



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE HIDALGO**

---

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE *Zaluzania augusta***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN QUÍMICA**

P R E S E N T A:

**QUIM. LAURA ADRIANA ORTIZ LEÓN**

ASESOR:

Dr. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
DIRECCIÓN

**M. en C. Julio César Leines Medécigo**  
Director de Administración Escolar  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la Candidata a Maestro en Química, **Q. Laura Adriana Ortiz León**, quien presenta el trabajo “**Estudio Químico y Biológico de Zaluzania augusta**”, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, han decidido **autorizar la impresión** del mismo, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra (AAQ)

SECRETARIO: Dra. Susana Rojas Lima (AAQ)

VOCAL: Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia (AAQ)

SUPLENTE: Dr. Juan Antonio Gayosso De Lucio (AAF-ICSa)

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Mineral de la Reforma, Hidalgo, el 26 de mayo de 2014

Dr. Orlando Ávila Pozos  
Director del ICB



Ciudad del Conocimiento Carretera Pachuca-Tulancingo  
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184  
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.  
Tel: (771)7172000 ext. 2230 , 2231



# *A G R A D E C I M I E N T O S*

“La ilusión despierta el empeño, la paciencia lo consigue”

-Anónimo.

A Dios, por permitirme seguir este camino, darme tanto para apreciar lo maravillosa que es la vida y continuar con este inmenso amor hacia ella.

A Susan y Santiago, a pesar de todo lo que hemos vivido y compartido, con sus consejos, apoyo y amor he podido llegar hasta aquí y realizar este enorme sueño, que también es de ustedes. Gracias por estar siempre a mi lado y ser mi soporte para todo lo que emprendo, los amo demasiado.

A Cristina, eres la mejor hermana que me pudo haber tocado en la vida, tu apoyo y momentos divertidos son un motor para soportar este camino.

Abuela Tere, por ser una pieza clave para que yo siga, tu cariño ha influido en lo que soy ahora y lograr mis objetivos. Te amo.

A todos mis tíos, tías y primos por estar al pendiente y compartir periodos de aliento.

Mis amigos del laboratorio 5: Alejandro, Elena, René, Luann, Olivia, César B., Mike y compañeros que han pasado por ahí, mil gracias por los momentos divertidos, saben que los aprecio demasiado, con ustedes, el camino se convirtió en toda una aventura que a pesar de todo, disfrute.

A Jorge, a pesar de la distancia, gracias por el tiempo dedicado a aconsejarme, regañarme y apoyarme en momentos difíciles, eres una gran persona que aprecio y me ayuda día a día a seguir adelante. Millones de gracias, amigo.

A los que por el trabajo abandone pero supieron entender y darme un poquito de su cariño, tiempo para escucharme y sobretodo, aliento. Los momentos que he vivido con ustedes son muy especiales. Amigos que forman y saben mi vida: Arely y Fernanda, Judith, Diana, Miriam, Alan, Juan Carlos, César Eduardo, Christian y Bety.

Acela, Charly, Mayra, Emilio, Imelda, Liz, Horacio, Juan R., Fernando, Saray, Erick y Simplicio, sus anécdotas o experiencias ayudaron a sobrellevar el proceso, al fin y al cabo pasamos por lo mismo ¡Gracias!

A cada uno de los doctores que me impartieron clases para mi formación profesional e integran el Área Académica de Química.

A los doctores Roberto Villagómez Ibarra y Susana Rojas Lima que integran mi jurado y se tomaron el tiempo de asesorarme en el trabajo de tesis durante el periodo de la maestría.

Al Doctor Juan Antonio Gayosso De Lucio por aceptar ser parte del jurado, por su paciencia y amabilidad al explicar un tema nuevo, su apoyo fue fundamental en el trabajo biológico para completar este proyecto.

Al Quim. Uvaldo Hernández Balderas y Dr. José Guadalupe Alvarado Rodríguez del Área Académica de Química de la UAEH, así como al Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas y Dr. Pedro Joseph-Nathan, por su enorme colaboración en el desarrollo y proceso del proyecto.

A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización del posgrado, a través del número de becario: 440492

En especial agradecimiento a mi asesor de tesis, Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, por aceptarme en su grupo de trabajo desde la licenciatura, sus consejos me han sido de gran ayuda en este largo proceso. Agradezco infinitamente su paciencia y en algunas ocasiones palabras de aliento, su confianza y amistad me han permitido aprender día a día mucho más de lo esperado. Por ser un claro ejemplo de investigador y contagiar ese amor a la Química de los Productos Naturales. Mil Gracias.

El presente trabajo se llevó acabo en el laboratorio 5 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, con recursos del proyecto CONACYT **“Estudio químico biodirigido de especies medicinales del estado de Hidalgo para la obtención de principios activos anticancerosos y antiinflamatorios”** (ref. U2-80555).



Esta tesis generó dos participaciones en congreso:

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA ZALUZANINA A EN EL TÉ DE *Zaluzania augusta*.** Laura Adriana Ortiz León, J. Martin Torres-Valencia, René Velázquez-Jiménez, Alejandro Valdez-Calderón, Juan A. Gayosso-De-Lucio, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. 9<sup>a</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales “Dra. Luisa Urania Román Marín” del 29 al 31 de Mayo de 2013, Pachuca de Soto, Hidalgo

**ADICIÓN DIASTEREOSELECTIVA DE DIAZOMETANO A ZALUZANINA A.** Adriana Ortiz León, J. Martin Torres-Valencia, J. Jesús Manríquez Torres, José G. Alvarado-Rodríguez, Uvaldo Hernández-Balderas, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. 10<sup>a</sup> Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica del 5 al 9 de Mayo de 2014, San Luis Potosí.

# SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\Delta G$	Diferencial de la energía libre de Gibbs
$\Delta H$	Diferencial de entalpía
$\Delta S$	Diferencial de entropía
$\mu$	Micrómetro
$\mu M$	Micromolar
$\mu L$	Microlitros
$[\alpha]$	Rotación específica
Ac	acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
anH	Anharmonicidad
c	Concentración
$^{\circ}C$	Grados Celsius
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
COSY	Correlation spectroscopy (Espectroscopia de correlación homonuclear)
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Señal doble

DCV	Dicroísmo circular vibracional
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de dobles
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
dt	Señal doble de triples
<i>E</i>	Entgegen
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
Fig.	Figura
g	Gramos
GC-MS	Espectroscopia de gases-masa
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (Correlación Heteronuclear a varios enlaces)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (Correlación Heteronuclear de cuanto sencillo)
HT-29	Línea celular inmortalizada de adenocarcinoma de colon humano
h	Horas
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración mínima inhibitoria 50
IR	Infrarrojo

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	grados Kelvin
Kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramos
L	Litros
LPS	Lipopolisacárido
m	Señal múltiple
Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
MEP	Fosfato de metileritritol
mg	Miligramos
MHz	Mega hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MMFF	Molecular mechanics force field (Mecánica Molecular y Campo de Fuerza)
MVA	Ácido mevalónico
nm	Nanómetro
nM	Nano molar

No.	Número
p.f.	Punto de fusión
PFDMA	Pirofosfato de dimetilalilo
PFG	Pirofosfato de geranilo
PFGG	Pirofosfato de geranilgeranilo
PFF	Pirofosfato de farnesilo
PFI	Pirofosfato de isopentenilo
PMA	Miristato acetato de forbol
ppm	Partes por millón
<i>R</i>	Constante molar de los gases
$R_f$	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN $^1\text{H}$	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN $^{13}\text{C}$	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	revoluciones por minuto
s	Señal simple
$S_E$	Similitud espectral
SRB	Sulforrodamina B
T	Temperatura
t	Señal triple

T.A.	Temperatura ambiente
THP-1	Línea celular inmortalizada de monocitos provenientes de leucemia monocito aguda humana
td	Señal triple de dobles
TMS	Tetrametilsilano
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Radiación ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
Z	Zusammen

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Metabolitos secundarios y Terpenos .....	2
1.2 Sesquiterpenos (C <sub>15</sub> ) .....	6
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	12
2.1 Familia Astereace .....	12
2.2 Género <i>Zaluzania</i> .....	13
2.3 Composición química y biológica del género <i>Zaluzania</i> .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	24
5.1 Colecta e Identificación de la especie .....	24
5.2 Obtención de la zaluzania A.....	25
5.3 Obtención de la zaluzanina B .....	34
5.4 Acetilación de la zaluzanina A .....	40
5.5 Reacción de zaluzanina A con diazometano: formación de la pirazolina de la zaluzanina A.....	46
5.6 Análisis por difracción de rayos-X de la zaluzanina A y la pirazolina de la zaluzanina A.....	58
5.6.1 Dicroísmo Circular Vibracional del diacetato de zaluzanina A.....	61
5.7 Cuantificación de las zaluzaninas en el té de la parte aérea de <i>Zaluzania augusta</i> .....	66
5.8 Ensayos de citotoxicidad actividad antiinflamatoria del extracto de AcOEt de <i>Zaluzania augusta</i> .....	69
5.8.1 Determinación de la actividad citotóxica.....	69
5.8.2 Determinación de la capacidad inhibitoria del Factor Necrótico Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	73

5.8.3 Determinación de la toxicidad aguda de <i>Zaluzania augusta</i> .....	74
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	75
<b>7. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	77
7.1 Generalidades .....	77
7.2 Recolección e identificación de la especie .....	78
7.3 Obtención del té y extracto de Acetato de etilo de <i>Zaluzania augusta</i> .....	78
7.4 Separación del extracto de acetato de etilo del té de la parte aérea de <i>Zaluzania augusta</i> .....	78
7.5 Obtención de la zaluzanina A .....	79
7.6 Obtención de la zaluzanina B .....	79
7.7 Obtención del diacetato de la zaluzanina A.....	80
7.8 Pirazolina de la zaluzanina A .....	80
7.9 Modelado molecular.....	81
7.10 Cuantificación por HPLC de lactonas en el té de la parte aérea de <i>Z.</i> <i>augusta</i> .....	82
7.11 Estudios biológicos .....	82
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	84

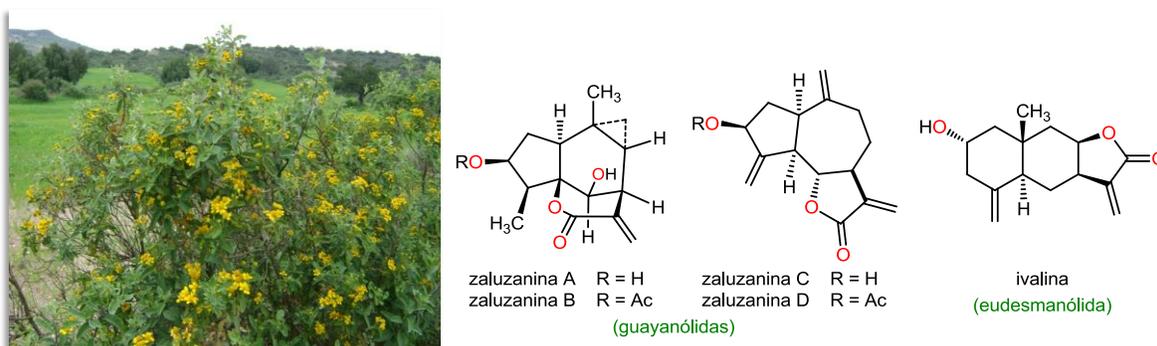
# 1. INTRODUCCIÓN

México es un país de gran diversidad florística, se estima que la flora medicinal en uso contiene alrededor de 5000 plantas (Lozoya, 1982). La población a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse de recursos naturales para su beneficio y utilidad. Así encontramos plantas para diversos fines, tanto de orden alimenticio como forrajero, ornamental o medicinal. Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional popular mexicana y han representado desde siempre una alternativa a otro tipo de recursos para la salud (Aguilar, 1994).

*Zaluzania augusta* (Lag.) Schultz Bip. (Asteraceae/Compositae) (Sinónimo: *Fernandina augusta* Lag.) (Figura 1.1) es una especie originaria de Aguascalientes y San Luis Potosí; se ha extendido en todo el centro de la República Mexicana, incluyendo el estado de Hidalgo. Se localiza en zonas de matorrales xerófilos, en encinares arbustivos, rocas calcáreas, orillas de parcelas y caminos, así como en superficies de tepetate. Esta planta se usa en la elaboración de escobas para la eliminación de espinas en las tunas, por lo que recibe el nombre trivial de “limpia tuna”. En medicina tradicional se emplea una preparación a manera de infusión para contrarrestar el dolor de estómago, cólicos y como abortiva (CONABIO, 2014).

Se han llevado a cabo algunos estudios químicos de la parte aérea de *Z. augusta* evidenciando la presencia de lactonas sesquiterpénicas conocidas como zaluzaninas A, B, C y D, y la ivalina (Figura 1) (Romo de Vivar, 1966). De estos metabolitos secundarios, la zaluzanina C y la ivalina han mostrado actividad

citotóxica importante contra la leucemia linfocítica, y algunos otros tipos de líneas celulares (Abdallah, 1984). Sin embargo, la actividad citotóxica de las zaluzaninas A y B no ha sido determinada.



**Figura 1.1.** Imagen de *Zaluzania augusta* y estructura de las zaluzaninas A–D y (+)-ivalina.

Los compuestos de la figura 1.1. representan productos naturales considerados como metabolitos secundarios de la familia de los terpenos, y particularmente lactonas sesquiterpénicas del tipo guayanólidas y eudesmanólidas. Para mayor entendimiento del porqué de estos nombres, su clasificación y nombres particulares se describen los siguientes temas.

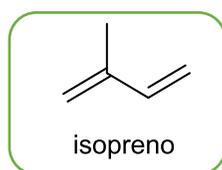
### 1.1 Metabolitos secundarios y Terpenos

Los metabolitos secundarios suponen retos importantes para la aplicación de estrategias que permitan elucidar su estructura química, así como su actividad biológica los hace sumamente atractivos en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Su formación en la naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios (carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos), cuya síntesis comienza con la fotosíntesis. Tales sustancias se encuentran sólo en organismos

específicos o grupos de organismos y son una expresión de individualidad de las especies. Algunos son producidos como sustancias tóxicas previniendo defensa contra depredadores, atrayentes volátiles hacia la misma o diferente especie, o como agentes coloridos.

La clasificación de los metabolitos secundarios depende de la ruta biosintética empleada para su formación y comprende tres grandes familias: los **alcaloides** (ruta del ácido shikimico), los **terpenos** (ruta del ácido mevalónico) y los **policétidos** (ruta del acetato malonato).

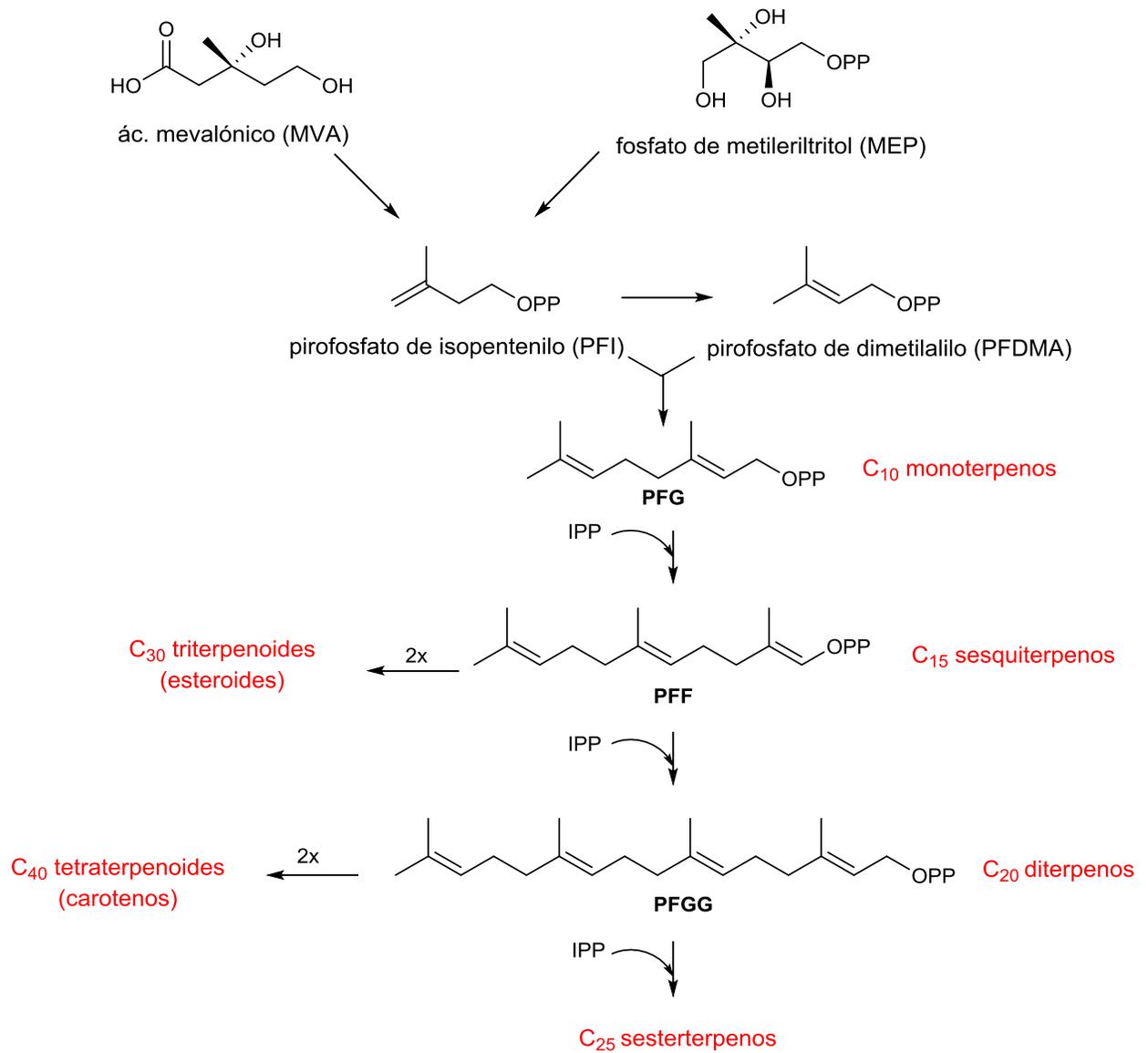
**Los terpenos** constituyen una familia importante y amplia de productos naturales que contienen unidades C<sub>5</sub>, denominadas isoprénicas, usualmente ensambladas de una manera cabeza-cola. Se clasifican de acuerdo al número de unidades isoprénicas, como se muestra en la tabla 1.



**Tabla 1.** Clasificación de terpenos de acuerdo a las unidades isoprénicas (C<sub>5</sub>).

No. de unidades C <sub>5</sub>	No. de átomos de C	Nombre
1	5	Hemiterpenos
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
5	25	Sesterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos

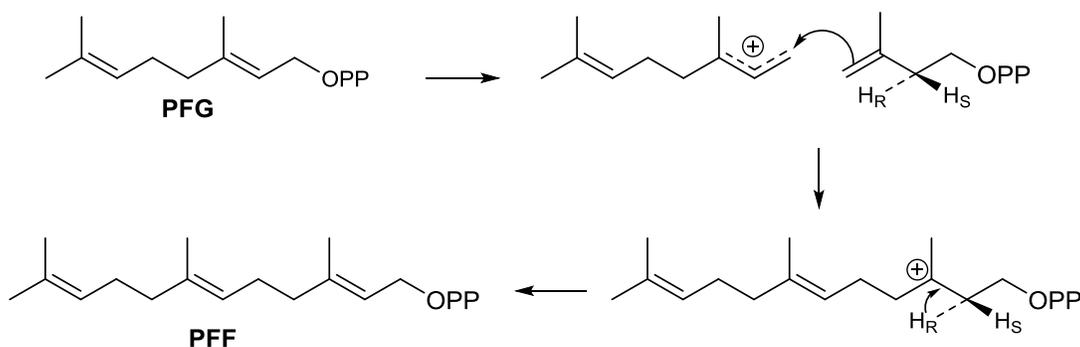
Aunque el isopreno se produce naturalmente, no está involucrado en la formación de terpenos, sino que las unidades de isopreno son identificadas a partir de ésteres difosfato (pirofosfato): el pirofosfato de isopentenilo (PFI) y el pirofosfato de dimetilalilo (PFDMA) los cuales son derivados de dos rutas biosintéticas: ácido mevalónico (MVA) o del fosfato de metileritritol (MEP). Así dos unidades de PFI conducen al pirofosfato de geranilo (PFG), el cual es el precursor de los monoterpenos (C<sub>10</sub>). Cuando otra unidad de PFI se adiciona a la molécula de PFG se forma el pirofosfato de farnesilo (PFF) que es el precursor de los sesquiterpenos (C<sub>15</sub>). Nuevamente, si se adiciona otra unidad de PFI a la de PFF, dará lugar al pirofosfato de geranil-geranilo (PFGG), precursor de los diterpenos (C<sub>20</sub>) (Figura 1.2). En el caso de los triterpenos (C<sub>30</sub>), éstos no se forman uniendo una unidad más al PFGG, si no de dos unidades de PFF que se unen para formar escualeno.



**Figura 1.2.** Formación de terpenos a partir de MVA y MEP.

## 1.2 Sesquiterpenos (C<sub>15</sub>)

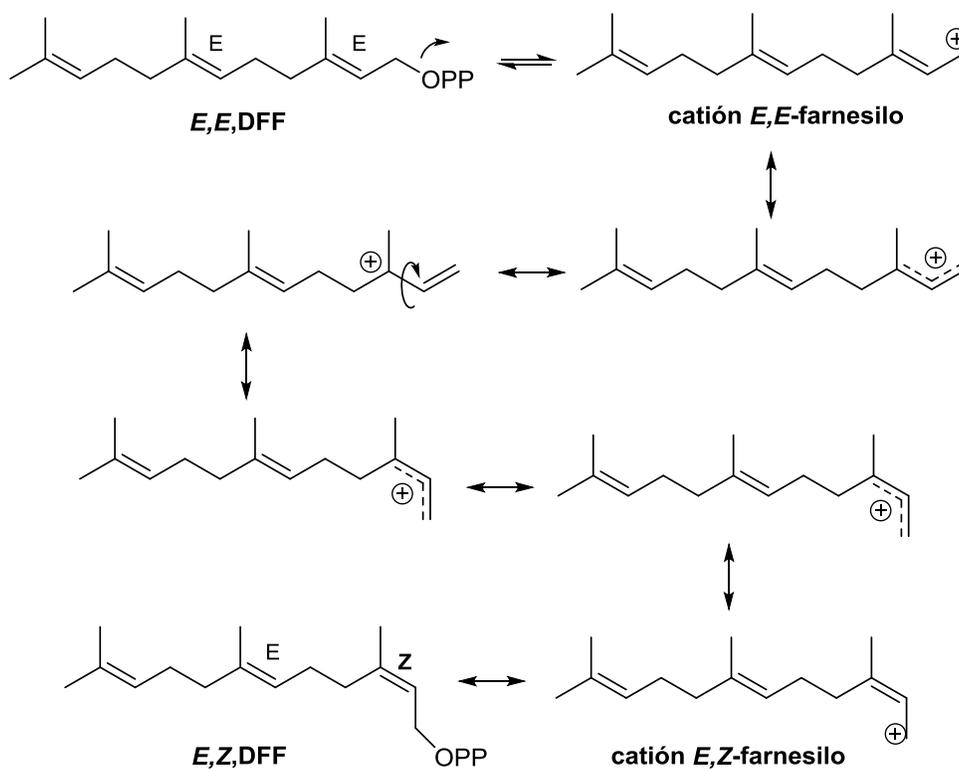
Se forman a partir de tres unidades de C<sub>5</sub>, la terminología viene del prefijo latín *sesqui*: “una vez y media”. Los mecanismos implicados en su formación son similares a los monoterpenos y la adición de una unidad C<sub>5</sub> (PFI) al pirofosfato de geranilo (PFG) lleva a cabo una extensión de cadena, conduciendo al pirofosfato de farnesilo (PFF) (Figura 1.3) que es considerado como precursor de este tipo de compuestos. La salida del grupo difosfato del PFF conduce al catión *E,E*-farnesilo el cual es intercambiable en el catión *E,Z*-farnesilo (Figura 1.4), estos dos cationes conducen a otros cationes clave en la construcción de la mayoría de los esqueletos hidrocarbonados de los sesquiterpenos (Figura 1.4).



**Figura 1.3.** Formación del pirofosfato de farnesilo (PFF).

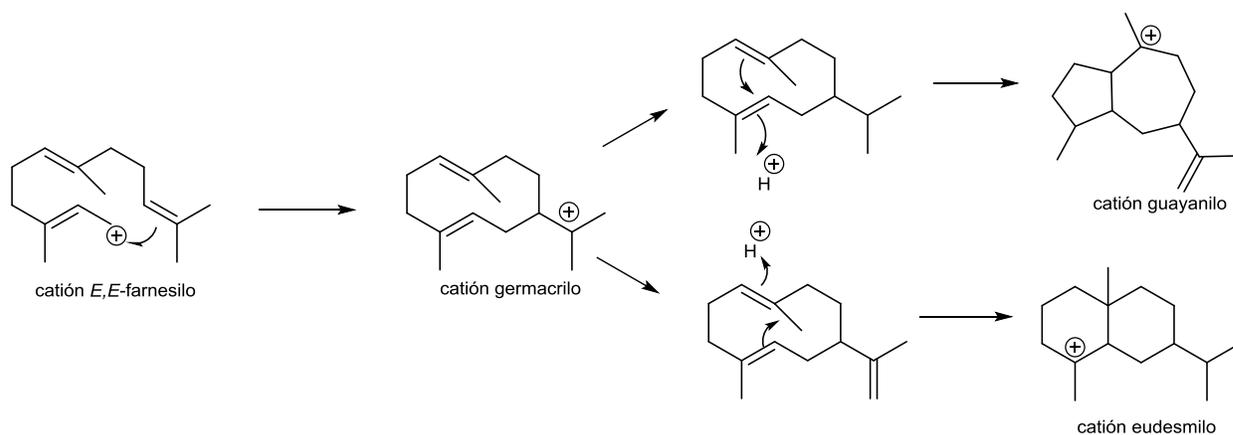
El pirofosfato de farnesilo puede dar lugar a sesquiterpenos cíclicos y lineales, debido a la longitud de cadena y el doble enlace, el número de modos posibles de ciclación se incrementa y una gran variedad de *mono*, *bi*, *tri*- ciclados pueden formarse. El número de sesquiterpenos conocidos naturales excede a los monoterpenos. La estereoquímica del doble enlace más cercano al difosfato puede adoptar una configuración *E* (como en el pirofosfato de farnesilo) o *Z* a través de ionización. Esto permite diferentes posibilidades de plegado en la

cadena de carbono y la ciclación por ataque nucleofílico sobre el doble enlace apropiado (Dewick, 2009).



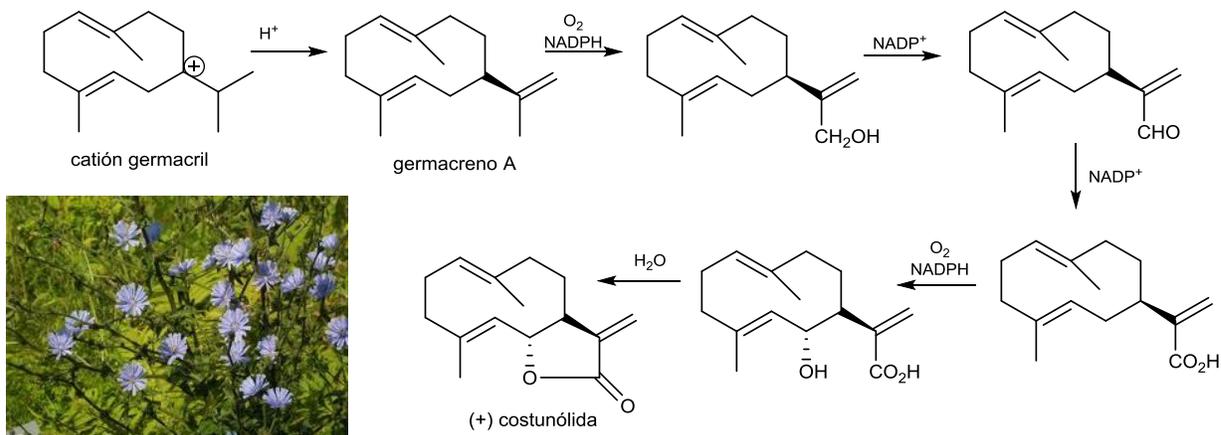
**Figura 1.4.** Formación de cationes *E,E* y *E,Z*-farnesilo

Reacciones comunes vía carbocationes pueden visualizarse razonablemente para la formación de la mayoría de los esqueletos carbonados y son intermediarios clave para la formación de los sesquiterpenos finales en los organismos. (Figura 1.5). En esta figura sólo se muestra la formación de los esqueletos de guayano y eudesmano, que es el caso que nos ocupa con respecto a la formación de las lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Zaluzania*.



**Figura 1.5.** Reacciones de carbocationes para generar los esqueletos de guayano y eudesmano.

Así por ejemplo, el catión germacrilo, sin sufrir ciclación es responsable de la variedad de derivados de sesquiterpenos naturales, como por ejemplo la costunólida (Figura 1.6), un principio amargo que se encuentra en las raíces de Achicoria (*Cichorium intybus*; *Compositae/Astereaceae*). Actualmente, la costunólida se clasifica como una germacranólida, el sufijo “olida” se refiere al grupo lactona (Dewick, 2009).



**Figura 1.6.** Imagen de la Achicoria (*Cichorium intybus*) y biosíntesis de la costunólida

Así como la partenólida, que se encuentra en el feverfew (*Tanacetum parthenium*; Compositae) (Figura 1.7). Feverfew es un remedio tradicional herbolario para el tratamiento de la migraña, la artritis y las dificultades menstruales.

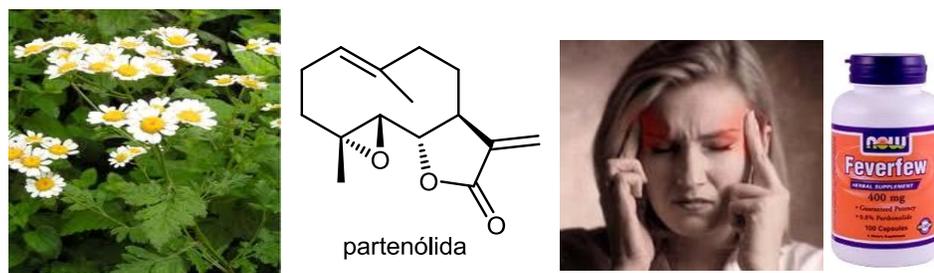
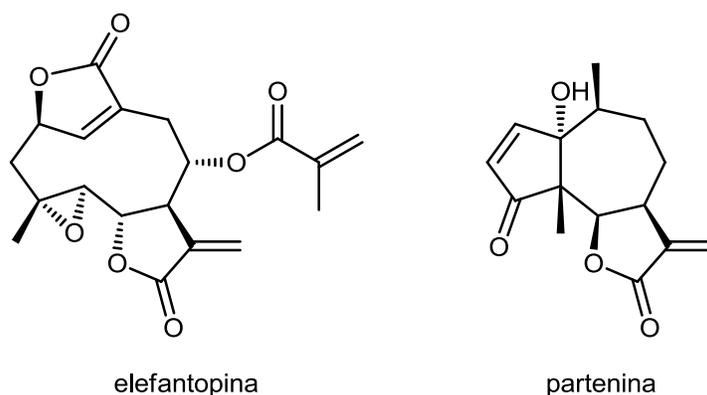
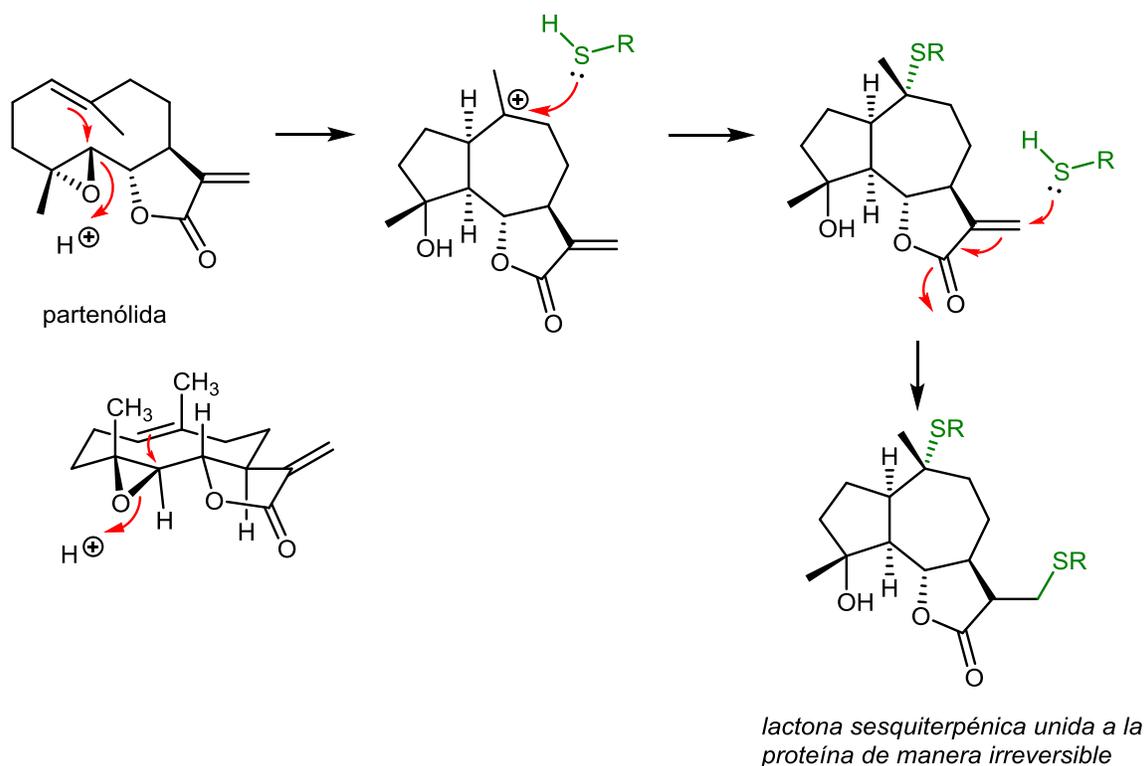


Figura 1.7. El agente antimigraña partenólida aislada de *Tanacetum parthenium*.

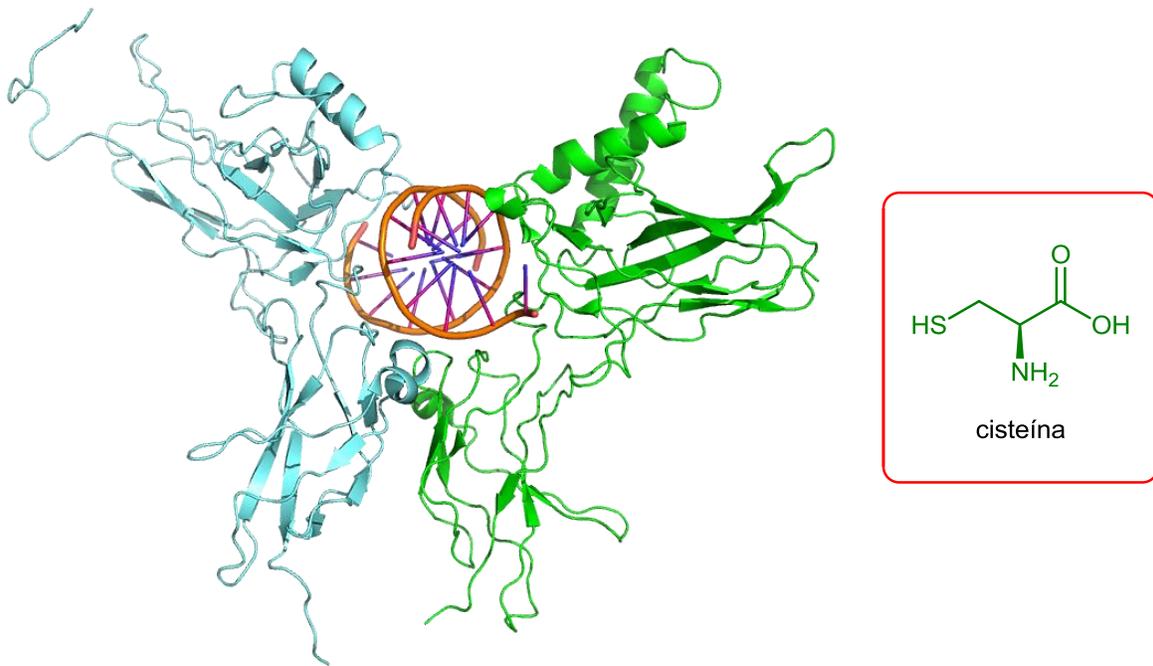
La funcionalidad lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada es común en muchos terpenos biológicamente activos. Esta actividad frecuentemente se manifiesta a manera de toxicidad, especialmente como citotoxicidad, lo que ha hecho que las lactonas sesquiterpénicas sean muy estudiadas para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, por ejemplo la germacranólida **elefantopina**, encontrada en *Elephantopus elatus* (Compositae), o en alergias de piel, como las causadas por la pseudoguaiólida (guaianólida reordenada) **partenina** aislada de *Parthenium hysterophurus* (Compositae) (Dewick, 2009).



Algunos de estos compuestos son considerados como agentes alquilantes eficaces mediante una adición tipo Michael a la lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada por parte de un nucleófilo, por ejemplo tioles (Figura 1.8). Tales reacciones sirven para explicar la actividad biológica debido a que los agentes alquilantes tienen la propiedad de formar enlaces covalentes con nucleófilos. Esto se puede determinar con la inhibición del factor de transcripción NF-kappaB (p65) (Figura 1.9) mediante la alquilación de la cisteína-38 en la unión con ADN; esta unión altera la posición de los aminoácidos de tal manera que imposibilita la interacción específica impidiendo su replicación y mostrando su efecto mutágeno y citotóxico (Rakotonandrasana, *et al.* 2010).



**Figura 1.8.** Adición nucleofílica de tío a la lactona sesquiterpénica.



**Figura 1.9.** NF-kappaB (verde) interacciona con el ADN (naranja) para formar un complejo que promueve la transcripción genética (izquierda). Estructura del aminoácido cisteína (derecha).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Familia Asteraceae

Asteraceae (Compositae), su nombre proviene de la etimología latina “*aster*” que significa: estrella, se refiere a la forma de las inflorescencias (Freinet, 2004), es originaria de la Patagonia (Katinas, *et.al.*, 2007), y es una de las familias de plantas vasculares más grande que existe en México, se estima alrededor de 3351 especies. Son una familia cosmopolita, que se distribuye en casi todas las latitudes, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta las zonas alpinas, por lo tanto es posible encontrar sus representantes en casi todos los tipos de vegetación y climas.

Las especies de esta familia son de diferentes tipos, desde plantas herbáceas de tamaño milimétrico (*Aphanactis standleyi* Steyererm), hierbas leñosas (*Conyza canadensis* L.), trepadoras (*Mikania cordifolia*), arbustos (*Baccharis dioica* Vahl), hasta árboles (*Vernonia arborea* Buch Ham.). Su diversidad se atribuye principalmente a los mecanismos de dispersión y capacidad de adaptación a diferentes condiciones ecológicas, por lo que es común encontrarlas en medios rurales o cultivos (Tapia, 2010).

A esta familia de plantas pertenece la especie estudiada en este trabajo, *Zaluzania augusta*.



*Aphanactis standleyi*  
Steyserm



*Mikania cordifolia*



*Stevia serrata*



*Vernonia arborea* Buch  
Ham

**Figura 2.1.** Ejemplos de plantas de la familia Astereacea.

## 2.2 Género *Zaluzania*

Cuando se habla de malezas, generalmente se piensa en plantas no deseadas que reducen la producción y calidad de algunos cultivos; sin embargo, éstas controlan la erosión y aumentan la cantidad de materia orgánica en el suelo, así como presentan propiedades medicinales y extienden la diversidad (Morín, 2011). Un claro ejemplo es el género *Zaluzania* perteneciente a la familia Astereace (Compositae); el cual comprende aproximadamente de 32 especies, pero solo 14 han sido aceptados (Tabla 2.1) (The Plant List, 2014). En México crecen 11 especies de *Zaluzania*, la mayoría de ellas en hábitats montañosos del norte y centro del país (Turner, 2012).

**Tabla 2.1.** Especies del género *Zaluzania* conocidas.

<i>Z. angusta</i>	<i>Z. grayana</i>	<i>Z. quitensis</i>
<i>Z. angusta</i> (Lag.)	<i>Z. indica</i>	<i>Z. resinosa</i>
<i>Z. anthemidifolia</i>	<i>Z. megacephala</i>	<i>Z. robinsonii</i>
<i>Z. aspérrima</i>	<i>Z. mollissima</i>	<i>Z. sodiroi</i>
<i>Z. augusta</i> (Lag.)	<i>Z. montagnifolia</i>	<i>Z. squarrosa</i>
<i>Z. cinerascens</i>	<i>Z. myriophylla</i>	<i>Z. subcordata</i>
<i>Z. coulteri</i>	<i>Z. nonensis</i>	<i>Zaluzania triloba</i>
<i>Z. delgadoana</i>	<i>Z. nonensis</i>	<i>Z. trilobata</i>
<i>Z. discoidea</i>	<i>Z. oppositifolia</i>	
<i>Z. eminens</i>	<i>Z. parthenioides</i>	
<i>Z. ensifolia</i>	<i>Z. pinnatilobata</i>	
<i>Z. globosa</i>	<i>Z. pringlei</i>	

Existen dos variedades de la especie: *angusta* y *rzedowskii* que se reconocen por la medida de vilano y color gris de la hoja y el ápice redondo (Turney, 2012), *rzedowskii* crece en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas (Herbarium, 2014) y se puede encontrar en suelos arcillosos (CONABIO, 2014).

*Zaluzania augusta* (Lag.) Schultz Bip. (Figura 2.2), también llamada *Fernandina augusta* Lag., cenicilla, caxtidán y limpia tunas, es una especie que tiene flores amarillas liguladas con vilano de 2-4 escamitas (5 mm de largo y cabezuelas 1.5 cm de diámetro), se distingue por ser un arbusto de hasta 3 m de largo con ramas de color café claro, follaje gris y hojas pilosas u ovaladas-lanceoladas (en forma de corazón), su tallo es aromático al comprimir, sus frutos secos (2 mm de largo) no abren al madurar y se producen en Noviembre-Diciembre, su raíz son tubérculos gruesos y florece en los meses de Agosto y Septiembre. La distribución de la planta se encuentra en los estados de Aguascalientes, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Querétaro y San Luis Potosí (CONABIO, 2014).



**Figura 2.2.** Imágenes de *Zaluzania augusta*.

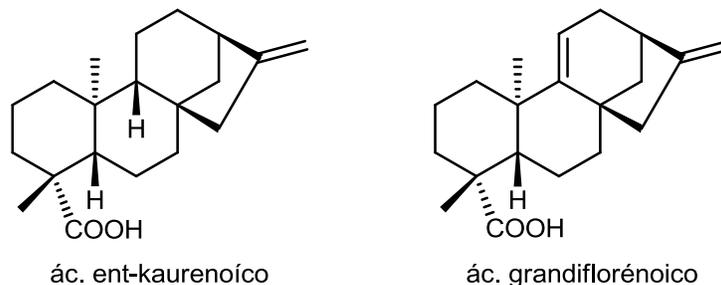
El uso de la especie se basa en ser polinizada y alimento de insectos. Asimismo, su metabolismo conlleva a beneficios considerables en el ambiente, ya que ayuda a controlar la erosión, infiltra el agua y mejora los suelos de hojarasca (CONABIO, 2014).

En la medicina tradicional, su infusión se usa para contrarrestar el dolor de estómago, los cólicos y es como expectorante (CONABIO, 2014). Se ha descrito que esta especie posee propiedades anti-tumorales, anti-diabéticas, abortivas (Andrade-Cetto, *et al.*, 2005; Martínez, 1967). También se emplea la decocción de hojas y raíces como anticonceptiva (Aguilar *et. al.*, 1994).

### 2.3 Composición química y biológica del género *Zaluzania*

Los estudios fitoquímicos de raíces y parte aérea de algunas especies del género *Zaluzania* han evidenciado la presencia de diferentes compuestos como diterpenos, hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos y lactonas sesquiterpénicas del tipo guayano y eudesmano que representan a los compuestos mayoritarios con propiedades tripanocidas, fungicidas, insecticidas (Juárez *et al.*, 2010), polinizadoras (Kaiser-Bunbury, 2009) relajantes y citotóxicas (Fischedick, *et al.*, 2013).

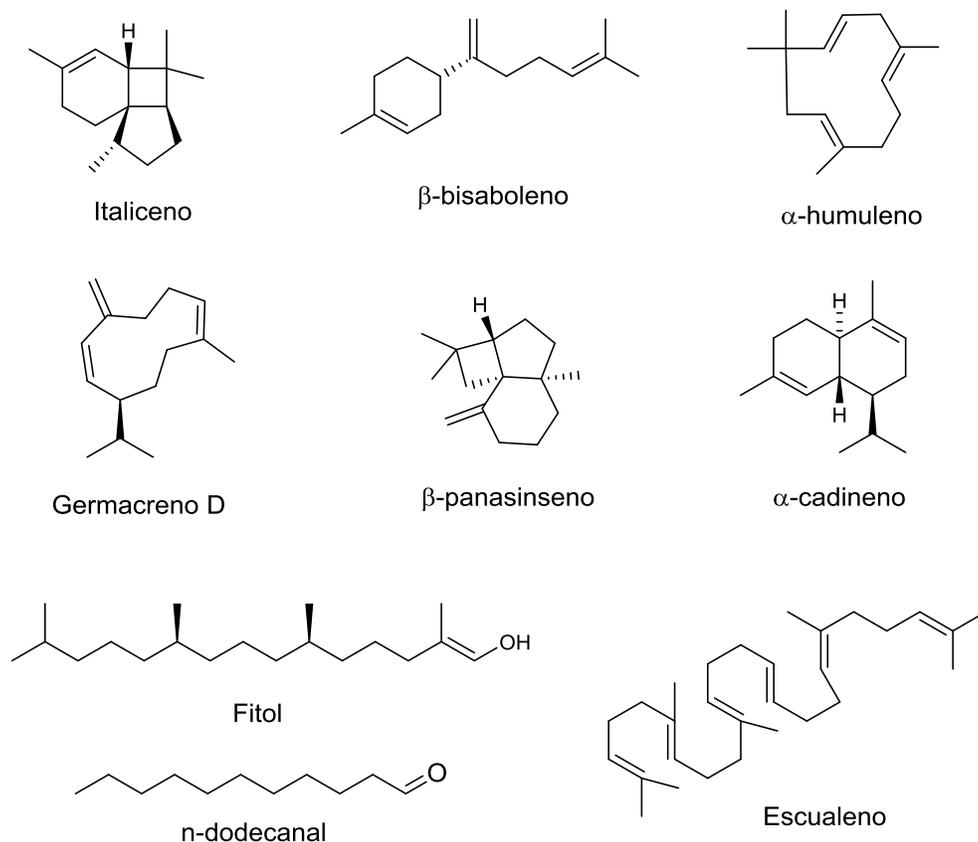
La infusión de *Z. montagnifolia* se usa para tratamiento de diabetes e inducir el aborto. Se ha encontrado que esta especie contiene ácido *ent*-kaurenoico que es un agente hipoglicémico, y ácido grandiflorénoico (Figura 2.3), que posee propiedades uterotónicas (contracciones del útero) (Villa-Ruano *et al.*, 2013). De acuerdo con las pruebas *in vivo* la alta abundancia de estos diterpenos genera los efectos antidiabéticos en pruebas *in vivo* (Bresciani *et al.*, 2004).



**Figura 2.3.** Estructura de los ácidos *ent*-kaurénico y grandiflorénico

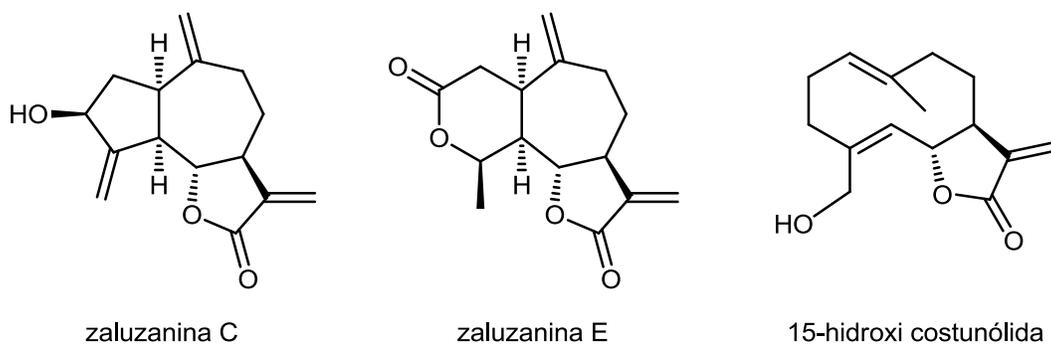
El análisis de perfil lipofílico en la misma especie, por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) de los extractos hexánicos, demostró 59 compuestos, incluyendo sesquiterpenos, hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos y diterpenos. La evaluación biológica de estos compuestos explicó

la actividad antibacteriana, alelopática y antioxidante (Figura 2.4) (Villa-Ruano *et al.*, 2013).



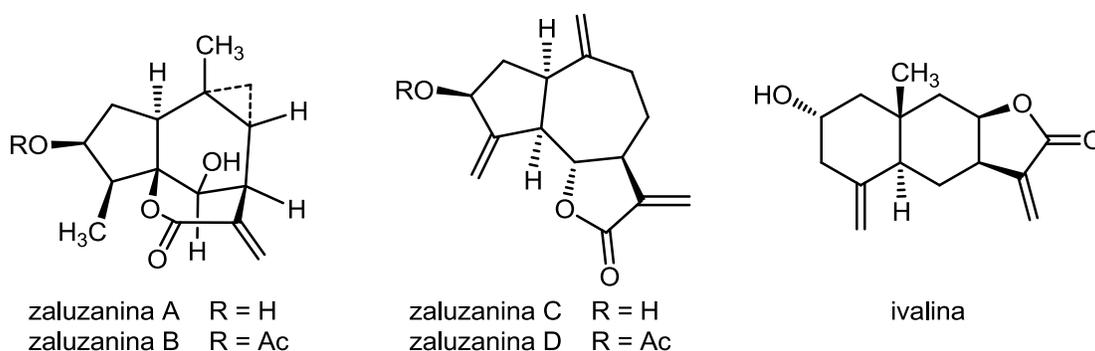
**Figura 2.4.** Compuestos aislados de *Zaluzania montagnifolia*.

De *Z. Grayana* se ha descrito la presencia de guayanólidas, pseudoguayanólidas, y germacranólidas (Spring *et al.*, 1994) (Figura 2.5). Algunos metabolitos de este tipo se han reportado en *Z. triloba*, *Z. pringlei* y *Z. augusta* (Yabuta *et al.*, 1978).



**Figura 2.5.** Estructuras de metabolitos secundarios aislados de *Z. grayana*.

Estudios realizados a la especie *Z. augusta*, en los años sesentas, revelaron la presencia de lactonas sesquiterpénicas con estructura del guayano y eudesmano denominadas zaluzaninas A, B, C y D, e ivalina (Figura 2.6) (Romo de Vivar et al., 1967). De estos metabolitos secundarios, la zaluzanina C y la ivalina han mostrado actividad citotóxica importante contra la leucemia linfocítica y algunos otros tipos de líneas celulares (Abdallah, 1984; Yabuta, 1978).

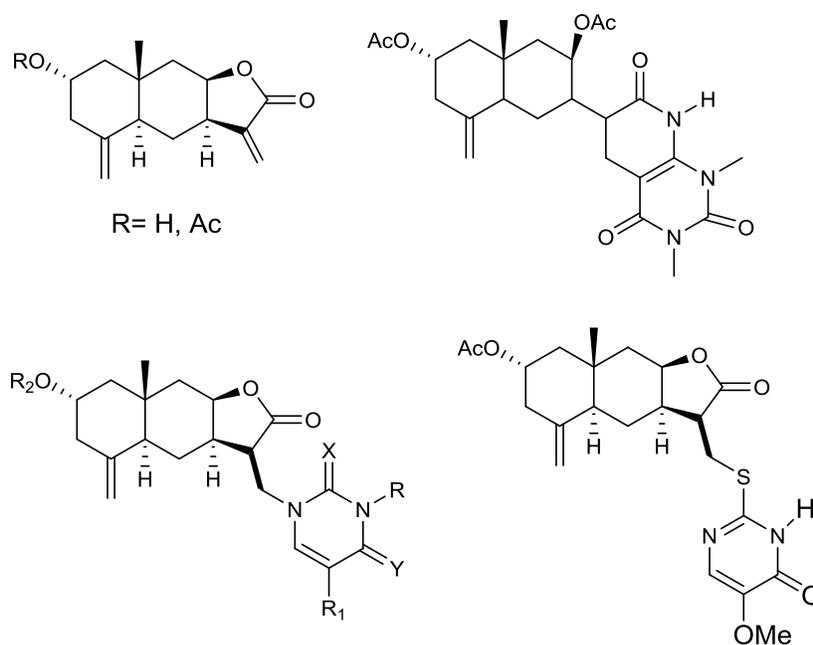


**Figura 2.6.** Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Zaluzania augusta*.

La estructura y estereoquímica de zaluzanina A y B ha sido determinada por medio de experimentos de RMN, así como análisis de difracción de rayos-X (Toscano et al., 1997; Van Calsteren et al., 2008).

Se ha demostrado que zaluzanina A reduce en un 16% la movilidad de espermatozoides humanos a 15 minutos de incubación, pero no afecta su viabilidad. Además inactiva los grupos tiol de la membrana externa de los espermatozoides y se han propuesto como anticonceptivos masculinos (Huacuja, *et al.*, 1993). Adicionalmente, el compuesto ha sido probado en modelo de relajación de músculo liso uterino en rata induciendo la contracción con oxitocina, indicando que el efecto relajante se lleva a cabo por medio del control de flujo de calcio (Van Calsteren *et al.*, 2008).

Por otro lado, la ivalina (aislada de *Z. triloba*) ha servido de material de partida en la preparación de derivados para su uso potencial como agentes anti-VIH (Díaz, *et al.*, 1998). Estos derivados se prepararon mediante la adición estereoselectiva tipo Michael al sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado de la lactona.



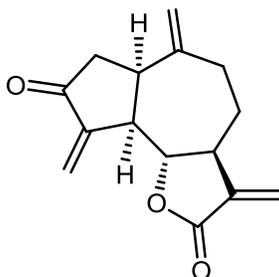
**Figura 2.7.** Derivados de ivalina con actividad anti-VIH.

La zaluzanina C ha mostrado actividad anti-Leishmaniasis, enfermedad causada por un parasito llamado *Leishmania* y que es transmitido a los humanos a través de la picadura de un insecto del género *Lutzomyia*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación grave del hígado y del bazo. La enfermedad es una zoonosis que afecta tanto a perros como a humanos. Sin embargo, animales silvestres como liebres, zarigüeyas y coatíes, entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, por lo que se los considera animales reservorios (Rocha *et al.*, 2005).



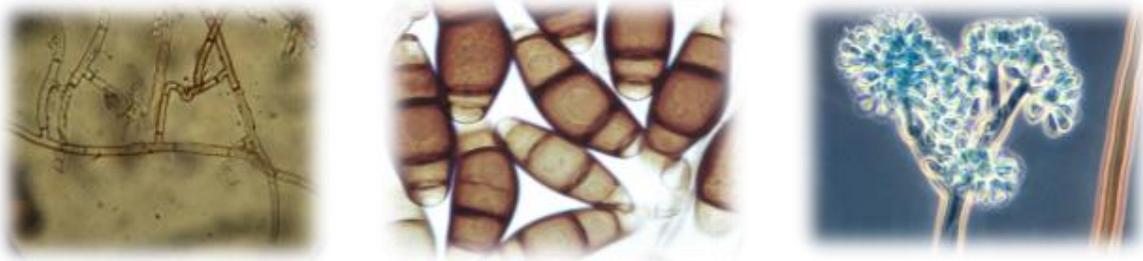
**Figura 2.8** *Leishmania* sp., *Lutzomyia longipalpis* y úlcera cutánea.

La dehidrozaluzanina C, es un potente regulador del crecimiento de plantas y ha sido evaluado en bioensayos alelopáticos fitotóxicos en lechuga (*Lactuca sativa* cv.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), zanahorias (*Daucus carota* L.) y berros (*Lepidium sativum* L.), para uso de herbicidas naturales (Macias, *et al*, 2000).



**Figura 2.9.** Estructura de la dehidrozaluzanina C.

Zaluzanina D mostró actividad fungistática importante en los ensayos de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata* y *Botrytis cinérea* a una concentración de 200 ppm (Kumari *et al.*, 2003).



**Figura 2.10.** *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata* y *Botrytis cinérea*

El estudio de citotoxicidad y actividad anti-tripanosomal de la zaluzanina D en Tripanosomiasis africana (*enfermedad del sueño*, causada por *Typanosoma brucei*) demostró una  $IC_{50}$  de 10.8  $\mu M$ , siendo un potente candidato para el tratamiento de infecciones causadas por tripanosomas, como la enfermedad del sueño (Julianti *et al.*, 2011).



**Figura 2.11.** *Trypanosoma brucei* entre glóbulos sanguíneos y niña recibe tratamiento para la enfermedad del sueño (África).

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo consistió en llevar a cabo la evaluación de la actividad citotóxica y antiinflamatoria de la decocción (té) de la parte aérea de *Zaluzania augusta*, así como el estudio químico para caracterizar las principales lactonas sesquiterpénicas presentes en esta parte, con la finalidad de contribuir al conocimiento de nuevos principios activos anticancerosos y antiinflamatorios.

Los objetivos específicos comprendieron:

- Colecta e identificación taxonómica de la especie.
- Obtención el extracto de AcOEt del té de la parte aérea de *Zaluzania augusta*.
- Evaluación de la actividad citotóxica y antiinflamatoria del extracto de AcOEt, así como su toxicidad aguda en modelo de ratones.
- Aislamiento y caracterización de las principales lactonas sesquiterpénicas del extracto de AcOEt.

## 4. JUSTIFICACIÓN

El estudio químico de especies medicinales ha permitido contar con sustancias promisorias para el control y tratamiento de algunos tipos de cáncer y la inflamación. Aunque existen en el mercado varios fármacos con propiedades anticancerosas y antiinflamatorias, se conoce que éstos en ocasiones no son efectivos debido al desarrollo de resistencia que presentan por parte de las células cancerosas, en adición a los efectos secundarios. Por lo tanto, se buscan nuevos principios activos para esos padecimientos, que sean efectivos y de ser posible, de bajo costo. Una estrategia es el estudio químico y biológico de plantas usadas en medicina tradicional para el tratamiento de síntomas relacionados con el cáncer y la inflamación. En este contexto, se planteó el estudio de *Zaluzania augusta*, una especie abundante en el estado de Hidalgo que ha tenido uso para curar heridas, para los cólicos y como abortiva.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Colecta e Identificación de la especie

Los ejemplares de *Zaluzania augusta* (Figura 5.1) se colectaron en la comunidad del Nopalillo, municipio de Epazoyucan en el Estado de Hidalgo, en Agosto de 2011 y en Septiembre de 2012. Un espécimen de la planta se envió al Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, donde el M.C. Manuel González Ledesma identificó la especie como *Zaluzania augusta* (Lag.) Schultz Bip. (Compositae) (No. de depósito JM Torres-Valencia 140).

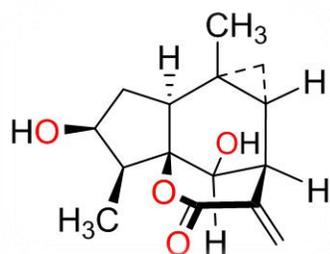


**Figura 5.1.** Imágenes de *Zaluzania augusta*

## 5.2 Obtención de la zaluzanina A.

La planta se dejó secar a la sombra, se separó en parte aérea (flores y hojas) y raíz; a la parte aérea se realizó molienda y decocción (700 g en 2.5 L de H<sub>2</sub>O destilada). El producto de decocción se extrajo con AcOEt (1 L) para obtener el correspondiente extracto (4 g), el cual fue sometido a separación cromatográfica en columna y como eluyentes hexano-AcOEt (2:3, 3:7, 1:3, 1:4). Se colectaron cinco fracciones gruesas etiquetadas de **A–E**, y se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) y RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

La fracción B se purificó mediante CC usando las mismas condiciones descritas arriba, lo cual condujo a la obtención de cristales, los cuales se analizaron por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C en 1D y 2D. Estos datos se compararon con los descritos (Romo de Vivar, *et al.*, 1966), permitiendo la caracterización de la lactona sesquiterpénica conocida como zaluzanina A (**1**) (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Estructura de la zaluzanina A (**1**) e imagen de la muestra cristalina obtenida.

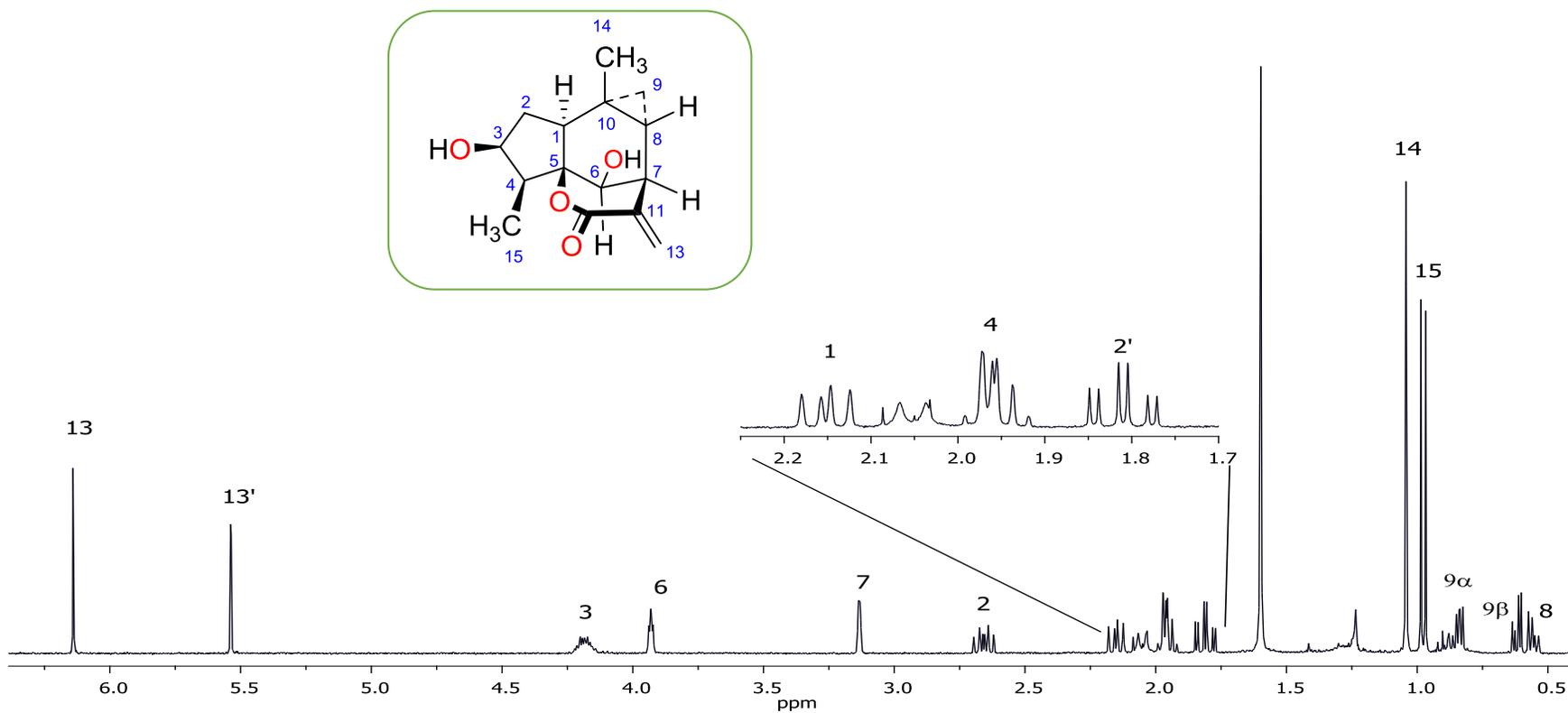
En su espectro de RMN de <sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> (Figura 5.3) se observó en 6.15 y 5.55 ppm 2 señales simples que integraron cada una para un protón correspondientes a los protones del doble enlace en la posición 13. En 4.20 y 3.95 ppm se apreciaron las señales de los protones base de hidroxilo H-3 (m) y H-6 (t, *J* = 2.8 Hz), respectivamente, en 3.15 ppm se observó la señal del protón en C-7 (d, *J* =

2.8 Hz), en 2.67 (dddd,  $J = 13.4, 8.9, 8$  y  $0.7$  Hz) y 1.82 (td,  $J = 13, 4.2$  Hz) ppm se apreciaron las señales debidas a los protones del metileno en C-2. Los hidrógenos H-1 y H-4 se observaron en 2.17 y 1.97 ppm como señales doble de dobles ( $J = 13.4, 8.9$  Hz) y quintuple ( $J = 7.2$  Hz), respectivamente. Las señales de metilos 14 (s) y 15 (d,  $J = 7.0$  Hz) se apreciaron en 1.05 y 0.99 ppm, correspondientemente; así mismo, el protón de la posición 8 se observó en 0.85 ppm (dd,  $J = 5.7, 4.0$  Hz) y finalmente, las señales de los hidrógenos H-9 $\beta$  y H-9 $\alpha$  presentaron un desplazamiento de 0.66 (dd,  $J = 9.7, 4.0$  Hz) y 0.55 (dd,  $J = 9.7, 5.7$  Hz) ppm respectivamente. La asignación de estas señales se corroboró mediante el uso del experimento COSY (Figura 5.5), el cual mostró la mayoría de las correlaciones esperadas como por ejemplo entre los protones vinílicos H-13, el protón 3 con los hidrógenos del metileno en C-2 y con el protón metílico H-4. En adición, se apreció el acoplamiento H-4 con el Me-15, y el acoplamiento entre sí de los protones del sistema de ciclopropano.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  de **1** (Figura 5.4) se observaron 15 señales, entre las más características fueron la de 164.5 ppm para el carbonilo de lactona (C-12), en 140.3 y 124.1 ppm se apreciaron las señales correspondientes al doble enlace conjugado al carbonilo (C-11 y C-13), mientras que los carbonos base de oxígeno (C-3 y C-6) se aprecian en 72.3 y 66 ppm, en ese orden. Adicionalmente, se observó una señal de un carbono cuaternario base oxígeno en 92.7 ppm que se asignó al carbono base de la lactona (C-5). En la tabla 5.1 se describen los datos de RMN completos de la lactona **1**.

La asignación de las señales tanto en el espectro de protón como en el de carbono-13 se corroboró mediante el uso de los experimentos HSQC y HMBC (Figuras 5.6 y 5.7), en los cuales se observa el acoplamiento entre hidrógenos y carbonos a uno, dos y tres enlaces. Por ejemplo, en el experimento HSQC se pudieron apreciar las correlaciones que mostraron los protones vinílicos (H-13) con los carbonos en 140.5 y 124.1 ppm, confirmando la asignación de C-11 y C-13. Asimismo, en el HMBC (Figura 5.6) el acoplamiento que mostró el Me-15 con

la señal de un carbono cuaternario base de oxígeno en 92.7 ppm, permitió asignar a este carbono como C-5, mientras que el Me-14 presentó una correlación con la señal de carbono en 14.4 ppm por lo que ésta se asignó al carbono cuaternario C-10 (Tabla 5.1).



**Figura 5.3.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) en CDCl<sub>3</sub> de la zaluzanina A (1).

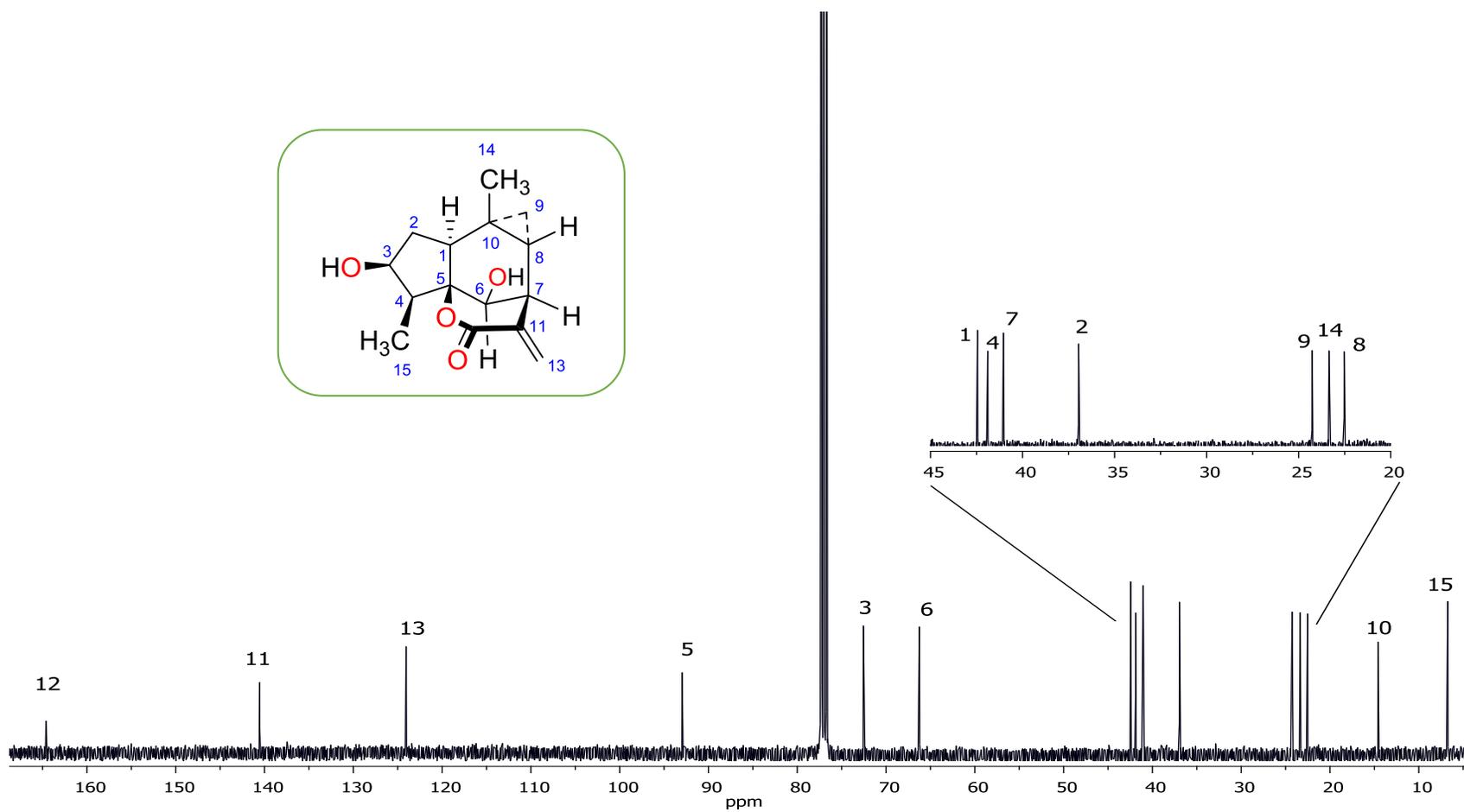


Figura 5.4. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub> de la zaluzanina A (1).

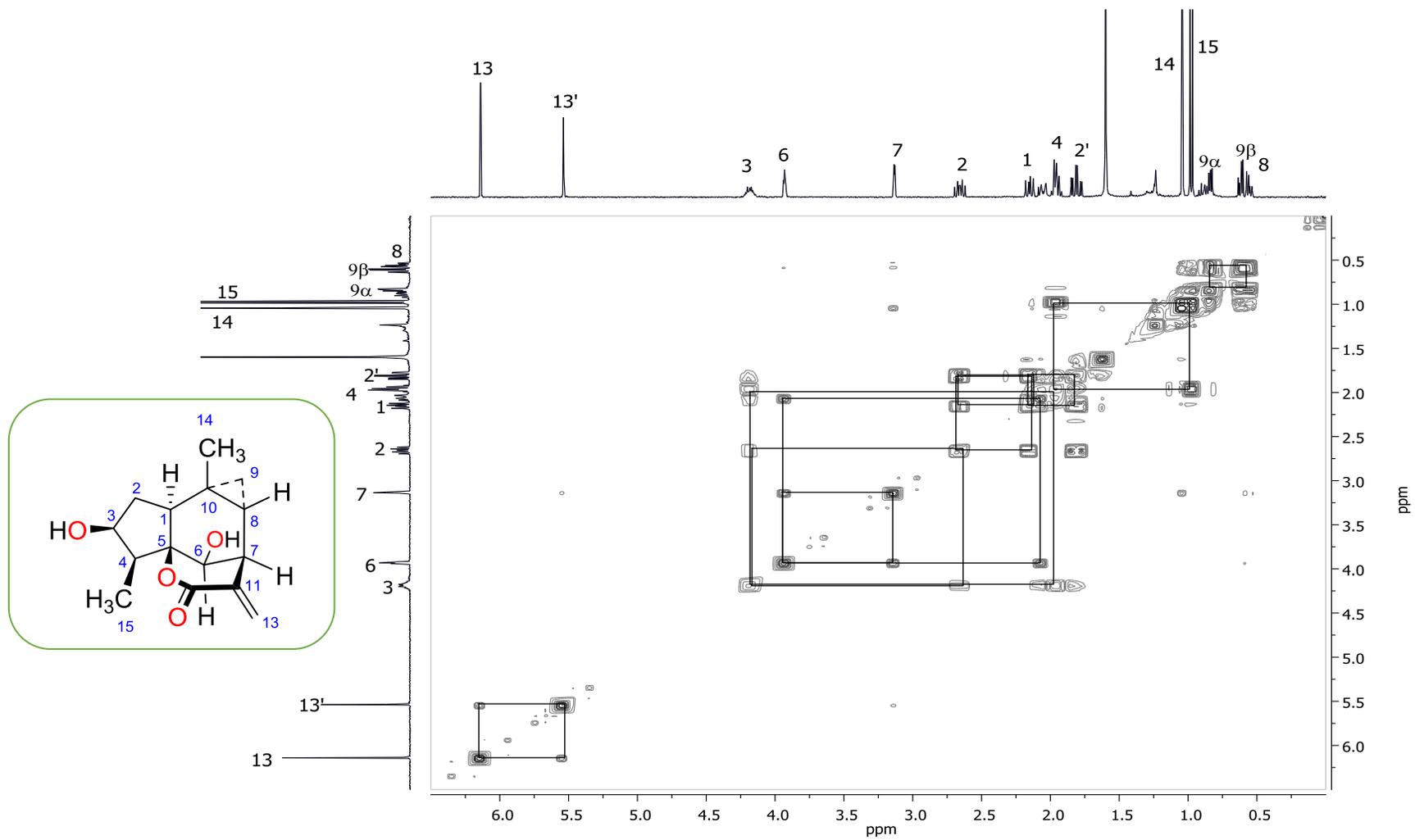


Figura 5.5. Espectro COSY en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz) de la zaluzanina A (1).

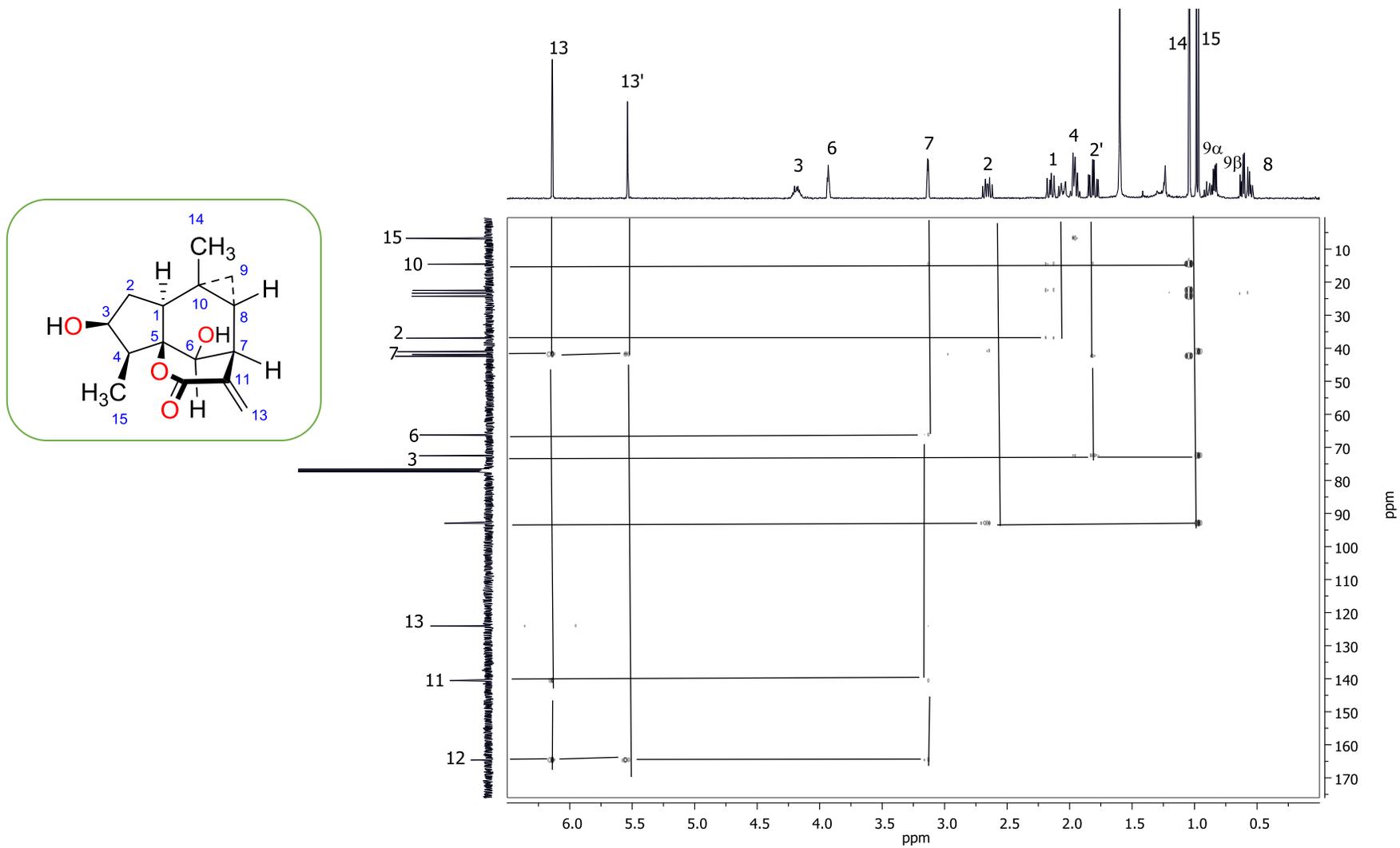


Figura 5.6. Espectro HMBC (400 MHz) de la zaluzanina A (1)

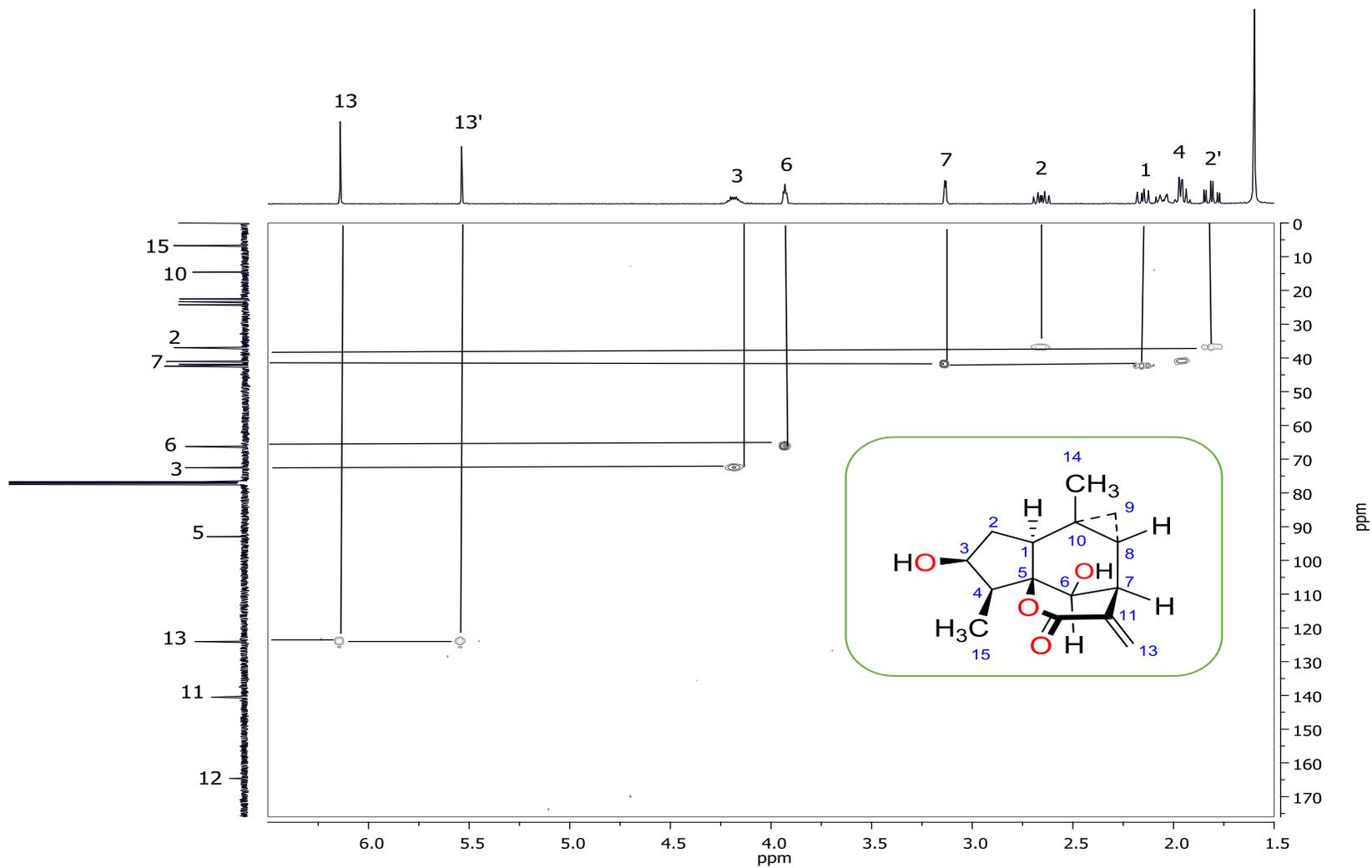


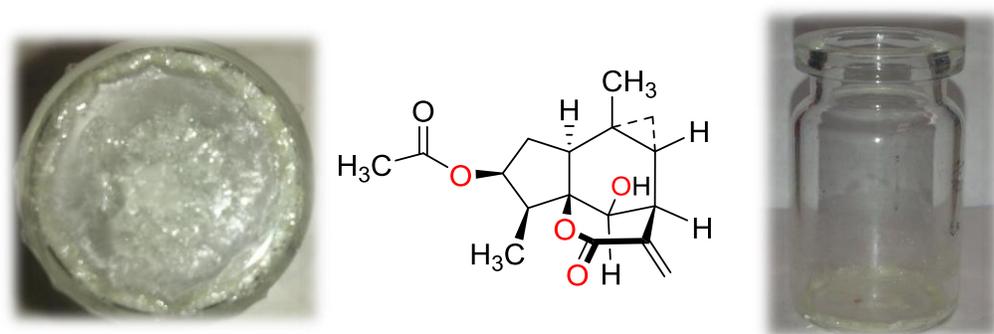
Figura 5.7. Ampliación del espectro HSQC (400 MHz) de la zaluzanina A (1).

**Tabla 5.1.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  y correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC de la zaluzanina A (**1**).

<b>Posición</b>	<b>Protón</b> $\delta$ en ppm (m, $J$ en Hz)	<b>Carbono</b> $\delta$ en ppm	<b>HMBC</b> C→H	<b>COSY</b> H→H
1	2.17 (dd, 13.4, 8.9)	42.23	2, 15	2, 2', 14, 3
2	2.67 (ddd, 13.4, 8.9, 8)	36.85	4	2', 1, 3
2'	1.82 (td, 13, 4.2)	---		2,1
3	4.20 (m)	72.30	2,4,15	2, 2',4,1
4	1.97 (q, 7.2)	40.89	1,5	15, 15', 2,3
5	---	92.70	2,15	
6	3.95 (t, 2.8)	66.00	7	7
7	3.15 (d, 2.8)	41.60	6, 9, 10, 13	6, 8
8	0.55 (dd, 9.7, 5.7)	22.34	1, 14	7, 9 $\alpha$ ,9 $\beta$
9 $\alpha$	0.85 (dd, 5.7, 4.0)	24.09	7,14	8, 9 $\beta$
9 $\beta$	0.66 (dd, 9.7, 4.0)	---		8, 9 $\alpha$
10	---	14.33	1,2	
11	---	140.30	13, 13'	
12	---	164.50	13, 13'	
13	6.15 (s)	124.10	13'	13'
13'	5.55 (s)	123.92		13
14	1.06 (s)	23.13	8, 9 $\alpha$ , 9 $\beta$	
15	1.00 (d, 7.2)	6.50	4	

### 5.3 Obtención de la zaluzanina B

Un lote de la parte aérea de la especie (100 g) se sometió a decocción (1 L de H<sub>2</sub>O destilada) y se extrajo con AcOEt (1 L). La parte de AcOEt (2.0 g) se sometió a separación mediante cromatografía en columna usando hexano-isopropanol (4:1). En las fracciones 12–14 se obtuvo zaluzanina B (**2**) (10 mg). La purificación de las demás fracciones permitió obtener mayor cantidad del compuesto (54 mg). La caracterización se llevó a cabo mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en 1D y 2D y sus datos se muestran en la tabla 5.2.



**Figura 5.8.** Cristales y estructura de zaluzanina B (**2**).

En comparación con RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de zaluzanina A, en el espectro de <sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> (Figura 5.9) se observa un desplazamiento a 5.28 ppm del protón 3 base hidroxilo; así como la señal característica de metilo del grupo acetilo a 2.8 ppm. En el espectro de <sup>13</sup>C se observaron 17 señales, entre las más características fueron las de 171.48 y 164.77 ppm para los grupos carbonilo de C-16 y C12, respectivamente, también en 21.17 ppm correspondiente al metilo del acetilo. La posición del grupo acetato en C-3 se confirmó mediante el experimento HMBC (Figura 5.12) en el cual se observó la correlación del hidrógeno H-3 con la señal en 171.48 asignada al carbonilo del acetato.

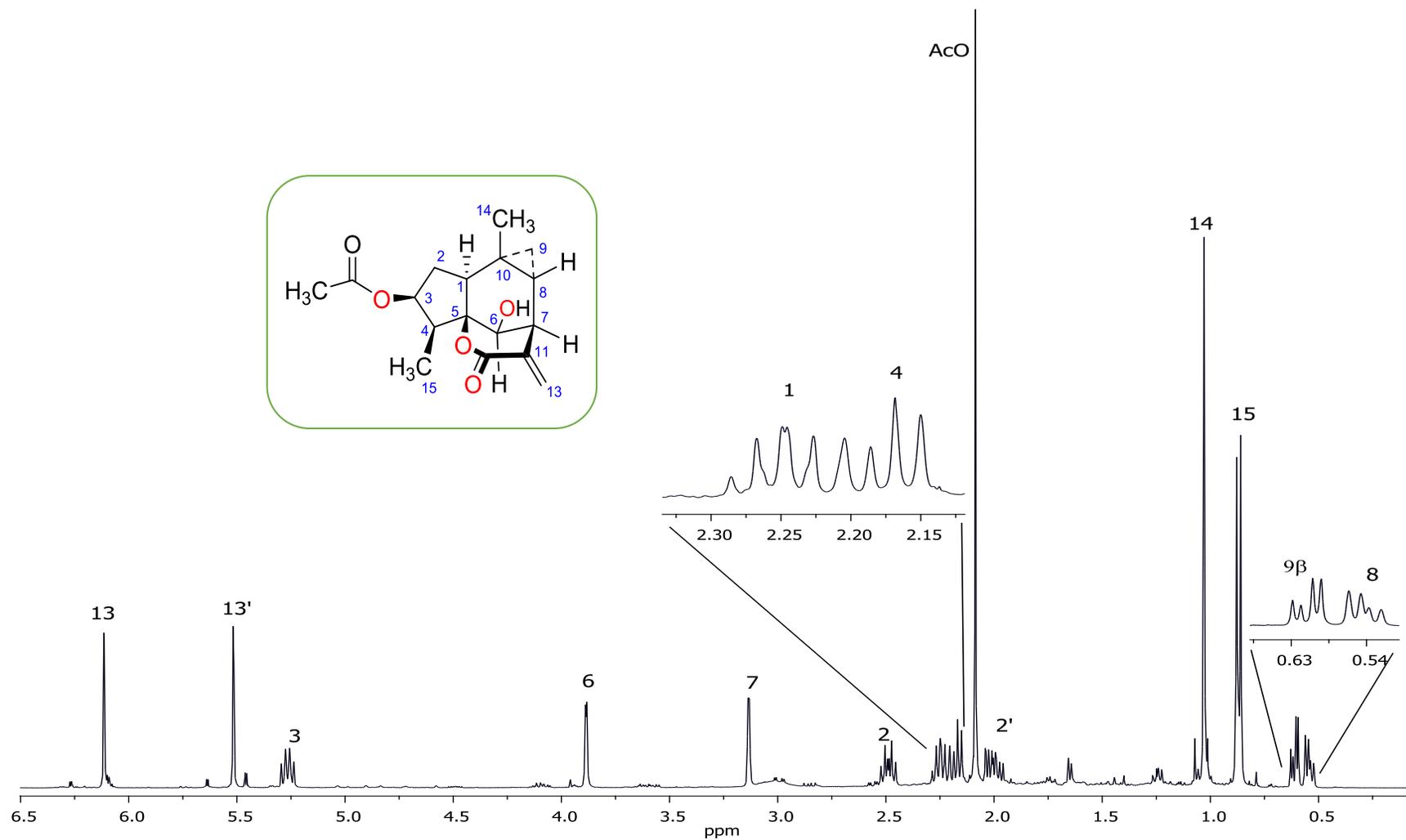


Figura 5.9. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) en CDCl<sub>3</sub> de zaluzanina B (2).

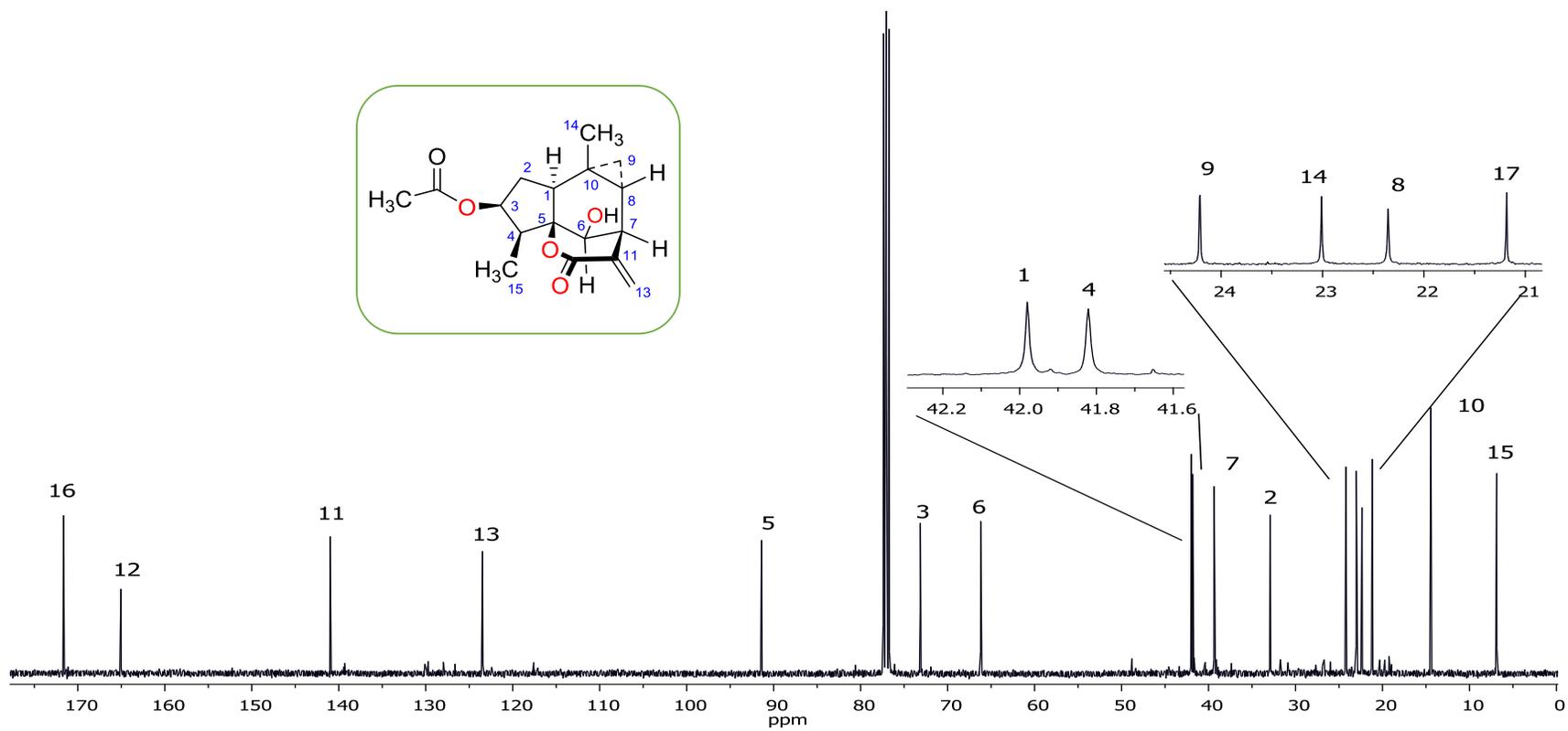


Figura 5.10. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  de zaluzanina B (2).

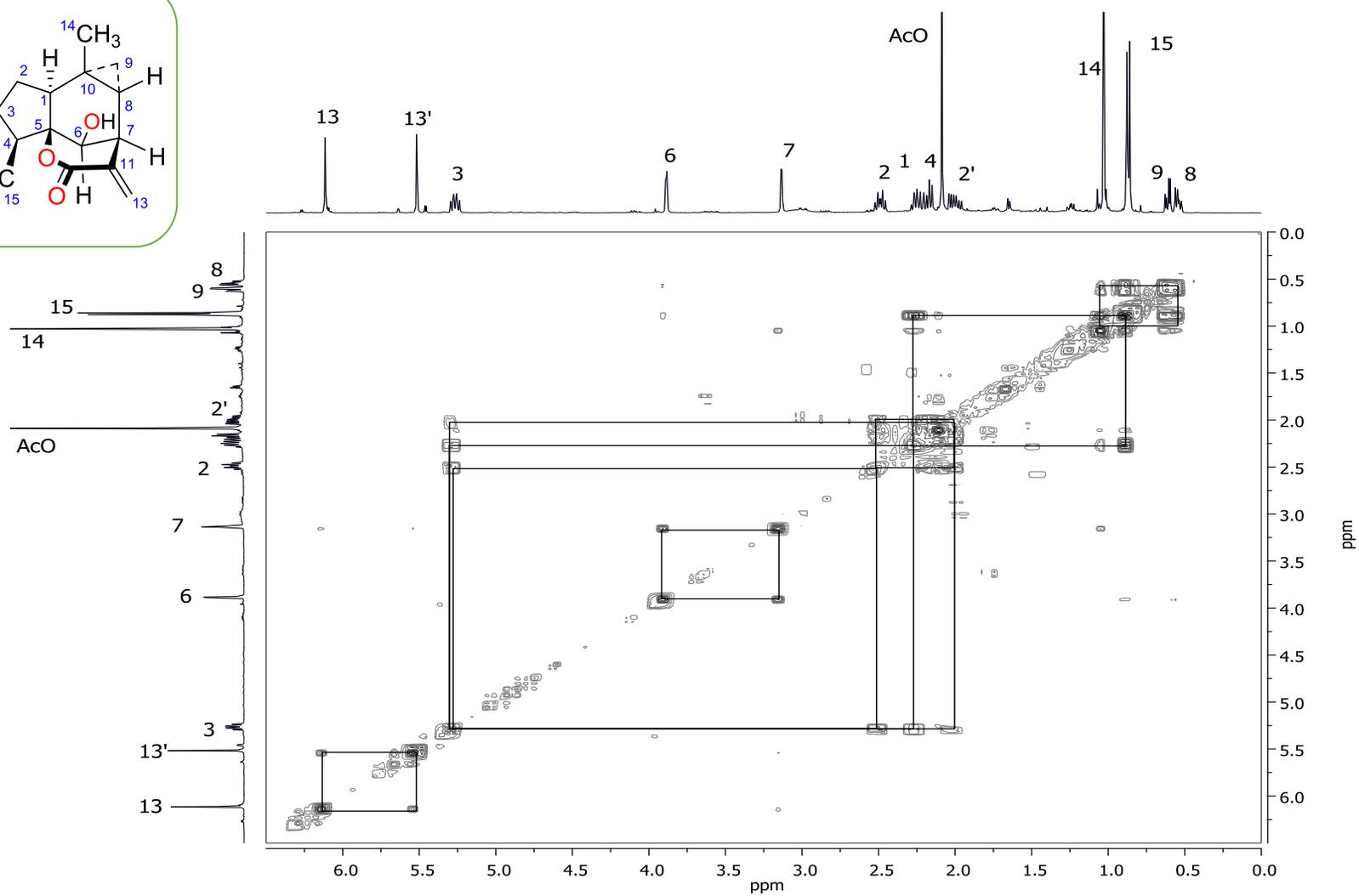
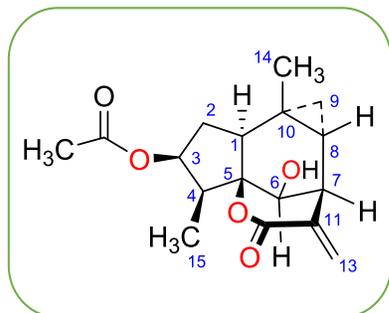


Figura 5.11. Espectro COSY en  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz) de la zaluzanina B (**2**).

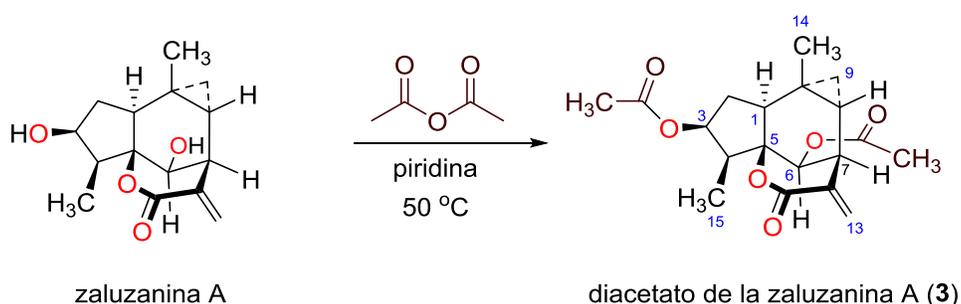


**Tabla 5.2** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  y correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC de la zaluzanina B (**2**).

<b>Posición</b>	<b>Protón</b> $\delta$ en ppm (m, $J$ en Hz)	<b>Carbono</b> $\delta$ en ppm	<b>HMBC</b> C $\rightarrow$ H	<b>COSY</b> H $\rightarrow$ H
1	2.22 (cd, 16.12, 7.32)	41.82	---	2,3
2	2.54 (cd, 12.10, 7.46)	32.94	1, 2'	1, 2', 3
2'	2.03 (ddd, 12.6, 7.55, 6.82)	---	1,2	---
3	5.29 (m)	73.03	2,15	1, 2, 4
4	2.15 (t, 7.23)	41.99	15	2, 3, 15
5	---	91.06	2, 3, 6, 7, 15	---
6	3.91 (s)	66.09	7	7
7	3.12 (d, 2.55)	39.35	6, 10	6
8	0.56 (dd, 9.64, 5.81)	22.37	9 $\alpha$ , 9 $\beta$	9 $\alpha$ , 9 $\beta$
9 $\alpha$	0.85 (dd, 5.72, 4.05)	24.33	8, 9 $\beta$	8
9 $\beta$	0.62 (dd, 9.65, 4.02)	---	8, 9 $\alpha$	---
10	---	14.64	7, 14	---
11	---	140.83	7, 13	---
12	---	164.77	7, 13	---
13	6.13 (s)	123.31	7	13'
13'	5.52 (s)			
14	1.04 (s)	23.05	7	---
15	0.89 (d, 7.22)	6.83	2, 4	4
16	2.08 (s)	171.48	2	2, 3
17	---	21.17	---	---

## 5.4 Acetilación de la zaluzanina A

Una muestra de zaluzanina A (50 mg) se sometió a reacción con anhídrido acético (1 mL) y piridina (0.75 mL) por 24 horas en baño de vapor (Figura 5.13). El producto se analizó por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D mostrando que se trataba del diacetato de la zaluzanina A (**3**). Sus datos espectroscópicos se muestran en la tabla 5.3.

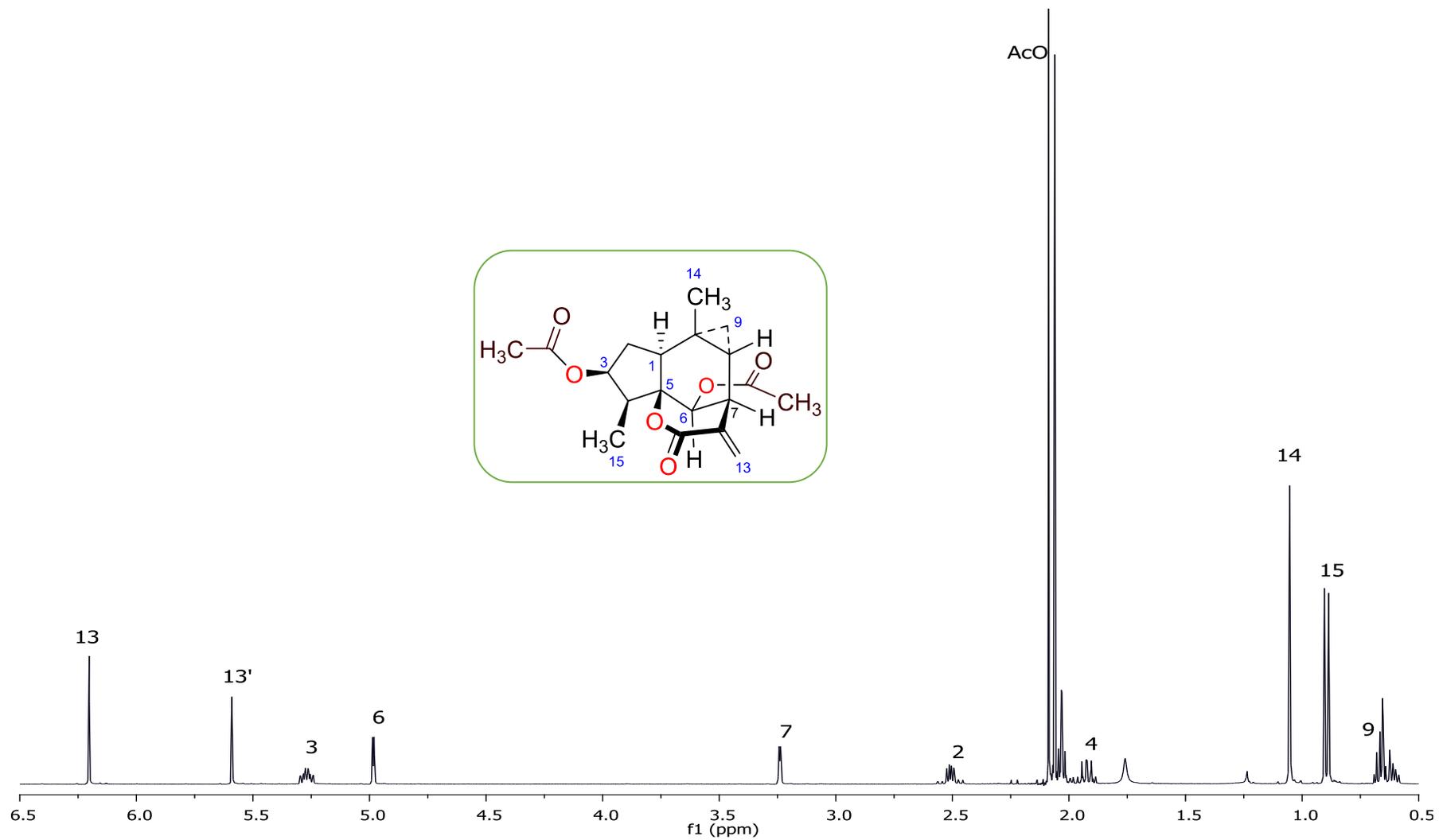


**Figura 5.13.** Reacción de acetilación de zaluzanina A.

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  (Figura 5.14) se observó en 6.20 y 5.58 ppm 2 señales simples que integraron cada una para un protón correspondientes al metileno exocíclico conjugado al carbonilo (H-13 y H13'). En 5.26 y 4.98 ppm se apreciaron las señales de los protones H-3 (m) y H-6 (dd,  $J = 4.75, 0.74$  Hz), respectivamente, en 3.24 ppm se observó la señal del protón en C-7, en 2.51 ppm se apreció una señal múltiple debida a los protones del metileno en posición C-2. En 2.09 y 2.05 ppm se apreciaron las señales características de grupos metilo de acetato, las señales de metilos 14 (s) y 15 (d,  $J = 7.0$  Hz) se apreciaron en 1.06 y 0.90 ppm, respectivamente. Así mismo, el protón de la posición 8 se observó en 0.60 ppm, y finalmente las señales de los hidrógenos en C-9 presentaron un desplazamiento de 0.57 ppm. La asignación de estas señales se corroboró

mediante el uso del experimento COSY (Figura 5.15), en cual se aprecian las correlaciones del grupo acetilo, principalmente.

En la Figura 5.16 se muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ , en el cual se pueden apreciar 19 señales, entre las más características fueron las de 171.43 y 169.14 ppm para los grupos carbonilos de acetato, en 163.84 ppm para el carbonilo de lactona C-12 , también en 139.32 y 124.64 ppm se apreciaron las señales correspondientes al doble enlace conjugado con carbonilo (C-11 y C-13), así mismo, se observó una señal de carbono cuaternario base de oxígeno en 88.68 ppm (C-5) , por último, en 21.10 y 21.05 ppm se aprecian señales correspondientes a los metilos de acetato.



**Figura 5.14.** Espectro de <sup>1</sup>H (400 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del diacetato de la zaluzanina (3).

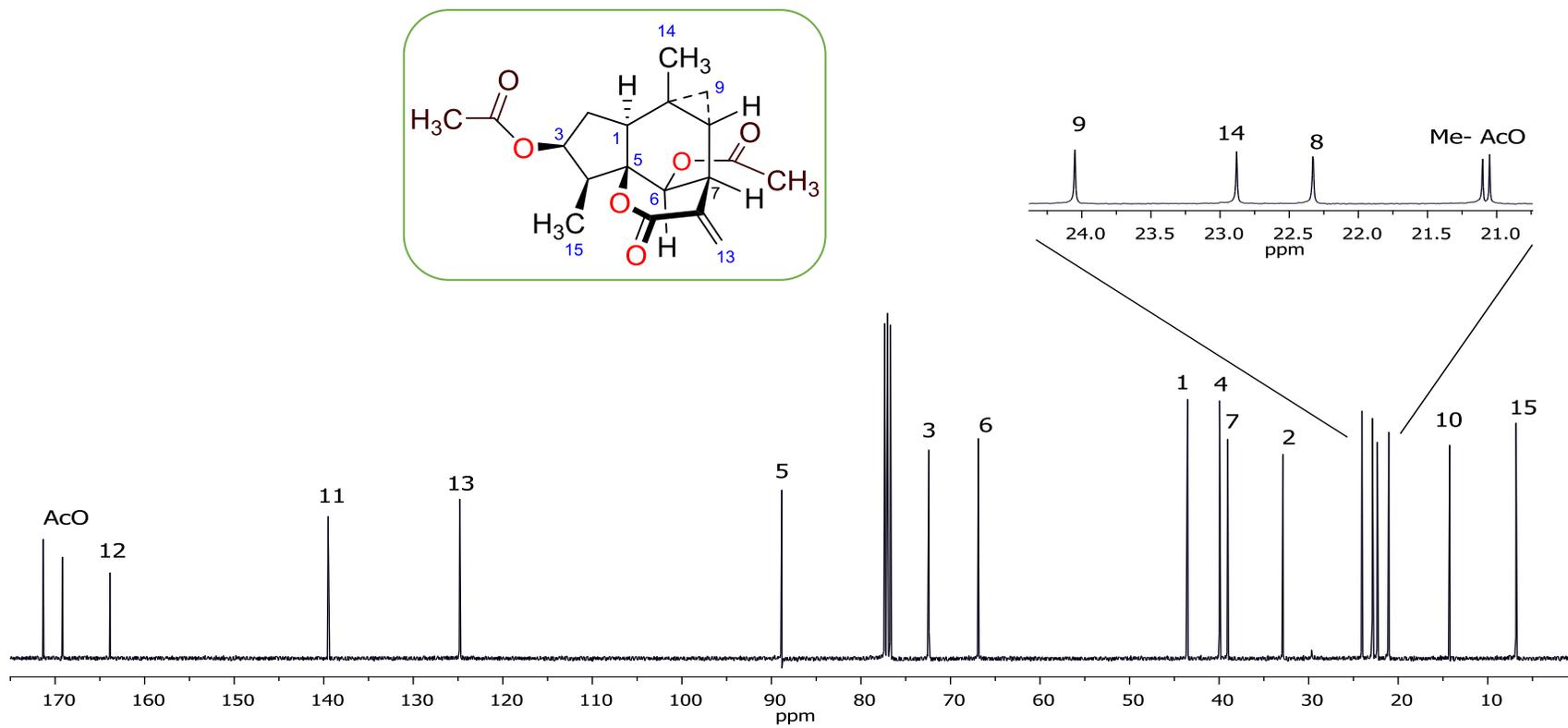


Figura 5.15. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  del diacetilado de zaluazina A (3).

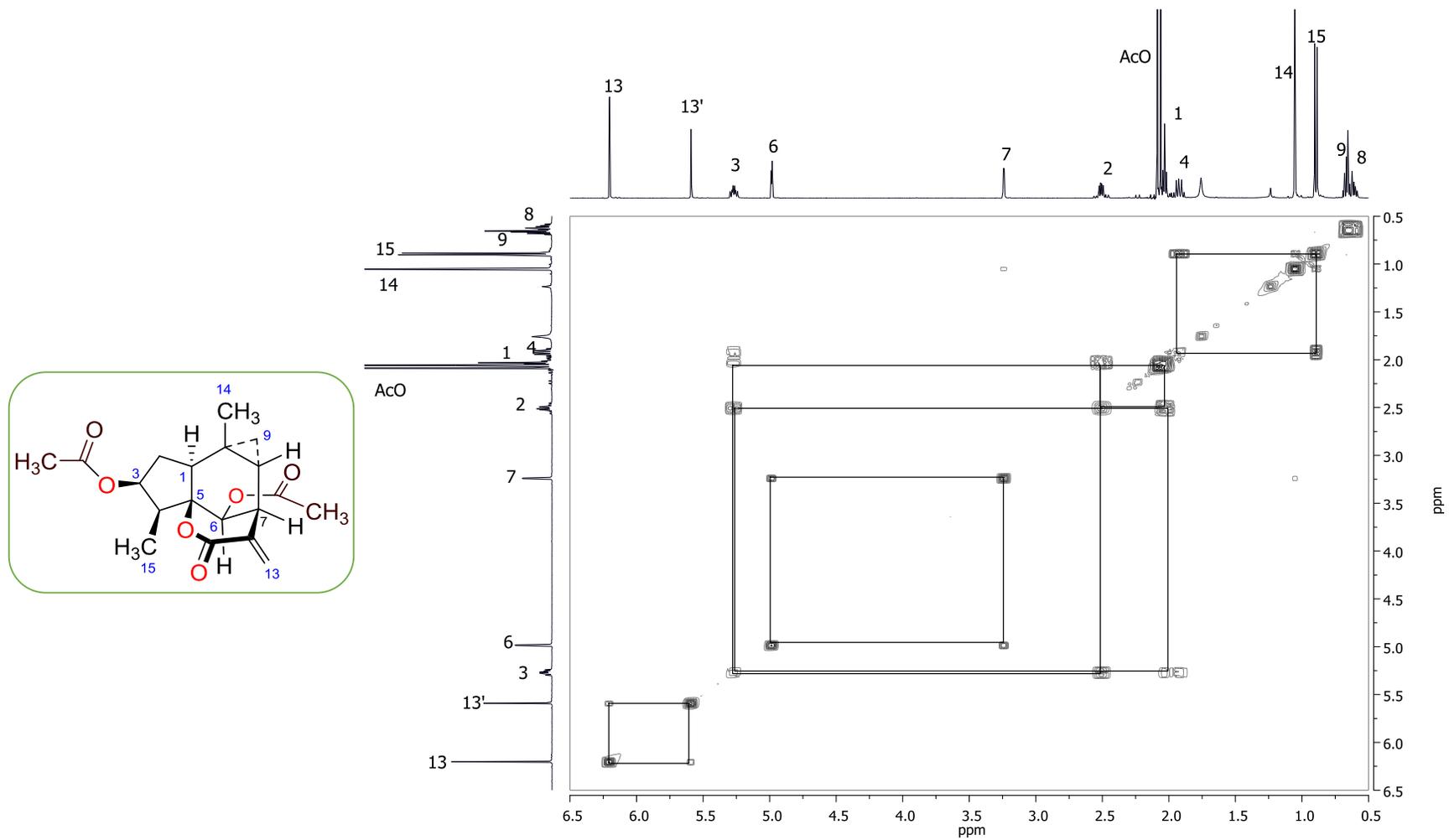


Figura 5.16. Espectro COSY en CDCl<sub>3</sub> (400 MHz) del diacetato de la zaluzanina A (3).

**Tabla 5.3** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{CDCl}_3$  y correlaciones observadas en los espectros COSY del diacetato de zaluzanina A (**3**).

<b>Posición</b>	<b>Protón</b> $\delta$ en ppm (m, <i>J</i> en Hz)	<b>Carbono</b> $\delta$ en ppm
1	2.03 d (5.08)	43.32
2	2.50 dd (7.89, 4.24)	33.10
2'	1.92 td (7.12, 1.86)	--
3	5.28	72.48
4	--	39.39
5	--	89.07
6	4.99	67.12
7	3.24	38.97
8	0.61 dd (9.85, 4.55)	22.33
9 $\alpha$	0.69 dd (9.97, 4.22)	24.06
9 $\beta$	0.65 d (4.32)	--
10	--	13.92
11	--	139.68
12	--	164.00
13	6.20	124.62
13'	5.59	--
14	1.05	22.89
15	0.89	7.04

## 5.5 Reacción de zaluzanina A con diazometano: formación de la pirazolina de la zaluzanina A

Por muchos años se empleó la formación de pirazolininas, seguido por análisis elemental, como una prueba química para la demostrar la presencia de un metileno exocíclico  $\alpha,\beta$ -insaturado a carbonilo durante la elucidación de la estructura de lactonas sesquiterpénicas (Romo *et al.*, 1967). Esta reacción se hizo obsoleta hace unos cincuenta años con el advenimiento de los espectrómetros de RMN que mostraron la presencia de dos señales dobles a frecuencias altas debidas al metileno exocíclico. Sin embargo, una cuestión principal acerca de la estereoquímica de la adición de diazometano al doble enlace conjugado de la lactona en estas sustancias sigue sin respuesta. Con la finalidad de contestar esta cuestión, en este trabajo se llevó a cabo la reacción de la zaluzanina A con diazometano como un modelo representativo de lactonas sesquiterpénicas  $\alpha,\beta$ -insaturadas.

Así, el tratamiento de la zaluzanina A (**1**) con una solución etérea de diazometano, siguiendo un procedimiento descrito (Romo *et al.*, 1967), condujo a la obtención de la pirazolina de zaluzanina A (**4**) (Figura 5.17).

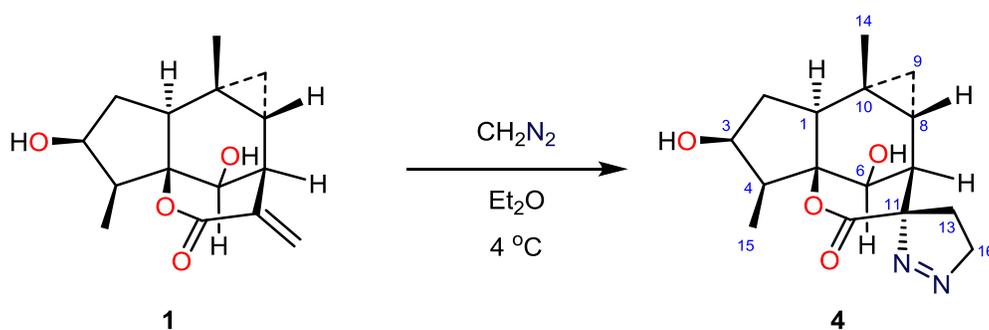


Figura 5.17. Reacción de la zaluzanina A (**1**) con diazometano.

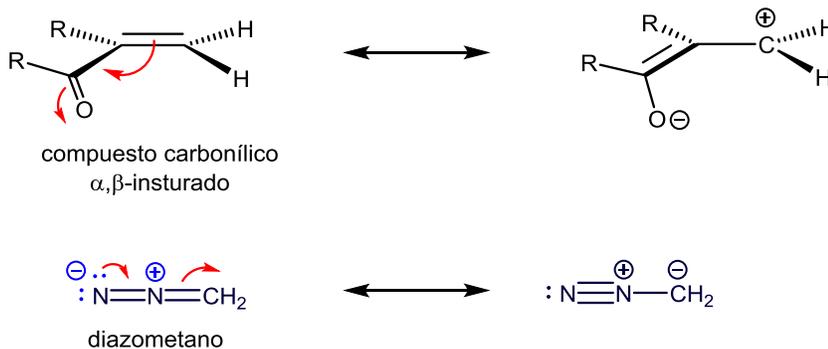
El análisis cuidadoso por RMN de  $^1\text{H}$  del crudo de la reacción (Figura 5.19) evidenció la formación del compuesto **4**. Mediante la integración de las señales

correspondientes a la posición 6 (Figura 5.20), con lo cual nos permitió determinar la diastereoselectividad de la reacción, que fue de 6:1 hacia del isómero 11 S.

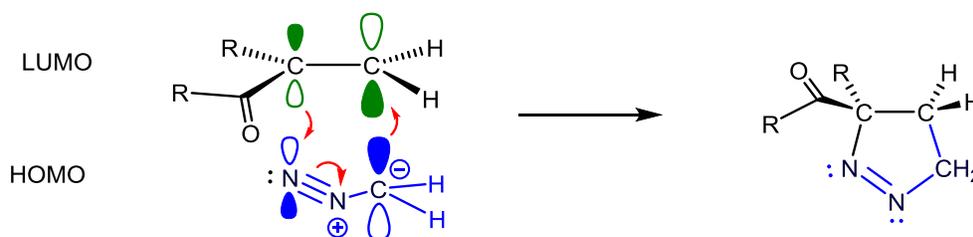
La adición de diazometano al doble enlace  $\alpha,\beta$ -insaturado de compuestos carbonílicos para formar productos de cicloadición de cinco miembros es estereoespecífica y regioselectiva, dado que representa una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. En esta reacción hay retención de la configuración con respecto al doble enlace (estereoespecificidad) porque la reacción es concertada; el doble enlace retiene su configuración *cis* o *trans* cuando se forma un ciclo (Lévai *et al.*, 2009). La reacción se puede visualizar como una interacción HOMO-LUMO entre un dienófilo (doble enlace  $\alpha,\beta$ -insaturado) y un dieno (en este caso diazometano). Debido a que el doble enlace representa un alqueno deficiente en electrones (también llamado dipolarófilo) el diazometano que actúa como dieno. El diazometano prefiere usar su HOMO en la reacción (el carbono tiene el coeficiente HOMO más grande), mientras que el doble enlace conjugado utiliza su LUMO, (el carbono beta tiene el mayor LUMO) formándose dos enlaces simultáneamente para dar el anillo de la pirazolina. De esta manera se puede explicar la regioselectividad y la estereoespecificidad observada en la reacción de la zaluzanina A con diazometano. Para un mejor entendimiento de lo anterior, en la figura 5.18 se describe las estructuras resonantes de un compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado y del diazometano, así como la interacción HOMO – LUMNO de la cicloadición 1,3-dipolar entre estos dos sistemas. En adición, en la figura también se puede observar la adición del diazometano a la zalunanina A.

En cuanto a diastereoselectividad observada en la adición de diazometano a la zaluzanina A, una posible explicación pudiera ser el impedimento estérico del Me-14 y H-8 de la estructura, que impiden el acercamiento del diazometano por la cara (*re*) del doble enlace.

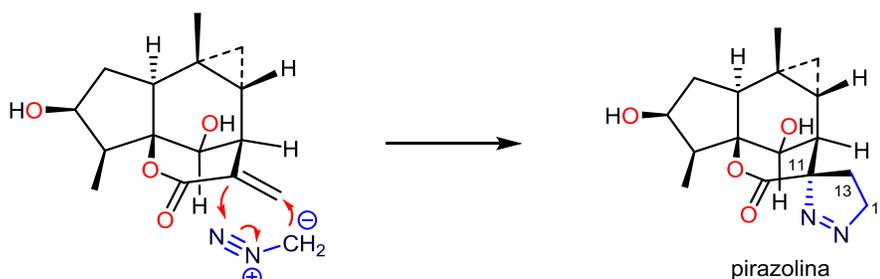
Estructuras de resonancia



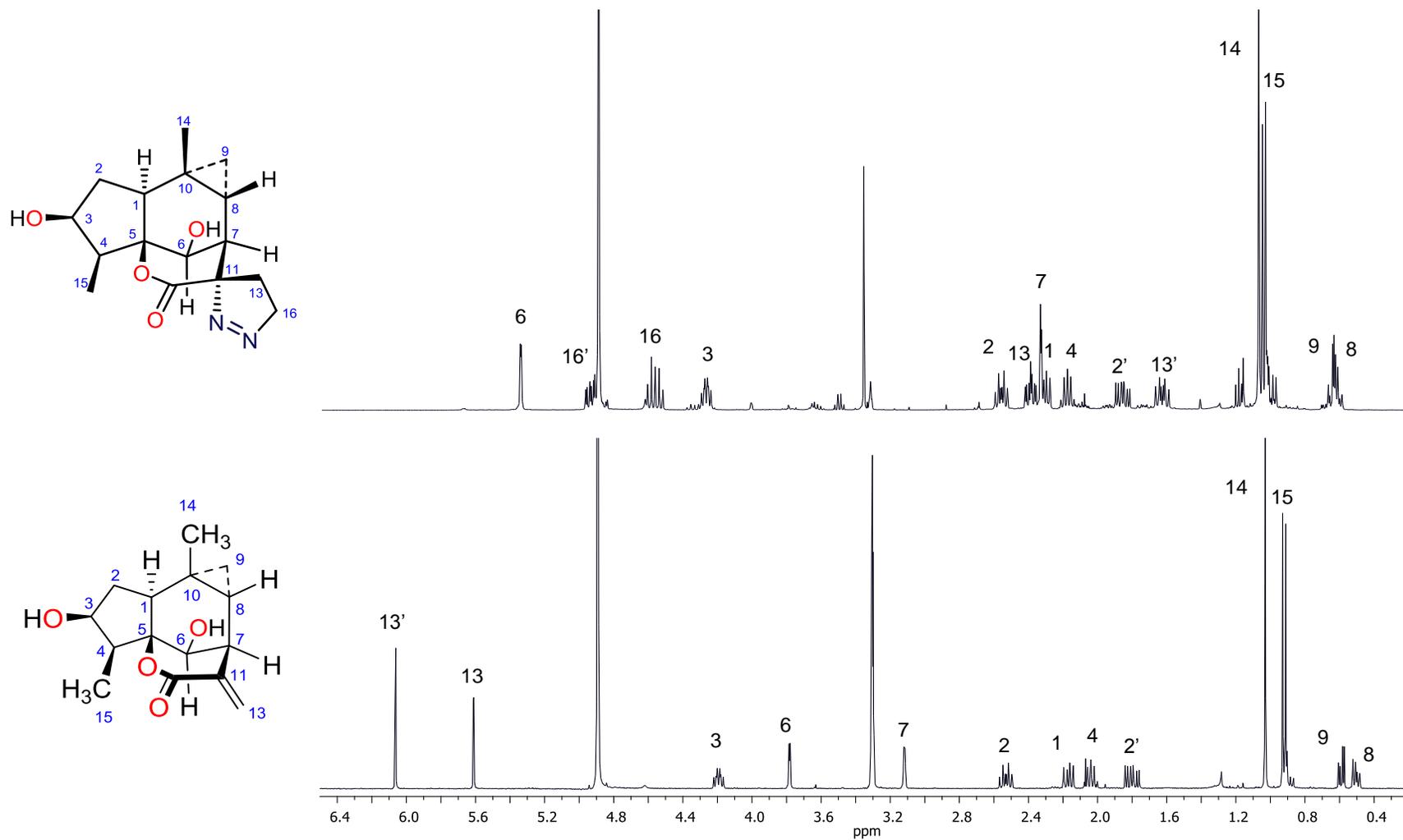
Interacción HOMO - LUMO



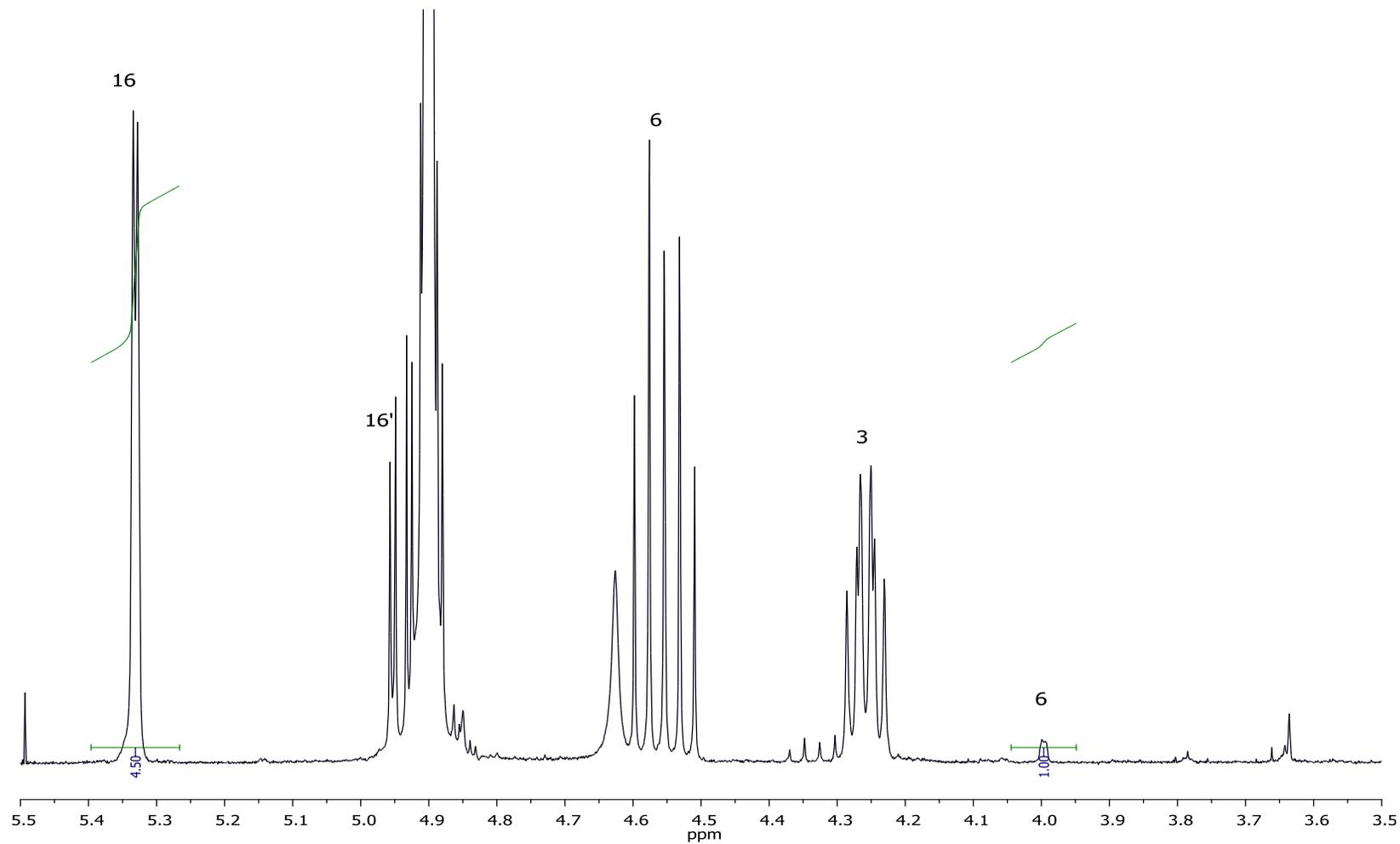
Reacción



**Figura 5.18.** Estructuras de resonancia de compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado y el diazometano, interacción HOMO-LUMNO en la cicloadición 1,3-dipolar de diazometano y un dipolarófilo, y reacción de la zaluzanina A para para obtener la pirazolina.



**Figura 5.19.** Comparación de espectros de RMN  $^1\text{H}$  del crudo de reacción (arriba) y zaluzanina A (abajo), ambos en metanol- $d_4$ .



**Figura 5.20.** Ampliación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{MeOH-}d_4$  de la pirazolina con la integración de señales.

La cristalización del producto en Et<sub>2</sub>O-acetona formó prismas, con p.f. 155–157 °C y  $[\alpha]_D -322$  (c 0.8, dioxano), estuvieron de acuerdo con los descritos (Romo *et al.*, 1967). En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **4** (Figura 5.21), las señales dobles a frecuencias altas del metileno exocíclico conjugado con la δ-lactona de zaluzanina A (**1**), no estuvieron presentes, en su lugar se observaron dos señales múltiples en 2.38 (ddd,  $J = 12.7, 8.8, 3.2$ , H-13) y 1.61 ppm (ddd,  $J = 12.7, 9.6, 8.8$ , H-13') correspondientes a los hidrógenos del metileno en C-13. En adición, las señales para los hidrógenos del metileno en C-16, base del grupo diazo, se apreciaron en 4.92 (ddd,  $J = 17.7, 9.6, 3.2$  Hz, H-16) y 4.55 ppm (ddd,  $J = 17.7, 8.8, 8.8$  Hz, H-16'). Asimismo, la señal de H-6 de **4** en 5.33 ppm (d,  $J = 2.6$  Hz) se desplazó 1.53 ppm a frecuencias más altas, mientras que la de H-7 en 2.31 (d,  $J = 2.6$  Hz) se movió 0.78 ppm a frecuencias menores con respecto a las mismas señales de la zaluzanina A. Estos desplazamientos proporcionan evidencia para la presencia del isómero 11S, debido a que, de acuerdo con la estructura **4** dibujada en la figura 5.17, H-6 puede experimentar un desplazamiento diamagnético inducido por el doble enlace del grupo diazo, mientras que H-7 experimenta el efecto contrario debido a su colocación con respecto a los electrones π del enlace N=N.

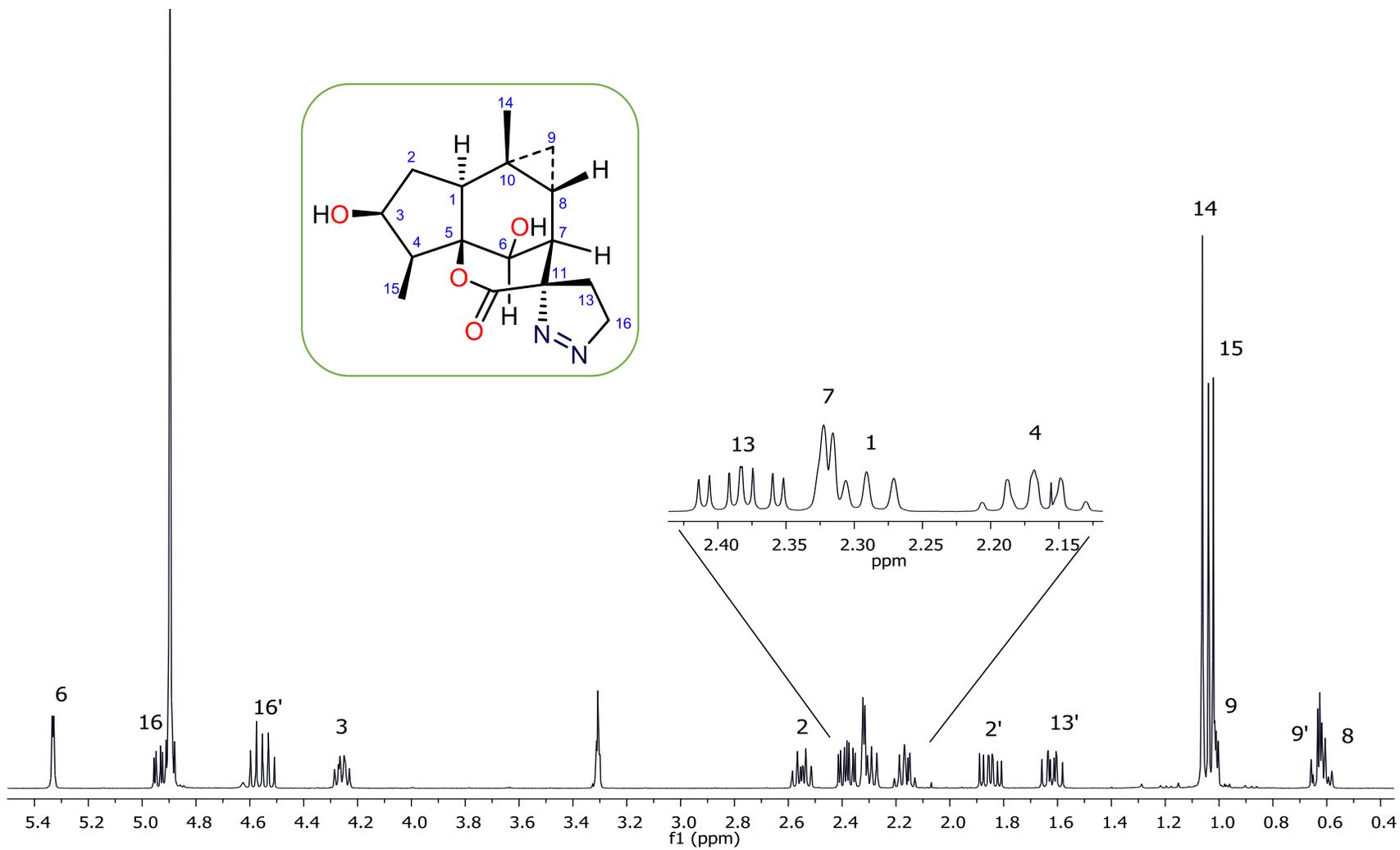


Figura 5.21. Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{MeOH-}d_4$  de la pirazolina de zaluzanina A (4).

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  de la pirazolina **4** (Figura 5.22), asignado por experimentos de 2D HSQC y HMBC (Figura 5.23-24), se observaron 16 señales, de las cuales la de 169.2 ppm se asignó al grupo carbonilo (C-12), y aquellas en 103.1 (C-16), 78.1 (C-11) y 27.2 ppm (C-13) fueron asignadas al anillo de pirazolina. Además, las señales en 95.4, 71.1 y 62.7 ppm, característica de carbonos base se oxígeno, se atribuyeron a C-5, C-3 y C-6, respectivamente. En la tabla 5.4 se describen los datos completos de RMN de **4**.

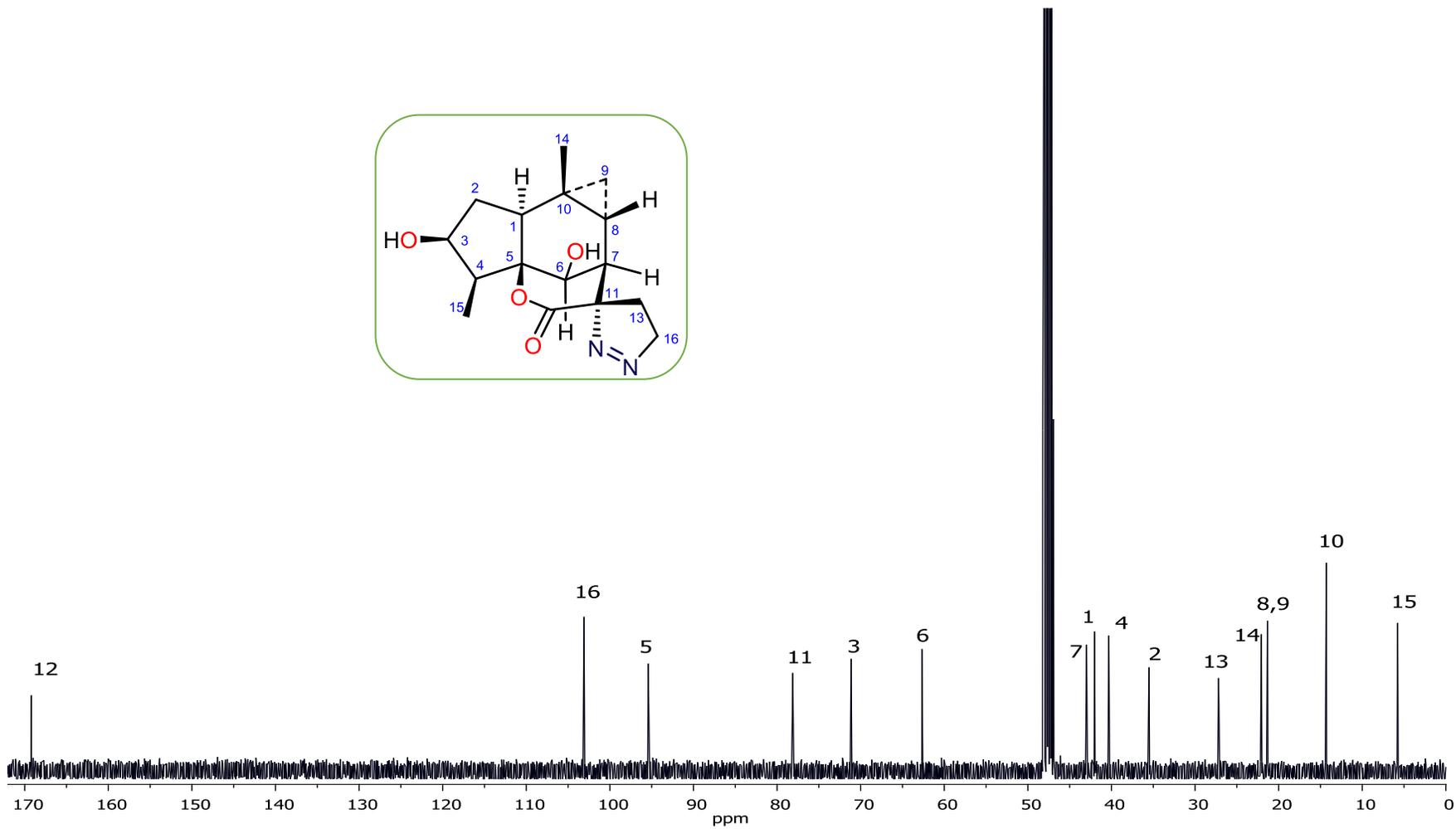
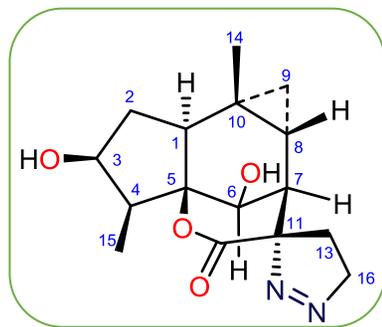


Figura 5.22 Espectro de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{MeOH-}d_4$  de la pirazolina de zaluazina A (4).

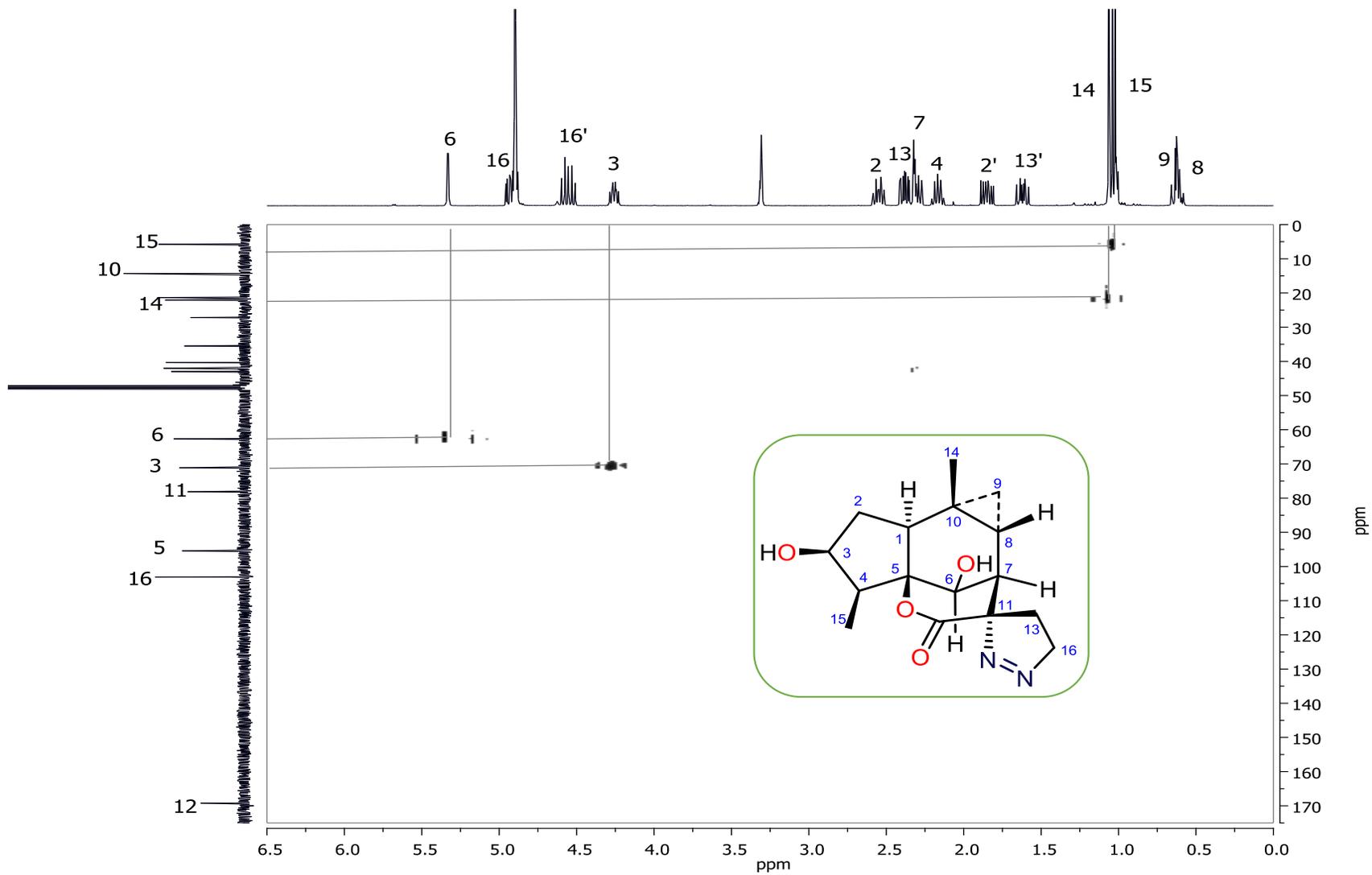


Figura 5.23. Espectro HSQC en MeOH- $d_4$  de la pirazolina de zaluzanina A (4).

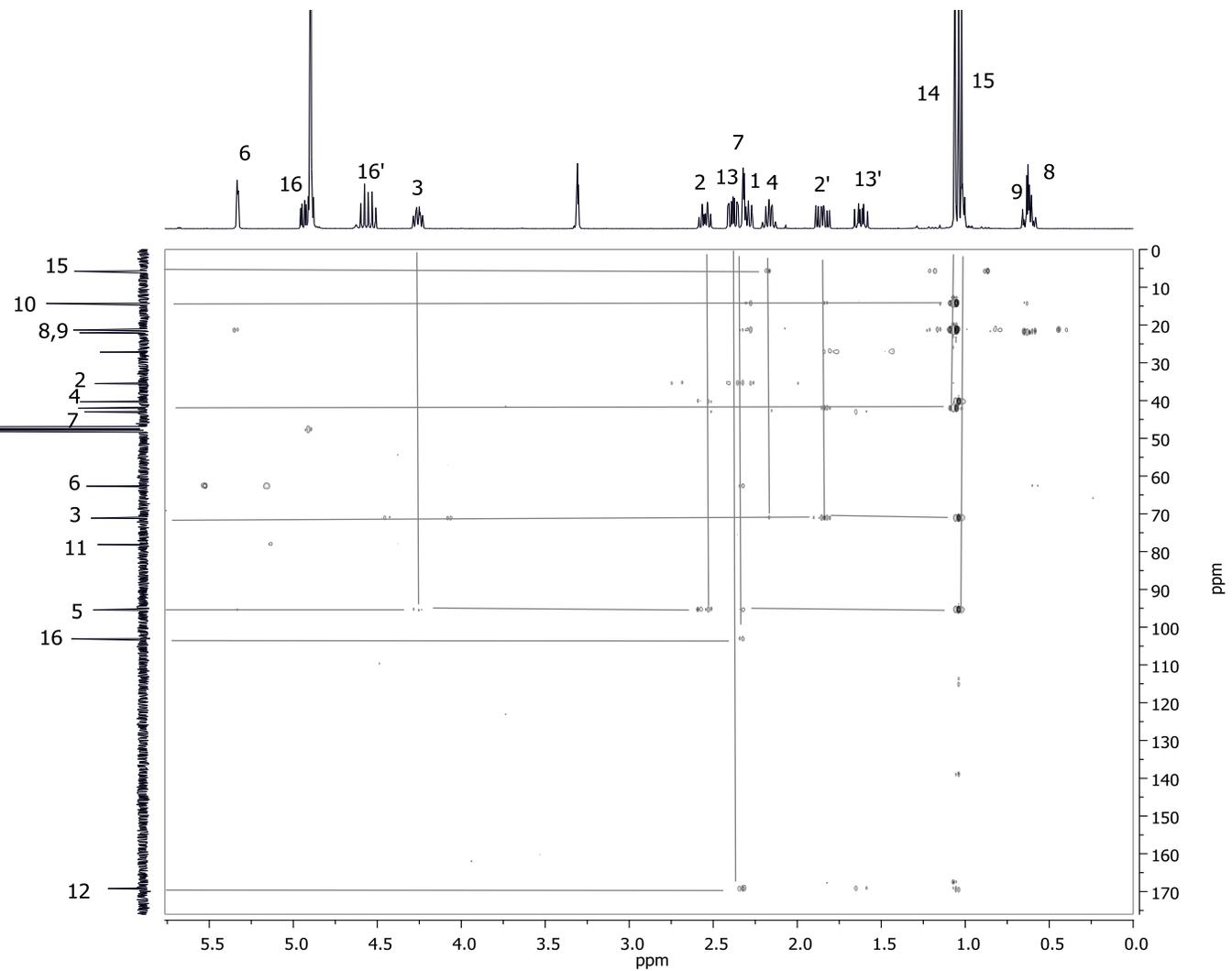
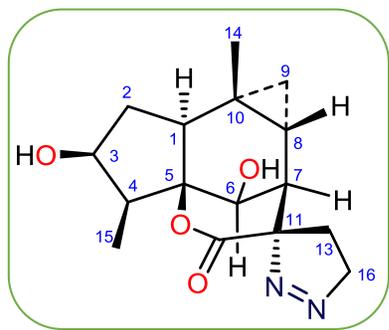


Figura 5.24. Espectro HMBC en MeOH- $d_4$  de la pirazolina de zaluzanina A (4).

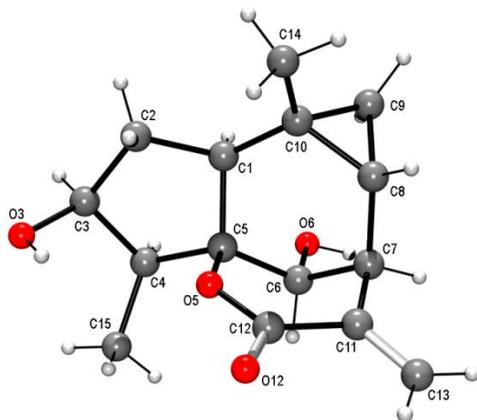
**Tabla 5.4.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{MeOH-}d_4$  y correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC de la pirazolina de zaluzanina A (4).

<b>Posición</b>	<b>Protón</b> <i><math>\delta</math> en ppm (m, J en Hz)</i>	<b>Carbono</b> <i><math>\delta</math> en ppm</i>	<b>COSY</b> H→H	<b>HMBC</b> C→H
1	2.29 t (7.03)	40.33	-	-
2	2.55 td (12.55, 7.85)	27.14	1, 2', 3	1,4,5
2'	1.86 td (12.59, 6.04)	-	1, 2, 3	-
3	4.26 td (8.09, 5.92)	71.10	1, 2, 2'	-
4	2.17 td (15.16, 7.61)	42.09	3, 15	1, 5
5	--	95.40	-	4, 6
6	5.33 d (2.6)	62.70	7, 8	8
7	2.33 d (2.6)	35.38	6, 8, 9 13'	11,16, 16'
8	0.60 dd (9.89, 5.07)	21.33	7, 9, 9'	9
9 $\alpha$	1.01 t (2.53)	22.06	-	9', 8
9 $\beta$	0.64 dd (9.89, 2.96)	-	-	9, 8
10	-	14.21	-	-
11	-	78.10	-	-
12	-	169.20	-	-
13	2.38 ddd (12.7,8.8, 3.2)	27.20	13', 16, 16'	-
13'	1.62 ddd (12.7, 9.6, 8.8)	-	-	-
14	1.06 s	21.37	1, 9, 9'	1,10
15	1.03 d (7.26)	5.75	4	4,5
16	4.94 dd (9.63, 3.16)	103.10	13, 13', 16'	-
16'	4.54 cd (17.68, 8.84)	-	13, 16, 16'	-

## 5.6 Análisis por difracción de rayos-X de la zaluzanina A (1) y la pirazolina de la zaluzanina A (4)

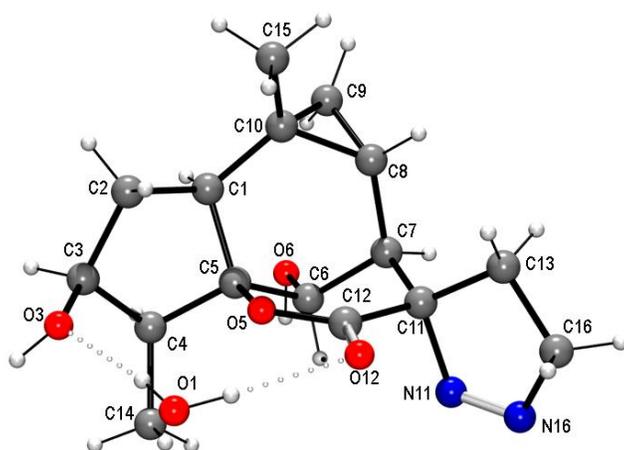
La zaluzanina A (1) se recrystalizó de hexano-AcOEt, mientras que su pirazolina (4) se recrystalizó de acetona-Et<sub>2</sub>O. Los cristales se colocaron en un difractor de rayos-X equipado con radiación monocromática de CuK $\alpha$  y un detector acoplado con un dispositivo de carga grande, que permite coleccionar los datos de la esfera completa. La estructura molecular de ambos compuestos se resolvió por métodos directos y refinado a un índice de discrepancia de 3.2 y 2.7%, respectivamente (Tabla 5.5). Para 1, los datos de la esfera completa se utilizaron para calcular el parámetro de Flack (Flack, *et al.*, 2008), que para el enantiómero que se muestra en la figura 2.5, fue  $x = 0.1$  (3), y el parámetro Hooft (Hooft, *et al.*, 2008) fue  $y = 0.10$  (11). Para la estructura invertida, los parámetros de Flack y Hooft fueron  $x = 0.9$  (3) y  $y = 0.90$  (11), respectivamente, de donde se asegura que el enantiómero correcto es el que se dibuja en la figura 2.5. Siguiendo el mismo procedimiento para el compuesto 4, el enantiómero mostrado en la figura 5.17 fue validado de acuerdo al parámetro de Flack de  $x = -0.12$  (16), y el parámetro de Hooft de  $y = -0.07$  (6), mientras que para la estructura invertida, los parámetros de Flack y Hooft fueron  $x = 1.13$  (15) y  $y = 1.06$  (6), respectivamente. Por lo tanto, la configuración absoluta del nuevo centro estereogénico en C-11 en la pirazolina 4 se determinó como S.

En la zaluzanina A (Figura 5.25), se puede apreciar que la fusión de los anillos de 5 y 6 miembros es *trans*, donde el protón en C-1 es *alfa* y el oxígeno en C-5 es *beta*. De igual manera en esta figura se observa que el sustituyente en C-7 es *beta*, lo cual permitió la formación de la lactona con el oxígeno en C-5 en su biosíntesis. Adicionalmente, se puede apreciar que el hidroxilo en C-3 y el metilo en C-4 tienen una orientación *beta*. El hidroxilo en C-6 se orienta de manera pseudo ecuatorial, con H-6 pseudo axial. Finalmente se observó que el metileno en C-9 del grupo ciclopropilo tiene una orientación *anti* con respecto al anillo de la lactona.



**Figura 5.25.** Estructura de rayos-X de zaluzanina A (1)

En la estructura de rayos-X del compuesto **4** se observó relación espiro de los anillos de la pirazolina y de la lactona, donde el grupo diazo tiene una orientación “alfa”. Al igual que en el caso de la zaluzanina A, el hidroxilo en C-6 tiene una orientación pseudo ecuatorial, pero su hidrógeno se orienta de manera casi eclipsada con H-6. Es interesante observar en este caso la formación de un solvato con la adición de la molécula de agua en la estructura cristalina, en la cual se puede apreciar puentes de hidrógeno con el oxígeno de hidroxilo en C-3, así como con el oxígeno del carbonilo en C-12.



**Figura 5.26.** Estructura de rayos X de la pirazolina de zaluzanina A (4).

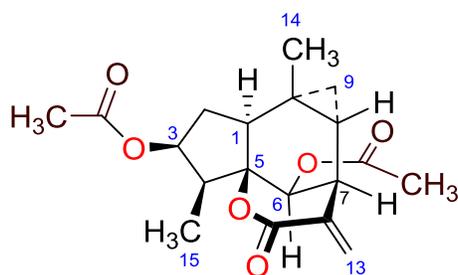
**Tabla 5.5.** Parámetros de rayos-X de zaluzanina A (**1**) y pirazolina de zaluzanina A (**4**).

Parámetros	<b>1</b>	<b>4</b>
Fórmula	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O
<i>M</i>	264.31	324.37
Sistema del cristal	ortorrómbico	ortorrómbico
Grupo espacial	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	6.7403(2)	9.6905(2)
<i>b</i> (Å)	10.0471(3)	12.2870(2)
<i>c</i> (Å)	19.6148(6)	13.5275(2)
<i>V</i> (Å <sup>3</sup> )	1328.32(7)	1610.68(5)
<i>Z</i>	4	4
$\rho$ (mg/mm <sup>3</sup> )	1.32	1.34
$\mu$ (CuK $\alpha$ , mm <sup>-1</sup> )	0.776	0.825
Refinamiento de celda por reflexiones	6985	8183
Total reflexiones	24312	16676
Reflexiones únicas ( $R_{\text{int}}$ 0.01%)	2648	3373
Reflexiones observadas	2329	3252
Final R1 index [ $I > 2\sigma(I)$ ] (%)	3.2%	2.7%
Final wR2 index [ $I > 2\sigma(I)$ ] (%)	6.9%	7.2%
Diferencia más grande entre pico y hoyo (e.Å <sup>3</sup> )	0.133 and -0.137	0.133 and -0.111
Parámetro Flack <i>x</i>	0.1(3)	-0.12(16)
Parámetro Hooft <i>y</i>	0.10(11)	-0.07(6)
Parámetro Flack para estructura inversa <i>x</i>	0.9(3)	1.13(15)
Parámetro Hooft para estructura inversa <i>y</i>	0.90(11)	1.06(6)

### 5.6.1 Dicroísmo Circular Vibracional del diacetato de zaluzanina A

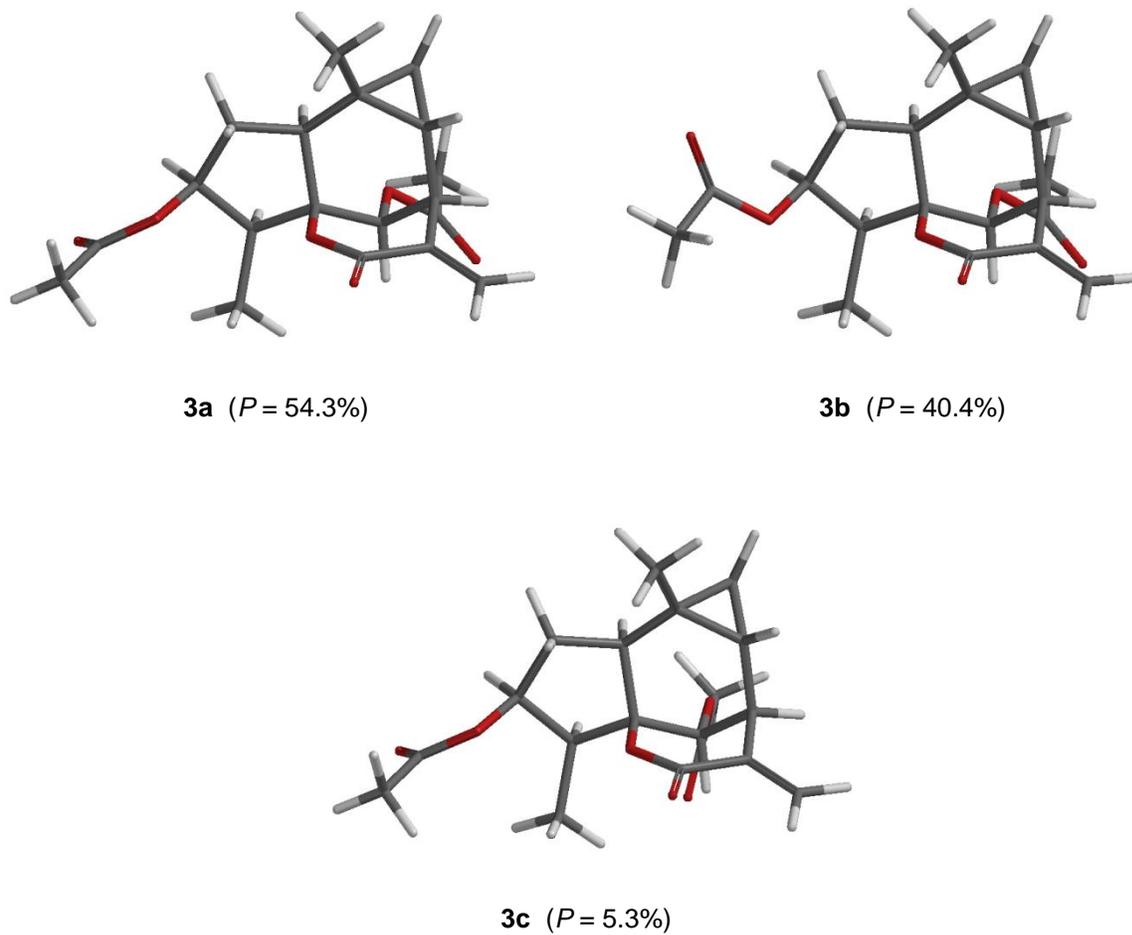
El dicroísmo circular vibracional (DCV) es una técnica espectroscópica que se ha empleado recientemente para asignar la configuración absoluta de sustancias naturales (Gómez-Hurtado, 2011; Velázquez-Jiménez, 2011; Manríquez-Torres *et al.*, 2013), y se basa en el hecho de que una molécula quiral puede absorber de forma diferente la luz infrarroja circularmente polarizada a la derecha de la izquierda, o viceversa. Entonces se puede medir esta pequeña diferencia resultado un gráfico que se compara con el calculado para uno de los estereoisómeros en particular. Generalmente el cálculo se lleva a cabo usando teoría de funcionales de la densidad (DFT). Conociendo cuál configuración de la molécula se empleó para el cálculo, se puede conocer la configuración absoluta de la sustancia natural, ya que el gráfico será el mismo si la sustancia natural tiene la misma configuración que la de la estructura calculada. Si el compuesto natural tiene la configuración opuesta los gráficos se verán como imágenes de espejo (Cedrón, 2008).

La configuración absoluta de un grupo de sustancias estrechamente relacionadas se puede determinar si se escoge una molécula representativa para realizar el cálculo del espectro de DCV. En este sentido, se usó el diacetato de la zaluzanina A (**3**) para tal fin. En adición, cabe mencionar que para determinar un espectro de DCV generalmente se usa  $\text{CDCl}_3$ , debido a que la señal de IR de este disolvente en la zona de medición no interfiere con las señales de la molécula. El compuesto **3** (Figura 5.27) es mucho más soluble en  $\text{CDCl}_3$  que la zaluzanina A, siendo esta una de las razones por la que se empleó.



**Figura 5.27.** Diacetato de zaluzanina A.

El modelo molecular de **3** se construyó de acuerdo a la configuración propuesta anteriormente (Figura 2.5) y se sometió a una búsqueda de conformeros utilizando el método Monte Carlo y mecánica molecular (MMFF) (Höltje *et al.*, 1996). Los conformeros obtenidos fueron analizados y seleccionados de acuerdo a sus energías eliminando a los repetidos. Una selección entre 0–10 kcal/mol proporcionó 5 conformeros. Los cálculos de energía por DFT de estas estructuras a un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d), seguido por una selección dentro del rango de 0–5 kcal/mol, generó 3 conformeros. La optimización de la geometría de los conformeros seleccionados se hizo por B3LYP/DGDZVP (Godbout, *et al.*, 1992; Andzelm, *et al.*, 1992), en la cual también se calcularon las frecuencias vibracionales. Posteriormente se seleccionaron aquellos conformeros con un rango de energía entre 0–3 kcal/mol, lo cual condujo a únicamente tres conformeros (**3a–3c**) que en suma contribuyeron con el 100% de la población (Figura 5.28). Estos conformeros esencialmente preservan el mismo arreglo espacial con cambios en la rotación de los grupos acetilo. La tabla 5.6 contiene los parámetros termoquímicos de los cálculos del equilibrio conformacional del compuesto **3**, incluyendo las tres especies principales (**3a–3c**).



**Figure 5.28.** Estructuras de mínima energía, DFT//B3LYP/DGDZVP, del diacetato de zaluzanina A.

**Tabla 5.6** Energías conformacionales y relativas de las poblaciones del diacetato de zaluzanina A.

Confórmero	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	% $_{\text{MMFF}}^{\text{b}}$	$\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$	% $_{\text{DFT}}^{\text{d}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{e}}$	% $_{\text{OPT}}^{\text{f}}$
<b>3a</b>	0.98	15.2	0.62	12.63	0.00	54.3
<b>3b</b>	0.00	79.5	0.20	25.70	0.18	40.4
<b>3c</b>	1.69	4.6	0.19	25.91	1.38	5.3
<b>3d</b>	2.82	0.7	0.00	35.76	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Energía de mecánica molecular relativa de **3a** con  $E_{\text{MMFF}} = 65.8187$  kcal/mol.

<sup>b</sup> % de población calculada a partir de las energías MMFF de acuerdo a  $\Delta E_{\text{MMFF}} \approx -RT \ln K$ .

<sup>c</sup> Cálculo de energía B3LYP/6-31G(d) a 0°K relativas de **3a** con  $E_{6-31G(d)} = -746611.73$  kcal/mol.

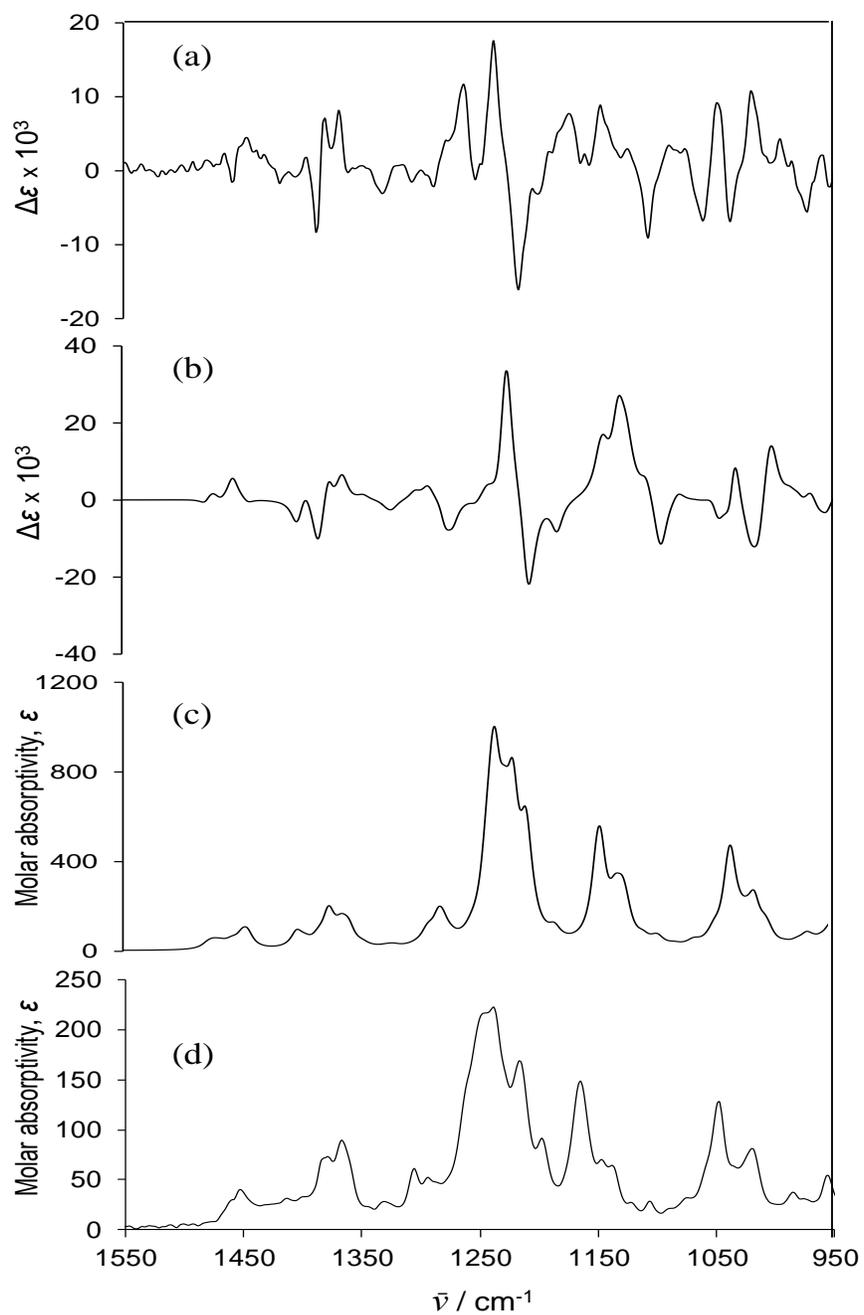
<sup>d</sup> % de población calculada a nivel B3LYP/6-31G(d) de acuerdo a  $\Delta E_{6-31G(d)} \approx -RT \ln K$ .

<sup>e</sup> Energía libre de Gibbs relativa a **3a** con  $G_{\text{DGDZVP}} = -746489.49$  kcal/mol.

<sup>f</sup> % de población calculada a partir de las energías libres de Gibbs de acuerdo a  $\Delta G = -RT \ln K$ .

<sup>g</sup> Convergencia al confórmero **3a**.

La distribución de Boltzmann fue calculada de acuerdo a las ecuaciones  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  y  $\Delta G = -RT \ln K$ , considerando las frecuencias B3LYP/DGZVP calculadas (Valdez, *et al.*, 2013). Las frecuencias de DCV de los tres confórmeros mayoritarios **3a**, **3b** y **3c** se promediaron para generar el espectro calculado. La figura 5.26 muestra la comparación entre el espectro teórico y experimental de DCV del diacetato de zaluzanina A, los cuales mostraron muy buena similitud. La evaluación cuantitativa de esta similitud fue llevada a cabo aplicando un algoritmo de nivel de concordancia recientemente desarrollado (BioTools Co., Jupiter, FL 33458, USA), el cual calcula los datos sobrepuestos del espectro teórico y experimental como función de un cambio relativo. La aplicación de este método condujo a la optimización del factor de anarmonicidad ( $anH = 0.981$ ), y la similitud espectral de DCV para el enantiómero correcto ( $S_E = 75.3\%$ ) e incorrecto ( $S_{-E} = 15.5\%$ ) con un índice de similitud enantiomérica ( $ESI$ ) con valor de 59.8% y el 100% de nivel de confianza para la determinación de la configuración absoluta. Estos resultados proporcionan evidencia directa y concluyente para la configuración absoluta del compuesto **3**, y por ende, la de los compuestos **1**, **2** y **4**.



**Figure 5.29.** (a) DCV experimental en  $\text{CDCl}_3$ , (b) DCV calculado al nivel B3LYP/DGDZVP, usando  $anH = 0.981$ , (c) IR experimental en  $\text{CDCl}_3$ , y (d) IR calculado al nivel B3LYP/DGDZVP, usando  $anH = 0.981$ .

## 5.7 Cuantificación de las zaluzaninas en el té de la parte aérea de *Z. augusta*

La parte aérea seca y molida (2.5 g) se extrajo con H<sub>2</sub>O (infusión, 250 mL), dando una solución de color verde oscuro que se filtró y se extrajo con AcOEt (250 mL). La fase orgánica se concentró en el rotavapor para obtener un residuo (50 mg), el cual se analizó por triplicado mediante HPLC para cuantificación de las lactonas sequiterpénicas. Dicha determinación se llevó a cabo mediante comparación con una curva estándar, obtenida a partir de las siguientes concentraciones de la zaluzanina A: 0.1, 0.15, 0.25, 0.3 y 0.4 mg/ml (Figura 5.27).

Las muestras de referencia se disolvieron en CH<sub>3</sub>CN para su análisis, y se aplicaron a una columna de fase reversa, eluyendo con H<sub>2</sub>O-MeOH (7:3) y CH<sub>3</sub>CN. Los cromatogramas de una muestra estándar, así como de la muestra por analizar (té) se observan en la figura 5.28. La curva estándar que se utilizó en la cuantificación siguió el método de los estándares externos para obtener el factor de proporcionalidad cumpliendo con la Ley de Beer, la cual menciona que la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de las especies absorbentes, usando la ecuación de regresión lineal  $B = mx + y$  dio un factor de correlación de  $R^2 = 0.9974$  (Figura 5.30).

Las muestras provenientes del té se prepararon a una concentración de 0.5 mg/mL en MeOH, y sus picos se identificaron comparándolos con los tiempos de retención de estándar (Figura 5.31), el cual fue de 12 minutos.

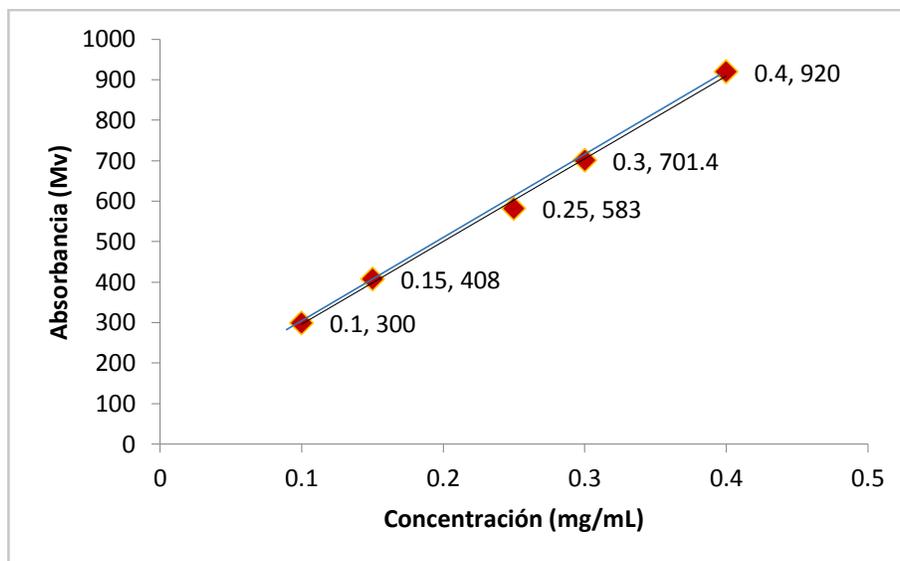


Figura 5.30. Curva estándar de la zaluzanina A a diferentes concentraciones.

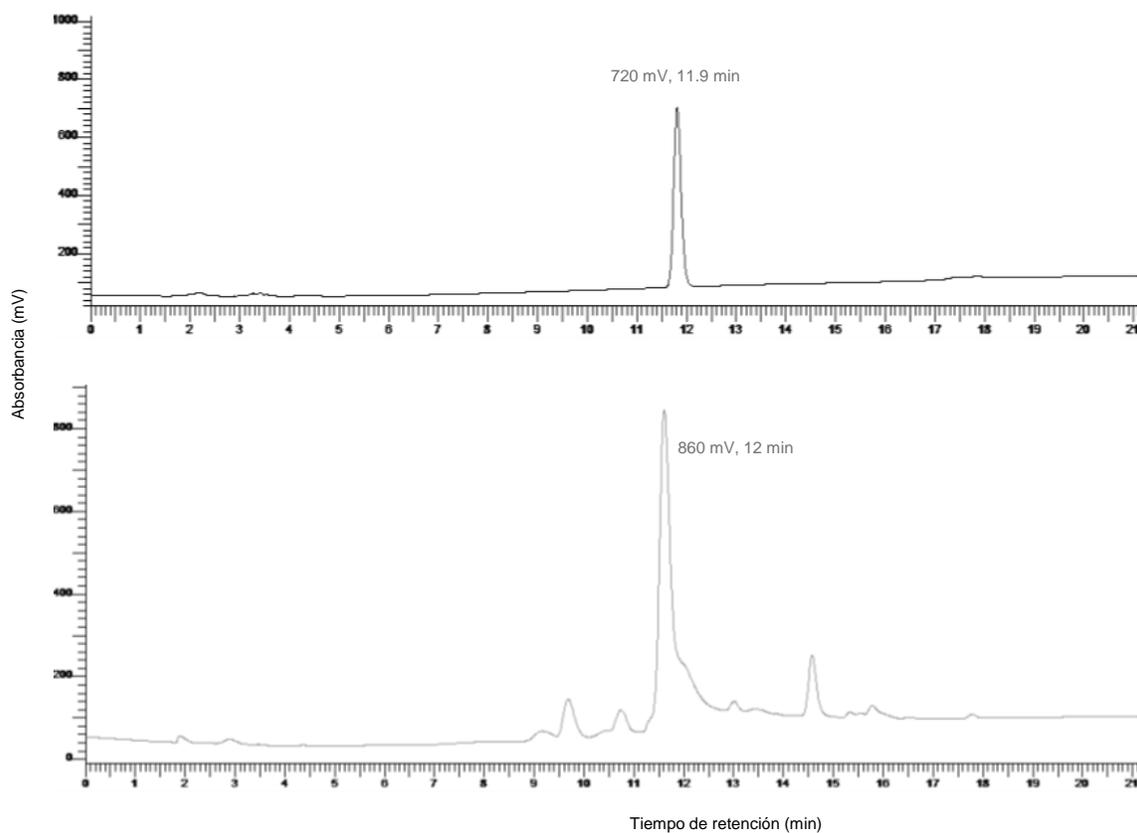


Figura 5.31. Cromatogramas del estándar (arriba,  $c = 0.3 \text{ mg/mL}$ ) y de la muestra problema (parte AcOEt del té de *Z. augusta*)

Los resultados obtenidos indicaron que en tal cantidad de infusión (té, 250 mL) de la parte aérea de *Zaluzania augusta* (2.5 g) contiene 26 mg de las zaluzaninas.



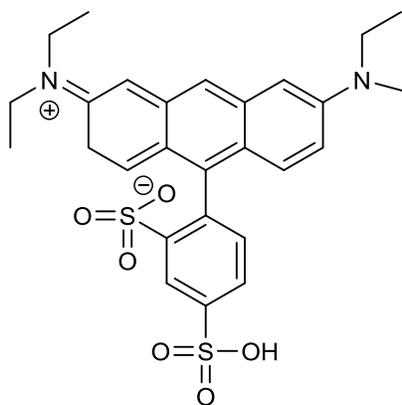
**Figura 5.32.** Análisis de *Z. augusta* por HPLC conteniendo 26 mg de lactonas.

## 5.8 Ensayos de citotoxicidad y actividad antiinflamatoria del extracto de AcOEt de *Zaluzania augusta*

### 5.8.1 Determinación de la actividad citotóxica

#### 5.8.1.1 Ensayo de sulforrodamina B (SRB)

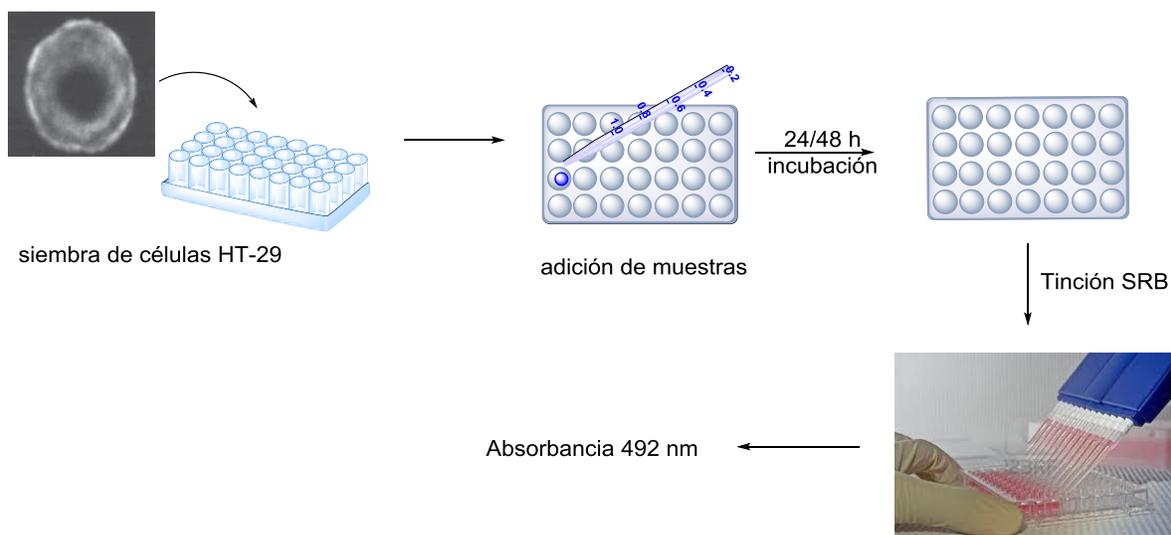
La actividad citotóxica del extracto de AcOEt se determinó mediante el ensayo con sulforrodamina B (SRB) (Figura 5.33), el cual es un compuesto de color rosa, poseedor de dos grupos sulfónicos ( $-\text{SO}_3^-$ ) cargados negativamente, con la capacidad de unirse electrostáticamente a cationes, en este caso, a los aminoácidos básicos de proteínas de células vivas. En esta prueba se asume que la cantidad de proteínas medida en el estudio es directamente proporcional a la cantidad de células viables, expresada en porcentaje.



**Figura 5.33.** Estructura de sulforrodamina B.

El ensayo se realizó sobre placas estériles de 96 pocillos con densidad de 5,000 células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) por pocillo, la concentración de la muestra fue de < 0.05% en DMSO. Después de 24 horas de la siembra de células en la placa, se adicionó la muestra a ensayar, a partir de ese momento se incubó por 48 y 72 horas. Una vez transcurrido el tiempo las células se fijaron con

ácido tricloroacético al 50% por una hora a 4°C, luego se eliminó el ácido tricloroacético mediante 5 lavados de las placas con agua desionizada, se adicionó sulforrodamina B y dejó en reposo durante treinta minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de SBR mediante cinco lavados con agua destilada; finalmente se adicionó una solución amortiguadora conocida como tampón TRIS para la solubilización de las proteínas unidas a SRB, y entonces proceder a la determinación de la absorbancia a 492 nm. A mayor absorbancia, mayor cantidad de proteína. El ensayo se realizó por triplicado y se probó con concentraciones de la sustancia que fueron de los 18 µg/mL hasta 15.65 µg/mL.



**Figura 5.34.** Determinación de la actividad citotóxica en sustancias químicas frente a células HT-29 mediante la técnica SRB.

En la tabla 5.8 se muestran los resultados de la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>), es decir la concentración a la que la muestra ensayada impide el crecimiento de las células cancerígenas en un 50%, tanto a 48 como a 72 horas.

**Tabla 5.8.** IC<sub>50</sub> del extracto de AcOEt de *Z. augusta*, ensayo de tinción de SRB en células HT-29.

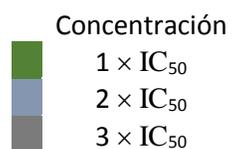
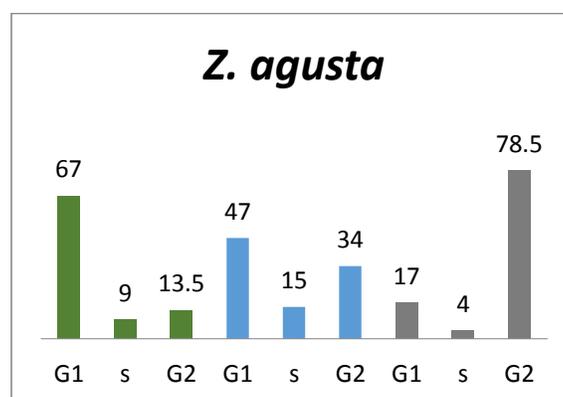
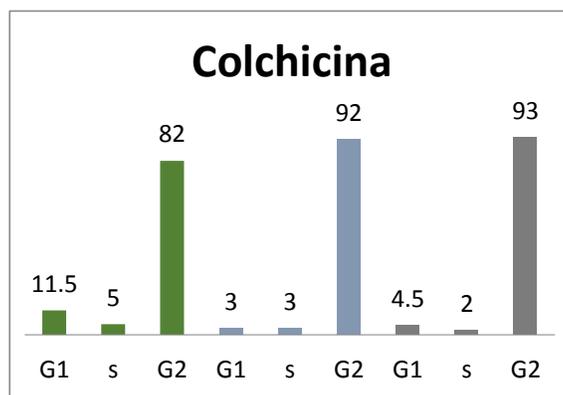
IC <sub>50</sub> a 48 h de incubación (µg/mL)			Promedio
18.00	18.04	17.68	<b>17.91 (± 0.14)</b>
IC <sub>50</sub> a 72 h de incubación (µg/mL)			
15.76	15.65	16.18	<b>15.86 (± 0.16)</b>

### 5.8.1.2 Análisis del ciclo celular

El análisis para determinar el arresto del ciclo celular se llevó a cabo con la intención de conocer de manera preliminar el mecanismo de la actividad citotóxica de las muestras, y se determinó mediante citometría de flujo.

Las células de HT-29 fueron sembradas en placas de 6 pocillos (700,000 – 800,000 células) dejándolas 24 horas a 37 °C, posteriormente se trataron con el extracto de AcOEt de *Z. augusta*. Después al tratamiento, fueron lavadas con PBS (0.5 mL) y colectadas con tripsina-EDTA (0.25%) para ser centrifugadas (1500 rpm a 10 °C) durante 5 minutos, seguido de suspensión en etanol (70%) y nuevamente en reposo de 24 horas a –20 °C. transcurrido el tiempo, se agregó ARNasa (20 µL) con incubación de 3–4 días a 4 °C, finalmente se agregó yoduro de propilo (50 µl) por 30 minutos para su posterior análisis en el citómetro de flujo. Se realizaron 10,000 conteos de la muestra, así como las distribuciones de porcentaje de células en cada fase. En este estudio se utilizó la colchicina como control positivo.

Los resultados mostraron que a una concentración de tres veces la IC<sub>50</sub> comienza a detener el ciclo celular en la fase G2, las células ya no son capaces de dividirse y detienen su proliferación (Grafica 5.1).



**Gráfica 5.1.** Comparación de IC<sub>50</sub> (3 ×) de colchicina y el extracto de AcOEt de *Z. augusta* en cada fase.

## 5.8.2 Determinación de la capacidad inhibitoria del Factor Necrótico Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

Este ensayo se realizó con la intención de saber si el extracto de *Z. augusta* presenta actividad antiinflamatoria.

La producción de la citosina TNF- $\alpha$  se analizó a partir de los sobrenadantes procedentes del cultivo de la línea celular THP-1 de monocitos humanos diferenciados a macrófagos mediante la adición de 200 nM de miristato acetato de forbol (PMA) e incubados por 24 horas con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) 1  $\mu$ g/mL. La cuantificación se realizó mediante ELISA (Figura 5.32) a partir de un Kit comercial (eBiosciences™) el cual consiste en el uso de una placa de adsorción de 96 pocillos en los cuales se adhieren anticuerpos específicos de TNF- $\alpha$  y posterior adición de los macrófagos, de este modo, la citoquina de interés se une específicamente a los anticuerpos.

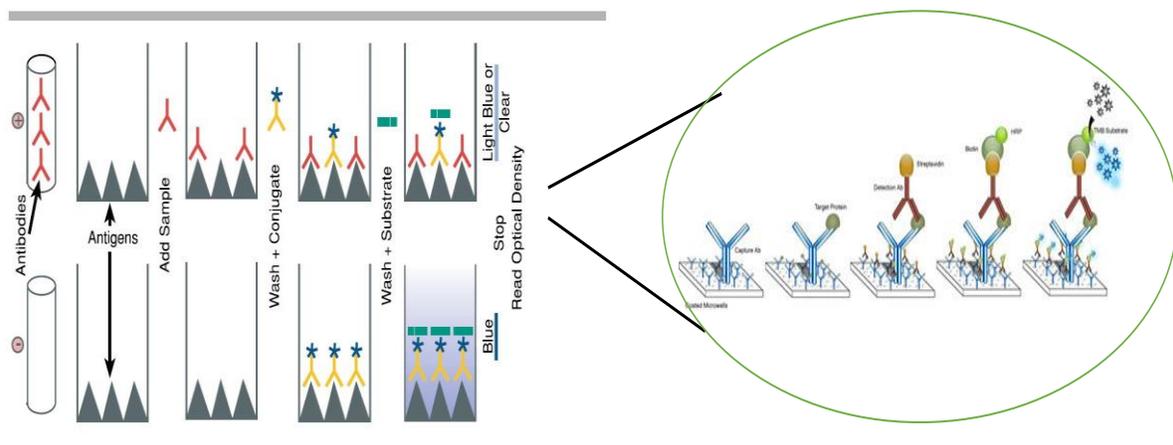


Figura 5.35. Representación esquemática del ensayo ELISA.

La medición de la absorbancia fue a 450 nm y la cantidad de citosina se obtuvo tras la realización de una recta de calibrado construida con concentraciones crecientes de TNF- $\alpha$ .

La medición de IC<sub>50</sub> e IC<sub>95</sub> en macrófagos para medir la expresión de TNF- $\alpha$  a 72 horas fue de 37.25 y 7.45  $\mu$ g/mL, respectivamente. Con la estimación de IC<sub>95</sub>, se estableció las concentraciones de 10 y 5  $\mu$ g/mL, por lo tanto, el porcentaje de inhibición para 10  $\mu$ g/mL fue de 69% con un 88% de células vivas, y para 5  $\mu$ g/mL fue de 55% con un 98% de células vivas. Es decir, que la capacidad del extracto para disminuir la producción de la citosina TNF- $\alpha$  a un 55% y una concentración menor a 7.45  $\mu$ g/mL, permite la sobrevivencia de células THP-1 cercanas a 95%.

### 5.8.3 Determinación de la toxicidad aguda de *Zaluzania augusta*

La evaluación de la toxicidad aguda para obtener la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del extracto de acetato de etilo de la especie, se realizó mediante el método de Lorke, el cual se describe dos fases, la primera consiste en administrar dosis de 10, 100 y 1,000 mg/kg vía oral a 3 grupos de animales. Con respecto a los datos obtenidos, se seleccionan las dosis de la segunda fase, las cuales son dosis máximas 1,600, 2,900 y 5,000 mg/kg. Posteriormente a la administración vía oral, los animales son supervisados durante 14 días y se registra muerte o supervivencia, a los sobrevivientes se les sacrifica y se observan los órganos de la cavidad abdominal y torácica comparando con un grupo control (Lorke, 1983).

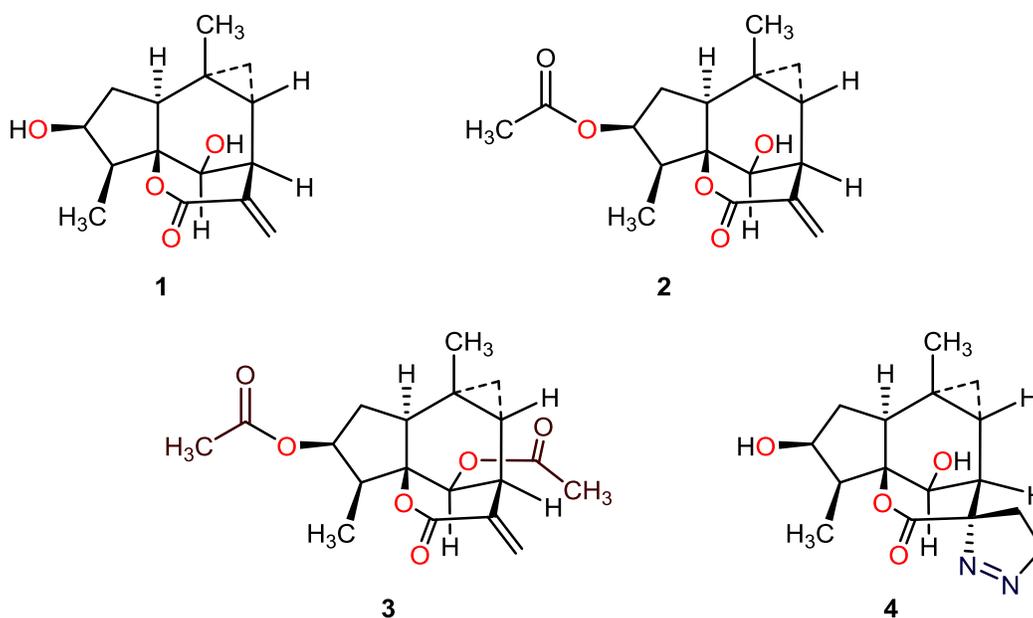
La tabla 5.9 indica la DL<sub>50</sub> de la segunda fase de toxicidad aguda, con un valor de 3,000 mg/Kg, en comparación con la escala de toxicidad de Hodge y Sterner el extracto se considera ligeramente tóxico para humanos con una concentración de 5–15 g/Kg (Gosselin, *et al.*, 1984).

**Tabla 5.9.** Resultados de segunda fase de dosis.

Dosis/Kg de peso	1,600 mg	2,900 mg	5,000 mg	DL <sub>50</sub>
Mortalidad/Total	0/3	1/3	3/3	3,000 mg

## 6. CONCLUSIONES

- La evaluación de la actividad citotóxica de la parte extraída con AcOEt del té frente a células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) mostró una  $IC_{50}$  de 17  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el ensayo de toxicidad en modelos de ratones indicó que este extracto es prácticamente inofensivo para el consumo humano. Lo anterior reveló que, si bien el extracto no tiene una potencia muy alta comparado con las actuales drogas citotóxicas, si podría emplearse para combatir el cáncer de colon.
- El estudio de la actividad antiinflamatoria del extracto de AcOEt reveló un alto grado de actividad inhibitoria de la citocina proinflamatoria,  $\text{TNF-}\alpha$ , inhibiendo cerca del 80% de la producción a una concentración de 7.45  $\mu\text{g/mL}$ . Por lo tanto, el extracto posee actividad antiinflamatoria significativa y es una fuente importante de productos naturales antiinflamatorios.
- La separación mediante técnicas cromatográficas del extracto de acetato de etilo del té, condujo al aislamiento y caracterización de las lactonas sesquiterpénicas conocidas: zaluzanina A (**1**) y B (**2**), siendo **1** el compuesto mayoritario. La caracterización de estos dos compuestos se determinó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, principalmente RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D, rayos-X y por comparación con datos descritos.
- Los tratamientos de zaluzanina A (**1**) con anhídrido acético/piridina y con diazometano, permitieron obtener sus derivados diacetilado (**3**) y la pirazolina (**4**), respectivamente.



- La cristalización de la lactona **1** y la pirazolina **4** permitió su estudio por difracción de rayos-X, lo cual condujo a determinar la configuración relativa y absoluta, mediante la evaluación de los parámetros de Flack y Hooft. Adicionalmente, se determinó la configuración absoluta del derivado diacetilado **3** mediante cálculos teóricos, utilizando DFT//B3LYP/DGDZVP, corroborando la configuración absoluta de las sustancias **1–4**. De acuerdo con lo anterior, se estableció la configuración absoluta del nuevo centro quiral C-11 en la pirazolina de zaluzanina A (**4**) como S.
- Finalmente, se cuantificaron las lactonas sesquiterpénicas en la infusión de la parte aérea mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Este resultado nos permitió conocer que tal cantidad del té (2.5 g en 250 mL) contiene aproximadamente 26 mg de las lactonas (1.04%), las cuales son posiblemente las responsables de las propiedades citotóxicas y antiinflamatorias presentadas por el extracto.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1 Generalidades

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando gel de sílice 60, Merk, 0.04-0.063 mm (Aldrich, 230-400 mesh ASTM) en columnas de vidrio de 5, 2 y 1 cm de diámetro interno por 40 y 60 cm de largo. La separación mediante cromatografía en placa fina se realizó en cromatofolios de gel de sílice sobre Aluminio de 1 x 5 cm y 2 x 5 cm, usando como revelador sulfato cérico amoniacal. Las rotaciones ópticas se determinaron en etanol en un polarímetro Perkin-Elmer 341. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer serie 200 usando una columna de fase reversa Alltech C18 de 250 x 4.6 mm en un sistema MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B), gradiente 100% de A – 100% de B, en un tiempo de 30 minutos, a velocidad de flujo 1.0 mL/min, empleando un detector UV-visible 213 nm y 25 °C. Los espectros de <sup>1</sup>H (400 MHz) y de <sup>13</sup>C (100 MHz), así como el espectro COSY, HSQC y HMBC se determinaron en un equipo Varian 400, usando como disolvente CDCl<sub>3</sub>, MeOH-d<sub>4</sub> y D<sub>2</sub>O teniendo como referencia interna TMS. Los datos de rayos-X se colectaron en un difractómetro Agilent Xcalibur Atlas Gemini con radiación monocromática de CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ ) a 293 K en el  $\omega$  modo de captura. Los refinamientos de la celda unitaria se obtuvieron con CrysAlisPro, software Agilent Technologies, Version 1.171.34.49. La resolución de las estructuras se llevó a cabo por métodos directos usando el programa SHELXS-97, incluyendo el software cristalográfico WinGX v1.70.01. Para el refinamiento estructural, los átomos diferentes de hidrógeno se trataron anisotrópicamente, y los átomos de hidrógeno, que se incluyeron en el cálculo del factor estructura, fueron refinados isotrópicamente.

## 7.2 Recolección e identificación de la especie

*Zaluzania augusta* (Lag.) Schultz Bip. (Compositae) se colectó en agosto de 2011 y septiembre de 2012 en la comunidad de Nopalillo, municipio de Epazoyucan, Hidalgo. Un ejemplar de la especie está depositado en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo (JM Torres-Valencia 140), donde el Prof. Manuel González Ledesma identificó el material vegetal.

## 7.3 Obtención del té y extracto de Acetato de etilo de *Zaluzania augusta*

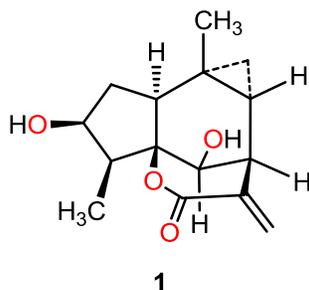
La planta se dejó secar a la sombra por 20 días, posteriormente se separó en parte aérea (flores y hojas) y raíz. La parte aérea (700 g) se molió y se sometió a decocción (2.5 L de H<sub>2</sub>O dest.) por 30 minutos a 70 °C. El producto de decocción se filtró y se extrajo con AcOEt (1 L) para obtener el extracto correspondiente (4g).

## 7.4 Separación del extracto de acetato de etilo del té de la parte aérea de *Zaluzania augusta*

El extracto de AcOEt (3 g) se sometió a separación cromatográfica en columna usando gel de sílice y como eluyente mezclas de hexano–AcOEt (2:3, 3:7, 1:3 y 1:4). Se colectaron cinco fracciones gruesas, las cuales se monitorearon por cromatografía en capa fina y fueron etiquetadas como **A** (326 mg, 10.86%), **B** (300 mg, 10%), **C** (184 mg, 6.1%), **D** (39 mg, 1.3%) y **E** (13 mg, 0.43%). Con la finalidad de obtener más extracto para los usos siguientes, el proceso (decocción y separación cromatografica) se repitió 6 veces.

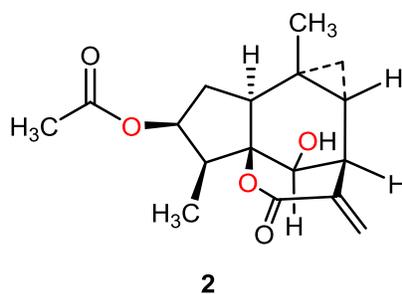
## 7.5 Obtención de la zaluzanina A (1)

La fracción A y B (626 mg, 21%) se sometió a purificación mediante cromatografía en columna, usando gel de sílice y hexano–AcOEt 200 mL (1:1, 2:3 y 3:7) como eluyente. Se colectaron 10 eluatos de 20 mL, los cuales se analizaron por CCF. Este procedimiento condujo a la obtención de un precipitado blanco (zaluzanina A; 180 mg), el cual fue cristalizado de acetona–CHCl<sub>3</sub> (2:1). El proceso se repitió con las fracciones C y D, y con el propósito de obtener mayor cantidad de la zaluzanina A se procedió a reproducir el método 3 veces más. La caracterización se llevó a cabo mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en 1D y 2D (Figuras 5.3–5.7), así como difracción de rayos–X (Figura 5.22).



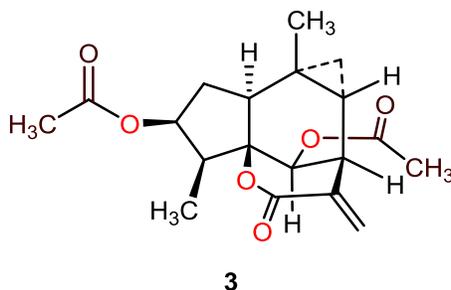
## 7.6 Obtención de la zaluzanina B (2)

Un nuevo lote de la parte aérea de la especie se sometió a decocción (100 g en 1 L de H<sub>2</sub>O dest.). El producto se filtró y se extrajo con AcOEt (1 L) para obtener la parte AcOEt (2.1 g). La parte de AcOEt (2.0 g) se sometió a separación mediante cromatografía en columna usando gel de sílice y hexano-isopropanol (4:1) como eluyente. Se colectaron 40 fracciones, las cuales se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF). De las fracciones 20 y 21 se obtuvo a la zaluzanina B (10 mg). Con el objetivo de obtener mayor cantidad del compuesto, las demás fracciones fueron sometidas a purificación en hexano–AcOEt (2:3, 150 mL), obteniendo la zaluzanina B (54 mg, 2.7%). La caracterización se llevó a cabo mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en 1D y 2D (Figuras 5.9–5.12).



### 7.7 Obtención del diacetato de la zaluzanina A (**3**)

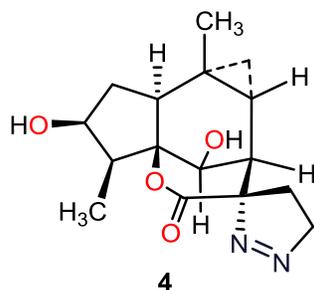
Una muestra de zaluzanina A (148 mg) se sometió a reacción con anhídrido acético (0.75 mL) y piridina (0.75 mL) por 4 horas en baño de vapor. Posteriormente se extrajo con AcOEt, se lavó con HCl (4 x 5 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 x 5 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó en el rotavapor. Esta muestra se analizó mediante CCF y RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en 1D y 2D (Figuras 5.14–5.16), confirmando la estructura del diacetato de la zaluzanina A (**3**) (130 mg, 88%).



### 7.8 Pirazolina de la zaluzanina A (**4**)

Una muestra de zaluzanina A (100 mg) en metanol (2 mL) fue sometida a reacción con diazometano (10 mL) (preparado con 1g de *N*-nitrosometilurea) por 12 horas a 4 °C. Posteriormente se evaporó el disolvente a sequedad bajo una corriente de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente. El producto se cristalizó de acetona–Et<sub>2</sub>O obteniendo

prismas incoloros. El compuesto se caracterizó por medio de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D (Figuras 5.18–5.21), así como por difracción de rayos-X (Figura 5.23).



## 7.9 Modelado molecular

Las optimizaciones de energía para el diacetato de la zaluzanina A (**3**) se realizaron por medio de mecánica molecular (MMFF94) con el programa Spartan'04. Primeramente se llevó a cabo una búsqueda conformacional usando el método Monte Carlo y considerando un corte de energía de 10 kcal/mol. La energía de punto simple de los conformeros encontrados dentro del rango  $E_{mmff}$  0–10 kcal/mol se calculó con el nivel de teoría DFT B3LYP/6-31G(d) con el programa Spartan'04. Los conformeros dentro del rango 0–5 kcal/mol se optimizaron con B3LYP/DGDZVP empleando el programa Gaussian 03W. Los espectros calculados de IR y DCV de las estructuras de mínima energía se determinaron a 298 K y a 1 atmósfera de presión. El tiempo de cálculo computacional osciló entre 17 y 24 h para cada conformero cuando se utilizaron computadoras operando a 3 GHz y 8 Gb de memoria RAM.

### 7.10 Cuantificación por HPLC de lactonas en el té de la parte aérea de *Z. augusta*

La parte aérea seca y molida (2.5 g) se sometió a una infusión con H<sub>2</sub>O dest. (250 mL) por 15 minutos, dando una solución de color verde oscuro que se filtró y se extrajo con AcOEt (250 mL). La fase orgánica se concentró en el rotavapor para obtener un residuo (50 mg), el cual se analizó por triplicado mediante HPLC para determinar las zaluzaninas. La cuantificación se llevó a cabo mediante la comparación de la curva estándar obtenida usando diferentes concentraciones de una muestra auténtica de la zaluzanina A. Así, se preparó una solución madre con 5 mg, se aforó a 5 mL en MeOH y de esta solución se prepararon 5 soluciones a diferentes concentraciones, como se muestra a continuación.

Muestra	1	2	3	4	5
Concentración mg/mL	0.1	0.15	0.25	0.3	0.4

### 7.11 Estudios biológicos

Los estudios de citotoxicidad del extracto de AcOEt se realizaron con células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29). En los ensayos de actividad antiinflamatoria se utilizaron macrófagos diferenciados de monocitos de la línea celular THP-1. Para evaluar la toxicidad aguda se usaron ratones CD-1 macho con un peso entre 30–40 g. Se utilizó un incubador de CO<sub>2</sub> modelo UN-4750-E US Auto Flow para el almacenamiento de células en ensayo. Así como una centrifuga marca Beckman Coulter modelo Allegra X-22-R para la sedimentación de las células. La medición de la actividad proapoptótica se realizó en un citómetro analizador flexible Beckman Coulter modelo CYTOMICS FC-500 MPL y se determinó usando un kit comercial de Annexin-V-Human Apoptosis Detection Kit de eBioscience Diagnostics. La actividad antiinflamatoria se determinó utilizando

un kit comercial de TNF- $\alpha$  humano diferenciados a macrófagos marca eBiosciences TM.

El estudio de toxicidad aguda en ratones fue realizado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para producción, cuidado y uso de los animales en el laboratorio. Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura a 22–24 °C, doce horas de luz de día y doce de oscuridad, alimentación controlada y suministrada por el Bioterio de la UAEH.

## 8. REFERENCIAS

- Abdallah A.O., Taha M.S., Saad M.K., Yousef E.I., Michael G. (1984). Guaianolides from *Cynara sibthorpiana*. *Phytochemistry* 23, 2381–2382.
- Aguilar A., Camacho J.R., Chino S., Jácquez P., López M.E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, pp 253.
- Andzelm J., Wimmer E. (1992) Density functional Gaussian-type-orbital approach to molecular geometries, vibrations, and reaction energies. *The Journal of Chemical Physics* 96, 1280–1303.
- Bresciani L., Yunes R., Bürger C., De Oliveira L., Bof K., Cechinel-Filho V. (2003). Seasonal Variation of Kaurenoic acid, a Hypoglycemic Diterpene Present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Zeitschrift Naturforsch.* 59, 229–232.
- Cedron J. C. (2008). Métodos para determinar la configuración absoluta de una molécula. *Revista de Química*. Pontificia Universidad Católica del Perú. 22, 19–31.
- CONABIO (2012). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/zaluzania-augusta/fichas/ficha.htm>. Ingreso: 9 de Febrero de 2014.
- Debie E., De Gussem E., Dukor R.K., Herrebout W., Nafie L.A., Bultinck P. (2011) A confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism or Raman optical activity. *ChemPhysChem* 12, 1542–1549.
- Dewick P. M. (2009). Medicinal natural products. A biosynthetic approach. United Kingdom. Wiley, pp. 247.

- Díaz E., Nava J., Barrio H., Quiroz B., Guzman A., León L., Fentes A. (1998). 2D H and C NMR evidence for stereoselective formation of a new bond C-N, C-S or C-C in the reaction of ivalin acetate with substituted pyrimidines. *Spectrochimica Acta Part A*, 54, 567–574.
- Dolomanov O.V., Bourhis L.J., Gildea R.J., Howard J.A.K., Puschmann H. (2009) OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*, 42, 339–341.
- Freire Fierro, A. (2004). Botánica Sistemática Ecuatoriana. Missouri Botanical Garden, FUNDACYT, QCNE, RLB y FUNBOTANICA. Murray Print, St. Louis, Missouri, pp122–123
- Fischedick J.T., Pesic M., Podolski-Renic A., Bankovic J., De Vos R., Perić M., Todorović S., Tanic N. (2012). Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from *Inula Britannica* on human cancer cell lines. *Phytochemistry Letters*, 6, 246–252.
- Flack HD, Bernardinelli G. (2008). The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. *Chirality*, 20, 681–690.
- Ginotra K.S., Friest J.A., Berkowitz D.B. (2011). Halocarbocyclization entry into the oxabicyclo [4.3.1]decyl exomethylene-d-lactone cores of linearifolin and zaluzanin A: exploiting combinatorial catalysis. *Organic Letters* 14 (4), 968–971.
- Godbout N., Salahub D.R., Andzelm J., Wimmer, E. (1992) Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Canadian Journal of Chemistry*, 70, 560–571.
- Gómez-Hurtado M. A., Torres-Valencia J. M., Manríquez-Torres J.J., Del Río R. E., Motilva V., García-Mauriño S., Ávila J., Talero E., Cerda-García-Rojas C., Joseph-Nathan P. (2011). Absolute configuration of labdanes and ent-clerodanes from *Chomolaena pulchella* by vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*, 72, 409-414.
- Gosselin R. E., Smith R. P., Hodge H.C., Braddock J.E. (fecha de acceso: 2014, 10 de marzo). Clinical Toxicity of Commercial Products. [En red]. (Fecha de

- trabajo original: 1984). Disponible en: <http://www.chemistryexplained.com/Te-Va/Toxicity.html#ixzz2x5iNCmfM>.
- Hodge H.C., Sterner J.H. (1949). Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, 10, 94-97.
- Hooft R.W.W., Straver L.H., Spek A.L. (2008) Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. *Journal of Applied Crystallography*, 41, 96–103
- Höltje HD, Folkers G. (1996) In Molecular Modeling. Basic Principles and Applications; Mannhold R, Kubinyi H, Timmerman H. Eds., Methods and Principles in Medicinal Chemistry, VCH: Weinheim, Vol. 5, capítulo 2, pp 29.
- Huacuja R., Carranco A., Guzmán S., Guerrero C. (1993). Inactivation of SH groups with sesquiterpene lactones: effects on nuclear decondensation pattern / motility induced by heparin in human spermatozoa. *Advanced Contraception. Delivery. Systems*, 9, 97.
- Juárez B.I., Jasso P.Y., Aguirre R.J., Pineda J. (2010). Efecto de polvos de asteráceas al gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* motsch). *Polibotánica*, 30, 123–135.
- Julianti T., Hata Y., Zimmermann S., Kaiser M., Hamburger M., Adams M. (2011). Antitrypanosomal sesquiterpene lactones from *Saussurea costus*. *Fototerapia* 82, 955–959.
- Katinas L., Gutiérrez D.G., Grossi M. A., Crisci J.V. (2007). Panorama de la familia Astereceae (=Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42 (1-2), 113–129.
- Kaiser-Bunbury C. N., Valentin T., Mougil J., Matatiken D., Ghazoul J. (2010). The tolerance of island plant-pollinator networks to alien plants. *Journal of ecology*, 99 (1), 202–213.
- Krishna Kumari G.N, Masilamani S., Ganesh M.R., Aravind S., Sridhar S.R. (2003). Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from *Veronia arborea*. *Fitoterapia*, 74, 479–482.
- Krishna Kumari G.N, Masilamani S., Ganesh M.R., Aravind S., Sridhar S.R. (2002). Microbial transformation of zaluzanin D. *Phytochemistry*, 62, 1101–1104.

- Lévai A., Simon A., Jenei A., Kálmán G., Jekö J., Tóth G. (2009). Synthesis of spiro-1-pyrazolines by the reaction of exocyclic  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -unsaturated ketones with diazomethane. *ARKIVOC*, xii, 161 – 172.
- Lozoya X., Lozoya M. (1982). Flora Medicinal de México. Primera parte. Plantas Indígenas, IMSS, México, pp 18.
- Lorke D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology* 54 (4), 275–287.
- Macias F.A., Galindo J.G., Molinillo J., Castellano D. (2000). Dehydrozaluzanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. *Phytochemistry* 54, 165–171.
- Manríquez-Torres J.J., Torres-Valencia J.M., Velázquez-Jiménez R., Valdez-Calderón A., Alvarado-Rodríguez J.G., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P. (2013). A macrocyclic dimeric diterpene with a  $C_2$  symmetry axis. *Organic Letters*, 15 (18), 4658-4661.
- Martinez M. (1987). Las plantas medicinales de México. D.F., México. Editorial Botas, pp 430.
- The Plant List (2013) A working list of all plant species. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Zaluzania>. Ingreso: 10 de febrero 2014.
- Rakotonandrasana O.L., Raharinjato F.H., Rajaonarivelo M., Dumontet V., Martin M.T., Bignon J., Rasoanaivo P. (2010). Cytotoxic 3,4 – seco – Atisane Diterpenoides from *Croton barorum* and *Croton goudotti*. *Journal Natural Products*, 73, 1730 – 535.
- Rocha L.G., Alemida J. R., Macedo R.O., Barbosa-Filho J.M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12, 514 – 535.
- Romo de Vivar R.A., Cabrera A., Ortega A., Romo J. (1966). Constituents of *Zaluzania augusta* species II structures of zaluzanin C and zaluzanin D. *Tetrahedron*, 23, 3903–3907.
- Tapia M.J. (2010) La familia Asteraceae. *Herbario CICY*, 2, 82-84. [http://www.cicy.mx/sitios/desde\\_herbario/2010/diciembre/la-familia-asteraceae](http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/2010/diciembre/la-familia-asteraceae). Ingreso: 23 de Enero de 2014.

- Turner B. (2012). Recension of the Mexican species of *Zaluzania*. (Asteraceae: Heliantheae). *Phytologia*, 94 (3), 316-333.
- Spring O., Buschman H., Vogler B., Schilling E., Spraul M., Hoffmann M. (1994). Sesquiterpene Lactone Chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR Measurements. *Phytochemistry*, 39 (3), 609-612.
- Toscano R., Nava J., Guerrero C., Guzmán A., Díaz E. (1997). Absolute structure of zaluzanine A and B. *Journal of Chemical Crystallography*, 27 (8), 457–463).
- Van Casteren M.R., Jankowski C.K., Reyes Chilpa R., Jimenez-Estrada M., Campos M.G., Zarazua-Loza M., Lesage D. (2008). X-ray and high-resolution  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of smooth muscle relaxant sesquiterpene lactones. *Canadian Journal of Chemistry*, 86, 1077–1084.
- Valdez-Calderón A., Torres-Valencia J.M., Manríquez-Torres J.J., Velázquez-Jiménez R., Román-Marín L.U., Hernández-Hernández J.D., Cerda-García-Rojas C.M., Joseph-Nathan P. (2013) An unusual diepoxyguaianolide from *Stevia tomentosa*. *Tetrahedron Letters*, 54, 3286–3289.
- Velázquez-Jiménez R., Torres-Valencia J.M., Cerda-García-Rojas C. M., Román-Marín L.U., Manríquez-Torres J.J., Gómez-Hurtado M.A., Valdéz-Calderon A., Motilva V., Gracia-Mauriño S., Talero E., Ávila J., Joseph-Nathan P. (2011). Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursela fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*, 72, 2237-2243.
- Villa-Ruanao N., Pacheco-Hernández Y., Lozoya- Gloria E., Rubio-Rosas E., Ruiz-González N., Martinez-Orea Y., Cruz-Duran R., Ramirez- Garcia A., Ramon-Candúl G. (2013). Constituyentes lipofílicos y algunas actividades biológicas de los extractos hexánicos de *Zaluzania mantagninifolia* (SCH. BIP) SCH. BIP: (ASTERACEAE). *Agrociencia*, 47 (4), 335-346.
- Yabuta G., Olse J., Mabry T. (1978). Sesquiterpen lactones from the genus *Zaluzania* (Compositae: Heliantheae). *Revista Latinoamericana de Química.*, 9, 83-85.