



**Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo**

Facultad de Químico Farmacobiología



Tesis

**Optimización del aislamiento y ciclodeshidratación del
tetranorlabdanodiol**

Que presenta:

Iroel García Pacheco

Para obtener el título de:

Químico Farmacobiólogo

ASESORES

Doctora en Ciencias Químicas Rosa Elva Norma del Río Torres

Doctor en Química Mario Armando Gómez Hurtado

Morelia, Michoacán

Junio, 2015

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	6
EVOLUCIÓN DE LAS FRAGANCIAS	6
ÁMBAR GRIS	8
SÍNTESIS DEL AMBROX [®] (2)	11
SÍNTESIS DE AMBROX [®] (2) A PARTIR DEL (-)-ÁCIDO LABDANÓLICO (13)	12
AGERATINA JOCOTEPECANA	17
JUSTIFICACIÓN	20
OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
CONCLUSIONES	31
PARTE EXPERIMENTAL	32
DATOS DE LA ESPECIE VEGETAL	32
OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	32
AISLAMIENTO DE TETRANORLABDANODIOL (1)	34
PURIFICACIÓN DEL TETRANORLABDANODIOL (1)	34
REACCIÓN DE CICLODESHIDRATACIÓN DEL TETRANORLABDANODIOL (1)	35
BIBLIOGRAFÍA	36

Resumen

El ámbar gris es un producto metabólico de los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) y es considerado uno de los más valiosos perfumes animales; desafortunadamente, los intestinos del cachalote son la única fuente natural de esta sustancia, y es sabido que esta especie mamífera se encuentra en peligro de extinción; por estas circunstancias se trata de una especie protegida. Actualmente, existen alternativas para la síntesis de sustancias que componen el ámbar gris, entre ellas la del Ambrox[®] (**2**); sin embargo, estas estrategias sintéticas requieren múltiples etapas de reacción, lo que las hace costosas, tardadas y pueden generar considerable cantidad de contaminantes y/o subproductos no deseados; no obstante, la mayoría de las propuestas de síntesis involucran la utilización de productos naturales como materias de partida, principalmente los terpenos con esqueleto de labdano, que pueden ser obtenidos a partir de extractos de especies vegetales. En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se determinó la presencia de 13,14,15,16-tetranor-8 α -12-labdanodiol (**1**) y otros labdanos en *Ageratina jocotepecana*; empleando **1**, se estableció la obtención de **2** utilizando *p*-TsOH en benceno.

En el presente trabajo se describe la optimización del aislamiento y ciclodeshidratación del 13,14,15,16-tetranor-8 α -12-labdanodiol (**1**) de *Ageratina jocotepecana* para la obtención de (-)-Ambrox[®] (**2**). La caracterización del compuesto **1** se realizó por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación de estos con la literatura; del compuesto **2** se obtuvieron cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos-x, lo que permitió confirmar su caracterización espectroscópica y estereoquímica.

Palabras claves: *Ageratina*, Ambrox[®], ciclodeshidratación.

Abstract

Ambergris is an excretion from the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) and it is considered as one of the most valuable perfume from animal source; unfortunately, the intestines of sperm whale are the only natural source to get this substance, and it is well known that this mammalian species is endangered. Recently, several alternatives on chemical synthesis of substances composing ambergris have been described, including those to obtain Ambrox[®] (**2**); however, for these synthetic strategies, multiple reaction stages are required, affording expensive, delayed and polluting processes, which can give non wished subproducts; nonetheless, most of the proposed synthesis pathways involving the use of terpenes with labdane skeleton, which can be obtained from natural sources. In a previous study made by our research group, the presence of 13,14,15,16-tetranor-8 α -12-labdane-1,11-diol (**1**) and another labdanes in *Ageratina jocospecana* was determined; preparation of **2** employing **1** and *p*-TsOH in benzene was established.

In the present work, the optimization of the isolation and cyclodehydration of 13,14,15,16-tetranor-8 α -12-labdane-1,11-diol (**1**) from *Ageratina jocospecana* was described. Compounds **1** and **2** were characterized by its physical and spectroscopic data, as well as by its comparison with the literature; compound **2** afforded adequate crystals for its x ray diffraction analysis, which confirmed the correct characterization and stereochemistry.

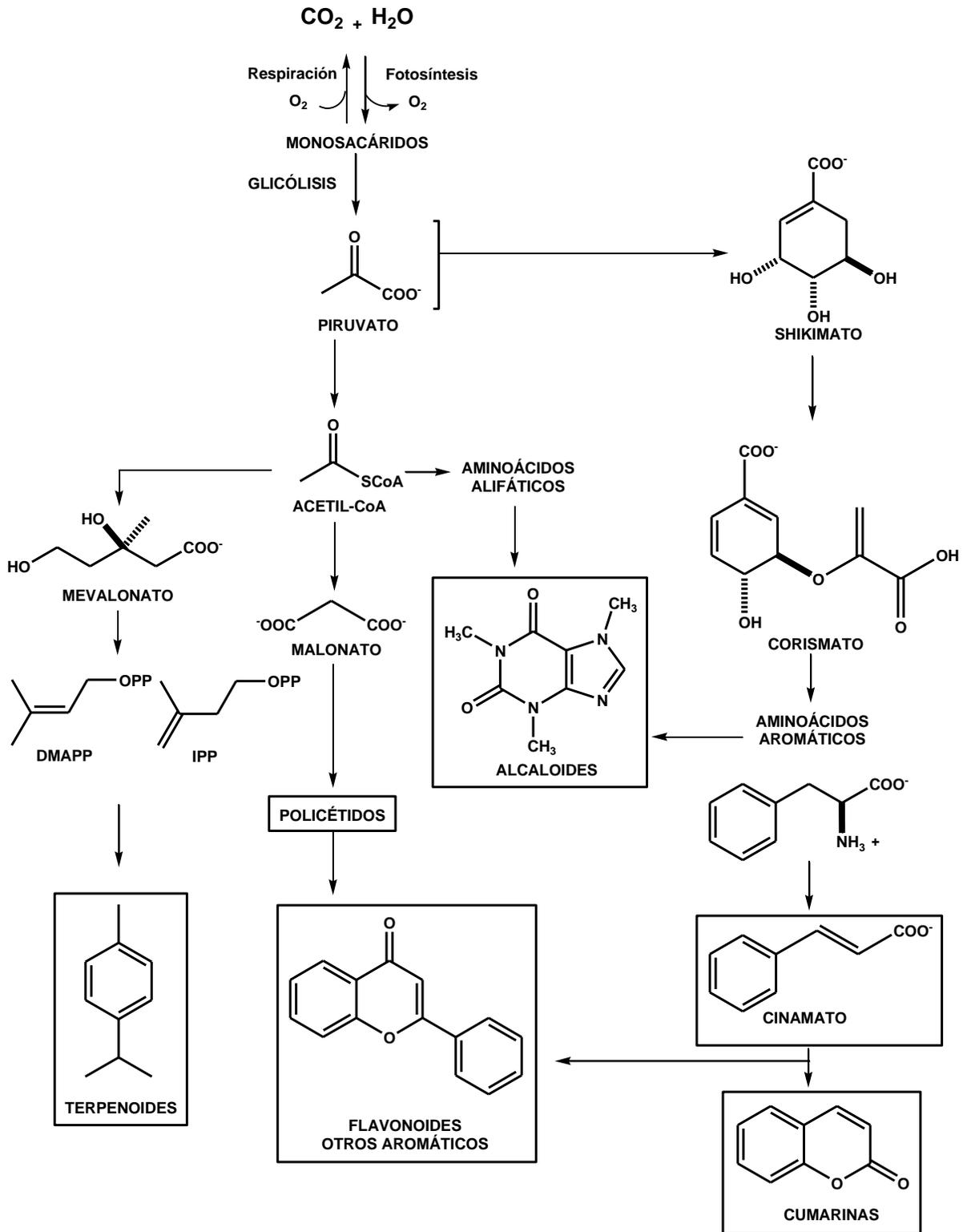
Key words: *Ageratina*, Ambrox[®], cyclodehydration

INTRODUCCIÓN

Las plantas son esenciales en la vida del hombre, puesto que a partir de moléculas de agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2) y energía solar, elaboran carbohidratos, grasas y proteínas, considerados como metabolitos primarios. Las plantas también producen otros compuestos llamados metabolitos secundarios (Valencia, 1995) (esquema 1).

Aunque estas no pueden huir de sus enemigos naturales, pueden defenderse químicamente atrayendo, resistiendo e inhibiendo a otros organismos mediante la producción de metabolitos secundarios (Sadava, 2009). Durante muchos años, el significado adaptativo de muchos metabolitos secundarios era desconocido, se creía que estos compuestos eran productos finales de metabolismo sin función o metabolitos de desecho. Posteriormente, se descubrió que éstos tienen importantes funciones en las plantas: proteger a las plantas de la ingestión de herbívoros y de la infección por patógenos microbianos; como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas y como agentes en la competencia planta-planta (Taiz & Zeiger, 2006).

Muchos de los constituyentes de las plantas se utilizan terapéuticamente, en la preparación de bebidas, en condimentos para alimentos, colorantes y aromatizantes; por ejemplo, en la industria alimenticia se emplean plantas frescas sobre todo cuando se usan como saborizantes; en la industria de cosméticos se utilizan flores frescas porque tienen mayor cantidad de aceites esenciales. Los aceites esenciales de las plantas presentan una compleja composición química y un carácter fuertemente aromático, este último, los ha llevado a su inclusión en la perfumería. Entre los componentes de los aceites esenciales se encuentran los terpenos, que son una familia de hidrocarburos a menudo mayoritarios, llegando a alcanzar elevadas concentraciones del 75% al 90% del peso total en el aceite esencial.



Esquema 1. Ruta biosintética de metabolitos secundarios (Modificado de Dewick, 2009).

Los terpenoides forman el mayor grupo de sustancias olorosas naturales, es de esperar que también formen el mayor grupo de modernos ingredientes en fragancias. Existen diferentes estructuras terpenoides en los ingredientes de perfumes, tanto naturales como sintéticos. En lo que se refiere a materiales de perfume, los miembros más importantes de la familia terpenoide son los monoterpenos oxigenados. Los hidrocarburos terpenoides generalmente tienen olores más débiles y se utilizan principalmente como materias primas.

Debido a que poseen una mayor composición carbonada, los sesquiterpenos (C-15) tienen menores presiones de vapor en comparación con los monoterpenos (C-10).

Un menor porcentaje de sesquiterpenos y diterpenos tienen olores útiles. Sin embargo, los que sí tienen olores, son muy tenaces por su menor volatilidad, por consiguiente permiten una pérdida más lenta del perfume. Estos materiales forman la base de los perfumes y sirven también para fijar los componentes más volátiles. Los diterpenos, por definición, tienen estructuras de 20 átomos de carbono, esto significa que muy pocos son suficientemente volátiles para poseer un olor. Los diterpenos se utilizan en perfumería como disolventes, en vista de su hidrofobicidad y baja volatilidad, estos disolventes tienen también propiedades fijadoras.

Algunos aceites esenciales y fragancias son extremadamente volátiles. Estos requieren específicamente un fijador natural o sintético si se utilizan para la elaboración de un perfume.

En el presente trabajo se describe la optimización en la reacción de ciclodeshidratación del tetranorlabdanodiol (**1**) para la obtención del Ambrox[®] (**2**), utilizado en perfumería como materia odorífera y fijador.

ANTECEDENTES

EVOLUCIÓN DE LAS FRAGANCIAS

Nuestros antepasados descubrieron el fuego y con él los aromas de maderas y resinas quemadas. Las flores, plantas aromáticas y resinas eran ante todo materias primas que se dedicaban al culto de los dioses (Stevens & Verhé, 2004).

Los perfumes existen desde la antigüedad, varias civilizaciones los han utilizado para ocultar olores o para dar un aroma agradable. El nombre de perfume proviene del latín “*per*” (por) y “*fumare*” (producir humo), haciendo referencia a las sustancias aromáticas que desprendían un humo fragante al ser quemadas, usado para sahumar o perfumar.

Las actividades religiosas y placenteras han sido las principales unidades del crecimiento fenomenal del uso de los perfumes a lo largo de los siglos. Algunas religiones del mundo empleaban fragancia en cumplimiento de sus creencias. Con el florecimiento de las civilizaciones, el uso de las fragancias se desarrolló dentro de cuatro grandes centros culturales, China, India, Egipto y Mesopotamia, que se extendió con el tiempo a las sociedades sofisticadas de Grecia, Palestina, Roma, Persia y Arabia (Harrewijn *et al*, 2012).

Con el declive del imperio romano y la expansión del cristianismo, que prohibió el uso del perfume por su relación con la lúbrico, en Europa desapareció el conocimiento del perfume, reapareciendo con la llegada de las Cruzadas a Tierra Santa durante los siglos XI-XII y con ellas la destilación de alcohol hecha por alquimistas árabes, que además fueron expertos en el uso de las especias. Los delicados aromas, la destilación de alcohol y el refinado de materiales a base de cristal, fueron la manifestación física de miles de años de investigación.

En Medio Oriente las sustancias aromáticas elaboradas a base de extractos naturales eran un símbolo de lujo y del prestigio entre las clases sociales más favorecidas. Estas sustancias eran muy costosas, por ejemplo el ámbar gris tenía el mismo valor que el oro o los esclavos (Sell, 2006).

En la actualidad, un perfume se define como una sustancia aromática elaborada para dar un olor agradable, suficientemente intenso, difuso, persistente y debe retener su carácter esencial durante todo el periodo de evaporación. Generalmente es constituido por fragancia y aceites esenciales, mientras que el resto se compone de disolvente y el fijador, algunos perfumes incluyen pequeñas cantidades de agua (tabla 1).

Tabla 1. Terpenos utilizados en las fragancias.

Material	Olor
Amberlyn [®] / Ambrox [®]	Floral, madera
Carvona	Menta verde
Citronelol y ésteres	Rosa
Dihidromircenol	Cítrico, floral
Geraniol/nerol y ésteres	Rosa
Linalool	Floral, madera
Acetato de linalilo	Frutas, flores
Metil iononas	Violeta
α -terpineol y acetato	Pino

Los fijadores son eficientes en la reducción de la velocidad de evaporación de los aceites utilizados en la fabricación de los perfumes. La ausencia de un buen fijador es una de las causas principales por lo cual un perfume pierde su aroma con el tiempo. Se han obtenido buenos efectos con este fin, incluyendo en la composición tinturas alcohólicas de almizcle, civeta o ámbar gris, preparados generalmente en forma de maceración alcohólicas al 3% y dejadas en reposo por varios meses.

ÁMBAR GRIS

Los fijadores eran obtenidos tradicionalmente de fuentes naturales como animales y plantas (Palmer, 2013). Lamentablemente esta fue una de las razones para cazar a los cachalotes (*Physeter macrocephalus*), ya que el ámbar gris es una excrecencia intestinal patológica secretada por el animal para proteger su estómago de las lesiones provocadas por los picos de las sepias, calamares y algunos crustáceos que ingiere (Groom, 2012). Los cachalotes envuelven objetos que podrían dañar su tubo digestivo en una especie de pasta blanquecina y blanda, que luego expulsan al exterior. Esta sustancia, al principio, no se parece mucho al ámbar gris que se conoce: es muy blanda, tiene un olor claramente fecal, y es de un color muy claro. Sin embargo, poco a poco, debido a la degradación por la luz solar, y la oxidación en el agua salada, se va endureciendo, oscureciendo y cambiando de olor, éste se afina, se vuelve suave, muy agradable y único (Schäfer, 2011).

El lado gris oscuro de esta historia tiene al ser humano como protagonista. A principios del siglo XVIII comenzó la caza masiva del cachalote y el ámbar gris fresco y en cantidad era uno de los codiciados trofeos. Era utilizado en ceremonias religiosas como incienso, logró ser parte de la vida diaria de los reyes. En Asia, llegó a ser utilizado como medicamento, como condimento en la comida típica y el vino. Tuvo gran popularidad en la Europa Medieval debido a sus propiedades reconstituyentes y fue parte de las farmacopeas hasta finales del siglo pasado; fue a partir del siglo XX que se convirtió en un ingrediente dominante en la industria de la perfumería francesa.

Actualmente, el ámbar gris está desapareciendo del mercado mundial debido a la caza excesiva en el pasado del cachalote y el crecimiento continuo de la contaminación costera, lo que hace aún más difícil encontrar materiales de buena calidad. El ámbar gris es utilizado en la perfumería de lujo dada su escasez y elevado costo, donde se usa como fijador de olores, además de proporcionar su peculiar olor almizclado a los perfumes (Machado *et al*, 2000).

El ámbar gris es uno de los pocos y valiosos perfumes animales, como la algalia (gato de algalia), el almizcle (ciervo almizclero) y castóreo (castor). Utilizado durante siglos debido a su fragancia única y propiedades para la adherencia, pero ahora está prohibido o retirado del mercado gracias a la Ley de Protección de Mamíferos Marinos.

Su componente principal es el triterpeno ambreína (3), este es prácticamente inodoro y se utiliza en la industria de la perfumería como fijador (figura 1). Los componentes olfativos importantes del ámbar gris se forman durante el período de maduración en el mar, por degradación oxidativa de la ambreína (3) en el doble enlace central, formando compuestos volátiles mono-, di- y tri-cíclicos. Debido a la salinidad del agua de mar se han encontrado derivados clorados como el homociclogeraniol 9.

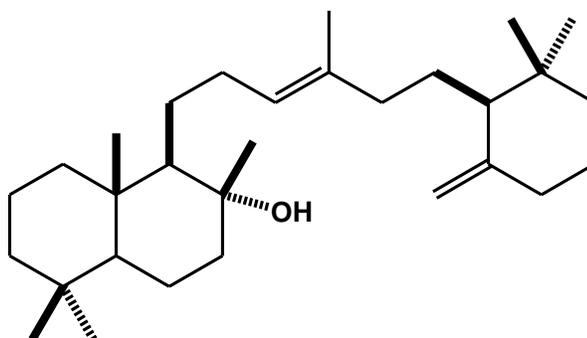


Figura 1. Estructura de la Ambreína (3).

Entre los compuestos formados su componente más importante es el (-)-Ambrox[®] (2). Se presume que los compuestos cíclicos 2, 5 y 6 se originan de la parte de la ambreína bicíclica, mientras que los fragmentos más pequeños 7-10 están relacionados con el fragmento homociclogeranilo de la molécula (figura 2).

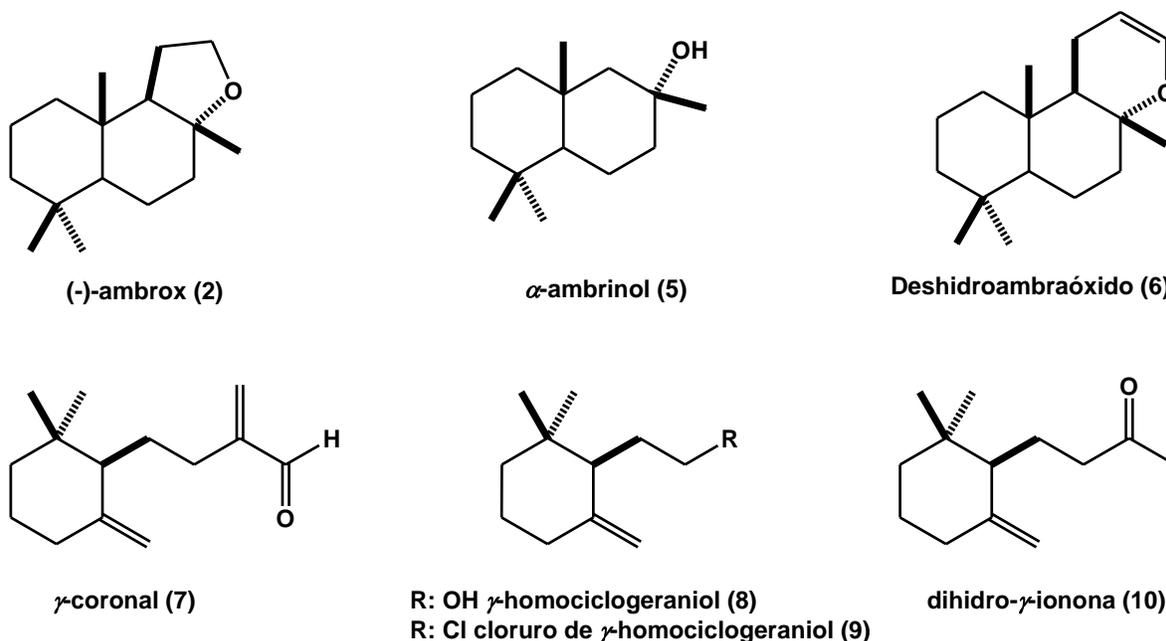


Figura 2. Productos de degradación oxidativa de la ambreína (3).

La creciente demanda de sustancias odoríferas del tipo ámbar gris ha estimulado una intensa búsqueda de sustitutos. Por esta razón se han desarrollado varias rutas sintéticas para la obtención de Ambrox[®] (2), ya que constituye hoy en día el equivalente sintético más importante para reemplazar el ámbar gris obtenido directamente del cachalote.

La mayoría de estas síntesis tienen la ventaja de que ocurren naturalmente a partir de diterpenos y sesquiterpenos, tal como (-)-sclareol (11) (Barton *et al*, 1994), óxido de manoilo (12) (Cambia *et al*, 1971), (-)-ácido labdanólico (13), (Castro *et al*, 2000; Bolster *et al*, 2001; Ishihara *et al*, 2002), ácido commúnico (14), (Barrero *et al*, 1993), (-)-ácido abiético (15) (Koyama *et al*, 1987), y el (-)-drimenol (16) (Gonzalez *et al*, 1987), (figura 3). El equivalente sintético más importante es el (-)-8 α ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdano (2) (Ambrox[®]), (Benites *et al*, 2006).

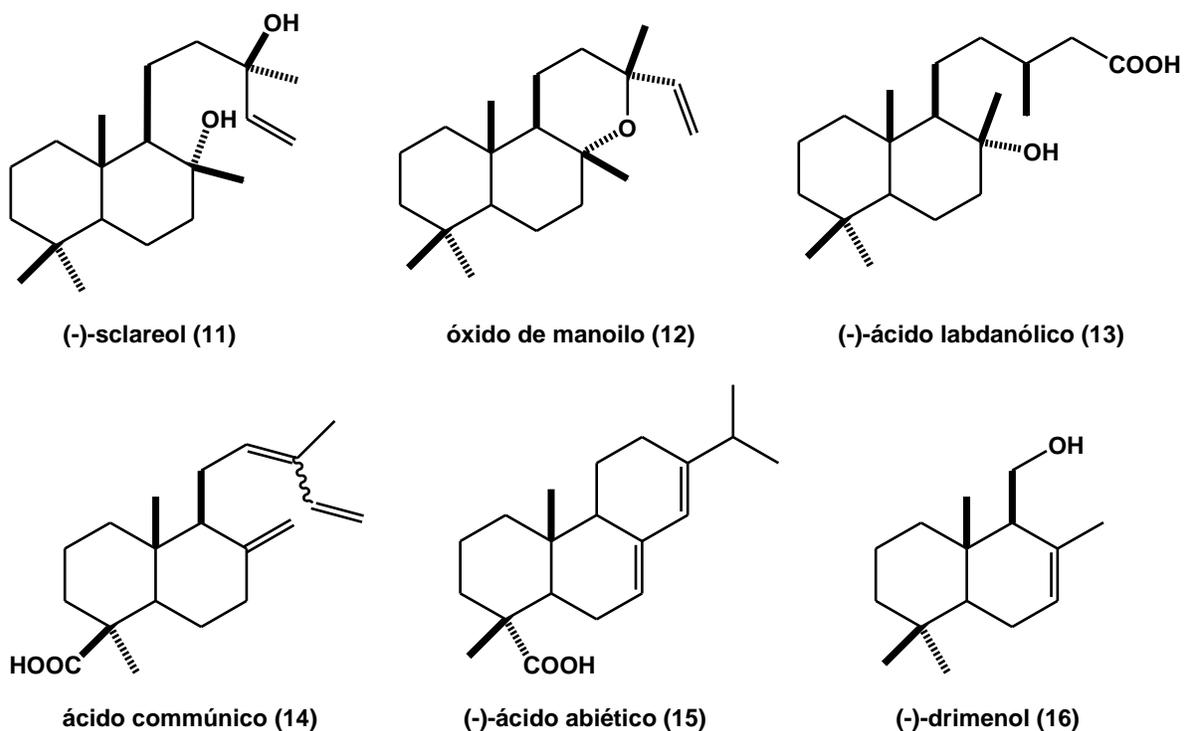
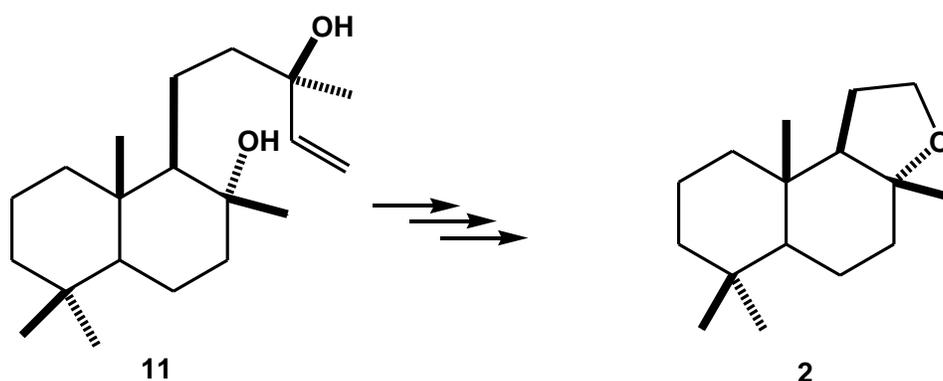


Figura 3. Terpenos utilizados en la síntesis de Ambrox[®] (2).

SÍNTESIS DEL AMBROX[®] (2)

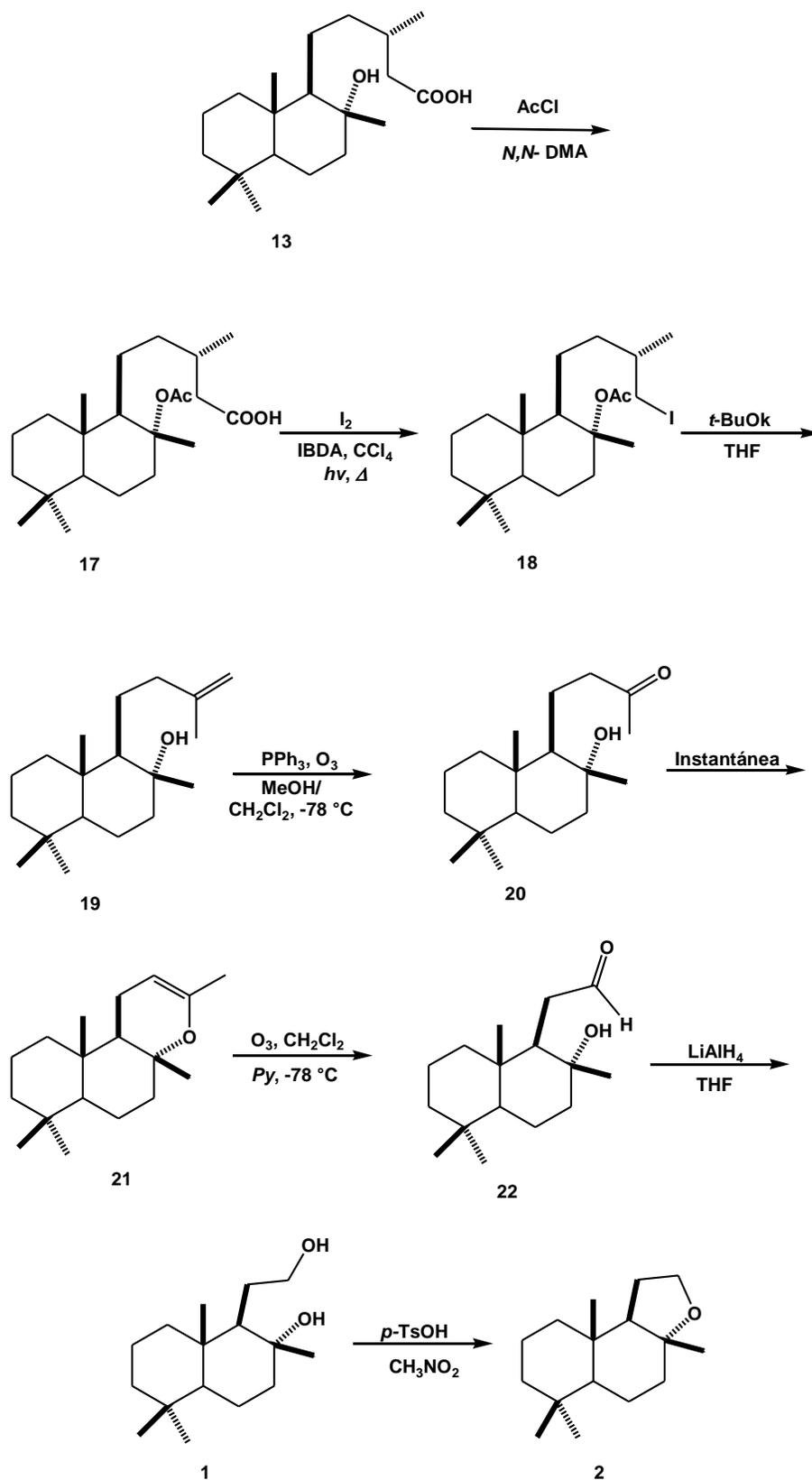
Este compuesto, fue sintetizado por primera vez por Stoll y Hinder en los años cincuenta a partir de sclareol (11) en tres etapas, (esquema 2). La mayoría de las síntesis ocurren a partir de diterpenos.



Esquema 2. Obtención del Ambrox[®] (2) a partir del sclareol (11).

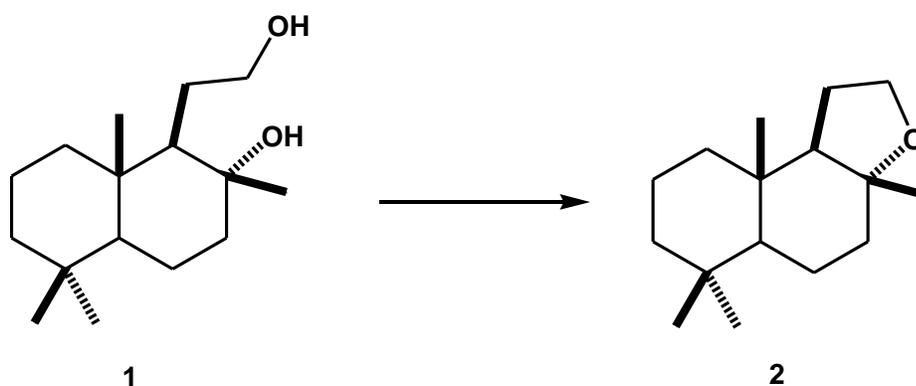
SÍNTESIS DE AMBROX[®] (2) A PARTIR DEL (-)-ÁCIDO LABDANÓLICO (13)

Una de las rutas de síntesis más importantes reportadas para la síntesis de Ambrox[®] (2) es la descrita por Marjon *et al* (2001) en ocho etapas de reacción, a partir del ácido labdanólico (13), aislado de *Cistus ladaniferus* L. (esquema 3), consiste en la degradación de la cadena alifática y finalmente la ciclodeshidratación de 1 para obtener al Ambrox[®] (2).



Esquema 3. Síntesis de Ambroxol[®] (2) a partir del Ácido labdanólico (13).

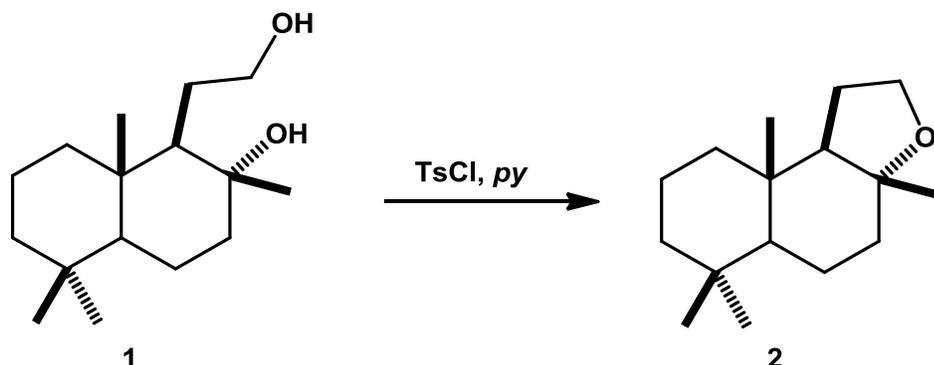
Analizando la ruta de síntesis de Ambrox[®] (**2**) a partir de **13**, especialmente el último paso de reacción donde se muestra la deshidratación y ciclación del compuesto **1** (esquema 4), el cual es un intermediario común en todas las rutas de síntesis, es decir todas las rutas conducen a este compuesto, nos llevó a realizar una búsqueda en la base de datos SciFinder[®] para conocer cuántos métodos se han empleado en esta última etapa para la transformación del intermediario **1** al derivado tricíclico **2**.



Esquema 4. Ciclodeshidratación del labdanodiol **1**.

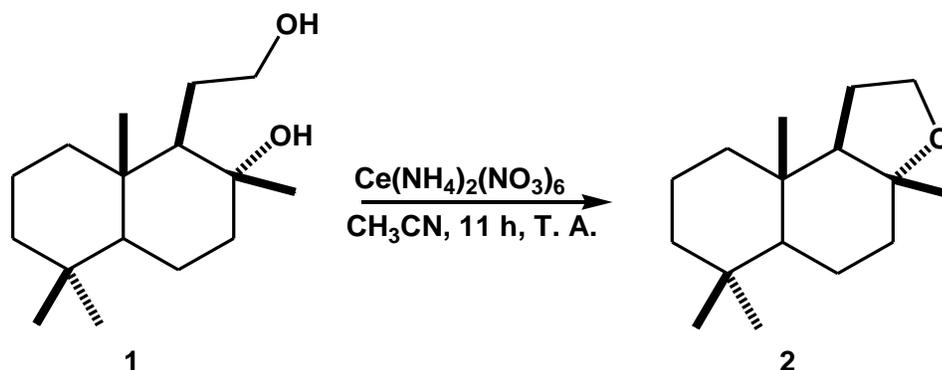
Se encontraron más de 70 reportes de ésta reacción de ciclodeshidratación del 13,14,15,16-tetranor-8 α -12-labdanodiol (**1**), que implica la generación de un anillo heterocíclico de cinco miembros y con ello la formación del (-)-Ambrox[®] (**2**). En múltiples procesos para la síntesis de este compuesto, ésta reacción es empleada en la última etapa de síntesis. Debido a ello, se han descrito y patentado variados métodos y condiciones de reacción; entre los que se encuentran aquellos que emplean agentes orgánicos que favorecen reacciones de sustitución nucleofílica (SN), como el cloruro de tosilo, esquema 5, (Fekih & Habbachi, 2001; Moulinesa *et al*, 2001; Barrero *et al*, 1994; Barrero *et al*, 1993; Petrzilka *et al*, 1992) y la trifenílfosfina (Álvarez-Manzaneda & Chahboun, 2007; Barrero *et al*, 2003; Barrero *et al*, 2004), donde se han observado rendimientos

desde 92% (Barrero *et al*, 2003) hasta rendimientos cuantitativos (Barrero *et al*, 1994).



Esquema 5. Ciclodeshidratación de 1 empleando condiciones de SN.

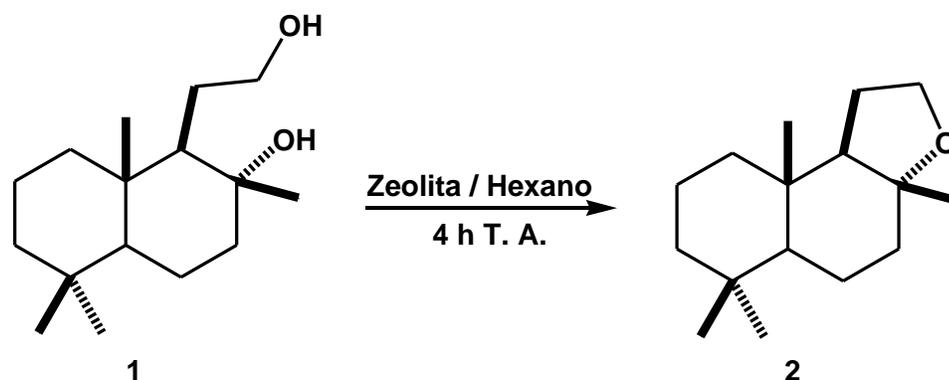
Por otra parte, la eficiencia de catalizadores metálicos en reacciones de síntesis orgánica ha sugerido el uso de derivados de Cerio, esquema 6 (Álvarez-Manzaneda *et al*, 2006), catálisis a partir de Óxidos de Estaño y Aluminio (Barrero *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2012), así como de Zinc; de igual manera, se han considerado complejos de Paladio y Rutenio generados *in situ* como agentes catalíticos (Zahra *et al*, 1997).



Esquema 6. Ciclodeshidratación de 1 con catalizadores metálicos.

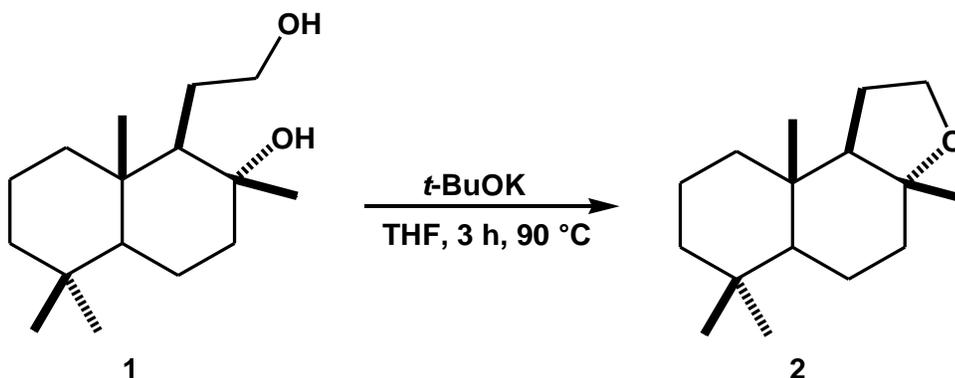
Otros materiales inorgánicos empleados en la ciclodeshidratación de 1 corresponden a minerales del grupo de los silicatos o aluminosilicatos como la zeolita y montmorillonita (esquema 7), respectivamente; ambos grupos han

promovido rendimientos de reacción cuantitativos (Carey, 2013; Steenkamp & Mihloti, 2010; Hüllmann *et al*, 1996).



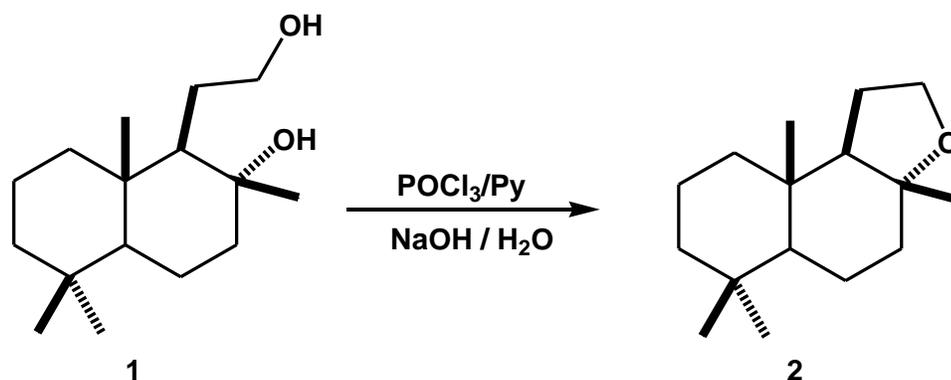
Esquema 7. Ciclodeshidratación de 1 empleando catalizadores minerales.

También han sido reportadas condiciones de reacción básicas, empleando *t*-BuOK con rendimientos del 91% (Bevinakatti *et al*, 2009), 95% (Aricò *et a*, 2012) y 100% (Aricò & Tundo, 2014), siendo hasta el momento la única base empleada para esta reacción (esquema 8).



Esquema 8. Ciclodeshidratación de 1 en condiciones básicas.

Cabe mencionar que al menos un ejemplo de cada una de las reacciones antes mencionadas corresponde a una patente, al igual que las mencionadas a continuación (Tanino & Aoki, 2014; Knuebel *et al*, 1995), (esquema 9).



Esquema 9. Ciclodeshidratación de 1 con un agente deshidratante.

AGERATINA JOCOTEPECANA

Como es sabido un gran número de rutas para la síntesis de 2 involucran el uso de diterpenos de tipo labdano. Este tipo de compuestos se han aislado de *Ageratina jocotepecana* la cual pertenece a la tribu *Eupatorieae*, es un género americano que comprende alrededor de 200 especies distribuidas principalmente en las zonas templadas de México y Centroamérica. Son hierbas anuales o perennes, subarbustos o arbustos, hasta de 2.5 m de altura; tallos herbáceos o leñosos, erguidos o algo decumbentes, simples o ramificados; hojas opuestas o a veces alternas, pecioladas o sésiles (Rzedowski, 2010) (figura 4).



Figura 4. *Ageratina jocotepecana*.

Ageratina jocotepecana B. L. Turner, es una de las 28 especies de *Ageratina* que se encuentran en el occidente de México, clasificada por primera vez por B. L. Turner en 1996 con una muestra colectada en Jocotepec, Jalisco (Turner, 1996). Jocotepec se encuentra situado a una altura 2100 msnm, cuenta con un clima semiseco, semicálido con una temperatura promedio anual de 20 °C y temperaturas mínimas de 13 °C (figura 5).

En Michoacán la zona de colecta se encuentra a una altura aproximada de 2260 msnm, donde se cuenta con un clima templado con lluvias en verano y una temperatura de 6 a 24 °C.

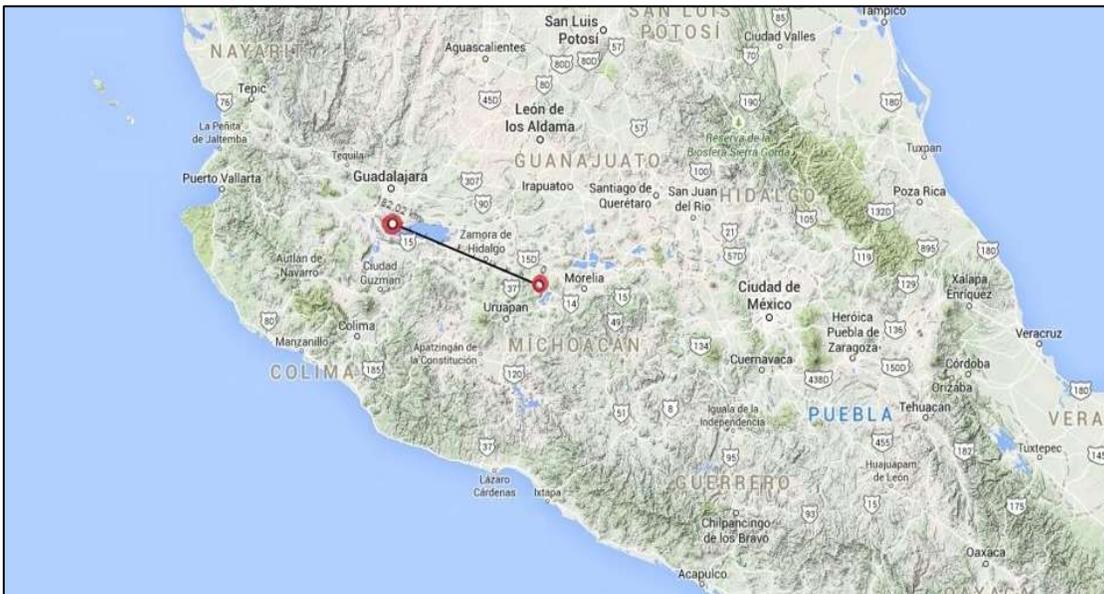


Figura 5. Localización de *A. jocotepecana* en México.

En una investigación fitoquímica de *Ageratina jocotepecana*, se demostró la coexistencia de (13*R*)- y (13*S*)-labdanos por dicroísmo circular vibracional. Los labdanos aislados correspondieron al ácido catívico (**23**), catívato de metilo (**24**), ácido (+)-13-*epi*-labdanólico (**25**), (13*Z*)-lab-7,13-dien-15-oico (**26**), (García *et al*, 2014) (figura 6). Analizando las estructuras químicas de estos labdanos, podemos ver que todos son materias primas potenciales para síntesis de Ambrox[®] (**2**). Lo que genera una fuente nueva de estos metabolitos.

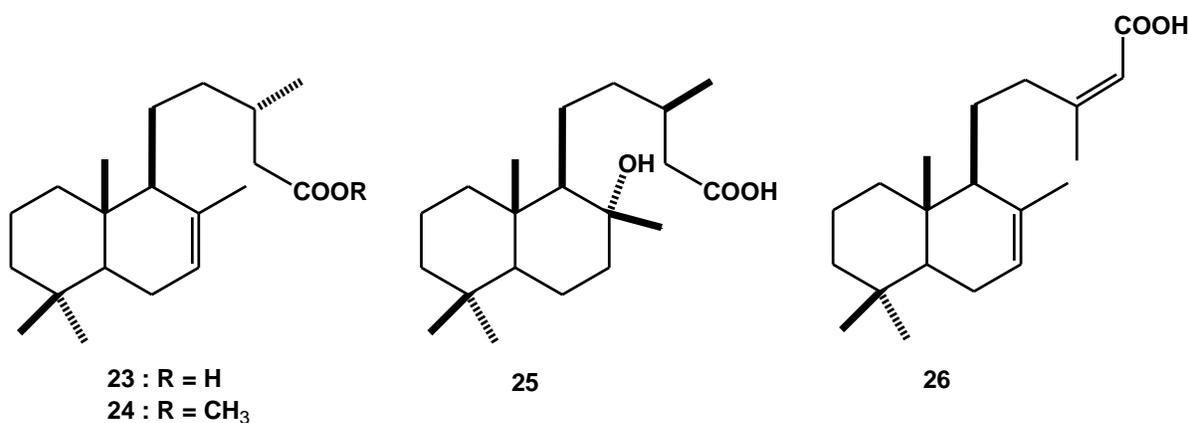


Figura 6. Labdanos aislados de *A. jocotepecana*.

Pérez Gutiérrez, en 2012 reportó el aislamiento del tetranorlabdanodiol (**1**) en el extracto hexánico de tallos de *Ageratina jocotepecana*. Este hallazgo permite seguir explorando la reactividad del diol **1** en la obtención de **2** dada su importancia en la industria de la perfumería.

JUSTIFICACIÓN

El 13,14,15,16-tetranor-8 α ,12-labdanodiol (**1**) es un compuesto reportado como el último intermediario de reacción para la obtención de (-)-8 α ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdano (**2**). Hasta ahora la única fuente natural reportada del derivado **1** es el extracto hexánico de tallos de *A. jocotepecana*. Debido a la distribución tan restringida que presenta dicha especie, se desconoce su adaptación en otras zonas geográficas y climáticas. Además de la prevalencia de los metabolitos secundarios conocidos y en especial el labdanodiol **1**.

Por lo antes mencionado resulta interesante investigar si el derivado **1** se encuentra presente también en flores y hojas de *A. jocotepecana*, así como buscar mejores condiciones de purificación y ciclodeshidratación del labdanodiol **1** para la obtención del Ambrox[®] (**2**).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar las condiciones de aislamiento y ciclodeshidratación de 13,14,15,16-tetranor-8 α ,12-labdanodiol (**1**) para la preparación de (-)-8 α ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdano (**2**).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos hexánicos y de cloruro de metileno (CH₂Cl₂) de las partes aéreas de la planta (flor, hoja y tallo).
- Identificar la presencia del tetranorlabdanodiol (**1**) en los extractos hexánicos y de CH₂Cl₂ de flor, hoja y tallo.
- Determinar la presencia del tetranorlabdanodiol (**1**), en plantas trasplantadas en Morelia y Ario de Rosales.
- Optimizar las condiciones para la purificación y aislamiento del tetranorlabdanodiol (**1**), por cromatografía en columna.
- Optimizar las condiciones de ciclodeshidratación del tetranorlabdanodiol (**1**).
- Caracterizar al Ambrox[®] (**2**) mediante sus datos físicos y espectroscópicos.

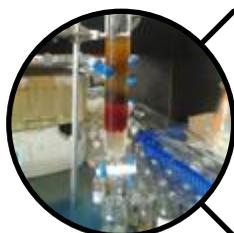
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



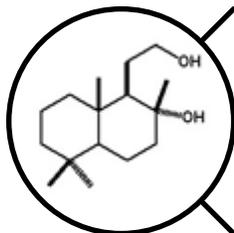
Realizar la colecta de la especie vegetal, *A. jocotepecana* en tres localidades



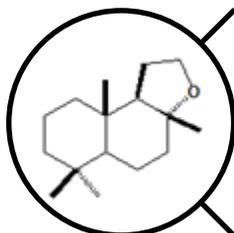
Obtener los extractos de hexano y de cloruro de metileno de flor, hoja y tallo.



Purificar el 13,14,15,16-tetranor-8 α ,12-labdanodiol (**1**).



Optimizar la ciclodeshidratación de **1** para la obtención del (-)-8 α ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdano (**2**).



Purificar y caracterizar a **2** mediante sus datos físicos y espectroscópicos

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ageratina jocotepecana es considerada hasta ahora una planta endémica del Centro Occidente de la República Mexicana, ya que como se mencionó en la parte de antecedentes hasta ahora solo se ha detectado en Jalisco y Michoacán. El hecho de haber encontrado en un estudio previo del extracto hexánico de tallos al tetranorlabdanodiol (**1**), nos motivó a realizar trasplantes de esta especie vegetal, obtenidas del kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacapu, en dos localidades como son Morelia y Ario de Rosales, para ver si esta especie vegetal se podía adaptar a otras condiciones climatológicas y orográficas. Se les dio seguimiento a las especies trasplantadas logrando sobrevivir aproximadamente el cincuenta por ciento.

El siguiente objetivo a estudiar, fue ver si estas especies trasplantadas en otras localidades también producían al tetranorlabdanodiol (**1**), por lo que se realizaron los diferentes extractos hexánicos y cloruro de metileno de estas especies. Los rendimientos de los extractos se muestran en la parte experimental (tabla 3).

Con el antecedente de que este compuesto se encontraba en los tallos del extracto hexánico, primeramente se analizaron los extractos hexánicos de tallos de las tres especies, realizando cromatografías en columna, con lo que se logró demostrar que el compuesto **1** estaba presente en las muestras de las tres colectas.

Otro objetivo planteado en el presente trabajo, era investigar si el labdanodiol **1** se encontraba en las flores y hojas, tanto de los extractos hexánicos como cloruro metilénicos de *Ageratina jocotepecana*, ya que estos extractos no habían sido estudiados anteriormente. Las cromatografías realizadas a los extractos hexánicos y clorometilénicos de las hojas y flores de la especie colectada en la carretera Morelia-Zacapu, nos revelaron la presencia del labdanodiol **1**. Este hecho resultó de gran relevancia ya que ahora se sabe que se puede emplear toda la parte aérea de esta especie para la obtención de **1**.

Cabe mencionar que la purificación del labdanodiol **1** a partir de los extractos hexánicos presentó menor dificultad, esto se debe a que los extractos de cloruro de metileno presentan metabolitos secundarios más polares que dificultan la separación del diol **1**.

Un lote de 2 g de extracto hexánico desengrasado de tallos de *A. jocotepecana*, después de recromatografías sucesivas permitió obtener cristales con punto de fusión de 130-132 °C. En su espectro de RMN de ^1H del tetranorlabdanodiol (**1**) figura 7, mostró en 3.79 y 3.44 ppm señales para los protones del metileno del H-12 base de alcohol, en 1.90 ppm se observó la señal correspondiente a uno de los protones del metileno del H-7; en 1.19 y 0.88 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones de los de los metilos 17 y 18, respectivamente. En 0.79 ppm se observó una señal simple que integró para 6 protones correspondiente a los metilos 19 y 20.

El experimento TOCSY (figura 8), nos permitió asignar inequívocamente los protones 5, 6 y 7, así como los protones 9, 11 y 12.

El espectro de RMN de ^{13}C figura 9, mostró 16 señales, lo que nos indicaba que se trataba de un derivado tetranorlabdano. En 73.1 y 64.1 ppm se observaron las señales correspondientes a los carbonos base de oxígeno en las posiciones C-8 y C-12, respectivamente; en 59.1 y 55.9 ppm se observaron las señales de los carbonos de los metinos 9 y 5. En 44.2, 41.8, 39.3, 20.4 y 18.3 ppm se observaron las señales correspondientes a los metilenos C-7, C-3, C-1, C-6 y C-2 de la decalina; en 38.9 y 33.2 ppm se observaron la señales de los carbonos cuaternarios C-10 y C-4, en 33.3, 24.6, 21.4 y 15.2 ppm se observaron las señales de los metilos 18, 17, 19 y 20, respectivamente; finalmente, en 27.8 ppm se observó la señal del metileno 11. Estos datos fueron idénticos a los reportados por Pérez Gutiérrez en 2012.

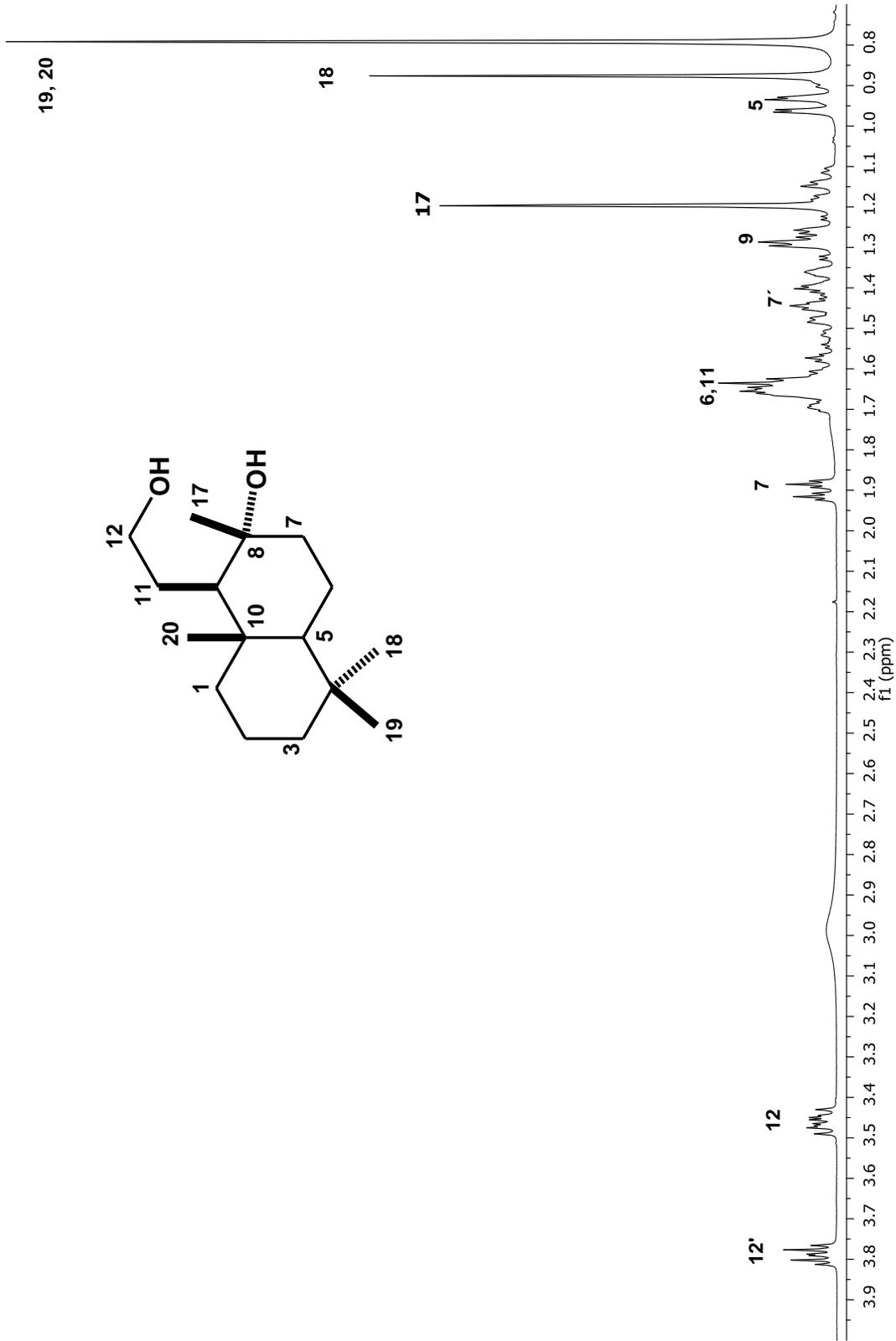


Figura 7. Espectro de RMN de ¹H del tetranorlabdanodiol (1).

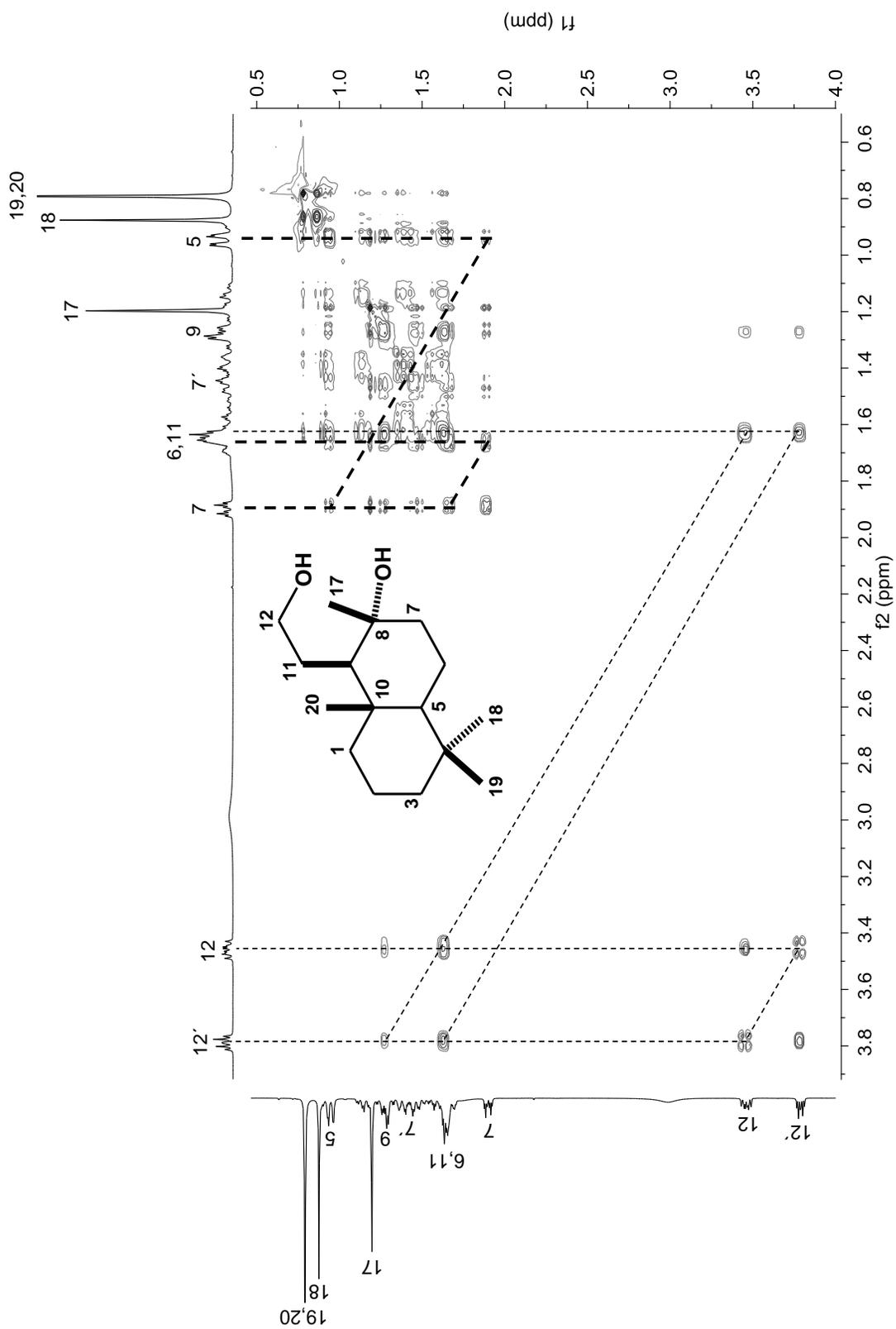


Figura 8. Espectro TOCSY del tetranorlabdanodiol (1).

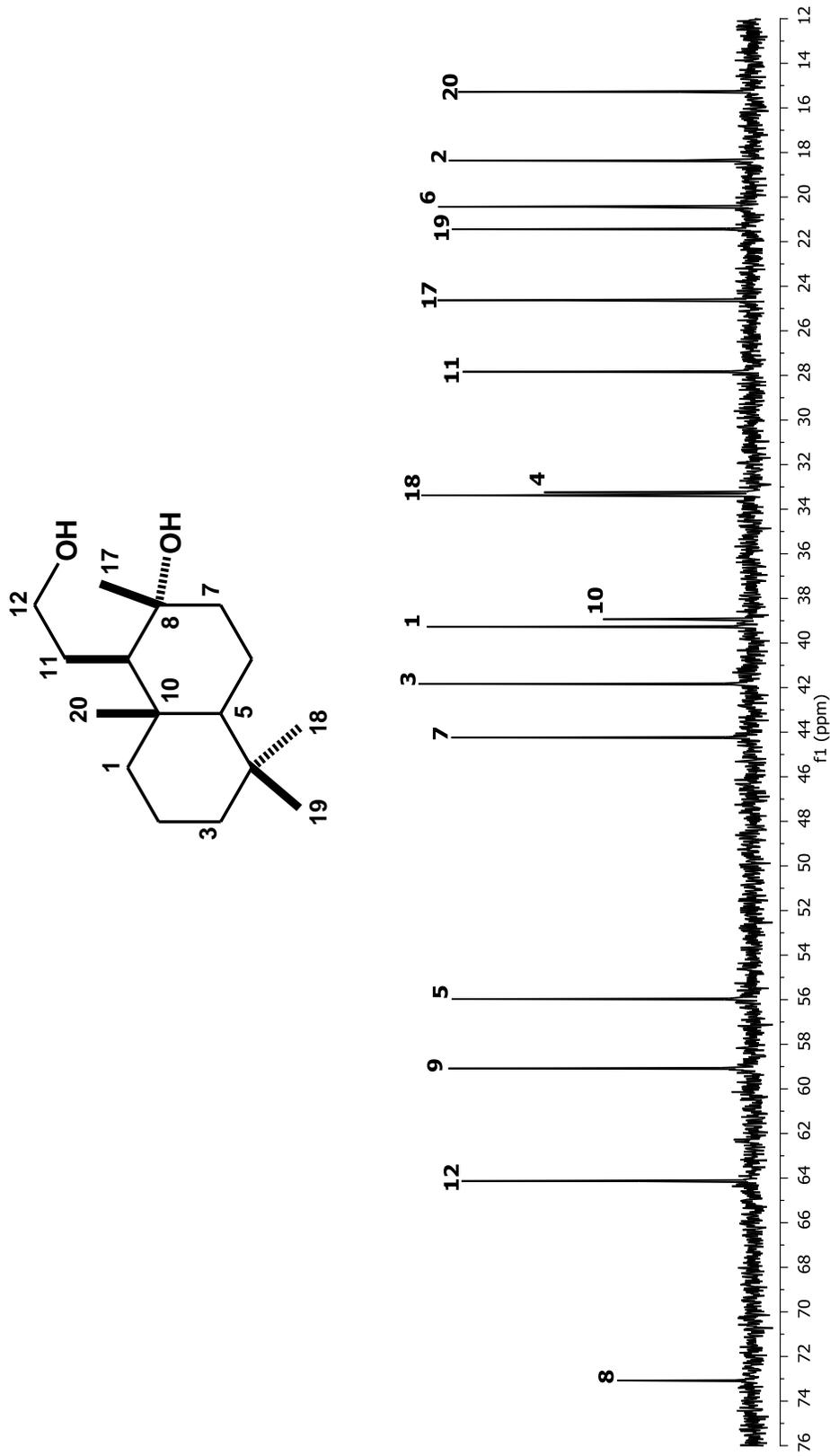


Figura 9. Espectro de RMN de ¹³C del tetranorlabdanodiol (1).

Una vez aislado e identificado el diol **1**, se procedió a buscar condiciones de reacción, para la obtención del Ambrox[®] (**2**) a partir de este, lo cual implica una reacción de ciclodeshidratación, modificando primeramente el catalizador, anteriormente se había empleado al *p*-TsOH, en benceno y cloruro de metileno por una hora a temperatura ambiente.

En la tabla 2 se muestran las condiciones ensayadas.

Tabla 2. Condiciones de ciclodeshidratación con BF₃·(OEt)₂.

Materia prima (mg)	Tiempo	T° (°C)	Disolvente CH ₂ Cl ₂ (mL)	Ácido BF ₃ ·(OEt) ₂ (mL)	Producto
100	30 min.	21	2.22	0.33	Mezcla
50	15 min.	21	1.2	0.16	Mezcla
52	5 min.	25	1.2	0.16	2
48	90 s	15	1.2	0.16	2

Cuando la reacción se dejó 30 minutos se obtuvieron además del Ambrox[®] (**2**), otros productos, razón por la cual se disminuyeron los tiempos de reacción como se muestra en la tabla 2. Los mejores resultados se lograron cuando se redujo la temperatura, colocando la reacción en un baño de hielo y dejando la mezcla de reacción durante 90 segundos.

El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna, obteniéndose unos cristales con punto de fusión de 70-72 °C. El espectro de RMN de ¹H del Ambrox[®] (**2**) a 400 MHz, figura 10, mostró en 3.95 y 3.75 ppm las señales correspondientes a los protones del metileno del H-12 del anillo del tetrahidrofurano, en 1.97 y 1.91 ppm, se observaron las señales correspondientes a los protones del metileno en H-7, de 1.09, 0.87, 0.84 y 0.83 ppm se observaron cuatro señales simples que integraron para 3 hidrógenos cada una para los metilos 17, 18, 19 y 20, respectivamente.

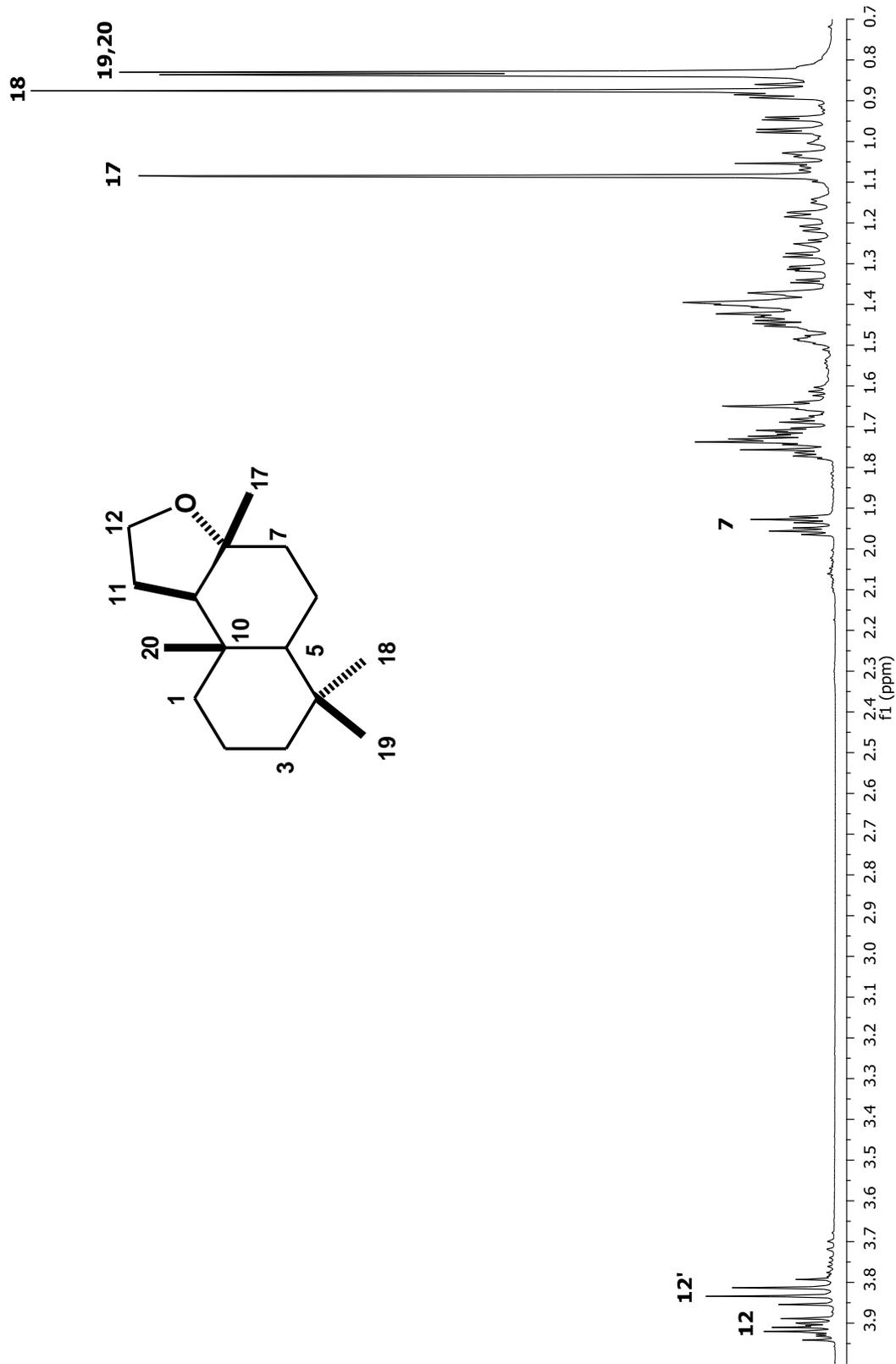


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H de Ambroxol® (2)

Su espectro de RMN de ^{13}C mostró, en 79.9 ppm una señal para el carbono cuaternario base de oxígeno C-8, en 65.0 y 22.6 ppm se observaron las señales de los metilenos del tetrahidrofurano. En 60.2 y 57.3 ppm se observaron las señales de los carbonos metínicos 9 y 5, respectivamente; en 42.4, 39.9, 39.7, 20.7 y 18.4 ppm se observaron las señales de los metilenos C-3, C-7, C-1, C-6 y C-2 de la decalina respectivamente, en 33.6 ppm se encontró la señal del metilo 18, en 21.1 ppm se encontraron traslapadas las señales de los metilos 17 y 19, en 15.4 ppm se observó la señal del metilo 20. Estos datos fueron idénticos a los reportados previamente (Pérez Gutiérrez, 2012).

Los cristales del Ambrox[®] (2), fueron analizados por difracción por rayos X (figura 11), lo que nos permitió corroborar la estereoquímica de la reacción de formación del anillo del tetrahidrofurano.

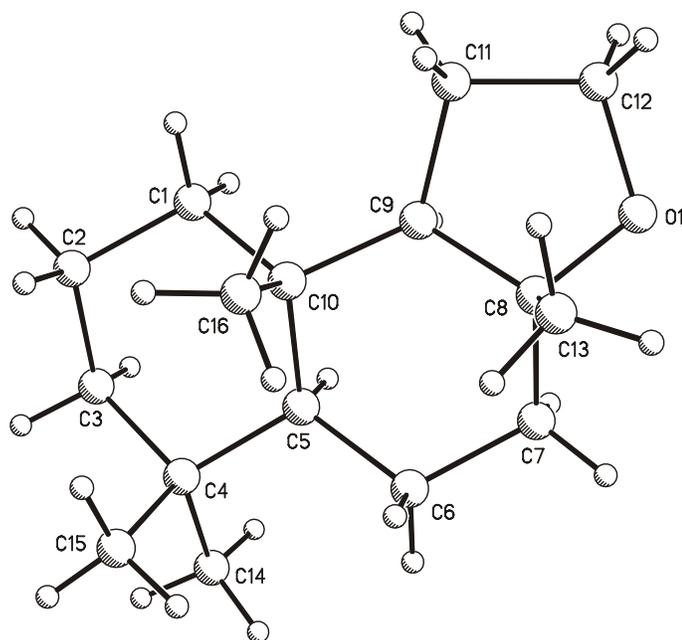


Figura 11. Difracción de rayos X del Ambrox[®] (2).

Como se puede observar en la figura de la difracción de rayos X, la estereoquímica del cierre del anillo del heterociclo, el oxígeno se encuentra orientado en posición alfa, mientras que el metilo 17, que se encuentra en el mismo C-8, posee la misma estereoquímica beta que el metilo 20 y el C-9.

CONCLUSIONES

La presencia del tetranorlabdanodiol (**1**), fue demostrada por RMN de ^1H en los extractos hexánicos y clorometilénicos de flor, hoja y tallo de *Ageratina jocotepecana*.

Se demostró la presencia del tetranorlabdanodiol (**1**) en los tallos de las plantas de Ario de Rosales, Morelia y carretera Morelia-Zacapu kilómetro 51.

La purificación del tetranorlabdanodiol (**1**) a partir de los tallos fue más sencilla.

La reacción de ciclodeshidratación del derivado **1**, se logró empleando $\text{BF}_3 \cdot (\text{OEt})_2$ con un tiempo de 90 segundos en un baño de hielo.

La estereoquímica de la reacción de ciclación fue confirmada por difracción de rayos X.

PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, se determinaron en el equipo Varian Mercury Plus-400. En todas las determinaciones se utilizó deuterocloroformo (CDCl_3) y como referencia interna se utilizó tetrametil silano (TMS).

El análisis de difracción de rayos X se llevó a cabo en un difractorómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de $\text{Cu K}\alpha$.

Para las separaciones cromatográficas en columna se utilizó sílice gel malla 230-400 marca Merck y malla 70-230 marca Sigma-Aldrich®.

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

DATOS DE LA ESPECIE VEGETAL

Ageratina jocotepecana se colectó en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacapu en febrero de 2013 y 2014. La especie cultivada en Morelia se pudo en febrero de 2014; y la especie cultivada en Ario de Rosales en octubre de 2014. *A. jocotepecana* fue identificada por el Dr. Jerzy Rzedowski del Instituto de Ecología A.C. del Centro Regional del Bajío, en Pátzcuaro, Michoacán.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

La planta se secó a la sombra y se separó en flor, hoja y tallo. La obtención de los extractos se realizó con maceración, con disolventes en polaridades ascendentes, utilizando hexanos y cloruro de metileno (CH_2Cl_2). Cada maceración se hizo por triplicado por un periodo de tres días cada una. El disolvente se evaporó por destilación en rotavapor para la obtención del extracto respectivo (tabla 3).

Los extractos se desengrasaron disolviendo con metanol para precipitar las grasas, las cuales fueron separadas por filtración en papel filtro, se evaporó el metanol por destilación para posteriormente llevar cada extracto a peso constante.

TABLA 3. Rendimiento de los extractos de las partes aéreas de *A. jocotepecana*.

Lugar de colecta	Parte de la planta	Peso seco de la planta (g)	Extracto hexánico (g)	Extracto CH ₂ Cl ₂ (g)
Morelia-Zacapu	Flor	100	11.9 (12%)	2.4 (2%)
	Hoja	100	12.5 (12%)	3.0 (3%)
	Tallo	500	6.0 (1%)	4.7 (1%)
Morelia	Flor	25	2.2 (9%)	0.5 (2%)
	Hoja	65	7.5 (12%)	1.8 (3%)
	Tallo	450	13.9 (3%)	5.5 (1%)
Ario de Rosales	Tallo	135	2.1 (2%)	1.0 (1%)

AISLAMIENTO DE TETRANORLABDANODIOL (1)

El extracto hexánico de tallo desengrasado (2 g) se solubilizó en la mínima cantidad de hexano y se aplicó a una columna de 2 cm de diámetro, empacada con 15 g de sílice gel malla 70-230 (10 cm) como fase estacionaria, empleando como eluyente mezclas de hexanos-acetato de etilo en orden de polaridad ascendente, empleando 50 mL por cada polaridad y colectando fracciones de 10 mL aproximadamente.

En las fracciones 38 a 51 colectadas en la polaridad 3:2 a 2:3 se obtuvo una miel de color coral donde se identificaron señales por RMN de ^1H correspondientes al labdanodiol **1** en mezcla con otros compuestos.

PURIFICACIÓN DEL TETRANORLABDANODIOL (1)

Un lote de 94 mg del labdanodiol **1** impuro obtenidos de la primera cromatografía, se llevaron a una recromatografía en columna de 1 cm de diámetro impregnando la sílice 230-400 mallas con la muestra, utilizando la misma como fase estacionaria con 10 cm de altura (14 g). Como eluyente se utilizaron mezclas de hexanos y acetato de etilo en orden de polaridad ascendente, empleando 50 mL de cada polaridad. En las fracciones 14 a 21 colectadas en la polaridad 7:3 y 3:2 se obtuvieron 21 mg de **1** en forma de cristales con una coloración coral. Las señales de RMN de ^1H mostraron pequeñas impurezas con el compuesto **1**. Un lote de 21 mg de **1** impregnados en sílice 1:1 se purificó en columna de 1 cm de diámetro, con sílice gel malla 230-400 como fase estacionaria (15 cm) y 100 mL de hexanos-etanol en polaridad única 2.3:0.2 como fase móvil, colectando fracciones de 2 mL. Se obtuvieron 18 mg de cristales incoloros y amorfos con punto de fusión de 130-132 °C de **1**.

RMN de ^1H δ ppm: 3.79 (1H, dt, $J = 10.4, 5.6, 5.6$ Hz, H-12'), 3.44 (1H, m, H-12), 1.90 (1H, dt, $J = 12.3, 3.2, 3.2$ Hz, H-7), 1.19 (3H, s, CH₃-17), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.79 (6H, s, CH₃-19 y 20).

RMN de ^{13}C δ ppm: 73.1 (C, C-8), 64.1 (CH_2 , C-12), 59.1 (CH, C-9), 55.9 (CH, C-5), 44.2 (CH_2 , C-7), 41.8 (CH_2 , C-3), 39.3 (CH_2 , C-1), 38.9 (C, C-10), 33.3 (CH_3 , C-18), 33.2 (C, C-4), 27.8 (CH_2 , C-11), 24.6 (CH_3 , C-17), 21.4 (CH_3 , C-19), 20.4 (CH_2 , C-6), 18.3 (CH_2 , C-2), 15.2 (CH_3 , C-20).

REACCIÓN DE CICLODESHIDRATACIÓN DEL TETRANORLABDANODIOL (1).

A una solución de 50 mg del labdanodiol **1**, en 2.22 mL de CH_2Cl_2 se le adicionaron 0.16 mL de $\text{BF}_3 \cdot (\text{OEt})_2$, la mezcla de reacción se dejó reaccionar en agitación en un baño de hielo durante 90 segundos. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó tres veces con agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se evaporó a sequedad en el rotavapor. Se obtuvieron 39 mg de una miel de color ligeramente amarillo, la cual en su espectro de RMN de ^1H mostró señales características del Ambrox[®] (**2**). El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna, de un cm de diámetro y empacada con 15 cm de gel de sílice 230-400 mallas, empleando mezclas de hexanos y acetato de etilo en polaridades ascendentes. Se prepararon volúmenes de 50 mL por cada polaridad, se colectaron fracciones de 2 mL aproximadamente. En las fracciones 5 a 15 obtenidas con polaridad hexanos-acetato de etilo 9:1, se obtuvieron 28 mg del Ambrox[®] puro, en forma de cristales incoloros con p.f. 70-72 °C.

RMN de ^1H δ ppm: 3.92 (3H, m, H-12), 3.82 (1H, ddd, $J = 8$ Hz, H-12'), 1.94 (1H, dt, $J = 11.5, 3.2$, Hz, H-7), 1.09 (3H, s, CH_3 -17), 0.87 (3H, s, CH_3 -18), 0.84 (3H, s, CH_3 -19), 0.83 (3H, s, CH_3 -20).

RMN de ^{13}C δ ppm: 79.9 (C, C-8), 65.0 (CH_2 , C-12), 60.2 (CH, C-9), 57.3 (CH, C-5), 42.4 (CH_2 , C-3), 39.9 (CH_2 , C-7), 39.7 (CH_2 , C-1), 36.2 (C, C-10), 33.6 (CH_3 , C-18), 33.1 (C, C-4), 22.6 (CH_2 , C-11), 21.1 (CH_3 , C-17, CH_3 , C-19), 20.7 (CH_2 , C-6), 18.4 (CH_2 , C-2), 15.4 (CH_3 , C-20).

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Manzaneda E. J., Chabouna R., Álvarez E., Cabrera E., Álvarez-Manzaneda R., Haidour A., Ramos J. M. *Synlett*, **2006**, 1756-1758.
- Álvarez-Manzaneda E., y Chahboun, R., **2007**, ES2284370.
- Álvarez-Ruiz A. "Reactividad del ácido (+) 13-*epi*-labdanólico en medios ácidos". Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH, **2014**.
- Aricò F., Tundo P, Maranzana A., Tonachini G. *ChemSusChem* **2012**, 5:1578-86.
- Aricò F., Tundo P. Five- Membered N- and O- Heterocycles by Dimethyl Carbonate Chemistry. En Tundo P., Andraos J. *Green Chemistry* **2014**, 205-2018, CRC Press, New York
- Barrero A. F., Altarejos J., Alvarez-Manzaneda E., Ramos J. y Salido S. *Tetrahedron*, **1993**, 43: 6251-6256.
- Barrero A. F., Álvarez-Manzaneda E. J., Chahbouna R., Arteaga A.F., *Synthetic Communications*, **2004**, 34: 3631-3643.
- Barrero A. F., Alvarez-Manzaneda R., Enrique J., Chahboun R, **2003**, ES2195777A1.
- Barrero A. F., Alvarez-Manzaneda E.J., Altarejos J., Salido S., Ramos J.M., *Tetrahedron*, **1993**, 49: 10405-10412.
- Barrero, A. F., Alvarez-Manzaneda R., Enrique J., Ramos L.J.M., Altarejos, J. **1994**, ES2044780.
- Barrero, A. F.; Altarejos, J.; Alvarez-Manzaneda, E.J.; Ramos, J.M.; Salido, S. *Tetrahedron* **1993**, 49, 9525.
- Barton, D.H.R.; Parekh, S.I.; Taylor, D.K.; Tse, C. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5801
- Benites J., Lopez J., Farias J. y Cortes M. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2006**, 50: 979.
- Bevinakatti H.S., Newman C.P., Schroeder M., Ellwood S., Tundo P., Arico F., **2009**, PCT/WO 2009010791 A3.
- Bolster G. M., M. Jansen B.J.M., y de Groot A. *Tetrahedron*, **2001**, 57: 5657-5659.
- Cambie, R.C.; Joblin, K.N.; Preston, A.F. *Aust. J. Chem.* **1971**, 24, 583.
- Carey C. **2013**, PCT/WO 2013007832 A1.

- Castro J.M., Salido S., Altarejos J., Noguerras M., Sánchez A. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5941.
- Chinou I. *Current Medicinal Chemistry*, **2005**, 12: 1295-1300.
- Dewick P.M., "Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach". 3ª Edición. Ed. John Wiley & Sons, Ltd., Publication, **2009**, 9-21.
- Fekih, A., Habbachi, F, *Journal de la Societe Chimique de Tunisie*, **2001**, 4: 909-914.
- García Sánchez. E., Ramírez López C.B., Talavera Alemán. A., León Hernández. A., Martínez Muñoz. R., Martínez Pacheco. M.M., Gómez Hurtado. M.A., Cerda García Rojas. C.M., Joseph Nathan. P., del Rio R. E. *J. Nat. Prod.*, **2014**, 77: 1005-1012.
- Gonzalez Sierra M., Rúveda E. A., López J. T.; Cortés M.J. *Heterocycles* **1987**, 26, 2801.
- Groom N. "The New Perfume". 2ª Edición. Ed. Blackie Academic & Professional, Londres, **1997**, 7-8.
- Harrewijn P., van Oosten A. M. y Piron G. M. "Natural Terpenoids as Messengers: A multidisciplinary study of their production, biological function and practical applications". Ed. Springer Science & Business Media, **2012**, 329.
- Hüllmann M., Becker R., Hasel W., Jessel B., **1996**, EP696587.
- Ishihara K., Ishibashi H., Yamamoto H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124: 3647
- Koyama, H.; Kaku, Y.; Ohno, M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2863.
- Knuebel Georg, Bomhard Andreas, Markert Thomas, Ger. Offen., **1995**, PCT/EP1995/004225.
- Machado T.B., Koeche S. E. *Química Nova*, **2000**, 23: 225-227.
- Moulinesa J., Lamideya A.M., *Desvergnés-Breuil V.* **2001**, 31: 749-758.
- Ortuño S. M. "Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes". 1ª Edición. Ed. Aiyana, España, **2006**, 7-10.
- Palmer I. "Perfume, Soap and Candle Making". Ed. Lulu Press, Inc, **2013**, 31.
- Pérez-Gutiérrez A.I. "Ageratina jocosotepecana fuente de tetranorlabdanodiol". Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH, **2012**.

- Petrzilka M., Giraudi E., Martres P., Zahra J.P., Waegell B., **1992**, FR2676229.
- Sadava D. E. "Vida, la ciencia de la biología". 8^a Edición. Ed. Médica Panamericana S.A., Argentina **2009**, 841.
- Schäfer B. *Chem. Unserer Zeit*, **2011**, 45, 374-379.
- Sell C. "The Chemistry of Fragrances, From Perfumer to Consumer". 2^a Edición. Ed. RSCPublishing, Reino Unido, **2006**, 3-9/54-56.
- Steenkamp, L. H. & Mihloti T., **2010**, US20100248316.
- Stevens C. V., Verhé R. "Renewable Bioresources, Scope and Modification for Non-food Applications". Ed. John Wiley & Sons Ltd, **2004**, 2, 255-256.
- Stoll M. & Hinder M. *Helvetica Chimica Acta*, **1950**, 33, 1251-1255.
- Taiz L., Zeiger E. "Fisiología Vegetal". 3^a Edición, Vol. 1. Ed. Universitat Jaume I, **2006**, 534-536.
- Tanino K., Aoki T., **2014**, PCT2014061470.
- Valencia O. C. "Fundamentos de Fitoquímica". 1^a Edición. Ed. Trillas, México, **1995**, 7-11.
- Zahra J.P., Chauvet F., Coste-Manière I., Martres P., Perfetti P., Waegell B. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1997**,134: 1001-1024.
- Zhu W., Lin N., Yuan X., Chen X. Y. **2012**, CN102391227.