



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Estudio por modelado y anclaje molecular de la amida
preparada a partir del ácido 2-hidroxiéperuico.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

LUIS JAVIER CALVILLO CARRANZA

ASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD
DE FARMACOLOGÍA HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ

Morelia, Michoacán, enero de 2016

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA MEDICINAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D. C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ. PROYECTO REALIZADO CON APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CIC-UMSNH Y CONACYT CIENCIA BÁSICA (167952).

PARA ELEAZAR CARRANZA HUERTA, MI MADRE

Por todo el cariño y amor que me has brindado, por el esfuerzo realizado, no sólo durante mis estudios de licenciatura si no también durante toda tu vida. Lo cierto es que nada por lo que hemos luchado ha sido fácil, hemos tenido tropiezos y caídas una y otra vez, algunas veces fue muy difícil levantarse, otras veces nada parecía estar a favor pero siempre tuviste el coraje y el valor de llevarme por el buen camino, de enseñarme lo que es la humildad e inculcarme buenos principios y valores. Gracias porque es algo que no se compra en la vida, ni se aprende de la noche a la mañana, es algo que con trabajo, esfuerzo y disciplina de todos los días se va forjando y tu tuviste la paciencia de hacer de mí una persona de bien, solo sé que mientras Dios me preste vida estaré agradecido contigo. Pues no me queda más que decirte gracias por ser una excelente madre, por ser la protagonista de todos mis éxitos, por ser el ancla que me mantiene con los pies sobre la tierra. Por todo, porque con tu gran esfuerzo este proyecto de vida el cual es nuestro proyecto, nuestro logro, ahora es posible.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme siempre por el buen camino, por permitirme estar siempre en los momentos correctos con las personas correctas, y por darme la oportunidad de ver realizados mis proyectos.

A mi Papá, por esforzarse día a día para ser mejor padre para mí y mis hermanos. Sé que no ha sido fácil, pero nadie nace sabiendo ser padre, Valoro el gran esfuerzo que hace y le agradezco por enseñarme el valor del trabajo y a afrontar la vida e inculcarme a dar ese extra que se necesita para sacar el trabajo adelante.

A mis hermanos Carlos y Dany, por su gran cariño, apoyo y confianza que me han brindado toda la vida y durante esta larga trayectoria de mi preparación académica. Aunque soy el mayor me he aprendido de ustedes y con ustedes. También les agradezco por todas las alegrías que me han brindado. Me considero afortunado de tenerlos.

A mis abuelos, Heraclio Carranza Ambríz y Encarnación Huerta Flores, por todas las bendiciones que me dan al momento de salir de casa.

A mis tíos, Fernando Carranza Huerta y Ofelia Carranza Huerta por su apoyo incondicional, que para mí tiene un gran valor, gracias por creer en mí.

A mis primos, Alejandro Carranza Mendoza, a Jorge Calvillo Carranza y Carelia Calvillo Carranza por su confianza y apoyo. Realmente me atrevo a decir que los considero mis hermanos.

Al Sax (Pablo Flores Cervantes) por la competitividad que siempre tuvimos, a Richi (Ricardo Salazar Gonzáles) por esas charlas interminables que aún llevo presentes, al Mostro (Rodrigo Bravo Remigio) por enseñarme a ponerle buena cara a los malos momentos, al Paisa (Emilio Coria) y al Ponchado (Enrique) por esos consejos que en su momento se necesitaron. Y a todos por ser mis compañeros, amigos, hermanos y formar parte de mi vida, por su cariño y confianza, por permitirme aprender de ustedes y con ustedes, por estar en las buenas y en las malas, por impulsarme a ser mejor. Me quedo con muy buenos recuerdos y me llevo un buen sabor de boca y aunque todos escogimos direcciones diferentes, se les quiere y se les sigue estimando. Y para lo que se ofrezca cuentan conmigo.

A Nanis y a Alex por los buenos momentos que pasamos en compañía y por todas las experiencias que compartimos juntos.

A Isa, a Gladis y a Damián, por su gran amistad que nunca me fue indiferente por hacer gratos todos los momentos que pasamos en el tiempo de nuestra formación como QFB'S.

A Ricardo Espino, por ser siempre un amigo en quien confiar y por esa sinceridad que te caracteriza.

A Lupita y Jourdan por ser buenos amigos y por las buenas convivencias.

A Críz y a Juanpa, por todas esas alegrías que compartieron conmigo.

A Pepe, a Baci y a Vago, por todos los momentos que pasamos en las canchas de fut bol, divirtiéndonos y sacando un poco de stress.

A Miriam y a Moni, primero que nada por su gran apoyo, por ser mis compañeras, amigas, por permitirme aprender de ustedes. Sólo puedo decir que son excelentes personas y forman un gran equipo.

A Juanjo, por su gran amistad, por el buen recibimiento durante mi llegada al Laboratorio de Química Medicinal, también por compartir parte de sus conocimientos durante mi estancia en el laboratorio y por ser mi compañero de tesis.

A David Calderón Rangel y a Luu Montiel, por ser dos amigos más con los cuales se puede contar.

Al M. C. Morán, mi enorme gratitud por su amistad, por todas las convivencias, por esas pláticas que se dan en su momento y por todos esos consejos que significan mucho para mí.

A mis revisores, el D. C. Juan Diego Hernández Hernández, la D. C. Rosa Elva Norma del Río Torres, la D. C. Luisa Urania Román Marín y el M. C. José Luis Salvador Hernández, por haberse dado el tiempo de revisar mi tesis.

A la D. Q. Lidia Beiza Granados, le agradezco el tiempo que se tomó para revisar mi tesis, también por su colaboración en mi proyecto, gracias a ello mis técnicas mejoraron significativamente, agradezco sus buenos consejos, pero realmente mi mayor gratitud es por su amistad.

A MI ASESOR, D. C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ

Primero que nada, agradezco la oportunidad que me ha dado de formar parte de su equipo de trabajo dentro del Laboratorio de Química Medicinal, también por la paciencia y el tiempo que se ha dado para compartirme gran parte de sus conocimientos, pero mi mayor gratitud es por su gran comprensión, confianza y apoyo que me ha brindado. Realmente ha sido un placer colaborar con usted y convivir. No me queda más que decir gracias por saber ser un líder dentro de la parte laboral y un amigo fuera de ella.

ÍNDICE

I. Símbolos, abreviaturas y acrónimos	Xi
II. Resumen	Xiii
III. Abstract	Xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Compuestos fenólicos	4
2.2. Glicósidos	5
2.3. Alcaloides	5
2.4. Terpenos	5
2.4.1. Diterpenoides	9
2.4.2. Actividad farmacológica de los diterpenos	10
2.4.3. Diterpeno tipo labdano	10
2.4.4. Actividad biológica de los labdanos	10
2.4.4.1. Actividad antibacterial y antiviral	10
2.4.4.2. Actividad antifúngica	12
2.4.4.3. Actividad citotóxica	13
2.5. El cáncer	14
2.6. Taxol®	14
2.7. Métodos de Química Computacional	16
2.7.1. Modelado molecular	16
2.7.2. Protocolo de Monte Carlo	16
2.7.3. Mecánica molecular	16
2.7.4. Teoría de funcionales de la densidad	16

2.8.	Familia Asteraceae	17
2.8.1.	Género <i>Ageratina</i>	17
2.8.2.	<i>Ageratina petiolaris</i>	17
2.8.3.	Preparación de la amida	19
2.9.	Microtúbulos	19
2.10.	Estudio de anclaje molecular proteína-ligando (Docking)	20
2.11.	Derivados de ácidos carboxílicos	21
2.11.1.	Cloruro de ácido	22
2.11.2.	Formación de anhídridos	22
2.11.3.	Formación de ésteres	23
2.11.3.1.	Esterificación de Fisher	23
2.11.3.2.	Esterificación por reacción de un anhídrido con un alcohol	23
2.11.3.3.	Por reacción de un anión carboxilato con halogenuro de alquilo	23
2.11.3.4.	Reacción de ácidos carboxílicos con diazometano	23
2.11.4.	Formación de amidas	24
2.11.4.1.	Por reacción de un ácido carboxílico con una amida	24
2.11.4.2.	Por reacción de una amina con éster	24
2.11.4.3.	Por hidrólisis parcial de un nitrilo	24
3.	JUSTIFICACIÓN	25
4.	OBJETIVOS	25
4.1.	Objetivo general	25

4.2. Objetivos específicos	25
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
5.1. Identificación del ácido 2 α -hidroxieperuico (2)	26
5.2. Preparación del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (3)	29
5.3. Preparación del éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico (5)	32
5.4. Preparación del cinamato 6 a partir del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (3)	35
5.5. Modelado de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico	39
5.6. Confórmeros de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico	40
5.7. Anclaje molecular de los derivados del diterpeno tipo <i>ent</i> -labdano	42
5.7.1. Anclaje molecular del éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico-tubulina	43
5.7.2. Anclaje molecular cinamato-tubulina	44
5.7.3. Anclaje molecular amida-tubulina	45
6. PROPUESTA TEÓRICA DEL DERIVADO 8	46
6.1. Preparación del derivado teórico 8	46
6.2. Modelado del derivado teórico 8	46
6.3. Confórmero del derivado teórico 8	47
6.4. Anclaje molecular del derivado teórico 8	48
7. CONCLUSIONES	49
8. PARTE EXPERIMENTAL	50
8.1. Generalidades	50
8.2. Obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico (2)	50
8.3. Preparación del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (3)	51

8.4. Preparación de éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico	52
8.5. Preparación del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (6)	53
8.6. Modelado molecular de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico	54
8.7. Estudio docking	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55
10. ANEXO	59

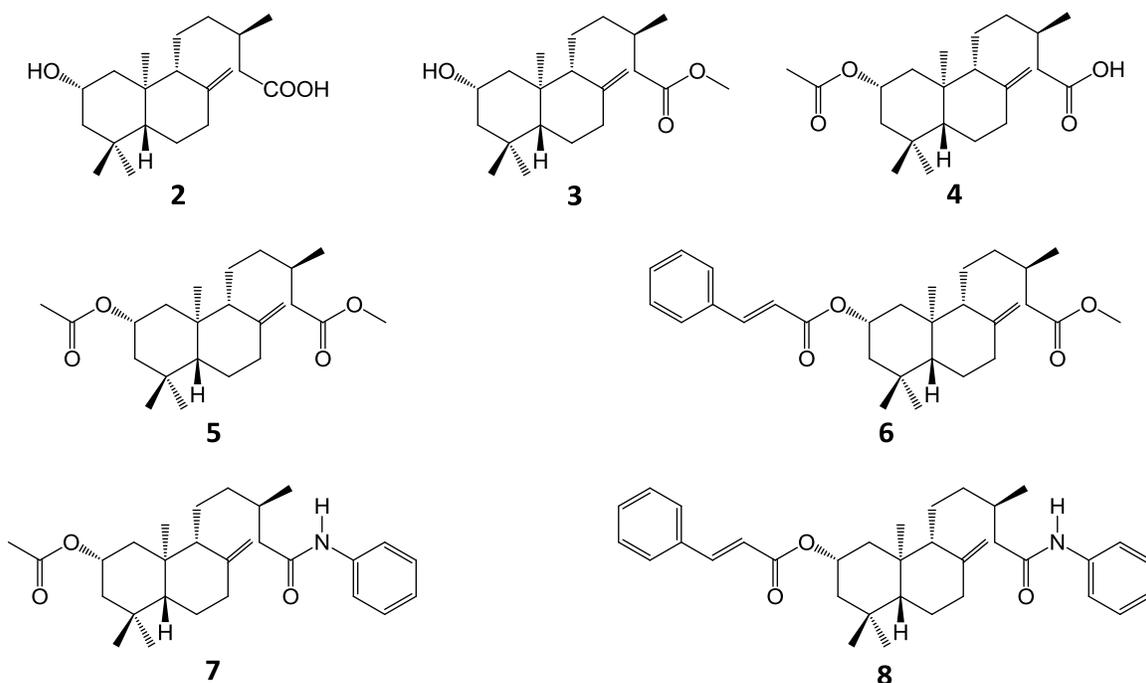
I. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcOEt	Acetato de etilo
a. de C	Antes de Cristo
°C	Grados Celsius
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DMAPP	Dimetilalil difosfato
FPP	Farnesil difosfato
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CHCl ₃	Cloroformo
Cm	Centímetros
COSY	Resonancia magnética de correlación homonuclear
DEPT	Resonancia magnética nuclear de carbono trece con mejora sin distorsión de polarización
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
G	Gramo
GGPP	Geranil geranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
HETCOR	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear
Hex	Hexano
HMBC	Resonancia magnética nuclear de coherencia heteronuclear a múltiples enlaces
Hz	Hertz
<i>i</i> -BCF	Cloroformiato de isobutilo
IR	Infrarrojo
IPP	Isopentil difosfato

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kcal	Kilocaloría
Kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MEP	Metileritritol fosfato
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
MMFF	Mecánica molecular
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NCI	Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América
NMM	<i>N</i> -Metilmorfolina
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
OMS	Organización Mundial de la Salud
p. f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Ultravioleta
V_{\max}	Frecuencia Máxima
δ	Desplazamiento químico
®	Marca registrada

II. RESUMEN

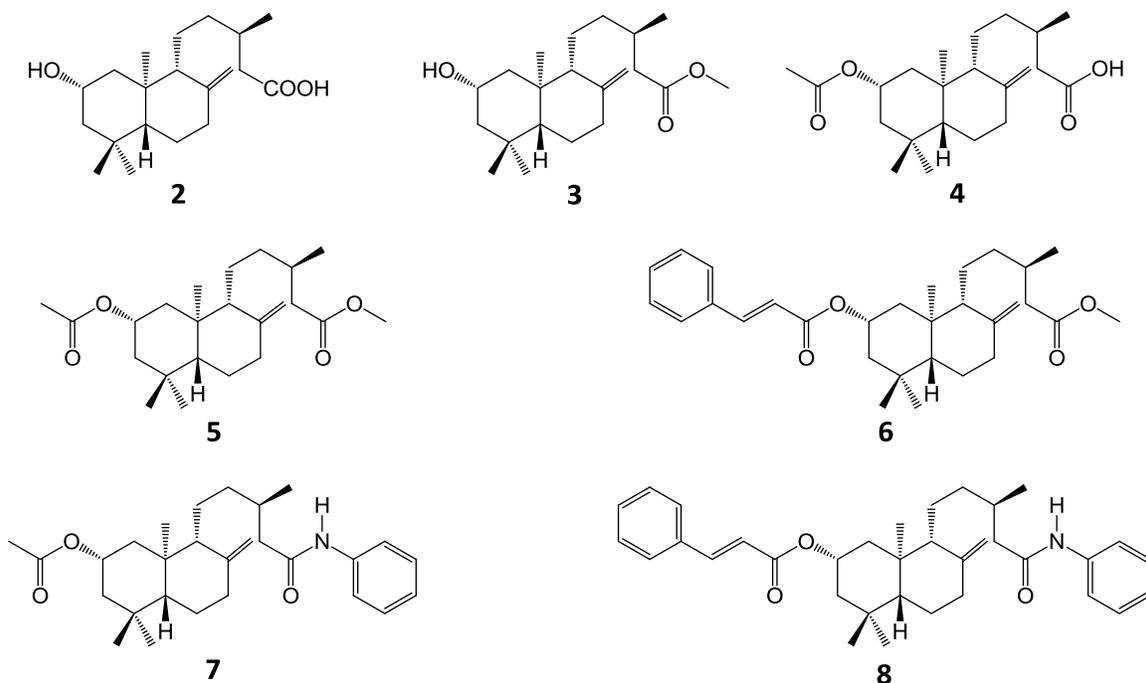
De *Ageratina petiolaris* se obtuvo el extracto hexánico de las flores, el cual se sometió a hidrólisis alcalina empleando KOH y metanol para obtener el ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**). Una vez obtenido el diterpeno se realizó la metilación en el grupo carboxilo con diazometano formando el éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**). A partir del ácido 2 α -acetoxieperuico (**4**) empleando diazometano se obtuvo el correspondiente éster metílico **5**. Empleando al éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**) se preparó el cinamato **6** utilizando cloruro de cinamoilo y piridina. Ya preparado los derivados **3**, **6**, la amida **7**, así como el derivado teórico **8**, se construyeron los modelos moleculares de partida de cada uno de ellos, seguido de una búsqueda conformacional empleando el protocolo de Monte Carlo con Mecánica Molecular, posteriormente se analizaron las conformaciones realizando un corte dentro de las primeras 5 kcal/mol, se optimizó la geometría de los confórmeros que contribuían de manera notable en la distribución de Boltzmann empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p). Una vez obtenido el confórmero de menor energía se procedió a realizar el estudio de anclaje molecular entre el heterodímero de alfa- y beta-tubulina con los diferentes derivados: el éster metílico **3**, el cinamato **6**, la amida **7** y el derivado **8**. Los cuales indican que la predicción del sitio activo de los derivados diterpénicos preparados a partir del producto natural **2** de *Ageratina petiolaris* en el heterodímero de alfa- y beta-tubulina es el mismo sitio que el ocupado por el paclitaxel.



Palabras clave: *Ageratina*, diterpeno, tubulina, diazometano, confórmero.

III. ABSTRACT

Hexane extract of flowers of *Ageratina petiolaris* was subjected to alkaline hydrolysis using KOH and methanol to obtain the 2 α -hydroxieperuic acid (**2**). After obtaining the diterpene, methylation of carboxyl group was carried out with diazomethane yielding the methyl ester **3**. 2 α -acetoxieperuic acid (**4**) was methylated with diazomethane to obtain the corresponding methyl ester **5**. A cinnamate derivative (**6**) was prepared from the methylester **3** using cinnamoyl chloride and pyridine. Derivatives **3**, **6**, **7** and a theoretical derivative **8**, were subjected to a molecular model study, therefore molecular mechanics conformational search was made via the Monte Carlo protocol with MMFF force-field, conformations in the first 5 kcal/mol were analyzed and subsequently geometry optimization of these conformations were calculated at DFT B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. Once obtained lower energy conformation we proceeded to the docking study between tubulin heterodimer and the derivatives: methylester **3**, cinnamate **6**, amide **7**, and a theoretical derivative **8**. Prediction of the active site of the diterpene derivatives in beta-tubulin is similar that occupied by paclitaxel but lower affinity.



Keywords: *Ageratina*, diterpene, tubulin, diazomethane, conformer.

1. INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento llevado a cabo por el hombre de las plantas medicinales, ha quedado plasmado en numerosos testimonios escritos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas. La medicina tradicional practicada desde la antigüedad a través de errores y aciertos fue utilizada en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, obtenidos exclusivamente en base a la experiencia práctica y observación, así como al empirismo transmitido a través de generaciones.¹

Las plantas con atributos farmacológicos fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre; se diferenciaron las que curaban de las que mataban, y dichos conocimientos fueron transmitidos oralmente debido a la carencia de escritura. Al desarrollarse la escritura y con la aparición del papiro como soporte de la misma, se comenzó a recoger información, convirtiéndose esta en patrimonio de unos pocos dentro de las sociedades por las cuales ha transitado la humanidad hasta nuestros días.

En la Biblia (Figura 1) se describen aproximadamente 200 plantas de uso medicinal y además sus aplicaciones.

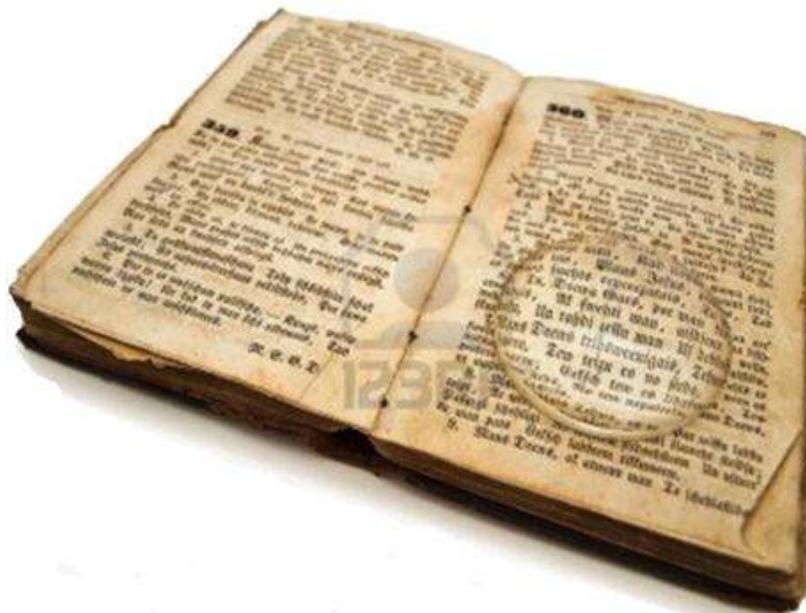


Figura 1. La biblia en la antigüedad.

El papiro de Ebers (Figura 2), escrito hace unos 3500 años a.de C, describe enfermedades e indicaciones para solucionarlas mediante el empleo de especies vegetales.

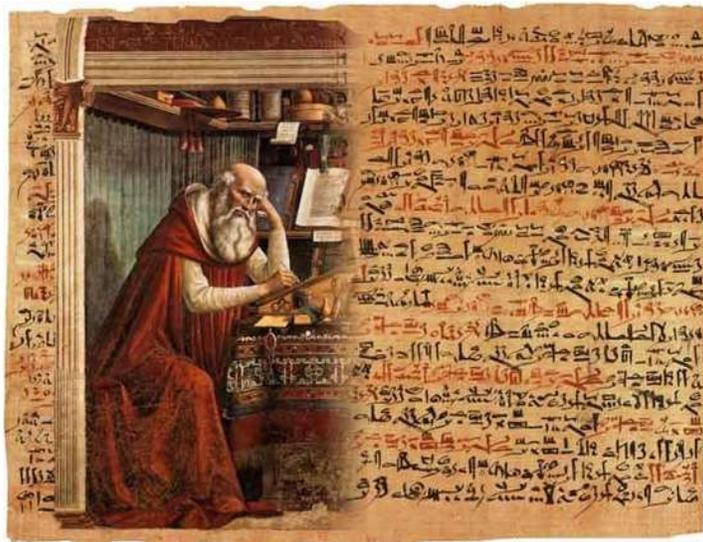


Figura 2. Papiro de Ebers.

Durante los siglos XII al XIII la Escuela Árabe (célebre por sus renombrados médicos) así como la de Salerno en Italia, prescribían numerosas sustancias vegetales de las cuales muchas son utilizadas actualmente. En esa época vivió el famoso médico musulmán Ibn Wafid (nacido en Toledo en el año 1008 y muerto en esa misma ciudad en 1074) fue autor de la obra “El libro de la almohada” famoso recetario médico del siglo XI. Sus recetas casi todas originales, comprendían remedios para atender dolencias o disturbios desde la cabeza hasta los pies, según la tradición de la medicina árabe, y en ella se empleaban numerosas plantas casi todas procedentes de España y del norte de África.

En el siglo XV eran ya conocidas las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia, lavanda, entre otras. Un siglo después, más de 60 nuevas esencias se añadían a estas. En 1511 se publicó en Barcelona “*Concordia Pharmacopolarum*” que es la primera farmacopea territorial del mundo.

El famoso Códice de la Cruz Badiano (Figura 3) escrito en 1552 por el indígena Xochimilca Martín de la Cruz y traducido del náhuatl al latín por Juan Badiano en México, contiene el tesoro herbolario de los antiguos mexicanos.

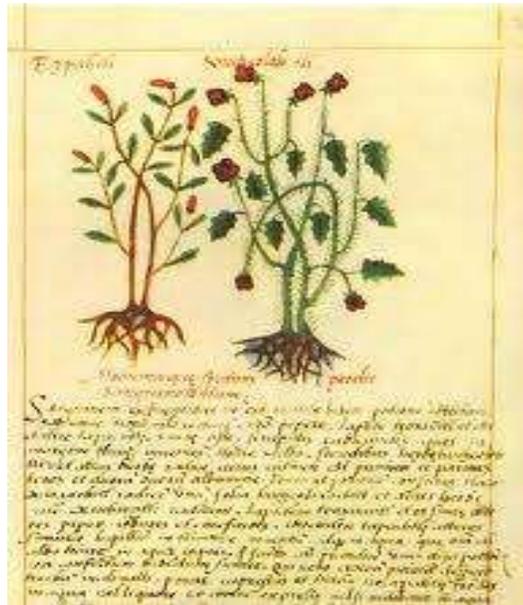


Figura 3. Códice de la Cruz Badiano.

En el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica nace la farmacoquímica. En 1811 se aísla la morfina a partir del opio.

En la actualidad, existe un amplio reconocimiento del empleo de fuentes naturales como medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos debidos a sustancias químicas puras y con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones. Cabe hacer mención del importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas en la historia de la humanidad.²

La OMS apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando está demostrado el beneficio y la existencia de mínimo riesgo para el paciente. La medicina tradicional es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, creencias experiencias de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. El uso a través del tiempo ha demostrado la inocuidad y eficacia de la medicina tradicional. En la actualidad solo falta comparar el empirismo con el cientificismo, respetando la investigación y evaluación de la medicina tradicional, los conocimientos y experiencia obtenidos en la invaluable historia de sus procedimientos.³

2. ANTECEDENTES

Para poder vivir, crecer y reproducirse los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. Estas transformaciones requieren energía que obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo.

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con muy pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios.

Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo. Los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios y son específicos de las especies y también se les llama productos naturales.⁴

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, sino también en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos. La síntesis activa de los metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados); el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos); la competencia por el espacio del suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico.⁵

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales: compuestos fenólicos, glicósidos, alcaloides y terpenos.

2.1. Compuestos fenólicos

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis

de ácido shikímico y los aminoácidos (fenilalanina, triptófano y tirosina). Entre los que se encuentran: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.

2.2. Glicósidos

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Entre los glicósidos se encuentran: saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

2.3. Alcaloides

Se sintetizan a partir de aminoácidos normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina.⁶

2.4. Terpenos

Los terpenos que se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetyl-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. El isopentil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranil geranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos. Como ejemplos de terpenos se encuentran hormonas, pigmentos o aceites.

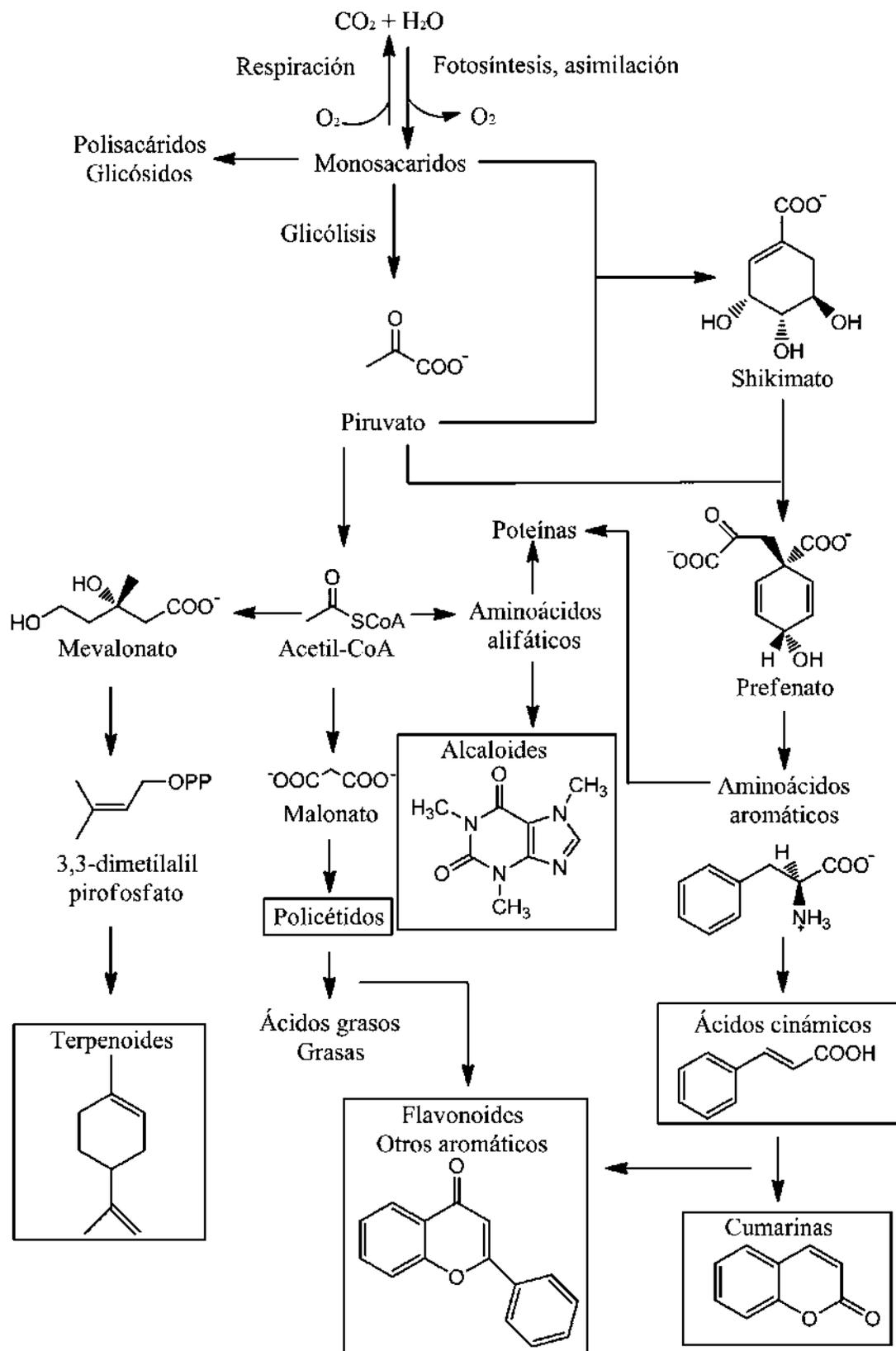


Figura 4. Rutas de producción de metabolitos secundarios.⁷

Ya para el siglo XIX, los químicos poseían herramientas para llevar a cabo la elucidación estructural de compuestos recientemente descubiertos. Conociéndose para la época una gran cantidad de estructuras de productos naturales, el científico alemán Otto Wallach⁷ notó que las estructuras de muchos compuestos, especialmente los principios fragantes de las plantas (aceites esenciales), podían ser divididas en unidades ramificadas de cinco carbonos derivadas del isopreno (Figura 5) o 2-metil-1,3-butadieno, de fórmula molecular C_5H_8 .

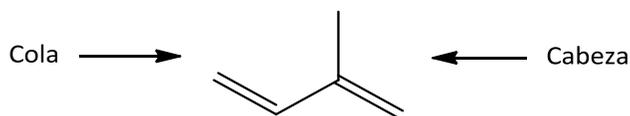


Figura 5. Estructura del isopreno.

Estos compuestos, que típicamente presentaban una fórmula molecular que resultaba un múltiplo entero de la del isopreno, fueron agrupados bajo el término genérico de terpenos, vocablo derivado etimológicamente del nombre del árbol de terebinto (*Pistacia terebinthus*), el cual exuda una resina. Wallach recibió el Premio Nobel de Química por este descubrimiento en 1910.

Después de extensas investigaciones, se formuló la llamada regla del isopreno, la cual propone que los terpenos están formados por un determinado número de unidades isoprénicas unidas mediante enlaces cabeza-cola. Sin embargo, se presentaban compuestos que, a pesar de estar constituidos mayormente por estas unidades no seguían cabalmente la regla del isopreno, ya sea por violación del principio cabeza-cola, reordenamientos, degradaciones, etc. Estos compuestos se denominaron terpenoides.⁷

Los terpenos y terpenoides constituyen el grupo más grande de los productos naturales. Para 1998, se habían aislado más de 30000 terpenoides, de los cuales más de la mitad eran sintetizados por plantas.⁸

Debido a la amplia gama de este grupo de productos naturales, surgió la necesidad de establecer un sistema de clasificación. La clasificación tradicionalmente aceptada se basa en la cantidad de unidades de isopreno presentes en la estructura. De esta manera se tiene hemiterpenos (una), monoterpenos (dos), sesquiterpenos (tres). Diterpenos (cuatro), triterpenos (seis), tetraterpenos (ocho), etc.^{7,9} como se muestra en la Tabla 1.¹⁰

Tabla 1. Clasificación y precursores de los Terpenos.¹⁰

	 Isopreno
Hemiterpenos	 DMAPP IPP
Monoterpenos	 GPP
Sesquiterpenos	 FPP
Diterpenos	 GGPP
Sesterterpenos	 GFPP
Triterpenos	 Escualeno
Tetraterpenos	 Fitoeno
Politerpenos	 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_2\text{)}_n\text{-CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_2\text{OPP}$

2.4.1. Diterpenoides

A medida que se fueron descubriendo más diterpenos, surgió la necesidad de implementar a su vez un sistema para clasificarlos. El sistema establecido los subdivide en grupos (Figura 6), dependiendo de la cantidad de los ciclos que presentan en su estructura. Así, se tiene diterpenos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, macrocíclicos, etc. Y a su vez, dependiendo de la distribución del esqueleto carbonado, pueden conformarse familias. Dentro de estas subdivisiones, las cuales son nombradas en base a algunos de los primeros descubrimientos para cada una de ellas por ejemplo, cembranos, labdanos, kauranos, etc.¹¹

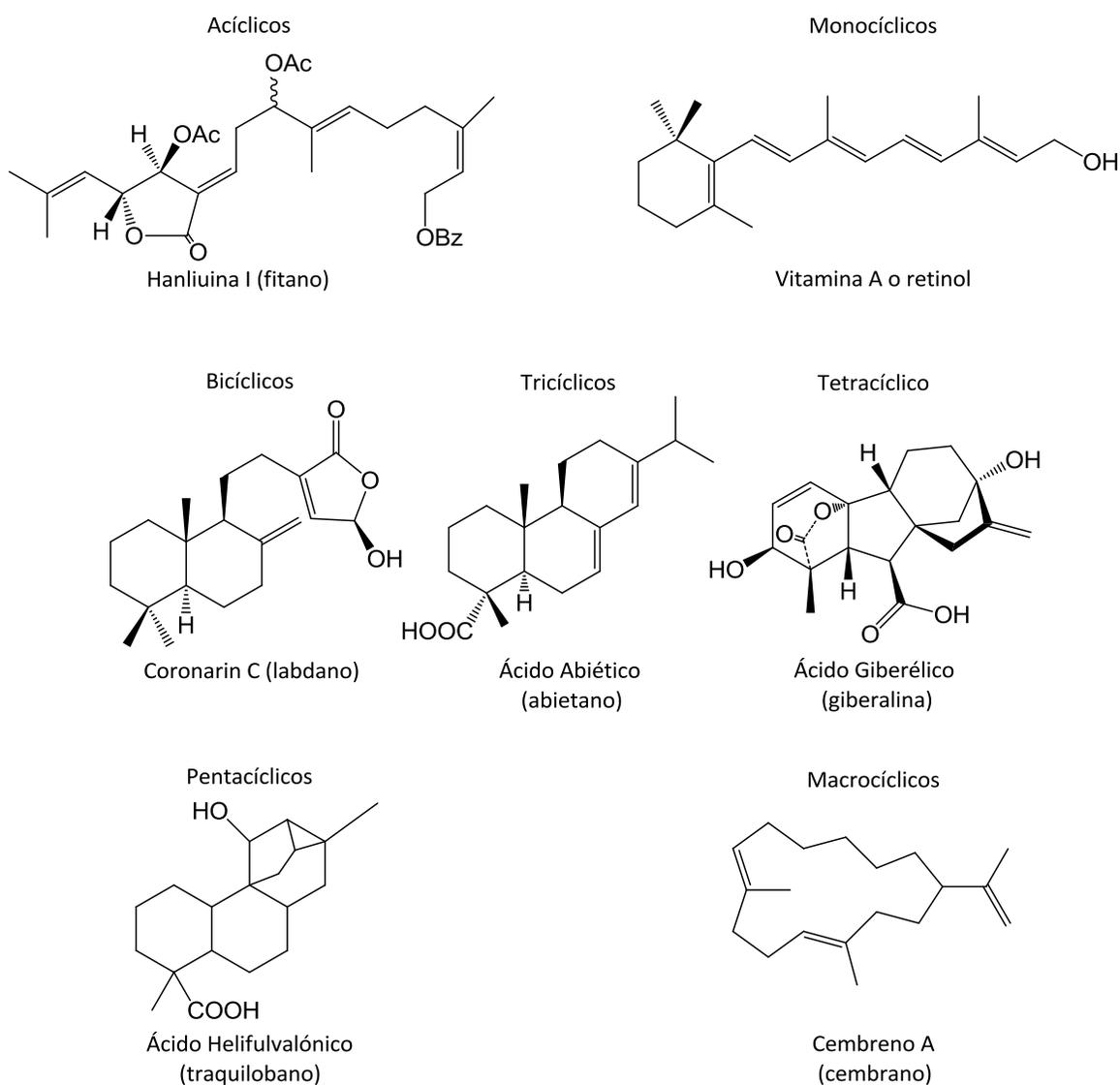


Figura 6. Clasificación de los terpenos.

2.4.2. Actividad farmacológica de los diterpenos

El interés farmacológico de los diterpenos está fuera de toda duda, ya que dentro de este grupo se encuentran los diterpenos tricíclicos del género *Taxus* y sus derivados (paclitaxel o Taxol[®] y docetaxel o Taxotere[®]) utilizados actualmente en terapéutica en el tratamiento de algunos tipos de cáncer por su acción antimetabólica.¹²

2.4.3. Diterpenos tipo labdano

Una de las familias de compuestos naturales que ha recibido en años recientes una atención particular debido a sus diversas aplicaciones farmacológicas, es la de los diterpenos tipo labdano.

Los labdanos han sido encontrados ampliamente en la naturaleza, aislados principalmente de plantas terrestres y esponjas marinas. Su estructura se basa en un esqueleto bicíclico carbonado del tipo *trans*-decalina (Figura 7).⁷

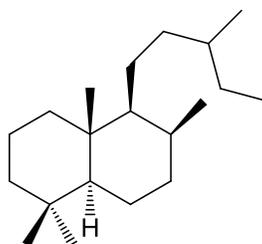


Figura 7. Esqueleto carbonado del tipo *trans*-decalina.

2.4.4. Actividad biológica de los labdanos

2.4.4.1. Actividad antibacteriana y antiviral

Existen varios diterpenos tipo labdano que han mostrado actividad antibacteriana. Por ejemplo, los compuestos 13-*epi*-Sclareol, (5*R*,8*R*,9*R*,10*R*,13*E*)-labdan-en-8 α ,15-diol y acetato de (5*R*,8*R*,9*R*,10*R*,13*E*)-labdan-en-8 α ,15-diol, aislados de las hojas de *Cistus incanus* (Figura 8) han mostrado una mayor actividad que la ampicilina contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 100 ppm, así como actividad moderada sobre *S. eidermis*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*.⁷

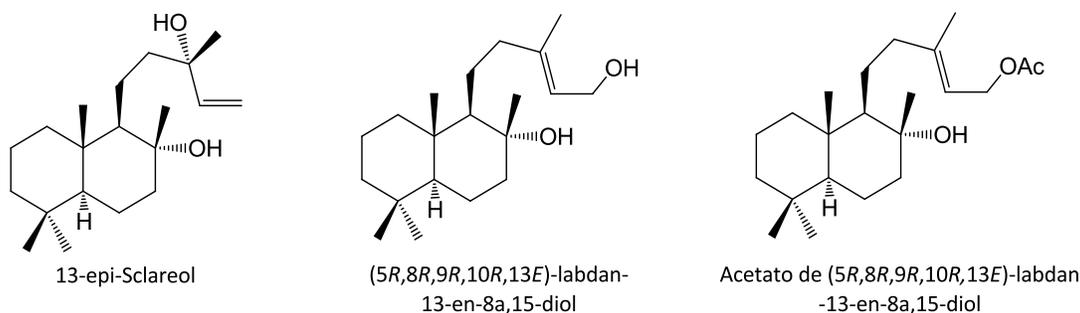
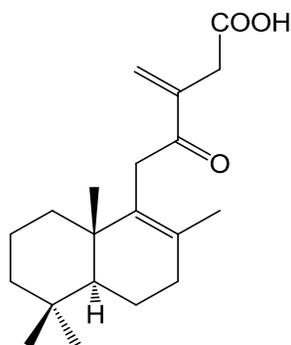


Figura 8. Diterpenos con actividad antibacterial y antiviral.

Así mismo, el extracto etanólico de la planta *Prema oligotricha* (Verbenaceae), cuyas ramas son masticadas en África oriental y el humo al ser quemada es utilizado para esterilizar recipientes de leche (usos que indican una posible actividad antibacterial), presentó actividad contra una gran variedad de bacterias Gram-positivas, como por ejemplo *Streptococcus sp.* y *Lactobacillus sp.*, responsables de la aparición de caries y otros problemas dentales, utilizando como estándar estreptomycin. De ese extracto se aisló, entre otros, el ácido 12-oxolabda-8,13(16)-dien-15-oico (Figura 9).⁷



Ácido 12-oxolabda-8,13(16)-dien-15-oico

Figura 9. Diterpeno con actividad antibacterial.

También se han encontrado labdanos con actividad antibacterial y antiviral en organismos marinos, tales como los Mycaperóxidos A y B (Figura 10), provenientes del extracto metanólico de la esponja Thai del género *Mycale*. Ambos compuestos fueron activos contra las bacterias Gram-positivas *Bacillus subtilis* y *S. aureus*, pero también mostraron actividad contra los virus de la estomatitis vesicular y del herpes simple tipo I (IC₅₀ ~ 0.25-1.0 ppm).¹³

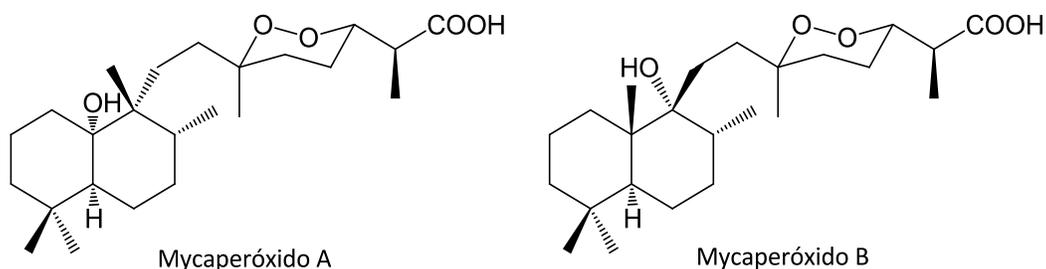


Figura 10. Diterpenos tipo labdano con actividad antibacterial y antiviral provenientes de la esponja Thai del género *Mycale*.

2.4.4.2. Actividad antifúngica

Se ha descubierto una gran variedad de diterpenos labdánicos que inhiben el crecimiento de hongos patógenos y que pueden ser efectivamente utilizados para el tratamiento de la mayoría de las infecciones fúngica superficiales. Sin embargo, aún existe la necesidad de fármacos con baja toxicidad que puedan ser administrados parental u oralmente de manera segura y que puedan alcanzar concentraciones efectivas en la zona afectada.¹³

En el año 1988, Morita e Itokawa⁷ aislaron de la planta *Alpina galanga* una serie de labdanos con estructuras nuevas e interesantes, entre los cuales se señalan los aldehídos labda-8(17),12-dien-15,16-dial, 8 β (17)-epoxilabda-12-en-15,16-dial y la Galanolactona (Figura 11), que presentaron actividad contra varias cepas de *Candida*.

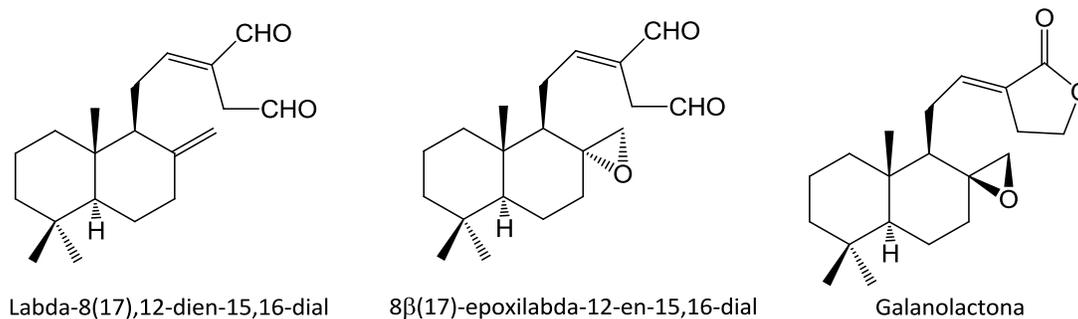


Figura 11. Aldehídos tipo labdano con actividad antifúngica.

Similarmente, el Sclareol, empleados comercialmente en la manufactura del perfume de ambar gris, es un inhibidor potente del crecimiento de hongos de herrumbre y óxidos. Sin embargo, puesto que este compuesto no es fácilmente obtenible a partir de fuentes naturales, siendo las únicas fuentes viables las hojas de *Nicotiana glutinosa* y las cabezas de flor de *Salvia sclarea*, existe en la actualidad un gran interés por el desarrollo de cepas

de microorganismos capaces de sintetizarlo y además por purificar la enzima responsable de su transformación a partir de su precursor biogénico.^{14, 15}

2.4.4.3. Actividad citotóxica

Hoy en día el cáncer es una de los padecimientos más graves que sufre el ser humano. Durante el año 1998, más de 6,200,000 personas murieron de cáncer en el planeta y aún no se ha desarrollado un tratamiento que pueda disminuir éste número significativamente. Es por esto que la búsqueda de fármacos citotóxicos adquiere una importancia suprema en las vertientes actuales del desarrollo de la química medicinal.

En 1987, Itokawa y colaboradores aislaron de las raíces de una planta utilizada como antirreumático en Brasil, *Hedychium coronarium* o caña de indio, las Coronarinas A, B, C y D (Figura 12). Estas sustancias, sobre todo el Coronarina A y el B, mostraron citotoxicidad cuando fueron aplicadas a cultivos de células V-79 de hámster chino clonadas.⁷

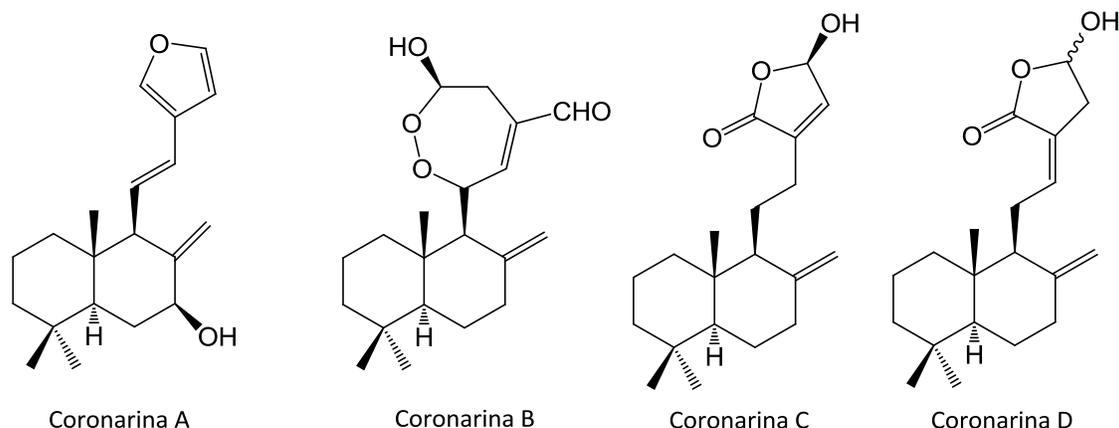


Figura 12. Coronarinas A, B, C, D, con actividad citotóxica.

Otro efecto importante que se ha podido observar en algunos labdanos, es el de inhibir la agregación de plaquetas comportándose como un antagonista del Factor Activador de Plaquetas (FAP), el cual se sabe que está involucrado en una variedad de condiciones como el asma bronquial, coagulación intravascular diseminada, inflamación y alergia aguda, entre otras. La búsqueda de un nuevo agente terapéutico más potente, menos tóxico y con mejor biodisponibilidad ha propiciado el descubrimiento de compuestos como el 3 α -hidroximanool (Figura 13), hallado en la planta medicinal nativa de Bután llamada shug chher (*Juniperus communis*), el cual mostró un potente efecto inhibitorio sobre la agregación de plaquetas mediada por el FAP.¹⁶

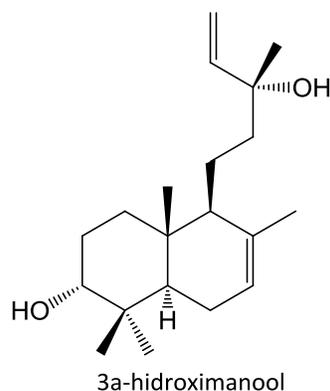


Figura 13. 3α-hidroximanol, antagonista del Factor Activador de Plaquetas (FAP).

2.5. El cáncer

Bajo la denominación de cáncer, se engloba a un grupo numeroso de enfermedades malignas, con origen genético monoclonal, caracterizadas por una proliferación celular anormal, anaplásica, autónoma, progresiva y destructiva. Comienza por una falta de control en el proceso de reproducción celular en un tejido en el que las células se reproducen de forma autónoma e irreversible, sin regulación ni afinidad. La pérdida de la capacidad celular de realizar apoptosis se traduce en la aparición del fenómeno metástasis, que es el rasgo más característico de esta enfermedad.¹⁷

El enorme interés en el conocimiento de la enfermedad, se ha traducido en un extenso y exhaustivo estudio biológico y farmacológico destinado a desarrollar nuevos fármacos que de forma selectiva eliminen las células enfermas.

2.6. Taxol

El paclitaxel (Figura 14), conocido comercialmente como Taxol®, es uno de los agentes antitumorales más efectivo empleado en las últimas décadas. Recientemente, se cumplieron 30 años desde el descubrimiento del modo de acción de este fármaco, obtenido a partir de un extracto vegetal y 15 años desde la aprobación del uso para el tratamiento del cáncer, de mama y algunos otros tipos de cáncer debido a su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales. En la Tabla 2 se muestran las fases del desarrollo del paclitaxel. Identificado y extraído inicialmente a partir de la corteza del tejo *Taxus brevifolia*. En combinación con otros compuestos (cisplatino), constituye la quimioterapia de primera línea para el tratamiento del cáncer de ovario.^{18, 19}

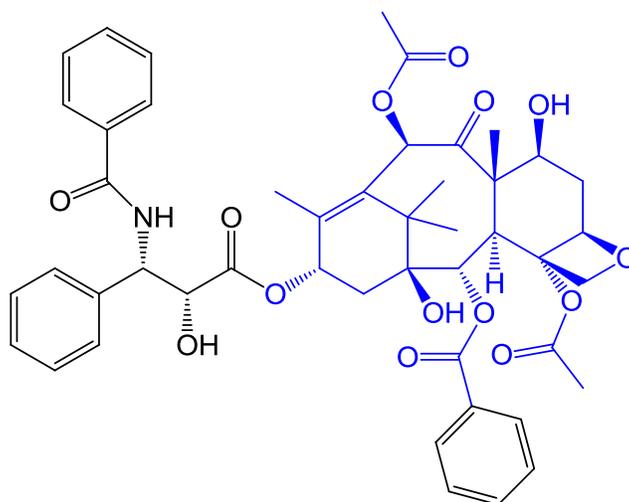


Figura 14. Estructura del paclitaxel.

Tabla 2. Fases del desarrollo del paclitaxel como agente quimioterapéutico.

1963	El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos observa actividad antitumoral en el extracto de corteza de tejo.
1971	Se identifica el principio activo: paclitaxel.
1979	Se determina el modo de acción del paclitaxel.
1983	Comienzan los ensayos clínicos – Fase I.
1991	La empresa farmacéutica Bristol-Myers Squibb se hace cargo del desarrollo y comercialización del paclitaxel bajo el nombre del Taxol®.
1994	Se publica la síntesis total del paclitaxel. Se autoriza el uso del Taxol® en Estados Unidos para el tratamiento del cáncer de mama.
1998	Se prueba el uso clínico de Taxol® para el tratamiento del carcinoma de ovario.
2000	Se permite el desarrollo de paclitaxel como medicamento genérico.

2.7. Métodos de Química Computacional

2.7.1. Modelado molecular

Es una serie de métodos que consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones, análisis conformacional, mecánica cuántica, mecánica molecular, termodinámica estadística y los gráficos moleculares interactivos. Lo que permite la representación y manipulación de las moléculas en tres dimensiones y proporciona información espacial que es esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligando y receptores macromoleculares.¹⁹

2.7.2. Protocolo Monte Carlo

El protocolo Monte Carlo es una combinación de muestreo aleatorio y el empleo de la distribución de Boltzmann.

$$\exp[-V(r_1, r_2, \dots, r)/KB T]$$

Es una mera colección de estructuras tridimensionales arbitrarias, no relacionadas entre sí. Las configuraciones secuenciales de este tipo de muestreo son instantáneas al azar del movimiento total de la molécula y, por tanto no ofrece ninguna pista sobre la ruta traslacional que las une. Las estructuras se pueden organizar sobre la base de algún criterio y compararse luego frente a modelos ideales o modelos de otras moléculas.¹⁹

2.7.3. Mecánica molecular

La expresión mecánica molecular se emplea ampliamente para definir un método de cálculo basado en la mecánica clásica y diseñada para obtener *a priori* las estructuras y las energías de las moléculas. La idea central de la mecánica molecular es que los enlaces poseen valores de longitudes y ángulos ideales o naturales, los cuales van a condicionar la geometría molecular.²⁰

2.7.4. Teoría de Funcionales de la Densidad

Es un proceso variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. Es uno de los métodos más utilizados en los cálculos cuánticos de la estructura electrónica de la materia, tanto en la física de la materia condensada como en la química cuántica.

Originalmente, la DFT se desarrolló en el marco de la teoría cuántica no relativista (ecuación de Schrödinger independiente del tiempo) y de la aproximación de Born-Oppenheimer. La teoría fue extendida posteriormente al dominio de la mecánica cuántica dependiente del tiempo, y se habla de la TD-DFT o Teoría de Funcionales de la Densidad

Dependiente del Tiempo y del dominio relativista. Entre otras cosas, esto permite calcular estados excitados.²¹

2.8. Familia *Asteraceae*

La familia Asteraceae es un grupo monofilético y representa una de las familias más numerosas de angiospermas, con 1600 a 1700 géneros y 24000 a 30000 especies. Esta familia también presenta una amplia variedad de formas de vida: herbáceas, suculentas, lianas, epifitas, árboles y arbustos.²² Su distribución es cosmopolita, exceptuando la región Antártica, y se le encuentra en todos los ambientes. La evidencia filogenética y los datos paleontológicos sugieren que el ancestro de Asteraceae surgió en el hemisferio sur, en el área que hoy corresponde a la región andina de Sudamérica.^{23,24} Estimaciones conservadoras del número de géneros de compuestas conocidas en la República Mexicana es de 310 a 387. El número de las especies se encuentra cerca de las 3000.²⁵

2.8.1. Género *Ageratina*

Ageratina es uno de los géneros con más especies de la familia *Asteraceae* en México ya que se encuentran alrededor de 153 especies.²⁵

El género *Ageratina* es un grupo taxonómico complejo al cual se han incluido algunas especies antes pertenecientes al género *Eupatorium*, tal es el caso de *Ageratina petiolaris* anteriormente conocida como *Eupatorium petiolare*.¹⁰

2.8.2. *Ageratina petiolaris*

Es un arbusto hasta de 2 m de altura; tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 5 mm de diámetro, estriados, blanco-amarillentos, puberulentos; hojas opuestas, peciolo de 1.5 a 8 cm de largo, pubescente, lámina ovada, de 3.5 a 10 cm de largo por 2.5 a 10 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde crenado-dentado, base cordada, haz puberulento, envés pubescente, con abundantes glóbulos resinosos, tri a pentanervada desde la base, membranácea; numerosos capítulos de 7 a 8 mm de largo dispuestos en corimbos, compuestos terminales, pedicelos pubescentes; involucreo turbinado, de 5 a 7 mm de largo por ± 5 mm de ancho, cubre la mitad basal o más de las corolas, sus brácteas discretas en 3 series de la misma longitud, lineal-lanceoladas, agudas, verdes, pubescentes; flores 35 a 40; corola de 4 a 5 mm de largo, blanca, glabra, con glóbulos resinosos en los lóbulos; aquenio de 2 a 3 mm de largo, muy pubescente, vilano casi del largo de la corola, cerdas blanco-rosadas (Figura 15).



Figura 15. *Ageratina petiolaris*.

Es conocida como “Hierba del Ángel” o “yolochíchitl”. Se ha colectado de Huehuetoca a Milpa Alta y de Pachuca y Real del Monte a Amecameca, entre 2350 y 3000 m de altitud, en sitios con pastizal, matorral xerófilo y bosque de pino, encino y *Juniperus*; crece frecuentemente en ambientes de disturbio, especialmente a lo largo de caminos y carreteras. Se conoce de Coahuila y Tamaulipas a Oaxaca.^{26,27}

En 1983, Calderón y colaboradores realizaron el estudio fitoquímico de *Eupatorium petiolare* (*Ageratina petiolare*) colectada en la ciudad de México, aislando al ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**1**) (Figura 16), un diterpeno tipo *ent*-labdano.²⁸

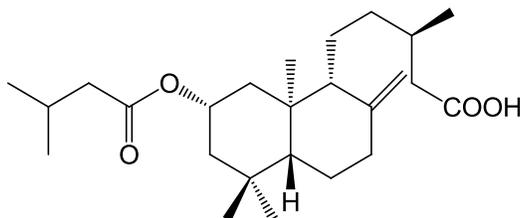


Figura 16. Ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**1**).

A partir de una hidrólisis básica sobre el enlace tipo éster del ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**1**), se obtuvo el ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**) (Figura 17) en forma de cristales.

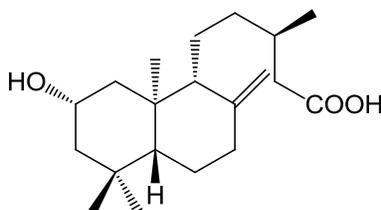


Figura 17. Ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**).

2.8.3. Preparación de la amida

Dentro del grupo de trabajo se realizó la preparación de la amida **6** (Figura 18) a partir del ácido 2 α -acetoxieperuico (**4**) obtenido a partir del producto natural **1** de *Ageratina petiolaris* mediante la protección de la posición dos con un grupo acetato, empleando anhídrido acético y piridina previa hidrólisis alcalina del grupo isovalerato. Una vez protegida la posición dos se procedió a llevar a cabo la preparación de la amida empleando anilina vía anhídridos mixtos usando NMM y *i*-BCF para la formación del enlace amida entre el grupo carboxilo del producto natural y el grupo amino de la anilina, la cual fue obtenida en forma de miel incolora. Su elucidación se realizó por RMN en una y dos dimensiones.

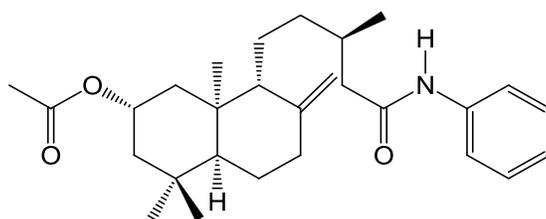


Figura 18. Amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**6**).

2.9. Microtúbulos

Los microtúbulos están constituidos por heterodímero de *alfa*-tubulina y *beta*-tubulina (Figura 19) y estos a su vez son polímeros proteícos cilíndricos huecos de unos 24 nm de diámetro y una longitud variable. Los heterodímeros de tubulina interaccionan cabeza con cola para formar protofilamentos rectos que posteriormente se asocian de forma paralela, estableciendo contactos laterales entre ellos, para formar la pared cilíndrica del microtúbulo. Dado que los dímeros de tubulina asocian cabeza con cola para formar protofilamentos dentro del microtúbulo, éste tiene una polaridad determinada por las diferencias de sus extremos. En cada microtúbulo, existe un extremo (+) compuesto por *beta*-tubulina, y un extremo (-) compuesto por *alfa*-tubulina.¹⁷

Heterodímeros α - y β - tubulina

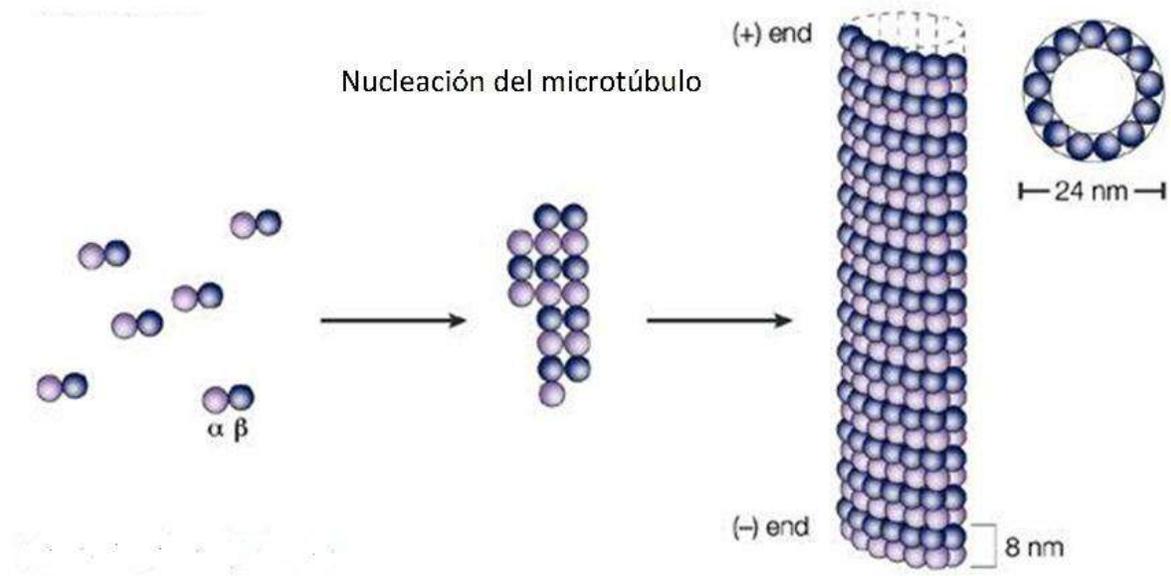


Figura 19. Microtúbulos.

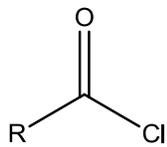
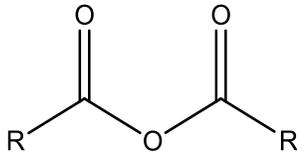
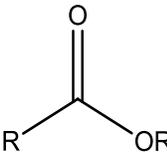
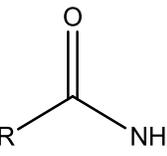
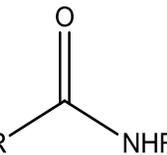
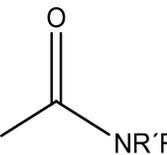
2.10. Estudio de anclaje molecular proteína-ligando (Docking)

Es un procedimiento computacional que intenta predecir la unión no covalente de macromoléculas o más frecuentemente, de una macromolécula (receptor) y una pequeña molécula (ligando) de manera eficiente a partir de sus estructuras no unidas, obtenidas a partir de modelado molecular. La predicción de la unión de moléculas pequeñas a la proteína es muy importante, ya que se puede determinar la conformación de ligantes conocidos, cuando las estructuras experimentales no están disponibles.^{29,30}

2.11. Derivados de ácidos carboxílicos

Los ácidos carboxílicos son la materia prima para diferentes derivados de acilo, como son cloruros de ácido, anhídridos de ácido, ésteres y amidas. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que provienen de la oxidación de aldehídos y alcoholes en el metabolismo.³¹

Tabla 3. Clases de derivados.

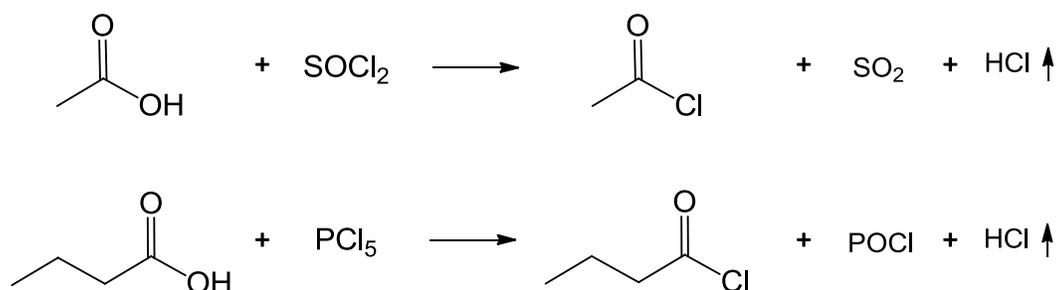
Clase	Fórmula general
Cloruro de ácido	
Anhídrido de ácido	
Éster	
Amida	
Amida N-sustituida	
Amida N,N-disustituida	

2.11.1. Cloruro de ácido

Los halogenuros de ácido son generalmente intermediarios muy útiles en la formación de derivados de ácidos carboxílicos debido a que ellos son normalmente mucho más reactivos que estos últimos, por ejemplo en reacciones de esterificación, amidación, etc.

En particular, los cloruros de ácido son un tipo de derivados muy utilizados, que provienen de sus correspondientes ácidos carboxílicos, y donde el grupo acilo está unido a un buen grupo saliente.

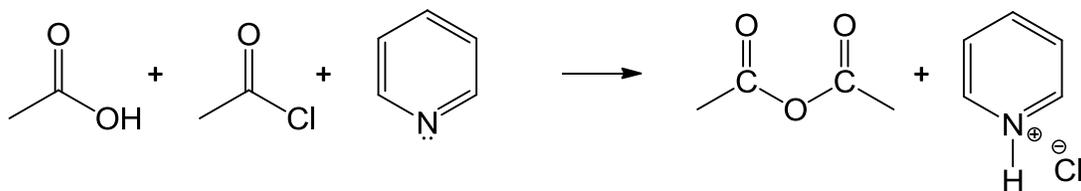
Se preparan al calentar un ácido carboxílico con uno de los siguientes reactivos: cloruro de tionilo (SOCl_2), tricloruro de fósforo (PCl_3) o pentacloruro de fósforo (PCl_5).^{32,33}



2.11.2. Formación de anhídridos

La formación de los anhídridos se lleva a cabo al calentar ácidos carboxílicos en presencia de pentóxido de fósforo (P_2O_5) y se generan anhídridos simétricos por deshidratación entre dos moléculas diferentes de ácido carboxílico.³³

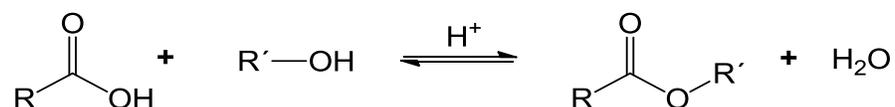
Los ácidos carboxílicos reaccionan con cloruros de ácido en presencia de piridina para dar anhídridos:



2.11.3. Formación de ésteres

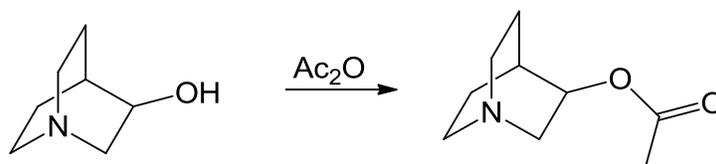
2.11.3.1. Esterificación de Fisher

Los ácidos carboxílicos pueden transformarse directamente en ésteres al calentarlos con alcoholes en presencia de una cantidad catalítica de ácido mineral.³³



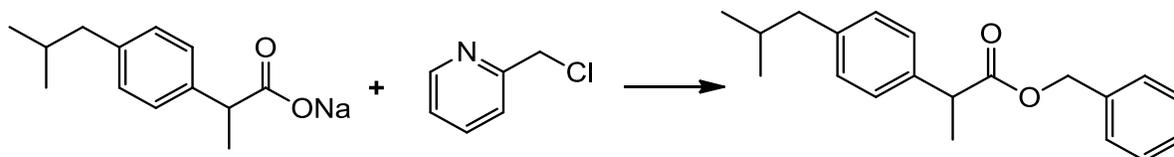
2.11.3.2. Esterificación por reacción de un anhídrido de ácido con un alcohol.

La reacción de anhídridos con alcoholes permite obtener ésteres.



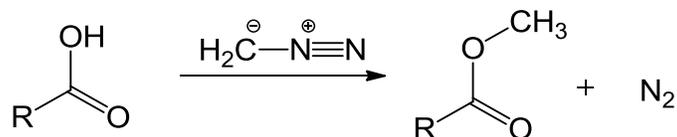
2.11.3.3. Por reacción de un anión carboxilato con un halogenuro de alquilo.

La reacción de un anión carboxilato con un halogenuro de alquilo en un disolvente polar aprótico permite obtener ésteres.



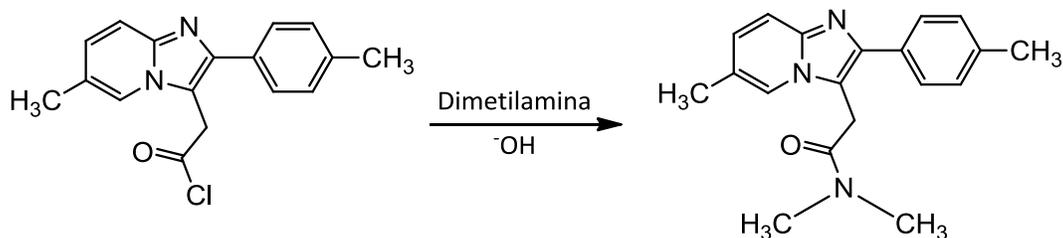
2.11.3.4. Reacción de ácidos carboxílicos con diazometano.

La reacción de ácidos carboxílicos con diazometano permite obtener ésteres. Esta reacción es poco utilizada debido a la elevada toxicidad del diazometano.³⁴⁻³⁷



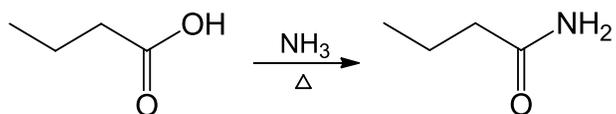
2.11.4. Formación de amidas

La reacción de un cloruro de acilo con amoníaco, una amina primaria o secundaria en medio básico permite obtener amidas.³⁴



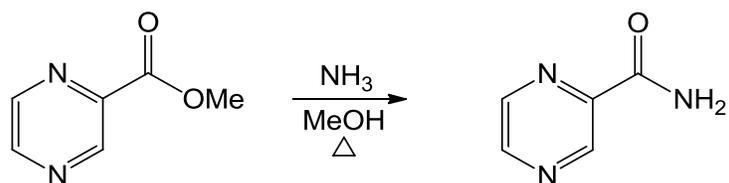
2.11.4.1. Por reacción de un ácido carboxílico con una amina

Este método funciona bien cuando la amina es primaria o amoníaco.



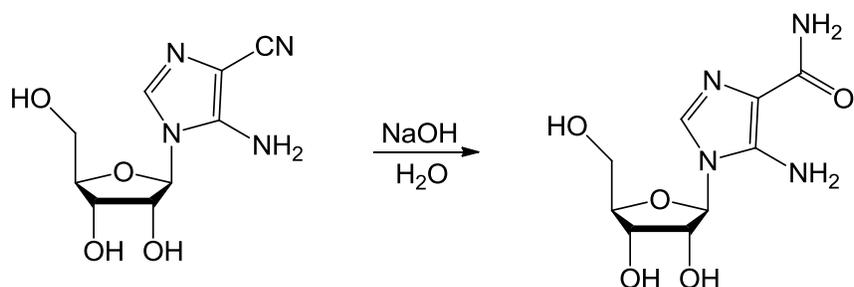
2.11.4.2. Por reacción de una amina con ésteres

La reacción de ésteres con aminas proporciona amidas. En general sólo es útil cuando la amina a introducir es barata y puede utilizarse en exceso.



2.11.4.3. Por hidrólisis parcial de un nitrilo

La hidrólisis en condiciones suaves de un nitrilo puede detenerse en la amida. Aunque el proceso puede realizarse bajo catálisis básica, es más usual utilizar catálisis ácida.



3. JUSTIFICACIÓN

Dado que no se cuenta con un estudio de anclaje molecular de la amida preparada a partir del producto natural obtenido de *Ageratina petiolaris* y sus derivados, es necesario realizar este estudio para conocer el sitio de acción sobre el heterodímero de *alfa* y *beta*-tubulina de los derivados del diterpeno tipo *ent*-labdano, con la finalidad de ampliar el conocimiento del posible sitio blanco de estos derivados en esta proteína y de esta manera encontrar una nueva alternativa en el tratamiento de cáncer.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Realizar el modelado y anclaje molecular de la amida **7** preparada a partir del ácido 2 α -acetoxieperuico (**4**).

4.2. Objetivos específicos

- Llevar a cabo las reacciones correspondientes para preparar nuevos derivados del compuesto natural **2**.
- Caracterizar los productos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas.
- Llevar a cabo el modelado molecular de los nuevos derivados de **2** para conocer sus estructuras de mínima energía.
- Realizar un estudio docking (proteína-ligando) de los nuevos derivados preparados a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se colectó *Ageratina petiolaris* en el estado de Michoacán cerca de San Joaquín Morelos, Municipio de Tlalpujahuá a 2592 msnm; utilizando únicamente las flores para la obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**) mediante una hidrólisis básica de su extracto hexánico, ya que en esta parte es donde se encuentra en abundancia, con respecto a la hoja, tallo y raíz, de acuerdo a los estudios realizados dentro del grupo de trabajo.

5.1. Identificación del ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**)

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 20) se observaron dos señales simples en 4.84 y 4.50 ppm correspondientes a los hidrógenos del metilo exocíclico H-17 y H-17' respectivamente. En 4.17 ppm se apreció una señal quintuple ($J = 5.4$ Hz) correspondiente al hidrógeno base de hidroxilo H-2, en 1.15 ppm se observó una señal doble de dobles ($J = 12.5, 2.8$ Hz) identificada como H-5, en 0.99 ppm se encontró una señal simple que integra para tres hidrógenos identificado como H-18, así mismo en 0.98 ppm se observó una señal doble ($J = 6.2$ Hz) para el metilo secundario de la molécula, así como dos señales simples para H-19 y H-20. Cabe señalar que estas dos últimas señales habían sido reportadas en un principio como una sola señal simple que integraba para seis hidrógenos.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21) se observaron 20 señales que confirman la presencia del diterpeno, en 178.9 ppm se observó la señal para el carbonilo C-15, en 148.0 ppm se observó la señal del C-8 base del metileno exocíclico, en 107.0 ppm se apreció la señal del carbono del metileno exocíclico C-17 y en 67.8 ppm se observó la señal del carbono base de hidroxilo C-2.

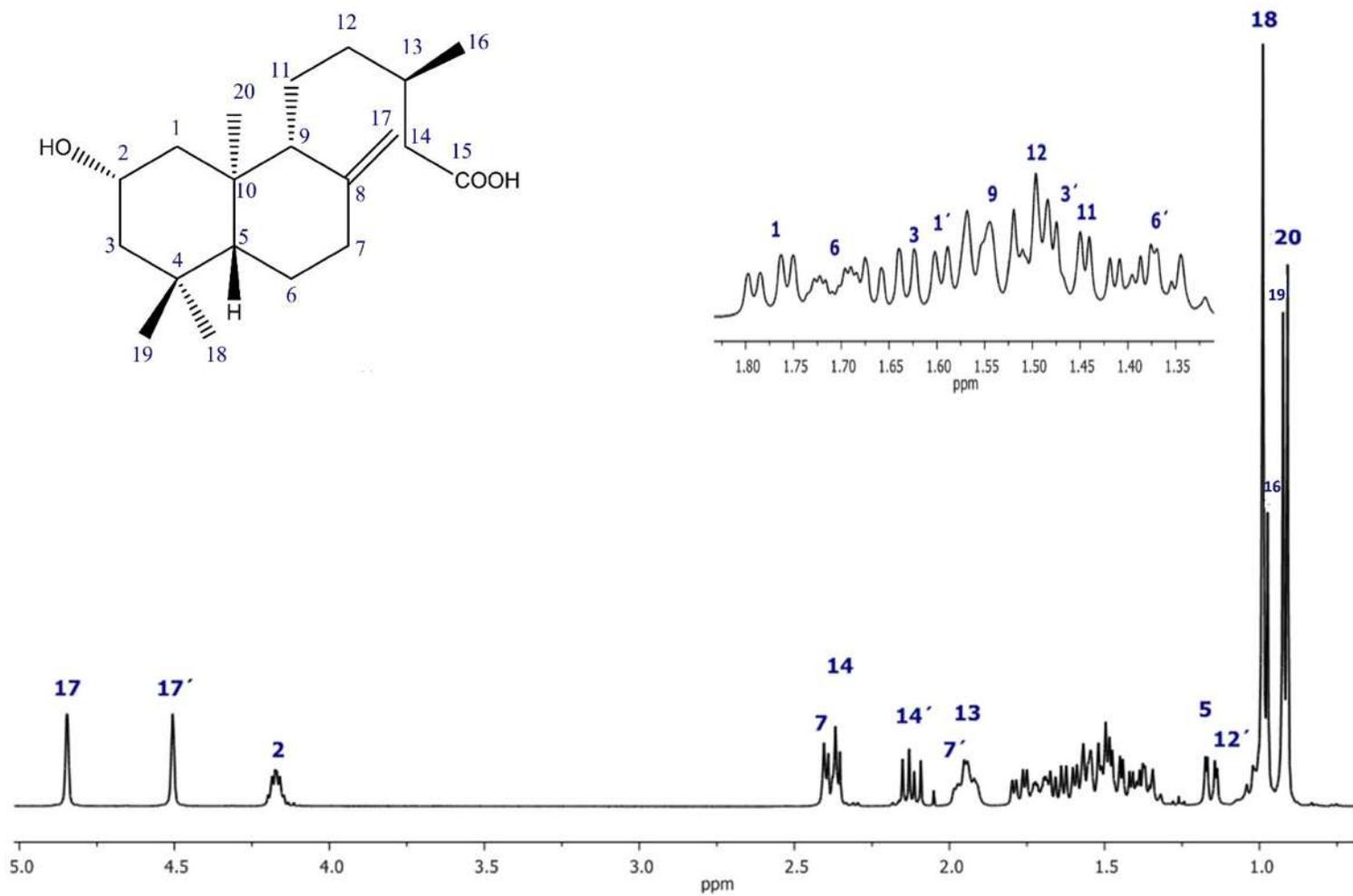


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) del ácido 2 α -hidroxieperuico (2) en CDCl_3 .

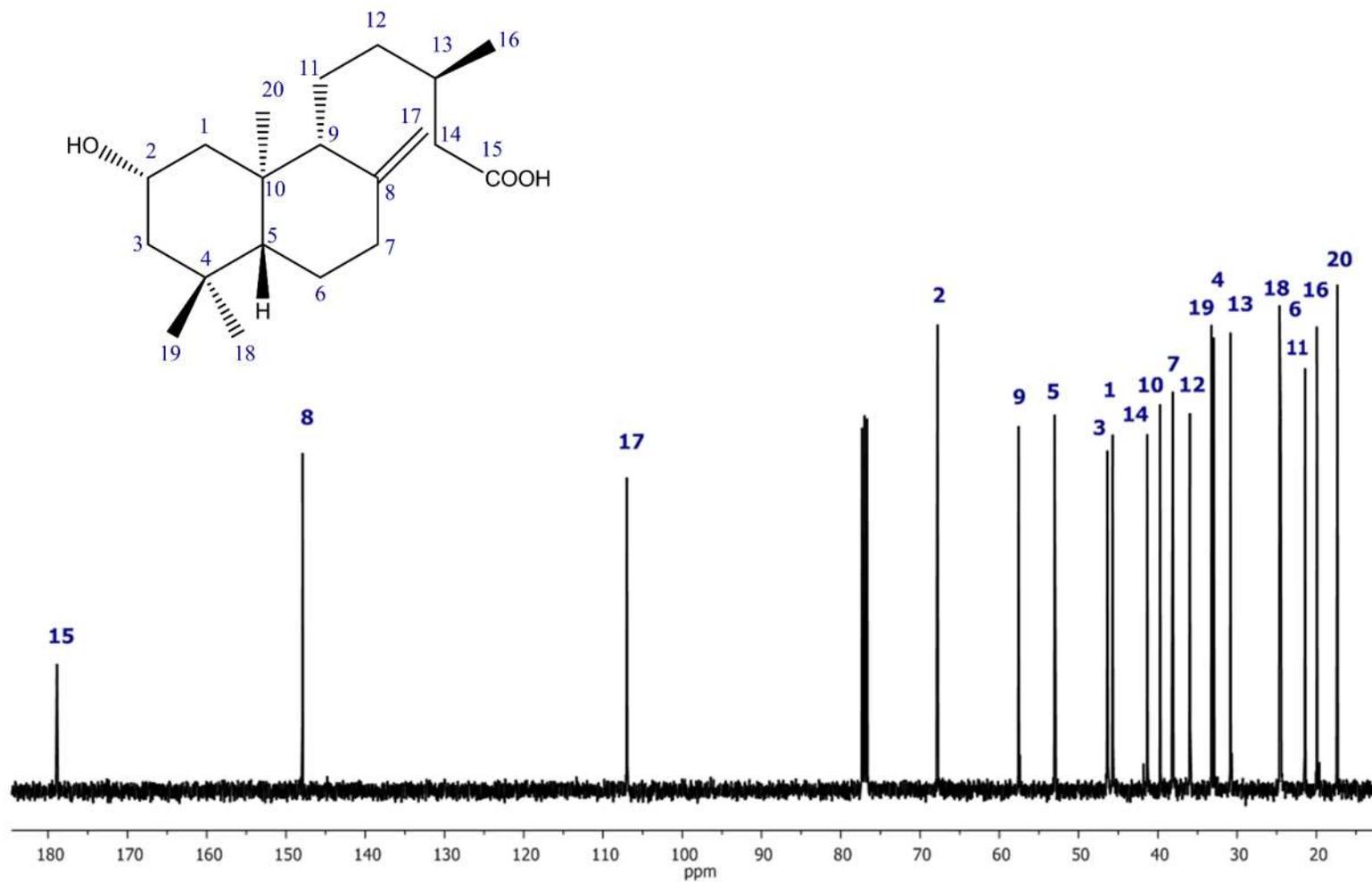
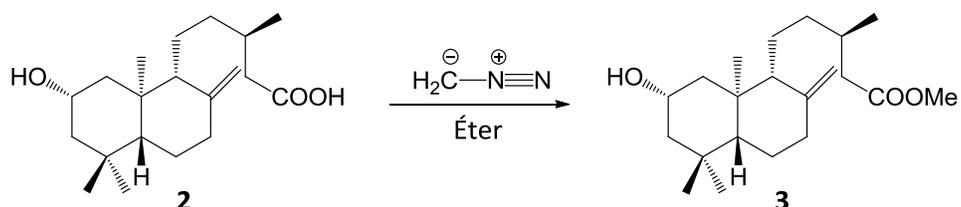


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) del ácido 2 α -hidroxieperuico (2) en CDCl_3 .

5.2. Preparación del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico

La metilación del ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**) en el grupo carboxilo se llevó a cabo con diazometano. La reacción fue *in situ*, obteniéndose como producto el éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), como un aceite denso incoloro.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 22) mostró una señal quintuple en 4.15 ppm, correspondiente al hidrógeno base hidroxilo H-2, y una señal en 3.66 ppm correspondiente al metilo del éster que integra para tres protones.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) mostró una señal en 173.3 ppm correspondiente al carbonilo de éster C-15, en 67.5 ppm se observó la señal del carbono base de hidroxilo C-2 y en 51.2 ppm la señal que se asignó al metilo de éster C-21, lo que concuerda con el reporte previo.²⁷

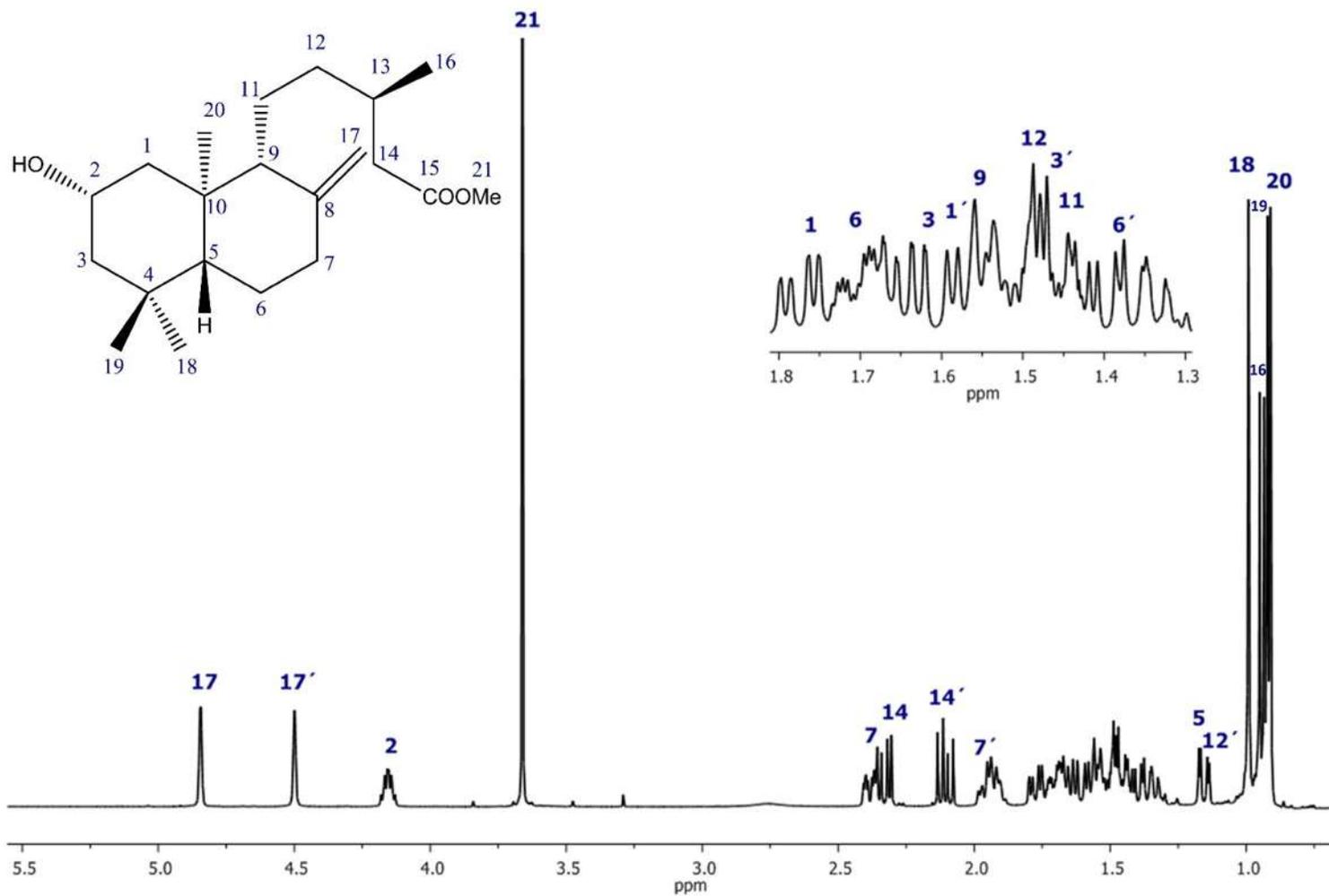


Figura 22. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del éster metílico del ácido 2α-hidroxi-peruico (**3**) en CDCl₃.

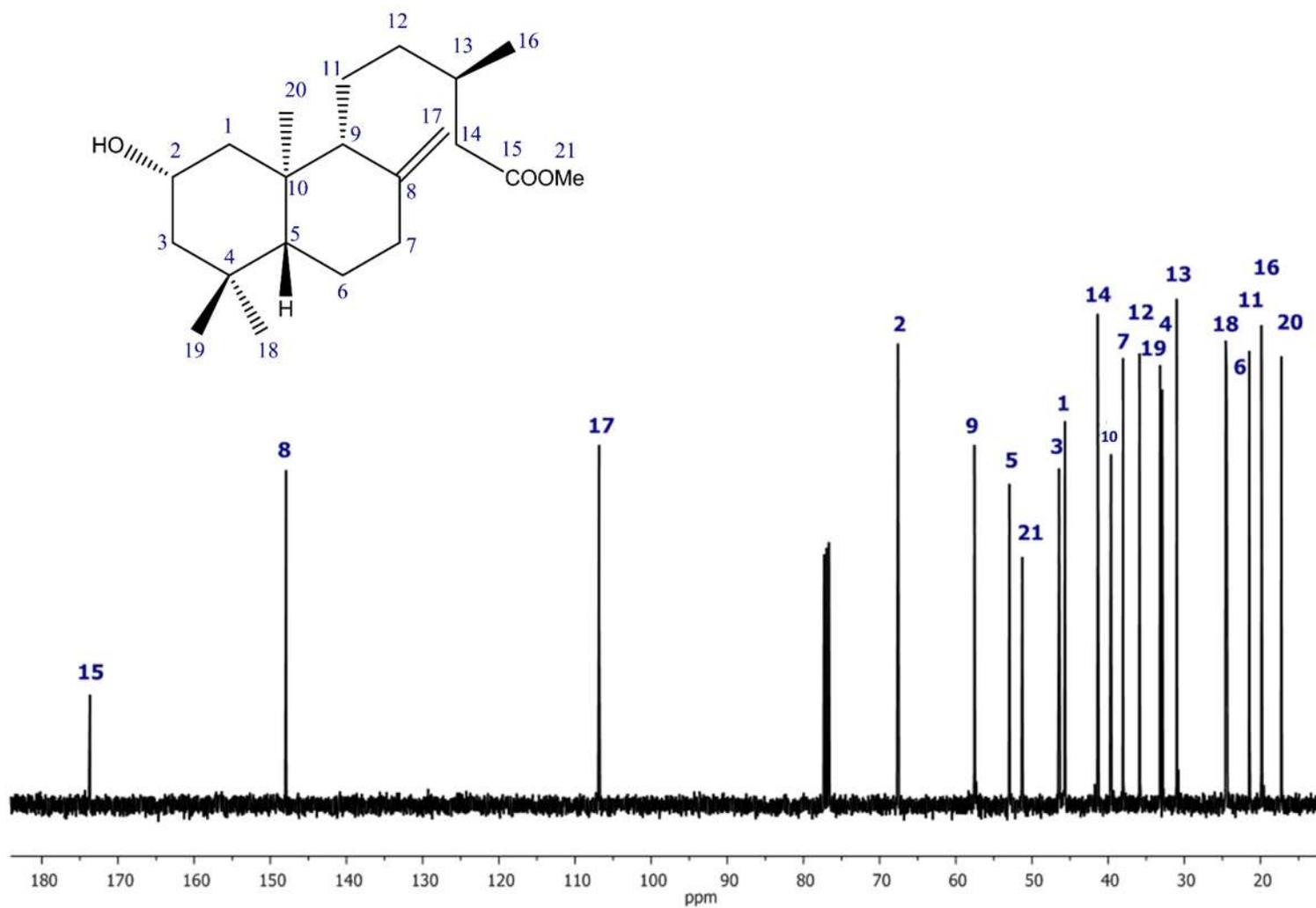
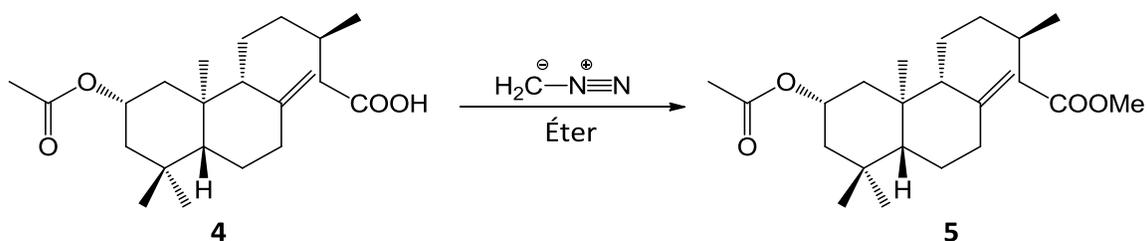


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**) en CDCl_3 .

5.3. Preparación del éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico

La metilación del ácido 2 α -acetoxieperuico (**4**) en el grupo carboxilo se llevó a cabo con diazometano. La reacción fue *in situ*, generando como producto el éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico (**5**), como un aceite denso incoloro.



El espectro de RMN de ^1H de (Figura 24) mostró una señal quintuple en 5.15 partes por millón ($J = 4.1$ Hz), correspondiente al hidrógeno base de éster H-2, una señal a 3.15 ppm del metilo de éster para el hidrógeno H-21 que integra para tres protones así como también la señal del acetato en 2.03 ppm que integra para tres protones.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) mostró dos señales de carbonilo, una en 173.7 ppm correspondiente al éster metílico y otra en 170.6 ppm asignada al éster del acetilo, en 70.8 ppm mostró una señal del carbono base de éster, en 51.1 una señal del metilo de éster y en 21.6 ppm la señal que se asignó al metilo de acetilo, los datos espectroscópicos concuerdan con lo reportado en la literatura.²⁷

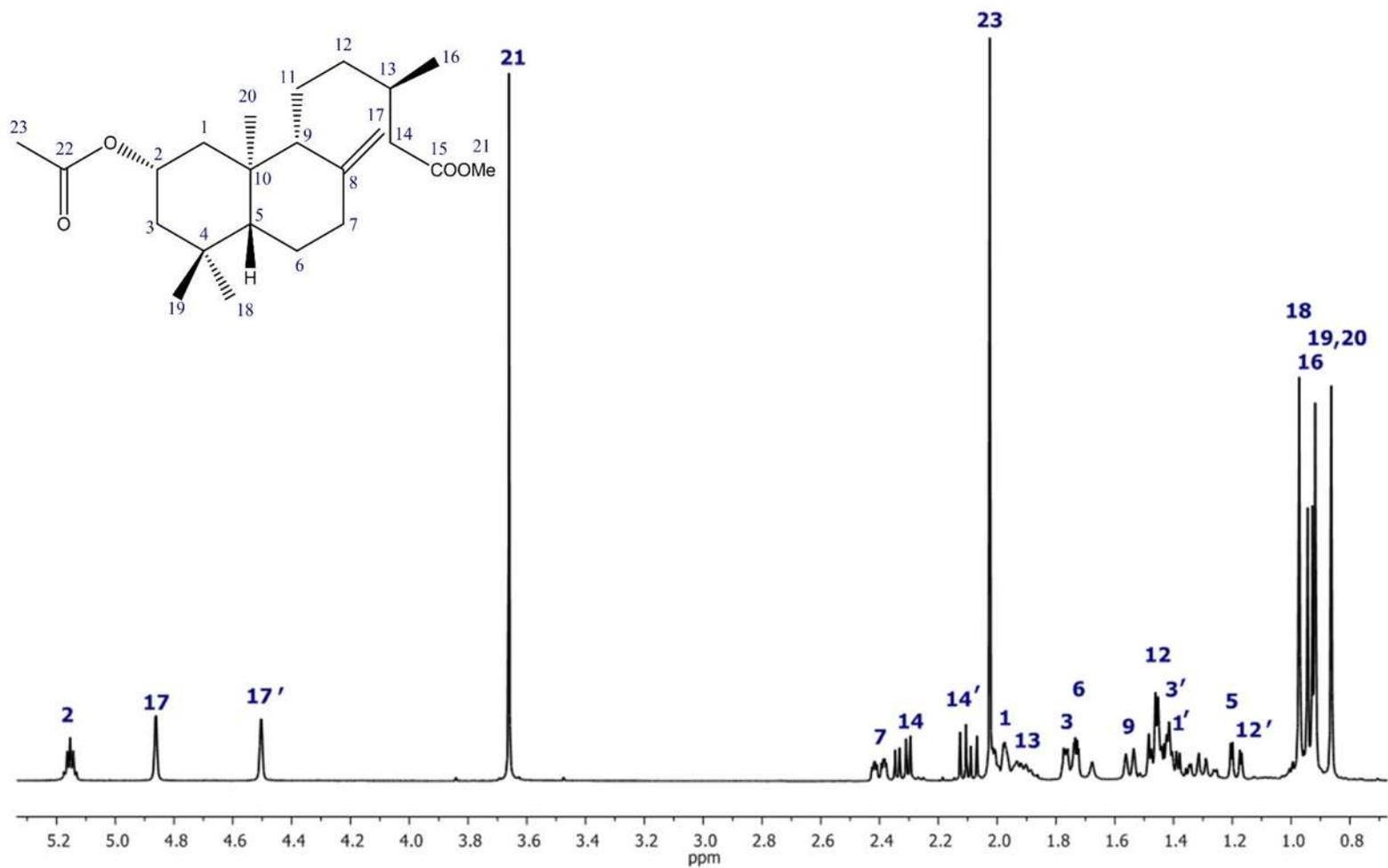


Figura 24. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del éster metílico del 2α-acetoxiperuico (5) en CDCl₃.

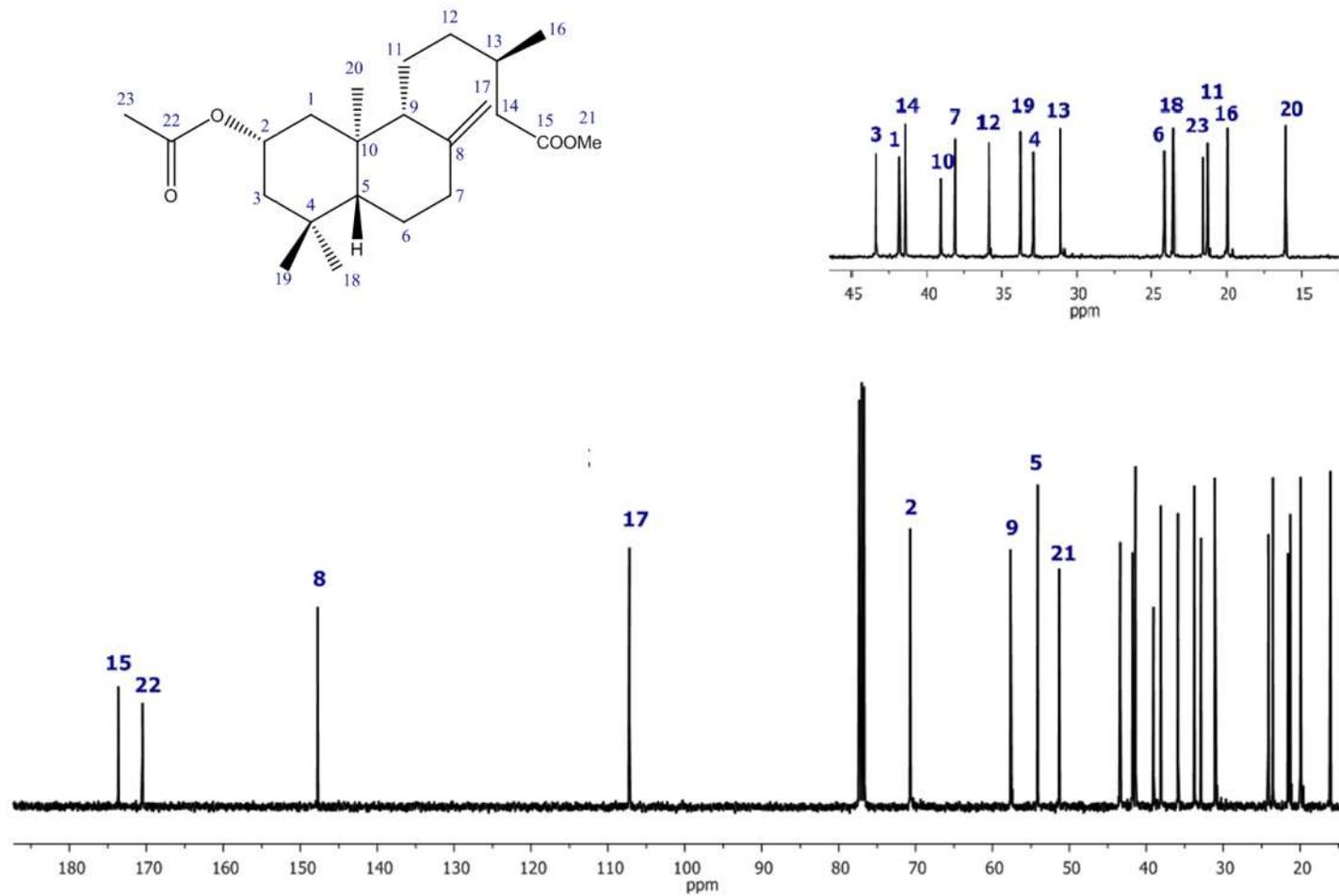
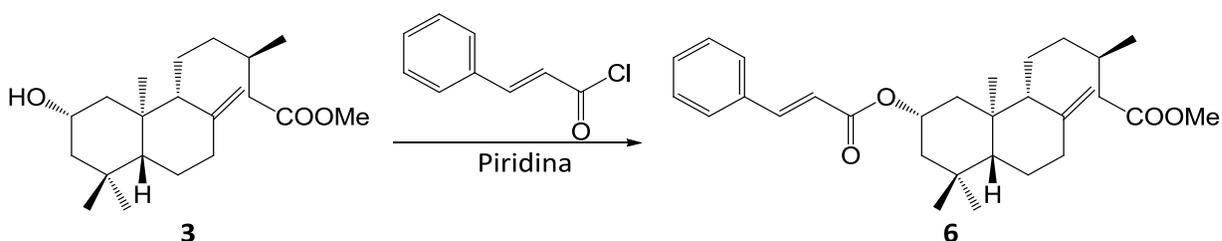


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) del éster metílico del 2 α -acetoxieperuico (5) en CDCl_3 .

5.4. Preparación del cinamato a partir del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico

El cinamato **5** se preparó a partir del derivado éster metílico del 2 α -hidroxieperuico (**3**), con el cloruro de cinamoilo en presencia de piridina recién destilada, obteniendo un aceite denso amarillo.



El espectro de RMN de ^1H (Figura 26) mostró una señal quintuple en 5.31 ppm, correspondiente al hidrógeno base de éster H-2, una señal a 3.66 ppm correspondiente al metilo de éster H-21 que integra para tres protones, dos señales dobles de un sistema AX correspondientes a los protones vinílicos del doble enlace α a carbonilo del cinamoilo; una en 6.40 ppm correspondiente al hidrógeno H-23 y la segunda en 7.66 ppm para el hidrógeno H-24, una señal triple en 7.39 ppm para los hidrógenos H-26 y H-30 y finalmente una señal cuádruple en 7.52 ppm para los hidrógenos H-27 y H-29.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 27) se observó una señal en 173.7 ppm debida al carbonilo de éster C-15, una señal a 166.6 ppm del carbonilo de éster C-22, una señal a 144.5 ppm del C-24, una señal a 134.0 ppm correspondiente al carbono cuaternario C-25, la señal correspondiente a C-28 se observó en 131.0 ppm, mientras que a 128.8 ppm una señal para los carbonos C-26 y C-30, a 128.2 ppm se vio una señal para los carbonos C-27 y C-29, así como una señal a 118.9 ppm para el C-23.

En el espectro NOESY (Figura 28) se observó interacción en el espacio entre el hidrógeno base de hidroxilo H-2 y el hidrógeno H-1, los hidrógenos H-7 y H-17, así como también el hidrógeno H-23 con el hidrógeno H-24 correspondientes a los hidrógenos vinílicos y estos a su vez presentaron interacción con el hidrógeno H-29 del anillo aromático del cinamato.

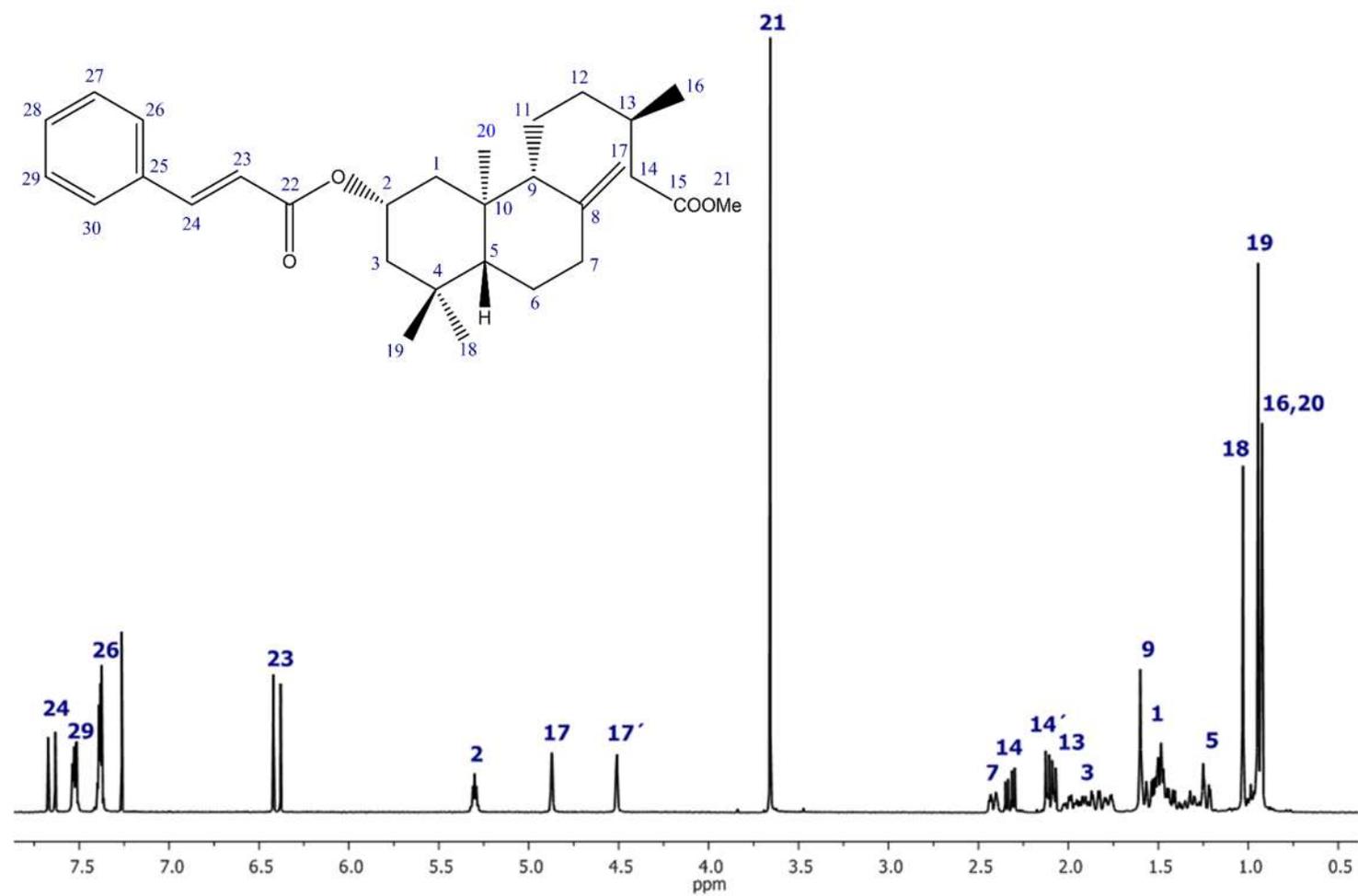


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del cinamato 6 en CDCl_3 .

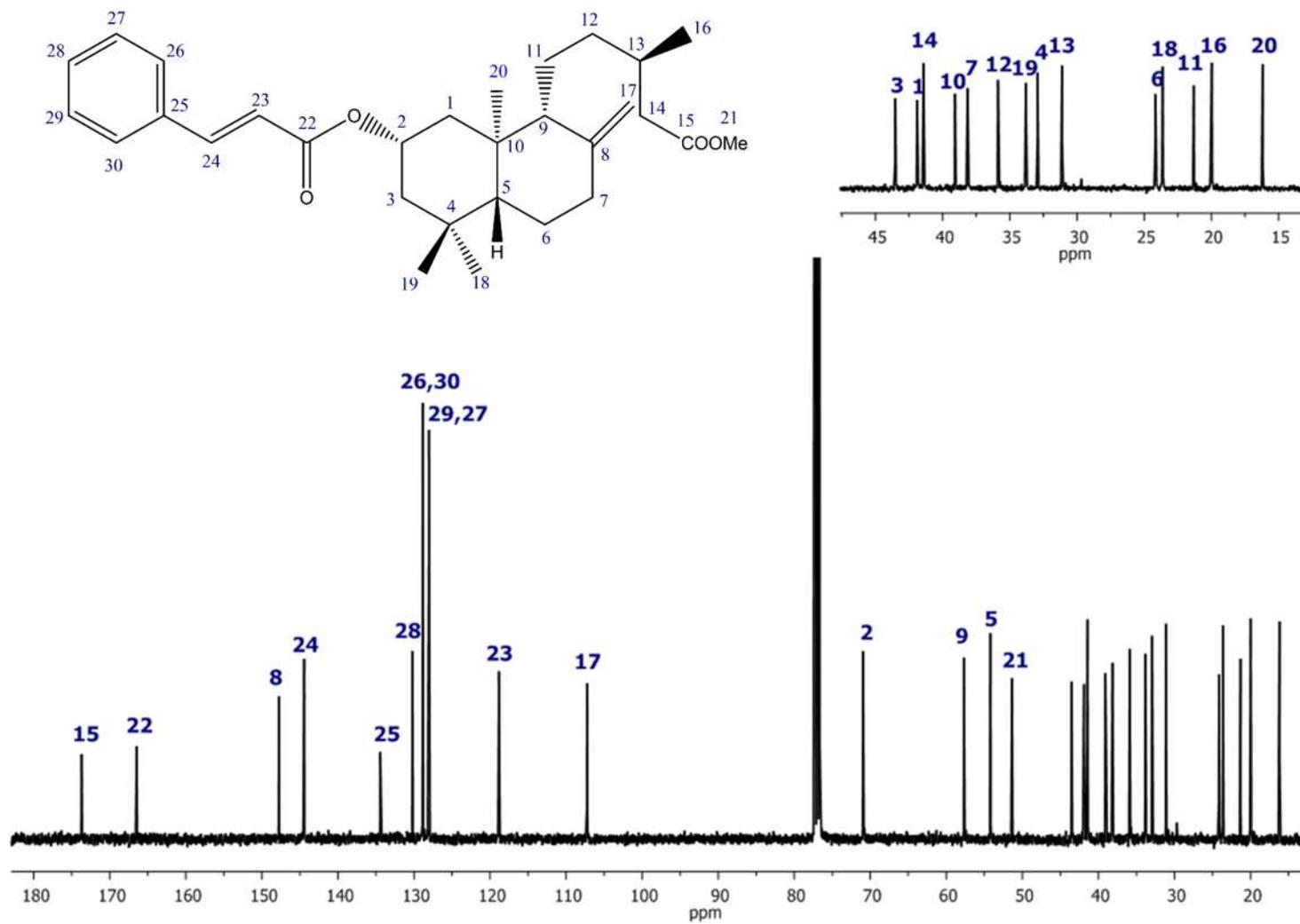


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) del cinamato 6 en CDCl_3 .

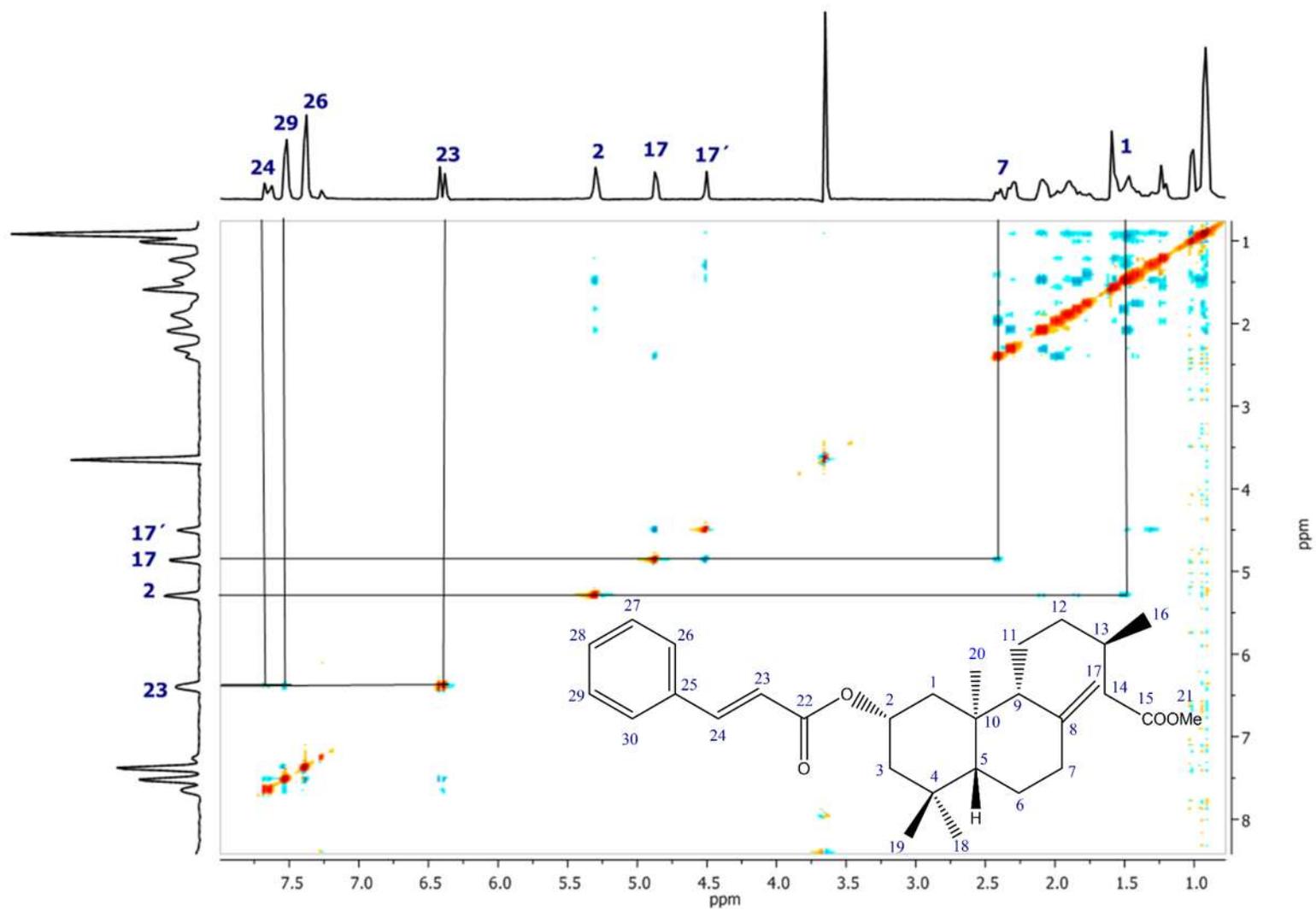


Figura 28. Espectro NOESY (400 MHz) del cinamato **6** en CDCl₃.

5.5. Modelado de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico

El modelo molecular del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**) (Figura 29) se realizó construyendo la molécula de acuerdo a los datos físicos y espectroscópicos.

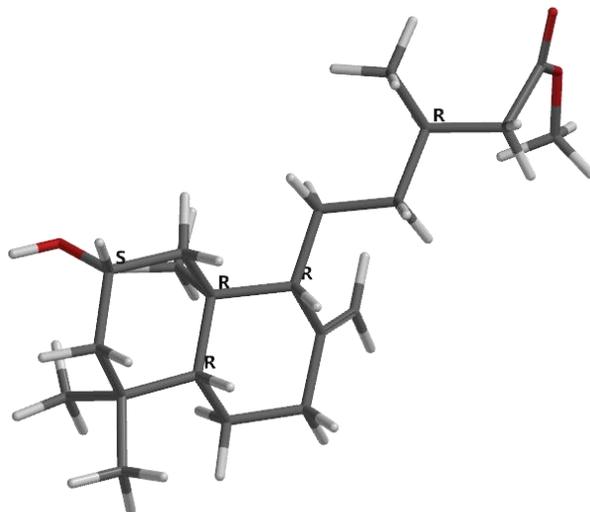


Figura 29. Modelo molecular del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), $E = -6.254$ kcal/mol, $A = 418.18$ Å², $Vol = 406.63$ Å³.

El modelo molecular del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**) (Figura 30), se realizó acorde a sus datos obtenidos mediante RMN de ¹H, ¹³C y NOESY.

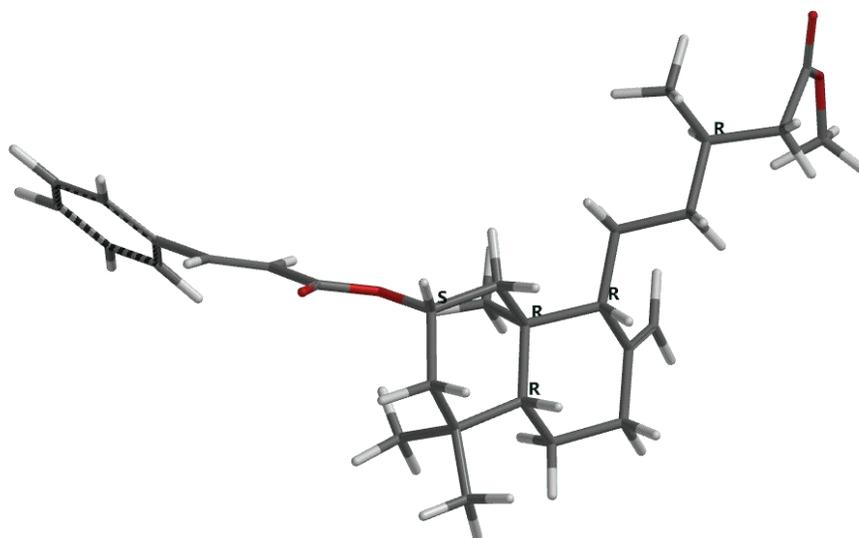


Figura 30. Modelo molecular del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**), $E = -6.9216$ kcal/mol, $A = 535.59$ Å², $Vol = 525.02$ Å³.

El modelo molecular de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**) (Figura 31), se realizó construyendo la molécula de acuerdo a los datos físicos y de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC.

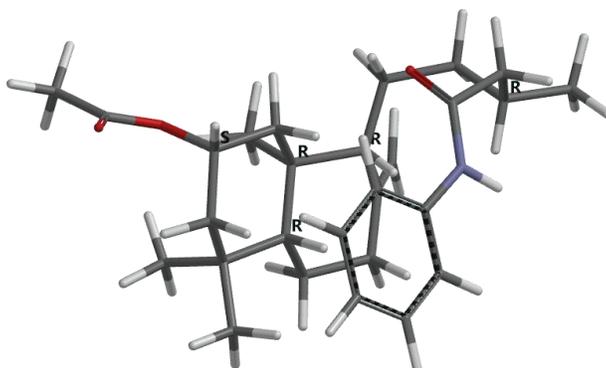


Figura 31. Modelo molecular de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**), $E = -8.7380$ kcal/mol, $A = 498.10 \text{ \AA}^2$, $\text{Vol} = 495.69 \text{ \AA}^3$.

5.6. Conformeros de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico

El conformero del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**) (Figura 32) se obtuvo empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p).

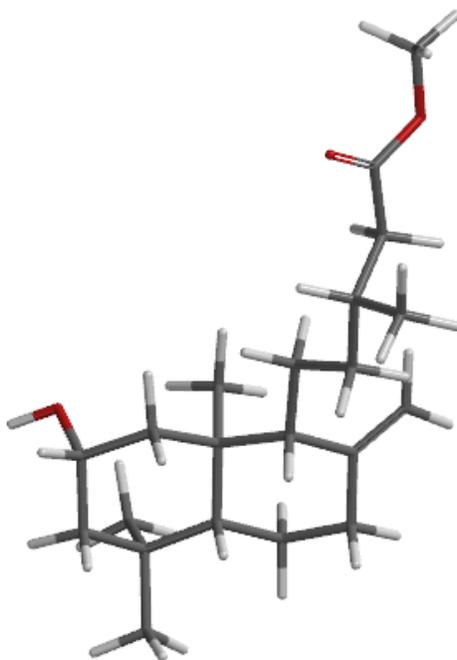


Figura 32. Conformero de menor energía del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), $E_{DFT} = -657399.773$ kcal/mol, $A = 397.91 \text{ \AA}^2$, $\text{Vol} = 385.80 \text{ \AA}^3$.

Empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p) se obtuvo el conformero de menor energía del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**) (Figura 33).

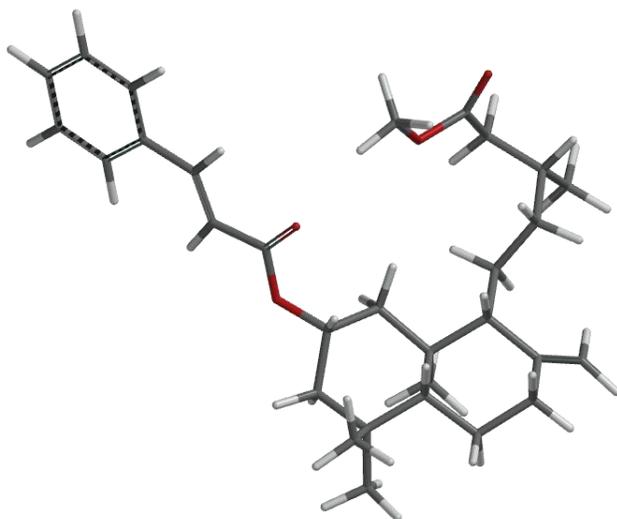


Figura 33. Conformero de menor energía del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**), $E_{DFT} = -3858057.89$ kcal/mol, $A = 535.82 \text{ \AA}^2$, $\text{Vol} = 524.79 \text{ \AA}^3$.

El conformero de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**) (Figura 34) se obtuvo empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p).

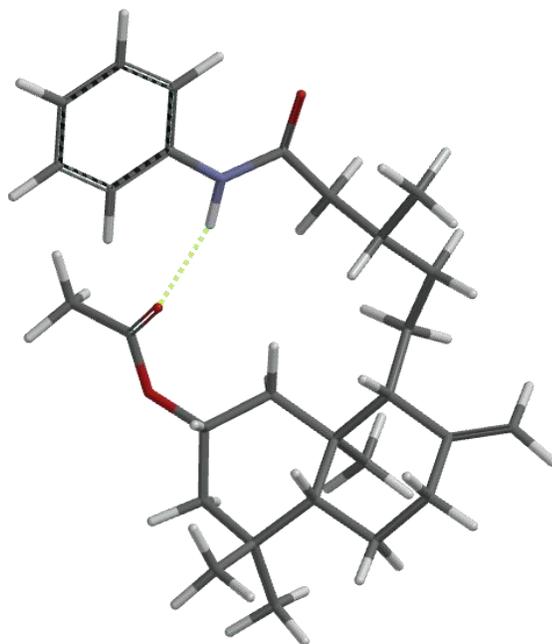


Figura 34. Conformero de menor energía de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**), $E_{DFT} = -861065.184$ kcal/mol, $A = 498.45 \text{ \AA}^2$, $\text{Vol} = 494.81 \text{ \AA}^3$.

5.7. Anclaje molecular de los derivados del diterpeno tipo *ent*-labdano

A los conformeros de menor energía de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico, el éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), el cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**), la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**) y el derivado teórico obtenido por modelado molecular **8** que se puede preparar a partir del producto natural **1** se les realizó el estudio Docking por separado; proteína-ligando para conocer su sitio blanco en el heterodímero formado por *alfa*- y *beta*- tubulina. De acuerdo con los antecedentes previos hay reportes donde se confirma que los diterpenos tipo labdano actúan como anticancerígenos, así que se tomó como referencia uno de los mejores anticancerígenos hoy en día, el paclitaxel, que tiene como sitio activo a la *beta*-tubulina (Figura 35), sitio de interés donde se espera que actúen los derivados diterpénicos.

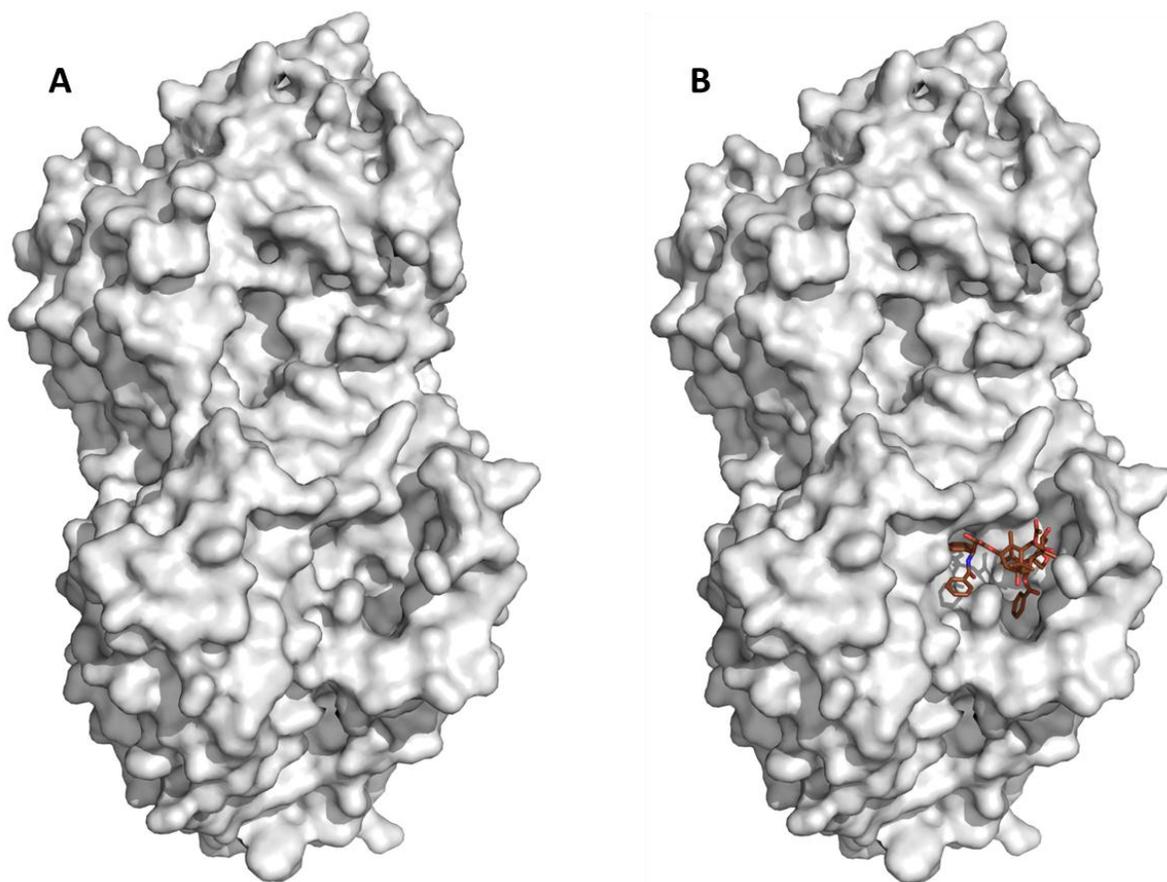


Figura 35. A) Heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina obtenida del Protein Data Bank, código 1JFF. B) Sitio activo del paclitaxel (café) en la *beta*-tubulina.

5.7.1. Anclaje molecular del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico-tubulina

Se llevó a cabo el docking del conformero de menor energía del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), sometido a un estudio ciego sobre todo el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina, así como a un estudio de refinamiento en una rejilla de 30 Å³ tomando como centro el sitio ocupado por el paclitaxel. El estudio ciego del derivado **3** mostró interacción en *alfa*-tubulina, por otra parte el estudio de refinamiento en la rejilla de 30 Å³ del mismo derivado **3** cuenta con en el mismo sitio de interacción que el paclitaxel (Figura 36), con una energía de afinidad de -6.9 kcal/mol comparada con la energía de afinidad del paclitaxel de -10.0 kcal/mol.

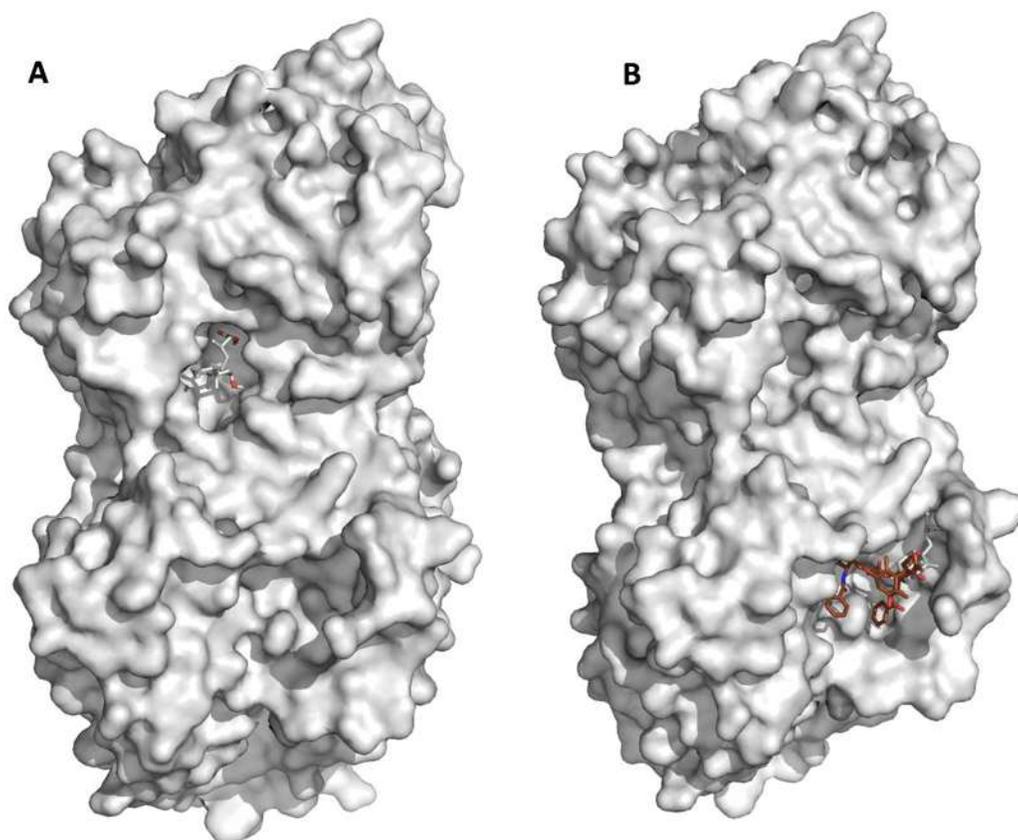


Figura 36. A) Sitio blanco en la tubulina donde actúa el éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), $E_{Dock} = -6.9$ kcal/mol. **B)** Comparación del modo de unión obtenido por docking ciego con la estructura cristalográfica del paclitaxel (en café).

5.7.2. Anclaje molecular cinamato-tubulina.

Se llevó a cabo el docking del conformero de menor energía del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**), sometido a un estudio ciego sobre todo el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina, así como un estudio de refinamiento en una rejilla de 30 Å³ tomando como centro el sitio ocupado por el paclitaxel. Ambos estudios mostraron que el derivado **6** cuenta con en el mismo sitio de interacción que el paclitaxel (Figura 37), con una energía de afinidad de -8.5 kcal/mol comparada con la energía de afinidad del paclitaxel de -10.0 kcal/mol.

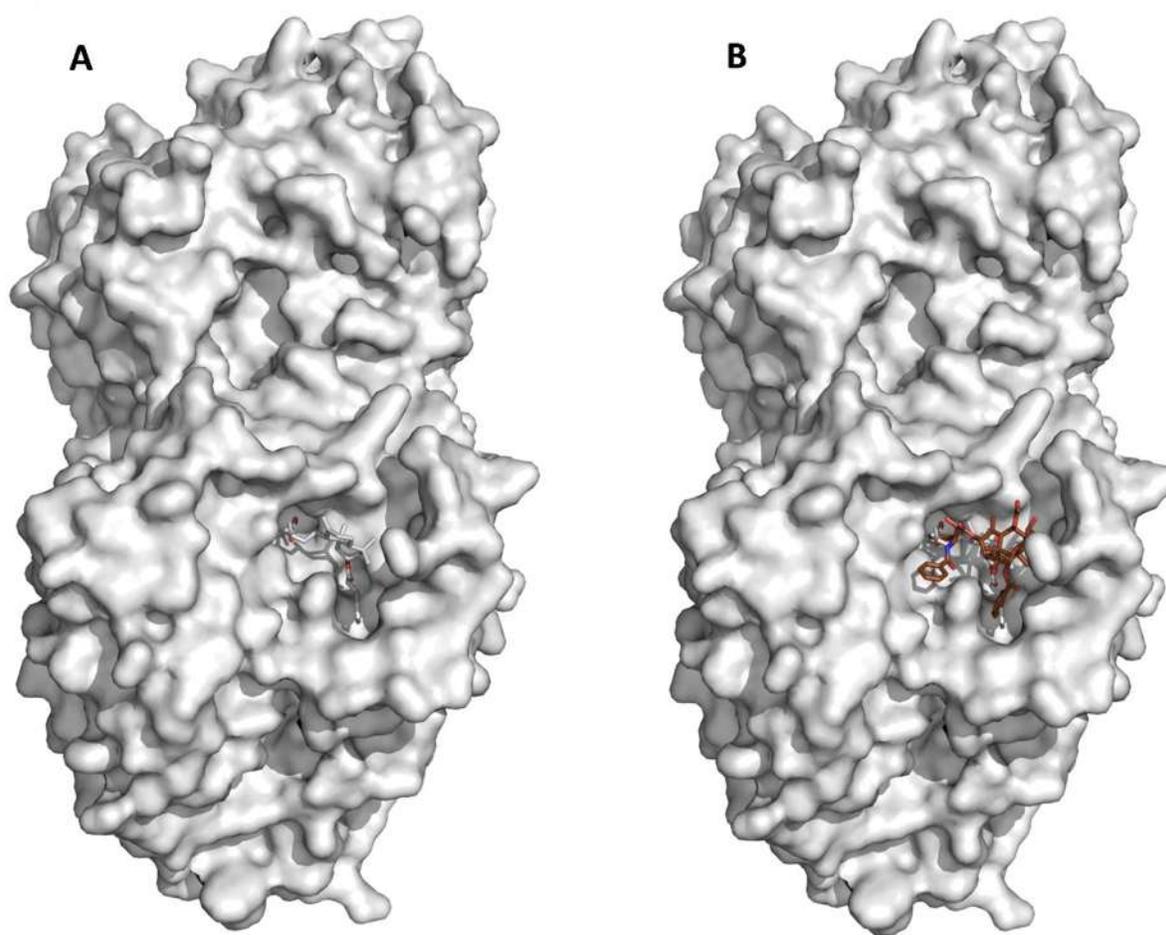


Figura 37. A) Sitio blanco en la tubulina donde actúa el cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**), $E_{Dock} = -8.5$ kcal/mol. **B)** Comparación del modo de unión obtenido por docking ciego con la estructura cristalográfica del paclitaxel (en café).

5.7.3. Anclaje molecular amida-tubulina

Se llevó a cabo el docking del conformero de menor energía de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**), sometido a un estudio ciego sobre todo el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina, así como un estudio de refinamiento en una rejilla de 30 Å³ tomando como centro el sitio ocupado por el paclitaxel. Ambos estudios mostraron que el derivado **7** cuenta con en el mismo sitio de interacción que el paclitaxel (Figura 38), con una energía de afinidad de -8.0 kcal/mol comparada con la energía de afinidad del paclitaxel de -10.0 kcal/mol.

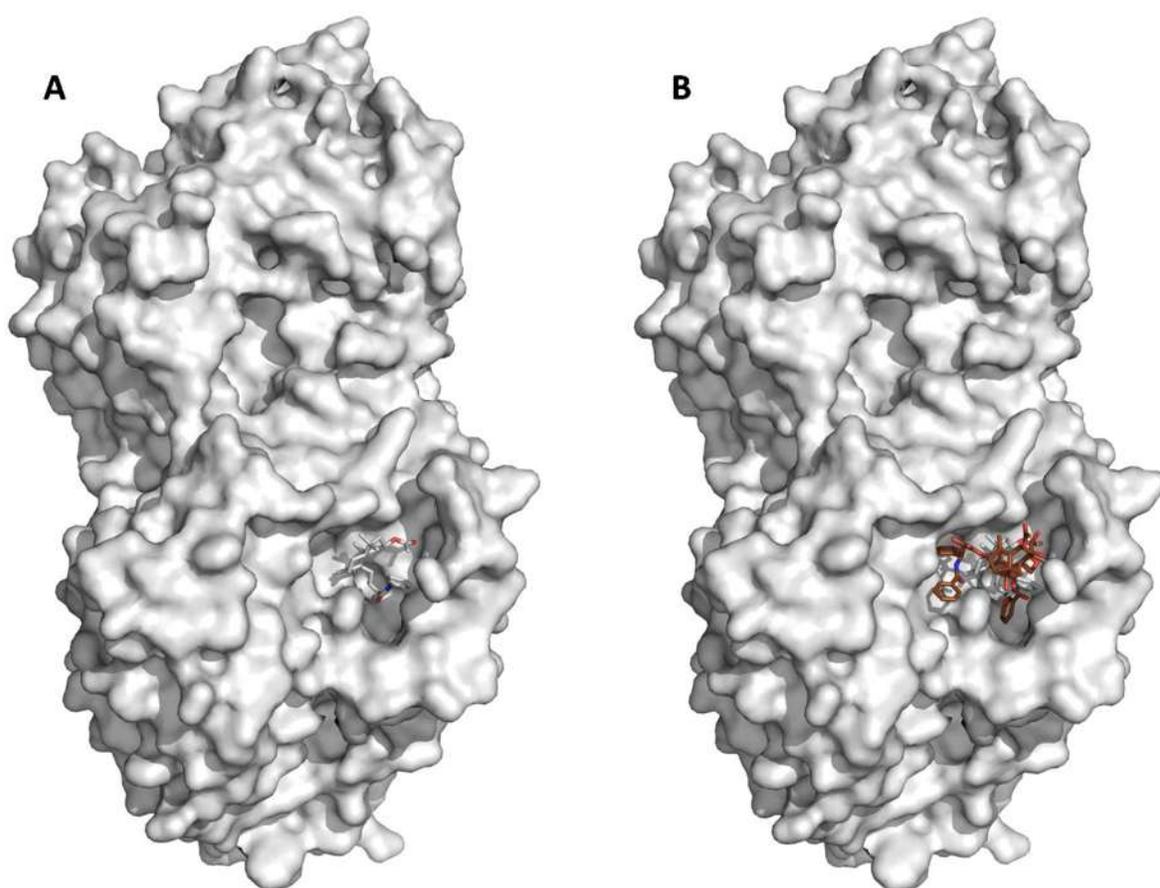


Figura 38. **A)** Sitio blanco en la tubulina donde actúa la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**), $E_{Dock} = -8.0$ kcal/mol. **B)** Comparación del modo de unión obtenido por docking ciego con la estructura cristalográfica del paclitaxel (en café).

6. PROPUESTA TEÓRICA DEL DERIVADO 8

6.1. Preparación del derivado teórico 8

De acuerdo a los dos grupos funcionales que presenta el producto natural (**1**) de *Ageratina petiolaris* se propone al derivado teórico **8** (Figura 39) obtenido por modelado molecular. De esta manera se realizó su análisis computacional de anclaje molecular en *alfa*- y *beta*-tubulina. Dado que su sitio blanco es el mismo que el ocupado por el paclitaxel en la *beta*-tubulina, pero con una energía de afinidad mayor que los derivados anteriores, por este motivo se tiene como perspectiva a corto plazo su preparación.

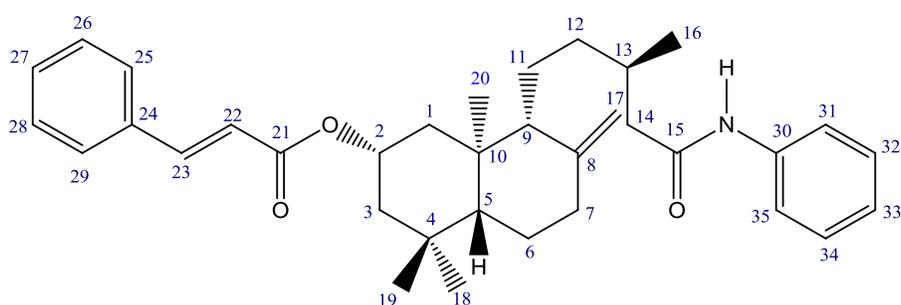


Figura 39. Derivado teórico **8** a partir del ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**1**).

6.2. Modelo del derivado teórico 8

El modelado del derivado teórico **8** (Figura 40), se realizó construyendo la molécula mediante su predicción tomando en cuenta sus los grupos funcionales que presentan los derivados **6** y **7**.

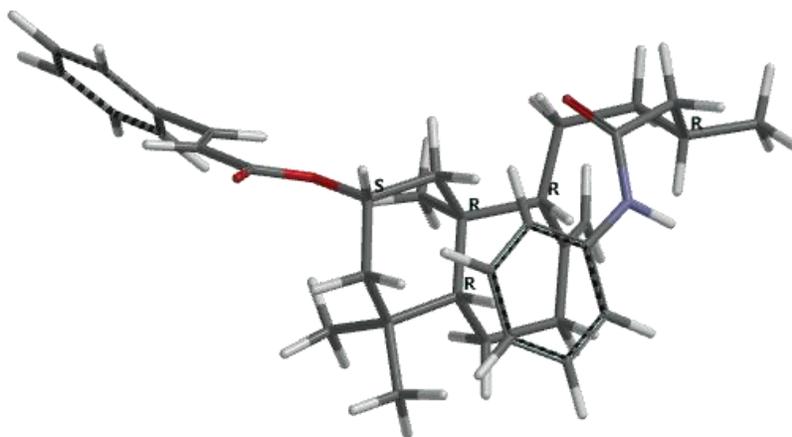


Figura 40. Modelo molecular del derivado teórico **8**, $E = -11.68499$ kcal/mol, $A = 594.77$ Å², Vol = 593.80 Å³.

6.3. Confórmero del derivado teórico 8

El confórmero de menor energía del derivado **8** (Figura 41) se obtuvo empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p).

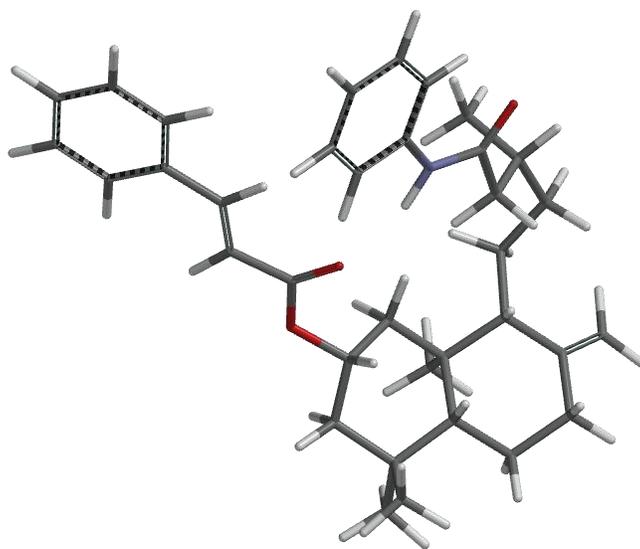


Figura 41. Confórmero de menor energía del derivado **8**, $E_{DFT} = -102959$ kcal/mol, $A = 591.66 \text{ \AA}^2$, $\text{Vol} = 592.74 \text{ \AA}^3$.

6.4. Anclaje molecular del derivado teórico **8**

Se llevó a cabo el docking del conformero de menor energía del derivado teórico **8**, sometido a un estudio ciego sobre todo el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina, así como un estudio de refinamiento en una rejilla de 30 Å³ tomando como centro el sitio ocupado por el paclitaxel. Ambos estudios mostraron que el derivado teórico **8** cuenta con en el mismo sitio de interacción que el paclitaxel (Figura 42), con una energía de afinidad de -9.1 kcal/mol comparada con la energía de afinidad del paclitaxel de -10.0 kcal/mol.

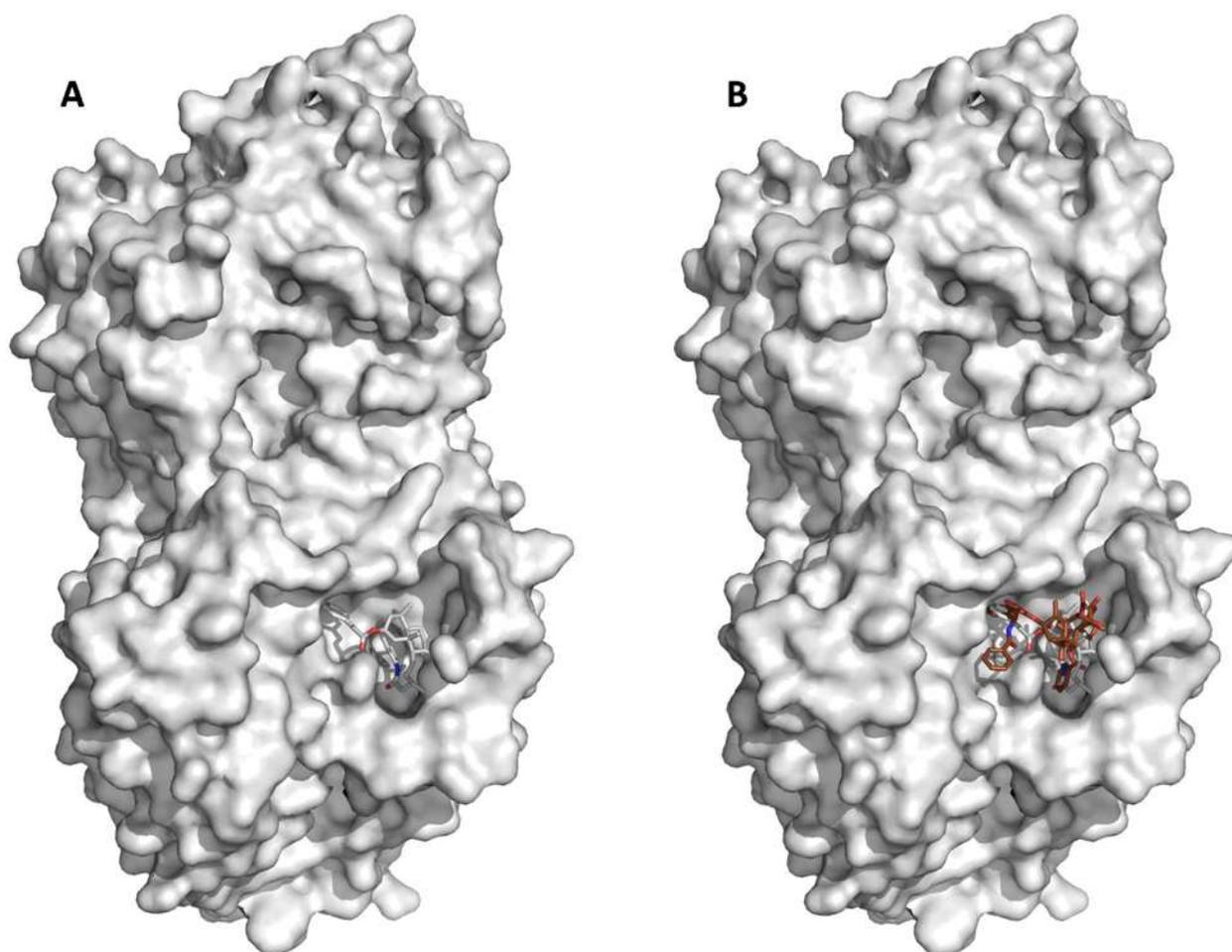
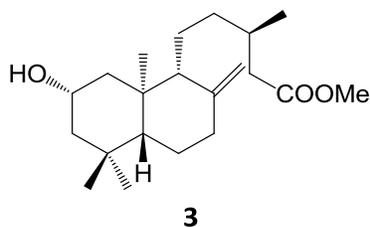


Figura 42. **A)** Sitio blanco en la tubulina donde actúa el derivado teórico **8**, $E_{Dock} = -9.1$ kcal/mol. **B)** Comparación del modo de unión obtenido por docking ciego con la estructura cristalográfica del paclitaxel (en café).

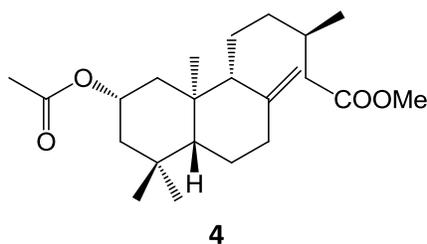
7. CONCLUSIONES

El ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**1**), diterpeno tipo *ent*-labdano, cuenta con dos grupos funcionales en su esqueleto, un hidroxilo en C-2, un carboxilo en C-15 y un doble enlace exocíclico permitiendo modificaciones químicas necesarias para obtener los derivados **3-6**.

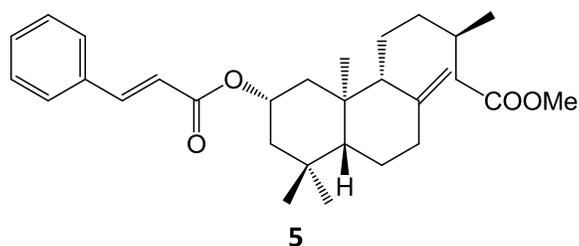
El derivados **3** se preparó a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**) modificando el grupo carboxilo en posición C-15 con diazometano.



Del ácido 2 α -acetoxieperuico (**4**), derivado del producto natural de *Ageratina petiolaris* se obtuvo el éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico (**5**) empleando diazometano previa acetilación en condiciones estándar de reacción.



La formación del derivado metilado **3** permitió la preparación del cinamato **6** en la posición 2 del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**3**), empleando cloruro de cinamoilo y piridina.



En el estudio del anclaje molecular de los derivados diterpénicos **3**, **6**, **7** y el derivado teórico **8**, con el heterodímero de *alfa*- y *beta*-*tubulina*, mostraron que su sitio blanco es el mismo sitio que el ocupado por el paclitaxel, pero con una afinidad menor que el compuesto empleado en la clínica, esto nos indica que el anillo aromático introducido al

esqueleto *ent*-labdano aumenta la afinidad por la proteína por lo que funcionalizar aromáticamente este tipo de esqueletos hidrocarbonados puede incrementar la afinidad de estas sustancias con el fin de encontrar una alternativa en el tratamiento de las enfermedades que presentan un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo.

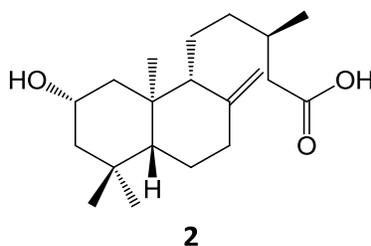
8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Generalidades

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C se adquirieron en un equipo Varian Mercury Plus a 400 MHz y 100 MHz respectivamente, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y como referencia interna tetrametilsilano (TMS), la purificación de los compuestos obtenidos fue mediante cromatografía en columna empleando gel de sílice 230-400 mallas.

8.2. Obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico

Para la obtención del extracto se maceraron las flores con hexano y cloruro de metileno. Posteriormente se concentró en rotavapor obteniendo 26 g del macerado de hexano y 16 g del macerado de cloruro de metileno, ambos en forma de una miel oscura. El extracto hexánico de las flores se sometió a hidrólisis alcalina empleando KOH y metanol a reflujo por 2 h, seguido de acidificación del crudo de reacción con HCl al 10% hasta pH de 2, la fase orgánica se extrajo con AcOEt, se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El concentrado del crudo de reacción se purificó en cromatografía en columna para obtener el ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**) como cristales incoloros en forma de aguja en un rendimiento del 17%.



Agujas incoloras

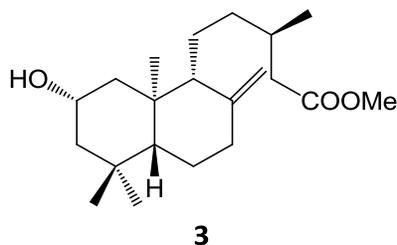
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4.84 (1H, s, H-17), 4.50 (1H, s, H-17'), 4.17 (1H, quint, $J = 5.4$ Hz, H-2), 2.39 (1H, m, H-7), 2.39 (1H, dd, $J = 14.7, 5.4$ Hz, H-14), 2.12 (1H, dd, $J = 14.7, 8.4$ Hz, H-14'), 1.95 (1H, m, H-7'), 1.94 (1H, m, H-13), 1.77 (1H, m, H-1), 1.71 (1H, m, H-6),

1.64 (1H, m, H-3), 1.61 (1H, m, H-1'), 1.57 (1H, m, H-9), 1.51 (1H, m, H-12), 1.49 (1H, m, H-3'), 1.48 (1H, m, H-11), 1.42 (1H, m, H-6'), 1.15 (2H, dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, H-5), 1.03 (1H, m, H-12'), 0.99 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s H-20).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 178.9 (C=O, C-15), 148.0 (C, C-8), 107.0 (CH_2 , C-17), 67.8 (CH, C-2), 57.6 (CH, C-9), 53.1 (CH, C-5), 46.4 (CH_2 , C-3), 45.7 (CH_2 , C-1), 41.3 (CH_2 , C-14), 39.7 (C, C-10), 38.1 (CH_2 , C-7), 36.0 (CH_2 , C-12), 33.3 (CH_3 , C-19), 33.0 (C, C-14), 30.9 (CH, C-13), 24.6 (CH_3 , C-18), 24.5 (CH_2 , C-6), 21.5 (CH_2 , C-11), 19.9 (CH_3 , C-16), 17.3 (CH_3 , C-20).

8.3. Preparación del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (2)

En un matraz de 50 mL se colocaron 200 mg del ácido 2 α -hidroxieperuico, se disolvieron en 2 mL de éter etílico, el matraz se tapó con una septa y se llevó a 4 °C. Posteriormente se preparó el diazometano con la *N*-nitroso-metil-urea. Para su preparación, en un segundo matraz de 50 mL sobre un baño de hielo se colocaron 3 mL de éter etílico y se adicionaron 2 mL de KOH al 40%, a continuación se adicionaron 320.06 mg de la *N*-nitroso-metil-urea (10:1) en pequeñas porciones durante un minuto, manteniendo una agitación suave. Una vez formado el diazometano la fase etérea se separó de la fase acuosa por medio de un embudo de separación. El diazometano se agregó a la materia prima dejando reaccionar 24 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo la reacción se monitorio por medio de cromatografía en capa fina. Una vez consumida la materia prima, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y con agua, se secó sobre sulfato anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida obteniendo 152.5 mg de un aceite denso incoloro correspondiente al 73% de rendimiento de **3**.



Aceite denso incoloro

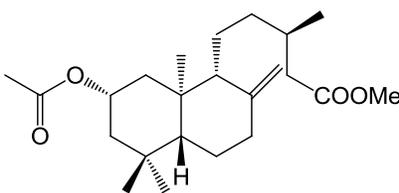
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.84 (1H, s, H-17), 4.500 (1H, s, H-17'), 4.15 (1H, quint, $J = 4.9$ Hz, H-2), 3.65 (3H, s, H-21), 2.38 (3H, m, H-7), 2.34 (1H dd, $J = 14.6, 5.9$ Hz, H-14), 2.12 (1H, dd, $J = 14.7, 8.2$ Hz, H-14'), 1.77 (1H, m, H-1), 1.70 (1H, m, H-6), 1.60 (1H, m, H-3), 1.59 (1H, m, H-1'), 1.55 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-12), 1.46 (1H, m, H-3'), 1.38 (1H, m, H-

6'), 1.15 (1H, dd, $J = 9.58, 2.9$ Hz, H-5), 1.0 (1H, m, H-12'), 0.99 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 174 (C=O, C-15), 148.2 (C, C-8), 106.8 (CH_2 , C-17), 67.58 (CH, C-2), 57.5 (CH, C-9), 53.0 (CH, C-5), 51.12 (CH_3 , C-21), 46.6 (CH_2 , C-3), 45.82 (CH_2 , C-1), 41.3 (CH_2 , C-14), 39.7 (C, C-10), 38.5 (CH_2 , C-7), 35.9 (CH_2 , C-12), 33.2 (CH_3 , C-19), 33. (C, C-4), 31.2 (CH, C-13), 24.6 (CH_3 , C-18), 24.4 (CH_2 , C-6), 21.4 (CH_2 , C-11), 19.8 (CH_3 , C-16), 17.3 (CH_3 , C-20).

8.4. Preparación de éster metílico del ácido 2 α -acetoxieperuico

En un matraz de 50 mL se colocaron 70 mg de una mezcla del ácido 2 α -acetoxieperuico (4), se disolvieron en 2 mL de éter etílico, el matraz se llevó a 4 °C. Posteriormente se preparó el diazometano con la *N*-nitroso-metil-urea. Para su preparación en un segundo matraz de 50 mL sobre un baño de hielo se colocaron 3 mL de éter etílico y se le adicionaron 2 mL de KOH al 40% y luego 198.22 mg de la *N*-nitroso-metil-urea (10:1) en pequeñas porciones durante un minuto, manteniendo una agitación suave. Una vez formado el diazometano la fase etérea se separó de la fase acuosa. El diazometano se adicionó a la materia prima lentamente dejando reaccionar 24 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo la reacción se monitorio por medio de cromatografía en capa fina. Una vez consumida la materia prima, el diazometano remanente se eliminó bajo corriente de Nitrógeno para posteriormente extraer con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio y con agua, secándose sobre sulfato de sodio anhidro. El producto de reacción se sometió a cromatografía en columna y en las fracciones eluidas con Hex:AcOEt 19:1 se obtuvieron 11.3 mg del éster metílico del 2 α -acetoxieperuico (5) en un rendimiento del 16% de (5).



5

Aceite denso incoloro

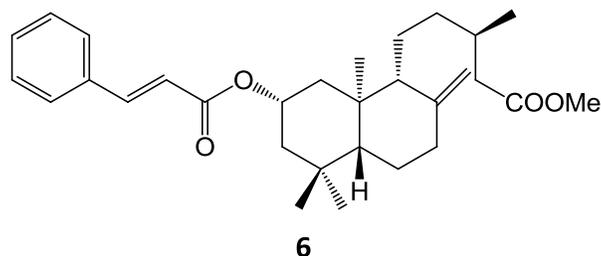
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.15 (1H, quint, $J = 4.4$ Hz, H-2), 4.86 (1H, s, H-17), 4.50 (1H, s, H-17'), 4.50 (3H, s, 3H, s, H-21), 2.40 (2H, m, H-7), 2.32 (1H, dd, $J = 14.9, 5.4$ Hz, H-14), 2.1 (1H, dd, $J = 14.9, 8.4$, H-14'), 2.02 (3H, s, H-23), 1.97 (1H, m, H-1), 1.93 (1H, m, H-13), 1.77 (1H, m, H-3), 1.73 (1H, m, H-6), 1.53 (1H, m, H-9), 1.46 (1H, m, H-12), 1.4 (1H, m, H-

3'), 1.40 (1H, m, H-1'), 1.2 (1H, dd, $J = 12.5, 2.6$ Hz, H-5), 1.17 (1H, m, H-12'), 0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ 179.2 (C=O, C-15), 170.6 (C=O, C-22), 147.8 (C, C-8), 107.2 (CH_2 , C-17), 70.8 (CH, C-2), 57.8 (CH, C-9), 54.2 (CH, C-5), 51.3 (CH_3 , C-21) 43.4 (CH_2 , C-3), 41.8 (CH_2 , C-1), 41.4 (CH_2 , C-14), 39.0 (C, C-10), 38.1 (CH_2 , C-7), 35.8 (CH_2 , C-12), 33.7 (CH_3 , C-19), 32.8 (C, C-4), 31.0 (CH, C-13), 24.2 (CH_2 , C-6), 23.5 (CH_3 , C-18), 21.6 (CH_3 , C-23), 21.3 (CH_2 , C-11), 20.0 (CH_3 , C-16), 16.0 (CH_3 , C-20).

8.5. Preparación del cinamato del éster metílico del 2 α -hidroxieperuico

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 42 mg del éster metílico del 2 α -hidroxieperuico (**3**) adicionándole 0.416 g de cloruro de cinamoilo (2:1) y 3 mL de piridina seca recién destilada con atmósfera inerte de argón. La mezcla de reacción se dejó en baño de vapor durante 8 horas, transcurrido el tiempo la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo, lavándose con HCl al 10%, agua destilada, solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua destilada. Posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó en columna con gel de sílice 230-400 mallas. De las fracciones eluidas con Hex:AcOEt 19:1 se obtuvieron 9.3 mg de **6** en forma de miel amarilla con un 16% de rendimiento.



Aceite denso amarillo

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-24), 7.52 (2H, dd, $J = 6.0$, Hz, H-29), 7.38 (3H, t, $J = 2.1$ Hz, H-26), 6.40 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-23), 5.30 (1H, quint, $J = 5.4$ Hz, H-2), 4.87 (1H, s, H-17), 4.51 (1H, s, H-17'), 3.65 (3H, s, H-21), 2.35 (1H, m, H-7), 2.32 (1H, dd, $J = 14.7, 5.4$ Hz, H-14), 2.10 (1H, dd, $J = 14.7, 8.4$ Hz, H-14'), 2.00 (1H, m, H-13), 1.90 (1H, m, H-3), 1.56 (1H, m, H-9), 1.50 (1H, m, H-1), 1.15 (2H, dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, H-5), 1.03 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 173.7 (C=O, C-15), 166.6 (C=O, C-22) 148.0 (C, C-8), 134 (C, C-25), 130.2 (CH, C-28), 128.8 (CH, C-26 y C-30), 128.2 (CH, C-27 y C-29), 118.9 (CH, C-23),

107.3 (CH₂, C-17), 71.0 (CH, C-2), 57.8 (CH, C-9), 54.2 (CH, C-5), 51.4 (CH₃, C-21), 43.5 (CH₂, C-3), 41.9 (CH₂, C-1), 41.4 (CH₂, C-14), 39.1 (C, C-10), 38.1 (CH₂, C-7), 35.8 (CH₂, C-12), 33.8 (CH₃, C-19), 32.8 (C, C-4), 31.1 (CH, C-13), 23.6 (CH₃, C-18), 24.1 (CH₂, C-6), 21.3 (CH₂, C-11), 19.9 (CH₃, C-16), 16.1 (CH₃, C-20).

8.6. Modelado molecular de los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico

Los modelos moleculares se obtuvieron utilizando el programa Spartan¹⁴ aplicando el protocolo Monte Carlo empleando mecánica molecular MMFF para encontrar las estructuras de mínima energía de cada derivado del ácido 2 α -hidroxieperuico. Los conformeros de mínima energía se optimizaron mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con el nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p).

8.7. Estudio Docking

Los estudios de anclaje molecular entre los derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico y el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina, se realizaron utilizando el programa AutoDock Vina 1.0. Para la preparación de la proteína y de los modelos moleculares de los derivados diterpénicos se utilizó el programa AutoDock Tools. La visualización de los resultados y su análisis se llevó a cabo empleando el programa PyMol. El archivo cristalográfico de la proteína se obtuvo el RCSB Protein Data Bank bajo el código 1JFF y los modelos moleculares diterpénicos se obtuvieron de los resultados del modelado molecular.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. AKERELE, O. WHO S. TRADITIONAL MEDICINE PROGRAMME: PROGRESS AND PERSPECTIVES. WHO CHRONIDE **1994**, *38*, 76-81.
2. AKERELE, O. THE BEST OF BOTH WORLDS: BRINGING TRADITIONAL MEDICINE UP TO DATE. *SOCIAL SCIENCE & MEDICINE* **1987**, *24*, 177-181.
3. BERDONCES, J. L. PRINCIPIOS ACTIVOS Y PREPARACIONES FARMACEÚTICAS. *NATURA MEDICATRIX* **1994-1995**, *37-38*, 50-53.
4. RAVELO, G. A.; BRAUN E. A. RELEVANCIA DE LOS PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS EN EL SIGLO XXI. **2009**, *103*, 409-419.
5. SEPÚLVEDA, J. G.; PORTA, D. H.; ROCHA, S. M. LA PARTICIPACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA DEFENSA DE LAS PLANTAS. *REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA* **2003**, *21*, 355-363.
6. GARCÍA, A. A.; CARRIL, U. P. E. METABOLISMO SECUNDARIO DE PLANTAS. *SERIE FISIOLÓGICA VEGETAL* **2009**, *2*, 119-145.
7. JUNCOSA, J. I, T. SÍNTESIS DEL DITERPENO TIPO LABDANO 12S-ZERUMIN B. COORDINACIÓN DE LICENCIATURA EN QUÍMICA. UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR. **2005**.
8. TRAPP, S.; CROTEAU, R. GENOMIC ORGANIZATION OF PLANTS TERPENE SYNTHASES AND MOLECULAR EVOLUTIONARY IMPLICATIONS. *GENETICS* **2001**, *158*, 811-832.
9. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/class/terp.html>
10. LUNA-VAZQUEZ. M. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DEL ÁCIDO 2 α -HIDROXIEPERUICO AISLADO DE *AGERATINA PETIOLARIS*. TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACOBIOLOGA, FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA U.M.S.N.H., **2008**.
11. BONKANKA, C. X. T. EVOLUCIÓN FARMACOLÓGICA DE TERPENOS Y FLAVOIDES DE ORIGEN VEGETAL. CIENCIAS Y TECNOLOGÍA/28 NÚMERO INTERNACIONAL DEL LIBRO: 978-84-7756-779-0. CURSO **2006/07**.

12. <http://www.prweb.com/releases/2004/5/prweb/128689.htm>
13. TANAKA, J.; HIGA, T.; SUWANBORIRUX, K.; KOKPOL, U.; BERNADINELLI, G.; JEFFORD, C. W. BIOACTIVE NORSESTERTERPENE 1, 2-DIOXANES FROM A THAU SPONGE, MYCALE SP. *JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY* **1993**, *58*, 2999-3002.
14. SINGH, M.; PAL, M.; SHARMA, R. BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE LABDANE DITERPENES. *PLANTA MÉDICA* **1999**, *65*, 2-8.
15. BANTHORPE, D. V.; BROWN, J. T.; MORRIS, G. S. ACUMULATION OF THE ANTI-FUNGAL DITERPENEO SCLAREOL BY CELL CULTURES OF SALVIA SCLAREA A NICOTIANA GLUTINOSA. *PHYTOCHEMISTRY* **1990**, *29*, 2145-2148.
16. KAGAWA, K.; TOKURA, K.; UCHIDA, K.; KAKUSHI, H.; SHIKE, T.; KIKUCHI, J.; NAKAI, H.; DORGI, P.; SUBEDI, L. PLATELET AGGREGATION INHIBITORS IN A BHUTANESE MEDICINAL PLANTS, SHUG CHHER. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (TOKYO)* **1993**, *41*, 1604-1607.
17. MARTÍNEZ, R. B. INTERACCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS CON LIGANDOS ACTIVADORES DE TUBULINA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, **2005**.
18. CENTELLES, J. J.; IMPERIAL, S. PACLITAXEL. DESCUBRIMIENTO, PROPIEDADES Y USO CLÍNICO. **2010**, *29*, 68-76.
19. CASANVA, S. O. B. UNIVERSIDAD DE TARAPACA. NOMENCLATURA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS. ESTRUCTURAS CONFORMACIONALES ESTEREOISOMERIA.
20. PÉREZ, M. S. A. MECÁNICA MOLECULAR. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA. UNIVERSIDAD DE ALCALÁ.
21. PINEDA, J. L.; RESENDIS, A. B.; ROJAS, C. A. G.; SIFUENTES. L. D. V. PRINCIPIOS DE ESTRUCTURA DE LA MATERIA. *TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD* 1-8.
22. CUREÑO, B. H. J; HERNÁNDEZ, S. C. BIOQUÍMICA DE LOS TAXOIDES UTILIZADOS CONTRA EL CÁNCER. *REB* **2011**, *30*, 12-20.

23. KATINA, L.; CRISIS, J. V.; TELLERÍA, M. C.; BARREDA, V.; PALAZZESI L. EARLY HISTORY ASTERACEAE IN PATAGONIA: EVIDENCE FROM FOSSIL POLLEN GRAIN. *NEW ZEALAND JOURNAL OF BOTANY* **2007**, *45*, 605-610.
24. KATINAS, L.; GUTIÉRREZ, D. G.; GROSSI, M. A.; CRISCI, J. V. PANORAMA DE LA FAMILIA ASTERACEAE (COMPOSITAE) EN LA REPÚBLICA ARGENTINA. *BOLETÍN DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE BOTÁNICA* **2007**, *42*, 113-129.
25. REGALADO, G. G. NEW DISTRIBUTION RECORDS OF COMPOSITAE FROM AGUASCALIENTES, MÉXICO. *ACTA BOTANICA MEXICANA* **1999**, *46*, 1-17.
26. TURNER, B. L. FOUR NEW SPECIES OF *AGERATINA* (ASTERACEAE: EUPATORIEAE) FROM OAXACA, MÉXICO. *PHYTOLOGÍA* **2010**, *92*, 388-399.
27. RZEDOWSKI, G. C.; RZEDOWSKI, J. FLORA FANEROGÁMICA DEL VALLE DE MÉXICO. 2ª ED. *INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C. Y COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD*. **2005**, 797.
28. CALDERÓN, J. S.; QUIJANO, L.; GARDUÑO, M.; GÓMEZ, F.; RIOS, T. 2A-ISO-VALEROYLOXYPERUIC ACID, A DITERPENE FROM *EUPATORIUM PETIOLARE*. *PHYTOCHEMISTRY* **1983**, *22*, 2617-2619.
29. TROTT, O.; OLSON, A. J. SOFTWARE NEWS AND UPDATE AUTODOCK VINA: IMPROVING THE SPEED AND ACCURACY OF DOCKING WITH A NEW SCORING FUNCTION, EFFICIENT OPTIMIZATION, AND MULTITHREADING. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY* **2010**, *31*, 455-461.
30. MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. AUTODOCK AND AUTODOCK TOOLS 4: AUTOMATED DOCKING WITH SELECTIVE RECEPTOR FLEXIBILITY. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY* **2009**, *00*, 000-000.
31. CAREY, F. A. QUÍMICA ORGÁNICA, 6ª ED. *MCGRAW HILL*. **2006**.
32. GIL, A. R.; V, L. C.; B, A. B. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DEL CLORURO DE OLEOILO. *AVANCES EN QUÍMICA* **2007**, *2*, 15-20.

33. JARAMILLO, L. M. CURSO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL. UNIVERSIDAD DEL VALLE VICERRECTORA ACADÉMICA. SANTIAGO DE CALI, **2002**.
34. GARCÍA, P. C.; CRUZ, S. V.; MIRÓN, C. E. FUNDAMENTOS DE SÍNTESIS DE FÁRMACOS. UNIVERSIDAD DE BARCELONA, **2005**, 294.
35. BELSAY, C.; BORGES, R.; ACEVEDO, S. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE DISTINTAS FRACCIONES AISLADAS DEL CRUDO EXTRAPESADO CARABOBO. *REVISTA LATINOAMERICANA DE METALURGIA Y MATERIALES* **2007**, 27, 83-94.
36. LORENZO, M.; GONZÁLES, J.; MICHELENA, G. MÉTODOS DE METILACIÓN DE JASMONATOS Y ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA. *INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR* **2007**, XLI, 39-43.
37. BRITTO, B; ARANA, C. COROTIPOS PRELIMINARES DE PERÚ BASADOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE LA FAMILIA ASTERACEAE. *DARWINIANA* **2014**, 2, 39-56.

Residuos de *beta*-tubulina donde interactúan los derivados preparados a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico (**2**).

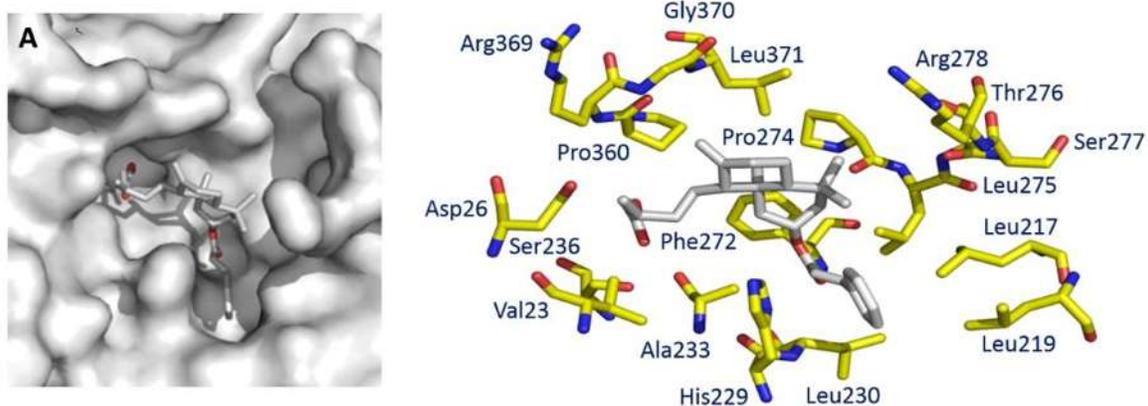


Figura 43. Acercamiento del sitio blanco del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**) en *beta*-tubulina.

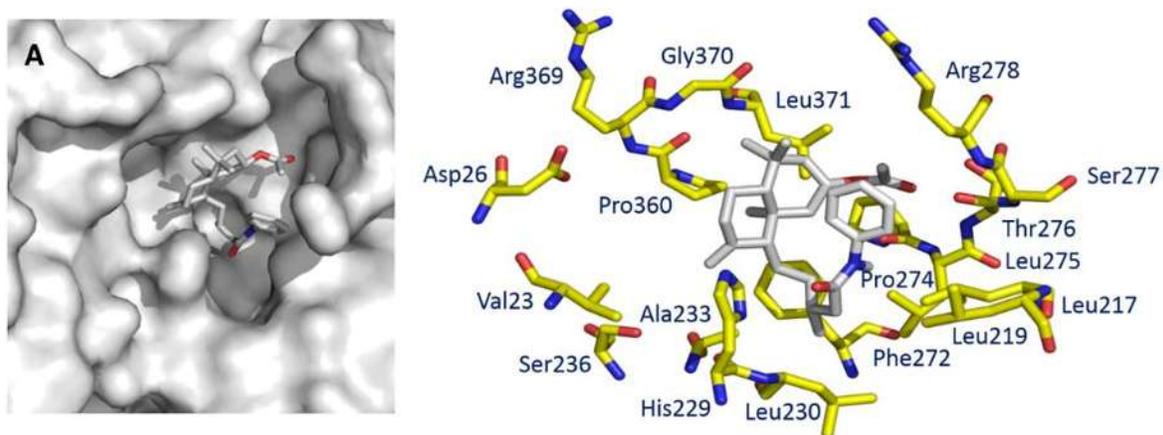


Figura 44. Acercamiento del sitio blanco de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**) en *beta*-tubulina.

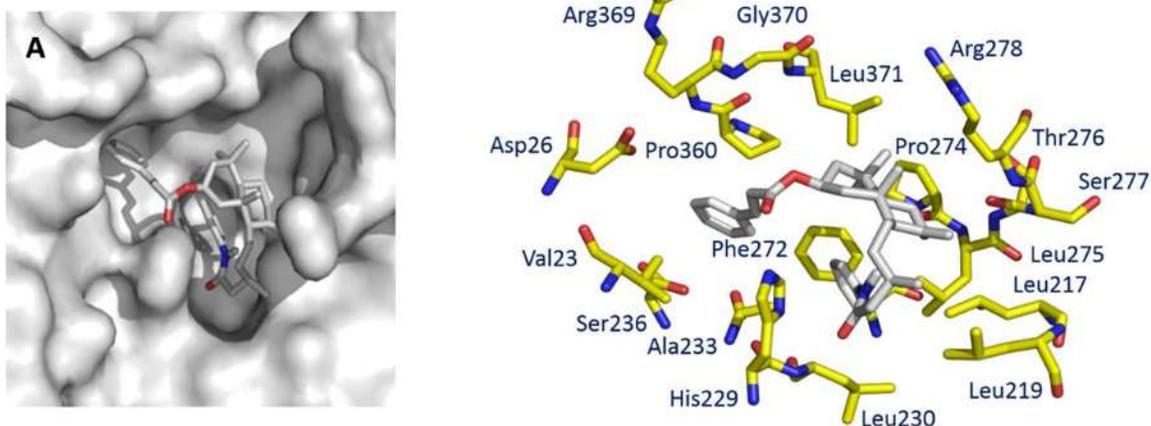


Figura 45. Acercamiento del sitio blanco del derivado teórico **8** en *beta*-tubulina.

Tabla 4. Comparación de la energía de afinidad (kcal/mol) del confórmero de menor energía del éster metílico del 2 α -hidroxieperuico (**3**) en un estudio docking ciego en una rejilla de 30 Å³.

Docking ciego			Docking rejilla de 30 Å ³		
Compuesto 3	Energía		Compuesto 3	Energía	
Confórmero 1	-6.8		Confórmero 1	-6.9	●
Confórmero 2	-6.5	●	Confórmero 2	-6.7	●
Confórmero 3	-6.1	●	Confórmero 3	-6.5	●
Confórmero 4	-6.0		Confórmero 4	-6.5	●
Confórmero 5	-5.9		Confórmero 5	-6.5	●
Confórmero 6	-5.8		Confórmero 6	-6.5	●
Confórmero 7	-5.8		Confórmero 7	-6.5	●
Confórmero 8	-5.7		Confórmero 8	-6.5	●
Confórmero 9	-5.7	●	Confórmero 9	-6.4	●

Tabla 5. Comparación de la energía de afinidad (kcal/mol) del confórmero de menor energía del cinamato del éster metílico del ácido 2 α -hidroxieperuico (**6**) en un estudio docking ciego en una rejilla de 30 Å³.

Docking ciego			Docking rejilla de 30 Å ³		
Compuesto 6	Energía		Compuesto 6	Energía	
Confórmero 1	-8.1	●	Confórmero 1	-8.5	●
Confórmero 2	-8.0		Confórmero 2	-8.3	●
Confórmero 3	-7.6	●	Confórmero 3	-8.0	●
Confórmero 4	-7.6	●	Confórmero 4	-7.9	●
Confórmero 5	-7.5		Confórmero 5	-7.8	●
Confórmero 6	-7.4		Confórmero 6	-7.8	●
Confórmero 7	-7.2	●	Confórmero 7	-7.6	●
Confórmero 8	-7.1		Confórmero 8	-7.5	●
Confórmero 9	-7.1		Confórmero 9	-7.5	●

Tabla 6. Comparación de la energía de afinidad (kcal/mol) del confórmero de menor energía de la amida del ácido 2 α -acetoxieperuico (**7**) en un estudio docking ciego en una rejilla de 30 Å³.

Docking ciego			Docking rejilla de 30 Å ³		
Compuesto 7	Energía		Compuesto 7	Energía	
Confórmero 1	-7.8	●	Confórmero 1	-8.0	●
Confórmero 2	-7.4	●	Confórmero 2	-7.8	●
Confórmero 3	-7.3		Confórmero 3	-7.5	●
Confórmero 4	-7.1	●	Confórmero 4	-7.5	●
Confórmero 5	-7.0	●	Confórmero 5	-7.5	●
Confórmero 6	-6.8		Confórmero 6	-7.5	●
Confórmero 7	-6.6	●	Confórmero 7	-7.4	●
Confórmero 8	-6.5		Confórmero 8	-7.4	●
Confórmero 9	-6.5		Confórmero 9	-7.3	●

Tabla 7. Comparación de la energía de afinidad (kcal/mol) del confórmero de menor energía del derivado **8** en un estudio docking ciego en una rejilla de 30 Å³.

Docking ciego			Docking rejilla de 30 Å ³		
Compuesto 8	Energía		Compuesto 8	Energía	
Confórmero 1	-9.1	●	Confórmero 1	-9.1	●
Confórmero 2	-8.3	●	Confórmero 2	-8.3	●
Confórmero 3	-8.1	●	Confórmero 3	-8.2	●
Confórmero 4	-7.6	●	Confórmero 4	-8.1	●
Confórmero 5	-7.5		Confórmero 5	-8.1	●
Confórmero 6	-7.5	●	Confórmero 6	-8.0	●
Confórmero 7	-7.5		Confórmero 7	-8.0	●
Confórmero 8	-7.5	●	Confórmero 8	-8.0	●
Confórmero 9	-7.4		Confórmero 9	-7.9	●