



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional**

**Unidad Zacatenco**

**Departamento de Farmacología**

**Obtención de nuevos derivados del longipineno  
estabilizadores de microtúbulos**

Tesis que presenta:

**Q.F.B. Esmeralda Jazmín Chávez Estrada**

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de Farmacología

Director de Tesis: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

México, D. F.

Diciembre de 2013

Esta tesis se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas dentro del programa de posgrado en Farmacología con una beca de inversión en el conocimiento otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 333689 y con apoyo del proyecto ICYTDF 337/2010.

*No estudio por saber más, sino por ignorar menos.*

*Sor Juana Inés de la Cruz*

*Agradezco y dedico este trabajo a:*

*Dios por darme la fuerza y el valor necesarios para llegar hasta el día de hoy.*

*Las dos mujeres que han sido los pilares mi vida: mi mamá **María Guadalupe Chávez Estrada** y mi abuelita **Ernestina Estrada Barrera**, por su cariño y apoyo ante todo.*

*Mis hermanos **Diana** y **Roberto**, ustedes me impulsan a tratar de ser mejor día a día.*

*Mi amado **Eduardo**, por tu amor, tu paciencia y apoyo en cada momento. Te amo.*

*Agradecimientos:*

*De manera especial agradezco a los doctores **Carlos Martín Cerda García-Rojas** y **Pedro Joseph Nathan** por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Doctor Carlos fue un gusto estar bajo su tutela.*

*A **Angelina, Alvina, Celina** y **Ángel**, por toda la ayuda y consejos recibidos.*

*A **Benjamín** y **Vero**, por cada uno de los momentos divertidos y las largas, largas platicas en el laboratorio.*

*A mis amigos de la Maestría en Farmacología generación 2012, por esta aventura de dos años y medio que compartimos juntos.*

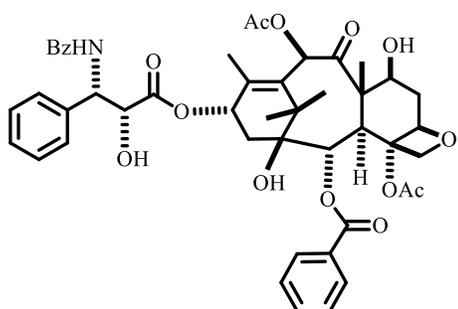
*A la doctora **Nury Pérez** y el doctor **Javier Camacho** por sus valiosas aportaciones durante la realización de la presente tesis.*

## ÍNDICE GENERAL

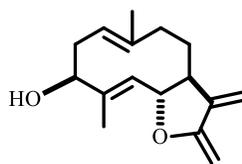
	<b>Página</b>
ÍNDICE GENERAL	i
RESUMEN DE ESTRUCTURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia de los productos naturales en la medicina	1
1.2. Compuestos terpénicos con actividad antitumoral	2
1.3. Rasteviona, un sesquiterpeno de <i>Stevia serrata</i> Cav.	5
1.4. Tubulina y microtúbulos	6
1.5. Agentes que interaccionan con el heterodímero de $\alpha,\beta$ -tubulina	9
1.6. Acoplamiento molecular proteína–ligando ( <i>docking</i> )	10
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	13
4.1. General	13
4.2. Específicos	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5.1. Obtención y caracterización de los sesquiterpenos funcionalizados	13
5.2. Determinación de la actividad estabilizante de microtúbulos <i>in vitro</i>	18
5.3. Estudio de reconocimiento molecular <i>in silico</i>	21
6. RESUMEN DE RESULTADOS	27
7. CONCLUSIONES	27
8. PERSPECTIVAS	28
9. PARTE EXPERIMENTAL (MATERIALES Y MÉTODOS)	28
9.1. Procedimientos generales de purificación de los compuestos	28
9.1.1. Cromatografía en columna abierta	28
9.1.2. Cromatografía en capa fina	28
9.2. Datos generales de la espectroscopía y espectrometría utilizadas en la determinación estructural de los derivados del longipineno	29

9.2.1.	Determinación de los puntos de fusión	29
9.2.1.	Rotación específica	29
9.2.3.	Espectroscopía de infrarrojo	29
9.2.4.	Espectroscopía de ultravioleta	29
9.2.5.	Resonancia magnética nuclear	29
9.2.6.	Espectrometría de masa	30
9.3.	Difracción de rayos X	30
9.4.	Obtención de los compuestos de partida para la funcionalización de los longipinenos	30
9.4.1.	Colecta de <i>Stevia Serrata</i> Cav.	30
9.4.2.	Obtención de la materia prima	30
9.4.3.	Obtención de longipinan-7,8,9-triol-1-ona ( <b>11</b> )	31
9.4.4.	Obtención del ditiglato de morelieno ( <b>12</b> )	31
9.4.5.	Obtención de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona ( <b>13</b> )	32
9.5.	Preparación y datos espectroscópicos de los derivados del longipineno funcionalizados	32
9.5.1.	7,8-Dicinato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona ( <b>19</b> )	32
9.5.2.	7,8-Dibenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona ( <b>20</b> )	33
9.5.3.	7-Monobenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona ( <b>21</b> )	34
9.5.4.	Dicinato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona ( <b>22</b> )	35
9.5.5.	Dibenzoato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona ( <b>23</b> )	36
9.6.	Evaluación <i>in vitro</i> de la estabilidad de los microtúbulos formados por heterodímeros de $\alpha,\beta$ -tubulina	37
9.7.	Estudios de reconocimiento molecular <i>in silico</i>	37
10.	REFERENCIAS	38
11.	APÉNDICE A. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ de <b>11</b> y <b>13</b> , y espectros de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de los sesquiterpenos funcionalizados <b>19–23</b>	42

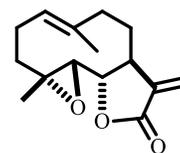
## RESUMEN DE ESTRUCTURAS



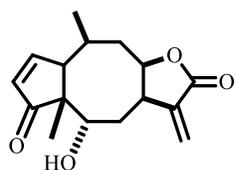
1



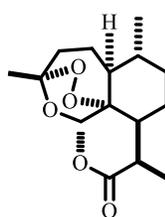
2



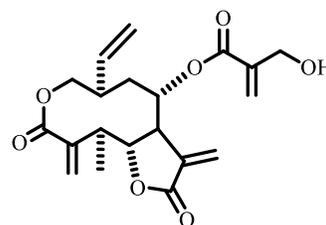
3



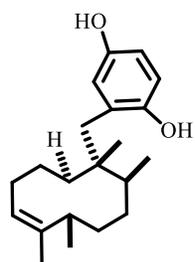
4



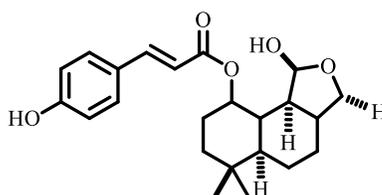
5



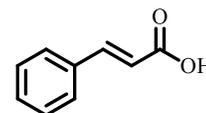
6



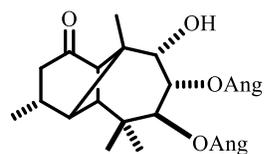
7



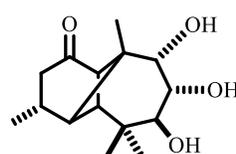
8



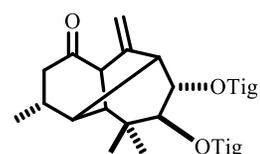
9



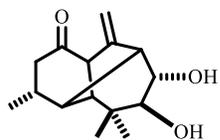
10



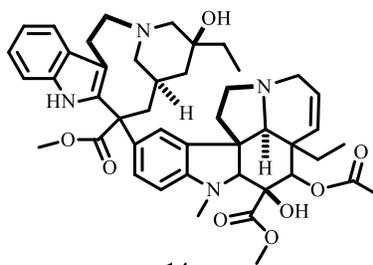
11



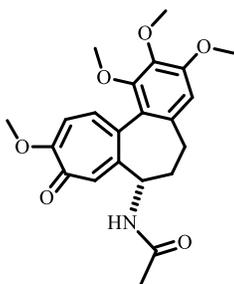
12



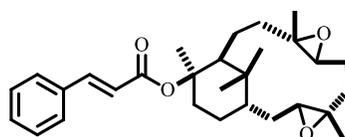
13



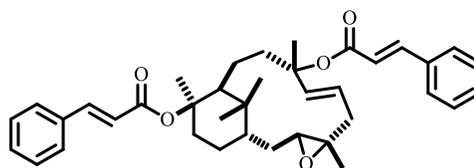
14



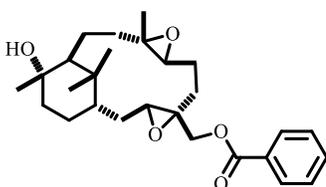
15



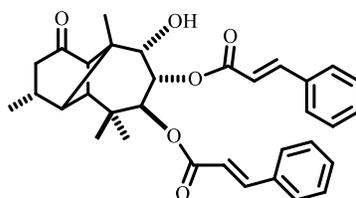
16



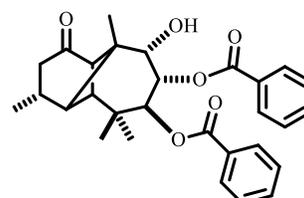
17



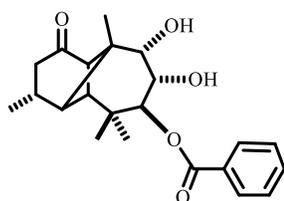
18



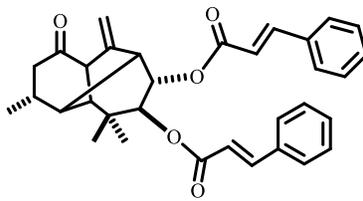
19



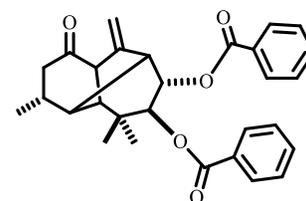
20



21



22



23

## RESUMEN

Los productos naturales obtenidos de plantas han sido muy importantes para el desarrollo de fármacos preparados con el fin de tratar diversas enfermedades. Una de esas enfermedades es el cáncer el cual es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Los esfuerzos por vencer a este padecimiento hacen que cada día se continúe con la búsqueda de nuevos fármacos más eficientes para su tratamiento.

En este trabajo se exploró la formación de nuevos compuestos sesquiterpénicos derivados del longipineno y se evaluó su interacción con la tubulina en ensayos de polimerización *in vitro*. Dicha exploración se hizo a partir de los productos naturales terpénicos del género *Stevia*, tales como la rasteviona (**10**) que se aísla en alto rendimiento de las raíces de *Stevia serrata* Cav. y cuyo estudio químico se ha efectuado a profundidad. La hidrólisis alcalina de **10** generó el sesquiterpeno denominado longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**). Por otro lado, el compuesto **10** se transpuso en medio ácido al sesquiterpeno tricíclico de tipo morelieno **12**, el cual se hidrolizó en medio alcalino para dar la moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona **13**. Los compuestos **10** y **11** fueron la base para la preparación de los ésteres **19-23** derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico mediante el tratamiento con el cloruro de acilo correspondiente en presencia de piridina.

El derivado del longipineno **19** esterificado con un derivado del ácido cinámico aceleró la polimerización de los heterodímeros de  $\alpha,\beta$ -tubulina y presentó un efecto estabilizante de los microtúbulos. Los estudios de reconocimiento molecular (*docking*) revelaron que este derivado de longipineno (**19**,  $E_{Dock} = -9.3$  kcal/mol) ocupa el sitio activo del paclitaxel, sugiriendo que éste puede ser el mecanismo por el cual se produce la estabilidad en los microtúbulos.

## ABSTRACT

Plant-derived natural products have been very important in drug development allowing the treatment of many diseases. One of these diseases is cancer which is one of the leading causes of death worldwide. Many efforts are devoted to fight this disease, resulting in a continuous search for more effective new drugs for its treatment.

In the present work, the preparation of new sesquiterpene compounds derived from longipinene was explored and were evaluated their interactions with tubulin polymerization in *in vitro* assays. Such scanning was made starting from the natural products of the genus *Stevia* as rastevione (**10**) isolated in high yields from the roots of *Stevia serrata* Cav. and whose chemical study has been carried out in depth. Alkaline hydrolysis of **10** generated longipinan-7,8,9-triol-1-one (**11**). Moreover, compound **10** was rearranged in acid media to yield the tricyclic sesquiterpene derived from moreliene (**12**), which was hydrolyzed in alkaline medium to give moreli-10(14)-en-7,8- diol-1-one (**13**). Compounds **11** and **13** were the starting materials for the preparation of esters **19-23** derived from benzoic and cinnamic acids by treatment with the appropriate acyl chloride in the presence of pyridine.

Longipinene derivative **19** esterified with a cinnamic acid derivative accelerated the polymerization of  $\alpha,\beta$ -tubulin heterodimers and showed microtubule stabilization. *Docking* studies revealed that this longipinene derivative (**19**,  $E_{\text{Dock}} = -9.3$  kcal/mol) occupies paclitaxel active site, suggesting that this could be the mechanism for producing microtubule stability.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Importancia de los productos naturales en la medicina

Los organismos vivos como plantas, hongos, bacterias y animales producen una variedad de compuestos que se denominan metabolitos primarios y metabolitos secundarios, estos metabolitos abarcan una amplia gama de funciones. Los metabolitos primarios incluyen aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y lípidos, compuestos necesarios para que se lleven a cabo todas las funciones celulares, mientras que los metabolitos secundarios son biosintetizados para incrementar las posibilidades de supervivencia del organismo que los produce ya sea alejando depredadores o como en el caso de las plantas terrestres atrayendo insectos para favorecer la polinización.<sup>1</sup>

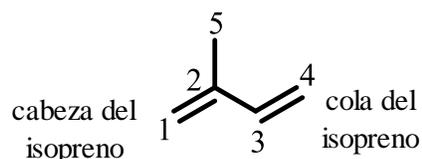
A lo largo de la historia de la humanidad, los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de la medicina, la farmacología y la química orgánica. Gracias a la llegada de la biología molecular y la química combinatoria que han hecho posible el diseño racional de compuestos químicos con blancos celulares específicos, el papel de los productos naturales pasó a un plano secundario en el descubrimiento de nuevos fármacos.<sup>2</sup> Sin embargo, en la actualidad existe un interés renovado en explorar la actividad farmacológica de los productos naturales, todo esto con el objetivo de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades en las cuales la eficacia de los fármacos con los que se cuenta no es óptima.

Actualmente el 34% de los fármacos que se emplean en la terapéutica son productos naturales o derivados semisintéticos de productos naturales. De este porcentaje el 68% pertenecen a fármacos antibacterianos, mientras que el 54% son fármacos que se utilizan para el tratamiento del cáncer.<sup>3</sup>

La estructura química de los productos naturales es compleja y dichas moléculas adoptan generalmente distintas conformaciones en el espacio las cuales son necesarias para que se lleve a cabo la interacción con el blanco farmacológico al que se dirigen. Los productos naturales presentan una alta afinidad por su sitio de acción y en algunos casos esta afinidad no puede ser igualada por algún otro compuesto obtenido por síntesis química.

## 1.2. Compuestos terpénicos con actividad antitumoral

Los terpenos son compuestos naturales que provienen en su mayoría de plantas sin embargo también se pueden encontrar en bacterias, hongos y algunos organismos marinos. Se construyen a partir de unidades del hidrocarburo isopreno (2-metil-1,3-butadieno) en base a la regla del isopreno que fue descrita por Wallach en 1887 (Figura 1) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que contienen (Tabla 1).<sup>4</sup>

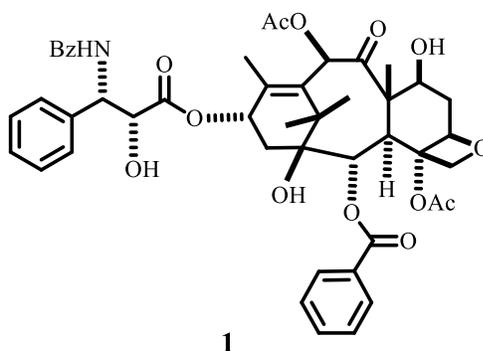


**Figura 1.** Estructura del isopreno (2-metil-1,3-butadieno). El extremo ramificado de la molécula es la cabeza y el otro extremo es la cola. En moléculas con dos o más unidades de isopreno, la cabeza de una unidad va unida a la cola de la siguiente cadena.

**Tabla 1.** Clasificación de los terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno.

	Número de unidades de isopreno	Número de carbonos
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	35

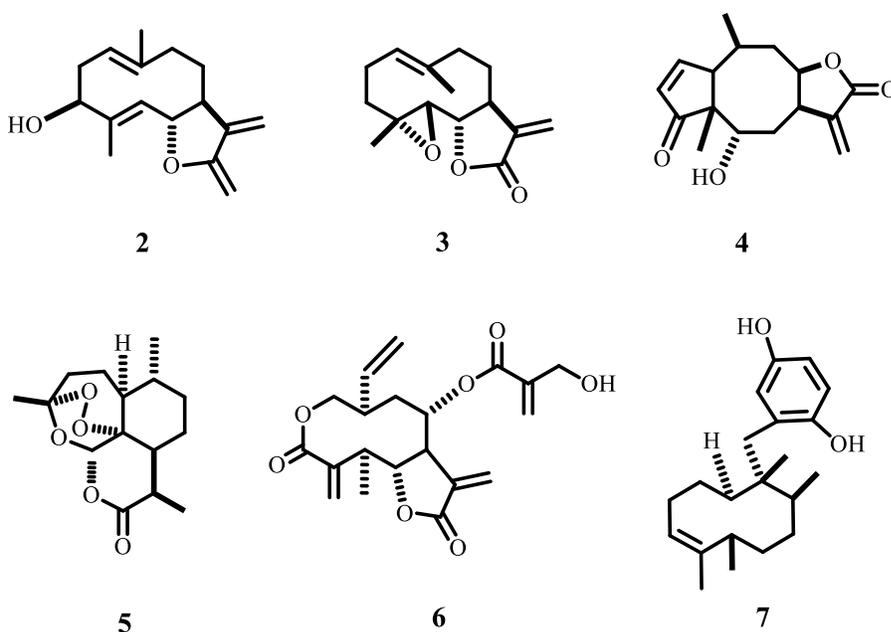
Algunos de estos productos naturales presentan actividad biológica, un ejemplo de ello es el taxol (**1**) o paclitaxel (Figura 2) un diterpeno aislado de *Taxus brevifolia*.<sup>5</sup> Este compuesto es un agente anticancerígeno ampliamente utilizado en la clínica para el tratamiento de tumores sólidos como el carcinoma metastásico de ovario, de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas.



**Figura 2.** Estructura del paclitaxel

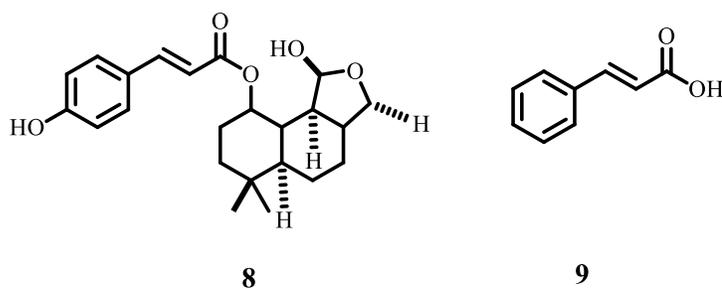
Otros compuestos que presentan actividad biológica son las lactonas terpénicas que se aíslan de distintas familias de plantas y animales de origen marino. La mayoría de estos compuestos presentan actividad citotóxica, cuya actividad se encuentra estrechamente relacionada con su estructura química y la presencia de un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado.

Haciendo una revisión en la literatura se encontró que hay lactonas terpénicas (Figura 3) que presentan actividad antitumoral. El costunólido (**2**) es una lactona monoterpénica que se aísla de la raíz de *Saussurea lappa* induce la apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer al disminuir la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y promueve además la diferenciación de células de leucemia al inhibir la angiogénesis endotelial e interrumpir la arquitectura de los microtúbulos.<sup>6,7,8</sup> La lactona sesquiterpénica partenólido (**3**) que se obtiene de *Tanacetum parthenium* induce muerte celular por apoptosis a través de estrés oxidativo, además de estimular el rápido ensamble de la tubulina.<sup>9,10</sup> La helenalina (**4**) se aísla de varias especies de *Arnica* y de *Helenalinum* y ejerce su actividad anticancerígena mediante un mecanismo similar al de otras lactonas sesquiterpénicas al inhibir al NF- $\kappa$ B e inducir la apoptosis celular.<sup>11,12,13</sup> La artemisina (**5**) ejerce su efecto citotóxico en presencia de iones ferrosos, y como las células cancerígenas presentan una alta acumulación de hierro, la artemisina y sus derivados pueden matar selectivamente a las células cancerosas.<sup>14,15</sup> Otras lactonas sesquiterpénicas como la vernodalina aislada de *Vernonia amigdalina*,<sup>16</sup> la eupatoriopicrina aislada de *Eupatorium cannabinum*<sup>17</sup> y el avarol aislado de la esponja marina *Dysidea avara*<sup>18</sup> también presentan una actividad citotóxica notable.



**Figura 3.** Lactonas sesquiterpénicas con actividad antitumoral.

Es interesante analizar el caso de un sesquiterpeno aislado de *Zygodinium calothyrsum*, el 1 $\beta$ -*p*-hidroxi-*E*-cinamoildrimeninol (**8**) (Figura 4) ya que éste demostró tener una alta citotoxicidad en células de carcinoma de colón COLO205 y KM12.<sup>19</sup> Este sesquiterpeno presenta dentro de su estructura un derivado del ácido cinámico que es de gran importancia ya que se sabe que varios cinamatos son extremadamente potentes como agentes antitumorales.

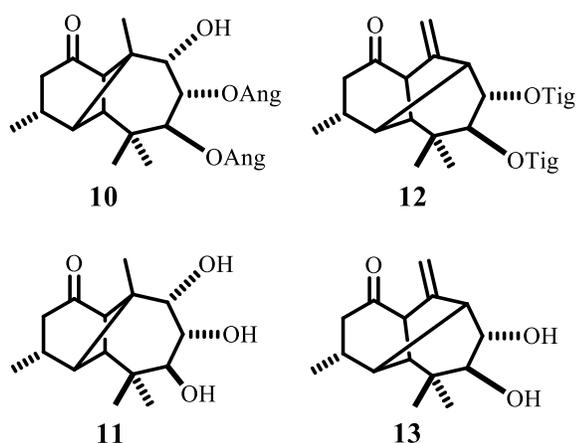


**Figura 4.** 1 $\beta$ -*p*-Hidroxi-*E*-cinamoildrimeninol (**8**) y ácido cinámico (**9**)

Los cinamatos están constituidos por un ácido acrílico sustituido en la posición  $\beta$  con un grupo fenilo y se encuentran esterificados, generalmente a un alcohol de tipo terpénico. El ácido cinámico (**9**) (Figura 4) por sí mismo presenta una baja toxicidad a la exposición humana, aunque posee un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado el cual se emplea comúnmente en el diseño de agentes anticancerígenos.<sup>20</sup>

### 1.3. Rasteviona, un sesquiterpeno de *Stevia serrata*

El género *Stevia* comprende alrededor de 230 especies de las cuales alrededor de 70 son endémicas de nuestro país. De este género se han aislado gran variedad de terpenos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos. Algunos de estos compuestos se aíslan en alto rendimiento, especialmente el derivado del longipineno denominado rasteviona (**10**) (Figura 5) procedente de la raíz de *Stevia serrata* Cav.<sup>21</sup> Este sesquiterpeno presenta una gran reactividad química, siendo un blanco interesante para realizar modificaciones estructurales por lo que su estudio químico se ha efectuado a profundidad obteniéndose así una amplia variedad de derivados del longipineno. Uno de estos compuestos es la denominada longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**) que es producto de la hidrólisis alcalina de la rasteviona.<sup>21</sup>



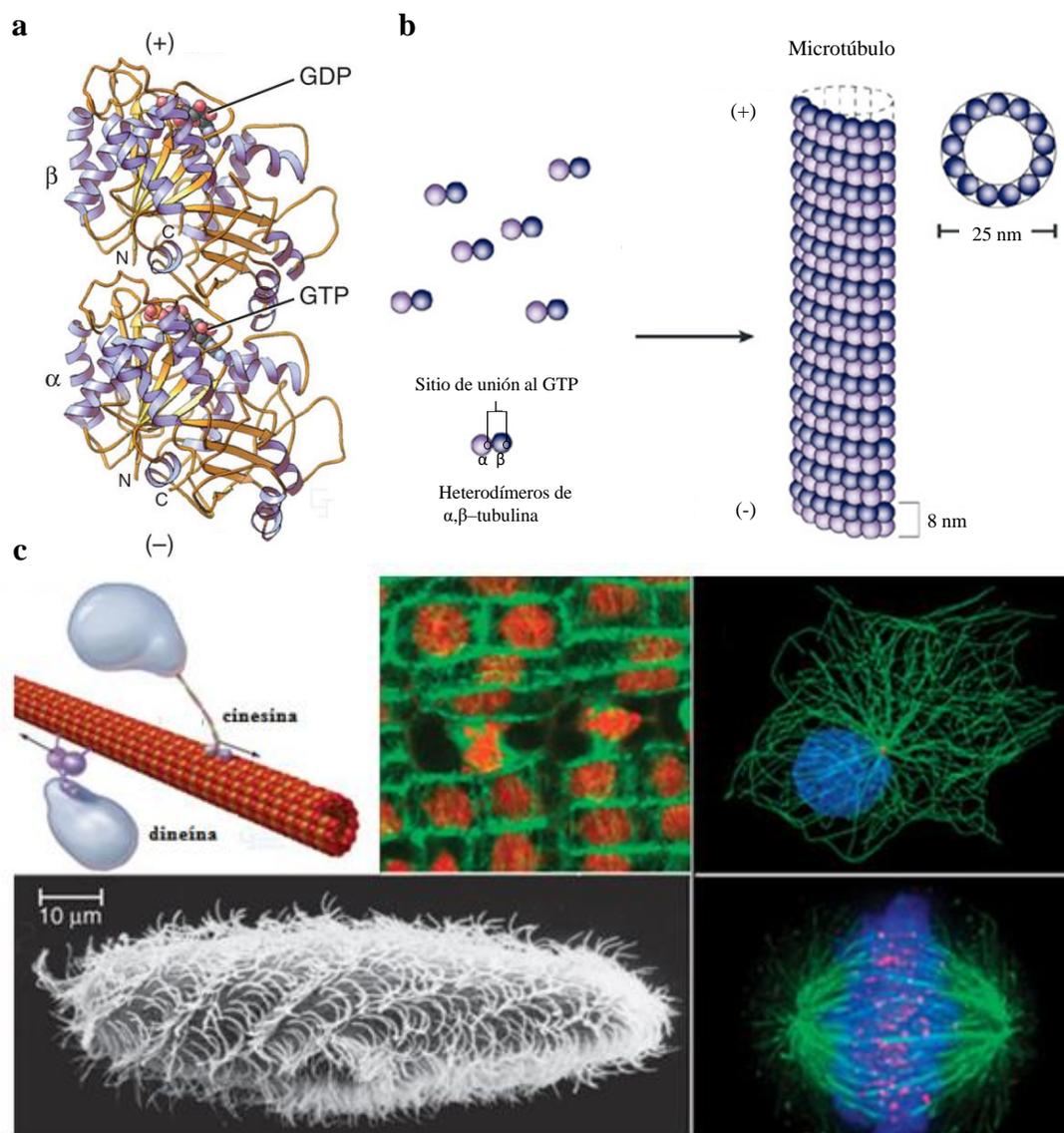
**Figura 5.** Derivados del longipineno **10** y **11** y productos de transposición **12** y **13**. Ang = (*Z*)-2-metil-2-butenóilo, Tig = (*E*)-2 metil-2-butenóilo.

El hecho de que la rasteviona (**10**) sea un compuesto tricíclico formado por un anillo de siete miembros, uno de seis y uno de cuatro hace que este sesquiterpeno pueda experimentar en medio ácido una transposición tipo Wagner-Meerwein generando un sesquiterpeno de tipo morelieno (**12**). En dicha transposición, el anillo de cuatro miembros se expande a uno de cinco, ocurre la eliminación de una molécula de agua y los grupos angelólo se isomerizan a grupos tigloílo. La hidrólisis de **12** da como resultado la remoción de los grupos tigloílo, obteniéndose la moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**).<sup>22</sup>

#### 1.4. Tubulina y microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros cilíndricos huecos del citoesqueleto compuestos por la proteína tubulina, la cual se presenta como un heterodímero formado por las subunidades  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Ambos monómeros comparten aproximadamente el 40% de identidad de secuencia y sus estructuras tridimensionales son muy similares, cada subunidad tiene un sitio de unión al 5'-trifosfato de guanosina (GTP) (Figura 6a). El sitio de unión del GTP en la  $\alpha$ -tubulina se conoce como sitio no intercambiable (N-site) mientras que el sitio de unión de GTP en  $\beta$ -tubulina es conocido como sitio intercambiable (E-site), que es donde tiene lugar la hidrólisis de GTP.<sup>23</sup> La disposición de cabeza a cola de los dímeros de  $\alpha,\beta$ -tubulina dentro de los microtúbulos dan al polímero cierta polaridad. El extremo “más” constituido por  $\beta$ -tubulina crece más rápido que el extremo “menos” formado por  $\alpha$ -tubulina.<sup>5</sup> La polimerización de la tubulina da origen a protofilamentos y la interacción de 13 protofilamentos forman un microtúbulo (Figura 6b). Los microtúbulos tienen un diámetro de 8 nm y pueden crecer hasta 20  $\mu$ m en las células y 3 mm *in vitro*, entre sus funciones destacan: contribuir al mantenimiento de la forma celular, servir como pistas para el transporte intracelular de vesículas y organelos gracias a las proteínas motoras dineína y kinesina, ser los componentes principales de cilios y flagelos, así como formar el huso mitótico, necesario para la división celular (Figura 6c).<sup>24</sup>

Una propiedad que presentan los microtúbulos es la capacidad de someterse a periodos de rápido crecimiento y acortamiento (Figura 7). Este comportamiento se denomina inestabilidad dinámica, la cual se lleva a cabo en los extremos de un microtúbulo. La dinámica de los microtúbulos es central para que estos cumplan sus funciones biológicas ya



**Figura 6.** (a) Heterodímero de  $\alpha,\beta$ -tubulina en donde se puede ver el sitio de unión al GTP en ambos dímeros. (b) Formación de microtúbulos. (c) Funciones de los microtúbulos. Proteínas motoras dineína y kinesina. Micrografías de fluorescencia de cultivos celulares, microtúbulos (verde) en elongación desde el centrosoma (rojo) cercano al núcleo (azul), célula HeLa en mitosis con los microtúbulos (verde) formados desde el centrosoma en el huso mitótico. Micrografía electrónica de barrido de los cilios coordinados de *Paramecium sp.* Modificado de Jordan, M. A; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drug. Nature Cancer Review. **2004**, **4**, 253-265 y Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. Cell Biology. Second Edition. Saunders, W. B. (ed.) New York, **2007**.

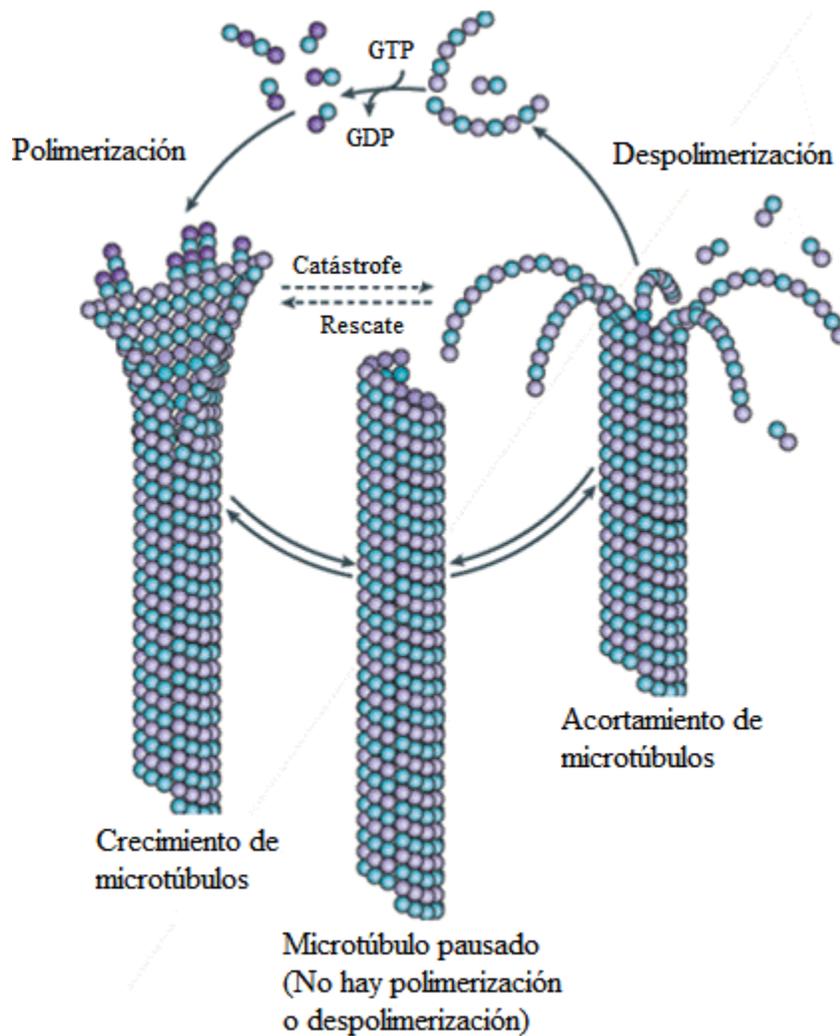
que les permite reorganizarse rápidamente y generar fuerzas de empuje y tracción durante la polimerización y despolimerización. Para que se lleve a cabo la polimerización de los microtúbulos es necesaria la presencia de GTP.<sup>25</sup>

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos está en función de cuatro factores:

1. Velocidad de crecimiento del microtúbulo.
2. Velocidad de acortamiento del microtúbulo.
3. Frecuencia de transición de un estado de crecimiento o pausa a un estado de acortamiento denominado catástrofe.
4. La frecuencia de transición de un estado de acortamiento a un estado de crecimiento o pausa el cual se denomina rescate.<sup>26</sup>

La dinámica de los microtúbulos depende de factores tanto físicos como químicos, tales como temperatura, presión, concentración de iones calcio, pH y la presencia de ciertos compuestos orgánicos. En base a esto se han desarrollado distintos métodos *in vitro* para evaluar el efecto de posibles fármacos cuyo blanco farmacológico sean los microtúbulos. Uno de los métodos más utilizados es una modificación del descrito originalmente por Shelanski *et al.*<sup>27</sup> que emplea tubulina de cerebro de bovino o porcino, una solución de GTP y los compuestos a ensayar disueltos en DMSO. La solución con la proteína, GTP y los compuestos se incuban a 37 °C durante 60 minutos para que se lleve a cabo la polimerización de los heterodímeros de  $\alpha,\beta$ -tubulina.

Este método aprovecha la capacidad que tienen los microtúbulos para dispersar la luz. Dicha propiedad es proporcional a la concentración de polímeros dentro de la solución. Mientras se está realizando la incubación se toman lecturas de absorbancia a 340 nm, ya que la densidad óptica de la solución aumenta conforme se van formando los polímeros. Posteriormente se aplica un estímulo despolimerizante, que puede ser dado por una solución de CaCl<sub>2</sub> o por una disminución de la temperatura de incubación.



**Figura 7.** Dinámica de los microtúbulos. Las diferentes fases están en función de las necesidades celulares. Modificado de: Conde, C.; Cáceres, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2009**, *10*, 319-332.

### 1.5. Agentes que interaccionan con el heterodímero de $\alpha,\beta$ -tubulina

Debido a que los microtúbulos juegan un papel crucial en el proceso de división celular diversos fármacos que se utilizan en el tratamiento del cáncer tienen como blanco terapéutico a la tubulina, la mayoría de estos compuestos se han aislado a partir de bacterias esponjas marinas, moluscos y plantas, presentando una gran diversidad y complejidad estructural. Estos agentes se pueden clasificar como ligandos activadores y ligandos desactivadores de la tubulina. Los ligandos activadores son aquellos que al unirse a la

tubulina favorecen la polimerización y por ende la formación de microtúbulos, mientras que los ligandos desactivadores favorecen la despolimerización de los microtúbulos.<sup>28</sup>

Tanto los ligandos activadores como los ligandos desactivadores tienen un sitio de unión específico dentro de la tubulina por lo que se han descrito tres sitios principales de unión: (a) sitio de la colchicina, (b) sitio de los alcaloides de la vinca y (c) sitio del taxol (Figura 8).

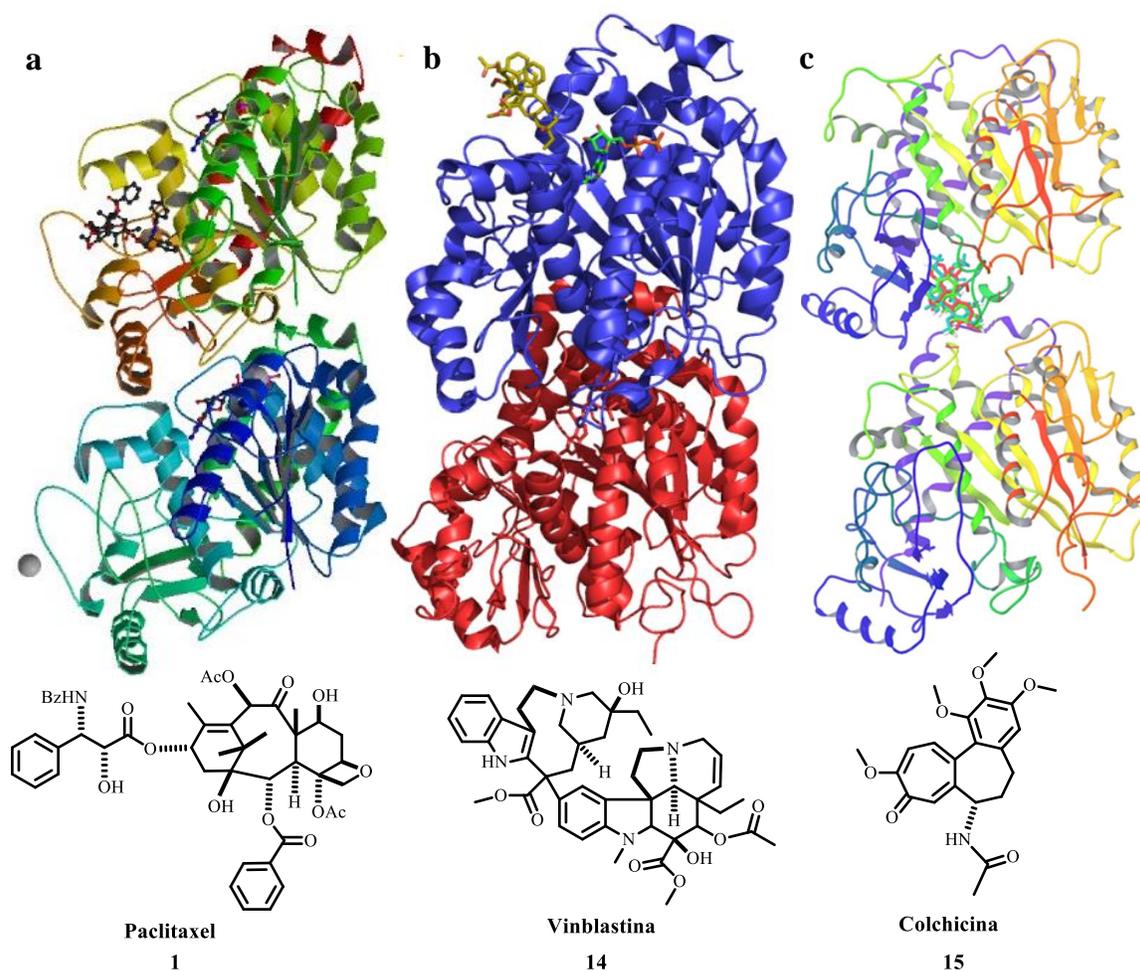
**Sitio de la colchicina:** Este sitio de unión está localizado en el centro del dímero de tubulina, en la interfase entre los monómeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina.<sup>26</sup> Los fármacos que se unen a este sitio despolimerizan a los microtúbulos a altas concentraciones y estabilizan la dinámica de los microtúbulos a bajas concentraciones. Los compuestos que se unen a este sitio: la colchicina y sus análogos, las podofilotoxinas, las combretastinas, el 2-metoxiestradiol, las dicetopiperazinas, las esteganacinas y las curacinas.<sup>28</sup>

**Sitio de los alcaloides de la vinca:** Los compuestos que se unen a este sitio son los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina y vinflunina), las criotoficinas y las dolastatinas (eribulina, espongistatinas, rhizoxina, maitansinoides y tasidotina).<sup>28</sup> Los compuestos se introducen como una cuña entre dos dímeros de tubulina interaccionando con la subunidad alfa de uno y beta de otro, esta interacción interfiere con la hidrólisis de GTP ya que evita los contactos que esta reacción requiere.<sup>29,30</sup>

**Sitio del taxol:** Los compuestos que se unen a este sitio son los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y las epotilonas (ixabepilone, patupilone y discodermólido) principalmente. Estos compuestos se unen a la  $\beta$ -tubulina en un bolsillo hidrofóbico entre el dominio intermedio y el dominio N-terminal y en contacto con el lazo M, elemento principal de las interacciones laterales entre los protofilamentos. Estabilizan a los microtúbulos por un cambio de conformación que hace más estable la estructura de la  $\beta$ -tubulina-GTP.<sup>26</sup>

## 1.6. Acoplamiento molecular proteína–ligando (*docking*)

A lo largo del tiempo el diseño y la producción de fármacos se ha renovado constantemente, todo esto con el objetivo de diseñar candidatos más eficaces para el



**Figura 8.** Sitios de unión de fármacos en el heterodímero de  $\alpha,\beta$ -tubulina. Se distinguen tres sitios principales de unión: (a) sitio del taxol, (b) sitio de los alcaloides de la vinca y (c) sitio de la colchicina. La unión de estos fármacos afecta la dinámica de los microtúbulos. **a:** tomada de *PDB* bajo el código 1JFF. **b:** tomada de *PDB* bajo el código 1Z2B. **c:** Imagen modificada de Pradeep, K. N.; Biswa, P. C.; Surya, N. V.; Ritu, A.; Ramesh, C.; Srinivas, K.; Harish, C. J. Rational desing, synthesis and biological evaluations of amino-noscapine: a high affinity tubulin-binding noscapinoid. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **2011**, 25, 443-454

tratamiento de diversas enfermedades. Una de las herramientas que más se emplea en la actualidad es el diseño de fármacos asistidos por computadora en donde los objetivos principales de esta técnica son tres: descubrir nuevas moléculas activas, optimizar

moléculas activas ya conocidas y seleccionar de un grupo dado de estructuras a los candidatos que tengan mayor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos.<sup>31</sup>

El acoplamiento molecular proteína-ligando es un método computacional que permite encontrar la orientación y posición de un ligando en el sitio activo al que se unen, es decir, encontrar la unión más probable entre un ligando y su receptor. Dicha interacción será aquella que presente una menor energía de unión.<sup>32</sup> Para llevar a cabo este tipo de estudios es necesario contar con la estructura tridimensional del receptor. La fuente principal de estas estructuras es el *Protein Data Bank* (PDB).<sup>33</sup> Para preparar el ligando se debe contar con un criterio establecido para distinguir cuál de todas las conformaciones que éste adopta en el espacio es la más adecuada para que la interacción receptor-ligando sea más eficaz.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Tanto la tubulina como los microtúbulos juegan un papel esencial en la división celular, por lo que han sido utilizados como blancos farmacológicos para el tratamiento del cáncer. Actualmente existen varios compuestos que interactúan con estas estructuras, sin embargo es importante la exploración de nuevas moléculas que interaccionen con los microtúbulos para contar con herramientas que en un futuro pudieran ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales dirigidos a este blanco farmacológico. La obtención de nuevos compuestos derivados del longipineno que interactúen con la tubulina presentan las ventajas siguientes: fácil obtención de los compuestos de partida, en este caso de la rasteviona (**10**) aislada en alto rendimiento de las raíces de la *Stevia serrata* y por otra parte el bajo costo económico que implica la obtención de los compuestos, ya que la *S. serrata* es una planta abundante en nuestro país.

## 3. HIPÓTESIS

La incorporación de ésteres aromáticos al esqueleto del longipineno y sus derivados permitirá obtener compuestos que interactúen con los microtúbulos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. General

Obtener nuevos sesquiterpenos funcionalizados con ésteres aromáticos que estabilicen a los microtúbulos a partir de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**) y moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**).

### 4.2. Específicos

- 4.2.1. Preparar el derivado de longipinano (**11**) y del morelieno (**13**) a partir del producto natural *rasteviona* (**10**).
- 4.2.2. Efectuar reacciones de esterificación en **11** y **13** para obtener los sesquiterpenos funcionalizados **19-23**.
- 4.2.3. Evaluar el efecto de los derivados sesquiterpénicos **19-23** en la polimerización de los heterodímeros de  $\alpha,\beta$ -tubulina.
- 4.2.4. Realizar cálculos de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*) entre el heterodímero de  $\alpha,\beta$ -tubulina y los compuestos que presenten interacción con dicha proteína.

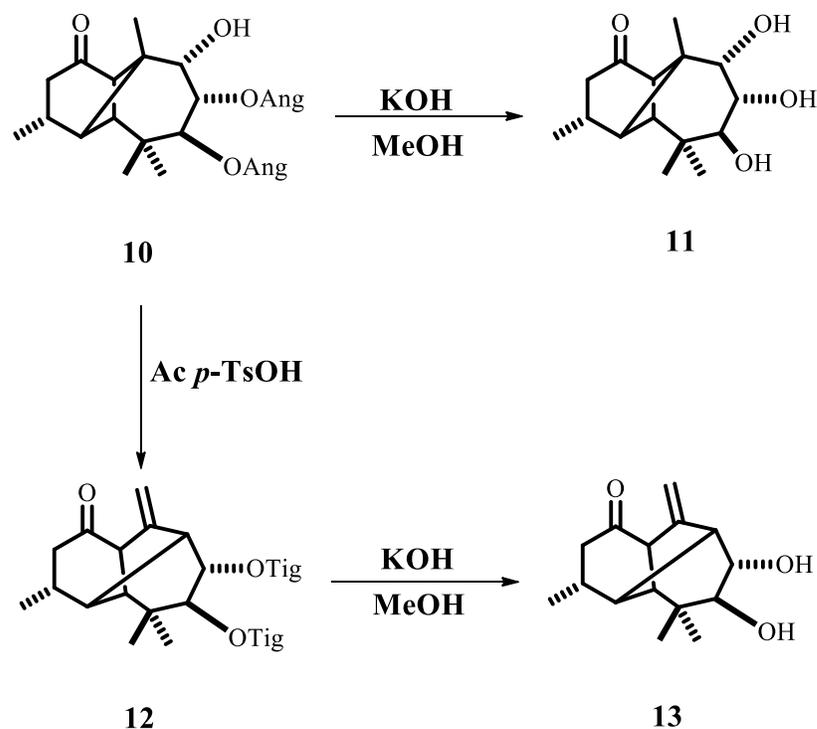
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Obtención y caracterización de los sesquiterpenos funcionalizados

El compuesto de partida fue el producto natural *rasteviona* (**10**) el cual se obtiene al someter a reflujo hexánico a las raíces de *Stevia serrata* Cav. El rendimiento promedio de este compuesto fue de alrededor de 7 g por cada kg de peso seco de la raíz.

En el Esquema 1 se muestra la secuencia de reacciones que se siguieron para obtener los compuestos de partida que fueron la longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**) y la moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**). El compuesto **11** se obtuvo al tratar a la *rasteviona* (**10**) con hidróxido de potasio en metanol, dando lugar a la remoción de los grupos angelato presentes en el producto natural con un rendimiento del 87%. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sobresalen las

señales correspondientes a los protones base de hidroxilo H-7, H-8 y H-9 en 3.83, 3.78 y 3.65 ppm respectivamente (Figura 1A, apéndice). Para la obtención de la moreli-10(14)en-7,8-diol-1-ona (**13**) primeramente se realizó la transposición tipo Wagner-Meerwein en medio ácido de **10** obteniéndose así un compuesto de tipo morelieno el cual se hidrolizó obteniéndose así el segundo compuesto de partida con un rendimiento de reacción del 80%.



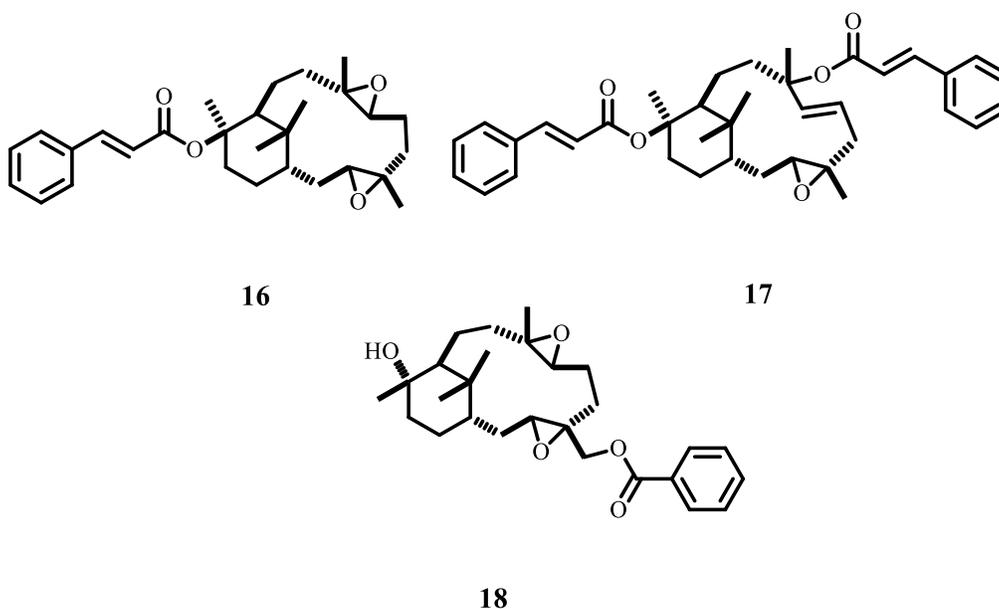
**Esquema 1.** Secuencia de reacciones para la preparación de los compuestos **11-13** a partir del producto natural **10** [Ang = (*Z*)-2-metil-2-butenóilo, Tig = (*E*)-2-metil-2-butenóilo].<sup>21,22</sup>

En el espectro de  $^1\text{H}$  se observaron las señales correspondiente a los protones vinílicos H-14 y H-14' en 5.09 y 5.05 ppm respectivamente, así como en 3.16 y 3.64 ppm se encontraron las señales correspondientes a los protones base de hidroxilo H-7 y H-8 (Figura 2A, apéndice).

Los ésteres que se incorporaron a **11** y **13** fueron derivados del ácido cinámico y benzoico. Se decidió esterificar con estos compuestos ya que existen reportes que mencionan que la incorporación de grupos cinamato y benzoato a compuestos tipo diterpénico genera

sustancias que inhiben la despolimerización de los microtúbulos al interactuar en el mismo sitio de unión del taxol dentro del heterodímero de  $\alpha,\beta$ -tubulina (Figura 9).<sup>34,35</sup>

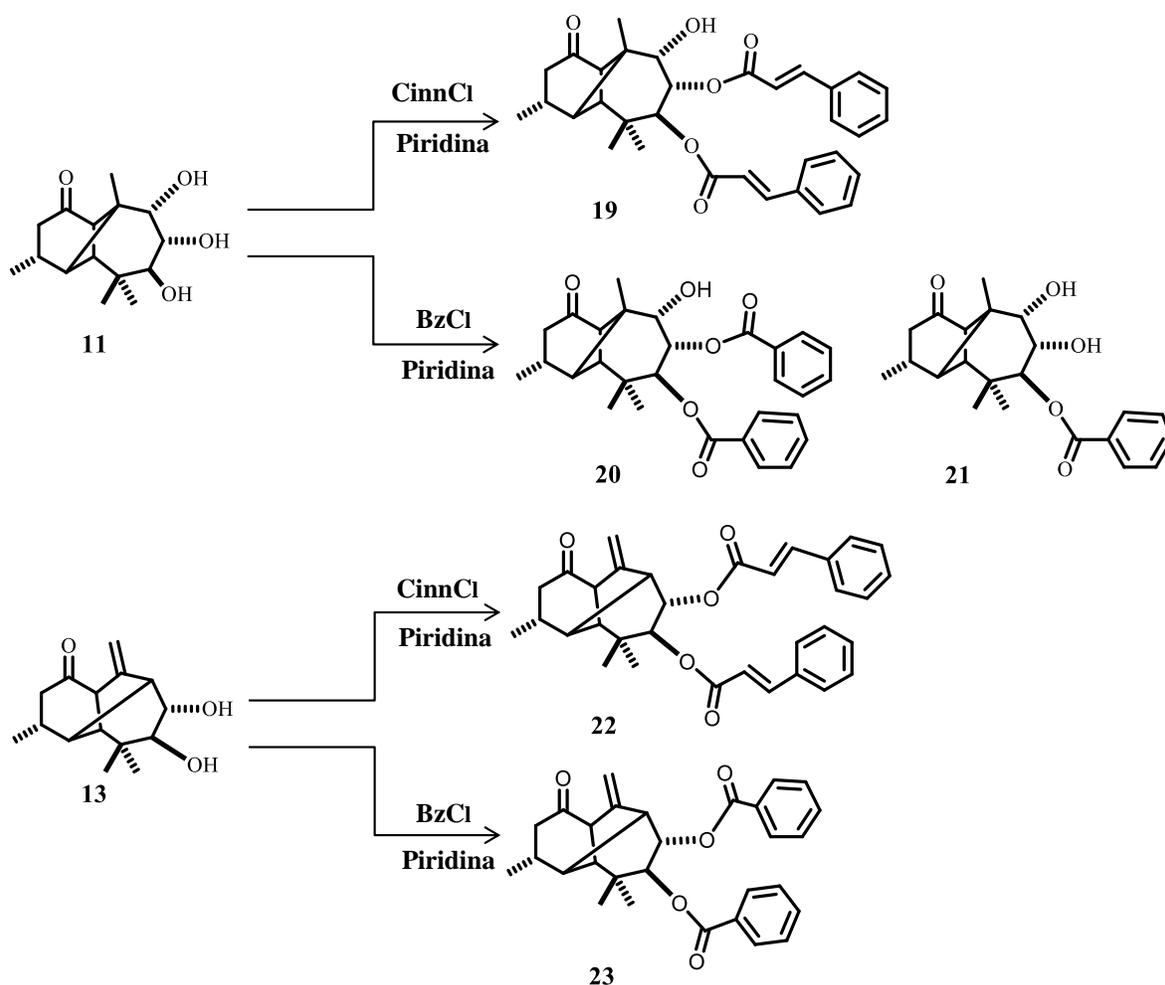
El tratamiento de **11** y **13** con cloruro de cinamoilo y cloruro de benzoilo bajo diferentes condiciones de reacción dio origen a los sesquiterpenos funcionalizados **19-23** (Esquema 2). Los sesquiterpenos funcionalizados obtenidos son compuestos nuevos por lo que su caracterización se llevó a cabo mediante espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como experimentos de RMN en una y dos dimensiones como COSY, NOESY, HSQC y HMBC.



**Figura 9.** Derivados del verticilano inhibidores de la despolimerización de los microtúbulos.

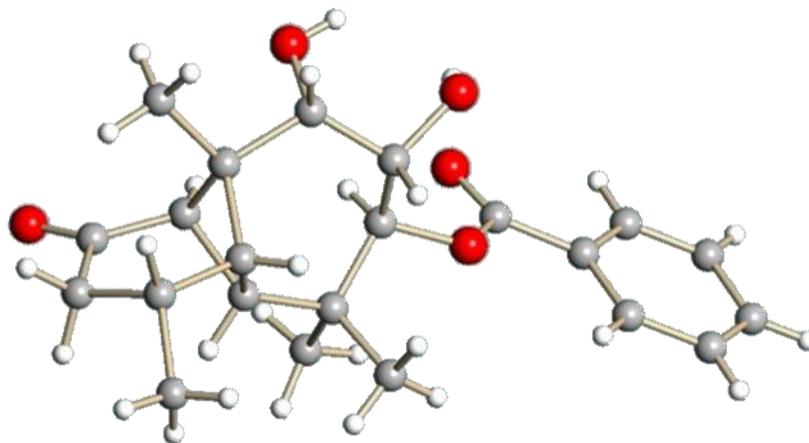
Al tratar a **11** con cloruro de cinamoilo en piridina durante 4 horas en un baño de vapor, el crudo de reacción se purificó y se obtuvo el 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**19**) con un rendimiento de reacción del 9%. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se muestran las señales a frecuencias altas de los grupos vinílicos del cinamato así como de los anillos bencénicos. En 5.59 y 5.56 ppm se observan las señales correspondientes a los hidrógenos base de cinamato H-7 y H-8 respectivamente (Figura 3A, apéndice).

Cuando el derivado del longipineno **11** se pone a reaccionar con un exceso de cloruro de benzoílo durante 4 horas en el baño de vapor, se obtiene el 7,8-dibenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**20**) con un rendimiento promedio del 10% como un aceite incoloro. Su caracterización se llevó a cabo con base en sus espectros de RMN en una y dos dimensiones. En el espectro de  $^1\text{H}$  se puede ver a frecuencias altas, las señales correspondientes a los grupos benzoato en 7.80, 7.45 y 7.39 ppm, mientras que en 5.79 y 5.72 ppm se muestran las señales de los hidrógenos base de benzoato H-8 y H-7, respectivamente (Figura 5A, apéndice). Por otra parte, cuando **11** se pone a reaccionar con



**Esquema 2.** Preparación de los ésteres sesquiterpénicos (**19-23**) a partir de la 7,8,9-triol-1-ona (**11**) y la moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**). [Cinn= (*E*)-cinamoílo, Bz=benzoílo]

cloruro de benzoílo bajo condiciones de reacción más suaves que las utilizadas para obtener el derivado **20**, se obtiene el monobenzoato **21** cuya estructura de rayos X se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Estructura del derivado **21** obtenida por difracción de rayos X. En rojo se muestran los oxígenos de la molécula.

Una solución de moreli-10(14)en-7,8-diol-1-ona (**13**) en piridina se sometió a reacción durante 2.5 horas en un baño de vapor con cloruro de cinamoílo y el crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía en columna, obteniéndose así el dicinamato de moreli-10(14)en-7,8-diol-1-ona (**22**) con un rendimiento de 70%. Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró a frecuencias altas las señales para los hidrógenos del anillo bencénico y las señales de los hidrógenos vinílicos del grupo cinamato. En 5.27 y 5.17 ppm se encontraron las señales de los protones vinílicos del morelieno y en 5.18 ppm apareció una señal compleja que integró para dos hidrógenos y que corresponde a los hidrógenos base de cinamato H-7 y H-8 (Figura 9A, apéndice).

El tratamiento de **13** con cloruro de benzoílo en piridina dio como producto principal de reacción, con un rendimiento del 72%, al dibenzoato de moreli-10(14)en-7,8-diol-1-ona (**23**). En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se muestra, en la región de los hidrógenos aromáticos, las señales correspondientes a los grupos benzoato, mientras que en 5.42 y 5.33 ppm se encuentran las señales correspondientes a los protones base de benzoílo H-7 y H-8.

Finalmente en 5.30 y 5.20 ppm se presentan las señales de los hidrógenos del metileno exocíclico del morelieno (Figura 11A, apéndice).

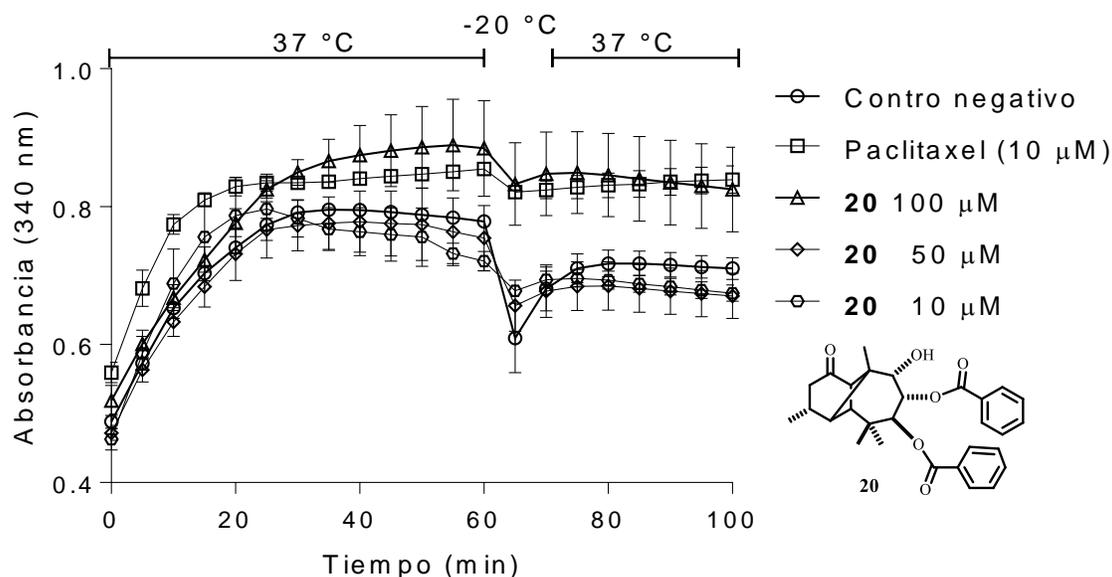
## 5.2. Determinación de la actividad estabilizante de microtúbulos *in vitro*

Se evaluó la influencia de los diésteres **19**, **20**, **22** y **23** sobre la inestabilidad dinámica de los microtúbulos formados por heterodímeros de  $\alpha,\beta$ -tubulina. Para la determinación del ensayo *in vitro* se emplearon como control positivo al paclitaxel (**1**) y como control negativo a la tubulina con el vehículo que fue DMSO. Las concentraciones finales que se emplearon para realizar este ensayo fueron de 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  para los sesquiterpenos funcionalizados y de 10  $\mu\text{M}$  para el paclitaxel (**1**). El ensayo consistió en medir el cambio de absorbancia a temperatura controlada de 37 °C durante 60 min, transcurrido este tiempo se aplicó un estímulo despolimerizante que consistió en una disminución drástica de la temperatura a -20°C por 15 minutos para finalmente reincubar a 37 °C por treinta minutos más.

En la Figura 11 se presenta el comportamiento del 7,8-dibenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**20**) sobre la despolimerización de los microtúbulos. Este compuesto no resultó ser un buen estabilizante de los microtúbulos ya que a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  presenta un comportamiento de polimerización parecido al que el paclitaxel presenta a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , mientras que a concentraciones de 50 y 10  $\mu\text{M}$  presenta un comportamiento similar al del control de tubulina. El compuesto **23** a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  mostró favorecer un incremento en la polimerización de la tubulina, sin embargo al momento de dar el estímulo despolimerizante este compuesto no mostró ser tan buen estabilizador de microtúbulos. A una concentración de 50  $\mu\text{M}$  favoreció la polimerización de la tubulina ligeramente más que el paclitaxel y a 10  $\mu\text{M}$  la polimerización de tubulina presenta un comportamiento similar al del control de tubulina (Figura 12).

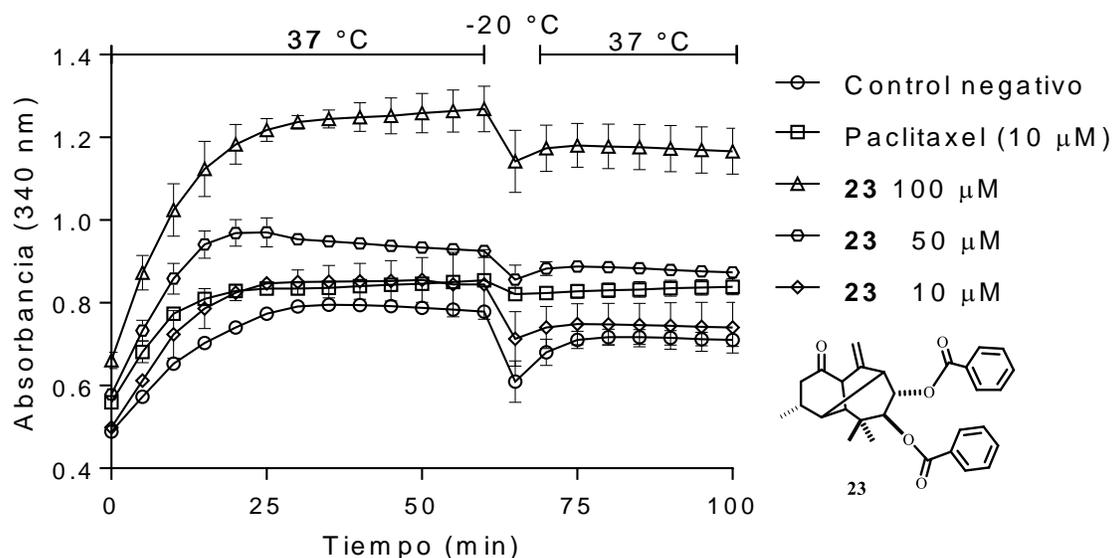
Los compuestos que presentaron dentro de su estructura un grupo cinamato mostraron tener un mejor efecto sobre la despolimerización de microtúbulos. El dicinamato **22** a una concentración de 50 y 100  $\mu\text{M}$  favoreció la polimerización de la proteína y al momento de dar el estímulo despolimerizante este compuesto presentó un efecto parcial de

estabilización de microtúbulos mientras que a 10  $\mu\text{M}$  el comportamiento fue similar al control de tubulina (Figura 13). El 7,8-dicinato de longipnan-7,8,9-triol-1-ona (**19**) demostró ser el compuesto que mejor actividad presentó en el ensayo de polimerización *in vitro* de la  $\alpha,\beta$ -tubulina ya que se pudo apreciar un aumento en la velocidad de polimerización con respecto a la del paclitaxel de una manera dependiente de la concentración. Se observó además una retención de la polimerización al momento de aplicar el estímulo despolimerizante a concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  incluso mejor que el paclitaxel (Figura 14). Cabe hacer notar que el dicinato **19** es estructuralmente menos complejo que el paclitaxel.

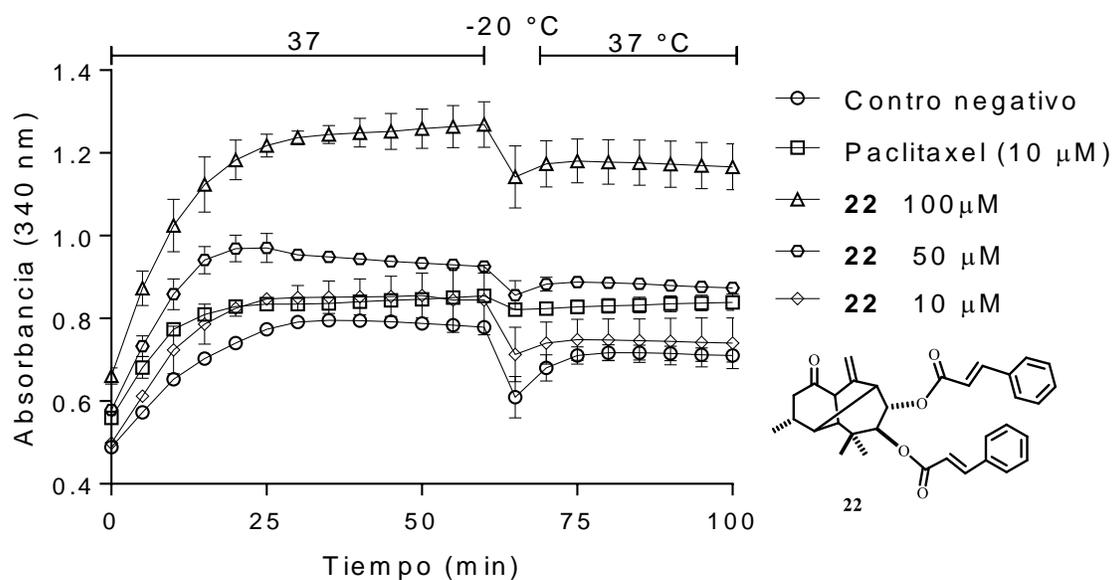


**Figura 11.** Efecto del 7,8-dibenzoato de longipnan-7,8,9-triol-1-ona (**20**) en la polimerización de  $\alpha,\beta$ -tubulina sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por disminución de la temperatura,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm \text{EE}$ .

Los resultados obtenidos para los sesquiterpenos **19** y **22** concuerdan con los obtenidos para los verticilanos **14** y **15**<sup>34,35</sup> ya que la adición de grupos cinamato demostró ser bastante efectiva debido a que este grupo interacciona, de acuerdo al modelo de acoplamiento

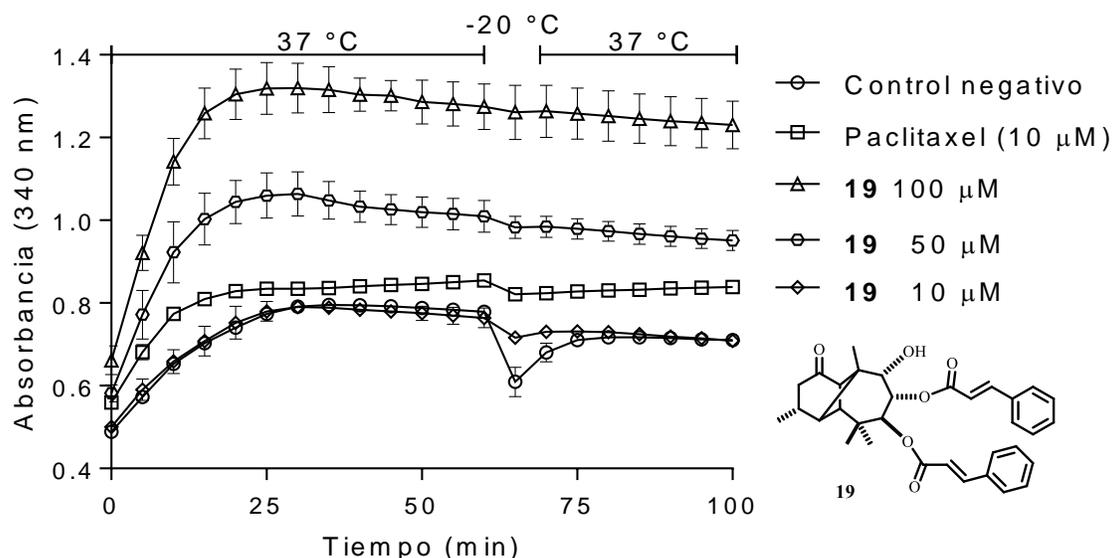


**Figura 12.** Efecto del dibenzoato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**23**) en la polimerización de  $\alpha,\beta$ -tubulina sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por disminución de la temperatura,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm EE$ .



**Figura 13.** Efecto del dicinamato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**22**) en la polimerización de  $\alpha,\beta$ -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por disminución de la temperatura,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm EE$ .

molecular, con los mismo aminoácidos con los que la fenilisoserina del paclitaxel interacciona dentro de la tubulina.



**Figura 14.** Efecto del 7,8-dicinamato de longipnan-7,8,9-triol-1-ona (**19**) en la polimerización de  $\alpha,\beta$ -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por disminución de la temperatura,  $n = 3$ .  $\bar{x} \pm EE$

### 5.3. Estudio de reconocimiento molecular *in silico*

Una de las herramientas que resulta ser de más utilidad para la comprensión de las interacciones proteína-ligando es el análisis de reconocimiento molecular. Como se mencionó en la introducción, este análisis permite conocer el sitio de interacción de un compuesto con una proteína.

Debido a lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la exploración de los posibles sitios de interacción de los compuestos preparados con el heterodímero de  $\alpha,\beta$ -tubulina. El sitio de unión al que se le puso énfasis al momento de buscar la interacción de los compuestos con la tubulina fue el sitio de unión del paclitaxel, ya que algunos de esos compuestos presentaron tener una actividad estabilizadora de los microtúbulos.

Para realizar el ensayo *in silico* los compuestos se modelaron y se efectuó una búsqueda conformacional de cada uno bajo el protocolo Monte Carlo con el campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF) en el programa Spartan'04 para así obtener la estructura de mínima energía global de cada compuesto. El mínimo global se sometió a una optimización de la geometría empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) a nivel B3LYP/DGDZVP en el programa Gaussian 03<sup>36</sup> para obtener un modelo más preciso de los compuestos que se utilizaron como ligandos en el programa Autodock Tools.

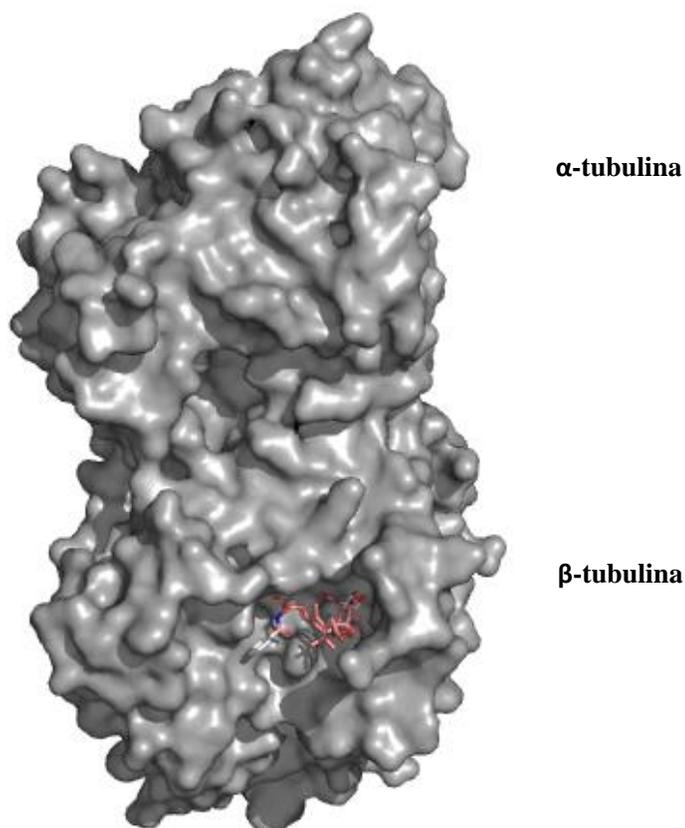
La estructura de la proteína así como la del paclitaxel se obtuvieron del archivo cristalográfico del *RCS Protein Data Bank* bajo el código 1JFF<sup>33</sup> y se procesaron con el programa Autodock Tools.

Para la realización del estudio de *docking* se empleó el programa AutoDock Vina versión 1.1.2.<sup>37</sup> Primeramente se realizó un *docking* ciego con el fin de buscar interacciones dentro de toda la proteína con una malla de búsqueda de 100 Å y finalmente se realizó un *docking* refinado con una malla de búsqueda de 25 Å, en el sitio de interacción del paclitaxel.

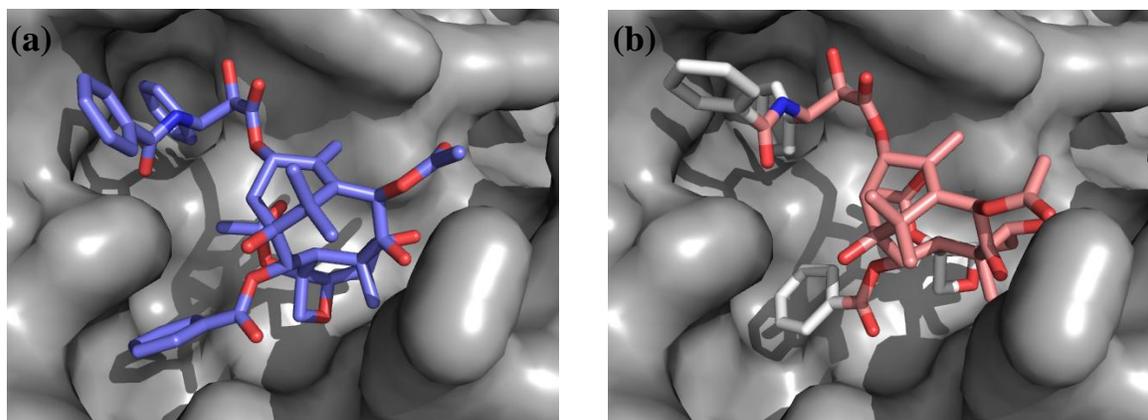
Dado que el efecto que presentaron los compuestos fue el de inhibir la despolimerización de la tubulina, los resultados de *docking* de los compuestos obtenidos se compararon con el que presenta el paclitaxel. En la Figura 15 se muestra el modo de unión de mayor afinidad de este agente con una  $E_{dock} = -10$  kcal/mol.

Para validar los datos arrojados por el *docking*, el resultado obtenido del paclitaxel se comparó con el de la estructura cristalográfica del heterodímero de  $\alpha,\beta$ -tubulina con paclitaxel (Figura 16a) obtenida del *RCSB Protein Data Bank* bajo el código 1JFF.<sup>16,40</sup> Se observó que la interacción se realiza en el mismo sitio y que presentan una orientación igual, lo que permite validar los resultados obtenidos del estudio de *docking* (Figura 16b).

Los sesquiterpenos funcionalizados **19–23** se evaluaron con el heterodímero de la tubulina en un *docking* ciego como primer paso para evaluar el sitio de interacción de éstos en la estructura completa de la proteína. Todos los compuestos mostraron tener una mayor interacción en el bolsillo hidrofóbico de la unidad  $\beta$  del heterodímero en el mismo sitio de interacción que el paclitaxel. En la Tabla 2 se presentan las energías de *docking* ( $E_{dock}$ ) que presentaron los ésteres sesquiterpénicos tanto del *docking* ciego como del *docking* refinado.



**Figura 15.** Modo de unión de mayor afinidad del paclitaxel (**1**) en el heterodímero de  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, obtenido por *docking* ciego,  $E_{dock} = -10.0$  kcal/mol.



**Figura 16.** (a) Ampliación del sitio de unión de la estructura cristalográfica del heterodímero de  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina con paclitaxel (**1**) en azul. (b) Modo de unión del paclitaxel obtenido por *docking* refinado (en rosa),  $E_{dock} = -10.0$  kcal/mol, con la estructura cristalográfica.

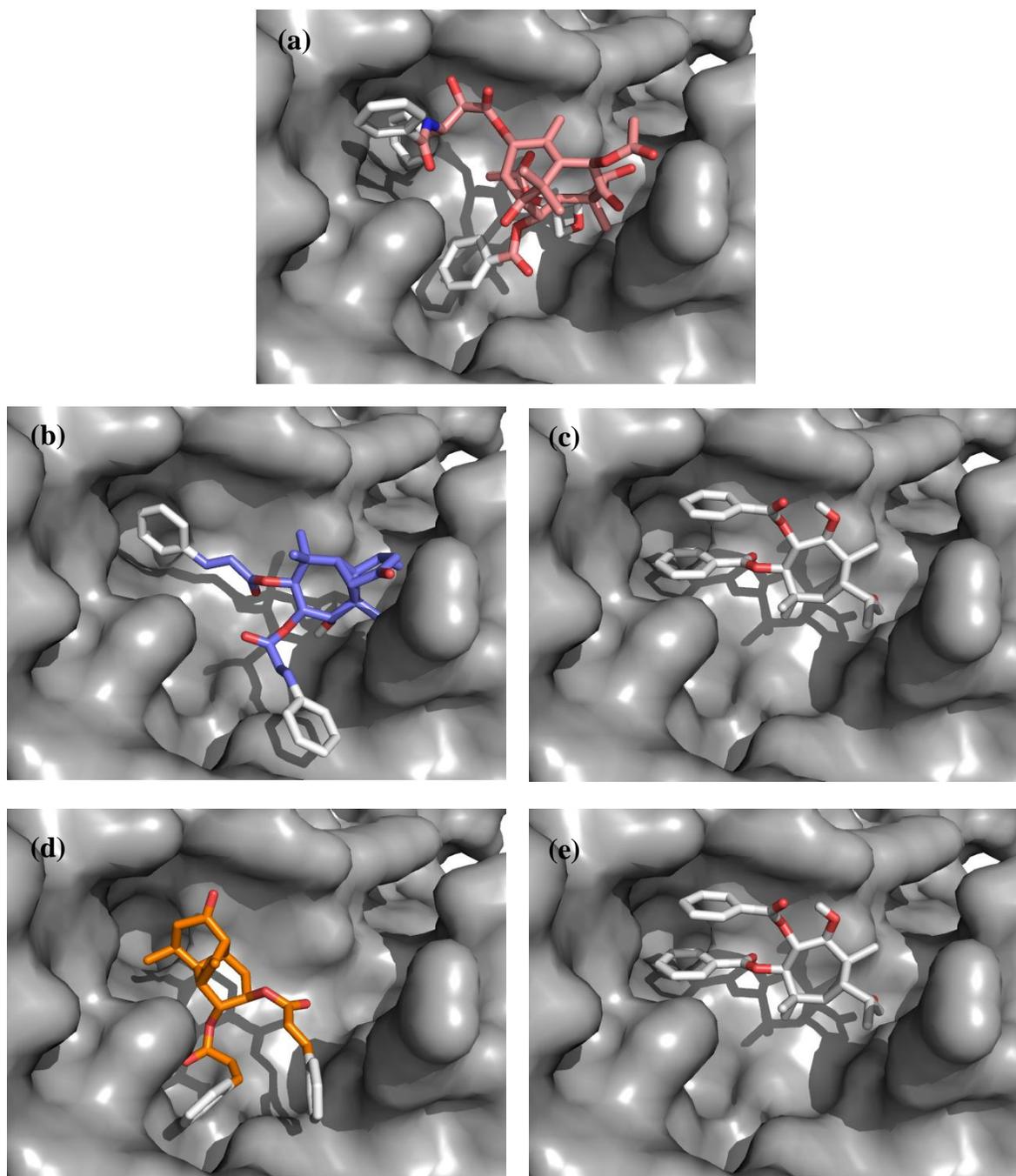
Los resultados *in silico* concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* ya que el compuesto **20**, que resultó ser el de menor actividad al momento de favorecer la polimerización de la tubulina, presentó una menor energía de *docking* en comparación al dicinamato **19** que resultó tener una mayor actividad al favorecer la polimerización de la tubulina y evitar la despolimerización de los microtúbulos. Esto es interesante de observar ya que reafirma el hecho de que la interacción en bolsillo hidrofóbico situado en la  $\beta$ -tubulina es indispensable para que se lleve a cabo la inhibición de la despolimerización de los microtúbulos.

**Tabla 2.** Energías de *docking* de los sesquiterpenos funcionalizados **19**, **20**, **22** y **23** comparadas con la energía del paclitaxel. <sup>a</sup>*Docking* ciego (malla de búsqueda 100 Å), <sup>b</sup>*Docking* refinado (malla de búsqueda 25 Å).

Compuesto	$E_{\text{dock}}$ (kcal/mol)	
	D. C. <sup>a</sup>	D. E. <sup>b</sup>
Paclitaxel ( <b>1</b> )	-9.9	-10.0
<b>19</b>	-9.0	-9.3
<b>20</b>	-7.7	-7.9
<b>22</b>	-8.7	-8.9
<b>23</b>	-8.2	-8.4

En la Figura 17 se comparan las interacciones que presentan los sesquiterpenos funcionalizados y el paclitaxel con la tubulina. Se puede observar la disposición de los grupos éster responsables en gran medida de la actividad de los sesquiterpenos funcionalizados.

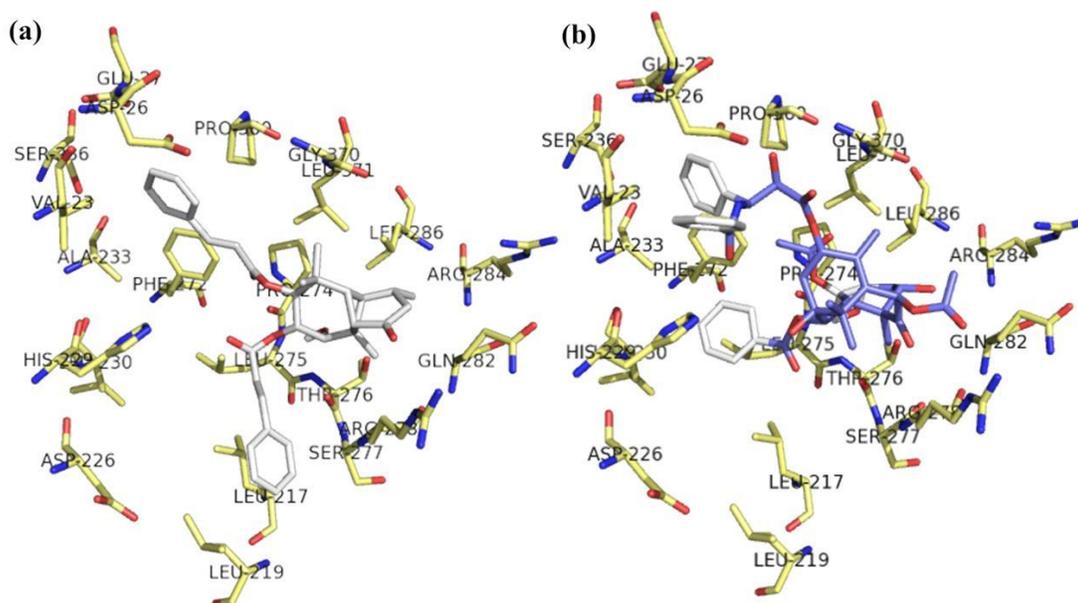
El 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**19**) presentó una  $E_{\text{dock}} = -9.3$  kcal/mol. En la Figura 14(a) se muestra que uno de los grupos cinamato interacciona en la misma cavidad del grupo *N*-benzoilfenilisoserina del paclitaxel (**1**). Se sabe que este residuo le confiere gran parte de su actividad antitumoral.<sup>38</sup> El dicinamato **19** presenta interacciones hidrofóbicas entre el grupo cinamato en posición C-7 y los residuos Asp-26, Ser-386, Val-



**Figura 17.** Comparación de las interacciones de los sesquiterpenos funcionalizados con el paclitaxel. (a) Interacción del paclitaxel (**1**) en su sitio activo. (b) Interacción de **19** en el sitio activo del paclitaxel. (c) Interacción de **20** en el sitio activo del paclitaxel. (d) Interacción de **22** en el sitio activo del paclitaxel. (e) Interacción de **23** en el sitio activo del paclitaxel.

23, Ala-233 y Pro-360, cabe destacar que el residuo Phe-272 presenta una interacción  $\pi$ - $\pi$  con el grupo vinílico del cinamato. El grupo cinamato en esta posición es el que interacciona en la misma cavidad que la *N*-benzoilfenilisoserina del paclitaxel (**1**). El grupo cinamato en posición C-8 presenta interacciones hidrofóbicas con los residuos Leu-217, Leu-275, Ser-277, Arg-278 y Thr-276. Otra interacción importante es el puente de hidrógeno que se forma entre el oxígeno del grupo –OH de **19** y el hidrógeno del grupo amino del residuo Thr-276 a una distancia de 2.8 Å (Figura 18a). Este compuesto presenta interacciones con los mismos aminoácidos con los que interacciona el paclitaxel (**1**). Los residuos Val-23, Asp-26, Ser-236 y Ala-233 interaccionan con la cadena lateral de (2*R*,3*S*)-*N*-benzoil-3-fenilisoserina.

Los aminoácidos Leu-217, Leu-219, His-229 y Leu-230 interactúan con el anillo aromático del benzoílo en C-2. Los aminoácidos Phe-272, Pro-274, Leu-275 y Thr-276 interaccionan con el sistema de taxano cuyo sitio de unión queda completamente conformado al considerar los residuos de Pro-360, Arg-369, Gly-370 y Leu-371<sup>16</sup> (Figura 18b).



**Figura 18.** Interacciones del cinamato **19** y del paclitaxel (**1**) con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la  $\beta$ -tubulina, obtenido por *docking* refinado.

## 6. RESUMEN DE RESULTADOS

- Se prepararon y caracterizaron cinco nuevos derivados del longipineno (**19-23**) a partir de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**) y moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**).
- El benzoato **21** se logró cristalizar y se confirmó su estructura por difracción de rayos X.
- El benzoato **20** no acelera la polimerización de los heterodímeros de  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina.
- El cinamato **22** y el benzoato **23** aceleraron el proceso de polimerización de los heterodímeros de  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina *in vitro*.
- El cinamato **19** acelera la polimerización de los heterodímeros de  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina presentando un efecto estabilizante de los microtúbulos.
- Los estudios de reconocimiento molecular (*docking*) revelaron que el derivado del longipineno **19** ( $E_{dock} = -9.3$  kcal/mol) ocupa el sitio activo del paclitaxel, sugiriendo el mecanismo por el cual producen la estabilidad en los microtúbulos.

## 7. CONCLUSIONES

- La evaluación de la actividad de los ésteres aromáticos del longipineno sobre la polimerización de la  $\alpha$ , $\beta$ -tubulina, comparada con el efecto producido por el paclitaxel, permitió encontrar nuevos estabilizadores de microtúbulos. Los estudios de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*), generaron los modelos teóricos para explicar dicha actividad.
- El compuesto que presentó mayor actividad estabilizante fue el derivado del longipineno que tiene en su estructura dos grupos cinamoílo y un grupo hidroxilo, el cual corresponde al 7,8-dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**19**).
- Es necesario hacer notar que este compuesto no presenta el mismo esqueleto químico que el paclitaxel y posee una estructura química más simple.

## 8. PERSPECTIVAS

- Continuar los estudios farmacológicos del derivado cinamoilado del longipineno estabilizador de microtúbulos **19** en líneas celulares para conocer la concentración mínima inhibitoria y realizar ensayos de apoptosis y citotoxicidad en líneas celulares, así como conocer la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de este derivado en ratones.
- Reducir el grupo carbonilo presente en la longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**) y moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**) y así estudiar el efecto sobre la  $\alpha,\beta$ -tubulina al adicionar un grupo éster en esa posición.
- Estudiar el efecto sobre la  $\alpha,\beta$ -tubulina de ésteres del longipineno con derivados del ácido cinámico funcionalizados.
- Probar nuevas condiciones de reacción para la obtención del cinamato **19** esto con el objetivo de mejorar el rendimiento de reacción.

## 9. Parte experimental

### 9.1. Procedimientos generales para la separación de compuestos

#### 9.1.1. Cromatografía en columna abierta

Esta técnica se utilizó para la separación y purificación de los compuestos obtenidos. Se realizó en columnas de vidrio, utilizando como fase fija gel de sílice de malla 230-400 y 100-200. Como fase móvil se utilizó la mezcla adecuada de disolventes según las características del producto a separar, se eluyó a presión atmosférica o con presión de aire.

#### 9.1.2. Cromatografía en capa fina

Este método se utilizó para la identificación de los compuestos. Se utilizaron cromatofolios de gel de sílice soportada en aluminio Merck 60 F<sub>254</sub>. La detección de los compuestos presentes en la placa se llevó a cabo con luz UV de onda corta (254 nm) y sulfato cérico amoniacal como agente cromógeno preparado con 12 g de sulfato cérico amoniacal, 22.5 mL de ácido sulfúrico y 350 g de hielo.

## **9.2. Datos generales para la identificación y caracterización estructural de los derivados del longipineno**

### **9.2.1. Determinación de los puntos de fusión**

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

### **9.2.2. Rotación específica**

La rotación específica se determinó a cinco longitudes de onda (589, 578, 546, 436 y 365 nm) utilizando un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341.

### **9.2.3. Espectroscopía de infrarrojo**

Los espectros de IR se obtuvieron usando un espectrofotómetro marca BUCK Scientific 500 utilizando  $\text{CHCl}_3$  como disolvente. Se dan sólo las lecturas de las bandas más importantes.

### **9.2.4. Espectroscopía de ultravioleta**

Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo lambda 12 utilizando etanol como disolvente.

### **9.2.5. Resonancia magnética nuclear**

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se determinaron en  $\text{CDCl}_3$  utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros a 300 MHz para  $^1\text{H}$  y a 75.4 MHz para  $^{13}\text{C}$ , así como los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300. La multiplicidad de las señales se indica de acuerdo a las siguientes abreviaciones: s (simple), d (doble), dd (doble de dobles), t (triple), q (cuádruple), quint (quíntuple), m (múltiple).

### 9.2.6. Espectrometría de masa (EM)

Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro Absciex modelo 3200 QTRAP por electrospray (ESI).

### 9.3. Difracción de rayos X

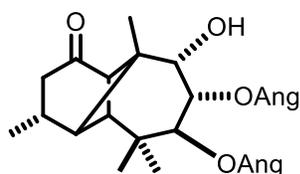
Los análisis por difracción de rayos X de los compuestos que cristalizaron de forma adecuada se llevaron a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 a 298 K equipado con radiación de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$ ). Los datos colectados se resolvieron con el programa SHELXS-97.

## 9.4. Obtención de los compuestos de partida para la funcionalización de los longipinenos

### 9.4.1. Colecta de *Stevia Serrata Cav.*

La colecta de la planta se realizó en el municipio de Iratzio en el estado de Michoacán el día 7 de octubre de 2011. Las partes aéreas de la planta se separaron de las raíces. Las raíces se extendieron en papel absorbente y se dejaron secar en un cuarto a temperatura ambiente. Una vez que la raíz se secó, se realizó su molienda el día 1 de noviembre de ese mismo año.

### 9.4.2. Obtención de la materia prima

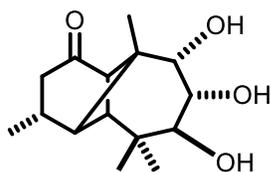


El producto natural rasteviona (**10**) se aisló de *Stevia serrata Cav.*

Para la extracción, un lote de 1.5 kg de raíz se sometió a reflujo durante 4 horas en 2.5 L de hexano. El extracto se filtró y se concentró en un rotavapor, dejando reposar con 200 mL de

hexano hasta la formación de cristales, los cuales se filtraron, dando 10 g de placas blancas de punto de fusión de 130-131°C.<sup>21</sup>

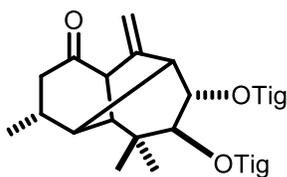
#### 9.4.3. Obtención de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (11)



A una solución de 4 g de cristales de rasteviona (**10**) en 50 mL de metanol se agregaron 4 g de hidróxido de potasio disuelto en la mínima cantidad de agua y se sometió a reflujo durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente en el rotavapor y el concentrado se vertió sobre hielo extrayendo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua tres veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad obteniéndose un aceite denso color amarillo el cual se cristalizó en hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron 1.86 (87%) g de cristales color blanco en forma de placas con un punto de fusión de 129-130 °C.<sup>21</sup>

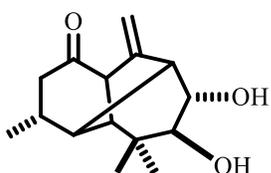
#### 9.4.4. Obtención del ditiglato del morelieno



A una solución de 500 mg de **10** en 40 mL de benceno se le agregaron 100 mg de ácido *p*-toluensulfónico y se sometió a reflujo por una hora con una trampa Dean-Stark. Transcurrido el tiempo de reacción se concentró el benceno en un rotavapor, el

crudo de reacción se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó tres veces con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción (530 mg) se purificó en una columna cromatográfica utilizando una columna de vidrio de 3 cm de diámetro empacada con gel de sílice 100-200 empleando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo (9:1, 8:2 y 7:3). De las fracciones 12-21 eluidas con hexano-acetato de etilo 9:1 se obtuvieron 300 mg (75%) de un aceite denso incoloro correspondiente al ditiglato de morelieno (**12**).<sup>22</sup>

#### 9.4.5. Obtención de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (13)

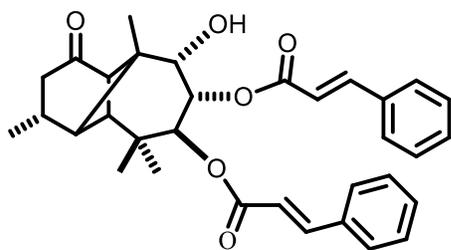


A una solución de 300 mg de **12** en 20 mL de metanol se le agregaron 400 mg de KOH y se colocó en reflujo por 2 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporaron  $\frac{3}{4}$  partes de

metanol en un rotavapor. El crudo de reacción se extrajo con acetato de etilo y se lavó con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad. Se obtuvo un aceite denso incoloro el cual se recrystalizó con hexano-acetato de etilo, para dar cristales blancos en forma de placas con un punto de fusión de 142-143 °C con un rendimiento de reacción del 80%, el cual coincide con el reportado en la literatura.<sup>22</sup>

## 9.5. Preparación y datos espectroscópicos de los derivados del longipineno funcionalizados

### 9.5.1 7,8-Dicinamato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (19)

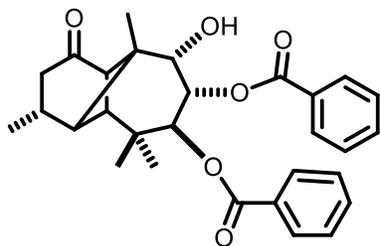


Una solución de 30 mg de **11** en 0.5 mL de piridina a la que se le agregaron 100  $\mu$ L de cloruro de benzoílo se dejó reaccionar durante 2.5 horas en un baño de vapor. Trascurrido el tiempo de reacción, se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo lavando la

fase orgánica con solución de ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad en un rotavapor. El crudo de reacción se sometió a una columna cromatográfica utilizando una columna de 2.5 cm empacada con gel de sílice 230-400 y empleando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo (95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1) y acetato de etilo. De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 95:5 se obtuvieron 7 mg (9%) de **19**,  $[\alpha]_{589} +125$ ,  $[\alpha]_{578} +133$ ,  $[\alpha]_{546} +160$ ,  $[\alpha]_{436} +398$  (*c* 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3610, 3604, 2983, 2966, 2929, 1714, 1637, 1282, 1172, 1020 $\text{cm}^{-1}$ ; UV (EtOH)  $\lambda$  201 (log  $\epsilon$  4.50), 217 (log  $\epsilon$  4.46), 223 (log  $\epsilon$  4.40), 273 (log  $\epsilon$  4.60); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) 7.63 (1H, d,  $J=5.4$  Hz, H-18') 7.58 (1H, d,  $J=5.5$  Hz, H-18), 7.4 (4H, m,  $J = 11.7, 4.6$  Hz, Ar), 7.35 (6H, m,  $J = 7.6, 3.3$  Hz, Ar), 6.36 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-17) 6.31 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-17'), 5.59 (1H, d,  $J=11.1$  Hz, H-7), 5.56 (1H, dd,  $J=17.6, 2.6$  Hz, H-8), 3.89 (1H, d,  $J=2.3$  Hz, H-9), 3.14 (1H, d,  $J= 5.5$  Hz, H-11), 2.74 (1H, dd,  $J = 19.0, 8.5$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.38 (1H, q,  $J=4.0, 1.9$  Hz, H-3), 2.29 (1H, d,  $J= 5.7$  Hz, H-4), 2.17 (1H, dd,  $J=18.9, 6.8$  Hz, H-2 $\beta$ ), 1.86

(1H, s, H-5), 1.17 (3H, s, Me-13), 1.12 (3H, d,  $J=6.7$  Hz, Me-15), 1.09 (3H, s, Me-14), 0.9 (3H, s, Me-12); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  211.7 (C-1), 166.4 (C-16), 165.7 (C-16'), 146.3 (C-18'), 145.6 (C-18), 134.1 (C-19 y C-19'), 130.5 (C-22'), 130.3 (C-22), 128.8 (C-21, C-21', C-23 y C-23'), 128.1 (C-20' y C-24'), 128.1 (C-20 y C-24), 117.6 (C-17), 117.0 (C-17') 75.1 (C-9), 71.8 (C-8), 71.6 (C-7), 51.6 (C-11), 46.3 (C-5), 45.9 (C-10), 42 (C-2), 35.2 (C-6), 27.1 (C-12), 20.5 (C-15), 19.9 (C-13), 19.7 (C-14); EMESI  $m/z$  529 [M+1], 131, 103, 105, 77, 51.

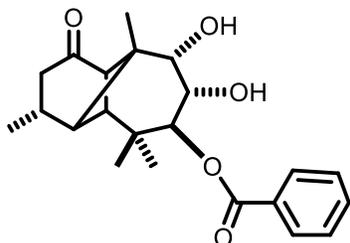
### 9.5.2. 7,8-Dibenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (20)



Una solución de 30 mg de **11** en 1 mL de piridina y 129  $\mu\text{L}$  de cloruro de benzoilo se dejó reaccionar durante 4 horas en un baño de vapor. Trascurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo lavando la fase orgánica con una solución de ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad en un rotavapor. El crudo de reacción (45 mg) se sometió a una columna cromatográfica utilizando una columna de 2.5 cm empacada con gel de sílice 230-400 y empleando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 1:1) y acetato de etilo. De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 9:1 se obtuvieron 8.9 mg de **20** (10%),  $[\alpha]_{589} +32$ ,  $[\alpha]_{578} +34$ ,  $[\alpha]_{546} +39$ ,  $[\alpha]_{436} +74$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3609, 2966, 1717, 1278, 1120  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (EtOH)  $\lambda$  200 (log  $\epsilon$  4.47), 198 (log  $\epsilon$  4.37), 230 (log  $\epsilon$  4.37); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.8 (4H, dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, H-18, H-18', H-22 y H-22'), 7.39 (2H, t,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, H-20 y H-20'), 7.45 (4H, dd,  $J = 7.2, 2.1$  Hz, H-19, H-19', H-21 y H-21'), 5.79 (1H, d,  $J = 11.1$  Hz, H-7), 5.72 (1H, dd,  $J = 11.1, 2.3$  Hz, H-8), 3.97 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-9), 3.20 (1H, d,  $J = 5.2$  Hz, H-11), 2.6 (1H, dd,  $J = 27.5, 8.7$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.4 (1H, q,  $J = 13.4, 7.0$ , H-3), 2.36 (1H, d,  $J = 5.8$ , H-4), 2.18 (1H, dd,  $J = 14.0, 5.8$ , H-2 $\beta$ ), 1.90 (1H, s, H-5), 1.25 (3H, s, Me-13), 1.16 (3H, d,  $J=7.0$ , Me-15), 1.10 (3H, s, Me-14), 1.02 (3H, s, Me-12); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  211.3 (C-1), 165.9 (C-16), 165.4 (C-16'), 133.2 (C-20 y C-20'), 132.8 (C-18), 129.6 (C-17), 129.5 (C-18'), 129.4 (C-19), 128.9 (C-

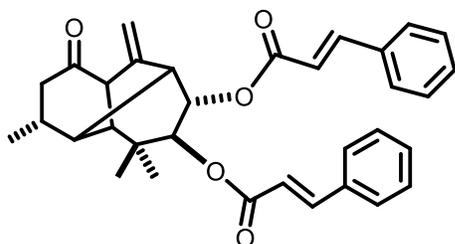
17'), 128.2 (C-19'), 128.1 (C-22 y C-22'), 75.0 (C-9), 72.2 (C-8), 71.8 (C-7), 51.6 (C-11), 46.3 (C-5), 45.9 (C-10), 44.3 (C-2), 35.3 (C-6), 27.1 (C-12), 20.5 (C-14), 19.9 (C-13), 19.7 (C-15); EMESI  $m/z$  477 [M+1], 337, 215, 187, 173, 105.

### 9.5.3. 7-Monobenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (21)



Una solución de 74 mg de **11** en 1.5 mL de piridina se le agregaron 200 mg de anhídrido benzoico se dejó reaccionar durante 30 horas a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo de reacción, se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo lavando la fase orgánica con solución de ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad en un rotavapor. El crudo de reacción (87 mg) se sometió a una columna cromatográfica utilizando una columna de 2.5 cm empacada con gel de sílice 230-400 y empleando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 1:1) y acetato de etilo. De las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 8:2 se obtuvieron 30 mg (45%) de **20** en forma de cristales blancos con p.f de 208-209 °C,  $[\alpha]_{589} +30$ ,  $[\alpha]_{578} +11$ ,  $[\alpha]_{546} +11$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3588, 2916, 2930, 1714, 1279, 1116,  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (EtOH)  $\lambda$  201 ( $\log \epsilon$  4.50), 228 ( $\log \epsilon$  4.31); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  8.09 (2H, dd,  $J= 9.8, 1.4$  Hz, H-18 y H-22), 7.59 (1H, t,  $J= 16.1, 1.3$  Hz, H-20), 7.45 (2H, dd,  $J= 17.7, 1.9$  Hz, H-19 y H-21), 5.39 (1H, d,  $J= 10.9$  Hz, H-7), 4.06 (1H, dd,  $J= 10.8, 3.3$  Hz, H-8), 3.87 (1H, d,  $J= 3.7$  Hz, H-9), 3.06 (1H, d,  $J= 5.4$  Hz, H-11), 2.59 (1H, dd,  $J= 8.5, 2.6$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.36 (1H, q,  $J= 8.5, 2.6$ , H-3), 2.21 (1H, dd,  $J= 9.8, 6.0$ , H-2 $\beta$ ), 2.12 (1H, d,  $J= 6$ , H-4), 1.80 (1H, s, H-5), 1.1 (3H, s, Me-13), 1.11 (3H, d,  $J=6.7$ , Me-15), 1.08 (3H, s, Me-14), 0.97 (3H, s, Me-12); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  211.8 (C-1), 167.1 (C-16), 133.6 (C-17), 133.3 (C-20), 130.2 (C-22), 129.9 (C-21), 129.8 (C-19), 128.5 (C-20), 77.0 (C-9), 75.1 (C-7), 70.1 (C-8), 51.5 (C-11), 46.4 (C-5), 45.8 (C-10), 44.1 (C-4), 42.0 (C-2), 35.4 (C-6), 27.5 (C-12), 27.0 (C-3), 20.7 (C-14), 19.8 (C-13), 19.7 (C-15); EMESI  $m/z$  313 [M+1], 357, 300, 286.8, 269, 253, 149, 74, 73. Cristal monoclinico,  $P2_1$ ,  $a= 9.128$  (4) Å,  $b= 10.823$  (5) Å,  $c= 10.227$  (5) Å,  $\alpha= 90^\circ$ ,  $\beta= 102.01(4)^\circ$ ,  $\gamma= 90^\circ$ ,  $Z=4$ .

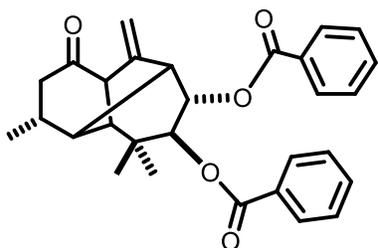
#### 9.5.4. Dicinamato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (22)



A una solución de 30 mg de **13** en 0.4 mL de piridina se le agregaron 110 mg de cloruro de cinamoílo y se puso a reaccionar en un baño de vapor por 3 horas. Trascurrido el tiempo de reacción, se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo lavando la fase

orgánica con solución de ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad en un rotavapor. El crudo de reacción (50 mg) se sometió a una columna cromatográfica utilizando una columna de 2 cm empacada con gel de sílice 230-400 y empleando como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo (95:5, 93:7, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1) y acetato de etilo. De las fracciones 32-41, eluídas con hexano-acetato de etilo 93:7 se obtuvieron 42 mg (72%) de **22** como un aceite denso incoloro,  $[\alpha]_{589} +368$ ,  $[\alpha]_{578} +223$ ,  $[\alpha]_{546} +236$ ,  $[\alpha]_{436} +279$  (*c* 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3043, 3036, 2970, 1713.9, 1709, 1638, 1167.5  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (EtOH)  $\lambda$  217 (log  $\epsilon$  4.29), 222 (log  $\epsilon$ =4.21), 277 (log  $\epsilon$  5.52); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.66 (1H, d,  $J=3.5$ , H-18) 7.64 (1H, d,  $J=3.6$ , H-18'), 7.4 (4H, m,  $J = 11.7, 4.6$  Hz, Ar), 7.35 (6H, m,  $J = 7.6, 3.3$  Hz, Ar), 6.40 (1H, d,  $J=4.9$ , H-17') 6.38 (1H, d,  $J=4.9$ , H-17), 5.27 (1H, s, H-14') 5.18 (1H, s, H-7), 5.18 (1H, s, H-8), 5.17 (1H, s, H-14), 3.48 (1H, s, H-9), 2.94 (1H, s, H-11), 2.74 (1H, dd,  $J = 16.9, 8.6$  Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.36 (1H, s, H-4), 2.12 (1H, q,  $J= 4, 1.9$ , H-3), 2.0 (1H, s, H-5), 1.87 (1H, dd,  $J=16.8, 3.6$ , H-2 $\beta$ ), 1.16 (3H, s, Me-13), 1.09 (3H, d,  $J=7.1$ , Me-15), 1.04 (3H, s, Me-12); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  208.7 (C-1), 166.5 (C-16'), 166.3 (C-16), 145.6 (C-18') 145.3 (C-18), 144.7 (C-10), 134.1 (C-19 y C-19'), 130.4 (C-22'), 130.3 (C-22), 128.8 (C-21, C-21', C-23 y C-23'), 128.2 (C-20' y C-24'), 128.1 (C-20 y C-24), 117.6 (C-17 y C-17'), 112.4 (C-14), 75.5 (C-7), 75.4 (C-8), 58.4 (C-11), 52.2 (C-5), 51.1 (C-9), 45.1 (C-4), 41.6 (C-2), 38.5 (C-6), 31.6 (C-3), 25.7 (C-12), 23.0 (C-13), 22.2 (C-15); EMESI  $m/z$  511.3 [M+1], 363, 215, 131, 103.

### 9.5.6. Dibenzoato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (23)



A una solución de 32.8 mg de **13** en 0.8 mL de piridina se le agregaron 454  $\mu$ L de cloruro de benzoílo y se puso a reaccionar en un baño de vapor por 6 horas. Trascurrido el tiempo de reacción, se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo lavando la fase orgánica con solución de

ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad en un rotavapor. El crudo de reacción (55 mg) se sometió a una columna cromatográfica utilizando una columna de 1.5 cm empacada con gel de sílice 230-400 y empleando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo (95:5, 96:4, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1) y acetato de etilo. De las fracciones 14-24, eluidas con hexano-acetato de etilo 96:4 se obtuvieron 34.1 mg (72%) de **23** como un aceite denso incoloro,  $[\alpha]_{589} +100$ ,  $[\alpha]_{578} +105$ ,  $[\alpha]_{546} +122$ ,  $[\alpha]_{436} +337$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); IR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\nu_{\text{max}}$  3071, 2970, 1722, 17255, 1710, 1275  $\text{cm}^{-1}$ ; UV (EtOH)  $\lambda$  200 ( $\log \epsilon$  4.31), 230 ( $\log \epsilon$  4.31); RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.96 (2H, dd,  $J=$  11.8, 1.7 Hz, H-18 y H-22), 7.95 (2H, dd,  $J=$  11.2, 1.7 Hz, H-18' y H-22'), 7.51 (2H, t,  $J=$  7.3, 1.7 Hz, H-20 y H-20'), 7.38 (4H, dd,  $J=$  15.0, 7.0 Hz, H-19, H-19', H-21 y H-21'), 5.42 (1H, d,  $J=$  9.6 Hz, H-7), 5.33 (1H, dd,  $J=$  9.6, 2.7 Hz, H-8), 5.3 (1H, s, H-14'), 5.2 (1H, s, H-14), 3.52 (1H, s, H-11), 3.04 (1H, s, H-11), 2.75 (1H, dd,  $J=$  17.0, 8.4 Hz, H-2 $\alpha$ ), 2.42 (1H, s, H-4), 2.15 (1H, m,  $J=$  6.9, H-3), 2.05 (1H, s, H-5), 1.89 (1H, dd,  $J=$  20.5, 3.8, H-2 $\beta$ ), 1.24 (3H, s, Me-13), 1.11 (3H, d,  $J=$  6.7, Me-15), 1.07 (3H, s, Me-12); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  208.7 (C-1), 166.1 (C-16'), 165.9 (C-16), 144.9 (C-10), 133.3 (C-21'), 133.2 (C-19'), 133.0 (C-19), 129.7 (C-17, C-17', C-18, C-22 y C-22'), 129.6 (C-18'), 128.4 (C-20'), 128.3 (C-20), 112.5 (C-14), 76.0 (C-8), 76.0 (C-7), 58.5 (C-11), 52.3 (C-5), 51.2 (C-9), 45.2 (C-4), 41.6 (C-2), 38.7 (C-6), 31.7 (C-3), 25.7 (C-12), 23.1 (C-13), 22.3 (C-15); EMESI  $m/z$  459.3[M+1], 459, 337, 215, 173, 105, 77.

### 9.6. Evaluación *in vitro* de la polimerización de $\alpha$ , $\beta$ -tubulina.

Los derivados del longipineno disueltos en DMSO se colocaron en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y media área, en alícuotas de 10  $\mu$ L de una concentración tal que permitiese obtener concentraciones finales de 10, 50 y 100  $\mu$ M. Se utilizó una solución de tubulina de cerebro bovino de >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E. U. A.) mantenida siempre a 0 °C. Para preparar la solución, la tubulina se descongeló y se disolvió la cantidad necesaria en buffer de tubulina (pH 6.9, sal sesquisódica del ácido piperazin-N,N'-bis(2-etansulfónico) 80.0 mM, cloruro de magnesio 2.0 mM, ácido etilén-glicol-bis( $\beta$ -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético 0.5 mM y 5'-trifosfato de guanosina 1.0 mM) para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL. La solución de tubulina se agregó, en alícuotas de 100  $\mu$ L, a los pozos con los compuestos. La placa de ELISA mantenida a 0 °C, se transfirió inmediatamente a un lector de placas BioTek EL808IU precalentado a 37 °C durante 30 minutos. La polimerización de los heterodímeros de  $\alpha$ , $\beta$ -tubulina se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 60 minutos con temperatura controlada a 37 °C y con un periodo de mezclado inicial de 5 segundos. Después de 60 minutos de incubación la placa se llevó a una temperatura de -20 °C por 15 minutos. Después de este tiempo, la placa se colocó nuevamente en el lector por 45 minutos más a 37 °C para determinar el efecto del frío en la estabilidad de los microtúbulos inducida por los compuestos a probar. Los ensayos de polimerización de la tubulina y despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura se realizaron por triplicado. Los resultados se graficaron con el programa GraphPad Prism 6 para Windows, los puntos de las gráficas muestran la desviación estándar de las lecturas para cada derivado evaluado.

### 9.7. Estudios de reconocimiento molecular *in silico*.

Los estudios de reconocimiento molecular entre el heterodímero de  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina y los derivados del longipineno estabilizantes de microtúbulos se realizaron utilizando el programa AutoDock Vina<sup>37</sup> para Windows versión 1.1.2. Para la preparación de la proteína y de los modelos moleculares de los longipinenos se empleó el programa AutoDock Tools

para Windows versión 4.2. La visualización de los resultados y el análisis de los mismos se llevaron a cabo empleando el programa PyMol para Windows versión 1.3. Las simulaciones computacionales se hicieron empleando una computadora personal acondicionada con un procesador AMD Dual-Core E-450 a 1.65 GHz, 2 Gb de RAM y una tarjeta de video AMD Radeon HD 6320 Discrete-Class a 949 MB. El archivo cristalográfico de la proteína se obtuvo del RCSB Protein Data Bank,<sup>33</sup> bajo el código 1JFF y los modelos moleculares de los derivados del longipineno se obtuvieron de los resultados del modelado molecular en el programa Spartan'04 para Windows.

## 10. Referencias

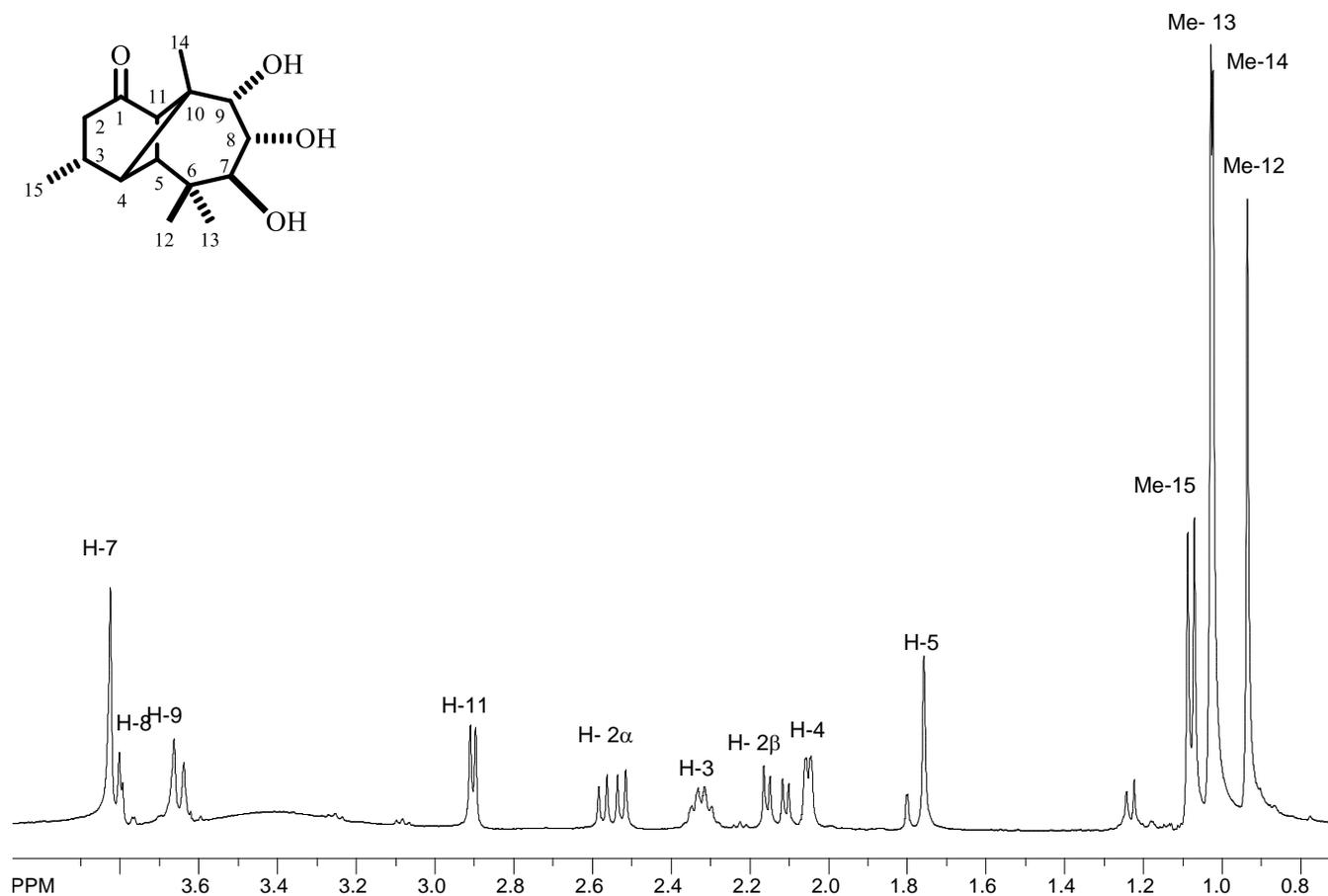
1. Williams, D. A.; Lemke, T. L. Foye's Principles of medicinal chemistry. 5a edición, Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, E.U.A. **2002**, pp. 24–25.
2. Hong, F. J.; Xue, J. L.; Hong, Y. Z. Natural products and drug discovery. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 194–200.
3. Walsh, T. C.; Fischbach, A. M. Natural products version 2.0: Connecting genes to molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469–2493.
4. Seyhan, E. Química orgánica. Estructura y reactividad. Editorial Reverté, España. **2002**, pp. 761–763.
5. 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.
6. Chen, C. H.; Chou, C. K.; Lee, S. D.; Wang, J. C.; Yeh, S. F. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* **1995**, *27*, 99–109.
7. Choi, J. H.; Ha, J.; Park, J. H.; Lee, Y. S.; Choi, J. W.; Masuda, Y.; Nakaya, K.; Lee, K. T. Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002**, *93*, 1327–33.
8. Choi, J. H.; Seo, B. R.; Seo, S. H.; Lee, K. T.; Park, J. H.; Park, H. J.; Choi, J. W.; Ithon, Y.; Miyamoto, K. Costunolide induces differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Arch. Pharm. Res.* **2002**, *25*, 480–484.

9. Hehner, S. P.; Heinrich, M.; Bork, P. M.; Vogt, M.; Tatter, F.; Lehmann, V.; Schulze-Osthoff, K.; Dröge, W.; Schmitz, M. L. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J. Biol. Chem.* **1998**, *16*, 1288–1297.
10. Miglietta, A.; Bozzo, F.; Gabriel, L.; Bocca, C. Microtubule-interfering activity of parthenolide. *Chem. Biol. Interact.* **2004**, *149*, 165–173.
11. Romo, J.; Joseph-Nathan, P.; Díaz, F. Aromatin and aromaticin, new sesquiterpene lactones isolated from *Helenium aromaticum*. *Chem. Ind.* **1963**, 1839–1839.
12. Fernandes, K. M.; Auld, C. A.; Hopkins, R. G.; Morrison, R. F. Helenalin-mediated post-transcriptional regulation of p21(Cip1) inhibits 3T3-L1 preadipocyte proliferation. *J. Cell Biochem.* **2008**, *105*, 913–921.
13. Lyss, G.; Knorre, A.; Schmidt, T. J.; Pahl, H. L.; Merfort, I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33508–33516.
14. Lai, H.; Singh, N. P. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Lett.* **1995**, *91*, 41–46.
15. Singh, N. P.; Lai, H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci.* **2001**, *70*, 49–56.
16. Jisaka, M.; Ohigashi, H.; Takegawa, K.; Huffman, M. A.; Hoshimizu, K. Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 833–834.
17. Rucker, G.; Heiden, K.; Schenkel, E. Antitumor-active lactones from *Kaunia rufescens* and *Eupatorium cannabinum*. *J. Indian Inst. Sci.* **2001**, *81*, 333–334.
18. Sladiae, D.; Gasiae, M. J. Reactivity and biological activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol and related compounds from sponges of the order Dictyoceratida. *Molecules* **2006**, *11*, 1–33.
19. Devkota, K. P.; Covell, D.; Ransom, T.; McMahon, J. B.; Beutler, J. A. Growth inhibition of human colon carcinoma cells by sesquiterpenoids and tetralones of *Zygogynum calothyrsum*. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 710–714.

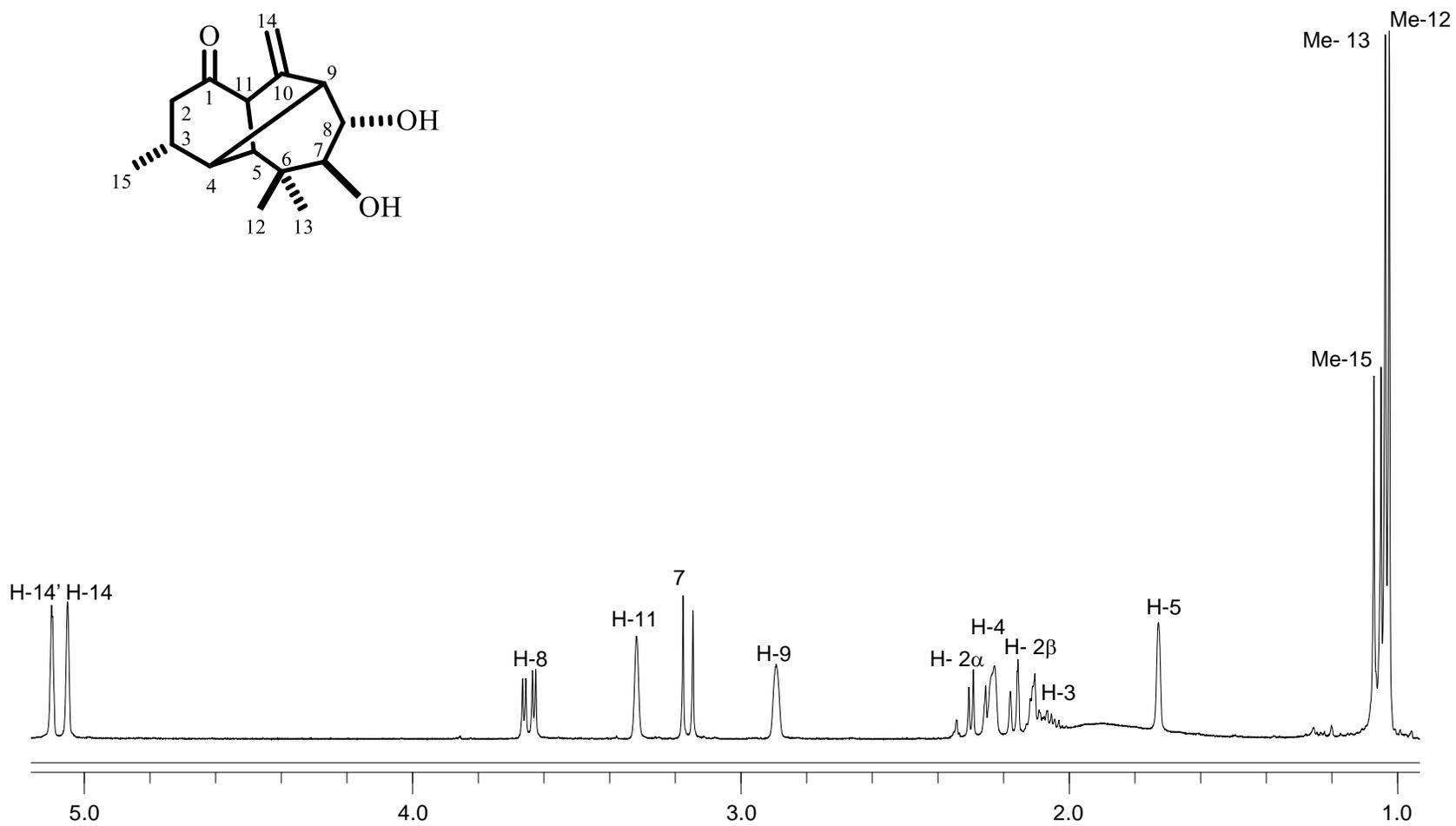
20. De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agentes- A review. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1672–1703.
21. Román, L. U.; del Río, R. E.; Hernández, J. D.; Joseph-Nathan, P.; Zabel, V.; Watson, W. H. Structure, chemistry and stereochemistry of rastevione, a sesquiterpenoid from the genus *Stevia*. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2769–2778.
22. Román, L. U.; Hernández, J. D.; del Río, R. E.; Bucio, M. A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. Wagner-Meerwein rearrangements of longipinane derivatives. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1938–1940.
23. Nogales, E.; Wolf, S.; Downing, K. H. Structure of the  $\alpha$ - $\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **1998**, *391*, 199–203.
24. Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. Cell Biology, Ed. Saunders/Elsevier, 2002, p. 579.
25. Gardner, M., K.; Zanic, M.; Howard, J. Microtubule catastrophe and rescue. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, *25*, 14–22.
26. Staton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443–481.
27. Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Prod. Nat. Acad. Sci.* **1973**, *70*, 765–768.
28. Dumontet, C.; Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 790–803.
29. Gigant, B.; Curmi, P. A.; Martin-Barbey, C.; Charbaut, E.; Lachkar, S.; Lebeau, L.; Siavoshian, S.; Sobel, A.; Knossow, M. The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* **2000**, *102*, 809–816.
30. Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A.; Sobel, A.; Knossow, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **2005**, *435*, 519–522.
31. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **2004**, *303*, 1813–1813.
32. Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 238–248.
33. <http://www.pdb.org>

34. García-Gutiérrez, H. A. Obtención de nuevos derivados del verticilano estabilizadores de microtúbulos a partir de productos naturales del género *Bursera*. *Tesis doctoral. Cinvestav*, México, **2010**.
35. Silva-Sánchez, B. Diseño de un nuevo derivado del *epi*-verticilol con actividad estabilizante de microtúbulos. *Tesis de Maestría. Cinvestav*, México, **2011**.
36. Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560-571.
37. 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
38. Kobayashi, J.; Shigemori, H. Bioactive taxoids from the Japanese yew *Taxus cuspidata*. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 305-328.

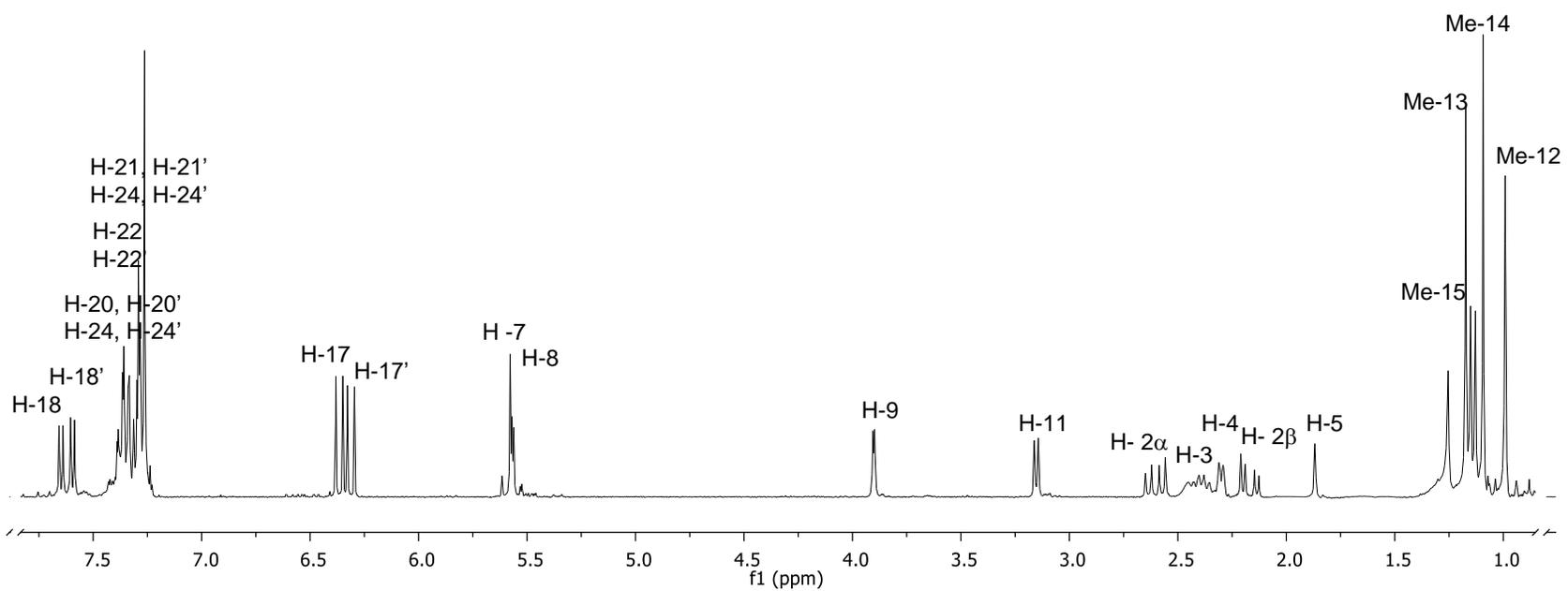
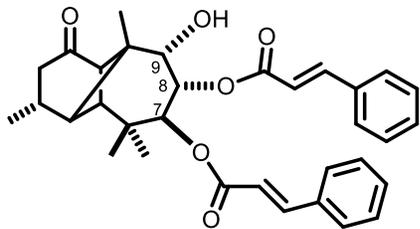
**11. APÉNDICE A. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de 11 y 13, y espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los sesquiterpenos funcionalizados 19-23.**



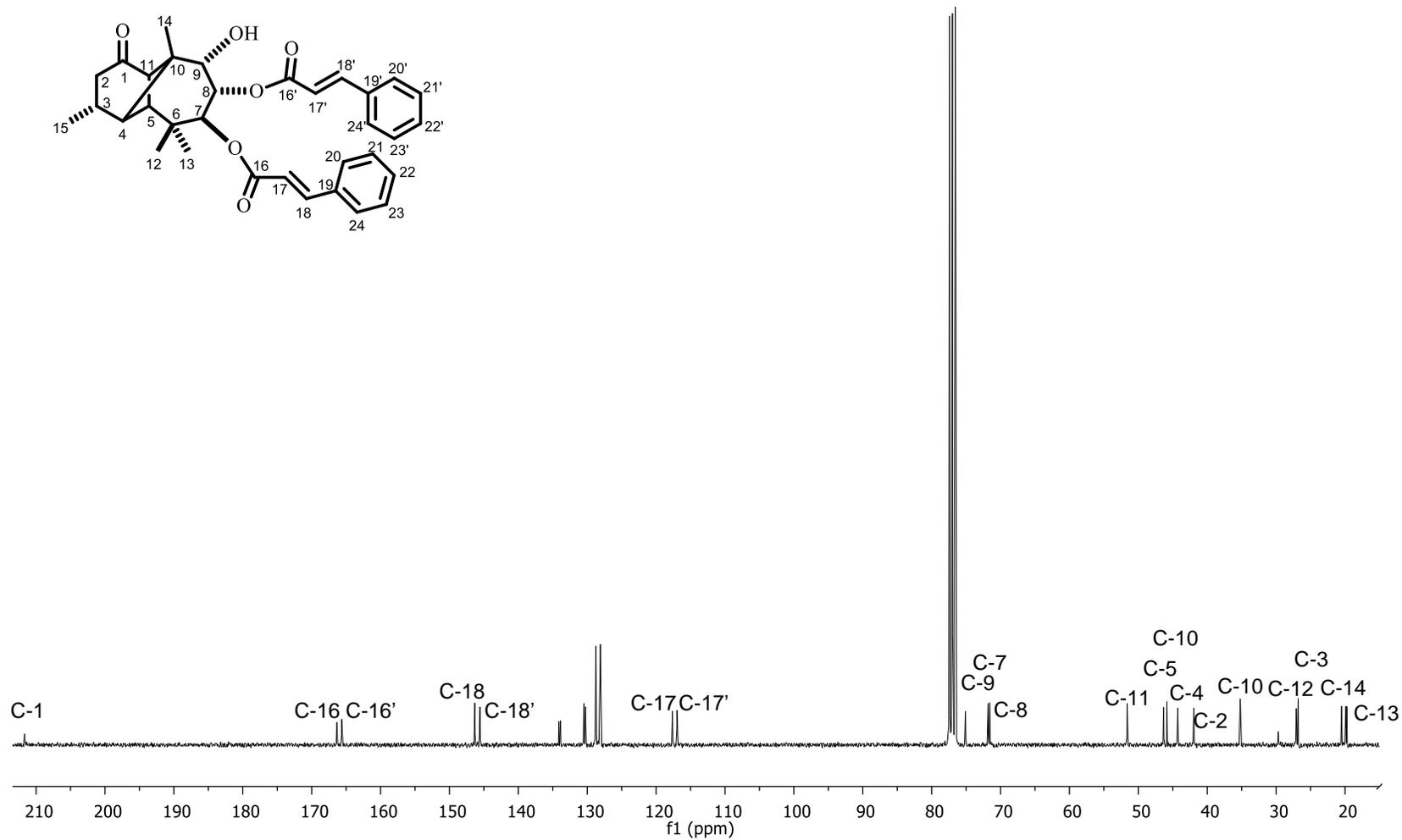
**Figura 1A.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**11**)



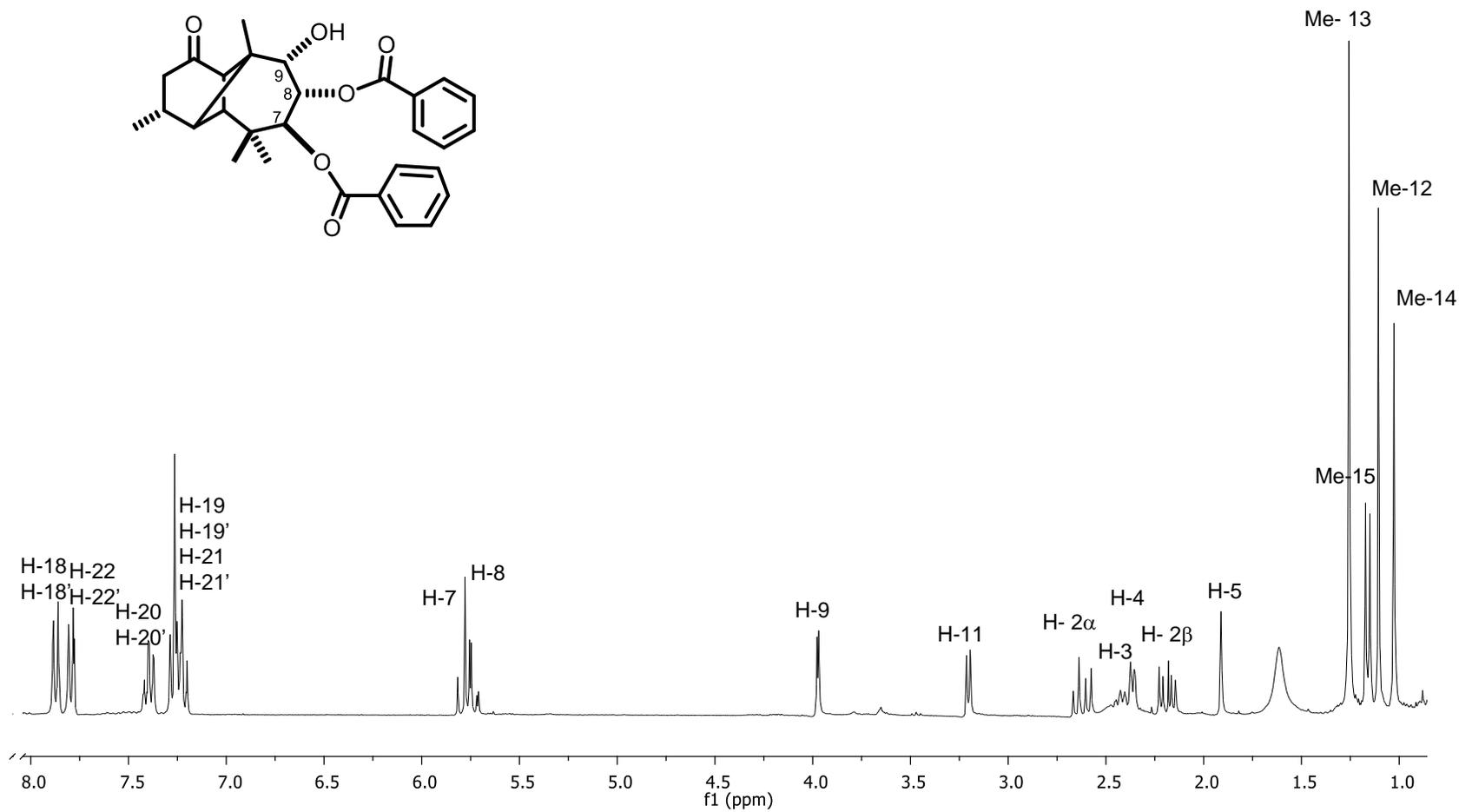
**Figura 2A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**13**)



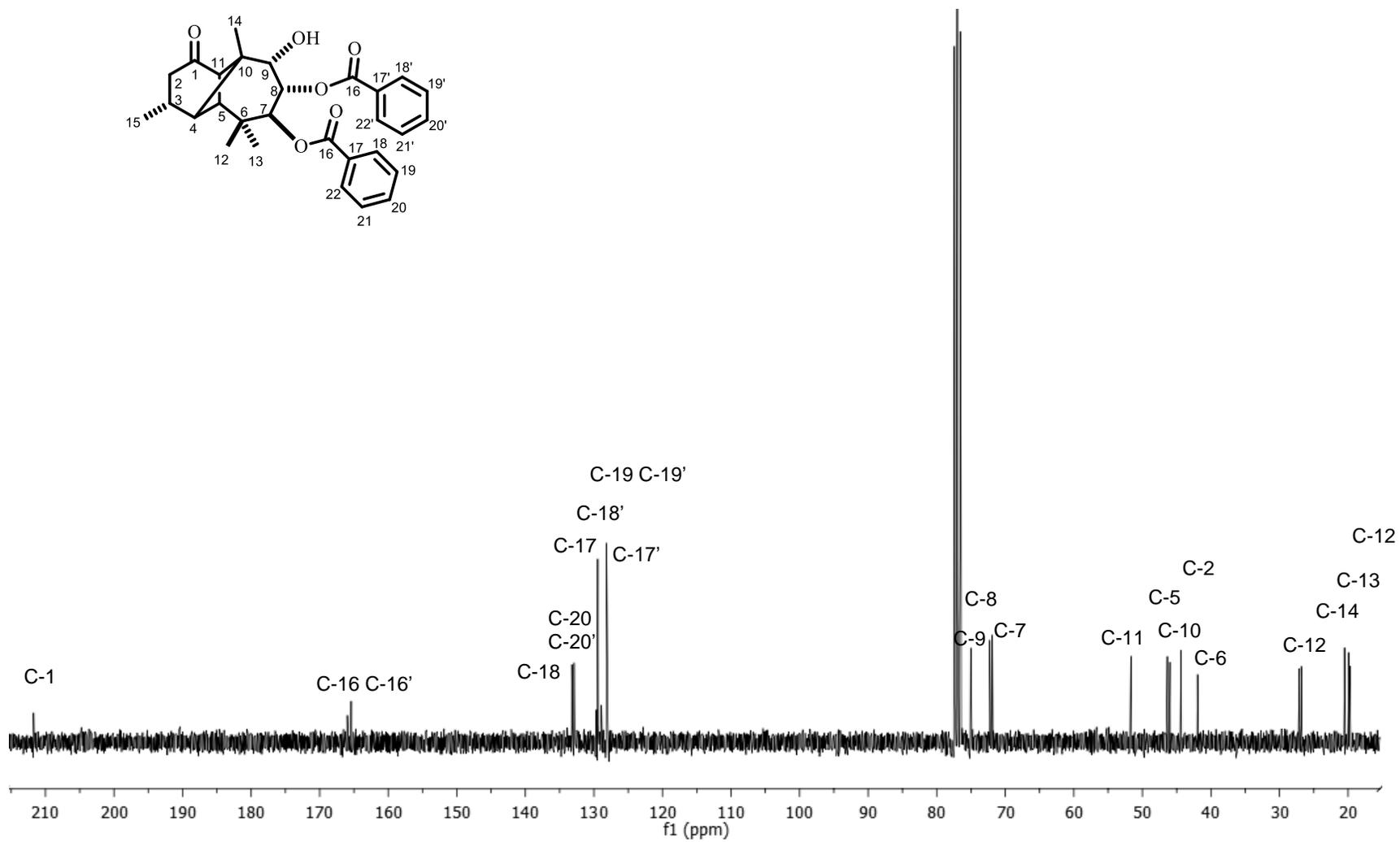
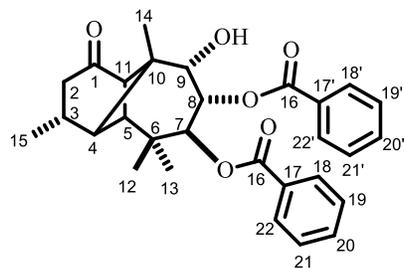
**Figura 3A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz del 7,8-dicinato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**19**)



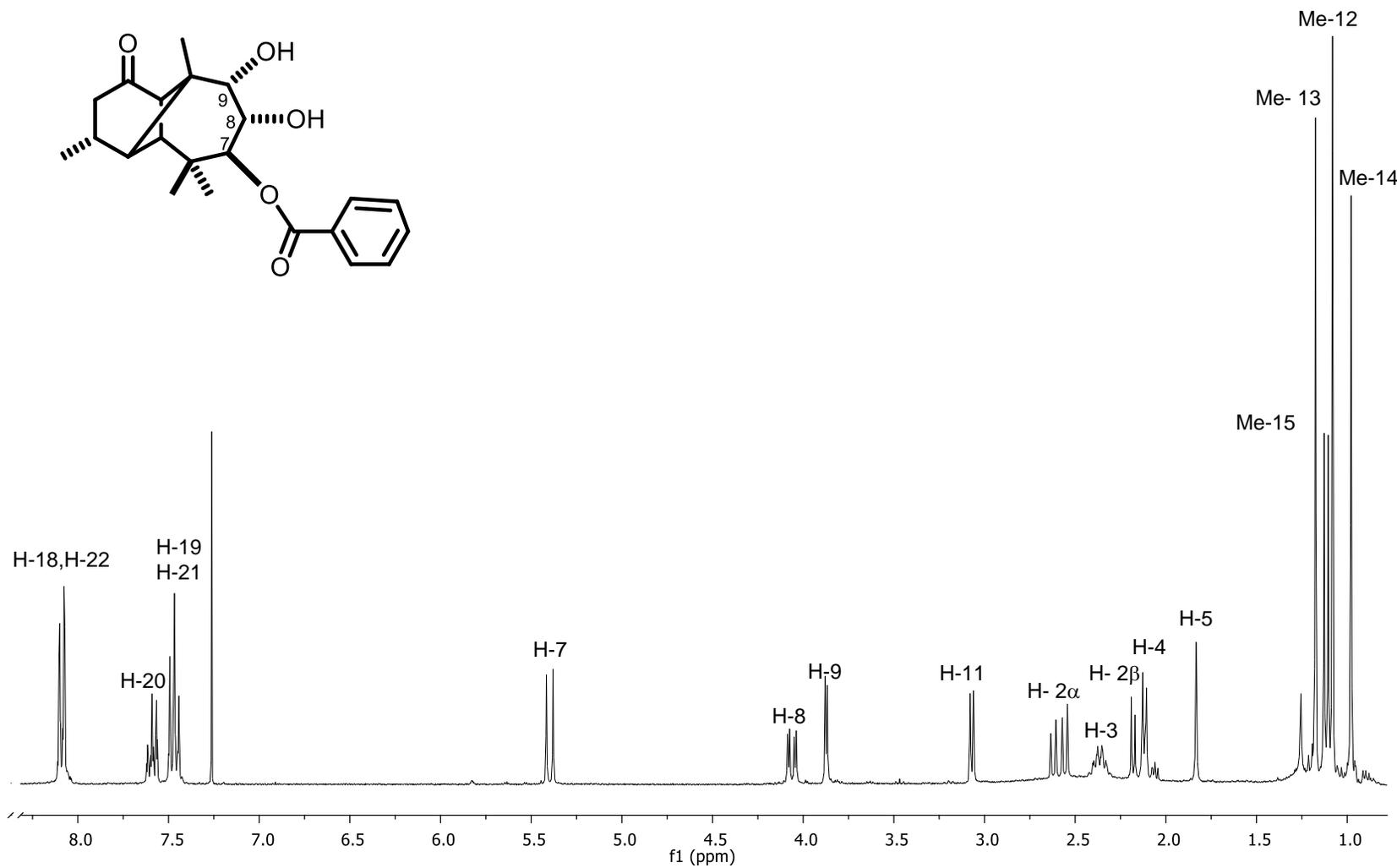
**Figura 4A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{H}$  a 75.4 MHz del 7,8-dicinato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (17)



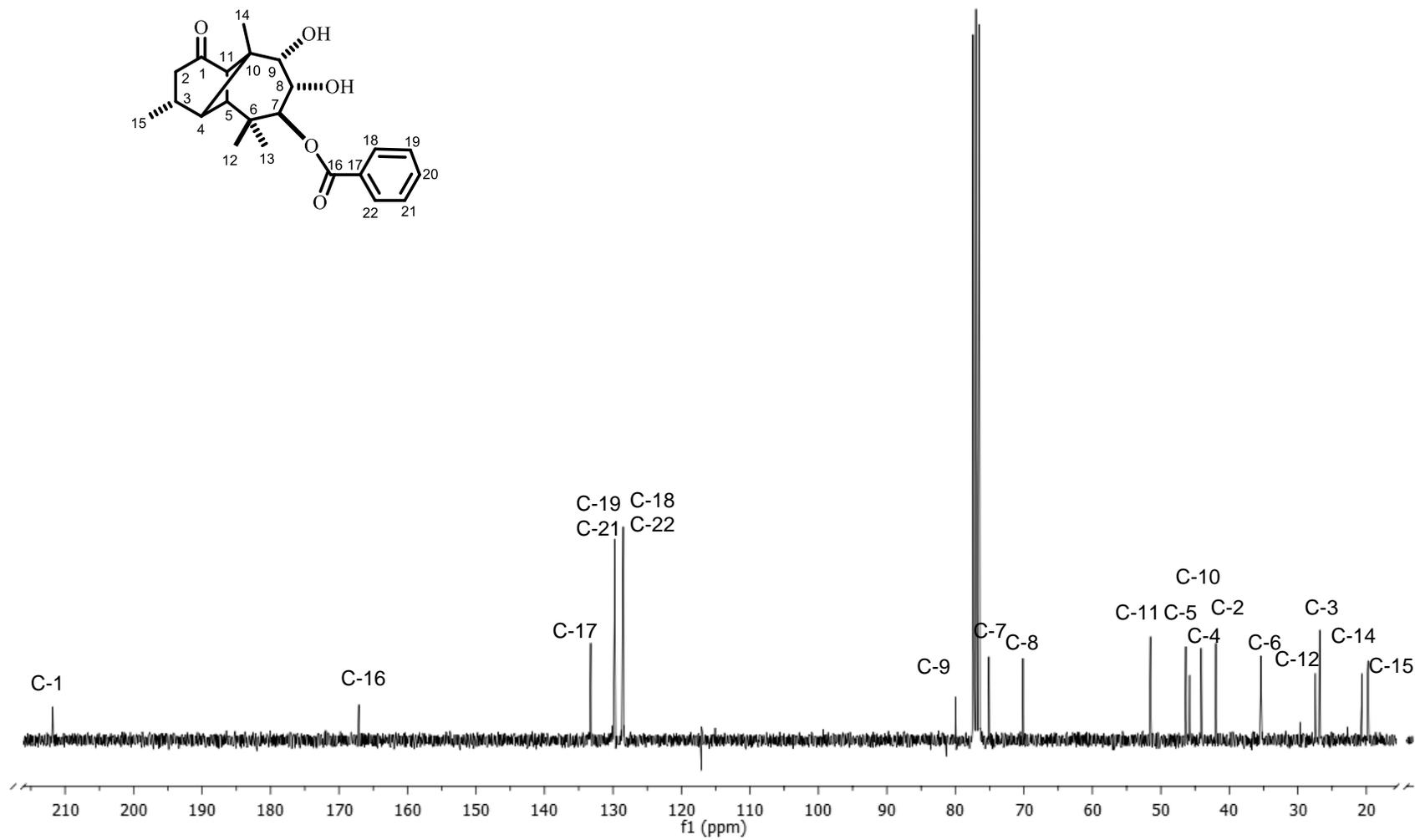
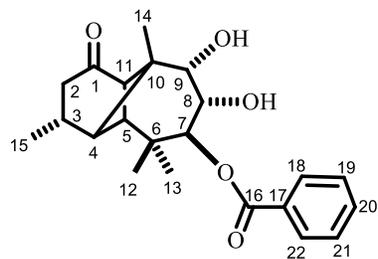
**Figura 5A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz del 7,8-dibenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**20**)



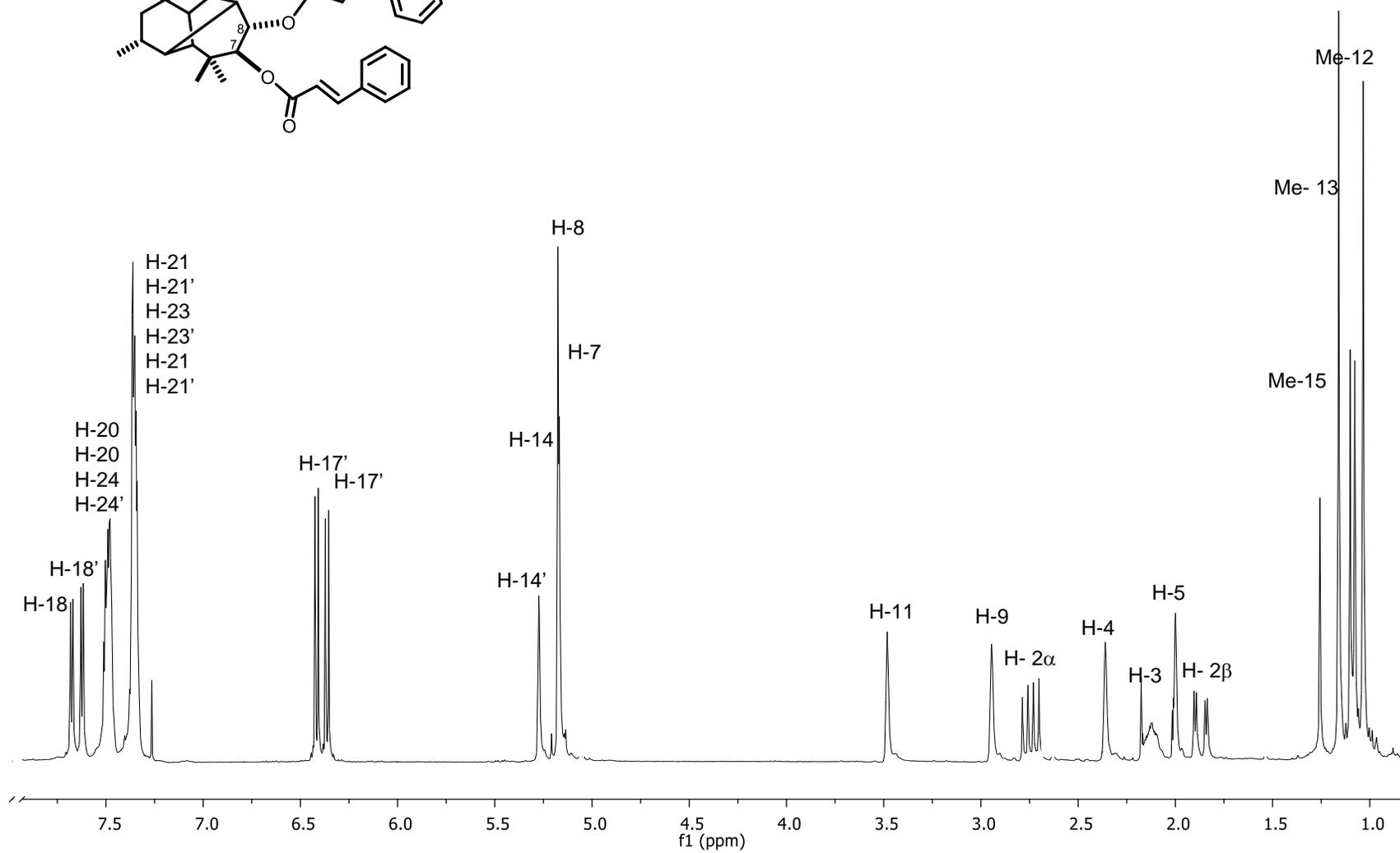
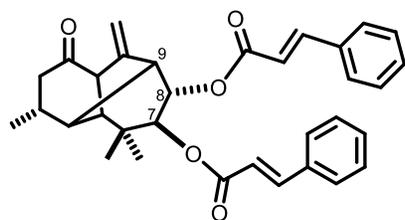
**Figura 6A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75.4 MHz del 7,8-dibenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**20**)



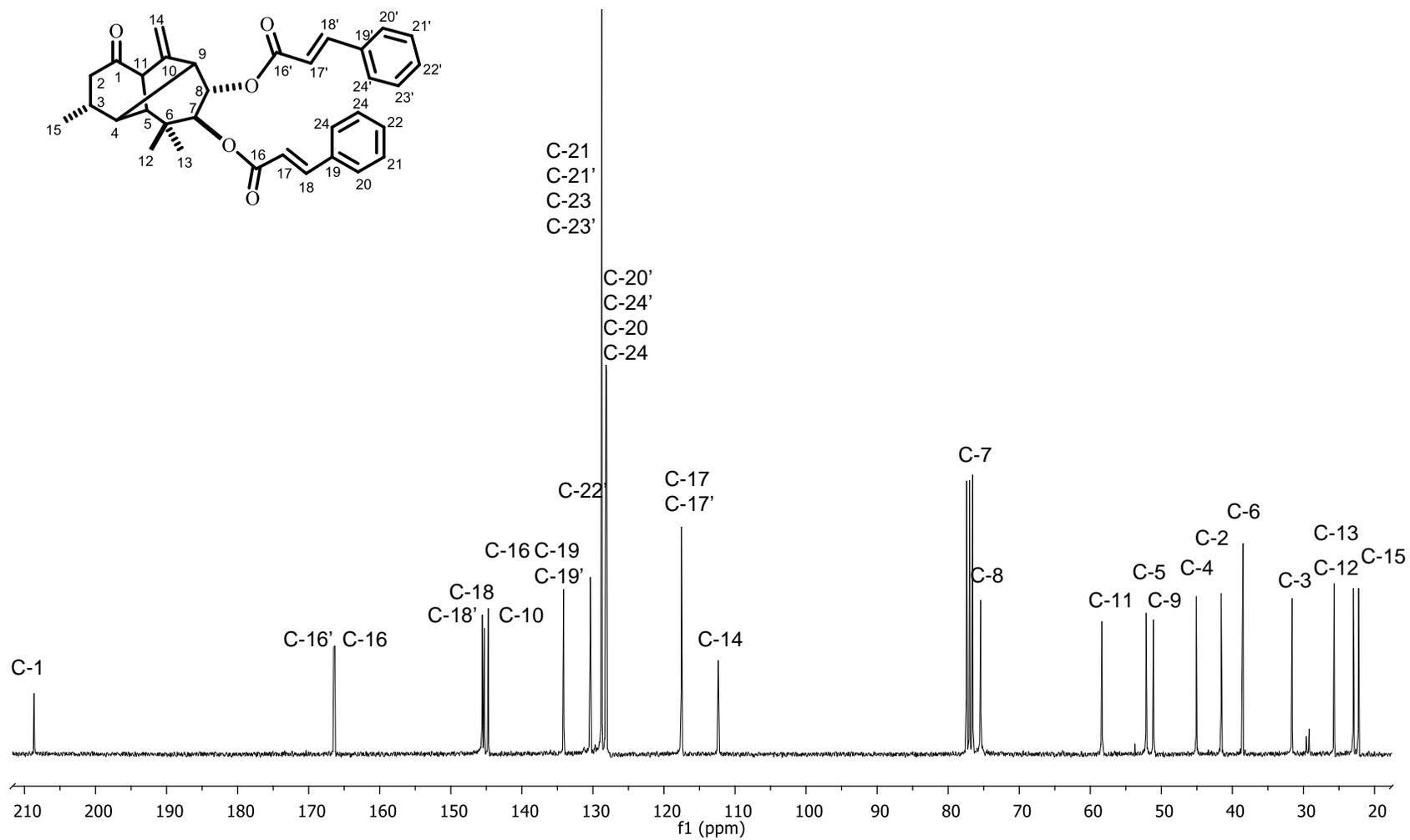
**Figura 7A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz de 7-monobenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**21**)



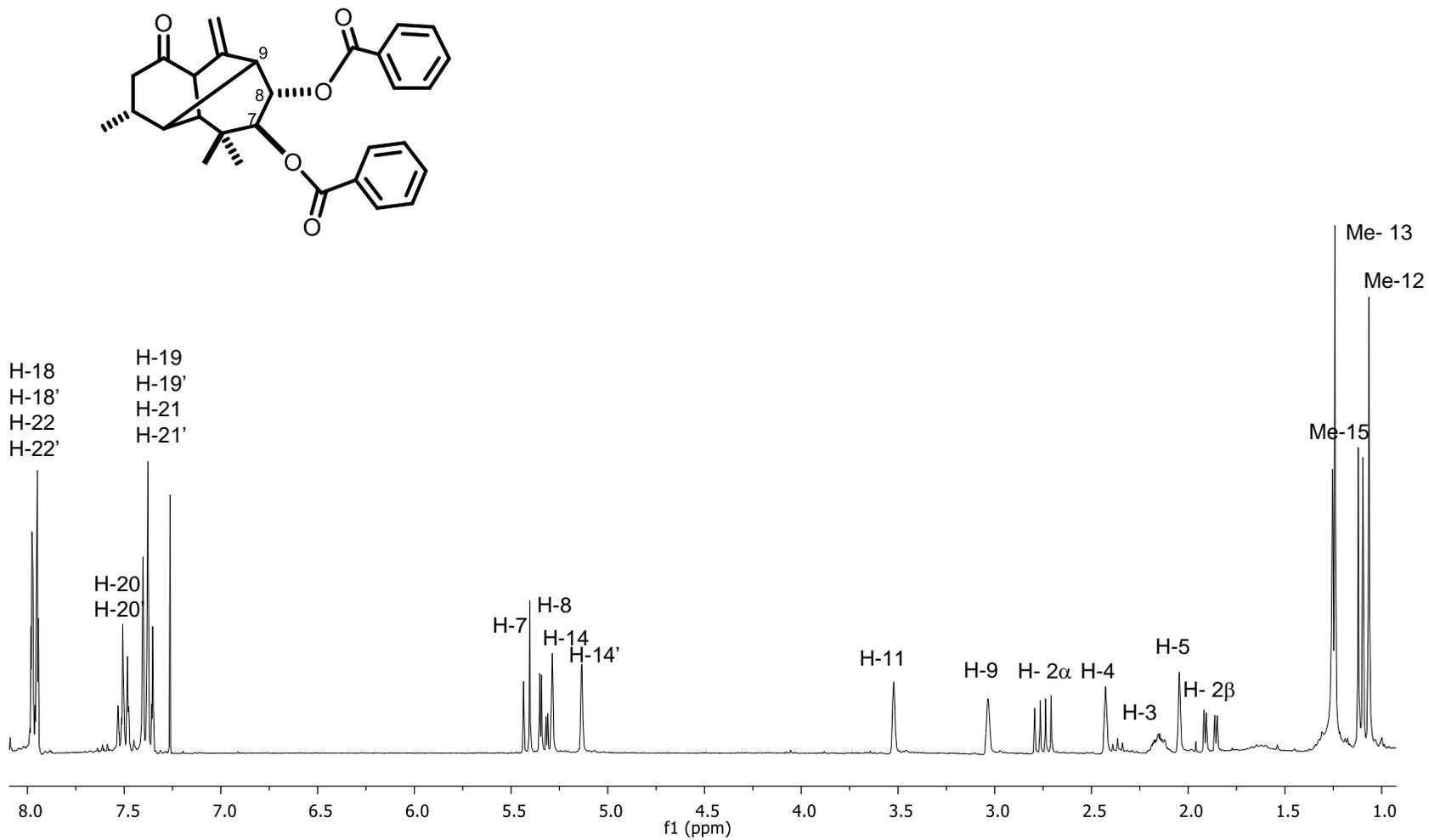
**Figura 8A.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 74.5 MHz de 7-monobenzoato de longipinan-7,8,9-triol-1-ona (**21**)



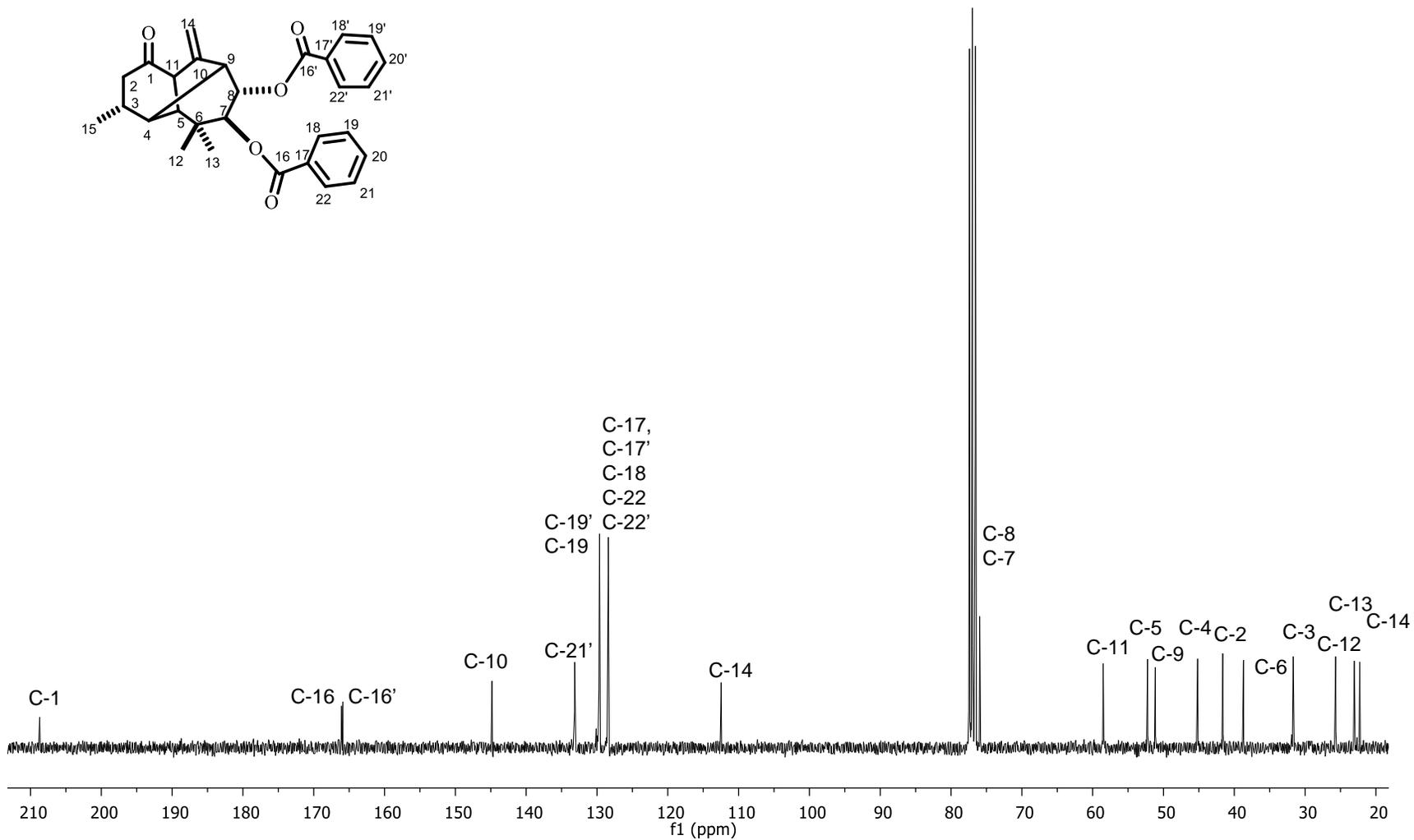
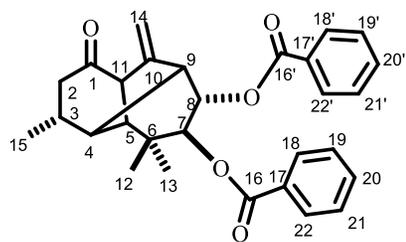
**Figura 9A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz de dicinamato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**22**)



**Figura 10A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75.4 MHz de dicinamato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**22**)



**Figura 11A.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 300 MHz de dibenzoato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**23**)



**Figura 12A.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75.4 MHz de dibenzoato de moreli-10(14)-en-7,8-diol-1-ona (**23**)