



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Preparación de diterpenos aromáticos a partir del
producto natural de *Ageratina petiolaris*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B. MÓNICA LUNA VÁZQUEZ

DIRECTORES DE TESIS

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

DOCTORA EN QUÍMICA
LIDIA BEIZA GRANADOS

ABRIL DE 2018

MORELIA, MICHOACÁN

*Cuando uno es joven tiene la tendencia
de hacer experimentos sin buscar cosas específicas.
Yo establecí un pequeño laboratorio en el desván de la casa
para ver crecer cristales.*

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ CABO EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA MEDICINAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D. C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ Y LA D. Q. LIDIA BEIZA GRANADOS. PROYECTO REALIZADO CON EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CIC-UMNSH Y CONACYT CIENCIA BÁSICA (167952).

Parte del presente trabajo se presentó en los siguientes eventos académicos:

1. Hugo A. García-Gutiérrez, Luis J. Carranza-Calvillo, Mónica Luna-Vázquez, Rosa E. del Río, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan. Modificación química, modelado y anclaje molecular de diterpenos tipo *ent*-labdano de *Ageratina petiolaris*. Presentado en la 12ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Celebrada en Xalapa, Veracruz, del 18 al 20 de mayo de 2016. *Rev. Latinoamer. Quím.* 2016, 44 (Suplemento especial), 194.
2. Mónica Luna-Vázquez, Hugo A. García-Gutiérrez, Víctor M. Delgadillo-Becerra, Lidia Beiza-Granados, Juan D. Hernández-Hernández, Rosa E. del Río. Reactividad del ácido 2-hidroxiéperuico obtenido de *Ageratina petiolaris*. Presentado en la 3ª Semana del Posgrado en Ciencias Químicas. Celebrada en Morelia, Michoacán, del 27 al 30 de junio de 2016.
3. Mónica Luna-Vázquez, Víctor M. Delgadillo-Becerra, Rosa E. del Río, Hugo A. García-Gutiérrez. Reactividad del diterpeno tipo *ent*-labdano de *Ageratina petiolaris*. Presentado en el 11º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Quinto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Celebrado en Morelia, Michoacán, el 13 y 14 de octubre de 2016.
4. Mónica Luna-Vázquez, Lidia Beiza-Granados, Rosa E. del Río, Hugo A. García-Gutiérrez. Síntesis de amidas a partir del ácido 2-hidroxiéperuico obtenido de *Ageratina petiolaris*. Presentado en el II Congreso Internacional y IV Nacional de Químico Farmacobiología. Celebrado en Morelia, Michoacán del 28 de noviembre al 1 de diciembre de 2016.

5. Mónica Luna-Vázquez, Hugo A. García-Gutiérrez, Marili Martínez-Cabello, Luis J. Calvillo-Carranza, Rosa E. del Río, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. Estudio del equilibrio dinámico de la tubulina frente a derivados diterpénicos tipo *ent-labdano* de *Ageratina petiolaris*. Presentado en la 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Celebrada en Morelia, Michoacán, del 17 al 20 de mayo de 2017, *Rev. Latinoamer. Quim.* 2017, 45 (*Suplemento Especial*), 291.

6. Mónica Luna-Vázquez, Lidia Beiza-Granados, Marili Martínez-Cabello, Luis J. Calvillo-Carranza, Luisa U. Román-Marín, Rosa E. del Río, Hugo A. García-Gutiérrez. Equilibrio dinámico de los microtúbulos frente a derivados de *ent-labdano*. Presentado en el 1er Foro del Posgrado en Ciencias Químicas. Celebrado en Morelia, Michoacán, del 31 de julio al 4 de agosto de 2017.

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|-----|
| I. | Índice de estructuras | vi |
| II. | Índice de figuras | x |
| III. | Índice de tablas | xiv |
| IV. | Símbolos, abreviaturas y acrónimos | xv |
| V. | Resumen | xix |
| VI. | Abstract | xx |
| 1. | Introducción | 1 |
| 2. | Antecedentes | 2 |
| 2.1. | Terpenos | 3 |
| 2.2. | Diterpenos | 4 |
| 2.3. | Actividad biológica de los diterpenos | 7 |
| 2.4. | Taxol® | 8 |
| 2.5. | Características del cáncer | 9 |
| 2.6. | Equilibrio dinámico de la tubulina | 11 |
| 2.7. | Familia Asteraceae | 13 |
| 2.8. | Género <i>Ageratina</i> | 13 |
| 2.9. | <i>Ageratina petiolaris</i> | 14 |
| 2.10. | Ácido 2 α -hidroxieperuico | 16 |
| 2.11. | Características de las amidas y ésteres | 18 |
| 2.12. | Anclaje molecular (Docking) | 19 |

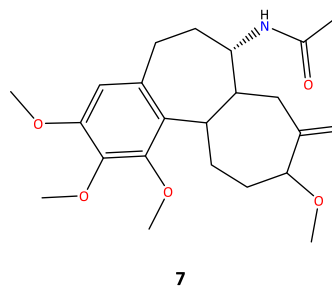
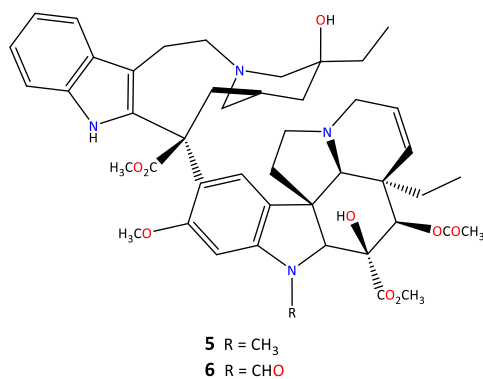
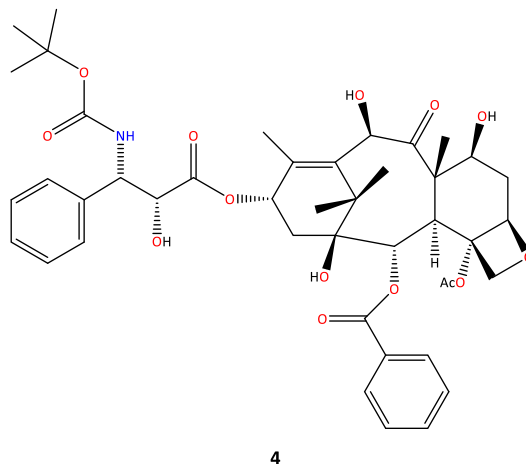
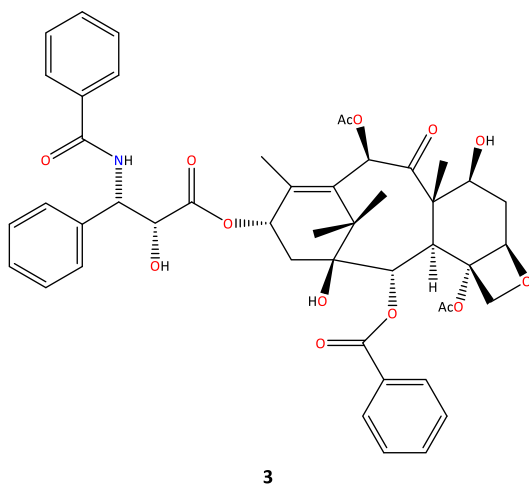
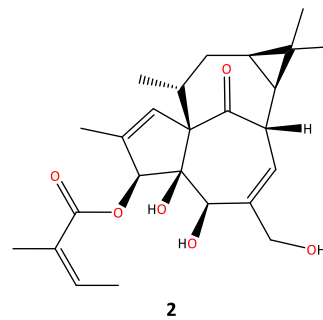
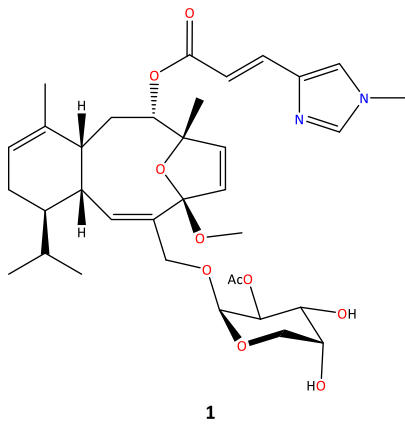
| | | |
|--------|--|----|
| 3. | Justificación | 20 |
| 4. | Objetivos | 21 |
| 4.1. | Objetivo general | 21 |
| 4.2. | Objetivos específicos | 21 |
| 5. | Discusión de resultados | 22 |
| 5.1. | Obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | 22 |
| 5.2. | Obtención del ácido 2 α -acetoxieperuico (18) | 23 |
| 5.3. | Obtención de amidas con esqueleto tipo <i>ent</i> -labdano a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico | 25 |
| 5.3.1. | Preparación del derivado 27 | 25 |
| 5.3.2. | Preparación del derivado 23 | 27 |
| 5.3.3. | Preparación del derivado 30 | 29 |
| 5.3.4. | Preparación del derivado 32 | 30 |
| 5.3.5. | Preparación del derivado 34 | 31 |
| 5.3.6. | Preparación del derivado 35 | 32 |
| 5.3.7. | Preparación de los derivados 37 y 38 | 34 |
| 5.3.8. | Preparación del derivado 39 | 37 |
| 5.4. | Obtención de ésteres con esqueleto tipo <i>ent</i> -labdano a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico | 38 |
| 5.4.1. | Preparación del derivado 41 | 38 |
| 5.4.2. | Preparación del derivado 42 | 39 |
| 5.4.3. | Preparación del derivado 44 | 41 |
| 5.4.4. | Preparación del derivado 45 | 42 |

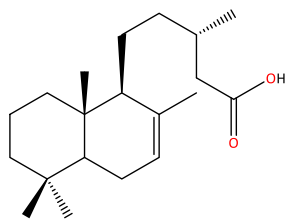
| | | |
|-----------|---|----|
| 5.4.5. | Preparación del derivado 47 | 43 |
| 5.4.6. | Preparación del derivado 48 | 44 |
| 5.5. | Estudios de anclaje molecular (Docking) de las moléculas preparadas frente al heterodímero de alfa- y beta-tubulina | 45 |
| 5.5.1. | Análisis conformacional | 45 |
| 5.5.2. | Estudios de anclaje molecular | 48 |
| 5.5.2.1. | Anclaje molecular del derivado 27 | 49 |
| 5.5.2.2. | Anclaje molecular del derivado 23 | 50 |
| 5.5.2.3. | Anclaje molecular del derivado 30 | 52 |
| 5.5.2.4. | Anclaje molecular del derivado 32 | 53 |
| 5.5.2.5. | Anclaje molecular del derivado 34 | 53 |
| 5.5.2.6. | Anclaje molecular del derivado 35 | 55 |
| 5.5.2.7. | Anclaje molecular del derivado 37 | 56 |
| 5.5.2.8. | Anclaje molecular del derivado 38 | 57 |
| 5.5.2.9. | Anclaje molecular del derivado 39 | 58 |
| 5.5.2.10. | Anclaje molecular del derivado 41 | 59 |
| 5.5.2.11. | Anclaje molecular del derivado 42 | 60 |
| 5.5.2.12. | Anclaje molecular del derivado 44 | 61 |
| 5.5.2.13. | Anclaje molecular del derivado 45 | 61 |
| 5.5.2.14. | Anclaje molecular del derivado 47 | 63 |
| 5.5.2.15. | Anclaje molecular del derivado 48 | 64 |
| 5.6. | Ensayos del equilibrio dinámico de la tubulina frente a derivados diterpénicos | 65 |

| | | |
|---------|--|----|
| 6. | Conclusiones | 70 |
| 7. | Parte experimental | 71 |
| 7.1. | Generalidades | 71 |
| 7.2. | Colecta de la especie vegetal | 71 |
| 7.3. | Obtención del extracto hexánico de flor de <i>Ageratina petiolaris</i> | 72 |
| 7.4. | Obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | 72 |
| 7.5. | Obtención del ácido 2 α -acetoxieperuico (18) | 73 |
| 7.6. | Obtención del derivado 27 | 73 |
| 7.7. | Obtención del derivado 23 | 74 |
| 7.8. | Obtención de amidas y ésteres empelando CDI como activador del grupo carboxilo | 75 |
| 7.8.1. | Derivado 30 | 76 |
| 7.8.2. | Derivado 32 | 77 |
| 7.8.3. | Derivado 34 | 77 |
| 7.8.4. | Derivado 35 | 78 |
| 7.8.5. | Derivado 37 | 79 |
| 7.8.6. | Derivado 39 | 79 |
| 7.8.7. | Derivado 41 | 80 |
| 7.8.8. | Derivado 42 | 81 |
| 7.8.9. | Derivado 44 | 81 |
| 7.8.10. | Derivado 45 | 82 |
| 7.8.11. | Derivado 47 | 82 |
| 7.8.12. | Derivado 48 | 83 |

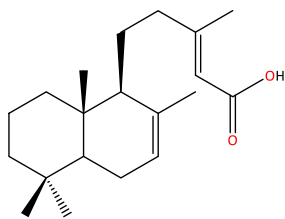
| | | |
|---------|---|----|
| 7.9 | Obtención de amidas vía anhídridos mixtos | 84 |
| 7.9.1. | Obtención de 37 y 38 | 84 |
| 7.10. | Anclaje molecular (docking) de las moléculas preparadas frente al heterodímero de alfa- y beta-tubulina | 85 |
| 7.10.1. | Modelado molecular | 85 |
| 7.10.2. | Anclaje molecular (docking) | 85 |
| 7.11. | Ensayos del equilibrio dinámico de la tubulina frente a derivados diterpénicos | 86 |
| 8. | Referencias bibliográficas | 87 |
| 9. | ANEXO. Tablas de desplazamiento químico de ¹³ C | 91 |

I. ÍNDICE DE ESTRUCTURAS

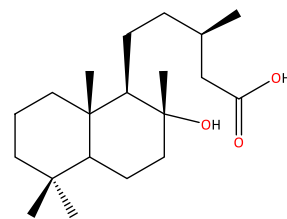




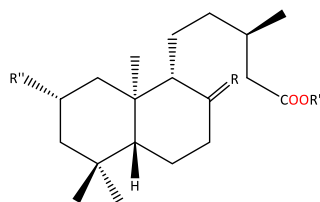
8



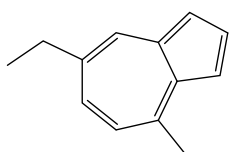
9



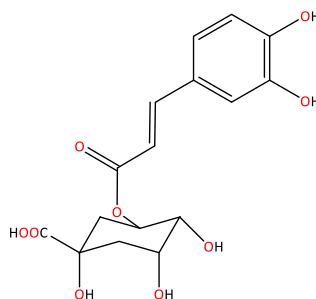
10



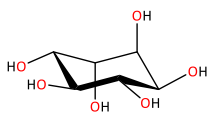
- | | | | |
|------------|---------------------|----------------------|------------------------------|
| 11 | R = CH ₂ | R' = H | R'' = <i>O</i> -iso-Valeroil |
| 11a | R = CH ₂ | R' = CH ₃ | R'' = <i>O</i> -iso-Valeroil |
| 11b | R = CH ₂ | R' = CH ₃ | R'' = OH |
| 11c | R = CH ₂ | R' = CH ₃ | R'' = OAc |
| 11d | R = CH ₂ | R' = CH ₃ | R'' = O |
| 11e | R = CH ₂ | R' = CH ₃ | R'' = H |
| 11f | R = O | R' = CH ₃ | R'' = OAc |
| 11g | R = O | R' = CH ₃ | R'' = H |



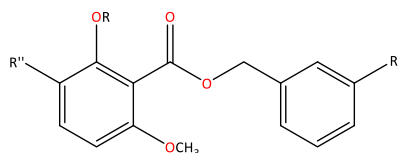
12



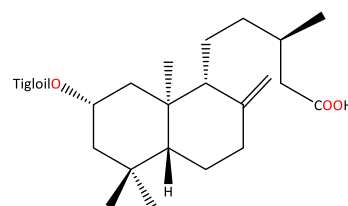
13



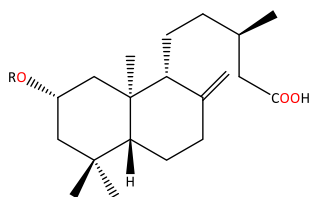
14



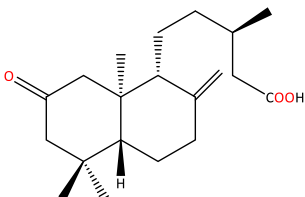
- | | | | |
|------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| 15a | R = H | R' = H | R'' = H |
| 15b | R = CH ₃ | R' = H | R'' = H |
| 15c | R = CH ₃ | R' = OCH ₃ | R'' = H |
| 15d | R = H | R' = H | R'' = OCH ₃ |



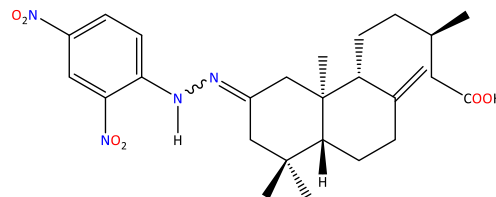
16



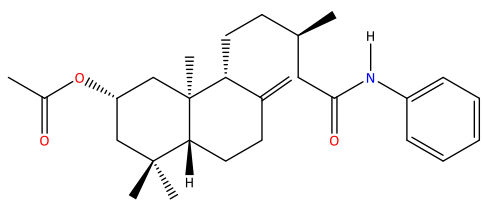
- | | |
|-----------|--------|
| 17 | R = H |
| 18 | R = Ac |



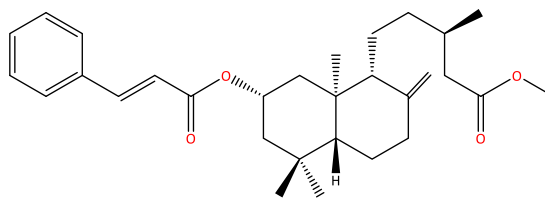
19



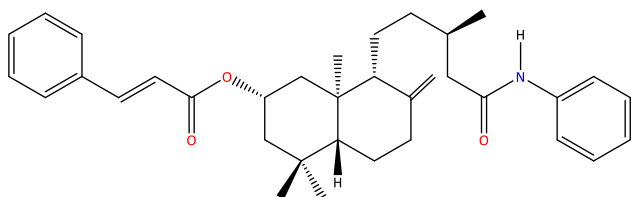
20



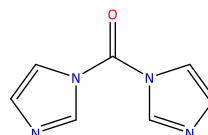
21



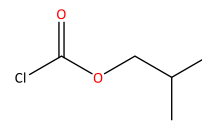
22



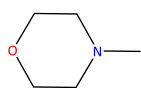
23



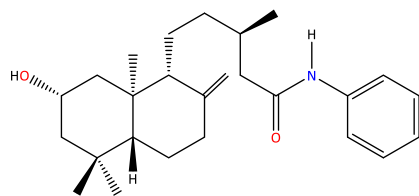
24



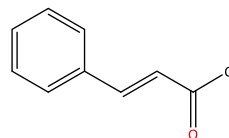
25



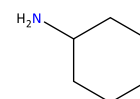
26



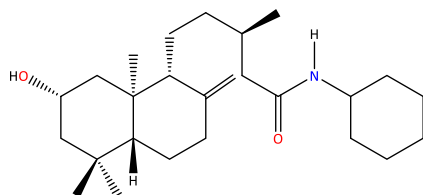
27



28



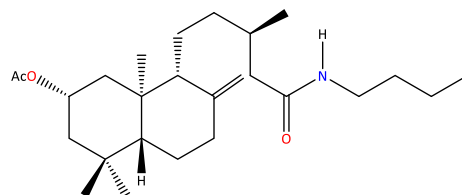
29



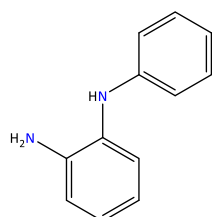
30



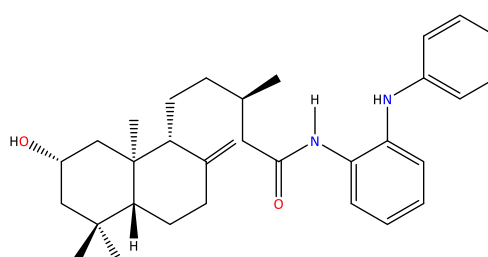
31



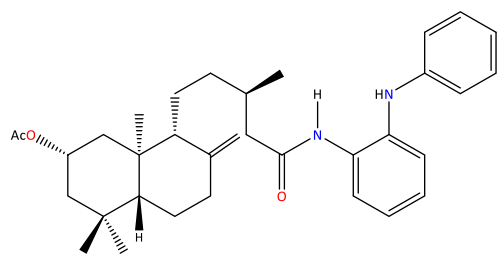
32



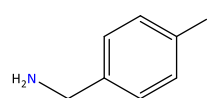
33



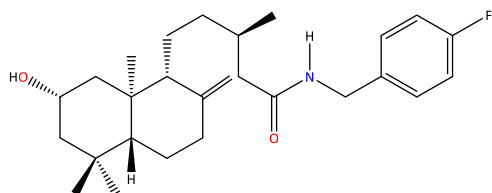
34



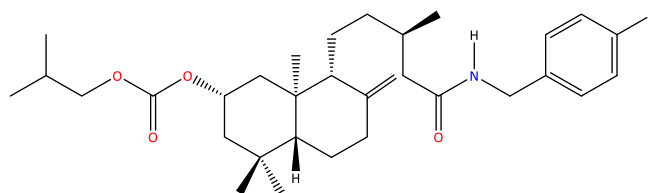
35



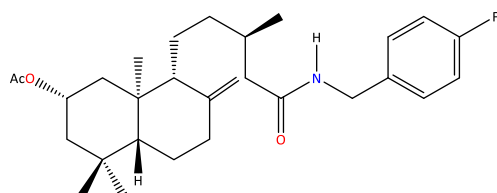
36



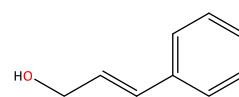
37



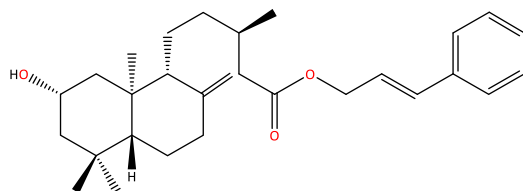
38



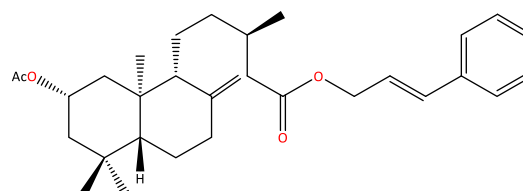
39



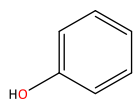
40



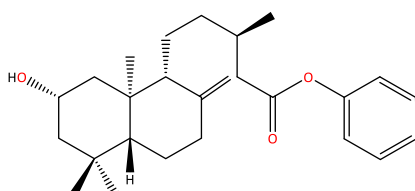
41



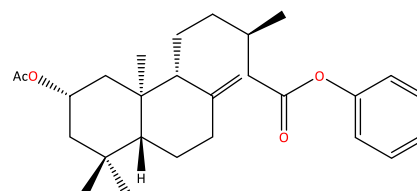
42



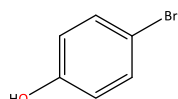
43



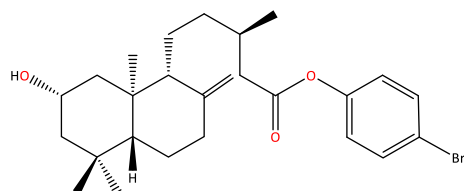
44



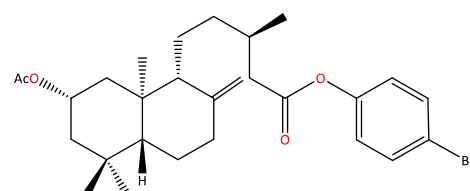
45



46



47



48

II. ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Principales rutas de la biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interacciones con el metabolismo primario | 3 |
| Figura 2 | Principales tipos de esqueletos diterpénicos | 6 |
| Figura 3 | Estructura de diterpenos anticancerosos | 7 |
| Figura 4 | Estructura del paclitaxel (3) y su análogo semisintético docetaxel (4) | 8 |
| Figura 5 | Sitio de unión de 3 en la β -tubulina. Archivo 1JFF obtenido de PDB | 9 |
| Figura 6 | Alcaloides de la vinca 5-6 y colchicina (7) | 10 |
| Figura 7 | Sitio de unión de 5 interaccionando con la subunidad α de un dímero de tubulina y la β de otro (Dominio de la vinca). Archivo 4EB6 obtenido de PDB | 10 |
| Figura 8 | Sitio de unión de 7 en la región entre monómeros del heterodímero de tubulina. Archivo 1SA0 obtenido de PDB | 11 |
| Figura 9 | Microtúbulo: Estructura tubular de las células compuesta por heterodímeros de α - y β -tubulina | 11 |
| Figura 10 | Inestabilidad dinámica de los microtúbulos | 12 |
| Figura 11 | Compuestos tipo labdano y <i>ent</i> -labdano | 14 |
| Figura 12 | <i>Ageratina petiolaris</i> | 15 |
| Figura 13 | Compuestos obtenidos de <i>A. petiolaris</i> | 16 |
| Figura 14 | Ácido 2 α -isovaleroxieperuico (11) y sus derivados | 16 |
| Figura 15 | Derivados del ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | 17 |
| Figura 16 | Hidrazonas derivadas del ácido 2 α -hidroxieperuico (20) | 17 |
| Figura 17 | Derivados 21-22 del ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | 17 |
| Figura 18 | Compuesto teórico 23 | 18 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 19 | Formación de amidas mediante CDI | 19 |
| Figura 20 | Síntesis de amidas vía anhídridos mixtos | 19 |
| Figura 21 | Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | 22 |
| Figura 22 | Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | 23 |
| Figura 23 | Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido 2 α -acetoxieperuico (18) | 24 |
| Figura 24 | Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido 2 α -acetoxieperuico (18) | 24 |
| Figura 25 | Secuencia de reacciones para la obtención de la amida 21 | 25 |
| Figura 26 | Hidrólisis alcalina para la obtención de la amida 27 | 25 |
| Figura 27 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 27 | 26 |
| Figura 28 | Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de 27 | 27 |
| Figura 29 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 23 | 28 |
| Figura 30 | Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de 23 | 29 |
| Figura 31 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 30 | 30 |
| Figura 32 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 32 | 31 |
| Figura 33 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 34 | 32 |
| Figura 34 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 35 | 33 |
| Figura 35 | Ampliación del experimento HMBC de 35 | 34 |
| Figura 36 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 37 | 35 |
| Figura 37 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 38 | 36 |
| Figura 38 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 39 | 38 |
| Figura 39 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 41 | 39 |
| Figura 40 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 42 | 40 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 41 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 44 | 42 |
| Figura 42 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 45 | 43 |
| Figura 43 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 47 | 44 |
| Figura 44 | Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de 48 | 45 |
| Figura 45 | Confórmeros de mínima energía (DFT//B3LYP/DGDZVP) | 46 |
| Figura 46 | Interacción del derivado 27 (blanco) sobre la tubulina en comparación con el paclitaxel (gris) | 50 |
| Figura 47 | Interacción del derivado 23 (blanco) en el mismo sitio unión que el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 51 |
| Figura 48 | Interacción de 23 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 51 |
| Figura 49 | Interacción del derivado 30 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 52 |
| Figura 50 | Interacción de 30 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 52 |
| Figura 51 | Interacción del derivado 32 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 53 |
| Figura 52 | Interacción del derivado 34 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 54 |
| Figura 53 | Interacción de 34 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 54 |
| Figura 54 | Interacción del derivado 35 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 55 |
| Figura 55 | Interacción de 35 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 56 |
| Figura 56 | Interacción del derivado 37 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 56 |
| Figura 57 | Interacción de 37 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 57 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 58 | Interacción del derivado 38 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 57 |
| Figura 59 | Interacción de 38 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 58 |
| Figura 60 | Interacción del derivado 39 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 58 |
| Figura 61 | Interacción de 39 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 59 |
| Figura 62 | Interacción del derivado 41 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 59 |
| Figura 63 | Interacción de 41 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 60 |
| Figura 64 | Interacción del derivado 42 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 60 |
| Figura 65 | Interacción del derivado 44 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 61 |
| Figura 66 | Interacción del derivado 45 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 62 |
| Figura 67 | Interacción de 45 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 62 |
| Figura 68 | Interacción del derivado 47 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 63 |
| Figura 69 | Interacción de 47 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 63 |
| Figura 70 | Interacción del derivado 48 (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina | 64 |
| Figura 71 | Interacción de 48 con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión | 64 |
| Figura 72 | Efecto de los derivados 17, 18 y 19 sobre la polimerización de tubulina | 66 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 73 | Efecto de los derivados 11b , 11c y 22 sobre la polimerización de tubulina | 67 |
| Figura 74 | Efecto del derivado 21 sobre la polimerización de tubulina | 68 |
| Figura 75 | Efecto del derivado 23 sobre la polimerización de tubulina | 69 |

III. ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------------|---|----|
| Tabla 1 | Clasificación y precursores de los Terpenos | 5 |
| Tabla 2 | Energía de afinidad de los <i>ent</i> -labdanos a la tubulina | 65 |
| Tabla 3 | Amidas y ésteres obtenidos a partir del <i>ent</i> -labdano de <i>A. petiolaris</i> | 76 |

IV. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|---------------|---|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| δ | Delta, desplazamiento químico |
| μm | Micrómetro |
| μM | Micromolar |
| 3D | Tridimensional |
| Ala | Alanina |
| Arg | Arginina |
| Asp | Aspartato |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| c | Concentración |
| CDI | 1,1'-Carbonildiimidazol |
| cm | Centímetro |
| COSY | Correlation spectroscopy (Espectroscopia de correlación) |
| d | Doble |
| dd | Doble de dobles |
| ddd | Doble de doble de dobles |
| DFT | Density functional theory (Teoría del funcional de la densidad) |
| DMAPP | Difosfato de dimetilalil |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dt | Doble de triples |
| E | Energía |

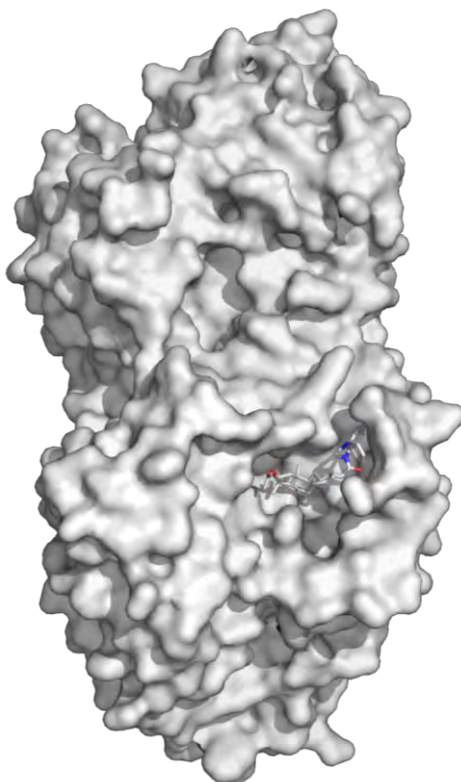
| | |
|---------------|---|
| E_f | Energía de afinidad |
| Eq | Equivalentes |
| FDA | Food and drug administration (Administración de medicamentos y alimentos) |
| FPP | Pirofosfato de farnesilo |
| g | Gramos |
| GDP | Guanosín difosfato |
| GFPP | Geranil farnesil pirofosfato |
| GGPP | Geranilgeranil pirofosfato |
| Gly | Glicina |
| GPP | Geranilpirofosfato |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| His | Histidina |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond correlation (Correlación heteronuclear a múltiples enlaces) |
| HSQC | Heteronuclear simple quantum correlation (Correlación heteronuclear múltiple cuántica) |
| Hz | Hertz |
| <i>i</i> -BCF | Cloroformiato de isobutilo |
| IPP | Isopentenil pirofosfato |
| IR | Infrarrojo |
| J | Constante de acoplamiento |
| kcal | Kilocalorías |
| L | Litro |
| Leu | Leucina |
| m | Metro |

| | |
|-------|--|
| mg | Miligramo |
| MHz | Megahertz |
| min | Minutos |
| mL | Mililitos |
| mm | Milímetros |
| MMFF | Merck molecular force field |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| nm | Nanómetros |
| NMM | <i>N</i> -Metilmorfolina |
| NOESY | Nuclear overhauser effect spectroscopy (Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser) |
| PDB | Protein data bank (Banco de datos de proteínas) |
| p. f. | Punto de fusión |
| PGA | Ácido 3-fosfoglicérico |
| pH | Potencial hidrógeno |
| Phe | Fenilalanina |
| ppm | Partes por millón |
| Pro | Prolina |
| Pyr | Piridina |
| q | Cuádruple |
| quint | Quíntuple |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| s | Simple |
| Ser | Serina |

| | |
|-------------|----------------------|
| t | Triple |
| THF | Tetrahidrofurano |
| Thr | Treonina |
| TMS | Tetrametilsilano |
| UV | Ultravioleta |
| Val | Valina |
| ν_{max} | Frecuencia máxima |
| ® | Marca registrada |
|))) | Ondas de ultrasonido |
| % | Por ciento |
| °C | Grado Celsius |

V. RESUMEN

Los productos naturales se consideran fuente importante de moléculas con actividad biológica y estas a su vez pueden ser modificadas por medio de métodos químicos para la obtención de derivados con diversas funcionalizaciones. El ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**) es un diterpeno *ent*-labdano aislado de *Ageratina petiolaris* el cual debido a los grupos funcionales presentes en su estructura permitió la obtención de diferentes amidas y ésteres. Los derivados fueron sometidos a un estudio de anclaje molecular *in silico* frente a tubulina, donde se observó que la mayoría presentan afinidad a la proteína en el mismo sitio de acción ocupado por el paclitaxel, fármaco empleado en la clínica para tratar cáncer de ovario, mama y pulmón. Por otra parte se llevó a cabo un estudio sobre el equilibrio dinámico de la tubulina *in vitro* empleando derivados de **17**, donde exhibieron actividad como estabilizadores de microtúbulos.

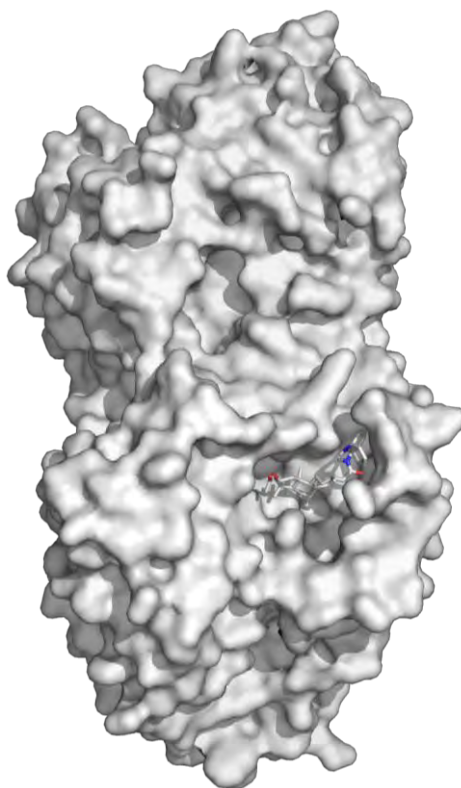


Interacción del derivado **35** sobre la tubulina ($E_f = -8.7$ kcal/mol).

Palabras clave: *Ageratina petiolaris*, *Ent*-labdano, Amida, Éster, Tubulina.

VI. ABSTRACT

Natural products are a source of molecules with biological activity, these compounds can be modified by chemical methods to generate functionalized derivatives. The 2 α -hydroxyeperuic acid (**17**) isolated from *Ageratina petiolaris* is an *ent*-labdane-type diterpene. Compound **17** has a hydroxyl group at C-2 and a carboxyl group at C-15, these functional groups have been modified to prepared some amides and esters with *ent*-labdane moiety. Interactions of new *ent*-labdane derivatives with the paclitaxel binding site of microtubules were studied employing docking. It is important to mention that paclitaxel is an antineoplastic agent used to treat a number of types of cancer, this includes ovarian cancer, breast cancer and lung cancer. Finally, *in vitro* studies between porcine neuronal tubulin and derivatives of compound **17** exhibited that these semi-synthetic molecules have the ability to suppress microtubules dynamics.



Interaction of **35** with tubulin ($E_f = -8.7$ kcal/mol).

Keywords: *Ageratina petiolaris*, *Ent*-labdane, Amide, Ester, Tubulin.

1. INTRODUCCIÓN

El interés en las propiedades medicinales que poseen las preparaciones obtenidas a partir de organismos vivos, especialmente de las plantas ha sido evidente desde la antigüedad, como lo comprueban escritos como el papiro de Ebers, un manual medicinal egipcio del año 1550 a. C., el cual describe propiedades de ciertas especies vegetales.¹

Los productos naturales son compuestos orgánicos aislados a partir de sistemas vivos, se han empleado diversos procedimientos experimentales para la extracción, aislamiento y caracterización de diversas sustancias.²

Más del 40% de los fármacos actuales, y aún más de los agentes contra el cáncer, tienen sus orígenes o principios de diseño sintético en un producto natural.³

Las metas del uso de plantas como fuente de agentes terapéuticos son: a) aislar compuestos bioactivos para uso directo como medicamentos; b) producir compuestos bioactivos de nuevas o estructuras conocidas por medio de semisíntesis para producir derivados con mayor actividad y/o menor toxicidad; y c) usar toda la planta o parte de ella como remedio herbal.⁴

Aunque el valor terapéutico de los productos naturales es evidente, el uso de estos compuestos presenta una serie de desafíos. A menudo es difícil acceder a cantidades suficientes de un producto natural, por lo tanto, la caracterización completa de las propiedades biológicas y químicas de los compuestos puede ser problemático.

Hoy en día se cuenta con un gran acervo de estructuras moleculares obtenidas a partir de fuentes naturales que han promovido la síntesis orgánica, las biotransformaciones, la biosíntesis y han inspirado a muchos investigadores a continuar con el estudio de diferentes especies vegetales para ampliar y profundizar en el conocimiento de los metabolitos secundarios.

2. ANTECEDENTES

Todos los organismos transforman y utilizan varios compuestos como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos que les permiten sobrevivir, crecer y reproducirse ya que estas sustancias los proveen de energía en forma de ATP y nutrientes.⁵

Las plantas son muy eficientes en la síntesis de compuestos orgánicos debido a que la red metabólica de estas es mucho más amplia que en otros organismos. Aunado a la producción de metabolitos primarios las plantas sintetizan una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo, estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Los metabolitos secundarios desempeñan un papel clave en adaptación de las plantas a medida que funcionan en la protección contra las infecciones microbianas y virales, herbivoría, la radiación UV, la atracción de los polinizadores y frugívoros, alelopatía y señalización.⁶

Los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, se encuentran con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo taxonómico delimitado y algunos son específicos para definir el género y la especie de la planta, esta distribución más estrecha de los metabolitos secundarios constituye la base de la quimiotaxonomía. Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son de gran interés debido a su enorme diversidad estructural y funcional, los cuales se pueden dividir en tres grupos químicamente diferentes: *terpenos* formados principalmente por la vía del mevalonato, *fenoles* la mayoría formados por la vía del shikimato y/o la vía de los acetatos y compuestos que contienen nitrógeno: principalmente los *alcaloides*, formados por la vía de los aminoácidos (Figura 1).⁷

2.1. Terpenos

El término terpeno deriva de la palabra alemana *Terpentin* que significa esencia de trementina.⁸

Los terpenos constituyen el más amplio conjunto de metabolitos secundarios y la mayoría de estos son específicos del reino vegetal, sin embargo, también los podemos encontrar en animales como insectos y organismos marinos.⁹

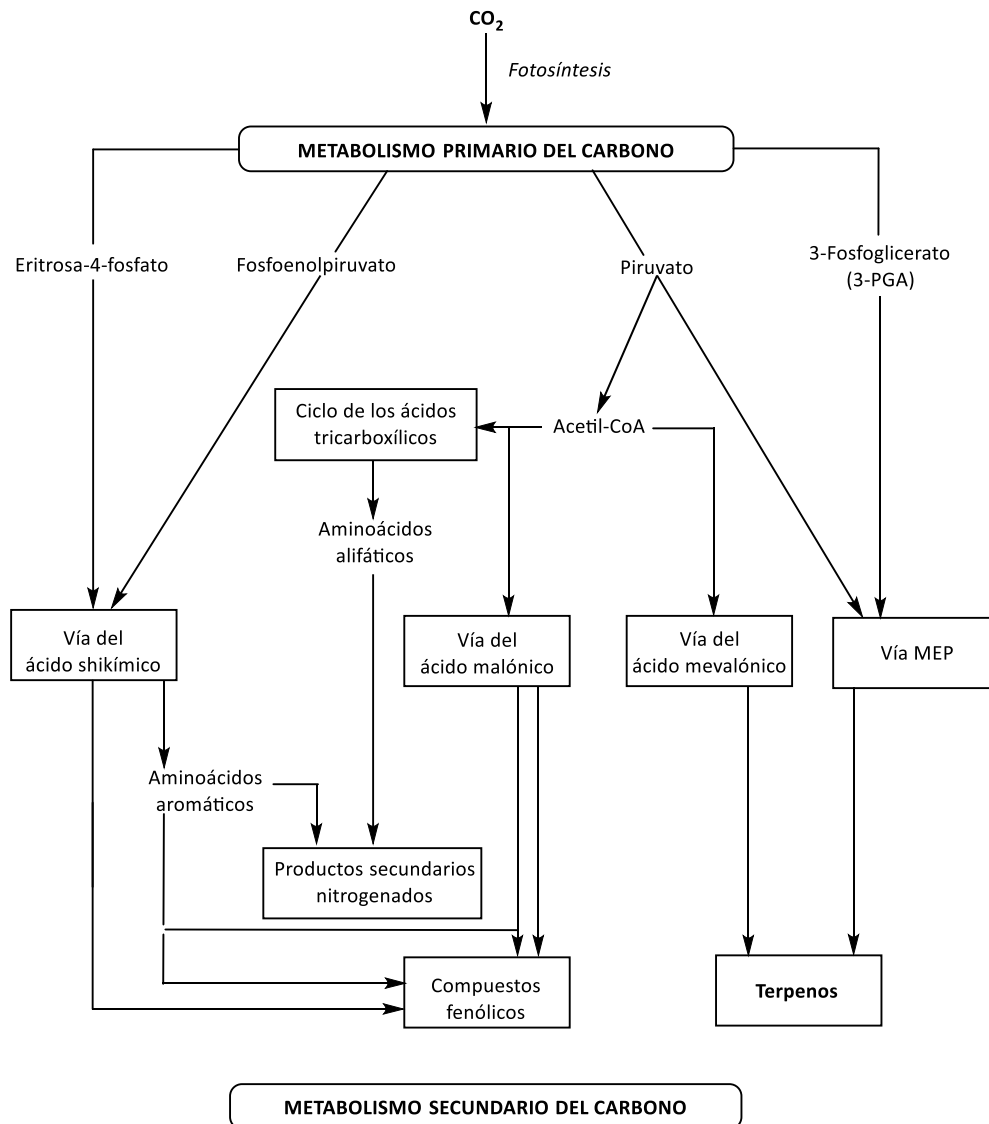


Figura 1. Principales rutas de la biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interacciones con el metabolismo primario.

Los terpenos son compuestos que resultan de la polimerización de unidades isoprenicas (isoprenilpirofosfato [IPP] y su isómero dimetilalilpirofosfato [DMAPP]), moléculas de 5 carbonos que proceden del ácido mevalónico siendo que cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación cabeza-cola de un número variable de unidades isoprenicas, aunque también se han encontrado casos de unión cabeza-cabeza o cola-cola. La diversidad de los metabolitos terpénicos naturales ha llevado a considerar reacciones y mecanismos que justifican la existencia de los principales esqueletos, siendo el origen de las unidades de isopreno: vía del mevalonato y vía formación de IPP (GAP/Piruvato).¹⁰

Con frecuencia se les llama compuestos *isoprenoides* y se clasifican de acuerdo a la cantidad de unidades de isopreno que contienen (Tabla 1).¹¹

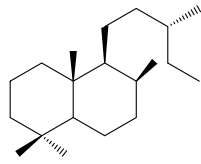
2.2. Diterpenos

Usualmente son compuestos de la resina de las plantas y algunas ocasiones forman parte del aceite esencial de las especies vegetales. Los diterpenos son químicamente complejos y difíciles de aislar, purificar y caracterizar, constituyen un amplio conjunto de compuestos de veinte carbonos procedentes del metabolismo del (2*E*,6*E*,10*E*)-geranilgeranilpirofosfato (GGPP).^{12,13}

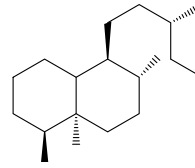
Su estructura varía dependiendo principalmente de su biogénesis siendo clasificados en función a la misma como: lineales, bicíclicos, tricíclicos tetracíclicos, pentacíclicos o macrocíclicos dependiendo de su núcleo esquelético (Figura 2). En la naturaleza se encuentran comúnmente en una forma polioxigenada con grupos ceto e hidroxilo, estos últimos a menudo esterificados por ácidos alifáticos o aromáticos.¹⁴

Los diterpenos tipo labdano son poco comunes en la naturaleza, por esta razón se busca explorar su potencial como fuente de moléculas susceptibles a ser transformadas en nuevos derivados, se ha descrito que este tipo de estructuras se pueden emplear como agentes anticancerosos potenciales.

BICÍCLICOS

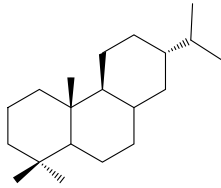


Labdano

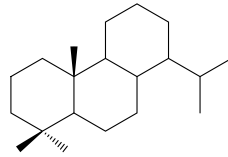


Clerodano

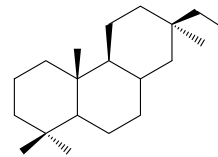
TRICÍCLICOS



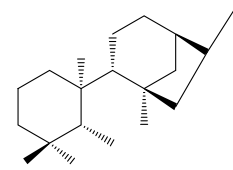
Abietano



Totarano

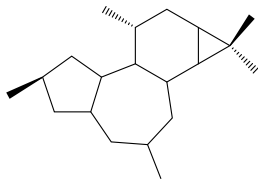


Pimarano

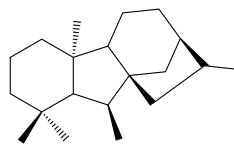


Fujinano

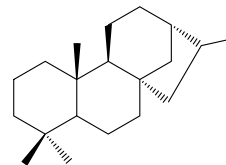
TETRACÍCLICOS Y PENTACÍCLICOS



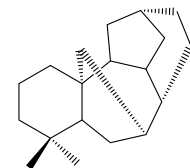
Tigliano



Gibberellano

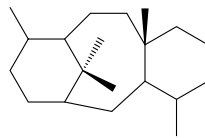


Kaureno

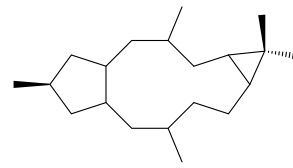


Aconano

MACROCÍCLICOS



Taxano



Lathirano

Figura 2. Principales tipos de esqueletos diterpénicos.

2.3. Actividad biológica de los diterpenos

Esta clase de moléculas tiene miembros con actividad terapéutica que incluyen propiedades anticancerosas, antiparasitarias, antimicrobianas, antialérgicas, antiespasmódicas, antihiper glucémicas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras.

Diterpenos derivados de plantas son los agentes anticancerosos más eficaces aprobados por la FDA. La eleuterobina (**1**) es un diterpeno glicosilado aislado de un coral marino, *Eleutherobia* sp., es un agente anticanceroso potente que inhibe la proliferación celular. Otro derivado recientemente identificado como mebutato de ingenol (**2**) comercialmente conocido como Picato[®], un éster aislado de la savia de *Euphorbia peplus*, el cual es un quimioterapéutico tópico para el tratamiento de cáncer de piel, que causa una rápida interrupción mitocondrial provocando la muerte celular por necrosis primaria, con un resultado estético favorable (Figura 3). Estos compuestos anticancerosos tienen mayor eficacia y perfil de toxicidad más seguros que algunas alternativas sintéticas. Sin embargo, pocos de estos terpenoides se pueden obtener en cantidades suficientes a partir de fuentes naturales, limitando así su despliegue eficaz en el tratamiento de enfermedades humanas.¹⁵

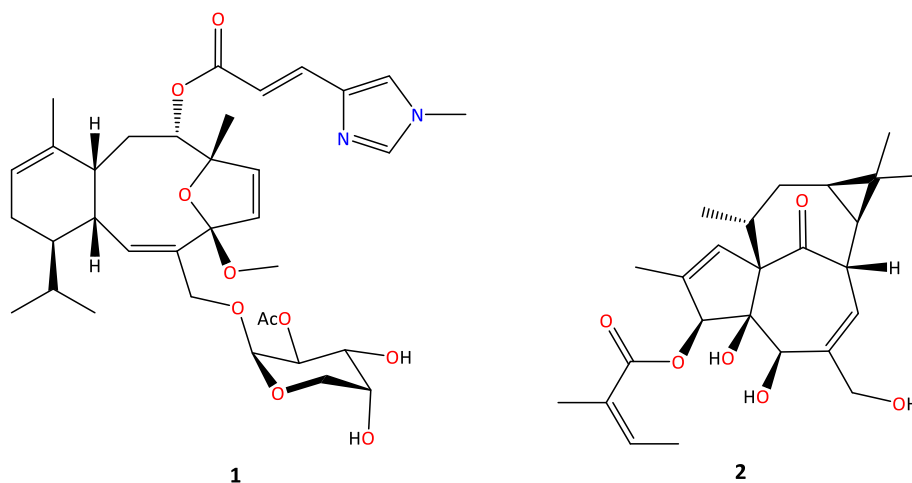


Figura 3. Estructura de diterpenos anticancerosos.

2.4. Taxol®

El paclitaxel (**3**) comercialmente denominado Taxol® fue aislado por Wall, Wani y colaboradores a partir de la corteza de *Taxus brevifolia*, conocido como tejo del Pacífico.¹⁶

Es un compuesto complejo en el que destaca un esqueleto hidrocarbonado de naturaleza diterpénica tipo taxano, formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos, polisustituido con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas, la molécula posee un total de once estereocentros.¹⁷

Es un agente antimitótico potente, el cual ha sido usado para tratar diferentes tipos de tumores sólidos, pero particularmente presenta una excelente actividad contra cánceres de mama, ovario y pulmón.¹⁸

También se ha descrito un análogo semisintético llamado docetaxel (**4**), cuyo precursor es encontrado en las hojas del tejo europeo *Taxus bacata*, el compuesto **4** difiere de **3** en la sustitución en la posición C-10 del anillo de taxano y en la cadena lateral de la posición C-13 del macrociclo (Figura 4).¹⁹

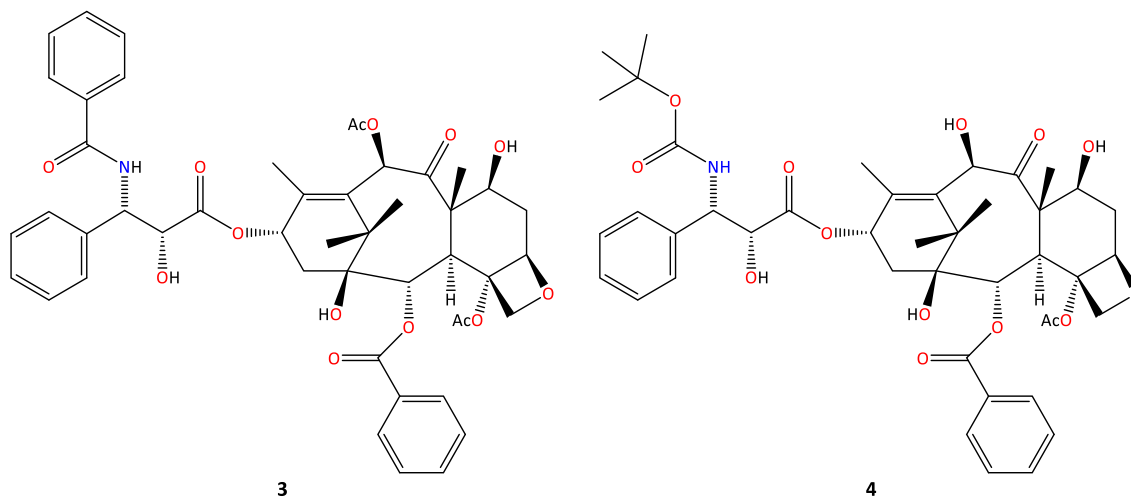


Figura 4. Estructura del paclitaxel (**3**) y su análogo semisintético docetaxel (**4**).

2.5. Características del cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales.

Las principales características del cáncer o de las células cancerosas es su alta velocidad de proliferación, la evasión de la apoptosis y de las señales supresoras del crecimiento, invasión de los tejidos, evadir el sistema inmune, reprogramar el sistema celular, presenta inestabilidad genómica como mutaciones y está íntimamente relacionado con procesos inflamatorios.²⁰

Como se mencionó previamente, dentro de los compuestos con propiedades citotóxicas se encuentra **3**, el cual tiene como blanco molecular los microtúbulos, debido a que este se une a la β -tubulina, promueve y estabiliza el ensamblaje de los microtúbulos, detiene la división celular y posteriormente conduce a la célula a apoptosis (Figura 5).²¹

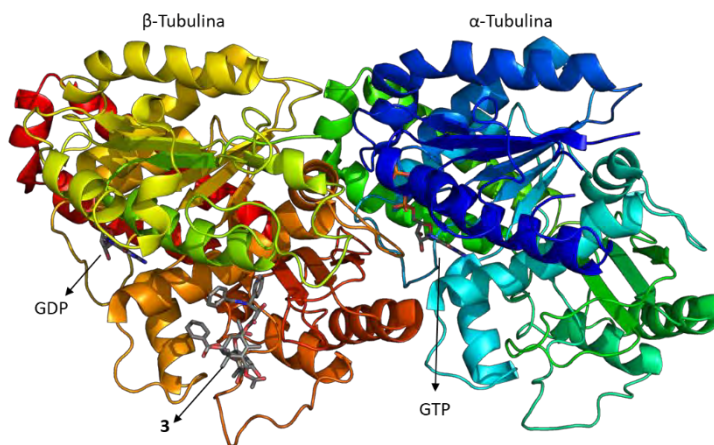


Figura 5. Sitio de unión de **3** en la β -tubulina. Archivo 1JFF obtenido de PDB.²²

Además del sitio unión de **3** en la β -tubulina podemos encontrar el dominio de los alcaloides de la vinca (Figura 7) y el sitio de la colchicina (**7**) (Figura 8), a diferencia del paclitaxel estos últimos actúan desestabilizando la estructura de los microtúbulos. Dentro

de los alcaloides de la vinca podemos encontrar a los dos compuestos naturales aislados originalmente, vinblastina (**5**, Velban®) y vincristina (**6**, Oncovin®), aprobados por la FDA en 1961 y 1963, respectivamente.²³

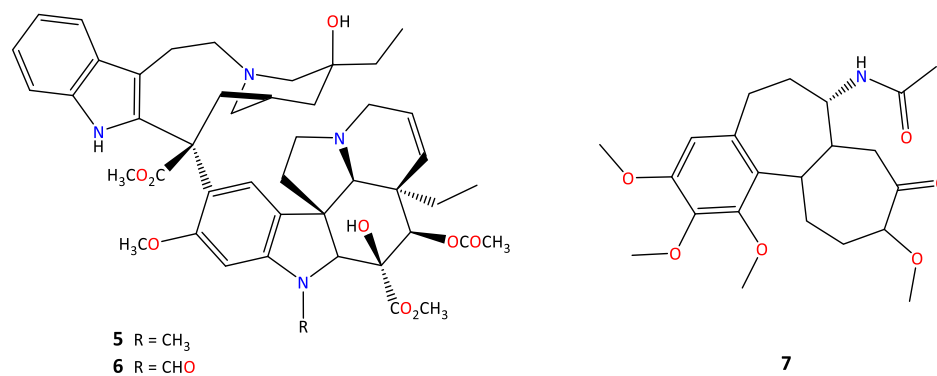


Figura 6. Alcaloides de la vinca **5-6** y colchicina (**7**).

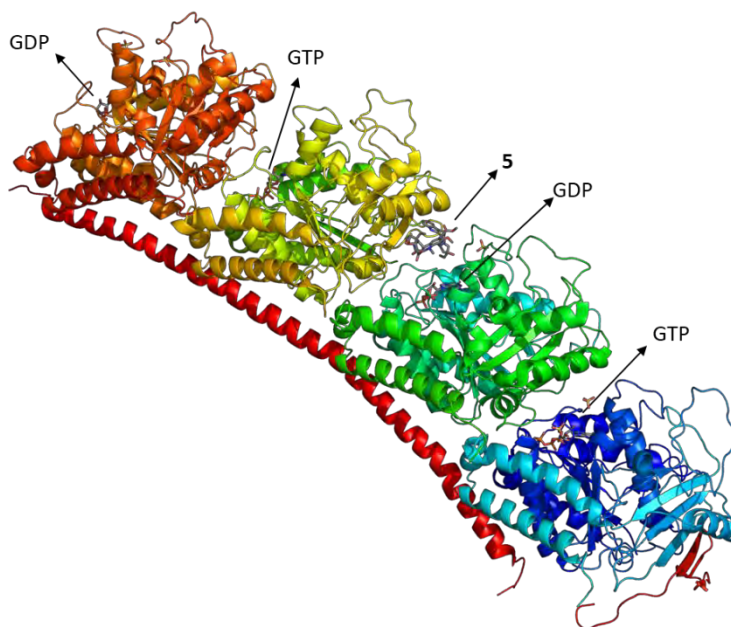


Figura 7. Sitio de unión de **5** interaccionando con la subunidad α de un dímero de tubulina y la β de otro (Dominio de la vinca). Archivo 4EB6 obtenido de PDB.²⁴

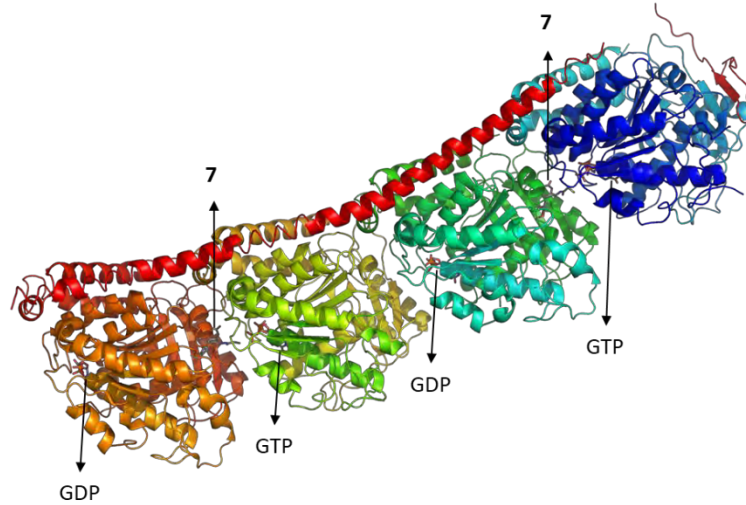


Figura 8. Sitio de unión de **7** en la región entre monómeros del heterodímero de tubulina. Archivo 1SA0 obtenido de PDB. ²⁵

2.6. Equilibrio dinámico de la tubulina

Los microtúbulos (Figura 9) son tubos cilíndricos de 25 nm de diámetro exterior y 12 nm de diámetro interior, con longitudes que varían entre unos pocos nm a μm , están formados a partir de 13 protofilamentos compuestos por heterodímeros de α - y β -tubulina.²⁶

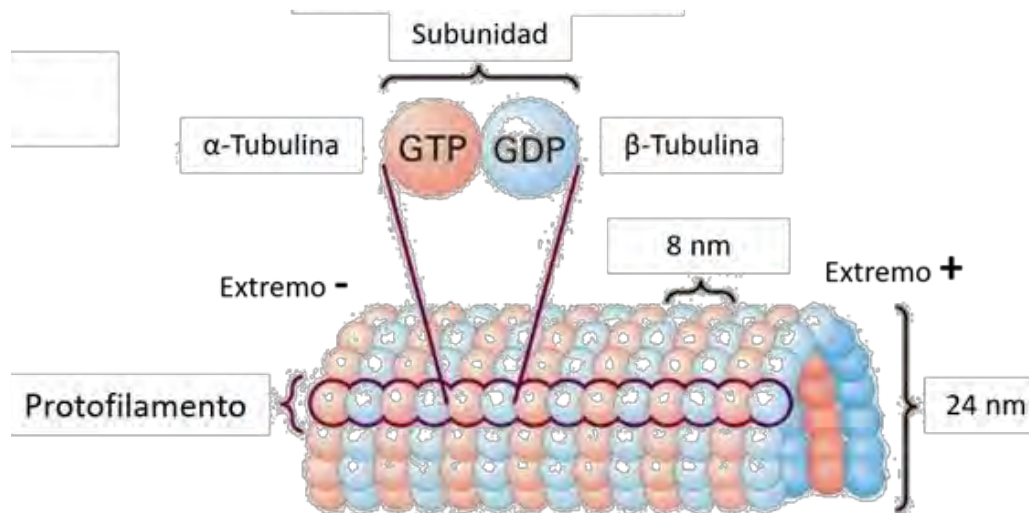


Figura 9. Microtúbulo: Estructura tubular de las células compuesta por heterodímeros de α - y β -tubulina.

La polimerización de tubulina en microtúbulos es un proceso dinámico, los microtúbulos son estructuras polares, con crecimiento favorecido en el extremo positivo donde se ubica la β -tubulina y la contracción más prevalente en el extremo negativo donde se localiza la α -tubulina. Sin embargo, ambos extremos de los microtúbulos experimentan períodos de crecimiento y retracción, el equilibrio entre crecimiento y contracción es esencial para muchos procesos celulares. Los microtúbulos son una de las estructuras fundamentales que comprenden el citoesqueleto de las células eucariotas y están involucrados en procesos celulares tan diversos como la división celular, la locomoción y el transporte intracelular (Figura 10).²⁶

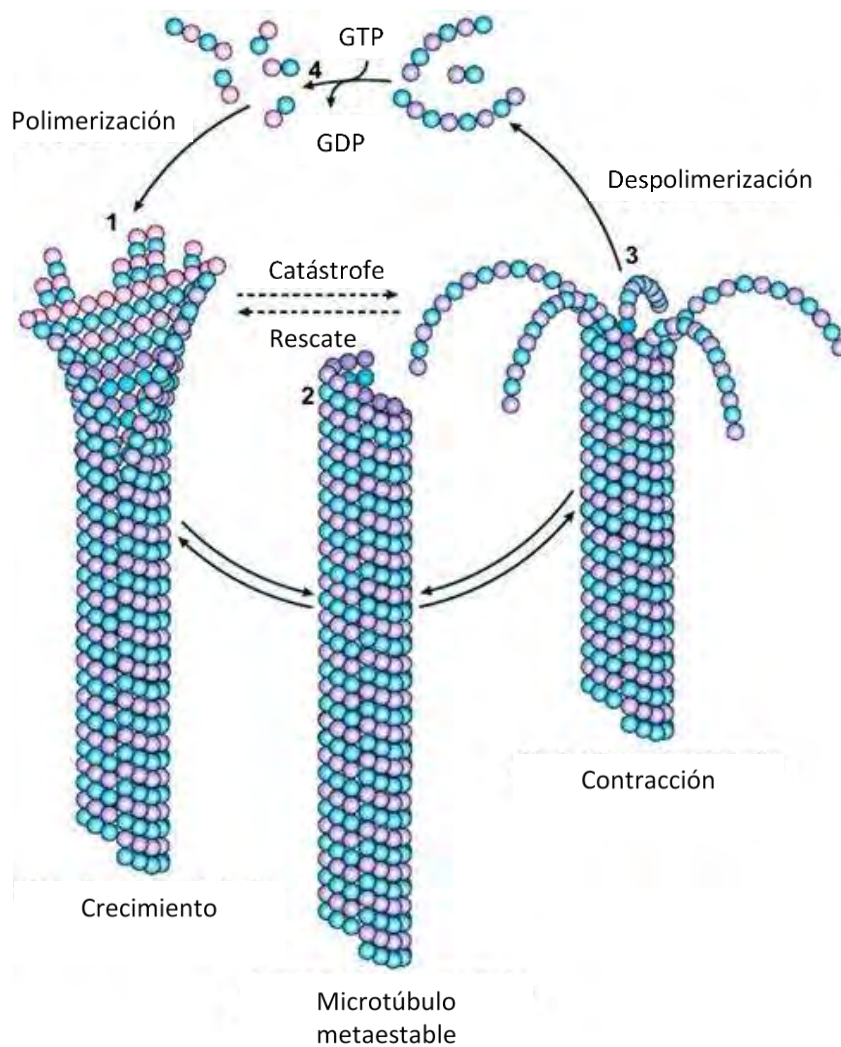


Figura 10. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos.²⁷

La tubulina aislada del tejido cerebral porcino se ha utilizado ampliamente en ensayos de polimerización siendo una herramienta poderosa para caracterizar las interacciones microtúbulo-ligando.

Los diterpenos de tipo labdano sugieren junto con su baja toxicidad celular, posibles aplicaciones terapéuticas de gran impacto incluyendo propiedades citotóxicas.²⁸

En las Asteráceas se han descrito más de 1200 productos terpénicos distribuidos en un centenar de esqueletos, dentro de los cuales se incluyen estructuras tipo labdano y *ent*-labdano.²⁹

2.7. Familia Asteraceae

Las Asteráceas es un grupo monofilético y representa una de las familias más numerosas de angiospermas con más 1000 géneros y de 25000 a 30000 especies.³⁰

En la República Mexicana se estiman alrededor de 300 géneros, con un número de especies cerca de 3000.²⁴ Una de las características más importantes es la presencia de flores apretadas en una inflorescencia condensada que se asemeja a una sola flor grande. Esta familia también presenta una amplia variedad de formas: herbáceas, suculentas, lianas, epifitas, árboles y arbustos. Su distribución es cosmopolita y se encuentra prácticamente en todos los ambientes. Además, la evidencia filogenética y los datos paleontológicos sugieren que el ancestro de las Asteraceae surgió en el hemisferio sur, en el área que hoy corresponde a la región andina de Sudamérica.³¹

2.8. Género *Ageratina*

Ageratina es quizá el género con más especies de la familia de las Asteraceae en México, ya que se encuentran distribuidas en el territorio nacional cerca 190 especies.³²

Las plantas pertenecientes al género *Ageratina* poseen una riqueza importante en compuestos labdanólicos dentro de los que destacan los ácidos catívico (**8**), labdadiénoico (**9**) y 13-*epi*-labdanólico (**10**) aislados de *A. jocotepecana* y el ácido 2 α -isovaleroxiéperuico (**11**), un *ent*-labdano aislado de *A. petiolaris* (Figura 11).^{33,34}

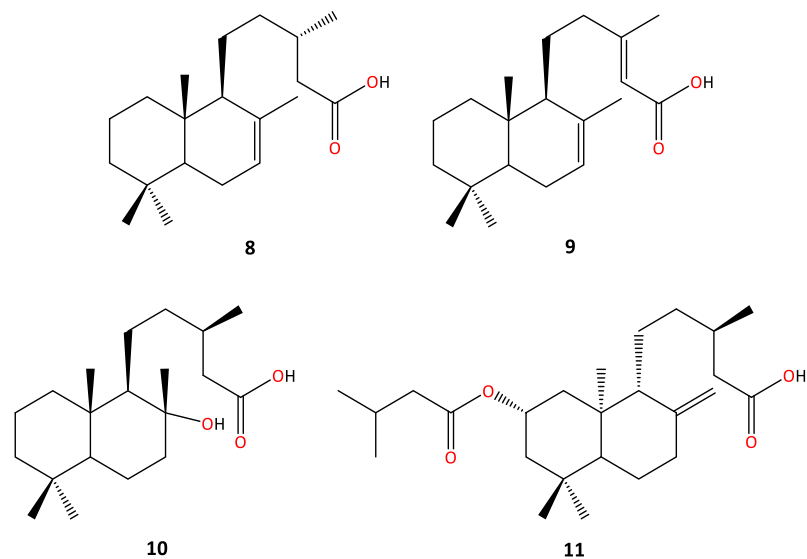


Figura 11. Compuestos tipo labdano y *ent*-labdano.

2.9. *Ageratina petiolaris*

Es un arbusto hasta de 2 m de altura; tallos leñosos, cilíndricos, de 2 a 5 mm de diámetro, estriados, blanco-amarillentos, puberulentos; hojas opuestas, peciolo de 1.5 a 8 cm de largo, pubescente, lámina ovada, de 3.5 a 10 cm de largo por 2.5 a 10 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, borde crenado-dentado, base cordada, haz puberulento, envés pubescente, con abundantes glóbulos resinosos, tri a pentanervada desde la base, membranácea; numerosos capítulos de 7 a 8 mm de largo dispuestos en corimbos compuestos terminales, pedicelos pubescentes; involucreo turbinado, de 5 a 7 mm de largo por \pm 5 mm de ancho, cubre la mitad basal o más de las corolas, sus brácteas dispuestas en 3 series de la misma longitud, lineal-lanceoladas, agudas, verdes, pubescentes; flores 35 a 40; corola de 4 a 5 mm de largo, blanca, glabra, con glóbulos resinosos en los lóbulos; aquenio de 2 a 3 mm de largo, pubescente, vilano casi del largo de la corola, cerdas blanco-rosadas (Figura 12).



Figura 12. *Ageratina petiolaris*.

Es conocida como “Hierba del ángel” o “yolochíchitl”. Se ha colectado entre 2350 y 3000 m de altitud, en sitios con pastizal, matorral xerófilo y bosque de pino y encino; crece frecuentemente a lo largo de caminos y carreteras.³⁵

Existen varios reportes sobre la composición fitoquímica de *A. petiolaris* identificando al chamazuleno (**12**), ácido clorogénico (**13**), *L*-quiro-inositol (**14**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (**15a**), 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**15b**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3-metoxibencilo (**15c**), 2-hidroxi-3,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**15d**), ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**11**) y ácido 2 α -tigloiloxieperuico (**16**) (Figura 13).^{34,36,37}

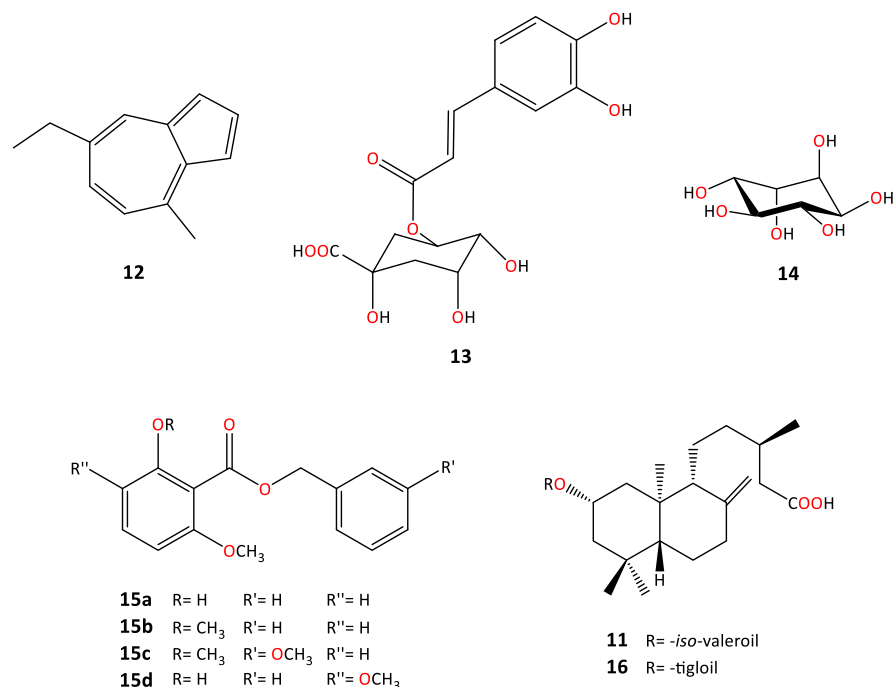


Figura 13. Compuestos obtenidos de *A. petiolaris*.

El ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**11**), un diterpeno tipo *ent*-labdano al cual se le realizaron diferentes transformaciones químicas obteniendo los derivados **11a-11g** y **17** (Figura 14).³⁴

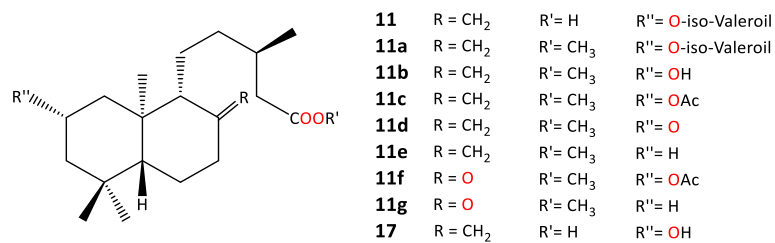


Figura 14. Ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**11**) y sus derivados.

A partir de una hidrólisis básica sobre el enlace tipo éster del ácido 2 α -isovaleroxieperuico (**11**), se obtiene el ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**) en forma de cristales.

2.10. Ácido 2 α -hidroxieperuico

En trabajos recientes se ha estudiado la transformación química del ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**) preparándose nuevos derivados **18-22**.³⁶

Los derivados **18** y **19** se prepararon mediante la modificación del grupo hidroxilo en la posición C-2 (Figura 15).

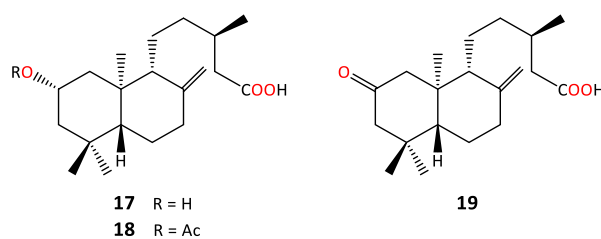


Figura 15. Derivados del ácido 2α-hidroxiéperuico (**17**).

A partir del derivado oxidado **19** se obtuvieron las 2,4-dinitrofenilhidrazonas (**20**) (Figura 16).

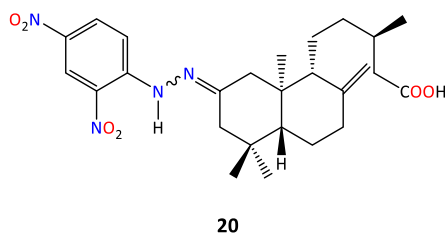


Figura 16. Hidrazonas derivadas del ácido 2α-hidroxiéperuico (**20**).

Así mismo, a partir del derivado acetilado **18** se realizó la preparación de la amida **21**, mientras que a partir de **11b** se preparó el derivado cinamoilado **22** (Figura 17).

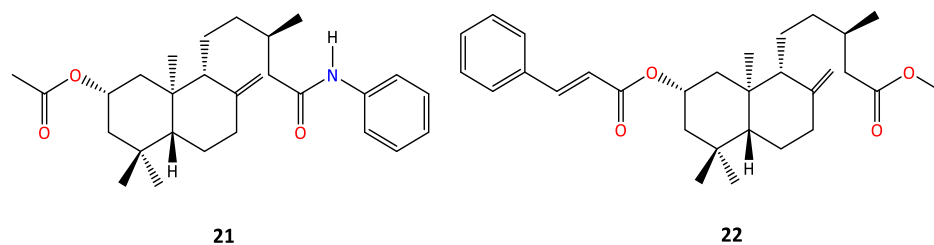


Figura 17. Derivados **21-22** del ácido 2α-hidroxiéperuico (**17**).

Posteriormente se realizó el modelado molecular de los diterpenos **21** y **22** empleando el protocolo de Monte Carlo con MMFF seguido de optimización de la geometría de los mínimos globales con DFT a nivel de teoría B3LYP/6-31G(d,p), se efectuó el estudio de anclaje molecular (docking) entre los derivados diterpénicos y el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina utilizando AutoDock Vina, mostrando que la mayor afinidad en la

proteína de estos compuestos se presenta en el mismo sitio blanco ocupado por el fármaco antimetabólico paclitaxel. La energía de afinidad difiere dependiendo de los sustituyentes acoplados al diterpeno de partida. Se observó que la presencia de anillos aromáticos en el esqueleto de *ent*-labdano incrementa la afinidad por la proteína debido a las interacciones de éstos con los anillos aromáticos de los residuos de aminoácido presentes en el sitio blanco, por lo que acoplar este tipo de sustituyentes favorece el anclaje en el sitio activo. También se llevó a cabo el estudio docking sobre un derivado teórico **23** (Figura 18) mostrando resultados *in silico* favorables, este derivado fue propuesto tomando como base los sustituyentes aromáticos de los derivados **21** y **22**.^{38,39}

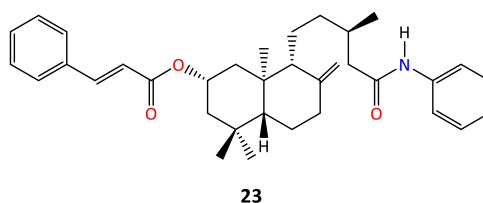


Figura 18. Compuesto teórico **23**.

Para la obtención de nuevos derivados a partir del ácido 2 α -hidroxieiperuico es necesario recurrir a diferentes metodologías de acuerdo a los grupos funcionales que este posee dentro de su estructura como el grupo hidroxilo en C-2 y el carbonilo en C-15, teniendo como finalidad la obtención de compuestos con funciones amida y éster, principalmente.

2.11. Características de las amidas y ésteres

Las amidas predominan en todos los organismos vivos; las proteínas, ácidos nucleicos y numerosos productos farmacéuticos tienen grupos funcionales amida, además los derivados de amida se han asociado a un amplio espectro de actividades biológicas. Por otra parte estas son más estables a las condiciones acuosas que se encuentran en los organismos vivos. Los ésteres se encuentran entre los compuestos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, cabe mencionar que también algunos analgésicos cuentan con funcionalizaciones éster en su estructura.⁴⁰

Actualmente existe una gran cantidad de metodologías utilizadas por los químicos para sintetizar amidas y ésteres, dentro de los que se encuentran el uso de agentes activadores del grupo carboxilo como el 1,1'-carbonildiimidazol (**24**, CDI) (Figura 19) y la síntesis de amidas vía anhídridos mixtos (Figura 20).^{41,42}

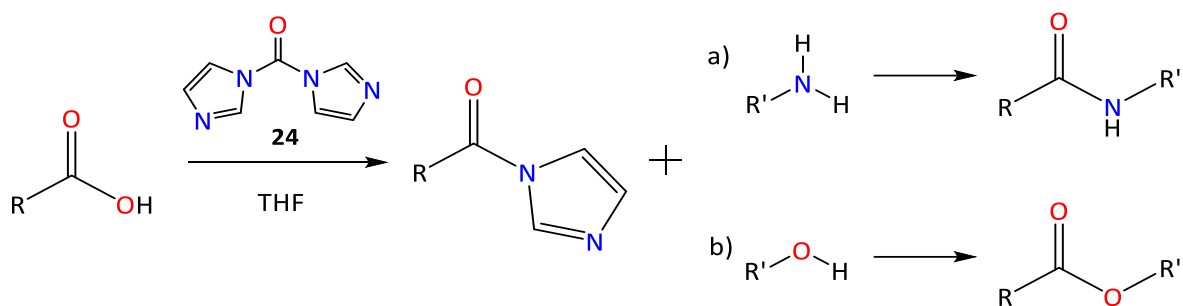


Figura 19. Formación de amidas mediante CDI.

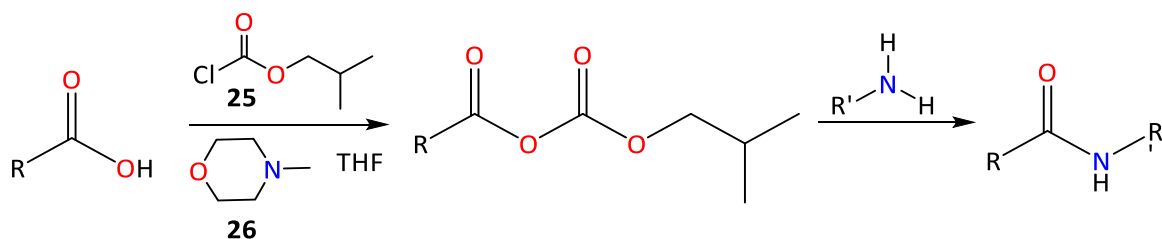


Figura 20. Síntesis de amidas vía anhídridos mixtos.

2.12. Anclaje molecular (Docking)

Los estudios de anclaje molecular (docking) es un método computacional que busca predecir la unión no covalente de macromoléculas o más frecuentemente la unión eficiente de un blanco macromolecular (receptor, generalmente proteínas) y una molécula de menor tamaño (ligando), comenzando con el modelado molecular de las estructuras de interés o bien obteniendo estas a partir de bancos de datos donde se recopilan principalmente estructuras de proteínas en 3D. El objetivo es predecir el sitio de unión y la afinidad entre las moléculas a estudiar, teniendo como resultado un complejo donde se muestra la interacción receptor-ligando. Existen varios programas de simulación *in silico* que permiten obtener resultados confiables en periodos de tiempo cortos.^{43,44}

3. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este proyecto radica en la obtención de nuevos derivados tipo *ent*-labdano a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico realizando diversas transformaciones químicas con el propósito de incrementar su posible actividad biológica.

Así mismo, realizar estudios de docking para conocer el sitio de interacción de las moléculas sintetizadas con el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina, siendo este el sitio activo del paclitaxel que es un compuesto que posee un efecto antimitótico.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

Preparar nuevos derivados diterpénicos con posible actividad biológica a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico aislado de *Ageratina petiolaris*.

4.2. *Objetivos específicos*

- ⊕ Colectar y separar las partes de *Ageratina petiolaris*.
- ⊕ Obtener el extracto hexánico de flores.
- ⊕ Obtener el ácido 2 α -hidroxieperuico por medio de hidrólisis alcalina del extracto hexánico y su purificación.
- ⊕ Realizar las transformaciones químicas correspondientes al ácido 2 α -hidroxieperuico.
- ⊕ Caracterizar los productos obtenidos mediante sus propiedades físicas y datos espectroscópicos.
- ⊕ Llevar a cabo estudios de docking para conocer el sitio de interacción de las moléculas sintetizadas con el heterodímero de *alfa*- y *beta*-tubulina.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Ageratina petiolaris se colectó al oriente del estado de Michoacán cerca de San Joaquín Morelos, Municipio de Tlalpujahua a 2592 msnm.

5.1. Obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico (17)

Primeramente, se obtuvo el extracto hexánico de flores secas de *Ageratina petiolaris*. La hidrólisis alcalina de este extracto generó el ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**), como cristales incoloros en forma de aguja con un punto de fusión de 127-128 °C (Lit. 127-128 °C), el cual se identificó por medio de sus espectros de RMN.

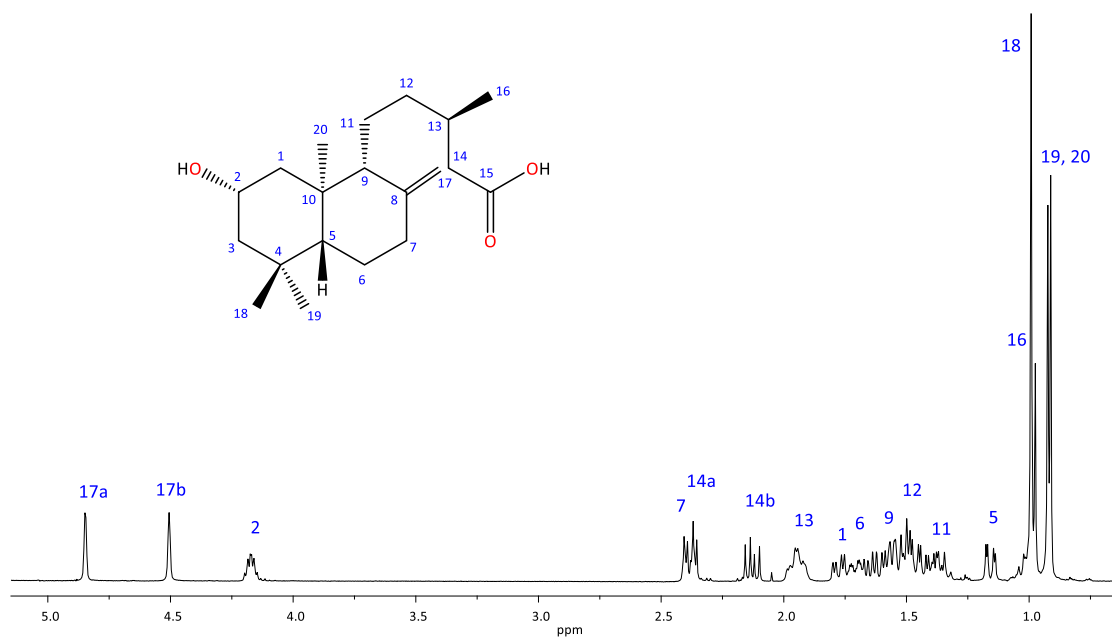


Figura 21. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**).

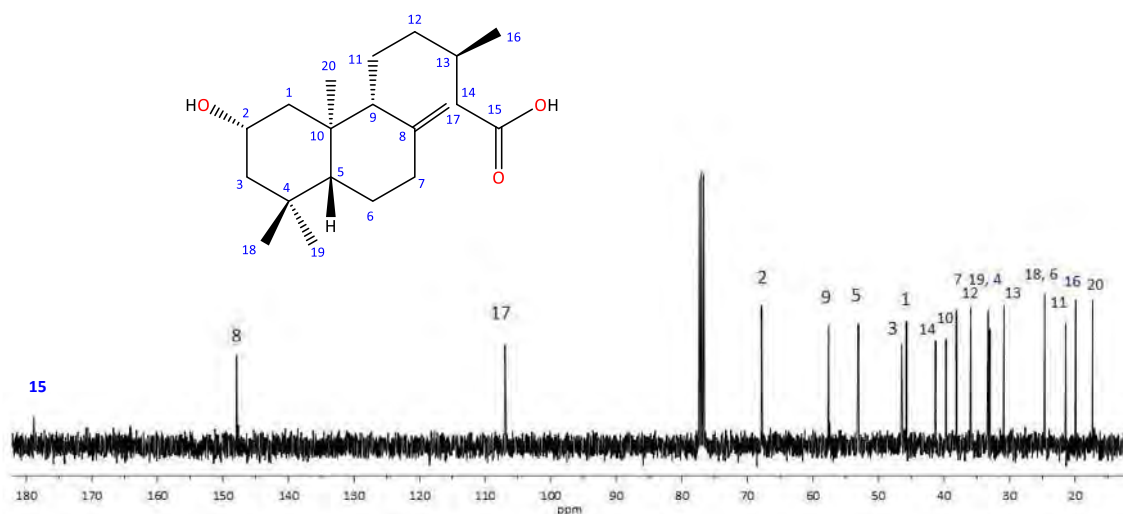
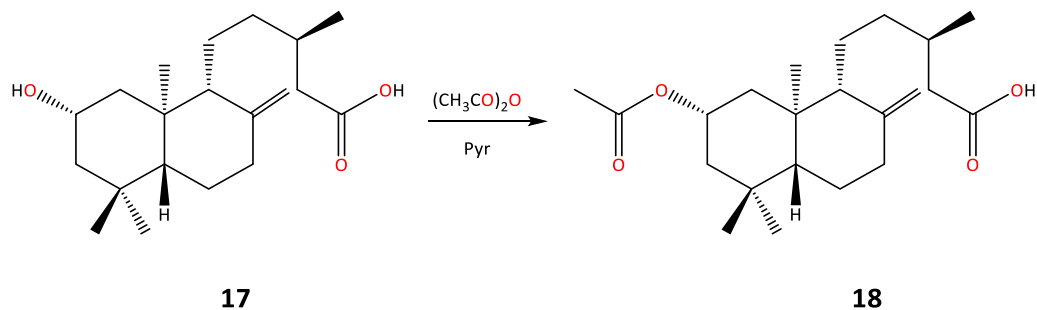


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**).

Una vez identificado el *ent*-labdano **17**, se continuó con la preparación de nuevos derivados a partir de las funcionalizaciones contenidas en la estructura.

5.2. *Obtención del ácido 2 α -acetoxieperuico (18)*

Otro compuesto de partida para el presente estudio fue **18**, el cual se obtuvo con la acetilación del grupo hidroxilo en C-2 de **17**, el derivado acetilado se identificó por medio de sus espectros de RMN.



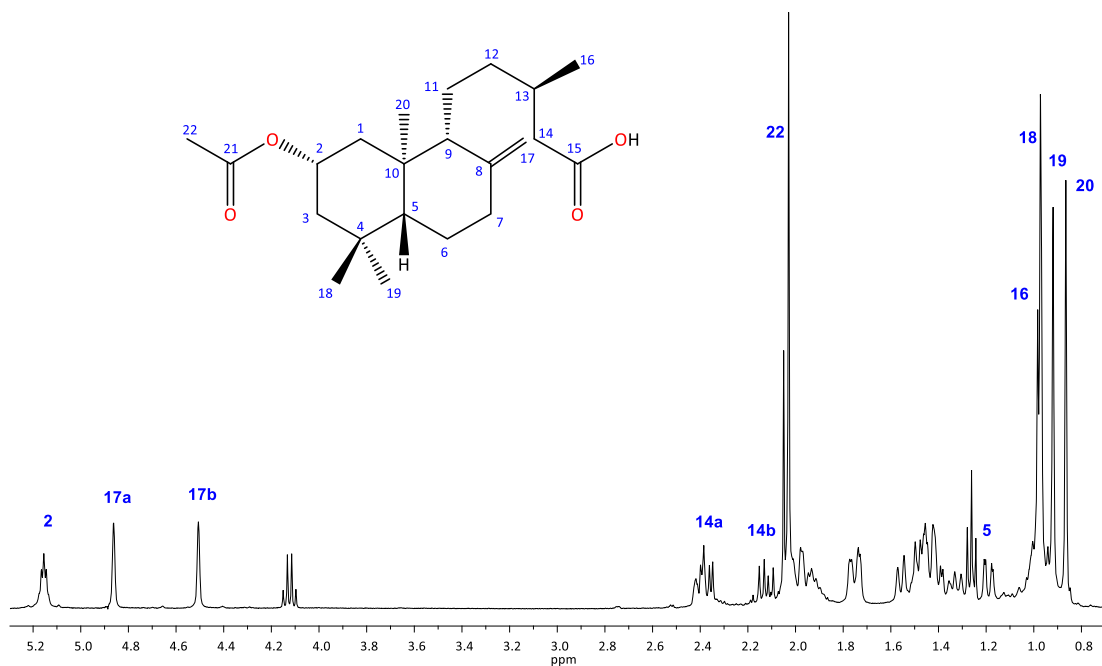


Figura 23. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del ácido 2 α -acetoxieperuico (18).

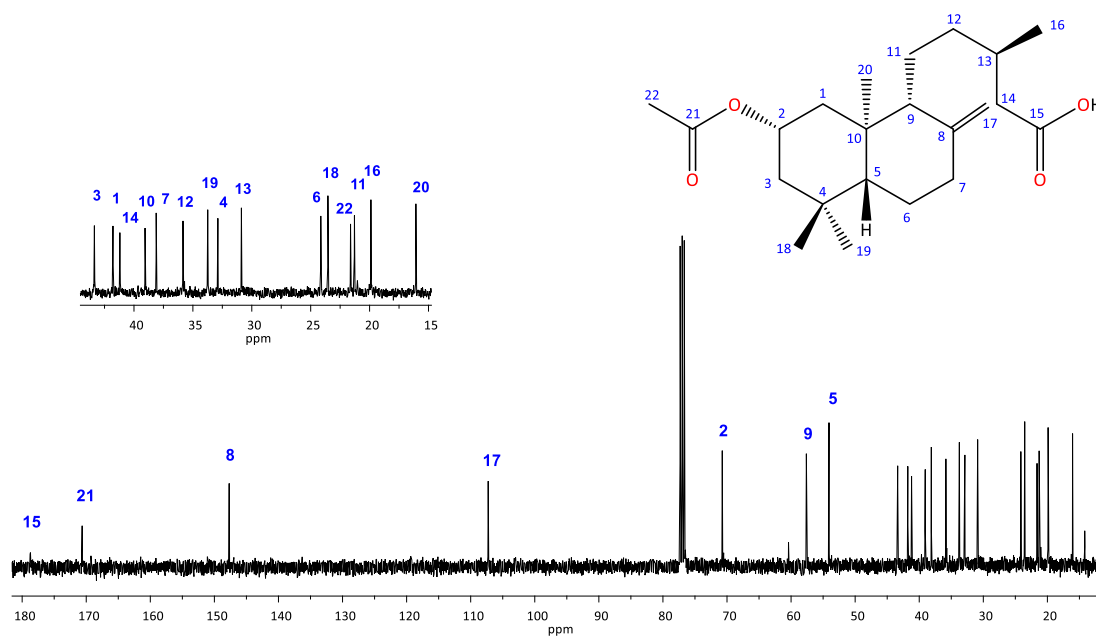


Figura 24. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del ácido 2 α -acetoxieperuico (18).

5.3. Obtención de amidas con esqueleto tipo ent-labdano a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico

5.3.1. Preparación del derivado 27

En trabajos previos dentro del grupo de investigación se llevó a cabo la preparación de la amida **21**, a partir del producto natural **17** mediante la secuencia de reacciones mostrada en la Figura 25, dicha amida contiene dentro de su estructura un grupo éster en la posición C-2 y una funcionalización amida en C-15.

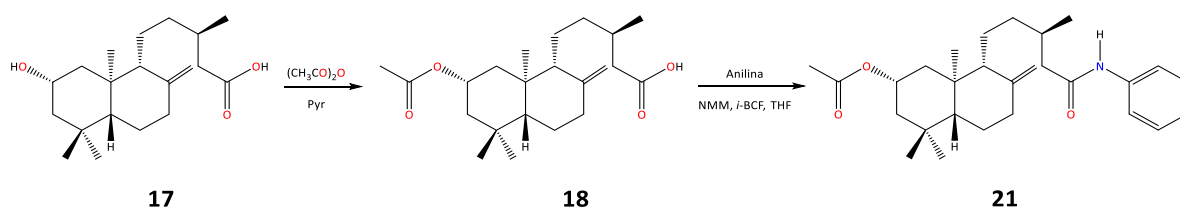


Figura 25. Secuencia de reacciones para la obtención de la amida **21**.

La amida **21** fue sometida a hidrólisis alcalina, empleando KOH en MeOH, para la obtención de **27** que en comparación con la amida **21** posee un grupo hidroxilo en la posición C-2, antes acetato.

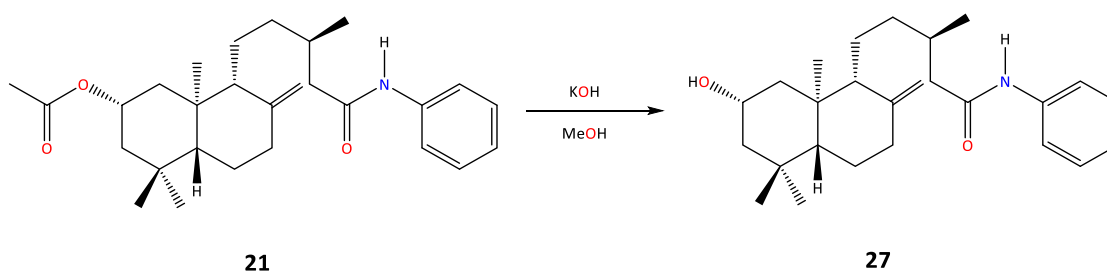


Figura 26. Hidrólisis alcalina para la obtención de la amida **27**.

Dicha amida fue confirmada mediante RMN, la cual en su espectro de ^1H (Figura 27) mostró señales a campo bajo para los hidrógenos del anillo aromático los cuales se presentaron de la siguiente manera, a 7.51 ppm una señal doble ($J = 7.8$ Hz) para H-22 y 26, en 7.32 ppm se apreció una señal triple ($J = 7.3$ Hz) para H-23 y 25, en 7.10 ppm una señal triple ($J = 7.3$ Hz) asignada a H-24, así mismo se notaron dos señales simples en 4.84 y 4.50

ppm correspondientes a los hidrógenos del metileno exocíclico H-17a y H-17b, respectivamente, en 4.17 ppm se observó una señal quintuple ($J = 5.4$ Hz) correspondiente al hidrógeno base de hidroxilo H-2, así como el resto de las señales características del sistema.

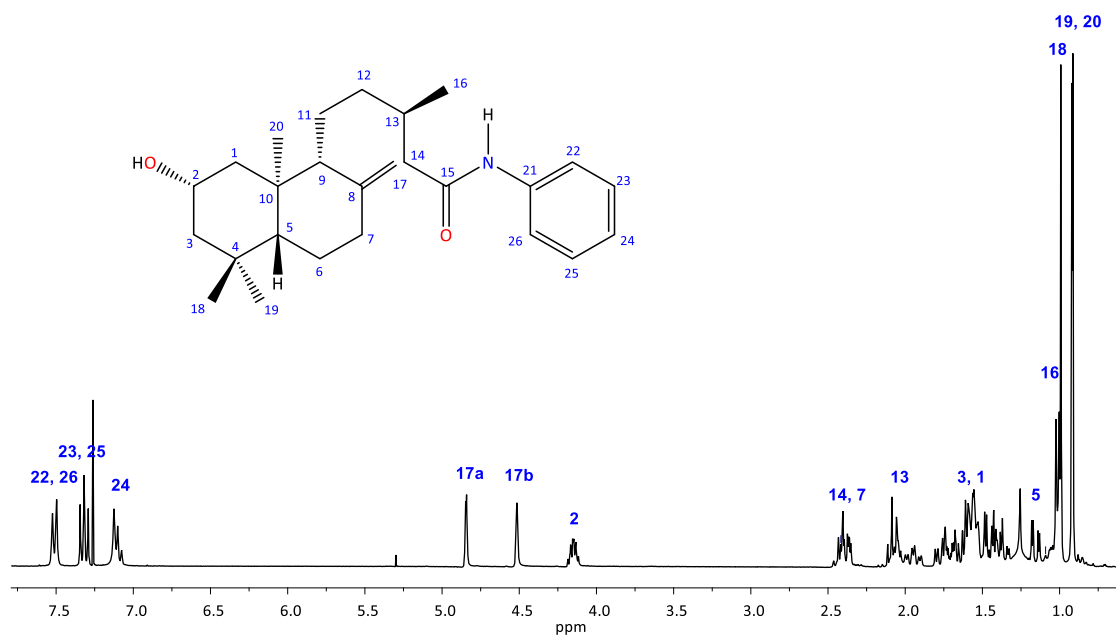


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **27**.

El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28), mostró entre 139 y 118 ppm las señales correspondientes a los carbonos del anillo aromático presente en la estructura, así como el desplazamiento de C-15 a 170.7 ppm, en 67.8 ppm se apreció la señal característica para el carbono C-2 base de hidroxilo.

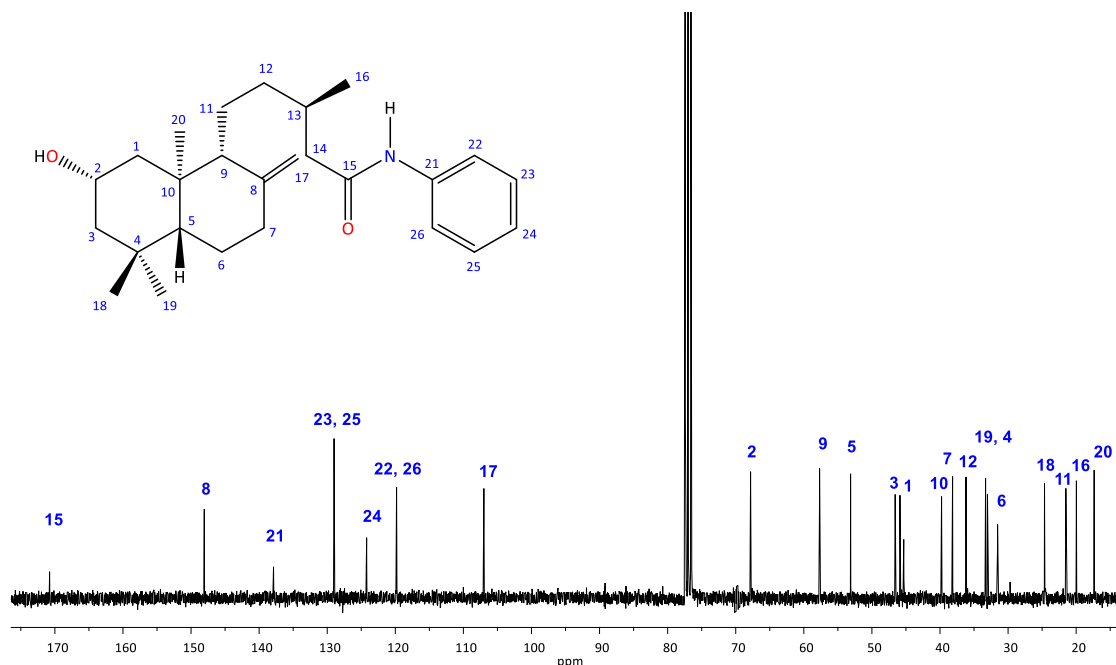
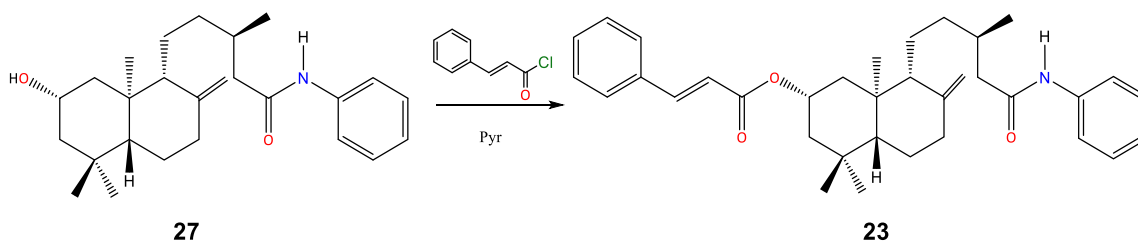


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de **27**.

5.3.2. Preparación del derivado **23**

Una vez obtenida y caracterizada la amida **27** se preparó la 2 α -cinamoiloxi-*N*-fenileperuamida (**23**), aprovechando la funcionalización en C-2, para lo cual se empleó cloruro de cinamoilo (**28**) en piridina. Cabe señalar que la amida **23** fue propuesta como derivado teórico, al ser sometido a estudios de acoplamiento molecular frente a tubulina mostrando resultados satisfactorios.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 29) de **23** se observaron señales a campo bajo para los hidrógenos del anillo aromático cercano al grupo amida, a 7.51 ppm una señal doble ($J = 7.8$ Hz) para H-22 y H-26, en 7.32 ppm se apreció una señal triple ($J = 7.3$ Hz) para H-23 y H-25, en 7.10 ppm una señal triple ($J = 7.3$ Hz) asignada a H-24, en cuanto al cinamato

se observaron dos señales dobles a 7.65 y 6.40 ppm ($J = 16$ Hz) correspondientes a los protones vinílicos H-29 y H-28, respectivamente, a 7.52 ppm se observó una señal múltiple correspondiente a H-31 y H-35, a 7.38 ppm se mostró una señal triple ($J = 3.0$ Hz) de H-33, a 7.16 se encuentra la señal correspondiente a H-32 y H-34, en 5.29 ppm se apreció una señal quintuple ($J = 5.4$ Hz) correspondiente al hidrógeno base de cinamato H-2, también se observaron dos señales simples en 4.87 y 4.53 ppm correspondientes a los hidrógenos del metileno exocíclico H-17a y H-17b, respectivamente, así como el resto de las señales características del sistema.

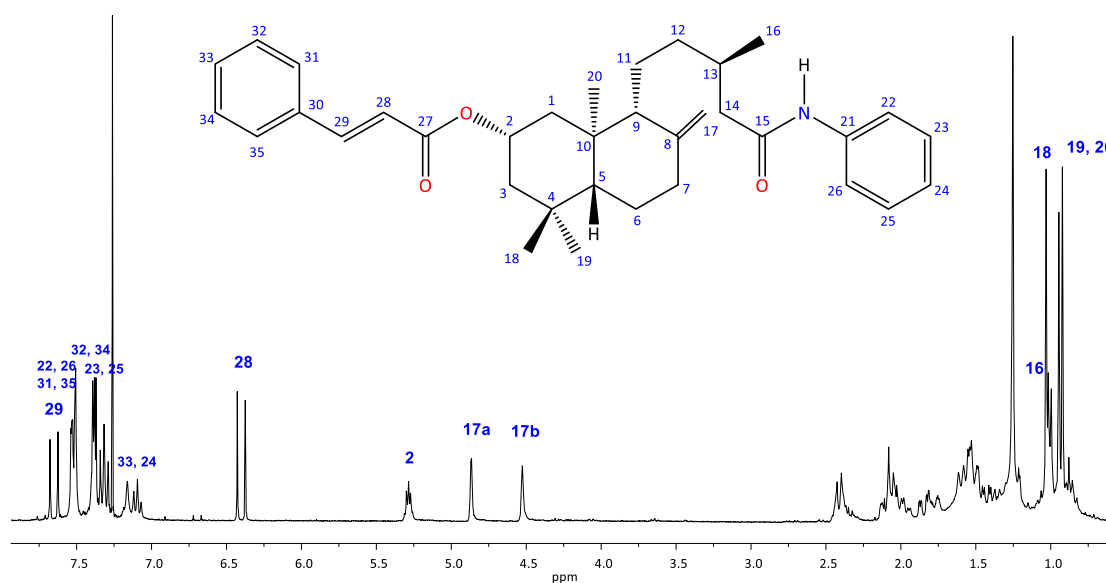


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **23**.

El espectro de RMN de ^{13}C de **23** (Figura 30) mostró las señales correspondientes a los carbonos del cinamato; en 166.5 ppm se observó la señal para el carbono C-27, en 144.5 y 118.8 ppm las señales de los carbonos vinílicos C-29 y C-28, respectivamente, entre 138 y 119 ppm se aprecian las señales características para los anillos aromáticos del sistema, también fue posible identificar el desplazamiento del carbono C-2 desde 67.8 hasta 71.0 ppm aproximadamente.

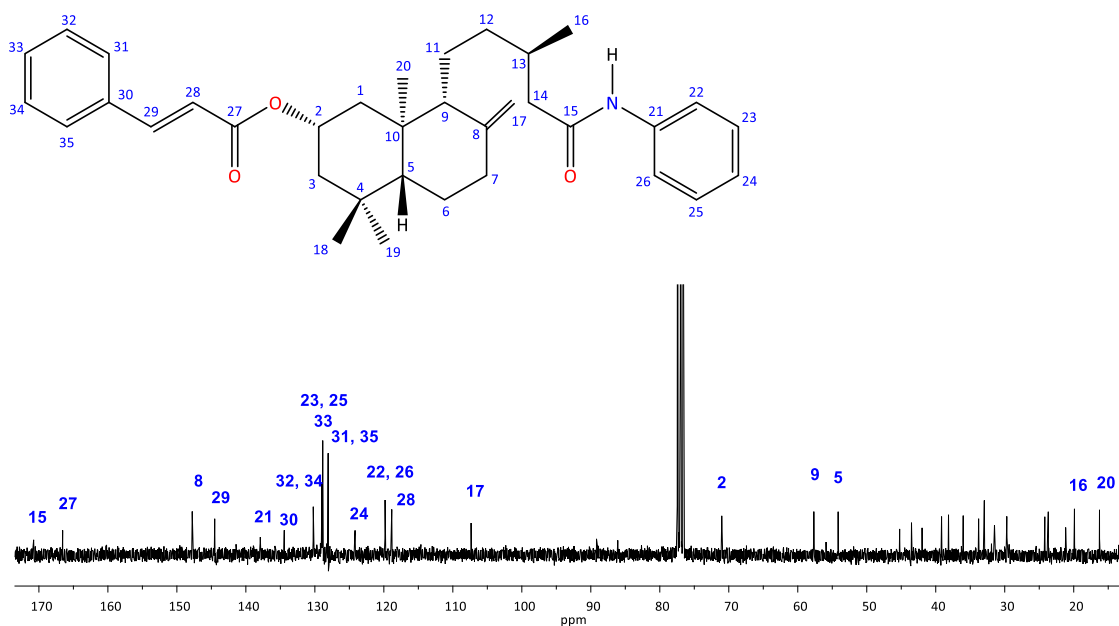
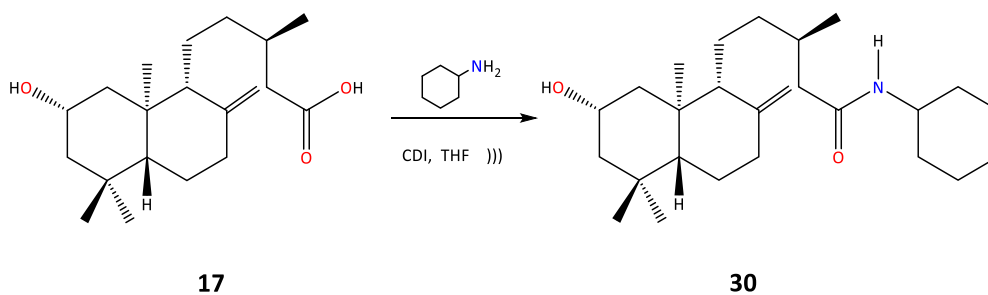


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz de **23**.

5.3.3. Preparación del derivado **30**

A partir de **17** se obtuvo la 2 α -hidroxi-*N*-ciclohexileperuamida (**30**), utilizando CDI (**24**) como activador del grupo carbonilo, ciclohexilamina (**29**) y como disolvente se empleó THF, en una atmósfera reducida de humedad y aplicando ondas de ultrasonido.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 31) de la amida **30**, se observó a 5.22 ppm una señal doble ($J = 7.7$ Hz) correspondiente al N-H, a 4.85 y 4.49 ppm se apreciaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 4.16 ppm se observó una señal quintuple perteneciente al H-2 base de hidroxilo, a 3.77 ppm mostró una señal múltiple correspondiente a H-21, así como el resto de las señales características del sistema.

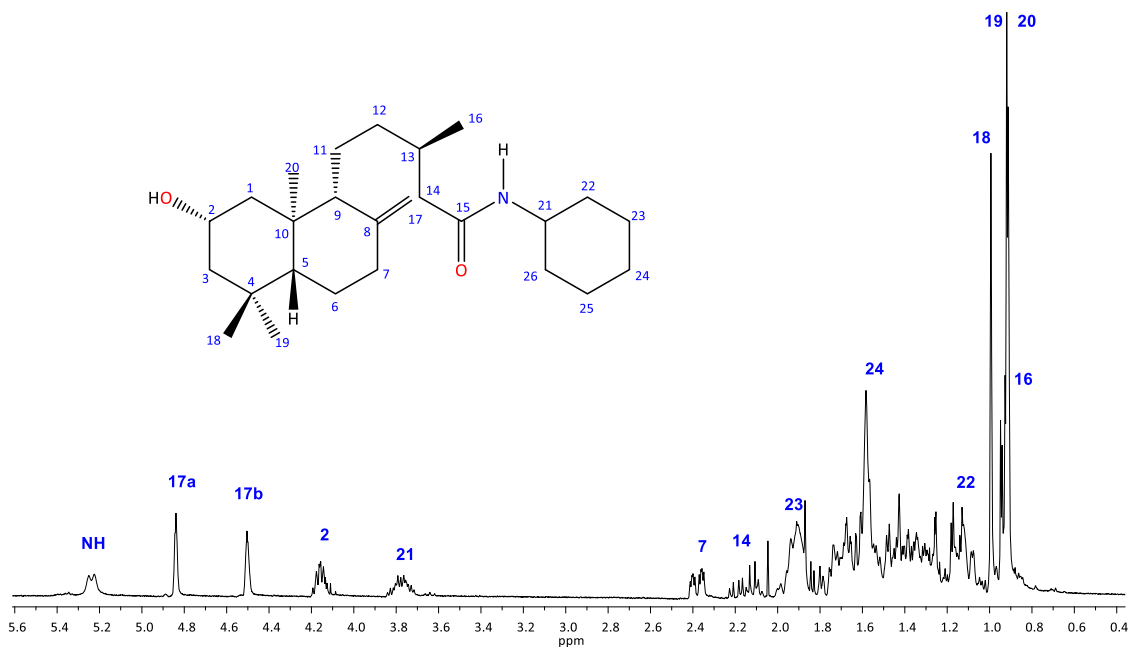
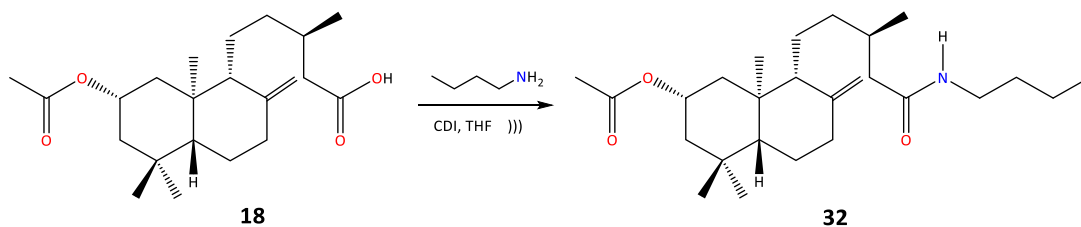


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **30**.

5.3.4. Preparación del derivado **32**

A partir del derivado acetilado **18** se preparó la amida **32**, empleando *n*-butilamina (**31**) con CDI como activador del grupo carbonilo en THF, en atmósfera reducida de humedad y aplicando ondas de ultrasonido para promover la reacción.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 32), se observó a 5.43 ppm una señal triple ($J = 5.3$ Hz) correspondiente al N-H, a 5.14 ppm se apreció la señal quintuple de H-2 base de acetato, a 4.84 y 4.50 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, a 3.23 ppm se mostró una señal cuádruple ($J = 12.8, 7.0$ Hz) correspondiente a los protones del metileno H-21, a 2.02 ppm se apreció una señal simple correspondiente al metilo del acetato H-26, así como una señal simple triple a 0.91 ppm correspondiente al metilo H-24, confirmando así la estructura hidrocarbonada.

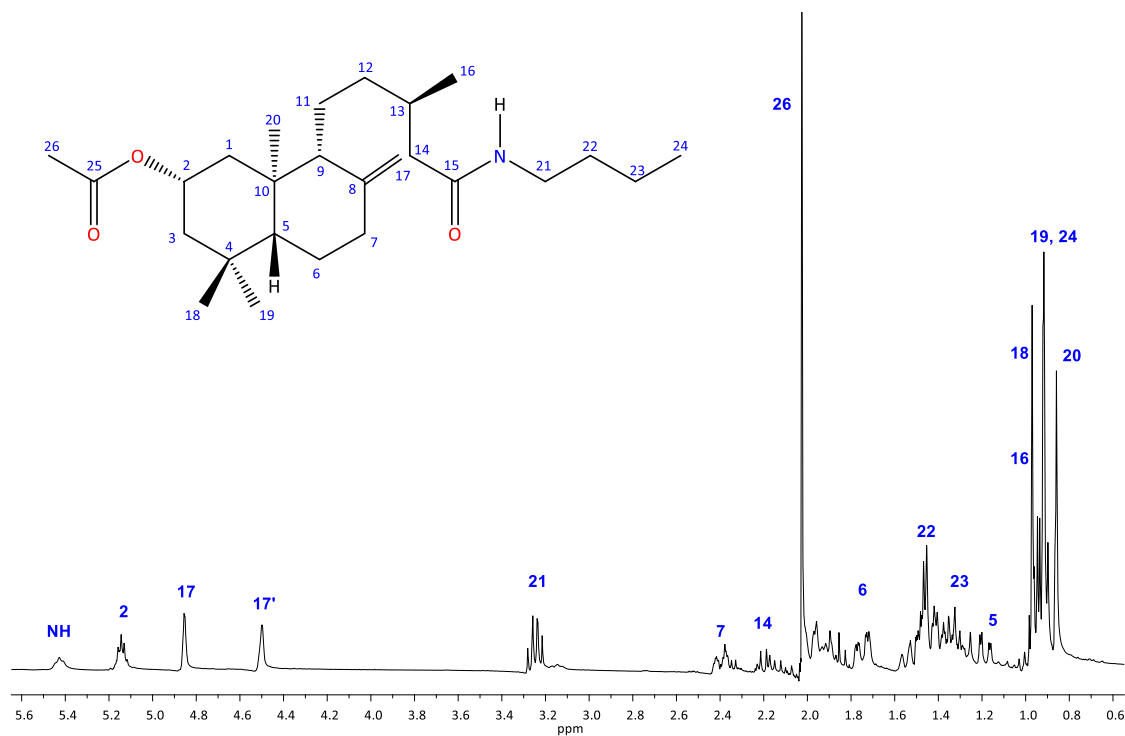
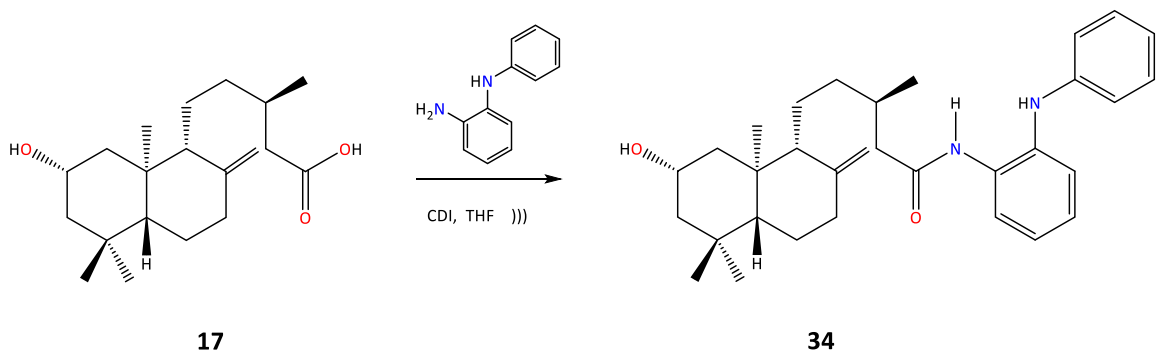


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **32**.

5.3.5. Preparación del derivado **34**

A partir del derivado **17** se preparó la amida **34**, empleando CDI como activador del grupo carbonilo en THF, en atmósfera reducida de humedad y aplicando ondas de ultrasonido, en donde se adicionaron a la estructura diterpénica dos anillos aromáticos, cabe señalar que se tienen en la estructura las siguientes funcionalizaciones: un grupo hidroxilo y un doble enlace exocíclico procedentes de la estructura base o de partida, agregando con esta reacción química un grupo amida y un grupo amina.



La estructura mostró el siguiente espectro de RMN de ^1H (Figura 33), en el que se observó entre 7.91 y 6.78 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos del sistema, en 7.58 y 5.73 ppm destacaron dos señales simples correspondientes a los protones de los N-H siendo el primero correspondiente al protón de la amida y el segundo al protón de la amina secundaria, también a 4.81 y 4.47 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 4.12 ppm se apreció una señal quintuple perteneciente al H-2 base de hidroxilo, así como el resto de las señales características del sistema.

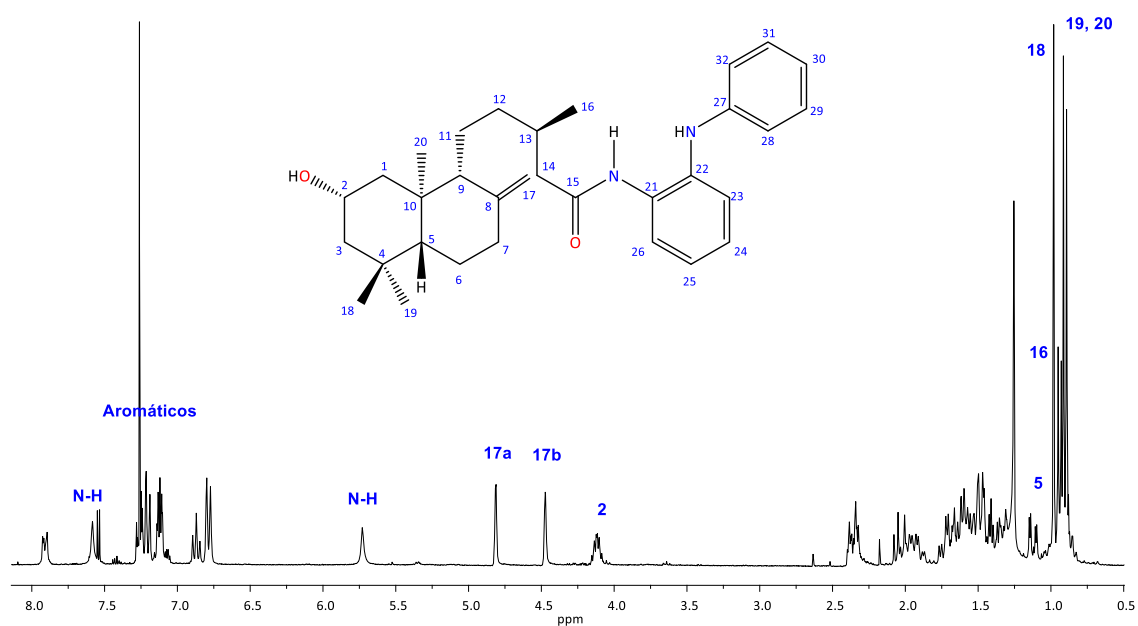
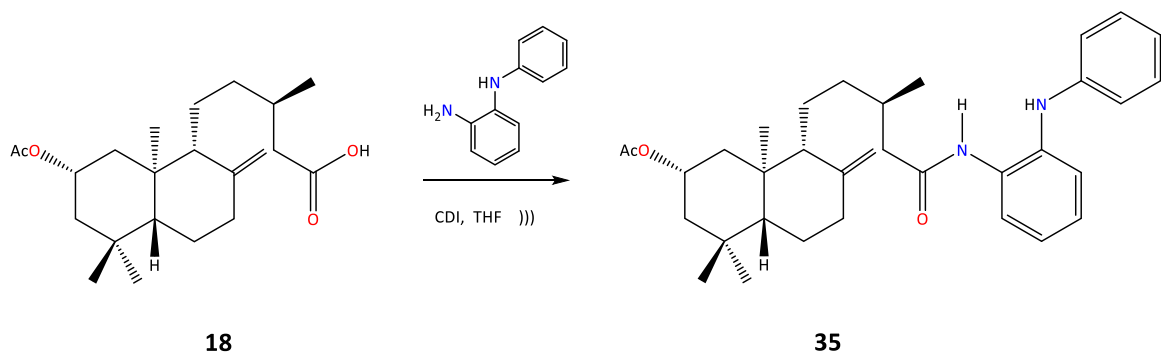


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **34**.

5.3.6. Preparación del derivado 35

A partir del derivado **18** se preparó la amida **35**, dicho producto en comparación con **34** muestra un grupo acetato en la posición C-2.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 34) para **35**, se observó entre 7.89 y 6.79 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos del sistema, en 7.59 y 5.73 ppm se mostraron dos señales simples correspondientes a los protones de los N-H, en 5.12 ppm se apreció una señal quintuple perteneciente al H-2 base de acetato, a 4.83 y 4.48 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 2.03 ppm se mostró una señal simple que integra para tres protones, correspondientes a H-34 del acetato, así como el resto de las señales características del sistema.

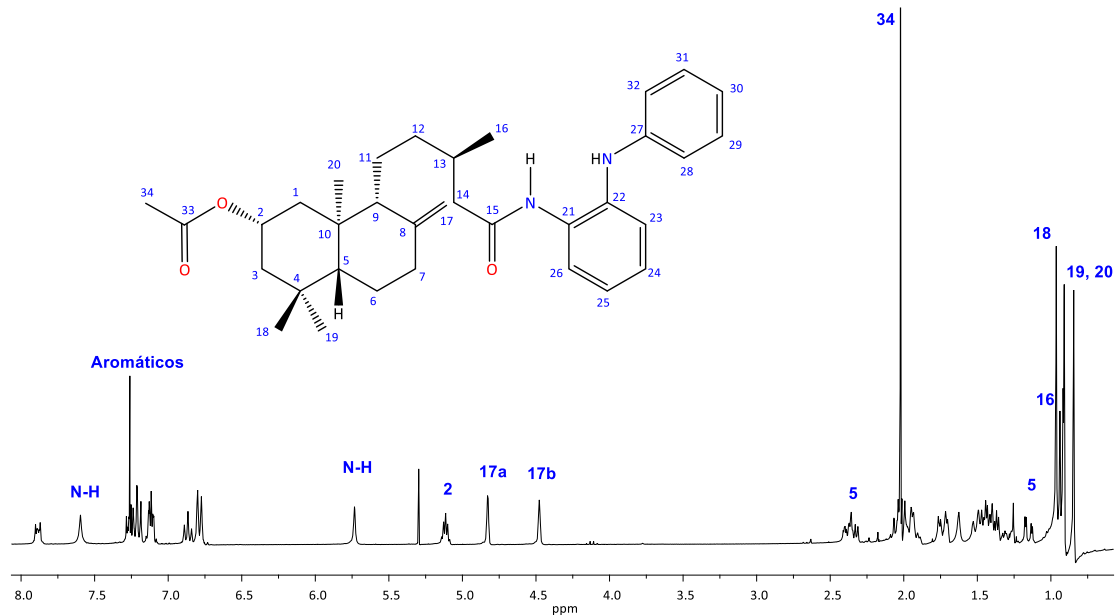


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **35**.

Debido a que tanto el derivado **34** y **35** poseen dos N-H dentro de su estructura fue necesario recurrir al experimento HMBC para determinar que señales en el espectro de

RMN de ^1H corresponde al grupo amida y cuál al grupo amina. En el experimento HMBC de **35** (Figura 35) se observó la correlación a dos enlaces del N-H en 7.59 ppm con C-15, el cual corresponde al protón de la amida, por otro lado se observaron las correlaciones a dos enlaces y a tres enlaces por parte del N-H ubicado en 5.73 ppm con los carbonos asignados para C-22 y C-32, respectivamente de los anillos aromáticos, lo cual confirma que esta señal pertenece a la amina.

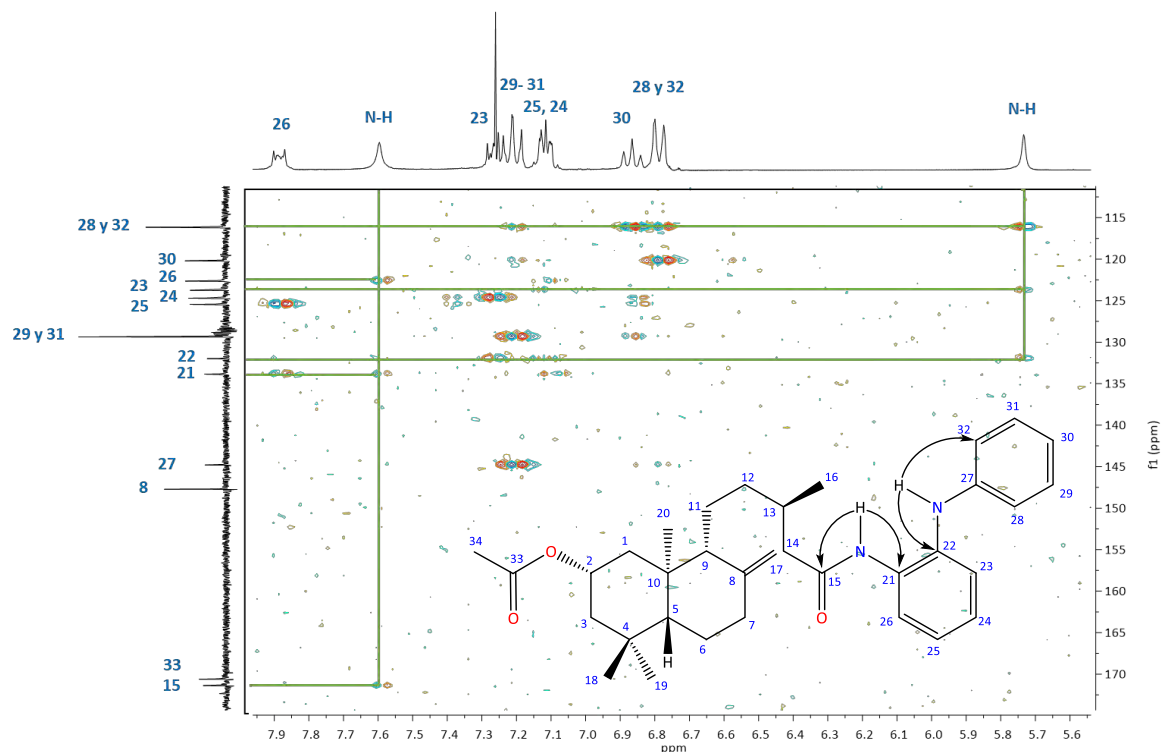
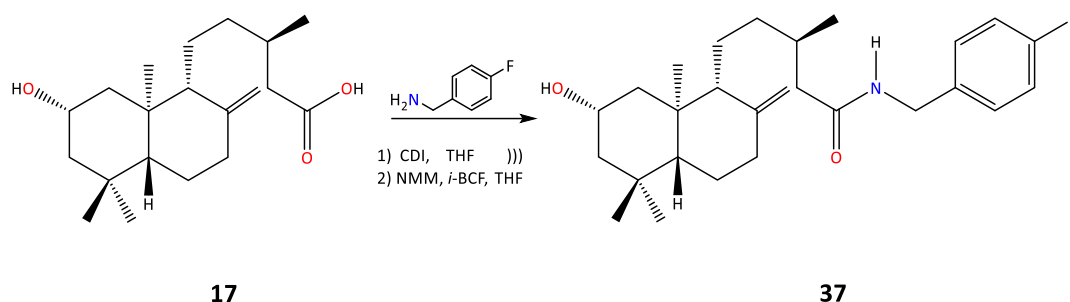


Figura 35. Ampliación del experimento HMBC de **35**.

5.3.7. Preparación de los derivados 37 y 38

A partir del derivado **17** se preparó la amida **37** mediante dos procedimientos: 1) empleando CDI como activador del grupo carbonilo en THF, en atmósfera reducida de humedad en presencia de ondas ultrasónicas y 2) vía anhídridos mixtos. Dicha modificación química además de cambiar el grupo carboxilo a amida adiciona a la estructura diterpénica un átomo de flúor, debido a que se emplea la 4-fluoro-bencilamina.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 36) de **37** se observó entre 7.26 y 7.0 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos del sistema, en 5.72 ppm se mostró una señal triple correspondiente al protón del N-H, a 4.83 y 4.48 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, a 4.40 ppm se mostró una señal múltiple correspondiente a los protones del metileno H-21, así mismo se apreció a 4.13 ppm una señal quintuple correspondiente al protón H-2 base de hidroxilo.

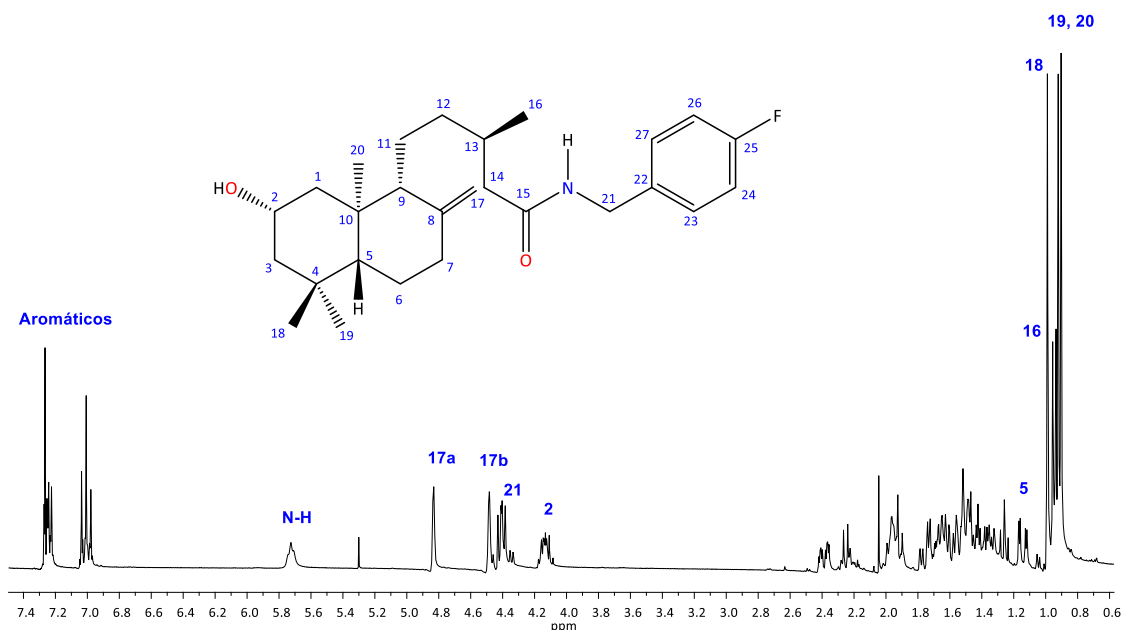
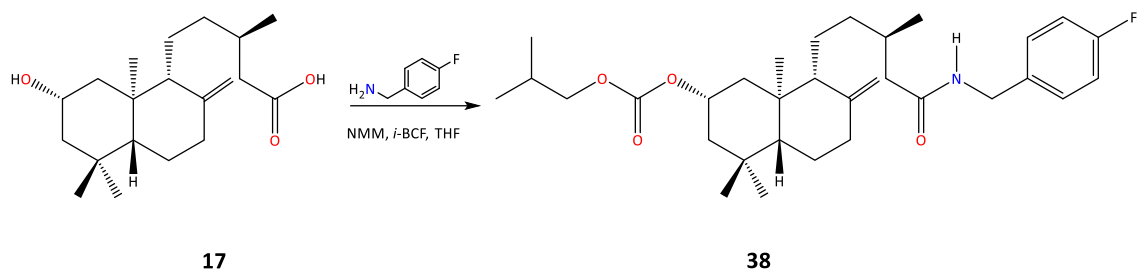


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **37**.

En la preparación del compuesto **37** vía anhídridos mixtos se obtuvo un segundo producto de reacción **38**, en el cual el grupo hidroxilo de la posición C-2 se vio comprometido, resultando un éster carbónico, dicho producto fue identificado y caracterizado mediante RMN.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 37) para **38** se observaron entre 7.26 y 7.00 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos del sistema, en 5.76 se apreció una señal triple correspondiente al protón del N-H, en 4.95 ppm se mostró una señal quintuple correspondiente al protón H-2, a 4.84 y 4.49 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, a 4.42 ppm se aprecia una señal múltiple correspondiente a los protones del metileno H-21, así mismo en 3.89 ppm se identificó una señal doble correspondiente a los protones del metileno H-29 del grupo isobutilo.

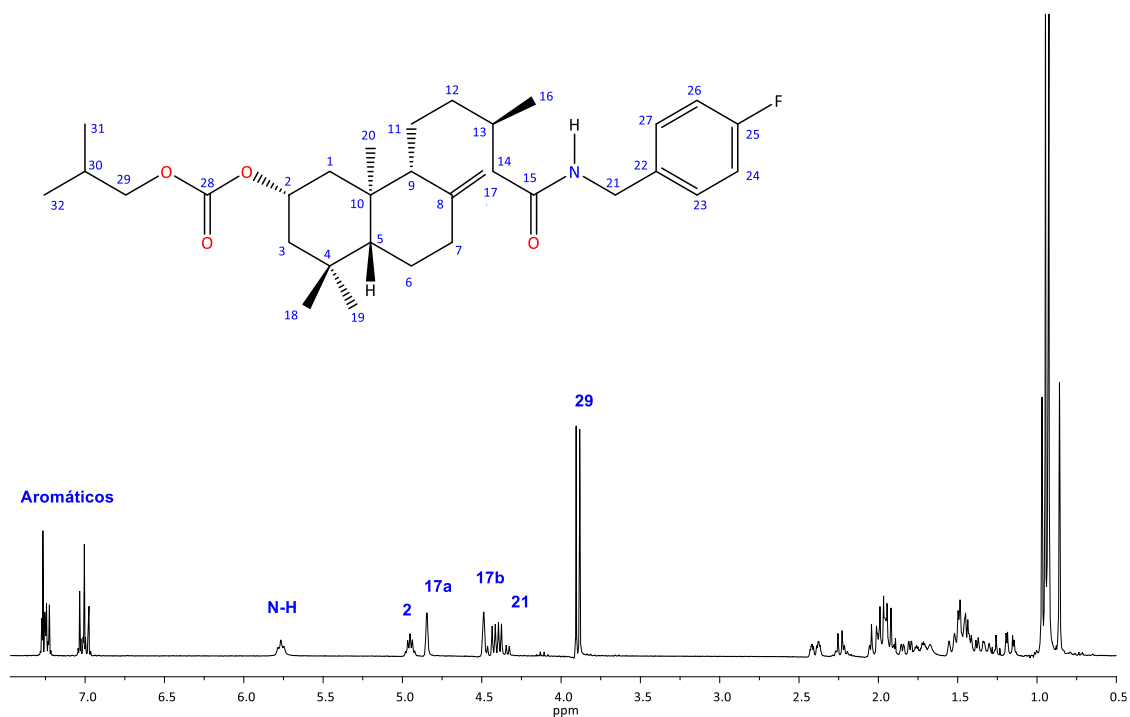
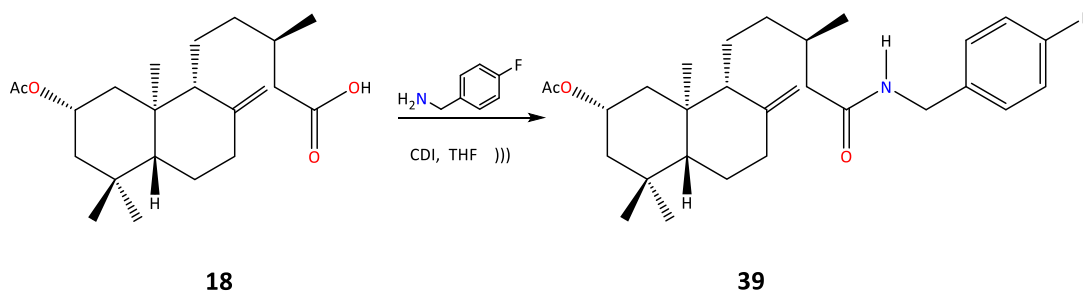


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **38**.

5.3.8 Preparación del derivado 39

A partir del derivado **18** se preparó la amida **39**, empleando CDI como activador del grupo carbonilo en THF, en atmósfera reducida de humedad y aplicando ondas de ultrasonido.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 38), se observó entre 7.26 y 7.00 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos del sistema, en 5.74 ppm se mostró una señal triple correspondiente al protón del N-H, en 5.12 ppm se apreció una señal quintuple perteneciente al H-2 base de acetato, a 4.85 y 4.49 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 4.40 se apreció una señal múltiple del metileno H-21, en 2.01 ppm se observó una señal simple que corresponde a los tres protones H-29 del acetato.

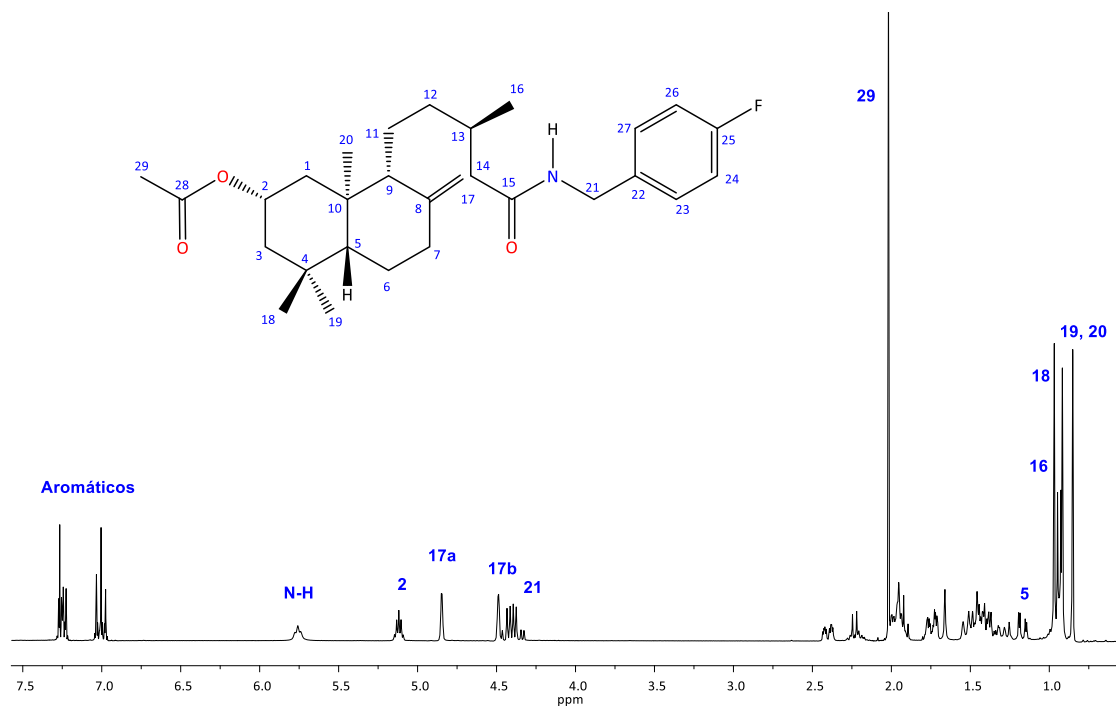


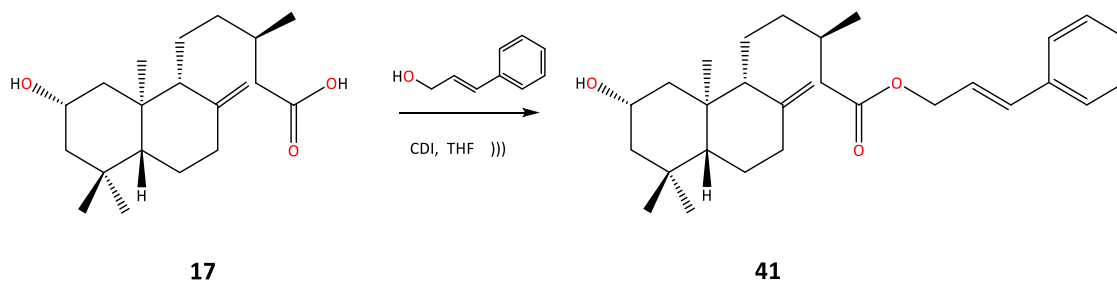
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **39**.

5.4. Obtención de ésteres con esqueleto tipo *ent*-labdano a partir del ácido 2 α -hidroxieperuico

Posterior a la preparación de amidas se prosiguió con la obtención de ésteres a partir del esqueleto *ent*-labdano, con la finalidad de enriquecer la serie de derivados diterpénicos.

5.4.1. Preparación del derivado 41

A partir del derivado **17** se preparó el éster **41**, empleando como activador del grupo carbonilo CDI y utilizando como disolvente THF, en atmósfera reducida de humedad y en presencia de ondas de ultrasonido para promover la reacción. Para este derivado la funcionalización de la estructura diterpénica cuenta con un grupo hidroxilo, dos dobles enlaces y un grupo éster, además del anillo aromático procedente del cinamilo.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 39) de **41**, se observó entre 7.40 y 7.20 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos, en 6.65 ppm se apreció una señal doble correspondiente al protón vinílico H-23, en 6.29 ppm se mostró una señal doble de triples correspondientes a H-22, en 4.73 ppm se observó una señal doble correspondiente al metileno H-21 cercano al doble enlace, en 4.83 y 4.50 ppm se apreciaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 4.13 ppm se observó una señal quintuple perteneciente al H-2 base de hidroxilo.

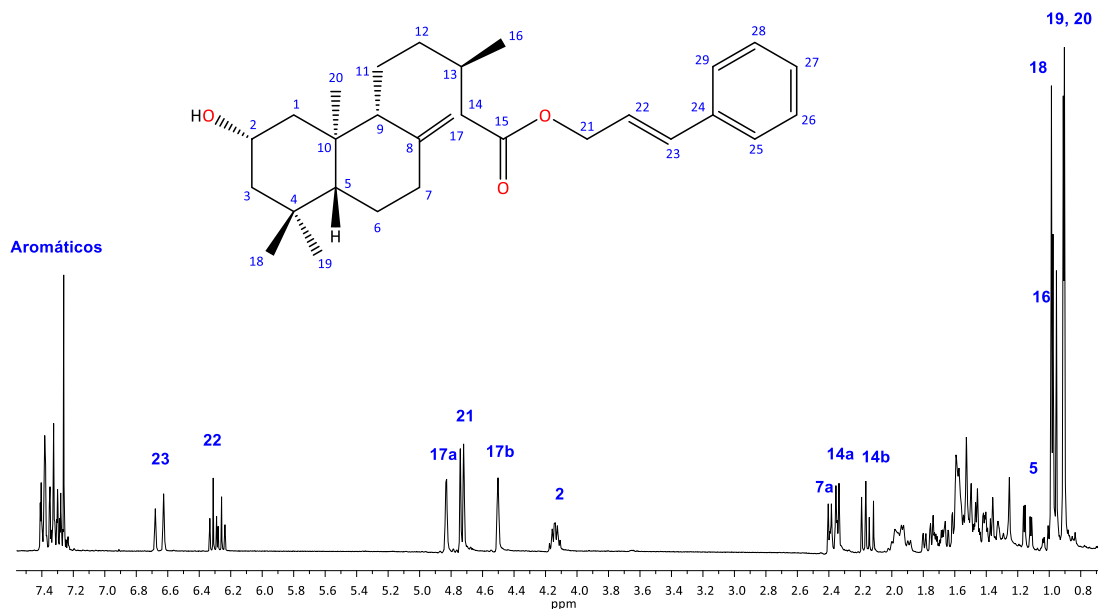
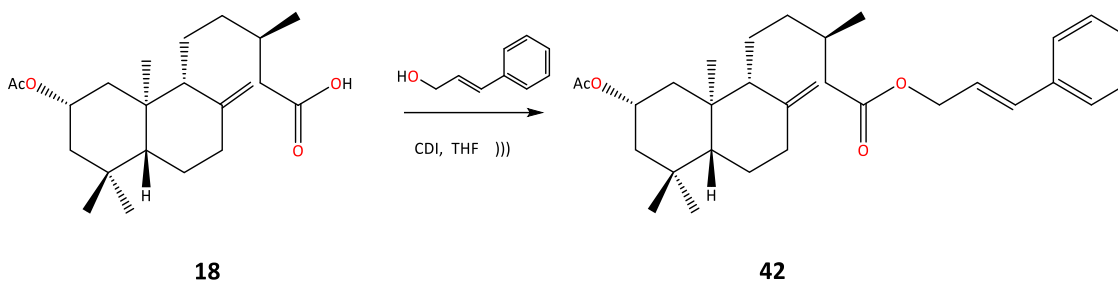


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **41**.

5.4.2. Preparación del derivado **42**

A partir del derivado **18** se preparó la éster **42**, empleando CDI como activador del grupo carbonilo y THF como disolvente, en atmósfera reducida de humedad y en presencia de ondas de ultrasonido. El compuesto **42** muestra dos grupos éster dentro de su esqueleto.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 40), se observó entre 7.40 y 7.20 ppm las señales correspondientes a los protones aromáticos, en 6.65 ppm se apreció una señal doble correspondiente al protón vinílico H-23, en 6.28 ppm se mostró una señal doble de triples correspondientes a H-22, en 5.14 ppm se observó una señal quintuple perteneciente al H-2 base de acetato, en 4.72 ppm se apreció una señal doble correspondiente al metileno H-21 cercano al doble enlace, en 4.84 y 4.48 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 2.01 ppm se mostró una señal simple que integra para los tres protones del metilo del acetato H-29.

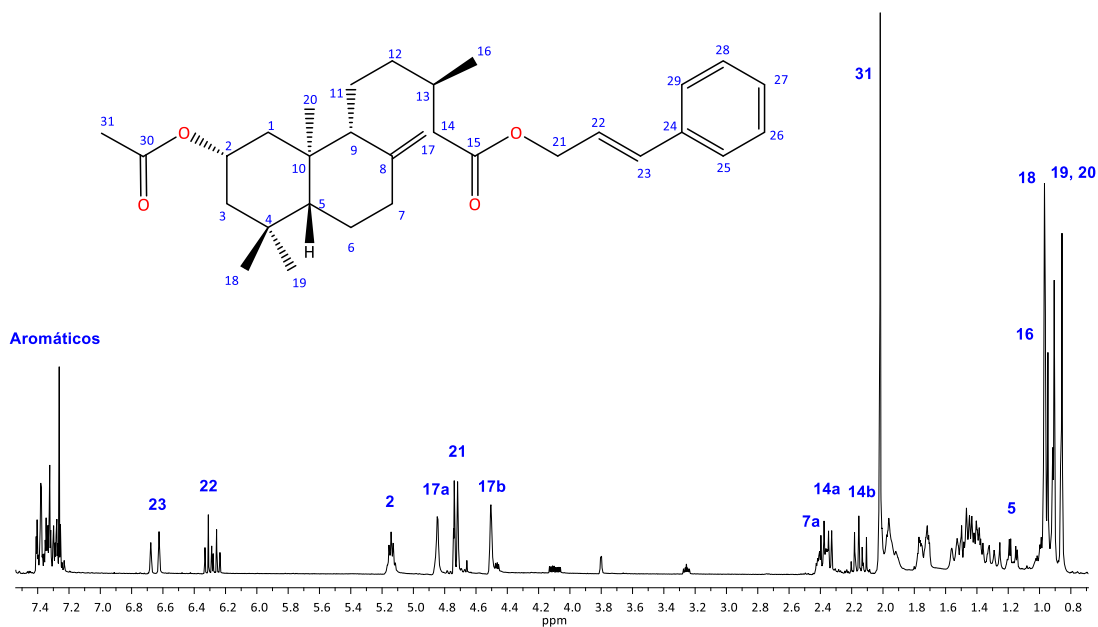
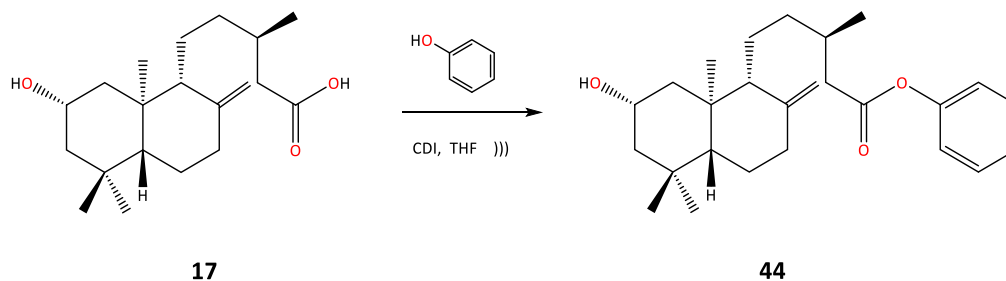


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **42**.

5.4.3. Preparación del derivado 44

Teniendo como materiales de partida a **17** y al fenol (**43**) y activando al grupo carboxilo con CDI en THF, el derivado **44** muestra cierta analogía con el derivado **27**; la diferencia radica en la funcionalización en C-15, que para **44** es un grupo éster y para **27** un grupo amida.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 41), entre 7.38 y 7.06 ppm se apreciaron tres juegos de señales múltiples correspondientes para H-23 y H-25, H-24 y H-22 y H-26, en 4.87 y 4.54 ppm se observaron dos señales simples correspondientes para los protones H-17a y H-17b, respectivamente, también se mostró una señal quintuple en 4.15 ppm correspondiente para H-2 base de hidroxilo, así como el resto de las señales características para el sistema.

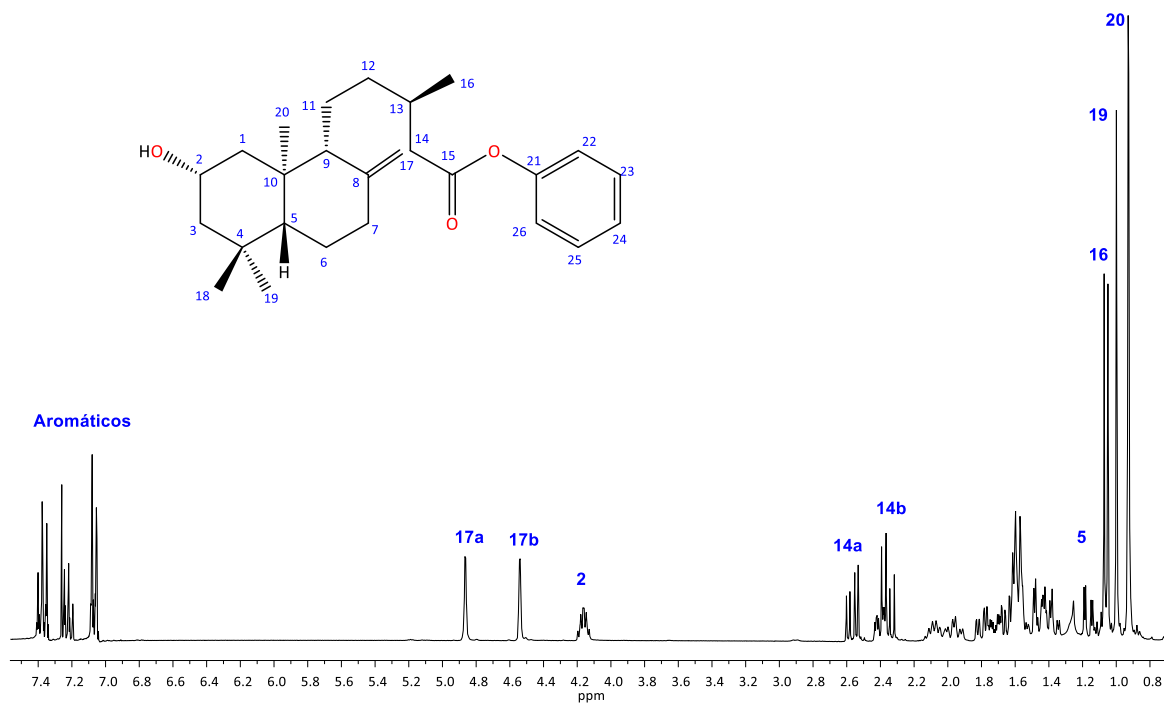
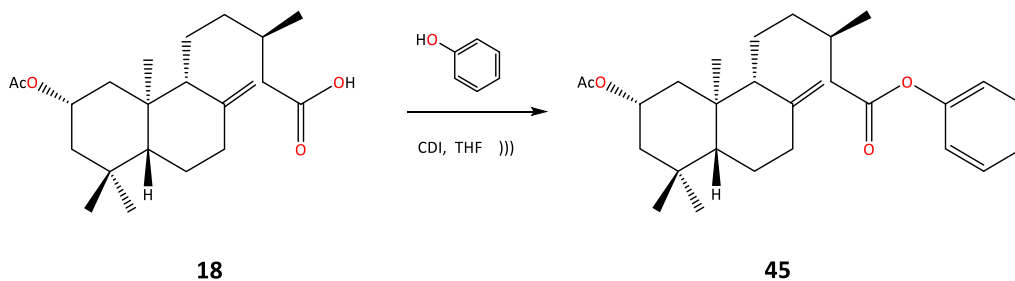


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **44**.

5.4.4. Preparación del derivado **45**

Para la preparación del éster **45** se utilizó como materia de partida el derivado acetilado **18** y al fenol (**43**).



El producto de reacción mostró en su espectro de RMN de ^1H (Figura 42), entre 7.31 y 7.08 ppm las señales correspondientes para los protones pertenecientes al anillo aromático, en 5.16 ppm se apreció una señal cuántuple correspondiente para H-2, en 2.02 se observó una señal simple correspondiente para el metilo H-28, así como el resto de las señales características del esqueleto hidrocarbonado.

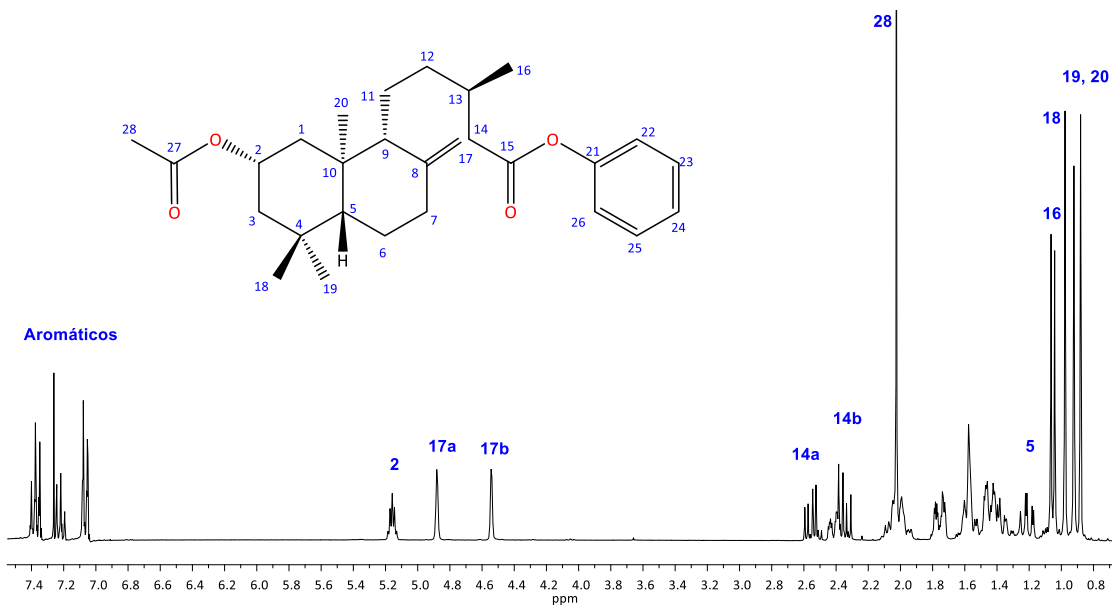
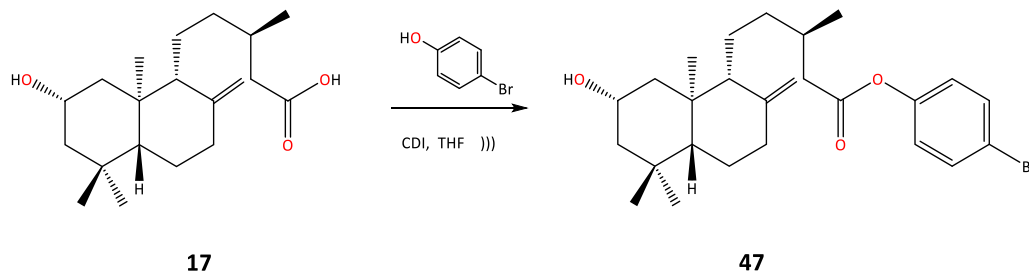


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **45**.

5.4.5. Preparación del derivado **47**

A partir del derivado **17** se preparó el éster **47**, empleando como activador del grupo carbonilo CDI, utilizando como disolvente THF y en presencia de ondas de ultrasonido. El derivado **47** en comparación con las amidas **37**, **38** y **39** cuenta con un halógeno en su estructura, en este caso se trata de un átomo de Br.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 43), se observó en 7.47 y 6.96 ppm dos señales dobles correspondientes a los protones del anillo aromático, en 4.85 y 4.52 ppm se apreciaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 4.15 ppm se mostró una señal quintuple perteneciente al H-2 base de hidroxilo, a 0.92 ppm se observó una señal simple que integra para 6 protones correspondientes a los metilos H-19 y H-20.

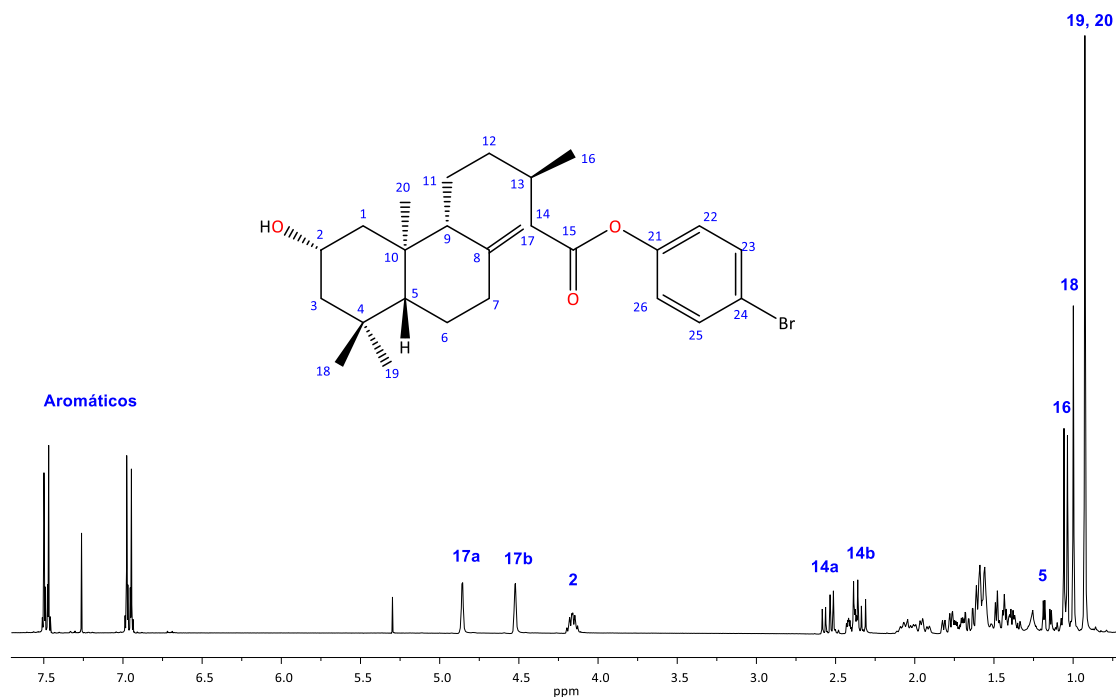
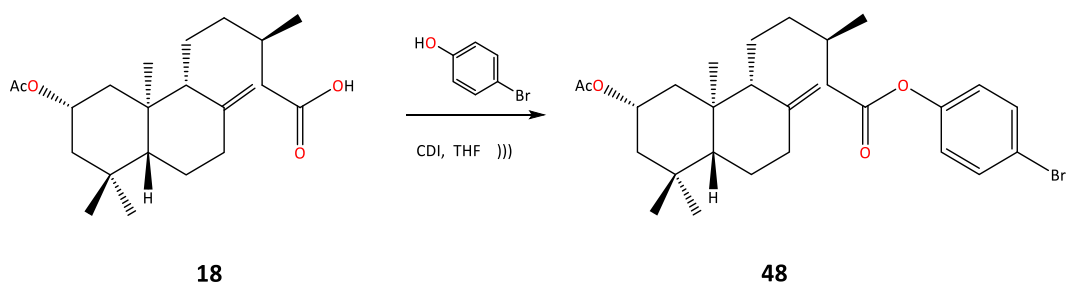


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **47**.

5.4.6. Preparación del derivado **48**

A partir del derivado **18** se preparó la éster **48**, empleando como activador del grupo carbonilo CDI y utilizando como disolvente THF, en atmósfera reducida de humedad y en presencia de ondas de ultrasonido.



En el espectro de RMN de ^1H (Figura 44), se observaron en 7.48 y 6.96 ppm dos señales dobles correspondientes a los protones del anillo aromático, en 5.15 ppm se apreció una señal quintuple perteneciente al H-2, en 4.87 y 4.52 ppm se observaron dos señales simples correspondientes a los protones H-17a y H-17b, respectivamente, en 2.03 ppm se identificó una señal simple correspondiente a los tres protones del metilo del acetato H-28.

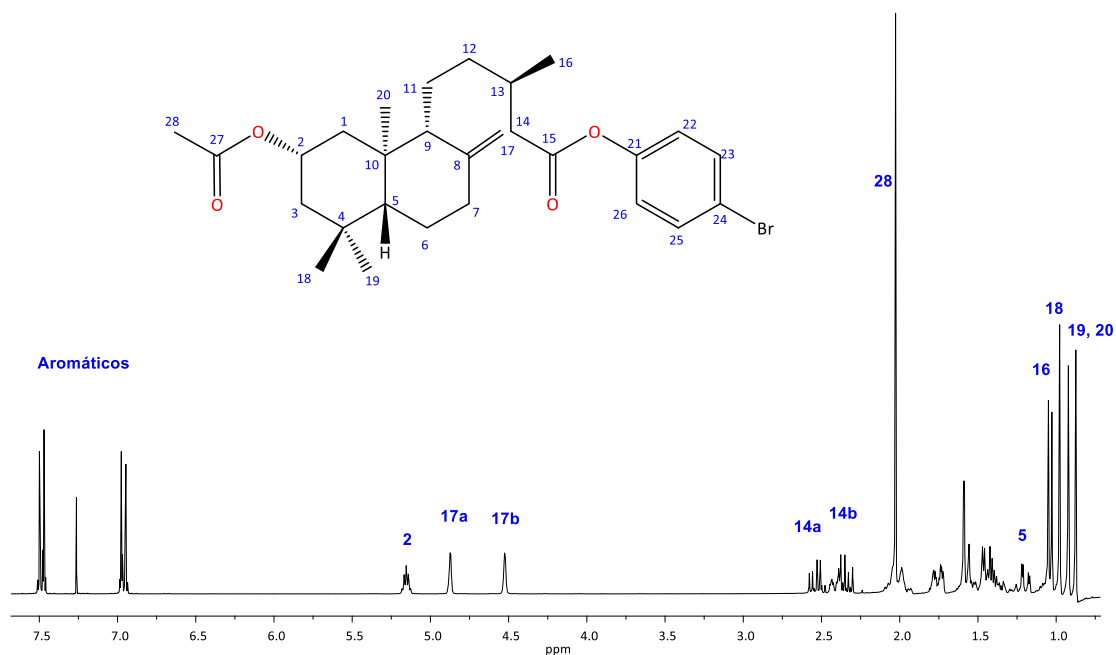
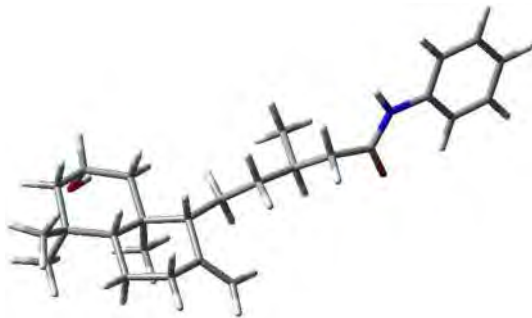


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz de **48**.

5.5. Estudios de anclaje molecular (Docking) de las moléculas preparadas frente al heterodímero de alfa- y beta-tubulina

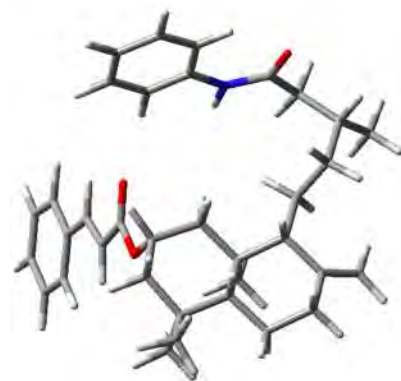
5.5.1. Análisis conformacional

Debido a la flexibilidad molecular que presentan los derivados *ent*-labdano, resultó necesario realizar el análisis conformacional correspondiente para cada uno de ellos, iniciando con la construcción de la molécula, seguido de la búsqueda conformacional usando el protocolo de Monte Carlo empleando MMFF, a los conformeros obtenidos se les calculó la energía empleando DFT a un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en el programa Spartan'14, el conformero de mínima energía se llevó a la optimización de la geometría con DFT a nivel de teoría B3LYP/DGDZVP en el programa Gaussian09W.



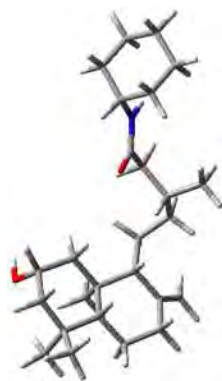
27

$E_{\text{DFT}} = -765296.0 \text{ kcal/mol}$



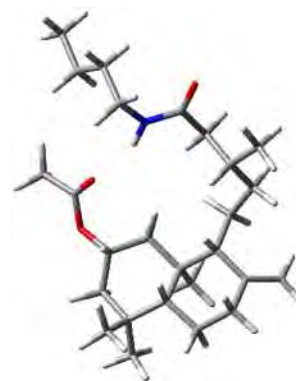
23

$E_{\text{DFT}} = -1030009.8 \text{ kcal/mol}$



30

$E_{\text{DFT}} = -767573.6 \text{ kcal/mol}$



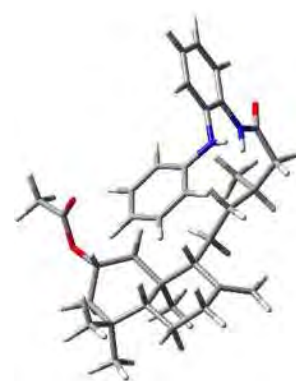
32

$E_{\text{DFT}} = -814801.2 \text{ kcal/mol}$



34

$E_{\text{DFT}} = -945031.1 \text{ kcal/mol}$



35

$E_{\text{DFT}} = -1040842.8 \text{ kcal/mol}$



37

$E_{\text{DFT}} = -852253.8 \text{ kcal/mol}$



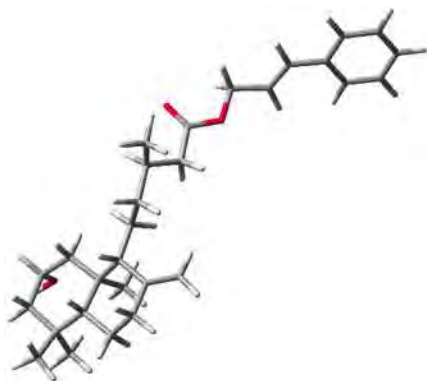
38

$E_{\text{DFT}} = -1069297.6 \text{ kcal/mol}$



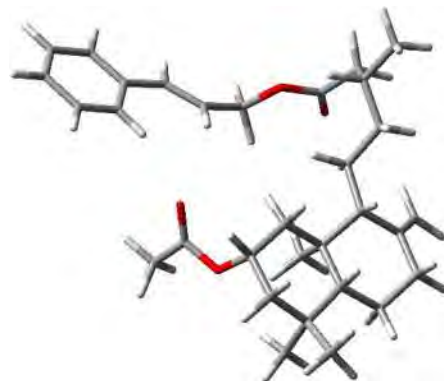
39

$E_{\text{DFT}} = -948068.6 \text{ kcal/mol}$



41

$E_{\text{DFT}} = -851009.7 \text{ kcal/mol}$



42

$E_{\text{DFT}} = -946823.5 \text{ kcal/mol}$

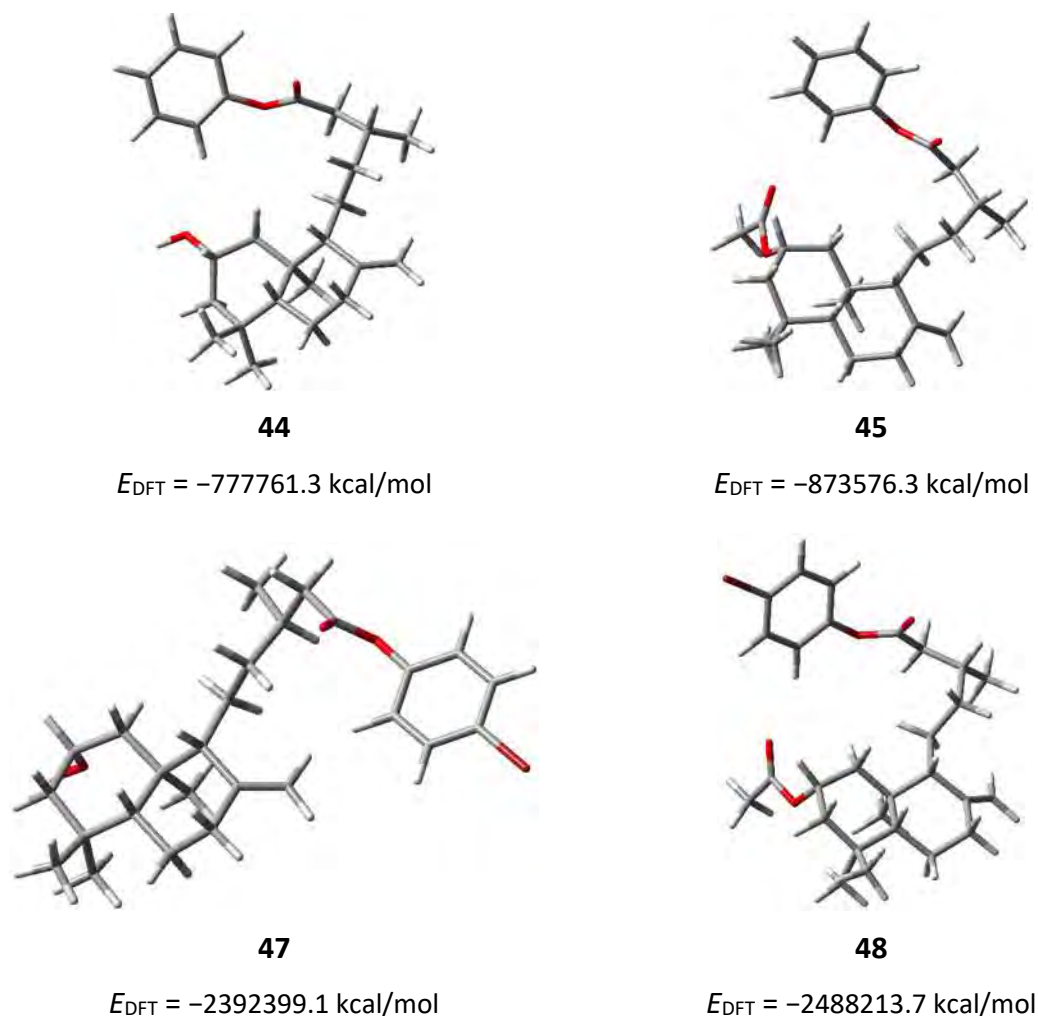


Figura 45. Confórmeros de mínima energía (DFT//B3LYP/DGDZVP).

5.5.2. Estudios de anclaje molecular

Los estudios de acoplamiento molecular pueden determinar la conformación óptima y el modo de unión de un ligando con una macromolécula.

Se pueden encontrar varios estudios estructurales de rayos X que contienen las coordenadas cristalográficas para tubulina. Algunos de estos reportes proporcionan la información correspondiente para el heterodímero de α - y β -tubulina como la unidad estructural básica de los microtúbulos, algunos otros muestran las coordenadas para los complejos α , β , α , β -tetraméricos, y en algunos casos incluyen proteínas asociadas para estabilizar las macroestructuras. En el presente estudio las coordenadas atómicas de la

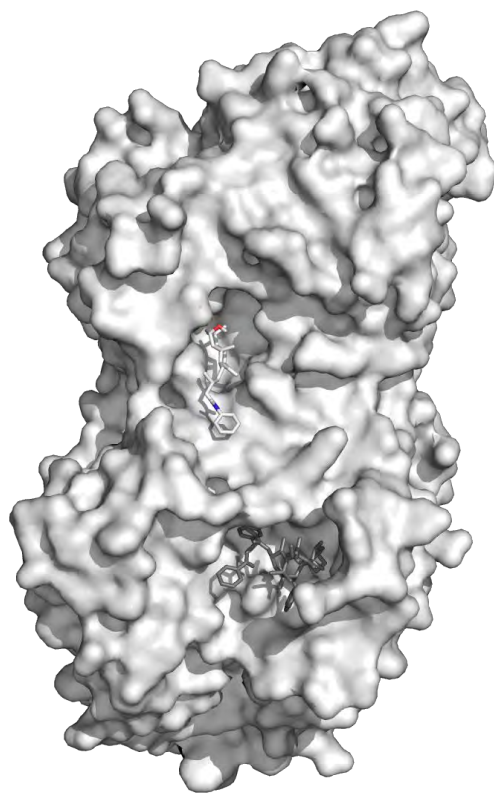
tubulina fueron obtenidas del archivo 1JFF, que corresponde al heterodímero de α - y β -tubulina cristalizado con paclitaxel, GDP, GTP, Zn^{2+} y Mg^{2+} .

Los modelos moleculares de mínima energía mostrados previamente fueron empleados como punto de partida para la preparación de los ligandos por medio del programa AutoDock Tools. Posteriormente se realizó el escaneo en la superficie de la proteína en el programa AutoDock Vina. A continuación se muestran los modos de unión más representativos (*ent*-labdano-tubulina) de acuerdo al sitio de anclaje y energía de afinidad.

En la mayoría de los casos los derivados ensayados permanecieron en el mismo sitio de unión que el paclitaxel.

5.5.2.1. Anclaje molecular del derivado 27

El derivado **27** muestra una afinidad diferente al sitio de acción del paclitaxel, el anclaje molecular entre **27**-tubulina tiene lugar entre los dímeros, teniendo que la parte aromática de la estructura se orienta hacia la β -tubulina y el grupo hidroxilo hacia la α -tubulina.

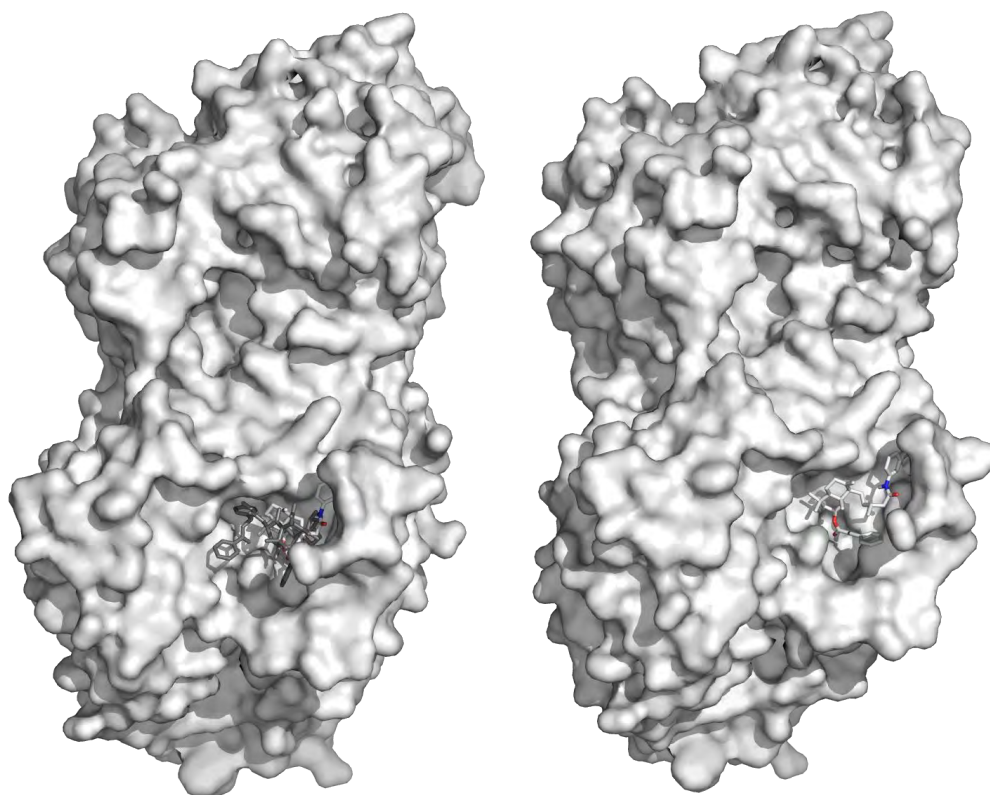


$$E_f = -7.9 \text{ kcal/mol}$$

Figura 46. Interacción del derivado **27** (blanco) sobre la tubulina en comparación con el paclitaxel (gris).

5.5.2.2. *Anclaje molecular del derivado 23*

El derivado **23** cuenta con el mismo sitio de unión que el fármaco de referencia, el anillo aromático del cinamato se encuentra orientado hacia la Leu217 y Leu219.



$$E_f = -8.5 \text{ kcal/mol}$$

Figura 47. Interacción del derivado **23** (blanco) en el mismo sitio unión que el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

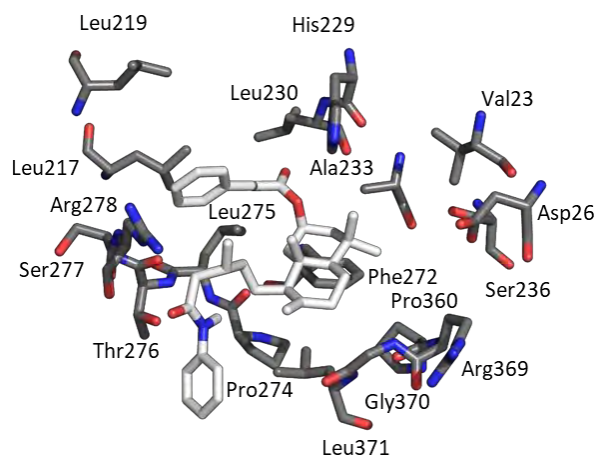
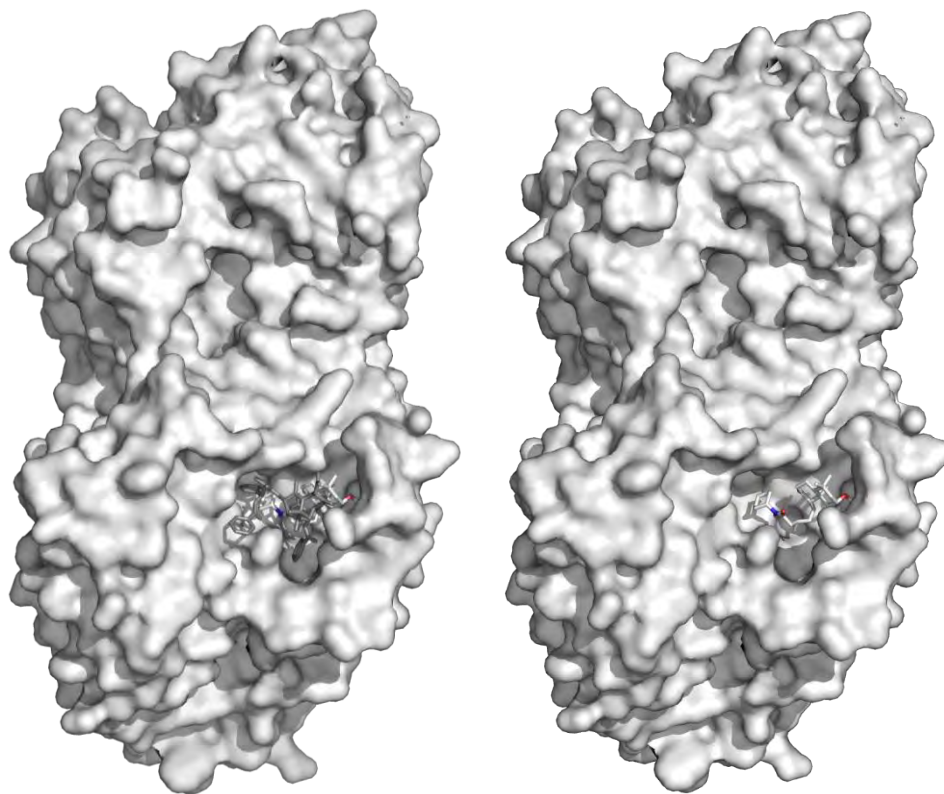


Figura 48. Interacción de **23** con los residuos de aminoácidos en el sitio de unión.

5.5.2.3. Anclaje molecular del derivado 30

El derivado **30** mostró afinidad al sitio del paclitaxel, en donde el grupo hidroxilo de la estructura se encuentra orientado hacia los átomos de oxígeno de los grupos carbonilos de Arg278, Ser277 y Thr276.



$$E_f = -6.8 \text{ kcal/mol}$$

Figura 49. Interacción del derivado **30** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

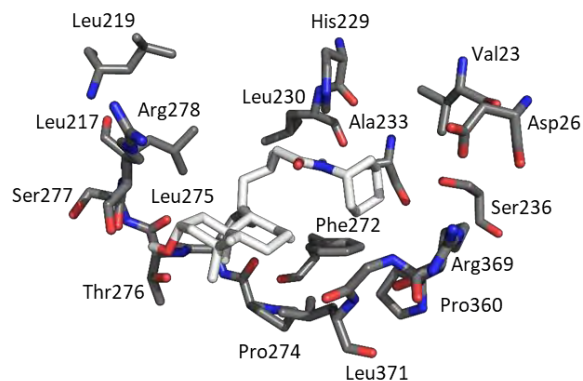
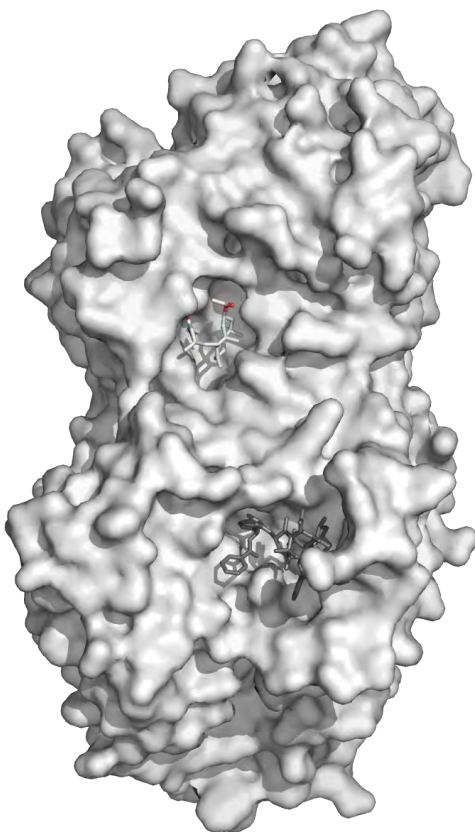


Figura 50. Interacción de **30** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.4. Anclaje molecular del derivado 32

El derivado **32** mostró afinidad a la α -tubulina, cerca de la subunidad β , sin embargo, no establece ninguna interacción con esta última.

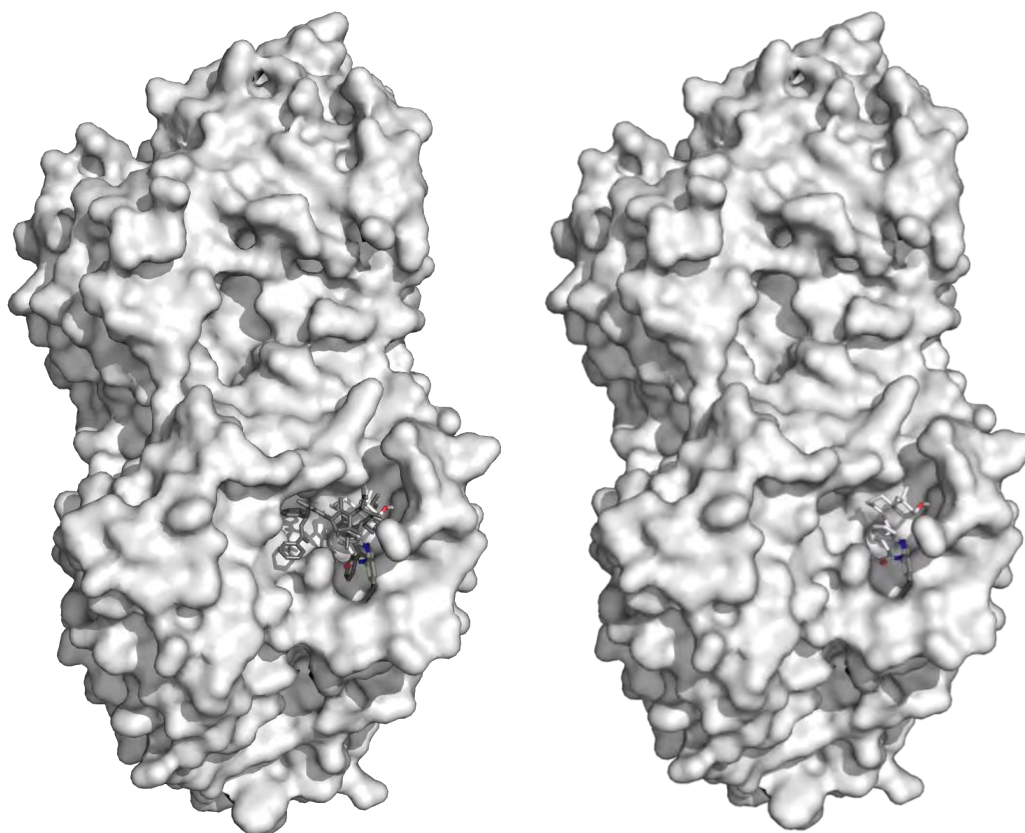


$$E_f = -6.5 \text{ kcal/mol}$$

Figura 51. Interacción del derivado **32** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

5.5.2.5. Anclaje molecular del derivado 34

El derivado **34** al igual que **30** orienta el grupo hidroxilo hacia los residuos aminoácidos de Arg278, Ser277 y Thr276, sin embargo con una energía de afinidad menor.



$E_f = -6.4$ kcal/mol

Figura 52. Interacción del derivado **34** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

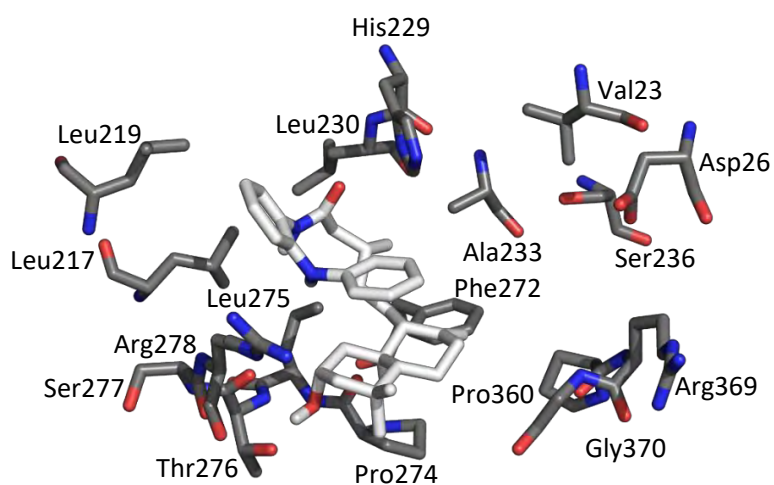
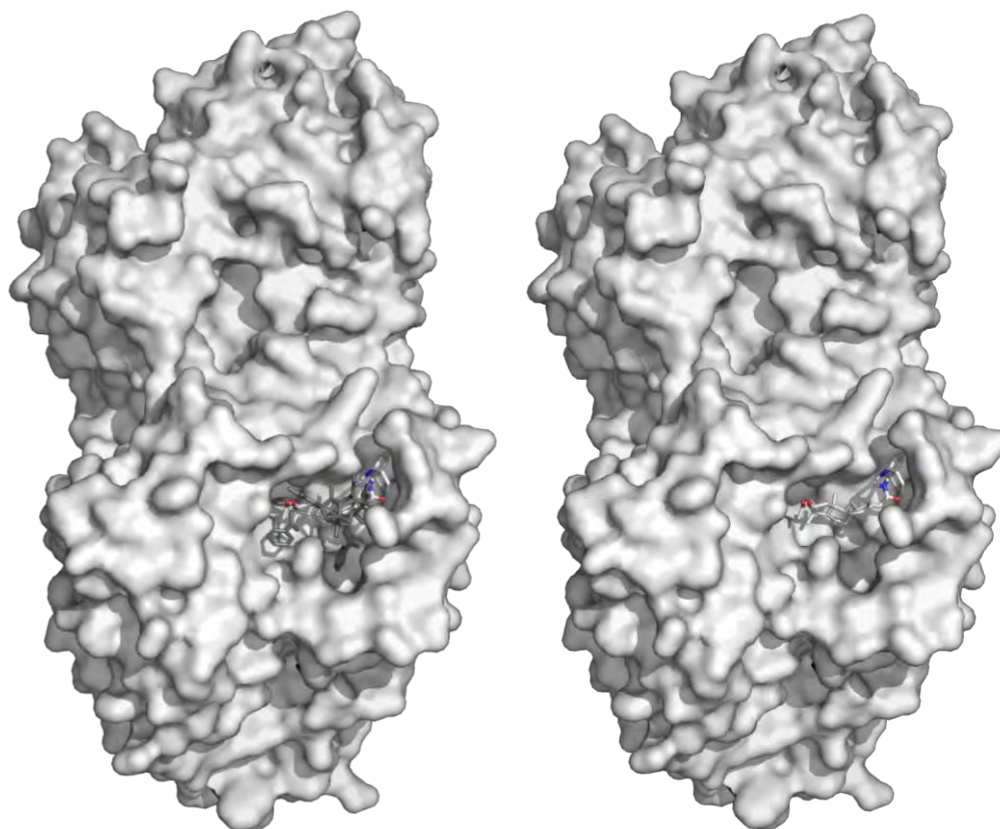


Figura 53. Interacción de **34** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.6. Anclaje molecular del derivado 35

El derivado **35** comparte el mismo sitio de unión que el paclitaxel, **35** mantiene orientado el grupo acetato hacia Asp26, mientras el grupo carbonilo de la amida se encuentra dirigido hacia carbonilos de los aminoácidos Arg278, Ser277 y Thr276.



$$E_f = -8.7 \text{ kcal/mol}$$

Figura 54. Interacción del derivado **35** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

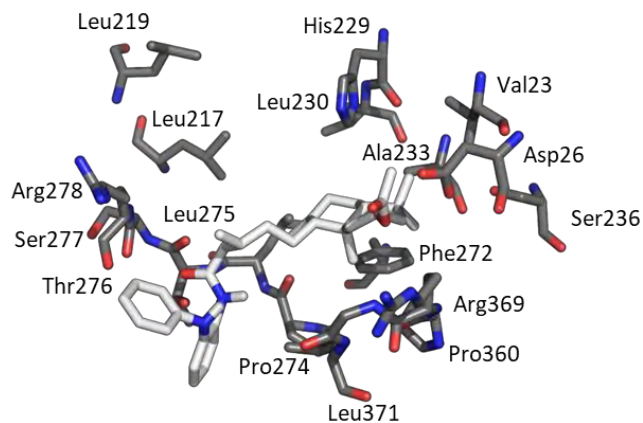
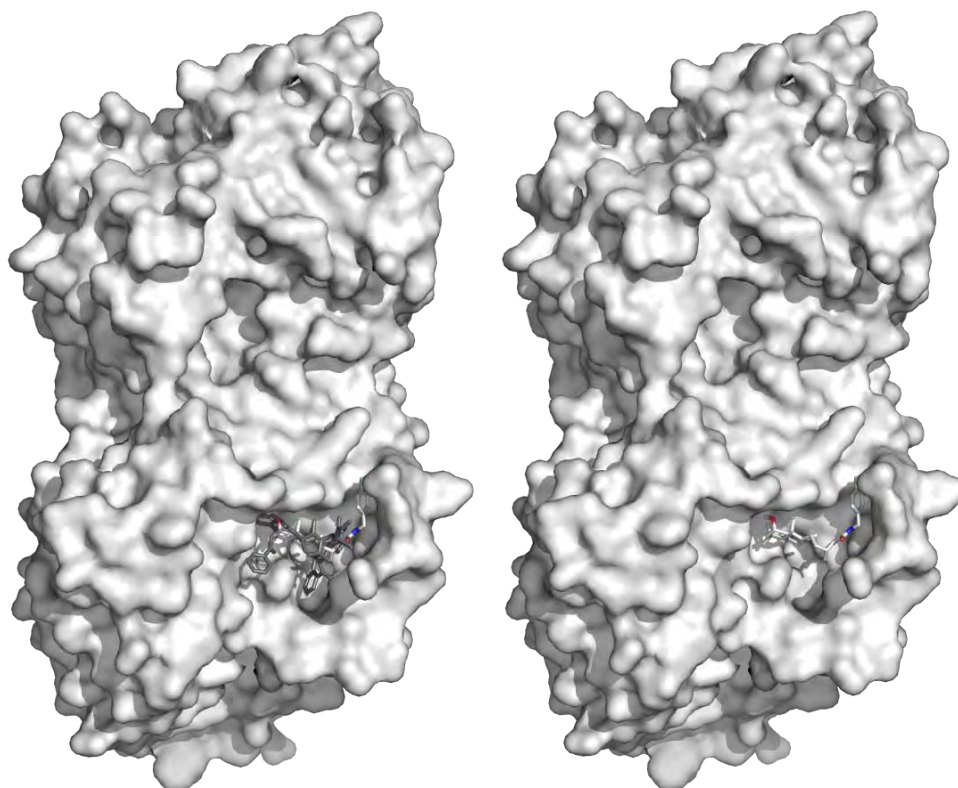


Figura 55. Interacción de **35** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.7. Anclaje molecular del derivado 37

El derivado **37** ocupa el mismo sitio activo que el paclitaxel, orientando el grupo aromático al fondo de la cavidad detrás del residuo Arg278.



$$E_f = -7.6 \text{ kcal/mol}$$

Figura 56. Interacción del derivado **37** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

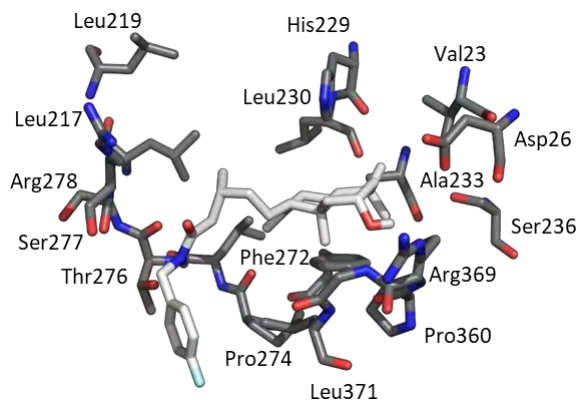


Figura 57. Interacción de **37** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.8. Anclaje molecular del derivado 38

Los derivados **37** y **38** muestran una energía de afinidad semejante, sin embargo, ambas estructuras presentan diferente acomodo dentro de la proteína blanco, **38** orienta al anillo aromático entre Leu219 y Arg278.

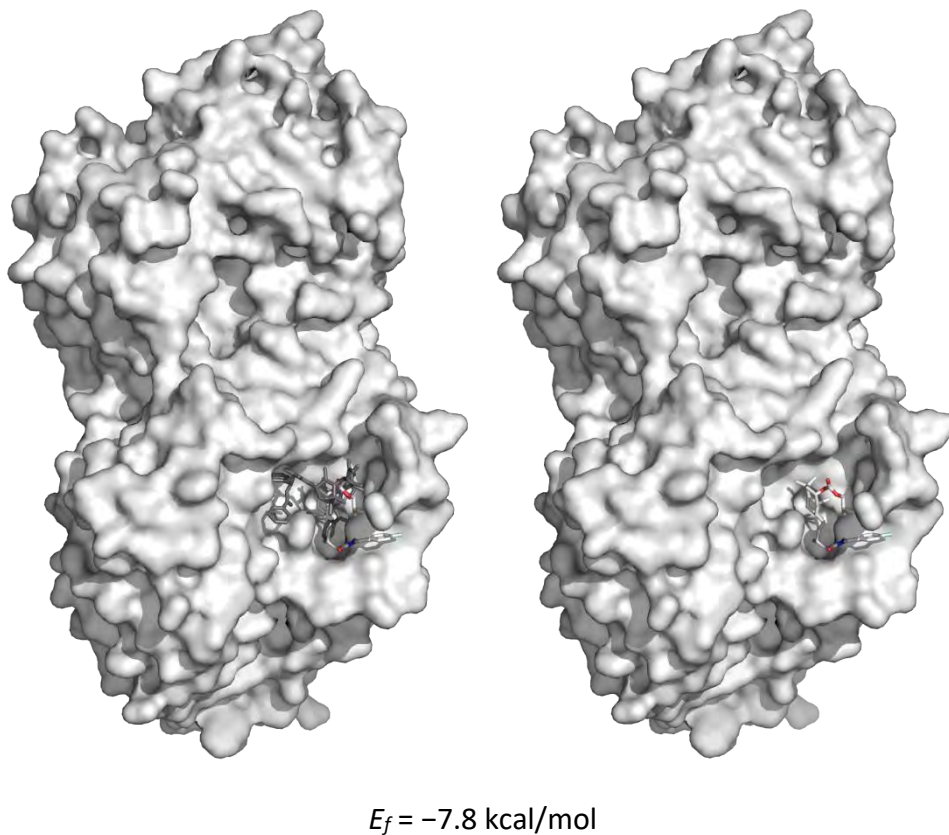


Figura 58. Interacción del derivado **38** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

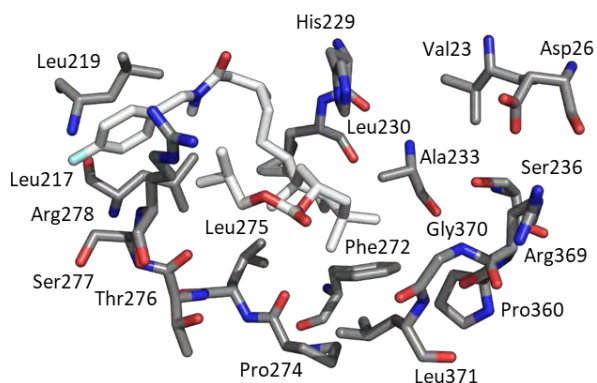


Figura 59. Interacción de **38** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.9. Anclaje molecular del derivado 39

No obstante que la única diferencia entre los derivados **37**, **38** y **39**, solo radica en la sustitución en el C-2 del diterpeno la conformación que estos adoptan es diferente, así como el modo de interacción con la tubulina. **39** dirige al grupo acetato hacia Asp26.

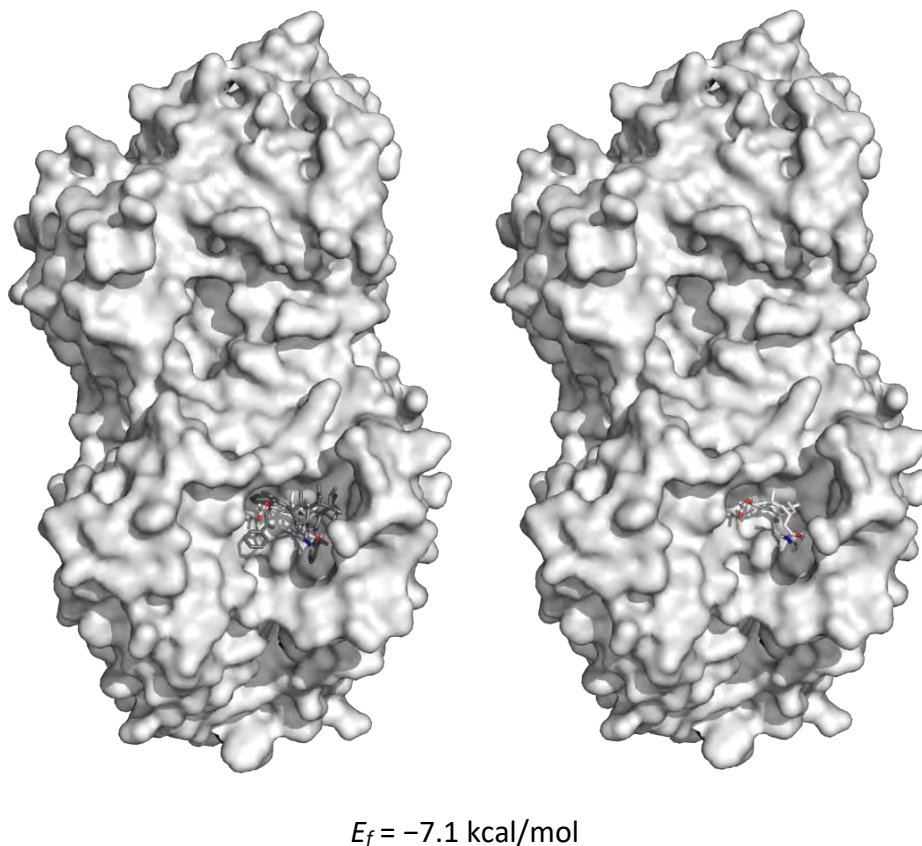


Figura 60. Interacción del derivado **39** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

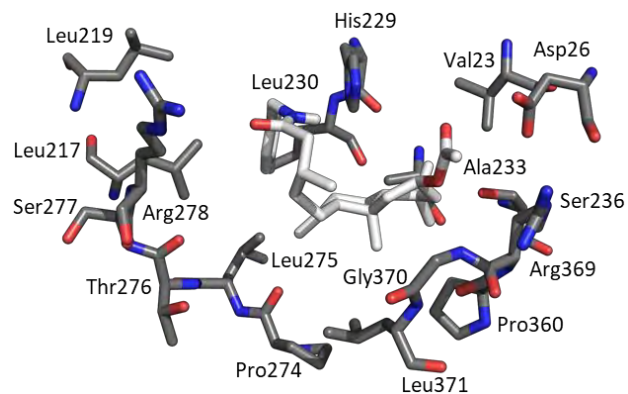


Figura 61. Interacción de **39** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.10. Anclaje molecular del derivado 41

El derivado **41** orienta el grupo hidroxilo hacia los oxígenos de los aminoácidos Arg278, Ser277 y Thr276.

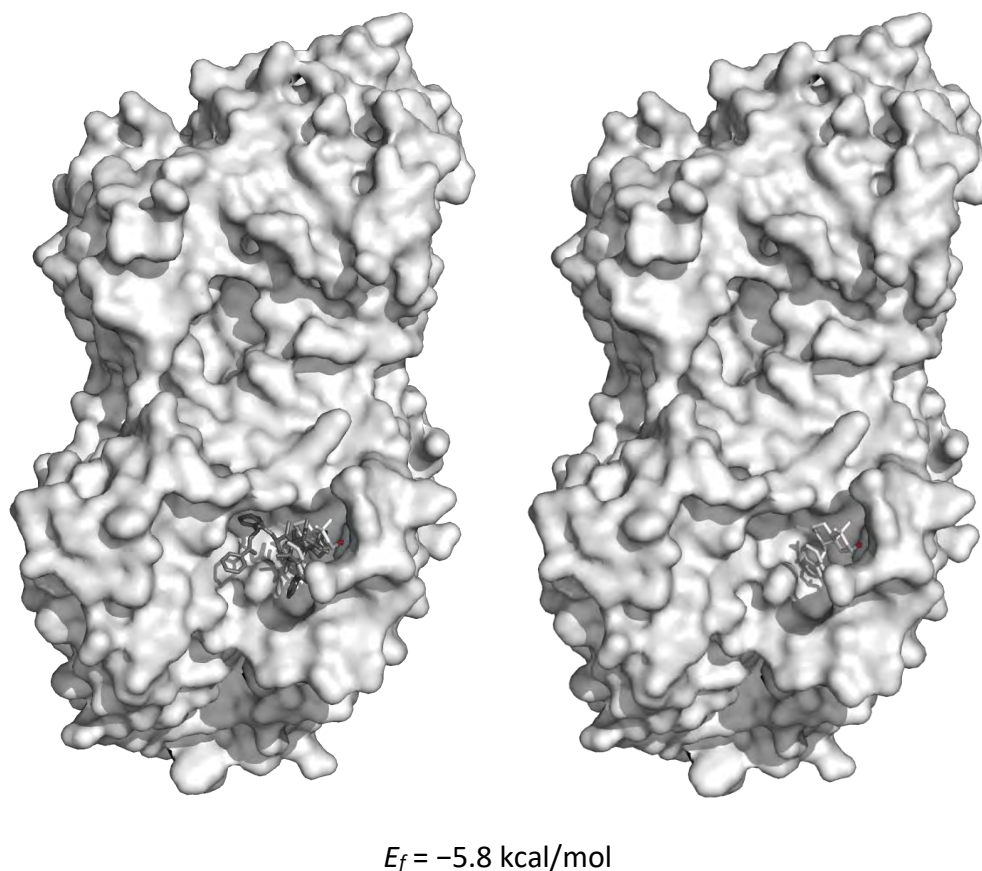


Figura 62. Interacción del derivado **41** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

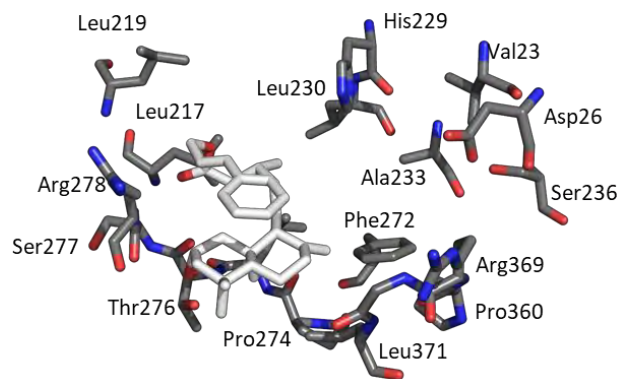
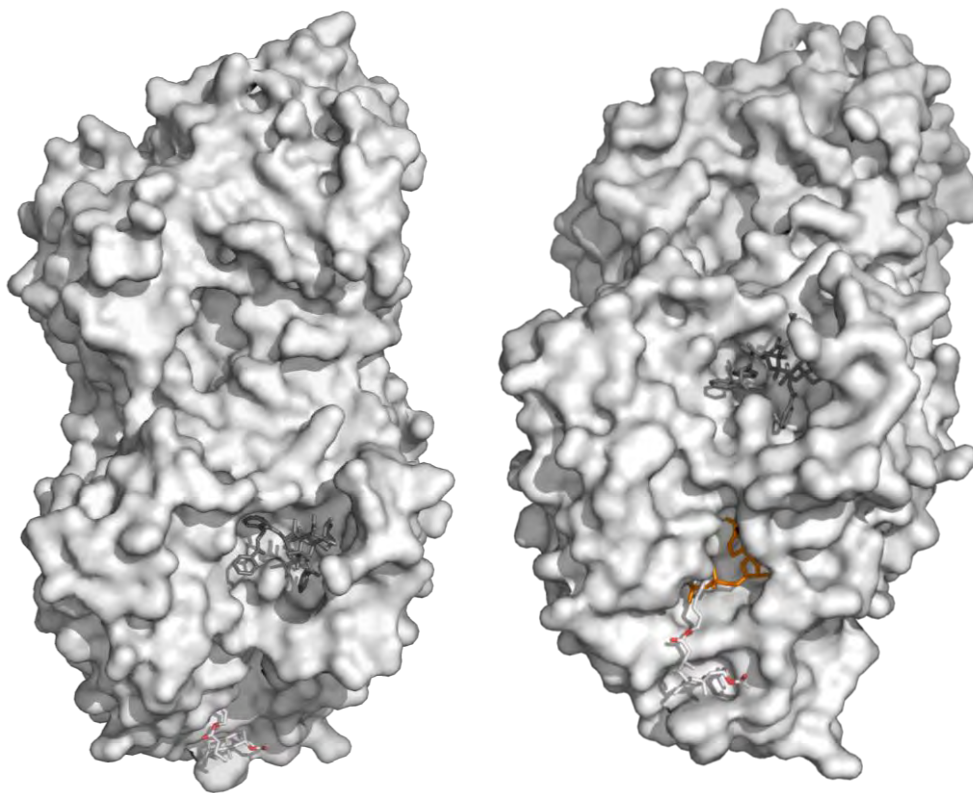


Figura 63. Interacción de **41** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.11. Anclaje molecular del derivado 42

Aunque **42** no mantiene el mismo sitio de unión que el paclitaxel, este se ancla cerca del sitio ocupado por el GDP dentro de la β -tubulina.

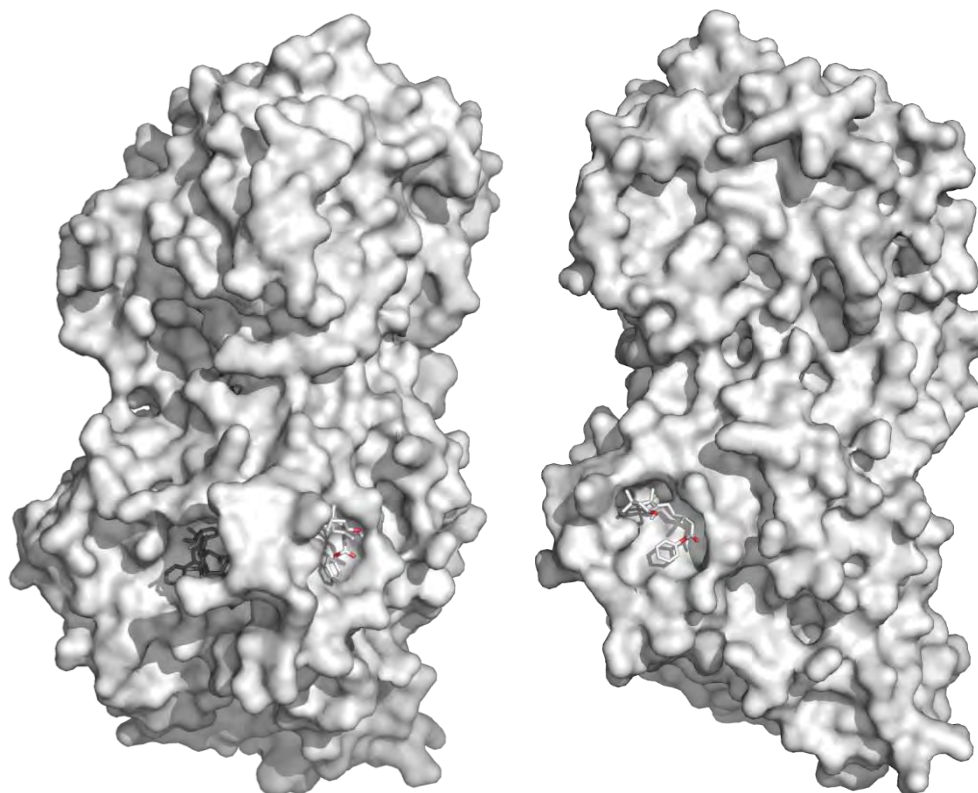


$$E_f = -7.8 \text{ kcal/mol}$$

Figura 64. Interacción de **42** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina (GDP, naranja).

5.5.2.12. Anclaje molecular del derivado 44

El derivado **44** tiene su sitio de unión justo por la parte posterior a donde se une el paclitaxel.

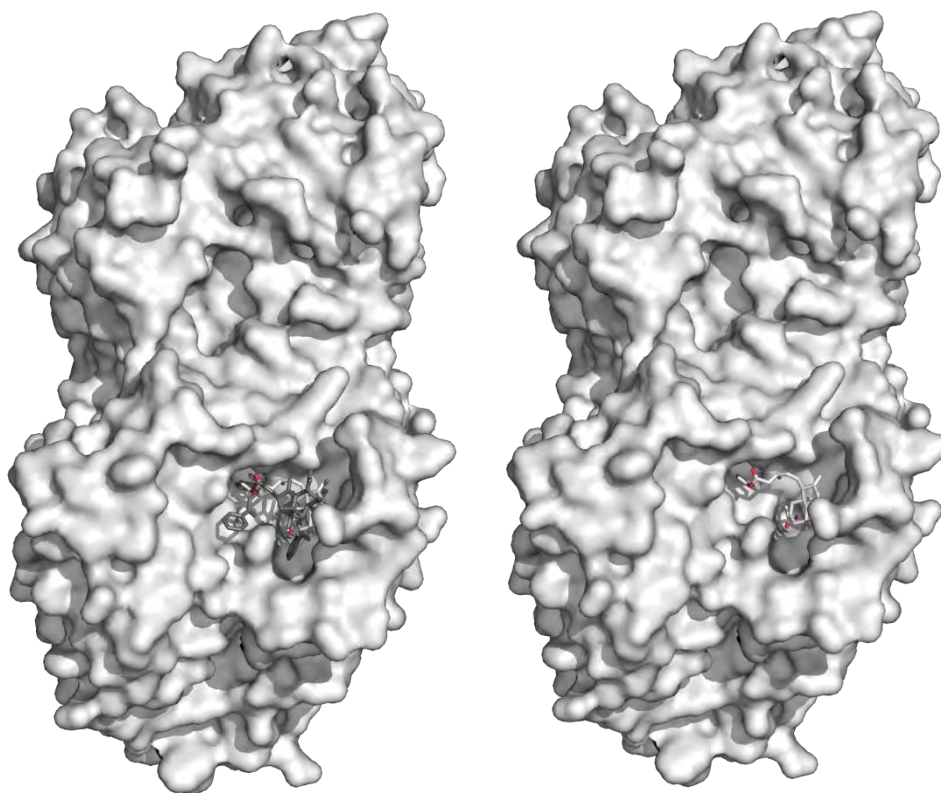


$$E_f = -7.1 \text{ kcal/mol}$$

Figura 65. Interacción del derivado **44** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

5.5.2.13. Anclaje molecular del derivado 45

Aunque la única diferencia entre el derivado **44** y **45** es la sustitución en C-2 donde **44** posee un grupo hidroxilo, mientras que **45** un grupo acetato, ambos derivados muestran diferente afinidad y sitio de unión con la tubulina.



$$E_f = -7.7 \text{ kcal/mol}$$

Figura 66. Interacción del derivado **45** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

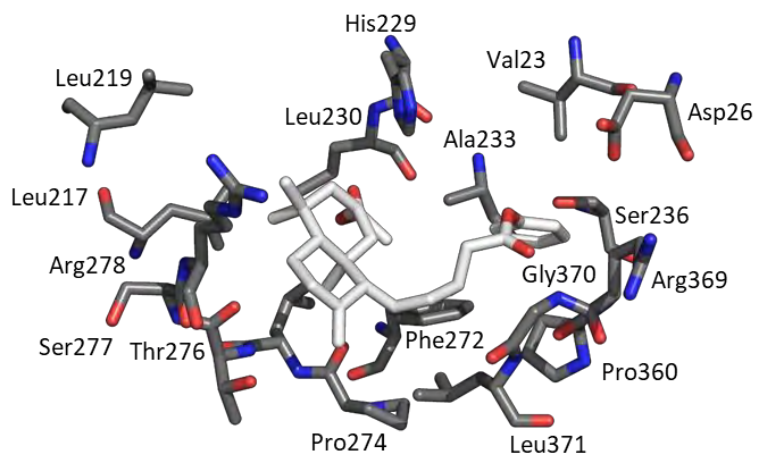
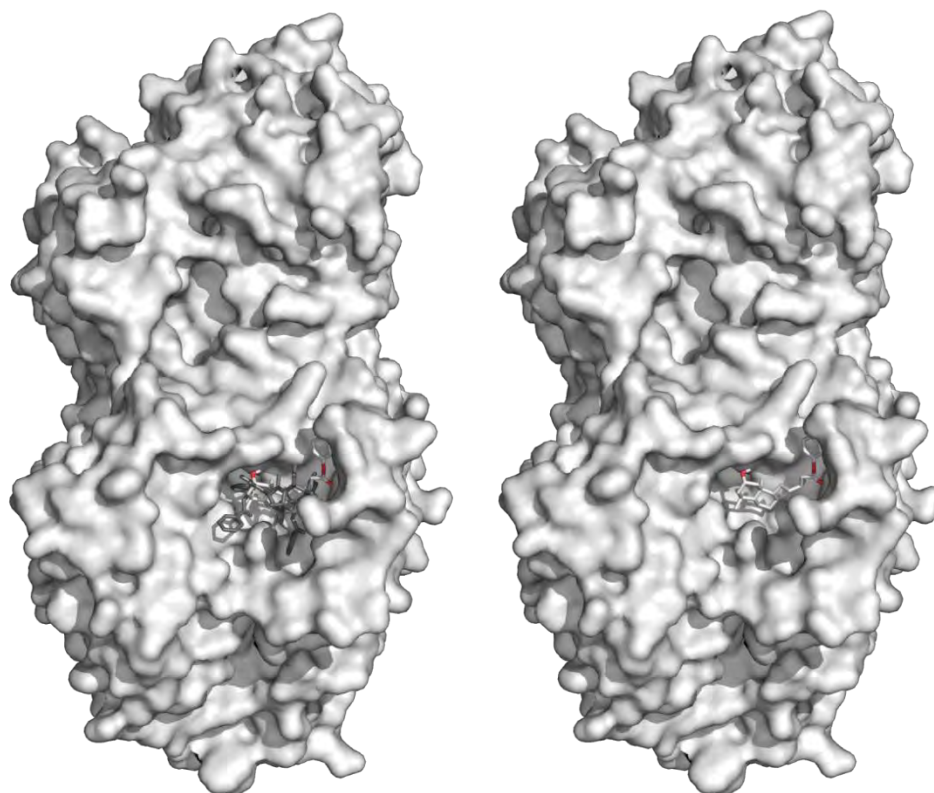


Figura 67. Interacción de **45** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.14. Anclaje molecular del derivado 47

El derivado **47** orienta al grupo aromático halogenado al fondo de la cavidad detrás del residuo Arg278, del mismo modo que lo hace el derivado **37**.



$$E_f = -7.8 \text{ kcal/mol}$$

Figura 68. Interacción del derivado **47** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

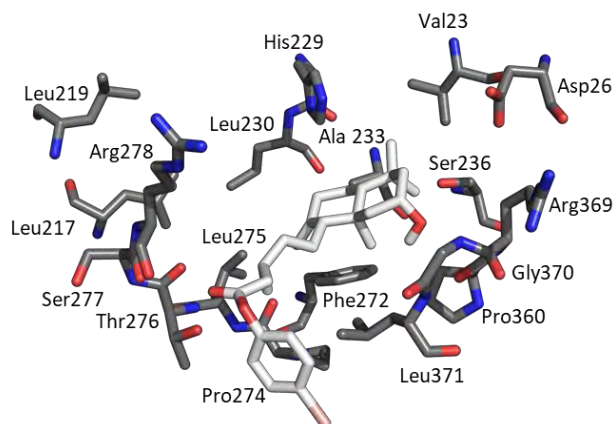
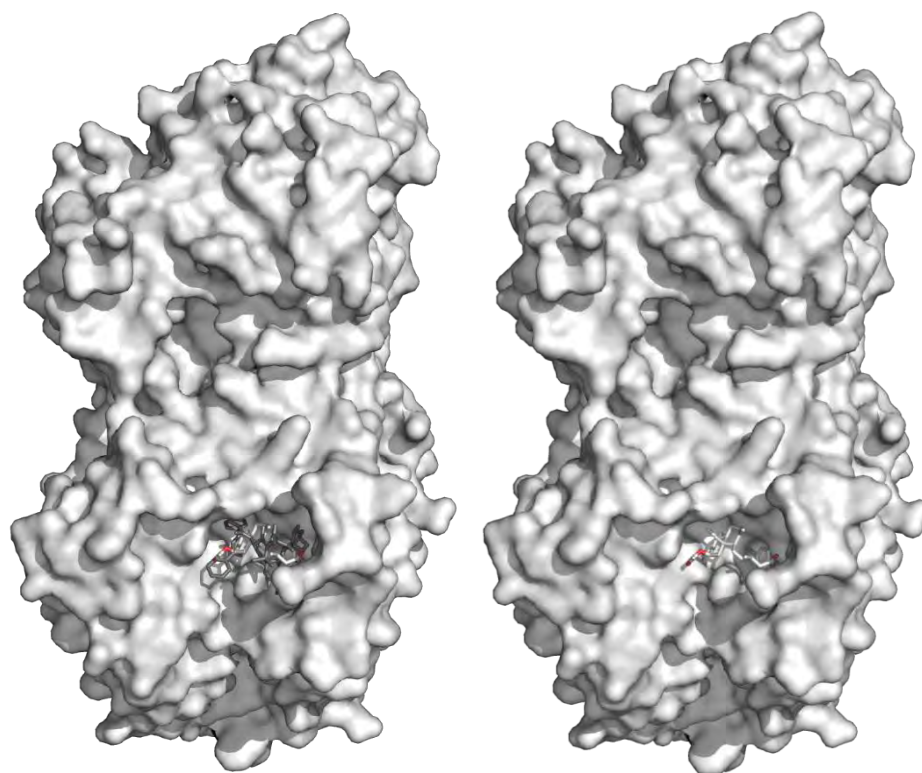


Figura 69. Interacción de **47** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

5.5.2.15. Anclaje molecular del derivado 48

El derivado **48** tiene como sitio de unión el mismo que el paclitaxel, en donde orienta al grupo éster de la posición C-15 hacia los residuos de aminoácido Arg278, Ser277 y Thr276, mientras que el grupo éster de la posición C-2 se dirige hacia Asp26.



$$E_f = -6.7 \text{ kcal/mol}$$

Figura 70. Interacción del derivado **48** (blanco) y el paclitaxel (gris) sobre la tubulina.

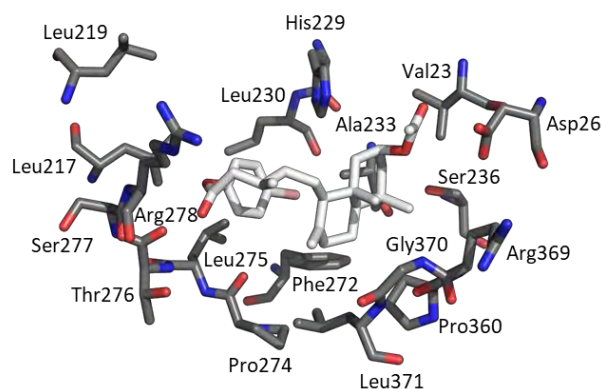


Figura 71. Interacción de **48** con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión.

Tabla 2. Energía de afinidad de los *ent*-labdanos a la tubulina

| Derivado | E_f (kcal/mol) | Derivado | E_f (kcal/mol) |
|-------------------------|------------------|-----------|------------------|
| Paclitaxel (3) | -10.0 | 38 | -7.8 |
| 23 | -8.5 | 39 | -7.1 |
| 27 | -7.9 | 41 | -5.8 |
| 30 | -6.8 | 42 | -7.8 |
| 32 | -6.5 | 44 | -7.1 |
| 34 | -6.4 | 45 | -7.7 |
| 35 | -8.7 | 47 | -7.8 |
| 37 | -7.6 | 48 | -6.7 |

5.6. Ensayos del equilibrio dinámico de la tubulina frente a derivados diterpénicos

El ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**), junto con los derivados **11b**, **11c**, **18**, **19**, **21**, **22** y **23** a una concentración de 200 μ M fueron sometidos a pruebas de polimerización de α - y β -tubulina *in vitro*, empleando como control negativo DMSO y como control positivo paclitaxel a una concentración de 20 μ M, mientras que la tubulina (proteína de cerebro de porcino) se utilizó a una concentración de 2 mg/ml. El ensayo se realizó por triplicado, utilizando una placa de 96 pozos que se introdujo en un espectrofotómetro BioTek ELx808IU y las lecturas se realizaron a 340 nm. Debido a que el proceso de ensamblaje de microtúbulos es endotérmico, las pruebas *in vitro* se llevaron a cabo a una temperatura de 37 °C, las lecturas se realizaron cada minuto durante 60 minutos, posteriormente se disminuyó la temperatura hasta 4 °C durante 30 minutos, debido a que cuando la temperatura desciende, los microtúbulos se despolimerizan, por lo cual un ligando estabilizador de microtúbulos como el paclitaxel mantiene el efecto aún sobre la despolimerización de éstos inducida al disminuir la temperatura, posteriormente se continuaron con las lecturas a 37 °C durante 30 minutos más.

Los compuestos **17**, **18** y **19** no mostraron una actividad favorable frente a la tubulina en comparación con el paclitaxel (Figura 72), es importante mencionar que los tres poseen un grupo carboxilo en la posición C-15.

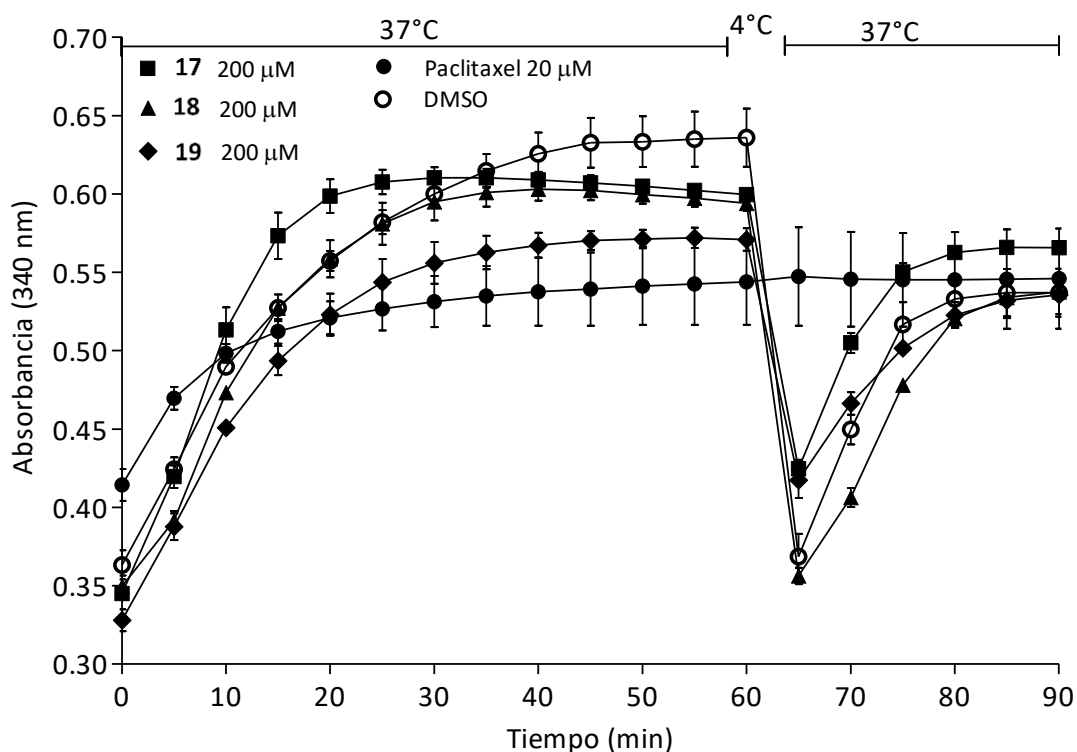


Figura 72. Efecto de los derivados **17**, **18** y **19** sobre la polimerización de tubulina.

El siguiente grupo de compuestos sometidos a pruebas de polimerización de tubulina fueron los derivados **11b**, **11c** y **22** (Figura 73), los cuales poseen un éster metílico en la posición C-15, estos presentaron actividad en el ensayo aumentando la velocidad de polimerización, aunque al disminuir la temperatura ocurre despolimerización de los microtúbulos, posteriormente la polimerización se recupera.

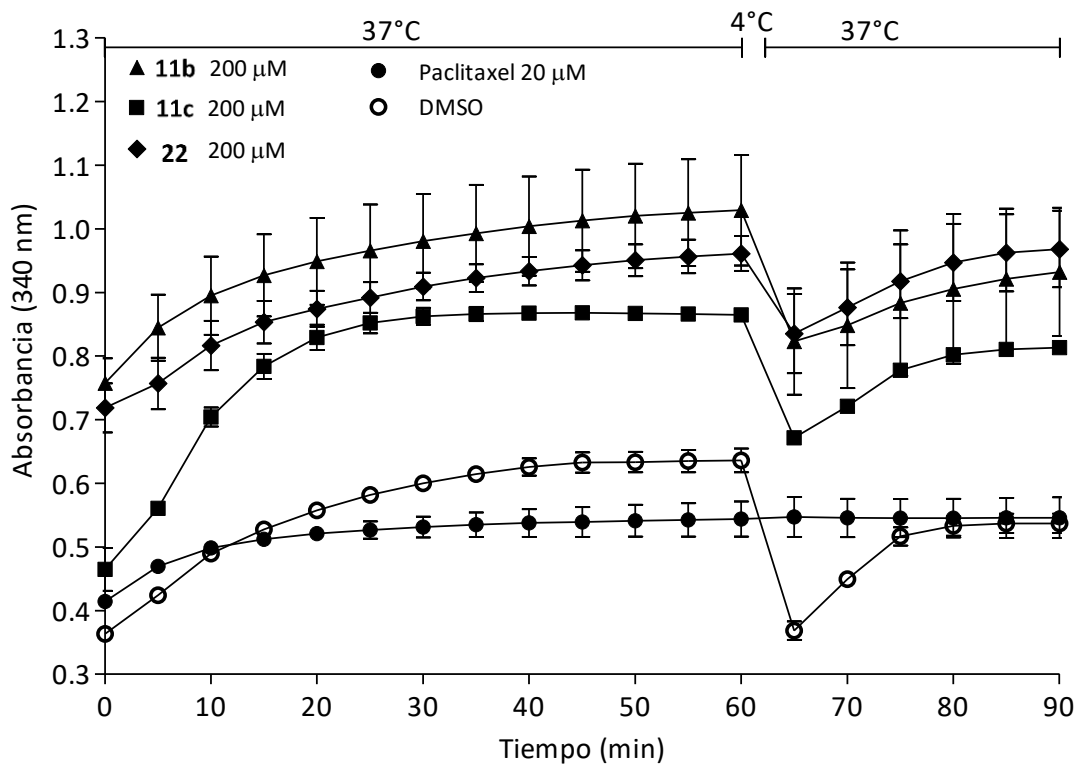


Figura 73. Efecto de los derivados **11b**, **11c** y **22** sobre la polimerización de tubulina.

El compuesto **21** al igual que los derivados **11c** y **18** posee un éster de acetato en la posición C-2, y a diferencia de estos cuenta con una función amida en la posición C-15, la cual es responsable de la notable actividad que tiene frente a la polimerización de tubulina. Y al disminuir la temperatura la despolimerización ocurre en menor grado que en los derivados que no presentan esta función en C-15.

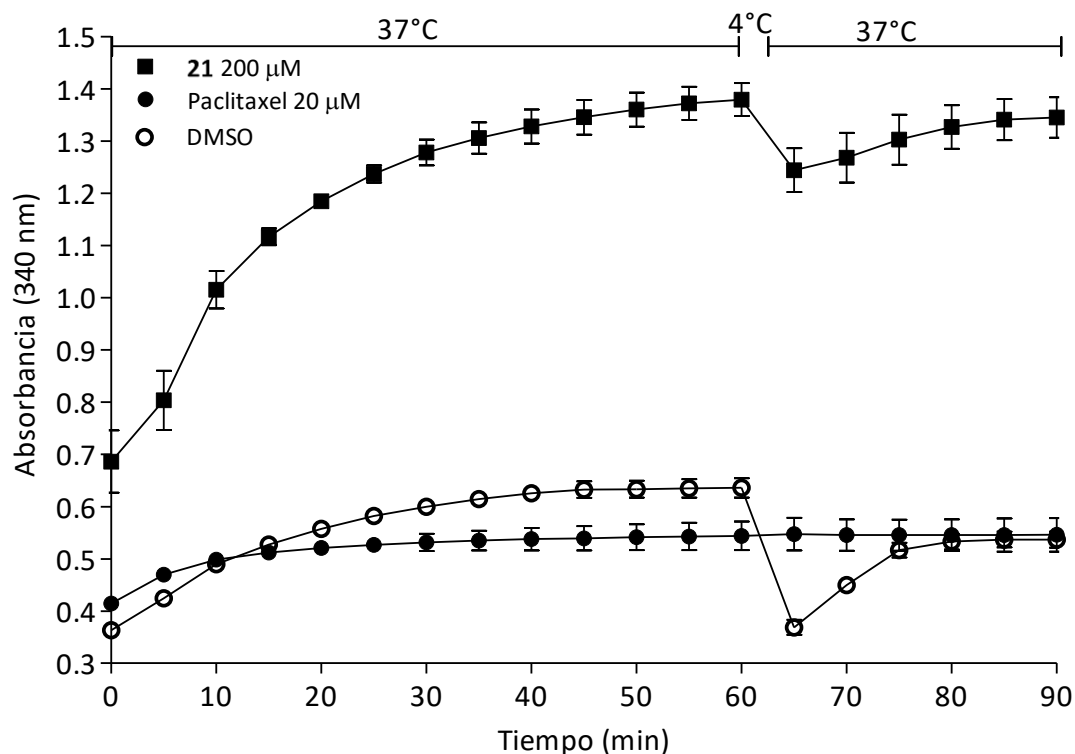


Figura 74. Efecto del derivado **21** sobre la polimerización de tubulina.

Por último el derivado **23**, el cual posee un éster de cinamato en la posición C-2 y una función amida en la posición C-15, es el que muestra mayor actividad como estabilizador de microtúbulos al disminuir la temperatura presenta menor despolimerización en comparación con el resto de los derivados ensayados. En trabajos previos **23** había sido sometido a estudios de anclaje molecular (docking) mostrando interacción en el mismo sitio activo que el ocupado por el paclitaxel, esta actividad se le puede atribuir a los anillos aromáticos presentes en la estructura.

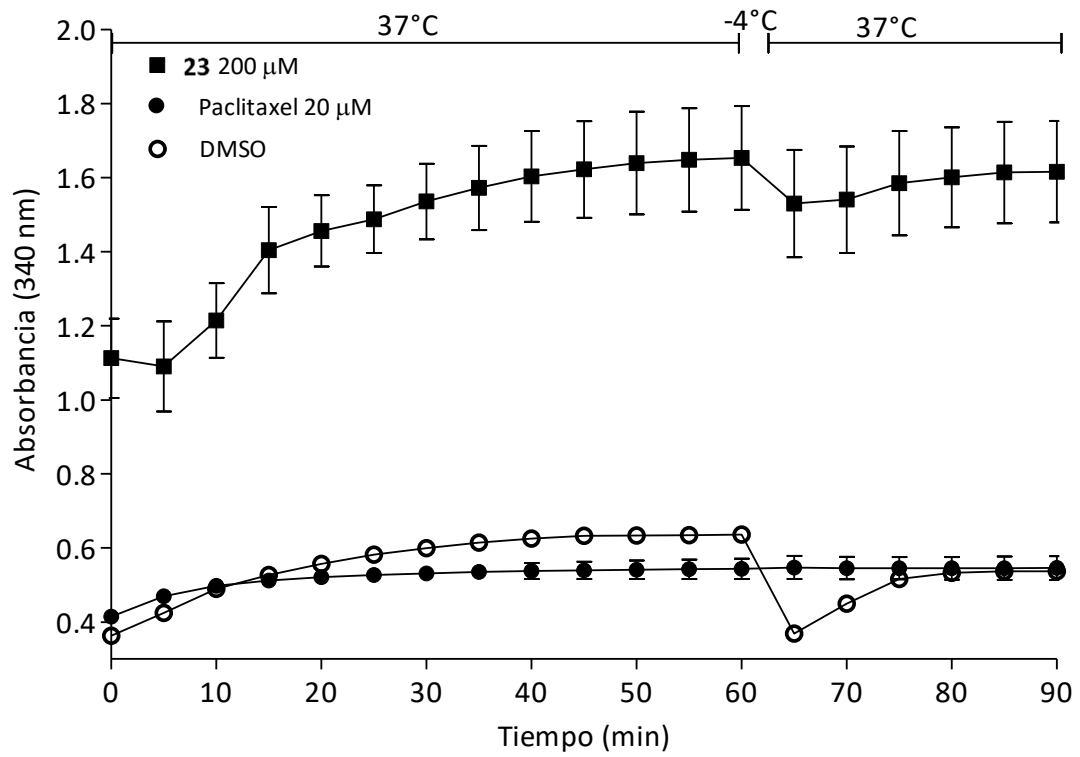


Figura 75. Efecto del derivado **23** sobre la polimerización de tubulina.

6. CONCLUSIONES

A partir del producto natural **17** y mediante la activación de grupo carboxilo empleando principalmente CDI fue posible la obtención de diferentes amidas y ésteres, en cuyas estructuras podemos encontrar sistemas aromáticos, enlaces dobles, aminas y halógenos como flúor y bromo.

Los estudios de anclaje molecular de los derivados preparados mostraron que **35** y **23** son los ligandos con mayor afinidad a la tubulina con E_f de -8.7 y -8.5 kcal/mol, respectivamente, además el sitio de unión es el mismo que ocupa el paclitaxel en la proteína.

Dentro del estudio del equilibrio dinámico de la tubulina frente a derivados diterpénicos ensayados *in vitro* se observó que **23** muestra mayor actividad como estabilizador de microtúbulos, seguido del derivado **21**. En cuanto a la actividad deseada sobre el equilibrio dinámico de los microtúbulos como blanco farmacológico de los compuesto obtenidos en el presente trabajo, el caso más notable fue **23**, el cual mostró actividad tanto en los estudios *in vitro* como *in silico*.

Debido a lo anterior se confirma que el diterpeno *ent*-labdano ácido 2 α -hidroxieperuico (**17**) es un precursor potencial para la preparación de estructuras con interés farmacológico, especialmente para generar fármacos con actividad anticancerosa. Por lo que es importante profundizar con la exploración química y biológica tanto de **17** como de sus derivados.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Generalidades

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

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 300 MHz y de ^{13}C a 75 MHz, así como los experimentos COSY, NOESY, HSQC y HMBC se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400. Empleando como disolvente CDCl_3 y como referencia se utilizó TMS.

Los espectros de masa se determinaron en un sistema acoplado de cromatografía de gases/espectrometría de masa con una trampa iónica Varian Saturn 2000.

La rotación óptica se determinó empleando un polarímetro Perkin Elmer 341, utilizando CDCl_3 como disolvente.

La obtención de los espectros de Infrarrojo (IR) se realizó en un espectrofotómetro BUCK Scientific 500, empleando como disolvente CDCl_3 .

La rotación óptica, los espectros de IR, masa y RMN de ^1H a 300 MHz y de ^{13}C a 75 MHz, se determinaron en el Departamento de Química del CINVESTAV-IPN, México.

7.2. Colecta de la especie vegetal

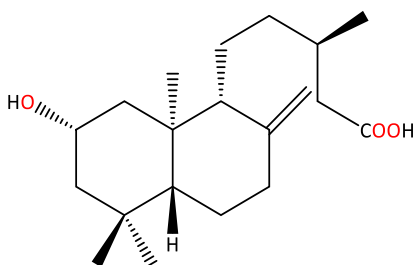
Las flores de *Ageratina petiolaris* fueron colectadas el 28 de febrero de 2016 y 18 de febrero de 2017 en San Joaquín Morelos, Municipio de Tlalpujahuá, Michoacán a 2592 msnm (19°44'48.99" Norte, 100°14'45.37" Oeste) y se dejaron secar a la sombra para su posterior procesamiento.

7.3. Obtención del extracto hexánico de flor de *Ageratina petiolaris*

Se tomaron 493 g de flores secas y sometieron a maceración con 3 L de hexano durante 7 días, se filtró y se concentró en rotavapor, este procedimiento se repitió 4 veces para el mismo lote obteniendo una miel color verde oscuro (10% de rendimiento).

7.4. Obtención del ácido 2 α -hidroxieperuico (17)

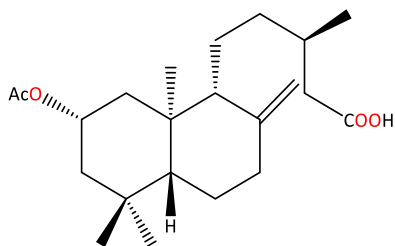
Un lote de 10 g de extracto hexánico de flor de *A. petiolaris* se disolvió en 100 mL de metanol, se agregaron 10 g de hidróxido de potasio y 0.5 mL de agua. La mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 3 horas, posteriormente se agregó 200 mL de ácido clorhídrico al 10% hasta llegar a un pH de 3. Se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo en un embudo de separación. Se lavó 4 veces con agua agitando ligeramente y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se concentró en rotavapor hasta sequedad y se obtuvo un producto verde con olor característico. El producto de reacción se sometió a cromatografía en columna abierta, de las fracciones eluidas con hexano:acetato de etilo (7:3) se obtuvieron 2.0 g del ácido 2 α -hidroxieperuico en forma de agujas con 20% de rendimiento.



Agujas incoloras, p.f. 127-128 °C; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4.84 (1H, s, H-17a), 4.50 (1H, s, H-17b), 4.17 (1H, quint, $J = 5.4$ Hz, H-2), 2.39 (1H, m, H-7a), 2.39 (1H, dd, $J = 14.7, 5.4$ Hz, H-14a), 2.12 (1H, dd, $J = 14.7, 8.4$ Hz, H-14b), 1.95 (1H, m, H-7b), 1.94 (1H, m, H-13), 1.77 (1H, m, H-1a), 1.71 (1H, m, H-6a), 1.64 (1H, m, H-3a), 1.61 (1H, m, H-1b), 1.57 (1H, m, H-9), 1.51 (1H, m, H-12a), 1.49 (1H, m, H-3b), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.42 (1H, m, H-6b), 1.15 (2H, dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, H-5), 1.03 (1H, m, H-12b), 0.99 (3H, s, H-18), 0.98 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 178.9 (C-15), 148.0 (C-8), 107.0 (C-17), 67.8 (C-2), 57.6 (C-9), 53.1 (C-5), 46.4 (C-3), 45.7 (C-1), 41.3 (C-14), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 36.0 (C-12), 33.3 (C-19), 33.0 (C-4), 30.9 (C-13), 24.6 (C-18), 24.5 (C-6), 21.5 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20).

7.5. Obtención del ácido 2 α -acetoxieperuico (18)

A una solución de 500 mg de **17** en 10 mL de piridina, se agregaron 5 mL de anhídrido acético, se calentó en baño de vapor durante 24 horas, se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó 3 veces con ácido clorhídrico al 10% y 4 veces con agua agitando ligeramente, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró en rotavapor, se obtuvo un crudo de reacción con color ámbar. El producto de la reacción se purificó en columna cromatográfica, de las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo (8:2) se obtuvo un aceite denso incoloro con un 92% de rendimiento.

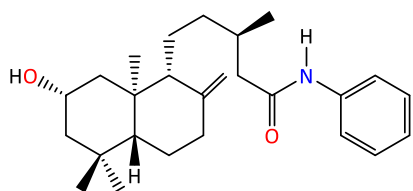


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.15 (1H, quint, $J = 4.4$ Hz, H-2), 4.86 (1H, s, H-17a), 4.51 (1H, s, H-17b), 2.38 (2H, m, H-7a), 2.37 (1H, dd, $J = 14.9, 5.4$ Hz, H-14a), 2.12 (1H, dd, $J = 14.9, 8.4$, H-14b), 2.03 (3H, s, H-22), 1.99 (1H, m, H-1a), 1.93 (1H, m, H-13), 1.70 (1H, m, H-6a), 1.70 (1H, m, H-3a), 1.50 (1H, m, H-9), 1.47 (1H, m, H-12a), 1.45 (1H, m, H-3b), 1.42 (1H, m, H-1b), 1.42 (1H, m, H-6b), 1.89 (1H, dd, $J = 12.5, 2.6$ Hz, H-5), 1.0 (1H, m, H-12b), 0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 179.3 (C-15), 170.6 (C-21), 147.6 (C-8), 107.1 (C-17), 70.6 (C-2), 57.5 (C-9), 54.0 (C-5), 43.3 (C-3), 41.7 (C-1), 41.3 (C-14), 39.0 (C-10), 38.1 (C-7), 35.8 (C-12), 33.7 (C-19), 32.8 (C-4), 30.9 (C-13), 24.1 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-22), 21.2 (C-11), 19.8 (C-16), 16.0 (C-20).

7.6. Obtención del derivado 27

En un trabajo previo dentro del grupo de investigación se preparó el derivado **21**.³⁶ En un matraz balón se disolvieron 25 mg de **21** en 3 mL de metanol, se agregaron 0.20 mg de hidróxido de potasio y una gota de agua. La mezcla de reacción se llevó a reflujo durante 3 horas, se agregó 20 mL de ácido clorhídrico al 10% hasta llegar a un pH de 3. Se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo, se lavó 4 veces con agua agitando ligeramente y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se concentró en rotavapor hasta sequedad y se obtuvo un aceite denso incoloro. El producto de la reacción se sometió a cromatografía en

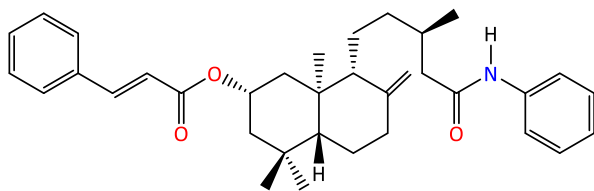
columna abierta, de las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo (7:3) se obtuvieron 22 mg del producto con un 86% de rendimiento.



$[\alpha]_{589} -30$, $[\alpha]_{578} -32$, $[\alpha]_{546} -35$, $[\alpha]_{436} -58$, $[\alpha]_{365} -85$, (c 0.81, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 3596, 3422, 2919, 1681, 1597, 1517, 1437 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.52 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-22 y H-26), 7.32 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-23 y H-25), 7.11 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-24), 4.84 (1H, s, H-17a), 4.50 (1H, s, H-17b), 4.15 (1H, quint, $J = 5.3$ Hz, H-2), 2.41 (1H, dd, $J = 15.2, 4.1$ Hz, H-14a), 2.38 (1H, m, H-7a), 2.07 (1H, m, H-14b), 2.06 (1H, m, H-13), 1.94 (1H, m, H-7b), 1.77 (1H, m, H-1a), 1.70 (1H, m, H-6a), 1.63 (1H, dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, H-3a), 1.58 (1H, m, H-1b), 1.57 (1H, m, H-9), 1.54 (1H, m, H-11a), 1.54 (1H, m, H-12a), 1.45 (1H, dd, $J = 13.4, 4.1$ Hz, H-3b), 1.39 (1H, m, H-11b), 1.38 (1H, m, H-6b), 1.16 (1H, dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, H-5), 1.05 (1H, m, H-12b), 1.01 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-16), 0.99 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 170.7 (C-15), 148.0 (C-8), 137.8 (C-21), 128.9 (C-23 y C-25), 124.2 (C-24), 119.8 (C-22 y C-26), 106.9 (C-17), 67.8 (C-2), 57.6 (C-9), 53.1 (C-5), 46.5 (C-3), 45.8 (C-1), 45.3 (C-14), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 36.1 (C-12), 33.2 (C-19), 33.0 (C-4), 31.5 (C-13), 24.6 (C-6), 24.5 (C-18), 21.5 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20); EIMS m/z 415 $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ (1), 381 (3), 365 (25), 297 (21), 207 (3), 135 (27), 93 (100), 77 (16).

7.7. Obtención del derivado 23

A una solución de 19 mg de **27** en 1 mL de piridina, se adicionaron 100 mg de cloruro de cinamoilo (**28**), la mezcla se dejó reaccionar por 8 horas en baño de vapor. Transcurrido el tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico al 10% y agua; posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna empleando mezclas de hexano-acetato de etilo, en orden ascendente de polaridad, de las fracciones eluidas con una polaridad 9:1, se obtuvieron 22 mg de un aceite denso incoloro (88%).



$[\alpha]_{589} +29$, $[\alpha]_{578} +31$, $[\alpha]_{546} +37$, $[\alpha]_{436} +85$,
 (c 0.7, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 3425, 2923,
 1695, 1515, 1438, cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃,
 300 MHz) δ 7.66 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-29),

7.52 (2H, d, $J = 7.6$, H-22 y H-26), 7.52 (2H, m, H-31 y H-35), 7.38 (2H, m, H-32 y H-34), 7.38
 (1H, m, H-33), 7.32 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-23 y H-25), 7.16 (1H, s, N-H), 7.09 (1H, t, $J = 7.6$ Hz,
 H-24), 6.41 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-28), 5.28 (1H, quint, $J = 4.4$ Hz, H-2), 4.87 (1H, s, H-17a),
 4.52 (1H, s, H-17b), 2.40 (1H, m, H-7a), 2.40 (1H, m, H-14a), 2.11 (1H, m, H-1a), 2.06 (1H, m,
 H-14b), 2.05 (1H, m, H-13), 1.97 (1H, dd, $J = 12.6, 4.4$ Hz, H-7b), 1.85 (1H, m, H-3a), 1.77 (1H,
 m, H-6a), 1.59 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-9), 1.54 (1H, m, H-11a), 1.54 (1H, m, H-12a), 1.51 (1H,
 m, H-1b), 1.51 (1H, m, H-3b), 1.42 (1H, m, H-6b), 1.40 (1H, m, H-11b), 1.40 (1H, m, H-12b),
 1.23 (1H, m, H-5), 1.03 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-16), 0.95 (3H, s, H-19), 0.92
 (3H, s, H-20); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 170.7 (C-15), 166.5 (C-27), 147.7 (C-8), 144.5 (C-
 29), 137.9 (C-21), 134.4 (C-30), 130.2 (C-32 y C-34), 128.9 (C-23 y C-25), 128.8 (C-33), 128.0
 (C-31 y C-35), 124.1 (C-24), 119.8 (C-22 y C-26), 118.8 (C-28), 107.3 (C-17), 71.0 (C-2), 57.6
 (C-9), 54.1 (C-5), 45.2 (C-14), 43.5 (C-3), 41.9 (C-1), 39.1 (C-10), 38.1 (C-7), 36.0 (C-12), 33.7
 (C-19), 32.9 (C-4), 31.4 (C-13), 24.1 (C-6), 23.6 (C-18), 21.1 (C-11), 19.8 (C-16), 16.2 (C-20);
 EIMS m/z 526 [M - H]⁺ (1), 365 (7), 258 (27), 207 (10), 135 (48), 119 (61), 93 (100).

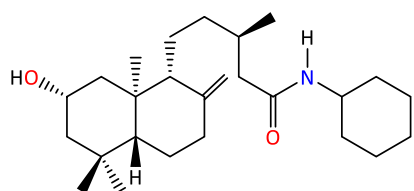
7.8. Obtención de amidas y ésteres empelando CDI como activador del grupo carboxilo.

Metodología general: El diterpeno tipo *ent*-labdano se coloca en un matraz balón de 5 mL, se adiciona 1.5 eq de CDI y 3 mL de THF, la reacción se lleva a cabo en baño ultrasónico durante 60 min, posteriormente se adiciona 3.0 eq de la amina o el éster según corresponda y se mantiene en baño ultrasónico durante 60 min, transcurrido el tiempo se coloca sobre hielo y se extrae utilizando acetato de etilo, se lava 2 veces con agua, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se concentra en rotavapor y se purifica por cromatografía en columna.

Tabla 3. Amidas y ésteres obtenidos a partir del *ent*-labdano de *A. petiolaris*.

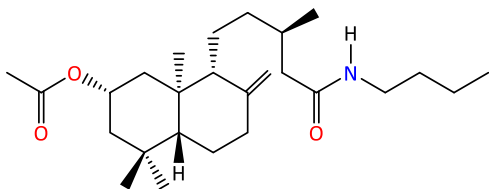
| | Ácido 2 α -hidroxieperuico (17) | Ácido 2 α -acetoxieperuico (18) |
|---------------------------|---|---|
| Ciclohexilamina (29) | 30 | – |
| <i>n</i> -Butilamina (31) | – | 32 |
| 2-Aminodifenilamina (33) | 34 | 35 |
| 4-Fluorobencilamina (36) | 37 | 39 |
| Alcohol de cinamilo (40) | 41 | 42 |
| Fenol (43) | 44 | 45 |
| 4-Bromofenol (46) | 47 | 48 |

7.8.1. Derivado 30



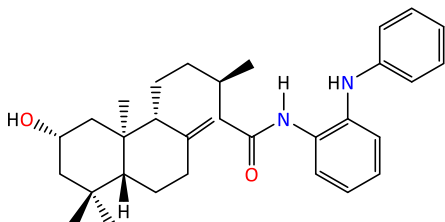
$[\alpha]_{589} -31$, $[\alpha]_{578} -33$, $[\alpha]_{546} -37$, $[\alpha]_{436} -61$, $[\alpha]_{365} -93$, (c 0.38, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 3594, 3426, 2924, 2848, 1654, 1507 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5.22 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, N-H), 4.85 (1H, s, H-17a), 4.49 (1H, s, H-17b), 4.16 (1H, quint, $J = 5.3$ Hz, H-2), 3.77 (1H, m, H-21), 2.38 (1H, ddd, $J = 3.8, 2.6$ Hz, H-7a), 2.11 (1H, m, H-14a), 1.95 (1H, m, H-7b), 1.91 (1H, m, H-13), 1.90 (4H, m, H-23 y H-25), 1.88 (1H, m, H-14b), 1.77 (1H, m, H-1a), 1.68 (1H, m, H-6a), 1.64 (1H, m, H-3a), 1.60 (2H, m, H-24), 1.56 (1H, m, H-1b), 1.56 (1H, m, H-9), 1.46 (1H, m, H-3b), 1.43 (2H, m, H-11), 1.35 (1H, m, H-6b), 1.28 (1H, m, H-12a), 1.17 (4H, m, H-22 y H-26), 1.16 (1H, dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, H-5), 1.13 (1H, m, H-12b), 0.99 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.4 (C-15), 148.1 (C-8), 106.9 (C-17), 67.8 (C-2), 57.4 (C-9), 53.2 (C-5), 47.9 (C-21), 46.5 (C-3), 45.8 (C-1), 45.1 (C-14), 39.6 (C-10), 38.1 (C-7), 36.0 (C-12), 33.3 (C-19), 33.2 (C-23 y C-25), 33.0 (C-4), 31.3 (C-13), 25.5 (C-24), 24.8 (C-6), 24.5 (C-18), 24.5 (C-24 y C-26), 21.3 (C-11), 19.4 (C-16), 17.2 (C-20); EIMS m/z 402 $[\text{M} - \text{H}]^+$ (1), 386 (15), 370 (100), 302 (71), 264 (18), 196 (18), 168 (54), 100 (38), 83 (19).

7.8.2. Derivado 32



$[\alpha]_{589} -27$, $[\alpha]_{578} -29$, $[\alpha]_{546} -32$, $[\alpha]_{436} -54$, $[\alpha]_{365} -82$, (c 1.9, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 3435, 2950, 2865, 1724, 1658, 1514, 1378, 1263 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.43 (1H, t, $J = 5.3$ Hz, N-H), 5.14 (1H, quint, $J = 4.1$ Hz, H-2), 4.84 (1H, s, H-17a), 4.50 (1H, s, H-17b), 3.23 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-21), 2.38 (1H, m, H-7a), 2.19 (1H, m, H-14a), 2.02 (3H, s, H-26), 1.98 (1H, m, H-1a), 1.94 (1H, m, H-7b), 1.90 (1H, m, H-13), 1.87 (1H, m, H-14b), 1.73 (1H, m, H-3a), 1.73 (1H, m, H-6a), 1.54 (1H, m, H-9), 1.46 (1H, m, H-11a), 1.46 (1H, m, H-12a), 1.46 (2H, m, H-22), 1.43 (1H, m, H-3b), 1.42 (1H, m, H-1b), 1.37 (1H, m, H-6b), 1.33 (2H, m, H-23), 1.30 (1H, m, H-11b), 1.30 (1H, m, H-12b), 1.17 (1H, dd, $J = 12.6, 2.9$ Hz, H-5), 0.96 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-16), 0.91 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, t, $J = 5.6$ Hz, H-24), 0.86 (3H, s, H-20); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 172.5 (C-15), 170.6 (C-25), 147.7 (C-8), 107.2 (C-17), 70.7 (C-2), 57.6 (C-9), 54.0 (C-5), 44.4 (C-14), 43.3 (C-3), 41.8 (C-1), 39.1 (C-21), 39.0 (C-10), 38.1 (C-7), 36.0 (C-12), 33.7 (C-19), 32.8 (C-4), 31.7 (C-22), 31.4 (C-13), 24.1 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-26), 21.2 (C-11), 20.0 (C-23), 19.8 (C-16), 16.0 (C-20), 13.7 (C-24); EIMS m/z 419 [M]⁺ (1), 377 (1), 361 (8), 345 (100), 277 (67), 170 (24), 142 (57), 74 (50), 43 (43).

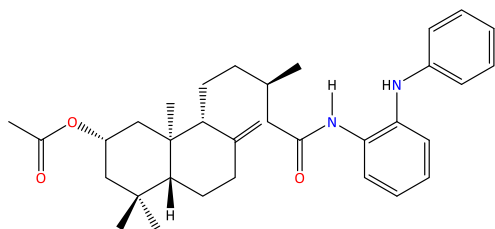
7.8.3. Derivado 34



$[\alpha]_{589} -28$, $[\alpha]_{578} -30$, $[\alpha]_{546} -38$, (c 0.25, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 3405, 2926, 1698, 1594, 1517, 1448, 1308 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.91 (1H, dd, $J = 6.7, 2.6$ Hz, H-26), 7.58 (1H, s, N-H), 7.25 (1H, m, H-23), 7.21 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-29 y H-31), 7.13 (1H, m, H-25), 7.11 (1H, m, H-24), 6.87 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-30), 6.78 (2H, d, $J = 7.9$ Hz, H-28 y H-32), 5.73 (1H, s, N-H), 4.81 (1H, s, H-17a), 4.47 (1H, s, H-17b), 4.12 (1H, quint, $J = 5.3$ Hz, H-2), 2.36 (1H, m, H-7a), 2.34 (1H, m, H-14a), 2.02 (1H, m, H-14b), 1.95 (1H, m, H-13), 1.90 (1H, m, H-7b), 1.72 (1H, m, H-1a), 1.67 (1H, m, H-6a), 1.62 (1H, m, H-3a), 1.53 (1H, m, H-1b), 1.49 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H,

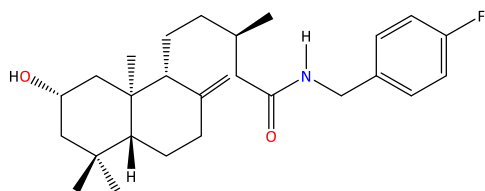
m, H-12a), 1.43 (1H, m, H-3b), 1.37 (1H, m, H-6b), 1.34 (1H, m, H-11b), 1.11 (1H, dd, $J = 12.3, 2.9$ Hz, H-5), 0.98 (1H, m, H-12b), 0.97 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.91 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.4 (C-15), 148.0 (C-8), 144.8 (C-27), 133.7 (C-22), 132.1 (C-21), 129.4 (C-29 y C-31), 125.4 (C-24), 124.8 (C-25), 123.8 (C-23), 122.5 (C-26), 120.2 (C-30), 116.1 (C-28 y C-32), 106.9 (C-17), 67.7 (C-2), 57.5 (C-9), 52.9 (C-5), 46.5 (C-3), 45.8 (C-1), 44.9 (C-14), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.2 (C-19), 33.0 (C-4), 31.5 (C-13), 24.6 (C-6), 24.5 (C-18), 21.2 (C-11), 19.8 (C-16), 17.3 (C-20).

7.8.4. Derivado 35



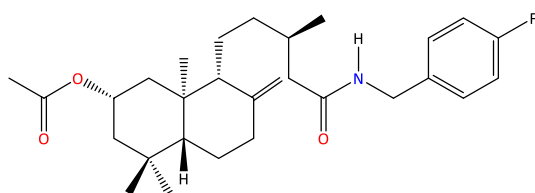
$[\alpha]_{589} -28$, $[\alpha]_{578} -33$, $[\alpha]_{546} -37$, $[\alpha]_{365} -89$, (c 0.18, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 3390, 2943, 2863, 1723, 1672, 1593, 1519, 1448, 1377, 1304, 1262 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.89 (1H, m, H-26), 7.59 (1H, s, N-H), 7.27 (1H, m, H-23), 7.21 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H-29 y H-31), 7.12 (1H, m, H-25), 7.11 (1H, m, H-24), 6.87 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-30), 6.79 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-28 y H-32), 5.73 (1H, s, N-H), 5.12 (1H, quint, $J = 4.1$ Hz, H-2), 4.83 (1H, s, H-17a), 4.48 (1H, s, H-17b), 2.38 (1H, m, H-7a), 2.34 (1H, m, H-14a), 2.03 (3H, s, H-34), 2.01 (1H, m, H-14b), 1.97 (1H, m, H-1a), 1.94 (1H, m, H-7b), 1.93 (1H, m, H-13), 1.74 (1H, m, H-3a), 1.74 (1H, m, H-6a), 1.51 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-12a), 1.45 (1H, m, H-11a), 1.41 (1H, m, H-3b), 1.38 (1H, m, H-1b), 1.38 (1H, m, H-6b), 1.31 (1H, m, H-11b), 1.16 (1H, dd, $J = 12.3, 2.6$ Hz, H-5), 0.98 (1H, m, H-12b), 0.97 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.91 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.3 (C-15), 170.0 (C-33), 147.7 (C-8), 144.8 (C-27), 133.8 (C-21), 131.9 (C-22), 129.3 (C-29 y C-31), 125.4 (C-25), 124.7 (C-24), 123.7 (C-23), 122.6 (C-26), 120.2 (C-30), 116.1 (C-28 y C-32), 107.2 (C-17), 70.7 (C-2), 57.5 (C-9), 53.6 (C-5), 44.9 (C-14), 43.3 (C-3), 41.7 (C-1), 39.0 (C-10), 38.0 (C-7), 35.8 (C-12), 33.7 (C-19), 32.8 (C-4), 31.4 (C-13), 24.1 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-34), 21.0 (C-11), 19.8 (C-16), 16.0 (C-20); EIMS m/z 532[M + H]⁺ (20) 471 (25), 454 (88), 318 (27), 264 (26), 236 (100), 208 (69).

7.8.5. Derivado 37



$[\alpha]_{589} -34$, $[\alpha]_{578} -36$, $[\alpha]_{546} -40$, $[\alpha]_{436} -68$, $[\alpha]_{365} -104$, (*c* 1.22, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 3591, 3438, 2931, 2861, 1660, 1508, 1464, 1365 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.24 (2H, m, H-23 y H-27), 7.01 (2H, m, H-24 y H-26), 5.72 (1H, t, *J* = 5.1 Hz, N-H), 4.85 (1H, s, H-17a), 4.48 (1H, s, H-17b), 4.41 (2H, m, H-21), 4.13 (1H, m, H-2), 2.30 (1H, m, H-7a), 2.24 (1H, m, H-14a), 1.94 (1H, m, H-13), 1.91 (1H, m, H-14b), 1.90 (1H, m, H-7b), 1.71 (1H, m, H-1a), 1.67 (1H, m, H-6a), 1.61 (1H, m, H-3a), 1.52 (1H, m, H-1b), 1.51 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-12a), 1.47 (1H, m, H-11a), 1.43 (1H, m, H-3b), 1.36 (1H, m, H-6b), 1.25 (1H, m, H-11b), 1.14 (1H, dd, *J* = 12.3, 2.8 Hz, H-5), 0.99 (3H, s, H-18), 0.94 (1H, m, H-12b), 0.94 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-16), 0.92 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-20); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 172.4 (C-15), 163.8 (C-25), 148.1 (C-8), 134.3 (C-22), 129.6 (C-23 y C-27), 115.6 (C-24 y C-26), 106.9 (C-17), 67.8 (C-2), 57.7 (C-9), 53.1 (C-5), 46.6 (C-3), 45.8 (C-1), 44.3 (C-14), 42.8 (C-21), 39.7 (C-10), 38.2 (C-7), 35.1 (C-12), 33.3 (C-19), 33.0 (C-4), 31.5 (C-13), 24.6 (C-6), 24.5 (C-18), 21.4 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20).

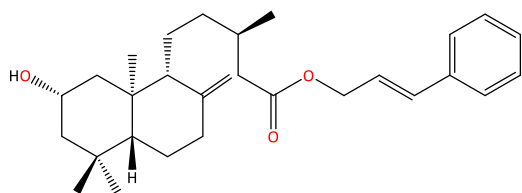
7.8.6. Derivado 39



$[\alpha]_{589} -37$, $[\alpha]_{578} -38$, $[\alpha]_{546} -43$, $[\alpha]_{436} -73$, $[\alpha]_{365} -112$, (*c* 1.86, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 3436, 2941, 1724, 1660, 1508, 1377, 1260 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.26 (2H, m, H-23 y H-27), 7.0 (2H, m, H-24 y H-26), 5.74 (1H, t, *J* = 5.6 Hz, N-H), 5.12 (1H, quint, *J* = 4.1 Hz, H-2), 4.85 (1H, s, H-17a), 4.49 (1H, s, H-17b), 4.40 (2H, m, H-21), 2.41 (1H, ddd, *J* = 12.6, 4.1, 2.4 Hz, H-7a), 2.23 (1H, m, H-14a), 2.01 (3H, s, H-29), 1.98 (1H, m, H-1a), 1.97 (1H, m, H-13), 1.96 (1H, m, H-7b), 1.95 (1H, m, H-14b), 1.75 (1H, m, H-6a), 1.74 (1H, m, H-3a), 1.53 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H, m, H-12a), 1.44 (1H, m, H-3b), 1.40 (1H, m, H-1b), 1.40 (1H, m, H-6b), 1.31 (1H, m, H-11b), 1.18 (1H, dd, *J* = 12.3, 2.6 Hz, H-5), 0.97 (3H, s, H-18), 0.96 (1H, m,

H-12b), 0.94 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.91 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 172.3 (C-15), 170.6 (C-28), 163.7 (C-25), 147.7 (C-8), 134.3 (C-22), 129.6 (C-23 y C-27), 113.6 (C-24 y C-26), 107.2 (C-17), 70.7 (C-2), 57.6 (C-9), 54.0 (C-5), 44.2 (C-14), 43.3 (C-3), 42.7 (C-21), 41.8 (C-1), 39.0 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.7 (C-19), 32.8 (C-4), 31.4 (C-13), 24.1 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-29), 21.1 (C-11), 19.8 (C-16), 16.0 (C-20); EIMS m/z 472 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (1), 413 (67), 397 (27), 291 (12), 223 (19), 195 (14), 168 (35), 109 (100), 43 (18).

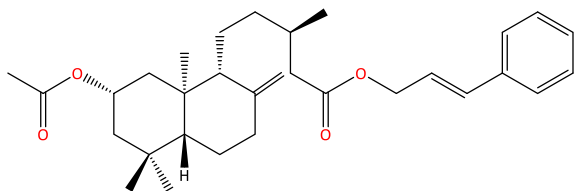
7.8.7. Derivado 41



$[\alpha]_{589} -30$, $[\alpha]_{578} -32$, $[\alpha]_{546} -36$, $[\alpha]_{436} -60$, $[\alpha]_{365} -92$, (c 0.6620, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 3594, 2936, 1723, 1460, 1447, 1382, 1365 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.39 (2H, m, H-25 y H-29),

7.32 (2H, m, H-26 y H-28), 7.27 (1H, m, H-27), 6.65 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-23), 6.29 (1H, dt, $J = 15.8, 6.5$ Hz, H-22), 4.83 (1H, s, H-17a), 4.73 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 4.50 (1H, s, H-17b), 4.13 (1H, quint, $J = 5.3$ Hz, H-2), 2.37 (1H, m, H-7a), 2.36 (1H, m, H-14a), 2.15 (1H, dd, $J = 14.7, 7.9$ Hz, H-14b), 1.97 (1H, m, H-13), 1.92 (1H, m, H-7b), 1.77 (1H, dd, $J = 14.8, 5.3$ Hz, H-1a), 1.69 (1H, m, H-6a), 1.62 (1H, m, H-3a), 1.56 (1H, m, H-1b), 1.53 (1H, m, H-9), 1.51 (1H, m, H-11a), 1.50 (1H, m, H-12a), 1.44 (1H, m, H-3b), 1.39 (1H, m, H-6b), 1.35 (1H, m, H-11b), 1.14 (1H, dd, $J = 12.5, 2.8$ Hz, H-5), 0.99 (1H, m, H-12b), 0.99 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.91 (3H, s, H-19), 0.9 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 173.0 (C-15), 148.0 (C-8), 136.2 (C-24), 134.1 (C-23), 128.5 (C-26 y C-28), 128.0 (C-27), 126.6 (25 y C-29), 123.3 (C-22), 106.9 (C-17), 67.8 (C-2), 64.8 (C-21), 57.6 (C-9), 53.1 (C-5), 46.5 (C-3), 45.8 (C-1), 41.6 (C-14), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.3 (C-19), 33.0 (C-4), 31.1 (C-13), 24.6 (C-18), 24.5 (C-6), 21.4 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20).

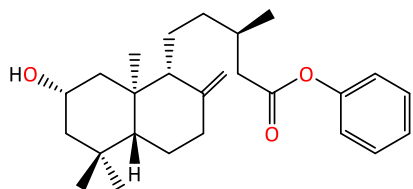
7.8.8. Derivado 42



$[\alpha]_{589} -26$, $[\alpha]_{578} -27$, $[\alpha]_{546} -31$, $[\alpha]_{436} -51$,
 $[\alpha]_{365} -77$, (*c* 1.32, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max}
2947, 1724, 1639, 1460, 1448, 1379, 1255
cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.39 (2H,

m, H-25 y H-29), 7.32 (2H, m, H-26 y H-28), 7.26 (1H, m, H-27), 6.65 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-23), 6.28 (1H, dt, *J* = 16.1, 6.5 Hz, H-22), 5.14 (1H, quint, *J* = 4.1 Hz, H-2), 4.84 (1H, s, H-17a), 4.72 (2H, dt, *J* = 16.1, 6.5 Hz, H-21), 4.48 (1H, s, H-17b), 2.39 (1H, m, H-7a), 2.36 (1H, m, H-14a), 2.15 (1H, m, H-14b), 2.01 (3H, s, H-31), 1.99 (1H, m, H-1a), 1.95 (1H, m, H-7b), 1.94 (1H, m, H-13), 1.73 (1H, m, H-3a), 1.73 (1H, m, H-6a), 1.54 (1H, m, H-6a), 1.54 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-11a), 1.48 (1H, m, H-12a), 1.41 (1H, m, H-3b), 1.38 (1H, m, H-6b), 1.31 (1H, m, H-11b), 1.17 (1H, dd, *J* = 12.3, 2.7 Hz, H-5), 0.97 (1H, m, H-12b), 0.96 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-16), 0.91 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 173.0 (C-15), 148.0 (C-8), 136.2 (C-24), 134.1 (C-23), 128.5 (C-26 y C-28), 128.0 (C-27), 126.6 (25 y C-29), 123.3 (C-22), 106.9 (C-17), 67.8 (C-2), 64.8 (C-21), 57.6 (C-9), 53.1 (C-5), 46.5 (C-3), 45.8 (C-1), 41.6 (C-14), 39.7 (C-10), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.3 (C-19), 33.0 (C-4), 31.1 (C-13), 24.6 (C-18), 24.5 (C-6), 21.4 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20).

7.8.9. Derivado 44

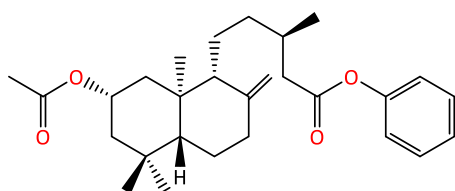


$[\alpha]_{589} -36$, $[\alpha]_{578} -37$, $[\alpha]_{546} -41$, $[\alpha]_{436} -68$, $[\alpha]_{365} -103$, (*c*
1.53, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 3598, 2947, 2901, 2861, 1748,
1640, 1591, 1491, 1365 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz)
 δ 7.38 (2H, m, H-23 y H-25), 7.22 (1H, m, H-24), 7.06 (2H,

m, H-22 y H-26), 4.87 (1H, s, H-17a), 4.54 (1H, s, H-17b), 4.15 (1H, quint, *J* = 5.2 Hz, H-2), 2.56 (1H, dd, *J* = 14.6, 6.2 Hz, H-14a), 2.39 (1H, m, H-7a), 2.36 (1H, dd, *J* = 14.6, 8.2 Hz, H-14b), 2.07 (1H, m, H-13), 1.96 (1H, m, H-7b), 1.79 (1H, m, H-1a), 1.72 (1H, m, H-6a), 1.64 (1H, m, H-3a), 1.59 (1H, m, H-1b), 1.59 (1H, m, H-11a), 1.59 (1H, m, H-12a), 1.58 (1H, m, H-9), 1.48 (1H, m, H-3b), 1.36 (1H, m, H-6b), 1.32 (1H, m, H-11b), 1.16 (1H, dd, *J* = 12.3, 2.9 Hz,

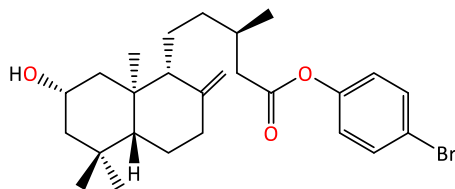
H-5), 1.08 (1H, m, H-12b), 1.06 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 1.00 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.7 (C-15), 150.7 (C-21), 148.0 (C-8), 129.4 (C-23 y C-25), 125.7 (C-24), 121.6 (C-22 y C-26), 107.0 (C-17), 67.8 (C-2), 57.7 (C-9), 53.2 (C-5), 46.6 (C-3), 45.8 (C-1), 41.7 (C-14), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 36.0 (C-12), 33.3 (C-19), 33.0 (C-4), 31.3 (C-13), 24.6 (C-18), 24.5 (C-6), 21.5 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20).

7.8.10. Derivado 45



$[\alpha]_{589} -32$, $[\alpha]_{578} -34$, $[\alpha]_{546} -39$, $[\alpha]_{436} -64$, $[\alpha]_{365} -96$, (c 1.39, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 2936, 2865, 1748, 1726, 1591, 1491, 1365, 1263 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.31 (2H, m, H-23 y H-25), 7.21 (1H, m, H-24), 7.08 (2H, m, H-22 y H-26), 5.16 (1H, quint, $J = 4.1$ Hz, H-2), 4.88 (1H, s, H-17a), 4.55 (1H, s, H-17b), 2.56 (1H, dd, $J = 14.7, 6.2$ Hz, H-14a), 2.40 (1H, m, H-7a), 2.35 (1H, dd, $J = 14.9, 8.2$ Hz, H-14b), 2.05 (1H, m, H-13), 2.02 (3H, m, H-28), 2.01 (1H, m, H-1a), 1.98 (1H, m, H-7b), 1.75 (1H, m, H-6a), 1.74 (1H, m, H-3a), 1.58 (1H, m, H-11a), 1.57 (1H, m, H-9), 1.56 (1H, m, H-12a), 1.44 (1H, m, H-1b), 1.43 (1H, m, H-3b), 1.40 (1H, m, H-6b), 1.30 (1H, m, H-11b), 1.19 (1H, dd, $J = 12.6, 2.9$ Hz, H-5), 1.05 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 1.04 (1H, m, H-12b), 0.98 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.7 (C-15), 170.6 (C-27), 150.7 (C-21), 147.7 (C-8), 129.4 (C-23 y C-25), 125.7 (C-24), 121.6 (C-22 y C-26), 107.3 (C-17), 70.7 (C-2), 57.7 (C-9), 54.1 (C-5), 43.4 (C-3), 41.8 (C-1), 41.6 (C-14), 39.1 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.8 (C-19), 32.9 (C-4), 31.3 (C-13), 24.2 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-28), 21.3 (C-11), 20.0 (C-16), 16.1 (C-20).

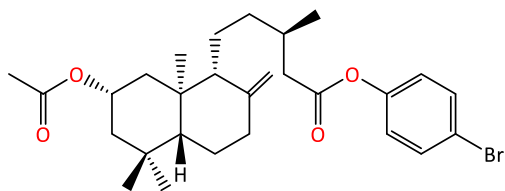
7.8.11. Derivado 47



$[\alpha]_{589} -25$, $[\alpha]_{578} -26$, $[\alpha]_{546} -30$, $[\alpha]_{436} -48$, $[\alpha]_{365} -71$, (c 2.0, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 3598, 2953, 2863, 1747, 1365, 1482, 1366 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.47 (2H, dt, $J = 9.3, 3.2$ Hz, H-23 y H-25), 6.96 (2H, dt, $J = 9.3, 3.2$ Hz, H-22 y H-26), 4.85 (1H, s, H-17a), 4.52 (1H, s, H-17b), 4.15 (1H, quint, $J = 5.1$

Hz, H-2), 2.54 (1H, dd, $J = 14.7, 6.0$ Hz, H-14a), 2.39 (1H, m, H-7a), 2.34 (1H, m, H-14b), 2.05 (1H, m, H-13), 1.95 (1H, m, H-7b), 1.78 (1H, m, H-1a), 1.70 (1H, m, H-6a), 1.63 (1H, m, H-3a), 1.57 (1H, m, H-1b), 1.57 (1H, m, H-9), 1.57 (1H, m, H-12a), 1.55 (1H, m, H-11a), 1.45 (1H, dt, $J = 12.9, 3.8$ Hz, H-3b), 1.40 (1H, m, H-6b), 1.38 (1H, m, H-11b), 1.15 (1H, dd, $J = 12.6, 3.8$ Hz, H-5), 1.05 (1H, m, H-12b), 1.04 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 0.99 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.3 (C-15), 149.7 (C-21), 148.0 (C-8), 132.4 (C-23 y C-25), 123.4 (C-22 y C-26), 118.7 (C-24), 106.9 (C-17), 67.8 (C-2), 57.6 (C-9), 53.1 (C-5), 46.6 (C-3), 45.8 (C-1), 41.6 (C-14), 39.7 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.3 (C-19), 33.0 (C-4), 31.2 (C-13), 24.6 (C-18), 24.5 (C-6), 21.5 (C-11), 19.9 (C-16), 17.3 (C-20).

7.8.12. Derivado 48

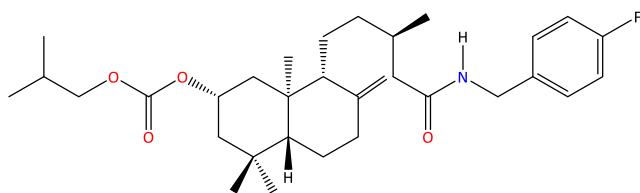
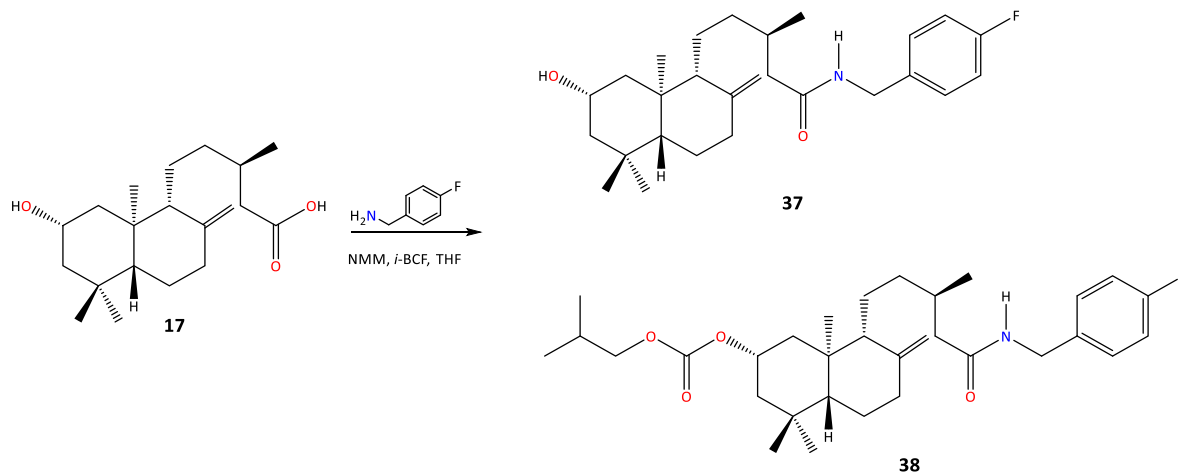


$[\alpha]_{589} -24$, $[\alpha]_{578} -25$, $[\alpha]_{546} -28$, $[\alpha]_{436} -46$, $[\alpha]_{365} -69$, (c 1.34, CHCl_3); IR (CHCl_3) ν_{max} 2940, 2865, 1750, 1724, 1641, 1482, 1372, 1259 cm^{-1} ; RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.48 (2H, m, H-23 y H-25), 6.96 (2H, m, H-22 y H-26), 5.15 (1H, quint, $J = 4.1$ Hz, H-2), 4.88 (1H, s, H-17a), 4.52 (1H, s, H-17b), 2.53 (1H, dd, $J = 14.9, 6.2$ Hz, H-14a), 2.43 (1H, m, H-7a), 2.35 (1H, dd, $J = 14.6, 7.9$ Hz, H-14b), 2.04 (1H, m, H-13), 2.03 (1H, m, H-1a), 2.03 (3H, s, H-28), 1.99 (1H, m, H-7b), 1.76 (1H, m, H-3a), 1.76 (1H, m, H-6a), 1.59 (1H, m, H-9), 1.59 (1H, m, H-11a), 1.58 (1H, m, H-12a), 1.45 (1H, m, H-3b), 1.45 (1H, m, H-1b), 1.42 (1H, m, H-6b), 1.31 (1H, m, H-11b), 1.20 (1H, dd, $J = 12.6, 2.6$ Hz, H-5), 1.04 (1H, m, H-12b), 1.04 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 0.98 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 171.4 (C-15), 170.6 (C-27), 149.7 (C-21), 147.8 (C-8), 132.4 (C-23 y C-25), 123.4 (C-22 y C-26), 118.8 (C-24), 107.3 (C-17), 70.7 (C-2), 57.7 (C-9), 54.1 (C-5), 43.4 (C-3), 41.8 (C-1), 41.6 (C-14), 39.1 (C-10), 38.1 (C-7), 35.9 (C-12), 33.8 (C-19), 32.9 (C-4), 31.3 (C-13), 24.2 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-28), 21.3 (C-11), 20.0 (C-16), 16.1 (C-20).

7.9. Obtención de amidas vía anhídridos mixtos

El diterpeno tipo *ent*-labdano se colocó en un matraz de tres bocas provisto con una barra magnética, se tapó con septos y purgó con N₂, se adicionó THF anhidro y se colocó en baño de hielo en agitación durante 10 minutos, se agregó 1.1 eq de NMM gota a gota se sometió a agitación durante 20 minutos, se adicionó 1.1 eq de *i*-BCF gota a gota y se dejó en agitación durante 20 minutos. Por separado se preparó una solución de la amina a reaccionar en THF anhidro (3 mL) y 1.1 eq de NMM la cual se agregó gota a gota a la mezcla que contenía al ácido carboxílico y se dejó reaccionar durante 24 horas en agitación a temperatura ambiente. Se extrajo con acetato de etilo, se lavó 2 veces con solución de ácido clorhídrico al 10% y 3 veces con agua, secándose con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró en rotavapor, el producto de reacción se sometió a cromatografía en columna para su purificación.

7.9.1. Obtención de 37 y 38



RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.25 (2H, m, H-23 y H-27), 7.01 (2H, m, H-24 y H-26), 5.76 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, N-H), 4.95 (1H, quint, *J* = 4.5 Hz, H-2), 4.84 (1H, s,

H-17a), 4.49 (1H, s, H-17b), 4.42 (2H, m, H-21), 3.98 (2H, d, $J = 6.7$, H-29), 2.39 (1H, m, H-7a), 2.24 (1H, m, H-14a), 2.08 (1H, m, H-1a), 1.97 (1H, m, H-13), 1.96 (1H, m, H-30), 1.95 (1H, m, H-7b), 1.93 (1H, m, H-14b), 1.82 (1H, m, H-3a), 1.73 (1H, m, H-6a), 1.53 (1H, m, H-9), 1.49 (2H, m, H-1b y H-12a), 1.47 (1H, m, H-3b), 1.45 (1H, m, H-11a), 1.39 (1H, m, H-6b), 1.36 (1H, m, H-11b), 1.18 (1H, dd, $J = 12.4, 2.7$ Hz, H-5), 0.97 (3H, s, H-18), 0.96 (1H, m, H-12b), 0.94 (3H, d, $J = 5.0$ Hz, H-16), 0.94 (6H, d, $J = 6.7$ Hz, H-31, 32), 0.93 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 172.4 (C-15), 163.8 (C-25), 155.0 (C-28), 147.7 (C-8), 134.4 (C-22), 129.6 (C-23 y C-27), 115.7 (C-24 y C-26), 107.3 (C-17), 74.6 (C-2), 73.6 (C-29), 57.7 (C-9), 53.7 (C-5), 44.2 (C-14), 43.1 (C-3), 42.8 (C-21), 41.9 (C-1), 39.2 (C-10), 38.1 (C-7), 36.0 (C-12), 33.5 (C-19), 31.5 (C-13), 27.8 (C-4), 27.8 (C-30), 24.2 (C-6), 23.8 (C-18), 21.2 (C-11), 18.9 (C-16), 18.9 (C-31, 32), 16.3 (C-20).

7.10. Anclaje molecular (docking) de las moléculas preparadas frente al heterodímero de alfa- y beta-tubulina

7.10.1. Modelado molecular

Los modelos de partida de los derivados preparados se construyeron y se llevó a cabo la búsqueda conformacional mediante el protocolo de Monte Carlo con MMFF, se calculó la energía electrónica empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a un nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) en el programa Spartan'14, posteriormente al confórmero de mínima energía de cada derivado fue sometido a optimización de la geometría con DFT a un nivel de teoría B3LYP/DGDZVP empleando el programa Gaussian09W.

7.10.2. Anclaje molecular (docking)

Una vez obtenidos los archivos de los confórmeros optimizados, se crearon los archivos PDBQT mediante el programa AutoDock Tools-1.5.6, los cuales fueron sometidos a estudios de anclaje molecular frente al heterodímero de α - y β -tubulina (archivo 1JFF, PDB), empleando el programa Autodock Vina 1.0. Para la visualización de los resultados se utilizó el programa PyMOL.

7.11. Ensayos del equilibrio dinámico de la tubulina frente a derivados diterpénicos

La prueba se realizó por triplicado para cada compuesto. Los derivados se disolvieron en DMSO para obtener una concentración final de 200 μM , se empleó una placa de 96 pozos. Se colocaron alícuotas de 10 μL para cada derivado. Por separado se preparó una solución de tubulina de cerebro de porcino >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E. U. A.) a una concentración final de 2 mg/mL. Manteniéndola siempre a 0 °C. De la solución de tubulina se agregaron 100 μL a cada pocillo donde estaban contenidos los derivados, posteriormente se transfirió la placa a un lector BioTek ELx808IU precalentado a 37 °C, se llevó a cabo un mezclado inicial de 5 segundos. La polimerización de los heterodímeros de α -tubulina- β -tubulina se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante una hora, transcurrido el tiempo la placa se removió del lector e inmediatamente se llevó a una temperatura de 4 °C por 30 minutos. Después de este tiempo, la placa se colocó nuevamente en el lector por 30 minutos más a 37 °C para determinar el efecto de la temperatura en la estabilidad de los microtúbulos inducida por los compuestos a evaluar.

Los resultados se graficaron con el programa GraphPad Prism 7.0 para Windows, los puntos de las gráficas muestran la desviación estándar de las lecturas para cada derivado evaluado.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dawson, W.R.; Ebbell, B. *The papyrus Ebers. The greatest Egyptian Medical document. J. Egypt. Archaeol.* **1937**, *24*, 250.
2. Firn, R. D.; Jones, C. G. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 382-391.
3. Hanson. J. R. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge; **2003**, pp 1.
4. Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 69-75.
5. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, third edition*. Wiley: Inglaterra; **2009**, pp 6.
6. Aharoni, A.; Galili, G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology.* **2011**, *22*, 239–244.
7. Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology, Fifth Edition*. Sinauer Associates, Inc.: USA; **2012**, pp 369-396.
8. Breitmaier, E. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Wiley-vch: Alemania; **2006**.
9. Bruneton, J. *Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales, segunda edición*. Acribia: México; **2001**, pp 457.
10. Primo, E., *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Réverte: Barcelona; **1995**, pp 851-859.
11. Carey, F. A.; Giuliano, R. M. *Química Orgánica, Novena edición*. Mc Graw Hill Education: México; **2014**.
12. Seigler, D. S. *Plant Secondary Metabolis*. Springer science: Nueva York; **1998**, pp 398.
13. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, third edition*. Wiley: Inglaterra; **2009**, pp 223.
14. Lanzotti, V. Diterpenes for Therapeutic Use. *Nat Prod.* **2013**, 3174-3189.

15. Kumaran A. P.; Tyo, K.; Carlsen, S.; Mucha, O.; Heng, P. T.; Stephanopoulos, G. Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. *Mol. Pharmaceutics*. **2008**, *5*, 167–190.
16. Wani, M.C.; Taylor, H.L.; Wall, M.E.; Coggon, P.; McPhail, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327.
17. Centelles, J. J., Imperial, S. Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Offarm.* **2010**, *29*, 68-75.
18. Yang, C. P. H.; Horwitz, S. B. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1733.
19. Catimel, G.; Verweij, J.; Mattijssen, V.; Hanauske, A.; Piccart, M.; Wanders, J.; Franklin, H.; Le Bail, N.; Clavel, M.; Kaye, S. B. Docetaxel (Taxotere®): an active drug for the treatment of patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann. Oncol.* **1994**, *5*, 533-537.
20. World Health Organization. <http://www.who.int/topics/cancer/en/>; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Revisado: 10/01/2018).
21. Kumar, N. Taxol-induced Polymerization of Purified Tubulin. Mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 10435-10441.
22. Lowe, J.; Li, H.; Downing, K. H.; Nogales, E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045-1057.
23. Yue, Q.; Liu, X.; Guo, D. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1037–1043.
24. Ranaivoson, F. M.; Gigant, B.; Berritt, S.; Joullié, M.; Knossow, M. Structural plasticity of tubulin assembly probed by vinca-domain ligands. *Acta Crystallogr.* **2012**, *8*, 927–934.
25. Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428*, 198-202.

26. Cao, Y. N.; Zheng, L. L.; Wang, D.; Liang, X. X.; Gao, F.; Zhou, X. L. Recent advances in microtubule-stabilizing agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 806-828.
27. Dráber, P.; Sulimenko, V.; Dráberová, E. Cytoskeleton in mast cell signaling. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 130.
28. Girón, N.; Través, P. G.; Rodríguez, B.; López-Fontal, R.; Boscá, L.; Hortelano, S.; Heras, B. Supression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *228*, 179-189.
29. González, A. G.; Rodríguez, P. E.; Díaz, J. G.; Bermejo, B. J. Absolute stereochemistry of salvic acid and related diterpenes. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 609-611.
30. García, R. G. New distribution records of compositae from Aguascalientes, México. *Acta Botanica Mexicana.* **1999**, *46*, 1-17.
31. Brito, B.; Arana, C. Cariotipos preliminares de Perú basados en la distribución de la familia Asteraceae. *Darwiniana* **2014**, *2*, 39-56.
32. Turner, B. L. Five new species of *Ageratina* (Asteraceae: Eupatorieae) from Oaxaca, Mexico. *Phytologia* **2013**, *95*, 141- 150.
33. García-Sánchez, E. Ramírez-López, C. B.; Talavera-Alemán, A.; León-Hernández, A.; Martínez-Muñoz, R. E.; Martínez-Pacheco, M. M.; Gómez-Hurtado, M. A.; Cerda-García Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; del Río R. E. Absolute configuration of (13*R*)- and (13*S*) labdane diterpenes coexisting in *Ageratina jocotepecana*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1005-1012.
34. Calderón, J. S.; Quijano, L.; Garduño, M.; Gómez, F.; Ríos, T. 2 α -iso-Valeroyloxyeperuic acid, a diterpene from *Eupatorium petiolare*. *Phytochemistry.* **1983**, *22*, 2617-2619.
35. Rzedowski, G. C.; Rzedowski, J. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda edición. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **2005**, 797.
36. Luna-Vázquez, M. "Transformación química del ácido 2 α -hidroxieperuico aislado de *Ageratina petiolaris*". Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. **2015**.

37. Bustos-Brito, C.; Andrade-Cetto, A.; Giraldo-Aguirre, J.D.; Moreno-Vargas, A. D.; Quijano, L. Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *185*, 341–346.
38. Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455-461.
39. García-Gutiérrez, H. A.; Carranza-Calvillo, L. J., Luna-Vázquez, M.; del Río, R. E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. Modificación química, modelado y anclaje molecular de diterpenos tipo *ent*-labdano de *Ageratina petiolaris*. *Rev. Latinoamer. Quim.* **2016**, *44* (Suplemento Especial), 194.
40. Kushwaha, N.; Saini, R. K.; Kushwaha, S. K. S. Synthesis of some amide derivatives and their biological activity. *Int. J. Chem. Tech. Res.* **2011**, *3*, 203–209.
41. Zambron, B. K.; Dubbaka, S. R.; Markovic, D.; Moreno-Clavijo, E.; Vorgel, P. Amide Formation in One Pot from Carboxylic Acids and Amines via Carboxyl and Sulfinyl Mixed Anhydrides. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2550-2553.
42. Verma, S. K.; Ghorpade, R.; Pratap, A.; Kaushik, M. P. Solvent free, *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) mediated amidation. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 2373-2376.
43. Trott, O.; Olson, A. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.* **2010**, *31*, 455-461.
44. Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2006**, *65*, 15–26.

9. ANEXO. TABLAS DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO DE ¹³C

| Posición | 17 | 23 | 27 | 30 | 32 | 34 | 35 | 37 | 38 | 39 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 45.7 | 41.9 | 45.8 | 45.8 | 41.8 | 45.8 | 41.7 | 45.8 | 41.9 | 41.8 |
| 2 | 67.8 | 71.0 | 67.8 | 67.8 | 70.7 | 67.7 | 70.7 | 67.8 | 74.6 | 70.7 |
| 3 | 46.4 | 43.5 | 46.5 | 46.5 | 43.3 | 46.5 | 43.3 | 46.6 | 43.1 | 43.3 |
| 4 | 33.0 | 32.9 | 33.0 | 33.0 | 32.8 | 33.0 | 32.8 | 33.0 | 27.8 | 32.8 |
| 5 | 53.1 | 54.1 | 53.1 | 53.2 | 54.0 | 52.9 | 53.6 | 53.1 | 53.7 | 54.0 |
| 6 | 24.5 | 24.1 | 24.6 | 24.8 | 21.4 | 24.6 | 24.1 | 24.6 | 24.2 | 24.1 |
| 7 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.0 | 38.2 | 38.1 | 38.1 |
| 8 | 148.0 | 147.7 | 148.0 | 148.1 | 147.7 | 148.0 | 147.7 | 148.1 | 147.7 | 147.7 |
| 9 | 57.6 | 57.6 | 57.6 | 57.4 | 57.6 | 57.5 | 57.5 | 57.7 | 57.7 | 57.6 |
| 10 | 39.7 | 39.1 | 39.7 | 39.6 | 39.0 | 39.7 | 39.0 | 39.7 | 39.2 | 39.0 |
| 11 | 21.5 | 21.1 | 21.5 | 21.3 | 21.2 | 21.2 | 21.0 | 21.4 | 21.2 | 21.1 |
| 12 | 36.0 | 36.0 | 36.1 | 36.0 | 36.0 | 35.9 | 35.8 | 36.1 | 36.0 | 35.9 |
| 13 | 30.9 | 31.4 | 31.5 | 31.3 | 31.4 | 31.5 | 31.4 | 31.5 | 31.5 | 31.4 |
| 14 | 41.3 | 45.2 | 45.3 | 45.1 | 44.4 | 44.9 | 44.9 | 44.3 | 44.2 | 44.2 |
| 15 | 178.9 | 170.7 | 170.7 | 171.4 | 172.5 | 171.4 | 171.3 | 172.4 | 172.4 | 172.3 |
| 16 | 19.9 | 19.8 | 19.9 | 19.4 | 19.8 | 19.8 | 19.8 | 19.9 | 18.9 | 19.8 |
| 17 | 107.0 | 107.3 | 106.9 | 106.9 | 107.2 | 106.9 | 107.2 | 106.9 | 107.3 | 107.2 |
| 18 | 24.6 | 23.6 | 24.5 | 24.5 | 23.5 | 24.5 | 23.5 | 24.5 | 23.8 | 23.5 |
| 19 | 33.3 | 33.7 | 33.2 | 33.3 | 33.7 | 33.2 | 33.7 | 33.3 | 33.5 | 33.7 |
| 20 | 17.3 | 16.2 | 17.3 | 17.2 | 16.0 | 17.3 | 16.0 | 17.3 | 16.3 | 16.0 |
| 21 | | 137.9 | 137.8 | 47.9 | 39.1 | 132.1 | 133.8 | 42.8 | 42.8 | 42.7 |
| 22 | | 119.8 | 119.8 | 24.5 | 31.7 | 133.7 | 131.9 | 134.3 | 134.4 | 134.3 |
| 23 | | 128.9 | 128.9 | 33.2 | 20.0 | 123.8 | 123.7 | 129.6 | 129.6 | 129.6 |
| 24 | | 124.1 | 124.2 | 25.5 | 13.7 | 125.4 | 124.7 | 115.6 | 115.7 | 113.6 |
| 25 | | 128.9 | 128.9 | 33.2 | 170.6 | 124.8 | 125.4 | 163.8 | 163.8 | 163.7 |
| 26 | | 119.8 | 119.8 | 24.5 | 21.6 | 122.5 | 122.6 | 115.6 | 115.7 | 113.6 |
| 27 | | 166.5 | | | | 144.8 | 144.8 | 129.6 | 129.6 | 129.6 |
| 28 | | 118.8 | | | | 116.1 | 116.1 | | 155.0 | 170.6 |
| 29 | | 144.5 | | | | 129.4 | 129.3 | | 73.6 | 21.6 |
| 30 | | 134.4 | | | | 120.2 | 120.2 | | 27.8 | |
| 31 | | 128.0 | | | | 129.4 | 129.3 | | 18.9 | |
| 32 | | 130.2 | | | | 116.1 | 116.1 | | 18.9 | |
| 33 | | 128.8 | | | | | 170.6 | | | |
| 34 | | | | | | | 21.6 | | | |

| Posición | 17 | 41 | 42 | 44 | 45 | 47 | 48 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 45.7 | 45.8 | 41.7 | 45.8 | 41.8 | 45.8 | 41.8 |
| 2 | 67.8 | 67.8 | 70.7 | 67.8 | 70.7 | 67.8 | 70.7 |
| 3 | 46.4 | 46.5 | 43.3 | 46.6 | 43.4 | 46.6 | 43.4 |
| 4 | 33.0 | 33.0 | 32.8 | 33.0 | 32.9 | 33.0 | 32.9 |
| 5 | 53.1 | 53.1 | 54.0 | 53.2 | 54.1 | 53.1 | 54.1 |
| 6 | 24.5 | 24.5 | 24.1 | 24.5 | 24.2 | 24.5 | 24.2 |
| 7 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 | 38.1 |
| 8 | 148.0 | 148 | 147.7 | 148.0 | 147.7 | 148.0 | 147.8 |
| 9 | 57.6 | 57.6 | 57.6 | 57.7 | 57.7 | 57.6 | 57.7 |
| 10 | 39.7 | 39.7 | 39.0 | 39.7 | 39.1 | 39.7 | 39.1 |
| 11 | 21.5 | 21.4 | 21.2 | 21.5 | 21.3 | 21.5 | 21.3 |
| 12 | 36.0 | 35.9 | 35.8 | 36.0 | 35.9 | 35.9 | 35.9 |
| 13 | 30.9 | 31.1 | 31.1 | 31.3 | 31.3 | 31.2 | 31.3 |
| 14 | 41.3 | 41.6 | 41.6 | 41.7 | 41.6 | 41.6 | 41.6 |
| 15 | 178.9 | 173.0 | 173.0 | 171.7 | 171.7 | 171.3 | 171.4 |
| 16 | 19.9 | 19.9 | 19.9 | 19.9 | 20.0 | 19.1 | 20.0 |
| 17 | 107.0 | 106.9 | 107.2 | 107.0 | 107.3 | 106.9 | 107.3 |
| 18 | 24.6 | 24.6 | 23.5 | 24.6 | 23.5 | 24.6 | 23.5 |
| 19 | 33.3 | 33.3 | 33.7 | 33.3 | 33.8 | 33.3 | 33.8 |
| 20 | 17.3 | 17.3 | 16.0 | 17.3 | 16.1 | 17.3 | 16.1 |
| 21 | | 64.8 | 64.8 | 150.7 | 150.7 | 149.7 | 149.7 |
| 22 | | 123.3 | 123.3 | 121.6 | 121.6 | 123.4 | 123.4 |
| 23 | | 134.1 | 134.1 | 129.4 | 129.4 | 132.4 | 132.4 |
| 24 | | 136.2 | 136.2 | 125.7 | 125.7 | 118.7 | 118.8 |
| 25 | | 126.6 | 126.5 | 129.4 | 129.4 | 132.4 | 132.4 |
| 26 | | 128.5 | 128.5 | 121.6 | 121.6 | 123.4 | 123.4 |
| 27 | | 128.0 | 128.0 | | 170.6 | | 170.6 |
| 28 | | 128.5 | 128.5 | | 21.6 | | 21.6 |
| 29 | | 126.6 | 126.5 | | | | |
| 30 | | | 170.5 | | | | |
| 31 | | | 21.6 | | | | |