UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“PREPARACIÓN DE UNA BETA-LACTONA A PARTIR DEL ÁCIDO KERLÍNICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA

LEONARDO RENÉ ÁLVAREZ GARCÍA

DIRECTORAS

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

M.C. EVA ESTHEFANY SOTO GUZMÁN

MORELIA, MICHOACÁN DICIEMBRE 2023

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres. Las personas más importantes en mi vida, ***René Álvarez Martínez*** y ***Marilú García Zarco***, por su apoyo y amor incondicional. Esta tesis es una forma de agradecimiento hacia ustedes.

A mi hermana, ***Leticia Álvarez García***, por ser una gran amiga; juntos hemos construido momentos inolvidables y es uno de los seres más importantes en mi vida. Igualmente, a mi sobrino ***Saul***, quien me ha dado grandiosos momentos de alegría.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, a la Facultad de Químico Farmacobiología y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada como ayudante de investigador SNII 3.

Agradezco a la D.C. ***Rosa Elva Norma del Río Torres***, profesora e investigadora de excelencia, a quien admiro y aprecio porque siempre ha sido un ejemplo de motivación e inspiración en mi desarrollo personal y profesional, por ejercer tan bella profesión y compartir vivencias únicas y enseñanzas magnificas al encaminarme en el estudio químico de las plantas, y sobre todo por su amistad. También expreso mi agradecimiento por su apoyo con el estímulo económico otorgado como Ayudante de Investigador.

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo incondicional de la M.C. ***Eva Esthefany Soto Guzmán***, quien es una investigadora extraordinaria y una amiga fenomenal. Agradezco el tiempo, paciencia y compromiso que dedico en instruirme, creando un nivel de seguridad y confianza inimaginable que permitió crecer mis habilidades. Valoro todos sus consejos y enseñanzas que actualmente son base fundamental de mi desarrollo personal y académico. Realmente no encuentro palabras suficientes para expresar mi agradecimiento.

Estoy muy agradecido con el D.C. ***Armando Talavera Alemán***, su conocimiento, experiencia y sabiduría han sido una fuente constante de inspiración y motivación en mi camino académico. Además, quiero agradecer por su paciencia, por brindarme confianza en mis capacidades y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con determinación y optimismo.

Me gustaría agradecer a mi comité sinodal conformado por el D.C. ***Armando Talavera Alemán***, la D.C. ***Sandra Guadalupe Sánchez Ceja***, la M.C. ***Mariela Roque Flores***, el D.Q. ***Mario Armando Gómez Hurtado*** y la D.C. ***Yliana López Castro***, por sus correcciones y aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A la D.C. ***Concepción Armenta Salinas*** por la determinación de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al D.Q. ***Juan Pablo García Merinos*** por la obtención de los espectros de Infrarrojo.

Al Laboratorio de Biotecnología Microbiana por las facilidades otorgadas al realizar las pruebas de actividad antibacteriana.

Mi sincero agradecimiento a mis compañeros y amigos de laboratorio por su apoyo y amistad. En particular al M.C. ***Irving Raúl Vázquez Cacho***, al M.C. ***Luis Daniel Herrera Sanabria***, y a la M.C. ***Gabriela Servín García***, a quienes agradezco por su amistad, por sus lecciones y por acompañarme en el dominio de mis conocimientos.

A mis compañeros y amigos: ***Joselyn***, ***Mariela***, ***Guadalupe***, ***Arturo***, ***Dana***, ***Paulina***, ***Juana***, ***Hugo***, ***Nicol***, ***Karla***, ***Zamara***, ***Ángel***, ***Evelin***, ***Jorge***, ***Samuel*** y ***Ale***, con quienes experimente momentos sorprendentes a lo largo de mi etapa universitaria.

Quisiera expresar mi agradecimiento a mi amiga ***Hilda Joselyn Pagaza Ibarra***, por siempre mostrarme su apoyo y comprensión, por ser partícipe de mis incontables historias y formando parte importante de ellas.

Especial reconocimiento merecen mis padrinos, ***Juan Gabriel Álvarez Ruiz*** y ***Ma. Guadalupe Pineda Becerra***, a quienes admiro y valoro como a unos padres. Estoy agradecido porque en todo momento me han brindado su apoyo absoluto.

A todos mis familiares que no menciono por cuestión de espacio, pero igual les estoy muy agradecido.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y la M.C. Eva Esthefany Soto Guzmán, con apoyo económico de la CIC-UMSNH al proyecto.

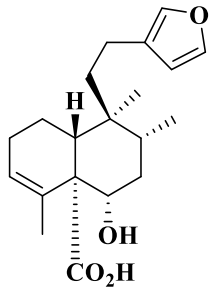
Beca de ayudante de investigador del Programa CONAHCYT SNII 3.

ÍNDICE

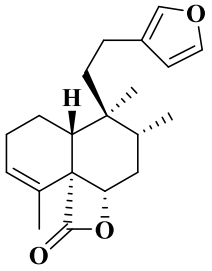
RESUMEN ii
ABSTRACT iii
INTRODUCCIÓN 1
ANTECEDENTES 3
neo-clerodanos 3
Importancia de las lactonas 7
Reactividad de las *β*-lactonas 15
Ácido kerlínico 18
JUSTIFICACIÓN 20
OBJETIVOS 21
Objetivo general: 21
Objetivos específicos: 21
METODOLOGÍA GENERAL 22
DISCUSIÓN DE RESULTADOS 23
Obtención del ácido kerlínico (**4**) 23
Obtención de la *β*-lactona **4a** 27
Mecanismo de reacción 31
Actividad antibacteriana 32
CONCLUSIONES 33
PARTE EXPERIMENTAL 34
Espectroscopia y métodos físicos 34
Muestra vegetal 34
Obtención de extracto 34
Obtención del ácido kerlínico (**4**) 34
Metodología de la reacción de lactonización 35
Pruebas antibacterianas 36
BIBLIOGRAFÍA 37

RESUMEN

En el presente trabajo se describe la obtención del componente mayoritario del extracto de acetona de las hojas de *Salvia dugesii*, el *neo*-clerodano denominado ácido kerlínico (**4**), a partir del cual se obtuvo la *β*-lactona **4a** mediante la ciclación entre el ácido carboxílico y el grupo hidroxilo. Se ensayo la actividad antibacteriana de **4a** frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, el cual no mostró actividad, demostrando que el cambio estructural de **4** no modificó su actividad; ya que se conoce que **4** no muestra actividad antibacteriana. Estos compuestos fueron caracterizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de una y dos dimensiones e IR.



4

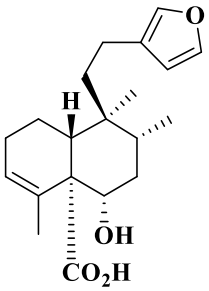


4a

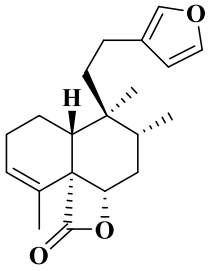
Palabras clave: *Salvia*, diterpeno, *neo*-clerodano, ácido kerlínico, *β*-lactona.

ABSTRACT

The study outlines the isolation of the principal component of the acetone extract of *Salvia dugesii* leaves, which is the *neo*-clerodane known as kerlinic acid (**4**). The β-lactone 4a was subsequently synthesized via cyclization between the carboxylic acid and the hydroxyl group of kerlinic acid (**4**). The antibacterial activity of **4a** was tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results showed no activity, indicating that the structural modification of **4** did not affect its activity. This is consistent with the known antibacterial inactivity of **4**. One- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance and IR were used to characterize these compounds.



4



4a

Key words: *Salvia*, diterpene, *neo*-clerodane, kerlinic acid, *β*-lactone.

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas con fines terapéuticos es una de las prácticas más antiguas de la humanidad. Los egipcios registraron el uso de analgésicos con drogas opioides, así como la utilidad de hongos con propiedades antibióticas; otras civilizaciones, como India y China también dejaron un registro sobre el uso de aproximadamente 700 plantas medicinales que aún juegan un papel importante en la medicina tradicional (Barreiro & Bolzani, 2009; Cechinel & Yunes, 2016). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que al menos el 80% de la población mundial sigue utilizando plantas, principalmente en forma de extractos o de ingredientes activos para tratar enfermedades básicas (Niero et al., 2018).

Los productos naturales provienen de bacterias, hongos, plantas, insectos y esponjas marinas, estos compuestos y sus derivados presentan un elevado potencial clínico debido a sus efectos terapéuticos y pueden emplearse como precursores o prototipos de nuevos medicamentos (Robinson et al., 2019). En el período comprendido entre 1981 al 2019, se determinó que aproximadamente el 18.9% de los 1881 medicamentos recientemente aprobados se derivan de productos naturales (Newman & Cragg, 2020). Esto ha llevado al estudio biotecnológico de compuestos bioactivos con el propósito de efectuar modificaciones estructurales, crear grupos de análogos sintéticos y obtener análogos funcionales que determinen posibles relaciones estructura-actividad (Egbuna et al., 2019).

Los productos naturales bioactivos que contienen un núcleo β-lactona presentan un alto potencial clínico al mostrar actividad anticancerígena y neurotóxica primordialmente (Robinson et al., 2019). Por ejemplo, la salinosporamida A (**1**) (Marizomib®) (**figura 1**), mostró actividad citotóxica inhibiendo las actividades proteolíticas del proteasoma 20S, siendo eficaz contra las neoplasias malignas hematológicas y los carcinomas pancreáticos (Potts et al., 2011). Otro ejemplo, es la lipstatina (**2**), un metabolito microbiano aislado de *Streptomyces toxytricini* y su derivado la tetrahidrolipstatina (**3**), los cuales demostraron inhibición eficaz de la lipasa pancreática; además, **3** (Orlistat®, Xenical®, Allí®) se utiliza como tratamiento para la obesidad y la hipercolesterolemia, debido a la reducción de la absorción de grasa y los niveles de colesterol en el plasma (Lowe & Vederas, 1995; Jouanneau et al., 2019).

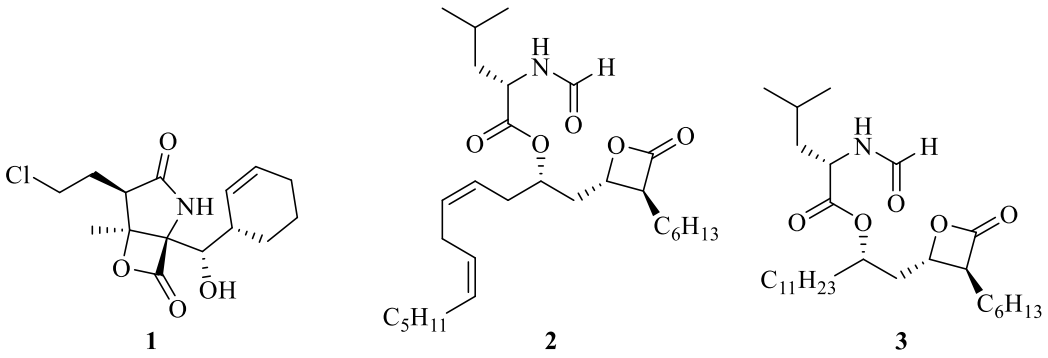
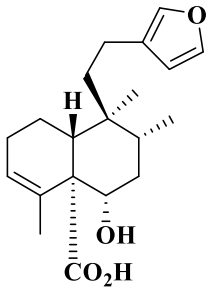


Figura 1. Estructuras químicas de la salinosporamida A (**1**), la lipstatina (**2**) y la tetrahidrolipstatina (**3**).

En los últimos años, diversos estudios han revelado el potencial del núcleo *β*-lactona debido a las reacciones nucleofílicas y electrofílicas que pueden experimentar, convirtiéndolo en un valioso intermediario sintético para la producción de productos naturales con actividad biológica o farmacológica (Böttcher & Sieber, 2008; Kluge & Petter, 2010; Robinson et al., 2019).

En estudios realizados previamente en el grupo de trabajo del extracto de diclorometano de la especie vegetal *Salvia dugesii*, aislaron como componente mayoritario el ácido kerlínico (**4**) (**figura 2**), el cual presenta diversos grupos funcionales en su estructura (Calderón-Oropeza, 2021). Por lo tanto, en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la reactividad de los grupos hidroxilo y carboxilo de **4** para generar derivados novedosos que posean un núcleo de *β*-lactona.



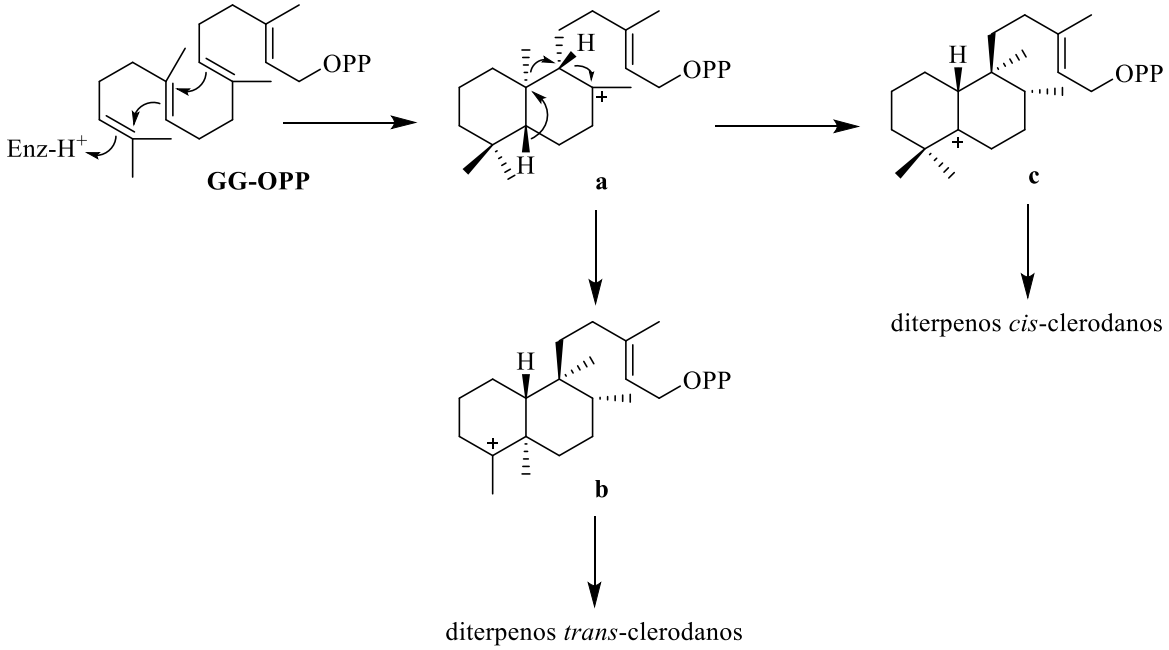
4

Figura 2. Estructura química del ácido kerlínico (**4**).

ANTECEDENTES

neo-clerodanos

Los diterpenos de tipo clerodano son los más abundantes en la naturaleza (Hagiwara, 2019), se forman biosintéticamente mediante el reordenamiento del catión labdadienilo (**a**) producido por la ciclación enzimática del geranilgeranilpirofosfato (**GG-OPP**) y a través de subsiguientes migraciones de hidruros y metilos se generan productos con estructura *trans*-anular, conocidos como *trans*-clerodanos. Para la obtención de *cis*-clerodanos, se generan reordenamientos del catión **c** (**esquema 1**) (Tokoroyama, 2000; Gómez-Hurtado et al., 2011; Hagiwara, 2019).



Esquema 1. Biosíntesis de clerodanos (Tomado de Hagiwara, 2019).

Los clerodanos muestran una estructura básica **5** (**figura 3**), dividiéndose en dos fragmentos, un resto de decalina de anillo fusionado (C-1—C-10) con cuatro centros estereogénicos contiguos (C-5,C-10,C-9,C-8) y una cadena lateral de seis carbonos en C-9 (C-11—C-16) donde C-16 se une a C-13 dando una estructura de 3-metilpentilo, los carbonos C-17, C-18, C-19 y C-20 se encuentran unidos en C-8, C-4, C-5 y C-9, respectivamente en el sistema de decalina (Merritt & Ley, 1992; Li et al., 2016). La estereoquímica absoluta se indica como *neo*-clerodano (**6**) para los clerodanos con estereoquímica igual a la clerodina y *ent-neo*-clerodano (**7**) para referir a los enantiómeros (Tokoroyama, 2000).

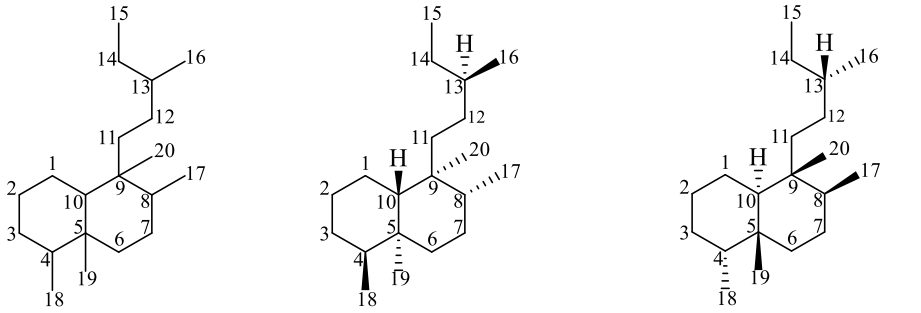


Figura 3. Estructura básica y estereoquímica absoluta de los clerodanos.

Los compuestos de tipo *neo*-clerodano son abundantes en la naturaleza y poseen una amplia gama de actividades biológicas; por ejemplo, la escutalbina C (**8**), el escuteciprol B (**9**), la jodrelina A (**10**), y la dihidroclerodina (**11**) (**figura 4**) presentan actividad antialimentaria contra *Spodoptera littoralis* (Bruno et al., 2002; Klein et al., 2002).

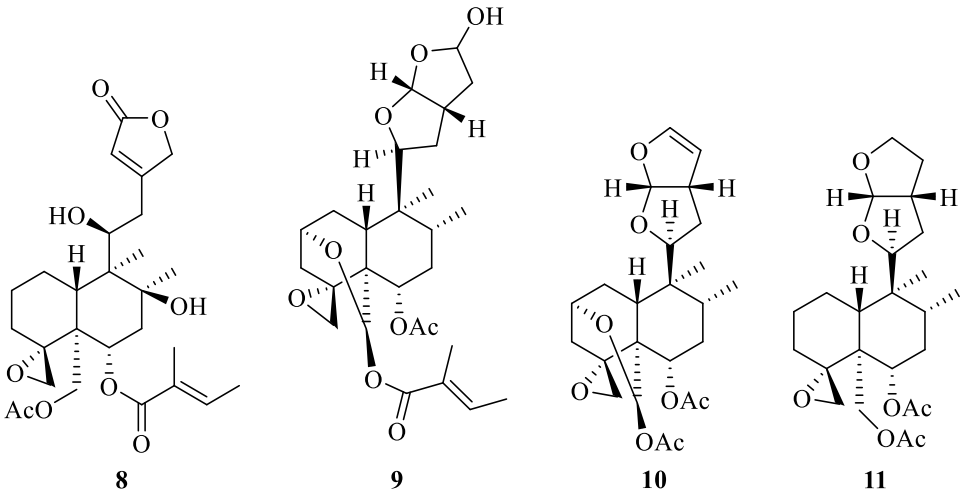


Figura 4. Clerodanos que presentan actividad antialimentaria.

Estudios efectuados por Prisinzano y Rothman (2008), y por Hooker y colaboradores (2009), demostraron el efecto de la salvinorina A (**12**) aislada de *Salvia divinorum* y de sus derivados el 22-tiocianato **13** y la 22-cloro-salvinorina A (**14**) (**figura 5**), como agonistas de receptores opioides kappa (k) no nitrogenados, además **12** posee efectos antinociceptivos y antiinflamatorios (Aviello et al., 2011).

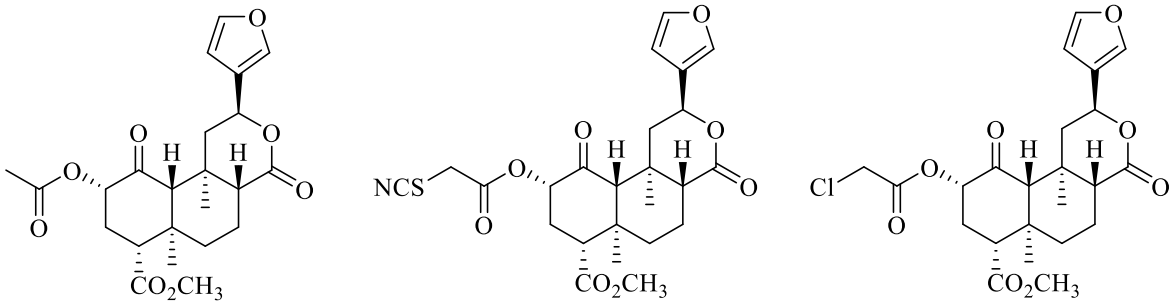


Figura 5. Clerodanos que actúan como agonistas de receptores opioides.

Los clerodanos también han mostrado actividad antimicrobiana; por ejemplo, las sepulturinas A, C, D y E (**15-18**) (**figura 6**) aisladas de *Saliva shannoni*, exhiben actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Bautista et al., 2013).

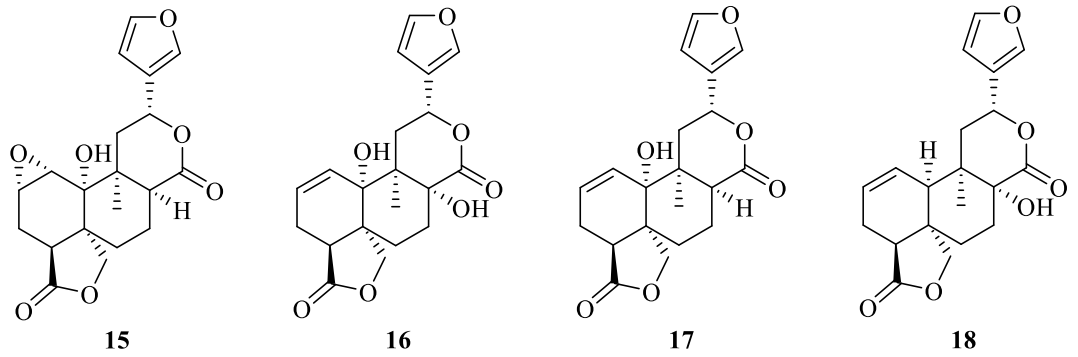


Figura 6. Estructuras químicas de las sepulturinas A, C, D y E (**15-18**).

Los clerodanos **19** y **20** (**figura 7**) aislados de *Salvia adenophora*, mostraron actividad contra *Staphylococcus epidermidis* (Bisio et al., 2015); mientras que **21** fue activo contra *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Marthanda et al., 2005; Gupta et al., 2013); además, **21** es el primer clerodano reductor de lípidos (Sashidhara et al., 2011).

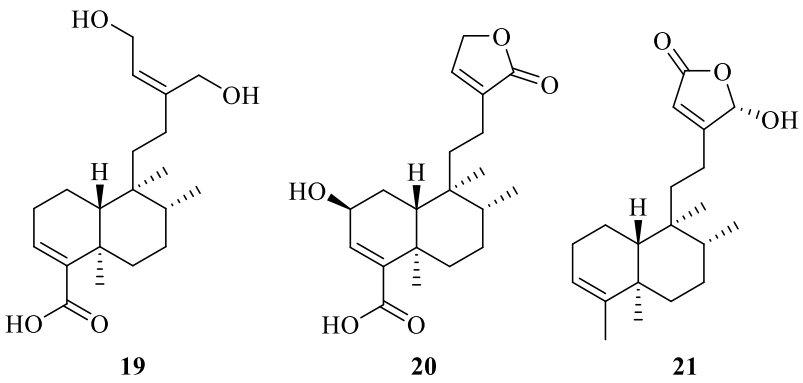


Figura 7. Clerodanos que presentan actividad antimicrobiana.

Otras actividades biológicas presentadas por este tipo de compuestos es la actividad potenciadora de NGF en células PC12 (Tang et al., 2009), la cual es exhibida por el 6*α*,7*α*-dihidroxiannoneno (**22**) (**figura 8**); mientras que la *trans*-dehidrocrotonina (**23**) reduce significativamente la lesión gástrica por estrés al presentar actividad antiulcerosa (Hiruma-Lima et al., 2001; Brasil et al., 2006); asimismo **23** presentó actividad antitumoral, antiinflamatoria, hipoglucémica, antiaterogénica, antiestrógenos; entre otras (Costa et al., 2007). Algunos *neo*-clerodanos mostraron otros efectos biológicos, como el 3*β*,4*β*:15,16-diepoxi-13(16),14-clerodadieno (**24**) que inhibió la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS (Harinantenaina et al., 2006); y el ácido clerodérmico (**25**) que indujo apoptosis contra células HL60 de leucemia humana (Efdi et al., 2007).

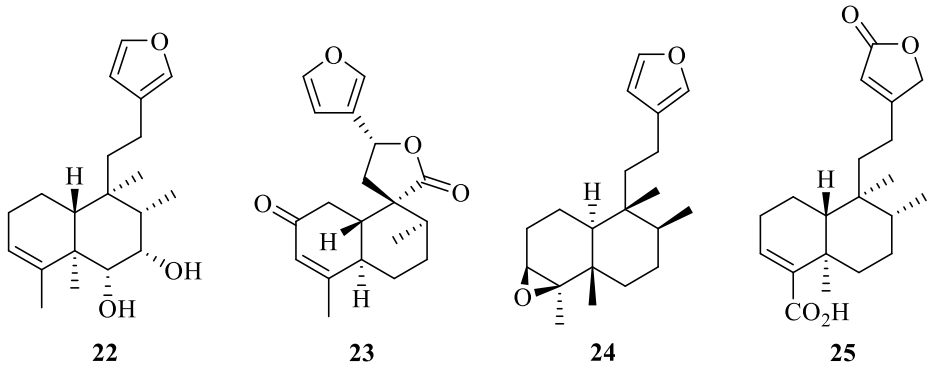


Figura 8. Clerodanos con diversas actividades biológicas.

Importancia de las lactonas

Las lactonas son un éster cíclico generadas por la esterificación entre un alcohol y un ácido carboxílico, pueden encontrarse en la naturaleza anillos desde cuatro hasta más de 20 átomos en su cadena heterocíclica; se nombran eliminando la palabra "ácido", y sustituyendo la terminación *-oico* del ácido carboxílico precursor por la terminación *-ólido* y se identifica con un número el carbono oxigenado (Carey et al., 2014). También, suelen presentarse por sus nombres comunes, combinando la terminación *-ico* del hidroxiácido por *-olactona* y designando una letra griega al átomo de carbono que tiene el grupo hidroxilo para cerrar el anillo, los sustituyentes se nombran de igual forma que el ácido precursor (**figura 9**) (Wade, 2017).

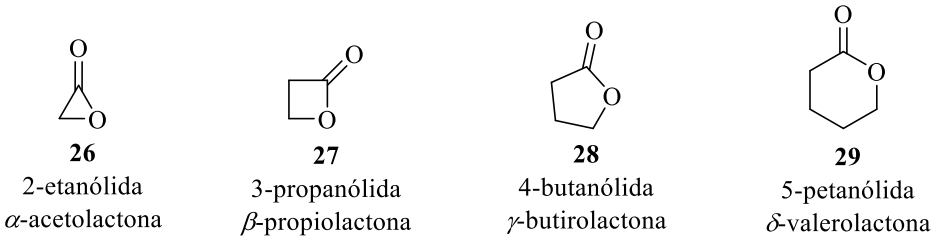


Figura 9. Nomenclatura de las lactonas.

Las γ- y δ-lactonas constituidas por anillos heterocíclicos de cinco y seis átomos, respectivamente; suelen ser las lactonas más comunes distribuidas en la naturaleza, principalmente en los productos naturales sintetizados por plantas y de manera particular en compuestos terpénicos (Guerrero Reyes, 2015). La actividad biológica de los diterpenos de tipo labdano, halimano y clerodano aumenta cuando presentan un grupo lactona (Silva, et al., 2011); por ejemplo, la gomphostenina (**30**) y la gomphostenina A (**31**) (**figura 10**), las cuales fueron aisladas de *Gomphostemma niveum* y presentaron actividad antipalúdica contra *Plasmodium falciparum* (Sathe & Kaushik, 2010); mientras que los clerodanos **32** y **33** mostraron actividad inhibitoria moderada contra *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* (Bisio et al., 2015). Otro ejemplo, son los clerodanos **34**, **35** y **36** que exhibieron actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* y *Samonella flexneri* (Iqbal et al., 2013).

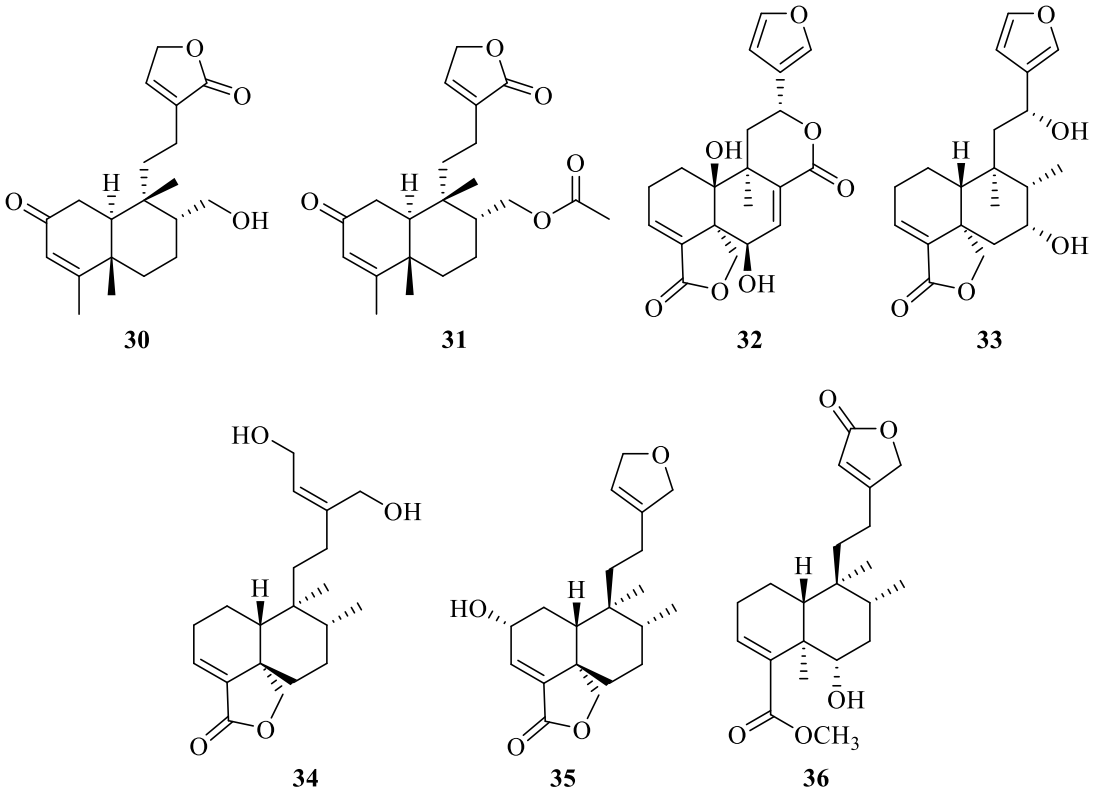


Figura 10. Clerodanos con actividad antimicrobiana que presentan en su estructura un grupo lactona.

Este tipo de compuestos presentan otro tipo de actividades; por ejemplo, la escutehenanina H (**37**) (**figura 11**) que fue aislada de *Scutellaria barbata*, mostró actividad citotóxica (Dai et al., 2010); y las limbatólidas A y B (**38-39**) actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (Ahmad et al., 2005).

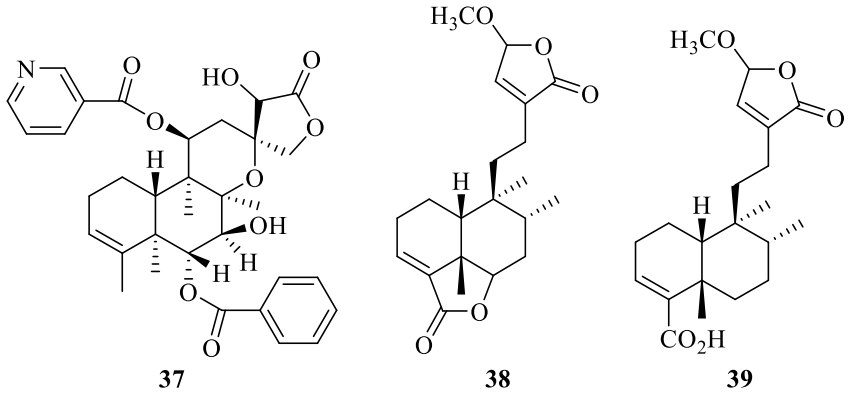
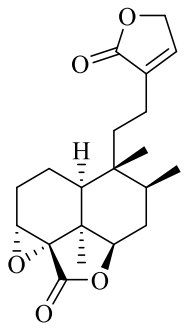


Figura 11. Estructuras químicas de la escutehenanina H (**37**) y las limbatólidas A y B (**38-39**).

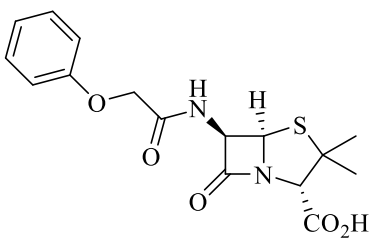
En el 2015 Mantaj y colaboradores, aislaron un diterpeno de tipo *cis*-clerodano de *Tinospora crispa*, nombrado crispina E (**40**) (**figura 12**) que mostró actividad inhibitoria selectiva de STAT3, proporcionando una alternativa natural de terapia contra gran variedad de neoplasias malignas, como tumores de mama, próstata, cabeza y cuello, mielomas múltiples y neoplasias hematológicas (Mataj et al., 2015).



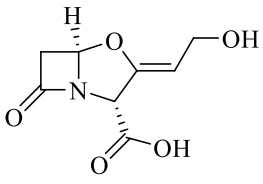
40

Figura 12. Estructura química de la crispina E (**40**).

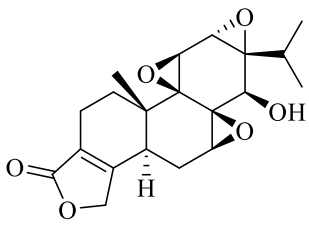
Los productos naturales bioactivos que contienen *β*-lactonas, *β*-lactamas y epóxidos, tienen la capacidad de producir aductos inactivos de acil-enzima mediante la acilación covalente de los residuos nucleofílicos de lisina, serina, histidina y cisteína en los sitios activos de las enzimas (Drahl et al., 2005; Zeiler et al., 2013). Por ejemplo, la penicilina V (**41**) (**figura 13**), inhibe la síntesis del peptidoglucano mediante la acilación de la transpeptidasa a través de la escisión del enlace -CO-N del anillo de *β*-lactama (Knollmann, et al., 2017); mientras que el ácido clavulánico (**42**) actúa como un inhibidor de *β*-lactamasas (Reading & Cole, 1977) y la triptólida (**43**), se une covalentemente al XPB humano, una subunidad del factor de transcripción TFIIH e inhibe su actividad ATPasa dependiente de ADN (Titov et al., 2011).



41



42



43

Figura 13. Productos naturales bioactivos que contienen *β*-lactonas, *β*-lactamas y epóxidos.

Los productos naturales que contienen un núcleo *β*-lactona, en su mayoría se obtienen mediante modificaciones químicas con el propósito de obtener compuestos bioactivos que presenten un alto potencial anticancerígeno y neurotóxico (Robinson et al., 2019). Estos compuestos han contribuido en la investigación médica; por ejemplo, la lactacistina (**44**), un metabolito microbiano aislado de *Streptomyces* sp y su derivado omurálida (**45**) (**figura 14**), mostraron actividad neurotrófica y han sido utilizados ante padecimientos del sistema nervioso por disminución de NTF (factores neurotróficos) (Omura et al., 1991).

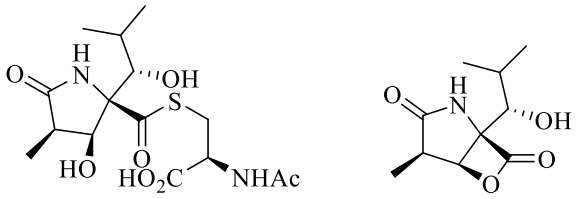
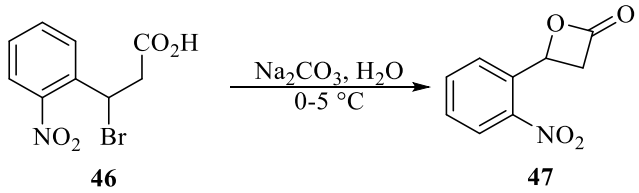


Figura 14. Estructuras químicas de la lactacistina (**44**) y la omurálida (**45**).

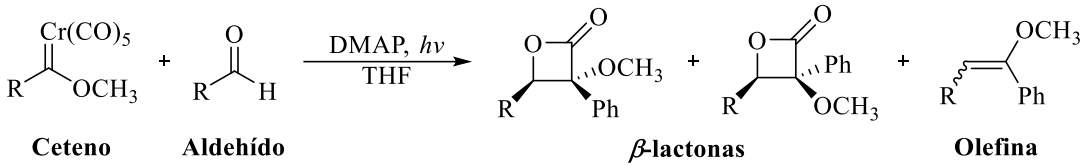
Las *β*-lactonas se modifican con el propósito de diseñar sondas ABPP (proteómica basada en actividad) para la determinación de actividades enzimáticas sobre proteomas bacterianos, lo cual brinda una estrategia novedosa para la inhibición de diversas enzimas bacterianas y ventajas sobre el desarrollo de nuevos antibióticos (Böttcher & Sieber, 2008). Debido a ello, existen publicaciones con el propósito de abordar las modificaciones químicas con relación a la obtención de *β*-lactonas y explorar sus aplicaciones en el ámbito farmacológico (Kluge & Petter, 2010; Robinson et al., 2019).

La primera estructura de tipo *β*-lactona **47** la sintetizó Einhorn en 1883, a partir del ácido 3-bromo-3(-2-nitrofenil)propiónico (**46**) (**esquema 2**), y determinó que el grupo nitro de la estructura permite la prevalecía del intermediario *β*-lactona.



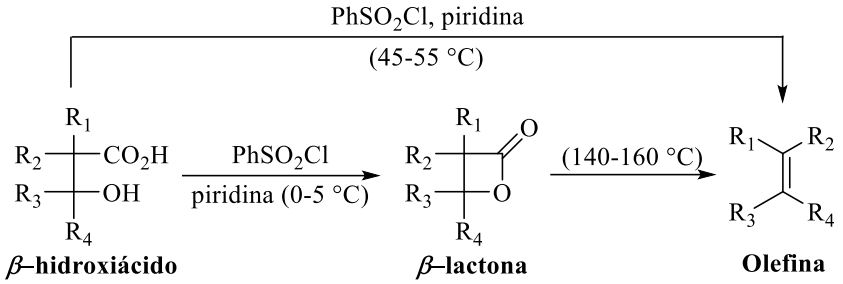
Esquema 2. Síntesis de la nitrolactona **47** a partir de **46**.

Una ruta más versátil para obtener *β*-lactonas la desarrollaron Staudinger & Bereza mediante la cicloadición [2+2] entre cetenos y compuestos carbonílicos (Staudinger & Bereza, 1911). Casi un siglo después, Merlic & Doroh (2003) obtuvieron *β*-lactonas a partir de la reactividad entre aldehídos y cetenos, estos últimos generados por fotólisis de complejos de cromo-carbeno (**esquema 3**).



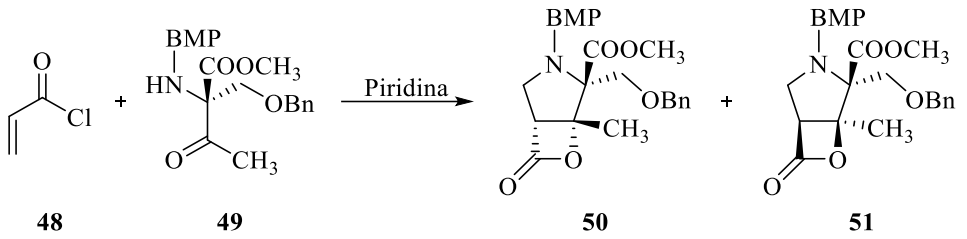
Esquema 3. Obtención de *β*-lactonas por cicloadición [2+2] entre cetenos y compuestos carbonílicos.

Otro método desarrollado para la obtención de *β*-lactonas tri y tetrasustituidas en alto rendimiento fue el de Adam, el cual consiste en la ciclación directa de *β*-hidroxiácidos (**esquema 4**). También, determinaron que al incrementar la temperatura de las *β*-lactonas se generan las olefinas correspondientes (Adam et al., 1972).



Esquema 4. Procedimiento de Adam para la obtención de *β*-lactonas por ciclación directa de *β*-hidroxiácidos.

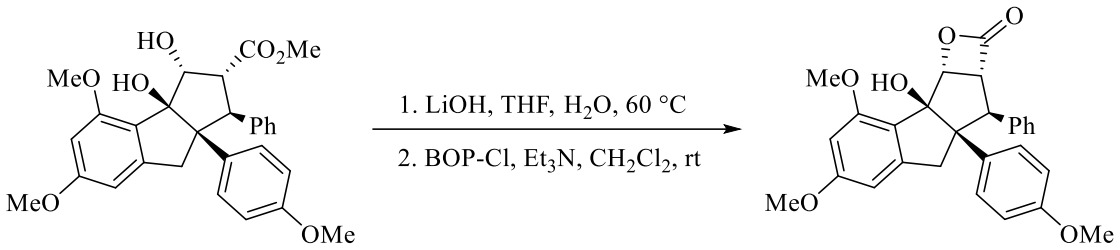
Mientras que Reddy & Corey en 2006 sintetizaron las *β*-lactonas bicíclicas **50** y **51** a partir del cloruro de acrililo (**48**) con la aminocetona **49** en lugar de la acrilamida correspondiente (**esquema 5**).



48 **49** **50** **51**

Esquema 5. Síntesis de *β*-lactonas bicíclicas a partir del cloruro de acrililo (**48**) con la aminocetona **49**.

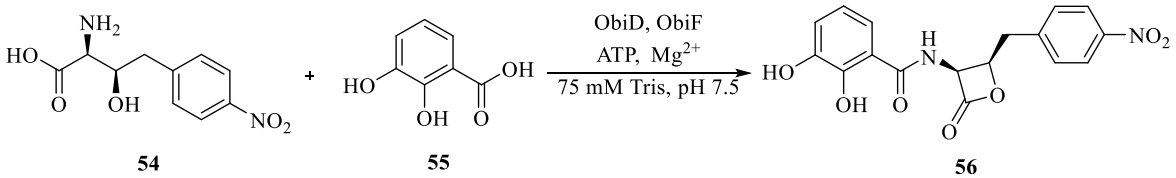
Por su parte, Lajkiewicz et al. (2014) obtuvieron la *β*-lactona **53** a partir del rocaglato de metilo (**52**) mediante la reducción y posterior ciclación de **52** (**esquema 6**), determinando la utilidad y aplicación de **53** como un quimiotipo para la modificación covalente de serina hidrolasa y peptidasa al inhibir varias enzimas, entre ellas, CTSA, serina carboxipeptidasa inducible por retinoides (SCPEP1), proteína 10 que contiene el dominio *α*/*β* hidrolasa (ABHD10) y acil-CoA tioesterasa 1/2 (ACOT1/2).



52 **53**

Esquema 6. Obtención de la *β*-lactona **53** a partir del rocaglato de metilo (**52**).

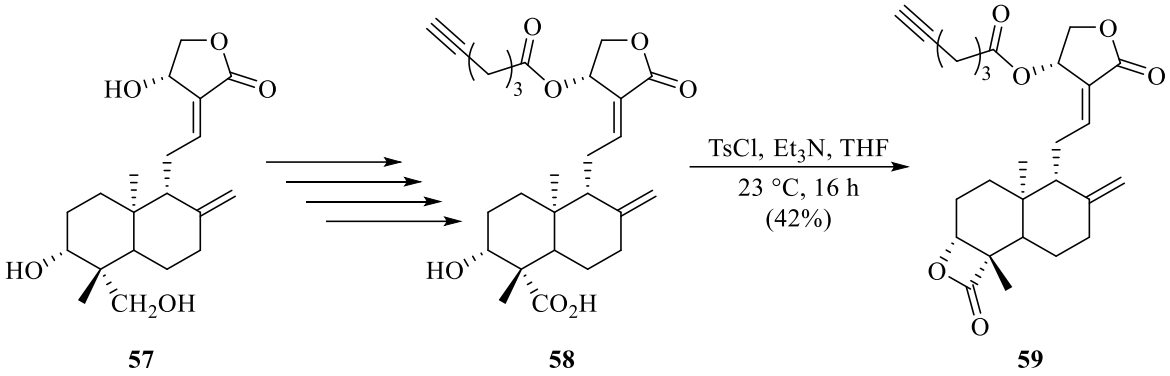
En 2017 Schaffer y colaboradores describieron la formación catalizada por enzimas de un anillo de *β*-lactona durante la ciclización mediada por TE (dominios tioesterasa) del (*R*)-*β*-hidroxi-*p*-nitro-L-homofenilalanina (**54**) y el ácido 2,3-dihidroxibenzóico (**55**) para generar la obafluorina (Obi, **56**) (**esquema 7**), un antibiótico *β*-lactona *cis*-monocíclico producido por cepas de *Pseudomonas fluorescens*.



54 **55** **56**

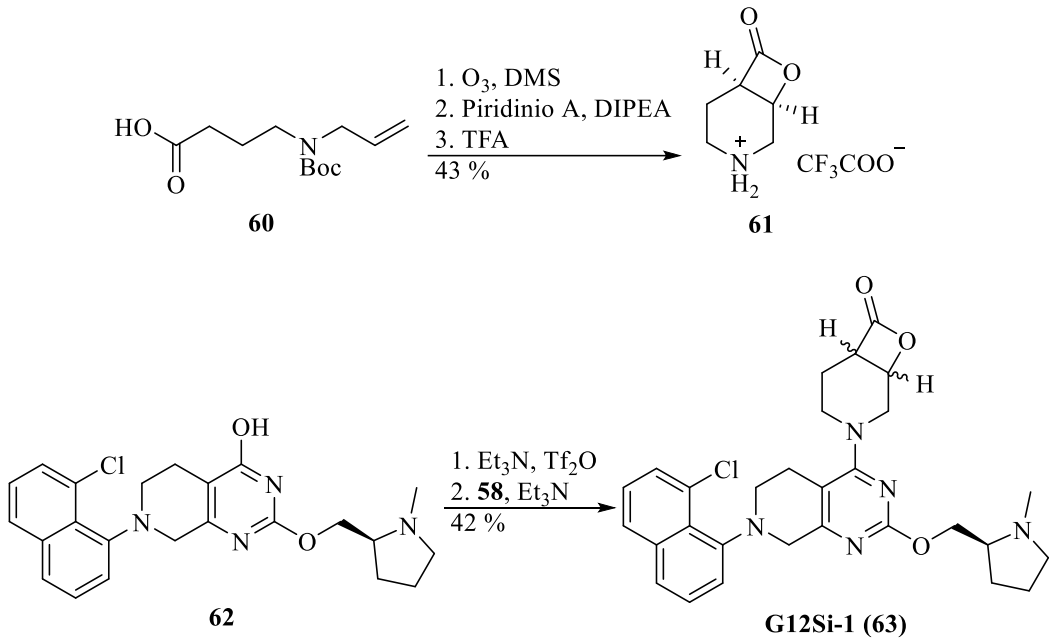
Esquema 7. Conversión enzimática de **54** y **55** en la *β*-lactona Obi (**56**).

Mediante la modificación del procedimiento de Adam, realizada por Jouanneau y colaboradores en el 2019, obtuvieron la sonda proteómica portadora de *β*-lactona **59** a partir del inmunomodulador natural conocido como andrografólido (**57**), añadiendo un fragmento electrófilo adicional mediante la oxidación del 1,3-diol de **57** y la posterior lactonización del *β*-hidroxiácido **58** (**esquema 8**).



Esquema 8. Obtención de la *β*-lactona **59** a partir del andrografólido (**57**).

Mientras que Zhang y colaboradores obtuvieron una mezcla diastereomérica de inhibidores G12Si-1 (**63**), mediante la síntesis de la *β*-lactona **61** a partir del precursor **60** a través de una lactonización aldólica intramolecular catalizada por nucleófilos (NCAL) y la posterior unión de la *β*-lactona **61** al resto de la tetrahidropiridopirimidina E triflada (**62**) (**esquema 9**). Estos inhibidores actúan como un electrófilo privilegiado para la serina adquirida en K-Ras(G12S), y proporcionan una alternativa en el tratamiento de otros mutantes de KRAS que ocasionan adenocarcinomas colorrectales y carcinomas de pulmón, principalmente (Zhang et al., 2022).

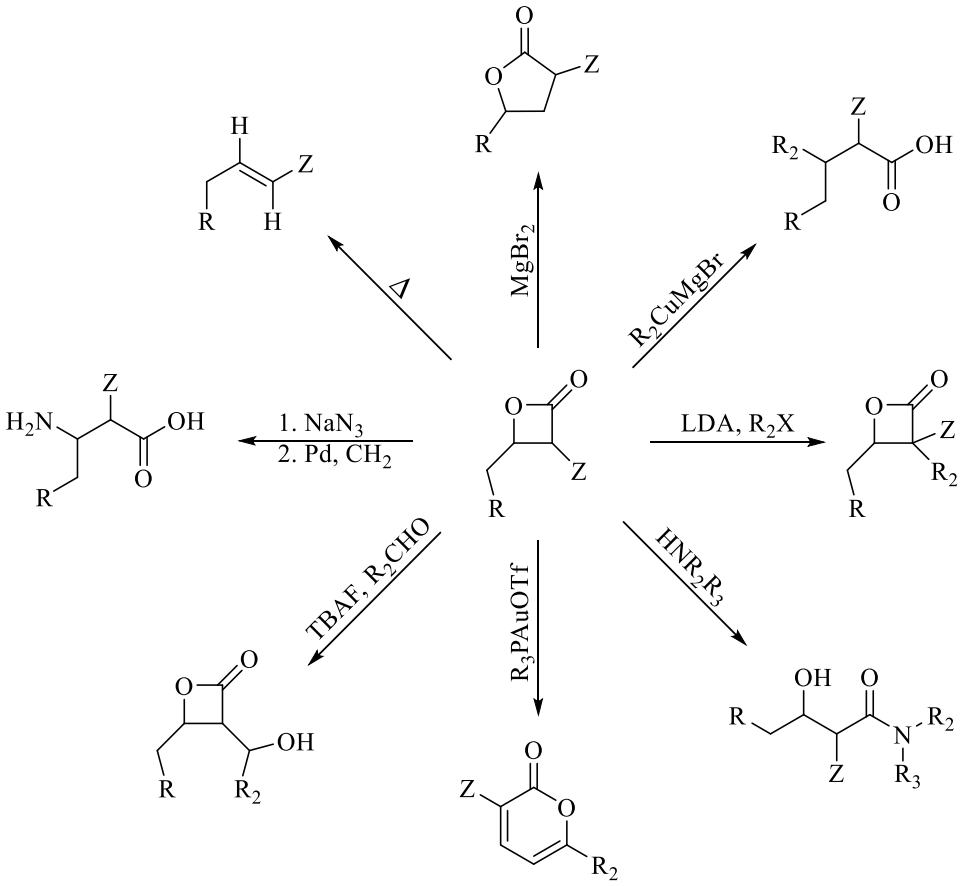


60 **61** **62** **G12Si-1 (63)**

Esquema 9. Síntesis del inhibidor covalente selectivo a cisteína del gen mutante G12C de K-Ras (G12Si-1, **63**) a partir de la tetrahidropiridopirimidina E triflada (**62**).

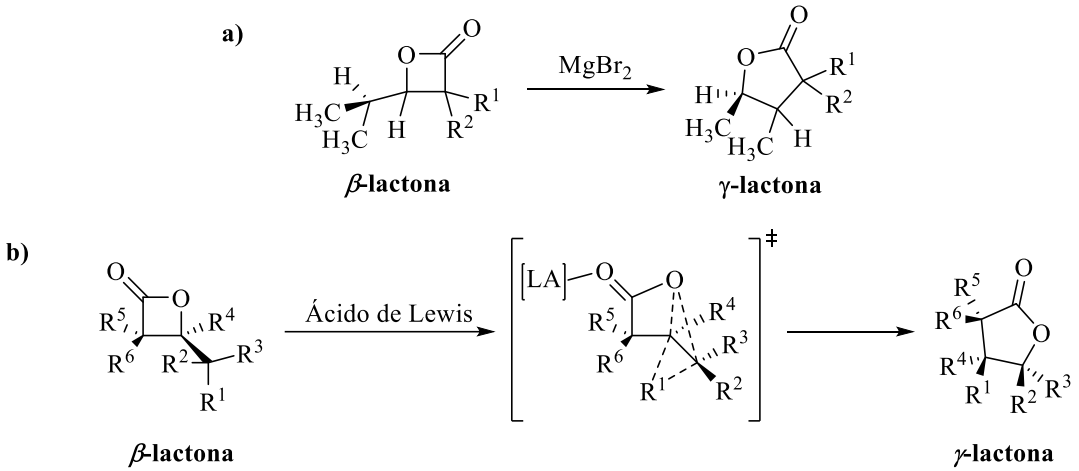
Reactividad de las *β*-lactonas

Las *β*-lactonas se denominan estructuras privilegiadas porque pueden actuar como electrófilos altamente reactivos que sirven como intermediarios versátiles para la síntesis de productos con grupos funcionales que incluyen alquenos, heterociclos e hidroxiácidos (Robinson et al., 2019); a través de diversas transformaciones como se muestra en el **esquema 10**:



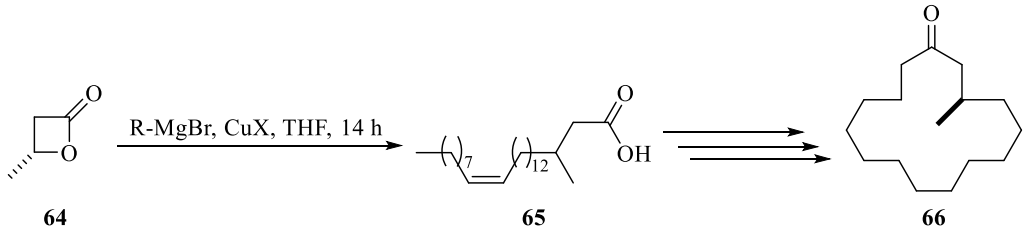
Esquema 10. Reactividad de las *β*-lactonas.

Mulzer y colaboradores reportaron la formación de *γ*-lactonas a partir de *β*-lactonas impulsada por la liberación de la tensión anular que presenta el anillo *β*-lactona, generando dos centros estereogénicos; en donde uno de los enlaces químicos migratorios se posiciona en el anillo y otro en posición C-5 (**esquema 11a**) (Mulzer et al., 1979), debido a que la selectividad de los reordenamientos diotrópicos está relacionada con los sustituyentes (R^1-R^6) en el anillo de *β*-lactona, clasificándolos en grupos migradores (R^1), de reserva (R^2, R^3 y R^4) y periféricos (R^5 y R^6) (**esquema 11b**) (Zhang et al., 2022).



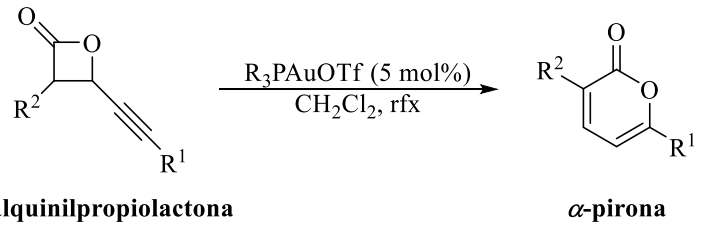
Esquema 11. Formación de *γ*-lactonas a partir de *β*-lactonas.

Posteriormente, Morita et al. (2005) obtuvieron el ácido carboxílico **65**, precursor para la síntesis de (*R*)-muscona (**66**), mediante la apertura del anillo de la (*R*)-(+)-*β*-metil-*β*-propiolactona (**64**) con un organocuprato funcionalizado (**esquema 12**), siendo **66** la fuente clásica más importante de olores de almizcle para perfumes y colonias.



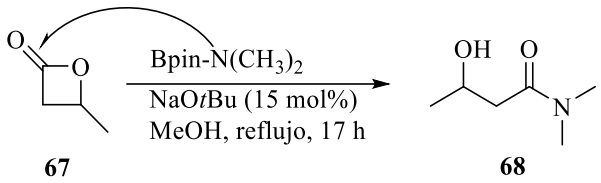
Esquema 12. Obtención del ácido carboxílico **65** para la síntesis de la (*R*)-muscona (**66**).

Las cicloisomerizaciones proporcionan heterociclos funcionalizados como las *α*-pironas, Dombray y colaboradores sintetizaron *α*-pironas sustituidas mediante reordenamientos de *β*-alquinilpropiolactonas catalizadas por oro(I) (**esquema 13**); este tipo de compuestos han sido utilizados como precursores para la obtención de derivados bioactivos (Goel & Ram, 2009).



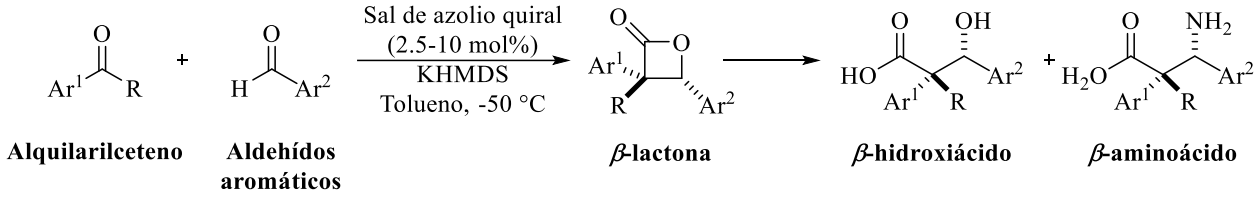
Esquema 13. Síntesis de *α*-pironas sustituidas a partir de *β*-alquinilpropiolactonas.

Solé & Fernández (2013) obtuvieron el *β*-hidroxi-N-dimetilamida (**68**) en buen rendimiento, a partir de la apertura del anillo de la *β*-butirolactona (**67**) mediante una vía de adición-eliminación (**esquema 14**).



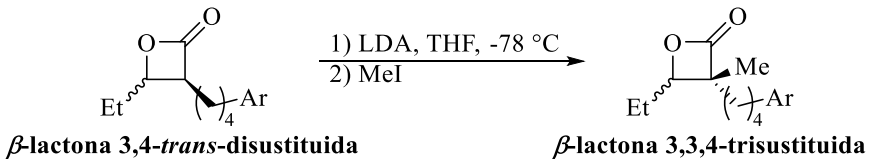
Esquema 14. Síntesis del *β*-hidroxi-N-dimetilamida (**68**) a partir de la *β*-butirolactona (**67**).

Por su parte, Douglas et al. (2013) determinaron que la cicloadición de alquilarilcetenos con aldehídos aromáticos catalizada con NHC genera *β*-lactonas y productos de derivatización *β*-hidroxi y *β*-aminoácido a través de la apertura del anillo de las *β*-lactonas (**esquema 15**).



Esquema 15. Obtención de *β*-hidroxiácidos y *β*-aminoácidos a partir de *β*-lactonas.

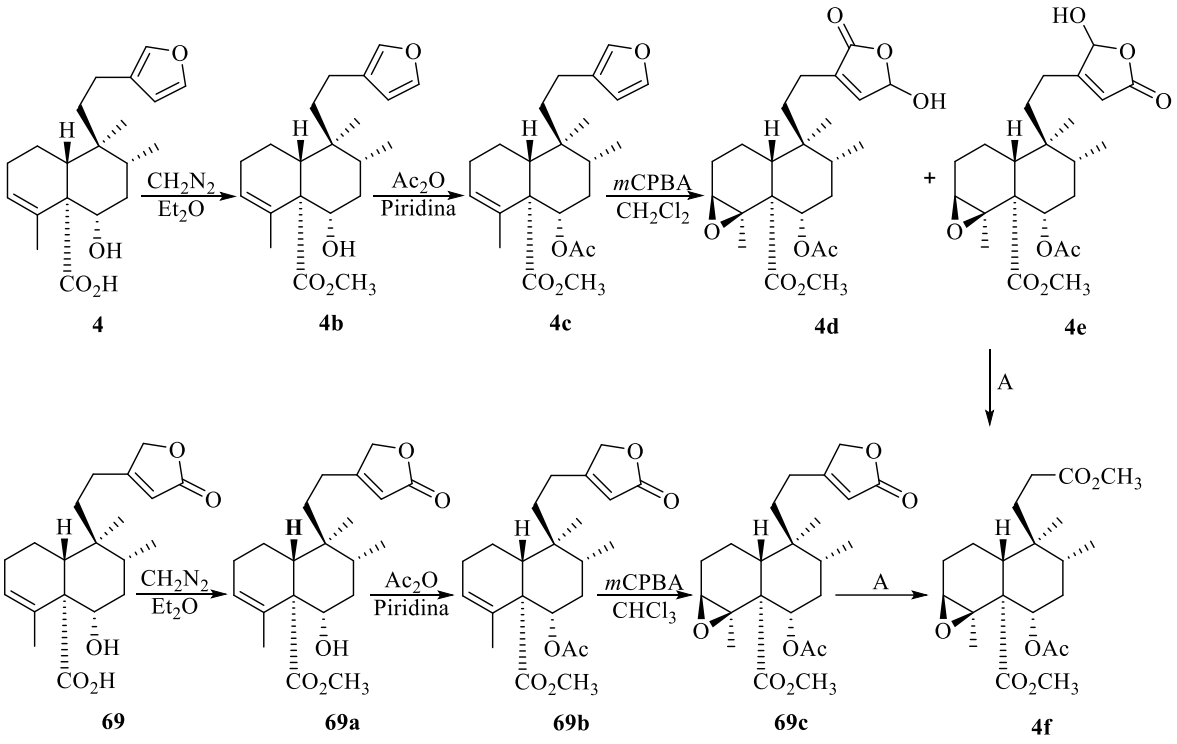
Mientras que Noel y colaboradores obtuvieron sistemas *β*-lactona 3,3,4-trisustituidos a partir de una *β*-lactona 3,4-*trans*-disustituida, mediante métodos sintéticos que incluyen la adición electrofílica a través de un intermediario enolato (**esquema 16**) (Noel et al., 2014).



Esquema 16. Síntesis de *β*-lactonas 3,3,4-trisustituidas.

Ácido kerlínico

En estudios realizados previamente en el grupo de trabajo, se aisló del extracto de diclorometano de la especie vegetal *Salvia dugesii*, el componente mayoritario conocido como ácido kerlínico (**4**) (Calderón-Oropeza, 2021), un diterpeno de tipo *neo*-clerodano; el cual también ha sido aislado de *Salvia kerlii* colectada en el estado de Querétaro y su estructura y configuración relativa se establecieron mediante correlación química a partir de la obtención del derivado de éster dimetílico **4f** (**esquema 17**), que fue obtenido previamente del ácido melisodórico (**69**) y su configuración relativa fue determinada por RMN y transformaciones químicas. (Rodríguez et al., 1973; Rodríguez-Hahn et al., 1987).



A= **1)** O_3, CH_2Cl_2, -70°C/$NaHCO_3$, H_2O_2, MeOH. **2)** CH_2N_2, Et_2O.

Esquema 17. Correlación química de **4f** a partir de **4** y **69**.

Un isómero del ácido kerlínico fue aislado de la esponja marina *Raspailia bouryesnaultae*. Este compuesto presenta actividad citotóxica moderada en la línea celular de cáncer humano A549 con valores de IC_{50} inferiores a 25 µM y difiere en la estereoquímica con **4** (**figura 15**), debido a que presenta una fusión de anillo *cis* en el resto de decalina, y los grupos metilo en C-8 y C-9 se encuentran en una relación *trans* (tipo *cis*/*trans*) (Lhullier et al., 2019).

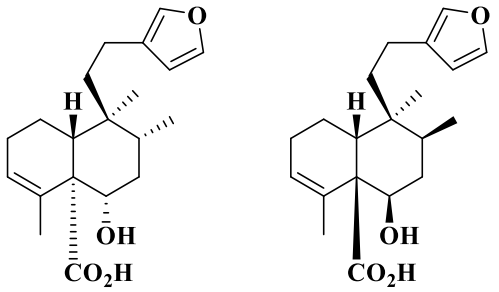


Figura 15. Estructura química del ácido kerlínico (**4**) y el isómero **70**.

Por su parte, el ácido kerlínico (**4**) presentó actividad antialimentaria contra *Spodoptera littoralis* (Simmonds et al., 1996); herbicida frente a *Echinochloa crus-galli* (González et al., 2003); y actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* y *Fusarium verticillioides* (Calderón-Oropeza, 2021) y se caracteriza por presentar en su estructura diversos grupos funcionales, susceptibles a modificaciones químicas, por ello en este trabajo se preparó un derivado novedoso con posible actividad biológica.

JUSTIFICACIÓN

El ácido kerlínico (**4**), al ser un *neo*-clerodano aislado de *Salvia dugesii* en buen rendimiento y al presentar diversos grupos funcionales en su estructura, genera el interés de realizar un estudio de la reactividad del grupo carboxilo e hidroxilo, para generar el núcleo de β-lactona, el cual ha demostrado un alto potencial anticancerígeno y neurotóxico.

Las β-lactonas son estructuras privilegiadas debido a las reacciones nucleofílicas y electrofílicas que pueden experimentar, convirtiéndose en valiosos intermediarios sintéticos para la producción de productos naturales con actividad biológica.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Preparar el núcleo *β*-lactona a partir del ácido kerlínico (**4**) aislado de *Salvia dugesii*, para estudiar la reactividad de los grupos funcionales carboxilo e hidroxilo.

Objetivos específicos:

- Aislar y purificar el ácido kerlínico (**4**) del extracto de acetona de las hojas de *Salvia dugesii*.
- Realizar y optimizar reacciones de ciclación entre el grupo carboxilo e hidroxilo del ácido kerlínico (**4**).
- Caracterizar los productos obtenidos mediante métodos físicos y espectroscópicos.

METODOLOGÍA GENERAL

1. Colecta de la especie vegetal *Salvia dugesii*.
2. Separación y secado de las partes aéreas de la planta.
3. Obtención del extracto de acetona de las hojas de *Salvia dugesii*.
4. Purificación del ácido kerlínico (**4**) mediante métodos cromatográficos.
5. Ensayo de reacciones de ciclación en el ácido kerlínico (**4**).
6. Optimización de las reacciones de ciclización.
7. Determinación de las propiedades físicas de los derivados preparados.
8. Elucidación estructural de los derivados preparados mediante métodos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear de una y dos dimensiones.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Obtención del ácido kerlínico (4)

El extracto de acetona de hojas de *Salvia dugesii* fue fraccionado por cromatografía en columna, obteniéndose con la polaridad 9:1 hexanos-acetona cristales incoloros con punto de fusión de 184-186 °C, los cuales fueron analizados por RMN de ^{1}H. En el espectro (**figura 16**) se observó en 7.35 ppm una señal triple ancha con J = 1.4 Hz, $W_{1/2}$ = 3.85 Hz, una señal simple en 7.20 ppm y una señal simple ancha en 6.25 ppm, $W_{1/2}$ = 3.85 Hz, correspondientes a los protones H-15, H-16 y H-14, respectivamente de un furano monosustituido. En 5.64 ppm se apreció una señal múltiple característica del protón vinílico H-3 y en 3.48 ppm se observó una señal doble de dobles con J = 11.4, 4.6 Hz, correspondiente al protón H-6 base de hidroxilo. En 1.93 y 0.73 ppm se observaron dos señales simples características del metilo vinílico CH_3-18 y al metilo terciario CH_3-20, respectivamente. En 0.86 ppm se apreció una señal doble con J = 6.6 Hz, correspondiente al metilo secundario CH_3-17. Estos datos fueron comparados con los de la literatura (Rodríguez-Hahn et al., 1987) indicando la presencia del ácido kerlínico (**4**) (**tabla 1**).

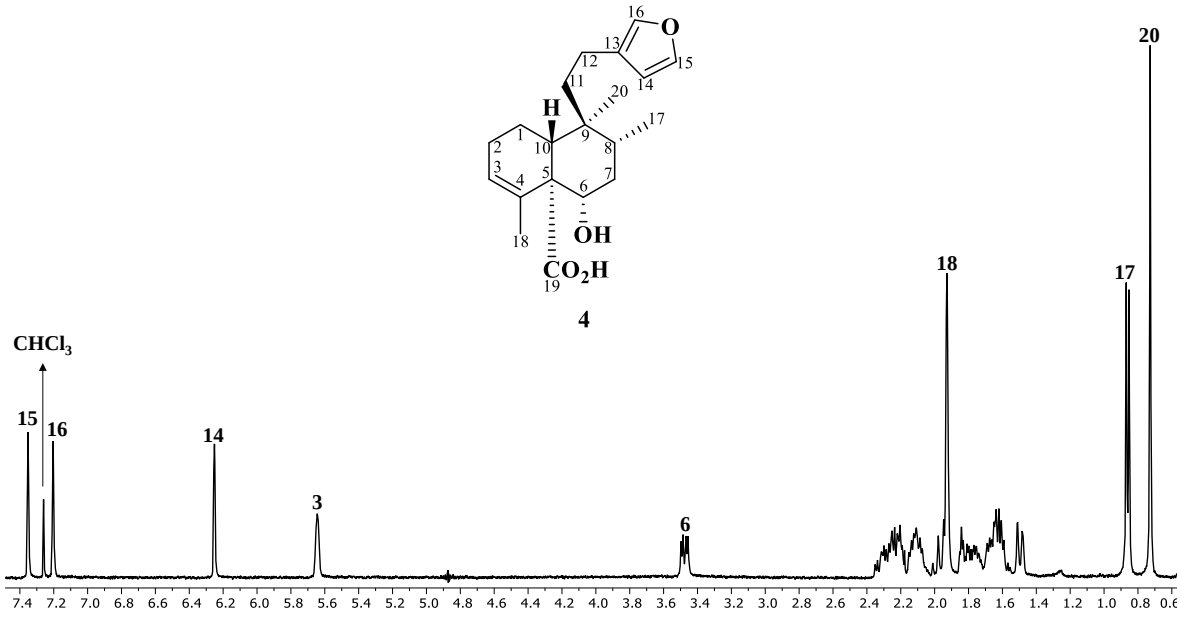


Figura 16. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz en $CDCl_3$ del ácido kerlínico (**4**).

Tabla 1. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{1}H en ppm, del ácido kerlínico (**4**) con la literatura (Rodríguez-Hahn et al., 1987).

H	Experimental δ (*J*)	Literatura δ (*J*)	Δ δ
3	5.64 (m)	5.60 (m)	0.04
6	3.48 (dd, *J* = 11.4, 4.6 Hz)	3.45 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz)	0.03
14	6.25 (sa, $W_{1/2}$ = 3.85 Hz)	6.20 (dd, *J* = 2.0,1.0 Hz)	0.05
15	7.35 (ta, *J* = 1.4 Hz, $W_{1/2}$ = 3.85 Hz)	7.30 (t, *J* = 2.0 Hz)	0.05
16	7.20 (s)	7.15 (s)	0.05
17 (Me)	0.86 (d, *J* = 6.6 Hz)	0.85 (d, *J* = 7.0 Hz)	0.01
18 (Me)	1.93 (s)	1.90 (s)	0.02
20 (Me)	0.73 (s)	0.75 (s)	0.02

Al comparar los datos de RMN de ^{1}H con la literatura se observó una tendencia en todos los desplazamientos químicos, por tal motivo se verificó la referencia experimental tanto con el TMS y el $CDCl_3$, en ambos los desplazamientos químicos experimentales se mantuvieron; esto sugiere que los autores emplearon una referencia diferente en el espectro de RMN de ^{1}H, ya que haciendo el ajuste a 0.04 ppm los datos son más aproximados.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**figura 17**) se observó en 180.9 ppm una señal característica del carbonilo del ácido carboxílico C-19. En 142.8, 138.4, 125.1 y 110.8 ppm se observaron los carbonos sp^2 pertenecientes a los C-15, C-16, C-13 y C-14 del anillo de furano, respectivamente. En 136.0 y 127.7 ppm se apreciaron las señales de los carbonos vinílicos C-4 y C-3, respectivamente y en 75.9 ppm se observó la señal del carbono base de hidroxilo C-6. En 53.6 ppm se ubicó la señal del carbono cabeza de puente C-5. En 23.5 y 16.0 ppm se observaron las señales de los carbonos de los metilos terciarios C-18 y C-20, respectivamente; y en 15.5 ppm se apreció la señal del carbono del metilo secundario C-17. El resto de las señales del esqueleto de la estructura se encontraron entre 48.2 y 17.4 ppm. En el espectro de IR se observó una banda intensa en 1673 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del ácido carboxílico. Estos datos fueron comparados con los de la literatura (Rodríguez-Hahn et al., 1987) como se observa en la **tabla 2** mostrando que la asignación de los metilos 17 y 20 se encuentran intercambiados, lo cual fue corroborado por el experimento HETCOR, el resto de las señales coinciden indicando que se trata del ácido

kerlínico (**4**); el cual también ha sido aislado por Rodríguez-Hahn y colaboradores de *Salvia kerlii* colectada en el estado de Querétaro y presenta actividad antialimentaria (Simmonds et al., 1996), herbicida (González et al., 2003) y fungicida (Calderón-Oropeza, 2021).

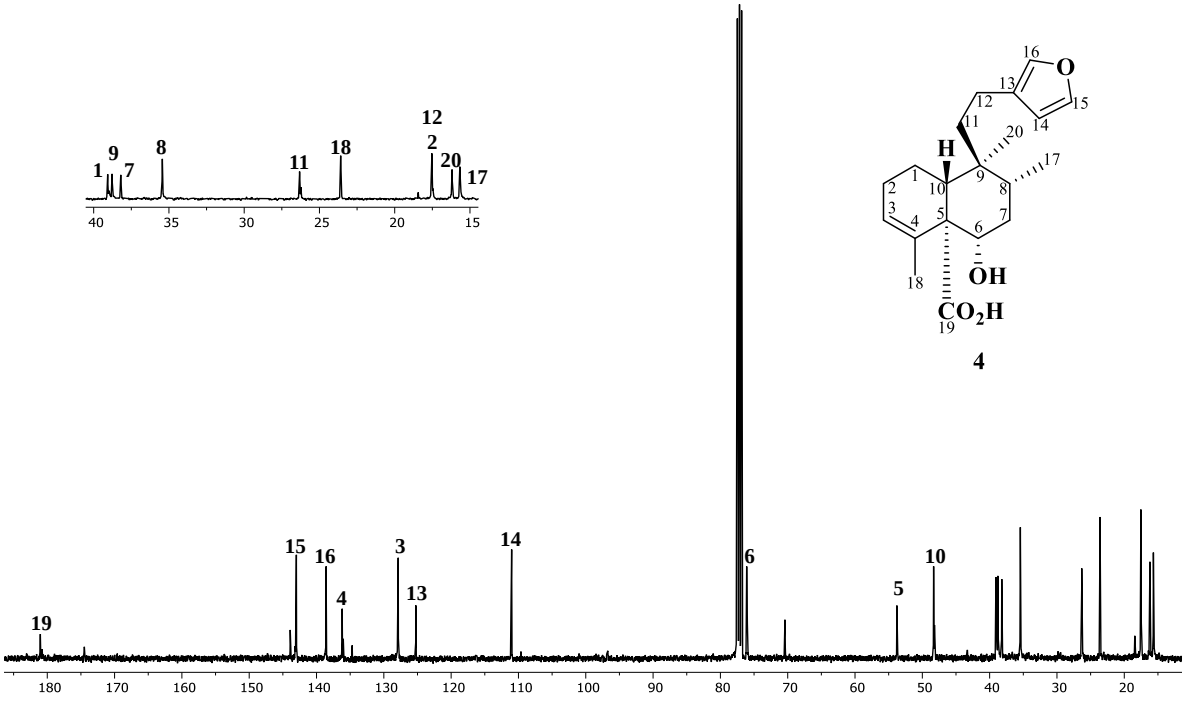


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en $CDCl_3$ del ácido kerlínico (**4**).

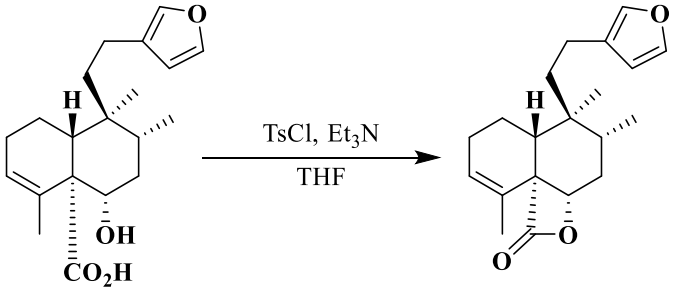
Tabla 2. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del ácido kerlínico (**4**) con la literatura en ppm (Rodríguez-Hahn et al., 1987).

Carbono	Experimental	Literatura
1	38.9	38.9
2	17.4	17.5
3	127.7	127.6
4	136.0	136.2
5	53.6	53.7
6	75.9	76.0
7	38.0	38.8
8	35.3	35.5
9	38.6	38.9
10	48.2	48.4
11	26.2	26.3
12	17.4	17.5
13	125.1	125.2
14	110.8	110.9
15	142.8	142.8
16	138.4	138.5
17	15.5*	16.1*
18	23.5	23.3
19	180.9	181.0
20	16.0*	15.2*

*Los Δδ pueden estar intercambiados

Obtención de la *β*-lactona 4a

Se realizó la búsqueda de condiciones, para llevar a cabo la reacción de ciclización entre el ácido carboxílico y el hidroxilo del ácido kerlínico (**4**), para obtener la *β*-lactona correspondiente (**esquema 18**). Primeramente, se tomaron en cuenta las condiciones reportadas en la literatura. El primer ensayo se llevó a cabo utilizando 5 equivalentes de TsCl y 5 equivalentes de Et_3N (Jouanneau et al., 2019) (**tabla 3, entrada 1**), obteniéndose 44 mg (45%) de la *β*-lactona **4a**, en forma de una miel amarilla clara.



4 **4a**

Esquema 18. Obtención de la *β*-lactona **4a** a partir del ácido kerlínico (**4**).

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la síntesis de la *β*-lactona **4a**.

Entradas	**Condiciones (TsCl, base)**	**Tiempo (h)**	**Rendimiento %[d]**
1[a]	5 eq, 5eq Et_3N	16	45
2[b]	2 eq, 5 eq Et_3N	2.5	57
3[a]	5 eq, 16.5 eq py	24	N.D.[e]
4[b]	1 eq, 2 eq Et_3N-2 eq py	2.5	22
5[bc]	2 eq, 5 eq Et_3N	24	N.D.[e]

[a] Se realizó con extracción. [b] Se realizó sin extracción. [c] Se realizó a -3 °C.
[d] Rendimiento calculado después de la cromatografía en columna. [e] N.D. = no detectado

Continuando con la búsqueda de condiciones de reacción, al disminuir el número de equivalentes de TsCl a 2 y el tiempo a 2.5 h y no llevarse a cabo extracción se observó un aumento en el rendimiento de 57% (**entrada 2**). Al utilizar piridina como base durante 24 h (**entrada 3**) y al disminuir la temperatura a -3 °C (**entrada 5**), no se obtuvo el producto esperado; mientras que al disminuir la cantidad de TsCl a 1 eq y usar una mezcla de Et_3N y piridina como base (**entrada 4**) se observó un decremento considerable del rendimiento, el cual fue del 22%. Las condiciones de la **entrada 2** fueron las óptimas para la obtención de la *β*-lactona **4a** con un rendimiento del 57%.

El producto de reacción de la **entrada 2**, se purificó por cromatografía en columna, obteniéndose con la polaridad 99:1 hexanos-acetona cristales incoloros con punto de fusión de 78-81 °C, los cuales fueron analizados por RMN de ^1H. En el espectro (**figura 18**) se observó en 7.35 ppm una señal triple ancha con J = 1.5 Hz, una señal simple en 7.20 ppm y una señal simple ancha en 6.25 ppm, correspondientes a los protones H-15, H-16 y H-14, respectivamente, de un furano monosustituido. En 5.65 ppm se apreció una señal múltiple correspondiente al protón vinílico H-3 y se observó el desplazamiento de la señal doble de dobles del H-6 en 4.90 ppm con J = 8.8 Hz, 3.1 Hz, correspondiente al protón base de lactona. En 1.82 y 0.90 ppm se ubicaron dos señales simples correspondientes al metilo vinílico CH_3-18 y al metilo terciario CH_3-20, respectivamente. En 0.91 ppm se apreció una señal doble con J = 6.9 Hz, correspondiente al metilo secundario CH_3-17.

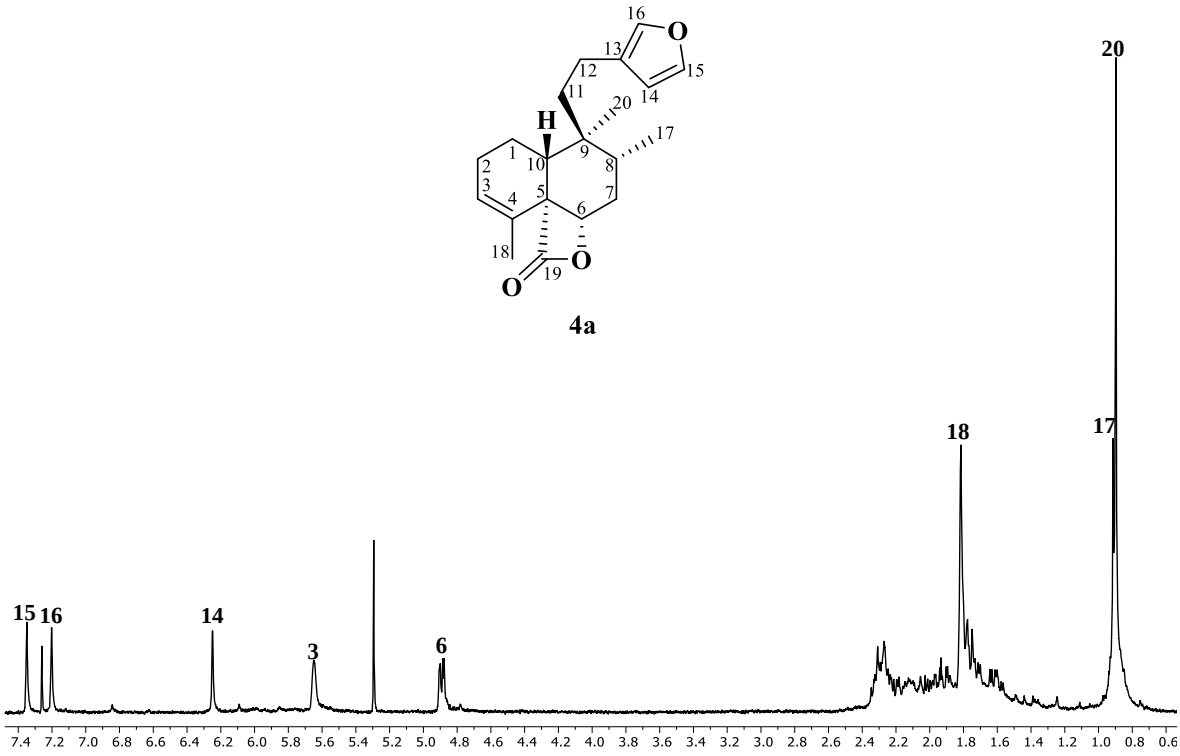


Figura 18. Espectro de RMN de ^{1}H a 400 MHz en $CDCl_3$ de la *β*-lactona **4a**.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**figura 19**) se observó en 174.6 ppm una señal característica de un carbonilo de éster, que anteriormente se ubicaba en 180.9 ppm por ser un carbonilo de ácido carboxílico. En 143.0, 138.5, 125.1 y 110.9 ppm se ubicaron los carbonos sp^2 pertenecientes a los C-15, C-16, C-13 y C-14, respectivamente del anillo de furano. En 131.1 y 127.9 ppm se apreciaron las señales de los carbonos vinílicos C-4 y C-3. Se observó el desplazamiento hacia 72.7 ppm correspondiente al C-6 base de éster y en 62.3 ppm se ubicó la señal del carbono cabeza de puente C-5 alfa al carbonilo. En 18.3 y 15.8 ppm se mostraron las señales de los metilos terciarios C-18 y C-20 y en 16.2 ppm se apreció la señal del metilo secundario C-17. El resto de las señales del esqueleto de la estructura se encontraron entre 44.7 y 17.5 ppm.

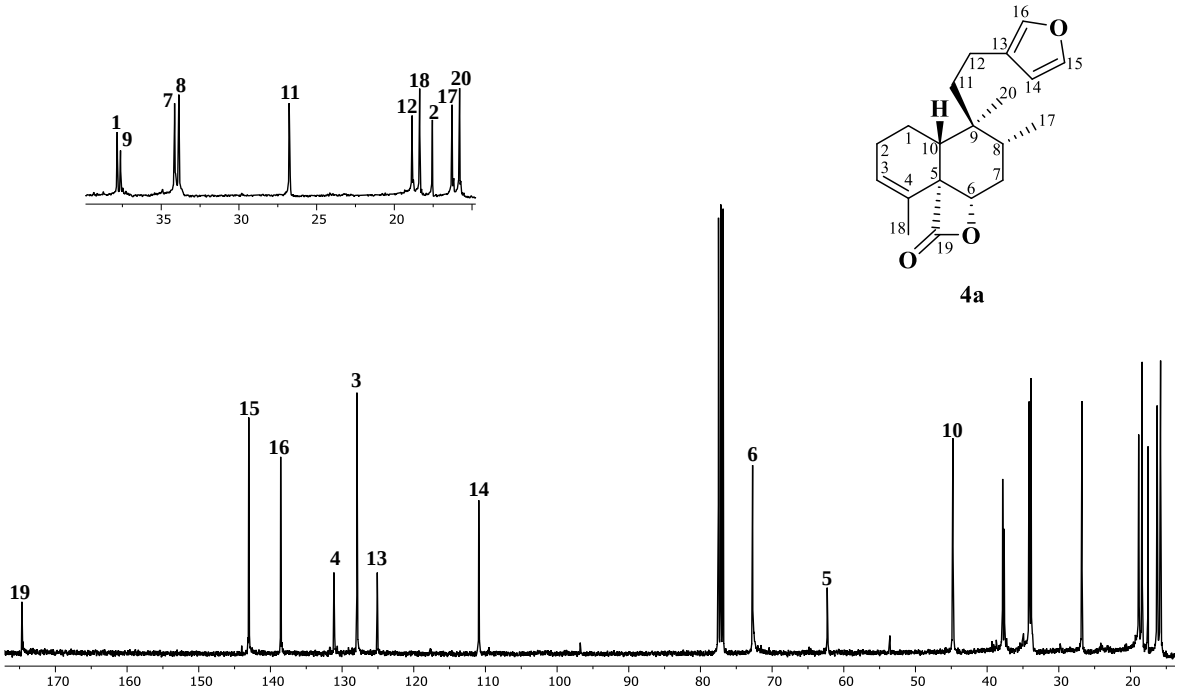


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en $CDCl_3$ de la *β*-lactona **4a**.

En el espectro de IR (**figura 20**) se observó una banda intensa en 1809 cm^{-1} característica de un carbonilo de *β*-lactona (Gholizadeh et al., 2020). Las correlaciones entre los carbonos e hidrógenos fueron confirmadas por el experimento bidimensional HETCOR, con base en los datos anteriores se propuso la estructura **4a**, la cual presenta la ciclación entre el carboxilo en C-19 y el hidroxilo de C-6 generando una *β*-lactona.

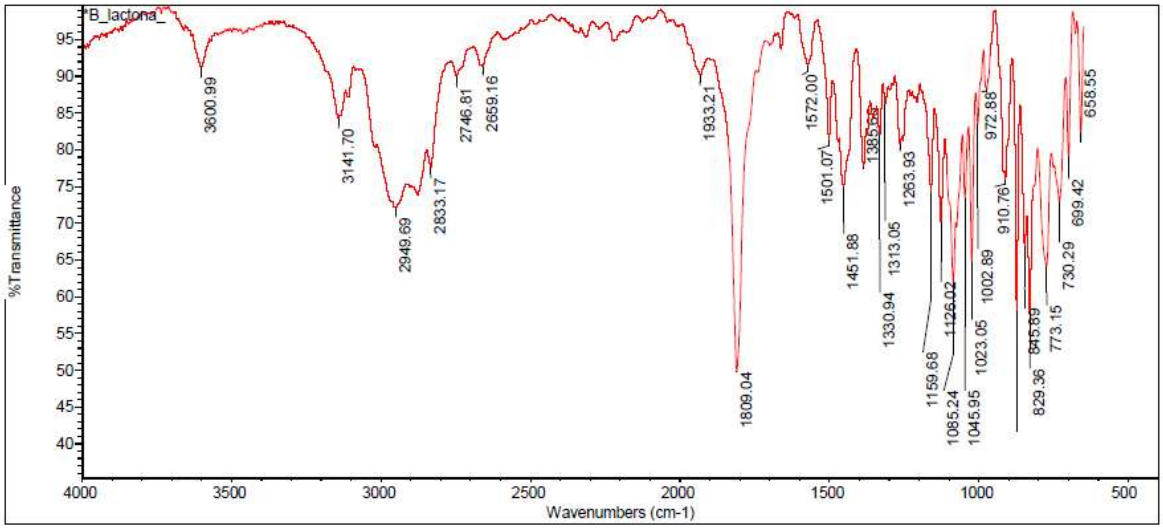
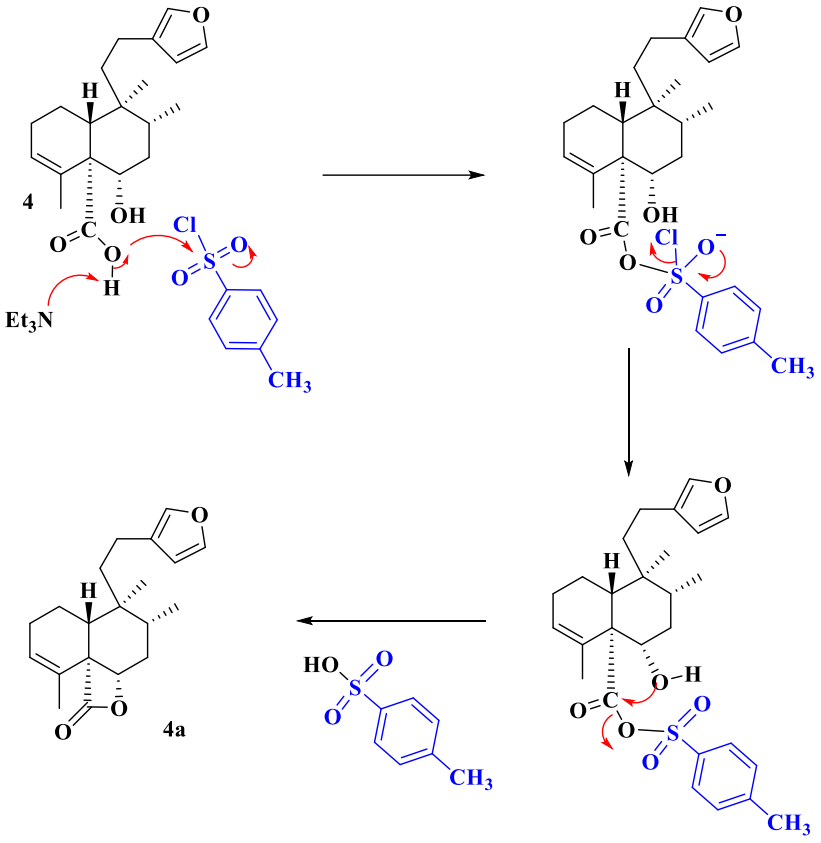


Figura 20. Espectro de IR de la *β*-lactona **4a**.

Mecanismo de reacción

El mecanismo propuesto para la obtención de la *β*-lactona **4a** es mediante la deprotonación del ácido carboxílico por parte de la Et_3N y el posterior ataque del carboxilato al cloruro de tosilo, generándose el tosilato correspondiente. Después, ocurre el ataque nucleofílico por parte del hidroxilo hacia el carbonilo, ocasionando la salida del anión tosilato y la formación de la *β*-lactona **4a** manteniendo la estereoquímica del *β*-hidroxiácido precursor (**esquema 19**) (Adam et al., 1972).



Esquema 19. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de la *β*-lactona **4a** a partir del ácido kerlínico (**4**).

Actividad antibacteriana

Se realizó un ensayo de actividad antibacterial del ácido kerlínico (**4**) y de su derivado la *β*-lactona **4a**, los cuales fueron probados en dos cepas diferentes una Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 27543) y una Gram negativa (*Escherichia coli* JM101) por el método de difusión en placa (Kirby-Bauer).

Las concentraciones ensayadas fueron de 5, 1, 0.5 y .0.05 mg/mL utilizándose como control negativo DMSO y como control positivo el antibiótico ampicilina (200 mg/mL). Después de 24 h de incubación con los tratamientos se examinaron las placas sin mostrar actividad los compuestos probados contra estas cepas (**figura 21**); sin embargo, este resultado genera el interés para continuar con la exploración de la actividad biológica de la *β*-lactona **4a**, la cual es un derivado novedoso que podría actuar como un inhibidor no covalente de proteínas desarrollando actividades anticancerígenas y neurotóxicas, principalmente (Robinson et al., 2019).

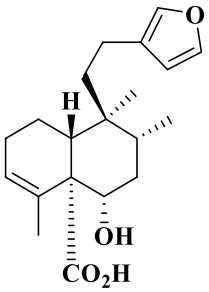


4 **4a**

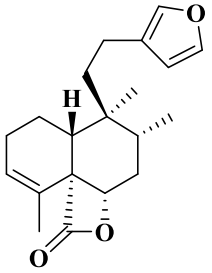
Figura 21. Efecto de la actividad antibacterial de **4** y **4a** frente a *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSIONES

Se aisló de *Salvia dugesii*, el *neo*-clerodano ácido kerlínico (**4**), a partir del cual se preparó la *β*-lactona **4a**, a través de la ciclación entre el grupo hidroxilo y carboxilo para lo cual se propuso el mecanismo de reacción. Siendo **4a** un derivado novedoso que no presentó actividad antibacterial, se plantea como perspectivas continuar con la investigación de su potencial farmacológico debido a que podría actuar como anticancerígeno o neurotóxico; así como seguir explorando la reactividad del doble enlace.



4



4a

PARTE EXPERIMENTAL

Espectroscopia y métodos físicos

El análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de ^{1}H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se realizó en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400, utilizando cloroformo deuterado ($CDCl_3$) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros obtenidos fueron procesados a través del programa MestReNova 14.3.3-33362. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

El espectro de IR se midió en un espectrofotómetro FT-IR 200 Perkin Elmer.

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

Muestra vegetal

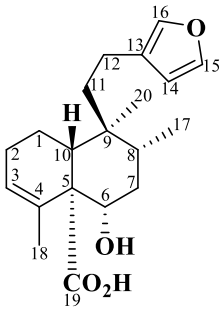
La especie vegetal *Salvia dugesii* fue colectada el 3 de diciembre de 2020 en La Alberca de los Espinos, Municipio de Villa Jiménez, Michoacán de Ocampo a 19°54'24" N, 101°46'17" W y a una altitud de 2049 m sobre el nivel del mar.

Obtención de extracto

Las partes aéreas de *Salvia dugesii* se separaron y secaron a la sombra durante tres días; 2.6 kg de hojas fueron macerados a temperatura ambiente con acetona durante tres días. Transcurrido este tiempo, el macerado se filtró y se concentró en un rotavapor; este procedimiento se efectuó tres veces sobre el mismo material vegetal, obteniéndose 160 g del extracto total correspondiente.

Obtención del ácido kerlínico (4)

Un lote de 40 g de extracto de acetona de hojas de *Salvia dugesii* fue fraccionado por cromatografía en columna, utilizando una columna de vidrio de 5.5 cm de diámetro, empacada con 12 cm de gel de sílice marca Merck de 230-400 mallas como fase estacionaria (desactivada con metanol) y como fase móvil mezclas de hexanos-acetona en orden ascendente de polaridad, colectando fracciones de 10 mL y obteniéndose con la polaridad 9:1 hexanos-acetona 6.3 g (1.0 %) de cristales incoloros correspondientes al ácido kerlínico (**4**).



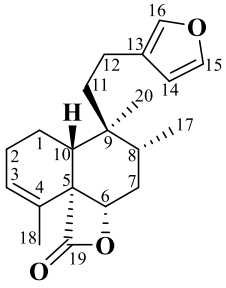
4

Ácido kerlínico (4). Cristales incoloros con p.f. 184-186 °C. RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): ver tabla 1.

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): ver tabla 2.

Metodología de la reacción de lactonización

A una solución de 100 mg (0.3 mmol) de **4** en 3 mL de THF en baño de hielo, se añadieron 114 mg (2 eq) de TsCl y 0.2 mL (5 eq) de Et_3N. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 minutos en baño de hielo y posteriormente se colocó a temperatura ambiente durante 2.5 h. Trascurrido este tiempo, el disolvente fue evaporado a presión reducida y el crudo de reacción fue impregnado con gel de sílice y fraccionado en cromatografía en columna, utilizando una columna de vidrio de 2.5 cm de diámetro, empacada con 13 cm de gel de sílice marca Merck de 230-400 mallas como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad 99:1, colectando fracciones de 5 mL y obteniéndose la *β*-lactona **4a**.



4a

***β*-lactona 4a.** cristales incoloros con p.f. 78-81 °C. RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.35 (1H, t, J = 1.5 Hz, H-15), 7.20 (1H, s, H-16), 6.25 (1H, d, J = 1.5, 1.0 Hz, H-14), 5.65 (1H, m, H-3), 4.90 (1H, dd, J = 8.8, 3.1 Hz, H-6), 1.82 (3H, s, CH_3-18), 0.91 (3H, d, J = 6.9 Hz, CH_3-17), 0.90 (3H, s, CH_3-20).

RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ: 174.6 (C, C-19), 143.0 (CH, C-15), 138.5 (CH, C-16), 131.1 (C, C-4), 127.9 (CH, C-3), 125.1 (C, C-13), 110.9 (CH, C-14), 72.7 (CH, C-6), 62.3 (C, C-5), 44.7 (CH, C-10), 37.8 (CH_2, C-1), 37.6 (C, C-9), 34.1 (CH_2, C-7), 33.8 (CH, C-8), 26.7 (CH_2, C-11), 18.8 (CH_2, C-12), 18.3 (CH_3, C-18), 17.5 (CH_2, C-2), 16.2 (CH_3, C-17), 15.8 (CH_3, C-20).

Pruebas antibacterianas

Las bacterias utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 27543 y *Escherichia coli* JM101.

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

a) Medio líquido Luria-Bertani (LB) modificado: 0.5 g de NaCl, 1 g de peptona de caseína, 0.5 g de levadura, agua destilada c.b.100 mL, pH 7.
b) Medio agar LB modificado: 0.5 g de NaCl, 1 g de peptona de caseína, 0.5 g de levadura, agua destilada c.b.100 mL, pH 7.

La prueba antibacteriana se realizó por el método de difusión en placa (Método Kirby-Bauer), utilizando aislados en medio líquido LB en crecimiento exponencial. Se preparó un pre-inóculo con las bacterias a ensayar en 3 mL de medio líquido LB, el cual se incubó a 37 °C durante 18 h en rotación de 120 rpm. Posteriormente, se prepararon disoluciones 1:200 del pre-inóculo y se colocaron 15 µL de la disolución y 15 µL de H_2O para *S. aureus* y 7.5 µL de la disolución y 15 µL de H_2O para *E. coli* en el centro de las cajas de medio sólido LB y fueron diseminadas empleando la técnica de estriado masivo por toda la placa con un hisopo estéril. Después, de la inoculación, se colocaron los discos estériles de papel filtro en la placa y fueron impregnados con 6 µL de las diferentes concentraciones, las cuales se dejaron absorber antes de cerrar las cajas y fueron incubados por 24 h a 37 °C.

Las concentraciones ensayadas fueron de 5, 1, 0.5 y 0.05 mg/mL utilizándose como control negativo DMSO y como control positivo el antibiótico ampicilina (100 µg/mL). Para las disoluciones se utilizó como vehículo DMSO y para la solución stock^0 se disolvieron 2 mg de cada compuesto en 400 µL de vehículo (**tabla 4**).

Tabla 4. Preparación de disoluciones.

1. 5 mg/mL	40 µL stock^0 + 160 µL vehículo	[1.0 mg/mL]^1
2. 1 mg/mL	100 µL stock^1 + 100 µL vehículo	[0.5 mg/mL]^2
3. 0.5 mg/mL	20 µL stock^2 + 180 µL vehículo	[0.05 mg/mL]^3

BIBLIOGRAFÍA

Adam, W., Baeza, J. & Liu, J. C. (1972). Stereospecific introduction of double bounds via thermolysis of β-lactones. *Journal of the American Chemical Society*, *94*(6), 2000–2006. https://doi.org/10.1021/ja00761a036.

Ahmad, V. U., Khan, A., Farooq, U., Kousar, F., Khan, S. S., Nawaz, S. A., Abbasi, M. A., & Choudhary, M. I. (2005). Three new cholinesterase-inhibiting *cis*-clerodane diterpenoids from *Otostegia limbata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *53*(4), 378–381. https://doi.org/10.1248/cpb.53.378.

Aviello, G., Borrelli, F., Guida, F., Romano, B., Lewellyn, K., De Chiaro, M., Luongo, L., Zjawiony, J. K., Maione, S., Izzo, A. A., & Capasso, R. (2011). Ultrapotent effects of salvinorin A, a hallucinogenic compound from *Salvia divinorum*, on LPS-stimulated murine macrophages and its anti-inflammatory action in vivo. *Journal of Molecular Medicine*, *89*(9), 891–902. https://doi.org/10.1007/s00109-011-0752-4.

Barreiro, E. J. & Bolzani, V. da S. (2009). Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quimica Nova*, *32*(3), 679–688. https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300012.

Basmadjian, C., Thuaud, F., Ribeiro, N., & Désaubry, L. (2013). Flavaglines: potent anticancer drugs that target prohibitins and the helicase eIF4A. *Future Medicinal Chemistry*, *5*(18), 2185–2197. https://doi.org/10.4155/fmc.13.177.

Bautista, E., Toscano, A., Calzada, F., Díaz, E., Yépez-Mulia, L., & Ortega, A. (2013). Hydroxyclerodanes from *Salvia shannoni*. *Journal of Natural Products*, *76*(10), 1970–1975. https://doi.org/10.1021/np400606g.

Bisio, A., Schito, A. M., Ebrahimi, S. N., Hamburger, M., Mele, G., Piatti, G., Romussi, G., Dal Piaz, F., & De Tommasi, N. (2015). Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry*, *110*, 120–132. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.033.

Böttcher, T. & Sieber, S. A. (2008). *β*-lactones as privileged structures for the active-site labeling of versatile bacterial enzyme classes. *Angewandte Chemie International Edition. 47*(24), 4600–4603. https://doi.org/10.1002/anie.200705768.

Brasil, D. S. B., Moreira, R. Y. O., Müller, A. H., & Alves, C. N. (2006). Theoretical and experimental study of aparisthman: A natural product with anti-ulcer activity. *International Journal of Quantum Chemistry*, *106*(13), 2706–2713. https://doi.org/10.1002/qua.21031.

Bruno, M., Piozzi, F. & Rosselli, S. (2002). Natural and hemisynthetic *neo*-clerodane diterpenoids from *Scutellaria* and their antifeedant activity. *Natural Product Reports*, *19*(3), 357–378. https://doi.org/10.1039/b111150g.

Calderón Oropeza, M. A. (2021). Estudio químico y antifúngico *in vitro* de tres especies del género *Salvia* (Familia: *Lamiaceae*) del Estado de Michoacán. [Tesis de Doctorado]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Carey, F. A., & Giuliano, R. M. (2014). Química orgánica (9ª ed.). Mc Graw-HiIl. ISBN: 978-607-15-1210-9.

Cechinel Filho, V., & Yunes, R. A. (2016). Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. *Química de produtos naturais, novos fármacos ea moderna farmacognosia, 5th edn. da Univali, Itajaí*, 13-39.

Costa, M. P. D., Magalhães, N. S. S., Gomes, F. E. S., & Maciel, M. A. M. (2007). Uma revisão das atividades biológicas da *trans*-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *17*(2), 275–286. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200024.

Dai, S. J., Qu, G. W., Yu, Q. Y., Zhang, D. W., & Li, G. S. (2010). New *neo*-clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. *Fitoterapia*, *81*(7), 737–741. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.01.001.

Dombray, T., Blanc, A., Weibel, J. M., & Pale, P. (2010). Gold(I)-catalyzed cycloisomerization of *β*-alkynylpropiolactones to substituted *α*-pyrones. *Organic Letters*, *12*(23), 5362–5365. https://doi.org/10.1021/ol1023739.

Douglas, J., Taylor, J. E., Churchill, G., Slawin, A. M. Z., & Smith, A. D. (2013). NHC-promoted asymmetric *β*-lactone formation from arylalkylketenes and electron-deficient benzaldehydes or pyridinecarboxaldehydes. *Journal of Organic Chemistry*, *78*(8), 3925–3938. https://doi.org/10.1021/jo4003079.

Drahl, C., Cravatt, B. F. & Sorensen, E. J. (2005). Protein-reactive natural products. *Angewandte Chemie International Edition*, *44*(36), 5788–5809. https://doi.org/10.1002/anie.200500900.

Ebada, S. S., Lajkiewicz, N., Porco, J. A., Jr, Li-Weber, M., & Proksch, P. (2011). Chemistry and biology of rocaglamides (= flavaglines) and related derivatives from *Aglaia* species (*Meliaceae*). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, *94*, 1–58. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0748-5_1.

Efdi, M., Itoh, T., Akao, Y., Nozawa, Y., Koketsu, M., & Ishihara, H. (2007). The isolation of secondary metabolites and *in vitro* potent anti-cancer activity of clerodermic acid from *Enicosanthum membranifolium*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *15*(11), 3667–3671. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.051.

Egbuna, C., Ezzat, S. M., Tijjani, H., & Srivastav, V. K. (2019). Synthetic analogs of phytochemicals. In Phytochemistry: An *in-silico* and *in-vitro* Update. *Springer*, 23–55. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6920-9_2.

Einhorn, A. (1883). Ueber derivate der orthonitrozimmtsäure. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, *16*(2), 2208–2216. https://doi.org/10.1002/cber.188301602132.

Gholizadeh, E., Belibel, R., Bachelart, T., Bounadji, C., & Barbaud, C. (2020). Chemical grafting of cholesterol on monomer and PDMMLA polymers, a step towards the development of new polymers for biomedical applications. *RSC Advances*, *10*(54), 32602–32608. https://doi.org/10.1039/d0ra06033j.

Goel, A. & Ram, V. J. (2009). Natural and synthetic 2*H*-pyran-2-ones and their versatility in organic synthesis. *Tetrahedron*, *65*(38), 7865–7913. https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.06.031.

Gómez-Hurtado, M. A., Torres-Valencia, J. M., Manríquez-Torres, J., del Río, R. E., Motilva, V., García-Mauriño, S., Ávila, J., Talero, E., Cerda-García-Rojas, C. M., & Joseph-Nathan, P. (2011). Absolute configuration of labdanes and *ent*-clerodanes from *Chromolaena pulchella* by vibrational circular dichroism, *Phytochemistry*, *72*(4-5), 409–414. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.021

González Ibarra, M. L., Lotina Hennsen, B., Trejo, C., Esquivel, B. (2003). Potential activity herbicide of kerlinic acid. Abstracts of Papers, *226th ACS National Meeting*.

Guerrero Reyes, J. R. (2015). Síntesis de beta-hidroxiácidos para la formación de beta-lactonas. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gupta, V. K., Verma, S., Pal, A., Srivastava, S. K., Srivastava, P. K., & Darokar, M. P. (2013). *In vivo* efficacy and synergistic interaction of 16*α*-hydroxycleroda-3,13 (14) *Z*-dien-15,16-olide, a clerodane diterpene from *Polyalthia longifolia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(20), 9121–9131. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5154-9.

Hagiwara, H. (2019). Total syntheses of clerodane diterpenoids—A review. *Natural Product Communications*, *14*(6), 1934578X1984361. https://doi.org/10.1177/1934578x19843613.

Harinantenaina, L., Takahara, Y., Nishizawa, T., Kohchi, C., Soma, G., & Asakawa, Y. (2006). Chemical constituents of malagasy liverworts, part V: prenyl bibenzyls and clerodane diterpenoids with nitric oxide inhibitory activity from *Radula appressa* and *Thysananthus spathulistipus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *54*(7), 1046–1049. https://doi.org/10.1248/cpb.54.1046.

Hiruma-Lima, C. A., Gracioso, J. S., Toma, W., Almeida, A. B., Paula, A. C., Brasil, D. S., Muller, A. H., & Souza Brito, A. R. (2001). Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *8*(2), 94–100. https://doi.org/10.1078/0944-7113-00017.

Hooker, J. M., Munro, T. A., Béguin, C., Alexoff, D., Shea, C., Xu, Y., & Cohen, B. M. (2009). Salvinorin A and derivatives: protection from metabolism does not prolong short-term, whole-brain residence. *Neuropharmacology*, *57*(4), 386–391. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.044.

Iqbal Choudhary, M., Mohammad, M. Y., Musharraf, S. G., Onajobi, I., Mohammad, A., Anis, I., Shah, M. R., Atta-ur-Rahman. (2013). Biotransformation of clerodane diterpenoids by *Rhizopus stolonifer* and antibacterial activity of resulting metabolites *Phytochemistry*, *90*, 56–61. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.007.

Jouanneau, M., Vellalath, S., Kang, G., & Romo, D. (2019). Natural product derivatization with *β*-lactones, *β*-lactams and epoxides toward 'infinite' binders. *Tetrahedron*, *75*(24), 3348–3354. https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.04.068.

Klein Gebbinck, E. A., Jansen, B. J. M. & de Groot, A. (2002). Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry*, *61*(7), 737–770. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00174-7.

Kluge, A. F. & Petter, R. C. (2010). Acylating drugs: redesigning natural covalent inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology*, *14*(3), 421–427. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.035.

Knollmann, B., Brunton, L., & Hilal-Dandan, R. (2017). *Goodman and gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (13a ed.). McGraw-Hill Education.

Lajkiewicz, N. J., Cognetta, A. B., III, Niphakis, M. J., Cravatt, B. F., & Porco, J. A., Jr. (2014). Remodeling natural products: Chemistry and serine hydrolase activity of a rocaglate-derived *β*-lactone. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(6), 2659–2664. https://doi.org/10.1021/ja412431g.

Lhullier, C., de Oliveira Tabalipa, E., Nienkötter Sardá, F., Sandjo, L., Zanchett Schneider, N., Carraro, J., & Schenkel, E. (2019). Clerodane diterpenes from the marine sponge *Raspailia bouryesnaultae* Collected in South Brazil. *Marine Drugs, 17(1), 57.* doi:10.3390/md17010057.

Li, R., Morris-Natschke, S. L. & Lee, K.-H. (2016). Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Natural Product Reports*, *33*(10), 1166–1226. https://doi.org/10.1039/c5np00137d.

Lowe, C. & Vederas, J. C. (1995). Naturally occurring *β*-lactones: Occurrence, syntheses and properties. A review. *Organic Preparations and Procedures International*, *27*(3), 305–346. https://doi.org/10.1080/00304949509458466.

Mantaj, J., Rahman, S. M., Bokshi, B., Hasan, C. M., Jackson, P. J., Parsons, R. B., Rahman, K. M. (2015). Crispene E, a *cis*-clerodane diterpene inhibits STAT3 dimerization in breast cancer cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *13*(13), 3882–3886. https://doi.org/10.1039/c5ob00052a.

Marthanda Murthy, M., Subramanyam, M., Hima Bindu, M., & Annapurna, J. (2005). Antimicrobial activity of clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia* seeds. *Fitoterapia*, *76*(3–4), 336–339. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.02.005.

Merlic, C. A. & Doroh, B. C. (2003). Amine-catalyzed coupling of aldehydes and ketenes derived from Fischer carbene complexes: Formation of *β*-lactones and enol ethers. *Journal of Organic Chemistry*, *68*(15), 6056–6059. https://doi.org/10.1021/jo034476n.

Merritt, A. T. & Ley, S. V. (1992). Clerodane diterpenoids. *Natural Product Reports*, *9*(3), 243–287. https://doi.org/10.1039/np9920900243.

Morita, M., Mase, N., Yoda, H., & Takabe, K. (2005). A simplified synthesis of (*R*)-(−)-muscone using a ring-opening reaction of (*R*)-(+)-*β*-methyl-*β*-propiolactone. *Tetrahedron, Asymmetry*, *16*(19), 3176–3182. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.08.042.

Mulzer, J. & Brütrup, G. (1979). Stereospecific synthesis of *γ*-lactones by dyotropic Wagner-Meerwein rearrangement. *Angewandte Chemie International Edtion*, *18*(10), 793–794. https://doi.org/10.1002/anie.197907931.

Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, *83*(3), 770–803. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Niero, R., Cechinel Filho, V. & Yunes, R. A. (2018). Medicinal Plants and Phytomedicines. In Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential. *Springer*, 1-34. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00545-0_1.

Noel, A., Delpech, B. & Crich, D. (2014). Chemistry of the *β*-thiolactones: Substituent and solvent effects on thermal decomposition and comparison with the *β*-lactones. *Journal of Organic Chemistry*, *79*(9), 4068–4077. https://doi.org/10.1021/jo500577c.

Omura, S., Fujimoto, T., Otoguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H., & Sasaki, Y. (1991). Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *Journal of Antibiotics*, *44*(1), 113–116. https://doi.org/10.7164/antibiotics.44.113.

Potts, B. C., Albitar, M. X., Anderson, K. C., Baritaki, S., Berkers, C., Bonavida, B., Chandra, J., Chauhan, D., Cusack, J. C., Jr, Fenical, W., Ghobrial, I. M., Groll, M., Jensen, P. R., Lam, K. S., Lloyd, G. K., McBride, W., McConkey, D. J., Miller, C. P., Neuteboom, S. T., Oki, Y., & Palladino, M. A. (2011). Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Current Cancer Drug Targets*, *11*(3), 254–284. https://doi.org/10.2174/156800911794519716.

Prisinzano, T. E. & Rothman, R. B. (2008). Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology. *Chemical Reviews*, *108*(5), 1732–1743. https://doi.org/10.1021/cr0782269.

Reading, C. & Cole, M. (1977). Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *11*(5), 852–857. https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.852.

Reddy, L. R. & Corey, E. J. (2006). Novel bicyclization reaction leading to a fused beta-lactone. *Organic letters*, *8*(8), 1717–1719. https://doi.org/10.1021/ol060464n.

Robinson, S. L., Christenson, J. K. & Wackett, L. P. (2019). Biosynthesis and chemical diversity of *β*-lactone natural products. *Natural Product Reports*, *36*(3), 458–475. https://doi.org/10.1039/c8np00052b.

Rodríguez-Hahn, L., García, A., Esquivel, B., & Cárdenas, J. (1987). Structure of kerlinic acid from *Salvia keerlii*. Chemical correlation with melisodoric acid. *Canadian Journal of Chemistry*, *65*(12), 2687–2690. https://doi.org/10.1139/v87-445.

Rodríguez-Hahn, L., Martínez, C. G., & Romo, J. (1973). Estructura del ácido melisodórico, un diterpeno aislado de *Salvia melissodora* Lag. *Rev. Latinoamer. Quím*, *4*, 93–100.

Sashidhara, K. V., Singh, S. P., Srivastava, A., Puri, A., Chhonker, Y. S., Bhatta, R. S., Shah, P., & Siddiqi, M. I. (2011). Discovery of a new class of HMG-CoA reductase inhibitor from *Polyalthia longifolia* as potential lipid lowering agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(10), 5206–5211. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.012.

Sathe, M. & Kaushik, M. P. (2010). Gomphostenins: two new antimalarial compounds from the leaves of *Gomphostemma niveum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *20*(3), 1312–1314. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.120.

Schaffer, J. E., Reck, M. R., Prasad, N. K., & Wencewicz, T. A. (2017). *β*-Lactone formation during product release from a nonribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology*, *13*(7), 737–744. https://doi.org/10.1038/nchembio.2374.

Shen, L., Pugsley, L., Cencic, R., Wang, H., Robert, F., Naineni, S. K., Sahni, A., Morin, G., Zhang, W., Nijnik, A., Porco, J. A., Jr, Langlais, D., Huang, S., & Pelletier, J. (2021). A forward genetic screen identifies modifiers of rocaglate responsiveness. *Scientific Reports*, *11*(1), 18516. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97765-8.

Silva, L., Gomes, A. C. & Rodilla, J. M. L. (2011). Diterpene lactones with labdane, halimane and clerodane frameworks. *Natural Product Communications*, *6*(4), 497–504. https://doi.org/10.1177/1934578x1100600410.

Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., Esquivel, B., & Rodriguez-Hahn, L. (1996). Effect of clerodane-type diterpenoids isolated from *Salvia* spp. on the feeding behaviour of *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Science*, *47*(1), 17–23. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199605)47:1<17::aid-ps378>3.0.co;2-i.

Solé, C. & Fernández, E. (2013). Alkoxide activation of aminoboranes towards selective amination. *Angewandte Chemie International Edition*, *52*(43), 11351–11355. https://doi.org/10.1002/anie.201305098.

Staudinger, H. & Bereza, S. (1911). Zur Kenntnis der Ketene. Einwirkung von Diphenylketen auf Chinone. *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, *380*(3), 243–277. https://doi.org/10.1002/jlac.19113800302.

Tang, W., Kubo, M., Harada, K., Hioki, H., & Fukuyama, Y. (2009). Novel NGF-potentiating diterpenoids from a Brazilian medicinal plant, *Ptychopetalum olacoides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *19*(3), 882–886. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.100.

Titov, D. V., Gilman, B., He, Q. L., Bhat, S., Low, W. K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A. L., Miller, P. S., Kugel, J. F., Goodrich, J. A., Liu, J. O. (2011). XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nature Chemical Biology*, *7*(3), 182–188. https://doi.org/10.1038/nchembio.522.

Tokoroyama, T. (2000). Synthesis of clerodane diterpenoids and related compounds - stereoselective construction of the decalin skeleton with multiple contiguous stereogenic centers. *Synthesis*, *2000*(5), 611–633. https://doi.org/10.1055/s-2000-6381.

Wade, L. G., & Simek, J. W. (2017). Química orgánica. Volumen 2 (9ª ed.). Pearson Educación. ISBN: 978-607-32-3849-6.

Zeiler, E., List, A., Alte, F., Gersch, M., Wachtel, R., Poreba, M., Drag, M., Groll, M., & Sieber, S. A. (2013). Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(28), 11302–11307. https://doi.org/10.1073/pnas.1219125110.

Zhang, J., Ma, Y., Qiu, K., Li, B., Xue, Z., Tian, B., & Tang, Y. (2022). Elucidating the selectivity of dyotropic rearrangements of *β*-lactones: a computational survey. *Organic Chemistry Frontiers*. *9*(2), 329–341. https://doi.org/10.1039/d1qo01591e.

Zhang, Z., Guiley, K. Z. & Shokat, K. M. (2022). Chemical acylation of an acquired serine suppresses oncogenic signaling of K-Ras(G12S). *Nature Chemical Biology*, *18*(11), 1177–1183. https://doi.org/10.1038/s41589-022-01065-9.