



Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

“Estudio de la reactividad química del grupo carboxilo de
diterpenos aislados del género *Ageratina*.”

Tesis

Para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias Químicas:

PRESENTA

Q.F.B. David Calderón Rangel

ASESOR:

Doctor en Ciencias en la especialidad de Farmacología

Hugo Alejandro García Gutiérrez

Morelia, Michoacán.

Abril del 2017.

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, con una beca de inversión en el conocimiento (264405) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto realizado con el apoyo económico otorgado por la CIC-UMSNH y el CONACYT-Ciencia Básica (167952).

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber. (Albert Einstein)

Agradecimientos

Primeramente quiero agradecer a Dios por permitirme y brindarme la salud necesaria para continuar con mi preparación académica, así como a mis papás Juan y Maria Auxilio que siempre me brindaron el apoyo suficiente durante mi formación profesional apoyándome en todos los aspectos posibles, además de inculcarme el buen camino y siempre las cosas buenas, si en este día soy lo que soy o en el futuro llegue a ser alguien, se lo debo indiscutiblemente a mis padres, soy muy afortunado de tener una familia unida, estoy muy orgulloso y siempre lo estaré de ellos.

También quiero darle las gracias a mi hermana Arisbeth que también siempre me apoyo en todo y que en ciertas ocasiones sufría una que otra desvelada que le hacía pasar, me siento muy agradecido con dios y me da gusto tenerte como hermana.

A mi tía Lulú que la considero como mi segunda mamá, también siempre me ha brindado su apoyo y siempre me ha dado consejos para seguir adelante.

Por otra parte quiero agradecer a mi asesor el D.C Hugo Alejandro por haberme aceptado en su grupo de trabajo y por permitirme estar bajo su tutoría, estoy muy agradecido debido a que me enseñó muchas cosas, además de ser mi asesor lo considero como un muy buen amigo y ejemplo a seguir.

A mis sinodales la Dra. Rosy, Dra. Urania, Dr. Juan Diego y Dr. Carlos Cerda les agradezco por sus puntos de vista y disposición durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio y a su vez de generación de licenciatura Luisja que si escribo todo el recital ocuparía varias páginas, eres un muy buen amigo en quien confiar, Luu que estuvimos desde el primer año de farma y que a pesar de que casi no convivimos mucho, después tuvimos la fortuna de coincidir nuevamente en la maestría, además de las buenas charlas siempre nos apoyamos en lo académico, por lo que me da gusto haberte tenido de compañera, Miriam quien iba a pensar que estuvimos y coincidimos en muchas ocasiones en lugares donde nunca nos hubiéramos imaginado, aquí es donde uno dice como el mundo es tan pequeño, así como a Moni que a pesar de que no llevamos mucho tiempo conociéndonos las considero como unas muy buenas amigas con las que pase muchas risas, a todos ell@s les doy las gracias por esos buenos momentos y ratos que pasamos, también gracias por ayudarme en las cuestiones del

laboratorio ya que sin su ayuda no sé qué hubiera hecho, la verdad me sentí muy cómodo con ustedes como grupo de trabajo, ya que es un ambiente con muy buena vibra.

A mis compañeros de generación Luu y Pepe que siempre nos apoyamos en todo lo posible además de las buenas convivencias junto con el Jordan que a pesar del poco tiempo de conocernos terminamos siendo muy buenos amigos, así como a Francisco gracias por su amistad durante este tiempo.

A Roció gracias por estar en este momento tan importante, gracias por la paciencia y tiempo que me has brindado.

También quiero darle las gracias a muchas de las personas que día con día nos veíamos en el laboratorio como por ejemplo a Lupita que casi siempre la consideramos como de la generación, además de que nos acompañaba a todos lados, a los del servicio Marili, Luis (el güero) y Dani que también me apoyaron con cuestiones del laboratorio, a Tere que era compañera de la choza y por supuesto a Dany, Cristian, Alex, Juan Luis, Isai, Hector con los cuales tuve la fortuna de convivir todo este tiempo de la maestría, también a el maestro José Luis, Moran y Dra. Lidia que de vez en cuando teníamos una que otra buena platica.

También agradecer a los técnicos de Resonancia José Manuel y Coni, ya que ellos fueron los responsables de procesar la mayoría de los compuestos que se llevaron a cabo.

A mis compañeros de licenciatura Oziel, Guillermo, Alfredo, Iván y Abel, darle las gracias por la convivencia durante todo el trayecto de la carrera y aun hoy en día.

A mis amigos de la infancia y del fucho Yiyo y Pancho que todavía nos juntamos de vez en cuando y que siempre he contado con ellos.

Continuara.....

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes eventos académicos:

1. “Preparación de amidas a partir de ácidos diterpénicos aislados de *Ageratina jocotepecana*”. **David Calderón-Rangel**, Hugo A. García-Gutiérrez, Rosa E. del Río, Lidia Beiza-Granados, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. Presentado en la 12^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, celebrada en la ciudad de Xalapa, Veracruz los días 18, 19 y 20 de mayo del 2016.
2. “Preparación de amidas y ésteres a partir de ácidos diterpénicos aislados de *Ageratina jocotepecana*”. **David Calderón-Rangel**, Hugo A. García-Gutiérrez, Ulises D. Silva-Vázquez, Lidia Beiza-Granados, Juan D. Hernández- Hernández, Luisa U. Román-Marín, Rosa E. del Río. Presentado en la 3^a Semana del Posgrado en Ciencias Químicas, Morelia, Michoacán a 28 de junio de 2016.
3. “Formación de amidas y ésteres a partir de diterpenos”. **David Calderón-Rangel**, Ulises D. Silva-Vázquez, Rosa E. del Río, Hugo A. García-Gutiérrez. Presentado en el 11^o Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Quinto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán celebrado los días 13 y 14 de octubre del 2016.
4. “Activación de grupos carboxilo de ácidos diterpénicos empleando carbonildiimidazol”. **Calderón-Rangel, D.**; del Río R. E., Beiza-Granados, L.; García-Gutiérrez H. A. Presentado en el II Congreso Internacional y IV Nacional de Químico Farmacobiología, Morelia Michoacán los días 28 de noviembre al 1 diciembre del 2016.

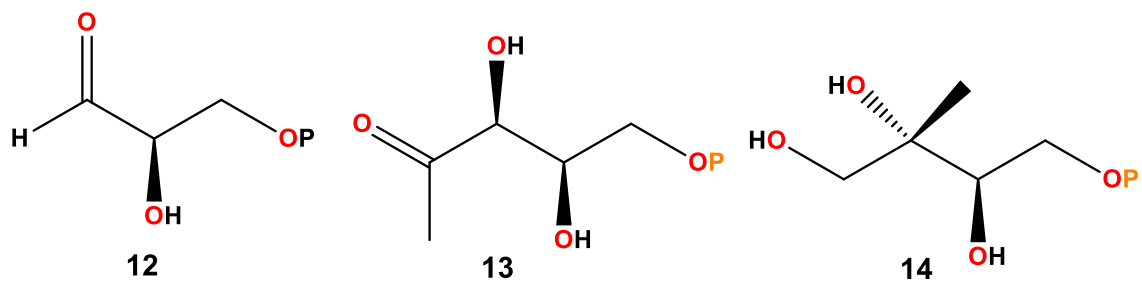
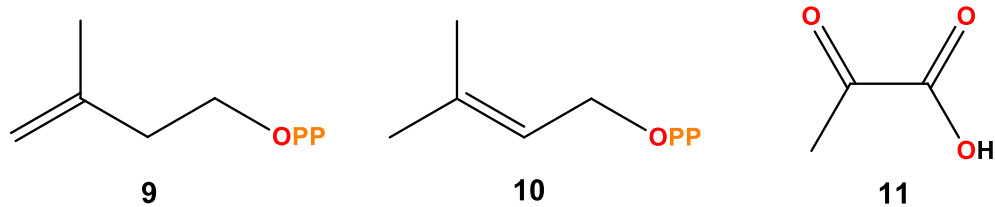
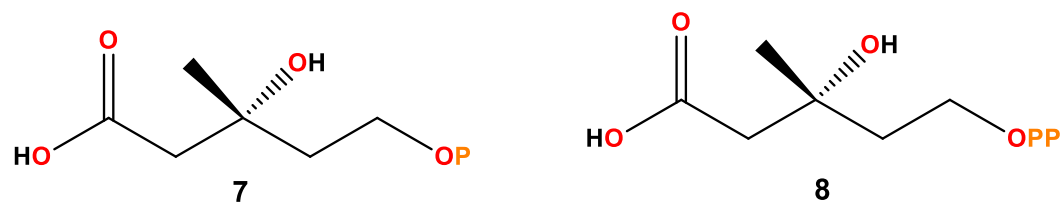
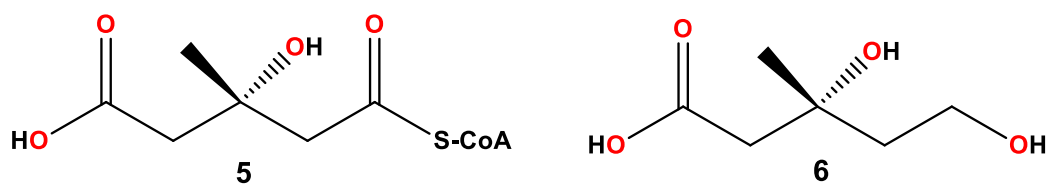
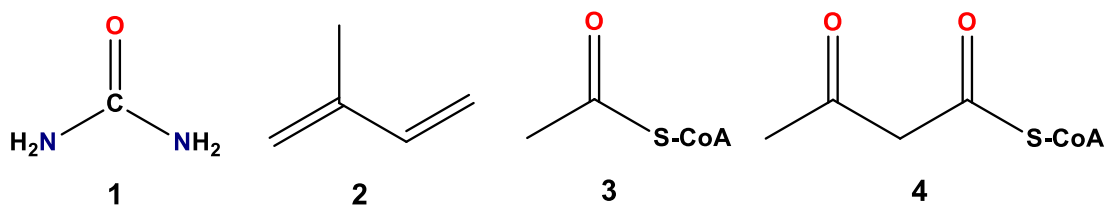
Índice

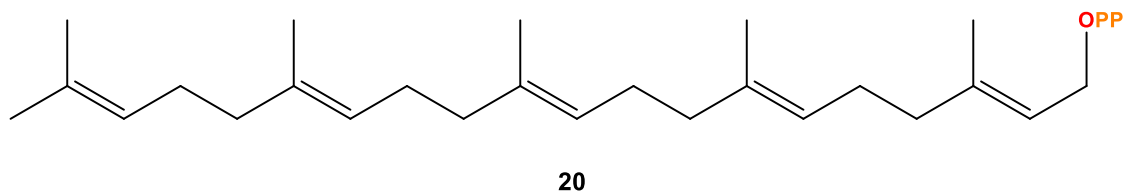
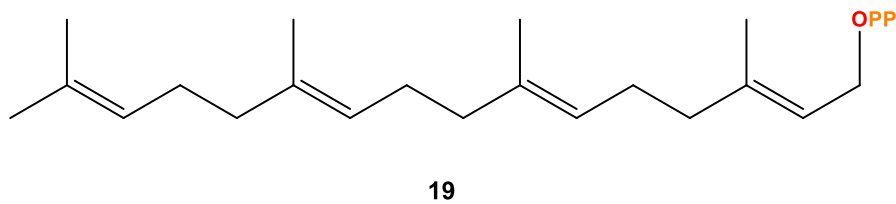
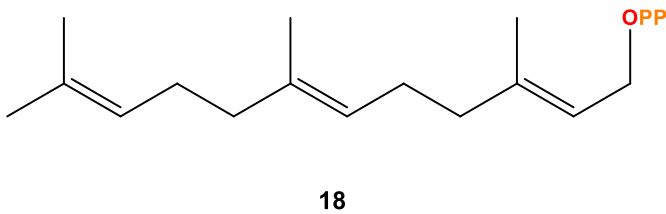
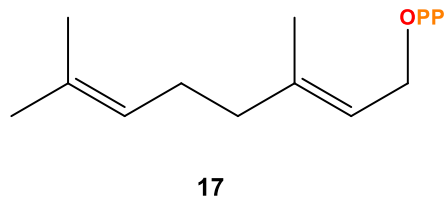
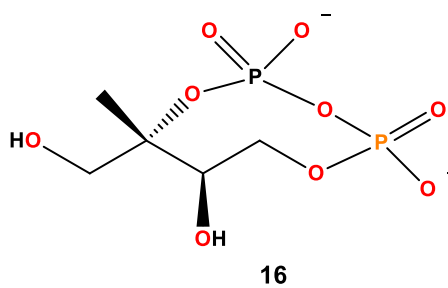
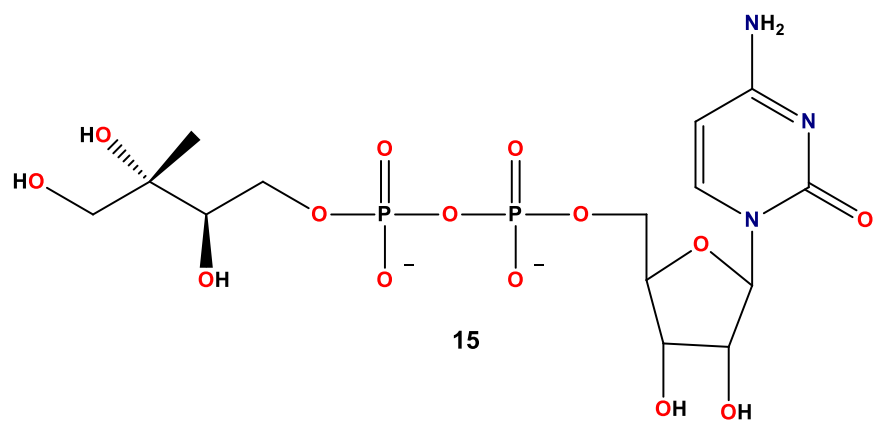
I	Resumen de estructuras	1
II	Índice de figuras	10
III	Índice de tablas	14
IV	Glosario	15
1	Resumen	18
2	Abstract	19
3	Introducción	20
	3.1 Terpenos	23
	3.2 Clasificación de Terpenos	23
	3.3 Biosíntesis de unidades reactivas IPP y DMAPP	24
	3.4 Precursores de los terpenos	25
	3.5 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos	28
4	Antecedentes	29
	4.1 Enlaces tipo amida y éster	33
5	Justificación	35
6	Objetivos	36
	6.1 Objetivo general	36

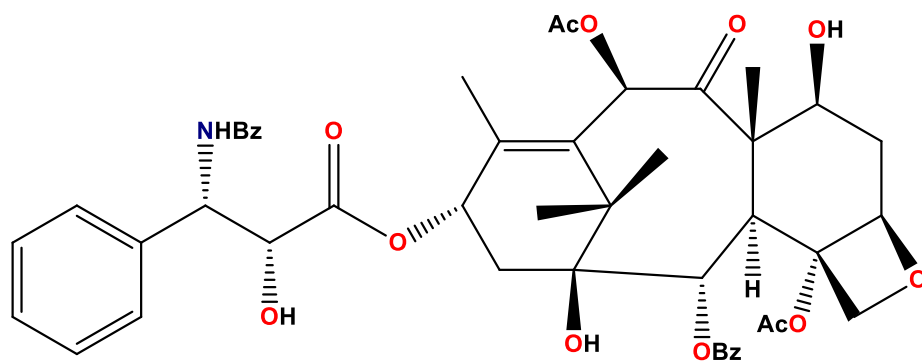
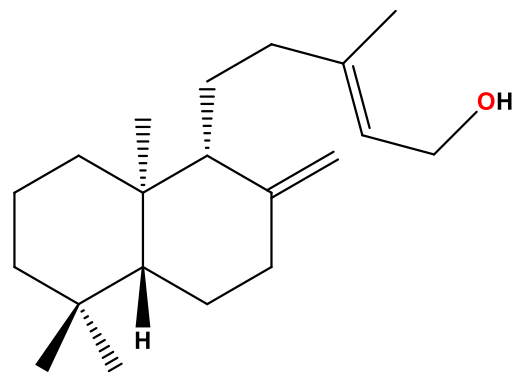
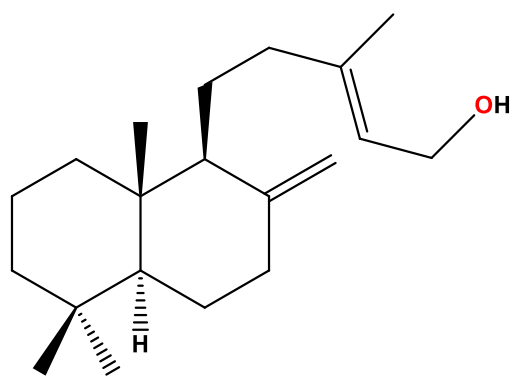
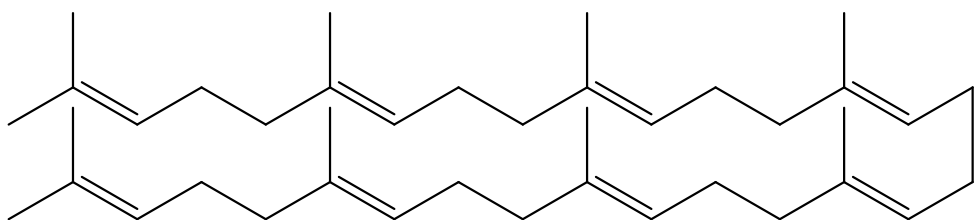
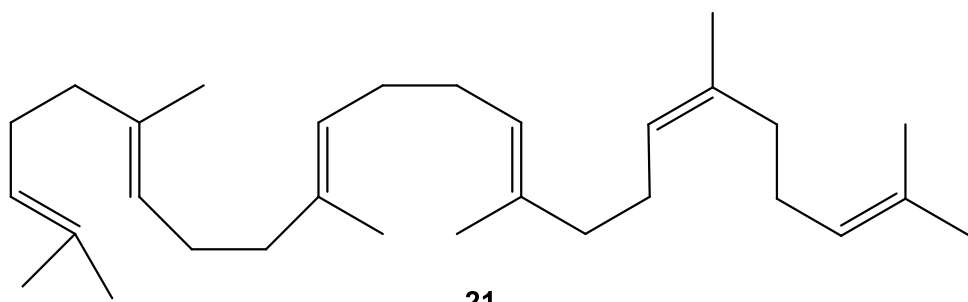
6.2	Objetivos particulares	36
7	Discusión de Resultados	36
7.1	Procesamiento de la planta	36
7.2	Metabolitos aislados	37
7.2.1	Identificación del ácido labdadienoico (30)	37
7.2.2	Identificación del ácido catívico (31)	40
7.2.3	Identificación del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico (32)	42
7.3	Reacción con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI)	44
7.4	Reacción vía de anhídridos mixtos	45
7.5	Reacción con COMU	46
7.6	Reacción con PyBOP	47
7.7	Reacciones para la obtención de los derivados	48
7.8	Evaluación <i>in vitro</i> de la estabilidad de los microtúbulos en presencia de derivados de labdano	53
8	Conclusiones	60
9	Parte experimental	63
9.1	Procedimientos generales	63
9.2	Obtención del extracto hexánico	63
9.3	Obtención del ácido labdadienoico	65

9.4	Obtención del ácido catívico	65
9.5	Obtención del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico	66
9.6	Metodología general de reacción con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI)	66
9.7	Metodología general de reacción con cloroformiato de isobutilo (<i>i</i> BCF)	67
9.8	Metodología general de reacción con COMU y con PyBOB	67
9.9	Obtención y asignación de los derivados	68
	9.9.1 Derivado 58	68
	9.9.2 Derivado 59	68
	9.9.3 Derivado 60	69
	9.9.4 Derivado 61	70
	9.9.5 Derivado 62	70
	9.9.6 Derivado 63	71
	9.9.7 Derivado 64	72
	9.9.8 Derivado 65	73
	9.9.9 Derivado 66	73
9.10	Metodología general para la tubulina	75
10	Bibliografía	76
11	Anexos	81

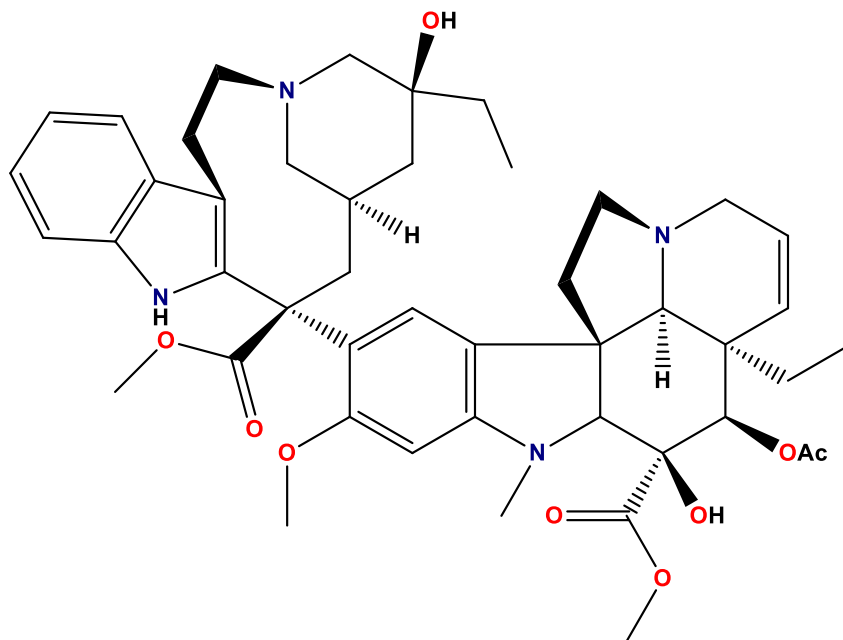
I. Resumen de estructuras



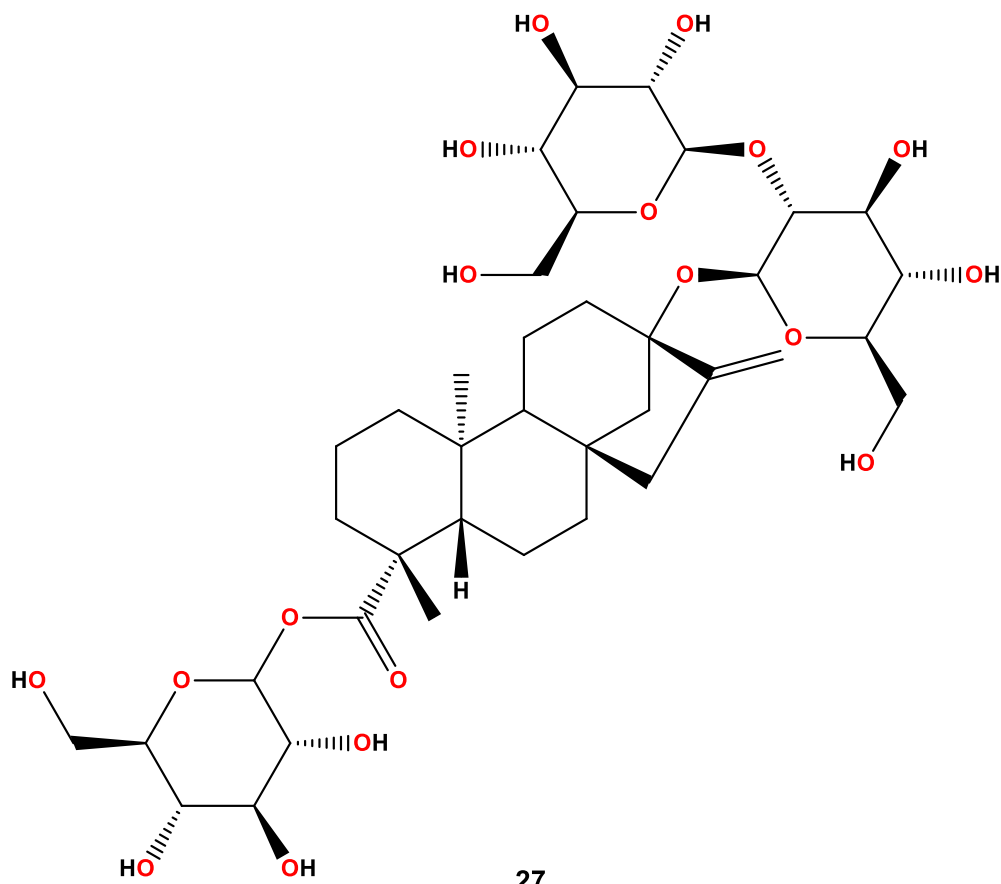




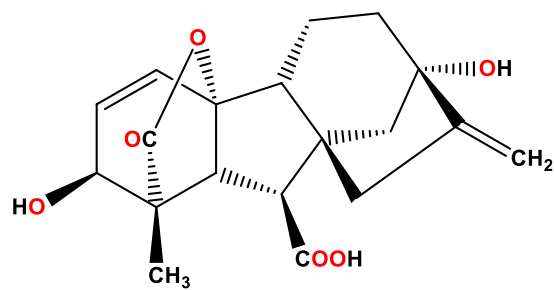
25



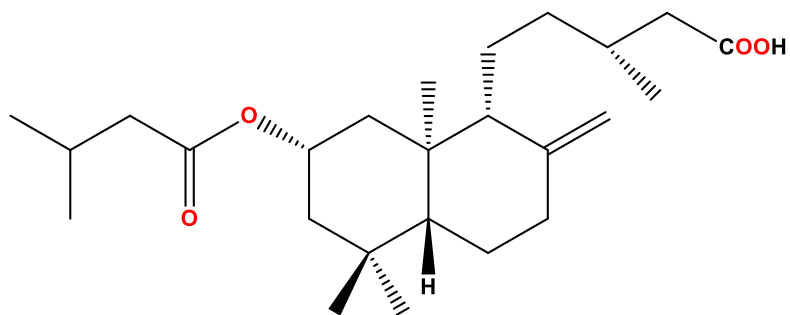
26



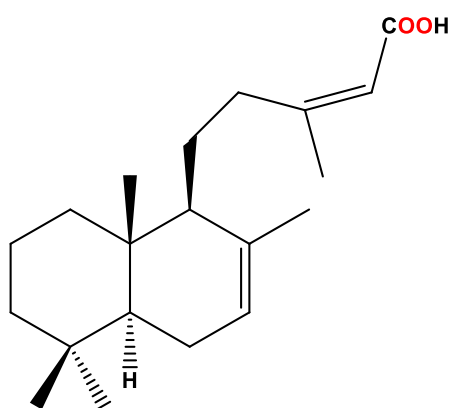
27



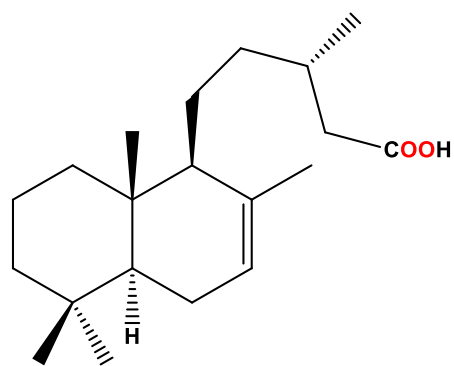
28



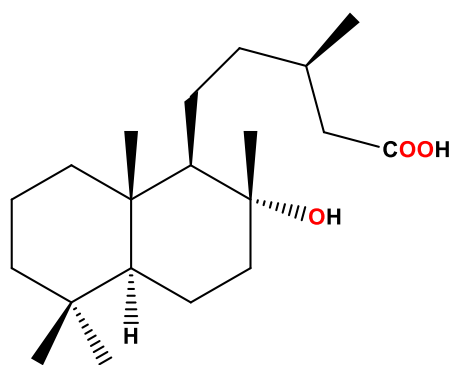
29



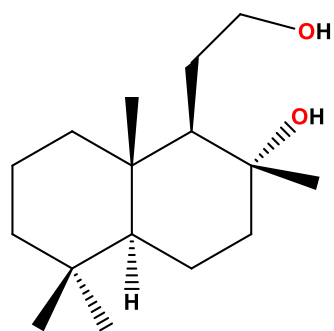
30



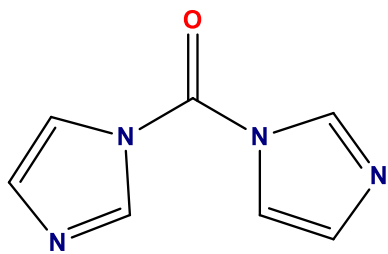
31



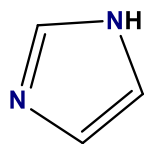
32



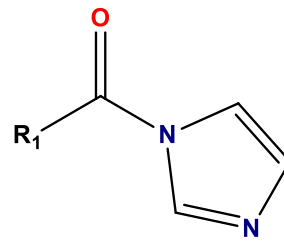
33



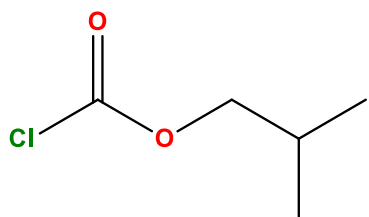
34



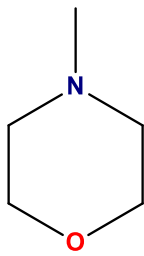
35



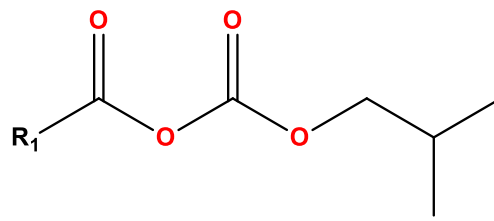
36



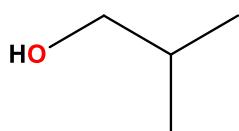
37



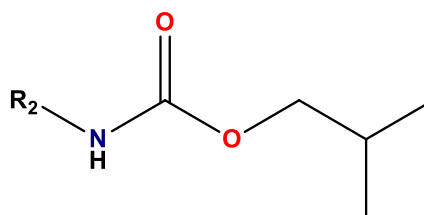
38



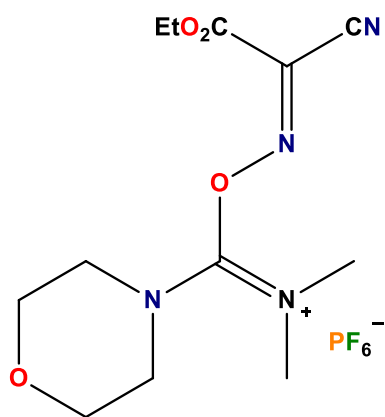
39



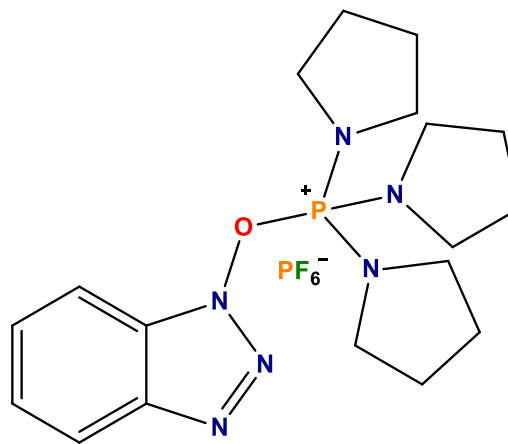
40



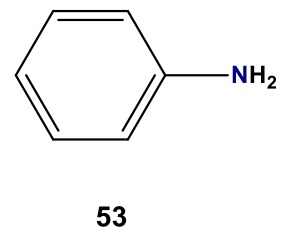
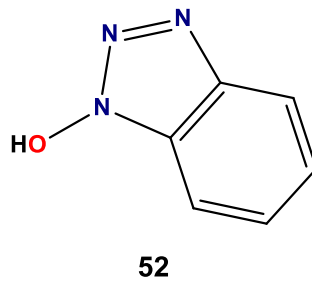
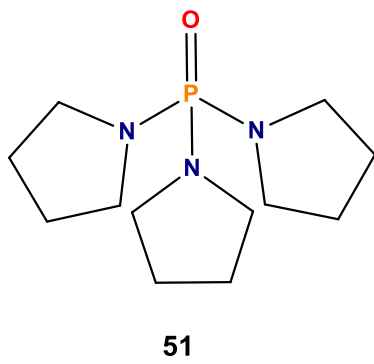
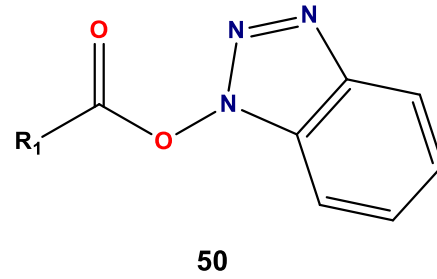
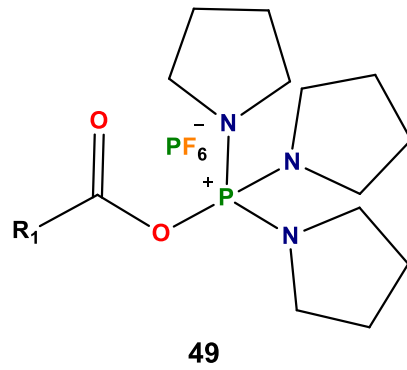
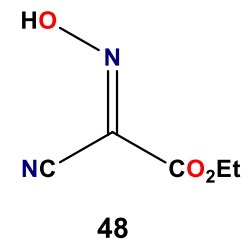
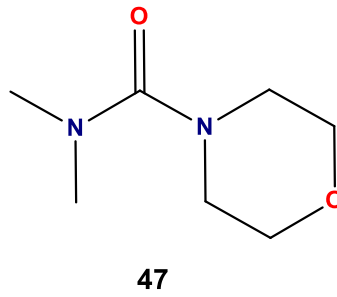
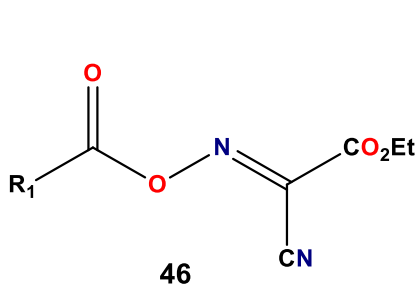
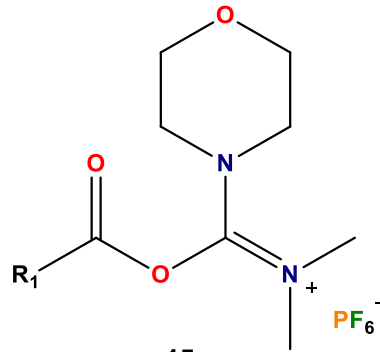
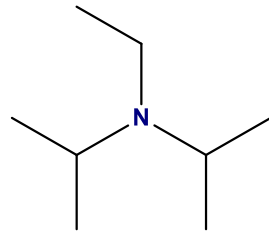
41

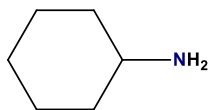


42



43

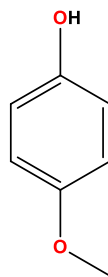




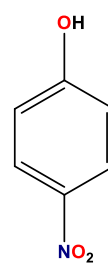
54



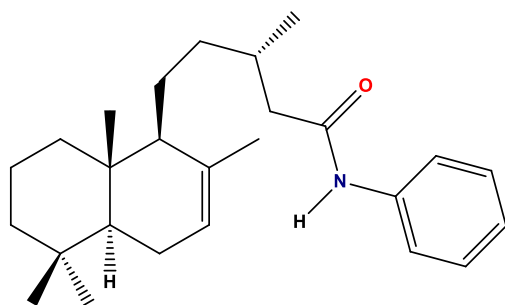
55



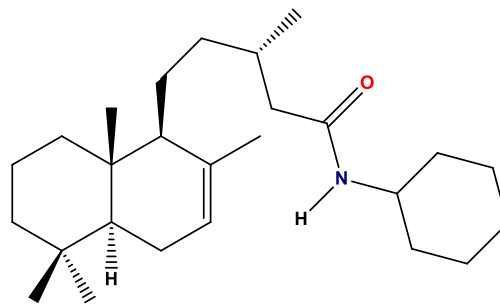
56



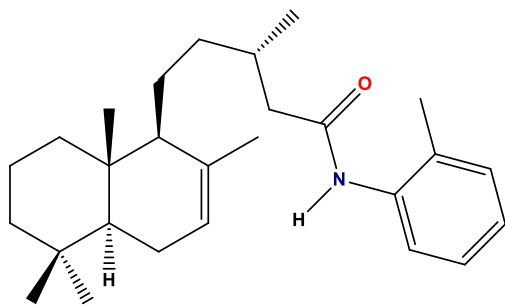
57



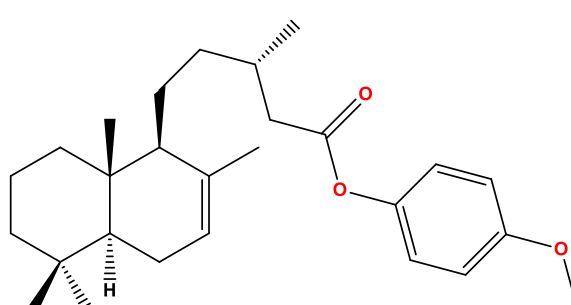
58



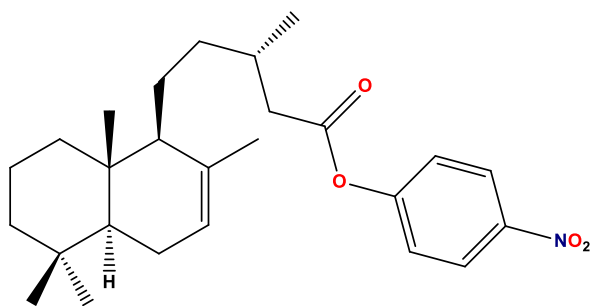
59



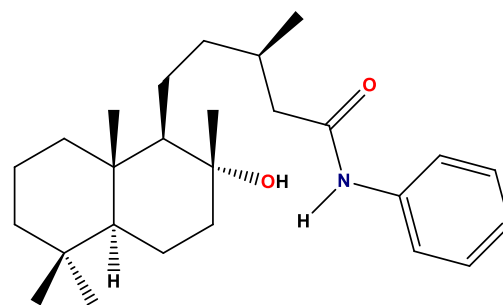
60



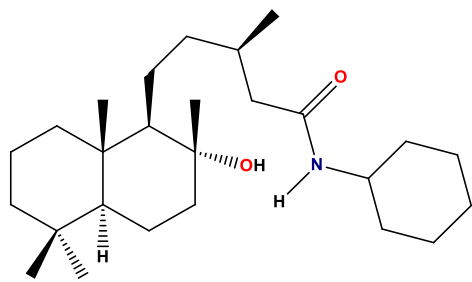
61



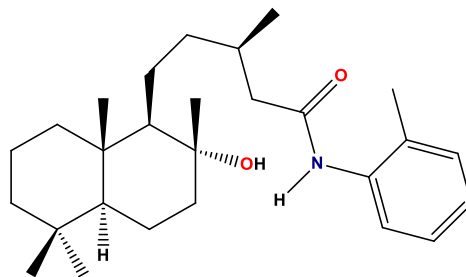
62



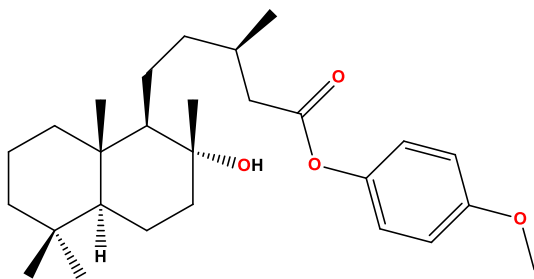
63



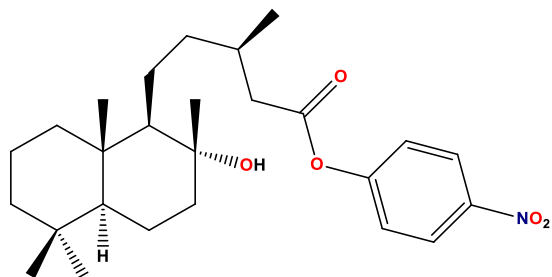
64



65



66



67

II. Índice de figuras

Figura 1.	Síntesis de urea por Friedrich Wöhler.	21
Figura 2.	Rutas metabólicas de metabolitos secundarios.	22
Figura 3.	Vía MEV y MEP para formación de IPP y DMAPP.	24
Figura 4.	Acoplamiento cabeza-cola.	25
Figura 5.	Bioformación de los precursores de terpenos.	26
Figura 6.	Ciclación de 19 para la formación de la serie normal 23 y enantio 24 de labdano.	27
Figura 7.	Estructura de los microtúbulos.	28
Figura 8.	Estructura del paclitaxel (25).	29
Figura 9.	Estructura del esteviósido (27).	30
Figura 10.	Estructura del ácido giberélico (28).	30
Figura 11.	Estructura del ácido 2 α -isovaleroxieperúico (29).	31
Figura 12.	Planta de <i>Ageratina jocotepecana</i> .	32
Figura 13.	Estructura de los diterpenos aislados de <i>Ageratina jocotepecana</i> .	33
Figura 14.	Reacción mediada por CDI.	34
Figura 15.	Reacción vía anhídridos mixtos.	34
Figura 16.	Reacción mediante agentes acoplantes COMU y PyBOP.	35
Figura 17.	Ácido labdadienoico (30).	37
Figura 18.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido labdadienoico (30).	39
Figura 19.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido labdadienoico (30).	39
Figura 20.	Ácido catívico (31).	40
Figura 21.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido catívico (31).	41
Figura 22.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido catívico (31).	41
Figura 23.	Ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico (32).	42

Figura 24.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico (32).	43
Figura 25.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico (32).	43
Figura 26.	Activación del grupo carboxilo utilizando CDI.	44
Figura 27.	Mecanismo de reacción con CDI como activador.	45
Figura 28.	Activación del grupo carboxilo vía anhídridos mixtos.	45
Figura 29.	Mecanismo de reacción vía anhídridos mixtos.	46
Figura 30.	Activación del grupo carboxilo mediante COMU.	46
Figura 31.	Mecanismo de reacción empleando COMU.	47
Figura 32.	Activación del grupo carboxilo mediante PyBOP.	47
Figura 33.	Mecanismo de reacción con PyBOP.	48
Figura 34.	Estructuras de los derivados obtenidos.	50
Figura 35.	Efecto del ácido 30 aislado de <i>Ageratina jocotepecana</i> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	53
Figura 36.	Efecto del ácido 31 aislado de <i>Ageratina jocotepecana</i> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	54
Figura 37.	Efecto del ácido 32 aislado de <i>Ageratina jocotepecana</i> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	55
Figura 38.	Efecto del derivado 58 sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	56
Figura 39.	Efecto del derivado 60 sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	57
Figura 40.	Efecto del derivado 63 sobre la polimerización de la tubulina y sobre la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	58
Figura 41.	Efecto del derivado 66 sobre la polimerización de la tubulina y sobre la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.	59

Figura 42.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de extracto hexánico crudo.	64
Figura 43.	A) Columna cromatográfica y B) Fracciones eluídas.	64
Figura 44.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 58 .	83
Figura 45.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 58 .	84
Figura 46.	Espectro COSY del derivado 58 .	85
Figura 47.	Espectro HETCOR del derivado 58 .	86
Figura 48.	Espectro NOESY del derivado 58 .	87
Figura 49.	Espectro HMBC del derivado 58 .	88
Figura 50.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 59 .	89
Figura 51.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 59 .	90
Figura 52.	Espectro COSY del derivado 59 .	91
Figura 53.	Espectro HETCOR del derivado 59 .	92
Figura 54.	Espectro NOESY del derivado 59 .	93
Figura 55.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 60 .	94
Figura 56.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 60 .	95
Figura 57.	Espectro COSY del derivado 60 .	96
Figura 58.	Espectro HETCOR del derivado 60 .	97
Figura 59.	Espectro NOESY del derivado 60 .	98
Figura 60.	Espectro HMBC del derivado 60 .	99
Figura 61.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 61 .	100
Figura 62.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 61 .	101
Figura 63.	Espectro COSY del derivado 61 .	102
Figura 64.	Espectro HETCOR del derivado 61 .	103
Figura 65.	Espectro NOESY del derivado 61 .	104
Figura 66.	Espectro HMBC del derivado 61 .	105

Figura 67.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 62 .	106
Figura 68.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 62 .	107
Figura 69.	Espectro COSY del derivado 62 .	108
Figura 70.	Espectro HSQC del derivado 62 .	109
Figura 71	Espectro NOESY del derivado 62 .	110
Figura 72.	Espectro HMBC del derivado 62 .	111
Figura 73.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 63 .	112
Figura 74.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 63 .	113
Figura 75.	Espectro COSY del derivado 63 .	114
Figura 76.	Espectro HETCOR del derivado 63 .	115
Figura 77.	Espectro NOESY del derivado 63 .	116
Figura 78.	Espectro HMBC del derivado 63 .	117
Figura 79.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 64 .	118
Figura 80.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 64 .	119
Figura 81.	Espectro COSY del derivado 64 .	120
Figura 82.	Espectro HETCOR del derivado 64 .	121
Figura 83.	Espectro NOESY del derivado 64 .	122
Figura 84.	Espectro HMBC del derivado 64 .	123
Figura 85.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 65 .	124
Figura 86.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 65 .	125
Figura 87.	Espectro COSY del derivado 65 .	126
Figura 88.	Espectro HETCOR del derivado 65 .	127
Figura 89.	Espectro NOESY del derivado 65 .	128
Figura 90.	Espectro HMBC del derivado 65 .	129
Figura 91.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 66 .	130

Figura 92.	Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 66 .	131
Figura 93.	Espectro COSY del derivado 66 .	132
Figura 94.	Espectro HSQC del derivado 66 .	133
Figura 95.	Espectro NOESY del derivado 66 .	134
Figura 96.	Espectro HMBC del derivado 66 .	135
Figura 97.	Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado 67 .	136

III. Índice de tablas

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Ageratina jocotepecana</i> .	31
Tabla 2.	Reacciones de los 3 ácidos diterpénicos con aminas y CDI.	48
Tabla 3.	Reacciones de los 3 ácidos diterpénicos con alcoholes y CDI.	48
Tabla 4.	Reacciones del ácido catívico con anilina utilizando diferentes activadores.	49
Tabla 5.	Reacciones de los ácidos diterpénicos.	49
Tabla 6.	Datos espectroscópicos de ^{13}C del ácido catívico (31) y derivados.	81
Tabla 7.	Datos espectroscópicos de ^{13}C del ácido 13- <i>epi</i> -labdanólico (32) y derivados.	82

IV. Glosario

AcOEt	Acetato de etilo
Bz	Benzoílo
<i>c</i>	Concentración
<i>ca.</i>	Cerca
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CDI	1,1'-carbonildiimidazol
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
CHCl₃	Cloroformo
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear.
COMU	Hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi) dimetilamino-morfolino-carbenio
dest	Destilada
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
dm	Decímetro
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E</i>	Entgegen
EIMS	Espectrometría de masas por impacto electrónico
<i>ent</i>	Enantio
<i>epi</i>	Epímero
FPP	Farnesil pirofosfato
g	Gramo
GFPP	Geranil farnesil pirofosfato
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
HETCOR	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear

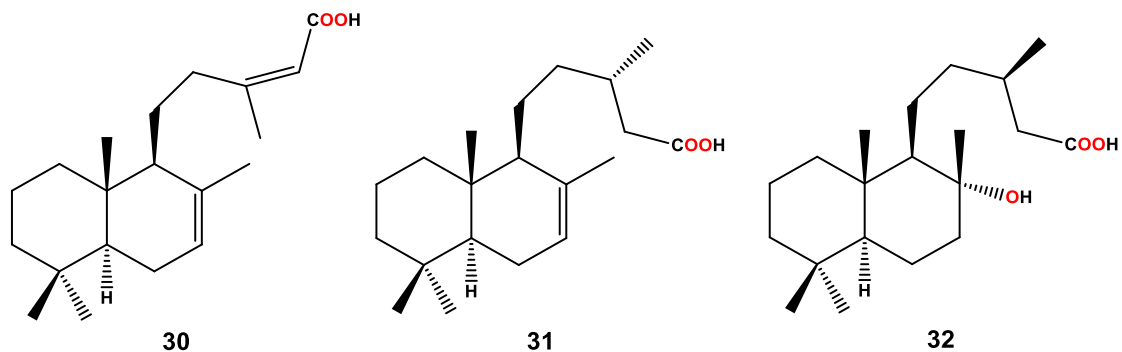
Hex	Hexano
HMBC	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de coherencia heteronuclear a múltiples enlaces
HOBt	Hidroxibenzotriazol
h	Hora
HSQC	Espectroscopia de coherencia cuántica única heteronuclear
Hz	Hertz
<i>i</i>BCF	Cloroformiato de isobutilo
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	Kilodalton
MeOH	Metanol
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
MEP	Metileritritol fosfato
Mesh	Malla
Met	Metilo
MEV	Mevalonato
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N₂	Nitrógeno
nm	Nanómetro
NMM	4-metilmorfolina
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser.
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón

PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfato
<i>R</i>	Rectus
RMN	Resonancia magnética nuclear
<i>S</i>	Sinister
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
<i>V_{max}</i>	Frecuencia máxima
<i>Z</i>	Zusammen
°C	Grados Celsius
δ	Desplazamiento químico
®	Marca registrada

1. Resumen

Un gran número de diterpenos han mostrado propiedades antitumorales, antibióticas, como hormonas del crecimiento vegetal y edulcorantes. Estos compuestos se obtienen de numerosas fuentes vegetales siendo una de ellas la *Ageratina jocotepecana*, un arbusto que pertenece a la familia Asteraceae. Esta especie se puede encontrar en los alrededores de varias ciudades del Estado de Michoacán como Zitácuaro, Zacapu, Pátzcuaro y Morelia.

De los extractos hexánicos de sus flores, hojas y tallos se aíslan ácidos diterpénicos de tipo labdano como el ácido labdadienoico (**30**), catívico (**31**) y 13-*epi*-labdanólico (**32**). El interés en generar derivados de ácido carboxílicos (amidas y ésteres) surge debido a que los grupos funcionales de éstos derivados se encuentra en estructuras de compuestos naturales con propiedades biológicas importantes, además de que estos grupos constituyen la base en la formación de péptidos, así como de productos farmacéuticos. En el presente trabajo se probó la reactividad química del grupo carboxilo de los tres ácidos diterpénicos llevando a cabo reacciones con diferentes activadores como 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi) dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfato (PyBOP) y la vía de anhídridos mixtos, llegando a la obtención de 10 nuevos derivados. Además se llevó a cabo la evaluación *in vitro* de la estabilidad de los microtúbulos para los ácidos diterpénicos **30-32** y los derivados **58, 60, 63 y 66**.



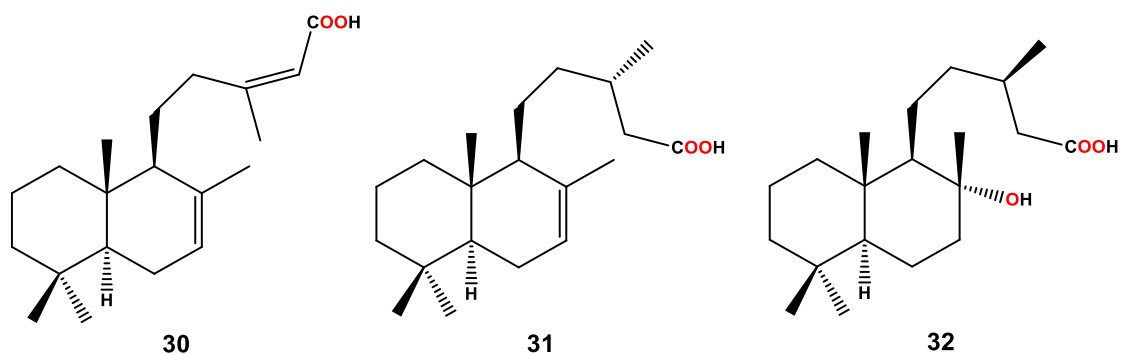
Palabras clave: *Ageratina jocotepecana*, CDI, PyBOP, COMU, Tubulina.

2. Abstract

A large number of diterpenes have shown biological properties as antitumorals, antibiotics, plant growth hormones and sweeteners. These compounds are obtained from numerous vegetable sources, one of which is *Ageratina jocosotepecana*, a shrub belonging to the Asteraceae family. This species can be found in the vicinity of several cities in the State of Michoacán such as Zitácuaro, Zacapu, Pátzcuaro and Morelia.

From the hexane extracts of its flowers, leaves and stems, labdane-type diterpenic acids are isolated, such as labdadienoic (**30**), cativic (**31**) and 13-*epi*-labdanolic (**32**) acids.

The interest in generating amides and esters arises because such functional groups are found in structures of natural compounds with important biological properties, in addition these functional groups form the basis in the formation of peptides as well as pharmaceuticals. In the present work, labdane-type diterpenic acids of *A. jocosotepecana* were subjected to reactions using different carboxyl activators such as 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), (1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy) dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate (COMU), (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) and mixed anhydride coupling, arriving at the obtaining of 10 new derivatives. In addition, the *in vitro* evaluation of microtubule stability for diterpene acids **30-32** and derivatives **58**, **60**, **63** and **66** were carried out.



Key words: *Ageratina jocosotepecana*, CDI, PyBOP, COMU, Tubulin.

3. Introducción

Desde los orígenes de la vida en la Tierra, el hombre ha empleado lo que la naturaleza ha puesto a su alcance para alimentarse, vestirse y curarse.

Los primeros estudios dedicados en exclusiva al mundo vegetal se deben a Teofrasto (372-288 a. C.), discípulo de Aristóteles y autor de dos grandes obras, la primera *De historia plantarum*, la segunda *De causis plantarum*.

La llegada de los españoles a América supuso un nuevo hito en el particular mundo de las plantas ya que se puso de manifiesto el intercambio cultural entre dos mundos (América y Europa).

El siguiente momento destacado en la historia de las plantas ocurrió en el siglo XVIII, cuando el médico sueco Carl von Linné (1707-1778) sistematizó los reinos vegetal y animal, los que organizó en familias y dio a cada planta un nombre específico en latín, lo que ayudó a su identificación universal.

A lo largo de la historia, el ser humano se ha ocupado de ir perfeccionando y atribuyéndole ciertas propiedades a las plantas, de tal manera que hoy en día se sabe que la actividad terapéutica de las plantas viene determinada por la presencia de una o varias moléculas, metabolitos, principios activos, responsables de la acción terapéutica beneficiosa.¹

Hasta los comienzos del siglo XIX los compuestos orgánicos se consideraban como productos únicos de los organismos vivos, y que contaban con una fuerza vital para su formación, hasta que en 1828 Friedrich Wöhler llevó a cabo la síntesis de la urea (**1**) marcando el comienzo de la química sintética lo que condujo a la conjugación de la química orgánica y los productos naturales (Figura 1).

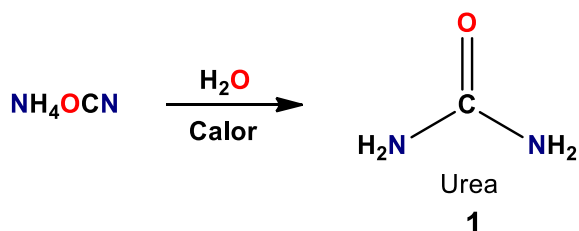
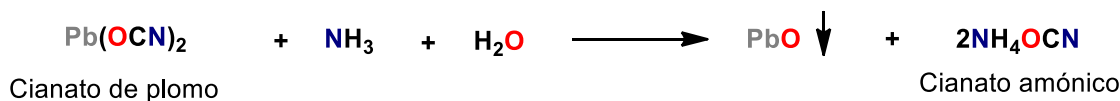


Figura 1. Síntesis de urea por Friedrich Wöhler.

En la actualidad el campo de productos naturales, cubre aspectos adicionales como estructura de los constituyentes químicos, actividad biológica, extracción, purificación, datos espectroscópicos, síntesis y biosíntesis, todo esto logrado por el paso de diferentes etapas:

1. Utilización de las plantas enteras o parte de ellas en pócimas curativas o religiosas.
2. Tratamiento, cocción, maceración y mezclado para ciertas acciones específicas, lo que implica conocimiento acerca del uso de las especies y su aprovechamiento (alteración de su acción).
3. Extracción de los productos de la planta.
4. Determinación estructural, modificación de las estructuras y síntesis.
5. Estudio de la relación estructura química-actividad biológica y farmacológica, utilizando cada día más el método computacional.

En si los seres vivos son capaces de sintetizar gran variedad de compuestos, y se define como producto natural o metabolito secundario, aquel que es propio de una especie y en la mayoría de los casos tienen funciones muy específicas para el ente que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos que son comunes en todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse en base a sus estructuras, su bioformación, a la fuente que lo produce o su acción biológica.

La formación de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en las plantas superiores, algas y algunas bacterias.

Los metabolitos secundarios se forman por diferentes vías y siguiendo el criterio biogénico, una misma clase de compuestos puede tener varios orígenes y pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y alcaloides (Figura 2).²

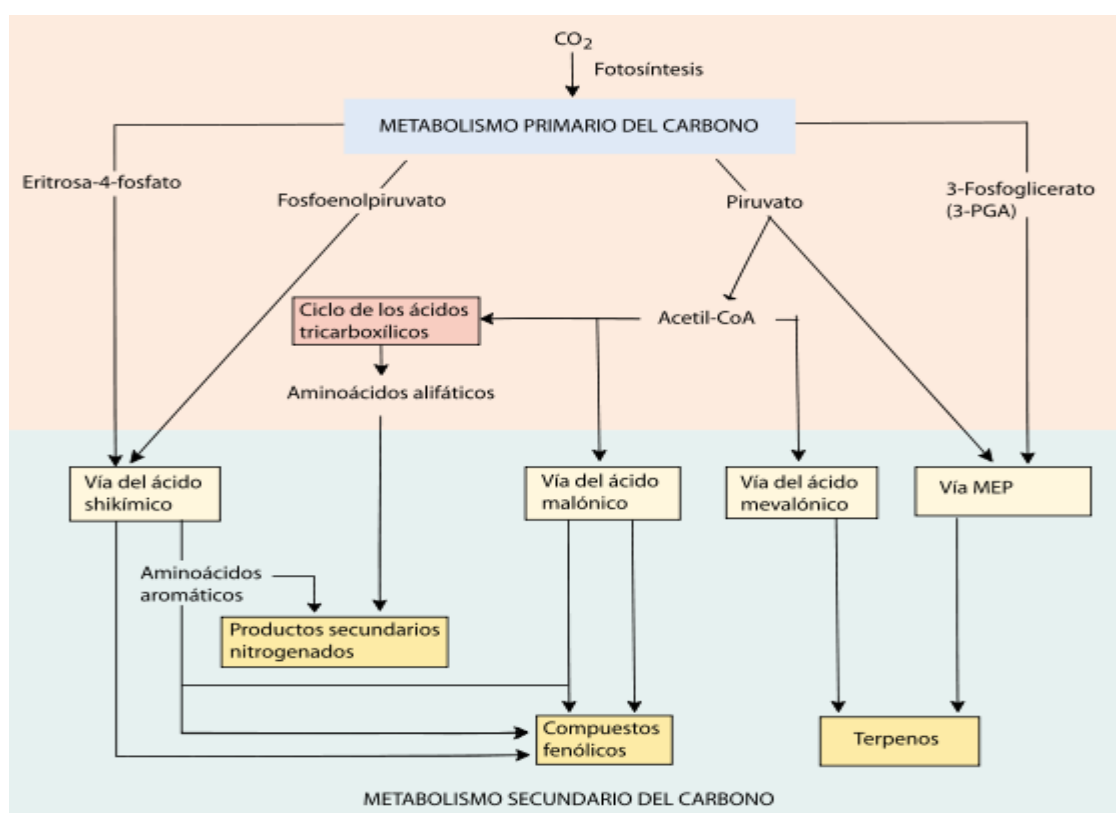
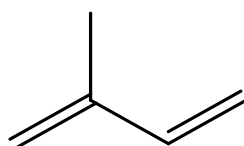


Figura 2. Rutas metabólicas de metabolitos secundarios (*Secondary Metabolites and Plant Defense*).

3.1 Terpenos

Los terpenos que se encuentran en la naturaleza son muy abundantes, su investigación se debe particularmente a Otto Wallach (1887) quien consideraba que los terpenos debían estar constituidos a partir de unidades de 5 átomos de carbono denominadas isopreno (2), años más tarde Ruzicka después de consagrado el estudio de los terpenos transformó esta hipótesis en una regla general.

Esta regla del isopreno fue ampliada más tarde en el sentido de que no solo se producen adiciones de moléculas de isopreno, sino que también pueden ocurrir transposiciones debido a las numerosas modificaciones metabólicas, lo cual puede hacer difícil reconocer las unidades originales de isopreno.³



Isopreno

2

3.2 Clasificación de terpenos

Los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno presentes en su estructura:

1. *Hemiterpenos*: Terpenos que contienen 1 isopreno.
2. *Monoterpenos*: Terpenos que contienen 2 unidades de isopreno.
3. *Sesquiterpenos*: Terpenos que contienen 3 unidades de isopreno.
4. *Diterpenos*: Terpenos que contienen 4 unidades de isopreno.
5. *Triterpenos*: Terpenos que contienen 6 unidades de isopreno.
6. *Tetraterpenos*: Terpenos que contienen 8 unidades de isopreno.
7. *Politerpenos*: $[C_5]_n$ cuando $n > 8$. unidades de isopreno.⁴

3.3 Biosíntesis de unidades reactivas IPP y DMAPP

La biosíntesis de estas unidades reactivas puede iniciar por diferentes vías, estas pueden ser la vía del ácido mevalónico (**6**, MEV) o la 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (**14**, MEP), para dar como productos el pirofosfato de isopentenilo (**9**) el cual se isomeriza para dar lugar a la formación del dimetilalilpirofosfato (**10**, Figura 3).⁹

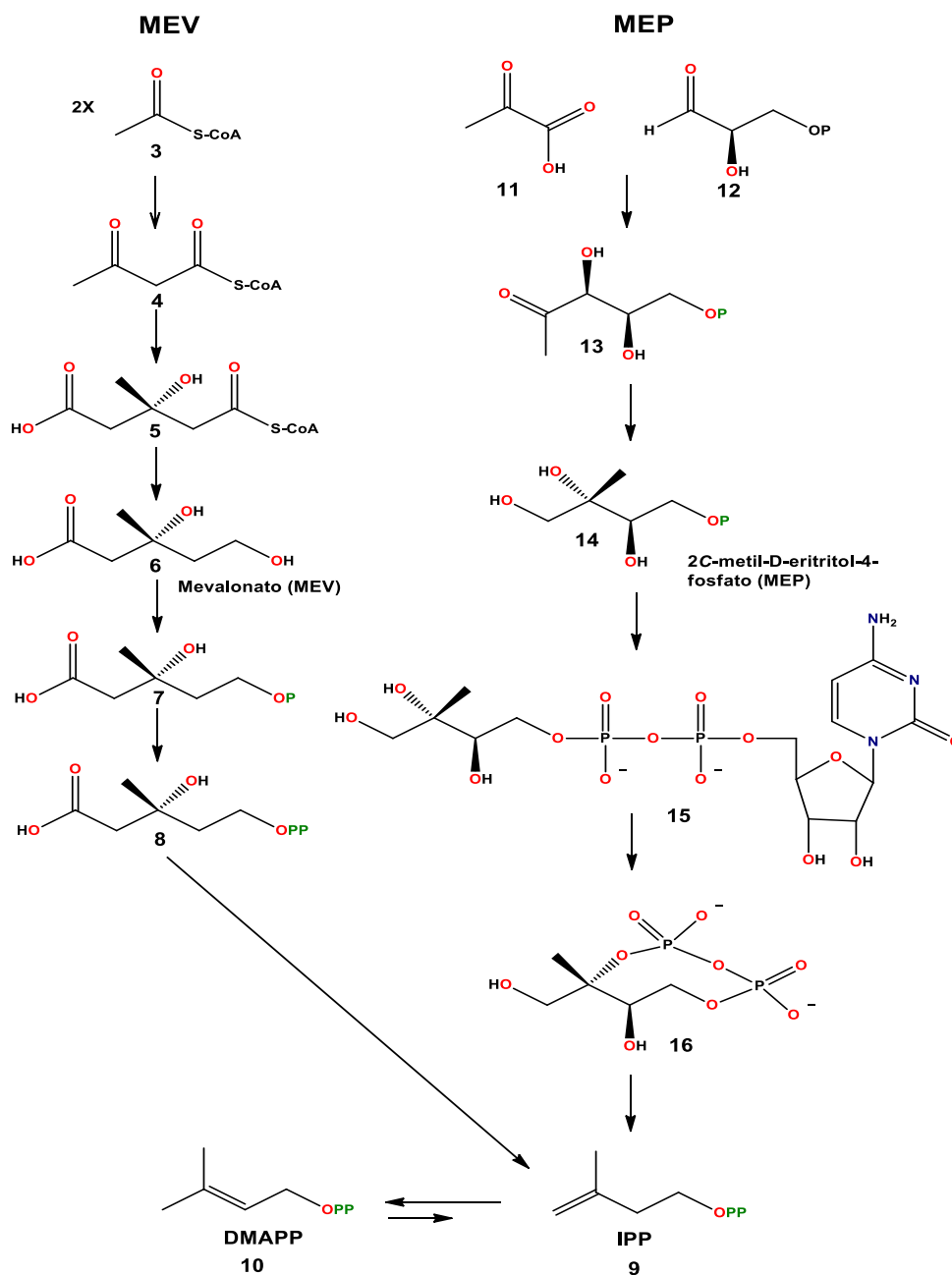


Figura 3. Vía MEV y MEP para formación de IPP y DMAPP.

3.4 Precursores de los terpenos

Una vez formadas las unidades activas, éstas se condensan para dar la formación de los diferentes tipos de terpenos, cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación «cabeza-cola» de un número variable de unidades isoprénicas (Figura 4).

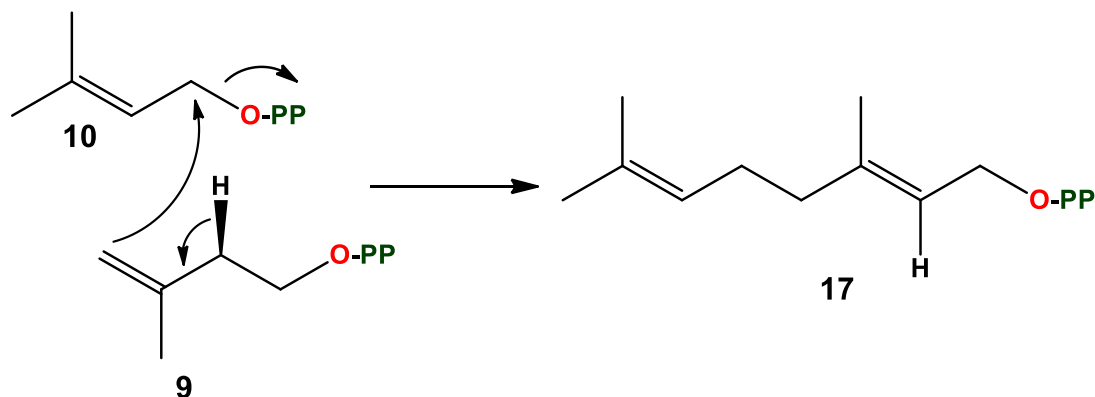


Figura 4. Acoplamiento cabeza-cola.

Los precursores de los principales tipos de terpenos se forman mediante reacciones catalizadas por enzimas (Figura 5).

Existen dos modos de ciclación del precursor GGPP:

- Ciclación inducida por la pérdida del grupo pirofosfato, formación de un carbocatión y alquilación de un doble enlace por éste, generalmente se trata del doble enlace del isopropilideno terminal, lo que da lugar a la formación de un macrociclo.
- Ciclación ácida catalizada del GGPP, similar a la que interviene en la elaboración de los triterpenos pero sin epoxidación previa, se forma así un decahidronaftaleno sustituido. Este tipo de ciclación conduce a dos series enantioméricas que difieren por las configuraciones opuestas de los carbonos C-5, C-9 y C-10. La serie se llama «normal» cuando la fusión de los ciclos A y B es idéntica a la de los esteroides y «*ent*» (enantio) cuando es la antípoda: e.g.: labdano (**23**) y *ent*-labdano (**24**).

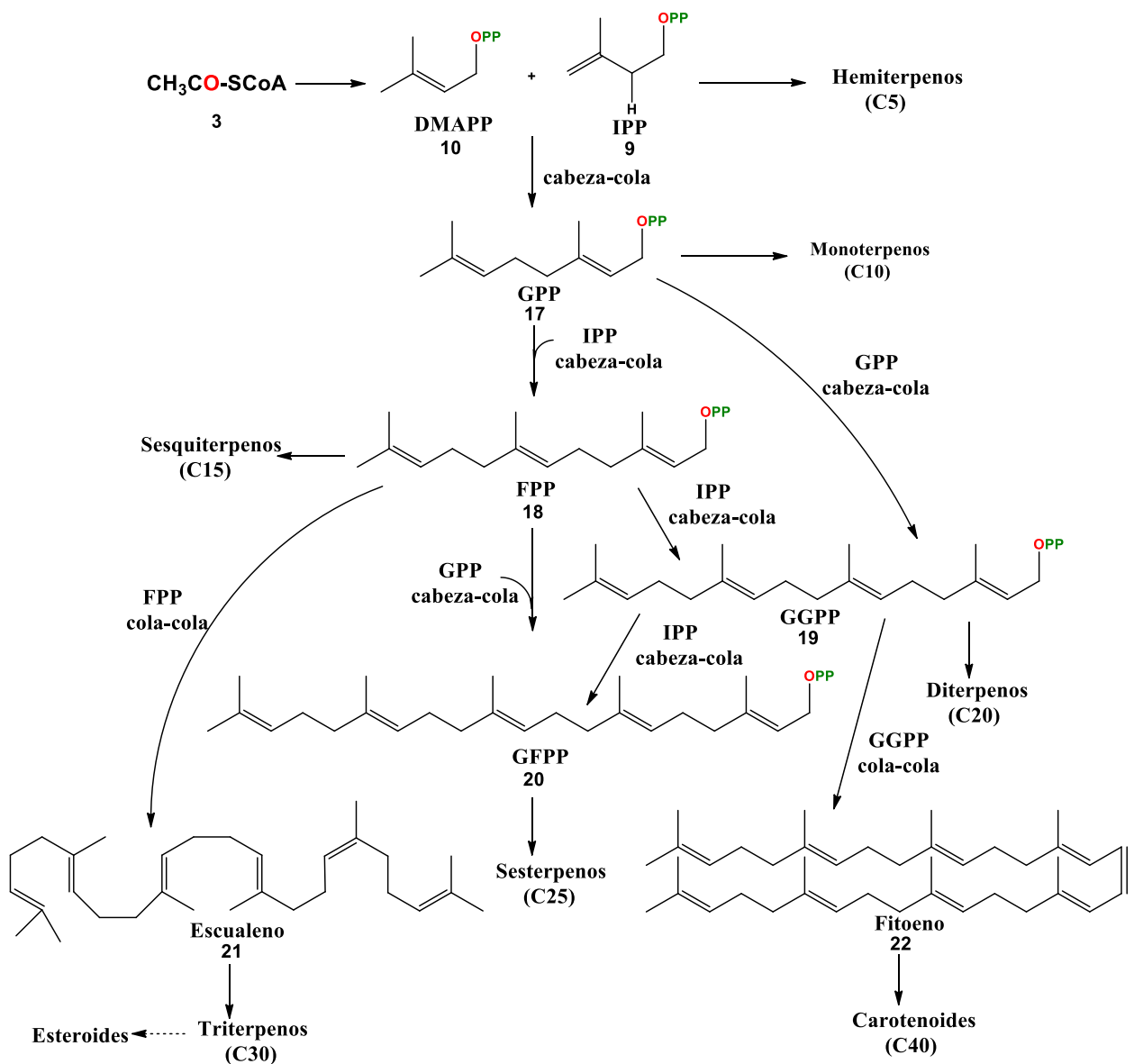


Figura 5. Bioformación de los precursores de terpenos.

La orientación hacia una u otra serie está dirigida por la conformación del precursor lineal de **19** (GGPP) sobre la superficie de la enzima que cataliza la ciclación. La secuencia de la reacción es la siguiente: protonación del doble enlace 2-3 del precursor y adiciones antiparalelas de los enlaces 7-2 y 11-6 para formar, en ambos casos, una *trans*-decalina (Figura 6).⁵

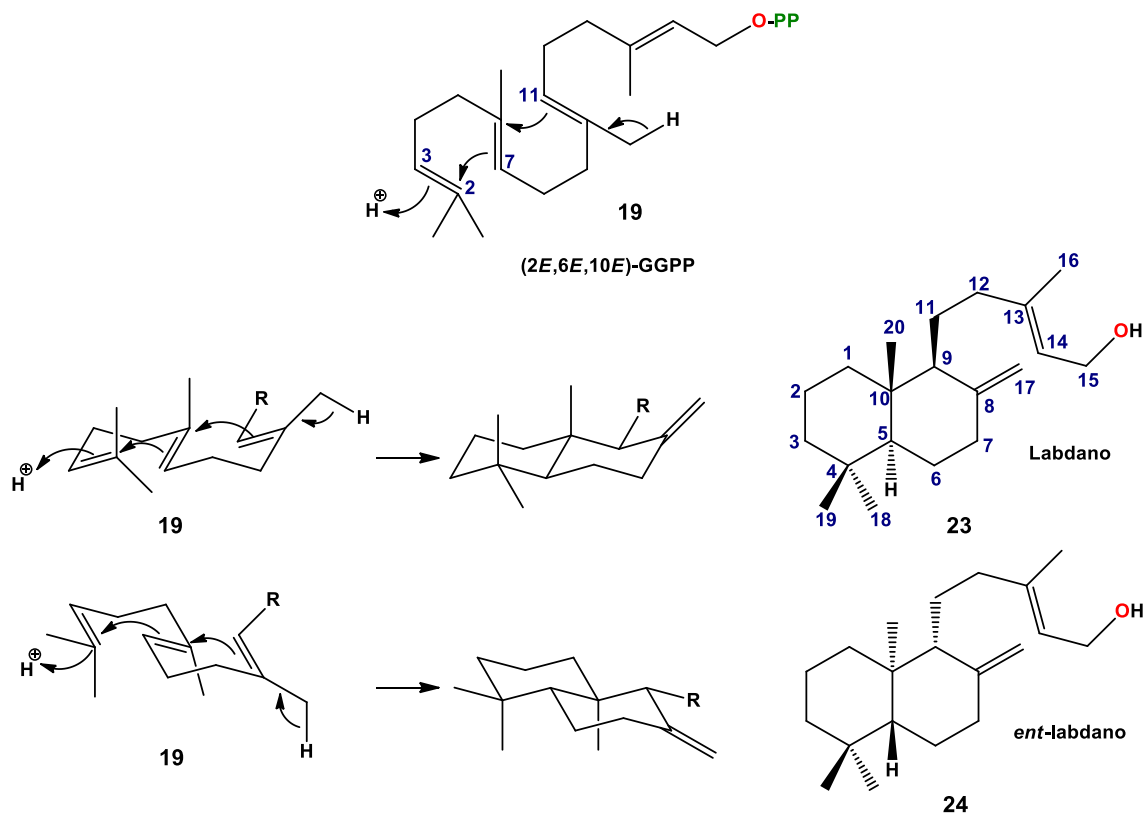


Figura 6. Ciclación de **19** para la formación de la serie normal **23** y enantio **24** de labdano.

3.5 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos

La tubulina se compone de un heterodímero de proteínas globulares denominadas subunidad α y β tubulina, las cuales tienen un peso aproximado de 55 kDa. La tubulina se polimeriza para formar inicialmente protofilamentos, éstos se asocian para formar a su vez los microtúbulos, cada microtúbulo está constituido por 13 protofilamentos, el diámetro de un microtúbulo es de aproximadamente 25 nm y cada μm de longitud de protofilamento está compuesto de 1650 heterodímeros de tubulina (Figura 7).²⁸

Los microtúbulos tienen una polaridad intrínseca de tal manera que la subunidad β presenta carga positiva y la α negativa, esto hace que se pueda polimerizar de ambos extremos siendo el extremo positivo de polimerización rápida y el extremo negativo de polimerización lenta, esto debido a una inestabilidad dinámica que presentan estas subunidades.

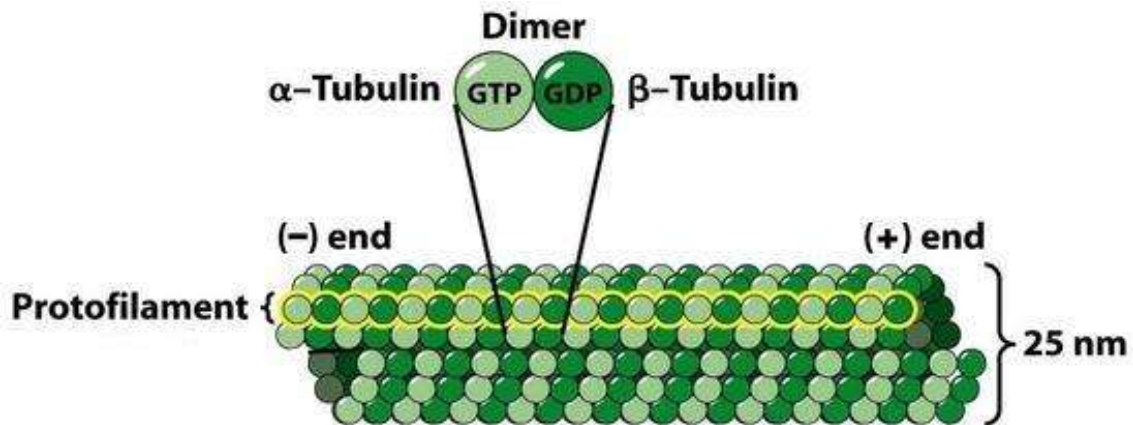


Figura 7. Estructura de los microtúbulos (*Molecular Cell Biology Sixth Edition*).

La estructura de los microtúbulos es esencial para muchas funciones celulares, incluyendo la forma celular, la motilidad y el transporte intracelular, además también son el principal componente estructural del huso mitótico y son críticos para la división celular.²⁹

Por este motivo es el blanco ideal de muchos agentes antimitóticos como el paclitaxel (25) y la vinblastina (26).^{30,31} Estos fármacos actúan suprimiendo directamente la dinámica de los microtúbulos durante la mitosis, lo que da como resultado un bloqueo mitótico para que las células entren en la vía apoptótica y mueran.^{32,45,46}

4. Antecedentes

Las plantas vasculares en México están representadas por 2,804 géneros nativos, de los cuales 127 son helechos y plantas afines, 14 gimnospermas, 546 monocotiledóneas y 2,117 dicotiledóneas. Estos géneros se incluyen en 304 familias y a su vez contienen hasta la fecha un total de 23,424 especies.

Las dicotiledóneas (Clase Magnoliopsida) constituyen el grupo más diverso de todas las plantas vasculares, representando 76% de la riqueza genérica mexicana, siguiéndole en importancia las monocotiledóneas (Clase Liliopsida), en menor escala los helechos, plantas afines y las gimnospermas.

El interés por el estudio de las plantas radica en su gran diversidad de compuestos que poseen, dentro de los cuales podemos encontrar a los diterpenos, un tipo de terpenos que muestran un amplio rango de actividades biológicas como antitumorales, antibióticos, hormonas del crecimiento vegetal, intermediarios de perfumería y edulcorantes entre otros.¹⁴ Se han aislado diterpenos de una gran variedad de plantas, árboles, animales terrestres, esponjas y animales marinos.¹¹

Como ejemplo tenemos el paclitaxel (**25**) conocido como Taxol® que se aisló de la corteza del tejo del pacífico o *Taxus brevifolia*, al cual se le han atribuido propiedades antitumorales, lo que revolucionó el tratamiento de este padecimiento, y ha sido considerado como el mejor agente anticanceroso derivado de productos naturales, usado en la clínica (Figura 8).¹⁶

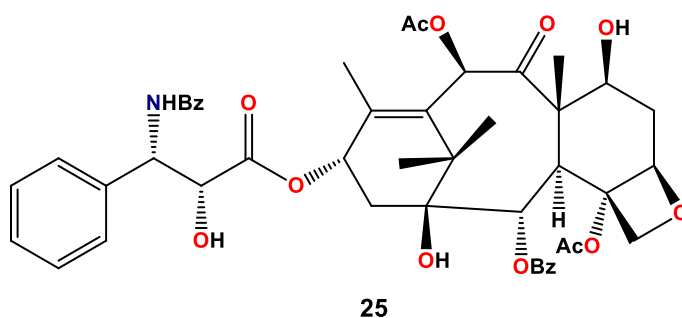


Figura 8. Estructura del paclitaxel (**25**).

El esteviósido (**27**) es un glúcido diterpénico de considerable importancia que se ha obtenido naturalmente de *Stevia rebaudiana* Bertoni, el cual es 150-300 veces más dulce que la sacarosa sin aumentar las concentraciones de glucosa en sangre (Figura 9).^{12,15}

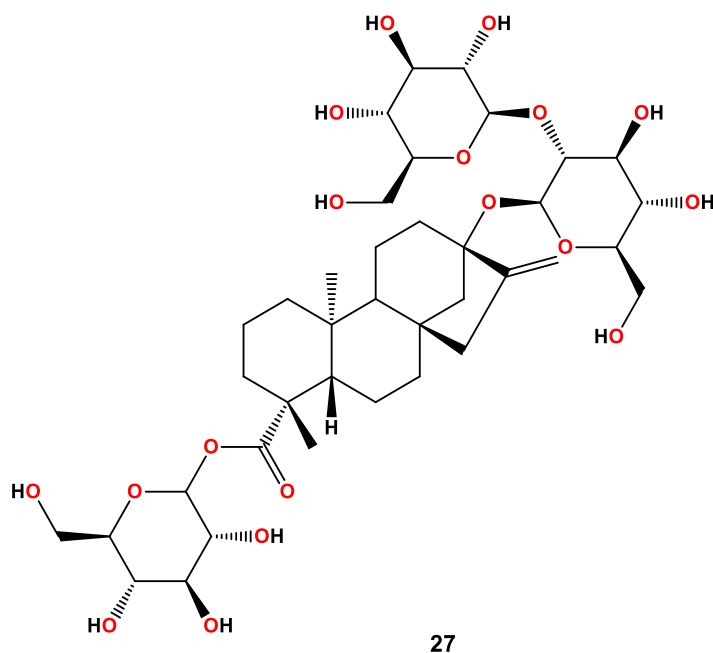


Figura 9. Estructura del esteviósido (**27**).

Otro ejemplo notable es el ácido giberélico (**28**), diterpeno de estructura *ent*-kaureno, el cual fue descubierto primeramente en Asia, producido por un hongo (*Gibberella fujikuroi*) que hacía que las plantas de arroz crecieran altas, posteriormente se descubrió que las plantas también lo producen y que es considerado como una fitohormona que promueve el crecimiento y desarrollo celular en las plantas (Figura 10).^{18,19}

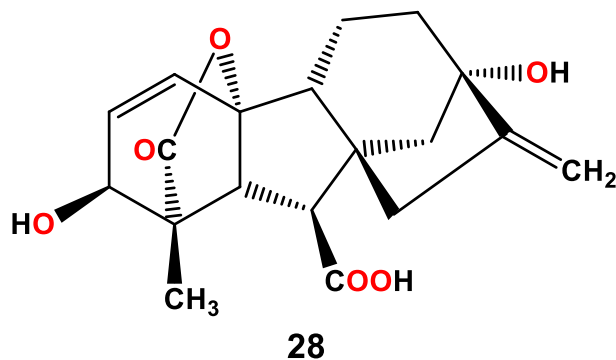


Figura 10. Estructura del ácido giberélico (**28**).

La familia Asteraceae es la que contiene mayor número de géneros con 362, dentro de los cuales se ubica el género *Ageratina* con 143 especies respectivamente, dentro de las cuales 28 son encontradas en el occidente de México.¹⁰

Un ejemplo de ellas es *Ageratina petiolaris* de la que se han aislado diterpenos como el ácido 2 α -isovaleroxieperúico (**29**, Figura 11). A esta planta se le han atribuido propiedades hipoglucémicas utilizándose para el tratamiento de la diabetes tipo 2.^{20,21}

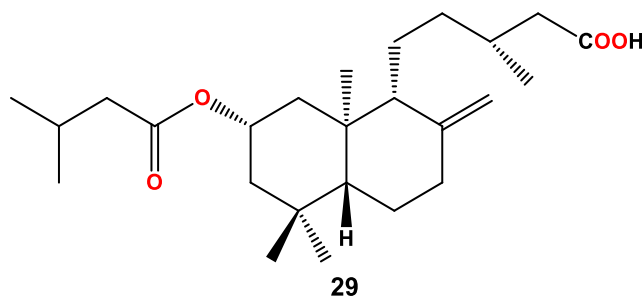


Figura 11. Estructura del ácido 2 α -isovaleroxieperúico (**29**).

Otra especie de importancia es *Ageratina jocotepecana*, la cual fue clasificada por B. L. Turner, cuyo nombre se debe a Jocotepec, municipio de la Región Ciénega del estado de Jalisco⁷ (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Ageratina jocotepecana*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Ageratina</i>
Especie	<i>jocotepecana</i> B.L.Turner

Las características particulares de esta especie incluyen peciolo de 3 a 6 cm de largo, hojas deltoides subcordadas, palmeadas y nervadas cerca de la base, márgenes dentados

irregulares, de 5 a 10 cabezas bracteadas dispuestas en racimos auxiliares, 50-80 flores por cabeza, corolas blancas de 5-6 mm de largo y aquenios cilíndricos *ca.* 4 mm de largo (Figura 12).²⁷



Figura 12. Planta de *Ageratina jocotepecana*.

En un estudio químico y biológico de *Ageratina jocotepecana* se reportó su actividad microbicida y citotóxica,^{22,23} así como el aislamiento de diterpenos tipo labdano conocidos como ácido $(-)-(5S,9S,10S,13Z)$ -labda-7,13-dien-15-oico (ácido labdadienoico **30**), ácido $(-)-(5S,9S,10S,13S)$ -labda-7-en-15-oico (ácido catívico **31**), ácido $(+)-(5S,8R,9R,10S,13R)$ -8-hidroxilabdan-15-oico (ácido 13-*epi*-labdanólico **32**) y tetranorlabdanodiol (**33**), cabe mencionar que este último se aisló solo del extracto hexánico de tallo (Figura 13).^{13,27}

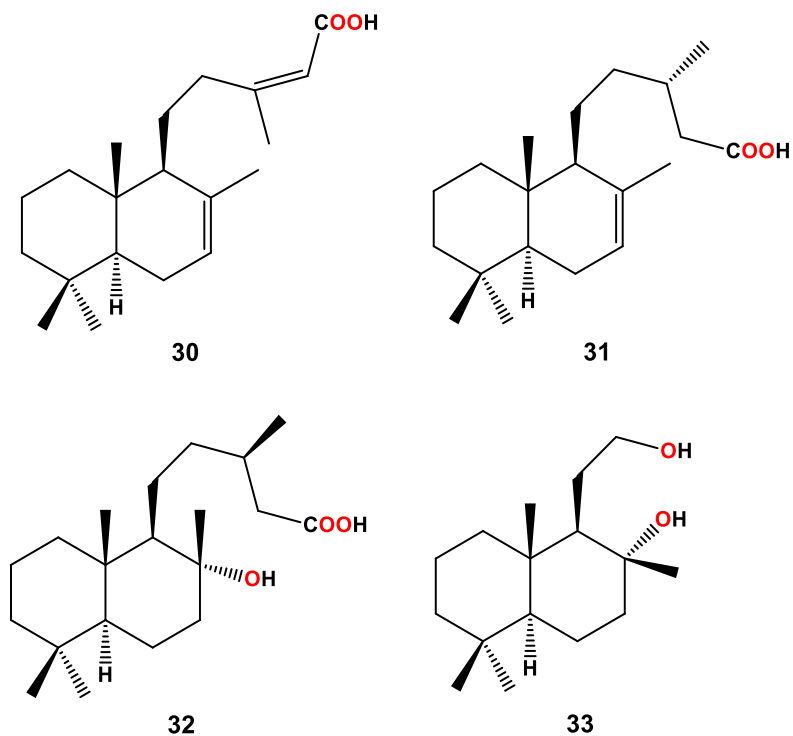


Figura 13. Estructura de los diterpenos aislados de *Ageratina jocotepecana*.

Los diterpenos **32** y **33** se han utilizado para la síntesis del ambrox el cual es un fijador importante en la industria de la perfumería.^{24,27,33}

Los ácidos **31** y **32** se les ha atribuido que tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima aldosa reductasa de cristalinos de rata, la cual es una enzima que está implicada en la catarata metabólica, que es una opacidad del cristalino causada por un estado de hiperglucemia como en la diabetes mellitus.^{25,26}

4.1 Enlaces tipo amida y éster

El interés en generar amidas y ésteres surge debido a que dichos grupos funcionales se encuentran en estructuras de compuestos naturales con propiedades biológicas importantes, además de que son uno de los vínculos más importantes en Química Orgánica. Este grupo funcional constituye la clave en la formación de péptidos, polímeros, así como de productos farmacéuticos.

Debido a la complejidad de llevar a cabo la conversión de un grupo funcional carboxilo a un grupo amida o éster, se ha llegado a la necesidad de la utilización de activadores o

agentes acoplantes, esto con la finalidad de hacer más favorable la reacción entre un ácido carboxílico y un grupo amino o alcohol para la formación de sus amidas y ésteres respectivos.

Un reactivo ampliamente utilizado es el 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, **34**) en la síntesis de amidas a partir de ácidos carboxílicos y aminas que ocurre a través de un intermediario acil-imidazol (**36**) y que favorece el ataque nucleofílico por parte del grupo amino o alcohol formando la amida o éster correspondiente (Figura 14).^{37,38}

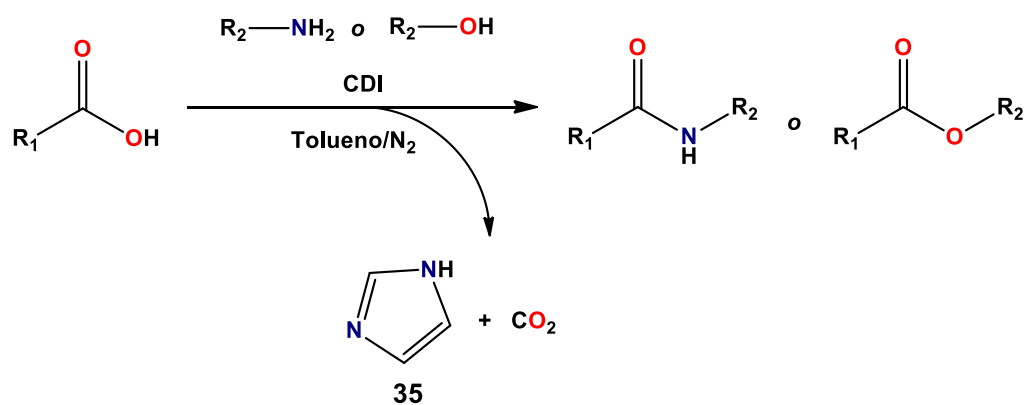


Figura 14. Reacción mediada por CDI.

Otra metodología para la activación del grupo carboxilo es a través de la vía de anhídridos mixtos en donde previamente el ácido carboxílico se convierte en un anhídrido como intermediario y posteriormente sufre un ataque nucleofílico sobre el carbonilo más cercano al ácido formando así la amida (Figura 15).³⁴

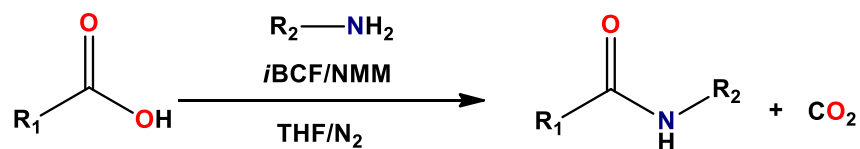


Figura 15. Reacción vía anhídridos mixtos.

También se ha implementado la utilización de agentes acoplantes como lo son COMU (42) y PyBOP (43), los cuales son considerados dentro del grupo de las sales de uronio y fosfonio, para este tipo de reacciones es necesario la presencia de una base en este caso DIPEA (44, Figura 16).³⁵

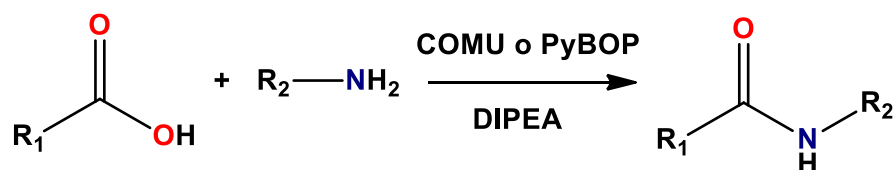


Figura 16. Reacción mediante agentes acoplantes COMU y PyBOP.

5. Justificación

Reportes previos han demostrado la importancia de estudiar los Productos Naturales, tal es el caso de los diterpenos, cuyo interés radica en su amplio rango de actividades biológicas que se les ha atribuido como antitumoral, antibiótico, hormonas del crecimiento vegetal, intermediarios de perfumería y edulcorantes entre otros, por lo que llevar a cabo el estudio de la reactividad química de los diterpenos aislados de *Ageratina jocotepecana*, pretende aportar conocimiento científico en la química de estos productos naturales.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Llevar a cabo el estudio de la reactividad del grupo carboxilo de los diterpenos aislados del género *Ageratina*.

6.2 Objetivos particulares

1. Obtener los extractos hexánicos por maceración a partir de las flores de *Ageratina jocotepecana*.
2. Aislar y purificar el ácido labdadienoico (**30**), el ácido catívico (**31**) y el ácido 13-*epi*-labdanólico (**32**) por métodos cromatográficos.
3. Llevar a cabo las modificaciones químicas del grupo carboxilo de los ácidos mencionados para la obtención de sus derivados.
4. Caracterizar los compuestos derivados mediante sus datos físicos y espectroscópicos.
5. Evaluar la interacción entre los ácidos diterpénicos y sus derivados en condiciones de polimerización de tubulina *in vitro*.

7. Discusión de Resultados

7.1 Procesamiento de la planta

Ageratina jocotepecana fue colectada el 5 de febrero del 2015 en el km 51 de la carretera Morelia-Zacapu. La planta se secó a la sombra y posteriormente se separó en sus diferentes partes (flores, hojas, tallos), se llevó a cabo la maceración en hexano de 580 g de flores, el extracto obtenido fue re-suspendido en metanol para precipitar las grasas. A partir de 580 g de flor se obtuvieron tres lotes de 8.58, 4.45 y 2.15 g.

7.2 Metabolitos aislados

Para el aislamiento de los ácidos diterpénicos **30**, **31** y **32**, se emplearon 2.1465 g de extracto, el cual fue sometido a cromatografía en columna utilizando mezclas de Hex:AcOEt en orden ascendente de polaridad, empleando como fase estacionaria sílica gel 60 230-400 mesh. Las fracciones eluidas se monitorearon mediante cromatografía en capa fina y se caracterizaron por RMN de una y dos dimensiones, por comparación con los datos de la literatura.

7.2.1 Identificación del ácido labdadienoico (**30**)

De las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (9:1), se aislaron 82.3 mg de un sólido blanco (Figura 17) que correspondió al ácido labdadienoico (**30**).

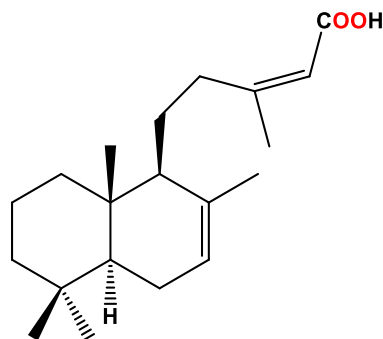
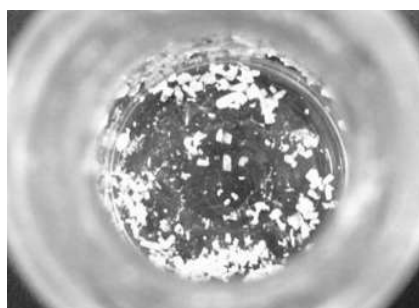


Figura 17. Ácido labdadienoico (**30**).

El espectro de RMN de ^1H (Figura 18) mostró las señales características. En 5.66 ppm una señal simple ancha correspondiente para H-14, en 5.39 ppm una señal simple ancha correspondiente para el H-7, en 1.94 ppm se observó una señal simple correspondiente al Me-17, en 1.75 ppm se observó una señal simple para el metilo 16, en 0.87, 0.85 y 0.74 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos 18, 19 y 20 respectivamente.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19) se observó en 171.2 ppm una señal correspondiente al carbonilo de ácido carboxílico, en 163.7 ppm se observó una señal

para el carbono cuaternario vinílico 13, en 135.2 ppm una señal para el carbono cuaternario vinílico 8, en 122.3 ppm una señal correspondiente para el carbono vinílico 7, en 115.3 ppm una señal correspondiente para el carbono vinílico 14. Para corroborar los desplazamientos químicos, éstos se compararon con los reportados en la literatura.³⁶

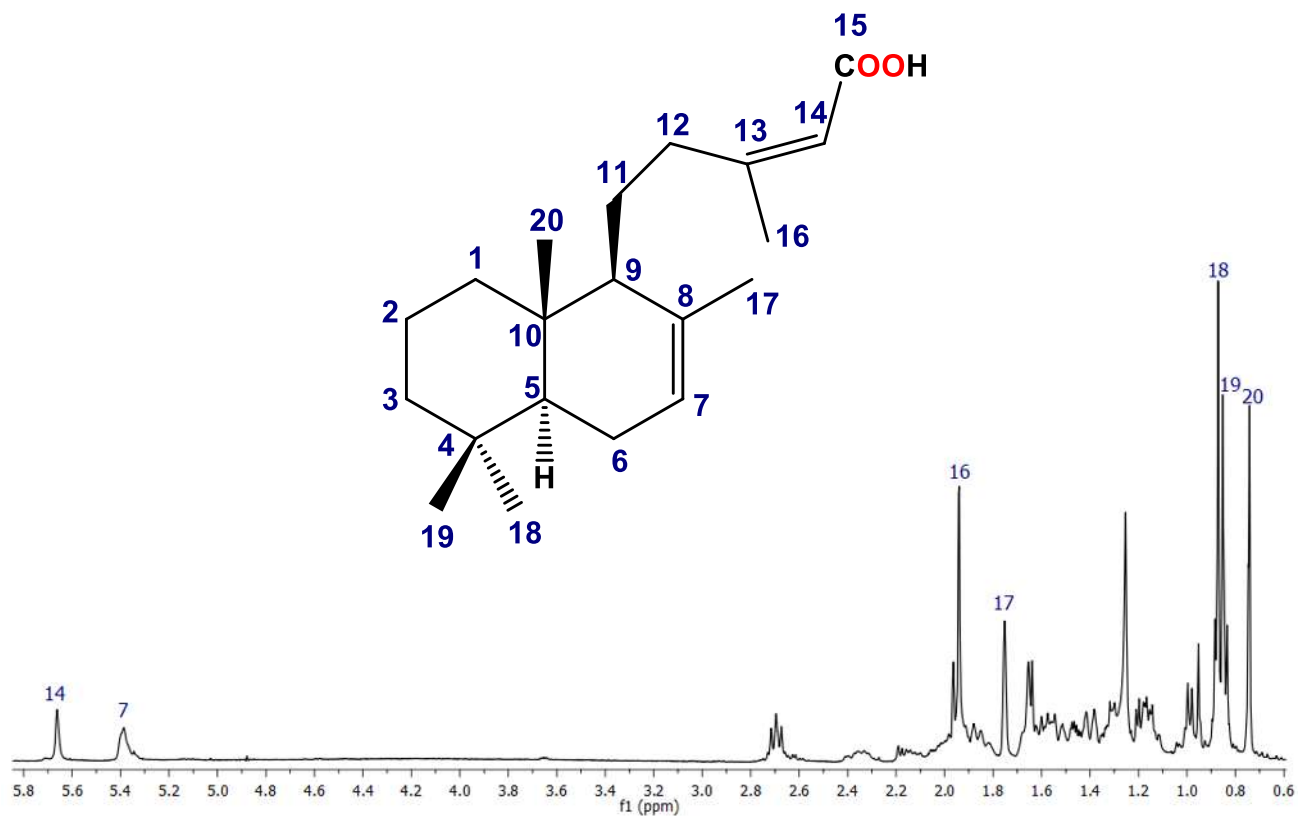


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido labdadienoico (**30**).

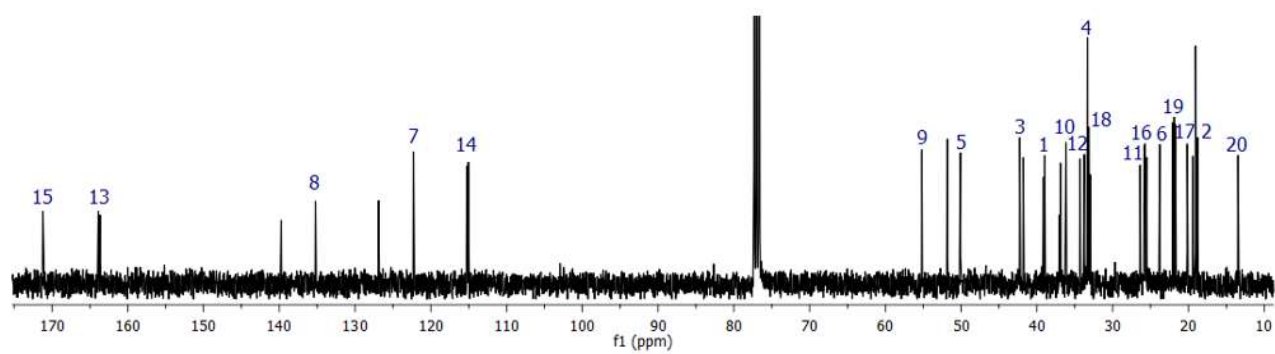


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido labdadienoico (**30**).

7.2.2 Identificación del ácido catívico (31)

De las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (85:15), se aislaron 464.4 mg de un sólido blanco (Figura 20) que correspondió al ácido catívico (31).

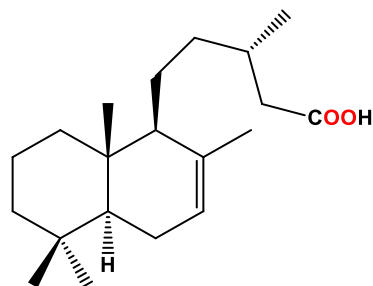
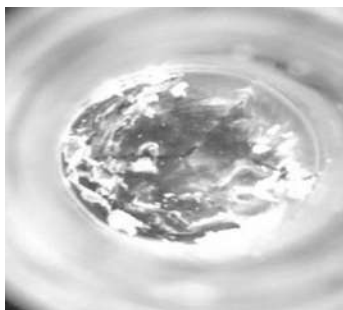


Figura 20. Ácido catívico (31).

El espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 21) mostró una señal simple ancha en 5.38 ppm correspondiente a H-7, en 2.39 se observó una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 15.0 y 5.8 Hz correspondiente a H-14, en 2.15 ppm se observó una doble de dobles con constantes de acoplamiento de 15.0 y 8.3 Hz correspondiente a H-14', en 1.65 ppm se observó una señal simple ancha que integra para 3H correspondiente al Met-17, en 1.00 ppm se observó una señal doble que integra para 3H con una $J = 6.6$ Hz que corresponde a Met-16, en 0.87 ppm se observó una señal simple que integra para 3H correspondientes a Met-18, en 0.85 ppm se observó una señal simple que integra para 3H correspondientes a Met-19, en 0.75 ppm una señal simple que integra para 3H correspondientes a Met-20.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22) se observó en 179.5 ppm la señal correspondiente al carbonilo de ácido carboxílico, en 135.2 y 122.2 ppm se observaron las señales correspondientes a los carbonos vinílicos 8 y 7. Para corroborar los desplazamientos químicos, éstos se compararon con los reportados en la literatura.¹³

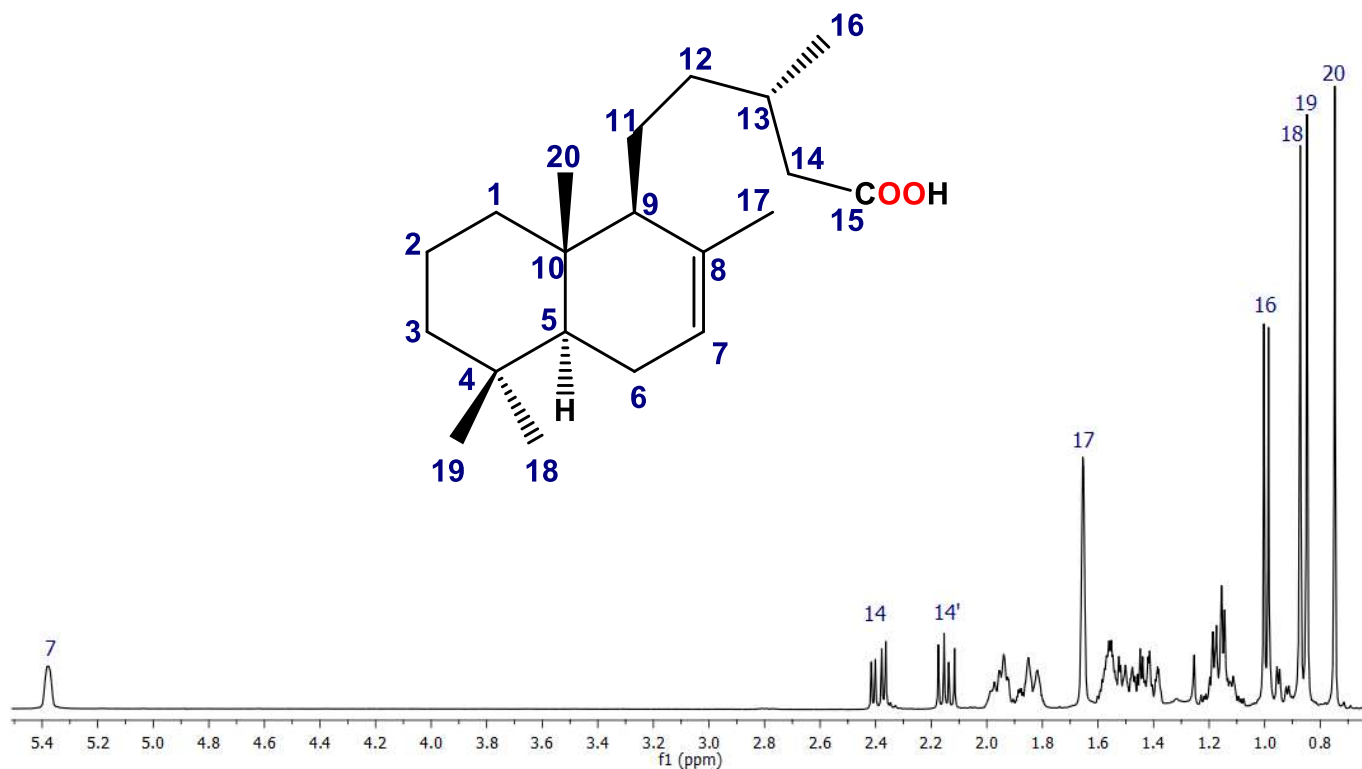


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido catívico (31).

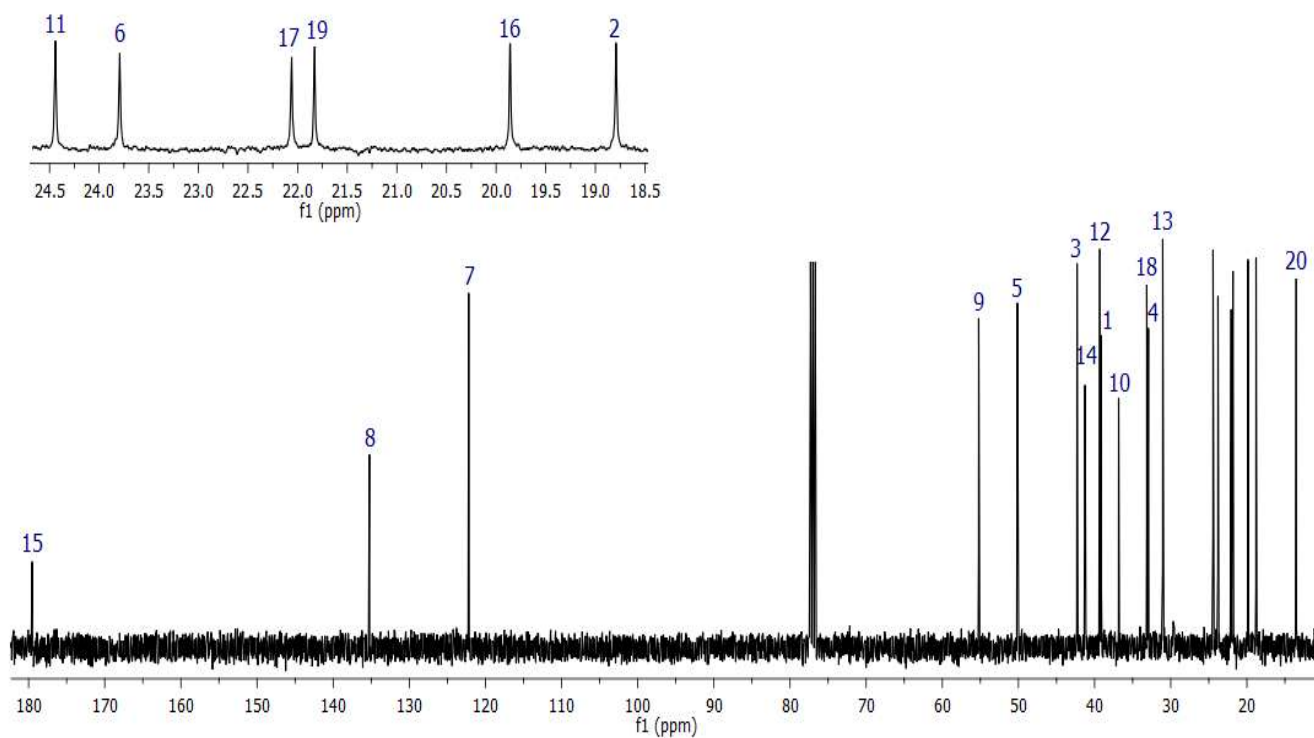


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido catívico (31).

7.2.3 Identificación del ácido 13-*epi*-labdanólico (32)

De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (1:1), se aislaron 242.2 mg de unos cristales ligeramente verdes (Figura 23).

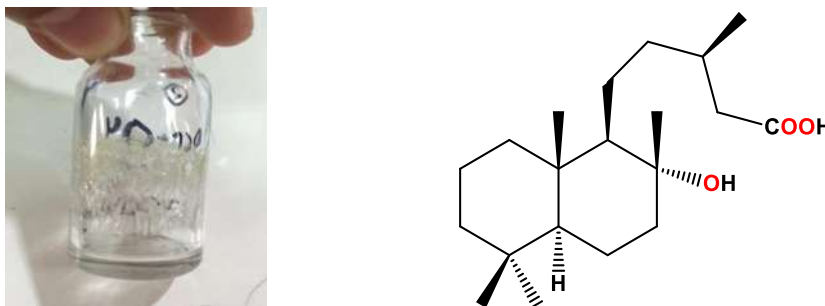


Figura 23. Ácido 13-*epi*-labdanólico (32).

El espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 24) mostró en 2.40 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 14.6 y 6.5 Hz correspondiente para H-14, en 2.14 ppm se observó una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 14.6 y 7.9 Hz correspondiente a H-14', en 1.16 ppm se observa una señal simple que integra para 3H que corresponden a Met-17, en 0.98 ppm se observa una señal doble con una $J = 6.7$ Hz que integra para 3H correspondiente a Met-16, en 0.86 ppm se observó una señal simple correspondiente a Met-18, en 0.78 ppm se observa una señal simple que integra para 6H correspondientes a los metilos 19 y 20 que se encuentran sobrepuestos.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) se observó en 179.4 ppm la señal correspondiente al carbonilo de ácido carboxílico, en 74.7 y 44.2 ppm se observaron las señales correspondientes a los carbonos vinílicos 8 y 7. Para corroborar los desplazamientos químicos, éstos se compararon con los reportados en la literatura.¹³

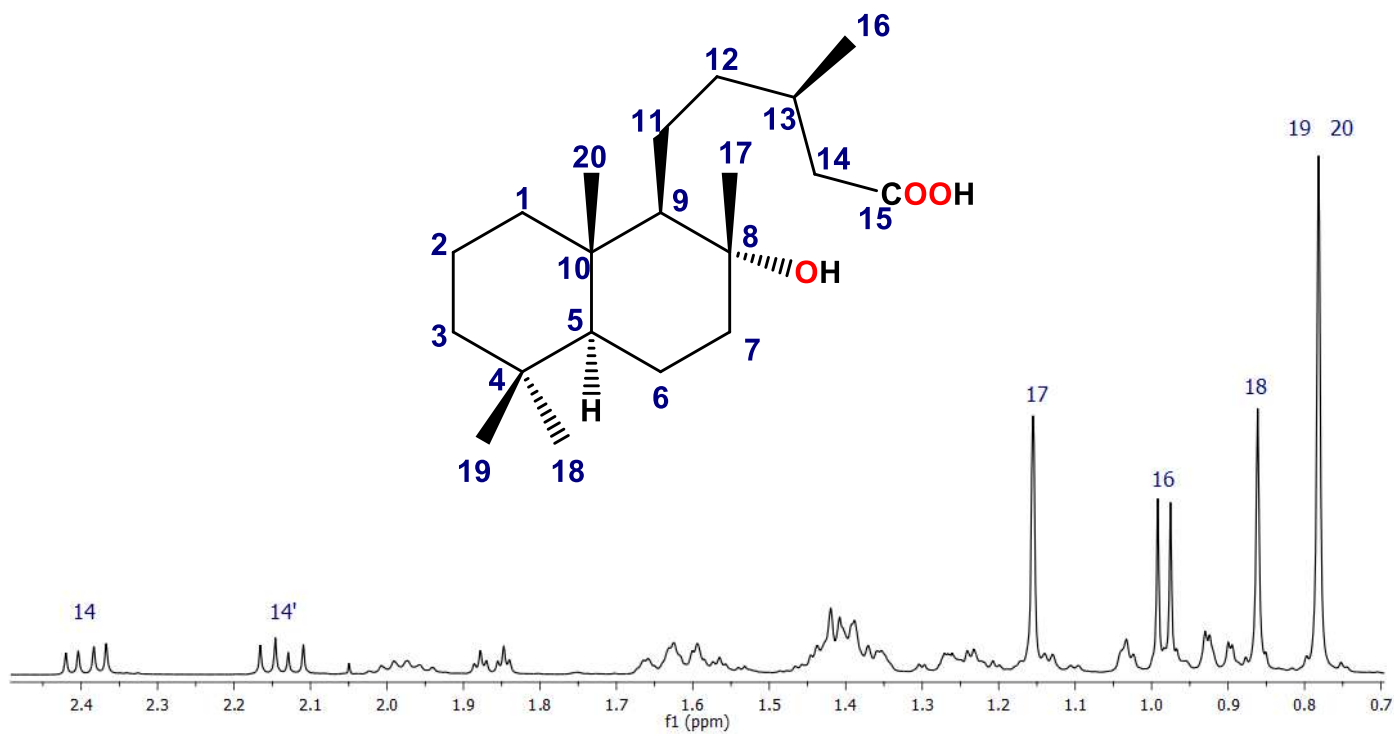


Figura 24. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del ácido 13-*epi*-labdanólico (32).

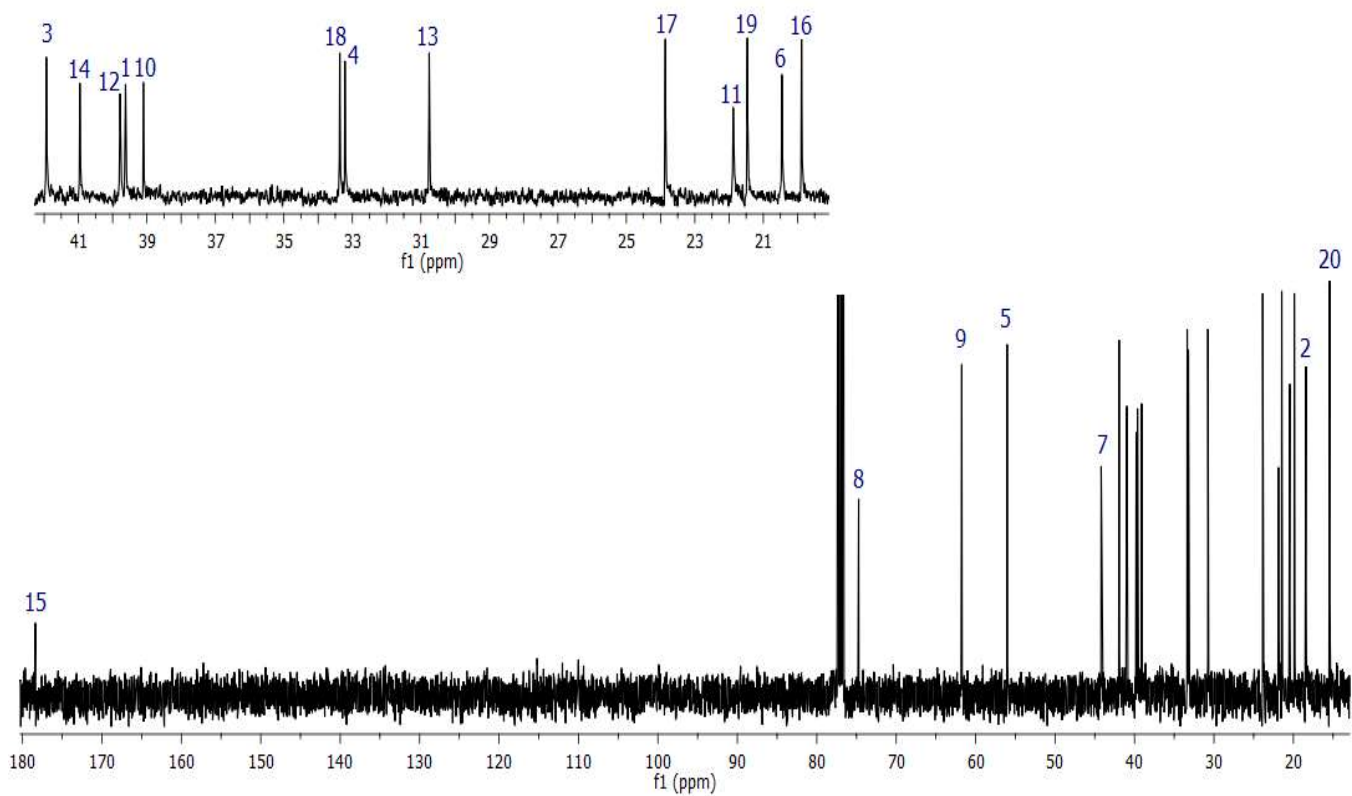


Figura 25. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del ácido 13-*epi*-labdanólico (32).

7.3 Reacción con 1, 1'-carbonildiimidazol (CDI)

Después de obtener los tres ácidos diterpénicos se comenzó con las reacciones correspondientes utilizando 1,1'-carbonildiimidazol (**34**) como activador del grupo carboxilo (Figura 26) que a través de un intermediario acil-imidazol (**36**) favorece el ataque nucleofílico por parte de una amina o un alcohol formando así sus amidas y ésteres respectivos.³⁷⁻³⁹

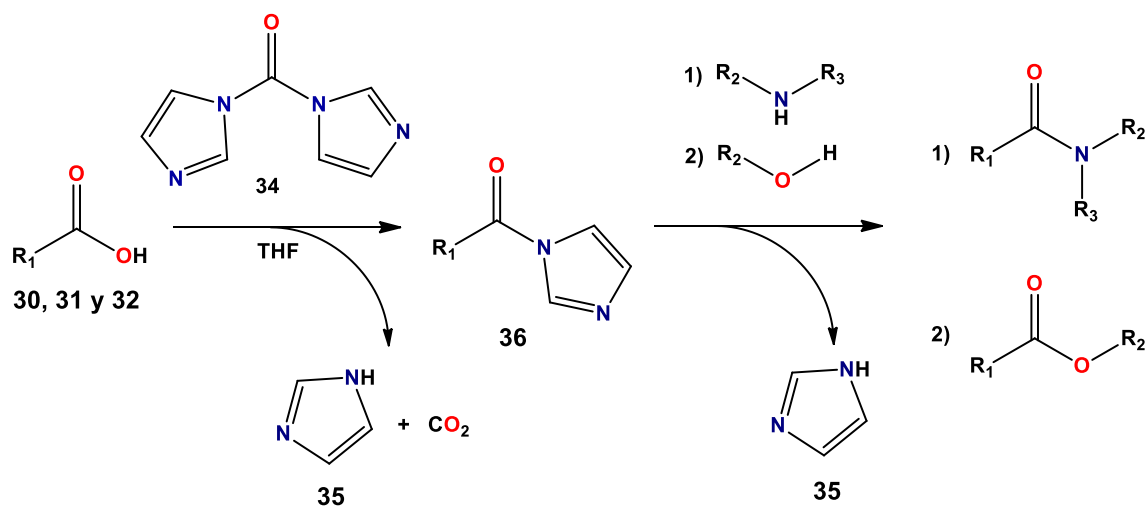


Figura 26. Activación del grupo carboxilo utilizando CDI.

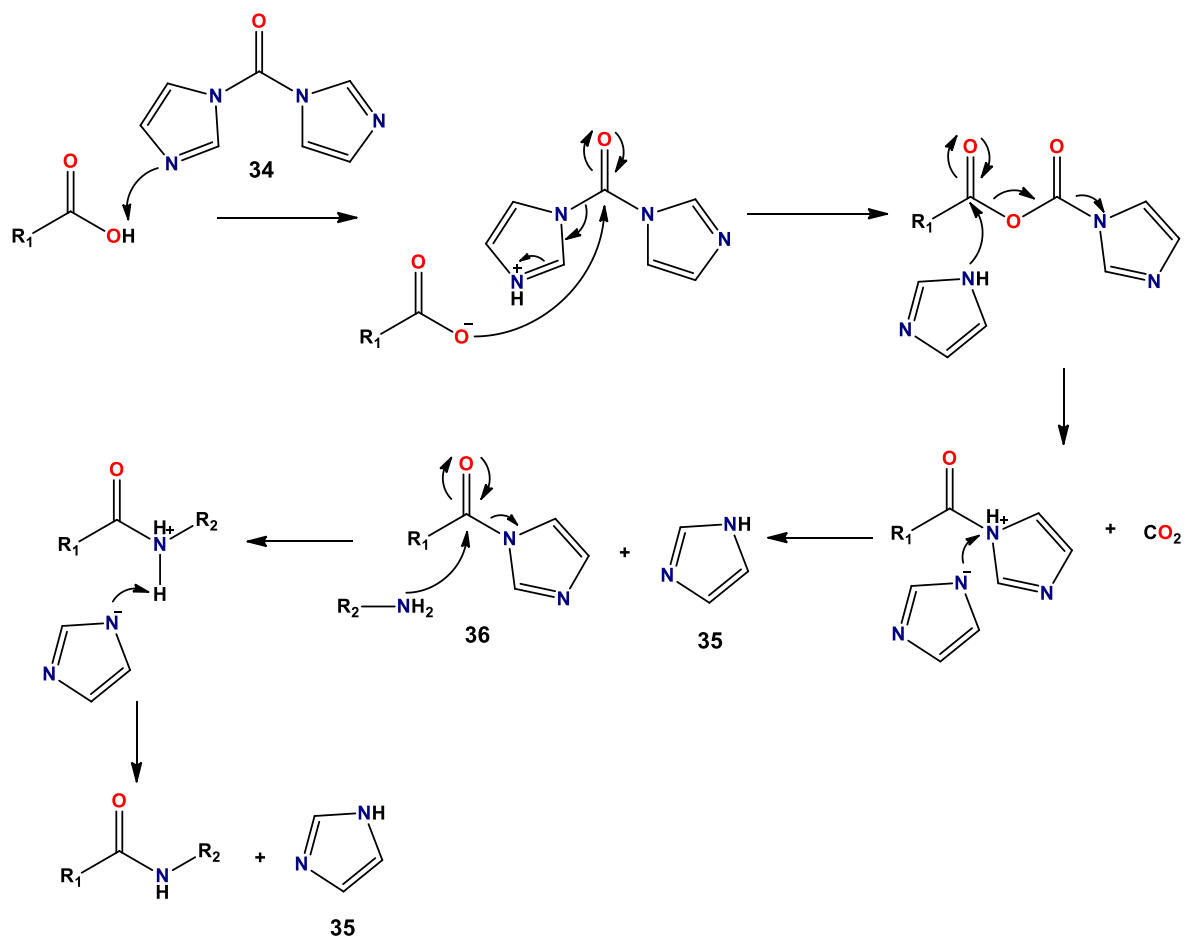


Figura 27. Mecanismo de reacción con CDI como activador.

7.4 Reacción vía de anhídridos mixtos

La vía de anhídridos mixtos es muy utilizada en la síntesis de péptidos en donde se utiliza como activador el *i*BCF (37) y como base la 4-metilmorfolina (NMM, 38), hay que tener en consideración que al formarse el anhídrido mixto 39 como intermediario éste puede sufrir un ataque nucleofílico en ambos carbonilos formando por un lado la amida con liberación de isobutanol (40) y CO₂, mientras que el otro carbonilo forma un uretano (41) como subproducto.^{34,40}

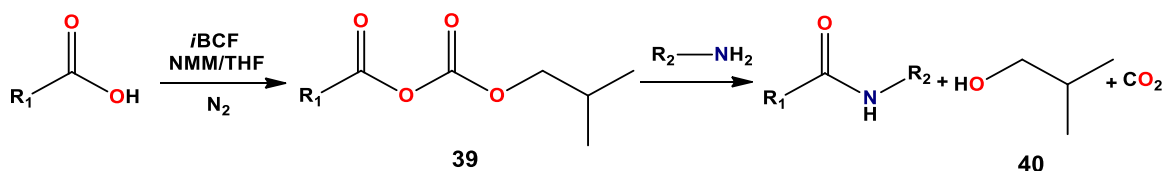


Figura 28. Activación del grupo carboxilo vía anhídridos mixtos.

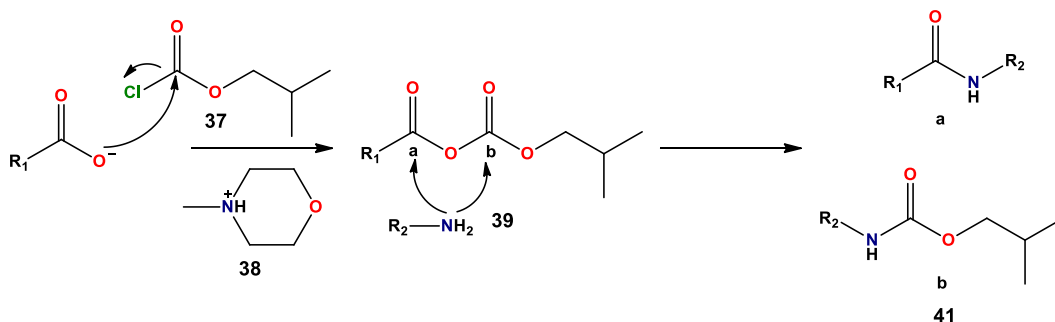


Figura 29. Mecanismo de reacción vía anhídridos mixtos.

7.5 Reacción con COMU

Este reactivo pertenece a la familia de agentes acoplantes de tipo uronio, en su estructura presenta un grupo morfolino **47** en conjunción de la oxima 2-ciano-2-(hidroxiiminio) acetato de etilo (**48**), lo cual favorece la solubilidad, estabilidad y reactividad de este reactivo, la reacción se lleva a cabo a través de un intermediario **45** que posteriormente se transforma en el éster reactivo **46** que se forma entre el acilo y la oxima.^{41,42}

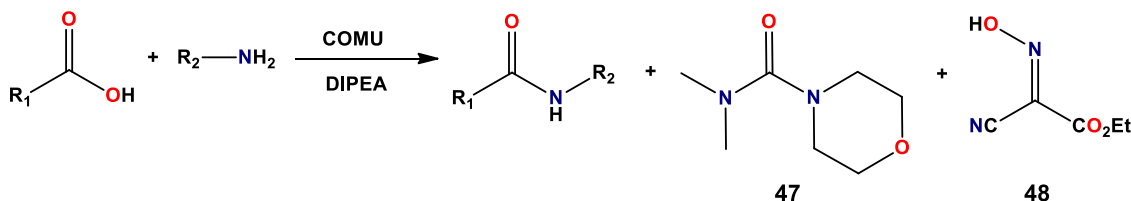


Figura 30. Activación del grupo carboxilo mediante COMU.

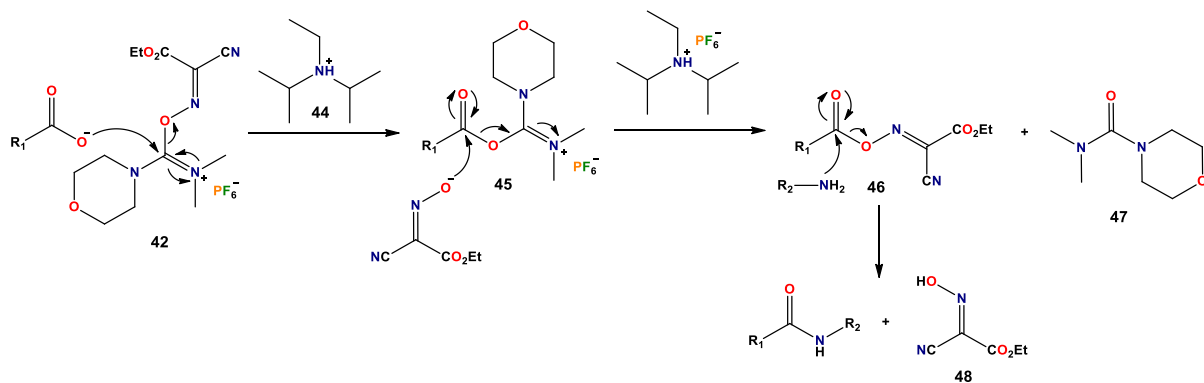


Figura 31. Mecanismo de reacción empleando COMU.

7.6 Reacción con PyBOP

Este reactivo pertenece a la generación de agentes acoplantes conocidos como sales de fosfonio, éste presenta en su estructura un equivalente de benzotriazol y la especie acilante final es el éster de benzotriazol, para esto primeramente tiene que desprotonarse el ácido carboxílico, que a su vez ataca la sal de fosfonio formando así la sal de acilfosfonio (**49**) la cual evoluciona para la formación del éster activo **50**, por último sufre un ataque nucleofílico por parte de la amina para la formación de la amida además de la liberación de óxido de tripirrolidinofosfina (**51**) y el hidroxibenzotriazol (HOBt, **52**) como subproductos (Figura 32).^{43,44}

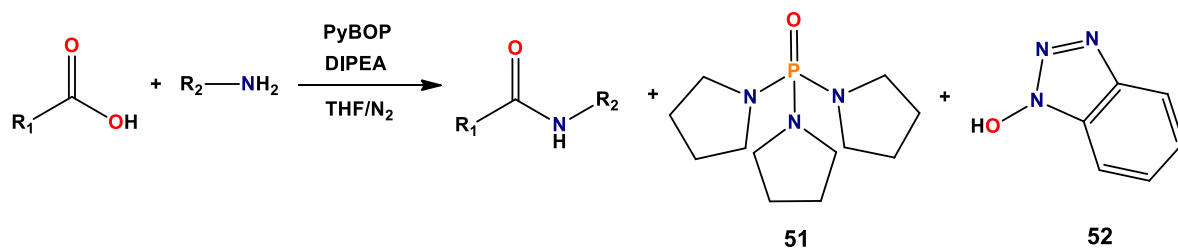


Figura 32. Activación del grupo carboxilo mediante PyBOP.

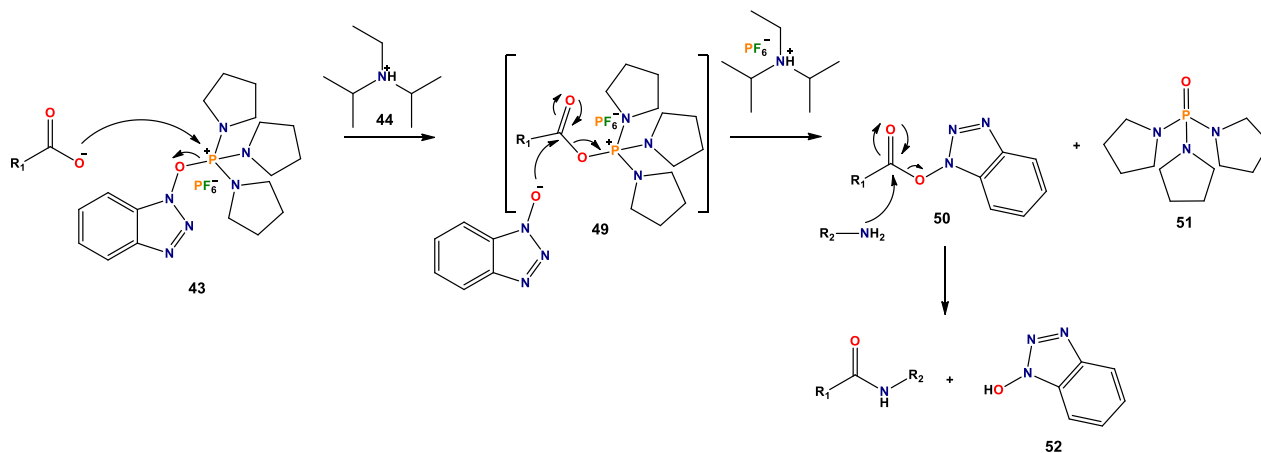


Figura 33. Mecanismo de reacción con PyBOP.

7.7 Reacciones para la obtención de los derivados

Las reacciones que se llevaron a cabo con aminas y alcoholes utilizando CDI se presentan en la Tabla 2 y Tabla 3 mientras que las pruebas que se realizaron con el ácido catívico y anilina utilizando diferentes activadores como COMU, PyBOP y la vía de anhídridos mixtos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 2. Reacciones de los 3 ácidos diterpénicos con aminas y CDI.

	Labdadienoico (30)	Catívico (31)	13- <i>epi</i> -labdanólico (32)
Anilina (53)	●	●	●
Ciclohexilamina (54)	●	●	●
<i>o</i> -Toluidina (55)	●	●	●

● Se obtuvo el producto deseado.

● No reaccionó.

Tabla 3. Reacciones de los 3 ácidos diterpénicos con alcoholes y CDI.

	Labdadienoico (30)	Catívico (31)	13- <i>epi</i> -labdanólico (32)
<i>p</i> -metoxifenol (56)	●	●	●
<i>p</i> -nitrofenol (57)	●	●	●

● Se obtuvo el producto deseado.

● No reaccionó.

Tabla 4. Reacciones del ácido catívico con anilina utilizando diferentes activadores.

	COMU	PyBOP	Anhídridos mixtos
Catívico- Anilina	●	●	●

● Se obtuvo el producto deseado.

● No reaccionó.

A continuación en la Tabla 5 se muestran las reacciones favorables donde se obtuvo el producto deseado así como las estructuras de cada uno de ellos (Figura 34).

Tabla 5. Reacciones de los ácidos diterpénicos.

Producto	Estado físico	Rendimiento %
58	Oleoso verde	32 (CDI)
58	Oleoso verde	23 (COMU)
58	Oleoso verde	16 (Mixtos)
58	Oleoso verde	14 (PyBOP)
59	Oleoso incoloro	38
60	Oleoso verde	30
61	Oleoso incoloro	27
62	Oleoso incoloro	21
63	Sólido blanco p.f 136-138 °C	25
64	Sólido blanco p.f. 165-167 °C	30
65	Oleoso incoloro	30
66	Sólido blanco p.f. 95-97 °C	42
67	Sólido blanco p.f. 114-116 °C	23

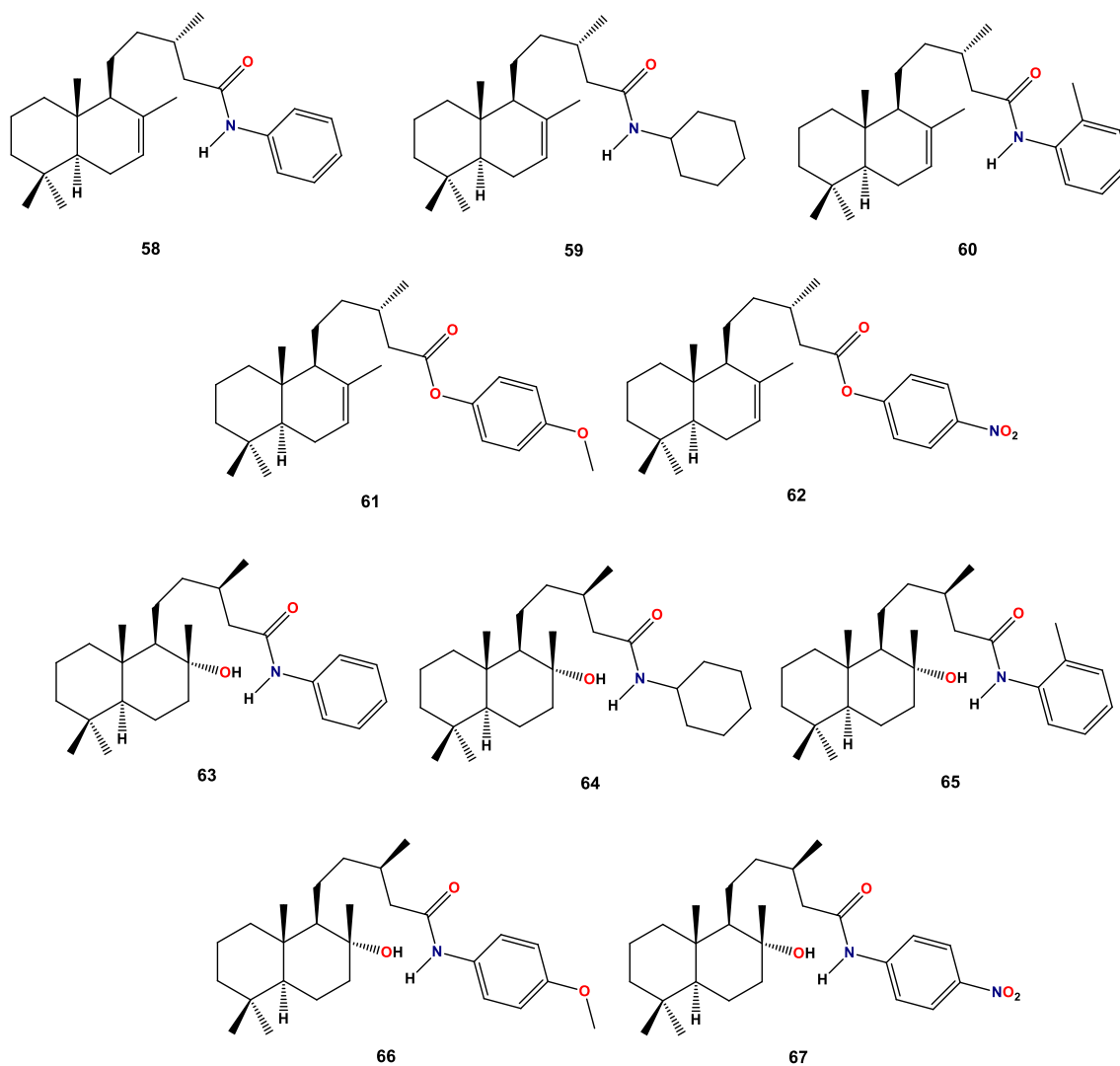


Figura 34. Estructuras de los derivados obtenidos.

El derivado **58** en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 44) presentó alrededor de 7.51 ppm una señal doble con una constante de acoplamiento de 7.7 Hz correspondiente para H-22, en 7.31 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 8.2 y 7.6 Hz correspondiente para H-23, en 7.20 ppm una señal simple ancha correspondiente a N-H, en 7.11 ppm una señal triple con una constante de acoplamiento de 7.4 Hz correspondiente para H-24, en 5.37 ppm una señal simple ancha correspondiente al protón vinílico H-7.

El compuesto **59** presentó en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 50) señales características, en 5.38 ppm una señal simple ancha correspondiente para el protón vinílico H-7, en 5.31 ppm una señal simple ancha correspondiente al N-H, en 3.78 ppm una señal múltiple correspondiente a H-21, en 1.90, 1.41 y 1.13 ppm se encuentran señales múltiples traslapadas correspondientes para los protones H-22, H-24, H-23 respectivamente.

Por su parte el derivado **60** en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 55) mostró en 7.79 ppm una señal doble con una constante de acoplamiento de 7.9 Hz correspondiente a H-26, en 7.19 ppm una señal múltiple donde se traslapan las señales de H-23 y H-25, en 7.07 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 7.4 Hz correspondientes a H-24, en 6.92 ppm una señal simple ancha correspondiente a N-H, en 5.38 ppm una señal simple ancha correspondiente para el protón vinílico H-7, en 2.26 ppm una señal simple correspondiente para los protones de H-27.

Para el derivado **61** se aprecia en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 61) en 6.98 ppm una señal múltiple correspondiente a H-22, en 6.88 ppm una múltiple correspondiente a H-23, en 5.38 ppm una señal simple ancha correspondiente al protón vinílico H-7, en 3.79 ppm una señal simple correspondiente a los protones H-25 del metoxilo.

En cuanto al derivado **62** se pudo observar en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 67) en 8.28 ppm una señal múltiple correspondiente a H-23, en 7.26 ppm una señal múltiple debida a H-22, en 5.40 ppm una señal simple ancha correspondiente al protón vinílico H-7.

Para **63** su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 72) mostró en 7.66 ppm una señal ancha correspondiente a N-H, en 7.53 ppm una señal doble con una constante de acoplamiento de 8.9 Hz correspondiente a H-22, en 7.31 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 8.2 y 7.6 Hz correspondientes a H-23, en 7.08 ppm una señal triple con una constante de acoplamiento de 7.3 Hz.

En el espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 78) de **64** se observó en 5.49 ppm una señal doble correspondiente para N-H, en 3.77 ppm una señal múltiple correspondiente

para H-21, en 1.87, 1.62 y 1.38 ppm se encuentran señales múltiples traslapadas correspondientes para los H-22, H-24, H-23 respectivamente.

En cuanto a el derivado **65** se presentó en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 84) una señal doble con una constante de acoplamiento de 7.9 Hz en 7.75 ppm correspondiente a H-26, en 7.19 ppm una señal múltiple donde se traslapan las señales de H-23, H-25 y N-H, en 7.07 ppm una señal doble de dobles con constante de acoplamiento de 7.3 Hz correspondientes a H-24, en 2.26 ppm una señal simple correspondiente para los protones H-27 del metilo.

Para el derivado **66** se observó en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 90) en 6.98 ppm una señal múltiple correspondiente a H-22, en 6.88 ppm una múltiple correspondiente a H-23, en 3.79 ppm una señal simple correspondiente a los protones H-25 del metoxilo.

Finalmente el derivado **67** se pudo observar en su espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (Figura 96) en 8.27 ppm una señal múltiple correspondiente a H-23, en 7.27 ppm una señal múltiple originada por H-22, en 2.65 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 15.0 y 6.2 Hz que corresponden para H-14 y en 2.40 ppm una doble de dobles con constantes de acoplamiento de 15.0 y 8.0 Hz que corresponden para H-14'.

7.8 Evaluación *in vitro* de la estabilidad de los microtúbulos en presencia de derivados de labdano

El grupo de compuestos que se probaron frente a la tubulina fueron los tres ácidos diterpénicos de origen natural **30**, **31** y **32** además de sus derivados: **58**, **60**, **63** y **66**, en todos se utilizó como control negativo DMSO y como control positivo paclitaxel (**25**) a una concentración de 20 μM .

El ácido **30** de origen natural mostró tener un efecto sobre la tubulina al producir una polimerización mucho mayor que los ácidos **31** y **32**, la polimerización máxima se alcanzó al minuto 60 con una Δ de absorbancia igual a 0.700, como se puede apreciar en la Figura 35. Durante el periodo de enfriamiento a 4 °C ocurrió la despolimerización de los microtúbulos, la inestabilidad de éstos se observó con una caída en la Δ de absorbancia a 0.556, seguida de una mediana polimerización de tubulina.

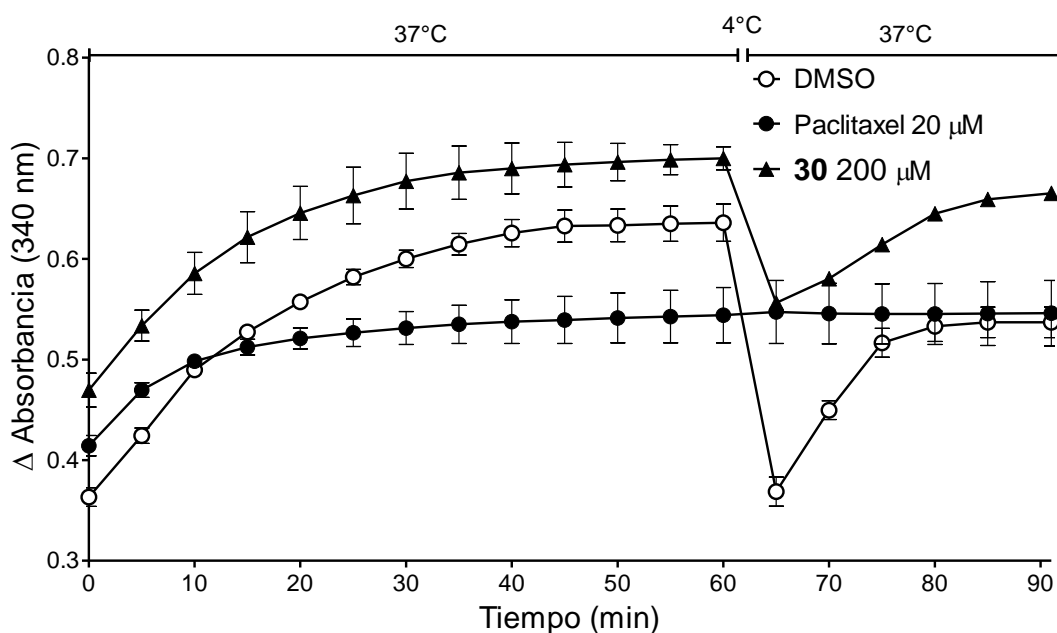


Figura 35. Efecto del ácido **30** aislado de *Ageratina jocospecana* sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

El ácido **31** de origen natural presentó el máximo de polimerización al minuto 30 con una Δ absorbancia de 0.646 (Figura 36). La despolimerización de los microtúbulos se observó con una caída en la Δ de absorbancia a 0.419, lo que indica que no tiene influencia sobre la polimerización de tubulina ni estabiliza los microtúbulos.

La diferencia estructural entre los ácidos diterpénicos **30** y **31** es únicamente la insaturación en la posición 13-14 que presenta **30**, este cambio estructural favorece la polimerización y una mejor actividad sobre la tubulina en comparación con **31**.

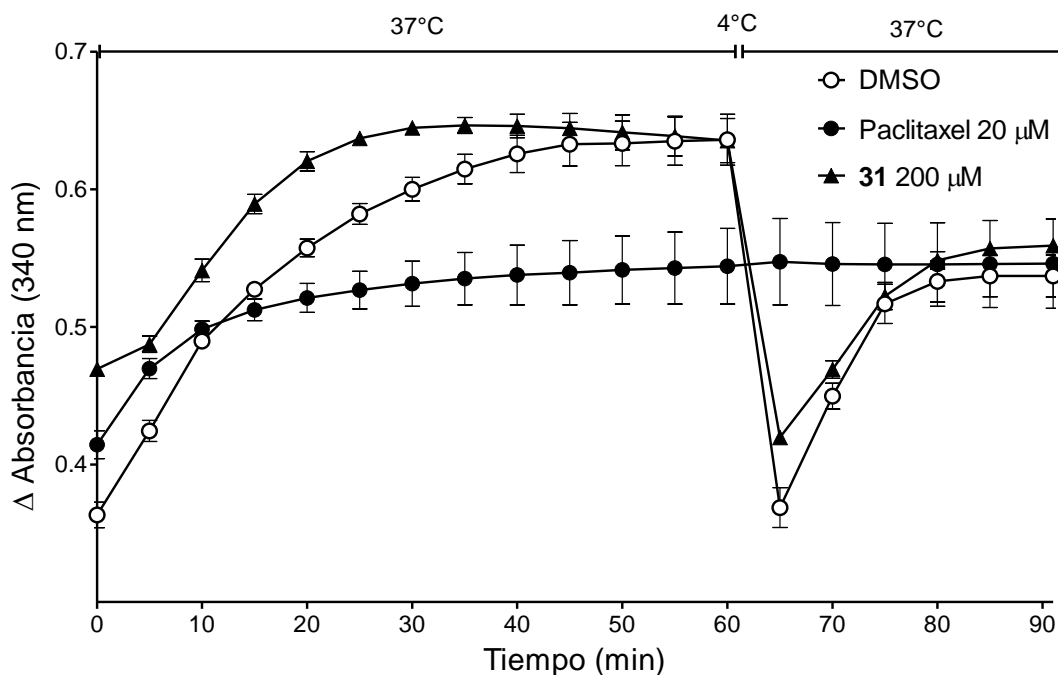


Figura 36. Efecto del ácido **31** aislado de *Ageratina jocospecana* sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

Por otra lado el ácido diterpénico **32** presentó un efecto menor sobre la polimerización de la tubulina comparada con los ácidos **30** y **31**, alcanzando el máximo de polimerización al minuto 60 con una Δ de absorbancia de 0.386 (Figura 37), la inestabilidad de los microtúbulos se pone de manifiesto al registrarse una caída en la Δ de absorbancia a 0.386 muy similar al control negativo (DMSO), la diferencia estructural que presenta este ácido comparado con **31** es un grupo OH en el carbono 8 en lugar de la insaturación C-7=C-8, así como cambios en las configuraciones absolutas de los carbonos 8, 9 y 13, estos cambios demostraron poca actividad sobre la tubulina *in vitro*.

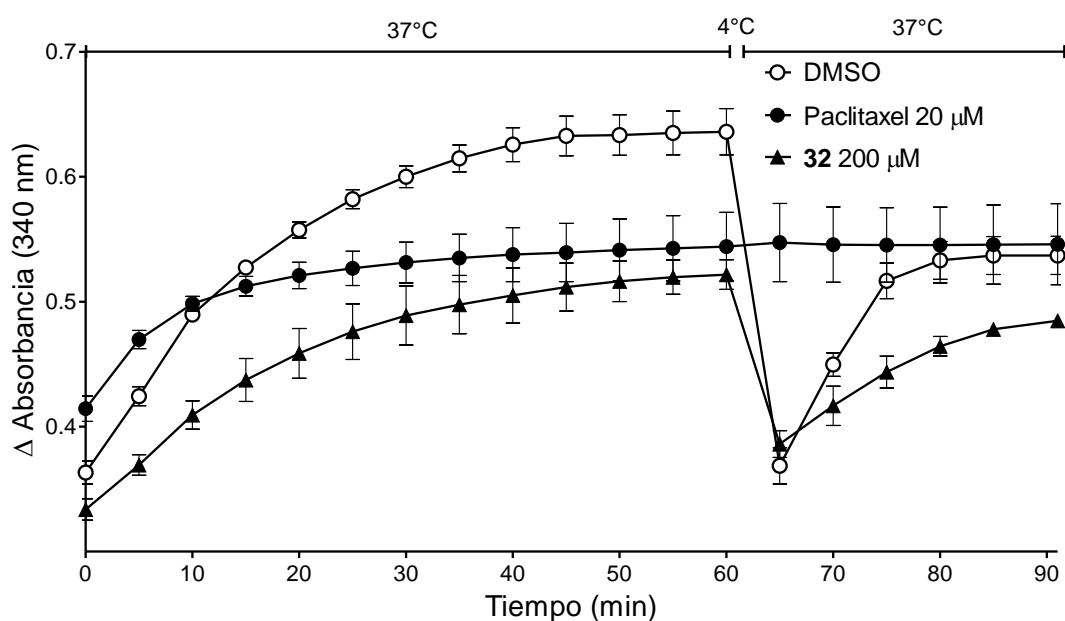


Figura 37. Efecto del ácido **32** aislado de *Ageratina jocospecana* sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

Por su parte el derivado **58** mostró tener un efecto importante en la polimerización y en la estabilización de los microtúbulos (Figura 38) en comparación con el ácido de partida **31**. Este derivado presentó el máximo de polimerización al minuto 60 con una Δ de absorbancia de 0.874, al disminuir la temperatura se registró una caída en la Δ de absorbancia a 0.750 siendo diferente a la del control negativo (DMSO), esto indicó que la presencia de un anillo aromático esterificado en C-20, favorece la polimerización de la tubulina además de estabilizar los microtúbulos de mejor manera comparada con **31**.

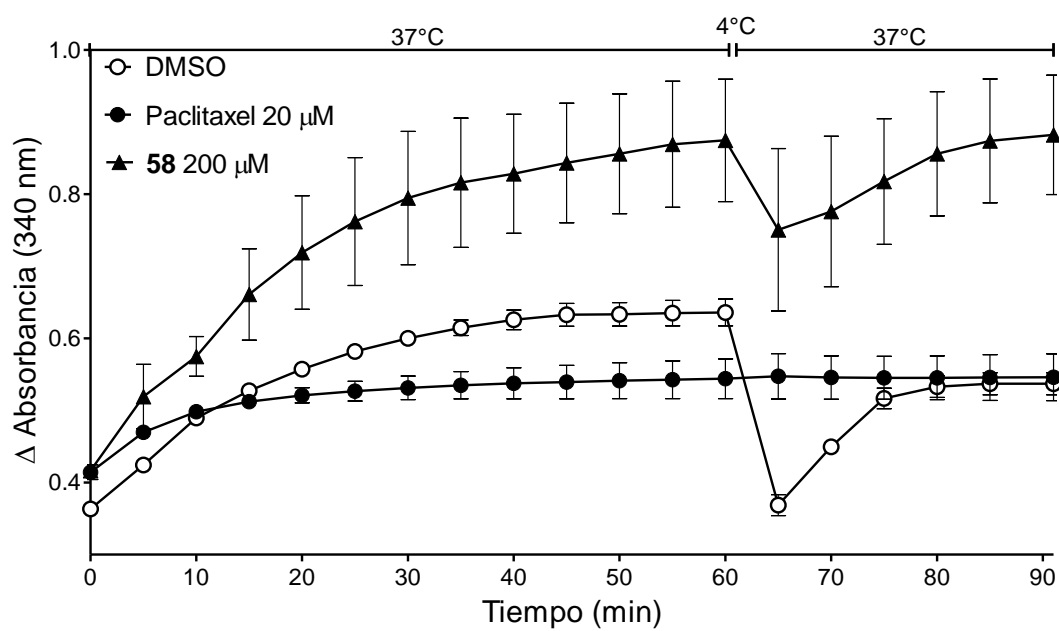


Figura 38. Efecto del derivado **58** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

El derivado **60** por su parte demostró mejor efecto en la polimerización de la tubulina presentando el máximo de polimerización a los 60 min con una Δ de absorbancia de 0.915 (Figura 39), además al disminuir la temperatura la despolimerización se comportó de manera similar a la de **58** obteniendo una Δ de absorbancia de 0.775, la diferencia estructural entre **60** y **58** es un metilo en el anillo aromático, este cambio se vio reflejado en el aumento de la polimerización de la tubulina por efecto de **60**.

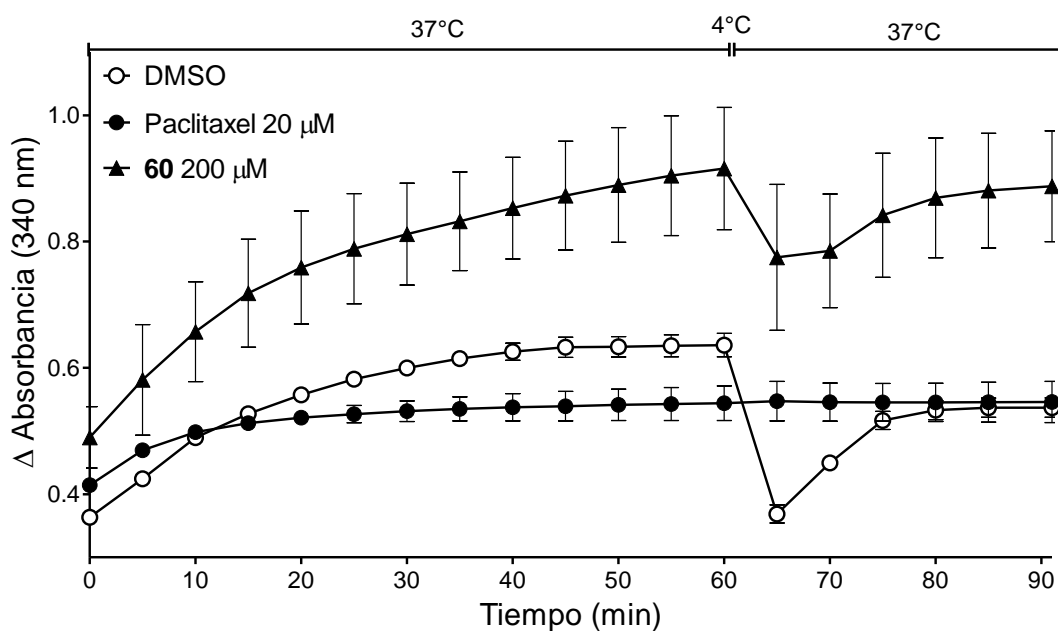


Figura 39. Efecto del derivado **60** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

Por su parte el derivado **63** mostró tener un efecto importante en la polimerización y en la estabilización de los microtúbulos (Figura 40) en comparación del ácido **32** de partida, este derivado presentó el máximo de polimerización al minuto 55 con una Δ de absorbancia de 1.084. Al disminuir la temperatura se registró una caída en la Δ de absorbancia a 0.919 siendo mucho mejor que el ácido de partida **32**, esto nos reiteró que la presencia del anillo aromático es importante ya que favorece y en cierto caso acelera la polimerización de la tubulina además de que estabiliza los microtúbulos de mejor manera en comparación con los ácidos diterpénicos de origen natural.

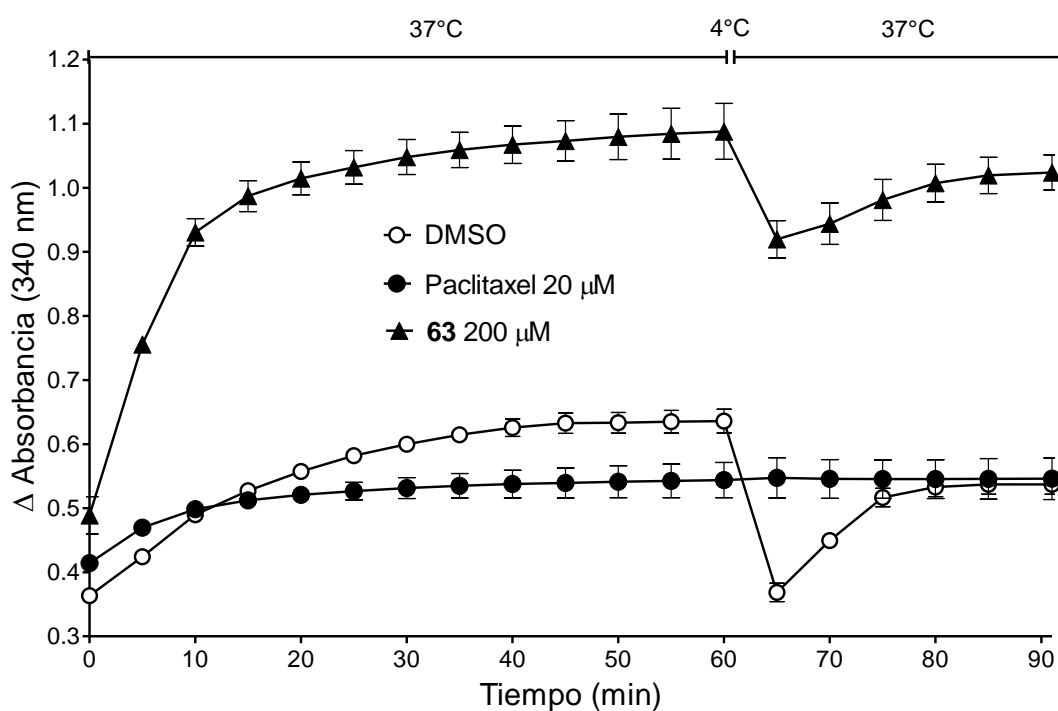


Figura 40. Efecto del derivado **63** sobre la polimerización de la tubulina y sobre la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

Finalmente el derivado **66** presentó mejor actividad, obteniendo el máximo de polimerización al minuto 60 con una Δ de absorbancia de 1.174 (Figura 41). Al disminuir la temperatura se registró una caída en la Δ de absorbancia a 1.080 siendo mejor que el derivado **63**, la diferencia estructural es la presencia de un grupo metoxilo en C-24, los resultados revelaron que la presencia de este grupo funcional favoreció significativamente la polimerización de la tubulina además de la actividad estabilizante sobre los microtúbulos en comparación con **32** que fue obtenido de manera natural.

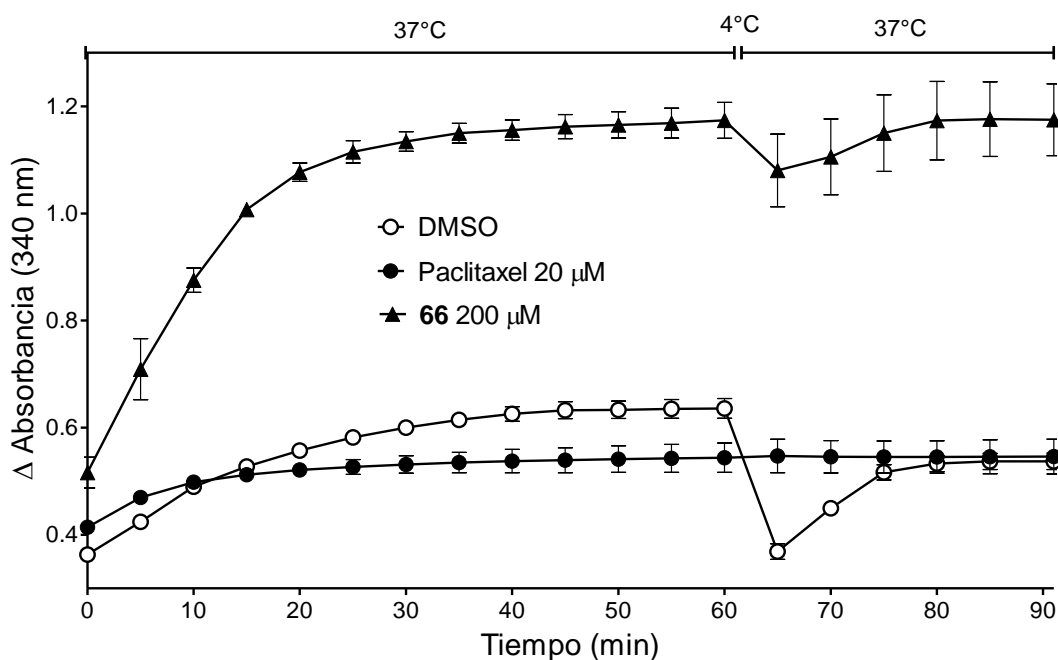
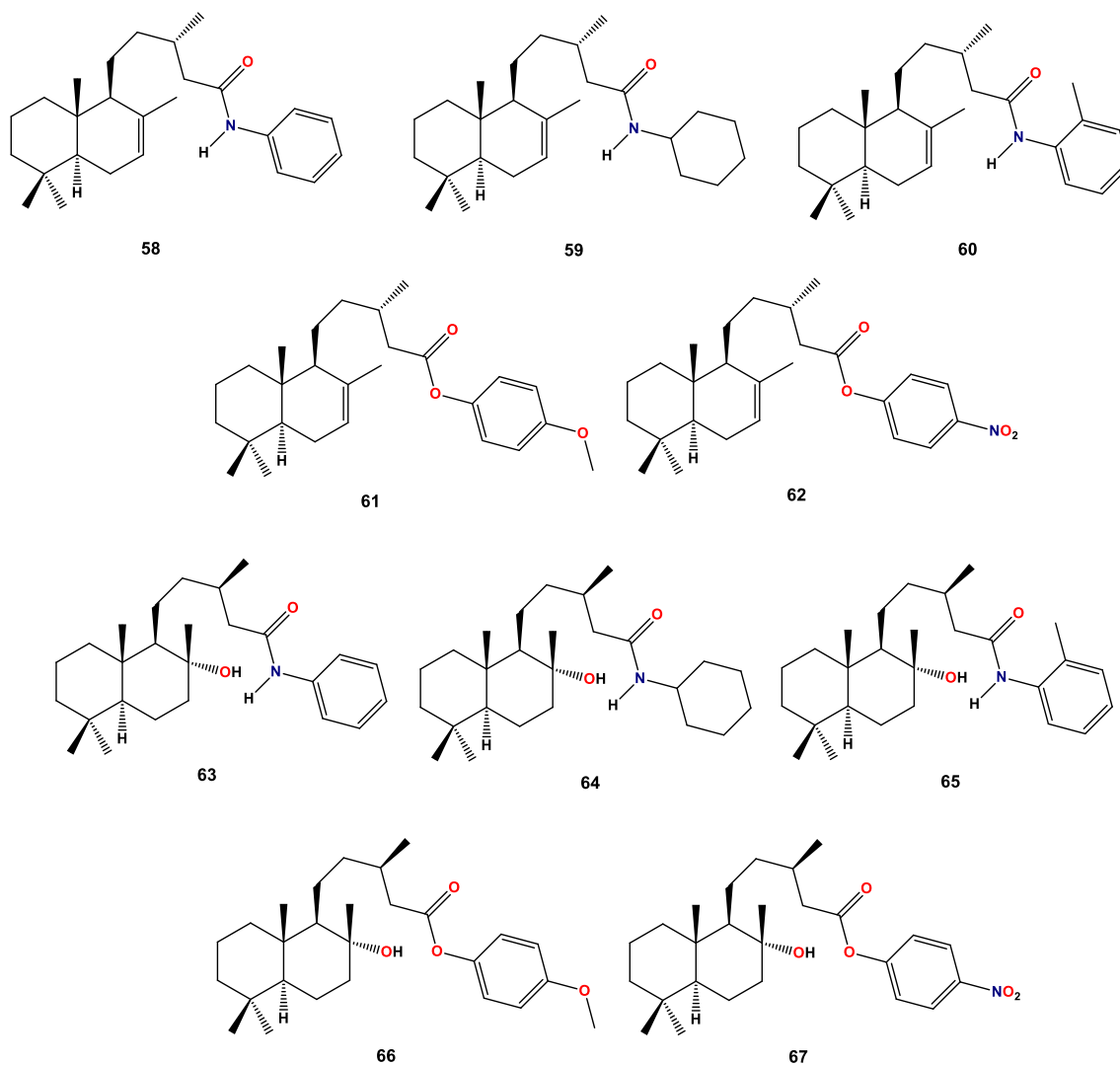


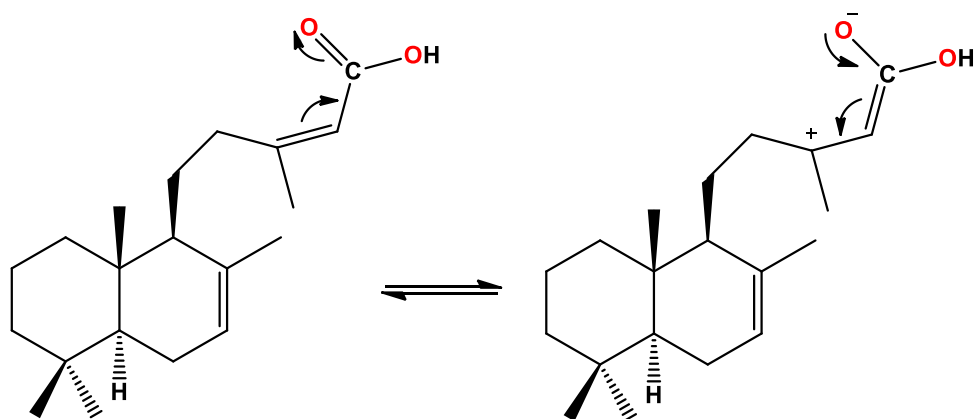
Figura 41. Efecto del derivado **66** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

8. Conclusiones

De las técnicas utilizadas para activar el grupo carboxilo, concluimos que la utilización de CDI (**34**) fue la más eficiente ya que ésta no requiere tiempos de reacción largos, temperaturas altas o incluso condiciones anhidras, llegando a la obtención de los derivados **58-67**, los cuales se prepararon a partir de los ácidos **31** y **32**.



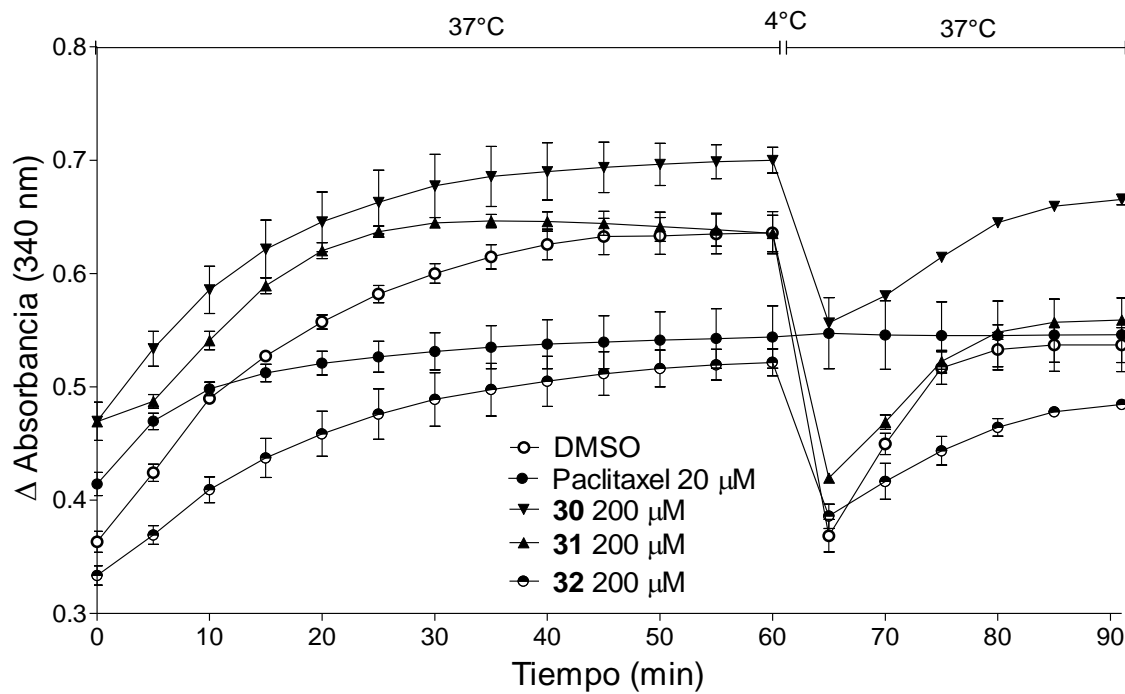
Cabe mencionar que el ácido **30** presentó una nula reactividad frente a este reactivo esto debido a que en su estructura presenta una insaturación α al carbonilo lo que hace que disminuya la disponibilidad del grupo carboxilo por un efecto resonante que se puede presentar entre la insaturación C-13=C-14 y el grupo carbonilo presente en su estructura.



30

La implementación de nuevas estrategias y agentes acoplantes nos permitió ver el comportamiento del grupo carboxilo frente a diferentes condiciones de reacción, por ejemplo el derivado **58** que se obtuvo empleando CDI (**34**), COMU (**42**), PyBOP (**43**) y la vía de anhídridos mixtos donde se utiliza el *i*BCF (**37**), los rendimientos bajos en cada reacción se puede deber a que los intermediarios obtenidos durante el transcurso de las reacciones no sean lo suficientemente estables regresándose o hidrolizándose al ácido de partida, ya que éste se recupera en la mayoría de las reacciones.

Las pruebas que se realizaron frente a la tubulina nos permitieron apreciar el efecto de polimerización de los tres ácidos diterpénicos **30**, **31** y **32** en comparación con el mejor agente anticanceroso obtenido de origen natural el paclitaxel (**25**). También se observó que la presencia de una insaturación en las posiciones C-13=C-14 del ácido **30** fue suficiente para presentar una mejor actividad que la del ácido **31**.



Los derivados **58**, **60**, **63** y **66** que contenían un grupo aromático en su estructura mostraron un mejor comportamiento y una mejor actividad sobre la polimerización de la tubulina comparados con los ácidos de origen natural.

9. Parte experimental

9.1 Procedimientos generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher Johns y no están corregidos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear a 400 MHz para ^1H y ^{13}C a 100 MHz y los experimentos COSY, HETCOR y NOESY se determinaron en un equipo Varian Mercury Plus 400 del IIQB-UMSNH. Los experimentos HMBC y HSQC se determinaron en un equipo Varian Mercury 300 en el CINVESTAV- IPN. En todos los casos se empleó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los espectros de masas (EIMS), se determinaron en un Varian Saturn 2000 de trampa iónica por impacto electrónico a 70 eV acoplado a cromatografía de gases.

Las separaciones cromatográficas se realizaron empleando gel de sílice MERCK 60 (230-400 mesh).

Las reacciones con CDI se llevaron a cabo en un baño ultrasónico con calentamiento Cole-Parmer CPXH 08895-27.

El espectrofotómetro utilizado para la determinación de la polimerización de la tubulina fue un BioTeK ELx808 y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism 7.0 para Windows.

9.2 Obtención del extracto hexánico

Se llevó a cabo la maceración en hexano de 580 g de flores, esto durante 7 días por 3 veces o hasta agotar por completo los componentes. Transcurrido este tiempo se filtró y concentró a sequedad en rotavapor. El extracto obtenido se suspendió en metanol durante 3 días a 3-8 °C con la finalidad de precipitar las grasas presentes en el extracto. El extracto se almacenó en un vial color ámbar cubriéndose de la luz y a temperatura ambiente hasta su utilización.

El extracto hexánico crudo se analizó mediante RMN de ^1H , para observar la naturaleza de las señales debidas a los componentes presentes en la muestra, en dicho espectro se podían apreciar señales muy características de los compuestos diterpénicos (Figura 42).

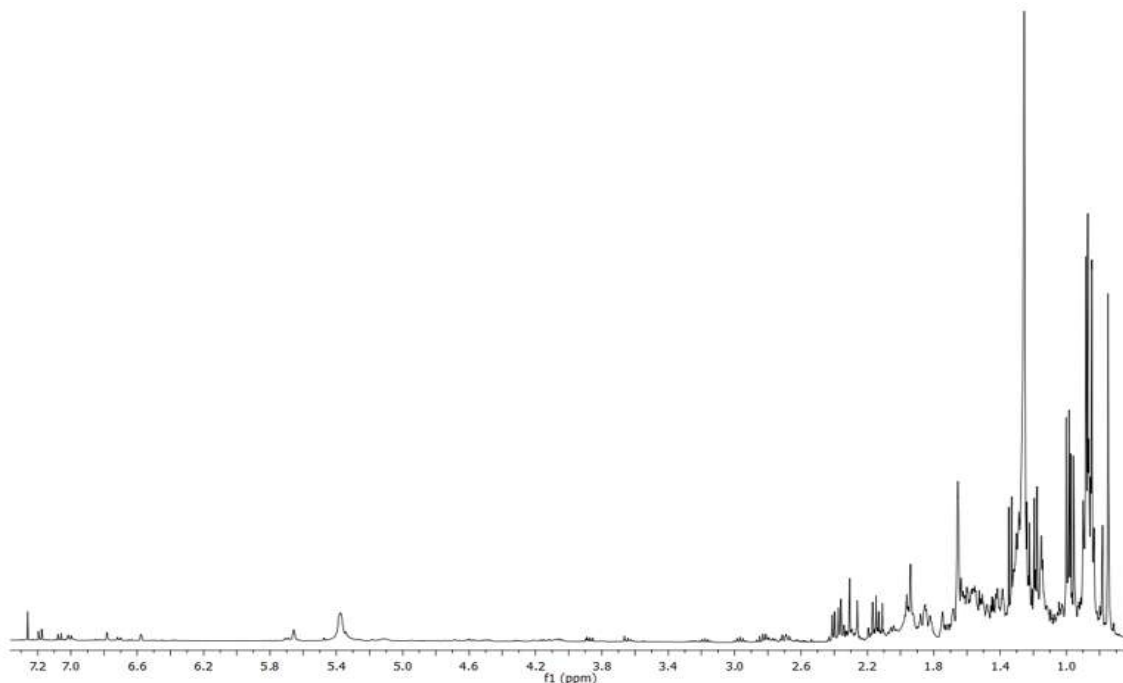


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de extracto hexánico crudo.

El extracto se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de disolventes Hex-AcOEt en orden ascendente de polaridad, las fracciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina (Figura 43).



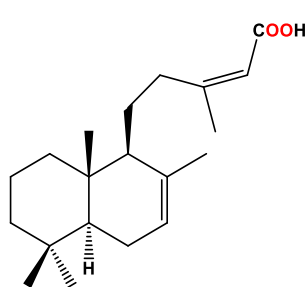
A



B

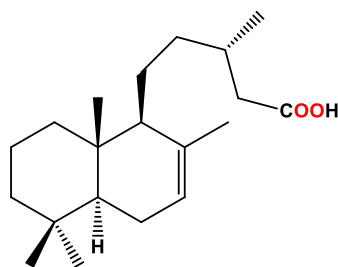
Figura 43. A) Columna cromatográfica y B) Fracciones eluidas.

9.3 Obtención del ácido labdadienoico



Ácido (-)-(5S,9S,10S,13Z)-labda-7,13-dien-15-oico (30). En las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (9:1) se observó la presencia de un sólido blanco con p.f. 112-114 °C. RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.66 (1H, sa, H-14), 5.39 (1H, sa, H-7), 2.70 (2H, m, H-12), 1.94 (3H, s, H-16), 1.93 (1H, m, H-6a), 1.91 (1H, m, H-1a), 1.84 (1H, m, H-6b), 1.74 (3H, s, H-17), 1.65 (1H, m, H-9), 1.58 (1H, m, H-11a), 1.47 (2H, m, H-2), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.32 (1H, m, H-11b), 1.18 (1H, m, H-5), 1.16 (1H, m, H-3b), 1.00 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.74 (3H, s, H-20). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.2 (C-15), 164.0 (C-13), 135.2 (C-8), 122.3 (C-7), 115.2 (C-14), 55.2 (C-9), 50.1 (C-5), 42.3 (C-3), 39.0 (C-1), 37.0 (C-10), 36.2 (C-12), 33.2 (C-18), 33.0 (C-4), 25.8 (C-11), 25.7 (C-16), 23.8 (C-6), 22.0 (C-17), 21.9 (C-19), 18.8 (C-2), 13.4 (C-20).

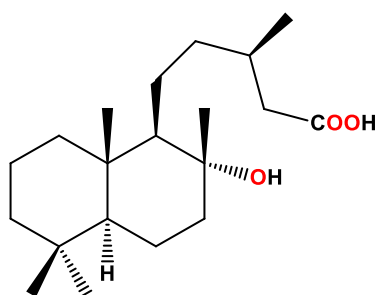
9.4 Obtención del ácido catívico



Ácido (-)-(5S,9S,10S,13S)-labda-7-en-15-oico (31). Se aisló en las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (85:15), como un sólido blanco con p.f. 47-49 °C. $[\alpha]_{589} -5$, $[\alpha]_{578} -5$, $[\alpha]_{546} -6$, $[\alpha]_{436} -14$, $[\alpha]_{365} -28$ (c 1.1, CHCl_3). IR ν_{max} 2927, 1707, 1648, 1459, 1387 cm^{-1} . RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.38 (1H, sa, H-7), 2.39 (1H, dd, $J = 14.9, 5.8$ Hz, H-14a), 2.14 (1H, dd, $J = 14.9, 8.3$ Hz, H-14b), 1.94 (1H, m, H-13), 1.93 (1H, m, H-6a), 1.89 (1H, m, H-6b), 1.83 (1H, m, H-1a), 1.65 (3H, sa, H-17), 1.57 (1H, m, H-9), 1.56 (1H, m, H-12a), 1.52 (1H, m, H-2a), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.46 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.18 (1H, m, H-12b), 1.17 (1H, m, H-5), 1.16 (1H, m, H-3b), 1.13 (1H, m, H-11b), 0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.94 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, s, H-20). RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 179.7 (C-15), 135.3 (C-8), 122.1 (C-7), 55.2 (C-9), 50.1 (C-5), 42.3 (C-3), 41.3 (C-14), 39.3 (C-12), 39.1 (C-1), 36.8 (C-10), 33.2 (C-

18), 32.9 (C-4), 31.1 (C-13), 24.5 (C-11), 23.8 (C-6), 22.1 (C-17), 21.8 (C-19), 19.9 (C-16), 18.8 (C-2), 13.5 (C-20).

9.5 Obtención del ácido 13-*epi*-labdanólico



Ácido (+)-(5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*)-8-hidroxilabdan-15-oico (32): Se aisló de las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (1:1), como cristales ligeramente verdes con p.f. 66-68 °C. $[\alpha]_{589} +5$, $[\alpha]_{578} +5$, $[\alpha]_{546} +6$, $[\alpha]_{436} +10$, $[\alpha]_{365} +14$ (*c* 0.9, CHCl₃). IR ν_{\max} 3591, 3505, 2931, 1706, 1459, 1389, 1083 cm⁻¹. RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.39 (1H, dd, *J* = 14.7, 6.4 Hz, H-14a), 2.13 (1H, dd, *J* = 14.7, 7.6 Hz, H-14b), 1.97 (1H, m, H-13), 1.85 (1H, dt, *J* = 12.2, 2.9 Hz, H-7a), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.60 (1H, m, H-1a), 1.58 (1H, m, H-2a), 1.42 (2H, m, H-2b y H-11a), 1.40 (2H, m, H-12a y H-12b), 1.35 (2H, m, H-3a y H-7b), 1.25 (1H, m, H-6b), 1.24 (1H, m, H-11b), 1.15 (3H, s, H-17), 1.13 (1H, m, H-3b), 1.03 (1H, m, H-9), 0.98 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-16), 0.93 (1H, m, H-1b), 0.91 (1H, m, H-5), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (6H, s, H-19 & H-20). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 178.4 (C-15), 74.6 (C-8), 61.7 (C-9), 56.0 (C-5), 44.2 (C-7), 41.9 (C-3), 40.9 (C-14), 39.8 (C-12), 39.6 (C-1), 39.1 (C-10), 33.3 (C-18), 33.2 (C-4), 30.7 (C-13), 23.8 (C-17), 21.9 (C-11), 21.4 (C-19), 20.4 (C-6), 19.9 (C-16), 18.4 (C-2), 15.4 (C-20).

9.6 Metodología general de reacción con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI)

Se colocó el ácido diterpénico en un matraz Erlenmeyer de 5 mL, se adicionó CDI y THF, la reacción se llevó a cabo en baño ultrasónico durante 30 min, pasado este tiempo se le adicionó la amina o el alcohol, la reacción nuevamente se dejó en baño ultrasónico durante 1 h, transcurrido el tiempo se adicionó HCl 10%, la reacción se extrajo utilizando AcOEt, realizando lavados con H₂O dest., la fase orgánica se filtró sobre Na₂SO₄ anhidro, el disolvente se evaporó y se monitoreó mediante cromatografía en capa fina. La muestra se impregnó en silica gel y se purificó mediante cromatografía en

columna utilizando una mezcla de disolventes Hex-AcOEt, Hex-CHCl₃ o Hex-CH₂Cl₂ en orden ascendente de polaridad.

9.7 Metodología general de reacción con cloroformiato de isobutilo (iBCF)

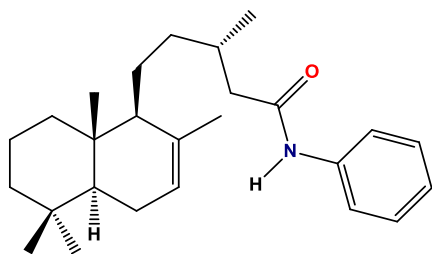
En un matraz balón se colocó la amina junto con la base, se adicionó THF y se dejó reaccionar en agitación, atmósfera inerte y baño de hielo durante 1 h, Por otro lado, en un matraz de tres bocas se colocó el ácido diterpénico, disuelto en THF y la base durante 10 minutos. A este matraz se acoplaron dos embudos de adición, posteriormente se agregó el iBCF gota a gota, finalmente la amina con una adición lenta, todo esto en baño de hielo. Una vez que la adición de la amina terminó, se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se extrajo utilizando AcOEt realizando lavados con HCl al 10%, solución saturada de NaHCO₃ y H₂O dest., la fase orgánica se filtró sobre Na₂SO₄ anhidro y se monitoreó mediante cromatografía en capa fina, para posteriormente purificarse mediante cromatografía en columna.

9.8 Metodología general de reacción con COMU y con PyBOB

La reacción se llevó a cabo en un matraz balón de 25 mL colocando el ácido diterpénico y el agente acoplante (COMU o PyBOP). Se adicionó THF anhidro y se dejó en agitación durante 1 h, pasado este tiempo se adicionó la base (DIPEA) dejándose reaccionar por 5 min para finalmente adicionar la amina. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 h, en el caso de COMU la reacción se tornó de una coloración amarilla al transcurrir el tiempo, la reacción se extrajo utilizando AcOEt y realizando lavados con HCl al 10%, solución saturada de NaHCO₃ y H₂O dest., la fase orgánica se filtró sobre Na₂SO₄ anhidro y se monitoreó mediante cromatografía en capa fina, posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna.

9.9 Obtención y asignación de los derivados

9.9.1 Derivado 58

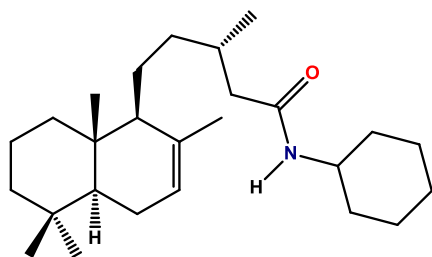


De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (9:1), el compuesto se aisló en forma oleosa de color verde. $[\alpha]_{589} -0.4$, $[\alpha]_{578} -0.9$, $[\alpha]_{546} -1.2$, $[\alpha]_{436} -2.9$ (c 1.0, CHCl_3). IR (CHCl_3) ν_{max} 3422, 2919, 1679, 1597, 1519, 1438 cm^{-1} . RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ

7.51 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-22 y H-22'), 7.31 (2H, dd, $J = 8.2, 7.6$ Hz, H-23 y H-23'), 7.20 (1H, sa, NH) 7.11 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 5.37 (1H, sa, H-7), 2.41 (1H, m, H-14a), 2.08 (1H, m, H-14b), 2.06 (1H, m, H-13), 1.90 (2H, m, H-6), 1.84 (2H, m, H-1a), 1.65 (3H, sa, H-17), 1.57 (1H, m, H-9), 1.57 (1H, m, H-12a), 1.53 (1H, m, H-2a), 1.51 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.19 (1H, m, H-12b), 1.16 (1H, m, H-5), 1.14 (1H, m, H-3b), 1.16 (1H, m, H-11b), 1.02 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 0.94 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.84 (3H, s, H-18), 0.75 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 170.8 (C-15), 137.9 (C-21), 135.2 (C-8), 129.0 (C-23), 124.2 (C-24), 122.2 (C-7), 119.8 (C-22), 55.3 (C-9), 50.1 (C-5), 45.3 (C-14), 42.3 (C-3), 39.6 (C-12), 39.2 (C-1), 36.9 (C-10), 33.1 (C-18), 32.9 (C-4), 31.8 (C-13), 24.5 (C-11), 23.8 (C-6), 22.2 (C-17), 21.8 (C-19), 19.9 (C-16), 18.8 (C-2), 13.6 (C-20). EIMS m/z 382 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (2), 366 (36), 191 (100), 135 (51), 121 (27), 109 (40), 93 (95), 77 (23), 41 (22).

9.9.2 Derivado 59



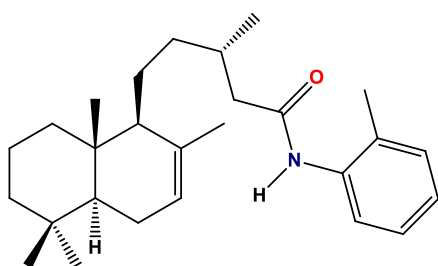
De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (9:1), se aisló en forma oleosa e incolora. RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.37 (1H, m, H-7), 5.32 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, NH), 3.76 (1H, m, H-21), 2.18 (1H, dd, $J = 5.5, 5.4$ Hz, H-14a), 1.93 (2H, m, H-6), 1.93 (1H, m, H-13), 1.89 (2H, m, H-22a), 1.84 (1H, m, H-14b),

1.82 (1H, m, H-1a), 1.81 (1H, m, H-12a), 1.68 (2H, m, H-23a), 1.63 (3H, s, H-17), 1.60

(1H, m, H-24a), 1.54 (1H, m, H-9), 1.36 (1H, m, H-3a), 1.35 (1H, m, H-11a), 1.35 (2H, m, H-23b), 1.27 (1H, m, H-2a), 1.18 (1H, m, H-11b), 1.17 (1H, m, H-3b), 1.15 (1H, m, H-24b), 1.14 (1H, m, H-5), 1.11 (1H, m, H-12b), 1.10 (2H, m, H-22b), 0.95 (1H, m, H-1b), 0.94 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.85 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-19), 0.76 (1H, m, H-2b), 0.72 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.5 (C-15), 135.3 (C-8), 122.1 (C-7), 55.3 (C-9), 50.1 (C-5), 48.0 (C-21), 44.6 (C-14), 42.3 (C-3), 39.6 (C-12), 39.2 (C-1), 36.8 (C-10), 33.3 (C-22), 33.2 (C-18), 32.9 (C-4), 31.7 (C-13), 25.5 (C-24), 24.8 (C-11), 24.4 (C-23), 23.8 (C-6), 22.1 (C-17), 21.8 (C-19), 19.7 (C-16), 18.8 (C-2), 13.5 (C-20).

9.9.3 Derivado 60

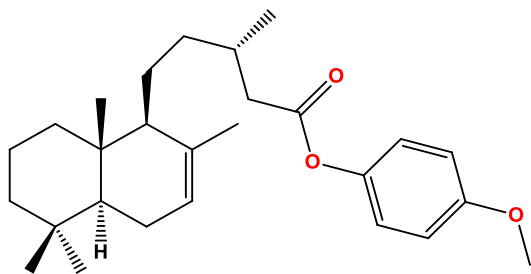


De las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (9:1), se aisló en forma oleosa de color verde. $[\alpha]_{589} -0.2$, $[\alpha]_{578} -0.2$, $[\alpha]_{546} -0.3$, $[\alpha]_{436} -1$, (c 1.0, CHCl_3). IR (CDCl_3) ν_{max} 3422, 2919, 1678, 1586, 1452 cm^{-1} . RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78 (1H, d, $J = 7.9$

Hz, H-26), 7.20 (1H, m, H-25), 7.17 (1H, m, H-23), 7.08 (1H, dd, $J = 7.4$ Hz, H-24), 6.92 (1H, sa, NH), 5.38 (1H, sa, H-7), 2.44 (1H, dd, $J = 13.1, 4.7$ Hz, H-14a), 2.26 (3H, s, H-27), 2.12 (1H, m, H-14b), 2.08 (1H, m, H-13), 1.92 (1H, m, H-6a), 1.85 (1H, m, H-1a), 1.84 (1H, m, H-6b), 1.66 (3H, s, H-17), 1.59 (1H, m, H-12a), 1.57 (1H, m, H-9), 1.52 (1H, m, H-11a), 1.51 (1H, m, H-2a), 1.45 (1H, m, H-2b), 1.39 (1H, m, H-3a), 1.20 (1H, m, H-12b), 1.17 (1H, m, H-11b), 1.16 (1H, m, H-5), 1.15 (1H, m, H-3b), 1.04 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 0.94 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.76 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 170.7 (C-15), 135.7 (C-21), 135.3 (C-8), 130.4 (C-25), 128.9 (C-22), 126.8 (C-23), 125.2 (C-24), 123.3 (C-26), 122.2 (C-7), 55.3 (C-9), 50.2 (C-5), 45.2 (C-14), 42.3 (C-3), 39.6 (C-12), 39.1 (C-1), 36.9 (C-10), 33.2 (C-18), 33.0 (C-4), 31.8 (C-13), 24.5 (C-11), 23.8 (C-6), 22.2 (C-17), 21.8 (C-19), 19.9 (C-16), 18.8 (C-2), 17.8 (C-27), 13.6 (C-20). EIMS m/z 396 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (2), 380 (42), 272 (11), 204 (23), 191 (84), 149 (63), 107 (100), 91 (27), 77 (23), 55 (14), 41 (20).

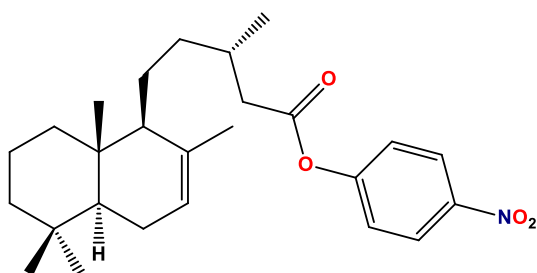
9.9.4 Derivado 61



De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (9:1), se aisló con consistencia oleosa incolora. $[\alpha]_{589} -6.7$, $[\alpha]_{578} -7.2$, $[\alpha]_{546} -8.4$, $[\alpha]_{436} -16.7$, $[\alpha]_{365} -30.7$ (c 1.0, CHCl_3). IR (CDCl_3) ν_{max} 2924, 1746, 1506, 1465, 1248, 1141 cm^{-1} . RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 6.98 (2H, m, H-22 y H-22'), 6.88 (2H, m, H-23 y H-23'), 5.38 (1H, sa, H-7), 3.78 (3H, s, H-25), 2.55 (1H, dd, $J = 14.8, 6.1$ Hz, H-14a), 2.34 (1H, dd, $J = 14.8, 8.1$ Hz, H-14b), 2.08 (1H, m, H-13), 1.92 (1H, m, H-6a), 1.87 (1H, m, H-6b), 1.85 (1H, m, H-1a), 1.67 (3H, s, H-17), 1.62 (1H, m, H-12a), 1.59 (1H, m, H-9), 1.53 (1H, m, H-11a), 1.52 (1H, m, H-2a), 1.44 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.23 (1H, m, H-12b), 1.17 (1H, m, H-11b), 1.17 (1H, m, H-5), 1.15 (1H, m, H-3b), 1.06 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 0.96 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.77 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.1 (C-15), 157.1 (C-24), 144.2 (C-21), 135.2 (C-8), 122.3 (C-22), 122.2 (C-7), 114.4 (C-23), 55.6 (C-25), 55.3 (C-9), 50.1 (C-5), 42.3 (C-3), 41.5 (C-14), 39.4 (C-12), 39.2 (C-1), 36.9 (C-10), 33.2 (C-18), 32.9 (C-4), 31.4 (C-13), 24.5 (C-11), 23.8 (C-6), 22.2 (C-17), 21.8 (C-19), 19.9 (C-16), 18.8 (C-2), 13.6 (C-20). EIMS m/z 398 $[\text{M-Me}]^+$ (2), 191 (4), 125 (9), 124 (100), 109 (15), 95 (5), 81 (6), 67 (5), 41 (5).

9.9.5 Derivado 62

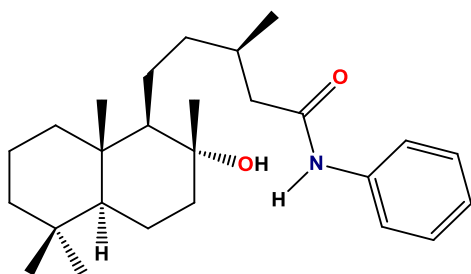


De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (9:1), se aisló con consistencia oleosa e incolora. $[\alpha]_{589} -12.6$, $[\alpha]_{578} -12.9$, $[\alpha]_{546} -15.3$, $[\alpha]_{436} -30.6$ (c 1.0, CHCl_3). IR (CDCl_3) ν_{max} 2920, 1758, 1592, 1526, 1348, 1112 cm^{-1} . RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.28 (2H, m, H-23 y H-23'), 7.26 (1H, sa, H-7), 5.40 (2H, m, H-22 y H-22'), 2.62 (1H, dd, $J = 15.1, 6.0$ Hz, H-14a), 2.39 (1H, dd, $J = 15.1, 8.1$ Hz, H-14b), 2.07 (1H, m, H-13),

1.89 (2H, m, H-6), 1.84 (1H, m, H-1a), 1.67 (3H, s, H-17), 1.60 (1H, m, H-12a), 1.59 (1H, m, H-9), 1.54 (1H, m, H-2a), 1.52 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, m, H-3a), 1.23 (1H, m, H-12b), 1.17 (1H, m, H-5), 1.17 (1H, m, H-11b), 1.14 (1H, m, H-3b), 1.07 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 0.96 (1H, m, H-1b), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-18), 0.76 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 170.7 (C-15), 155.5 (C-24), 145.2 (C-21), 135.0 (C-8), 125.2 (C-23), 122.4 (C-7), 122.4 (C-22), 55.2 (C-9), 50.1 (C-5), 42.3 (C-3), 41.4 (C-14), 39.3 (C-12), 39.1 (C-1), 36.9 (C-10), 33.1 (C-18), 32.9 (C-4), 31.3 (C-13), 24.5 (C-11), 23.8 (C-6), 22.1 (C-17), 21.8 (C-19), 19.9 (C-16), 18.8 (C-2), 13.6 (C-20). EIMS m/z 428 $[\text{M}+1]^+$ (2), 413 (12), 287 (31), 192 (29), 178 (7), 164 (30), 148 (13), 122 (27), 109 (100), 81 (29), 63 (5).

9.9.6 Derivado 63



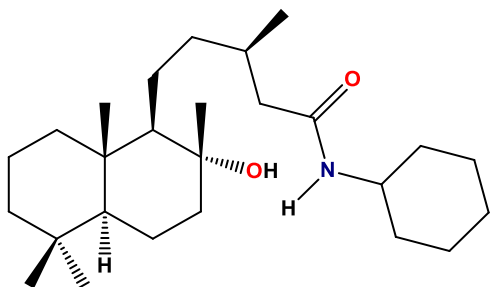
De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (9:1), se aisló en forma de sólido de color blanco con p.f. 136-138 °C. $[\alpha]_{589} -1.0$, $[\alpha]_{578} -1.3$, $[\alpha]_{546} -1.4$, $[\alpha]_{436} -2.1$ (c 1.0, CHCl_3). IR (CDCl_3) ν_{max} 3585, 3430, 2937, 1679, 1598, 1440 cm^{-1} . RMN de ^1H δ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.70 (1H, sa, NH),

7.53 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-22 y H-22'), 7.30 (2H, dd, $J = 7.7, 8.2$ Hz, H-23 y H-23'), 7.09 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 2.51 (1H, dd, $J = 13.1, 6.2$ Hz, H-14a), 2.10 (1H, m, H-13), 2.05 (1H, dd, $J = 13.1, 7.7$ Hz, H-14b), 1.87 (1H, dt, $J = 12.3, 3.2$ Hz, H-7a), 1.65 (1H, m, H-6a), 1.61 (1H, m, H-1a), 1.57 (1H, m, H-2a), 1.51 (1H, m, H-11a), 1.45 (2H, m, H-12), 1.44 (1H, m, H-2b), 1.43 (1H, m, H-7b), 1.36 (1H, m, H-3a), 1.28 (1H, m, H-11b), 1.28 (1H, m, H-6b), 1.18 (3H, s, H-17), 1.15 (1H, m, H-3b), 1.10 (1H, m, H-9), 1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.93 (1H, m, H-1b), 0.92 (1H, m, H-5), 0.87 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, s, H-20). 0.79 (3H, s, H-19).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.7 (C-15), 138.2 (C-21), 129.0 (C-23), 123.9 (C-24), 119.7 (C-22), 74.8 (C-8), 61.2 (C-9), 56.0 (C-5), 44.6 (C-7), 44.4 (C-14), 41.9 (C-3), 39.9 (C-1), 39.2 (C-12), 39.1 (C-10), 33.4 (C-18), 33.2 (C-4), 31.3 (C-13), 24.4 (C-

17), 21.5 (C-19), 21.1 (C-11), 20.6 (C-6), 20.2 (C-16), 18.4 (C-2), 15.5 (C-20). EIMS m/z 382 $[M-H_2O]^+$ (2), 307 (9), 191 (31), 162 (26), 135 (32), 93 (100), 69 (14), 43 (15).

9.9.7 Derivado 64

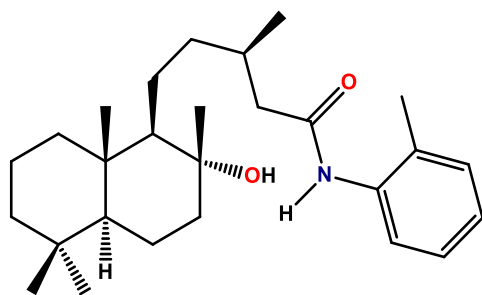


De las fracciones eluídas con Hex:AcOEt (6:4), se aisló como un sólido blanco con p.f. 165-167 °C. $[\alpha]_{589} -0.8$, $[\alpha]_{578} -0.9$, $[\alpha]_{546} -0.9$, $[\alpha]_{436} -1.7$, $[\alpha]_{365} -5.2$ (c 1, $CHCl_3$). IR ($CDCl_3$) ν_{max} 3589, 3425, 2926, 1651, 1507 1456, 1388 cm^{-1} . RMN 1H δ ($CDCl_3$, 400

MHz) δ 5.49 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, NH), 3.77 (1H, m, H-21), 2.23 (1H, dd, $J = 13.2, 6.8$ Hz, H-14a), 1.98 (1H, m, H-13), 1.90 (1H, m, H-23a), 1.87 (1H, m, H-14b), 1.84 (1H, m, H-7a), 1.68 (1H, m, H-22a), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.60 (2H, m, H-24), 1.60 (1H, m, H-1a), 1.58 (1H, m, H-2a), 1.46 (1H, m, H-11a), 1.41 (1H, m, H-2b), 1.38 (1H, m, H-7b), 1.37 (2H, m, H-12), 1.37 (1H, m, H-3a), 1.34 (1H, m, H-22b), 1.26 (1H, m, H-6b), 1.21 (1H, m, H-11b), 1.15 (3H, s, H-17), 1.14 (1H, m, H-3b), 1.09 (1H, m, H-23b), 1.05 (1H, m, H-9), 0.94 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.92 (1H, m, H-1b), 0.91 (1H, m, H-5), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, s, H-19), 0.78 (3H, m, H-20).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 172.0 (C-15), 74.3 (C-8), 61.7 (C-9), 56.1 (C-5), 48.0 (C-21), 44.4 (C-7), 44.0 (C-14), 42.0 (C-3), 39.8 (C-1), 39.6 (C-12), 39.1 (C-10), 33.4 (C-18), 33.2 (C-23), 33.2 (C-4), 31.4 (C-13), 25.5 (C-24), 24.9 (C-22), 24.1 (C-17), 21.5 (C-11), 21.4 (C-19), 20.5 (C-6), 19.9 (C-16), 18.4 (C-2), 15.5 (C-20). EIMS m/z 405 $[M]^+$ (1), 388 $[M-H_2O]^+$ (8), 373 (45), 210 (100), 196 (22)100 (22), 168 (80), 141 (80), 60 (43), 43 (28).

9.9.8 Derivado 65



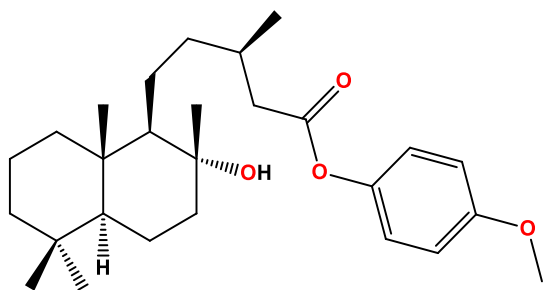
De las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (7:3), se aisló en forma oleosa e incolora.

$[\alpha]_{589} +0.2$, $[\alpha]_{578} +0.1$, $[\alpha]_{546} +0.1$, $[\alpha]_{436} +0.3$ (*c* 1.0, CHCl₃). IR (CDCl₃) ν_{\max} 3590, 3423, 2927, 1679, 1539, 1522, 1456 cm⁻¹.

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.76 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-26), 7.20 (1H, m, H-23), 7.17 (1H, m, H-25), 7.07 (1H, dd, *J* = 7.3 Hz, H-24), 2.53 (1H, m, H-14a), 2.26 (3H, s, H-27), 2.09 (1H, m, H-13), 2.06 (1H, m, H-14b), 1.85 (1H, dt, *J* = 12.2, 3.0 Hz, H-7a), 1.69 (1H, m, H-6a), 1.63 (1H, m, H-1a), 1.57 (1H, m, H-2a), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.47 (2H, m, H-12), 1.40 (1H, m, H-2b), 1.37 (1H, m, H-7b), 1.36 (1H, m, H-3a), 1.28 (1H, m, H-11b), 1.25 (1H, m, H-6b), 1.16 (3H, s, H-17), 1.12 (1H, m, H-3b), 1.07 (1H, m, H-9), 1.04 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, H-16), 0.93 (1H, m, H-1b), 0.91 (1H, m, H-5), 0.86 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-20), 0.78 (3H, s, H-19).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.1 (C-15), 135.8 (C-21), 130.4 (C-23), 129.3 (C-22), 126.7 (C-25), 125.1 (C-24), 123.5 (C-26), 74.5 (C-8), 61.4 (C-9), 56.1 (C-5), 44.5 (C-14), 44.5 (C-7), 41.9 (C-3), 39.8 (C-1), 39.7 (C-12), 39.1 (C-10), 33.4 (C-18), 33.2 (C-4), 31.5 (C-13), 24.2 (C-17), 21.7 (C-11), 21.5 (C-19), 20.6 (C-6), 20.2 (C-16), 18.4 (C-2), 17.9 (C-27), 15.5 (C-20). EIMS *m/z* 397 [M-H₂O]⁺ (3), 381 (18), 192 (46), 177 (31), 150 (50), 134 (15), 107 (100), 91 (12), 67 (15), 41 (17).

9.9.9 Derivado 66



De las fracciones eluidas con Hex:AcOEt (85:15), se aisló en forma de sólido blanco con p.f. 95-97 °C.

$[\alpha]_{589} +6.3$, $[\alpha]_{578} +5.1$, $[\alpha]_{546} +7.2$, $[\alpha]_{436} +12$, $[\alpha]_{365} +19.5$ (*c* 1.0, CHCl₃). IR (CDCl₃) ν_{\max} 3588, 2926, 1744, 1505, 1465, 1388, 1248 cm⁻¹.

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.98 (2H, m, H-22 y H-22'), 6.86 (2H, m, H-23 y H-23'), 3.78 (3H, s, H-25), 2.56 (1H, dd, *J* = 14.7, 6.2 Hz, H-14a), 2.33 (1H, dd, *J* = 14.7, 8.0

Hz, H-14b), 2.07 (1H, m, H-13), 1.86 (1H, dt, $J = 12.1, 3.0$ Hz, H-7a), 1.64 (1H, m, H-6a), 1.63 (1H, m, H-1a), 1.58 (1H, m, H-2a), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.45 (2H, m, H-12), 1.40 (1H, m, H-2b), 1.37 (1H, m, H-7b), 1.36 (1H, m, H-3a), 1.26 (1H, m, H-11b), 1.26 (1H, m, H-6b), 1.15 (3H, s, H-17), 1.13 (1H, m, H-3b), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 1.03 (1H, m, H-9), 0.94 (1H, m, H-1b), 0.93 (1H, m, H-5), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, s, H-19), 0.78 (3H, s, H-20).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 172.3 (C-15), 157.1 (C-24), 144.2 (C-21), 122.3 (C-22), 114.4 (C-23), 74.3 (C-8), 62.1 (C-9), 56.1 (C-5), 55.6 (C-25), 44.6 (C-7), 42.0 (C-3), 41.4 (C-14), 40.4 (C-12), 39.7 (C-1), 39.1 (C-10), 33.4 (C-18), 33.2 (C-4), 31.3 (C-13), 23.9 (C-17), 22.6 (C-11), 21.5 (C-19), 20.5 (C-6), 20.0 (C-16), 18.4 (C-2), 15.5 (C-20). EIMS m/z 398 $[\text{M-Me}]^+$ (1), 191 (7), 124 (100), 109 (14), 95 (7), 41 (6).

9.10 Metodología general para la tubulina

Los derivados de los ácidos diterpénicos disueltos en DMSO se colocaron por triplicado en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y de media área, en alícuotas de 10 μ L de una concentración tal que permitiese tener concentraciones finales de 200 μ M. Por otro lado, se preparó una solución de tubulina de cerebro de porcino >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E. U. A.) manteniéndola siempre a 0 °C. Para preparar la solución, la tubulina se disolvió en la cantidad necesaria de un buffer de pH 6.9 para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL. El buffer contenía sal sesquisódica del ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etansulfónico) 80.0 mM, cloruro de magnesio 2.0 mM, ácido etilén-glicol-bis(β -aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético 0.5 mM y 5'-trifosfato de guanosina 1.0 mM. La solución de tubulina a 0 °C se agregó, en alícuotas de 100 μ L, a los pozos con los compuestos. La placa de ELISA, mantenida a 0 °C, se transfirió inmediatamente a un lector de placas BioTek ELx808IU precalentado a 37 °C durante 30 minutos. La polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 60 minutos con temperatura controlada a 37 °C y con un periodo de mezclado inicial de 5 segundos. Después de 60 minutos de incubación, la placa se removió del lector e inmediatamente se llevó a una temperatura de 4 °C por 30 minutos. Después de este tiempo, la placa se colocó nuevamente en el lector por 30 minutos más a 37 °C para determinar el efecto de la disminución de la temperatura en la estabilidad de los microtúbulos inducida por los compuestos a evaluar.^{45,46} Los ensayos de polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura se realizaron por triplicado. Los resultados se graficaron con el programa GraphPad Prism 7.0 para Windows, los puntos de las gráficas muestran la desviación estándar de las lecturas para cada derivado evaluado.

10. Bibliografía

- 1) Mar Rey Bueno; Historia de las Hierbas Mágicas y Medicinales; Plantas alucinógenas, hongos psicoactivos, lianas visionarias, hierbas fúnebres todos los secretos sobre las propiedades y virtudes ocultas del ancestral mundo vegetal, Nowtilus S.L. **2008**, 15-27.
- 2) D. Marcano y M. Hasegawa; Fitoquímica Orgánica, Torino **2002**, 237-309.
- 3) W. Beyer; Manual de Química Orgánica; Versión Española de la 19 edición Alemana, Reverté, S. A. **1987**, 712-726.
- 4) L. Taiz y E. Zeiger; Fisiología Vegetal Volumen 1, Universitat Jaume I, D.L. **2006**, 536-541.
- 5) J. Brunetón; Farmacognosia; Fitoquímica Plantas Medicinales 2 Edición, Acribia, S. A. **1993**, 457-465.
- 6) J. Rzedowski, G. Calderón de Rzedowski; Flora fanerogámica del valle de México, Instituto de Ecología, A. C. **2005**, 786
- 7) B. L. Turner; A new species of *Ageratina* (Asteraceae, Eupatorieae) from Jalisco, México; *Phytologia*. **1996**, 80, 128-132.
- 8) E. García-Sánchez, C. B. Ramírez-López, R. E. del Río, M. M. Martínez-Pacheco; A revision of *Eupatorium* (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan. *Phyton*. **2011**, 80, 139-146.
- 9) N. Civjan; Natural products in chemical biology, *Wiley*. **2012**, 127-139.
- 10) J. L. Villaseñor; Los géneros de plantas vasculares de la flora de México Boletín de la Sociedad Botánica de México [en línea] **2004**, Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707506>> ISSN 0366-2128.
- 11) O. L. de Ugaz; Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios, Pontificia Universidad Católica de Perú, 41-48.
- 12) S. K. Goyal, Samsher & R. K. Goyal; Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review, *INT. J. FOOD. SCI. NUTR.* **2010**, 61 (1), 1-10.

- 13) E. García-Sánchez, C. B. Ramírez-López, A. Talavera Alemán, A. León-Hernández, R. E. Martínez-Muñoz, M. M. Martínez-Pacheco, M. A. Gómez-Hurtado, C. M. Cerda-García-Rojas, P. Joseph-Nathan, and R. E. del Río; Absolute Configuration of (13*R*)- and (13*S*)-Labdane Diterpenes Coexisting in *Ageratina jocotepecana*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1005–1012.
- 14) Biotransformación de diterpenos obtenidos de Asteraceas por hongos filamentosos nativos, **2003** en línea, Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/gifuj/BIOTRNSFORMACI%D3N%20DE%20DITERPENOS.PDF>.
- 15) H. Misra, M. Sonii, N. Silawat, D. Mehta, B. K. Mehta, D. C. Jain; Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J. Pharm. Bioall. Sci.* **2011**, *3*, 242-248.
- 16) N. H. Oberlies and D. J. Kroll; Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 129-135.
- 17) Clasificación taxonómica de *Ageratina jocotepecana* B.L. Turner; En línea, Disponible en; <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/30333?proyecto=Irekani>
- 18) E. P. Yúfera; Química Orgánica Básica y Aplicada, De la Molécula a la Industria Tomo II. *Reverte*. **1995**, 861.
- 19) P. W. Brian, G. W. Elson, H. G. Hemming and M. Radley; The plant-growth-promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*. *J. Sci. Food Agric.* **1954**, *5*, 602-612.
- 20) C. Bustos-Brito, A. Andrade-Cetto, J. D. Giraldo-Aguirre, A. D. Moreno-Vargas, L. Quijano; Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*, *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *185*, 341-346.
- 21) J. S. Calderón, L. Quijano, M. Garduño, F. Gomez and T. Rios; 2 α -Isovaleroyloxyperuic acid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*. *Phytochemistry.* **1983**, *22*, 2617-2619.
- 22) A. L. Hernández; Actividad citotóxica de *Eupatorium cardiophyllum* (B.L.Rob); Tesis de Maestría, Instituto de investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH **2010**.

- 23) E. García-Sánchez, R. E. del Río; L. U. Román, J. D. Hernández, M. A. Calderón, D. Raya, M. Martínez-Pacheco, A. Flores y M. E. Morales; XVI Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina **2007**, La Plata, Argentina, Memorias 234.
- 24) S. I. Martínez-Guido, J. B. González-Campos, R. E. del Río, J. M. Ponce-Ortega, F. Nápoles-Rivera, M. Serna-González, and M. M. El-Halwagi; A Multiobjective Optimization Approach for the Development of a Sustainable Supply Chain of a New Fixative in the Perfume Industry. *Sustainable Chem. Eng.* **2014**, *2(10)*, 2380–2390.
- 25) A. Andrade-Cetto, M. Heinrich; Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *99*, 325–348.
- 26) Athenea Biomedicina; 3^{er} Congreso Internacional del Hospital de la Mujer; Efecto inhibitorio de extractos de *Ageratina jocotepecana* sobre la enzima aldosa reductasa de cristalinos de rata **2014**, En línea, Disponible en: http://www.fundaciongalenica.org/docs/4_congreso_internacional_hospital_mujer/Athenea_Suplemento_3_CIHM.pdf
- 27) A. I. Pérez-Gutiérrez; *Ageratina jocotepecana* fuente de Tetranorlabdanodiol, Tesis para obtener el Título de Química Farmacobióloga **2012**.
- 28) L. A. Amos and A. Klug; Arrangement of subunits in flagellar microtubules, *J. Cell Sci.* **1974**, *14*, 523-549.
- 29) R. H. Wade and A. A. Hyman; Microtubule structure and dynamics, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 12-17.
- 30) L. A. Amos; Microtubule structure and its stabilisation, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2153-2160.
- 31) B. Gigant, C. Wang, R. B. G. Ravelli, F. Roussi, M. O. Steinmetz, P. A. Curmi, A. Sobel and M. Knossow; Structural basis for the regulation of tubulin by vimblastine, *Nature.* **2005**, *435*, 519-522.
- 32) W. Brent-Derry, L. Wilson and M. Ann-Jordan; substoichiometric Binding of Taxol Suppresses Microtubule Dynamics, *Biochemistry.* **1995**, *34*, 2203-2211.
- 33) M. G. Bolster, B. J. M Jansen and A. de Groot; The synthesis of (-)-Ambrox starting from labdanolic acid, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *57*, 5657-5662.

- 34) K. U. Prasad, M. A. Iqbal and D. W. Urry; Utilization of 1-hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1985**, *25*, 408-413.
- 35) D. S. MacMillan, J. Murray, H. F. Sneddon, C. Jamieson and A. J. B. Watson; Evaluation of Alternative Solvents in Common Amide Coupling Reactions: Replacement of Dichloromethane and *N, N*-Dimethylformamide, *Green Chem.* **2013**, *15*, 596-600.
- 36) F. Tschritzis, J. Jakupovic; Diterpenes from *Leyssera gnaphaloides* *Phytochemistry*. **1991**, *30*, 211–213.
- 37) R. Paul, G. W. Anderson; *N,N'*-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (17), 4596–4600.
- 38) S. K. Verma, R. Ghorpade, A. Pratap, M. P. Kaushik; Solvent free, *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) mediated amidation, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2373–2376.
- 39) C. A. G. N. Montalbetti and V. Falque; Amide bond formation and peptide coupling, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *61*, 10827-10852.
- 40) N. Sole, J. L. Torres, J. M. Garcia Anto, G. Valencia and F. Reig; Mixed Anhydrides in Peptide Synthesis, Factors Affecting Urethane Formation and Racemization, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *42*, 193-198.
- 41) A. El-Faham, R. Subirós-Funosas, R. Prohens and F. Albericio; COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404 –9416.
- 42) A. El-Faham and F. Albericio; COMU: A third generation of uronium-type coupling reagents, *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 6–9.
- 43) D. Andreu y L. Rivas; Péptidos en Biología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Madrid **1997**, 63-70.
- 44) Z. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, and T. S. Mansour; The Scope and Mechanism of Phosphonium-Mediated S_NAr Reactions in Heterocyclic Amides and Ureas, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 10194-10210.

- 45) A. Davis, J. Jiang, K. Middleton, Y. Wang, I. Weisz, Y. Ling and J. G. Bekesi; Novel Suicide Ligands of Tubulin Arrest Cancer Cells in S-Phase, *Neoplasia*. **1999**, *1*, 498-507.
- 46) J. Jiang, A. Davis, K. Middleton, Y. Ling, R. Perez-Soler, J. F. Holland, and J. G. Bekesi; 3-(Iodoacetamido)-benzoylurea: A Novel Cancericidal Tubulin Ligand that Inhibits Microtubule Polymerization, Phosphorylates bcl-2, and Induces Apoptosis in Tumor Cells, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5389-5395.

11. Anexo

Tabla 6. Datos espectroscópicos de ^{13}C del ácido catívico (**31**) y derivados.

^{13}C						
Carbono	31*	58	59	60	61	62
1	39.1	39.2	39.2	39.1	39.2	39.1
2	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8
3	42.3	42.3	42.3	42.3	42.3	42.3
4	32.9	32.9	32.9	33.0	32.9	32.9
5	50.1	50.1	50.1	50.2	50.1	50.1
6	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8
7	122.1	122.2	122.1	122.2	122.2	122.4
8	135.3	135.2	135.3	135.3	135.2	135.0
9	55.2	55.3	55.3	55.3	55.3	55.2
10	36.8	36.9	36.8	36.9	36.9	36.9
11	24.5	24.5	24.8	24.5	24.5	24.5
12	39.3	39.6	39.6	39.6	39.4	39.3
13	31.1	31.8	31.7	31.8	31.4	31.3
14	41.3	45.3	44.6	45.2	41.5	41.4
15	179.7	170.8	171.5	170.7	172.1	170.7
16	19.9	19.9	19.7	19.9	19.9	19.9
17	22.1	22.2	22.1	22.2	22.2	22.1
18	33.2	33.1	33.1	33.2	33.2	33.1
19	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8
20	13.5	13.6	13.5	13.6	13.6	13.6
21		137.9	48.0	135.7	144.2	145.2
22		119.8	33.3	128.9	122.3	122.4
23		129.0	24.4	126.8	114.4	125.2
24		124.2	25.5	125.2	157.1	155.5
25				130.4	55.6	
26				123.3		
27				17.8		

Tabla 7. Datos espectroscópicos de ^{13}C del ácido 13-*epi*-labdanólico (**32**) y derivados.

^{13}C					
Carbono	32*	63	64	65	66
1	39.6	39.9	39.8	39.8	39.7
2	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4
3	41.9	41.9	42.0	41.9	42.0
4	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2
5	56.0	56.0	56.1	56.1	56.1
6	20.4	20.6	20.5	20.6	20.5
7	44.2	44.6	44.4	44.5	44.6
8	74.6	74.8	74.3	74.5	74.3
9	61.7	61.2	61.7	61.4	62.1
10	39.1	39.1	39.1	39.1	39.1
11	21.9	21.1	21.5	21.7	22.6
12	39.8	39.2	39.6	39.7	40.4
13	30.7	31.3	31.4	31.5	31.3
14	40.9	44.4	44.0	44.5	41.4
15	178.4	171.7	172.0	171.1	172.3
16	19.9	20.2	19.9	20.2	20.0
17	23.8	24.4	24.1	24.2	23.9
18	33.3	33.4	33.4	33.4	33.4
19	21.4	21.5	21.4	21.5	21.5
20	15.4	15.5	15.5	15.5	15.5
21		138.2	48.0	135.8	144.2
22		119.7	24.9	129.3	122.3
23		129.0	33.2	130.4	114.4
24		123.9	25.5	125.1	157.1
25				126.7	55.6
26				123.5	
27				17.9	

*Referencia 13

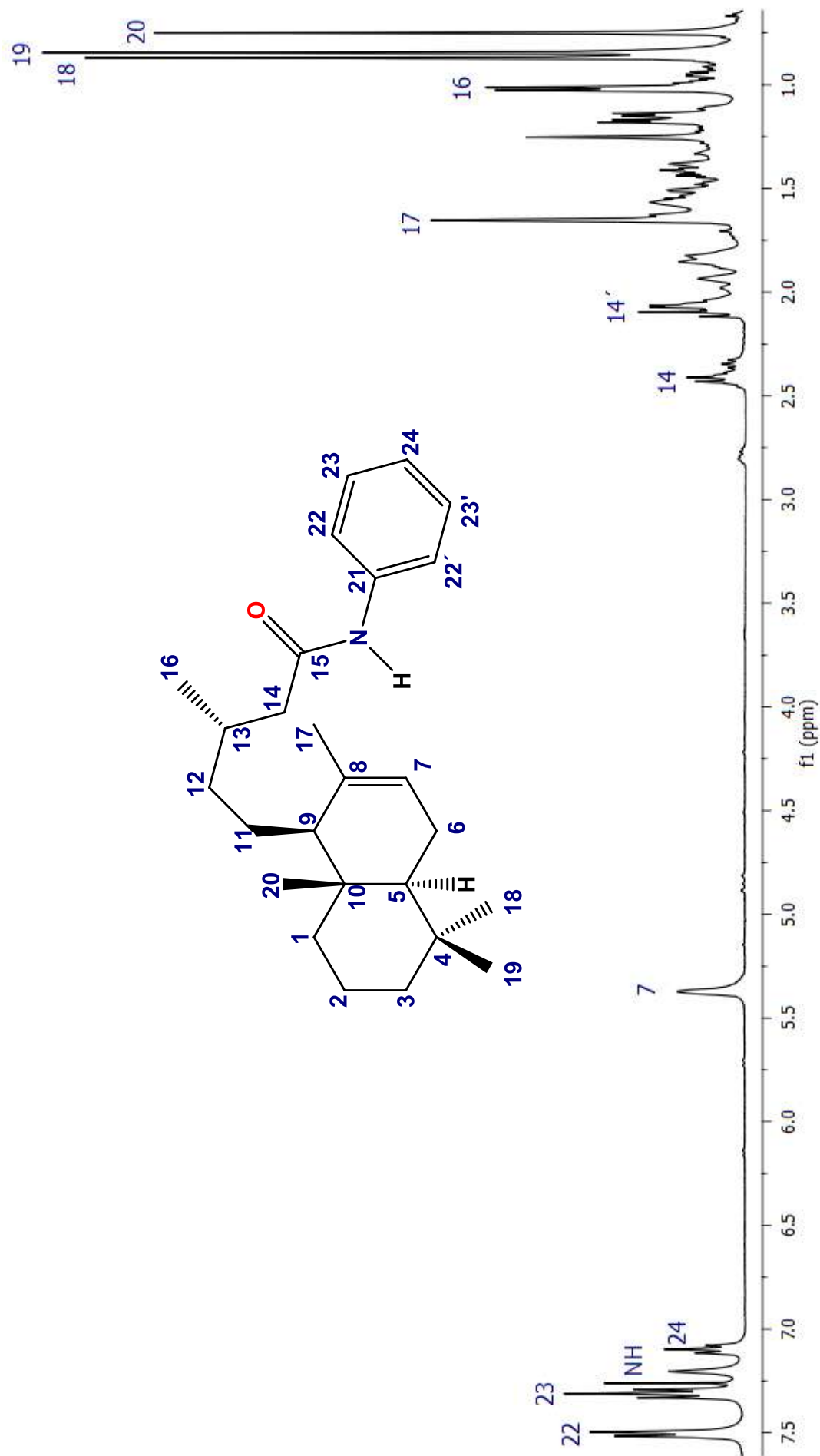


Figura 44. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado **58**.

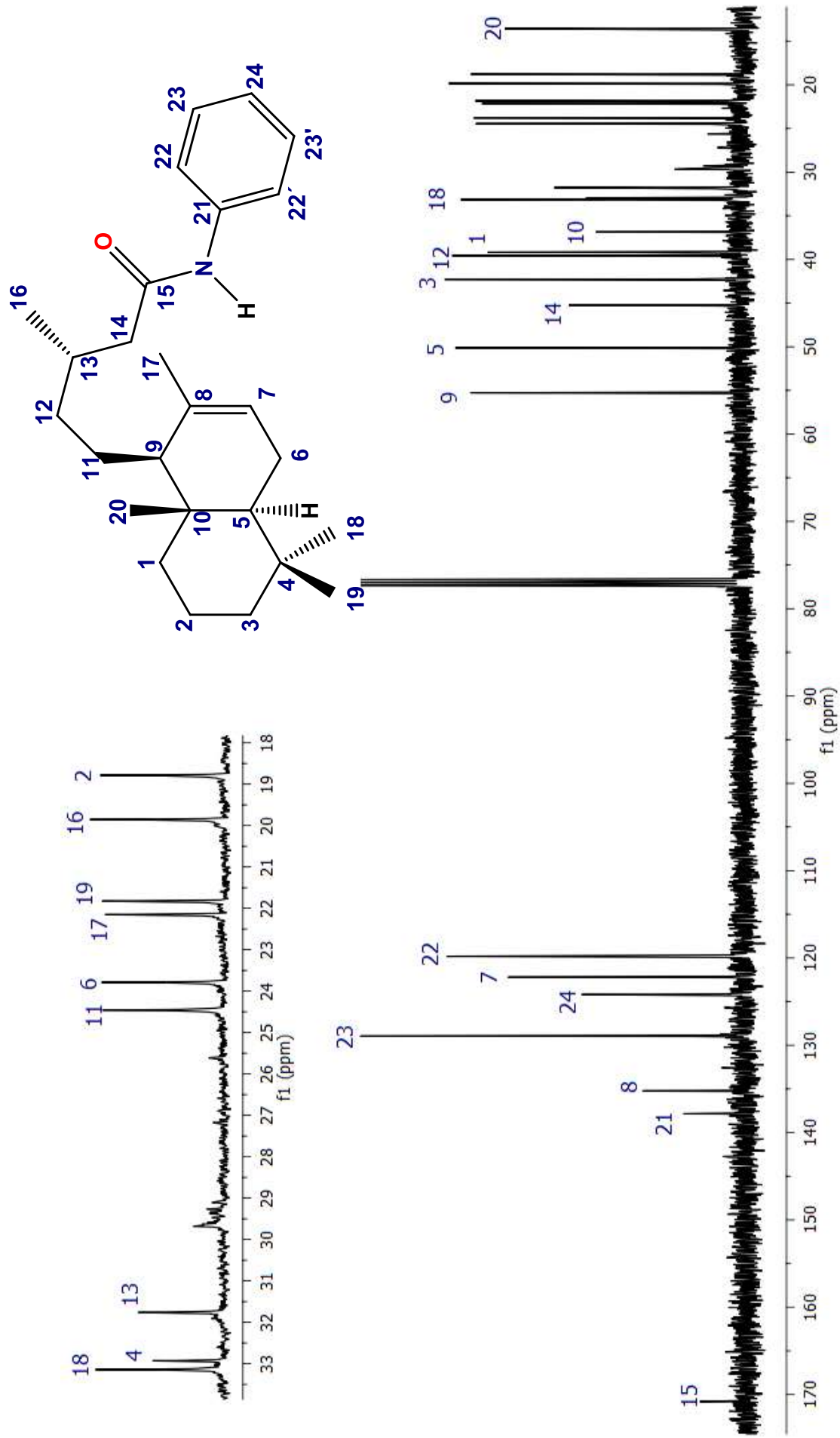


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado **58**.

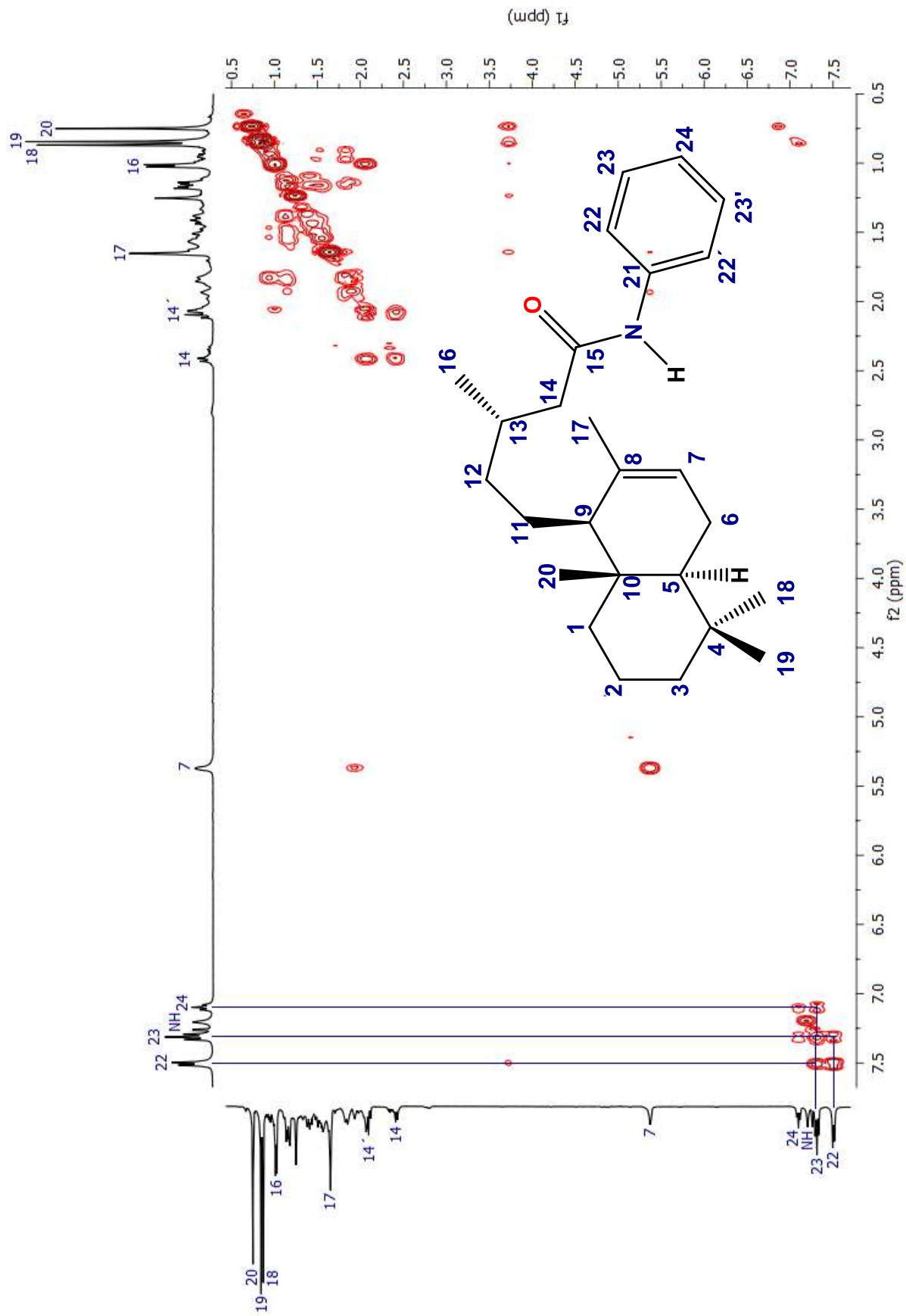


Figura 46. Espectro COSY del derivado 58.

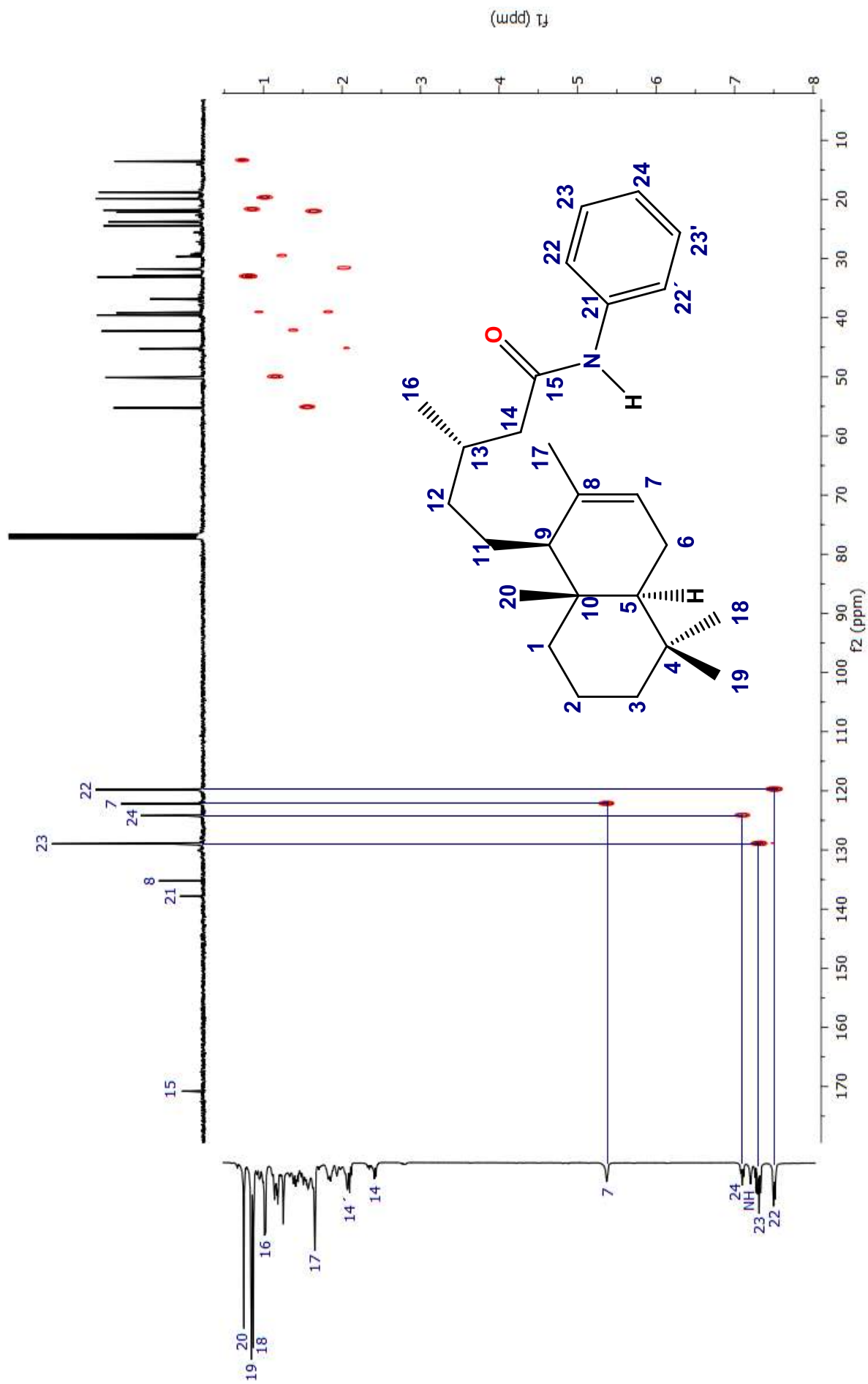


Figura 47. Espectro HETCOR del derivado 58.

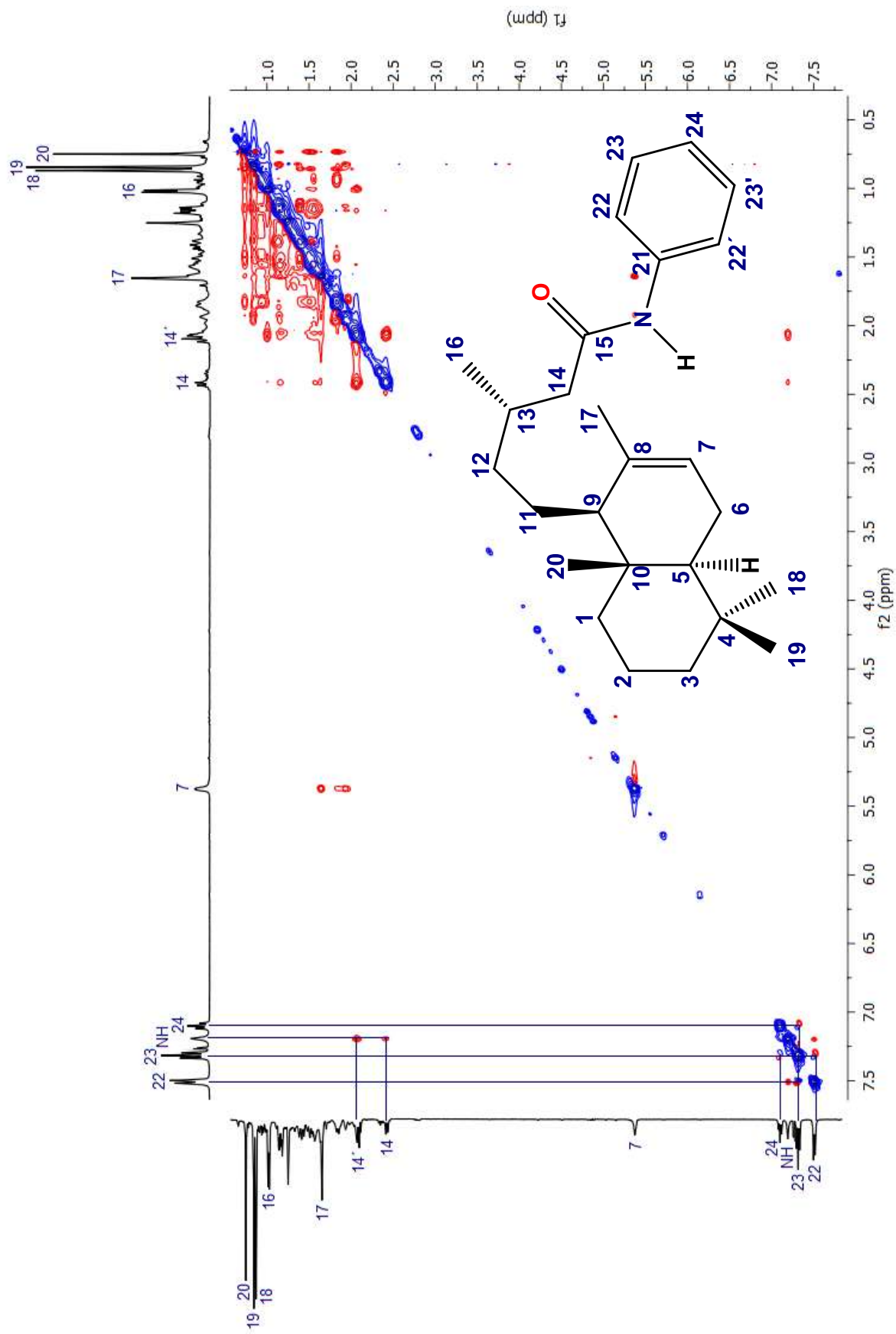


Figura 48. Espectro NOESY del derivado 58.

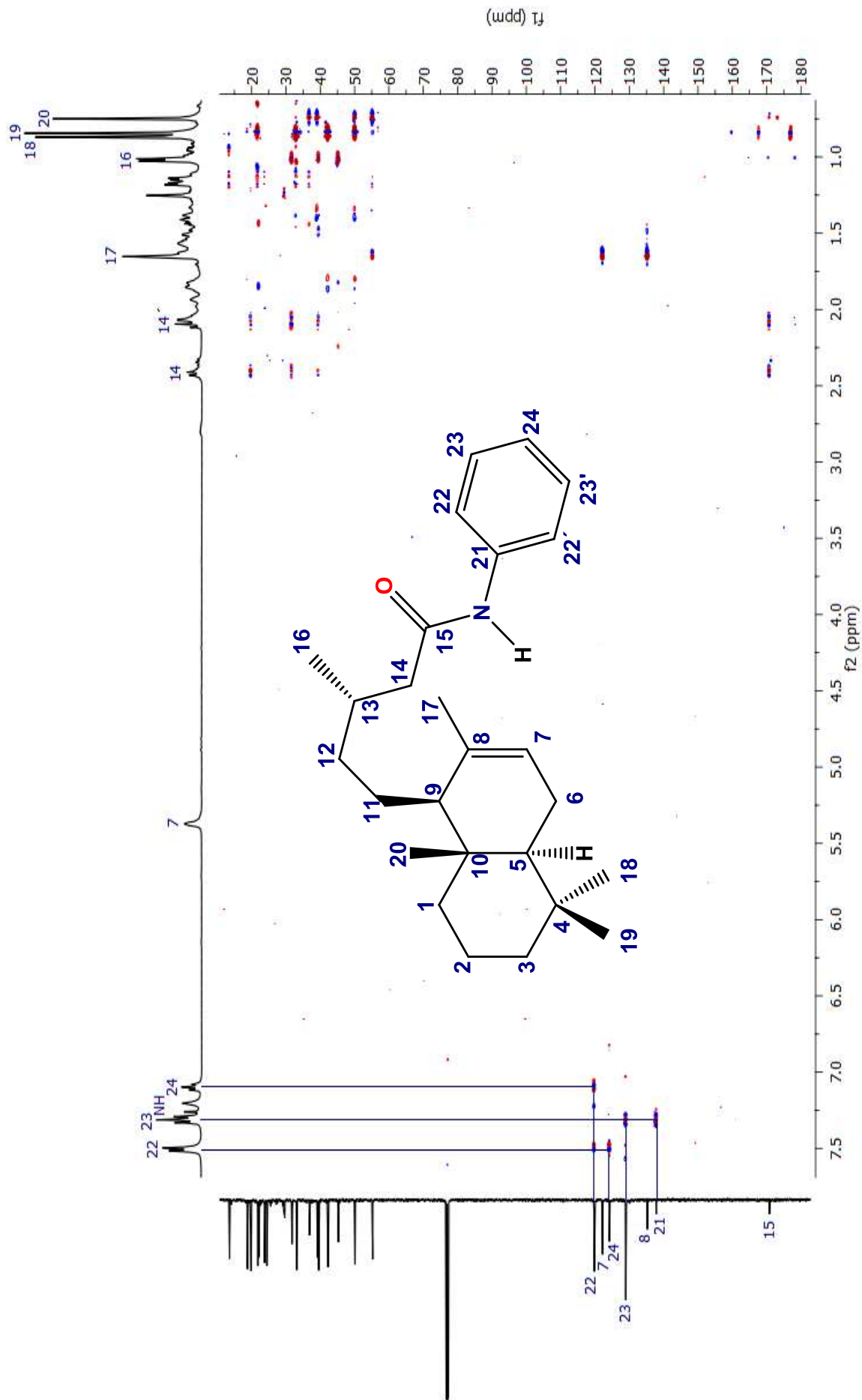


Figura 49. Espectro HMBC del derivado 58.

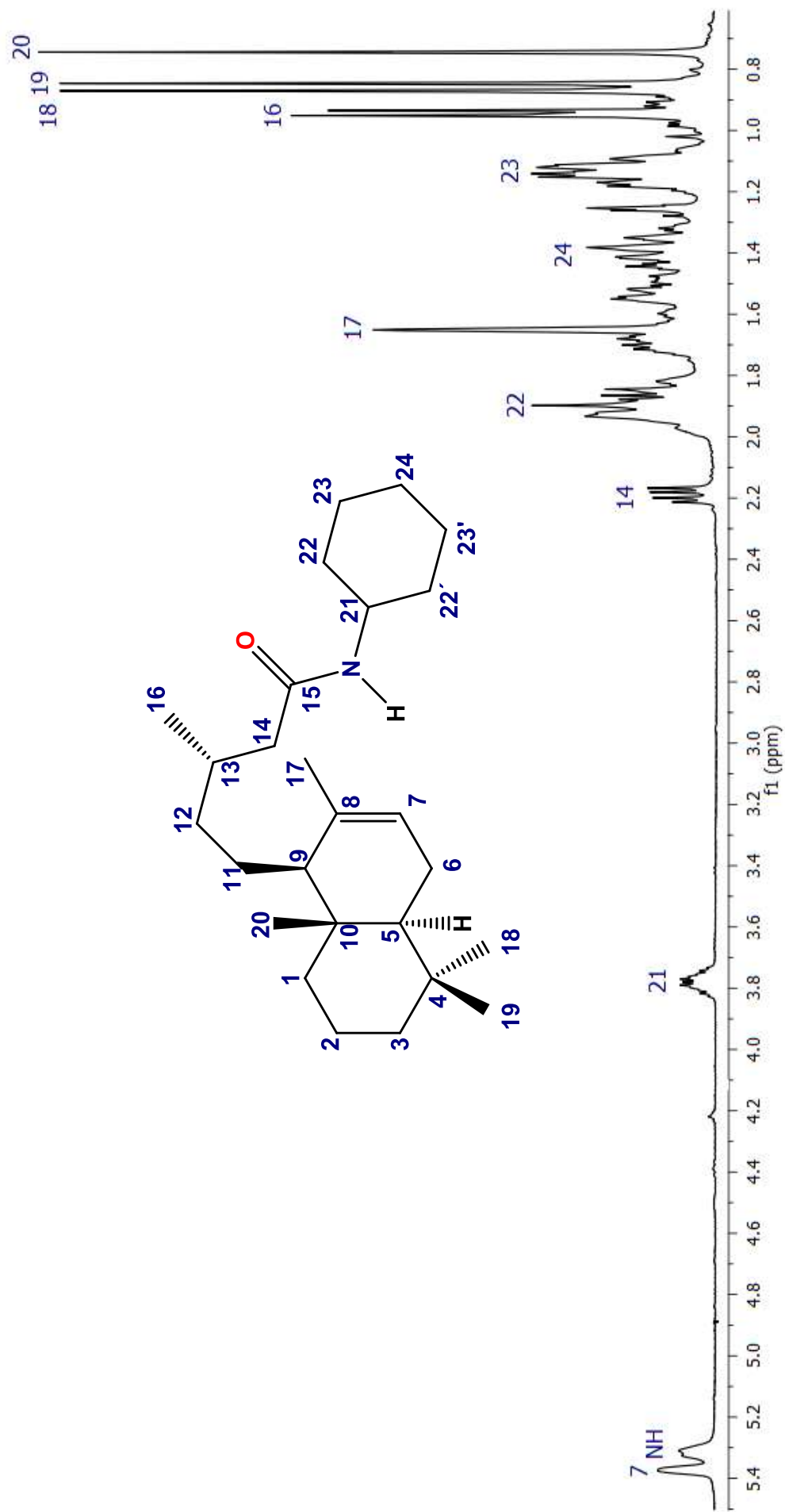


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado **59**.

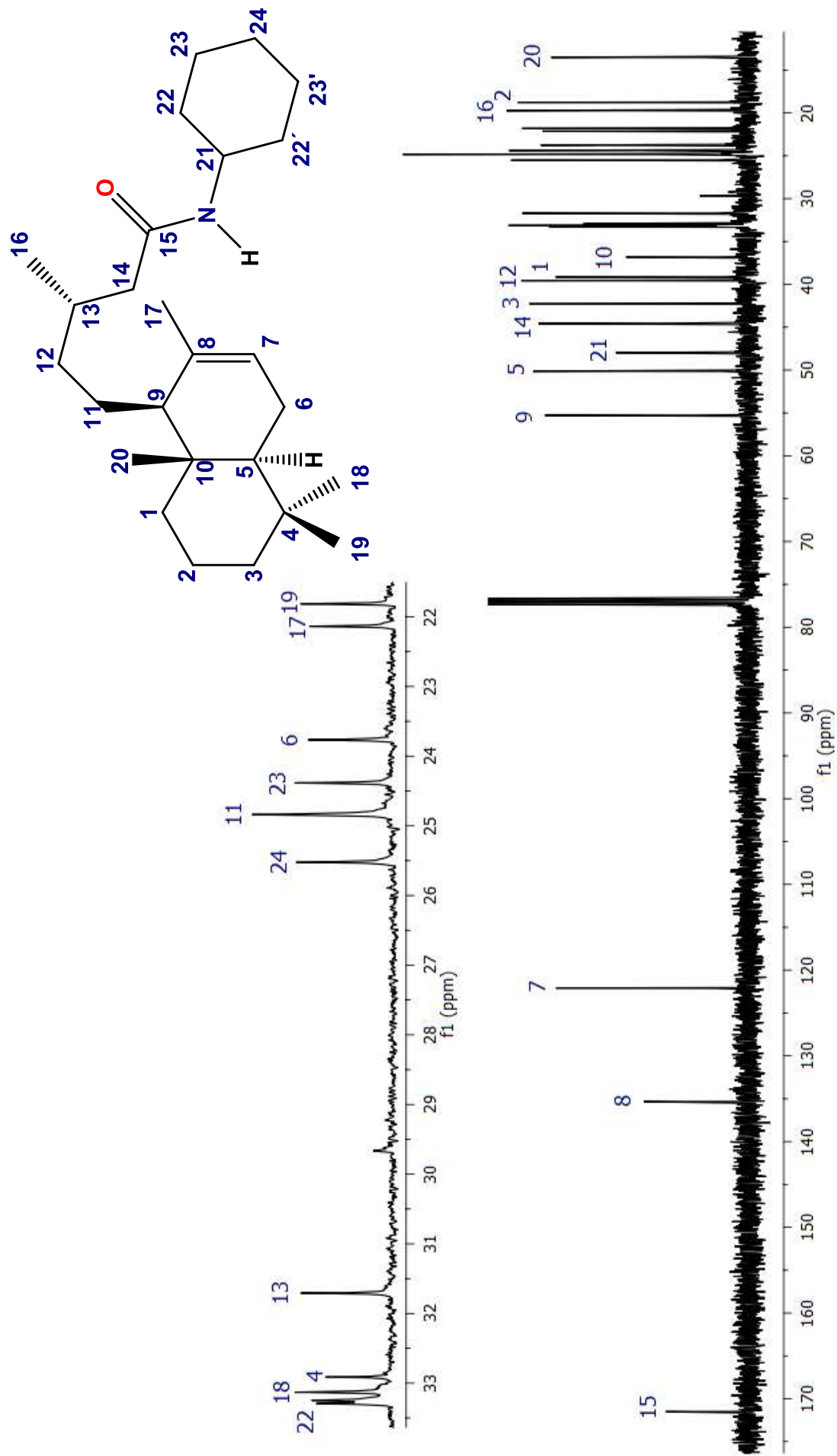


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado **59**.

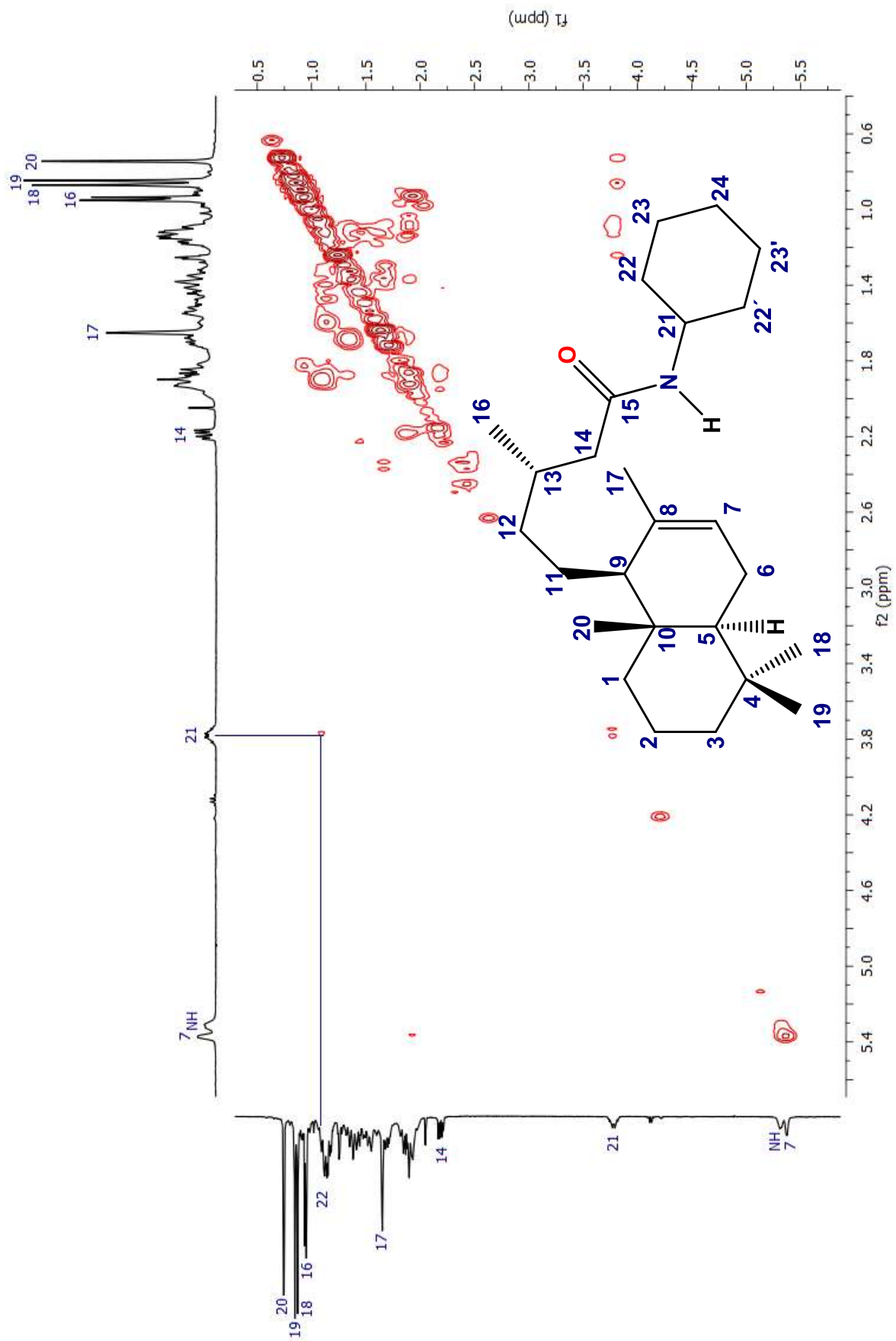


Figura 52. Espectro COSY del derivado 59.

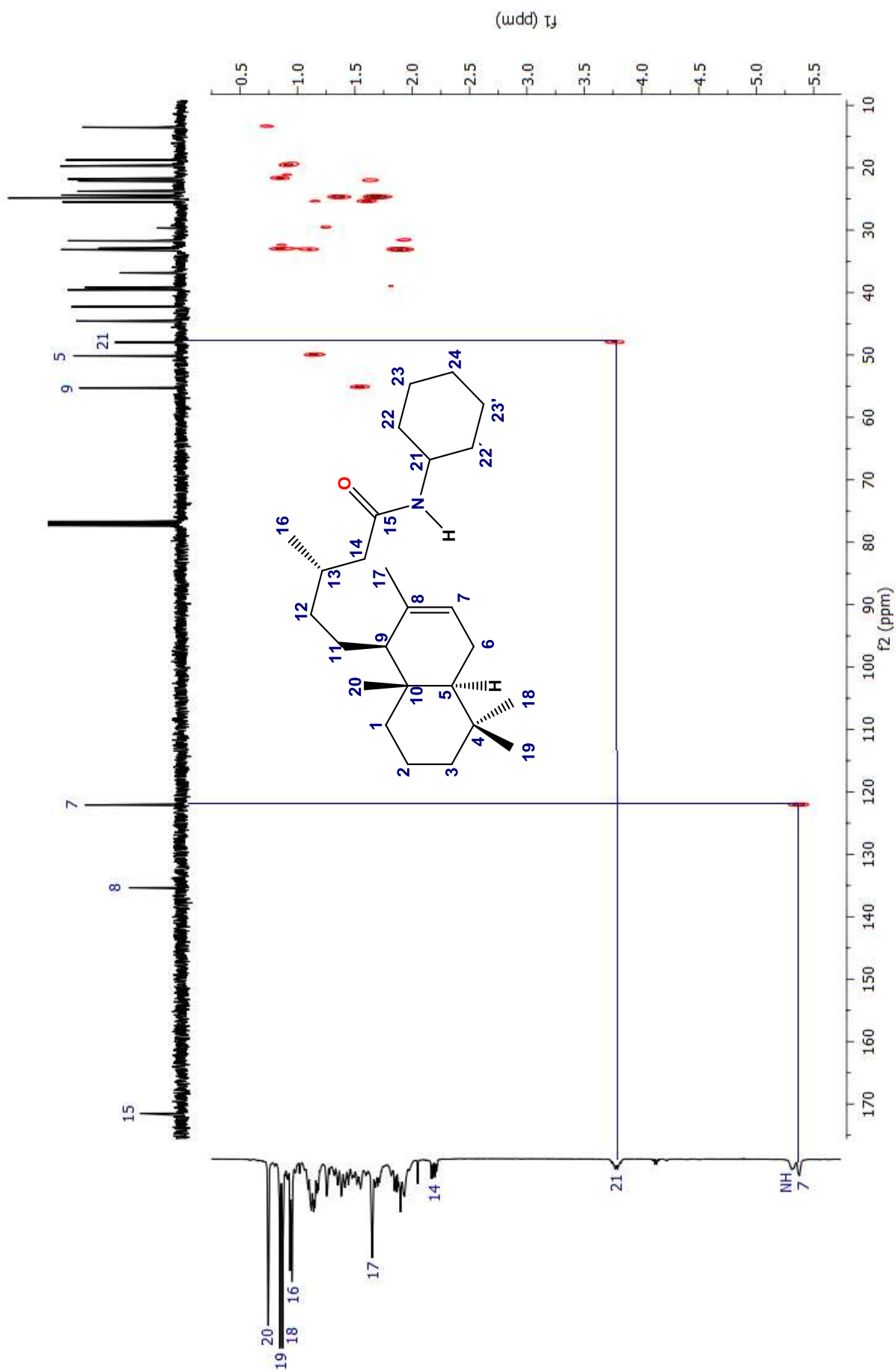


Figura 53. Espectro HETCOR del derivado **59**.

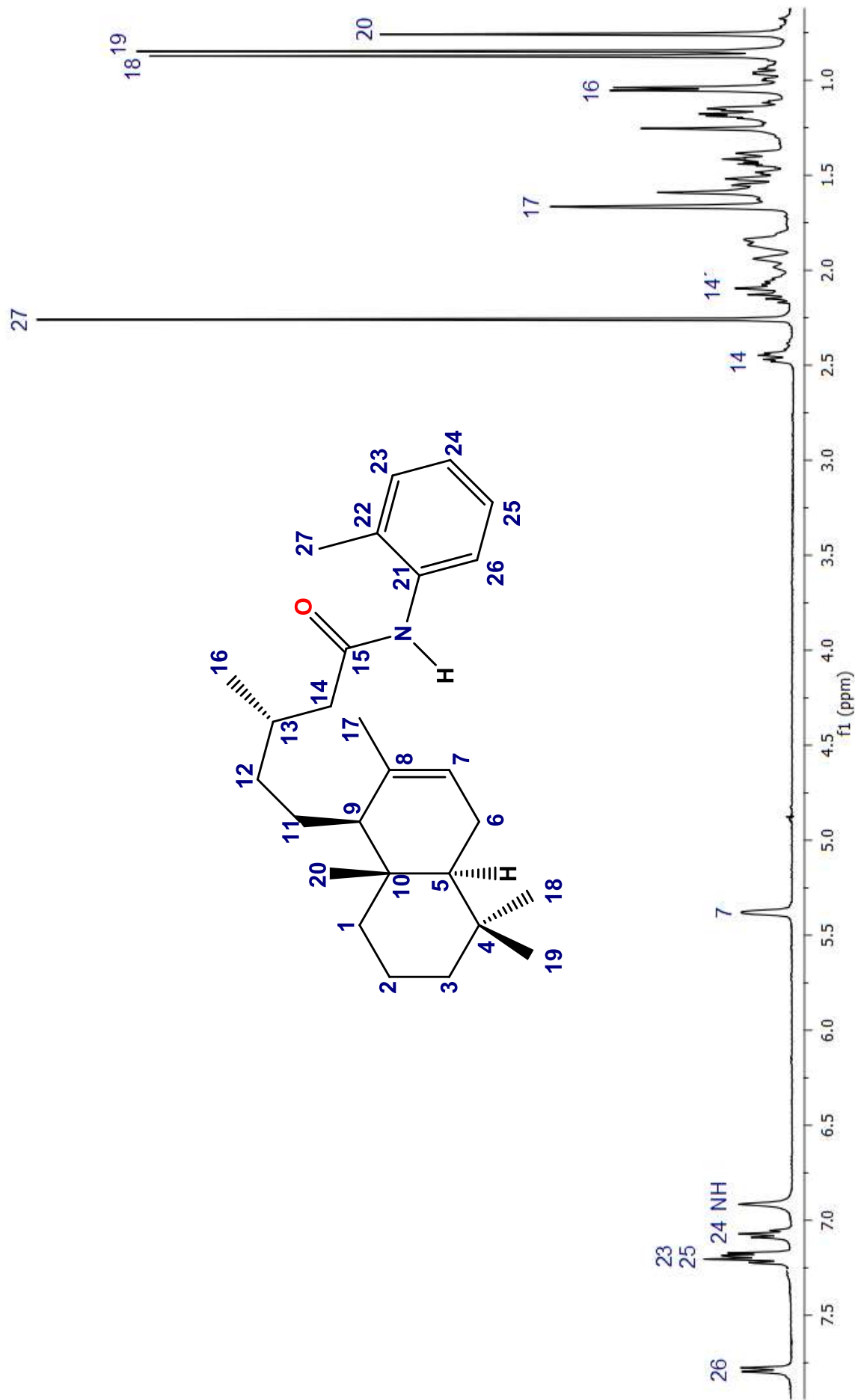


Figura 55. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado 60.

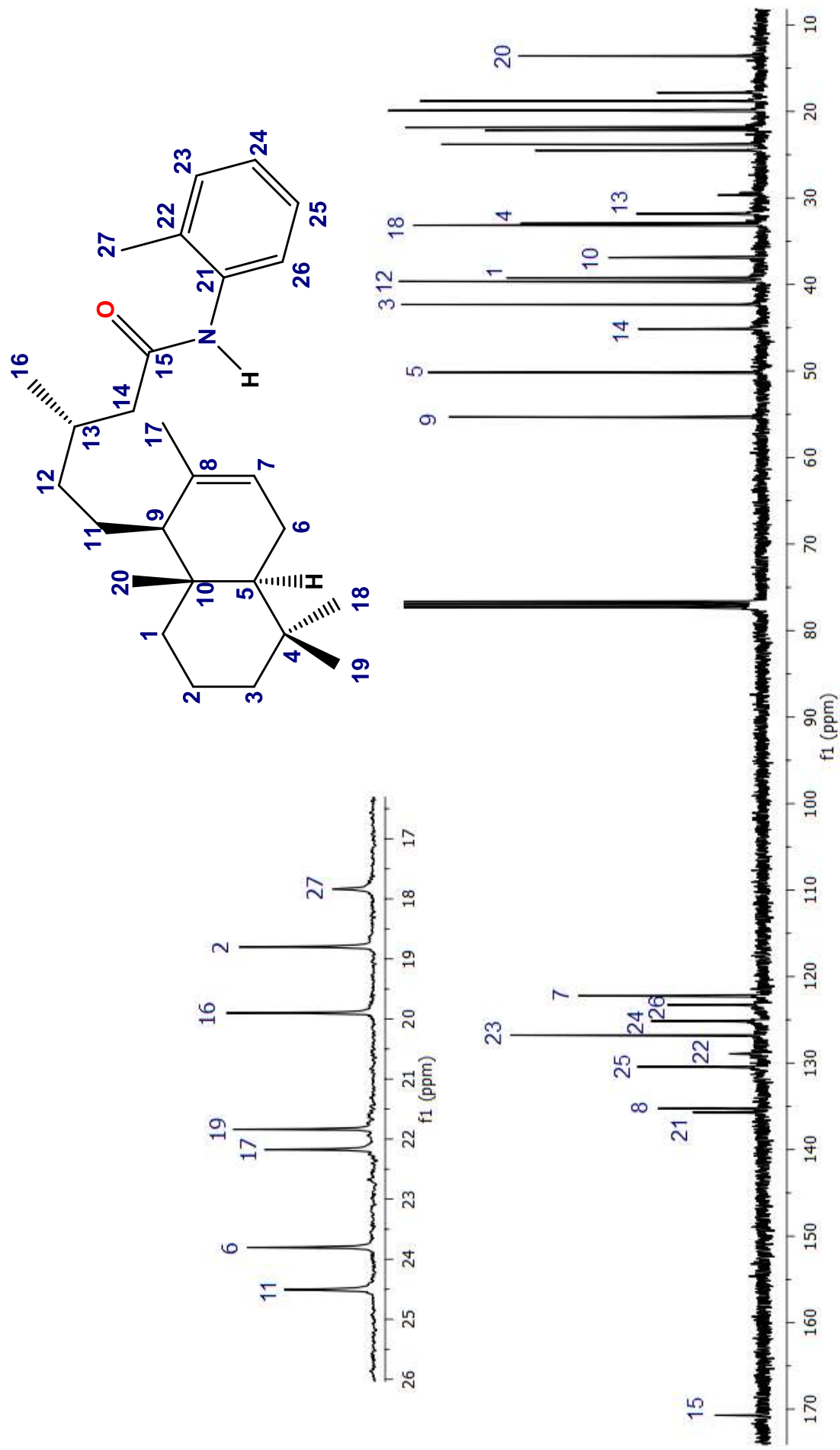


Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado **60**.

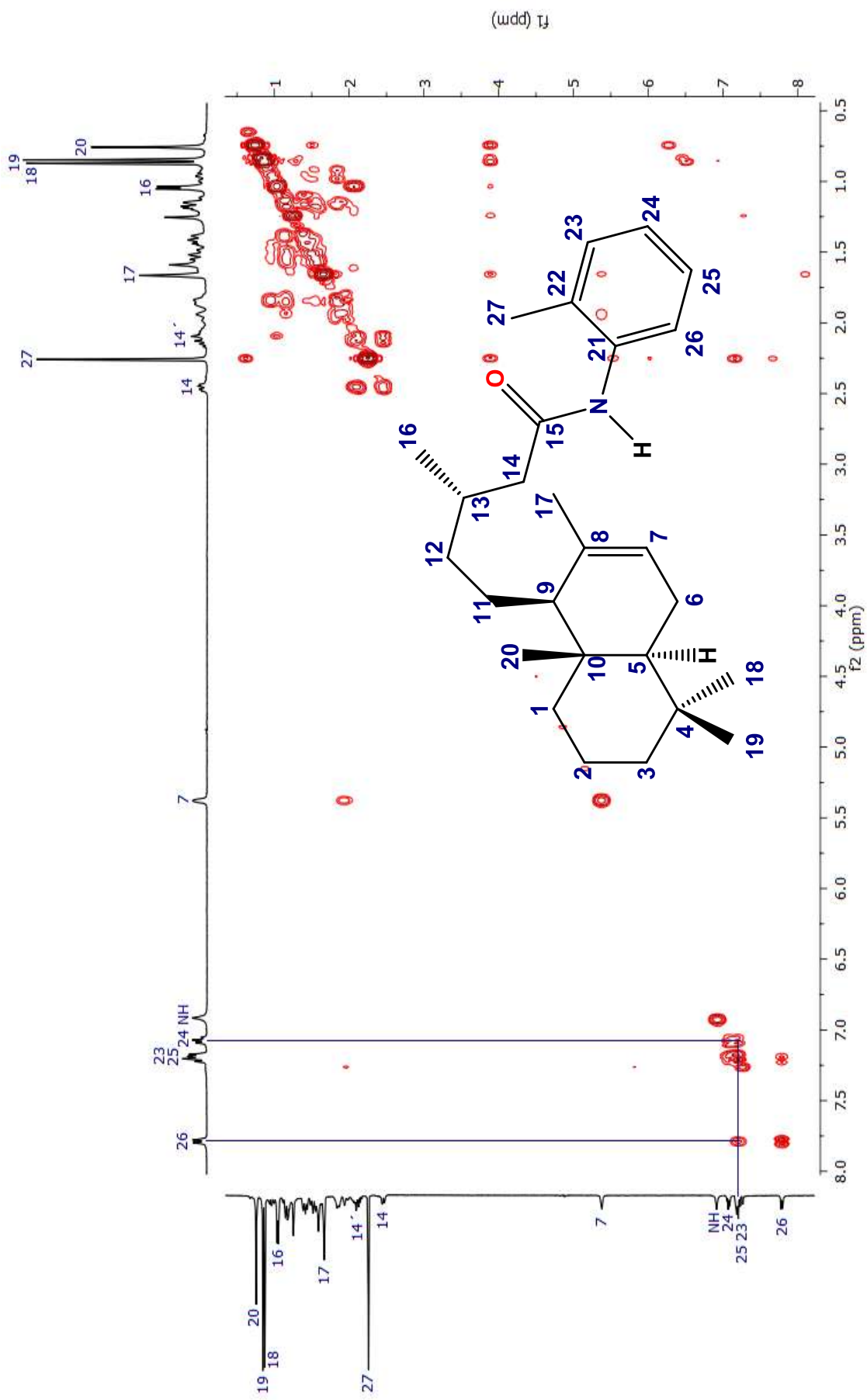


Figura 57. Espectro COSY del derivado **60**.

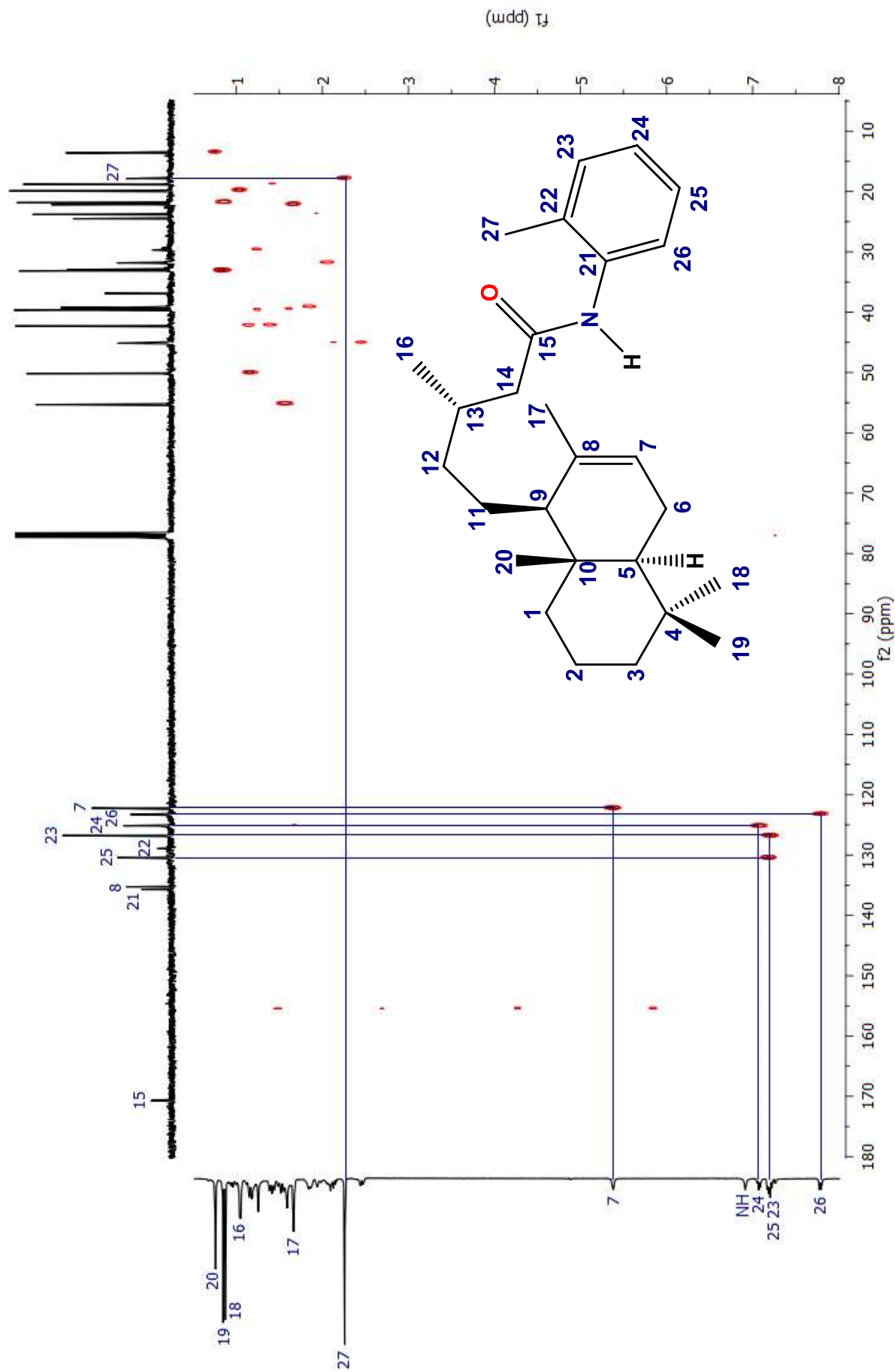


Figura 58. Espectro HETCOR del derivado 60.

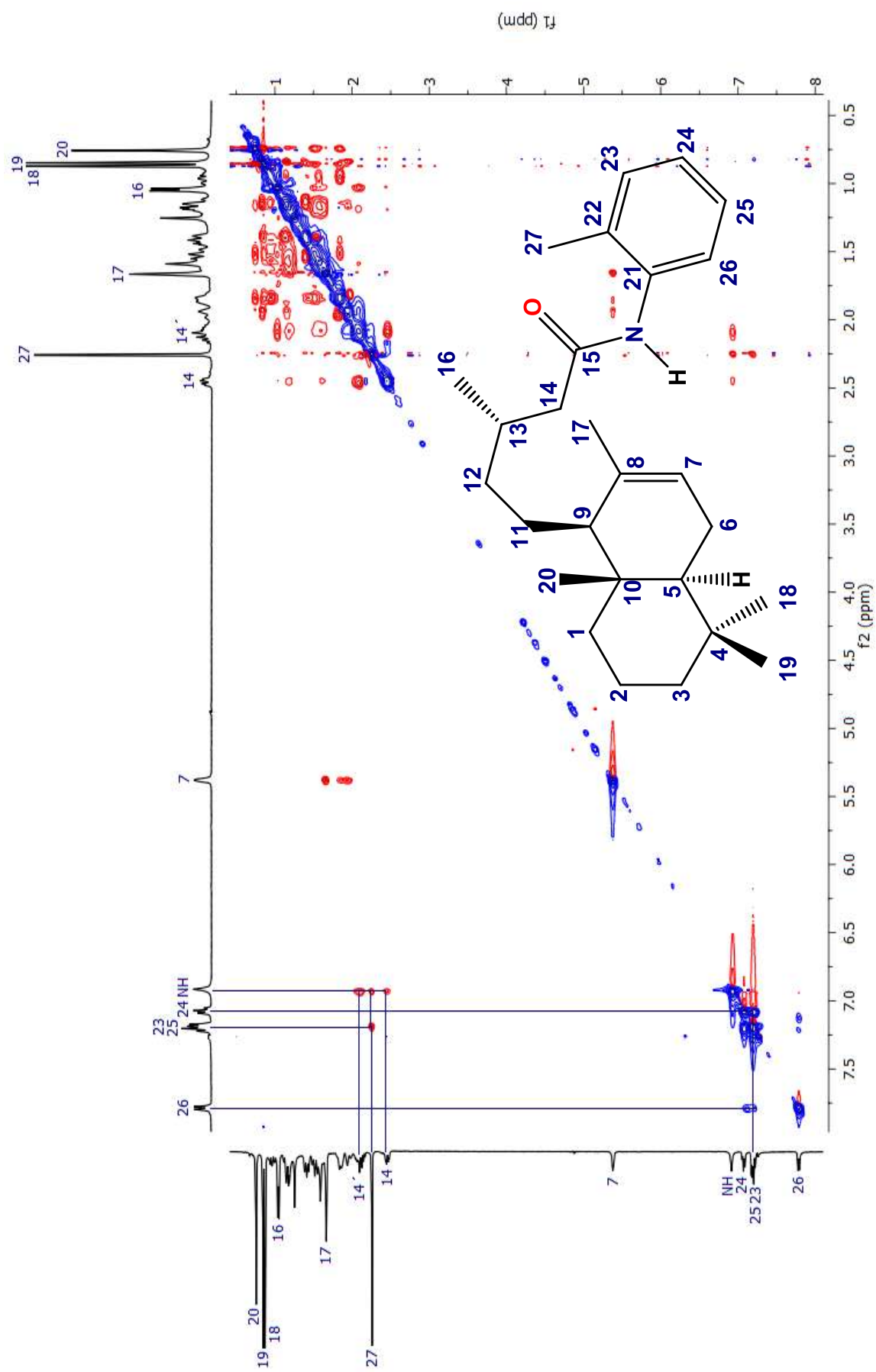


Figura 59. Espectro NOESY del derivado 60.

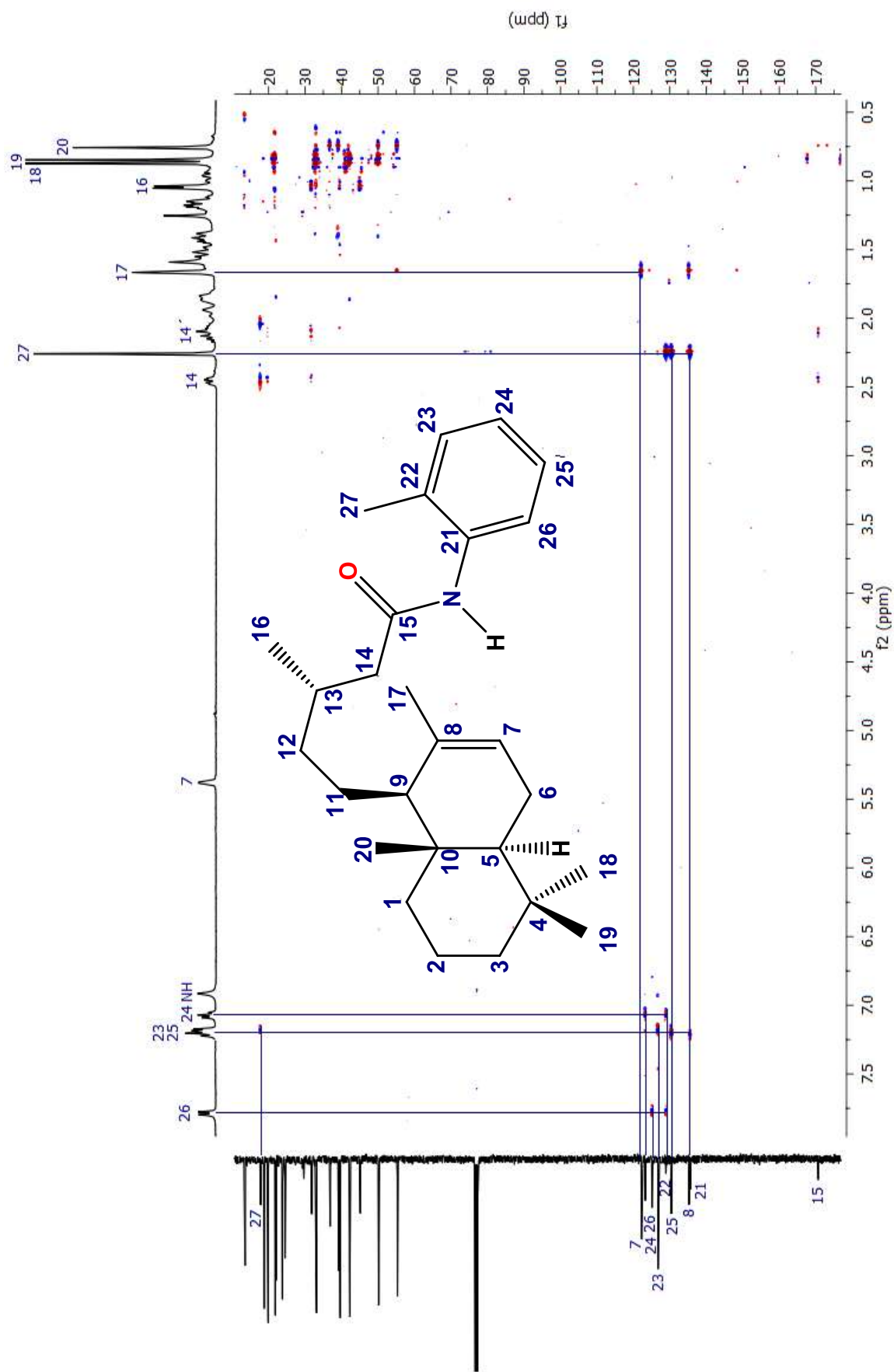


Figura 60. Espectro HMBC del derivado 60.

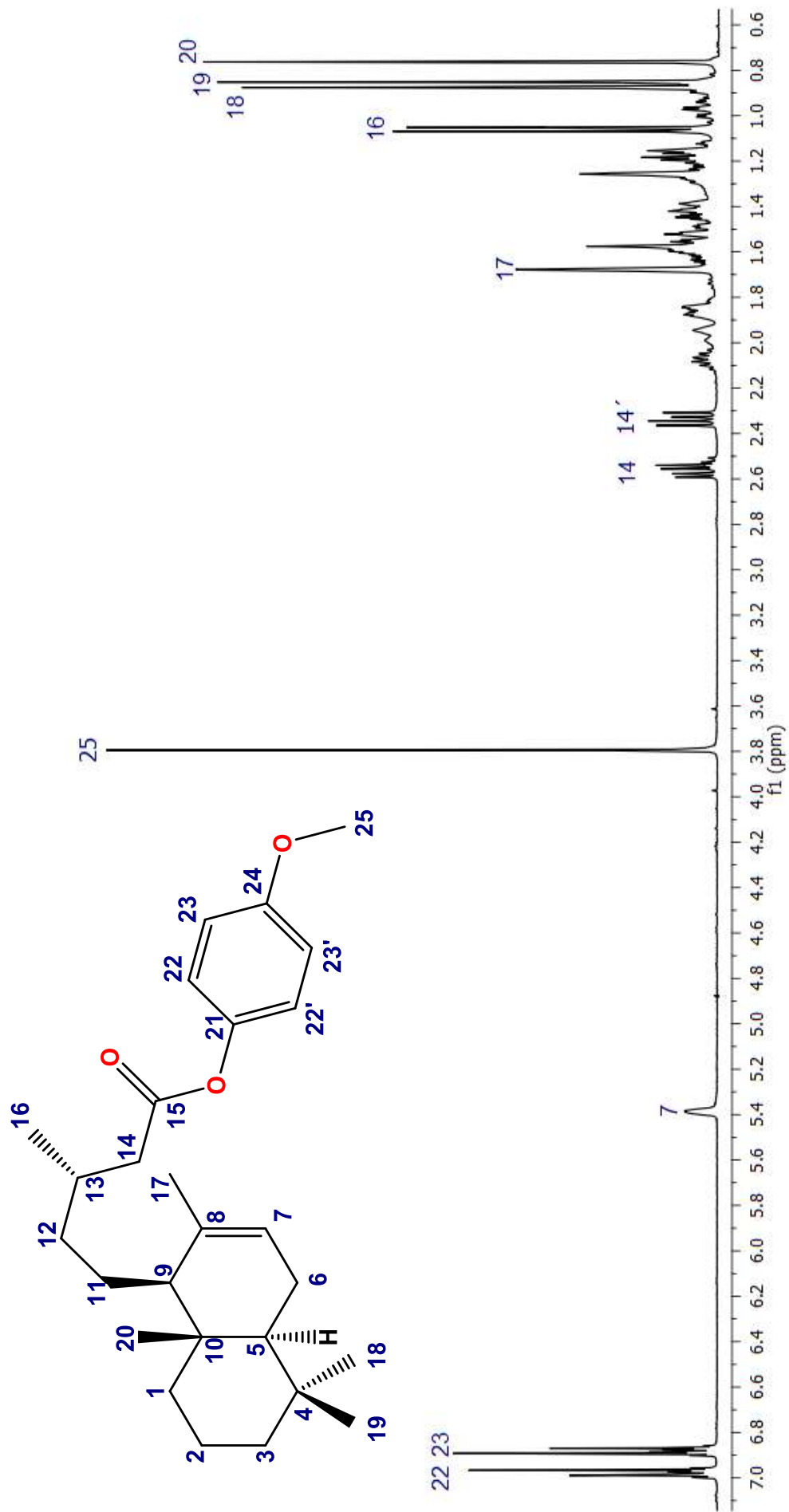


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado **61**.

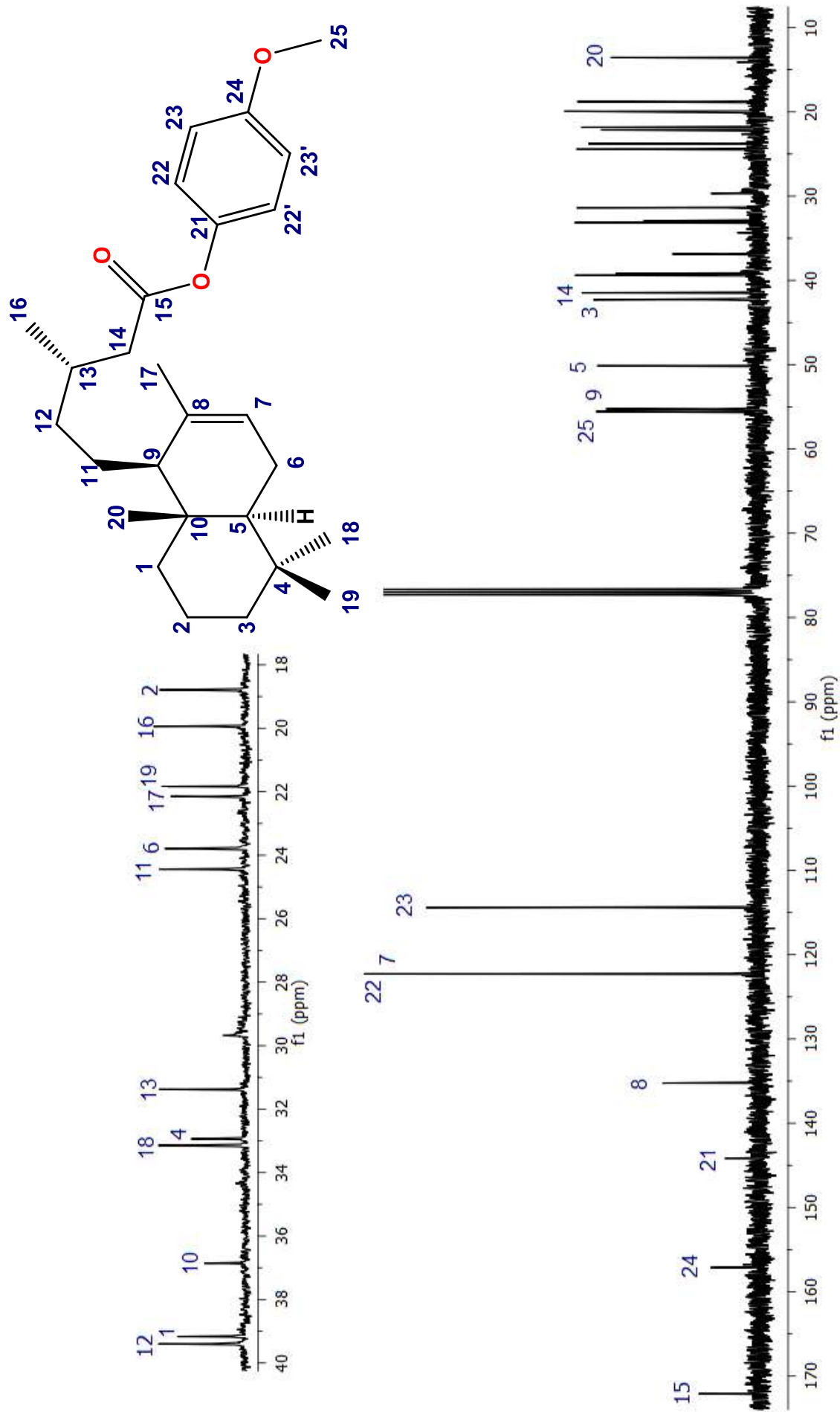


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 61.

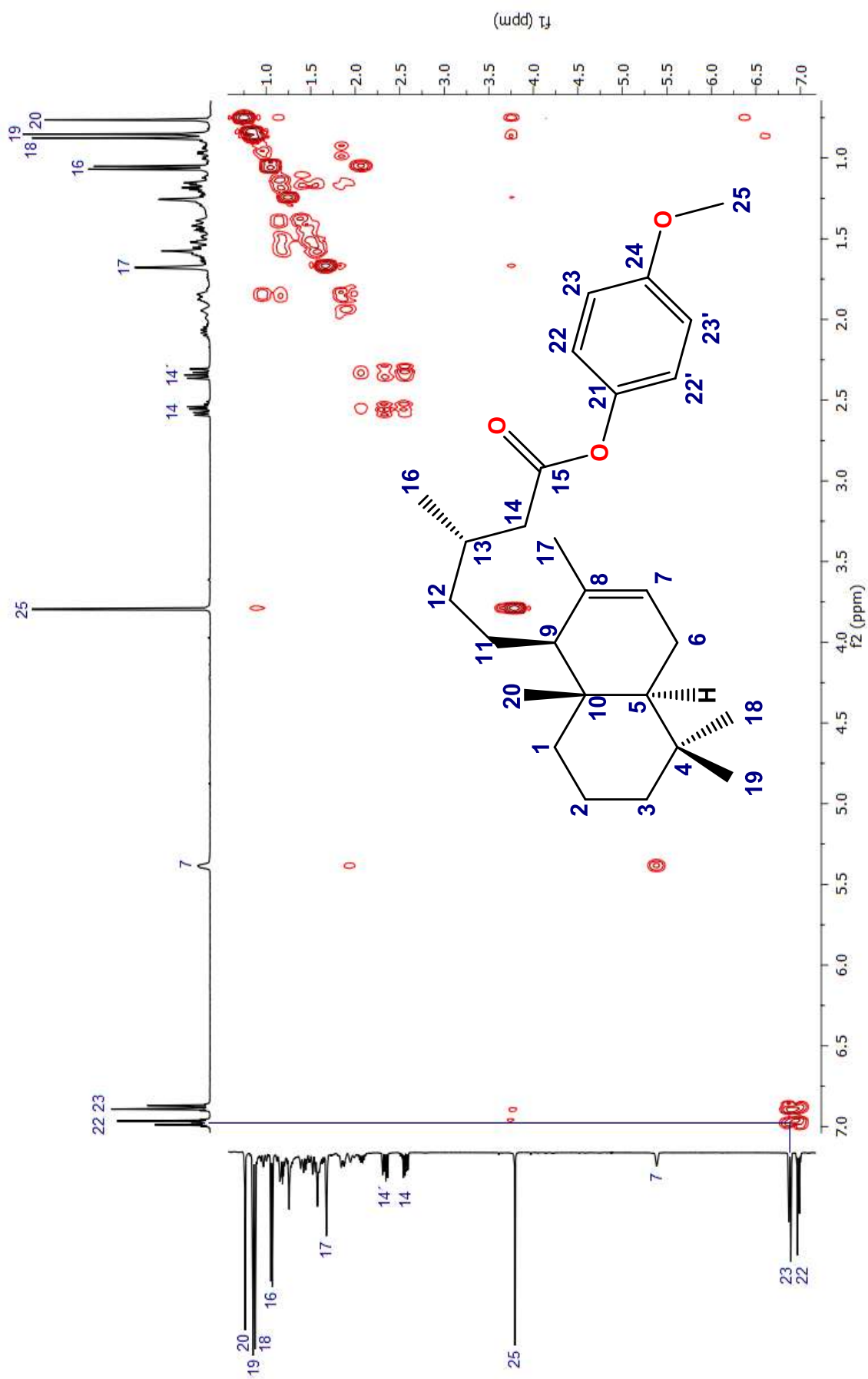


Figura 63. Espectro COSY del derivado **61**.

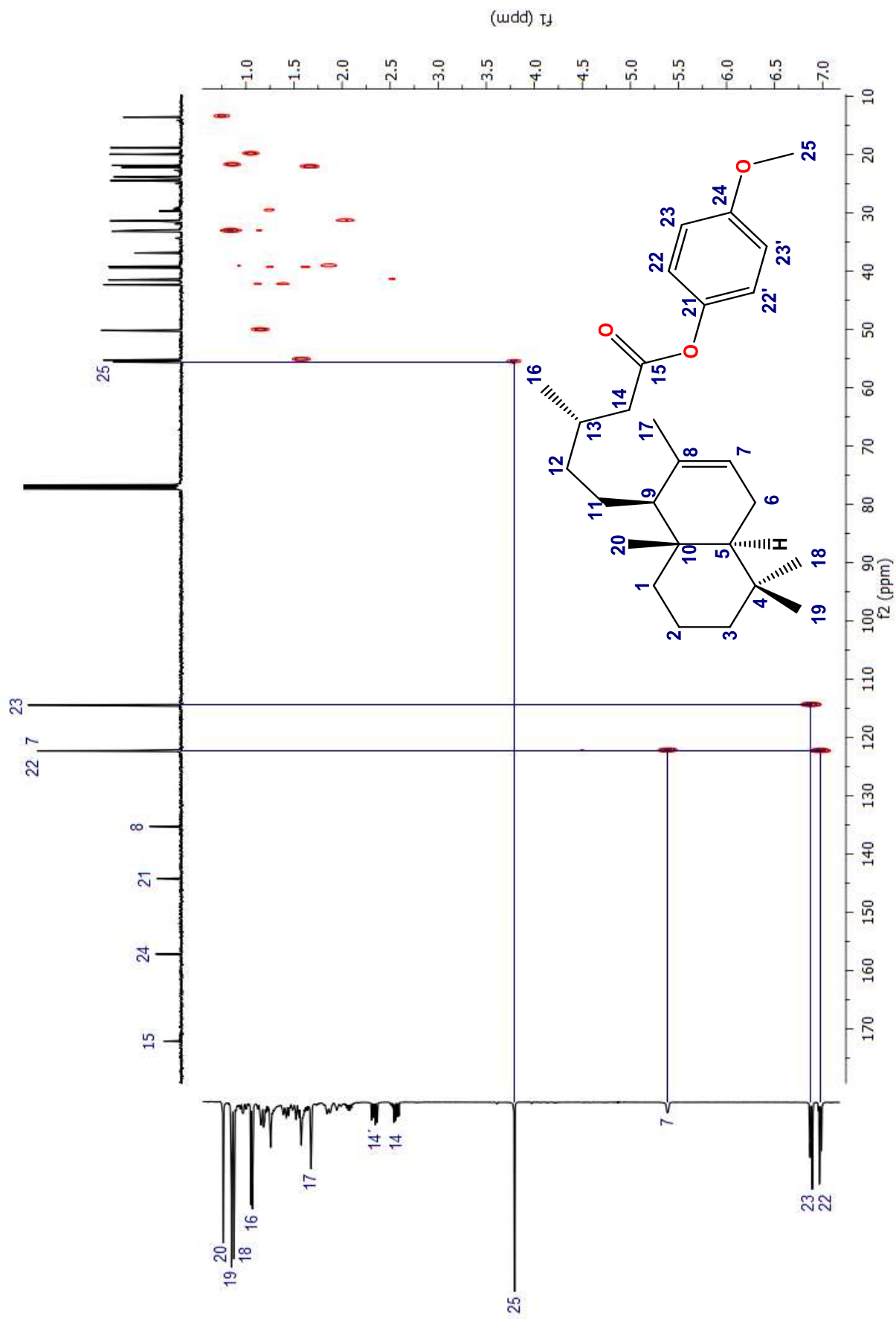


Figura 64. Espectro HETCOR del derivado 61.

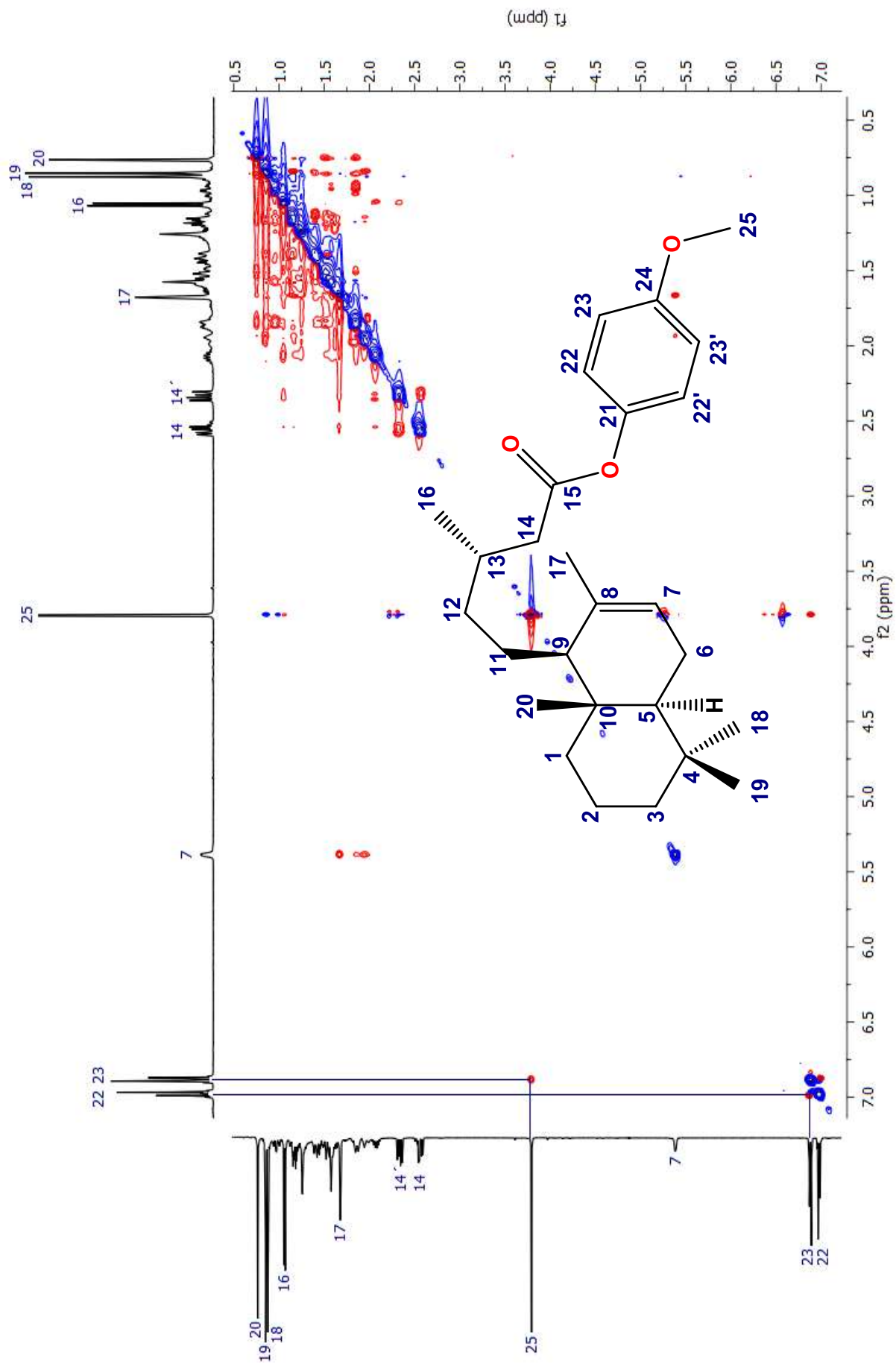


Figura 65. Espectro NOESY del derivado 61.

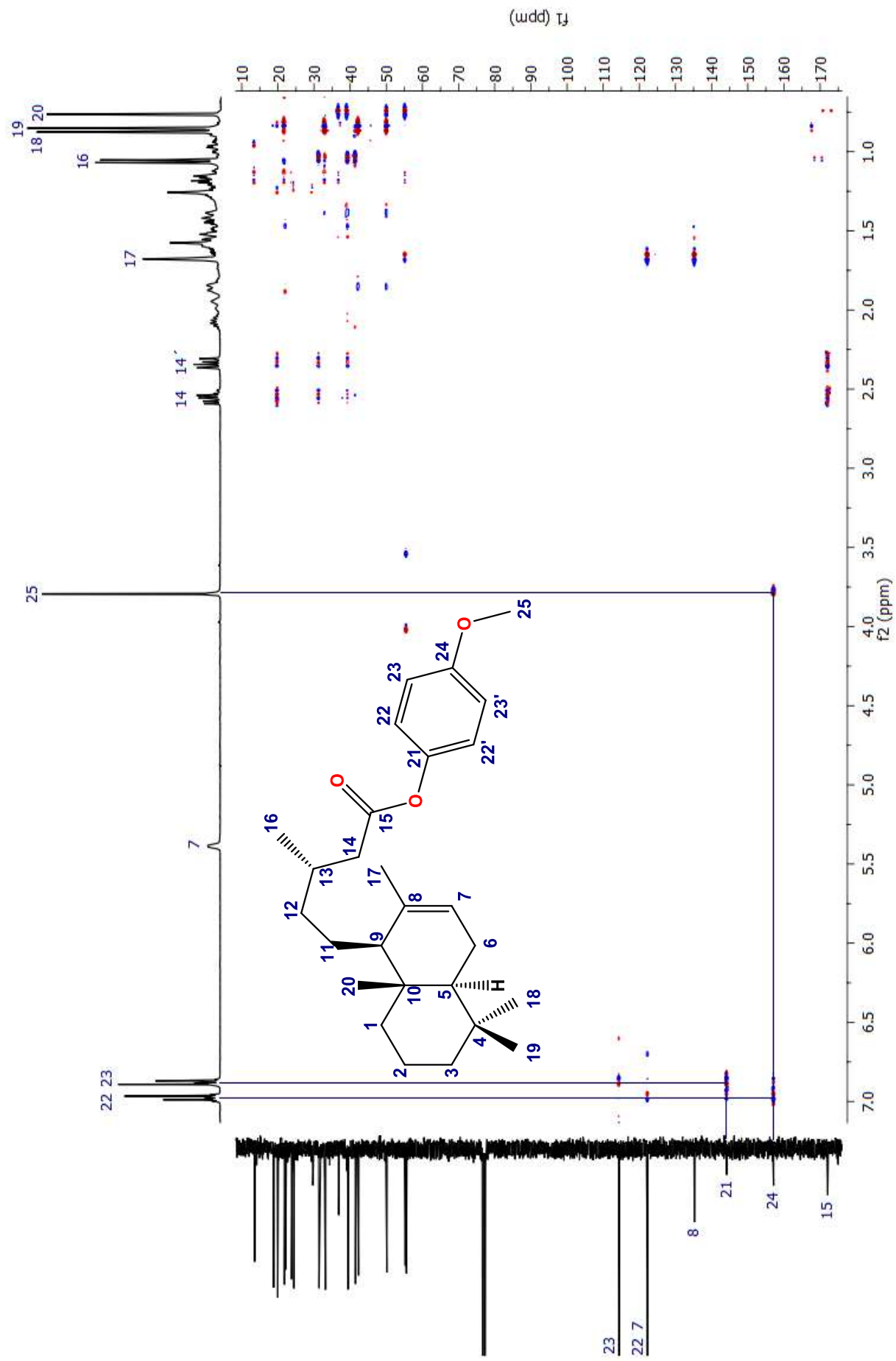


Figura 66. Espectro HMBC del derivado 61.

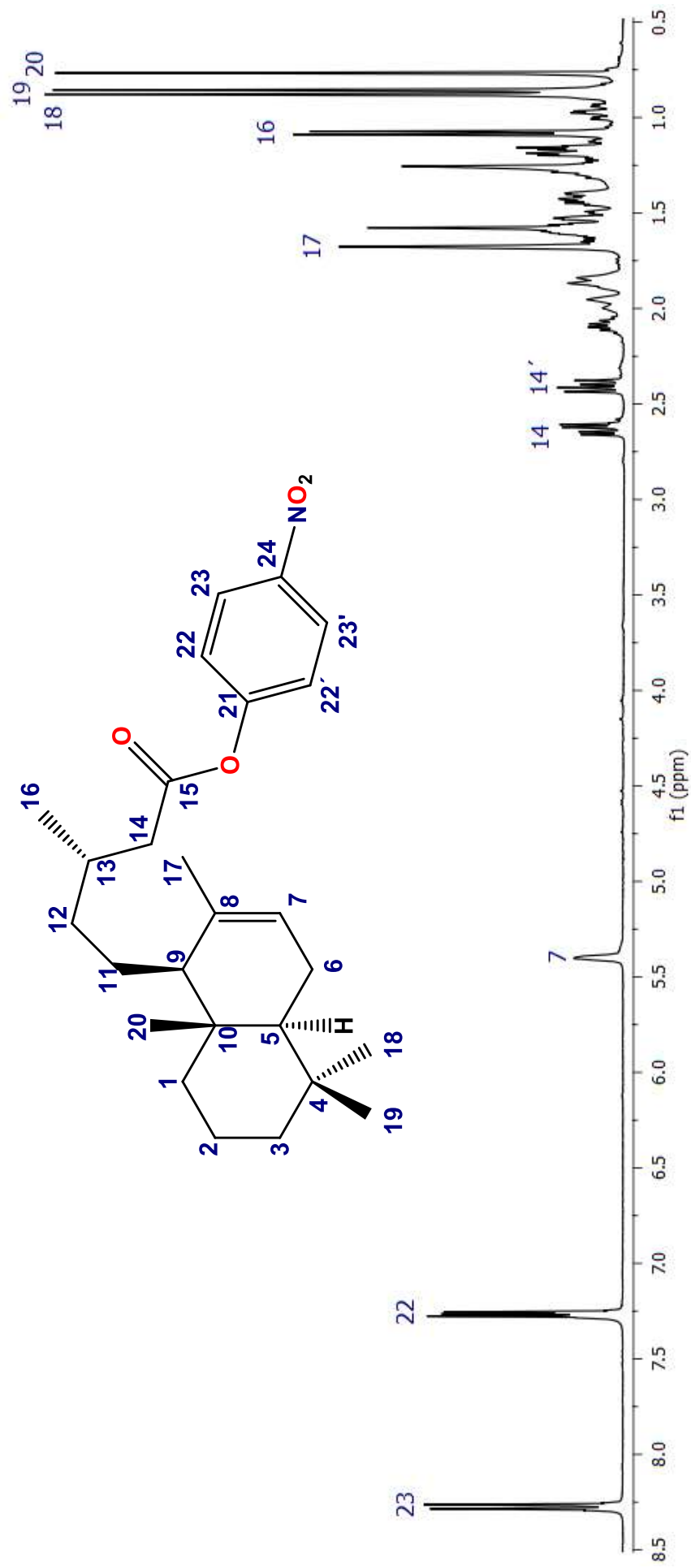


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado **62**.

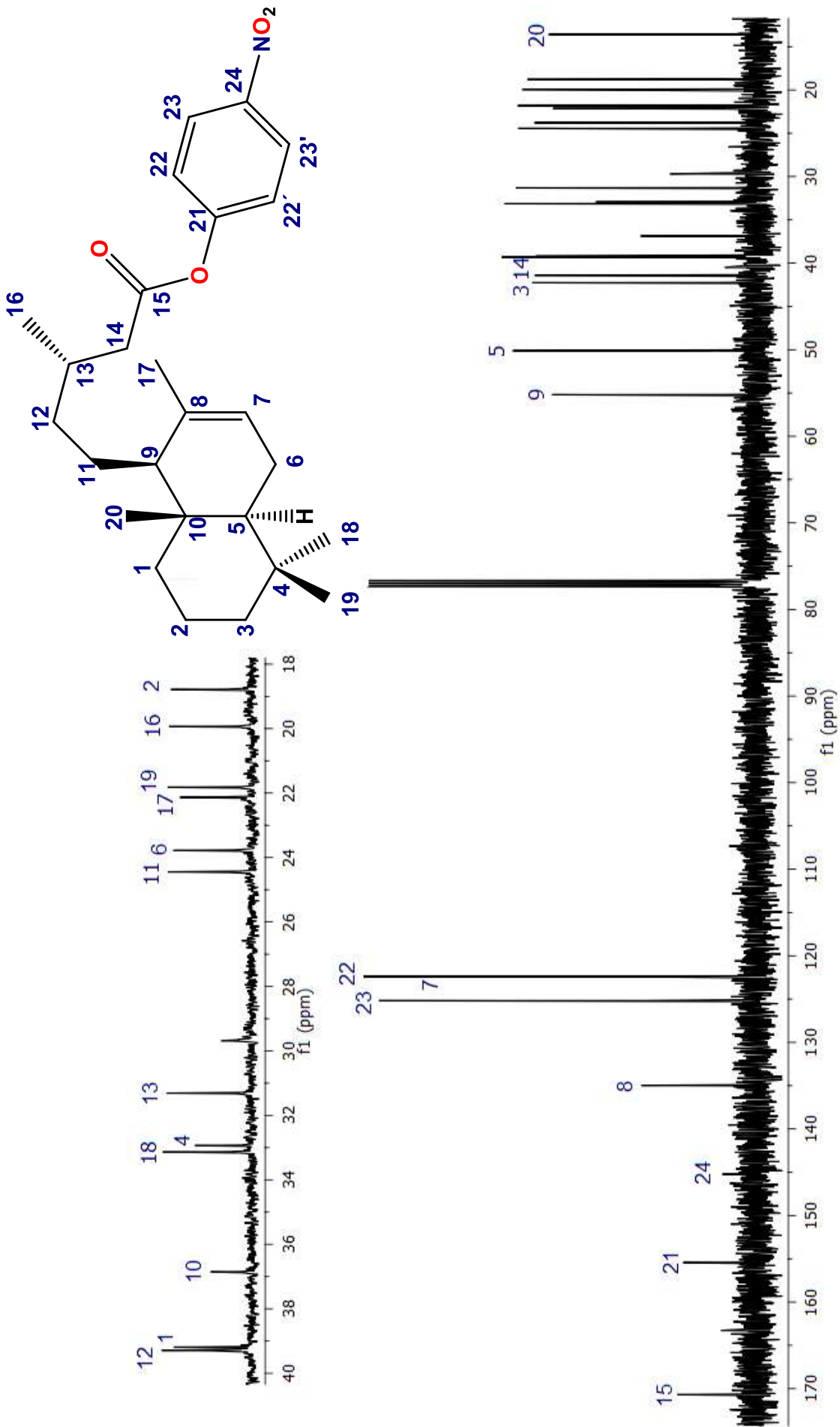


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado **62**.

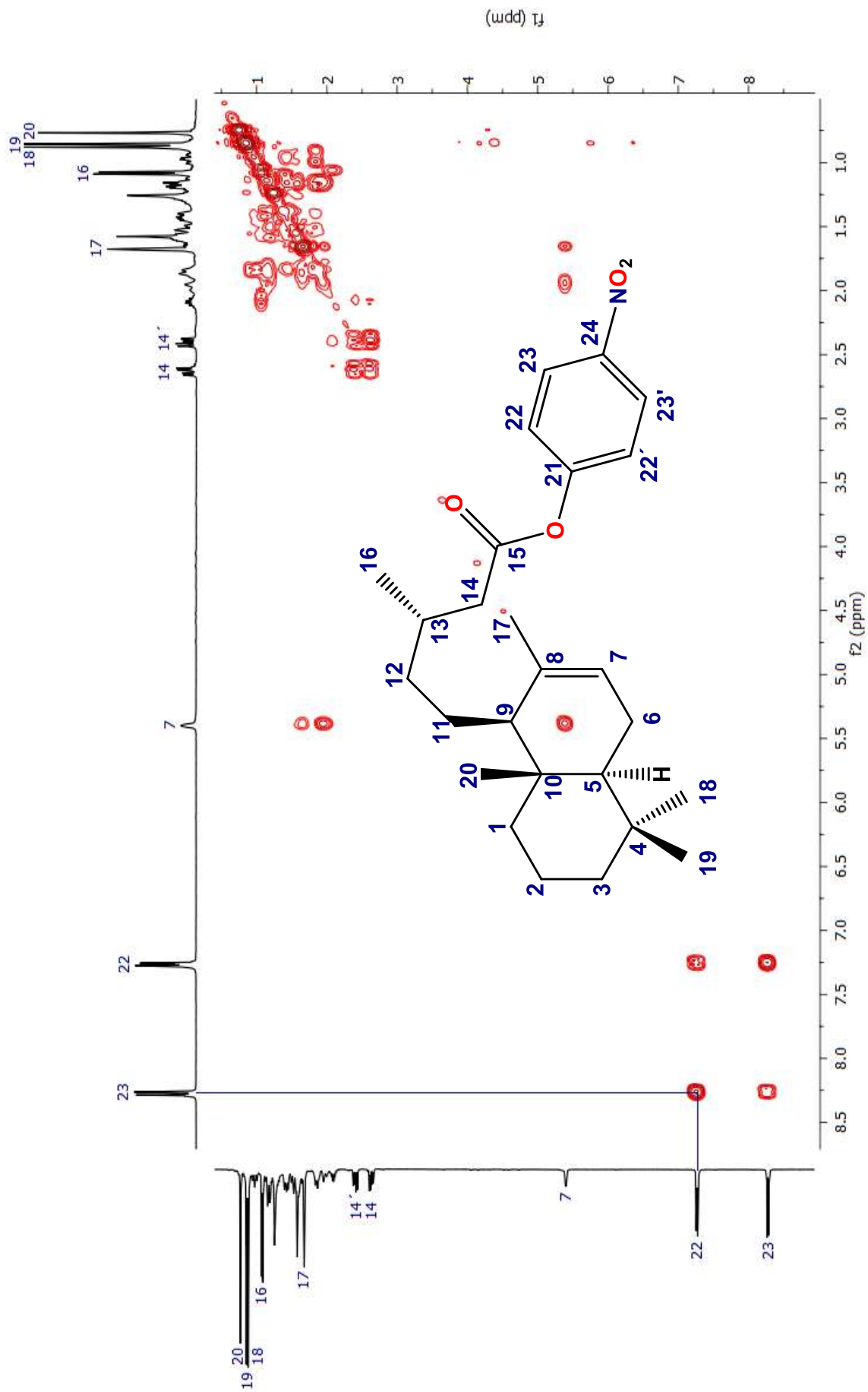


Figura 69. Espectro COSY del derivado 62.

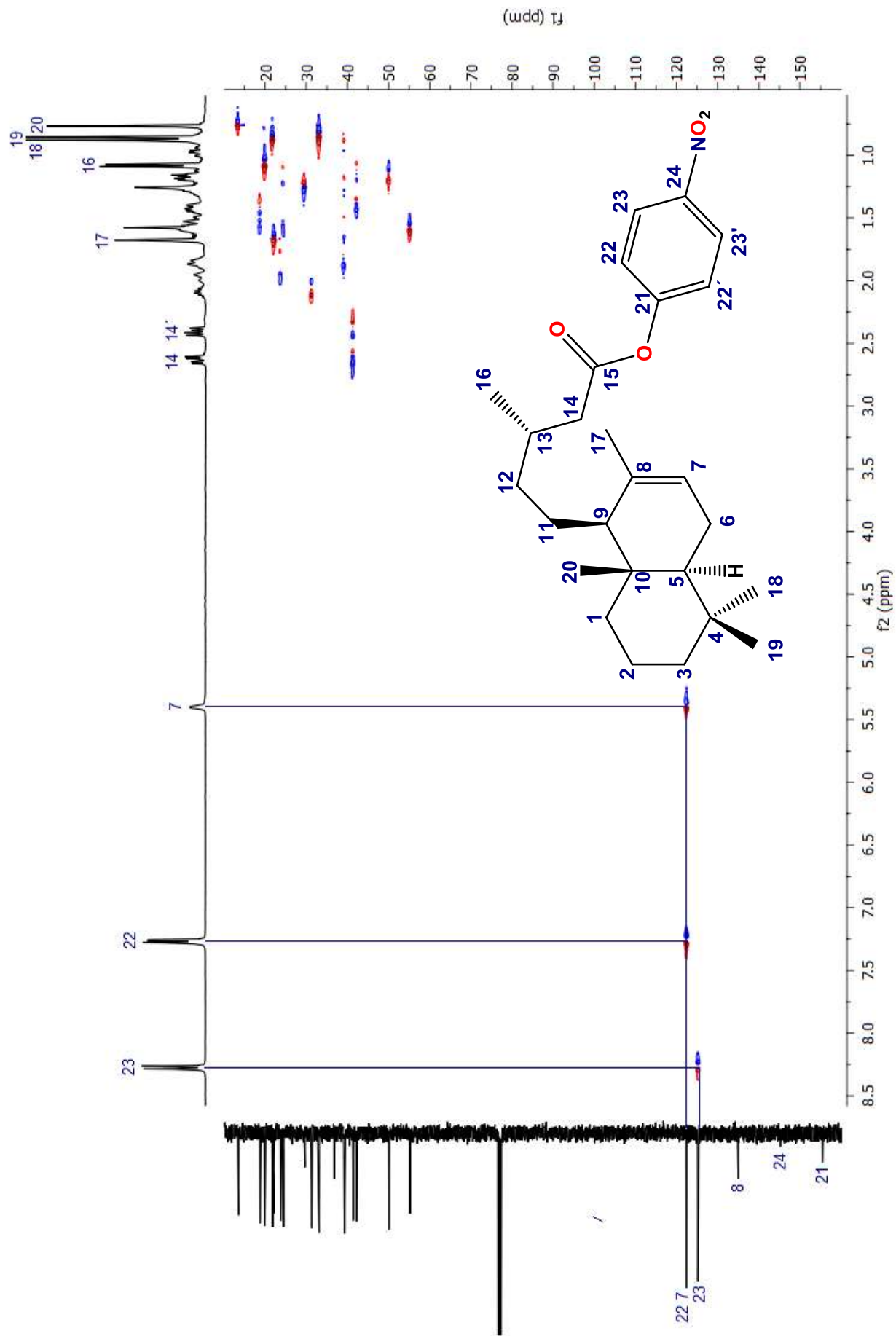


Figura 70. Espectro HSQC del derivado 62.

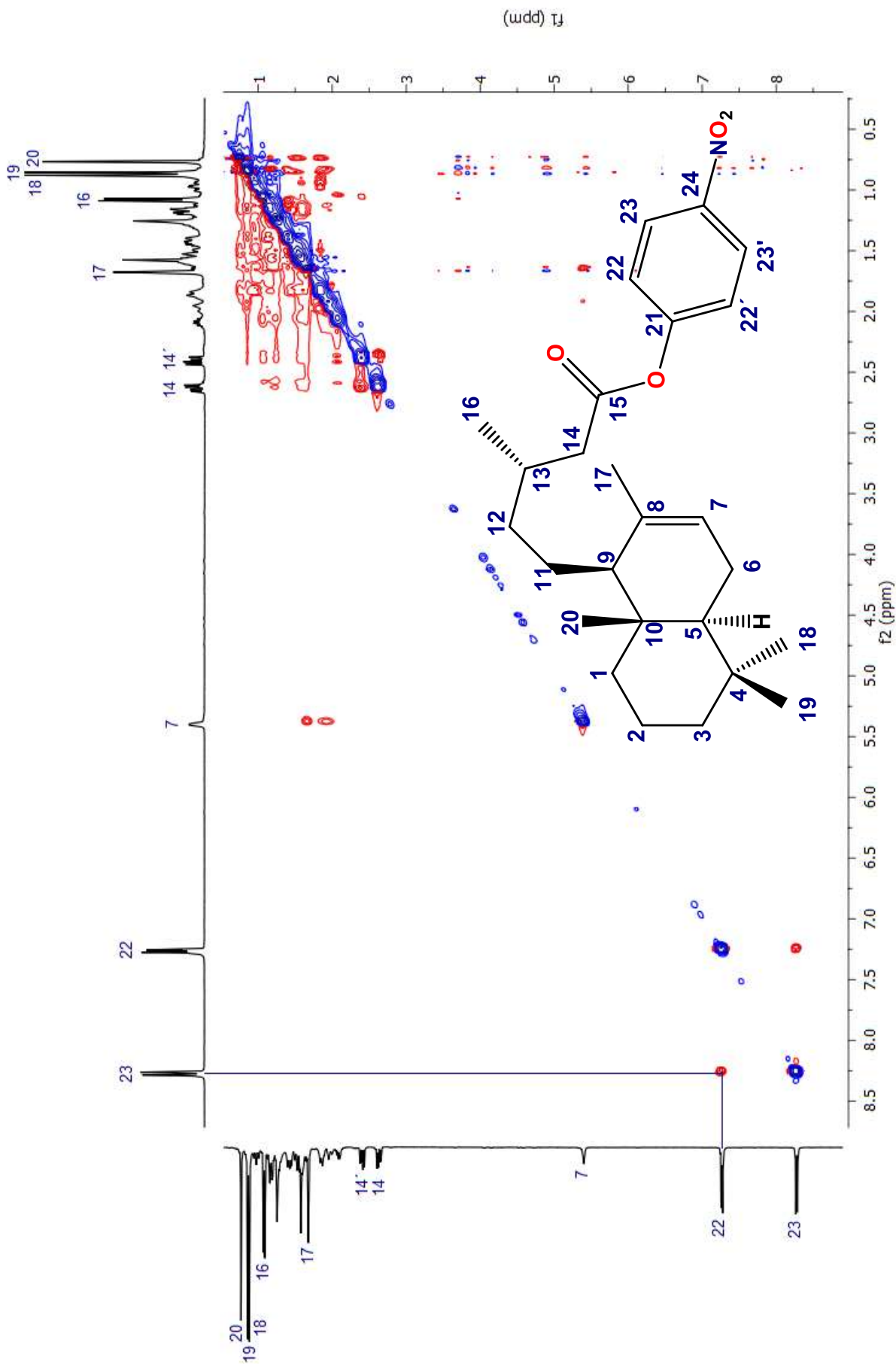


Figura 71. Espectro NOESY del derivado **62**.

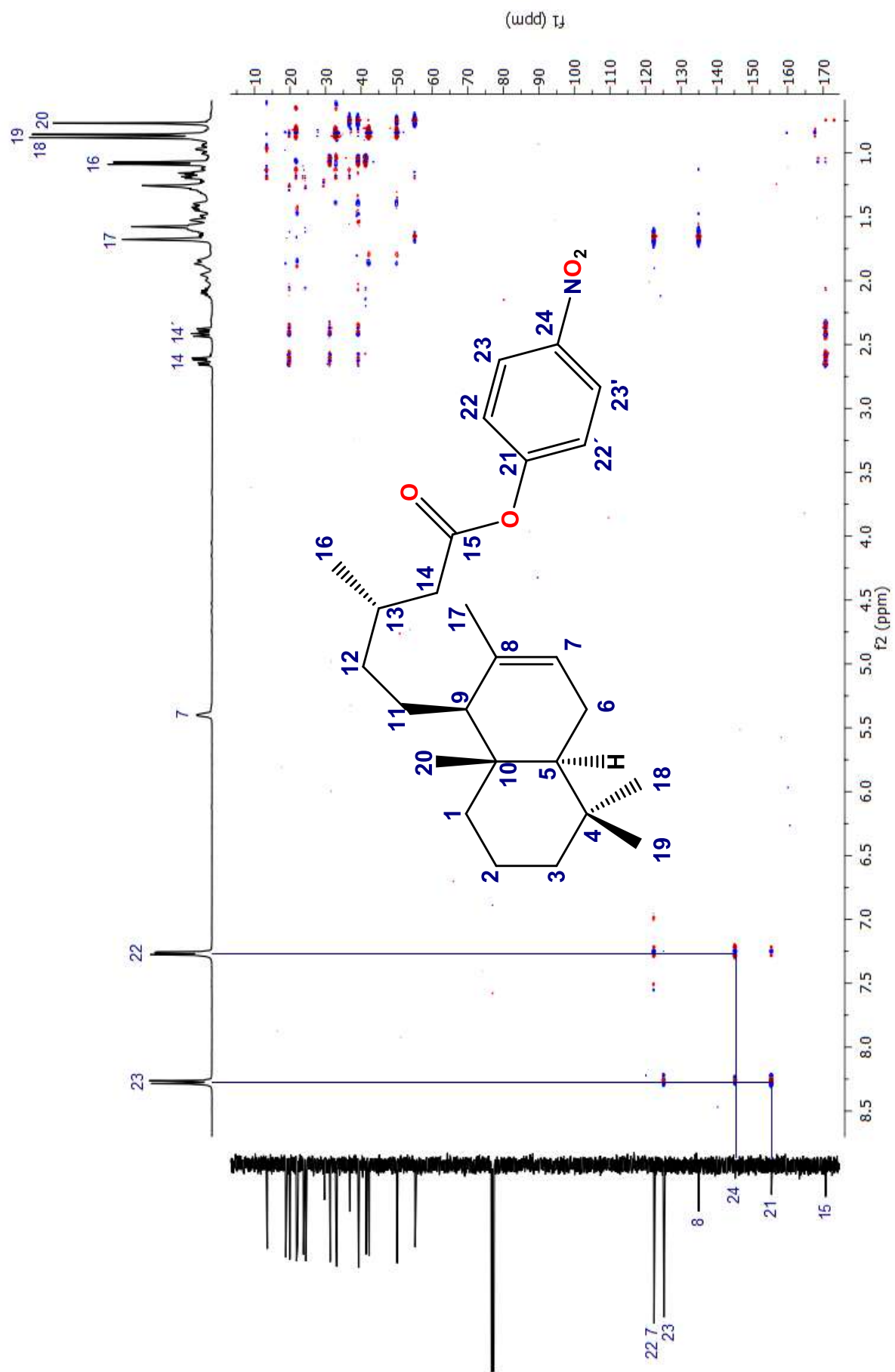


Figura 72. Espectro HMBC del derivado 62.

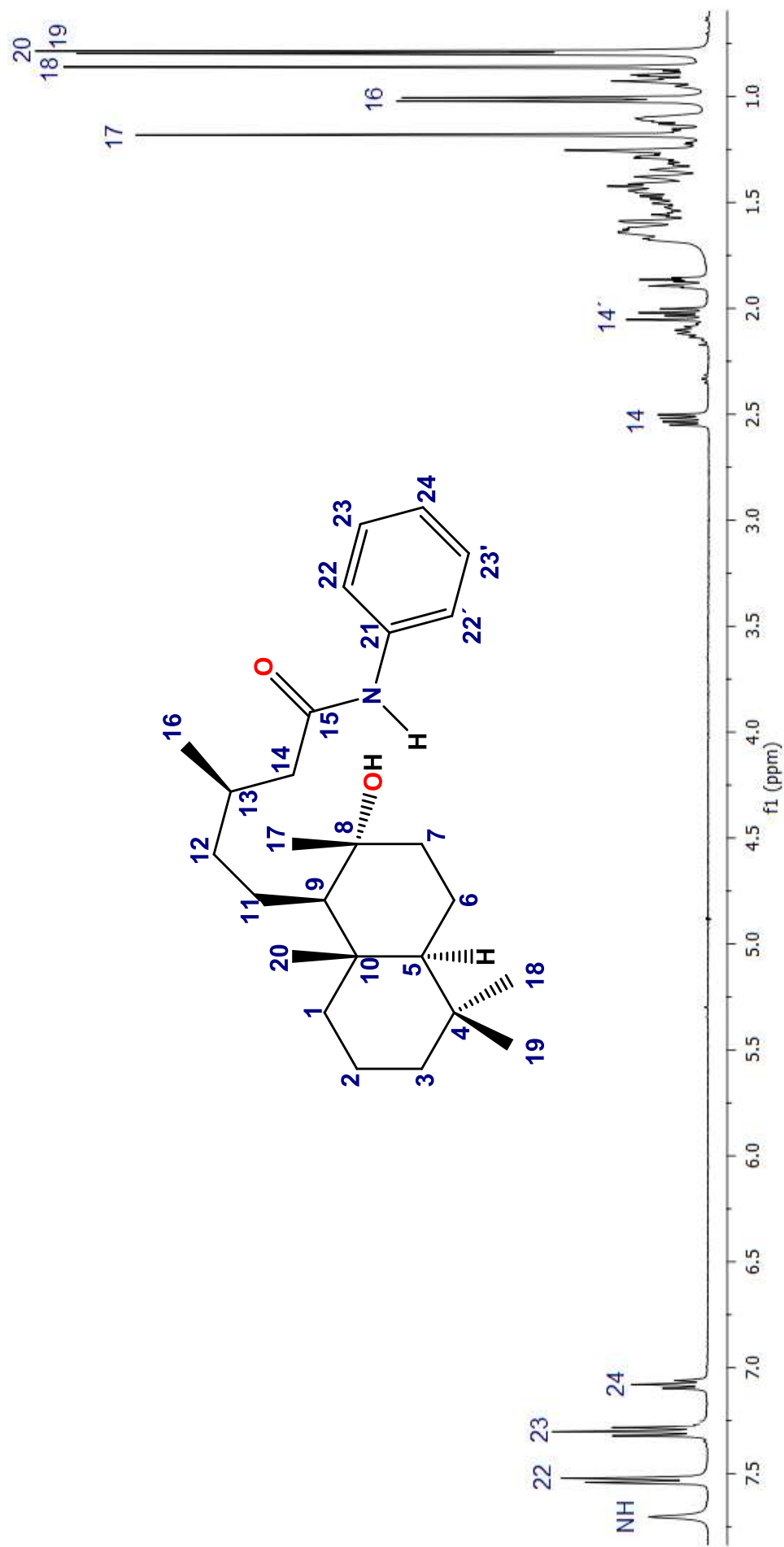


Figura 73. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado **63**.

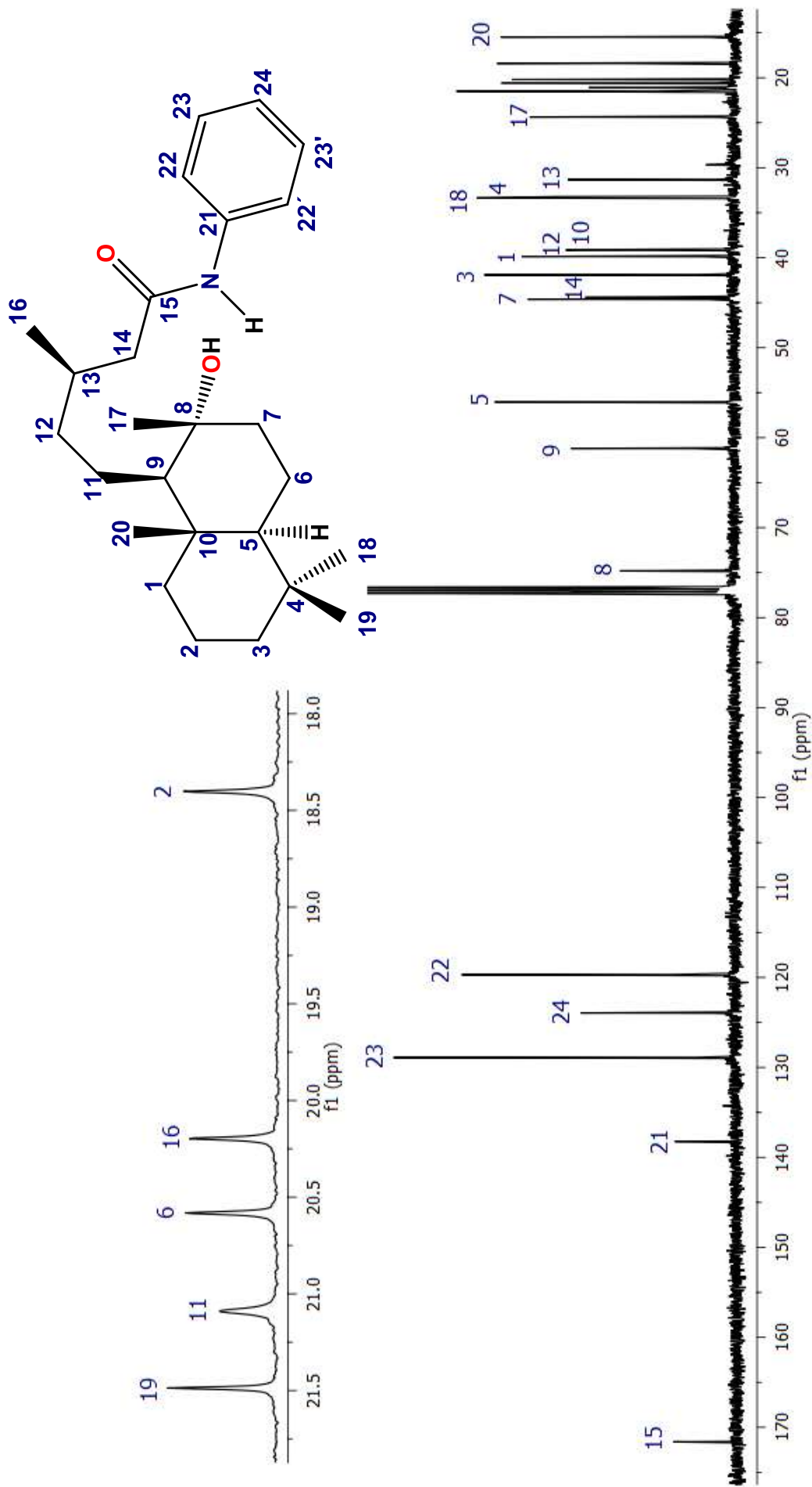


Figura 74. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 63.

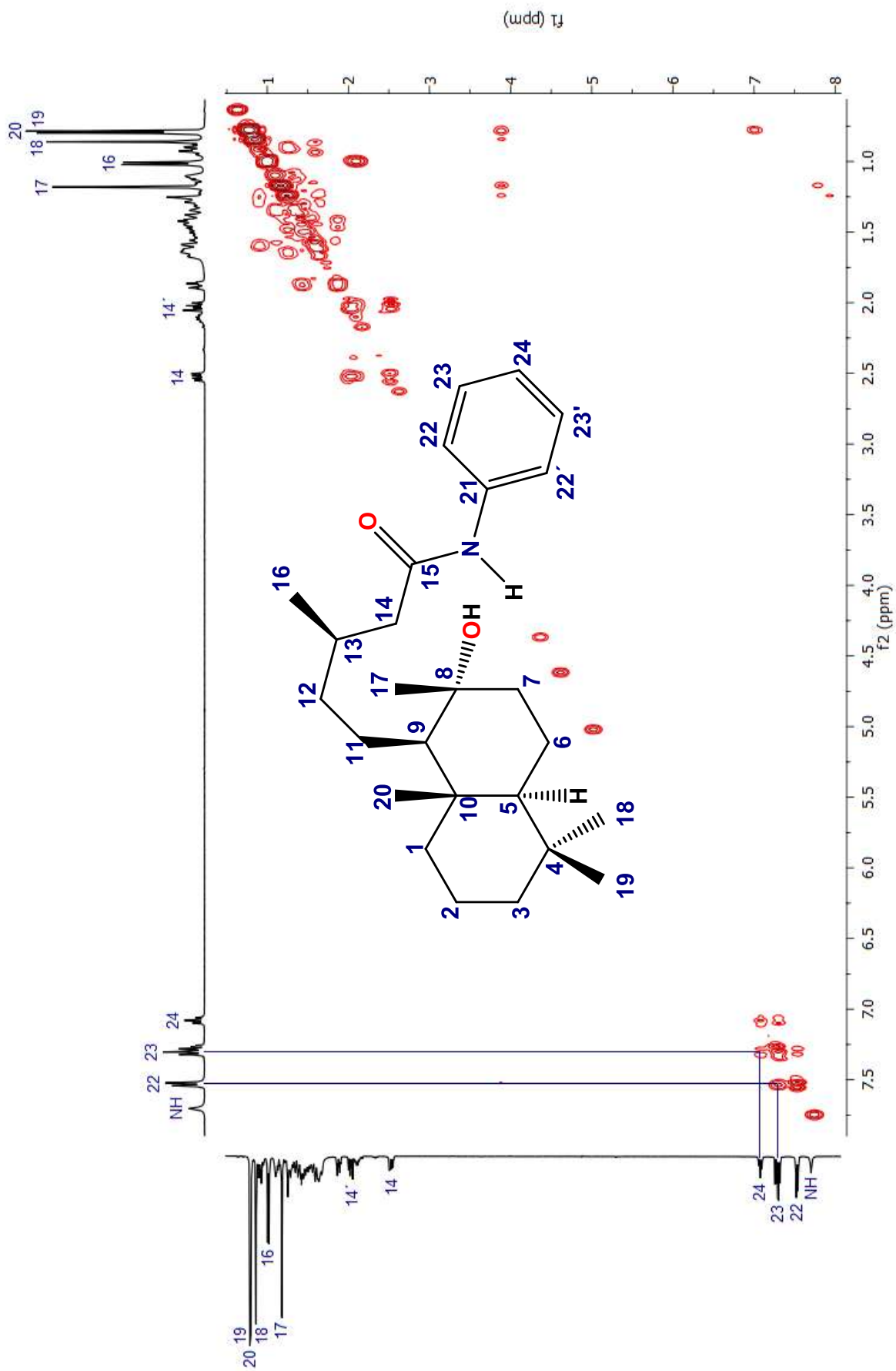


Figura 75. Espectro COSY del derivado **63**.

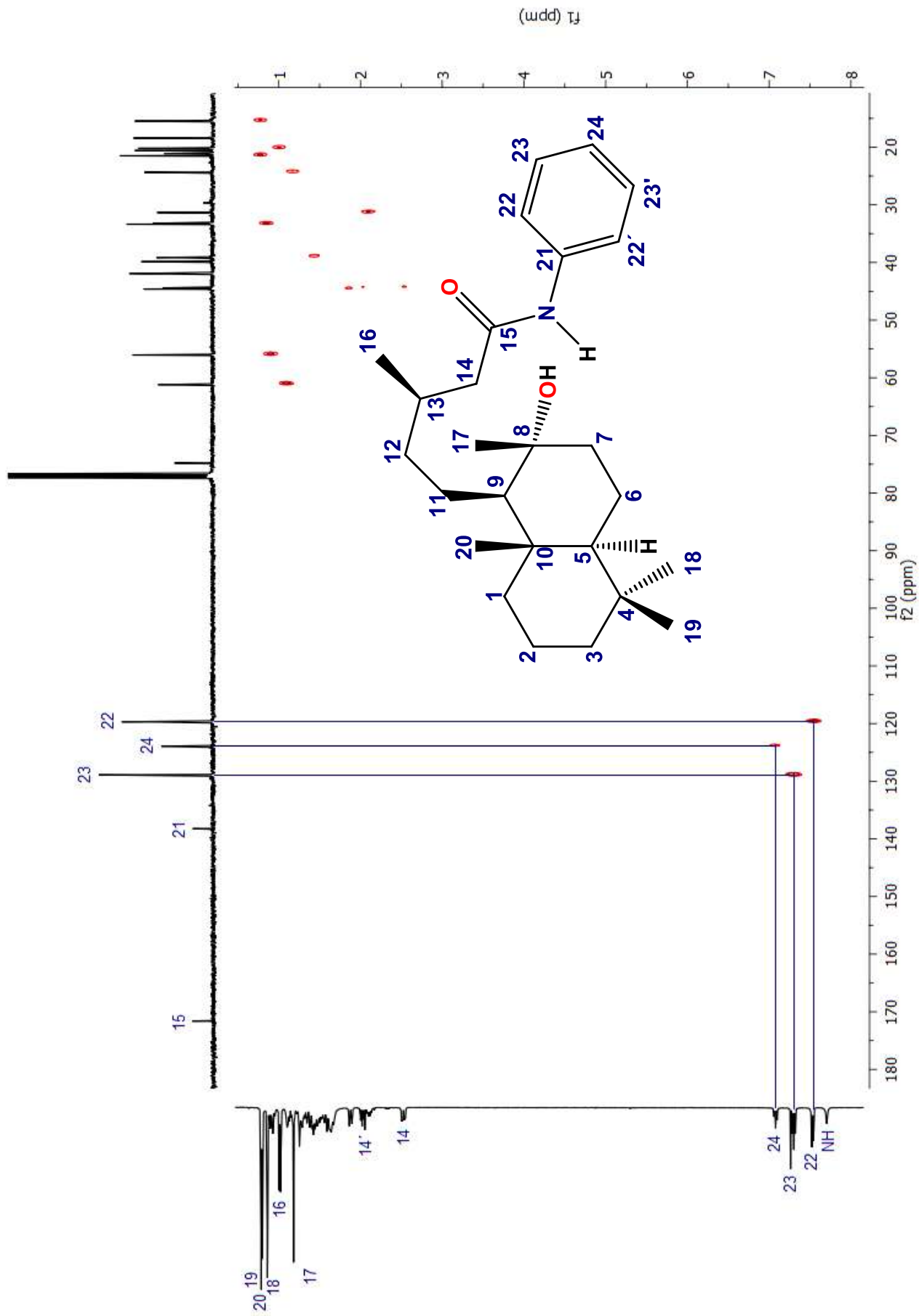


Figura 76. Espectro HETCOR del derivado 63.

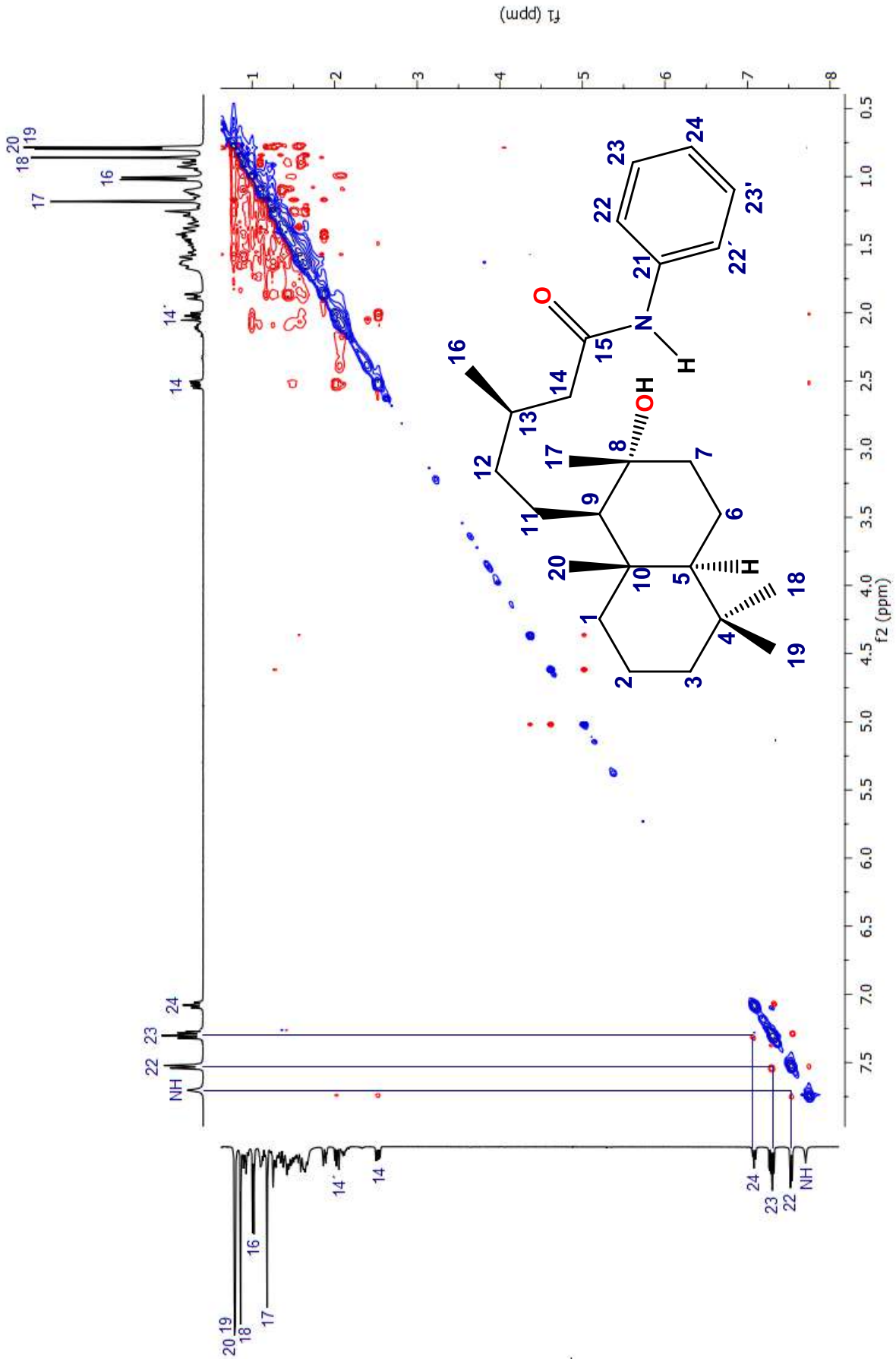


Figura 77. Espectro NOESY del derivado 63.

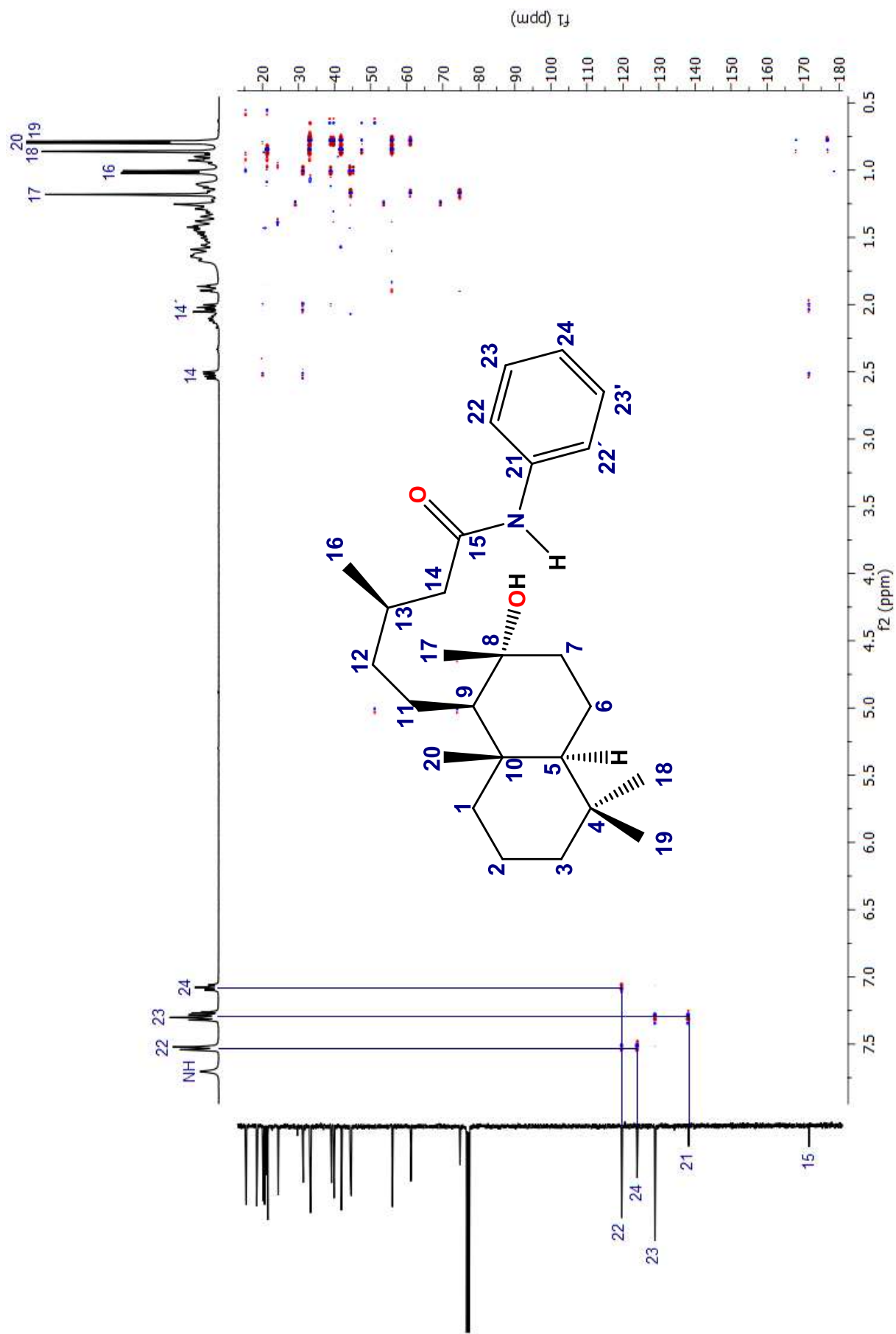


Figura 78. Espectro HMBC del derivado 63.

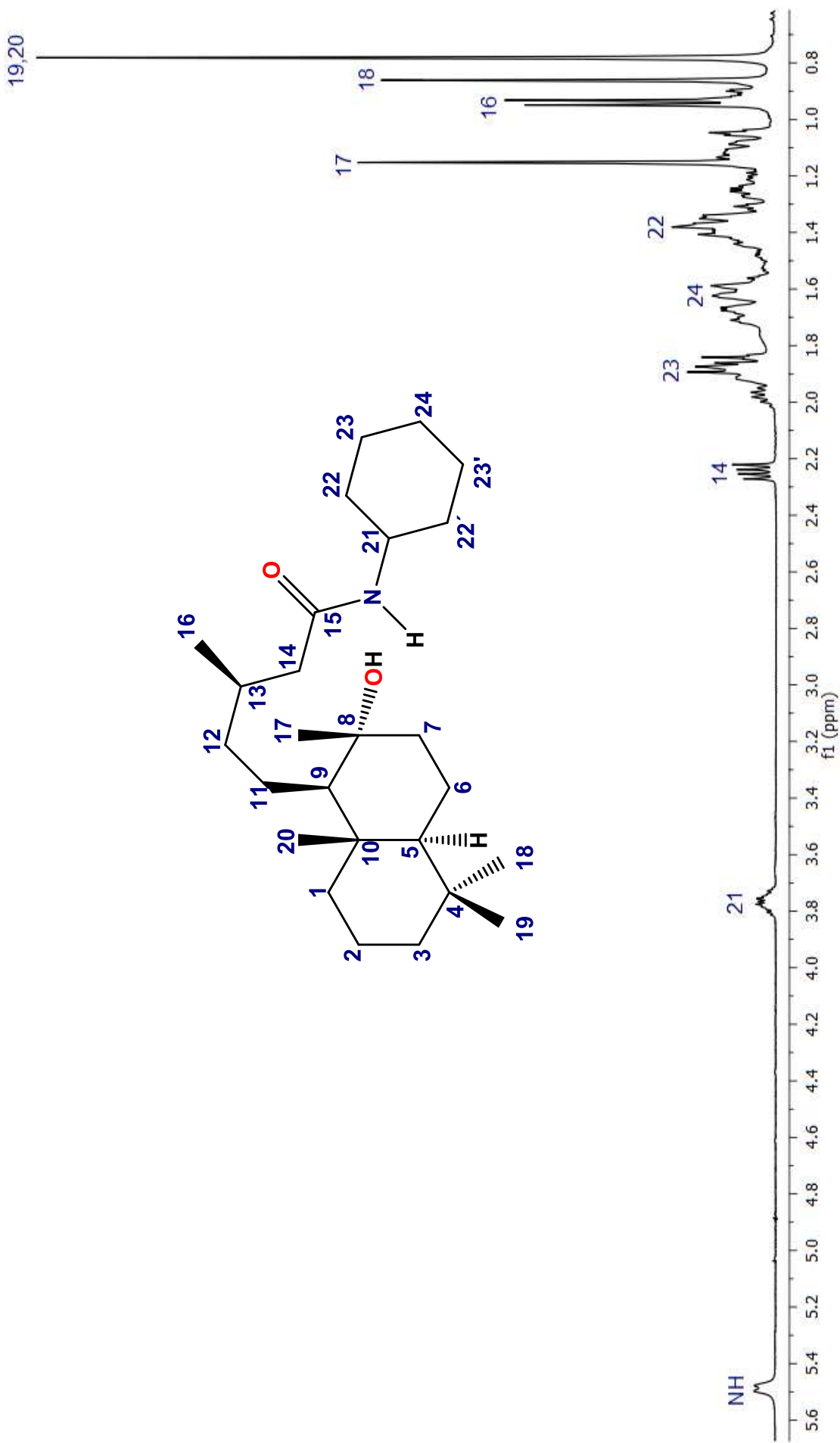


Figura 79. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado **64**.

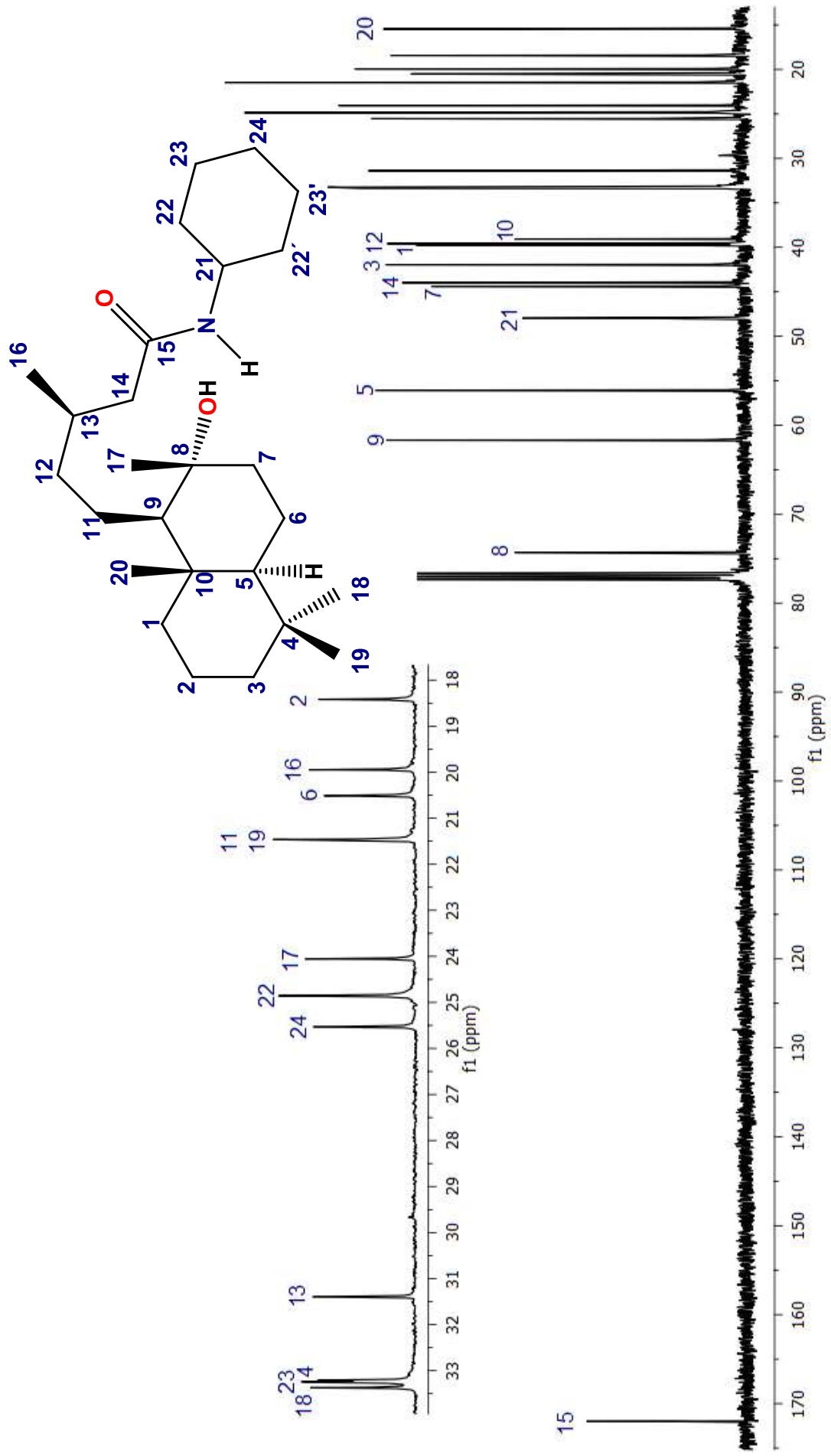


Figura 80. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado **64**.

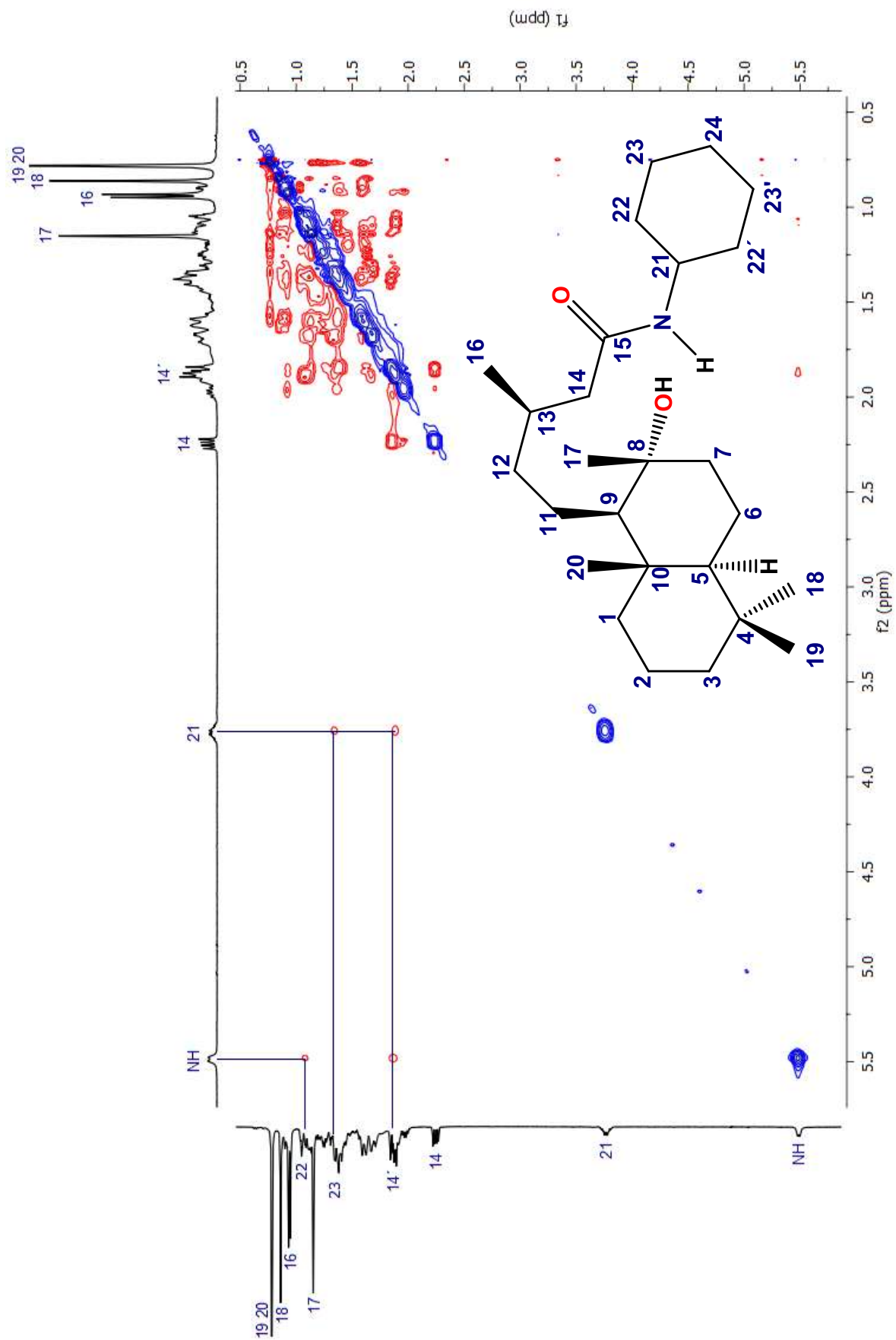


Figura 83. Espectro NOESY del derivado **64**.

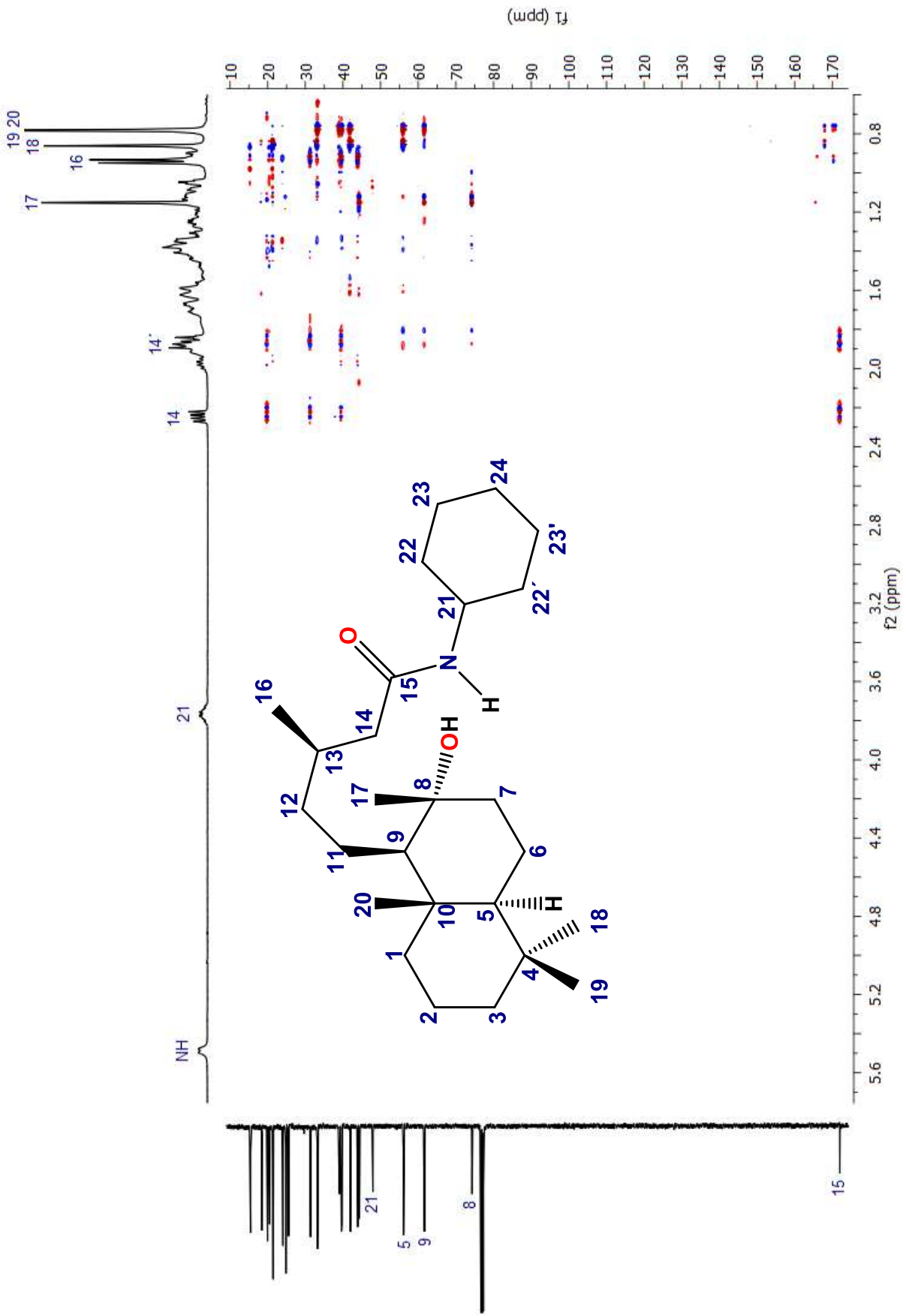


Figura 84. Espectro HMBC del derivado 64.

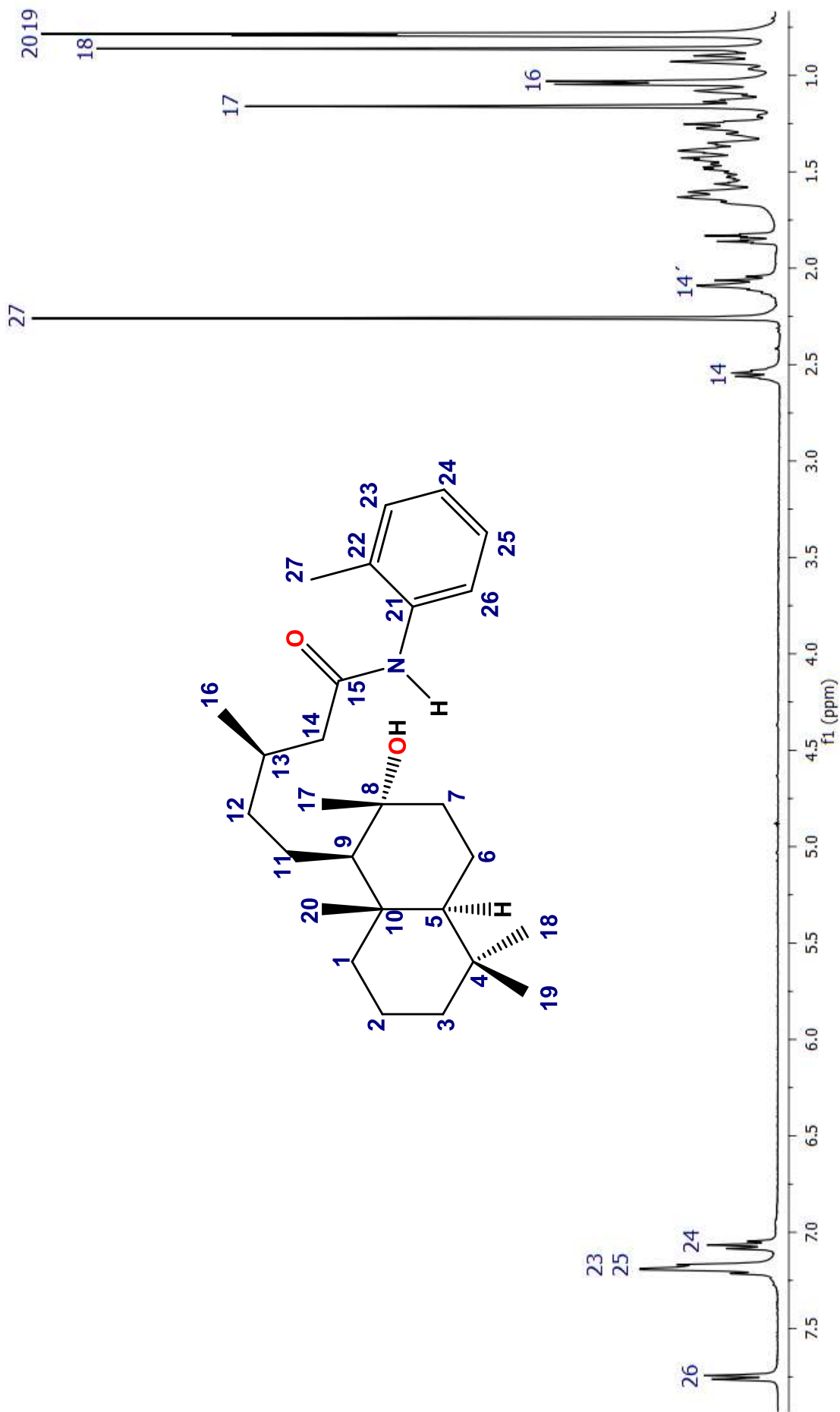


Figura 85. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado **65**.

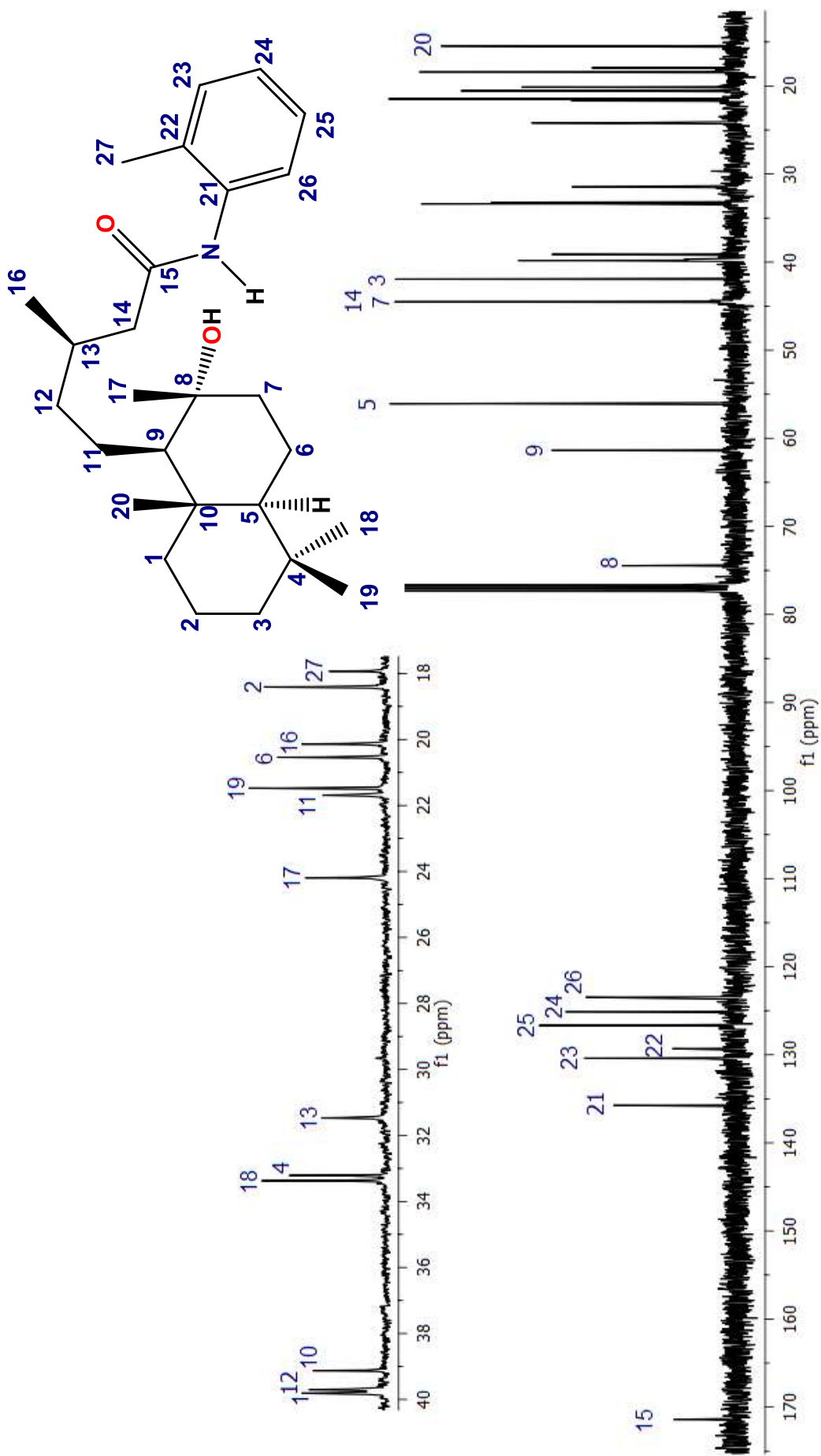


Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado **65**.

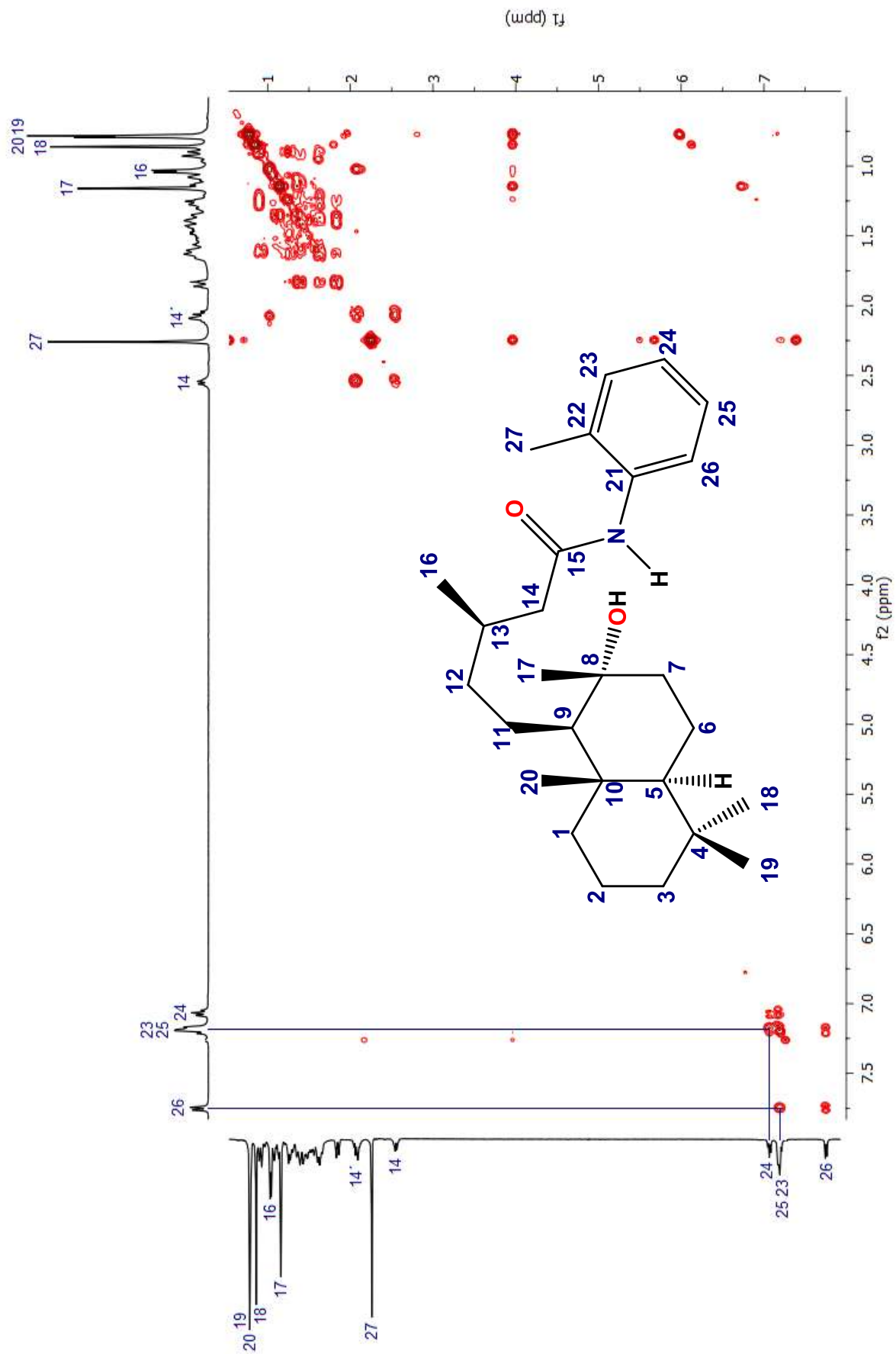


Figura 87. Espectro COSY del derivado 65.

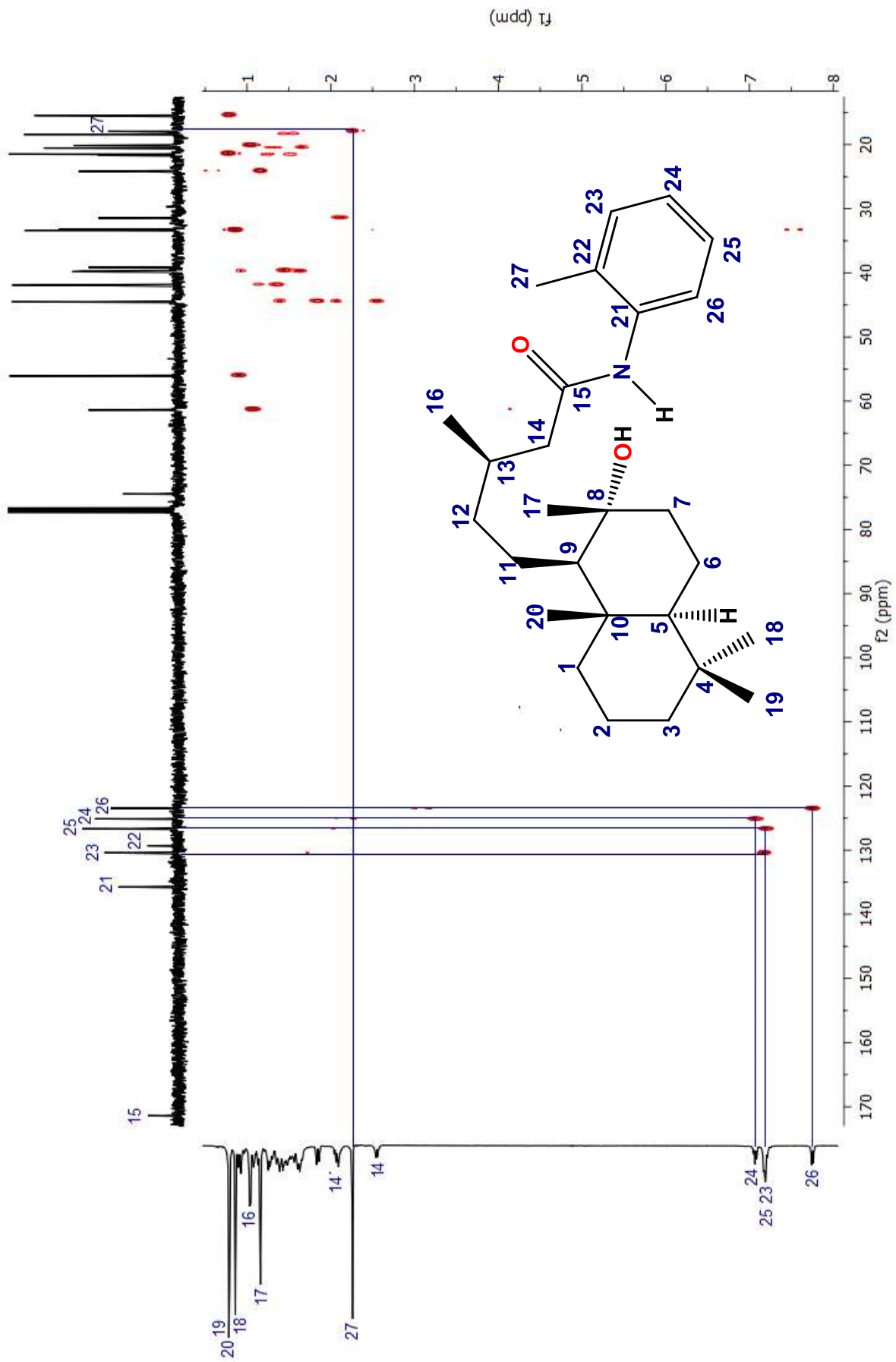


Figura 88. Espectro HETCOR del derivado 65.

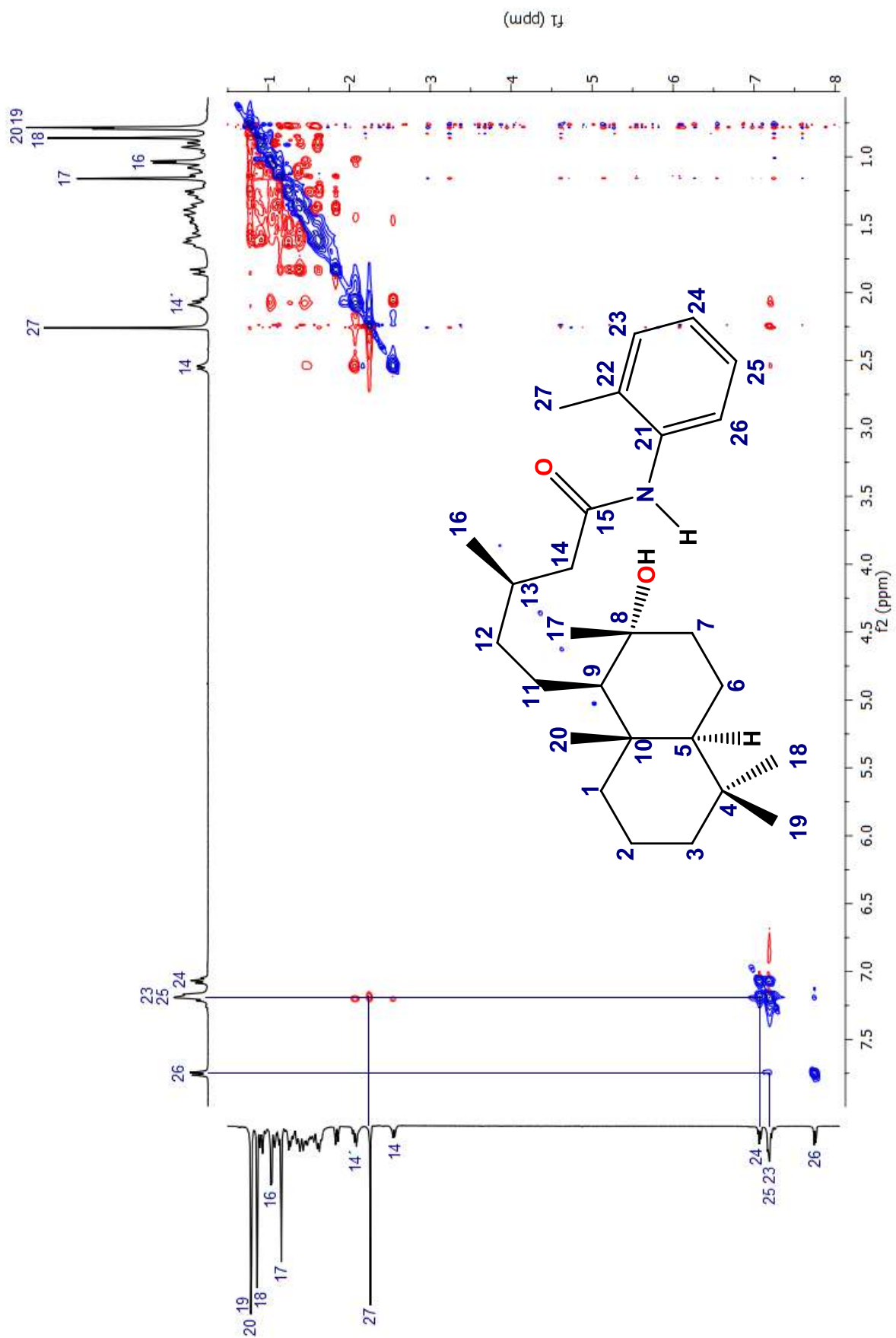


Figura 89. Espectro NOESY del derivado **65**.

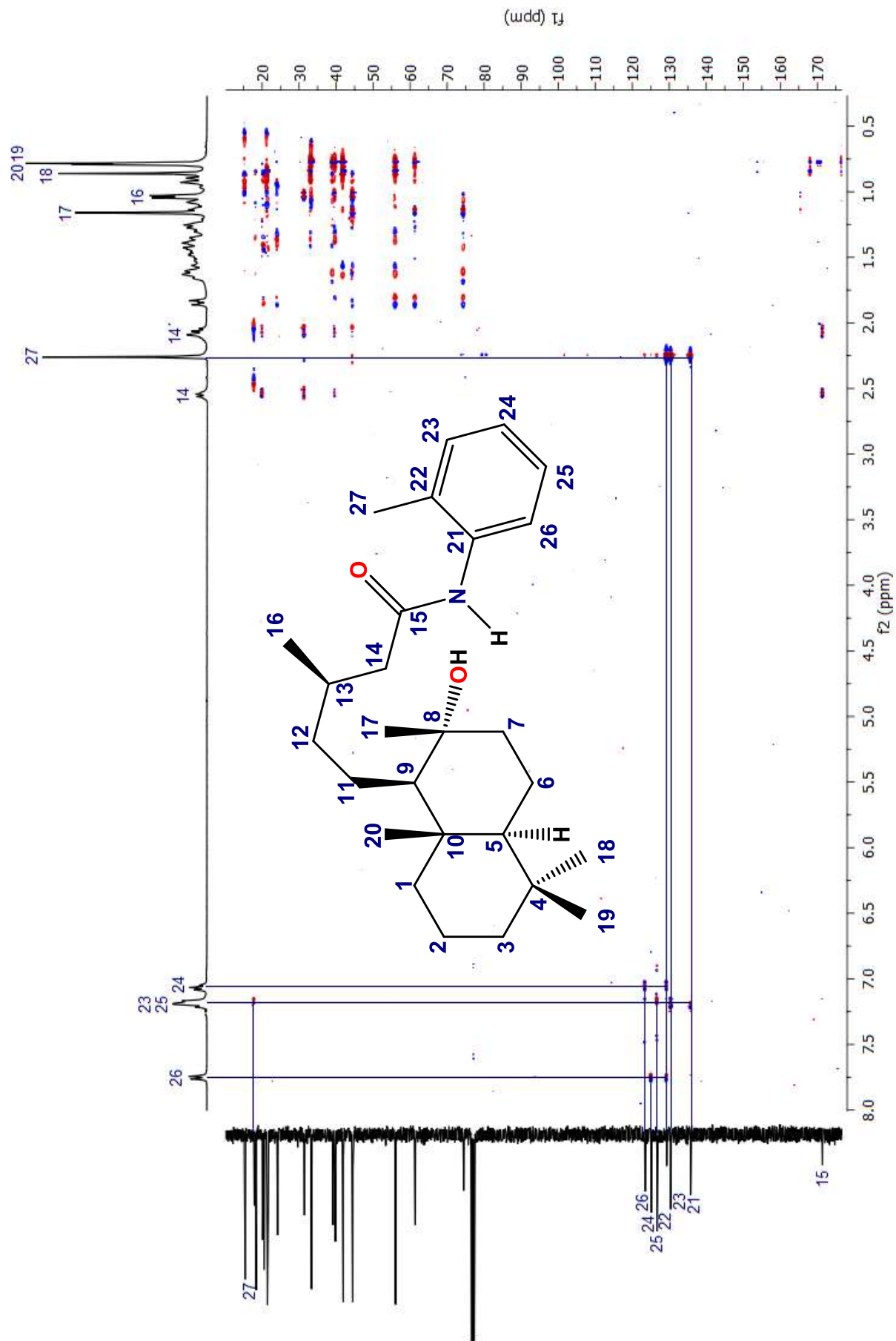


Figura 90. Espectro HMBC del derivado **65**.

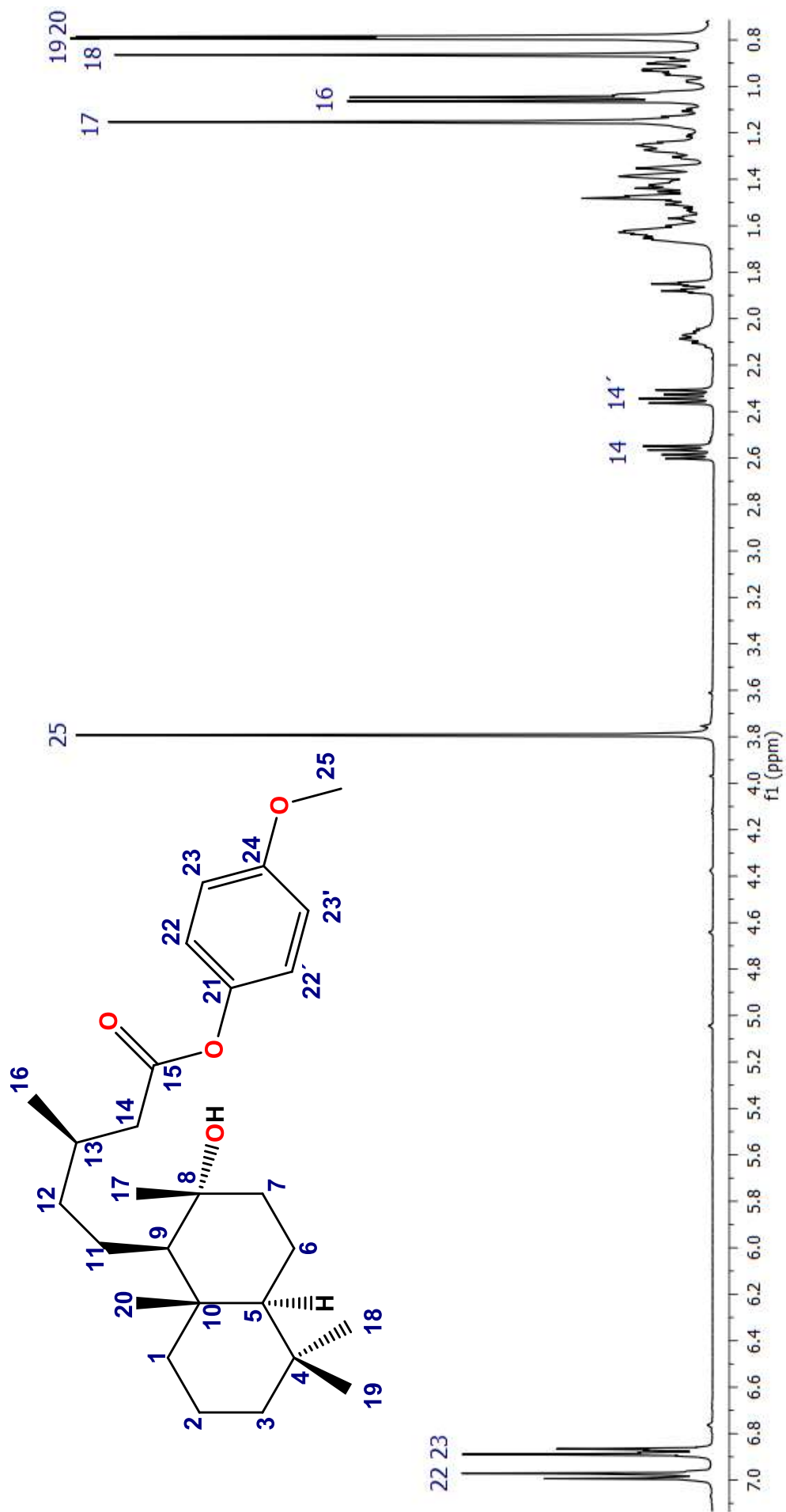


Figura 91. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado 66.

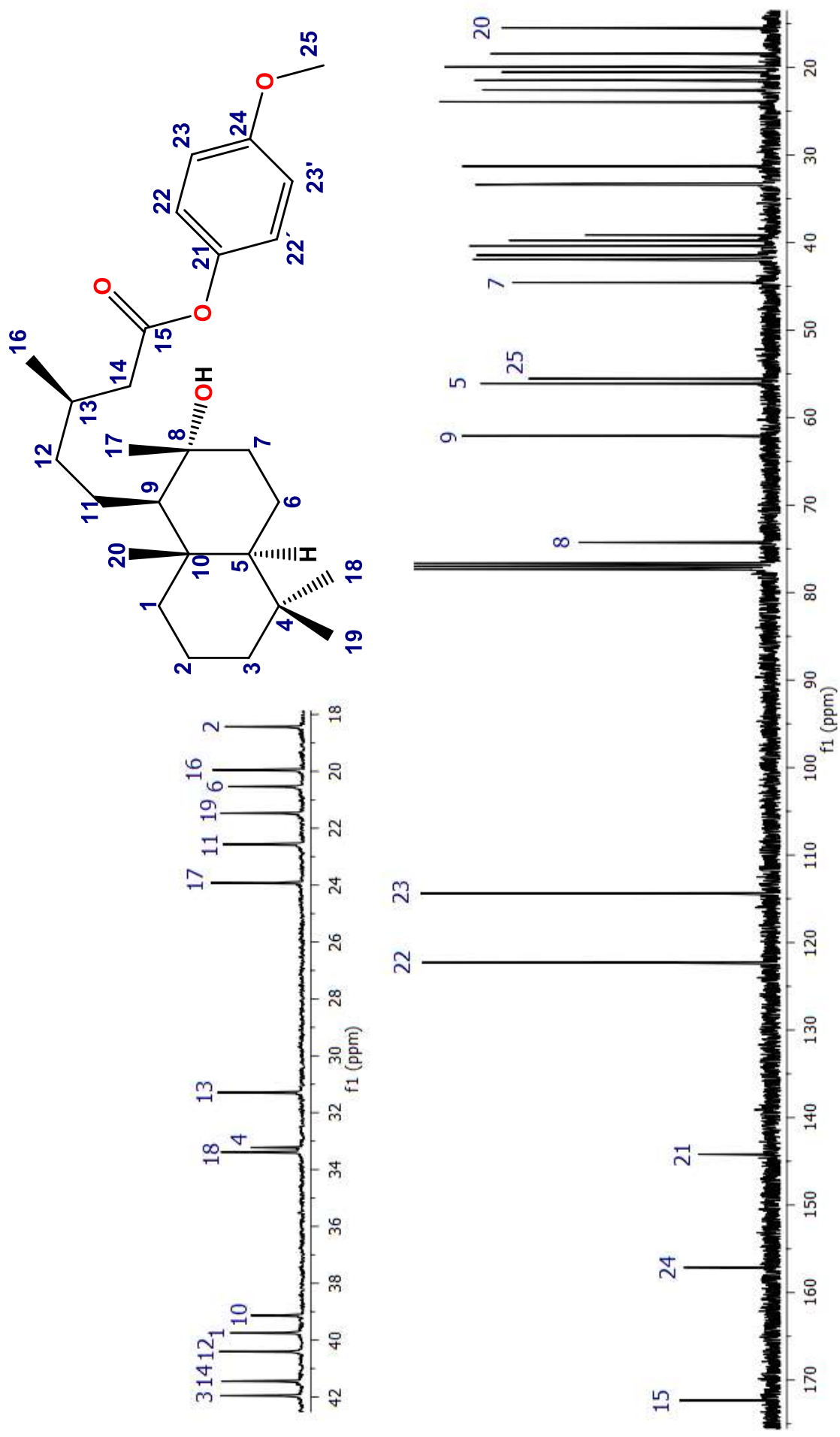


Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado 66.

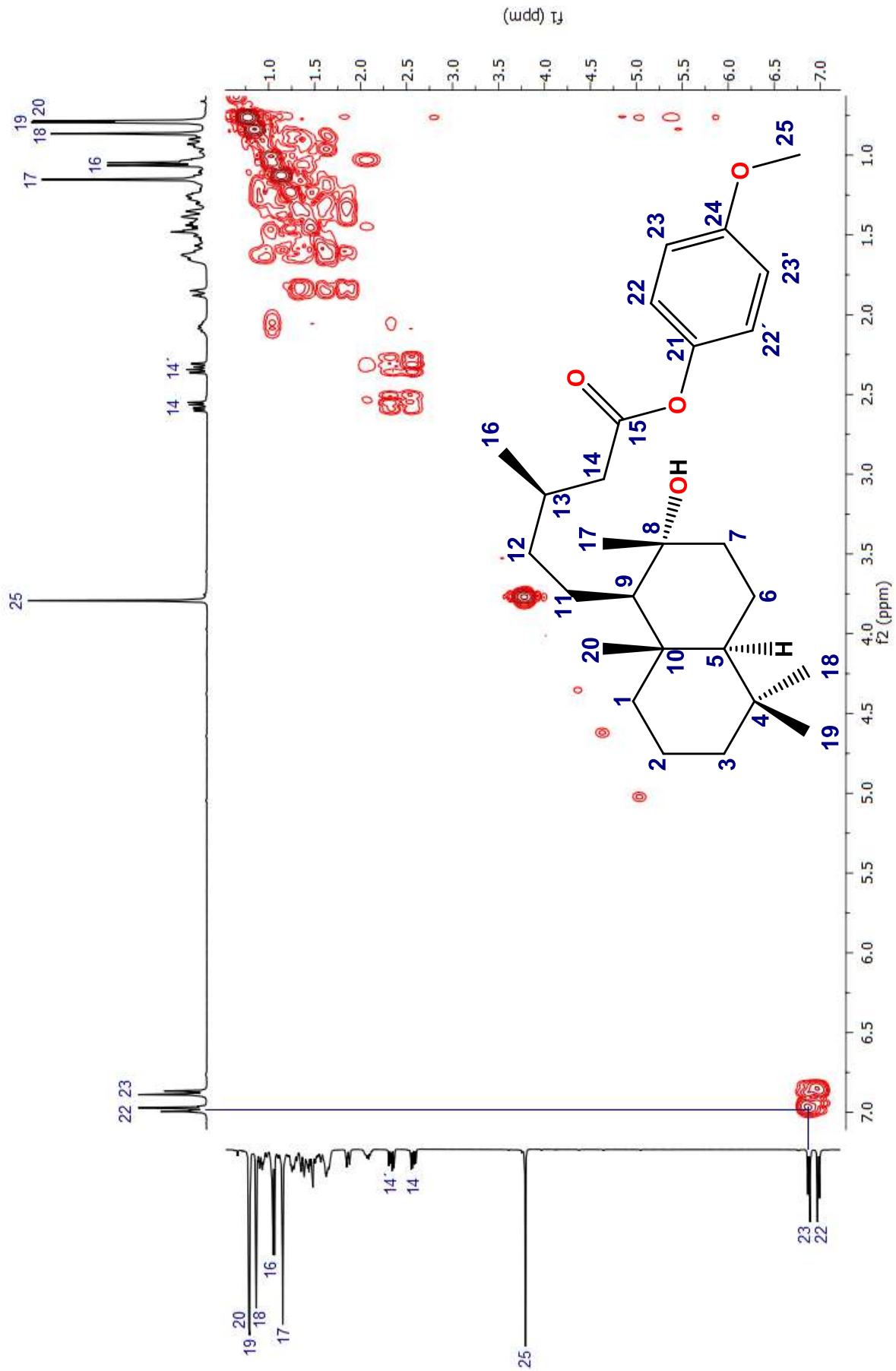


Figura 93. Espectro COSY del derivado 66.

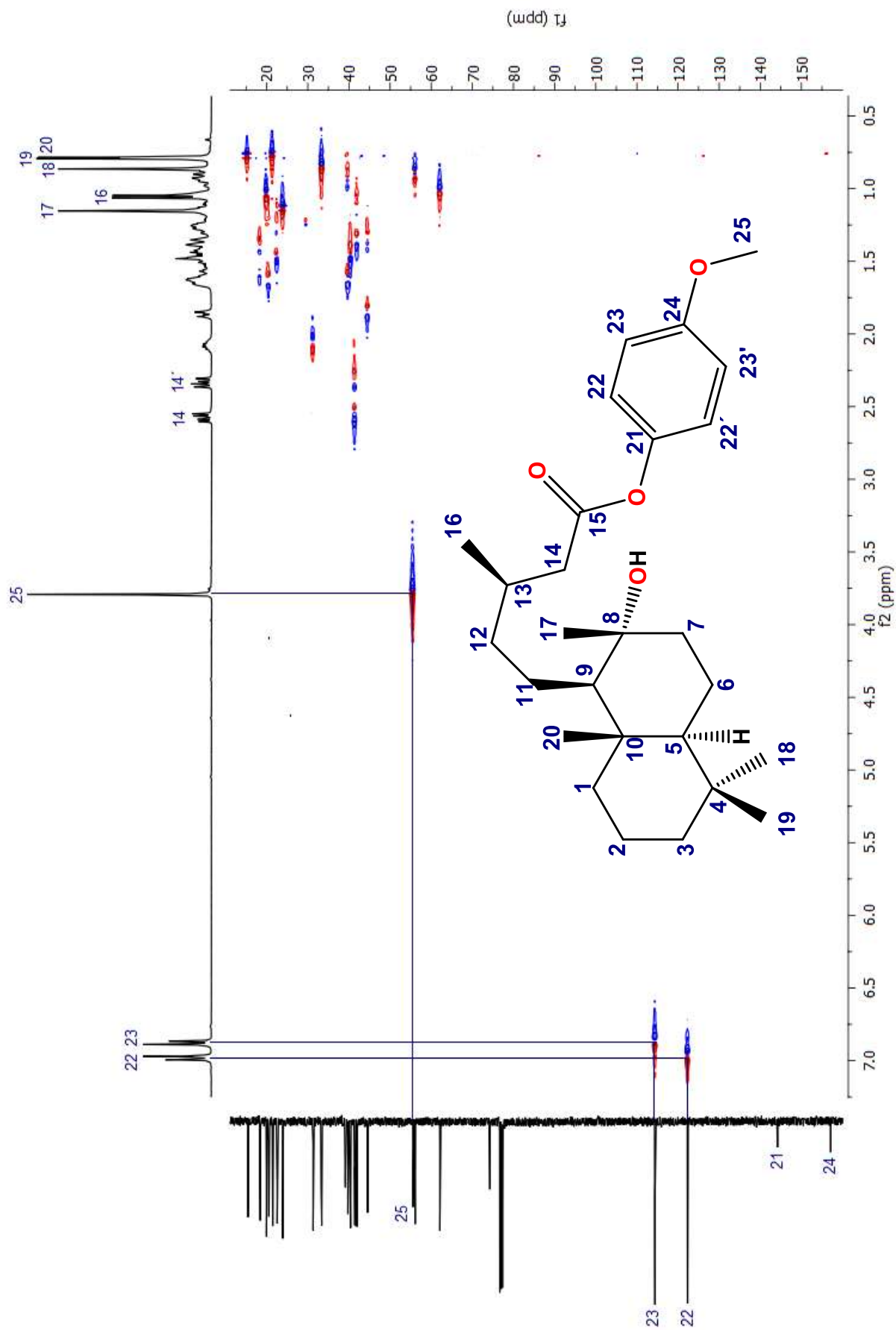


Figura 94. Espectro HSQC del derivado **66**.

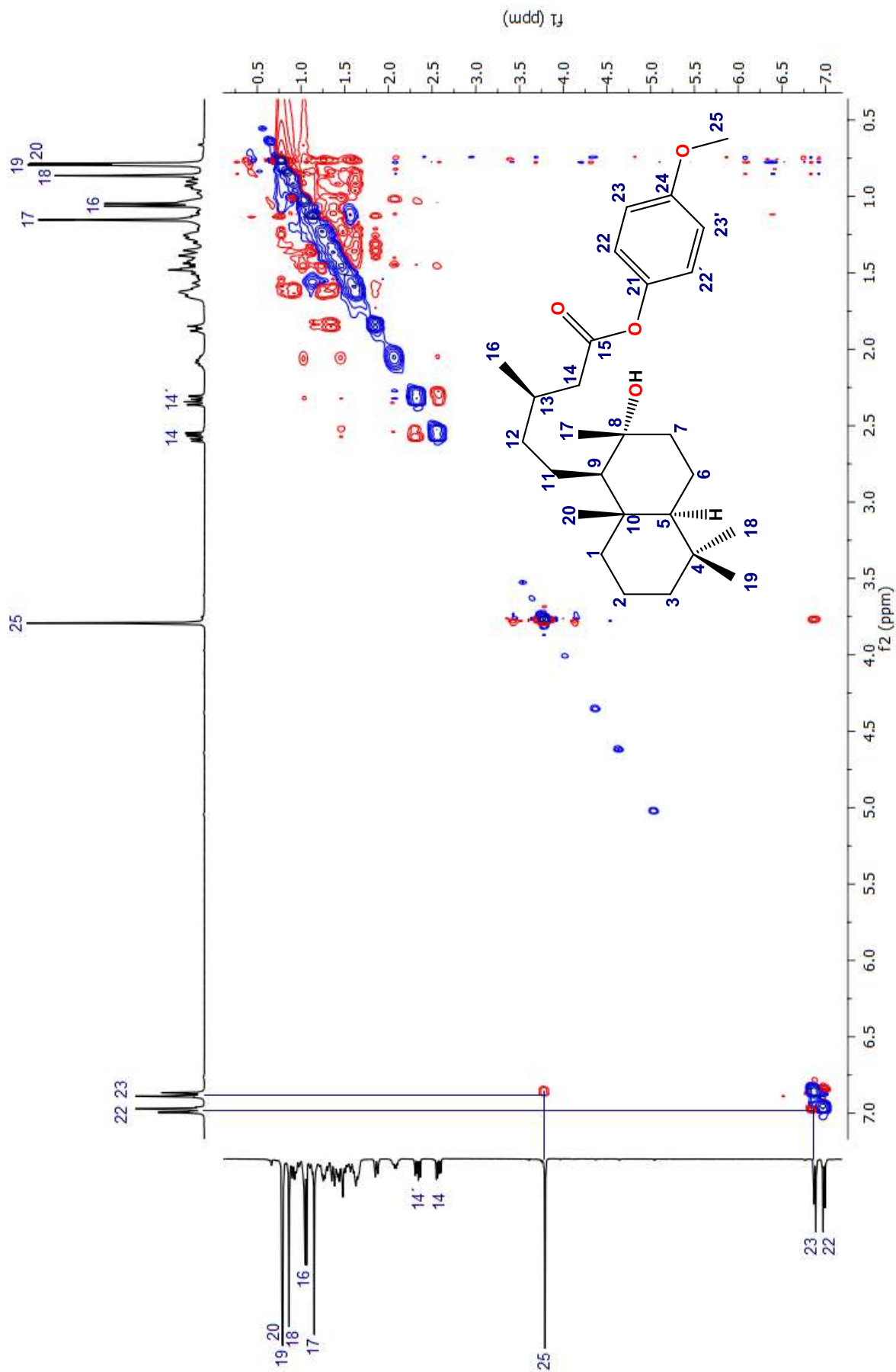


Figura 95. Espectro NOESY del derivado **66**.

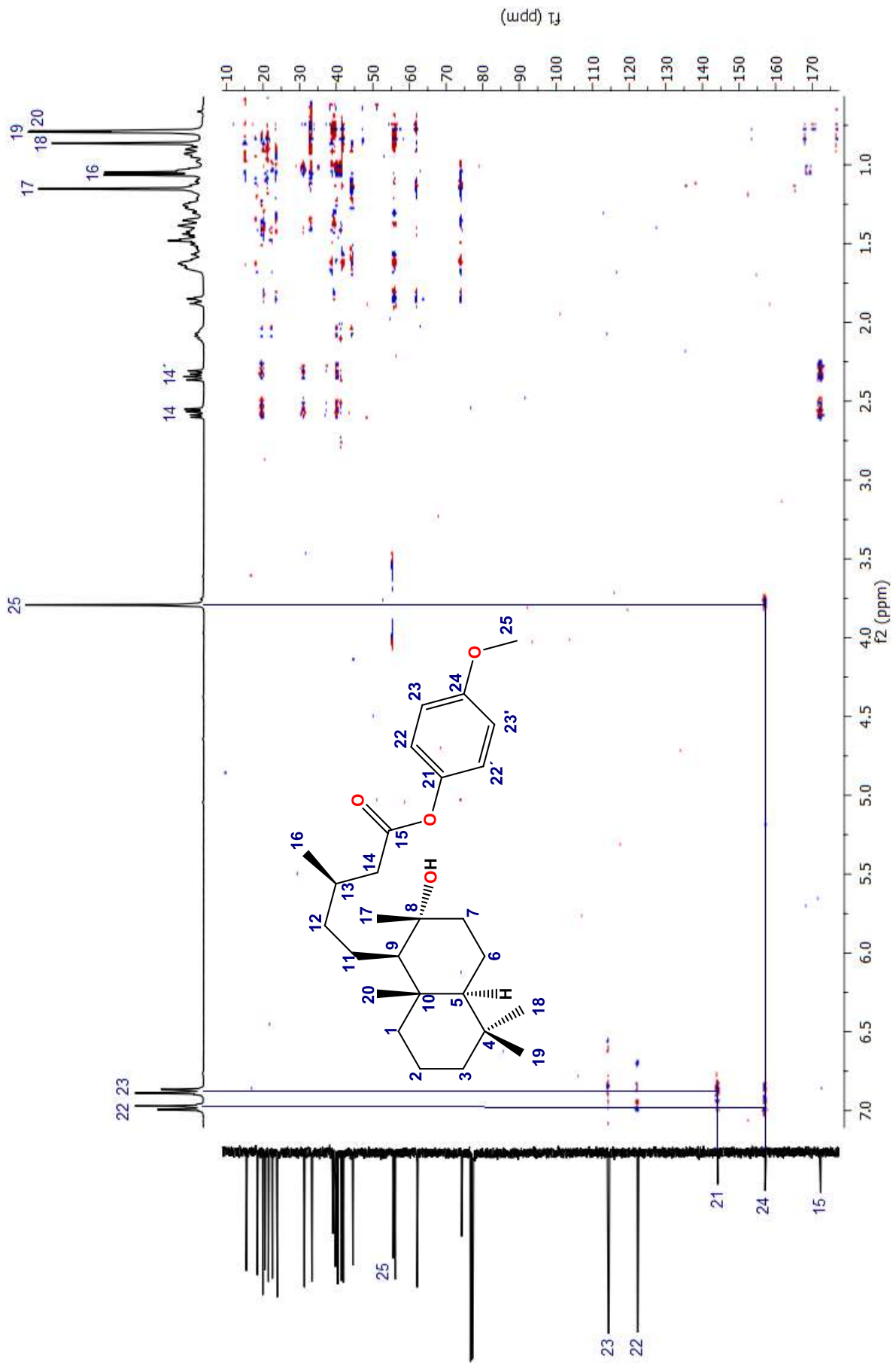


Figura 96. Espectro HMBC del derivado 66.

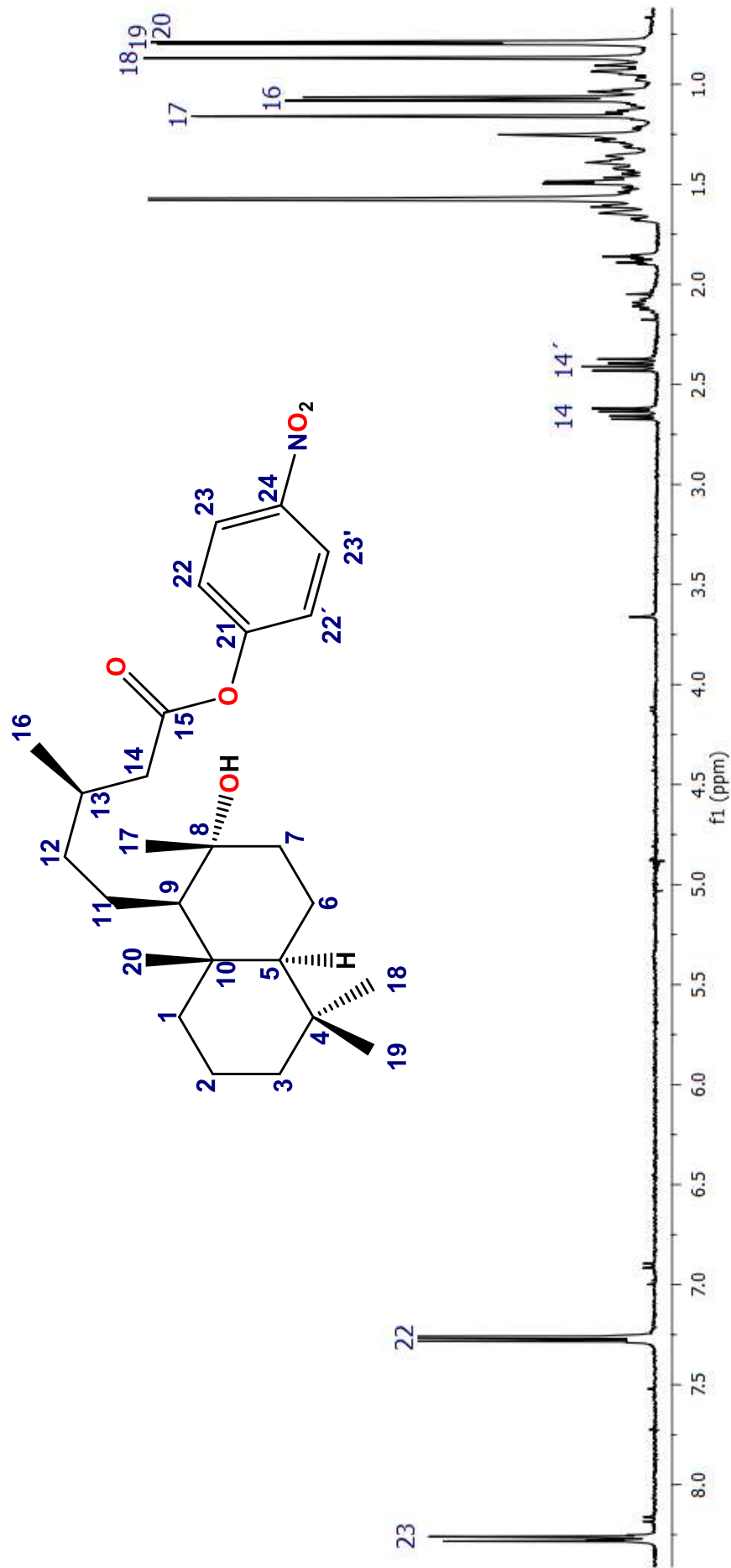


Figura 97. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado **67**.

