



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Estudio Químico y Biológico de *Perymenium buphthalmoides*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

M.C. ANA KAREN VILLAGÓMEZ GUZMÁN

DIRECTORES:

D. Q. Mario Armando Gómez Hurtado

D. Q. Gabriela Rodríguez García

Morelia, Michoacán a julio de 2021

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D. Q. Mario Armando Gómez Hurtado y la D. Q. Gabriela Rodríguez García, con apoyo de la beca de doctorado 334474 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Esta investigación, así como colaboraciones dentro de nuestro grupo de trabajo permitieron la generación de las siguientes publicaciones, participación en congresos y coasesoría de tesis profesionales.

PUBLICACIONES:

1. **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Gabriela Rodríguez-García, Rosa E. del Río, Antonio J. Oliveros Ortiz, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan, Mario A. Gómez-Hurtado, New Kaurene Derivative From *Lasianthaea aurea* roots, *Chemistry of Natural Compounds*, 2021, 57, 319-322.
2. Gabriela Rodríguez-García, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Armando Talavera-Alemán, Rosalba Cruz-Corona, Mario A. Gómez-Hurtado, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan, Rosa E. del Río, Conformational, configurational, and supramolecular studies of podocephalol acetate from *Lasianthaea aurea*, *Chirality*, 2019, 31, 923-933.
3. Mario A. Gómez-Hurtado, Karina Nava-Andrade, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Rosa E. del Río, Noemí Andrade-López, José G. Alvarado-Rodríguez, Diego Martínez-Otero, David Morales-Morales, Gabriela Rodríguez-García, “Facile Synthesis and Structural Characterization of μ_4 -Oxo Tetrazinc Clusters of Beyerenic and Kaurenic Acids. *Tetrahedron Letters*, 2017, 58, 1112-1116.

TRABAJOS EN CONGRESOS:

1. Síntesis verde del complejo organometálico [Ru(η^6 -p-CIMENO)(KAURENATO)Cl], Mayra A. Martínez Torres, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Mario A. Gómez-Hurtado, David Morales Morales, Rosa E. del Río, Gabriela Rodríguez-García, presentado durante la 16^a Reunión Internacional de Investigaciones en Productos Naturales, “Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez” celebrada del 19 al 21 de mayo de 2021 en Zacatecas, Zacatecas, México.
2. Aislamiento y caracterización de metabolitos mayoritarios de *Trixis michuacana* var. *longifolia*, Luis Daniel Herrera Sanabria, Ángel Perea Frausto, **Ana Karen Villagómez Guzmán**, Rosa E. del Río, Mario Armando Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, presentado en el IV Foro del Posgrado en Ciencias Químicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, celebrado del 18 al 22 de enero de 2021 en Morelia, Michoacán, México.

3. Síntesis del complejo [Ru(h6-p-CIMENO) (BEYERENATO)Cl], Mayra Alejandra Martínez Torres, **Ana Karen Villagómez Guzmán**, Mario Armando Gómez Hurtado, Rosa Elva del Río Torres, Gabriela Rodríguez García, presentado en el marco del XLI Encuentro Nacional de la AMIDIQ celebrado de manera virtual del 22 al 24 de octubre de 2020.

4. Estudio de Reactividad del Ácido Kaurenoico Frente a Rutenio (II), Mayra A. Martínez-Torres, Cinthya A. Aguilera-Rebollar, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Rosa E. del Río, Mario A. Gómez-Hurtado, Gabriela Rodríguez-García, presentado en el marco de las actividades académicas del 14° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 30 de octubre de 2019 en Morelia, Michoacán, México.

5. Transesterificación de Aceite de *Olea europea* Mediante un Cúmulo Molecular Zinc-Diterpeno. Karina Zamudio-Jaime, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Rosa E. del Río, José L. Rico, Gabriela Rodríguez-García, Mario A. Gómez-Hurtado, presentado en el marco de las actividades académicas de 14° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 30 de octubre de 2019 en Morelia, Michoacán, México.

6. Análisis Químico Preliminar de *Trixis sp.* y su Uso Etnofarmacológico” Luis D. Herrera-Sanabria, **Ana Karen Villagómez-Guzmán**, Gabriela Rodríguez García, Rosa Elva Norma del Río Torres, Mario Armando Gómez Hurtado, presentado en el marco de las actividades académicas de 14° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 30 de octubre de 2019 en Morelia, Michoacán, México.

7. Synthesis of Novel 4-chloro-tetrahydropyranated derivatives from kaurenoic and beyerenoic acid via Prins cyclization, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Mario A. Gómez-Hurtado, Gabriela Rodríguez-García, Rosa E. del Río, Christine Thomassigny, Christine Greck, presentado en La 17^{ème} Rencontres de Chimie Organique (RCO), celebrada el 19 abril de 2019 en el campus CNRS de Gif sur Yvette, Francia.

8. Determinación de la actividad biológica de terpenos de *Perymenium sp.* Sara García Gil, Sara Cuadra Domínguez, Mario A. Gómez Hurtado, Gabriela Rodríguez García, **Ana Karen**

Villagómez Guzmán, María Dolores Jiménez Gordillo, Virginia Motilva Sánchez, Elena Talero Barrientos, presentado en la XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía, celebrada el 31 de mayo de 2019 en Málaga España.

9. *Ent*-kauranos de Interés Químico y Biológico Aislados de Extractos de *Perymenium bupthalmoides*. **Ana Karen Villagómez Guzmán**, Luis D. Herrera-Sanabria, Amalia Gutiérrez-Santoyo, J. Betzabe González-Campos, Rosa E. del Río, Gabriela Rodríguez-García, Mario A. Gómez-Hurtado, presentado en el marco de las actividades académicas del 13° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el Séptimo Encuentro de Jóvenes investigadores del Estado de Michoacán, celebrado el 19 de octubre de 2018 en Morelia, Michoacán, México.

10. Evaluación del potencial catalítico de cúmulos moleculares de zinc-kaureno y zinc-beyereno, Karina Zamudio-Jaime, Scarlet E. Madrigal Ortiz, Itzel E. Saldaña Herrera, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Rosa E. del Río, Gabriela Rodríguez-García, presentado en el marco de las actividades académicas del 13° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el Séptimo Encuentro de Jóvenes investigadores de Estado de Michoacán, celebrado el 19 de octubre de 2018 en Morelia, Michoacán, México.

11. Optimización del Proceso de Obtención del Complejo (μ_4 -oxo)-hexakis(μ_2 -kaurenato)-tetra-zinc(II), Mayra A. Martínez-Torres, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Mario A. Gómez-Hurtado, Luis D. Silva-Castillo, Rosa E. del Río, Gabriela Rodríguez-García, en el marco de las actividades académicas del 13° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el Séptimo Encuentro de Jóvenes investigadores de Estado de Michoacán, celebrado el 19 de octubre de 2018 en Morelia, Michoacán, México.

12. Triterpenos de Interés Biológico Aislados de *Perymenium bupthalmoides*, **Ana Karen Villagómez-Guzmán**, Luis D. Herrera-Sanabria, J. Betzabe González-Campos, Yliana López-Castro, Rosa E. del Río, Gabriela Rodríguez-García, Mario A. Gómez-Hurtado, presentado en el marco de las actividades académicas de 12° Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y el sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores de Estado de Michoacán, celebrado el 6 de octubre de 2017 en Morelia, Michoacán, México.

13. Estudio de los componentes minoritarios del extracto hexánico de raíz de *Perymenium buphthalmoides*, **Ana Karen Villagómez-Guzmán**, J. Betzabe González-Campos, Yliana López-Castro, Rosa E. del Río, Gabriela Rodríguez-García, Mario A. Gómez-Hurtado, presentado durante el 1er. Foro del Posgrado en Ciencias Químicas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, celebrado del 31 de julio al 4 de agosto de 2017 en Morelia, Michoacán, México.

14. Uso de un diterpeno en la química de coordinación, Gabriela Rodríguez-García, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Karina Nava-Andrade, Rosa E. del Río, Noemí Andrade-López, José G. Alvarado-Rodríguez, David Morales-Morales, Mario A. Gómez-Hurtado, presentado durante la 13ª Reunión Internacional de Investigaciones en Productos Naturales, “Dr. Juan Diego Hernández Hernández” celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.

15. Aislamiento y caracterización de triterpenos de *Perymenium buphthalmoides*, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Herminio Campos-Ramírez, Luis D. Herrera-Sanabria, Gabriela Rodríguez-García, J. Betzabe González-Campos, Rosa E. del Río, Mario A. Gómez-Hurtado, presentado durante la 13ª Reunión Internacional de Investigaciones en Productos Naturales, “Dr. Juan Diego Hernández Hernández” celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.

16. Kaurenos aislados de *Lasinthaëa aurea*, Rosalba Cruz-Corona, **Ana K. Villagómez-Guzmán**, Mario A. Gómez-Hurtado, Gabriela Rodríguez-García, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan, Rosa E. del Río, presentado durante el 51º Congreso Mexicano de Química y el 35º Congreso Nacional de Química, celebrado del 28 de septiembre al 01 de octubre del 2016 en Pachuca de Soto, Hidalgo, México.

TESIS DIRIGIDAS:

1. Coasesoria del alumno Luis Daniel Herrera Sanabria en la realización de su tesis profesional titulada: “Estudio Químico Preliminar de *Trixis michoacana* var. *longifolia* (D. Don) C.E. Anderson” realizada en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, presentada en mayo de 2019.

DEDICATORIA

A mi familia

A mi hija Constanza, el regalo más maravilloso que me ha dado la vida.

A mi esposo por su amor incondicional, por su paciencia, por su comprensión, por acompañarme en todas mis locuras, gracias por motivarme a ser mejor persona cada día, gracias Jairis por decidir compartir tu vida a mi lado.

A mis padres Ignacio Villagómez Morales (Q.E.P.D.) y Gloria Guzmán Rosales por amarme tanto, por enseñarme a luchar por mis sueños, porque sé que lo más importante para ustedes es siempre verme feliz.

A mis hermanos, por su amor incondicional, por estar cerca de mí en todo momento, este logro no sería posible sin su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Mario Armando Gómez Hurtado y a la Dra. Gabriela Rodríguez García por inspirarme en el camino de la investigación, por su confianza, por su paciencia, por todos los conocimientos que de manera muy gentil han compartido conmigo durante ya varios años, gracias por mostrarme el sorprendente mundo de los productos naturales y catálisis química.

De manera muy especial deseo expresar mi gratitud al grupo de investigación de la doctora Christine Greck, en especial a la Dra. Christine Thomassigny que sin conocerme decidió darme una oportunidad, gracias por mostrarme el camino de la síntesis química, pero, sobre todo, gracias a usted, a su familia y al equipo de trabajo del Institut Lavoisier de Versailles -UVSQ, por haberme hecho sentir en casa durante mi estancia.

Deseo también expresar mi agradecimiento a la Dra. J. Betzabe González Campos por compartir su área de trabajo para la realización de este proyecto, y a su grupo de investigación: Humberto, Fanny y Ale por los momentos que pase con ustedes.

Es importante manifestar mi agradecimiento a la Dra. Rosa Elva del Río Torres, al Dr. J. Martín Torres Valencia, al Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas y al Dr. Pedro Joseph-Nathan por sus amables comentarios durante el desarrollo de este proyecto, pero sobre todo gracias por ser personas que nos inspiran a las nuevas generaciones en el mundo de la investigación.

También deseo expresar mi gratitud a la Dra. Yliana López Castro, al Dr. Juan Pablo García Merinos y al Dr. Pedro Navarro por su amabilidad y confianza durante mi estancia en el laboratorio Síntesis Química, a mis compañeros del laboratorio de síntesis Alejandro, Cristian, Juan Antonio, Juan Luis, Isaí, Daniela y Roció, por ser muy buenos compañeros y por todos los momentos tan amenos que compartieron conmigo

De igual manera, agradezco a el Q.F.B. José Manuel y la Dra. Concepción por la importante labor que realizaron en la obtención de los espectros de RMN. Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento al M.C. José Luis por la obtención de los espectros de masa.

Gracias Dra. Lirenny Quevedo Tinoco por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas, gracias por esas platicas agradables que compartiste conmigo.

Agradezco enormemente, a grandes amigos Héctor, Dani y Jessy, fueron varios años trabajando juntos los cuales pasaron tan rápido gracias a su agradable compañía.

Gracias a los estudiantes con los que tuve oportunidad de trabajar Dani, Liliana, Ana Karina, Amalia, Alfredo, Daniel, Herminio, Kary y Mayra por ser personas perseverantes y comprometidas con el desarrollo de un excelente trabajo. Asimismo, gracias Toñito, Héctor, Dona, Eli, Fredy, Juan Carlos por su apoyo el en laboratorio, en general gracias a todos por ser buenos de compañeros de trabajo.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Género <i>Perymenium</i>	2
2.2. Investigaciones Fitoquímicas de <i>Perymenium bupthalmoides</i>	3
2.3. Aplicación de los metabolitos mayoritarios dentro de química de coordinación y catálisis.	6
2.4.1. Actividad antidiabética del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1)	8
2.4.2. Propiedad antiinflamatoria y analgésica del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1)	8
2.4.3. Actividad antioxidante del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1)	9
2.4.4. Actividad antibacteriana del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1)	10
2.4.5. Actividad antifúngica del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1).....	10
2.4.6. Actividad antiprotozoaria del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1).....	11
2.4.7. Actividad citotóxica y antitumoral del ácido <i>ent</i> -kaurenoico (1) y derivados	11
2.4.8. Actividad, antibacteriana, antifúngica y citotóxica del ácido <i>ent</i> -beyerenoico (2)	14
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	20
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
6.1. Colecta de la especie vegetal y análisis del extracto de AcOEt de flores	22
6.2. Aislamiento y caracterización de los metabolitos presentes en extracto hexánico de raíz.....	34
6.3. Obtención de derivados diterpénicos a partir de los ácidos <i>ent</i> -kaurenoico (1) y <i>ent</i> -beyerenoico (2).....	65
6.4. Evaluación Biológica de los metabolitos mayoritarios	86
7. CONCLUSIONES	89
8. SECCION EXPERIMENTAL	92
9. REFERENCIAS.....	110

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$[\alpha]_D^{25}$	Rotación específica
δ_H	Desplazamiento químico de H en ppm
δ_C	Desplazamiento químico de C en ppm
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
AcOEt	Acetato de etilo
Ang	Angelato
APT	Attached Proton Test
CA	Configuración absoluta
cm	Centímetro
COSY	Correlated spectroscopy
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
dda	Señal doble de dobles ancha
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional
DFT	Density Functional Theory
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dt	Señal doble de triples
dq	Señal doble de cuádruples
EMIE	Espectrometría de masa de impacto electrónico
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
g	Gramos
h	Horas
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy
HRMS	High Resolution Mass Spectra
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
km	Kilómetro
m	Señal múltiple
min	Minutos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MTT	(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PCC	Clorocromato de Piridinio
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
qd	Señal cuádruple de dobles
qq	Señal cuádruple de cuádruples
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN de ^1H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
T.A.	Temperatura ambiente
ta	Señal triple ancha
td	Señal triple de dobles
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

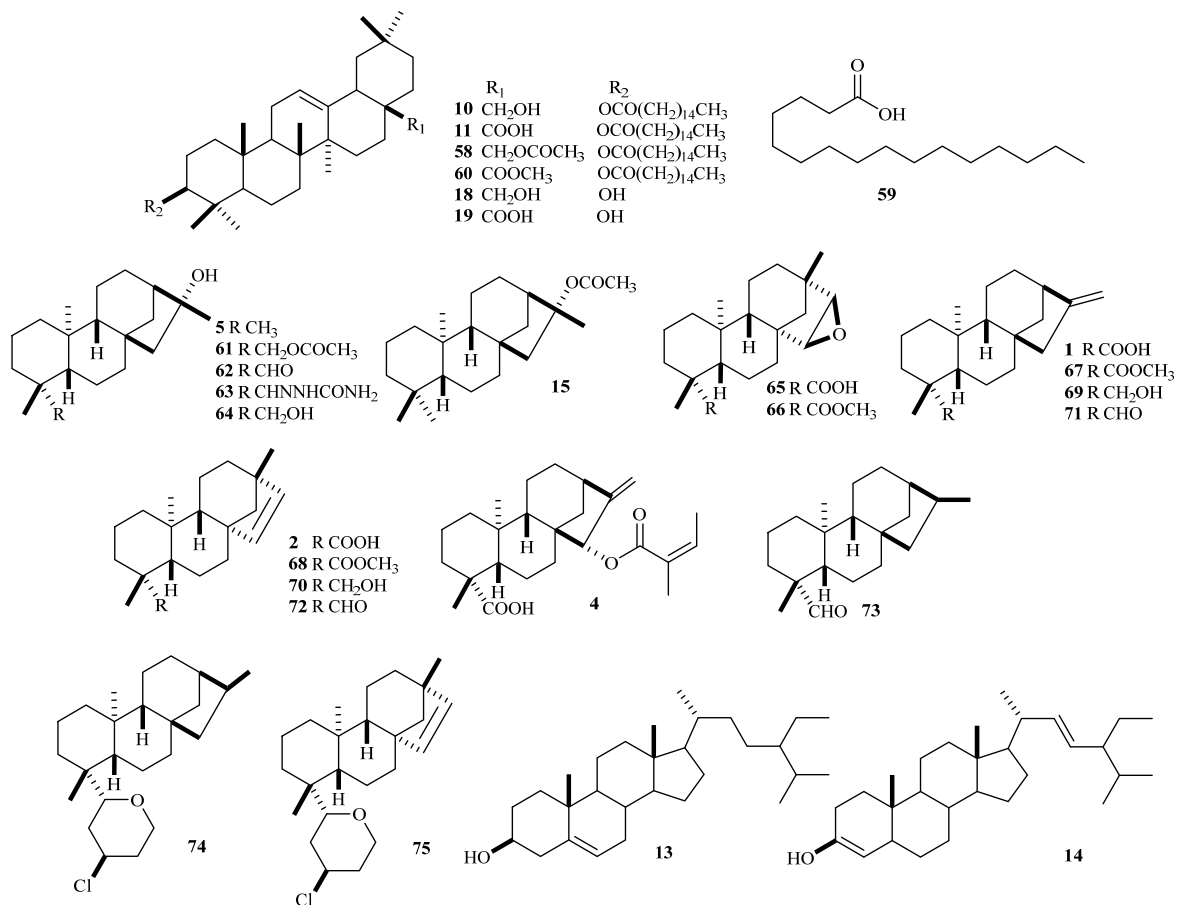
El análisis fitoquímico del extracto de AcOEt de flores de *Perymenium bupthalmoides* proporcionó como componentes mayoritarios los palmitatos de oleanilo (**10**) y de ácido oleanólico (**11**). Como parte de la caracterización química, los ésteres triterpénicos se sometieron a hidrólisis alcalina, acetilación y metilación generando los derivados **18-19** y **58** y **60**, respectivamente.

El estudio del extracto de hexanos de raíz permitió el aislamiento e identificación del *ent*-kauran-16 α -ol (**5**), 19-acetoxi-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**), *ent*-kauran-16 α ,19-diol (**64**), el 16 α -hidroxi-*ent*-kauran-19-al (**62**), este último identificado a través su derivado semicarbazona **63** y el nuevo ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (**65**). La metilación de **65** generó su respectivo éster metílico (**66**) el cual fue empleado para corroborar su configuración absoluta mediante la comparación de su espectro experimental de DCV respecto el espectro DFT calculado, sin embargo, dicha comparación generó un nivel de confianza de 100% para ambos epímeros, lo que sugiere que esta técnica no logró distinguir la quiralidad de los epímeros **66a** y **66b**, lo que representa el primer reporte sobre las limitaciones de la técnica de DCV para la determinación de la CA de *ent*-beyeranos. Por otro lado, fue posible establecer la configuración absoluta por correlación química de la serie *ent*-kauran-16 α -oles que involucran al *ent*-kauran-16 α -ol (**5**), 19-acetoxi-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**), *ent*-kauran-16 α ,19-diol (**64**), el 16 α -hidroxi-*ent*-kauran-19-al (**62**), este último identificado a través su derivado semicarbazona **63**.

En adición, del extracto de hexanos de la raíz se obtuvo la mezcla de fitoesteres **13** y **14**, así, como los componentes mayoritarios, los ácidos kaurenoico (**1**) y beyerenico (**2**) los cuales, fueron empleados como precursores para la preparación los derivados *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-16 β -kaurano (**74**) y *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-beyerenico (**75**). Para lograr lo anterior, procesos reductivos consecutivos a partir de **1** o **2** se llevaron a cabo (**67-69** y **70-73**, respectivamente), después, una ciclización Prins, la cual procedió de manera enantioespecífica.

Finalmente, se realizó la evaluación de la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de los metabolitos mayoritarios (ácido beyerenico (**2**), ácido kaurenoico (**1**), su derivado 15 α -angeloiloxi (**4**) y el palmitato del ácido oleanólico (**11**). La evaluación de la

actividad citotóxica fue llevada a cabo a través de la viabilidad de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y melanoma de piel humana UACC62 determinado por el método MTT.



Fórmulas de los metabolitos naturales **1-2**, **4-5**, **10-11**, **61-62**, **64-65**, aislados de *Perymenium buphthalmoides* y sus derivados **15**, **18-19**, **58-60**, **63**, **66-75**

Palabras Clave: *Perymenium buphthalmoides*, kaurano, beyerano, Asteraceae.

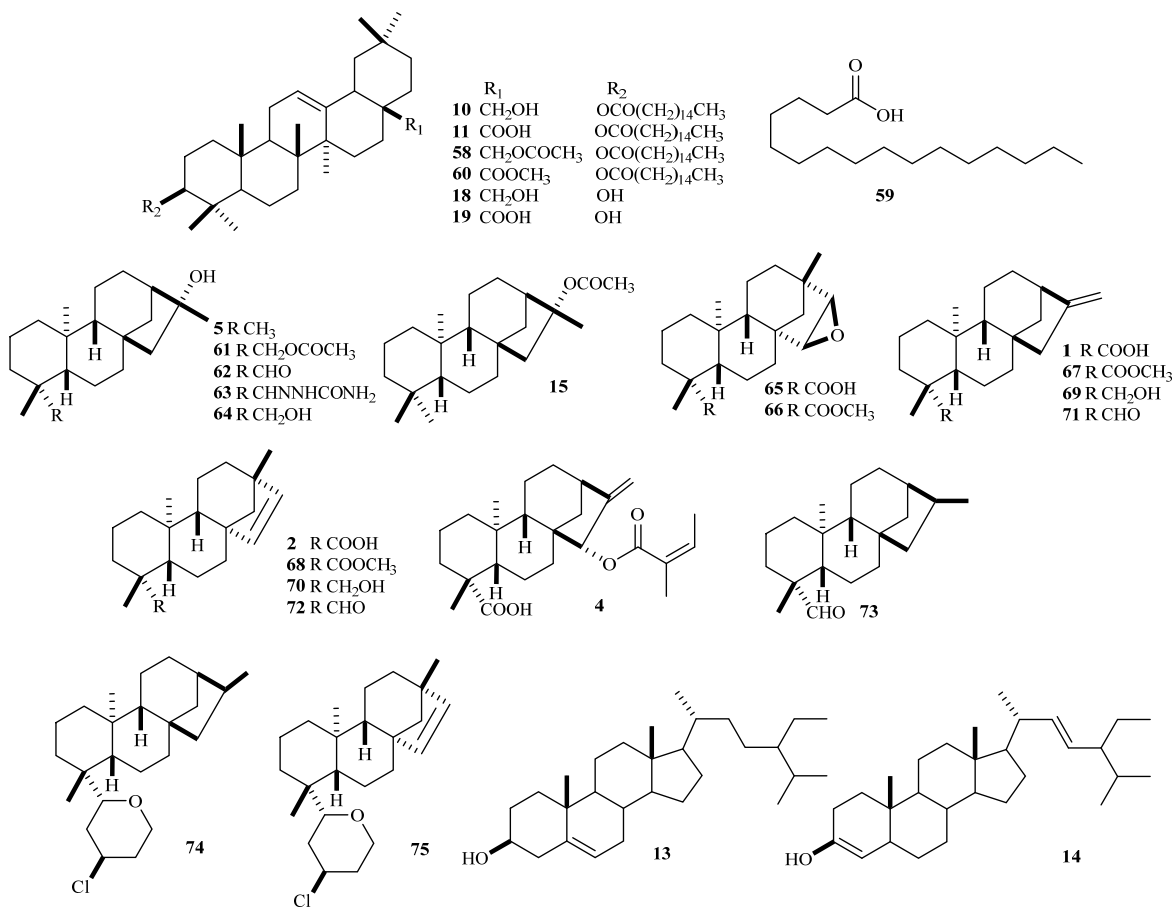
ABSTRACT

The phytochemical analysis of the EtOAc extract of the flowers from *Perymenium bupthalmoides* afforded oleanyl palmitates (**10**) and oleanolic acid (**11**) as major constituents. As part of the chemical characterization, the triterpene esters were derivatized by alkaline hydrolysis, acetylation, and methylation processes to give its respective derivatives **18-19**, **58** and **60**.

The study of the hexanes extract of the roots from *P. bupthalmoides* allowed the isolation of *ent*-kauran-16 α -ol (**5**), 19-acetoxy-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**), *ent*-kauran-16 α ,19-diol (**64**), 16 α -hydroxy-*ent*-kauran-19-al (**62**), and the new *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxy-19-oic acid (**65**). Compound **62** was unstable, thereby, its respective semicarbazone **63** was prepared. Methylation reaction of **65** provides the respective methyl ester derivative **66**, which was employed to support the absolute configuration (AC) determination by VCD experiments, however, statistical analysis provided 100% confidence level for both epimers suggesting limitations of this technique. The above represents the first report about limitations in VCD technique to determine the AC of *ent*-beyerane compounds. On the other hand, the absolute configuration of the *ent*-kauran-16 α -ol series were determined by chemical correlation.

In addition, chromatography of the hexanes extract from roots afforded the mixture of phytosterols **13** and **14**, as well as, kaurenoic (**1**) and beyerenoic (**2**) acids as the major components, which were employed as precursors for the preparation of derivatives *ent*-19-(4 β -chloro-tetrahydropyran)-16 β -kaurane (**74**) and *ent*-19-(4 β -chloro-tetrahydropyran)-beyerene (**75**). To gain the above, reductive reaction processes from **1** or **2** were done (**67-69** and **70-73**, respectively), after, a Prins cyclization was achieved which proceeded enantiospecifically.

Finally, the cytotoxic, anti-inflammatory, and antioxidant activity of the major metabolites, including beyerenoic acid (**2**), kaurenoic acid (**1**), 15 α -angeloyloxy (**4**), and oleanolic acid palmitate (**11**) were evaluated. The cytotoxic activity was carried out through the viability of the human colon adenocarcinoma cell lines HT-29 and human skin melanoma UACC62 determined by the MTT method.



Formulas of natural metabolites **1-2**, **4-5**, **10-11**, **61-62**, **64-65** isolated from *Perymenium bupthalmoides* and its derivatives **15**, **18-19**, **58-60**, **63**, **66-75**

Key Words: *Perymenium bupthalmoides*, kaurane, beyerane, Asteraceae.

INTRODUCCIÓN

El género *Perymenium* es un miembro de la familia Asteraceae, tribu Helianthae, subtribu Helianthinae. Se caracteriza por su vilano de aristas caducas y escabrosas, y sus flores amarillas con cabezas fértiles rayadas. Se sitúa en América tropical desde el Noroeste de México hasta Perú, de acuerdo a lo publicado por Fay en 1978 y Rzedowski, 2011. Al día de hoy, la composición química del género *Perymenium* ha sido poco explorada, hasta el momento, *P. ecuadoricum*,¹ *P. mendezii*,² *P. featherstonei*,³ *P. klattianum*,⁴ *P. discolor*,⁵ *P. berlandieri*,⁶ *P. hintonii*,⁷ y *P. grande*,⁸⁻⁹ cuentan con investigación fitoquímica de un total de 50 especies descritas, entre los principales componentes reportados destacan metabolitos de tipo monoterpenos identificados como constituyentes de los aceites esenciales, lactonas sesquiterpénicas, diterpenos tetracíclicos (*ent*-kauranos y *ent*-beyeranos) y triterpenos así como cumarinas y flavonoides, mientras que datos de estudios biológicos de estas especies no han sido reportados.

Perymenium buphthalmoides es una planta nativa de México, distribuida en el Estado Michoacán y Estados aledaños. Con investigaciones preliminares se estableció que los ácidos kaurenico (**1**) y beyerenico (**2**) son los principales componentes del extracto hexánico de raíz,¹⁰ posteriormente en un segundo análisis se describió la presencia de *ent*-kaurenos, *ent*-beyeranos, y alcoholes triterpénicos.¹¹ De acuerdo a los datos descritos estos terpenoides aislados de otras familias botánicas han mostrado potencial terapéutico.

En el presente trabajo, como parte de la continuidad de nuestra investigación fitoquímica de *P. buphthalmoides* se describe el aislamiento de los triterpenos 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol (**10**) y el ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**11**) cuyo proceso de acetilación, metilación e hidrólisis generaron evidencia experimental para su identificación, el nuevo ácido epoxi-beyerano (**65**), la serie de *ent*-kauran-16-ol (**5**, **61**, **62** y **64**), la mezcla de fitoesteroles **13** y **14**, los ácidos kaurenico (**1**) y beyerenico (**2**) los cuales, a través de la reacción de ciclización Prins generaron los *ent*-19-(4β -cloro-tetrahidropiran)- 16β -kaurano (**74**) y *ent*-19-(4β -cloro-tetrahidropiran)-beyereno (**75**). Además, se realizó la evaluación de la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de los metabolitos mayoritarios **1**, **2**, **4** y **11**, encontrando actividad de baja a moderada.

2. ANTECEDENTES

2.1. Género *Perymenium*

El género *Perymenium* fue descrito por primera vez por el botánico Schander en 1830 empleando como especie de estudio a *Perymenium discolor*. Posteriormente, en 1836 Agustín Pyramos de Candolle retomó la caracterización de las especies de este género en su libro *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* donde reconoció ocho especies, entre ellas, *Perymenium buphthalmoides*. Más tarde, en 1899, Robinson y Greenman llevan a cabo la primera revisión del género, y Blake en 1924 transfiere el género *Oteiza* a *Perymenium*. Ulteriormente, McVaugh's retomó los trabajos de revisión del género en su tratado de la *Flora Novo-Galiciana*, y en 1978 J. Fay realizó uno de los más recientes trabajos de investigación del género en México y Centroamérica reconociendo 33 especies.¹²⁻¹³

El género *Perymenium* se compone aparentemente de especies que descienden de un mismo antepasado de origen (monofilético), sin embargo, la identificación de sus especies ha presentado dificultad debido a su taxonomía difícil y controvertida, y que a menudo las claves existentes de clasificación no funcionan bien para el reconocimiento de estos ejemplares, por lo que los especialistas en la investigación de este género han sugerido que aún se encuentra en nuestro país un importante contingente de especímenes localizados de *Perymenium* por describirse y darse a conocer, situación que queda comprobada por la existencia de numerosos ejemplares de este género en los herbarios mexicanos clasificados incorrectamente o aún sin identificar.¹⁴⁻¹⁵

La información más actualizada sobre este género fue presentada por el Dr. Rzedowski en su libro *Flora del Bajío y Regiones adyacentes* publicado en el año 2011, en este trabajo reconoció 50 especies, indicando que nuestro país es su principal centro de diversidad.¹⁶

Dentro de las especies reconocidas se encuentra la especie *buphthalmoides*, planta herbácea perenne, erecta, ascendente o decumbente, hasta de 60 cm de largo con una raíz tuberosa a menudo muy engrosada y leñosa. Tallos frecuentemente varios partiendo de la base, simples o a veces ramificados, estriados, por lo común esparcidamente estrigosos, otras veces parcial o totalmente hispídos, sus hojas opuestas, casi sésiles o con peciolo hasta de 6

mm de largo, lámina foliar ovada a elíptica, ampliamente lanceolada u oblanceolada y flores liguladas 8 a 13, sus láminas elípticas ablanceoladas, de 0.8 a 2 cm de largo, amarillas, glabras o casi glabras; flores del disco 25 a 50, sus corolas tubulosas, de 3.5 a 5.5 mm de largo (Figura 2.1.1) distribuida principalmente en el Estado Michoacán, Querétaro y Guanajuato, la cual crece principalmente en matorrales xerófilos, pastizales, bosques de encino y de coníferas. Florece de junio a septiembre, especie por lo general común y sin problemas de supervivencia.¹⁶



Figura 2.1.1. *Perymenium bupthalmoides*. Espécimen colectado en la carretera Tiripetío-Acutzio de Canje en el año 2014.

2.2. Investigaciones Fitoquímicas de *Perymenium bupthalmoides*

Durante la investigación preliminar de *Perymenium bupthalmoides* en el año 2014, describimos la presencia de ácidos *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1**) y el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (**2**), como los metabolitos mayoritarios del extracto hexánico de raíz, así como el 3 β -friedelinol (**3**), Figura 2.2.1.¹⁰

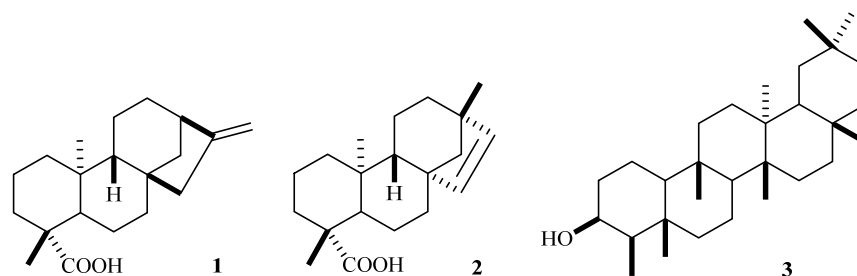


Figura 2.2.1. Terpenoides aislados de *Perymenium bupthalmoides*.

La continuación de la exploración química del extracto hexánico de raíz, proporcionó nuevamente los ácidos kaurenoico (**1**) y beyerenico (**2**), así mismo, se obtuvo el *ent*-kaur-15 α -angeloxi-16-en-19-oico (**4**) y el kauranol (**5**), identificado preliminarmente como el *ent*-kaur-16 β -ol de acuerdo a los datos reportados, adicionalmente, se obtuvieron los triterpenos acetato de taraxerol (**6**) y el acetato de 3 β -friedelinol (**7**) (Figura 2.2.2).

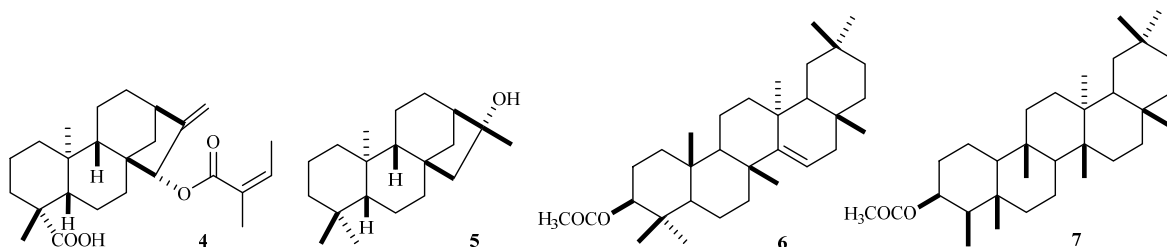


Figura 2.2.2. Metabolitos aislados de *Perymenium bupthalmoides*.

La investigación química de los extractos hexánicos de partes aéreas derivó en la obtención de la mezcla de 3 α -amirina (**8**) y 3 β -amirina (**9**), los triterpenos identificados de manera preliminar como palmitato de eritrodinol (**10**) y palmitato del ácido oleanólico (**11**), lupeol (**12**) y la mezcla de estigmasterol (**13**) y 3 β -sitosterol (**14**) (Figura 2.2.3).

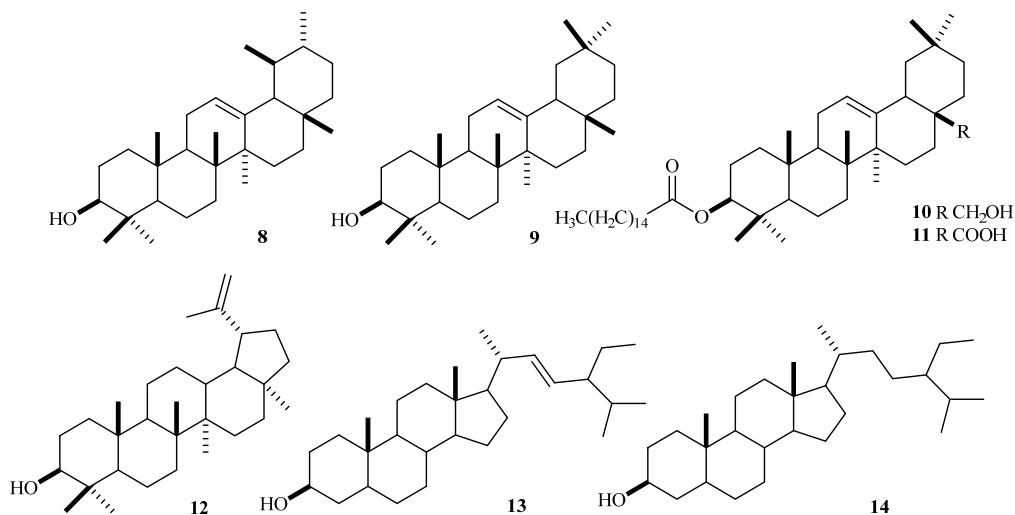


Figura 2.2.3. Triterpenos aislados de *Perymenium bupthalmoides*.

Asimismo, como parte de la caracterización del kauranol **5**, se preparó su derivado acetilado **15**, además, durante este procedimiento se obtuvieron de manera minoritaria **16** y **17** como productos de deshidratación y finalmente la hidrólisis básica de los ésteres triterpénicos proporcionaron los respectivos alcoholes **18** y **19** (Figura 2.2.4).¹¹

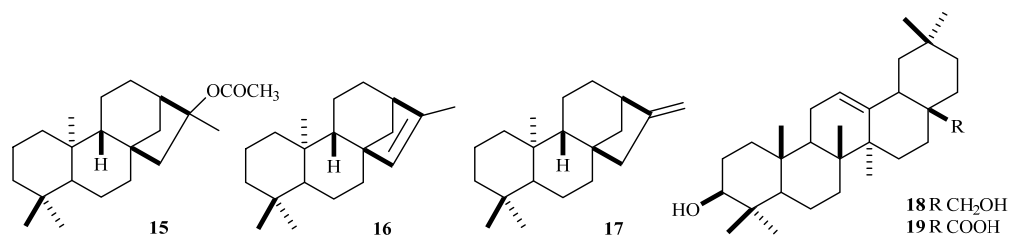


Figura 2.2.4. Derivados de los metabolitos naturales aislados de *P. buphthalmoides*.

Los terpenos con esqueleto de *ent*-kaureno representan una gran clase de productos naturales. Se han descrito más de 600 diterpenoides con esqueleto de *ent*-kaureno de 36 especies, muchos de ellos son ingredientes activos en la medicina tradicional y se han utilizado en China y Japón para el tratamiento de enfermedades asociadas con la inflamación y cáncer.¹⁷ Adicional a su actividad farmacológica esta clase de metabolitos representan un importante valor económico como lo son los *ent*-kauranos glicosilados (esteviósido y rebaudiósidos A-F) edulcorante natural no calórico aislado de las hojas de *Stevia rebaudiana*.¹⁸⁻¹⁹ De manera paralela a los *ent*-kaurenos se encuentran los *ent*-beyerenos, reportados dentro de especies de la familia Asteraceae como *Baccharis*, algunas de estas especies son empleadas en la medicina tradicional en países como Argentina, Bolivia, Chile y Perú para el tratamiento de heridas e inflamación.²⁰

Otro prominente grupo de productos naturales es el que incluye a triterpenos, presentes en aceites vegetales, hierbas medicinales, cereales y frutas. Una estimación de la ingesta media de triterpenos consumida por persona fue aproximado a 250 mg por día en países desarrollados y a 400 mg/kg en países del mediterráneo, donde la mayoría de las dietas se basan en aceite de oliva.²¹ Este aceite es una fuente importante de triterpenos tetra y pentacíclicos como el ácido oleanólico, eritrodiol y uvaol a los que se le atribuyen una gran variedad de efectos biológicos. El ácido oleanólico ha demostrado ser poseedor de una variedad de propiedades farmacológicas como actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora, citotóxica y antibacteriana. En relación al eritrodiol y al uvaol, solo han informado de su eficacia terapéutica en diferentes modelos experimentales de inflamación.²² En este contexto, en la búsqueda de posibles aplicaciones químicas y o biológicas, los metabolitos **1** y **2**, han sido sujetos de investigación por nuestro grupo trabajo en la química de coordinación y los derivados obtenidos han sido evaluados dentro de catálisis mostrando muy buenos resultados.

23,25

2.3. Aplicación de los metabolitos mayoritarios dentro de química de coordinación y catálisis.

El desarrollo de posibles aplicaciones para los diterpenos naturales **1** y **2** presentes *Perymenium buphthalmoides* se llevó a cabo explorando su reactividad frente a las sales de ZnCl₂ y IrCl₃. En el estudio de los terpenos **1-2** con ZnCl₂ a partir de los carboxilatos generados *in situ* **20** y **21**, propiciaron la formación de los complejos Zn₄O(kaurenato)₆] (**22**) y [Zn₄O(beyerenato)₆] (**23**) respectivamente (Figura 2.3.1).

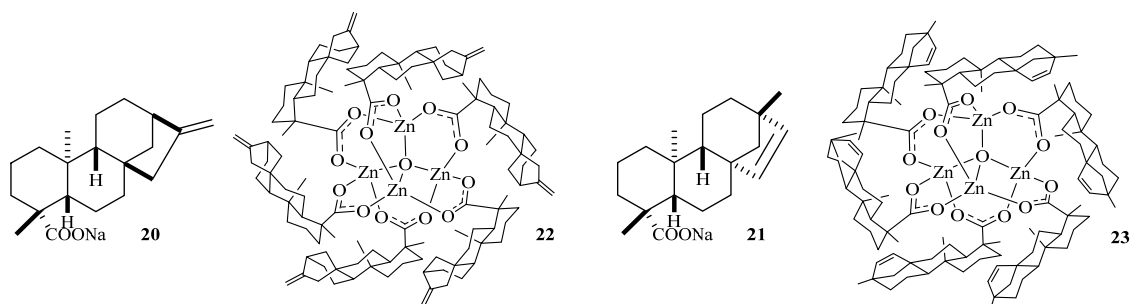


Figura 2.3.1. Cúmulos diterpénicos con Zn como centro metálico.

Además, durante esta investigación, reportaron los primeros ensayos catalíticos de los complejos [Zn₄O(kaurenato)₆] (**22**) y [Zn₄O(beyerenato)₆] (**23**) exhibiendo buena actividad catalítica en la reacción de transesterificación de tricaprilato de glicerina con metanol; por tanto, fueron considerados como catalizadores prometedores en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales.²³⁻²⁴

Estos ensayos preliminares de actividad catalítica por parte de los cúmulos diterpénicos **22** y **23** surgieron como un proyecto de investigación relevante, para ello nuestro grupo de trabajo amplió la investigación de condiciones para su utilización en reacciones de transesterificación logrando la optimización del proceso en rendimientos del 98% de FAME.²⁵

Estas investigaciones orientaron al grupo de trabajo a continuar con la exploración de la reactividad de los metabolitos **1** y **2**, ahora frente a las sales metálicas de Platino (II) y Rutenio (II) generando los complejos de coordinación **24-27** (Figura 2.3.2).²⁶

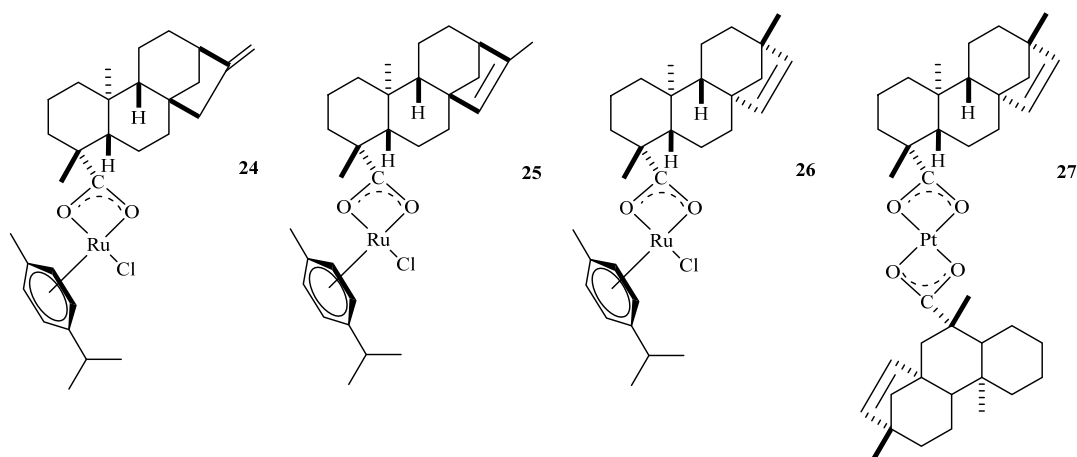


Figura 2.3.2. Complejos de coordinación a partir de sales de Platino (II) y Rutenio (II).

El ácido kaurenoico (**1**) es el miembro más representativo dentro de los diterpenos naturales con esqueleto de *ent*-kaurano, y ha sido identificado de especies del género *Wedelia*,²⁷⁻²⁸ *Viguiera*,²⁹ *Mikania*,³⁰⁻³¹ y *Helianthus*.³²

Es un diterpeno bioactivo participante en el metabolismo primario y secundario de las plantas con un amplio rango de actividades biológicas, el cual ha sido empleado como precursor para la semisíntesis de nuevos diterpenoides de tipo *ent*-kaurano con actividad farmacológica.³³ Dentro de las bioactividades descritas para el ácido kaurenoico (**1**), incluye efectos analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, hipoglucémico³⁴, tripanocida³⁵, anticancerígeno³⁶, anti-Alzheimer y antioxidante³⁷ diabetes tipo 2 y obesidad.³⁸

Con estructura similar se encuentran el ácido beyerenoico (**2**) identificado de *Perymenium klattianum*,⁴ *Mikania laevigata*,³⁹ *Elaeoselinum asclepium*⁴⁰ y *Viguiera hypargyrea*.⁴¹ También ha sido descrito de *Montanoa tomentosa*, empleada en la medicina tradicional como abortifaciente en las primeras etapas del embarazo, así como para inducir labor de parto.⁴²⁻⁴³

El amplio espectro de bioactividades descritas para los *ent*-kaurenos ha motivado la continuación de su evaluación biológica, así como, modificaciones estructurales con el objetivo de obtener nuevas sustancias potencialmente bioactivas⁴⁴ y dado que el ácido beyerenoico (**2**) también se encuentra presente en plantas empleadas en la medicina tradicional son considerados metabolitos de interés dentro de la investigación farmacológica.³³

2.4. Ácido *ent*-kaurenoico (1) y *ent*-beyerenoico (2) dentro de la medicina tradicional y evaluación biológica

2.4.1. Actividad antidiabética del ácido *ent*-kaurenoico (1)

La diabetes mellitus, es una enfermedad de alta incidencia en todo el mundo, incluye diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) es un objetivo terapéutico en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Productos naturales con varios esqueletos y diversas bioactividades brindan oportunidades para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad inhibidora de PTP1B *in vitro* e *in vivo*. *Aralia continentalis* es una hierba consumida en Corea, cuyas raíces se utilizan en la medicina tradicional china, su investigación fitoquímica proporcionó **1** el cual presentó una buena actividad anti-PTP1B.⁴⁵

La actividad hipoglucémica de **1** aislado de diferentes plantas medicinales ha sido sujeto de investigación. La administración intraperitoneal del **1** obtenido principalmente de tallos y raíces de *Wedelia paludosa* fue evaluado en ratas diabéticas inducida con aloxano donde el **1** presentó efectos significativos sobre los niveles de glucosa en relación al grupo control, sugiriendo que el **1** está contribuyendo a la actividad hipoglucémica de *W. paludosa*.⁴⁶ Similares resultados fueron obtenidos de la investigación de *Smallanthus sonchifolius*, conocido como yacón, comercializado en Filipinas como un tipo de té que posee propiedades antidiabéticas, la evaluación de **1** en la administración oral no afectó el nivel de glucosa en sangre de los ratones diabéticos inducidos por aloxano, pero una única inyección intraperitoneal en ratones normoglucémicos tuvo un porcentaje de reducción constante de glucosa en sangre que persistió durante períodos de observación de 1 a 2 h.⁴⁷

2.4.2. Propiedad antiinflamatoria y analgésica del ácido *ent*-kaurenoico (1)

Wedelia paludosa, es una planta medicinal brasileña empleada en la medicina popular contra una variedad de enfermedades, incluidas patologías dolorosas. El análisis farmacológico de **1** reveló que causó una inhibición gradual y significativa de la constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones con una inhibición máxima del 87%. En comparación con el ácido acetilsalicílico, acetaminofén, dipirona e indometacina, utilizando el mismo procedimiento farmacológico, el compuesto **1** fue aproximadamente 2 a 4 veces más potente.⁴⁸

De manera similar, el tratamiento intraperitoneal y oral con **1** dosis-dependiente inhibió la nocicepción inflamatoria inducida por ácido acético. Mecánicamente, **1** inhibió la producción de las citocinas hiperalgésicas TNF- α e IL-1 β . Además, el efecto analgésico de **1** fue inhibido por el tratamiento con L-NAME (L-nitro-arginina metil éster), ODQ, KT5823 y glibenclamida, lo que demostró que dicha actividad también depende de la activación de la vía de señalización del canal de potasio sensible al NO-cíclico GMP-proteína quinasa G-ATP, respectivamente.⁴⁹

Adicionalmente, el ácido *ent*-kaurenoico (**1**), aislado de *Copaifera langsdorffii* se evaluó en colitis en ratas inducida por ácido acético donde **1** mostró una reducción de daño en ratas que recibieron 100 mg/kg de ácido kaurenoico (**1**), por vía rectal y oral.⁵⁰

Por otro lado, **1** aislado de *Copaifera officinalis* L. causó efecto antinociceptivo en la prueba de movimiento de la cola de una manera dosis-dependiente.⁵¹ Adicionalmente, **1**, aislado de la raíz de *Aralia continentalis* mostró actividad antiinflamatoria, inhibiendo la producción de óxido nítrico (NO), la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la expresión inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) a concentraciones micromolares en macrófagos, el cual podría ser uno de los mecanismos responsables de esta propiedad. En la evaluación del efecto antiinflamatorio *in vivo* **1** redujo la hinchazón de la pata hasta un 34.4% a las 5 h después de la inducción, lo que demuestra la inhibición en un modelo de inflamación aguda.⁵²

2.4.3. Actividad antioxidante del ácido *ent*-kaurenoico (1**)**

El ácido kaurenoico (**1**) ha sido objeto de análisis en investigaciones biológicas mostrando un efecto antiinflamatorio en diferentes modelos. La evaluación *in vitro* de **1** frente a los efectos inmunomoduladores y antioxidantes se llevó a cabo en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c tratados durante 24 h. El ácido kaurenoico (**1**) indujo la producción de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , mientras que también aumentó los niveles de IL-10. También hubo reducción de la producción de NO e inducción del perfil antioxidante. Adicionalmente, la evaluación de **1** sobre algunos parámetros de estrés oxidativo, promovió el aumento de la capacidad antioxidante total (TRAP).⁵³

2.4.4. Actividad antibacteriana del ácido *ent*-kaurenoico (1)

Aislado de distintas plantas medicinales usadas en la cicatrización de heridas, el ácido *ent*-kaurenoico (1) fue evaluado frente a su potencial antibacteriano mostrando mejores efectos antibacterianos contra bacterias Gram-positivas como *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*,⁵⁴ y *Bacillus subtilis* que contra los bacilos Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* y *Escherichia coli*.⁵⁵ Algunos estudios sugieren que dicha selectividad está relacionada con las diferencias en la estructura de la pared celular y la permeabilidad de la membrana celular.⁵⁶⁻⁶⁰ Sin embargo, concluyen que la moderada actividad antibacteriana de **1** puede reducir su utilidad como compuesto principal en el descubrimiento y desarrollo de fármacos pero todavía podría ser útil en formulaciones antisépticas y desinfectantes.⁵⁷ No obstante, el potencial antimicrobiano frente a *Pseudomonas pyocyanea* ha sido descrito.⁶¹ Así mismo, el ácido *ent*-kaurenoico (1) inhibió significativamente el crecimiento y la producción de ácido de *Streptococcus mutans*, disminuyó la viabilidad bacteriana de una manera dependiente de la dosis, sugiriendo que **1** puede ser un agente útil para inhibir las propiedades cariogénicas de *Streptococcus mutans*.⁶²

2.4.5. Actividad antifúngica del ácido *ent*-kaurenoico (1)

Dentro de la medicina tradicional brasileña existen reportes del uso de las flores de *Wedelia paludosa* para tratar afecciones de la piel. El ácido *ent*-kaurenoico (1) uno de los principales componentes de esta planta fue evaluado contra dermatofitos como *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, mostrando moderada actividad, con lo que pudo relacionarse el popular uso de esta parte de la planta en el tratamiento de infecciones dérmicas.⁶³⁻⁶⁴ Extraído de las hojas de *Mikania hirsutissima*, **1** mostró actividad fungistática contra *Aspergillus nidulans* con alargamiento hifal visible y daño morfológico. Estos efectos se revirtieron mediante la adición de CaCl₂, lo que demostró que **1** interfirió con el gradiente de Ca²⁺ intracelular en el hongo.⁶⁵ Adicionalmente, fue reportado que derivados del ácido *ent*-kaurenoico (1) cuando se combinaron con fluconazol, mostraron actividad contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes al fluconazol.⁶⁶

2.4.6. Actividad antiprotozoaria del ácido *ent*-kaurenoico (1)

Leishmaniasis es una enfermedad tropical, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, hay aproximadamente entre 600,000 y un millón de casos nuevos de leishmaniasis cutánea cada año en todo el mundo. Con el objetivo de investigar su actividad antiprotozoaria, **1** fue evaluado por Santos *et al.*, 2013 contra *Leishmania amazonensis*, mostrando actividad contra la forma amastigote de *L. amazonensis*. Además, se reporta que **1** causó alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática y la despolarización de la membrana mitocondrial del protozoo.⁶⁷⁻⁶⁸ La actividad antipalúdica del ácido *ent*-kaurenoico (**1**) y sus derivados *ent*-kauranepoxidos fue reportada con estudios *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina mostrando de moderada a buena actividad antimalárica.⁶⁹

El diterpeno **1** también fue identificado como el componente tripanocida del extracto etanólico de *Mikania obtusata*, este compuesto mostró actividad contra las formas tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*.⁷⁰

2.4.7. Actividad citotóxica y antitumoral del ácido *ent*-kaurenoico (1) y derivados

En adición a las propiedades anteriormente descritas, el ácido *ent*-kaurenoico (**1**) ha sido sujeto de investigación frente su actividad citotóxica para su posible aplicación en tratamiento del cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en las Américas. De acuerdo a lo publicado en el 2018, se diagnosticaron 3.8 millones de casos y 1.4 millones de personas murieron por esta enfermedad. En México se presentaron un total 190,667 casos de los cuales 83,476 desafortunadamente perdieron la vida. Los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en nuestro país son: de mama (14.3%), de próstata (13.1%), colorrectal (7.8%), tiroides (6.4%), de pulmón y cervicouterino con 4.1% de incidencia respectivamente.⁷¹

Existen diversos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas. Sin embargo, muchos de los medicamentos obtenidos por síntesis química y/o derivados de plantas no tienen el efecto esperado, esto debido a la misma complejidad de la enfermedad y a los efectos secundarias que presentan. En la búsqueda de nuevas sustancias

activas, las plantas han sido y seguirán siendo una excelente alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que contribuyan de base en el desarrollo de nuevos fármacos.⁷² En este sentido, los diterpenos con esqueleto de *ent*-kaurano y *ent*-beyerano han sido sujetos de estudio en esta área de investigación, mostrando buenos resultados, que pueden contribuir al diseño de nuevos fármacos anticancerígenos.

El ácido kaurenoico (**1**) mostró un efecto citotóxico moderado hacia las células cancerosas de HL60 y K562 (leucemia), SF295 (melanoma) y MDA-MB435 (glioblastoma). Sin embargo, **1** mostró poca selectividad, ya que también inhibió la proliferación de linfocitos con IC₅₀ de 12.6 mg/mL. Dado que HL-60 fue la célula más sensible a los efectos del **1**, fue seleccionada para evaluar los mecanismos subyacentes a la citotoxicidad observada. A sí mismo, la microscopia de fluorescencia indicó que **1** puede inducir tanto la apoptosis como la necrosis en cultivos de células HL-60, lo que corrobora los hallazgos con MTT.⁷³

Por otra parte, el tratamiento del ácido kaurenoico (**1**) disminuyó significativamente la viabilidad celular en las células de glioblastoma humano U87 a través del método de exclusión del colorante azul tripán. El porcentaje de células apoptóticas fue del 9% para las células control, del 26% para las células sometidas a 48 h de tratamiento con **1** a 50 µM y del 31% para las células sometidas a 48 h de tratamiento con 70 µM de **1**. Asimismo, en células U87 tratadas con **1** durante 48 h, aumentó en la expresión de genes apoptóticos (caspara-8, -3) y una disminución en la expresión de genes antiapoptóticos (miR-21 y c-FLIP).⁷⁴

En el ensayo MTT, el ácido kaurenoico (**1**) produjo inhibición del crecimiento de las células leucémicas CEM en un 95%, células de cáncer de mama MCF-7 y de cáncer de colon HCT-8 en un 45% cada una. Además, **1** indujo una hemólisis dependiente de la dosis de eritrocitos humanos y de ratón con una CE₅₀ de 74.0 y 56.4 µM, respectivamente.⁷⁵

La actividad antitumoral *in vivo* e *in vitro* del ácido kaurenoico (**1**) fue evaluada en ratones C57BL/6 y cultivos celulares, mostrando resultados de efecto antitumoral en ambos ensayos y en comparación con taxol, su actividad antimelanoma mostró buenos resultados. Estos resultados fueron confirmados por análisis morfológico.⁷⁶

Asimismo, del ácido *ent*-kauranoico (**1**) y sus análogos **28-31** fueron evaluados *in vitro* frente a células tumorales de próstata (22Rv1, LNCaP), colon (HT-29, HC-T116, SW-

480, SW-620), y de mama (MCF-7) en concentraciones que van de 6 a 50 mg/mL. Los kaurenos mostraron actividad en todas las líneas celulares ensayadas, siendo las células de la próstata las que mostraron mayor sensibilidad (Figura 2.4.7.1).⁷⁷

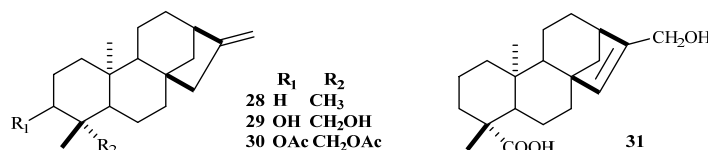


Figura 2.4.7.1. *Ent*-kaurenos probados frente a líneas celulares.

El ácido *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oico (**33**) derivado del ácido grandiflorólico (**32**) aislado de *Espeletia scultzii* mostró efecto proapoptótico sobre la línea celular epitelial del carcinoma de próstata humano PC-3. La viabilidad celular se vio afectada tras la exposición al compuesto, mostrando una CI₅₀ de 3.7 µg/mL (Figura 2.4.7.2).⁷⁸

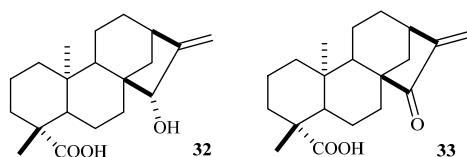


Figura 2.4.7.2. Derivados con esqueleto de *ent*-kaureno con efecto proapoptótico.

Las actividades citotóxicas del ácido *ent*-kaurenoico (**1**) y 15 derivados (Figura 2.4.7.3) fueron evaluados en cultivos de células cancerosas de colon (SW620 y SW480), de páncreas (PANC-1 y BxPC-3), estómago (SGC-7901), esófago (Eca-109), y leucemia (K562 y HL-60). **1** fue inactivo contra las líneas de células tumorales; sin embargo, sus derivados que contienen cetona α,β -insaturada presentaron actividad citotóxica. Los compuestos **35-48** con una sustitución en la posición C-4 mostraron una actividad inhibitoria significativa contra las líneas celulares ensayadas, mientras que el compuesto **33**, sin alguna sustitución en la posición C-4, fue ligeramente menos activo en estas líneas celulares. La célula de cáncer de colon (SW620) fue altamente susceptible a todos los derivados ensayados.⁷⁹

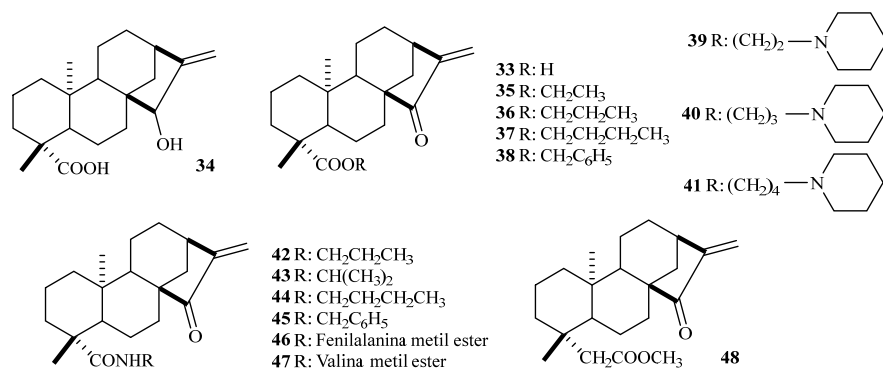


Figura 2.4.7.3. Ácido *ent*-kaurenoico (**1**) y 15 derivados semisintéticos evaluados en cultivos de células cancerosas.

Considerando el potencial citotóxico reportado para el ácido kaurenoico (**1**) Simão y colaboradores en el año 2015, llevaron a cabo la síntesis de los derivados amídicos **49-57** los cuales fueron evaluados para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama (MCF-7). Entre los derivados probados, el compuesto **54** fue el más activo (Esquema 2.4.7.4).⁸⁰

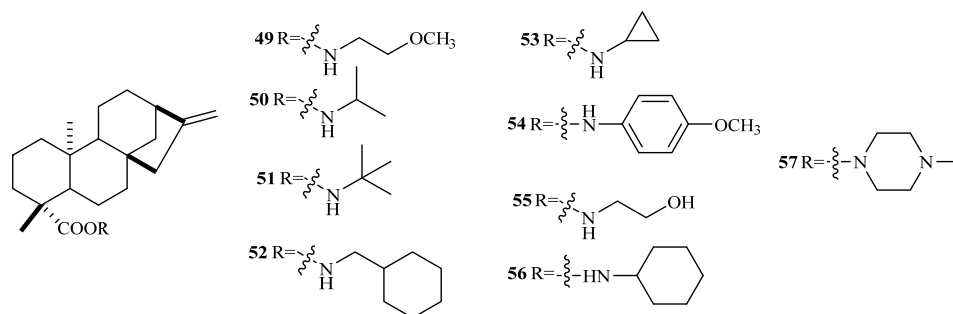


Figura 2.4.7.4. Derivados semisintéticos del ácido *ent*-kaurenoico (**1**) evaluados *in vitro*.

2.4.8. Actividad, antibacteriana, antifúngica y citotóxica del ácido *ent*-beyerenoico (**2**)

La evaluación farmacológica del ácido beyerenoico (**2**) aislado de *Viguiera hypargyrea* (asterácea) conocida comúnmente como “plateada” empleada en la medicina tradicional en el tratamiento de desórdenes intestinales mostró un efecto antiespasmódico con una inhibición de la contracción del 63.54%. Además, presentó actividad antibacteriana y antifúngica frente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.⁸¹

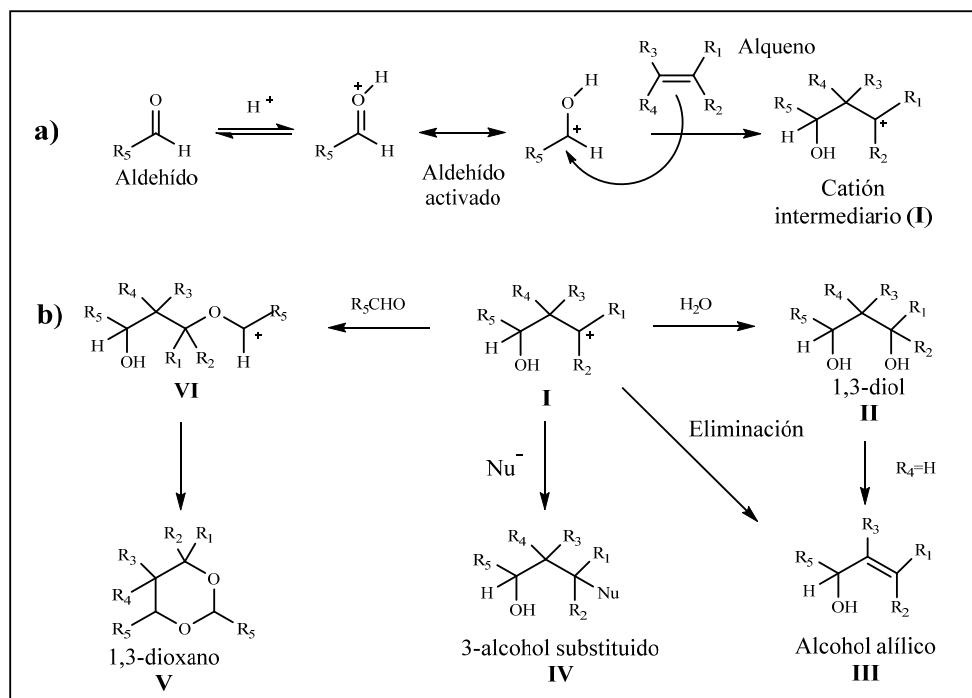
Así mismo, la investigación fitoquímica del extracto de acetona de las partes aéreas de *Elaeoselinum asclepium* proporcionó varios diterpenoides conocidos, entre ellos el ácido

ent-beyerenoico (**2**), el cual fue investigado frente células C-6 de glioma de rata mediante la evaluación de inhibición del crecimiento celular mostrando actividad citotóxica.

Con la finalidad de obtener estructuras biológicamente activas se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de la incorporación de anillos de tetrahidropirano (THP) en los metabolitos **1** y **2**, de la cual no se encontraron datos. Dicho grupo funcional representa el interés científico debido a su presencia en agentes terapéuticos y productos naturales biológicamente activos,⁸³ y tras reportes de que la sustitución en la posición número 4 de *ent*-kaurenos ha derivado en la mejora de la actividad biológica,⁷⁹ estos metabolitos representan una excelente alternativa para el desarrollo de nuevos compuestos con la incorporación del THP a su estructura.

Reacciones de oxa-Michael o las ciclaciones vía radicales han sido empleadas como metodologías que dan acceso a la incorporación del anillo de tetrahidropirano (THP). Sin embargo, entre estas reacciones, la ciclización de Prins tiene un gran impacto, como lo confirma el flujo continuo de artículos que se publicaron y aún se publican.⁸⁴ La reacción de Prins es una importante reacción de acoplamiento carbono-carbono que consiste en la condensación de aldehídos con alquenos catalizada por ácidos (Esquema 2.4.8.1-a).

El ion carbenio (**I**), generado por la adición de la olefina al compuesto de carbonilo activado (Esquema 2.4.8.1-a), puede considerarse inicialmente como el intermediario para esta reacción escalonada, que puede agregar agua produciendo el correspondiente 1,3-diol (**II**) o puede eliminar un protón originando un alcohol alílico (**III**) como se aprecia en el Esquema 2.4.8.1-b. Aquí, el resultado de la reacción depende de la estructura del sustrato y las condiciones de reacción, lo que resulta en una variedad de productos, tales como alcoholes 3-sustituídos (**IV**), condensación con otra molécula de aldehído (**V**) o 1,3-dioxanos (**VI**) por ciclización intramolecular.⁸⁵

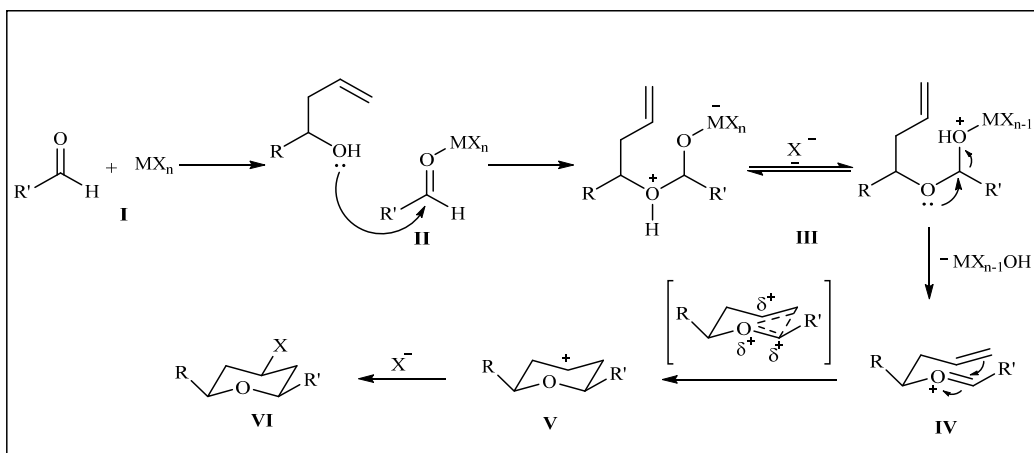


Esquema 2.4.8.1. Reacciones Prins. Productos generados de acuerdo a condiciones de reacción.⁸⁶

La demostración de que los alcoholes homoalílicos participan como intermediarios en la vía de reacción motivo al desarrollo de la "ciclización de Prins".

El mecanismo general para la reacción de ciclización (Esquema 2.4.8.2) es bien conocido e involucra un alcohol homoalílico, un aldehído y un ácido de Lewis. El ácido es esencial para la activación del aldehído, y dependiendo de las condiciones experimentales, este puede actuar como fuente de nucleófilo.

La reacción inicia con la complejación del ácido de Lewis con el carbono carbonílico del aldehído (I), seguido por la reacción del complejo acido-aldehído con el alcohol homoalílico (II), generando un intermediario hemiacetal (III) que favorece la formación del ion oxocarbenio o ion oxonio (IV). Este intermediario clave es susceptible a ciclización 6-endo, cuya conformación de silla, termodinámicamente favorecida, mantiene la posición pseudoecuatorial de los sustituyentes. Simultáneamente, el carbocatión de tetrahidropiraniolo secundario (V) puede ser atrapado por un nucleófilo para dar lugar a la formación del producto de ciclización Prins (VI).⁸⁶⁻⁸⁷



Esquema 2.4.8.2. Mecanismo general de reacción de Reacciones de ciclización Prins.⁸⁶

El empleo de las especies vegetales en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, ha hecho de ellas una fuente importante de moléculas activas, una de las familias de compuestos naturales que ha recibido particular atención debido a sus diversas actividades biológicas es la de los diterpenos con esqueleto de *ent*-kaureno y *ent*-beyerano, estos diterpenos han sido encontrados ampliamente en la naturaleza entre ellos el género *Perymenium*, taxón distribuido ampliamente en el Estado de Michoacán y Estados colindantes, el cual, no cuenta con reporte de estudios biológicos lo que orientó a nuestro grupo de trabajo a llevar acabo esta investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

La alta diversidad de especies vegetales en México, la amplia gama de moléculas orgánicas que presentan y los reportes de interesantes propiedades biológicas, hacen de las plantas una de principales fuentes de productos biológicamente activos.

Perymenium bupthalmoides, cuenta con un estudio fitoquímico preliminar en el que se describe la presencia en buenos de rendimientos del ácido *ent*-kaurenoico (**1**) y *ent*-beyerenoico (**2**), estos diterpenos policíclicos contienen en su estructura sustituyentes con heteroátomos lo que permite que a partir de ellos se puedan hacer una serie de modificaciones químicas, obteniendo nuevos derivados que puedan ser probados farmacológicamente, así como la pertinencia en la continuación de la exploración química de dicha especie vegetal que contribuya a la quimiotaxonomía de este género.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Llevar a cabo el estudio químico y biológico de *Perymenium buphthalmoides* con la finalidad de contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios con potencial actividad biológica para el tratamiento de cáncer, inflamación y potencial antioxidante.

4.2. Objetivos específicos

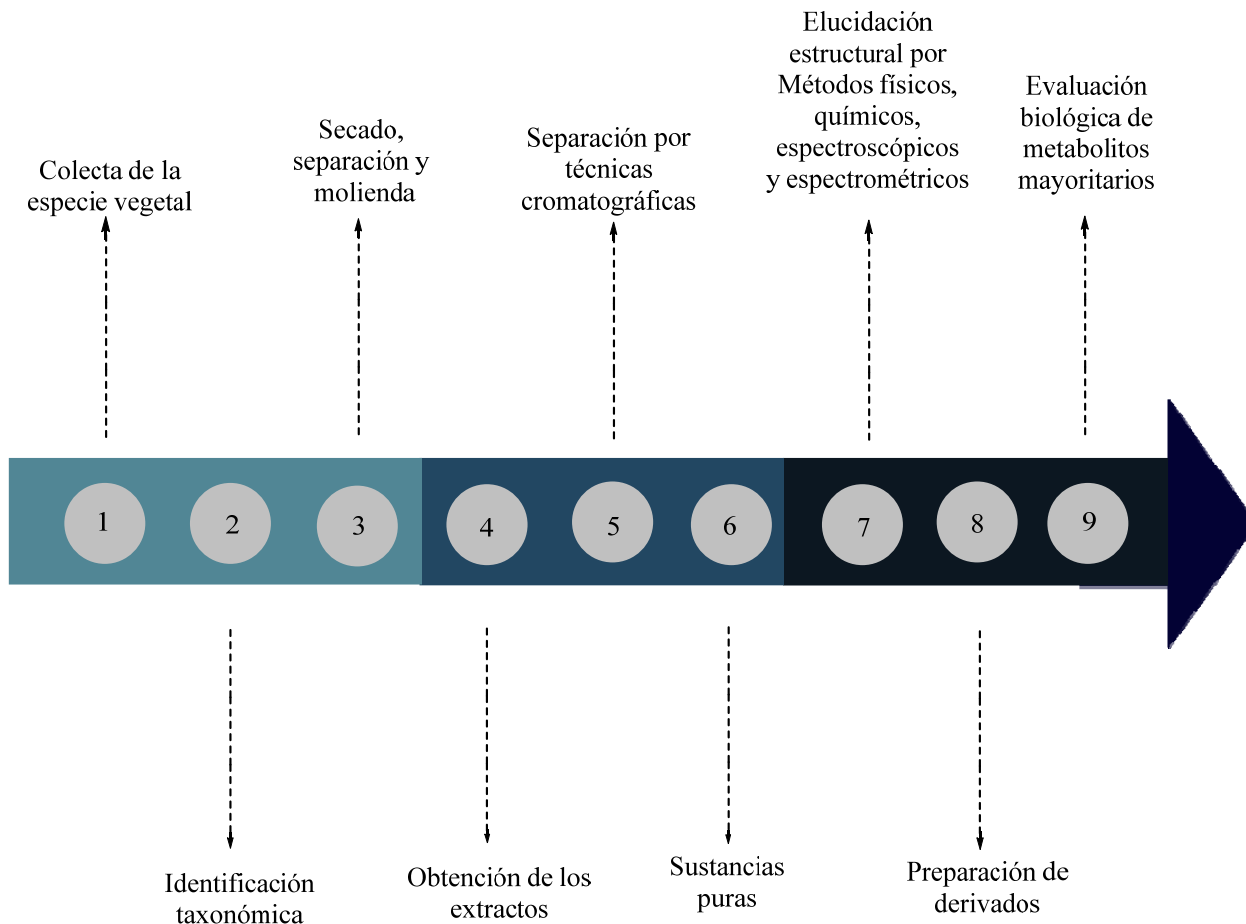
- Colectar de la especie vegetal.
- Obtener los extractos de raíz y flores de la planta con distintos disolventes.
- Separar y purificar mediante técnicas cromatográficas los componentes mayoritarios presentes en dichos extractos.
- Caracterizar las sustancias químicas mediante métodos físicos, químicos espectroscópicos y espectrométricos.
- Preparar derivados a partir de los componentes mayoritarios.
- Evaluar la actividad citotóxica, inflamación y potencial antioxidante de los metabolitos mayoritarios.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para el estudio de los compuestos contenidos en *Perymenium bupthalmoides* se llevó a cabo la siguiente metodología:

- Colecta de la especie vegetal.
- Secado a la sombra de la especie vegetal.
- Separación de la planta en sus distintas partes (raíz, tallo, hojas y flores) y molienda de las mismas.
- Obtención de los extractos con distintos disolventes.
- Aislamiento y purificación mediante técnicas cromatográficas que involucran cromatografía en columna y cromatografía en capa fina.
- Elucidación estructural mediante Resonancia Magnética Nuclear de 1D y 2D, Infrarrojo, Espectrometría de Masa, punto de fusión y rotación específica.
- Preparación de derivados a partir de los componentes mayoritarios.
- Evaluación de la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de los metabolitos mayoritarios.

La metodología experimental se resume en el Esquema 5.1.



Esquema 5.1. Metodología experimental para el desarrollo del proyecto.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Colecta de la especie vegetal y análisis del extracto de AcOEt de flores

Perymenium buphthalmoides fue colectada en el km 3.5 de la carretera Tiripetío-Acuitzio y como sede alterna de colecta la tenencia de Santa María en Morelia, Michoacán.

Durante investigaciones preliminares se describió la composición de los extractos hexánicos de raíz y partes aéreas.¹⁰⁻¹¹ Por consiguiente, para dar continuidad al estudio químico iniciamos la exploración de los extractos de AcOEt de flores colocando en maceración 5 lotes de flores de diferentes años de colecta con AcOEt de acuerdo a la tabla 6.1.1. previamente extraídos con hexanos.

Tabla 6.1.1. Datos para la obtención de los extractos de AcOEt de flores de *Perymenium buphthalmoides*.

Lote	Lugar de colecta	Peso en (g)	Disolvente	Extracto (g)
2011	Tiripetío- Acuitzio	90	AcOEt 850 mL	2.3662
2013	Tiripetío- Acuitzio	25	AcOEt 300 mL	0.4023
2014	Tiripetío- Acuitzio	15	AcOEt 200 mL	0.2883
2016	Tiripetío- Acuitzio	25	AcOEt 350 mL	0.5118
2016	Tenencia Santa María	105	AcOEt 1L	2.0692

Los extractos obtenidos fueron analizados preliminarmente a través de RMN de ¹H (Figura 6.1.1), mostrando señales en la región de los protones vinílicos entre δ_H 5.50 a δ_H 5.00, así como señales en la región de protones base de heteroátomo de δ_H 4.75 a δ_H 3.15, y finalmente señales en la porción alifática de δ_H 2.90 a δ_H 0.50. Todos los extractos presentaron igual composición por lo que se unieron obteniendo 5.6 g de muestra.

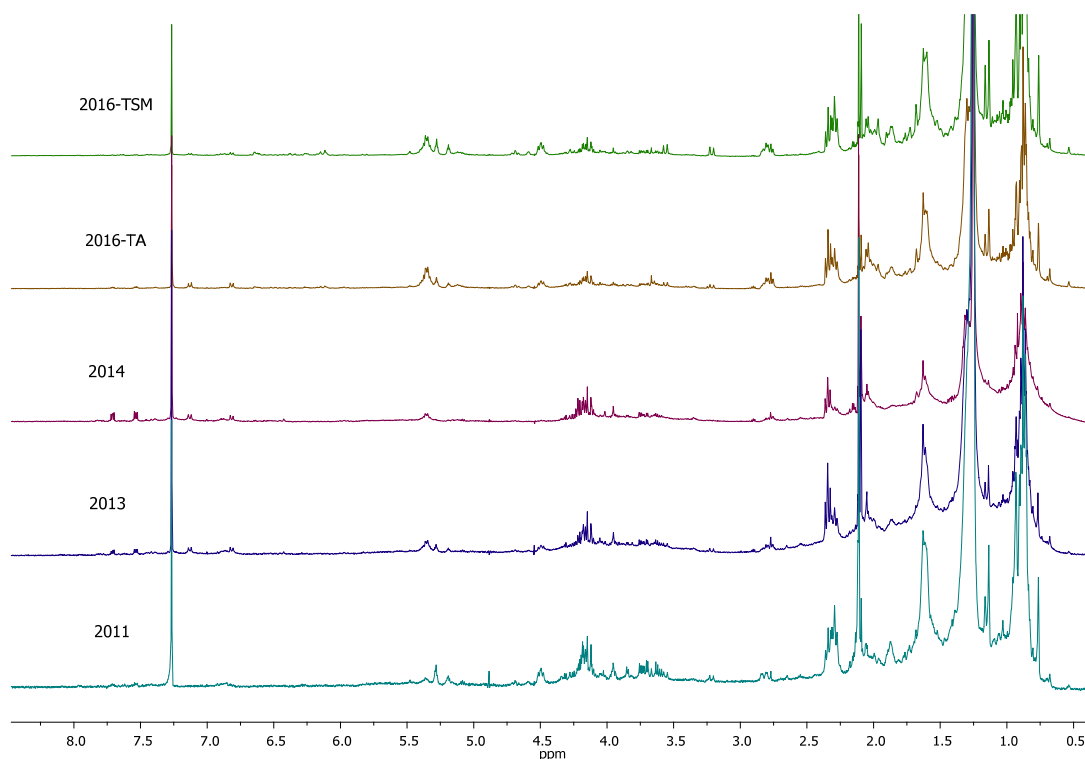


Figura 6.1.1. Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de los extractos de AcOEt de flores de *Perymenium bupthalmoides*.

El extracto fue separado en columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluente, obteniendo 10 fracciones las cuales fueron analizadas por RMN de ^1H .

La fracción 3 (hexanos-AcOEt 7:3) fue separada mediante cromatografía en columna y un sistema de elución (hexanos-AcOEt 9:1), obteniendo un sólido blanco con p.f. 115-117 °C. Su espectro RMN de ^1H (Figura 6.1.2) exhibió en la región de protones vinílicos una señal triple en δ_{H} 5.19 con $J= 3.6$ Hz (H-12); además, en δ_{H} 4.50 se apreció la señal múltiple asociada al protón base de éster H-3; en δ_{H} 3.55 y δ_{H} 3.21 se observaron las señales para el sistema AB con $J= 11.2$ Hz, pertenecientes a los protones base de alcohol H-28a y H-28b; en δ_{H} 2.29 se identificó la señal triple característica de la posición alfa al carbonilo con $J= 7.4$ Hz correspondiente al H-2'; mientras que en δ_{H} 1.25 se ubicó la señal simple ancha característica de ácido graso saturado, y en δ_{H} 1.16 a 0.86 se ubicaron las señales simples pertenecientes protones de grupo metilos.

Su espectro RMN de ^{13}C (Figura 6.1.3) mostró las señales los carbonos vinílicos en δ_c 122.3 (C-12) y 144.2 (C-13); además, se observaron las señales para el sistema esterificado en δ_c 80.5 correspondiente al C-3 base de éster; en δ_c 173.7 la señal para el carbono carbonílico C-1', y en δ_c 34.9 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.7-29.2 (C-4'-13'), 31.9 (C-14'), 22.7 (C-15'), 14.1 (C-16) se ubicaron las señales correspondientes a la cadena de ácido graso. Finalmente, la señal para el carbono base de alcohol C-28 se observó en δ_c 69.7.

Por otro lado, su espectro de masa de impacto electrónico mostró un ion m/z 662 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$. Los datos físicos y de RMN de ^1H y ^{13}C fueron similares a los reportados para el triterpeno 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol (**10**).⁸⁸⁻⁸⁹

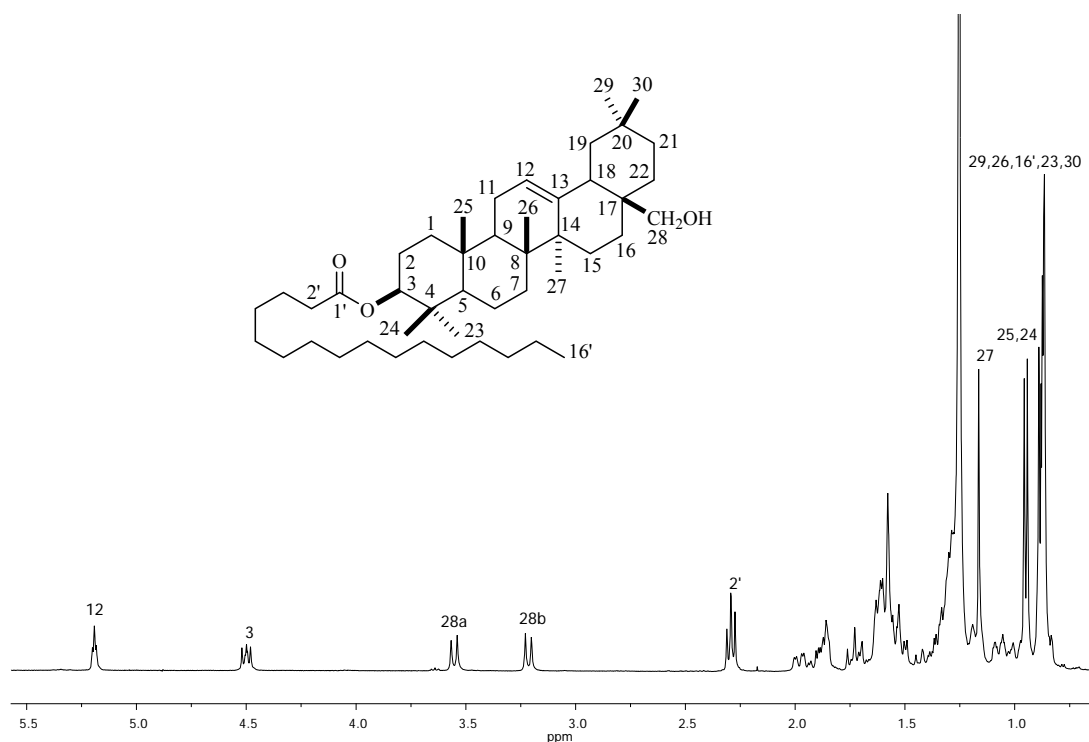
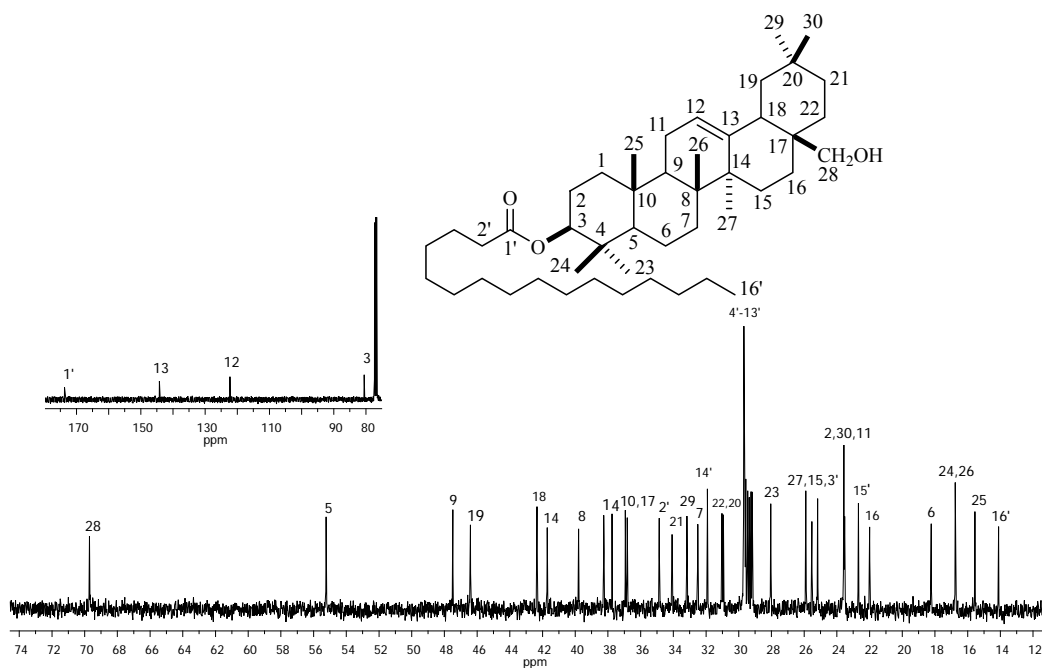


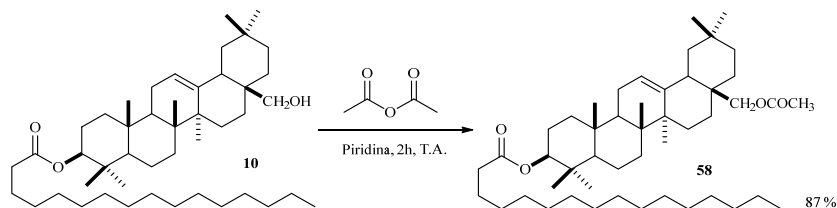
Figura 6.1.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol (**10**).



Figura

6.1.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol (10).

Como parte de la caracterización del trieterpeno **10**, se realizó su derivado acetilado empleando anhídrido acético y piridina (Esquema 6.1.1). El derivado **58** se obtuvo como una miel incolora. Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.1.4) mostró la formación del producto acetilado a través del desplazamiento de la señal del sistema AB a campo alto en δ_{H} 3.85 (H-28a y H-28b) y la aparición de la señal simple en δ_{H} 2.05 asociada al metilo del grupo acetato. Su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.1.5) mostró la formación del derivado **58** con la presencia de las señales en δ_{C} 171.3 (C-17'), 21.0 (C-18') y 70.8 (C-28). Este compuesto ya ha sido preparado por el tratamiento del palmitato de eritrodilol (**10**), sin embargo, no se reportan datos para su comparación.⁹⁰



Esquema 6.1.1. Reacción de acetilación del palmitato de eritrodilol (**10**).

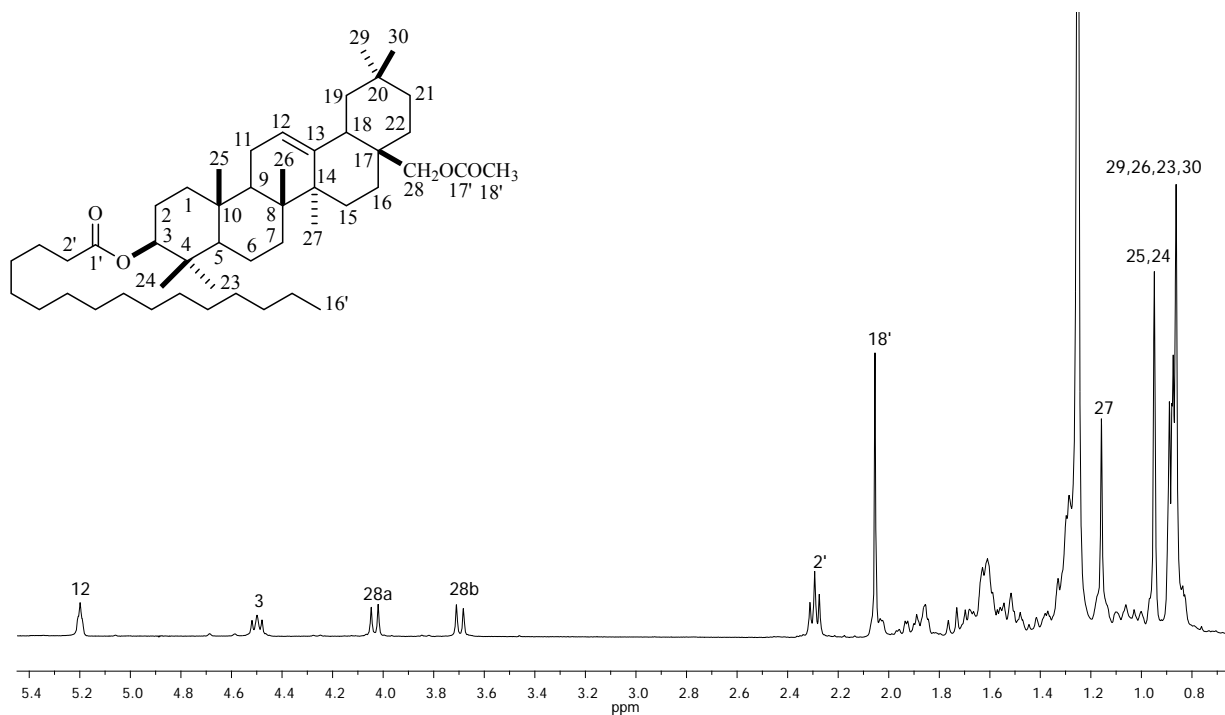


Figura 6.1.4. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del acetato del 3β-palmitoxi-olean-12-en-28-ol (58).

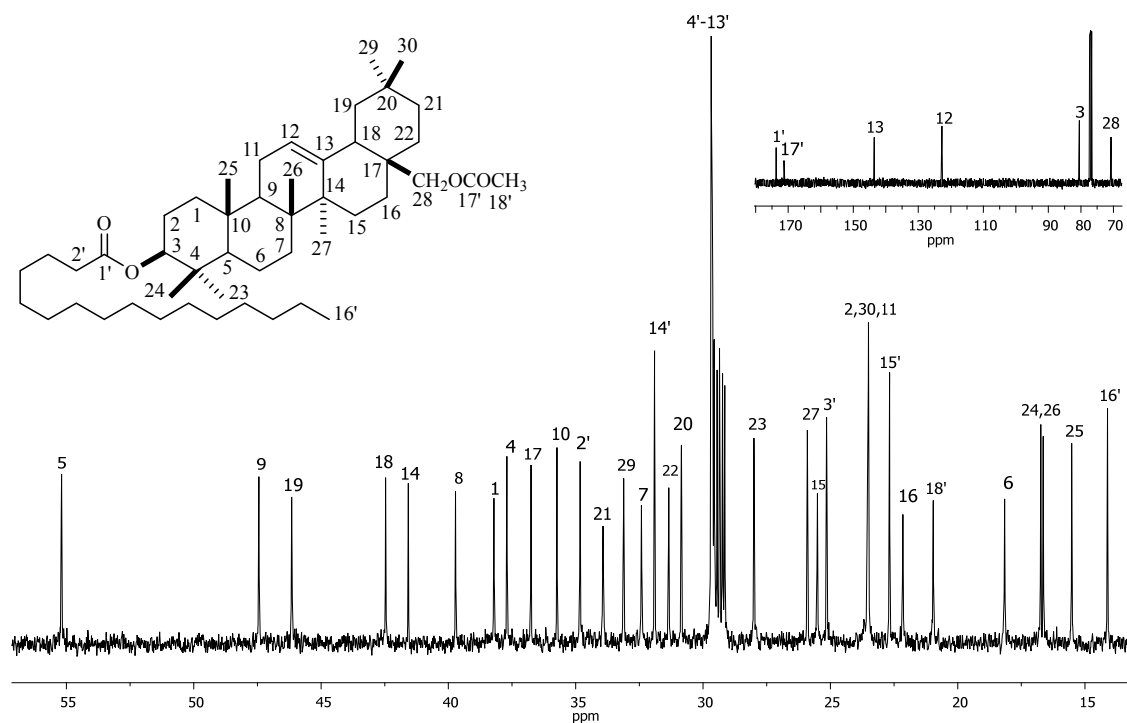
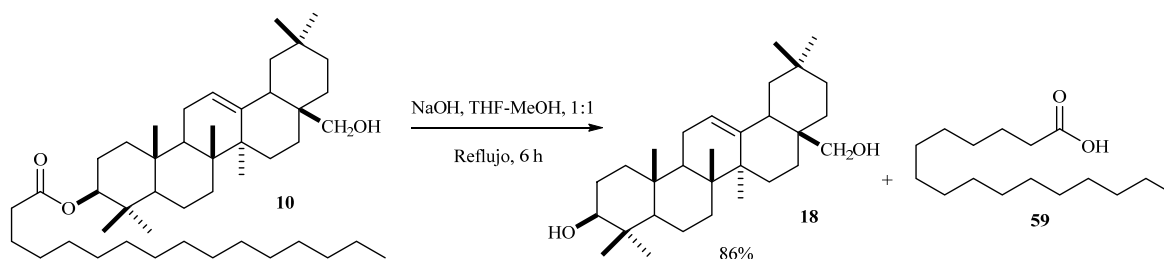


Figura 6.1.5. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del acetato del 3β-palmitoxi-olean-12-en-28-ol (58).

Con la finalidad de caracterizar la cadena de ácido graso presente en el compuesto **10**, se realizó la hidrólisis alcalina (Esquema 6.1.2). El triterpeno **18**, se obtuvo como un sólido blanco el cual presento un p.f. de 233-234 °C. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.1.6) la obtención del derivado reducido fue evidente al observarse el desplazamiento hacia campo alto de la señal asociada al H-3 en δ_{H} 3.23 junto al sistema AB perteneciente a los hidrógenos del hidroxilo primario H-28a y H-28b. En su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.1.7) la señal del carbono C-3 se desplazó a δ_{C} 79.0. Los datos de RMN de ^{13}C , fueron comparados con los reportados coincidiendo para el compuesto denominado eritrodiool (**18**).⁹¹



Esquema 6.1.2. Reacción de hidrólisis del palmitato de eritrodiool (**10**).

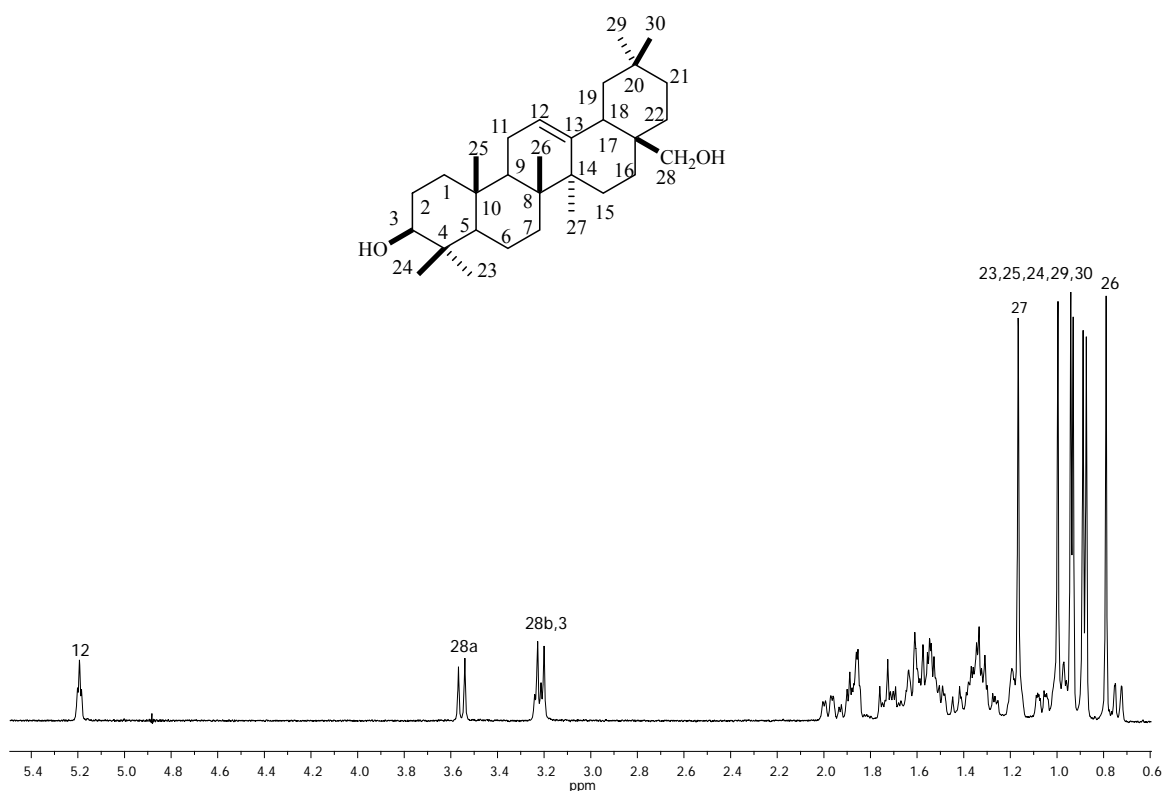


Figura 6.1.6. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del eritrodiool (**18**).

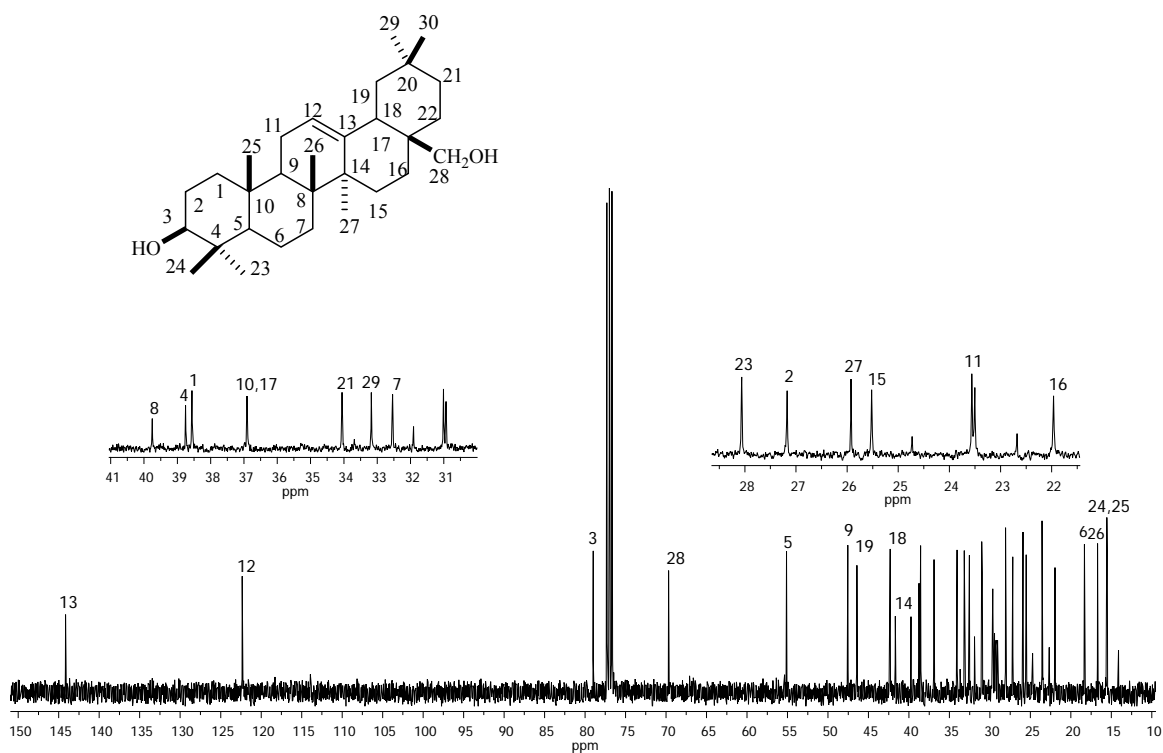


Figura 6.1.7. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del eritrodio (18).

Por su parte, el ácido graso mostró en su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.1.8) señales características en δ_{H} 2.35 (2H, t, $J= 7.4$ Hz, H-2), 1.63 (2H, q, $J= 7.3$ Hz, H-3), 1.26 (24H, s, CH_2 -4-15), 0.88 (3H, t, $J= 6.8$ Hz, CH_3 -16). Su espectro de masa de impacto electrónico (Figura 6.1.9) mostró un ion m/z de 256 $[\text{M}]^+$, congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$, coincidiendo la integración de todas sus señales para el ácido palmítico (59).

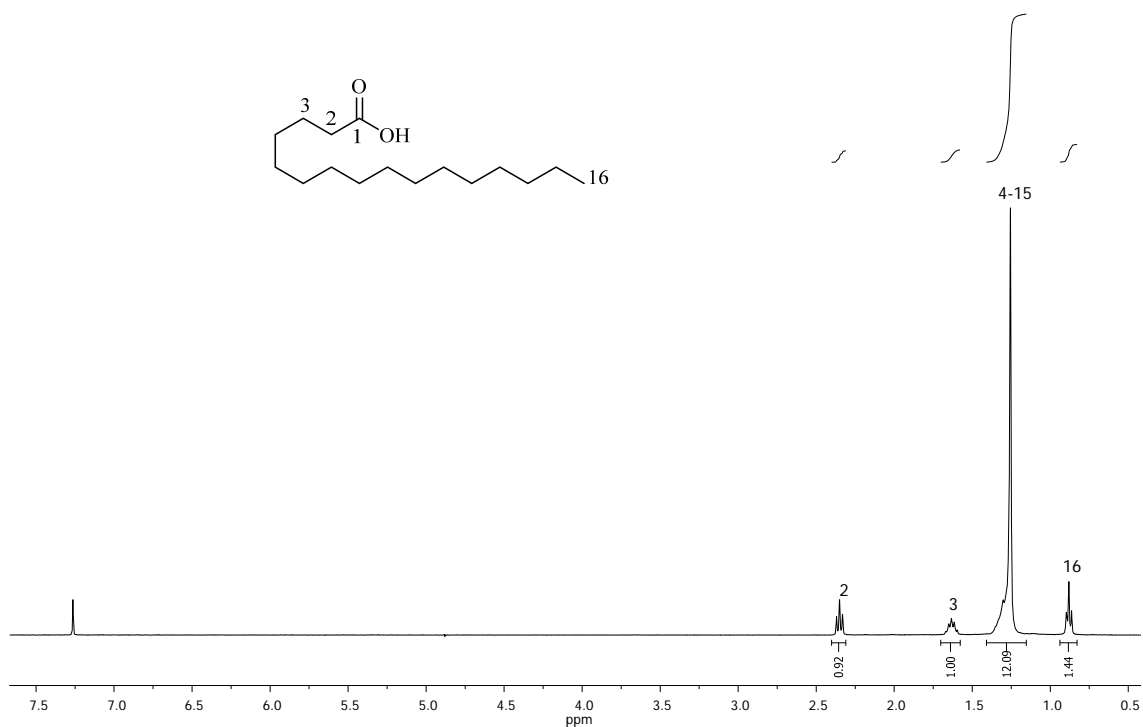


Figura 6.1.8. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido palmítico (59).

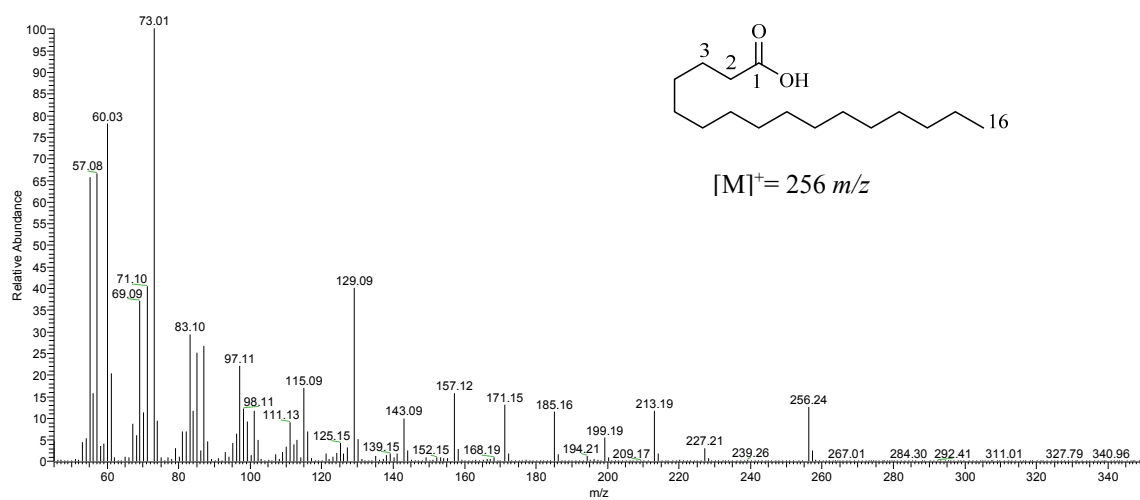


Figura 6.1.9. Espectro de masa de impacto electrónico del ácido palmítico (59).

Las fracciones 4-6 fueron recromatografiadas con un sistema de elución hexanos-AcOEt (9:1) obteniendo una sustancia cristalina purificada mediante recristalización a evaporación lenta con la mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1). Su espectro RMN de ¹H (Figura 6.1.10) mostró alta similitud respecto al triterpeno esterificado **10**; en δ_H 5.27 con una constante de acoplamiento de 3.4 Hz se observó la señal triple asociada al H-12; la señal base de éster H-3 apareció en δ_H 4.50; la señales características de la presencia de ácido graso se ubicaron en δ_H 2.29 (2H, t, $J= 7.4$ Hz, H-2') y en δ_H 1.25; además, en δ_H 2.82 se apreció una señal doble de dobles con $J= 13.8$ y 3.8 Hz asignada al protón alílico H-18 y en un rango de δ_H 1.13 a 0.75 se apreciaron las 7 señales simples correspondientes a grupos metilos.

Estos datos fueron validados a través de su análisis de RMN de ¹³C (Figura 6.1.11), con la presencia de las señales en δ_C 122.5 (C-12), 143.6 (C-13), 80.5 (C-3), 173.7 (C-1'), 34.8 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.7-29.4 (C-4'-13'), 31.9 (C-14'), 22.7 (15'), 14.1 (C-16'), 40.9 (C-18), 183.7 (C-28).

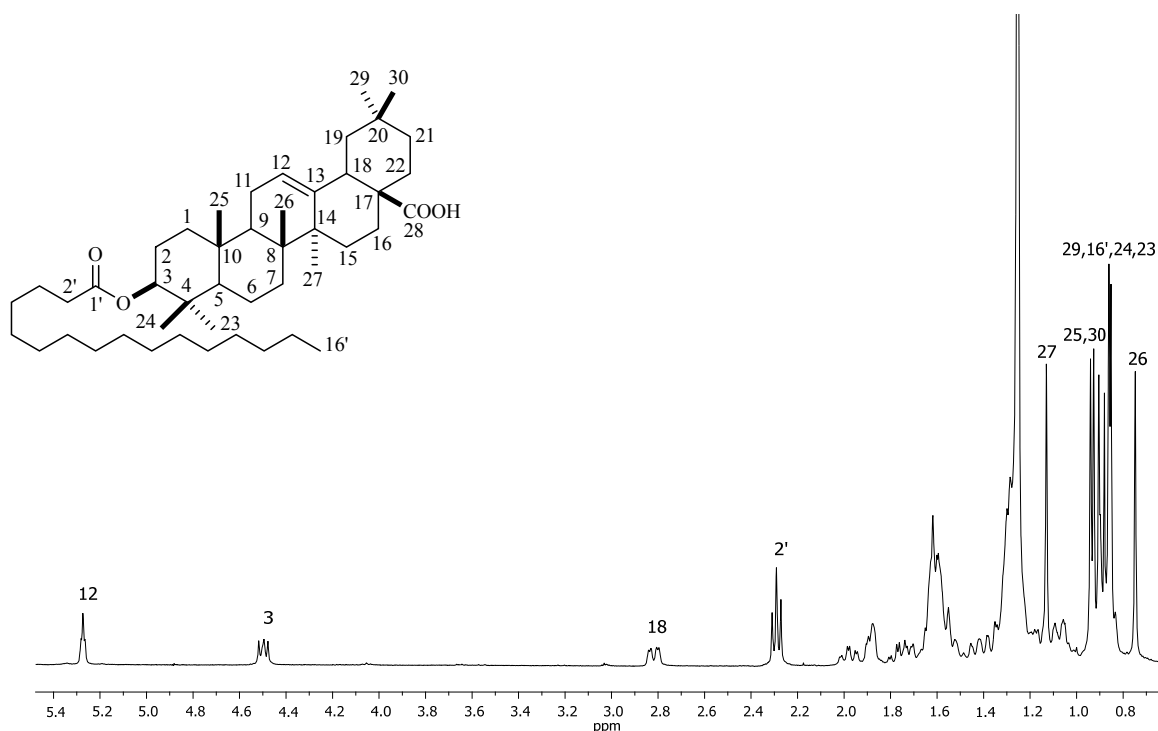


Figura 6.1.10. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del ácido 3 β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**11**).

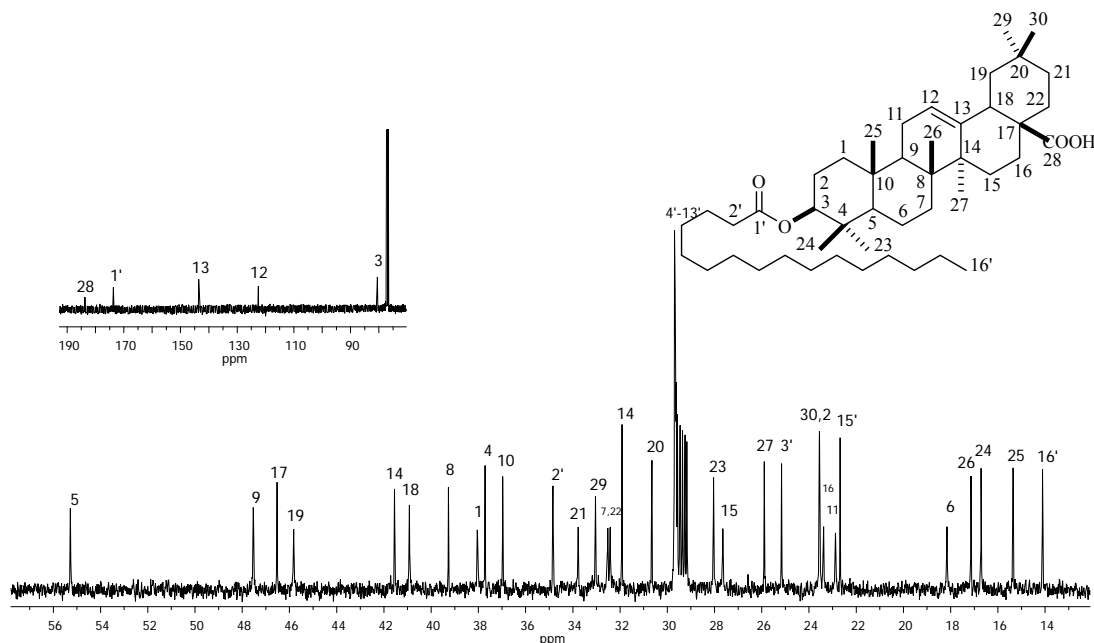
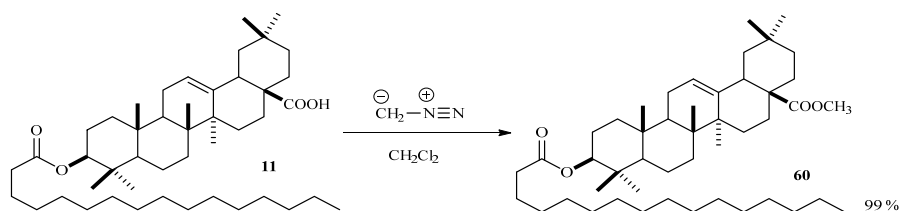


Figura 6.1.11. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**11**).

Los datos para el triterpeno **11** fueron comparados con los descritos,⁹² sin embargo, no encontramos coincidencia en los datos, su asignación se llevó a cabo con la ayuda de RMN de 1D y 2D, así como con ayuda de estructuras similares coincidiendo para el ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**11**).^{88-89,93}

Para apoyar la identificación del triterpeno **11**, se colocó en condiciones de metilación con diazometano (Esquema 6.1.3) obteniendo el derivado **60**. Su obtención fue verificada a través de su análisis de RMN de ^1H y ^{13}C (Figura 6.1.12 y 6.1.13) mostrando las señales características en δ_{H} 3.62 (CH_3 -17') y en δ_{C} 178.3 (C-28) y δ_{C} 51.5 (C-17').



Esquema 6.1.3. Reacción de metilación del ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**11**).

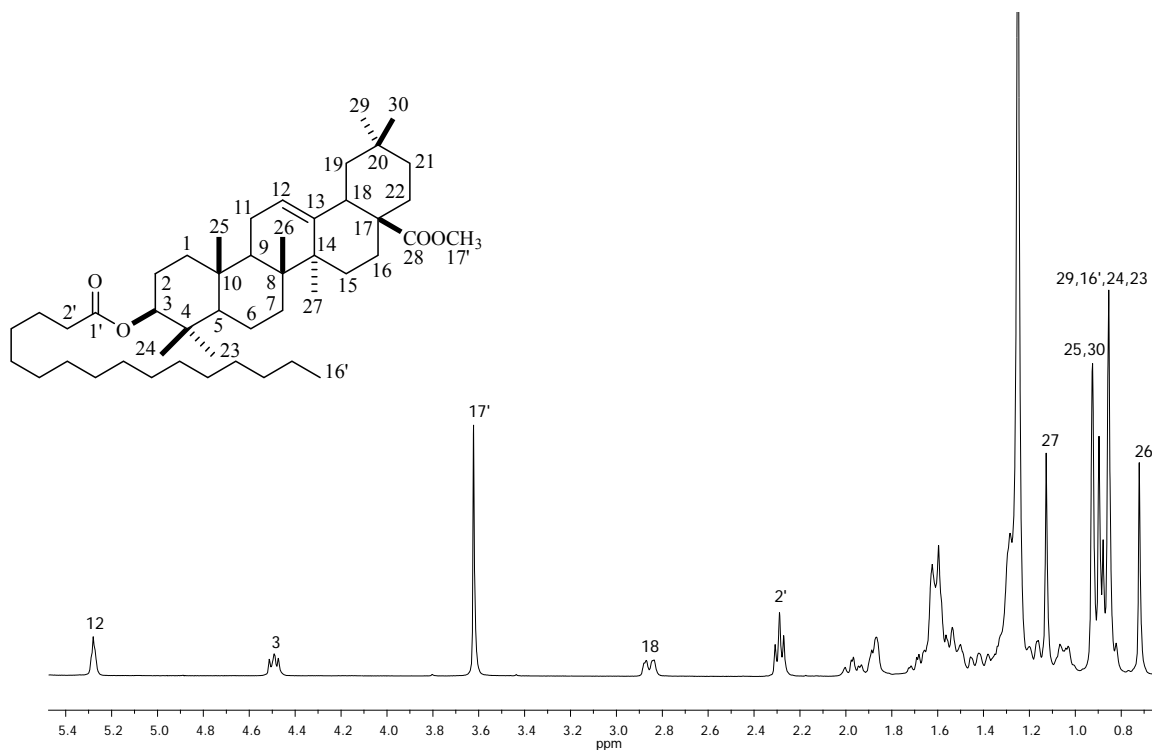


Figura 6.1.12. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 éster metílico del ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**60**).

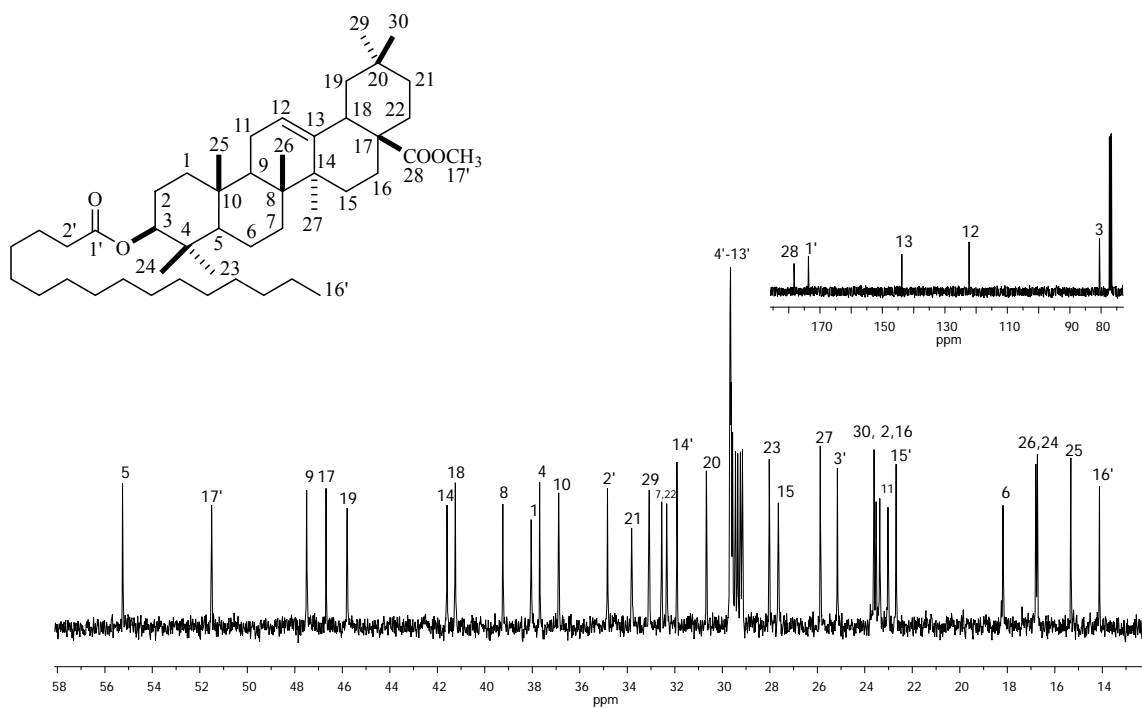
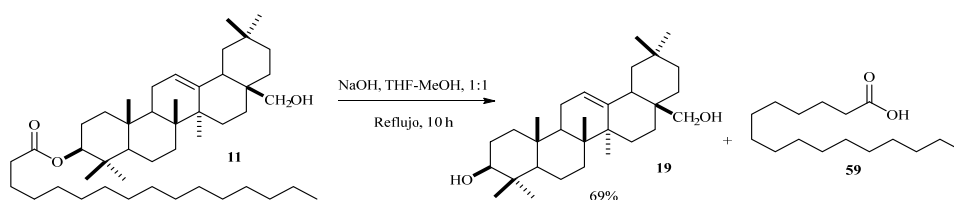


Figura 6.1.13. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 éster metílico del ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**60**).

Para complementar la caracterización del éster **11** se llevó a cabo la reacción de hidrólisis alcalina bajo las condiciones mostradas en el Esquema 6.1.4. De este proceso se obtuvo el triterpeno **19** como un sólido blanco. Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.1.14) mostró la ausencia de las señales correspondientes al ácido graso, por tanto, la señal asignada al H-3 base de alcohol sufrió un desplazamiento hacia campo alto de δ_{H} 4.50 a 3.22. Su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.1.15) apoyó esta información por la presencia de la señal asociada al C-3 en δ_{C} 79.0. Los datos de RMN de ^{13}C para **19** fueron comparados con los reportados coincidiendo para el ácido oleanólico.⁹¹ Referente a la cadena de ácido graso tras su análisis de RMN y EMIE (m/z de 256 $[\text{M}]^+$) coincidió para el ácido palmítico (**59**) anteriormente descrito durante la hidrólisis alcalina del triterpeno **10**.



Esquema 6.1.4. Reacción de hidrólisis del palmitato de del ácido oleanólico (**11**).

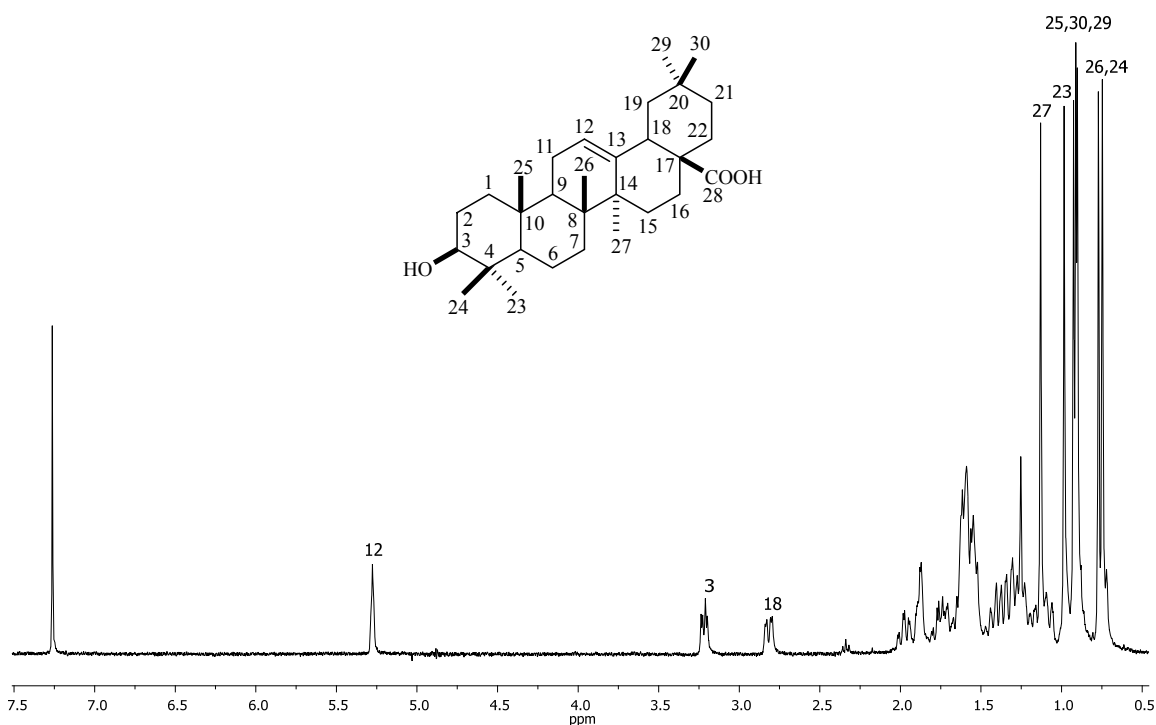


Figura 6.1.14. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido oleanólico (**19**).

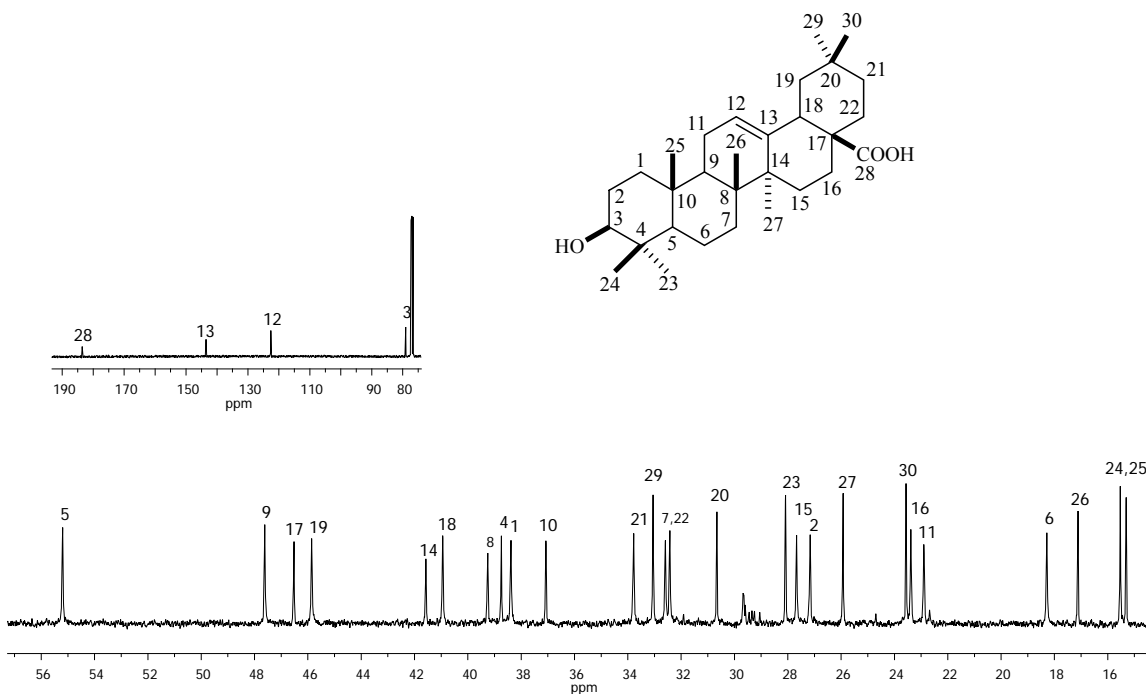


Figura 6.1.15. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del ácido oleanólico (**19**).

6.2. Aislamiento y caracterización de los metabolitos presentes en extracto hexánico de raíz

Continuando con la investigación fitoquímica del extracto de hexánico de raíz, fueron procesados los lotes la especie vegetal colectados en la carretera Tiripetío-Acuitzio y en la tenencia de Santa María empleando las condiciones previamente establecidas.¹⁰⁻¹¹ Sus análisis de RMN de ¹H (Figura 6.2.1.) mostraron igualdad en composición y abundancia, destacando la presencia de los metabolitos mayoritarios en δ_H 6.25 a δ_H 4.50 correspondientes a los ácidos *ent*-kaurenoico (**1**) y *ent*-beyerenoico (**2**) por tanto, se estableció a la tenencia de Santa María como sede de colecta de *Perymenium bupthalmoides*.

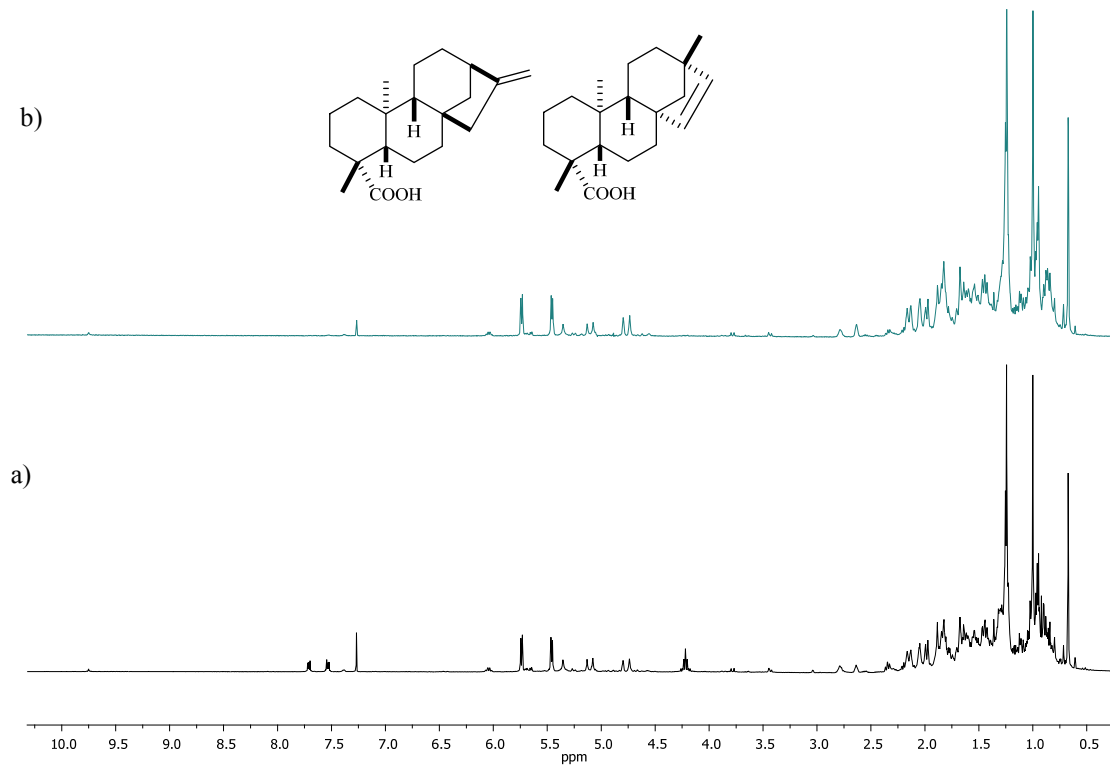
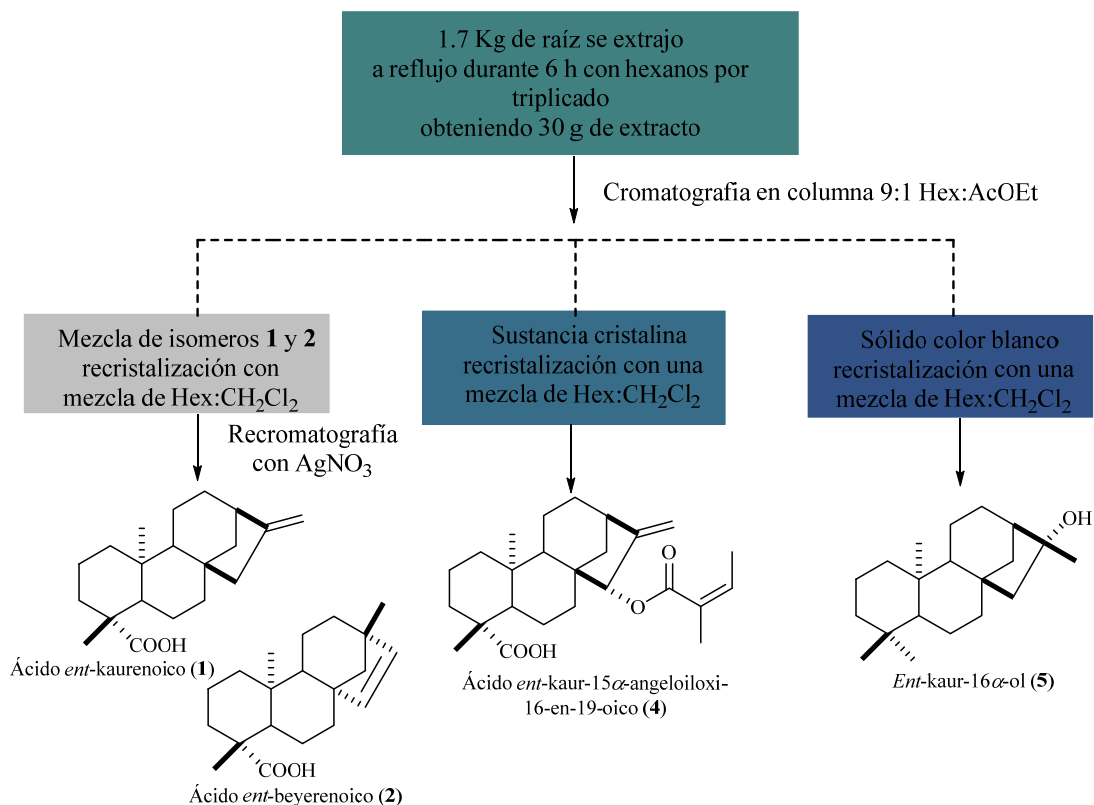


Figura 6.2.1. Comparación de los espectros de RMN de ¹H de los extractos hexánicos de raíz colectados en la carretera Tiripetío-Acuítzio (a) y la tenencia de Santa María (b).

Los extractos hexánicos obtenidos fueron separados siguiendo la metodología descrita por nuestro grupo de trabajo²³ (Esquema 6.2.1) lo que derivó en el aislamiento de los diterpenos **1**, **2**, **4**, **5** en solo un proceso cromatográfico, estos metabolitos representan una fuente importante de investigación para este proyecto, así como para colaboraciones dentro de nuestro grupo de trabajo.



Esquema 6.2.1. Metodología para el aislamiento de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de raíz en una sola etapa.

Durante la investigación fitoquímica de *Perymenium bupthalmoides* del año 2016 se reportó el aislamiento del compuesto **5**, de manera preliminar se identificó como el *ent*-kauran-16β-ol de acuerdo a los datos descritos por St. Pyrek en 1984.⁹⁴ Con la finalidad de validar la configuración propuesta, se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva que sustentará la CA del compuesto problema, donde se encontró que la CA del epímero 16α-ol ya había sido previamente establecida por J. R. Hanson a través de correlación química por modificaciones en el doble enlace del *ent*-kaureno (**17**).⁹⁵⁻⁹⁶ En 1976 Hanson⁹⁷ complementa los datos para el epímero 16α-ol con RMN de ¹³C los cuales fueron iguales a los experimentales (Tabla 6.2.1), no obstante, se estableció por RMN de 2D que los desplazamientos químicos para las señales de C-1 y C-7 se encuentran intercambiadas. Con base en lo anterior fue posible establecer la presencia del *ent*-kauran-16α-ol (**5**). Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se muestran en las Figuras 6.2.2 y 6.2.3.

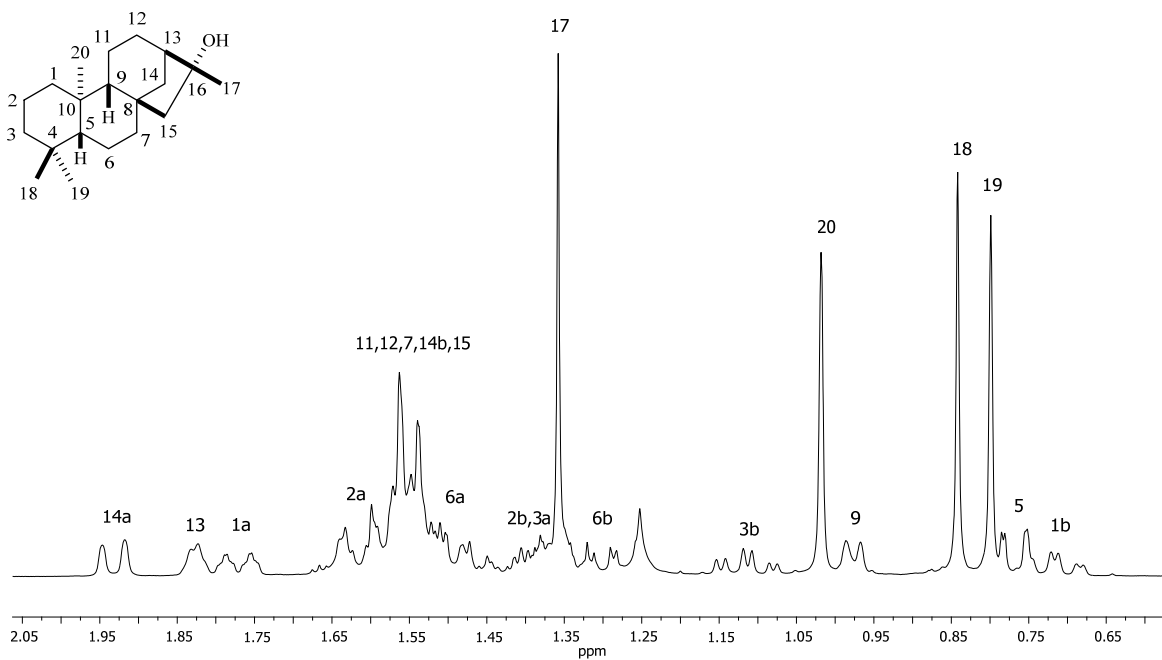


Figura 6.2.2. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del *ent*-kauran-16 α -ol (5).

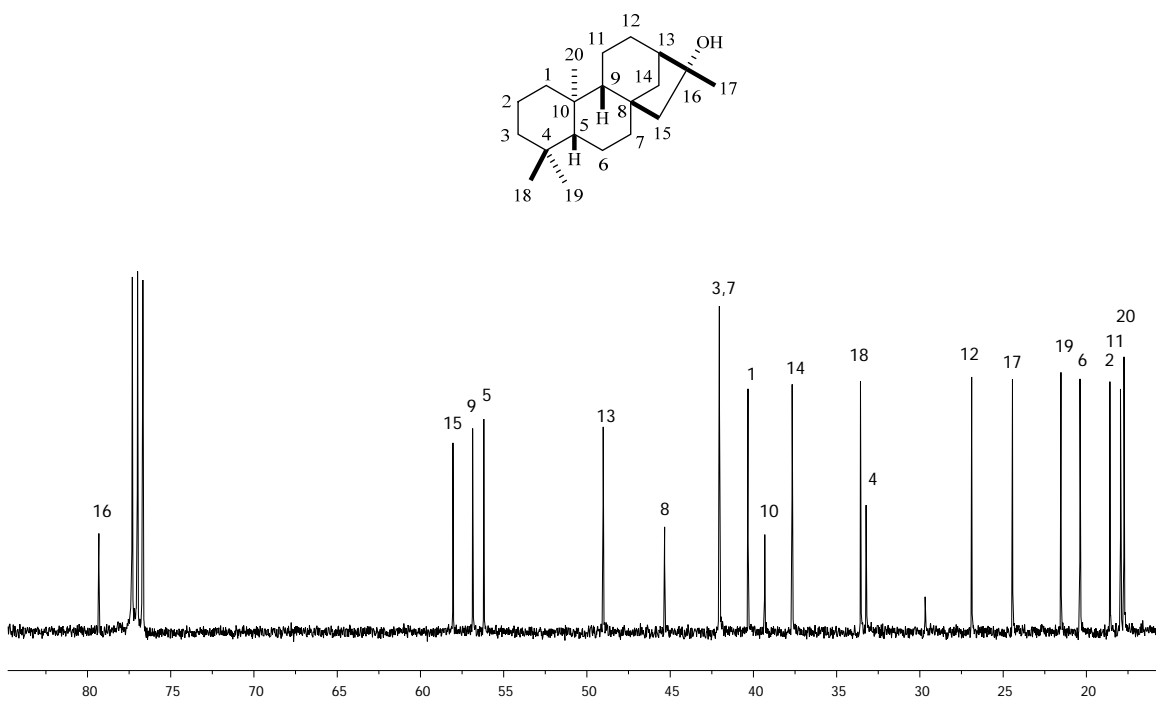


Figura 6.2.3. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del *ent*-kauran-16 α -ol (5).

Tabla 6.2.1. Comparación de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C para *ent*-kauran-16 α -ol (**5**).

Posición	Experimental		Reportado ⁹⁷
	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}
1a	40.3	1.77, m	42.0
1b		0.72, td (13.0, 3.4)	
2a	18.6	1.61, m	18.6
2b		1.36, m	
3a	42.1	1.35, m	42.0
3b		1.11, td (13.5, 4.3)	
4	33.2	-	33.2
5	56.2	0.77, dd (11.8, 1.4)	56.2
6a	20.4	1.52, m	20.4
6b		1.28, m	
7	42.0	1.55, m	40.3
8	45.3	-	45.3
9	56.9	0.98, d (7.6)	56.8
10	39.3	-	39.3
11	18.0	1.55, m	18.0
12a	26.9	1.55, m	26.9
12b			
13	49.0	1.83, da (3.6)	49.0
14a	37.7	1.93, da (11.6)	37.7
14b		1.54, m	
15a	58.0	1.54, m	58.0
15b			
16	79.3	-	79.4
17	24.4	1.36, s	24.5
18	33.6	0.84, s	33.5
19a	21.5	0.80, s	21.6
19b			
20	17.7	1.02, s	18.0

La preparación del derivado acetato a partir de **5** permitió establecer químicamente la presencia del hidroxilo y su p.f. 144-145 °C coincidió con la literatura.⁹⁸ Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.2.4) mostró además de las señales observadas para el compuesto **5**, la presencia de la señal simple en δ_{H} 1.95 característica del metilo del grupo acetato. Su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.2.5) mostró el desplazamiento químico de la base de acetato C-16 en δ_{C} 90.9 (C-16) y las señales en δ_{C} 170.8 (C-1') y δ_{C} 22.8 (C-2') indicando la presencia del acetato del *ent*-16 α -kauranilo (**15**). Cabe mencionar que Patra y colaboradores propusieron un estudio por RMN de 1D que involucra al diterpeno **15**, sin embargo, los desplazamientos de CH₂-12 y CH₃-OAc en RMN de ^{13}C muestran variaciones significativas por lo que la propuesta configuracional en esta referencia debe ser revisada.⁹⁹

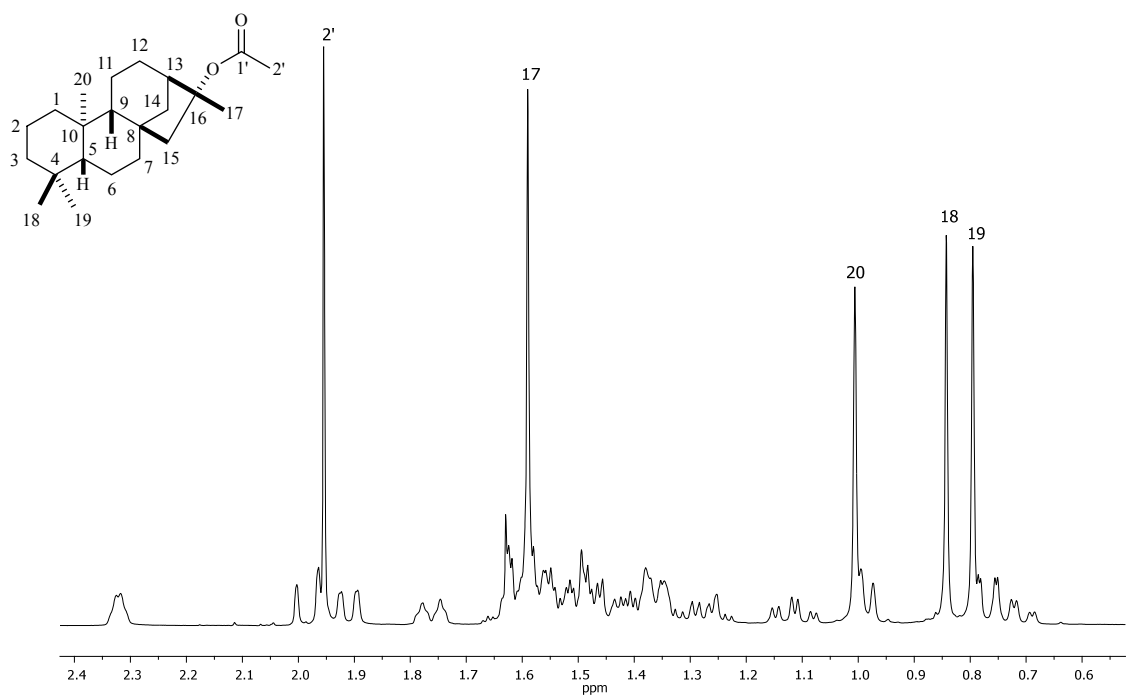


Figura 6.2.4. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del acetato del *ent*-16 α -kauranilo (15).

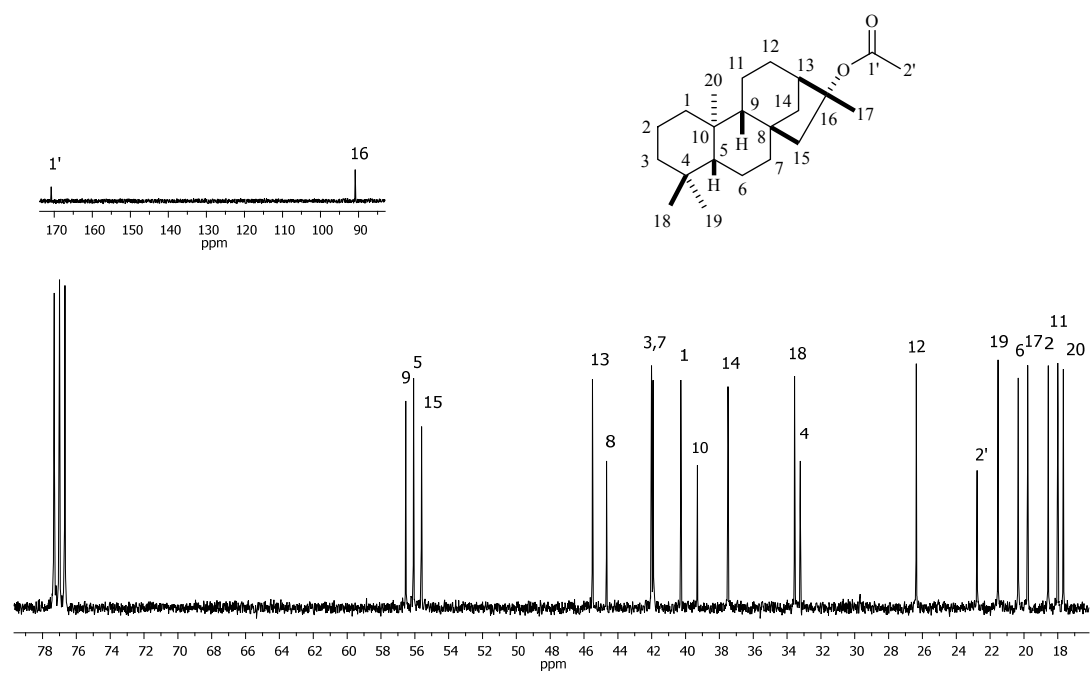


Figura 6.2.5. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del acetato del *ent*-16 α -kauranilo (15).

La porción más polar del extracto hexánico de raíz, fue separada mediante cromatografía en columna empleando un sistema de elución hexanos-CH₂Cl₂-AcOEt (7:2:1). En las fracciones 59-69 se obtuvo un sólido cristalino, el cual fue lavado con acetona proporcionando cristales incoloros. Su espectro de RMN de ¹H (Figura 6.1.6.) mostró dos juegos de señales en proporción 1:1, destacando una señal doble en δ_H 5.35 con una constante de acoplamiento de 5.2 Hz pertenecientes a los protones vinílicos H-6 y H-6'; así mismo en δ_H 5.08 se observó una señal múltiple asociada a los protones vinílicos H-22 y H-23, además en δ_H 3.53 se ubicó una señal múltiple asignada al protón base de oxhídrido H-3 y 3' y en la región de los protones alifáticos se apreciaron señales de alta intensidad correspondientes a protones de grupos metilo en δ_H 1.25 a 0.68. Su espectro de RMN de ¹³C (Figura 6.1.7.) mostró señales para carbonos vinílicos en δ_C 140.7 (C-5 y C-5'), 138.3 (C-22), 129.3 (C-23) y 121.7 (C-6 y C-6'); para base de hidroxilo en δ_C 71.8 (C-3 y C-3'), así como señales en la región alifática. De acuerdo a la literatura, estos datos corresponden a la mezcla de fitoesteros, estigmasterol (**13**) y β-sitosterol (**14**)¹⁰⁰⁻¹⁰¹ metabolitos previamente aislados durante la exploración del extracto hexánico de hojas.¹¹

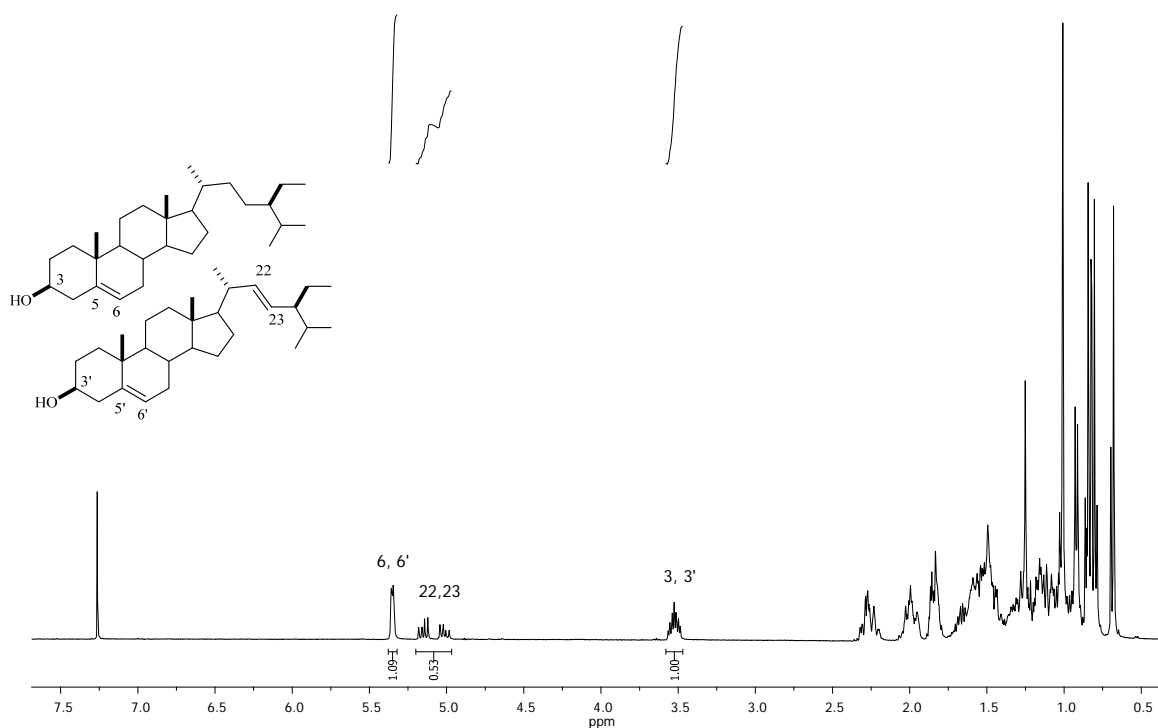
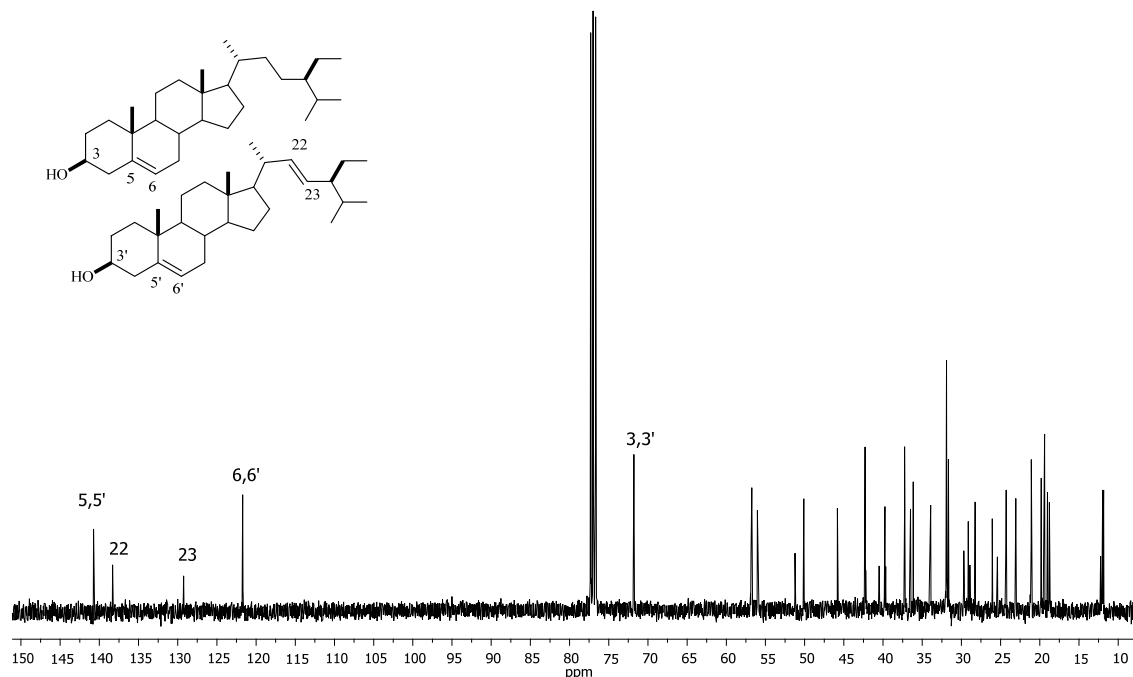


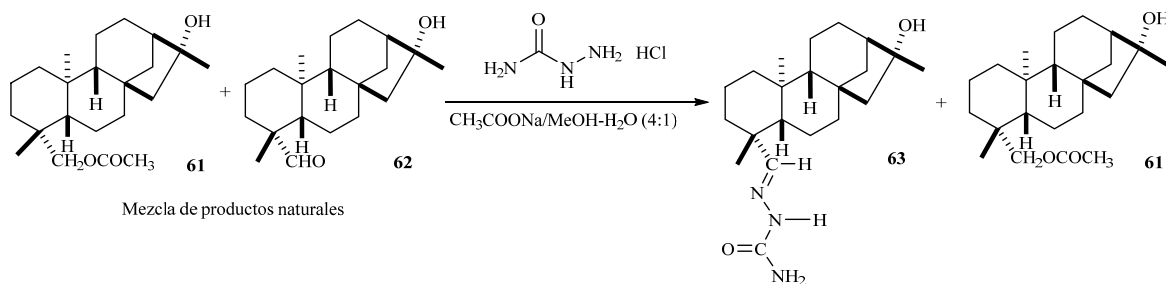
Figura 6.2.6. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ de la mezcla de estigmasterol (**13**) y β-sitosterol (**14**).



βFigura 6.2.7. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la mezcla de stigmasterol (**13**) y β -sitosterol (**14**).

Adicionalmente, durante este proceso de separación en las fracciones 80-93 se obtuvo un sólido blanco, el cual no fue posible separar mediante métodos cromatográficos. Su análisis de RMN de ^1H reveló la presencia de una señal de aldehído en δ_{H} 9.74, un sistema AB centrado en δ_{H} 4.03 correspondiente a los protones de la base de éster y un singulete en δ_{H} 2.05 lo que indicó la presencia de compuesto acetilado. La integral de estas señales sugirió una mezcla 1:1 de los compuestos.

Para su separación se recurrió a la preparación de un derivado base de Schiff preparado a partir de clorhidrato de semicarbazida y acetato de sodio (Esquema 6.2.2).



Esquema 6.2.2. Preparación de la base Schiff (**63**) a partir de la mezcla de productos naturales **61** y **62**.

El espectro de RMN de ^1H del crudo de reacción (Figura 6.2.8) mostró las señales características para la formación de la semicarbazona en δ_{H} 8.52 y δ_{H} 7.03, así mismo, se observó que las señales correspondientes al metabolito acetilado no sufrieron modificaciones.

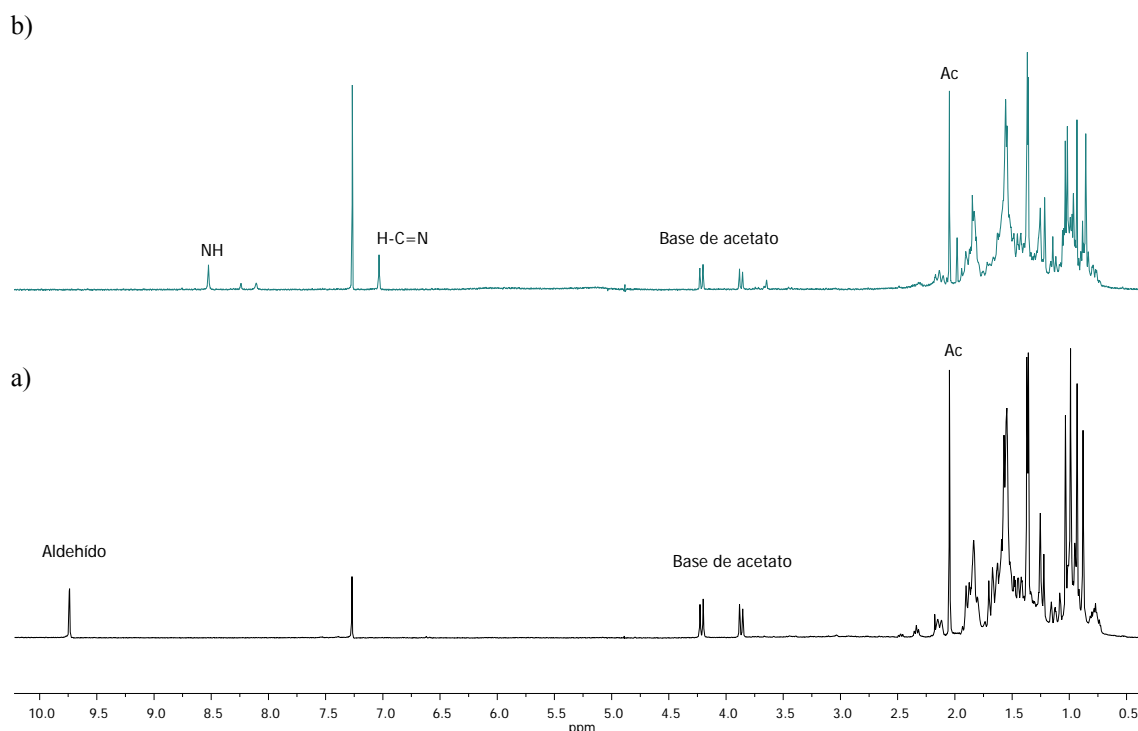


Figura 6.2.8. Comparación de los espectros de RMN de ^1H de la mezcla de diterpenos naturales (a) vs crudo de reacción para la obtención de la semicarbazona (b).

Este proceso permitió la separación de los compuestos. El primer compuesto se obtuvo como un sólido blanco que mostró en su espectro de IR bandas de absorción para grupos hidroxilo en 3300 cm^{-1} y carbonilo en 1741 cm^{-1} . Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.2.9, Tabla 6.2.2) mostró la presencia de un sistema AB centrado en δ_{H} 4.04 ($J= 11.2\text{ Hz}$) asignada a los protones geminales 19a y 19b, una señal simple perteneciente al metilo de acetato en δ_{H} 2.05; además se observó la presencia tres grupos metilo ubicados en δ_{H} 1.36 (H-17), 1.04 (H-20) y 0.93 (H-18) lo que sugirió cierta similitud con el espectro del kauranol (5). En su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.2.11, Tabla 6.2.2) se observaron las señales para el grupo éster en δ_{C} 171.5 (C-1'), 67.1 (C-19) y 21.0 (C-2') mientras que las señales características para el esqueleto de kaurano con hidroxilo 16- α se ubicaron en δ_{C} 79. (C-16),

24.4 (CH₃-17), 27.5 (CH₃-18) y 18.0 (CH₃-20). Los datos anteriores coincidieron con el análisis EMIE que sugirió la fórmula molecular C₂₂H₃₆O₃, permitiendo identificar a **61** como el 19-acetoxi-*ent*-kauran-16 α -ol.

La configuración del C-19 fue deducida a través del análisis homonuclear NOESY (Figura 6.2.10) el cual mostró la correlación del protón 19a con los hidrógenos del grupo CH₃-20 indicando que se encuentran orientados *sin*, revelando que el grupo acetato se encuentra con orientación α .

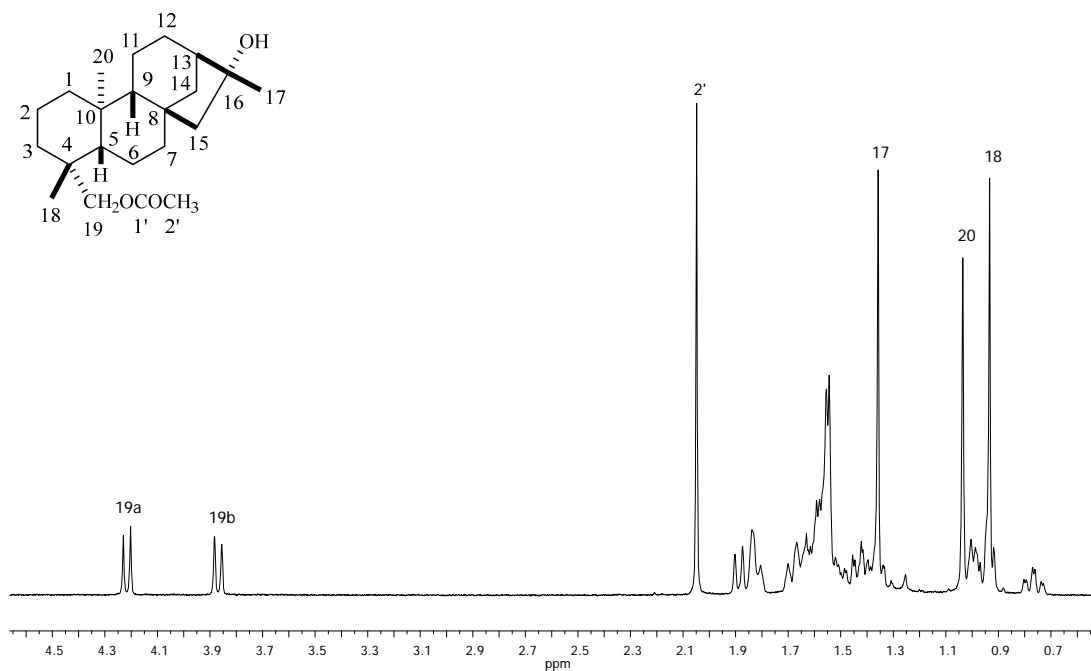
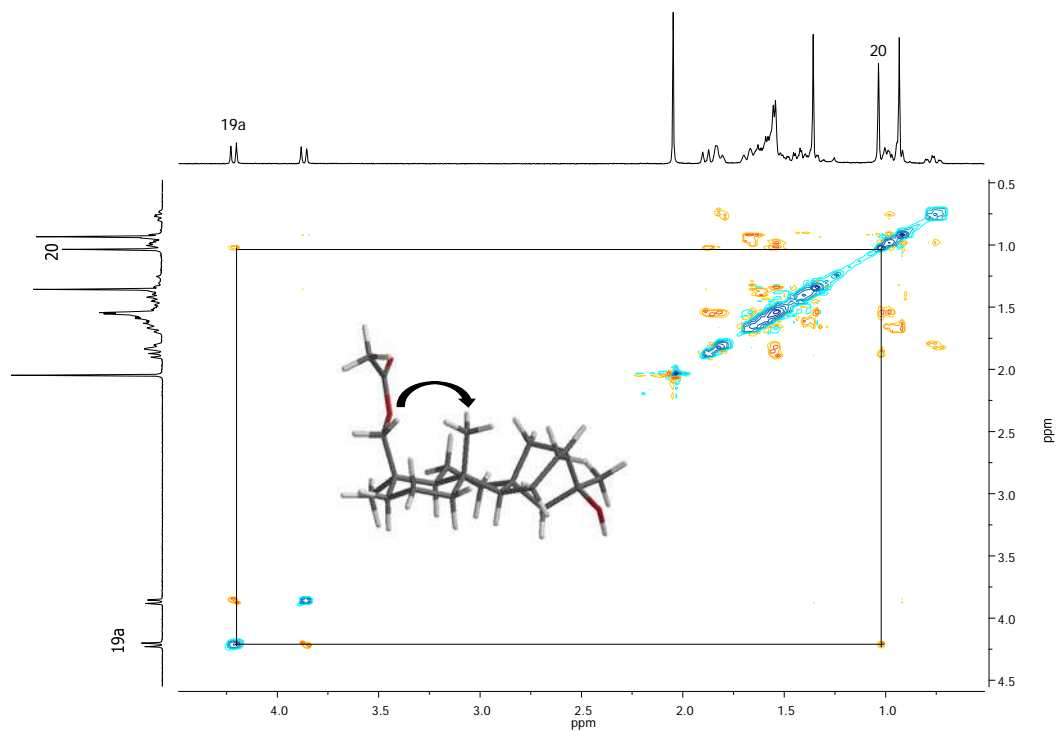


Figura 6.2.9. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del 19-acetoxi-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**).



6.2.10. Espectro NOESY del 19-acetoxy-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**).

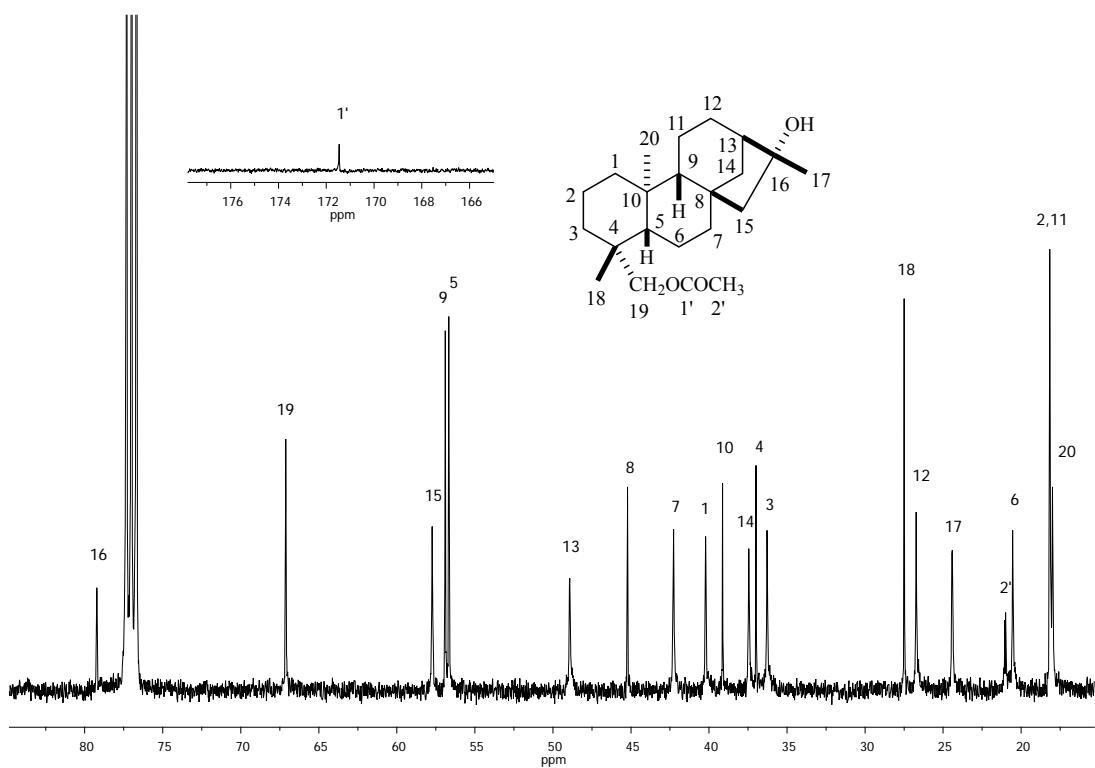


Figura 6.2.11. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del 19-acetoxy-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**).

Tabla 6.2.2. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del 19-acetoxy-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**).

19-acetoxy- <i>ent</i> -kauran-16 α -ol (61)		
Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a		1.82, m
1b	40.2	0.77, td (13.0, 3.6)
2a		1.58, m
2b	18.2	1.40, m
3a		1.68, m
3b	36.3	0.96, m
4	37.0	-
5	56.7	0.92, m
6a		1.64, m
6b	20.5	1.34, m
7	42.3	1.57, m
8	45.2	-
9	56.9	0.99, m
10	39.1	-
11	18.2	1.55, m
12a		1.56, m
12b	26.7	1.56, m
13	48.9	1.83, m
14a		1.89, d (11.2)
14b	37.5	1.54, m
15	57.7	1.54, m
16	79.2	-
17	24.4	1.36, s
18	27.5	0.93, m
19a		4.21, d (11.2)
19b	67.1	3.87, d (11.2)
20	18.0	1.04, s
1'	171.5	-
2'	21.0	2.05, s

El segundo compuesto correspondió al producto de reacción que tras de varios procesos de lavado con hexanos se obtuvo como un sólido blanco. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.2.12, Tabla 6.2.3), se observaron características espectroscópicas similares al material de partida. Los cambios más relevantes fueron el desplazamiento de la señal base de semicarbazona H-19 hacia frecuencias altas δ_{H} 7.00 y la aparición una señal simple en δ_{H}

8.05 perteneciente al NH. Por otro lado, los hidrógenos de los grupos metilo se ubicaron en δ_H 1.37 (CH₃-17), 1.02 (CH₃-18) y 0.86 (CH₃-20).

Su espectro de RMN de ¹³C (Figura 6.2.13, Tabla 6.2.3) mostró las señales correspondientes al esqueleto diterpénico destacando las señales en δ_C 149.4 correspondiente al C-19 de la imína y la señal atribuida al carbonilo de la semicarbazona en δ_C 157.1.

La correcta asignación de **63** fue confirmada a través del experimento HETCOR (Figura 6.2.14) en el cual se observó la correlación de la señal del carbonilo de imína C-19 con la señal simple base de semicarbazona H-19, mientras que las señales simples de grupos CH₃-17, CH₃-18 y CH₃-20 correlacionaron con las señales de los C-17, C-18 y C-20 respectivamente. La conformación *E* de la semicrabazona se estableció a través del experimento NOESY en la que se observó la correlación de la señal del NH con la señal del H-19.

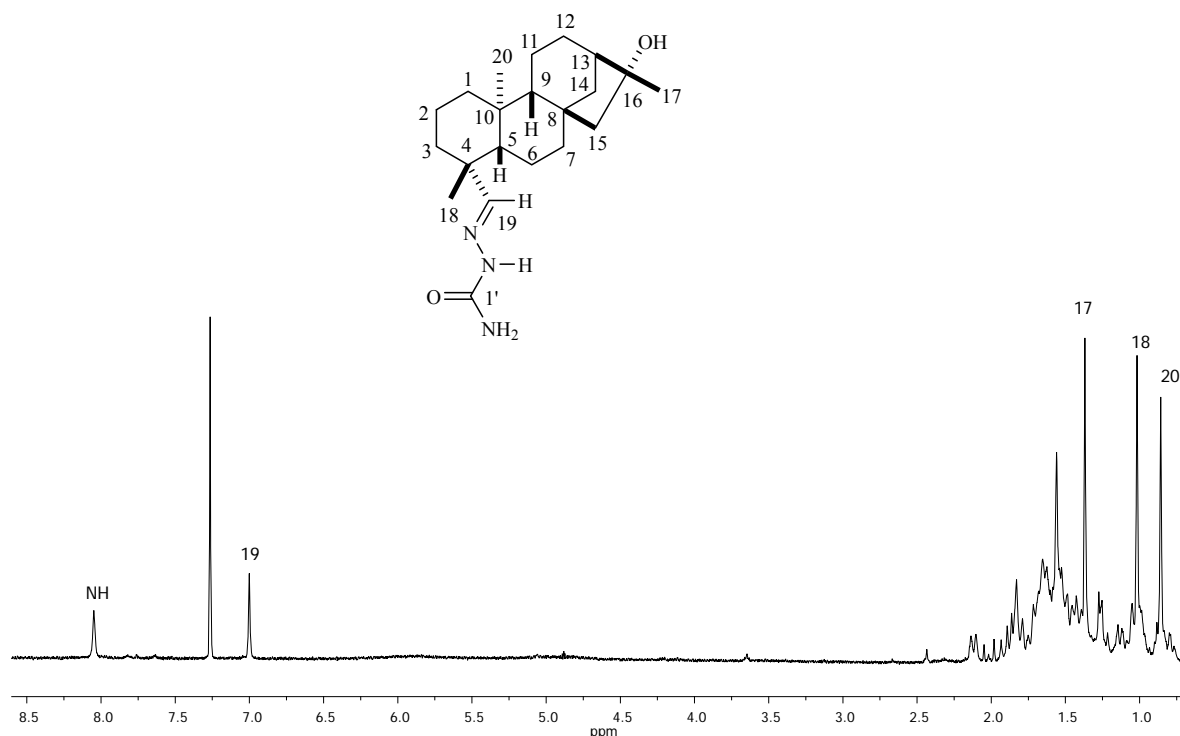


Figura 6.2.12. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del derivado semicarbazona del *ent*-kaur-16 α -hidroxi-19-al (**63**).

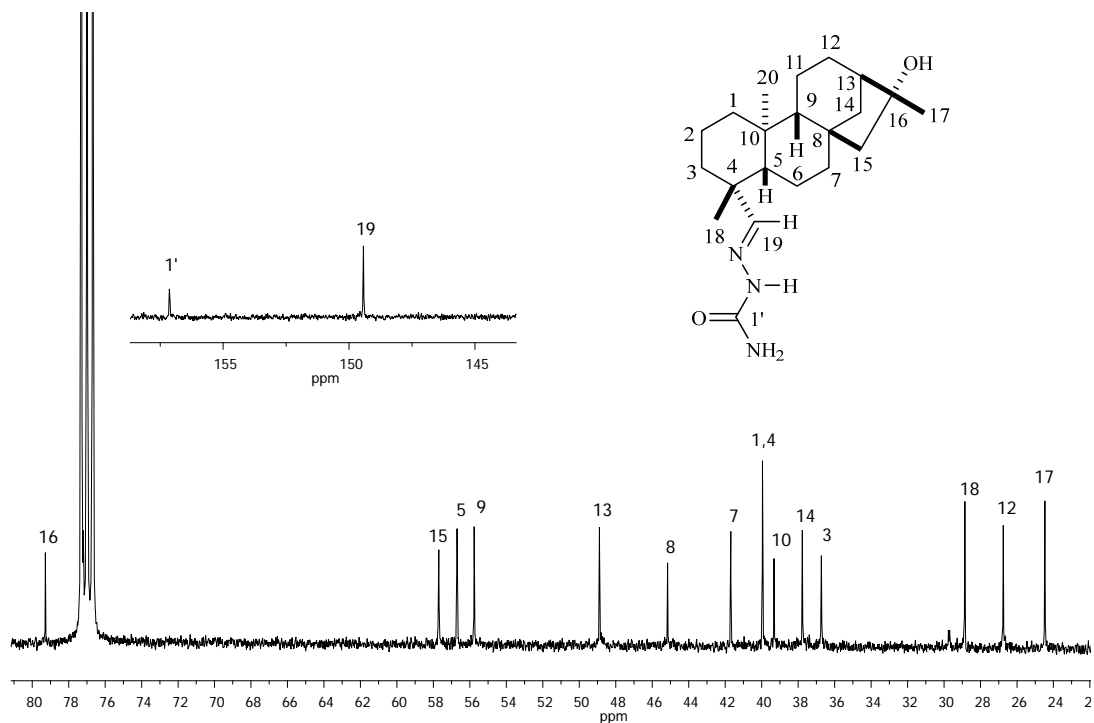


Figura 6.2.13. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del derivado semicarbazona del *ent*-kaur-16 α -hidroxi-19-al (63).

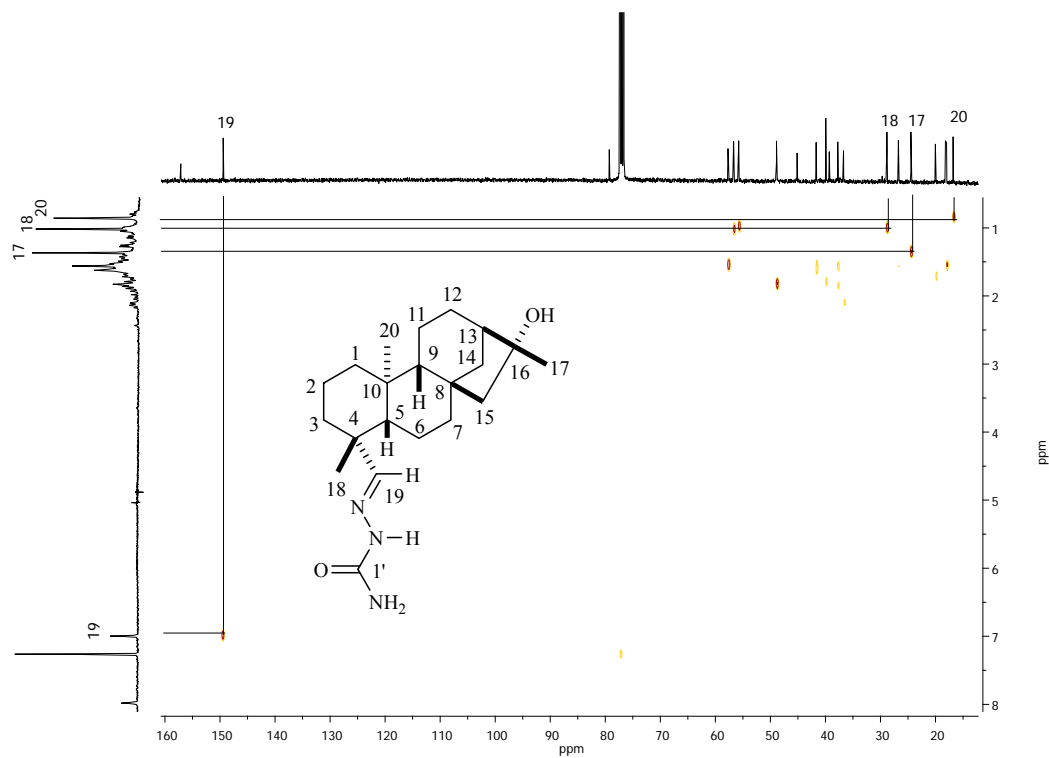


Figura 6.2.14. Espectro HETCOR del derivado semicarbazona del *ent*-kaur-16 α -hidroxi-19-al (63).

Tabla 6.2.3. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del derivado semicarbazona **63**.

Derivado semicarbazona 63		
Position	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a	40.0	1.81, m
1b		0.80, td (12.9, 3.5)
2a	18.2	1.73, m
2b		1.44, m
3a	36.7	2.12, da (13.2)
3b		1.12, td (13.5, 4.3)
4	40.0	-
5	56.7	1.04, dd (10.0, 2.8)
6a	20.0	1.70, m
6b		1.41, m
7	41.7	1.61, m
8	45.2	-
9	55.8	0.99, da (5.2)
10	39.3	-
11	18.0	1.52, m
12	26.8	1.61, m
13	48.9	1.83, m
14a	37.8	1.87, d (12.0)
14b		1.59, m
15	57.7	1.56, m
16	79.3	-
17	24.5	1.37, s
18	28.9	1.02, s
19	149.4	7.00, s
20	16.8	0.86, s
1'	157.1	-

No se encontraron datos para el derivado semicarbazona por lo que se trata de un nuevo derivado nitrogenado con esqueleto de *ent*-kaurano (**63**). Su asignación correcta se realizó con la ayuda de espectroscopia de 1D y 2D, así como por comparación de compuestos con estructura similar.

Continuando con la exploración fitoquímica, tras varios procesos cromatográficos, se obtuvo un sólido blanco (p.f. 203-205 °C). Su espectro de EMIE mostró un ion $[\text{M}]^+$ de *m/z* 306 de acuerdo a la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$.

Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.2.15, Tabla 6.2.4) indicó una importante similitud con el compuesto **61**, los cambios más significativos involucraron el desplazamiento de la señal correspondiente al sistema AB hacia frecuencias mayores en δ_{H} 3.58 ($J = 11.4$ Hz, H-19a y H-19b) y la ausencia de la señal simple perteneciente al metilo del acetato, indicando que el compuesto **64** corresponde al *ent*-kaur-16 α -19-diol, que puede ser considerado el producto reducido de **61**. Lo mencionado anteriormente fue respaldado por las señales de base de heteroátomo en RMN de ^{13}C (Figura 6.2.16, Tabla 6.2.4), δ_{C} 79.3 (C-16) y 65.5 (C-19).

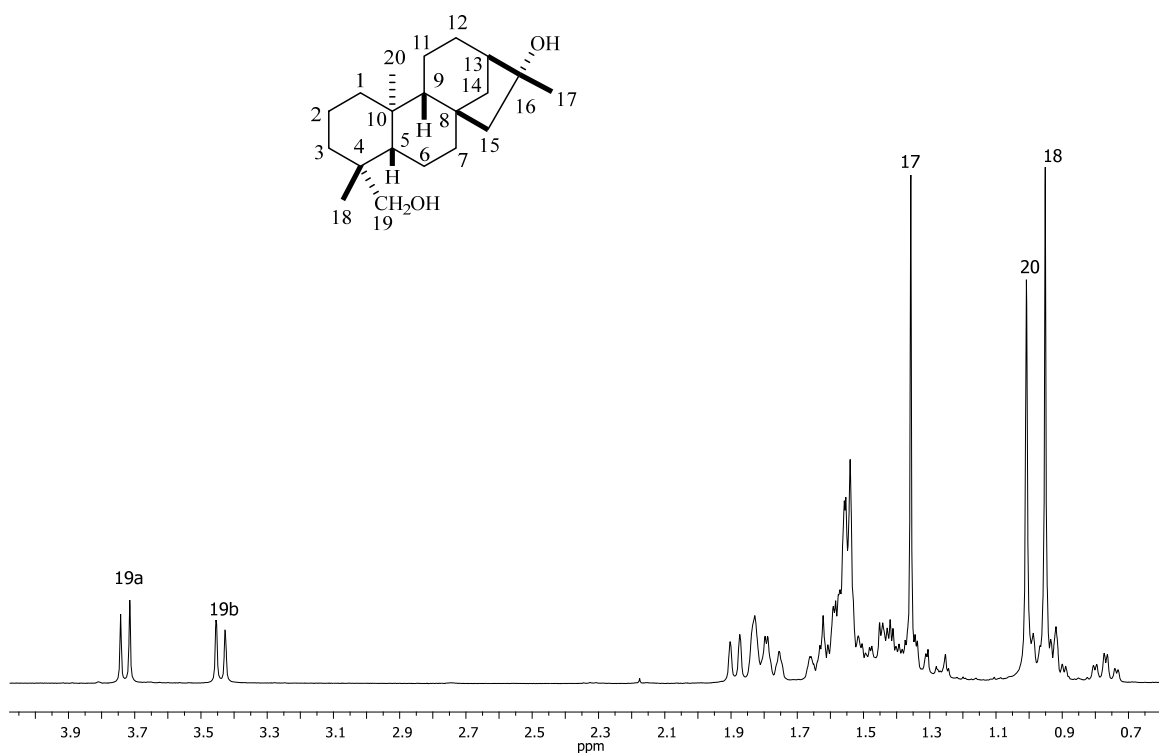


Figura 6.2.15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del *ent*-kaur-16 α -19-diol (**64**).

Los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C coincidieron con los descritos para el *ent*-kauran-16 α -19-diol (**64**),¹⁰² de igual forma se identificó que las señales de C-3, C-4, C-8, C-14, C-17 y C-18 se encuentran intercambiadas. Su asignación correcta se realizó con la ayuda de espectroscopia de RMN de 1D y 2D, así como por comparación de compuestos con estructura similar.

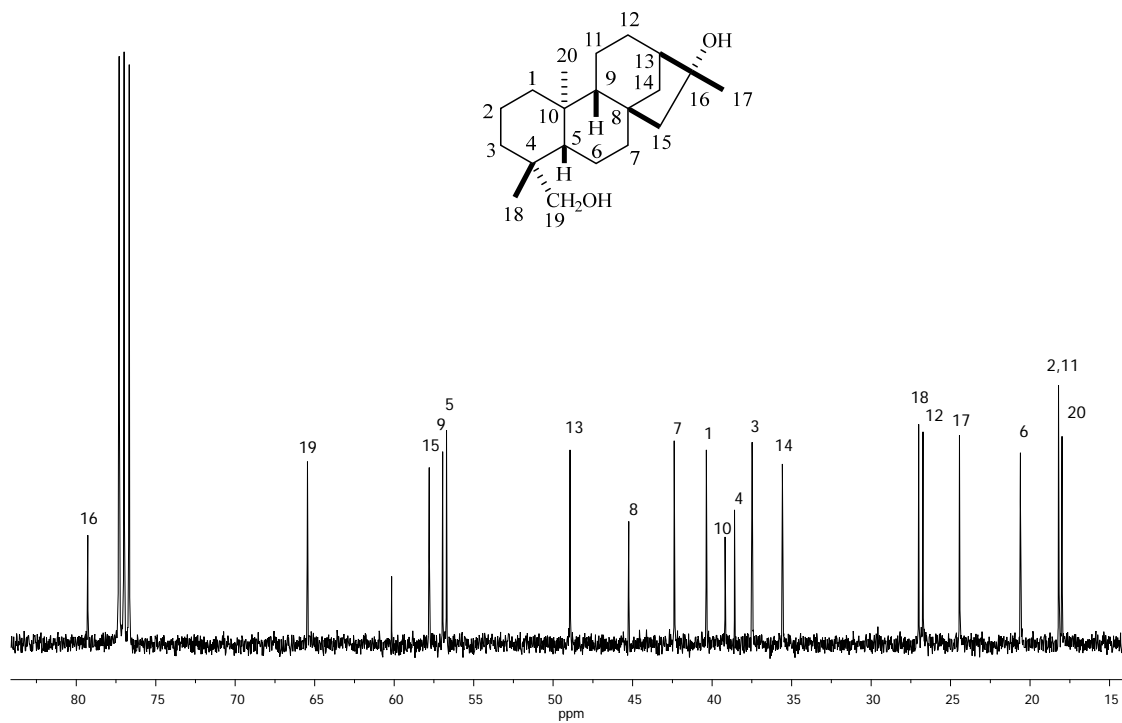


Figura 6.2.16. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del *ent*-kauran-16 α -19-diol (64).

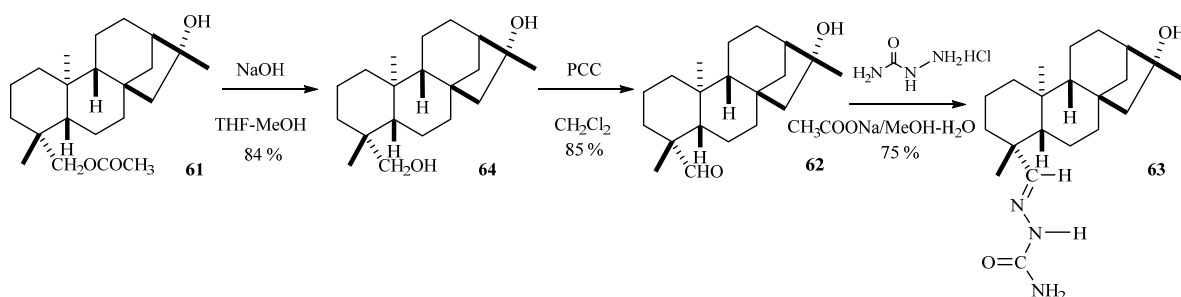
Tabla 6.2.4. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **64** en comparación con la literatura.¹⁰²

Posición	Experimental		Reportado	
	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a	40.4	1.81, m	40.2	-
1b		0.77, td (13.0, 3.9)		
2a	18.2	1.40, m	18.0	-
2b		1.56, m		
3a	35.6	1.77, m	37.3	-
3b		0.92, m		
4	38.6	-	39.0	-
5	56.7	0.93, m	56.7	-
6	20.6	1.63, m	20.4	-
7	42.4	1.57, m	42.2	
		1.45, m		
8	45.2	-	45.0	-
9	57.0	0.99, m	56.5	-
10	39.2	-	38.4	-
11	18.2	1.54, m	17.8	-
12	26.7	1.55, m	26.5	-
13	48.9	1.83, sa	48.7	
14a	37.5	1.89, d (11.6)	35.4	-
14b		1.54, m		
15	57.8	1.54, m	57.6	-
16	79.3	-	79.1	-
17	24.4	1.36, s	26.8	1.35, s
18	27.0	0.95, s	24.2	1.01, s
19a	65.5	3.73, d (11.0)	65.3	3.73, d (10.9)
19b		3.44, d (11.0)		3.44, d (10.9)
20	18.2	1.01	18.0	0.95, s

La señal del CH_3 -17 en los compuestos **5**, **61**, **62** y **64** mostró coincidencia en sus datos de RMN de ^1H (δ 1.36 o 1.37) y en ^{13}C (δ 24.5), lo que sugiere la relación química entre estas estructuras, la diferencia más significativa entre estos compuestos se basa en naturaleza del sustituyente de C-19 (CH_3 , CH_2OH , $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$ y CHO).

Para corroborar la relación entre estos metabolitos se llevó a cabo la correlación química mostrada en el Esquema 6.2.3, iniciando con la hidrólisis alcalina del grupo acetato en el compuesto **61** generando el 16 α ,19-diol (**64**), posteriormente el grupo hidroxilo en **64**

fue oxidado empleando PCC para proporcionar el compuesto carbonílico **62**, este compuesto presentó inestabilidad a temperatura ambiente por lo que se sometió directamente a derivatización para la obtención de la semicarbazona **63**, la cual fue comparada con la obtenida a partir del producto natural mediante RMN de ^1H coincidiendo totalmente, lo que permitió sugerir que la serie de 16 α -kauranoles **61**, **62** y **64** comparten la misma configuración en C-19 y C-16 y por lo tanto, estos se conectan mediante procesos de oxidación secuencial a partir del *ent*-kaur-16 α -ol (**5**), como es discutido más adelante.



Esquema 6.2.3. Correlación química de la serie 16-kauranol **61**, **62** y **64**.

Por otro lado, la fracción más polar del extracto hexánico de raíces se sometió a repetidos procesos cromatográficos con una mezcla de hexanos-AcOEt (4:1) obteniendo **65** como una miel incolora. Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.2.17, Tabla 6.2.5) mostró dos protones base de oxígeno acoplados en δ_{H} 3.43 con $J = 2.8$ Hz asignados a los H-15 y H-16 indicando la presencia de un grupo oxirano, conjuntamente, se observaron las señales de grupo metilo en δ_{H} 1.26 (CH₃-18) y 1.02 (CH₃-17) y un adicional grupo metilo en δ_{H} 0.85 (CH₃-20) sugirió la presencia de un compuesto con esqueleto de *ent*-beyerano.

El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.1.18, Tabla 6.2.5) mostró 20 resonancias y con ayuda experimento DEPT establecimos la naturaleza de los correspondientes grupos metilos en δ_{C} 29.0 (C-18), 21.4 (C-17) y en δ_{C} 14.2 (C-20); asimismo, se observaron ocho carbonos metilénicos en δ_{C} 46.6 (C-14), 39.6 (C-1), 37.7 (C-3), 35.4 (C-12), 33.4 (C-7), 21.3 (C-6), 19.4 (C-11), 19.1 (C-2); además, se apreciaron en δ_{C} 56.8 (C-5) y δ_{C} 55.7 (C-9) los carbonos metínicos; por consiguiente, los carbonos cuaternarios se asignaron en δ_{C} 44.3 (C-8), 43.6 (C-4), 38.9 (C-13), y 38.1 δ_{C} (C-10); un adicional carbono carbonílico en δ_{C} 183.9 (C-19) sugirió la presencia del carbonilo de ácido y finalmente las señales en δ_{C} 60.1 (C-16) y 55.8 (C-15) confirmaron la presencia del anillo de oxirano en **65**.

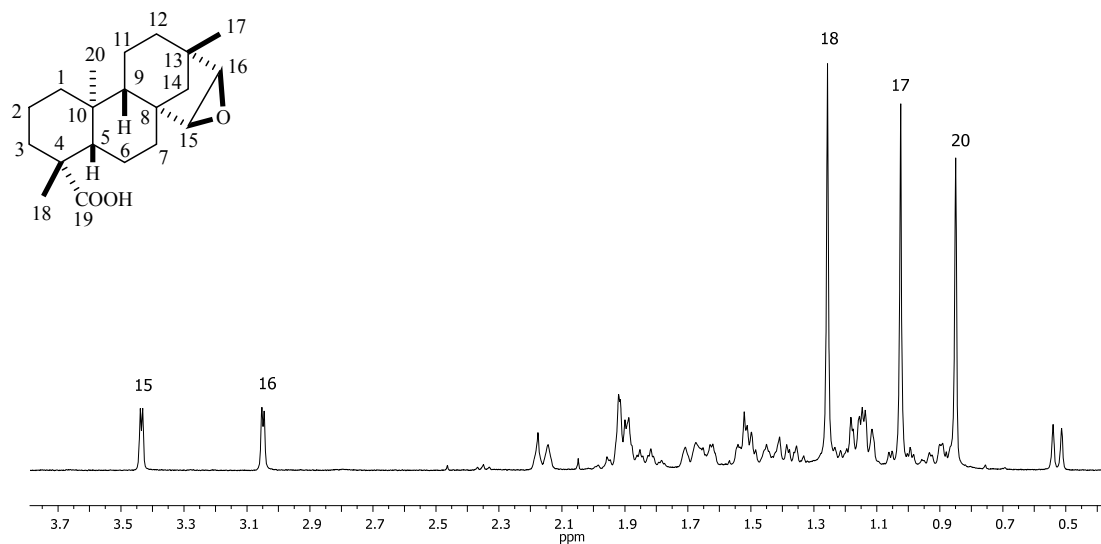


Figura 6.2.17. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (65).

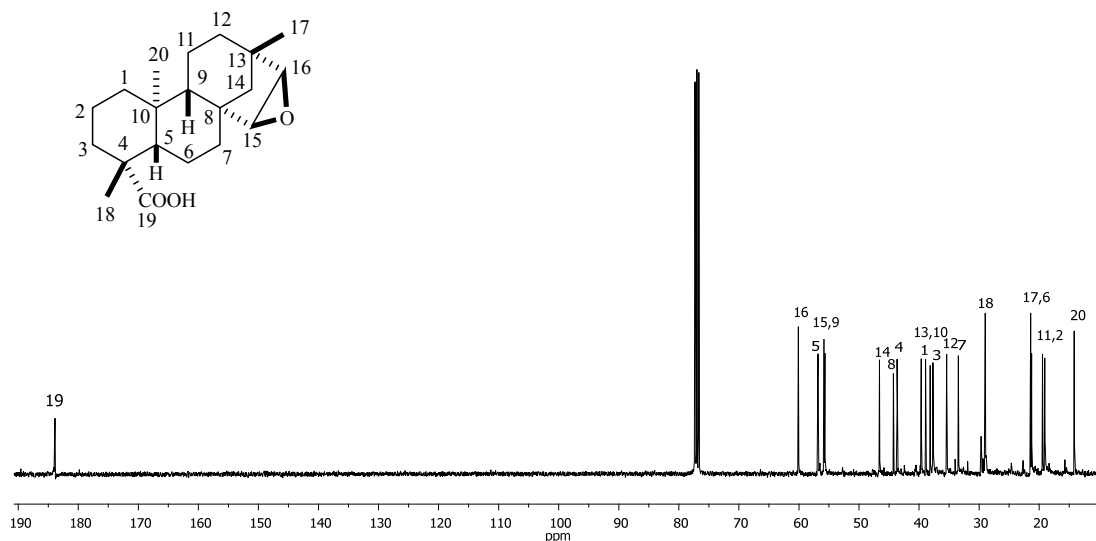


Figura 6.2.18. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (65).

El experimento HETCOR permitió la confirmación de la asignación establecida (Figura 6.2.19). Las principales correlaciones observadas fueron la correlación entre los carbonos C-16 y C-15 base de epóxido con las señales dobles ubicadas en δ_H 3.05 y 3.43 asignadas a los protones de oxirano, mientras que la señal perteneciente al C-5 correlacionó con la señal múltiple en δ_H 1.11 (H-5) y el C-9 correlacionó con la señal múltiple en δ_H 1.13; además, los C-18, C-17, y C-20 presentaron correlación con sus respectivos metilos CH₃-18, CH₃-17 y CH₃-20.

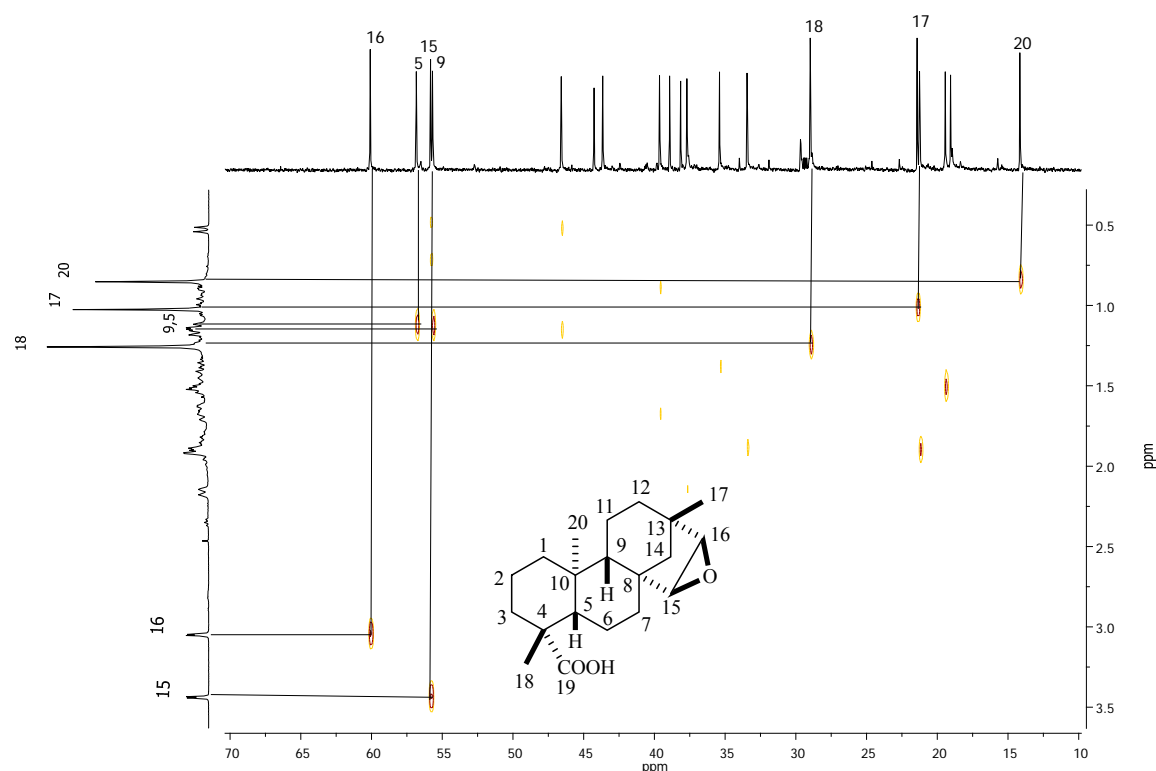
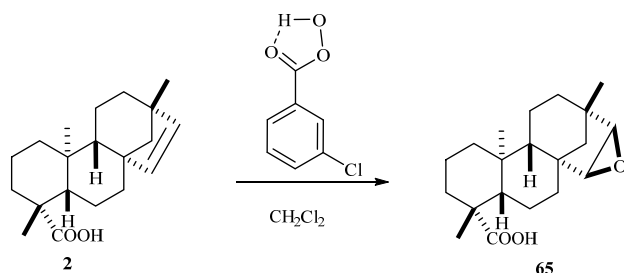


Figura 6.2.19. Espectro HETCOR del ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (**65**).

Basado en la anterior evidencia espectroscópica el metabolito **65** fue identificado como el ácido *ent*-beyer-15,16-epoxy-19-oico (**65**).

La quiralidad del producto natural **65**, fue establecida por correlación química a partir de la epoxidación del ácido beyerenico (**2**) empleando las condiciones reportadas para la obtención de un solo diastereoisómero (Esquema 6.2.4).²⁰



Esquema 6.2.4. Epoxidación de ácido beyerenoico (**2**) con ácido 3-cloroperbenzoico.

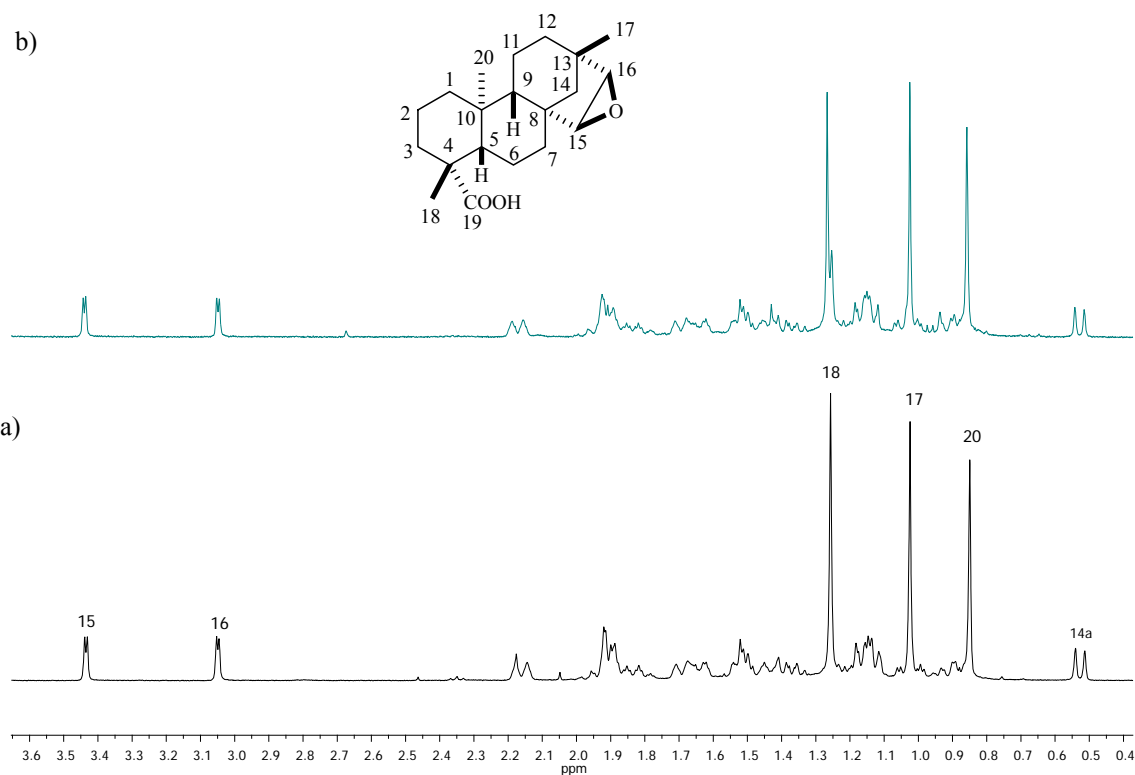


Figura 6.2.20. Comparación del espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del producto natural **65** (a) vs epóxido generado por tratamiento del Ac. beyerenoico (**2**) con ácido 3-cloroperbenzoico (b).

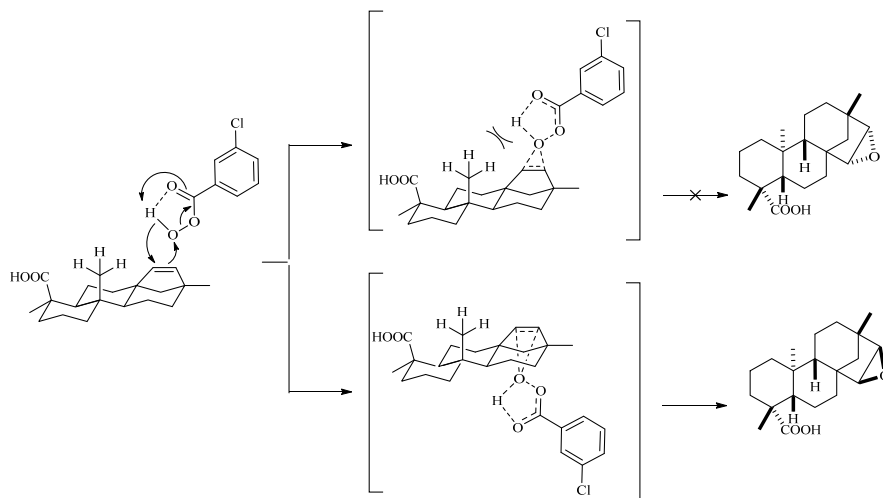
Los resultados espectroscópicos (Figura 6.2.20) del proceso de oxidación fueron comparados con los del producto natural **65** coincidiendo totalmente, destacando que los datos del C-15 y C-16 en RMN de ^{13}C coincidieron con los descritos para *ent*-beyeranos con anillo de oxirano en la posición $15\beta, 16\beta$.¹⁰³

Tabla 6.2.5. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (**65**).

Ácido <i>ent</i> -beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (65)		
Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a		1.66, m
1b	39.6	0.88, m
2a		1.81, m
2b	19.1	1.43, m
3a		2.16, da (12.8)
3b	37.7	1.01, m
4	43.6	-
5	56.8	1.11, m
6	21.3	1.89, m
7a		1.88, m
7b	33.4	1.16, m
8	44.3	-
9	55.7	1.13, m
10	38.1	-
11	19.4	1.51, m
12a		1.62, m
12b	35.4	1.38, m
13	38.9	-
14a		1.15, m
14b	46.6	0.53, da (10.8)
15	55.8	3.43, d (2.8)
16	60.1	3.05, d (2.8)
17	21.4	1.02, s
18	29.0	1.26, s
19	183. 9	-
20	14.2	0.85, s

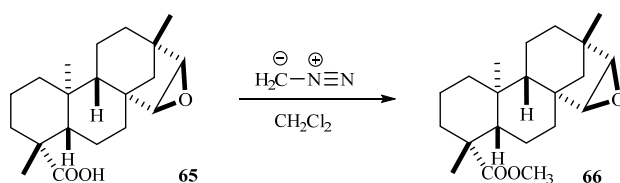
La estereoquímica del anillo de oxirano es específica al ser incorporado en el enlace doble de la posición 15,16 de esqueletos de *ent*-beyereno, cuando se emplea ácido 3-cloroperbenzoico como agente oxidante.¹⁰³⁻¹⁰⁴ El mecanismo reportado sugiere un proceso cíclico polar donde el protón del perácido es transferido intermolecularmente al oxígeno sp^2 del perácido cuando se promueve la formación del enlace C-O con un carbono sp^2 del alqueno, favoreciendo la generación del respectivo aducto. Este proceso favorece de manera concertada la ciclización que da lugar a la formación del oxirano, que finalmente favorece la

disociación del aducto formado y la concomitante generación de ácido 3-clorobenzoico. Debido al acomodo espacial en el estado de transición, se favorece el ataque en la cara menos impedida del *ent*-beyereno, en este caso, la repulsión estérica por parte del CH₃-20 es significativa, generando estereoespecificidad en el producto de reacción (Esquema 6.2.5).¹⁰⁵ Con base en lo anterior, se establece la configuración 15*S*,16*R* en el ácido *ent*-beyer-15,16-epoxi-19-oico (**65**).



Esquema 6.2.5. Mecanismo propuesto para la epoxidación de ácido beyerenoico (**2**) con ácido 3-cloroperbenzoico.

Como parte de la caracterización complementaria del producto natural **65**, se llevó a cabo la preparación del respectivo éster metílico empleando diazometano (Esquema 6.2.6). En su espectro de RMN de ¹H (Figura 6.2.21, Tabla 6.2.6) se encontró un singulete en δ_H 3.65 (CH₃-1'), que indicó la presencia del éster metílico **66**. Su espectro de RMN de ¹³C (Figura 6.2.22, Tabla 6.2.6) confirmó estos resultados a través de la presencia de señales a δ_C 178.0 (C-19) y en δ_C 51.2 (C-1').



Esquema 6.2.6. Obtención del éster metílico del ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (**66**).

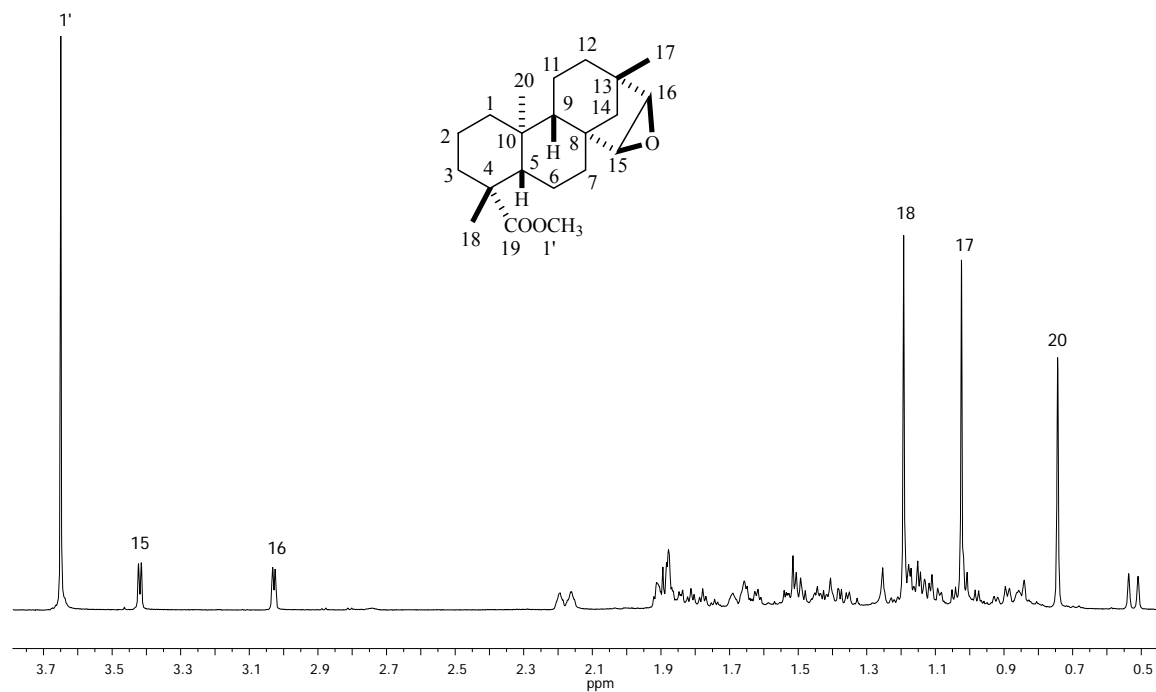


Figura 6.2.21. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del éster metílico del *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (66).

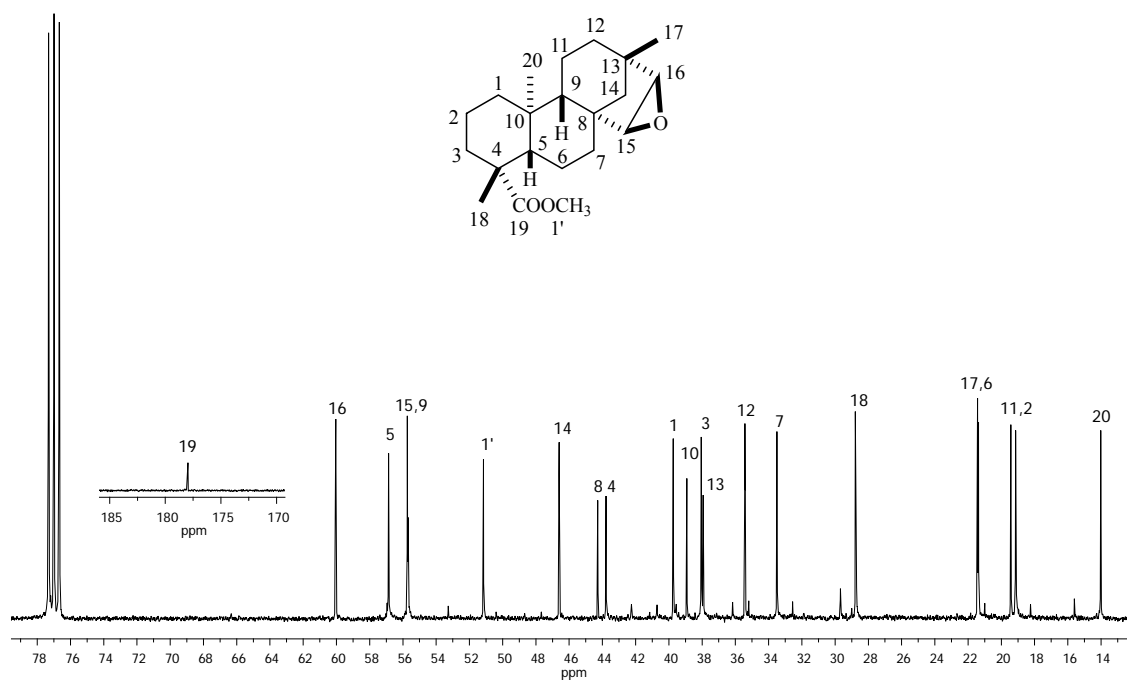


Figura 6.2.22. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del éster metílico del *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (66).

Tabla 6.2.6. Desplazamientos de RMN de ^1H del éster metílico del *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (**66**).

Éster metílico del <i>ent</i> -beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (66).		
Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a	39.7	1.66, m
1b		0.89, td (13.2, 4.5)
2a	19.1	1.79, m
2b		1.42, m
3a	38.1	2.18, da (12.4)
3b		1.01, td (13.5, 4.1)
4	43.8	-
5	56.9	1.09, m
6a	21.4	1.88, m
6b		1.01, m
7a	33.5	1.87, m
7b		1.13, m
8	44.3	-
9	55.7	1.11, m
10	38.9	-
11	19.4	1.50, m
12a	35.4	1.61, m
12b		1.35, m
13	37.9	-
14a	46.6	1.15, m
14b		0.52, d (10.8)
15	55.7	3.42, d (3.2)
16	60.0	3.03, d (3.2)
17	21.4	1.02, s
18	28.8	1.19, s
19	178.0	-
20	14.2	0.74, s
1'	51.2	3.65, s

Con la finalidad de complementar los estudios configuracionales de **65**, se llevaron a cabo estudios de DCV, a partir del derivado **66**, ya que el grupo funcional éster metílico es deseable para evitar interacciones intermoleculares que dificulten el análisis de los resultados. Esta técnica se define como el diferencial de absorción de luz infrarroja circularmente polarizada a la izquierda frente a la derecha. Consiste en mediciones en la región espectral infrarroja comúnmente en un rango $\sim 2000\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (región de la huella digital) empleando espectrómetros de DCV de transformada de Fourier (FT). Los espectros DCV contienen rica información estructural. En primer lugar, la técnica se puede utilizar para determinar la configuración absoluta de una molécula quiral sin la necesidad de desarrollar monocristales como lo es en la técnica de Rx. Los enantiómeros tienen signos opuestos para las bandas vibratorias correspondientes. La asignación de configuraciones absolutas se lleva a cabo mediante en la comparación entre espectros DCV experimentales vs calculados, para ello, se deben determinar las posibles conformaciones de la molécula, se debe refinar su estructura y se debe determinar su espectro DCV. Generalmente, los espectros DCV de diferentes conformeros difieren significativamente. Esta estrategia para la determinación de la estructura de moléculas se basa en la calidad del cálculo. Sin embargo, en la actualidad, se dispone de métodos, que se basan principalmente en la teoría funcional de la densidad (DFT), de naturaleza predictiva muy eficiente.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Esta técnica ha sido empleada para la determinación de la CA de compuestos de origen natural, incluyendo terpenos, fenoles y alcaloides.¹⁰⁸

Para llevar a cabo los estudios por dicroísmo circular vibracional (DCV), primeramente, se modeló la estructura de **66** considerando la configuración *15R,16S* (**66a**) y *15S,16R* (**66b**) del anillo de epóxido individualmente, empleando el programa Spartan `04. Posteriormente, se realizó una búsqueda conformacional empleando el protocolo Montecarlo¹⁰⁹ donde se obtuvieron 6 conformeros en un rango de 0-10 kcal/mol, para cada estereoisómero.

Una vez concluida la exploración conformacional se optimizaron las energías de todos los conformeros obtenidos, empleando teoría de funcionales de la densidad (DFT) con el método B3LYP y un nivel de teoría 6-31G**, la cual es una base de cálculo adecuado para estudios computacionales de diterpenos epiméricos.¹¹⁰ La selección de los conformeros en

un rango de 0 a 3 kcal/mol generó dos conformeros tanto para el epóxido α (15*R*, 16*S*) como para el epóxido β (15*S*, 16*R*). La población conformacional que representan estos conformeros fue de 99.99% y del 99.98%, respectivamente y su variación conformacional se limitó en la rotación del grupo carbonilo. Posteriormente, se llevó a cabo la minimización de la energía y la optimización de la geometría de los conformeros utilizando DFT con el método B3LYP y el nivel de teoría DGDZVP (Figura 6.2.23). Concluidas estas optimizaciones se empleó el mismo método para calcular las frecuencias y el espectro de DCV. Finalmente, se ponderaron y graficaron los espectros calculados de IR_{VCD} y DCV (Figura 6.2.24). Los espectros calculados fueron comparados con los datos experimentales mediante el software CompareVOA el cual permite cuantificar la similitud espectral y establecer el nivel de confianza del resultado.¹⁸

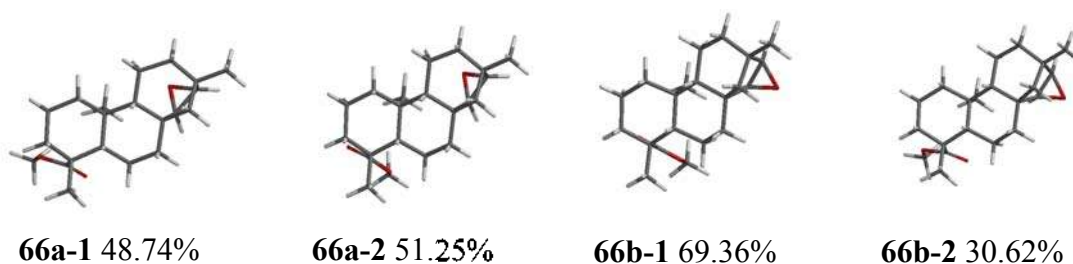


Figura 6.2.23. Conformeros de mayor contribución poblacional para el éster metílico del *ent*-beyer-15 α ,16 α -epoxi-19-oico (**66a**) y *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico(b) (**66b**).

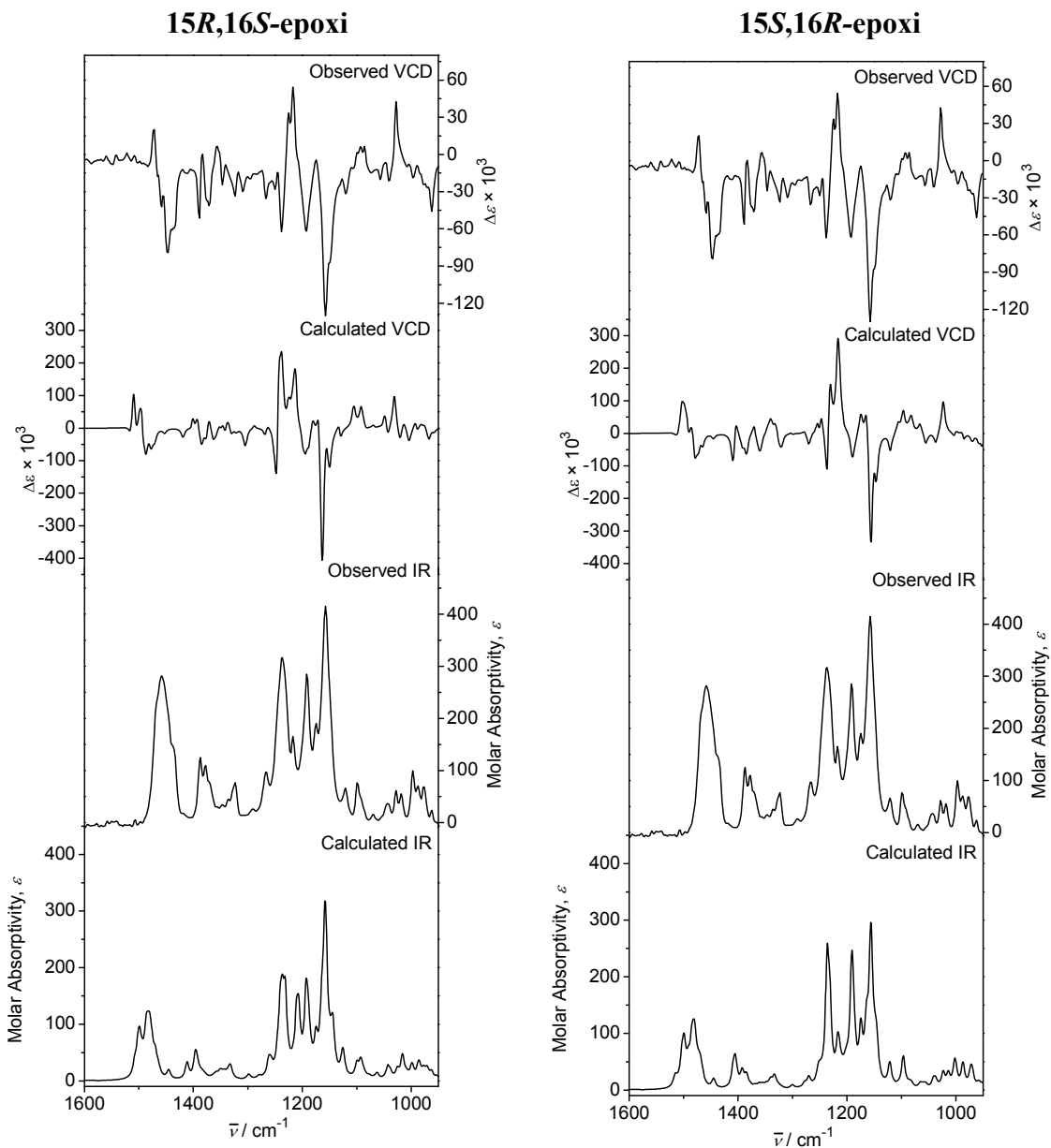


Figura 6.2.24. Comparación de los espectros de IR y DCV experimentales *vs* calculados del éster metílico del ácido *ent*-beyer-15 β ,16 β -epoxi-19-oico (**66**).

Los factores óptimos de anarmonicidad (anH), similitud espectral en IR (S_{IR}) y las similitudes espectroscópicas de DCV para el enantiómero correcto (S_E) y el incorrecto (S_{-E}) de cada compuesto se enumeran en la Tabla 6.2.7 junto con los valores del índice de similitud de enantiómeros (ESI) y el nivel de confianza de las asignaciones configuracionales. Para ambos casos, el parámetro de confianza fue del 100%, lo que sugiere que esta técnica no

logró distinguir la quiralidad de los epímeros **66a** y **66b**, lo que representa el primer reporte sobre las limitaciones de la técnica de DCV para la determinación de la CA de *ent*-beyeranos.

Tabla 6.2.7. Datos de nivel de confianza de los espectros de IR y DCV del compuesto **66**, calculado para los epímeros α -epóxido y β -epóxido.

Epímero	<i>anH</i>	S _{IR}	S _E	S _{-E}	ESI	C (%)
66a	0.979	87.0	79.1	18.2	60.9	100
66b	0.982	85.6	82.3	16.4	65.9	100

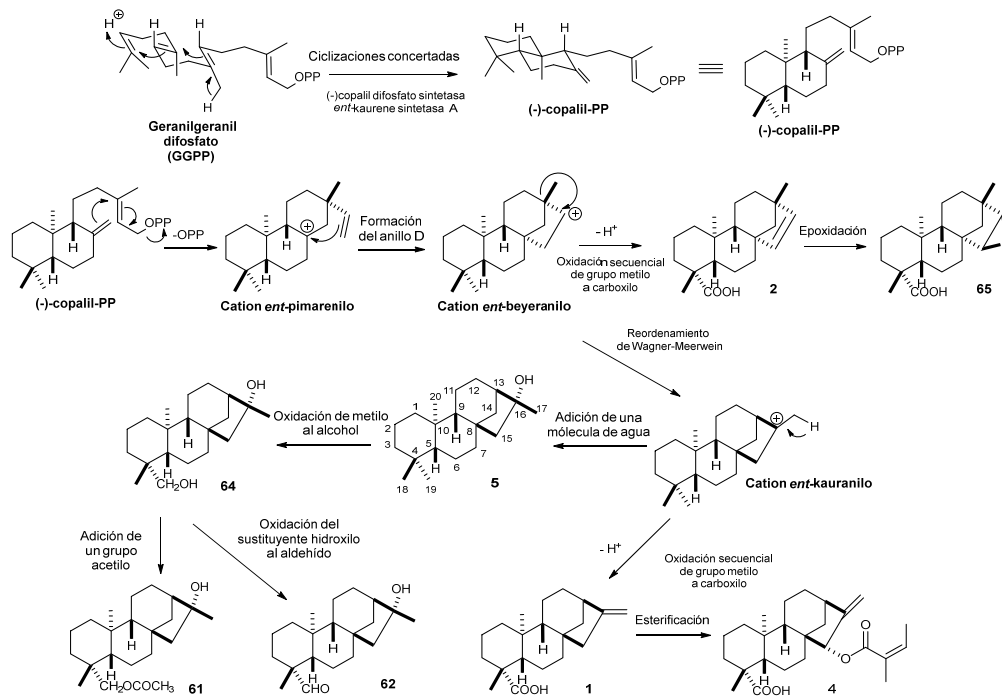
Del estudio químico realizado hasta el momento podemos establecer una propuesta para la ruta biosintética de los diterpenos con esqueleto de *ent*-kaurano y *ent*-beyerano presentes en *Perymenium buphthalmoides* (Esquema 6.2.7).

La síntesis de los diterpenoides *ent*-kaurano y *ent*-beyerano inicia con la protonación del doble enlace en la cabeza de la cadena de GGPP permitiendo una serie de ciclaciones concertadas terminada por la pérdida de un protón para conducir a la formación del (-)-copalil-PP. El (-)-copalil-PP después de la salida del grupo difosfato proporciona el catión *ent*-pimarenilo, intermediario clave en la formación del anillo D en los *ent*-kauranos y *ent*-beyeranos que posteriormente da lugar a la formación del catión *ent*-beyereno, este intermediario, tras la salida de un protón genera el *ent*-beyereno que puede experimentar una serie de oxidaciones secuenciales en C-19 para generar el ácido *ent*-beyerenoico (**2**) y tras un proceso de epoxidación generar su derivado epoxi-beyerano **65**.

Alternativamente el catión *ent*-beyereno tras un reordenamiento posterior de Wagner-Meerwein conduce a la formación del catión *ent*-kauranilo, si el catión *ent*-kaurenilo experimenta la pérdida del protón genera el doble enlace exocíclico dando lugar a la formación del *ent*-kaureno y tras una oxidación secuencial de grupo metilo a carboxilo en el C-19 origina el ácido kaurenoico (**1**) el cual experimenta una esterificación en el C-15 para dar origen a su derivado angeloiloxi (**4**).¹¹¹⁻¹¹²

Finalmente, si al catión *ent*-kauranilo sufre la adición de una molécula de agua genera el *ent*-16-kauranol (**5**), que puede proporcionar el compuesto 16-19-diol (**64**) a través del proceso de oxidación en C-19, el kauranodiol **64** a su vez puede experimentar acetilación en

C-19 proporcionando el correspondiente derivado acetilado **61**, mientras que alternativamente, un paso oxidativo en C-19 de **64** puede generar el compuesto aldehído **62**.¹¹³



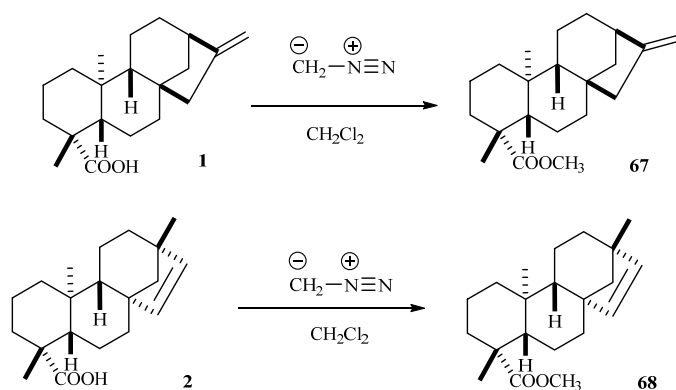
Esquema 6.2.7. Propuesta de ruta biosintética para *ent*-kauranos y *ent*-beyeranos en *P. bupthalmoides*.

Una vez aislados e identificados los ácidos diterpénicos **1** y **2** debido a su valor terapéutico, pureza enantiomérica y abundancia dentro de nuestra fuente de estudio fueron empleados como precursores en la preparación de derivados de kaureno y beyerano con un anillo de THP en su estructura a través de la reacción de ciclización Prins.

Para lograr lo anterior, se llevaron a cabo procesos de esterificación, reducción y oxidación consecutivos a partir de los diterpenos **1** o **2**, con la finalidad de obtener los derivados **72-73** intermediarios clave en la reacción de ciclización Prins.

6.3. Obtención de derivados diterpénicos a partir de los ácidos *ent*-kaurenoico (**1**) y *ent*-beyerenoico (**2**)

De acuerdo a la ruta sintética propuesta para la generación de los productos de ciclización Prins, inicialmente, se realizó la reducción de los grupos ácidos en los metabolitos **1** y **2** de manera directa empleando LiAlH_4 como agente reductor, el ensayo preliminar procedió adecuadamente, no obstante, no fue posible su continua reproducibilidad, debido a ello como alternativa se optó por transformarlos en sus respectivos ésteres metílicos empleando diazometano como agente alquilante (Esquema 6.3.1).



Esquema 6.3.1. Obtención del éster metílico del *ent*-kaurenoico (**1**) y el *ent*-beyerenoico (**2**).

La metilación de los ácidos **1** y **2** fue evidente al observar la señal simple característica de grupo metoxilo en sus respectivos espectros de RMN de ^1H (Figura 6.3.1 y Figura 6.3.3) las cuales se ubicaron en δ_{H} 3.64 para cada uno de los derivados **67** y **68**.

Estos datos fueron confirmados en sus espectros de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.2, Figura 6.3.4) mediante la presencia de las señales del carbonilo de éster y el grupo metilo los cuales se observaron en δ_{C} 178.1 (C-19) y δ_{C} 51.1 (C-1') y δ_{C} 178.1 (19) y δ_{C} 51.1 (C-1') respectivamente.^{40,99}

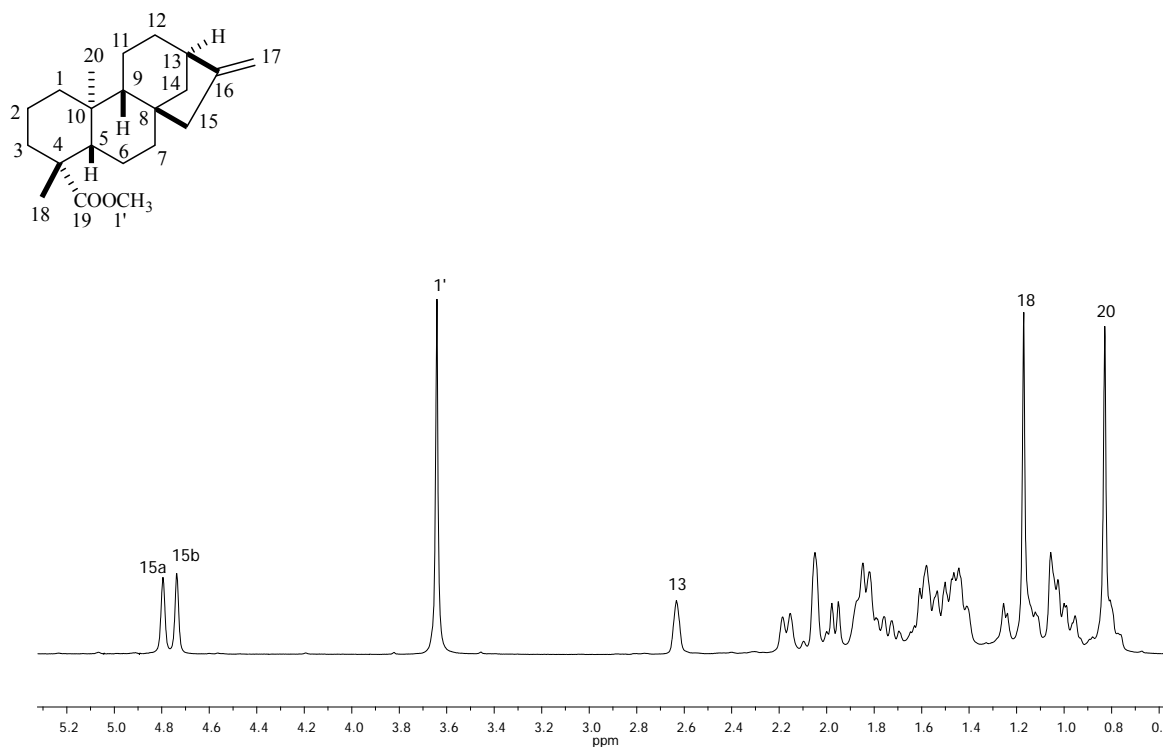


Figura 6.3.1. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del éster metílico del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (67).

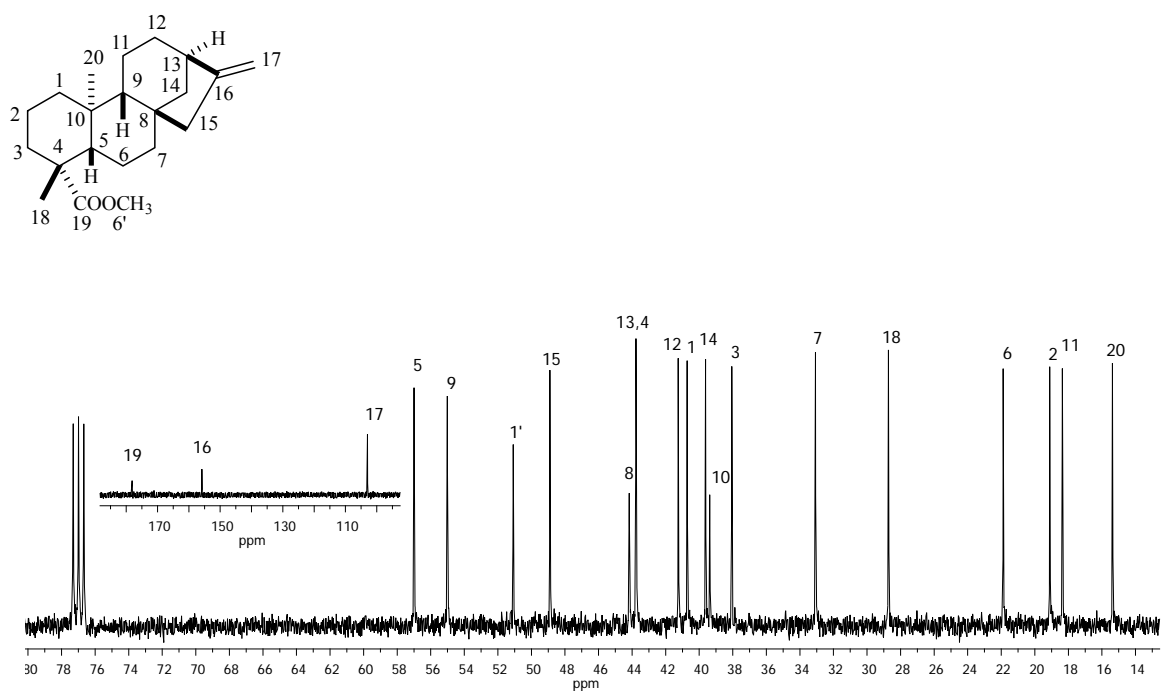


Figura 6.3.2. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del éster metílico del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (67).

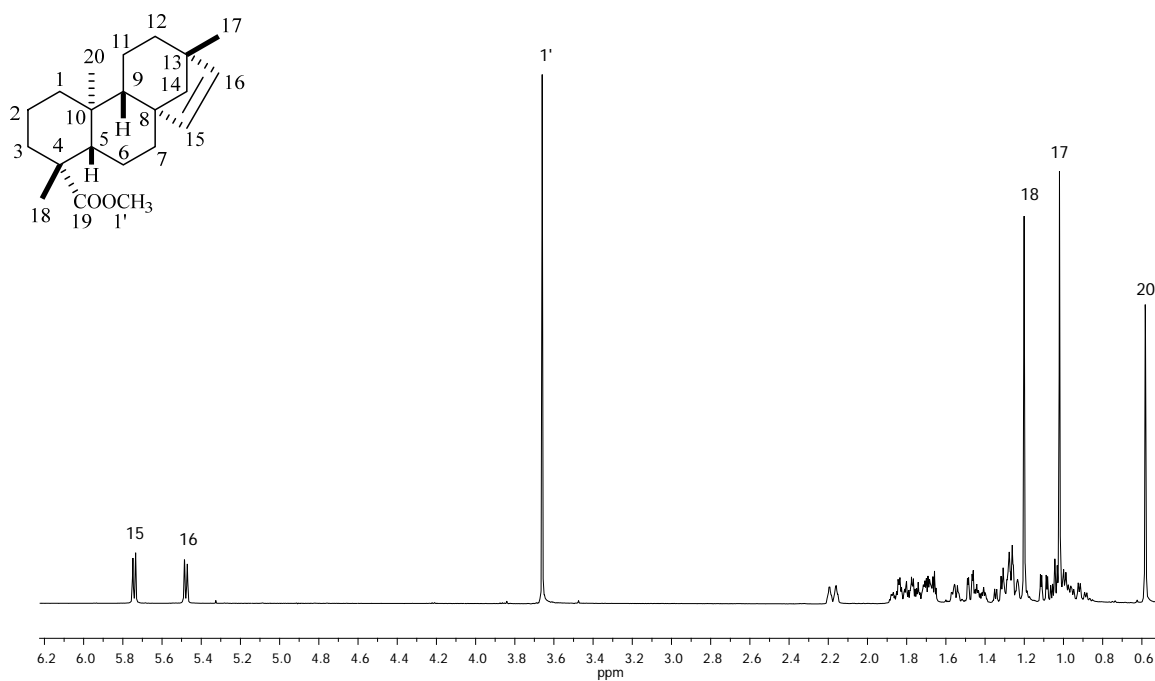


Figura 6.3.3. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del éster metílico del ácido *ent*-beyer-16-en-19-oico (**68**).

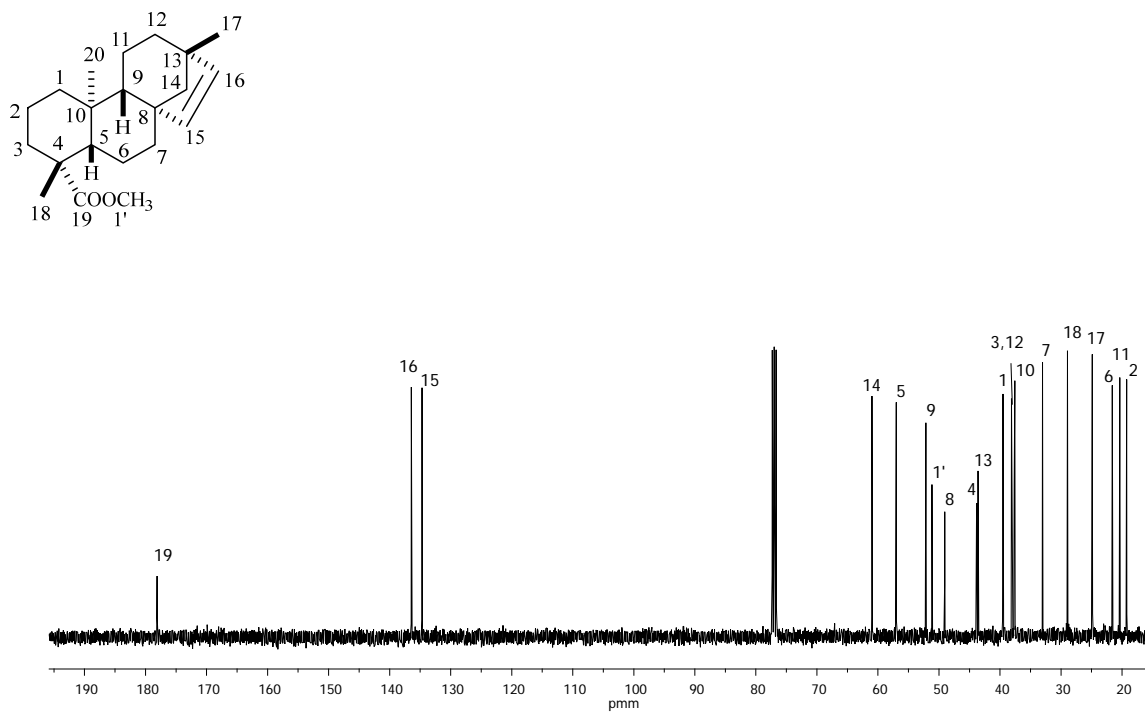
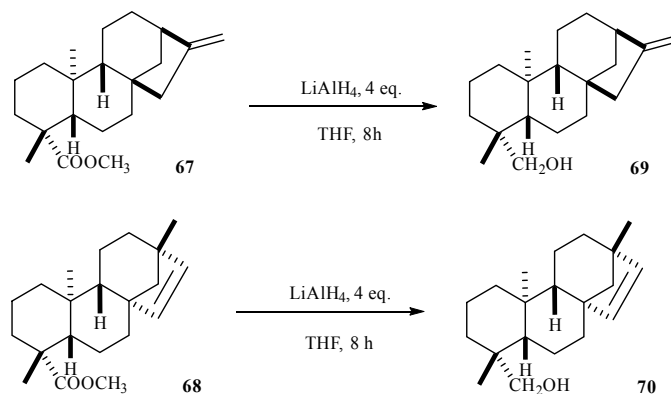


Figura 6.3.4. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del éster metílico del ácido *ent*-beyer-16-en-19-oico (**68**).

Obtenidos los ésteres metílicos **67** y **68** se procedió a realizar la reducción del grupo carbonilo por el tratamiento con LiAlH_4 en THF (Esquema 6.3.2) generando los alcoholes diterpénicos **69** y **70** como sólidos de color blanco.



Esquema 6.3.2. Obtención de los alcoholes diterpénicos **69** y **70**.

En el caso de los derivados **66** y **67** sus espectros de RMN ^1H (Figura 6.3.5 y Figura 6.3.7) mostraron características similares al material de partido excepto por la ausencia de la señal simple del metilo del éster las cuales fueron remplazadas por la aparición de un cuarteto AB en δ_{H} 3.62 con una constante de acoplamiento geminal de 11.1 Hz para el derivado **69** y en δ 3.63 con una $J = 10.8$ Hz para el derivado **70**, indicando la presencia de los grupos hidroxilo primarios. Sus espectros de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.6 y figura 6.3.8) respaldaron esta información a través de la presencia las señales en δ_{C} 65.6 y δ_{C} 65.5, perteneciente ahora al carbono base de hidroxilo C-19, respectivamente.

El alcohol **69** fue obtenido previamente por la reducción del ácido kaurenico (**1**) y la comparación de sus datos espectroscópicos coincidió para el *ent*-kaur-16-en-19-ol (**69**).^{99,114} Este compuesto fue evaluado frente a su efecto tripanocida contra formas de tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, mostrando actividad tripanocida.³⁵

Por otro lado, el derivado **70** conocido como Eritroxilol A fue aislado por primera vez de *Erythroxylon monogynum*¹¹⁵ además la evaluación biológica de **70** *in vitro* e *in vivo* contra amastigotes de *L. (V) braziliensis*, sugieren que el beyerenol es un potencial candidato para quimioterapia de leishmaniasis cutánea por aplicación tópica.²⁰

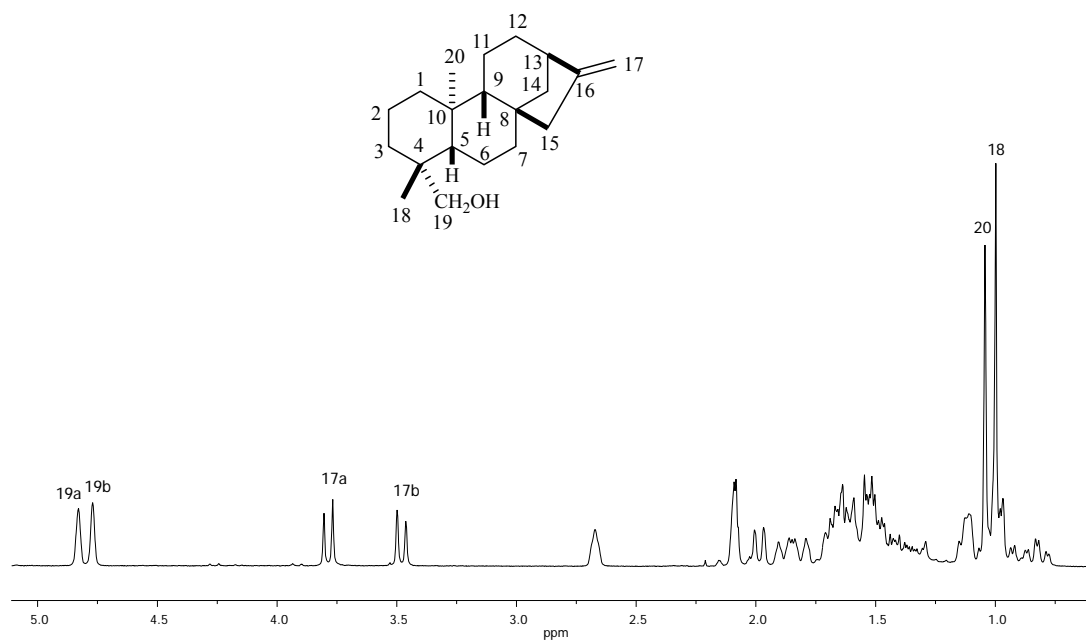


Figura 6.3.5. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 del *ent*-kaur-16-en-19-ol (**69**).

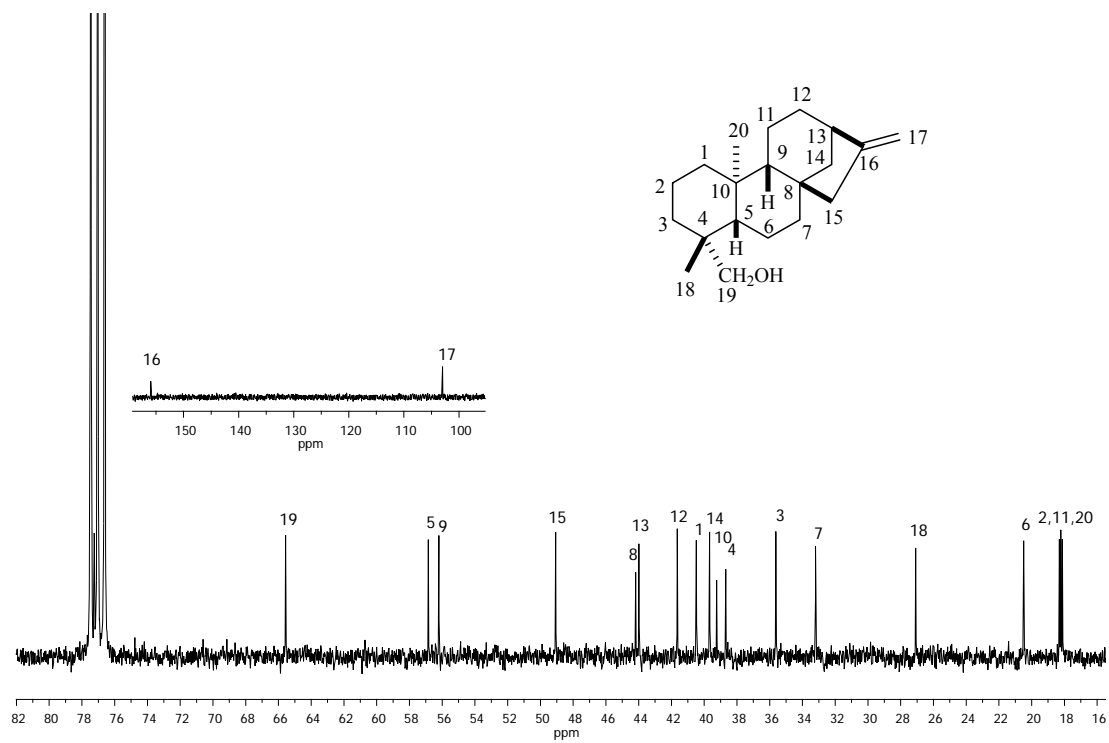


Figura 6.3.6. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 del *ent*-kaur-16-en-19-ol (**69**).

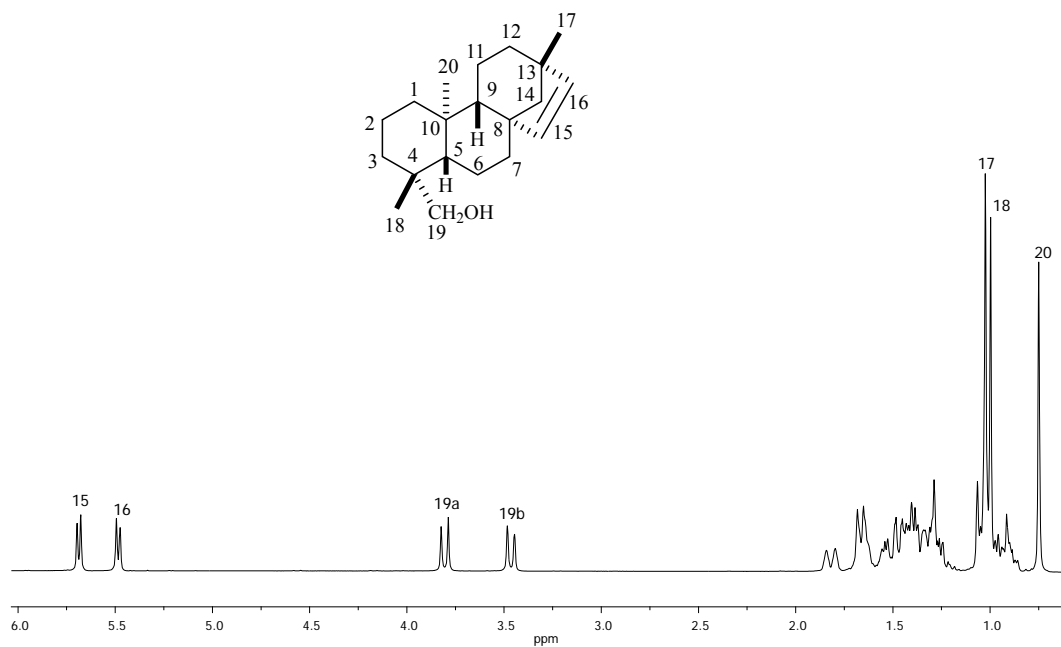


Figura 6.3.7. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz en CDCl₃ del *ent*-beyer-15-en-19-ol (70).

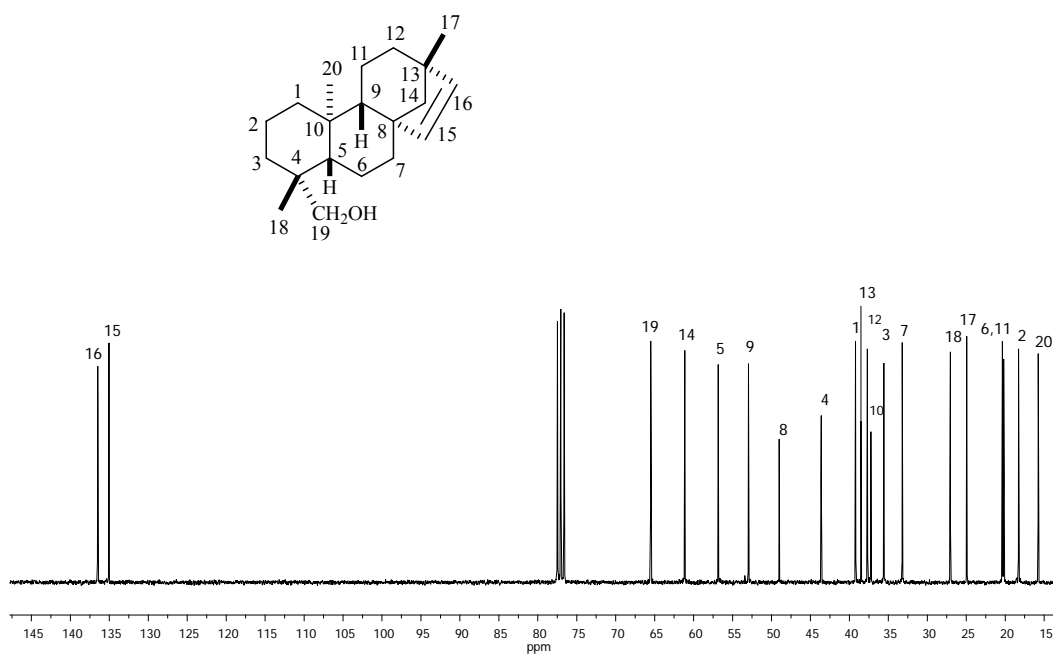
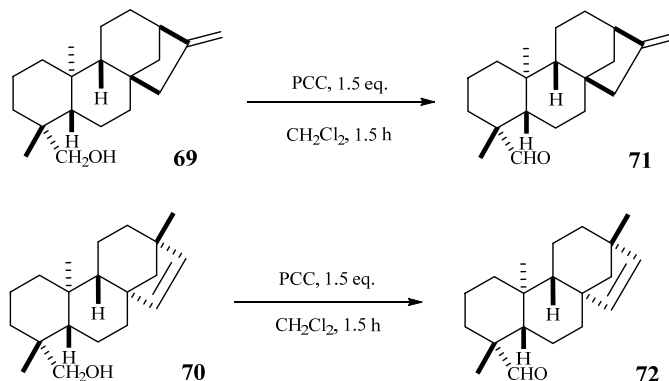


Figura 6.3.8. Espectro de RMN de ¹³C a 75.4 MHz en CDCl₃ del *ent*-beyer-15-en-19-ol (70).

Caracterizados los alcoholes diterpénicos **69** y **70**, se procedió al proceso de oxidación empleando clorocromato de piridinio (PCC), originando los respectivos aldehídos **71** y **72** intermediarios necesarios clave en la reacción de ciclización Prins (Esquema 6.3.3).



Esquema 6.2.3. Oxidación de los alcoholes **69** y **70** con PCC.

El resultado del proceso oxidativo fue la conversión cuantitativa hacia los derivados carbonílicos **71** y **72**. Sus espectros de RMN de ¹H (Figura 6.3.9 y Figura 6.3.11) mostraron las señales características de la presencia de hidrógenos de aldehído en δ_H 9.78 (H-19) y δ_H 9.79 (H-19) respectivamente. En sus espectros de RMN de ¹³C (Figura 6.3.10 y Figura 6.3.12) los cambios fueron evidentes al exhibir el desplazamiento de la señal de carbono base de hidroxilo ubicada en δ_C 65.6 a δ_C 206.0 (C-19) y δ_C 65.5 a δ_C 206.1 C-19 ahora carbono carbonílico, respectivamente.

Los datos obtenidos para el derivado **71** fueron comparados con los reportados por Hayman & Weavers en 1980 encontrando coincidencia.¹¹⁶

Por otro lado, el *ent*-beyerenal (**72**) fue obtenido a través de procesos oxidativos del *ent*-beyer-15-en-19-ol (**70**)¹¹⁵ así como aislado de especies vegetales como *Erythroxylum zambesiacum*. Estos metabolitos presentaron inestabilidad bajo condiciones ambientales, lo cual ya había sido previamente descrito atribuyéndolo a la posición axial del grupo aldehído, lo cual favorece la autooxidación.¹¹⁷

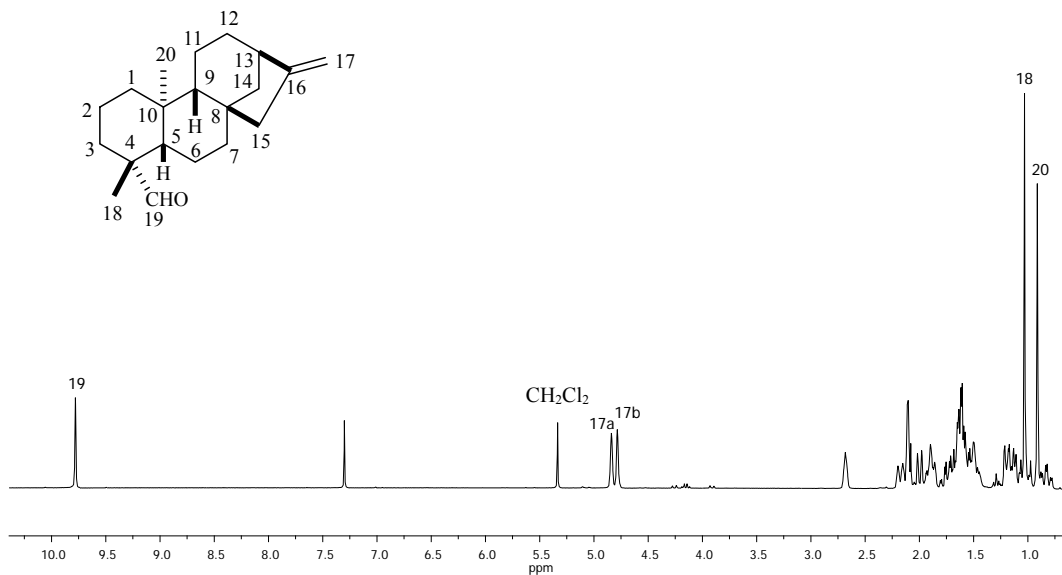


Figura 6.3.9. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 del *ent*-kaur-16-en-19-al (**71**).

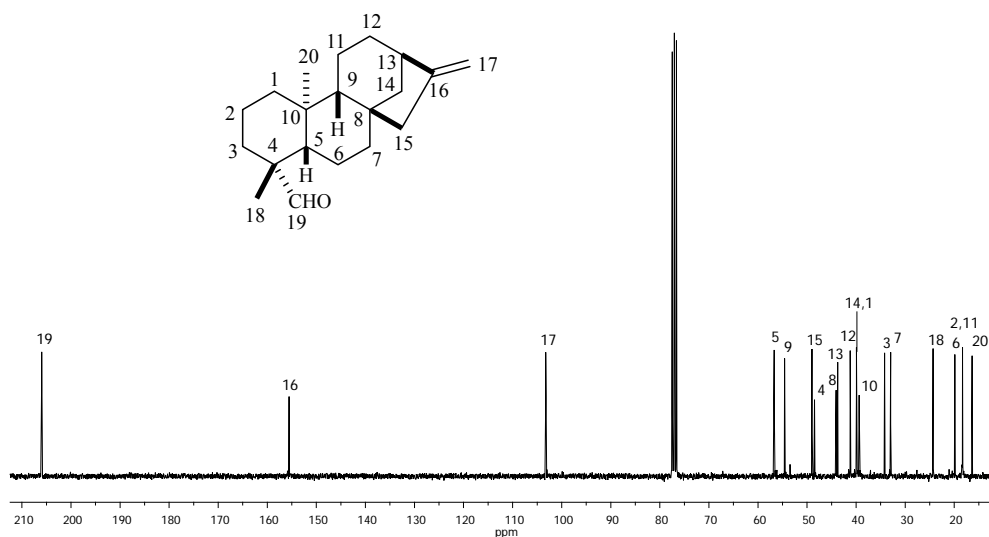


Figura 6.3.10. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 del *ent*-kaur-16-en-19-al (**71**).

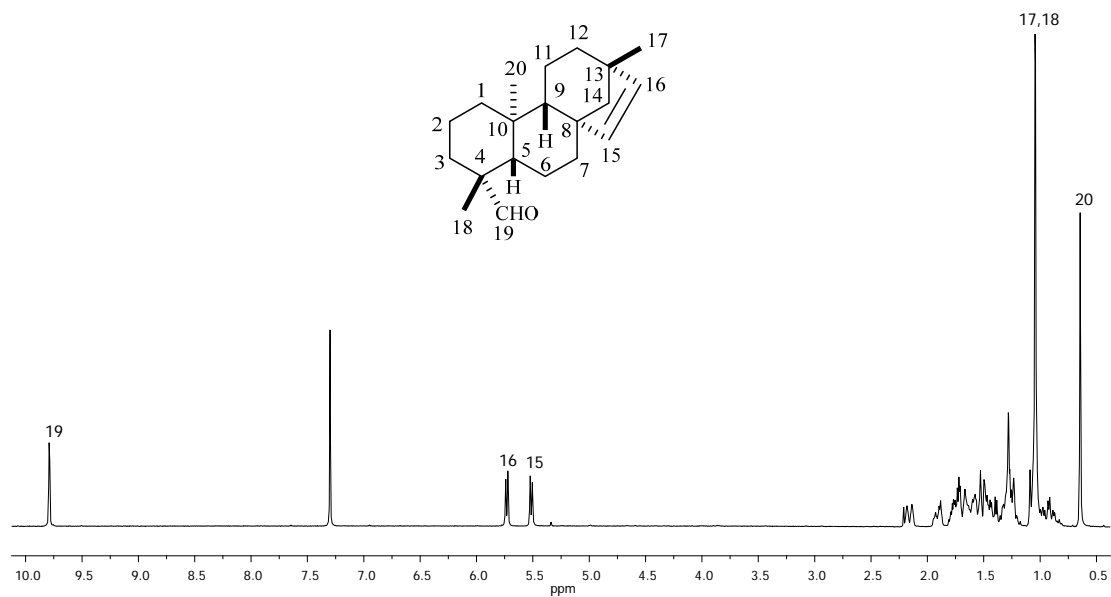


Figura 6.3.11. Espectro de RMN de ¹H a 300 MHz en CDCl₃ del *ent*-beyer-15-en-19-al (72).

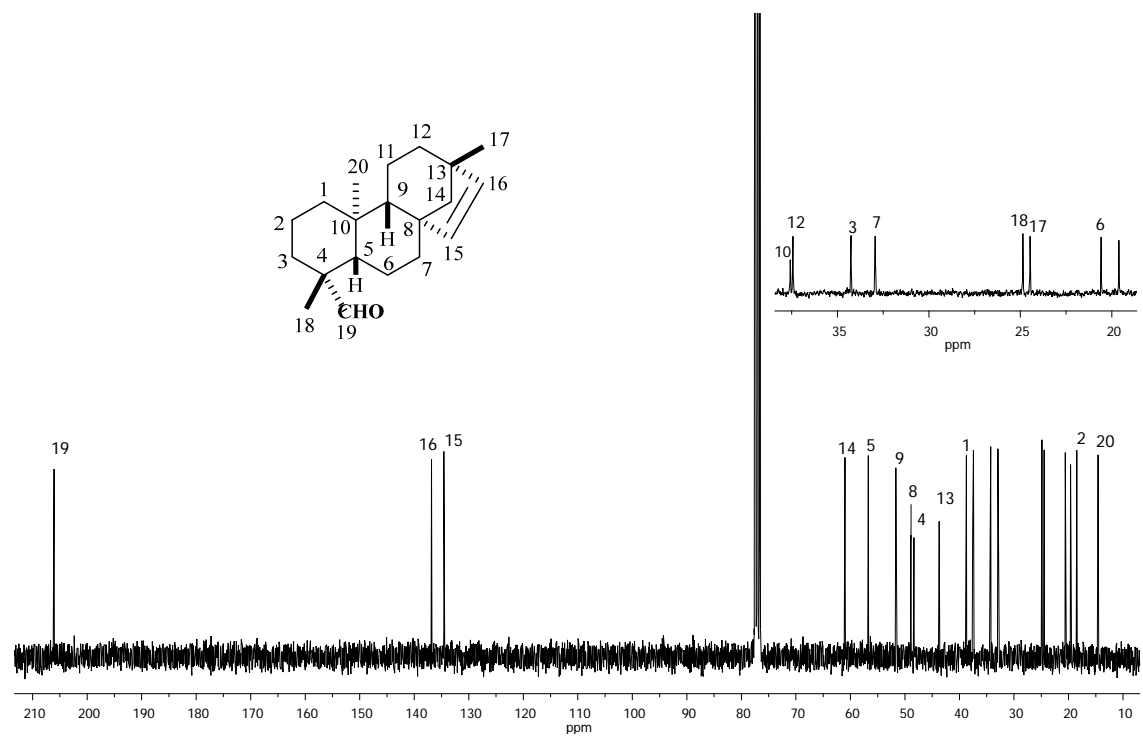
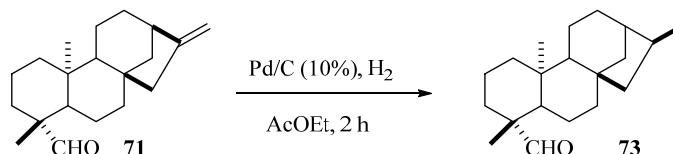


Figura 6.3.12. Espectro de RMN de ¹³C a 75.4 MHz en CDCl₃ del *ent*-beyer-15-en-19-al (72).

Una vez obtenido el *ent*-kaurenal (**71**) fue colocado en condiciones de ciclización Prins con InCl_3 y 3-buten-1-ol. Tras el análisis de RMN de ^1H del crudo de reacción se observó que el ácido de Lewis había tenido alta afinidad por el doble enlace generando principalmente el producto de isomerización, por ello se procedió a realizar la hidrogenación catalítica del *ent*-kaurenal (**71**) previo a la reacción Prins bajo las condiciones mostradas en el esquema 6.3.4.



Esquema 6.4.4. Hidrogenación catalítica del *ent*-kaurenal (**71**).

El derivado hidrogenado **73** mostró en su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.13) una señal doble asociada al protón de aldehído en δ_{H} 9.77 (1H, d, $J= 1.2$ Hz, H-19) y en δ_{H} 1.04 apareció la señal doble generada por el acoplamiento de los hidrógenos del H-16 con CH_3 -17 (d, $J= 9.0$ Hz). Su espectro de RMN ^{13}C (Figura 6.3.14) mostró en δ_{C} 206.1 el carbono perteneciente al grupo aldehído (C-19) el resto de las señales se ubicaron en la región alifática de δ_{C} 56.8 a δ_{C} 15.8, sin embargo, en este experimento se apreciaron señales que denotaron degradación del compuesto, como se sugiere en la literatura para diterpenos aldehídicos.¹¹⁷

De acuerdo a los datos publicados por Yaouba *et al.*, 2018 para el ácido *ent*-16 β -kauranoico el desplazamiento químico de la señal doble en δ_{H} 1.04 corresponde a la posición β del grupo CH_3 -17¹¹⁸ lo cual, coincide con los datos experimentales de **73** permitiendo identificar al compuesto carbonílico como el del *ent*-16 β -kauran-19-al.

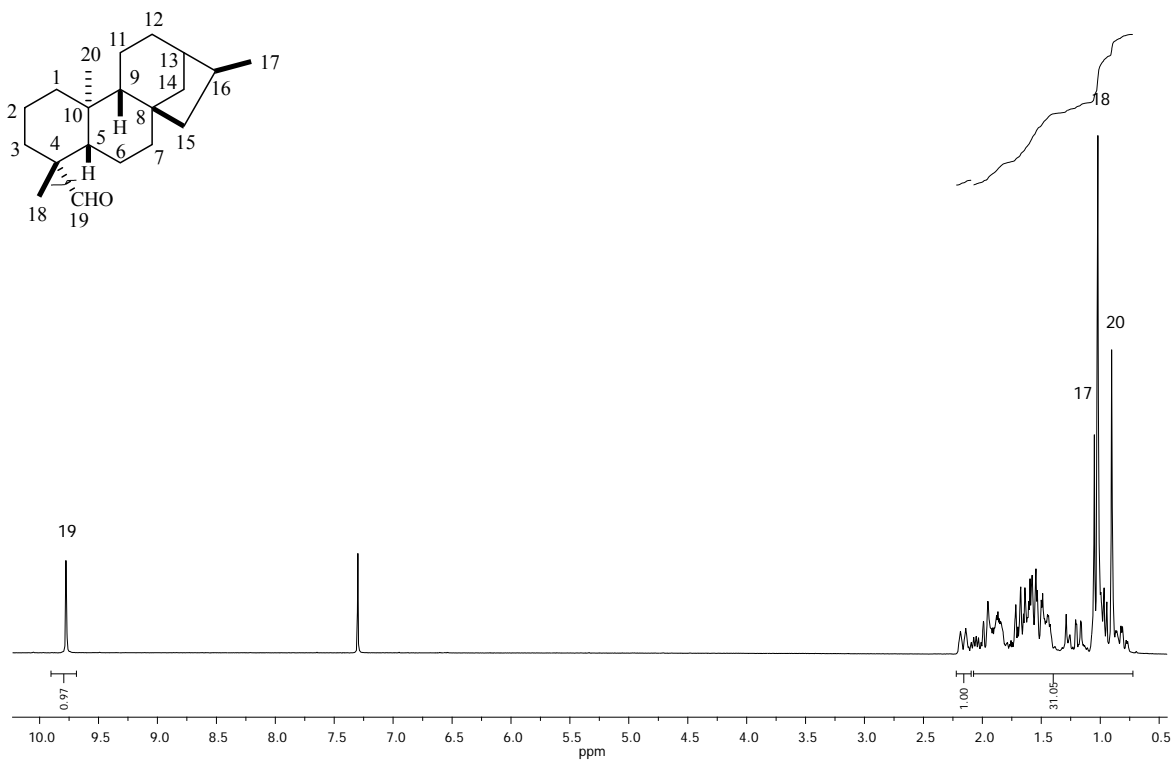


Figura 6.3.13. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 del *ent*-16 β -kauran-19-al (73).

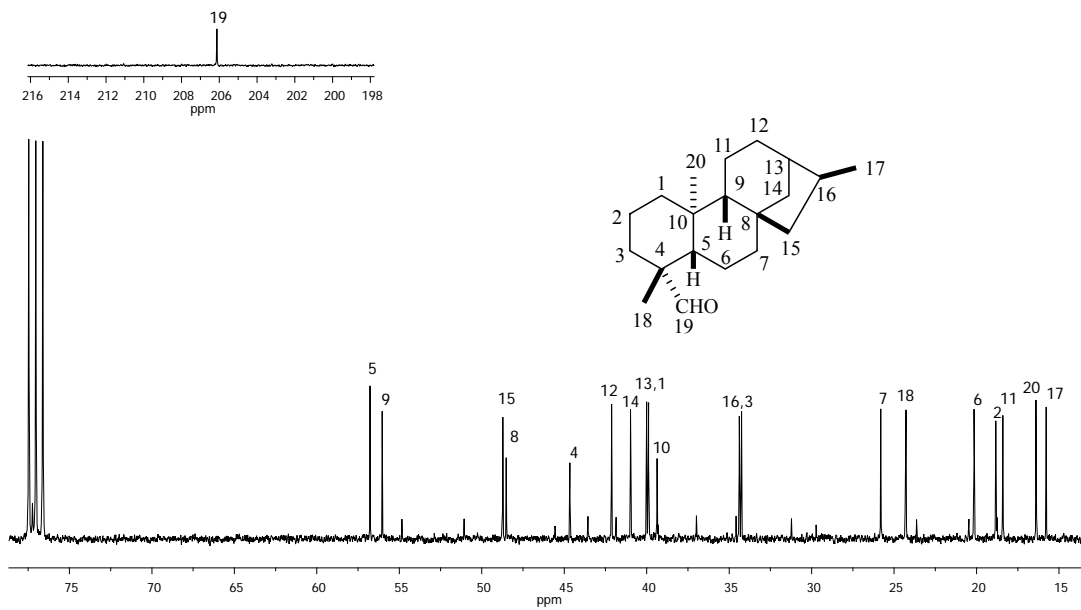
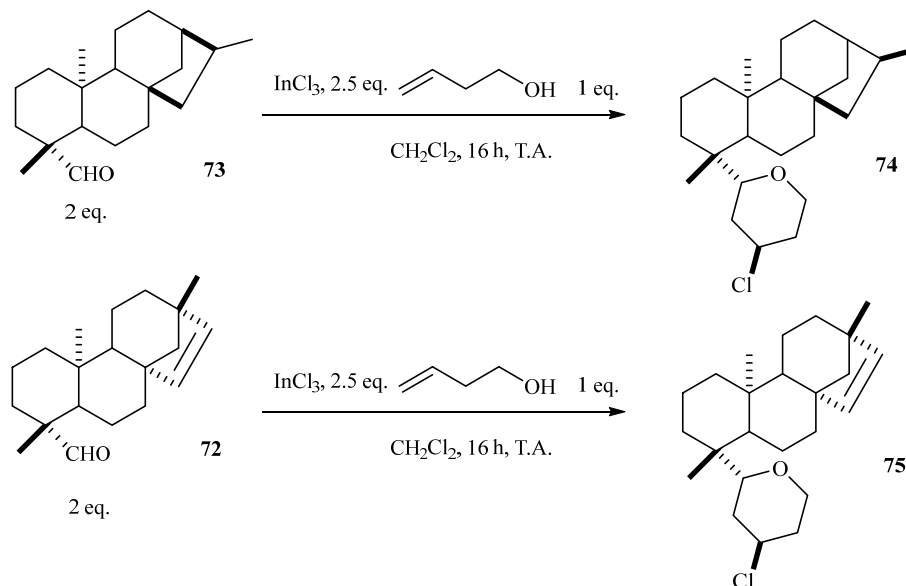


Figura 6.3.14. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 del *ent*-16 β -kauran-19-al (73).

Generados el *ent*-kauranal (**73**) y el *ent*-beyerenal (**72**) fueron colocados en presencia del 3-buten-1-ol y InCl_3 obteniendo los respectivos productos de ciclización Prins **74** y **75**, (Esquema 6.3.5).



Esquema 6.2.5. Reacciones de ciclización Prins.

El espectro de RMN de ^1H del derivado **74** (Figura 6.3.15) mostró nuevas señales en la región base de heteroátomo asociadas al anillo de THP; en δ_{H} 4.03 se observó la señal múltiple que integro para dos protones correspondiente al H-2a' y H-4' base de halógeno; en δ_{H} 3.69 apareció una señal doble (1H, d, $J= 10.8$ Hz) perteneciente al H-19; mientras que el protón vecinal al oxígeno H-2b' se observó en δ_{H} 3.32 como una señal td y una constante de acoplamiento de 12.0 y 1.5. Hz; la señal múltiple en δ_{H} 2.10 fue asignada al H-5a' y en δ_{H} 2.06 se encontró la señal múltiple correspondiente a los hidrógenos H-3a' y H-16, además, se observó en δ_{H} 1.83 una señal múltiple perteneciente al H-3b', finalmente la señal múltiple ubicada δ_{H} 1.59 correspondió al H-5b' y el resto de las señales del esqueleto tetracíclico no presentó diferencias significativas en sus desplazamientos (Tabla 6.3.1).

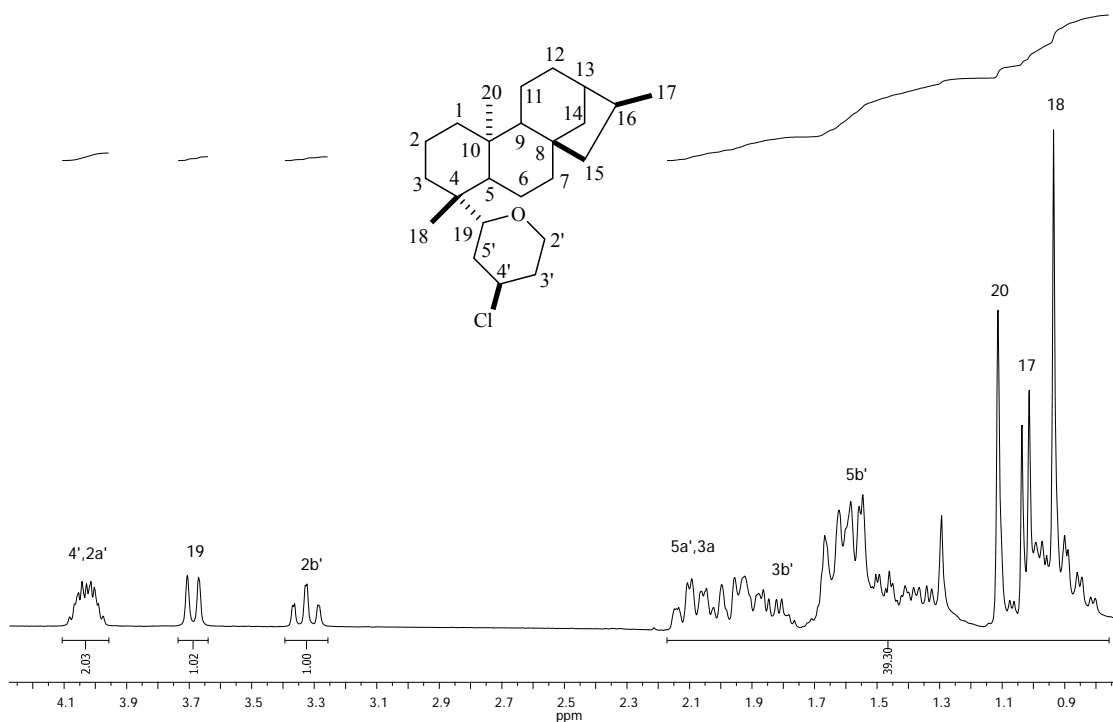


Figura 6.3.15. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-16 β -kaurano (**74**).

El experimento COSY (Figura 6.3.16) permitió corroborar la asignación correcta del anillo de THP a través de la correlación de la señal en δ_{H} 4.03 asignada a los protones H-2a' y H-4' con las señales localizadas en δ_{H} 3.32 (H-2b'), 2.10 (H-5a'), 2.06 (H-3a'), 1.83 (H-3b') y 1.59 (H-5b'), además, la señal doble ubicada en δ_{H} 3.69 perteneciente al H-19 presentó correlación con los protones geminales H-5a (δ_{H} 2.10) y H-5b' (δ_{H} 1.59), mientras la señal td ubicada en δ_{H} 2.15 exhibió tres correlaciones en δ_{H} 4.03 (H-2a), en δ_{H} 2.06 (H-3a') y en δ_{H} 1.83 (H-3b'); el H-5a' presentó correlación con su protón geminal H-5b' observado en δ_{H} 1.59 y con la señal múltiple situada en δ_{H} 4.03 (H-4') base de halógeno; por tanto, la señal ubicada en δ_{H} 2.06 (H-3a') presento correlación con la señal en δ_{H} 1.83 (H-3b') y con las señales H-2b', H-2a' y H-4' ubicadas en δ_{H} 3.31 y δ_{H} 4.03 respectivamente; el H-3b' presentó correlación con la señal ubicada en δ_{H} 2.06 (H-3a') y al igual que su hidrógeno geminal 3b'presento correlación con las señales H-2b', H-2a' y 4', finalmente el H-5b' presentó correlación con los H-5a', H-19 y H-4'.

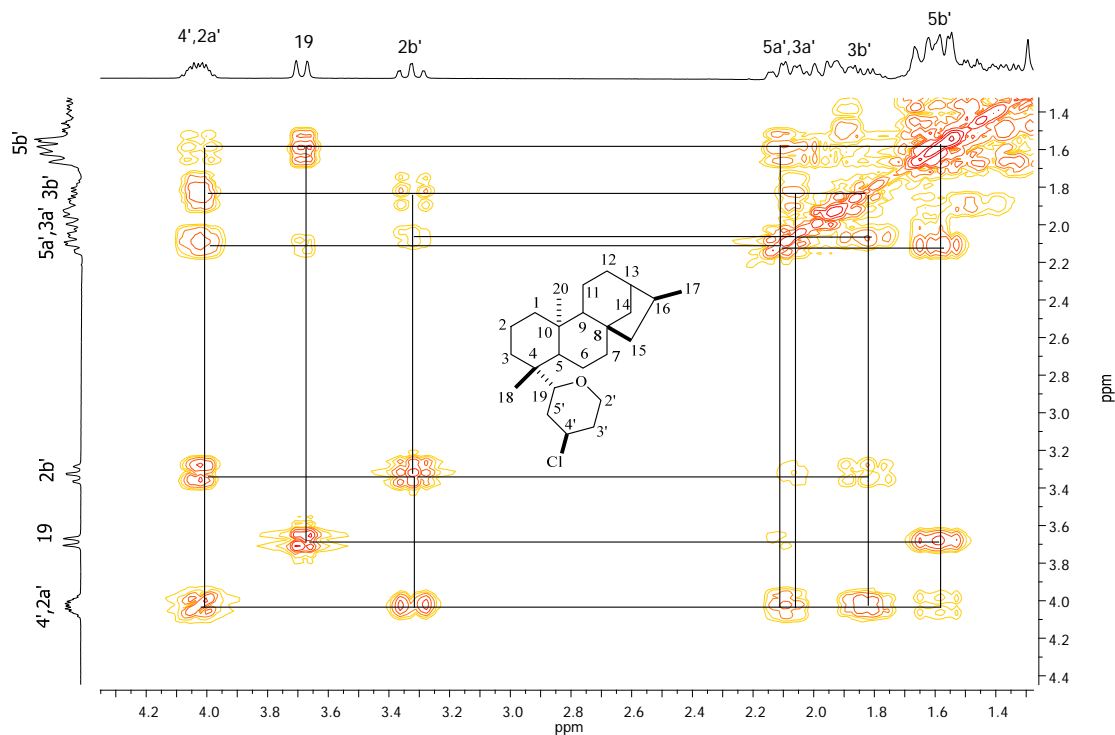


Figura 6.2.16. Experimento COSY del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-16 β -kaurano (**74**).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.17, Tabla 6.3.1) se observaron 24 señales, de las cuales se identificó en δ_{C} 80.2 el C-19; en δ_{C} 66.6 se observó la señal correspondiente al C-2'; por otro lado, la señal del C-4' base de halógeno se observó en δ_{H} 57.7 y los carbonos C-5' y C-3' se ubicaron en δ_{C} 38.2 y δ_{C} 37.3 respectivamente. Estas señales corresponden a los carbonos de anillo de tetrahidropirano, los datos del esqueleto de *ent*-kaurano permanecen con desplazamientos similares al aldehído **70** la asignación se realizó con ayuda del experimento APT y experimentos en 2D.

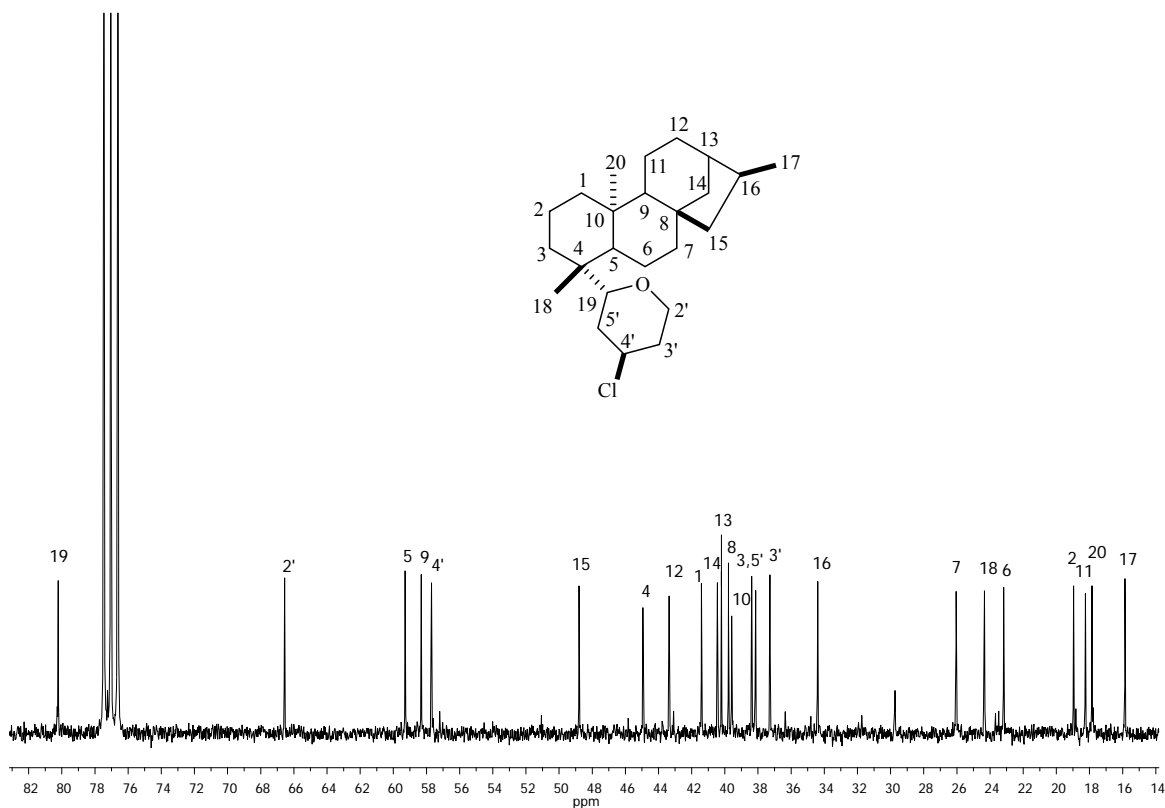


Figura 6.3.17. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-16 β -kaurano (**74**).

El experimento HSQC (Figura 6.3.18) permitió asignar de manera inequívoca el ciclo de tetrahidropirano mediante la correlación del C-19 con la señal doble asignada al H-19; además C-2' presentó correlación con la señales asignadas a los H-2a y H-2b'; asimismo, la señal del C-4' base de halógeno presentó correlación con la señal múltiple correspondiente al H-4', mientras que el C-5' presentó correlación con las señales para H-5a'y H-5b' y finalmente se encontró la correlación del C-3' con los protones H-3a' H-3b.

Tabla 6.3.1. Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-16 β -kaurano (**74**).

<i>Ent</i> -19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-16 β -kaurano (74)		
Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a	41.4	1.89, m
1b		0.85, td (12.9, 4.5)
2a	19.0	1.57, m
2b		1.51, m
3a	38.4	1.62, m
3b		1.05, m
4	45.0	-
5	59.3	0.93, m
6	23.2	1.67, m
7a	26.1	1.63, m
7b		1.57, m
8	39.8	-
9	58.3	0.99, m
10	39.6	-
11	18.3	1.34, m
12	43.4	1.51, m
13	40.2	1.93, m
14a	40.5	2.00, m
14b		1.01, m
15a	48.8	1.65, m
15b		0.95, m
16	34.4	2.06, m
17	15.9	1.02, d (7.2)
18	24.3	0.94, s
19	80.2	3.69, d (10.8)
20	17.9	1.11, s
2^a	66.6	4.03, m
2b'		3.32, td (12.0, 1.5)
3a'	37.3	2.06, m
3b'		1.83, m
4'	57.7	4.03, m
5a'	38.2	2.10, m
5b'		1.59, m

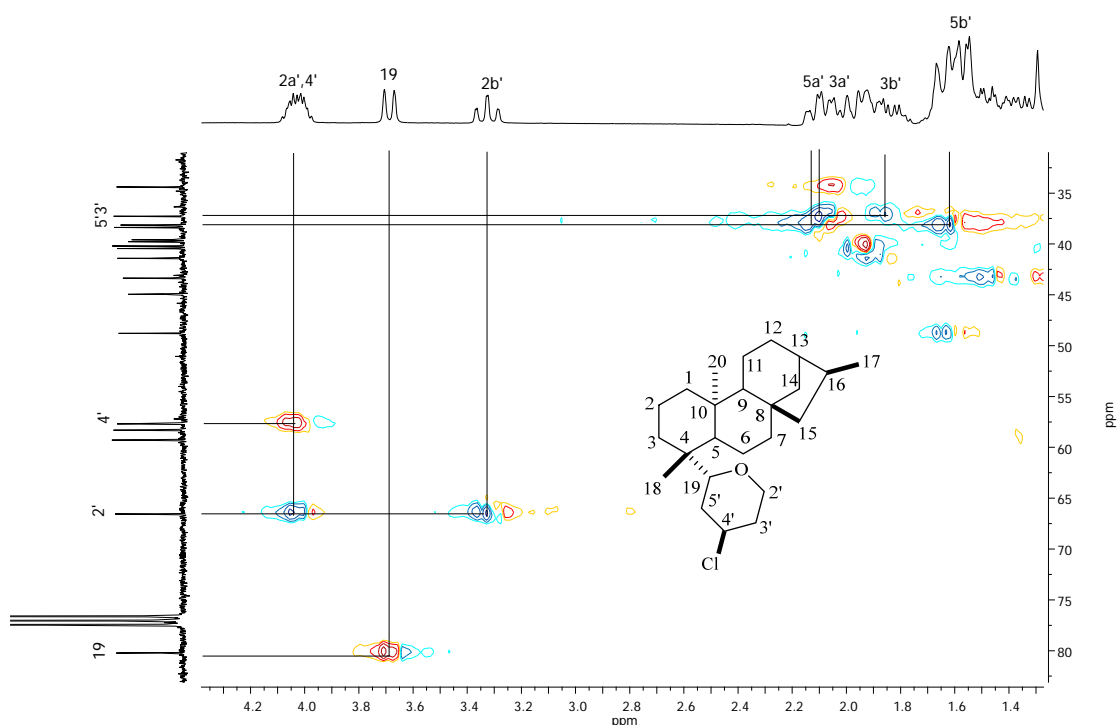
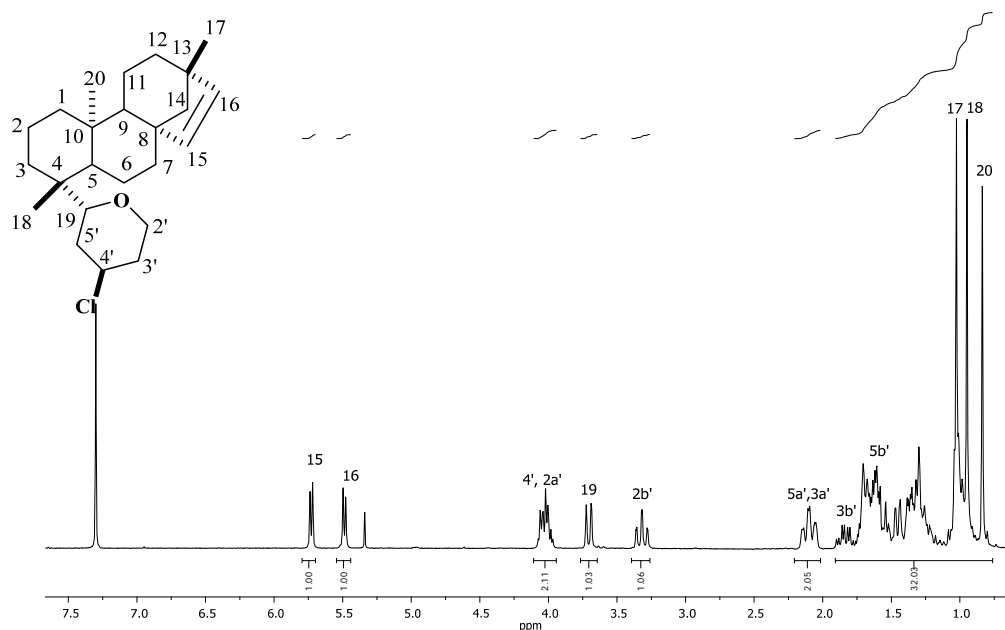


Figura 6.3.18. Experimento HSQC del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahipiran)-16 β -kaurano (**74**).

La elucidación estructural de **74** se llevó a cabo mediante análisis de RMN de 1D y 2D, IR y por comparación de sus datos con compuestos de estructura similar. Este derivado corresponde a una estructura novedosa.

Con respecto al derivado tetrahídropirano **75**, se obtuvo como un aceite incoloro, el cual tras refrigeración dio lugar a la formación de un sólido blanco p.f. 99-100 °C. Su espectro de RMN de ^1H (Figura 6.3.19) mostró las señales del característico doble enlace *cis*-disustituido para *ent*-beyeranos en δ_{H} 5.73 (d, $J= 5.7$ Hz, 1H, H-15) y δ_{H} 5.49 (d, $J= 5.7$ Hz, 1H, H-16); además, se observó el sistema de señales característico del anillo THP en δ_{H} 4.02 (m, 2H, H-4', 2a'); δ_{H} 3.70 (d, $J= 10.8$ Hz, 1H, H-19); δ_{H} 3.32 (td, $J= 12.0, 1.8$ Hz, 1H, H-2b'); δ_{H} 2.10 (m, 2H, H-5a', H-3a'); δ_{H} 1.83 (qd, $J= 12.3, 5.0$ Hz, 1H, H-3b') y en δ_{H} 1.63 (m, 1H, H-5b'), mientras que los desplazamientos de los protones del esqueleto tetracíclico se ubicaron de δ_{H} 1.75 a δ_{H} 0.80 (Tabla 6.2.3).



Figura

6.3.19. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz en CDCl_3 del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-beyereno (**75**).

En el experimento COSY se observaron las correlaciones para asignar inequívocamente el anillo de TPH y con ello se corroboró la gran similitud del sistema con respecto al derivado **74** como se aprecia en la Figura 6.2.20. Las correlaciones encontradas se presentan en la tabla 6.2.2.

Tabla 6.2.2. Correlaciones observadas en el experimento COSY.

Posición	Correlaciones
H-4'	H-5a', H-3a', H-3b' y H-5b'
H-2a	H-2b', H-3a', H-3b'
H-19	H-5a', H-5b'
H-5a	4', H-5b'
H-3a	H-2a', H-2b', H-3b'
H-3b'	H-2a', H-2b', H-3a'
H-5b'	4', H-5a'

En el experimento de RMN de ^{13}C (Figura 6.3.21, Tabla 6.3.3) se observaron las señales para los carbonos vinílicos en δ_{C} 136.4 (C-16) y δ_{C} 135.1 (C-15); adicionalmente, se apreciaron las señales asociadas al anillo de THP en δ_{C} 80.3 (C-19), 66.6 (C-2'), 57.7 (C-4'), 38.4 (C-5') y en δ_{C} 37.2 (C-3').

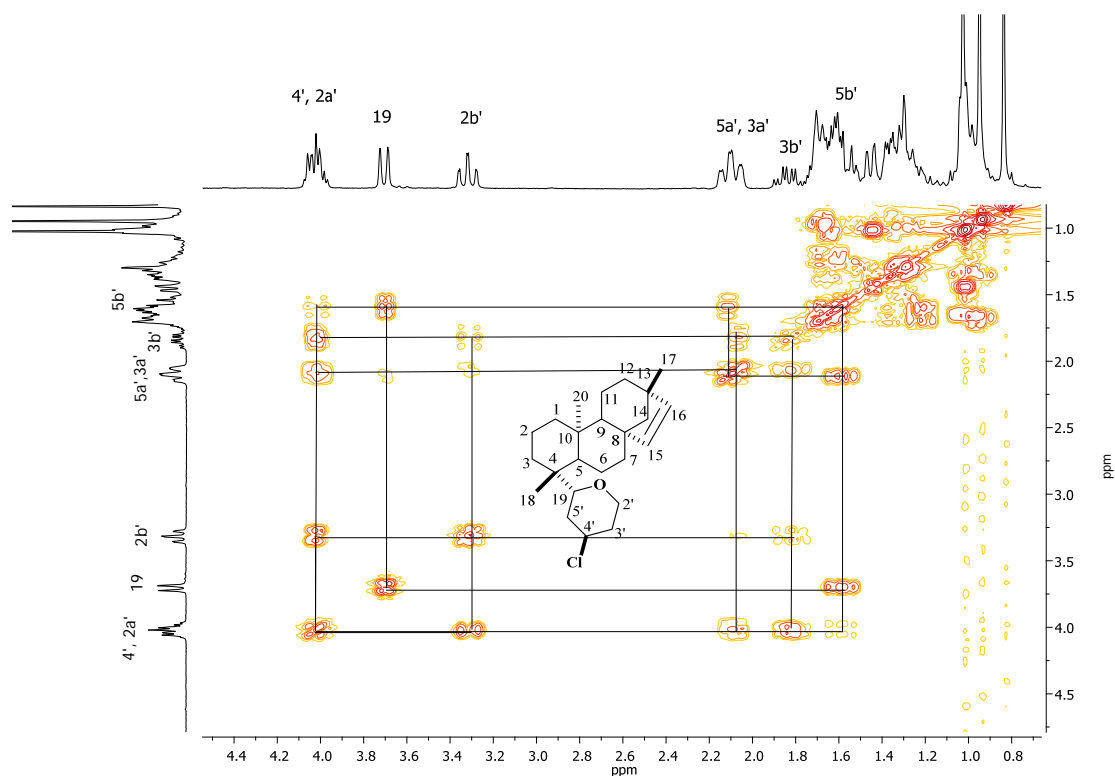


Figura 6.3.20. Experimento COSY del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-beyereno (75).

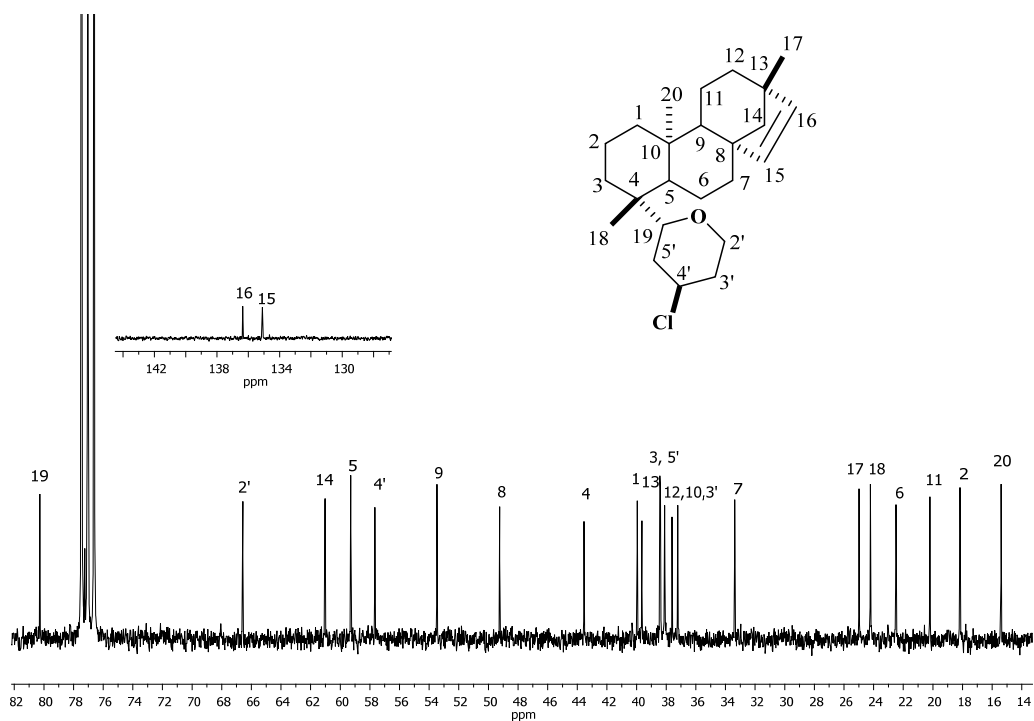


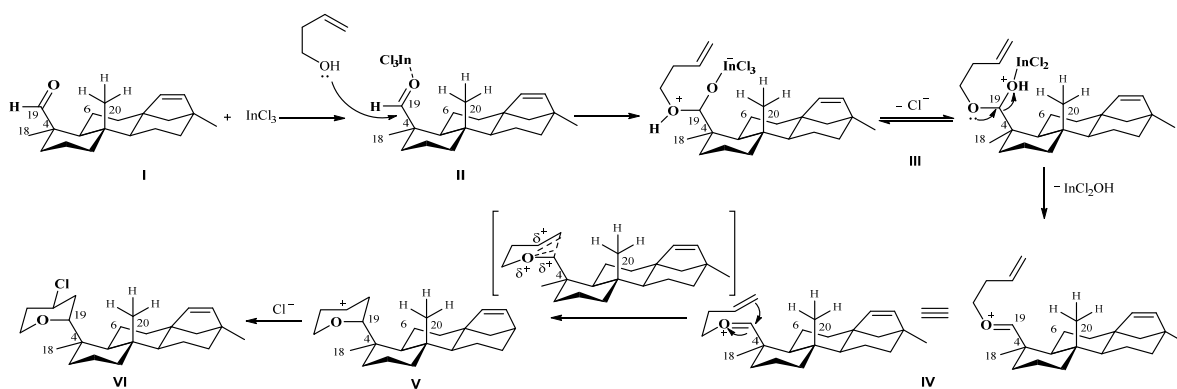
Figura 6.3.21. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz en CDCl_3 del *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-beyereno (75).

Tabla 6.3.3. Desplazamientos de RMN de ^1H y ^{13}C del *ent*-19-(4-cloro-tetrahidropiran)-beyereno (**75**).

<i>Ent</i> -19-(4-cloro-tetrahidropiran)-beyereno (75)		
Posición	δ_{C}	δ_{H} , mult (<i>J</i> en Hz)
1a		1.70, m
1b	40.0	0.98, m
2a		1.39, m
2b	18.2	1.32, m
3a		1.63, m
3b	38.4	1.00, m
4	43.6	-
5	59.3	0.99, m
6a		1.71, m
6b	22.5	1.64, m
7a		1.33, m
7b	33.4	1.26, m
8	49.2	-
9	53.5	1.03, m
10	37.6	-
11a		1.55, m
11b	20.2	1.27, m
12	38.1	1.55, m
13	39.7	-
14a		1.45, dd (9.8, 1.7)
14b	61.0	1.00, m
15	135.1	5.73, d (5.7)
16	136.4	5.49, d (5.7)
17	25.0	1.02, s
18	24.2	0.95, m
19	80.3	3.70, d (10.8)
20	15.4	0.84, s
2a'		4.02, m
2b'	66.6	3.32, td (12.0, 1.8)
3a'		2.10, m
3b'	37.2	1.83, qd (12.3, 5.0)
4'	57.7	4.02, m
5a'		2.10, m
5b'	38.4	1.63, m

El derivado *ent*-19-(4 β -cloro-tetrahidropiran)-beyereno (**75**) se trata de una estructura novedosa, su caracterización completa se llevó a cabo con ayuda de experimentos de RMN de 1D y 2D.

El mecanismo propuesto para la reacción de ciclización Prins (Esquema 6.3.6) inicia activando el carbonilo en el *ent*-beyerenal (**72**) a través de la reacción con InCl_3 (**I**) dando lugar a la formación del complejo diterpeno- InCl_3 (**II**), una vez activado el grupo carbonilo se lleva a cabo el ataque del 3-buten-1-ol. En esta etapa, tanto la cara *Si* o *Re* del carbonilo pueden estar involucrados cuando este se polariza con ayuda del InCl_3 . El hemiacetal resultante (**III**) tras la salida del ácido de Lewis da lugar a la formación del ion oxocarbenio (**IV**), el cual es susceptible a una ciclización 6-endo. La ciclización ocurre en el mismo plano del CH_3 -18, ya que el aducto carbenio está confinado al ángulo diedro de C-18-C-4-C-19-O-19 de 109° para disminuir tensión estérica que hay entre la cadena adicionada, CH_3 -20, CH_3 -18 y el CH_2 -6 del anillo B. Con la conformación anterior la ciclización intramolecular es estereoespecífica, favoreciendo la configuración $19R$ y consecuentemente favorecer la formación del carbocatión tetrahidropiraniolo secundario (**V**). La incorporación del cloro favorece la neutralidad del heterociclo formado, la cual debe ser estereoespecífica por la cara *Re*, dado el impedimento estérico ocasionado por CH_3 -20. Con base en lo anterior, el producto generado posee la configuración $19R, 4'R$.



Esquema 6.3.6. Mecanismo propuesto para la reacción de ciclización Prins.

La propuesta mecanística fue corroborada a través del estudio conformacional sobre del aducto carbenio (**IV**) intermediario clave para la estereo especificidad en la reacción Prins, arrojando un resultado concluyente y comparable con la propuesta anterior. Inicialmente, se modeló al intermediario deseado en el programa Spartan '04, la búsqueda conformacional se llevó a cabo empleando el protocolo MonteCarlo (MMFF) la cual generó 56 conformeros en un rango de 0-10 kcal/mol. Posteriormente se llevó a cabo la optimización de la energía de todos los conformeros encontrados mediante DFT B3LYP 631G**,

proporcionando 2 conformeros en un rango de 0-3 kcal/mol con un valor de ángulo diedro de 109° para ambos conformeros. El conformero de mínima energía representó el 95% de la población (Figura 6.3.22), estos valores se encuentran relacionados con la alta restricción estérica y la consecuente estereo especificidad.



Figura 6.3.22. Conformero de mínima energía, el cual representa al 95% de la población.

6.4. Evaluación Biológica de los metabolitos mayoritarios

La evaluación de la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de los metabolitos mayoritarios los ácidos beyerenico (**2**), kaurenico (**1**) su derivado 15 α -angeloiloxi (**4**) y el palmitato de ácido oleanólico (**11**) se realizó siguiendo la metodología propuesta dentro de nuestro grupo de trabajo.¹²² La evaluación de la actividad citotóxica fue llevada a cabo a través de la viabilidad de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y melanoma de piel humana UACC62 determinado por el método MTT. Los resultados indicaron que los compuestos **1**, **2** y **11** no mostraron actividad citotóxica significativa a una concentración de hasta 100 μ M, en ambas líneas celulares analizadas. Mientras que, la evaluación del compuesto **4** mostró un ligero porcentaje de disminución de la viabilidad celular mostrando una mejor actividad citotóxica en la línea celular HT-29 que UACC62 (Figura 6.4.1). Este comportamiento interesante entre el ácido kaurenico (**1**) y su derivado 15 α -angeloiloxi (**4**) indicó que la presencia del grupo angeloiloxi en C-15 del anillo D en **4** juega un papel importante en la actividad biológica y podría considerarse para diseñar las nuevas estructuras con actividad citotóxica.

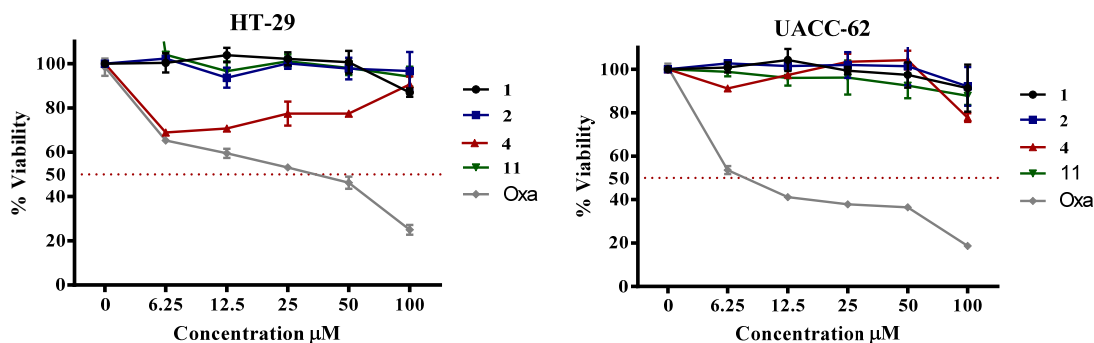


Figura 6.4.1. Viabilidad de las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y melanoma de piel humana UACC62 determinado por el método MTT después de 48 h de tratamiento con los compuestos ácido kaurenico (**1**), ácido beyerenico (**2**), ácido 15 α -angeloiloxi-kaurenico (**4**) y palmitato de ácido oleanólico (**11**) y oxaliplatino (Oxa) como control positivo a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μ M. Los datos se muestran en los gráficos como la media \pm desviación estándar.

Establecidas las concentraciones no letales por el método MTT para los compuestos **1**, **2**, **4** y **11** la actividad antiinflamatoria se determinó mediante la cuantificación de la de citocina proinflamatoria TNF- α mediante la técnica ELISA. Estos resultados mostraron que el ácido beyerenico (**1**) y el palmitato de ácido oleanólico (**11**) redujeron los niveles de TNF- α inducida por LPS siendo los metabolitos más activos a una concentración de 10 μ M, los cuales podrían ser considerados para el diseño de nuevos agentes antiinflamatorios (Figura 6.4.2).

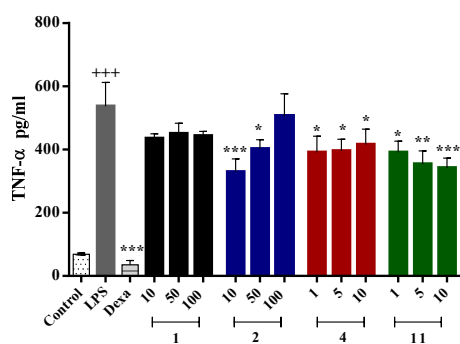


Figura 6.4.2. Efecto del ácido kaurenico (**1**), ácido beyerenico (**2**), ácido 15 α -angeloiloxi-kaurenico (**4**) y palmitato de ácido oleanólico (**11**) en la producción de TNF- α inducida por lipopolisacárido (LPS) en macrófagos THP-1. Las células se incubaron con **1** y

2 a 10, 50 y 100 μM , y **4** y **11** a 1, 5 y 10 μM durante 1 h y luego se estimularon con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. La dexametasona (Dexa) se utilizó como compuesto de referencia positivo a 1 μM . Los datos corresponden a la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes (n=3). El análisis estadístico se realizó evaluó mediante ANOVA-Bonferroni. +++p<0.001 vs. Control; *** p<0.001 vs. LPS; ** p <0.01 vs. LPS; *p <0.05 vs. LPS

Finalmente, la evaluación de la actividad antioxidante con el método ABTS^{•+} también fue determinada empleando como control positivo Trolox[®]. Sin embargo, los metabolitos **1**, **2**, **4** y **11** no mostraron efectos antioxidantes, Tabla 6.4.1.

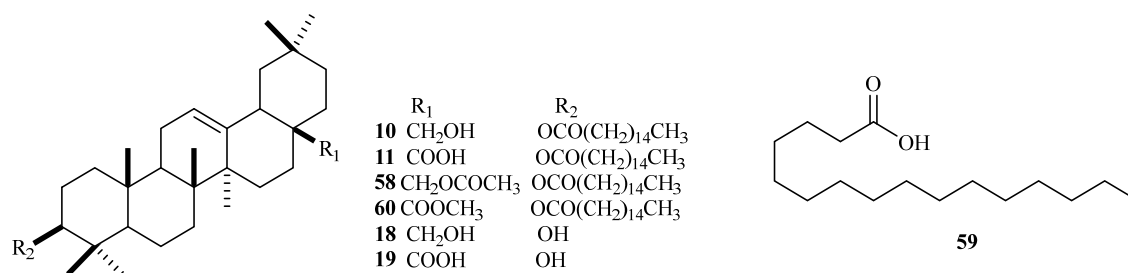
Compuesto	EC ₅₀
Trolox [®]	20.9 \pm 3.1
1	>200
2	>200
4	>200
11	>200

Tabla 6.4.1. Efecto de la capacidad antioxidante de los compuestos ácido kaurenico (**1**), ácido beyerenico (**2**), ácido 15 α -angeloiloxi-kaurenico (**4**) y palmitato de ácido oleanólico (**11**) contra el radical ABTS^{•+} a concentraciones de 3.12, 6.25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 μM , expresados en la concentración efectiva 50 (CE₅₀), como control positivo se utilizó Trolox[®].

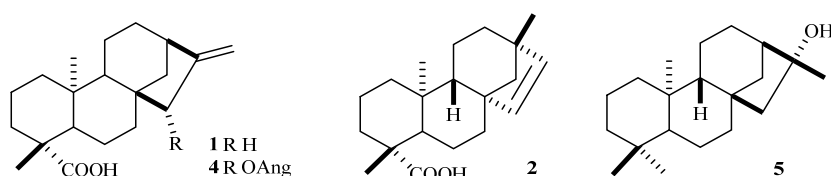
7. CONCLUSIONES

El presente trabajo constituye un aporte importante en la investigación del género *Perymenium*, por un lado, se exploró ampliamente la composición química de *Perymenium bupthalmoides* contribuyendo a la quimiotaxonomía del género. Por otro lado, el explorar nuevas sedes de colecta fomenta la conservación de la especie, así como, contar con material suficiente para la continuación de su investigación.

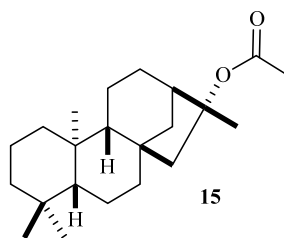
Los triterpenos esterificados **10** y **11** descritos anteriormente como los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flores, se validaron como los metabolitos más abundantes dentro del extracto de AcOEt de flores y mediante la preparación de los derivados **58**, **60** y **18-19** fue posible caracterizar la cadena de ácido graso y asignar inequívocamente la estructura de **10** como el 3β -palmitoxy-olean-12-en-28-ol y de **11** como el ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico.



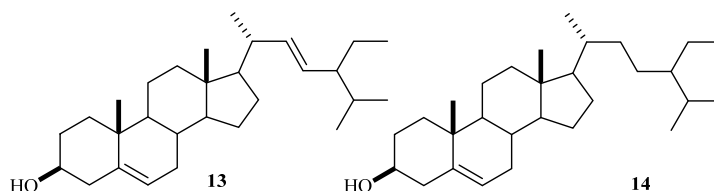
La optimización de la metodología para separar del extracto hexánico de raíz, permitió obtener los metabolitos mayoritarios los ácidos *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1**), *ent*-beyer-15-en-19-oico (**2**), y *ent*-kaur-15 α -angeloiloxi-16-en-19-oico (**4**) y el *ent*-kauran-16-ol (**5**), en un solo proceso cromatográfico en buenos rendimientos, lo que permitió ser fuente de material de partida para la preparación de metabolitos con posibles propiedades farmacológicas.



Fue posible definir la configuración absoluta del *ent*-kauran-16 α -ol (**5**). Asimismo, permitió identificar a su derivado acetilado **15** como acetato de *ent*-16 α -kauranilo.

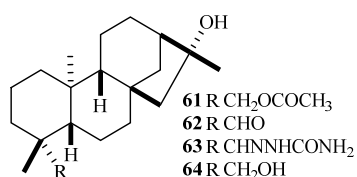


La continuación del análisis fitoquímico del extracto hexánico de raíz proporcionó la mezcla de fitoesteroides, estigmasterol (**13**) y sitosterol (**14**) los cuales ya habían sido reportados durante el análisis del extracto hexánico de hojas.



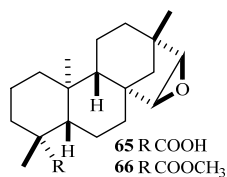
Asimismo, se obtuvo la serie de *ent*-kauran-16 α -ol: 19-acetoxi-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**), *ent*-kauran-16 α ,19-diol (**64**) y el 16 α -hidroxi-*ent*-kauran-19-al (**62**) del cual fue preparado su derivado semicarbazona **63** considerado un nuevo derivado nitrogenado con esqueleto de *ent*-kaurano, lo que permitió corroborar la identidad del producto natural **62**.

La CA y relación biogénica de la serie de *ent*-kauran-16 α -ol (**5**, **61**, **62** y **64**) presente en *P. bupthalmoides* fue establecida mediante RMN y correlación química. Dichos compuestos están relacionados con procesos oxidativos partiendo de *ent*-kaur-16 α -ol (**5**).

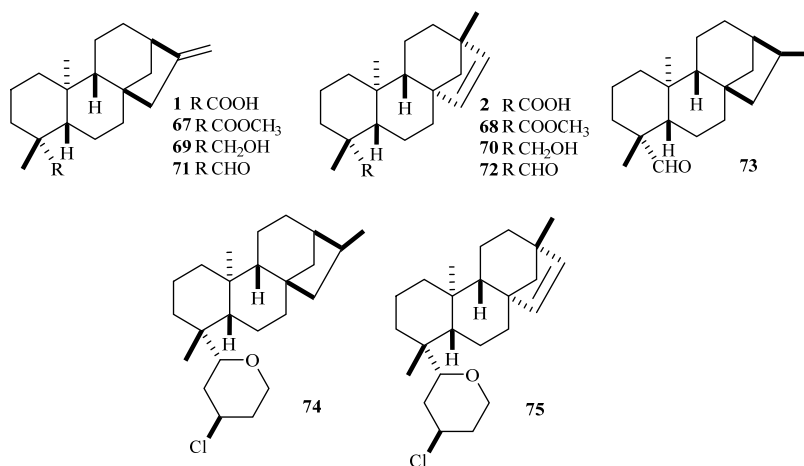


El extracto de hexanos de la raíz, adicionalmente, proporcionó el ácido *ent*-15 β ,16 β -epoxi-beyerano (**65**), su configuración absoluta fue asignada a través de correlación química.

La metilación de **65** generó su respectivo éster metílico **66** el cual fue empleado para corroborar la configuración absoluta a través de la técnica de DCV, sin embargo, el parámetro de confianza para ambos epímeros fue del 100%, lo que sugiere que esta técnica no logró distinguir la quiralidad de los epímeros **66a** y **66b**, lo que representa el primer reporte sobre las limitaciones de la técnica de DCV para la determinación de la CA de *ent*-beyeranos.



A partir de los diterpenos **1** y **2** fue posible obtener la serie de derivados **67-75**, destacando la obtención de los primeros productos de ciclización Prins con esqueleto *ent*-kaurano y *ent*-beyereno **74** y **75** respectivamente. La configuración absoluta del nuevo anillo de tetrahíropirano fue asignada tomando en cuenta el mecanismo de reacción que sigue este proceso, el cual se encuentra ampliamente explorado. Este resultado fue apoyado por el análisis conformacional del intermediario clave (aducto carbenio) mediante cálculos DFT para revelar los factores termoquímicos que derivan en la estereo especificidad en la reacción Prins.



8. SECCION EXPERIMENTAL

Procedimientos generales. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Las rotaciones ópticas se registraron en soluciones de CHCl_3 en un polarímetro PerkinElmer 341. Los espectros de masa se midieron en un cromatógrafo de gases Thermo Scientific Trace 1310, acoplado a espectrómetro de masas ISQ LT.

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro marca Buck 500 y los espectros de RMN se midieron a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C en un espectrómetro Varian Mercury 400 y a 300 MHz para ^1H y 75.4 MHz para ^{13}C en un espectrómetro Bruker Avanced 300 a partir de soluciones de CDCl_3 usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz.

Las purificaciones, así como las reacciones se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (TLC). La TLC se llevó a cabo utilizando placas de aluminio de gel de sílice 60 F254 de E. Merk (0.25 mm), que se visualizaron mediante UV y/o por la adición de H_2SO_4 al 10%/etanol o H_2SO_4 al 30%/ H_2O . Se utilizó gel de sílice de malla 230-400 (Merck) para la cromatografía en columna.

Material vegetal. Se recolectaron especímenes de *Perymenium bupthalmoides* (DC) durante la etapa de floración, en el km 3.5 de la carretera Tiripetío-Acuitzio en junio de 2016 a ($19^\circ 30.916' \text{ N}$ y $101^\circ 20.634' \text{ W}$) y una altitud de 2095 metros sobre el nivel del mar. y en Morelia, Michoacán, México ($19^\circ 39' 36.2'' \text{ N}$, $101^\circ 10' 18.2'' \text{ W}$), en julio de 2018. Se depositó un ejemplar de voucher (00243995) en el Herbario del Instituto de Ecología A.C., Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México, donde el Prof. Jerzy Rzedowski identificó el material vegetal.

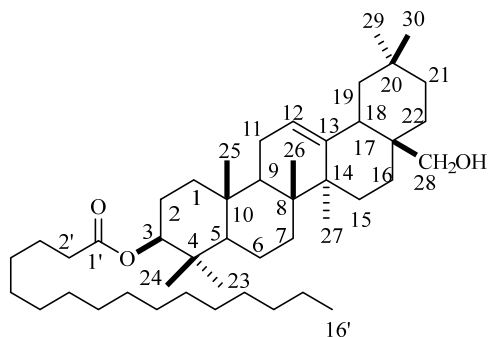
Estudio químico de flores

El extracto de flores de AcOEt (5.6 g) se fraccionó mediante cromatografía en columna empleando gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente como eluyente obteniendo 10 fracciones.

La fracción 3 (7:3) fue recromatografiada con una mezcla de hexanos-AcOEt 9:1 y en las fracciones 13-15 se obtuvo un sólido blanco el cual fue lavado con acetona para su purificación obteniendo el compuesto **10**.

3 β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol (10): Sólido

blanco; p.f. 115-117 °C; IR_{vmax} 3470, 2919, 2850, 1702, 1464, 1265, 824, 814, 799 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.19 (t, *J*= 3.6 Hz, 1H, H-12), 4.49 (m, 1H, H-3), 3.55 (d, *J*= 11.2 Hz, 1H, H-28a), 3.21 (d, *J*= 11.2 Hz, 1H, H-28b), 2.29 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.16 (s, 3H, CH₃-27), 0.96

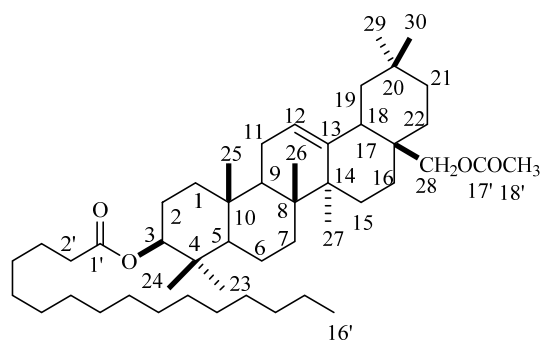


(s, 3H, CH₃-25), 0.94 (s, 3H, CH₃-24), 0.89 (s, CH₃-29), 0.88-0.86 (CH₃-26, CH₃-16', CH₃-23, CH₃-30); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 38.3 (C-1), 23.6 (C-2), 80.5 (C-3), 37.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.2 (C-6), 32.5 (C-7), 39.8 (C-8), 47.5 (C-9), 36.9 (C-10), 23.5 (C-11), 122.3 (C-12), 144.2 (C-13), 41.7 (C-14), 25.5 (C-15), 22.0 (C-16), 36.8 (C-17), 42.3 (C-18), 46.4 (C-19), 30.9 (C-20), 34.0 (C-21), 31.0 (C-22), 28.0 (C-23), 16.7 (C-24), 15.6 (C-25), 16.8 (C-26), 25.9 (C-27), 69.7 (C-28), 33.2 (C-29), 23.6 (C-30), 173.7 (C-1'), 34.9 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.7-29.2 (C-4'-C-13'), 31.9 (C-14'), 22.7 (C-15'), 14.1 (C-16'); EMIE *m/z* 662 [M-H₂O]⁺ (calculada para C₄₆H₈₀O₃-H₂O).

Preparación del acetato del 3 β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol (58): 30 mg de **10** se colocaron con 2 mL de piridina, 2 mL de Ac₂O y 1 mL CH₂Cl₂, la solución se dejó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con HCl acuoso al 10%, solución acuosa saturada de NaHCO₃ y H₂O, se secó, filtró y evaporó, proporcionando el derivado acetilado **58** (27.6 mg).

Acetato del 3 β -palmitoxi-olean-12-en-28-ol

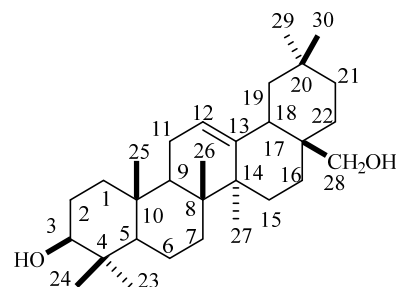
(58): Miel incolora; IR_{vmax} 3387, 2919, 2852, 1732, 1463, 1229 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.20 (t, *J*= 3.0 Hz, 1H, H-12), 4.40 (m, 1H, H-3), 4.03 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, H-28a), 3.70 (d, *J*= 11.0 Hz, 1H, H-28b), 2.29 (t, *J*= 7.6 Hz, 2H, H-2'), 2.05 (s, 3H, CH₃-18'), 1.16 (s,



3H, CH₃-27), 0.95 (s, 6H, CH₃-25-CH₃-24), 0.89-0.86 (CH₃-29, CH₃-26, CH₃-23, CH₃-30); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 38.2 (C-1), 23.5 (C-2), 80.5 (C-3), 37.0 (C-4), 55.2 (C-5), 18.2 (C-6), 32.4 (C-7), 39.7 (C-8), 47.4 (C-9), 35.7 (C-10), 23.5 (C-11), 122.8 (C-12), 143.6 (C-13), 41.6 (C-14), 25.5 (C-15), 22.2 (C-16), 36.8 (C-17), 42.5 (C-18), 46.2 (C-19), 30.9 (C-20), 33.9 (C-21), 31.4 (C-22), 28.0 (C-23), 16.7 (C-24), 15.5 (C-25), 16.6 (C-26), 25.9 (C-27), 70.8 (C-28), 33.1 (C-29), 23.5 (C-30), 173.7 (C-1'), 34.8 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.7-29.2 (C-4'-13'), 31.9 (C-14'), 22.7 (C-15'), 14.1 (C-16'), 171.3 (C-17'), 21.0 (C-18').

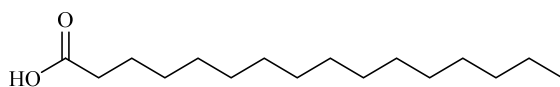
Hidrólisis alcalina del éster 10: Se disolvió el 3β-palmitoxi-olean-12-en-28-ol (**10**) (35 mg) en 3 ml de THF: MeOH (1: 1), posteriormente, se añadieron (48 mg) de NaOH y 0.5 mL de H₂O. La solución se calentó a reflujo durante 6 h el THF se evaporó al vacío y la solución se acidificó con HCl al 10% hasta pH 6. La reacción se extrajo con AcOEt. El crudo (39 mg) se cromatografió empleando gel de sílice y hexanos-AcOEt (9:1) como eluyente, obteniendo 3.4 mg de ácido palmítico (**59**) y una mezcla de eritrodíol y ácido palmítico que se lavó con hexanos para obtener 19.5 mg de eritrodíol (**18**).

Eritrodíol (18): Sólido blanco; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.19 (t, *J*= 3.6 Hz, 1H, H-12), 3.23 (m, 1H, H-3), 3.52 (d, *J*= 11.2 Hz, 1H, H-28a), 3.22 (d, *J*= 11.2 Hz, 1H, H-28b), 1.17 (s, 3H, CH₃-27), 1.00 (s, 3H, CH₃-23), 0.94 (s, 3H, CH₃-25), 0.93 (s, 3H, CH₃-24), 0.89 (s, 3H, CH₃-29), 0.87 (s, 3H, CH₃-30), 0.79 (s, 3H, CH₃-26);



RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 38.6 (C-1), 27.2 (C-2), 80.5 (C-3), 38.8 (C-4), 55.1 (C-5), 18.3 (C-6), 32.5 (C-7), 39.8 (C-8), 47.6 (C-9), 36.9 (C-10), 23.5 (C-11), 122.3 (C-12), 144.2 (C-13), 41.7 (C-14), 25.5 (C-15), 22.0 (C-16), 36.9 (C-17), 42.3 (C-18), 46.4 (C-19), 30.9 (C-20), 34.1 (C-21), 31.0 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 15.6 (C-25), 16.7 (C-26), 25.9 (C-27), 69.7 (C-28), 33.2 (C-29), 23.6 (C-30); EMIE *m/z* 442 [M]⁺ (calcd for C₃₀H₅₀O₂).

Ácido palmítico (59): Sólido blanco, p.f. 53-54 °C; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.35

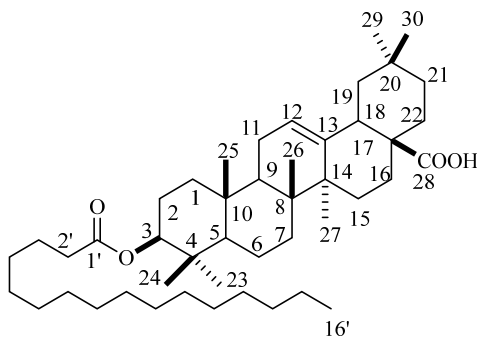


(t, *J*= 7.4 Hz, 2H, H-2), 1.63 (q, *J*= 7.3 Hz, 2H, H-3), 1.26 (s, 24H, CH₂-4-15), 0.88 (t, *J*= 6.8 Hz, 3H, CH₃-16); EMIE *m/z* 256 [M]⁺ (calculado para C₁₆H₃₂O₂).

Las fracciones 4-6 (Hexanos-AcOEt (3:2, 4:1 y 1:1)) del extracto de AcOEt de flores fueron recromatografiadas con un sistema de elución hexanos-AcOEt (9:1) obteniendo en las fracciones 25-75 una sustancia cristalina la cual fue purificada mediante lavados con metanol seguido de cristalización a evaporación lenta empleando la mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1), estos procedimientos condujeron a la obtención de 1 g de un sólido blanco correspondiente al compuesto **11**.

Ácido 3β-palmitoxi-olean-12-en-28-oico (11):

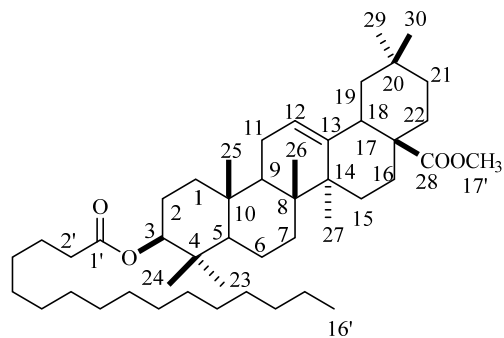
Sólido blanco; IR_{vmax} cm⁻¹ 2919, 2851, 1724, 1685, 1464; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (t, *J*= 3.4 Hz, 1H, H-12), 4.50 (m, 1H, H-3), 2.82 (dd, *J*= 13.8, 1H, 3.8 Hz, H-18), 2.29 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 0.94 (s, 3H, CH₃-25), 0.93 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.88 (t, *J*= 7.4



Hz, 3H, CH₃-16'), 0.86 (s, 3H, CH₃-24), 0.85 (s, 3H, CH₃-23), 0.75 (s, 3H CH₃-26); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 38.0 (C-1), 23.6 (C-2), 80.5 (C-3), 37.7 (C-4), 55.3 (C-5), 18.2 (C-6), 32.5 (C-7), 39.3 (C-8), 47.5 (C-9), 37.0 (C-10), 22.9 (C-11), 122.5 (C-12), 143.6 (C-13), 41.6 (C-14), 27.7 (C-15), 23.4 (C-16), 46.5 (C-17), 40.9 (C-18), 45.8 (C-19), 30.7 (C-20), 33.8 (C-21), 32.4 (C-22), 28.0 (C-23), 16.7 (C-24), 15.4 (C-25), 17.1 (C-26), 25.9 (C-27), 183.7 (C-28), 33.0 (C-29), 23.6 (C-30), 173.7 (C-1'), 34.8 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.7-29.4 (C-4'-C-13'), 31.9 (C-14'); 22.7 (C-15'), 14.1 (C-16'); EMIE *m/z* 694 [M]⁺ (calculada para C₄₆H₇₈O₄).

Éster metílico del ácido 3β-palmitoxi-olean-12-en-28-oico (60):

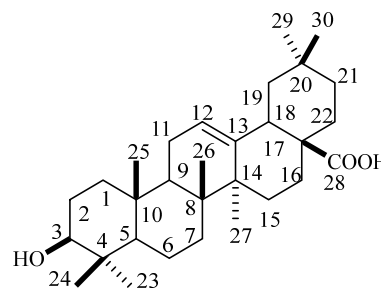
Miel incolora; IR_{vmax} 3387, 2924, 2852, 1727, 1463, 1172 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.28 (m, 1H, H-12), 4.49 (m, 1H, H-3), 3.62 (s, 3H, CH₃-17'), 2.86 (dd, *J*= 13.8, 3.4 Hz, 1H, H-18), 2.29 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 0.92 (s, 6H, CH₃-25, CH₃-30), 0.90-0.85 (CH₃-29, CH₃-16', CH₃-24, CH₃-23), 0.72 (s, 3H, CH₃-26); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 38.1 (C-1), 23.5 (C-2), 80.5 (C-3), 37.7 (C-4), 55.3 (C-5), 18.2 (C-6),



32.6 (C-7), 39.2 (C-8), 47.5 (C-9), 36.9 (C-10), 23.0 (C-11), 122.2 (C-12), 143.8 (C-13), 41.6 (C-14), 27.6 (C-15), 23.4 (C-16), 46.7 (C-17), 41.3 (C-18), 45.8 (C-19), 30.7 (C-20), 33.8 (C-21), 32.3 (C-22), 28.0 (C-23), 16.7 (C-24), 15.3 (C-25), 16.8 (C-26), 25.9 (C-27), 178.3 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30), 173.7 (C-1'), 34.8 (C-2'), 25.2 (C-3'), 29.7-29.2 (C-4'-13'), 31.9 (C-14'), 22.7 (15'), 14.2 (C-16'), 51.5 (C-17').

Hidrólisis alcalina del éster 11: Se disolvió el ácido 3β -palmitoxi-olean-12-en-28-oico (**11**) (50 mg) en 5 ml de la mezcla THF: MeOH (1:1), posteriormente, se añadieron (69 mg) de NaOH y 1 ml de H₂O. La solución se calentó a reflujo durante 10 h, el THF se evaporó al vacío y a la solución se acidificó con HCl al 10% hasta pH 6. La reacción se extrajo con AcOEt produciendo 51.5 mg. El crudo se cromatografió empleando gel de sílice y una mezcla de hexanos-AcOEt (9:1) como eluyente, obteniendo ácido palmítico (**59**) y una mezcla de ácido oleanólico y ácido palmítico que se lavó con hexanos para proporcionar 22.7 mg de ácido oleanólico (**19**).

Ácido oleanólico (19): Sólido blanco; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.28 (t, $J= 3.4$ Hz, 1H, H-12), 3.22 (dd, $J= 11.4, 4.6$ Hz, 1H, H-3), 2.82 (dd, $J= 13.8, 1H, 3.8$ Hz, H-18), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 0.99 (s, 3H, CH₃-23), 0.93 (s, 3H, CH₃-25), 0.91 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.78 (s, 3H, CH₃-26), 0.75 (s, 3H, CH₃-24); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 38.4 (C-1), 27.2 (C-2), 79.0 (C-3), 38.7 (C-4), 55.2 (C-5), 18.3 (C-6), 32.6 (C-7), 39.3 (C-8), 47.6 (C-9), 37.1 (C-10), 22.9 (C-11), 122.6 (C-12), 143.6 (C-13), 41.6 (C-14), 27.7 (C-15), 23.4 (C-16), 46.5 (C-17), 40.9 (C-18), 45.9 (C-19), 30.7 (C-20), 33.8 (C-21), 32.4 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 15.3 (C-25), 17.1 (C-26), 25.9 (C-27), 183.6 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30); EMIE m/z 456 [M]⁺ (calculado para C₃₀H₄₈O₃).



Estudio químico de raíz

Las raíces secas y posteriormente molidas (1.730 kg), de *Perymenium bupthalmoides* (lote Morelia 2018), se extrajeron con hexanos (2.5 L), a reflujo durante 6 h por triplicado proporcionando 30 g de una miel amarilla.

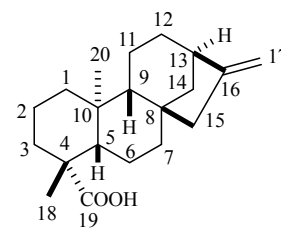
El extracto de las raíces (30 g) se separó empleando gel de sílice y una mezcla de hexanos-AcOEt (9: 1) como eluyente. En las primeras fracciones se obtuvo la mezcla de los ácidos kaurenoico (**1**) y beyerenoico (**2**) la cual fue recristalizada con hexanos-CH₂Cl₂ (1:1) produciendo 8 g de la mezcla de los diterpenos. La mezcla de los ácidos kaurenoico (**1**) y beyerenoico (**2**) (1.5 g) se separó en cromatografía en columna impregnada con AgNO₃ al 15% y CH₂Cl₂-EtOAc (4:2) como eluyente obteniendo 346 mg de ácido kaurenoico (**1**) y 843 mg de ácido beyerenoico (**2**).

En las siguientes fracciones se obtuvieron: el ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**4**) y el *ent*-kaur-16-ol (**5**), los cuales fueron lavados con hexanos y posteriormente recristalizados con la mezcla de hexanos-CH₂Cl₂ (1:1) proporcionando 586 mg y 480 mg, respectivamente.

Ácido kaurenoico (1): Cristales incoloros; p.f. 146-148 °C; [α]₅₈₉=

-83 (*c* 0.58, CHCl₃); IR_{vmax} 3508, 2934, 2853, 1729, 1693, 1266 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 4.80 (s, 1H, H-17a), 4.74 (s, 1H, H-17b), 2.64 (ta, *J*= 4.0 Hz, 1H, H-13), 1.24 (s, 3H, CH₃-18), 0.95 (s, 3H, CH₃-20) ; RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 40.7 (C-1), 19.1

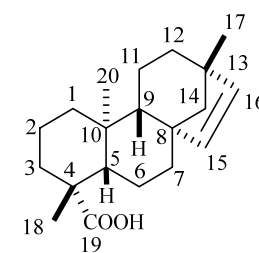
(C-2), 37.8 (C-3), 43.7 (C-4), 57.0 (C-5), 21.8 (C-6), 33.1 (C-7), 44.2 (C-8), 55.1 (C-9), 39.6 (C-10), 18.4 (C-11), 41.3 (C-12), 43.8 (C-13), 39.7 (C-14), 48.9 (C-15), 155.9 (C-16), 103.0 (C-17), 28.9 (C-18), 184.5 (C-19), 15.6 (C-20); EMIE *m/z* 302 [M]⁺(calculado para C₂₀H₃₀O₂).



Ácido beyerenoico (2): Cristales incoloros; p.f. 160-161°C; [α]₅₈₉=

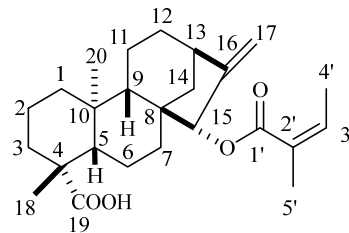
-4.5 (*c* 0.31, CHCl₃) ; IR_{vmax} 3513, 2946, 2850, 1730, 1693, 1273 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.74 (d, *J*= 5.6, 1H, H-15), 5.46 (d, *J*=5.6, 3H, H-16), 1.24 (s, 3H, CH₃-18), 1.00 (s, 3H, CH₃-17), 0.67 (s, 3H, CH₃-20); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 39.5 (C-

1), 19.2 (C-2), 37.9 (C-3), 43.7 (C-4), 56.9 (C-5), 21.5 (C-6), 33.0 (C-7), 49.1 (C-8), 52.2 (C-9), 37.6 (C-10), 20.4 (C-11), 37.8 (C-12), 43.6 (C-13), 60.0 (C-14), 134.8 (C-15), 136.5 (C-16), 24.9 (C-17), 29.1 (C-18), 184.1 (C-19), 13.8 (C-20) ; EMIE *m/z* 302 [M]⁺(calculado para C₂₀H₃₀O₂).



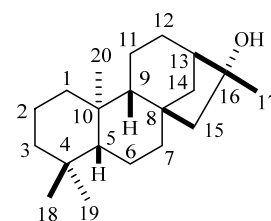
Ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-19-en-19-oico (3): Cristales

incolores; p.f. 180-182 °C; $[\alpha]_{589} -80.7$, $[\alpha]_{578} -84.3$, $[\alpha]_{546} -96.1$, $[\alpha]_{436} -164.1$, $[\alpha]_{365} -262.4$; IR $_{\nu_{\max}}$ 3513, 2927, 2857, 1726, 1692, 1261 cm $^{-1}$; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl $_3$): δ 6.04 (qq, $J=7.2, 1.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.35 (s, 1H, H-15), 5.13 (s, 1H,



H-17a), 5.07 (s, 1H, H-17b), 2.64 (ta, $J=4.0$ Hz, H-13), 1.98 (dd, $J=7.2, 1.6$ Hz, 3H, H-4'), 1.88 (dd, $J=2.8$ Hz, 3H, H-5'), 1.22 (s, 3H, CH $_3$ -18), 0.96 (s, 3H, CH $_3$ -20); RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl $_3$) δ 40.5 (C-1), 19.0 (C-2), 37.6 (C-3), 43.7 (C-4), 56.5 (C-5), 20.8 (C-6), 34.9 (C-7), 47.5 (C-8), 52.9 (C-9), 39.8 (C-10), 18.4 (C-11), 32.7 (C-12), 42.5 (C-13), 37.3 (C-14), 82.5 (C-15), 155.5 (C-16), 109.9 (C-17), 28.8 (C-18), 184.4 (C-19), 15.7 (C-20), 168.0 (C-1'), 137.4 (C-3'), 128.2 (C-2'), 20.7 (C-5'), 15.8 (C-4'); EMIE m/z 400 $[\text{M}]^+$ (calculado para C $_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$).¹¹⁹

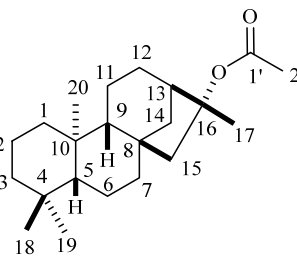
***Ent*-kaur-16 α -ol (5):** Sólido blanco; p.f. 190-191 °C; $[\alpha]_{589} -34.4$, $[\alpha]_{578} -35.6$, $[\alpha]_{546} -40.4$, $[\alpha]_{436} -66.9$, $[\alpha]_{365} -102.4$; IR $_{\nu_{\max}}$ 3320, 2919, 2849 cm $^{-1}$; Datos de RMN de ^1H y ^{13}C , consulte la Tabla 6.2.1.



Preparación del acetato *ent*-16 α -kauranilo (15): Se disolvieron parcialmente 50 mg de **5** con piridina (1 mL), Ac $_2$ O (1 ml) y CH $_2$ Cl $_2$ (1 mL), la solución se colocó a reflujo durante 8 h. La mezcla se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se lavó con solución de HCl al 10%, solución acuosa saturada de NaHCO $_3$ y H $_2$ O, se secó con Na $_2$ SO $_4$, filtró y evaporó. El crudo de reacción (52.7 mg) se separó por cromatografía en columna empleando gel de sílice y se eluyó con una mezcla de hexanos-AcOEt (9:1). El derivado acetilado **15** se obtuvo en forma de sólido blanco (34.2 mg). El *ent*-kaureno y el isokaureno (12.6 mg) se obtuvieron como productos secundarios. La mezcla de *ent*-kaureno (**17**) e isokaureno (**16**) (12.6 mg) se separó por TLC preparativa impregnada con AgNO $_3$ al 20% y hexanos-AcOEt (19:1) como eluyente proporcionando 3 mg de *ent*-kaureno (**17**) ($R_F=0.57$) y 6.9 mg de isokaureno (**16**) ($R_F=0.38$).

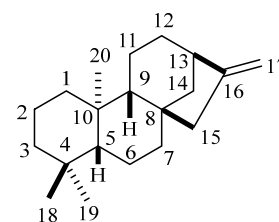
***Ent*-16 α -kauranilo (15):** Sólido blanco; IR $_{\nu_{\max}}$ 2921, 2850, 1715, 1256 cm $^{-1}$; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl $_3$): δ 2.32 (d, $J=3.2$ Hz, 1H, H-13), 1.95 (s, 3H, CH $_3$ -1'), 1.98 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, H-15a), 1.91 (dd, $J=11.6, 1.2$ Hz, 1H, H-14a), 1.76 (m, 1H, H-1a), 1.63 (m, 1H, H-

12a), 1.61 (m, 1H, H-2a), 1.59 (m, 1H, H-15b), 1.59 (s, 3H, CH₃-17), 1.53 (m, 2H, H-11), 1.52 (m, 1H, H-6a), 1.47 (m, 2H, H-7), 1.37 (m, 1H, H-2b), 1.35 (m, 3H, H-3a, H-12b, H-14b), 1.27 (m, 1H, H-6b), 1.11 (td, *J*= 13.6, 4.3 Hz, 1H, H-3b), 1.01 (s, 3H, CH₃-20), 0.84 (s, 3H, CH₃-18), 0.98 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H, H-9), 0.80 (s,

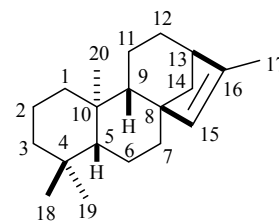


3H, CH₃-19), 0.77 (dd, *J*= 12.0, 2.0 Hz, 1H, H-9), 0.72 (td, *J*= 12.8, 3.6 Hz, 1H, H-1b; RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 40.3 (C-1), 18.6 (C-2), 42.0 (C-3), 33.2 (C-4), 56.1 (C-5), 20.3 (C-6), 41.9 (C-7), 44.7 (C-8), 56.5 (C-9), 39.3 (C-10), 18.0 (C-11), 26.4 (C-12), 45.5 (C-13), 37.5 (C-14), 55.6 (C-15), 90.9 (C-16), 19.8 (C-17), 33.6 (C-18), 21.5 (C-19), 17.7 (C-20), 170.8 (C-1'), 22.8 (C-2'); EMIE *m/z* 332 [M]⁺ (calculado para C₂₂H₃₆O₂).

Ent-kaureno (17): Cristales incoloros; p.f. 41-42 °C; IR_vmax 2982, 2921, 2854, 1557, 1256 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 4.79 (sa, 1H, H-17a), 4.73 (sa, 1H, H-17b), 1.02 (s, 3H, CH₃-20), 0.85 (s, 3H, CH₃-18), 0.81 (s, 3H, CH₃-19); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 41.2 (C-1), 18.6 (C-2), 42.0 (C-3), 33.3 (C-4), 56.2 (C-5), 20.2 (C-6), 40.4 (C-7), 44.2 (C-8), 56.0 (C-9), 39.3 (C-10), 18.1 (C-11), 33.3 (C-12), 44.0 (C-13), 39.8 (C-14), 49.2 (C-15), 156.2 (C-16), 102.8 (C-17), 33.7 (C-18), 21.6 (C-19), 17.6 (C-20); EMIE *m/z* 272 [M]⁺(calculado para C₂₀H₃₂).



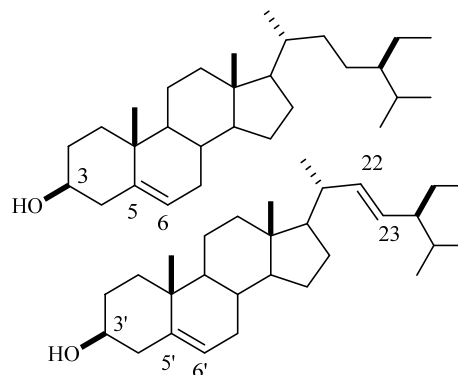
Isokaureno (16): Cristales incoloros; p.f. 62-63 °C; IR_vmax 2918, 2847, 1697 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.06 (m, 1H, H-15), 1.70 (d, *J*= 1.2 Hz, 3H, CH₃-17), 1.02 (s, 3H, CH₃-20), 0.84 (s, 3H, CH₃-18), 0.79 (s, 3H, CH₃-19); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): 40.5 (C-1), 18.7 (C-2), 42.1 (C-3), 33.3 (C-4), 56.0 (C-5), 19.3 (C-6), 39.5 (C-7), 49.2 (C-8), 48.9 (C-9), 39.5 (C-10), 18.7 (C-11), 25.1 (C-12), 44.9 (C-13), 43.9 (C-14), 135.6 (C-15), 142.3 (C-16), 15.4 (C-17), 33.6 (C-18), 21.6 (C-19), 17.7 (C-20); EMIE *m/z* 272 [M]⁺(calculado para C₂₀H₃₂).



El barrido de la primera cromatografía del extracto hexánico de raíz (3.5 g) se sometió a cromatografía en columna empleando gel de sílice con una mezcla de hexanos-CH₂Cl₂-AcOEt (7:2:1) como sistema de elución proporcionando 261 mg de la mezcla de

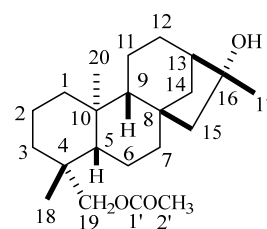
estigmasterol (**13**) y sitosterol (**14**). Además, de este proceso se obtuvo un sólido blanco el cual fue lavado con hexanos generando 31 mg de la mezcla de los diterpenos **61** y **62**.

Estigmasterol (13) y Sitosterol (14): Cristales incoloros; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 5.35 (2H, d, $J=5.2$ Hz, H-6), 5.15 (1H, m, H-23), 5.01 (1H, m, H-22), 3.53 (2H, m, H-3), 1.01 (6H, s, H-19), 0.92 (6H, d, $J=6.8$ Hz, H-21), 0.84 (6H, t, $J=7.4$ Hz, H-29), 0.83 (6H, d, $J=7.2$ Hz, H-26), 0.81 (6H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.70 (3H, s, H-18), 0.68 (3H, s, H-18); EMIE estigmasterol m/z 412 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$), y EMIE sitosterol m/z 414 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$).

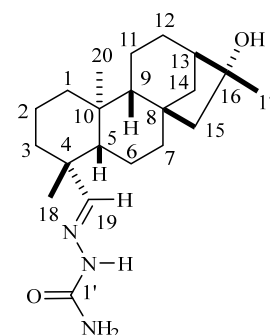


Preparación de la base Schiff a partir de la mezcla de diterpenos 61 y 62. 12 mg de clorhidrato de semicarbazida, 9 mg de acetato de sodio disueltos en 1 mL de la mezcla de MeOH- H_2O (4:1) se calentó a reflujo durante 15 min. Después, se agregaron 30 mg de la mezcla de **61** y **62** con 1.5 mL de la mezcla de MeOH- H_2O (4:1), la solución se mantuvo a reflujo durante 5 h. El matraz se retiró de la fuente de calor y el crudo de reacción se vertió en hielo, se dejó evaporar y el sólido obtenido se lavó con agua proporcionando 36.1 mg de la mezcla de **61** y la respectiva base Schiff **63**. La mezcla se lavó con hexanos proporcionando 11 mg del compuesto acetilado **61** y 8 mg de la base de base Schiff **63**.

19-acetoxy-ent-kauran-16 α -ol (61): Sólido blanco; IR_{vmax} 3290, 2921, 2851, 1741, 1223 cm^{-1} ; EMIE m/z 348 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_3$); Datos de RMN de ^1H y ^{13}C , consulte la Tabla 6.2.2

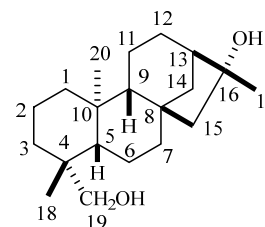


Base Schiff 63: Sólido blanco; IR_{vmax} 3480, 3316, 2919, 2849, 1681, 1595 cm^{-1} ; Datos de RMN de ^1H y ^{13}C , consulte la Tabla 6.2.3.



El barrido de la segunda cromatografía del extracto hexánico de raíz (660 mg) se separó utilizando mezclas de hexanos-acetona en polaridad ascendente. Las fracciones 75-90 (17:1 y 4:2) tras varios procesos de cromatografía en columna se separó empleando gel de sílice y la mezcla de hexanos-AcOEt (4:1) proporcionando el compuesto **64**.

Ent-kaur-16 α -19-diol (64): Sólido blanco; IR ν_{\max} 3395, 2923, 2850 cm $^{-1}$; EMIE m/z 306 [M] $^{+}$ (calculado para C $_{20}$ H $_{34}$ O $_2$); Datos de RMN de ^1H y ^{13}C consulte la Tabla 6.2.4.

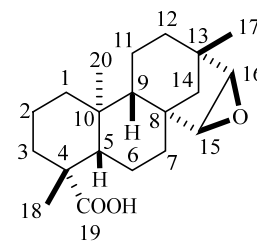


Hidrólisis de básica de 61: Se disolvió el 19-acetoxy-*ent*-kauran-16 α -ol (**61**) (16.2 mg) en 2 mL de THF: MeOH (1:1), luego se añadieron (22 mg) de NaOH y 0.25 mL de H $_2$ O. La solución se calentó a reflujo durante 2 h. El THF se evaporó al vacío y la solución acuosa se acidificó con HCl al 10% a pH 6. La reacción extrajo AcOEt, obteniendo 11.9 mg de **61**.

Oxidación de 64 con PCC. Se añadió lentamente PCC (12.56 mg) a una solución del kauranol **61** (11.9 mg) en CH $_2$ Cl $_2$ (1.5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h. El crudo de reacción se diluyó con CH $_2$ Cl $_2$ y se percoló sobre gel de sílice. El disolvente se eliminó al vacío proporcionando 10.1 mg de **62** como un sólido blanco p.f. 160-162 °C.

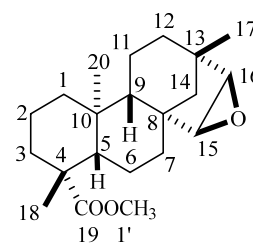
Preparación de la base Schiff 63. Un lote de 10 mg de clorhidrato de semicarbazida, 10 mg de acetato de sodio en 1 mL de la mezcla de agua-MeOH (4:1) se calentó a reflujo durante 15 min. Luego, se agregaron 10 mg de **62** disuelto en 2 mL de MeOH, la solución se mantuvo a reflujo durante 5 h. El matraz se retiró de la fuente de calor y el crudo de reacción se vertió en hielo, se dejó evaporar y el sólido obtenido se lavó con agua proporcionando 8.9 mg de la respectiva base Schiff **63**.

La fracción 54-74 (172 mg) del residuo de la segunda cromatografía del extracto hexánico después de varios procesos de cromatografía se separó en cromatografía en columna empleando gel de sílice y hexanos-AcOEt (4: 1) como eluyente obteniendo **65** como aceite incoloro (13 mg); IR ν_{\max} 3395, 2944, 2848, 1691 cm $^{-1}$; Datos de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C , consulte la Tabla 6.2.5.



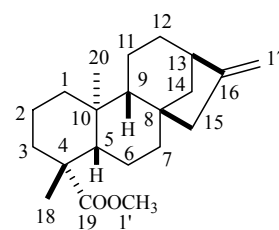
Preparación de epoxi beyerano 65. A una solución de ácido beyerenoico (30 mg) en CH₂Cl₂ (5 mL) se le añadieron 33.27 mg de ácido 3-cloro-perbenzoico. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos; luego, se añadió una solución 2 M de NaHSO₃. La reacción se extrajo con CH₂Cl₂, la fase orgánica se lavó con solución de NaCl, se filtró, seco y se evaporó al vacío. El crudo (47 mg) se separó por cromatografía en columna empleando gel de sílice y se eluyó con hexanos-AcOEt (4:1) proporcionando el producto natural **65** con un poco de ácido 3-cloro-perbenzoico, ya que no fue posible eliminarlo completamente.

Preparación de éster metílico 66: Se trató una fracción enriquecida de **65** (34.2 mg) con una solución de diazometano en CH₂Cl₂ (10 mL) (ver procedimiento general de metilaciones) generando **66** como un sólido blanco (15.1 mg) tras lavados con hexanos; IR_{vmax} 3424, 2924, 2851, 1719, 1444, 1235, 1152 cm⁻¹. Datos de RMN de ¹H y RMN de ¹³C, consulte la Tabla 6.2.6.



Procedimiento general para metilaciones: En un matraz sobre baño de hielo se colocaron 100 mL CH₂Cl₂ (Bidestilado recientemente) y se añadieron 67 mL de una solución 10% de NaOH (100 mL de agua/ 10 g de NaOH), después se agregaron lentamente 1.06 g de N-nitroso-N-metilurea hasta la aparición de un color amarillo intenso, lo que indicó la formación del diazometano, posteriormente, se adicionaron 10 mL a cada muestra, se dejaron secar a temperatura ambiente para dar el producto esperado.

Éster metílico del ácido kaurenoico (67): Cristales incoloros; p.f. 82-83 °C; IR_{vmax} 3508, 2934, 2853, 1729, 1693, 1266 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 4.80 (s, 1H, H-17a), 4.74 (s, 1H, H-17b), 3.64 (s, 1H, CH₃-1'), 2.63 (sa, 1H, H-13), 1.17 (s, 3H, CH₃-18), 0.83 (s, 3H, CH₃-20); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 40.7 (C-1), 19.1



(C-2), 38.1 (C-3), 43.8 (C-4), 57.0 (C-5), 21.9 (C-6), 33.1 (C-7), 44.2 (C-8), 55.0 (C-9), 39.4 (C-10), 18.4 (C-11), 41.3 (C-12), 43.8 (C-13), 39.6 (C-14), 48.9 (C-15), 155.9 (C-16), 103.0 (C-17), 28.7 (C-18), 178.1 (C-19), 15.4 (C-20), 51.1 (C-1'); EMIE *m/z* 316 [M]⁺ (calculado para C₂₁H₃₂O₂).

Éster metílico del ácido beyerenoico (68): Cristales incoloros; p.f.

116-118 °C; IR ν_{\max} 3425, 2946, 2925, 2859, 1720, 1682, 1253 cm⁻¹;

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5.72 (d, $J=5.8$, 1H, H-15), 5.45 (d,

$J=5.8$, 1H, H-16), 3.64 (s, 3H, CH₃-1'), 1.18 (s, 3H, CH₃-18), 1.00 (s,

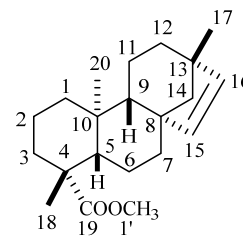
3H, CH₃-17), 0.56 (s, 3H, CH₃-20); RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃):

δ 39.5 (C-1), 19.2 (C-2), 38.1 (C-3), 43.8 (C-4), 57.0 (C-5), 21.6 (C-6), 33.1 (C-7), 49.1 (C-

8), 52.2 (C-9), 37.6 (C-10), 20.4 (C-11), 37.7 (C-12), 43.6 (C-13), 61.0 (C-14), 134.7 (C-15),

136.5 (C-16), 24.9 (C-17), 28.9 (C-18), 178.1 (C-19), 14.0 (C-20), 51.1 (C-1'); EMIE m/z

316 [M]⁺(calculado para C₂₁H₃₄O₂).



Procedimiento general de la reacción de reducción: En un matraz que contenía el compuesto carbonilo **67** o **68** (100 mg) disuelto en THF bajo atmósfera de nitrógeno, se añadieron 4 eq de LiAlH₄. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h y la reacción se inactivó con MeOH, se extrajo con AcOEt (10 mL, 3 veces) y se secó sobre NaSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el producto esperado.

Ent-kaur-16-en-19-ol (69): Sólido blanco: IR ν_{\max} 3351, 2924, 2839

1585 cm⁻¹; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4.83 (s, 1H, H-17a);

4.77 (s, 1H, H-17b), 3.79 (d, $J=11.1$ Hz, 1H, H-19a), 3.48 (d, $J=11.1$

Hz, 1H, H-19b), 2.67 (m, 1H, H-13), 2.09 (m, 2H, H-15), 1.98 (d, $J=$

11.4 Hz, 1H, H-14a), 1.88 (m, 1H, H-1a), 1.81 (m, 1H, H-3a), 1.67

(m, 1H, H-6a), 1.66 (m, 1H, H-7a), 1.62 (m, 2H, H-11), 1.59 (m, 1H, H-2a), 1.52 (m, 2H, H-

12), 1.49 (m, 1H, H-7b), 1.43 (m, 1H, H-2b), 1.36 (m, 1H, H-6b), 1.12 (m, 1H, H-14b), 1.10

(m, 1H, H-9), 1.04 (s, 3H, CH₃-18), 1.00 (s, 3H, CH₃-20), 0.99 (m, 1H, H-3b), 0.98 (m, 1H,

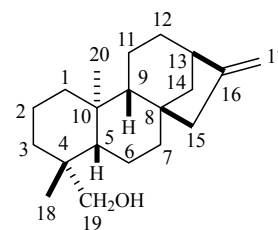
H-5), 0.82 (td, $J=12.9, 3.9$ Hz, 1H, H-1b); RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ 40.5 (C-1),

18.3 (C-2), 35.6 (C-3), 38.7 (C-4), 56.8 (C-5), 20.5 (C-6), 33.2 (C-7), 44.2 (C-8), 56.2 (C-9),

39.2 (C-10), 18.2 (C-11), 41.6 (C-12), 44.0 (C-13), 39.7 (C-14), 49.1 (C-15), 156.0 (C-16),

103.0 (C-17), 27.1 (C-18), 65.6 (C-19), 18.1 (C-20); EMIE m/z 288 [M]⁺(Calculado para

C₂₀H₃₂O).



Ent-beyer-15-en-19-ol (70): Sólido blanco; p.f. 121-123°C; IR_vmax

3363, 2922, 2866, 2844, 1587 cm⁻¹; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ

5.69 (d, 1H, *J*= 5.6 Hz, H-15), 5.48 (d, 1H, *J*= 5.6 Hz, H-16), 3.81 (d,

J= 10.8 Hz, 1H, H-19a), 3.47 (d, *J*= 10.8 Hz 1H, H-19b), 1.81 (da, 1H,

J= 13.8 Hz H-3a), 1.66 (m, 2H, H-1a, H-12a), 1.65 (m, 1H, H-6a), 1.53

(m, 1H, H-11a), 1.46 (m, 1H, H-14a), 1.42 (m, 2H, H-2), 1.38 (m, 1H, H-6b), 1.33 (m, 1H,

H-12b), 1.29 (m, 1H, H-7), 1.26 (m, 1H, H-11b), 1.04 (m, 1H, H-5), 1.04 (m, 1H, H-14a),

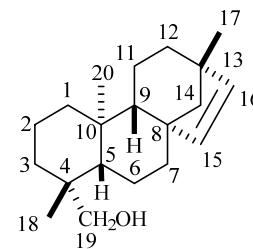
1.02 (m, 1H, H-9), 1.02 (s, 3H, CH₃-17), 1.00 (s, 3H, CH₃-18), 0.98 (m, 1H, H-3b), 0.92 (m,

1H, H-1b), 0.75 (s, 3H, CH₃-20); RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ 39.2 (C-1), 18.3 (C-2),

35.6 (C-3), 43.6 (C-4), 56.8 (C-5), 20.4 (C-6), 33.2 (C-7), 49.0 (C-8), 52.9 (C-9), 37.2 (C-

10), 20.2 (C-11), 37.7 (C-12), 38.5 (C-13), 61.1 (C-14), 135.1 (C-15), 136.5 (C-16), 24.9 (C-

17), 27.0 (C-18), 65.1 (C-19), 15.8 (C-20); EMIE: *m/z* 288 [M]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₂O).



Procedimiento general de reacción de oxidación: El alcohol **69** o **70** se disolvió en CH₂Cl₂ (2 mL), luego se añadió PCC (1.5 eq.). La reacción se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. Después, el crudo de reacción se percoló con y gel de sílice y CH₂Cl₂ (20 mL) el disolvente se eliminó a presión reducida para dar el producto esperado.

Ent-kaur-16-en-19-al (71): Cristales incoloros; IR_vmax 2951, 2915,

1708, 1654 cm⁻¹; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.78 (s, 1H, H-

19), 4.84 (s, 1H, H-17a), 4.78 (s, 1H, H-17b), 2.68 (m, 1H, H-13),

2.18 (d, *J*= 13.5 Hz, 1H, H-3a), 2.11 (m, 2H, H-15), 2.00 (d, *J*= 11.1

Hz, 1H, H-14a), 1.90 (m, 1H, H-6a), 1.87 (m, 1H, H-1a), 1.75 (m,

1H, H-7a), 1.63 (m, 3H, H-11, H-2a), 1.62 (m, 1H, H-7a), 1.61 (m, 1H, H-12a), 1.52 (m, 2H,

H-12b, H-7b), 1.47 (m, 1H, H-2b), 1.20 (m, 1H, H-5), 1.19 (m, 1H, H-14b), 1.12 (m, 1H, H-

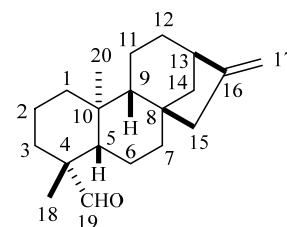
9), 1.03 (s, 3H, CH₃-18), 0.91 (s, 3H, CH₃-20), 0.83 (td, *J*= 12.9, 3.9 Hz, 1H, H-1b); RMN

de ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ 39.9 (C-1), 18.4 (C-2), 34.2 (C-3), 44.1 (C-4), 56.7 (C-5), 19.9

(C-6), 33.0 (C-7), 48.5 (C-8), 54.6 (C-9), 39.4 (C-10), 18.3 (C-11), 41.2 (C-12), 43.8 (C-13),

39.9 (C-14), 49.0 (C-15), 155.6 (C-16), 103.3 (C-17), 24.3 (C-18), 206.0 (C-19), 16.4 (C-

20).



Ent-beyer-15-en-19-al (72): Cristales incoloros; p.f. 52-54°C; IR_{vmax}

2945, 2932, 2845, 1710, 1585 cm⁻¹; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃):

δ 9.79 (s, 1H, H-19), 5.73 (d, 1H, *J* = 5.7, H-15), 5.51 (d, *J* = 5.7 1H, H-

16), 2.16 (da, *J* = 13.2, 1H, H-3a), 1.91 (m, 1H, H-11a), 1.77 (m, 1H,

H-12a), 1.75 (m, 1H, H-11b), 1.68 (m, 1H, H-1a), 1.59 (m, 1H, H-6a),

1.51 (m, 1H, H-14a), 1.50 (m, 1H, H-2), 1.41 (m, 1H, H-12b), 1.30 (m, 2H, H-7), 1.27 (m,

1H, H-6b), 1.25 (m, 1H, H-5), 1.08 (m, 1H, H-14), 1.05 (m, 1H, H-9), 1.04 (s, 3H, CH₃-17),

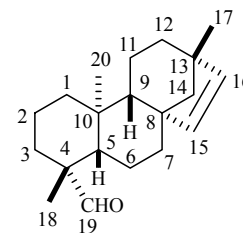
1.04 (s, 3H, CH₃-18), 1.01 (m, 1H, H-3b), 0.92 (td, *J* = 12.9, 4.2, 1H, H-1b), 0.64 (s, 3H, CH₃-

20); RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ 38.7 (C-1), 18.5 (C-2), 34.3 (C-3), 48.4 (C-4), 56.7

(C-5), 20.6 (C-6), 32.9 (C-7), 48.9 (C-8), 51.7 (C-9), 37.6 (C-10), 19.6 (C-11), 37.4 (C-12),

43.7 (C-13), 61.0 (C-14), 134.6 (C-15), 136.8 (C-16), 24.5 (C-17), 24.9 (C-18), 206.1 (C-

19), 14.6 (C-20); EMIE *m/z* 286 [M]⁺ (Calculado para C₂₀H₃₀O).



Reacción de hidrogenación con Pd/C: En un matraz que contenía el *ent*-karenal (71)

disuelto en acetato de etilo (2 mL) se adiciono Pd/C (10% p/p) posteriormente se colocó en

atmosfera de H₂ y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla

se filtró a través de celita eluyendo con AcOEt (15 mL), el disolvente se eliminó a presión

reducida para dar el producto 73.

Ent-kauran-16β-19-al (73): Cristales incoloros; IR_{vmax} 2921,

2857, 1712 cm⁻¹; RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 9.78 (s, 1H, H-

19), 2.16 (da, *J* = 13.5, 1H, H-3a), 2.07 (m, 1H, H-16), 1.98 (d, *J* =

11.1, 1H, H-14a), 1.93 (m, 1H, H-1a), 1.85 (m, 1H, H-13), 1.88 (m,

1H, H-6a), 1.72 (m, 1H, H-6b), 1.70 (m, 1H, H-15a), 1.65 (m, 1H,

H-2), 1.61 (m, 1H, H-12a), 1.60 (m, 1H, H-7a), 1.51 (m, 1H, H-12b), 1.45 (m, 1H, H-7a),

1.18 (dd, *J* = 12.3, 2.1, 1H, H-5), 1.04 (d, 1H, *J* = 7.5, CH₃-17), 1.03 (m, 2H, H-14b, H-3b);

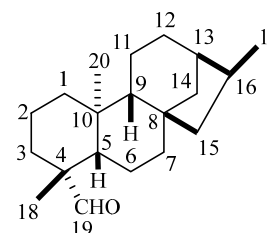
1.02 (s, 3H, CH₃-18), 1.01 (m, 1H, H-9), 1.00 (m, 1H, H-15), 0.90 (s, 3H, CH₃-20), 0.82 (td,

1H, *J* = 13.2, 3.9, H-1b); RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃): δ 39.9 (C-1), 18.8 (C-2), 34.3 (C-

3), 44.7 (C-4), 56.8 (C-5), 20.2 (C-6), 25.8 (C-7), 48.5 (C-8), 56.0 (C-9), 39.4 (C-10), 18.4

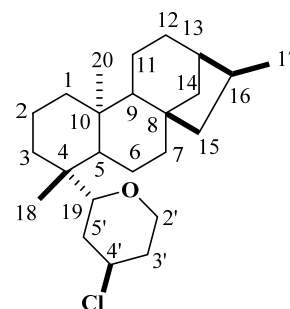
(C-11), 42.1 (C-12), 40.1 (C-13), 40.1 (C-14), 48.7 (C-15), 34.4 (C-16), 15.8 (C-17), 24.3 (C-

18), 206.1 (C-19), 16.4 (C-20).

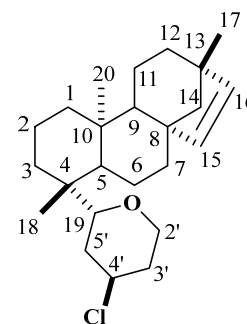


Procedimiento general de reacción de Prins: En un matraz que contenía el compuesto aldehído **72** o **73** disuelto en CH₂Cl₂ seco (2 mL) se añadieron 2.5 eq. de InCl₃, la mezcla se agitó durante 10 min a T.A. Después se añadió 1 eq. de 3-buten-1-ol. La reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con H₂O (5 mL) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (5 ml, 3 veces), se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna (éter de petróleo) para dar los productos **74** y **75** respectivamente.

Ent-19-(4-clorotetrahidro-2H-piran)-16β-kaurano (74):
 Aceite incoloro; IR_{vmax} 2918, 2854, 1084 cm⁻¹. Datos de RMN de ¹H y ¹³C consulte la Tabla 6.3.1.



Ent-19-(4-clorotetrahidro-2H-piran) beyereno (75): Sólido blanco; IR_{vmax} 2925, 2838, 1585, 1085 cm⁻¹. Datos de RMN de ¹H y ¹³C consulte la Tabla 6.3.3.



Cálculos de DCV

Las mediciones de DCV e IR se realizaron en un espectrofotómetro BioTools dual PEM Chiral IR FT. Las muestras se disolvieron en CDCl₃ y se colocaron en células BaF₂ con una longitud de trayectoria de 100 μm. Para los espectros DCV e IR calculados, se llevaron a cabo protocolos de búsqueda de Monte Carlo para **66** (MMFF) en el programa Spartan'04. Se realizó un corte de energía de 10 kcal/mol, que produjo seis conformeros para cada epímero. Se examinaron todos los conformeros para descartar duplicados. La energía de cada conformero se calculó con el nivel de teoría DFT B3LYP/631G** en el programa Spartan'04, generando 2 conformeros de baja energía parapara cada epímero. Las geometrías de estas estructuras se optimizaron con DFT en el nivel de teoría B3LYP/DGDZVP empleando el programa Gaussian 09. Las estructuras minimizadas en las primeras 3 kcal/mol,

dos para cada epímero se utilizaron para calcular los parámetros termoquímicos y las frecuencias IR y DCV. Los espectros de IR y DCV ponderados para cada compuesto se calcularon. La visualización molecular se realizó con el programa Gauss view. Los datos experimentales y calculados se compararon estadísticamente utilizando el programa Compare/VA.

Para el mecanismo Prins se modeló al intermediario deseado en el programa Spartan '04, la búsqueda conformacional se llevó a cabo empleando el protocolo MonteCarlo (MMFF) la cual generó 56 conformeros en un rango de 0-10 kcal/mol. El mínimo global tuvo una energía de 112.641058. Posteriormente se llevó a cabo la optimización de la energía de todos los conformeros encontrados mediante DFT B3LYP 631G**, proporcionando 2 conformeros en un rango de 0-3 kcal/mol con un valor de ángulo diedro de 109° para ambos conformeros. El mínimo global en este cálculo arrojó una energía de -634913.106 kcal/mol.

La optimización de la geometría y los cálculos vibracionales se llevaron a cabo empleando un procesador de 20 núcleos de 2.3 Hz con 128 Gb de RAM.

Cultivos celulares

La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 fue adquirida de la European Collection of Cell Cultures y la línea celular de melanoma de piel humano UACC-62 fue amablemente proporcionada por el grupo de investigación del Profesor Miguel López Lázaro del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Todas las líneas celulares fueron incubadas en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C. HT-29 fue cultivada en medio McCoy's 5A y las células UACC-62 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM y HEPES 25 mM. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina.

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad *in vitro* de los compuestos se evaluó mediante la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetraazolío), el cual puede ser metabolizado por las células vivas a formazán, un compuesto color morado cuya absorbancia puede definir

el porcentaje de viabilidad de las células al ser tratadas con el compuesto que se quiere evaluar.

Primeramente, la línea celular THP-1 se sometió a diferenciación a macrófagos utilizando el compuesto phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA), con el cual las células se sembraron en placas de 96 pocillo a una densidad de 10^4 células por pocillo y se incubaron por 72 h en atmosfera húmeda y 5% de CO_2 a 37 °C.

Las líneas celulares de cáncer HT-29 y UACC-62 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10^4 células por pocillo. Las células se les permitió adherirse por 24 en atmosfera húmeda y 5% de CO_2 a 37 °C. Posterior al tiempo de incubación se removió el medio de cultivo y las células fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS) e incubadas nuevamente por 48 h con soluciones de los compuestos disueltos en DMSO y preparados en medio de cultivo a concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 μM . Se consideraron controles incubados únicamente disueltos en DMSO (0.1% v/v), el cual no afecta la viabilidad celular, además de que se utilizó el fármaco oxaliplatino como control positivo. Posterior al tiempo de tratamiento, se retiró el medio y adicionó 100 μL a cada pocillo de solución (0.25 mg/mL) de MTT y se incubó por 4 h. Los cristales de formazán fueron disueltos con DMSO (100 μL /pocillo) y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas Labsystems Multiskan EX. Los experimentos se llevaron por triplicado y la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) fue calculada, se consideraron activos aquellos compuestos cuyo IC_{50} fuera menor a 100 Mm.

Evaluación de la actividad antioxidante con el método ABTS

La actividad antioxidante fue evaluada empleando el método ABTS, ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) el cual es un radical catiónico de color azul que al reaccionar con un antioxidante regresa a su forma neutra incolora. El radical ABTS^{*+} se generó con ABTS y persulfato de potasio disueltos en agua e incubado en la obscuridad por 12-16 h. Los ensayos se llevaron a cabo a diferentes concentraciones de los compuestos desde 200 hasta 3.12 μM donde se añadieron en placas de 96 pocillos; el radical ABTS^{*+} se diluyo con etanol hasta una concentración final de 0.0795 mg/mL y se añadieron 100 μL de esta disolución a cada pocillo, incubándose por 6 min a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 734 nm en un lector de placas Synergy HT. Como

control positivo se utilizó Trolox® (3.12-200 µM) para generar una curva de calibración. Se calculó la concentración efectiva 50 (EC₅₀) que es la concentración para ejercer el 50 % de actividad antioxidante, los resultados se expresan como equivalentes de Trolox® (EC₅₀ muestra/EC₅₀ del Trolox®).

Actividad anti-inflamatoria (Estudio de niveles de citocinas mediante ELISA)

El estudio de producción de citocinas reguladoras de respuestas inflamatorias y tumorales (TNF- α) se realizó empleando la línea celular monocitaria THP-1. Para lo cual, primeramente y mediante el ensayo de MTT se buscaron las concentraciones de los compuestos en un rango de 100-6.25 µM que mantuviera al menos un 80% de viabilidad de las células.

La obtención de las citocinas se realizaron ensayos en placas de 96 pocillos, donde se sembraron 15 x 10³ células/pocillo a los cuales se les añadió PMA a una concentración de 8 nM y se incubaron durante 72 h en una atmosfera húmeda y 5% de CO₂ a 37 °C para diferenciar de células a macrófagos. A continuación, se les retiro el medio y las células se lavaron con PBS estéril frío para eliminar los monocitos no transformados. Posteriormente se pre-trataron por 1 h con los compuestos **1**, **2**, **4**, **11** y agregando, por separado y disueltas en DMSO, concentraciones no letales de **1** y **2** (10, 50 y 100 µM), **4** y **11** (1, 5 y 10 µM), se usó dexametasona (1 µM) como control positivo. La respuesta inflamatoria fue inducida por la adición del liposacárido de *Escherichia coli* (LPS) a una concentración de 1 µg/mL, se consideraron grupos control (sin estimulación con LPS) y estimulados con LPS. Las células se incubaron durante 24 h y los sobrenadantes de los cultivos que contenían las citocinas fueron recogidos y almacenados -80° C hasta su uso. La cuantificación de la citocina (TNF- α) se realizó con kits ELISA específico para esta citocina (Diaclone), la absorbancia fue medida en un lector de placas Labsystems Multiskan-EX a 450 nm. Para el cálculo de concentración de citocinas se preparó una curva patrón a partir de disoluciones de citocina estándar provenientes del kit.

9. REFERENCIAS

- (1) Bohlmann, F.; Zdero, C. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 786-787.
- (2) Maldonado, E.; Vaughan, J.; Ortega A. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 813-815.
- (3) Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1185-1187.
- (4) Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Schuster, A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 495-499.
- (5) Maldonado, E.; Mayorga, L.; Ortega A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 205-207.
- (6) Maldonado, E.; Mancera, C.; Fiallega G.; Ortega A. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1265-1267.
- (7) Maldonado, E.; Bello M., Villaseñor, J. L.; Ortega, A. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1115-1118.
- (8) Murillo, R.; Castro V.; Araya, J.; Poveda, L. *Ciencia y Tecnología* **2006**, *24*, 217-226.
- (9) Ciccio, J. F.; Chaverri, C. *Rec. Nat. Prod.* **2012**, *6*, 371-375.
- (10) Villagómez-Guzmán, A. K. Estudio Químico Preliminar de *Perymenium bupthalmoides*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, México, 2014.
- (11) Villagómez-guzmán, A. K. Estudio Químico Preliminar de *Perymenium bupthalmoides*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, México, 2016.
- (12) Fay, J. J. *Allertonia* **1978**, *1*, 235-296.
- (13) Pyramus de Candolle, A.; *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, 1830; Vol. V, pp 608-609.
- (14) Rzedowski, J.; Calderón de Rzedowski, G. *Acta Bot. Mex.* **2010**, *90*, 119-127.
- (15) Monophyletic. *Encyclopedia of Astrobiology*, [Online]; Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4_1022 (consultado el día 15 de junio de 2021).
- (16) Rzedowski, J.; Calderón de Rzedowski, G.; Carrillo-Reyes, P. *Flora del Bajío y regiones adyacentes, Compositae, Tribu Helianthae II**; Rzedowski, J., Calderón de Rzedowski, G., Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán; 2011; pp 106-114.

- (17) Riehl, P. S.; De Porre, Y. C.; Armaly, A. M.; Gros, E. J.; Schindler, C. S. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 6629-6650.
- (18) Bustos-Brito, C.; Sánchez-Castellanos, M; Esquivel, B.; Calderón, J. S.; Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Joseph-Nathan, P.; Cuevas, G.; Quijano L. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2580-2587.
- (19) Gupta, E.; Purwar, S.; Sundaram, S.; Rai, G. K. *J. Med. Plant Res.* **2013**, *7*, 3343-3353.
- (20) Murillo, J. A.; Gila, J. F.; Upeguib, Y. A.; Restrepob, A. M.; Robledob, S. M.; Quinonesa, W.; Echeverria, F.; San Martin, A.; Olivod, H. F.; Escobara, G. *Bioorgan. Med. Chem.* **2019**, *27*, 153-160.
- (21) Babalola, I. T.; Shode, F. O. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *2*, 214-222.
- (22) Herrera, M. D.; Rodríguez-Rodríguez, R.; Ruiz-Gutiérrez, V. *Curr. Nutr. Food. Sci.* **2006**, *2*, 45-49.
- (23) Nava-Andrade, K. Preparación de Complejos de Coordinación a partir de Productos Naturales. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, México, 2016.
- (24) Gómez-Hurtado, M. A.; Nava-Andrade, K.; Villagómez-Guzmán, A. K.; del Río, R. E.; Andrade-López, N.; Alvarado-Rodríguez, J. G.; Martínez-Otero, D.; Morales-Morales D.; Rodríguez-García, G. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 1112-1116.
- (25) Zamudio-Jaime, K. Evaluación del potencial catalítico de Oxo-tetrazinc-diterpenos en reacciones de transesterificación. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, México, 2019.
- (26) Martínez-Torres, M. A. Estudio de la reactividad de ácidos diterpénicos frente a Platino (II) y Rutenio (II). Tesis de Maestría, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán, México, 2019.
- (27) Batista, R.; Braga, F.; Oliveira, A. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 119-125.
- (28) de Carvalho, G. J. A.; de Carvalho, M. G; Ferreira, D. T; de J. Faria T.; Braz-Filho, R. *Quim. Nova.* **2001**, *24*, 24-26.
- (29) Marquina, S.; Parra, J.; González, M.; Zamilpa, A.; Escalante, J.; Trejo-Hernández, M.; Álvarez, L. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 2017-2022.

- (30) do Nascimento, A. M.; de Oliveira, D. C. R. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 552-555.
- (31) Ohkoshi, E.; Kamo, S.; Makino, M.; Fujimoto Y. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 885-890.
- (36) Pereira, S.; Taleb-Contini, S.; Coppede, J.; Pereira, P.; Bertoni, B.; França, S.; Pereira, A. *Molecules* **2012**, *17*, 8851-8858.
- (32) Mitscherg, L.; Rao, G.; Veysoglu, T.; Drake, S.; Haas, T. *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 745-746.
- (33) Villa-Ruano, N.; Lozoya-Gloria, E.; Pacheco-Hernández, Y. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2016**, *51*, 151-174.
- (34) Ragasa, C. Y.; Alimboyoguen, A. B.; Urban, S.; Raga, D. D. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1663-1666.
- (35) Takahashi, J. A.; Vieira H. S.; Silva, E.; Boaventura, M. A. D.; de Oliveira, A. B.; Chiari, E. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, *12*, 118-120.
- (36) Zhang, Y.; Peng, H.; Xia, G.; Wang, M.; Han, Y. *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 937-942.
- (37) Jung, H.; Lee, E.; Kim J.; Kang, S.; Lee, J.; Min, B.; Choi, J. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1399-1408.
- (38) Na, M.; Oh, W.; Kim, Y.; Cai, X.; Kim, S.; Kima, B.; Ahna, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3061-3064.
- (39) Ferreira, F. P.; de Oliveira, D. C. R. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6856-6859.
- (40) Grande, M.; Mancheño, B.; Sánchez, M. J. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1977-1982.
- (41) Marquina, S.; Parra, J. L.; González, M.; Zamilpa, A.; Escalante, J.; Trejo-Hernández, M. R.; Álvarez, L. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 2017-2022.
- (42) Enríquez, R. G.; Barajas, J.; Ortiz, B.; Lough, A. J.; Reinols, W. F.; Yu, M.; León, I.; Genecco, D. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 342-347.
- (43) Enríquez, R. G.; Escobar, L. I.; Romero, M. L.; Chávez, M. A.; Lozoya, X. *J. Chromatogr. A* **1983**, *258*, 297-301.
- (44) Morarescu, O. *Chem. J. Mold.* **2015**, *10*, 9-19.
- (45) Wang, L. J.; Jiang B.; Wu, N.; Wang, S. Y.; Shi, D. Y. *RSC. Adv.* **2015**, *5*, 48822-48834.
- (46) Bresciani, L. F. V.; Yunes, R. A.; Bürger, C.; de Olivera, L. E.; Bóf, K. L.; Cechinel-Filho, V. Z. *Naturforsch* **2004**, *59*, 229-232.

- (47) Raga, D. D.; Alimboyoguen A. B.; del Fierro, R. S.; Ragasa, C. Y. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 1771-1782.
- (48) Block, L. C.; Santos, A. R.; de Souza, M. M.; Scheidt, C.; Yunes, R. A.; Santos, M. A.; Monache, F. D.; Filho, V. C. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 85-89.
- (49) Mizokami, S. S.; Arakawa, N. S.; Ambrosio, S. R.; Zarpelon, A. C.; Casagrande, R.; Cunha, T. M.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.; Verri Jr., W. A. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 896-904.
- (50) Paiba, L. A. F.; Gurgel, A.; Silva, R. M.; Tome, A. R.; Gramosa, N. V.; Silveira, E. R.; Santos, F. A.; Rao V. S. N. *Vascul. Pharmacol.* **2003**, *39*, 303-307.
- (51) Dalenogare, D. P.; Ferro, P. R.; De Prá, S. D. T.; Rigo, F. K.; de David Antoniazzi, C. T.; de Almeida, A. S.; Damiani, A. P.; Strapazzon, G.; de Oliveira Sardinha, T. T.; Galvani, N.C.; Boligon, A. A.; de Andrade, V. M.; Brum, E. D. S.; Oliveira, S. M.; Trevisan. G. *Inflammopharmacology* **2019**, *27*, 829-844.
- (52) Choi, R. J.; Shin, E. M.; Jung, H. A.; Choi, J. S.; Kim, Y. S. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 667-682.
- (53) Macri, J. A.; da Silva, S. S.; Miranda, M. M.; Kawakami, N. Y.; Hashida, T. H.; Madeira, T. B.; Nixdorf, S. L.; Acquaro Jr., V. R.; Ambrosio, S. R.; Verry Jr., W. A.; Cecchinni, R.; Concho-Costa, I.; Arakawa, N. S.; Pavanelli, W. R. *Am. J. Immunol.* **2014**, *10*, 183-188.
- (54) Zgoda-Pols, J. R.; Freyer, A. J.; Killmer, L. B.; Porter, J. R. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 434-438.
- (55) Okoye, T. C.; Akah, P. A.; Okoli, C. O.; Ezike, A. C.; Omeje, E.O.; Odoh, U. E. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2012**, 1-10.
- (56) Padla, E. P.; Solis, L. T.; Ragasa, C. Y. *Chin. J. Nat. Med.* **2012**, *10*, 408-414.
- (57) Rezende, M. C.; Urzúa, A.; Bortoluzzi, A. J.; Vásquez, L. *J. Ethnopharmacol* **2000**, *72*, 459-464.
- (58) Wilkens, M.; Alarcon, C.; Urzúa, A.; Mendoza, L. *Planta Med.* **2002**, *68*, 452-454.
- (59) Mendoza, L.; Wilkens, M.; Urzúa, A. *J. Ethnopharmacol* **1997**, *58*, 85-88.
- (60) Padmaja, V.; Thankamany, V.; Hara, N.; Fujimoto, Y.; Hisham, A. *J. Ethnopharmacol* **1995**, *48*, 21-24.
- (61) Torres-Bustos, J.; Fariás, L.; Urzúa, A.; Mendoza, L.; Wilkens, M. *Planta Med.* **2009**, *75*, 823-828.
- (62) Jeong, S. I.; Kim, B. S.; Keum, K. S.; Lee, K. H.; Kang, S. Y.; Park, B. I.; Lee, Y. R.; You, Y. O. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 1-9.
- (63) Sartori, M. R. K.; Pretto, J. B.; Cruz, A. B.; Bresciani, L. F. V.; Yunes, R. A.; Sortino, M.; Zacchino, S. A.; Filho, C. *Pharmazie* **2003**, *58*, 567-569.

- (64) Boeck, P.; Sa, M. M.; de Souza, B. S.; Cercena, R.; Escalante, A. M.; Zachino, S. A.; Filho, V. C.; Yunes, R. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1360-1366.
- (65) Rafael, J. A.; Arakawa, N. S.; Ambrosio, S. R.; Da Costa, F. B.; Said, S. *Adv. Microbiol.* **2013**, *3*, 438-444.
- (66) Cotoras, M.; Folch, C.; Mendoza, L. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2821-2826.
- (67) Santos, A. O.; Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Veiga-Junior, V. F.; Nakamura, C. V. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 59-64.
- (68) Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Consultado en línea el día 16 de junio de 2021).
- (69) Batista, R.; García, P. A.; Castro, M. A.; del Corral, J. M. M.; Speziali, N. L.; Varotti, F. P.; de Paula, R. C.; García-Fernández, L. F.; Francesch, A.; San Feliciano, A.; de Oliveira, A. B. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 168-176.
- (70) Alves, T. M. A.; Chaves, P. P. G.; Santos, L. M. S. T.; Nagem, T. J.; Murta, S. M. F.; Geravolo, I. P.; Romanha, A. J.; Zani, C. L. *Planta Med.* **1995**, *61*, 85-87.
- (71) Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es#:~:text=Febrero%202020&text=Los%20tipos%20de%20cancer%20diagnosticados,colorrectal%20\(8%2C%25\)](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es#:~:text=Febrero%202020&text=Los%20tipos%20de%20cancer%20diagnosticados,colorrectal%20(8%2C%25)), (Consultado en línea el día 15 de diciembre de 2020).
- (72) Schlaepfer, L.; Mendoza-Espinoza J. A. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2010**, *41*, 18-27.
- (73) Cavalcanti, B. C.; Bezerra, D. P.; Magalhaes, H. I.; Moraes, M. O.; Lima, M. A.; Silveira, E. R.; Camara, C. A.; Rao, V. S.; Pessoa, C.; Costa-Lufo, L. V. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 560-568.
- (74) Neto, F. S. L.; Tirapelli, D. P. C.; Ambrosio, S. R.; Tirapelli, C. R.; Oliveira, F. M.; Novais, P. C.; Peria, F. M.; Oliveira, H. F.; Carlotti Jr., C. G.; Tirapelli, L. F. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2013**, *46*, 71-78.
- (75) Costa-Lotuf, L. V.; Cunha, G. M.; Farías, P. A.; Viana, G. S.; Cunha, K. M.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Silveira, E. R.; Gramosa, N. V.; Rao, V. S. *Toxicon* **2002**, *40*, 1231-1234.
- (76) Sosa-Sequera, M. C.; Chiurillo, M.; Moscoso, J.; Dolinar, J.; Suarez, O.; Neira, N.; Mendoza, H.; Rivero-Paris, M. *Indian J. Pharmacol.* **2011**, *43*, 683-688
- (77) Henry, G. E.; Adams, L. S.; Rosales, J. C.; Jacobs, H.; Heber, D.; Seeram, N. P. *Cancer Lett.* **2006**, *244*, 190-194.
- (78) Ruíz, Y.; Rodríguez, J.; Arvelo, F.; Usubillaga, A.; Monsalve, M.; Diez, N.; Galindo-Castro, I. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 432-438.

- (79) Lei, Z.; Fei, W.; Xin-hua, M.; Fang, Z.; Sheng-mei, W.; Tian-hua, Z.; Quan-yu, L.; Shi-wu, C.; Yong-hong, Z. *Planta Med Lett* **2015**, *2*, 48-51.
- (80) Simao, M. R.; Carneiro, L. J.; Dos Santos, R. A.; Bastos, J. K.; Veneziani, R. C. S.; Ambrosio, S. R.; Mizuno, C. S. *Med. Chem. Res.* **2015**, 1-7.
- (81) Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Navarro, V.; Delgado, G.; Álvarez, L. *Planta Med.* **2002**, *68*, 281-283.
- (82) Rosselli, S.; Maggio, A.; Eiroa, C.; Formisano, C.; Bruno, M.; Irace, C.; Maffettone, C.; Mascolo, N. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1285-1287.
- (83) Loh, T. P.; Hu, Q. Y.; Tan, K. T.; Cheng, H. S. C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2669-2672.
- (84) Clarisse, D.; Pelotier, B.; Piva O.; Fache, F. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 157-159.
- (85) Pastor, I. M.; Yus, M.; *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 925-957.
- (86) Olier, C.; Kaafarani, M.; Gastaldi, S.; Bertrand M. P. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 413-445.
- (87) Colin; O.; Greck, C.; Prim, D.; Thomassigny, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *31*, 7000-7005.
- (88) Awasthi, Y. C.; Mitra, C. R. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 637-640.
- (89) Barreiros, M. L.; David, J. M.; de P. Pereira, P. A.; Guedes, M. L. S.; David J. P. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 669-673.
- (90) Ango, Y. P.; Kapche, G. D. W. F.; Kuete, V.; Mapitse, R.; Yeboah, S. O.; Ngadjui, B. T. *Helv. Chim. Acta* **2016**, *99*, 642-649.
- (91) Mahato S. B.; Kundu A. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517-1575.
- (92) Mallavadhani, U. V.; Mahapatra, A.; Raja, S. S.; Manjula, A. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1952-1955.
- (93) Faizi, S.; Naz, A. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 46-56.
- (94) St. Pirek, J. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 822-827.
- (95) Hanson, J. R.; *J. Chem. Soc.* **1963**, 5061-5066.
- (96) Hanson, J. R. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 801-804.
- (97) Hanson, J. R.; Siversns, M.; Piozzi, F.; Savona, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1976**, 114-117.
- (98) Briggs, L.H.; Cain, B. F.; Cambie, R. C.; Davis, B. R.; Rutledge, P. S.; Wilmshurst, J. K. *J. Chem. Soc.* **1963**, 1345-1355.

- (99) Patra, A.; Mitra, A. K.; Mitra, S. R.; Kirtaniya, C. L.; Adityachaudhury, N. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14*, 58-60.
- (100) Nes, W. D.; Norton, R. A.; Benson, M. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 805-811.
- (101) Isah, Y.; Ndukwe, I. G.; Amupitan J. O. *World J Life Sci. and Med Res.* **2012**, *2*, 77-81.
- (102) Hueso-Falcón, I.; Cuadrado, I.; Cidre, F.; Amaro-Luis, J. M.; Ravelo, A. G.; Estévez-Braun, A.; de las Heras, B.; Hortelano, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1291-1305.
- (103) San Martín, A. Roviroso, J.; Castillo, M. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 1461-1663.
- (104) Martin, A.; Murray, R. D. H. *J. Chem. Soc.* **1968**, 2529-2533.
- (105) Bach, R. D.; Cenepa, C.; Winter, J. E.; Blanchette, P. E. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5191-5197.
- (106) Bürgi, T. *Physical and Spectrometric Analysis: Nano-Detection of Chirality*, In: Comprehensive Chirality. Hisashi Yamamoto, Erick Carreira. (Eds). 2012; 8, pp 657-675. 1st. Edition. Ed. Elsevier, Netherland.
- (107) Raghavan, V.; Polavarapu, P. L. *Chiroptical Spectroscopic Studies on Soft Aggregates and Their Interactions*. In: Chiral Analysis. Polavarapu, P. L. (Eds). 2018; pp 153-200. 2nd. Edition. Ed. Elsevier, Netherland.
- (108) Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; del Río, R. E. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1005-1012.
- (109) Quevedo-Tinoco, L.; Rodríguez-García, G.; del Río, R. E.; Talero, E.; Motilva, V.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Gómez-Hurtado, M. A.; *J. Mol. Struct.* **2021**, *1225*, 129-147.
- (110) García-Sánchez, E.; Ramírez-López, C. B.; Talavera-Alemán, A.; León-Hernández, A.; Martínez-Muñoz, R. E.; Martínez-Pacheco, M. M; Gómez-Hurtado, M. A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; del Río R. E. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1005-1012.
- (111) Dewik, P. M.; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Ed.; John Wiley & Sons, 2009; pp 228-229.
- (112) Hong, Y. J.; Tantillo, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5375-5386.
- (113) Kawaide, H.; Hayashi, K.; Kawanabe, R.; Sakigi, Y.; Matsuo, A.; Natsume, M.; Nosaki, H. *FEBS Journal*, **2011**, *278*, 123-133.

- (114) Batista, R.; Humberto, J. L.; Chiari, E.; Braga de Oliveira A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *15*, 381-391.
- (115) McCrindle, R.; Martin, A.; Murray, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 2349-2354.
- (116) Hayman, A. R.; Weavers, R. T. *Phytochemrstry* **1990**, *29*, 3157-3162.
- (117) Ansell, S. M.; Pegel K. H.; Taylor, D. A. H. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 953- 959.
- (118) Yaouba, S.; Valkonen, A.; Coghi, P.; Gao, J.; Guantai, E. M.; Derese, S.; Wong, V. K. W.; Erdélyi, M.; Yenesew A. *Molecules* **2018**, *23*, 3199.
- (119) Kakuta, H.; Seki, T.; Hashidoko, Y.; Mizutani, J. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 1562-1564.