



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**TRANSPOSICIONES MOLECULARES EN DERIVADOS DE
VOUACAPANOS DEL GÉNERO *CAESALPINIA***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

M.C. ODESSA MAGALLÓN CHÁVEZ

DIRECTORES

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, bajo la dirección de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y la Codirección del D.C. Mario Armando Gómez Hurtado; con el apoyo de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) con número de registro 602906 y con apoyo financiero del proyecto CIC-UMSNH, ICTI FCCHT123_ME-4.1 y PRODEP.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
<i>Coulteria platyloba</i>	5
<i>Coulteria velutina</i>	5
Modificaciones químicas en productos naturales	6
Modificaciones químicas en vouacapanos	7
Transposiciones químicas	10
Transposiciones químicas en productos naturales	11
Reordenamientos químicos en el furano	12
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	15
Colecta	15
– <i>Coulteria platyloba</i>	15
– <i>Coulteria velutina</i>	29
Dicroísmo Circular Vibracional (DCV).	42

CONCLUSIONES	47
PARTE EXPERIMENTAL	48
Generalidades	48
Materia vegetal	48
Reacción general de aromatización	49
Reacción general de hidrólisis	49
<i>Coulleria platyloba</i>	49
→6β-acetoxivouacapano (6)	49
→6β-acetoxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (19)	50
→6β-hidroxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (51)	50
→6β-hidroxivouacapano (47)	50
→6β-formilvouacapano (52)	51
→Derivado vinílico 48	51
→Derivado vinílico 53	51
→6β-formilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (54)	52
→Derivado reordenado 55	53
→23-oxo-6β-acetoxivouacapano (56)	53
→Alcohol furánico 57	54
→Lactona 25	55
→12-hidroxipiranona 58	55
<i>Coulleria velutina</i>	55
→Ácido-6 <i>p</i> -cumariloxi-18-vouacapanoico (59)	55
→Vouacapano 59b	57
→Derivado metilado 60	57
→6β,18α-vouacapandiol (61)	58
→Derivado 62	59
→(+)-(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-vouacapan-4,6-olida (63)	59
Cultivos celulares	60
Medios de cultivo	60
Ensayo de viabilidad celular por MTT	61
REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de diterpenos comúnmente aislados del género <i>Caesalpinia</i> .	2
Figura 2. Vouacapanos funcionalizados con grupos hidroxilo y ésteres.	2
Figura 3. Productos naturales utilizados para el tratamiento contra el cáncer.	4
Figura 4. Cassanos aislados de <i>C. platyloba</i> .	5
Figura 5. Producto natural 11 y compuesto sintético 12 inhibidores de la HDAC.	6
Figura 6. Desarrollo de cabazitaxel a partir de docetaxel y paclitaxel.	7
Figura 7. Epoxilactonas obtenidas por fotooxidación del 6 β -acetoxivouacapano (6).	8
Figura 8. Derivados oxidados obtenidos a partir del 6 β -acetoxivouacapano (6).	8
Figura 9. Semisíntesis de tetrazoles a partir del vouacapano natural 6 .	9
Figura 10. Estructura del diterpeno 33 y las lactonas derivadas 34-36 .	9
Figura 11. Derivados de Mannich obtenidos a partir de la lactona semisintética 34 .	10
Figura 12. a) Reordenamiento de Wagner-Meerwein, b) expansión del anillo de indol.	11
Figura 13. Transposiciones de Wagner Meerwein de rasteviona (40).	11
Figura 14. Reordenamiento de vouacapanos aislados de <i>P. pulcherrima</i> .	11
Figura 15. Fórmula del 6 β -acetoxivouacapano (6) y sus derivados semisintéticos.	15
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del 6 β -hidroxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (51).	16
Figura 17. Productos de reacción con ácido fórmico de 47 .	17
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del derivado vinílico 53 .	18
Figura 19. Espectro COSY del derivado vinílico 53 .	19
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del 6 β -formilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (54).	20
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz del compuesto 55 .	21
Figura 22. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz del compuesto 55 .	22
Figura 23. Experimento NOESY del compuesto 55 .	23
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H de la cetona 56 en CDCl ₃ a 400 MHz.	24
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H en CDCl ₃ a 400 MHz del hidroxilo 57 .	25
Figura 26. Espectro de RMN de ¹ H de la lactona 25 en CDCl ₃ a 400 MHz.	27

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de productos de oxidación en CDCl_3 a 400 MHz.	28
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H del derivado 58 en CDCl_3 a 400 MHz.	29
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H del extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de <i>C. velutina</i> .	30
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 59 en CDCl_3 .	31
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 59b en CDCl_3 .	32
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado metilado 60 en CDCl_3	33
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado metilado 60 .	34
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del vouacapano 61 en CDCl_3 .	35
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto 61 en CDCl_3 .	36
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del vouacapano 62 en CDCl_3 .	37
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto 62 en CDCl_3 .	38
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del vouacapano 63 en CDCl_3 .	39
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto 63 en CDCl_3	40
Figura 40. Experimento COSY del compuesto 63 en CDCl_3	41
Figura 41. Experimento NOESY del compuesto 63 en CDCl_3	42
Figura 42. Confórmero de mínima energía del (+)-(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-vouacapan-4,6-olida (63) en nivel de teoría B3LYP/DGDZVP.	43
Figura 43. Comparación de los espectros de IR y DCV experimentales y DFT B3LYP/DGDZVP calculados de (+)-(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-vouacapan-6,18-olida (63).	44
Figura 44. Efecto del cumarato 59 sobre la viabilidad de las líneas celulares HeLa, MDA-MB-232, Caco-2 y NIH/3T3 tras un tratamiento de 48 h.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de colecta	15
----------------------------------	----

ÍNDICE DE ESQUEMAS

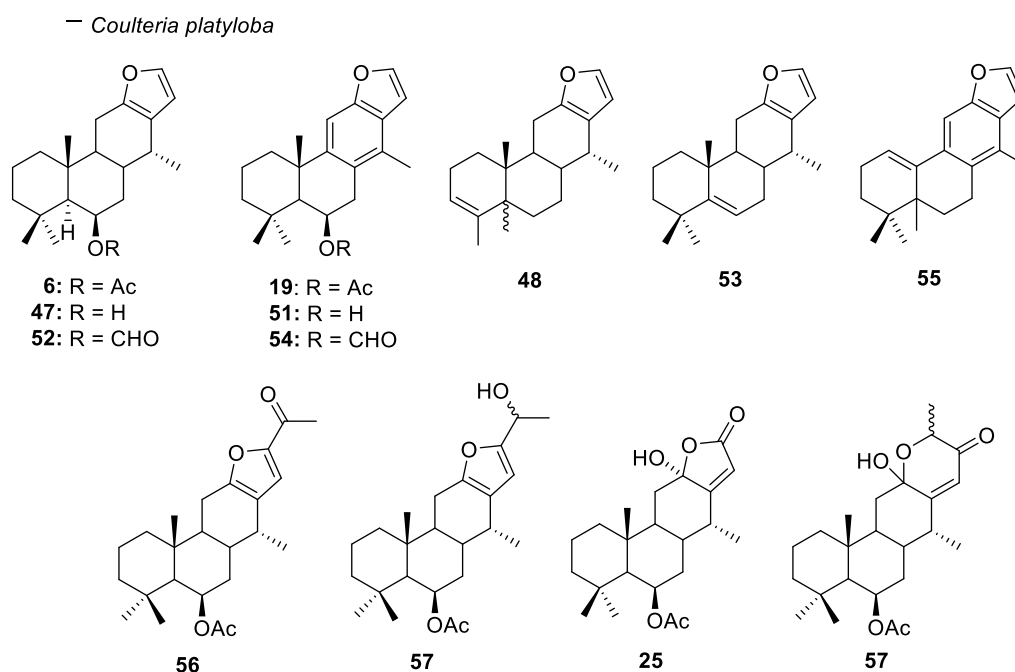
Esquema 1. Reacción de deshidratación y reordenamiento el diterpeno 44 .	12
--	----

Esquema 2.	Reordenamiento del 6 β -hidroxivouacapano 47 en medio ácido.	12
Esquema 3.	Esquema general de reacción de reordenamiento de Achmatowicz.	13
Esquema 4.	Reordenamiento de Achmatowicz.	13
Esquema 5.	Tratamiento con ácido perclórico del 6 β -hidroxivouacapano (47).	17
Esquema 6.	Tratamiento ácido del alcohol benzofuránico 51 .	19
Esquema 7.	Acilación del vouacapano 6 .	23
Esquema 8.	Reducción de la cetona 56 .	25
Esquema 9.	Reacción de fotooxidación del compuesto 57 .	26
Esquema 10.	Reordenamiento de Achmatowicz del compuesto 57 .	27
Esquema 11.	Reacción de metilación del producto natural 59 .	32
Esquema 12.	Hidrólisis del cumarato natural 59 .	34
Esquema 13.	Hidrólisis del vouacapano natural 59 .	36
Esquema 14.	Lactonización del vouacapano 62 .	38

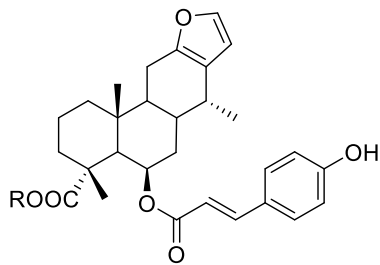
RESUMEN

En el presente trabajo se describe el aislamiento del 6 β -acetoxivouacapano (**6**) aislado de la especie *Coulteria platyloba*, así como, de un nuevo vouacapano, el ácido (-) - (4*R*,5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-((*E*)-*p*-cumaril-oxi)-18-vouacapanoico (**59**) aislado de la especie *Coulteria velutina*. A partir de estos productos naturales, se prepararon derivados mediante reacciones de hidrólisis, oxidación, deshidratación y reordenamiento. La exploración de estas reacciones permitió conocer, acerca del comportamiento reactivo de este tipo de estructuras y de cómo las funcionalidades presentes en cada una modifican este comportamiento. Las estructuras se elucidaron mediante RMN de una y dos dimensiones; se obtuvieron 10 nuevos compuestos, así como, 9 previamente reportados. Además, se determinó la configuración absoluta de los compuestos **59** – **63** mediante dicroísmo circular vibracional (DCV).

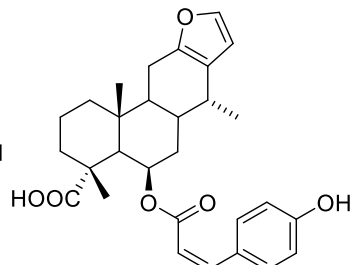
Adicionalmente, en este trabajo se realizaron ensayos para evaluar la actividad antiproliferativa del novedoso producto natural **59**, utilizando las líneas celulares HeLa, (adenocarcinoma cervical humano), MDA-MB-231 (cáncer de mama), Caco-2 (adenocarcinoma de colon caucásico) y NIH/3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón).



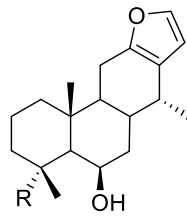
- *Coulteria velutina*



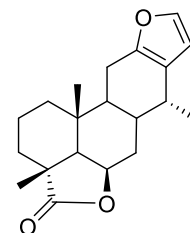
59: R = H
60: R = Me



59b



61: R = CH₂OH
62: R = COOH



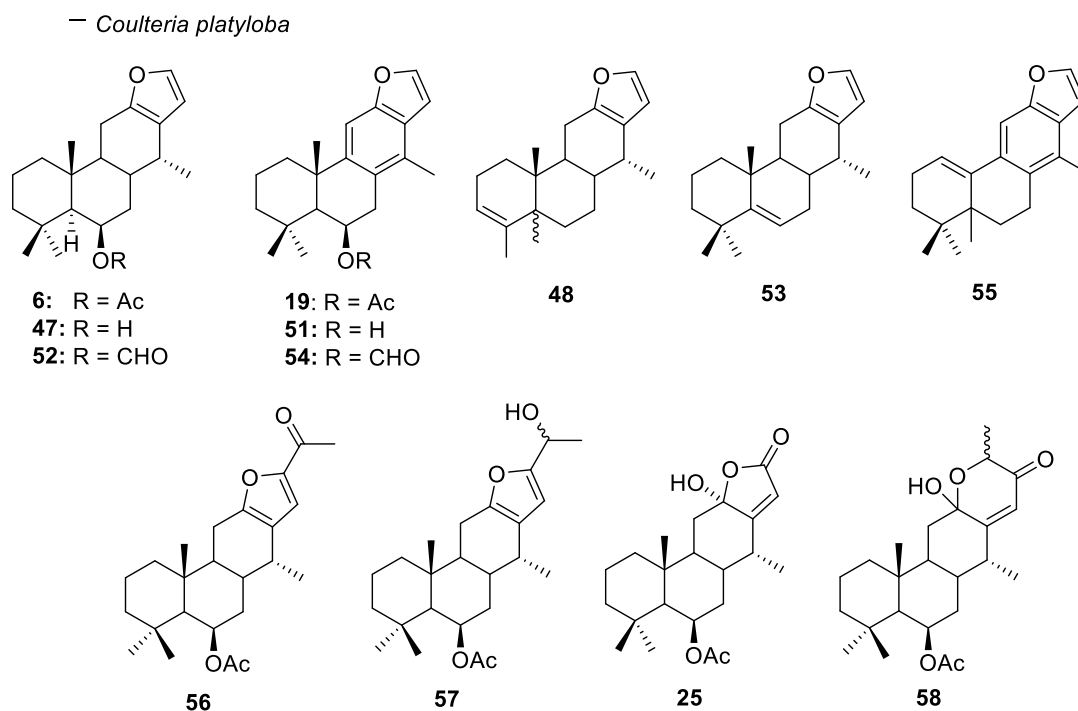
63

Palabras clave: *Coulteria*, vouacapanos, reordenamiento molecular, DCV.

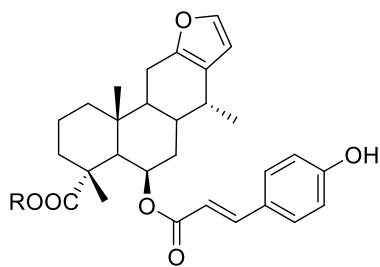
ABSTRACT

In the present work, we report the isolation of 6β -acetoxyvouacapane (**6**) isolated from the species *Coulteria platyloba*, as well as a new $(-)-(4R,5R,6R,8S,9S,10R,14R)$ -6-[(*E*)-*p*-coumaroyloxy]vouacapane-18-oic acid (**59**) obtained from the species *Coulteria velutina*. From these natural products, derivatives were prepared by hydrolysis, oxidation, aromatization, dehydration and rearrangement reactions. The exploration of these reactions in the structure of vouacapanes allowed us to learn more about the reactive behavior of this type of structure and how the functionalities present in each one modify this behavior. The structures were elucidated by one- and two-dimensional NMR; 10 new compounds were obtained, as well as 9 previously reported ones. In addition, the absolute configuration of the new natural vouacapane **59** and its derivatives (**59-63**) was determined by vibrational circular dichroism (VCD).

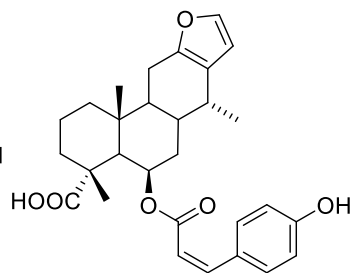
In addition, assays to evaluate the cytotoxic activity of the novel natural product **59** were performed, using HeLa (human cervical adenocarcinoma), MDA-MB-231 (breast cancer), Caco-2 (Caucasian colon adenocarcinoma) and NIH/3T3 (mouse embryonic fibroblast) cell lines.



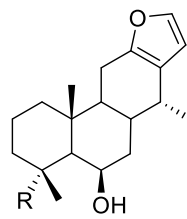
- *Coulteria velutina*



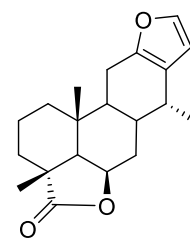
59: R = H
60: R = Me



59b



61: R = CH₂OH
62: R = COOH



63

Key words: *Coulteria*, vouacapane, molecular rearrangement, VCD.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son laboratorios químicos especializados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, estos metabolitos, constituyen la base de varios fármacos comerciales y remedios herbales, hasta la fecha, más del 30% de los medicamentos proceden directa o indirectamente de productos naturales (PNs) (Schwachtje et al., 2018).

Los metabolitos secundarios aportan un valor agregado por lo que no solo son importantes para la industria alimentaria y farmacéutica, sino que también, son valiosos para la industria perfumería, cosmética y agrícola (Twaij & Hasan, 2022).

El grupo más grande y diverso de compuestos naturales que se encuentran en las plantas son los terpenos. Se pueden clasificar según el número de unidades de isopreno, siendo los más comunes los monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) y politerpenos.

Los diterpenoides son biosintetizados por plantas, animales y hongos; exhiben diversas actividades biológicas y farmacológicas. Algunos de estos compuestos han sido ampliamente utilizados para fines clínicos y son medicamentos disponibles en el mercado (Wang et al., 2019).

Caesalpinia L. es uno de los géneros más importantes de la familia Fabaceae; incluye arbustos, árboles y trepadoras leñosas distribuidas en zonas tropicales y subtropicales con importancia medicinal, hortícola y económica (Torres-Colín & Saynes-Vásquez, 2020).

En los últimos 35 años se han presentado dudas persistentes sobre la delimitación del género (Gagnon et al., 2013). Pero estudios recientes (Gagnon et al., 2016), han demostrado la no monofilia de algunos de ellos y la necesidad de una nueva clasificación genérica. Actualmente, se clasifica en 21 géneros (Van-Lume et al., 2017). Sin embargo, en términos fitoquímicos algunas especies del género *Caesalpinia*, han sido reclasificadas y son la fuente principal de terpenos de tipo cassano, norcassano y vouacapanos (Figura 1). Esta clase de compuestos, han presentado atribuciones farmacológicas como antimicrobianos (Sudhakar et al., 2006), citotóxicos (Palasap et al., 2014) y antimaláricos (Kalauni et al., 2006), entre otras.

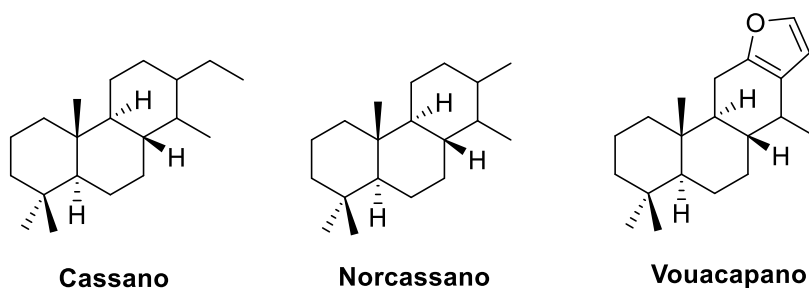


Figura 1. Esqueleto base de diterpenos comúnmente aislados del género *Caesalpinia*.

Las especies vegetales que se tomaron en consideración en la presente investigación han sido reclasificadas, *Caesalpinia platyloba* y *Caesalpinia velutina* pertenecen ahora al género *Coulteria* (Gagnon et al., 2013). A partir de especies de los géneros *Poinciana* y *Coulteria* se han aislado cassanos de tipo vouacapano funcionalizados con grupos alcoholes y ésteres (**1-6**) (Figura 2), que pueden dar paso a las exploraciones en su reactividad (Gómez-Hurtado et al., 2013; Maurya et al., 2012; Ragasa et al., 2002).

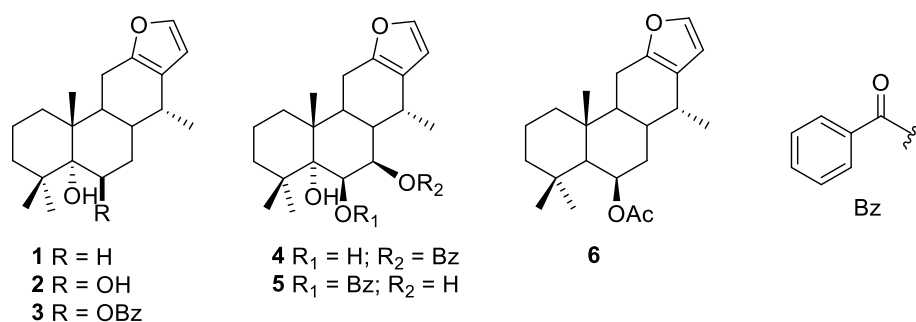


Figura 2. Vouacapanos funcionalizados con grupos hidroxilo y ésteres.

Este tipo de compuestos han demostrado ser moléculas bioactivas para el tratamiento de diversas enfermedades en las cuales destaca, la actividad citotóxica que exhiben tanto los metabolitos secundarios aislados, como, los derivados semisintéticos que se preparan a partir de estos.

Las modificaciones químicas a moléculas bioactivas permiten la obtención de nuevas estructuras que tengan mayor actividad que el producto natural, menor toxicidad, más solubilidad y mayor biocompatibilidad (Vivek et al., 2023).

Los reordenamientos químicos agrupan una amplia clase de reacciones orgánicas donde el esqueleto base de una molécula se reorganiza para dar un isómero estructural de la molécula

original; son reacciones de primera elección en la búsqueda de poblar el universo químico, ya que estos, permiten la obtención de productos con esqueletos distintos a la materia de partida.

En la presente investigación se reporta el aislamiento de vouacapanos a partir de los extractos de *C. velutina* y *C. platyloba*, así como, la preparación de derivados producto de variables condiciones de reacción que favorezcan los reordenamientos químicos y su exploración citotóxica.

ANTECEDENTES

Los organismos vivos producen miles de estructuras diferentes de compuestos orgánicos de bajo peso molecular. Algunos no tienen ninguna función aparente en los procesos básicos de crecimiento y desarrollo y se han denominado históricamente productos naturales o metabolitos secundarios.

Los terpenos, también conocidos como terpenoides o isoprenoides, son el mayor grupo de productos naturales, de las cuales, muy pocas se han investigado desde una perspectiva funcional (Gershenzon & Dudareva, 2007). La mayoría de estos compuestos tienen una fuerte tendencia lipofílica, son solubles en disolventes orgánicos y contienen átomos de carbono asimétricos con rotaciones ópticas.

La quimiodiversidad de los compuestos terpénicos, así como, el continuo avance en los procesos industriales hace que sus aplicaciones sean cada vez más amplias.

En la industria farmacéutica, los terpenos se utilizan principalmente como nuevos medicamentos contra el cáncer (Figura 3). Por ejemplo, el elemeno **7** es un compuesto natural contra el cáncer con efectos secundarios tóxicos menores, inhibe el cáncer de pulmón, hígado, nasofaríngeo y tumores cerebrales (Fan et al., 2023). El paclitaxel (**8**) es un agente antitumoral que se emplea para el tratamiento de algunos tipos de cáncer debido a su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales (Wani et al. 1971; Chavez et al., 2019). También son utilizados como antimicrobianos, antivirales, analgésicos, antiinflamatorios, antifúngicos, antiparasitarios, entre otras actividades.

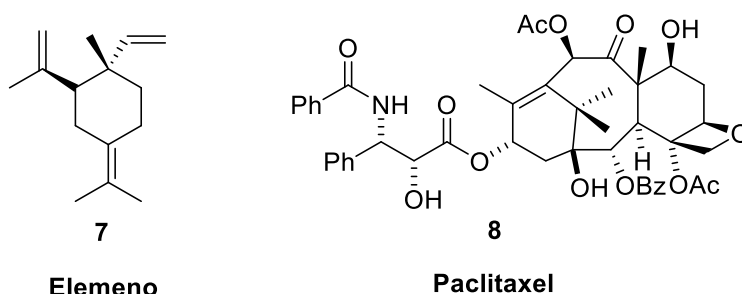


Figura 3. Productos naturales utilizados para el tratamiento contra el cáncer.

Modificaciones químicas en productos naturales

La diversidad de especies de plantas, animales, microorganismos y organismos marinos da lugar a múltiples metabolitos secundarios con estructuras químicas diversas, que ofrecen características especiales en comparación con las moléculas sintéticas convencionales, que confieren tanto ventajas como retos para el proceso de descubrimiento de fármacos.

Los productos naturales se caracterizan por una importante diversidad de andamiajes y complejidad estructural, ya que suelen tener un alto número de átomos de carbono sp^3 y átomos de oxígeno, más aceptores y donantes de electrones y una mayor rigidez molecular en comparación con las moléculas sintéticas (Atanasov et al., 2021). Estos, se adaptan y modifican químicamente en función de sus propiedades estructurales y biológicas, el descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales se caracteriza por tomar como punto de partida un compuesto activo y realizar manipulaciones a su estructura hasta alcanzar un criterio farmacológico adecuado (Guo, 2017).

A menudo los productos naturales sirven de inspiración para la elaboración de drogas sintéticas, evidencias de ello es la tricostatina A (**11**) (Figura 5), aislada de *Streptomyces hygroscopicus* en 1970, inicialmente se usó como antibiótico y antifúngico. Posteriormente, se descubrió que es un potente inhibidor reversible de las histonas desacetilasas (HDAC), estas son una diana importante para la terapia anticancerígena y antiinflamatoria. El primer inhibidor de la HDAC aprobado por la FDA fue el vorinostat (**12**) en 2006, los hallazgos sobre la actividad inhibidora del compuesto **11** sirvieron de guía para dilucidar el mecanismo molecular del vorinostat (Guo, 2017).



Figura 5. Producto natural **11** y compuesto sintético **12** inhibidores de la HDAC.

Un ejemplo de modificaciones químicas realizadas a productos naturales es el caso del paclitaxel (**8**) (*Taxus brevifolia*) y el docetaxel (**13**) (*Taxus baccata*) producto de semisíntesis con mayor potencia. En las últimas dos décadas ambos se han utilizado ampliamente como una

clase importante de agentes quimioterapéuticos solos o en combinación para tratar múltiples tipos de neoplasias malignas. Sin embargo, las proteínas MDR tienen cada vez más afinidad por el paclitaxel, lo que hace que algunas células tumorales sean más resistentes al fármaco. Para superar esto, los grupos hidroxilo en las posiciones C-7 y C-10 del docetaxel se sustituyeron por grupos metoxi, dando lugar al cabazitaxel (**14**) (Figura 6). Los ensayos de bioactividad demostraron que esta alteración estructural daba lugar a una mayor potencia tanto en las líneas celulares sensibles al docetaxel como en las resistentes a este fármaco, sin un aumento significativo de la toxicidad a la dosis máxima tolerada. El cabazitaxel tiene una lipofilia superior a la del docetaxel, lo que se traduce en una mayor penetración celular, que resulta en una mejor actividad contra las líneas celulares resistentes. El cabazitaxel combinado con prednisona prolongó significativamente la tasa de supervivencia global en pacientes con cáncer de próstata que habían recibido previamente tratamiento con docetaxel, por lo que el cabazitaxel recibió la aprobación de la FDA en 2010 para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico refractario a las hormonas (Galsky et al., 2010).

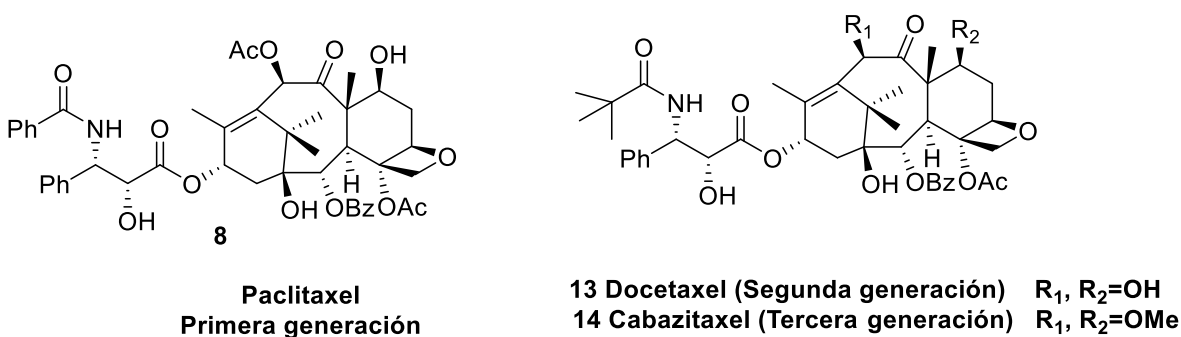


Figura 6. Desarrollo de cabazitaxel a partir de docetaxel y paclitaxel.

Modificaciones químicas en vouacapanos

La presencia de un ciclo reactivo como el furano en el anillo C de los vouacapanos y las funcionalizaciones que presentan comúnmente hacen que este tipo de moléculas sean susceptibles a modificaciones químicas. En la literatura existen algunas evidencias de ello. Talavera-Alemán y colaboradores en el 2017, mediante reacciones de fotooxidación de **6**, lograron modificar el anillo de furano generando las mezclas diastereoisoméricas de las epoxilactonas (**15 – 18**) (Figura 7) (Talavera-Alemán et al., 2017).

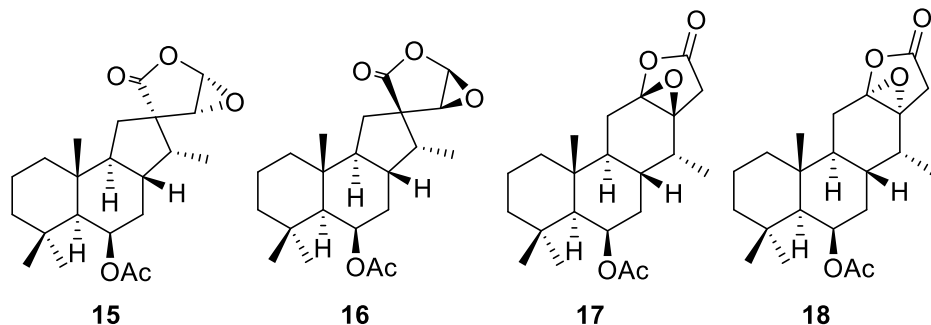


Figura 7. Epoxilactonas obtenidas por fotooxidación del 6 β -acetoxivouacapano (**6**).

Años más tarde Talavera-Alemán y colaboradores, reportaron nuevas modificaciones a partir del vouacapano **6** (Figura 8), mediante reacciones de oxidación usando diferentes agentes oxidantes, prepararon los derivados **19** – **27** que presentan diferente grado de oxidación. Ensayaron la actividad citotóxica de **6**, **19** y los cuales presentaron actividad citotóxica moderada frente a células cancerosas MCF-7 y HL-60 (Talavera-Alemán et al., 2020).

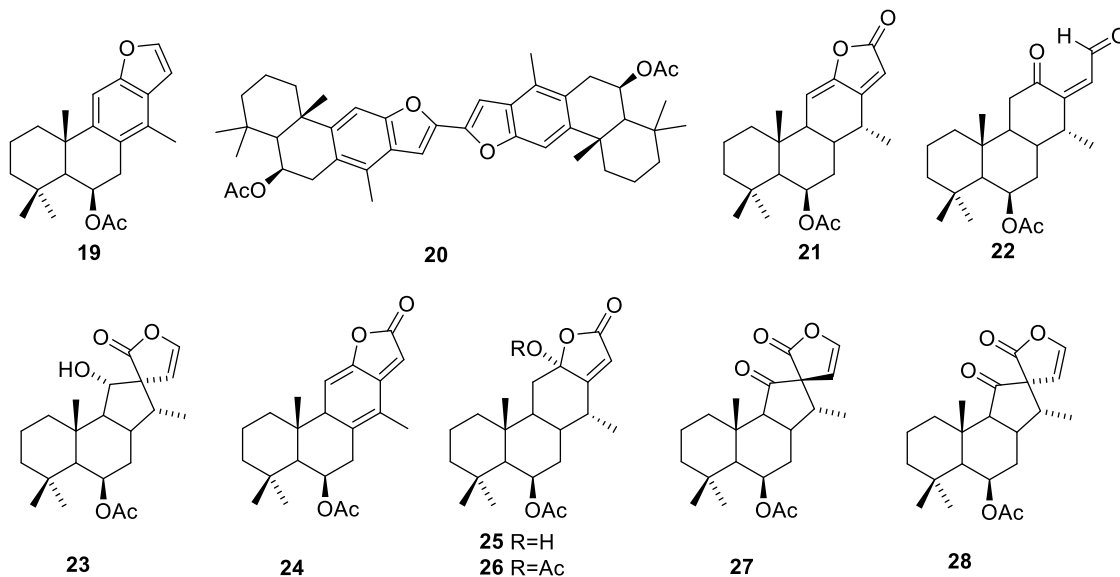


Figura 8. Derivados oxidados obtenidos a partir del 6 β -acetoxivouacapano (**6**).

Por su parte, Servín-García y colaboradores utilizaron el vouacapano **6**, primeramente prepararon el derivado formilado **29** para realizar la semisíntesis de los tetrazoles **30-32** (figura 9), esta modificación química implica la adición de un grupo sintético (tetrazol) clasificado como molécula diana, con lo cual, las posibilidades de bioactividad ya presentes en el producto natural incrementan (Servín-García et al., 2022).

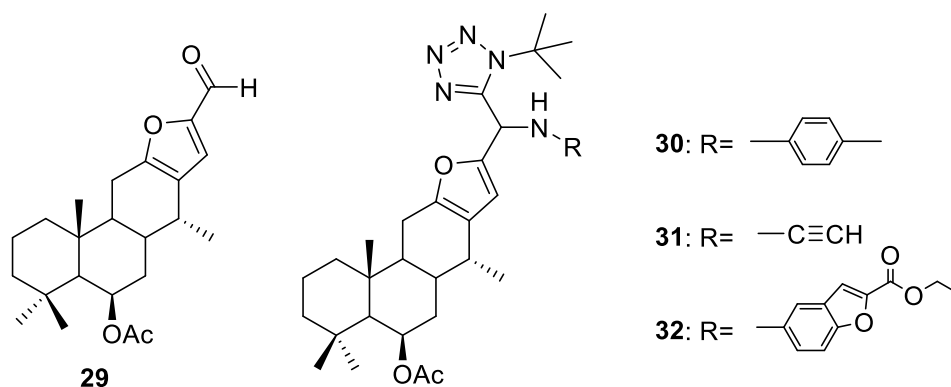


Figura 9. Semisíntesis de tetrazoles a partir del vouacapano natural **6**.

En 2009 Euzébio y colaboradores publicaron el aislamiento del compuesto **33** a partir de los frutos de *Pterodon polygalaeflorus*, así como la semisíntesis de tres derivados lactónicos: 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**34**), 6 α -acetoxivouacapan-7 β ,17 β -lactona (**35**) y 6-oxovouacapan-7 β ,17 β -lactona (**36**); investigaron la actividad antiproliferativa de estos compuestos frente a nueve líneas celulares de cáncer humano, los resultados revelaron que la lactona **34** era el furanditerpeno más potente contra todas las líneas celulares cancerosas estudiadas. Demostrando que la presencia de un grupo hidroxilo en C-6 y la presencia del anillo 7 β ,17 β -lactona son importantes para la actividad antiproliferativa de estos compuestos (Figura 10) (Euzébio et al., 2009).

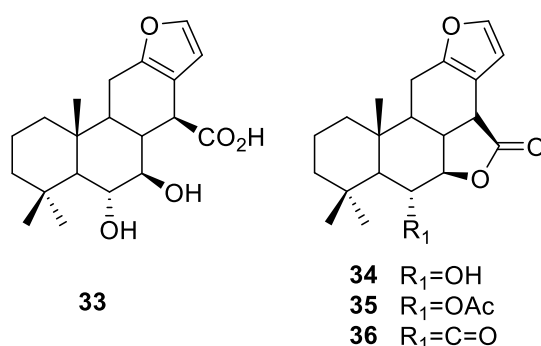


Figura 10. Estructura del diterpeno **33** y las lactonas derivadas **34-36**.

Posteriormente a partir del compuesto **34** que presentó más actividad se prepararon derivados **37 – 39** mediante la reacción de Mannich (Figura 11), estos compuestos también se probaron en líneas celulares de cáncer; observaron que los derivados eran más potentes que el compuesto **34** en la inhibición de la proliferación de células cancerosas.

Los estudios teóricos que realizaron apoyaron esos hallazgos, revelando el carácter nucleofílico del anillo de furano como una característica importante para el efecto antiproliferativo de los derivados de Mannich estudiados (Euzébio et al., 2010).

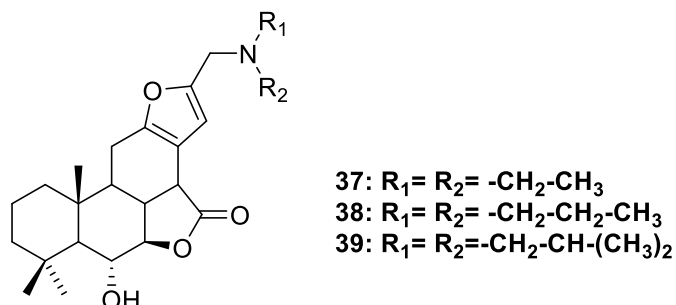


Figura 11. Derivados de Mannich obtenidos a partir de la lactona semisintética **34**.

Transposiciones químicas

En este tipo de reacciones ocurre la migración de un átomo, grupo funcional o grupo alquilo. Normalmente el reordenamiento químico se da debido a un cambio durante la mecanística de la reacción para cumplir con el principio de mínima energía.

El termino reordenamiento es usado para describir dos diferentes tipos de reacciones en química orgánica. Un reordenamiento puede involucrar la migración en un solo paso de un H o un fragmento molecular más grande, mediante la formación de un intermediario con tiempo de vida relativamente corto, por ejemplo, el reordenamiento de Wagner-Meerwein; o bien, puede ser una reacción de varios pasos donde de igual manera migre un H o un fragmento molecular más grande en alguno de los pasos de la reacción. Otro tipo de reordenamiento es la expansión del anillo (Figura 12). El reordenamiento ocurre en muchas reacciones orgánicas. Los compuestos reordenados son producto de una estabilidad termodinámica y dentro de los reordenamientos, los más comunes son los que tienen lugar en iones carbenio (Moulay, 2002).

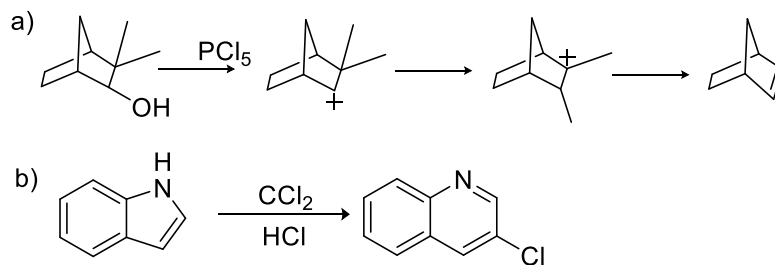


Figura 12. a) Reordenamiento de Wagner-Meerwein, b) expansión del anillo de indol.

Transposiciones químicas en productos naturales

Ejemplo de este tipo de reordenamientos es el reportado por Román y colaboradores sobre derivados de longipineno. El tratamiento con ácido *p*-toluensulfónico en benceno de la rasteviona (**40**) (Figura 13) condujo al derivado **41** mediante transposiciones de Wagner- Meerwein (Román et al., 1991).

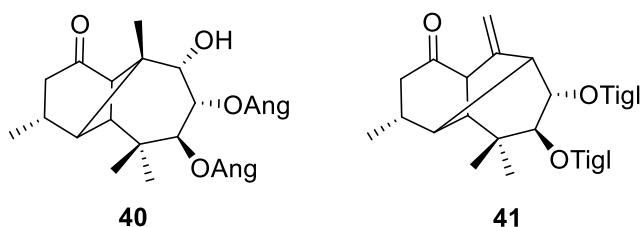


Figura 13. Transposiciones de Wagner Meerwein de rasteviona (**40**).

Adicionalmente, se han reportado transposiciones de los metilos en posición 4 de vouacapanos, como se muestra en la Figura 14, utilizando el compuesto **42**, aislado de *Poinciana pulcherrima* por Sudhakar y colaboradores en 2012, al ser tratado con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en diclorometano, favoreciendo la deshidratación del OH-5 y un reordenamiento de grupo metilo generando el derivado **43** en los cuales se presenta una alteración del esqueleto base (Sudhakar et al., 2012).

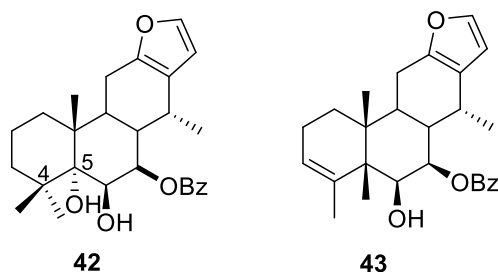
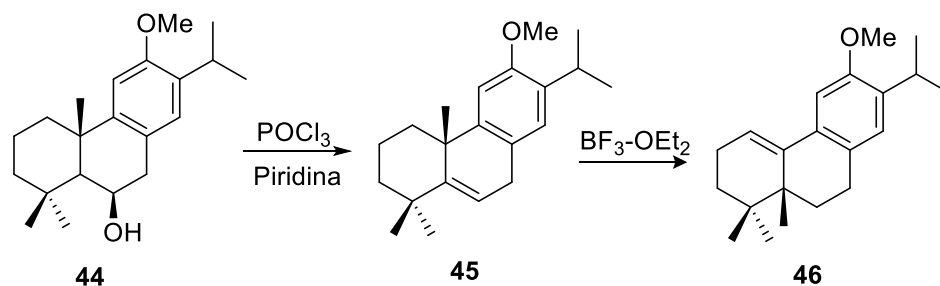


Figura 14. Reordenamiento de vouacapanos aislados de *P. pulcherrima*.

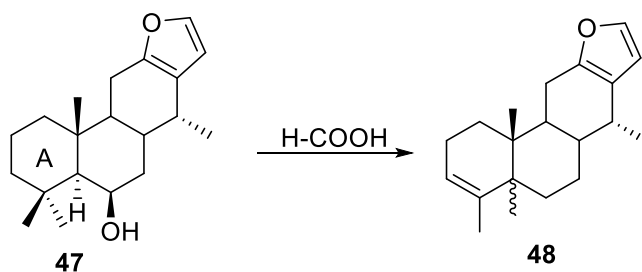
Matsumoto y colaboradores, trataron al diterpeno 12-metoxi-8,11,13-abietatrien-6 β -ol (**44**) con oxiclورو de fósforo en piridina con lo cual obtuvieron la olefina **45**, posterior

tratamiento de **45** con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ a temperatura ambiente produjo el compuesto reordenado **46** en dos etapas (Esquema 1) (Matsumoto et al., 1993).



Esquema 1. Reacción de deshidratación y reordenamiento del diterpeno **44**.

Por otro lado, el tratamiento con ácido fórmico del 6β -hidroxivouacapano (**47**) obtenido de la hidrólisis de **6**, favoreció la migración de uno de los metilos del anillo A hacia el C-5 de la estructura, dando lugar al derivado reordenado **48** (Esquema 2), cuya estereoquímica del C-5 no fue determinada (Magallón-Chávez, 2018).



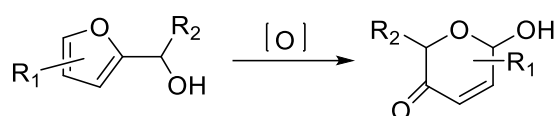
Esquema 2. Reordenamiento del 6β -hidroxivouacapano **47** en medio ácido.

Reordenamientos químicos en el furano

Los compuestos heterocíclicos son aquellos compuestos orgánicos cíclicos que contienen al menos un heteroátomo, estos compuestos son considerados vitales dentro de la química orgánica por su uso en el campo biológico, ya que han mostrado actividad contra variadas enfermedades (Banerjee & Banerjee, 2020).

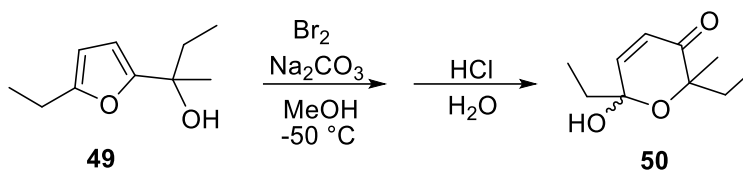
Los furanos son heterociclos que juegan un papel importante en la síntesis química ya que se encuentran presentes en diversas moléculas orgánicas. La reactividad de este heterociclo ha permitido la obtención de derivados con utilidad sintética mediante reacciones de sustitución, oxidaciones, reducciones, entre otras (Ke et al., 2017).

Desde un punto de vista sintético, la expansión oxidativa del anillo de furano representa un ejemplo importante de la utilidad de los bloques de construcción furánicos. El primer reporte de esta expansión de anillo se dio a finales de la década de los 1960, la llamada “Reacción de reordenamiento de Achmatowicz” (Esquema 3), valiosa debido a la amplia versatilidad de los productos resultantes. Esta reacción se ha llevado a cabo con diferentes reactivos como son, NBS, AMCPB, Br₂, PCC, conduciendo principalmente a la obtención de hidroxipiranonas (Ghosh & Brindisi, 2016; Bielski & Gryniewicz, 2021).



Esquema 3. Esquema general de reacción de reordenamiento de Achmatowicz.

Cavill y colaboradores reportaron por primera vez la adaptación del reordenamiento de Achmatowicz para la síntesis de 6-hidroxipiranona **50** mediante la expansión del anillo de furano de **49** (Esquema 4) (Cavill et al., 1969).



Esquema 4. Reordenamiento de Achmatowicz.

JUSTIFICACIÓN

Con base en el interés de la investigación básica relacionada con las exploraciones del comportamiento reactivo de productos naturales, y a los pocos reportes sobre reordenamientos moleculares en esqueletos de cassano, surge el interés de aislar los metabolitos secundarios mayoritarios de especies de la familia Fabaceae para promover los reordenamientos moleculares que permitan obtener compuestos novedosos, con la intención de conocer más acerca de la reactividad química de esqueletos de vouacapano y generar nuevas estructuras.

OBJETIVOS

Objetivo general

Promover reacciones de reordenamiento molecular en vouacapanos empleando condiciones de reacción estratégicas para la obtención de novedosos derivados diterpénicos con posible actividad citotóxica.

Objetivos específicos

- ° Aislar vouacapanos de *C. platyloba* y *C. velutina*.
- ° Preparar derivados estratégicos que permitan ensayar reacciones de reordenamiento.
- ° Explorar condiciones generales de reordenamiento en presencia de ácido y oxidación.
- ° Aislar y caracterizar los productos obtenidos.
- ° Determinar la actividad citotóxica de vouacapanos naturales y modificados químicamente.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Colecta

La colecta de las especies de interés se realizó en diferentes temporadas del año (Tabla 1), la especie vegetal previamente secada a la sombra y molida se sometió al método de extracción como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Datos de colecta y extracción

Especie	Parte de la planta	Disolvente	Método de extracción	Tiempo (h)	Lugar de colecta
<i>C. platyloba</i>	Hoja	CH ₂ Cl ₂	Maceración	72	Buenavista
<i>C. velutina</i>	Hoja	CH ₂ Cl ₂	Reflujo	4	Carácuaro

Los extractos de las especies utilizadas fueron analizados por RMN de ¹H para confirmar la presencia de vouacapanos en su contenido, se aislaron los compuestos mayoritarios de las dos especies mediante cromatografías en columna sucesivas con sistemas de disolventes adecuados.

→ *Coulteria platyloba*

Para iniciar el estudio de reactividad y reordenamientos de los vouacapanos se procedió a aislar el 6 β -acetoxivouacapano (**6**) a partir de las hojas de *C. platyloba* por la metodología descrita por Gómez-Hurtado y colaboradores en el 2013, y a partir de **6** se prepararon estratégicamente los derivados hidroxilados **47** y **51**, a partir de los derivados **6** y **19** (Figura 15) mediante las metodologías descritas (Talavera-Alemán et al., 2020; Álvarez-Esquivel 2012), respectivamente. Para generar el derivado **51** se trató a **19** con LiAlH₄/THF.

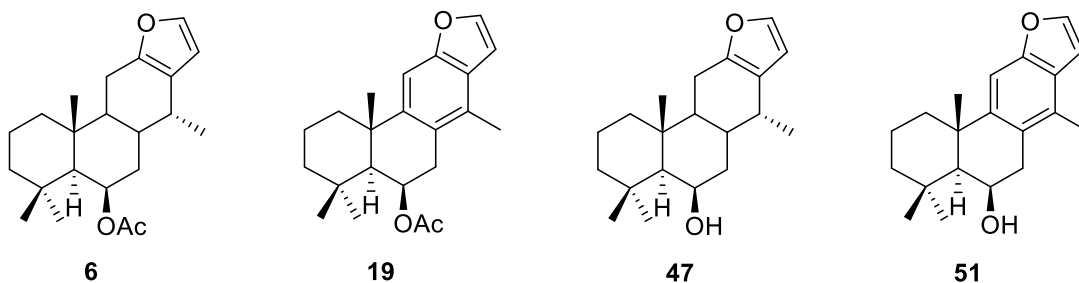


Figura 15. Fórmula del 6 β -acetoxivouacapano (**6**) y sus derivados semisintéticos.

El alcohol benzofuránico **51** fue identificado mediante su espectro de RMN de ^1H (Figura 16) se observa que la señal del H-6 se desplaza de 5.81 a 4.69 ppm siendo ahora base de hidroxilo, mientras que la señal en 2.11 ppm correspondiente al metilo del acetilo desaparece.

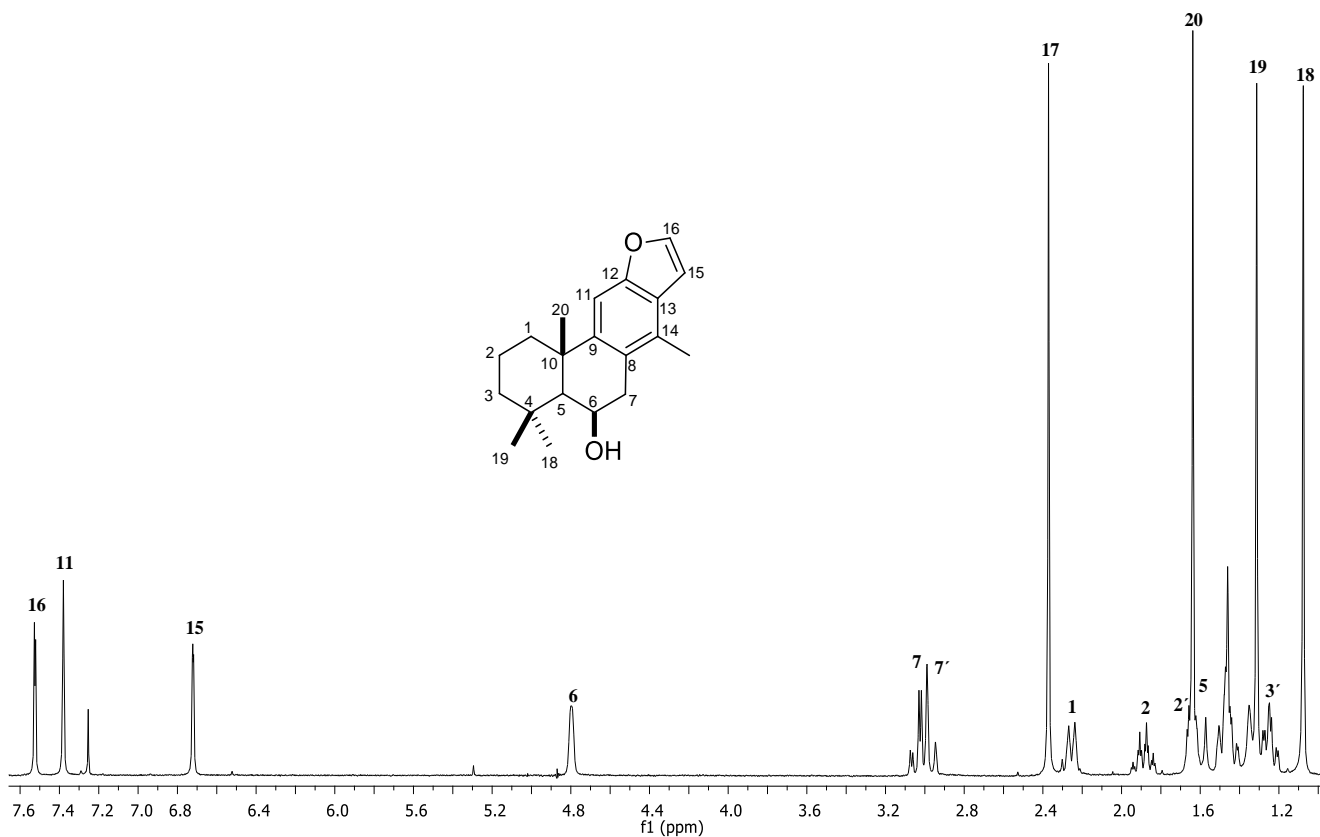


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6 β -hidroxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (**51**) en CDCl_3 .

Tomando como antecedentes los estudios realizados en un trabajo previo (Magallón-Chávez, 2018) (Esquema 2), para promover los reordenamientos de **47** en condiciones ácidas, el compuesto **47** generó al formiato **52** como único producto mediante tratamiento con ácido fórmico en diclorometano, mientras que en ausencia de disolvente y por lo tanto a una temperatura de reflujo mayor, dio como producto una mezcla del derivado reordenado **48** y el formiato **52** (Figura 17).

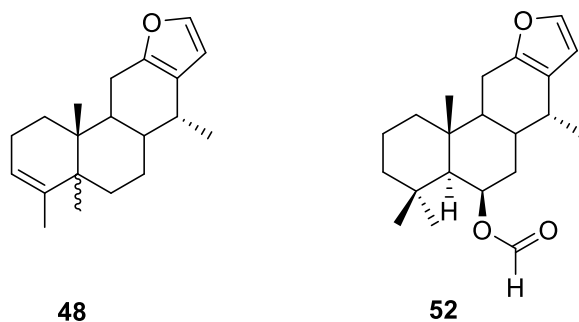
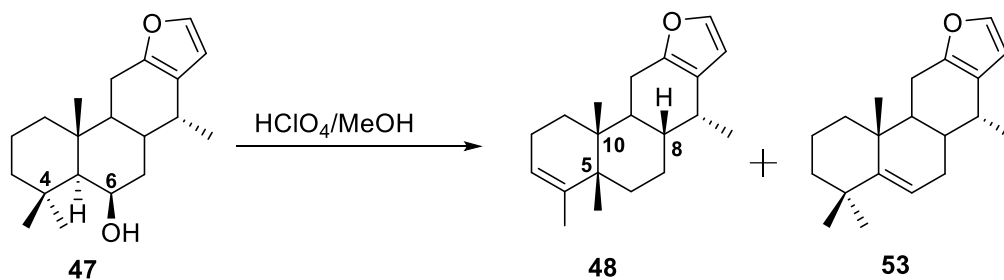


Figura 17. Productos de reacción con ácido fórmico de **47**.

Continuando con los ensayos en condiciones ácidas se decidió modificar el ácido, empleando ahora ácido perclórico en metanol durante cuatro horas. Lo que condujo nuevamente a la formación del derivado **48** y de **53** producto de la deshidratación. (Esquema 5).



Esquema 5. Tratamiento con ácido perclórico del 6 β -hidroxivouacapano (**47**).

La estereoquímica del metilo que migró de la posición 4 a la posición 5 se estableció por comparación con los resultados obtenidos por Sudhakar y colaboradores en el 2012, en vouacapanos aislados de *Caesalpinia pulcherrima*; mediante el análisis del experimento NOESY ellos observaron correlación de los metilos en posición 5, 10 y el H *beta* del C-8 en **48**. Bajo estas condiciones el compuesto **48** fue obtenido como producto mayoritario, mientras que en el espectro de RMN de ^1H (Figura 18) del producto minoritario **53** se observa en 5.55 ppm una señal triple con $J = 4.0$ Hz asignada al hidrógeno vinílico H-6, en 2.17 ppm se encuentra una señal múltiple correspondiente a los hidrógenos alílicos en posición 7, la señal del CH_3 -20 se presenta en 1.13 ppm como una señal simple que integra para tres hidrógenos, en 1.10 y 1.05 ppm se muestran dos señales simples asignadas a los metilos CH_3 -18 y CH_3 -19, la señal del CH_3 -17 secundario se observa como una señal doble en 1.01 ppm con una $J = 7.0$ Hz. Mediante el análisis de los desplazamientos químicos, se puede deducir que la reacción ocurrió únicamente con la deshidratación del grupo hidroxilo en la posición 6, sin evidencia de un

reordenamiento, ya que, los desplazamientos químicos de los metilos 18,19 y 20 no muestran un cambio significativo.

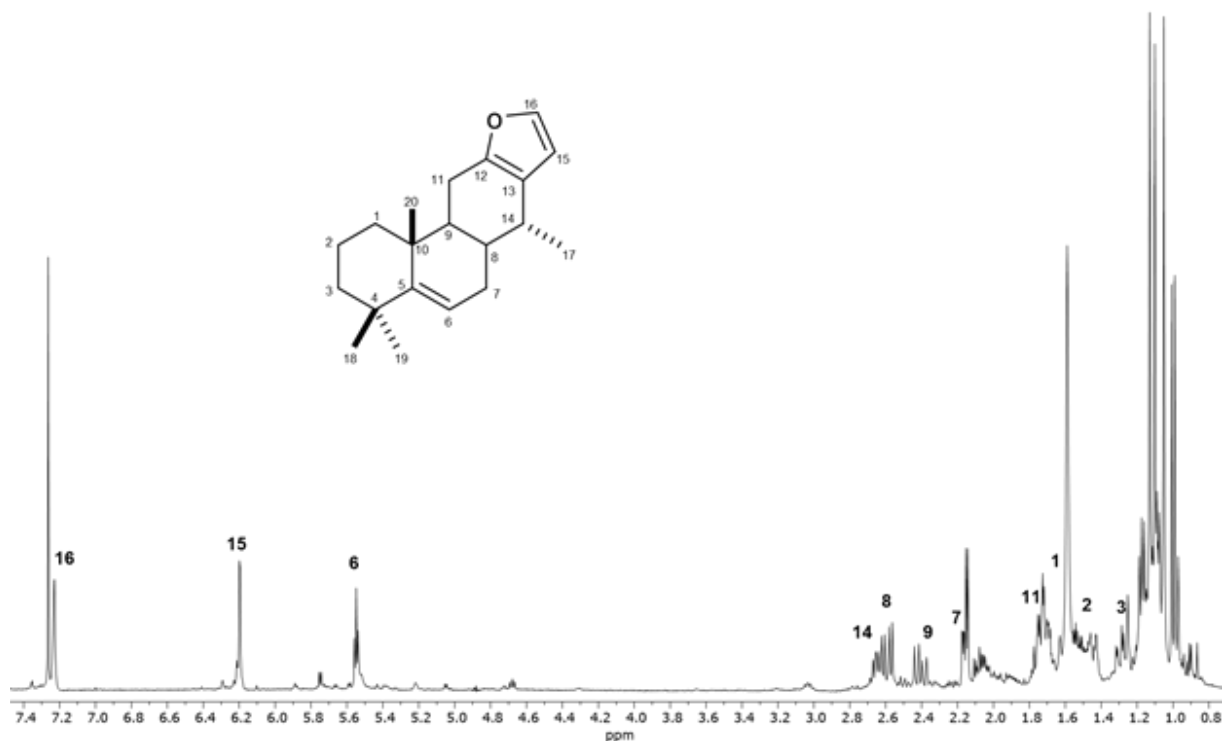


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado vinílico **53** en CDCl₃.

En el espectro COSY (Figura 19) se aprecian las correlaciones entre el protón vinílico H-6 y las señales de los hidrógenos de CH₂-7, también se observa la correlación entre los hidrógenos H-8 con H-9, así como H-9 con H-11, el metilo secundario CH₃-17 se correlaciona con el H-14 base de este metilo. Lo que sugiere la obtención del compuesto **53** producto de la deshidratación de **47**.

En todas las condiciones de reacción por los tratamientos ácidos se generaron mezclas de productos, modificando los rendimientos obtenidos.

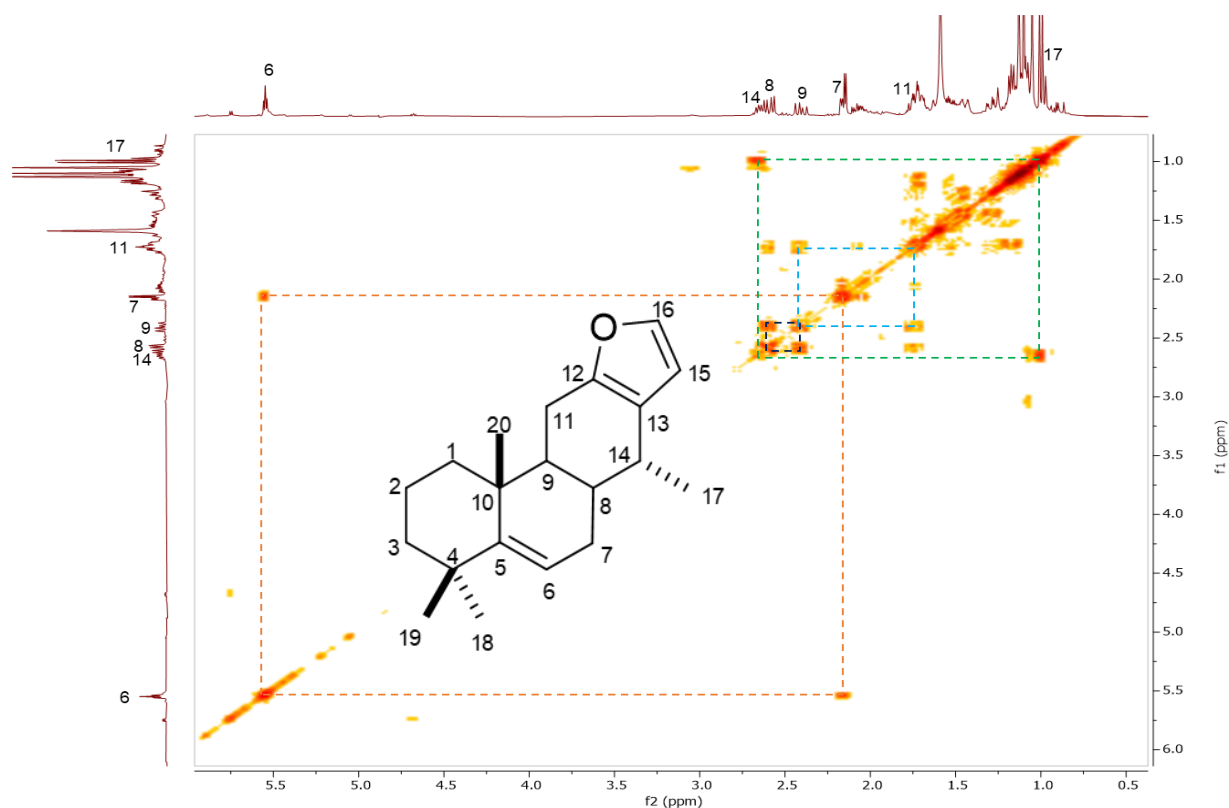
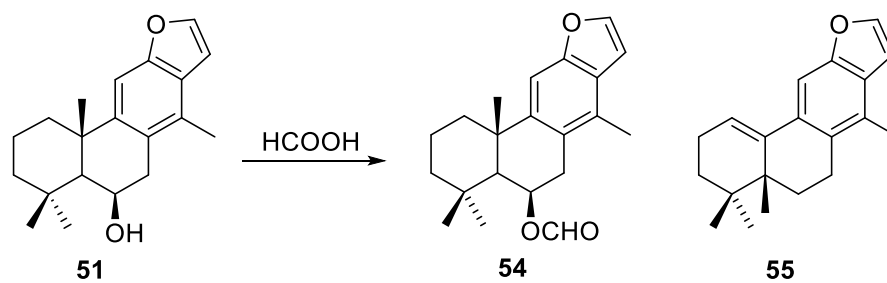


Figura 19. Espectro COSY del derivado vinílico **53** en CDCl_3 .

En reportes previos el derivado benzofurónico **51** había sido tratado con ácido fórmico en diclorometano, obteniendo como único producto el 6β -formilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (**54**) (Magallón-Chávez, 2018). Con la finalidad de obtener un producto reordenado se incrementó la temperatura de reflujo en ausencia de un co-disolvente con ácido fórmico (Esquema 6), la reacción se dejó durante cuatro horas, en el crudo de reacción se distingue la presencia de dos compuestos los cuales se separaron mediante cromatografía en columna y fueron analizados mediante RMN, correspondiendo a los compuestos **54** y **55**.



Esquema 6. Tratamiento ácido del alcohol benzofuránico **51**.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 20) del derivado formilado **54**, se encuentra en 8.10 ppm una señal simple de hidrógeno de formiato, en 7.53 ppm y 6.72 ppm se observan las señales características de los protones furánicos H-16 y H-15 con una $J = 2.2$ Hz, en 7.40 ppm se localiza una señal simple correspondiente al protón aromático H-11 y en 6.00 ppm la señal del hidrógeno base del formiato H-6. Los datos obtenidos coincidieron con los reportados para el 6β -formilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (**54**) (Magallón-Chávez, 2018). En estas condiciones el compuesto **54** se obtuvo como compuesto minoritario, mientras que a menor temperatura se obtiene como único producto.

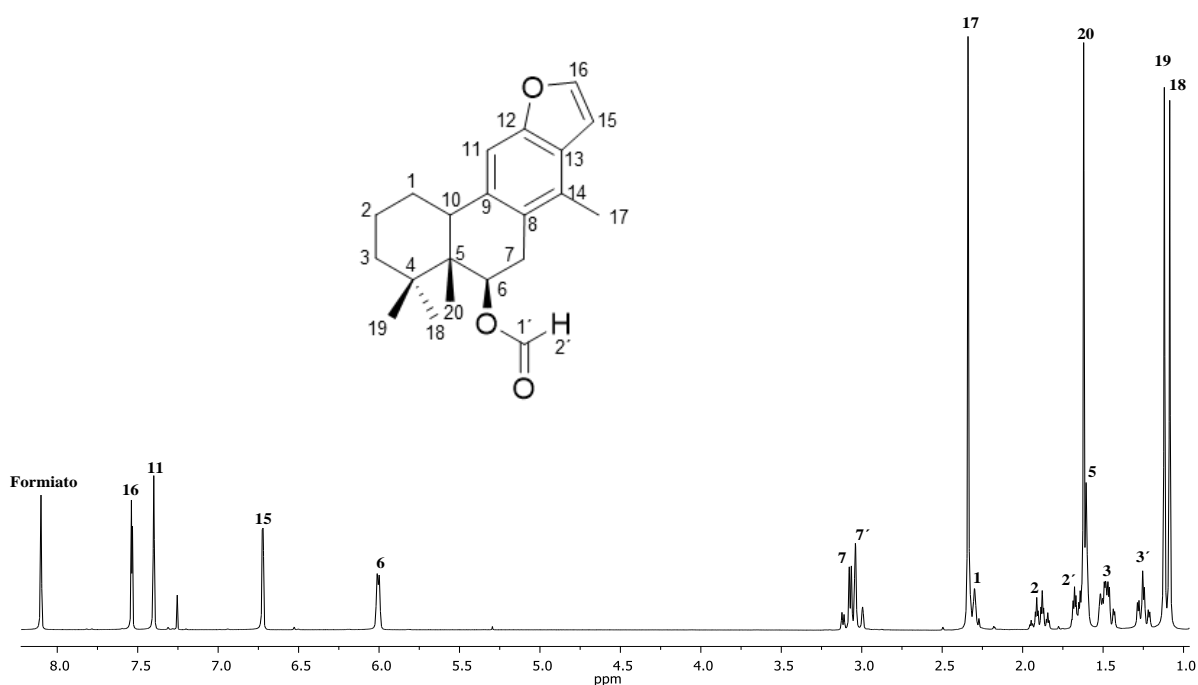


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 6β -formilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (**54**) en CDCl_3 .

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 21) del compuesto **55** se observa un desplazamiento en la señal del H-11 hacia 7.61 ppm, la señal del protón del furano H-16 se encuentra en 7.53 ppm y la señal del H-15 en 6.75 ppm como una doble de dobles con $J = 2.3$, 1.0 Hz, en 6.32 ppm se muestra una señal doble de dobles con $J = 4.9$, 2.8 Hz que corresponde a un hidrógeno vinílico en la posición 1, en 2.88 ppm y 2.68 ppm se ubican las señales de los protones H-7 y H-7', en 2.39 ppm se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos asignada al metilo aromático CH_3 -17, en 0.96 ppm se encuentra una señal simple que integra

para 6 hidrógenos correspondiente a los protones de los metilos CH₃-18 y CH₃-19, la señal simple del CH₃-20 se desplazó hacia campo alto (0.93 ppm), indicando la formación del derivado reordenado **55**.

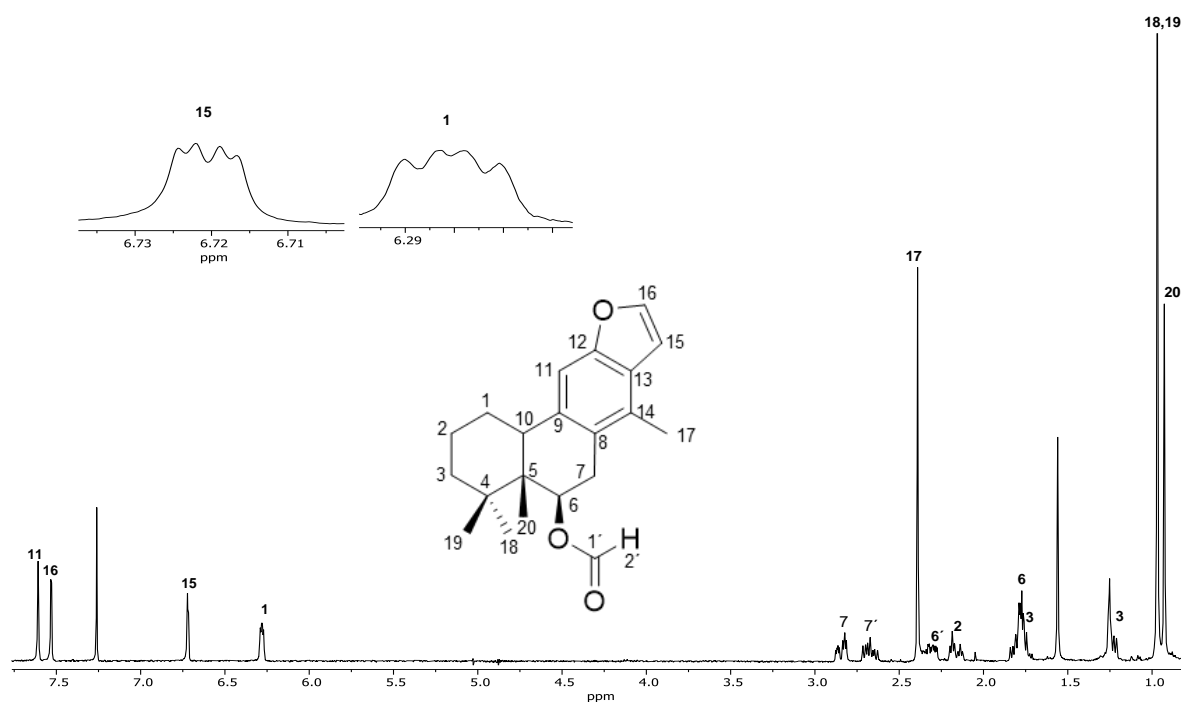


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del compuesto **55** en CDCl₃.

En el espectro de RMN de ¹³C (Figura 22) del derivado **55**, se observaron 20 señales características de un esqueleto diterpénico, entre 153.3 - 104.9 ppm se observan las señales de los carbonos del furano. En 120.1 ppm se observa una señal asignada al CH-1 vinílico, el C-10 cabeza de puente vinílico se muestra en 134.5 ppm, las señales de los carbonos del anillo C aromático se observan entre 140.3-105.2 ppm.

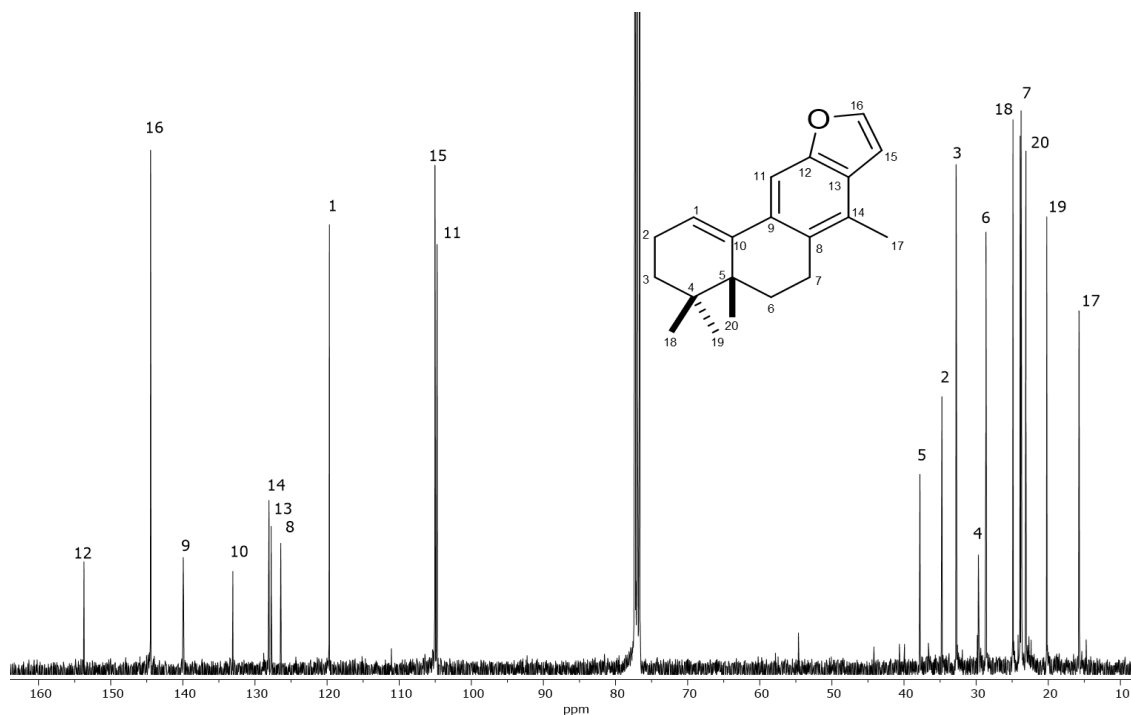


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **55** en CDCl_3 .

En el experimento NOESY (Figura 23), se observa la correlación entre el hidrógeno vinílico H-1 con el H-11 aromático lo que confirma la posición del doble enlace entre los carbonos C-1 y C-10 y la migración del metilo de posición 10 a posición 5. La correcta asignación de la estructura se llevó a cabo por RMN de una y dos dimensiones. En la literatura consultada no se encontraron datos sobre el compuesto **55** por lo que corresponde a una nueva estructura, la cual al presentar el desplazamiento del CH_3 -20 en posición 5 no corresponde a un esqueleto de tipo vouacapano.

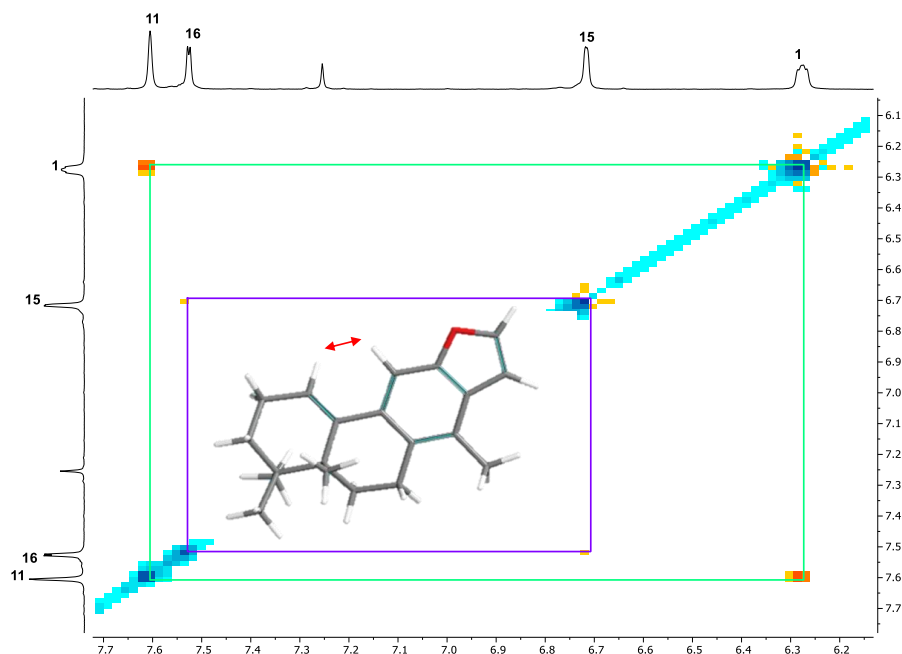
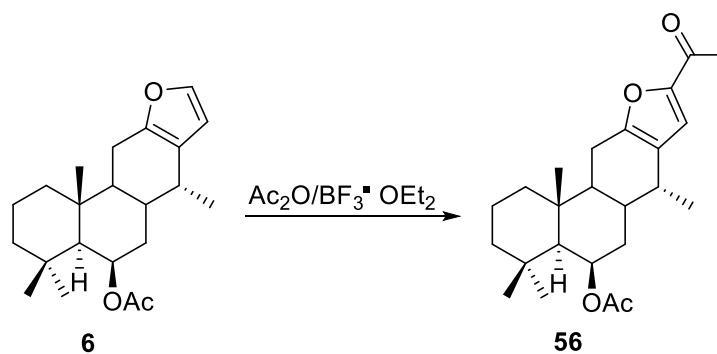


Figura 23. Experimento NOESY del compuesto **55** en CDCl_3 .

Considerando que el reordenamiento de Achmatowicz se utiliza para realizar expansiones del anillo del furano (Liang et al., 2022), se decidió explorar la reactividad del anillo del furano del 6β -acetoxivouacapano (**6**); teniendo en cuenta también que Servín-García y colaboradores introdujeron un grupo aldehído en el carbono C-2 del furano de **6** (Servín-García et al., 2022), se realizó una reacción de acilación, utilizando anhídrido acético y $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (Sartori & Maggi, 2006), obteniéndose el derivado **56** (Esquema 7).



Esquema 7. Acilación del vouacapano **6**.

El crudo de reacción se separó mediante cromatografía en columna obteniendo un compuesto mayoritario con un rendimiento del 57 %, el cual mostró en su espectro de RMN de ^1H (Figura 24) un desplazamiento de la señal del H-15 de 6.40 a 7.01 ppm. En 2.41 ppm se observa la señal del nuevo CH_3 -22 que se encuentra en posición alfa al carbonilo, el resto de las señales no sufrió un cambio significativo.

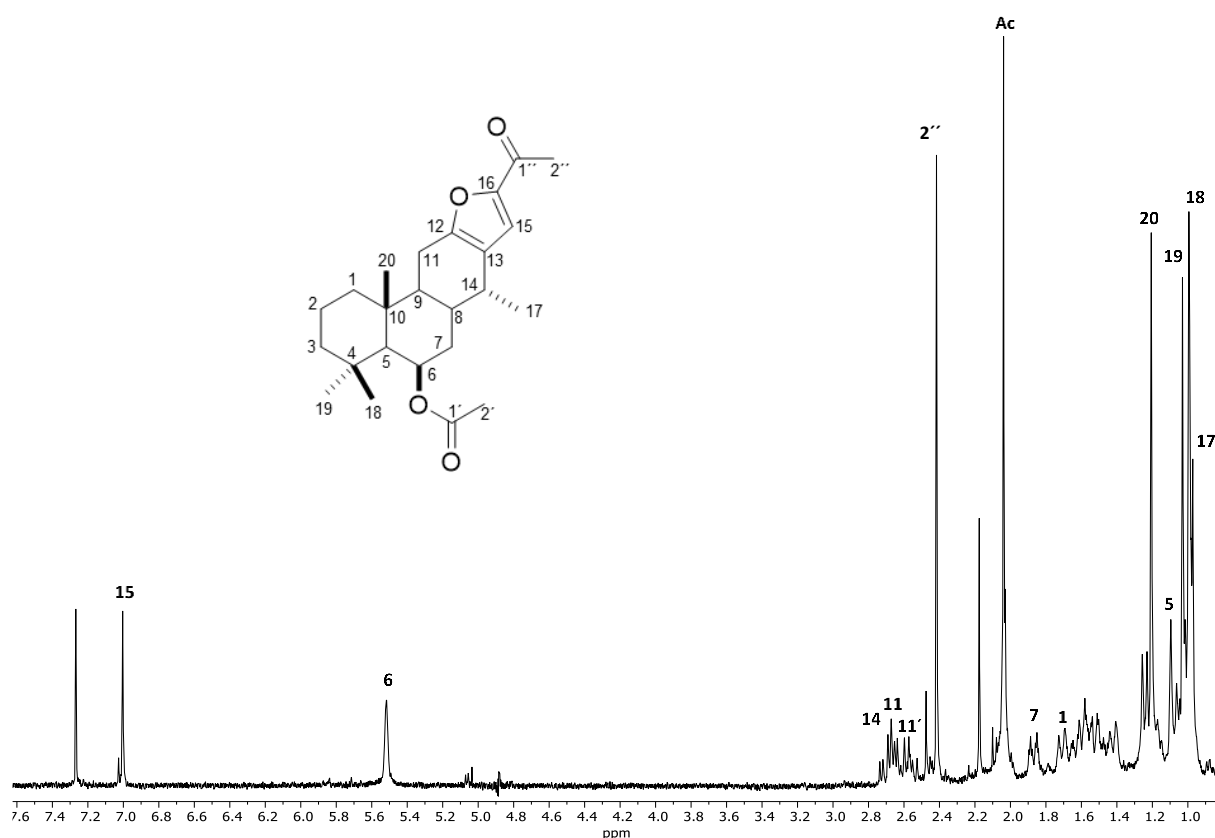
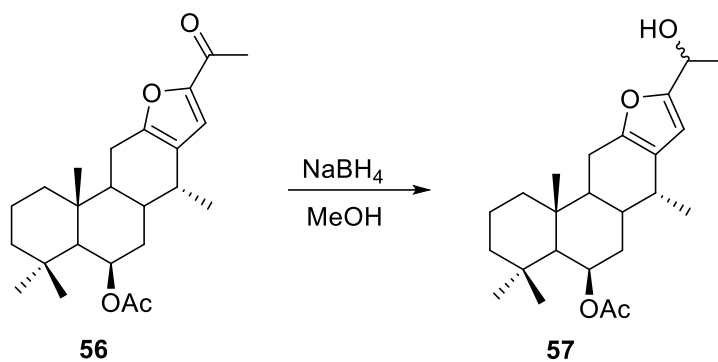


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H de la cetona **56** en CDCl_3 a 400 MHz.

Mediante el análisis del espectro de RMN de ^1H , se propone que la adición del grupo acetilo se llevó a cabo en el carbono C-16, correspondiente al carbono 2 del anillo de furano, obteniendo la cetona **56**. Posteriormente se realizó la reducción de la cetona **56** con borohidruro de sodio en metanol, con la finalidad de generar el alcohol necesario para el reordenamiento de Achmatowicz (Esquema 8).



Esquema 8. Reducción de la cetona **56**.

En el espectro de RMN de ^1H de **57** (Figura 25) se observa un desplazamiento a frecuencias menores de la señal del H-15 de 7.01 a 6.03 ppm, en 4.82 ppm se aprecia una señal cuádruple correspondiente al H-1' base de hidroxilo, en 1.52 ppm se observa una señal doble que integra para 3 hidrógenos asignada al metilo 2'. El producto corresponde al compuesto **57**.

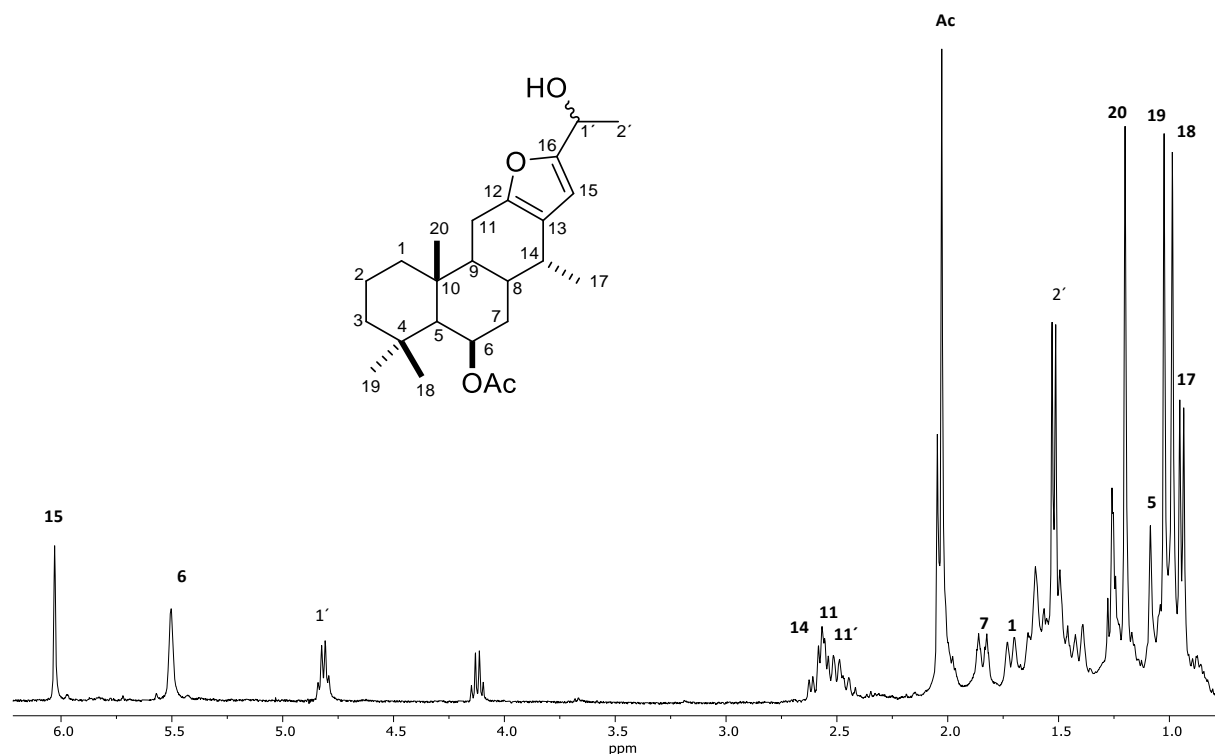
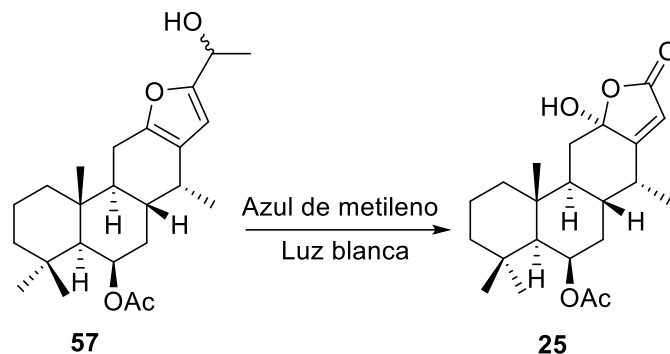


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz del hidroxilo **57** en CDCl_3 .

Para favorecer el reordenamiento de Achmatowicz, el hidroxilo **57** se inició ensayando la reacción de fotooxidación con azul de metileno bajo radiación de luz blanca durante 24 h a

temperatura ambiente, ya que existen reportes que bajo estas condiciones se favorece la expansión del anillo en varios derivados sustituidos con diferentes grupos alquilo (Esquema 9) (Deska et al., 2015; Plutschack et al., 2016; Zhou et al., 2023).



Esquema 9. Reacción de fotooxidación del compuesto **57**.

Bajo estas condiciones se obtuvo un único producto, el cual en el espectro de RMN de ^1H (Figura 26) presentó una sola señal de hidrógeno vinílico en 5.71 ppm correspondiente al H-15. En 5.51 ppm se identificó la señal del hidrógeno H-6 base del acetato. En 2.92 ppm se ubicó una señal quintuple con una $J = 7.4$ Hz, asignada al protón H-14. En 2.45 ppm se observó una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 13.0, 3.0$ Hz, la cual pertenece al H-11. Los desplazamientos obtenidos correspondieron a la lactona **25** obtenida anteriormente en nuestro grupo de trabajo mediante la oxidación del 6β -acetoxivouacapano (**6**) con DDQ (Talavera-Alemán et al., 2020).

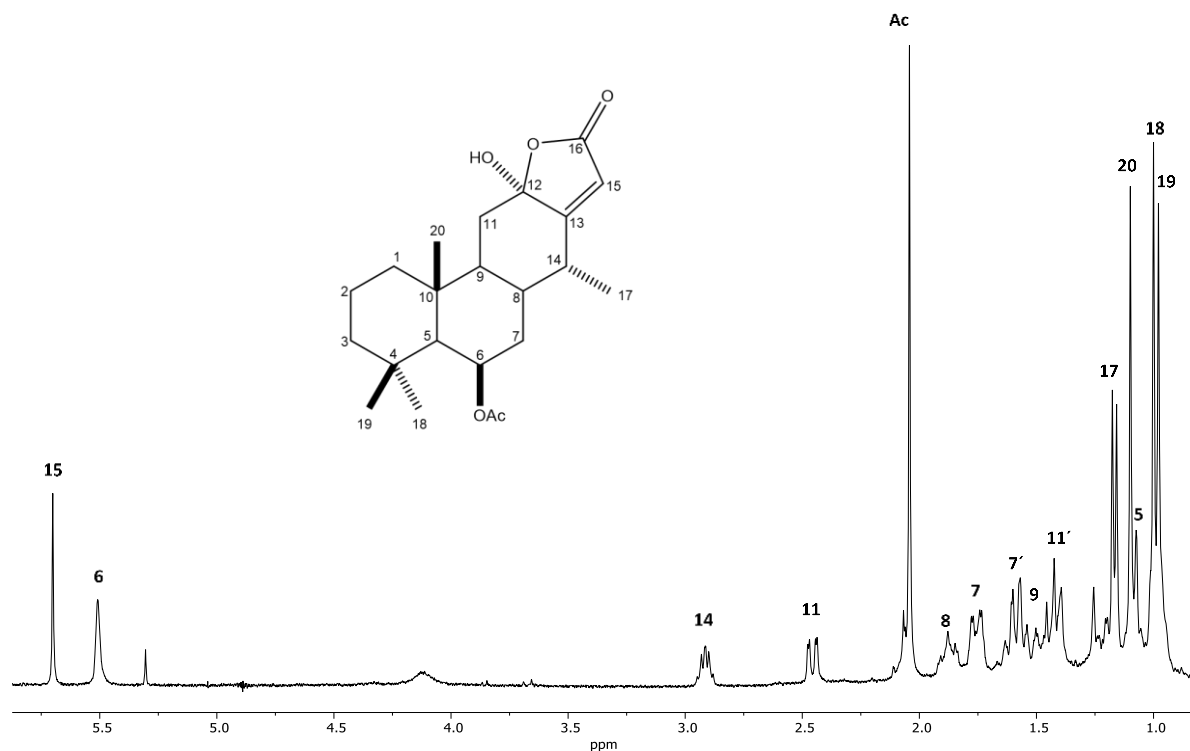
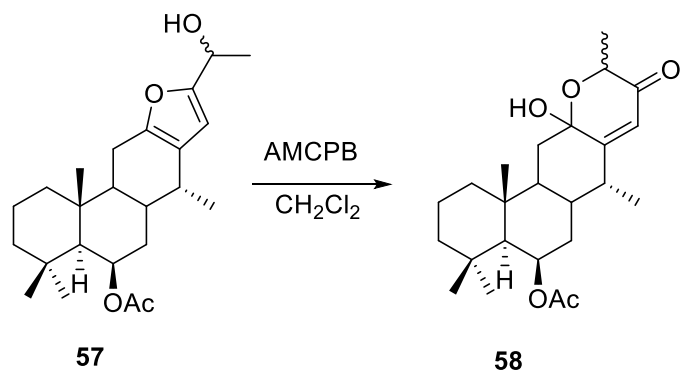


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H de la lactona **25** en CDCl_3 a 400 MHz.

Al no obtener los resultados esperados mediante la reacción de fotooxidación, se decidió utilizar AMCPB en diclorometano (Esquema 10), reacción previamente reportada (Buffat et al, 2004) en la que se favorece la expansión del anillo de furano.



Esquema 10. Reordenamiento de Achmatowicz del compuesto **57**.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 27) del crudo de reacción se observan varias señales duplicadas, por ejemplo se aprecia en 5.83 ppm y 5.88 ppm dos señales simples correspondientes a hidrógenos vinílicos, en 4.25 ppm y 4.63 ppm se observan dos señales

cuádruples de los hidrógenos base de oxígeno y metilo secundario, así como en 1.38 ppm y 1.50 ppm se observan dos señales dobles de metilos secundarios, de igual manera en la región de 0.8 ppm a 1.2 ppm se observan varias señales, lo que se sugiere la generación de dos isómeros producto de la expansión del anillo de furano.

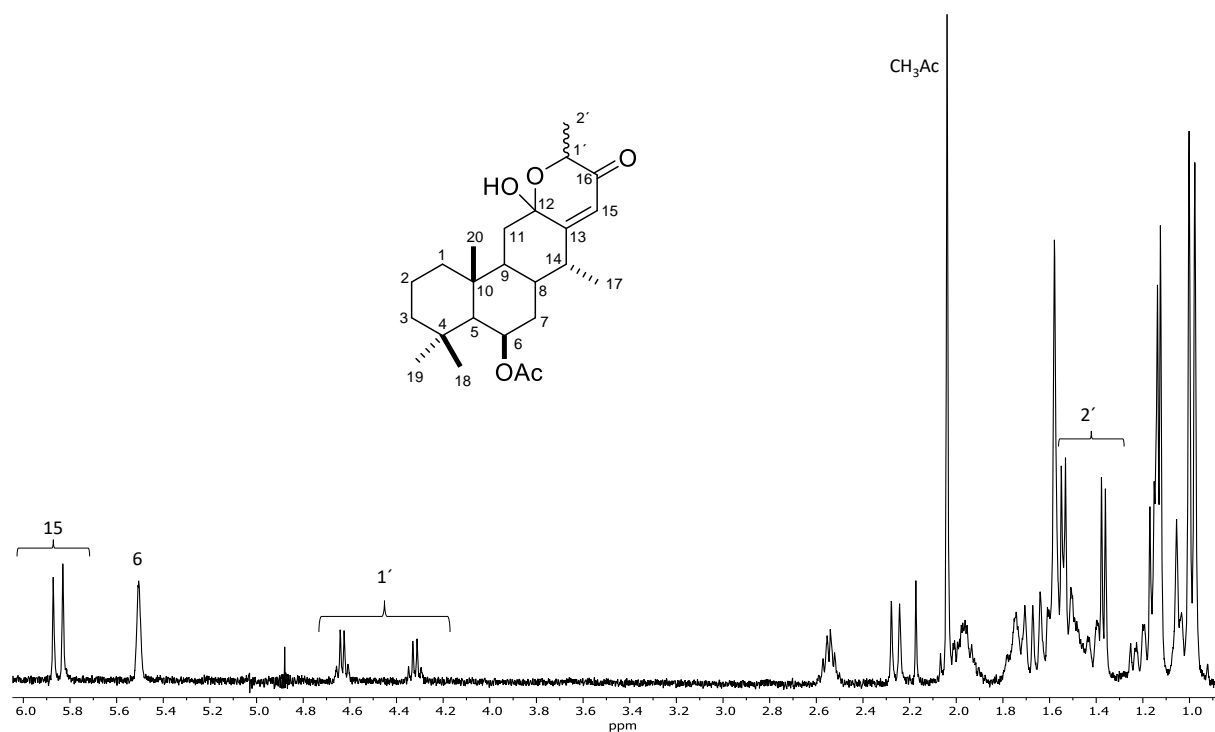


Figura 27. Espectro de RMN de ¹H de los productos de oxidación en CDCl₃ a 400 MHz.

Mediante cromatografía en capa fina se logró aislar una limitada cantidad de uno de los dos isómeros que permitió la obtención de un espectro de RMN de ¹H (Figura 28), se muestra en 5.83 ppm una señal simple del hidrógeno vinílico H-15, en 5.50 ppm se aprecia la señal simple ancha del H-6 base de éster, en 4.63 ppm se encuentra una señal cuádruple correspondiente al H-16 que presenta una constante de acoplamiento de 6.8 Hz con el metilo 21 en 1.38 ppm. La obtención del compuesto **58** representa el primer reporte de expansión del anillo de furano en vouacapanos para la obtención de hidroxipirranonas. Estos resultados abren la posibilidad de seguir explorando otras condiciones reportadas para el reordenamiento de Achmatowicz.

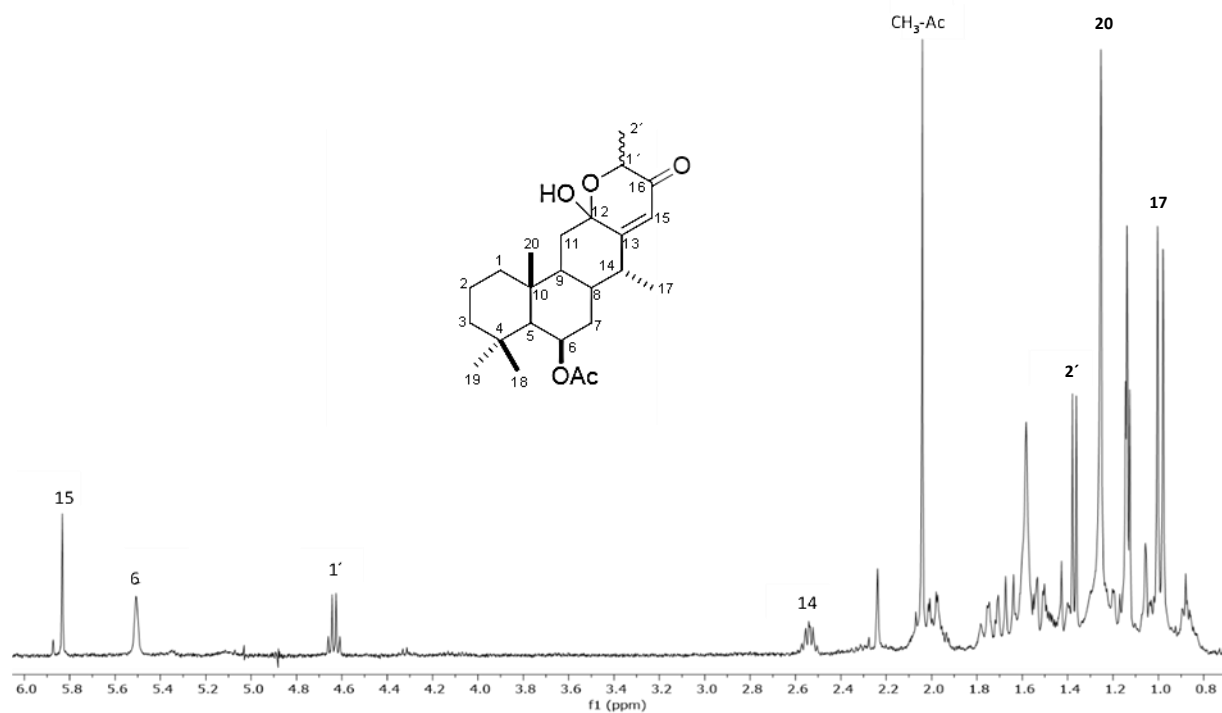


Figura 28. Espectro de RMN de ¹H del derivado **58** en CDCl₃ a 400 MHz.

Una vez observado el comportamiento reactivo del producto natural **6** se continuó con el resto de las especies para ver de qué manera afectaba la presencia de otras funcionalidades en la estructura.

→ *Coulteria velutina*

Esta especie no cuenta con estudios químicos previos; sin embargo, analizando el espectro de RMN de ¹H del extracto con cloruro de metileno de hojas (Figura 29) se observó la presencia de un compuesto mayoritario, en el cual, destacaban las señales típicas del esqueleto de vouacapano, así como, de un grupo cumarilo.

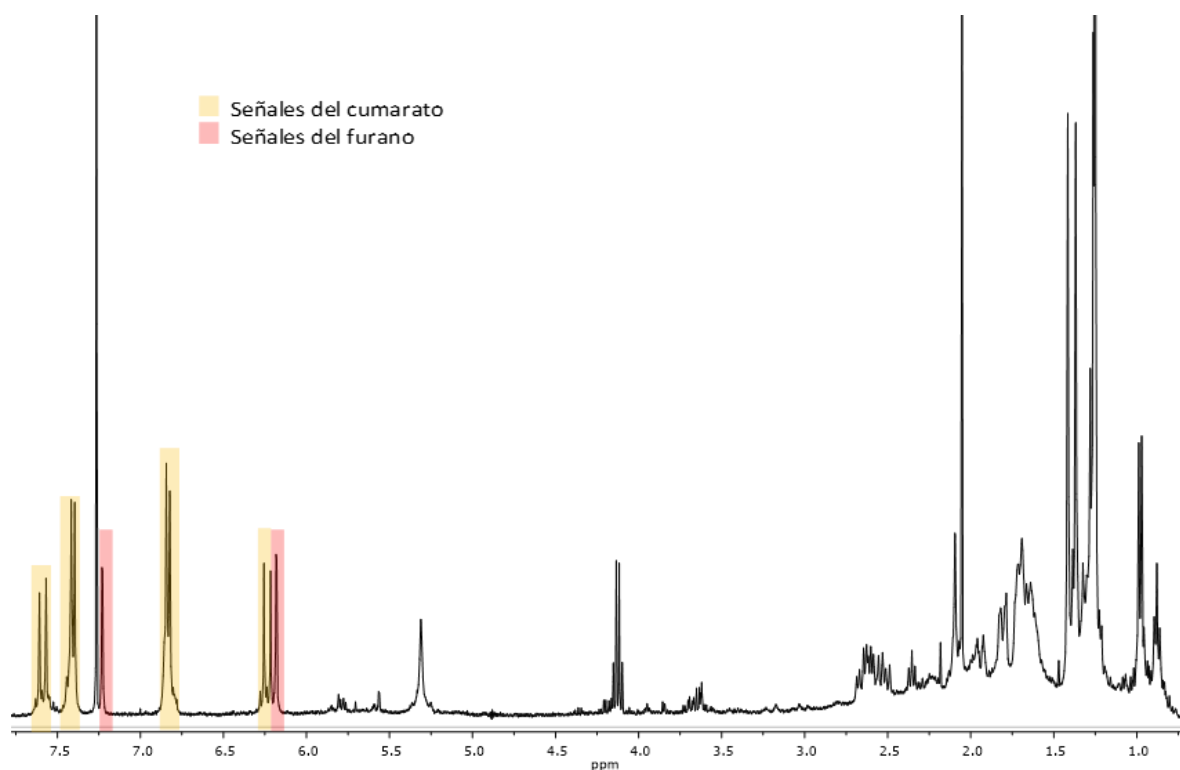


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H del extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de *C. velutina* en CDCl_3 .

Para el aislamiento del producto mayoritario, se llevó a cabo una cromatografía en columna, utilizando como fase móvil polaridades ascendentes de mezclas Hexanos-AcOEt. En las fracciones colectadas en la polaridad 1:1 se obtuvo una miel verde que fue analizada por RMN de ^1H . En el espectro (Figura 30) se muestran en 7.22 ppm y 6.23 ppm dos señales dobles con $J = 1.5$ Hz correspondientes a los protones H-15 y H-16 del anillo de furano. También se observan dos señales dobles en 7.56 ppm y 6.20 ppm con $J = 15.8$ Hz asignadas a los protones vinílicos H-2' y H-3', en 7.37 y en 6.83 ppm se encuentran dos señales dobles con $J = 8.8$ Hz de protones aromáticos; estos desplazamientos corresponden a señales típicas de grupos *p*-cumarilo. Adicionalmente confirmando la presencia de este grupo, se observa en 5.31 ppm una señal simple asignada al H-6 base de éster. En el espectro se pueden observar señales de una impureza correspondiente a ácidos grasos, lo que adicionalmente permite ver que el compuesto posee solo dos metilos terciarios, indicando que uno de los metilos debe estar funcionalizado. Analizando el espectro se propuso obtención de la estructura del vouacapano **59**.

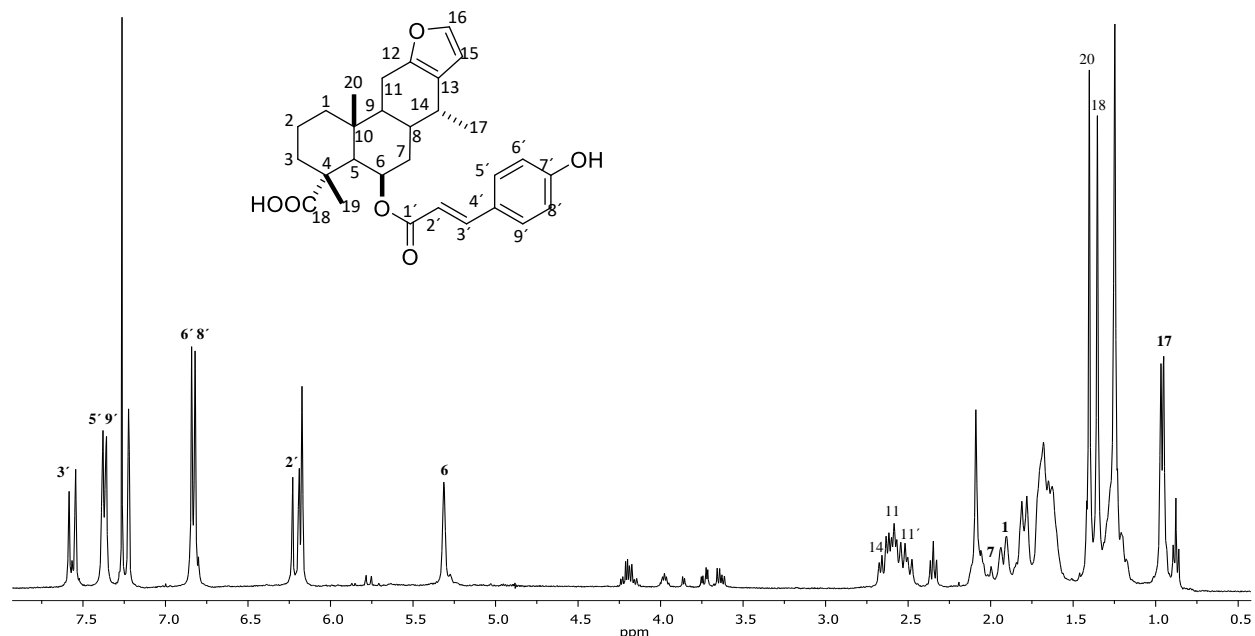


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **59** en CDCl_3 .

En la misma polaridad se obtuvieron fracciones de una miel que correspondían a otro compuesto. Se observó mediante cromatografía en capa fina un compuesto de R_f muy similar al compuesto mayoritario, por lo que mediante recromatografías sucesivas se logró aislar un sólido blanco que presentó en el espectro de RMN de ^1H (Figura 31) nuevamente las señales correspondientes al grupo *p*-cumarilo, observándose las señales de los protones vinílicos H-3' y H-2' en 6.82 ppm y 5.79 ppm desplazadas hacia campo alto y con una $J = 12.5$ Hz, la señal del metilo terciario CH_3 -18 se desplazó de 1.41 a 1.22 ppm, las señales del anillo de furano se presentan en 7.20 y 6.19 ppm, la señal simple ancha del H-6 base del cumarilo se aprecia en 5.48 ppm estas señales corresponden al diastereómero *cis* **59b**. De igual manera se observa solo dos señales simples de metilos terciarios.

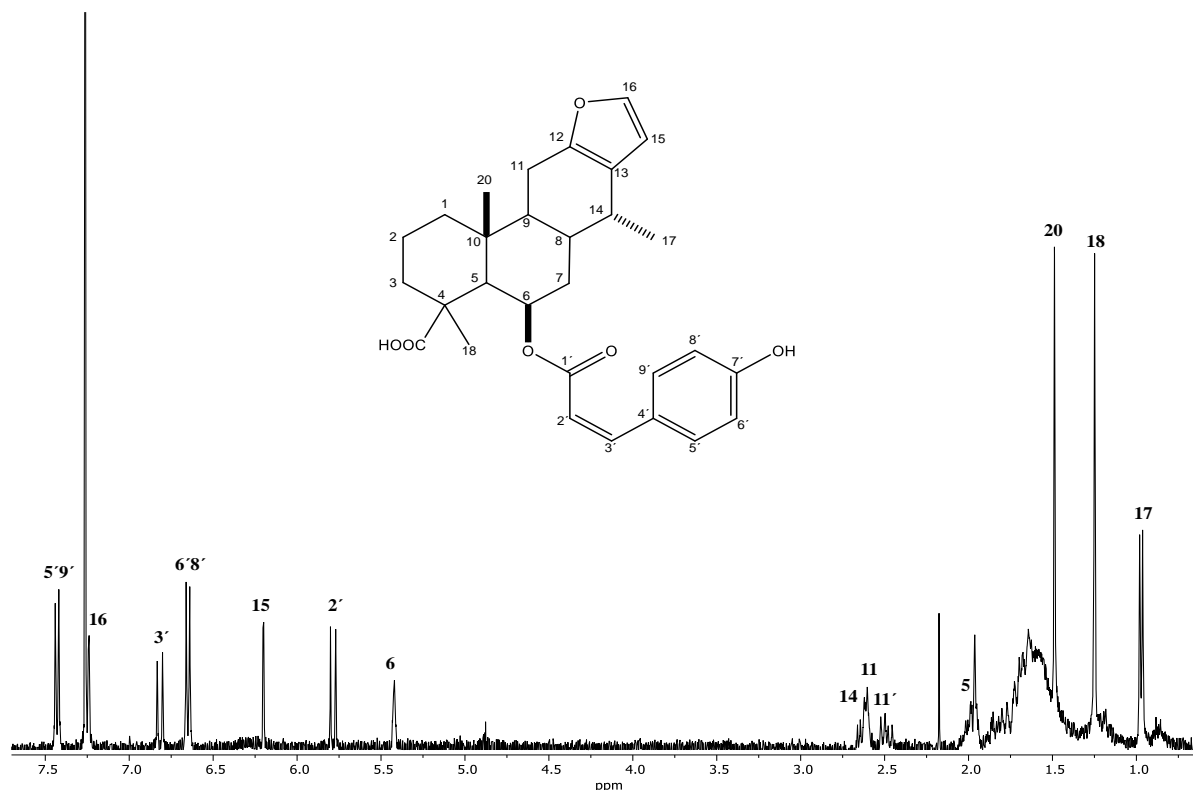
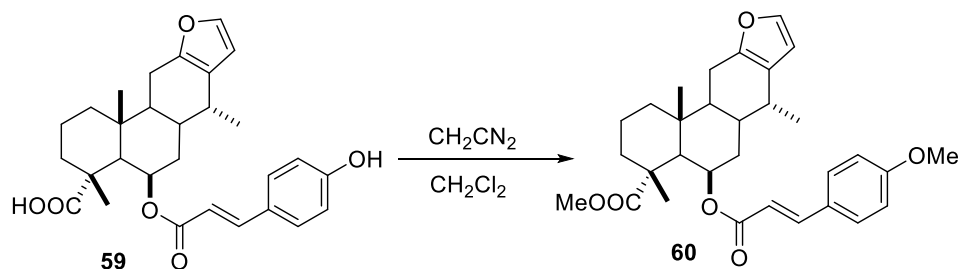


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **59b** en CDCl_3 .

La purificación del compuesto **59** resultó difícil debido a la presencia de los grupos OH del fenol y del ácido carboxílico grupos que aumentan la acidez de la molécula.

Con el propósito de incrementar la estabilidad de su estructura se decidió preparar un derivado que involucrara la protección de ambos grupos, utilizando diazometano para generar el derivado **60** (Esquema 11).



Esquema 11. Reacción de metilación del producto natural **59**.

En el espectro de RMN de ^1H del producto obtenido (Figura 32) se observan en 3.83 ppm y 3.71 ppm dos señales simples que integran para 3 hidrógenos correspondientes al éster

metílico 18 y al metoxilo del grupo cumarilo; se aprecian en 7.41 ppm y 6.83 ppm las señales de los protones aromáticos H-5', H-6', H-8' y H-9'; en 7.21 y 6.19 ppm se encuentran las señales de los protones del furano, así como, en 5.19 ppm la señal simple ancha del H-6 base de éster.

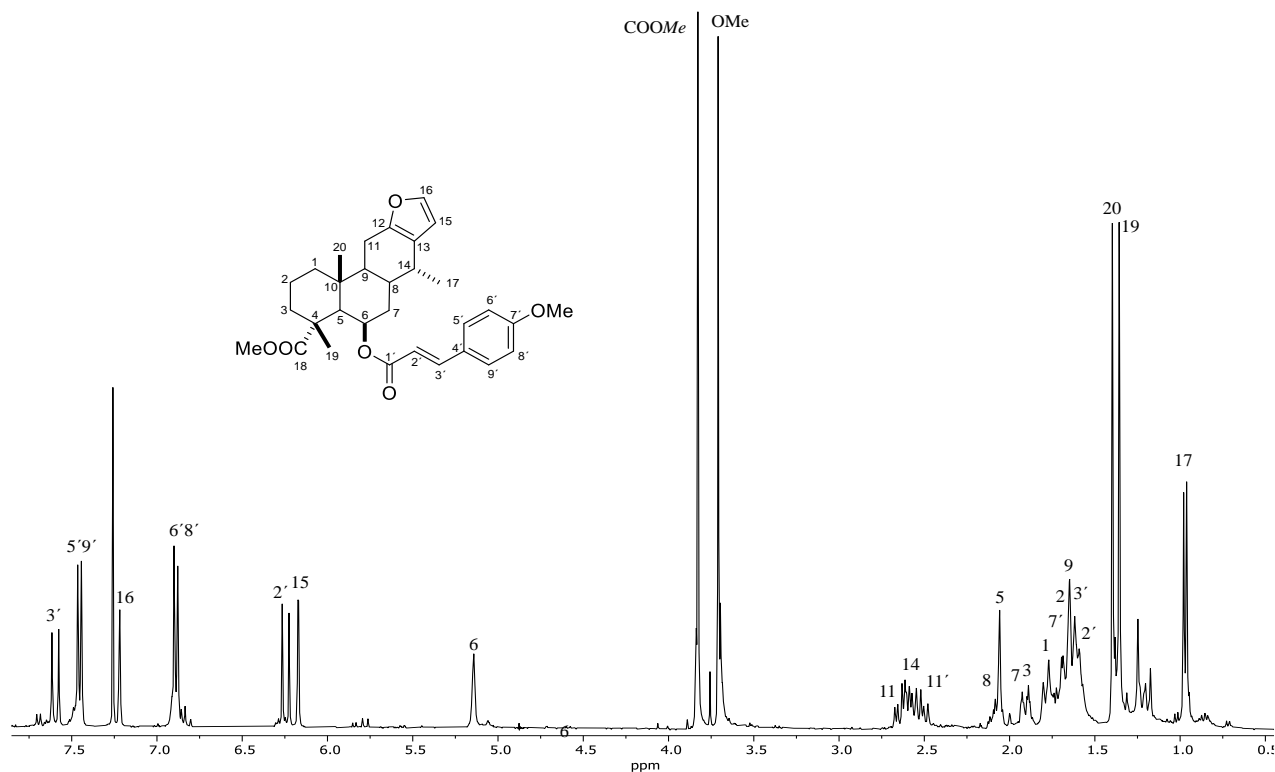


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado metilado **60** en CDCl₃.

En el espectro de RMN de ¹³C (Figura 33) se observa en 179.2 ppm la señal del carbonilo de éster 18, entre 168.5 –109.2 ppm las señales de los protones aromáticos del grupo cumarilo y el anillo de furano; en 145.2 ppm y 116.2 ppm las señales de los carbonos vinílicos CH-3' y CH-2' respectivamente; en 72.3 ppm la señal del carbono base de cumarilo y en 55.5 y 52.3 ppm se encuentran las señales de los metoxilos, con lo cual, se confirmó la presencia del derivado **60**.

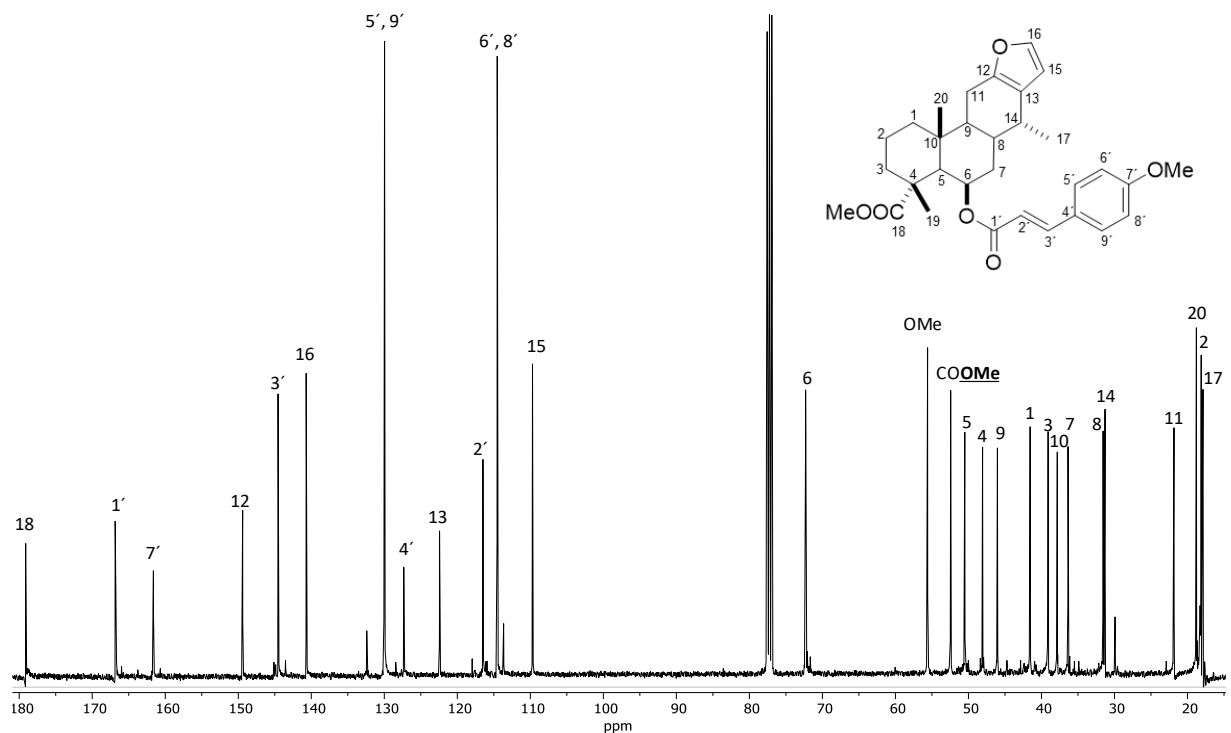
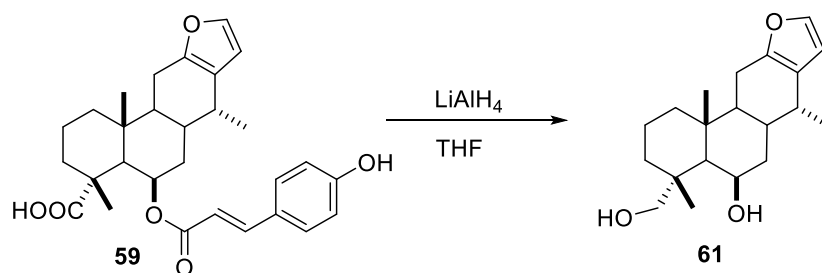


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado metilado **60** en CDCl_3 .

Analizando la estructura de **59** y considerando su inestabilidad, se pensó en preparar otro derivado que involucrara la hidrólisis del éster. Se llevó a cabo el tratamiento de hidrólisis de **59** (Esquema 12), utilizando LiAlH_4 en THF, producto de esta reacción se obtuvo un único compuesto que fue analizado mediante RMN.



Esquema 12. Hidrólisis del cumarato natural **59**.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 34) se observa en 7.22 ppm y 6.20 ppm dos señales dobles de los protones H-15 y H-16 del furano, en 4.43 ppm se observa una señal doble ancha correspondiente al H-6 ahora base del hidroxilo, mientras que en 3.64 ppm y 3.22 ppm se ubican dos señales dobles base de hidroxilo, asignadas a los protones H-19 y H-19' con $J = 10.9$

Hz, lo cual indica que la reacción procedió con la hidrólisis del éster y la reducción del ácido carboxílico.

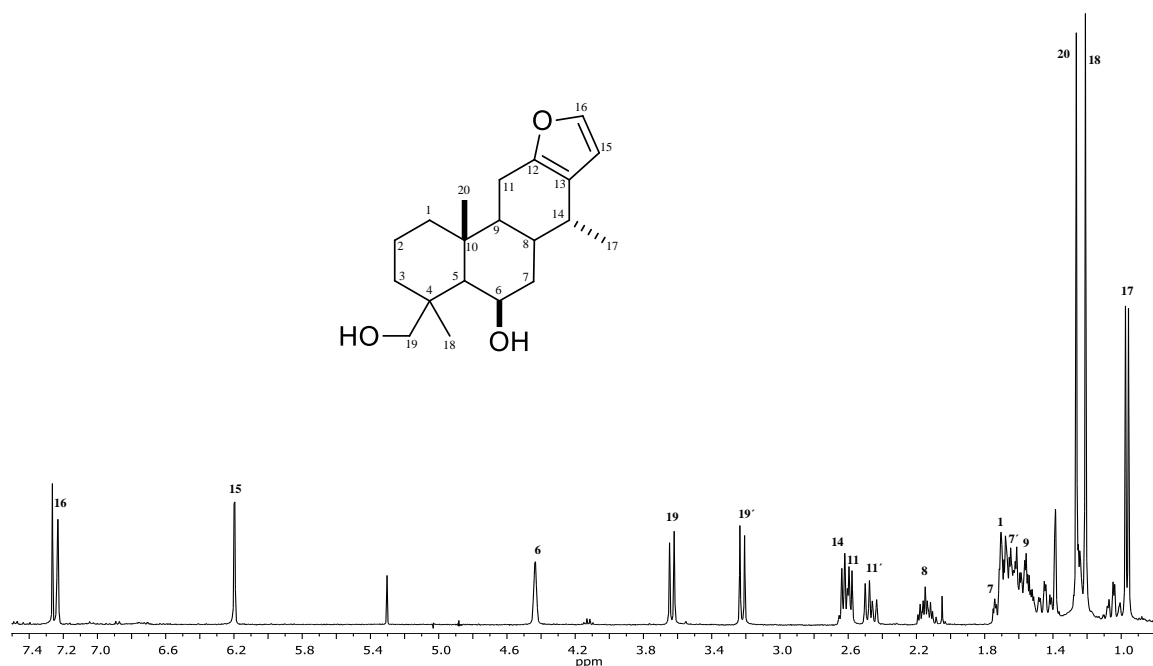


Figura 34. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del vouacapano **61** en CDCl₃.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 35) se observa la presencia de 20 carbonos, se presentan las señales de los carbonos del anillo de furano entre 149.5 –109.2 ppm, en 72.1 ppm y 67.5 ppm se ubican las señales de los carbonos CH₂-19 y CH-6 ahora bases de hidroxilo, confirmando la obtención del compuesto **61**, el cual es una estructura novedosa. Debido al resultado observado, se pensó en la posibilidad de llevar a cabo la reacción con un agente más suave, que solo involucrara la hidrólisis del éster sin afectar al ácido carboxílico.

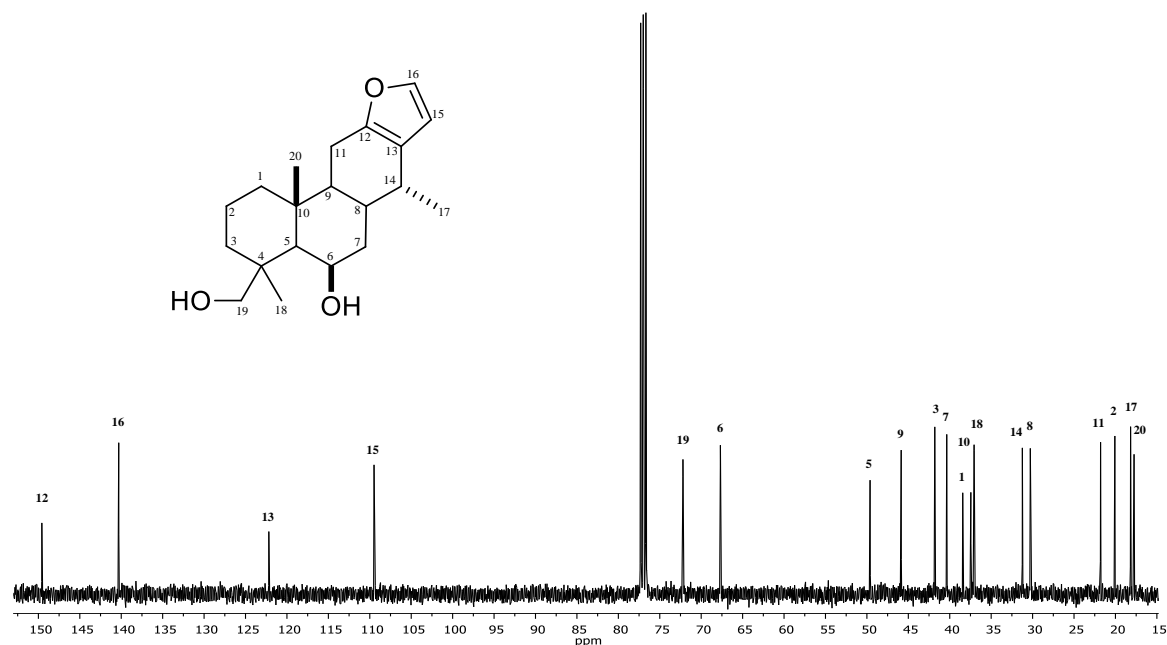
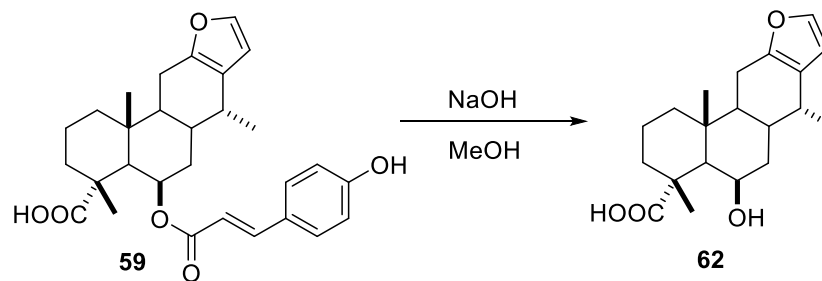


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **61** en CDCl_3 .

Para esto, el compuesto **59** se sometió a condiciones de hidrólisis más suaves utilizando NaOH (Esquema 13). Debido a que estas estructuras obtenidas son novedosas y en la necesidad de determinar la configuración absoluta de estos compuestos, se planteó el preparar una lactona que permitiera realizar un experimento de DCV.



Esquema 13. Hidrólisis del vouacapano natural **59**.

En el espectro de RMN de ^1H del derivado **62** (Figura 36) se muestran las señales del anillo de furano en 7.25 ppm y 6.20 ppm, se observa la señal del H-6 ahora base de hidroxilo desplazada de 5.32 a 4.15 ppm.

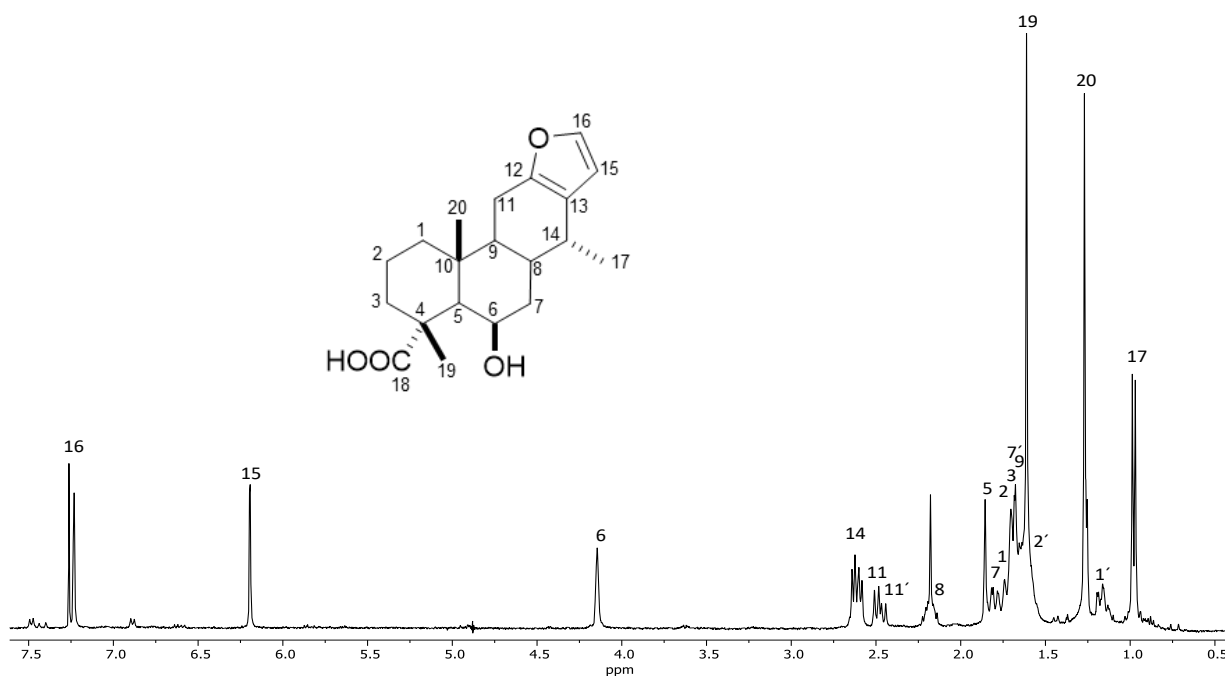


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del vouacapano **62** en CDCl_3 .

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37) se observa en 184.7 ppm la señal carbono de carbonilo de ácido, entre 151 –109 ppm se observan las señales de los protones aromáticos del anillo del furano; en 69.8 ppm la señal del C-6 ahora base de hidroxilo, así como el resto de las señales asignadas al vouacapano **62**. Al comparar este producto con el derivado en donde ocurrió adicionalmente la reducción del ácido carboxílico, se observa que el cambio principal ocurrió solo con la hidrólisis del éster.

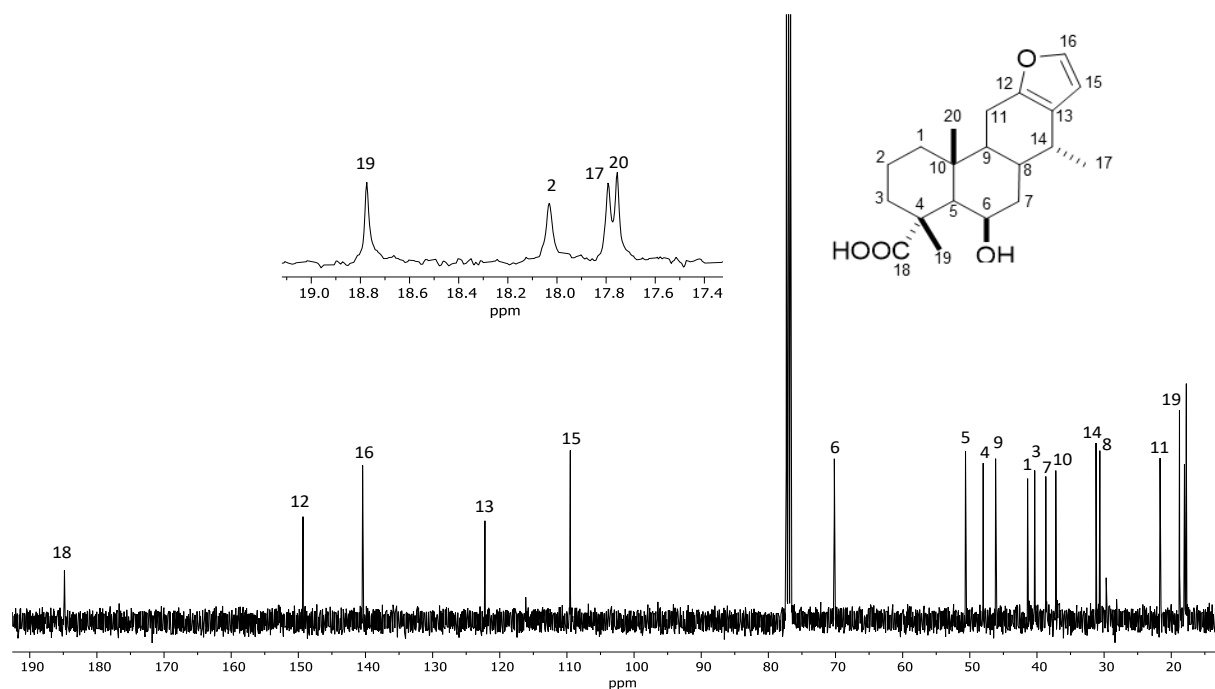
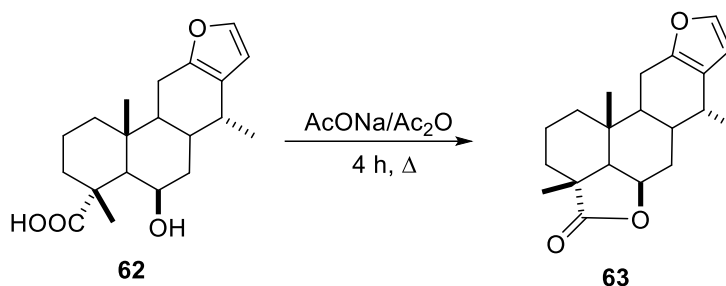


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **62** en CDCl_3 .

Posteriormente el compuesto **62** se trató con acetato de sodio en anhídrido acético (Esquema 14) para favorecer la lactonización (Euzébio et al., 2009). De esta reacción se logró aislar un producto que se analizó por RMN.



Esquema 14. Lactonización del vouacapano **62**.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 38) se puede ver que la señal del H-6 que se presentaba como simple ancha en 4.15 ppm, ahora es una ddd ($J = 14.1, 11.0, 5.9$ Hz) en 4.51 ppm, el cambio en la multiplicidad del hidrógeno 6 se puede atribuir al aumento en la rigidez adquirida por la formación de la lactona cíclica y por lo tanto el cambio de conformación, también se observan las señales esperadas del sistema furánico en 7.21 y 6.19 ppm; así como el resto de las señales de los hidrógenos de la estructura.

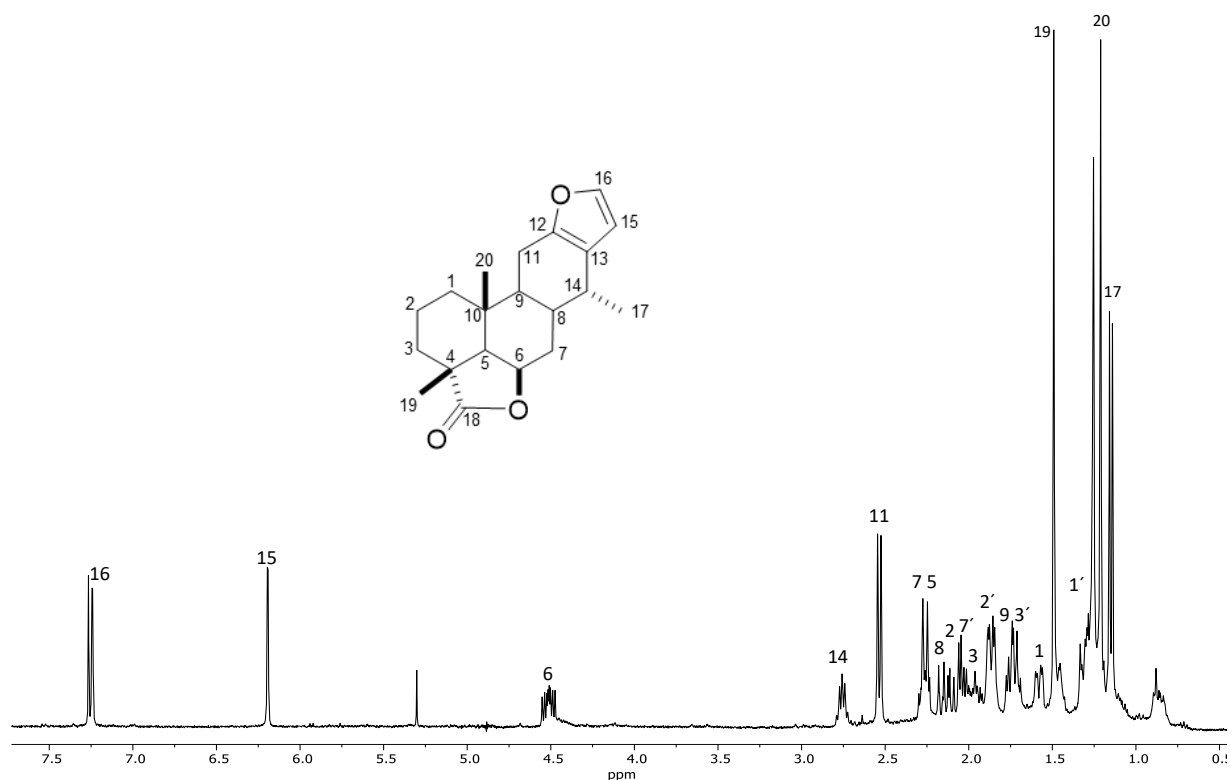


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del vouacapano **63** en CDCl_3 .

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 39) se observa que la señal del C-18 ahora carbonilo de lactona se desplaza a frecuencias menores apareciendo ahora en 181.7 ppm. La señal del C-6 se desplazó de 69.8 ppm a 76.4 ppm; entre 149.0 ppm y 109.0 ppm se encuentran las señales de los carbonos del anillo de furano; en 51.2 ppm se muestra la señal del carbono 5; entre 42-17 ppm el resto de las señales correspondientes al compuesto **63**.

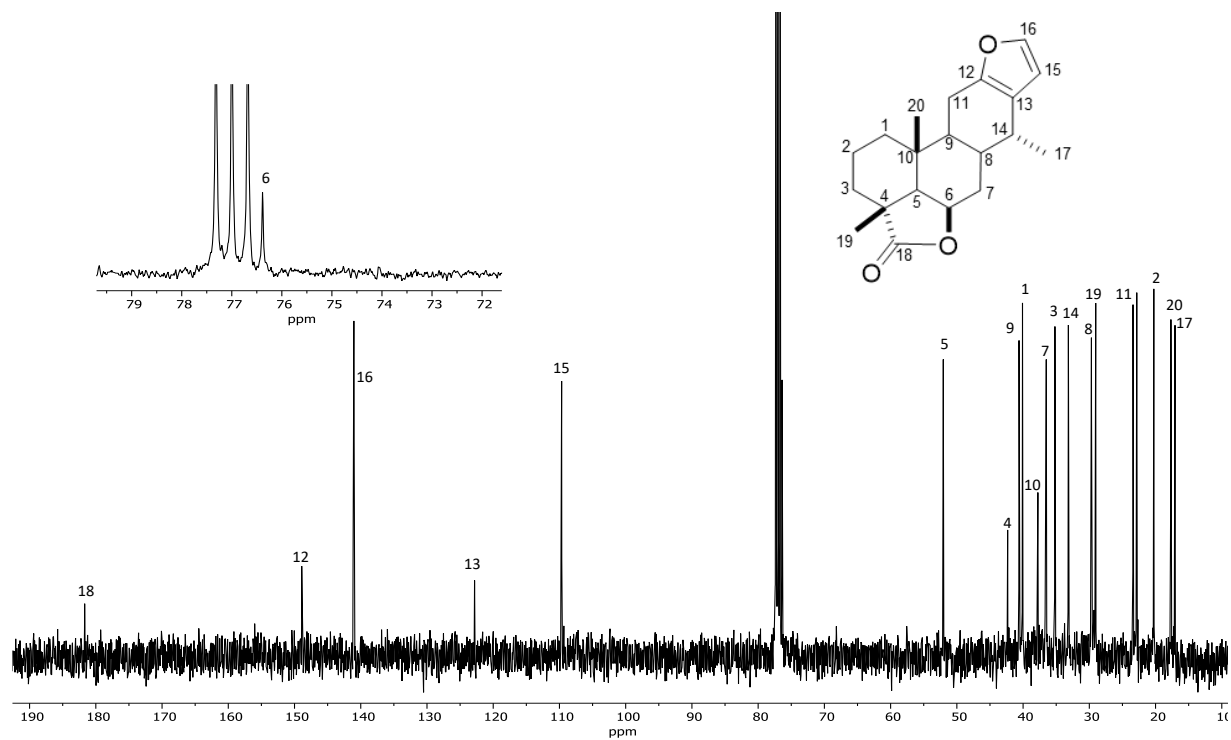


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **63** en CDCl_3 .

Posteriormente se analizaron los espectros de dos dimensiones para la correcta asignación; en el experimento COSY (Figura 40) se observó la correlación que existen entre los hidrógenos H-15 y H-16; entre H-7 y H-6; H-14 y H-8; H-8 y H-9, entre otras correlaciones que permitieron la asignación del esqueleto.

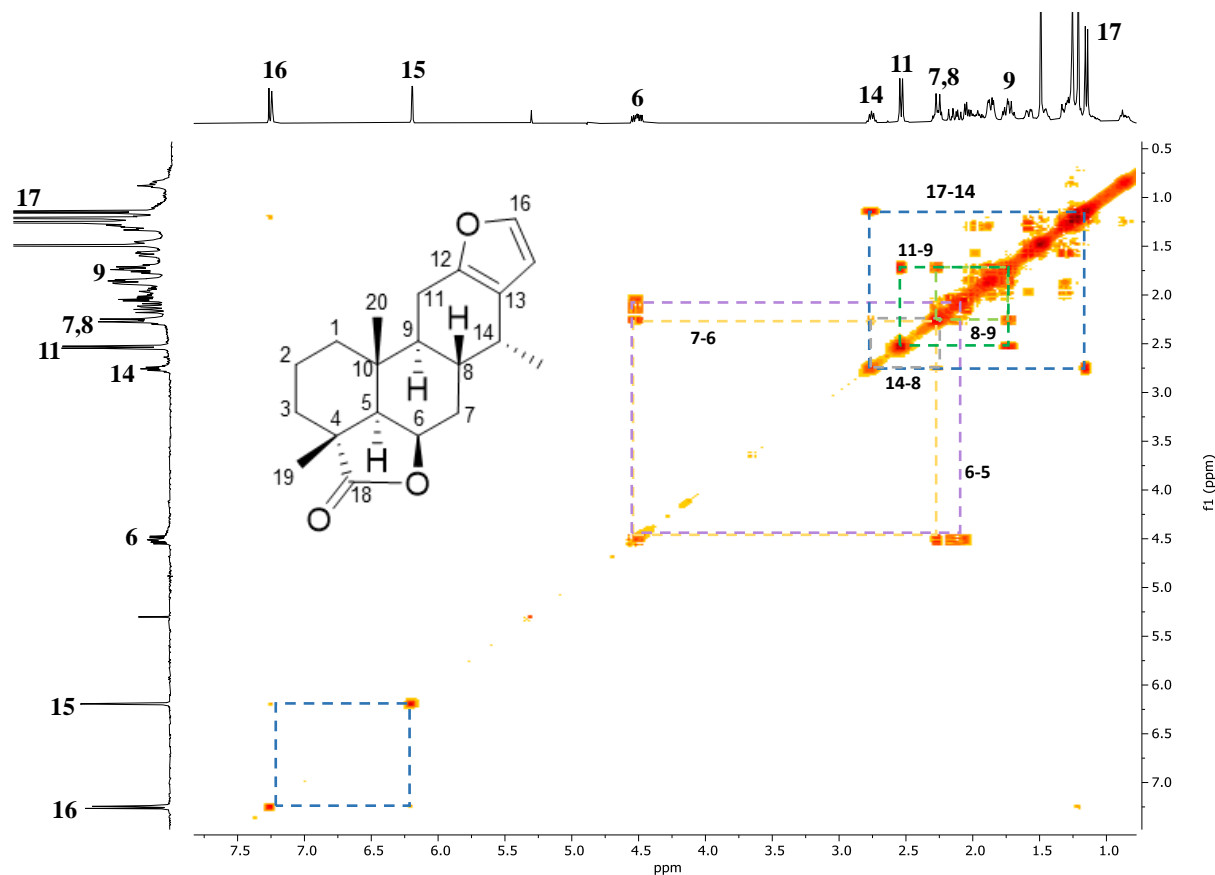


Figura 40. Experimento COSY del compuesto **63** en CDCl_3 .

En el espectro NOESY (Figura 41) se observa la correlación del CH_3 -20 del cual se conoce que se encuentra orientado en beta con el CH_3 -18 lo que indica que este también debe tener una orientación beta, por lo tanto, el carbono 19 de la lactona se encuentra orientado en alfa. El producto **63** obtenido reveló la proximidad de los grupos en C-18 (ácido carboxílico) y C-6 (hidroxilo); además, la rigidez de la molécula y la ausencia de interacciones intermoleculares críticas.

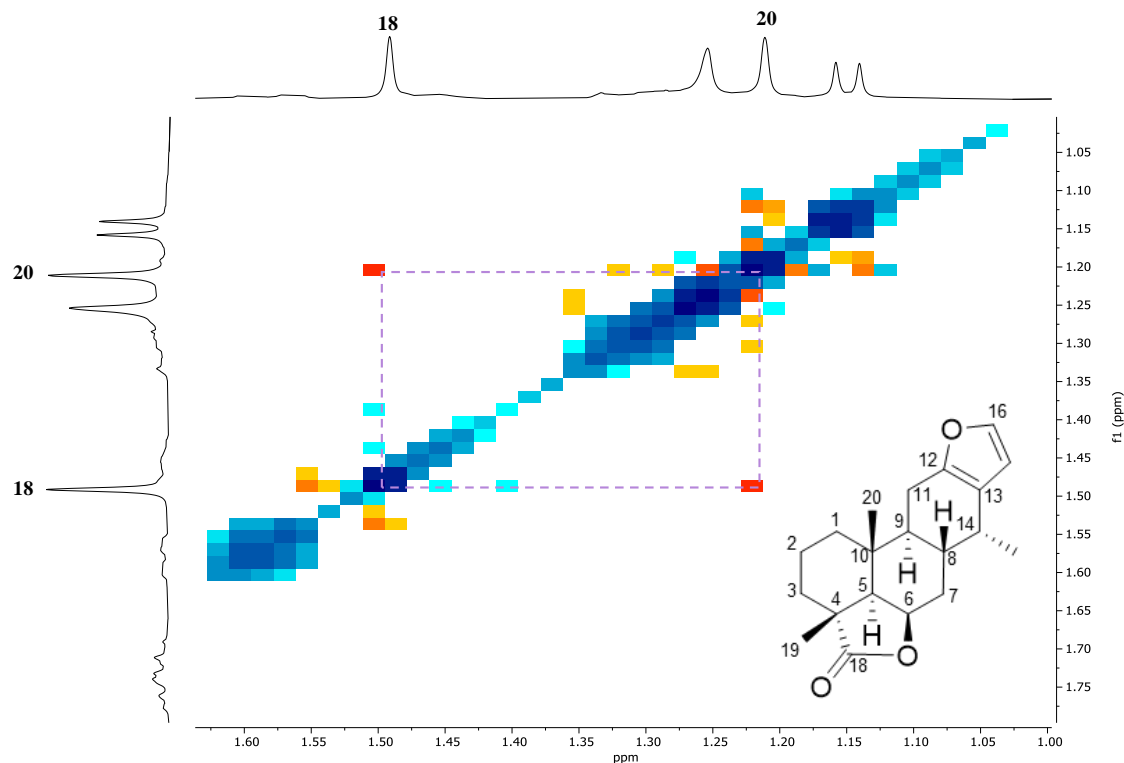


Figura 41. Experimento NOESY del compuesto **63** en CDCl_3 .

Dicroísmo Circular Vibracional (DCV)

Para confirmar la propuesta de la estereoquímica de la lactona, se llevó a cabo un análisis por DCV; los cálculos se iniciaron a partir del modelo molecular de **63** que se construyó utilizando el software Spartan '04, considerando la configuración relativa prevista. A continuación, se realizó un análisis de distribución conformacional mediante el protocolo Monte Carlo y el campo de fuerza molecular de Merck (MMFF) para revelar dos preferencias conformacionales en la ventana energética de 0-10 kcal/mol, evidenciando la influencia de la restricción conformacional en la molécula. La optimización energética posterior de los conformeros se logró mediante DFT utilizando el conjunto de bases B3LYP 631G(d) para revelar un conformero **63a** en la ventana energética de 0-3 kcal/mol. Se realizó una optimización adicional de la geometría de **63a** en B3LYP/DGDZVP, utilizando el software Gaussian 09 (Figura 42) para sucesivos cálculos de espectros de DCV e IRVCD (Figura 43) en el mismo nivel de teoría (Joseph-Nathan & Gordillo-Román, 2015). La comparación estadística de los espectros calculados y experimentales mediante el programa CompareVOA proporcionó similitudes espectrales cuantitativas, (Debie et al., 2011) donde el factor óptimo de

anarmonicidad (anH) fue 0.981. Las similitudes espectroscópicas de DCV para el enantiómero correcto (SE) fue de 76.5, mientras que la del enantiómero incorrecto (S-E) fue de 12.0. El índice de similitud de enantiómeros (ESI), obtenido por la diferencia SE - S-E fue de 64.6, y los datos indicaron un nivel de confianza (C) del 100% para la (+)-(4*R*,5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-vouacapan-6,18-olida (**63**). Por consiguiente, la quiralidad de los precursores es ácido (-)-(4*R*,5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-((*E*)-*p*-cumaril-oxi)-18-vouacapanoico (**59**) y ácido (+)-(4*R*,5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-hidroxi-18-vouacapanoico (**62**).



Figura 42. Confórmero de mínima energía del (+)-(4*R*,5*S*,6*S*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-vouacapan-4,6-olida (**63**) en nivel de teoría B3LYP/DGDZVP.

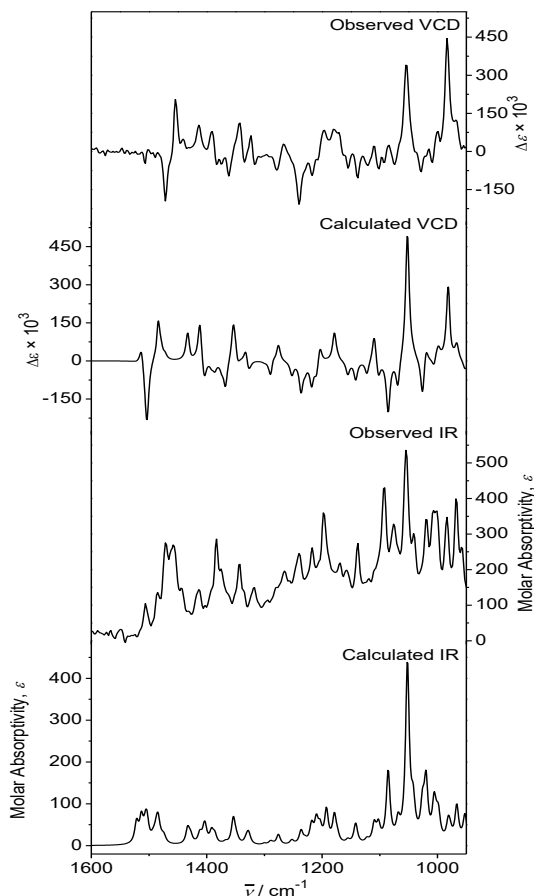


Figura 43. Comparación de los espectros de IR y DCV experimentales y DFT B3LYP/DGDZVP calculados de (+)-(4*R*,5*R*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-vouacapan-6,18-olida (**63**).

Ensayos Antiproliferativos

Los compuestos de tipo cassano han mostrado una potencial actividad citotóxica (Pournaghi et al., 2020), por lo que se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* del compuesto natural **59** mediante el ensayo MTT. Para el ensayo antiproliferativo se utilizaron las líneas celulares de carcinoma cervical humano HeLa, de cáncer de mama humano MDA-MB-231, de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2 y fibroblasto embrionario de ratón NIH/3T3, los ensayos se realizaron por triplicado a cinco concentraciones de **59** para obtener los valores medios de IC₅₀ y los intervalos de confianza (IC). Los valores IC₅₀ fueron 92.2 μg mL⁻¹ (IC 95%: 89.9-119.6) para HeLa y 106.2 μg mL⁻¹ (IC 95%: 104.6-125.7) para las líneas celulares MDA-MB-231, mientras que el valor IC₅₀ para Caco-2 fue superior a 130 μg mL⁻¹. El valor IC₅₀ para una línea celular sana (NIH/3T3) fue de 127.6 μg mL⁻¹ (IC 95%: 126.8-136.7).

Se utilizó metotrexato como control positivo y DMSO como control negativo. La evaluación de la línea celular sana NIH/3T3 fue significativa para comprobar la selectividad del compuesto **59**. Los resultados presentados en la Figura 44 muestran un cierto grado de selectividad a dosis más bajas, aunque al considerar el conjunto de datos, la selectividad parece ser pequeña. La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT por cuantificación de la intensidad de fluorescencia, mostrando los resultados como porcentaje de células viables. Las barras representan el valor medio \pm el error estándar (SE) de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis de varianza unidireccional con la prueba post hoc de Tukey, $n = 3$. Los valores de SE ($P < 0,05$) se muestran en minúsculas (a-f). Análisis de regresión no lineal de dosis-respuesta para la inhibición de la viabilidad por el compuesto **59**, intervalo de confianza del 95%, $P < 0,001$. La IC_{50} para la línea celular HeLa fue de $92.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $R^2 = 0.9173$; para MDAMB-231: $IC_{50} = 106.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $R^2 = 0.9803$; para Caco-2: $IC_{50} > 130 \mu\text{g mL}^{-1}$ R^2 no determinada; y para NIH/3T3: $IC_{50} = 127.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, $R^2 = 0.9901$ (GraphPad Prism 5.0) (Figura 44).

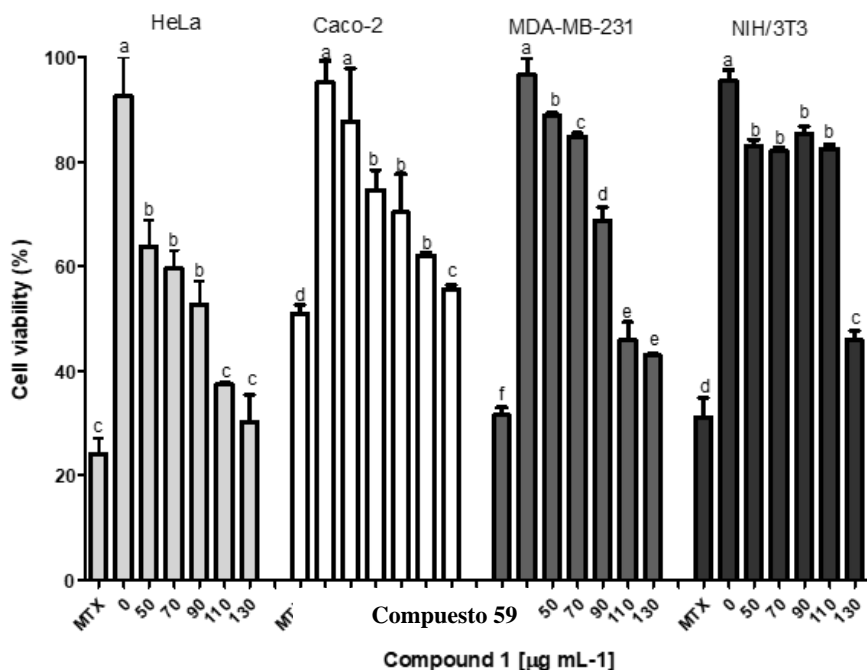


Figura 44. Efecto del cumarato **59** sobre la viabilidad de las líneas celulares HeLa, MDA-MB-232, Caco-2 y NIH/3T3 del tratamiento de 48 h. En el gráfico podemos observar que los tratamientos asignados en cada grupo de color con la misma letra, no presentaron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos muestran que el compuesto **59** afecta la viabilidad de las células cancerosas humanas MDA-MB-231, HeLa y CaCo-2 de manera dosis-dependiente, mostrando una disminución de la viabilidad de aproximadamente ~60, 50 y 40% respectivamente, después de 24 h del tratamiento con el cumarato **59** a 130 mg/mL (Figura 44).

Para la investigación de la toxicidad de los fármacos en los modelos de células de la barrera intestinal, la línea celular epitelial CaCo-2 ha sido el modelo más utilizado (Castillo *et al* 2006). El enfoque científico del fármaco es maximizar la eficacia terapéutica y minimizar los posibles peligros de los medicamentos. Por lo tanto, la baja toxicidad del cumarato **59** en las células CaCo-2 podría disminuir los efectos secundarios a través de la barrera intestinal. Eso se ha visto con algunos medicamentos que provocan daño intestinal macroscópico, como desprendimiento celular, acumulación de líquidos, erosión vellosa y dilatación del tracto intestinal (Kilcoyne, et al., 2014).

Estos hallazgos indican que el cumarato **59** de *Coulteria velutina* causó la inhibición de la viabilidad de estas tres líneas celulares de cáncer, de manera dosis dependiente.

CONCLUSIONES

Las reacciones en medio ácido ensayadas evidenciaron que los compuestos **48** y **51** funcionalizados únicamente con un grupo hidroxilo en el C-6, propiciaron la generación de derivados vínilicos (**58**, **53** y **55**) en algunos casos acompañados de transposiciones químicas que incrementaban la estabilidad de la molécula. El uso de ácido fórmico en la reacción favorecía la obtención de formiatos como subproductos.

Las reacciones de oxidación llevadas a cabo en el anillo de furano permitieron la obtención de la hidroxipiranona **74** mediante la expansión del anillo a través del reordenamiento de Achmatowicz, siendo este el primer reporte de esta reacción en vouacapanos, los productos presentaron rendimientos de moderados a buenos; los derivados **56**, **57** y **58** obtenidos corresponden a estructuras novedosas que resultan interesantes desde el punto de vista sintético.

El aislamiento del nuevo vouacapano **59** a partir de la especie *Coulteria velutina*, que no contaba con estudios químicos previos, exhibe una vez más que las especies de la familia fabácea son una fuente inagotable de este tipo de cassanos. La derivatización de **59** permitió sintetizar la lactona **63** mediante la cual se determinó la configuración absoluta por DCV. El producto natural resultó inestable por lo que se preparó el derivado metilado **60**. La colecta de la especie en diferentes temporadas del año permitió corroborar que el vouacapano **59** solo está presente de septiembre a noviembre, probablemente las condiciones climáticas características de esa temporada del año.

El producto natural **59** presentó actividad citotóxica moderada frente a las líneas celulares HeLa, (adenocarcinoma cervical humano), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y Caco-2 (adenocarcinoma de colon caucásico), a través de un mecanismo de muerte celular por apoptosis.

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz, de ^{13}C a 100 MHz y los espectros bidimensionales se determinaron en el espectrómetro Varian Mercury Plus 400, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros fueron procesados en el programa MestReNova. Las constantes de acoplamiento se encuentran expresadas en Hertz (Hz).

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

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron usando sílica gel 230-400 mallas marca Merck.

Los espectros de IR se midieron en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Nicolet Is10 empleando la técnica ATR.

Los experimentos en microondas se llevaron a cabo utilizando un equipo CEM-Discover mono modal que opera a una frecuencia de 2.45 GHz.

Materia vegetal

Se colectaron las hojas de las especies *Coulteria platyloba* S. Watson y *Coulteria velutina* (Britton & Rose) Sotuyo & G.P. Lewis en la comunidad de Los Charcos en Buenavista Tomatlán, Michoacán ($19^\circ 21' 33.26''$ N, $102^\circ 59' 64.3''$ W) y en Carácuaro, Michoacán ($18^\circ 53' 15.4''$ N, $100^\circ 59' 18.3''$ W), respectivamente, durante el período 2018–2021.

La identificación taxonómica de la especie *C. velutina* fue realizada por la Biól. Rosa Isabel Fuentes Chávez y la Biól. Norma Patricia Reyes Martínez y la especie *C. platyloba* por el M.C. Xavier Madrigal. Las identificaciones se llevaron a cabo en la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Las hojas de la planta se dejaron secar a la sombra, para su posterior tratamiento.

Reacción general de aromatización

A una solución de 100 mg de vouacapano en 2 mL de CH₂Cl₂ acidificado con 0.1 mL de HCl se adicionó a una suspensión de 2.5 Eq de DDQ en 2 mL de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante 20 min en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se extrajo con 100 mL de CH₂Cl₂, se lavó 5 veces con agua (150 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Finalmente, el disolvente se extrae a presión reducida en rotavapor para la obtención del crudo de reacción.

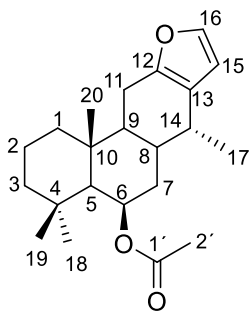
Reacción general de hidrólisis

Una solución de 100 mg de vouacapano en 2 mL de THF anhidro se adicionó a una suspensión 2 Eq de LiAlH₄ en 1 mL de THF anhidro. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 2 h bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Terminada la reacción se neutralizó con una solución de HCl al 10% adicionando gota a gota en agitación. La reacción se extrajo con AcOEt, se lavó con agua y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, el disolvente se evaporó en rotavapor.

Couleria platyloba

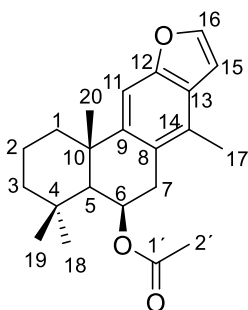
→ 6β-acetoxivouacapano (6)

Un lote de 2 kg de hojas secas se maceró durante 3 días a temperatura ambiente empleando hexanos como disolvente. Transcurrido el tiempo la maceración se filtró y concentró en rotavapor, posteriormente, el proceso se repitió en tres ocasiones utilizando diclorometano como disolvente, obteniendo 47 g (2.35% rendimiento) de una miel verde oscuro.



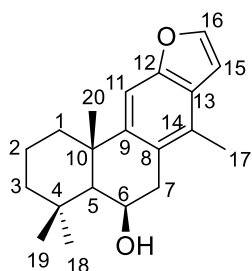
Un lote de 30 g de extracto de CH₂Cl₂ se fraccionó mediante cromatografías en columna sucesivas a una altura de 11 cm, utilizando como fase móvil mezclas de Hexanos-AcOEt. De las fracciones obtenidas en la polaridad 49:1 se obtuvieron 988 mg de cristales (3.29 % rendimiento) con un punto de fusión de 114-116 °C (Gómez-Hurtado et al., 2013).

→ **6β-acetoxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (19)**



El 6β-acetoxivouacapano (**6**) se trató con las condiciones de aromatización previamente descritas. El crudo de reacción se colocó en cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y mezcla Hexanos-AcOEt polaridad 49:1 como fase móvil. Obteniendo 68.3 mg del compuesto **19**, los datos espectroscópicos fueron comparados con la literatura (Talavera-Alemán et al., 2020).

→ **6β-hidroxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (51)**

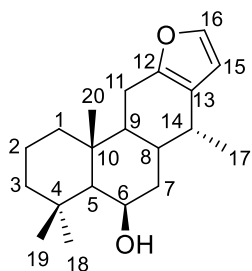


El benzofurano **19** mediante la reacción general de hidrólisis permitió la obtención del 6β-hidroxivouacapan-8(14),9(11)-dieno (**51**) como una miel amarilla en un rendimiento del 93%.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.54 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-16), 7.40 (1H, s, H-11), 6.74 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-15), 4.81 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-6), 3.04 (1H, dd, *J* = 17.7, 5.0 Hz, H-7), 2.97 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, H-7'), 2.37 (3H, s, CH₃-17) 2.25 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-1), 1.94 (1H, dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, H-2), 1.64 (1H, m, H-2'), 1.64 (3H, s, CH₃-20), 1.49 (1H, m, H-1'), 1.46 (1H, s, H-5), 1.45 (1H, m, H-3), 1.31 (3H, s, CH₃-19), 1.23 (1H, m, H-3'), 1.10 (3H, s, CH₃-18).

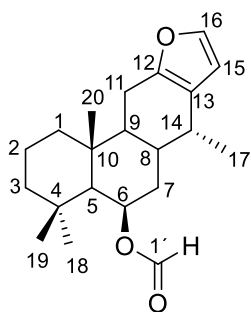
RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 153.8 (C, C-12), 146.4 (C, C-9), 144.2 (CH, C-16), 128.5 (C, C-14), 125.5 (C, C-13), 124.1 (C, C-8), 105.2 (CH, C-11), 104.9 (CH, C-15), 65.7 (CH, C-6), 52.8 (CH, C-5), 43.3 (CH₂, C-1), 43.1 (CH₂, C-3), 39.0 (CH₂, C-7), 38.2 (C, C-10), 34.2 (C, C-4), 33.8 (CH₃, C-18), 28.8 (CH₃, C-19), 27.7 (CH₃, C-20), 19.8 (CH₂, C-2), 16.1 (CH₃, C-17).

→ **6β-hidroxivouacapano (47)**



El 6β-acetoxivouacapano (**6**) se sometió a la reacción general de hidrólisis, producto de la reacción se obtuvieron 81 mg del compuesto **47** (Gómez-Hurtado et al., 2013).

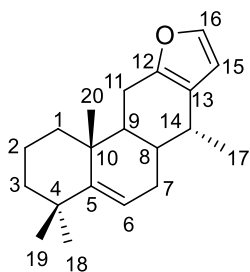
→ **6 β -formilvouacapano (52)**



A una solución de 80 mg de 6 β -hidroxivouacapano (**47**) en 3 mL de CH₂Cl₂ se le adicionaron 0.8 mL de ácido fórmico bajo reflujo durante tres h. El crudo de reacción se extrajo (100 mL AcOEt) y se lavó con solución saturada de NaHCO₃, se secó con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente fue evaporado en rotavapor. El crudo de la reacción se separó mediante cromatografía, de las fracciones 12 – 15 con polaridad 24:1 hexanos-AcOEt se obtuvieron 35 mg del formiato **52**

(Magallón-Chávez, 2018) como una miel incolora.

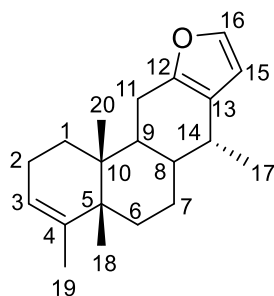
→ **Derivado vinílico 48**



Una solución de 100 mg de 6 β -hidroxivouacapano (**47**) en 4 mL de ácido fórmico se hicieron reaccionar durante 6 h bajo reflujo. Transcurrido el tiempo la reacción se extrajo con diclorometano y se lavó con solución saturada de NaHCO₃, se secó con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente fue evaporado en rotavapor. El crudo de la reacción (65 mg) se purificó mediante cromatografía en columna, obteniendo en la

fracción 5 con polaridad 99:1 hexanos-AcOEt un sólido blanco con p.f. 171– 173 °C correspondiente al compuesto **48** (4 mg) (Magallón-Chávez, 2018).

→ **Derivado vinílico 53**



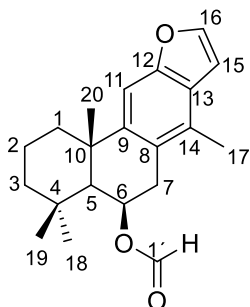
A una solución de 100 mg de 6 β -hidroxivouacapano (**47**) en 4 mL de MeOH, se adicionaron 0.5 mL de ácido perclórico a temperatura ambiente, se colocó en agitación durante cuatro h, la reacción se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio. Se secó con Na₂SO₄ anhidro. El crudo de reacción se separó mediante cromatografía

en columna y posteriormente se purificó en cromatografía en placa preparativa impregnada con AgNO₃, utilizando como fase móvil Hexanos-AcOEt 4:1. Se obtuvo una miel incolora 6.8 mg (6 % rendimiento).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.23 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-16), 6.20 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-15), 5.55 (1H, t, $J = 4.0$ Hz, H-6), 2.65 (1H, m, H-14), 2.57 (1H, m, H-8), 2.41 (1H, m, H-9), 2.17 (1H, m, H-7), 1.72 (2H, m, H-11), 1.30 (2H, m, H-3), 1.13 (3H, s, H-19), 1.10 (3H, s, H-20), 1.05 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 150.67 (C, C-5), 149.6 (C, C-12), 140.1 (CH, C-16), 122.9 (C, C-13), 118.3 (CH, C-6), 109.6 (CH, C-15), 42.0 (CH, C-14), 40.7 (C, C-10), 38.0 (C, C-4), 37.1 (CH, C-9), 34.9 (CH_2 , C-3), 32.9 (CH, C-8), 32.2 (CH_3 , C-18), 31.6 (CH_2 , C-7), 31.1 (CH_3 , C-20), 29.6 (CH_2 , C-1), 27.3 (CH_2 , C-11), 22.9 (CH_3 , C-19), 20.2 (CH_2 , C-2), 18.2 (CH_3 , C-17).

→ 6 β -formilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (54)



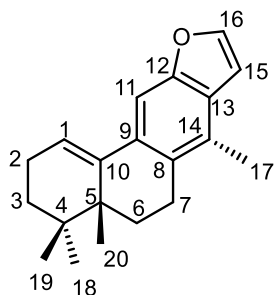
A una solución de 100 mg del benzofurano **51** en 3 mL de CH_2Cl_2 , se adicionó 1 mL de ácido fórmico, la solución se dejó bajo reflujo durante 1 h. Transcurrido el tiempo la reacción se extrajo con diclorometano (200 mL), se lavó con solución saturada de NaHCO_3 (300 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente fue evaporado en rotavapor. El crudo de la reacción (87 mg) se separó mediante cromatografía en columna, utilizando mezclas hexanos-AcOEt polaridad 49:1 como fase móvil, obteniendo 20 mg del compuesto **54** como un sólido blanco con punto de fusión de 145–147 °C.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.10 (1H, s, H-formiato), 7.53 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-16), 7.40 (1H, s, H-11), 6.72 (1H, dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz, H-15), 6.00 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-6), 3.11 (1H, dd, $J = 5.3, 18.2$ Hz, H-7), 3.07 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-7'), 2.34 (3H, s, CH_3 -17), 2.32 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-1), 1.89 (1H, qt, $J = 13.9, 3.5$ Hz, H-2), 1.66 (1H, ddd, $J = 13.9, 7.1, 3.5$ Hz, H-2'), 1.62 (3H, s, CH_3 -20), 1.59 (1H, s, H-5), 1.48 (1H, m, H-3), 1.25 (1H, m, H-3'), 1.12 (3H, s, CH_3 -19), 1.08 (3H, s, CH_3 -18).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 161.2 (C, OCOH), 153.8 (C, C-12), 145.9 (C, C-9), 144.4 (CH, C-16), 128.3 (C, C-14), 125.5 (C, C-13), 123.2 (C, C-8), 105.3 (CH, C-11), 104.9 (CH, C-15), 67.6 (CH, C-6), 51.5 (CH, C-5), 43.1 (CH_2 , C-1), 43.0 (CH_2 , C-3), 35.2

(CH₂, C-7), 38.3 (C, C-10), 34.2 (C, C-4), 33.5 (CH₃, C-18), 27.4 (CH₃, C-20), 23.2 (CH₃, C-19), 19.6 (CH₂, C-2), 16.0 (CH₃, C-17).

→ Derivado reordenado **55**

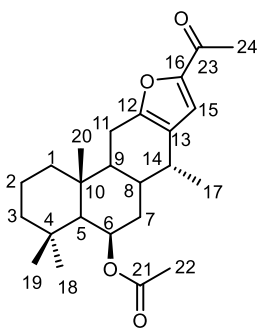


Una solución del alcohol benzofuránico **51** (100 mg) en 10 mL de ácido fórmico reaccionó durante 4 h a una temperatura de 90-100 °C en reflujo. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt (200 mL), se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (200 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente fue evaporado en rotavapor. Obteniéndose 64 mg del derivado **55** (69% rendimiento).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.61 (1H, s, H-11), 7.53 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-16), 6.72 (dd, *J* = 2.3, 1.0 Hz, H-15), 6.28 (1H, dd, *J* = 5.0, 3.0 Hz, H-1), 2.98 (1H, dd, *J* = 11.0, 6.1 Hz, H-7'), 2.89 (1H, dd, *J* = 5.0, 3.0, Hz, H-7), 2.39 (3H, s, H-17), 2.32 (1H, m, H-6'), 2.34 (1H, m, H-2'), 2.27 (1H, m, H-2), 1.77 (1H, m, H-6), 1.74 (1H, m, H-3), 1.25 (1H, m, H-3'), 0.96 (3H, s, CH₃-19), 0.96 (3H, s, CH₃-18), 1.62 (3H, s, CH₃-20).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 153.5 (C, C-12), 144.2 (CH, C-16), 139.8 (C, C-9), 133.0 (C, C-10), 127.8 (C, C-14), 127.7 (C, C-13), 126.3 (C, C-8), 119.7 (CH, C-1), 105.0 (CH, C-15), 104.7 (CH, C-11), 37.7 (CH, C-5), 34.7 (C, C-4), 32.8 (CH₂, C-3), 28.6 (CH₂, C-6), 24.9 (CH₃, C-18), 23.8 (CH₂, C-2), 23.7 (CH₂, C-7), 23.0 (CH₃, C-20), 20.2 (CH₃, C-19), 15.7 (CH₃, C-17).

→ **23-oxo-6β-acetoxivouacapano (56)**



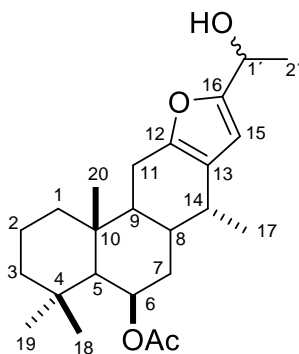
A una solución del 50 mg 6β-acetoxivouacapano (**6**) en 3 mL de anhídrido acético, se adicionaron 0.5 mL de BF₃•O(Et)₂ a 0 °C, la mezcla de reacción se dejó durante 1 h bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se vertió sobre hielo, se extrajo con AcOEt (150 mL), la fase orgánica se lavó con agua, con una solución de NaHCO₃ (250 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó en rotavapor. El crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía

en columna, utilizando como fase móvil mezclas Hexanos-AcOEt en polaridad 45:5. El compuesto **56** se obtuvo como una miel con un rendimiento del 57 %.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.01 (1H, s, H-15), 5.52 (1H, da, $J = 5.6$ Hz, H-6), 2.71 (1H, m, H-14), 2.62 (1H, m, H-11), 2.54 (1H, m, H-11'), 2.42 (3H, s, H-22), 2.03 (3H, s, OAc), 2.03 (1H, m, H-8), 1.85 (1H, dt, $J = 14.2, 3.6$ Hz, H-7), 1.71 (1H, m, H-1), 1.65 (1H, d, H-2), 1.57 (1H, m, H-7'), 1.53 (1H, m, H-9), 1.44 (1H, m, H-2'), 1.40 (1H, m, H-3), 1.23 (1H, m, H-3'), 1.20 (3H, s, CH_3 -20), 1.17 (1H, m, H-1'), 1.09 (1H, s, H-5), 1.03 (3H, s, CH_3 -19), 0.99 (3H, s, CH_3 -18), 0.98 (3H, d, $J = 7.8$ Hz, CH_3 -17).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 186.0 (C, C-21), 170.5 (C, C-1'), 156.0 (C, C-12), 151.2 (C, C-16), 125.8 (C, C-13), 117.9 (CH, C-15), 69.4 (CH, C-6), 55.5 (CH, C-5), 45.0 (CH, C-9), 43.6 (CH_2 , C-3), 42.0 (CH_2 , C-1), 37.9 (C, C-10), 36.0 (CH_2 , C-7), 33.7 (C, C-4) 33.6 (CH_3 , C-18), 30.8 (CH, C-14), 30.7 (CH, C-8), 25.5 (CH_3 , C-22), 23.4 (CH_3 , C-19), 22.0 (CH_2 , C-11), 21.7 (CH_3 , s, CH_3 -Ac), 18.7 (CH_2 , C-2), 17.5 (CH_3 , C-17), 17.0 (CH_3 , C-20).

→ Alcohol furánico **57**

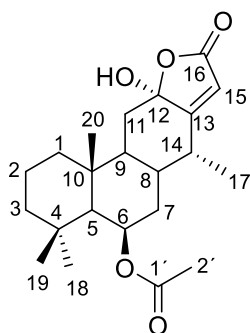


Una solución de 100 mg de la cetona **56** en 5 mL de metanol, se colocó en un baño de hielo, se adicionaron 28.3 mg de NaBH_4 (3 Eq), la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió agua (100 mL) y la fase orgánica se extrajo con CH_2Cl_2 (200 mL) y se lavó con salmuera (150 mL), se secó con Na_2SO_4 y se concentró a sequedad. Se obtuvo el alcohol **57** como un polvo blanco con punto de fusión de 166 –168 °C con un

rendimiento del 67 %.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 6.03 (1H, s, H-15), 5.50 (1H, da, $J = 1.9$ Hz, H-6), 4.82 (1H, q, $J = 6.5$ Hz, H-1'), 2.61 (1H, m, H-14), 2.57 (1H, m, H-11), 2.46 (1H, m, H-11'), 2.04 (1H, m, H-8), 2.03 (3H, s, OAc), 1.84 (1H, dt, $J = 14.4, 3.7$ Hz, H-7), 1.72 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-1) 1.52 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H- CH_3 -2'), 1.20 (3H, s, CH_3 -20), 1.08 (1H, s, H-5), 1.02 (3H, s, CH_3 -19), 0.99 (3H, s, CH_3 -18), 0.94 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -17).

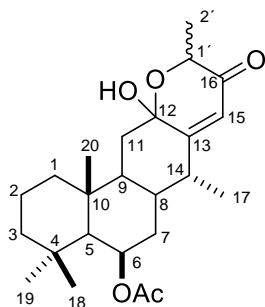
→ Lactona **25**



Una solución del derivado **57** (50 mg), 2.5 mL de acetonitrilo con azul de metileno (3 % mol), se sometió a irradiación de luz blanca (400 – 500 nm) durante 1 h. Una vez completada la reacción se evaporó el disolvente y se separó mediante cromatografía en columna, utilizando como fase móvil mezclas Hexanos-AcOEt en polaridad 45:5. obteniendo un sólido blanco con pf 117-119 °C de la lactona **25**. (Talavera-Alemán et al., 2020)

→ 12-hidroxi-6-acetoxi-18-vouacapanona **58**

A una solución de 50 mg del vouacapano hidroxilado **56** en 10 mL de CH₂Cl₂ se adicionaron 150 mg de AMCPB a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 h. Se extrajo con acetato de etilo (100 mL) y se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (200 mL). La mezcla (57 mg) se separó mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil polaridad Hexanos–AcOEt (2:1), se colectaron fracciones de 10 mL. Posteriormente las fracciones que presentaban el compuesto mayoritario se sometieron a placa preparativa usando como fase móvil polaridad Hexanos–AcOEt (9:1). Se aislaron 4.1 mg del derivado **58** como un sólido blanco.

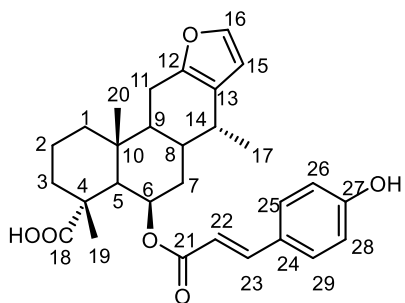


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 5.83 (1H, s, H-15), 5.50 (1H, sa, H-6), 4.63 (1H, q, *J* = 6.8 Hz, H-16), 2.54 (1H, m, H-14), 2.03 (3H, s, OAc), 1.37 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, CH₃-21), 0.94 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-17).

Coulteria velutina

→ Ácido-6*p*-cumariloxi-18-vouacapanoico (**59**)

Las hojas secas de *C. velutina* (1.2 kg) se extrajeron con CH₂Cl₂ (3.5 L) en reflujo durante 4 h. Una vez filtrado y evaporado el disolvente se obtuvo una miel color verde (85



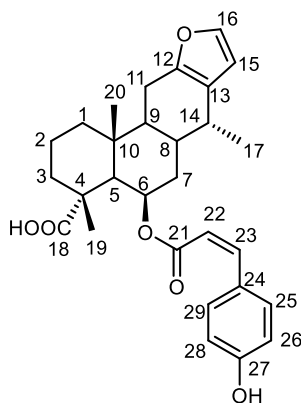
g). Una porción de está (35 g) se sometió a cromatografía con gel de sílice (250 g) usando 200 mL de gradientes hexanos–AcOEt (1:0, 9:1, 4:1, 3:2, y 1:1). Se colectaron fracciones de 10 mL, se monitoreó mediante TLC. El compuesto mayoritario fue obtenido en la polaridad 3:2 (7g).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.56 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-23), 7.35 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-25 H-29) 7.21 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-16), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-26 H-28) 6.20 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-22) 6.16 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-15), 5.32 (1H, sa, H-6), 2.63 (1H, d, $J = 16.0, 7.0$ Hz, H-11) 2.56 (1H, m, H-14), 2.48 (1H, dd, $J = 16.0, 10.0$ Hz, H-11'), 2.08 (1H, s, H-5), 2.05 (1H, m, H-8), 1.91 (1H, da, $J = 14.5$ Hz, H-7), 1.80 (1H, m, H-3) 1.78 (1H, da, $J = 13.1$ Hz, H-1), 1.68 (1H, m, H-7'), 1.67 (1H, m, H-2), 1.66 (1H, m, H-9), 1.64 (1H, m, H-3'), 1.61 (1H, m, H-2'), 1.37 (3H, s, CH_3 -20), 1.33 (3H, s, CH_3 -19), 0.94 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -17).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm 184.3 (C, C-18) 167.7 (C, C-21) 158.5 (C, C-27) 149.2 (C, C-12), 145.4 (CH, C-23) 140.1 (CH, C-16), 130.4 (CH, C-29) 130.3 (CH, C-25) 126.7 (C, C-24) 122.3 (C, C-13), 116.1 (CH, C-26 C-28), 115.4 (CH, C-22), 109.6 (CH, C-15), 72.7 (CH, C-6), 49.7 (CH, C-5), 47.9 (C, C-4) 45.9 (CH, C-9), 41.3 (CH_2 , C-1), 38.8 (CH_2 , C-3), 37.6 (C, C-10), 36.1 (CH_2 , C-7), 31.6 (CH, C-8), 31.2 (CH, C-14), 21.7 (CH_2 , C-11), 18.5 (CH_3 , C-19), 18.0 (CH_3 , C-20), 17.9 (CH_2 , C-2), 17.7 (CH_3 , C-17).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -18, $[\alpha]_{578}$ -19, $[\alpha]_{546}$ -21, $[\alpha]_{436}$ -26 (c 0.4, CHCl_3); IR (film): 3673-2900 (ancha), 1698, 1602, 1513, 1262, 1168, 1159 cm^{-1} ; EMIE (70 eV): m/z (%) 314 (24) $[\text{M} - \text{ácido cumárico}]^+$, 270 (17) $[\text{M} - \text{ácido cumárico} - \text{CO}_2]^+$, 199 (12), 159 (20), 147 (100), 145 (64), 120 (71), 91 (82); HRESIMS m/z 501.2241 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculado para $[\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_6 + \text{Na}]^+$ 501.2248.

→ Vouacapano 59b

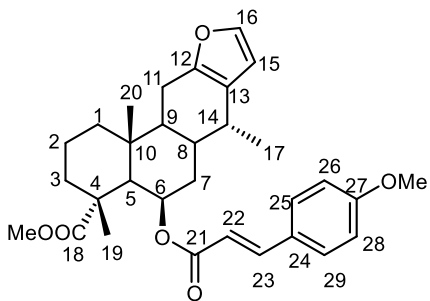


Producto de esta columna cromatográfica en la polaridad 3:2 Hexanos-AcOEt se obtuvo un compuesto minoritario (50 mg) en forma de miel amarilla.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.39 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-25 H-29), 7.21 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-16), 6.82 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-23), 6.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-26 H-28), 6.19 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-15), 5.79 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-22), 5.45 (1H, sa, H-6), 2.63 (1H, d, $J = 16.0, 7.0$ Hz, H-11) 2.56 (1H, m, H-14), 2.48 (1H, dd, $J = 16.0, 10.0$ Hz, H-11'), 1.98 (1H, s, H-5), 1.47 (3H, s, CH_3 -20), 1.25 (3H, s, CH_3 -19), 0.97 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 -17).

→ Derivado metilado 60

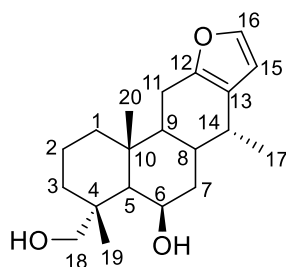
Un lote de 100 mg de **59** se hizo reaccionar con diazometano (10 mL) preparado *in situ*. Para la preparación del diazometano se colocó en un embudo de separación sobre baño de hielo una solución de KOH al 50 % (130 mL), una vez frío se adicionan 100 mL de CH_2Cl_2 , se deja enfriar y posteriormente se agrega lentamente *N*-nitroso-*N*-metilurea (1 g). La presencia de un color amarillo intenso indica la formación del diazometano.



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.60 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-23), 7.45 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-25 H-29) 7.22 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-16), 6.89 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-26 H-28), 6.25 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-23) 6.17 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-15), 5.14 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-6), 3.83 (3H, s, CH_3 - COOCH_3), 3.71 (3H, s, CH_3 - Cum CH_3), 2.66 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-11) 2.58 (1H, m, H-14), 2.49 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-11'), 2.08 (1H, da, $J = 2.0$ Hz, H-5), 2.05 (1H, m, H-8), 1.91 (1H, dt, $J = 14.4, 3.6$ Hz, H-7), 1.80 (1H, m, H-3) 1.78 (1H, da, $J = 13.1$ Hz, H-1), 1.68 (1H, m, H-7'), 1.67 (1H, m, H-2), 1.66 (1H, m, H-9), 1.64 (1H,

m, H-3'), 1.61 (1H, m, H-2'), 1.40 (3H, s, CH₃-20), 1.36 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-17).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 179.2 (C, C-18), 166.9 (C, C-21), 161.7 (C, C-27), 149.5 (C, C-12), 144.5 (CH, C-23), 140.5 (CH, C-16), 130.1 (CH, C-25, 29), 127.4 (C, C-24), 122.5 (C, C-13), 116.6 (CH, C-22), 114.6 (CH, C-26 C-28), 109.8 (CH, C-15), 72.4 (CH, C-6), 55.5 (CH₃, CH₃-27), 52.3 (CH₃, COO-CH₃), 50.3 (CH, C-5), 48.1 (C, C-4) 45.9 (CH, C-9), 41.3 (CH₂, C-1), 38.9 (CH₂, C-3), 37.6 (C, C-10), 36.1 (CH₂, C-7), 31.0 (CH, C-8), 31.3 (CH, C-14), 21.6 (CH₂, C-11), 18.5 (CH₃, C-20), 18.0 (CH₂, C-2), 17.9 (CH₃, C-19), 17.6 (CH₃, C-17).



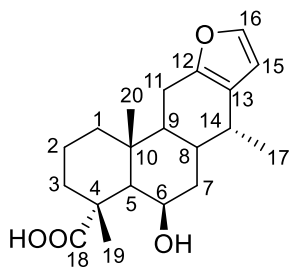
→ **6β,18α-vouacapandiol (61)**

A una suspensión de 15.2 mg LiAlH₄ en 1 mL de THF, se adicionó lentamente una solución de 100 mg de **59** en 2 mL de THF anhidro en baño de hielo. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 2 h bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se neutralizó con una solución de HCl al 10%, se extrajo con AcOEt (150 mL), se lavó con agua (3 x 100 mL) y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Obteniéndose el compuesto **61** como una miel incolora (78 mg).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.24 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-16), 6.20 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-15), 4.44 (1H, da, *J* = 2.9 Hz, H-6), 3.64 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-18), 3.23 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-18'), 2.56 (1H, m, H-14), 2.50 (1H, d, *J* = 10 Hz, H-11) 2.45 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-11'), 2.16 (1H, m, H-8), 1.74 (1H, m, H-7), 1.71 (1H, m, H-1), 1.68 (1H, m, H-7'), 1.56 (1H, m, H-9), 1.46 (1H, m, H-2) 1.39 (1H, s, H-5), 1.25 (1H, m, H-3), 1.23 (1H, m, H-2'), 1.27 (3H, s, CH₃-20), 1.22 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-17).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 149.6 (C, C-12), 140.3 (CH, C-16), 122.3 (C, C-13), 109.5 (CH, C-15), 72.2 (CH₂, C-18), 67.7 (CH, C-6), 49.6 (CH, C-5), 45.9 (CH, C-9), 41.8 (CH₂, C-3), 40.3 (CH₂, C-7), 38.4 (C, C-4), 37.5 (C, C-10), 37.0 (CH₂, C-1), 31.2 (CH, C-14), 30.3 (CH, C-8), 21.8 (CH₂, C-11), 20.0 (CH₃, C-19), 18.2 (CH₂, C-2), 18.1 (CH₃, C-17). 17.8 (CH₃, C-20).

→ Derivado 62

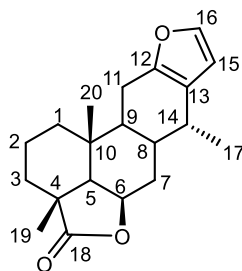


A una solución de **59** (100 mg) en 20 mL de MeOH:CH₂Cl₂ (9:1) se agregaron 50 mg de NaOH en agua (0.2 mL). La mezcla de reacción se colocó en un reactor de microondas a 150 W durante 15 min. El crudo de reacción se neutralizó con HCl al 2%, se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL), se lavó con agua (3 x 100 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El producto se obtuvo en un rendimiento del 89 % como un sólido blanco con p.f. 125-127 °C. $[\alpha]_D^{20}$: +30, $[\alpha]_{578}$ +31, $[\alpha]_{546}$ +36, $[\alpha]_{436}$ +65, $[\alpha]_{365}$ +119 (*c* 0.9, CHCl₃).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.23 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-16), 6.19 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-15), 4.15 (1H, da, *J* = 1.6 Hz, H-6), 2.61 (1H, m, H-14), 2.61 (1H, dd, *J* = 16.7, 7.2 Hz, H-11), 2.48 (1H, dd, *J* = 16.7, 10.3 Hz, H-11'), 2.18 (1H, m, H-8), 1.85 (1H, s, H-5), 1.80 (1H, m, H-7), 1.72 (1H, m, H-1), 1.69 (1H, m, H-2), 1.69 (1H, m, H-3), 1.69 (1H, m, H-7'), 1.62 (1H, m, H-9), 1.22 (3H, s, CH₃-19), 1.59 (1H, m, H-2'), 1.27 (3H, s, CH₃-20), 1.18 (1H, m, H-1'), 0.98 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-17).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 184.7 (C, C-18), 149.2 (C, C-12), 140.4 (CH, C-16), 122.3 (C, C-13), 109.5 (CH, C-15), 69.8 (CH, C-6), 50.2 (CH, C-5), 48.0 (C, C-4), 46.2 (CH, C-9), 41.4 (CH₂, C-1), 40.4 (CH₂, C-3), 38.7 (CH₂, C-7), 37.3 (C, C-10), 31.3 (CH, C-14), 30.7 (CH, C-8), 21.7 (CH₂, C-11), 18.9 (CH₃, C-19), 18.0 (CH₂, C-2), 18.0 (CH₃, C-17), 17.8 (CH₃, C-20).

→ (+)-(4R,5S,6S,8S,9S,10R,14R)-vouacapan-4,6-olida (**63**)



Una solución de 50 mg del compuesto **62** y 25 mg de AcONa en 4 mL de anhídrido acético se calentó en reflujo durante 4 h. Posteriormente la reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt (100 mL), la fase orgánica se lavó con una solución de NaHCO₃ (200 mL) y se secó con Na₂SO₄ anhidro para dar 46 mg del compuesto **63** como un sólido blanco con p.f. 157 – 159 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: +102, $[\alpha]_{578}$ +106, $[\alpha]_{546}$ +121, $[\alpha]_{436}$ +208, $[\alpha]_{365}$ +334 (*c* 0.8, CHCl₃); IR (CHCl₃): 2923, 1770, 1657, 1014 cm⁻¹; EMIE (70 eV): *m/z* (%) 314 (100) [M]⁺, 270 (12), 255 (24), 199 (16), 162 (29), 147 (90), 145 (47), 133 (29), 108 (70).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.24 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-16), 6.19 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-15), 4.51 (1H, ddd, *J* = 14.1, 11.0, 5.9 Hz, H-6), 2.75 (1H, m, H-14), 2.74 (1H, m, H-11'), 2.54 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-11), 2.26 (1H, m, H-7), 2.25 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-5), 2.25 (1H, m, H-8), 2.03 (1H, m, H-2), 1.88 (1H, dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, H-3), 1.88 (1H, m, H-7'), 1.85 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H-2'), 1.74 (1H, td, *J* = 10.3, 2.5 Hz, H-9), 1.69 (1H, m, H-3'), 1.58 (1H, dd, *J* = 12.3, 4.5 Hz, H-1), 1.49 (3H, s, CH₃-19), 1.32 (1H, m, H-1'), 1.21 (3H, s, CH₃-20), 1.15 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH₃-17).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm 181.7 (C, C-18), 148.9 (C, C-12), 141.0 (CH, C-16), 122.8 (C, C-13), 109.7 (CH, C-15), 76.4 (CH, C-6), 52.0 (CH, C-5), 42.3 (C, C-4), 40.6 (CH, C-9), 40.0 (CH₂, C-1), 37.8 (C, C-10), 36.5 (CH₂, C-7), 35.2 (CH₂, C-3), 33.2 (CH, C-14), 29.7 (CH, C-8), 23.4 (CH₃, C-19), 22.8 (CH₂, C-11), 20.3 (CH₂, C-2), 17.7 (CH₃, C-20), 17.0 (CH₃, C-17).

Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer humano HeLa, MDA-MB-232 y Caco-2 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 80% de humedad, en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de solución antibiótica (10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina y 25 μ g de anfotericina B por mL).

Medios de cultivo

- Medio completo. Composición: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES 15.6 gr/L, NaHCO₃ 1.5

gr/L, Penicilina/Estreptomicina 10,000 U/mL de Penicilina y 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma) 1%, suero fetal bovino (SFB, Sigma) 10%.

- Medio incompleto. Composición: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham con L-glutamina y 15 mM de HEPES 15.6 gr/L, NaHCO₃ 1.5 gr/L

Ensayo de viabilidad celular por MTT

Para determinar la toxicidad por el método colorimétrico MTT las células HeLa, MDA-MB-231, Caco-2 y NIH/3T3 se sembraron individualmente en placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 3×10^4 células por pocillo en 200 μ L de medio enriquecido con suero. Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n = 3$) utilizando concentraciones crecientes del compuesto **59** (50, 70, 90, 110 y 130 μ g mL⁻¹) durante 48 h. Se empleó metotrexato (MTX) como control positivo a 100 μ M para las células MDA-MB-231, HeLa y NIH/3T3 y 1 μ M para las células Caco-2, mientras que el DMSO ($\leq 0,1\%$ en medio de cultivo) se utilizó como control negativo. Tras el tratamiento, se añadió a cada pocillo una solución (10 μ L) de MTT (5 mg mL⁻¹ en PBS) y se incubó durante 4 h a 37 °C. Consecutivamente, se añadieron 100 μ L de 2-propanol/1M HCl (19:1 v/v) para disolver los cristales de formazán, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro para microplacas Biotek Epoch a 595 nm. Los datos fueron recolectados y extraídos con el software Microplate manager (Biotek). Se realizaron 2 ensayos para cada tratamiento con tres repeticiones cada uno. Los valores medios de IC₅₀ se expresan en μ g mL⁻¹, incluidos los correspondientes intervalos de confianza al 95%.

REFERENCIAS

- Atanasov, A., Zotchev, S., Dirsch, V., Orhan, I., Banach, M., Rollinger, J., Barreca, D., Weckwerth, W., Bauer, R., Edward, B., Majeed, M., Bishayee, A., Bochkov, V., Bonn, G., Braidy, N., Bucar, F., Cifuentes, A., D'Onofrio, G., Bodkin, M., & Supuran, C. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20, 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Álvarez-Esquivel, F. E. (2012). Tesis de Maestría. Estereoquímica y configuración absoluta de Diterpenos del género *Caesalpinia*, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Banerjee, R., HKS, K., & Banerjee, M. (2015). Medicinal significance of furan derivatives: A Review . *International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology*, 5(3), 48-57. Retrieved from <https://scienztech.org/index.php/ijrpp/article/view/877>
- Bielski, R., & Gryniewicz, G. (2021). Half a century with Achmatowicz rearrangement. *Tetrahedron*, 85, 132058. doi:10.1016/j.tet.2021.132058 .
- Castillo, R., Chiriboga, C, & Fontanilla, M. R. (2006). Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 35(2), 177-191.
- CATIE (1992). Aripín, (*Caesalpinia velutina* Britton et Rose Standley) Especie de árbol de uso múltiple en América Central. CATIE. Serie Técnica. Informe técnico No 197. Turrialba, Costa Rica.
- Cavill, G., Laing, D., & Williams, P. (1969). A synthesis of the juvenile hormone, methyl-cis-10,11-Epoxy-7-ethyl-3,11-dimethyltrideca-trans-2,trans-6-dienoate. *Australian Journal of Chemistry*, 22(10), 2145-2160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/CH9692145>
- Chavez, J.D., Keller, A., Zhou, B., Tian, R. & Bruce, J.E. (2019). Cellular interactome dynamics during Paclitaxel treatment. *Cell Reports*, 29(8), 2371-2383. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.063>.
- Debie, E., De Gussem, E., Dukor, R. K., Herrebout, W., Nafie, L. A., & Bultinck, P. (2011). A confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using

- vibrational circular dichroism or Raman optical activity. *Chemphyschem*, 12(8), 1542-1549. <https://doi.org/10.1002/cphc.201100050>
- Deska, J., Thiel, D., & Gianolio, E. (2015). The Achmatowicz rearrangement – oxidative ring expansion of furfuryl alcohols. *Synthesis*, 47(22), 3435-3450. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1560345>
- Euzébio, F. P., Santos, F. J., Piló-Veloso, D., Alcântara, A. F., Ruiz, A. L., Carvalho, J. E., Foglio, M. A., Ferreira-Alves, D. L., & Fátima, A. (2010). Synthesis, antiproliferative activity in cancer cells and theoretical studies of novel 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid Mannich base derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(23), 8172-8177. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.10.015>
- Euzébio, F. P., Santos, F. J., Piló-Veloso, D., Ruiz, de Carvalho, J. E., Ferreira-Alves, D. L., & Fátima, A. (2009). Effect of 6 α ,7 β -dihydroxyvouacapan-17 β -oic acid and its lactone derivatives on the growth of human cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 37(3), 96-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2009.03.004>
- Fan, M., Yuan, S., Li, L., Zheng, J., Zhao, D., Wang, C., Wang, H., Liu, X., & Liu, J. (2023). Application of terpenoid compounds in food and pharmaceutical products. *Fermentation*, 9(2), 119. <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/2/119>
- Gagnon, E., Bruneau, A., Hughes, C. E., de Queiroz, L. P., & Lewis, G. P. (2016). A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). *PhytoKeys*, 71. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.71.9203>
- Gagnon, E., Lewis, G. P., Solange Sotuyo, J., Hughes, C. E., & Bruneau, A. (2013). A molecular phylogeny of *Caesalpinia* sensu lato: Increased sampling reveals new insights and more genera than expected. *South African Journal of Botany*, 89, 111-127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.027>
- Galsky, M. D., Dritselis, A., Kirkpatrick, P., & Oh, W. K. (2010). Cabazitaxel [Drug overview]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 677+. <https://link.gale.com/apps/doc/A237134957/AONE?u=anon~635d853e&sid=google Scholar&xid=8e22d5c0>
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3, 408-414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>

- Ghosh, A. K., & Brindisi, M. (2016). Achmatowicz reaction and its application in the syntheses of bioactive molecules. *RSC Advances*, 6(112), 111564-111598. <https://doi.org/10.1039/c6ra22611f>
- Gómez-Hurtado, M. A., Álvarez-Esquivel, F. E., Rodríguez-García, G., Martínez-Pacheco, M. M., Espinoza-Madrigal, R. M., Pamatz-Bolaños, T., Salvador-Hernández, J. L., García-Gutiérrez, H. A., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., & del Río, R. E. (2013). Cassane diterpenes from *Caesalpinia platyloba*. *Phytochemistry*, 96, 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.028>
- Guo, Z. (2017). The modification of natural products for medical use. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(2), 119-136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.003>.
- Gutiérrez-Vázquez, E., del Río, R.E. & Juárez-Gutiérrez, A.C. (2020). *Coulteria platyloba* (S. Watson) N. Zamora. En Recursos arbóreos y arbustivos tropicales II para una ganadería bovina sustentable. pp 33-40. ISBN: 978-607-8549-80-1. Universidad de Colima.
- Joseph-Nathan, P., & Gordillo-Román, B. (2015). Vibrational circular dichroism absolute configuration determination of natural products. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 100, 311-452. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05275-5_4.
- Kalauni, S. K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Linn, T. Z., Asih, P. B., Syafruddin, D., & Kadota, S. (2006). Antimalarial activity of cassane- and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* and their structure-activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 1050-1052.
- Ke, Z., Chit Tsui, G., Peng, X.-S., & Yeung, Y.-Y. (2017). Chapter 5.3 - Five-membered ring systems: Furans and benzofurans. In G. W. Gribble & J. A. Joule (Eds.), *Progress in Heterocyclic Chemistry* (Vol. 29, pp. 239-275). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102310-5.00007-2>.
- Liang, L., Guo, L-D., & Tong, R. (2022). Achmatowicz rearrangement-inspired development of green chemistry, organic methodology, and total synthesis of natural products. *Accounts of Chemical Research*, 55(16), 2326–2340. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.2c00358>.

- Magallón-Chávez, O. (2018). Preparación de derivados del 6 β -acetoxivouacapano modificados en el anillo B. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Matsumoto, T., Tanaka, Y., Terao, H., Takeda, Y., & Wada, M. (1993). Rearrangement of the angular methyl group in dehydroabietic acid derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 41(11), 1960-1964. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1960>
- Maurya, R., Ravi, M., Singh, S., & Yadav, P. P. (2012). A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*, 83(2), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.007>
- Moulay, S. (2002). The most well-known rearrangements in organic chemistry at hand. *Chemistry Education Research and Practice*, 3(1), 33-64. <https://doi.org/10.1039/B1RP90039K>
- Palasap, A., Limpaboon, T., Boonsiri, P., Thapphasaraphong, S., Daduang, S., Suwannalert, P., & Daduang, J. (2014). Cytotoxic effects of phytophenolics from *Caesalpinia mimosoides* Lamk on cervical carcinoma cell lines through an apoptotic pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1), 449-454.
- Plutschack, M. B., Seeberger, P. H., & Gilmore, K. (2016). Visible-Light-Mediated Achmatowicz Rearrangement. *Organic Letters*, 19(1), 30–33. <https://doi.10.1021/acs.orglett.6b03237>
- Ragasa, C. Y., Hofileña, J. G., & Rideout, J. A. (2002). New furanoid diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Natural Products*, 65(8), 1107-1110. <https://doi.org/10.1021/np0201523>
- Román, L. U., Hernández, J. D., del Río, R. E., Bucio, M. A., Cerda-García-Rojas, C. M., & Joseph-Nathan, P. (1991). Wagner-Meerwein rearrangements of longipinane derivatives. *Journal Organic Chemistry*, 56(5), 1938-1940. <https://doi.org/10.1021/jo00005a050>
- Sánchez-Soto, B., Pacheco-Aispuro, E., Reyes, A., Lugo-Garcia, G., Casillas-Alvarez, P., & Saucedo, P. (2016). Breaking physical dormancy of *Caesalpinia platyloba* S. Watson seeds. *Interciencia*, 41, 691-695.
- Sartori, G., & Maggi, R. (2006). Use of solid catalysts in Friedel–Crafts acylation reactions. *Chemical Reviews*, 106(3), 1077–1104. doi:10.1021/cr040695c

- Schwachtje, J., Fischer, A., Erban, A., Kopka, J. (2018). Primed primary metabolism in systemic leaves: a functional systems analysis. *Scientific reports*, 8, 216. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18397-5>
- Servín-García, G., Chacón-García, L., González-Marrero, J., Macías-Alonso, M., Gómez-Hurtado, M. A., Rodríguez-García, G., del Río, R. E., & Cortés-García, C. J. (2022). Semisynthesis of 6 β -Acetoxylvouacapane derivatives via the Ugi-Azide multicomponent reaction. *Chemistry Proceedings*, 12(1), 24. <https://www.mdpi.com/2673-4583/12/1/24>
- Sudhakar, C., Reddy, P. R., Raju, T. V., & Das, B. (2012). Interesting transformations of naturally occurring cassane diterpenoids and bioevaluation of the products. *Tetrahedron Letters*, 53(30), 3850-3852. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.05.032>.
- Sudhakar, M., Rao Ch, V., Rao, P. M., Raju, D. B., & Venkateswarlu, Y. (2006). Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. *Fitoterapia*, 77(5), 378-380. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.02.011>
- Talavera-Alemán, A., Gómez-Hurtado, M. A., del Río, R. E., Marrot, J., Thomassigny, C., & Greck, C. (2017). Epoxy lactones by photooxidative rearrangement of 6 β -acetoxylvouacapane. *Tetrahedron Letters*, 58(30), 2901-2903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.06.030>
- Talavera-Alemán, A., Gómez-Hurtado, M. A., Rodríguez-García, G., Ochoa-Zarzosa, A., Thomassigny, C., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., & del Río, R. E. (2020). Preparation and cytotoxic evaluation of vouacapane oxidation products. *Heterocycles*, 100(2), 207-224. <https://doi.org/10.3987/com-19-14195>
- Torres-Colín, R., & Saynes-Vásquez, A. (2020). A new species of the genus *Coulteria* (Leguminosae) in the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Phytotaxa*, 459(2), 108-116. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.459.2.2>
- Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4-14. <https://www.mdpi.com/2037-0164/13/1/3>
- Van-Lume, B., Esposito, T., Diniz-Filho, J. A. F., Gagnon, E., Lewis, G. P., & Souza, G. (2017). Heterochromatic and cytomolecular diversification in the *Caesalpinia* group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytogeographical data.

- Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 29, 51-63.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ppees.2017.11.004>
- Vilariño Pavia, J. L. (2022). Caracterización etnobotánica y ecogeográfica de las especies proteicas *Caesalpinia platyloba* S. Watson (*palo rojo*) Universidad de Holguín]. Repositorio uho.
- Vivek, A. S., Riyas, C. T., & Swapna, T. S. (2023). Enhanced secondary metabolite production for drug leads. In S. T. Sukumaran & K. T R (Eds.), *Conservation and Sustainable Utilization of Bioresources* (pp. 473-504). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5841-0_19
- Wang, M., Wang, D., Gao, C., Li, X., Sha, L., Zhao, Q., Gao, H., & Wu, Z. (2019). Pharmacokinetic and tissue distribution studies of cassane diterpenoids, in rats through an ultra-high-performance liquid chromatography–Q exactive hybrid quadrupole–Orbitrap high-resolution accurate mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 33(10), e4610. <https://doi.org/10.1002/bmc.4610>
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. & McPhail, A.T. (1971.) Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal American Chemical Society*, 93(9), 2325-2327, <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>
- Xavier, V., Spréa, R., Finimundy, T. C., Heleno, S. A., Amaral, J. S., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2023). Terpenes. In M. Caroch, S. A. Heleno, & L. Barros (Eds.), *Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry* (pp. 107-156). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-18587-8_5