



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Transformación química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico  
aislado de *Ageratina petiolaris*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA

MÓNICA LUNA VÁZQUEZ

ASESOR

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

MORELIA, MICHOACÁN.

JUNIO DE 2015

*La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real,  
es un viaje, nunca una llegada.*

*Karl Popper*

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA MEDICINAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D. C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ. PROYECTO REALIZADO CON EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CIC-UMSNH, CONACYT CIENCIA BÁSICA (167952) Y SEP-PROMEP (UMSNH-CA-239, IDCA 11176).

*Para Fermi y Salvador*

## AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud a Dios que me ha brindado la posibilidad de existir y permitirme ver cristalizadas mis metas.

A ti Papá por permitirme ser tu figurita. A ti Mamá por tu paciencia y cariño. Ustedes llenan de amor mi vida, son mi ejemplo y estoy muy orgullosa de ser su chiquilla sangrona, agradezco enormemente su apoyo para culminar este proyecto y aunque no ha sido fácil lo hemos logrado. ¡Los amo!

A mis hermanos Jana, Reynís, Chavy y klavito, por convivir con mis defectos y aun así quererme como lo hacen, porque le sonríen a mis días, aun cuando estos parecen estar nublados y sobre todo por ser mis aliados en todo momento, ¡Los amo!

A mis entrañables amigos Ivonne Inca, Lorena, Gulliver, J. Lupe, Samii y J. Alberto, su amistad y cariño me han impulsado a seguir adelante.

A mis amigas y compañeras QFB's Karii, Ceci Hope, Jesy, Zuleyma y Celeste por compartir gratas experiencias conmigo y sobrevivir a cada uno de mis berrinches en el laboratorio.

A mis amigos Eliseo y Layt, por regalarme una sonrisa cada día.

A JP Alvaro, por cambiar mi forma de ver el mundo, nadie es perfecto pero no es necesario para ser feliz.

A mis compañeros y amigos de batalla Luisja y Miriam, aunque ninguna columna ha sido fácil siempre tienen una excelente razón para sonreír y continuar. Mirii Leco, me siento afortunada al contar con tu amistad, son varios los logros que hemos compartido, así como aventuras, alegrías y tristezas. 6 años después casi QFB's!!!

A Verónica, Leticia y Rebeca, por compartir los secretos del laboratorio.

A ti Manuel, por formar parte de mi estudio químico y brindarme apoyo, alegría y cariño que acortan las ocupaciones y me llenan de sonrisas.

A mi asesor de tesis Dr. Hugo, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y confiar en mí este proyecto, por guiarme durante la investigación, compartir sus conocimientos...

A los Doctores Juan Diego Hernández Hernández, Rosa Elva Norma del Río Torres, Judit Araceli Aviña Verduzco, Yliana López Castro y Luisa Urania Román Marín, por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito y sus valiosas aportaciones.

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

1. Transformación química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico por oxidación. Mónica Luna-Vázquez. Presentado en el 3er Verano Nicolaita de Investigación, celebrado del 21 al 23 de agosto de 2014 en Morelia, Michoacán.
2. Reactividad química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico. Hugo A. García-Gutiérrez, Mónica Luna-Vázquez, Rosa E. del Río, Luisa U. Román-Marín, Juan D. Hernández-Hernández, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan. Presentado en el Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, "Dr. Norberto Farfán", celebrado del 25 al 27 de febrero de 2015 en Colima, Colima. *Memoria*, p. O-18.
3. Transformación Química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico aislado de *Ageratina petiolaris*. Hugo A. García-Gutiérrez, Mónica Luna-Vázquez, Luisa U. Román-Marín, Rosa E. del Río. Presentado en la 11ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, celebrada del 20 al 22 de mayo de 2015 en San Carlos, Sonora. *Rev. Latinoamer. Quím.* 2015, 43 (suplemento especial), 158, resumen QSE-JA194.

## ÍNDICE

|        |                                       |     |
|--------|---------------------------------------|-----|
| I      | SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS    | i   |
| II     | RESUMEN                               | iii |
| III    | ABSTRACT                              | iv  |
| 1.     | INTRODUCCIÓN                          | 1   |
| 2.     | ANTECEDENTES                          | 3   |
| 2.1.   | Terpenos                              | 4   |
| 2.1.1. | Sesquiterpenos                        | 5   |
| 2.1.2. | Diterpenos                            | 7   |
| 2.2.   | Actividad biológica de los diterpenos | 9   |
| 2.3.   | Familia <i>Asteraceae</i>             | 12  |
| 2.3.1. | Género <i>Ageratina</i>               | 12  |
| 2.4.   | <i>Ageratina petiolaris</i>           | 12  |
| 2.5.   | Ésteres                               | 14  |
| 2.6.   | Alcoholes                             | 15  |
| 2.7.   | Bases de Schiff                       | 16  |
| 2.8.   | Formación de amidas                   | 17  |
| 3.     | JUSTIFICACIÓN                         | 19  |
| 4.     | OBJETIVOS                             | 20  |
| 4.1.   | Objetivo General                      | 20  |
| 4.2.   | Objetivos Específicos                 | 20  |
| 5.     | DISCUSIÓN DE RESULTADOS               | 21  |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.1 | Obtención e identificación del chamazuleno (3)                                    | 21 |
| 5.2 | Obtención del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)                               | 25 |
| 5.3 | Oxidación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)                               | 30 |
| 5.4 | Preparación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona 5 del ácido 2-oxoeperuico (4)         | 35 |
| 5.5 | Esterificación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)                          | 41 |
| 5.6 | Preparación de la amida 7 del ácido 2 $\alpha$ -acetoxieperuico (6)               | 45 |
| 6.  | CONCLUSIONES  | 49 |
| 7.  | PARTE EXPERIMENTAL  | 51 |
| 8.  | TABLA DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO DE <sup>13</sup> C DE LOS COMPUESTOS TIPO LABDANO | 60 |
| 9.  | REFERENCIAS   | 61 |

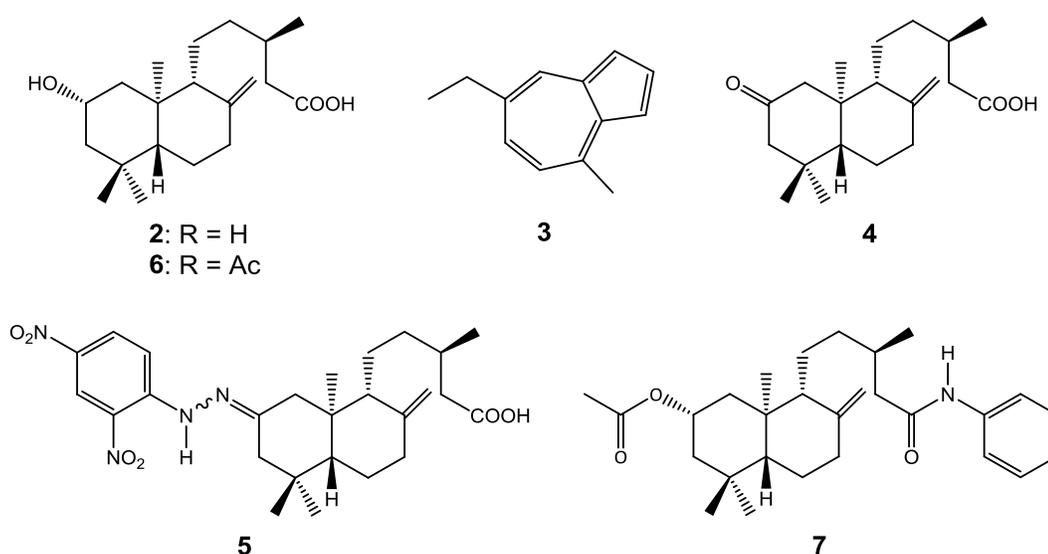
## I. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

|           |  |
|-----------|--|
| AcOEt     | Acetato de etilo   |
| <i>c</i>  | Concentración  |
| °C        | Grados Celsius   |
| cm        | Centímetros  |
| COSY      | Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de correlación homonuclear  |
| DC        | Dicroísmo circular   |
| DEPT      | Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono trece con mejora sin distorsión de transferencia de polarización |
| DMAPP     | Difosfato de dimetilalilo  |
| 2, 4-DNFH | 2, 4-Dinitrofenilhidrazina   |
| EIMS      | Espectrometría de masa por impacto electrónico   |
| EtOH      | Etanol   |
| FPP       | Difosfato de farnesilo   |
| g         | Gramos   |
| GGPP      | Difosfato de geranilgeranilo   |
| GPP       | Difosfato de geranilo  |
| Hex       | Hexano   |
| HETCOR    | Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear  |

|               |  |
|---------------|--|
| HMBC          | Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de coherencia heteronuclear a múltiples enlaces |
| Hz            | Hertz  |
| <i>i</i> -BCF | Cloroformiato de isobutilo   |
| IPP           | Difosfato de isopentenilo  |
| IR            | Infrarrojo   |
| <i>J</i>      | Constante de acoplamiento  |
| kg            | Kilogramo  |
| L             | Litro  |
| MeOH          | Metanol  |
| Mg            | Miligramos   |
| MHz           | Megahertz  |
| mL            | Mililitro  |
| <i>m/z</i>    | Relación masa/carga  |
| NMM           | <i>N</i> -Metilmorfolina   |
| NOESY         | Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser   |
| p.f.          | Punto de fusión  |
| Ppm           | Partes por millón  |
| RMN           | Resonancia magnética nuclear   |
| UV            | Ultravioleta   |
| $\nu_{máx}$   | Frecuencia máxima  |
| $\delta$      | Delta, desplazamiento químico  |
| ®             | Marca registrada   |

## II. RESUMEN

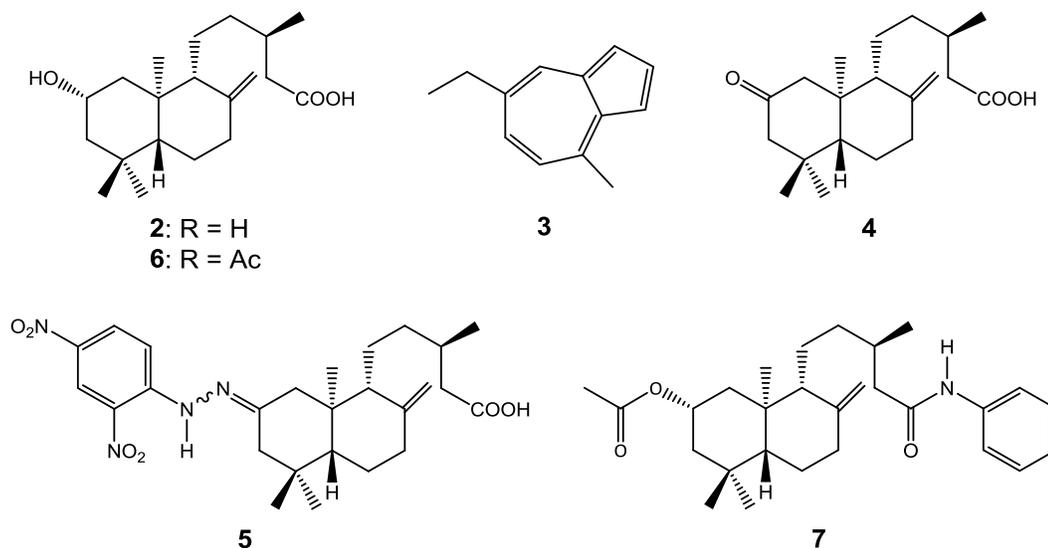
*Ageratina petiolaris* se encuentra distribuida en gran parte del territorio nacional, incluido el estado de Michoacán. En el extracto hexánico de sus flores se encuentra el ácido 2 $\alpha$ -isovaleroxieperuico (**1**), el cual al ser sometido a hidrólisis básica produce ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) y ácido isovalérico. En el presente trabajo, se realizó la transformación química del grupo hidroxilo en C-2 y del grupo carboxilo en C-15 del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**), ante condiciones estándar de oxidación empleando trióxido de cromo y acetilación utilizando anhídrido acético en C-2, dando como productos el derivado oxidado **4** y el acetato **6**; una vez obtenido el ácido 2-oxoeperuico (**4**) se preparó la 2,4-dinitrofenilhidrazona **5**. Por su parte, el grupo carboxilo del derivado acetilado **6** se hizo reaccionar vía anhídridos mixtos empleando cloroformiato de isobutilo, *N*-metilmorfolina y anilina para obtener la amida **7**. Cabe mencionar que durante la obtención de **2** se observó un color azul. El compuesto de tonalidad azul se aisló y se confirmó como chamazuleno (**3**), el cual se encuentra en el extracto crudo de las flores de *Ageratina petiolaris*. Todos los compuestos fueron caracterizados empleando Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones.



**Palabras clave:** *Ageratina*, Diterpeno, Grupo carboxilo.

### III. ABSTRACT

*Ageratina petiolaris* is distributed throughout of Mexico, including the state of Michoacan. 2 $\alpha$ -isovaleroyxyperuic acid (**1**) is an *ent*-labdane type diterpene isolated from hexane extracts of flowers of *A. petiolaris*, and its alkaline hydrolysis gave **2** and isovaleric acid. In this work, chemical transformation of its hydroxyl group at C-2 and its carboxyl group at C-15 of **2** was carried out under oxidation and acetylation standard reaction conditions yielded 2-oxoeperuic acid (**4**) and 2 $\alpha$ -acetoxyperuic acid (**6**). 2-oxoeperuic acid (**4**) was treated with 2,4-dinitrophenylhydrazine to give compound **5**. Meanwhile, compound **7** was synthesized from 2 $\alpha$ -acetoxyperuic acid (**6**) using a mixed anhydride employed isobutyl chloroformate, *N*-methylmorpholine and aniline. On the other hand, nonpolar fractions of the hexane extracts of the flowers of *A. petiolaris* afforded an azulene derivative known as chamazulene (**3**). The structures of **3-7** were established by spectroscopic analyses, particularly by 1D and 2D NMR spectra.



**Key words:** *Ageratina*, Diterpene, Carboxyl grup.

## 1. INTRODUCCIÓN

El reino de las plantas ha sido una de las fuentes más antiguas de fármacos útiles para el hombre (Figura 1), mucho antes de que los científicos comenzaran a investigar los productos químicos de la naturaleza, los seres humanos estaban haciendo extractos, tinturas y otros preparados de plantas y animales. Miles de años antes del descubrimiento de los antibióticos, algunos de estos preparados naturales servían para aliviar el dolor o curar la enfermedad, otros eran venenos útiles en la caza y la guerra. Civilizaciones en todo el mundo han acudido a plantas medicinales durante miles de años, su éxito en general dependía de ensayo y error, la suerte y la casualidad.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Uso de plantas medicinales.

En los siglos anteriores a la medicina moderna, la química sintética, y la industria farmacéutica, prácticamente todos los medicamentos procedían de plantas. La medicina tradicional que se basa en gran medida en los productos vegetales y animales todavía se practica en China, a menudo junto con técnicas occidentales modernas, explotando especies medicinales con un éxito considerable. Investigadores han dado seguimiento a los medicamentos tradicionales de muchas culturas en la búsqueda de nuevos

compuestos activos, estas investigaciones son responsables del descubrimiento del Taxol®, un compuesto de la corteza del tallo del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) como un medicamento para tratar el cáncer, la quinina, la morfina, la digitalina, el cornezuelo, la atropina, la cocaína entre otros, son ejemplos clásicos de medicinas derivadas de plantas y si se añaden las variantes de productos derivados, el papel de los productos naturales de fuentes vegetales es más impresionante.<sup>2</sup>

Aunque el valor terapéutico de los productos naturales es evidente, el uso de estos compuestos estructuralmente complejos presenta una serie de desafíos. A menudo es difícil acceder a cantidades suficientes de un producto natural. Por lo tanto, la caracterización completa de las propiedades biológicas y químicas de los compuestos puede ser problemático. Sin embargo, el éxito de los productos naturales en el desarrollo de agentes terapéuticos, ha atraído la atención de los investigadores. En consecuencia, muchas estrategias para identificar un número creciente de productos naturales han sido reportadas. Además, las técnicas de biosíntesis y semisíntesis juegan un papel crítico en la provisión de un suministro adecuado de muchos productos naturales.<sup>3</sup>

Más del 40% de los fármacos actuales, y aún más de los agentes contra el cáncer, pueden rastrear sus orígenes o principios de diseño sintético en el descubrimiento de un producto natural. El desarrollo de la química orgánica, la maduración de los campos científicos afines, algunos premios Nobel, fueron posibles gracias a los productos naturales. Sin productos naturales, el estudio del análisis conformacional, la evolución de dicroísmo circular (CD), la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masa (MS), "el arte de la síntesis orgánica", y por supuesto, los marcos lógicos para la síntesis total de productos naturales de alta complejidad molecular pudieron haber seguido caminos muy diferentes.<sup>4</sup>

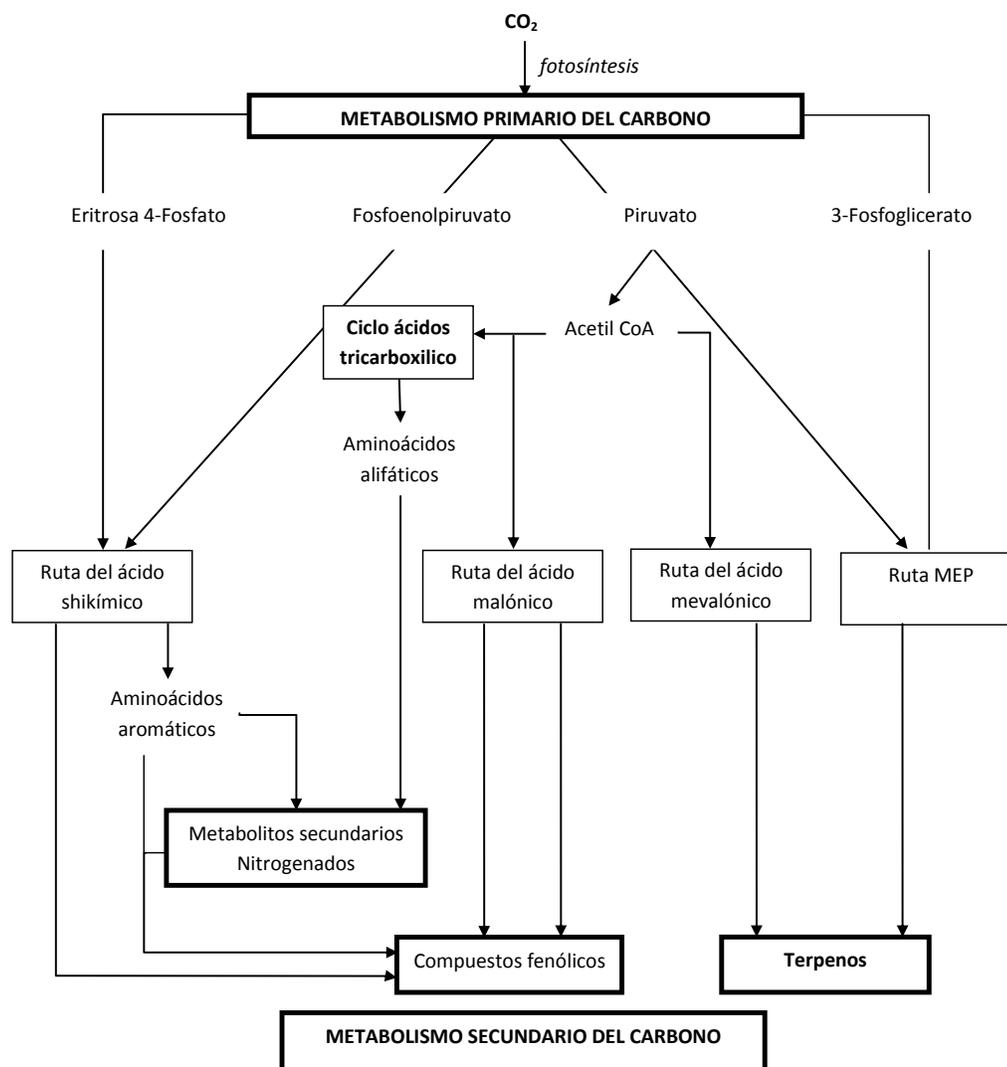
## 2. ANTECEDENTES

Todos los organismos transforman y utilizan varios compuestos orgánicos que les permiten sobrevivir, crecer y reproducirse, ya que estas sustancias los proveen de energía en forma de ATP y nutrientes. Algunas moléculas son de crucial importancia en la vida como lo son los carbohidratos, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos.<sup>5</sup> Los organismos varían ampliamente en su capacidad de síntesis y transformación química. Las plantas son muy eficientes en la síntesis de compuestos orgánicos, mientras que la mayoría de otros organismos como lo son animales y microorganismos dependen de lo que consumen.<sup>6</sup>

La red metabólica de las plantas es mucho más amplia que en otros organismos. Aparte de la producción de metabolitos primarios las plantas sintetizan una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo, estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales que se derivan del metabolismo central o primario (Figura 2).<sup>7,8</sup>

Los metabolitos secundarios juegan un papel clave en la adecuación de las plantas a medida que funcionan en la protección contra las infecciones microbianas y virales, herbivoría, la radiación UV, la atracción de los polinizadores y frugívoros, y la alelopatía.<sup>6</sup> A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida en el reino vegetal, es decir se encuentran con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo taxonómico delimitado.<sup>9</sup> Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son de gran interés debido a su enorme diversidad estructural y funcional y se pueden dividir en tres grupos químicamente diferentes: Terpenos formados principalmente por la vía del mevalonato, fenoles la mayoría formados por la vía del

shikimato y/o la vía de los acetatos y compuestos que contienen nitrógeno: principalmente los alcaloides, formados por la vía de los aminoácidos.<sup>10</sup>



**Figura 2.** Principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interacciones con el metabolismo primario.

## 2.1. Terpenos

La mayoría de los terpenos son específicos del reino vegetal, la palabra terpeno proviene del nombre alemán de la esencia de trementina: *Terpentin*.<sup>11</sup> Los terpenos son compuestos que resultan de la polimerización de unidades isoprénicas (isoprenil

pirofosfato [IPP] y su isómero dimetilalil pirofosfato [DMAPP], moléculas de 5 carbonos que proceden del ácido mevalónico siendo que “cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación cabeza-cola de un número variable de unidades isoprénicas” aunque también se han encontrado casos de unión cabeza-cabeza o cola-cola.<sup>8</sup> La diversidad de los metabolitos terpénicos naturales nos lleva a considerar la presentación de reacciones y mecanismos que justifican la existencia de los principales esqueletos, siendo el origen de las unidades de isopreno: vía del mevalonato y vía de formación de IPP (GAP/Piruvato).<sup>11</sup>

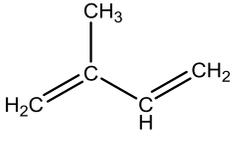
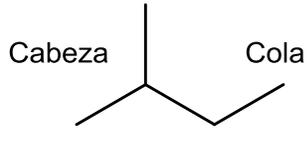
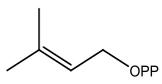
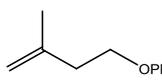
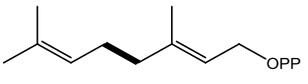
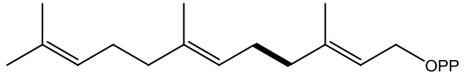
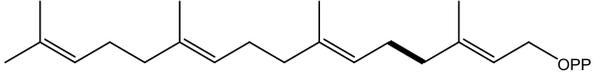
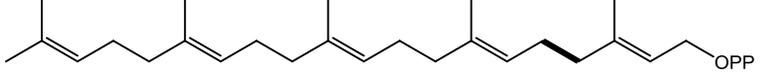
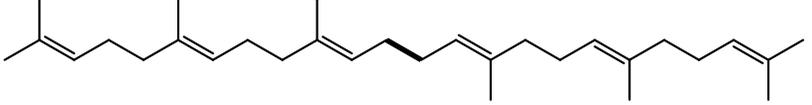
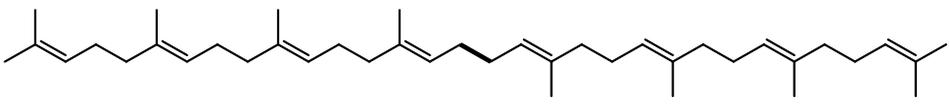
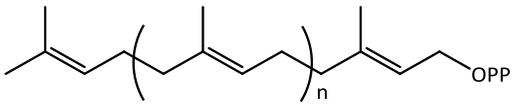
Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que se unen (Tabla 1).<sup>12,13</sup>

### **2.1.1. Sesquiterpenos**

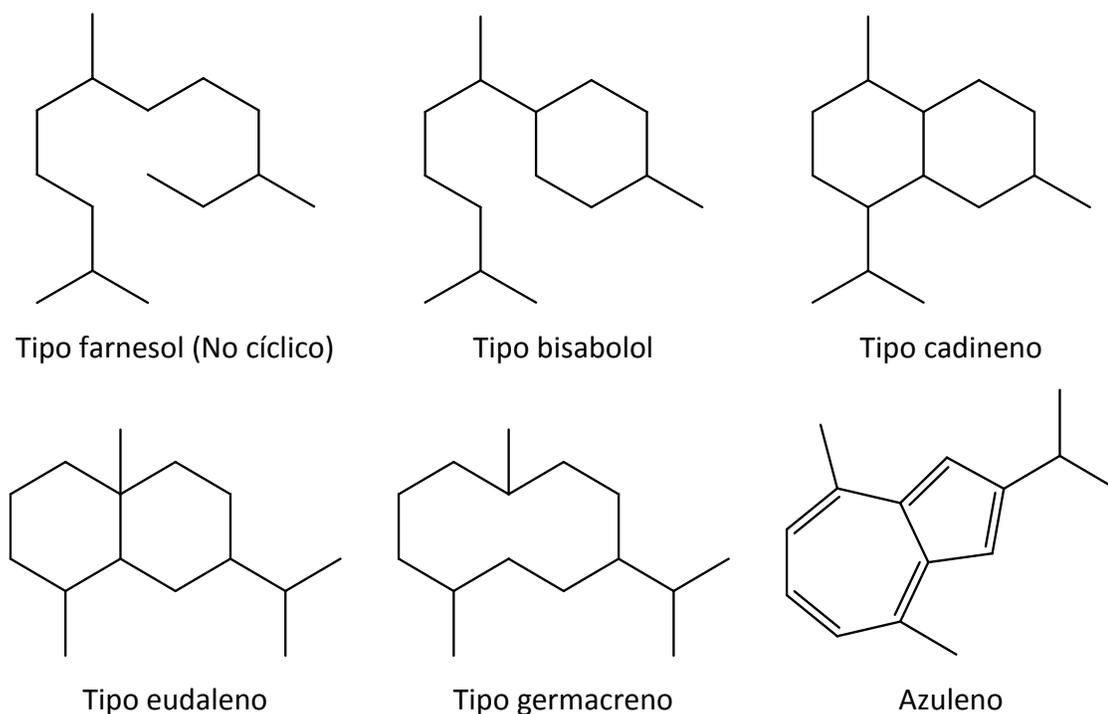
Son terpenos con 15 átomos de carbono (C<sub>15</sub>) cuyo esqueleto está formado por la unión de tres unidades de isopreno, que derivan del farnesil pirofosfato. Esta molécula se forma por adición de un IPP al geranil pirofosfato y según el modo de unión pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e incluso tetracíclicos, y éstos con acoplamientos de distintos tipos (Figura 3).

Derivados de estos esqueletos existen en plantas principalmente en *Labiatae*, *Mirtaraceae*, *Asteraceae* y *Rutaceae*, aunque pueden observarse en miembros de otras familias, también se han encontrado en mohos, corales e insectos, en los que actúan como hormonas juveniles y como feromonas.<sup>8,9</sup>

**Tabla 1.** Clasificación y precursores de los Terpenos

|                           |   |   |                |
|---------------------------|---|---|----------------|
|                           |  <p>Isopreno</p>     |  <p>Unidad de 5 Carbonos</p> |                |
| <b>C<sub>5</sub></b>      |  <p>DMAPP</p>        |  <p>IPP</p>                   | Hemiterpenos   |
| <b>C<sub>10</sub></b>     |  <p>GPP</p>          |   | Monoterpenos   |
| <b>C<sub>15</sub></b>     |  <p>FPP</p>         |   | Sesquiterpenos |
| <b>C<sub>20</sub></b>     |  <p>GGPP</p>       |   | Diterpenos     |
| <b>C<sub>25</sub></b>     |  <p>GFPP</p>      |   | Sesterterpenos |
| <b>C<sub>30</sub></b>     |  <p>Escualeno</p> |   | Triterpenos    |
| <b>C<sub>40</sub></b>     |  <p>Fitoeno</p>   |   | Tetraterpenos  |
| <b>&gt;C<sub>40</sub></b> |                   |   | Politerpenos   |

Un ejemplo de sesquiterpenos son los azulenos que cuentan con dos anillos acoplados con enlaces dobles conjugados que son causantes del color azul, como el guayazuleno obtenido de la esencia de guayaco o el chamazuleno de la manzanilla, este último con actividad antiulcerosa, antiinflamatoria y espasmolítica.<sup>8</sup>



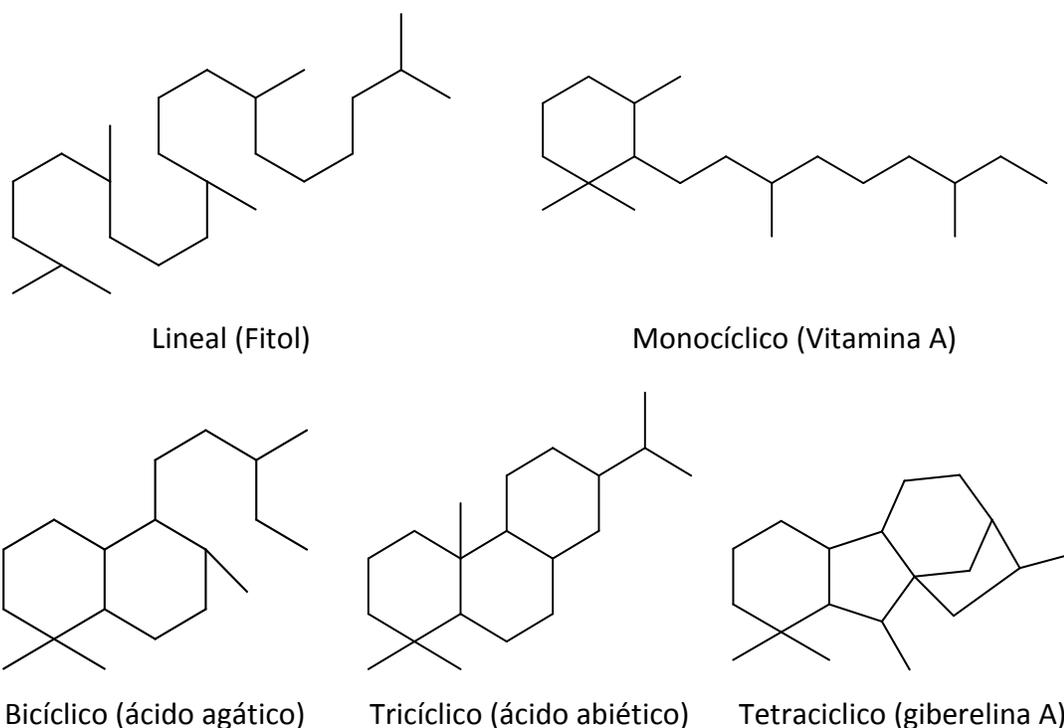
**Figura 3.**Esqueletos de sesquiterpenos.

### 2.1.2. Diterpenos

Los diterpenos constituyen un amplio conjunto de compuestos de veinte carbonos procedentes del metabolismo del (2*E*,6*E*,10*E*)-geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Se encuentran en determinados insectos y en diversos organismos marinos, pero sobre todo están repartidos en los vegetales, son especialmente abundantes en los órdenes *Lamiales* y *Asterales*, aunque también aparecen en *Gentianales*, *Geraniales* y *Fabales*.<sup>9</sup>

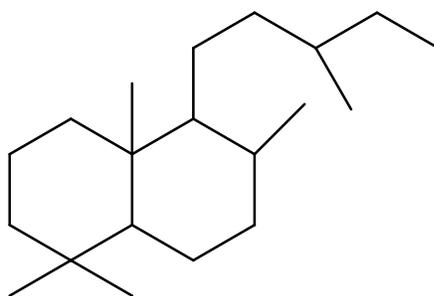
La estructura de los diterpenos es muy variable dependiendo principalmente de su biogénesis siendo clasificados en función a la misma (Figura 4).<sup>11</sup>

- Compuestos acíclicos.
- Compuestos ciclados: diterpenos monocíclicos, diterpenos bicíclicos (tipo labdano y clerodano), diterpenos tricíclicos (tipo primario, abietano, cassano, totarona y podocarpano) y diterpenos tetracíclicos (tipo kaurano, beyerano, atisano, giberelano).<sup>14,15</sup>



**Figura 4.** Esqueletos de diterpenos.

Los diterpenos tipo labdano (Figura 5) son poco comunes en la naturaleza, por esta razón se busca preparar nuevos derivados a partir de productos naturales, se ha informado que este tipo de estructuras se pueden emplear como agentes anticancerosos potenciales. Además de que pueden ser empleados para la síntesis de metabolitos más complejos, como es el caso del 13-hidroxi podocarpa-8,11,13-trieno sintetizado a partir de (-)-sclareol.<sup>16</sup>



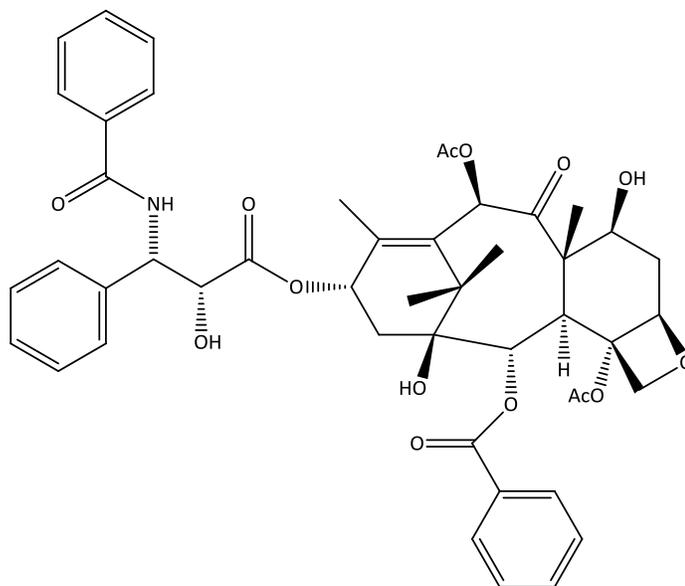
**Figura 5.** Esqueleto base de diterpenos tipo labdano.

## **2.2. Actividad biológica de los diterpenos**

En la actualidad se conoce una amplia gama de actividades farmacológicas provocadas por varios terpenos, tales como antimicrobiana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral, antialérgico, cardiotónico, antiespasmódico, antidiabético, antiinflamatorio, antioxidante, quimioterapéutico e inmunomoduladoras.<sup>10,12,14,17</sup>

Diterpenos derivados de plantas son los agentes anticancerígenos más eficaces aprobados por la FDA.<sup>10</sup> Taxol® (Figura 6), un diterpenoide complejo de la corteza del tejo, es un agente antimetabólico potente con una excelente actividad contra cánceres de mama y de ovario, se une a heterodímeros de tubulina, promueve y estabiliza el ensamblaje de los microtúbulos y detiene la división celular.<sup>2</sup> Eleuterobina es un diterpeno glicosilado aislado de un coral marino, *Eleutherobia sp.*, es un agente anticancerígeno potente que inhibe la proliferación celular a través de la promoción de la polimerización de la tubulina en microtúbulos de manera análoga a la del Taxol®. Otro derivado identificado es el 3-ingenilangelato, un éster aislado de la *Euphorbia peplus*, el cual es un quimioterapéutico tópico para el tratamiento de cáncer de piel, que causa una rápida interrupción mitocondrial provocando la muerte celular por necrosis primaria, con un resultado estético favorable. La escualamina es otro terpenoide identificado como un buen candidato para el desarrollo de fármacos antiproliferativos. Estos compuestos anticancerígenos obtenidos de especies vegetales tienen mayor eficacia y perfil de toxicidad más seguros que las alternativas sintéticas. Aunque muchos de estos fármacos tienen aplicaciones prometedoras, pocos de estos terpenoides se pueden obtener en

cantidades suficientes a partir de fuentes naturales, limitando así su despliegue eficaz en el tratamiento de enfermedades humanas.<sup>10</sup>



**Figura 6.** Estructura del Taxol® (Paclitaxel).

Hay terpenoides conocidos por su efecto antiinflamatorio como las pseudopterosinas, glicósidos diterpénicos que fueron aislados originalmente del coral *Pseudopteroorgia elisabethae*. Nuevos derivados de pseudopterosina y *seco*-pseudopterosinas fueron aisladas de especies *Pseudopteroorgia*. Es interesante observar que el potencial antiinflamatorio de pseudopterosinas es superior a la de medicamentos estándar.<sup>10</sup> La hispanolona un labdano aislado de *Ballota hispanica*, y diterpenos estructuralmente relacionados también han puesto de manifiesto su actividad antiinflamatoria.<sup>18</sup>

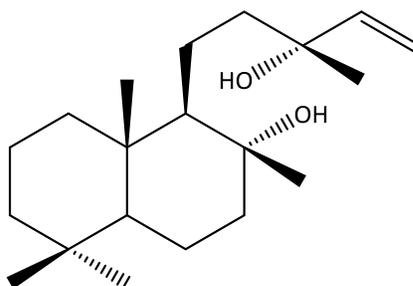
Una variedad de terpenos han sido descritos como agentes antiparasitarios y antibacterianos con alta eficacia y selectividad. El antiparasitario más usado en el mundo es la artemisinina, extraído de *Artemisia annua*, una hierba originaria de China. Esta hierba se ha utilizado para el tratamiento de la malaria en China por más de 1000 años. Algunos diterpenos y sus lactonas, por ejemplo, el dehidroabietinol aislado de *Hyptis suaveolens*, ha demostrado que tienen actividad antimalárica. La escualamina, un agente

anticancerígeno, ha mostrado también ser un potente antibacteriano y antifúngico, otros extraídos de especies de *Salvia* han mostrado actividades antibacterianas contra una variedad de organismos tales como *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli*, y *P. mirabilis*. El mecanismo de acción antimicrobiana está estrechamente relacionado con su carácter lipófilico.<sup>10</sup>

Se ha demostrado que el diterpeno tipo labdano miriadenolido (AMY) aislado de *Alomia myriadenia* puede reducir la expresión de las proteínas estructurales y la gemación de partículas virales.<sup>17</sup>

Los diterpenos de tipo labdano sugieren junto con su baja toxicidad celular, posibles aplicaciones terapéuticas de gran impacto.<sup>18</sup>

Además de las propiedades medicinales antes mencionadas, también son útiles como agentes potenciadores en la penetración de la piel (para mejorar la administración transdérmica de fármacos) y como agentes suplementarios en preparaciones tópicas dérmicas, cosméticos y artículos de higiene. Finalmente, el uso de terpenoides como saborizantes y fragancias en alimentos y cosméticos ha sido conocido durante siglos.<sup>10</sup> Un ejemplo es el sclareol (Figura 7) que es un diterpeno aislado de *Salvia sclarea* el cual es utilizado para síntesis de Ambrox® el cual es componente de lambar gris empleado como constituyente de finas fragancias.<sup>19</sup>



**Figura 7.**Estructura química del (-)-sclareol.

En las Asteráceas se han descrito más de 1 200 productos terpénicos distribuidos en un centenar de esqueletos, dentro de los cuales se incluyen estructuras tipo labdano.<sup>20</sup>

### **2.3. Familia Asteraceae**

Las Asteráceas es un grupo monofilético y representa una de las familias más numerosas de angiospermas con 1600 a 1700 géneros y 24000 a 30000 especies.<sup>21,22</sup>

En la República Mexicana se estiman alrededor de 300 géneros, con un número de especies cerca de 3 000.<sup>23</sup> Una de las características más importantes es la presencia de flores apretadas en una inflorescencia condensada que se asemeja a una sola flor grande. Esta familia también presenta una amplia variedad de formas de vida: herbáceas, suculentas, lianas, epifitas, árboles y arbustos. Su distribución es cosmopolita y se encuentra prácticamente en todos los ambientes. Además, la evidencia filogenética y los datos paleontológicos sugieren que el ancestro de las *Asteraceae* surgió en el hemisferio sur, en el área que hoy corresponde a la región andina de Sudamérica.<sup>24</sup>

#### **2.3.1 Género Ageratina**

*Ageratina* es quizá el género con más especies de la familia de las *Asteraceae* en México, ya que se encuentran distribuidas en el territorio nacional cerca 153 especies.<sup>25</sup>

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

#### **2.4. Ageratina petiolaris**

Es un arbusto hasta de 2 m de altura; tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 5 mm de diámetro, estriados, blanco-amarillentos, puberulentos; hojas opuestas, peciolo de 1.5 a 8 cm de largo, pubescente, lámina ovada, de 3.5 a 10 cm de largo por 2.5 a 10 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde crenado-dentado, base cordada, haz puberulento, envés pubescente, con abundantes glóbulos resinosos, tri a pentanervada desde la base, membranácea; numerosos capítulos de 7 a 8 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos pubescentes; involucre turbinado, de 5 a 7 mm de largo por  $\pm$  5 mm de ancho, cubre la mitad basal o más de las corolas, sus brácteas dispuestas

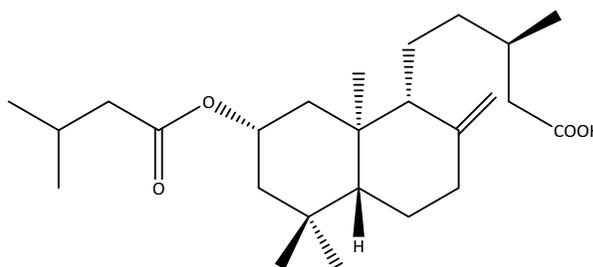
en 3 series de la misma longitud, lineal-lanceoladas, agudas, verdes, pubescentes; flores 35 a 40; corola de 4 a 5 mm de largo, blanca, glabra, con glóbulos resinosos en los lóbulos; aquenio de 2 a 3 mm de largo, muy pubescente, vilano casi del largo de la corola, cerdas blanco-rosadas (Figura 8).



**Figura 8.** *Ageratina petiolaris*.

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

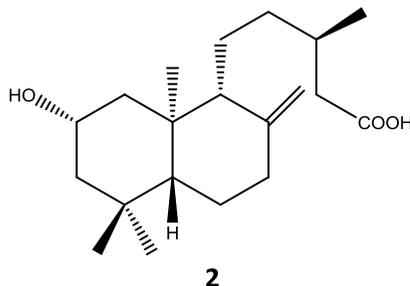
En 1983, Calderón y colaboradores realizaron el estudio fitoquímico de *Eupatorium petiolare* (*Ageratina petiolaris*) colectada en la ciudad de México, aislando al ácido 2 $\alpha$ -isovaleroxieperuico, un diterpeno tipo labdano (Figura 9).<sup>27</sup>



**1**

**Figura 9.** Ácido 2 $\alpha$ -isovaleroxieperuico (1).

A partir de una hidrólisis básica sobre el enlace tipo éster del ácido 2 $\alpha$ -isovaleroxieperuico (**1**), se obtuvo el ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) en forma de cristales (Figura 10).<sup>27</sup>



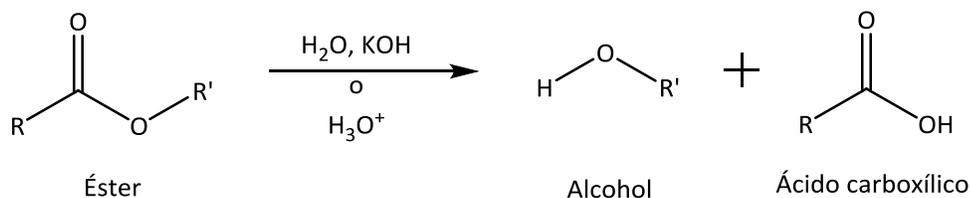
**Figura 10.** Ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**).

El ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**), posee dentro de su esqueleto grupos funcionales los cuales se pueden modificar mediante diferentes reacciones químicas que conduzcan a diversos derivados del diterpeno tipo labdano. Algunos procesos para la modificación química se describen a continuación, los cuales están estrechamente relacionados con los grupos funcionales existentes en el ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**).

## 2.5. Ésteres

Los ésteres se encuentran entre los compuestos que están más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunos ésteres sencillos son líquidos con aroma agradable, responsables de los olores fragantes de las frutas y las flores. El enlace éster también está presente en las grasas animales y en varias moléculas biológicamente importantes.<sup>28</sup>

Un éster es hidrolizado por una base acuosa o por un ácido acuoso para producir un ácido carboxílico y un alcohol.<sup>28</sup>

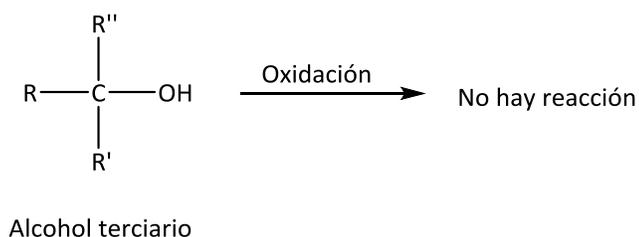
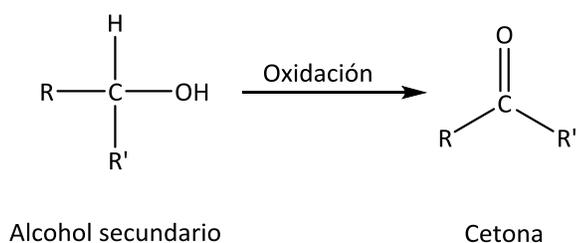
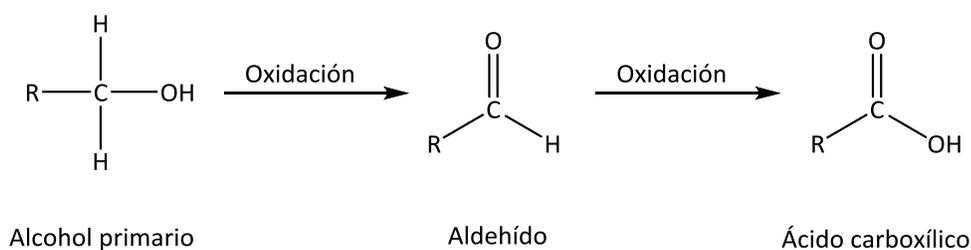


## 2.6. Alcoholes

Los alcoholes cuentan con varias aplicaciones industriales y farmacéuticas que resaltan su importancia.

Quizá la reacción más valiosa de los alcoholes es su oxidación para producir compuestos carbonílicos. Y según el alcohol que se trate ya sea este primario o secundario dependerá que el compuesto carbonílico resultante sea un aldehído, una cetona o un ácido carboxílico. Los alcoholes terciarios no presentan reacciones de oxidación.

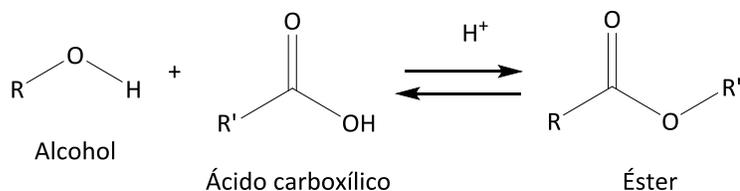
Los reactivos que más se usan para oxidar alcoholes se basan en metales de transición con estados de oxidación altos, como  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{CrO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , sobresaliendo el cromo (VI).<sup>28-30</sup>



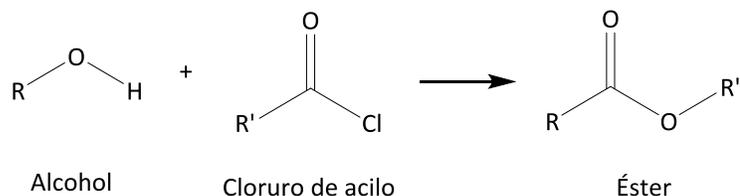
El producto de la oxidación de alcoholes secundarios son las cetonas, las cuales ocupan posiciones centrales como productos intermedios así como productos finales en la

síntesis de productos naturales y compuestos farmacéuticos,<sup>31</sup> este tipo de estructuras son generalmente estables y no sufren posteriores reacciones a menos que se sometan a condiciones de reacción muy drásticas.<sup>32</sup>

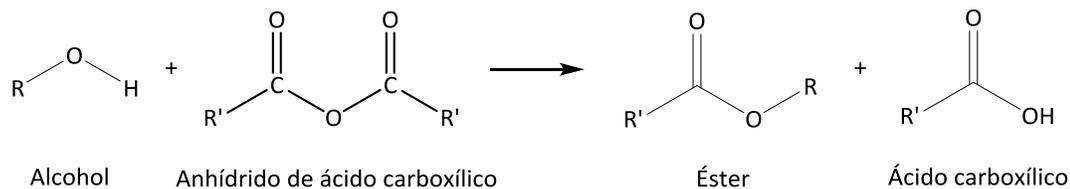
La condensación de un alcohol y un ácido carboxílico catalizada por ácidos produce un éster y agua, se conoce como esterificación de Fischer.<sup>30</sup>



Los esteres también se forman por la reacción de alcoholes con cloruros de acilo, esta reacción se lleva a cabo en presencia de una base débil como la piridina.<sup>30</sup>



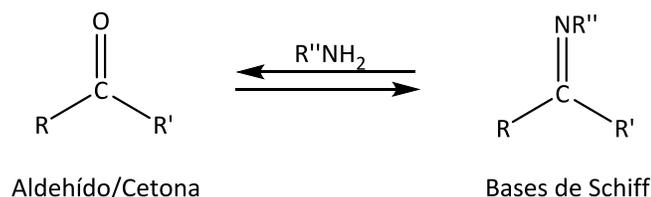
Los anhídridos de ácidos carboxílicos reaccionan en forma similar a como lo hacen los cloruros de acilo, ya que son derivados de ácidos carboxílicos bastante reactivos.<sup>30</sup>



## 2.7. Bases de Schiff

Las aminas primarias, RNH<sub>2</sub>, se adicionan a los aldehídos y a las cetonas para producir iminas, R<sub>2</sub>C=NR. Las iminas son particularmente comunes como intermediarias en muchas rutas biológicas, donde con frecuencia se llaman Bases de Schiff. La

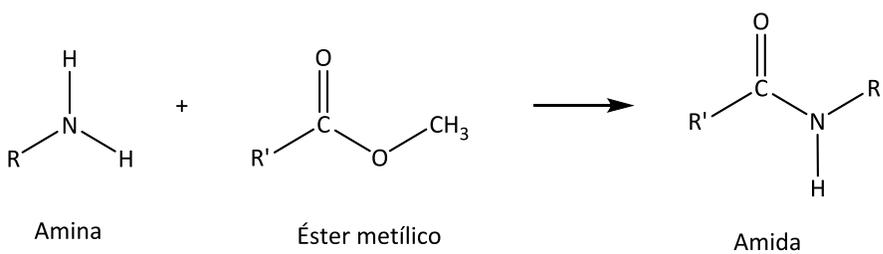
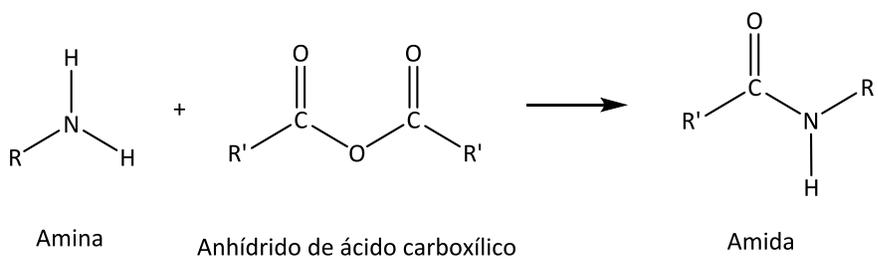
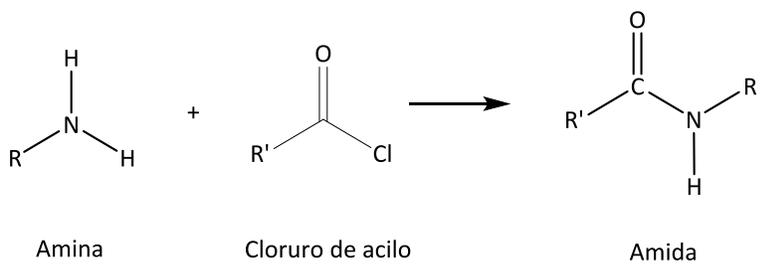
preparación de iminas a partir de reactivos como la hidroxilamina y la 2,4-dinitrofenilhidracina dan como producto de estas reacciones *oximas* y *2,4-dinitrofenilhidrazonas* respectivamente, con frecuencia son cristalinas y fáciles de manejar.<sup>28</sup>



## 2.8. Formación de amidas

Las amidas, al igual que los ésteres abundan en todos los organismos vivos; las proteínas, ácidos nucleicos y muchos productos farmacéuticos tienen grupos funcionales amida; la razón de esta abundancia de amidas es que son más estables a las condiciones acuosas que se encuentran en los organismos vivos. Las amidas son las menos reactivas de los derivados de ácidos carboxílicos.<sup>28</sup>

Los derivados de los ácidos carboxílicos se encuentran entre las moléculas más difundidas en la química. Las amidas son difíciles de preparar mediante la reacción directa de los ácidos carboxílicos con aminas debido a que éstas son bases que convierten a los grupos carboxilo ácidos en sus aniones carboxilato no reactivos.<sup>28</sup> Los métodos más comunes para la síntesis de amidas son reacción de aminas con cloruros de acilo, anhídridos y ésteres respectivamente.<sup>30</sup> En la práctica generalmente se prepara un anhídrido de ácido que reacciona con la amina.<sup>28</sup>



### 3. JUSTIFICACIÓN

Dado que no se cuenta con un estudio específico sobre la reactividad química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) principalmente sobre el grupo carboxilo y conocida la importancia que han desarrollado este tipo de estructuras y sus derivados en los últimos años, en este trabajo se dio a la tarea de transformar al diterpeno tipo labdano empleando condiciones estándar de reacción con el propósito de ampliar los conocimientos acerca del diterpeno cuya estructura es sumamente interesante y a su vez generar derivados funcionalizados, sobresaliendo las modificaciones químicas en el grupo carboxilo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Realizar distintas reacciones para llevar a cabo la transformación química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) obtenido por hidrólisis básica del extracto hexánico de flores de *Ageratina petiolaris*, que permitan comprender la reactividad que posee, analizando la estructura de los productos obtenidos, generar nuevos derivados funcionalizados y aunado a esto incrementar su posible actividad biológica.

### 4.2. Objetivos específicos

- Identificar, coleccionar y separar las partes de *Ageratina petiolaris*.
- Obtener el extracto hexánico de flores de *Ageratina petiolaris*.
- Obtener el ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) por medio de hidrólisis alcalina del extracto hexánico de *A. petiolaris* y purificación.
- Realizar las reacciones correspondientes para llevar a cabo la exploración de la reactividad química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**).
- Caracterizar los productos obtenidos, mediante sus propiedades físicas y datos espectroscópicos.

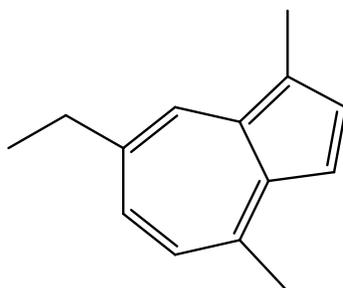
## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se colectó *Ageratina petiolaris* al oriente del estado de Michoacán cerca de San Joaquín Morelos, Municipio de Tlalpujahua a 2592 msnm; utilizando para este estudio únicamente las flores, ya que en esta parte se encontraba el ácido 2 $\alpha$ -isovaleroxieperuico (**1**) en abundancia, en comparación con hoja, tallo y raíz, de acuerdo a los estudios previos realizados dentro de nuestro equipo de trabajo

Durante la purificación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) se obtuvo e identificó al chamazuleno (**3**), lo cual resultó de gran interés ya que en estudios previos este compuesto no había sido reportado en *Ageratina petiolaris*.

### 5.1. *Obtención e identificación del chamazuleno (3)*

Como se mencionó previamente, el chamazuleno fue aislado durante la purificación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico, sobresaliendo en las fracciones no polares su característico color azul, dado que el extracto del cual fue aislado había sido sometido a una hidrólisis alcalina previa y para descartar que este compuesto se hubiera generando durante el tratamiento alcalino, se procedió a realizar un estudio sobre extracto sin hidrolizar, obteniendo nuevamente en las fracciones no polares el compuesto color azul corroborando de esta manera la procedencia natural del azuleno, el cual fue identificado por medio de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  como chamazuleno (**3**) (Figura 11). Los datos espectroscópicos de **3** se compararon con los descritos en la literatura para chamazuleno aislado de las flores de *Stevia serrata*.<sup>33</sup>



**3**

**Figura 11.**Estructura del chamazuleno (**3**).

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **3** (Figura 13) mostró en la región de los aromáticos dos señales dobles en 8.16 ppm ( $J = 1.6$  Hz) y en 7.60 ppm ( $J = 4.0$  Hz) correspondientes a H-8 y H-2 respectivamente, también se observó una señal doble de dobles a 7.38 ppm ( $J = 10.8, 1.6$  Hz) asignada a H-6, así mismo se observaron dos señales dobles en 7.22 ppm ( $J = 3.6$  Hz) y en 6.98 ppm ( $J = 10.8$  Hz) correspondientes a H-3 y H-5 respectivamente, observándose un acoplamiento de H-6 con H-8 y H-5. A frecuencias bajas se observó una señal cuádruple en 2.84 ppm ( $J = 7.6$  Hz) correspondiente a los dos protones de H-11, también se observaron dos señales simples en 2.83 y 2.65 ppm correspondiente a H-10 y H-9 respectivamente y por último se observó una señal triple en 1.34 ppm ( $J = 7.6$  Hz), correspondiente a H-12, debido al acoplamiento con H-11.

En el espectro de  $\text{C}^{13}$  de **3** (Figura 14) se observaron a frecuencia alta 10 señales correspondientes a los carbonos  $sp^2$ , y frecuencia baja se observaron 4 señales en 33.8, 24.1, 17.4 y 12.9 ppm para los carbonos  $sp^3$  C-11, C-10, C-12 y C-9 respectivamente.

**Figura 12.**Cromatografía en columna del chamazuleno (**3**) donde se observa su color característico



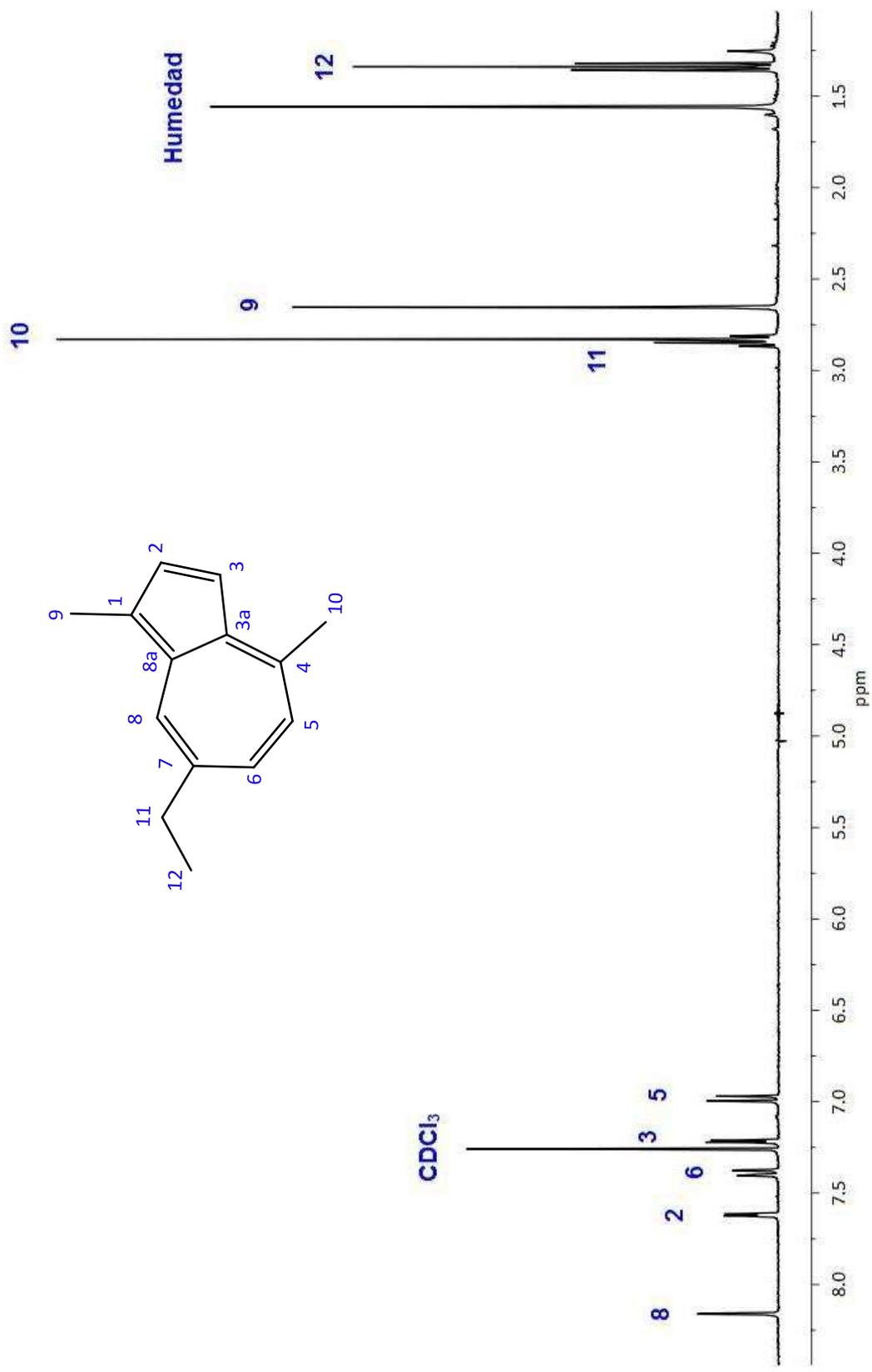


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) del chamazuleno (3) en  $\text{CDCl}_3$ .

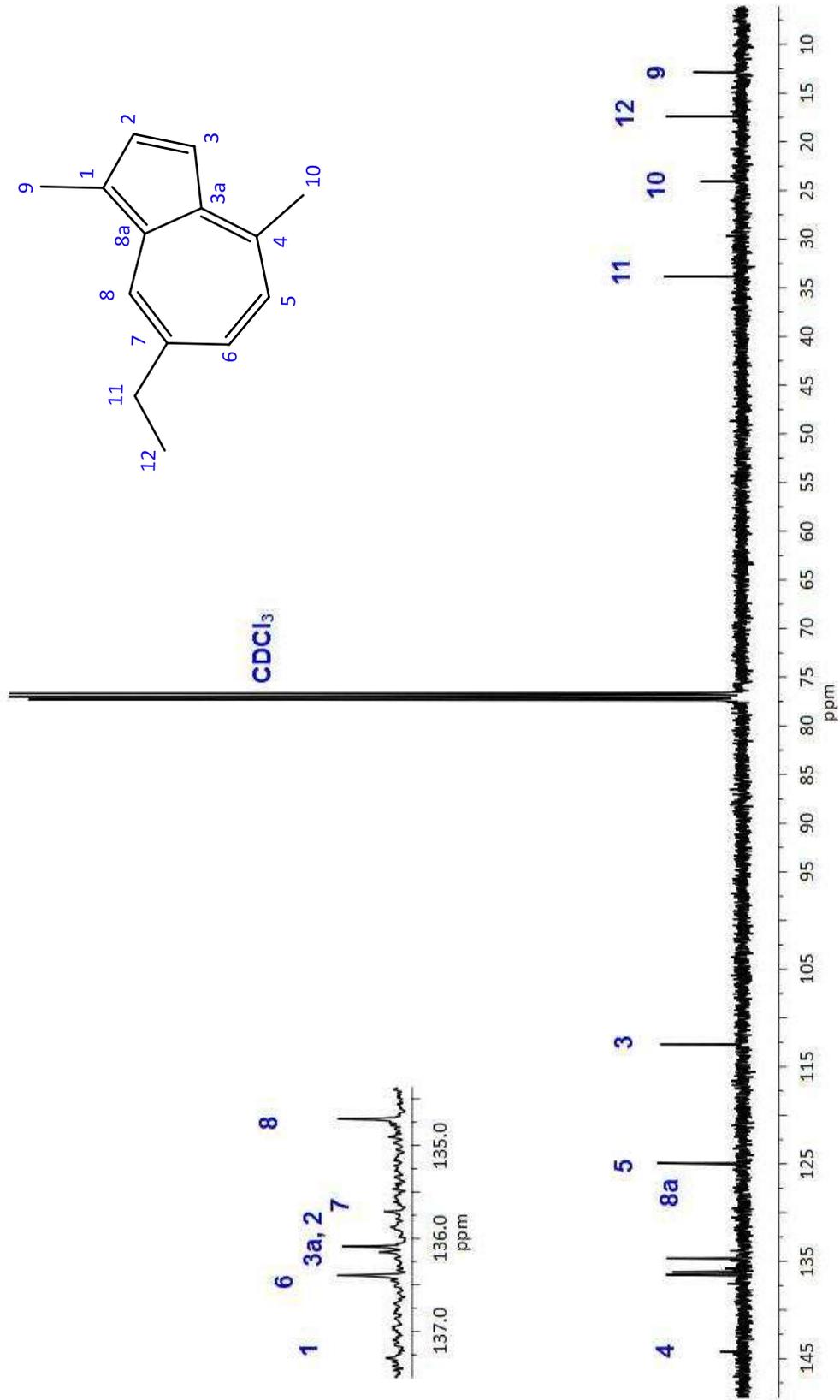
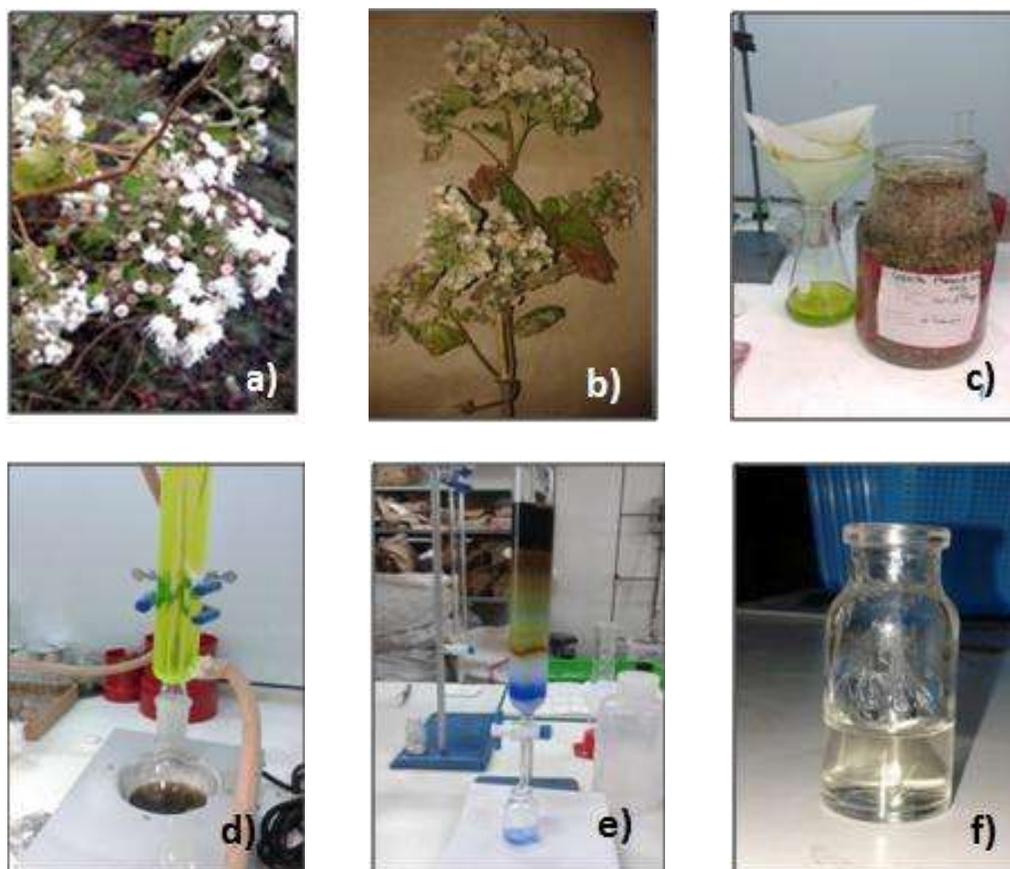


Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del chamazuleno (3) en  $\text{CDCl}_3$ .

## 5.2. Obtención del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)

El extracto hexánico de flores se sometió a una hidrólisis alcalina la cual generó al ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2), como cristales incoloros en forma de aguja (Figura 15f) el cual se identificó por medio de sus espectros de RMN de 1D y 2D, difracción de rayos X y su punto de fusión de 127-128°C (Lit. 127-128 °C), los desplazamientos de RMN de  $^1\text{H}$  y punto de fusión coincidieron con los descritos en la literatura por Calderón y colaboradores.<sup>27</sup>



**Figura 15.** Obtención del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2). a) *A. petiolaris* en su habitat; b) Flores secas; c) Maceración en hexano; d) Hidrólisis alcalina; e) Cromatografía en columna; f) Formación de cristales del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico.

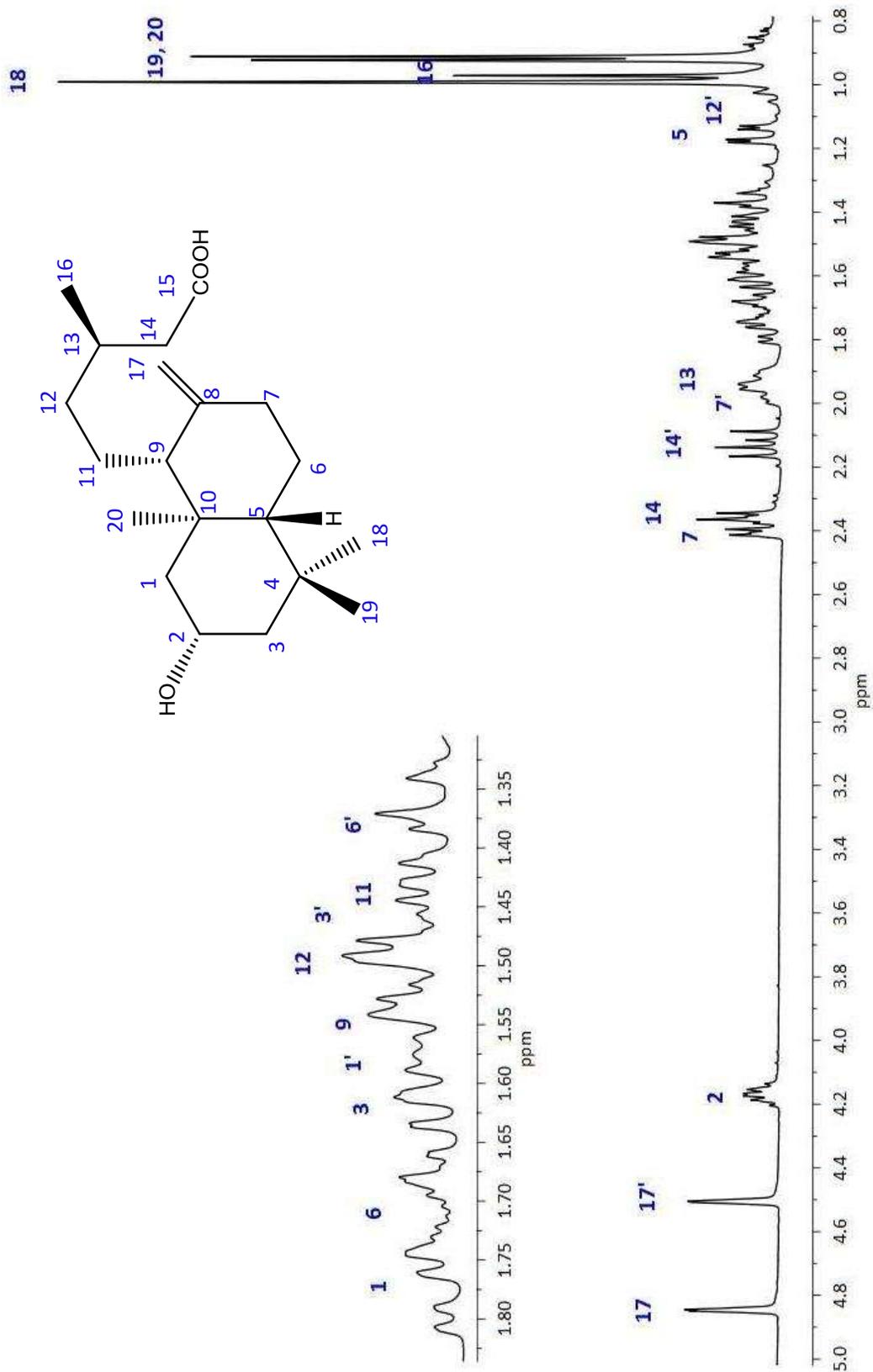
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 2 (Figura 17) se observaron dos señales simples en 4.84 y 4.50 ppm correspondientes a los hidrógenos del metileno exocíclico H-17 y H-17' respectivamente, en 4.17 ppm se apreció una señal quintuple ( $J=5.4$  Hz) correspondiente

al hidrógeno base de hidroxilo H-2, en 1.15 ppm se observó una señal doble de dobles ( $J = 12.5, 2.8 \text{ Hz}$ ) identificada como H-5, en 0.99 ppm se encontró una señal simple que integra para tres hidrógenos identificados como H-18, así mismo en 0.98 ppm se observó una señal doble ( $J = 6.2 \text{ Hz}$ ) debida al único metilo secundario de la molécula H-16, en 0.92 y 0.91 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a H-19 y H-20 respectivamente, cabe señalar que estas dos últimas señales habían sido reportadas como una señal simple que integraba para seis hidrógenos.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 18) se observaron 20 señales que confirman la presencia del diterpeno, en 178.9 ppm se observó la señal propia para el carbonilo C-15, en 148.0 ppm se observó la señal del C-8 base del metileno exocíclico, en 107.0 ppm se apreció la señal del carbono del metileno exocíclico C-17, en 67.8 ppm se observó la señal del carbono base de hidroxilo C-2 principalmente.



**Figura 16.** Cristales del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2).



**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) del ácido 2 $\alpha$ -hidroxiperuico (2) en  $\text{CDCl}_3$ .

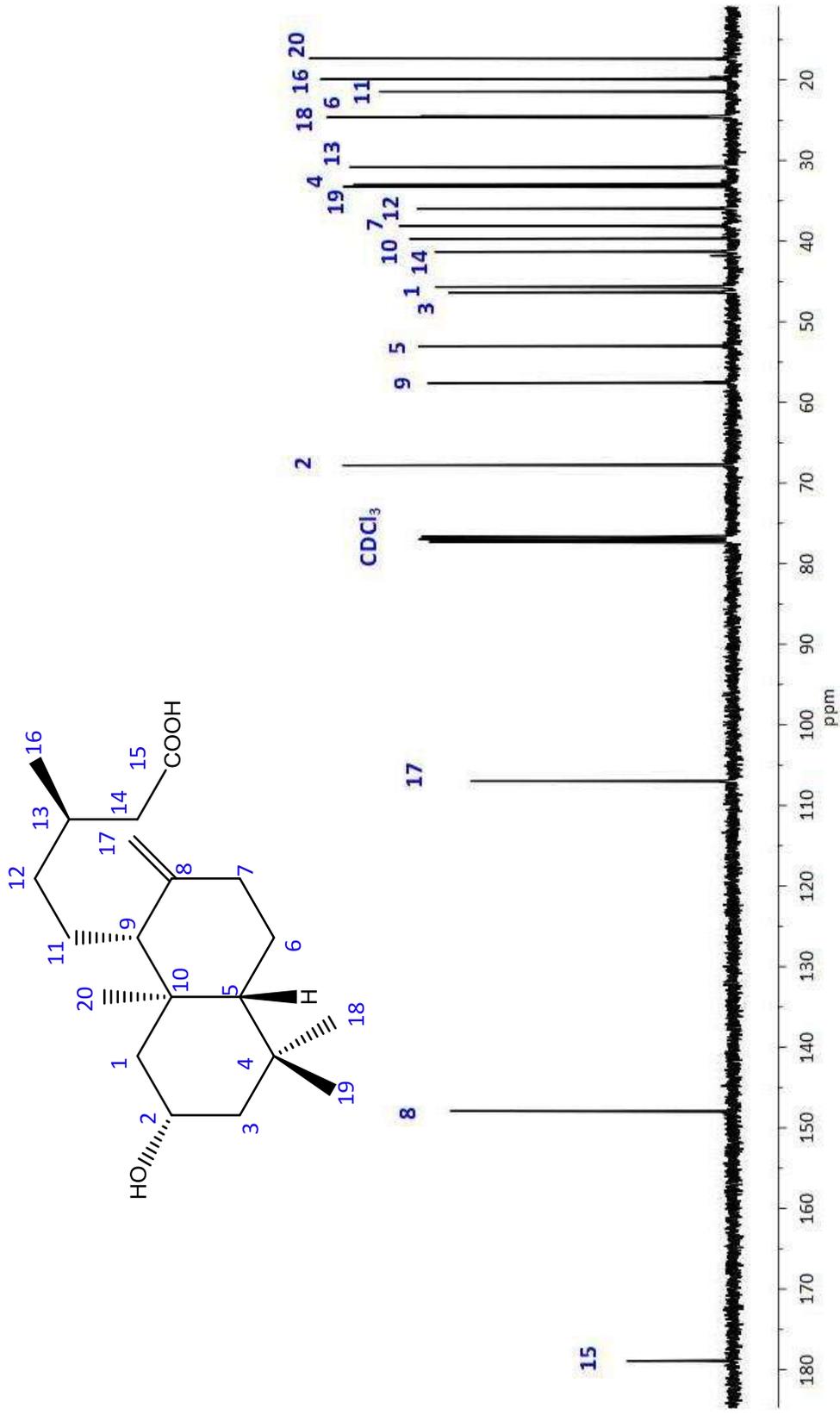
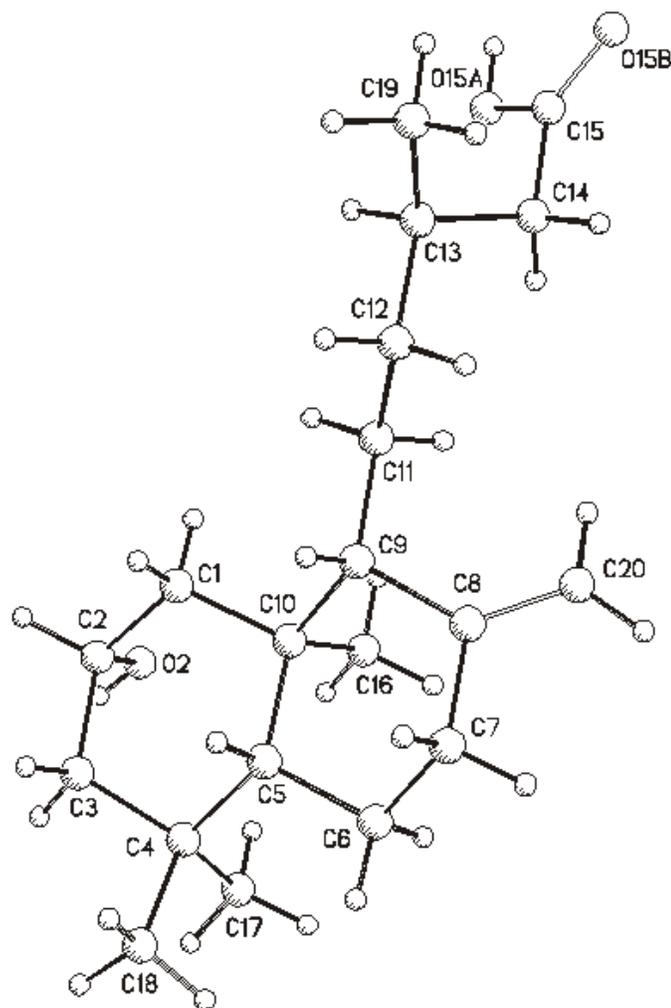


Figura 18. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) del ácido 2 $\alpha$ -hidroxiperuico (2) en  $\text{CDCl}_3$ .

Dado que los cristales obtenidos resultaron adecuados para su análisis por difracción de rayos X (Figura 19) se logró asignar la configuración absoluta de dicho compuesto como  $2S,5R,9R,10R,13R$ , en base a los parámetros de Flack  $x = 0.1$  (2) y Hooft  $y = 0.85$  (5) con una  $R = 2.9\%$ , lo cual resultó de un sistema cristalino monoclinico de grupo espacial  $P2_1$ .

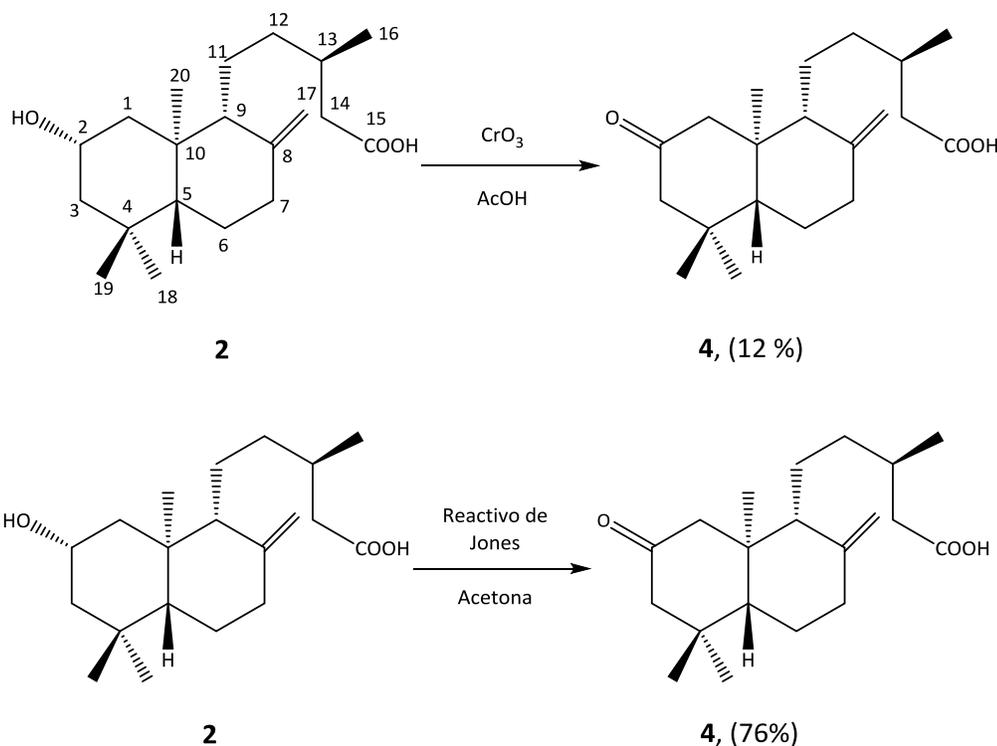


**Figura 19.** Estructura obtenida por difracción de rayos X del ácido  $2\alpha$ -hidroxieperuico (**2**).

Una vez identificado y caracterizado el compuesto **2**, se prosiguió con el estudio de la transformación química del ácido  $2\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) en sus grupos funcionales.

### 5.3. Oxidación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**)

Dado que el diterpeno tipo labdano **2** presenta un grupo oxhidrilo en la posición 2, se propuso oxidar este alcohol secundario con CrO<sub>3</sub> en ácido acético glacial obteniendo la cetona correspondiente en bajos rendimientos (12%) con el propósito de mejorar el rendimiento, se planteó utilizar reactivo de Jones el cual se prepara disolviendo CrO<sub>3</sub> en una dilución acuosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y acetona, mejorando el rendimiento de la oxidación de forma considerable (76%).



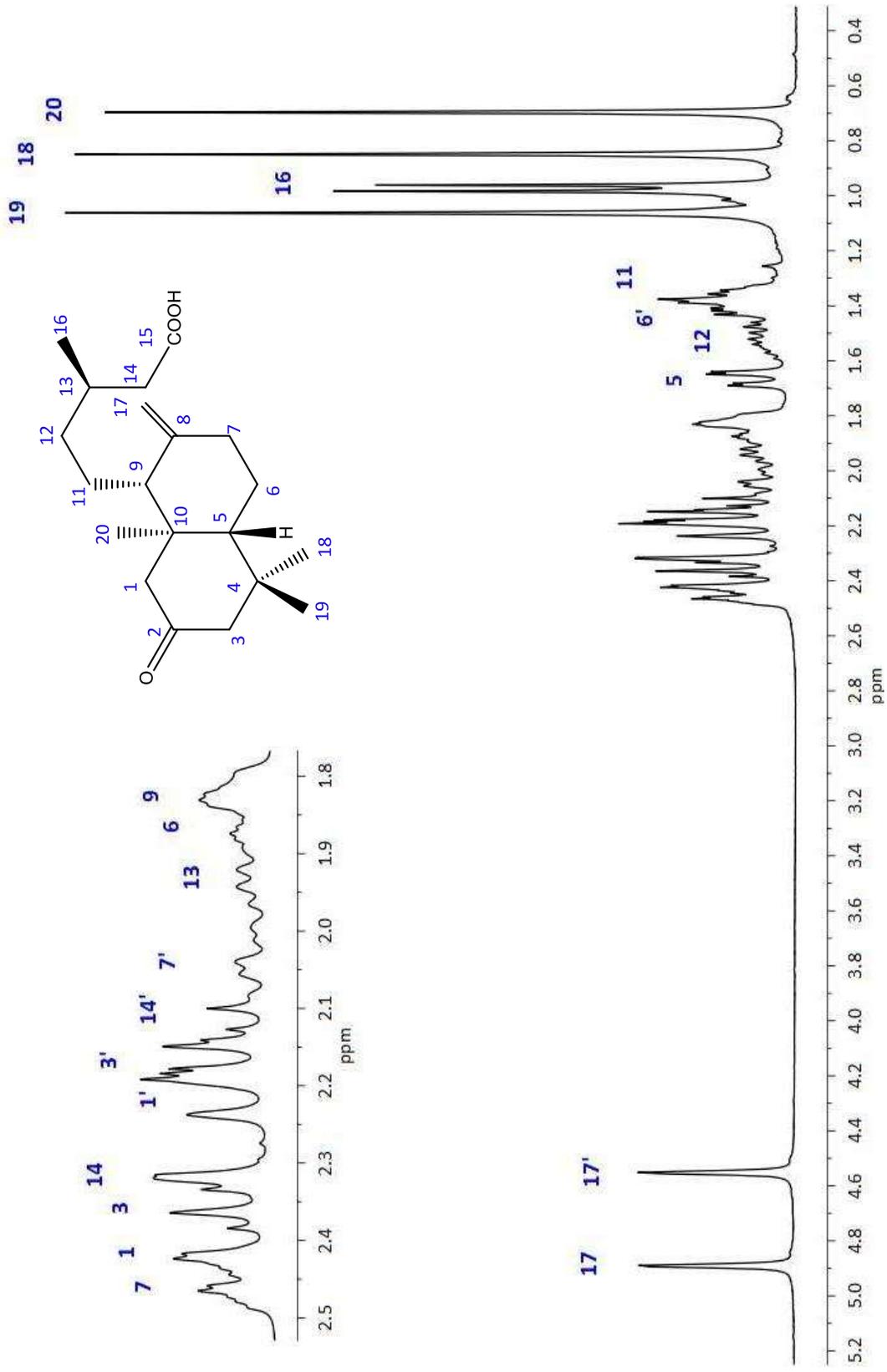
El ácido 2-oxoeperuico (**4**) se obtuvo en forma de cristales blancos con un punto de fusión de 70-75 °C, mostrando diferencia considerable respecto al punto de fusión de **2**. En su espectro de EIMS se observó el ión molecular  $m/z$  320 [M]<sup>+</sup>. El espectro de infrarrojo mostró bandas en 3400-2500 (COOH), 1702 (C=O), 1642 (C=O) y 1270 cm<sup>-1</sup> (C-O). En su espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 21) se observaron dos señales simples en 4.89 y 4.55 ppm correspondientes a los hidrógenos del metileno exocíclico H-17 y H-17' respectivamente, sin un desplazamiento considerable, destacando la ausencia de la señal de H-2 presente en el alcohol, lo cual indicó que la reacción se había llevado a cabo, observándose

desplazamientos significativos en las señales de los protones cercanos al C-2, adicionalmente se observaron los desplazamientos de la señales simples de H-19 y H-18 hasta 1.06 y 0.85 ppm respectivamente, lo que permitió observar claramente la señal doble del metilo secundario H-16 en 0.97 ppm ( $J = 6.6$  Hz), dichos desplazamientos se confirmaron en base a las correlaciones en el experimento NOESY (Figura 22), en donde se observa la interacción en el espacio entre el hidrógeno H-5 en posición *beta* con los protones del metilo H-19 también en posición *beta*, en el caso del metilo H-18 en posición *alfa* con los protones del metilo H-20 igualmente en posición *alfa*.

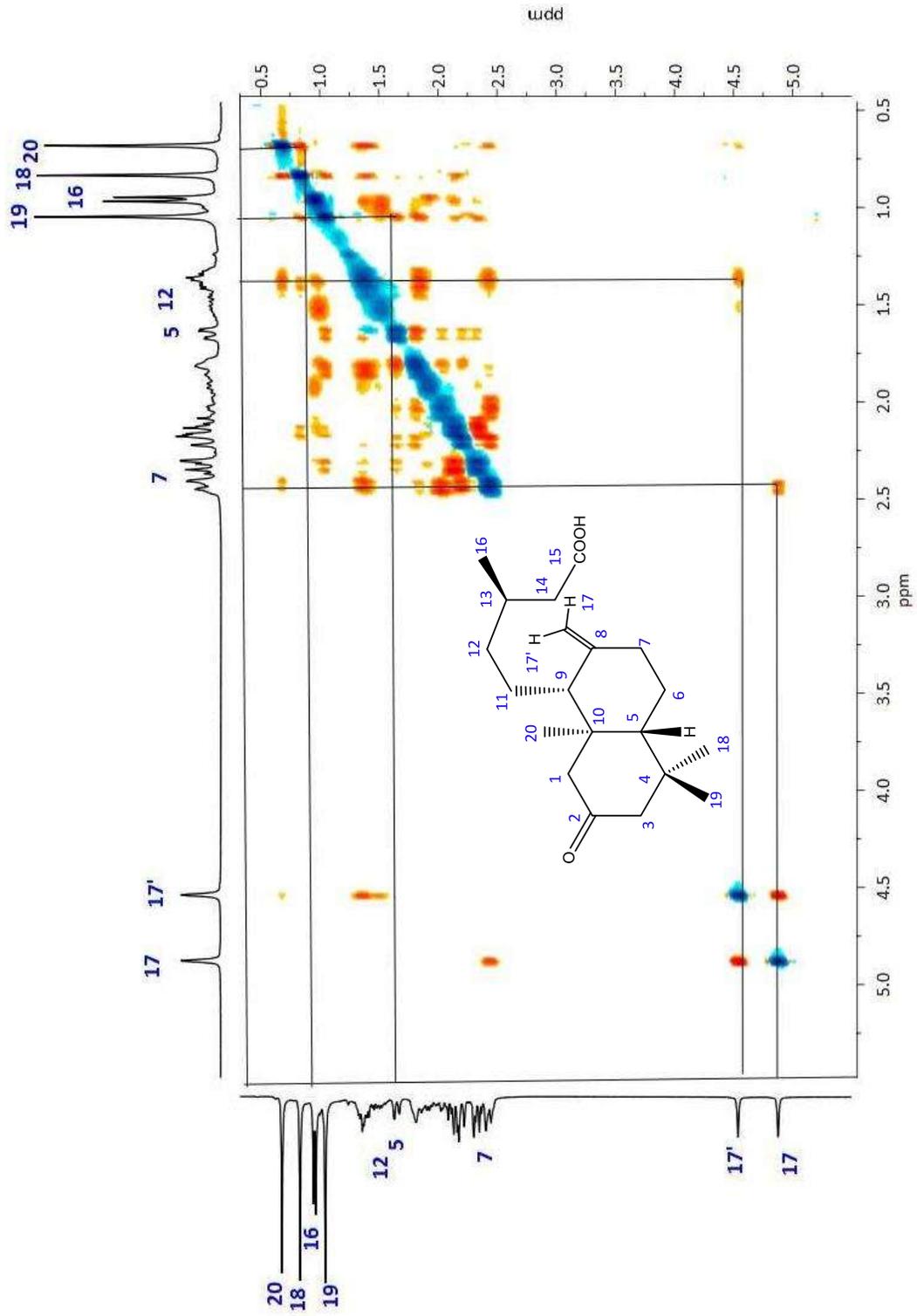
En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **4** (Figura 23), se observaron dos señales de carbonilo, una en 212.0 ppm correspondiente al carbonilo de cetona C-2 teniendo un desplazamiento considerable con respecto a **2** y otra en 179.1 ppm asignada al carbonilo del ácido carboxílico, mostrando también desplazamientos en las señales de C-1, C-3, C-4 y C-10 a 54.1, 56.2, 39.0 y 45.0 ppm respectivamente, dichas comparaciones se pueden apreciar con mayor detalle en la Tabla de desplazamiento químico de  $^{13}\text{C}$  (Apartado 8).



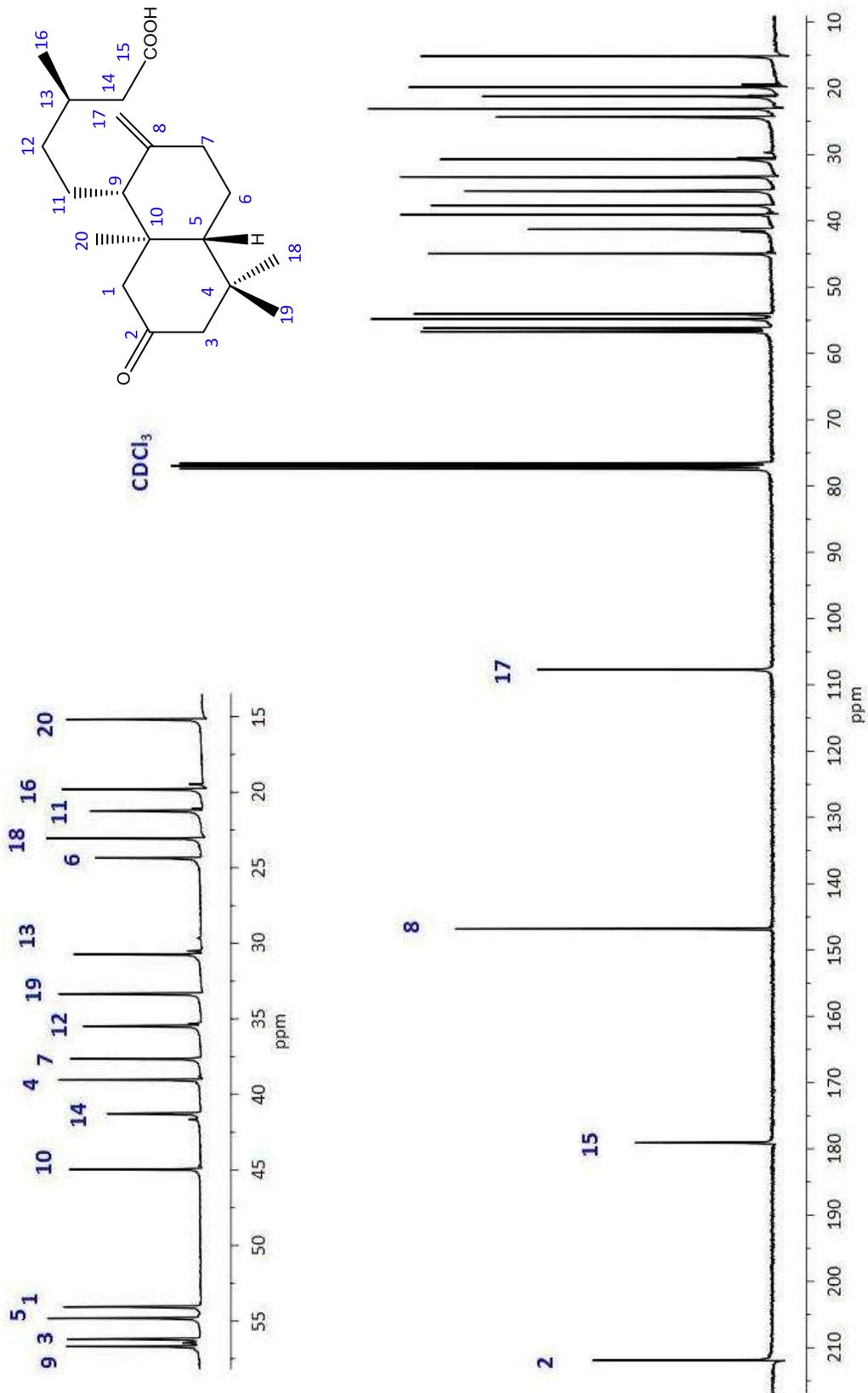
**Figura20.** Crudo de reacción empleando el reactivo de Jones.



**Figura 21.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) del ácido 2-oxoheperico (4) en CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 22.** Experimento NOESY del ácido 2-oxoheperuico (**4**) en CDCl<sub>3</sub>.

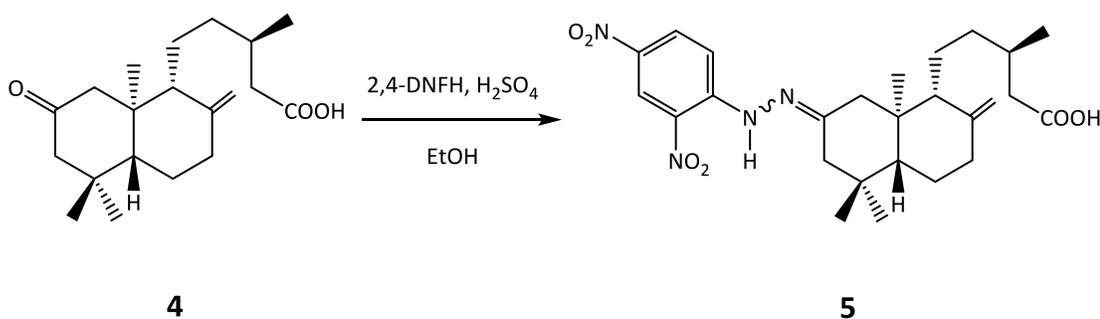


**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) del ácido 2-oxoheperuico (4) en  $\text{CDCl}_3$ .

#### 5.4. Preparación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona 5 del ácido 2-oxoepervuico (4)

El tratamiento del ácido 2-oxoepervuico con 2,4-dinitrofenilhidrazina dio lugar a la 2,4-dinitrofenilhidrazona (2,4-DNFH) correspondiente, obtenida en forma de agujas color naranja. Durante el análisis se observó la formación de dos compuestos con configuraciones diferentes (*E* y *Z*) de los cuales se logró aislar y caracterizar uno de ellos.

En los espectros de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  del crudo de reacción se observó la formación de las dos configuraciones posibles para 2,4-DNFH a partir del compuesto carbonílico **4**, esto debido a que no existen factores estéricos que promuevan una sola configuración, a pesar de haber separado de la mezcla uno de los isómeros no fue posible asignar la configuración del doble enlace del grupo imino con los datos espectroscópicos obtenidos.



En reportes previos sobre la preparación de bases de Schiff se describe la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona del producto natural rasteviona, encontrando coincidencias en los desplazamientos de la señal N-H y las señales de los hidrógenos aromáticos en comparación con el nuevo derivado **5**.<sup>34</sup>

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la 2,4-DNFH **5** (Figura 25) fue similar al del compuesto carbonílico **4**, excepto por la señal del N-H y las señales de los protones aromáticos. Se observó en 11.32 ppm la señal del N-H como una señal simple, las señales de los hidrógenos H-3DNFH, H-5DNFH y H-6DNFH del anillo aromático se observaron en 9.14 ppm ( $J = 2.4$  Hz), 8.30 ppm ( $J = 9.4, 2.4$  Hz) y 8.02 ppm ( $J = 9.4$  Hz) respectivamente. Las señales de los protones del metileno exocíclico se observaron en 4.90 y 4.58 ppm como

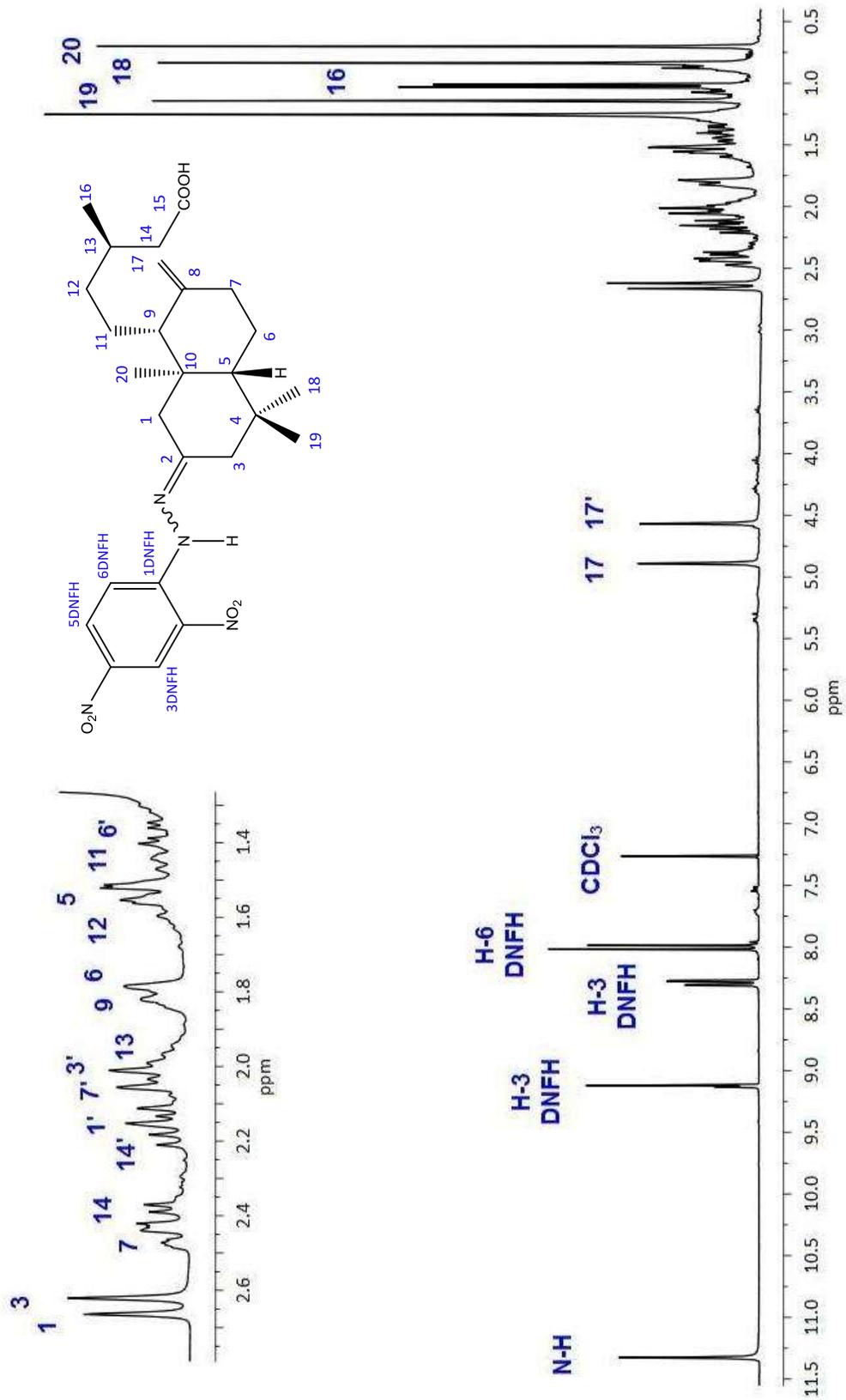
dos señales simples, en tanto que en el resto de las señales del sistema no se apreció un desplazamiento sobresaliente respecto a los mostrados en el ácido 2-oxoepérico (4) descritos previamente.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la 2,4-DNFH 5 (Figura 26) mostró en la región de los carbonos  $sp^2$  la señal del carbonilo C-15 del grupo carboxilo en 178.7 ppm, la señal del carbono del grupo imino en 160.1 ppm, así como las señales de los carbonos del doble enlace exocíclico y las del anillo aromático. En la región de los carbonos  $sp^3$ , los desplazamientos fueron similares a los del compuesto carbonílico correspondiente, excepto por las señales de los carbonos cercanos al grupo imino.

Las señales del anillo aromático se asignaron en base a su espectro HETCOR (Figura 27) y los carbonos cuaternarios del anillo se asignaron en base a su espectro HMBC (Figura 28), en donde se observó la correlación entre N-H y las señales de los carbonos C-1DNFH, C-2DNFH y C-6DNFH, otra correlación importante fue la observada entre el N-H y el carbono C-2 del grupo imino.



**Figura 24.** Cromatografía en columna de la 2,4-DNFH 5.



**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) de la 2,4-DNFH **5** en  $\text{CDCl}_3$ .

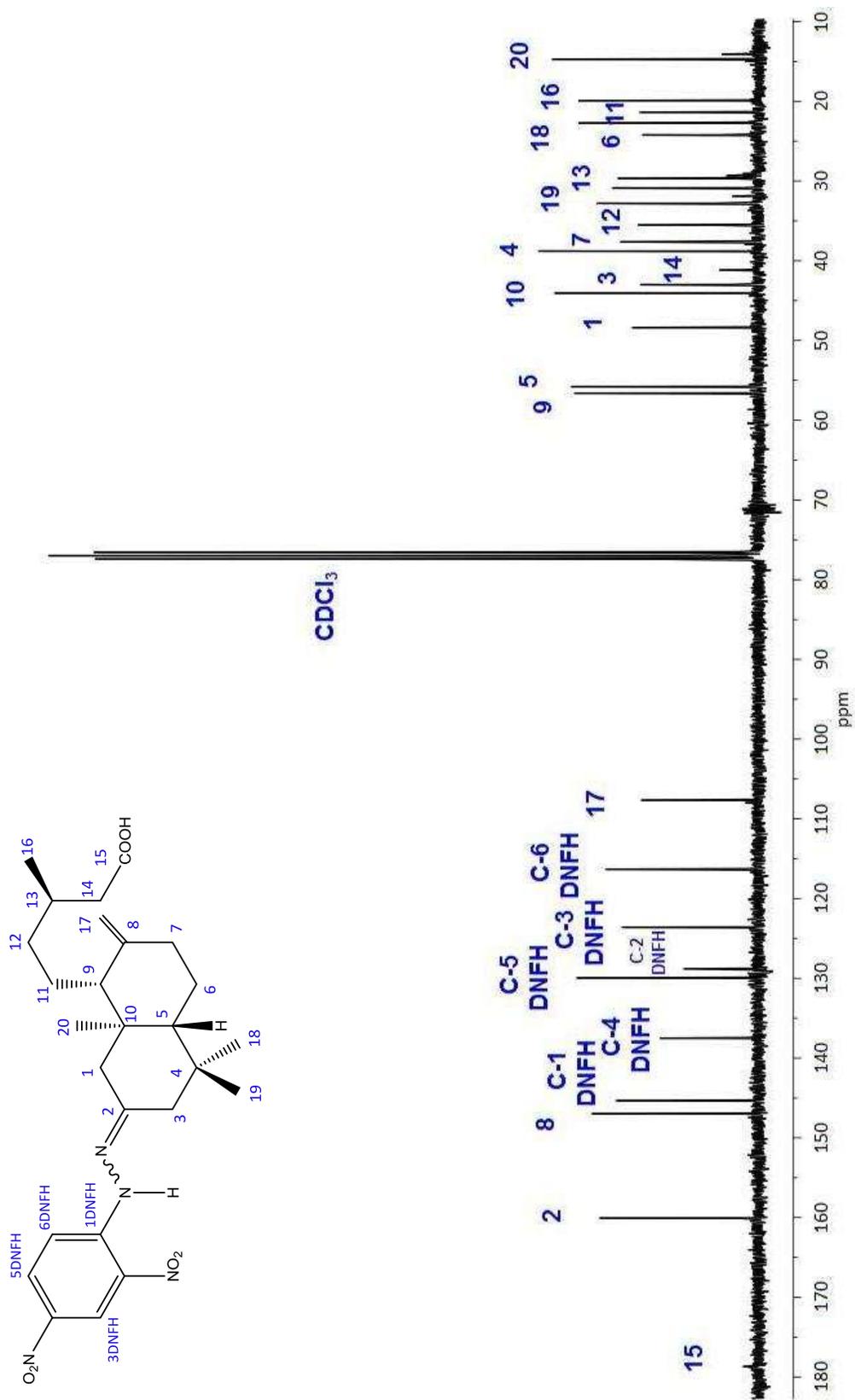


Figura 26. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de la 2,4-DNFH 5 en  $\text{CDCl}_3$ .

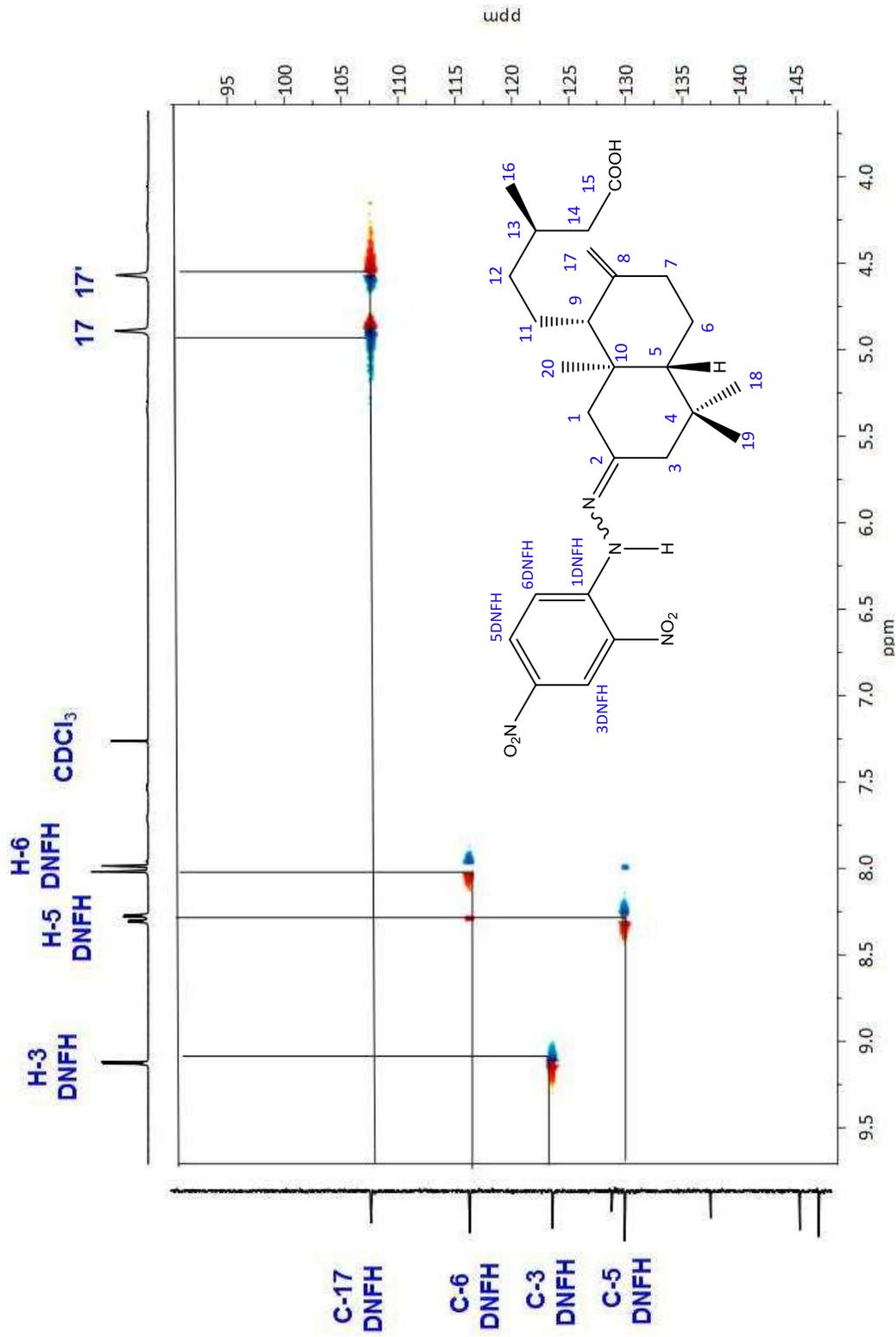


Figura 27. Ampliación del espectro HETCOR de la 2,4-DNFH **5** en CDCl<sub>3</sub>.

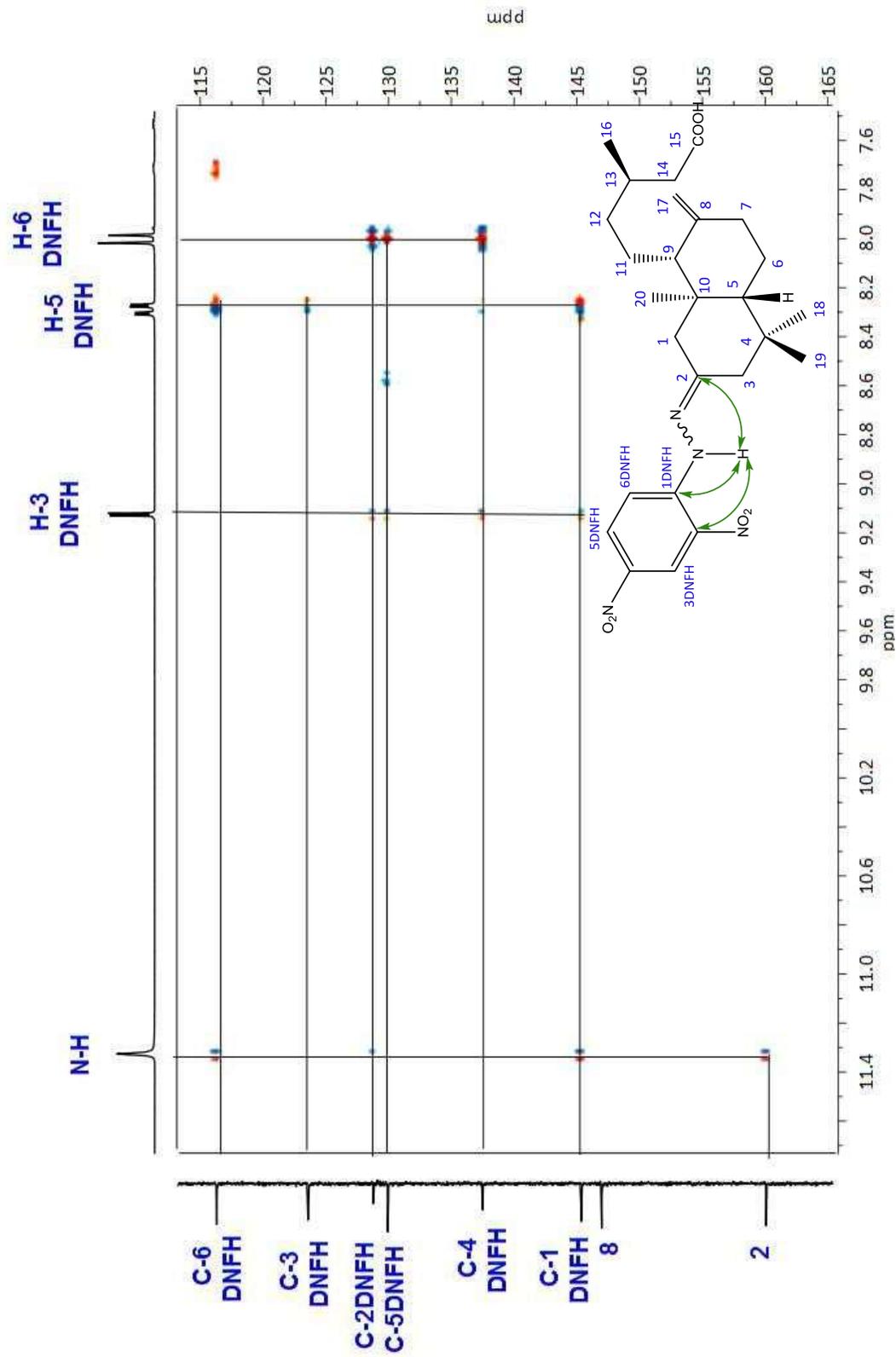
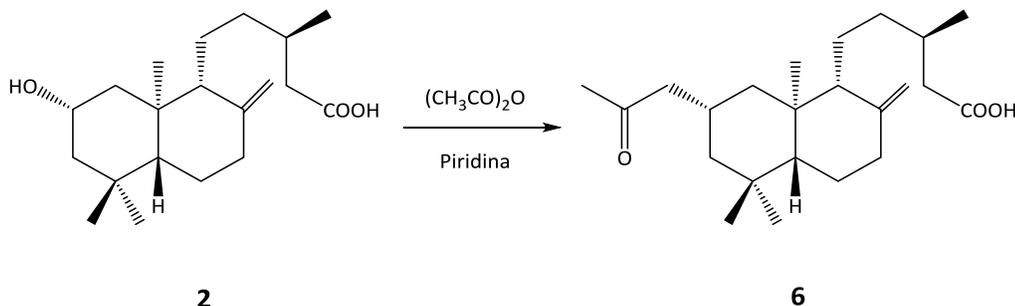


Figura 28. Ampliación del espectro HMBC de la 2,4-DNFH 5 en CDCl<sub>3</sub>.

### 5.5. Esterificación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)

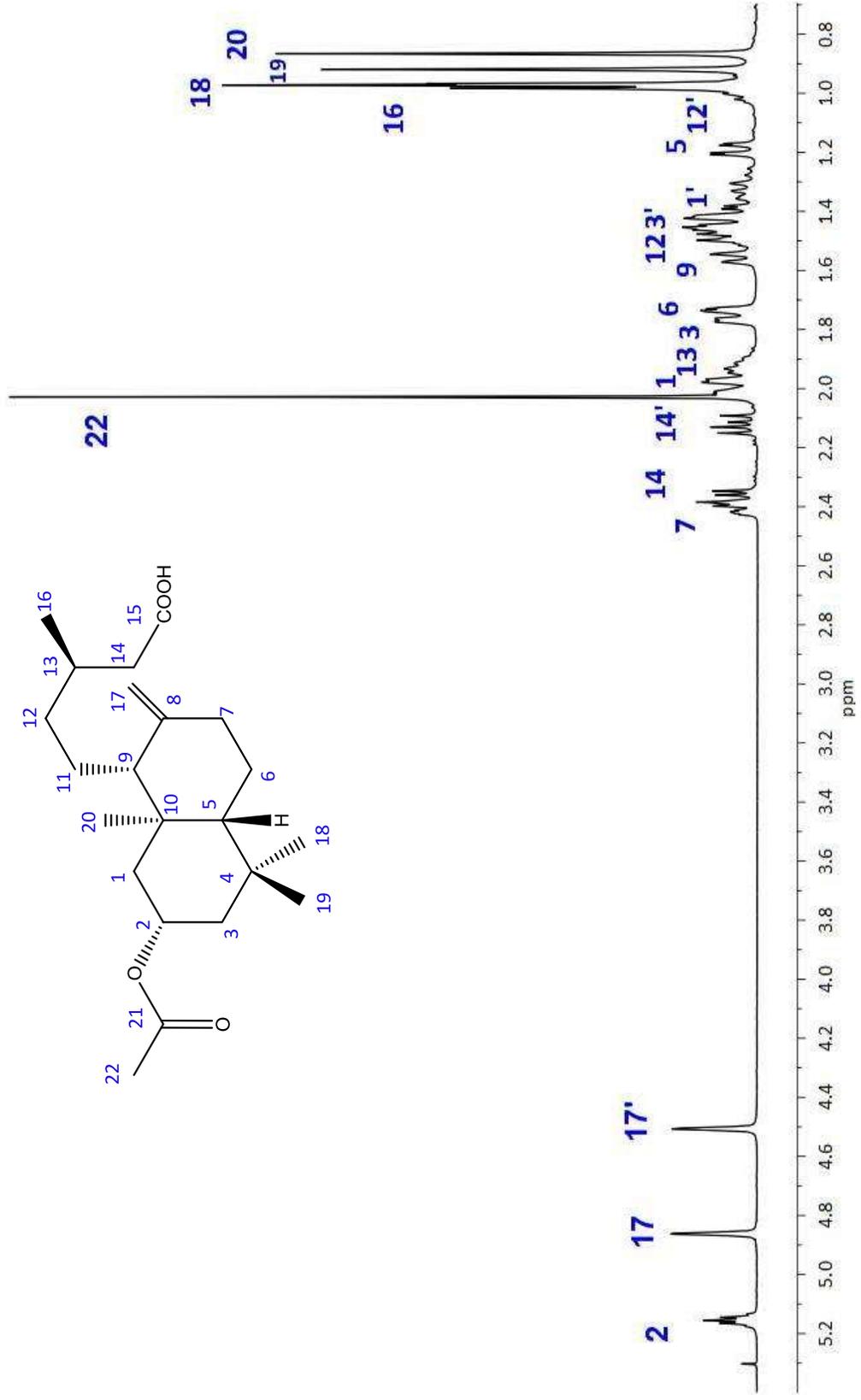
La reacción de esterificación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) con anhídrido acético en presencia de piridina generó como producto al ácido 2 $\alpha$ -acetoxieperuico (**6**), obtenido como una miel incolora.



El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (Figura 29) mostró una señal quintuple en 5.15 ppm ( $J = 4.1$  Hz), correspondiente al hidrógeno base de éster H-2, y la señal del acetato en 2.03 ppm que integra para tres protones.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **6** (Figura 30) mostró dos señales de carbonilo, una en 179.3 ppm correspondiente al ácido carboxílico y otra en 170.6 ppm asignada al carbonilo de éster del acetilo, también resultan importantes las señales en 70.6 ppm del carbono base de éster y en 21.6 ppm la señal que se asignó al metilo del acetilo.

En el espectro NOESY de **6** (Figura 31) se observó interacción en el espacio entre el hidrógeno H-17 y el protón H-7, destacando la correlación que establece el metilo del acetato con el metilo H-18, lo que confirma la posición *alfa* del grupo acetato.



**Figura 29.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) del ácido 2α-acetoxiperuico (6) en CDCl<sub>3</sub>.

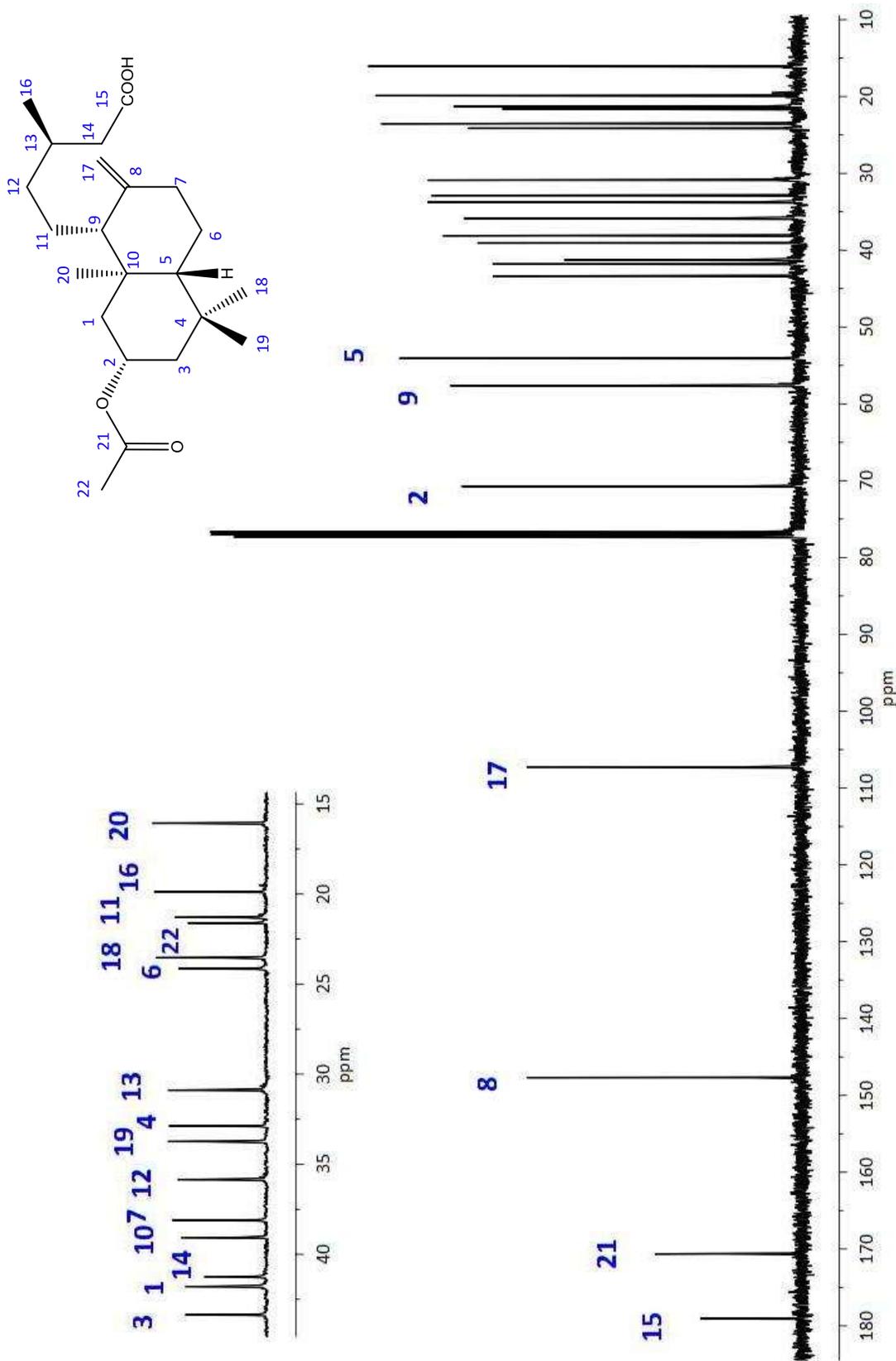
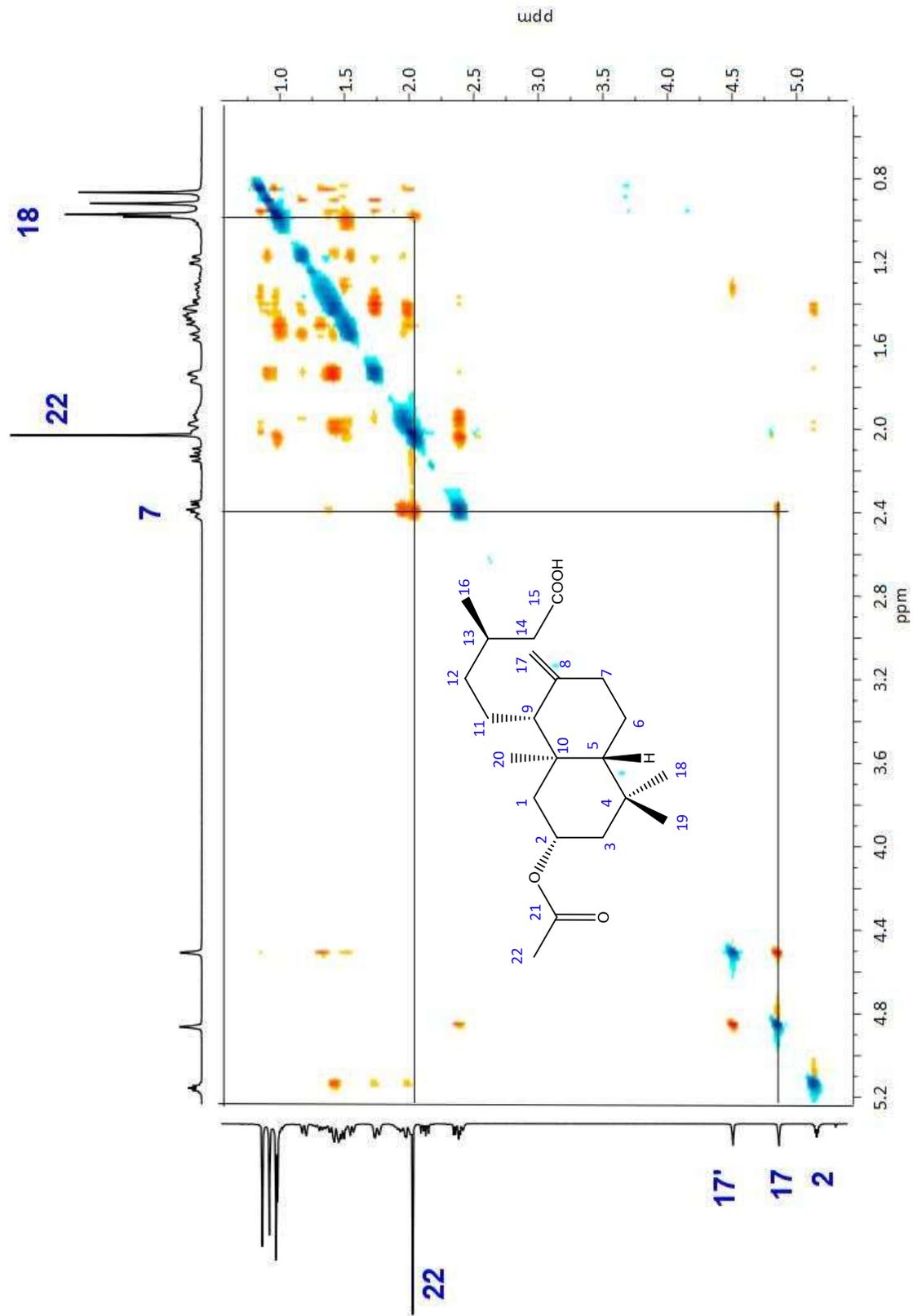


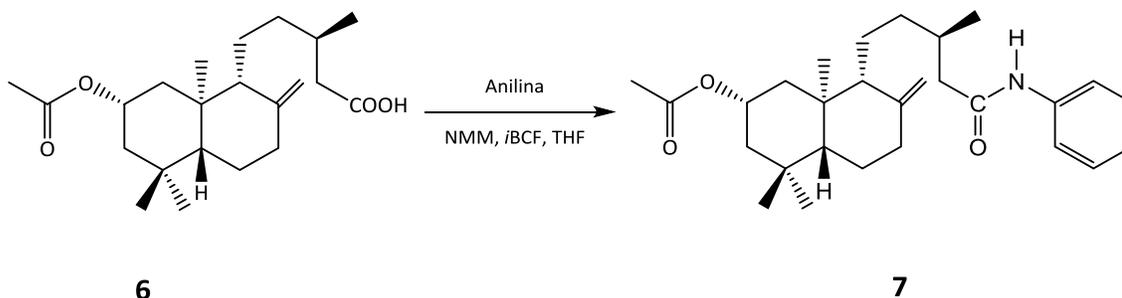
Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del ácido 2- $\alpha$ -acetoxiperuico (6) en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 31.** Ampliación del espectro NOESY del ácido 2α-acetoxiperuico (6) en CDCl<sub>3</sub>.

### 5.6. Preparación de la amida **7** del ácido 2 $\alpha$ -acetoxieperuico (**6**)

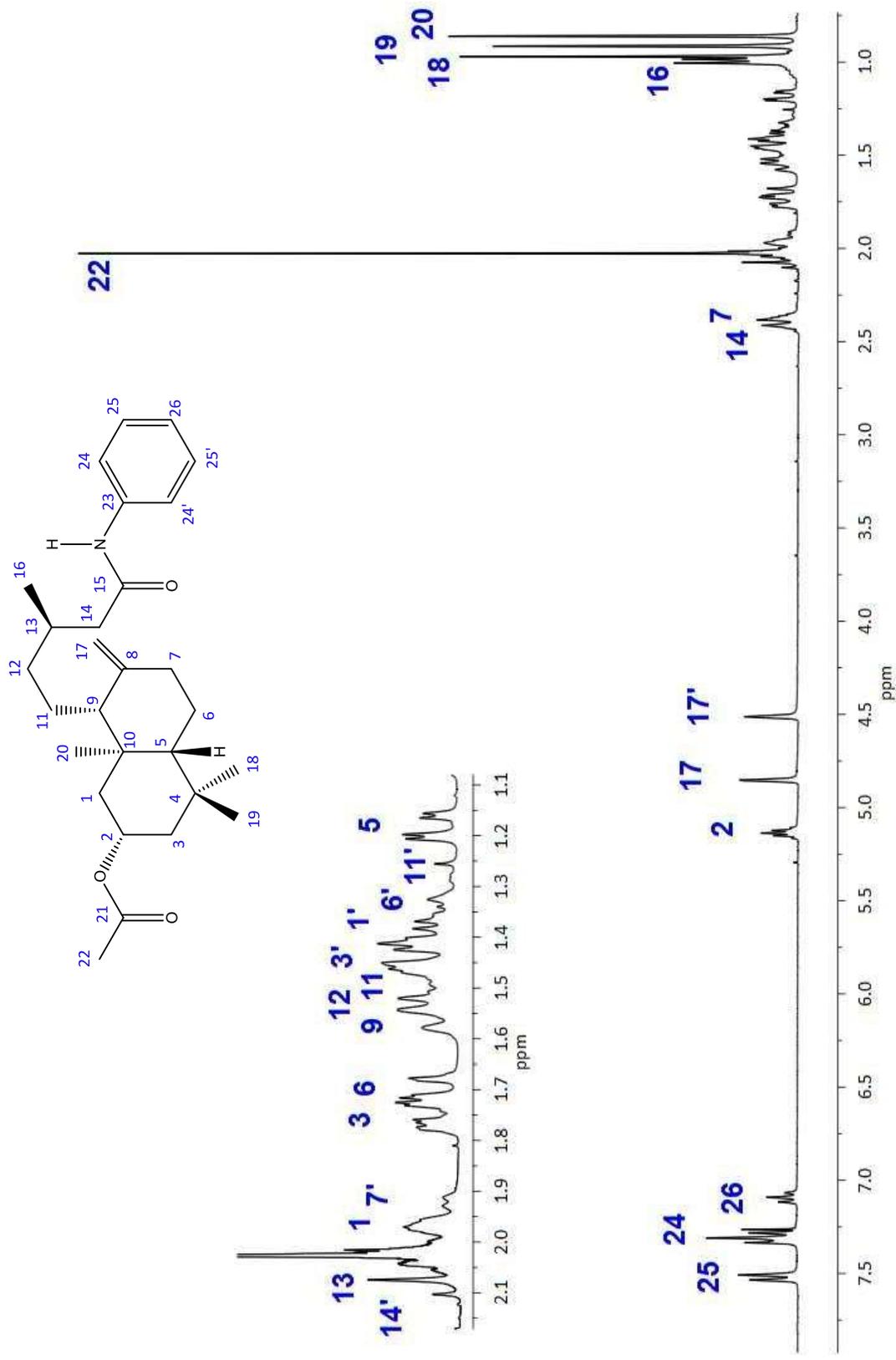
La amida **7** se preparó partiendo del derivado ácido 2 $\alpha$ -acetoxieperuico (**6**) con anilina vía anhídridos mixtos empleando NMM y *i*-BCF para la formación del enlace amida, esta metodología resulta novedosa en el área de productos naturales dado que comúnmente esta reacción es empleada para la síntesis de péptidos.<sup>35</sup>



En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la amida **7** (Figura 32) destacan las señales a frecuencia alta para los hidrógenos aromáticos en 7.52 ppm una señal doble ( $J = 8.2$  Hz) para H-25, en 7.31 ppm como una señal doble de dobles ( $J = 8.2, 7.6$  Hz) para H-24 y en 7.10 ppm una señal triple ( $J = 7.6$  Hz) asignada a H-26, observándose un acoplamiento entre dichas señales.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **7** (Figura 33) se observaron dos señales de carbonilos, una en 170.8 ppm correspondiente al carbonilo de amida C-15 y otra en 170.6 ppm asignada al carbonilo de éster C-21, en la región de los carbonos aromáticos se observaron cuatro señales en  $\delta$  137.9, 128.9, 124.1 y 119.8 que se asignaron a los carbonos C-23, C-24, C-26 y C-25 respectivamente del anillo aromático.

En el espectro HMBC de **7** (Figura 34) se observó una señal de correlación del hidrógeno en posición orto H-24 del anillo aromático con el carbono C-15 del carbonilo del enlace amida, así mismo se observaron las correlaciones de H-24 con el C-23 y C-25, C-25 a su vez presentó correlación con H-26.



**Figura 32.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) de la amida **7** en CDCl<sub>3</sub>.

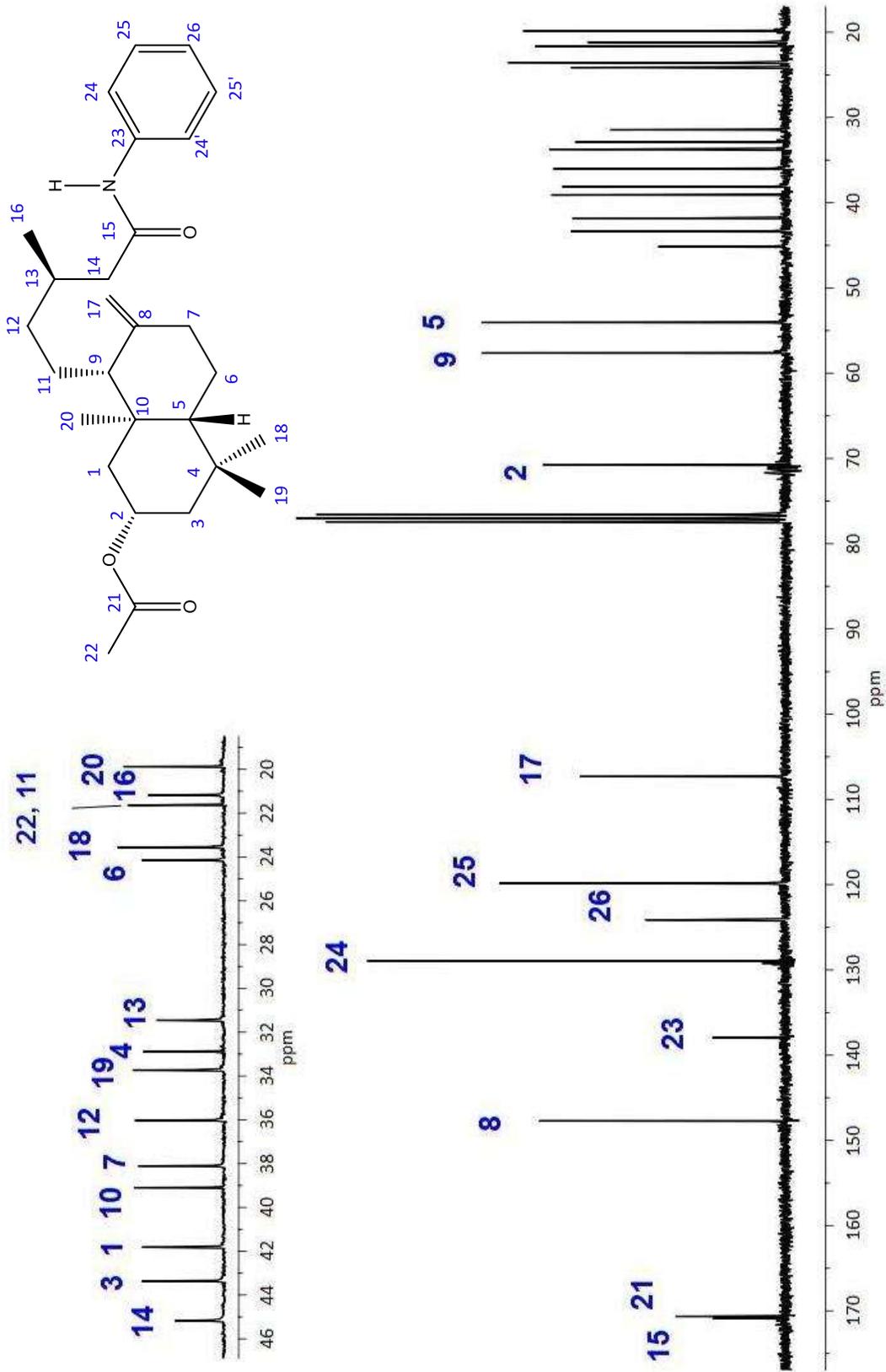
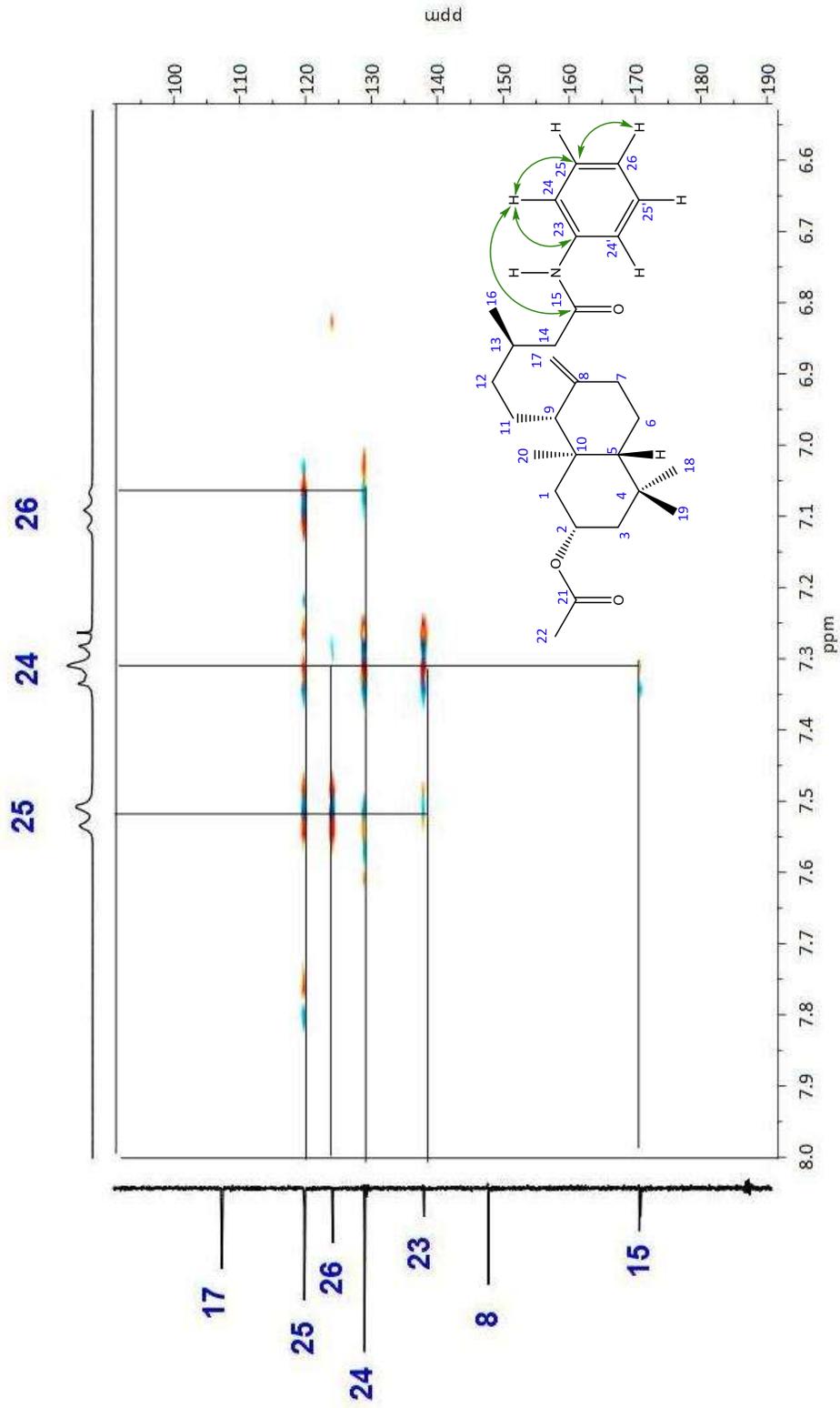


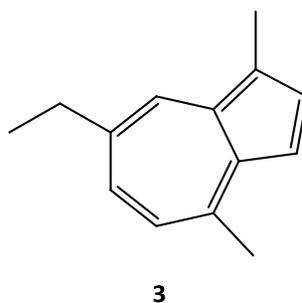
Figura 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de la amida 7 en  $\text{CDCl}_3$ .



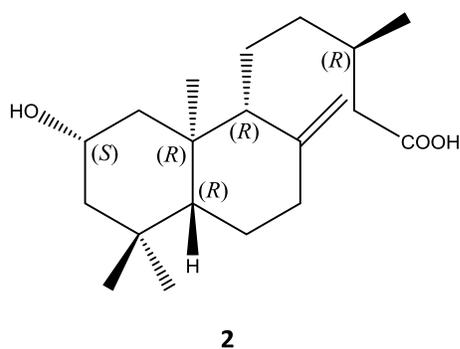
**Figura 34.** Ampliación del espectro HMBC de la amida **7** en  $\text{CDCl}_3$ .

## 6. CONCLUSIONES

Del extracto hexánico de flores de *Ageratina petiolaris* se aisló el chamazuleno (**3**), el cual presentó un color azul característico.

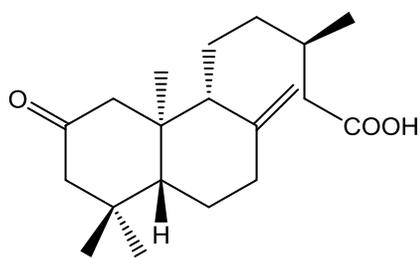


Se estableció la configuración absoluta mediante difracción de rayos X del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) obtenido por hidrólisis alcalina del extracto hexánico de flores de *Ageratina petiolaris* como (2*S*,5*R*,9*R*,10*R*,13*R*), la cual tiene algunas discrepancias con lo reportado en 1983, por lo que es necesario realizar la reasignación de la misma.

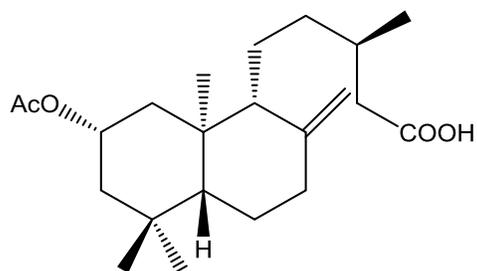


El diterpeno *ent*-labdano **2** resulta de interés desde el punto de vista químico, ya que en su estructura presenta diferentes grupos funcionales los cuales permitieron la obtención de nuevos derivados **4-7**.

Los derivados **4** y **6** se prepararon modificando el grupo hidroxilo en posición C-2 empleando condiciones estándar de reacción.

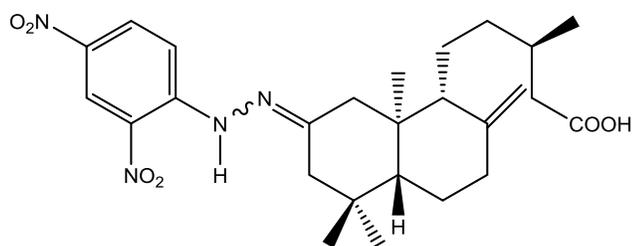


4



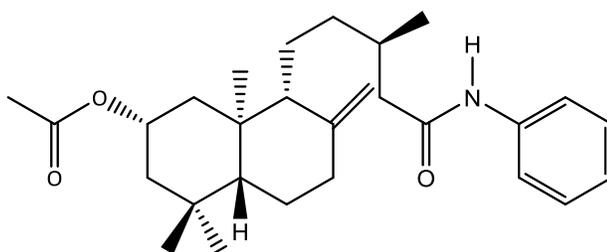
6

La formación del derivado oxidado **4** permitió la obtención de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas del ácido 2-oxoeperuico.



5

Asimismo se realizó la preparación de la amida **7** a partir del derivado acetilado **6**, empleando un activador del grupo carboxilo vía anhídridos mixtos para la formación del enlace amida.



7

La aplicación de esta metodología abre ampliamente el panorama para la síntesis de amidas a partir de productos naturales, en este caso particularmente contribuye de manera significativa extendiendo el conocimiento sobre la reactividad química del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**).

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### **Generalidades**

Para las separaciones cromatográficas en columna abierta se utilizó como fase estacionaria silica gel 60, de 230-400 mallas, y como fase móvil mezclas de disolventes orgánicos en orden ascendente de polaridad. La cromatografía se monitoreo por cromatografía en placa fina, observándose en luz UV y reveladas con sulfato cérico amoniacal.

El punto de fusión se determinó en un equipo Fisher Scientific y no están corregidos.

La rotación óptica del ácido 2-oxoeperuico se determinó empleando un polarímetro Perkin Elmer 341, empleando como disolvente  $\text{CDCl}_3$ .

La obtención del espectro de IR del ácido 2-oxoeperuico se realizó en un espectrofotómetro BUCK Scientific 500, empleando como disolvente  $\text{CDCl}_3$ .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  a 300 MHz y de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz, así como los experimentos HETCOR, COSY, NOESY, y HMBC se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  a 400 MHz y de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz así como los experimentos DEPT, HETCOR, COSY y NOESY se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400. Empleando como disolvente  $\text{CDCl}_3$  y como referencia se utilizó TMS. La multiplicidad de las señales se indica de acuerdo a las siguientes abreviaciones: s (simple), d (doble), t (triple), q (cuádruple), quint (quíntuple) y m (múltiple).

El espectro de masa del ácido 2-oxoeperuico se determinó en un sistema acoplado de cromatografía de gases/espectrometría de masa con trampa iónica Varian Saturno 2000.

El análisis de difracción de Rayos X del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico se llevó a cabo en un difractómetro CAD4 Bruker-Nonius.

La rotación óptica, el espectro de IR, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz y de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz, el espectro de masa y la difracción de Rayos X se determinaron en el Departamento de Química del CINVESTAV-IPN, México, D.F., dentro de los trabajos en colaboración que se realizan con el Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas y el Dr. Pedro Joseph-Nathan.

### ***Colecta de la especie vegetal***

*Ageratina petiolaris* fue colectada el 01 de Marzo de 2014 en San Joaquín Morelos, Municipio de Tlalpujahuá, Michoacán a 2592 msnm (19°44'48.99" Norte, 100°14'45.37" Oeste), cuando se encontraba en floración.

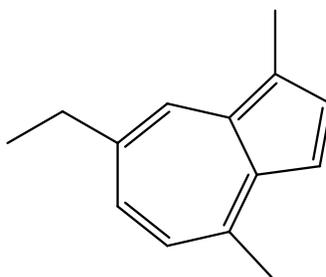
La planta se separó en sus distintas partes (flor, hoja, tallo y raíz), secándose a la sombra para su posterior procesamiento.

### ***Obtención del extracto hexánico de flor de Ageratina petiolaris***

285 g de flores secas, se sometieron a maceración con 3 L de hexano durante 7 días. Se filtró y se concentró en rotavapor, este procedimiento se repitió 4 veces para el mismo lote obteniéndose 26 g de una miel color verde oscuro (9% de rendimiento).

### **Obtención del chamazuleno (3)**

10 g de extracto de flores se sometieron a purificación en columna cromatográfica usando como fase estacionaria gel de sílice de 230-400 mallas y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad, la cromatografía se monitoreo por cromatografía en placa fina, de las fracciones eluídas con hexano se obtuvo un compuesto de color azul, el cual se llevó a recromatografía empleando como fase estacionaria gel de sílice de 230-400 mallas y como fase móvil éter de petróleo.



Miel color azul.

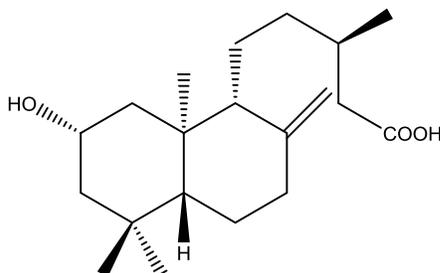
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-8), 7.62 (1H, d,  $J = 4.0$ Hz, H-2), 7.38 (1H, dd,  $J = 10.8, 1.6$  Hz, H-6), 7.22 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-3), 6.98 (1H, d,  $J = 10.8$  Hz, H-5), 2.84 (2H, q,  $J = 7.4$ Hz, H-11), 2.83 (3H, s, H-10), 2.65 (3H,s, H-9), 1.34 (3H, t,  $J = 7.6$ , H-12).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  144.3 (C, C-4), 137.4 (C, C-1), 136.4 (CH, C-6), 136.2 (C, C-3a), 136.1 (CH, C-2), 135.7 (C, C-7), 134.7 (CH, C-8), 125.0 (C, C-8a), 124.9 (CH, C-5), 33.8 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 24.1 ( $\text{CH}_3$ , C-10), 17.4 ( $\text{CH}_3$ , C-12), 12.9 ( $\text{CH}_3$ , C-9).

### **Obtención del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)**

En un matraz balón se disolvieron 10 g de extracto hexánico de flor de *Ageratina petiolaris* en 100 mL de metanol, se agregaron 10 g de hidróxido de potasio y 1 ml de agua. La mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 4 horas, se agregaron 170 mL de ácido clorhídrico al 10% hasta llegar a un pH de 3. Se vertió sobre hielo y se extrajo con

acetato de etilo en un embudo de separación. Se lavó 4 veces con agua agitando ligeramente y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se concentró en rotavapor hasta sequedad y se obtuvo un producto verde. El producto de la reacción se sometió a cromatografía en columna abierta. De las fracciones eluidas (Hex:AcOEt, 7:3) se obtuvieron 1.67 g del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico en forma de agujas con 17% de rendimiento.



Agujas incoloras, p.f 127-128°C.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.84 (1H, s, H-17), 4.50 (1H, s, H-17'), 4.17 (1H, quint,  $J = 5.4$  Hz, H-2), 2.39 (1H, m, H-7) 2.39 (1H, dd,  $J = 14.7, 5.4$  Hz, H-14), 2.12 (1H, dd,  $J = 14.7, 8.4$  Hz, H-14'), 1.95 (1H, m, H-7'), 1.94 (1H, m, H-13), 1.77 (1H, m, H-1), 1.71 (1H, m, H-6), 1.64 (1H, m, H-3), 1.61 (1H, m, H-1'), 1.57 (1H, m, H-9), 1.51 (1H, m, H-12), 1.49 (1H, m, H-3'), 1.48 (1H, m, H-11), 1.42 (1H, m, H-6'), 1.15 (2H, dd,  $J = 12.5, 2.8$  Hz, H-5), 1.03 (1H, m, H-12'), 0.99 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-20).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.9 (C=O, C-15), 148.0 (C, C-8), 107.0 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 67.8 (CH, C-2), 57.6 (CH, C-9), 53.1 (CH, C-5), 46.4 ( $\text{CH}_2$ , C-3), 45.7 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 41.3 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 39.7 (C, C-10), 38.1 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 36.0 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 33.3 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 33.0 (C, C-4), 30.9 (CH, C-13), 24.6 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 24.5 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 21.5 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 19.9 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 17.3 ( $\text{CH}_3$ , C-20).

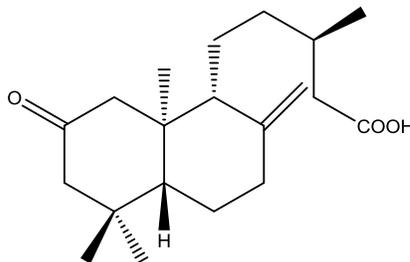
## ***Oxidación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)***

### *OXIDACIÓN CON CrO<sub>3</sub>*

En un matraz Erlenmeyer se disolvió 1 g de ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico en 2 mL de ácido acético glacial concentrado, por separado se disolvió 1 g de trióxido de cromo en 2 mL de ácido acético glacial y se colocaron en baño de hielo. Posteriormente se vertió el trióxido de cromo disuelto sobre la muestra, se agitó y dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con éter etílico en un embudo de separación. Se lavó 4 veces con agua agitando ligeramente y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se concentró en rotavapor y se obtuvo una miel color ámbar. El producto de la reacción se sometió a purificación en columna cromatográfica. De las fracciones eluidas (Hex:AcOEt, 8:2) se obtuvieron 120 mg de cristales incoloros con un rendimiento del 12%.

### *OXIDACIÓN CON REACTIVO DE JONES*

En un matraz balón se disolvió 1 g de ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico en 5 mL de acetona y se colocó sobre baño de hielo, se adicionó 1 mL del reactivo de Jones gota a gota con agitación, posterior a la adición se retiró del baño y la mezcla se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. El crudo de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo en un embudo de separación. Se lavó 4 veces con agua agitando ligeramente, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró. Obteniendo un producto con un ligero color azul verdoso en forma de cristales. El producto de la reacción se sometió a columna cromatográfica. De las fracciones eluidas (Hex:AcOEt, 8:2) se obtuvieron 757 mg cristales incoloros con un rendimiento de 76%.



Cristales incoloros, p.f. 70-75°C.

$[\alpha]_{589} -35$ ,  $[\alpha]_{578} -37$ ,  $[\alpha]_{546} -43$ ,  $[\alpha]_{436} -91$ ,  $[\alpha]_{365} -222$  (c 4.09, CHCl<sub>3</sub>).

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{m\acute{a}x}$  3400-2500, 1702, 1642 y 1270 cm<sup>-1</sup>

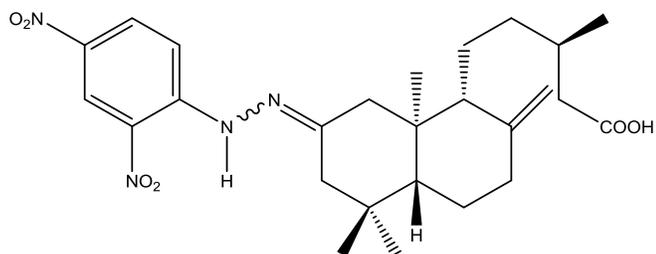
RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4.89 (1H, s, H-17), 4.55 (1H, s, H-17'), 2.46 (1H, m, H-7), 2.44 (1H, m, H-1), 2.34 (1H, m, H-3), 2.34 (1H, m, H-14), 2.22 (1H, m, H-1'), 2.17 (1H, m, H-3'), 2.12 (1H, m, H-14'), 2.05 (1H, m, H-7'), 1.93 (1H, m, H-13), 1.82 (1H, m, H-6), 1.82 (1H, m, H-9), 1.66 (1H, dd,  $J = 12.4, 2.6$  Hz, H-5), 1.54 (1H, m, H-12), 1.40 (1H, m, H-6'), 1.38 (1H, m, H-11), 1.06 (3H, s, H-19), 1.00 (1H, m, H-12'), 0.97 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-16), 0.85 (3H, s, H-18), 0.69 (3H, s, H-20).

RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  212.0 (C=O, C-2), 179.1 (C=O, C-15), 146.9 (C, C-8), 107.7 (CH<sub>2</sub>, C-17), 56.7 (CH, C-9), 56.2 (CH<sub>2</sub>, C-3), 54.8 (CH, C-5), 54.1 (CH<sub>2</sub>, C-1), 45.0 (C, C-10), 41.3 (CH<sub>2</sub>, C-14), 39.0 (C, C-4), 37.7 (CH<sub>2</sub>, C-7), 35.5 (CH<sub>2</sub>, C-12), 33.4 (CH<sub>3</sub>, C-19), 30.7 (CH, C-13), 24.4 (CH<sub>2</sub>, C-6), 23.1 (CH<sub>3</sub>, C-18), 21.2 (CH<sub>2</sub>, C-11), 19.8 (CH<sub>3</sub>, C-16), 15.2 (CH<sub>3</sub>, C-20).

EIMS  $m/z$  320 [M]<sup>+</sup> (4), 304 (31), 288 (26), 269 (12), 247 (5), 222 (14), 203 (19), 191 (35), 161 (13), 151 (100), 135 (25), 123 (39), 107 (58).

#### ***Preparación de la 2,4-difenilhidrazona (5) del ácido 2-oxoeperuico (4)***

113 mg del ácido 2-oxoeperuico (**4**) se disolvieron en 2.5 mL de etanol, por separado se preparó una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina (103 mg) en ácido sulfúrico (1mL), agua (1mL) y etanol (2.5mL), con la cual se trató el ácido 2-oxoeperuico. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas obteniendo cristales de color naranja, los cuales se sometieron a purificación en cromatografía en columna de las fracciones eluidas (CHCl<sub>3</sub>:AcOEt, 8:2) se obtuvo la 2,4-DNFH **5**.



Agujas amarillas.

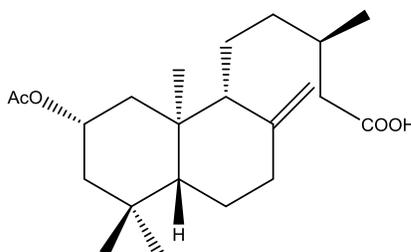
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.32 (1H, s, N-H), 9.14 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3DNFH), 8.30 (1H, dd,  $J = 9.4, 2.4$  Hz, H-5DNFH), 8.02 (1H, d,  $J = 9.4$  Hz, H-6DNFH), 4.90 (1H, s, H-17), 4.58 (1H, s, H-17'), 2.68 (1H, m, H-1), 2.65 (1H, m, H-3), 2.45 (1H, m, H-7), 2.40 (1H, dd,  $J = 14.7, 5.3$  Hz, H-14), 2.18 (1H, dd,  $J = 14.7, 8.8$  Hz, H-14'), 2.14 (1H, m, H-1'), 2.04 (1H, m, H-3'), 2.04 (1H, m, H-7'), 1.98 (1H, m, H-13), 1.81 (1H, m, H-6), 1.80 (1H, m, H-9), 1.55 (1H, m, H-12), 1.54 (1H, dd,  $J = 12.3, 2.5$  Hz, H-5), 1.48 (2H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-6'), 1.14 (3H, s, H-19), 1.06 (1H, m, H-12'), 1.02 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-16), 0.84 (3H, s, H-18), 0.70 (3H, s, H-20).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.7 (C=O, C-15), 160.1 (CH, C-2), 147.0 (C, C-8), 145.3 (C-1DNFH), 137.5 (C-4DNFH), 129.9 (C-5DNFH), 128.8 (C-2DNFH), 123.6 (C-3DNFH), 116.3 (C-6DNFH), 107.6 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 56.6 (CH, C-9), 55.7 (CH, C-5), 48.3 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 44.0 (C, C-10), 43.0 ( $\text{CH}_2$ , C-3), 41.1 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 38.8 (C, C-4), 37.6 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 35.5 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 32.8 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 30.8 (CH, C-13), 24.2 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 22.7 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 21.3 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 19.9 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 14.7 ( $\text{CH}_3$ , C-20).

### ***Esterificación del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (2)***

Se disolvieron 1.409 g del ácido 2 $\alpha$ -hidroxieperuico (**2**) en 10 mL de piridina, y se agregaron 5 mL de anhídrido acético, se calentó en baño de vapor durante 24 horas. Se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó 3 veces con ácido clorhídrico al 10% y 4 veces con agua agitando ligeramente, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró. Obteniendo un crudo de reacción con un ligero color ámbar. El

producto de la reacción se purificó en columna cromatográfica. De las fracciones eluidas (Hex:AcOEt ,8:2) se obtuvo 1.332 g de una miel incolora con un 84% de rendimiento.



Miel incolora

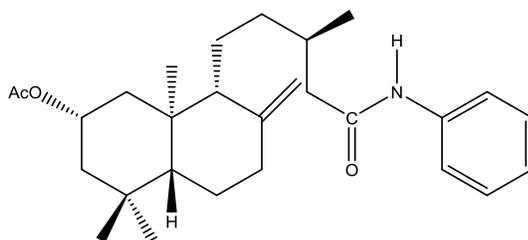
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.15 (1H,quínt,  $J = 4.4$  Hz, H-2), 4.86 (1H, s, H-17), 4.51 (1H, s, H-17'), 2.38 (2H, m, H-7), 2.37 (1H, dd,  $J = 14.9, 5.4$  Hz, H-14), 2.12 (1H, dd,  $J = 14.9, 8.4$ , H-14'), 2.03 (3H, s, H-22), 1.99 (1H, m, H-1), 1.93 (1H, m, H-13), 1.70 (1H, m, H-6), 1.70 (1H, m, H-3), 1.50 (1H, m, H-9), 1.47 (1H, m, H-12), 1.45 (1H, m, H-3'), 1.42 (1H, m, H-1'), 1.42 (1H, m, H-6'), 1.89 (1H, dd,  $J = 12.5, 2.6$  Hz, H-5), 1.0 (1H, m, H-12'), 0.98 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-20).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.3 (C=O, C-15), 170.6 (C=O, C-21), 147.6 (C, C-8), 107.1 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 70.6 (CH, C-2), 57.5 (CH, C-9), 54.0 (CH, C-5), 43.3 ( $\text{CH}_2$ , C-3), 41.7 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 41.3 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 39.0 (C, C-10), 38.1 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 35.8 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 33.7 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 32.8 (C, C-4), 30.9 (CH, C-13), 24.1 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 23.5 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 21.6 ( $\text{CH}_3$ , C-22), 21.2 ( $\text{CH}_2$ , C-11) 19.8 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 16.0 ( $\text{CH}_3$ , C-20).

### ***Preparación de la amida 7 del ácido 2 $\alpha$ -acetoxieperuico (6)***

Se colocaron 216 mg del ácido 2 $\alpha$ -acetoxieperuico (6) en matraz de tres bocas seco provisto con una barra magnética, se cerró, se hizo pasar corriente de nitrógeno en el sistema y se adiciono THF, se colocó en baño de hielo en agitación durante 10 minutos, se agregó 0.7 mL de NMM gota a gota se sometió a agitación durante 20 minutos, se adicionó iBCF gota a gota y se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Por separado se preparó una solución de anilina (55 mg) en THF (3mL) y NMM (0.7 mL) la cual se agregó

gota a gota a la mezcla que contenía al ácido carboxílico y se dejó durante 24 horas en agitación. Transcurrido este tiempo la reacción se extrajo con acetato de etilo, se lavó 2 veces con solución de HCl al 10% y 3 veces con agua, secándose con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró en rotavapor. El producto de reacción se sometió a cromatografía en columna. En las fracciones eluidas (Hex:AcOEt, 8:2) se obtuvieron 60 mg de la amida correspondiente con un rendimiento del 23%.



RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.52 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-25), 7.31 (1H, dd,  $J = 8.2, 7.6$  Hz, H-24), 7.10 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-26), 5.14 (1H, quint,  $J = 4.4$  Hz, H-2), 4.85 (1H, s, H-17), 4.52 (1H, s, H-17'), 2.39 (1H, m, H-14), 2.39 (1H, m, H-7), 2.05 (1H, m, H-14'), 2.05 (1H, m, H-13), 2.02 (3H, s, H-22), 2.00 (1H, m, H-1), 1.95 (1H, m, H-7'), 1.74 (1H, m, H-3), 1.74 (1H, m, H-6), 1.56 (1H, m, H-9), 1.51 (1H, m, H-12), 1.49 (1H, m, H-11), 1.43 (1H, m, H-3'), 1.43 (1H, m, H-1'), 1.39 (1H, m, H-6'), 1.34 (1H, m, H-11'), 1.18 (1H, dd,  $J = 12.3, 2.4$  Hz, H-5), 1.01 (1H, m, H-12'), 0.99 (3H, d,  $J = 5.9$  Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.8 (C=O, C-15), 170.6 (C=O, C-21), 147.7 (C, C-8), 137.9 (C, C-23), 128.9 (CH, C-24), 124.1 (CH, C-26), 119.8 (CH, C-25), 107.3 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 70.7 (CH, C-2), 57.6 (CH, C-9), 54.0 (CH, C-5), 45.1 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 43.3 ( $\text{CH}_2$ , C-3), 41.8 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 39.0 (C, C-10), 38.1 ( $\text{CH}_2$ , C-7), 36.0 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 33.7 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 32.8 (C, C-4), 31.4 (CH, C-13), 24.1 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 23.5 ( $\text{CH}_3$ , C-18), 21.6 ( $\text{CH}_3$ , C-22), 21.1 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 19.8 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 16.0 ( $\text{CH}_3$ , C-20).

**8. TABLA DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO DE <sup>13</sup>C DE LOS  
COMPUESTOS TIPO LABDANO**

| <b>Posición</b> | <b>2</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1               | 45.7     | 54.1     | 48.3     | 41.7     | 41.8     |
| 2               | 67.8     | 212.0    | 160.1    | 70.6     | 70.7     |
| 3               | 46.4     | 56.2     | 43.0     | 43.3     | 43.3     |
| 4               | 33.0     | 39.0     | 38.8     | 32.8     | 32.8     |
| 5               | 53.1     | 54.8     | 55.7     | 54.0     | 54.0     |
| 6               | 24.5     | 24.4     | 24.2     | 24.1     | 24.1     |
| 7               | 38.1     | 37.7     | 37.6     | 38.1     | 38.1     |
| 8               | 148.0    | 146.9    | 147.0    | 147.6    | 147.7    |
| 9               | 57.6     | 56.7     | 56.6     | 57.5     | 57.6     |
| 10              | 39.7     | 45.0     | 44.0     | 39.0     | 39.0     |
| 11              | 21.5     | 21.2     | 21.3     | 21.2     | 21.1     |
| 12              | 36.0     | 35.5     | 35.5     | 35.8     | 36.0     |
| 13              | 30.9     | 30.7     | 30.8     | 30.9     | 31.4     |
| 14              | 41.3     | 41.3     | 41.1     | 41.3     | 45.1     |
| 15              | 178.9    | 179.1    | 178.7    | 179.3    | 170.8    |
| 16              | 19.9     | 19.8     | 19.9     | 19.8     | 19.8     |
| 17              | 107.0    | 107.7    | 107.6    | 107.1    | 107.3    |
| 18              | 24.6     | 23.1     | 22.7     | 23.5     | 23.5     |
| 19              | 33.3     | 33.4     | 32.8     | 33.7     | 33.7     |
| 20              | 17.3     | 15.2     | 14.7     | 16.0     | 16.0     |
| 21              |          |          |          | 170.6    | 170.6    |
| 22              |          |          |          | 21.6     | 21.6     |
| 23              |          |          |          |          | 137.9    |
| 24              |          |          |          |          | 128.9    |
| 25              |          |          |          |          | 119.8    |
| 26              |          |          |          |          | 124.1    |
| C-1DNFH         |          |          | 145.3    |          |          |
| C-2DNFH         |          |          | 128.8    |          |          |
| C-3DNFH         |          |          | 123.6    |          |          |
| C-4DNFH         |          |          | 137.5    |          |          |
| C-5DNFH         |          |          | 129.9    |          |          |
| C-6DNFH         |          |          | 116.3    |          |          |

## 9. REFERENCIAS

1. Kapchan, M. Drugs from Natural Products—Plant Sources. *Drug Discovery*, **1971**, 1-13.
2. Kauffman, G. Medicines and Drugs from Plants. *J. Chem. Educ.*, **1997**, 74, 857-860.
3. Carlson E. Natural Products as Chemical Probes. *ACS Chem. Biol.*, **2010**, 5, 639-653
4. Molinski, T. All Natural: The Renaissance of Natural Products Chemistry. *Org. Lett.*, **2014**, 16, 3849–3855.
5. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3<sup>a</sup> ed. *Wiley*, **2009**
6. Aharoni A.; Galili G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*. *Wiley*, **2011**, 22, 239–244.
7. Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiología Vegetal, 3<sup>a</sup> ed. *Artmed*, **2006**, 529-536.
8. Primo Y.E., Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. *Réverte*, **1995**, 851-859.
9. Martínez, S. I.; Castillo, G. E. Manual de Fitoterapia. *Elsevier*, **2007**, 25-33.
10. Kumaran A. P.; Tyo, K.; Carlsen, S.; Mucha, O.; Heng, P. T.; Stephanopoulos, G. Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. *Mol. Pharm.* **2008**, 5, 167–190.
11. Bruneton, J. Farmacognosia, Fotoquímica Plantas Medicinales, 2<sup>a</sup> ed. *Acribia*. **2001**, 455-466, 629-652.
12. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach, 3<sup>a</sup> ed. *Wiley*, **2009**.
13. Claramunt, V.; Farrán, M.; López, G.; Pérez, T. Santa María G. Química Bioorganica y Productos Naturales. *Universidad Nacional de Educación a Distancia*, **2013**, 256.

14. Walter, P. M.; Theoduloz, C.; Bastías, M.; Schmeda-Hirschmann, G. Dimeric Labdane Diterpenes: Synthesis and Antiproliferative Effects. *Molecules*, **2013**, *18*, 5936-5953.
15. Roque, F. M. Diterpenos del Género *Eupatorium*, Tesis de Licenciatura. **2008**, Morelia Michoacán, México.
16. Alvarez-Manzaneda, R. E.; Romera, S. J.; Chahboun, R. A New Route toward 7-Oxo-13-hydroxy-8,11,13-podocarpatrienes from Labdane Diterpenes. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 563-566.
17. Silveira, M. C.; Abreu, G. O.; Lobato, M. M.; Debortoli, L.; Gontijo, J.; Guimaraes, F.; Goncalves, S.; Spangler, A. M.; Leomar, Z. C.; Souza-Fagundes, E. M.; Barbosa-Stancioli, E. F. A reduction of viral mRNA, proteins and induction of altered morphogenesis reveals the anti-HTLV-1 activity of the labdane-diterpene myriadenolide in vitro. *BMC Microbiology*, **2014**, *14*, 331.
18. Girón, N.; Través, P. G.; Rodríguez, B.; López-Fontal, R.; Boscá, L.; Hortelano, S.; Heras, B. Suppression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids. *TAAP, Elsevier*, **2008**, *228*, 179-189.
19. Frijia M. T.; Frade F. M.; Afonso A. M. Isolation, Chemical, and Biotransformation Routes of Labdane-type Diterpenes. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4418–4452.
20. González, A. G.; Rodríguez, P. E.; Díaz, J. G.; Bermejo, B. J. Absolute stereochemistry of salvic acid and related diterpenes. *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 609-611.
21. Brito, B.; Arana, C. Cariotipos preliminares de Perú basados en la distribución de la familia Asteraceae. *Darwiniana*, **2014**, 39-56.
22. Rahman, D. S.; Nurul, A. M.; Adnan, T.; Naim, U. Shahid-Ud-Daula, A.; Sarwar, G.; Shohel, H. Investigation of analgesic potential and in vitro antioxidant activity of two plants of Asteraceae family growing in Bangladesh. *JPR, Elsevier*, **2013**, *6*, 599-603.
23. García, R. G. New distribution records of compositae from Aguascalientes, México. *Acta Botánica Mexicana*, **1999**, *46*, 1-17.

24. Barreda, V. D.; Palazzesi, L.; Katinas, L.; Crisci, J. V.; Tellería, M. C.; Bremer, K.; Passsala, M. G.; Bechis, F.; Corsolini, R. An extinct Eocene taxón of the daisy family (Asteraceae): evolutionary, ecological and biogeographical implications. *Annals of Botany*, **2012**, *109*, 127–134.
25. Turner, B. L. Four new species of *Ageratina* (Asteraceae: Eupatorieae) from Oaxaca, México. *Phytologia*, **2010**, *92*, 388-399.
26. Rzedowski, G. C.; Rzedowski, J. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed., *Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, **2005**, 797.
27. Calderón, J. S.; Quijano, L.; Garduño, M.; Gómez, F.; Ríos, T. 2 $\alpha$ -iso-Valeroyloxyeperuicacid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*. *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 2617-2619.
28. McMurry, J. Química Orgánica, 8ª ed. *Cengage learning*, **2012**.
29. Santiago, J. F. Cinética y mecanismo de la reacción de oxidación del 1, 2-etanodiol, 1,3-propanodiol y 2,3-Butanodiol por hexacianoferrato (III) alcalino catalizada por tricloruro de rutenio. *Universidad de Castilla-La Mancha*. **1995**, 109.
30. Carey F.A. Química Orgánica. *McGraw Hill*
31. Wang, D.; Zhang, Z. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Carboxylic Anhydrides with Organozinc Reagents. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 4645-4648.
32. Camps, G. P.; Vázquez, C. S.; Escolano, M. C. Fundamentos de síntesis de fármacos. *Universidad de Barcelona*, **2005**.
33. Román-Marín, L. U., Mora, Y., Hernández-Hernández, J. D. *Stevia serrata*, a source of chamazulene. *Fitoterapia*, **1990**, *61*, 84
34. García-Gutiérrez, H. A., Román-Marín, L. U., Hernández-Hernández, J. D., Cerda-García-Rojas, C. Preparación de bases de Shiiff y transposición de Beckmann en derivados de longipinano. *Rev. Latinoamer. Quím.*, **2012**, *40*, 210-224
35. Bailey, P. D. An Introduction to Peptide Chemistry. *Wiley*, **1997**