



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Preparación de nuevos derivados del vouacapano y
su efecto en la polimerización de la tubulina**

T E S I S

Que presenta:

Q. F. B. Eugenio Alonso García Álvarez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

FARMACOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

México D. F.

Diciembre, 2014

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 289093.

Dedicatorias y agradecimientos:

*A mis padres **Rosa Eugenia Álvarez Jurado** y **Alejandro García Sánchez**, y a mis hermanos **Rodrigo, Alejandro** y **Davinia** por ser uno de mis grandes pilares apoyándome en todo momento y demostrándome siempre su orgullo, admiración y cariño.*

*A **Berenice de la Rosa Molina**, el amor de mi vida y mi otro gran pilar, por amarme y apoyarme incondicionalmente, alentándome a siempre seguir adelante y nunca rendirme.*

*Al **Dr. Carlos M. Cerda García Rojas** por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de maestría bajo su tutela, orientándome a lo largo de todo el trabajo realizado, siendo siempre una guía y un ejemplo.*

*Al **Dr. Pedro Joseph Nathan** por otorgarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo y su aceptación.*

*A todo el equipo de trabajo del laboratorio, **Vero, Alvina, Angelina, Celina, Yola** y **Azucena** por su impecable trabajo y su increíble disponibilidad a ayudar siempre con gran amabilidad y cariño.*

*A mis sinodales la **Dra. Patricia Talamás** y el **Dr. Gilberto Castañeda**, por sus valiosos comentarios y aportaciones a lo largo de todo el proyecto.*

*A la **Dra. Rosa Elva del Rio** por su fundamental apoyo en este proyecto de maestría.*

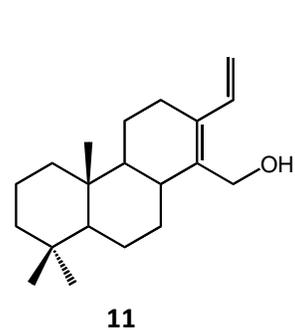
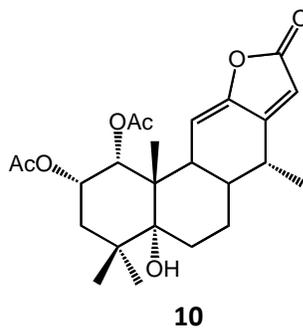
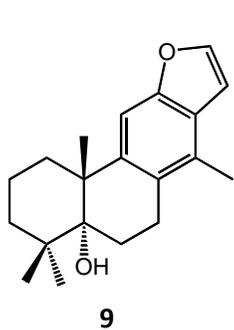
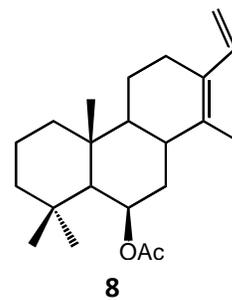
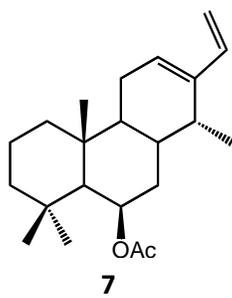
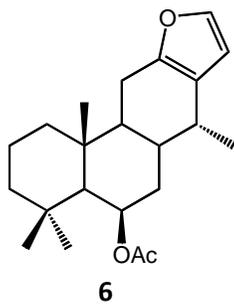
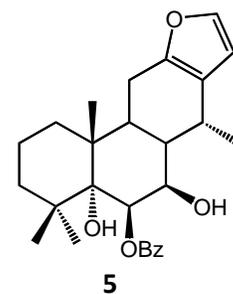
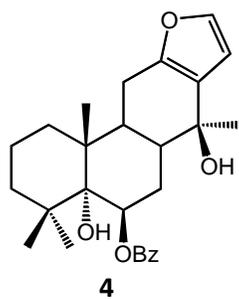
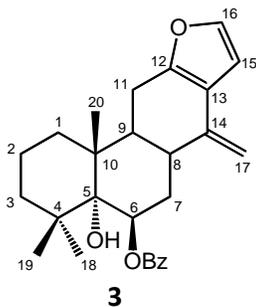
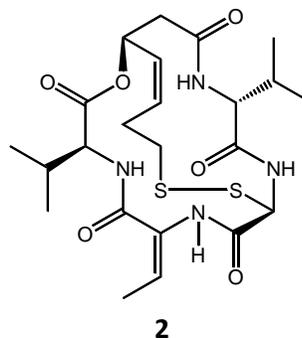
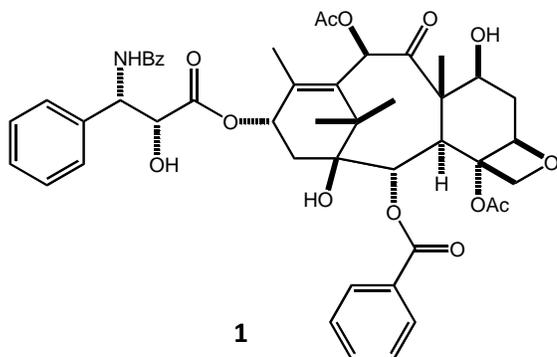
*A la **Dra. Martha Sonia Morales Ríos** por sus amables aportaciones y comentarios.*

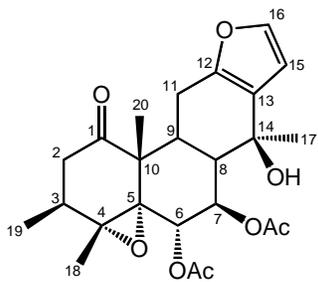
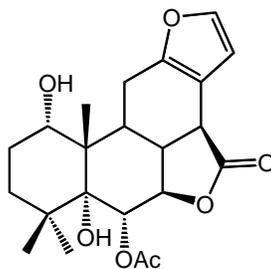
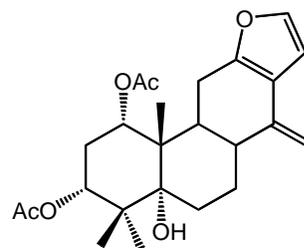
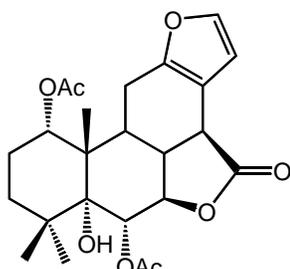
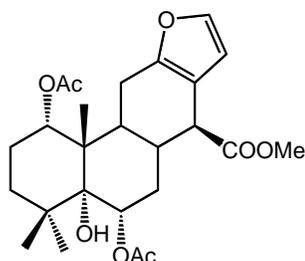
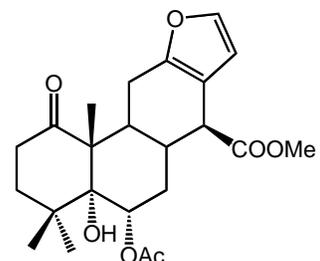
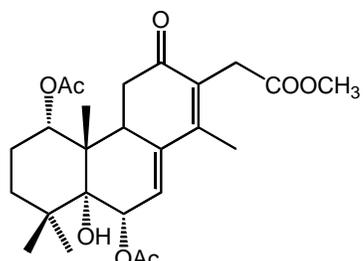
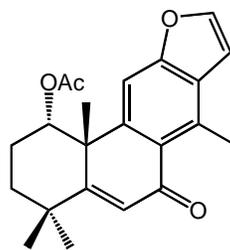
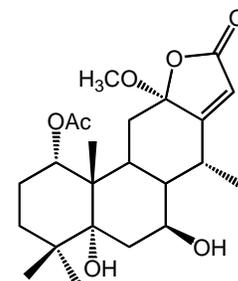
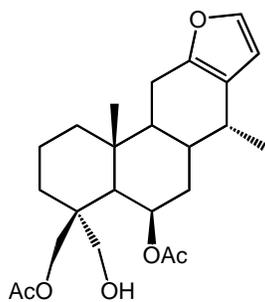
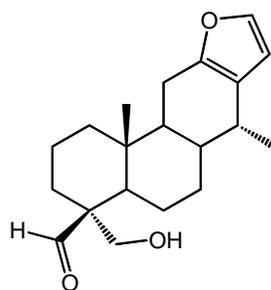
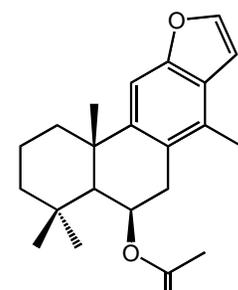
ÍNDICE GENERAL

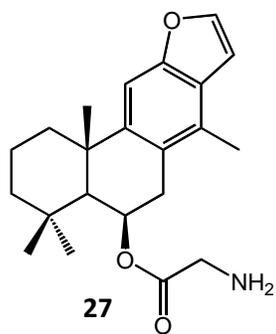
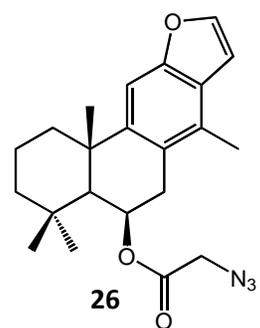
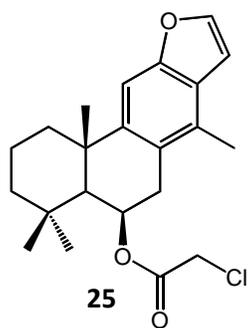
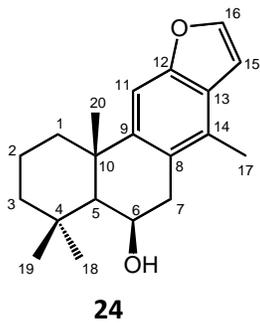
	Pagina
ÍNDICE GENERAL	I
RESUMEN DE ESTRUCTURAS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Productos naturales en la medicina	1
1.2. Productos naturales aislados del género <i>Caesalpinia</i>	2
1.3. Actividad biológica de los diterpenos tipo cassano	4
1.4. Los microtúbulos como diana terapéutica contra el cáncer	9
1.5. Reconocimiento molecular <i>in silico</i>	13
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	15
4.1. General	15
4.2. Específicos	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Derivados del vouacapano preparados a partir del (-)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-6-acetoxivouacapano (6)	16
5.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la estabilidad de los microtúbulos en presencia de derivados del vouacapano	23
5.3. Análisis del estudio de reconocimiento molecular <i>in silico</i> (<i>Docking</i>)	31
6. CONCLUSIONES	51
7. PERSPECTIVAS	52
8. PARTE EXPERIMENTAL	53
8.1. Purificación de compuestos	53

8.1.1.	Cromatografía en columna abierta	53
8.1.2.	Cromatografía en capa fina	53
8.1.3.	Determinación del punto de fusión	53
8.2.	Espectroscopía y espectrometría	53
8.2.1.	Rotación específica	53
8.2.2.	Espectroscopía ultravioleta (UV)	54
8.2.3.	Espectroscopía de infrarrojo (IR)	54
8.2.4.	Resonancia magnética nuclear (RMN)	54
8.2.5.	Espectrometría de masas (EM)	54
8.3.	Difracción de rayos X	54
8.4.	Modelado molecular de los derivados del vouacapano	55
8.5.	Colecta de <i>Caesalpinia platyloba</i>	55
8.6.	Obtención del (–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-6-acetoxivouacapano	55
8.7.	Espectrometría y espectroscopía de derivados del vouacapano	56
8.7.1.	(–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-6-Acetoxivouacapano (6)	56
8.7.2.	(–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-6-Acetoxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (23)	56
8.7.3.	(–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-6-Hidroxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (24)	57
8.7.4.	(–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-6[2'-Cloroacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (25)	58
8.7.5.	(–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-6[2'-Azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (26)	59
8.7.6.	(–)-(5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-6[2'-Aminoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (27)	60
8.8.	Evaluación <i>in vitro</i> de la estabilidad de los microtúbulos de α -tubulina– β -tubulina.	61
8.9.	Estudio de reconocimiento molecular <i>in silico</i> .	62
9.	BIBLIOGRAFÍA	63
10.	APÉNDICE A. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del vouacapano 6 y los derivados 23-27 .	67

RESUMEN DE ESTRUCTURAS



**12****13****14****15****16****17****18****19****20****21****22****23**



RESUMEN

Los productos naturales aislados de especies vegetales han cobrado gran interés en el área de la salud debido a las propiedades químicas y biológicas que poseen, las cuales han permitido su uso de manera práctica en la elaboración de medicamentos. Los medicamentos anticancerígenos son uno de los grupos de fármacos cuyos principios activos se obtienen, en buena medida, a partir de productos naturales. Un ejemplo de esto es el paclitaxel (**1**), que es un agente antimetabólico estabilizador de los microtúbulos que se obtiene de *Taxus brevifolia* y que forma parte esencial de la terapia contra el cáncer. La especie *Caesalpinia platyloba*, que crece en México en los bosques caducifolios desde Chihuahua y hasta Guerrero, es rica en (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**), que es un diterpeno del tipo cassano. Dicha familia de compuestos ha demostrado poseer una actividad antiproliferativa moderada, por lo que su estudio estructural y biológico resulta atractivo. Por ejemplo, los diterpenos tipo cassano aislados de *Caesalpinia minax* (**18-20**) mostraron una actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares MCF-7 y AGS de cáncer de mama y de estómago respectivamente. Los cassanos aislados de *Cordyla madagascariensis* ssp. (**21**) presentaron una citotoxicidad moderada contra células de cáncer de ovario A2780.

En el presente trabajo se sintetizaron cinco nuevos derivados del vouacapano (**23-27**) a través de transformaciones químicas tales como aromatizaciones, hidrólisis alcalinas y esterificaciones. Se evaluó también la influencia del vouacapano **6** y los compuestos sintetizados sobre el fenómeno de polimerización-despolimerización de los microtúbulos, encontrándose que todos los compuestos (**6, 23-27**) poseen una actividad estabilizadora de los microtúbulos de α -tubulina- β -tubulina. Finalmente, a través de estudios de reconocimiento molecular *in silico* se encontró que el vouacapano y sus derivados se unen a la proteína ocupando el sitio activo del paclitaxel (**1**). Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que el (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**) y sus derivados poseen un potencial importante como agentes antineoplásicos debido a su capacidad de interactuar con la tubulina y alterar su dinámica de polimerización.

ABSTRACT

Natural products isolated from plants have gained wide interest in the area of science and health due to their chemical and biological properties, which have allowed its practical use in drug development. Anticancer drugs are one of the groups of medicines with the largest proportion of active ingredients obtained from natural products. An example of this is paclitaxel (**1**) which is a microtubule stabilizer antimitotic agent isolated from *Taxus brevifolia* and that is used as a key agent in cancer therapy. The species *Caesalpinia platyloba*, that grows in the Mexican deciduous forest from Chihuahua to Guerrero, is rich in (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxylvouacapane (**6**) that is a cassane diterpene. This family of compounds has displayed a moderate antiproliferative activity, which make their structural and biological study appealing. For example, cassane diterpenes isolated from *Caesalpinian minax* (**18-20**) displayed an antiproliferative activity against breast and gastric carcinoma cell lines MCF-7 and AGS, respectively. Cassanes isolated from *Cordyla madagascariensis ssp.* (**21**) had moderate cytotoxicity against human ovarian cancer cell line A2780.

In this work, five new vouacapane derivatives (**23-27**) were synthesized via chemical transformations such as aromatizations, alkaline hydrolysis and esterifications. The influence of vouacapane and its derivatives on the microtubule polymerization-depolymerization process was also evaluated, and it was found that all compounds (**6**, **23-27**) had an α -tubulin- β -tubulin microtubules stabilizing activity. Finally, through molecular docking studies we found that the vouacapane and its derivatives bind to the protein occupying paclitaxel-binding site. The results gathered in this thesis support the conclusion that the (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxylvouacapane (**6**) and its derivatives have a significant potential use as anticancer agents due to their ability to interact with tubulin and alter their polymerization dynamics.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos naturales en la medicina

Los productos naturales se definen como moléculas que son sintetizadas por una fuente biológica como plantas o animales. ⁽¹⁾ Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos que no participan directamente en el crecimiento y desarrollo de las mismas. A estos compuestos orgánicos se les conoce como metabolitos secundarios, los cuales se producen y distribuyen en grupos taxonómicos específicos. Dichos compuestos han cobrado gran interés en el área de la ciencia y de la salud debido a las propiedades químicas y biológicas que poseen, ⁽²⁾ las cuales han permitido su uso de manera práctica en la elaboración de productos tales como perfumes, polímeros, aceites, fibras, saborizantes, colorantes y medicamentos.

La utilización de productos naturales en la medicina se aplica desde tiempos remotos. Existe evidencia de que civilizaciones tan antiguas como la egipcia, la china o la hindú se han valido de múltiples formulaciones y compuestos para hacer frente a las diferentes enfermedades que aquejaban en dichas épocas y regiones. ⁽³⁾

Con el transcurrir del tiempo el ser humano ha adquirido mayor conocimiento en las propiedades de los productos naturales, lo que le ha permitido hacer un uso más seguro y eficaz de dichas sustancias en la fabricación de medicamentos y remedios medicinales. En la actualidad, a pesar de las estrategias sintéticas que existen para preparar moléculas pequeñas, los productos naturales siguen siendo una fuente muy importante de principios activos en la fabricación de medicamentos. Del año 2000 al 2010 un promedio del $36.5 \pm 8.6\%$ de todas las moléculas pequeñas sintetizadas y utilizadas fueron obtenidas de productos naturales. ⁽⁴⁾ De manera particular, los medicamentos anticancerígenos son uno de los grupos de fármacos con mayor proporción de principios activos obtenidos a partir de productos naturales, ya sea que se utilice el producto natural sin modificar, el producto natural con alguna modificación sintética o semi-sintética o que sea una molécula 100% sintética de un farmacóforo natural. Como ejemplo de esto se encuentra el paclitaxel **(1)**

que es un agente antimitótico estabilizador de los microtúbulos que se obtiene de *Taxus brevifolia* y que desde la década de los 90 forma parte esencial de la terapia contra el cáncer. Un ejemplo más reciente de medicamento anticancerígeno obtenido de un producto natural es la romidepsina (**2**), que fue aprobada en el 2009 para el tratamiento de linfoma de células T y se obtiene de la bacteria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum*.⁽⁵⁾

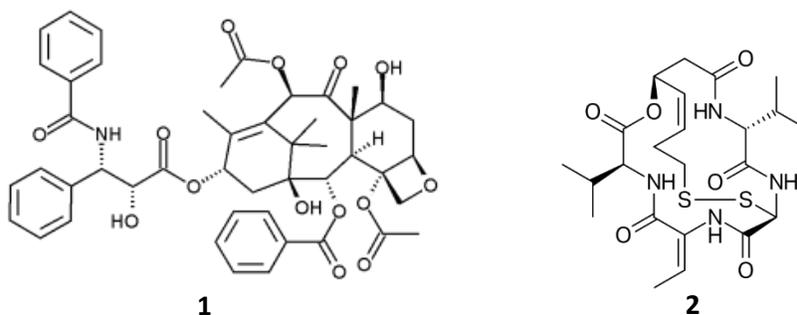


Figura 1. Estructura del paclitaxel (**1**) y de la romidepsina (**2**).

1.2. Productos naturales aislados del género *Caesalpinia*

El género *Caesalpinia* está constituido por más de 100 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del planeta. En México existen aproximadamente 25 especies diferentes de *Caesalpinia* distribuidas a lo largo del país, siendo 13 de ellas endémicas de la región.⁽⁶⁾ Las plantas de este género han demostrado ser una fuente abundante de compuestos diterpénicos tipo cassano, así como de otros diterpenos relacionados, además de triterpenos y flavonoides.⁽⁷⁾ Las investigaciones en diversas regiones del planeta han demostrado que algunas especies del género *Caesalpinia* poseen actividades biológicas diversas que son de gran importancia e interés para el ser humano. Por ejemplo, algunos de los componentes de *Caesalpinia pulcherrima* (**3-5**), especie que se distribuye desde México y hasta Sudamérica,⁽⁸⁾ poseen actividad antimicrobial moderada contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Trichophyton metagrophytes*. Por su parte, especies como *C. ferrea*, *C. sappan* y *C. bonucella* han presentado efectos analgésicos moderados en un modelo de dolor abdominal inducido con ácido acético en

ratones.⁽⁹⁾ Estudios realizados con *Caesalpinia crista* han comprobado que dicha especie presenta una actividad antihelmíntica dosis y tiempo dependiente, exhibiendo una concentración letal media (LC₅₀) de 0.134 mg/mL sobre gusanos de *Haemonchus contortus*; efecto que también está presente en los extractos de las especies *C. bunduc* y *C. major*.⁽⁹⁾

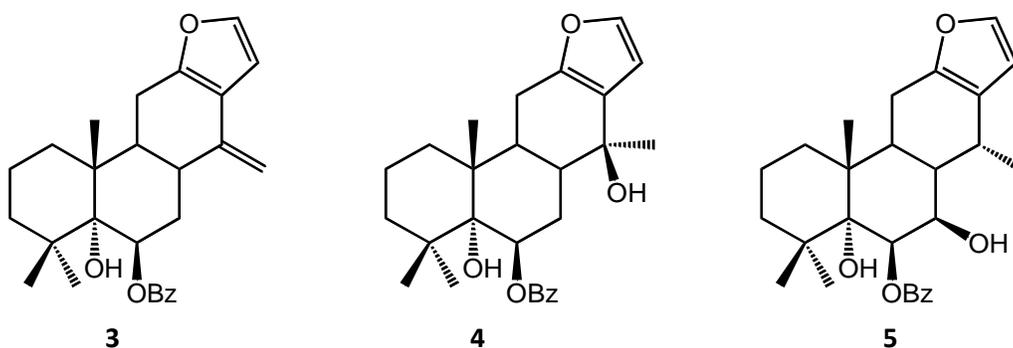


Figura 2. Furanditerpenos presentes en *Caesalpinia pulcherrima* con actividad antimicrobial.

En México, *Caesalpinia platyloba* conocida como palo colorado, que es el objeto de estudio del presente trabajo, es un árbol que crece comúnmente en los bosques tropicales caducifolios localizados desde Chihuahua y hasta Guerrero. Esta especie es una fuente importante de taninos y ácido gálico y es utilizada en dichas regiones como parte de la medicina tradicional, medicina veterinaria y como cercos naturales, debido a la resistencia y duración de su madera.⁽¹⁰⁾ Estudios realizados en nuestro país han demostrado que el extracto hexánico de *C. platyloba* presenta una actividad citotóxica moderada sobre líneas celulares de cáncer de próstata (DU-145) y células no cancerosas de fibroblastos (3T3), con porcentajes de viabilidad de 28.8 ± 4.2 y 27.6 ± 1.7 respectivamente.⁽¹¹⁾ Por su parte, Gómez-Hurtado y colaboradores determinaron la estructura de 3 nuevos diterpenos tipo cassano (**6-8**) aislados del extracto de CH₂Cl₂ de *C. platyloba*.⁽¹²⁾ El cassano que encontraron en mayor abundancia es un diterpenofurano que pertenece a la familia de los vouacapanos y lleva por nombre *(-)-(5S,6R,8S,9S,10R,14R)*-6-acetoxivouacapano (**6**), el cual, en investigaciones anteriores presentó actividad citotóxica moderada contra algunas líneas celulares de cáncer,⁽¹¹⁾ Figura 3.

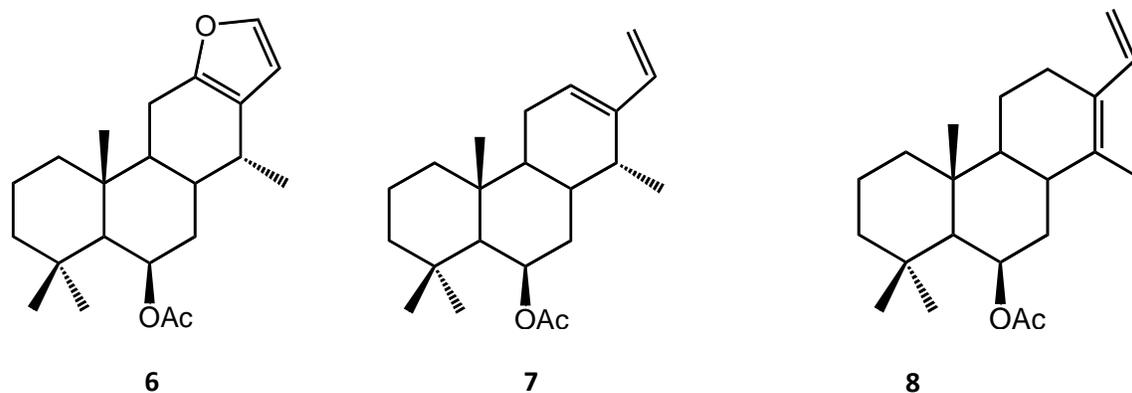


Figura 3. Diterpenos tipo cassano aislados de *Caesalpinia platyloba*.

1.3. Actividad biológica de los diterpenos tipo cassano

Los cassanos son un grupo de moléculas diterpenoides a las cuales se les han encontrado actividades biológicas diversas. El nombre deriva de “Cassa” de la cassaina, un alcaloide diterpénico que se encuentra en la especie *Erythrophleum guineense*. El esqueleto base de este grupo de compuestos está constituido por un diterpeno tricíclico con un grupo etilo en C-13 y un metilo en C-14 (Figura 4).⁽¹³⁾

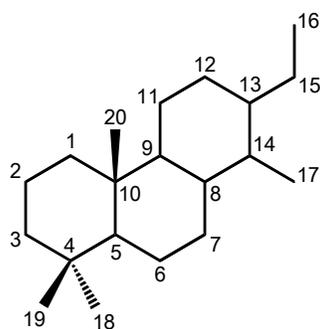


Figura 4. Esqueleto de los diterpenos de tipo cassano.

En las especies de *Caesalpinia* se pueden encontrar diterpenos de tipo cassano con cinco estructuras base características (**9-13**)⁽⁷⁾ como se observa en la Figura 5.

Derivados tricíclicos con un anillo furano fusionado (**9**).

Derivados tricíclicos fusionados con una γ -lactona entre C-12 y C-16 (**10**).

Derivados tricíclicos con los elementos precursores del anillo furánico (**11**).

Furanoditerpenos transpuestos con un grupo metilo migrado de C-4 a C-3 (**12**).

Furanoditerpenos con una γ -lactona entre C-7 y C-17 (**13**).

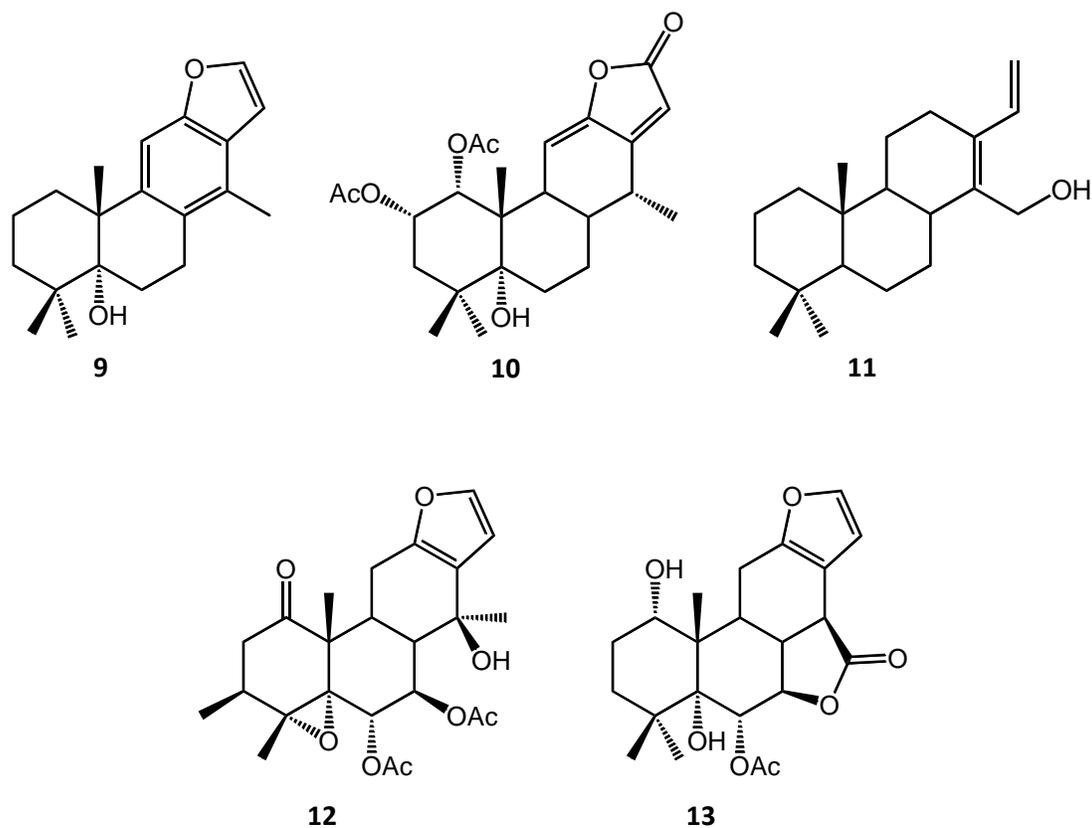


Figura 5. Estructuras base de los diterpenos tipo cassano (**9-13**) presentes en el género *Caesalpinia*.

A través de la investigación y de la práctica se ha demostrado que muchos de los diterpenos del tipo cassanos presentes en el género *Caesalpinia* y otras especies poseen una importante actividad biológica como antimaláricos, antibacteriales, antihelmínticos, antiproliferativos y antineoplásicos. ^{(7), (13)} Los diterpenos tipo cassano aislados de *Caesalpinia crista* (**14-17**) por el grupo de trabajo de Zaw Linn *et al.* en Indonesia, presentaron una actividad inhibitoria dosis-dependiente contra *Plasmodium falciparum* en un estudio *in vitro*, Tabla 1. ⁽¹⁴⁾

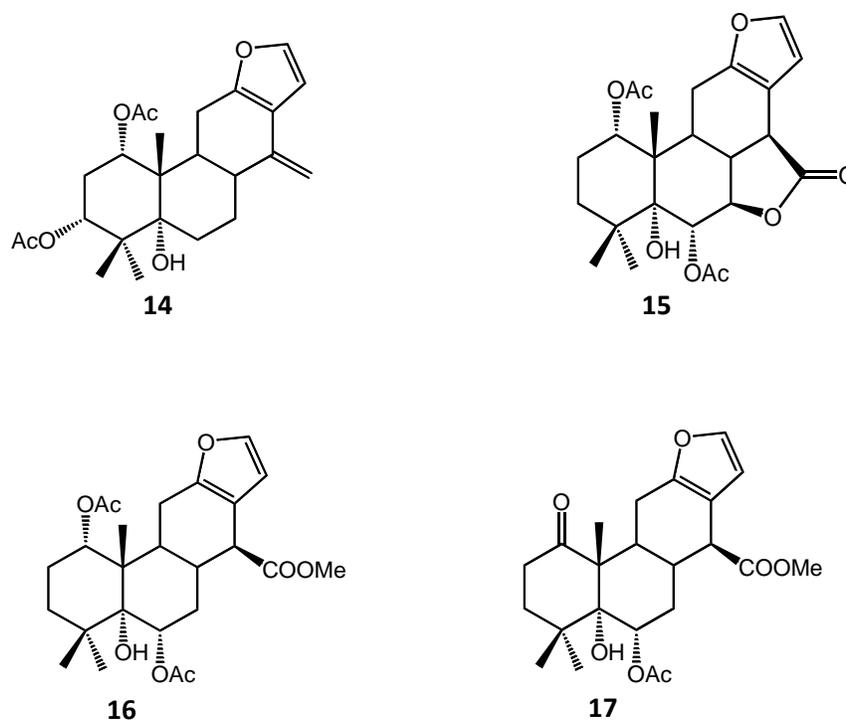


Figura 6. Diterpenofuranos aislados de *Caesalpinia crista* con actividad antimalárica.

Tabla 1. Actividad antimalárica de los compuestos aislados de *C. crista*

Compuestos	CI ₅₀ (μM)
14	0.76
15	0.80
16	6.5
17	0.65

Una especial atención se ha prestado a la capacidad de algunos diterpenofuranos de ejercer un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer. Debido a la importancia y repercusión mundial de dicho padecimiento en la actualidad, resulta de gran interés encontrar alternativas a los tratamientos ya establecidos que puedan ser más eficientes y accesibles, por lo que evaluar la actividad antineoplásica de compuestos obtenidos de recursos naturales resulta de gran utilidad. Existe una cantidad considerable de estudios, realizados en diversas regiones del planeta, que demuestran que los diterpenos del tipo cassano poseen una actividad antineoplásica moderada sobre tipos de

cáncer específicos, y más aún que determinados grupos funcionales en dichas moléculas pueden favorecer o potenciar su efecto antiproliferativo. En 2012, Ma y colaboradores encontraron que los diterpenos tipo cassano tricíclicos con un carbonilo α,β -insaturado (**18**), así como los furanditerpenos con el anillo aromático (**19**), presentan una actividad antiproliferativa más amplia y potente.⁽¹⁵⁾ Este grupo de trabajo en el mismo año observó que la presencia de una γ -lactona α,β -insaturada en el diterpeno tipo cassano (**20**) también mejoraba su actividad anticancerígena.⁽¹⁶⁾ Por su parte, Hou *et al.*⁽¹⁷⁾ en 2008 y Odalo *et al.*⁽¹⁸⁾ en 2009, descubrieron que un grupo acetilo en C-4 (**21**) y un grupo aldehído en el mismo carbono (**22**), respectivamente, mejoraba la actividad citotóxica de los cassanos (Figura 7).

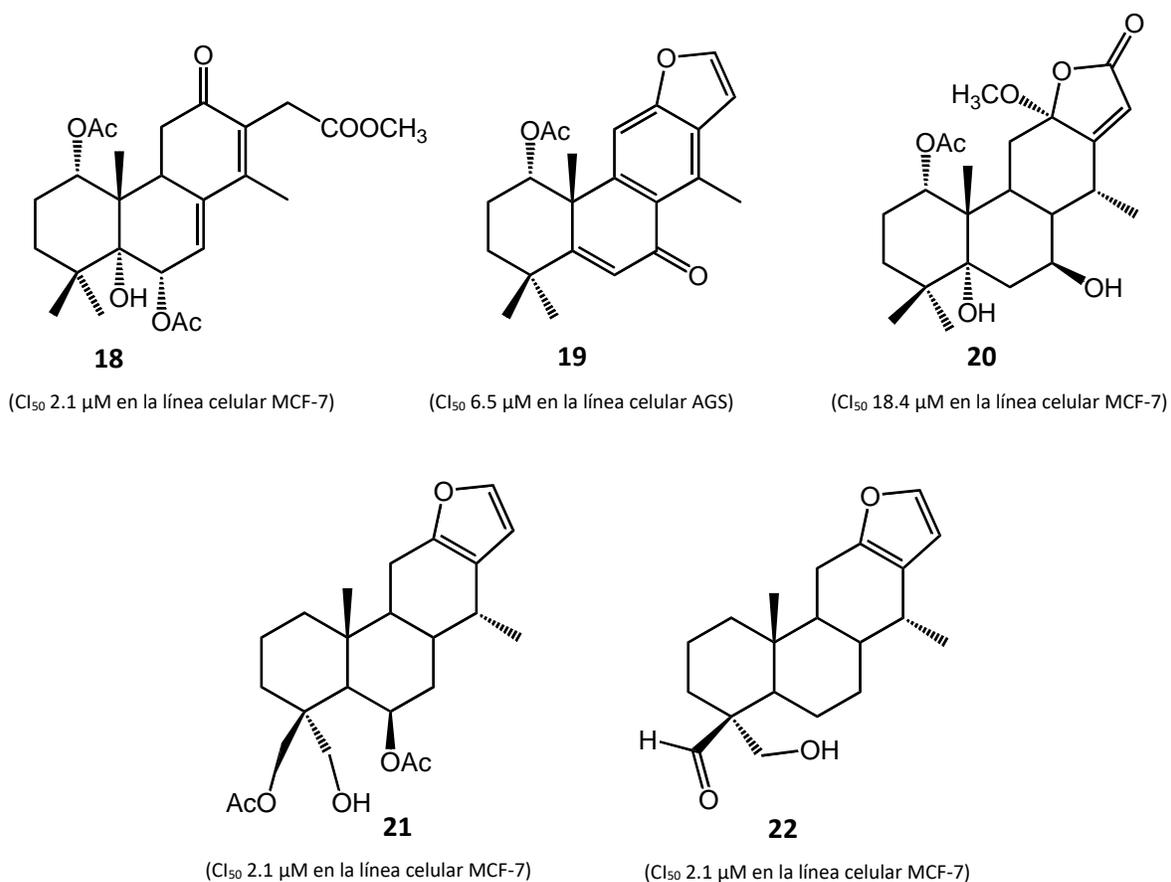


Figura 7. Estructuras de diterpenos tipo cassano con actividad antiproliferativa

A pesar de toda la información que existe sobre el efecto antiproliferativo de los cassanos, poco se ha investigado y poco se sabe del mecanismo de acción a través del cual estos compuestos ejercen su efecto antineoplásico. En 2007, Tu y colaboradores reportaron que

ciertos diterpenos de tipo cassano obtenidos de *Cryptomeria japonica* presentan un efecto terapéutico contra el cáncer de próstata, al inhibir al receptor de andrógenos, ⁽¹⁹⁾ el cual juega un papel crucial en el desarrollo de dicho padecimiento. ⁽²⁰⁾

Además de la inhibición del receptor de andrógenos, existen diferentes mecanismos a través de los cuales se puede abordar el tratamiento del cáncer. Al ser éste un padecimiento multifactorial que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada, ⁽²¹⁾ uno de los mecanismos útiles para tratar dicha enfermedad es a través de la inhibición de la división celular. Esto puede lograrse al evitar que el huso mitótico, el cual está formado por microtúbulos, se forme o que una vez formado se desorganice. Los taxanos fueron de los primeros compuestos en utilizar a los microtúbulos como diana terapéutica pues al unirse a la tubulina, interaccionando con los residuos del loop S9-S10 y de las α -hélices H1, H6 y H7 de la subunidad β , ⁽²²⁾ alteran la dinámica de los microtúbulos y arrestan a la célula en la fase G₂/M provocando que dicha célula sea llevada a apoptosis. ⁽²³⁾

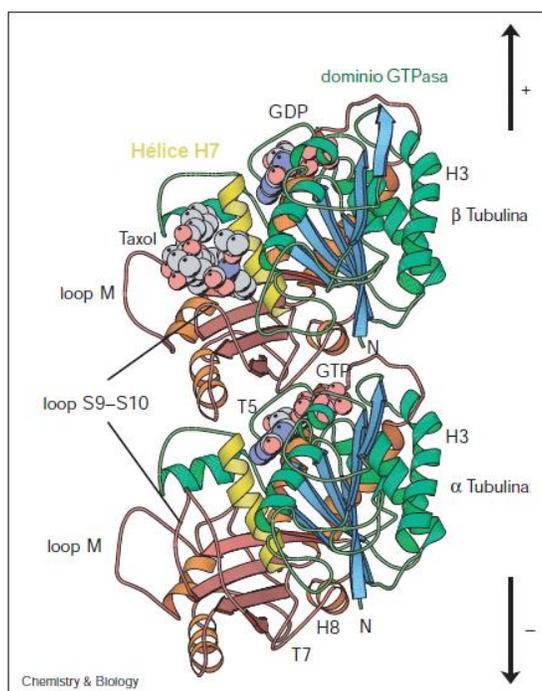


Figura 8. Esquema del sitio de unión del taxol en la estructura tridimensional de la α - β tubulina. ⁽²²⁾

1.4. Los microtúbulos como diana terapéutica contra el cáncer

Los microtúbulos son moléculas del citoesqueleto que cumplen con funciones muy diversas en las células. Estructuralmente son polímeros alargados y cilíndricos de α y β -tubulina que tiene 25 nm de diámetro y pueden alcanzar longitudes en la célula mayores a los 20 μm .⁽²⁴⁾ Los microtúbulos son estructuras dinámicas cuya estabilidad varía dependiendo de la región de la célula en la que se encuentren y la función que vayan a desempeñar, por lo que existen microtúbulos que pueden ser estables durante días e incluso semanas y los hay también que polimerizan y despolimerizan en periodos de minutos o segundos.⁽²²⁾

La tubulina es una proteína heterodimérica (α -tubulina y β -tubulina), cuyos monómeros tienen la capacidad de unirse a nucleótidos de guanina, ya sea GTP o GDP, Figura 9-A. La β -tubulina es la única con la capacidad de intercambiar su nucleótido de guanina pues el sitio de unión de éste se encuentra expuesto cuando la proteína está en solución y el GTP que se une ahí es hidrolizado a GDP durante el ensamblaje de los microtúbulos. Por su parte, el sitio de unión a nucleótidos de guanina de la α -tubulina se encuentra cubierto por la subunidad β , por lo que el GTP unido a dicho monómero (α -tubulina) queda atrapado permanentemente en esta región.⁽²²⁾

La polimerización de la tubulina para dar lugar a los microtúbulos involucra dos tipos de interacciones. Una de ellas es la unión cabeza-cola entre los dímeros de tubulina que da lugar a los protofilamentos y se presenta a lo largo del microtúbulo. Normalmente los microtúbulos citoplásmicos están constituidos por 13 protofilamentos. El otro tipo de unión son las interacciones laterales que se dan entre los protofilamentos paralelos y dan lugar a la pared del microtúbulo.^{(21), (23)} Estos dos tipos de interacciones son las que a grandes rasgos dictan la dinámica de los microtúbulos y desempeñan un papel fundamental en el entendimiento de dicho fenómeno.

Los microtúbulos son estructuras que tienen una polaridad definida debido a que la orientación de los dímeros es siempre la misma en todo el cilindro (Figura 9-B).⁽²³⁾ Al

extremo en el que se encuentra expuesta la β -tubulina se le llama extremo positivo (+) y es aquel en el que la tasa de polimerización es mayor. La otra terminación tiene la subunidad α expuesta y a ésta se le conoce como el extremo negativo (-) que tiene una velocidad de polimerización menor.

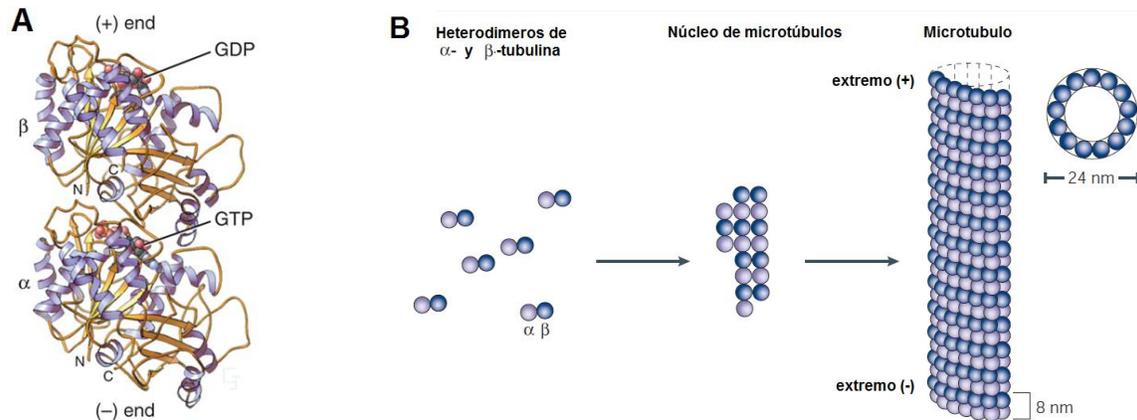


Figura 9. (A) Esquema tridimensional del heterodímero de α y β -tubulina unido a GTP y GDP respectivamente. **(B)** Esquema del proceso de polimerización de los microtúbulos. ⁽²⁵⁾

La polimerización de los microtúbulos se caracteriza por presentar periodos de rápido crecimiento en el extremo positivo (+) favorecidos por la presencia de GTP en la subunidad β , sin embargo, se ha observado que al hidrolizarse el GTP y formarse el GDP la estabilidad del microtúbulo decae y empieza a adquirir una conformación curva lo que da lugar a episodios de rápido acortamiento también conocidos como episodios de **catástrofe**. Esta fase de catástrofe puede ser revertida cuando el microtúbulo comienza a polimerizar de nuevo y crece a una tasa estable; a esto se le llama periodo de **rescate** ^{(21)-⁽²⁴⁾} (Figura 10-A).

Los microtúbulos desempeñan funciones diversas en las células, dentro de las cuales podemos encontrar:

- Soporte estructural: ayudan en el desarrollo y mantenimiento de la forma de las células.

- Transporte: participa en el transporte de vesículas y organelos dentro de la célula con la ayuda de proteínas motoras como la cinesina y la dineína.
- Señalización celular: regulan la transducción de señales a través de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP's). Además, de manera inversa, determinadas señalizaciones afectan la estabilidad de los microtúbulos. ⁽²⁶⁾
- División celular y mitosis: conforman el huso mitótico que desempeña un papel fundamental para la correcta distribución del material genético en las dos células hijas, ⁽²⁷⁾ Figura 10-B.

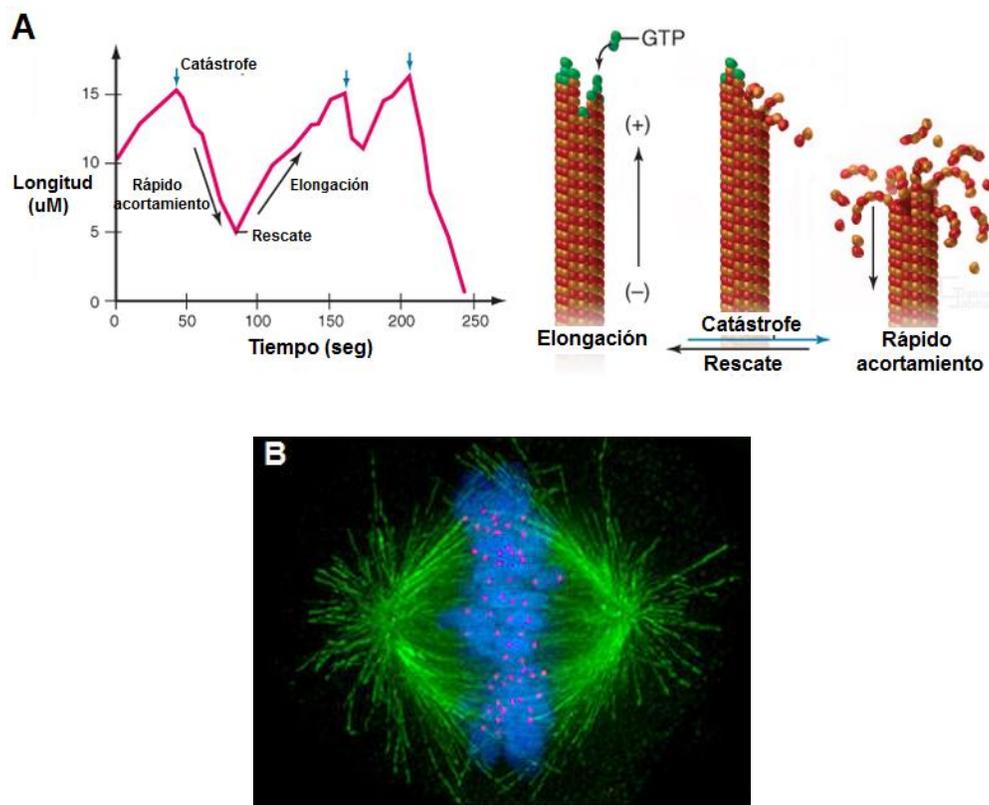


Figura 10. (A) Dinámica de los microtúbulos ejemplificada con una gráfica y un esquema.

(B) Huso mitótico (verde) de una célula en mitosis.

Cuando una célula se va a dividir requiere de la separación de su material genético en dos partes iguales para poder formar dos células hijas idénticas. El huso mitótico, constituido por microtúbulos, es la principal estructura que se va a encargar de separar dicho material

genético y requiere de un gran dinamismo estructural para lograrlo. En un primer momento, se necesita la rápida formación del huso mitótico de manera radial desde los dos extremos de la célula para así alinear los cromosomas al centro de la misma. En una segunda etapa es indispensable que el huso mitótico se desintegre desde el centro de la célula y hacia los extremos para que arrastre consigo al material genético y puedan finalmente formarse dos células hijas con exactamente la misma información genética. El dinamismo y regulación de este proceso es mucho más complejo de lo que se puede describir en este trabajo, sin embargo, se busca dar una idea de la importancia que tiene la dinámica de los microtúbulos en un proceso tan fundamental como la división celular. Es debido a esta función en particular que los microtúbulos resultan una diana terapéutica muy eficaz para el tratamiento contra el cáncer. ^{(23), (24), (26)}

En la actualidad existe una diversidad de compuestos en el mercado utilizados como terapia contra el cáncer que tienen como mecanismo de acción alterar la dinámica de los microtúbulos. Los taxanos son un grupo de compuestos que tienen la capacidad de favorecer la polimerización de la tubulina y estabilizar a los microtúbulos, acelerando así la formación de los mismos y evitando su desintegración. ⁽²²⁾ Este cambio en la dinámica de los microtúbulos provoca que una vez formado el huso mitótico éste no pueda desintegrarse por lo que la separación del material genético no se lleva a cabo y la célula queda arrestada en la fase G2/M de la división celular, lo cual genera señales para que dicha célula sea llevada a apoptosis ⁽²⁸⁾. Por otro lado, los alcaloides de la vinca son compuestos que a concentraciones altas tienen una actividad opuesta a los taxanos ya que promueven la despolimerización de los microtúbulos, ⁽²⁴⁾ evitando así la formación del huso mitótico. De esta manera la división celular se ve interrumpida, quedando las células arrestadas en la fase G2/M para su posterior destrucción a través de la muerte celular programada. Sin embargo, a concentraciones bajas se ha comprobado que el efecto antiproliferativo de los alcaloides de la vinca está dado por alterar la inestabilidad dinámica de los microtúbulos y no por favorecer su despolimerización. ⁽²⁹⁾

1.5. Reconocimiento molecular *in silico*

Gracias al avance tecnológico que ha venido desarrollándose de manera exponencial en las últimas décadas,⁽³⁰⁾ los modelos *in silico* forman parte esencial de la investigación de nuevas moléculas químicas. Los modelos *in silico* comprenden una amplia gama de herramientas computacionales que pueden ser utilizadas para diferentes fines, por ejemplo, para tener un mejor entendimiento de las interacciones proteína-ligando (*docking*), para evaluar la posible interacción de una amplia biblioteca de compuestos químicos sobre un blanco farmacológico determinado (muestreo de alta eficiencia o HTS), o incluso para sugerir posibles compuestos con potencial farmacológico a través del diseño de ligandos basado en fragmentos o FBD. Al día de hoy dichas herramientas computacionales han contribuido al diseño de múltiples compuestos. Tan solo en Estados Unidos aproximadamente 50 moléculas desarrolladas con la ayuda de métodos *in silico* han logrado llegar a fases clínicas.⁽³¹⁾

El *docking* o acoplamiento molecular, que es una técnica de interés para el presente estudio, trata de predecir, a través de un modelo tridimensional, el acomodo, orientación y conformación de una molécula pequeña en el sitio de unión que pudiera tener sobre una macromolécula blanco. Con esto, se puede estimar el posible sitio de unión de una molécula pequeña, así como la afinidad que dicho compuesto pueda tener por su molécula blanco, todo esto inclusive antes de la síntesis del mismo. De igual manera, el *docking* es una herramienta muy útil para optimizar ligandos a partir de las interacciones que predice dicha técnica.

Para poder llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular (*docking*) se requieren 3 elementos principales:

1. Se debe obtener la estructura tridimensional de la molécula blanco, que generalmente es una proteína, a la cual se le hacen ajustes para los cálculos posteriores.

2. Se necesita también de un modelo tridimensional de la molécula pequeña o ligando, la cual debe de pasar por una serie de optimizaciones estructurales y conformacionales por computadora para poder ser utilizado.
3. Finalmente, se requiere de un algoritmo computacional que tome el o los ligandos y los coloque dentro del sitio de unión de la molécula blanco en un gran número de orientaciones.

Una vez que las tres etapas del *docking* se llevan a cabo, es indispensable otorgar un valor numérico al cálculo y utilizar dicho criterio para distinguir cuál de todas las disposiciones probadas es la más adecuada. Dicha disposición es la que el ligando adoptaría si tuviera acceso al sitio de unión en la molécula blanco. A dicho valor numérico se llama puntaje.⁽³²⁾ El puntaje es de gran utilidad también para hacer el comparativo entre diferentes ligandos que pudieran tener afinidad por el mismo sitio de unión de la proteína blanco y con ello evaluar cuál es el que se une con mayor afinidad.

Hoy en día existen programas computacionales que nos permiten hacer el modelado tridimensional de los ligandos de interés. Por otro lado, la estructura tridimensional de las moléculas blanco se puede obtener experimentalmente por cristalografía de rayos X o por resonancia magnética nuclear, aunque existen bases de datos públicas que ponen a nuestra disposición la estructura en 3D de una muy extensa cantidad de proteínas de interés. La principal fuente de este tipo es el *Protein Data Bank* (PDB).⁽³³⁾

Actualmente el acoplamiento molecular es una de las principales áreas de investigación utilizadas para el diseño de fármacos *in silico* y es un componente principal en los programas de descubrimiento de fármacos tanto en la industria como en las instituciones de investigación. Esta rama ha cobrado tal importancia que, en la actualidad, existen más de 30 programas de docking comerciales como el AutoDock, Genetic Optimization for Ligand Docking, FlexX/FlexE, DOCK, entre otros.⁽³⁰⁾

2. JUSTIFICACIÓN

Algunos diterpenos de tipo cassano han demostrado poseer propiedades antiproliferativas y citotóxicas en diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos. Por lo tanto, es importante evaluar si este grupo de compuestos, específicamente los pertenecientes a la serie de los vouacapanos, de amplia accesibilidad en México, tienen la capacidad de interactuar con la tubulina e intervenir en la estabilidad de los microtúbulos, para ejercer así su actividad antiproliferativa.

3. HIPÓTESIS

Los vouacapanos que se obtengan de *Caesalpinia platyloba*, así como los derivados que se sinteticen, al presentar una estructura de diterpenos tipo cassano, podrán ejercer una actividad antiproliferativa mediante la alteración de la dinámica de los microtúbulos.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Obtener nuevos derivados del vouacapano por transformaciones químicas a partir de los productos naturales de *Caesalpinia platyloba* y estudiar su influencia en el proceso de polimerización de la tubulina.

4.2. Específicos

- Preparar derivados de mediana polaridad a partir del vouacapano que se obtengan de *Caesalpinia platyloba*.
- Caracterizar los productos nuevos mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Probar si el vouacapano obtenido de *Caesalpinia platyloba*, así como los derivados que se sinteticen impiden o alteran la polimerización de la α,β tubulina *in vitro*.

- Determinar el posible sitio de unión de los compuestos estudiados en el presente trabajo sobre el heterodímero de α -tubulina- β -tubulina a través de estudios de reconocimiento molecular *in silico* (*docking*).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Nuevos derivados del vouacapano preparados a partir del (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**)

El vouacapano **6** se obtuvo de *Caesalpinia platyloba* siguiendo la metodología reportada por Gómez-Hurtado y colaboradores.⁽¹²⁾ El compuesto se identificó por su espectro de RMN de ^1H en el cual se observaron las señales características correspondientes a los dos hidrógenos aromáticos del furano en δ 7.23 y δ 6.19, la señal del hidrógeno base de éster de C-6 en δ 5.51, también la señal perteneciente al metilo del grupo acetilo en δ 2.03 y las señales de los grupos metilo del esqueleto diterpénico en δ 1.21, δ 1.03, δ 0.99 y δ 0.96.

Como se mencionó en la introducción, en 2009 Ma y colaboradores⁽¹⁵⁾ al trabajar con diterpenos del tipo cassano de *C. minax* descubrieron que la aromaticidad del anillo adyacente al furano mejora el efecto antiproliferativo de estos productos naturales. Aunado a esto, los compuestos aromáticos presentan en su estructura una geometría particular, ya que son planos, son estables y tienen la capacidad de generar interacciones del tipo π .⁽³⁴⁾ Es con estos antecedentes que decidimos preparar derivados del vouacapano **6** con dicha característica estructural, para aumentar así las posibles interacciones de los compuestos sintetizados con el heterodímero de α -tubulina- β -tubulina.

Al tratar el (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**) con un agente oxidante como la 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) se formó el (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6-acetoxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**23**) como se aprecia en la Figura 11.

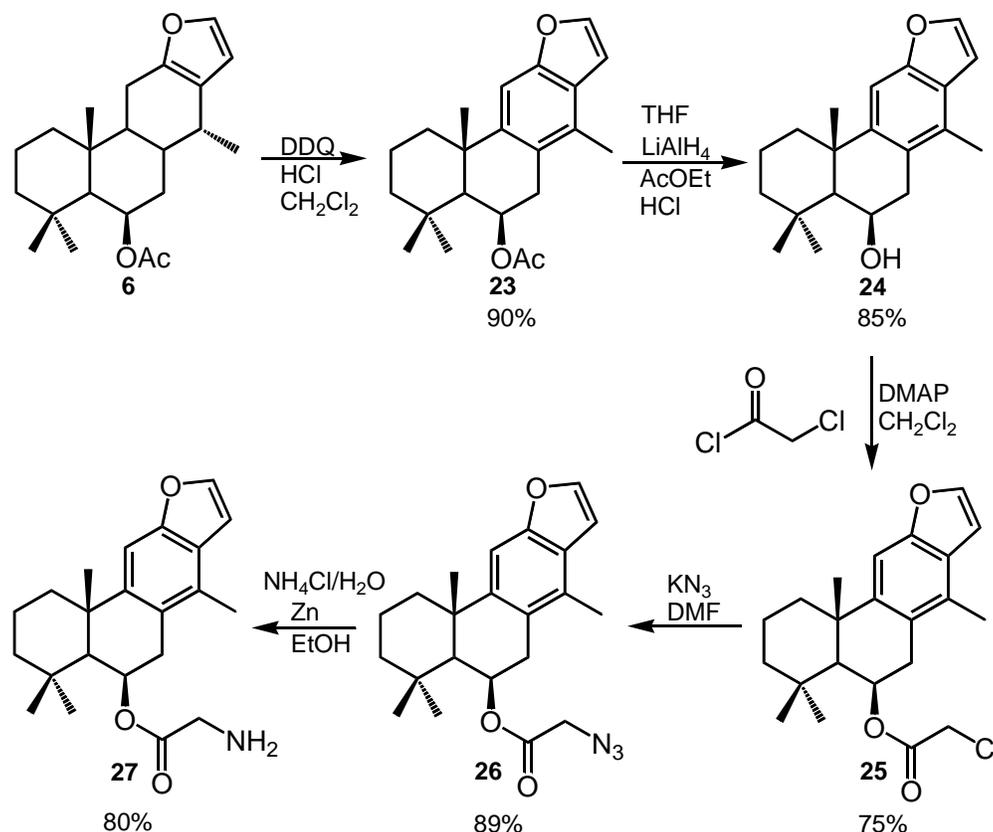


Figura 11. Obtención de **23-27** a partir del producto natural **6**, aislado de *C. platyloba*.

El derivado del vouacapano **23** se obtuvo como una miel incolora y presentó en su espectro de RMN de ^1H todas las señales características reportadas por el grupo de trabajo de Yadav *et al.*⁽³⁵⁾ dentro de las que se encuentran la señal correspondiente al protón aromático del anillo adyacente al furano (C-11) en δ 7.40 (s), la señal del protón base de éster en δ 5.85 (dt, $J = 5.2, 1.6$ Hz), así como la señal de un metilo aromático en δ 2.34 (s) y la señal de los hidrógenos del grupo acetilo en δ 2.02 (s) (ver apéndice A y parte experimental).

Se sabe que debido a la baja polaridad del paclitaxel, que se traduce en una poca solubilidad del compuesto en agua, éste debe ser administrado de forma intravenosa disuelto en vehículos muy agresivos e inclusive tóxicos para el paciente, que desencadenan efectos no deseados.⁽³⁶⁾ De igual manera, la preferencia del taxol por tejidos grasos debida a su alta lipofilidad tiene como consecuencia uno de los efectos

adversos más importantes de este fármaco que es la mielosupresión (neutropenia).⁽³⁷⁾ Aunado a esto, y teniendo en consideración que la polaridad es una propiedad fundamental de los medicamentos ya que ésta influye directamente en la solubilidad de los mismos y en el tipo de interacciones que éstos puedan generar con sus moléculas blanco,^{(38), (39)} decidimos enfocar la secuencia de síntesis en agregar grupos funcionales más polares que amplíen el número y tipo de interacciones de los derivados con la tubulina (interacciones polares, iónicas o puentes de hidrógeno), además de contribuir a la solubilidad de los mismos, para así obtener compuestos biológicamente activos y con una mejor solubilidad.

La hidrólisis del derivado **23** se llevó a cabo utilizando condiciones reductoras fuertes con hidruro de litio y aluminio en tetrahidrofurano anhidro, con lo cual se obtuvo como producto el (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6-hidroxiouacapa-8(14),9(11)-dieno (**24**), Figura 11. El espectro de infrarrojo (IR) de **24** mostró bandas para el grupo hidroxilo en 3628 y 3613 cm^{-1} . Por otro lado, en la espectrometría de masas por ionización química, se encontró el ion molecular en m/z 298 $[\text{M}]^+$ en concordancia con la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$. La rotación específica de este derivado fue dextrorrotatoria de $[\alpha]_{\text{D}} = +36$. Su espectro de RMN de ^1H presentó tres señales de protones aromáticos en δ 7.52 (d, $J = 2.3$ Hz), δ 7.38 (s) y δ 6.72 (dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz) debidas a los hidrógenos del furano y del anillo adyacente, una señal doble ancha a δ 4.79 (da, $J = 4.1$ Hz) correspondiente al hidrógeno base de alcohol y otras cuatro señales pertenecientes a los grupos metilo presentes en la estructura del compuestos en δ 2.37 (s), δ 1.64 (s), δ 1.31 (s), δ 1.08 (s) (ver apéndice A y parte experimental). El espectro de RMN de ^{13}C confirmó la presencia de ocho carbonos aromáticos δ 154.75 (C), δ 147.33 (C), δ 145.11 (CH), δ 129.33 (C), δ 126.31 (C), δ 124.83 (C), δ 105.89 (CH), δ 105.56 (CH) correspondientes a los de ambos anillos, además de cuatro metilos, cuatro metilenos, dos metinos y dos carbonos cuaternarios. La estructura, estereoquímica y configuración de **24** quedó definitivamente asignada con el análisis de difracción de rayos X (Figura 12a), la cual coincidió con la asignación establecida por RMN de una y dos dimensiones (HMBC, HSQC y NOESY) que se muestra en el modelo molecular del producto en cuestión en la Figura 12b.

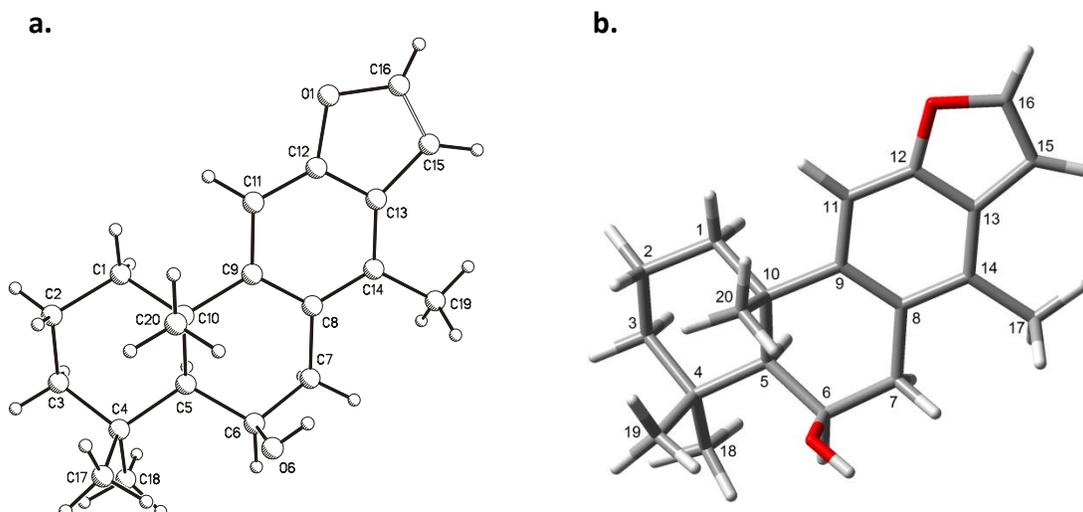


Figura 12. (a) Estructura del derivado **24** obtenida por difracción de rayos X. (b) Mínimo global de **24** (Carbonos en gris, hidrógenos en blanco y oxígenos en rojo).

El tratar el derivado **24** con cloruro de cloroacetilo en presencia de una base como la 4-*N,N*-dimetilaminopiridina se dio lugar a la formación del producto **25** denominado (–)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-cloroacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (Figura 11). La fórmula molecular se estableció como $C_{22}H_{27}ClO_3 + H^+$ (m/z 375) por espectrometría de masas con ionización por electrospray. El compuesto presentó una rotación específica $[\alpha]_D = -43$. En el espectro IR se apreció la señal del carbonilo en 1748 cm^{-1} , además de dos bandas correspondientes a la presencia de un halógeno como lo es el cloro (1309 y 1295 cm^{-1}). El espectro de RMN de ^1H del (–)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-cloroacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno presentó de nueva cuenta las señales correspondientes a los tres hidrógenos aromáticos de la molécula en δ 7.54 (d, $J = 2.3\text{ Hz}$), δ 7.39 (s), δ 6.72 (dd, $J = 2.3, 1.0\text{ Hz}$), una señal en δ 5.95 (dt, $J = 5.3, 1.6\text{ Hz}$) perteneciente al hidrógeno base de éster, además de la aparición de una señal simple del metileno del cloroacetilo en δ 4.01 (s) (ver apéndice A y parte experimental). Cabe mencionar que el desplazamiento químico de esta última señal se presenta particularmente a campos bajos debido al efecto de la electronegatividad del cloro adyacente que disminuye la protección diamagnética de los núcleos de dichos hidrógenos.⁽⁴⁰⁾ En el espectro HMBC las correlaciones de H-16 con C-12, C-13 y C-15; de H-15 con C-12, C-13 y C-16; de H-11 con C-8, C-10, C-12 y C-13; de H-7 con C-5, C-6, C-8, C-9

y C-14; de H-17 con C-8, C-13 y C-14; de H-18 con C-3, C-4, C-5 y C-20; de H-20 con C-1, C-5, C-9 y C-10, así como las interacciones encontradas entre en el espectro NOESY para H-1a, H-1b, H-2a, H-2b y H-3a y H-3b, coincidieron con la conformación y estereoquímica presentes en el modelo molecular de **25** (Figura 13).

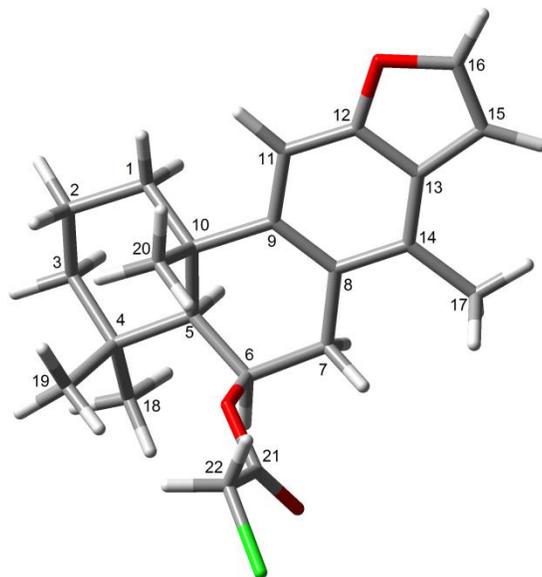


Figura 13. Mínimo global de **25** (carbonos en gris, cloro en verde, hidrógenos en blanco y oxígenos en rojo).

La sustitución nucleofílica del átomo de cloro presente en **25** por un grupo azido, utilizando azida de potasio, dio como producto el $(-)-(5S,6R,10S)-6[2'$ -azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**26**), como se muestra en la Figura 11. En su espectro de IR se observaron bandas correspondientes al grupo azido y al carbonilo en 2110 y en 1741 cm^{-1} , respectivamente. La fórmula molecular de **26** se estableció a través de espectrometría de masas con ionización por electrospray como $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{Na}$ (m/z 404), mientras que la rotación específica del $(-)-(5S,6R,10S)-6[2'$ -azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno fue de $[\alpha]_D = -59$. Los datos espectroscópicos de **26** fueron muy similares a los de **25**, debido a que estructuralmente hablando, ambos compuestos son idénticos teniendo como única diferencia el intercambio del átomo de cloro por un grupo azido, en donde la electronegatividad de estos dos grupos es muy parecida. Por ello, las diferencias observadas en sus espectros de RMN de ^1H fueron muy sutiles. Se presentó un ligero

desplazamiento hacia campos más altos de la señal de los hidrógenos del metileno adyacente al grupo azido pasando de δ 4.01 (s) en **25** a δ 3.82 (s) en **26**, así como también se dio el empalme de las señales correspondientes a los hidrógenos de los metilos en C-4, que aparecieron como una sola señal simple que integró para 6 hidrógenos en δ 1.09 (s) (ver apéndice A y parte experimental). Por su parte, en el espectro de RMN de ^{13}C se observó un desplazamiento de la señal de C-22 hacia campos más bajos pasando de δ 41.56 (CH_2) en **25** a δ 51.16 (CH_2) en **26** debido al cambio en la electronegatividad del grupo adyacente. Las correlaciones en los espectros de HMBC y NOESY permitieron establecer la conformación y estereoquímica del (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**26**) como se muestra en el modelo molecular de la Figura 14.

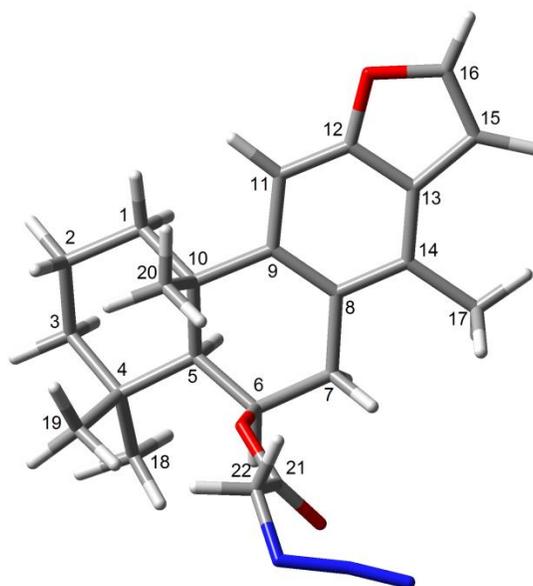


Figura 13. Mínimo global de **26** (carbonos en gris, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul y oxígenos en rojo).

Finalmente, haciendo una modificación al método de Lin *et al.*⁽⁴¹⁾ se redujo el grupo azido del derivado **26** a la amina correspondiente, como se expone en el Figura 11, tratando dicho derivado con cloruro de amonio y zinc metálico en polvo, para dar lugar a la formación del producto **27** denominado (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-aminoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno ó glicinato de (-)-(5*S*,6*R*,10*R*)-vouacapa-8(14),9(11)-dien-6-ilo. La

fórmula molecular de **27** se estableció como $C_{22}H_{29}NO_3 + H^+$ (m/z 356) haciendo uso de la espectrometría de masas con ionización por electrospray. En el espectro de RMN de 1H del derivado en cuestión se conservaron la mayoría de las señales características presentes en **26**, como las señales de los tres hidrógenos aromáticos en δ 7.53 (d, $J = 2.2$ Hz), δ 7.39 (s) y δ 6.72 (dd, $J = 2.2, 0.9$ Hz), y las señales de los grupos metilo de la molécula en δ 2.34 (s), δ 1.59 (s) y δ 1.08 (s) (ver apéndice A y parte experimental). Por otro lado, la señal correspondiente a los hidrógenos del metileno base de amina (C-22) se desplazó hacia campos más altos pasando de δ 3.82 (s) en **26** a δ 3.38 (sa) en **27** como consecuencia del cambio en la electronegatividad del grupo adyacente a dichos protones generada por la pérdida de los dos nitrógenos. Adicionalmente a esto, existe un acoplamiento entre los hidrógenos del metileno y los hidrógenos de la amina lo cual ocasiona que dicha señal se ensanche. El modelo molecular, así como las correlaciones observadas en los espectros HMBC y NOESY, reforzaron la stereoquímica y conformación del glicinato de $(-)-(5S,6R,10R)$ -vouacapa-8(14),9(11)-dien-6-ilo (**27**), la cual se muestra en la Figura 14.

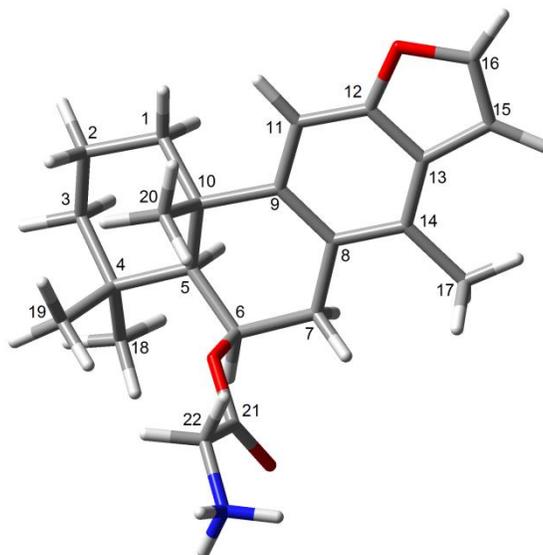


Figura 14. Mínimo global de **27** (carbonos en gris, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul y oxígenos en rojo).

5.2. Evaluación *in vitro* de la estabilidad de los microtúbulos en presencia de derivados del vouacapano

En esta sección se describe la influencia del producto natural (–)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**), aislado de *Caesalpinia platyloba*, así como la de los derivados sintetizados (**23-27**), sobre la inestabilidad dinámica de los microtúbulos compuestos por heterodímeros de α -tubulina– β -tubulina. Se utilizaron dos controles positivos, uno de ellos fue el paclitaxel (**1**) por ser un agente con un potente efecto estabilizador de los microtúbulos. El otro control utilizado fue el nocodazol, ya que éste es un potente inhibidor de la polimerización de la α -tubulina– β -tubulina y evita la formación de los microtúbulos. Como control negativo se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual se empleó como vehículo de todos los compuestos evaluados en esta prueba *in vitro*.

El producto natural **6** promovió un aumento en la polimerización de la tubulina mucho mayor al observado en la condición con el vehículo solo (DMSO), e incluso mayor al generado por el paclitaxel (**1**). La máxima polimerización se alcanzó a los 60 minutos con un Δ de absorbancia de 0.362, como se observa en la Figura 15. Tras el estímulo despolimerizante, que fue la disminución de la temperatura a -20 °C, el (–)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**) logró estabilizar de forma moderada los microtúbulos, ya que el cambio en el valor de Δ de absorbancia fue menos pronunciado que en la condición con el vehículo (0.025 de **6** contra 0.086 de DMSO), sin embargo, este efecto estabilizador no fue tan potente como el generado por el paclitaxel (**1**) (Figura 15).

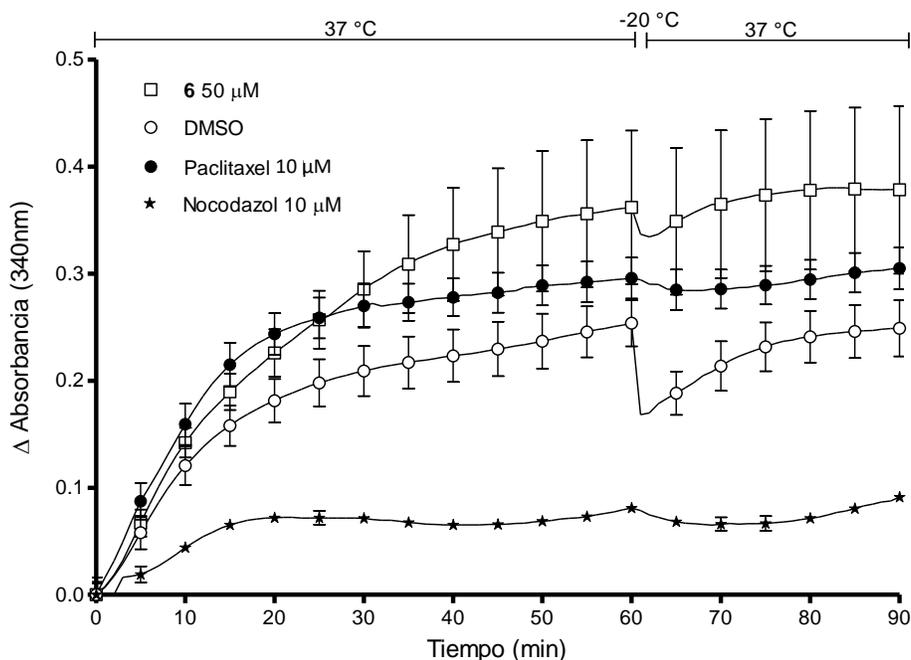


Figura 15. Efecto del producto natural **6** aislado de *Caesalpinia platyloba* sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por disminución de la temperatura, $n = 3$.

Del mismo modo, el derivado **23** promovió la polimerización de la tubulina en una proporción mayor que el paclitaxel (**1**), alcanzado la meseta de máxima polimerización al minuto 50 con un valor de Δ de absorbancia de 0.395 a 100 μM (Figura 16). Tras la disminución de la temperatura, el compuesto **23** demostró un efecto estabilizador moderado al impedir la caída de la polimerización al nivel de la condición con el vehículo (DMSO), manteniendo la Δ de absorbancia en 0.354. Una dilución del derivado **23** (50 μM) provocó que el efecto estabilizador de dicho compuesto sobre los microtúbulos se perdiera, mientras que la polimerización aumentada de la tubulina se mantuvo, Figura 16.

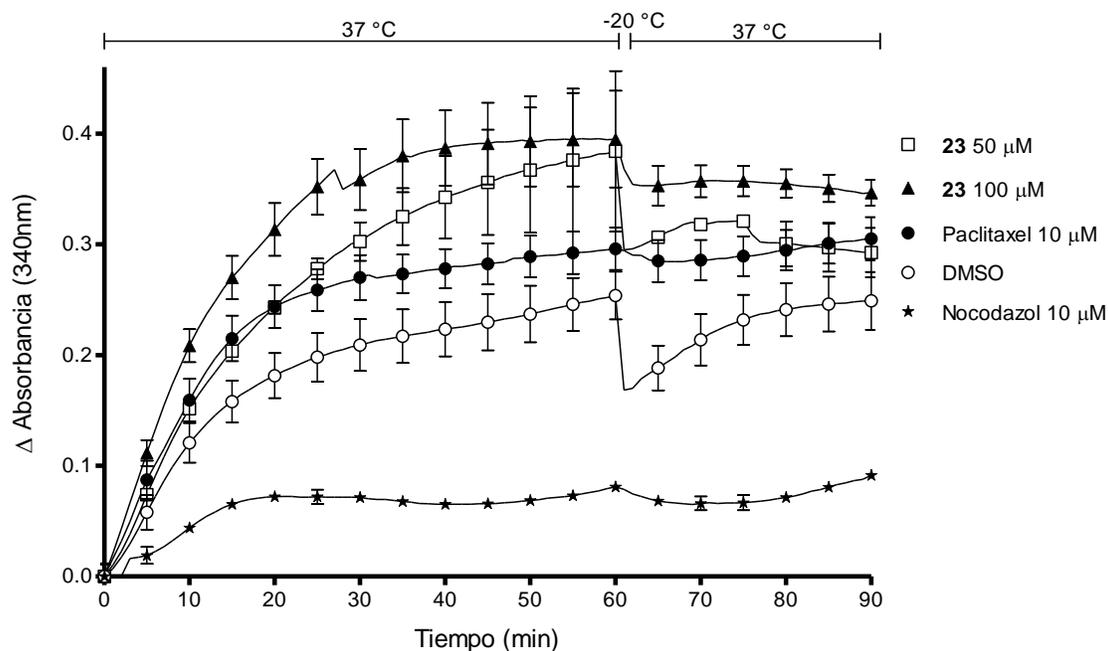


Figura 16. Efecto de **23** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

Por su parte, el derivado **24** a 50 μM provocó un aumento en la polimerización de la tubulina, sobrepasando la condición blanco (DMSO) y la condición control (paclitaxel), como se aprecia en la Figura 17. La máxima polimerización se alcanzó hasta el minuto 60 obteniéndose un Δ de absorbancia de 0.383. Al disminuir la temperatura a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para evaluar un posible efecto estabilizador se encontró que, al igual que los compuestos **6** y **23**, el $(-)-(5S,6R,10S)$ -6-hidroxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**24**) estabiliza de forma moderada a los microtúbulos evitando su desintegración (Figura 17), ya que genera un cambio en el valor de Δ de absorbancia de 0.054 unidades, el cual es menor al cambio que se da en la condición en la que únicamente está presente el vehículo (0.086), pero mayor al producido por el paclitaxel, que genera un cambio de 0.012 unidades.

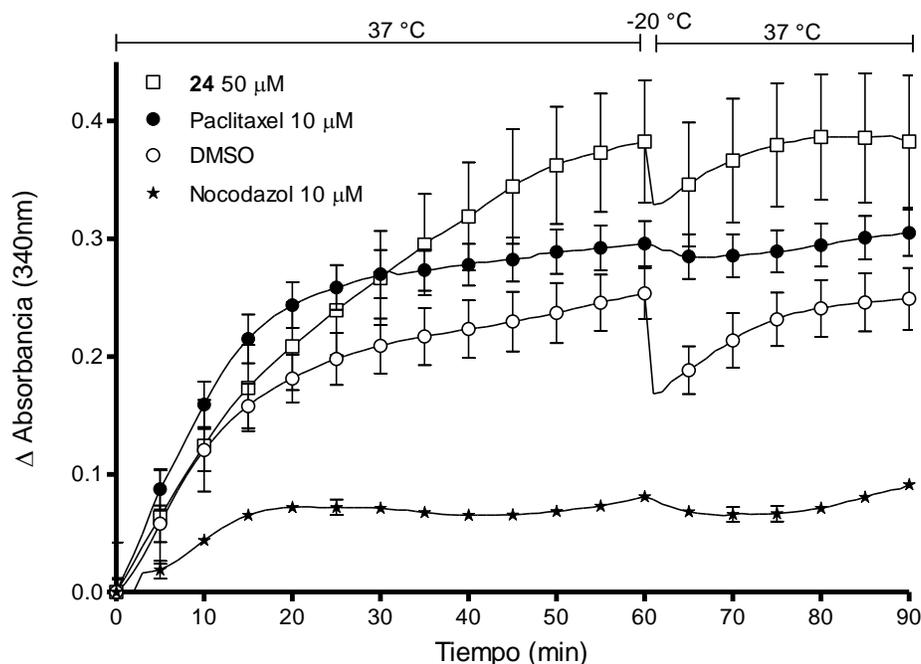


Figura 17. Efecto de **24** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por una disminución en la temperatura, $n = 3$.

En coincidencia con los resultados mencionados anteriormente, el $(-)-(5S,6R,10S)-6[2'$ -cloroacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**25**) generó un aumento en la polimerización de la α -tubulina- β -tubulina a 50 μ M y 100 μ M, alcanzando el máximo grado de polimerización al minuto 60 con un valor de Δ de absorbancia de 0.451 y 0.449, respectivamente. Dicho efecto sobrepasó el generado por el control positivo (paclitaxel) por un amplio rango, como se observa en la Figura 18. Sin embargo, tras el estímulo despolimerizante (disminución de la temperatura a -20 °C) únicamente la concentración de 100 μ M demostró un efecto estabilizador moderado, ya que la disminución de la Δ de absorbancia fue menor que la observada para 50 μ M y para la condición con el vehículo (DMSO) (Figura 18).

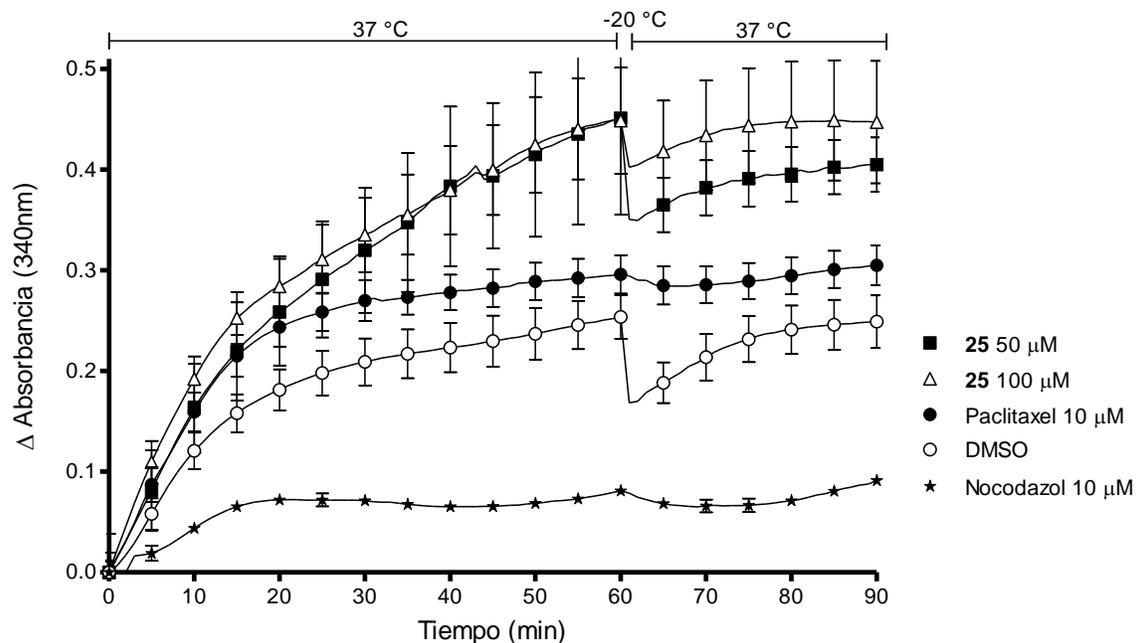


Figura 18. Efecto de **25** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

El (–)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**26**), a una concentración de 50 μM , conservó la tendencia observada en los derivados ya evaluados al producir una polimerización de la proteína mayor al del vehículo y mayor a la producida por el paclitaxel (**1**). La meseta de máxima polimerización se alcanzó desde el minuto 50 con un Δ de absorbancia de 0.383 como se aprecia en la Figura 19. Tras la disminución de la temperatura a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, el compuesto **26** logró evitar la caída del valor de Δ de absorbancia, generando una disminución menor a la que se presenta con el DMSO, por lo que dicho derivado posee también una actividad estabilizadora de los microtúbulos, la cual se considera moderada ya que el efecto generado no es tan potente como el producido por el paclitaxel (**1**) (Figura 19). Estos resultados nos indican que intercambiar el grupo cloro por un grupo azido en el C-22, mejora la actividad estabilizadora de microtúbulos de la molécula, ya que **26** generó el mismo efecto estabilizador que **25** pero a una menor concentración (50 μM de **26** contra 100 μM de **25**).

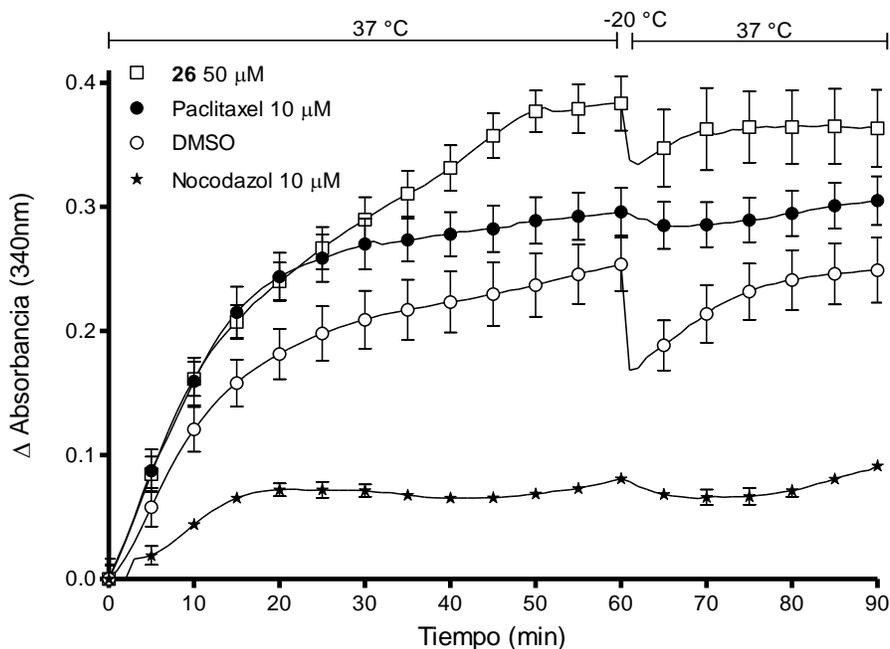


Figura 19. Efecto de **26** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por una disminución en la temperatura, $n = 3$.

Debido a lo mencionado con anterioridad en cuanto a la capacidad que tiene la presencia de grupos polares de generar interacciones iónicas y puentes de hidrógeno y que con esto se favorezcan más interacciones entre un ligando y su molécula blanco, nos resultó muy interesante probar el glicinato de $(-)-(5S,6R,10R)$ -vouacapa-8(14),9(11)-dien-6-ilo (**27**), que posee una amina primaria en C-22, en el sistema de polimerización-despolimerización de la tubulina *in vitro*. La tubulina en presencia de **27** a 50 μM mejoró su polimerización a niveles semejantes a los alcanzados en presencia de paclitaxel (**1**) (Figura 20). El máximo grado de polimerización se observó en el minuto 60 con un valor de Δ de absorbancia de 0.323. En cuanto el efecto del derivado **27** en la estabilización de los microtúbulos, se observó que al bajar la temperatura a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, el derivado en cuestión sí ejerció un efecto de estabilización al generar una disminución del Δ de absorbancia menor a la que se generó en la condición con DMSO. Tras estos resultados se evaluó el compuesto **27** ahora al doble de concentración (100 μM) para establecer si dicho efecto estabilizador mejoraba. En la Figura 20 se observa que a pesar del aumento en la concentración la capacidad de estabilizar los microtúbulos no mejora, sino que se mantiene en un rango

similar, pero por otro lado, la polimerización de la tubulina sí se incrementó con el aumento en la concentración del derivado.

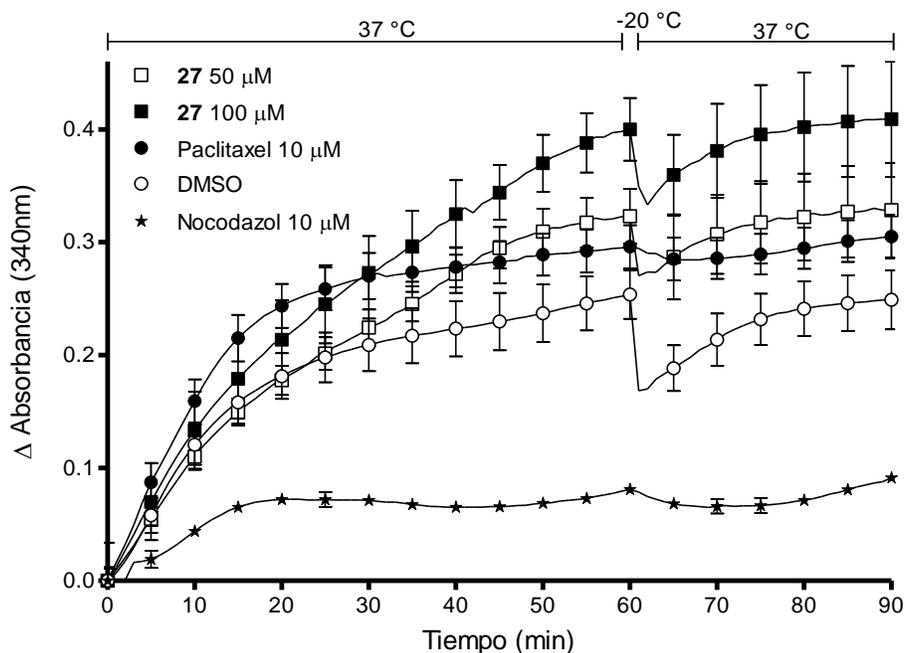


Figura 20. Efecto de **27** sobre la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

En la Tabla 2 se resumen los resultados del efecto de $(-)-(5S,6R,8S,9S,10R,14R)$ -6-acetoxivouacapano (**6**) y sus derivados **23-27** sobre la despolimerización de los microtúbulos *in vitro*. Se observa que el producto natural **6** fue el compuesto con el mejor efecto estabilizador de los microtúbulos al permitir únicamente el 29% de despolimerización a 50 μM. El derivado aromático **23**, a pesar de generar un efecto similar (31% de despolimerización) requirió una mayor concentración para alcanzarlo. Esto nos indica que el cambio en la geometría del derivado **23** debido a la aromatización no ayuda en el efecto estabilizador de los microtúbulos. Del mismo modo, analizando de la tabla el efecto de los compuestos con grupos más polares, que son **24** con un hidroxilo y **27** con una amina, se observa que son los derivados con el efecto estabilizador menos pronunciado al permitir el 60% de despolimerización. Esto es un indicativo de que la

polaridad de la molécula desempeña un papel fundamental en su actividad sobre los microtúbulos. De igual manera, es importante resaltar que ninguno de los compuestos evaluados logró estabilizar los microtúbulos en la magnitud en la que el paclitaxel (**1**) lo hizo, sin embargo, el efecto estabilizador de microtúbulos generado por los derivados sí puede considerarse como un efecto significativo, especialmente el producido por el producto natural **6** y su derivado **23**.

Tabla 2. Efecto del vouacapano **6** y sus derivados **23-27** sobre la estabilidad de los microtúbulos.

Compuesto	Concentración (μM)	Caída en Δ de absorbancia	Despolimerización (%)
DMSO ^a		0.086	100
Paclitaxel ^b	10	0.012	13
6	50	0.025	29
23	50	0.089	103
	100	0.027	31
24	50	0.054	62
25	50	0.101	117
	100	0.047	54
26	50	0.045	52
27	50	0.053	61
	100	0.067	77

^a Control negativo

^b Control positivo

5.3. Análisis del estudio de reconocimiento molecular *in silico* (docking)

El análisis computacional de reconocimiento molecular *in silico* (docking) es una herramienta muy útil para entender las interacciones que se generan entre una proteína y su ligando, como se explicó en la introducción. En el presente trabajo se llevó a cabo la exploración de los posibles sitios de interacción del heterodímero de α -tubulina- β -tubulina con el (-)-(5S,6R,8S,9S,10R,14R)-6-acetoxivouacapano (**6**) y sus derivados **23-27** haciendo uso del programa AutoDock 4.2.

En el estudio de reconocimiento molecular entre el (-)-(5S,6R,8S,9S,10R,14R)-6-acetoxivouacapano (**6**) y la tubulina se encontró que **6** se une en una región de la α -tubulina y en una región de la β -tubulina, con una frecuencia y energía similares (Figura 21 y Figura 22). En la α -tubulina el vouacapano **6** interacciona con residuos del loop H11-S10 y del loop S7-S8 con una energía de unión de -6.95 kcal/mol, mientras que en la β -tubulina la interacción se da con residuos de la α -helice H7 y del loop M, los cuales forman parte del sitio de unión a paclitaxel (**1**), con una energía de unión de -6.44 kcal/mol, Figura 23.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los compuestos que tienen algún efecto sobre la polimerización de la tubulina lo hacen uniéndose a la subunidad β de la proteína,^{(23), (25), (42)} y considerando también que el efecto *in vitro* de los compuestos **6**, **23-27** sobre la α -tubulina- β -tubulina observado en el presente trabajo fue análogo al efecto producido por el paclitaxel (**1**), se decidió enfocar el resto de los estudios de acoplamiento molecular *in silico* (docking) en la interacción y forma de unión de estos compuestos con la β -tubulina únicamente, aunque no se descarta que en un trabajo futuro se estudie a fondo la interacción en la subunidad α .

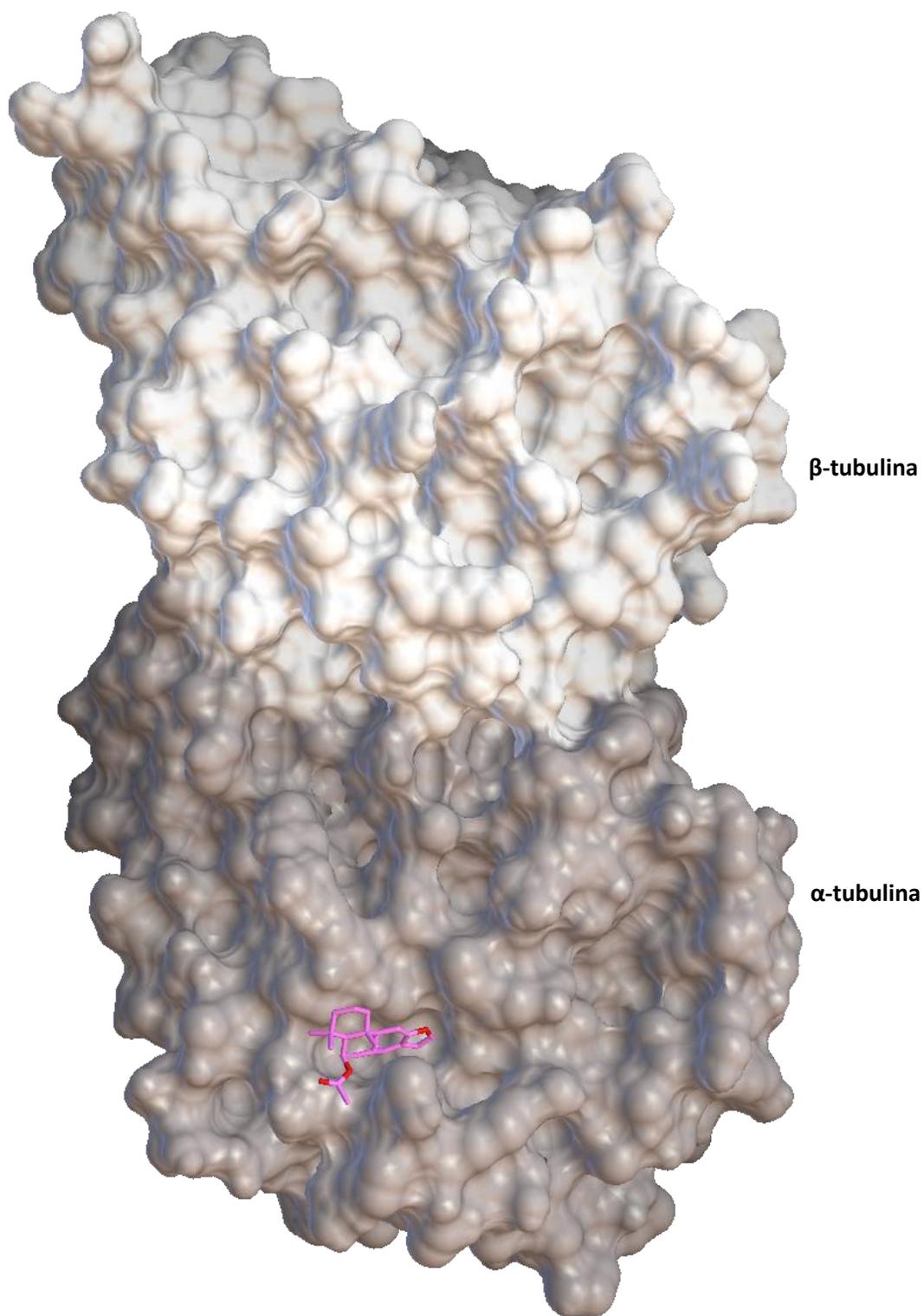


Figura 21. Modo de unión de mayor afinidad del producto natural **6** en la α -tubulina, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -6.95$ kcal/mol.

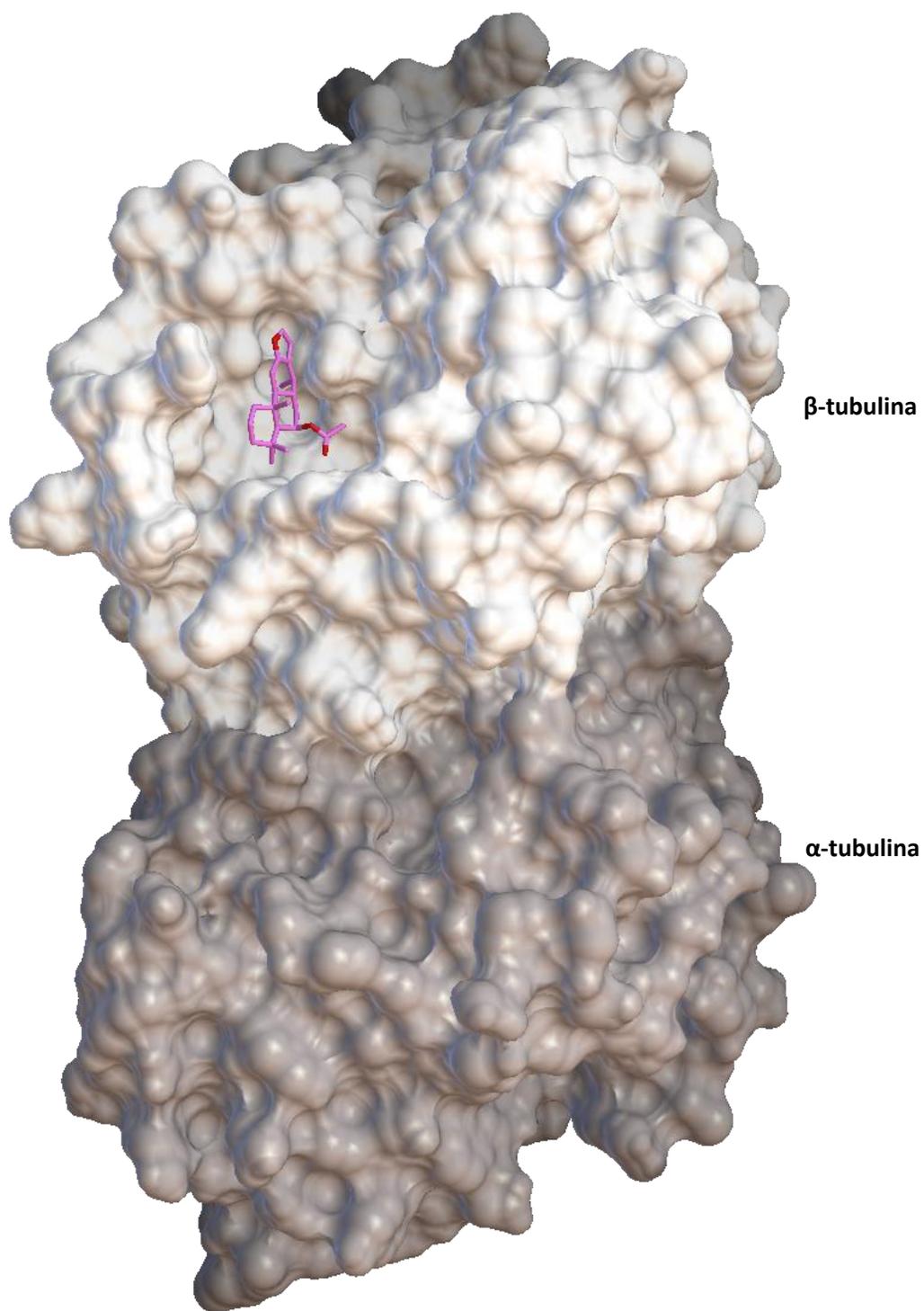


Figura 22. Modo de unión de mayor afinidad del producto natural **6** en la β -tubulina, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -6.44$ kcal/mol.

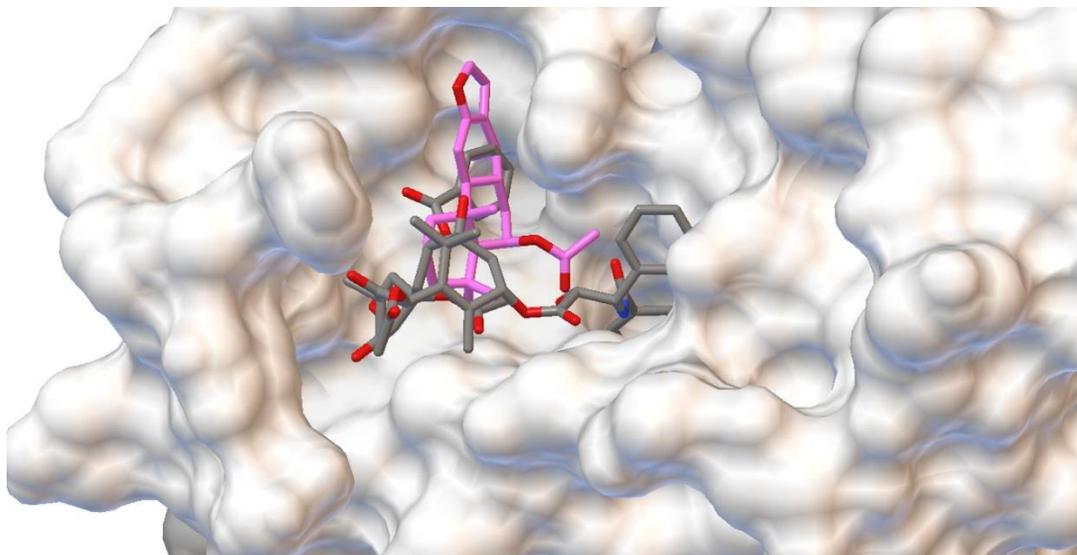


Figura 23. Comparación del modo de unión del producto natural **6** (rosa) con el del paclitaxel (gris) en la β -tubulina.

Una vez que establecimos la posible región de interacción *in silico* de **6** con la β -tubulina se procedió a realizar un *docking* de refinamiento. El modo de unión de mayor afinidad de **6** ($E_{Dock} = -7.43$ kcal/mol) mejoró, energéticamente hablando, con respecto al obtenido en el *docking* ciego ($E_{Dock} = -6.44$ kcal/mol), y observado la Figura 24, nos damos cuenta que la ubicación y orientación de **6** dentro de esta región cambió sustancialmente tras el refinamiento, ubicando al compuesto más cerca del loop M. Los resultados de este *docking* revelaron la formación de un puente de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo del vaouacapano (**6**) y el protón de la amina del enlace peptídico de la Arg284, con una distancia de 2.16 Å. Además, la Arg278 y la Thr276 generan interacciones polares con el oxígeno del furano y el oxígeno del éster de **6**, respectivamente, así como también hay interacción con la Ser277 y Gln282, que son residuos del tipo polar. Adicionalmente se generan interacciones del tipo hidrofóbicas entre los anillos y metilos de **6** con la Leu286, la Leu371 y la Pro274, Figura25.

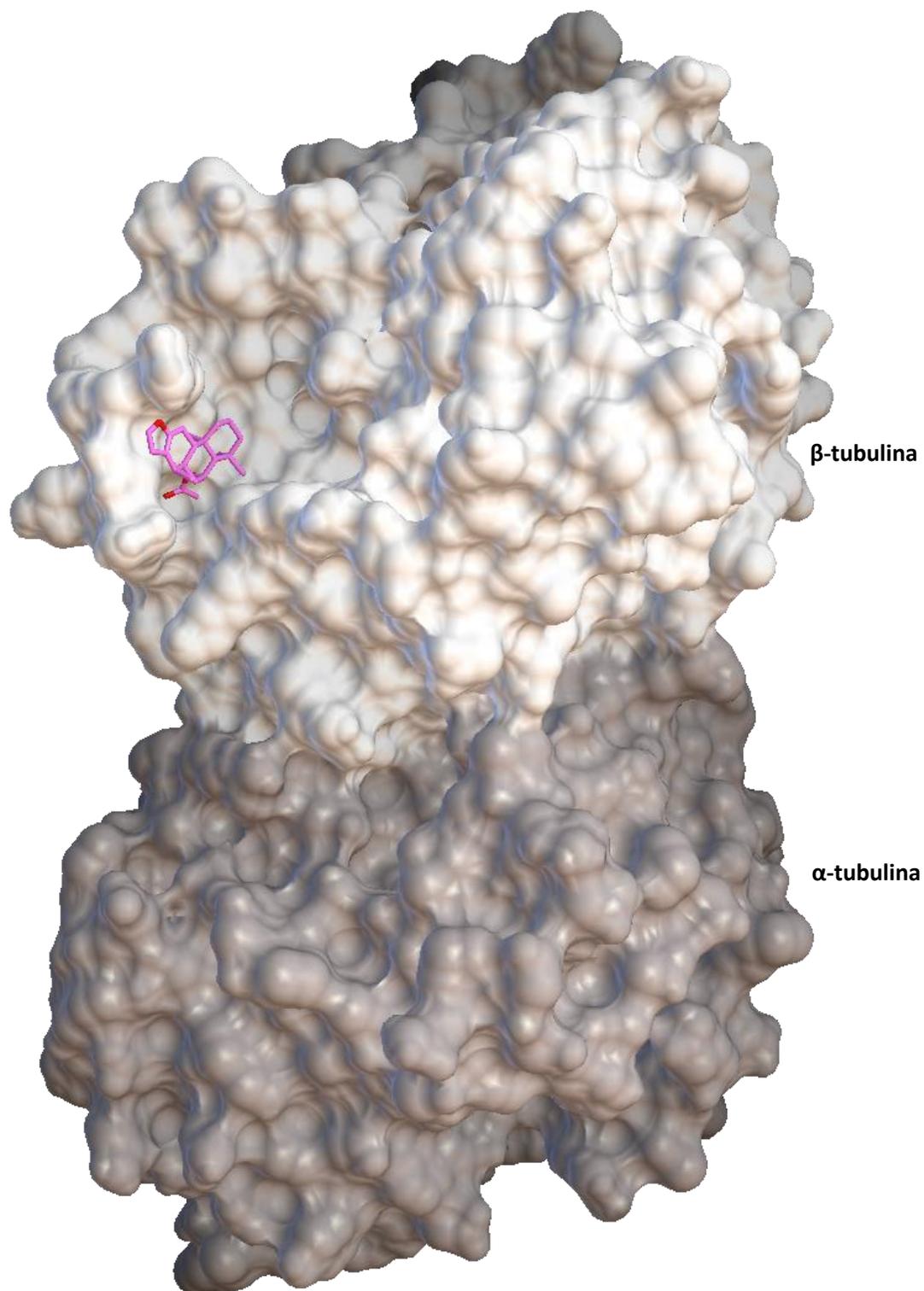


Figura 24. Modo de unión de mayor afinidad del vouacapano **6** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* refinado, $E_{Dock} = -7.43$ kcal/mol.

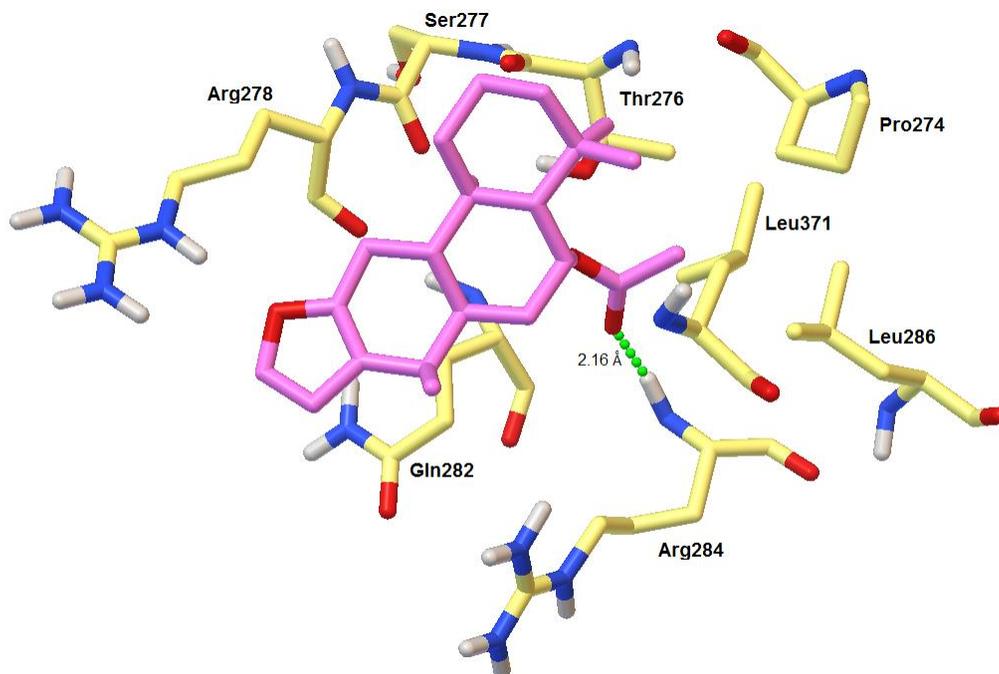


Figura 25. Interacción del vouacapano **6** con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado (estructura hidrocarbonada de los aminoácidos en amarillo, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo y estructura hidrocarbonada del ligando en magenta).

Por su parte, el estudio de acoplamiento molecular entre el (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6-acetoxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**23**) y el heterodímero de α -tubulina- β -tubulina, mostró nuevamente una marcada afinidad de este compuesto por el sitio de interacción con paclitaxel (**1**), alcanzando una $E_{Dock} = -6.54$ kcal/mol que es muy similar a la energía de unión de **6**, Figura 26a. En el modo de unión de **23** obtenido por *docking* ciego ($E_{Dock} = -6.54$ kcal/mol), el anillo de furano del derivado se orienta de una manera similar a la del grupo benzoilo del paclitaxel (Figura 26b).

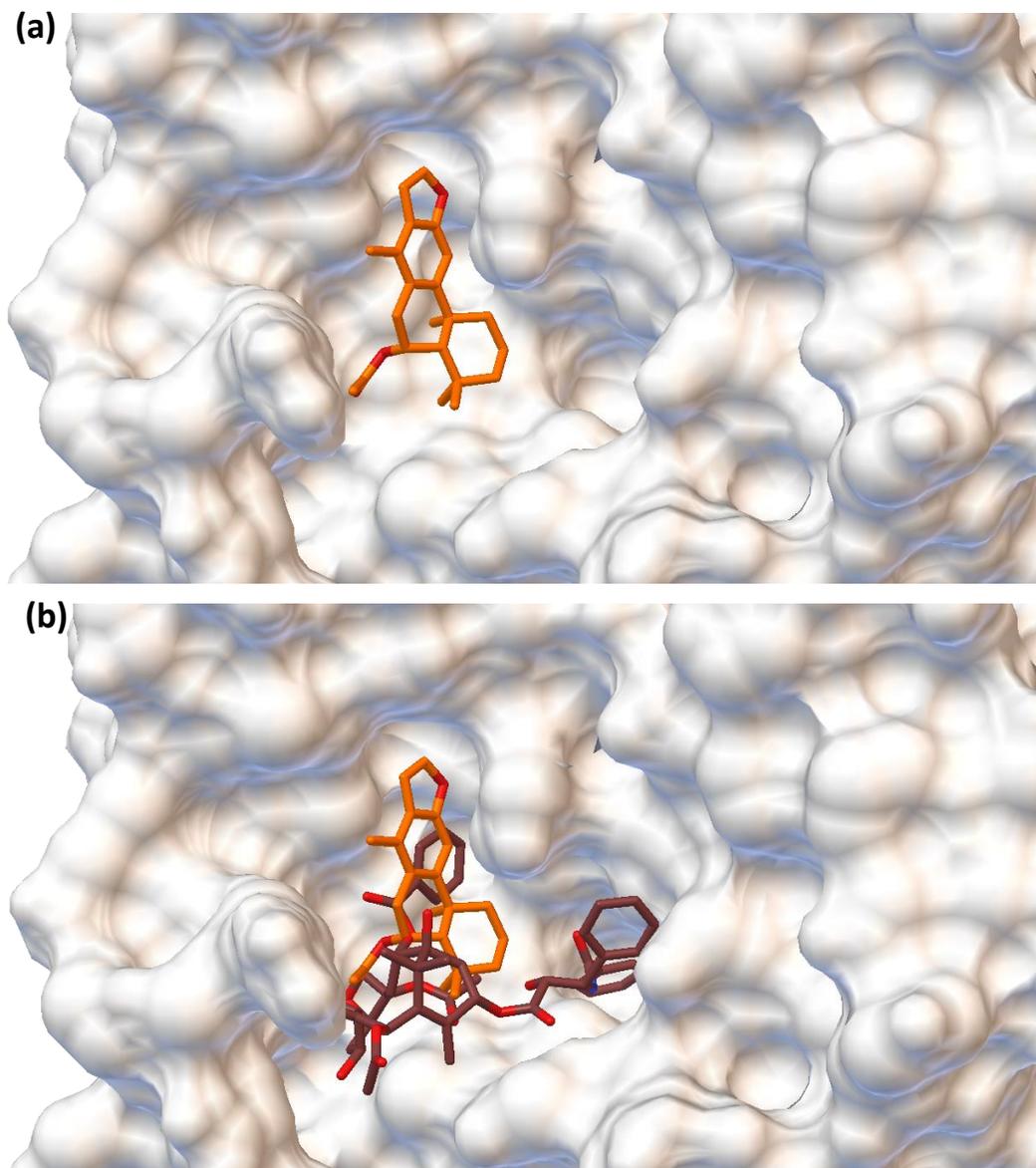


Figura 26. (a) Modo de unión de mayor afinidad de **23** en el sitio activo de paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -6.54$ kcal/mol. (b) Comparación del modo de unión de **23** (naranja) con el del paclitaxel (café).

En el estudio de acoplamiento molecular refinado de **23**, la orientación y región de unión del derivado cambió con respecto a la observada en el *docking* ciego. El modo de unión de mayor afinidad de **23** ($E_{Dock} = -7.28$ kcal/mol) se dio al interactuar con residuos del loop M de la β -tubulina, de una manera muy similar a lo que se observó para el producto natural **6**. Del mismo modo, los residuos de los aminoácidos en la β -tubulina con los que

interacciona **23** (Figura 27) son los mismos a los descritos para **6**, con la diferencia en que debido al cambio geométrico dado por la aromatización del anillo adyacente al furano, el oxígeno de este heterociclo queda a una distancia de 2.157 Å del protón de una de las aminas de la Arg278 permitiendo con esto la formación de un segundo puente de hidrógeno con dicho residuo.

Es importante mencionar que estos resultados están en concordancia con los resultados *in vitro* de la polimerización de la tubulina, ya que el derivado **23** fue el segundo compuesto más potente después del producto natural **6**, lo cual se puede explicar con la disminución de la afinidad de **23** por el sitio activo de paclitaxel en la β -tubulina.

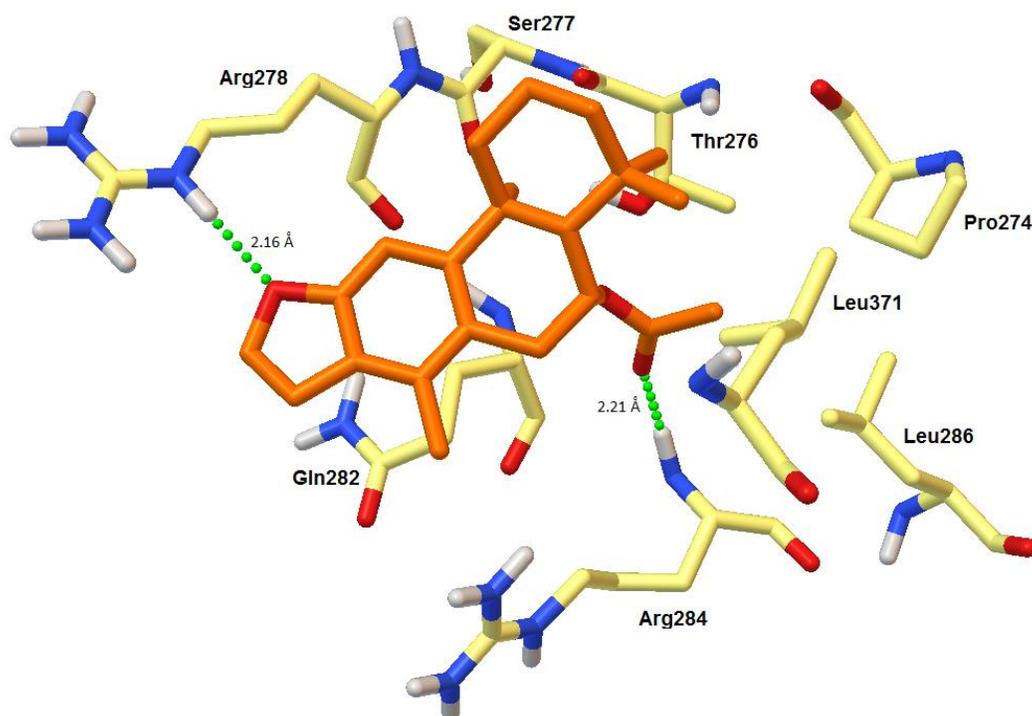


Figura 27. Interacción del derivado **23** con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado (estructura hidrocarbonada de los aminoácidos en amarillo, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo y estructura hidrocarbonada del ligando en naranja).

Por otro lado, el estudio de acoplamiento molecular *in silico* ciego del (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6-hidroxiouacapa-8(14),9(11)-dieno (**24**) con la tubulina, reveló que dicho derivado, al igual

que los compuestos anteriores (**6** y **23**), se une de manera preferente al sitio activo del paclitaxel en la subunidad β de la proteína. Como se observa de la Figura 28a, en la forma de unión de menor energía de **24** ($E_{Dock} = -6.12$ kcal/mol), el derivado se orienta hacia el mismo sitio espacial que ocupa la cadena de (2*R*,3*S*)-*N*-benzoil-3-fenilisoserina del paclitaxel (**1**) cuando éste interacciona con la tubulina. Sin embargo, en los resultados del *docking* de refinamiento, la forma de unión de mayor afinidad del derivado **24** ($E_{Dock} = -6.83$ kcal/mol) se orienta de una manera distinta, acercándose ahora al loop M de la β -tubulina, quedando sobrepuesto al sistema anular del taxol, Figura 28b. De estos mismos resultados se encontró que **24** genera interacciones del tipo polar entre su grupo hidroxilo y el carbonilo del enlace peptídico de la Thr276, además de interaccionar con los residuos polares Gln282 y Arg284. Por otra parte, se dan interacciones con la Phe272, la Pro274, la Leu286 y la Leu371 que son de tipo hidrofóbico, Figura 29.

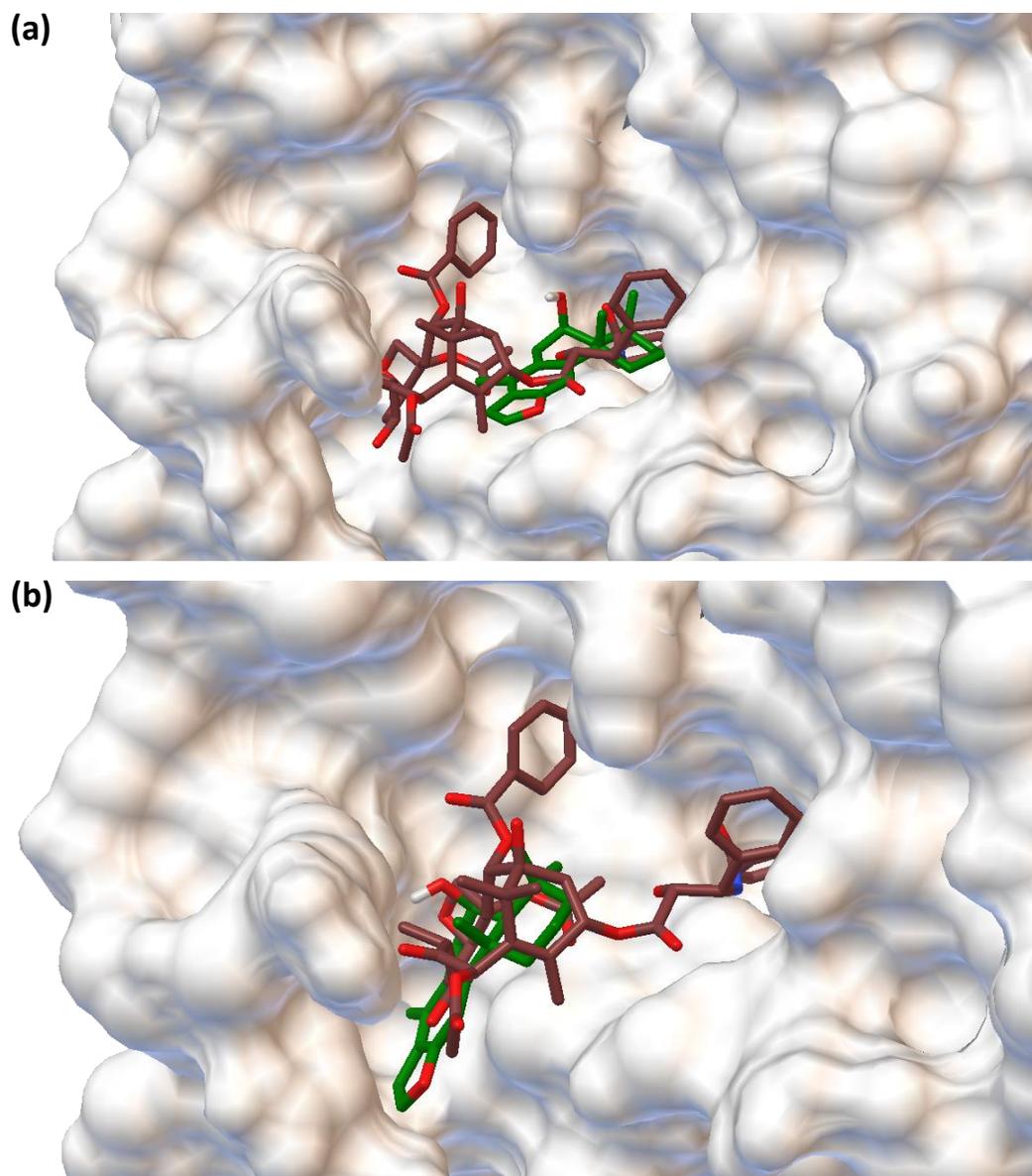


Figura 28. (a) Modo de unión de mayor afinidad del derivado **24** (verde) en el sitio activo de paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -6.12$ kcal/mol, comparado con el del paclitaxel (café). (b) Modo de unión de mayor afinidad del derivado **24** (verde) en el sitio activo de paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado, $E_{Dock} = -6.83$ kcal/mol, comparado con el del paclitaxel (café).

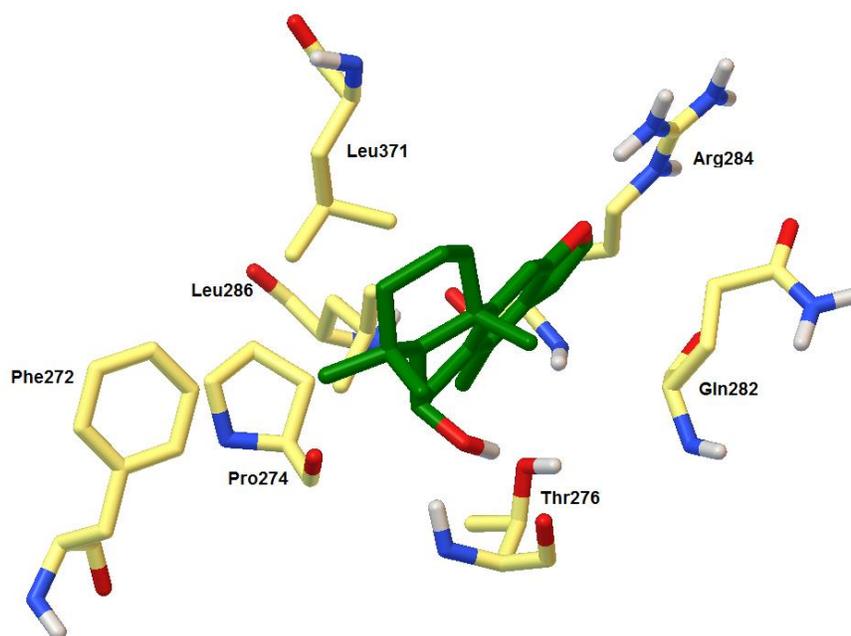


Figura 29. Interacción del derivado **24** con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado (estructura hidrocarbonada de los aminoácidos en amarillo, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo y estructura hidrocarbonada del ligando en verde).

En concordancia con el patrón observado hasta este momento, el *docking* ciego del (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-cloroacetoxi]vovucapa-8(14),9(11)-dieno (**25**) reveló que este derivado se une también de manera preferente en la región de la tubulina correspondiente al sitio activo del paclitaxel (**1**) con una $E_{Dock} = -6.53$ kcal/mol, como se aprecia en la Figura 30. Al refinar el estudio se encontró que la forma de unión de mayor afinidad de **25** ($E_{Dock} = -7.44$ kcal/mol) en la β -tubulina cambia con respecto al estudio ciego, ya que el derivado **25** se ubicó ahora más cercano al loop M de la proteína (Figura 31a). El *docking* refinado mostró también el tipo de interacciones que se generan entre el derivado (**25**) y los residuos de la proteína, encontrándose dos puentes de hidrógeno, uno de ellos entre la Arg278 y el oxígeno del furano, y el otro entre la Arg284 y el carbonilo del cloroacetilo. Además, se encontraron interacciones hidrofóbicas entre los metilos y los anillos de **25** con la Leu286, la Leu371, la Thr276, la Ser277 y la Gln282, Figura 31b.

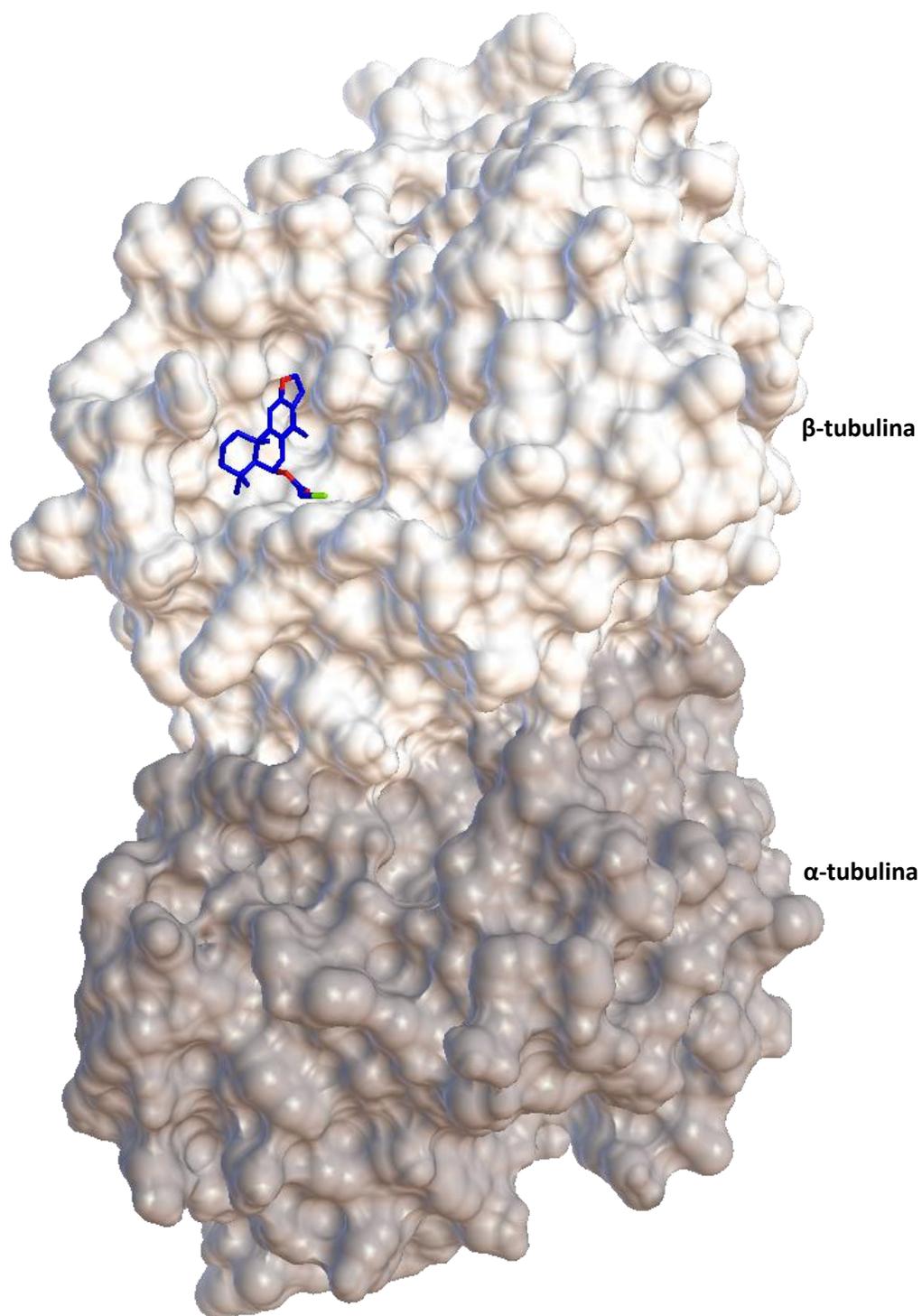


Figura 30. Modo de unión de mayor afinidad del derivado **25** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -6.53$ kcal/mol.

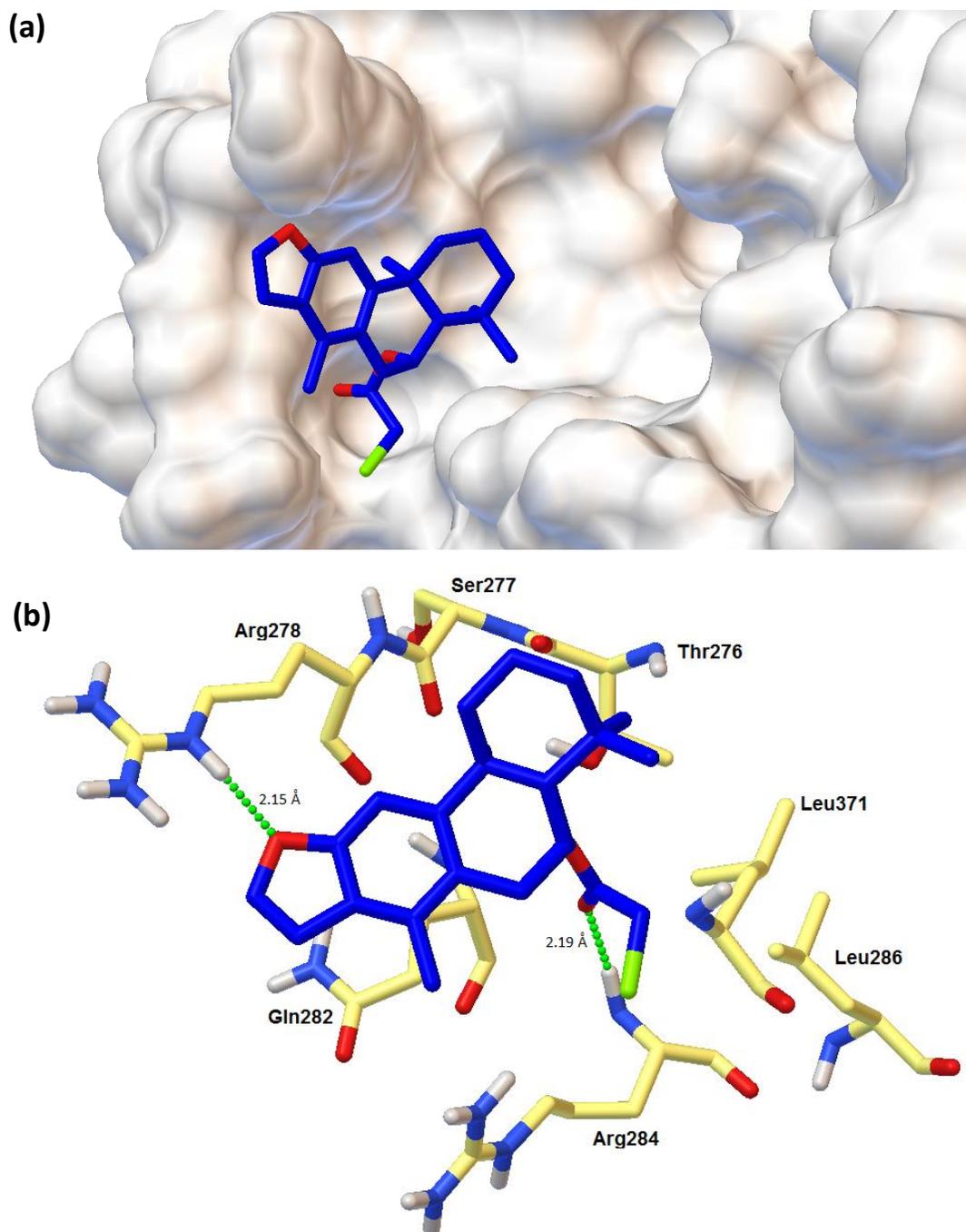


Figura 31. (a) Modo de unión de mayor afinidad del derivado **25** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* refinado, $E_{Dock} = -7.44$ kcal/mol. (b) Interacción del derivado **25** con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado (estructura hidrocarbonada de los aminoácidos en amarillo, cloro en verde, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo y estructura hidrocarbonada del ligando en azul).

Al igual que los compuestos anteriores (**6**, **23**, **24** y **25**), el estudio *in silico* de acoplamiento molecular del (–)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6[2'-azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**26**) demostró que la unión de dicho derivado con la α -tubulina– β -tubulina se lleva a cabo preferentemente en la región de la subunidad β correspondiente al sitio activo de paclitaxel (**1**). En el modo de unión de mayor afinidad de **26** ($E_{Dock} = -6.61$ kcal/mol) en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* ciego, la cadena de [2'-azidocetoxi] se orienta hacia el loop M de la proteína y los anillos de la molécula hacia las α -hélices H6 y H7, Figura 32.

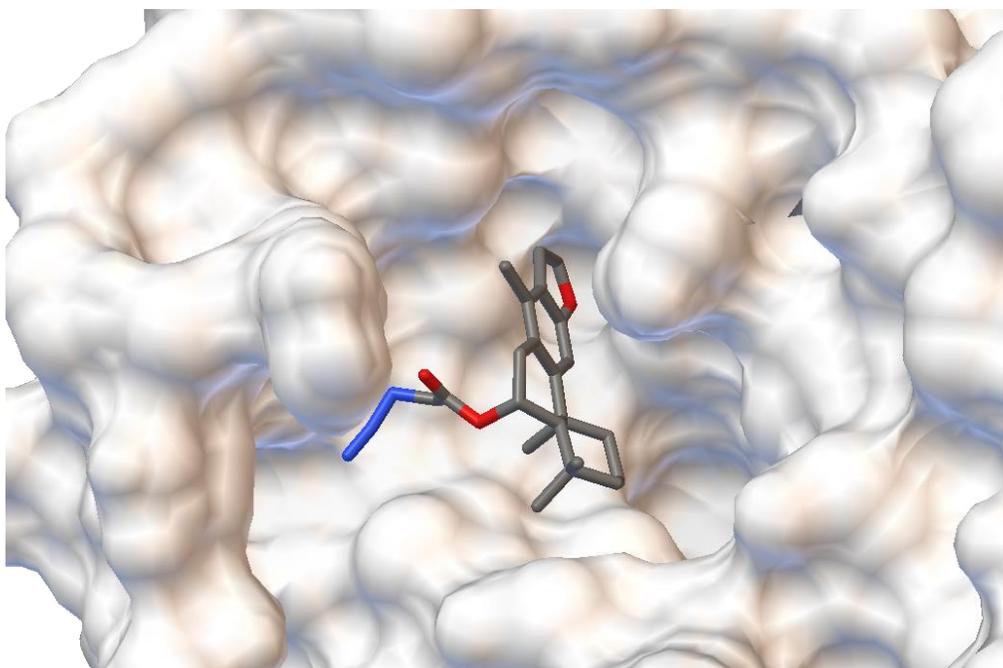


Figura 32. Modo de unión de mayor afinidad del derivado **26** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -6.61$ kcal/mol.

Por su parte, los resultados del *docking* de refinamiento ubican al derivado **26**, en su modo de unión de mayor afinidad ($E_{Dock} = -8.67$ kcal/mol), orientado de forma algo distinta a la observada en el estudio ciego, siendo que ahora tanto los anillos como la cadena [2'-azidocetoxi] se ubican más cercanos al loop M de la proteína, Figura 33. Los residuos de aminoácidos con los que interacciona **26** se observan en la Figura 34. El grupo azido del derivado genera interacciones del tipo polar con la Tyr283 y la Ala285 además de

un puente de hidrógeno con el primer nitrógeno (N1) y un protón de la Arg284. El oxígeno del furano interacciona con la Arg278 generando un segundo puente de hidrógeno, mientras que la estructura hidrocarbonada de **26** interacciona con la Thr276, la Ser277, la Gln282 y la Leu 371.

Es importante mencionar que en base a lo reportado por Techertanov (1999) ⁽⁴³⁾ en cuanto a que las azidas covalentes generan puentes de hidrógeno débiles y únicamente lo hacen a través del nitrógeno terminal (N3), los resultados de *docking* para este derivado se toman con cautela, ya que existe la posibilidad de que el modelo computacional del grupo azido no represente de la mejor manera su comportamiento real.

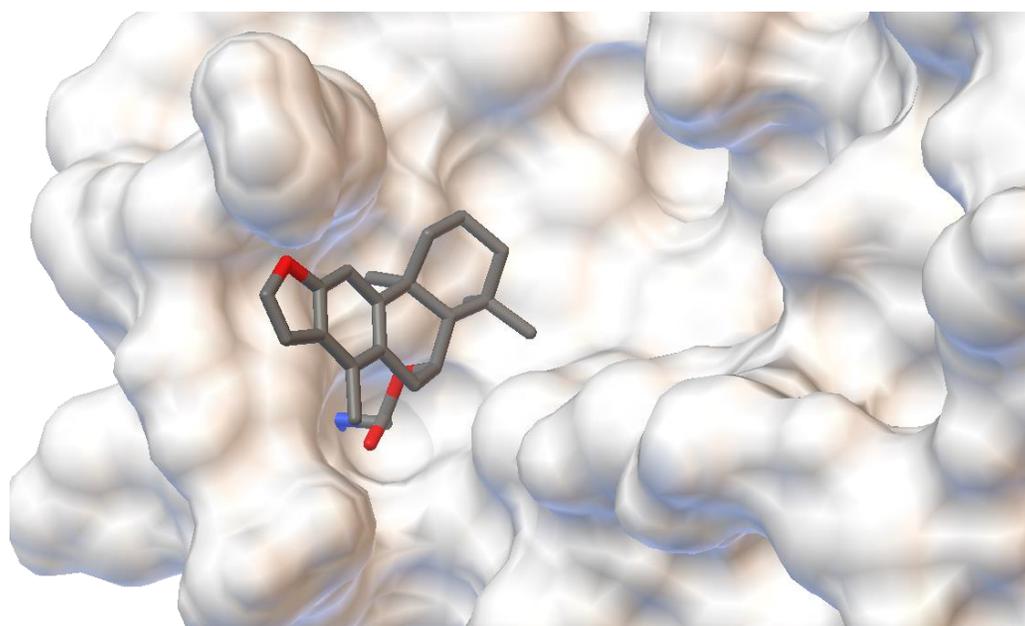


Figura 33. Modo de unión de mayor afinidad del derivado **26** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* refinado, $E_{Dock} = -8.67$ kcal/mol.

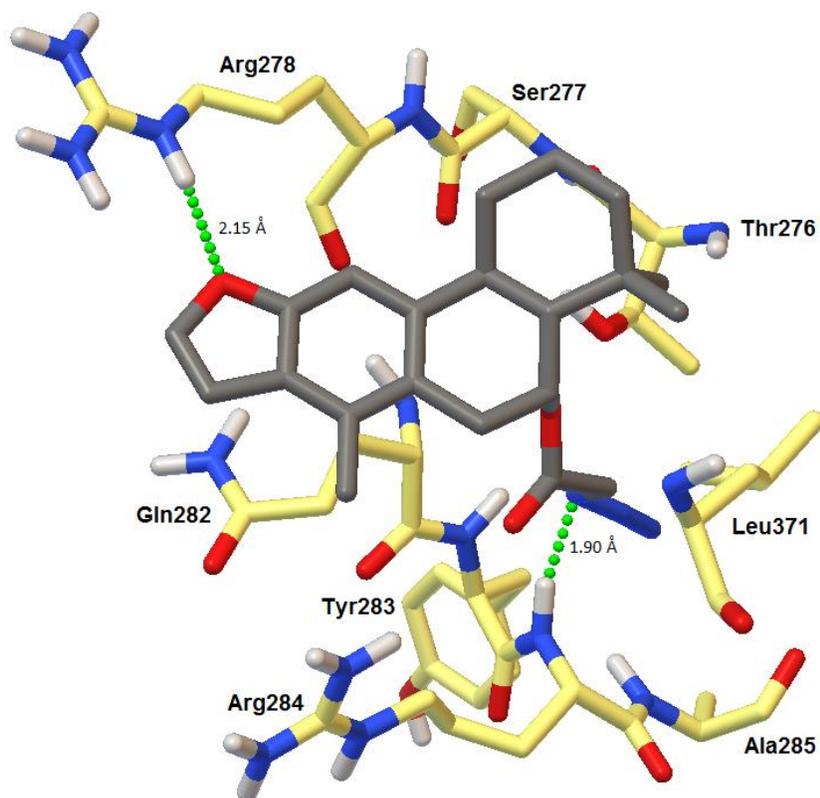


Figura 34. Interacción del derivado **26** con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado (estructura hidrocarbonada de los aminoácidos en amarillo, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo y estructura hidrocarbonada del ligando en gris).

Por último, el *docking* ciego entre el glicinato de (-)-(5*S*,6*R*,10*R*)-vouacapa-8(14),9(11)-dien-6-ilo (**27**) y el heterodímero de α -tubulina- β -tubulina reveló que dicho compuesto también se une al sitio activo de paclitaxel (Figura 35a). En el modo de unión de mayor afinidad de **27** ($E_{Dock} = -7.27$ kcal/mol), éste se ubica cercano a las α -hélices H6 y H7 de la proteína, ocupando el sitio espacial en el que se posiciona la cadena de (2*R*,3*S*)-*N*-benzoil-3-fenilisoserina del paclitaxel (**1**) cuando éste último interacciona con la tubulina, Figura 35b.

Cabe resaltar que la frecuencia con la que apareció el derivado **27** en el sitio activo de paclitaxel fue considerablemente menor a las frecuencias observadas para los derivados anteriores (**6**, **23-26**). Esto sugiere que debido a la presencia de un grupo amino en la molécula, la polaridad de **27** aumenta considerablemente permitiendo un número más

amplio de interacciones polares e incluso la formación de puentes de hidrógeno que promueven la unión del compuesto con más regiones de la tubulina.

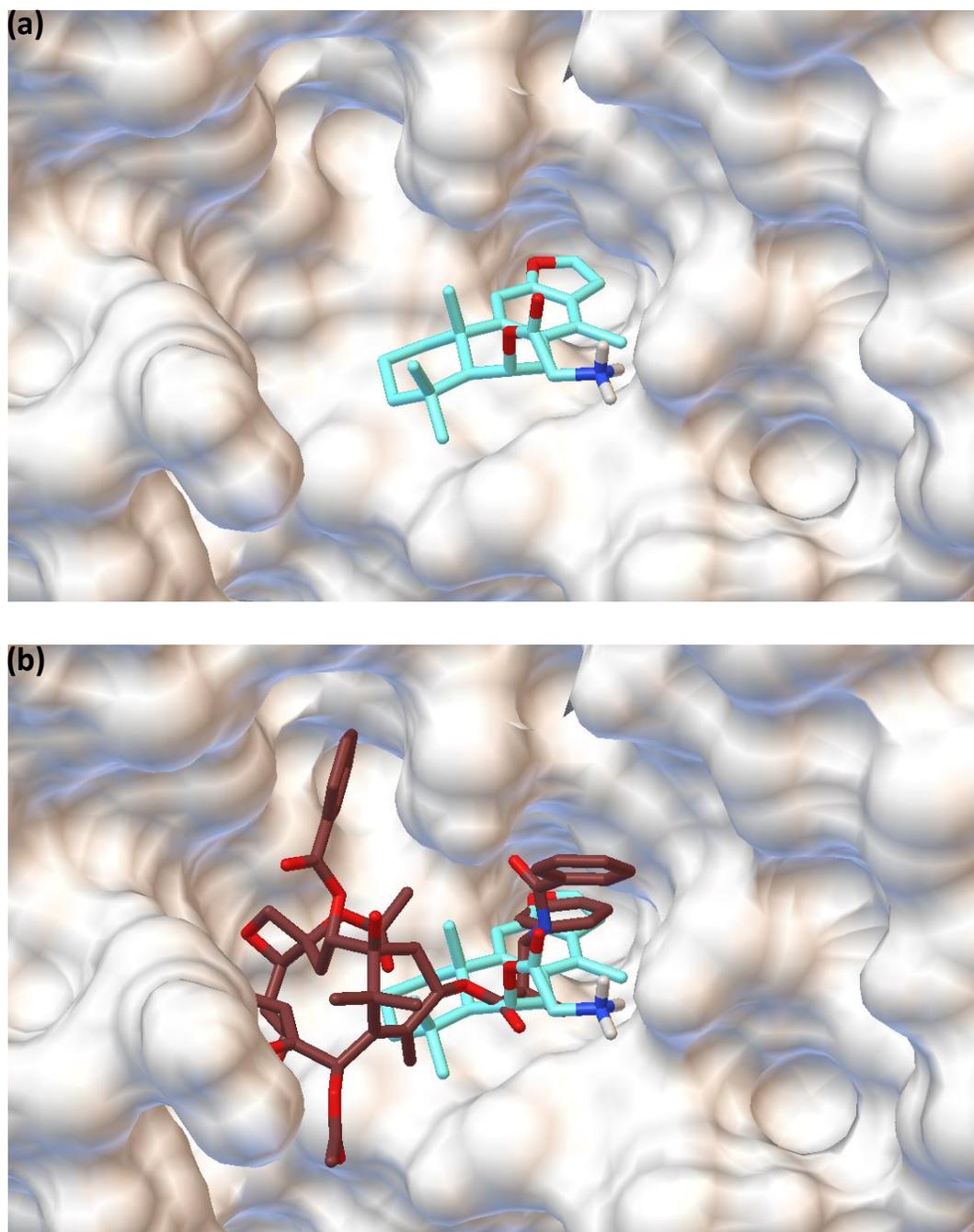


Figura 35. (a) Modo de unión de mayor afinidad del derivado **27** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* ciego, $E_{Dock} = -7.27$ kcal/mol. (b) Comparación del modo de unión de **27** (azul) con el del paclitaxel (café).

En el estudio de acoplamiento molecular *in silico* refinado de **27**, la ubicación del compuesto (**27**) en su modo de unión de mayor afinidad es similar a la obtenida en el estudio ciego, sin embargo, la orientación de la molécula es diferente, así como su energía de unión ($E_{Dock} = -8.64$ kcal/mol), Figura 36. En este mismo estudio se encontró que el carbonilo de **27** interacciona con el hidrógeno del enlace peptídico de la Gly370 a una distancia de 2.01 Å, dando lugar a la formación de un puente de hidrógeno. Además, la amina de **27** genera interacciones del tipo polar con los oxígenos del Asp26, mientras que el oxígeno del furano interacciona con el Glu22 y la His229. El resto de las interacciones son de tipo hidrofóbico y se dan con la Val23, la Ala233, la Pro360 y la Arg369, Figura 37.

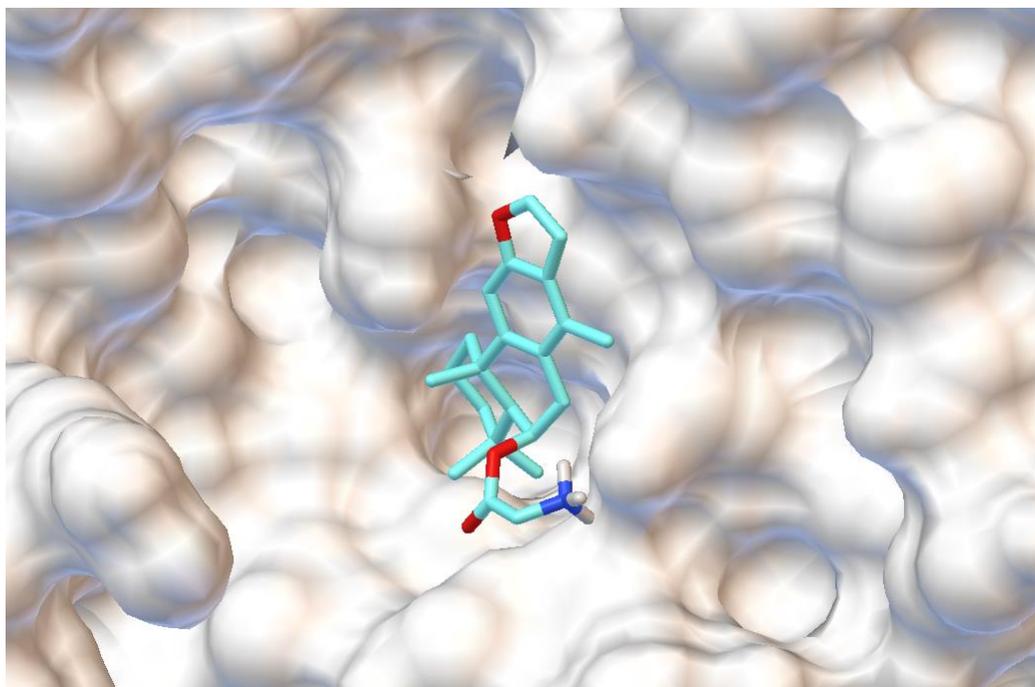


Figura 36. Modo de unión de mayor afinidad del derivado **27** en el sitio activo del paclitaxel, obtenido por *docking* refinado, $E_{Dock} = -8.64$ kcal/mol.

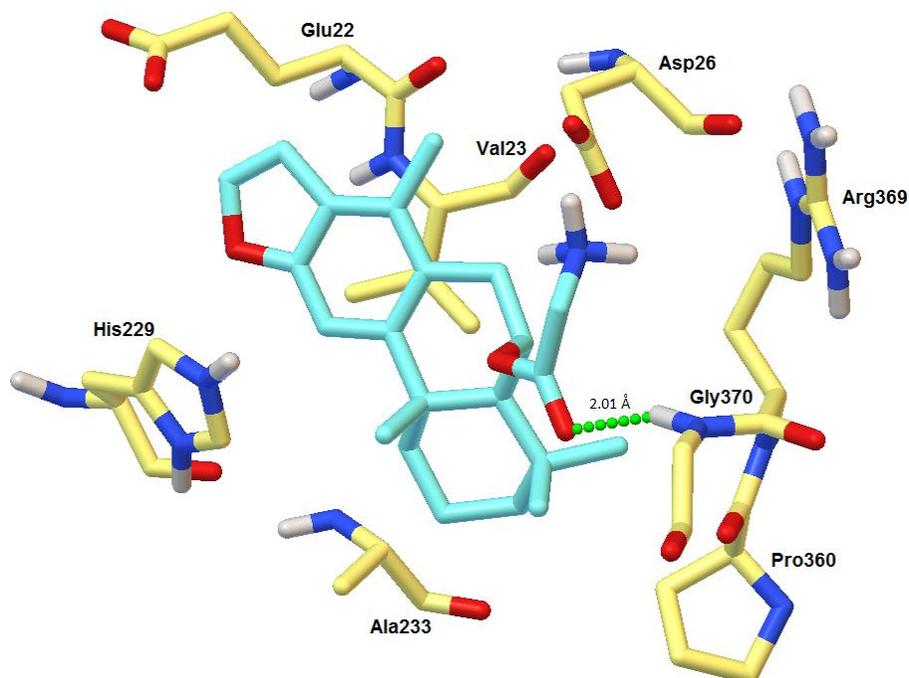


Figura 37. Interacción del derivado **27** con los residuos de aminoácidos en el sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina, obtenido por *docking* refinado (estructura hidrocarbonada de los aminoácidos en amarillo, hidrógenos en blanco, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo y estructura hidrocarbonada del ligando en azul claro).

Los modos de unión de mayor afinidad de **6**, **23**, **25** y **26** presentaron una orientación equivalente dentro del sitio activo del paclitaxel, Figura 38. La estructura policíclica de estos compuestos ocupó prácticamente el mismo espacio e incluso su orientación fue casi idéntica, a no ser por los cambios en la estructura de la cadena de C-6. El modo de unión de mayor afinidad del derivado **24** presentó una orientación diferente a la de los compuestos anteriormente mencionados (**6**, **23**, **25** y **26**), a pesar de ubicarse en una región espacial parecida. El derivado **27** en su modo de unión de mayor afinidad presentó una ubicación y orientación, en el mismo sitio activo del paclitaxel, algo diferente a la de los otros derivados (Figura 38).

En función de estos resultados y los datos obtenidos del ensayo *in vitro* de polimerización de la tubulina, se sugiere que el producto natural **6** y los derivados sintetizados **23-27** interaccionan de forma dinámica con la proteína en el sitio activo del paclitaxel ejerciendo así un efecto estabilizador de los microtúbulos moderado.

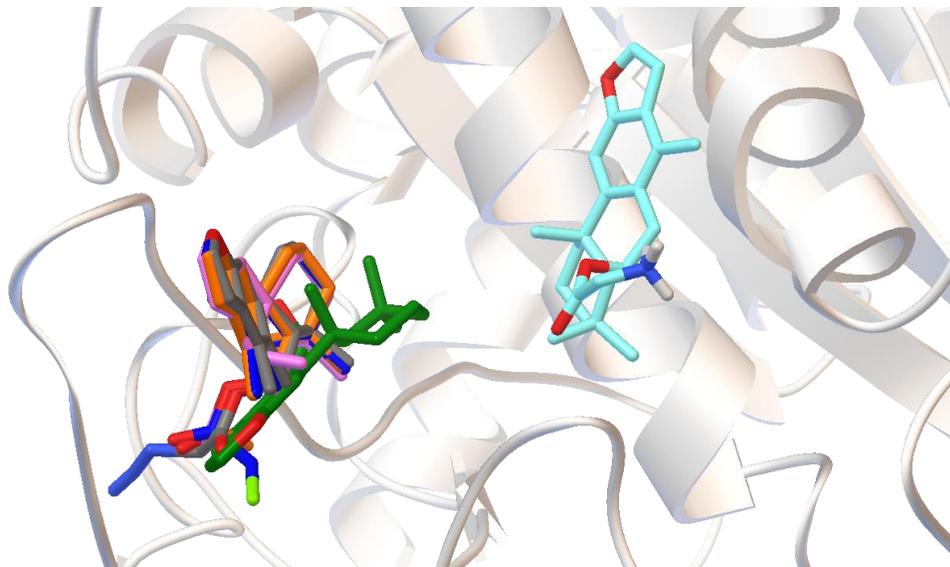


Figura 38. Comparación de los modos de unión de mayor afinidad de los *docking* refinados del vouacapano **6** (rosa) y los derivados **23** (naranja), **24** (verde), **25** (azul oscuro), **26** (gris) y **27** (azul claro) dentro del sitio activo del paclitaxel en la β -tubulina.

El mecanismo de acción a través del cual el paclitaxel estabiliza los microtúbulos aún no está bien establecido. Una de las teorías más aceptadas es que el paclitaxel estabiliza las interacciones laterales entre los protofilamentos de tubulina, siendo el loop M la región de la β -tubulina principalmente involucrada en este tipo de contactos ^{(23), (25)}. Por estas razones, el hecho de que los estudios de *docking* revelaran que los derivados del vouacapano tienen afinidad por los residuos del loop M de la tubulina, sugiere que la actividad estabilizadora de dichos compuestos se puede estar generando por un mecanismo similar al del paclitaxel, lo que explicaría hasta cierto punto el efecto análogo.

Finalmente, debido a las diferencias estructurales entre el paclitaxel y los derivados de vouacapano estudiados en este trabajo, el número, magnitud y tipo de interacciones que se generan con los residuos de aminoácidos del sitio activo de paclitaxel en la β -tubulina varían, lo que se puede traducir en cambios sobre el efecto estabilizador de los microtúbulos como se observó de los resultados del ensayo *in vitro* de polimerización de la tubulina.

6. CONCLUSIONES

Las transformaciones químicas llevadas a cabo sobre el anillo fusionado al furano y la cadena del grupo acetilo del (–)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano (**6**) llevaron a la formación de nuevos derivados, cuya estructura química se asignó con base en estudios de RMN de una y dos dimensiones, espectrometría de masas y difracción por rayos X.

A través de la evaluación *in vitro* de la estabilidad de los microtúbulos de α -tubulina- β -tubulina en presencia del vouacapano (**6**) y los nuevos derivados sintetizados (**23-27**), se encontró que dichos compuestos poseen una importante actividad estabilizadora, además de promover la polimerización de la tubulina, siendo el producto natural **6** y el derivado **23** los más potentes.

Mediante los estudios de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*), se generaron modelos teóricos para explicar que dicha actividad estabilizadora posiblemente se genera a través de un mecanismo similar al del paclitaxel, ya que los compuestos estudiados presentaron afinidad por el mismo sitio de unión en la β -tubulina.

Los compuestos que resultaron con mejor efecto estabilizador de los microtúbulos presentan en su estructura un grupo acetilo en el oxígeno de C-6. La estructura de furanditerpeno que se conservó en todos los compuestos evaluados parece desempeñar un papel importante en el efecto estabilizador, ya que todos los compuestos tuvieron actividad. Los derivados con el menor efecto estabilizador fueron los dos compuestos más polares, por lo que esta propiedad fisicoquímica parece influir directamente en dicho efecto.

Con los resultados obtenidos se concluye que el vouacapano **6** y los derivados sintetizados (**23-27**) son fuertes candidatos para la realización de síntesis dirigida con la finalidad de mejorar su efecto estabilizador de los microtúbulos. Adicionalmente, se considera que dichos compuestos pueden ser sometidos a pruebas de actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer y de obtenerse buenos resultados, se tendrían compuestos con potencial efecto anticancerígeno, análogo al del paclitaxel, pero con una solubilidad

mejorada que disminuya los efectos adversos que se presentan a causa de la alta lipofilidad del taxol.

7. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo estudios que permitan confirmar experimentalmente el sitio de unión de los compuestos utilizados en el presente trabajo (**6**, **23-27**) sobre el heterodímero de α -tubulina- β -tubulina.
- Realizar experimentos del vouacapano **6** y los derivados sintetizados (**23-27**) sobre line celulares de cáncer, para evaluar su efecto antiproliferativo, así como determinar la dosis letal media (LD₅₀) de dichos compuestos en roedores.
- Continuar con la preparación de nuevos derivados del vouacapano (**6**) para profundizar en la búsqueda de compuestos con mejor actividad estabilizadora de los microtúbulos, y realizar junto con esto estudios de relación estructura actividad.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Purificación de compuestos

8.1.1. Cromatografía en columna abierta

Se emplearon columnas de vidrio empacadas con gel de sílice neutro malla 230-400. La fase móvil se eluyó a presión atmosférica o con presión de aire y se utilizó, para cada compuesto, la mezcla de disolventes adecuada para una correcta elución, esto en base a las características de los mismos (en la sección de espectroscopía y espectrometría de derivados del vouacapano se describen las composiciones de los eluyentes utilizados en cada caso).

8.1.2. Cromatografía en capa fina

Se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice soportadas en aluminio Merck 60 F₂₅₄. La detección de compuestos en la placa se realizó con luz UV de onda corta (245 nm) o de onda larga (365 nm), así como con sulfato cérico amoniacal como agente revelador, el cual se preparó con 12 g de sulfato cérico amoniacal, 22.5 mL de ácido sulfúrico y 350 g de hielo.

8.1.3. Determinación del punto de fusión

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

8.2. Espectroscopía y espectrometría

8.2.1. Rotación específica

Se determinó la rotación específica de cada derivado a cinco longitudes de onda (589, 578, 546, 436 y 365 nm) en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341, utilizando cloroformo como disolvente.

8.2.2. Espectroscopía ultravioleta (UV)

Se realizó un barrido de 500-190 nm para cada uno de los compuestos disueltos en etanol grado espectro, utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS lambda 12.

8.2.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Se obtuvieron los espectros utilizando un espectrofotómetro marca BUCK Scientific 500 y CHCl_3 como disolvente. Se describen únicamente las lecturas de las bandas más importantes.

8.2.4. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y de ^{13}C se obtuvieron a 300 y 75.4 MHz respectivamente en CDCl_3 y utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Esto, junto con los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC, se llevó a cabo en un espectrómetro Varian Mercury 300. La multiplicidad de las señales se expresó de acuerdo a las abreviaturas siguientes: s (simple), d (doble), t (triple), q (cuádruple), m (múltiple) y a (ancha).

8.2.5. Espectrometría de masas (EM)

Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un equipo Varian Saturn 2000 de trampa iónica por ionización química con acetonitrilo (IQ). Los espectros de masas con ionización por electro-spray (EMIES) se determinaron con un espectrómetro Absciex modelo 3200 QTRAP por infusión directa.

8.3. Difracción de rayos X

El análisis por difracción de rayos X del compuesto **24**, se llevó a cabo en un difractómetro Agilent Xcalibur Atlas Gemini a 298 K utilizando radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$). Los datos obtenidos se procesaron y resolvieron con el programa SHELXS-97.

8.4. Modelado molecular de los derivados del vouacapano

Los modelos moleculares de los derivados del vouacapano se obtuvieron utilizando el programa Spartan'04 para Windows, en donde se les aplicó el protocolo Monte Carlo con el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF para encontrar las estructuras de mínima energía de cada derivado del vouacapano. Los confórmeros de mínima energía se optimizaron en el programa Gaussian 03W mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con el nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP. Los cálculos requirieron de un tiempo aproximado de 170 h por todos los derivados.

8.5. Colecta de *Caesalpinia platyloba*

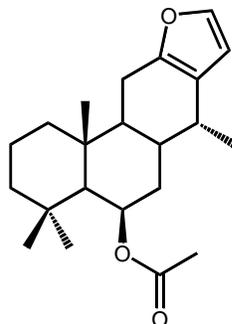
Los especímenes de *C. platyloba* S. Watson se colectaron en Los Charcos en el municipio de Buenavista del estado de Michoacán, México, en el mes de Septiembre del 2009 y fueron identificados por el Prof. Xavier Madrigal en la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo donde se conserva un espécimen con el número de voucher 2401.⁽¹²⁾

8.6. Obtención del (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-acetoxivouacapano

Se maceraron 90 g de *C. platyloba* con *n*-hexano (1 L x 3) a temperatura ambiente por 3 días y se repitió el procedimiento con CH₂Cl₂ (1 L x 3). La maceración se filtró y concentró en rotavapor para obtener 8.9 g de extracto (aceite verde), de los cuales se tomó una porción (4.2 g) para efectuar una cromatografía en columna con gel de sílice, eluyendo con una mezcla de hexano-CH₂Cl₂. El vouacapano puro (190 mg) se obtuvo de las fracciones 40-50 con hexano-CH₂Cl₂ 99:1 a 19:1.⁽¹²⁾

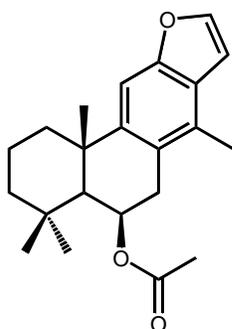
8.7. Espectrometría y espectroscopía de derivados del vouacapano

8.7.1. (-)-(5*S*,6*R*,8*S*,9*S*,10*R*,14*R*)-6-Acetoxivouacapano (**6**)



Cristales incoloros; $[\alpha]_D^{25}$ -18.3 (*c* 3.8, CHCl₃); UV $\lambda(\text{EtOH})_{\text{max}}$ (log ϵ) nm: 211 (3.86), 252 (3.29); IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 1724, 1631, 1250, 861; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (1H, dt, *J* = 1.9, 0.9 Hz, H-16), 6.19 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-15), 5.51 (1H, td, *J* = 3.1, 1.9 Hz, H-6), 2.60 (1H, dd, *J* = 16.9, 7.1 Hz, H-11 α), 2.59 (1H, m, H-14), 2.48 (1H, dd, *J* = 16.9, 10.0 Hz, H-11 β), 2.03 (1H, m, H-8), 2.03 (3H, s, AcO), 1.85 (1H, dt, *J* = 14.3, 3.5 Hz, H-7 β), 1.73 (1H, da, *J* = 12.7 Hz, H-1 β), 1.63 (1H, dt, *J* = 13.6, 3.2 Hz, H-2 α), 1.54 (1H, m, H-9), 1.53 (1H, m, H-7 α), 1.48 (1H, m, H-2 β), 1.41 (1H, da, *J* = 13.1 Hz, H-3 β), 1.21 (3H, s, H-20), 1.19 (1H, m, H-3 α), 1.09 (1H, s, H-5), 1.05 (1H, m, H-1 α), 1.03 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, s, H-18), 0.96 (3H, d, *J* = 7 Hz, H-17); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170.6 (C-21), 149.5 (C-12), 140.3 (C-16), 122.0 (C-13), 109.4 (C-15), 69.6 (C-6), 55.3 (C-5), 45.6 (C-9), 43.6 (C-3), 42.2 (C-1), 37.9 (C-10), 36.3 (C-7), 33.8 (C-4), 33.6 (C-18), 31.0 (C-8), 31.0 (C-14), 21.7 (C-11), 21.7 (C-22), 18.7 (C-2), 17.5 (C-17), 17.1 (C-20).

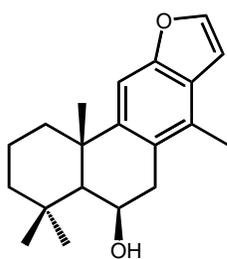
8.7.2. (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6-Acetoxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**23**)



A una solución de **6** (57 mg) en diclorometano (5 mL) se le agregaron 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, dejando agitar durante un minuto, para posteriormente agregar una suspensión de 95 mg de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona en 5 mL de diclorometano. La mezcla de reacción se dejó en agitación y a temperatura ambiente durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se lavó con agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua nuevamente, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se cromatografió en gel de sílice malla 230-400, empleando hexano-acetato de etilo 98:2 como eluyente para dar el (-)-(5*S*,6*R*,10*S*)-6-acetoxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**23**) (51.7 mg, 91%) puro. Aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25}$ -45.0

(c 0.02, MeOH); UV $\lambda(\text{MeOH})_{\text{max}}$ nm: 212, 266, 282, 294; IR ν_{max} cm^{-1} : 3436, 2929, 1729, 1624, 1458, 1134, 1033, 756; RMN de ^1H (300 MHz, cdcl_3) δ 7.53 (1H, s, $J = 2.3$ Hz, H-16), 7.40 (1H, s, H-11), 6.73 (1H, dd, $J = 2.3, 1.0$ Hz, H-15), 5.85 (1H, dt, $J = 5.2, 1.6$ Hz, H-6), 3.07 (1H, dd, $J = 18.4, 5.2$ Hz, H-7), 2.98 (1H, d, $J = 17.2$ Hz, H-7), 2.34 (3H, s, $J = 12.6$ Hz, H-17), 2.30 (1H, sa, H-1 β), 2.02 (3H, s, $J = 10.5$ Hz, H-22), 1.87 (1H, tt, $J = 13.8, 3.3$ Hz, H-2 β), 1.70 – 1.63 (1H, m, H-2 α), 1.62 (3H, s, H-20), 1.56 (1H, sa, $J = 9.9$ Hz, H-5), 1.49 (1H, da, $J = 13.3$ Hz, H-1 α), 1.31 – 1.19 (2H, m, H-3), 1.10 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, s, H-18); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.0 (C-21), 154.7 (C-12), 147.0 (C-9), 145.2 (C-16), 129.1 (C-14), 126.3 (C-13), 124.4 (C-8), 105.8 (C-11), 105.5 (C-15), 68.1 (C-6), 51.9 (C-5), 43.3 (C-3), 43.3 (C-1), 38.7 (C-10), 35.3 (C-7), 34.3 (C-4), 33.7 (C-18), 27.6 (C-20), 23.3 (C-19), 21.9 (C-22), 19.8 (C-2), 16.1 (C-17).

8.7.3. (-)-(5S,6R,10S)-6-Hidroxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**24**)

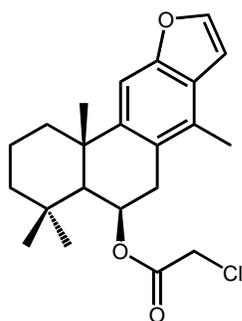


A una suspensión de hidruro de litio y aluminio (103 mg) en tetrahidrofurano anhidro (3 mL) se le agregó, bajo agitación, una solución de **23** (93.5 mg) en tetrahidrofurano anhidro (2 mL). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación durante 2 h a temperatura ambiente, conservándose las condiciones anhidras. Transcurrido este

tiempo, la reacción se neutralizó con una solución de ácido clorhídrico al 10% gota a gota. La mezcla neutralizada se extrajo con acetato de etilo, posteriormente se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad obteniéndose puro el (-)-(5S,6R,10S)-6-hidroxivouacapa-8(14),9(11)-dieno (**24**) (67 mg, 82%). Sólido cristalino blanco con p.f. 138-139 °C, $[\alpha]_{589} +36^\circ$, $[\alpha]_{578} +38^\circ$, $[\alpha]_{546} +43^\circ$, $[\alpha]_{436} 72^\circ$, $[\alpha]_{365}$ baja energía (c 13.5, CHCl_3); UV $\lambda(\text{EtOH})_{\text{max}}$ (log ϵ) nm: 212 (4.49), 253 (4.11); IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 3628, 3613, 2929, 1278, 1221, 1141; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-16), 7.38 (1H, s, H-11), 6.72 (1H, dd, $J = 2.2, 1.0$ Hz, H-15), 4.79 (1H, da, $J = 4.1$ Hz, H-6), 3.10 – 2.85 (2H, m, H-7), 2.37 (3H, s, H-17), 2.25 (1H, dtd, $J = 12.6, 3.1, 1.4$ Hz, H-1 β), 1.89 (1H, qt, $J = 13.6, 3.5$ Hz, H-2 β), 1.64 (1H, dq, $J = 17.4, 3.6$ Hz, H-2 α), 1.64 (3H, s, H-20), 1.53 – 1.42 (1H, m, H-3 β), 1.46 (1H, sa, H-5), 1.46 – 1.39 (1H, m, H-1 α), 1.31 (3H, s, H-

19), 1.24 (1H, td, $J = 13.1, 3.9$ Hz, H-3 α), 1.08 (3H, s, H-18); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 154.7 (C-12), 147.3 (C-9), 145.1 (C-16), 129.3 (C-14), 126.3 (C-13), 124.8 (C-8), 105.9 (C-11), 105.6 (C-15), 66.2 (C-6), 53.1 (C-5), 43.5 (C-1), 43.3 (C-3), 39.2 (C-7), 38.4 (C-10), 34.4 (C-4), 33.9 (C-18), 27.9 (C-20), 24.0 (C-19), 19.9 (C-2), 16.2 (C-17); EMIQ (CH_3CN) m/z 300 $[\text{M}]^+ + \text{H}^+$ (35), 282 (79), 266 (14), 226 (48), 186 (100), 123 (4); Cristal monoclinico, grupo espacial P2_1 , dimensiones de la celda $a = 7.5077(3)$, $b = 23.2159(6)$, $c = 9.7700(3)$ Å, $\beta = 107.392(4)^\circ$, $V = 1625.04(9)$ Å 3 , $\rho_{\text{calcd}} = 1.220$ g/cm 3 para $Z = 2$ y $Z' = 2$, $\text{PM} = 596.82$ y $\text{F}(000)e^- = 648$ (ver Apéndice A).

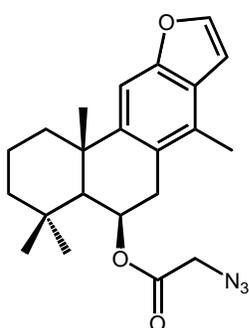
8.7.4. (-)-(5S,6R,10S)-6[2'-Cloroacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (25)



A una solución de **24** (54 mg) en diclorometano (2 mL) se le agregó 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (28 mg) como catalizador. Esta mezcla se trató con cloruro de cloroacetilo (0.15 mL) adicionado gota a gota, bajo agitación y a 0 °C. La reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante 1 h y transcurrido ese tiempo se extrajo con diclorometano, se lavó tres veces con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó en rotavapor a sequedad. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna con gel de sílice malla 230-400, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato (99.4-0.6) para obtener de manera pura el (-)-(5S,6R,10S)-6[2'-cloroacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**25**) (53.1 mg, 78.3%). Aceite incoloro, $[\alpha]_{589} -43^\circ$, $[\alpha]_{578} -45^\circ$, $[\alpha]_{546} -52^\circ$, $[\alpha]_{436} -95^\circ$, $[\alpha]_{365} -168^\circ$ (c 11.1, CHCl_3); UV $\lambda(\text{EtOH})_{\text{max}}$ (log ϵ) nm: 212 (4.52), 253 (4.09), 260 (4.02); IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 2934, 1748, 1726, 1309, 1295, 1279, 1223, 1187, 1141; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.54 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-16), 7.39 (1H, s, H-11), 6.72 (1H, dd, $J = 2.3, 1.0$ Hz, H-15), 5.95 (1H, dt, $J = 5.3, 1.6$ Hz, H-6), 4.01 (2H, s, H-22), 3.17 – 2.96 (2H, m, H-7), 2.34 (3H, s, H-17), 2.32 (1H, dtd, $J = 12.6, 3.1, 1.4$ Hz, H-1 β), 1.89 (1H, qt, $J = 13.7, 3.4$ Hz, H-2 β), 1.67 (1H, dq, $J = 14.0, 3.6$ Hz, H-2 α), 1.62 – 1.58 (1H, m, H-5), 1.60 (3H, s, H-20), 1.56 – 1.40 (2H, m, H-1 α y H-3 β), 1.32 – 1.20 (1H, m, H-3 α), 1.10 (3H, s, H-19), 1.08 (3H, s, H-18); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 168.3 (C-21), 154.8 (C-12), 146.7 (C-9), 145.4 (C-16), 129.2 (C-14), 126.4

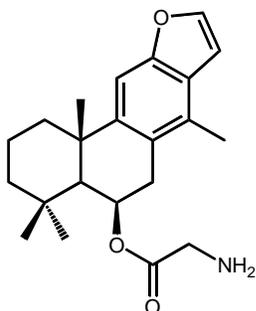
(C-13), 123.8 (C-8), 105.8 (C-11), 105.5 (C-15), 70.8 (C-6), 52.0 (C-5), 43.3 (C-1), 43.3 (C-3), 41.6 (C-22), 38.6 (C-10), 35.2 (C-7), 34.3 (C-4), 33.7 (C-18), 27.8 (C-20), 23.6 (C-19), 19.7 (C-2), 16.1 (C-17); EMIES (MeOH) m/z 375 $[M+1]^+$, 397 $[M+Na]^+$, 433 $[M+Na+2H_2O]^+$.

8.7.5. (-)-(5S,6R,10S)-6[2'-Azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (26)



A una suspensión de azida de potasio (18 mg) en *N,N*-dimetilformamida (1 mL) se le adicionó gota a gota, bajo agitación y en baño de hielo una solución de **25** (46 mg) en *N,N*-dimetilformamida (1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y a temperatura ambiente durante toda la noche, a la mañana siguiente la mezcla se depositó en un embudo de separación con agua (10 mL) y se realizó la extracción con cloruro de metileno (3 x 10 mL). La fase orgánica se lavó dos veces con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad en rotavapor para obtener de manera pura el (-)-(5S,6R,10S)-6[2'-azidoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (**26**) (40.2 mg, 85%). Aceite incoloro, $[\alpha]_{589} -59^\circ$, $[\alpha]_{578} -62^\circ$, $[\alpha]_{546} -71^\circ$, $[\alpha]_{436} -131^\circ$, $[\alpha]_{365} -232^\circ$ (c 12, CHCl₃); UV $\lambda(\text{EtOH})_{\text{max}}$ (log ϵ) nm: 212 (4.51), 253 (4.1), 260 (4.02); IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 2932, 2110, 1741, 1279, 1223, 1195, 1141; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-16), 7.39 (1H, s, H-11), 6.73 (1H, dd, $J = 2.3, 0.9$ Hz, H-15), 5.97 (1H, dt, $J = 5.3, 1.5$ Hz, H-6), 3.82 (2H, s, H-22), 3.18 – 2.97 (2H, m, H-7), 2.34 (3H, s, H-17), 2.32 (1H, dtd, $J = 12.6, 3.5, 1.4$ Hz, H-1 β), 1.88 (1H, qt, $J = 13.6, 3.4$ Hz, H-2 β), 1.67 (1H, dq, $J = 14.1, 3.6$ Hz, H-2 α), 1.61 (1H, sa, H-5), 1.58 (3H, s, H-20), 1.56 – 1.41 (2H, m, H-1 α y H-3 β), 1.26 (1H, td, $J = 13.6, 3.8$ Hz, H-3 α), 1.09 (6H, s, H-18 y H-19); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169.3 (C-21), 154.8 (C-12), 146.7 (C-9), 145.4 (C-16), 129.2 (C-14), 126.5 (C-13), 123.8 (C-8), 105.8 (C-11), 105.6 (C-15), 70.4 (C-6), 52.0 (C-5), 51.2 (C-22), 43.3 (C-1), 43.3 (C-3), 38.6 (C-10), 35.3 (C-7), 34.3 (C-4), 33.7 (C-18), 27.7 (C-20), 23.5 (C-19), 19.7 (C-2), 16.1 (C-17); EMIES (MeOH) m/z 399 $[M+H_2O]^+$, 404 $[M+Na]^+$, 421 $[M+K+H]^+$.

8.7.6. (-)-(5S,6R,10S)-6[2'-Aminoacetoxi]vouacapa-8(14),9(11)-dieno (27)
(Glicinato de (-)-(5S,6R,10R)- vouacapa-8(14), 9(11)- dien-6-ilo)



Una solución de **26** (28 mg) en etanol (2 mL) se mezcló con cloruro de amonio (10 mg) disuelto en agua (0.3 mL) y a esta mezcla se le adicionó zinc en polvo (10 mg). La reacción se llevó a cabo a reflujo y bajo agitación durante 40 minutos, que fue el tiempo en el que se consumió la totalidad de la materia prima (se monitoreo por cromatografía en capa fina). Terminada la reacción, se adicionó a la mezcla acetato de etilo (5 mL) e hidróxido de amonio (0.25 mL), se filtró, se lavó 3 veces con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, con lo que se obtuvo el glicinato de (-)-(5S,6R,10R)-vouacapa-8(14),9(11)-dien-6-ilo (**27**) puro (23.8 mg, 91%). Aceite incoloro, $[\alpha]_{589} -40^\circ$, $[\alpha]_{578} -42^\circ$, $[\alpha]_{546} -48^\circ$, $[\alpha]_{436} -88^\circ$, $[\alpha]_{365} -153^\circ$ (c 6.9, CHCl₃); UV $\lambda(\text{EtOH})_{\text{max}}$ (log ϵ) nm: 212 (4.54), 253 (4.12), 260 (4.05); IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 2933, 1730, 1278, 1222, 1197, 1141; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-16), 7.39 (1H, s, H-11), 6.72 (1H, dd, $J = 2.2, 0.9$ Hz, H-15), 5.92 (1H, dt, $J = 5.3, 1.5$ Hz, H-6), 3.38 (2H, sa, H-22), 3.16 – 2.91 (2H, m, H-7), 2.34 (3H, s, H-17), 2.32 (1H, dtd, $J = 12.6, 3.5, 1.4$ Hz, H-1 β), 1.89 (1H, qt, $J = 14.1, 3.7$ Hz, H-2 β), 1.66 (1H, dq, $J = 14.2, 3.6$ Hz, H-2 α), 1.59 (4H, s, H-20 y H-5), 1.55 – 1.37 (2H, m, H-1 α y H-3 β), 1.27 (1H, td, $J = 13.1, 4.0$ Hz, H-3 α), 1.08 (6H, s, H-18 y H-19); RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.1 (C-21), 154.7 (C-12), 146.8 (C-9), 145.3 (C-16), 129.1 (C-14), 126.4 (C-13), 124.2 (C-8), 105.8 (C-11), 105.5 (C-15), 69.0 (C-6), 52.0 (C-5), 44.7 (C-22), 43.3 (C-3), 43.2 (C-1), 38.6 (C-10), 35.4 (C-7), 34.3 (C-4), 33.7 (C-18), 27.8 (C-20), 23.5 (C-19), 19.8 (C-2), 16.1 (C-17); EMIES (MeOH) m/z 356 [M+H]⁺, 378 [M+Na]⁺, 396 [M+Na+H₂O]⁺, 418 [M+Na+K+H]⁺, 711 [2M+H]⁺.

8.8. Evaluación *in vitro* de la estabilidad de los microtúbulos de α -tubulina- β -tubulina.

El vouacapano **6** y los derivados sintetizados (**23-27**) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y fueron colocados en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y de media área, en alícuotas de 10 μ L a una concentración tal que permitiera obtener concentraciones finales de 10, 50 y 100 μ M dependiendo del compuesto a analizar. Además, se preparó una solución de tubulina de cerebro bovino de >97% de pureza (Cytoeskeleton Inc., E.U.A.) utilizando como solvente buffer de pH 6.9 para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL, todo esto a 0 °C. El buffer contenía sal sesquisódica del ácido piperazin-*N,N'*-bis(2-etansulfónico) 80.0 mM, cloruro de magnesio 2.0 mM, ácido etilén-glicol-bis(β -aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético 0.5 mM y 5'-trifosfato de guanosina 1.0 mM. La solución de tubulina a 0 °C se adicionó en alícuotas de 100 μ L a los pozos de la placa con los compuestos. La placa de ELISA, la cual se mantuvo a 0 °C durante la adición de la solución de tubulina, se transfirió inmediatamente a un lector de placas BioTek EL808IU, precalentado a 37 °C. La polimerización de la tubulina se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 1 hora, manteniéndose la temperatura a 37 °C y con un periodo de agitación inicial de 5 segundos. Transcurridos los 60 minutos la placa se transfirió del lector a un congelador con temperatura de -20 °C durante 15 minutos para favorecer la despolimerización. Pasado este tiempo la placa fue colocada nuevamente en el lector a 37 °C durante 30 minutos más para determinar el efecto de los compuestos a probar sobre la estabilidad de los microtúbulos tras el estímulo despolimerizante del frío. La lectura de absorbancia al tiempo cero se restó de las lecturas subsecuentes para cada pozo con la finalidad realizar una comparación más adecuada del efecto sobre la polimerización de la tubulina de cada compuesto probado, todo esto en acuerdo con los protocolos ya establecidos.^{(44), (45)} Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron y graficaron con el programa GraphPad Prism⁽⁴⁶⁾ versión de demostración para Windows.

8.9. Estudio de reconocimiento molecular *in silico*.

Los estudios de reconocimiento molecular entre el heterodímero de α -tubulina- β -tubulina y el vouacapano y sus derivados se realizaron utilizando el programa AutoDock para Windows versión 4.2. Para la preparación de la proteína y de los modelos moleculares de los compuestos a probar se empleó el programa AutoDock Tools para Windows versión 1.5.6rc3. La visualización de los resultados y el análisis de los mismos se llevaron a cabo empleando el mismo programa, así como el programa PyMol para Windows versión 1.3. Las simulaciones computacionales se hicieron empleando dos computadoras personales: una acondicionada con un procesador Intel Core 2 Duo E6400 a 2.13 GHz, 2 Gb de RAM y una tarjeta de video Intel GMA 4500 1024 MB, y otra con un procesador Intel core i5 2410M a 2.3 GHz, 4 Gb de RAM y una tarjeta de video AMD Radeon HD 6470M 512 MB. El archivo cristalográfico de la proteína se obtuvo del RCSB *Protein Data Bank* ⁽³³⁾ bajo el código 1JFF y los modelos moleculares del vouacapano y los derivados se obtuvieron de los resultados del modelado molecular.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. T.L. Shepard, Nature Publishing Group, All natural, *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 351.
2. R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis, in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Wiley-Blackwell, 2nd edition, **2000**, págs. 1250-1253.
3. C. K. Kokate, A. P. Purohit, S. B. Gokhale, *Pharmacognosy*, 50th ed., Nirali Prakashan, **2008**.
4. D. J. Newman, G. M. Cragg, Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.*, **2012**, 75, 311-335.
5. K. M. VanderMolen, W. McCulloch, C. J. Pearce, N. H. Oberlies, Romidepsin (Istodax[®], NSC 630176, FR901228, FK228, Depsipeptide): A natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma, *J. Antibiot.*, **2011**, 64, 525-531.
6. M. Ricker, H. M. Hernández, M. Sousa, H. Ochoterena, Especies arbóreas y arborescentes de México: *Asteraceae*, *Leguminosae* y *Rubiaceae*, *Rev. Mex. Biodivers.*, **2013**, 84, 439-470.
7. M Wu, Y. Wang, M. Zhang, C. Huo, M. Dong, Q. Shi, H. Kiyota, Chemical constituents of plants from the genus *Caesalpinia*, *Chem. Biodivers.*, **2011**, 8, 1372-1382.
8. <http://redbio.una.edu.ni/arboretum/fichas.php?cod=80>.
9. J. L. B. Zanin, B. A. de Carvalho, P. S. Martineli, M. H. dos Santos, J. H. G. Lago, P. Sartorelli, C.Viegas, Jr. y M. G. Soares, The genus *Caesalpinia* L. (*Caesalpinaceae*): phytochemical and pharmacological characteristics, *Molecules*, **2012**, 17, 7887-7902.
10. http://www.desertmuseum.org/programs/altos_trees_caepla.php.
11. T. Pamatz-Bolaños, Actividad citotóxica de *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Will y *C. platyloba* S. Watson, Tesis de Maestría, CINVESTAV, México, D. F., **2010**.
12. M. A. Gómez-Hurtado, F. E. Álvarez-Esquivel, G. Rodríguez-García, M. M. Martínez-Pacheco, R. M. Espinoza-Madrigal, T. Pamatz-Bolaños, J. L. Salvador-Hernández, H. A. García-Gutiérrez, C. M. Cerda-García-Rojas, P. Joseph-Nathan, Cassane diterpenes from *Caesalpinia platyloba*, *Phytochemistry*, **2013**, 96, 397-403.
13. R. Maurya, M. Ravi, S. Singh, P. P. Yadav, A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies, *Fitoterapia*, **2012**, 83, 272-280.

14. T. Z. Linn, S. Awale, Y. Tezuka, A. H. Banskota, S. K. Kalauni, F. Attamimi, J. Ueda, P. B. S. Asih, D. Syafruddin, K. Tanaka, S. Kadota, Cassane- and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their antimalarial activity against the growth of *Plasmodium falciparum*, *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 706-710.
15. G. Ma, J. Yuan, H. Wu, L. Cao, X. Zhang, L. Xu, H. Wei, L. Wu, Q. Zheng, L. Li, L. Zhang, J. Yang, X. Xu, Caesalpins A–H, bioactive cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax*, *J. Nat. Prod.*, **2013**, 76, 1025-1031.
16. G. Ma, X. Xu, L. Cao, J. Yuan, J. Yang, L. Ma, Cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax* with their antineoplastic activity, *Planta Med.*, **2012**, 78, 1363-1369.
17. Y. Hou, S. Cao, P. Brodie, J. S. Miller, C. Birkinshaw, F. Ratovoson, R. Rakotondrajaona, R. Andriantsiferana, V. E. Rasamison, D. G. I. Kingston, Antiproliferative cassane diterpenoids of *Cordyla madagascariensis ssp. madagascariensis* from the Madagascar rainforest, *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71, 150-152.
18. J. O. Odalo, C. C. Joseph, M. H. H. Nkunya, I. Sattler, C. Lange, H. Dahse, U. Möllman, Cytotoxic, anti-proliferative and antimicrobial furanoditerpenoids from *Stuhlmania moavi*, *Phytochemistry*, **2009**, 70, 2047-2052.
19. W. Tu, S. Wang, S. Chien, F. Lin, L. Chen, C. Chiu, P. Hsiao, Diterpenes from *Cryptomeria japonica* inhibit androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cells, *Planta Med.*, **2007**.
20. C. A. Heinlein, C. Chang, Androgen receptor in prostate cancer, *Endocr. Rev.*, **2004**, 25, 276-308.
21. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **2011**, 144.
22. E. Nogales, M. Whittaker, R. A. Milligan, K. H. Downing, High-resolution model of the microtubule, *Cell*, **1999**, 96, 79-88.
23. L. A. Amos, J. Löwe, How Taxol stabilises microtubule structure, *Chem. Biol.*, **1999**, 6, R65-R69.
24. T. D. Pollard, W. C. Ernschaw, *Cell Biology*, Saunders, **2007**.
25. M. A. Jordan, L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4, 253-265.

26. G. G. Gundersen, T. A. Cook, Microtubules and signal transduction, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1999**, 11, 81-94.
27. S. L. Kline-Smith, C. E. Walczak, Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics, *Mol. Cell*, **2004**, 15, 317-327.
28. P. K. Sorgen, M. Dobles, R. Tournebize, A. A. Hyman, Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1997**, 9, 807-814.
29. M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson, Mechanism of inhibition of cell proliferation by vinca alkaloids, *Cancer Res.*, **1991**, 51, 2212-2222.
30. B. Nagy, J. D. Farmer, Q. M. Bui, J. E. Trancik, Statistical basis for predicting technological progress, **2013**, PLOS ONE, 8.
31. V. Zoete, A. Grosdidier, O. Michielin, Docking, virtual high throughput screening and *in silico* fragment-based drug design, *J. Cell. Mol. Med.*, **2009**, 13, 238-248.
32. A. J. P. Zuñiga, A. R. Domínguez, Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos, *Mensaje Bioquímico*, **2002**, 26, 129-145.
33. RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
34. Harvey, R. G, Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity, Cambridge University Press, Cambridge, **1991**.
35. P. P. Yadav, R. Maurya, J. Sarkar, A. Arora, S. Kanojiya, S. Sinha, M. N. Srivastava, R. Raghbir, Cassane diterpenes from *Caesalpinia bonduc*, *Phytochemistry*, **2009**, 70, 256-261.
36. G. J. Fetterly, R. M. Straubinger, Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats, *AAPS PharmSci.*, **2003**, 5.
37. Drugs.com Know more. Be sure, <http://www.drugs.com/pro/taxol.html>.
38. K. T. Savjani, A. K. Gajjar, J. K. Savjani, Drug solubility: Importance and enhancement techniques, *ISRN Pharmaceutics*, India, **2012**, 2012.
39. Hans-Joachim Böhm, Gisbert Schneider, Protein-ligand interactions: From molecular recognition to drug design, *WILEY-VCH*, Alemania, **2006**.
40. P. Joseph-Nathan, E. Díaz-Torres, Elementos de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, Grupo Editorial Iberoamérica, Mexico, **1993**, 2ª ed.

41. W. Lin, X. Zhang, Z. He, Y. Jin, L. Gong, A. Mi, Reduction of azides to amines or amides with zinc and ammonium chloride as reducing agent, *Synthetic Commun.*, **2002**, 32, 3279-3284.
42. K. H. Downing, Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics, *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, **2000**, 16, 89-111.
43. L. Techertanov, Structural metrics relationships in covalently bonded organic azides, *Acta Cryst.*, **1999**, B55, 807-809.
44. C. F. Beyer, N. Zhang, R. Hernández, D. Vitale, J. Lucas, T. Nguyen, C. Discafani, S. Ayrál-Kaloustian, J. J. Gibbons, TTI-237: A novel microtubule-active compound with *in vivo* antitumor activity, *Cancer Res.*, **2008**, 68, 2297-2300.
45. A. Vogt, P. A. McPherson, X. Shen, R. Balachandran, G. Zhu, B. S. Raccor, S. G. Nelson, M. Tsang, B. W. Day, High-content analysis of cancer-cell-specific apoptosis and inhibition of *in vivo* angiogenesis by synthetic (-)-pironetin and analogs, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2009**, 74, 358-368.
46. <http://www.graphpad.com/prism/>.

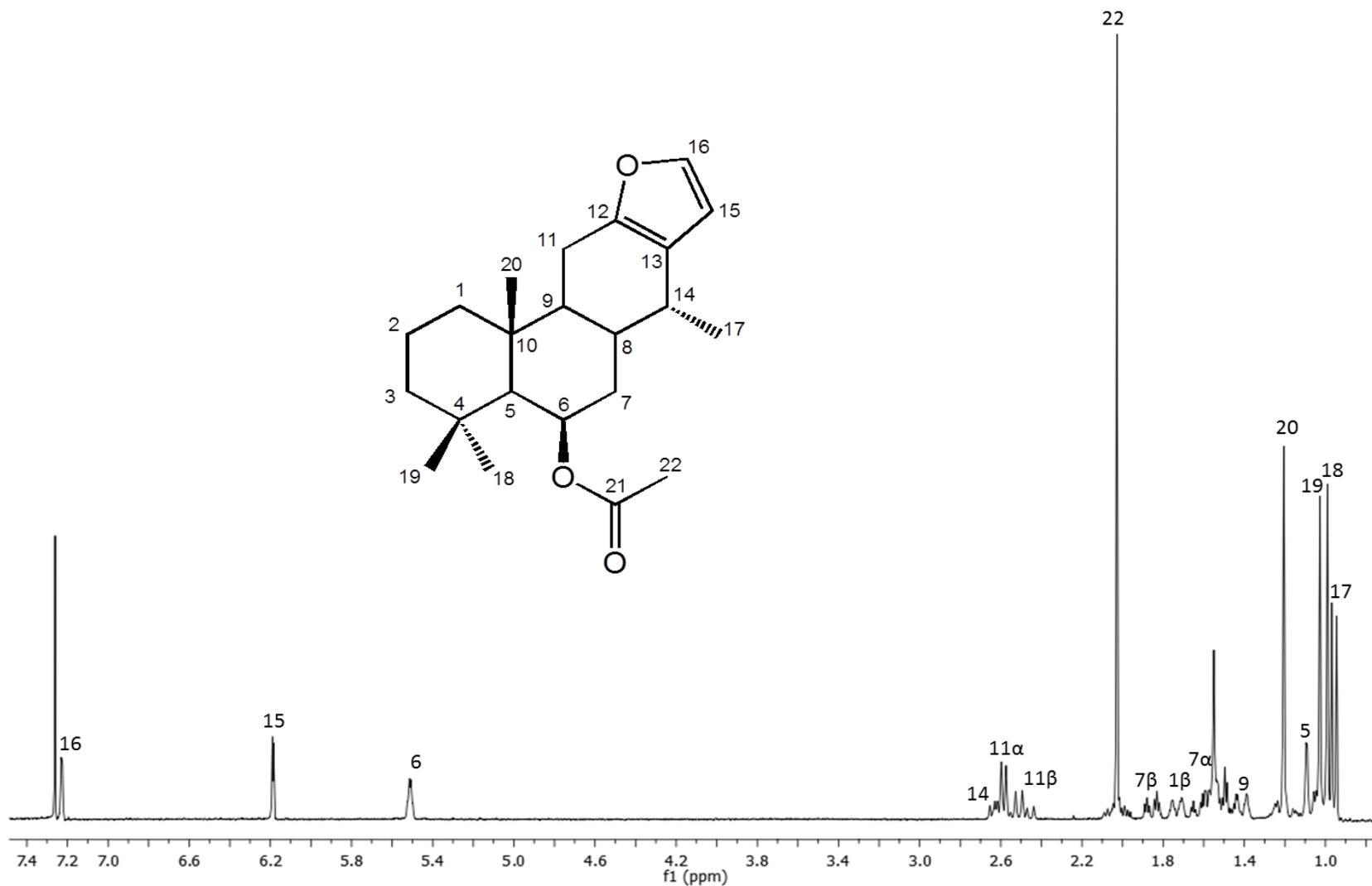
10. APÉNDICE A. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del vouacapano 6 y los derivados 23-27.

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del producto natural 6 aislado de *Caesalpinia platyloba*.

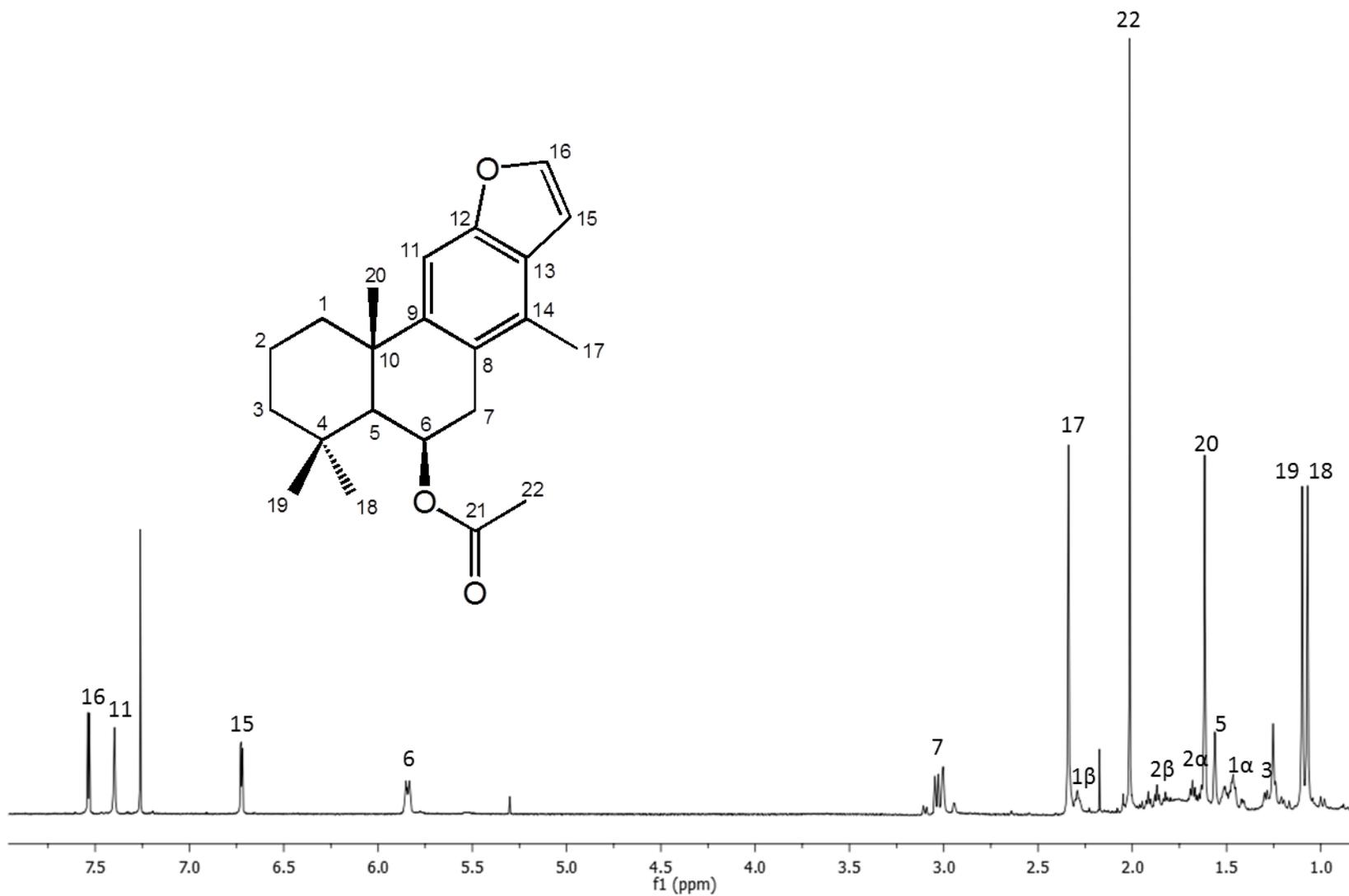


Figura 40. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del derivado del vouacapano **23**.

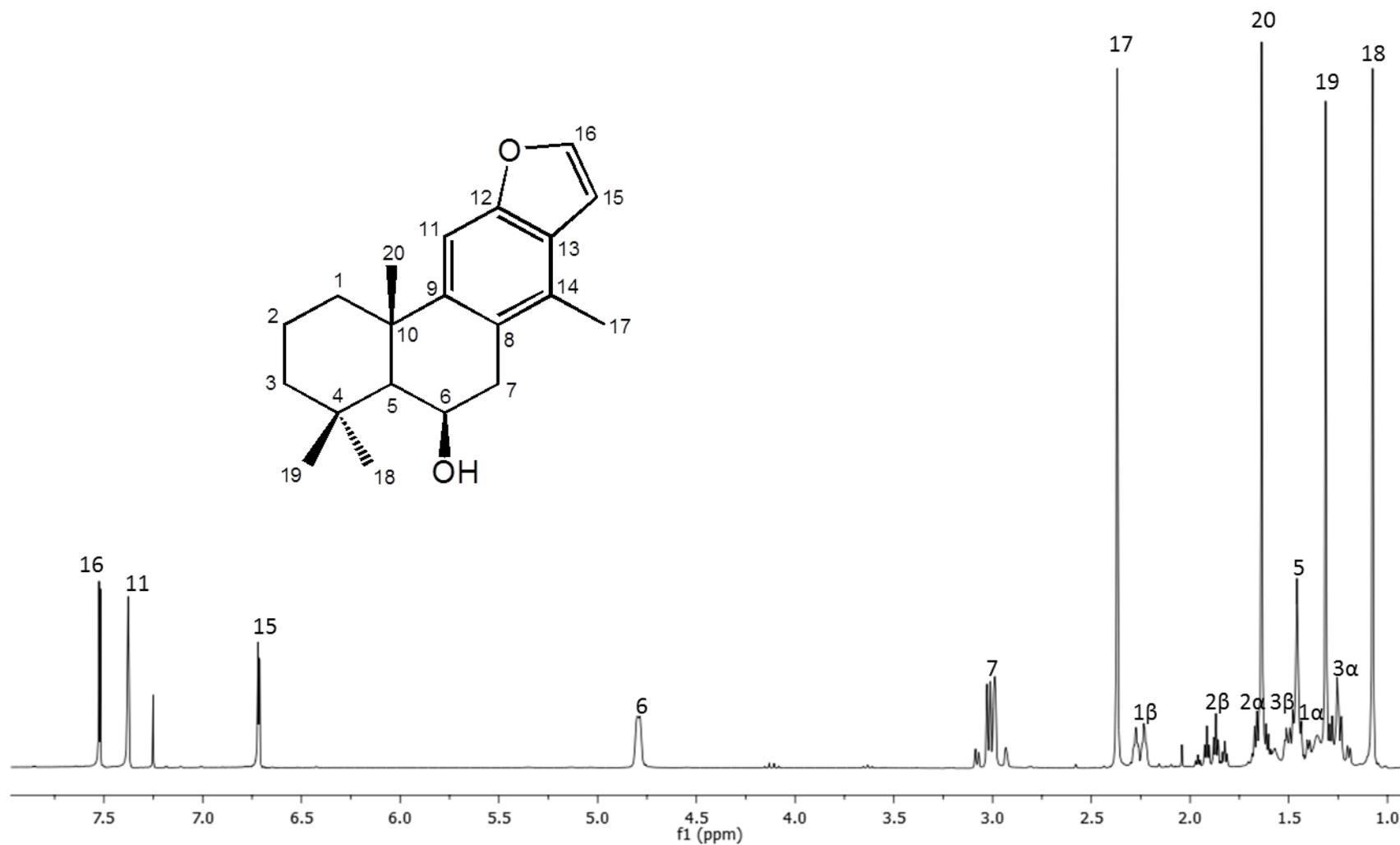


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del derivado del vouacapano **24**.

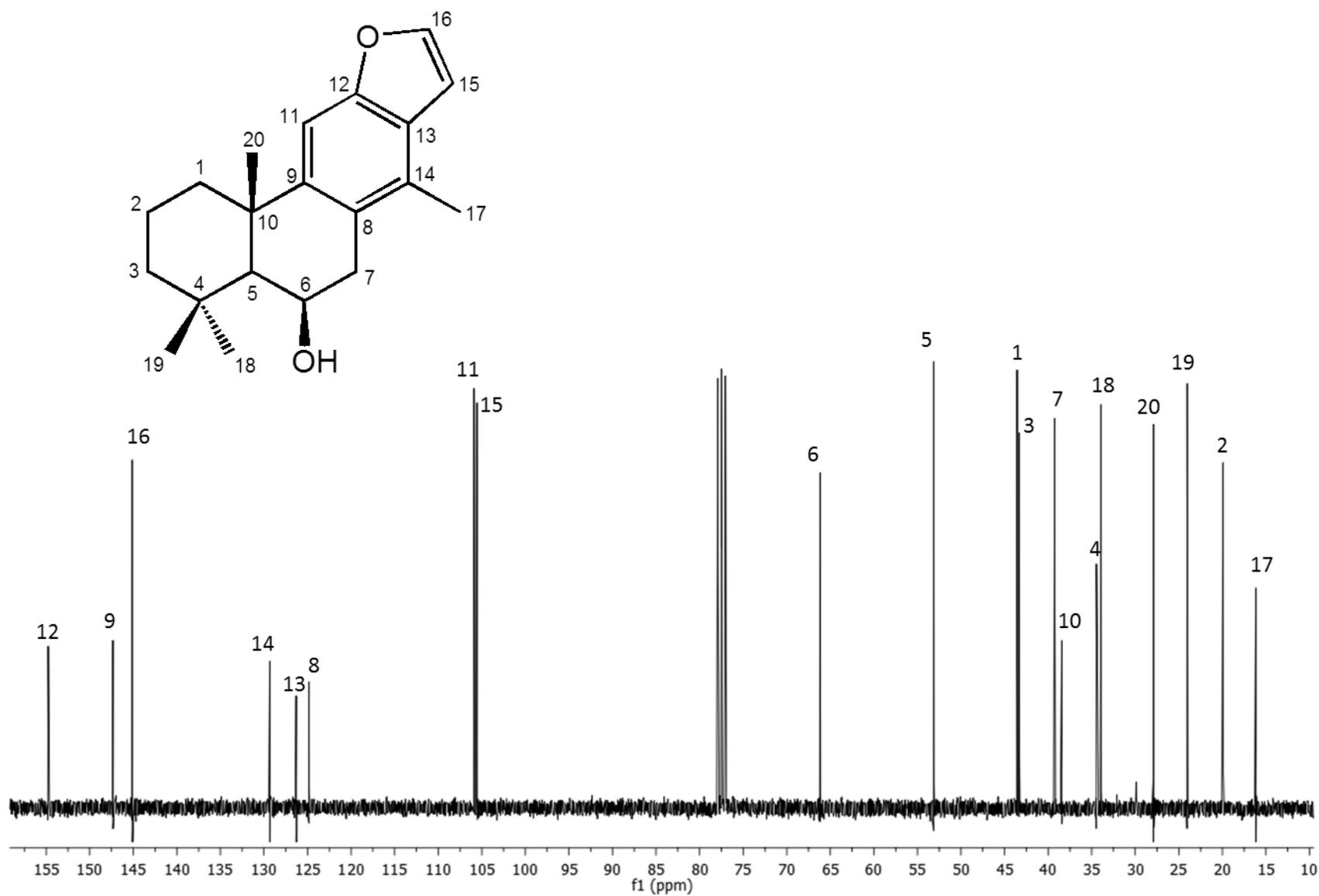


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del derivado del vouacapano 24.

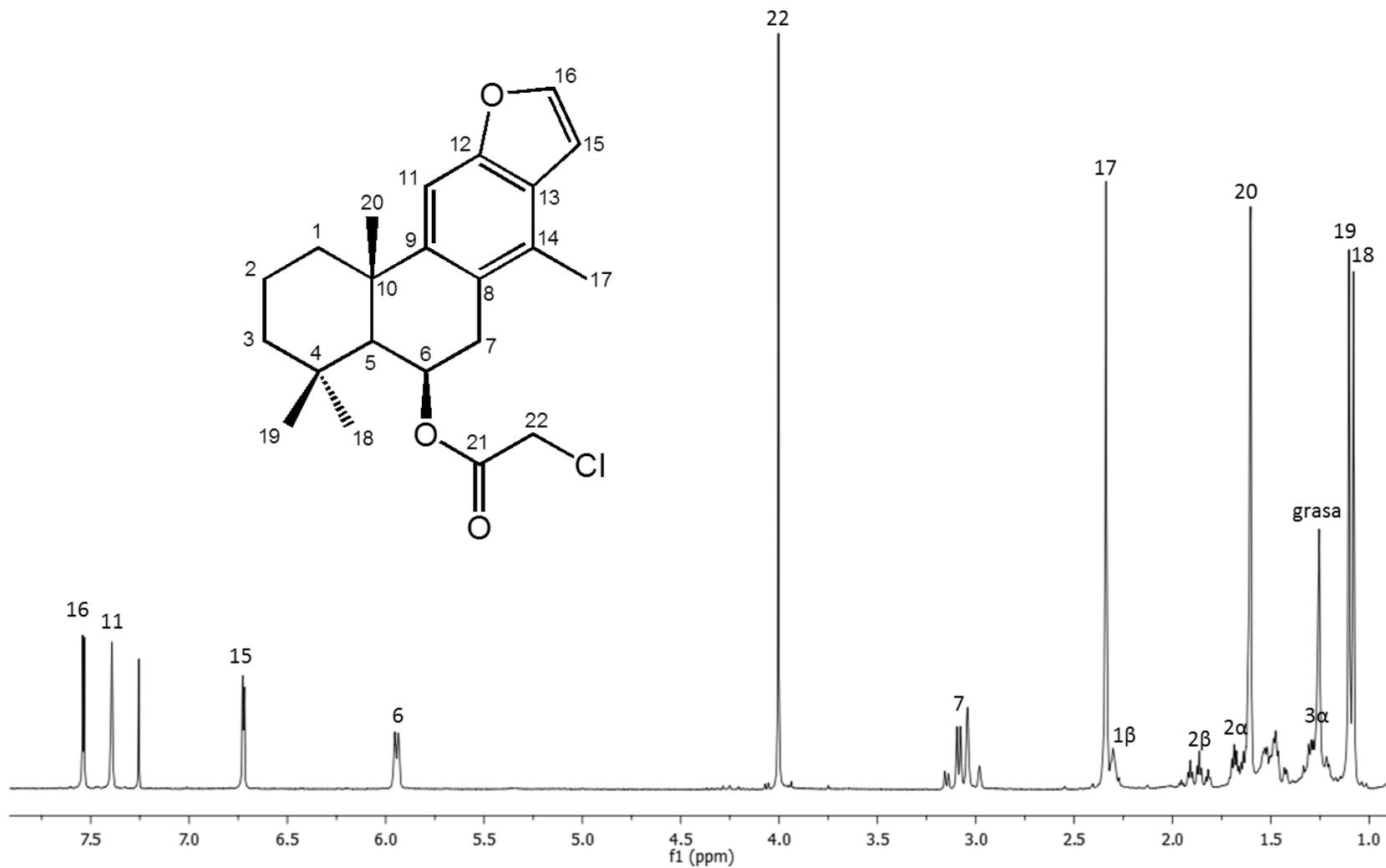


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del derivado del vaouacapano **25**.

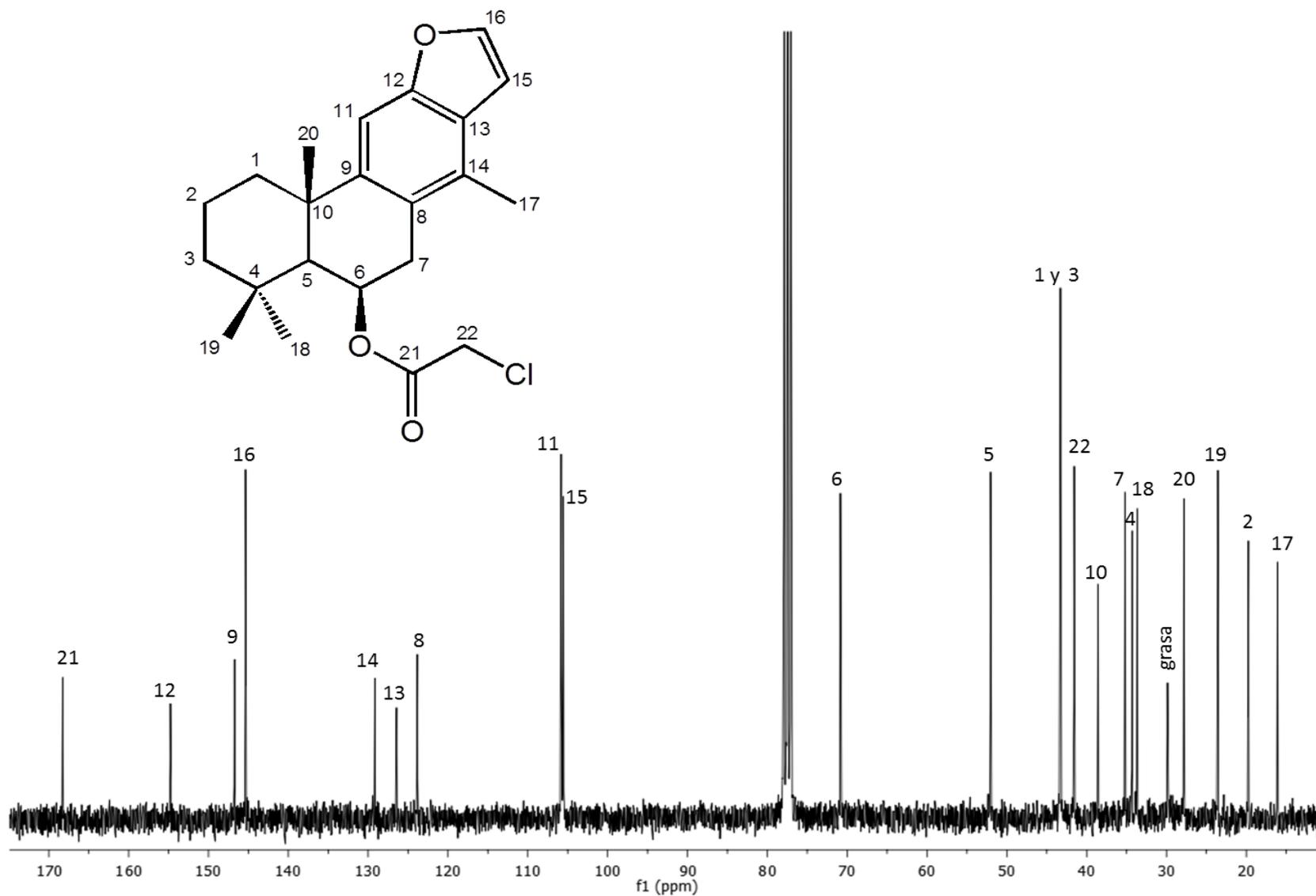


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del derivado del vouacapano **25**.

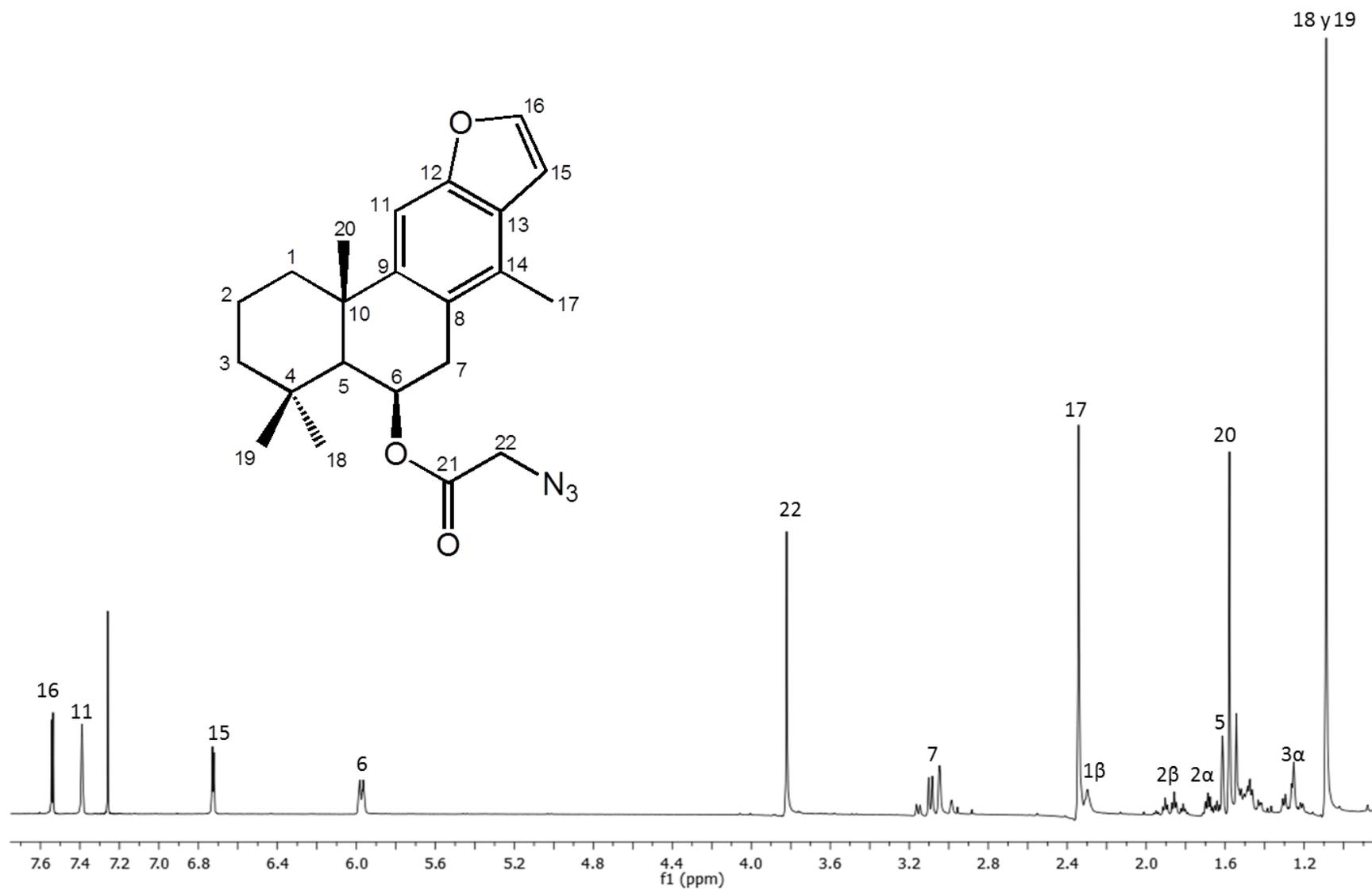


Figura 45. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del derivado del vouacapano 26.

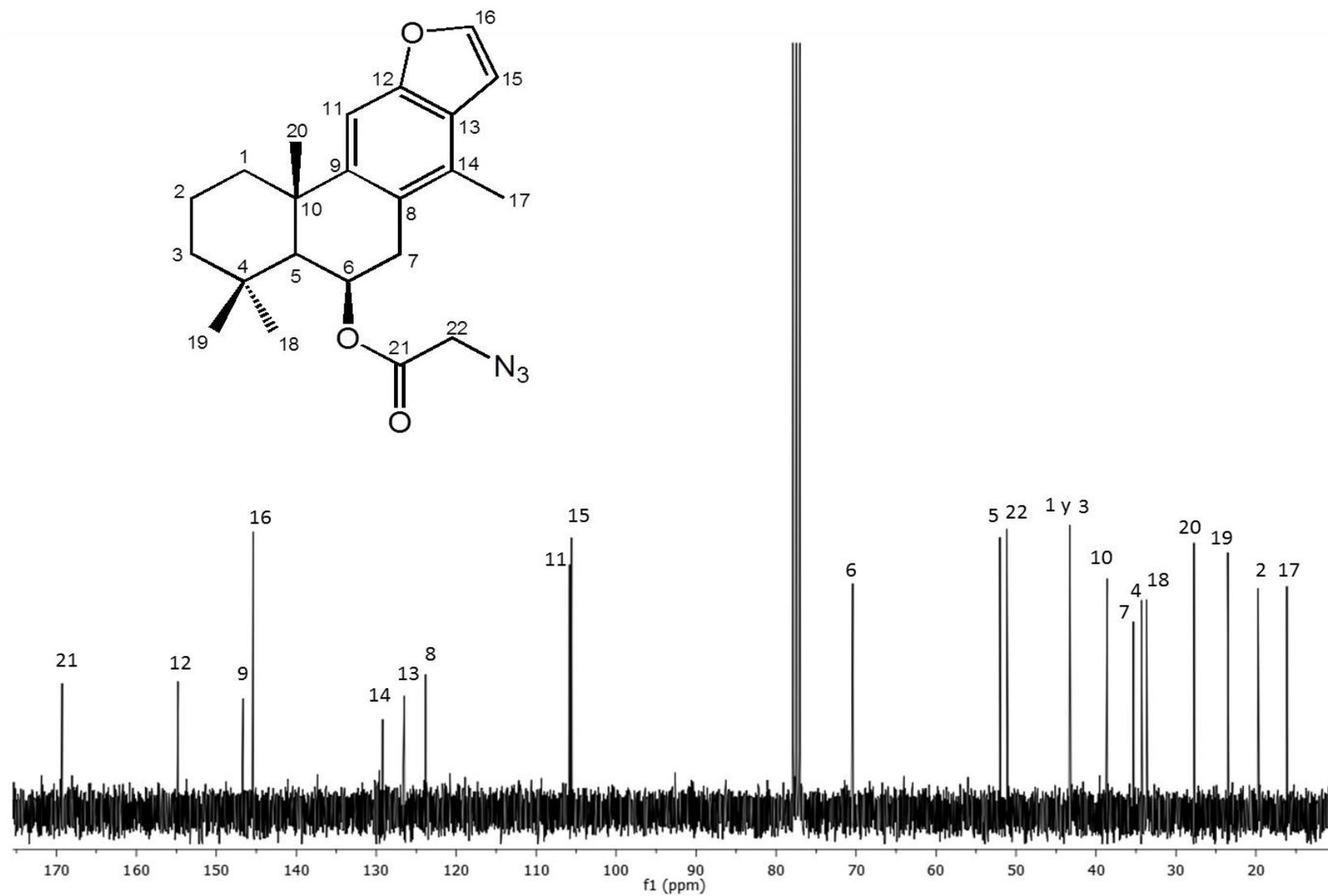


Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del derivado del vouacapano 26.

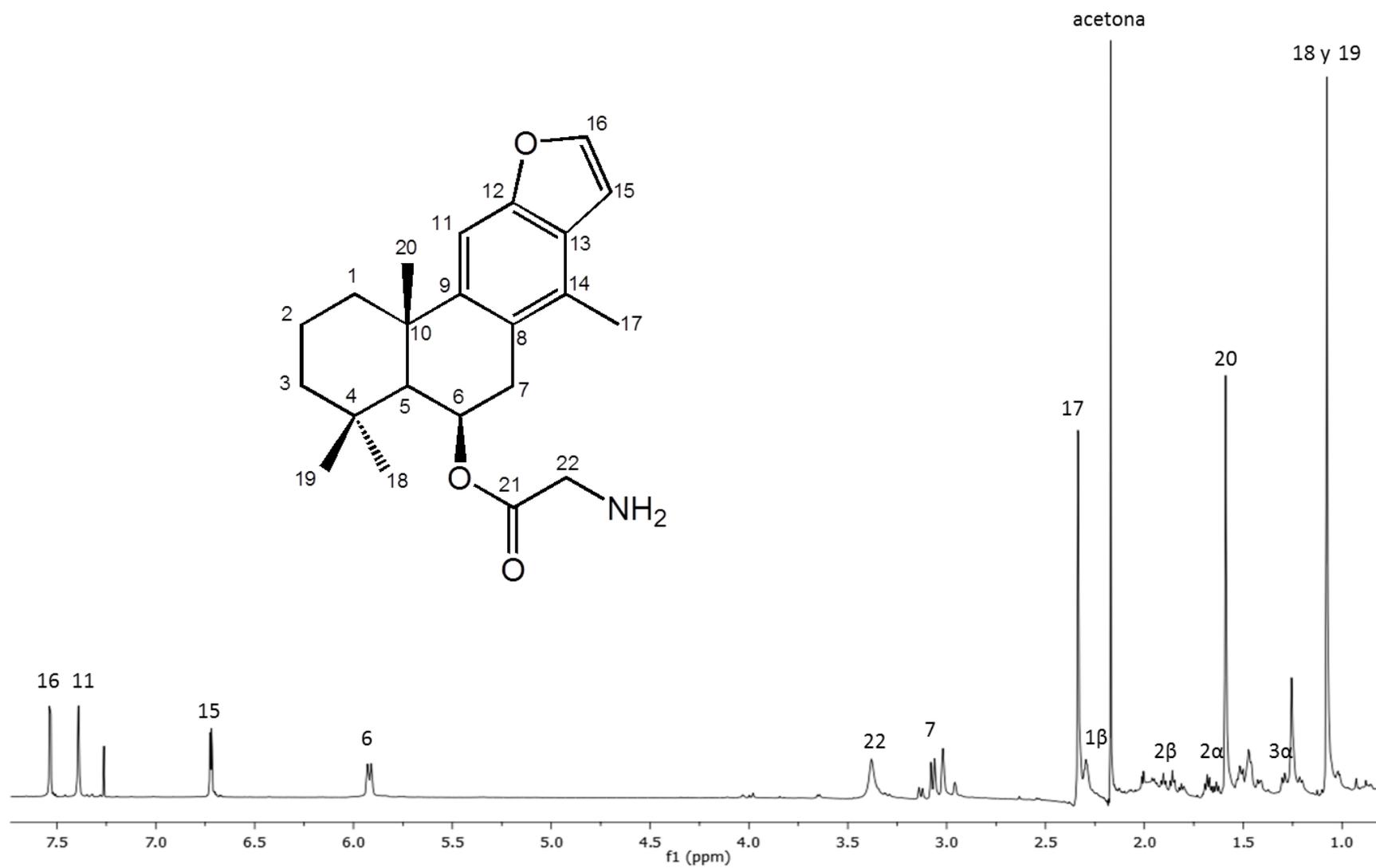


Figura 47. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz del derivado del vouacapano **27**.

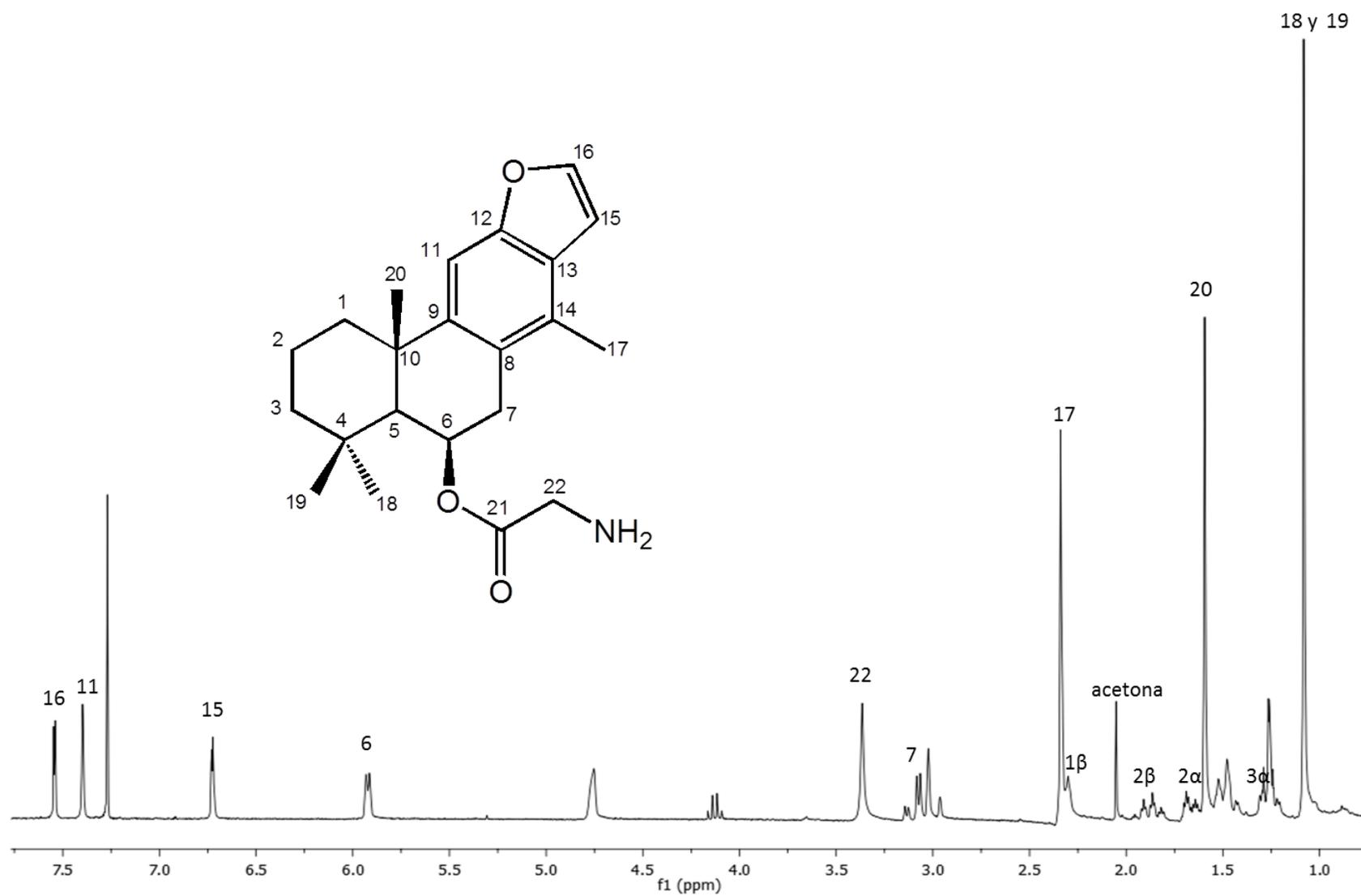


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz con D_2O del derivado del vouacapano **27**.

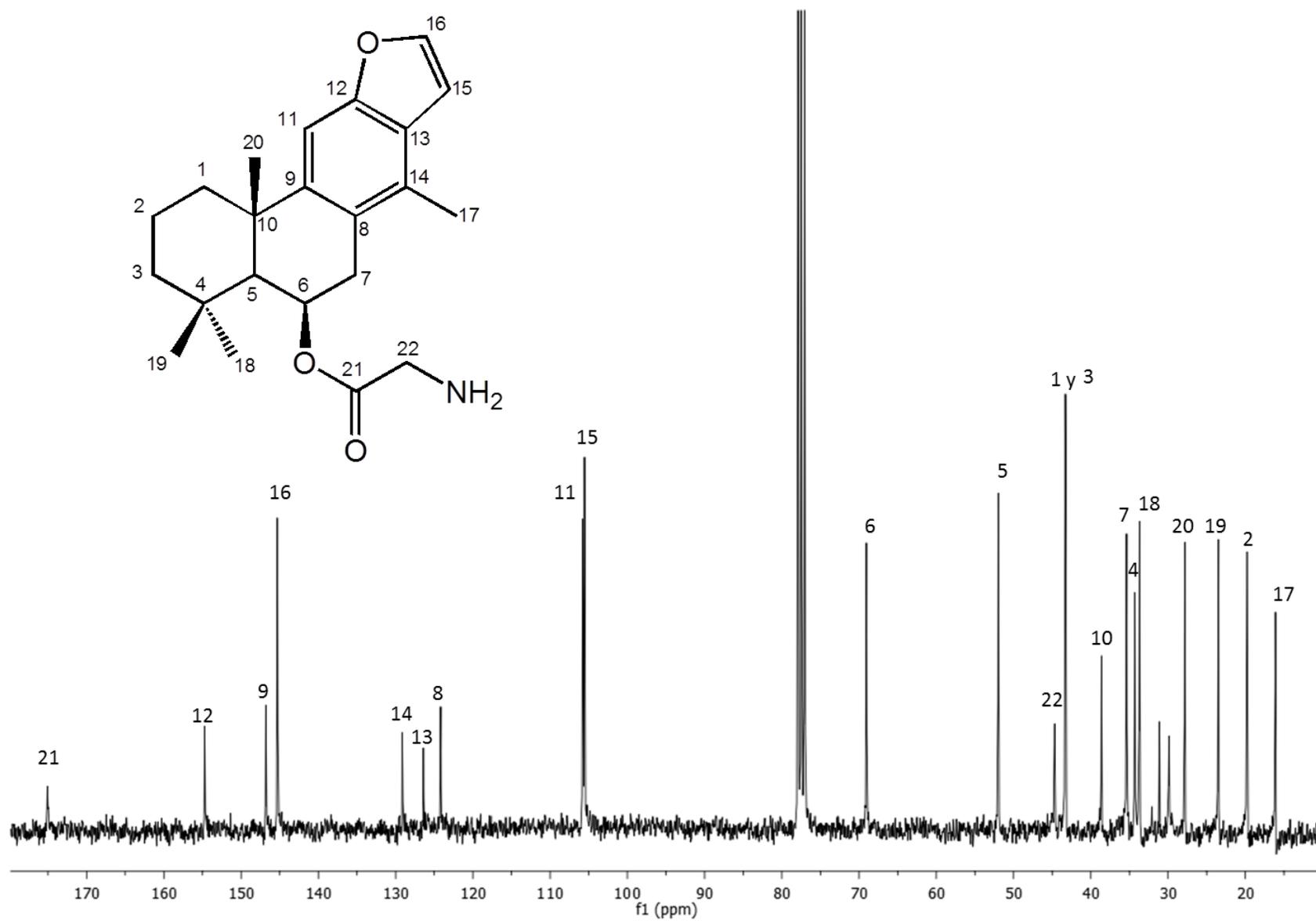


Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del derivado del vouacapano 27.

Tabla 3. Datos cristalográficos del derivado del vouacapano **24**.

Fórmula	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	
Peso molecular	596.82	
Temperatura	293(2) K	
Longitud de onda $\mu(\text{CuK}\alpha)$	1.54187Å	
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁	
Dimensiones de la celda	$a = 7.5077(3) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 23.2159(6) \text{ \AA}$	$\beta = 107.392(4)^\circ$
	$c = 9.7700(3) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	1625.04(9) Å ³	
Z, Z' densidad calculada	2, 2, 1.220 g/cm ³	
Coeficiente de absorción	0.596 mm ⁻¹	
F(000)	648	
Tamaño del cristal	0.30 x 0.20 x 0.20 mm	
Rango de θ en la colección de datos	De 3.81 a 77.71°	
Límite de los índices	-9<= h <=9, -29<= k <=29, -11<= l <=12	
Reflexiones colectadas/únicas	33078 / 6841 [R(int) = 0.0439]	
Integridad de $\theta = 77.71$	99.4 %	
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²	
Datos/restricciones/parámetros	5840 / 1 / 454	
Factor de bondad de ajuste para F ²	1.042	
Índices de R final [$I > 2\Sigma(I)$]	R1 = 4.81%, wR2 = 13.49%	
Índices R (todos los datos)	R1 = 5.78%, wR2 = 14.34%	
Parámetro de estructura absoluta	-0.1(2)	
Coeficiente de extinción	0.0000(2)	
Diferencia de densidad electrónica residual	0.259 y -0.195 eÅ ⁻³	

Tabla 4. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para el derivado del vouacapano **24**.

Átomo	x	y	z	U(eq)
O(12)	6564(3)	1599(1)	-3129(2)	64(1)
O(6)	95(2)	3530(1)	-3000(2)	58(1)
C(14)	1766(3)	2011(1)	-4603(3)	49(1)
C(8')	1522(3)	3206(1)	688(2)	43(1)
C(11')	4894(3)	3195(1)	1707(3)	50(1)
C(9')	3216(3)	2892(1)	1177(2)	42(1)
C(10)	3794(3)	3551(1)	-3662(2)	40(1)
C(13)	3423(4)	1693(1)	-4101(2)	50(1)
C(13')	3192(4)	4100(1)	1173(2)	49(1)
C(11)	5263(3)	2571(1)	-3486(3)	45(1)
C(9)	3620(3)	2896(1)	-3945(2)	40(1)
C(10')	3316(3)	2234(1)	1004(2)	46(1)
O(12')	6355(3)	4143(1)	2099(2)	67(1)
C(12)	5093(4)	1983(1)	-3578(2)	50(1)
O(6')	162(3)	2338(1)	-1749(2)	62(1)
C(14')	1497(3)	3807(1)	688(2)	47(1)
C(8)	1879(3)	2615(1)	-4526(2)	42(1)
C(5')	1356(3)	1960(1)	747(2)	46(1)
C(5)	1979(3)	3859(1)	-4554(2)	41(1)
C(12')	4829(3)	3782(1)	1685(2)	50(1)
C(7)	102(3)	2961(1)	-5083(3)	52(1)
C(7')	-326(3)	2891(1)	138(3)	52(1)
C(6)	211(3)	3559(1)	-4434(2)	48(1)
C(15)	3899(5)	1085(1)	-3953(3)	66(1)
C(3)	3761(4)	4754(1)	-4754(3)	63(1)
C(4)	1984(4)	4529(1)	-4456(3)	50(1)
C(1)	5411(3)	3804(1)	-4135(3)	53(1)

C(4')	1239(5)	1291(1)	665(3)	61(1)
C(6')	- 180(3)	2285(1)	-380(2)	49(1)
C(15')	3778(5)	4695(1)	1250(3)	64(1)
C(19')	-293(4)	4150(1)	132(3)	65(1)
C(20)	4288(3)	3617(1)	-2009(2)	48(1)
C(17)	-63(4)	1699(1)	-5204(4)	67(1)
C(20')	4231(4)	2142(1)	-208(3)	58(1)
C(18)	311(5)	4766(1)	-5674(4)	71(1)
C(1')	4599(4)	1962(1)	2409(3)	63(1)
C(16)	5742(6)	1062(1)	-3378(3)	72(1)
C(18')	-702(5)	1099(1)	737(4)	76(1)
C(3')	2689(5)	1053(1)	2030(4)	75(1)
C(2)	5550(4)	4457(1)	-3935(4)	67(1)
C(19)	1796(5)	4780(1)	-3046(3)	69(1)
C(2')	4622(5)	1307(1)	2326(4)	78(1)
C(16')	5641(5)	4689(1)	1801(4)	72(1)
C(17')	1499(6)	1018(1)	-694(4)	78(1)

$$U_{eq} = [1/(6\pi^2)] \chi \sum_i \sum_j \sum_{ij} a_i \cdot a_{jx}$$

Tabla 5. Distancias interatómicas (Å) para el derivado del vouacapano **24**, desviación estándar entre paréntesis.

Enlace	Distancia	Enlace	Distancia
O(12)-C(16)	1.378(4)	C(10')-C(5')	1.553(3)
O(12)-C(12)	1.386(3)	C(10')-C(1')	1.555(3)
O(6)-C(6)	1.431(3)	O(12')-C(16')	1.372(4)
C(14)-C(13)	1.403(4)	O(12')-C(12')	1.379(3)
C(14)-C(8)	1.404(3)	O(6')-C(6')	1.440(3)
C(14)-C(17)	1.508(4)	C(14')-C(19')	1.517(3)
C(8')-C(14')	1.394(3)	C(8)-C(7)	1.512(3)
C(8')-C(9')	1.420(3)	C(5')-C(6')	1.534(3)
C(8')-C(7')	1.518(3)	C(5')-C(4')	1.557(3)
C(11')-C(12')	1.365(4)	C(5)-C(6)	1.534(3)
C(11')-C(9')	1.400(3)	C(5)-C(4)	1.557(3)
C(9')-C(10')	1.541(3)	C(7)-C(6)	1.519(3)
C(10)-C(1)	1.538(3)	C(7')-C(6')	1.511(3)
C(10)-C(9)	1.544(3)	C(15)-C(16)	1.330(5)
C(10)-C(20)	1.552(3)	C(3)-C(2)	1.508(4)
C(10)-C(5)	1.556(3)	C(3)-C(4)	1.539(4)
C(13)-C(12)	1.379(4)	C(4)-C(19)	1.541(4)
C(13)-C(15)	1.453(4)	C(4)-C(18)	1.551(4)
C(13')-C(12')	1.393(4)	C(1)-C(2)	1.530(4)
C(13')-C(14')	1.395(3)	C(4')-C(17')	1.535(4)
C(13')-C(15')	1.445(4)	C(4')-C(18')	1.545(5)
C(11)-C(12)	1.370(3)	C(4')-C(3')	1.549(4)
C(11)-C(9)	1.401(3)	C(15')-C(16')	1.341(5)
C(9)-C(8)	1.419(3)	C(1')-C(2')	1.524(4)
C(10')-C(20')	1.551(3)	C(3')-C(2')	1.512(5)

Tabla 6. Ángulos de enlace (grados) para el derivado del vouacapano **24**, desviación estándar entre paréntesis.

Ángulo	Grados	Ángulo	Grados
C(16)-O(12)-C(12)	104.7(2)	C(11)-C(9)-C(10)	116.98(18)
C(13)-C(14)-C(8)	118.3(2)	C(8)-C(9)-C(10)	122.93(18)
C(13)-C(14)-C(17)	119.5(2)	C(9')-C(10')-C(20')	105.50(18)
C(8)-C(14)-C(17)	122.2(2)	C(9')-C(10')-C(5')	110.36(19)
C(14')-C(8')-C(9')	121.7(2)	C(20')-C(10')-C(5')	115.8(2)
C(14')-C(8')-C(7')	118.1(2)	C(9')-C(10')-C(1')	110.0(2)
C(9')-C(8')-C(7')	120.2(2)	C(20')-C(10')-C(1')	108.6(2)
C(12')-C(11')-C(9')	118.2(2)	C(5')-C(10')-C(1')	106.52(19)
C(11')-C(9')-C(8')	118.8(2)	C(16')-O(12')-C(12')	105.2(2)
C(11')-C(9')-C(10')	118.1(2)	C(11)-C(12)-C(13)	124.5(2)
C(8')-C(9')-C(10')	122.77(19)	C(11)-C(12)-O(12)	124.8(2)
C(1)-C(10)-C(9)	110.73(18)	C(13)-C(12)-O(12)	110.6(2)
C(1)-C(10)-C(20)	108.05(18)	C(8')-C(14')-C(13')	118.5(2)
C(9)-C(10)-C(20)	105.36(17)	C(8')-C(14')-C(19')	122.4(2)
C(1)-C(10)-C(5)	107.10(18)	C(13')-C(14')-C(19')	119.0(2)
C(9)-C(10)-C(5)	109.86(16)	C(14)-C(8)-C(9)	120.9(2)
C(20)-C(10)-C(5)	115.74(17)	C(14)-C(8)-C(7)	118.6(2)
C(12)-C(13)-C(14)	119.0(2)	C(9)-C(8)-C(7)	120.49(19)
C(12)-C(13)-C(15)	105.6(2)	C(6')-C(5')-C(10')	112.81(19)
C(14)-C(13)-C(15)	135.4(3)	C(6')-C(5')-C(4')	115.8(2)
C(12')-C(13')-C(14')	118.7(2)	C(10')-C(5')-C(4')	116.9(2)
C(12')-C(13')-C(15')	105.4(2)	C(6)-C(5)-C(10)	112.38(17)
C(14')-C(13')-C(15')	135.8(3)	C(6)-C(5)-C(4)	115.81(19)
C(12)-C(11)-C(9)	117.3(2)	C(10)-C(5)-C(4)	116.06(18)
C(11)-C(9)-C(8)	119.86(19)	C(11')-C(12')-O(12')	125.5(2)

C(11')-C(12')-C(13')	124.0(2)	C(17')-C(4')-C(18')	106.6(3)
O(12')-C(12')-C(13')	110.5(2)	C(17')-C(4')-C(3')	111.1(3)
C(8)-C(7)-C(6)	113.80(18)	C(18')-C(4')-C(3')	106.7(2)
C(6')-C(7')-C(8')	114.63(19)	C(17')-C(4')-C(5')	115.9(2)
O(6)-C(6)-C(7)	110.8(2)	C(18')-C(4')-C(5')	108.9(3)
O(6)-C(6)-C(5)	113.80(19)	C(3')-C(4')-C(5')	107.2(2)
C(7)-C(6)-C(5)	108.88(19)	O(6')-C(6')-C(7')	106.4(2)
C(16)-C(15)-C(13)	105.9(3)	O(6')-C(6')-C(5')	113.9(2)
C(2)-C(3)-C(4)	115.4(2)	C(7')-C(6')-C(5')	109.37(19)
C(3)-C(4)-C(19)	110.9(2)	C(16')-C(15')-C(13')	106.0(3)
C(3)-C(4)-C(18)	106.5(2)	C(2')-C(1')-C(10')	111.8(2)
C(19)-C(4)-C(18)	106.3(2)	C(15)-C(16)-O(12)	113.2(3)
C(3)-C(4)-C(5)	108.3(2)	C(2')-C(3')-C(4')	114.4(2)
C(19)-C(4)-C(5)	115.7(2)	C(3)-C(2)-C(1)	111.6(2)
C(18)-C(4)-C(5)	108.7(2)	C(3')-C(2')-C(1')	111.9(3)
C(2)-C(1)-C(10)	111.7(2)	C(15')-C(16')-O(12')	112.9(3)
