

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS



**“Estudio de la reactividad de los grupos hidroxilo de la lactama tricíclica obtenida a partir de rasteviona”**

Tesis que para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias Químicas**

Presenta

Q.F.B. Lucero Montiel López

Asesor

Doctos en Ciencias en la especialidad de Farmacología

D.C. Hugo Alejandro García-Gutiérrez

Co-asesor

D.C. Luisa Urania Román-Marín

Morelia, Michoacán.

Abril de 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 Y DE LA D.C. LUISA URANIA ROMÁN MARÍN, CON UNA BECA DE INVERSIÓN EN EL CONOCIMIENTO (264405) OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. CON EL APOYO ECONÓMICO DE LOS PROYECTOS: CIC-UMSNH Y CONACYT CIENCIA BÁSICA (167952).

*Dedicada a mis padres*

*Gricelda y José*

***Para Gricelda López Barbosa, mi madre.***

Un millón de gracias y toda una vida de felicidad, a la única persona del mundo que siempre estará conmigo en las buenas en las malas, mi Mamá. Gracias por ser la mejor persona, madre y amiga del mundo, por brindarme todo tu apoyo a lo largo de toda mi vida. Todo el esfuerzo realizado hasta ahora es para ti y te agradezco infinitamente por haberme alentado en los instantes en los que sentía que todo estaba perdido, no hay palabras para expresar toda mi gratitud. Te admiro, te adoro y siempre te tendré como un ejemplo de enseñanzas, sacrificios y paciencia. Gracias por hacer de mi lo que soy, por prepararme para la vida, por convencerme de que lo que yo me proponga lo podré lograr. Sin duda eres la mejor Madre del mundo y le agradezco a Dios que me hayas tocado a mí.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por que sin él nada de esto sería posible. Por darme la vida, cuidarme, por no dejarme caer y por darme fuerzas para continuar. Por permitirme tener esta experiencia y rodearme de excelentes personas.

A mi papá, gracias por enseñarme a alcanzar mis sueños, que el camino es largo y tiene muchas piedras pero que sabré como llegar bien hasta el final. Gracias por todas las cosas que has hecho por mí, por todo tu apoyo y por demostrarme todo tu cariño.

A mis hermanas Griselda y Jocy les agradezco por todas las alegrías que me han brindado y por ser parte importante de mi vida.

A Juanjo, por su gran amistad que me brindo desde el primer día que llegue al laboratorio, por compartir todos sus conocimientos y enseñarme el tiempo que convivimos juntos. Por darme ánimos todos los días, platicar conmigo y por creer en mí. Te estoy infinitamente agradecida por todo.

A David, por ser un gran amigo y compañero de laboratorio que sin duda hizo que los días no fueran tan largos. Gracias por ayudarme cuando lo necesitaba, por siempre pasar buenos momentos y por convertirte en un gran amigo para mí.

A Miriam, porque llegaste a ser una gran amiga para mí, por apoyarme, darme muchos ánimos y por hacer todos esos días de laboratorio más amenos. Gracias.

A Moni, por ser una gran amiga y compañera de laboratorio, por permitirme aprender de tu experiencia. Gracias.

A Teresita Pamatz, por tu apoyo y confianza. Gracias por todos tus consejos.

A Lupita y Jourdan, que fuera de ser mis compañeros, se convirtieron en parte importante de mi vida y en mis amigos. Gracias por todas las alegrías que pasamos juntos, por ayudarme siempre que podían y por la confianza que siempre me proporcionaron. Por apoyarme siempre y decirme muchas palabras de aliento.

A Pepe y Paquito, por brindarme su amistad en todo este tiempo.

A Coni, una excelente persona que me brindó su apoyo en todo momento y su amistad. Gracias por tu ayuda y todos tus consejos durante mi estancia en el laboratorio.

A Marcos, que siempre me das seguridad y confianza. Gracias por tus palabras de aliento, siempre eres el que me llena de optimismo de nuevo y sin duda tengo mucha suerte de tenerte a mi lado, ya que siempre has sido un gran apoyo para mí. Me inspiras a ser mejor, a ser mejor mujer, mejor profesional, mejor persona; gracias a ti y a tu apoyo he logrado muchas cosas.

Agradezco a mis revisores, D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, D. C. Juan Diego Hernández Hernández, y D.C. Carlos Martín Cerda-García-Rojas, por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito y por sus invaluable aportaciones y enseñanzas.

A mi co-asesora, la D.C. Luisa Urania Román Marín, por su apoyo en la realización del presente trabajo y el tiempo dedicado a su revisión. Gracias.

A mi asesor, D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez, por aceptarme y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Por todo el apoyo, orientación y ayuda en la realización del presente trabajo, por todos los conocimientos compartidos, por su paciencia, amistad y motivación que han sido fundamentales en la realización de este escrito. Es cierto, no ha sido nada fácil, sin embargo, gracias a su ayuda, sugerencias y recomendaciones, todo ha sido menos complicado. Gracias y que Dios lo bendiga.

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

1. “Obtención de lactamas de longipinatriol a partir de rasteviona” **Lucero Montiel López**, Hugo A. García-Gutiérrez, Luisa U. Román-Marín, Juan D. Hernández-Hernández, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. Presentado en la 12a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada del 18 al 20 de Mayo de 2016, Xalapa, Veracruz. *Rev. Latinoamer. Quím.*, **2016**, 44 (suplemento especial), 27.
2. “Preparación de derivados de la lactama de longipinatriol”, **Lucero Montiel López**, Hugo A. García-Gutiérrez, Marili Martínez-Cabello, Juan D. Hernández-Hernández, Lidia Beiza-Granados, Rosa E. del Río, Luisa U. Román-Marín. Presentado en la 3a. Semana del Posgrado en Ciencias Químicas en el marco de su 40 Aniversario el 28 de Junio de 2016 en Morelia, Michoacán.
3. “Reactividad de los grupos hidroxilo de lactamas obtenidas a partir de rasteviona” **Lucero Montiel López**, Luisa U. Román-Marín, Marili Martínez-Cabello, Juan D. Hernández-Hernández, Lidia Beiza-Granados, Hugo A. García-Gutiérrez. Presentado en el 11º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación celebrado los días 13 y 14 de Octubre de 2016 en Morelia, Michoacán.
4. “Estudio Químico de lactamas tricíclicas obtenidas a partir de longipinanos”, **Lucero Montiel López**, Luisa U. Román-Marín, Marili Martínez-Cabello, Juan D. Hernández-Hernández, Lidia Beiza-Granados, Hugo A. García-Gutiérrez. Presentado en el II Congreso Internacional y IV Nacional de Químico Farmacobiología celebrado los días 28 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2016 en Morelia, Michoacán.

# ÍNDICE GENERAL

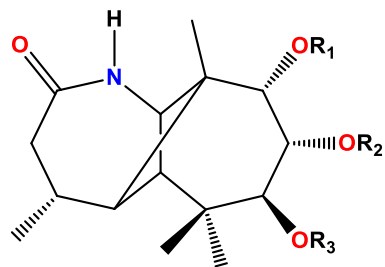
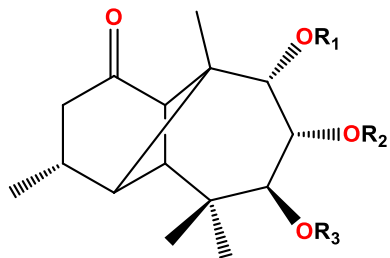
I.	RESUMEN DE ESTRUCTURAS	xi
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
III.	ÍNDICE DE TABLAS	xvii
IV.	SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	xviii
V.	RESUMEN	xx
VI.	ABSTRACT	xxi
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Productos naturales	1
1.2.	Género <i>Stevia</i> y composición	2
1.3.	Actividad farmacológica de sesquiterpenos	6
1.3.1	Actividad antineoplásica del paclitaxel	8
2.	ANTECEDENTES	10
2.1.	Reactividad de grupos funcionales de la rasteviona	10
2.2.	Reacciones de transposición y reordenamiento de la rasteviona	13
2.3.	Nuevos compuestos estabilizadores de microtúbulos	16
3.	JUSTIFICACIÓN	19
4.	OBJETIVOS	20
4.1.	Objetivo general	20
4.2.	Objetivos específicos	20
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1.	Obtención de la materia prima	21
5.2.	Reordenamiento de Beckmann de las oximas	26
5.3.	Lactama de longipinantriol	28
5.4.	Lactama-acetónido	30



5.5.	Lactama-acetónido-acetato	32
5.6	Lactama-tricinamato	34
5.6.1	Lactama-dicinamato	38
5.7	Modelado molecular	39
5.8	Ensayos de polimerización de microtúbulos con rasteviona y derivados	42
6.	CONCLUSIONES	49
7.	PARTE EXPERIMENTAL	51
	Generalidades	51
7.1.	Obtención de la rasteviona ( <b>10</b> )	52
7.2.	Obtención de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol-1-ona ( <b>12</b> )	52
7.3.	Obtención del triacetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol-1-ona ( <b>13</b> )	53
7.4.	Obtención de la oxima de triacetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol-1-ona ( <b>31</b> )	54
7.5.	Obtención de la lactama de triacetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol-1-ona ( <b>32</b> )	55
7.6.	Obtención de la lactama de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol ( <b>56</b> )	55
7.7.	Obtención de la lactama de 7,8-acetónido longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol ( <b>57</b> )	56
7.8.	Obtención de la lactama de 7,8-acetónido 9-acetato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol ( <b>58</b> )	58
7.9.	Obtención de lactama de 7,8,9-Tricinamato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol ( <b>59</b> )	59
7.9.1	Obtención de la lactama de 7,8-dicinamato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol ( <b>60</b> )	60
7.10	Modelado molecular	61
7.11	Ensayos de polimerización de microtúbulos con rasteviona y derivados	61
8.	REFERENCIAS	63
9.	ANEXOS	65
9.1.	Espectro COSY de la lactama de longipinatriol ( <b>56</b> )	67
9.2.	Espectro HETCOR de la lactama de longipinatriol ( <b>56</b> )	68

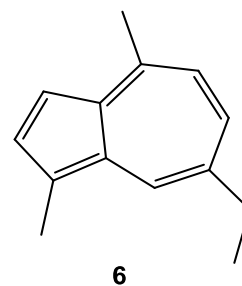
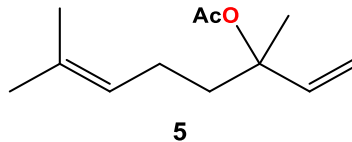
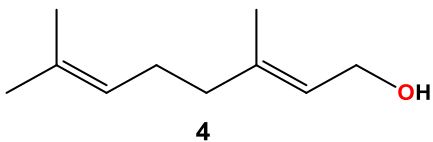
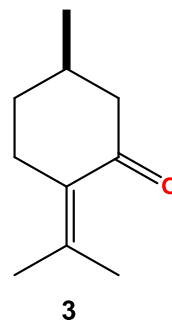
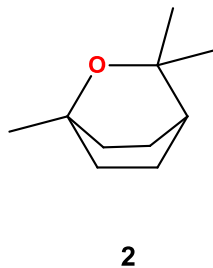
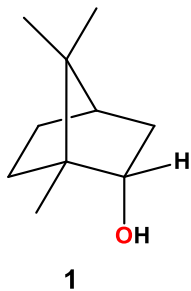
9.3.	Ampliación de espectro HMBC de la lactama de longipinatriol (56)	69
9.4.	Espectro COSY de la lactama-acetónido (57)	71
9.5.	Ampliación de espectro HETCOR de la lactama-acetónido (57)	72
9.6.	Ampliación de espectro HMBC de la lactama-acetónido (57)	73
9.7.	Espectro COSY de la lactama-acetónido-acetato (58)	75
9.8.	Ampliación de espectro HETCOR de la lactama-acetónido-acetato (58)	76
9.9.	Espectro COSY de la lactama-tricinamato (59)	78
9.10.	Ampliación de espectro HETCOR de la lactama-tricinamato (59)	79
9.11.	Ampliación de espectro HETCOR de la lactama-tricinamato (59)	80
9.12.	Ampliación de espectro HMBC de la lactama-tricinamato (59)	81

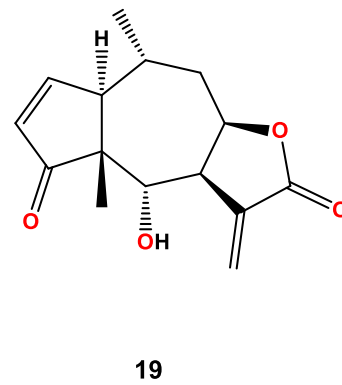
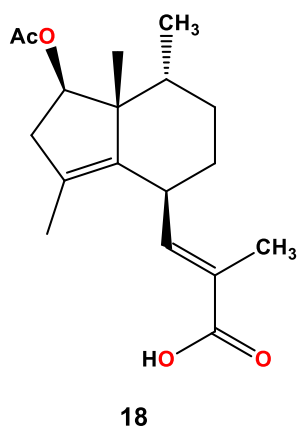
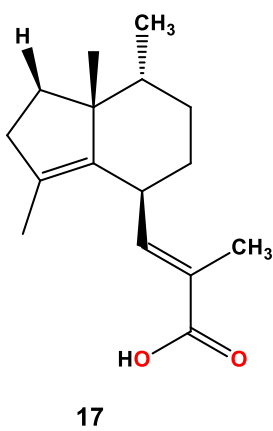
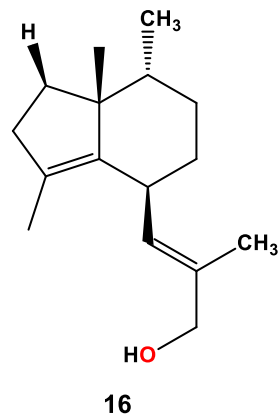
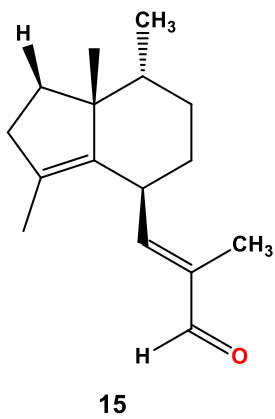
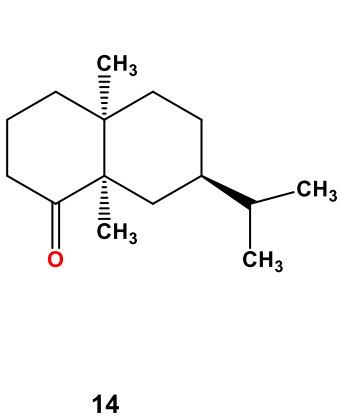
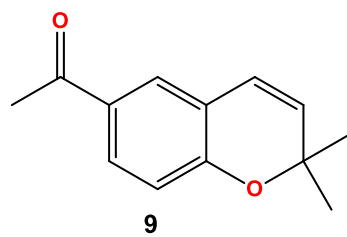
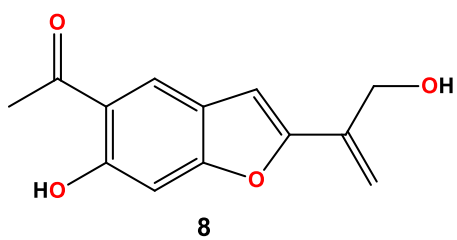
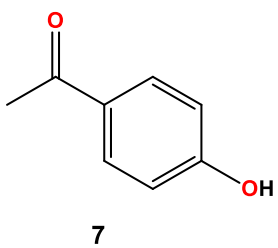
## I. RESUMEN DE ESTRUCTURAS

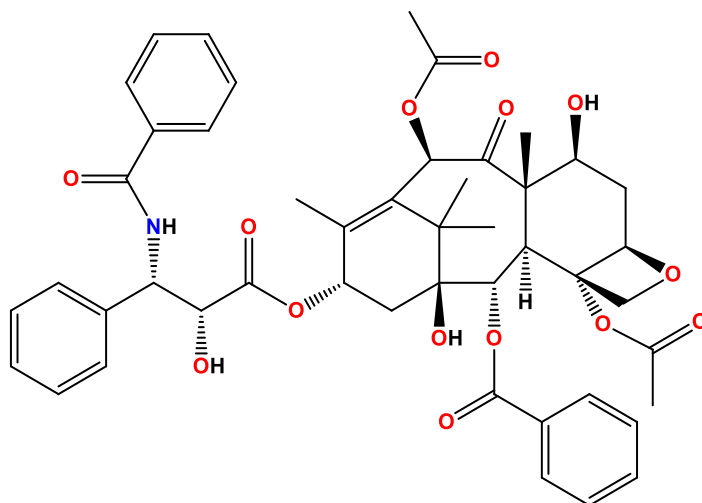


- 10:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = \text{Ang}$   
**11:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Ang}$   
**12:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = H$   
**13:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Ac}$   
**21:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = \text{Acetónido}$   
**22:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Acetónido}$   
**23:**  $R_1 = \text{Ms}$     $R_2 = R_3 = \text{Ang}$   
**24:**  $R_1 = \text{Ts}$     $R_2 = R_3 = \text{Ang}$   
**25:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = \text{Cin}$

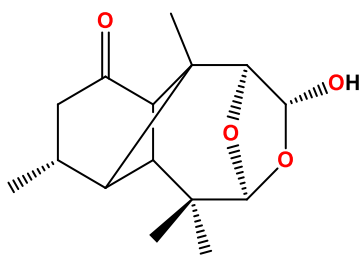
- 32:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Ac}$   
**56:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = H$   
**57:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = \text{Acetónido}$   
**58:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Acetónido}$   
**59:**  $R_1 = \text{Cin}$     $R_2 = R_3 = \text{Cin}$   
**60:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = \text{Cin}$



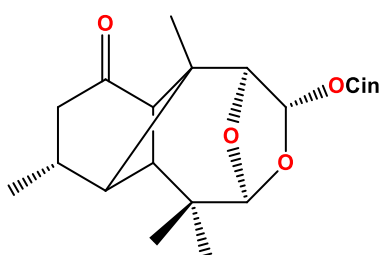




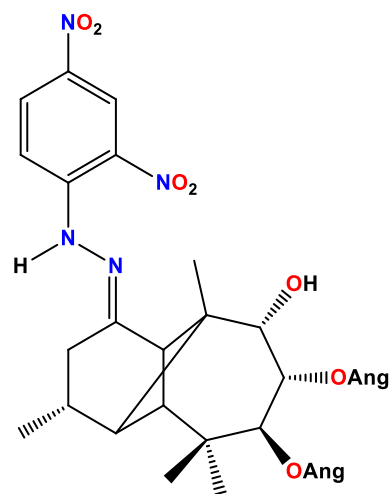
20



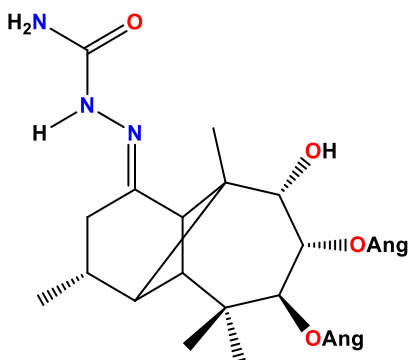
26



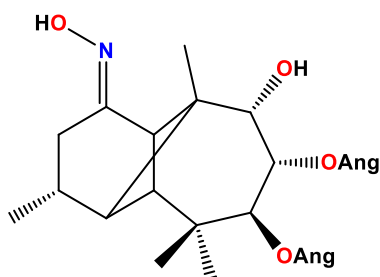
27



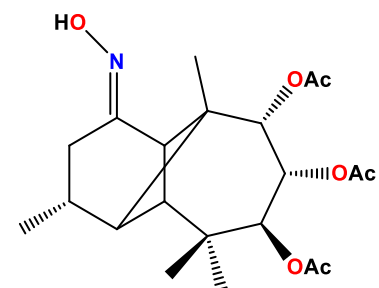
28



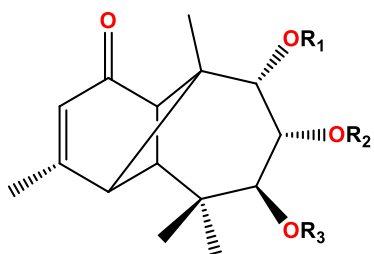
29



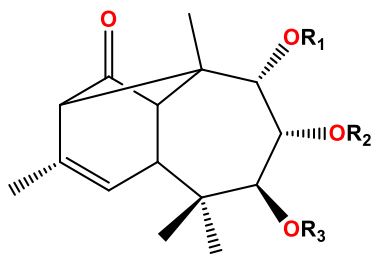
30



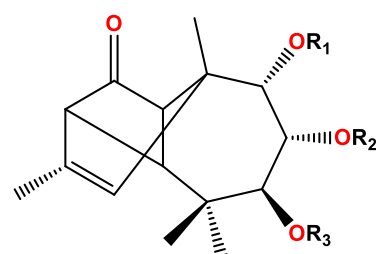
31



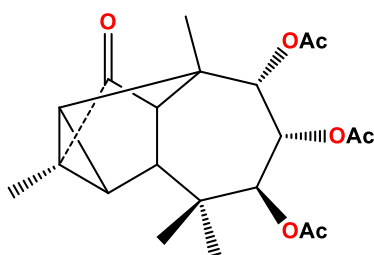
**33:**  $R_1 = R_3 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{H}$   
**36:**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}$



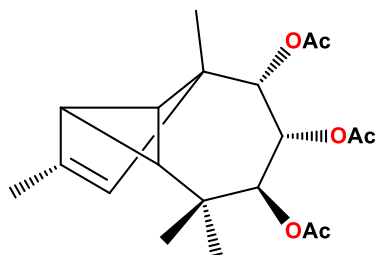
**34:**  $R_1 = R_3 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{H}$   
**37:**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}$



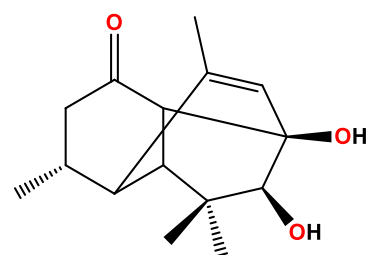
**35:**  $R_1 = R_3 = \text{Ac}$   $R_2 = \text{H}$   
**38:**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}$



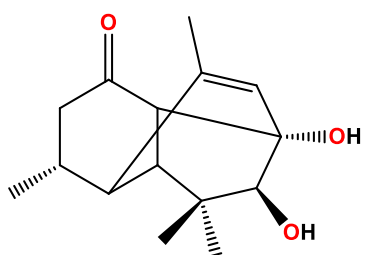
**39**



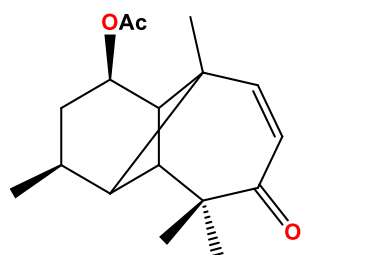
**40**



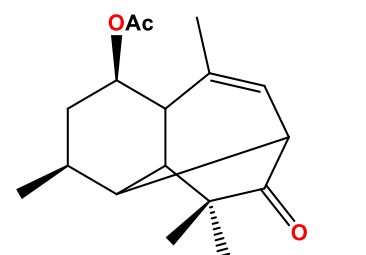
**41**



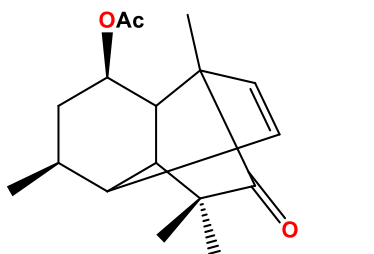
**42**



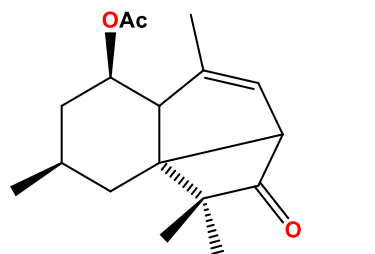
**43**



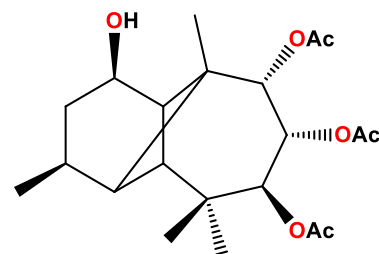
**44**



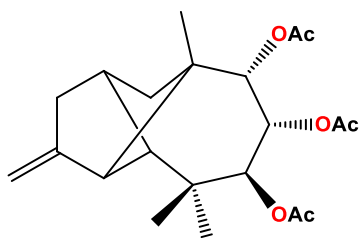
**45**



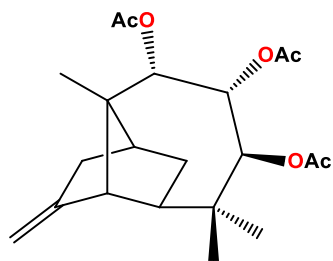
**46**



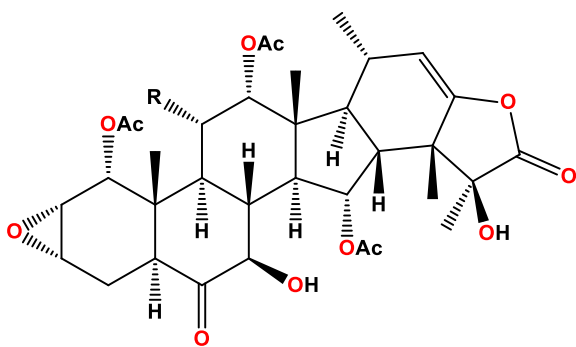
**47**



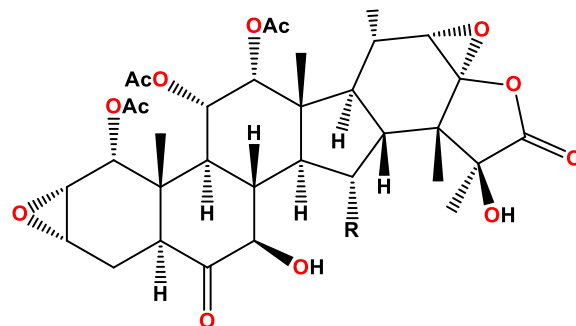
48



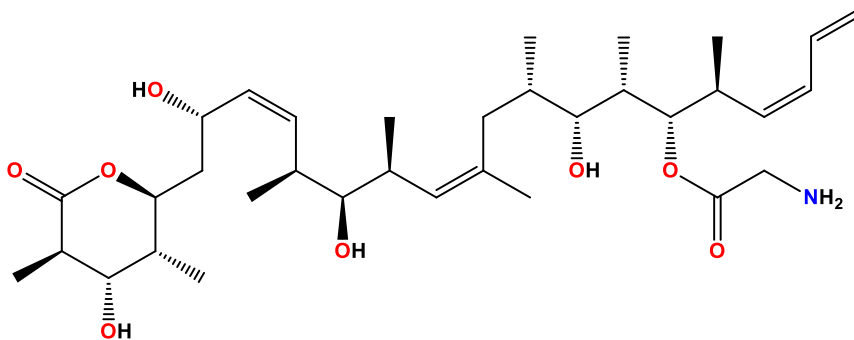
49



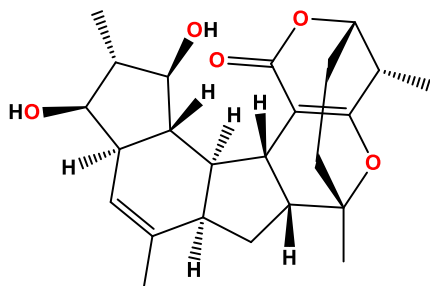
50: R = OAc  
51: R = H



52: R = OH  
53: R = OAc



54



55

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema general de rutas biosintéticas	2
<b>Figura 2.</b>	Tipos de diversos grupos de éster	5
<b>Figura 3.</b>	Microtúbulo: Estructura tubular de las células formados por heteropolímeros de $\alpha$ - y $\beta$ -tubulina	9
<b>Figura 4.</b>	Esquema de reacción de esterificación con haluros de ácido	11
<b>Figura 5.</b>	Mecanismo de reacción de esterificación a partir de cloruro de ácido	12
<b>Figura 6.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la rasteviona ( <b>10</b> )	21
<b>Figura 7.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la rasteviona ( <b>10</b> )	22
<b>Figura 8.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la triolona ( <b>18</b> )	23
<b>Figura 9.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz del triacetato de triolona ( <b>13</b> )	24
<b>Figura 10.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la oxima de triacetato de triolona ( <b>31</b> )	25
<b>Figura 11.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la oxima de triacetato de triolona ( <b>31</b> )	26
<b>Figura 12.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la lactama de triacetato de triolona ( <b>32</b> )	27
<b>Figura 13.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la lactama de triacetato de triolona ( <b>32</b> )	28
<b>Figura 14.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la lactama de longipinatriol ( <b>56</b> )	29
<b>Figura 15.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la lactama de longipinatriol ( <b>56</b> )	30
<b>Figura 16.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la lactama-acetónido ( <b>57</b> )	31
<b>Figura 17.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la lactama-acetónido ( <b>57</b> )	32
<b>Figura 18.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la lactama-acetónido-acetato ( <b>58</b> )	33
<b>Figura 19.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la lactama-acetónido-acetato ( <b>58</b> )	34
<b>Figura 20.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la lactama-tricinamato ( <b>59</b> )	36
<b>Figura 21.</b>	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C a 100 MHz de la lactama-tricinamato ( <b>59</b> )	37
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H a 400 MHz de la lactama-dicinamato ( <b>60</b> )	39
<b>Figura 23.</b>	Mínimos globales de las lactamas <b>32, 56-59</b>	40



<b>Figura 24.</b>	Efecto de los controles sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	43
<b>Figura 25.</b>	Efecto del producto natural <b>10</b> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	44
<b>Figura 26.</b>	Efecto del derivado <b>32</b> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	44
<b>Figura 27.</b>	Efecto del derivado <b>56</b> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	45
<b>Figura 28.</b>	Efecto del derivado <b>57</b> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	45
<b>Figura 29.</b>	Efecto del derivado <b>58</b> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	46
<b>Figura 30.</b>	Efecto del derivado <b>59</b> a 100 y 200 $\mu\text{M}$ sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	47
<b>Figura 31.</b>	Efecto del derivado <b>60</b> sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos por disminución de la temperatura	48

### III. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Ángulos diedros (en grados) de las lactamas.	41
<b>Tabla 2.</b>	Datos espectroscópicos de RMN para la lactama de longipinatriol ( <b>56</b> )	66
<b>Tabla 3.</b>	Datos espectroscópicos de RMN para la lactama-acetónido ( <b>57</b> )	70
<b>Tabla 4.</b>	Datos espectroscópicos de RMN para la lactama-acetónido-acetato ( <b>58</b> )	74
<b>Tabla 5.</b>	Datos espectroscópicos de RMN para la lactama tricinamato ( <b>59</b> )	77

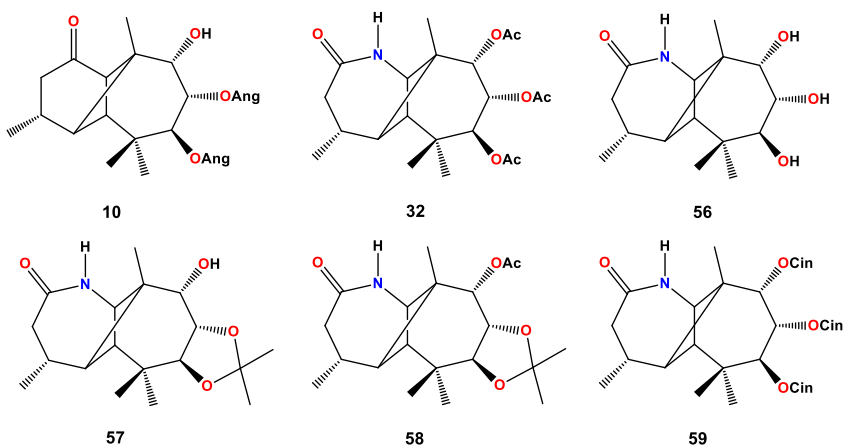
## IV. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados Celsius
Ac	Grupo acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
Ang	Grupo angelóilo
b.v.	Baño de vapor, aprox. 100 °C.
c	Concentración
Cav.	Cavanilles
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
Cin	Grupo cinamoílo
cm	Centímetros
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DEPT	Resonancia magnética nuclear de carbono trece con mejora sin distorsión de polarización
DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad
DMSO	Dimetilsulfóxido
EIMS	Espectrometría de masas por impacto electrónico
FM	Formula molecular
g	Gramo
h	Hora
HETCOR	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear
Hx	Hexano
HMBC	Resonancia magnética nuclear de coherencia heteronuclear a múltiples enlaces
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KOH	Hidróxido de potasio
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MMFF	Campo de fuerza de mecánica molecular
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
OAc	Grupo funcional acetoxi
OH	Grupo hidroxilo o alcohol

p. f.	Punto de fusión
$\text{POCl}_3$	Oxicloruro de fósforo
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
t	Señal triple
UV	Ultravioleta
$\delta$	Desplazamiento químico
$\nu_{\text{máx}}$	Frecuencia máxima

## V. RESUMEN

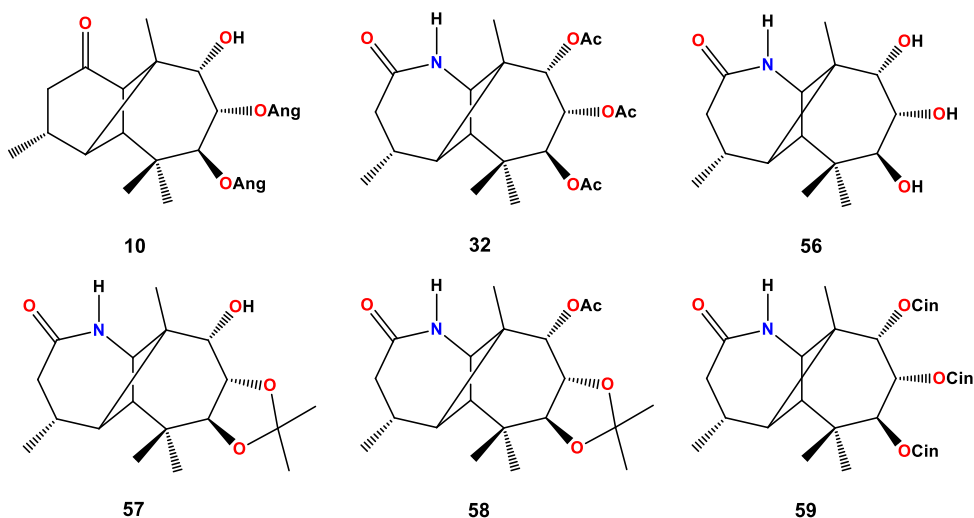
El género *Stevia* es uno de los más grandes y reconocidos de la tribu *Eupatorieae*. Sus distintas especies han demostrado poseer productos naturales con diversos esqueletos, algunos con aplicación en la industria alimentaria y otros con importante actividad biológica como antitumorales. Del extracto hexánico de las raíces de *Stevia serrata* Cav., se obtiene en forma cristalina la rasteviona (**10**), la cual posee un esqueleto hidrocarbonado denominado longipinano. Éste, se encuentra constituido por un ciclo de seis miembros, unido a un ciclo de siete miembros y un ciclobutano central. Una característica importante de esta clase de compuestos es su facilidad de transposición debido a la tensión generada por el ciclobutano central, la cual ha sido aprovechada para generar compuestos con nuevos esqueletos hidrocarbonados. En el presente trabajo el sesquiterpeno **10** se sometió a una secuencia de reacciones que incluyó hidrólisis alcalina, acetilación, preparación de su base de Schiff y transposición de Beckmann, obteniendo la lactama del triacetato de longipinatriol (**32**). Este compuesto se sometió a hidrólisis alcalina para liberar los grupos hidroxilo en las posiciones 7, 8 y 9 generando la lactama de longipinatriol (**56**). A partir de **56** empleando ácido *p*-toluensulfónico y acetona se obtuvo el correspondiente acetónido **57**, posteriormente, se preparó el derivado acetilado obteniendo la lactama acetónido-acetato (**58**). Empleando la lactama **56**, se realizaron pruebas de reactividad con cloruro de cinamoilo y piridina obteniendo la lactama de tricinato (**59**). Los productos se caracterizaron por Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones además de modelado molecular empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.



Palabras clave: Rasteviona, lactama, hidroxilos, reactividad, cinamatos.

## VI. ABSTRACT

The genus *Stevia* is one of the most recognized of the *Eupatorieae* tribe. Natural products with different structures can be isolated from its distinct species. Some compounds show important biological activity and others are been used in food industry. Hexane extraction of the roots of *Stevia serrata* Cav., yielded rastevione (**10**), which has a hydrocarbon skeleton named longipinane. Longipinane skeleton is formed by a six membered ring, bound to a seven membered ring and a central cyclobutane. An important feature of this class of compounds is their ease of transposition due to the tension generated by the central cyclobutane, which has been availed to generate new compounds with new hydrocarbon skeletons. In this work the sesquiterpene **10** was subjected to a sequence of reactions that included alkaline hydrolysis, acetylation, preparation of the Schiff base and Beckmann rearrangement, obtaining the longipinatriol triacetate lactam (**32**). This compound was subjected to alkaline hydrolysis to liberate the hydroxyl groups at the 7, 8 and 9 positions generating the longipinatriol lactam (**56**). From **56** using *p*-toluenesulfonic acid and acetone, the corresponding acetonide (**57**) was obtained. Subsequently from **57**, it was prepared the acetylated derivative obtaining the acetonide-acetate lactam (**58**). Using lactam **56**, reactivity tests were performed with cinnamoyl chloride and pyridine, obtaining tricinnamate (**59**). The products were characterized by nuclear magnetic resonance in one and two dimensions, and the global minimum energy structures for each longipinane derivative were obtained by Monte Carlo protocol using the molecular mechanics force field followed by Density-Functional Theory at the B3LYP/DGDZVP level of theory.



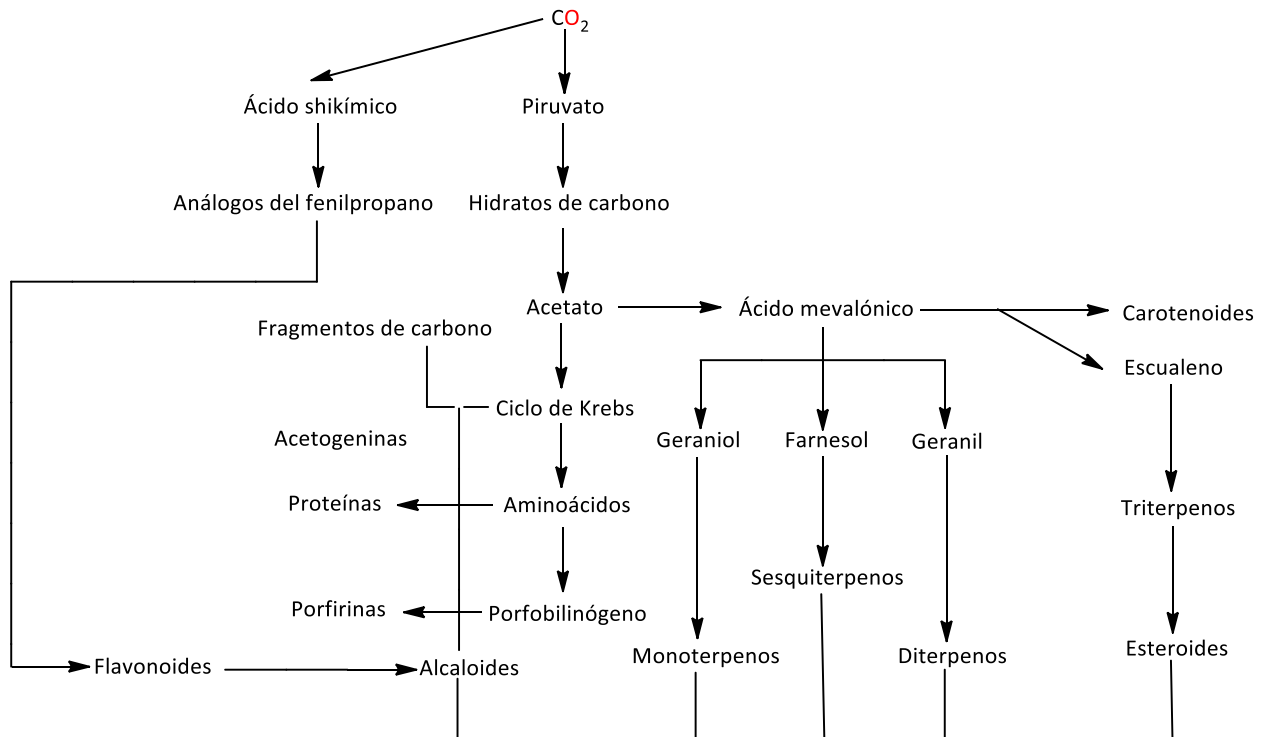
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Productos Naturales

Un producto natural es todo compuesto de origen orgánico o inorgánico que se encuentre en la naturaleza y que pueda ser procesado por el hombre. Generalmente en el área de la química orgánica, se consideran como productos naturales a aquellos provenientes principalmente de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos, los cuales llevan a cabo dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. El metabolismo primario es aquél en el cual los organismos sintetizan y convierten sustancias para sobrevivir a partir de compuestos simples como el  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  y algunos metales, que son transformados en polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son considerados bloques fundamentales de la materia viva. Este tipo de metabolismo lo llevan a cabo todos los organismos.

Otro proceso que se lleva a cabo en las plantas, dando diferentes productos de acuerdo al tipo de especie, es el llamado metabolismo secundario. Los productos formados por este metabolismo se conocen como productos naturales y como ejemplos se pueden mencionar a los terpenos, los alcaloides y los pigmentos, entre otros. La mayoría de estos compuestos orgánicos poseen peso molecular bajo o intermedio.

La ruta biogénica es una secuencia de reacciones en las cuales un organismo sintetiza a una sustancia comenzando con una molécula inicial. Los compuestos en los que molécula inicial se transforma hasta llegar al producto final se les denomina intermediarios naturales. Un metabolito secundario no es siempre el resultado de un solo paso en una ruta biosintética. Hay una gran diversidad de compuestos que se pueden obtener a través de relativamente pocas rutas fundamentales que dan lugar a miles de productos naturales,<sup>1</sup> a continuación se muestran algunas en la Figura 1.



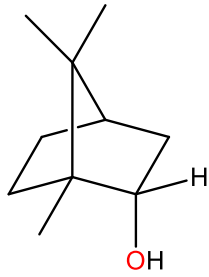
**Figura 1.** Esquema general de rutas biosintéticas.

## 1.2 Género *Stevia* y composición

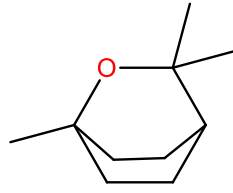
El género *Stevia*, perteneciente a la tribu Eupatorieae, familia Asteraceae, se extiende desde el suroeste de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central y los Andes. Se estima que el número de especies dentro del género es de 300, de las cuales más de 80 se encuentran en Norte América.<sup>1</sup>

De los estudios fitoquímicos realizados en aproximadamente 70 especies se han encontrado metabolitos tales como:

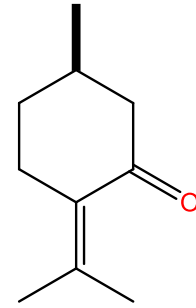
- Aceites esenciales y otros constituyentes volátiles como: borneol (**1**), cineol (**2**), pulegona (**3**), geraniol (**4**), acetato de linalol (**5**), chamazuleno (**6**), etc.<sup>1</sup>



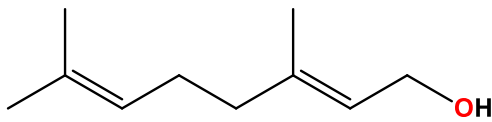
1



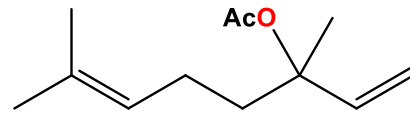
2



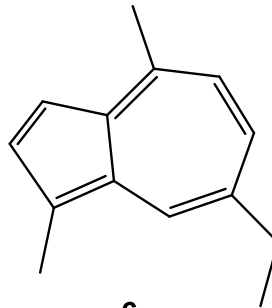
3



4



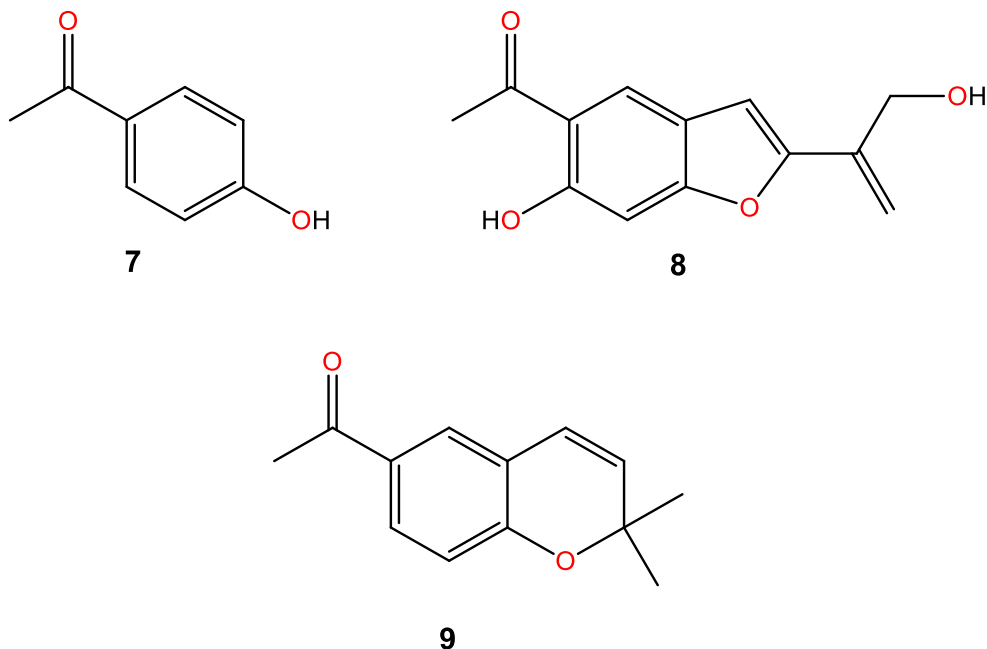
5



6

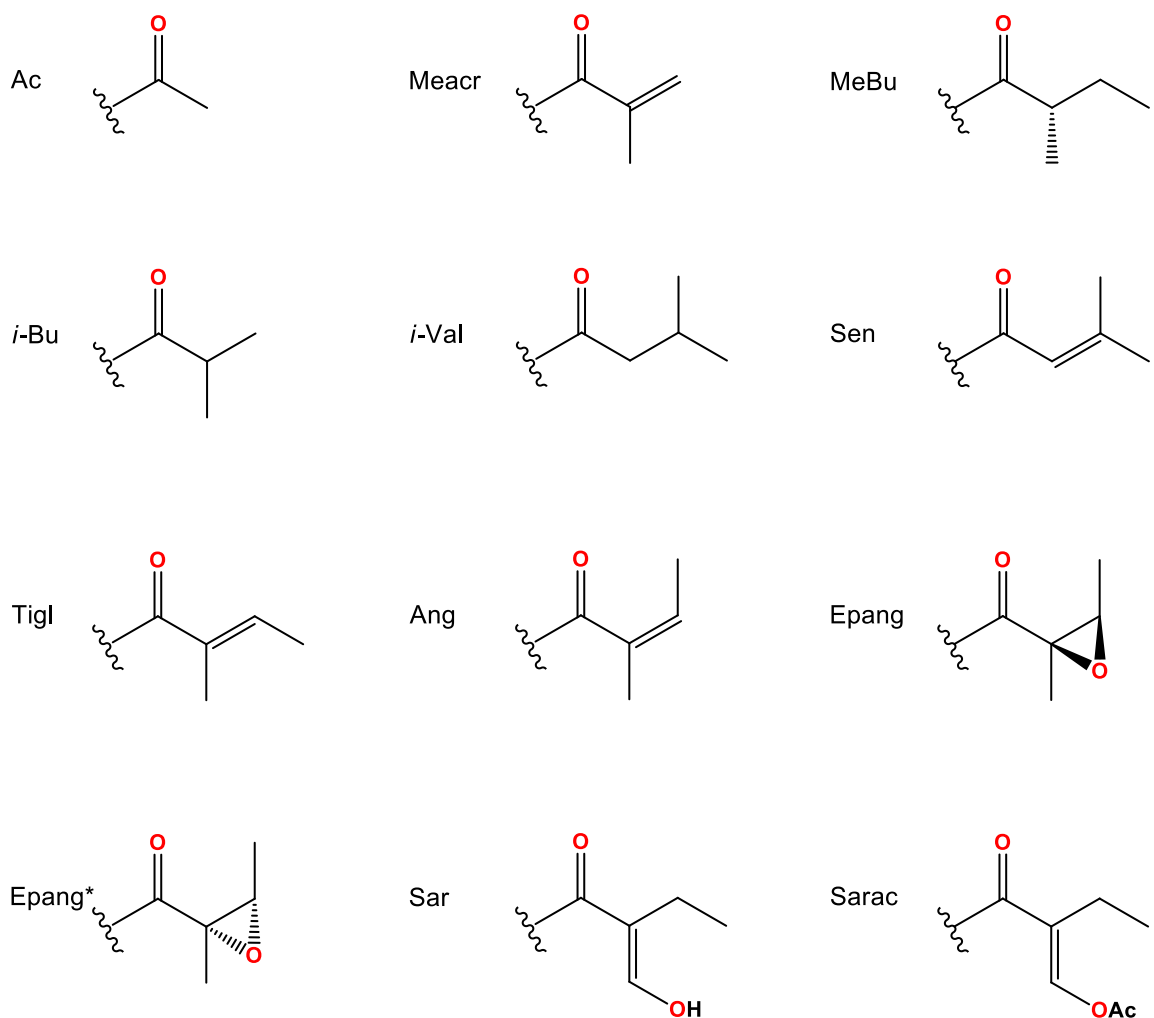
- Derivados de la acetofenona, benzofurano y cromeno. Como ejemplos de estos compuestos se encuentran: *p*-hidroxiacetofenona **7**, un derivado del benzofurano **8** y el derivado del cromeno **9**.<sup>1</sup>





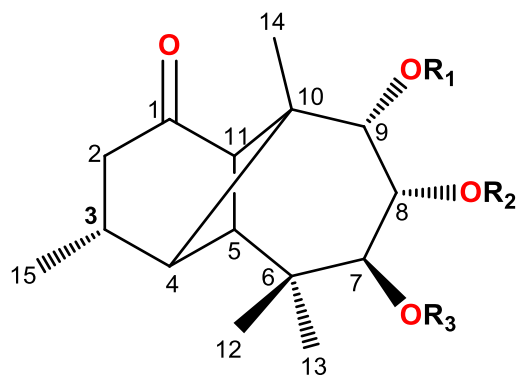
- Sesquiterpenos funcionalizados como: bisabolanos, germacrenos, eudesmanos, eremofilanos, etc. Los derivados de longipinano, constituyen una de las clases más representativas de sesquiterpenos presentes en el género *Stevia*. Este grupo comprende 61 compuestos, 43 longipinanos y 18 longipinenos. Los grupos funcionales característicos presentes en estos compuestos son un grupo carbonilo en C-1 y grupos hidroxilo o ésteres en C-7, C-8, C-9 y/o C-15. En los compuestos saturados, el grupo metilo en C-3 se encuentra siempre con una configuración  $\alpha$ , mientras que el grupo hidroxilo o los grupos ésteres en los respectivos carbonos, tienen siempre una configuración  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\alpha$  respectivamente. Los ésteres más comunes son angelatos (Ang), tiglatos (Tigl), senecioatos (Sen), metilacrilatos (Meacr) y acetatos (Ac), aunque también se han encontrado epoxiangelatos (Epang), isovaleratos (*i*-Val), isobutiratos (*i*-Bu), sarracenilatos (Sar), acetoxisarracenilatos (Sarac) y  $\alpha$ -metilbutiratos (MeBu). Este último residuo solo se ha encontrado unido a tres lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Stevia serrata* Cav.,<sup>1</sup> Figura 2.

También se han aislado diterpenos, triterpenos y esteroides.



**Figura 2.** Tipos de diversos grupos acilo.

Algunas de las especies más comunes son *Stevia elongata*, *Stevia purpurea*, *Stevia salicifolia* y *Stevia serrata* Cav. Debido a que el género *Stevia*, es uno de los más grandes y reconocidos de la tribu Eupatorieae, este taxón, tiene una amplia diversidad en su composición química.<sup>2</sup> El producto natural rasteviona (**10**) aislado de las raíces de la *Stevia serrata* Cav. y sus análogos **11-13**, poseen un esqueleto hidrocarbonado denominado longipinano. Éste, se encuentra formado por un ciclo de seis miembros, unido a un ciclo de siete miembros y un ciclobutano central.<sup>3</sup>

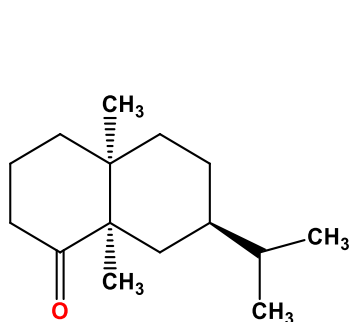


- 10:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = \text{Ang}$   
**11:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Ang}$   
**12:**  $R_1 = H$     $R_2 = R_3 = H$   
**13:**  $R_1 = \text{Ac}$     $R_2 = R_3 = \text{Ac}$

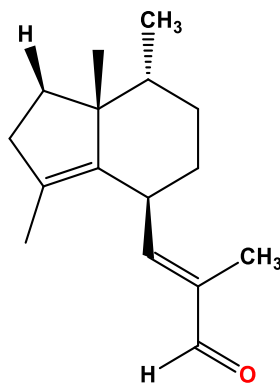
Una característica importante de esta clase de compuestos es su facilidad de transposición debido a la tensión generada por el ciclobutano central, la cual ha sido aprovechada para generar compuestos con nuevos esqueletos hidrocarbonados.<sup>3</sup>

### 1.3 Actividad farmacológica de sesquiterpenos

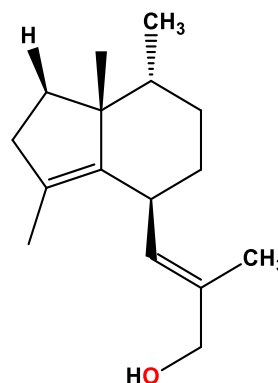
A lo largo del tiempo, se han aislado diversos tipos de sesquiterpenos de distintos géneros de plantas y algunos presentan actividad farmacológica, por ejemplo, las raíces de *Valeriana officinalis* L. (Valerianiaceae) han sido consideradas desde hace más de mil años como un remedio eficaz para el tratamiento de distintas alteraciones del sistema nervioso central, principalmente por su actividad ansiolítica y sedativo-hipnótica. Presenta monoterpenos como el canfeno y sesquiterpenos como la valeranona (**14**), valeranal (**15**) y el valeraniol (**16**).<sup>4</sup>



**14**

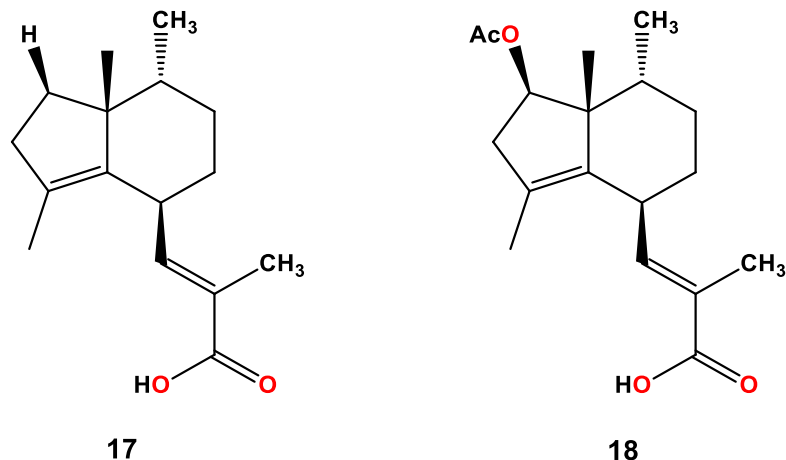


**15**



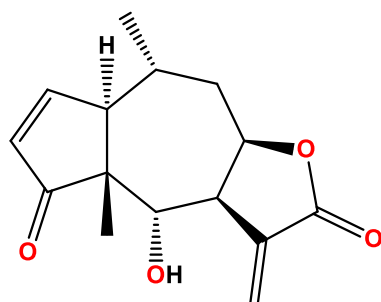
**16**

Esta planta también contiene otros sesquiterpenos no volátiles que son ácidos carboxílicos ciclopentánicos: valerénico (**17**) y acetoxivalerénico (**18**), a los cuales se responsabiliza en parte de su actividad farmacológica.<sup>5</sup>



También se encuentran las llamadas lactonas sesquiterpénicas, las cuales son compuestos que tradicionalmente han sido considerados como “amargos” y han sido aisladas de numerosos géneros de la familia Asteraceae. Ellas forman parte de los principios activos de una gran variedad de plantas medicinales que son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y han mostrado diferentes actividades biológicas tales como antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, antiviral, antifúngica, efectos en el sistema nervioso central y cardiovascular así como su potencia alergénica.<sup>6</sup>

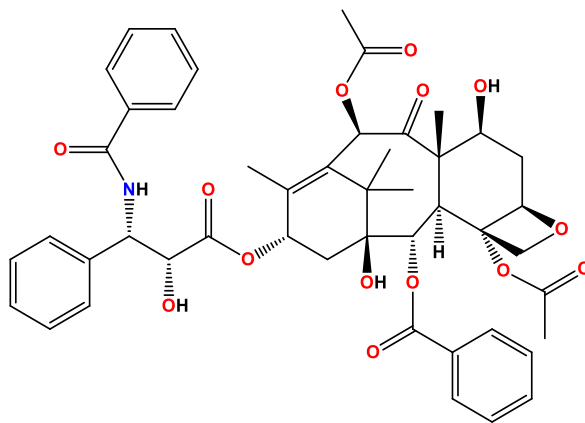
Por ejemplo, el árnica, perteneciente a la familia Asteraceae es utilizada para el tratamiento por vía tópica de procesos inflamatorios y alteraciones de la piel. En las flores de *Arnica montana* fue encontrada la helenalina (**19**), ésta posee un potente efecto citotóxico y actividad antineoplásica contra tumores en ratas y humanos. La manera en la cual actúa es en la inhibición del ADN, el ARN y la síntesis de proteínas.<sup>7</sup> Al igual que los sesquiterpenos, algunos diterpenos poseen la misma actividad antineoplásica pero distinta acción biológica.



19

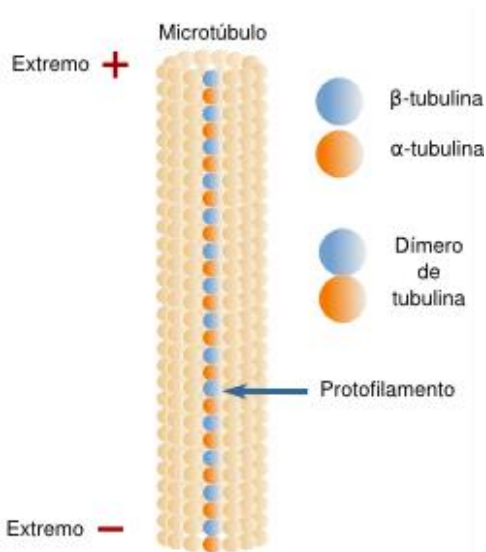
### 1.3.1 Actividad antineoplásica del paclitaxel

De la familia de las Taxáceas, el *Taxus brevifolia* se distribuye geográficamente en los continentes americano, europeo y asiático. Son árboles de tres a seis metros de altura, que poseen hojas lanceoladas de coloración verde, el fruto es una baya de color rojo brillante. Tanto de la corteza, como de las hojas se obtienen los taxoides, un grupo de metabolitos secundarios. El paclitaxel (**20**) es aislado de la corteza, su esqueleto central es un anillo de taxano de naturaleza isoprenoide, su estructura química es compleja en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituidos con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas. El Taxol<sup>®</sup>, comercialmente llamado, presenta amplio espectro de acción contra gran variedad de tipos de cáncer, tales como cáncer de seno, pulmón, ovario, colon, gástrico, cervical, próstata, hígado, e incluso para tratar la enfermedad del riñón policístico dominante autosomal, la artritis reumatoide y la malaria. Tiene un mecanismo de acción biológico que consiste en inhibir la despolimerización de las unidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina que forman los microtúbulos (Figura 3), impidiendo la mitosis en las células.<sup>8,9</sup>



20

El huso mitótico de la célula está formado por tubos unidos por la combinación de dos tipos de proteínas:  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina. Estas proteínas forman heterodímeros, capaces de agruparse en polímeros (microtúbulos) en presencia de otras proteínas denominadas MAPs (del inglés “microtubule-associated proteins”). Los heterodímeros de la tubulina interaccionan cabeza con cola para formar protofilamentos rectos que posteriormente se asocian en forma paralela, estableciendo contactos laterales entre ellos para formar la pared cilíndrica del microtúbulo, en cada uno de ellos existe un extremo (+) compuesto por  $\beta$ -tubulina, y un extremo (-) compuesto por  $\alpha$ -tubulina. El paclitaxel se une a la  $\beta$ -tubulina y con ello favorece la formación de largos polímeros.<sup>10</sup>



**Figura 3.** Microtúbulo: Estructura tubular de las células formados por heteropolímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina.

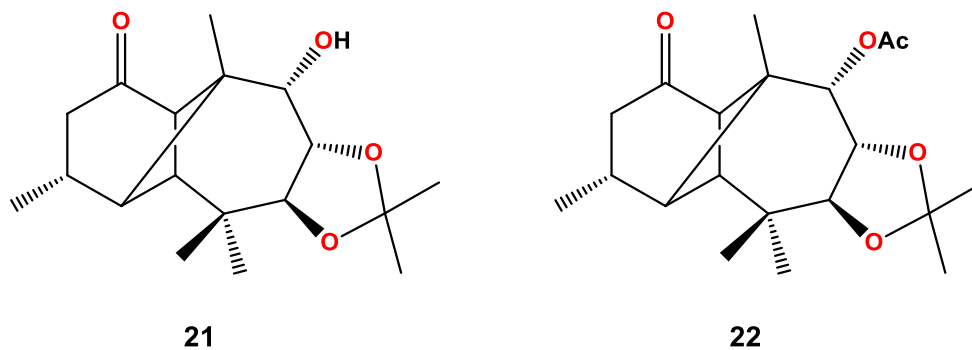
Uno de los problemas más difíciles para la producción del Taxol®, se debe a los mínimos contenidos concentrados en la corteza de las especies de *Taxus*, por ejemplo, *T. brevifolia* contiene de 0.01 a 0.05% de peso seco de taxol, así como el lento crecimiento de los árboles, por lo cual se están buscando nuevas alternativas para la producción de compuestos con actividad similar.

## 2. ANTECEDENTES

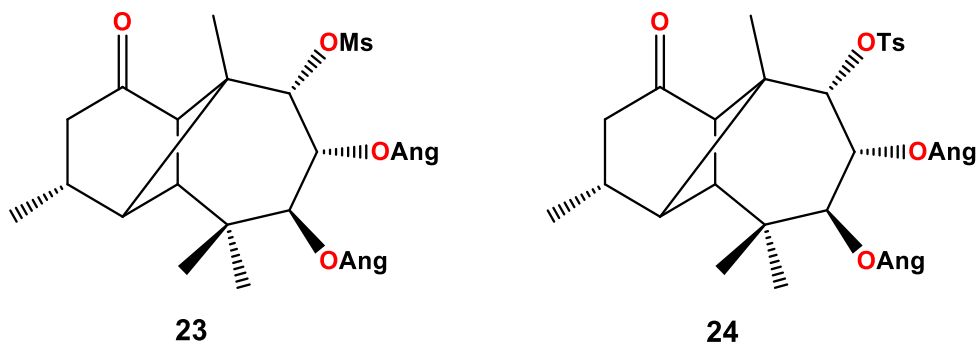
A lo largo de los últimos años, se han llevado a cabo varios estudios para determinar la reactividad de la rasteviona (**1**), en los cuales se han obtenido dos tipos de modificaciones: la primera, aquellas que conservan el esqueleto longipinano y la segunda, aquellas que promueven la ruptura y formación de enlaces, dando lugar a nuevos esqueletos hidrocarbonados mediante transposiciones y reordenamientos.

### 2.1 Reactividad de grupos funcionales de la rasteviona

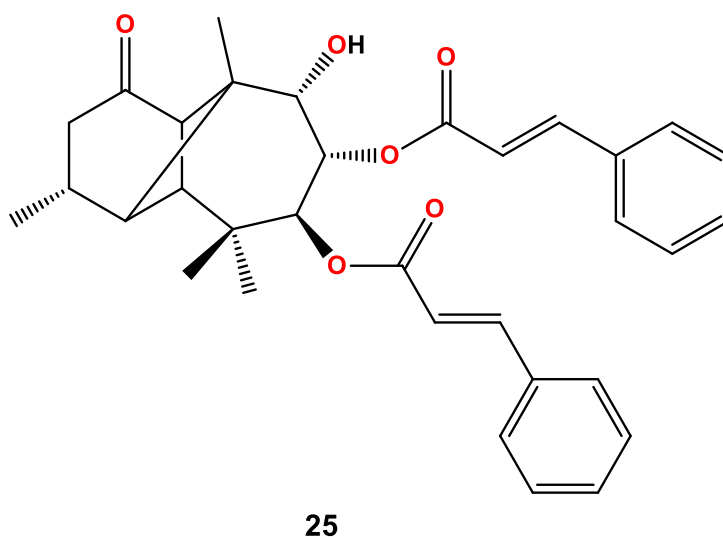
La estructura de **10**, fue comprobada a partir de estudios espectrales combinado con transformaciones químicas, por lo cual se llevaron a cabo modificaciones de los grupos funcionales que posee el anillo de siete miembros en las posiciones C-7, C-8 y C-9. Entre ellas encontramos la formación de la triolona (**12**) obtenida a partir de la hidrólisis básica de los angeloílos. A partir de **12**, se realizaron varias modificaciones, entre ellas la producción del triacetato de triolona (**13**) a partir de condiciones estándar de acetilación. También, llevaron a cabo la formación de su acetónido correspondiente utilizando ácido *p*-toluensulfónico y acetona, obteniendo el 7,8-acetónido de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -triol-1-ona (**21**). Su estructura la dedujeron con la acetilación del grupo hidroxilo libre restante obteniendo el 7,8-acetonido-9-acetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -triol-1-ona (**22**).<sup>11</sup>



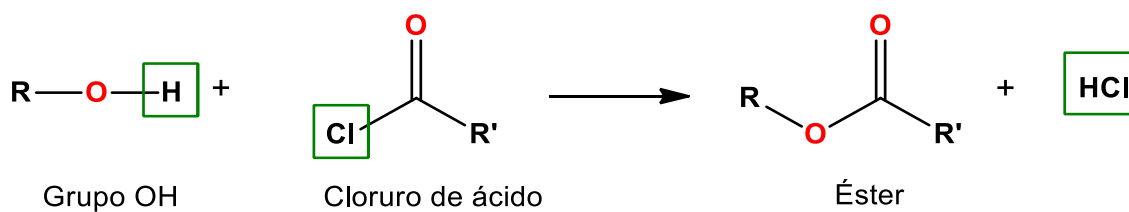
Posteriormente, para comprobar la reactividad del grupo hidroxilo en la posición C-9, generaron nuevos derivados esterificados, entre ellos el derivado mesilado **23** obtenido por el tratamiento con cloruro de metansulfonilo y el tosilado **24** obtenido por el tratamiento con cloruro de tosilo.<sup>12</sup>



Posteriormente, a partir de **12**, se realizaron la formación de ésteres cinamato con cloruro de cinamoilo y piridina, llevando a cabo la formación del dicinamato de triolona **25**.<sup>13</sup>



El esquema general de reacción llevado a cabo para la formación de los ésteres cinamato en **25** es el siguiente: un grupo hidroxilo reacciona con un cloruro de ácido en una reacción exotérmica para dar lugar a un éster a través de una sustitución nucleofílica del grupo acilo por el mecanismo de adición-eliminación (Figura 4).

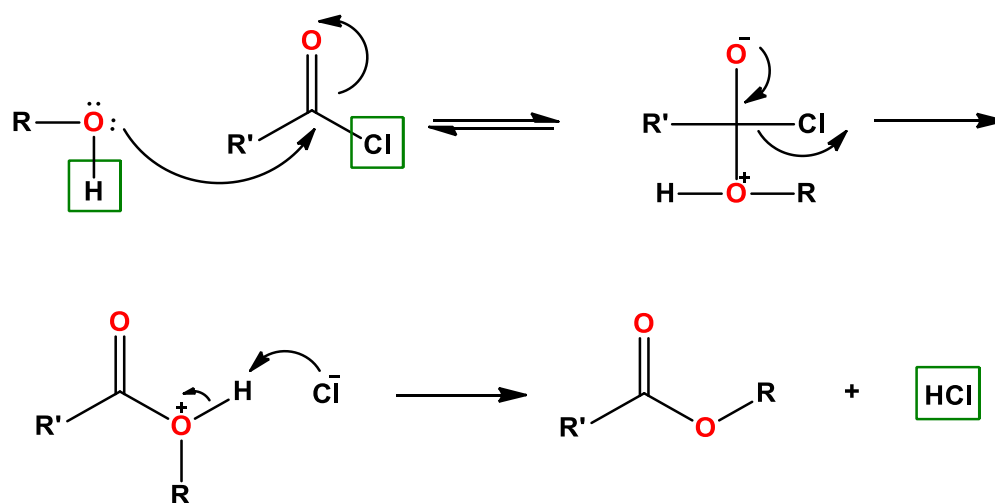


**Figura 4.** Esquema de reacción de esterificación con haluros de ácido.



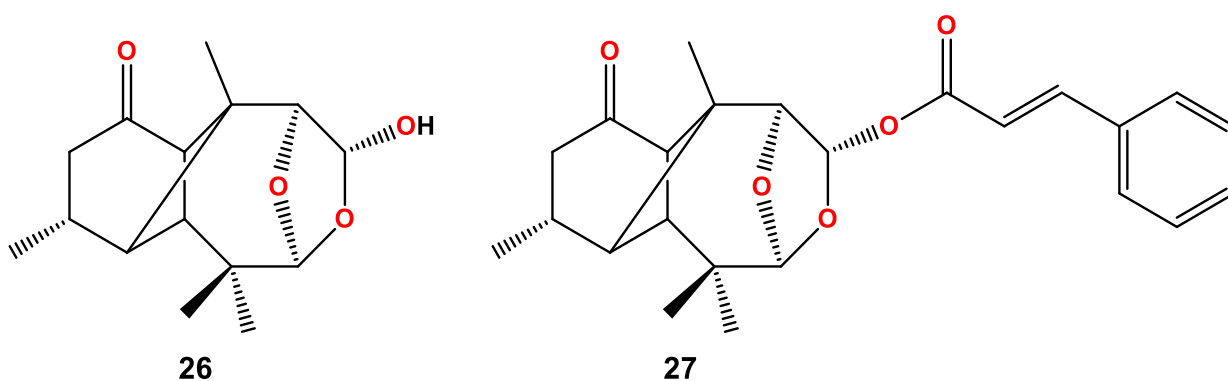
El átomo de halógeno de un haluro de acilo sustrae inductivamente densidad electrónica del átomo de carbono del grupo carbonilo, aumentando su naturaleza electrofílica y haciendo a los haluros de acilo particularmente reactivos respecto a la sustitución nucleofílica del grupo acilo. El ión haluro también actúa como buen grupo saliente.

El ataque del alcohol al grupo carbonilo electrofílico da lugar a un intermediario tetraédrico. La pérdida del cloruro seguida de la desprotonación da lugar al éster (Figura 5).<sup>14</sup>

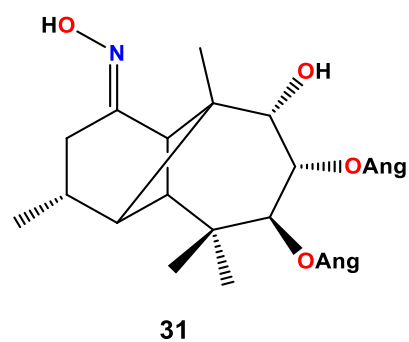
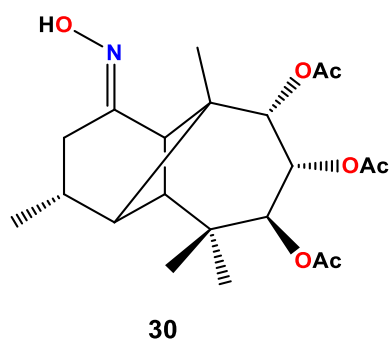
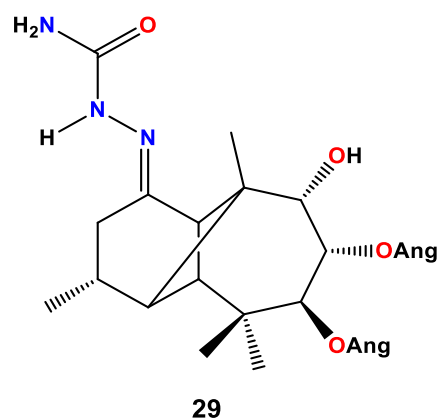
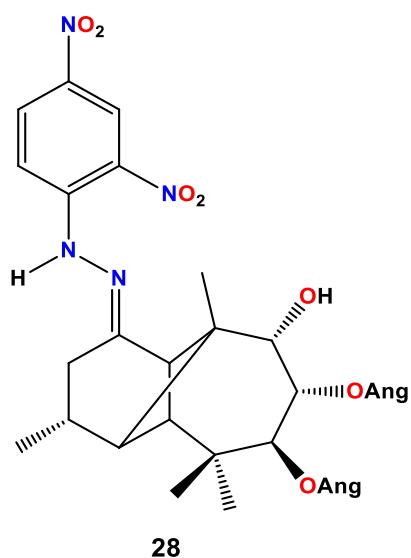


**Figura 5.** Mecanismo de reacción de esterificación a partir de cloruro de ácido.

Igualmente a partir de **12**, se llevó a cabo la producción de su hemiacetal acetal **26** utilizando  $\text{HIO}_4$ .<sup>15</sup> Éste fue sometido a condiciones de esterificación para evaluar la reactividad del grupo hidroxilo hemiacetalítico. Una de ellas fue la formación del derivado cinamoilado **27** con ácido cinámico y trazas de ácido *p*-toluensulfónico.<sup>16</sup>

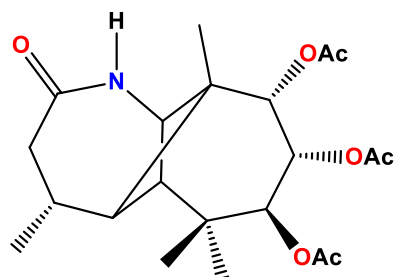


Continuando con la reactividad de **10**, en el ciclo de seis miembros recientemente se realizó el estudio de la reactividad del grupo carbonilo con la adición de derivados de amoníaco entre ellos la 2,4-dinitrofenilhidrazina, el clorhidrato de semicarbazida y el clorhidrato de hidroxilamina formando la 2,4-dinitrofenilhidrazona **28**, la semicarbazona **29** y la oxima **30**. En el mismo estudio, se llevó a cabo la formación de la oxima **31** a partir de **13**.<sup>3</sup>



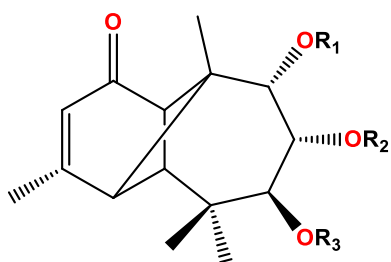
## 2.2 Reacciones de transposición y reordenamiento de la rasteviona

Por la tensión que genera el ciclobutano central en la rasteviona, a partir de **31** se efectuó el reordenamiento de Beckmann, el cual se llevó a cabo por el tratamiento con oxiclórico de fósforo obteniendo la lactama correspondiente. El ciclo de seis miembros del longipinano análogo, se transforma en un ciclo de siete miembros con la consecuente formación de la amida cíclica (**32**).<sup>3</sup>

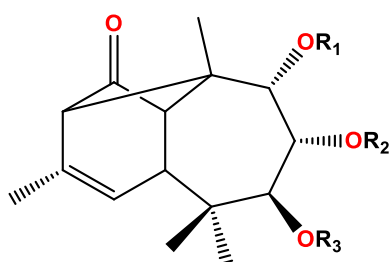


32

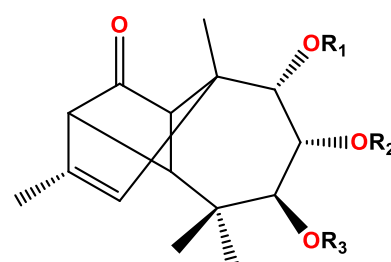
Continuando con el estudio de transposiciones moleculares, se llevó a cabo el estudio de reordenamientos fotoquímicos de derivados de longipinano los cuales se encontraban altamente funcionalizados. La 7 $\beta$ ,9 $\alpha$ -diacetiloxilongipin-2-en-1-ona (**33**) se sometió a irradiación ultravioleta y proporcionó la vulgarona A (**34**) y el compuesto **35**, éste último posee un esqueleto sesquiterpénico tricíclico llamado pingilonano. Se observó que se llevaron a cabo reordenamientos fotoquímicos de **33**, y que éstos ocurren vía [1,3] en reordenamientos sigmatrópicos del C-4-C-10 o de los enlaces C-4-C-5, respectivamente. La 7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triacetiloxilongipin-2-en-1-ona (**36**), se sometió a irradiación similar a la anterior, que produjo los compuestos **37** y el pingilonano **38**.<sup>17</sup> Éstos fueron considerados los productos principales, que se formaron por el cambio [1,3] y como foto productos minoritarios se obtuvieron los compuestos **39** y **40**.<sup>18</sup>



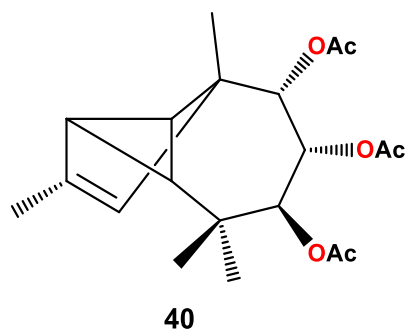
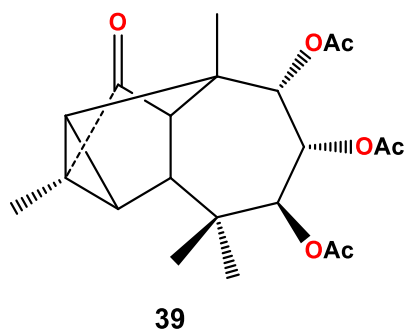
**33:** R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = Ac R<sub>2</sub> = H  
**46:** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = Ac



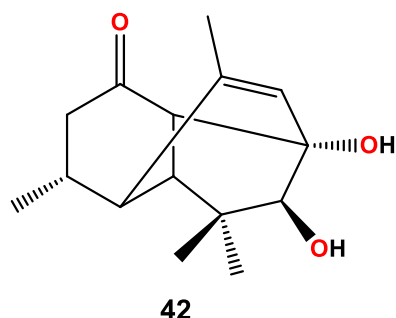
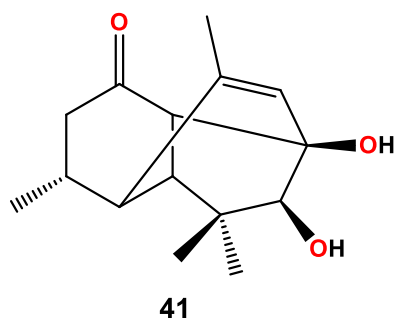
**34:** R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = Ac R<sub>2</sub> = H  
**37:** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = Ac



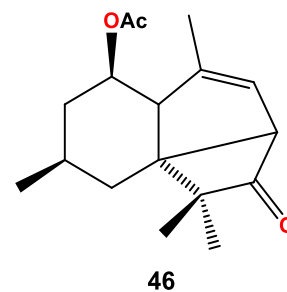
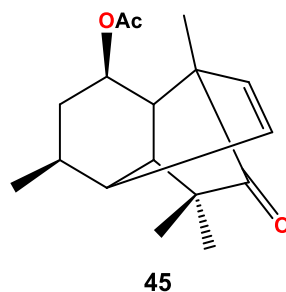
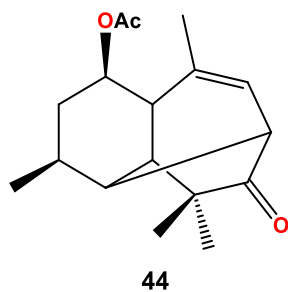
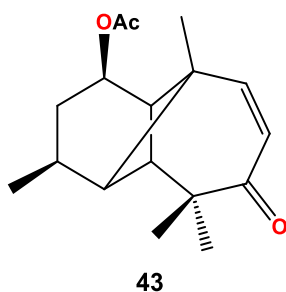
**35:** R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = Ac R<sub>2</sub> = H  
**38:** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = Ac



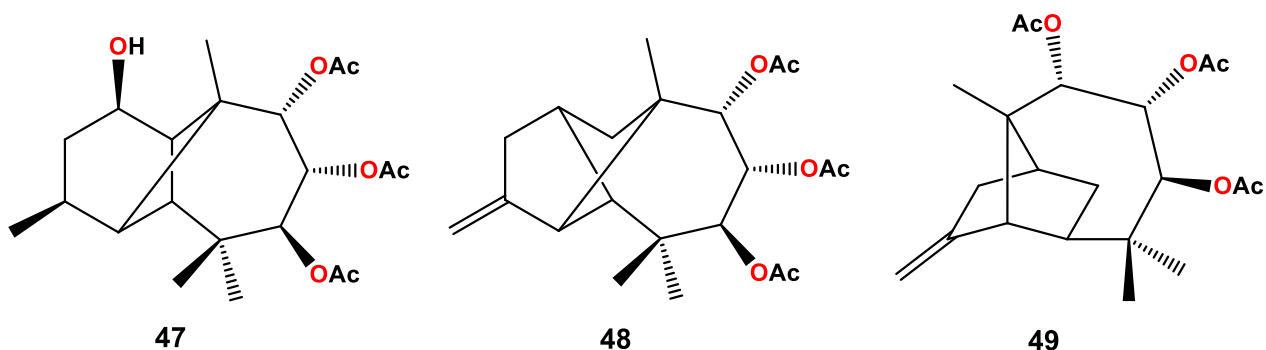
Al observar los nuevos esqueletos obtenidos a partir de la vía [1,3], se realizó el reordenamiento molecular del mesilato de rasteviona **23**, a partir del tratamiento con KOH y MeOH, el cual proporcionó dos derivados epiméricos del 2,6,6,11-tetrametiltriciclo[5.4.0.0<sup>4,8</sup>]undecano (**41** y **42**). El nuevo esqueleto generado se denominó artegano.<sup>19</sup>



Posteriormente, se llevó a cabo la preparación de nuevos esqueletos los cuales fueron llamados quirogano, prenopsano y patzcuareno. Iniciaron con la radiación ultravioleta de (1*R*,3*S*,4*S*,5*S*,10*R*,11*R*)-1-acetiloxi-7-oxolongipin-8-eno (**43**), éste compuesto fue preparado a partir de diésteres de longipineno aislados de *Stevia salicifolia*, que generaron el nuevo quirogano **44** y el prenopsano **45** como productos mayoritarios. A su vez obtuvieron el foto producto (1*R*,3*R*,5*R*,8*S*,11*S*)-1-acetiloxi-7-oxopatzcuar-9-eno (**46**), que posee un esqueleto de sesquiterpeno tricíclico.<sup>20</sup>



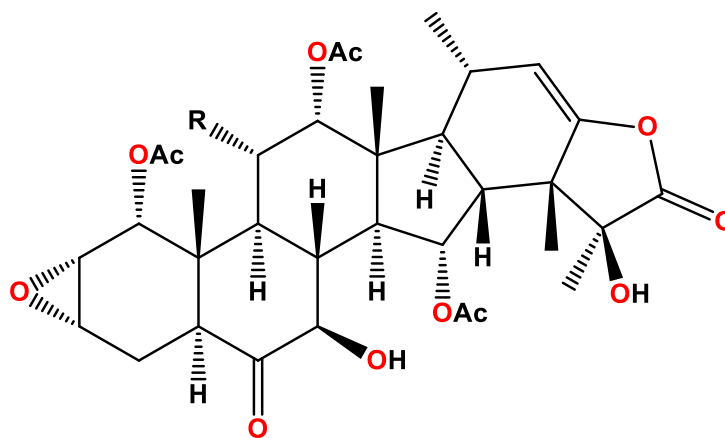
Al observar que el reordenamiento Warner-Meerwein era una técnica efectiva para el reordenamiento y la obtención de nuevos esqueletos, llevaron a cabo un segundo estudio en el cual generaron un esqueleto hidrocarbonado de jiquilpano a través de dos reordenamientos sucesivos Wagner-Meerwein aplicados a derivados de longipinano. Para promover el reordenamiento molecular del (1*R*,3*S*,4*S*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*)-7,8,9-triacetiloxilongipinan-1-ol (**47**), éste compuesto lo sometieron a condiciones ácidas lo que condujo a la formación del (1*S*,4*R*,5*R*,7*S*,8*R*,9*S*,10*S*)-7,8,9-triacetiloxiuruap-3(12)-eno (**48**); posteriormente el estereoisómero en C-3, después de dos reordenamientos Wagner-Meerwein seguidos y de dos migraciones de hidruro 1,2 proporcionó el (4*R*,5*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*,11*S*)-7,8,9-triacetiloxijiquilp-3(12)-eno (**49**). Las estructuras de las nuevas sustancias, fueron comprobadas con RMN de una y dos dimensiones en combinación con análisis de difracción de rayos-X para el uruapano y derivados del jiquilpano. El modelado molecular igualmente, fue utilizado para estudiar los mecanismos de reacción.<sup>21</sup>



### 2.3 Nuevos compuestos estabilizadores de microtúbulos

Los compuestos estabilizadores de microtúbulos son un grupo de moléculas aisladas de una amplia gama de fuentes, incluyendo microorganismos, esponjas y plantas. Actualmente nuevos estabilizadores se continúan aislando con sus correspondientes sitios activos.

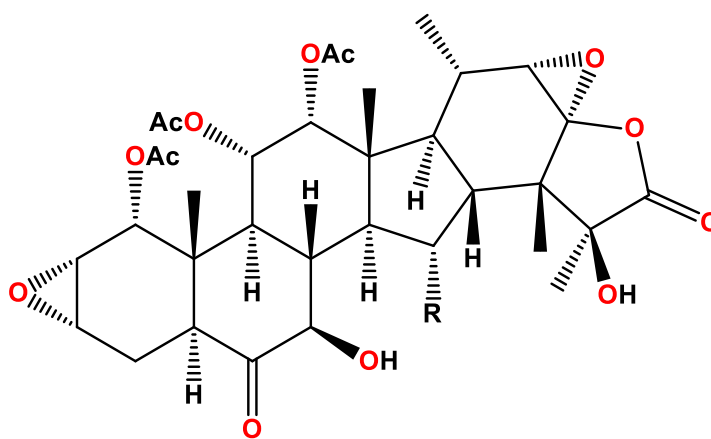
Recientes estudios han descubierto un nuevo género de planta llamado *Tacca chantrieri*, el cual proporciona tacalonólidas, los cuales son esteroides altamente acetilados que poseen actividad estabilizadora de microtúbulos. Los tacalonólidas **50** y **51** son agentes antitumorales muy potentes y eficaces contra modelos murinos de cáncer que son insensibles a paclitaxel.



**50:** R = OAc

**51:** R = H

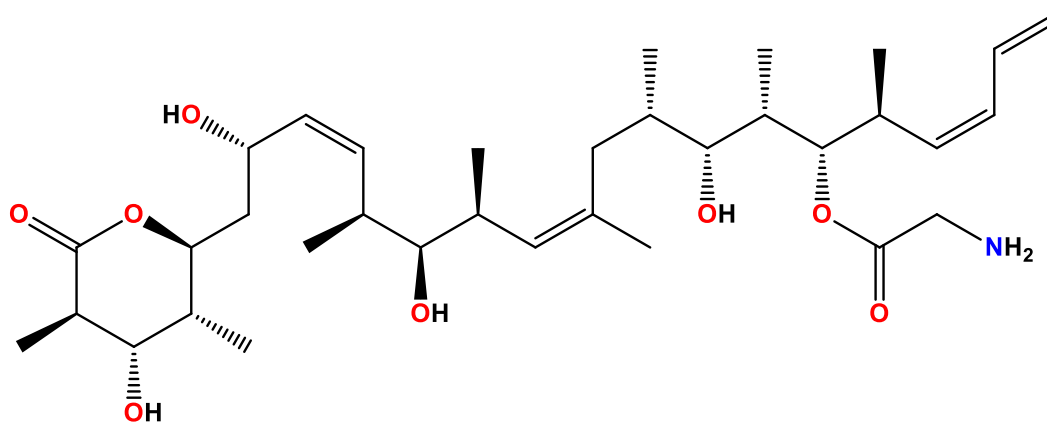
El aislamiento de la tacalonólida **52** y la generación de su análogo semi-sintético **53**, demostraron por primera vez una interacción directa con la tubulina purificada. Éstos estimulan la polimerización de la tubulina en un grado muy cercano al paclitaxel pero con diferente cinética. En presencia del paclitaxel, la tubulina se polimeriza inmediatamente; sin embargo, con **52** o **53** observaron un notable periodo de retraso, lo que sugiere la posibilidad de una interacción diferente. Recientemente se ha demostrado que las tacalonólidas se unen covalentemente a la tubulina, lo que probablemente explica las propiedades distintas en comparación con otros estabilizadores de microtúbulos, incluyendo su potente actividad *in vitro*.<sup>22</sup>



**52:** R = OH

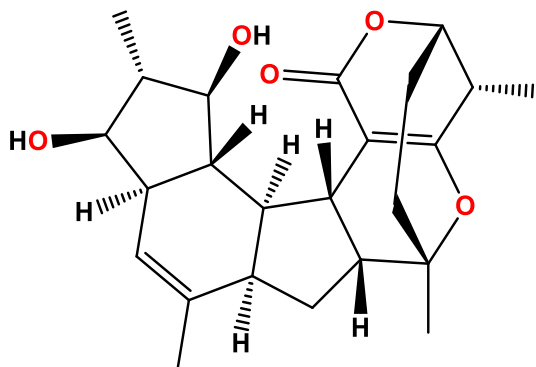
**53:** R = OAc

También, a partir de organismos marinos han aislado compuestos con actividad similar. De la esponja marina *Discodermina dissoluta* se aisló la discodermolida (**54**), un policétido que se describió inicialmente como un potente inmunodepresor. Años más tarde, se descubrió que tenía potencia en la inducción de haces de microtúbulos en células, además de inhibir fuertemente la unión del taxol a su sitio en los microtúbulos. El comportamiento citotóxico sinérgico entre la discodermolida y el taxol ha sido descrito, ya que ambos compiten por el mismo sitio de unión. Desafortunadamente la discodermolida no ha superado las fases clínicas de desarrollo como fármaco antitumoral debido a su elevada toxicidad.<sup>10</sup>



54

Otro compuesto que fue descrito como estabilizador de microtúbulos fue la ciclostreptina (**55**), que fue aislada del medio de cultivo de bacterias del género *Streptomyces*. De igual manera compite fuertemente con el taxol por su sitio en los microtúbulos, pero las células resistentes a taxol son sensibles a este ligando.<sup>10</sup>



55

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad existe un gran número de especies vegetales de las cuales se desconoce su composición química, y por lo tanto la estructura del o los productos naturales que pudiesen presentar alguna actividad, es necesario llevar a cabo el estudio químico de las especies que se encuentran a nuestro alrededor.

La rasteviona con el esqueleto de longipinano, posee tensión generada por el ciclobutano central, la cual ha sido aprovechada para llevar a cabo transposiciones con facilidad y así poder producir distintos tipos de reordenamientos y en consecuencia poder realizar varias reacciones; basados en esto, se realizó el estudio de la reactividad de los grupos hidroxilo de la lactama tricíclica producida por el reordenamiento del longipinano **31** para poder identificar su reactividad al realizar variaciones en las condiciones de reacción como lo son concentración de reactivos, temperatura y tiempo.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Analizar el comportamiento de los grupos hidroxilo de la lactama tricíclica preparada a partir de rasteviona; aislada de raíces de *Stevia serrata* Cav.

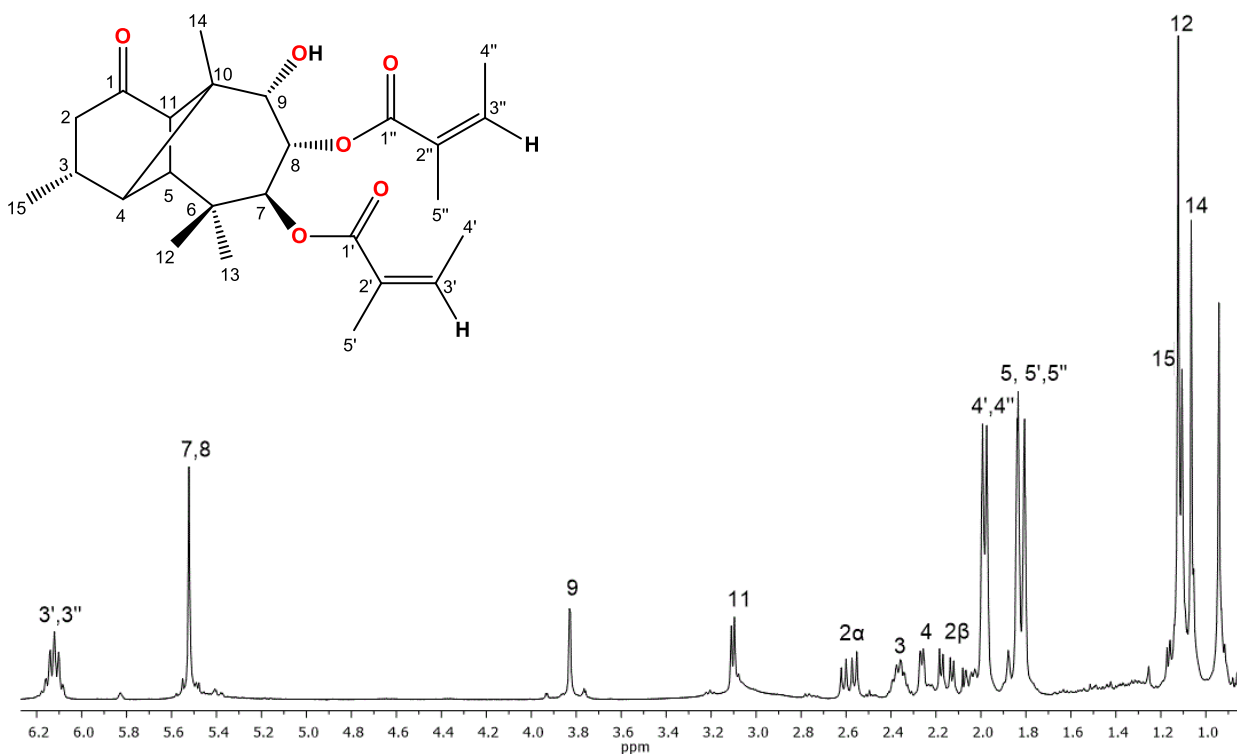
### 4.2 Objetivos específicos.

- Recolección, secado y molienda de raíces de *Stevia serrata* Cav.
- Obtención de rasteviona a partir de reflujo en hexano de las raíces de *Stevia serrata* Cav.
- Separación y purificación por técnicas cromatográficas de la lactama tricíclica obtenida a partir del triacetato de rasteviona.
- Realizar el estudio de la reactividad al variar concentración de reactivos, temperatura de reacción y tiempo.
- Elucidar y caracterizar los productos obtenidos por medio de sus propiedades físicas y espectroscópicas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de la materia prima

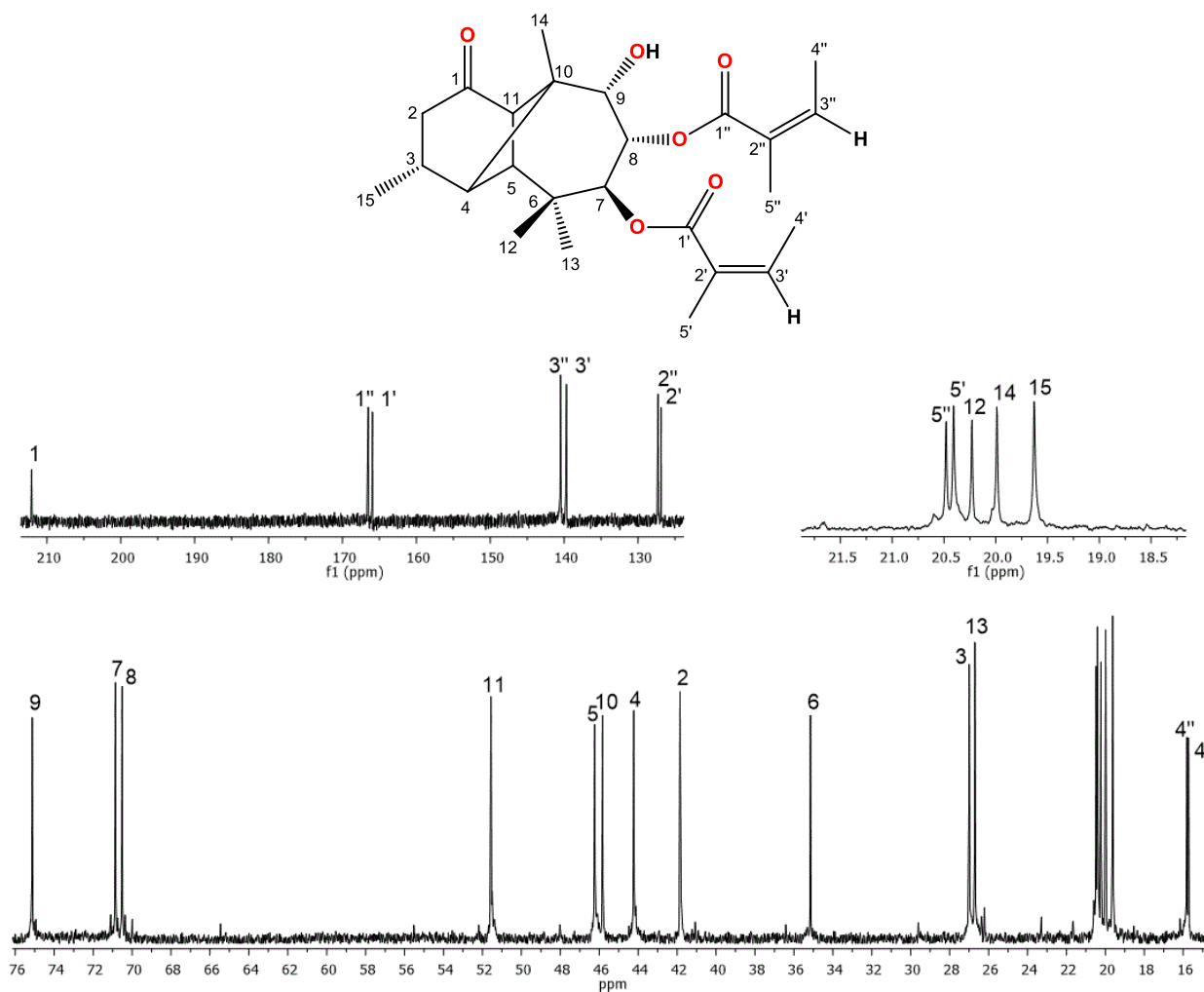
Del extracto hexánico de las raíces de *Stevia serrata* Cav. se obtuvo en forma cristalina la rasteviona (**10**). En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 6), se identificaron en 6.12 ppm las señales para los hidrógenos vínlicos H-3' y H-3'' correspondientes al sistema angelóilo, en 5.52 ppm se observó una señal simple correspondiente a los hidrógenos bases de angelóilo H-7 y H-8. La señal del protón H-9 base de hidróxilo proporcionó una señal doble en 3.82 ppm ( $J = 2.0$  Hz), en 3.10 ppm se observó una señal doble correspondiente al H-11 ( $J = 5.5$  Hz).



**Figura 6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de la rasteviona (**10**).

En cuanto al espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 7), presentó 25 señales que corresponden al esqueleto sesquiterpénico de la rasteviona y a los angelóilos. En 212.0 ppm, se observó la señal correspondiente al carbonilo, en 166.5 y 165.9 ppm se observaron las señales correspondientes a los carbonilos de los angelatos 1'' y 1' respectivamente. Se observó una señal a 75.1 ppm

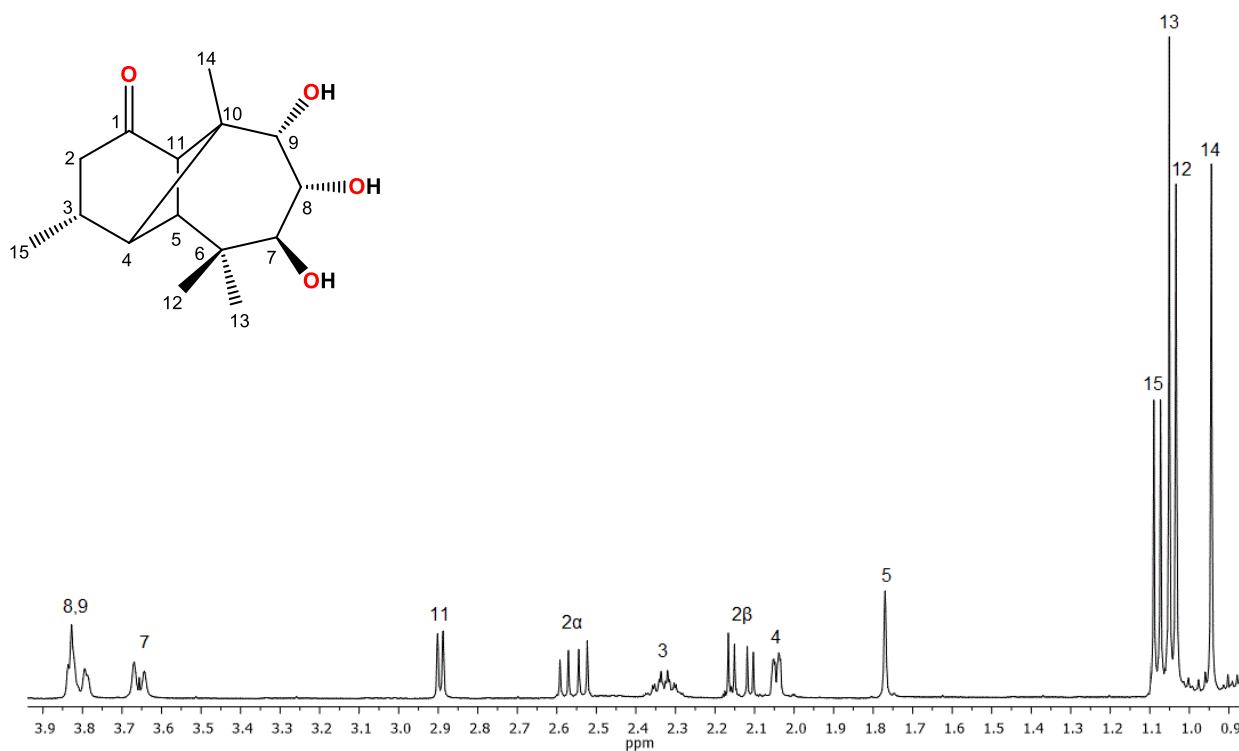
asignada a C-9 base de hidroxilo. En 70.8 y 70.5 ppm aparecieron dos señales que fueron asignadas a C-7 y C-8.



**Figura 7.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz de la rasteviona (**10**).

A continuación, el tratamiento del producto natural rasteviona (**10**) con hidróxido de potasio en metanol, hidrolizó los ésteres angélicos y condujo a la formación de la triolona (**12**) con aspecto aceitoso de color amarillo claro. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 8), mostró la desaparición de los hidrógenos y metilos vinílicos de los angeloilos. Las señales de base de hidroxilo H-8 y H-9 se observaron parcialmente sobrepuestas y desplazadas hacia campo alto en 3.81 ppm. Alrededor de 3.65 ppm se observó una señal doble correspondiente a la base de hidroxilo H-7 ( $J = 10.3$  Hz). En 2.89 ppm apareció una señal doble originada por el protón metínico del ciclobutano H-11 ( $J =$

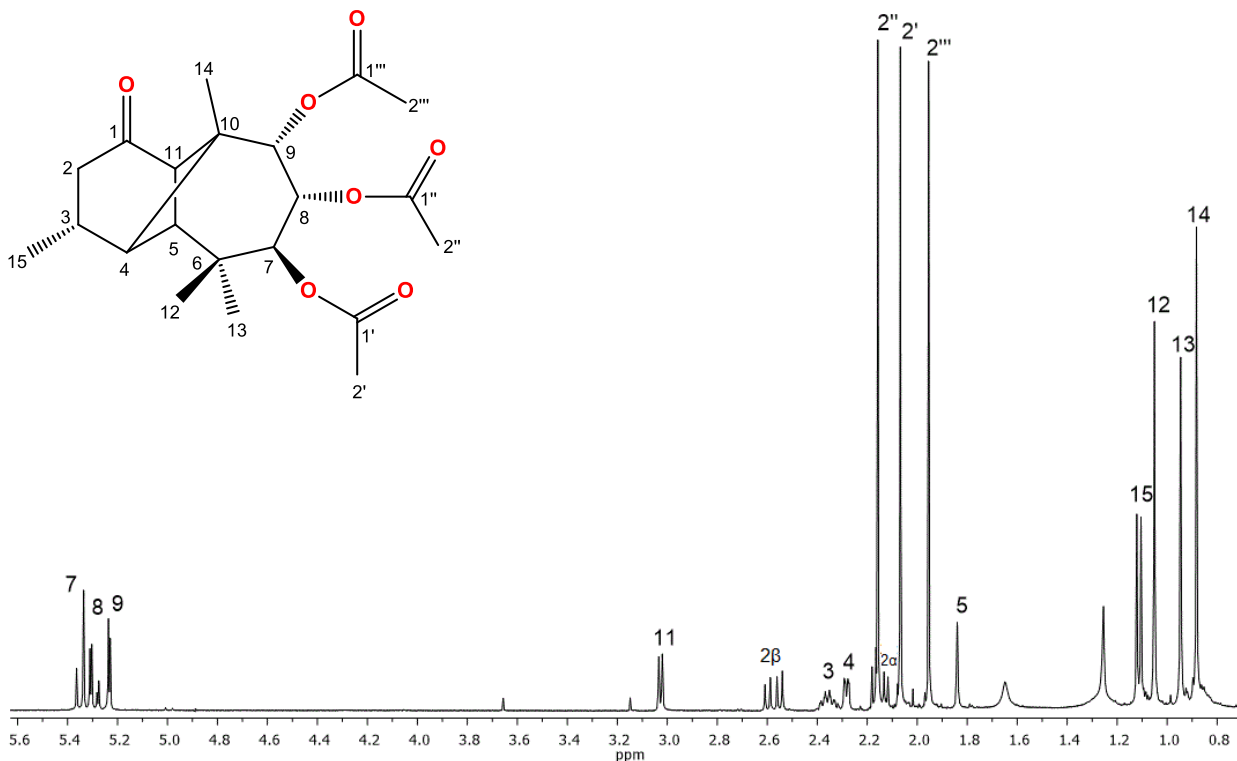
5.5 Hz). En 1.05, 1.03 y 0.94 ppm se observaron las señales simples correspondientes a los metilos terciarios 13, 12 y 14, respectivamente.



**Figura 8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de la triolona (**18**).

Posteriormente, el tratamiento del compuesto carbonílico **12** con anhídrido acético en piridina como disolvente, generó el triacetato de triolona (**13**) obteniéndose cristales en forma de agujas de color blanco.

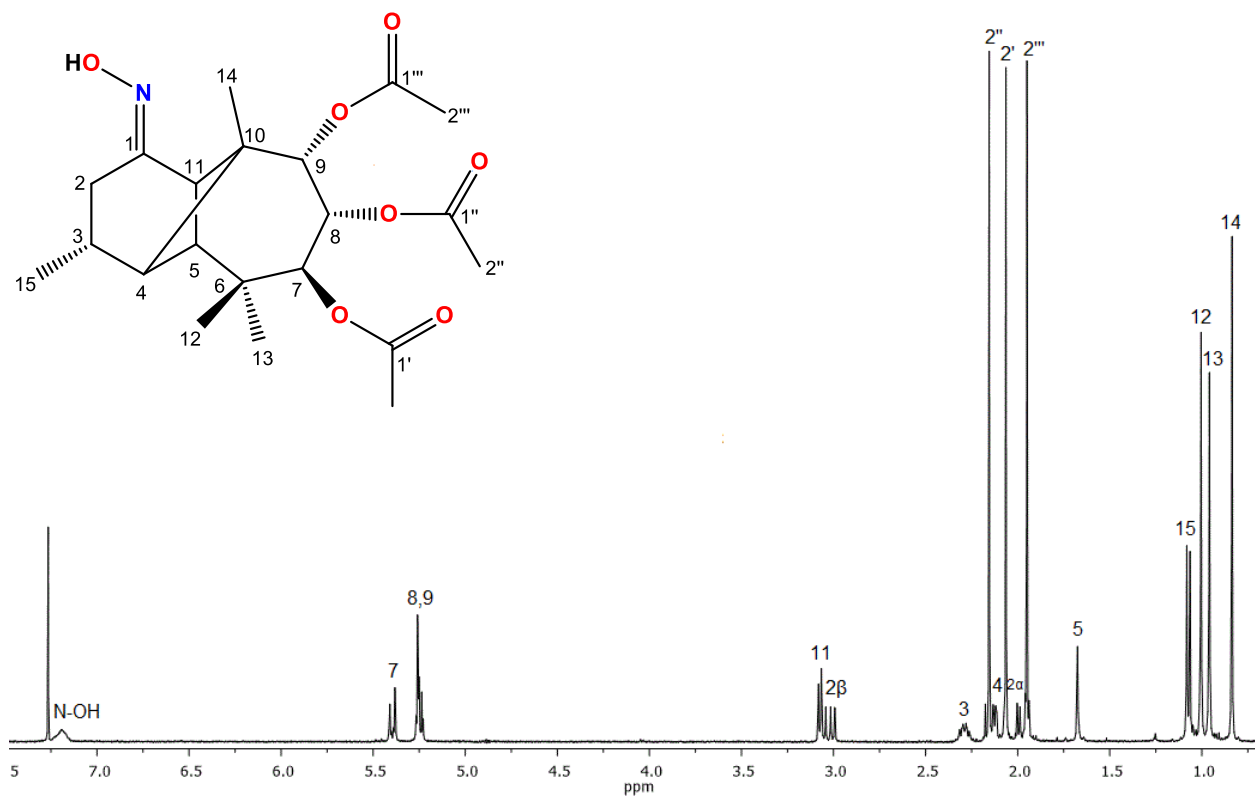
En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 9), se observaron desplazamientos hacia campo alto de los protones base de acetato. En 5.35 ppm se observó una señal doble ( $J = 11.3$  Hz) asignada a H-7, en 5.29 ppm una señal doble de dobles ( $J = 11.3, 3.0$  Hz) debida a H-8 y en 5.23 ppm una señal doble ( $J = 3.0$  Hz) que fue originada por H-9. En 3.02 ppm apareció una señal doble ( $J = 5.6$  Hz) debida a H-11. En 2.15, 2.06 y 1.95 ppm se observaron señales simples debidas a los metilos 2'', 2' y 2''' de los acetilos.



**Figura 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz del triacetato de triolona (**13**).

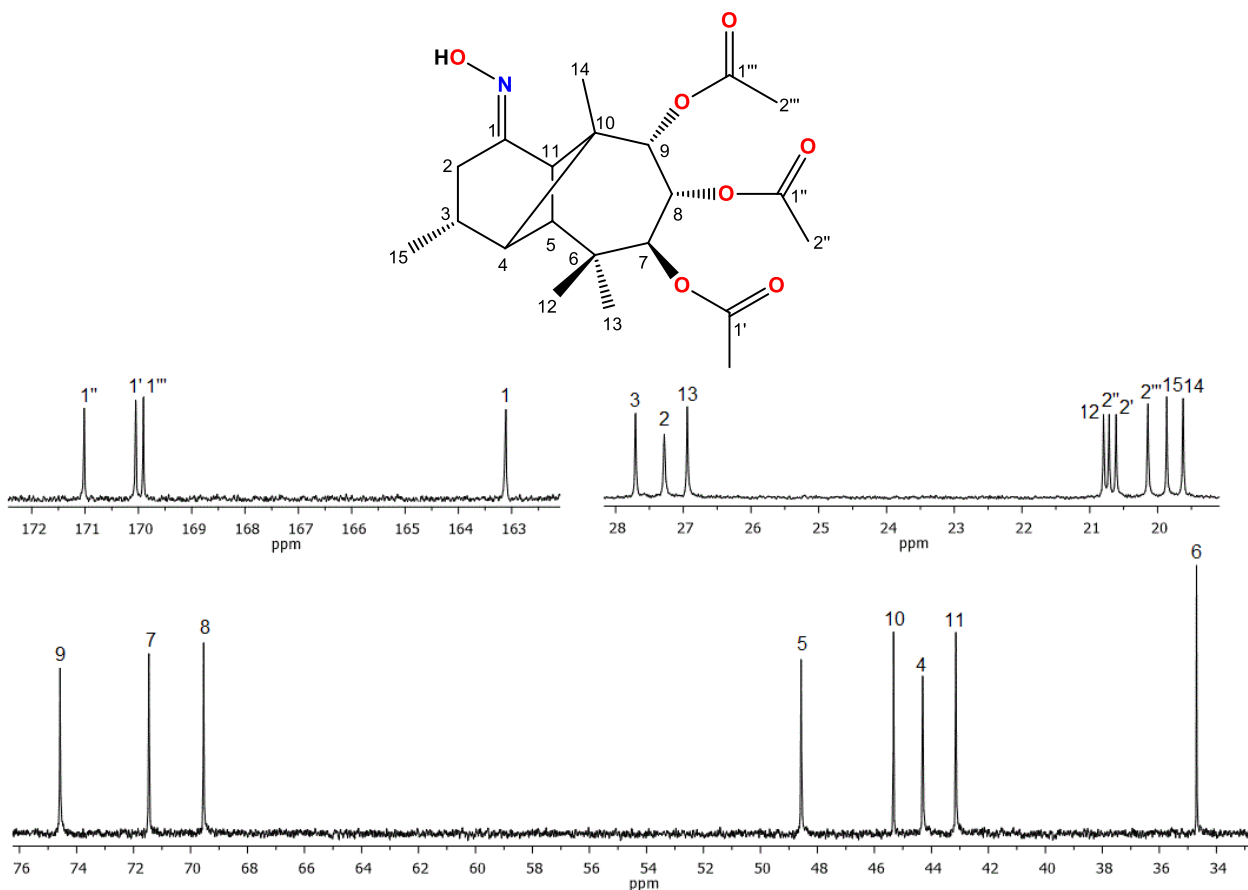
Las oximas de triacetato de triolona (**31**) se obtuvieron mediante tratamiento del compuesto carbonílico **13** con clorhidrato de hidroxilamina en presencia de piridina la cual fungió como disolvente y base. La oxima **31** se obtuvo como cristales de color blanco en forma de placas.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 10), mostró en 7.19 ppm una señal ancha debida al H del –OH del grupo =N-OH, en 5.40 ppm se observó una señal doble ( $J = 11.0$  Hz) asignada a H-7, en 5.25 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 5.7, 3.2$  Hz) debida a H-8 y en 5.23 ppm una señal doble ( $J = 3.2$  Hz) que fue originada por H-9. En 3.07 ppm apareció una señal doble ( $J = 6.2$  Hz) debida a H-11. En 2.15, 2.06 y 1.95 ppm se observaron señales simples debidas a los metilos 2'', 2' y 2''' de los acetilos.



**Figura 10.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 400 MHz de la oxima de triacetato de triolona (**31**).

En su espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 11), se observaron las señales correspondientes de los carbonilos de los acetatos 1'', 1' y 1''' en 171.0, 170.0 y 169.9 ppm. En 163.5 ppm se observó la señal que corresponde al carbono del grupo imino C=N-OH. En 74.5, 71.4 y 69.5 ppm se observaron las señales que fueron asignadas a los carbonos base de acetato 9, 7 y 8 respectivamente.

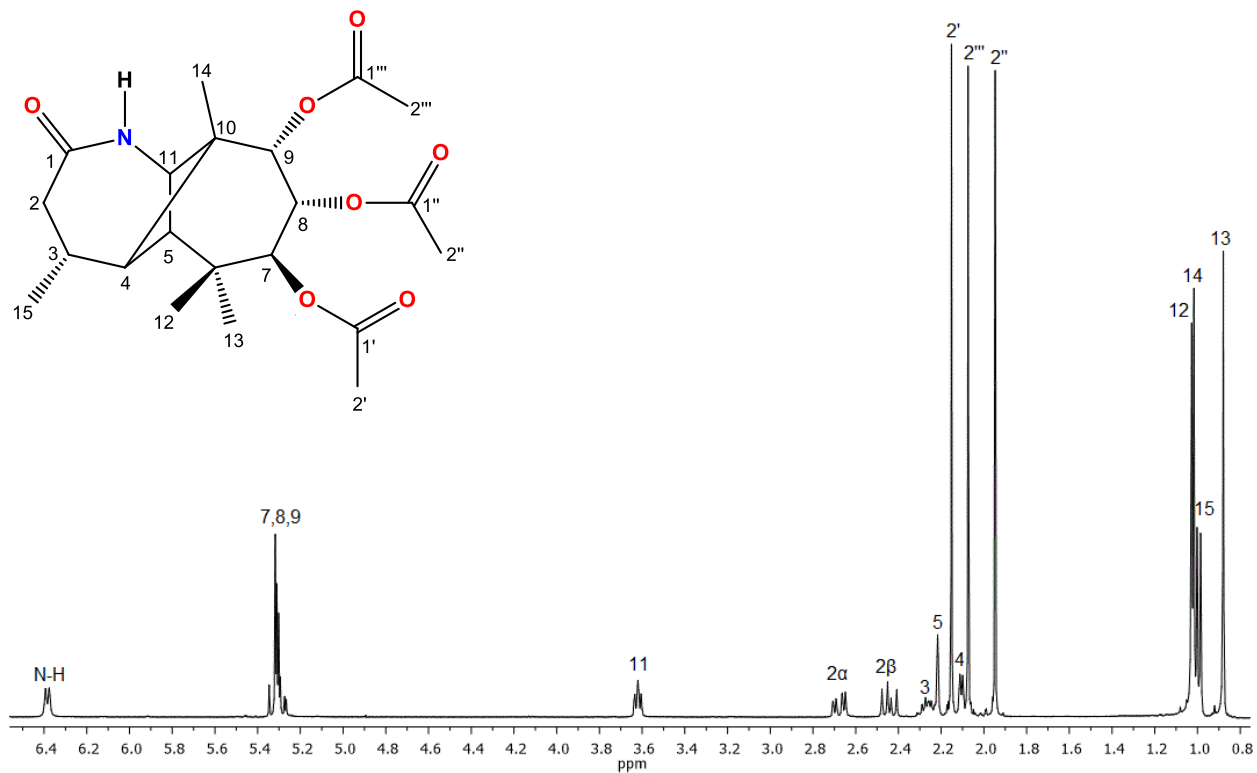


**Figura 11.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz de la oxima de triacetato de triolona (**31**).

## 5.2 Reordenamiento de Beckmann de las oximas

Se realizó el tratamiento de la oxima de triacetato de triolona (**31**) para inducir el reordenamiento de Beckmann. El derivado **31** se trató con oxiclورو de fósforo en piridina como disolvente a temperatura ambiente obteniéndose un sólido amorfo.

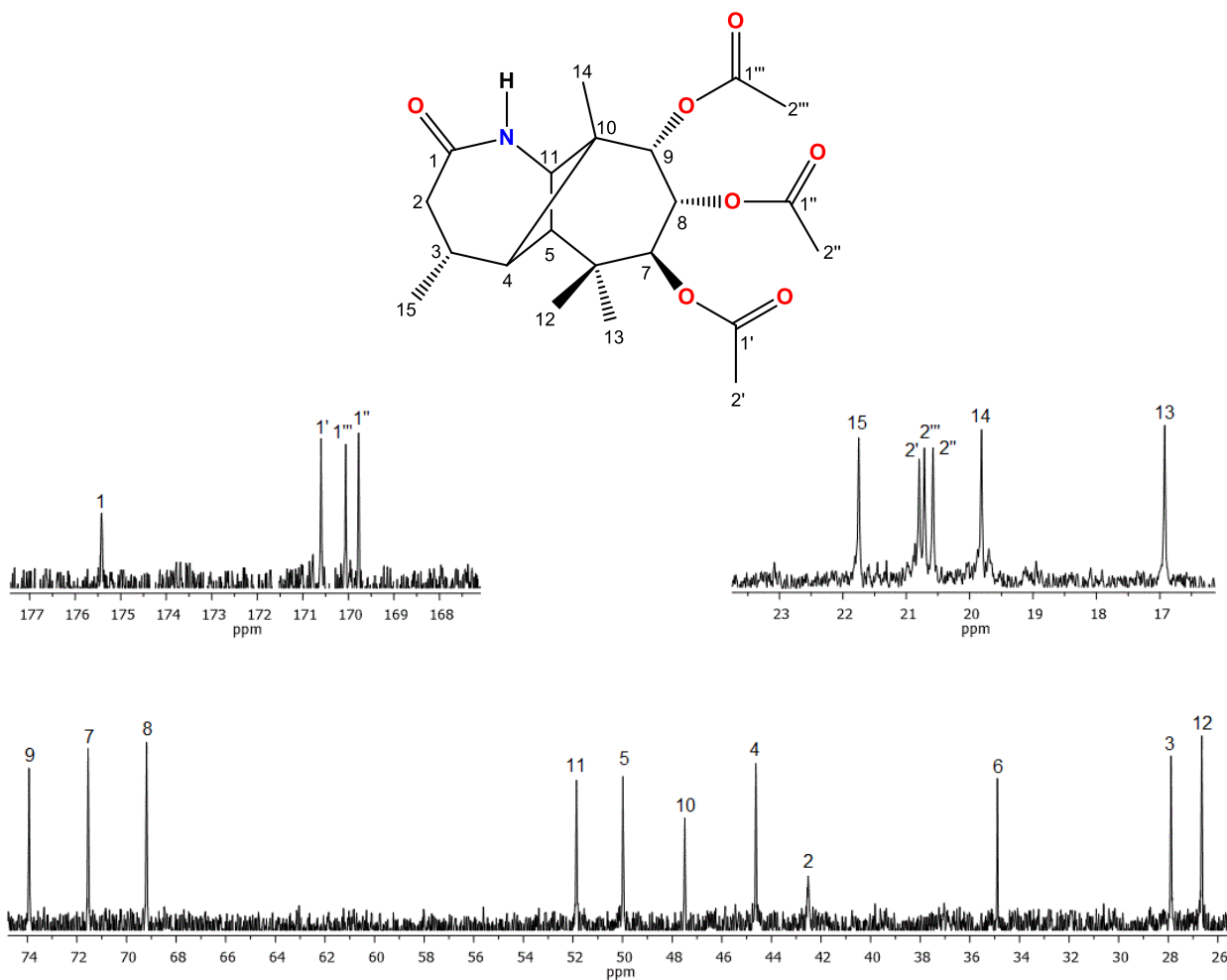
Los cambios significativos en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 12), con respecto al de la oxima de triacetato de triolona, fueron la aparición de una señal doble a 6.04 ppm ( $J = 6.6$  Hz) ligeramente ancha debida al N-H de la lactama. También se llevó a cabo la transformación de la señal doble debida a H-11, en una señal triple en 3.61 ppm ( $J = 5.7$  Hz) debido a su acoplamiento ahora con el N-H. El acoplamiento entre estos dos protones indicó que el enlace que migró hacia el nitrógeno fue el C-1–C-11 con la consecuente salida del OH de la oxima. En 5.32, 5.31 y 5.30 ppm se presentaron tres señales simples que corresponden a H-7, H-9 y H-8 respectivamente.



**Figura 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de la lactama de triacetato de triolona (**32**).

En su espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 13), además de las señales debidas a la parte del sistema de longipinano, se observaron las señales de los carbonilos de los acetatos 1', 1''' y 1'' en 170.6, 170.0 y 169.7 ppm; y la del carbonilo de la lactama en 175.4 ppm. Aparecieron tres señales asignadas a los carbonos base de acetato 9, 7 y 8 en 73.9, 71.5 y 69.2 ppm respectivamente.





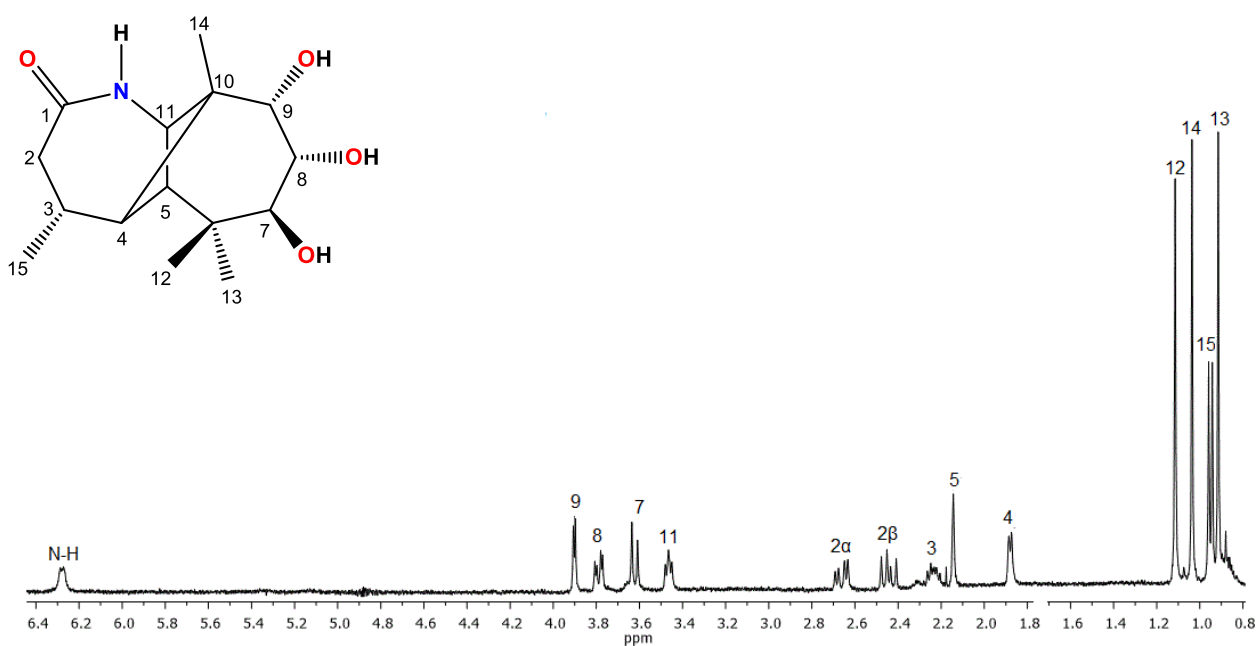
**Figura 13.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz de la lactama de triacetato de triolona (**32**).

### 5.3 Lactama de longipinatriol

El tratamiento del compuesto **32** con hidróxido de potasio en metanol, liberó los grupos hidroxilo de las posiciones 7, 8 y 9 generando la lactama de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (**56**), con aspecto oleoso de color amarillo claro.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 14) mostró en 6.27 ppm una señal doble ( $J = 5.2$  Hz) debida al H del grupo -NH. También, se observó la desaparición de los metilos de los acetatos. Las señales base de hidroxilo H-9, H-8 y H-7 se observaron desplazadas hacia campo alto. En 3.81 ppm se observó una señal doble ( $J = 3.6$  Hz) correspondiente a H-9, en 3.79 ppm, se observó una señal doble de dobles ( $J = 10.5, 3.6$  Hz) correspondiente a H-8 y en 3.59 ppm se observó una señal doble

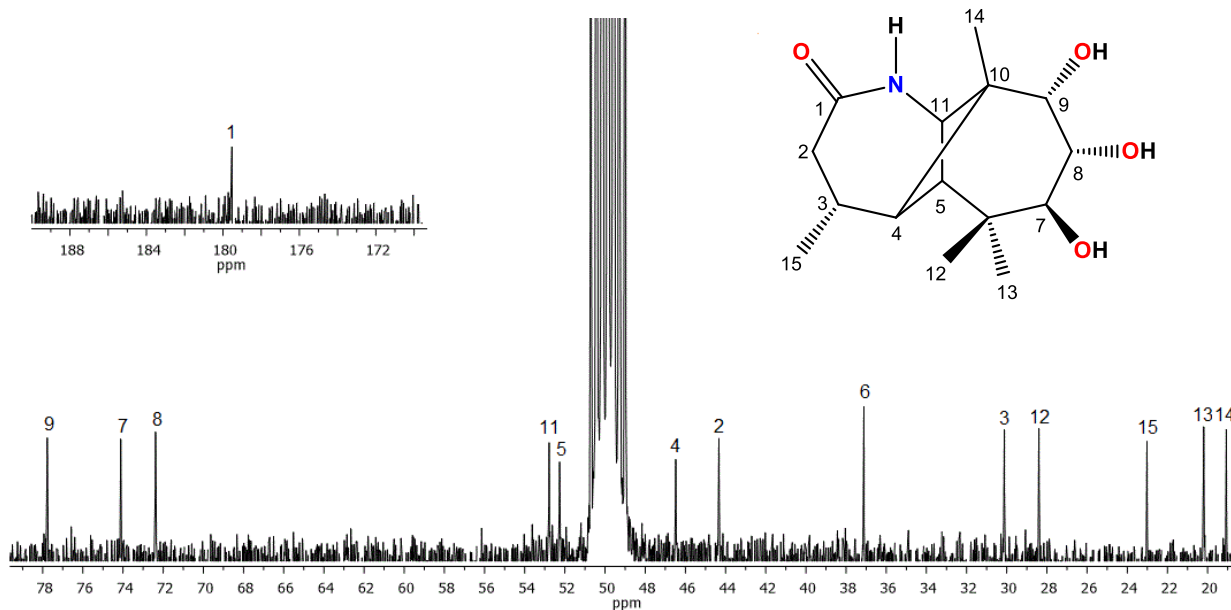
( $J = 10.5$  Hz) asignada a H-7. En 3.49 ppm apareció una señal triple ( $J = 5.8$  Hz) debida a H-11, en 2.66 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 17.1, 6.4$  Hz) asignada al protón H-2 $\alpha$  y en 2.48 ppm otra señal doble de dobles ( $J = 17.1, 10.4$  Hz) correspondiente a H-2 $\beta$ . En 2.26 ppm se asignó una señal múltiple a H-3, en 2.19 ppm apareció una señal simple asignada a H-5. En 1.99 ppm se observó una señal doble ( $J = 4.9$  Hz) que correspondió a H-4. En 0.99 ppm se observó una señal doble ( $J = 6.7$  Hz) que se originó por el metilo secundario H-15. En 1.13 ppm, 1.01 ppm y 0.94 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios 12, 14 y 13 respectivamente.



**Figura 14.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 400 MHz de la lactama de triolona (**56**).

En su espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 15), se observó en 179.6 ppm la señal correspondiente al carbonilo de la lactama, en 77.8, 74.1 y 72.4 ppm aparecieron las señales asignadas a los carbonos base de hidroxilo 9, 7 y 8 respectivamente. En 52.8, 52.3, 46.5 y 30.1 ppm se observan las señales que corresponden a los carbonos terciarios C-11, C-5, C-4 y C-3. En 49.8 y 37.1 ppm aparecieron las señales que se asignaron a los carbonos cuaternarios C-10 y C-6. En 44.3 ppm se observó la

señal que corresponde al carbono secundario C-2. En 28.4, 23.0, 20.2 y 19.1 ppm aparecen las señales que corresponden a los carbonos metílicos C-12, C-15, C-13 y C-14 respectivamente.



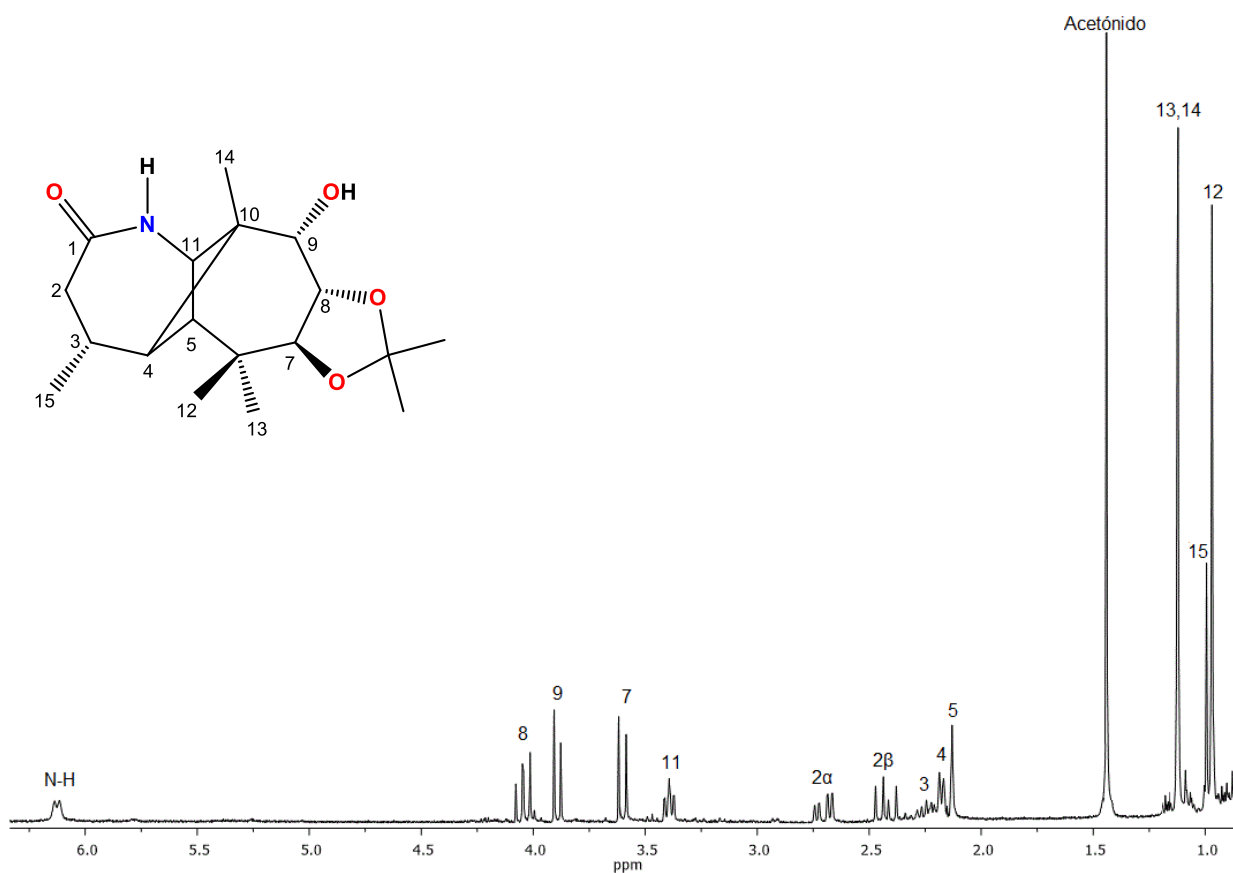
**Figura 15.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  a 100 MHz de la lactama de triolona (**56**).

#### 5.4 Lactama-acetónido

Para comenzar con pruebas de reactividad de los grupos OH, se realizó el tratamiento del compuesto **56** en acetona con ácido *p*-toluensulfónico que proporcionó un sólido amorfo de color blanco, correspondiente a la lactama de 7,8-acetónido longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (**57**).

Su espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 16) mostró en 6.13 ppm una señal doble ( $J = 7.4$  Hz) debida al H del grupo -NH. En 4.04 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 10.2, 8.8$  Hz) correspondiente a H-8, en 3.89 ppm, se observó una señal doble ( $J = 8.8$  Hz) correspondiente a H-9 y en 3.59 ppm se observó una señal doble ( $J = 10.2$  Hz) asignada a H-7. En 3.38 ppm apareció una señal triple ( $J = 6.1$  Hz) debida al H-11, en 2.70 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 17.7, 6.6$  Hz) asignada al protón H-2 $\alpha$  y en 2.43 ppm otra señal doble de dobles ( $J = 17.7, 10.3$  Hz) correspondiente a H-2 $\beta$ . En 2.23 ppm se asignó una señal múltiple a H-3, en 2.17 ppm apareció una señal doble ( $J = 4.2$  Hz) asignada a H-4. En 2.12 ppm se observó una señal simple que

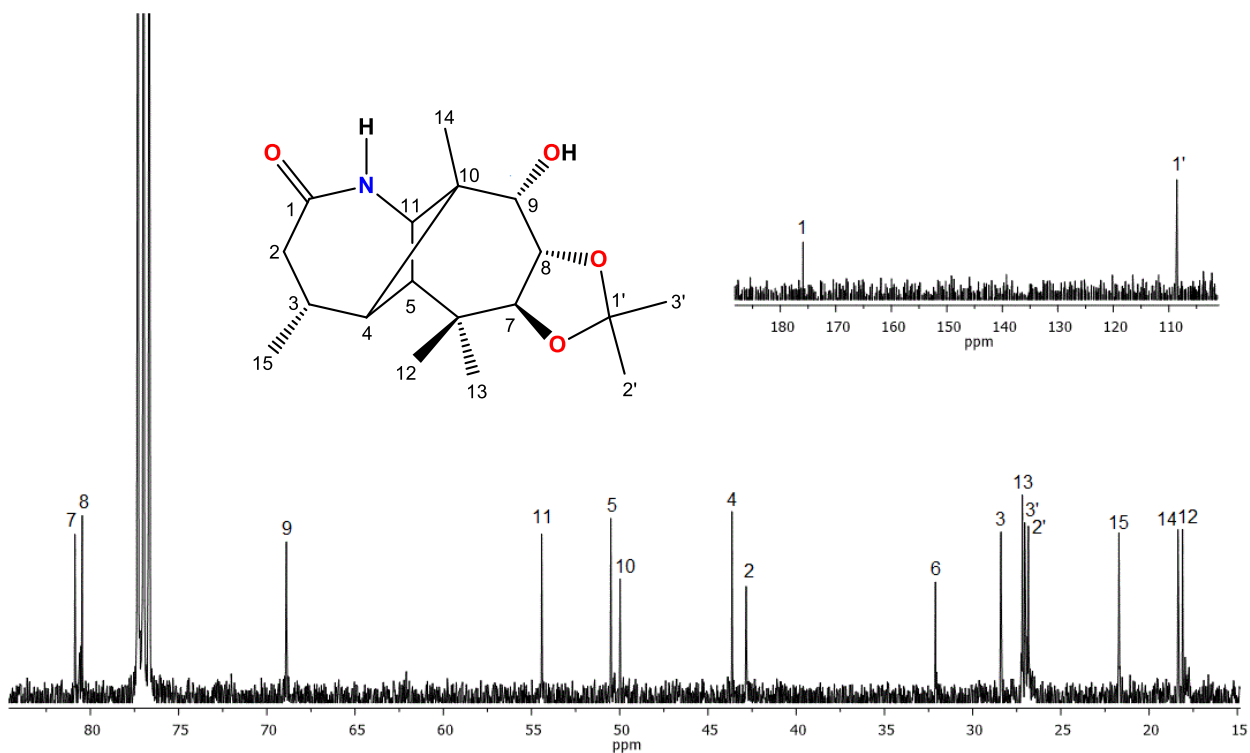
correspondió a H-5. En 1.56 ppm se observó la señal corresponde a los protones metílicos del acetónido. En 1.12, 1.11 y 0.96 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios 13, 14 y 12 respectivamente. En 0.98 ppm se observó una señal doble ( $J = 6.1$  Hz) que se originó por el metilo secundario H-15.



**Figura 16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de la lactama-acetónido (**57**).

En su espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 17), se observó en 175.7 ppm la señal correspondiente al carbonilo de la lactama, en 108.5 ppm apareció la señal del carbono cuaternario del anillo de dioxolano asignada a C-1'. En 80.9 y 80.4 ppm se observaron las señales que corresponden a los carbonos base de acetónido C-7 y C-8 respectivamente. En 68.8 ppm se observa la señal asignada al carbono base de hidroxilo C-9. En 54.4, 50.5, 43.6 y 28.4 ppm se observan las señales correspondientes a los carbonos terciarios C-11, C-5, C-4 y C-3. Los carbonos cuaternarios C-10 y C-6, aparecen en 49.9 y 32.1 ppm. En 42.8 ppm se muestra la señal que corresponde al carbono

secundario C-2. Las señales de los carbonos metílicos C-13, C-15, C-14 y C-12 aparecen en 27.2, 21.7, 18.4 y 18.1 ppm respectivamente. En 27.0 y 26.8 ppm se observan las señales asignadas a los carbonos metílicos del acetónido C-3' y C-2'.



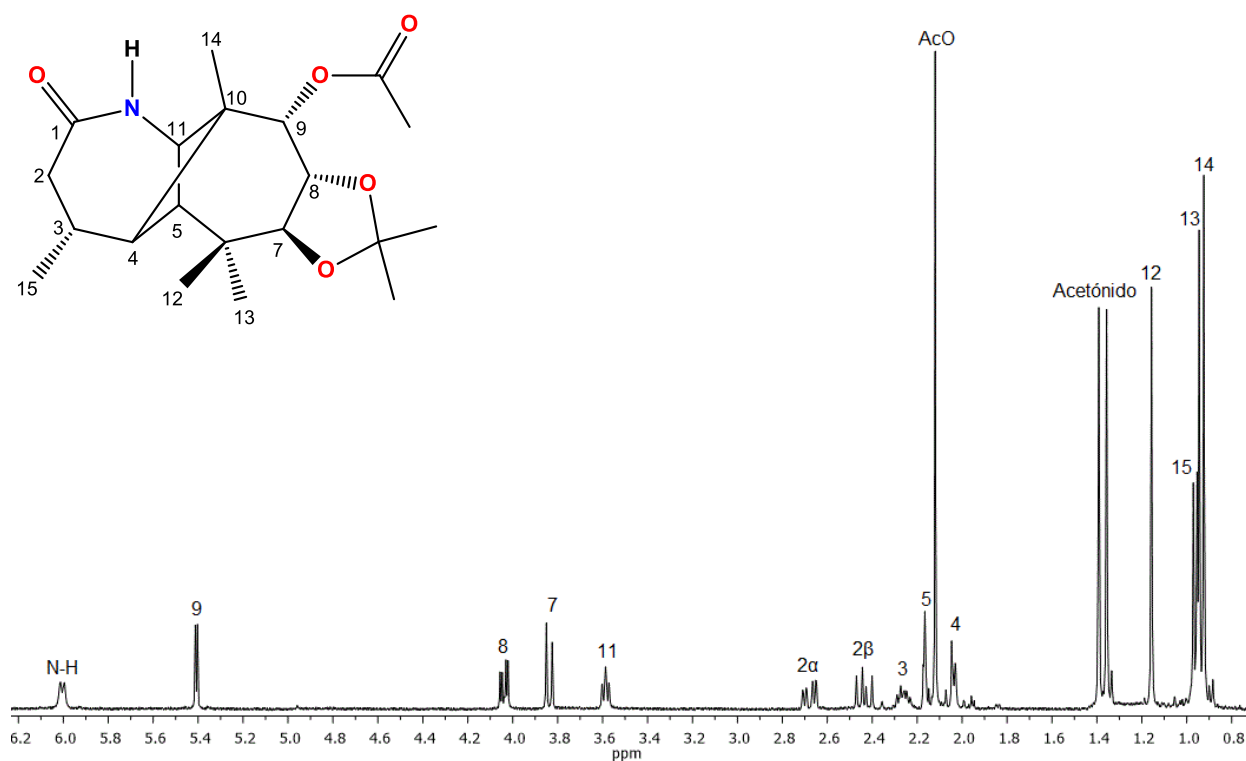
**Figura 17.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz de la lactama-acetónido (**57**).

### 5.5 Lactama-acetónido-acetato

El tratamiento del compuesto **57** con anhídrido acético en piridina, generó la lactama de 7,8-acetonido 9-acetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (**58**) obteniéndose un sólido amorfo de color blanco.

Su espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 18) mostró en 6.75 ppm una señal doble ( $J = 6.4$  Hz) debida al H del grupo -NH. Hacia campo bajo, podemos encontrar desplazada a 5.40 ppm una señal doble ( $J = 3.8$  Hz) correspondiente a H-9. En 4.07 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 10.4, 3.8$  Hz) correspondiente a H-8, en 3.81 ppm, se observó una señal doble ( $J = 10.4$  Hz) correspondiente a H-7. En 3.59 ppm apareció una señal triple ( $J = 6.7$  Hz) debida al H-11, en 2.67 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 17.1, 6.5$  Hz) asignada al protón H-2 $\alpha$  y en 2.43 ppm otra señal

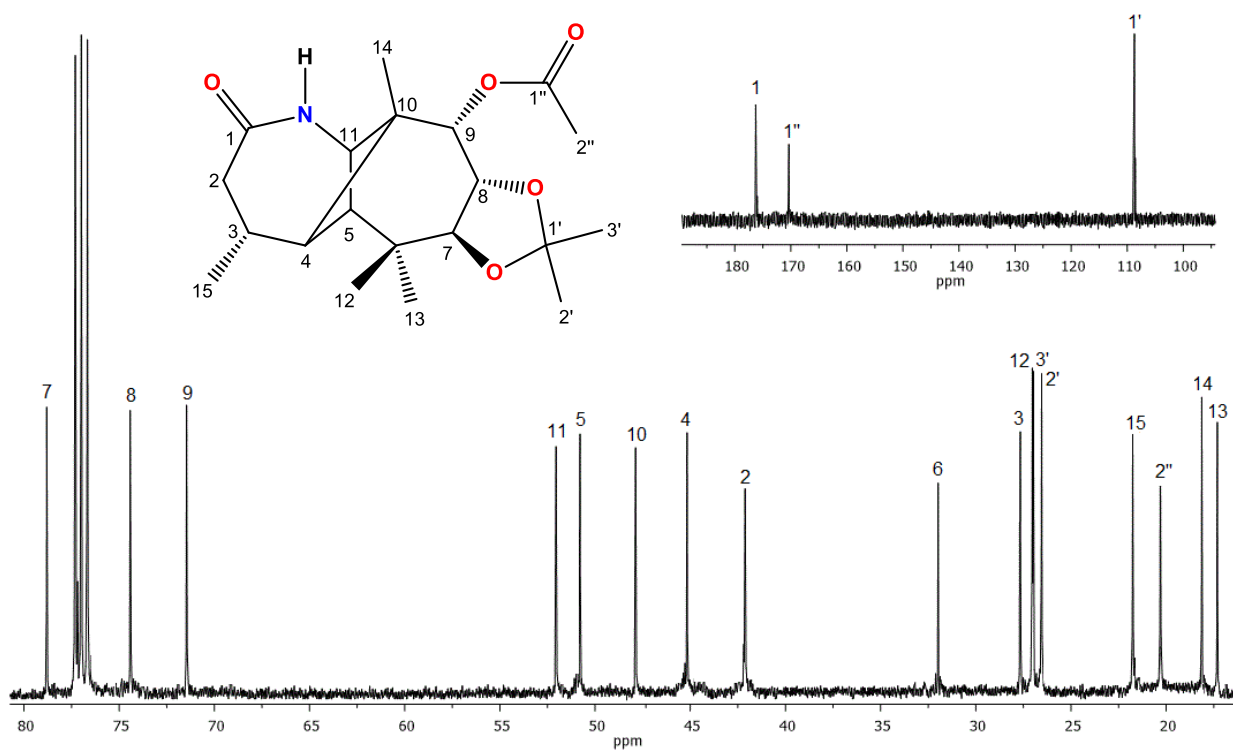
doble de dobles ( $J = 17.1, 10.4$  Hz) correspondiente a H-2 $\beta$ . En 2.23 ppm se asignó una señal múltiple a H-3. En 2.15 ppm se observó una señal simple que correspondió a H-5. En 2.12 ppm, apareció una señal simple correspondiente a los protones metílicos del acetato. En 2.04 ppm, se observó una señal doble ( $J = 6.7$  Hz) que fue asignada a H-4. En 1.38 y 1.35 ppm, se observaron dos señales simples correspondientes a los protones metílicos del acetónido. En 0.96 ppm se observó una señal doble ( $J = 6.6$  Hz) que se originó por el metilo secundario H-15. En 1.15, 0.94 y 0.91 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios 12, 13 y 14 respectivamente.



**Figura 18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de la lactama-acetónido-acetato (58).

En su espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 19), se observa la señal que corresponde al carbonilo de la lactama C-1 en 176.2 ppm. En 170.0 ppm aparece la señal asignada al carbonilo del acetato C-1''. En 108.5 ppm se observó la señal correspondiente al carbono C-1' del acetónido. Las señales que fueron asignadas a los carbonos base de acetónido C-7 y C-8 se observaron en 78.8 y 74.4 ppm respectivamente. En 71.5 ppm se mostró la señal que corresponde al carbono base de acetato C-

9. Los carbonos terciarios C-11, C-5, C-4 y C-3 aparecieron en 52.0, 50.8, 45.1 y 27.9 ppm respectivamente. En 47.9 y 32.0 ppm se mostraron las señales que se asignaron a C-10 y C-6. En 42.1 ppm se observó la señal que corresponde al carbono secundario C-2. Los carbonos metílicos C-12, C-15, C-14 y C-13 se observaron en 27.0, 21.8, 18.1 y 17.3 ppm respectivamente. En 26.9 y 26.5 ppm se mostraron las señales correspondientes a los carbonos metílicos C-3' y C-2' del acetónido. En 20.8 ppm aparece la señal que fue asignada al carbono metílico del acetato C-2''.



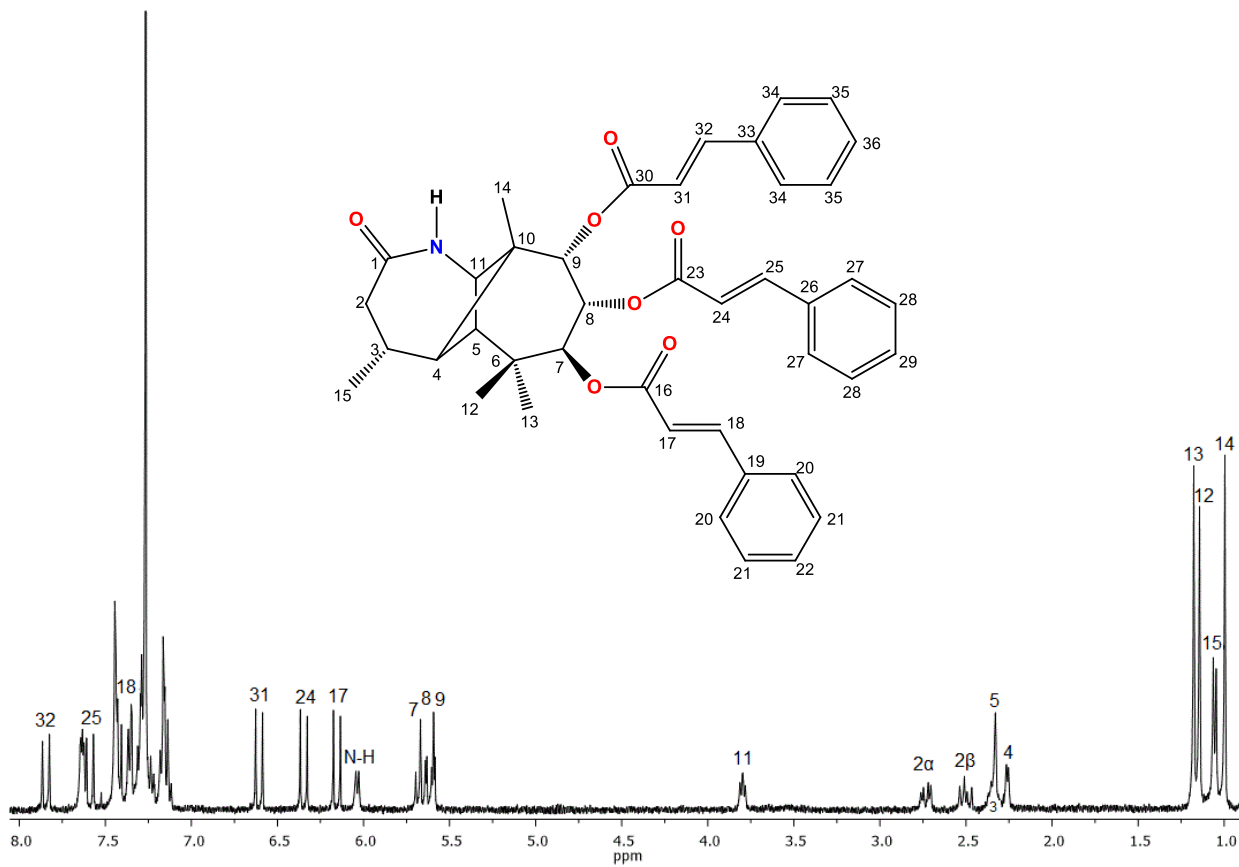
**Figura 19.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz de la lactama-acetónido-acetato (**58**).

## 5.6 Lactama-tricinamato

Se realizaron una serie de pruebas de reactividad a la lactama **56** con cloruro de cinamoilo al variar la concentración de reactivo, temperatura y tiempo de reacción. El tratamiento del compuesto **56** con cloruro de cinamoilo (1:4) y piridina como disolvente y base por 5 horas en baño de vapor proporciona la lactama de 7,8,9-tricinamato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (**59**) con aspecto aceitoso de color naranja.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 20), hacia campo bajo podemos observar tres señales dobles en 7.84 ppm ( $J = 16.0$  Hz), 7.59 ppm ( $J = 16.0$  Hz) y 7.43 ppm ( $J = 16.0$  Hz) que fueron asignadas a los protones vinílicos H-32, H-25 y H-18 respectivamente. En 6.60 ppm ( $J = 16.0$  Hz), 6.34 ppm ( $J = 16.0$  Hz) y 6.15 ppm ( $J = 16.0$  Hz) se observaron tres señales dobles que corresponden a los protones vinílicos alfa al carbonilo H-31, H-24 y H-17. Entre 7.64 y 7.13 ppm se observaron las señales que corresponden a los protones aromáticos. En 6.15 ppm una señal doble ( $J = 7.4$  Hz) debida al H del grupo -NH. En 5.66 ppm se observó una señal doble ( $J = 11.0$  Hz) asignada a H-7. En 5.64 ppm se mostró una señal doble de dobles ( $J = 11.0, 3.4$  Hz) que corresponde a H-8 y en 5.58 ppm una señal doble ( $J = 3.4$  Hz) correspondiente a H-9. En 3.80 ppm se observó una señal triple ( $J = 6.4$  Hz) debida al H-11, en 2.70 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 17.5, 6.0$  Hz) asignada al protón H-2 $\alpha$  y en 2.48 ppm otra señal doble de dobles ( $J = 17.5, 10.4$  Hz) correspondiente a H-2 $\beta$ . En 2.33 ppm se asignó una señal múltiple a H-3. En 2.32 ppm se observó una señal simple que correspondió a H-5. En 2.26 ppm, se observó una señal doble ( $J = 5.2$  Hz) que fue asignada a H-4. En 1.07 ppm se observó una señal doble ( $J = 6.7$  Hz) que se originó por el metilo secundario H-15. En 1.18, 1.14 y 0.99 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios 13, 12 y 14 respectivamente.

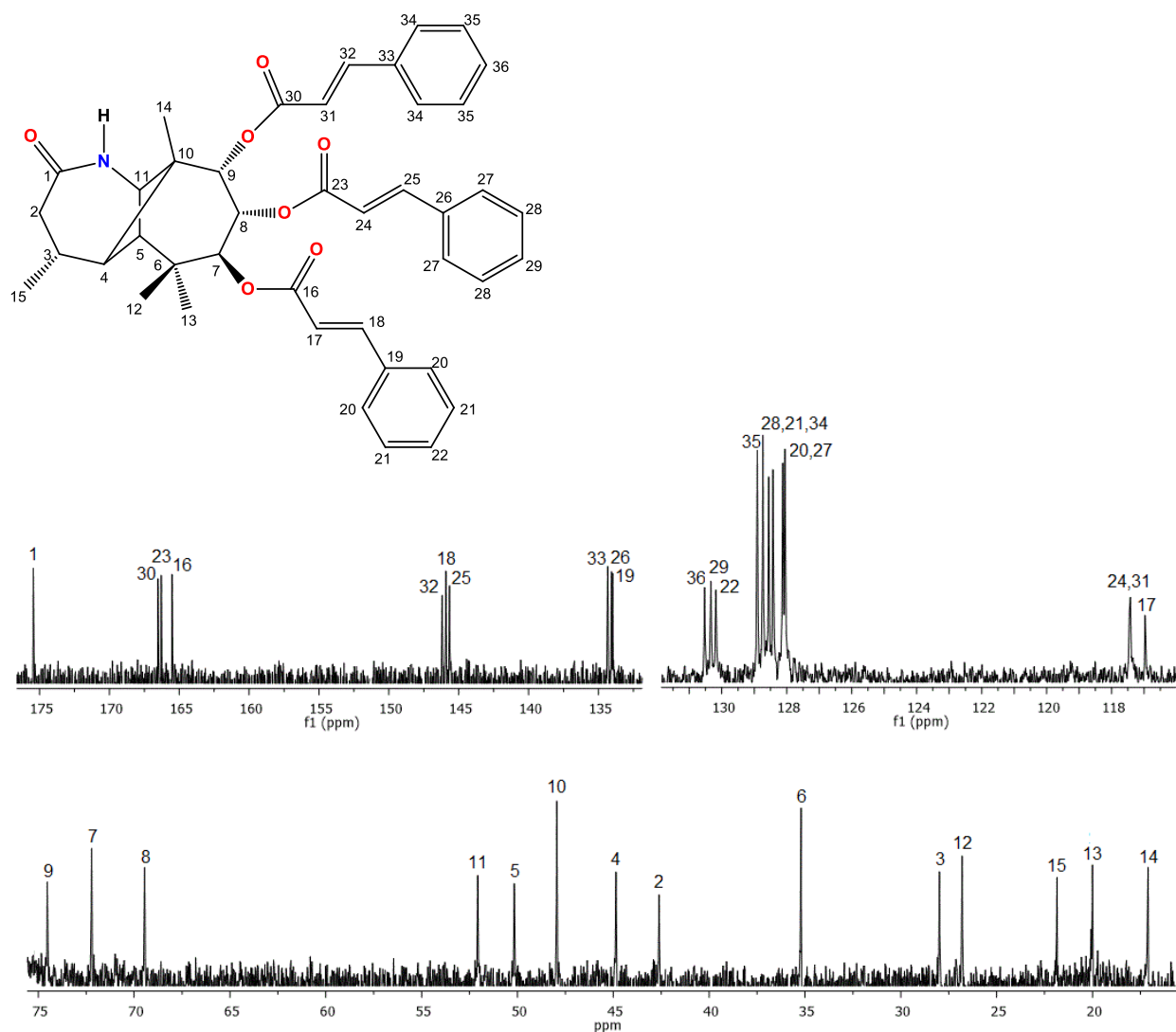




**Figura 20.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  a 400 MHz de la lactama tricinato (**59**).

En su espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 21), se observa la señal que corresponde al carbonilo de la lactama C-1 en 175.5 ppm. En 166.5, 166.3 y 165.5 ppm aparecen las señales asignadas a los carbonilos de los cinamatos C-30, C-23 y C-16 respectivamente. En 146.2, 145.9 y 145.7 ppm se observan las señales que corresponden a los carbonos vinílicos C-32, C-18 y C-25 respectivamente, en 117.5, 117.4 y 117.0 ppm se observaron las señales que fueron asignadas a los carbonos vinílicos alfa al carbonilo C-24, C-31 y C-17 respectivamente. Las señales que fueron asignadas a los carbonos cuaternarios de los anillos aromáticos C-33, C-26 y C-19 se observaron en 134.4, 134.1 y 134.0 ppm respectivamente. En 130.5, 130.4 y 130.2 ppm se mostraron las señales que corresponden a los carbonos C-36, C-29 y C-22 de los anillos aromáticos. Las señales correspondientes a los carbonos equivalentes C-21 y C-20 del anillo aromático del cinamato sobre C-7 se observaron en 128.6 y 128.2 ppm respectivamente, para C-28 y C-27 del anillo aromático del cinamato sobre la posición C-8 se observaron en 128.8 y 128.1 ppm respectivamente, los carbonos C-35 y C-34 del anillo aromático del cinamato de C-9 se asignaron en 128.9 y 128.4 ppm

respectivamente. Las señales correspondientes a C-9, C-7 y C-8, bases de cinamato se observaron en 74.5, 72.2 y 69.5 ppm. Los carbonos terciarios C-11, C-5, C-4 y C-3 aparecieron en 52.1, 50.2, 44.9 y 28.0 ppm respectivamente. En 48.0 y 35.2 ppm se mostraron las señales que se asignaron a C-10 y C-6. En 42.6 ppm se observó la señal que corresponde al carbono secundario C-2. Finalmente, los carbonos metílicos C-12, C-15, C-13 y C-14 se observaron en 26.8, 21.9, 20.0 y 17.1 ppm respectivamente.

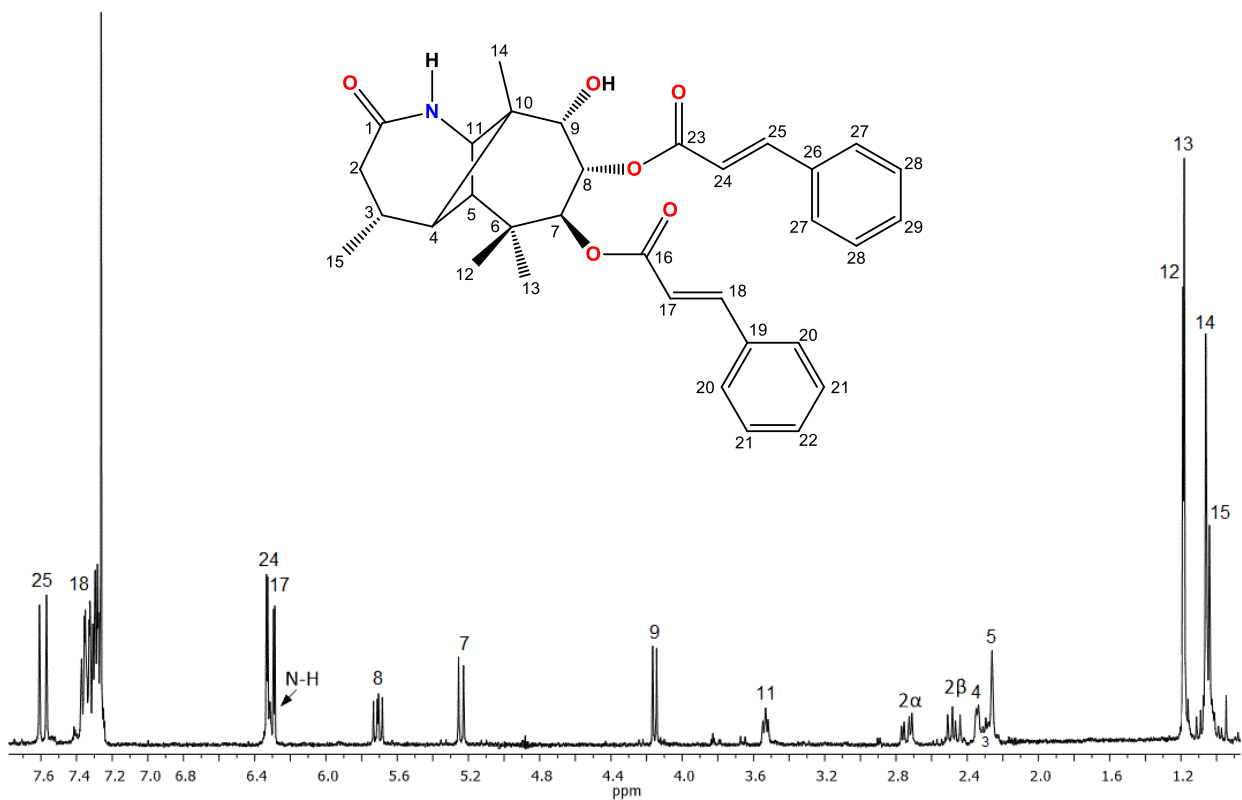


**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz de la lactama tricinamato (**59**).

### 5.6.1 Lactama-dicinamato

Posteriormente, se realizó una prueba disminuyendo el tiempo de reacción del tratamiento del compuesto **56** con cloruro de cinamoílo (1:4) y piridina a 3 horas en baño de vapor, el cual proporcionó la lactama de 7,8-dicinamoiloxilongipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -trioil (**60**) con aspecto aceitoso de color amarillo claro.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 22), hacia campo bajo podemos observar dos señales dobles en 7.60 ppm ( $J = 16.0$  Hz) y en 7.43 ppm ( $J = 16.0$  Hz) que fueron asignadas a los protones vinílicos H-25 y H-18 respectivamente. En 6.35 ppm ( $J = 16.0$  Hz) y 6.30 ppm ( $J = 16.0$ ) se observaron dos señales dobles traslapadas que corresponden a los protones vinílicos alfa al carbonilo H-24 y H-17. Entre 7.45 y 7.20 ppm se observaron varias señales múltiples que corresponden a los protones aromáticos. En 6.31 ppm una señal doble ( $J = 6.9$  Hz) debida al H del grupo -NH. En 5.70 ppm se mostró una señal doble de dobles ( $J = 11.1, 8.7$  Hz) que corresponde a H-8, en 5.25 ppm se observó una señal doble ( $J = 11.1$  Hz) asignada a H-7 y desplazada hacia campo alto en 4.15 ppm una señal doble ( $J = 8.7$  Hz) correspondiente a H-9. En 3.53 ppm se observó una señal triple ( $J = 6.1$  Hz) debida a H-11, en 2.74 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 17.5, 6.3$  Hz) asignada al protón H-2 $\alpha$  y en 2.48 ppm otra señal doble de dobles ( $J = 17.5, 10.5$  Hz) correspondiente a H-2 $\beta$ . En 2.34 ppm se observó una señal doble ( $J = 4.7$  Hz) que fue asignada a H-4. En 2.28 ppm se asignó una señal múltiple a H-3. En 2.26 ppm se observó una señal simple que correspondió a H-5. En 1.04 ppm se observó una señal doble ( $J = 6.4$  Hz) que se originó por el metilo secundario H-15. En 1.19, 1.18 y 1.06 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios 12, 13 y 14 respectivamente.



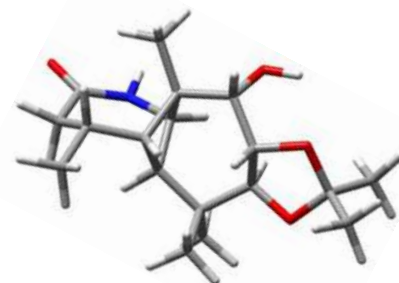
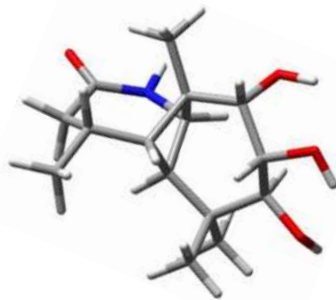
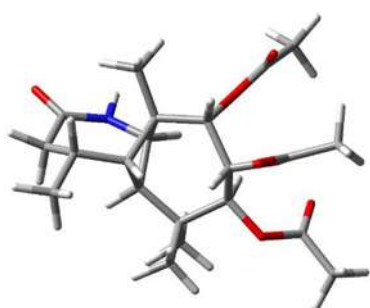
**Figura 22.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a 400 MHz de la lactama dicinamato (**60**).

### 5.7 Modelado molecular

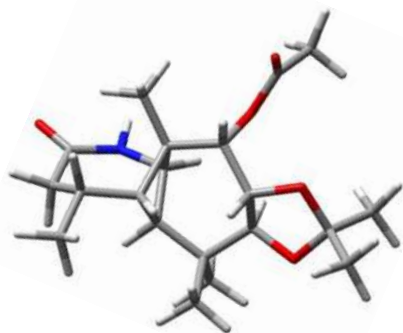
El modelo molecular se realizó construyendo la molécula de la lactama de triacetato de triolona (**32**), la lactama de longipinatriol (**56**), la lactama-acetónido (**57**), la lactama acetónido-acetato (**58**) y la lactama tricinamato (**59**) de acuerdo a los datos físicos y espectroscópicos en el programa Spartan'14, en el cual se aplicó el método de Monte Carlo con mecánica molecular para lograr obtener las estructuras de mínima energía de cada uno de ellos. Posteriormente, de cada compuesto se seleccionó el conformero de mínima energía (Figuras 23 y 24) y fueron optimizados mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con el nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP. Una vez obtenidos los mínimos globales de cada compuesto, se utilizó el programa Gauss View para realizar la medición de los ángulos diedros (Tabla 1).

Con esto se observó que no hay cambios significativos en los valores de los ángulos obtenidos. En el ciclo de siete que posee los carbonos 7, 8 y 9, se esperarían cambios significativos por los

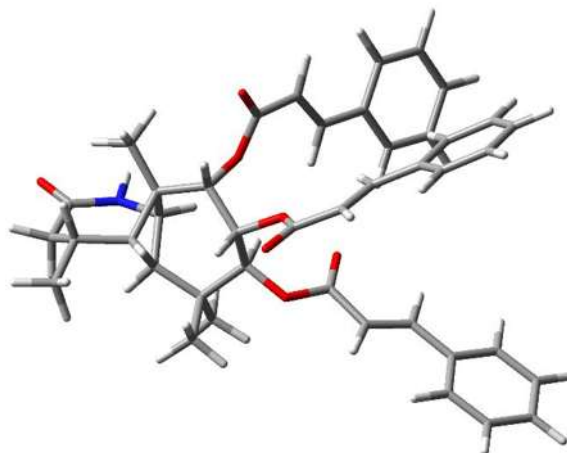
distintos sustituyentes que posee cada compuesto, pero dichos ángulos permanecen con valores cercanos. También, realizando una comparación de los ángulos diedros entre el anillo de seis miembros del longipinano análogo y el anillo de 7 miembros de la lactama, no se observan cambios significativos.



**32**,  $E_{DFT} = -1400.43$  hartrees.    **56**,  $E_{DFT} = -942.38$  hartrees.    **57**,  $E_{DFT} = -1059.13$  hartrees.



**58**,  $E_{DFT} = -1211.81$  hartrees.



**59**,  $E_{DFT} = -2207.91$  hartrees.

**Figura 23.** Mínimos globales de las lactamas **32**, **56-59**.

En la Tabla 1, se muestran los valores de los ángulos diedros de la lactama de triacetato de triolona (**32**), lactama de longipinatriol (**56**), lactama-acetónido (**57**), lactama-acetónido-acetato (**58**) y lactama-tricinamato (**59**), en los cuales podemos observar que permanecen con valores cercanos.

**Tabla 1.** Ángulos diedros (en grados) de las lactamas.

	<b>32</b>	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>59</b>
N-C1-C2-C3	47.0	46.6	46.6	46.1	46.6
C1-C2-C3-C4	-45.2	-44.7	-44.8	-44.4	-44.9
C2-C3-C4-C5	-29.7	-30.0	-30.0	-30.3	-29.8
C2-C3-C4-C10	69.9	69.8	70.1	69.9	69.9
C3-C4-C5-C6	-144.5	-144.2	-143.9	-143.9	-144.6
C3-C4-C5-C11	95.5	95.8	94.1	96.0	95.6
C3-C4-C10-C9	154.0	154.1	153.4	153.1	153.9
C3-C4-C10-C11	-93.7	-93.8	-94.1	-94.1	-93.7
C4-C5-C6-C7	-64.0	-64.8	-65.0	-64.6	-64.5
C4-C5-C11-C10	21.0	20.9	20.6	20.7	21.0
C4-C5-C11-N	-95.8	-96.2	-96.4	-96.2	-96.0
C4-C10-C9-C8	29.4	30.1	30.9	30.8	29.8
C4-C10-C11-N	94.9	94.8	95.0	95.1	94.9
C5-C6-C7-C8	48.9	49.0	50.5	49.9	50.3
C5-C11-N-C1	49.4	49.8	49.8	49.5	49.4
C5-C11-C10-C9	90.8	91.6	95.3	92.0	90.8
C6-C7-C8-C9	-77.7	-75.6	-80.0	-79.5	-78.8
C6-C5-C4-C10	98.8	99.1	99.5	99.3	98.7
C6-C5-C11-N	140.8	140.8	140.5	140.8	140.7
C6-C5-C4-C3	-144.5	-144.2	-143.9	-143.9	-144.6
C7-C8-C9-C10	58.5	56.0	56.5	56.4	58.2
C7-C6-C5-C4	-64.0	-64.9	-65.0	-64.6	-64.5
C7-C6-C5-C11	40.1	39.0	38.8	39.1	39.5
C8-C9-C10-C11	-66.0	-65.6	-64.8	-64.8	-65.7
C8-C9-C10-C4	29.4	30.1	30.9	30.8	29.8
C9-C10-C11-N	-153.2	-152.7	-152.0	-152.1	-153.2
C9-C10-C11-C5	90.8	91.6	92.3	92.0	90.8
C9-C10-C4-C3	154.0	154.1	153.4	153.1	153.9
C9-C10-C4-C5	-91.3	-91.2	-92.0	-92.2	-91.5
C9-C8-C7-C6	-77.7	-75.6	-80.0	-79.5	-78.8
C10-C11-N-C1	-51.0	-50.7	-51.0	-51.3	-51.1
C10-C11-C5-C4	21.0	20.9	20.6	20.7	21.0
C10-C11-C5-C6	-102.3	-102.0	-102.6	-102.3	-102.3
C10-C4-C3-C2	69.9	69.8	70.1	69.9	70.0
C10-C4-C5-C6	98.8	99.1	99.5	99.3	98.7
C11-N-C1-C2	-20.9	-21.0	-20.8	-20.4	-20.7
C11-C5-C4-C3	95.5	95.8	96.0	96.0	95.6
C11-C5-C6-C7	40.1	39.0	38.8	39.2	39.5
C11-C10-C9-C8	-66.0	-65.6	-64.8	-64.8	-65.7
C11-C10-C4-C5	20.9	20.8	20.5	20.6	20.9
N-C11-C5-C4	-95.8	-96.2	-96.4	-96.2	-96.0
N-C11-C5-C6	140.8	140.9	140.5	140.8	140.7
N-C11-C10-C9	-153.2	-152.7	-152.0	-152.1	-153.2
C1-N-C11-C5	49.4	49.8	49.8	49.5	49.4
C1-N-C11-C10	-51.0	-50.7	-51.0	-51.3	-51.1

## 5.8 Ensayos de polimerización de microtúbulos con rasteviona y derivados

El producto natural **10**, junto con los derivados **32** y **56-60** a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  fueron sometidos a estudios de polimerización de los heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina *in vitro*, utilizando como control negativo DMSO, como control positivo paclitaxel (**20**) a 20 $\mu\text{M}$  y la proteína de cerebro de porcino a una concentración de 2 mg/ml. Dado que el proceso de formación de microtúbulos es endotérmico, la inducción del ensamblaje *in vitro* se realiza elevando la temperatura de la muestra a 37 °C. Cuando la temperatura desciende a temperaturas bajas (4 °C), los microtúbulos se despolimerizan, por lo cual un ligando estabilizador de microtúbulos como el paclitaxel (**20**), mantiene el efecto aún sobre la despolimerización de éstos inducida por frío. Para comprobar si los compuestos son capaces de producir este efecto, se realizó el ensayo durante 1 hora a 37°C, y posteriormente las muestras se colocaron a 4 °C por 30 minutos.

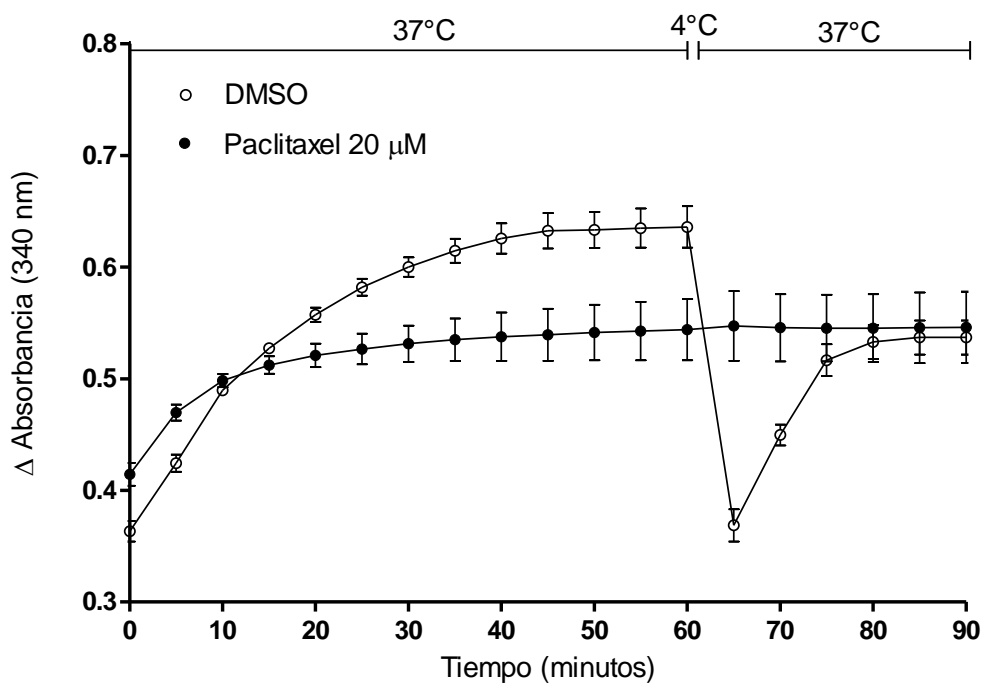
El ensayo se realizó por triplicado, utilizando una placa de 96 pozos que se introdujo en un espectrofotómetro BioTek. Las lecturas se realizaron cada minuto durante 1 hora a 37 °C y con una absorbancia de 340 nm. Posteriormente, se retiró la placa del equipo y se colocó a una temperatura de 4 °C durante media hora. Al finalizar el tiempo, la placa se introdujo nuevamente al equipo, en la cual se realizaron lecturas cada minuto por media hora en las mismas condiciones. La Figura 25, muestra el efecto sobre la inestabilidad dinámica de microtúbulos de los controles positivo y negativo. La curva tiene tres fases predominantes:

1. Fase de nucleación: No se produce crecimiento.
2. Fase de elongación o crecimiento: Se produce la tasa máxima de crecimiento.
3. Fase de estabilidad: La concentración polimerizada de la tubulina permanece constante.

Durante una fase inicial se forman pequeños núcleos y luego la polimerización incrementa linealmente en función del tiempo (fase de elongación) hasta alcanzar un estado estacionario donde la masa del polímero permanece constante.

En ausencia de compuestos, la fase de nucleación del DMSO ocurre aproximadamente en 10 minutos, seguida de la fase de crecimiento máximo, sin embargo, después de la disminución de

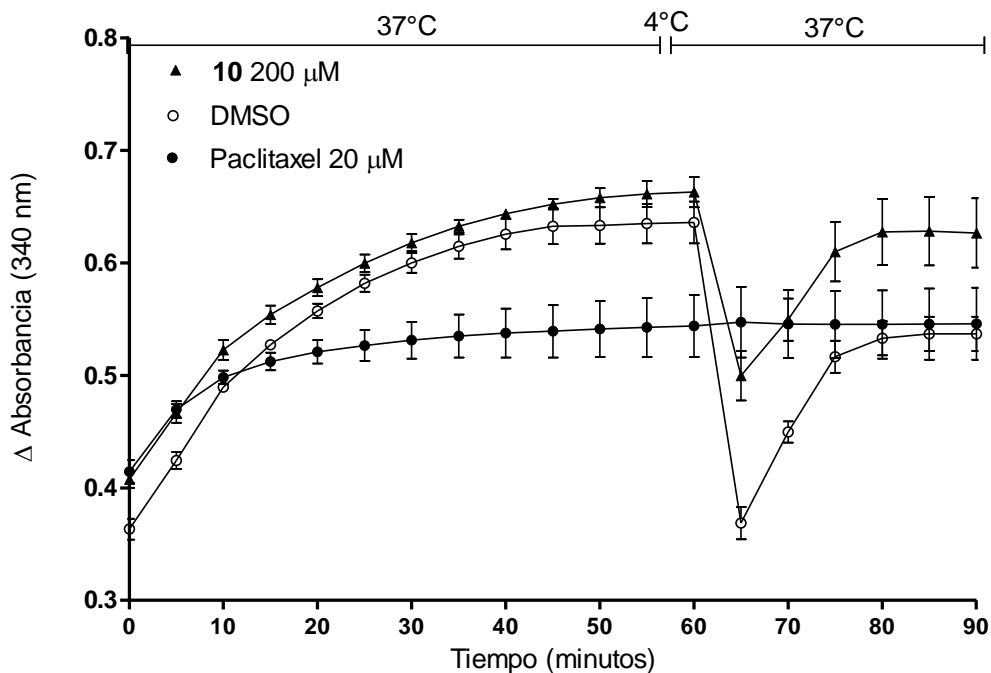
la temperatura la recuperación es nula. En presencia del estabilizador de microtúbulos paclitaxel (20), la fase de nucleación es desviada y presenta una rápida fase de crecimiento. La fase de estabilidad se mantiene aún después de la disminución de la temperatura.



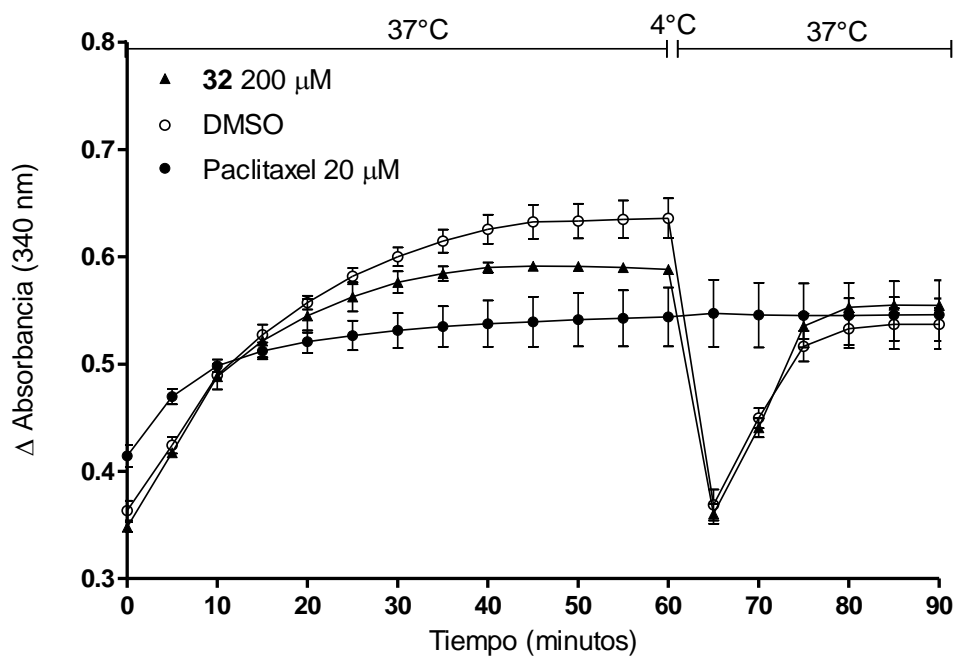
**Figura 24.** Efecto de los controles sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

Los compuestos 10, 32 y 56-58 a una concentración de 200  $\mu$ M, mostraron un comportamiento muy parecido al control negativo, por lo cual el proceso de polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos se llevó a cabo sin éxito. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto.

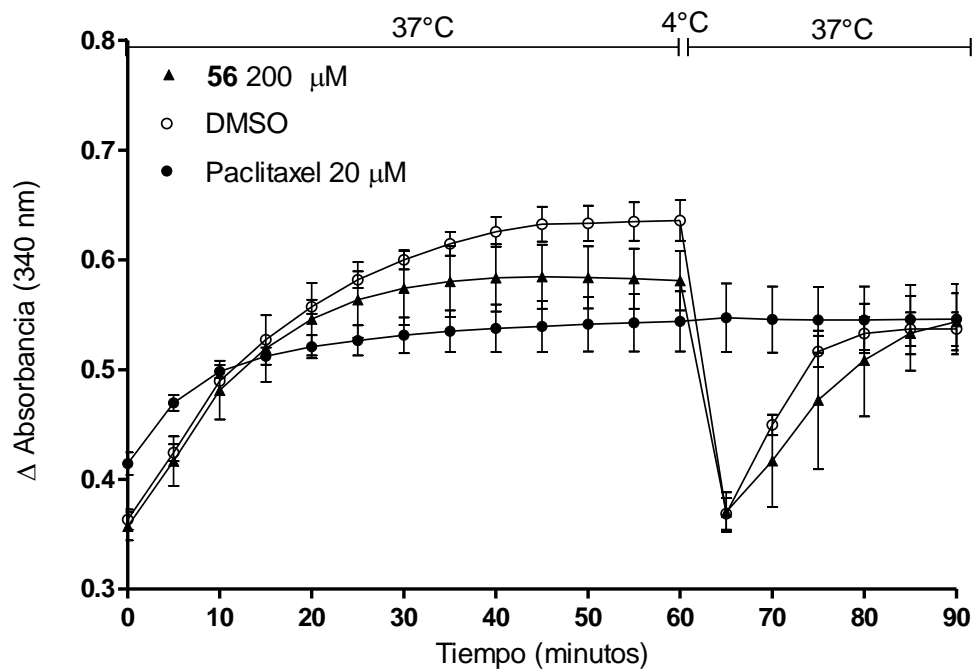




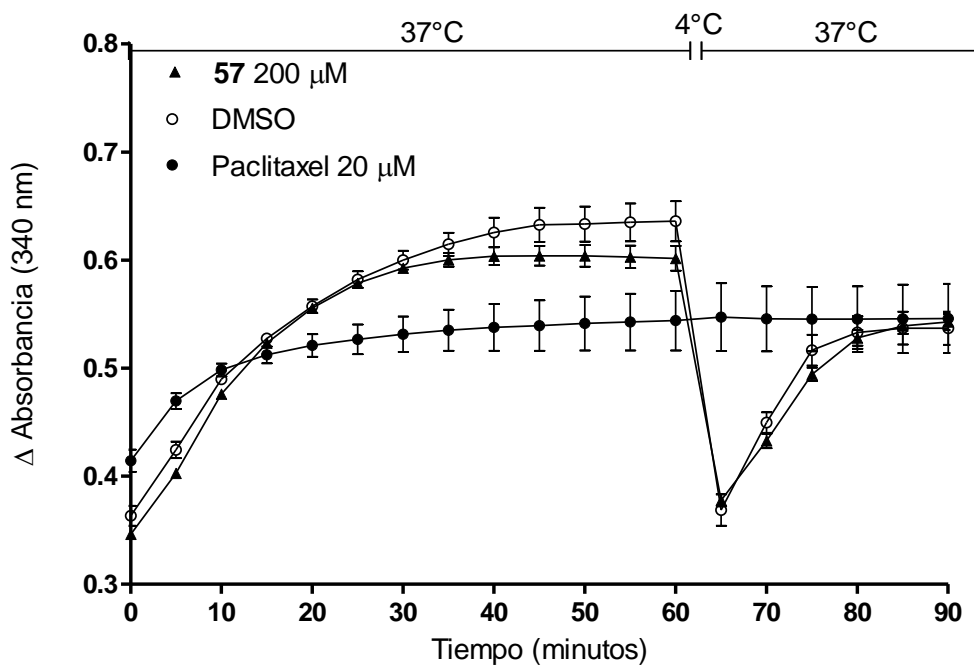
**Figura 25.** Efecto del producto natural **10** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.



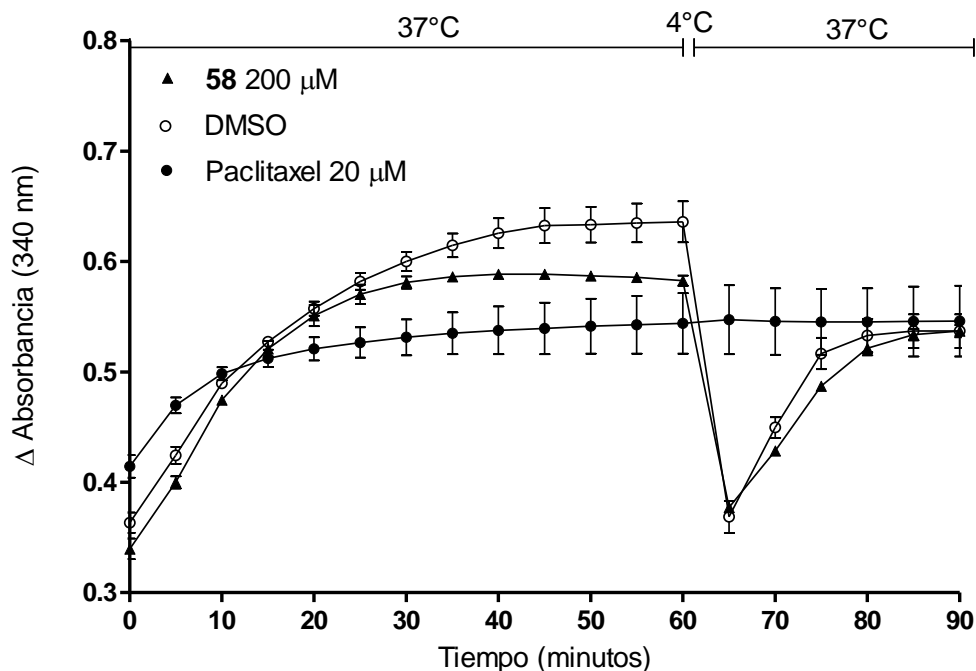
**Figura 26.** Efecto del derivado **32** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.



**Figura 27.** Efecto del derivado **56** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

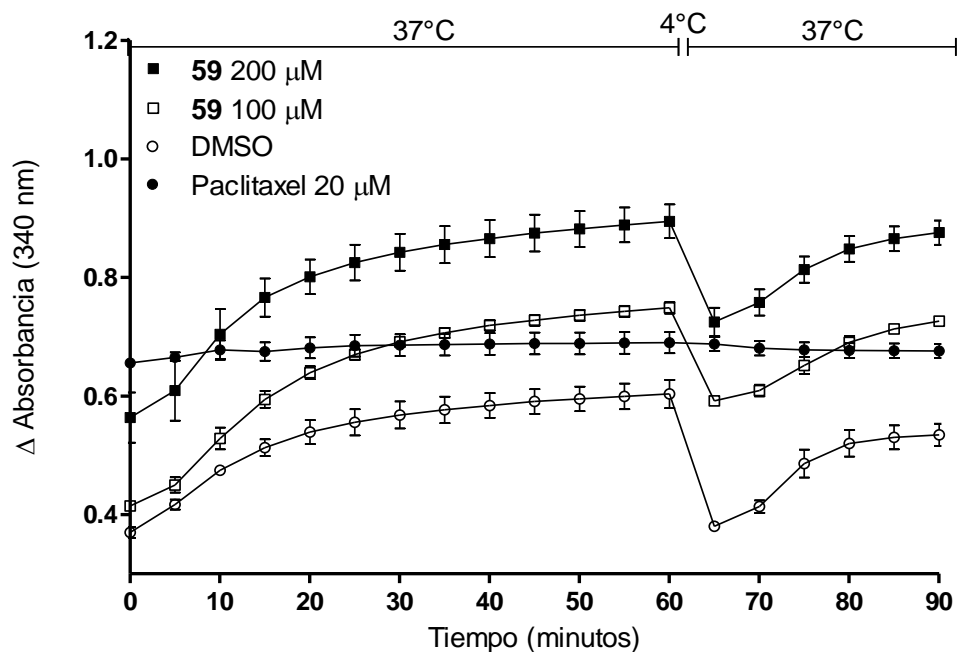


**Figura 28.** Efecto del derivado **57** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.



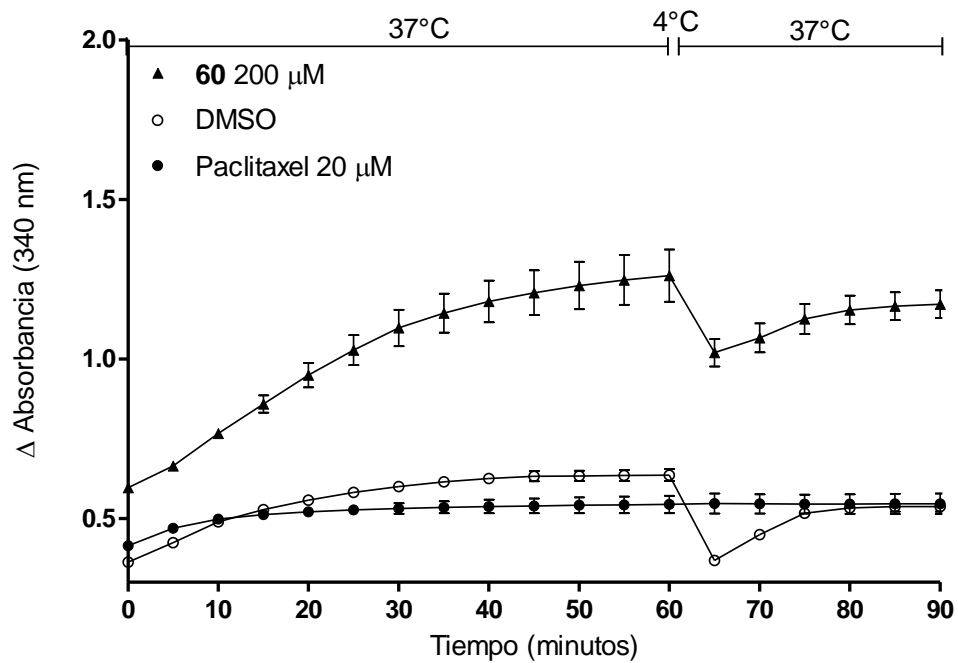
**Figura 29.** Efecto del derivado **58** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

La Figura 31, muestra las curvas de polimerización del compuesto **59** a una concentración de 100 y 200  $\mu\text{M}$ , en la cual se observa que la fase de nucleación ocurre aproximadamente en 5 minutos, seguida de la fase de crecimiento máximo. En ambas concentraciones, después de la disminución de la temperatura se observa que la polimerización se repone, propensa a estabilidad. Estos resultados confirman la utilidad de este ensayo al efecto de un compuesto sobre la estabilidad y polimerización de microtúbulos. También indica que la actividad es probablemente debido a la interferencia con el crecimiento de microtúbulos por estabilización.



**Figura 30.** Efecto del derivado **59** a 100 y 200  $\mu\text{M}$  sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

No obstante, el compuesto **60** a una concentración de 200  $\mu\text{M}$  (Figura 32) presenta una actividad similar al compuesto **59**, pero con mayor potencia, se observa el efecto de la polimerización de la tubulina y al llevarse a cabo la despolimerización al disminuir la temperatura, muestra restauración de la polimerización propensa a estabilidad.



**Figura 31.** Efecto del derivado **60** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura.

## 6. CONCLUSIONES

Los grupos hidroxilo de la lactama tríciclica **56**, a pesar de ser todos alcoholes secundarios presentaron diferencia en reactividad, en la cual los OH actuaron como especies nucleofílicas que reaccionaron con especies electrofílicas como fue el caso de la formación del compuesto **57**, en la cual se llevó a cabo el ataque del oxígeno al carbonilo de la cetona con la consecuente formación del anillo de dioxolano, el cual se formó en los carbonos en posición 7 y 8, esto es debido a que el valor del ángulo diedro es menor, en comparación con el de los carbonos en posición 8 y 9. Posteriormente para la formación del compuesto **58**, el grupo hidroxilo libre sobre C-9 realiza un mecanismo similar.

Para la realización de los ésteres cinamato, se logró la formación del compuesto **59** en un tiempo de reacción favorable, sin embargo al disminuir el tiempo de reacción se llevó a cabo la formación del dicinamato **60** en las posiciones C-7 y C-8, esto puede deberse al impedimento estérico que presenta C-9 por el metilo 14 y a la posición pseudo-axial a diferencia de los hidroxilos en C-7 y C-8 (pseudo-ecuatoriales) por lo cual reacciona más lentamente, produciendo con mayor facilidad los ésteres cinamatos en esas posiciones.

También al realizar las mediciones de los ángulos diedros del esqueleto cada una de las lactamas obtenidas, se pudo observar que no existen cambios significativos en los valores de los ángulos en las posiciones C-7, C-8 y C-9 en donde cada compuesto posee distintos sustituyentes. También, al realizar una comparación con los valores del esqueleto del longipinano análogo, no existen diferencias significativas entre ellos.

De los ensayos de polimerización de tubulina con el producto natural **10** y derivados **32**, **56-60**, se observó que solo los compuestos **59** y **60** presentan un efecto favorable en la polimerización de la tubulina y despolimerización de microtúbulos, esto se debe a los anillos aromáticos que poseen en su estructura, ya que estudios describen interacciones electrónicas  $\pi$ - $\pi$  stacking con aminoácidos presentes en la tubulina, específicamente con la fenilalanina, histidina y tirosina. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  stacking se refiere a las interacciones no covalentes de atracción entre los anillos aromáticos por los enlaces  $\pi$ , en las que se lleva a cabo un momento cuadrupolar con

fuerzas de dispersión de London, esto indica que se requiere la aromaticidad para que se lleven a cabo las interacciones entre los electrones deslocalizados en los orbitales  $p$ .

En el caso del compuesto **60**, los oxígenos de los carbonilos y el grupo hidroxilo libre en posición C-9 podrían establecer puentes de hidrógeno con los grupos amino o en general con los oxígenos presentes en los aminoácidos, por lo cual tendría a cabo dos tipos de interacciones, una con los anillos aromáticos y otra con el grupo hidroxilo libre.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### Generalidades

Los puntos de fusión se determinaron en el IIQB-UMSNH, en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 16F PC IR FT, empleando soluciones clorofórmicas y en algunos casos pastillas de KBr.

Los espectros de ultravioleta se midieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 12.

Las rotaciones específicas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 341 empleando  $\text{CHCl}_3$  y MeOH como disolvente y las concentraciones están dadas en g/100 mL.

Para las separaciones cromatográficas en columna abierta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice de 230-400 mallas y como fase móvil mezclas de disolventes orgánicos en orden ascendente de polaridad.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se determinaron cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los espectros a 400 MHz de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz fueron medidos en un equipo Varian Mercury Plus. Los espectros a 300 MHz de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  a 75.4 MHz, así como los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC se obtuvieron en un equipo Varian Mercury 300 en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en la Ciudad de México.

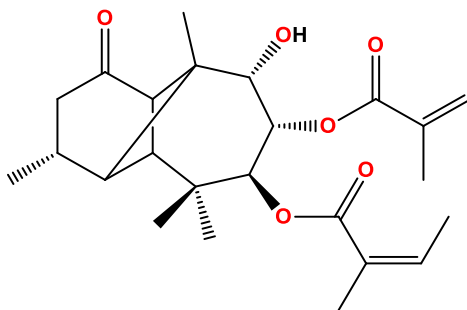
Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están dados con respecto al TMS.

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

Los ensayos de polimerización de tubulina se realizaron en un lector de placas BioTek ELx808IU, provisto de incubación y lectura en el rango UV.



### 7.1 Obtención de la rasteviona (10)

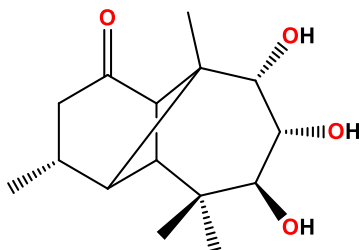


La rasteviona (**10**) se obtiene en forma de cristales de los extractos hexánicos de la raíz de *Stevia serrata* Cav. La planta se colectó en la comunidad de Iratzio, Mich. Después del secado se procedió a moler las raíces. Posteriormente se tomaron 2.5 kg de éstas y se sometieron a reflujo con hexano por 4 h. Transcurrido el tiempo, el extracto hexánico se filtró y se concentró en rotavapor. Posteriormente se dejó reposar el extracto concentrado durante 24 h a temperatura ambiente. Se filtró al vacío y realizando lavados con hexano obteniéndose 30 g de rasteviona (**1**) en forma de placas blancas de p.f. 127-130 °C (Reportado 130-131 °C) todo esto de acuerdo con la técnica descrita dentro de nuestro grupo de trabajo.

Estado físico: Cristales en forma de placas blancas con p.f. 127-130 °C.

FM: C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>; PM: 432 g/mol.

### 7.2 Obtención de longipinan-7β,8α,9α-triol-1-ona (12)



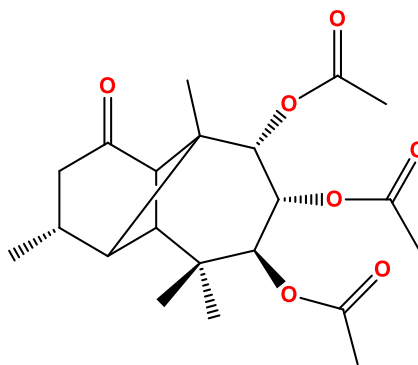
A una solución de 1 g de cristales de rasteviona (**10**) en 20 mL de metanol se agregó 1 g de hidróxido de potasio disueltos en mínima cantidad de agua. La solución se llevó a reflujo por 2 h. Transcurrido el tiempo, se evaporaron dos terceras partes del MeOH. Posteriormente, el remanente se vertió sobre hielo-agua en un embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó cuatro veces con agua; secándose sobre sulfato de sodio anhidro,

se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se colocó en matraz Erlenmeyer obteniéndose 404.2 mg de triolona (**12**), con un rendimiento de 67%, como un aceite de color amarillo claro.

Estado físico: Aceite de color amarillo claro.

FM: C<sub>15</sub>O<sub>4</sub>H<sub>24</sub>, PM: 268.34 g/mol.

### 7.3 Obtención de triacetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol-1-ona (**13**)

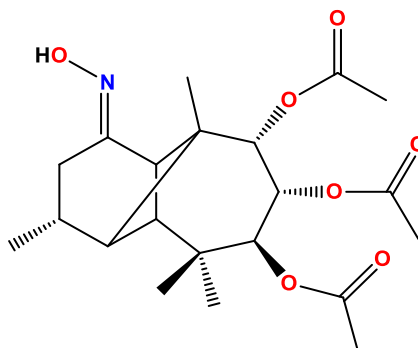


A una solución de 404.2 mg de triolona (**12**) en 3 mL de piridina se adicionaron 3 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar por 4 h en baño de vapor. Transcurrido el tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo-agua en embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó agitando ligeramente con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua; posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. Obteniéndose 505.2 mg de cristales en forma de placas de triacetato de triolona (**13**) de p.f. 154-156 °C (Reportado 150-152 °C) con un rendimiento de 85%.

Estado físico: Cristales en forma de placas color blanco con p.f. 154-156 °C.

FM: C<sub>21</sub>O<sub>7</sub>H<sub>30</sub>, PM: 394.45 g/mol.

#### 7.4 Obtención de oxima de triacetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol-1-ona (31)

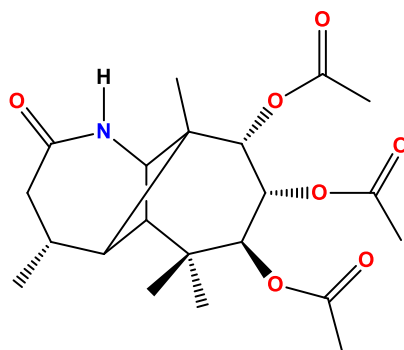


A una solución de 505.2 mg de cristales de triacetato de triolona (**13**) en 6 mL de piridina se le adicionaron 505.2 mg de clorhidrato de hidroxilamina, disolviendo en baño de vapor. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, transcurrido el tiempo de reacción, el residuo se vertió sobre hielo-agua en embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo, lavándose la fase orgánica con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua, posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, en fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones eluidas con una polaridad 6:4 hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 441.9 mg de cristales en forma de placas color blanco de oxima de triacetato de triolona (**31**) de punto de fusión 231-234 °C con un rendimiento de 84%.

Estado físico: Cristales en forma de placas color blanco con p.f. 231-234 °C.

FM: C<sub>21</sub>O<sub>7</sub>H<sub>31</sub>N, PM: 409.47 g/mol.

### 7.5 Obtención lactama de triacetato de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (32)

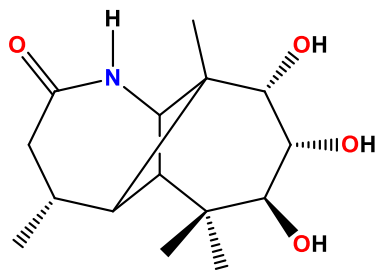


A una solución de 100 mg de cristales de oxima de triacetato de triolona (**31**) en 2 mL de piridina se le adicionaron 10 gotas (0.5 mL) de oxiclورو de fósforo sobre baño de hielo. Pasados 15 minutos se retiró del baño de hielo y se dejó a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción, el residuo se vertió cuidadosamente sobre hielo-agua en embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó mezclando ligeramente con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua; posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, en fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones eluídas con una polaridad 3:7 hexano-acetato de etilo se obtuvo la lactama de triacetato de triolona (**32**), obteniéndose 76 mg de sólido amorfo color blanco con punto de fusión de 200-202 °C, con un rendimiento de 76%.

Estado físico: Sólido amorfo de color blanco con p.f. 200-202 °C.

FM: C<sub>21</sub>O<sub>7</sub>H<sub>31</sub>N, PM: 409.47 g/mol.

### 7.6 Obtención de lactama de longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (56)



A una solución de 75 mg de lactama de triacetato de triolona (**32**) en 2 mL de metanol se agregó 75 mg de hidróxido de potasio disueltos en mínima cantidad de agua. La solución se llevó a reflujo por 4 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó completamente el MeOH. Posteriormente, el remanente se disolvió en cloroformo y se filtró a vacío a través de sílica gel. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente 200 mL una solución 5:3:2 cloroformo-acetato de etilo-metanol, en fracciones de 20 mL cada una. De la fracción 2-14 se obtuvo la lactama de longipinatriol (**56**), obteniéndose 46.7 mg de un aceite de color amarillo claro con un rendimiento de 89%.

Estado físico: Aceite de color amarillo claro.

FM: C<sub>15</sub>O<sub>4</sub>H<sub>25</sub>N, PM: 283.3633 g/mol.

Rotación:  $[\alpha]_{589} +5.0$ ,  $[\alpha]_{578} +5.0$ ,  $[\alpha]_{546} +6.1$ ,  $[\alpha]_{436} +8.3$ ,  $[\alpha]_{365} +4.4$  (c 1.8, MeOH).

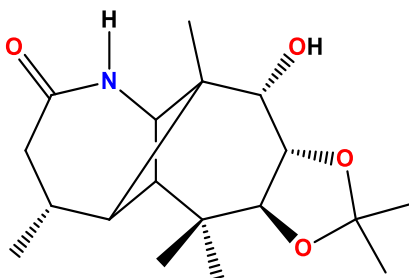
IR: (KBr)  $\nu_{\max}$  3366, 1624 cm<sup>-1</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz):  $\delta$  6.27 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, N-H), 3.81 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-9), 3.79 (1H, dd,  $J = 10.5, 3.6$  Hz, H-8), 3.59 (1H, d,  $J = 10.5$  Hz, H-7), 3.49 (1H, t,  $J = 5.8$  Hz, H-11), 2.66 (1H, dd,  $J = 17.1, 6.4$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.48 (1H, dd,  $J = 17.1, 10.4$  Hz, H-2 $\beta$ ), 2.26 (1H, m, H-3), 2.19 (1H, s, H-5), 1.99 (1H, d,  $J = 4.9$  Hz, H-4), 0.99 (3H, d,  $J = 6.7$ , Me-15), 1.13 (3H, s, Me-12), 1.01 (3H, s, Me-14), 0.94 (3H, s, Me-13).

RMN-<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz):  $\delta$  179.6 (C-1), 77.8 (C-9), 74.1 (C-7), 72.4 (C-8), 52.8 (C-11), 52.3 (C-5), 49.8 (C-10), 46.5 (C-4), 44.3 (C-2), 37.1 (C-6), 30.1 (C-3), 28.4 (C-12), 23.0 (C-15), 20.2 (C-13), 19.1 (C-14).

Espectro de masa EIMS:  $m/z$  285 [M+2]<sup>+</sup> (5), 224 (14), 125 (32), 110 (40), 85 (100), 39 (30).

### 7.7 Obtención de lactama de 7,8-acetónido longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (**57**)



A una solución de 100 mg de lactama de longipinatriol (**56**) en 2 mL de acetona se agregó 10 mg de ácido *p*-toluensulfónico. La solución se llevó a temperatura ambiente por 2.5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se concentró a vacío la acetona hasta sequedad. Posteriormente, el residuo se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó 2 veces con agua; secándose sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, en fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones eluidas con una polaridad 1:1 hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 81.7 mg de un sólido amorfo de color blanco con un punto de fusión de 235-240 °C, con un rendimiento de 72%.

Estado físico: Sólido amorfo de color blanco con p.f. 235-240 °C.

FM: C<sub>18</sub>O<sub>4</sub>H<sub>28</sub>N, PM: 323.21 g/mol.

Rotación:  $[\alpha]_{589} -20.6$ ,  $[\alpha]_{578} -21.1$ ,  $[\alpha]_{546} -23.9$ ,  $[\alpha]_{436} -43.9$ ,  $[\alpha]_{365} -80.0$  (c 1.8, CHCl<sub>3</sub>).

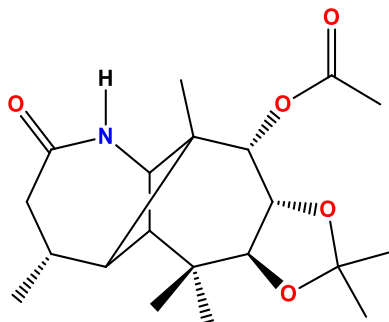
IR: (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3399, 1650 cm<sup>-1</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):  $\delta$  6.13 (1H, d,  $J = 7.4$ , N-H), 4.04 (1H, dd,  $J = 10.2, 8.8$  Hz, H-8), 3.89 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-9), 3.59 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-7), 3.38 (1H, t,  $J = 6.1$  Hz, H-11), 2.72 (1H, dd,  $J = 17.3, 6.6$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.42 (1H, dd,  $J = 17.3, 10.3$  Hz, H-2 $\beta$ ), 2.23 (1H, m, H-3), 2.17 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-4), 2.12 (1H, s, H-5), 1.56 (3H, s, Me-acetónido), 1.44 (3H, s, Me-acetónido), 1.11 (3H, s, Me-14), 1.12 (3H, s, Me-13), 0.98 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, Me-15), 0.96 (3H, s, Me-12).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  175.7 (C-1), 108.5 (C-acetónido), 80.9 (C-7), 80.4 (C-8), 68.8 (C-9), 54.4 (C-11), 50.5 (C-5), 49.9 (C-10), 43.6 (C-4), 42.8 (C-2), 32.1 (C-6), 28.4 (C-3), 27.2 (C-13), 27.0 (C-acetónido), 26.8 (C-acetónido), 21.7 (C-15), 18.4 (C-14), 18.1 (C-12).

Espectro de masa EIMS:  $m/z$  306 [M-OH]<sup>+</sup> (9), 249 (75), 166 (45), 84 (100), 43 (40).

## 7.8 Obtención de lactama de 7,8-acetónido 9-acetato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (58)



A una solución de 80 mg de lactama-acetónido (57) en 2 mL de piridina se adicionaron 2 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar por 4 h en baño de vapor. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió sobre hielo-agua en embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó agitando ligeramente con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua; posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, en fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones eluidas con una polaridad 7:3 hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 68.3 mg de un sólido amorfo de color blanco con un punto de fusión de 241-244 °C, con un rendimiento de 76%.

Estado físico: Sólido amorfo de color blanco con p.f. 241-244 °C.

FM: C<sub>20</sub>O<sub>5</sub>H<sub>31</sub>N, PM: 365.22 g/mol.

Rotación:  $[\alpha]_{589} -4.4$ ,  $[\alpha]_{578} -5.0$ ,  $[\alpha]_{546} -5.8$ ,  $[\alpha]_{436} -13.9$ ,  $[\alpha]_{365} -33.4$  (c 8.0, CHCl<sub>3</sub>).

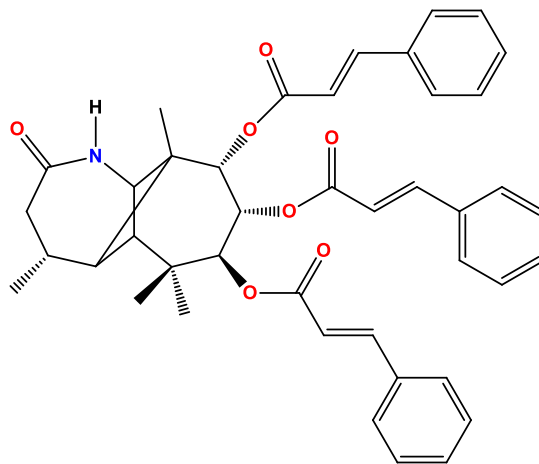
IR: (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3399, 1741, 1650 cm<sup>-1</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):  $\delta$  6.75 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz, N-H), 5.40 (1H, d,  $J = 3.8$  Hz, H-9), 4.07 (1H, dd,  $J = 10.4, 3.8$  Hz, H-8), 3.81 (1H, d,  $J = 10.4$  Hz, H-7), 3.62 (1H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-11), 2.67 (1H, dd,  $J = 17.1, 6.5$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.43 (1H, dd,  $J = 17.1, 10.4$  Hz, H-2 $\beta$ ), 2.23 (1H, m, H-3), 2.15 (1H, s, H-5), 2.12 (3H, s, AcO-9), 2.04 (1H, d,  $J = 5.19$  Hz, H-4), 1.38 (3H, s, Me-acetónido), 1.35 (3H, s, Me-acetónido), 1.02 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-15), 1.05 (3H, s, H-12), 0.94 (3H, s, H-13), 0.91 (3H, s, H-14).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  176.2 (C-1), 170.0 (AcO-9), 108.5 (C-acetónido), 78.8 (C-7), 74.4 (C-8), 71.5 (C-9), 52.0 (C-11), 50.8 (C-5), 47.9 (C-10), 45.1 (C-4), 42.1 (C-2), 32.0 (C-6), 27.9 (C-3), 27.0 (C-12), 26.9 (C-acetónido), 26.5 (C-acetónido), 21.8 (C-15), 20.8 (AcO-9), 18.1 (C-14), 17.3 (C-13).

Espectro de masa EIMS:  $m/z$  366  $[M+1]^+$  (5), 248 (25), 247 (40), 165 (37), 122 (60), 84 (100), 43 (65).

### 7.9 Obtención de lactama de 7,8,9-tricinamato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (59)



A una solución de 95 mg de lactama de longipinantriol (**56**) en 1.5 mL de piridina se adicionaron 380 mg de cloruro de cinamoilo (1:4). La mezcla se dejó reaccionar por 5 h en baño de vapor. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió sobre hielo-agua en embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua; posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, en fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones eluidas con una polaridad 1:1 hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 35.6 mg de un aceite de color naranja con un rendimiento de 16%.

Estado físico: Aceite de color amarillo claro.

FM:  $C_{42}O_7H_{43}N$ , PM: 673.79332 g/mol.

Rotación:  $[\alpha]_{589} +133.4$ ,  $[\alpha]_{578} +141.6$ ,  $[\alpha]_{546} +169.1$ ,  $[\alpha]_{436} +402.5$  ( $c$  4.4,  $CHCl_3$ ).

IR: ( $CHCl_3$ )  $\nu_{max}$  3393, 1712, 1635  $cm^{-1}$ .

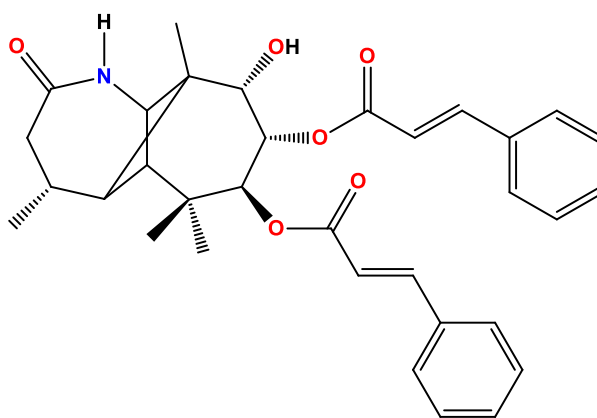
RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400MHz):  $\delta$  7.84 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-32), 7.59 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-25), 7.43 (1H, d,  $J = 16.0$ , H-18), 7.64 (1H, m, H-34), 7.44 (1H, m, H-36), 7.44 (1H, m, H-35), 7.34 (1H, m, H-27), 7.29 (1H, m, H-29), 7.29 (1H, m, H-28), 7.24 (1H, m, H-22), 7.16 (1H, m, H-20), 7.13 (1H, m, H-



21), 6.60 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-31), 6.34 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-24), 6.15 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-17), 6.15 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, N-H), 5.66 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz, H-7), 5.64 (1H, dd,  $J = 11.0, 3.4$  Hz, H-8), 5.58 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz, H-9), 3.80 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz, H-11), 2.70 (1H, dd,  $J = 17.5, 6.0$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.48 (1H, dd,  $J = 17.5, 10.4$  Hz, H-2 $\beta$ ), 2.33 (1H, m, H-3), 2.32 (1H, s, H-5), 2.26 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-4), 1.18 (3H, s, H-13), 1.14 (3H, s, H-12), 1.07 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-15), 0.99 (3H, s, H-14).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  175.5 (C-1), 166.5 (C-30), 166.3 (C-23), 165.5 (C-16), 146.2 (C-32), 145.9 (C-18), 145.7 (C-25), 134.4 (C-33), 134.1 (C-26), 134.0 (C-19), 130.5 (C-36), 130.4 (C-29), 130.2 (C-22), 128.9 (C-35), 128.8 (C-28), 128.6 (C-21), 128.4 (C-34), 128.2 (C-20), 128.1 (C-27), 117.5 (C-24), 117.4 (C-31), 117.0 (C-17), 74.5 (C-9), 72.2 (C-8), 69.5 (C-8), 52.1 (C-11), 50.2 (C-5), 48.0 (C-10), 44.9 (C-4), 42.6 (C-2), 35.2 (C-6), 28.0 (C-3), 26.8 (C-12), 21.9 (C-15), 20.0 (C-13), 17.1 (C-14).

### 7.9.1 Obtención de lactama de 7,8-dicinato longipinan-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -triol (60)



A una solución de 50 mg de lactama de longipinantriol (**56**) en 1 mL de piridina se adicionaron 150 mg de cloruro de cinamoilo (1:4). La mezcla se dejó reaccionar por 3 horas en baño de vapor. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió sobre hielo-agua en embudo de separación y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua; posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna a través de sílica gel malla 230-400 empleando como eluyente mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, en fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones eluidas con una polaridad 3:7 hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 31.7 mg de un aceite de color amarillo claro con un rendimiento de 33%.

Estado físico: Aceite de color amarillo claro.

FM: C<sub>33</sub>O<sub>6</sub>H<sub>37</sub>N, PM: 543.65 g/mol.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.60 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-25), 7.43 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-17), 7.24 (1H, m, H-22), 6.35 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-24), 6.30 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-17), 6.31 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, N-H), 5.70 (1H, dd, *J* = 11.1, 8.7 Hz, H-8), 5.25 (1H, d, *J* = 11.1 Hz, H-7), 4.15 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-9), 3.53 (1H, t, *J* = 6.1 Hz, H-11), 2.74 (1H, dd, *J* = 17.5, 6.3 Hz, H-2α), 2.48 (1H, dd, *J* = 17.5, 10.5 Hz, H-2β), 2.34 (1H, d, *J* = 4.7 Hz, H-4), 2.28 (1H, m, H-3), 2.26 (1H, s, H-5), 1.1 (3H, s, H-12), 1.18 (3H, s, H-13), 1.06 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-14), 1.04 (3H, s, H-15).

### 7.10 Modelado molecular

La construcción de los modelos moleculares de las lactamas **32**, **56-59** se realizó en el programa Spartan'14, en el cual se aplicó el protocolo de Monte Carlo con el campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF) para encontrar las estructuras de mínima energía de cada derivado. Los conformeros de mínima energía se optimizaron mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con el nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP en el programa Gaussian 09W. Los parámetros termodinámicos y las frecuencias se calcularon a 298 K y 1 atm. Una vez optimizados, se realizó la medición de los ángulos diedros de cada compuesto en el programa GaussView 5.0.

### 7.11 Ensayo de polimerización de microtúbulos con rasteviona y derivados

La rasteviona (**10**) y las lactamas **32**, **56-59** disueltas en DMSO se colocaron por triplicado en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y de media área, en alícuotas de 10 μL de una concentración tal que permitiese tener concentraciones finales de 100 o 200 μM, según el compuesto a analizar. 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 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 μL, 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 temperatura en la estabilidad de los microtúbulos inducida por los compuestos a evaluar.<sup>23</sup> 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.

## 8. REFERENCIAS

1. Álvarez-García, R.; Torres-Valencia, J. M.; Román-Marín, L. U.; Hernández-Hernández, J. D.; Cerda-García-Rojas, C.M.; Joseph-Nathan, P. Absolute configuration of the  $\alpha$ -methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. *Phytochem.* **2005**, *66*, 639-642.
2. Rojas-Pérez, R. E.; Cedilo-Portugal, E.; Joseph-Nathan, P.; Burgueño-Tapia, E. A new longipinene diester from *Stevia monardifolia* Kunth. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 757-762.
3. García-Gutiérrez, H. A.; Román-Marín, L. U.; Hernández-Hernández, J. D.; Cerda-García-Rojas, C. M. Preparación de bases de Schiff y reordenamiento de Beckmann de derivados de longipineno. *Rev. Latinoam. Quím.* **2012**, *40*, 210-224.
4. Stoll, A.; Seebeck, E.; Stauffacher, D. New investigations on valerian. *Schweiz. Apoth. Ztg.* **1957**, *95*, 115-20.
5. Bodesheim, U.; Holzl, J. Isolation and receptor binding properties of alkaloids and lignans from *Valeriana officinalis* L. *Pharmazie.* **1997**, *52(5)*:386-91.
6. Ruiz-Reyes, E.; Suarez M. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Revista CENIC.* **2015**, *46*, 9-24
7. Willuhn, G. *Arnica* Flowes: Pharmacology, toxicology, and analysis of the sesquiterpene lactones-their main active substances. *Phytomedicines of Europe*, **1998**, *10*; 118–132.
8. Barrales-Cureño, C.; Castillo-Hernández, F.; Barros-González, L. La molécula destacada: El paclitaxel. *Rev. Quím. PUCP.* **2015**, *29*, 7-10.
9. Martínez-Buey, R. Interacción de microtúbulos con ligandos activadores de tubulina. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, **2006**.
10. Barrales-Cureño, H. J.; Soto-Hernández, Marcos. Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *REB.* **2011**, *30*, 12-20.
11. Román-Marín, L. U.; del Río, R. E.; Hernández-Hernández, J. D.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Cervantes, D.; Castañeda, R.; Joseph-Nathan, P. Structural and stereochemical studies of naturally occurring longipinene derivatives. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3965-3972.
12. Sánchez-Arreola, E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. A.; Román-Marín, L.; Hernández-Hernández, J. D. Longipinene derivatives from *Stevia serrata*. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 853, 1995.

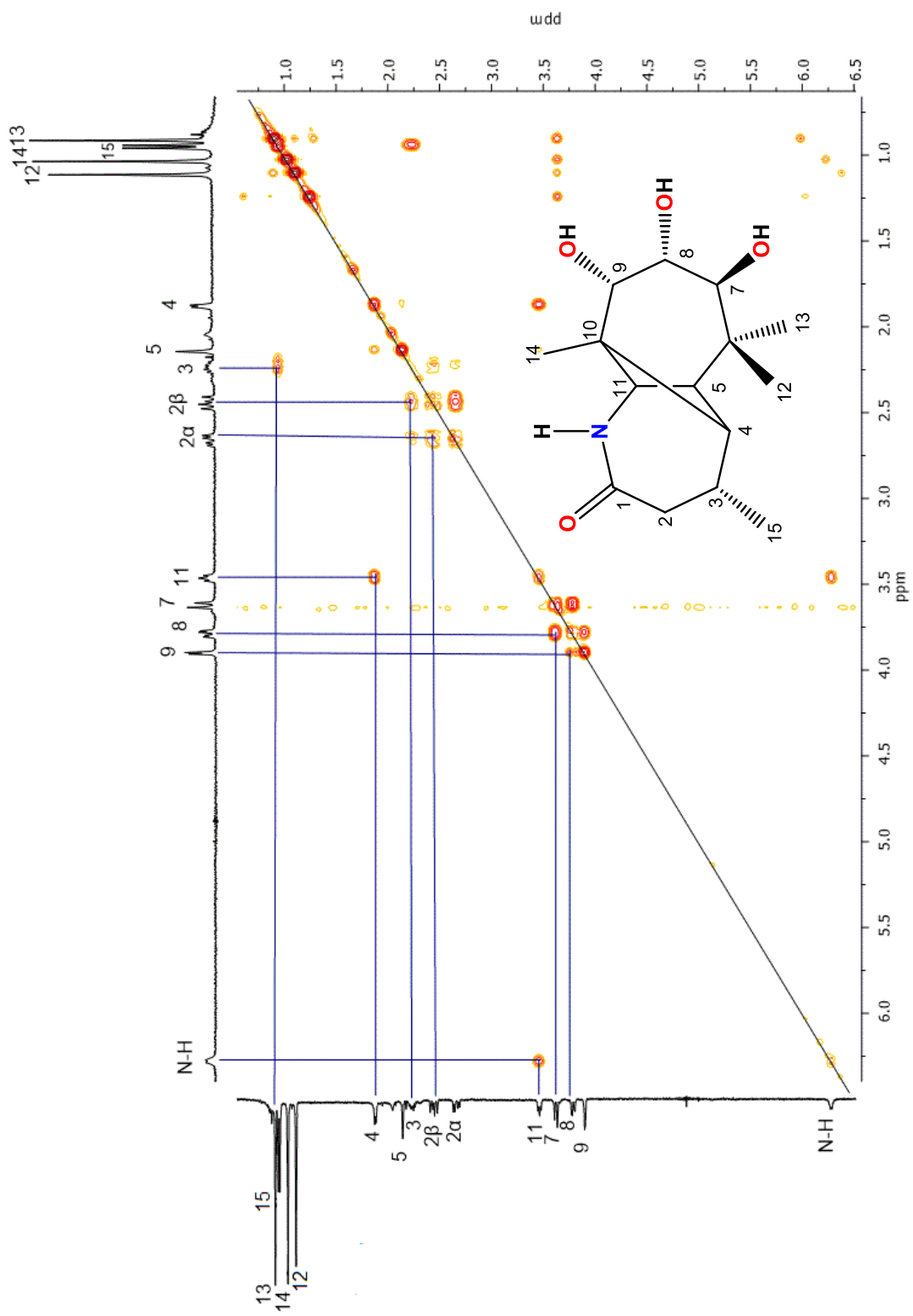
13. Chávez-Estrada, E. Obtención de nuevos derivados del longipineno estabilizadores de microtúbulos. Tesis de Maestría. Departamento de Química, CINVESTAV. México, D.F. **2013**.
14. Química Orgánica, Wade L.G. 5ª Edición, Editorial Pearson Educación, Madrid, 2004, p. 474-479, 945-947.
15. Román-Marín, L. U.; del Río, R.E.; Hernández-Hernández, J. D.; Joseph-Nathan, P.; Zabel, V.; Watson, W. H. Structure, Chemistry and Stereochemistry of rastevione, a sesquiterpenoid from the genus *Stevia*. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *37*, 2769-2778.
16. Ruiz-Ferrer, C. Derivados halogenados de sesquiterpenos provenientes de *Stevia*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH. **2015**.
17. Joseph-Nathan, P.; Meléndez-Rodríguez, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Catalán, C. Photochemical rearrangement of highly functionalized longipinene derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8093-8096.
18. Meléndez-Rodríguez, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Catalán, C.; Joseph-Nathan, P. Mechanistic studies of the photochemical rearrangement of 1-oxolongipin-2-ene derivatives. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2331-2338.
19. Román-Marín, L. U.; Zepeda, L. G.; Morales, N. R.; Hernández-Hernández, J. D.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. Molecular rearrangement of rastevione mesylate into arteagane derivatives. *J. Org. Chem.* **1995**, *58*, 1808-1816.
20. Meléndez-Rodríguez, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. Quirogane, Prenopsane, and Patzcuarene skeletons obtained by photochemically induced molecular rearrangements of longipinene derivatives. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1398-1411.
21. Román-Marín, L. U.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Guzmán, R.; Armenta, C.; Hernández-Hernández, J. D.; Joseph-Nathan, P. Jiquilpane hydrocarbon skeleton generated by two successive Wagner-Meerwein rearrangements of longipinane derivatives. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1540-1546.
22. Rohena, C.; Mooberry, S. Recent progress with microtubule stabilizers: New compounds, binding modes and celular activities. *Nat. Prod. Rep.* 2014, *31*, 335-355.
23. Shelanski, M.L.; Gaskin, F.; Cantor, C.R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1973**, *70*, 765-76.

## 9. ANEXOS

Espectros de RMN  
en  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{CD}_3\text{OD}$  de dos dimensiones.

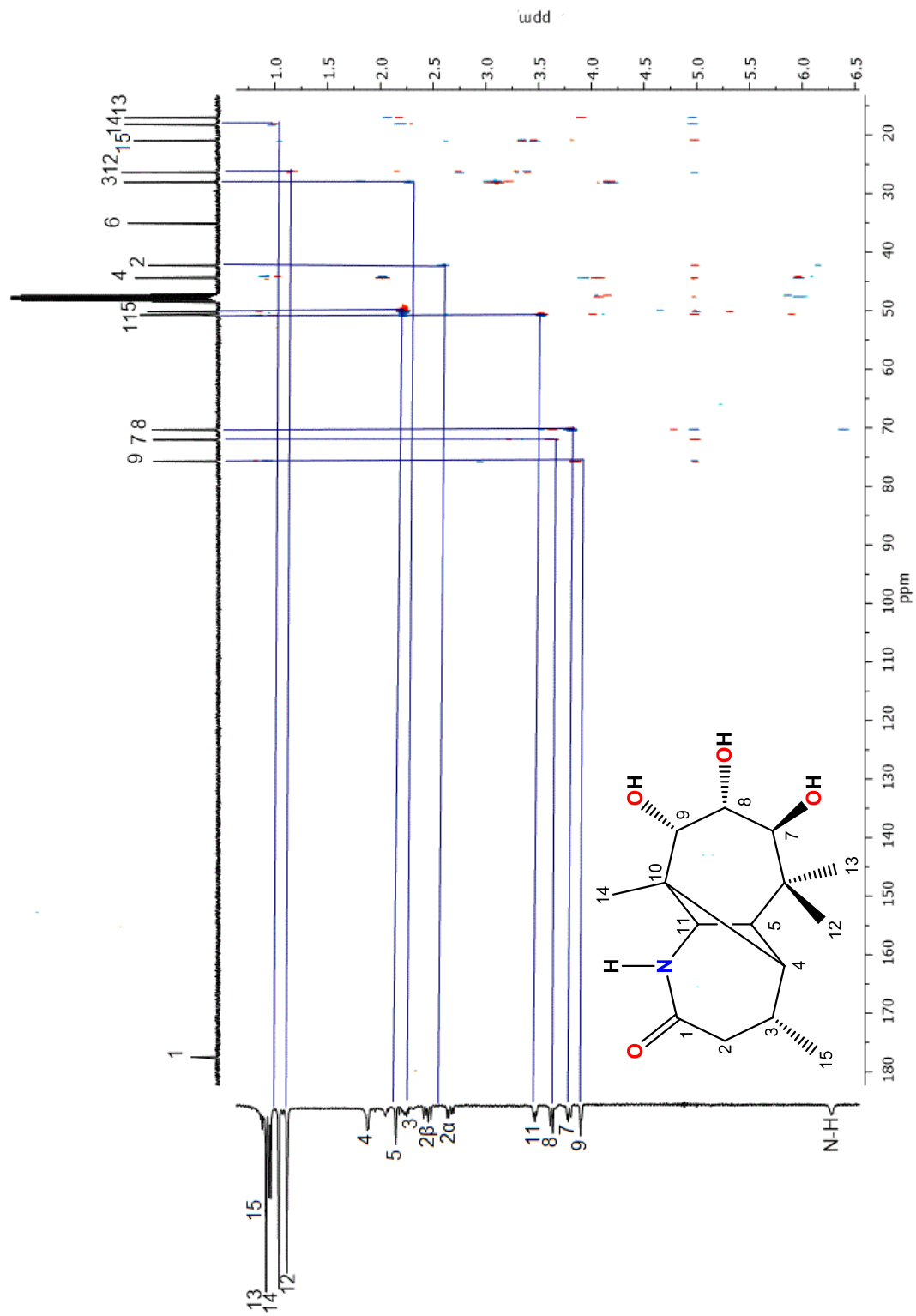
**Tabla 2.** Datos espectroscópicos de RMN para la lactama de longipinatriol (**56**).

<b>C/H</b>	<b>DEPT</b>	<b><math>\delta</math> 13C ppm</b>	<b>gHSQC</b>	<b>gHMBC</b>
1	C=O	179.6	/	/
2	CH <sub>2</sub>	44.3	2.66, 2.48	179.6, 46.5, 30.1, 23.0
3	CH	30.1	2.26	52.8, 23.0
4	CH	46.5	1.99	77.8, 52.8, 44.3, 23.0
5	CH	52.3	2.19	74.1, 52.8, 49.8, 37.1, 30.1, 28.4
6	C	37.1	/	/
7	CH	74.1	3.59	72.4, 28.4, 20.2
8	CH	72.4	3.79	74.1
9	CH	77.8	3.81	52.8, 19.1
10	C	49.8	/	/
11	CH	52.8	3.49	179.6, 77.8, 52.3, 49.8, 46.5, 37.1
12	CH <sub>3</sub>	28.4	1.13	74.1, 52.3, 37.1, 20.2
13	CH <sub>3</sub>	20.2	0.94	74.1, 52.3, 37.1, 28.4
14	CH <sub>3</sub>	19.1	1.01	77.8, 49.8, 52.8
15	CH <sub>3</sub>	23.0	0.99	46.5, 44.3, 30.1
NH	/	/	6.27	/

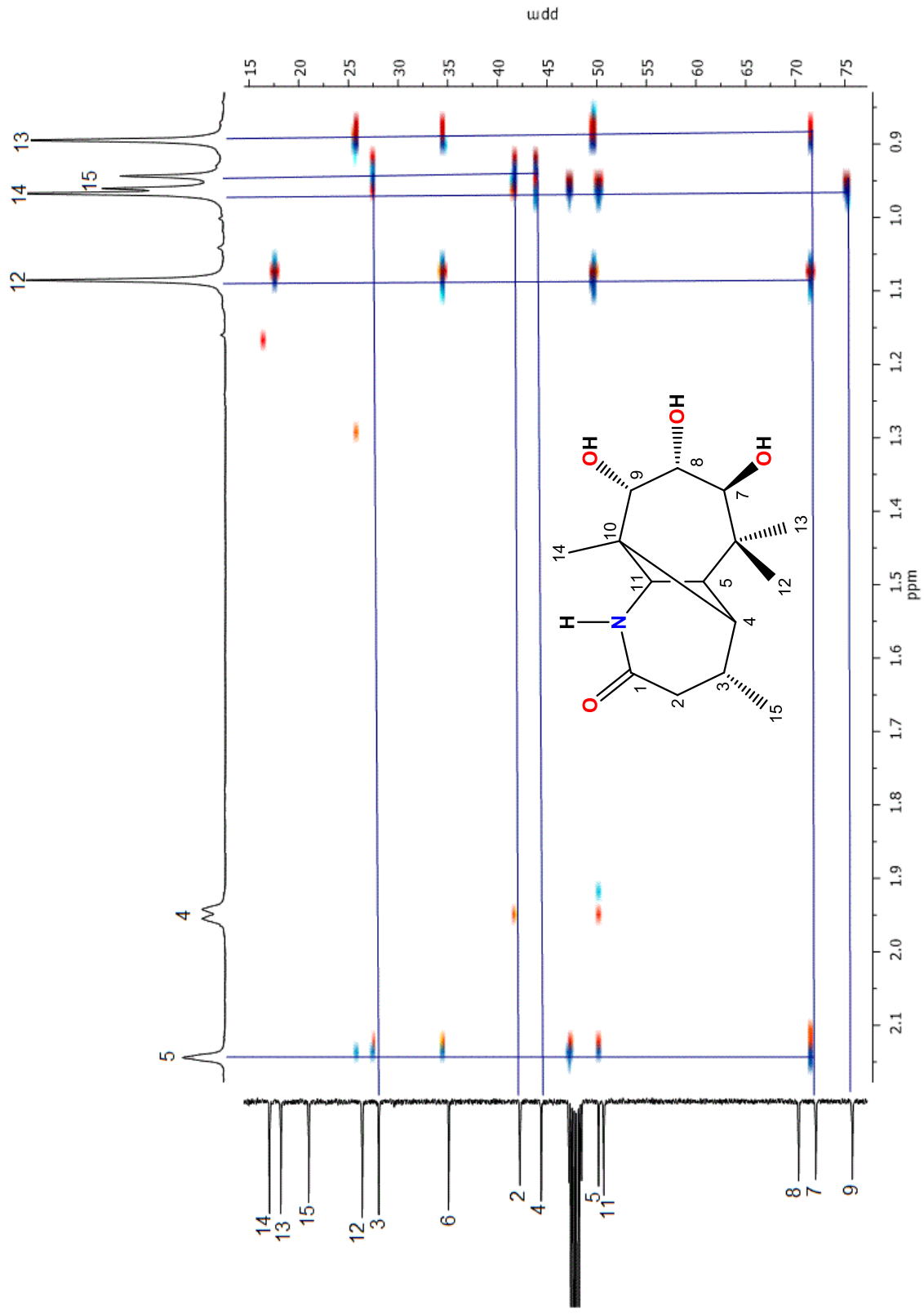


9.1 Espectro COSY de la lactama de longipinatriol (56).



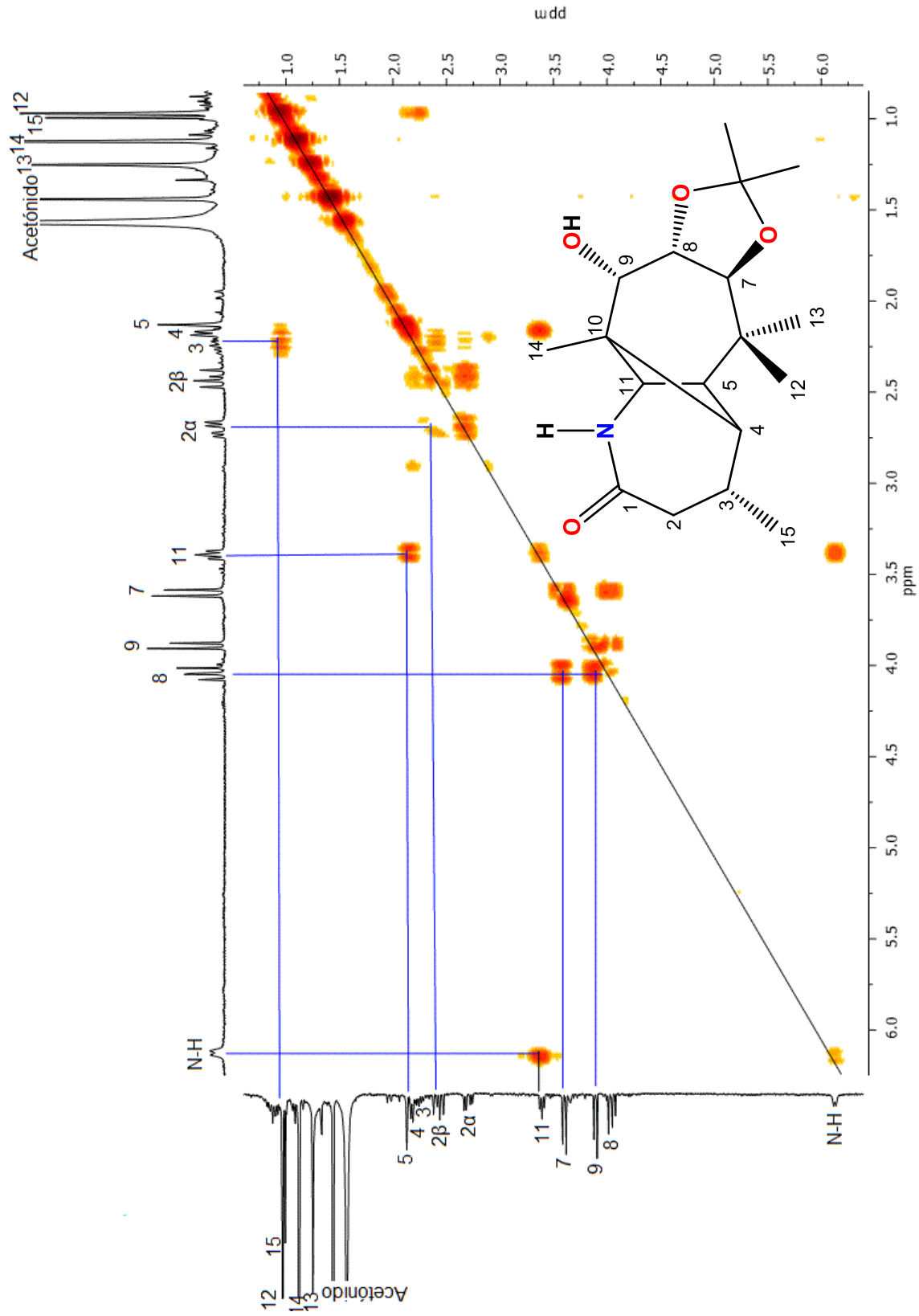


9.2 Espectro HETCOR de la lactama de longipinatriol (56).

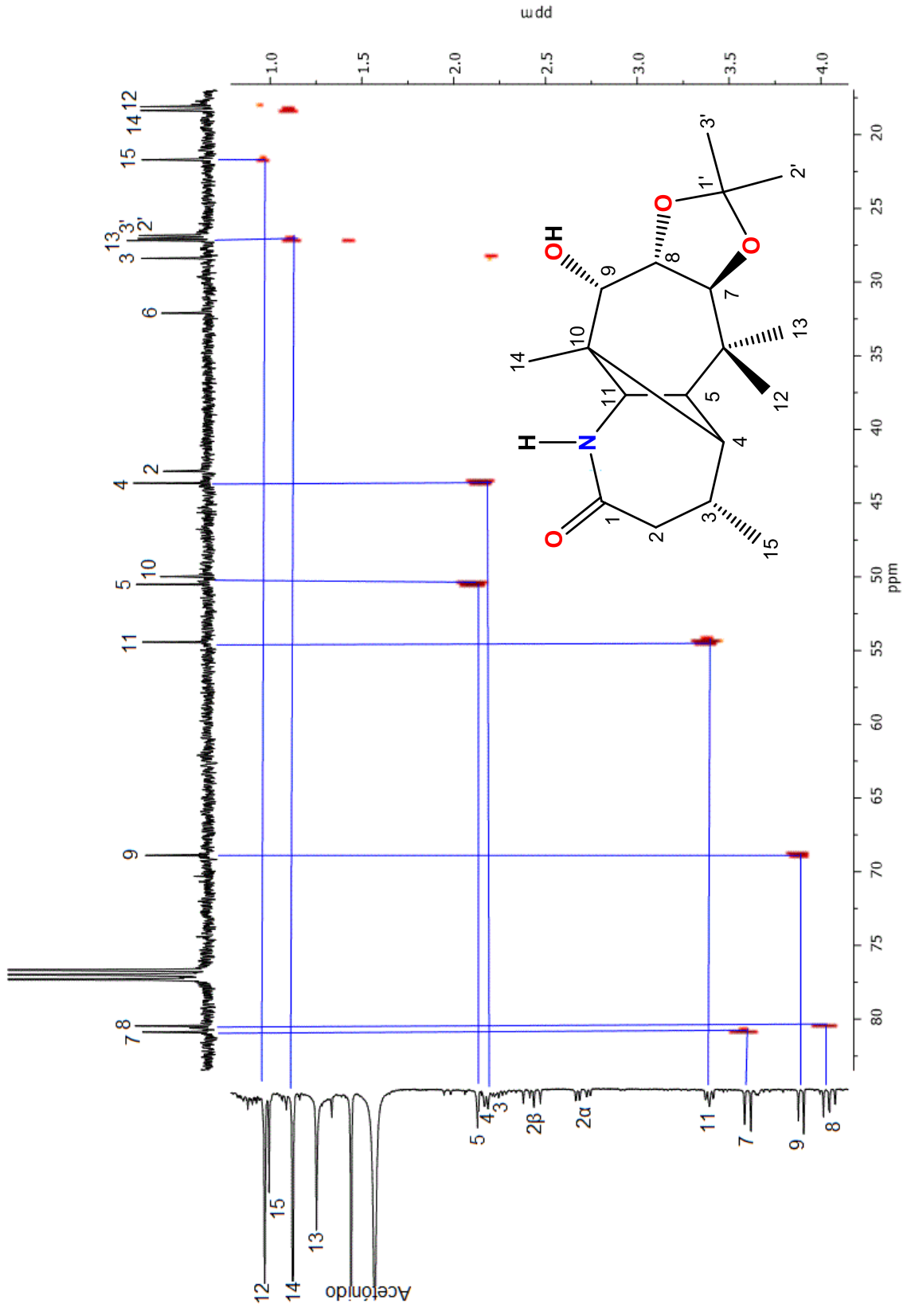


**Tabla 3.** Datos espectroscópicos de RMN para la lactama acetónidol (**57**).

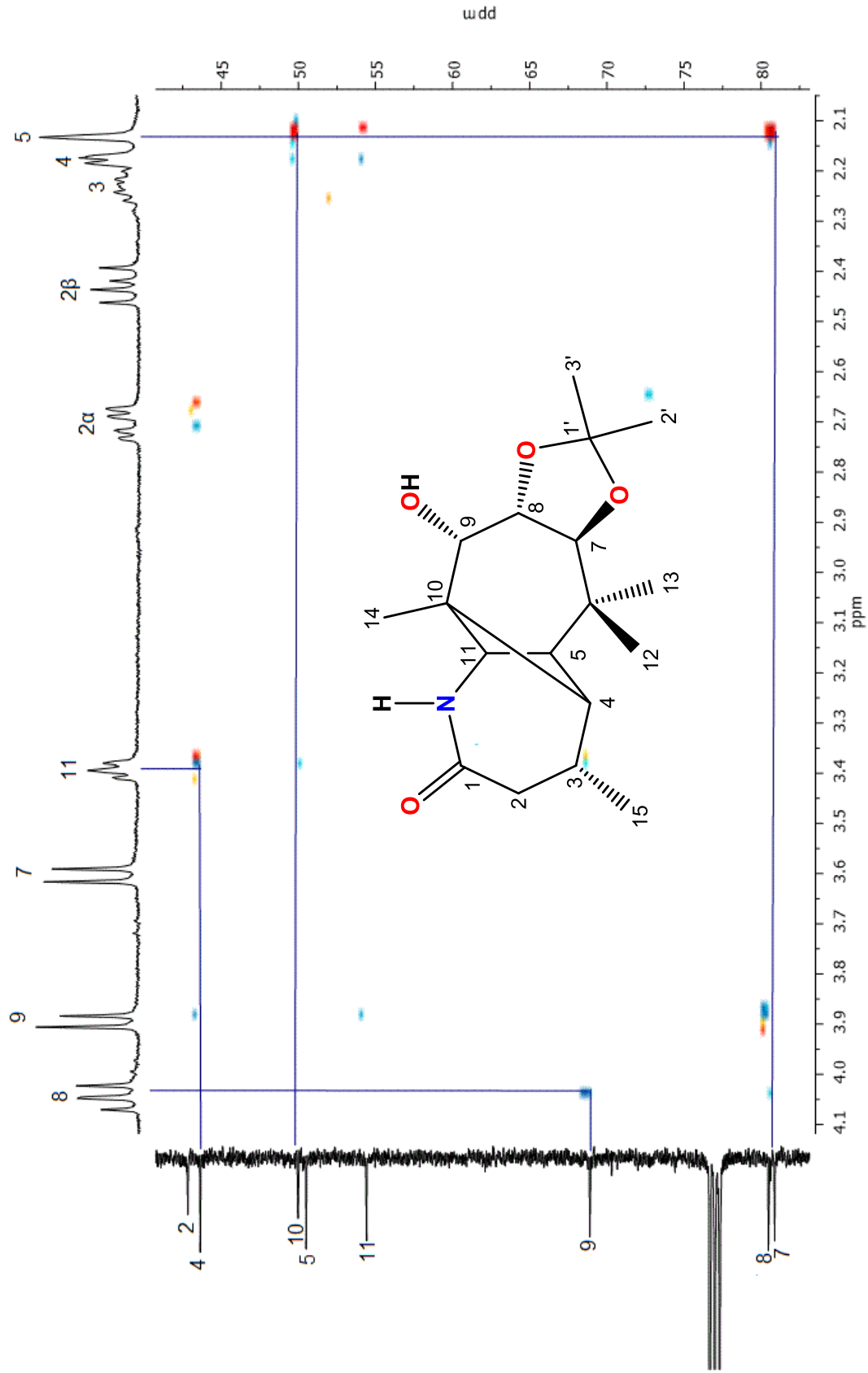
C/H	DEPT	$\delta$ 13C ppm	gHSQC	gHMBC
1	C	175.7	/	/
2	CH <sub>2</sub>	42.8	2.72, 2.42	21.7, 43.6, 175.7
3	CH	28.4	2.23	/
4	CH	43.6	2.17	21.7, 42.8, 49.9, 54.4, 68.8
5	CH	50.5	2.12	28.4, 32.1, 49.9, 54.4, 80.9
6	C	32.1	/	/
7	CH	80.9	3.59	18.1, 27.2
8	CH	80.4	4.04	68.8
9	CH	68.8	3.89	43.6, 54.4, 80.4
10	C	49.9	/	/
11	CH	54.4	3.38	32.1, 43.6, 50.5, 68.8, 175.7
12	CH <sub>3</sub>	18.1	0.96	27.2, 32.1, 50.5, 80.9
13	CH <sub>3</sub>	27.2	1.12	18.1, 32.1, 80.9
14	CH <sub>3</sub>	18.4	1.11	43.6, 49.9, 50.5, 54.4
15	CH <sub>3</sub>	21.7	0.98	28.4, 42.8, 43.6
1'	C	108.5	/	/
2'	CH <sub>3</sub>	26.8	1.44	*26.8, 27.0, 108.5
3'	CH <sub>3</sub>	27.0	1.56	*
NH		/	6.13	/



9.4 Espectro COSY de la lactama-acetónido (57).



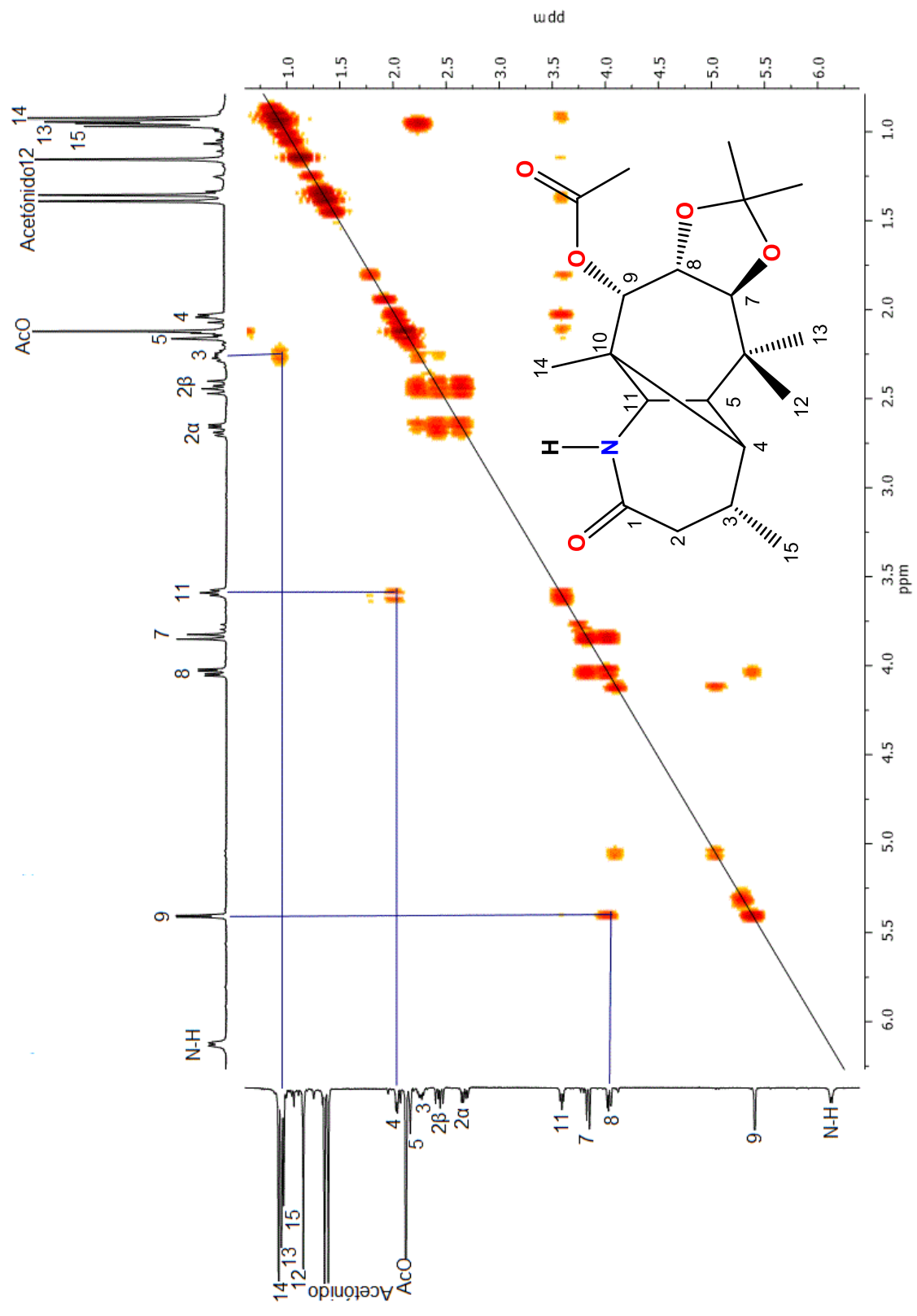
9.5 Ampliación de espectro HETCOR de la lactama-acetónido (57).



9.6 Ampliación de espectro HMBC de la lactama-acetonido (57).

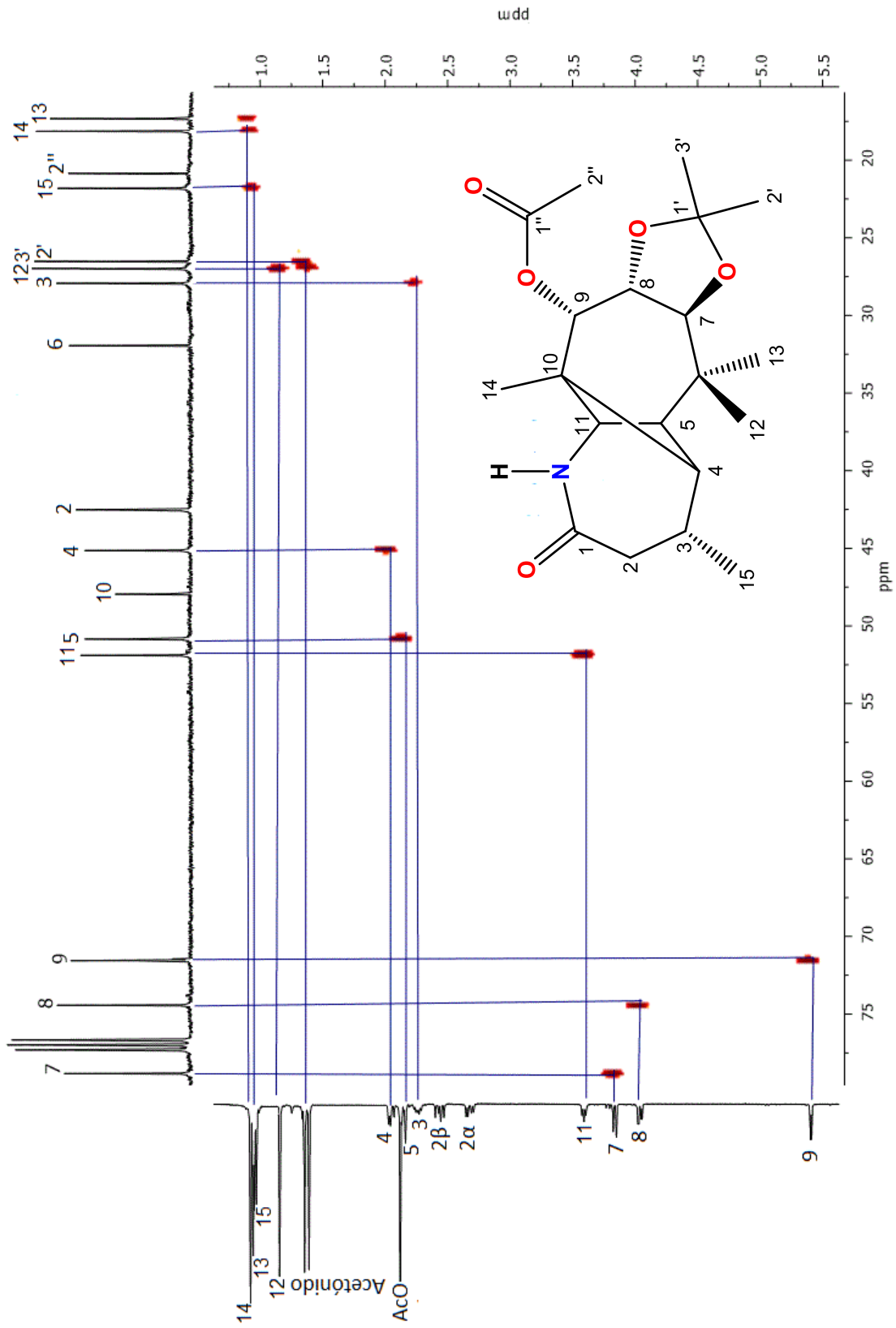
**Tabla 4.** Datos espectroscópicos de RMN para la lactama-acetónido-acetato (**58**).

<b>C/H</b>	<b>DEPT</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b> <b>ppm</b>	<b>HETCOR</b>
1	C=O	176.2	/
2	CH <sub>2</sub>	42.1	2.67, 2.43,
3	CH	27.9	2.23
4	CH	45.1	2.04
5	CH	50.8	2.15
6	C	32.0	/
7	CH	74.4	3.81
8	CH	71.5	4.07
9	CH	78.8	5.40
10	C	47.9	/
11	CH	52.8	3.62
12	CH <sub>3</sub>	27.0	1.05
13	CH <sub>3</sub>	17.3	0.94
14	CH <sub>3</sub>	18.1	0.91
15	CH <sub>3</sub>	21.8	1.02
NH	/	/	6.75
1'	C	108.5	/
2'	CH <sub>3</sub>	26.5	1.38
3'	CH <sub>3</sub>	26.9	1.35
1''	C=O	170.0	/
2''	CH <sub>3</sub>	20.8	2.12



9.7 Espectro COSY de la lactama-acetonido-acetato (58).

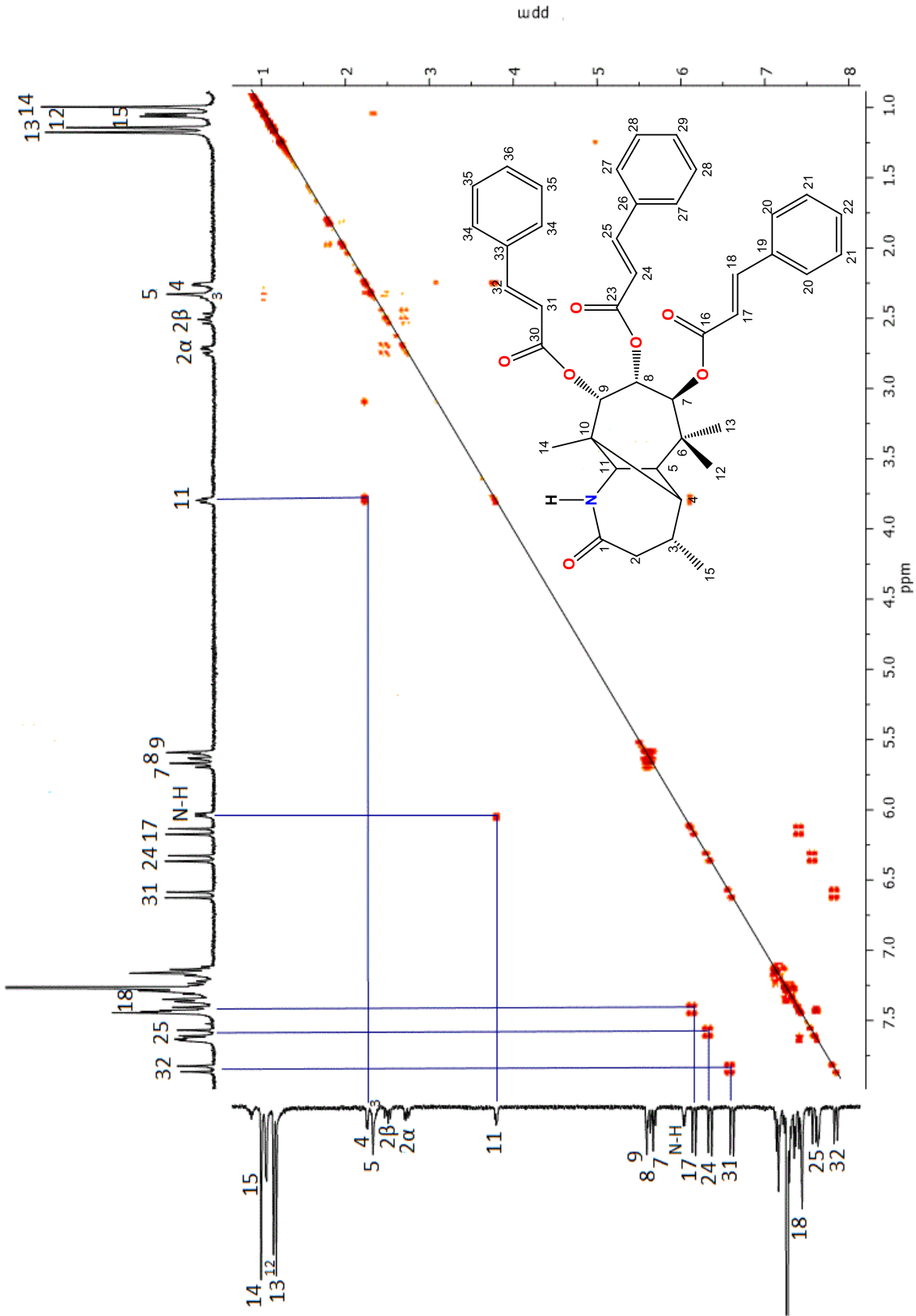




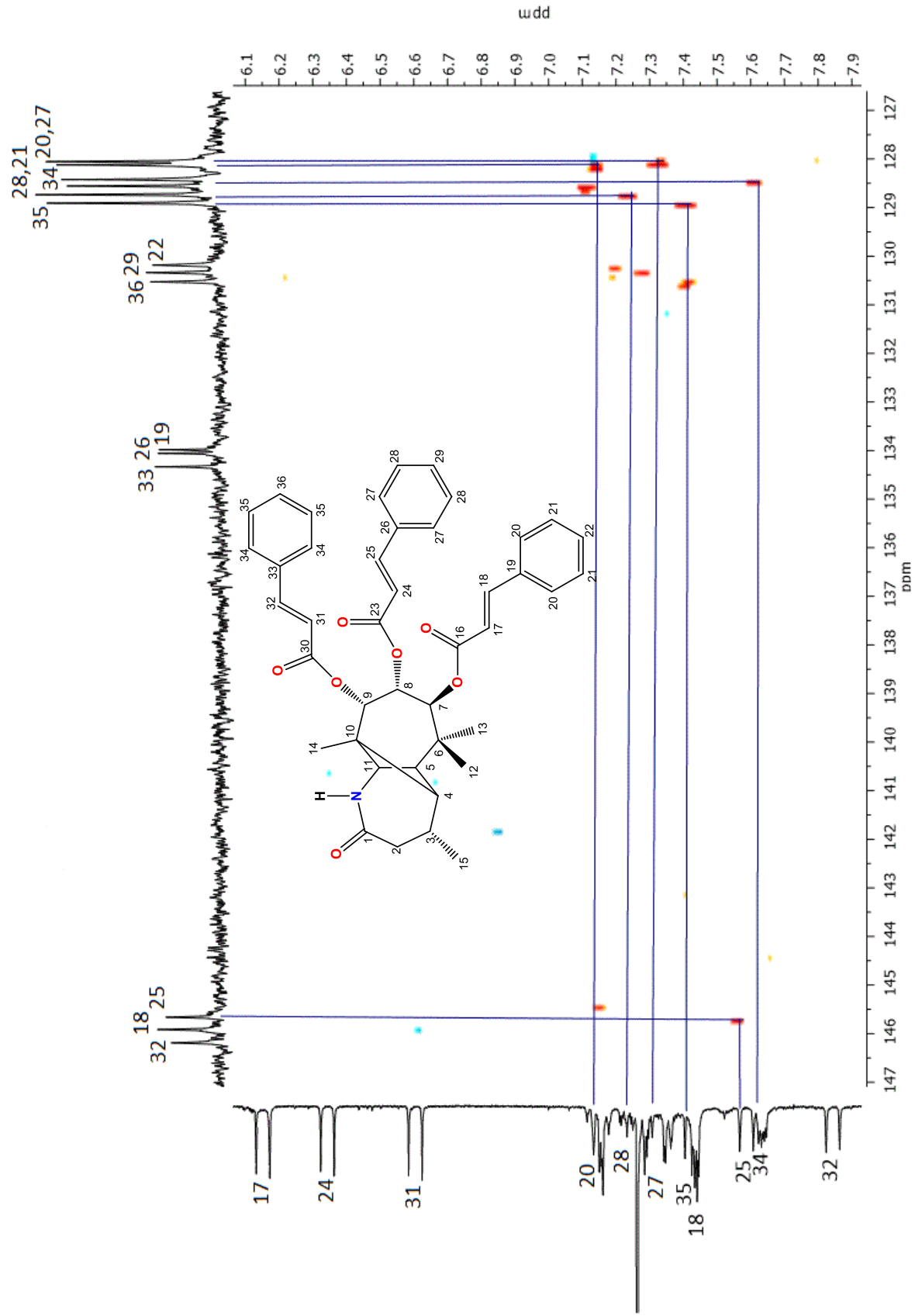
9.8 Ampliación de espectro HETCOR de la lactama-acetonido-acetato (58).

**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de RMN para la lactama tricinamato (**59**).

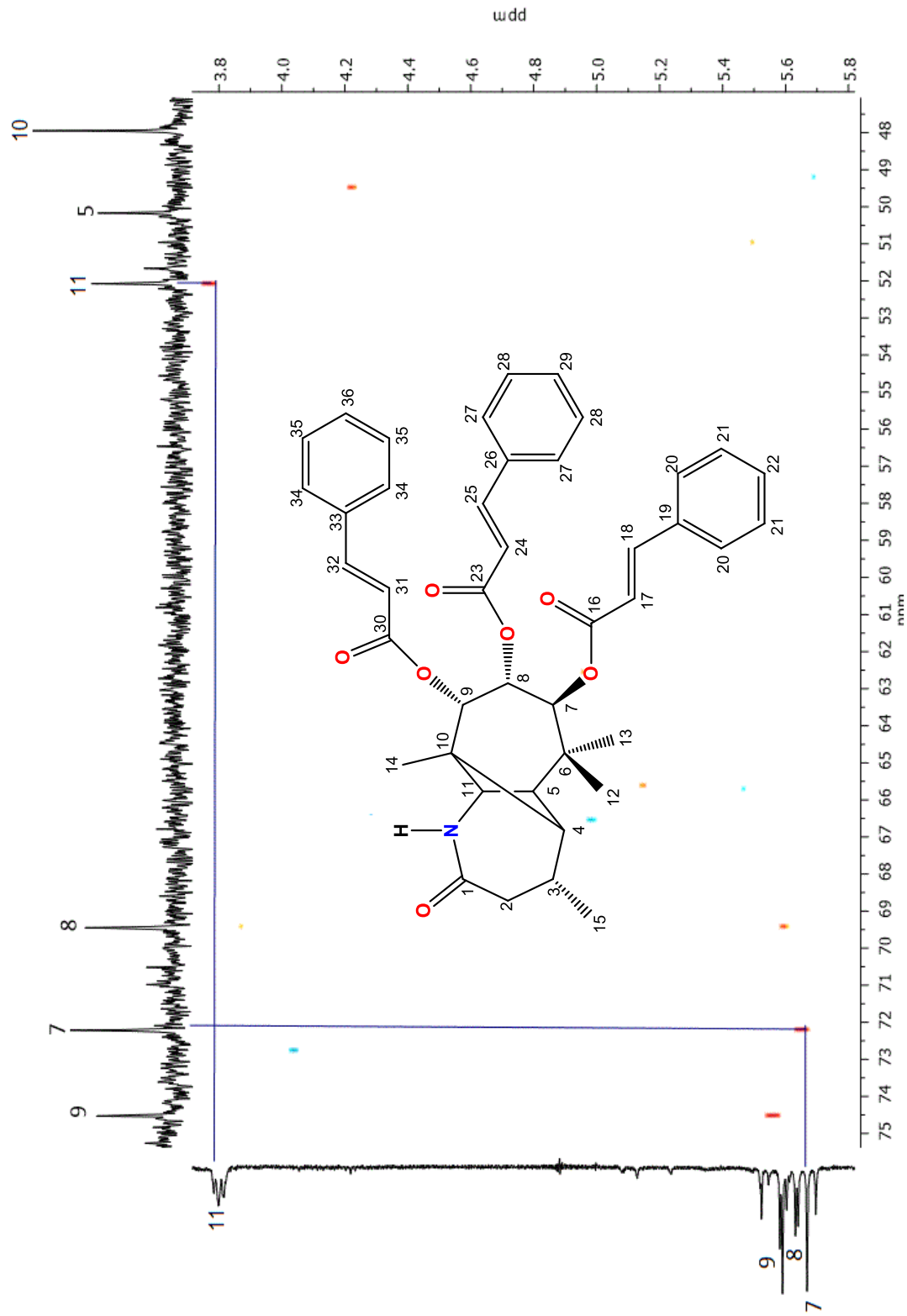
C/H	DEPT	$\delta$ 13C ppm	gHSQC	gHMBC
1	C=O	175.5	/	/
2	CH <sub>2</sub>	42.6	2.70, 2.48	175.5, 44.9
3	CH	28.0	2.33	72.2, 52.1, 48.0, 44.9, 35.2, 28.0, 26.8
4	CH	44.9	2.26	74.5, 52.1, 42.6, 35.2, 21.9
5	CH	50.2	2.32	72.2, 52.1, 48.0, 44.9, 35.2, 28.0, 26.8
6	C	35.2	/	/
7	CH	72.2	5.66	69.5
8	CH	69.5	5.64	74.5
9	CH	74.5	5.58	166.5, 52.1, 17.1
10	C	48.0	/	/
11	CH	52.1	3.80	175.5, 44.9
12	CH <sub>3</sub>	26.8	1.14	72.2, 50.2, 35.2, 20.0
13	CH <sub>3</sub>	20.0	1.18	72.2, 50.2, 35.2, 26.8
14	CH <sub>3</sub>	17.1	0.99	74.5, 52.1, 48.0, 44.9
15	CH <sub>3</sub>	21.9	1.07	44.9, 42.6, 28.0
16	C=O	166.5	/	/
17	CH	117.0	6.15	165.5, 134.0
18	CH	145.9	7.43	165.5, 128.2
19	C	134.0	/	/
20	CH	128.2	7.16	130.2, 128.2
21	CH	128.6	7.13	134.0, 128.6
22	CH	130.2	7.24	128.8, 128.2
23	C=O	166.3	/	/
24	CH	117.5	6.34	166.3, 134.1
25	CH	145.7	7.59	166.3, 128.1
26	C	134.1	/	/
27	CH	128.1	7.34	130.4
28	CH	128.8	7.29	/
29	CH	130.4	7.29	/
30	C=O	166.5	/	/
31	CH	117.4	6.60	166.5, 134.4
32	CH	146.2	7.84	166.5, 128.4
33	C	134.4	/	/
34	CH	128.4	7.64	130.5
35	CH	128.9	7.44	134.4, 128.4
36	CH	130.5	7.44	134.4, 128.4
NH	/	/	6.27	/



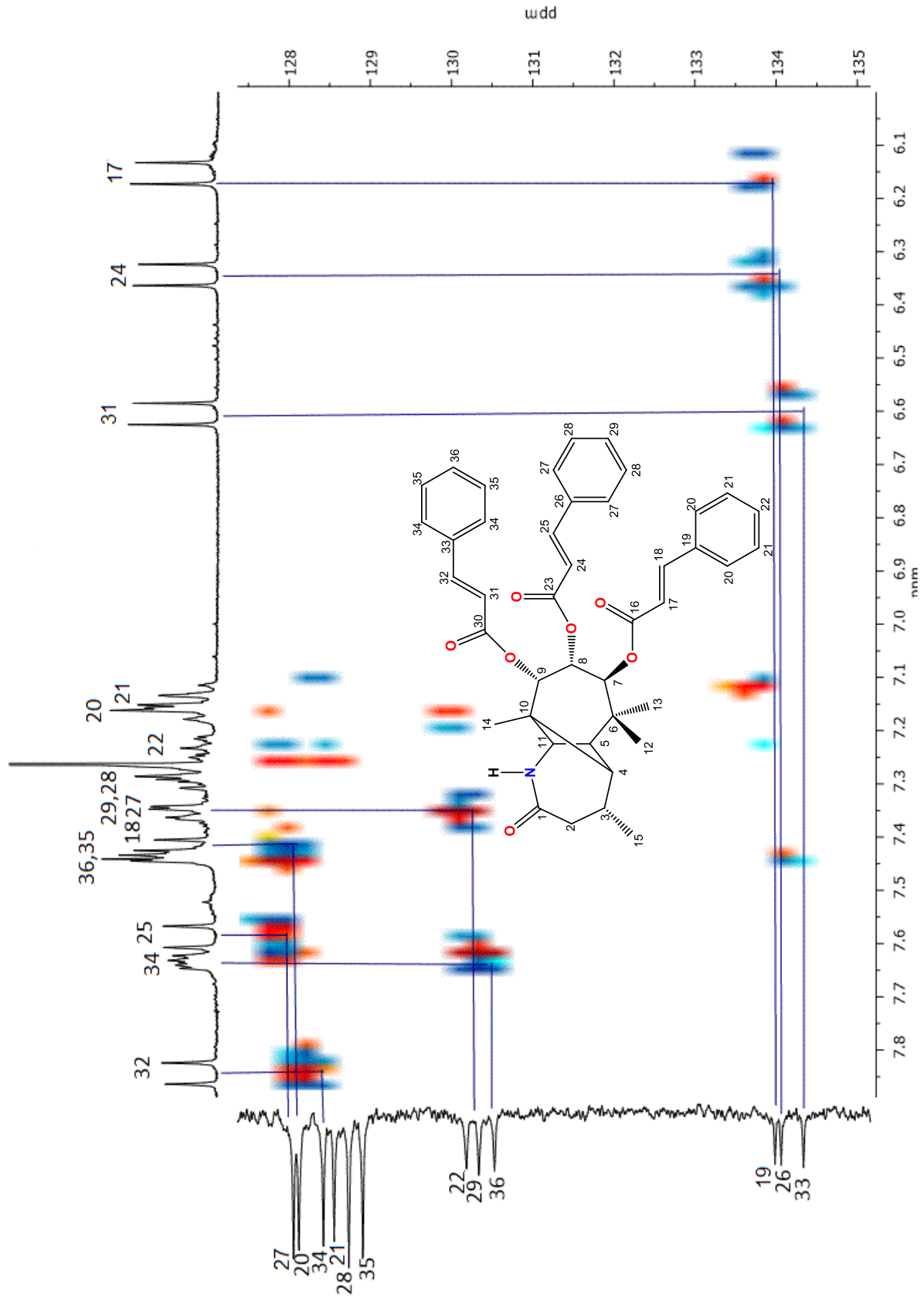
9.9 Espectro COSY de la lactama tricinnamato (59).



9.10 Ampliación de espectro HETCOR de la lactama tricinamato (59)



9.11 Ampliación de espectro HETCOR de la lactama tricinamato (59).



9.12 Ampliación de espectro HMBC de la lactama tricinamato (59).