



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco
Departamento de Farmacología

**Obtención y caracterización de nuevos benzociclooctenos inhibidores
de la polimerización de tubulina**

Tesis que presenta:

Q.F.B. Edna Milagros Silva García

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de Farmacología.

Director de Tesis: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

México, D. F.

Diciembre de 2014

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría 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 un número de registro 356119.

Parte de este trabajo se presentó en el 49° Congreso Mexicano de Química, celebrado del 17 al 21 de septiembre 2014 en Mérida, Yucatán, México.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

“Borraré de mi vocabulario palabras como "abandonar la idea",

"no puedo", "irrealizable", "sin esperanza", etc...

Porque son palabras de personas que no tienen fe ni en sí mismas, ni en Dios.”

Og Mandino

DEDICATORIA.

A **Dios**, señor gracias por la vida, por mi familia, por llevarme siempre de la mano en cada uno de mis proyectos, por los ángeles que pones en mi camino. Siempre bajo tu amparo y protección me vas guiando hacia donde tú sabes que es mi lugar.

A mis papás, **Elidia García Rodríguez** y **David Silva Vega**, gracias por apoyarme en cada una de mis decisiones, por estar allí esos días preguntando ¿cómo te fue hoy?, ¿qué tal va el laboratorio?, por las palabras justas para tranquilizar mi alma, tomar aliento y seguir aprendiendo. Gracias por su amor que llega a mí en sonrisas, abrazos y besos, los amo infinitamente.

A mis hermanas **Laura Elidia** y **Marissa Anaid**, gracias por ser esas grandes mujeres, guerreras nobles que Dios puso a mi lado para aprender, disfrutar y avanzar. Gracias por ser parte de mis proyectos, por dejarme gozar los suyos, por ser mis mejores amigas. ¡Las amo mucho!

A mi angelito **Elianne**, porque con tu llegada llenaste de bendiciones nuestro hogar, eres parte fundamental de la fuerza que me impulsa a ser un mejor ser humano cada día.

A mi ahijada **Estrella** y mis compadres **Juan** y **Mary**, gracias por su amistad, dejarme ser parte de su familia y dejarme ser parte la vida de la princesa que Dios les dio.

A mis abuelos **Polo**, **Lupita**, **Tere** y **David**, gracias por formar parte de mis padres, por su ejemplo, sus sonrisas, su amor, son ejemplo para mi vida.

A mis hermanas de vida **Anaís**, **Mayela**, **Mónica** y **Suhying**, gracias por estar siempre presentes, gracias por ser las grandes mujeres que son, pese a los kilómetros que nos separan siempre las siento cerca, siendo parte de mi corazón, las amo mucho.

“Te doy gracias, Señor, de todo corazón, pues oíste las palabras de mi boca.

Canto para ti en presencia de los ángeles, y me postro ante tu Templo santo.

Doy gracias a tu nombre por tu amor y tu verdad, pues tu palabra ha superado tu renombre.”

Salmo 138

AGRADECIMIENTOS.

*Al **Dr. Carlos M. Cerda García-Rojas** y al **Dr. Pedro Joseph Nathan**, por permitirme ser parte de su excelente equipo de laboratorio. Dr. Carlos gracias por compartir sus conocimientos, su tiempo y la confianza que depositó en mí.*

*A los integrantes de mi comité tutorial, el **Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo** y la **Dra. Rosa E. Norma del Río Torres**, por sus valiosas aportaciones para la realización de esta tesis. Gracias por dedicar su tiempo para ayudarme a desarrollar y pulir las habilidades que se requieren para la investigación.*

*A la **Dra. Martha Sonia Morales Ríos**, por su valiosa participación en cada uno de los seminarios presentados.*

*A **Alvina, Angelina, Celina, Yola** y **Vero**, gracias por su tiempo para ayudarme a despejar las dudas, pero más aún por las pláticas, consejos técnicos y lecciones de vida que se comparten en el día a día. Verito, gracias por ser más que la auxiliar de laboratorio, mi amiga.*

*A mis amigos del laboratorio, **Benjamín** y **Esmeralda**, por las pláticas y risas, que fueron los reactivos principales para hacer más ameno el trabajo. A **Eugenio, Eric** y **Triny**, por ayudarme a aprender y formar parte del equipo de “Los de Química”.*

A mis amigos de la generación 2013 de la maestría en Farmacología, por ser parte de los aprendizajes, retos y triunfos académicos y personales de dos años y medio de aventuras; porque echándonos la mano salimos todos juntos adelante. Gracias muchachos.

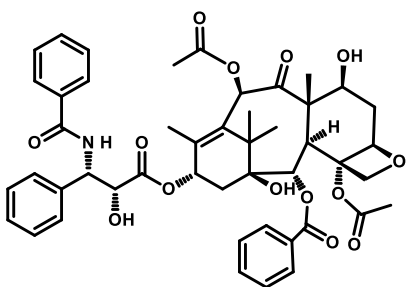
ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
RESUMEN DE ESTRUCTURAS.....	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Papel de los productos naturales en la medicina.	1
1.2 Compuestos terpénicos con actividad antitumoral.	2
1.3 La parvifolina.....	3
1.4 El cáncer.	4
1.5 Los microtúbulos y la tubulina.	9
1.6 Productos naturales que interactúan con el heterodímero α,β -tubulina. ..	12
1.7 Análisis de reconocimiento molecular proteína-ligando (<i>docking</i>).....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos específicos.	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	18
5.1 Obtención del producto natural y sus derivados.	18
5.2 Determinación de la actividad inhibitoria de la polimerización de microtúbulos <i>in vitro</i>	22
5.3 Estudio de reconocimiento molecular <i>in silico</i>	32
6. RESUMEN DE RESULTADOS.....	37
7. CONCLUSIONES.....	38

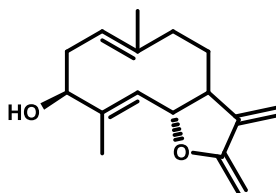
8. PERSPECTIVAS.....	38
9. PARTE EXPERIMENTAL	39
9.1 Procedimientos generales de purificación.....	39
9.1.1 Cromatografía.....	39
9.2 Determinaciones espectrofotométricas y espectroscópicas para la elucidación estructural de los compuestos.....	40
9.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	40
9.2.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	40
9.2.3 Espectroscopía de ultravioleta (UV).....	40
9.2.4 Difracción de rayos X.....	40
9.2.5 Espectrofotometría de masas (EM).....	41
9.2.6 Rotación específica.....	41
9.2.7 Determinación de puntos de fusión.....	41
9.3 Obtención del producto natural y sus derivados sintéticos.....	41
9.3.1 Obtención del extracto hexánico.....	41
9.3.2 Aislamiento de la parvifolina (5).....	41
9.3.3 Benzoilación de la parvifolina (5).....	42
9.3.4 Isomerización del benzoato de parvifolina (8).....	43
9.3.5 Epoxidación del benzoato de isoparvifolina (9).....	43
9.3.6 Transposición del epóxido 10	45
9.3.7 Reducción de la cetona 11	48
9.3.8 Preparación del cloruro de valeroílo.....	49
9.3.9 Esterificación con cloruro de valeroílo.....	49
9.4 Evaluación <i>in vitro</i> de la polimerización de α,β -tubulina.....	51
9.5 Estudios de reconocimiento proteína-ligando <i>in silico</i>	51

10. BIBLIOGRAFÍA.....	52
11. APÉNDICE A. Espectros de RMN de ^1H de 5 y 8-10 , espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los derivados 11-17 y espectro de IR del derivado 12	57

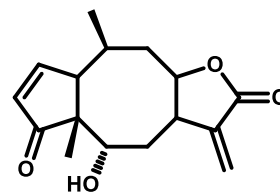
RESUMEN DE ESTRUCTURAS



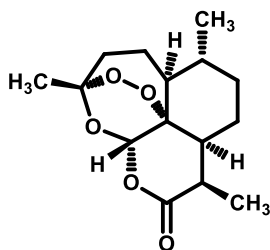
1



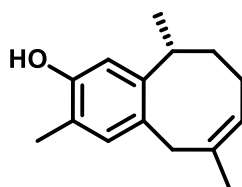
2



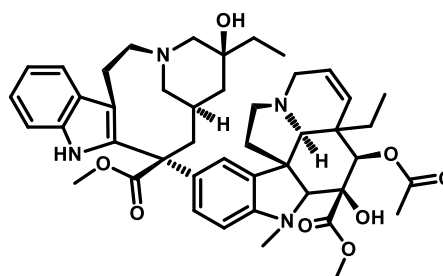
3



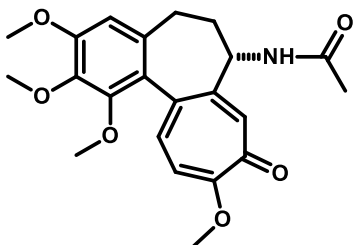
4



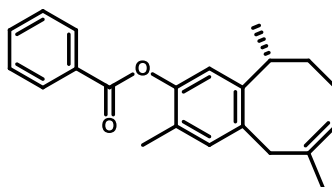
5



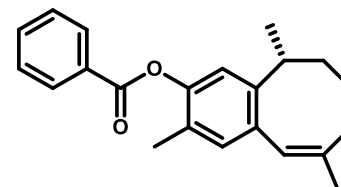
6



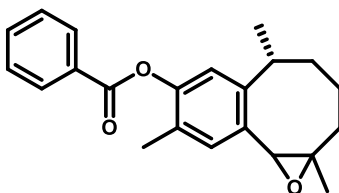
7



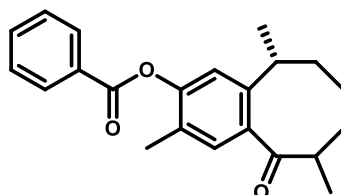
8



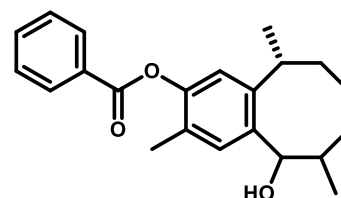
9



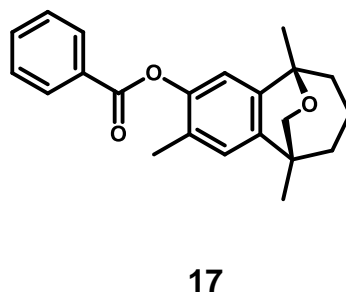
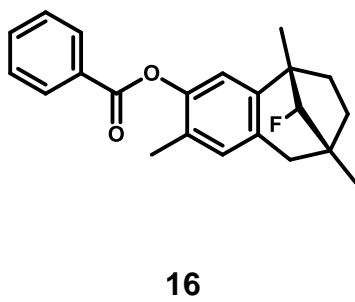
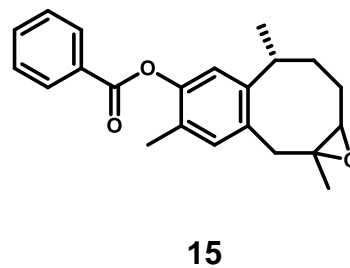
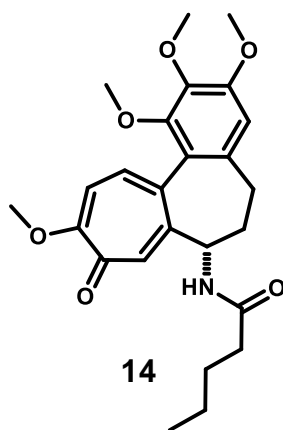
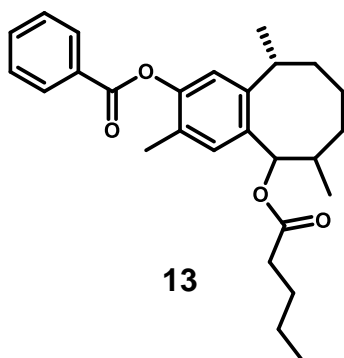
10



11



12



RESUMEN

Los productos naturales han sido fuente primordial en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades, una de ellas el cáncer, el cual es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Dado que los esquemas farmacológicos con los que se cuenta en la actualidad para tratar esta enfermedad presentan algunos inconvenientes, se han seguido buscando nuevas moléculas más eficientes.

En el presente trabajo se exploró la formación de nuevos derivados del benzocicloocteno cuya evaluación *in vitro* demostró que actúan como inhibidores de la polimerización de la tubulina. Dicha búsqueda se llevó a cabo a partir del producto natural terpénico llamado parvifolina (**5**) que se aísla en buen rendimiento de varias especies de la familia Asteraceae, principalmente *Coreopsis parvifolia*, *Perezia carpholepis*, *Perezia longifolia*, *Perezia alamanii* var. *oolepis* y *Acourtia humboldtii*, plantas muy abundantes en nuestro país. Del extracto hexánico de las raíces de *Acourtia humboldtii*, se obtuvo a **5**, el cual fue la base para la preparación de los derivados **8-13**. Durante la síntesis se identificaron y caracterizaron varios derivados nuevos (**12**, **13**, y **15-17**). Cabe señalar que los compuestos **12**, **13**, y **15** mantuvieron una estructura semejante al benzocicloocteno de origen, mientras que **16** y **17** presentaron sistemas de anillación novedosos como resultado de transposiciones múltiples.

La parvifolina (**5**) inhibió la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina *in vitro* guardando una relación proporcional al aumento de la concentración. Los estudios de reconocimiento molecular (*docking*) revelaron que este efecto se lleva a cabo a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre el sesquiterpeno y la proteína en el sitio de unión de la colchicina, sugiriendo que este podría ser el mecanismo por medio del cual se produce la inhibición de la polimerización de los microtúbulos.

ABSTRACT

Natural products have been very important for drug development allowing the treatment of many diseases, one of them is cancer, which is one of the leading causes of death worldwide. Because the drug regimens to treat this disease have many drawbacks, researchers have continued looking for new and more efficient molecules.

In the present work, it was explored the synthesis of new benzocyclootene derivatives whose *in vitro* evaluation demonstrated that they act as tubulin polymerization inhibitors. This study was carried out starting from the natural product parvifoline (**5**) which was isolated in good yields from several species of the Asteraceae family such as *Coreopsis parvifolia*, *Perezia carpholepis*, *Perezia longifolia*, *Perezia alamanii* var. *oolepis* and *Acourtia humboldtii*. These species are abundant in our country. Parvifoline (**5**) was obtained from the hexane extract of the roots of *Acourtia humboldtii*, which was employed for the preparation of derivatives **8-13**. During this synthesis several new molecules were identified and characterized (**12**, **13**, and **15-17**). It is worth mentioning that while molecules **12**, **13**, and **15** kept a framework similar to the original benzocyclootene, compounds **16** and **17** exhibited a novel hydrocarbon system as the result of multiple rearrangements.

Parvifoline (**5**) inhibited polymerization of α,β -tubulin heterodimers *in vitro*, displaying a relationship with a concentration increase. Docking studies revealed that this effect is due of hydrophobic interactions and hydrogen bonds between the sesquiterpene and the protein in the colchicine active site, suggesting that this could be the mechanism by which inhibition of tubulin polymerization occurs.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Papel de los productos naturales en la medicina.

Los conocimientos que ha ganado el hombre a través del tiempo han sido resultado de la observación de la naturaleza, tomando del medio los recursos básicos para su desarrollo y cuidado de la salud, de tal manera que, un gran número de medicamentos han surgido en base al estudio de los metabolitos presentes en plantas, bacterias y animales, denominados productos naturales. Estos compuestos son biosintetizados a partir del metabolismo primario o secundario, los primeros de ellos son los encargados de llevar a cabo las funciones celulares básicas como es la síntesis de aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y lípidos; mientras que los segundos son generados para incrementar la supervivencia del organismo. En el caso particular de las plantas, algunos de estos compuestos atraen a los insectos para la polinización o bien, las protegen de los depredadores.¹

En los últimos 30 años, aproximadamente el 48% de los nuevos medicamentos se inspiraron en productos naturales, buscando mejorar su efecto biológico modificando su estructura química, o bien descubriendo moléculas novedosas para la investigación farmacológica. Dentro de este porcentaje, el 45% de los fármacos desarrollados estuvieron enfocados a la búsqueda de anti-proliferativos (Figura 1).²

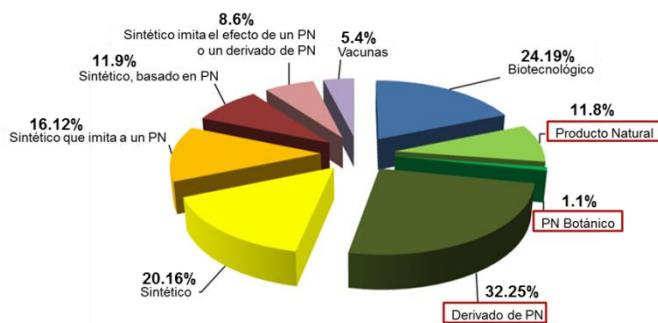
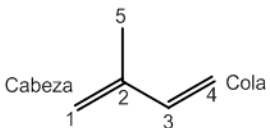


Figura 1. Fármacos anti-proliferativos desarrollados de 1981-2010. Tomada de Newman, D. J., Cragg, M. G. *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.* Journal of Natural Products **2012**, 75, 311–335.

1.2 Compuestos terpénicos con actividad antitumoral.

Los terpenos son compuestos naturales que han sido aislados de bacterias, hongos y organismos marinos. Sin embargo, la gran mayoría de ellos provienen del reino vegetal. Estructuralmente se puede considerar que están formados a partir de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), en base a la idea propuesta por Wallach en 1887,³ la cual fue transformada en regla por Ruzicka en 1953.⁴ La clasificación de los terpenos va en función justamente del número de unidades de isopreno que contienen (Tabla 1).

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

	Número de unidades de isopreno	Número de carbonos
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Triterpenos	6	30
Tetraterpenos	8	40

De acuerdo con la bibliografía, varios terpenos presentan una actividad biológica importante como anti-proliferativos. Un ejemplo claro es el del taxol (1) o paclitaxel, un diterpeno aislado de *Taxus brevifolia*, el cual es ampliamente usado en el tratamiento del cáncer de pulmón, ovario y mama.⁵ El costunólido (2) es una lactona monoterpénica que se aísla de *Saussurea lappa* e induce la apoptosis en varias líneas celulares de cáncer al disminuir la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, además promueve la diferenciación de las células en la

leucemia al inhibir la angiogénesis e interrumpir la estructura de los microtúbulos.^{6,7,8} La helenalina (**3**), aislada de varias especies de *Arnica* y de *Helenium*, ejerce su actividad antitumoral al inhibir al NF-κB e inducir la apoptosis celular. Se ha determinado que este mismo mecanismo ocurre en el caso de otras lactonas sesquiterpénicas.^{9,10} Finalmente, la artemisina (**4**) ejerce su efecto citotóxico en presencia de iones ferrosos que se encuentran en alta proporción en las células cancerosas por las que muestra mayor selectividad con respecto a las células sanas (Figura 2).^{11,12}

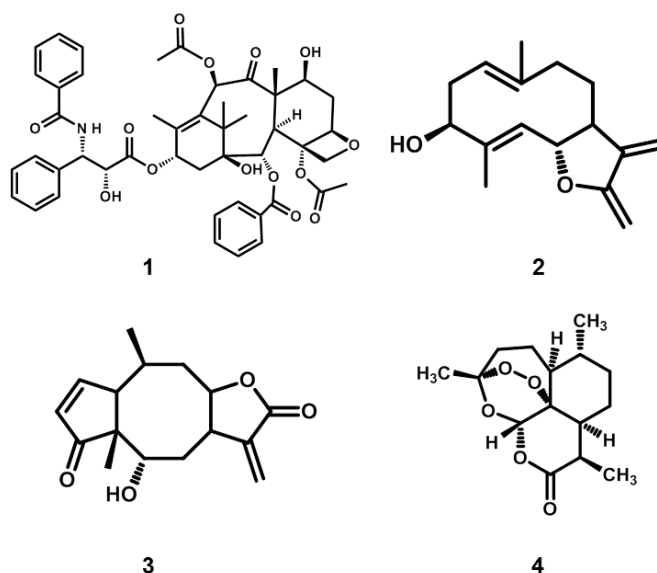


Figura 2. Ejemplos de terpenos con actividad antitumoral.

1.3 La parvifolina.

La parvifolina (**5**) es un sesquiterpeno bicíclico que se encuentra como metabolito secundario en las plantas de la familia Asteraceae, principalmente en *Coreopsis parvifolia*,¹³ *Perezia carpholepis*,¹⁴ *Perezia longilifolia*,¹⁵ *Perezia alamani* var. *oolepis*.¹⁶ Cabe señalar que ésta última ha sido reclasificada como *Acourtia humboldtii*.¹⁷

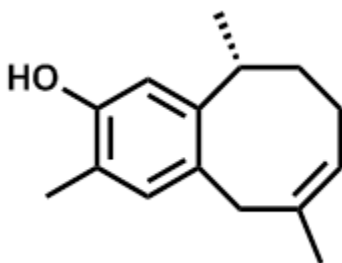


Figura 3. Estructura de la parvifolina (5).

En un trabajo previo, se demostró la capacidad antioxidante de la parvifolina y otros sesquiterpenos, usando una prueba con el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), actividad antioxidante equiparable a la de otros productos naturales ya evaluados en sistemas biológicos como el cacalol.¹⁸

1.4 El cáncer.

Cáncer es el término genérico con el que se designa a un conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular descontrolado, iniciándose con la transformación de una sola célula, la cual progresa desde lesiones precancerosas hasta finalmente tumores malignos. Este crecimiento desmedido conlleva a una invasión del tejido circundante que puede extenderse a otros tejidos (metástasis). El cáncer es resultado de la interacción de factores internos, como mutaciones, condiciones inmunes, hormonales o metabólicas; y factores externos, como son físicos, químicos e infecciosos. Cuando estos elementos actúan juntos se ve favorecido un ambiente propicio para el desarrollo de este padecimiento.^{20,24}

El cáncer puede aparecer prácticamente en cualquier lugar de cuerpo, en cualquier etapa de la vida, tanto en hombres como en mujeres, siendo esta una de las principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) los decesos a causa de esta enfermedad aumentarán un 45% para el 2030,¹⁹ siendo el de pulmón, estómago, hígado, colon, próstata,

cervicouterino y mama los de mayor incidencia entre la población mayor a 20 años, mientras que en edades menores el cáncer en órganos hematopoyéticos es el más común. Es importante indicar que esta misma tendencia se observa en México.^{20,21}

Las células al transformarse adquieren seis características principales que favorecen el desarrollo tumoral (Figura 4):²⁴

⊕ Son auto-suficientes en señales de proliferación.

Las células cancerosas adquieren la capacidad de producir factores de crecimiento y proliferación de manera autónoma, ya sea por estimulación autócrina o parácrina, es decir, la célula libera factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial (EGF) que se une a los receptores (EGFR) presentes en membrana de la que fue secretado o a los de las células vecinas. Además, esta señalización constante se relaciona con la desregulación a la alza de sus receptores, generando que al interior de las células las vías de señalización que promueven el ciclo celular se encuentren “encendidas” sin importar la calidad en la biosíntesis de macromoléculas, lo que a su vez favorece la aparición de mutaciones en el DNA o en la síntesis de proteínas reguladoras del ambiente celular como es el caso de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato-3-fosfatasa (PTEN) encargada de degradar, como su nombre lo dice el fosfatidilinositol(3,4,5)trifosfato (PIP₃), deteniendo así la cascada de señalización que mantiene a la célula en crecimiento y proliferación constante, por tanto cuando PTEN sufre una mutación se promueve la tumorigénesis.

⊕ Evaden las señales supresoras de crecimiento.

Las células sanas cuentan con proteínas supresoras de tumores que perciben el ambiente celular y en base a eso, limitan el crecimiento y la proliferación, o bien activan las vías de envejecimiento y muerte celular. Un ejemplo de este tipo de proteínas constituye la familia TP53, las cuales actúan detectando anomalías en el genoma celular. Cuando el daño se

puede reparar, TP53 detiene el ciclo celular hasta que éste quede en condiciones óptimas y de no ser así, activan las vías de apoptosis. En las células transformadas la expresión de estas proteínas está alterada, por lo tanto su función no se lleva a cabo de la manera esperada.

⊕ Son resistentes a la muerte celular.

La muerte celular programada es una barrera natural para el desarrollo del cáncer. Las células inducen su muerte a través de dos vías, una de origen extrínseco y otra que depende de señales internas (vía intrínseca). Las células cancerosas desarrollan estrategias para evitar ambas vías a través de mutaciones que menguan la actividad de genes supresores de tumores y de un aumento en la síntesis de protooncogenes y oncogenes.

⊕ Son replicativamente inmortales.

Las células tienen un número limitado de veces para dividirse, llegando al cual la célula envejece y muere. Sin embargo, en las células tumorales esta característica cambia debido a que la telomerasa, enzima encargada de recortar los telómeros que cubren los extremos terminales de los cromosomas, ya no llevan a cabo su función, ya sea por una regulación a la baja o una mutación, manteniéndose así una cantidad suficiente para que la célula cancerosa se replique una infinidad de veces y no envejezca.

⊕ Son capaces de inducir angiogénesis.

Como las células normales, las células tumorales requieren de oxígeno y nutrientes para llevar a cabo su metabolismo, razón por la cual producen factores que inducen el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, como por ejemplo el factor de crecimiento de endotelio vascular-A (VEGR-A) que se activa durante el desarrollo embrionario. Éste se induce por las células tumorales bajo condiciones de hipoxia o bien a través de vías de señalización mediadas por oncogenes. La neovascularización en los tumores favorece la expansión del cáncer a otros tejidos, ya que a través de

ellos se liberan y transportan los factores de crecimiento neoplásicos, además permite que células del sistema inmunológico como los linfocitos, lleguen al tumor proveyendo de factores proinflamatorios que favorezcan su desarrollo.

⊕ Activan los factores de invasión a otros tejidos (metástasis).

Cuando el cáncer se propaga desde el sitio primario a otras partes del cuerpo se le llama metástasis.²² Este fenómeno ocurre cuando las células tumorales adquieren la capacidad de vivir sin estar adheridas a la matriz extracelular y a sus células vecinas. Esto se debe a que se pierden las proteínas encargadas de su anclaje, las caderinas e integrinas; una vez perdidas, la célula tumoral entra a los vasos sanguíneos o linfáticos, dentro de los cuales viaja a tejidos distantes, sale de ellos y forma pequeños nódulos celulares, los cuales se adaptan a las condiciones del medio aumentando o disminuyendo la expresión de cualquiera de las características anteriores.²⁴

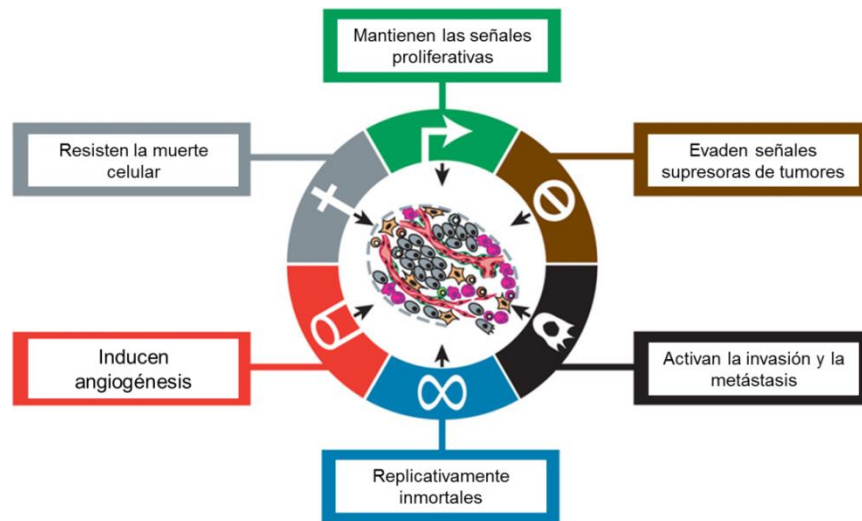


Figura 4. Características distintivas de las células tumorales. Editada de Hanahan, D., Weinberg, R. A. *Hallmarks of cancer: The Next Generation*. Cell **2011**, *144*, 646-666.

De acuerdo a las características que presenta el tipo del cáncer, será el tratamiento que se siga, siendo la mayoría de las veces la cirugía, la primera opción si es que se puede extirpar el tumor. Antes o después de la intervención quirúrgica puede usarse la radiación o la quimioterapia. La radioterapia se basa en utilizar ondas o partículas de alta energía como son los rayos X, rayos gamma, rayos de protones o electrones, con el objetivo de eliminar o dañar las células cancerosas. La radiación puede administrarse de manera externa, de manera interna o sistémica. En la quimioterapia, se combaten las células transformadas mediante el uso de medicamentos, los cuales suelen ser administrados por vía oral o intravenosa y se pueden clasificar de acuerdo en tres grandes grupos:²³

⊕ *Específicos del ciclo celular*, como su nombre lo dice, actúan sobre células en proliferación, o bien en neoplasias con una alta tasa de replicación como es el caso de las leucemias. Dentro de este grupo se encuentran:

- Los antimetabolitos: estos fármacos interfieren con la síntesis de ADN o ARN, debido a que tienen semejanzas estructurales al ácido fólico, las purinas y pirimidinas, dando como resultado moléculas inestables que son reconocidas como errores. Actúan sobre la fase S del ciclo celular.
- Los inhibidores de los microtúbulos: los fármacos que pertenecen a este grupo pueden evitar la despolimerización de los microtúbulos (taxanos) o inhibir su polimerización (alcaloides de la vinca y la colchicina). Actúan sobre la fase M del ciclo celular.
- Los inhibidores de las topoisomerasas: estos fármacos actúan sobre las enzimas topoisomerasa I y II, lo que genera tensión entre las hebras de ADN, provocando la ruptura de las mismas, con lo que la célula deja de ser viable. Actúan durante la fase S.

⊕ *Inespecíficos del ciclo celular*, pueden actuar sobre células que estén o no en proliferación (fase G0 del ciclo celular). Se recomienda para el tratamiento de tumores sólidos que tienen una tasa de proliferación baja. Los fármacos dentro de este grupo se clasifican en:

- Agentes alquilantes: estos fármacos pegan radicales alquilo sobre los nucleótidos.
 - Antibióticos antitumorales: estos medicamentos generan en la célula estrés oxidativo y radicales libres que van a dañar al ADN.
 - Complejos coordinados de platino: estas moléculas entran a la célula y bloquean los mecanismos de reparación celular, por lo tanto la célula se va a apoptosis.
- ⊕ Otros fármacos antineoplásicos: este grupo de fármacos está compuesto por una amplia variedad de moléculas las cuales van desde hormonas esteroideas y sus antagonistas, modificadores de la respuesta biológica como son citosinas y agentes inmunomoduladores; además de inhibidores de los EGFR'S como es el caso de anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas.²⁴

1.5 Los microtúbulos y la tubulina.

La importancia que tienen los microtúbulos como blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer se debe a que son estructuras del citoesqueleto que participan en el desarrollo y mantenimiento celular, siendo piezas clave para el ciclo celular al servir como pistas de las proteínas motoras, dineína y cinesina (Figura 5c), que transportan vesículas u organelos; como parte de cascadas de señalización, siendo los componentes principales de los cilios y flagelos, así como efectores durante la división celular y la mitosis, ya que son las estructuras encargadas de formar el huso mitótico.²⁵

Los microtúbulos son estructuras huecas formadas por tubulina que es una proteína estructural constituida por un par de heterodímeros, α -tubulina y β -tubulina. Ambos monómeros comparten el 40% de similitud en su secuencia de aminoácidos. Si bien la estructura tridimensional es muy parecida, difieren en el sitio de unión al 5-trifostato de guanosina (GTP); en la subunidad de α -tubulina el sitio de unión a GTP se conoce como no intercambiable (sitio-N), mientras en la β -

tubulina se denomina sitio intercambiable (sitio-E) debido a que allí se lleva a cabo la hidrólisis de este nucleótido (Figura 5a). El heterodímero de tubulina al polimerizarse forma un protofilamento con una cierta polaridad, ya que el extremo con mayor proporción de β -tubulina, llamado extremo más (+) o positivo, crece con mayor rapidez en comparación con el extremo menos (-) o negativo, cuya proporción de α -tubulina es mayor.²⁶

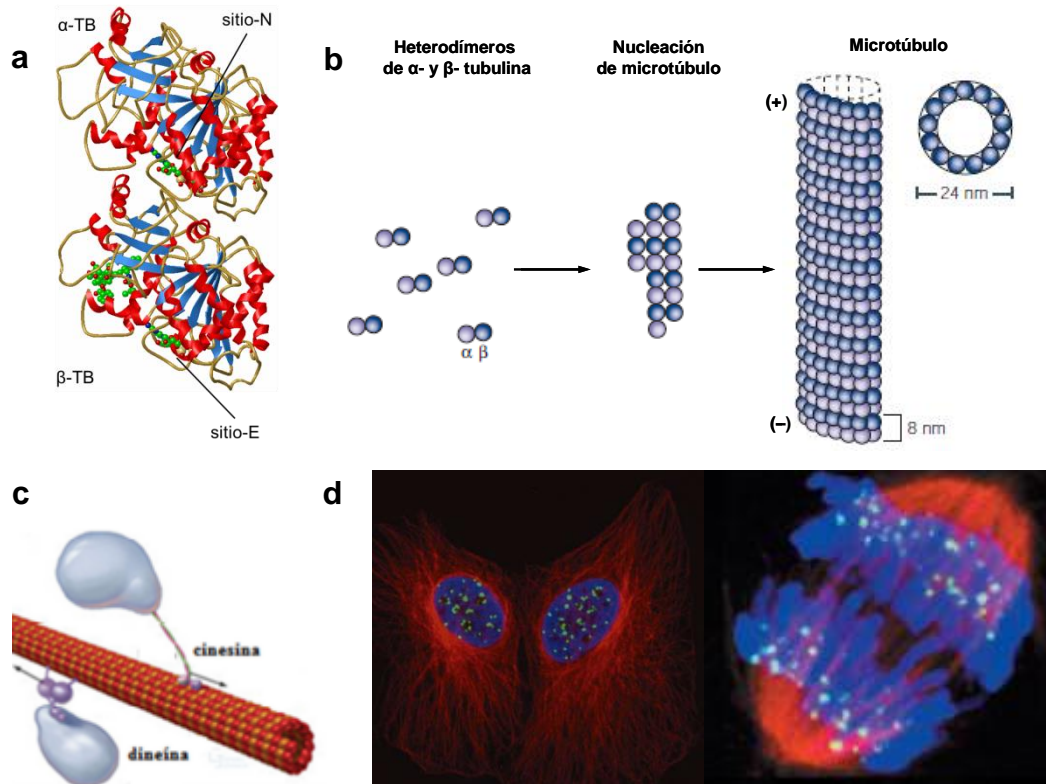


Figura 5. (a) Heterodímero de α,β -tubulina donde se observa el sitio-N y el sitio E. (b) Formación de microtúbulos. (c) Proteínas motoras dineína y cinesina que usan como rieles a los microtúbulos para el transporte intracelular. (d) Micrografía de fluorescencia de dos células de osteosarcoma en la interfase del ciclo celular. Micrografía de fluorescencia de una célula de osteosarcoma en la anafase de la mitosis. Los microtúbulos están en rojo, la cromatina en azul y los centrómeros en verde. Modificado de Jordan, M. A; Wilson, L. *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nature Reviews Cancer. **2004**, 4, 253-265.

Cuando se ensamblan 13 protofilamentos se forma un microtúbulo, los cuales están “anclados” a centros de nucleación ricos en γ -tubulina ubicados cerca de la membrana celular, nombrados centros organizadores de microtúbulos, a partir de los cuales se extienden hacia la periferia celular.²⁶ Los microtúbulos tienen un diámetro de 8 nm y pueden crecer hasta 20 μm en las células y 3 mm *in vitro* (Figura 5b). Para que se lleve a cabo la polimerización de la tubulina es indispensable la presencia de GTP.

Los microtúbulos llevan a cabo sus funciones biológicas debido a que se mantienen en un equilibrio dinámico, es decir pueden polimerizarse o despolimerizarse dependiendo de las condiciones celulares como concentraciones elevadas de iones de calcio, el pH, la presencia de algunos compuestos orgánicos, e inclusive factores físicos tales como temperatura y presión. La inestabilidad dinámica de los microtúbulos está en función de cuatro factores: velocidad de crecimiento del microtúbulo, velocidad de acortamiento del microtúbulo, frecuencia de transición de un estado de crecimiento o pausa a un estado de acortamiento denominado catástrofe, finalmente, de la frecuencia de transición de un estado de acortamiento a un estado de crecimiento o pausa el cual se conoce como rescate (Figura 6).²⁸ Esta característica de crecimiento-acortamiento o estabilización de la longitud de los microtúbulos ha permitido el estudio *in vitro* de la polimerización de la tubulina, así como cada uno de los procesos requeridos para su ensamble. Uno de los métodos más utilizados para su estudio es una variante del propuesto por Shelanski *et al.*²⁹ que emplea tubulina de cerebro de bovino o porcino, una solución de GTP y los compuestos a ensayar en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO). La solución con la proteína, GTP y los compuestos a probar se incuban por 60 minutos a 37 °C para que se lleve a cabo la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina, midiendo la polimerización con relación a la densidad óptica observada, para lo cual se toman lecturas a 340 nm durante la incubación. En seguida, se aplica un estímulo despolimerizante, el cual puede estar dado por una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) o por una disminución de la temperatura de incubación (-20 °C) para finalmente, volver a incubar a 37 °C por treinta minutos más. Durante el desarrollo

de esta prueba se usan controles que permiten observar tanto el efecto estabilizador como inhibidor de la polimerización. Cuando las moléculas que se evalúan o los controles absorben a la misma longitud de onda en la que se realiza la prueba, no es posible observar de manera clara el efecto que pudiesen tener sobre la polimerización de los microtúbulos, por lo que el protocolo de la prueba puede ajustarse tomando lecturas a otra longitud de onda, usualmente a 450 nm.³⁰

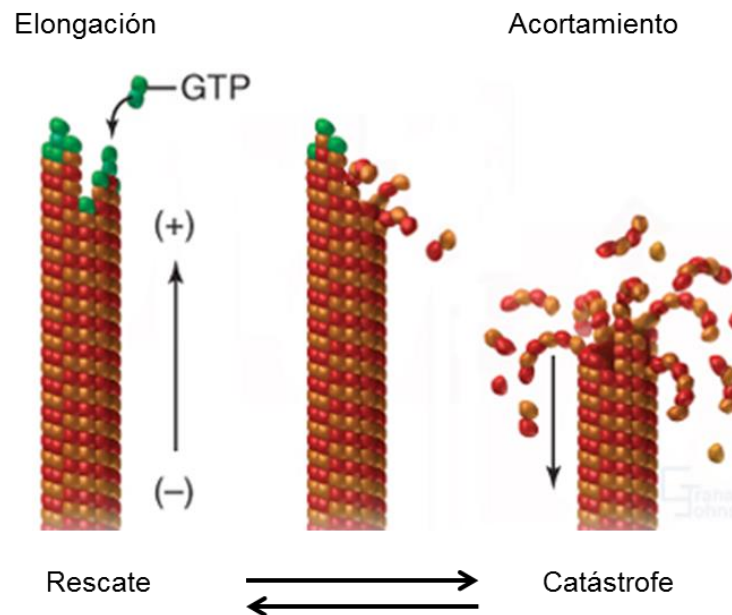


Figura 6. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Modificado de Pollard, T. D., Earnshaw, W. C. *Cell Biology*. Ed. Saunders-Elsevier, **2002**, 625-630.

1.6 Productos naturales que interactúan con el heterodímero α,β -tubulina.

Los productos naturales constituyen una vasta mayoría dentro de los agentes quimioterapéuticos comúnmente usados para el tratamiento de todos los tipos de cáncer. Estos fármacos intervienen en la proliferación y división celular a través de la interacción con proteínas. En el caso de la tubulina pueden actuar modificando su polimerización. Algunos ejemplos de ellos son los taxanos, los alcaloides de la vinca y la colchicina.³¹

Los compuestos anti-proliferativos que actúan sobre la tubulina se clasifican como ligandos activadores y desactivadores. Los ligandos activadores son aquellos que al unirse al heterodímero de tubulina favorecen su polimerización, con lo cual se ve exacerbado el ensamble de los microtúbulos; por otro lado, los ligandos desactivadores favorecen la despolimerización de los microtúbulos. Estos efectos se deben a que ambos tipos de ligandos se unen a la tubulina en un sitio específico, habiéndose descrito tres sitios principales de unión (Figura 7):

a) *Sitio de unión al paclitaxel*: los fármacos que se unen a este sitio son los taxanos (paclitaxel y docetaxel), y las epotilonas (ixabepilona, patupilona y discodermólido). Estos compuestos llevan a cabo el efecto estabilizador de los microtúbulos al unirse en el bolsillo hidrofóbico de la subunidad beta, entre el dominio intermedio y el dominio N-terminal, teniendo contacto también con el lazo M. Éste último es el encargado de fijar las interacciones laterales entre los protofilamentos, generando una conformación más estable de la estructura de β -tubulina-GTP.²⁷

b) *Sitio de los alcaloides de la vinca*: los compuestos que se unen a este sitio son los alcaloides tales como vinblastina (**6**), vincristina, vinorelbina, vindesina y vinflunina; las crioficinas y las dolastatinas (eribulina, espongistatinas, rhizoxina, maitansinoides y tasidotina)¹¹. Los compuestos se unen a la tubulina como una cuña entre dos dímeros, es decir, interaccionan con la subunidad alfa de uno y la subunidad beta de otro, lo que se traduce en la interferencia de la hidrólisis de GTP que evita los contactos que esta reacción requiere.²⁷

c) *Sitio de unión a la colchicina*: varios compuestos se unen en este sitio, por ejemplo las prodofilotoxinas, las combretastinas, el 2-metoxiestradiol, entre otros; sin embargo, el fármaco con mayor afinidad a él es la colchicina (**7**) y sus análogos, generando un efecto despolimerizante a altas concentraciones y un efecto estabilizador a bajas concentraciones. Este sitio está localizado en el centro de dímero de tubulina, en la interfase entre los monómeros de α -tubulina y β -tubulina.^{27,28}

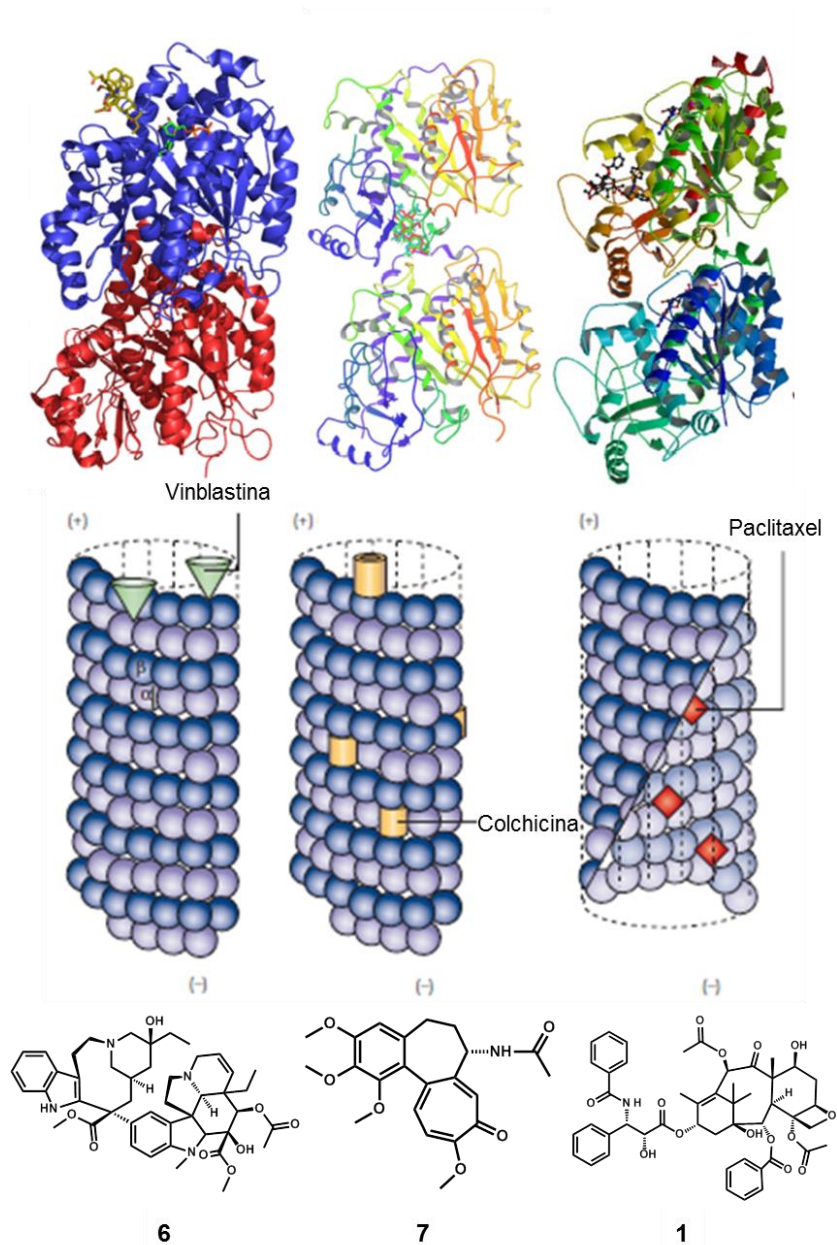


Figura 7. Sitios de unión de fármacos en el heterodímero de α,β -tubulina. (a) tomada de PDB bajo el código 1JFF. (b) tomada de PDB bajo el código 1Z2B. (c) Imagen modificada de Pradeep, K. N.; Biswa, P. C.; Surya, N. V.; Ritu, A.; Ramesh, C.; Srinivas, K.; Harish, C. J. *Rational design, synthesis and biological evaluations of amino-noscapine: a high affinity tubulin-binding noscapinoid*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, **2011**, 25, 443-454. Segunda sección de esquemas modificado de Jordan, M. A., Wilson, L. *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nature Reviews, **2004**, 4, 253-260.

La colchicina es un alcaloide lipofílico aislado de *Colchicum autumnale* y *Gloriosa superba*,³² usada en el tratamiento de la gota, la fiebre familiar del mediterráneo, la pericarditis y el síndrome de Behcet; además se une con una alta afinidad a la tubulina haciéndolo un candidato ideal para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, éste no es un fármaco altamente usado debido a que su ventana terapéutica es muy estrecha, registrándose efectos tóxicos a dosis superiores a >0.5 mg/kg de peso. Algunos de estos incluyen neutropenia, malestar gastrointestinal, afectaciones en la médula ósea y anemia.³² Cuando a una molécula se le modifica su estructura, ya sea agregando, quitando o cambiando los elementos que la conforman, su efecto farmacológico también cambia. En base a ello se ha buscado sintetizar análogos de la colchicina (**7**) que pudiesen tener un efecto tóxico menor.³⁴

1.7 Análisis de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*)

Actualmente la industria farmacéutica ha desarrollado nuevas herramientas computacionales para el diseño de nuevos fármacos que pudiesen ser candidatos en el tratamiento de diversas enfermedades de una forma rápida y con un costo menor.

El diseño de fármacos *in silico* ha ayudado en la toma de decisiones en diferentes etapas del proceso, tales como la identificación de las moléculas de interés terapéutico, la selección o diseño a partir de compuestos líder, así como sus modificaciones para obtener mejores afinidades, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.³⁵ Además, las herramientas computacionales permiten conocer el posible sitio de interacción de un compuesto con su diana farmacológica, ya sea un receptor de membrana, un canal iónico, una enzima o una proteína estructural.

Para realizar el análisis de reconocimiento molecular es indispensable conocer previamente la estructura tridimensional del blanco, la cual se puede elucidar por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear. La base de datos por excelencia de dichas estructuras es el *Protein Data Bank* (PDB).³⁶

Tanto los archivos de las proteínas como los de los candidatos a ligandos deben adecuarse antes de iniciar este tipo de estudios. En el caso de los posibles blancos farmacológicos, las adecuaciones más comunes son la adición de los átomos de hidrógeno, la remoción de las moléculas de agua que están presentes en la proteína, la eliminación de ligandos presentes durante la determinación de la estructura tridimensional de la macromolécula, y en caso de ser necesario, el modelado de las regiones que no pudieron ser determinadas experimentalmente o resultaron ambiguas. Para el ligando es necesario contar con un criterio establecido para distinguir cuál de todas las conformaciones posibles resulta ser la más adecuada, es decir, la que adoptaría el ligando si tuviera acceso al sitio de unión. Generalmente, este criterio se le conoce como puntaje el cual está dado en función de la energía de afinidad (kcal/mol) y la geometría del ligando en el sitio de unión.³⁷

2. JUSTIFICACIÓN.

Teniendo como perspectiva la importancia que adquieren los microtúbulos en el desarrollo del cáncer y el papel de la tubulina como blanco farmacológico, se busca sintetizar análogos de la parvifolina (**5**) que, debido a la similitud estructural con la colchicina (**7**), pudiesen interactuar con la tubulina potenciando su actividad anti-tumoral con una menor toxicidad.

3. HIPÓTESIS.

La parvifolina (**5**) y sus derivados sintéticos (**8-13**), al presentar una estructura con cierta semejanza a la colchicina, se unirán a la tubulina inhibiendo su polimerización en diferentes grados dependiendo de la estructura química de cada compuesto.

4. OBJETIVOS.

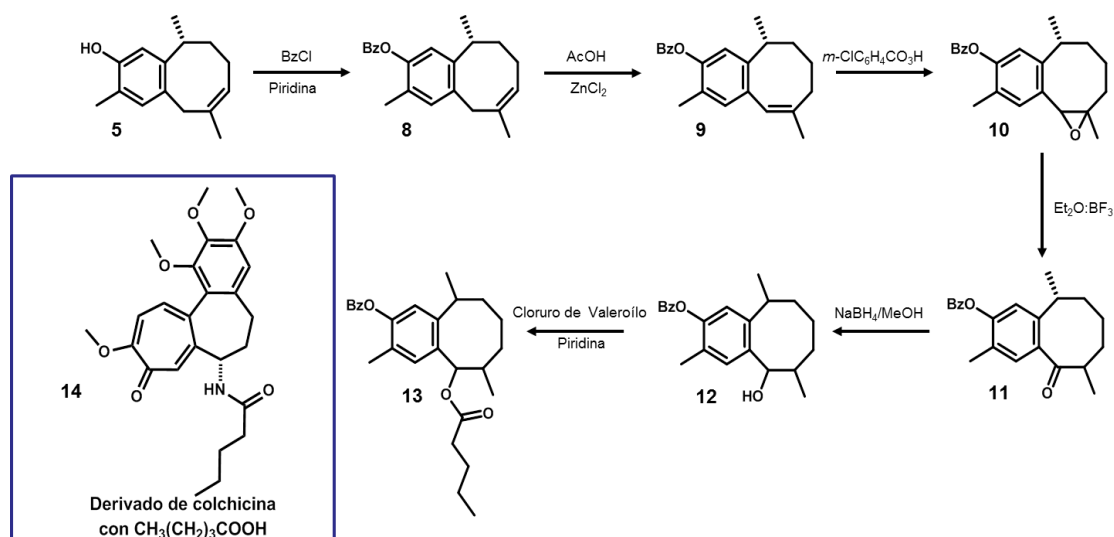
Los objetivos del presente trabajo fueron:

4.1 Objetivo general.

Obtener nuevos derivados de la parvifolina (**5**) funcionalizados con ésteres aromáticos y alifáticos para evaluar su interacción con el heterodímero de α,β -tubulina.

4.2 Objetivos específicos.

- A partir del producto natural **5**, efectuar una serie de reacciones para obtener los derivados funcionalizados **8-13**.
- Evaluar el efecto en la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina de la parvifolina (**5**) y sus derivados **8-13**.
- Realizar cálculos de reconocimiento proteína-ligando (*docking*) entre el heterodímero de α,β -tubulina y los compuestos que presenten interacción con la proteína.



Esquema 1. Secuencia de reacciones para obtener los nuevos derivados de la parvifolina a partir del producto natural **5**. Modificado de: Joseph-Nathan, P.; Hernández-Medel, M. R.; Martínez, E.; Rojas-Gardida, M.; Cerda, C. M. *Conformation and absolute configuration of naturally occurring parvifoline and several synthetic derivatives*. Journal of Natural Products. **1988**, 51, 675-689.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Obtención del producto natural y sus derivados.

Para obtener el producto natural **5**, la raíz molida de *Acourtia humboldtii* se maceró durante cinco días a temperatura ambiente, usando hexano como disolvente. La planta se colectó en octubre de 2013 en el km 63 de la carretera Morelia-Zacapu. En el extracto se observó la formación de cristales en forma de agujas, los cuales una vez purificados se analizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H . El espectro se comparó con los reportes bibliográficos,³⁸ comprobando así la obtención del producto natural parvifolina (**5**) (Figura 1A, apéndice), en la región de los hidrógenos aromáticos se encontraron las señales de H-4 y H-1 en 6.87 ppm y 6.58 ppm, respectivamente. En 5.35 ppm se observó una señal característica para un protón vinílico H-12, mientras que en 4.98 ppm se encontró una señal simple ancha correspondiente al protón del grupo hidroxilo de C-6. Para los protones α y β de C-14 se observó un sistema AB, con señales en 3.52 ppm y 3.06 ppm; en 3.14 ppm se observó una señal múltiple atribuida a H-8. Los CH_3 -7, CH_3 -15 y CH_3 -9, se encontraron a campos alto en 2.18 ppm, 1.74 ppm y 1.28 ppm. En el caso del metilo CH_2 -10 se observaron dos señales múltiples en 1.79 ppm, la correspondiente al protón β , y en 1.07 ppm la del protón α . Finalmente para el CH_2 -11 se observó una señal múltiple en 1.06 ppm que integró para ambos protones.

En el Esquema 1, *vide supra*, se muestra la secuencia de reacciones que se siguió para obtener cada uno de los derivados. El derivado benzoilado **8** se preparó al tratar el producto natural **5** con cloruro de benzoílo y piridina de acuerdo a las condiciones reportadas por Joseph-Nathan *et. al.*³⁸ Al purificar este derivado, se consiguieron cristales blancos en forma de prismas, cuyo análisis por RMN de ^1H comprobó la obtención del compuesto **8**. La asignación del espectro se hizo de acuerdo a la bibliografía (Figura 2A, apéndice).³⁸ Al comparar el espectro del derivado **8** con el de la materia prima **5**, se observó a campos bajos un sistema de

señales nuevo, el cual corresponde a los protones del benzoato, de tal modo que en 8.23 ppm se observó la señal doble de dobles de los hidrógenos 2' y 6', en 7.63 ppm se reconoció la señal atribuida al protón de la posición 4'. Por último, la señal en 7.51 ppm se asignó a los hidrógenos 3' y 5'; el resto las señales que caracterizan el esqueleto del sesquiterpeno se mantuvo prácticamente sin cambios.

A partir del derivado **8**, se generó el isómero **9** (Figura 3A, apéndice), usando como catalizador ZnCl₂ en un medio ácido.³⁸ Para comprobar que la reacción se había llevado a cabo, se comparó el espectro de RMN de ¹H del derivado **9** con respecto al de **8**, observándose que las señales correspondientes al metileno 14 que correspondía a un sistema AB en 3.59 ppm y 3.12 ppm ya no se encontraban, ya que al isomerizarse, dicho metileno se transformó en un metino cuya señal en 6.20 ppm se describió como simple; un cambio semejante se observa en la señal del C-12, la cual cambia de una señal triple en 5.39 ppm de un metino en el derivado **8**, a un sistema doble de doble de dobles de un metileno en 2.05 ppm y 2.15 ppm para el derivado **9**.

El compuesto **9** se disolvió en CH₂Cl₂ y se trató con ácido *meta*-cloroperbenzoico a reflujo durante dos horas,³⁸ generando como producto de reacción dos sustancias. La primera de ellas correspondió al derivado **10** ya descrito en la literatura³⁸ y cuya señal característica en el espectro de RMN de ¹H fue la del CH-14 que pasó de 6.20 ppm hacia campos más altos en 3.81 ppm (Figura 4A, apéndice).³⁸ Tras el análisis por RMN de una y dos dimensiones, el segundo compuesto fue caracterizado como el benzoato de (4*R*)-4,7,9a-trimetil-1a,2,3,4,9,9a-hexahidrobenczo[4,5]cicloocta[1,2-*b*]oxiren-6-ilo (**15**) (Figura 5A y 6A, apéndice) cuya estructura se pudo corroborar mediante difracción por rayos X (Figura 8). Este nuevo derivado de la parvifolina (**5**), al tener el epóxido en una posición distinta, abre la posibilidad para sintetizar análogos a los planteados en el presente trabajo que pudiesen interactuar con los microtúbulos de otra forma a los ya sintetizados, ya que la distribución espacial de los átomos condiciona el tipo de interacciones que alcanzasen a tener con la tubulina.

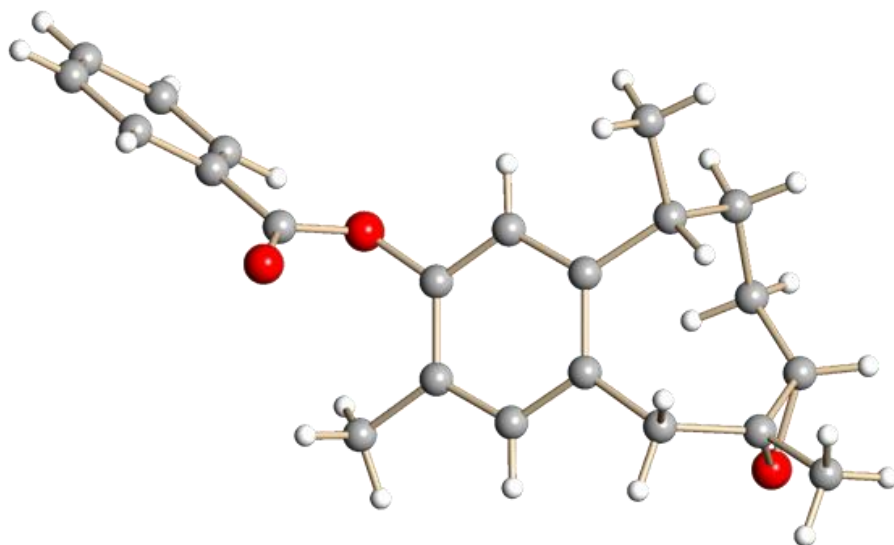


Figura 8. Estructura obtenida a partir de difracción de rayos X del derivado **15**. En rojo se muestran los átomos de oxígeno de la molécula.

El siguiente paso en la síntesis fue inducir la transposición del epóxido del derivado **10** a una cetona. Usando trifluoruro de boro eterato se logró generar este cambio obteniéndose el derivado **11**,³⁸ de tal manera que la señal de CH-14 del derivado **10** observada en 3.81 ppm en el espectro de RMN de ^1H desapareció debido a que en **11** corresponde a un carbono de carbonilo. De manera contraria, el carbono de la posición 13 que no tenía hidrógenos, ahora es un metino cuya señal se identificó en 2.90 ppm en el espectro de RMN de ^1H . Al llevar a cabo esta reacción se generaron además varios productos, teniendo entre los compuestos mayoritarios dos nuevas moléculas con anillaciones novedosas, las cuales fueron elucidadas a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos. La primera de ellas, resultó menos polar que el derivado **11**, correspondiendo al benzoato de 10-fluoro-2,5,8-trimetil-6,7,8,9-tetrahidro-5,8-metano-5*H*-benzociclohept-3-ilo (**16**) (Figuras 9A y 10A, apéndice). Cuando una molécula posee un átomo de flúor ocasiona que los carbonos cercanos a él aparezcan como señales dobles en el espectro de RMN de ^{13}C . Además se logró obtener un cristal idóneo para difractar por medio de rayos X (Figura 9). El segundo compuesto aislado fue el benzoato de

2,5,9-trimetil-6,7,8,9-tetrahidro-5*H*-5,9-(epoximetano)benzo[7]anulen-3-ilo (17) (Figuras 11A y 12A, apéndice), el cual incorporó un átomo de oxígeno (Figura 10); ambas estructuras guardan una similitud tanto en su distribución espacial como en la conexión entre sus átomos, por lo que podría inferirse que son resultado de un mecanismo concertado.

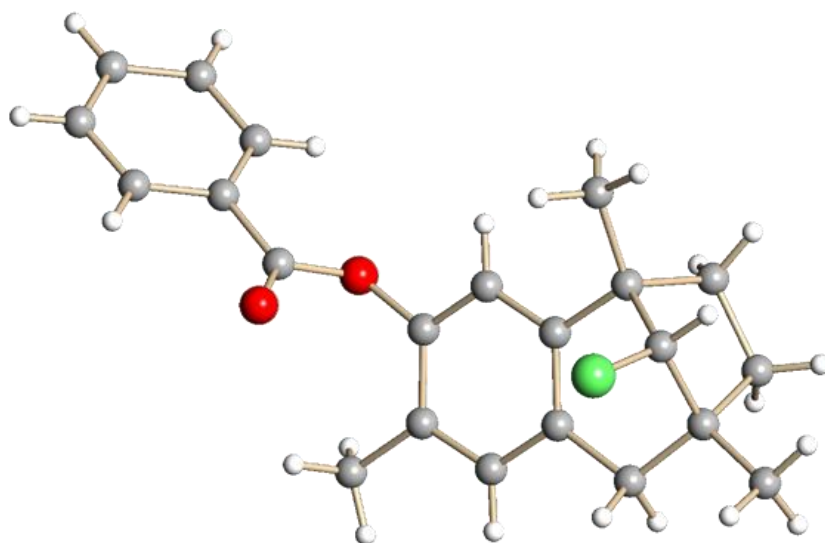


Figura 9. Estructura obtenida a partir de difracción de rayos X del derivado **16**. En rojo se identifican los átomos de oxígeno y en verde el átomo de flúor presentes en el compuesto.

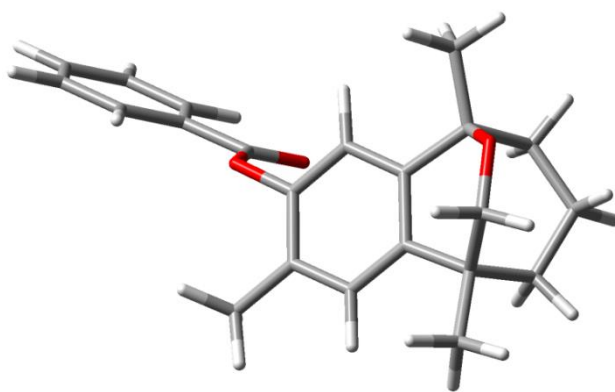


Figura 10. Modelo molecular del derivado **17** obtenido por DFT a nivel B3LYP/DGDZVP.

Al reducir el compuesto **11** usando borohidruro de sodio (NaBH_4), se preparó el derivado **12** el cual posee un grupo hidroxilo en la posición 14. Al haber partido de un carbono con hibridación sp^2 , la orientación del grupo hidroxilo que se genera puede quedar hacia adelante o hacia atrás del plano de la molécula. En este caso ocurrió así obteniéndose una mezcla de isómeros, la cual resultó muy compleja de purificar por métodos convencionales. El producto de reacción mostró un gran dinamismo conformacional, identificando en el espectro de RMN de ^1H las señales correspondientes CH-14 base del grupo hidroxilo de ambos isómeros. La primera de ellas en 4.75 ppm se observó más definida que la señal en 3.95 ppm, lo que podría sugerir que uno de los isómeros tiene una movilidad mayor que el otro (Figura 13A, apéndice). Para confirmar la presencia del grupo funcional hidroxilo en el derivado **12** y así pasar al último paso en la línea de síntesis, se realizó el estudio espectroscópico de infrarrojo (IR), a través del cual se observó en 3602 cm^{-1} la banda característica para el $-\text{OH}$, así como en la banda asociada a este grupo funcional en 3373 cm^{-1} (Figura 14A, apéndice).

Finalmente, el derivado **12** se disolvió en piridina y se esterificó usando cloruro de valeroílo. Tomando en cuenta que se partió de una mezcla de isómeros, resultó lógico que se aislaran dos derivados **13-A** y **13-B**, cuyo éster valérico se orientó hacia adelante o hacia atrás; también uno de estos derivados mostró una movilidad mayor que el otro, lo cual se observó en el espectro de RMN de ^1H del derivado **13-B**, específicamente en las señales anchas en 5.82 ppm y 3.78 ppm atribuidas a los CH-14 y CH-8, respectivamente (Figuras 15A y 16A, apéndice). El derivado minoritario **13-A** no se obtuvo en una proporción adecuada para completar el análisis de RMN.

5.2 Determinación de la actividad inhibitoria de la polimerización de microtúbulos *in vitro*.

La influencia del producto natural **5**, así como la de cada uno de los derivados obtenidos a partir la ruta de síntesis propuesta, se evaluó sobre la inestabilidad dinámica de los microtúbulos formados por los heterodímeros de α,β -tubulina.

Para la determinación *in vitro* se utilizaron: la colchicina (**7**) como control positivo de la inhibición de la polimerización, el dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo de la tubulina con el vehículo y el paclitaxel (**1**) como control positivo de la estabilización de la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina. Las concentraciones finales utilizadas para esta prueba fueron de 10 μM , 50 μM , y 100 μM para el producto natural **5** y sus derivados sintéticos, 10 μM para el paclitaxel (**1**) y 100 μM para la colchicina (**7**). El ensayo consistió en medir la absorbancia a una temperatura controlada de 37 °C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se aplicó un estímulo despolimerizante el cual consistió en un cambio brusco de temperatura a -20 °C por 15 min, para finalmente volver a incubar a 37 °C durante 30 min más; este experimento suele llevarse a cabo a una longitud de onda de 340 nm, sin embargo, ya que la colchicina (**7**) tiene uno de sus picos de absorbancia máxima en 350 nm, se cambió el protocolo realizando las lecturas a la longitud de onda a 450 nm.³⁰

En la figura 11 se presenta el comportamiento que tuvo la parvifolina (**5**) sobre la polimerización de los microtúbulos. Si bien este compuesto no alcanzó la afinidad de la inhibición que mostró el control de colchicina, sí reveló resultados interesantes ya que al aumentar la concentración el efecto inhibitor aumentó de manera proporcional. Es así que a 100 μM se logró inhibir la polimerización de los heterodímeros aproximadamente a la mitad con respecto al control de DMSO. Además, este efecto inhibitor se mantiene incluso después del estímulo despolimerizante, ya que la absorbancia registrada para cada una de las concentraciones ensayadas (10, 50 y 100 μM) no alcanza las lecturas observadas de la primera hora del experimento.

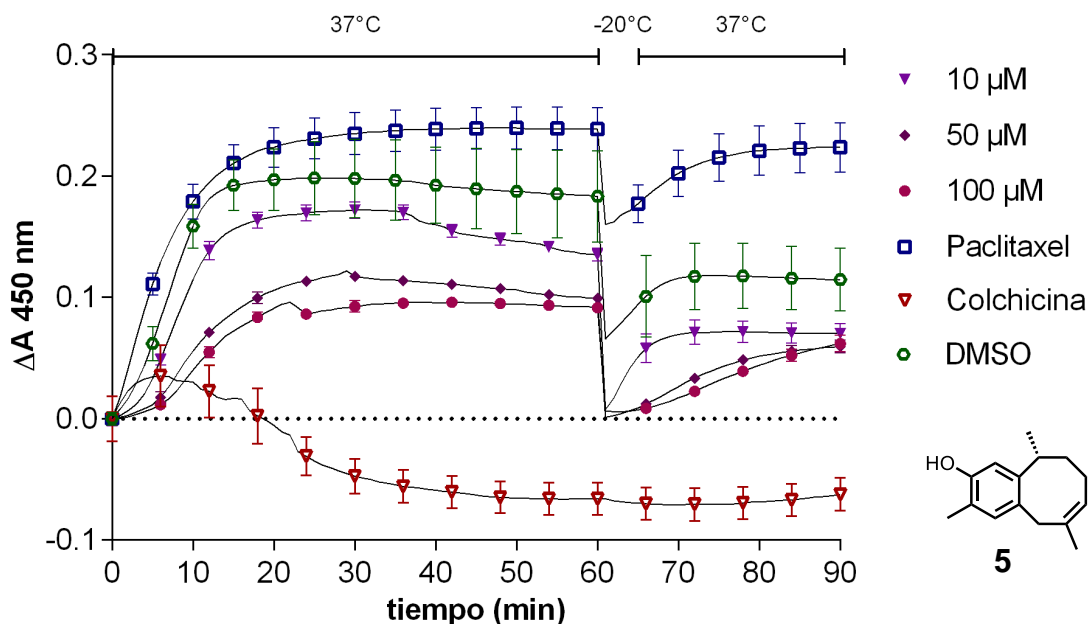


Figura 11. Efecto de la parvifolina (**5**) en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

Los derivados sintéticos **8** y **9** mostraron un efecto inhibitor de la polimerización de la tubulina al igual que el producto natural, sin embargo al ser más apolares que **5** tuvieron problemas de solubilidad a una concentración de 100 μM , siendo a 50 μM en donde mostraron un mejor efecto. Pese a que la diferencia estructural entre uno y otro solo es la posición de un doble enlace, se observó que el benzoato de isoparvifolina (**9**) ejerce un mayor efecto inhibitor sobre la polimerización de los heterodímeros en comparación de su isómero **8** y el producto natural **5**. Además, dicha inhibición se mantiene después de haber aplicado el estímulo despolimerizante (Figura 12).

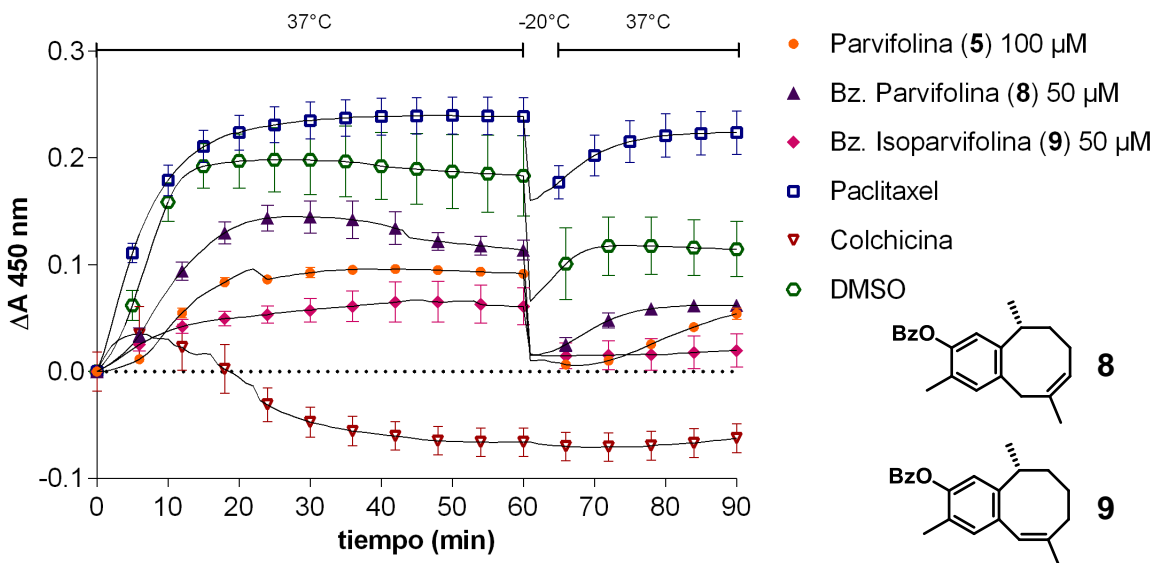


Figura 12. Comparación del efecto de los derivados **8** y **9**, con respecto a la parvifolina (**5**) en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

También se evaluó el efecto de los epóxidos **10** y **15** en la polimerización de la tubulina. En el caso del derivado **10**, se observó un efecto inhibitor de la polimerización a una concentración de 10 μM . Sin embargo, a 50 μM y 100 μM este efecto se vio disminuido, lo que podría explicarse de dos maneras. La primera de ellas hace referencia a problemas de solubilidad, ya que al aumentar la cantidad del derivado **10** en la solución, el sistema se satura y el compuesto forma “películas” insolubles en el medio mayormente acuoso. La segunda hipótesis parte del hecho de que la colchicina (**7**) tiene un efecto dual, es decir actúa como inhibidor y activador de la polimerización de la tubulina de acuerdo a la concentración en la que se evalúa, de tal manera que debido a la semejanza estructural que guarda **7** con los derivados de parvifolina, en este caso el derivado **10**, cabría la posibilidad de que presentase un efecto semejante dependiente de la concentración (Figura 13).²⁷ Por su parte el epóxido **15** no resultó un buen inhibidor de la polimerización ya que en ninguna de las tres concentraciones evaluadas se observó un efecto importante, inclusive los valores de absorbancia

fueron semejantes al control de polimerización de DMSO y lejanos a los observados para la parvifolina (**5**) a 100 μM o para el derivado **10** (Figura 14).

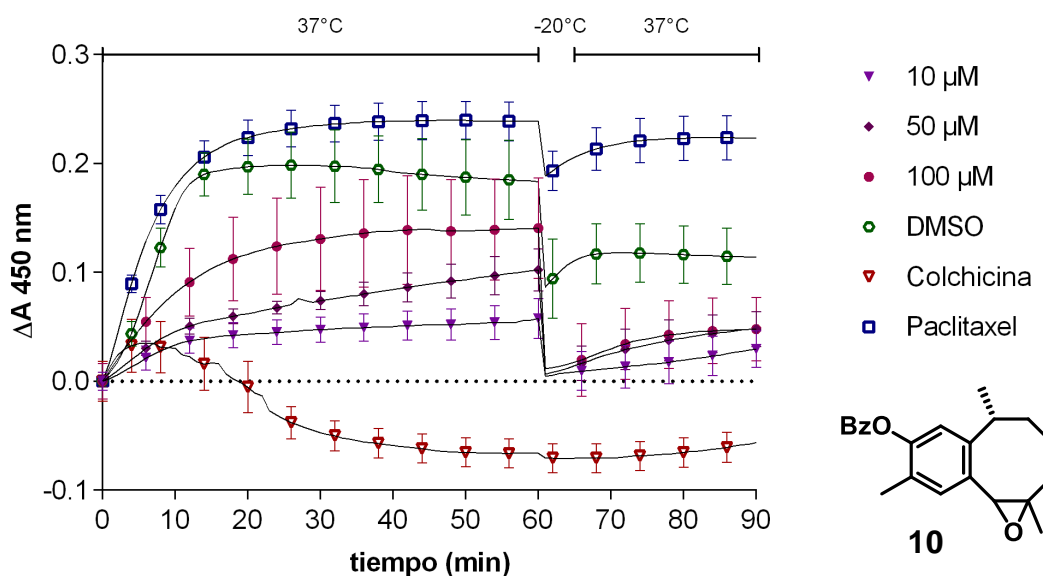


Figura 13. Efecto de la derivado epoxidado (**10**) en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

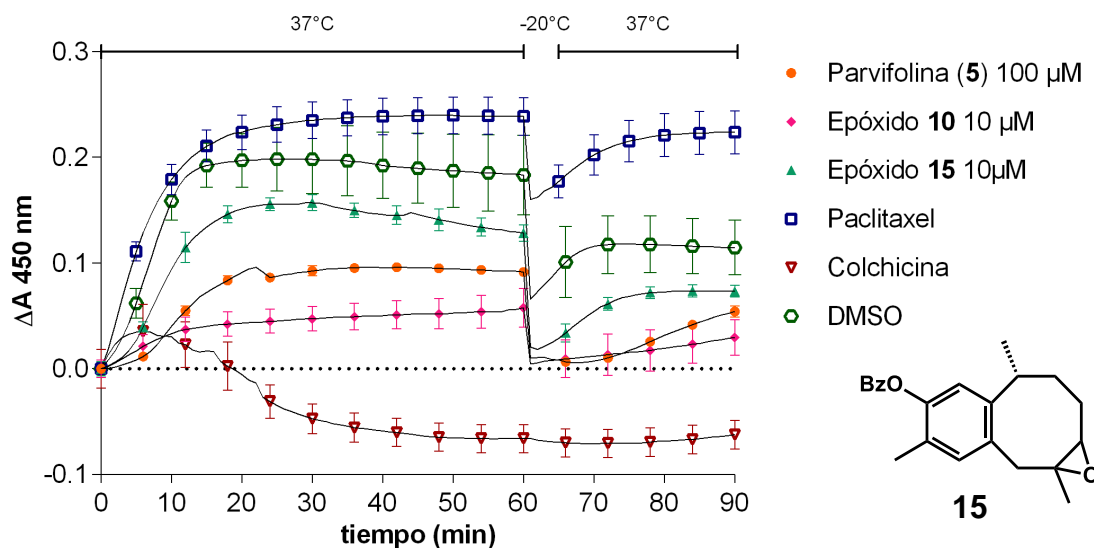


Figura 14. Comparación del efecto de los derivados **10** y **15**, con respecto al de la parvifolina (**5**), en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

En el análisis del derivado **11** a las concentraciones de 10, 50 y 100 μM se inhibió la polimerización aproximadamente a la mitad con respecto al control de DMSO. Este comportamiento fue muy parecido entre ellas ya que no hubo un cambio significativo, sin embargo se puede observar que el efecto aumenta ligeramente en la curva de 50 μM con respecto a la de 10 μM , situación que no se mantiene en la línea correspondiente a 100 μM , lo que podría explicarse por medio de las dos ideas explicadas anteriormente con respecto a la solubilidad de los compuestos y la naturaleza dual que pudiesen presentar por la semejanza estructural con la colchicina (**7**) (Figura 15).

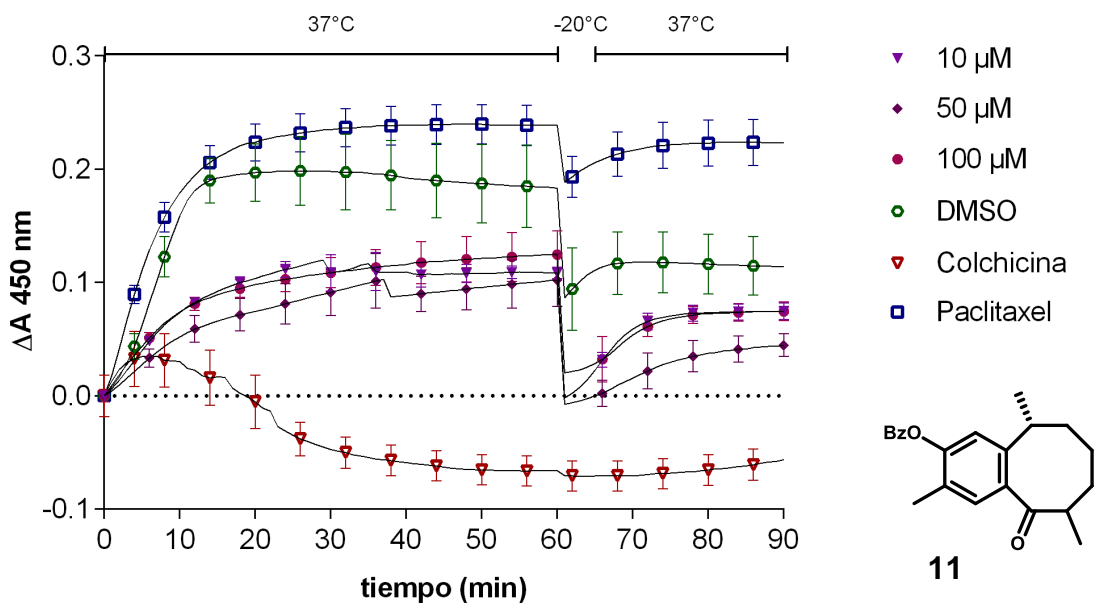


Figura 15. Efecto del derivado **11** en la polimerización de α, β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

En un experimento adicional se probó la influencia de la mezcla de alcoholes epiméricos **12** frente a la polimerización de los heterodímeros de α, β -tubulina, mostrando a 10 μM un efecto inhibitorio semejante al del producto natural **5** pero

una concentración de 100 μM (Figura 16), mientras que la parvifolina (**5**) aumentó su efecto al incrementar la concentración, la mezcla de los isómeros **12** no lo hizo, ya que no se observó un cambio significativo con respecto a la solución más diluida. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de la parvifolina (**5**) en la polimerización de la tubulina podría deberse a la ubicación del hidroxilo, ya que en la posición 6 tiene menor impedimento estérico que cuando se encuentra en la posición 14 como es el caso del derivado **12**.

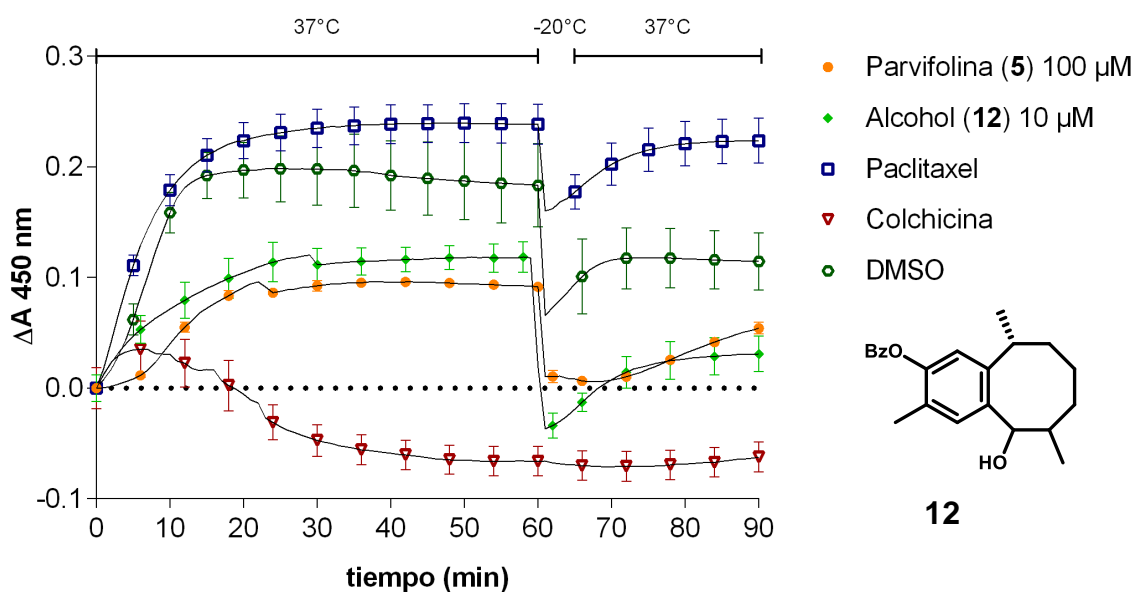


Figura 16. Comparación del efecto del derivado **12**, con respecto a la parvifolina (**5**) en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

En las figuras 17 y 18 se muestra el comportamiento observado para los derivados esterificados con el ácido valérico **13-A** y **13-B** respectivamente, los cuales resultaron buenos inhibidores de la polimerización de la tubulina a una concentración de 10 μM , mientras que a 50 μM y 100 μM el efecto cambió mostrando favorecer la polimerización de los microtúbulos. Particularmente el derivado **13-B** a una concentración de 100 μM indujo una polimerización mayor que el control de paclitaxel (**1**). Después del estímulo despolimerizante, la

interacción de ambos derivados con la parvifolina se mantiene aunque no alcanzó los niveles registrados durante la primera hora del ensayo. Este resultado podría deberse a un mecanismo de acción dual de los compuestos frente a la polimerización de tubulina. Sin embargo, para descartar que el fenómeno observado se deba a problemas de solubilidad, podría analizarse el coeficiente de partición de cada uno de los derivados.

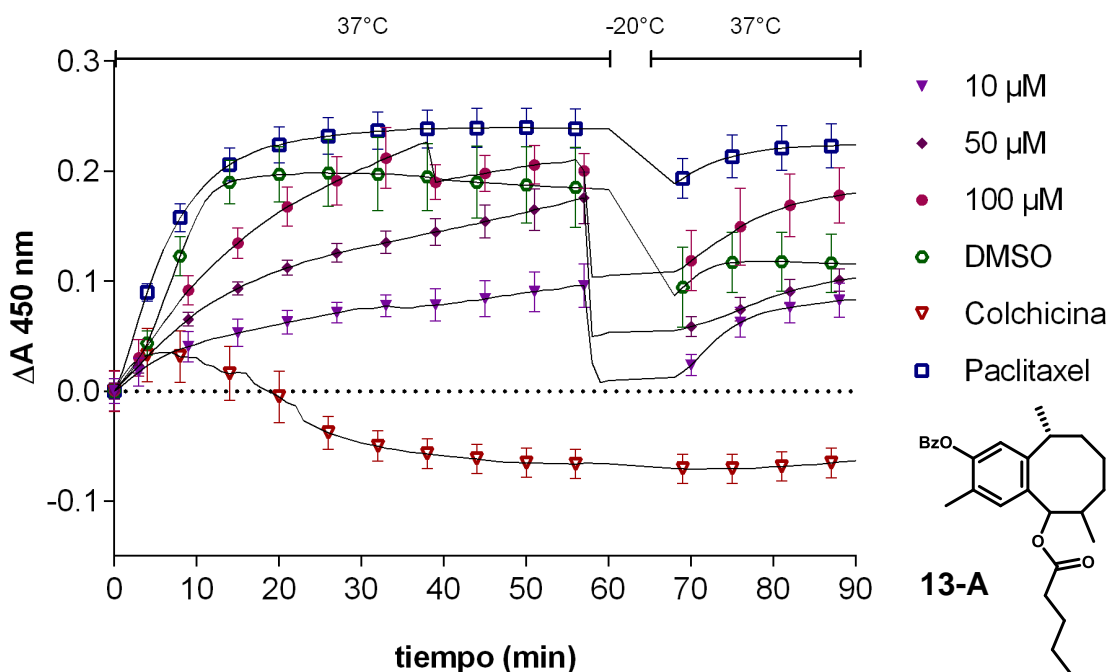


Figura 17. Efecto de la derivado **13-A** en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

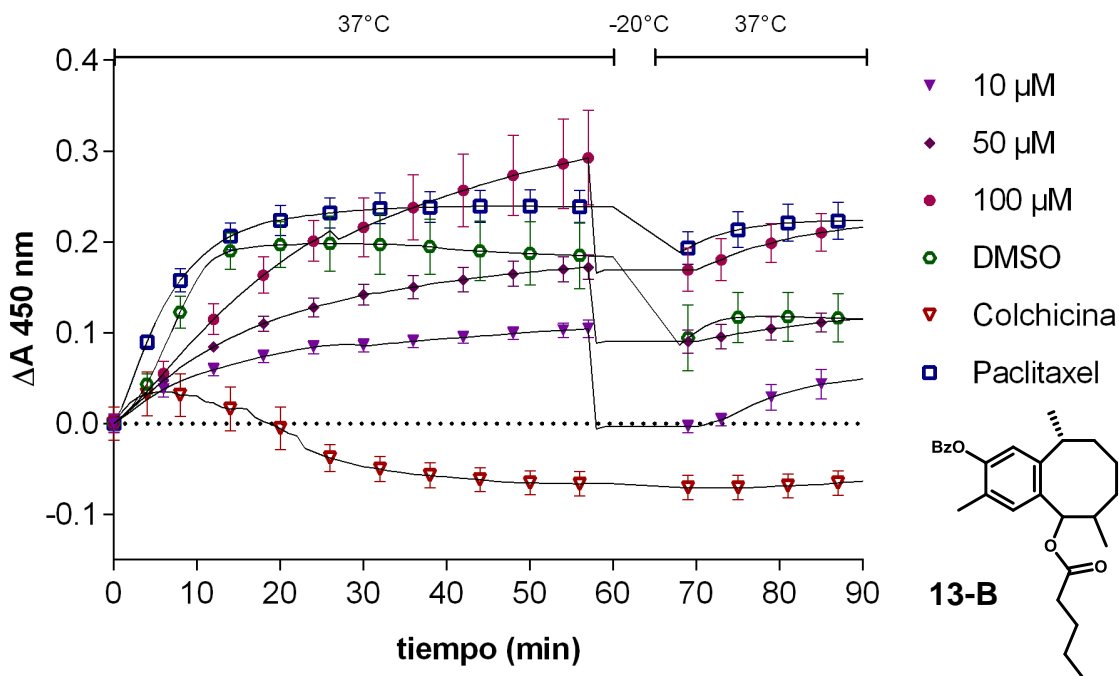


Figura 18. Efecto de la derivado **13-B** en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

Si bien el esqueleto hidrocarbonado de los derivados **16** y **17** no cumple con el requisito estructural de benzocicloocteno, resultó interesante evaluar su actividad ya que se obtuvieron a partir de un compuesto que sí entra en esta clasificación. Además, en el caso particular del derivado **16**, la incorporación de un átomo de flúor resulta farmacológicamente interesante ya que se ha visto que la presencia de este átomo suele producir un incremento en la actividad o en la eficacia terapéutica de los compuestos que lo poseen.³⁹ El derivado **16** al tener un sistema de anillación distinto mostró una interacción diferente en la polimerización de los microtúbulos a los revisados con anterioridad, ya que favoreció polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina. A una concentración de 100 μM , la respuesta observada fue semejante a la del control de paclitaxel (**1**). Sin embargo, después del estímulo despolimerizante no se mantuvo el efecto estabilizador a ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 19).

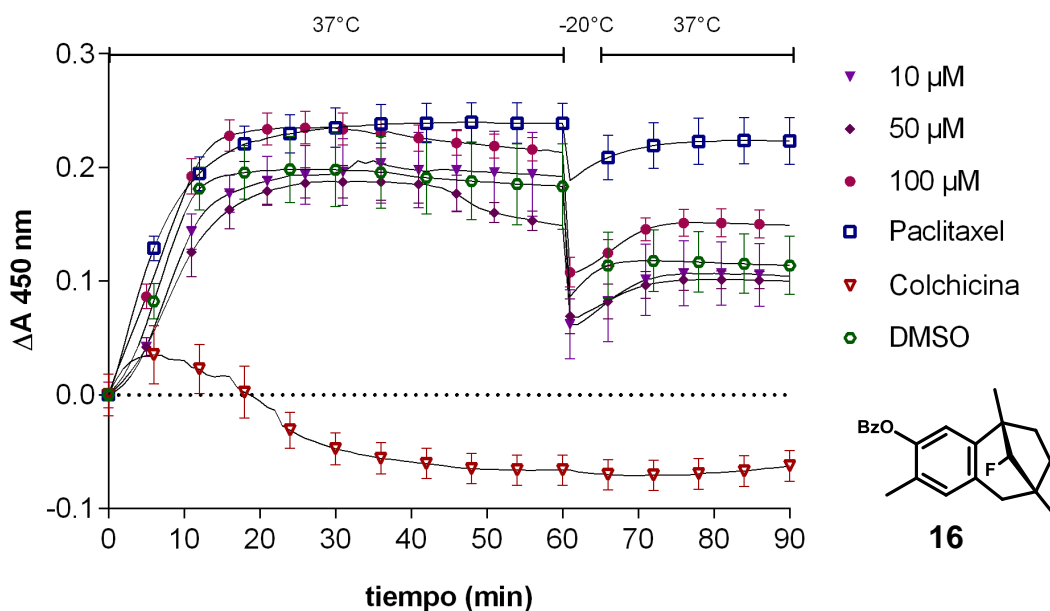


Figura 19. Efecto del derivado **16** en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

El comportamiento que mostró el derivado **17** fue semejante al de los derivados de la parvifolina **8-13**, ya que tuvo un efecto inhibitorio a la concentración de 10 y 50 μM , mientras que a 100 μM se vio favorecida la polimerización de los heterodímeros de tubulina (Figura 20). Lo que sugiere que el efecto inhibitorio está ligado a la presencia de los átomos de oxígeno en el ciclo unido directamente al anillo bencénico independientemente de la funcionalización de la que forma parte, ya que se observaron comportamientos semejantes cuando el oxígeno estaba formando parte de una cetona, un hidroxilo, un éster o un éter.

Para hacer más equiparables los resultados de los derivados sintéticos **8-13** con los obtenidos para el producto natural **5**, se podría hidrolizar el grupo benzoato, con lo cual se aumentaría la polaridad de los compuestos sintéticos y se dejaría libre el hidroxilo de la posición 6 favoreciendo así, la interacción del ligando con la proteína y por tanto se modificaría efecto inhibidor que se observó.

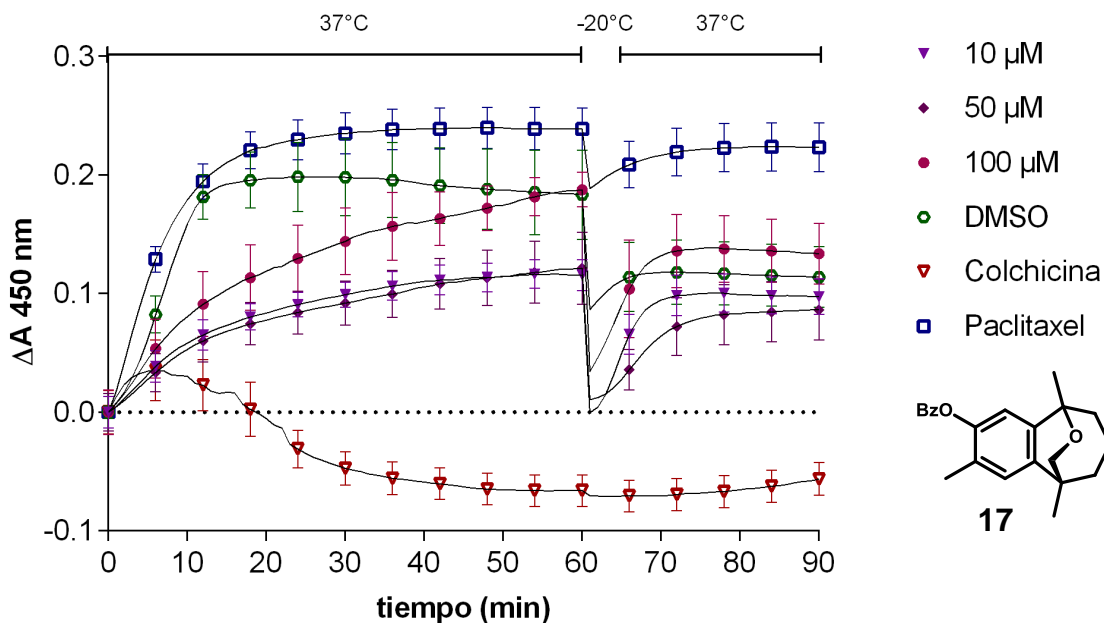


Figura 20. Efecto de la derivado **17** en la polimerización de α,β -tubulina y sobre la despolimerización de microtúbulos inducida por la disminución de la temperatura, $n = 3$.

5.3 Estudio de reconocimiento molecular *in silico*.

Una de las herramientas más útiles para comprender las interacciones entre las proteínas y sus ligandos es el análisis de reconocimiento molecular. Esta evaluación permite conocer el sitio donde se lleva a cabo la unión de un compuesto, así como el tipo de interacciones responsables del efecto observado.

Debido a lo anterior, en el presente proyecto se llevó a cabo la exploración de los posibles sitios de interacción entre los compuesto que mostraron un comportamiento interesante en la prueba de polimerización de tubulina *in vitro*. El sitio de unión sobre el cual se puso énfasis al momento de buscar la interacción de los compuestos con la tubulina fue el sitio de unión de la colchicina, ya que los derivados de benzocicloocteno mostraron una actividad inhibitoria.

Para realizar el ensayo *in silico*, los compuestos se modelaron y se efectuó una búsqueda conformacional de cada uno bajo un protocolo Monte Carlo con un

campo de fuerza mecánica molecular (MMFF) en el programa Spartan'04, obteniéndose así la estructura con la mínima energía global de cada molécula. El mínimo global se sometió a una optimización de la geometría empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) a nivel B3LYP/DGDZVP en el programa Gaussian 03⁴⁰ para obtener un modelo más preciso de los compuestos que se utilizaron como ligandos en el programa de AutoDock Tools. La estructura de la proteína, así como la de la colchicina se obtuvieron de archivo cristalográfico del *RCSB Protein Data Bank* bajo los códigos, 1JFF y 1Z2B³⁶ y se procesaron con el programa AutoDock Tools. Para la realización del estudio de *docking* se empleó el programa AutoDock versión 4.2.6, se llevó a cabo un *docking* ciego con el fin de buscar interacciones dentro de toda la proteína con una malla de búsqueda de 99.572 Å en el eje x, 59.422 Å en el eje y y 62.634 Å en el eje z.

Partiendo de que el efecto que presentaron los compuestos fue el de inhibir la polimerización de la tubulina, los resultados de *docking* de los compuestos **5**, **9**, **10**, **12** y **13** se compararon con el que presentó la colchicina (**7**). En la figura 21 se muestra el sitio de unión de mayor afinidad de este agente con una energía de docking (E_{dock}) igual a -7.62 kcal/mol; este análisis se hizo tomando la estructura de la colchicina co-cristalizada a la subunidad alfa de la tubulina bajo el código 1Z2B.³⁵

La parvifolina (**5**), así como sus derivados sintéticos, se evaluaron con el heterodímero de la tubulina en un *docking* ciego para evaluar el sitio de interacción de éstos en la estructura completa de la proteína. Todos los compuestos mostraron tener una mayor interacción en el bolsillo formado por los *turn* 12, 13, 15 y 16, y los *coil* 26, 31 y 32, los cuales corresponden con el sitio de unión a colchicina en la subunidad alfa de la tubulina. En la Tabla 2 se presentan las energías de *docking* (E_{dock}) que presentaron los compuestos **5**, **9**, **10**, **12** y **13** en *docking* ciego.

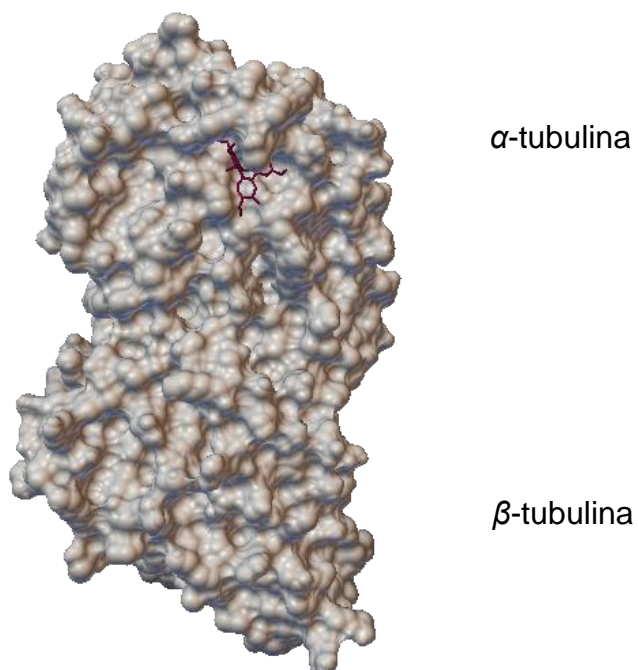


Figura 21. Modo de unión de mayor afinidad de la colchicina (**7**) en el heterodímero de α,β -tubulina, obtenido por *docking* ciego, $E_{dock} = -7.62$ kcal/mol.

Tabla 2. Energías de *docking* la parvifolina (**5**) y sus derivados sintéticos.

Compuesto	E_{dock} (kcal/mol)
7	-7.62
5	-6.54
9	-8.90
10	-7.79
12	-7.01
13	-7.84

Con respecto a la disposición espacial con la que interactuaron los compuestos evaluados en comparación con la colchicina (**7**), se observó que el producto natural **5** generó una mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas al unirse con la

misma profundidad en el bolsillo correspondiente como lo hace **7** (Figura 22a). El benzoato de parvifolina (**9**) por su parte logró una mejor afinidad de unión que la de colchicina (**7**), lo cual se debe a que logró entrar más profundamente, formando más interacciones polares (Figura 22b). Los derivados sintéticos **10** (Figura 22c), **12** (Figura 22d) y **13** (Figura 22e) fueron los que obtuvieron un puntaje de *docking* semejantes al de **7**, lo cual se corroboró al sobreponer cada una de las estructuras logrando cubrir con mayor similitud los puntos de interacción.

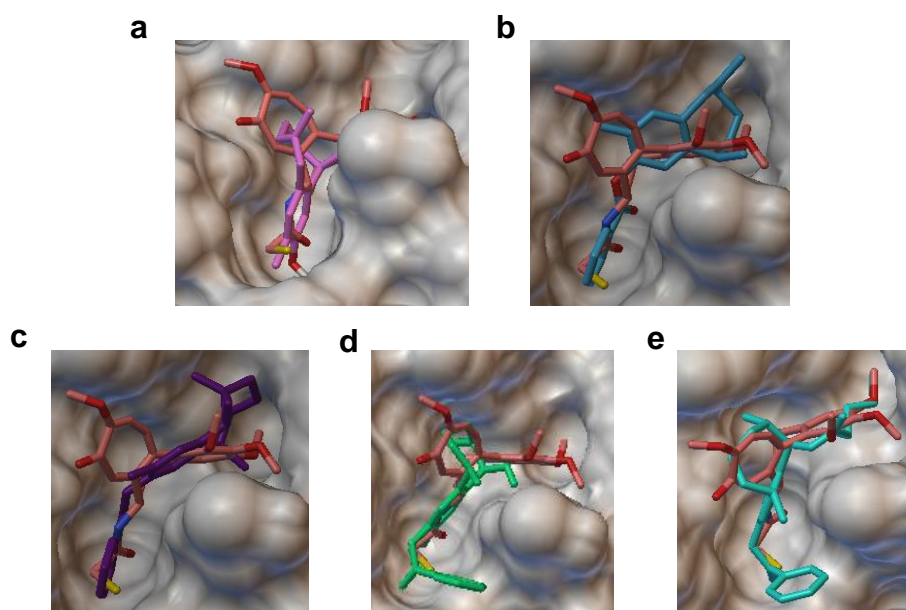


Figura 22. Comparación de las interacciones de la parvifolina y sus derivados con la colchicina (**7**, en café) en el sitio activo de ésta en la subunidad alfa. (a) Interacción de la parvifolina (**5**, en magenta). (b) Interacción de **9** (en azul). (c) Interacción de **10** (en violeta). (d) Interacción de **12** (en verde). (e) Interacción de **13** (en azul-verde).

Dado que la parvifolina (**5**) en la prueba de polimerización de tubulina *in vitro* mostró un efecto inhibitorio que aumentaba de manera directamente proporcional a la concentración, se decidió hacer un análisis más detallado de sus interacciones en el sitio de unión a colchicina (Figura 23); la mayoría de ellas

fueron de tipo hidrofóbico con los residuos de los aminoácidos Phe 296, Pro 307, Lys 311, Tyr 312, Thr 340, Ile 341. Cabe destacar la presencia de dos puentes de hidrógeno, uno con el oxígeno del hidroxilo de la posición 6 y el hidrógeno del grupo amino de la Tyr 312, mientras el segundo está entre el hidrógeno del hidroxilo y el oxígeno de la Gln 342.

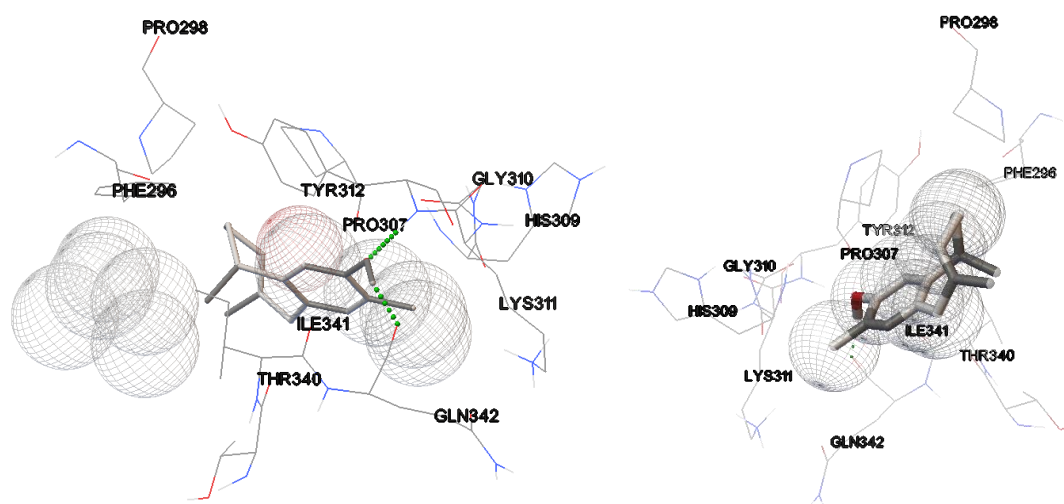


Figura 23. Interacciones de la parvifolina (**5**) con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la colchicina en la α -tubulina, obtenido por *docking* ciego.

El derivado sintético **9** fue el que mostró una energía de *docking* mucho mayor al sitio de unión a colchicina (**7**), es por eso que en la figura 24 se hace un análisis más puntual de los residuos de aminoácidos que participan en las interacciones; dentro de las de carácter hidrofóbico están la Phe 296, Pro 307, His 309, Lys 311, Tyr 312 y Ile 341. Finalmente, dos interacciones polares entre la Pro 307 y la Tyr 312 y los oxígenos que forman parte del benzoato.

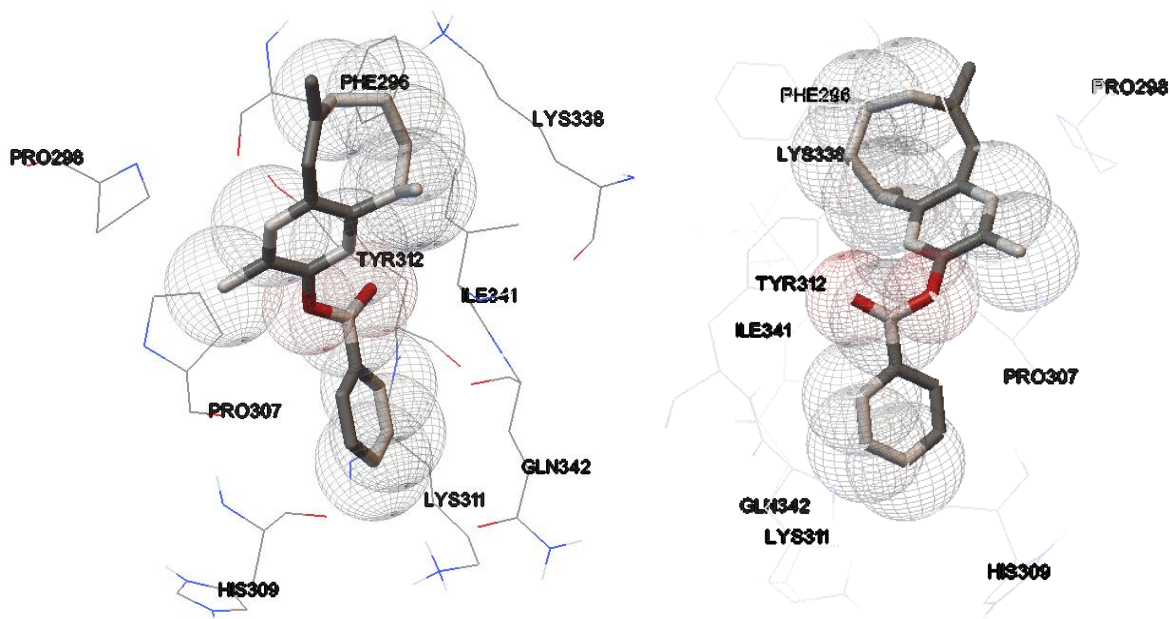


Figura 24. Interacciones del benzoato de isoparvifolina (**9**) con los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la colchicina en la α -tubulina, obtenido por *docking* ciego.

6. RESUMEN DE RESULTADOS.

- ✓ Se prepararon y caracterizaron cinco nuevos derivados de la parvifolina (**12**, **13** y **15-17**).
- ✓ El derivado epoxidado **15** y el derivado fluorado **16** se lograron cristalizar y se confirmó su estructura por difracción de rayos X.
- ✓ El producto natural **5** inhibe la polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina *in vitro*.
- ✓ El derivado sintético **9** a una concentración de 50 μ M inhibe la polimerización de los heterodímero de α,β -tubulina *in vitro* en una mayor proporción que **5**.
- ✓ Los derivados **8**, **10-13** y **17** inhibieron la polimerización heterodímero de α,β -tubulina *in vitro* a concentraciones iguales o menores a 50 μ M pero el

efecto no se mantuvo al evaluar concentraciones más altas ni superó al del producto natural **5**.

- ✓ El derivado **17** mostró un efecto promotor de la polimerización del heterodímero de α,β -tubulina *in vitro* semejante al paclitaxel.
- ✓ Los estudios de reconocimiento molecular (*docking*) revelaron que el efecto de la parvifolina (**5**) en la polimerización de los microtúbulos podría estar mediado por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.
- ✓ El derivado **9**, en los estudios de reconocimiento molecular (*docking*), dejó en evidencia que este compuesto tiene una mayor afinidad en el sitio de unión a colchicina debido a que posee interacciones hidrofóbicas y polares.

7. CONCLUSIONES.

- La evaluación de la actividad de los nuevos derivados del benzocicloocteno sobre la polimerización de la α,β -tubulina *in vitro*, comparada con el efecto producido por la colchicina, permitió encontrar nuevos inhibidores de los microtúbulos. Los estudios de reconocimiento molecular proteína-ligando (*docking*) generaron los modelos teóricos para explicar dicha actividad.
- El compuesto que presentó una mejor actividad inhibitoria fue el producto natural parvifolina (**5**) que tiene en su estructura un hidroxilo libre unido al anillo de benceno.
- Es necesario hacer notar que este compuesto no presenta el mismo esqueleto que la colchicina y posee una estructura química más simple.

8. PERSPECTIVAS.

- Explorar la posibilidad de generar derivados funcionalizados con ésteres alifáticos a partir del derivado **15**.

- Hidrolizar el grupo benzoato de los derivados sintéticos **8-13** para evaluar la relevancia que tiene el hidroxilo unido al C-6 en la polimerización del heterodímero de α,β -tubulina *in vitro*.
- Optimizar la reacción de esterificación con cloruro de valeroílo para complementar el estudio espectroscópico de **13-A** y **13-B**.
- Probar concentraciones intermedias entre 10, 50 y 100 μM para poder identificar si el aumento en la absorbancia en el ensayo de polimerización *in vitro* de la tubulina se debe a un efecto promotor de la polimerización.
- Continuar los estudios farmacológicos del producto natural (**5**) en líneas celulares para conocer la concentración mínima inhibitoria y realizar ensayos de citotoxicidad y apoptosis en líneas celulares, así como conocer la dosis letal 50 (DL_{50}) de este sesquiterpeno en ratones.

9. PARTE EXPERIMENTAL

9.1 Procedimientos generales de purificación.

9.1.1 Cromatografía.

Para desarrollar la técnica de cromatografía en columna abierta se empacaron columnas de vidrio con gel de sílice de diferentes tamaños de partícula (100-200 ó 230-400 mesh), usando presión atmosférica y la mezcla de disolventes apropiada para la separación de cada uno de los compuestos.

En el caso de la cromatografía en placa se usaron placas de gel de sílice 60 F_{254} de 20 x 20 cm, así como de gel de sílice de alto desempeño (HPTLC) de 10 x 10 cm; eluídas la cantidad de veces necesarias para lograr “bandas” definidas. La fase móvil usada se ajustó a las características de cada compuesto y las extracciones de sílice se llevaron a cabo con CH_2Cl_2 . La detección de los compuestos presentes en las placas se llevó a cabo con luz UV de onda corta (254 nm).

9.2 Determinaciones espectrofotométricas y espectroscópicas para la elucidación estructural de los compuestos.

9.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se obtuvieron a 300 MHz y 75.4 MHz, respectivamente, así como los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC se determinaron en un espectrofotómetro Varian Mercury 300, usando como disolvente CDCl_3 y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). La multiplicidad de las señales se indica de acuerdo a las siguientes abreviaciones: s (simple), d (doble), dd (doble de dobles), t (triple), tt (triple de triples), q (cuádruple), m (múltiple).

9.2.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR).

Los espectros de IR se obtuvieron usando un equipo marca BUCK Scientific 500 utilizando CHCl_3 como disolvente. Para cada uno de los compuestos se reportan solo las bandas más importantes.

9.2.3 Espectroscopía de ultravioleta (UV).

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

9.2.4 Difracción de rayos X.

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

9.2.5 Espectrofotometría de masas (EM).

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

9.2.6 Rotación específica.

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

9.2.7 Determinación de puntos de fusión.

Los puntos de fusión para los compuestos que se lograron cristalizar se determinaron en un aparato de Fisher-Johns.

9.3 Obtención del producto natural y sus derivados sintéticos.

9.3.1 Obtención del extracto hexánico.

La maceración de 300 g de raíz molida de *Acourtia humboldtii* colectada en el mes de octubre de 2013 en el km 63 de la carretera Morelia-Zacapu, se llevó a cabo durante 5 días a temperatura ambiente usando 1 L de hexano. El extracto obtenido se concentró en rotavapor, lográndose extraer 41 g.

9.3.2 Aislamiento de la parvifolina (5).

Una alícuota de 5 g del extracto hexánico se colocó en una columna de vidrio usando como fase estacionaria gel de sílice 100-200 mallas de 2.5 cm de diámetro externo y 13.5 cm de alto y se eluyó con disolventes en orden creciente de polaridad. Debido a que la parvifolina (5) es sumamente apolar las mezclas utilizadas llegaron hasta una proporción 95:5 hexano-acetato de etilo. Las fracciones se evaporaron a temperatura ambiente y se determinó su semejanza a

través del factor de retención (R_f) en una cromatografía en capa fina. El rendimiento total del producto natural **5** fue del 1%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6.87 (1H, s, H-4), 6.58 (1H, s, H-1), 5.35 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-12), 4.98 (1H, sa, -OH), 3.52 (1H, da, $J = 18.2$ Hz, H-14 β), 3.14 (1H, m, H-8), 3.06 (1H, da, $J = 18.2$ Hz, H-14 α), 2.18 (3H, s, H-7), 1.79 (1H, m, H-10 β), 1.74 (3H, s, H-15), 1.06 (2H, m, H-11), 1.28 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9), 1.07 (1H, m, H-10 α).

9.3.3 Benzoilación de la parvifolina (**5**).

Una solución de 30 mg de parvifolina (**5**) en 0.5 mL de piridina, se le adicionaron 50 μL de cloruro de benzoílo. La mezcla de reacción se tapó y se mantuvo en baño de vapor por tres horas. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó tres veces con agua, tres veces con solución de ácido clorhídrico (HCl) al 10%, tres veces con agua, tres veces con solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), tres veces con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se filtró y se evaporó en el rotavapor, obteniéndose una miel color amarillo claro, la cual se sometió a cromatografía en columna abierta de 3.5 cm de diámetro externo y 14 cm de alto, usando como fase estacionaria gel de sílice 100-200 mallas. El benzoato de parvifolina (**8**) se aisló en las fracciones eluidas en una polaridad 97:3 de hexano-acetato de etilo. En esta reacción se obtuvieron rendimientos del 75 al 88%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.63 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.51 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.05 (1H, s, H-4), 6.90 (1H, s, H-1), 5.39 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-12), 3.59 (1H, da, $J = 18.2$ Hz, H-14 β), 3.22 (1H, m, H-8), 3.12 (1H, da, $J = 18.2$ Hz, H-14 α), 2.17 (3H, s, H-7), 1.82 (1H, m, H-10 β), 1.78 (3H, s, H-15), 1.67 (2H, m, H-11), 1.34 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9), 1.15 (1H, m, H-10 α).

9.3.4 Isomerización del benzoato de parvifolina (**8**).

A una solución de 100 mg del derivado **8** en 0.5 mL de ácido acético glacial se le adicionó 2.5 mg de cloruro de zinc (ZnCl_2). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción se dejó atemperar y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó tres veces con agua, tres veces con solución saturada de NaHCO_3 , tres veces con agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor, obteniéndose una miel color amarillo claro, la cual se sometió a cromatografía en columna abierta de 2 cm de diámetro externo y 22 cm de alto, usando como fase estacionaria el gel de sílice 100-200 mallas. El benzoato de isoparvifolina (**9**) se aisló en las fracciones eluidas con hexano. En esta reacción se obtuvieron rendimientos de hasta el 83%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.64 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.51 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 6.99 (1H, s, H-4), 6.96 (1H, s, H-1), 6.20 (1H, s, H-14), 3.15 (1H, m, H-8), 2.17 (3H, s, H-7), 2.15 (1H, ddd, $J = 18.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 0.5$ Hz, H-12 β), 2.05 (1H, ddd, $J = 18.0$ Hz, $J = 9.0$ Hz, $J = 0.5$ Hz, H-12 α) 1.88 (3H, s, H-15), 1.67 (2H, m, H-10 α y H-11 β), 1.37 (2H, m, H-10 β y H-11 α), 1.26 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9).

9.3.5 Epoxidación del benzoato de isoparvifolina (**9**).

A una solución de 26.6 mg del derivado **9** en 1.5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) se le adicionaron 29.3 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico. La mezcla de reacción se mantuvo en reflujo por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó tres veces con agua, tres veces con solución saturada de NaHCO_3 , tres veces con agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor, obteniéndose una miel color amarillo, la cual se sometió a cromatografía en columna abierta de 2.5 cm de diámetro externo y 18 cm de alto, usando gel de sílice 100-200 mallas. El derivado epoxidado **10** se obtuvo en las fracciones 50 a 60 eluidas con una mezcla de polaridad 98:2 hexano-acetato de etilo en forma de una miel transparente. De las fracciones posteriores (70 a 85) se aisló un nuevo

derivado epoxidado **15**, cuya funcionalización está entre los carbonos 12 y 13. El rendimiento para esta reacción guardó una proporción de 70% y 30%, respectivamente.

Derivado **10**.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.64 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.51 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.30 (1H, s, H-4), 6.99 (1H, s, H-1), 3.81 (1H, s, H-14), 3.0 (1H, m, H-8), 2.19 (3H, s, H-7), 1.55 (3H, d, $J = 1.6$ Hz H-15), 1.32 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9), los protones restantes H-10 α , H-10 β , H-11 α , H-11 β , H-12 α y H-12 β , se encuentran traslapadas entre 1.92 ppm y 1.08 ppm.

Derivado **15**.

Punto de fusión: 75-77 °C.

$[\alpha]_{589} -47$, $[\alpha]_{578} -50$, $[\alpha]_{546} -56$, $[\alpha]_{436} -99$, $[\alpha]_{365} -163$.

IR (CHCl_3) V_{\max} 3075.9, 2977.6, 2939.9, 1743.7, 1509.5, 1462.3, 1273.5, 1184.8, 1175.1, 1132.8, 1110.4, 1101.5, 1073.5, 1032.8, 906.3, 862.1 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ 201 (log ϵ 4.59), 224 (log ϵ 4.12).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.64 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.51 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.03 (1H, s, H-4), 6.87 (1H, s, H-1), 3.28 (1H, da, $J = 15.8$ Hz, H-14 β), 3.12 (1H, da, $J = 16.1$ Hz, H-14 α), 3.06 (1H, m, H-8), 2.77 (1H, dd, $J = 6.3$ Hz, $J = 3.0$ Hz, H-12), 2.15 (3H, s, H-7), 1.96 (1H, m, H-10 α), 1.87 (1H, m, H-11 α), 1.43 (3H, s, H-15), 1.35 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 1.22 (1H, m, H-10 β), 0.76 (1H, m, H-11 β).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ 164.8 (C=O), 149.2 (C-6), 143.7 (C-2), 133.5 (C-4'), 133.4 (C-3), 133.2 (C-4), 130.1 (C-2' y C-6'), 129.6 (C-1'), 128.6 (C-3' y C-5'),

127.3 (C-5), 117.8 (C-1), 63.5 (C-12), 61.9 (C-13), 39.4 (C-14), 35.3 (C-10), 32.7 (C-8), 26.4 (C-15), 26.3 (C-11), 19.4 (C-9), 15.7 (C-7).

EMESI m/z 336 (M+1), 319, 307, 293, 279, 267, 255, 232, 215, 199, 186, 172, 159, 145, 131, 119, 105, 91, 77, 65, 51.

Rayos X: cristal ortorrómbico, $P2_1,2_1,2_1$, $a = 5.9169$ (1) Å, $b = 8.0880$ (1) Å, $c = 38.6754$ (4) Å, $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$.

9.3.6 Transposición del epóxido **10**.

A una solución de 47 mg del derivado **10** en 2.5 mL de benceno anhidro se adicionó 50 μ L de trifloruro de boro eterato ($\text{Et}_2\text{O}:\text{BF}_3$) en un baño de hielo, posteriormente la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas manteniéndolo en agitación a temperatura ambiente por 12 horas y media. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt, se lavó en tres ocasiones con solución saturada de NaHCO_3 , tres veces con agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó en rotavapor, obteniéndose una miel color naranja, la cual se sometió a cromatografía en columna abierta de 3.0 cm de diámetro externo y 14 cm de alto, usando gel de sílice 230-400 mallas. El derivado **11** se obtuvo en mezcla con otros productos en las fracciones eluidas a una polaridad 7:3 hexano- CH_2Cl_2 . Esta mezcla se recromatografió en TLC usando como fase móvil una polaridad 9:1 hexano-AcOEt. Se obtuvieron tres bandas mayoritarias, la primera de ellas con un R_f fue 0.63 correspondió al compuesto **16** con un rendimiento de hasta el 10%, el cual incorporó un átomo de flúor; la segunda banda cuyo R_f fue 0.40 correspondió al derivado **11** con un rendimiento de hasta el 42%, finalmente la tercer banda cuyo R_f fue 0.36 correspondió al compuesto **17** con un rendimiento de hasta 10%.

Compuesto **11**

$[\alpha]_{589} -12$, $[\alpha]_{578} -13$, $[\alpha]_{546} -13$, $[\alpha]_{436} -7$, $[\alpha]_{365} +98$.

IR (CHCl₃) V_{max} 3028.9, 3015.5, 2969.0, 2930.4, 2872.7, 1736.5, 1686.9, 1601.9, 1493.9, 1452.1, 1378.0, 1263.4, 1247.0, 1221.9, 1177.1, 1149.4, 1140.7, 1106.1, 1086.7, 1065.4, 1025.5, 902.1 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ 230 (log ϵ 4.33), 250 (log ϵ 3.90).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.66 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.54 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.16 (1H, s, H-4), 7.05 (1H, s, H-1), 3.10 (1H, m, H-8), 2.90 (1H, m, H-13), 2.21 (3H, s, H-7), 1.90 (1H, m, H-12 β), 1.76 (1H, m, H-10 β), 1.64 (1H, m, H-11 β), 1.56 (2H, m, H-12 α y H-11 α), 1.52 (1H, m, H-10 α), 1.27 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.24 (3H, d, $J = 6.5$ Hz).

RMN ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) δ 212.7 (C-14), 164.6 (C=O), 150.6 (C-6), 142.9 (C-2), 137.3 (C-3), 133.7 (C-4'), 130.1 (C-2' y C-6'), 129.3 (C-1'), 129.2 (C-4), 128.6 (C-3' y C-5'), 127.9 (C-5), 120.9 (C-1), 47.5 (C-13), 37.0 (C-8), 34.5 (C-10), 30.8 (C-12), 24.0 (C-9), 23.7 (C-11), 15.9 (C-15), 15.7 (C-7).

EMESI m/z 336 (M+1), 321, 308, 293, 279, 266, 239, 214, 199, 186, 161, 147, 133, 119, 105, 91, 77, 65, 51, 38, 21.

Compuesto 16

Punto de fusión: 104-106 °C.

$[\alpha]_{589} -30$, $[\alpha]_{578} -31$, $[\alpha]_{546} -37$, $[\alpha]_{436} -65$, $[\alpha]_{365} -110$.

IR (CHCl₃) V_{max} 2963.6, 2912.0, 2872.4, 1732.7, 1610.3, 1593.6, 1501.0, 1453.3, 1378.2, 1350.1, 1314.1, 1267.0, 1245.4, 1177.7, 1140.3, 1113.0, 1084.3, 1066.9, 1045.1, 1027.5, 896.3 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ 229 (log ϵ 4.22), 270 (log ϵ 4.25).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.64 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.52 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'),

7.00 (1H, s, H-4), 6.98 (1H, s, H-1), 4.40 (1H, d, $J = 55.1$ Hz, H-14), 3.04 (1H, da, $J = 16.4$ Hz, H-13 β), 2.55 (1H, dd, $J = 16.4$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-13 α), 2.16 (3H, s, H-7), 1.68 (2H, m, H-10 α y H-10 β), 1.61 (2H, m, H-11 α y H-11 β), 1.49 (3H, s, H-9), 1.23 (3H, s, H-15).

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ 165.0 (C=O), 147.9 (C-6), 141.3 (C-2), 133.4 (C-4'), 132.4 (C-3), 130.9 (C-4), 130.1 (C-2' y C-6'), 129.6 (C-1'), 128.5 (C-3' y C-5'), 127.6 (C-5), 117.9 (C-1), 103.0 (d, $J = 196.9$ Hz, C-14), 44.9 (d, $J = 17.7$ Hz, C-8), 41.5 (d, $J = 4.9$ Hz, C-13), 39.4 (d, $J = 16.6$ Hz, C-12), 36.7 (d, $J = 8.3$ Hz, C-10), 32.6 (d, $J = 7.2$ Hz, C-11), 25.2 (d, $J = 1.1$ Hz, C-15), 21.3 (C-9), 15.8 (C-7).

EMESI m/z 338 (M+1), 319, 290, 264, 249, 233, 213, 189, 171, 157, 141, 128, 105, 91, 77, 65, 51, 38, 25.

Rayos X: cristal monoclinico, $P2_1$, $a = 7.9615$ (2) Å, $b = 11.3005$ (2) Å, $c = 20.3129$ (5) Å, $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 95.147$ (2), $\gamma = 90^\circ$, $Z, Z' = 2, 2$, $d = 1.235$ g/cm 3 .

Derivado 17

$[\alpha]_{589} -5$, $[\alpha]_{578} -5$, $[\alpha]_{546} -6$, $[\alpha]_{436} -5$, $[\alpha]_{365} +1$.

IR (CHCl_3) V_{max} 3012.1, 2927.4, 2855.1, 1731.6, 1457.3, 1376.3, 1260.7, 1221.4, 1212.1, 1176.0, 1130.2, 1085.0, 1065.9, 1025.5 cm $^{-1}$.

UV (EtOH) λ 200 (log ϵ 4.32), 220 (log ϵ 3.95) 231 (log ϵ 3.86).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.65 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.53 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.17 (1H, s, H-4), 7.01 (1H, s, H-1), 3.78 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-14 α), 3.40 (1H, dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 1.6$ Hz, H-14 β), 2.26 (3H, s, H-7), 1.60 (3H, s, H-9), 1.33 (3H, s, H-15), los protones correspondientes a H-10 α , H-10 β , H-11 α , H-11 β , H-12 α y H-12 β aparecieron traslapados entre 1.84 y 0.73 ppm.

RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ 165.0 (C=O), 148.0 (C-6), 139.5 (C-2), 139.1 (C-9), 133.6 (C-4'), 130.2 (C-2' y C-6'), 129.5 (C-1'), 128.7 (C-5), 128.6 (C-5' y C-8'), 125.5 (C-4), 116.6 (C-1), 76.4 (C-8), 75.5 (C-14), 41.0 (C-10), 39.7 (C-12), 38.4 (C-3), 27.0 (C-9) 22.8 (C-15), 22.0 (C-11), 16.2 (C-7).

EMESI m/z 336 (M+1), 322, 308, 294, 281, 268, 251, 232, 216, 203, 189, 174, 161, 145, 128, 105, 91, 77, 65, 51, 38.

9.3.7 Reducción de la cetona (**11**).

A una solución de 16.1 mg del derivado **11** en 0.5 mL de MeOH grado espectro se agregó 18 mg de borohidruro de sodio (NaBH_4). La mezcla se mantuvo en agitación constante a 0 °C por una hora. Transcurrido este tiempo se agregaron 10 mL de agua tibia manteniendo la mezcla de reacción en agitación por treinta minutos. La fase orgánica se extrajo con AcOEt, se lavó con agua tres veces, tres veces con solución de HCl al 10%, tres veces con agua, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó en rotavapor, obteniéndose una miel amarilla transparente la cual se sometió a cromatografía en columna abierta de 2.0 cm de diámetro externo y 10 cm de alto, usando gel de sílice 230-400 mallas. El derivado **12** se obtuvo en mezcla de ambos epímeros en las fracciones eluidas a una polaridad 9:1 hexano-acetato de etilo. En esta reacción se obtuvieron rendimientos de hasta el 85%.

IR (CHCl_3) V_{max} 3602.1, 3143.0, 3014.5, 2960.4, 2931.8, 2874.4, 2845.3, 1734.7, 1601.7, 1584.4, 1578.6, 1499.7, 1451.8, 1379.9, 1360.6, 1314.8, 1264.2, 1211.5, 1177.1, 1166.0, 1141.3, 1109.9, 1087.2, 1067.3, 1026.0, 976.5, 902.6 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ 201 (log ϵ 4.79), 224 (log ϵ 4.36).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.64 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.52 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.01 (2H, sa, H-1 y H-4), 4.75 (1H, sa, H-14), 2.18 (3H, s, H-7), 1.91 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, -OH), 1.29 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-9), 0.96 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-15), los protones

correspondientes a H-8, H-10 α , H-10 β , H-11 α , H-11 β , H-12 α , H-12 β , H-13, se encuentran traslapados entre 1.80 y 0.90 ppm.

EMESI m/z 338 (M+1), 320, 306, 292, 277, 266, 253, 241, 216, 199, 187, 173, 159, 145, 133, 119, 105, 91, 77, 65, 51, 39.

9.3.8 Preparación del cloruro de valeroílo.

A una solución de 2.2 mL de ácido valérico en 15 mL de tolueno se le adicionaron 3.5 mL de cloruro de oxalilo, se tapó y se dejó reaccionar a 60 °C en un baño de aceite por tres horas, al sistema se le colocó una trampa de NaHCO₃ para neutralizar el ácido clorhídrico gas que se libera. Transcurrido este tiempo se destiló la mezcla de reacción separando el cloruro de valeroílo a una temperatura de 124-128°C.

9.3.9 Esterificación con cloruro de valeroílo.

A una solución de 3.9 mg del derivado **12** en 0.5 mL de piridina se le agregó 0.3 mL de cloruro de valeroílo. La mezcla se tapó y se mantuvo en baño de vapor por dos horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó tres veces con agua, tres veces con solución de HCl al 10%, tres veces con agua, tres veces con solución saturada de NaHCO₃, tres veces con agua, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor, obteniéndose una miel color amarillo claro, la cual se sometió a cromatografía en columna abierta de 2.5 cm de diámetro externo y 10 cm de alto, usando como fase estacionaria gel de sílice 230-400 mallas. De las fracciones eluidas con 98:2 hexano-acetato de etilo se obtuvo la mezcla de los ésteres funcionalizados con el valerato **13**; los cuales se separaron usando HPTLC eluida en una polaridad 99:1 hexano-acetato de etilo, obteniéndose dos bandas. La primera denominada **A** tuvo un R_f de 0.58, mientras que la segunda, denominada **B** tuvo un R_f de 0.48. El rendimiento fue de hasta un 88%, guardando una proporción para los isómeros de 22% para **13-A** y 78% para **13-B**.

Éster de valerato **13-A**.

$[\alpha]_{589} -5$, $[\alpha]_{578} -5$, $[\alpha]_{546} -10$, $[\alpha]_{436} -12$, $[\alpha]_{365} -18$.

UV (EtOH) λ 222 (log ϵ 3.44).

EMESI m/z 422 (M+1) 405, 377, 354, 337, 320, 292, 267, 241, 216, 187, 159, 135, 105, 85, 77, 57, 41.

Éster de valerato **13-B**.

$[\alpha]_{589} -1$, $[\alpha]_{578} -1$, $[\alpha]_{546} -1$, $[\alpha]_{436} +2$, $[\alpha]_{365} +12$.

IR (CHCl₃) V_{max} 3031.4, 3022.6, 3013.5, 2962.9, 2934.2, 2874.6, 1731.5, 1601.4, 1578.3, 1502.0, 1464.3, 1452.4, 1379.8, 1344.4, 1314.8, 1264.1, 1221.4, 1212.1, 1176.8, 1149.6, 1109.5, 1088.4, 1066.8, 1025.5, 989.7, 972.8, 902.2 cm⁻¹.

UV (EtOH) λ 200 (log ϵ 4.10), 224 (log ϵ 4.69).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (2H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-2', H-6'), 7.65 (1H, tt, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, H-4'), 7.52 (2H, tt, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.06 (1H, sa, H-4), 7.00 (1H, sa, H-1), 5.82 (1H, sa, H-14), 3.78 (1H, sa, H-8), 2.36 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, H-16), 2.17 (3H, s, H-7), 1.52 (2H, m, H-12 α y H-12 β), 1.62 (2H, m, H-17), 1.32 (2H, m, H-18), 1.33 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-9), 0.94 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, H-15), 0.92 (3H, m, H-19) los protones correspondientes a H-10 α , H-10 β , H-11 α , H-11 β , H-13, se encuentran traslapados entre 2.21 y 0.85 ppm.

RMN ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) δ 164.7 (C=O), 160.5 (C=O), 149.6 (C-6), 144.9 (C-2), 143.0 (C-3), 133.5 (C-4'), 130.1 (C-2' y C-6'), 129.6 (C-1'), 128.6 (C-3' y C-5'), 126.9 (C-5), 112.3 (C-1), 109.6 (C-4), 55.1 (C-14), 44.1 (C-13), 37.8 (C-10), 34.5 (C-16), 29.7 (C-11), 28.6 (C-12), 27.1 (C-17), 22.3 (C-18), 18.5 (C-9), 17.2 (C-15), 15.8 (C-7), 13.7 (C-19).

EMESI m/z 422 (M+1), 400, 375, 356, 337, 320, 292, 267, 241, 216, 188, 173, 157, 135, 105, 85, 77, 57, 40, 21.

9.4 Evaluación *in vitro* de la polimerización de α,β -tubulina

Los derivados de la parvifolina disueltos en DMSO se colocaron en placas de ELISA de 96 pozos, de fondo plano y media área, en alícuotas de 10 μ L de una concentración tal que permitiese obtener concentraciones finales de 10, 50 y 100 μ M. Se utilizó una solución de tubulina de cerebro bovino de >97% de pureza (Cytoskeleton, Inc., E. U. A.) mantenida siempre a 0 °C. Para preparar la solución, la tubulina se descongeló y se disolvió la cantidad necesaria en buffer de tubulina (pH 6.9, sal sesquisódica del ácido piperazin-N,N'-bis(2-etansulfónico) 80.0 mM, cloruro de magnesio 2.0 mM, ácido etilenglicol-bis(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético 0.5 mM y 5'-trifosfato de guanosina 1.0 mM) para dar una concentración final de tubulina de 2 mg/mL. La solución de tubulina se agregó en alícuotas de 100 μ L, a los pozos con los compuestos. La placa de ELISA mantenida a 0 °C, se transfirió inmediatamente a un lector de placas BioTek EL808IU precalentado a 37 °C durante 30 minutos. La polimerización de los heterodímeros de α,β -tubulina se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 340 y 450 nm cada minuto durante 60 minutos con temperatura controlada a 37 °C y con un periodo de mezclado inicial de 5 segundos. Después de 60 minutos de incubación la placa se llevó a una temperatura de -20 °C por 15 minutos, siendo este el estímulo despolimerizante. Después de este tiempo, la placa se colocó nuevamente en el lector por 30 minutos más a 37 °C. Los ensayos de polimerización de la tubulina y despolimerización inducida se realizaron por triplicado. Los resultados se graficaron con el programa GraphPad Prism 5 para Windows, los puntos de las gráficas muestran la desviación estándar de las lecturas para cada derivado evaluado.

9.5 Estudios de reconocimiento proteína-ligando *in silico*.

Los estudios de reconocimiento molecular entre el heterodímero de α,β -tubulina y el producto natural **5**, así como sus derivados con efecto inhibidor de microtúbulos se realizaron utilizando el programa AutoDock 4.2.6 para Windows. Para la

preparación de la proteína y de los modelos moleculares del producto natural parvifolina se empleó el programa AutoDock Tools para Windows versión 4.2. La visualización de los resultados y el análisis de los mismos se llevó a cabo empleando el programa PyMol para Windows versión 1.3. Las simulaciones computacionales se hicieron empleando una computadora personal acondicionada con un procesador Intel(R) Core(TM) i7-2670QM CPU a 2.20 GHz, 8 Gb de RAM y una tarjeta de video NVIDIA GeForce GT a 550 MB. El archivo cristalográfico de la proteína se obtuvo del RCSB Protein Data Bank, bajo el código 1JFF y los modelos moleculares del producto natural **5** y sus derivados se obtuvieron de los resultados del modelado molecular en el programa Spartan'04 para Windows.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Williams, D. A., Lemke, T. L. *Foye's Principles of medicinal chemistry*. 5a edición, Editorial Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, E.U.A. **2002**, 24-25.
2. Newman, D. J., Cragg, M. G. *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*. Journal of Natural Products. **2012**, 75, 311-335.
3. Christmann, M. *Otto Wallach: Founder of terpene chemistry and Nobel laureate 1910*. Angewandte Chemie International Edition in English. **2010**, 49, 9580-9586.
4. Ruzicka, L. *The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds 1953*. Experientia. **1994**, 50, 395-405.
5. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia*. Journal of the American Chemical Society. **1971**, 93, 2325-2327.
6. Chen, C. H., Chou, C. K., Lee, S. D., Wang, J. C., Yeh, S. F. *Active compounds from Saussurea lappa Clarks that suppress hepatitis B virus*

- surface antigen gene expression in human hepatoma cells*. Antiviral Research. **1995**, 27, 99-109.
7. Choi, J. H., Ha, J., Park, J. H., Lee, Y. S., Choi, J. W., Masuda, Y., Nakaya, K., Lee, K. T. *Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols*. Japanese Journal of Cancer Research. **2002**, 93, 1327-33.
 8. Choi, J. H., Seo, B. R., Seo, S. H., Lee, K. T., Park, J. H., Park, H. J., Choi, J. W., Ithon, Y., Miyamoto, K. *Costunolide induces differentiation of human leukemia HL-60 cells*. Archives of Pharmacal Research. **2002**, 25, 480-484.
 9. Hehner, S. P., Heinrich, M., Bork, P. M., Vogt, M., Tatter, F., Lehmann, V., Schulze-Osthoff, K., Dröge, W., Schmitz, M. L. *Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta*. Journal of Biological Chemistry. **1998**, 16, 1288-1297.
 10. Romo, J., Joseph-Nathan, P., Díaz, F. *Aromatin and aromaticin, new sesquiterpene lactones isolated from Helenium aromaticum*. Chemical Industry. **1963**, 1839–1839.
 11. Lai, H., Singh, N. P. *Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin*. Cancer Letters. **1995**, 91, 41-46.
 12. Singh, N. P., Lai, H. *Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells*. Life Sciences. **2001**, 70, 49-56.
 13. Bohlman, F., Zdero, C. *Polyacetylenic compounds, 243. Constituents of Coreolepsis parvifolia Blake*. Chemische Berichte. **1977**, 110, 468.
 14. Joseph-Nathan, P., Hernández, J. D., Román, L. U., García, G. E., Mendoza, V. *Sesquiterpenes from Perezia carpholepis*. Phytochemistry. **1982**, 21, 669-672.
 15. García, G. E., Mendoza, V., Guzmán, B. J. *Sesquiterpenes from Perezia longilifolia*. Journal of Natural Products. **1988**, 51, 150-151.

16. Joseph-Nathan, P., Hernández, J. D., Román, L. U., García, G. E., Mendoza, V., Mendoza, S. *Coumarin and terpenoids from Perezia alamani var. oolepis*. *Phytochemistry*. **1982**, 21, 1129-1132.
17. Cabrera, L. R. *Six new species of Acourtia (Asteraceae) and a historical account of Acourtia mexicana*. *Brittonia*, **2011**, 53, 416-429.
18. Mendoza-Gastélum, J. I. *Evaluación de la actividad antioxidante de sesquiterpenos derivados de benzociclooctano y del longipineno*. Tesis de Maestría presentada en la Sección Externa de Farmacología del CINVESTAV. México. **2008**.
19. Organización Mundial de la Salud. *¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo?. Datos y cifras sobre el cáncer*. Octubre, **2014**. En línea. [URL: <http://www.who.int/features/qa/15/es/>] [URL: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>]
20. Organización Mundial de la Salud. Centro de Prensa. *Cáncer*. Nota descriptiva No. 297. Octubre, **2014**. En línea. [URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>]
21. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer*. México. **2013**, 1-19.
22. American Cancer Society. *¿Qué es metástasis?*. Octubre **2014**. [URL: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/metastasisenhuesos/guiadetallada/metastasis-en-los-huesos-what-is-bone-mets>]
23. American Cancer Society. *Guía sobre quimioterapia*. Octubre **2014**. [URL: <http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/quimioterapia/fragmentado/quimioterapia-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-intro>]
24. Hanahan, D., Weinberg, R. A. *Hallmarks of cancer: The Next Generation*. *Cell*. **2011**, 144, 646-666.
25. Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C. *Cell Biology*. Ed. Saunders/Elsevier, **2002**, p. 579.
26. Nogales, E., Wolf, S., Downing, K. H. *Structure of the α - β tubulin dimer by electron crystallography*. *Nature*. **1998**, 391, 199-203.

27. Jordan, M. A., Wilson, L. *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nature Reviews. **2004**, 4, 253-265.
28. Staton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H., Aneja, R. *Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective*. Medicinal Research Reviews. **2011**, 31, 443-481.
29. Shelanski, M. L., Gaskin, F., Cantor, C. R. *Microtubule assembly in the absence of added nucleotides*. Proceedings of National Academy of Science. **1973**, 70, 765-768.
30. Andreu, J. M., Timasheff, S. N. *Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **1982**, 79, 6753-6756.
31. Baker, D. D., Chu, M., Oza, U., Rajgarhia, V. *The value of natural products to future pharmaceutical discovery*. Natural Product Reports. **2007**, 24, 1225-1244.
32. Finkelstein, Y., Aks, S. E., Hutson, J. R., Juurlink, D. N., Nguyen, P., Dubnov-Raz, G., Pollk, U., Koren, G., Bentur, Y. *Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug*. Clinical Toxicology. **2010**, 48, 407-414.
33. Lu, Yan., Chen, J., Xiao, M., Li, W., Miller, D. D. *An Overview of Tubuline Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site*. Pharmaceutical Research. **2012**, 29, 2943-2971.
34. Kim, S. K., Cho, S. M., Kim, H., Seok, H., Kim, S. O., Kwon, T. K., Chang, J. S. *The colchicine derivatives CT20126 shows a novel microtubule-modulating activity with apoptosis*. Experimental & Molecular Medicine. **2013**, 45, e19; doi:10.1038/emm.2013.38
35. Zoete, V., Grosdidier, A., Michielin O. *Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design*. Journal of Cellular and Molecular Medicine. **2009**, 13, 238-248.
36. RCSB. Protein Data Bank. En línea. [URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>]

37. Padilla-Zúñiga, A. J., Rojo-Domínguez, A. *Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos*. Mensaje Bioquímico. **2002**, 26, 129-145.
38. Joseph-Nathan, P., Hernández-Medel, M. R., Martínez, E., Rojas-Gardida, M., Cerda, C. M. *Conformation and absolute configuration of naturally occurring parvifoline and several synthetic derivatives*. Journal of Natural Products. **1988**, 51, 675-689.
39. Baran, E. J. *La nueva farmacoterapia inorgánica XIV. Compuestos Orgánicos Fluorados*. Acta Farmacéutica Bonaerense. **1992**, 2, 103-110.
40. Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. *Optimization of Gaussian type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation*. Canadian Journal of Chemistry. **1992**, 70, 560-571.

11. APÉNDICE A. Espectros de RMN de ^1H de **5** y **8-10**, espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los derivados **11-17** y espectro de IR del derivado **12**.

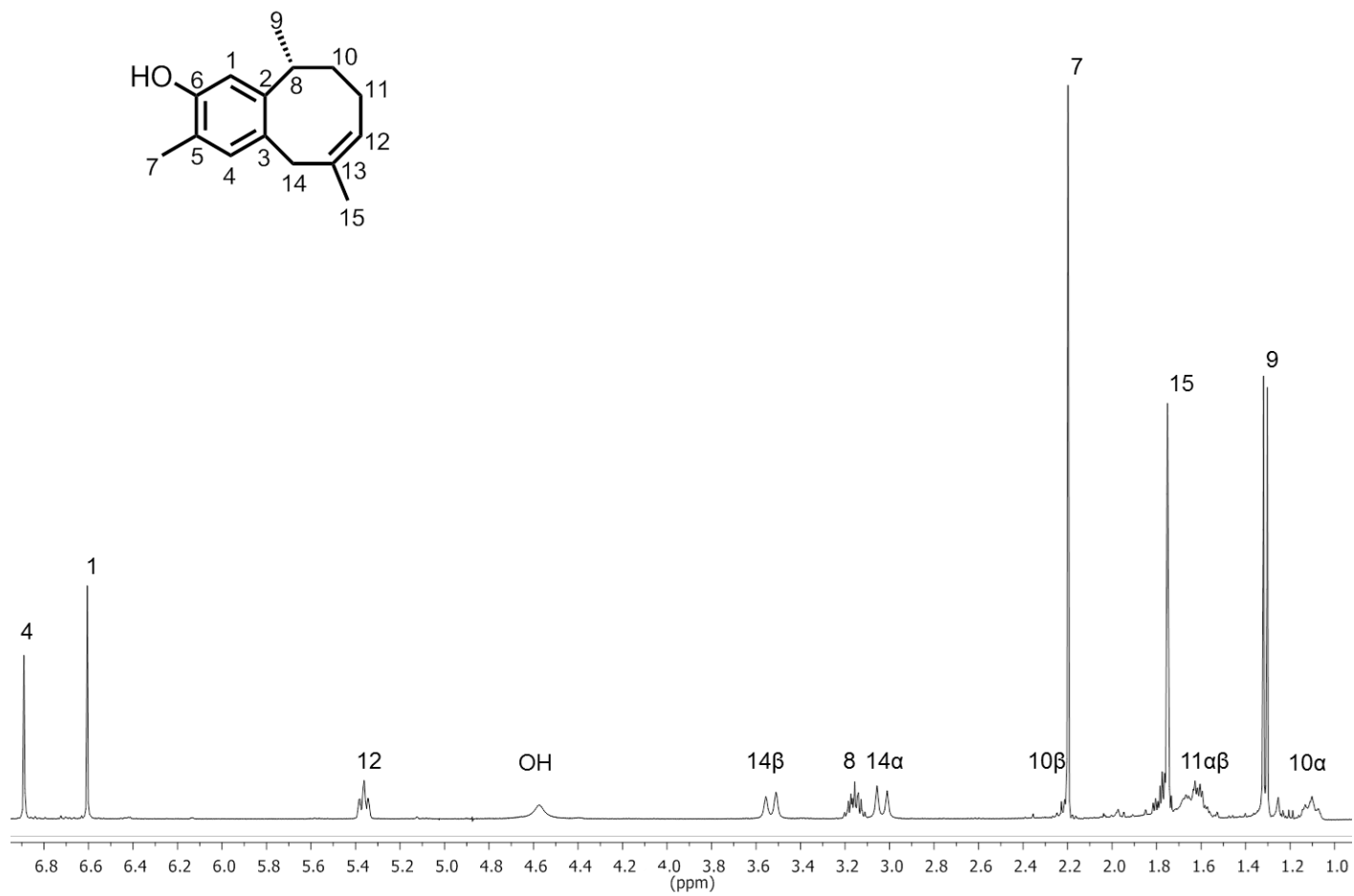


Figura 1A. Espectro de RMN de ^1H de la parvifolina (**5**)

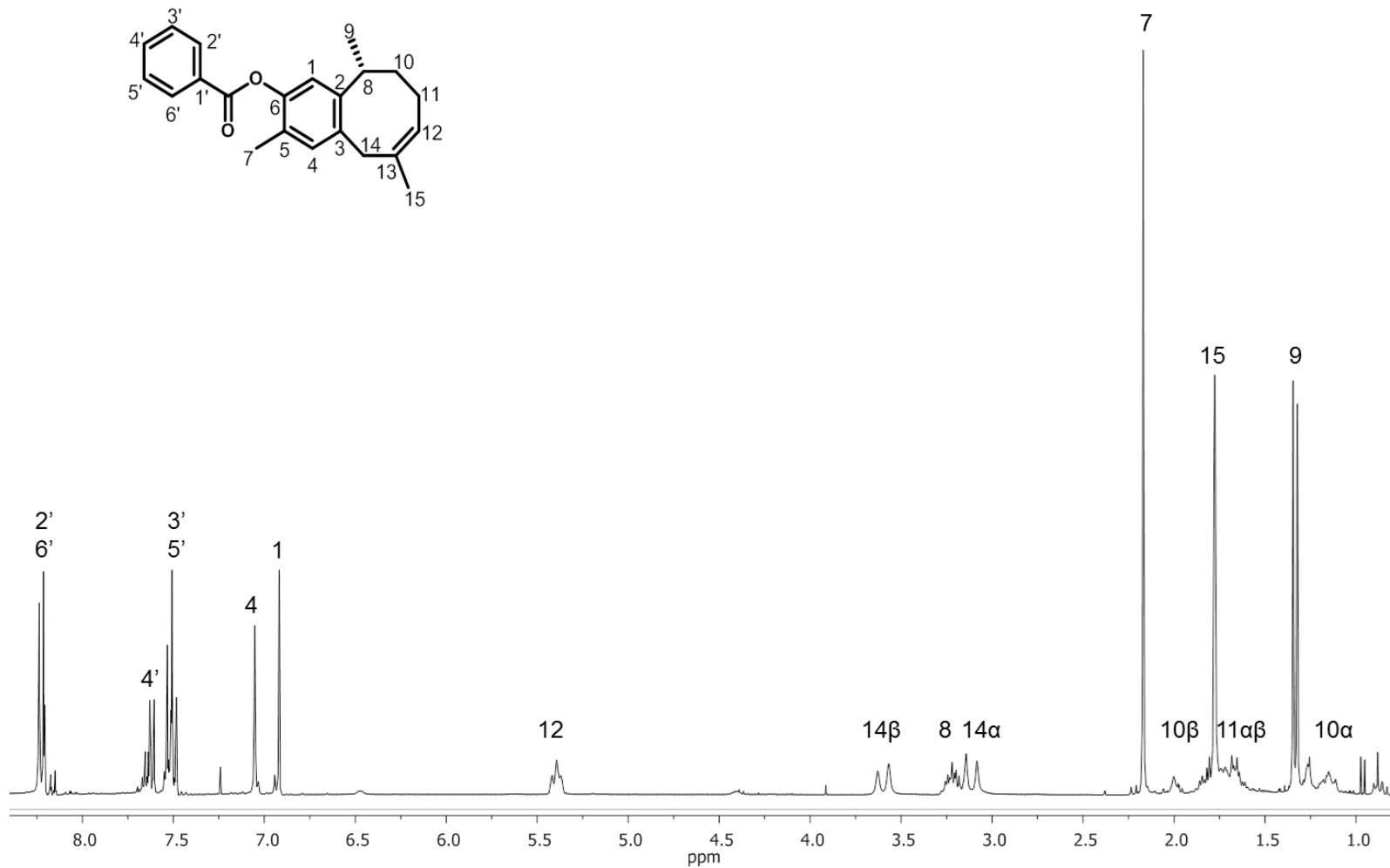


Figura 2A. Espectro de RMN de ¹H del benzoato de parvifolina (**8**).

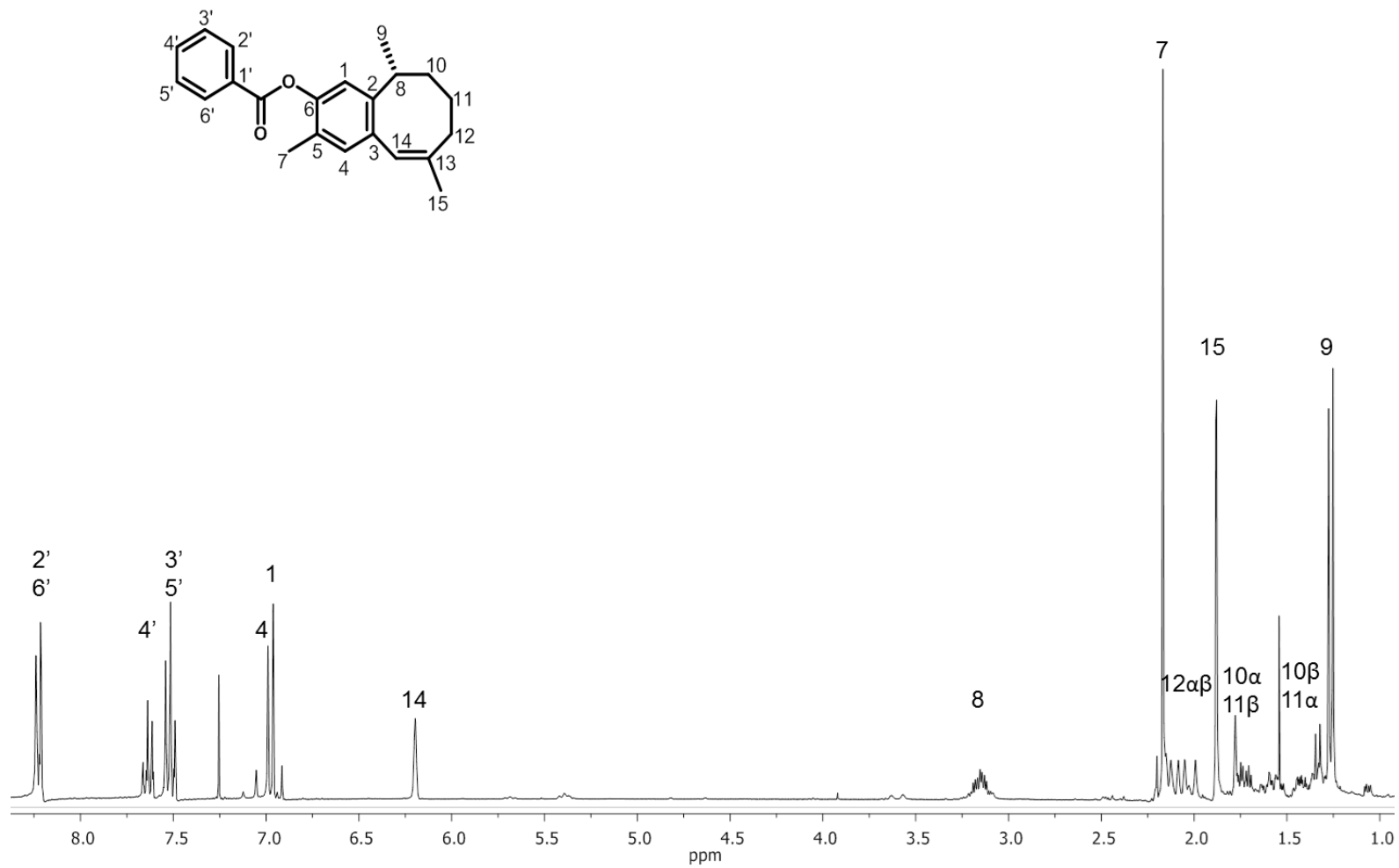


Figura 3A. Espectro de RMN de ¹H del benzoato de isoparvifolina (9).

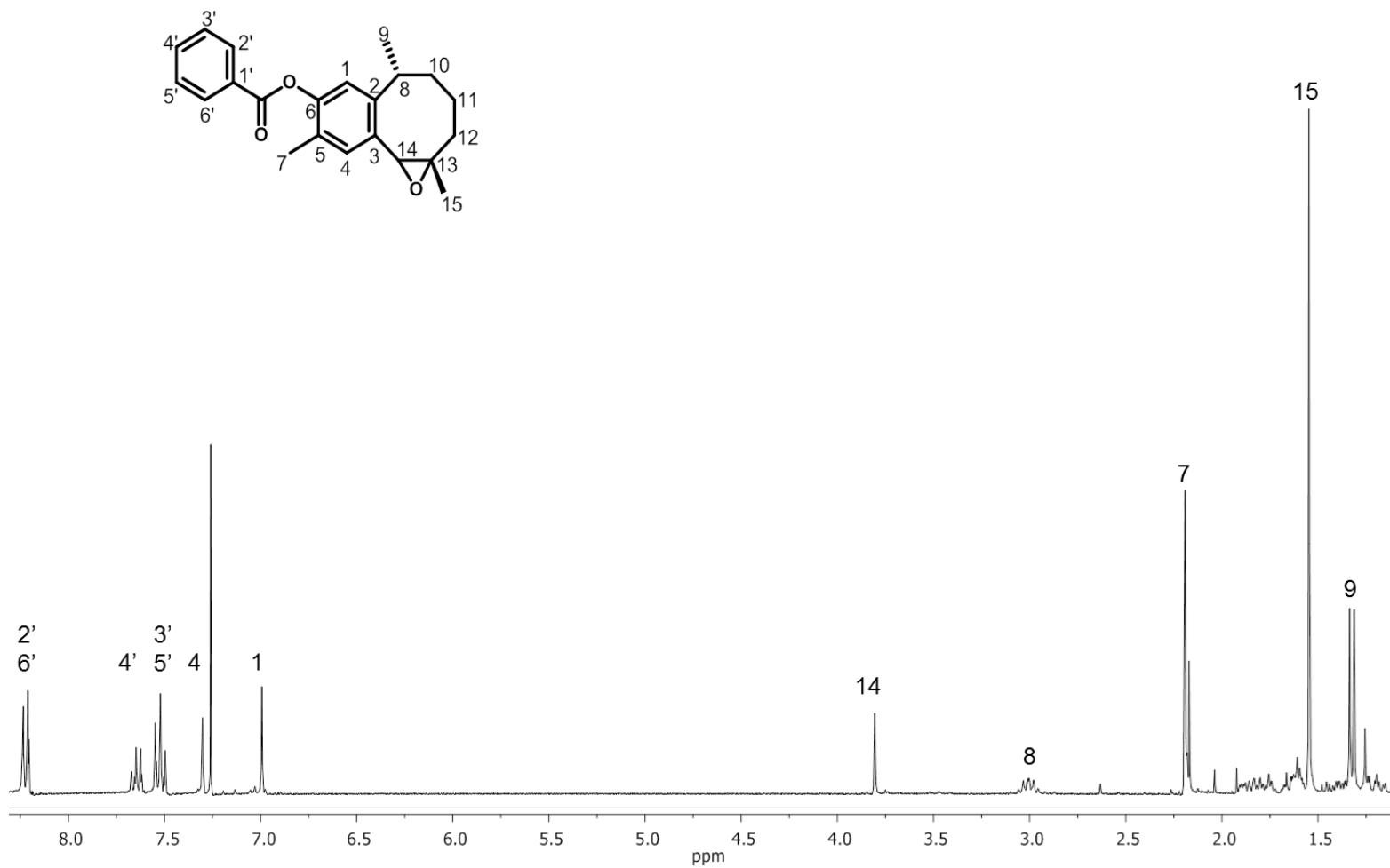


Figura 4A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 10.

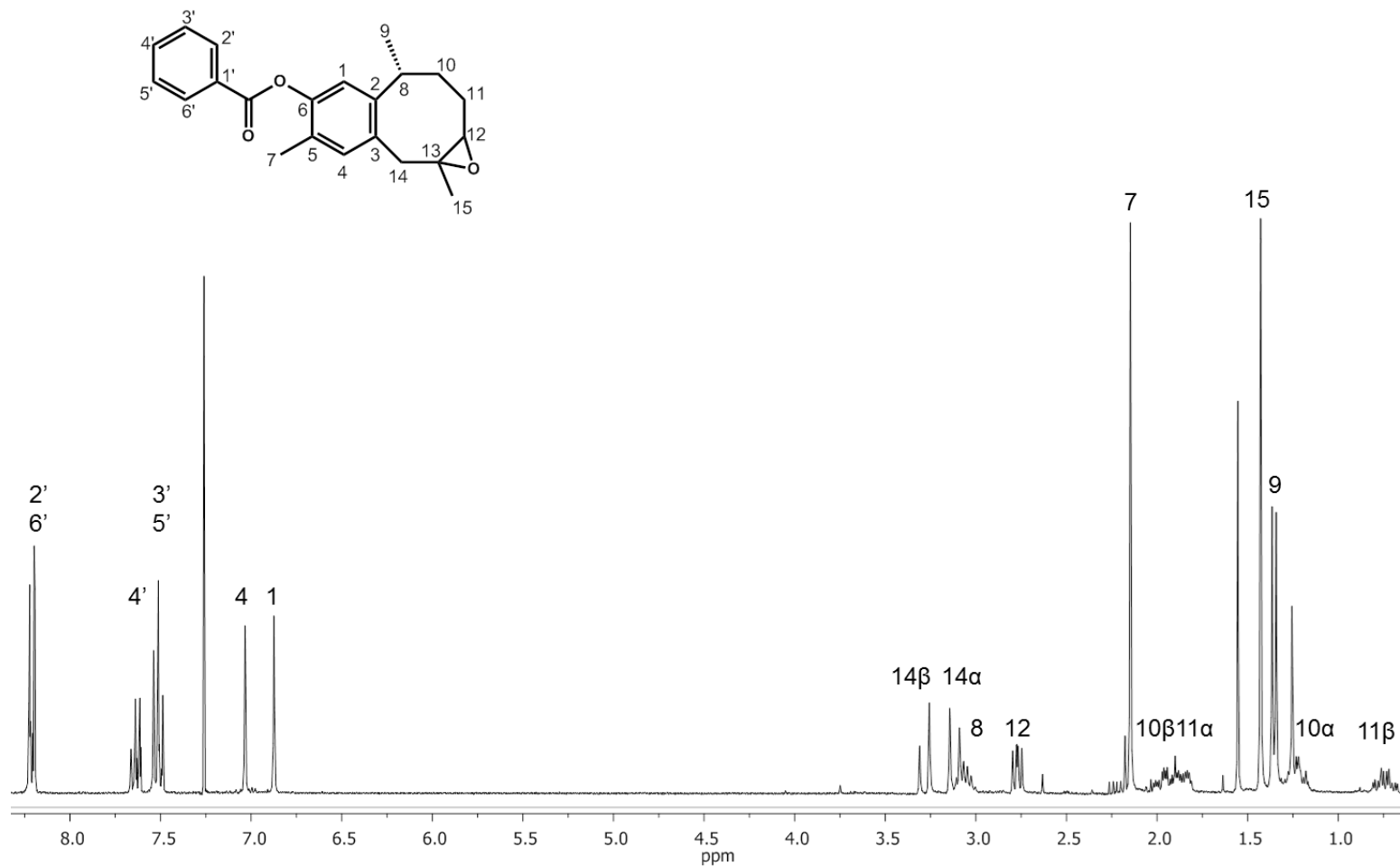


Figura 5A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 15.

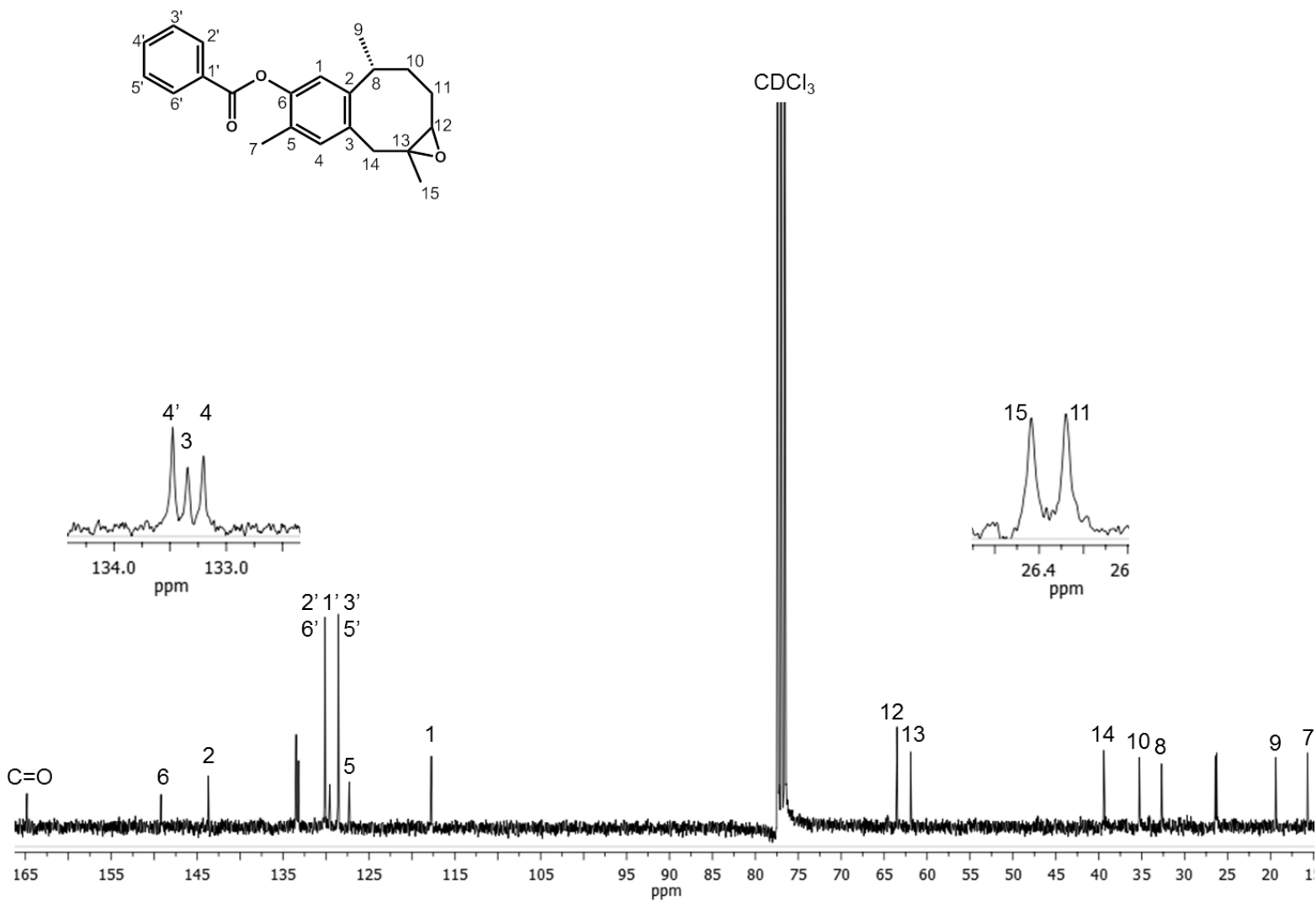


Figura 6A. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 15.

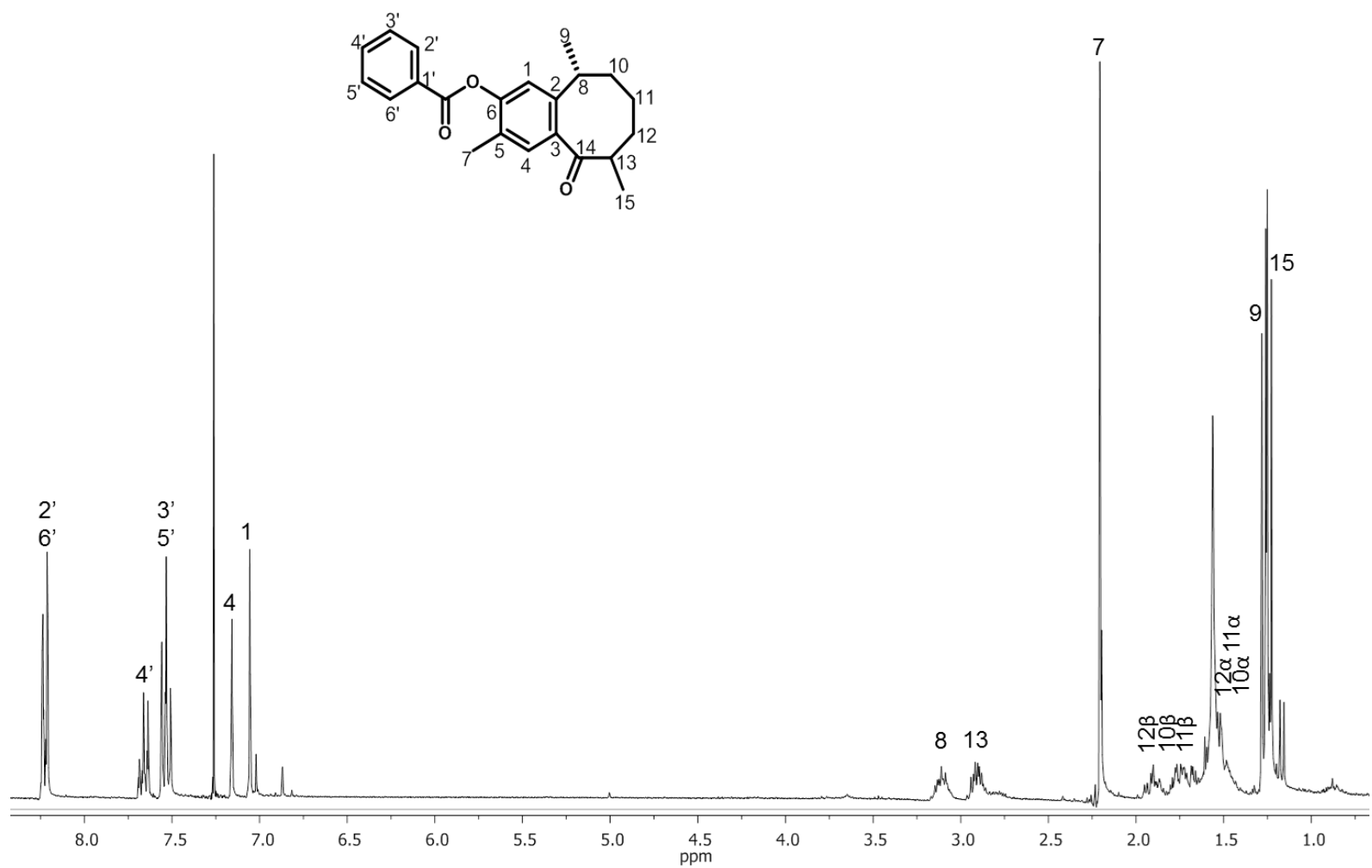


Figura 7A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 11.

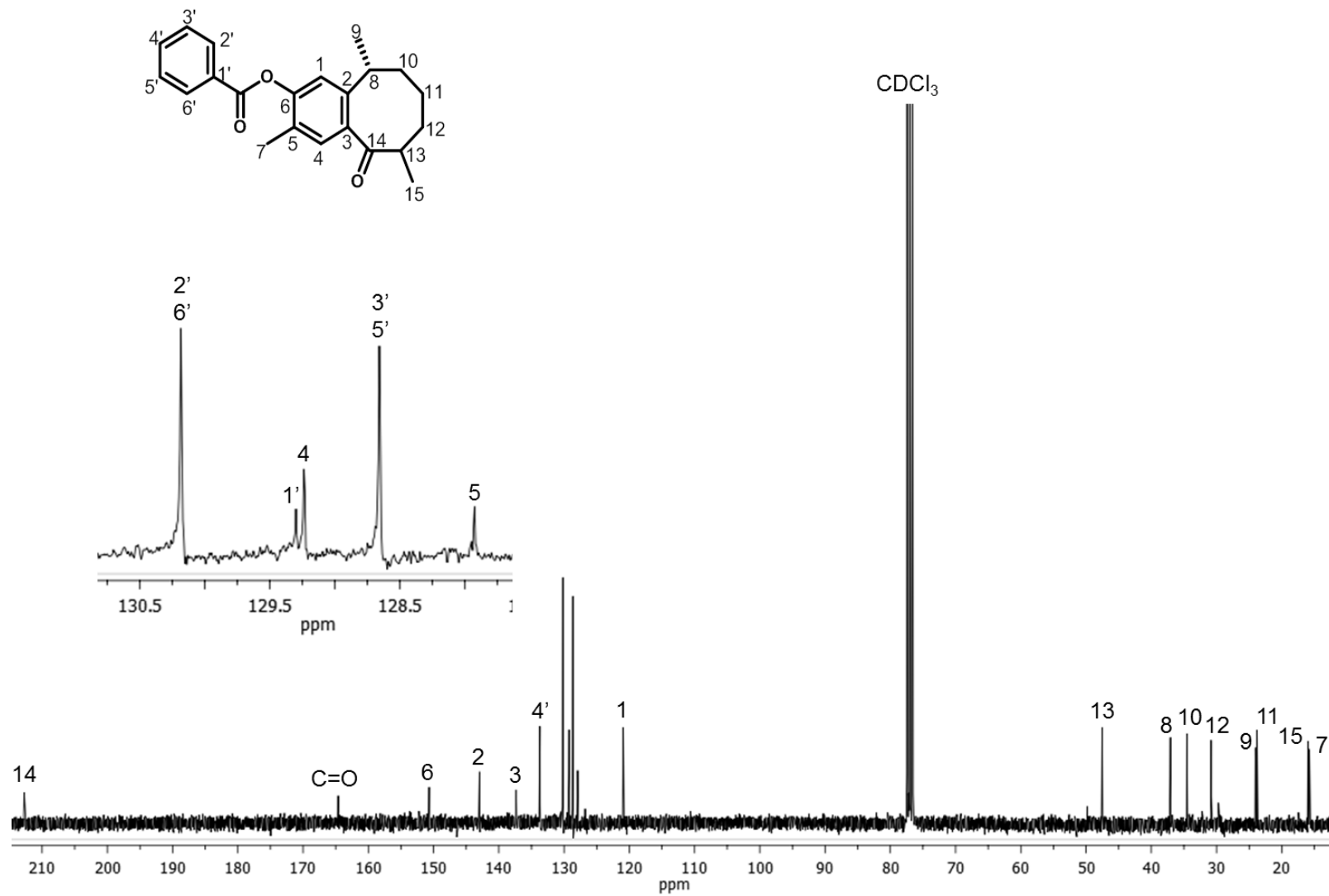


Figura 8A. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 11.

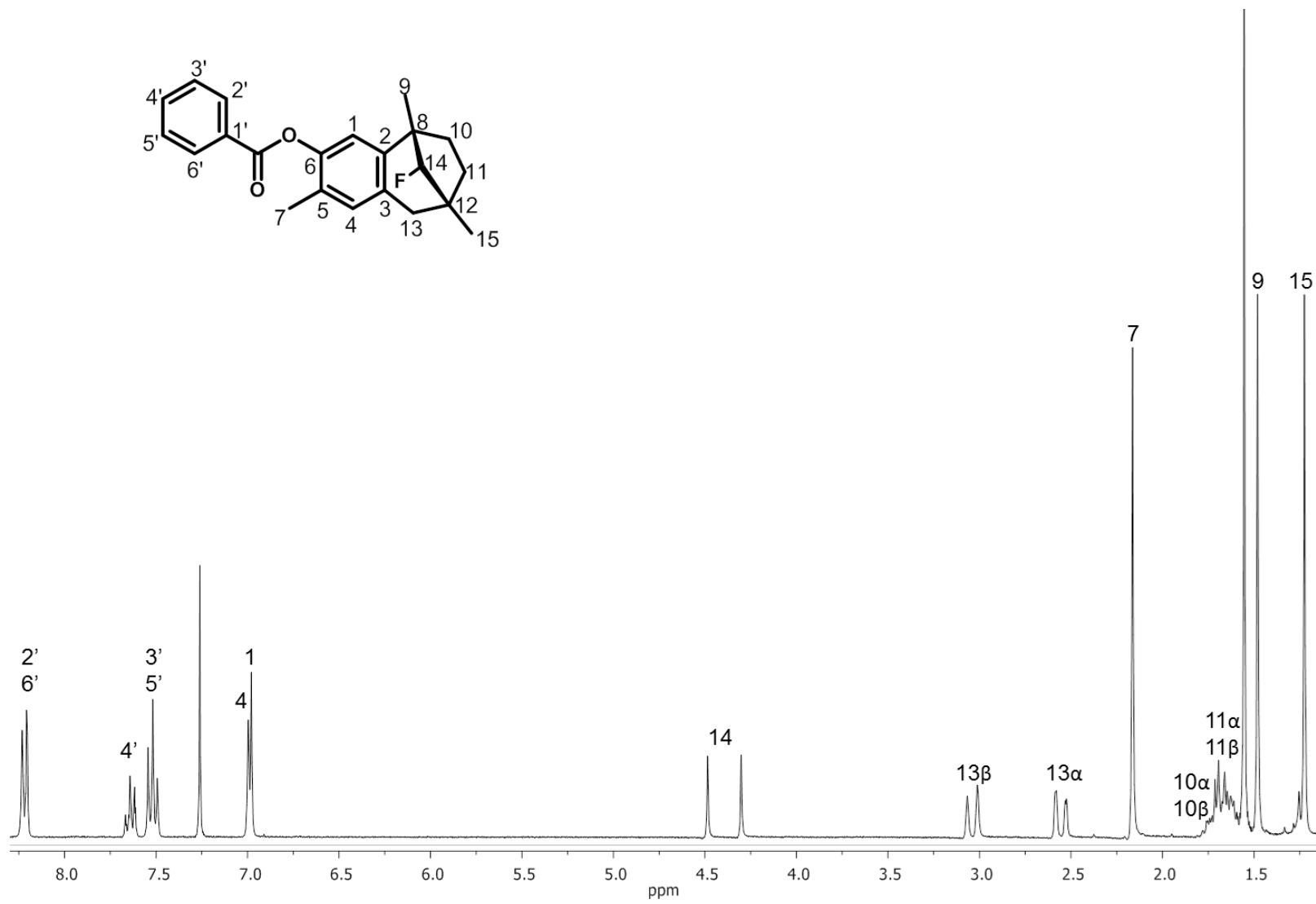


Figura 9A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 16.

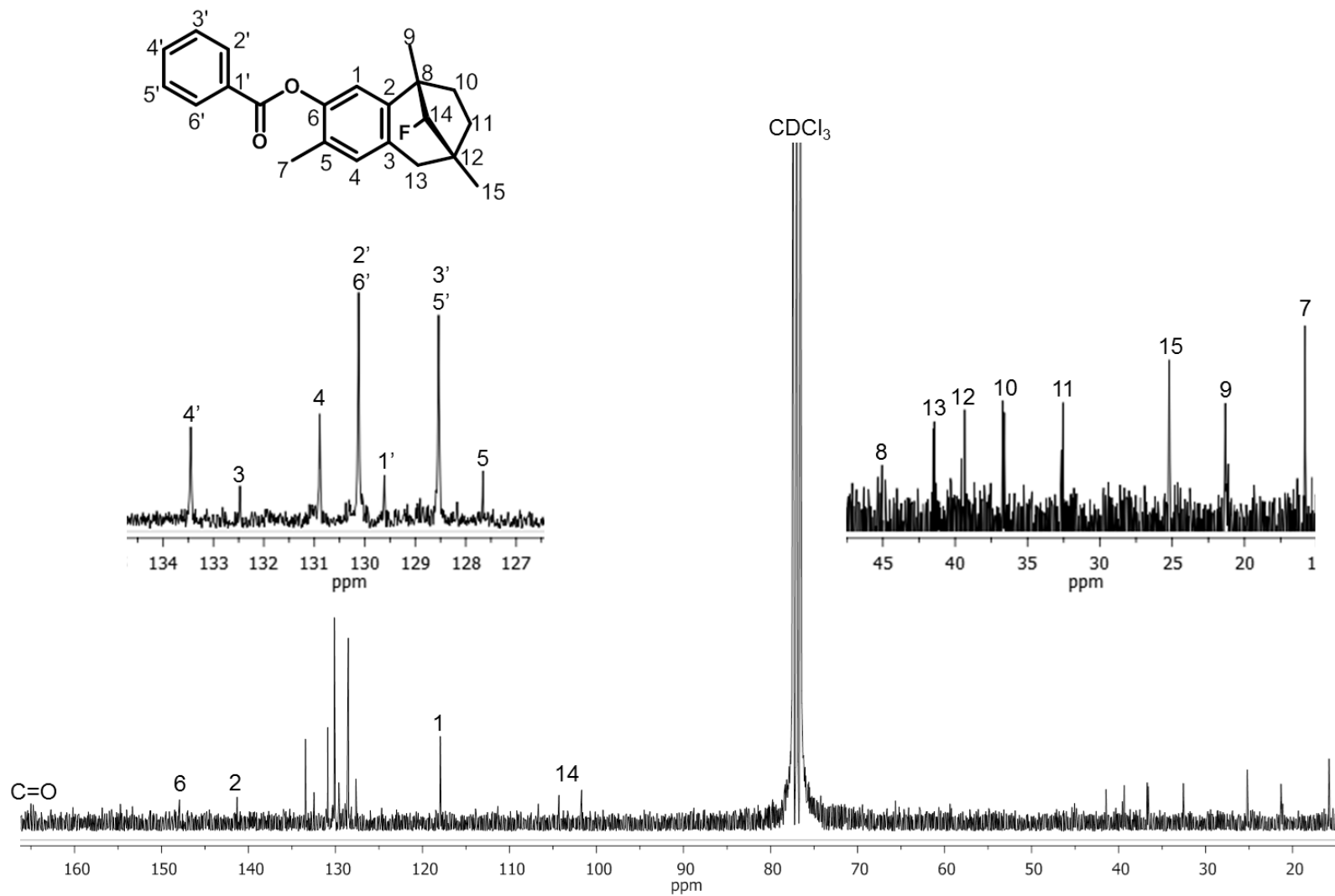


Figura 10A. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 16.

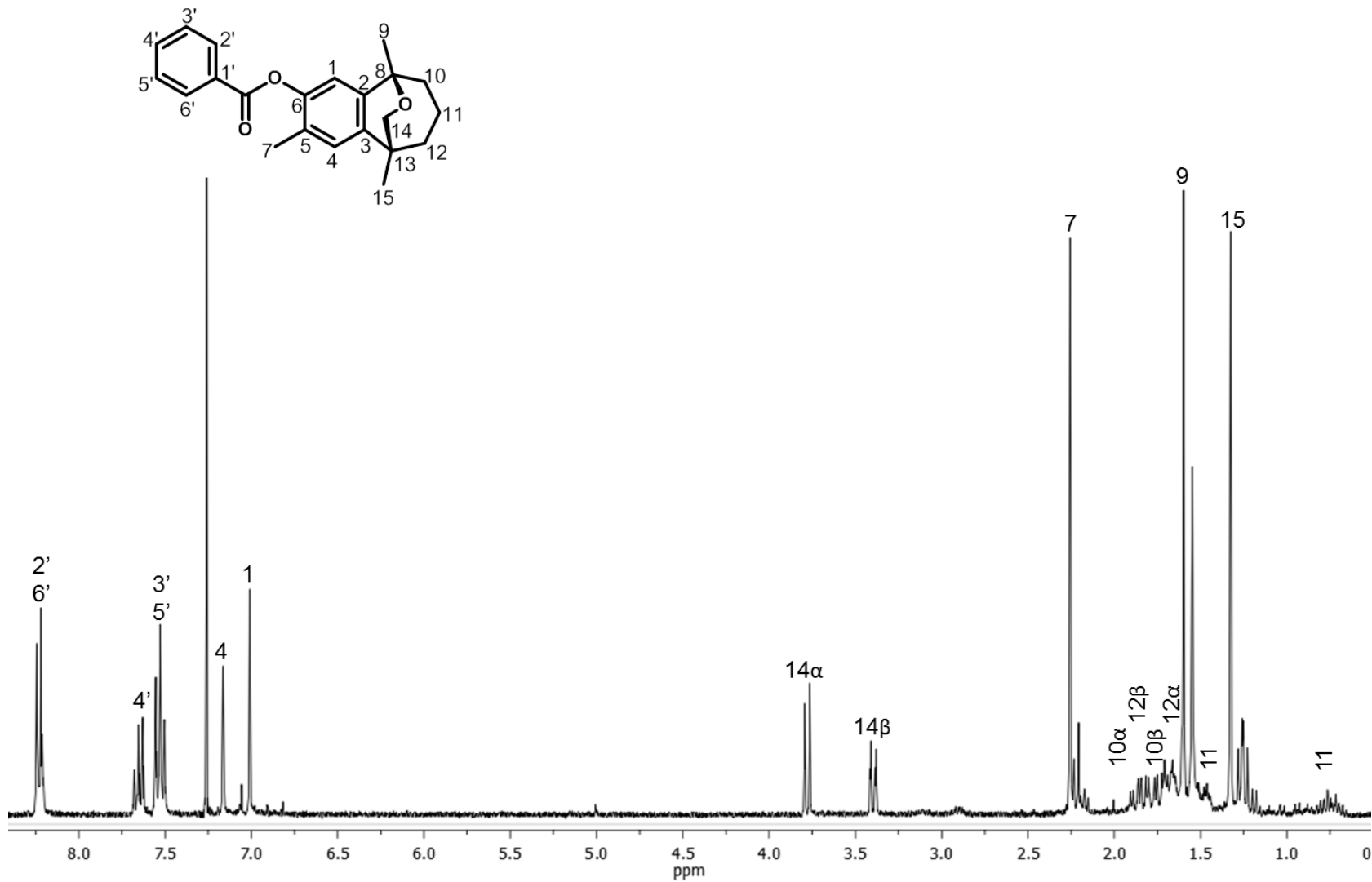


Figura 11A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 17.

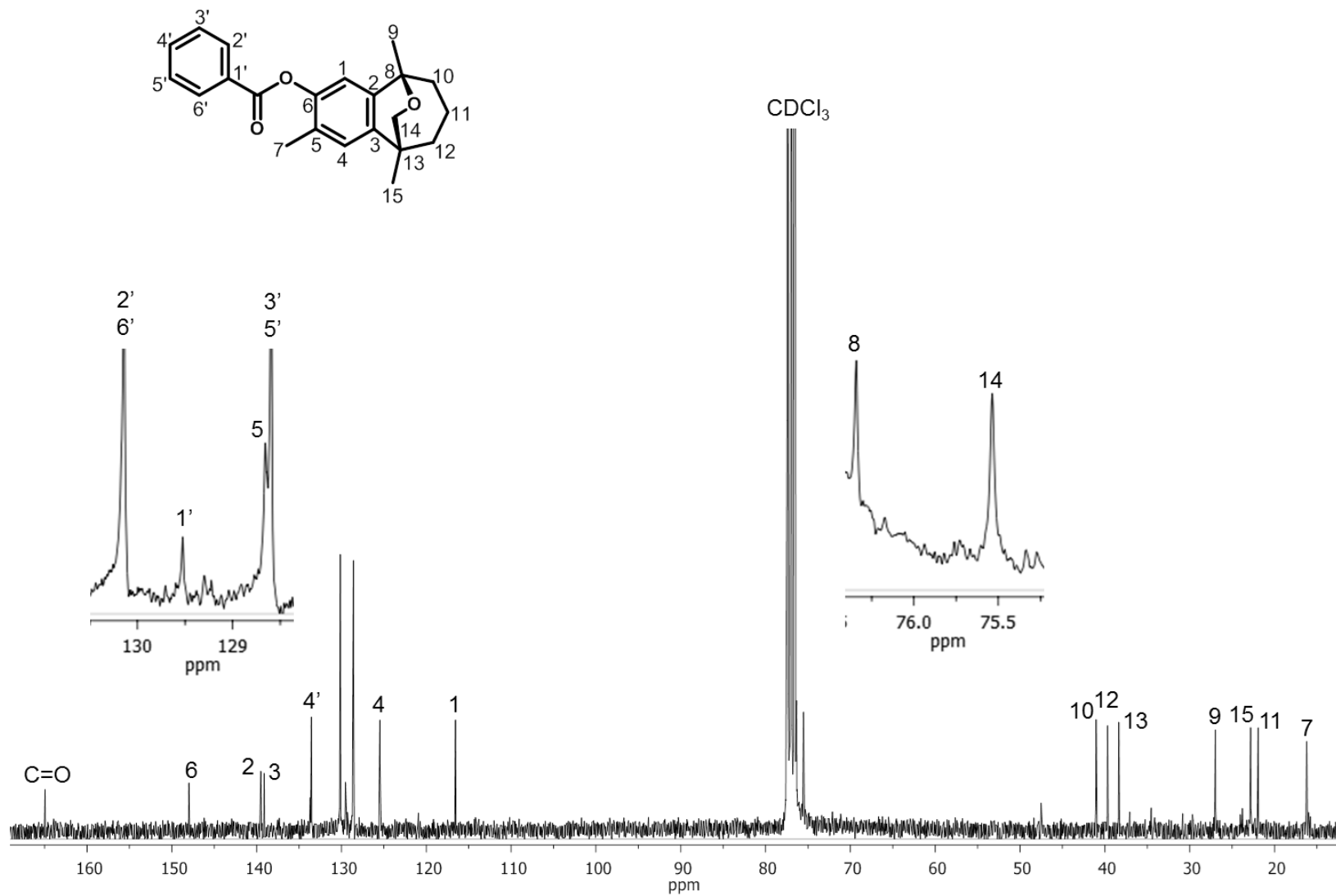


Figura 12A. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 17.

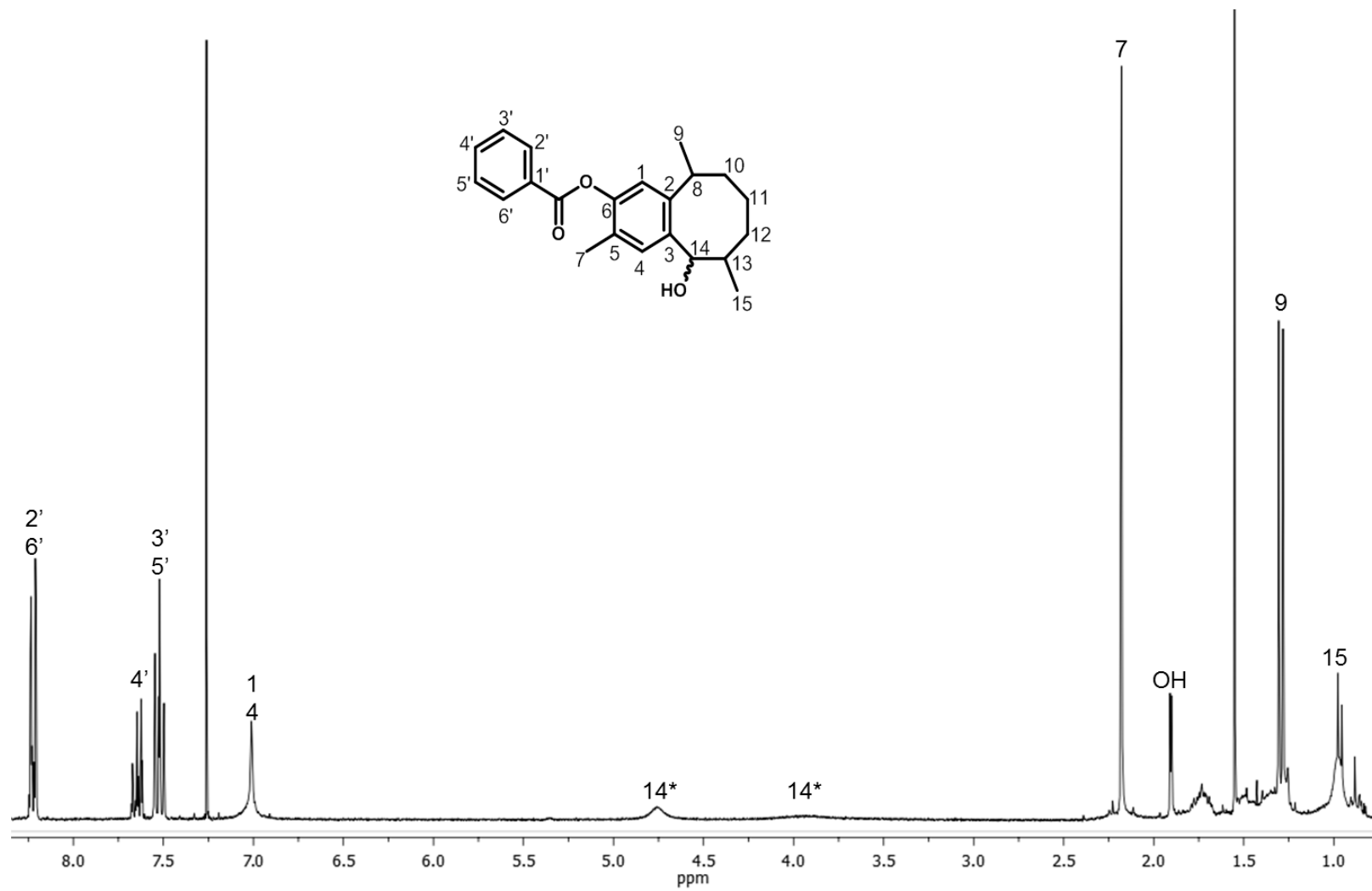


Figura 13A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 12. *señales simples anchas que corresponden al H-14 de ambos isómeros

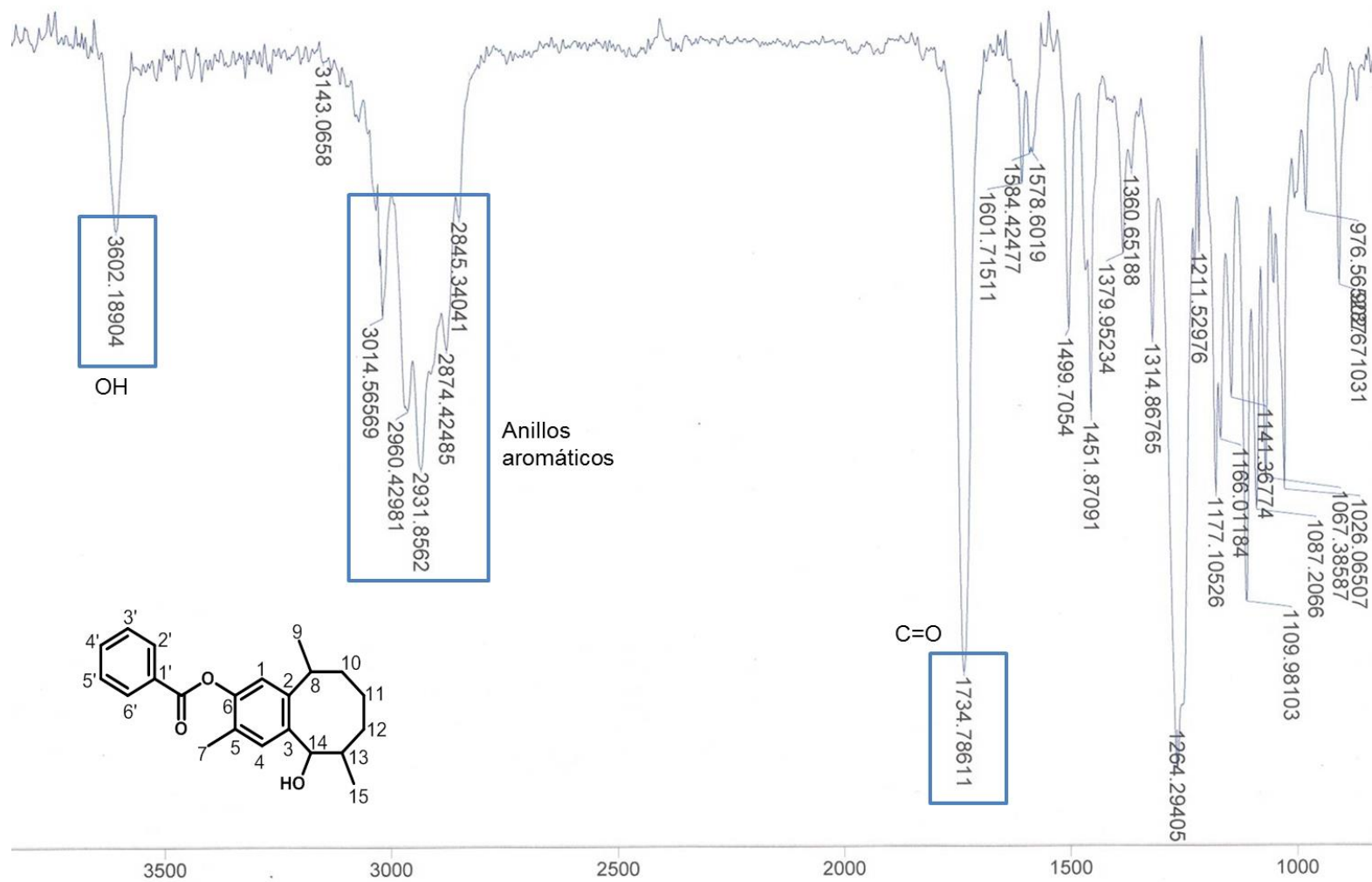


Figura 14A. Espectro de IR del derivado 12.

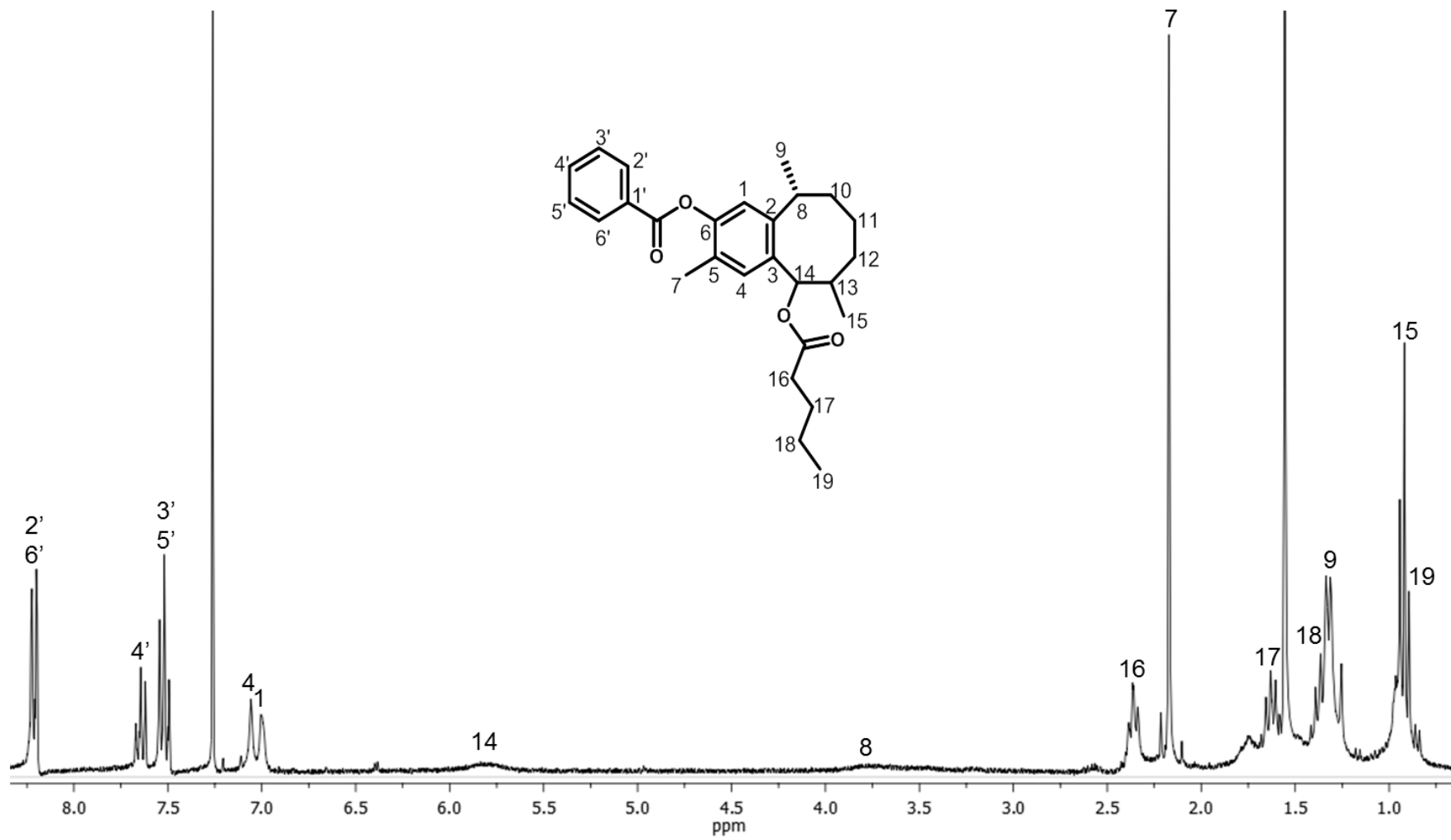


Figura 15A. Espectro de RMN de ¹H del derivado 13-B.

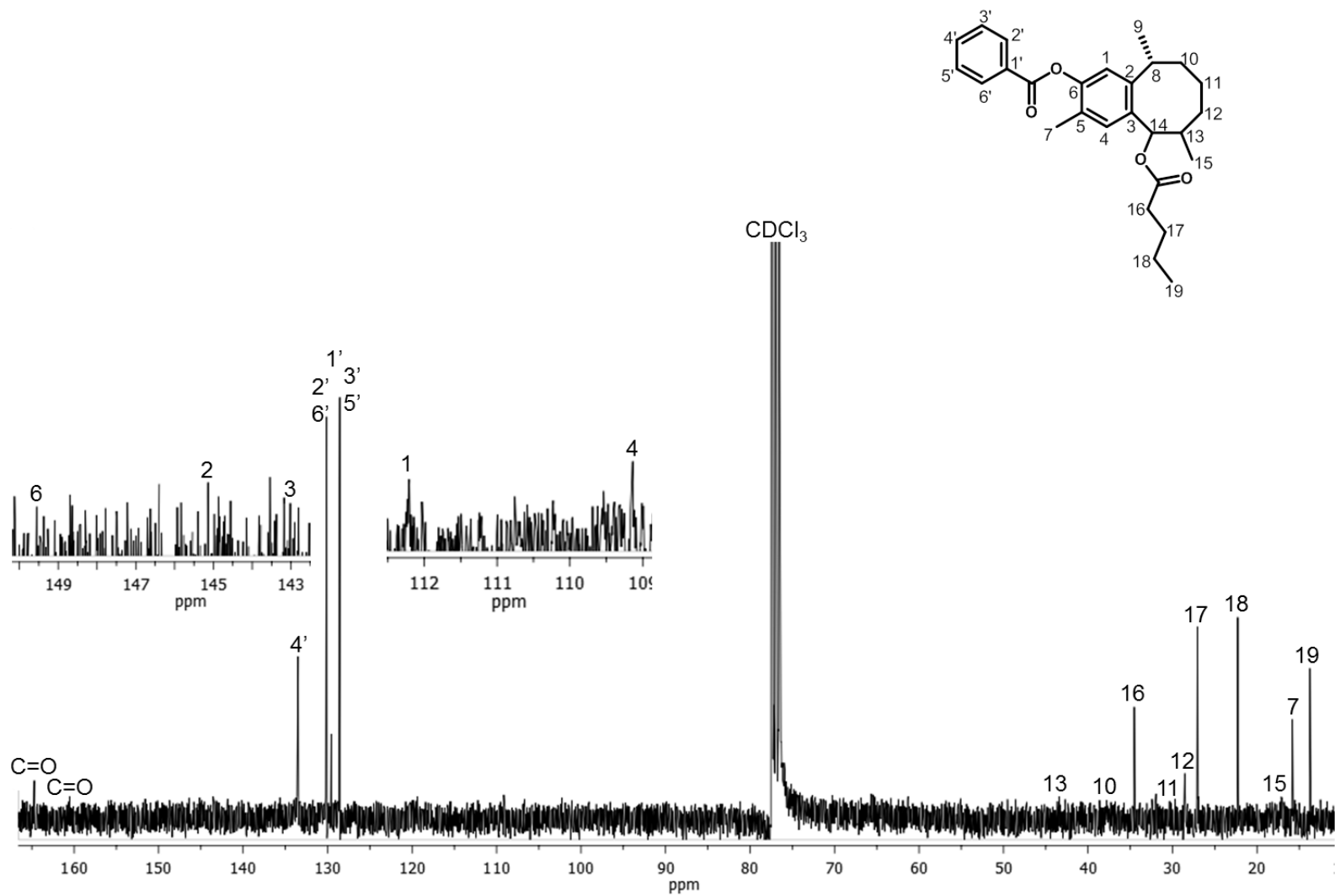


Figura 16A. Espectro de RMN de ^{13}C del derivado 13-B.

