



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

**FITOQUIMICA Y EVALUACION BIOLÓGICA DE
CROTON CARACASANA PITTIER.
HEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS
DEL ACIDO DE CARACASINA.**

LCDA. KATIUSKA EDITH CHÁVEZ VÉLEZ

Caracas, enero de 2013



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO EN QUIMICA DE MEDICAMENTOS



**FITOQUIMICA Y EVALUACION BIOLÓGICA DE
CROTON CARACASANA PITTIER.
HEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS
DEL ACIDO DE CARACASINA.**

LCDA. KATIUSKA EDITH CHÁVEZ VÉLEZ

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela para optar
al título de Doctor en Química de Medicamentos.

Tutores:

DRA. ALÍRICA SUÁREZ

DR. REINALDO COMPAGNONE

A mis padres Dolores y Manuel

A mi esposo y amigo Alejandro Muñoz

A mi tutora Dra. Alírica Suárez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios, por darme salud, fortaleza, sabiduría y guiar siempre mis pasos.

A mis tutores, Dr. Reinaldo Compagnone por su orientación durante el desarrollo de mi trabajo de grado y a la Dra. Alírica Suárez por su inigualable asesoría, su gran apoyo, estímulo, constancia, dedicación y sobre todo por transmitirme su gran amor por el trabajo y las ganas de siempre dar más para hacerlo mejor. A ambos agradezco la valiosa oportunidad de trabajar nuevamente bajo su dirección.

A mi esposo, amigo y compañero Alejandro Muñoz, por estar siempre a mi lado brindándome su valioso e incondicional apoyo, por su comprensión, paciencia, colaboración y palabras de ánimo en todo momento.

A mi familia, especialmente a mis padres, por su profundo amor, por apoyarme siempre y comprender mis ausencias.

A mis Profesores de Postgrado Dr. Jaime Charris, M.Sc. Nury Rivero, Dra. María Luisa Serrano, Dra. Beth Díaz, Dra. Nery Pérez y Dr. José Domingo Medina por sus valiosas enseñanzas.

A mis compañeros del Postgrado Karina, Jennifer, Zuleyma, Jholeisa, Katiuska, Griselda, Angelita, Jani, Hégira, y especialmente a Jesús, Joyce y Miguel con quienes tuve la oportunidad de compartir desde el inicio de mis estudios y formamos una bonita amistad. A todos gracias por su apoyo, compañía y ayuda.

A mis compañeras de cátedra, Dra. María Luisa Serrano, M.Sc. Nury Rivero y Ftca. Jennifer de Freitas por su guía, apoyo y comprensión.

Al Profesor Stephen Tillett, por estar siempre “vivo” para colaborar, ayudar y alegrar los días de aquellos que tenemos la dicha de conocerlo. Agradezco sus valiosos aportes a mi trabajo de investigación.

A la Dra. Ricarda Riina y a Giovannina Orsini, por coleccionar e identificar el material vegetal.

Al Dr. Alí Bahsas, por su colaboración con los espectros de RMN.

A los Profesores Luis Rojas, José Elías Villamizar y Julio Herrera, por su colaboración con los espectros de masas.

Al Dr. Alexander Briceño y a la Dra. Teresa González del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por su colaboración en la realización de los análisis de Rayos-X.

Al Dr. Emilio Squitieri y a Carlos Landaeta, por realizar los estudios teóricos y computacionales.

A la Dra. Antonieta Taddei, por realizar los ensayos de actividad antibacteriana en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar.

Al Dr. Ivan Galindo, Annamil Álvarez y Katherine Figarella, por realizar los ensayos de actividad citotóxica, leishmanicida y tripanocida en el Laboratorio de Genómica y Proteómica de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV (CDCH), por el financiamiento de mis estudios como Becario Académico.

Al CDCH-UCV, proyecto PG O6.7342.2008 y al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, UCV, proyecto IIF-15, por su financiamiento.

A mi Universidad Central de Venezuela, por permitirme alcanzar un nuevo nivel de desarrollo profesional.

**Fitoquímica y evaluación biológica de *Croton caracasana* Pittier.
Hemisíntesis y evaluación biológica de derivados del ácido de caracasina.**

Katiuska Edith Chávez Vélez
Postgrado en Química de Medicamentos
Universidad Central de Venezuela

RESUMEN

En este trabajo de investigación se presenta los resultados del estudio fitoquímico de la planta *Croton caracasana* Pittier (Euphorbiaceae) colectada en Venezuela. De los tallos y hojas de la planta, se aislaron y caracterizaron siete compuestos identificados como 5-hidroxi-3, 7, 8, 3', 4'-pentametoxiflavona (I), lupeol (II), crotofolin E (III), crotoctarasin A (IV), crotoctarasin B (V), crotoctarasin C (VI) y crotoctarasin D (VII). Los compuestos IV, V, VI y VII se reportan por primera vez en la literatura de productos naturales. Se evaluó la actividad citotóxica de estos compuestos a través del método del MTT sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 (carcinoma mamario). Se encontró que los compuestos IV, V, VI y VII presentaron actividad citotóxica sobre las líneas MCF-7 y SKBR3, mientras que el compuesto III solo mostró actividad sobre la línea SKBR3. Adicionalmente, se realizó la hemisíntesis de diversos derivados del ácido de caracasina aislado de *Croton micans*. Estos derivados se obtuvieron a través de reacciones de formación de ésteres y amidas, reducción con H₂ Pd/C y con NaBH₄, reacciones con *m*-CPBA y adiciones nucleofílicas 1,4. Se evaluó la actividad citotóxica, antibacteriana, leishmanicida y tripanocida de estos compuestos y se realizó un análisis preliminar de la relación estructura química-actividad biológica con los resultados obtenidos.

Palabras claves: *Croton caracasana* Pittier, diterpenos, crotofolanos, ácido de caracasina, hemisíntesis, actividad citotóxica, antibacteriana, leishmanicida, tripanocida.

**Phytochemical and biological evaluation of *Croton caracasana* Pittier.
Hemisynthesis and biological evaluation of derivatives from
caracasine acid.**

Katiuska Edith Chávez Vélez
Postgrado en Química de Medicamentos
Universidad Central de Venezuela

ABSTRACT

In this research paper the results are presented for the phytochemical study of *Croton caracasana* Pittier (Euphorbiaceae) collected in Venezuela. From the stems and leaves of the plant, seven compounds were isolated and characterized, identified as 5-hydroxy-3, 7, 8, 3', 4'-pentamethoxyflavone (I), lupeol (II), crotofolin E (III), crotoctarasin A (IV), crotoctarasin B (V), crotoctarasin C (VI) and crotoctarasin D (VII). Compounds IV, V, VI and VII are reported for first time as natural products. These compounds were evaluated against the MCF-7 and SKBR3 cell lines (breast cancer) using the MTT method. It was found that the compounds IV, V, VI and VII were active and present cytotoxic activity against the MCF-7 and SKBR3 cell lines, while compound III showed activity only against the SKBR3 cell line. Additionally, we performed the hemisynthesis of various derivatives from caracasine acid isolated from *Croton micans*. These derivatives were obtained through esters and amide forming reactions, reduction with H₂ Pd/C and NaBH₄, reactions with *m*-CPBA and nucleophilic additions. Cytotoxic, antibacterial, leishmanicidal and trypanocidal activity of these compounds was evaluated, and a preliminary analysis of the structure–activity relationship was conducted with the obtained results.

Keywords: *Croton caracasana* Pittier, diterpenes, crotofolanes, caracasine acid, hemisynthesis, cytotoxic, antibacterial, leishmanicidal, trypanocidal activity.

INDICE GENERAL

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xix
ÍNDICE DE ANEXOS	xxi
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xxv
I. INTRODUCCION	1
Capítulo I: Fitoquímica y evaluación biológica de Croton caracasana Pittier	4
I.1 FAMILIA EUPHORBIACEAE	5
I.2 GÉNERO CROTON	6
I.3 ANTECEDENTES	10
I.3.1 Diterpenos	10
I.3.1.1 Labdanos	11
I.3.1.2 Clerodanos	13
I.3.1.3 Kauranos	17
I.3.1.4 Otros diterpenos	23
I.3.1.4a Crotofolanos	23
I.3.1.4b Cembranolidos	26
I.3.2 Triterpenoides	29
I.3.3 Flavonoides	30
I.3.4 Alcaloides	33

I.3.5 Croton malambo H. Karst.	34
I.3.6 Croton cuneatus Klotz.	35
I.3.7 Croton huberi Steyerm.	37
I.3.8 Croton matourensis Aubl.	38
I.3.9 Croton micans Muell. Arg.	40
I.3.10 Croton gossypifolius Vahl.	43
I.3.11 Croton pungens Jacq.	43
I.4. Productos naturales como medicamentos contra el cáncer.	45
I.5 JUSTIFICACIÓN	50
I.6 OBJETIVOS	51
I.6.1 Objetivo general	51
I.6.2 Objetivos específicos	51
I.7 PARTE EXPERIMENTAL	52
I.8 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	54
I.8.1 Sección Fitoquímica	54
I.8.1.1 Colecta del material vegetal	54
I.8.1.2 Extracción	54
I.8.1.3 Separación de la fracción de hexano de los tallos	58
I.8.1.4 Separación de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de los tallos	58
I.8.1.5 Separación de la fracción de AcOEt de los tallos	60
I.8.1.6 Separación de la fracción de hexano de las hojas	61
I.8.1.7 Separación de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de las hojas	62
I.8.1.8 Separación de la fracción de AcOEt de las hojas	63
I.8.1.9 Características y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de Croton caracasana Pittier.	65

I.8.2 Sección Biológica	69
I.8.2.1 Evaluación de la actividad citotóxica	69
I.8.2.1a Mantenimiento de los cultivos celulares	69
I.8.2.1b Medición del efecto de los compuestos sobre la proliferación celular	69
I.8.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana.	70
I.9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
I.9.1 Estudio fitoquímico	72
I.9.1.1 Compuesto I: 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona	72
I.9.1.2 Compuesto II: Lupeol	78
I.9.1.3 Compuesto III: Crotofolin E	83
I.9.1.4 Compuesto IV: Crotoctarasin A	90
I.9.1.5 Compuesto V: Crotoctarasin B	95
I.9.1.6 Compuesto VI: Crotoctarasin C	100
I.9.1.7 Compuesto VII: Crotoctarasin D	107
1.9.2 Sección biológica	119
1.9.2.1 Evaluación de la actividad citotóxica	119
1.9.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana	121
1.10 CONCLUSIONES	123
Capítulo II: Hemisíntesis y evaluación biológica de derivados del ácido de caracasina.	126
II.1 Aspectos generales de los kauranos en las plantas	125
II.2 Síntesis y relevancia biológica de los kauranos	127
II.3 Ácido de caracasina	138
II.4 JUSTIFICACION	139
II.5 OBJETIVOS	140

II.5.1 Objetivo general	140
II.5.2 Objetivos específicos	140
II.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	141
II.6.1 Sección químico-sintética	141
II.6.1.1 Extracción del ácido de caracasina (117)	141
II.6.1.2 Reacciones sobre el ácido carboxílico	144
II.6.1.2a Hemisíntesis de ésteres del ácido de caracasina	144
II.6.1.2b Hemisíntesis de la ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9).	148
II.6.1.2c Aproximaciones de hemisíntesis del ent-3,4-seco-15-oxo-kaur-4(19),16(17)-dien-3-ol (C)	149
II.6.1.3 Reacciones sobre el doble enlace en la posición 4-19	154
II.6.1.3a Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-4,19-epoxi-kaur-16(17)-en-3-oico (II.10)	154
II.6.1.3b Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-4,19-dihidroxi-kaur-16(17)-en-3-oico (II.11).	156
II.6.1.4 Reacciones sobre el doble enlace en 16-17	157
II.6.1.4a Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.12)	157
II.6.1.5 Reacciones sobre la cetona en C-15	158
II.6.1.5a Síntesis del ácido ent-3,4-seco-15-hidroxi-kaur-4(19),16(17)-dien-3-oico (II.13).	158
II.6.1.5b Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-kaur-15-tiona-4(19),16(17)-dien-3-oico (E).	160
II.6.1.6 Reacciones sobre el sistema α , β -insaturado	162
II.6.1.6a Hemisíntesis ácido ent-3,4-seco-17-etoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14)	162
II.6.1.6b Hemisíntesis ácido ent-3,4-seco-17-ciano-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.15)	163

II.6.1.6c Síntesis del ácido ent-3,4-seco-17-bencilmercapto-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.16).	164
II.6.1.6d Síntesis del éster metílico del ácido ent-3,4-seco-17-azida-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.17) y del éster metílico del ácido ent-3,4-seco-17-metoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18)	166
II.6.1.6e Síntesis del éster metílico del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-17-(1''-dietilfosfonato-1''-ciano)metil-kaur-4(19)-en-3-oico (II.19)	169
II.6.2 Sección Biológica	172
II.6.2.1 Evaluación de la actividad citotóxica	173
II.6.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana	177
II.6.2.3 Evaluación de la actividad leishmanicida	181
II.6.2.4 Evaluación de la actividad tripanocida	183
II.7 PARTE EXPERIMENTAL	186
II.7.1 Generalidades	186
II.7.2 Aislamiento y purificación del ácido de caracasina (II.2)	189
II.7.3 Síntesis del metil éster del ácido de caracasina (II.2).	190
II.7.4 Síntesis del etil éster del ácido de caracasina (II.3).	191
II.7.5 Síntesis del propil éster del ácido de caracasina (II.4).	192
II.7.6 Síntesis del butil éster del ácido de caracasina (II.5).	193
II.7.7 Síntesis del isopropil éster de ácido de caracasina (II.6).	194
II.7.8 Síntesis del ciclohexil éster del ácido de caracasina (II.7).	195
II.7.9 Síntesis del bencil éster del ácido de caracasina (II.8).	196
II.7.10 Síntesis de la ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9).	198
II.7.11 Síntesis del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-4.19-epoxi-kaur-16(17)-en-3-oico (II.10).	199
II.7.12 Síntesis del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-4.19-dihidroxi-kaur-	200

16(17)-en-3-oico (II.11).	
II.7.13 Síntesis del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.12).	201
II.7.14 Síntesis del ácido ent—3,4-seco-15-hidroxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.13).	202
II.7.15 Síntesis del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-etoxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14).	203
II.7.16 Síntesis del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-ciano-kaur-4(19)-en-3-oico (II.15).	205
II.7.17 Síntesis del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-bencilmercapto-kaur-4(19)-en-3-oico (II.16).	206
II.7.18 Síntesis del éster metílico del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-azida-kaur-4(19)-en-3-oico (II.17).	207
II.7.19 Síntesis del Éster metílico del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-metoxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18).	208
II.7.20 Síntesis del éster metílico del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-(1''-dietilfosfonato-1''-ciano)metil-kaur-4(19)-en-3-oico (II.19).	209
II.8 CONCLUSIONES	211
II.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	214
II.10 ANEXOS	230

INDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Fotos de especies Croton	7
Figura 2. Látex en la especie Croton lechleri	8
Figura 3. Imágenes de la planta Croton caracasana Pittier.	54
Figura 4: Estructura del compuesto I	72
Figura 5: Espectro de masas del compuesto I	73
Figura 6: Espectro de RMN ^1H del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz)	74
Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto I (CDCl_3 , 67.5 MHz)	75
Figura 8: Espectro DEPT-135 del compuesto I (CDCl_3 , 67.5 MHz)	75
Figura 9: Estructura del compuesto II	78
Figura 10: Espectro de RMN ^1H del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz)	79
Figura 11: Espectros de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II (CDCl_3 , 67.5 MHz)	80
Figura 12: Estructura del compuesto III	83
Figura 13: Espectro de masas del compuesto III	83
Figura 14: Espectro IR del compuesto III	84
Figura 15: Espectro de RMN ^1H del compuesto III (MeOD, 270 MHz).	85
Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto III (MeOD, 67.5 MHz).	86
Figura 17: Diagrama ORTEP del compuesto III.	88
Figura 18: Estructura del compuesto IV	90
Figura 19: Espectro de masas del compuesto IV	90
Figura 20: Espectro IR del compuesto IV	91
Figura 21: Espectro de RMN ^1H del compuesto IV (CDCl_3 , 270 MHz).	92

Figura 22: Espectro HETCOR del compuesto IV (CDCl ₃ , 67.5 MHz).	92
Figura 23: Espectro de RMN ¹³ C y DEPT-135 del compuesto IV (CDCl ₃ , 67.5 MHz).	93
Figura 24: Estructura del compuesto V	95
Figura 25: Espectro de masas del compuesto V	95
Figura 26: Espectro de masas del compuesto V	96
Figura 27: Espectro de RMN ¹ H del compuesto V (CDCl ₃ , 270 MHz).	97
Figura 28: Espectro de RMN ¹³ C del compuesto V (CDCl ₃ , 67.5 MHz).	98
Figura 29: Espectro DEPT-135 del compuesto V (CDCl ₃ , 67.5 MHz).	98
Figura 30: Estructura del compuesto VI	100
Figura 31: Espectro de masas del compuesto VI.	100
Figura 32: Espectro de RMN ¹ H del compuesto VI (CDCl ₃ , 270 MHz).	101
Figura 33: Espectro de RMN ¹³ C y DEPT-135 del compuesto VI (CDCl ₃ , 67.5 MHz).	102
Figura 34: Espectro IR del compuesto VI	103
Figura 35: Diagrama ORTEP del compuesto VI	105
Figura 36: Estructura del compuesto VII	107
Figura 37: Espectro de masas del compuesto VI.	107
Figura 38: Espectro de RMN ¹ H del compuesto VII (CDCl ₃ , 270 MHz).	108
Figura 39: Comparación de los espectros de RMN ¹ H de los compuestos VI y VII	109
Figura 40: Espectro de RMN ¹³ C y DEPT-135 del compuesto VII (CDCl ₃ , 67.5 MHz).	110
Figura 41: Comparación de los espectros de RMN ¹³ C de los compuestos VI y VII	111
Figura 42: Biogénesis de los crotofolanos	112

Figura 43: Estructuras optimizadas de los diastereoisómeros obtenidas usando cálculos de química cuántica CAM-B3LYP/6-31+G(d,p).	113
Figura 44: Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C teóricos de D1 Vs. Experimentales	116
Figure 45. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C teóricos de D2 Vs. Experimentales	116
Figure 46. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C teóricos de D3 Vs. Experimentales	116
Capítulo II	
Figura 47. Esqueleto de un diterpeno tipo ent-kaurano	125
Figura 48. Biosíntesis de diterpenos	126
Figura 49: Derivados del ácido kaurenico (170).	136
Figura 50: Mecanismo de la reacción de Fischer	145
Figura 51: Mecanismo de la formación de amidas a partir de ácidos carboxílicos empleando EDC.	148
Figura 52: Mecanismo de la reacción de epoxidación de dobles enlaces con perácidos.	155
Figura 53: Mecanismo de la reacción de abertura de epóxidos	156
Figura 54: Reactivo de Lawesson	160
Figura 55: Mecanismo de adición nucleofílica 1,4.	162
Figura 55: Estructura del compuesto F	169
Figura 56: Estructura del ácido de caracasina y derivados sintetizados	172

INDICE DE TABLAS

Capítulo I

Tabla I: Datos de RMN ^1H del compuesto I y comparación con los datos reportados en la literatura.	76
Tabla II: Datos de RMN ^{13}C del compuesto I y comparación con los datos reportados en la literatura.	77
Tabla III: Datos de RMN ^{13}C del compuesto II y comparación con los datos reportados en la literatura.	81
Tabla IV: Datos de RMN ^1H del compuesto II y comparación con los datos reportados en la literatura.	82
Tabla V: Datos de RMN ^{13}C , RMN ^1H del compuesto III y comparación con los datos reportados para crotofolin E.	87
Tabla VI: Datos cristalográficos del compuesto III	88
Tabla VII: Datos de RMN ^{13}C y RMN ^1H del compuesto IV.	94
Tabla VIII: Datos de RMN ^{13}C , RMN ^1H , DEPT-135 y HETCOR del compuesto V.	99
Tabla IX: Datos de RMN ^{13}C , RMN ^1H , DEPT-135 y FLOCK del compuesto VI.	104
Tabla X: Datos cristalográficos del compuesto VI	105
Tabla XI. Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C experimentales del compuesto VII con los desplazamientos teóricos obtenidos por cálculos GIAO/CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) para los diastereoisómeros D1, D2 y D3.	114
Tabla XII. Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H experimentales del compuesto VII con los desplazamientos teóricos obtenidos por cálculos GIAO/CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) para los diastereoisómeros D1, D2 y D3.	115
Tabla XIII: Datos de RMN ^{13}C , ^1H , DEPT 135, HETCOR y FLOCK del compuesto VII y comparación con los datos de RMN ^{13}C del compuesto VI.	118

Tabla XIV: Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE de los compuestos III, IV, V, VI y VII sobre las líneas celulares MCF-7, SKBR3 y fibroblastos.	119
Tabla XV: Índice de selectividad de los compuestos III, IV, V, VI y VII.	120
Tabla XVI. Actividad antibacteriana de los compuestos I, III, IV, V, VI, y VII expresada como diámetros del halo de inhibición (mm).	121
Capítulo II	
Tabla XVII: Valores de CI_{50} (μM) de los compuestos 169-172.	133
Tabla XVIII. Datos de RMN ^{13}C y ^1H para el ácido de caracasina (117)	143
Tabla XIX: Características de los ésteres sintetizados.	145
Tabla XX: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre la línea celular MCF-7 y sobre cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.	173
Tabla XXI: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre la línea celular PC3 y sobre cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.	174
Tabla XXII: Valores de diámetros del halo de inhibición (mm) de los derivados del ácido de caracasina sobre diversos microorganismos utilizando el método de difusión sobre placas de agar.	178
Tabla XXIII: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y en cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.	181
Tabla XXIV: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y en cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.	184

INDICE DE ESQUEMAS

Capítulo I

Esquema 1. Proceso de extracción de los tallos de Croton caracasana Pittier	56
Esquema 2. Proceso de extracción de las hojas de Croton caracasana Pittier	57
Esquema 3. Separación y purificación de la fracción de hexano de los tallos de Croton caracasana.	58
Esquema 4. Separación y purificación de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de los tallos de Croton caracasana.	60
Esquema 5. Separación y purificación de la fracción de AcOEt de los tallos de Croton caracasana.	61
Esquema 6. Separación y purificación de la fracción de hexano de las hojas de Croton caracasana.	62
Esquema 7. Separación y purificación de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de las hojas de Croton caracasana.	63
Esquema 8. Separación y purificación de la fracción de AcOEt de las hojas de Croton caracasana.	64

Capítulo II

Esquema 9: Hemisíntesis de ésteres	144
Esquema 10: Hemisíntesis de la ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9)	147
Esquema 11: Hemisíntesis del compuesto A (método 1).	147
Esquema 12: Hemisíntesis del compuesto A (método 2).	148
Esquema 13: Aproximación 1 de hemisíntesis del compuesto C.	149
Esquema 14: Aproximación 2 de hemisíntesis del compuesto C.	151
Esquema 15: Aproximación de hemisíntesis del compuesto D.	153
Esquema 16: Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-4,19-epoxi-kaur-16(17)-en-3-oico (10) y del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-4,19-	154

dihidroxi-kaur-16(17)-en-3-oico (II.11).	
Esquema 17: Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.12)	157
Esquema 18: Hemisíntesis del ácido 15-hidroxi-3,4-seco-ent-kaur-4,16-dien-3-oico (II.13)	158
Esquema 19: Hemisíntesis de los compuestos II.12 y II.13 por reducción del ácido de caracasina con LiAlH_4 .	159
Esquema 20: Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-kaur-15-tiona-4(19),16(17)-dien-3-oico (E).	160
Esquema 21: Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-17-etoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14)	162
Esquema 22: Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-17-ciano-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.15)	163
Esquema 23: Hemisíntesis del ácido ent-3,4-seco-17-bencilmercapto-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.16).	164
Esquema 24: Hemisíntesis del éster metílico del ácido ent-3,4-seco-17-azida-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.17) y del éster metílico del ácido ent-3,4-seco-17-metoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18).	166
Esquema 25: Hemisíntesis del compuesto II.19.	169

ÍNDICE DE ANEXOS

Capítulo I

Anexo 1: Espectro de IR Compuesto I	231
Anexo 2: Espectro HETCOR del Compuesto I (CDCl ₃ , 270 MHz).	232
Anexo 3: Espectro HETCOR del compuesto III (MeOD, 270 MHz).	233
Anexo 4: Espectro FLOCK del compuesto III (MeOD, 270 MHz).	234
Anexo 5: Espectro HETCOR del compuesto IV (CDCl ₃ , 270 MHz).	235
Anexo 6: Espectro FLOCK del compuesto IV (CDCl ₃ , 270 MHz).	236
Anexo 7: Espectro HETCOR del compuesto V (CDCl ₃ , 270 MHz).	237
Anexo 8: Espectro HETCOR del compuesto VI (CDCl ₃ , 270 MHz).	238
Anexo 9: Espectro FLOCK del compuesto VI (CDCl ₃ , 270 MHz).	239
Anexo 10: Espectro HETCOR del compuesto VII (CDCl ₃ , 270 MHz).	240
Anexo 11: Espectro FLOCK del compuesto VII (CDCl ₃ , 270 MHz).	241

Capítulo II

Anexo 12: Espectro IR del compuesto 117	242
Anexo 13: Espectro de masas del compuesto 117	243
Anexo 14: Espectro de RMN ¹ H del compuesto 117 (CDCl ₃ , 270 MHz)	244
Anexo 15: Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 117 (CDCl ₃ , 67.5 MHz)	245
Anexo 16: Espectro DEPT-135 del compuesto 117 (CDCl ₃ , 67.5 MHz)	246
Anexo 17: Espectro IR del compuesto II.2	247
Anexo 18: Espectro de masas del compuesto II.2	248
Anexo 19: Espectro de RMN ¹ H del compuesto II.2 (CDCl ₃ , 270 MHz)	249
Anexo 20: Espectro de RMN ¹³ C y DEPT-135 del compuesto II.2 (CDCl ₃ , 67.5 MHz)	250

Anexo 21: Espectro de masas del compuesto II.3	251
Anexo 22: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.3 (CDCl_3 , 270 MHz)	252
Anexo 23: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.3 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	253
Anexo 24: Espectro de masas del compuesto II.4	254
Anexo 25: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.4 (CDCl_3 , 270 MHz)	255
Anexo 26: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.4 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	256
Anexo 27: Espectro de masas del compuesto II.5	257
Anexo 28: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.5 (CDCl_3 , 400 MHz)	258
Anexo 29: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.5 (CDCl_3 , 100 MHz)	259
Anexo 30: Espectro de masas del compuesto II.6	260
Anexo 31: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.6 (CDCl_3 , 270 MHz)	261
Anexo 32: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.6 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	262
Anexo 33: Espectro DEPT-135 del compuesto II.6 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	263
Anexo 34: Espectro de masas del compuesto II.7	264
Anexo 35: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.7 (CDCl_3 , 270 MHz)	265
Anexo 36: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.7 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	266
Anexo 37: Espectro DEPT-135 del compuesto II.7 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	267
Anexo 38: Espectro de masas del compuesto II.8	268
Anexo 39: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.8 (CDCl_3 , 270 MHz)	269
Anexo 40: Espectro del RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.8 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	270
Anexo 41: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.9 (CDCl_3 , 270 MHz)	271
Anexo 42: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.9 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	272

Anexo 43: Espectro IR del compuesto II.10	273
Anexo 44: Espectro de masas del compuesto II.10	274
Anexo 45: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.10 (CDCl_3 , 270 MHz)	275
Anexo 46: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.10 (CDCl_3 , 67.5MHz)	276
Anexo 47: Espectro DEPT-135 del compuesto II.10 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	277
Anexo 48: Espectro de masas del compuesto II.11	278
Anexo 49: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.11 (MeOD, 270 MHz)	279
Anexo 50: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.11 (MeOD, 67.5 MHz)	280
Anexo 51: Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.11 (MeOD, 67.5 MHz)	281
Anexo 52: Espectro IR del compuesto II.12	282
Anexo 53: Espectro de masas del compuesto II.12	283
Anexo 54: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.12 (CDCl_3 , 400 MHz)	284
Anexo 55: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.12 (CDCl_3 , 100 MHz)	285
Anexo 56: Espectro DEPT-135 del compuesto II.12 (CDCl_3 , 100 MHz)	286
Anexo 57: Espectro IR del compuesto II.13	287
Anexo 58: Espectro de masas del compuesto II.13	288
Anexo 59: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.13 (CDCl_3 , 270 MHz)	289
Anexo 60: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.13 (CDCl_3 , 67.5MHz)	290
Anexo 61: Espectro DEPT-135 del compuesto II.13 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	291
Anexo 62: Espectro de masas del compuesto II.14	292
Anexo 63: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.14 (CDCl_3 , 270 MHz)	293
Anexo 64: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.14 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	294
Anexo 65: Anexo 65: Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.14 (CDCl_3 , 67.5 MHz).	295

Anexo 66: Espectro de masas del compuesto II.15	296
Anexo 67: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.15 (CDCl_3 , 400 MHz)	297
Anexo 68: Espectro de RMN ^{13}C a campo bajo del compuesto II.15 (CDCl_3 , 100 MHz)	298
Anexo 69: Espectro de RMN ^{13}C a campo alto del compuesto II.15 (CDCl_3 , 100 MHz)	299
Anexo 70: Espectro de masas del compuesto II.16	300
Anexo 71: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.16 (CDCl_3 , 270 MHz)	301
Anexo 72: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.16 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	302
Anexo 73: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.17 (CDCl_3 , 270 MHz)	303
Anexo 74: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.17 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	304
Anexo 75: Espectro de masas del compuesto II.18	305
Anexo 76: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.18 (CDCl_3 , 270 MHz)	306
Anexo 77: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II.18 (CDCl_3 , 67.5 MHz)	307
Anexo 78: Espectro de masas del compuesto II.19	308
Anexo 79: Espectro de RMN ^1H del compuesto II.19 (CDCl_3 , 400 MHz)	309
Anexo 80: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.19 (CDCl_3 , 100 MHz)	310
Anexo 81: Ampliación del espectro de RMN ^{13}C del compuesto II.19 (CDCl_3 , 100 MHz)	311
Anexo 82: Espectro DEPT-135 del compuesto II.19 (CDCl_3 , 100 MHz)	312

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
c	Cuarteto
°C	Grado centígrado
CCF	Cromatografía de capa fina
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
Cy	Ciclohexil
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Δ	Calor suministrado a una reacción química
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
DHP	Dihidropirano
DIBAL	Hidruro de diisobutil aluminio
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EM	Espectrometría de masas
EM-IES	Espectrometría de masas por ionización electrospray
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EtO ⁻	Etóxido
EtOH	Etanol
Equiv.	Equivalente(s)
FLOCK	Multiple Bird long Range Correlation Spectroscopy
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
H ⁺	Protones (medio ácido)
H ₂	Hidrógeno gaseoso
HCl	Ácido Clorhídrico

HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
Hex.	Hexano
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento spin-spin (Hz)
KCN	Cianuro de potasio
KH	Hidruro de potasio
LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
m	Multiplete
mCPBA	Ácido metacloroperbenzoico
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligramo
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
MHz	Megahertz
min.	Minuto(s)
μM	Micromolar
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mmol	Milimol
mm	Milímetro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
m/z	Relación masa-carga
N ₂	Nitrógeno gaseoso
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NaBH(OMe) ₃	Trimetoxiborohidruro de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaN ₃	Azida de sodio
NaOEt	Etóxido de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio

p.a.	Para análisis
Pd/C	Paladio sobre carbono
p.f.	Punto de fusión
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
p-TsOH	Ácido p-toluensulfónico
Rf	Factor de retención
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protones
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RX	Rayos X
s	Singlete
sa	Singlete ancho
T	Temperatura
t	Triplete
Ta	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TMSCl	Cloruro de trimetilsilano
UV	Ultravioleta

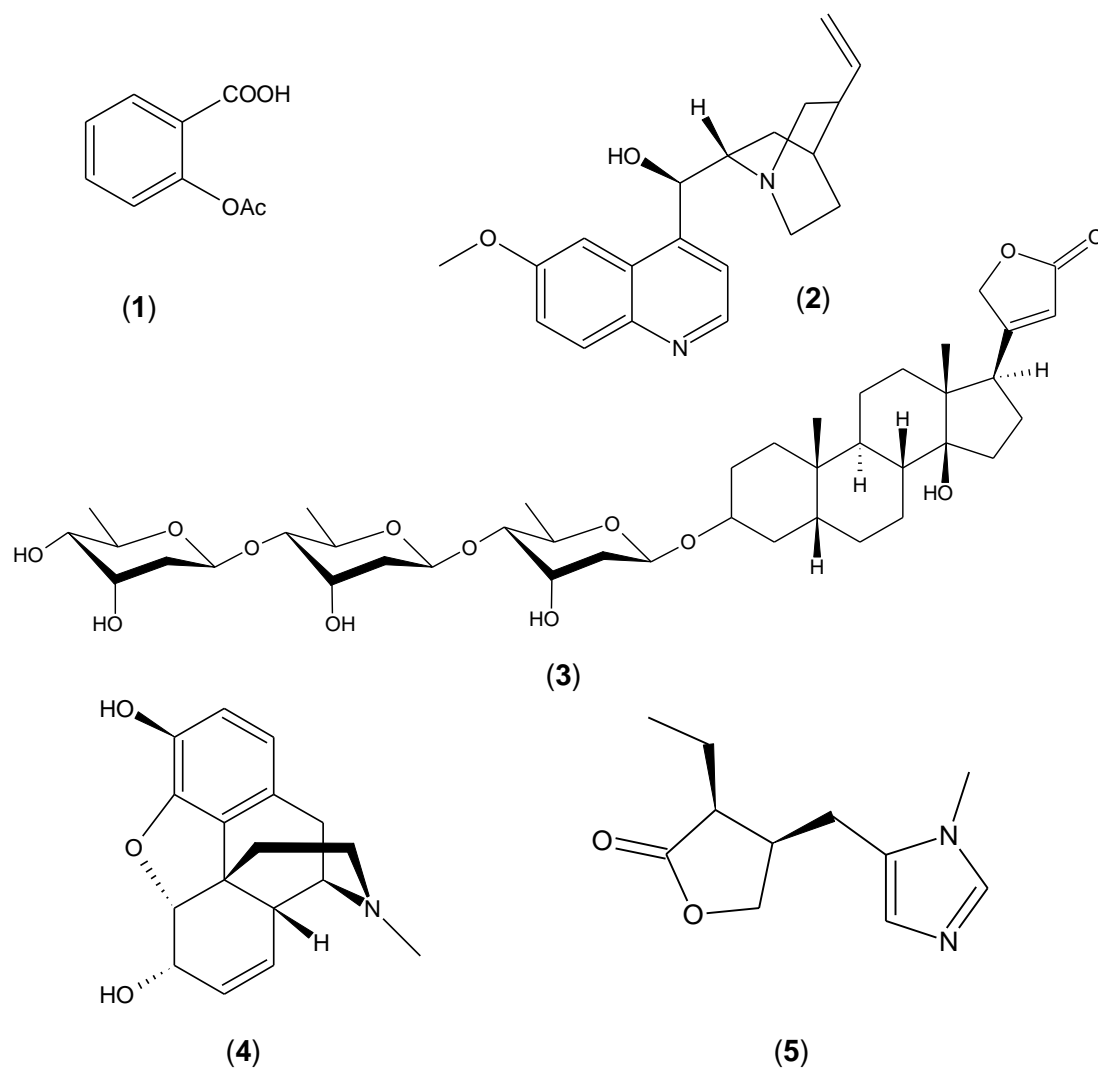
I. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales, especialmente de las plantas, se han utilizado desde hace miles de años para el tratamiento de diversas enfermedades.¹ Los medicamentos derivados de plantas han constituido la base de los sistemas de medicina tradicional que han sido utilizados durante siglos en muchos países como Egipto, China e India.²

En la actualidad, estos métodos basados en el uso de plantas siguen desempeñando un papel esencial en el tratamiento de diversas enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud,³ se estima que en muchos países desarrollados una gran proporción de la población hace uso de las prácticas tradicionales para tratar los problemas de salud, especialmente el uso de plantas medicinales.

Se calcula que en los países en vías de desarrollo, entre 65 y 80% de la población depende exclusivamente de las plantas medicinales para los cuidados básicos de salud; por ejemplo, hasta 80% de la población en África, 71% en Chile y 40% en Colombia, entre otros.⁴

Por otro lado, los estudios clínicos, farmacológicos y químicos de estas medicinas tradicionales, llevaron al descubrimiento de la mayoría de los primeros medicamentos tales como aspirina (1), quinina (2), digitoxina (3), morfina (4) y pilocarpina (5).⁵



Hoy en día, a pesar del desarrollo de la industria farmacéutica, el interés en la naturaleza como productora de agentes quimioterapéuticos potenciales continúa.⁶ Un análisis de los productos naturales como fuente de nuevos medicamentos en el período 1981-2002,⁷ indica que 16,4% de las 877 moléculas pequeñas, sintetizadas como nuevas entidades químicas, corresponden a estructuras que contienen farmacóforos derivados directamente de productos naturales. En el área de los antiinfecciosos (antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, y antivirales), cerca de 70% son de origen natural

o inspirados en ellos, mientras que en el área de tratamiento del cáncer 67% pertenecen a esta categoría.⁷

Esto nos confirma la gran importancia de los productos naturales en la búsqueda de nuevas drogas y a pesar de la intensa investigación de la flora terrestre, se estima que sólo entre 5 y 15% de las aproximadamente 250.000 especies de plantas superiores se han investigado química y farmacológicamente. El potencial de grandes áreas de bosques tropicales se mantiene prácticamente sin explotar.⁸

En el presente trabajo se muestra los resultados del estudio fitoquímico de la planta *Croton caracasana* Pittier (Euphorbiaceae) colectada en Venezuela y los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados.

Adicionalmente, se realizaron modificaciones estructurales del compuesto ácido de caracasina, aislado previamente por nuestro grupo de investigación de la planta *Croton micans* Muell. Arg. y los derivados sintéticos obtenidos fueron evaluados sobre las líneas celulares tumorales MCF-7 y PC3, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, *Leishmania mexicana* y *Tripanosoma cruzi*.

Capítulo I: Fitoquímica y evaluación biológica de *Croton caracasana* Pittier.



Capítulo I: Fitoquímica y evaluación biológica de *Croton caracasana* Pittier

I.1 Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes del reino vegetal, contiene alrededor de 8700 especies ubicadas en 320 géneros.⁹ Son plantas casi cosmopolitas, aunque se encuentran principalmente en América y África Tropical, son escasas en las regiones árticas. Las especies europeas son herbáceas, pero la mayor parte de las euforbiáceas corresponden a árboles o arbustos y algunas pocas son lianas.

Suelen tener hojas alternas y con estípulas que pueden transformarse en espinas o glándulas. Las flores, unisexuales, están reunidas en espigas, racimos o ciatos. El ovario es súpero, generalmente tricarpelar, trilobular, sincárpico; en cada una de las cavidades hay un solo óvulo anátropo con placentación axial. El fruto es una cápsula tricoca, o sea, un fruto seco que al madurar se subdivide en los tres carpelos que lo constituyen, denominado tricoco.¹⁰

La clasificación de la familia Euphorbiaceae es complicada debido al gran tamaño y la diversidad de la familia.¹¹ Según la clasificación de Webster, la familia se divide en cinco subfamilias: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae y Euphorbioideae.^{12, 13}

La característica principal de muchas de estas plantas, lo constituye la presencia de un látex que exudan cuando se cortan.

Esta familia posee una extrema diversidad botánica y química, por lo que abarca una gama de aplicaciones como: alimenticias, venenosas, medicinales, industriales, entre otras.¹⁴ Entre las especies más valiosas están *Manihot esculenta* Crantz, una de las plantas alimenticias más importantes a nivel mundial, *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch, especie ampliamente cultivada como ornamental y *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Juss.) Muell. Arg., la fuente principal del caucho natural.⁹

Las principales sustancias que contienen los ejemplares de esta familia son los triterpenos, seguidos de los flavonoides y alcaloides. Sin embargo, también se ha registrado la presencia de otros metabolitos como las cumarinas, glicósidos cianogénicos y taninos.¹⁴

Uno de los géneros importantes dentro de la familia Euphorbiaceae, es el género *Croton*, cuyas especies se reportan ampliamente usadas con propósitos medicinales.

I.2 Género *Croton*

El género *Croton* es el segundo más numeroso de la familia Euphorbiaceae comprendiendo alrededor de 1300 especies¹⁵ distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios.¹⁶

Pertenece a la subfamilia Crotonoideae,¹⁷ la cual contiene cerca de 2400 especies distribuidas en 67 géneros y 12 tribus.¹³

Este género está formado por hierbas, arbustos y árboles. Las plantas están recubiertas por pelos estrellados o escamosos, y tienen hojas enteras, dentadas, lobuladas. Sus flores son monoicas o dioicas, y están reunidas en espigas terminales o axilares. El fruto es una cápsula que se divide en cocas bivalvas, mientras que las semillas son lisas y presentan una pequeña carúncula.¹⁸

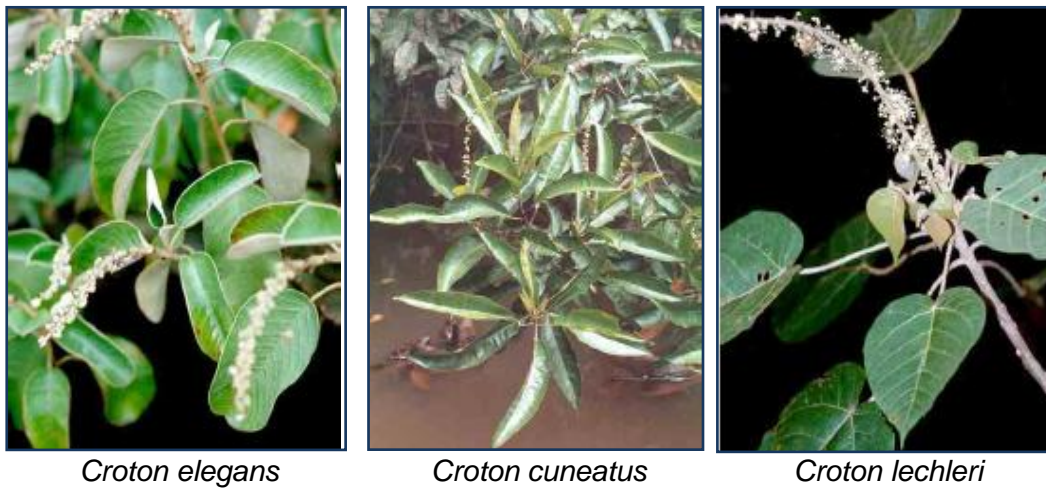


Figura 1. Fotos de especies *Croton*

Varias especies del género *Croton* tienen un gran papel en el uso tradicional de plantas medicinales en África, Asia y América del Sur. Las aplicaciones populares incluyen tratamiento del cáncer, estreñimiento, diabetes, problemas digestivos, disentería, heridas externas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, inflamación, parásitos intestinales, malaria, dolor, úlceras y pérdida de peso.¹⁶

Entre las actividades farmacológicas experimentalmente comprobadas para las especies de este género destacan su potente actividad antiinflamatoria, antiulcerogénica, antidiabética, analgésica y anticancerígena.¹⁹

Como la mayoría de las Euphorbiaceae, varias especies de *Croton*, tales como *C. lechleri* Muell. Arg., *C. palanostigma* Klotzsch, *C. draconoides* Muell. Arg. y *C. urucurana* Baillon, contienen un látex rojizo o amarillento que se obtiene al hacer cortes en la corteza¹⁶ (Figura 2). Debido a su apariencia similar a la sangre, este látex es llamado “sangre de drago”, “sangre de grado” o “sangre de dragón”²⁰ y es muy apreciado porque se considera que tiene capacidad de acelerar la cicatrización de heridas.¹⁶



Figura 2. Látex en la especie *Croton lechleri* Muell. Arg.

El látex es un remedio casero común en Perú y en otros países de América Latina, donde las tribus indígenas lo utilizan internamente y externamente para detener el sangrado, ayuda a curar heridas y tratar las enfermedades intestinales. Los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* apoyan el uso del látex viscoso, que exhibe actividad antioxidante, antiviral y antiinflamatoria, además

de ser eficaz en el tratamiento de diferentes tipos de diarrea incluyendo la que se presenta en casos de cólera.²⁰ Se reporta que el látex de algunas especies, contiene proantocianidinas y/o alcaloides tales como taspina o parte de varios compuestos similares a benzilisoquinolinas.¹⁶

La química del género *Croton* es considerablemente diversa, los terpenos son los metabolitos secundarios predominantes en el género, principalmente los diterpenoides, incluyendo los de tipo cembranoides, clerodano, neoclerodano, halimano, isopimarano, kaurano, seco-kaurano, labdano, esqueletos tipo fórbol y trachilobano. Triterpenoides pentacíclicos y esteroidales, así como alcaloides y flavonoides también han sido reportados. Algunas especies son aromáticas, debido a la presencia de aceites volátiles.¹⁶

I.3 ANTECEDENTES

A continuación se muestra una revisión de los metabolitos secundarios aislados en estudios fitoquímicos realizados en varias especies del género *Croton* a nivel mundial. Estos se muestran agrupados por tipo de esqueleto y en algunos casos se mencionan las actividades farmacológicas que han sido comprobadas para algunos de estos compuestos.

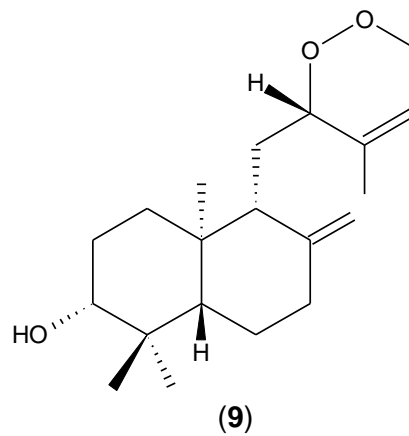
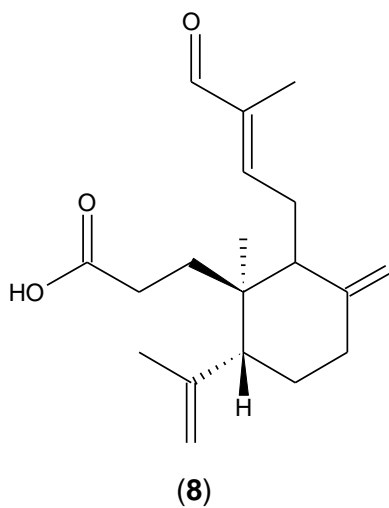
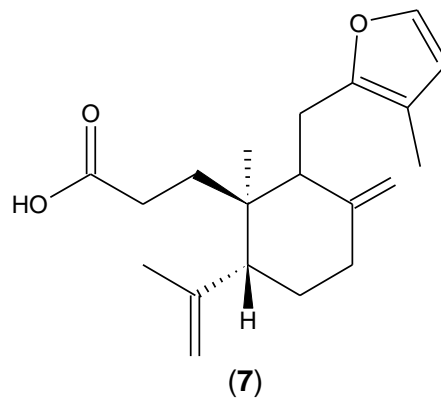
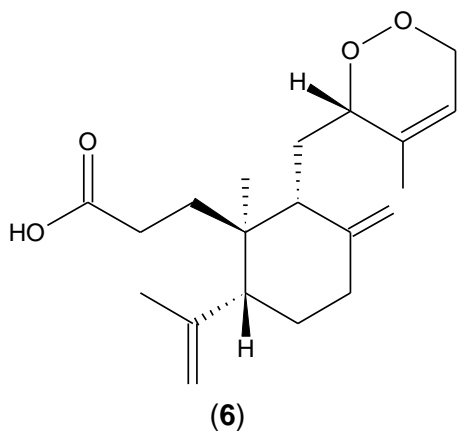
I.3.1 Diterpenos

Constituyen una extensa clase de productos naturales isoprenoides, biosintetizados por la ruta del ácido mevalónico a partir del 2*E*, 6*E*, 10*E*-geranilgeranil pirofosfato (GGPP). De acuerdo al número y a los patrones de ciclación que aparecen en su esqueleto se dividen en: acíclicos (fitano), bicíclicos (labdanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, vouacapanos, podocarpanos), tetracíclicos (trachilobanos, kauranos, afidicolanos, estemodanos, estemaranos, beyeranos, atisanos, gibberellanos), diterpenos macrocíclicos (taxanos, cembranos, dafnanos, tiglianos, ingenanos) y los compuestos mixtos. Se encuentran principalmente en plantas y hongos, aunque también se han encontrado en los organismos marinos e insectos.²¹

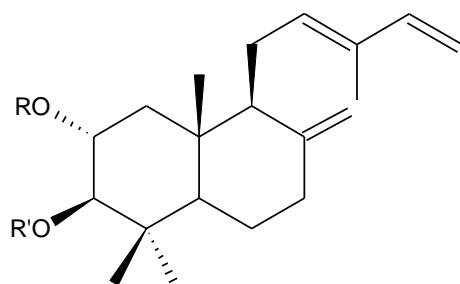
De las especies del género *Croton* estudiadas se han aislado un gran número de diterpenos bicíclicos tipo labdanos. A continuación se muestran algunos de estos compuestos.

I.3.1.1 Labdanos

Del extracto metanólico de las hojas de *Croton stipuliformis* J. Murillo, una especie colombiana, se aislaron e identificaron tres 3,4-seco-labdanos (**6-8**) y un *ent*-labdano (**9**). Estos compuestos se identificaron como ácido *ent*-3,4-seco-12,15-dioxo-4,8,13-labdatrien-3-oico (**6**), ácido *ent*-3,4-seco-12,15-epoxi-4,8,12,14-labdatetraen-3-oico (**7**), ácido 3,4-seco-15-nor-14-oxo-4,8,12(*E*)-labdatrien-3-oico (**8**) y *ent*-12,15-dioxo-8,13-labdadien-3 α -ol (**9**).²²



Del extracto de hexano de la corteza de *Croton oblongifolius* Roxb, un árbol mediano que se distribuye a lo largo de Tailandia, utilizado en la medicina tradicional como purgante y en el tratamiento de dispepsia y disentería, se aislaron tres diterpenos identificados como 2-acetoxi-3-hidroxi-labda-8(17),12(*E*),14-trien (**10**), 3-acetoxi-2-hidroxi-labda-8(17),12(*E*),14-trien (**11**) y 2,3,dihidroxi-labda-8(17),12(*E*),14-trien (**12**).²³



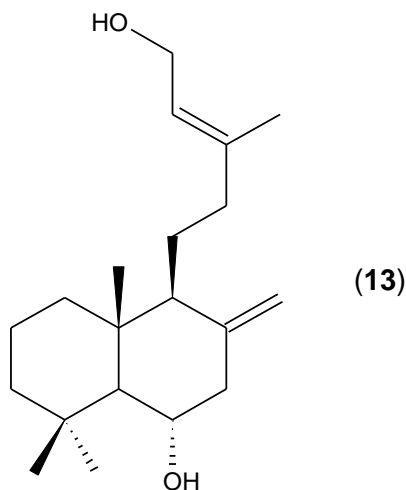
(**10**) R= Ac ; R' = H

(**11**) R= H ; R' = Ac

(**12**) R = H ; R' = H

Se ensayó la actividad citotóxica de los compuestos aislados contra las siguientes líneas celulares de cáncer: KATO-3 (carcinoma gástrico), SW620 (adenocarcinoma de colon), BT474 (carcinoma de mama), HEP-G2 (hepatoblastoma de hígado) y CHAGO (carcinoma de pulmón) obteniéndose como resultado que el compuesto **12** mostró acción citotóxica moderada contra KATO-3 (CI₅₀ 2,2 µg/mL), SW620 (CI₅₀ 2,7 µg/mL), BT474 (CI₅₀ 4,6 µg/mL), HEP-G2 (CI₅₀ 3,7 µg/mL) y CHAGO (CI₅₀ 3,3 µg/mL). Por otro lado, los compuestos **10** y **11** mostraron una débil actividad contra KATO-3 (5,7 µg/mL) y SW620 (CI₅₀ 7,1µg/mL) y KATO-3 (CI₅₀ 3,3 µg/mL) y BT474 (CI₅₀ 5,9 µg/mL), respectivamente.²³

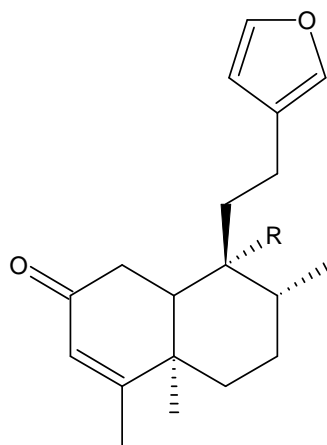
Croton zambezicus Muell. Arg. es un arbusto o árbol pequeño que se encuentra en África tropical. La decocción de las hojas se utiliza en la República de Benin como anti-hipertensivo, anti-microbiano (infecciones urinarias) y para tratar la fiebre asociada con la malaria.²⁴ De la corteza de esta especie se aisló el diterpenoide crotonadiol (**13**).²⁵



Como ya se mencionó, los diterpenos bicíclicos con esqueleto tipo clerodano son los más abundantes dentro del género *Croton*, algunos de los compuestos aislados en los estudios realizados se muestran a continuación.

I.3.1.2 Clerodanos

Del extracto de diclorometano de las raíces de la especie *Croton campestris* St. Hil, el cual es un arbusto distribuido en Brasil, llamado “velamo do campo”, y cuyas raíces son usadas en la medicina popular como un potente purgante y para tratar la sífilis, se aislaron tres furano-diterpenos llamados, velamone (**14**), velamolone (**15**) y acetato de velamolone (**16**). Estos compuestos mostraron actividad molusquicida contra *Bulinus truncatus*, uno de los caracoles acuáticos que originan la schistosomiasis.^{26, 27}

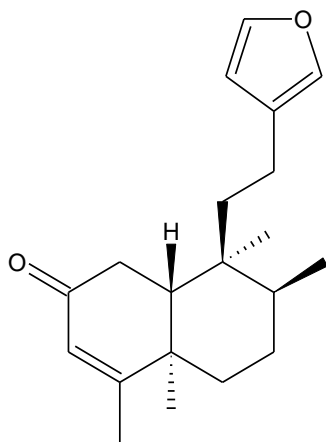


(14) R = Me

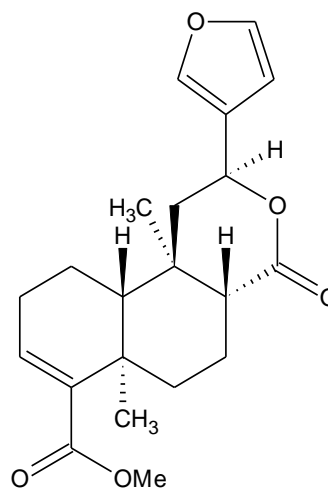
(15) R = CH₂OH

(16) R = CH₂OAc

Croton urucurana Baillon es un árbol comúnmente encontrado en la región de Dourados, MS, Brasil. Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratar heridas, reumatismo, cáncer y otras enfermedades.²⁸ De los tallos de esta planta se aislaron dos compuestos identificados como 15,16-epoxi-3,13(16)-clerodatrieno-2-ona (17) y 12-*epi*-metil-barbascoato (18).²⁹



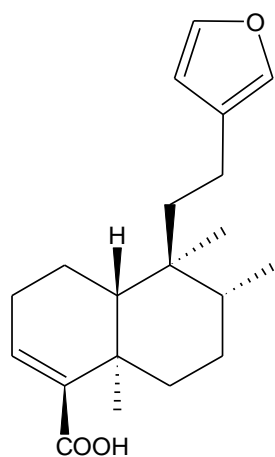
(17)



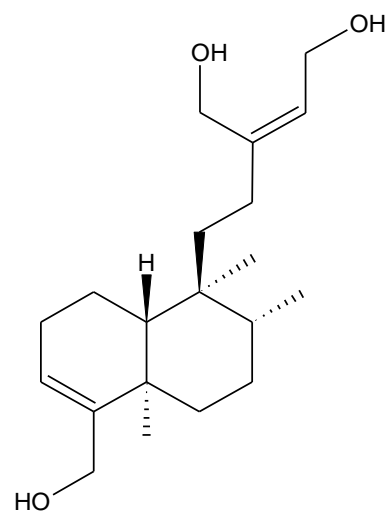
(18)

Así como otras especies de Sur América, *Croton lechleri* Muell. Arg. es conocido como “Sangre de Drago” o “Sangre de Grado” y es ampliamente usado en la medicina popular para el tratamiento de heridas, inflamación y

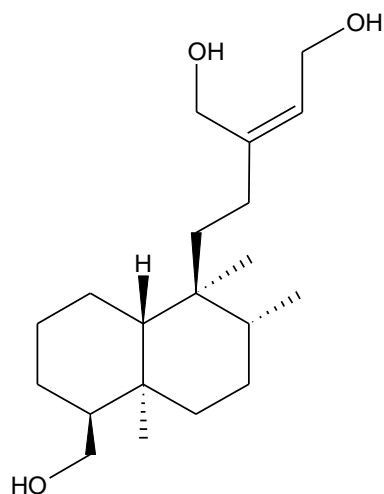
cáncer. Estudios químicos reportan que del extracto clorofórmico de esta especie, colectada en Ecuador, se aislaron cuatro diterpenoides identificados como ácido hardwíckiico (**19**), bincatriol (**20**), crolequinol (**21**) y el ácido crolequínico (**22**).³⁰



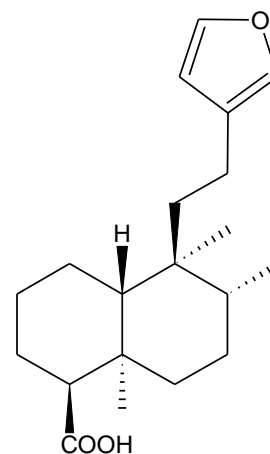
(19)



(20)



(21)

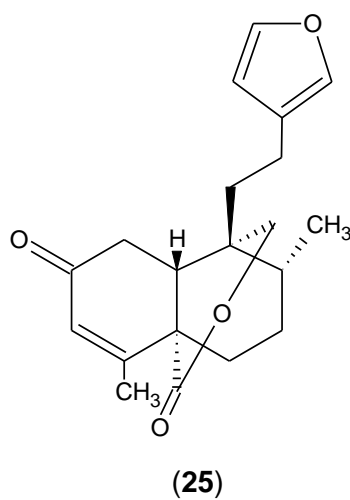
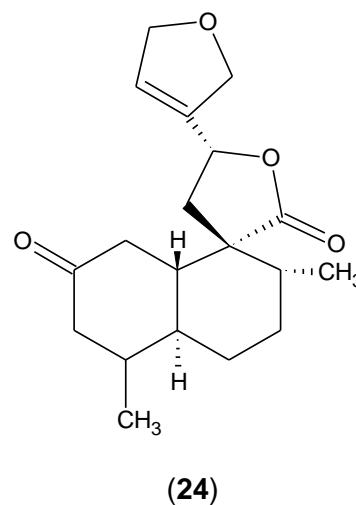
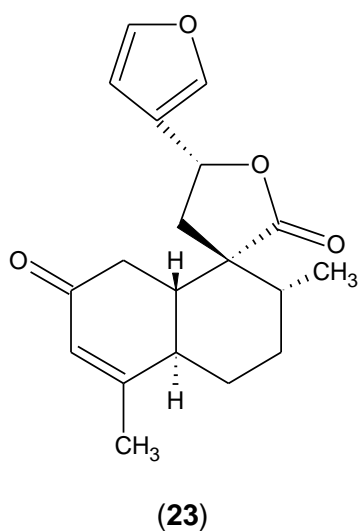


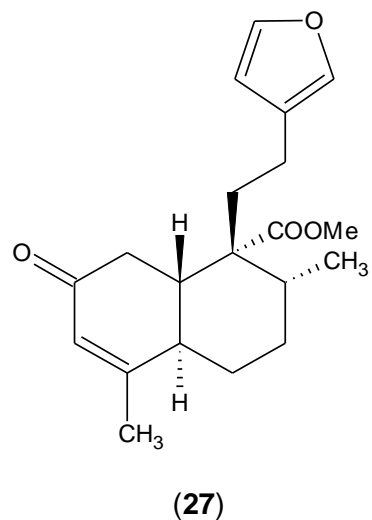
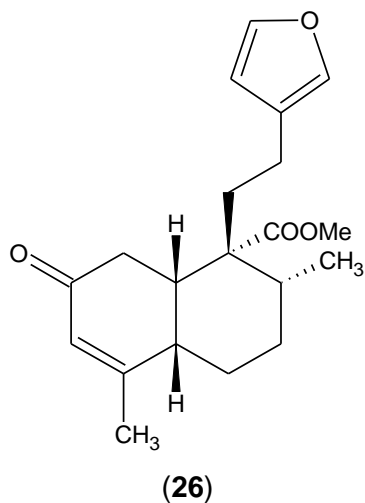
(22)

Croton cajucara Benth. es un árbol grande que crece abundantemente en la región amazónica de Brasil. Es llamado localmente como “sacaca” y es utilizado en la medicina popular para tratar desordenes hepáticos y de riñón, obesidad e

hipertensión. De la corteza del árbol se han aislado diterpenos como *trans*-dehidrocrotonina (**23**), *trans*-crotonina (**24**), sacacarina (**25**), *cis*-cajucarina B (**26**) y *trans*-cajucarina B (**27**).

Estudios llevados a cabo con el compuesto *trans*-dehidrocrotonina revelaron su amplio perfil farmacológico, que incluye actividad antiinflamatoria, citotóxica, antitumoral, hipoglicemiante, antiestrogénico y vasorelajante.³¹

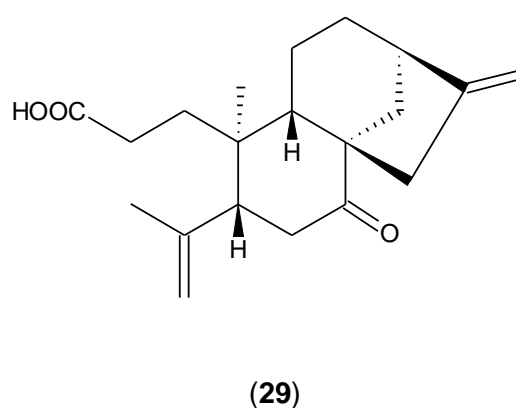
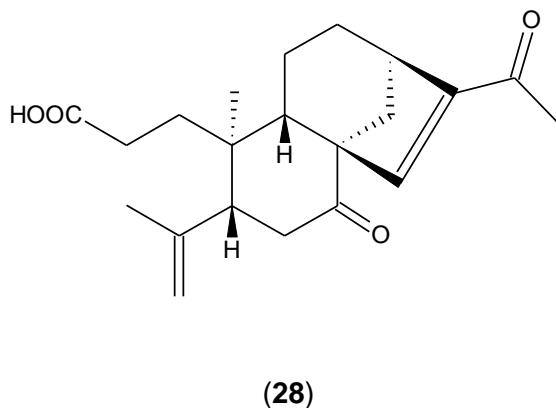




Entre los diterpenos tetracíclicos que se han aislado de especies del género *Croton* y que han resultado interesantes desde el punto de vista farmacológico se encuentran los kauranos.

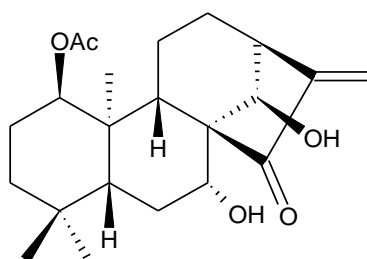
I.3.1.3 Kauranos

De la especie *Croton oblongifolius* Roxb. se aislaron dos diterpenos de tipo *ent*-3,4-*seco*-kauranos identificados como ácido *ent*-3,4-*seco*-17-oxo-kaur-4(19),15(16)-dien-3-oico (28) y ácido *ent*-3,4-*seco*-kaur-4(19),16(17)-dien-3-oico (29).³²



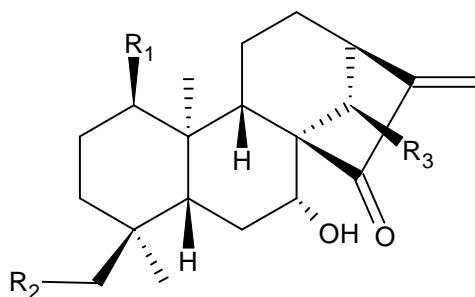
Croton tonkinensis Gagnep. es un arbusto nativo del norte de Vietnam, conocido por los vietnamitas como “kho sam Bac bo”, Sus hojas secas se usan en la medicina tradicional vietnamita para tratar quemaduras, abscesos, erupciones, dolor abdominal, dispepsia, úlceras gástricas y duodenales. Esta especie ha sido una fuente prolífica de diterpenoides tipo *ent*-kauranos.

De las hojas de esta especie se aisló el diterpeno *ent*-1 β -acetoxi-7 α ,14 β -dihidroxi-kaur-16-en-15-ona (**30**).³³



(30)

De la misma fuente se obtuvieron los siguientes *ent*-kauranos, *ent*-7 α ,14 β -dihidroxi-kaur-16-en-15-ona (**31**), *ent*-18-acetoxi-7 α -hidroxi-kaur-16-en-5-ona (**32**), *ent*-18-acetoxi-7 α ,14 β -dihidroxi-kaur-16-en-15-ona (**33**)³⁴ y *ent*-7 β -hidroxi-15-oxokaur-16-en-18-ol (**34**).³⁵



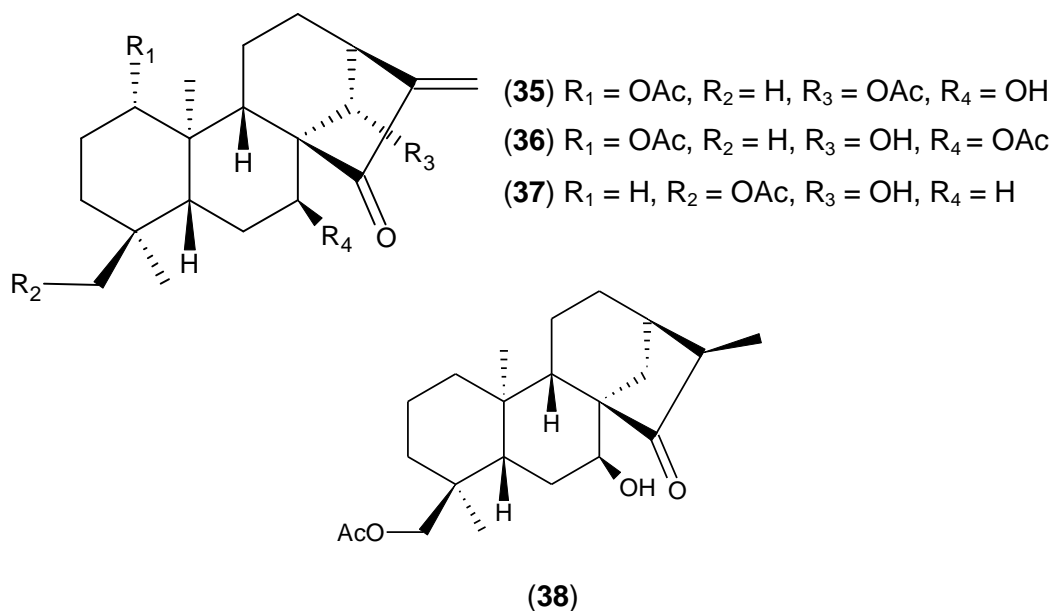
(31) R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OH

(32) R₁ = H, R₂ = OAc, R₃ = H

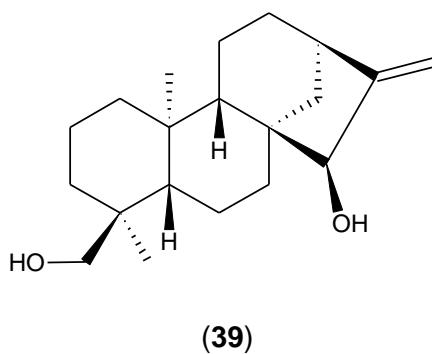
(33) R₁ = H, R₂ = OAc, R₃ = OH

(34) R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H

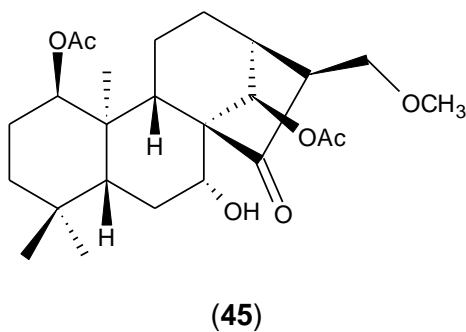
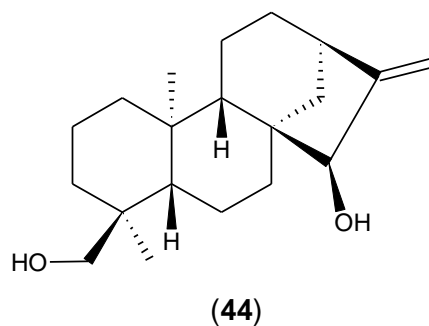
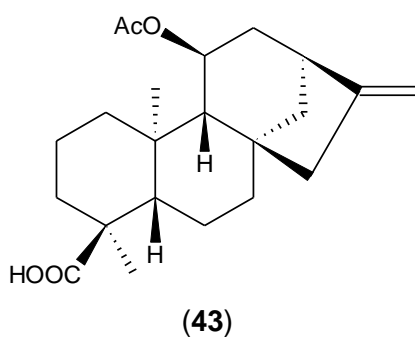
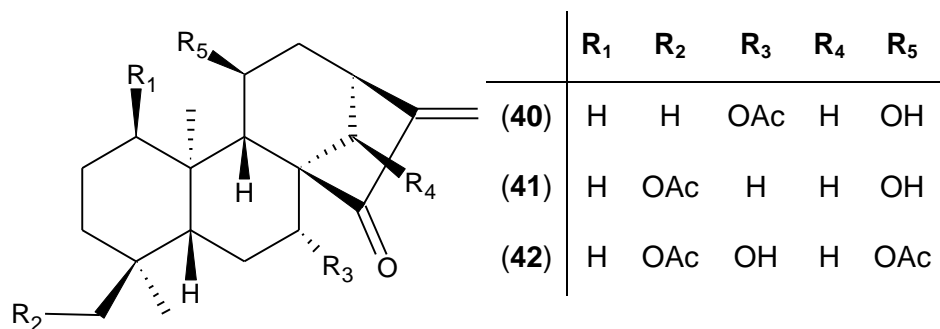
También se ha reportado el aislamiento de *ent*-1 α ,14 α -diacetoxi-7 β -hidroxikaur-16-en-15-ona (**35**), *ent*-1 α ,7 β -diacetoxi-14 α -hidroxikaur-16-en-15-ona (**36**), *ent*-18-acetoxi-14 α -hidroxikaur-16-en-15-ona (**37**) y *ent*-(16*S*)-18-acetoxi-7 β -hidroxikauran-15-ona (**38**).³⁶



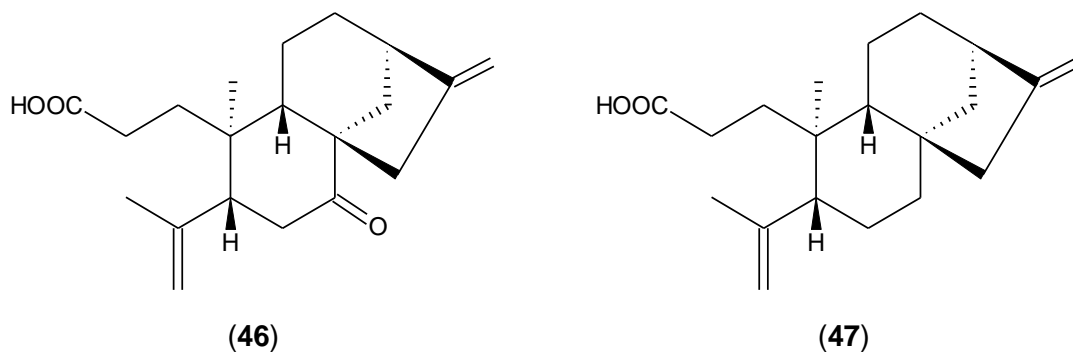
Del extracto metanólico de las hojas de esta planta se aisló el compuesto *ent*-15 β , 18-dihidroxikaur-16-en (**39**), el cual mostró una débil actividad citotóxica en artemia salina presentando un porcentaje de muertes a las 24h de 46.7% a 71.4 μ g/mL.³⁷



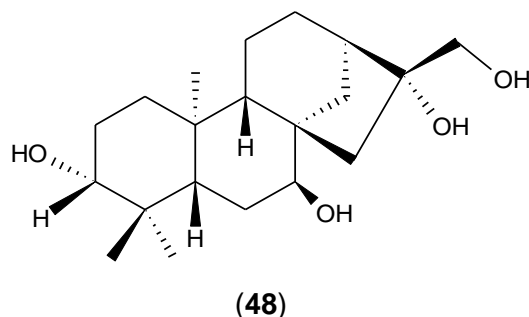
También se reporta el aislamiento de los diterpenos *ent*-7 α -acetoxi-11 β -hidroxikaur-16-en-15-ona (**40**), *ent*-18-acetoxi-11 β -hidroxikaur-16-en-15-ona (**41**), ácido *ent*-11 β -acetoxikaur-16-en-18-oico (**42**), *ent*-15 β -18-dihidroxikaur-16-en (**43**), *ent*-11 β -18-diacetoxi-7 α -hidroxikaur-16-en-15-ona (**44**) y *ent*-(16S)-1 β -14 β -diacetoxi-7 α -hidroxi-17-metoxikauran-15-ona (**45**).³⁷



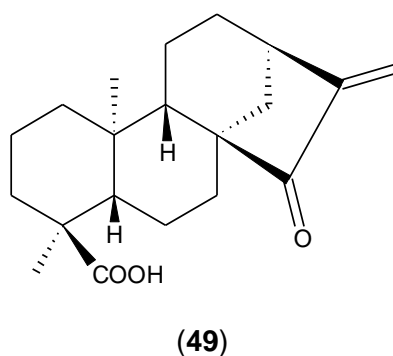
Croton geayi Leandri. es un arbusto endémico de Madagascar donde es usado en la medicina tradicional para varios propósitos, particularmente contra la malaria. La investigación fitoquímica del extracto metanólico de los tallos de esta especie resultó en el aislamiento de los diterpenos de tipo *ent*-3,4-*seco*-kauranos, geayine (**46**) y 7-deoxogeayine (**47**).³⁸



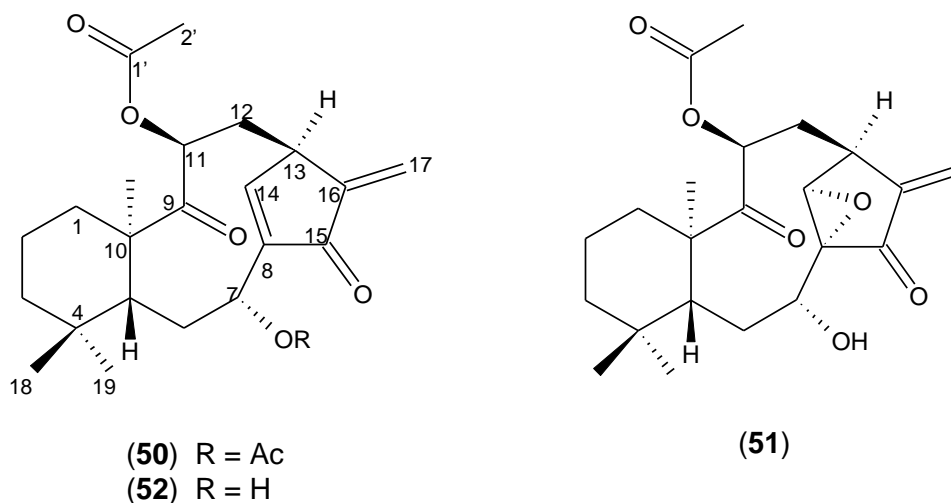
Se reporta que la raíz de *Croton zambesicus* Muell. Arg. se usa en Sudán para el dolor menstrual y como laxante, también en algunas regiones de Nigeria como antipalúdicos y antidiabéticos. La decocción de las hojas se utiliza en Benin para la fiebre, la disentería, convulsiones, como antihipertensivo y como antibiótico para las infecciones urinarias y en algunas partes como remedio contra la diabetes y la malaria. La decocción de las semillas se utiliza comúnmente para tratar la tos, la malaria y para aliviar el dolor menstrual. Del extracto metanólico de los frutos secos de esta planta se reporta el aislamiento de un diterpeno identificado como *ent*-kaurano-3 α ,16 α ,17-triol (**48**).³⁹



El compuesto ácido *ent*-15-oxo-kaur-16-*ent*-18-oico (49) aislado de *Croton argyrophilloides* Muell. Arg. exhibió potente actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer humano HCT-8, HL-60, SF-295 y MDAMB-435 con valores de Cl_{50} de 1.5 μ M, 2.0 μ M, 3.7 μ M y 4.2 μ M, respectivamente.⁴⁰



Del extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de la planta *Croton kongensis* Gagnepain se aislaron tres diterpenos tipo *ent*-8,9-*seco*-kauranos identificados como *ent*-8,9-*seco*-7 α ,11 β -diacetoxikaura-8(14),16-dien-9,15-diona (50), *ent*-8,9-*seco*-8,14-epoxi-7 α -hidroxi-11 β -acetoxi-16-kauran-9,15-diona (51) y *ent*-8,9-*seco*-7 α -hidroxi-11 β -acetoxikaura-8(14),16-dien-9,15-diona (52). Estos compuestos exhibieron actividad antimicrobacteriana a concentraciones mínimas inhibitorias de 25.0, 6.25 y 6.25 μ g/mL, respectivamente. También presentaron actividad antimalárica con valores de Cl_{50} en un intervalo de 1.0-2.8 μ g/mL.⁴¹



En otras pruebas estos *seco-ent-kauranos* demostraron citotoxicidad comparable contra la línea celular Vero (los valores de Cl_{50} oscilaron desde 0,9-3,2 $\mu\text{g/mL}$), la línea celular KB (Cl_{50} desde 1,2 a 13,8 $\mu\text{g/mL}$), y la línea celular BC (con Cl_{50} 1,1-2,2 $\mu\text{g/mL}$, excepto para el compuesto 52, que fue inactivo contra las células BC).⁴¹

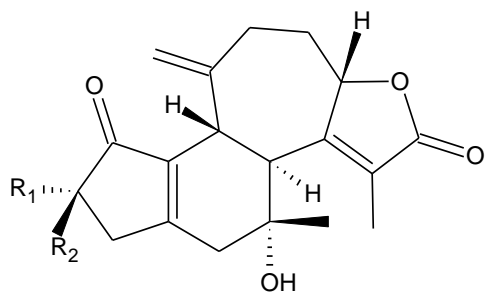
De las especies del género *Croton* también se han aislado diterpenos menos comunes como los crotofolanos y cembranolidos, entre otros.

I.3.1.4 Otros diterpenos

I.3.1.4a Crotofolanos

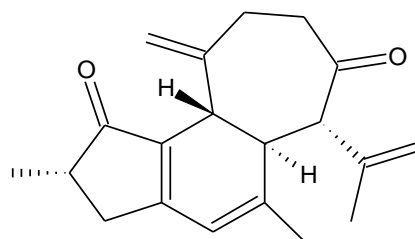
Los diterpenos tipo crotofolano tienen anillos de 5, 6 y 7 miembros fusionados y se cree que son biosintetizados desde cembrano vía latirano a través de una ciclización anular. Estos diterpenoides se han encontrado en pocas especies del género *Croton*, *C. corylifolius* Lam de Jamaica,⁴²⁻⁴³ *C. dichogamus* Pax. de Kenya,⁴⁴ *C. humanianus* J. Leonard. de la República Popular del Congo⁴⁵ y en la especie *C. cascarilloides* Räuschel.⁴⁶

De la especie *Croton corylifolius* Lam se aislaron cuatro diterpenos crotofolanos identificados como crotofolin A (**53**)⁴², B (**54**), C (**55**) y E (**56**).⁴³

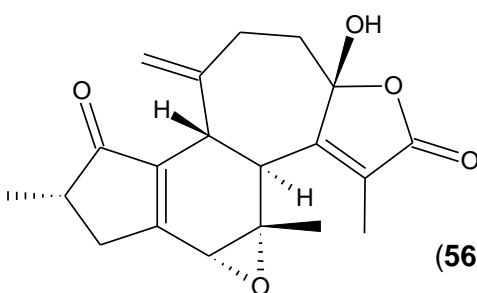


(53) $R_1 = OH$ $R_2 = CH_3$

(54) $R_1 = CH_3$ $R_2 = OH$

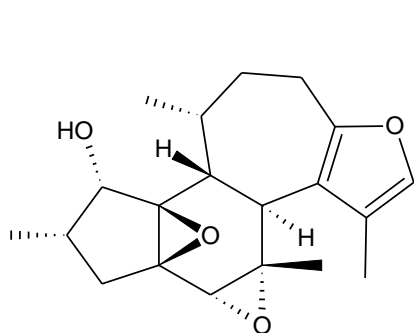


(55)

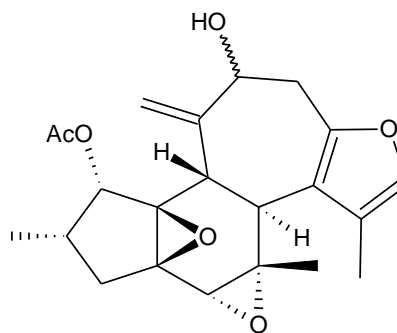


(56)

Del extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de la especie Africana *Croton dichogamus* Pax. se aislaron los compuestos crotóxidos A (**57**) y B (**58**).⁴⁴

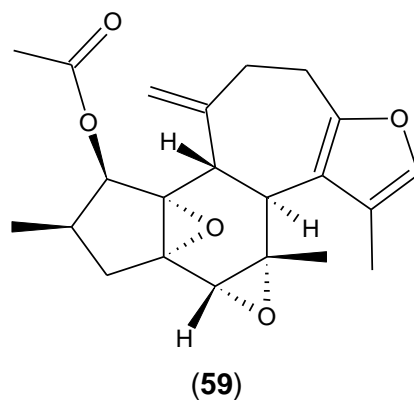


(57)

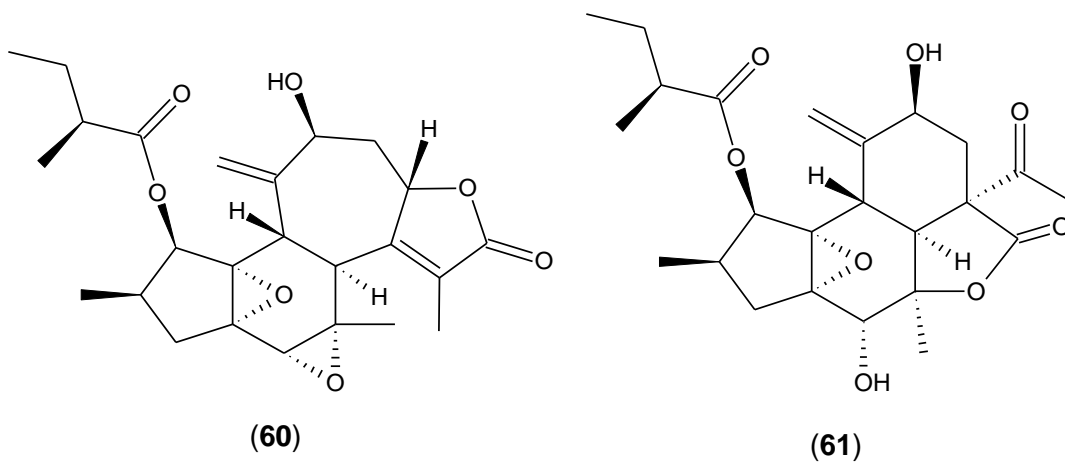


(58)

Croton haumanianus J. Leonard. es un arbusto tropical cuyas hojas y corteza se usan popularmente para tratar blenorragia, enfermedades gástricas y también como antihipertensivo y antiepiléptico. Del extracto de éter de petróleo de la corteza de esta especie se reporta el aislamiento de un diterpeno tipo crotofolano que se identificó como crotohaumanóxido (**59**).⁴⁵

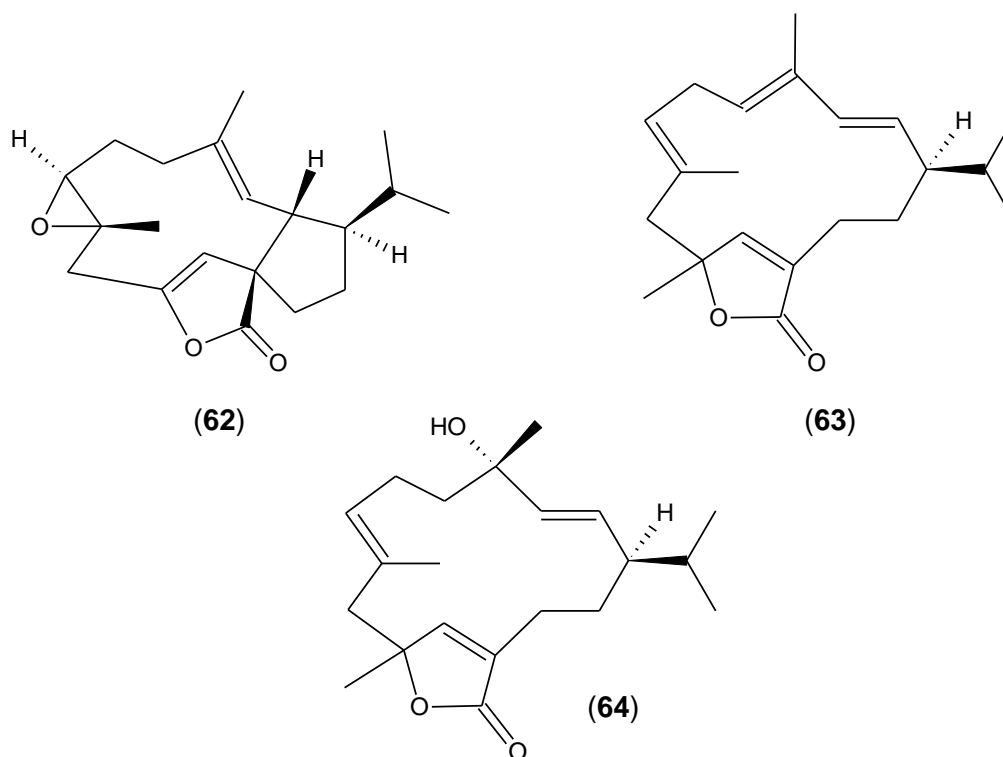


Del extracto metanólico de las ramas de *Croton cascarilloides* Rauschel colectada en las Islas Okinawa se aisló un diterpenoide de tipo crotofolano (**60**) y un nor-crotofolano rearrreglado (**61**).⁴⁶

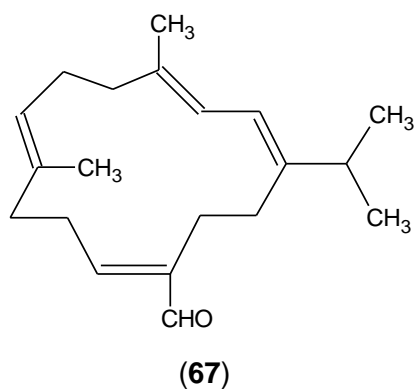
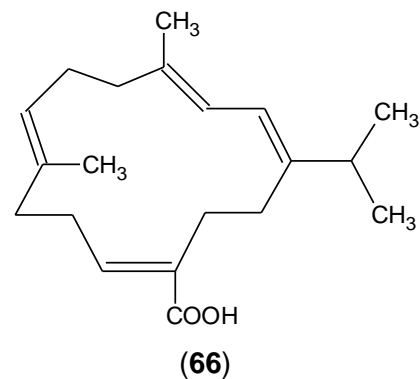
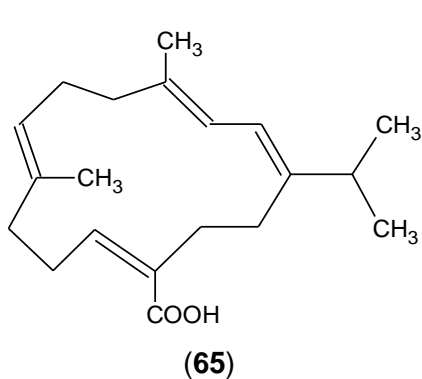


I.3.1.4b Cembranolidos

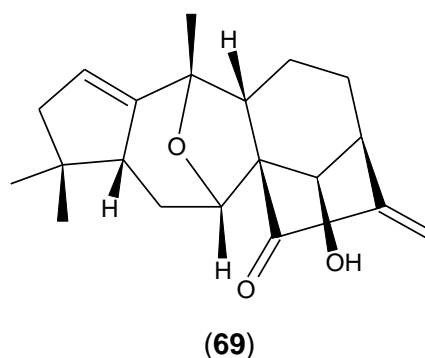
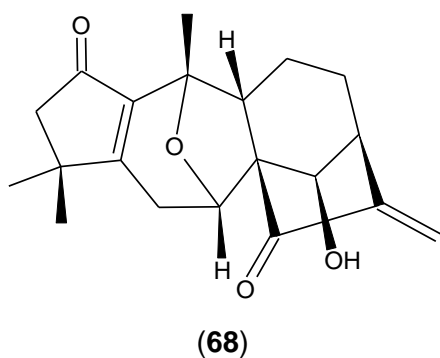
Del extracto de diclorometano de los tallos de la especie *Croton gratissimus* Burch. se aislaron cuatro cembranolidos identificados como (+)-[1*R*, 2*S*, 7*S*, 8*S*, 12*R*]-7,8-epoxi-2,12-ciclocembra-3*E*,10*Z*-dien-20,10-olido (**62**), (+)-[1*R*,10*R*]-cembra-2*E*,4*E*,7*E*,11*Z*-tetraen-20,10-olido (**63**), (+)-[1*R*, 4*S*, 10*R*]-4-hidroxicembra- 2*E*, 7*E*,11*Z*-trien-20,10-olido (**64**) y (-)-[1*R*, 4*R*, 10*R*]-4-hidroxicembra-2*E*,7*E*,11*Z*-trien-20,10-olido (**64**). Estos compuestos mostraron una actividad moderada contra las líneas celulares de cáncer de ovario PEO1 y PEO1 TaxR.⁴⁷



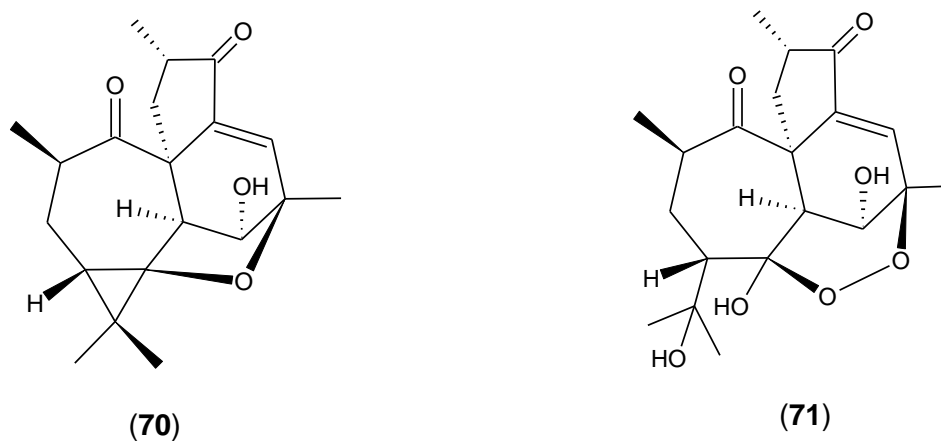
Del extracto de hexano de la corteza del árbol de *Croton oblongifolius* Roxb. se reporta el aislamiento de los compuestos ácido crotocebrenico (**65**) ácido neocrotocebrenico (**66**)⁴⁸ y el aldehído neocrotocebranal (**67**).⁴⁹



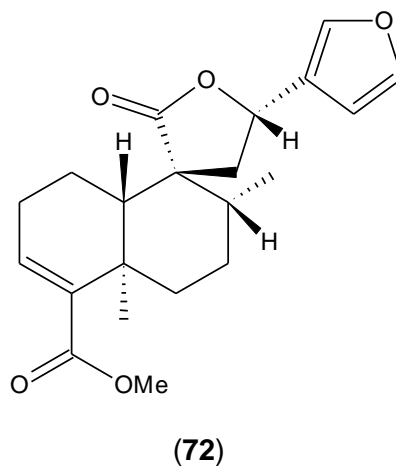
Del extracto etanólico de las hojas de la especie *Croton tonkinensis* Gagnep se aislaron dos diterpenos tipo grayanano que se identificaron como crotonkinensis A (68) y crotonkinensis B (69). Estos compuestos presentaron un potente efecto antiinflamatorio. Este tipo de diterpenos grayanano son rara vez obtenidos de fuentes naturales siendo este el primer informe de la presencia de este tipo de diterpenos en una especie *Croton* así como en la familia Euphorbiaceae.⁵⁰



Del extracto etanólico de las hojas de *Croton steenkampianus* Gerstner se aislaron dos nuevos diterpenoides identificados como steenkrotina A (**70**) y steenkrotina B (**71**). El compuesto steenkrotina A mostró moderada actividad contra *Plasmodium falciparum* a concentraciones de 9.1-15.8 μM .⁵¹



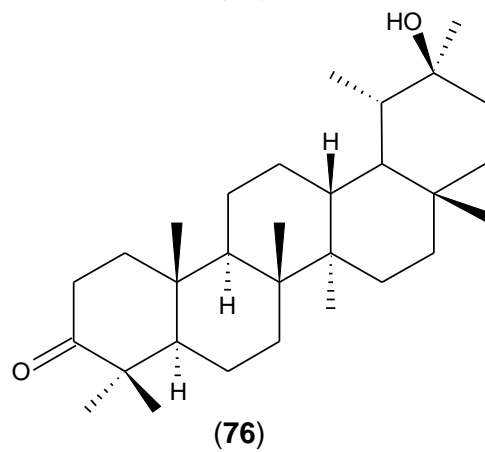
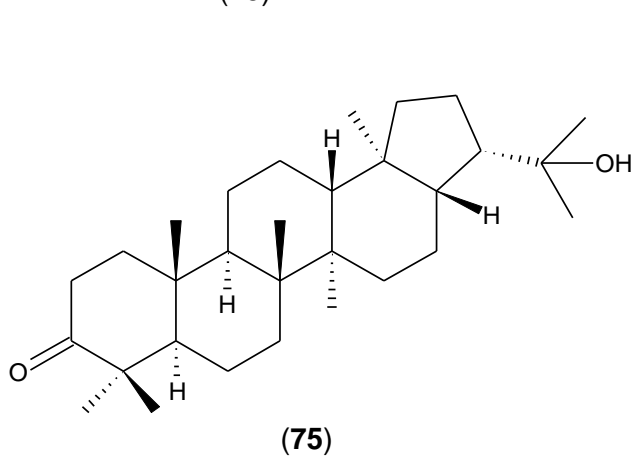
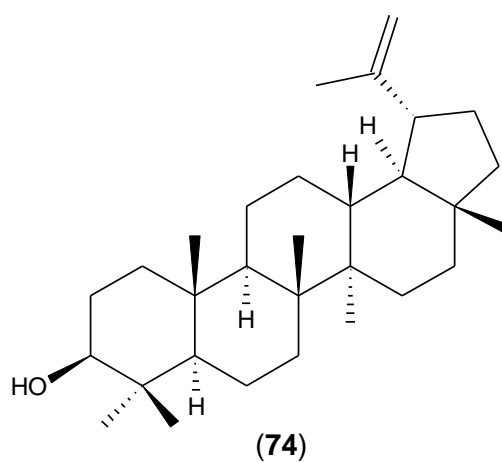
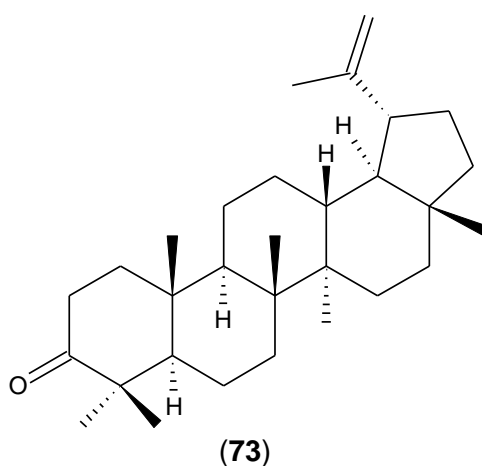
De los tallos de *Croton urucurana* Baillon se han aislado diterpenos con esqueleto tipo cleistantano como el sonderianin (**72**).²⁹

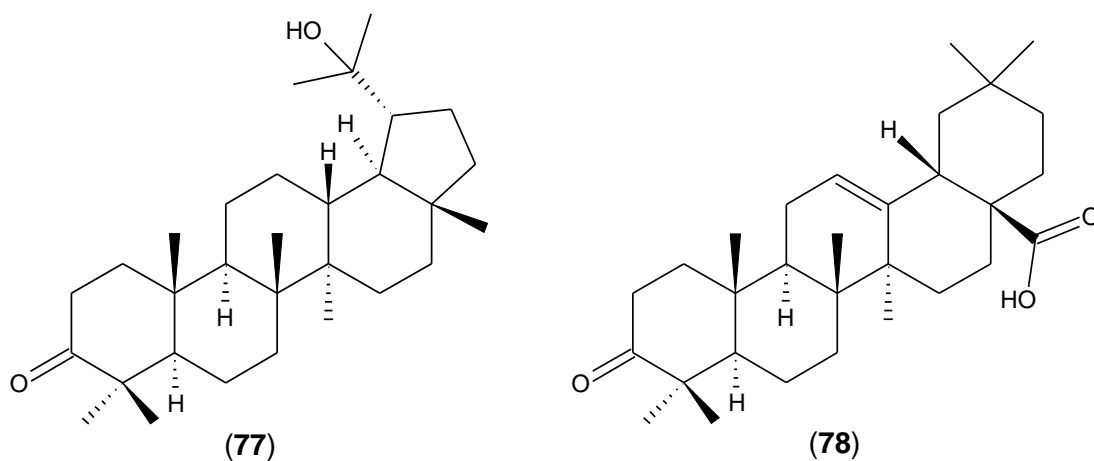


Los triterpenoides también son comunes en del género *Croton*, a continuación se muestran algunos de los compuestos dentro de esta categoría que han sido aislados en especies de este género.

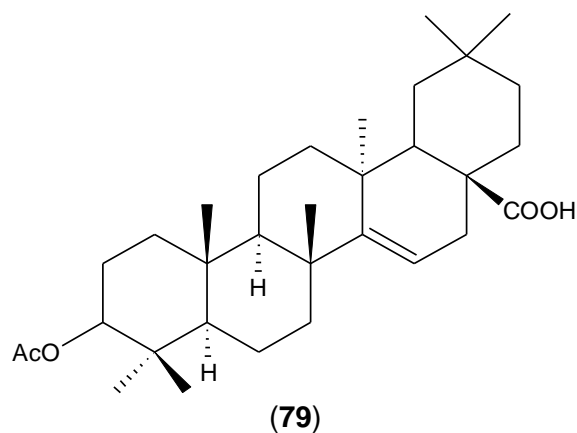
I.3.2 Triterpenoides

De las hojas de *C. betulaster* Muell. Arg., una especie del noreste de Brasil, Barbosa y colaboradores obtuvieron los triterpenos lupenona (73), lupeol (74), 3-oxo-22-hidroxihopano, 3-oxo-20- β -hidroxitaraxastano (75), 3-oxo-20-hidroxilupano (76), ácido 3-oxo-olean-12-en-28-oico (77) y ácido 3-oxo-olean-18-en-28-oico (78).⁵²





El triterpeno ácido acetil aleuritólico (**79**) se ha obtenido a partir de dos especies de *Croton* nativas de Brasil, *C. cajucara* Benth⁵³ y *C. urucurana* Baillon.²⁹

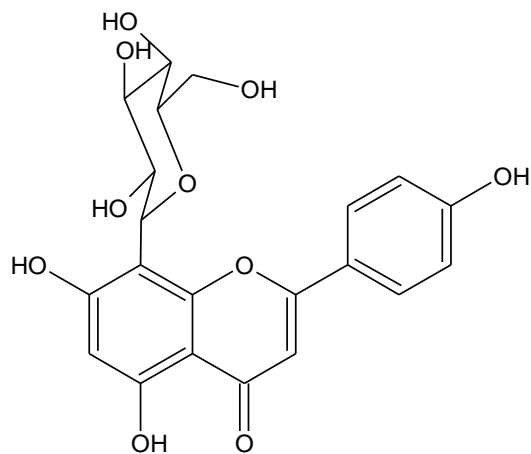


Dentro de la diversidad química del género *Croton*, los flavonoides también han sido aislados.

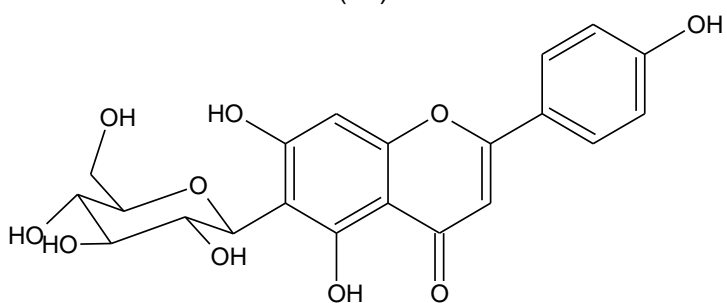
I.3.3 Flavonoides

Dos flavonas C-glucósidos vitexina (**80**) e isovitexina (**81**) fueron aisladas como las principales constituyentes del extracto metanólico de las hojas de *Croton tonkinensis* Gagnep. junto con un flavonol acilado conocido como tilirosido

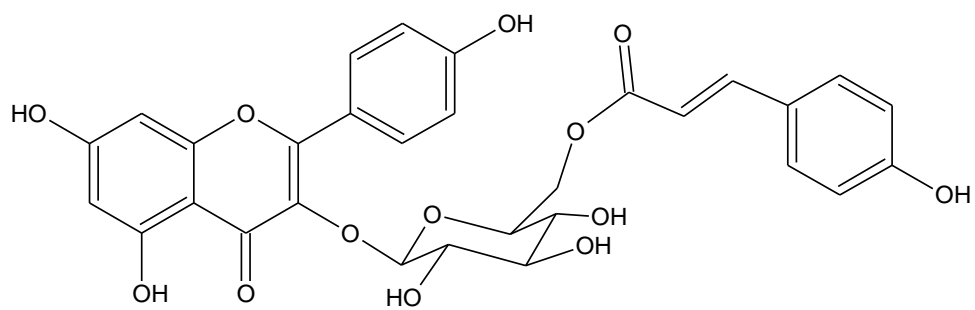
(82),⁵⁴ el cual también ha sido reportado para la especie *Croton micans* Muell. Arg.⁵⁵ y *Croton huberi* Steyerm.⁵⁶



(80)



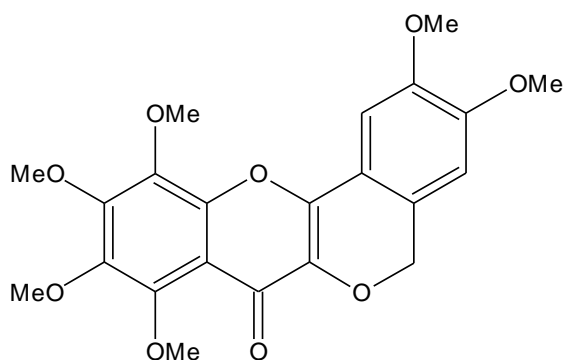
(81)



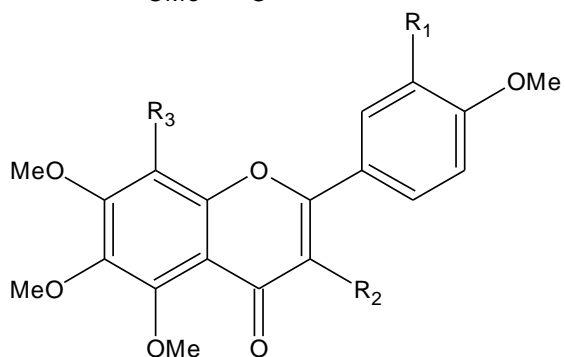
(82)

La flavona llamada crotoncudatin (83), fue aislada del extracto etanólico de los tallos de *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. junto con nueve análogos conocidos 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona (84), tangeretina (85),

nobiletina (**86**), 5,6,7,4'-tetrametoxi-flavona (**87**), sinensetina (**88**), kaempferol (**89**), tilirosido (**82**), kaempferol-3-O-rutinosido (**90**) y rutina (**91**). Los tallos y las hojas de esta planta se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, fiebre, convulsiones, la artritis reumática y entumecimiento.⁵⁷



(83)



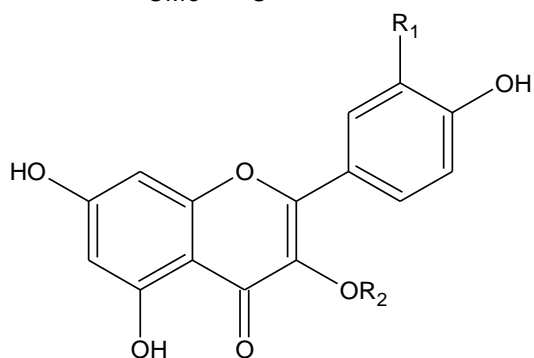
(84) R₁ = R₂ = R₃ = OCH₃

(85) R₁ = R₂ = H, R₃ = OCH₃

(86) R₁ = R₃ = OCH₃, R₂ = H

(87) R₁ = R₂ = R₃ = H

(88) R₁ = OCH₃, R₂ = R₃ = H



(89) R₁ = R₂ = H

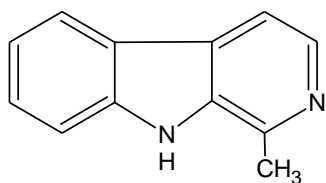
(90) R₁ = H, R₂ = Rutinosa

(91) R₁ = OH, R₂ = Rutinosa

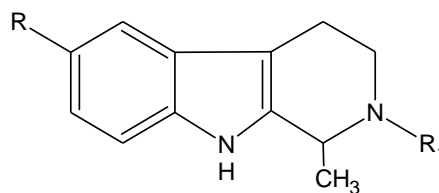
Otro grupo de compuestos que también han sido aislados y caracterizados en el género *Croton* aunque menos comunes son los alcaloides.

I.3.4 Alcaloides

Croton moritibensis es un arbusto oriundo de Brasil donde es popularmente conocido como “velame-preto”. De las partes aéreas de esta planta se aislaron cuatro alcaloides β -carbolina harman (**92**), tetrahydroharman (**93**), 2-etoxicarbonil-tetrahydroharman (**94**) y 6-hidroxi-2-metiltetrahydroharman (**95**).⁵⁸



(92)

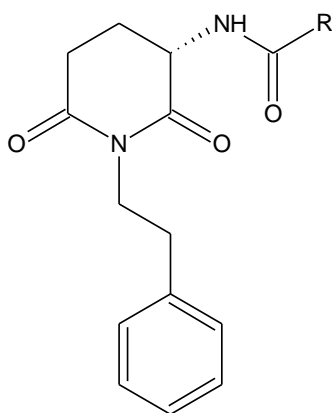


(93) R = R₁ = H

(94) R = R₁ = COOEt

(95) R = R₁ = Me

Del extracto de diclorometano de los tallos de de la especie brasileña *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. se aislaron los compuestos crotonimida A (**96**) y crotonimida B (**97**).⁵⁹



(96) R = -CH(CH₃)CH₂CH₃

(97) R = -CH₂CH₃

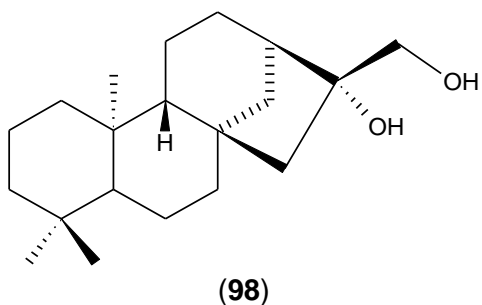
En nuestro grupo de investigación, como parte de un macroproyecto basado en el estudio fitoquímico de plantas de la familia Euphorbiaceae presentes en Venezuela, se han investigado varias especies pertenecientes a esta familia incluyendo las del género *Croton*. Las especies de este género que han sido estudiadas por nuestro grupo son *C. malambo*, *C. cuneatus*, *C. huberi*, *C. matourensis*, *C. micans*, *C. gossypiifolius*, *C. rodolens*, *C. pungens*, *C. hircinus*, *C. sucrensis* y *C. rhamnifolius*. Los resultados de algunos de estos estudios se muestran a continuación.

I.3.5 *Croton malambo* H. Karst

Este es un árbol pequeño que crece en la región oeste de Venezuela y en la parte noroeste de Colombia, es conocido como “palomatías”, “torco” y “cáscara de lombrices”. Una infusión de la corteza de *palomatías* es ampliamente usada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades como: diabetes, diarreas, reumatismo, úlceras gástricas, y como un agente antiinflamatorio y analgésico. En estudios realizados se demostró que el extracto acuoso de *C. malambo* tiene efectos analgésicos y antiinflamatorios significativos.⁶⁰

Del extracto de diclorometano se aisló un *ent*-kaurano, 16 β -17 α -diol-*ent*-kaurano (98). Se evaluó la actividad citotóxica y proapoptótica de este compuesto mediante el método colorimétrico MTT sobre líneas celulares del tipo MCF-7 (carcinoma mamario humano). Cuando las células del carcinoma mamario fueron tratadas con concentraciones crecientes del *ent*-kauranoide, su

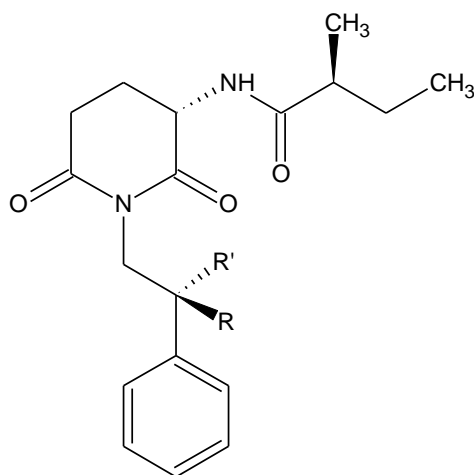
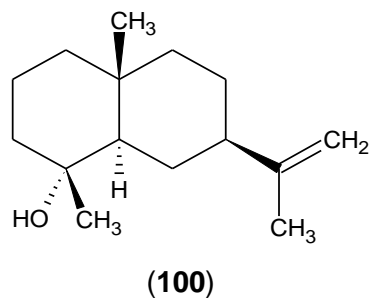
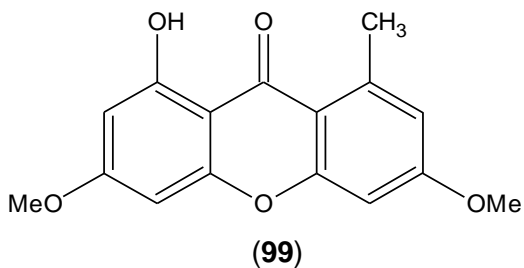
actividad citotóxica mostró un Cl_{50} de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, dosis que es 2,66 veces menor que los correspondientes valores para células no malignas.⁶¹



En otro estudio realizado, se determinó la composición del aceite esencial de esta planta por medio de un análisis GC-MS, encontrándose como compuesto mayoritario al fenilpropanoide metil eugenol (94.2%), seguido por γ -bisaboleno (1.3%), isoelemicina (0.8%), γ -curcumeno (0.8%), junto con otros 25 constituyentes minoritarios que fueron identificados. El aceite esencial presentó significativa actividad antibacteriana y citotóxica contra la línea celular MCF-7.⁶²

I.3.6 *Croton cuneatus* Klotz

Este es un árbol pequeño que crece en la región amazónica de Venezuela, y es comúnmente conocido como arapurina, caferana y manteco de agua. Esta planta medicinal es usada por los nativos del Amazonas para tratar inflamaciones, alteraciones gastrointestinales y como un agente analgésico. El análisis fitoquímico del extracto de diclorometano de las partes aéreas de esta planta, indicó la presencia de lichexantona (99), selin-11-en-4 α -ol (100) y los alcaloides glutarimídicos: julocrotonina (101), julocrotol (102), isojulocrotol (103) y julocrotona (104).⁶³



(101): R = R' = H

(102): R = H, R' = OH

(103): R = OH, R' = H

(104): R = R' = O

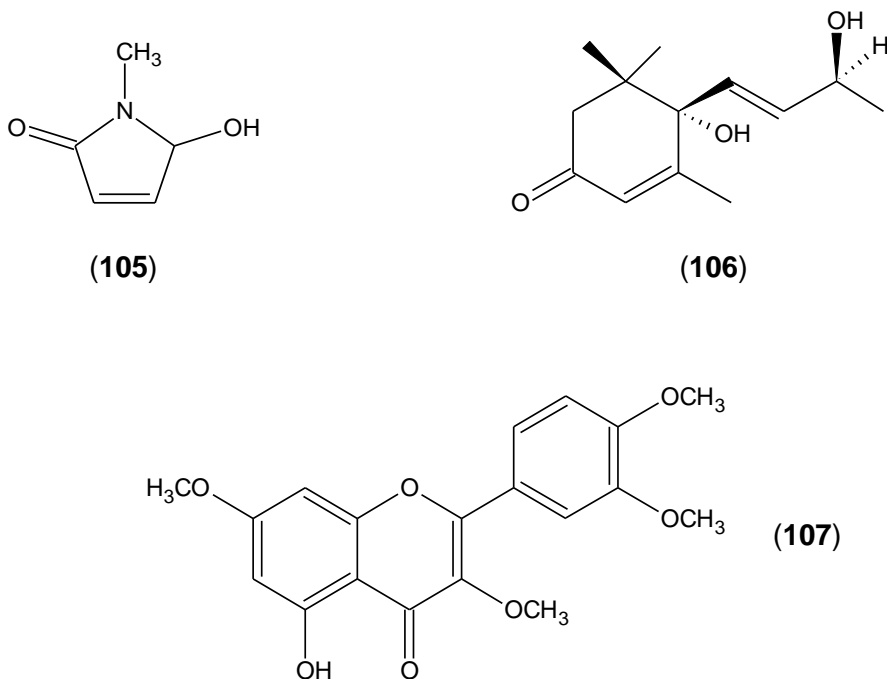
Se evaluó la actividad citotóxica de estos compuestos por medio del método MTT contra los siguientes tipos de líneas celulares tumorales humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), X-17 (carcinoma de colon), Hep-G2 (hepatoma), Skhep-1 (tumor de hígado) y LoVo (carcinoma de colon). Se encontró que todos los compuestos resultaron citotóxicos sobre las líneas MCF-7 y Hep-G2, siendo el julocrotol, el más citotóxico y selectivo sobre la línea MCF-7 con un valor de $Cl_{50} = 21.0 \mu\text{g/mL}$.⁶³ En otro estudio realizado, los compuestos julocrotonina, julocrotol, isojulocrotol y julocrotona presentaron excelente actividad antiinflamatoria.⁶⁴

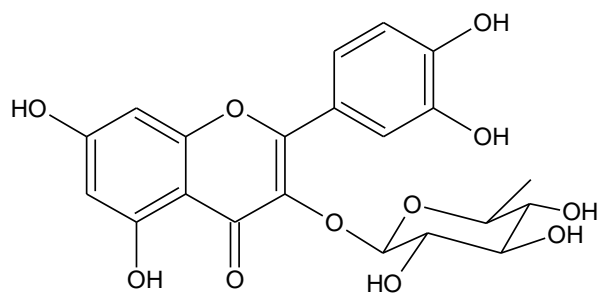
La composición del aceite esencial de *C. cuneatus* Klotz fue determinada mediante un análisis GC-MS, encontrándose como constituyentes principales fenilpropanoides y alcoholes sesquiterpénicos.⁶⁵

En estudios posteriores, se determinó que el extracto acuoso de *Croton cuneatus* presenta actividad antiinflamatoria⁶⁶ así como actividad antidiabética.⁶⁷

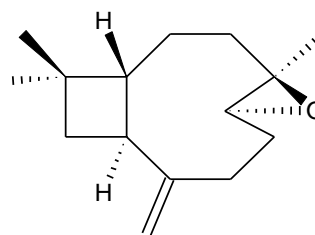
I.3.7 *Croton huberi* Steyerm

Este es un árbol mediano que crece en la cordillera norte de Venezuela. El estudio fitoquímico de las hojas de esta planta permitió el aislamiento e identificación de retusina (107) y N-metil-5-hidroxi- Δ^3 -pirrolin-2-ona (105), aislados del extracto de diclorometano, tilirosido (82) y quercitrina (108), aislados del extracto de acetato de etilo y del extracto de hexano se aisló blumenol A (106), óxido de cariofileno (109) y fitol (110).⁵⁶

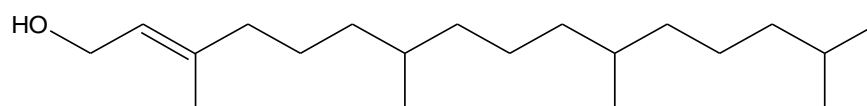




(108)



(109)



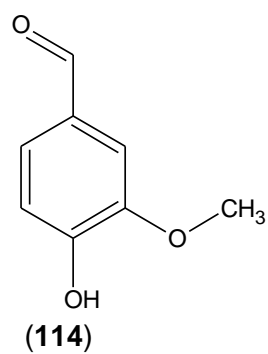
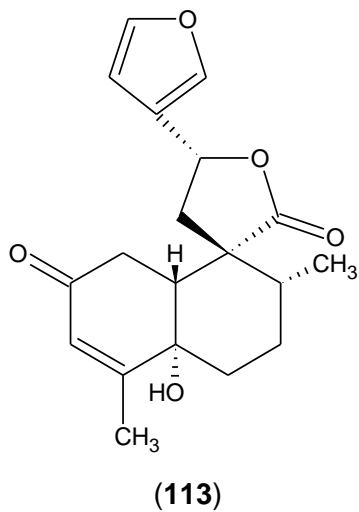
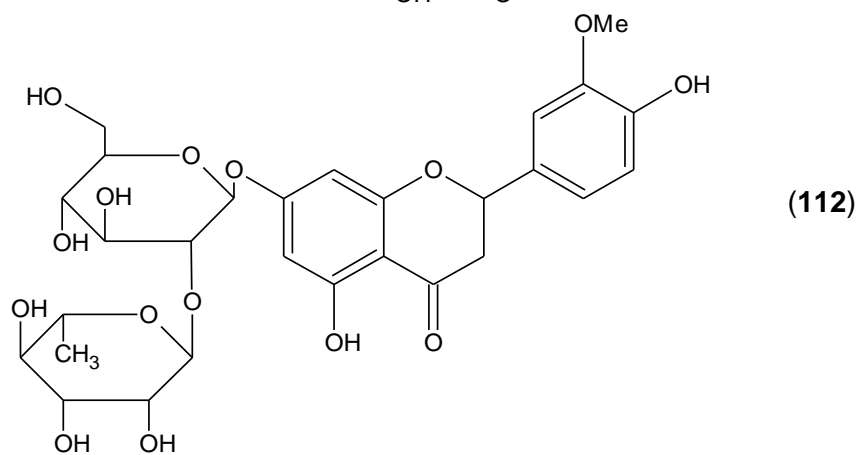
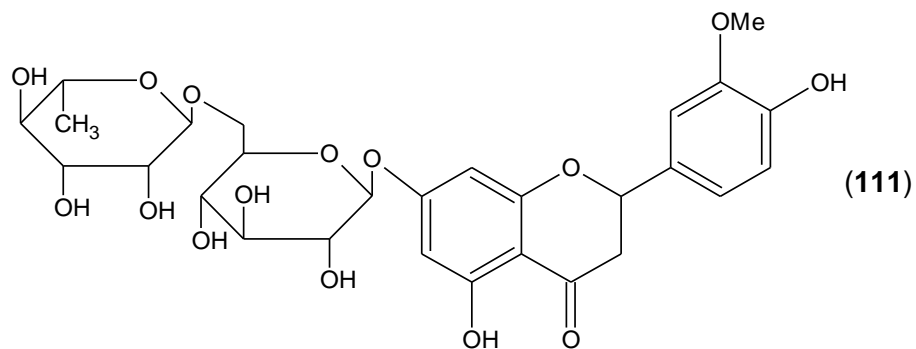
(110)

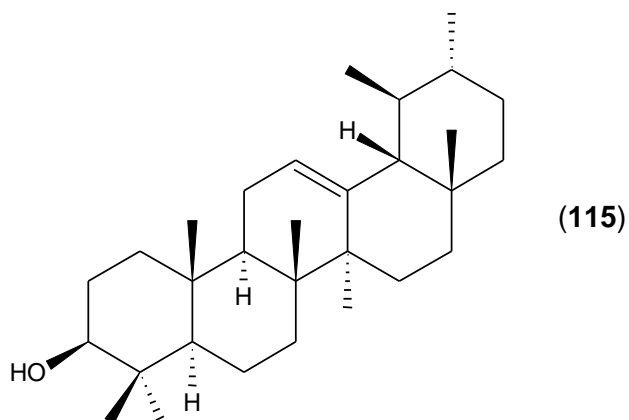
En otro estudio realizado, se determinó la composición del aceite esencial de las hojas de esta especie, que se caracterizó por poseer un alto contenido de sesquiterpenos (62,5%) siendo el γ -eudesmol el principal constituyente (18.7%), seguido por germacreno-D (11.7%), β -eudesmol (7,6%), óxido de cariofileno (6,9%), kauranos (5,3%), humuleno (4,3%), cedrol (4.6 %) e isoelemicina (3.0%).⁶⁸

I.3.8 *Croton matourensis* Aubl

Este es un árbol pequeño o mediano, el cual se encuentra abundantemente en Brasil y Guayana. En Venezuela se ha observado principalmente en el estado Bolívar. La investigación química de los extractos orgánicos obtenidos de las hojas de *Croton matourensis*, condujo al aislamiento e identificación de 6 compuestos: dos flavononas glicosiladas hesperidina (**111**) y naringina (**112**), dos diterpenos de tipo neoclerodano, *trans*-dehidrocrotonina (**23**) y 5 α -hidroxi-

trans-dehidrocrotonina (**113**), el monoterpeno vainillina (**114**) y el triterpeno de tipo oleanano α -amirina (**115**).⁶⁹

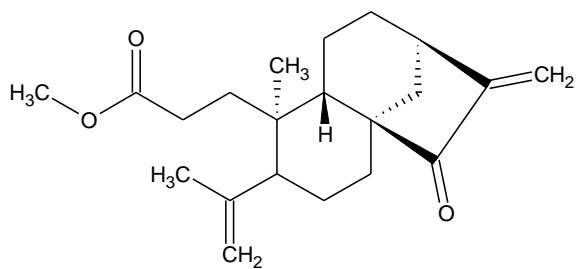




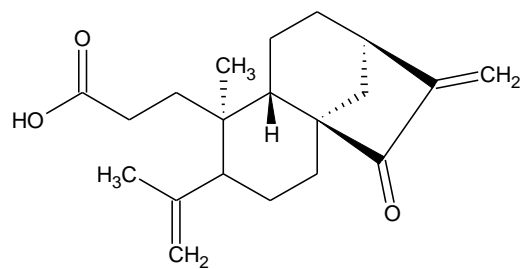
En el estudio del aceite esencial de esta especie se identificaron 46 compuestos, siendo los principales componentes fenchil acetato (19.5%), metileugenol (14.2%), isoelemicina (11.3%), elemicina (7.6%), espatulenol (6.9%) y valenceno (5.8%). El aceite esencial de esta especie presentó una citotoxicidad moderada sobre las líneas celulares LOVO (carcinoma de colon), X-17 (carcinoma de colon) y HeLa (cáncer de cuello uterino).⁷⁰

I.3.9 *Croton micans* Muell. Arg.

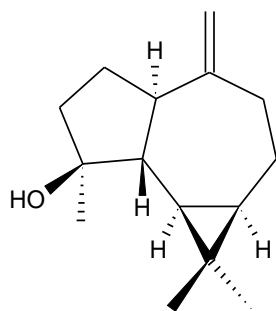
Es un arbusto que crece en la zona norte de Venezuela. En el estudio fitoquímico de los extractos apolares de las flores de esta especie (la cual, en principio, fue erróneamente identificada como *Croton caracasana*)⁷⁰ se aislaron dos nuevos 3,4-seco-ent-kauranos identificados como caracasina (116) y ácido de caracasina (117), junto con los terpenos óxido de cariofileno (109), espatulenol (118) estigmasterol (119), estigmastenona (120), y 3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7-diol (121), el ácido graso ácido hexadecanoico (122) y el flavonoide tilirosido (82).⁵⁵



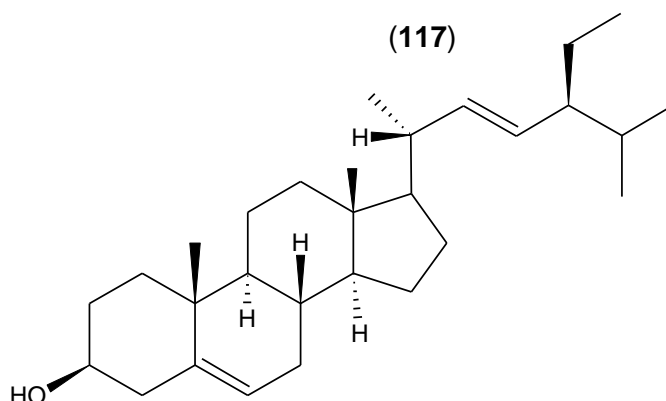
(116)



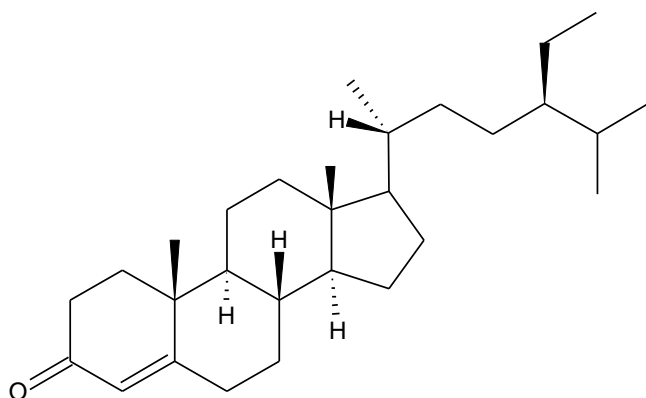
(117)



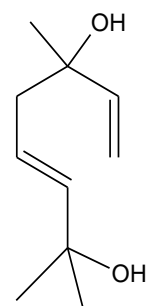
(118)



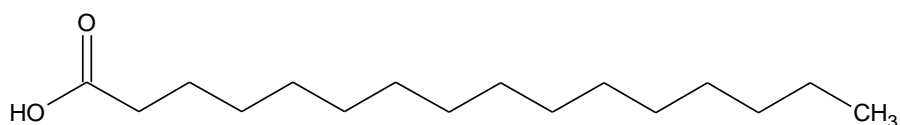
(119)



(120)



(121)



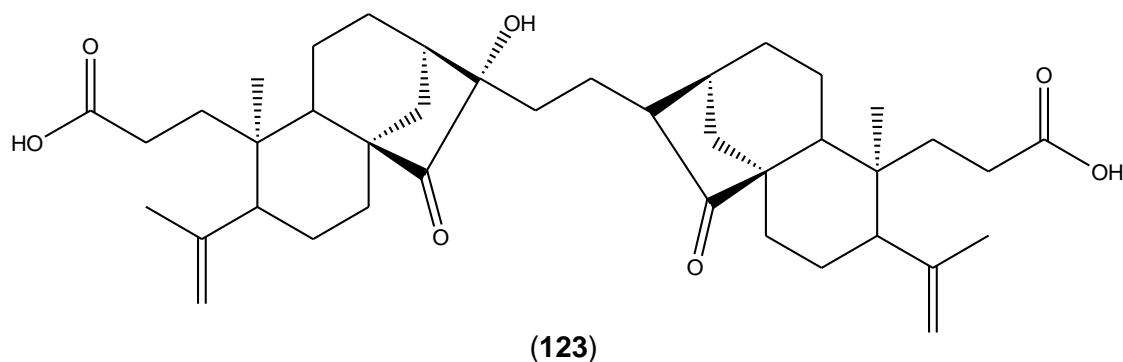
(122)

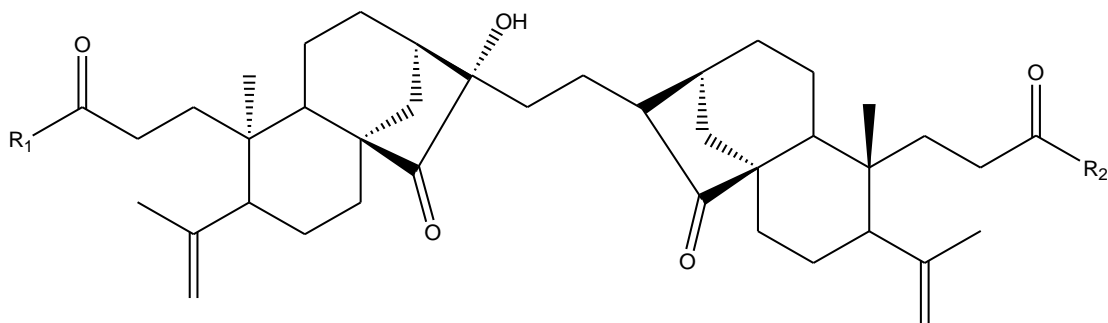
Se evaluó la actividad citotóxica de caracasina y el ácido de caracasina sobre diferentes líneas celulares de cáncer humano. Ambos compuestos indujeron

citotoxicidad en el rango de 2 a 25 μM para caracasina (CI_{50} 2.7-24.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 0.8 a 12 μM para el ácido (CI_{50} 1.4-10.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$).⁷¹

En otro trabajo de investigación se determinó la composición y se evaluó la actividad citotóxica de los aceites esenciales de las flores y hojas de esta especie. Se identificaron 63 compuestos del aceite esencial de las flores siendo los compuestos mayoritarios fenchil acetato (41.6%), α -cariofileno (12.6%), β -cubebeno (5.0%), β -cariofileno (5.5%), α -cubebene (5.3%), β -elemeno (4.7%) y valenceno (4.6%). Del aceite esencial de las hojas se identificaron los compuestos fenchil acetato (25.3%) α -cariofileno (20.7%), α -selineno (12.8%) y β -bourbano (9.3%). Los aceites esenciales de las flores y hojas de esta especie presentaron una citotoxicidad moderada sobre las líneas celulares LOVO, X-17 y HeLa.⁷⁰

En un estudio más reciente, se aislaron dímeros *ent*-3,4-*seco*-kauranos de esta especie, los cuales se identificaron como ácido micansinoico (**123**), ácido isomicansinoico (**124**), dimetil éster del ácido isomicansinoico (**125**), monometil éster del ácido isomicansinoico (**126**) y monoetil éster del ácido isomicansinoico (**127**).⁷²





(124) $R_1 = R_2 = H$

(125) $R_1 = R_2 = -CH_3$

(126) $R_1 = H, R_2 = -CH_3$

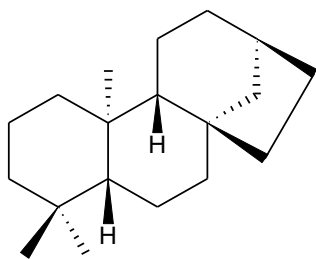
(127) $R_1 = H, R_2 = -CH_2CH_3$

I.3.10 *Croton gossypifolius* Vahl.

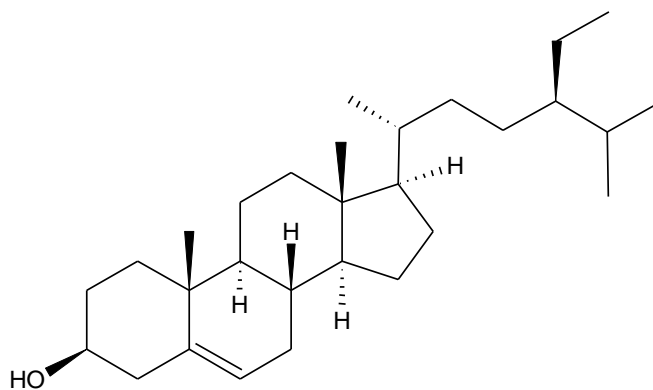
Este árbol, que crece en la zona norte de Venezuela, conocido como “Sangre de Drago”, es usado en la medicina tradicional como cicatrizante de heridas y para tratar la sífilis. En el aceite esencial de esta especie se identificaron 42 compuestos principalmente sesquiterpenos oxigenados siendo los mayoritarios el óxido de α -cedrene (18.6%), espatulenol (16.3%), valenceno (5.8%), geranil-pentanoato (5.3%), α -cadinol (4.0%), germacreno D (3.5%) y longifoleno (3.3%).⁷³

I.3.11 *Croton pungens* Jacq.

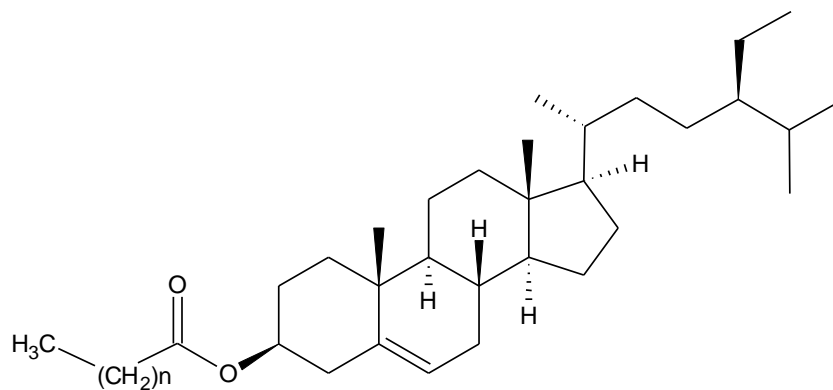
Esta planta es nativa de Venezuela y el estudio fitoquímico de los extractos apolares de esta especie llevó al aislamiento de fitol (110), nor-kaurano (128), β -sitosterol (129) y un éster de β -sitosterol (130).⁷⁴



(128)



(129)

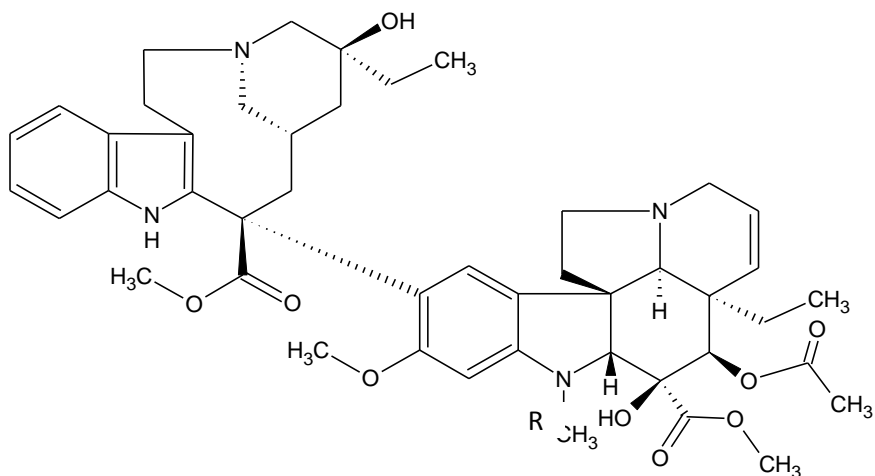


(130)

I.4 Productos naturales como medicamentos contra el cáncer.

En los últimos veinte años, ha habido un gran progreso en la guerra contra el cáncer. Los avances en biología celular y la biología molecular nos han ayudado en la comprensión de los diferentes mecanismos de esta enfermedad. Cada vez más medicamentos contra el cáncer y vacunas han sido desarrollados. Los productos naturales han contribuido significativamente al desarrollo de medicamentos contra el cáncer. Según un estudio reciente, entre los 79 medicamentos y vacunas aprobados por la FDA contra el cáncer desde 1983 hasta 2002, nueve de ellos fueron directamente productos naturales aislados y 21 de ellos fueron derivados de productos naturales. También, entre los 39 medicamentos sintetizados contra el cáncer, 13 de ellos se basaron en un farmacóforo que se originó a partir de compuestos naturales.⁷⁵ Esto nos indica el enorme potencial de los metabolitos secundarios aislados de plantas en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

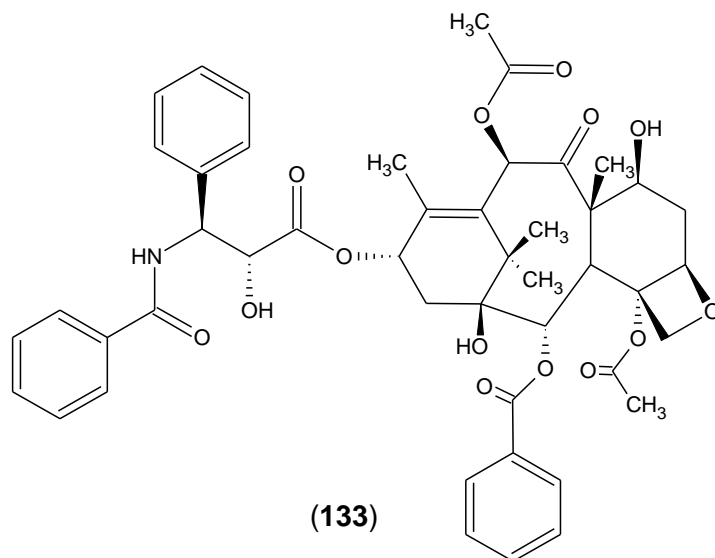
El aislamiento de los alcaloides de la vinca, vinblastina (**131**) y vincristina (**132**) del bígaro de Madagascar, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Apocynaceae) introdujo una nueva era del uso de los productos naturales como agentes contra el cáncer. Ellos fueron los primeros agentes en llegar al uso clínico para el tratamiento del cáncer. Vinblastina y vincristina se utilizan principalmente en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo leucemias, linfomas, cáncer avanzado de testículo, cáncer de mama y pulmón, y el sarcoma de Kaposi.⁷⁶



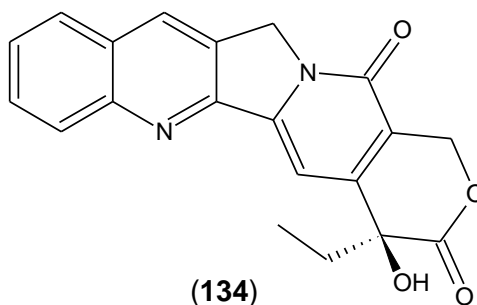
(131) R = CH₃

(132) R = CHO

El descubrimiento de paclitaxel (Taxol) (133) de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), es otra evidencia del éxito en el descubrimiento de drogas a partir de productos naturales.⁷⁶ La estructura de paclitaxel fue elucidada en 1971⁷⁷ y se introdujo en el mercado de EE.UU. en la década de 1990. Paclitaxel es significativamente activo contra el cáncer de ovario, cáncer de mama avanzado y cáncer de pulmón.⁷⁸

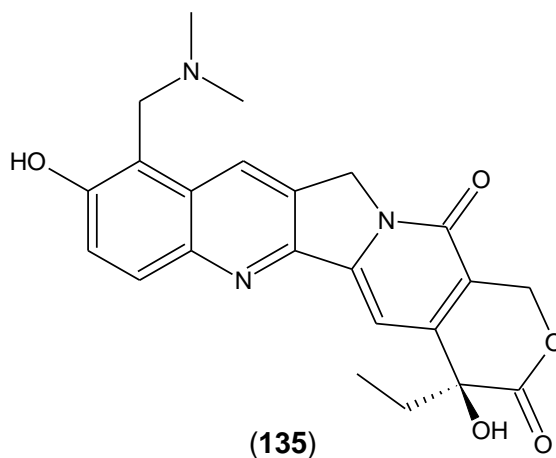


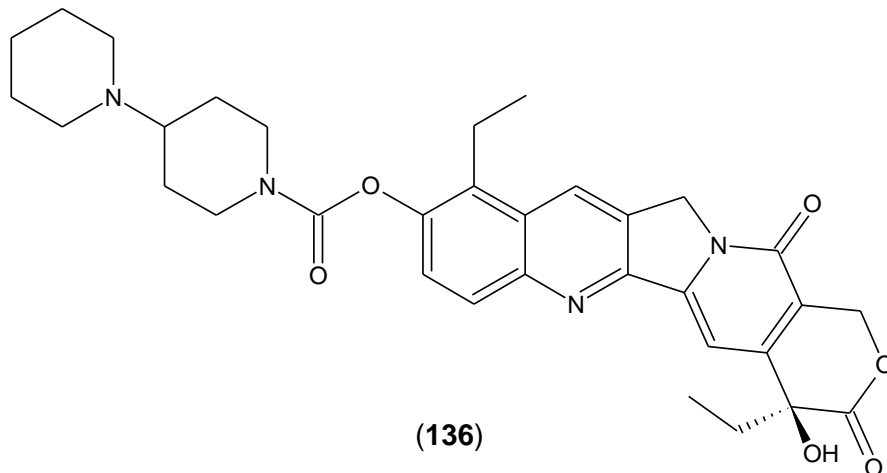
La camptotecina (**134**) es un alcaloide natural extraído del árbol ornamental chino *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae); también ha sido aislado de *Ophiorrhiza pumila* (Rubiaceae) y *Mappia foetida* (Icacinaceae). Es un agente citotóxico que muestra actividad anticancerígena principalmente contra tumores sólidos como cáncer de colon y páncreas.⁷⁹



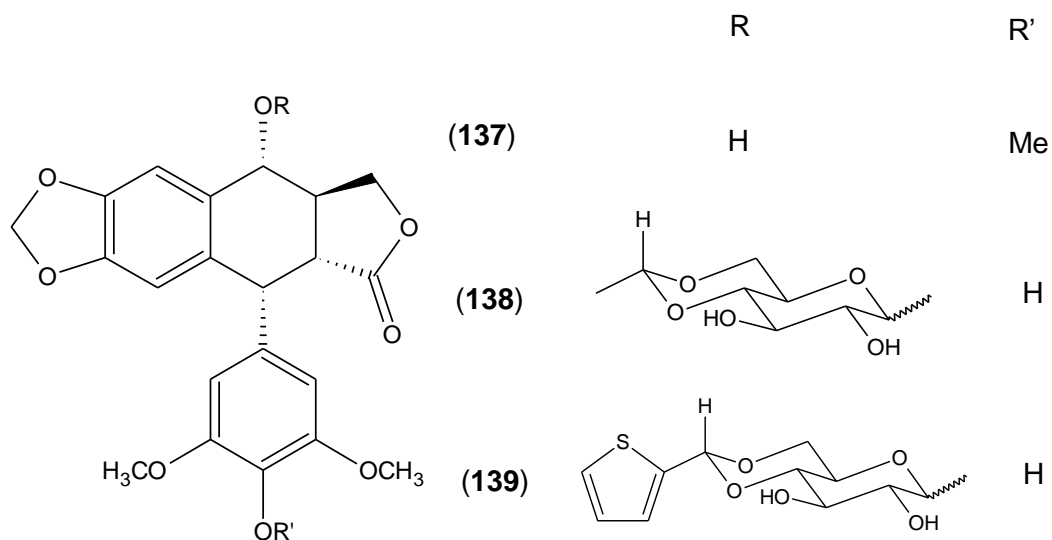
Este compuesto mostró notable actividad antitumoral en pruebas clínicas preliminares pero también baja solubilidad y reacciones adversas.

Topotecan (**135**) e irinotecan (**136**) son los derivados semisintéticos de la camptotecina y se utilizan para el tratamiento de cáncer de ovario y pulmón⁸⁰ y cáncer colorectal, respectivamente.⁸¹

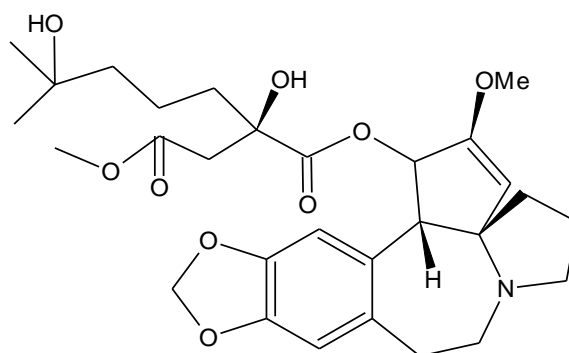




Epipodofilotoxina es un isómero de la podofilotoxina (137), que se aisló como el agente antitumoral de las raíces de las especies *Podophyllum peltatum* Linnaeus y *Podophyllum emodi* Wallich (Berberidaceae). Etopósido (138) y tenipósido (139) son dos derivados semi-sintéticos de epipodofilotoxina y se utilizan en el tratamiento de linfomas y cánceres bronquial⁷⁶ y testicular.⁸²

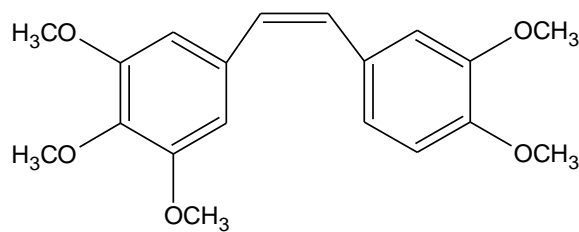


Homoharringtonina (**140**), aislado del árbol chino *Cephalotaxus harringtonia* var *drupacea* (Cephalotaxaceae), es otro agente de origen vegetal de uso clínico. Una mezcla racémica de homoharringtonina ha sido utilizado con éxito en China para el tratamiento de leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica.¹



(140)

Las combretastatinas fueron aisladas de la corteza del árbol de Sudáfrica *Combretum caffrum*.⁸³ La combretastatina A-4 (**141**) es activo frente a los cánceres de colon, pulmón y leucemia, y se cree que esta fitomolécula es la más citotóxica aislada hasta el momento.^{84, 85}



(141)

I.5 JUSTIFICACIÓN

Como parte de un macroproyecto de nuestro grupo de investigación, basado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos aislados de especies del género *Croton* (Euphorbiaceae) presentes en Venezuela, propusimos llevar a cabo el estudio fitoquímico de la planta *Croton caracasana* Pittier de la cual no se conocen antecedentes en la literatura. Se convierte éste, en el primer estudio fitoquímico de esta planta.

Basados en los resultados previamente descritos en nuestro grupo de investigación, consideramos que, el aislamiento, purificación e identificación de los compuestos provenientes de esta planta, representa una contribución importante en la búsqueda de nuevos compuestos para ensayar en líneas celulares tumorales.

I.6 OBJETIVOS

I.6.1 Objetivo general

1. Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas y tallos de la planta *Croton caracasana* Pittier y evaluar su actividad citotóxica.

I.6.2 Objetivos específicos

1. Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las fracciones de hexano, diclorometano, acetato de etilo e hidrometanólica de las hojas y tallos de la planta *Croton caracasana* Pittier.
2. Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HETCOR, FLOCK, IR, Rayos-X y Espectrometría de Masas.
3. Evaluar la citotoxicidad de los metabolitos secundarios aislados y caracterizados sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 utilizando el método del MTT.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios aislados y caracterizados contra diversos microorganismos utilizando el método de difusión sobre placas de agar.

I.7 PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de RMN fueron tomados en un Espectrómetro JEOL ECLIPSE 270 (270 MHz para ^1H y 67.5 MHz para ^{13}C). Se utilizó CDCl_3 y MeOD (Sigma-Aldrich) como solventes. El desplazamiento químico está reportado en ppm y se empleó como patrón interno trazas de los solventes utilizados.

Los espectros de IR fueron tomados en un Espectrofotómetro FT-IR Thermo Nicolet Nexus 470.

Los espectros de masas se tomaron en un Cromatógrafo de gases Varian modelo CP-3800, acoplado a un espectrómetro de masas Saturno 2000 y en un Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie II acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5971A.

Las rotaciones ópticas fueron medidas con un polarímetro ATAGO Polax-2L usando CHCl_3 como solvente.

Los análisis de cristalografía con Rayos-X se registraron a temperatura ambiente en un difractor Rigaku AFC-7S equipado con un detector CCD Mercury utilizando radiación monocromática $\text{Mo}(\text{K}\alpha)$ ($\lambda = 0.71070 \text{ \AA}$). Los detalles experimentales de la unidad de celda y mediciones de la intensidad se pueden encontrar en un archivo CIF depositado en el Centro de Datos Cristalográficos Cambridge con el número CCDC 867457.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer-Johns y no fueron corregidos.

Las cromatografías en columna se realizaron empleando Sílica gel G60, 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.

Las cromatografías en capa fina se realizaron en placas de sílica gel Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, 20x20 cm, 0,20 mm de espesor.

Las cromatografías de placa preparativas se realizaron en placas de sílica gel 60. F₂₅₄, 20x20 cm, 0,25 mm de espesor, Merck.

Como agente revelador de las placas cromatográficas se empleó principalmente el reactivo *p*-anisaldehído (0.5 mL de *p*-anisaldehído, 85 mL de MeOH, 5 mL de H₂SO₄ y 10 mL de ácido acético glacial).

Se utilizó una lámpara de UV multibanda 254/365 nm modelo UVGL-25, un rotavapor BÜCHI R-114, Balanza analítica OHAUS y Balanza METTLER PC 2000.

Todos los solventes usados fueron grado analítico. Los solventes empleados para realizar los espectros de RMN fueron CDCl₃ y MeOD Sigma-Aldrich.

La evaluación de la actividad citotóxica fue realizada en el Laboratorio el Laboratorio de Genómica y Proteómica, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), bajo la dirección del Dr. Iván Galindo.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar por la Dra. Antonieta Taddei.

I.8 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

I.8.1 Sección Fitoquímica

I.8.1.1 Colecta del material vegetal

La especie *Croton caracasana* Pittier (Figura 3), fue colectada en agosto de 2009 en las Faldas del Ávila, a la altura de la Quebrada el Ávila, Caracas, Venezuela y fue identificada por la Dra. Ricarda Riina. Una muestra representativa se encuentra en el Herbario Nacional de Venezuela bajo el voucher VEN 382364.



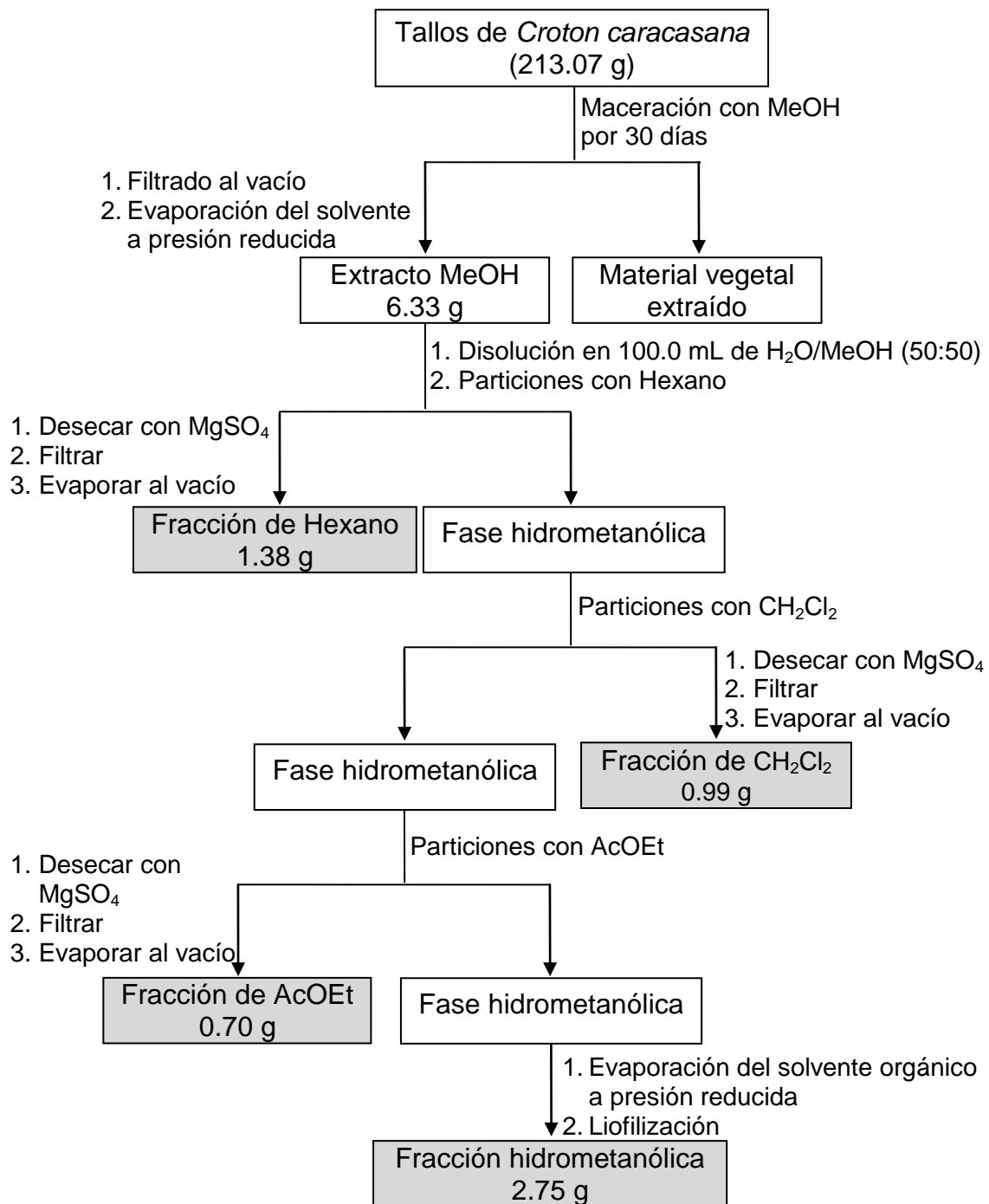
Figura 3. Imágenes de la planta *Croton caracasana* Pittier.

I.8.1.2 Extracción

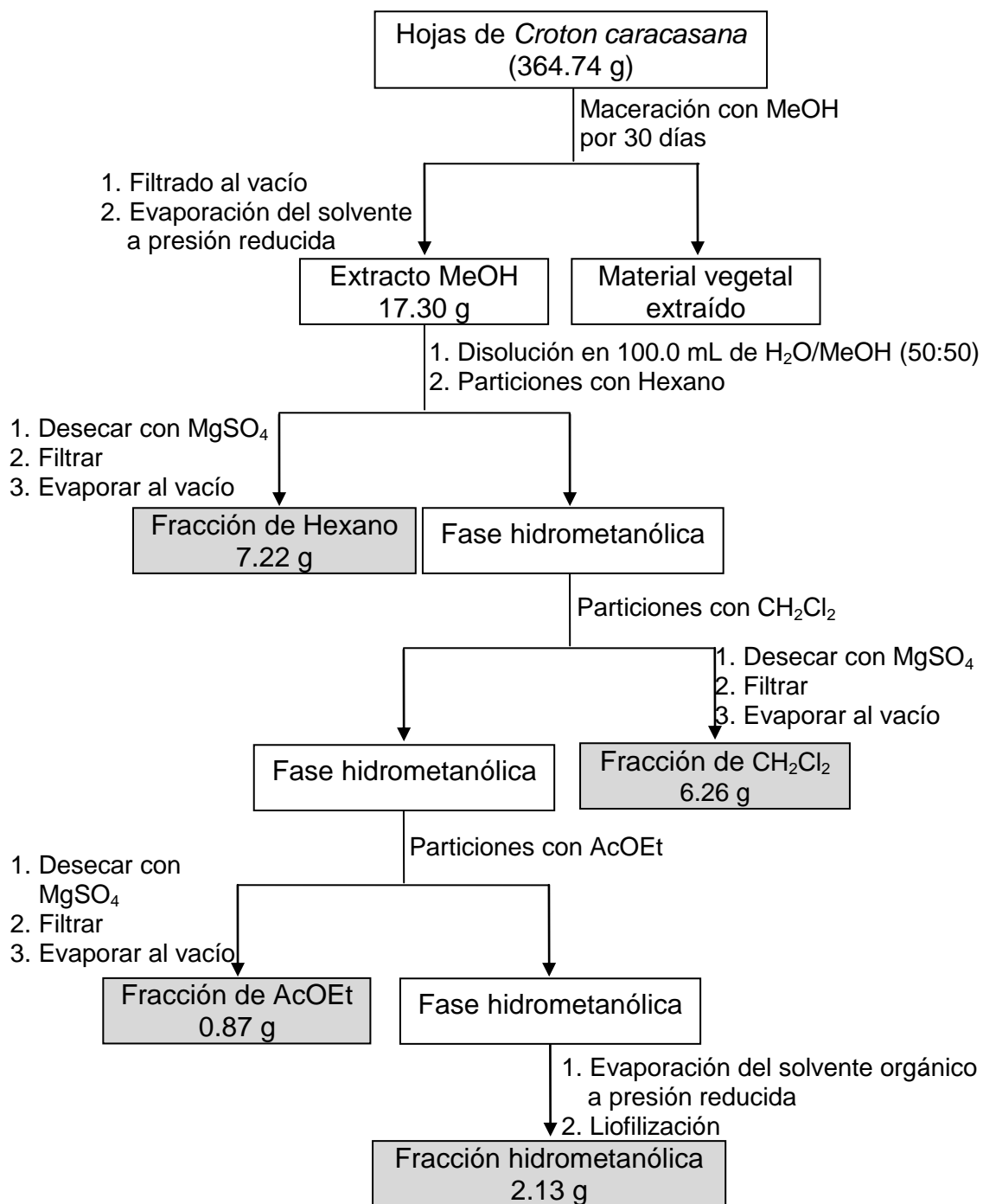
Una vez colectada la planta, se dejó secar a temperatura ambiente por varios días. Se separaron las hojas y los tallos y se molieron por separado. Las hojas y

los tallos secos y molidos se colocaron en maceración con MeOH por treinta días, posteriormente se filtraron los extractos y se evaporó el solvente hasta sequedad a presión reducida. Los extractos por separado fueron disueltos en 100.0 mL de una mezcla H₂O/MeOH (50:50) y se realizaron particiones con solventes en orden creciente de polaridad, primero con hexano, CH₂Cl₂ y finalmente AcOEt. Cada una de estas fracciones fue tratada con MgSO₄ anhidro, filtradas y concentradas al vacío hasta sequedad (Esquemas 1 y 2).

Las fracciones orgánicas obtenidas fueron monitoreadas mediante CCF y luego separadas y purificadas mediante técnicas cromatográficas.



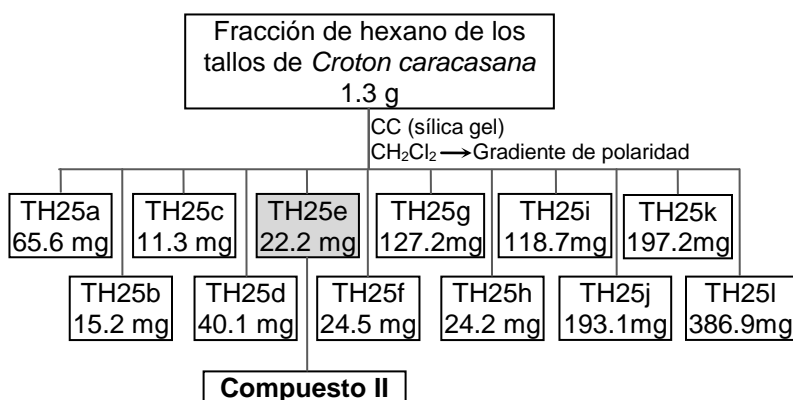
Esquema 1. Proceso de extracción de los tallos de *Croton caracasana* Pittier



Esquema 2. Proceso de extracción de las hojas de *Croton caracasana* Pittier

I.8.1.3 Separación de la fracción de hexano de los tallos

Se tomaron 1.3 g de la fracción de hexano de los tallos de la planta y se separaron mediante cromatografía de columna de fase normal utilizando CH_2Cl_2 como fase móvil inicial y luego gradiente de polaridad. Se obtuvieron 51 fracciones reagrupadas en 12 subfracciones de acuerdo al R_f de las manchas en CCF y su coloración al revelado con *p*-anisaldehído. De la fracción TH25e se obtuvo el **compuesto II** (Esquema 3).



Esquema 3. Separación y purificación de la fracción de hexano de los tallos de *Croton caracasana*.

I.8.1.4 Separación de la fracción de CH_2Cl_2 de los tallos

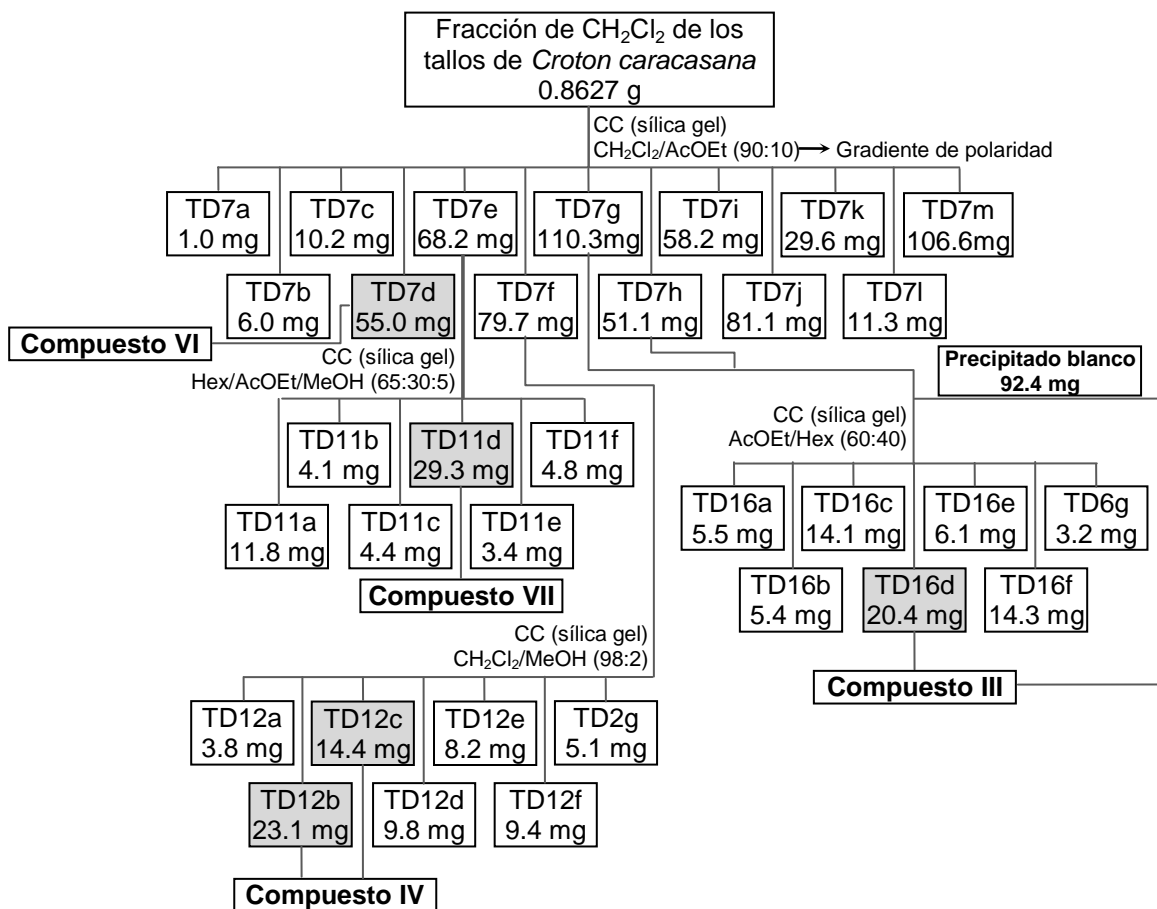
Se pesaron 862.7 mg de la fracción de CH_2Cl_2 de los tallos y se separaron mediante cromatografía en columna de sílica gel y como fase móvil inicial una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (90:10) y luego gradiente de polaridad. Se obtuvieron 32 fracciones que fueron monitoreadas mediante CCF y reagrupadas finalmente en 13 subfracciones.

A partir de la recristalización de la subfracción TD7d mediante cambio de polaridad (AcOEt/Hexano) se obtuvo el **compuesto VI** en una cantidad de 40.2 mg.

La subfracción TD7e se separó mediante cromatografía en columna de fase normal usando como eluyente una mezcla Hexano/AcOEt/MeOH (65:30:5). A partir de la subfracción TD11d se obtuvo el **compuesto VII**.

La subfracción TD7f se separó mediante cromatografía en columna de fase normal usando como eluyente una mezcla CH₂Cl₂/MeOH (98:2). A partir de las subfracciones TD12b y TD12c se obtuvo el **compuesto IV**.

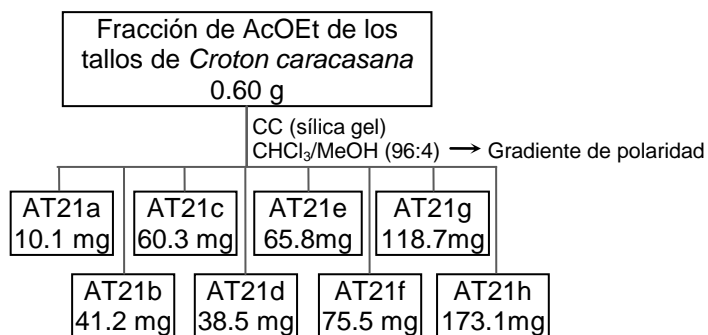
La subfracción TD7g se unió con la fracción TD7h y al disolverlas en una mezcla AcOEt/Hexano (60:40) elegida como fase móvil para separar la fracción mediante cromatografía en columna, precipitó un sólido blanco el cual se separó mediante decantación, este sólido pesó 92.4 mg. El resto de la fracción se separó en la columna cromatográfica bajo las condiciones descritas. A partir de la subfracción TD16d se obtuvo unos cristales blancos con un R_f similar al precipitado, los espectros de RMN nos indicaron que se trataba del mismo compuesto que fue identificado como el **compuesto III** (Esquema 4).



Esquema 4. Separación y purificación de la fracción de CH₂Cl₂ de los tallos de *Croton caracasana*.

I.8.1.5 Separación de la fracción de AcOEt de los tallos

La fracción de AcOEt de los tallos fue separada mediante cromatografía en columna sobre sílica gel empleando una fase móvil CHCl₃/MeOH (96:4) y luego gradiente de polaridad. Se obtuvieron 25 fracciones que se reagruparon de acuerdo a su perfil en CCF en 8 subfracciones. Todas las fracciones resultaron ser mezclas complejas, difíciles de separar y purificar, por lo tanto de esta fracción no se logró aislar ningún metabolito secundario puro (Esquema 5).



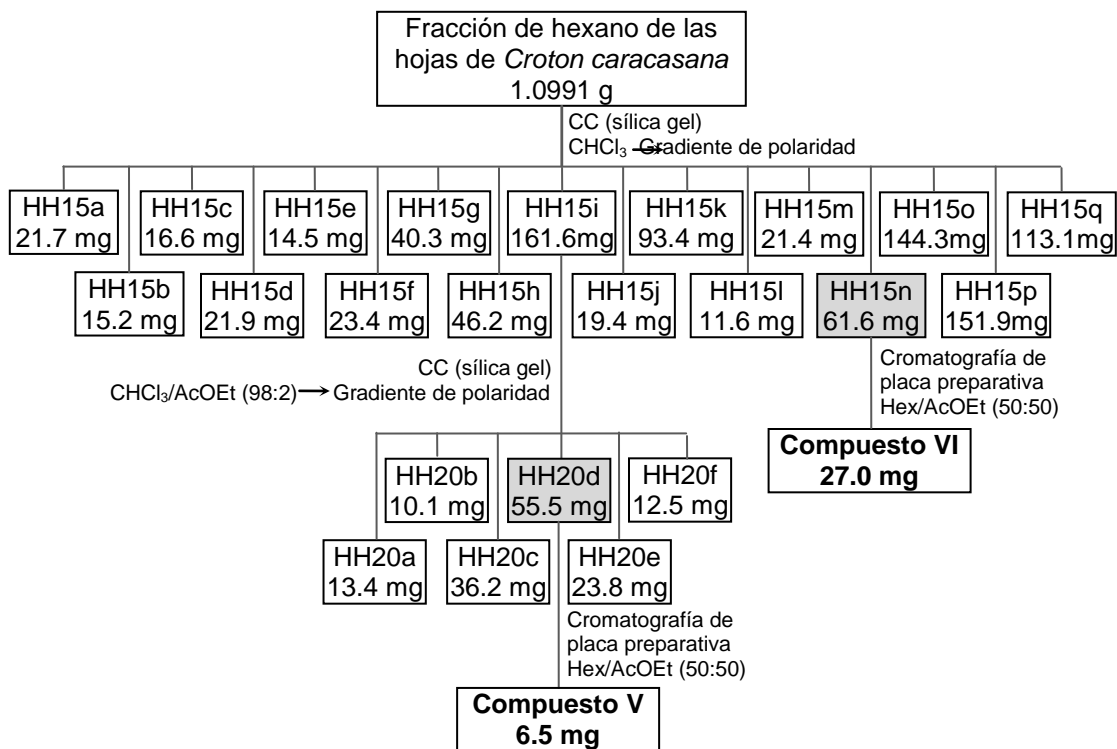
Esquema 5. Separación y purificación de la fracción de AcOEt de los tallos de *Croton caracasana*.

I.8.1.6 Separación de la fracción de hexano de las hojas

Se pesó 1.0991 g de la fracción de hexano de las hojas y se separó mediante cromatografía de columna de fase normal utilizando CHCl₃ como fase móvil inicial y luego gradiente de polaridad. Se obtuvieron 17 subfracciones identificadas como HH15.

La subfracción HH15i fue separada mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando como fase móvil inicial una mezcla CHCl₃/AcOEt (98:2) y luego gradiente de polaridad, se obtuvieron 6 subfracciones. La subfracción HH20d fue purificada mediante cromatografía de placa preparativa con una fase móvil Hexano/AcOEt (50:50) para obtener el **compuesto V**.

El **compuesto VI** se obtuvo nuevamente a partir de la purificación de la subfracción HH15n mediante cromatografía de placa preparativa empleando una mezcla de solventes Hexano/AcOEt (50:50) (Esquema 6).



Esquema 6. Separación y purificación de la fracción de hexano de las hojas de *Croton caracasana*.

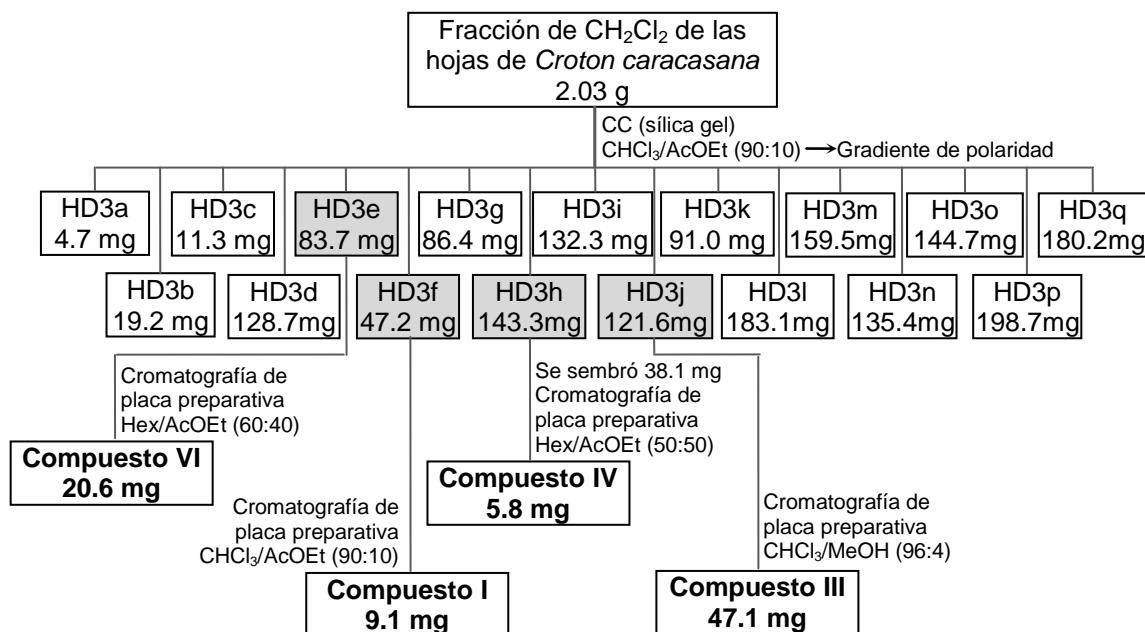
I.8.1.7 Separación de la fracción de CH₂Cl₂ de las hojas

Se separó mediante cromatografía en columna de fase normal 2.03 g de la fracción de CH₂Cl₂ de las hojas de *Croton caracasana* empleando una mezcla CHCl₃/AcOEt (90:10) como fase móvil inicial, se obtuvieron 17 subfracciones identificadas como HD3.

El **compuesto VI** se volvió a aislar a partir de la subfracción HD3e la cual fue purificada mediante cromatografía de placa preparativa usando una mezcla de solventes Hexano/AcOEt (60:40).

La subfracción HD3f se purificó mediante cromatografía de placa preparativa empleando como fase móvil una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (90:10) y a partir de esto se obtuvo el **compuesto I**.

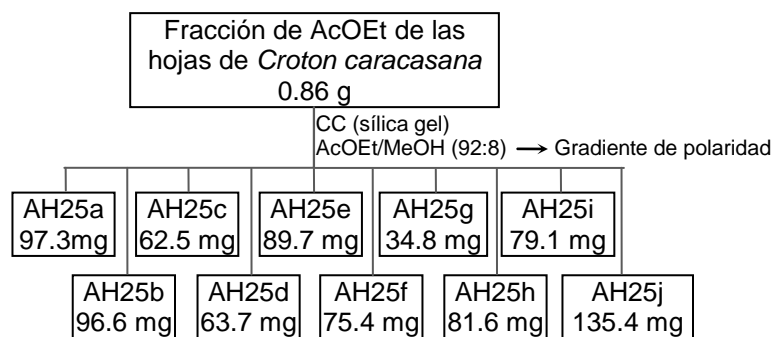
Los **compuestos III** y **IV** fueron nuevamente aislados a partir de las subfracciones HD3j y HD3h, respectivamente. (Esquema 7)



Esquema 7. Separación y purificación de la fracción de CH_2Cl_2 de las hojas de *Croton caracasana*.

I.8.1.8 Separación de la fracción de AcOEt de las hojas

La fracción de AcOEt de los tallos se fraccionó mediante cromatografía en columna de fase normal empleando AcOEt/MeOH (92:8) como fase móvil seguido de gradiente de polaridad. Se obtuvieron 16 subfracciones que se reagruparon de acuerdo a su perfil en CCF en 10 subfracciones. Todas las fracciones resultaron ser mezclas complejas, por ello, no se continuó el estudio (Esquema 8).



Esquema 8. Separación y purificación de la fracción de AcOEt de las hojas de *Croton caracasana*.

Las fracciones hidrometanólicas de las hojas y de los tallos no fueron estudiadas debido a que a través del análisis en CCF de fase normal así como de fase reversa no se encontró una buena separación y no se observaban manchas definidas que indicaran la presencia de algún metabolito secundario mayoritario.

I.8.1.9 Características y datos espectroscópicos de los compuestos aislados de *Croton caracasana* Pittier.

5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (I): caramelo marrón. IR ν_{\max} : 3424, 3024, 2960, 1747, 1702, 1694, 1596, 1507, 1450 cm^{-1} . RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.78 (dd, 1H, $J_1=8.6$ Hz, $J_2=2.1$ Hz, H6'), 7.73 (d, 1H, $J=2.0$ Hz, H2'), 6.94 (d, 1H, $J_1=8.7$ Hz, H5'), 6.34 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, 3-OCH₃), 3.89 (s, 3H, 8-OCH₃), 3.87 (s, 3H, 7-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.81 (s, 3H, 3'-OCH₃). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3): 179.4 (C-4), 158.5 (C-9), 157.5 (C-5), 155.6 (C-2), 151.6 (C-4'), 148.9 (C-3'), 148.5 (C-7), 138.8 (C-3), 128.8 (C-8), 123.2 (C-1'), 122.4 (C-6'), 111.2 (C-2'), 111.1 (C-5'), 105.4 (C-10), 95.5 (C-6), 61.6 (8-OCH₃), 60.2 (3-OCH₃), 56.5 (7-OCH₃), 56.1 (4'-OCH₃), 56.0 (3'-OCH₃). EM-IES: $m/z = 411.07$ [M + Na]⁺.

Lupeol (II): sólido blanco. p.f. 213-215 °C. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.67 (s, 1H, H29), 4.55 (s, 1H, H29), 3.16 (m, 1H, H3), 2.40 (m, 1H, H19), 1.71 (m, 1H, H13), 1.70 (m, 2H, H1), 1.69 (m, 2H, H12), 1.66 (s, 3H, H30), 1.66 (as, 2H, H15), 1.52 (m, 2H, H16), 1.50 (m, 2H, H2), 1.40 (m, 2H, H22), 1.38 (m, 1H, H18), 1.37 (m, 2H, H6), 1.30 (m, 2H, H21), 1.30 (s, 1H, H9), 1.01 (s, 3H, H23), 1.01 (s, 3H, H26), 0.95 (s, 3H, H27), 0.84 (s, 3H, H25), 0.81 (s, 3H, H28), 0.77 (s, 3H, H24), 0.74 (s, 1H, H5). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3): 151.0 (C-20), 109.4 (C-29), 79.1 (C-3), 55.4 (C-5), 50.5 (C-9), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 43.1 (C-17), 42.9 (C-14), 40.9 (C-8), 40.1 (C-22), 38.9 (C-4), 38.8 (C-1), 38.1 (C-13), 37.2 (C-10), 35.6 (C-16), 34.3 (C-7), 29.9 (C-2), 29.8 (C-21), 28.1 (C-23), 27.5 (C-15),

25.2 (C-12), 21.0 (C-11), 19.4 (C-30), 18.4 (C-6), 18.1 (C-28), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 15.4 (C-24), 14.6 (C-27).

Crotofolin E (III): cristales blancos. p.f. 207-209 °C. IR ν_{\max} : 3465, 2956, 2923, 2852, 1737, 1695, 1651, 1628, 1456, 952, 902 cm^{-1} . RMN ^1H (270 MHz, MeOD) δ ppm: 4.90 (s, 1H, H18), 4.44 (s, 1H, H18), 3.59 (td, $J_1= 11.6$, $J_2= 3.5$ Hz, H13), 3.30 (s, 1H, H5), 3.04; 2.41 (m, 2H, H3), 2.74 (d, $J= 11.6$ Hz, H7), 2.58 (m, H-10); 1.48 (dt, $J_1= 12.9$, $J_2= 5.7$ Hz, H-10), 2.53 (m, 2H, H11), 2.48 (m, 1H, H2), 1.85 (s, 3H, H17), 1.29 (s, 3H, H20), 1.17 (d, $J= 7.7$ Hz, H19). RMN ^{13}C (67.5 MHz, MeOD): 209.6 (C-1), 171.6 (C-16), 167.9 (C-4), 160.2 (C-8), 147.0 (C-12), 144.4 (C-14), 129.4 (C-15), 111.6 (C-18), 108.7 (C-9), 59.8 (C-6), 54.5 (C-5), 53.0 (C-7), 41.5 (C-10), 40.9 (C-2), 39.9 (C-13), 36.0 (C-3), 34.5 (C-11), 18.9 (C-20), 16.2 (C-19), 8.6 (C-17). EM-IE: $m/z = 342.2$ $[\text{M}]^+$.

Crotocarasin A (IV): aceite incoloro. IR ν_{\max} : 2962, 2927, 2860, 1753, 1704, 1663, 1630, 1447, 1013, 901 cm^{-1} . RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.00 (sA, 1H, H9), 4.94 (s, 1H, H18), 4.46 (s, 1H, H18), 3.14 (s, 1H, H5), 3.01 (m, 1H, H13), 2.88; 2.44 (m, 2H, H3), 2.83 (sa, 1H, H7), 2.64 (m, H11), 2.47 (m, 1H, H2), 2.23 (dt, $J_1= 12.6$, $J_2= 3.7$ Hz, H-11), 2.61 (d, $J= 3.7$ Hz, H-10), 1.23 (m, H-10), 1.93 (s, 3H, H17), 1.20 (s, 3H, H20), 1.18 (d, $J= 7.7$ Hz, H19). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3): 207.6 (C-1), 173.1 (C-16), 165.8 (C-4), 161.9 (C-8), 145.8 (C-12), 144.9 (C-14), 128.5 (C-15), 112.8 (C-18), 82.3 (C-9), 59.4 (C-6), 54.6 (C-5), 52.7 (C-7), 40.9 (C-2), 40.8 (C-13), 38.3 (C-10), 36.4 (C-3), 35.9 (C-11), 19.7 (C-20), 17.3 (C-19), 10.2 (C-17). EM-IE: $m/z = 326$ $[\text{M}]^+$.

Crotocarasin B (V): aceite amarillo. IR ν_{max} : 2956, 2924, 2853, 1763, 1735, 1710, 1458, 1379, 1166, 1027 cm^{-1} . RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.97 (dd, $J_1= 6.4$, $J_2= 3.5$ Hz, H-10), 5.04 (s, 1H, H18), 4.53 (s, 1H, H18), 3.21 (m, 1H, H13), 3.18 (m, 2H, H11), 3.16 (s, 1H, H5), 2.80 (d, $J= 11.6$ Hz, H7), 2.48 (m, 1H, H2), 2.43 (m, 2H, H3), 2.08 (s, 3H, H17), 1.23 (s, 3H, H20), 1.20 (d, $J= 7.4$ Hz, H19). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3): 207.3 (C-1), 169.4 (C-16), 166.2 (C-4), 148.8 (C-9), 147.1 (C-14), 146.3 (C-12), 141.6 (C-8), 130.2 (C-15), 113.4 (C-10), 113.0 (C-18), 59.8 (C-6), 55.0 (C-5), 53.3 (C-7), 41.1 (C-2), 40.6 (C-13), 39.0 (C-11), 36.2 (C-3), 19.4 (C-20), 17.4 (C-19), 11.3 (C-17). EM-IE: $m/z = 324$ $[\text{M}]^+$.

Crotocarasin C (VI): Cristales blanco p.f. 236-238 $^{\circ}\text{C}$. IR ν_{max} : 2978, 2932, 1758, 1707, 1670, 1650, 1630, 1441, 1305, 1122, 957, 940 cm^{-1} . RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.92 (s, 1H, H18), 4.44 (s, 1H, H18), 3.80 (pseudo q, $J= 7.2$ Hz, 2H, H21), 3.48 (td, $J_1= 11.6$, $J_2= 3.5$ Hz, H13), 3.14 (s, 1H, H5), 2.93 (2dd, $J_1= 6.4$, $J_2= 3.7$ Hz, H3) y 2.43 (m, H3), 2.77 (sa, 1H, H7), 2.81 (t, $J= 2.7$, H10) y 1.34 (dt, $J_1= 14.0$, $J_2= 4.9$ Hz, H10), 2.42 (m, H11) y 2.20 (dt, $J_1= 13.4$, $J_2= 4.2$ Hz, H11), 2.48 (m, 1H, H2), 1.89 (s, 3H, H17), 1.25 (s, 3H, H20), 1.17 (d, $J= 7.4$ Hz, H19) 1.15 (d, $J= 7.2$ Hz, H22). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3): 208.0 (C-1), 170.9 (C-16), 165.7 (C-4), 159.5 (C-8), 146.2 (C-12), 145.2 (C-14), 129.7 (C-15), 112.9 (C-18), 110.0 (C-9), 60.0 (C-6), 60.0 (C-21), 55.0 (C-5), 52.8 (C-7), 40.8 (C-2), 40.2 (C-13), 36.9 (C-10), 36.5 (C-3), 34.7(C-11), 20.1 (C-20), 17.4 (C-19), 15.5 (C-22), 10.0 (C-17). EM-IE: $m/z = 370$ $[\text{M}]^+$.

Crotocarasin D (VII): aceite incoloro, IR ν_{max} : 3465, 2956, 2923, 2852, 1737, 1695, 1651, 1628, 1456, 952, 902 cm^{-1} . RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.76 (s, 1H, H18), 4.30 (s, 1H, H18), 3.55 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, H21), 3.40 (s, 1H, H5), 3.18 (sa, 1H, H7), 3.15 (s, 1H, H13), 2.99 (m, H3) y 2.54 (m, H3), 2.72 (m, H11) y 2.39 (m, H11), 2.48 (m, 1H, H2), 2.34 (m, H10) y 2.04 (m, H10), 1.83 (s, 3H, H17), 1.46 (s, 3H, H20), 1.22 (d, $J=7.3$ Hz, H19) 1.22 (d, $J=6.9$ Hz, H22). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3): 208.8 (C-1), 171.4 (C-16), 166.2 (C-4), 162.1 (C-8), 145.7 (C-14), 137.7 (C-12), 123.4 (C-15), 110.1 (C-18), 108.7 (C-9), 61.2 (C-6), 59.0 (C-21), 56.4 (C-5), 44.6 (C-13), 41.3 (C-7), 40.6 (C-2), 37.4 (C-3), 36.3 (C-10), 28.5 (C-11), 22.0 (C-20), 17.5 (C-19), 15.3 (C-22), 11.0 (C-17). EM-IE: $m/z = 370.3$ $[\text{M}]^+$.

I.8.2 Sección Biológica

I.8.2.1 Evaluación de la actividad citotóxica

I.8.2.1a Mantenimiento de los cultivos celulares

El mantenimiento de las líneas celulares adherentes de carcinoma mamario MCF-7, SKBR3 y de cultivos primarios de fibroblastos dérmicos, se realizó en frascos de cultivo con medio Dulbecco modificado (DMEM) para garantizar su proliferación y crecimiento. El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de penicilina y 50 µg/uL de estreptomina. Las células fueron incubadas con humedad controlada con 5% CO₂, a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

I.8.2.1b Medición del efecto de los compuestos sobre la proliferación celular

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la proliferación celular, se construyeron curvas de viabilidad que permitieron determinar las CI₅₀ de cada uno de ellos, tanto en las líneas celulares tumorales MCF-7 y SKBR3 como en la no tumoral (Fibroblastos), obteniendo así la concentración de cada compuesto que origina la muerte de la mitad de la población celular. Posteriormente, 5000 células fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos (grado cultivo de tejidos) por 24 horas. Seguidamente, las células se trataron con diversas concentraciones de cada uno de los metabolitos secundarios aislados durante 72 horas, por triplicado, evaluando posteriormente la viabilidad de las mismas mediante el método de MTT. En

este método se utiliza el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio (MTT), el cual es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenasas presentes en mitocondrias activas (de células vivas) produciendo cristales de Formazan de color azul oscuro insolubles en medio acuoso. Este método nos permite cuantificar en forma de densidad óptica las células vivas después de la aplicación del compuesto, lo que indica que a mayor cantidad de células vivas mayor densidad óptica y menor citotoxicidad. Para ello, las células deben ser incubadas con MTT (0.2 mg/mL) a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se colocan en cada pozo 100 µL de DMSO para detener la reacción colorimétrica y se realiza la lectura de la absorbancia a $\lambda = 570$ nm en un lector de placas de ELISA.^{86,87} La CI_{50} se definió como el valor de concentración de cada compuesto que produjo una reducción del 50% de la absorbancia con respecto a las células control (cada línea celular sin compuesto). Estos valores permitieron obtener mediante el programa Origin versión 6.0, gráficas dosis-respuesta y el valor de CI_{50} de cada compuesto en cada una de las líneas celulares mencionadas.

I.8.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana.

Los bioensayos se realizaron utilizando el método de difusión sobre placas de agar.⁸⁸ Se analizaron seis muestras correspondientes a los compuestos **I**, **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII**. Las muestras **I**, **III**, **IV**, **VI** y **VII** fueron solubles en cloroformo, mientras que la muestra **V** fue soluble en una mezcla cloroformo/metanol (9.5:0.5). Se prepararon las soluciones de aproximadamente 1-2 mg/mL de

concentración y las referidas muestras fueron colocadas en discos de papel absorbente ($\varnothing = 5 \text{ mm}$, $5 \mu\text{L}$). El solvente se dejó secar antes de colocar la muestra sobre el cultivo del microorganismo contra el cual se evaluó.

La actividad antibacteriana se evaluó contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25963) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579), y los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). *P. aeruginosa* y *B. cereus* y fueron incubados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que *E. coli* y *S. aureus* fueron incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como controles positivos se utilizaron los antibióticos comerciales: amikacina, ampicilina y ofloxacina (BBL-Sensi-Disc); como control negativo se empleó el solvente o mezcla de solventes utilizada para solubilizar cada muestra. Igualmente, se dejó secar el disco que contenía el solvente antes de colocarlo sobre el cultivo del microorganismo contra el cual se evaluó.

Se sembró en superficie de agar Mueller-Hinton (Merck 1.05437), 0.1 mL de los cultivos microbianos crecidos en placas LB preparado en el laboratorio⁸⁹ y ajustados en solución salina ($0.85\% \text{ v/v}$) a la concentración correspondiente al Standard de McFarland N° 1. Sobre el cultivo microbiano se colocaron los discos de papel de filtro con las diferentes muestras y se determinó la longitud del diámetro de inhibición a las 24 horas.

I.9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.9.1 Estudio fitoquímico

La caracterización de los compuestos aislados de las hojas y tallos de la planta *Croton caracasana* Pittier se llevó a cabo por medio de técnicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT-135, HETCOR, FLOCK, IR y espectrometría de masas. Para el caso de los compuestos conocidos se realizaron las comparaciones respectivas con los datos espectroscópicos reportados en la literatura.

I.9.1.1 Compuesto I: 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona

Este compuesto se aisló de la fracción de CH_2Cl_2 de las hojas como un caramelo marrón, soluble en CH_2Cl_2 y MeOH. Se obtuvo en una cantidad de 9.1mg lo que representa un 0.0025% de rendimiento respecto al material vegetal inicial y un 0.14% respecto a la fracción de CH_2Cl_2 de las hojas. En CCF se observa como una mancha de color amarillo intenso al revelado con *p*-anisaldehído con un R_f de 0.73 en una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (90:10).

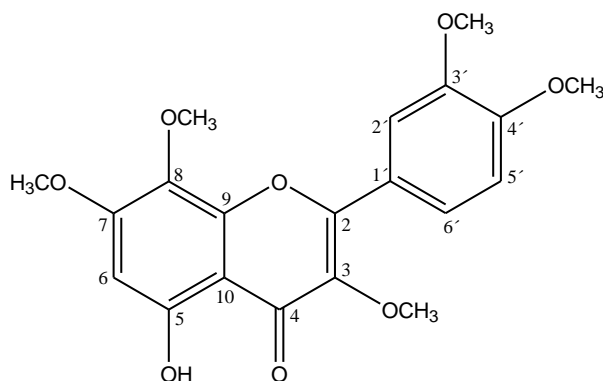


Figura 4: Estructura del compuesto I

En el espectro de masas se observa un ión $[M + Na]^+$ a 411.07 m/z (Figura 5) y en conjunto con el espectro de RMN ^{13}C se estableció una fórmula molecular de $C_{20}H_{20}O_8$, indicando once insaturaciones en la estructura. Su espectro de IR mostró bandas de absorción de grupo hidroxilo (3424 cm^{-1}), anillos aromáticos (1596 cm^{-1}) y cetona α,β -insaturada (1728 y 1640 cm^{-1}) (Anexo 1).

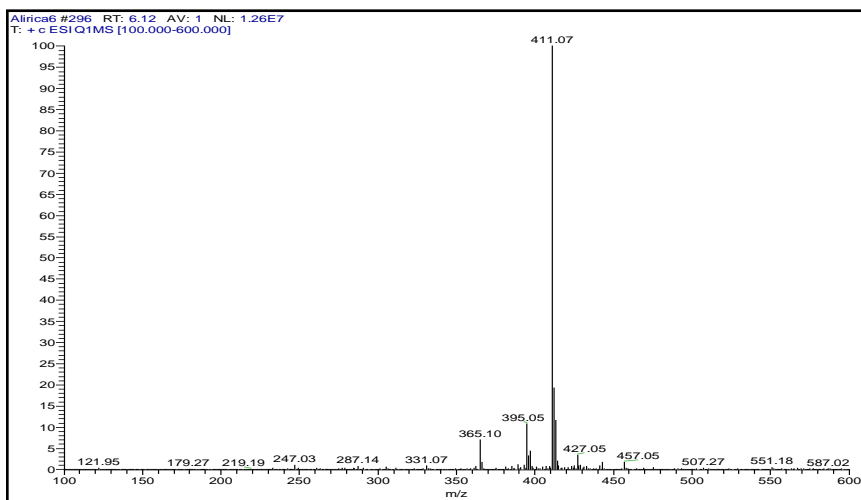


Figura 5: Espectro de masas del compuesto I

En el espectro de RMN 1H (Figura 6) se observan las resonancias de cuatro protones aromáticos, uno de los cuales aparece como un singlete a un desplazamiento de 6.34 ppm (H-6). Los otros tres protones forman parte de un sistema de espín ABX, observándose dos señales dobletes a 6.94 ppm ($J_1 = 8.7$ Hz, H-5') y 7.73 ppm ($J_2 = 2.0$ Hz), y una señal doblete de doblete a 7.78 ppm ($J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, H-6'). Adicionalmente, se observan cinco señales singletes que integran cada una para tres protones a desplazamientos de 3.90, 3.89, 3.87, 3.84 y 3.81 ppm indicando la presencia de cinco grupos metoxi en la estructura. La señal a 12.42 ppm es típica de un grupo hidroxilo en C-5 formando puente de hidrógeno.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 7) mostró la resonancia de 20 átomos de carbono, encontrándose la mayoría de las señales en la zona de campo bajo y medio. Con ayuda de un experimento DEPT-135 (Figura 8), estas señales fueron discriminadas en 11 carbonos cuaternarios, 4 metinos y 5 metilos, estos últimos resuenan entre 56.0 y 61.6 ppm confirmando la presencia de cinco grupos metoxi en la estructura.

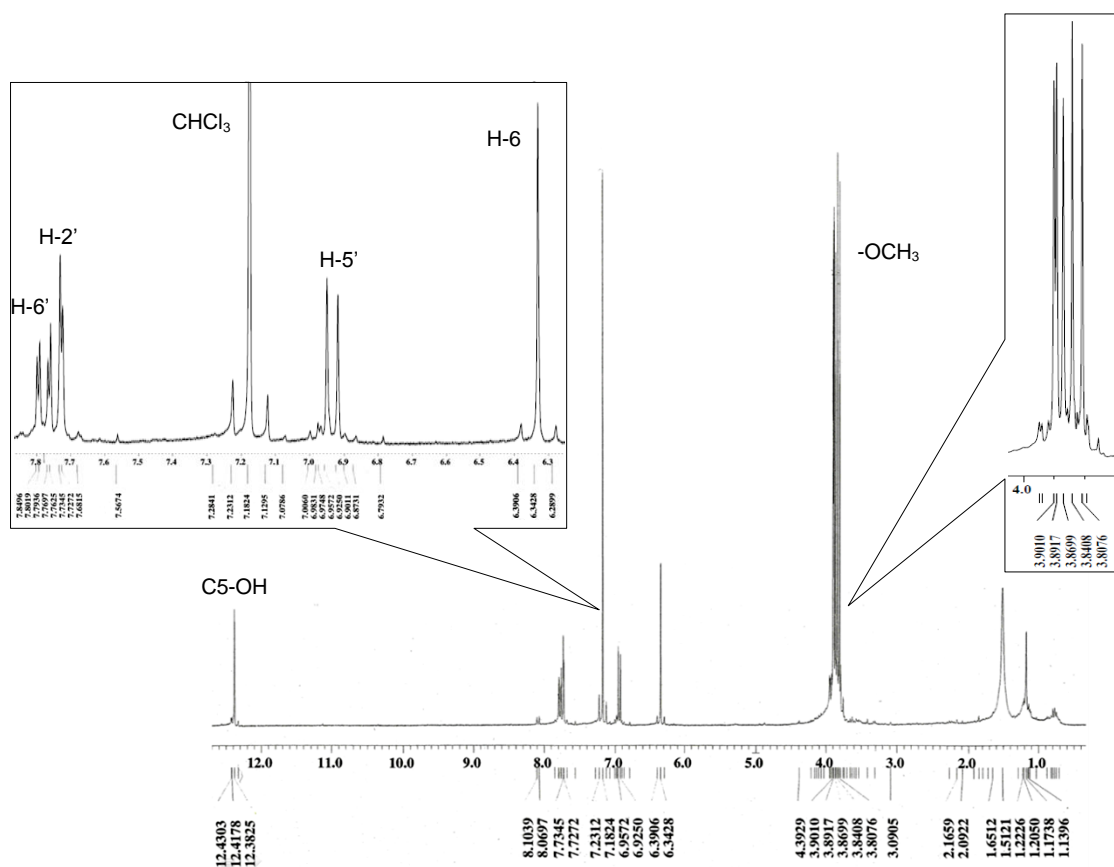


Figura 6: Espectro de RMN ^1H del compuesto I (CDCl_3 , 270 MHz)

Las señales antes descritas junto con la señal de un grupo carbonilo conjugado a 179.0 ppm y las señales a 155.6 y 138.8 ppm, nos llevó a proponer una estructura de tipo 3-metoxi flavona para el compuesto I con la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 5 (157.5 ppm). A través del espectro en dos

dimensiones HETCOR (Anexo 2) se establecieron las correlaciones entre carbonos y protones directamente enlazados. La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura para el compuesto 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona concluyeron con la elucidación de este flavonoide. (Tablas I y II)

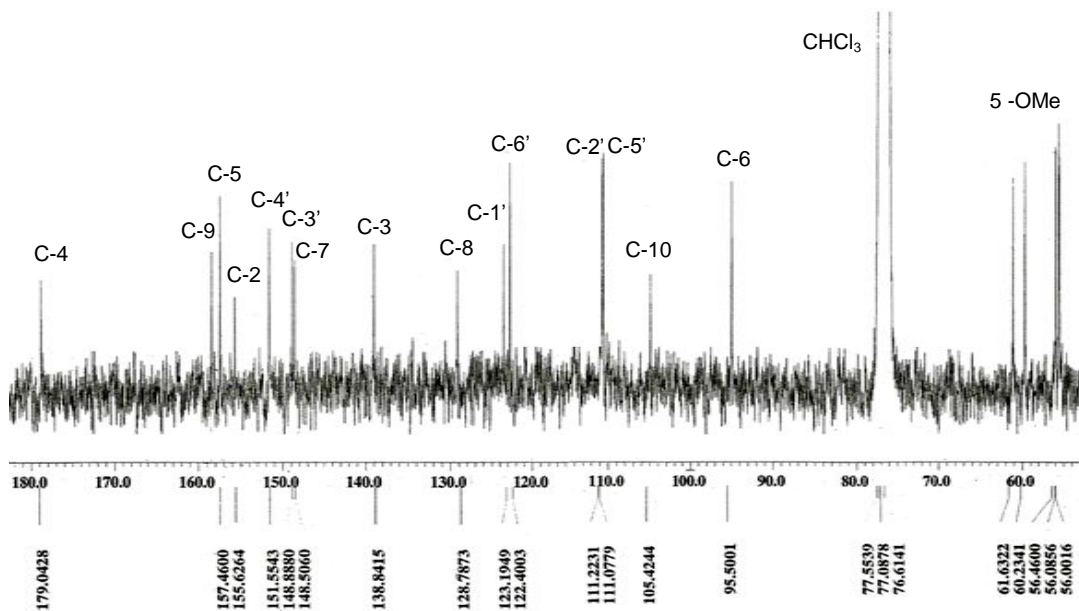


Figura 7: Espectro de RMN ¹³C del compuesto I (CDCl₃, 67.5 MHz)

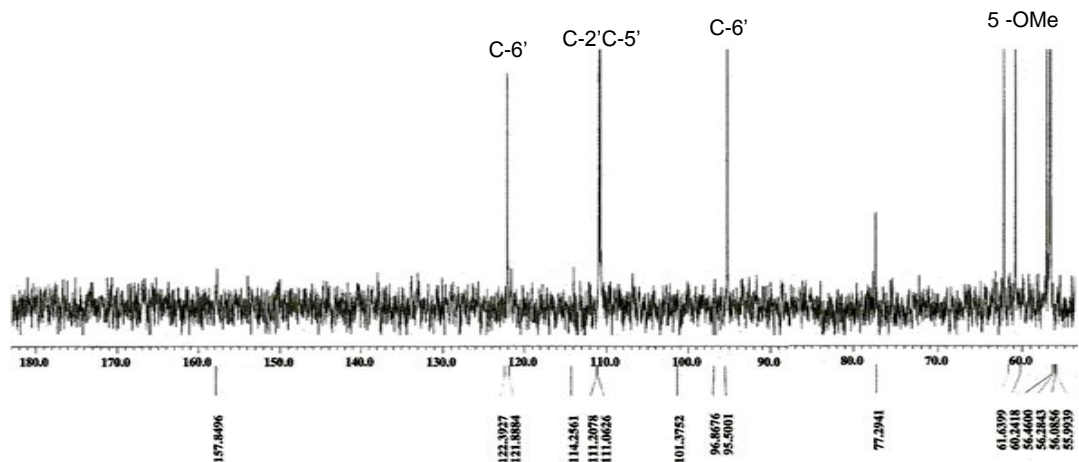


Figura 8: Espectro DEPT-135 del compuesto I (CDCl₃, 67.5 MHz)

Tabla I: Datos de RMN ^1H del compuesto I y comparación con los datos reportados en la literatura.⁹⁰

Posición	Experimental ^a	Reportado ^b
	δ_{H} (ppm) (mult, J (Hz), Integral)	δ_{H} (ppm) (mult, J (Hz), Integral)
6	6.34 (s, 1H)	6.58 (s, 1H)
2'	7.73 (d, 2.0, 1H)	7.67 (d, 2, 1H)
5'	6.94 (d, 8.7, 1H)	7.19 (d, 9, 1H)
6'	7.78 (dd, 8.6, 2.0, 1H)	7.19 (dd, 9, 2, 1H)
3-OMe	3.90*(s, 3H)	3.91*(s, 3H)
7-OMe	3.89*(s, 3H)	3.87*(s, 3H)
8-OMe	3.87*(s, 3H)	3.85*(s, 3H)
3'-OMe	3.84*(s, 3H)	3.84*(s, 3H)
4'-OMe	3.81*(s, 3H)	3.83*(s, 3H)
5-OH	12.42 (s, 1H)	12.42 (s, 1H)

a: CDCl_3 , 270 MHz

b: $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz

* Datos intercambiables

Este compuesto ha sido previamente aislado de *Ricinocarpus stylosus* Diels (Euphorbiaceae),⁹¹ *Citrus sinensis* (Rutaceae)^{90,92} y *Murraya paniculata* (Rutaceae).⁹³

Tabla II: Datos de RMN ^{13}C del compuesto I y comparación con los datos reportados en la literatura.⁹⁰

Posición	Experimental ^a	Reportado ^b
	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
2	155.6	155.2
3	138.8	138.0
4	179.0	178.3
5	157.5	156.4
6	95.5	95.8
7	158.5	158.2
8	128.8	128.8
9	148.5	147.8
10	105.4	104.5
1'	123.2	122.2
2'	111.2	111.7
3'	148.9	148.4
4'	151.6	151.3
5'	111.1	110.9
6'	122.4	121.9
3-OMe	60.2	59.7
7-OMe	56.5	56.5
8-OMe	61.6	61.0
3'-OMe	56.0	55.3
4'-OMe	56.1	56.0

a: CDCl_3 , 67.5 MHz

b: $\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz

I.9.1.2 Compuesto II: Lupeol

Este compuesto se aisló de la fracción de hexano de los tallos como un sólido blanco con punto de fusión 213-215°C. Se obtuvo en una cantidad de 22,2 mg lo que representa un 0.01% de rendimiento respecto al material vegetal inicial y un 1.71% respecto a la fracción de hexano.

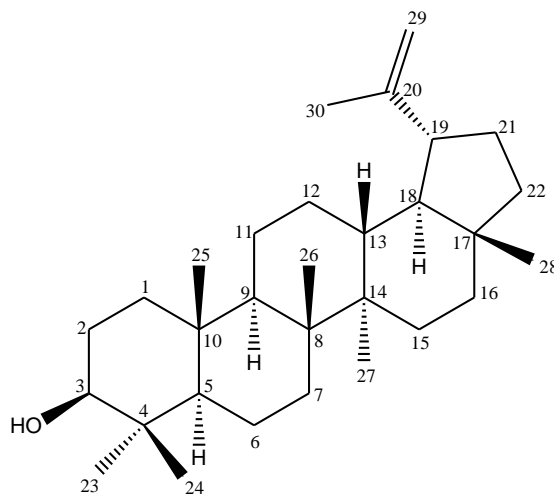


Figura 9: Estructura del compuesto II

A través de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Figuras 10 y 11) se puede apreciar que el compuesto no se aisló totalmente puro, sin embargo, se logró asignar cada una de las señales con ayuda de un experimento DEPT-135 y los espectros de RMN en dos dimensiones HETCOR y FLOCK (Anexos 3 y 4). En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales singlete que integran cada una para un protón a desplazamientos de 4.55 y 4.67 ppm indicando la presencia de una olefina en la estructura. A campo medio, se distingue una señal multiplete a un desplazamiento de 3.16 ppm, que en el espectro HMQC se correlaciona con un carbono metínico cuya señal resuena a 79.1 ppm. Esta última señal es

característica de compuestos triterpénicos esteroidales con un grupo hidroxilo con configuración β en la posición 3.

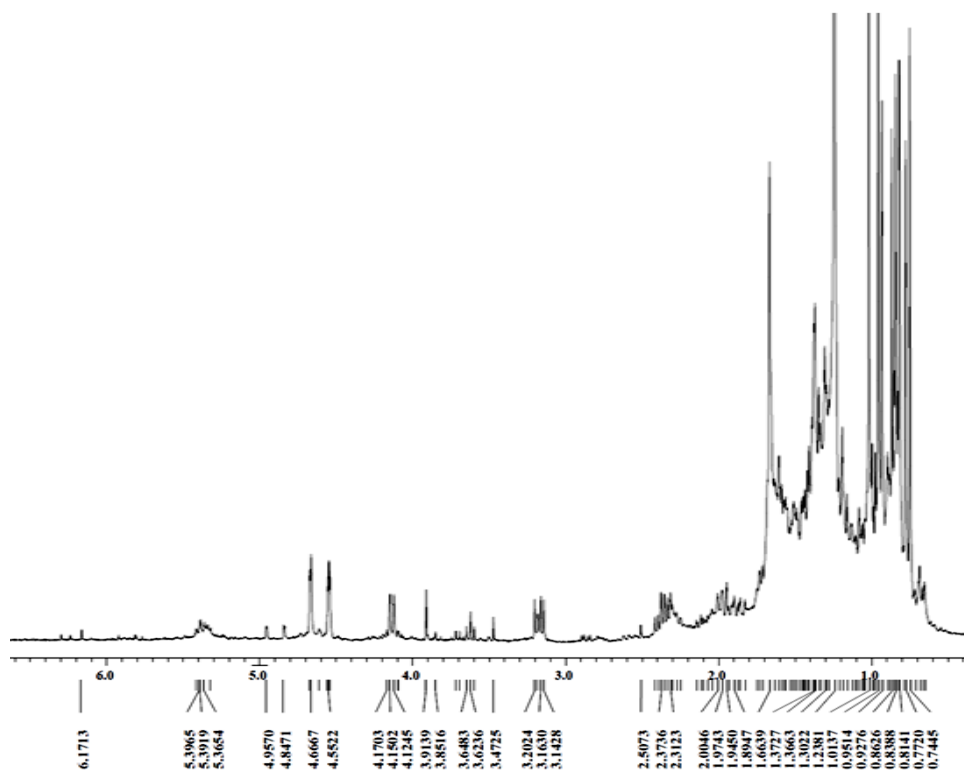


Figura 10: Espectro de RMN ^1H del compuesto II (CDCl_3 , 270 MHz)

Adicionalmente, en el espectro de RMN ^{13}C se observan las dos señales de carbonos olefínicos a desplazamientos de 109.4 y 151.0 ppm y a campo alto, se distinguen señales correspondientes a siete grupos metilos (δ_{C} 28.1, 19.4, 18.1, 16.2, 16.0, 15.4, 14.6 ppm). La multiplicidad de cada uno de los átomos de carbono presentes en la estructura fue establecida a través de un experimento DEPT-135 (Figura 11), distinguiéndose 6 carbonos cuaternarios, 11 metilenos, 6 metinos y 7 grupos metilos. La comparación de los datos espectroscópicos con los reportados en la literatura para el compuesto lupeol,⁹⁴ confirmaron que el compuesto II tenía la misma estructura (Tablas III y IV).

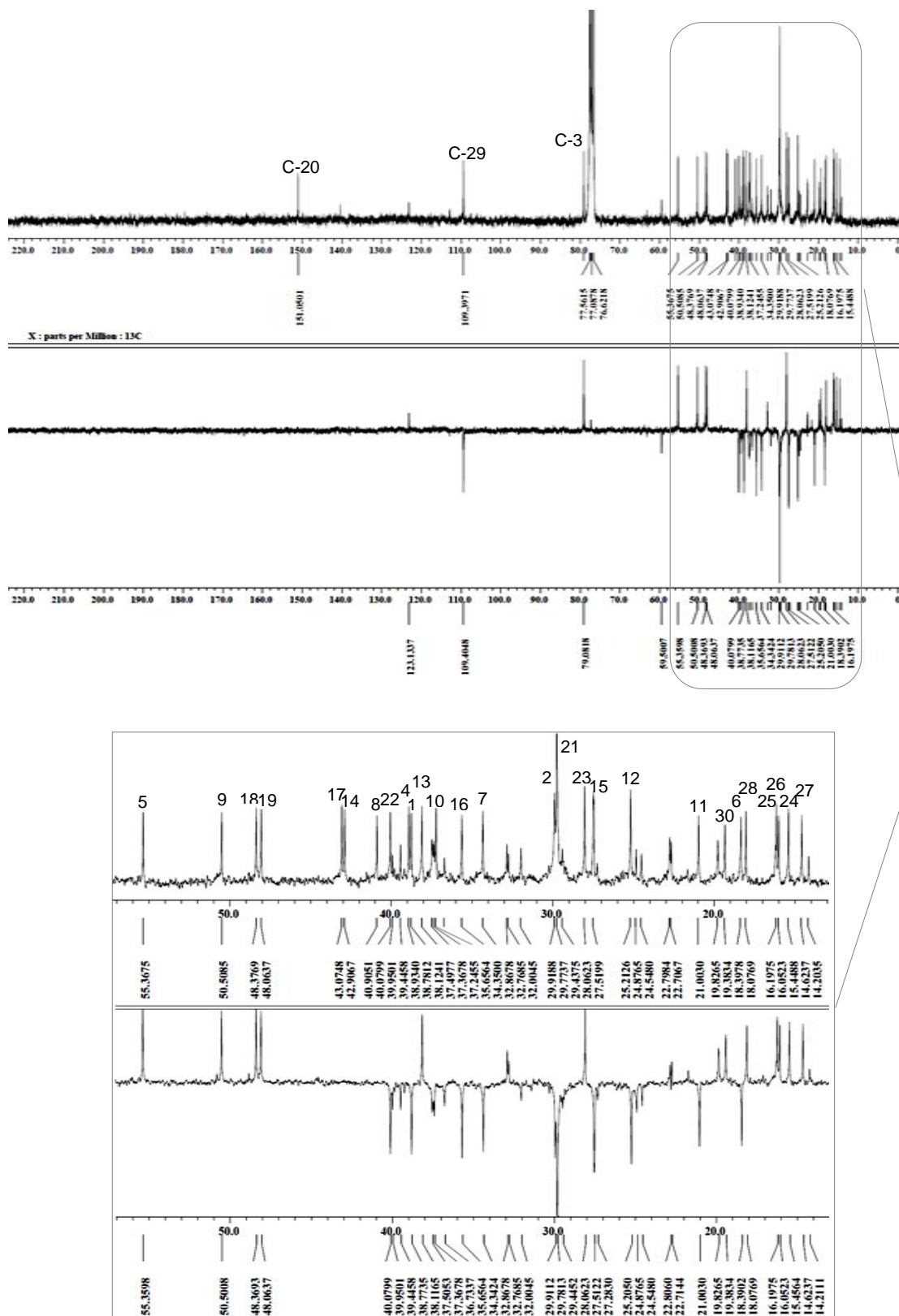


Figura 11: Espectros de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto II (CDCl_3 , 67.5 MHz)

Tabla III: Datos de RMN ^{13}C del compuesto II y comparación con los datos reportados en la literatura.⁹⁴

Posición	Experimental^a δ_{C} (ppm)	Reportado^b δ_{C} (ppm)
1	38.8	38.7
2	29.8	27.4
3	79.1	78.9
4	38.9	38.8
5	55.4	55.3
6	18.4	18.3
7	34.3	34.2
8	40.9	40.8
9	50.5	50.4
10	37.2	37.1
11	21.0	20.9
12	25.2	25.1
13	38.1	38.0
14	42.9	42.8
15	27.5	27.4
16	35.6	35.5
17	43.1	43.0
18	48.4	48.2
19	48.1	47.9
20	151.0	150.9
21	29.9	29.8
22	40.1	40.0
23	28.1	28.0
24	15.4	15.4
25	16.2	16.1
26	16.0	15.9
27	14.6	14.5
28	18.1	18.0
29	109.4	109.3
30	19.4	19.3

a: CDCl_3 , 67.5 MHz

b: CDCl_3 , 100.56MHz

Tabla IV: Datos de RMN ^1H del compuesto II y comparación con los datos reportados en la literatura.⁹⁴

Posición	Experimental^a δ_{C} (ppm)	Reportado^b δ_{C} (ppm)
1	1.70 (m)	0.91 (t), 1.68 (d)
2	1.50 (m)	1.54 (q), 1.61 (d)
3	3.16 (m)	3.18 (dd)
5	0.74 (s)	0.69 (d)
6	1.37 (m)	1.39 (q)
7	1.40 (m)	1.41 (m)
9	1.30 (m)	1.28 (d)
11	1.41 (m)	1.25 (q), 1.42 (d)
12	1.69 (m)	1.07 (q), 1.68 (d)
13	1.71 (m)	1.67 (t)
15	1.66 (sa)	1.01 (d), 1.71 (t)
16	1.52 (m)	1.38 (t), 1.49 (d)
18	1.38 (m)	1.37 (t)
19	2.40 (m)	2.39 (m)
21	1.30 (m)	1.33 (m), 1.93 (m)
22	1.41 (m)	1.20 (m), 1.42 (m)
23	1.01 (s)	0.98 (s)
24	0.77 (s)	0.77 (s)
25	0.84 (s)	0.84 (s)
26	1.01 (s)	1.04 (s)
27	0.95 (s)	0.97 (s)
28	0.81 (s)	0.79 (s)
29	4.55 (m), 4.67 (m)	4.56 (m), 4.69 (m)
30	1.66 (s)	1.69 (s)

a: CDCl_3 , 67.5 MHz

b: CDCl_3 , 100.56MHz

I.9.1.3 Compuesto III: Crotofolin E

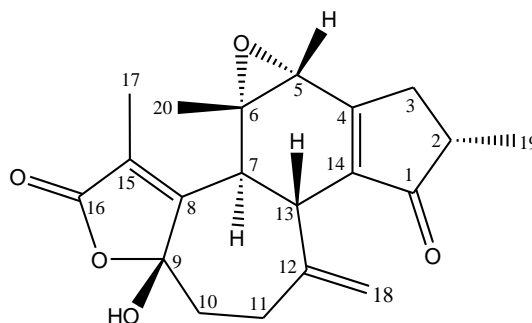


Figura 12: Estructura del compuesto III

El compuesto **III** se obtuvo como cristales blancos con p.f. 207-209°C y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} -76.4$ (c 1.00, CHCl₃). Su fórmula molecular fue establecida como C₂₀H₂₂O₅ basado en sus espectros de RMN ¹³C y masas (Figura 13) el cual mostró un ión molecular de 342.2 m/z indicando 10 grados de insaturación en la estructura.

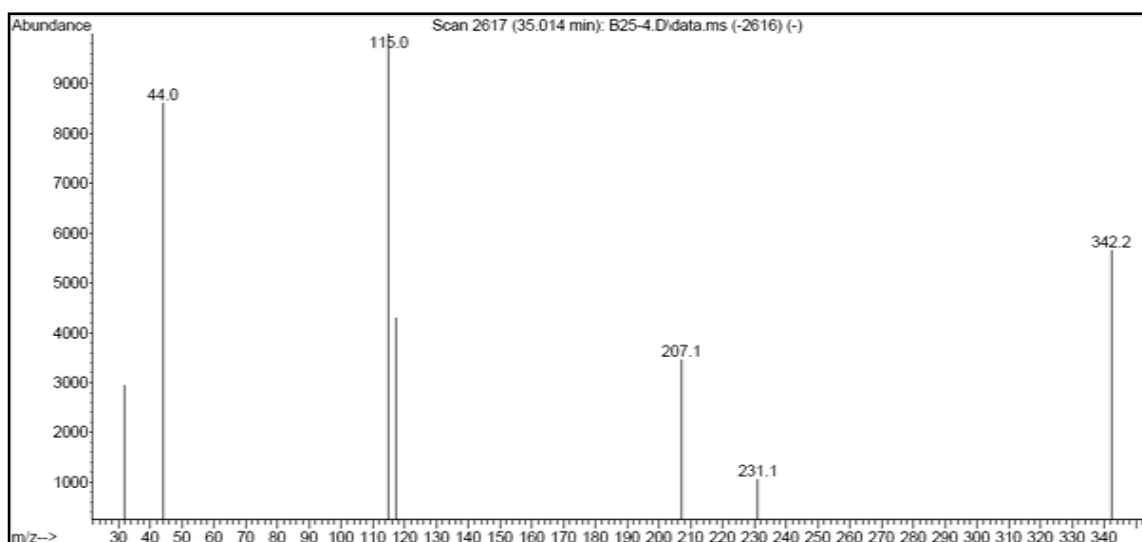


Figura 13: Espectro de masas del compuesto III

El espectro de IR reveló la presencia de bandas de absorción de grupo hidroxilo (3465.7 cm^{-1}), γ -lactona α,β -insaturada (1737.0 cm^{-1}), ciclopentenona α,β -insaturada (1695.4 cm^{-1}) y metileno terminal (1651.5 y 902.2 cm^{-1}) (Figura 14).

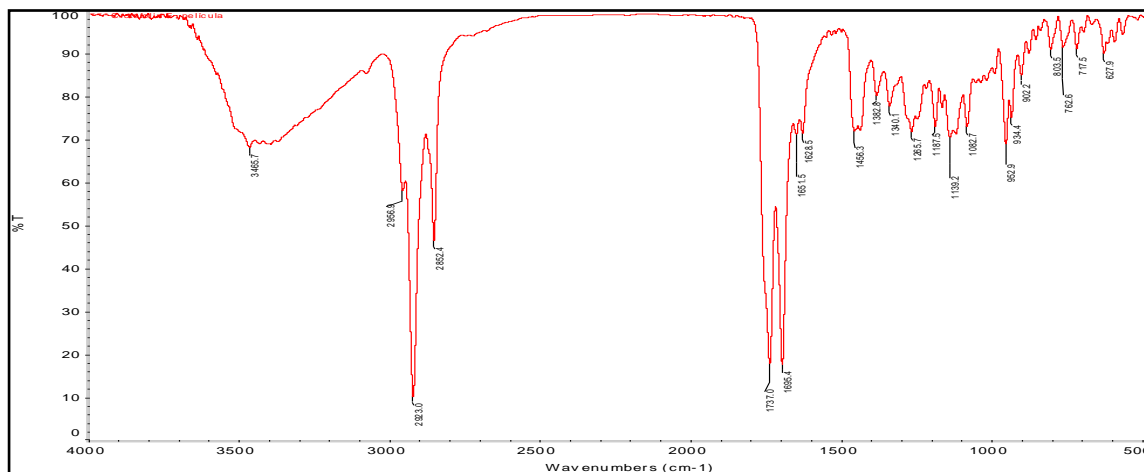


Figura 14: Espectro IR del compuesto III

El espectro de RMN ^1H (Figura 15) mostró señales debidas a un grupo metil vinílico a 1.85 ppm, un metilo secundario a 1.17 ppm y un metilo sobre un carbono epoxidado que aparece como un singlete a 1.29 ppm. Dos señales singlete integrando cada una para un protón a desplazamientos de 4.44 y 4.90 ppm evidenciaron la presencia de una olefina terminal o exocíclica en la estructura y un singlete a 3.30 ppm indicó la presencia de un protón oxo-alílico.

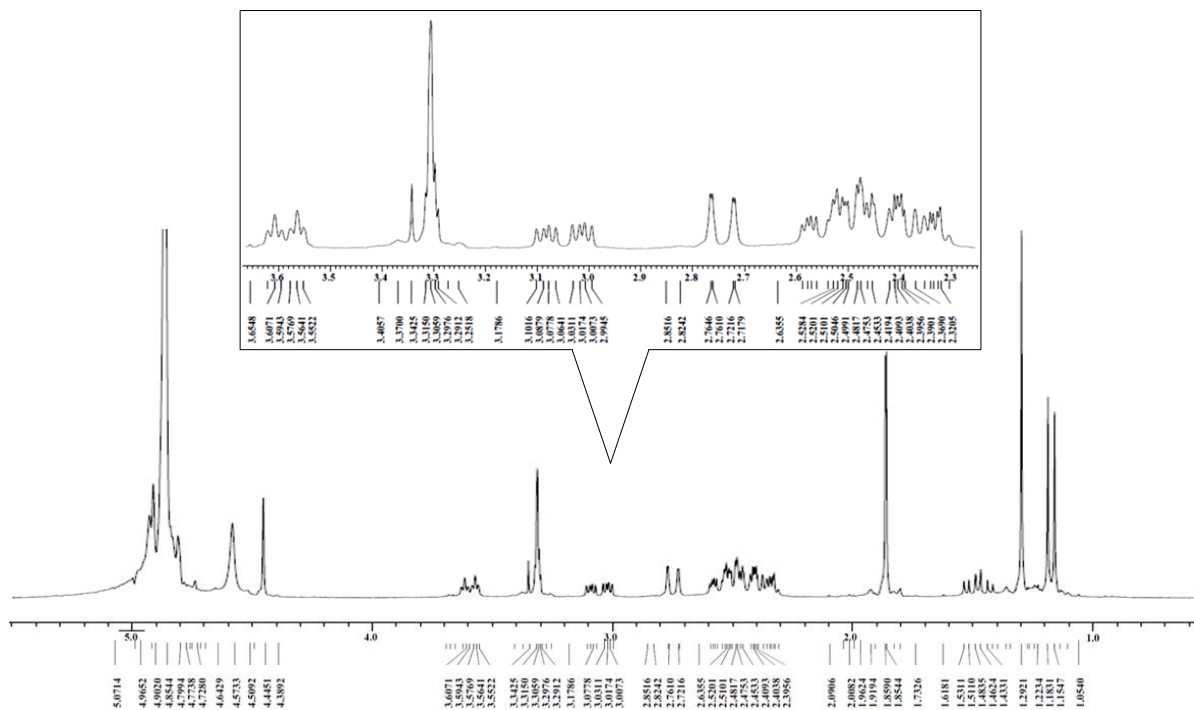


Figura 15: Espectro de RMN ¹H del compuesto III (MeOD, 270 MHz).

El espectro de RMN¹³C (Figura 16) mostró la resonancia de 20 átomos de carbono, los cuales fueron discriminados con ayuda de un experimento DEPT-135 (Figura 16) en nueve carbonos cuaternarios, cuatro metinos, cuatro metilenos y los tres grupos metilos ya mencionados. En la zona a campo bajo, se observan nueve señales, tres de las cuales fueron asignadas a una ciclopentenona α,β -insaturada (δ_C 209.6, 144.4 y 167.9 ppm), otras tres señales evidenciaron la presencia de una unidad butenolido α,β -insaturado (δ_C 171.6, 129.4 y 160.2 ppm), las resonancias a 111.6 y 147.0 ppm corresponden al par de carbonos de la olefina terminal ya observada en el espectro de protones. La señal a 108.7 ppm nos indicó la presencia de un carbono cuaternario hemiacetalico. A través de los espectros de RMN en 2D, HETCOR y FLOCK, se

establecieron las correlaciones de los protones y carbonos a uno, dos y tres enlaces, respectivamente (Anexos 5 y 6).

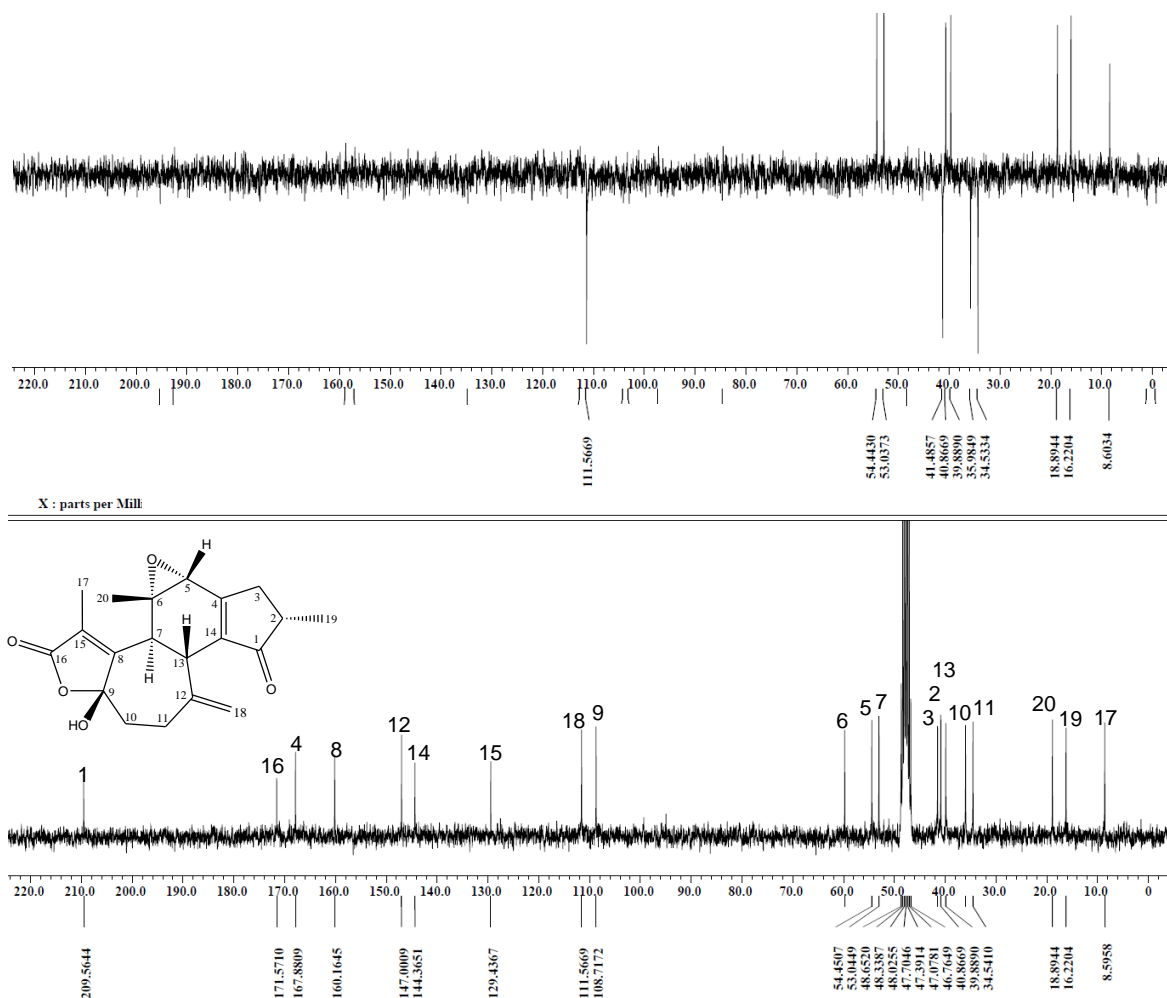


Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto III (MeOD, 67.5 MHz).

En base al análisis de los datos espectroscópicos de este compuesto, se propuso una estructura diterpénica con esqueleto crotofolano. La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura para el compuesto crotofolin E, aislado años atrás de la especie *Croton corylifolius*,⁴³ nos indicó que se trataba del mismo compuesto. En la Tabla V, se comparan los datos de RMN ^{13}C experimentales con los reportados para Crotofolin E. No se hace la comparación de los desplazamientos de ^1H ya que no se encuentran

reportados. Por otro lado, es importante mencionar que de acuerdo a los datos de RMN en 2D, los cuales no están disponibles en la publicación, se asignaron con certeza algunas de las señales. Finalmente, la estructura del compuesto fue confirmada a través de un análisis de difracción de Rayos-X (Figura 17, Tabla VI).

Tabla V: Datos de RMN ^{13}C , RMN ^1H del compuesto III y comparación con los datos reportados para crotofolin E.

Posición	Experimental (MeOD, 270 MHz y 67.5 MHz)			Reportado ⁴³ (CDCl ₃ , 100 MHz)
	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm (m, J(Hz))	FLOCK	δ_{C} ppm
1	209.6	----		206.6
2	40.9	2.48 (m)	1.17	52.2
3	41.5	1.47 (dt, $J_1=12.9$, $J_2=5.7$); 2.58 (m)	1.17	41.2
4	167.9	----		165.8
5	54.5	3.30 (s)	1.29	53.7
6	59.8	----	1.29; 2.74	59.2
7	53.0	2.74 (dd, $J_1=11.6$, $J_2=1.0$)	1.29	39.4
8	160.2	----	1.86; 2.74	159.1
9	108.7	----		107.9
10	36.0	2.41 (m); 3.04 (m)		34.3
11	34.5	2.53 (m)	4.44	35.7
12	147.0	----		128.4
13	39.9	3.59 (td, $J_1=11.6$, $J_2=3.5$)	4.90	40.0
14	144.4	----		146.1
15	129.4	----	1.86	143.6
16	171.6	----	1.86	169.7
17	8.6	1.86 (s)		19.6
18	111.6	4.44 (s); 4.90 (s)		111.7
19	16.2	1.17 (d, $J=7.7$)		16.8
20	18.9	1.29 (s)		9.5

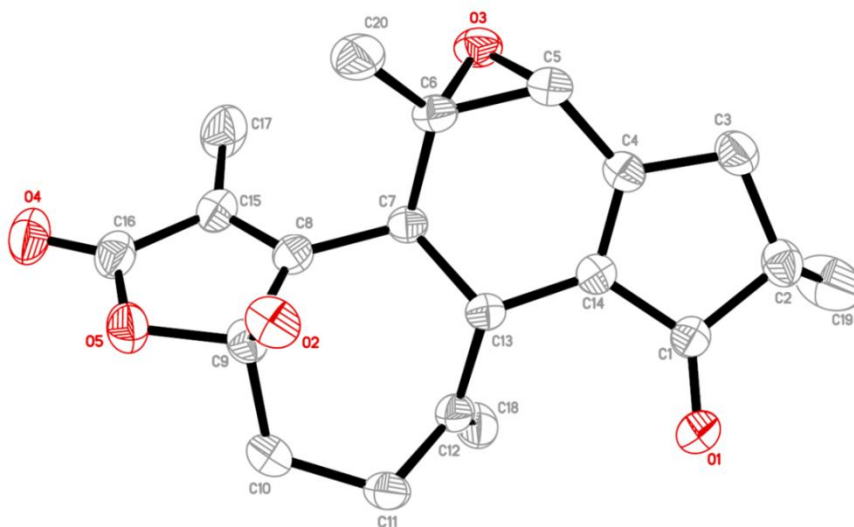


Figura 17: Diagrama ORTEP del compuesto III. No se determinó la configuración absoluta. (Se omiten los hidrógenos para mayor claridad)

Tabla VI: Datos cristalográficos del compuesto III.

Data del cristal							
$C_{20}H_{22}O_5$				$V = 1896.5 (6) \text{ \AA}^3$			
$Mr = 338.34$				$Z = 4$			
Orthorhombic, $P2_12_12_1$				Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71070 \text{ \AA}$			
$a = 10.941 (2) \text{ \AA}$				$\mu = 0.09 \text{ mm}^{-1}$			
$b = 10.946 (2) \text{ \AA}$				$T = 293 \text{ K}$			
$c = 15.835 (3) \text{ \AA}$				$0.50 \times 0.48 \times 0.45 \text{ mm}$			
Datos de recolección							
22682 reflejos medidos				3483 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$			
3910 reflexiones independientes				$R_{\text{int}} = 0.025$			
Distancia de enlaces Å							
O1-C1	1.217 (2)	C4-C5	1.482 (2)	C11-H11A	0.9700	C17-H17B	0.9600
O2-C9	1.382 (2)	C4-C3	1.500 (3)	C11-H11B	0.9700	C17-H17C	0.9600
O3-C5	1.450 (2)	C5-C6	1.471 (3)	C12-C18	1.318 (3)	C18-H18A	0.9300
O4-C16	1.210 (2)	C5-H5A	0.9800	C12-C11	1.506 (3)	C18-H18B	0.9300
O5-C16	1.347 (3)	C6-C20	1.502 (3)	C12-C13	1.526 (2)	C19-H19A	0.9600
O5-C9	1.486 (2)	C6-C7	1.550 (2)	C13-C7	1.552 (2)	C19-H19B	0.9600
C1-C2	1.525 (3)	C7-C8	1.513 (2)	C13-H13A	0.9800	C19-H19C	0.9600
C2-C19	1.520 (3)	C7-H7A	0.9800	C14-C1	1.474 (2)	C20-H20A	0.9600
C2-C3	1.532 (3)	C9-C8	1.511 (2)	C14-C13	1.509 (2)	C20-H20B	0.9600
C2-H2A	0.9800	C9-C10	1.530 (3)	C15-C8	1.335 (3)	C20-H20C	0.9600
C3-H3A	0.9700	C10-H10A	0.9700	C15-C16	1.468 (3)		
C3-H3B	0.9700	C10-H10B	0.9700	C15-C17	1.500 (3)		
C4-C14	1.345 (2)	C11-C10	1.533 (3)	C17-H17A	0.9600		

Tabla VI: Datos cristalográficos del compuesto III. (Continuación)

Parámetros geométricos (°)			
O1—C1—C14	127.82 (16)	C11—C10—H10A	108.3
O1—C1—C2	123.64 (16)	C9—C10—H10B	108.3
C14—C1—C2	108.49 (15)	C11—C10—H10B	108.3
C19—C2—C1	112.44 (19)	H10A—C10—H10B	107.4
C19—C2—C3	115.4 (2)	C12—C11—C10	112.52 (15)
C1—C2—C3	104.99 (15)	C12—C11—H11A	109.1
C19—C2—H2A	107.9	C10—C11—H11A	109.1
C1—C2—H2A	107.9	C12—C11—H11B	109.1
C3—C2—H2A	107.9	C10—C11—H11B	109.1
C5—O3—C6	60.94 (12)	H11A—C11—H11B	107.8
C4—C3—C2	103.88 (14)	C18—C12—C11	122.58(17)
C4—C3—H3A	111.0	C18—C12—C13	122.21 (16)
C2—C3—H3A	111.0	C11—C12—C13	114.95 (15)
C4—C3—H3B	111.0	C14—C13—C12	115.46 (14)
C2—C3—H3B	111.0	C14—C13—C7	108.85 (13)
H3A—C3—H3B	109.0	C12—C13—C7	109.24 (13)
C14—C4—C5	121.20 (16)	C14—C13—H13A	107.7
C14—C4—C3	114.10 (16)	C12—C13—H13A	107.7
C5—C4—C3	124.29 (15)	C7—C13—H13A	107.7
C16—O5—C9	109.29 (13)	C4—C14—C1	108.36 (15)
O3—C5—C6	59.55 (11)	C4—C14—C13	122.77 (16)
O3—C5—C4	119.16 (14)	C1—C14—C13	128.54 (14)
C6—C5—C4	118.01 (14)	C8—C15—C16	108.55 (17)
O3—C5—H5A	116.1	C8—C15—C17	129.7 (2)
C6—C5—H5A	116.1	C16—C15—C17	121.77 (19)
C4—C5—H5A	116.1	O4—C16—O5	121.1 (2)
O3—C6—C5	59.51 (11)	O4—C16—C15	129.5 (2)
O3—C6—C20	115.51 (15)	O5—C16—C15	109.40 (16)
C5—C6—C20	119.64 (16)	C15—C17—H17A	109.5
O3—C6—C7	112.31 (14)	C15—C17—H17B	109.5
C5—C6—C7	115.48 (15)	H17A—C17—H17B	109.5
C20—C6—C7	119.56 (16)	C15—C17—H17C	109.5
C8—C7—C6	113.27 (14)	H17A—C17—H17C	109.5
C8—C7—C13	113.50 (13)	H17B—C17—H17C	109.5
C6—C7—C13	111.65 (14)	C12—C18—H18A	120.0
C8—C7—H7A	105.9	C12—C18—H18B	120.0
C6—C7—H7A	105.9	H18A—C18—H18B	120.0
C13—C7—H7A	105.9	C2—C19—H19A	109.5
C15—C8—C9	109.66 (16)	C2—C19—H19B	109.5
C15—C8—C7	125.69 (17)	H19A—C19—H19B	109.5
C9—C8—C7	124.62 (16)	C2—C19—H19C	109.5
O2—C9—O5	109.09 (14)	H19A—C19—H19C	109.5
O2—C9—C8	110.17 (14)	H19B—C19—H19C	109.5
O5—C9—C8	102.66 (14)	C6—C20—H20A	109.5
O2—C9—C10	114.40 (16)	C6—C20—H20B	109.5
O5—C9—C10	104.20 (13)	H20A—C20—H20B	109.5
C8—C9—C10	115.29 (15)	C6—C20—H20C	109.5
C9—C10—C11	115.77 (15)	H20A—C20—H20C	109.5
C9—C10—H10A	108.3	H20B—C20—H20C	109.5

I.9.1.4 Compuesto IV: Crotoctarasin A

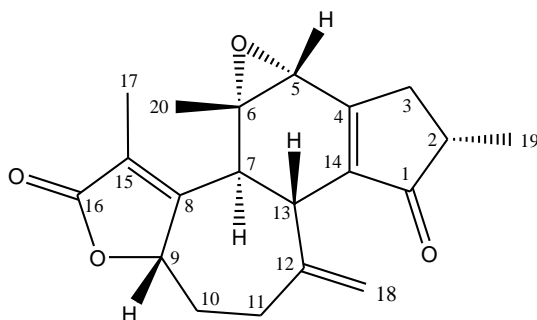


Figura 18: Estructura del compuesto IV

El compuesto IV se aisló como un aceite incoloro con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} -33.3$ (c 1.00, CHCl_3). El espectro de masas (Figura 19) mostró un ión molecular de 326 m/z lo que permitió establecer en conjunto con el espectro de RMN ^{13}C una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$.

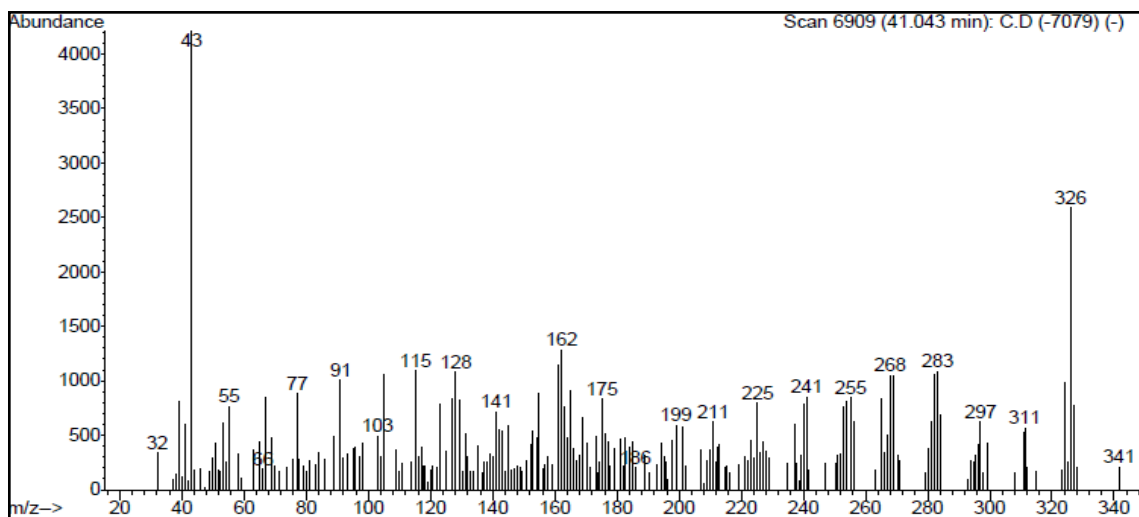


Figura 19: Espectro de masas del compuesto IV

El espectro de IR mostró bandas de absorción a 1753, 1704, 1663 y 901 cm^{-1} , indicando nuevamente la presencia de grupos γ -lactona α,β -insaturada, ciclopentenona α,β -insaturada y dobles enlaces (Figura 20).

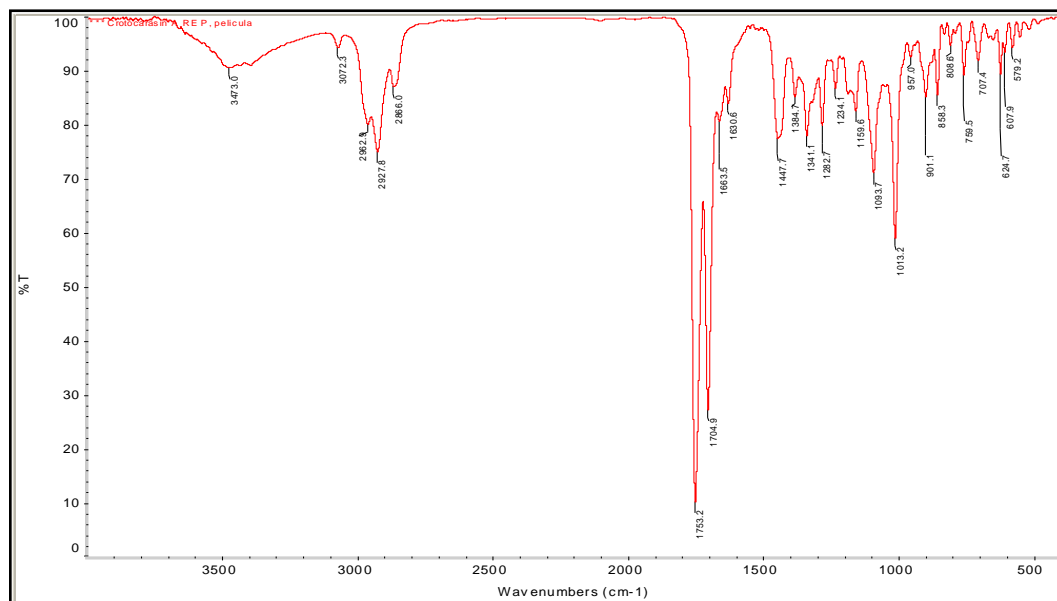


Figura 20: Espectro IR del compuesto IV

Al analizar los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Figuras 21 y 23), claramente se puede apreciar que este compuesto tiene un esqueleto similar al compuesto III. Las diferencias en sus espectros de RMN pueden ser explicadas por la aparición de un singlete ancho que integra para un protón a un desplazamiento de 5.00 ppm y que se correlaciona con un carbono que resuena a 82.3 ppm en el experimento HMQC (Figura 22). Esta nueva señal se asignó a un nuevo protón oxo-alílico sobre C-9, lo que fue evidente debido a la diferencia en el desplazamiento químico del carbono en esta posición cambiando de 108.7 a 82.3 ppm. Esta nueva señal y las pequeñas diferencias en el desplazamiento químico del resto de las señales, además del análisis detallado de los espectros de RMN en 2D (Anexos 7 y 8) nos llevaron a proponer un diterpeno pentacíclico muy similar a crotofolin E con la diferencia en la ausencia del grupo hidroxilo sobre el C-9.

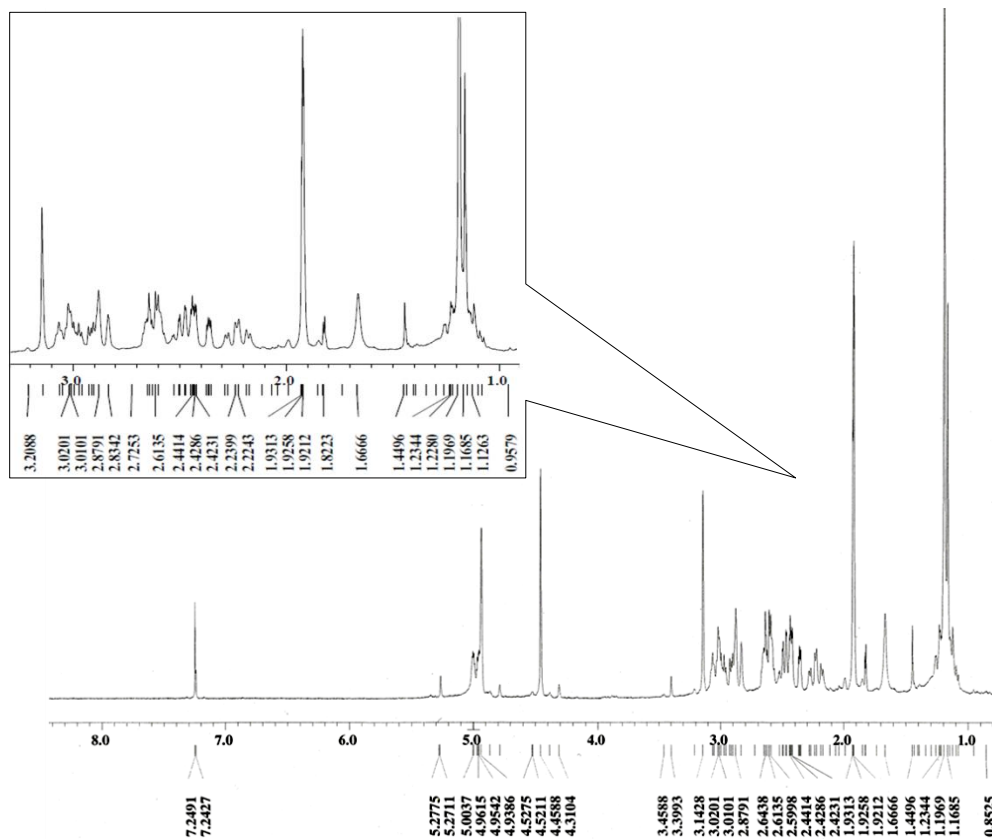


Figura 21: Espectro de RMN ^1H del compuesto IV (CDCl_3 , 270 MHz).

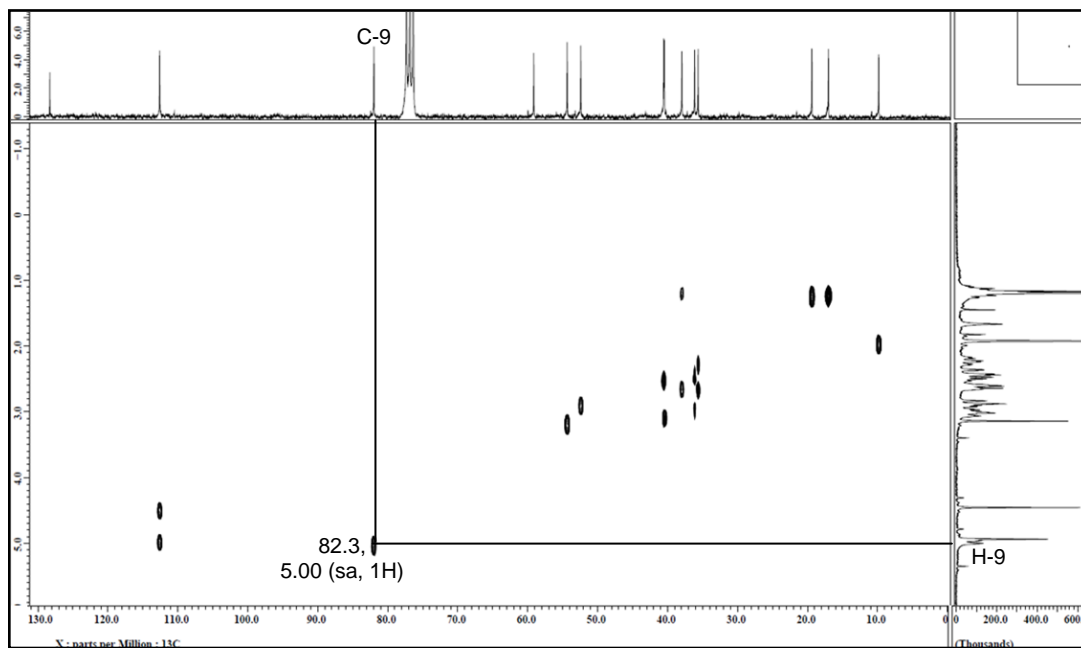


Figura 22: Espectro HETCOR del compuesto IV (CDCl_3 , 67.5 MHz).

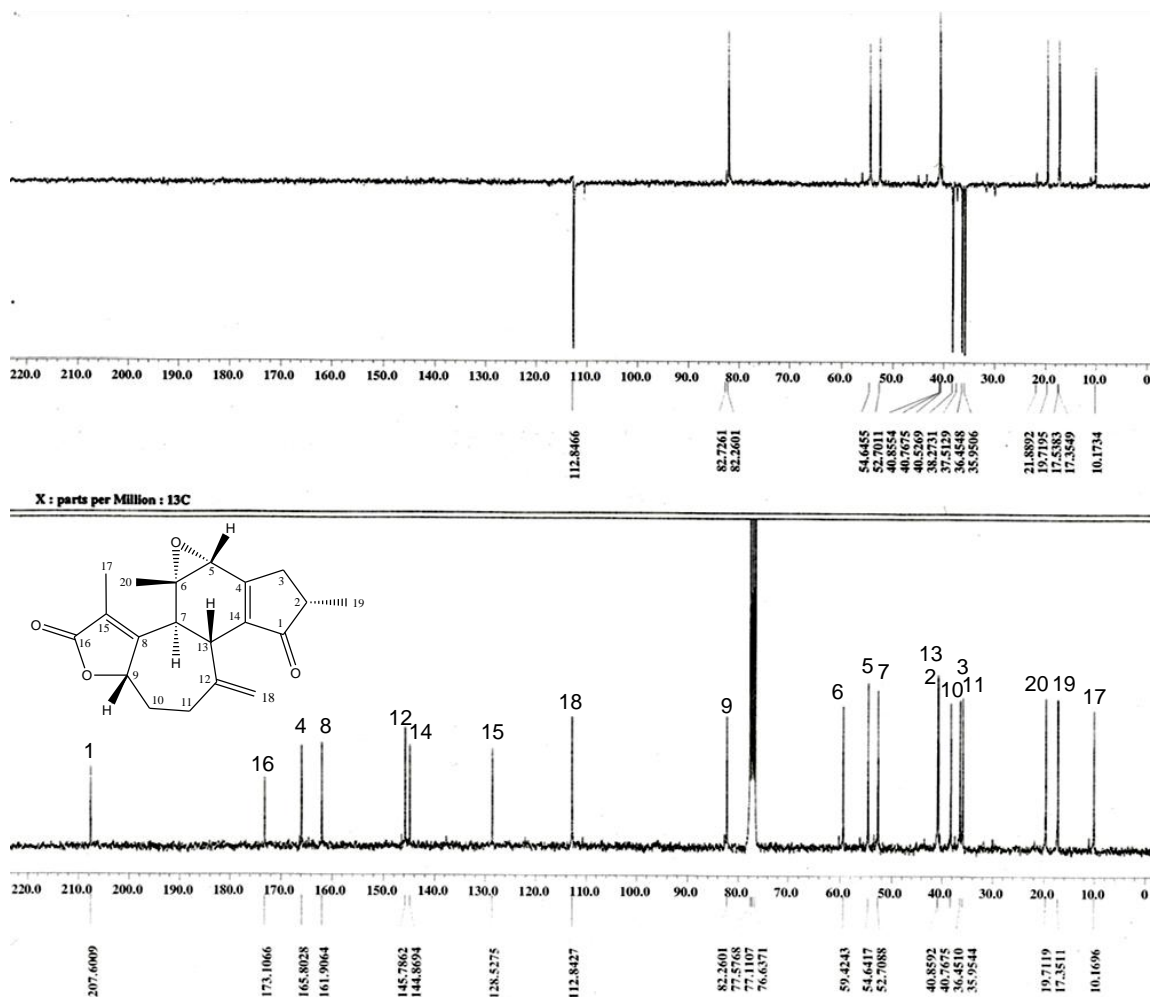


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto IV (CDCl_3 , 67.5 MHz).

En la Tabla VII se muestran los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto IV a partir de los espectros de RMN en una y dos dimensiones.

Tabla VII: Datos de RMN ^{13}C , ^1H , DEPT-135, HETCOR y FLOCK del compuesto IV.

Posición	δ_{C} ppm	DEPT	δ_{H} ppm	FLOCK
1	207.6	C	----	1.18
2	40.8	CH	2.47 (m)	1.18
3	36.4	CH ₂	2.44 (m); 2.87 (m)	1.18
4	165.8	C	----	3.14
5	54.6	CH	3.14 (s)	1.20
6	59.4	C	----	1.20; 2.83
7	52.7	CH	2.83 (sa)	1.20; 3.14
8	161.9	C	----	1.93
9	82.3	CH	5.00 (sa)	
10	38.3	CH ₂	1.23 (m); 2.61 (d, $J=3.7$ Hz)	2.23; 2.64
11	35.9	CH ₂	2.23 (dt, $J_1=12.6$ Hz; $J_1=3.7$ Hz); 2.64 (m)	4.46; 5.00
12	145.8	C	----	2.83
13	40.9	CH	3.01 (m)	2.64; 4.94
14	144.9	C	----	3.14
15	128.8	C	----	1.93
16	173.1	C	----	1.93
17	10.2	CH ₃	1.93 (s)	
18	112.8	CH ₂	4.46 (s,); 4.94 (s)	
19	17.3	CH ₃	1.18 (d, $J=7.7$ Hz)	
20	19.7	CH ₃	1.20 (s)	

Este es un nuevo compuesto con esqueleto crotofolano que se reporta en la literatura de productos naturales y al cual identificamos como crotoctarasin A. Debido a que la estereoquímica relativa de los diterpenos crotofolanos hasta ahora aislados⁴²⁻⁴⁶ ha sido establecida a través de estudios de Rayos-X y basados en la gran similitud de los datos de RMN de este compuesto con crotofolin E (III), aquí proponemos la misma estereoquímica relativa para crotoctarasin A (IV).

I.9.1.5 Compuesto V: Crotoctarasin B

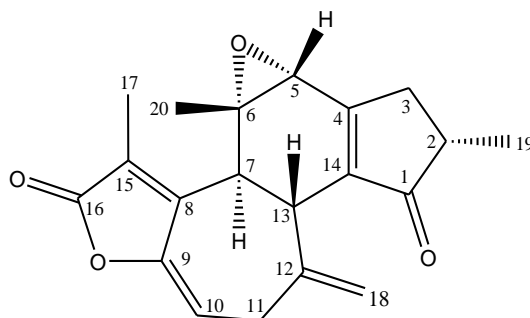


Figura 24: Estructura del compuesto V

El compuesto V se aisló como un aceite amarillo con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} -56.6$ (c 1.00, CHCl_3). Su fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$ fue deducida a partir de los espectros de RMN ^{13}C y masas (Figura 25) indicando once insaturaciones en la estructura.

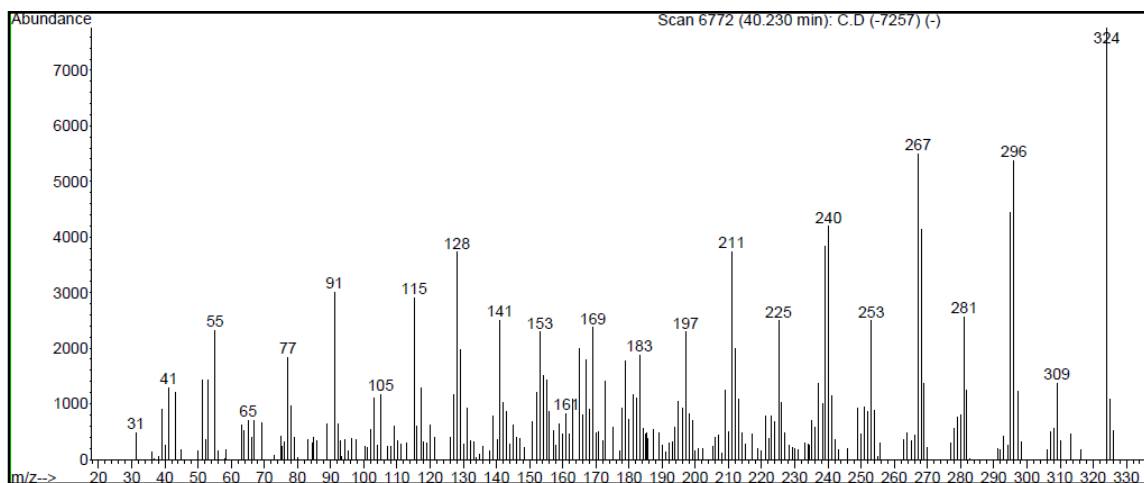


Figura 25: Espectro de masas del compuesto V

El espectro de IR (Figura 26) mostró bandas de absorción a 1735 y 1710 cm^{-1} , igual que en los compuestos III y IV, correspondientes a la vibración del enlace $\text{C}=\text{O}$ de una γ -lactona α,β -insaturada y a una ciclopentenona α,β -insaturada, respectivamente.

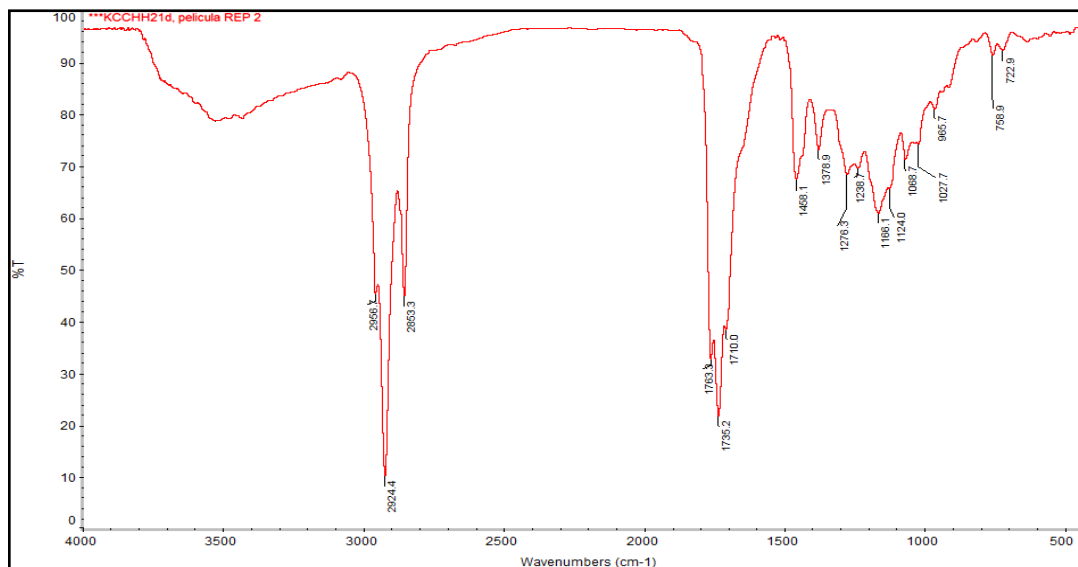


Figura 26: Espectro de masas del compuesto V

El espectro de RMN ^1H (Figura 27), a pesar de que mostraba restos de acetato de etilo, resultó ser muy similar a los espectros de los compuestos **III** y **IV**, observándose nuevamente las señales a campo alto de los tres grupos metilo a desplazamientos de 1.19 ppm (d, $J= 6.0$ Hz, H19), 1.21 ppm (s, H20) y 2.08 (s, H17). Se observa la señal singlete a 3.16 ppm del protón oxo-alílico en la posición 5 y las señales singletes a 4.53 y 5.04 ppm de la olefina exocíclica.

A pesar de estas similitudes, sin embargo, se observaba en el espectro una nueva señal doblete de doblete que integraba para un protón a 5.97 ppm (dd, $J_1=6.4$ Hz; $J_2=3.5$ Hz, H10) que no estaba presente en los espectros de los compuestos **III** y **IV**.

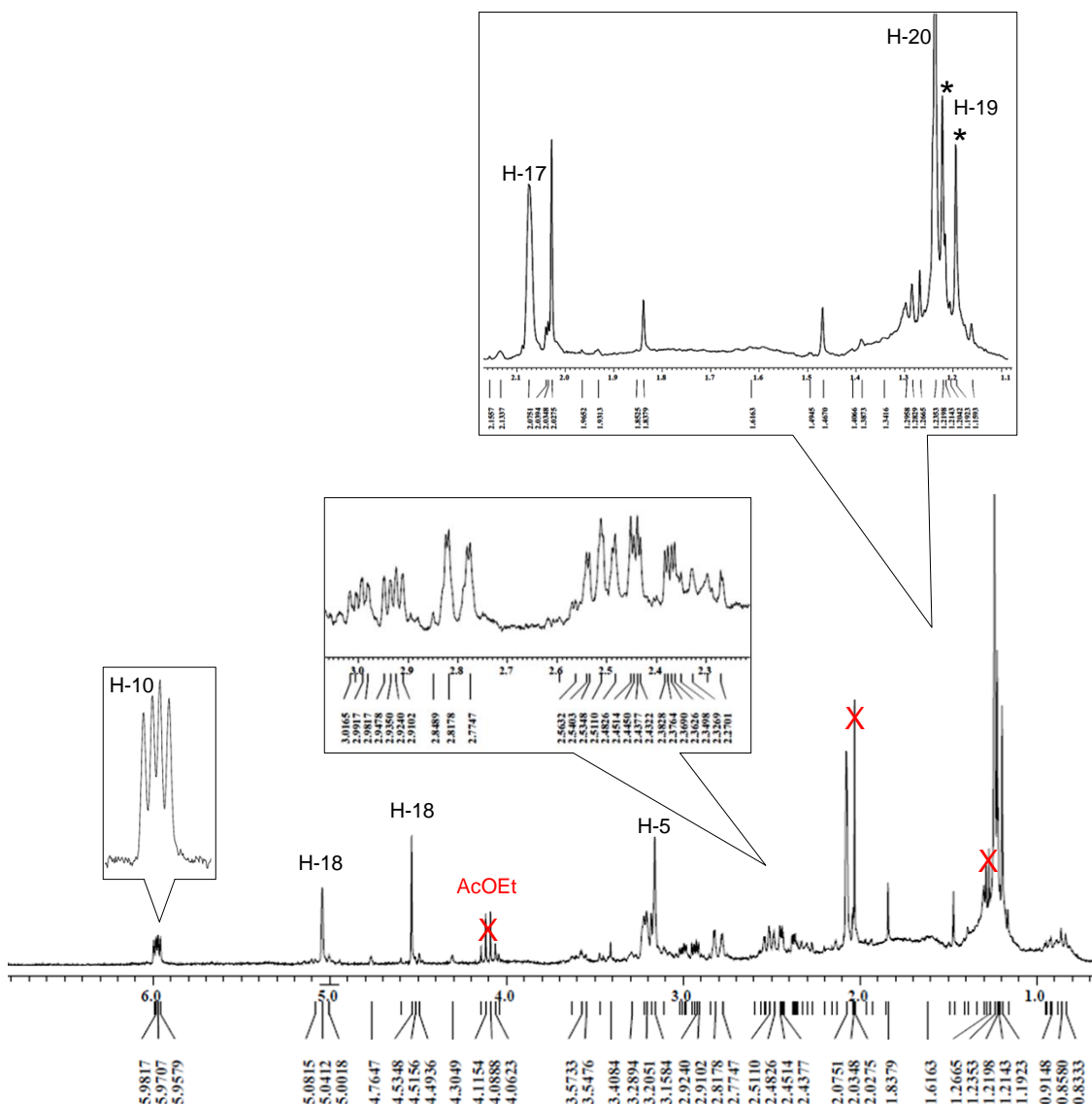


Figura 27: Espectro de RMN ^1H del compuesto V (CDCl_3 , 270 MHz).

Por otro lado, en el espectro RMN ^{13}C (Figura 28), se observa a 113.4 ppm una nueva señal, que en el espectro HETCOR (Anexo 9) se correlaciona con el doblete de doblete a 5.97 ppm y la señal de C-9 ahora se encuentra desplazada a 148.8 ppm. Estos datos, sumado a un número de insaturación adicional calculado a partir de la fórmula molecular, nos hizo pensar en un compuesto similar a croto-carasin A con una insaturación entre los carbonos 9 y 10.

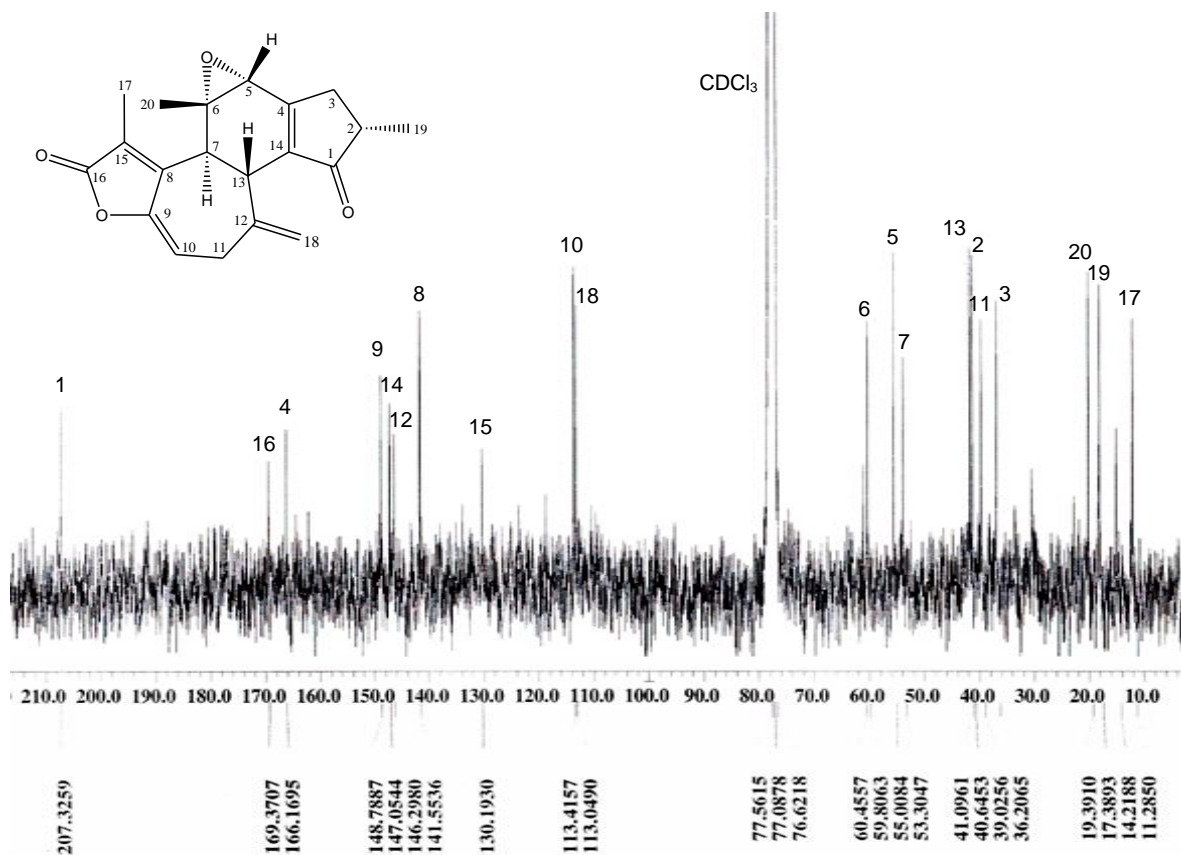


Figura 28: Espectro de RMN ¹³C del compuesto V (CDCl₃, 67.5 MHz).

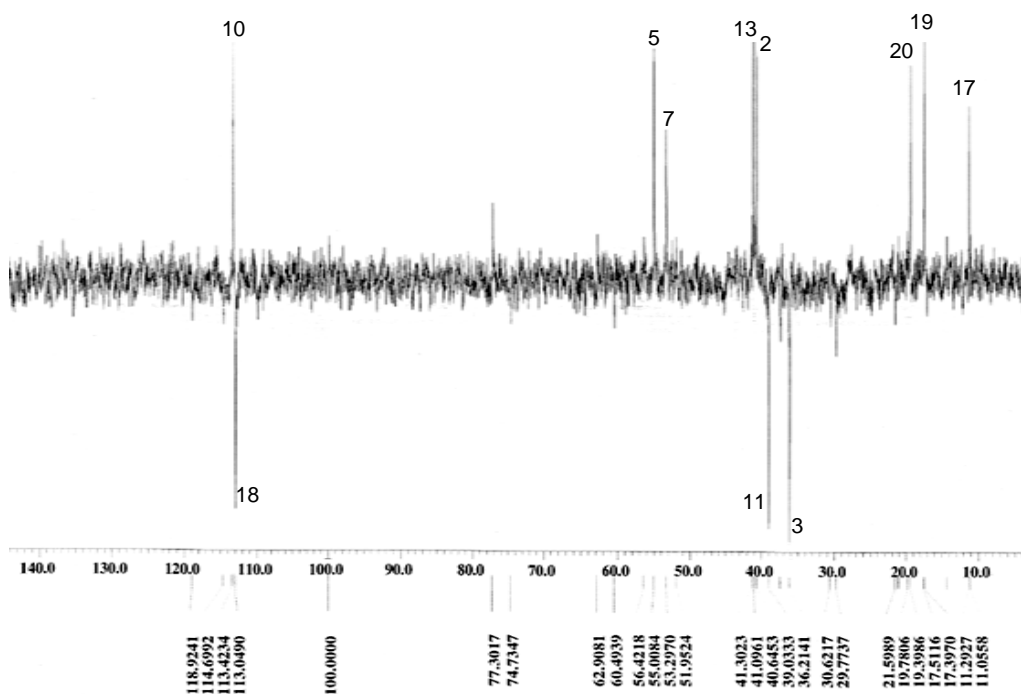


Figura 29: Espectro DEPT-135 del compuesto V (CDCl₃, 67.5 MHz).

Con ayuda del espectro DEPT-135 (Figura 29) se estableció la multiplicidad de cada una de las señales, confirmando que el carbono 9 corresponde a un carbono cuaternario insaturado y que el carbono 10 es un metino insaturado.

En la Tabla VIII se muestran los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto V a partir de los espectros de RMN en una y dos dimensiones.

Tabla VIII: Datos de RMN ^{13}C , RMN ^1H , DEPT-135 y HETCOR del compuesto V.

Posición	δ_{C} , ppm	DEPT	δ_{H} , ppm (m, J)
1	207.3	C	----
2	41.1	CH	2.48 (m)
3	36.2	CH ₂	2.43 (m)
4	166.2	C	----
5	55.0	CH	3.16 (s)
6	59.8	C	----
7	53.0	CH	2.80 (d, $J= 11.6$ Hz)
8	141.6	C	----
9	148.8	C	----
10	113.4	CH	5.97 (dd, $J_1= 6.4$ Hz; $J_2= 3.5$ Hz)
11	39.0	CH ₂	3.18 (m)
12	146.3	C	----
13	40.6	CH	3.21 (m)
14	147.1	C	----
15	130.2	C	----
16	169.4	C	----
17	11.3	CH ₃	2.08 (s)
18	113.0	CH ₂	4.53 (s); 5.04 (s)
19	17.4	CH ₃	1.20 (d, $J= 7.4$ Hz)
20	19.4	CH ₃	1.23 (s)

I.9.1.6 Compuesto VI: Crotoctarasin C

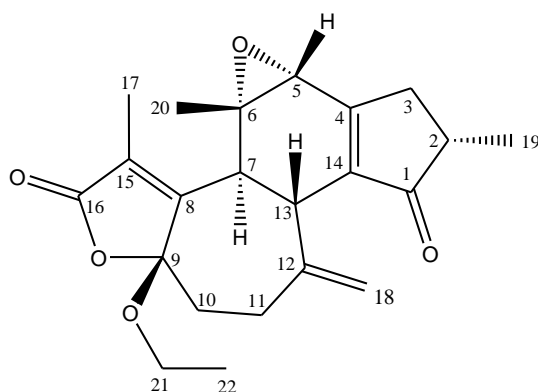


Figura 30: Estructura del compuesto VI

El compuesto VI se aisló como cristales blancos con p.f. 236-238°C y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} -78.4$ (c 1.00, CHCl_3). Su fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_5$ fue deducida a partir de su espectro de masas (Figura 31) el cual mostró un ión molecular de 370 m/z.

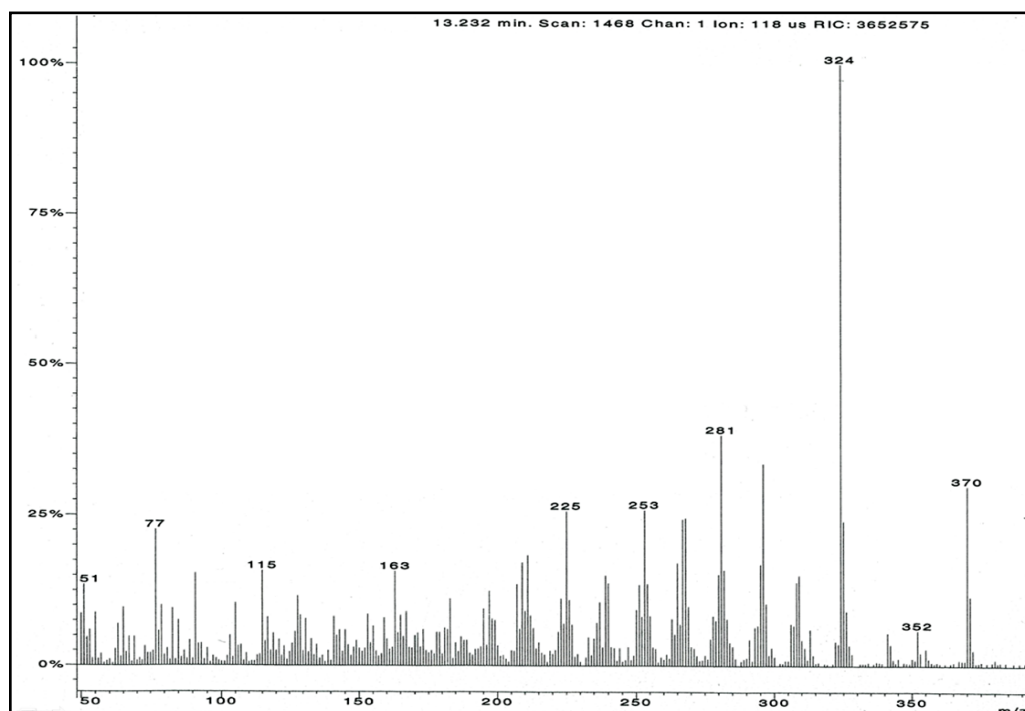


Figura 31: Espectro de masas del compuesto VI.

Al observar los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Figuras 32 y 33) y compararlos con los de crotofolin E (III) nos sugerían un compuesto con una estructura similar, sin embargo, se observaban señales adicionales. Una nueva señal triplete que integraba para tres protones a 1.19 ppm y una señal cuarteto a 3.80 ppm nos señalaron la presencia de un grupo etoxi en la estructura.

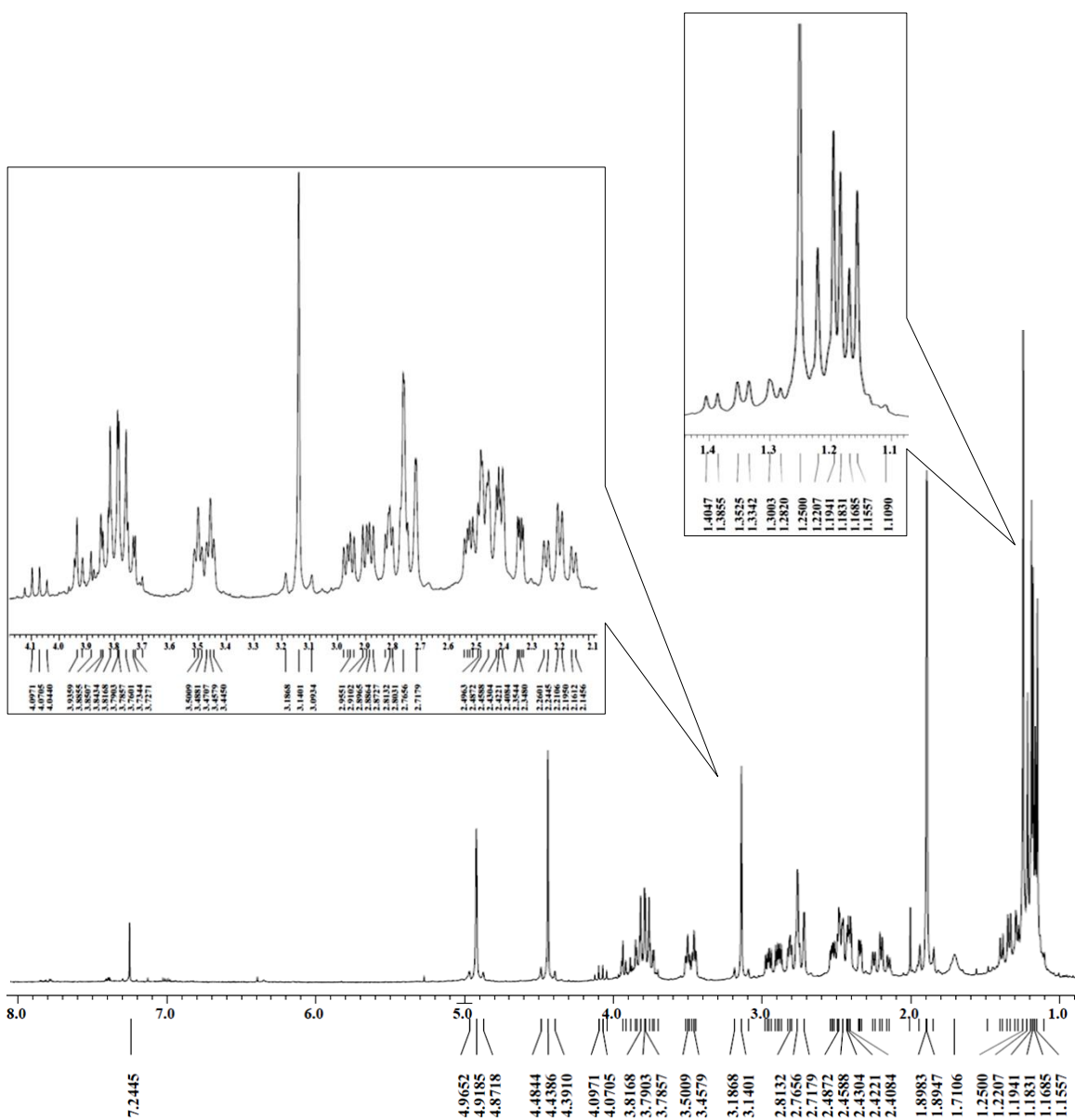


Figura 32: Espectro de RMN ^1H del compuesto VI (CDCl_3 , 270 MHz).

El espectro de RMN ^{13}C mostró la resonancia de 21 átomos de carbono; sin embargo, la señal en 60.0 ppm tenía el doble de la intensidad, lo que nos indicó que dos carbonos presentaban el mismo desplazamiento. Con ayuda del espectro DEPT-135 (Figura 33) estas señales fueron discriminadas en 9 carbonos cuaternarios, 4 metinos, 5 metilenos y 4 metilos. En el espectro se visualizaban las señales de la cetona α,β -insaturada (δ_{C} 208.0, 145.2 y 165.7 ppm), una olefina terminal (δ_{C} 146.2 y 112.9 ppm), la γ -lactona α,β -insaturada (δ_{C} 170.9, 129.7, 159.5 ppm) y también los carbonos del epóxido se encontraban presentes en esta estructura (δ_{C} 60.0 y 55.0 ppm).

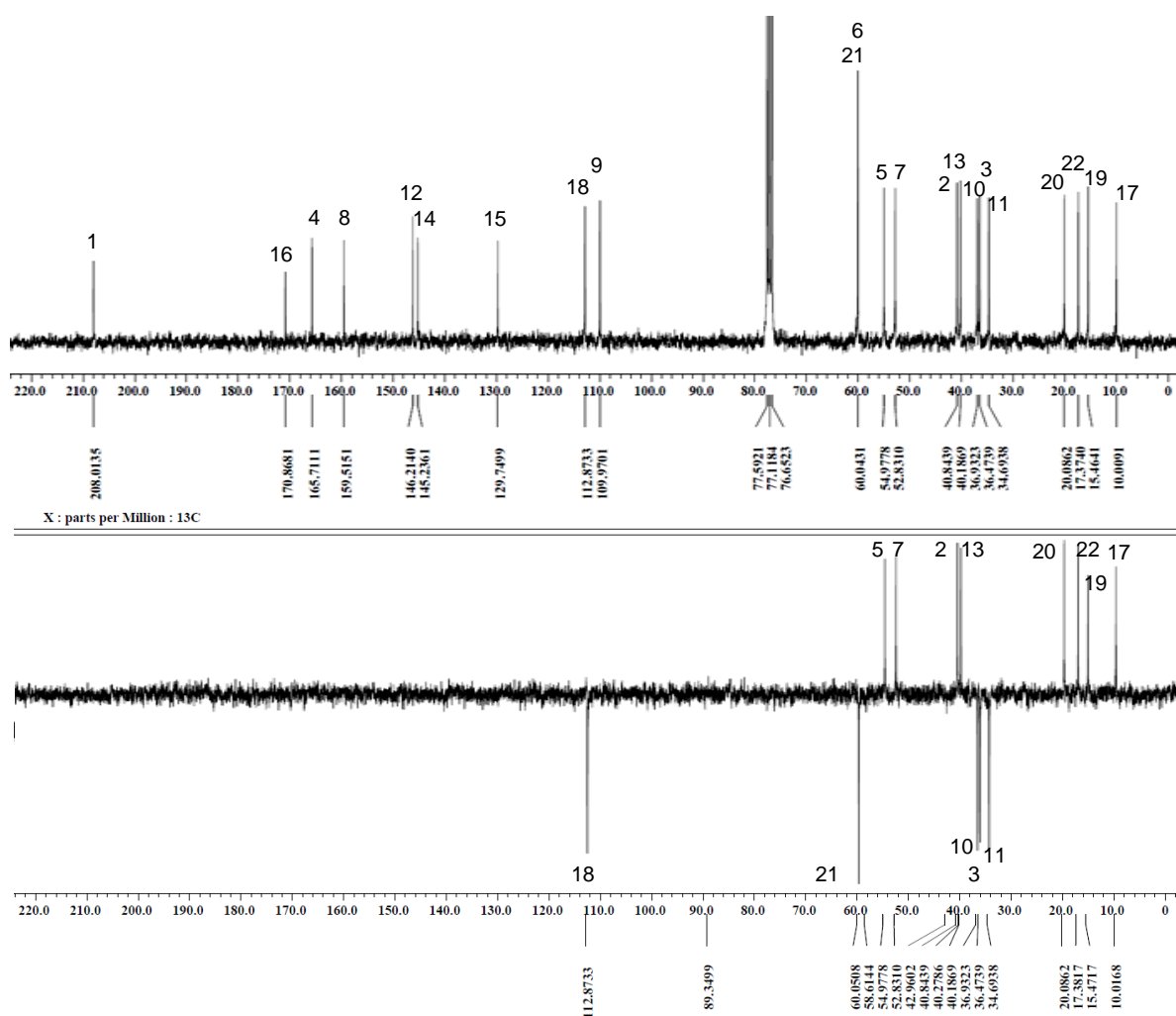


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto VI (CDCl_3 , 67.5 MHz).

A través del análisis detallado de los experimentos de RMN en 2D HMQC y HMBC (Anexos 10 y 11) se establecieron las correlaciones entre los protones y carbonos. La unión de toda la data espectroscópica disponible, permitió establecer un esqueleto de tipo crotofolano similar al compuesto **III**, pero con un grupo etoxi en la posición 9 en lugar del grupo hidroxilo presente en crotofolin E (**III**). El espectro de IR (Figura 34) muestra bandas similares a las mostradas para el compuesto **III**, sin embargo, no se observa la banda de absorción de grupos hidroxilos. Adicionalmente, el espectro de masas muestra un pico base a 324 m/z producto de la pérdida de 46 uma correspondientes a la masa del EtOH. Descartamos la posibilidad de que este compuesto sea un artefacto que se formó durante el proceso de extracción ya que no se usó EtOH como solvente.

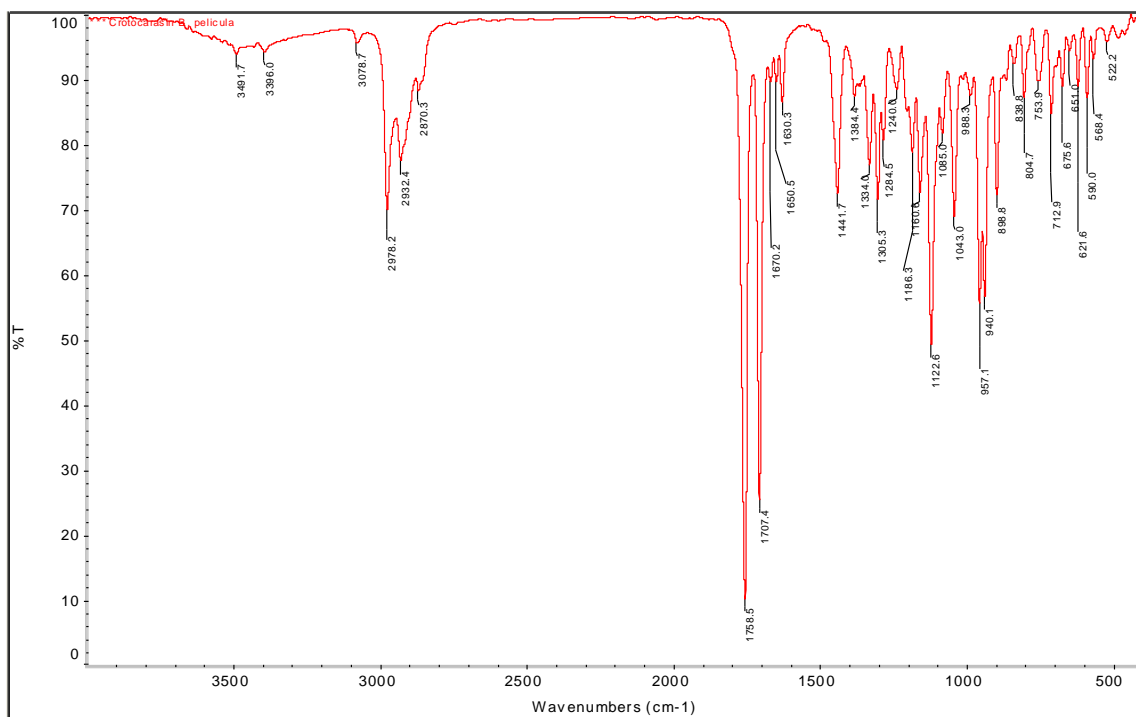


Figura 34: Espectro IR del compuesto VI

En la Tabla IX se muestran los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto VI a partir de los espectros de RMN en una y dos dimensiones.

Tabla IX: Datos de RMN ^{13}C , ^1H , DEPT-135, HETCOR y FLOCK del compuesto VI.

Posición	δ_{C} ppm	DEPT	δ_{H} ppm	FLOCK
1	208.0	C	----	1.17
2	40.8	CH	2.48 (m)	1.17
3	36.5	CH ₂	2.43 (m); 2.89 (dd, $J_1=6.4$ Hz; $J_2=3.7$ Hz);	
4	165.7	C	----	
5	55.0	CH	3.14 (s)	1.25
6	60.0	C	----	1.25; 2.77
7	52.8	CH	2.77 (m)	1.25
8	159.5	C	----	1.89; 2.77
9	109.9	C	----	
10	36.9	CH ₂	1.34 (dt, $J_1=14.0$ Hz; $J_2=4.9$ Hz); 2.81(t, $J=2.7$ Hz)	
11	34.7	CH ₂	2.20 (dt, $J_1=13.4$ Hz; $J_1=4.2$ Hz); 2.42 (m)	4.44
12	146.2	C	----	
13	40.2	CH	3.48 (td, $J_1=11.6$ Hz; $J_1=3.5$ Hz);	4.92
14	145.2	C	----	
15	129.7	C	----	1.89
16	170.9	C	----	1.89
17	10.0	CH ₃	1.89 (s)	
18	112.9	CH ₂	4.44 (s,); 4.92 (s)	
19	17.4	CH ₃	1.17 (d, $J=7.4$ Hz)	
20	20.1	CH ₃	1.25 (s)	
21	60.0	CH ₂	3.80 (q, $J=7.2$ Hz)	1.19
22	15.5	CH ₃	1.19 (t, $J=7.2$ Hz)	

La estructura del compuesto VI pudo ser confirmada a través de un análisis de difracción de Rayos X (Figura 35, Tabla X) que muestra claramente el grupo

etoxi enlazado en la posición 9. Adicionalmente, se observa una estereoquímica relativa similar a la reportada para crotofolin E (III).

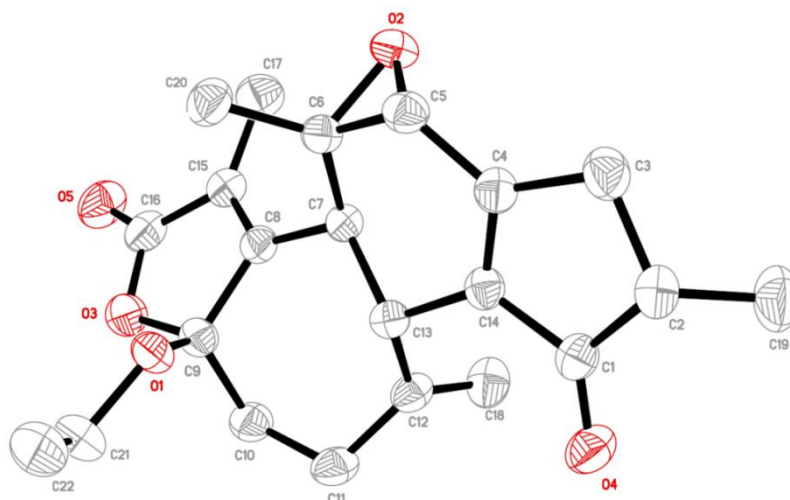


Figura 35: Diagrama ORTEP del compuesto VI

Tabla X: Datos cristalográficos del compuesto VI

Data del cristal							
$C_{22}H_{26}O_5$				$V = 2001.0 (9) \text{ \AA}^3$			
$M_r = 355.39$				$Z = 4$			
Orthorhombic, $P2_12_12_1$				Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71070 \text{ \AA}$			
$a = 10.478 (3) \text{ \AA}$				$\mu = 0.08 \text{ mm}^{-1}$			
$b = 12.250 (3) \text{ \AA}$				$T = 293 \text{ K}$			
$c = 15.590 (4) \text{ \AA}$				$0.50 \times 0.48 \times 0.45 \text{ mm}$			
Datos de recolección							
23828 reflejos medidos				3272 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$			
3948 reflexiones independientes				$R_{\text{int}} = 0.030$			
Distancia de enlaces \AA							
O1—C9	1.397 (3)	C4—C14	1.347 (3)	C10—H10B	0.9700	C18—H18A	0.9300
O1—C21	1.451 (3)	C4—C5	1.479 (3)	C11—H11A	0.9700	C18—H18B	0.9300
O2—C6	1.460 (2)	C4—C3	1.512 (3)	C11—H11B	0.9700	C19—H19A	0.9600
O2—C5	1.459 (3)	C5—H5A	0.9800	C12—C18	1.324 (3)	C19—H19B	0.9600
O3—C16	1.360 (3)	C6—C5	1.478 (3)	C12—C11	1.497 (3)	C19—H19C	0.9600
O3—C9	1.462 (3)	C6—C20	1.505 (3)	C12—C13	1.525 (3)	C20—H20A	0.9600
O4—C1	1.216 (3)	C7—C6	1.557 (3)	C13—C7	1.562 (3)	C20—H20B	0.9600
O5—C16	1.215 (3)	C7—H7A	0.9800	C13—H13A	0.9800	C20—H20C	0.9600
C1—C14	1.480 (3)	C8—C15	1.342 (3)	C14—C13	1.522 (3)	C21—C22	1.496 (5)
C1—C2	1.529 (3)	C8—C7	1.509 (3)	C15—C17	1.500 (3)	C21—H21A	0.9700
C2—C19	1.525 (3)	C8—C9	1.533 (3)	C16—C15	1.475 (3)	C21—H21B	0.9700
C2—C3	1.533 (3)	C10—C9	1.526 (3)	C17—H17A	0.9600	C22—H22A	0.9600
C2—H2A	0.9800	C10—C11	1.531 (3)	C17—H17B	0.9600	C22—H22B	0.9600
C3—H3A	0.9700	C10—H10A	0.9700	C17—H17C	0.9600	C22—H22C	0.9600
C3—H3B	0.9700						

Tabla X: Datos cristalográficos del compuesto VI. (Continuación)

Parámetros geométricos (°)			
C9—O1—C21	117.54 (19)	C10—C11—H11A	109.0
O4—C1—C14	127.6 (2)	C12—C11—H11B	109.0
O4—C1—C2	124.3 (2)	C10—C11—H11B	109.0
C14—C1—C2	107.94 (18)	H11A—C11—H11B	107.8
C6—O2—C5	60.85 (13)	C18—C12—C11	122.3 (2)
C1—C2—C19	113.0 (2)	C18—C12—C13	121.7 (2)
C1—C2—C3	104.98 (18)	C11—C12—C13	115.73 (19)
C19—C2—C3	115.3 (2)	C14—C13—C12	114.88 (16)
C1—C2—H2A	107.8	C14—C13—C7	108.60 (16)
C2—C2—H2A	107.8	C12—C13—C7	109.15 (16)
C3—C2—H2A	107.8	C14—C13—H13A	108.0
C16—O3—C9	109.39 (16)	C12—C13—H13A	108.0
C4—C3—C2	103.89 (18)	C7—C13—H13A	108.0
C4—C3—H3A	111.0	C4—C14—C1	109.05 (18)
C2—C3—H3A	111.0	C4—C14—C13	123.16 (17)
C4—C3—H3B	111.0	C1—C14—C13	127.50 (18)
C2—C3—H3B	111.0	C8—C15—C16	108.5 (2)
H3A—C3—H3B	109.0	C8—C15—C17	130.1 (2)
C14—C4—C5	121.42 (19)	C16—C15—C17	121.3 (2)
C14—C4—C3	113.18 (18)	O5—C16—O3	121.5 (2)
C5—C4—C3	125.01 (19)	O5—C16—C15	129.1 (2)
O2—C5—C4	119.74 (18)	O3—C16—C15	109.41 (18)
O2—C5—C6	59.59 (13)	C15—C17—H17A	109.5
C4—C5—C6	117.94 (18)	C15—C17—H17B	109.5
O2—C5—H5A	115.9	H17A—C17—H17B	109.5
C4—C5—H5A	115.9	C15—C17—H17C	109.5
C6—C5—H5A	115.9	H17A—C17—H17C	109.5
O2—C6—C5	59.57 (12)	H17B—C17—H17C	109.5
O2—C6—C20	115.40 (17)	C12—C18—H18A	120.0
C5—C6—C20	118.63 (19)	C12—C18—H18B	120.0
O2—C6—C7	112.14 (16)	H18A—C18—H18B	120.0
C5—C6—C7	115.56 (17)	C2—C19—H19A	109.5
C20—C6—C7	120.33 (18)	C2—C19—H19B	109.5
C8—C7—C13	113.84 (16)	H19A—C19—H19B	109.5
C8—C7—C6	112.45 (15)	C2—C19—H19C	109.5
C13—C7—C6	111.66 (16)	H19A—C19—H19C	109.5
C8—C7—H7A	106.1	H19B—C19—H19C	109.5
C13—C7—H7A	106.1	C6—C20—H20A	109.5
C6—C7—H7A	106.1	C6—C20—H20B	109.5
C15—C8—C7	126.18 (19)	H20A—C20—H20B	109.5
C15—C8—C9	108.65 (18)	C6—C20—H20C	109.5
C7—C8—C9	125.17 (17)	H20A—C20—H20C	109.5
O1—C9—O3	109.60 (17)	H20B—C20—H20C	109.5
O1—C9—C10	115.79 (18)	O1—C21—C22	107.1 (2)
O3—C9—C10	105.14 (17)	O1—C21—H21A	110.3
O1—C9—C8	107.22 (17)	C22—C21—H21A	110.3
O3—C9—C8	103.64 (16)	O1—C21—H21B	110.3
C10—C9—C8	114.69 (18)	C22—C21—H21B	110.3
C9—C10—C11	116.25 (19)	H21A—C21—H21B	108.6
C9—C10—H10A	108.2	C21—C22—H22A	109.5
C11—C10—H10A	108.2	C21—C22—H22B	109.5
C9—C10—H10B	108.2	H22A—C22—H22B	109.5
C11—C10—H10B	108.2	C21—C22—H22C	109.5
H10A—C10—H10B	107.4	H22A—C22—H22C	109.5
C12—C11—C10	113.05 (18)	H22B—C22—H22C	109.5
C12—C11—H11A	109.0		

I.9.1.7 Compuesto VII: Crotoctarasin D

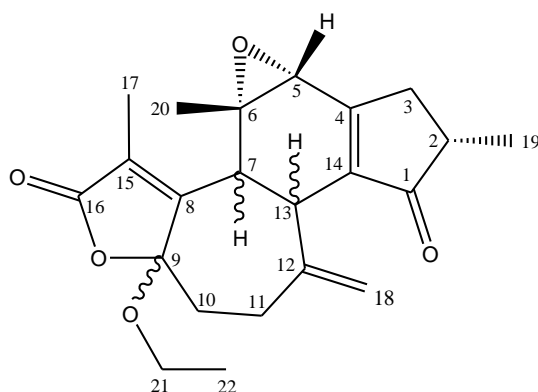


Figura 36: Estructura del compuesto VII

El compuesto VII se aisló como un aceite incoloro con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} -48.8$ (c 1.00, CHCl_3). Su fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_5$ resultó ser similar a la del compuesto VI y fue deducida de su espectro de masas (Figura 37) el cual mostró un $[\text{M}]^+ 370.3$ m/z.

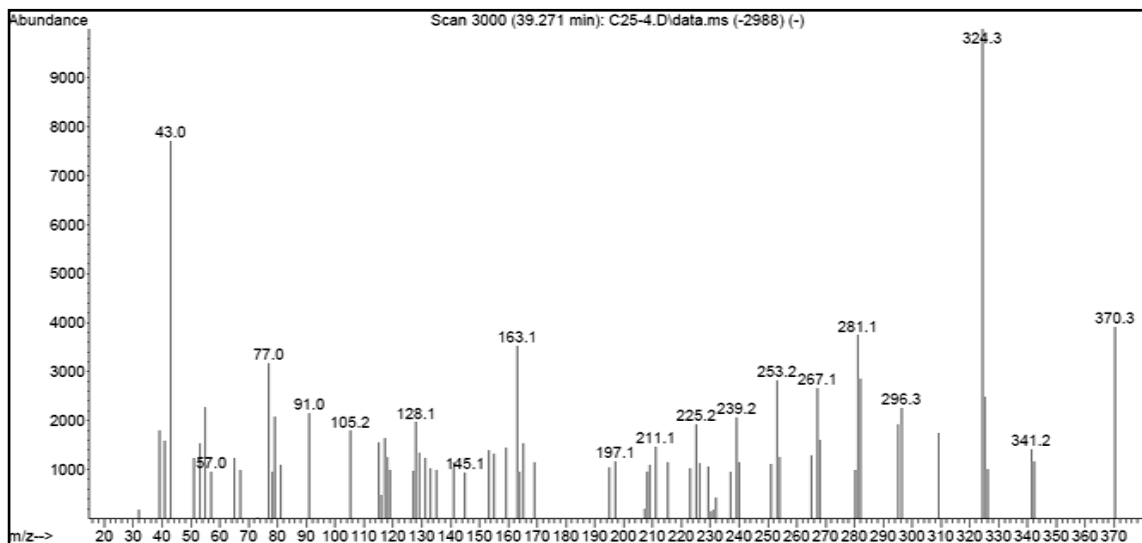


Figura 37: Espectro de masas del compuesto VII.

El espectro de RMN ^1H (Figura 38) muestra algunas características en común con crotoctarasin C (VI), como las dos señales singletes a 4.30 y 4.76 ppm de la olefina terminal y la señal singlete a 3.40 ppm correspondiente al protón oxoalílico H-5, aunque esta última se encuentra un poco desplazada a campo bajo.

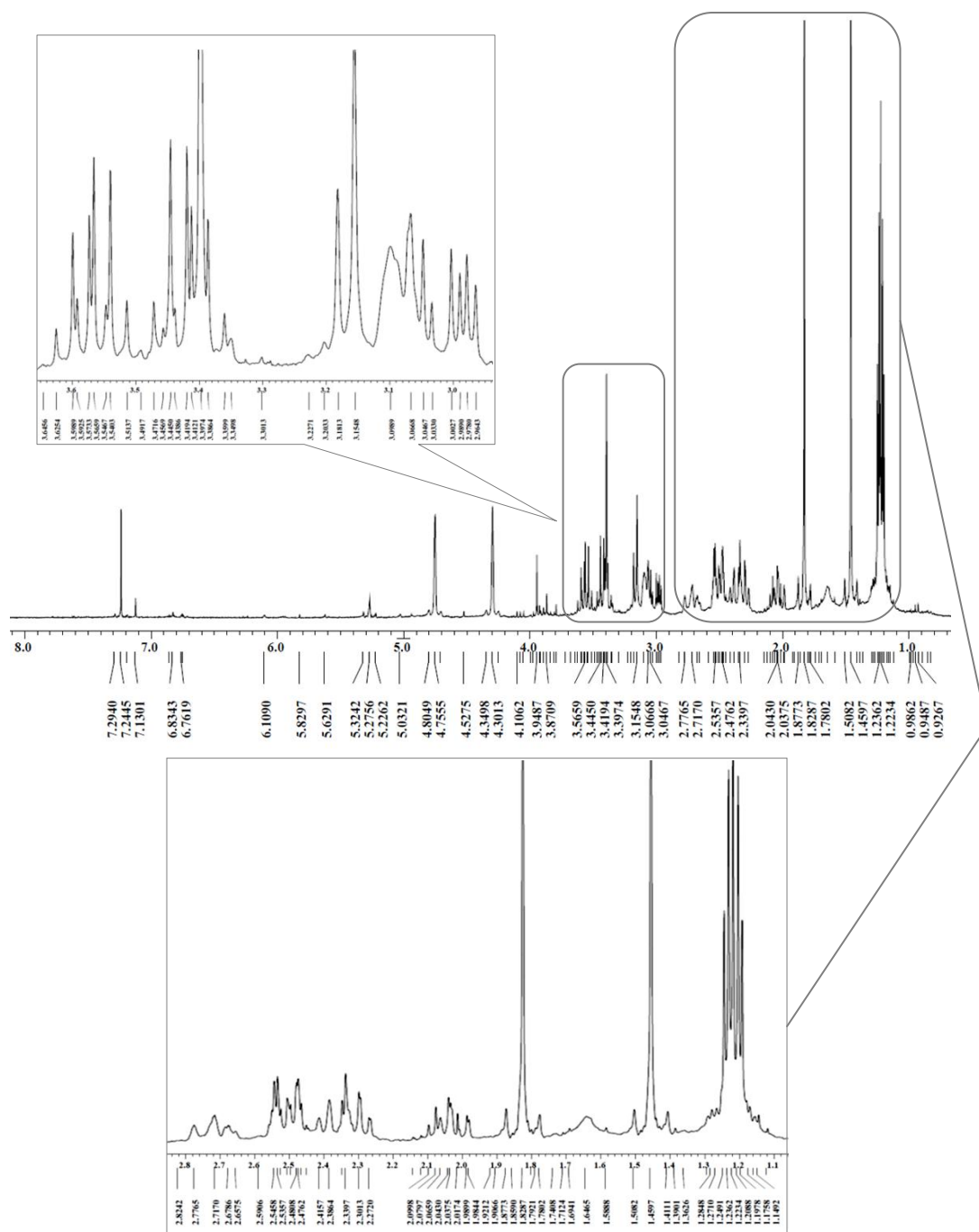


Figura 38: Espectro de RMN ^1H del compuesto VII (CDCl_3 , 270 MHz).

A campo alto, también se observan las señales de los grupos metilo, sin embargo, aparecen con una multiplicidad diferente; se visualiza como un pseudo-quintuplete centrado en 1.22 ppm que integra para seis protones. A través del espectro HETCOR (Anexo 12) se encontró correlación entre esta señal y las señales a 15.3 y 17.5 ppm en el espectro de RMN ^{13}C , indicando que las señales de dos grupos metilos formaban el pseudo-quintuplete, una señal triplete ($J= 6.9\text{Hz}$, H22) y una señal doblete ($J= 7.3\text{Hz}$, H19). Los otros grupos metilos terciarios presentes en el compuesto **VI** también están presentes en **VII**, sus señales aparecen como dos singletes a 1.46 ppm (H17) y 1.83 ppm (H20). En la figura 39 se hace una comparación entre los espectros de RMN ^1H del compuesto **VI** y del compuesto **VII**.

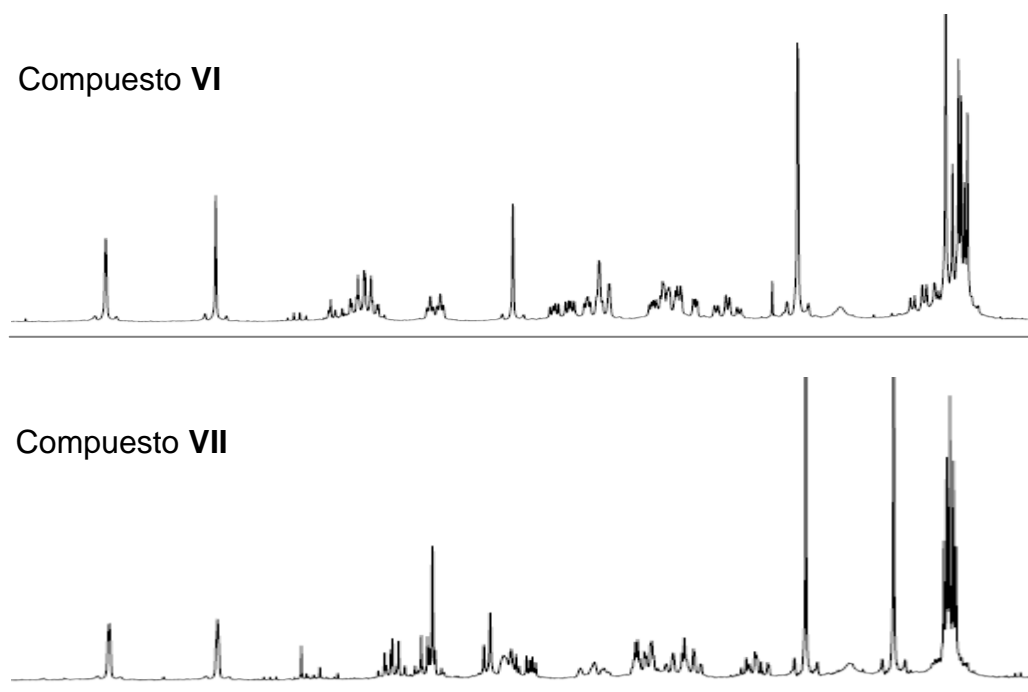


Figura 39: Comparación de los espectros de RMN ^1H de los compuestos VI y VII

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 40) analizado junto al espectro DEPT-135, igualmente resultó similar al del compuesto **VI**, sin embargo, algunas diferencias importantes en algunas de las señales resultaron evidentes.

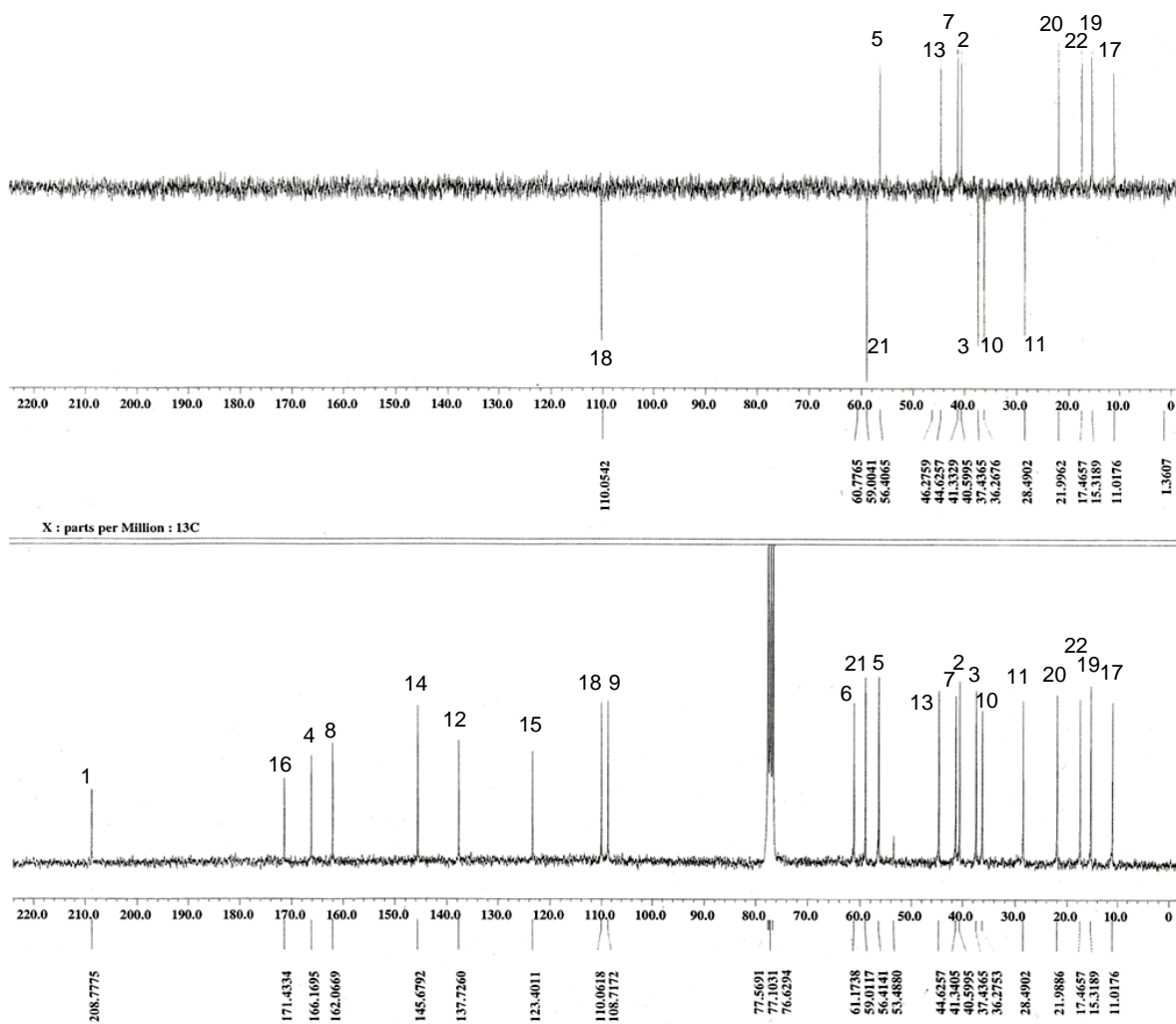


Figura 40: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto VII (CDCl_3 , 67.5 MHz).

Al hacer un análisis detallado de los espectros de RMN ^{13}C de ambos compuestos, y con ayuda de los espectros HETCOR y FLOCK (Anexos 12 y 13), se encontró que las diferencias involucraban principalmente al anillo de siete miembros y la γ -lactona α,β -insaturada, manteniéndose el resto de las señales a desplazamientos muy similares (Figura 41).

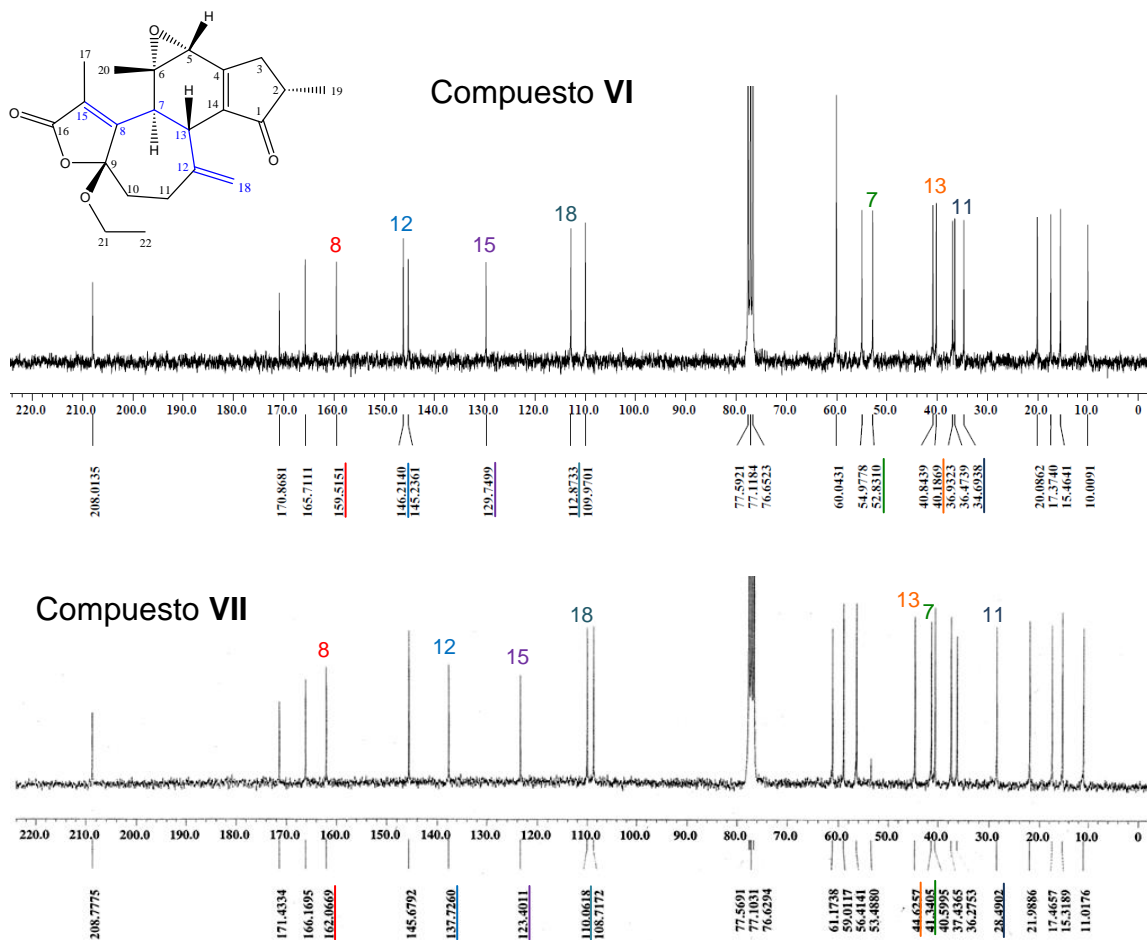


Figura 41: Comparación de los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos VI y VII

La igualdad en la fórmula molecular de ambos compuestos, sumado a las diferencias en los datos espectroscópicos, características físicas, R_f y rotación óptica, nos hicieron pensar que el compuesto VII tiene una estructura similar al compuesto VI. Las diferencias pueden ser explicadas por un posible cambio conformacional en el anillo de siete miembros, originado tal vez por cambios en la configuración de los carbonos 7, 13 y menos probable sobre el carbono 9. Esta suposición está basada en la biogénesis propuesta hasta el momento para los esqueletos crotofolanos. Se ha planteado que los crotofolanos

probablemente derivan de un precursor tipo latirano (A) que sufre un cierre transanular para formar el intermediario B como se muestra en la Figura 42.^{42, 43}

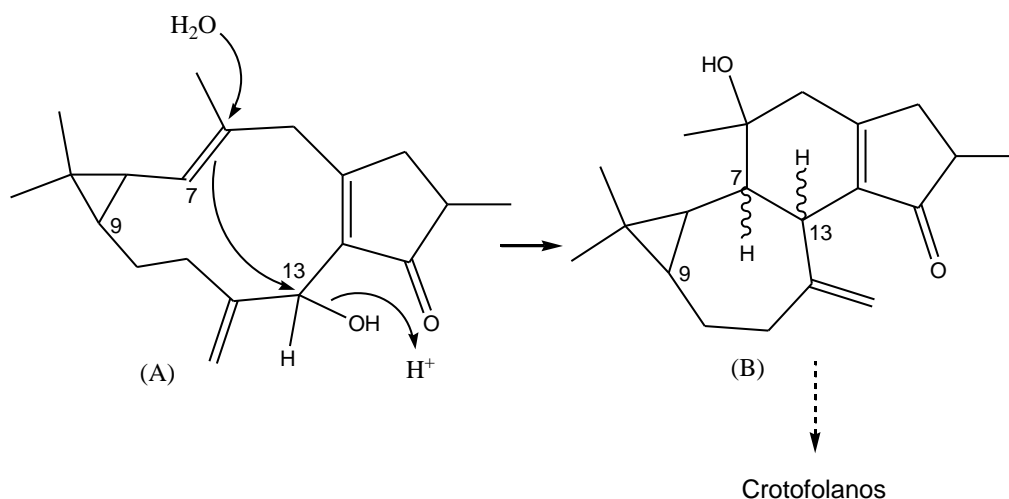


Figura 42: Biogénesis de los crotophanos

Durante el cierre, es posible que la configuración de los carbonos 7 y 13 cambie, dependiendo de la cara por la cual ataque el nucleófilo. Por otro lado, es importante mencionar que los protones sobre estos carbonos mantienen la configuración 7H α y 13H β , o viceversa, para reducir la tensión anular.

Basándonos en lo antes expuesto y con la finalidad de establecer una estructura más cercana del compuesto VII, se realizó un estudio teórico con cálculos GIAO/CAM-B3LYP/6-31+G(d,p)^{95,96} como se aplica en Gaussian 90⁹⁷ utilizando la estructura de rayos-X de crotoctarasin C (VI) como estructura de partida.

Para ello, se definieron tres posibles distereoisómeros del compuesto VI (D1, D2 y D3), cambiando la configuración en los carbonos 7, 9 y 13, y se

optimizaron las estructuras por medio del procedimiento de la Teoría del Funcional Densidad (DFT) (Figura 43).

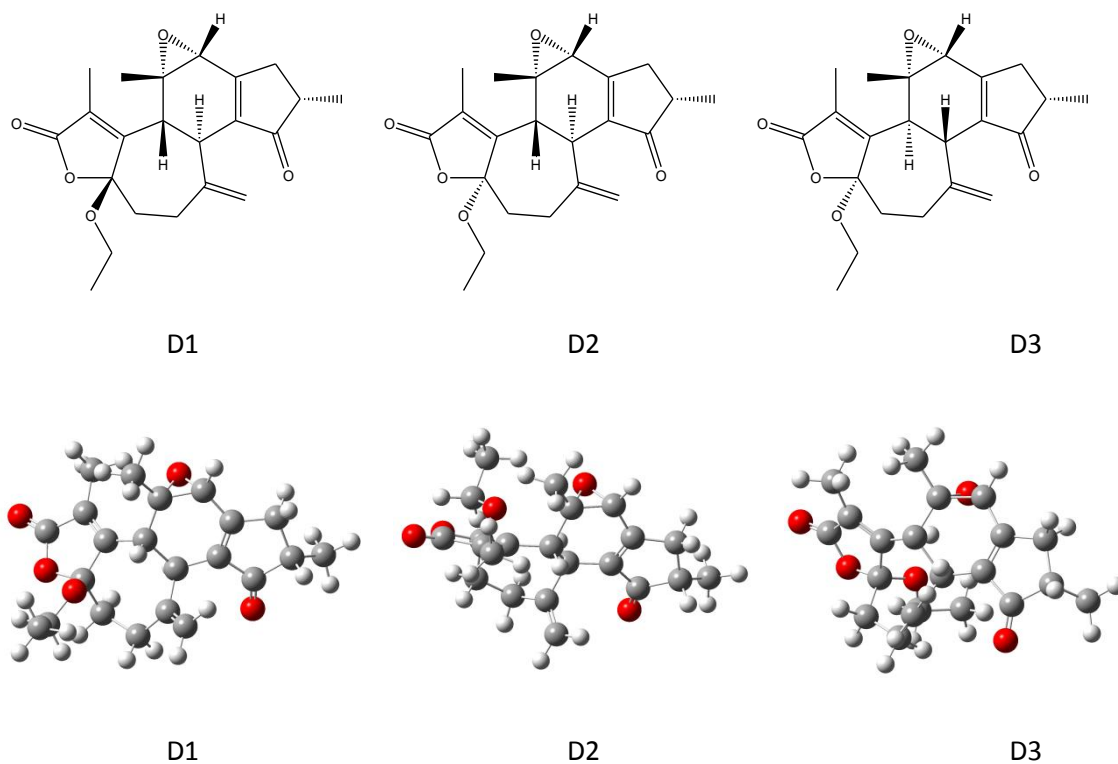


Figura 43: Estructuras optimizadas de los diastereoisómeros obtenidas usando cálculos de química cuántica CAM-B3LYP/6-31+G(d,p).

Una vez que las estructuras fueron optimizadas, se calcularon los desplazamientos químicos teóricos de ^1H y ^{13}C usando el método estándar de GIAO (Gauge-Independent Atomic Orbital) de Gaussian 90⁹⁸⁻¹⁰⁰ con el mismo nivel de teoría usado para la optimización de la geometría. En estos cálculos, se realizó una simulación de solvente (CDCl_3) usando la aproximación PCM (Polarized Continuum Model).¹⁰¹ Los desplazamientos químicos de ^{13}C y ^1H se muestran en las Tablas XI y XII, respectivamente.

Tabla XI. Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C experimentales del compuesto **VII** con los desplazamientos teóricos obtenidos por cálculos GIAO/CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) para los diastereoisómeros D1, D2 y D3.

Posición	D-1	D-2	D-3	Experimental
1	207,2	205,8	203,8	208,8
2	43,5	43,7	43,6	40,6
3	38,0	37,1	36,3	37,4
4	167,6	169,8	168,5	166,2
5	55,2	55,0	54,7	56,4
6	59,8	64,9	60,1	61,2
7	47,3	49,1	45,9	41,3
8	161,9	161,7	158,3	162,1
9	106,5	109,1	106,3	108,7
10	32,2	39,6	39,8	36,3
11	32,9	37,7	28,0	28,5
12	155,7	148,9	148,1	137,7
13	38,2	39,1	45,0	44,6
14	140,1	140,4	141,3	145,7
15	123,0	129,8	126,2	123,4
16	169,5	168,1	166,7	171,4
17	12,9	12,4	14,3	11,0
18	107,2	110,3	116,1	110,1
19	14,9	14,8	15,8	17,5
20	22,2	21,9	23,2	22,0
21	59,7	59,5	59,1	59,0
22	15,5	15,8	16,0	15,3

Tabla XII. Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H experimentales del compuesto **VII** con los desplazamientos teóricos obtenidos por cálculos GIAO/CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) para los diastereoisómeros D1, D2 y D3.

Posición	D-1	D-2	D-3	Experimental
2	2,34	2,40	2,15	2,48
3a	3,07	2,90	2,63	2,54
3b	2,47	2,42	2,25	2,99
5	3,22	3,12	2,95	3,40
7	3,19	2,91	3,26	3,18
10a	1,88	2,81	2,74	2,04
10b	2,64	1,08	1,09	2,34
11a	2,84	2,37	1,87	2,72
11b	2,52	2,30	2,17	2,39
13	2,74	3,80	3,39	3,15
17a	2,67	1,76	1,69	1,83
17b	1,84	1,76	1,59	1,83
17c	1,65	1,81	1,92	1,83
18a	5,22	5,39	5,31	4,76
18b	4,81	5,04	5,17	4,30
19a	1,19	1,17	1,11	1,22
19b	1,64	1,70	1,82	1,22
19c	0,63	0,61	0,57	1,22
20a	1,59	1,61	1,89	1,46
20b	0,83	1,64	1,87	1,46
20c	1,95	0,70	0,63	1,46
21a	4,07	3,92	3,72	3,55
21b	3,88	4,05	3,96	3,55
22a	1,18	1,16	1,02	1,22
22b	1,33	1,34	1,36	1,22
22c	1,28	1,42	1,40	1,22

Con la finalidad de observar las correlaciones entre los datos teóricos con los experimentales, se realizaron las rectas de regresión lineal y se calculó el coeficiente R^2 para cada caso (Figuras 44-46).

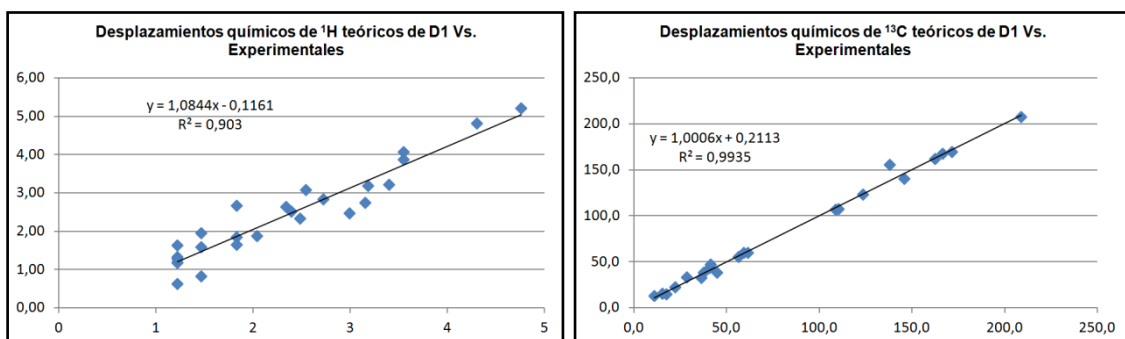


Figure 44. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C teóricos de D1 Vs. Experimentales

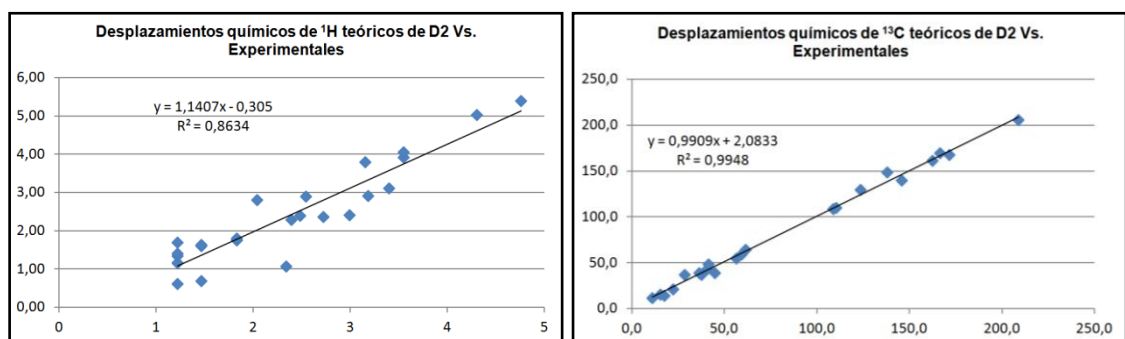


Figure 45. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C teóricos de D2 Vs. Experimentales

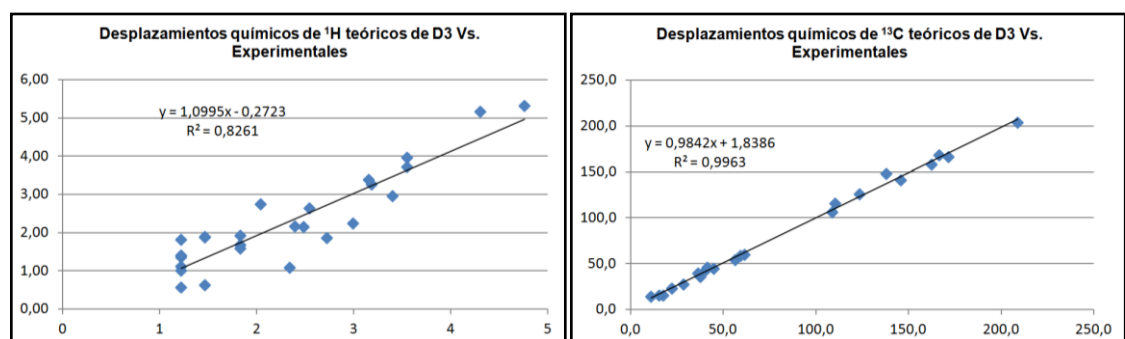


Figure 46. Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C teóricos de D3 Vs. Experimentales

Al realizar una comparación entre los valores de R^2 obtenidos de los gráficos de desplazamientos de ^1H teóricos versus los experimentales de cada diastereoisómero, se observa que sus valores son muy parecidos y no existe una diferencia significativa que marque una tendencia para decidir cuál de las estructuras es la más probable. Lo mismo sucede cuando se comparan los valores de R^2 obtenidos en los gráficos de ^{13}C . Por este motivo, con estos análisis no se pudo determinar con exactitud la estructura del compuesto VII. Otros análisis teóricos utilizando la base 6-311++G(d,p) se están llevando a cabo en este momento.

A pesar de estos resultados, y basándonos en los datos espectroscópicos previamente discutidos, se propone una estructura similar a crotocarasin C (VI), para el compuesto VII pero no se define la estereoquímica de los centros 7, 9 y 13 (Figura 36). A este compuesto lo denominamos crotocarasin D y se reporta por primera vez en la literatura de productos naturales.

En la Tabla XIII se muestran los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto VII a partir de los espectros de RMN en una y dos dimensiones y se compararan los desplazamientos de RMN ^{13}C con los obtenidos para el compuesto VI.

Tabla XIII: Datos de RMN ^{13}C , ^1H , DEPT 135, HETCOR y FLOCK del compuesto VII y comparación con los datos de RMN ^{13}C del compuesto VI.

Posición	δ_{C} ppm (VI)	δ_{C} ppm (VII)	DEPT (VII)	δ_{H} ppm (VII)	FLOCK (VII)
1	208.0	208.8	C	----	1.22
2	40.8	40.6	CH	2.48 (m)	1.22
3	36.5	37.4	CH ₂	2.54 (m); 2.99 (m)	1.22
4	165.7	166.2	C	----	3.40
5	55.0	56.4	CH	3.40 (s)	1.46
6	60.0	61.2	C	----	1.46
7	52.8	41.3	CH	3.18 (sa)	1.46
8	159.5	162.1	C	----	1.83
9	109.9	108.7	C	----	
10	36.9	36.3	CH ₂	2.04 (m); 2.34(m)	
11	34.7	28.5	CH ₂	2.39 (m); 2.72 (m)	4.30
12	146.2	137.7	C	----	
13	40.2	44.6	CH	3.15	4.30, 4.76
14	145.2	145.7	C	----	
15	129.7	123.4	C	----	1.83
16	170.9	171.4	C	----	1.83
17	10.0	11.0	CH ₃	1.83 (s)	
18	112.9	110.1	CH ₂	4.76 (s,); 4.30 (s)	
19	17.4	17.5	CH ₃	1.22 (d, $J=7.3$ Hz)	
20	20.1	22.0	CH ₃	1.46 (s)	
21	60.0	59.0	CH ₂	3.55 (q, $J=7.2$ Hz)	1.22
22	15.5	15.3	CH ₃	1.22 (t, $J=6.9$ Hz)	

* Se resalta en color azul los desplazamientos en los cuales se encuentran diferencias.

I.9.2 Sección biológica

I.9.2.1 Evaluación de la actividad citotóxica

Se evaluó el efecto citotóxico de los compuestos **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII** sobre la viabilidad celular utilizando el método del MTT. La Tabla XIV muestra los valores de CI_{50} de cada compuesto sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3, ambas correspondientes a cáncer de mama. El valor obtenido corresponde al promedio de cada ensayo por triplicado con su respectiva desviación estándar. La medición fue realizada en un tiempo de 72 horas.

Tabla XIV: Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DE de los compuestos **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII** sobre las líneas celulares MCF-7, SKBR3 y fibroblastos.

Compuesto	MCF-7	SKBR3	Fibroblastos
III	---	46.07 \pm 2.83	---
IV	52.28 \pm 2.84	45.09 \pm 2.72	138.67 \pm 11.29
V	60.79 \pm 2.73	53.67 \pm 2.16	135.41 \pm 4.48
VI	78.92 \pm 2,84	126.17 \pm 13.79	111.43 \pm 8.90
VII	37.48 \pm 3.98	34.57 \pm 1.96	90.44 \pm 10.264

--: sin actividad

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla XIV, se observa que los compuestos **IV**, **V** y **VII** presentaron actividad citotóxica sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3; sin embargo, el compuesto **III** solo mostró actividad sobre la línea SKBR3 y el compuesto **VI** fue activo contra MCF-7.

A pesar de los altos valores de CI_{50} determinados para cada compuesto, éstos presentaron selectividad citotóxica sobre las líneas probadas. Para medir esto numéricamente, se calculó el índice de selectividad (S) de cada compuesto que se define como:

$$S = \frac{CI_{50} \text{ de la línea control}}{CI_{50} \text{ de la línea tumoral}}$$

Los datos obtenidos se muestran en la Tabla XV.

Tabla XV: Índice de selectividad de los compuestos **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII**.

Compuesto	CI_{50} Fibroblastos/CI_{50} MCF-7	CI_{50} Fibroblastos/CI_{50} SKBR3
III	-	-
IV	2.7	3
V	2.2	2.5
VI	1.4	0.8
VII	2.4	2.6

Los valores del índice de selectividad mostrados en la Tabla XV, nos indica que los compuestos **IV**, **V**, **VI** y **VII** presentaron un efecto citotóxico más fuerte en la línea celular tumoral que en fibroblastos, mostrando una selectividad >1.4 en el caso de la línea celular MCF-7 y para la línea celular SKBR3, los compuestos **IV**, **V** y **VII** mostraron una selectividad >2.5 .

Adicionalmente, se evaluó la actividad antibacteriana de los compuestos aislados, a pesar de que no formaban parte de los objetivos establecidos previamente.

I.9.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana de los compuestos **I**, **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII** a través del método de difusión sobre placas de agar. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla XVI y se expresan como diámetros del halo de inhibición reportados en milímetros.

Tabla XVI. Actividad antibacteriana de los compuestos **I**, **III**, **IV**, **V**, **VI**, y **VII** expresada como diámetros del halo de inhibición (mm).

Microorganismo	Compuestos						Controles			
	I	III	IV	V	VI	VII	AN	AM	O	S
Bacterias Gram-positivas										
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	10	13	18	12	10	25	18	25	--
<i>Bacillus cereus</i>	12	10	10	18	10	10	25	15	25	--
Bacterias Gram-positivas										
<i>Escherichia coli</i>	--	--	--	15	10	10	20	15	25	--
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	18	--	--	18	10	10	20	28	25	--

Concentración de los compuestos = 1-2 mg/ml

-- = No inhibición

Controles positivos= AN: amikacina, AM: ampicilina, O: ofloxacina.

Control negativo= S: solvente/mezcla de solventes

Los compuestos evaluados mostraron tener actividad biológica específica contra los microorganismos empleados. El compuesto **V** resultó ser el más potente de todos, generando diámetros de inhibición similares a los de ampicilina empleado como control positivo. Los compuestos **V**, **VI** y **VII** mostraron actividad contra todos los microorganismos, mientras que los

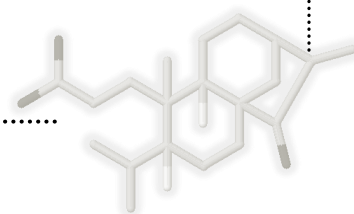
compuestos **III** y **IV** resultaron activos contra las bacterias Gram-positivas, *S. aureus* y *B. cereus*. El compuesto **I** presentó actividad contra las bacterias Gram-positivas y contra *Pseudomona aeruginosa*. La actividad biológica observada contra *P. aeruginosa* es importante, ya que esta es una bacteria sumamente resistente a diversos antibióticos.

No se presentó actividad inhibitoria por parte del solvente, o mezcla de solventes utilizados como control negativo.

I.10 CONCLUSIONES

- Del estudio fitoquímico de los tallos de *Croton caracasana* Pittier se aislaron los compuestos lupeol (II), crotofolin E (III), crotoctarasin A (IV), crotoctarasin C (VI) y crotoctarasin D (VII).
- De las hojas de *Croton caracasana* se aislaron los compuestos 5-hidroxi-3, 7, 8, 3', 4'-pentametoxiflavona (I) y crotoctarasin B (V), así como los compuestos crotofolin E, crotoctarasin A y crotoctarasin C, aislados también en los tallos.
- Los compuestos IV, V, VI y VII se reportan aquí por primera vez en la literatura de Productos Naturales.
- Los resultados obtenidos corroboran la estrecha relación quimiotaxonómica que existe entre *C. caracasana* y *C. corylifolius*, especie de la cual se aislaron por primera vez los diterpenos de tipo crotofolano.
- Los compuestos IV, V y VII presentaron actividad citotóxica con una potencia moderada sobre las líneas celulares MCF-7 y SKBR3, sin embargo, el compuesto III solo mostró actividad sobre la línea SKBR3 y el compuesto VI fue activo contra MCF-7.
- En la evaluación de la actividad antibacteriana los compuestos mostraron tener actividad biológica moderada y específica contra los microorganismos evaluados, siendo el más potente el compuesto V, el cual generó diámetros de inhibición similares a los de ampicilina empleado como control positivo.

Capítulo II: Hemisíntesis y evaluación biológica de
derivados del ácido de caracasina.



Capítulo II: Hemisíntesis y evaluación biológica de derivados del ácido de caracasina.

II.1 Aspectos generales de los kauranos en las plantas.

Los kauranos representan un importante grupo de diterpenos tetracíclicos y sus estructuras están constituidas por una unidad perhidrofenantreno (anillos A, B y C) fusionada con una unidad de ciclopentano (anillo D) formada por un puente de dos átomos de carbono entre los carbonos C-8 y C-13. Diferentes criterios se utilizan para la nomenclatura de los diterpenos kauranos, siendo el más frecuente el uso del prefijo “*ent*” que precede el nombre del compuesto cuando existe inversión de la estereoquímica convencional¹⁰² y “*seco*” que designa la rotura de un enlace entre dos átomos de carbono de la estructura patrón.¹⁰³ La nomenclatura, numeración y estereoquímica del esqueleto *ent*-kaurano ya han sido establecidas por la IUPAC (Figura 47). Salvo en el caso de unos pocos que presentan un doble enlace entre C-9 y C-11, la mayoría de *ent*-kauranos se caracterizan por presentar valores negativos para la rotación óptica específica $[\alpha]_D$.¹⁰²

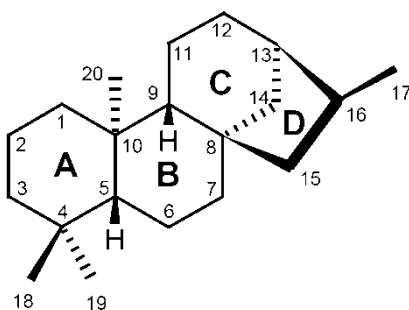


Figura 47. Esqueleto de un diterpeno tipo *ent*-kaurano

Los kauranos son biosintetizados por la ruta del ácido mevalónico a través de la ciclización del geranylgeranyl pirofosfato bajo catálisis ácida, dando lugar a dos series enantioméricas que difieren una de la otra en las configuraciones invertidas de los carbonos C-5, C-8, C-9, C-10 y C-13 (Figura 48).

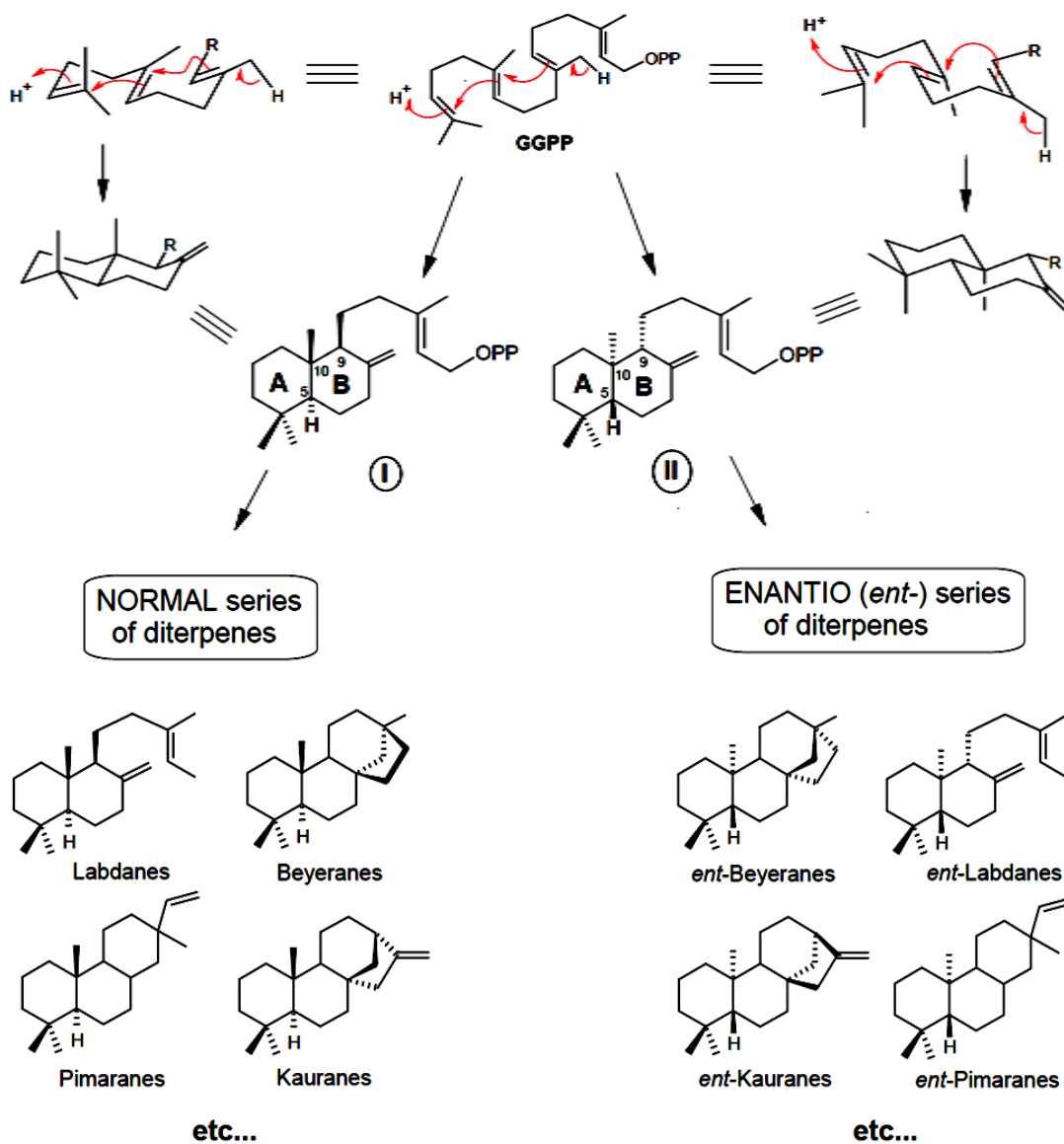


Figura 48. Biosíntesis de diterpenos

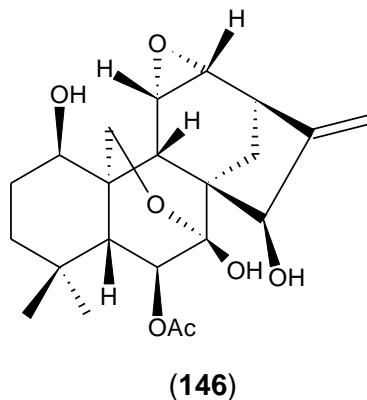
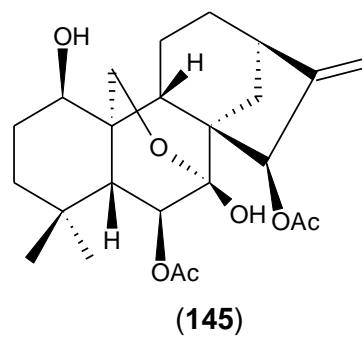
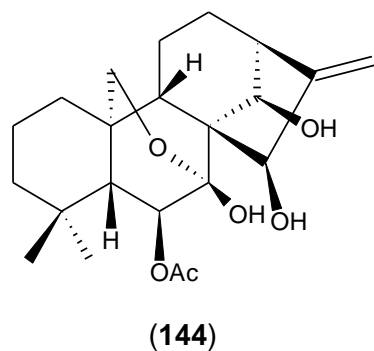
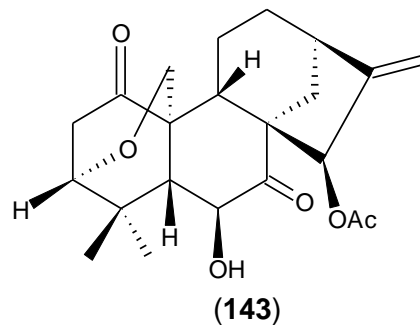
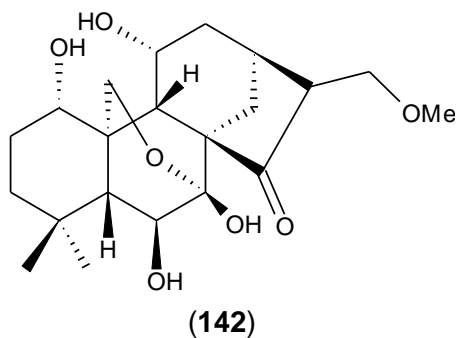
A saber, la serie "normal " son las estructuras cuya fusión entre los anillos A y B se produce en la misma forma que en los esteroides, mientras que las estructuras de la serie "enantiomérica" serie (denotada como "ent") son las imágenes especulares correspondientes de la serie normal.¹⁰²

Los diterpenos tipo kauranos se han aislado de diferentes especies de plantas pertenecientes a varias familias, tales como Asteraceae, Annonaceae, Euphorbiaceae, Celastraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Fabaceae, Rutaceae, Chrysobalanaceae, Jungermanniaceae, Erythroxylaceae, Rhizophoraceae, entre otras.¹⁰²

Diversas actividades biológicas se han descrito para los diterpenos kauranos tales como antitumorales, anti-VIH, tripanocida, antimicrobiana,¹⁰⁴ insecticida, hipotensora y antiinflamatoria, entre otras.¹⁰⁵

II.2 Síntesis y relevancia biológica de los kauranos

En una revisión del año 2006 se reportan las estructuras de 518 diterpenoides aislados de las especies *Isodon* (Lamiaceae), especialmente los que tienen un esqueleto *ent*-kaurano¹⁰⁶ y algunos de estos compuestos mostraron actividad citotóxica. Ejemplo de ellos fueron los diterpenos **142-146**, obtenidos del extracto de AcOEt de las partes aéreas de la especie China *Isodon sinuolata* (Lamiaceae).¹⁰⁷

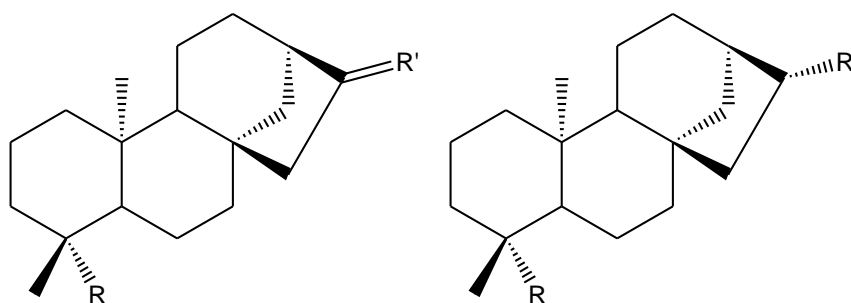


Todos estos compuestos mostraron significativa citotoxicidad contra la línea celular NB4 (leucemia promielocítica aguda) con valores de CI_{50} entre 1.7 y 9.1 μM . Adicionalmente, el compuesto **142** fue activo contra la línea celular SHSY5Y (neuroblastoma) con un CI_{50} de 2.7 μM y contra MCF-7 (cáncer de mama) con un CI_{50} de 4.3 μM usando taxol como control positivo.¹⁰⁷

El amplio espectro de actividades biológicas presentada por este tipo de diterpenos ha motivado diversos estudios de modificaciones estructurales de

este esqueleto con el objeto de obtener nuevos compuestos potencialmente bioactivos. Estas transformaciones estructurales se han logrado tanto químicamente¹⁰⁵ como a nivel microbiológico, utilizando cultivos de microorganismos.^{108,109}

Entre las transformaciones que se han logrado químicamente se reportan las siguientes. A partir del compuesto **148**, aislado del extracto etéreo de *Ricinocarpus stylosus* (Euphorbiaceae), se llevó a cabo diversas reacciones de esterificación, oxidación, reducción y homologación (reacción de Wittig) para obtener los derivados **149-155**, entre otros.¹¹⁰



(147) R= CO₂H; R'= CH₂

(149) R= CH₃; R'= C(C₆H₅)₂

(150) R= CH₂OH; R'= O

(151) R= CH₂OH; R'= CH₂

(152) R= CH₃; R'= O

(148) R= R'= CO₂H

(153) R= CO₂H; R'= CO₂H₃

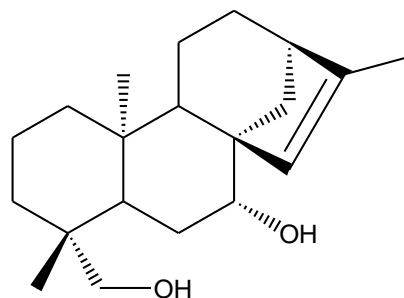
(154) R= CHO; R'= CO₂H₃

(155) R= CO₂H; R'= CH₂OH

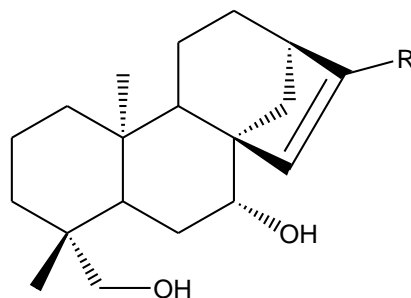
La síntesis total de ácido kaurenico (**147**) se llevó a cabo por Mori y colaboradores.¹¹¹

Usando episideridiol (**156**), un diterpeno abundante de *Sideritis infernalis* (Lamiaceae), como material de partida, se llevó a cabo la síntesis de los

derivados **157-162** a través de varias reacciones de fotooxidación, epoxidación, reordenamiento, bromación, acetilación e hidrólisis.¹¹²

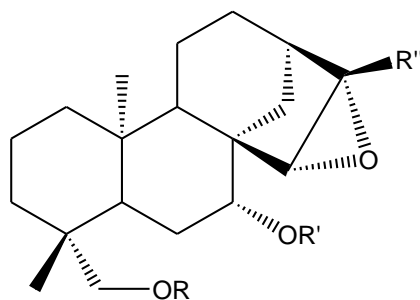


(156)



(157) R= CH₂OH

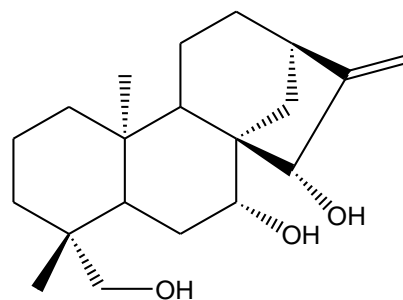
(158) R= CH₂Br



(159) R= R'= H; R''= CH₂OH

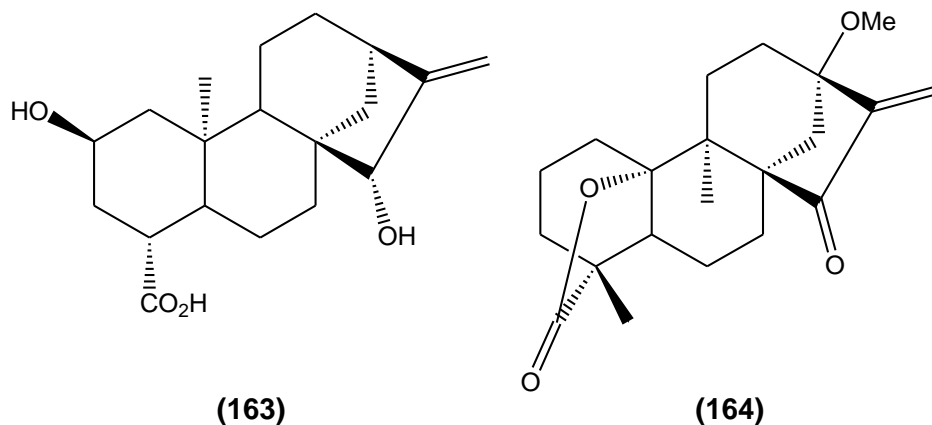
(160) R= R'= H; R''= CH₃

(161) R= R'= Ac; R''= CH₂OAc

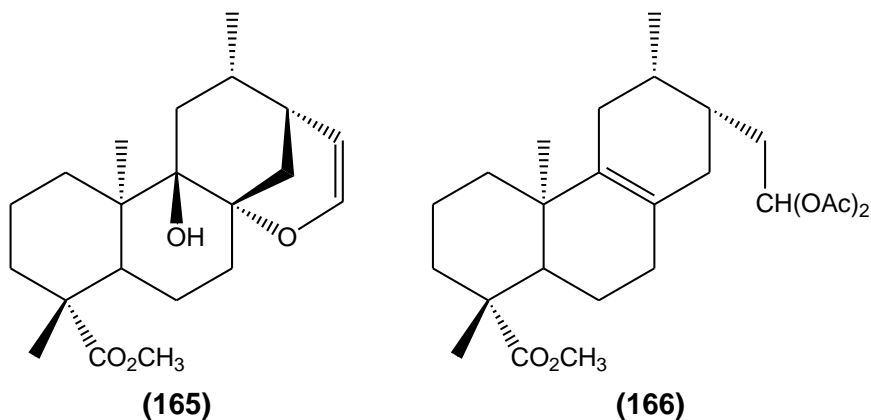


(162)

La síntesis total de (±)-atractiligenina (**163**) se había logrado como una mezcla racémica¹¹³. Sin embargo, 10 años después, se publicó una ruta de síntesis enantioselectiva de la preparación de **163** con un exceso enantiomérico superior al 87%, lo que hizo posible la síntesis de este kaurano en la forma como se encuentra en la naturaleza.¹¹⁴ La lactona diterpénica **164**, un diterpenoide kaurano rearrreglado que presenta actividad antitumoral y contra la malaria, se obtuvo como una mezcla racémica a través de una síntesis lineal total que consiste en 21 pasos.¹¹⁵

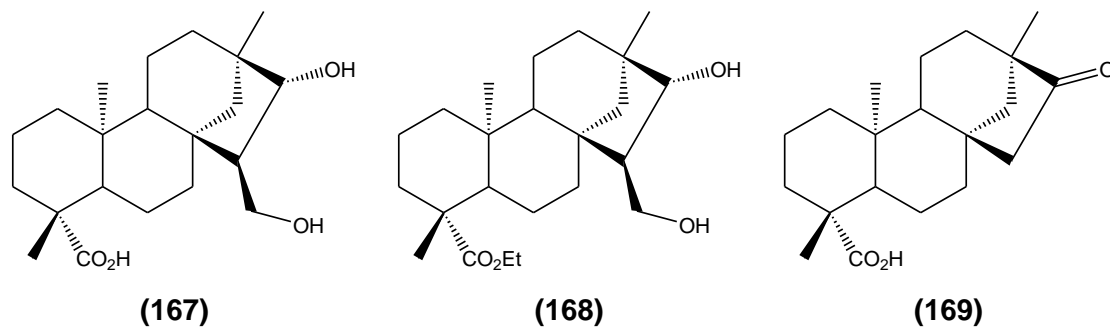


A través de una epoxidación con *m*-CPBA del ácido grandiflorencio aislado de las especies del género *Espeletia* (Asteraceae), seguido por consecuente reordenamiento molecular con trifluoruro de boro eterato o *N*-metil-*N*-nitrosoarea, se sintetizaron los diterpenos **165** y **166**. Estos diterpenos reordenados revelaron una considerable actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de neoplasias humanas como de colon, pulmón, leucemia, melanoma, ovario, riñón y próstata, con valores de CI_{50} entre 0,05 y 100 μ M.¹¹⁶

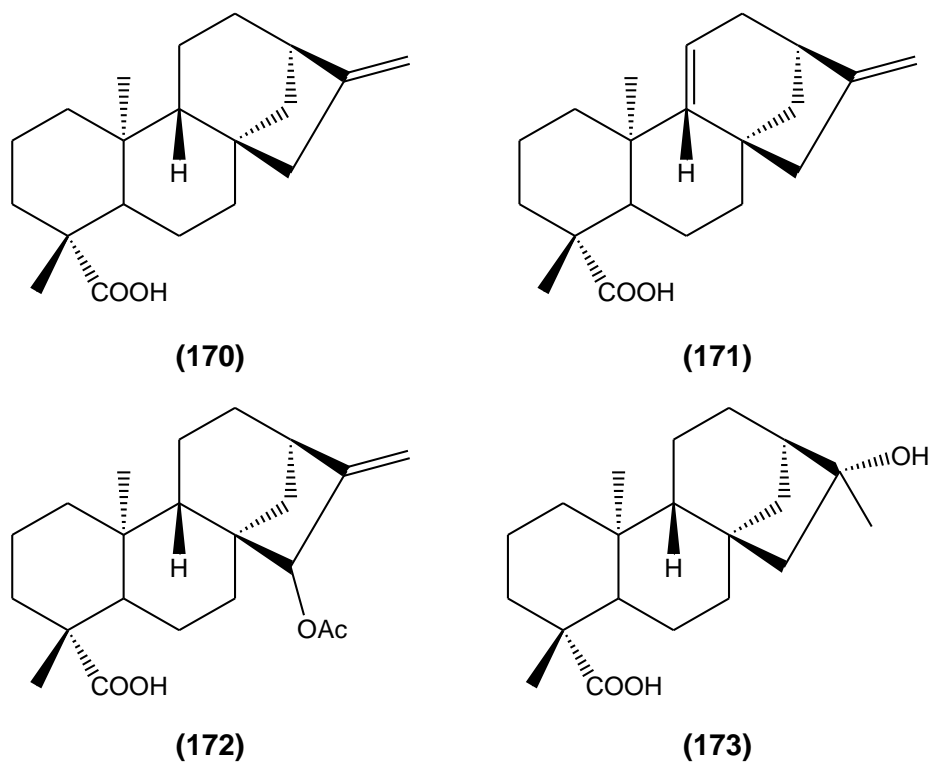


Dos compuestos kauranos relacionados, ácido *ent*-16 α -hidroxi-15 β -hidroximetilbeyeran-19-oico (**167**) y su éster etílico (**168**), se sintetizaron con un buen rendimiento a través de una reacción aldólica Cannizzaro de isosteviol

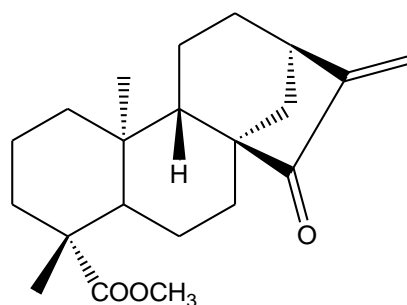
(169), El compuesto **168** mostró selectiva inhibición contra β -glucosidasas (61.3%) y α -mannasa (63.2%), a la concentración de 0.1 mmol/L.¹¹⁷



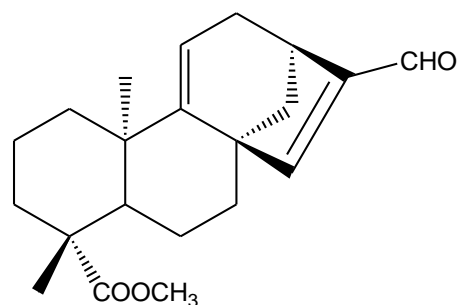
Más recientemente se reportó la síntesis de 31 derivados *ent*-kauranos a partir de los ácidos kaurenoico (**170**), grandiflorénico (**171**), 15 α -acetoxi-kaurenoico (**172**) y 16 α -hidroxi-kaurenoico (**173**).¹¹⁸



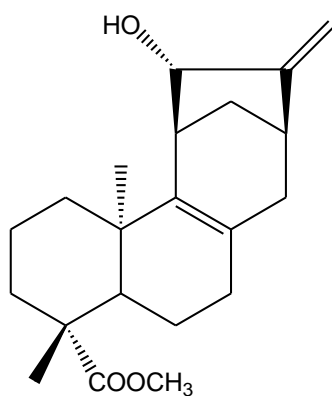
Se evaluó la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados contra las líneas celulares RAW 264.7, HELA, HepG2 y HT-29, y los compuestos más potentes fueron **174-177** con valores de CI_{50} (μM) que se muestran en la Tabla XVII.¹¹⁸



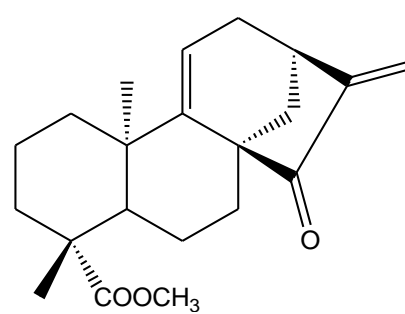
(174)



(175)



(176)



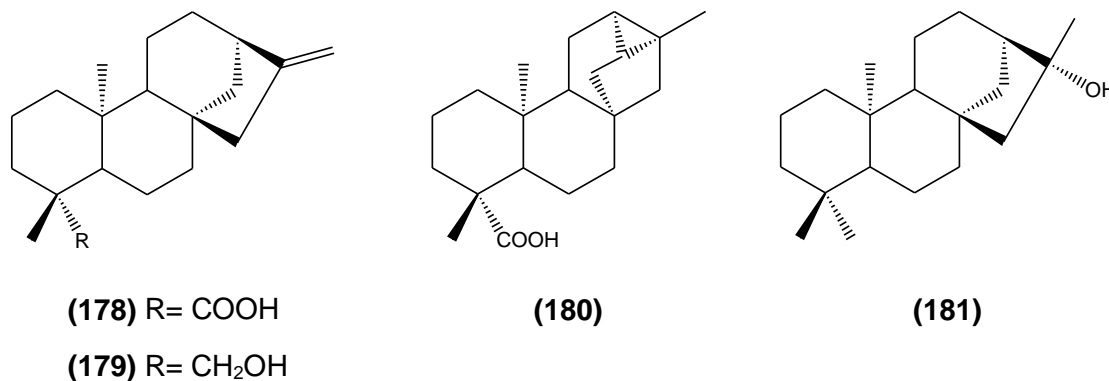
(177)

Tabla XVII: Valores de CI_{50} (μM) de los compuestos **174-177**.

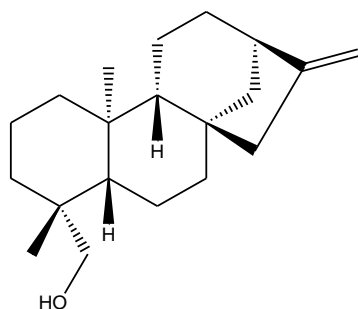
Compuesto	RAW 264.7	HELA	HepG2	HT-29
174	1.0 \pm 0.2	50.0 \pm 6.3	75.0 \pm 8.3	30.0 \pm 2.7
175	5.0 \pm 0.4	10.0 \pm 1.4	25.0 \pm 3.3	40.0 \pm 4.5
176	5.0 \pm 0.3	>100	>100	>100
177	5.0 \pm 0.7	25.0 \pm 1.2	>100	25.0 \pm 2.7

Además de la actividad citotóxica comprobada para muchos de los compuestos kauranos presentados, se ha encontrado que algunos de ellos presentan actividad tripanocida y leishmanicida. Se ha reportado que el ácido kaurenico (**170**) es activo contra *Tripanosoma cruzi*,¹¹⁹ agente causante de la enfermedad de Chagas.¹²⁰

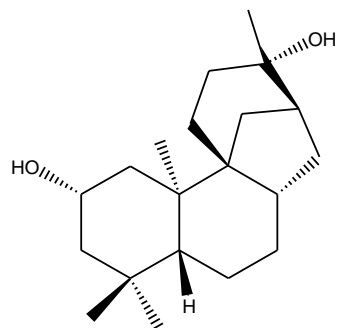
Da Costa y colaboradores reportaron que los diterpenos kauranos **178**, **179**, **180** y **181** fueron activos contra tripomastigotes de *T. cruzi* con valores de CI_{50} de 1.7, 0.7, 1.8, y 1.7 mM, respectivamente.^{119,121}



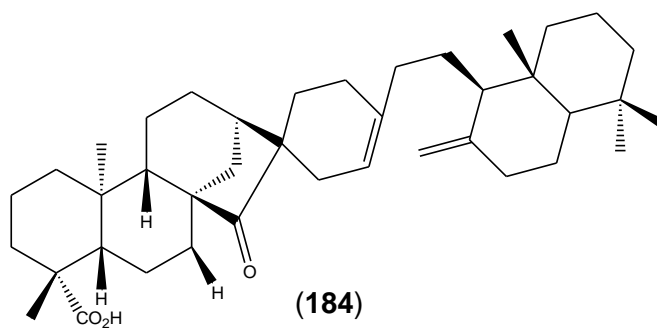
Se reportó los resultados de la evaluación de 26 diterpenos obtenidos de fuentes naturales o productos de transformaciones sintéticas/microbiológicas, principalmente derivados del ácido kaurenico (**170**), contra las formas tripomastigotes de *Tripanosoma cruzi*. De los compuestos evaluados, los más potentes resultaron ser el ácido kaurenico (**170**), kaurenol (**182**), estemodin (**184**) y ácido acutiflórico (**183**) con valores de DE_{100} de 1.363, 1.386, 1.390 y 1.599 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.¹²²



(182)



(183)



(184)

En 2002 se reportó la síntesis de derivados del ácido kaurenoico (**170**) en la búsqueda de compuestos que disminuyan la actividad lítica sobre eritrocitos sanguíneos que presenta **170** como efecto colateral. Para ello, sintetizaron los compuestos que se muestran en la Figura 49 y se evaluó la actividad de estos compuestos contra la forma tripomastigote de *T. cruzi*.¹²³

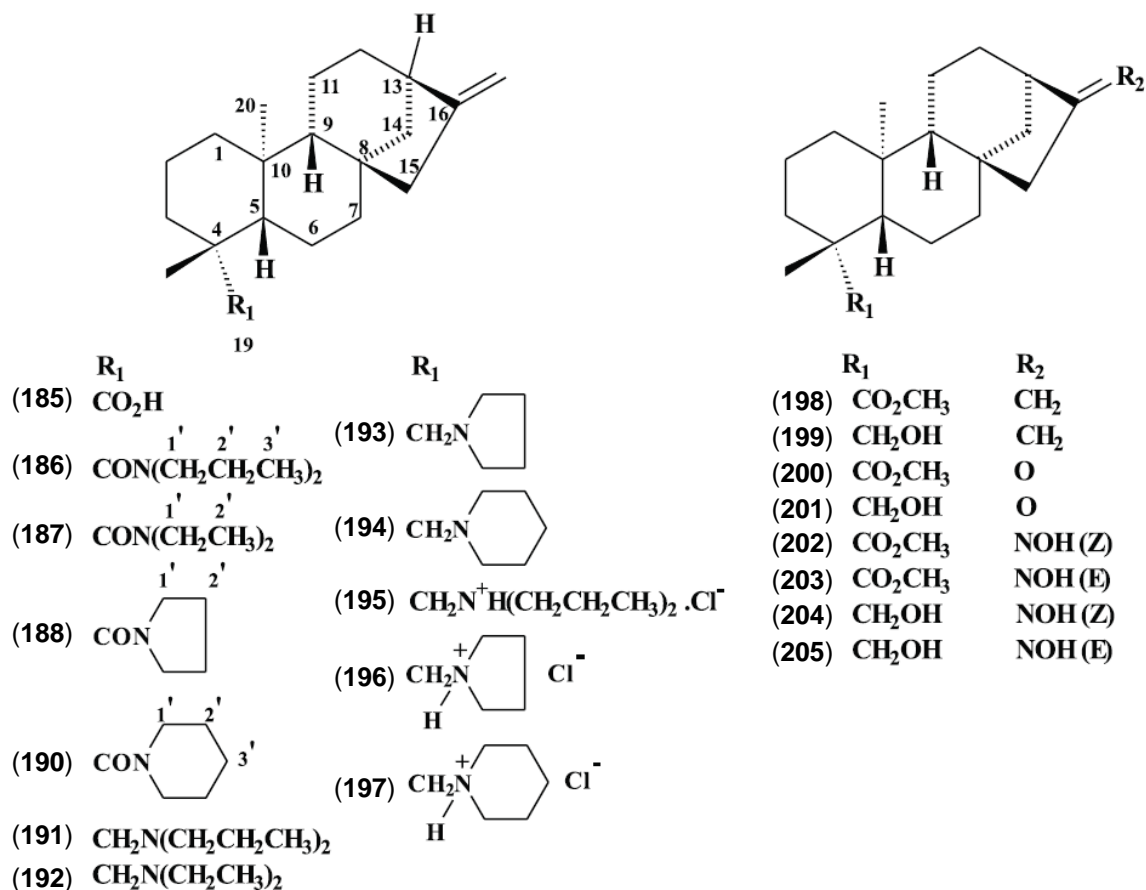
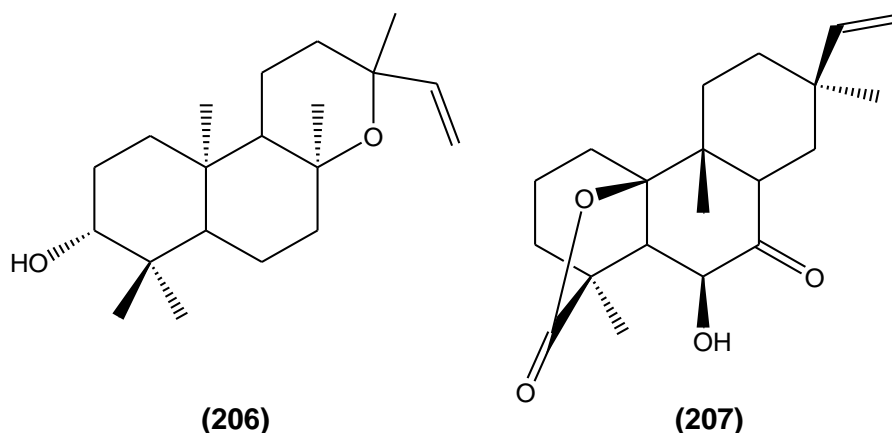


Figura 49: Derivados del ácido kaurenico (**170**).

De los derivados obtenidos, el compuesto **202** resultó más potente que el ácido kaurenico (**170**), presentando actividad tripanocida en todas las concentraciones probadas (2.27 - 0.57 mM), sin embargo, causaba una discreta lisis de los eritrocitos, lo mismo ocurrió con el compuesto **204**, el cual presentó una potencia similar a **170**. El compuesto **196** resultó tan potente como **170** y sin causar lisis de los eritrocitos.

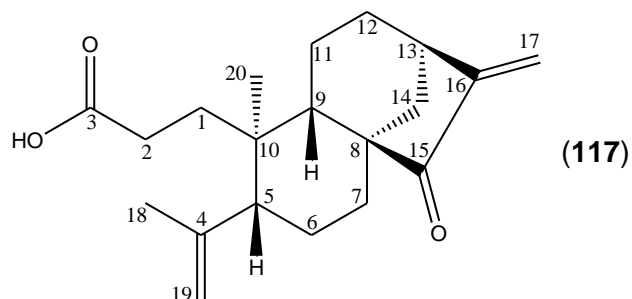
En el área de la leishmaniasis, muchos productos naturales han presentado excelente actividad contra los parásitos causante de esta enfermedad, principalmente alcaloides. Algunos terpenos también han sido reportados como

agentes activos contra estos parásitos; como por ejemplo, el compuesto **206** aislado de *Sideritis varoi* (Lamiaceae) mostró actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. donovani*.¹²⁴ Adicionalmente, el compuesto **207** aislado de la corteza de *Holarrhena floribunda* (Apocynaceae) presentó moderada actividad contra promastigotes y amastigotes de *L. donovani*.¹²⁵



En los resultados mostrados como antecedentes a esta investigación, se puede observar que un gran número de diterpenoides con esqueleto *ent*-kaurano, con diferentes oxigenaciones y patrones de clivaje han sido aislados, caracterizados y sintetizados; muchos de estos compuestos han presentado actividad antitumoral. Asimismo, en los últimos años, se ha reportado un número creciente de publicaciones donde se destaca el uso de los kauranos para la síntesis de nuevos agentes antimicrobianos, citotóxicos y tripanocidas. Esto confirma el enorme potencial de estos diterpenos como agentes terapéuticos y nos invita a continuar explorando más en esta familia interesante de compuestos.¹⁰²

II.3 Ácido de caracasina



El ácido de caracasina (117) es un diterpeno de tipo *ent*-3,4-seco-kaurano aislado de la planta *Croton micans* Muell. Arg. (la cual, en principio, fue erróneamente identificada como *Croton caracasana*).⁷⁰ Este compuesto presentó una excelente actividad citotóxica a concentraciones de 0,8 a 12 μ M contra las líneas celulares de cáncer humano HeLa (cáncer de cuello uterino), MCF- 7 (cáncer de mama), PC-3 (cáncer de próstata), LoVo (cáncer de colon), Jurkat E6.1 (leucemia aguda de células T humanas) y Jurkat JCaM1.6 (variante genética de la células Jurkat E6.1 deficiente en la proteína p56^{Lck}). Asimismo, presentó excelente actividad antiinflamatoria.⁷¹

En estudios recientes, el ácido de caracasina fue evaluado en parásitos de *Leishmania mexicana* y *Tripanosoma cruzi*, y adicionalmente se evaluó su actividad contra algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, resultando activo en todos los ensayos realizados.

II.4 JUSTIFICACIÓN

Basados en los antecedentes farmacológicos de los diterpenos *ent*-kauranos y derivados sintéticos hasta ahora reportados, además, de la actividad citotóxica, antiinflamatoria, leishmanicida, tripanocida y antibacteriana presentada por el ácido de caracasina, en este trabajo de investigación se realizaron modificaciones estructurales de este kaurano en la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente bioactivos. Esta es la primera investigación sobre modificaciones en estructuras tipo *ent*-3,4-*seco*-kauranos, ya que las reportadas hasta el momento, implican el esqueleto tetracíclico de los kauranos.

II.5 OBJETIVOS

II.5.1 Objetivo general

1. Realizar modificaciones estructurales del compuesto ácido de caracasina aislado de la planta *Croton micans* Muell. Arg. y evaluar la actividad biológica de los derivados obtenidos.

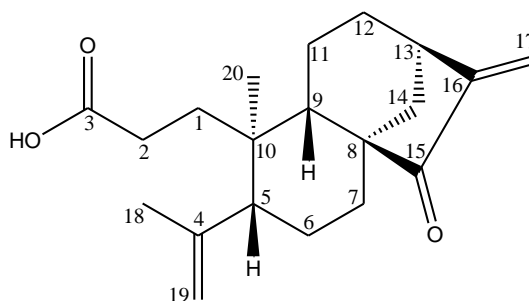
II.5.2 Objetivos específicos

1. Optimizar el proceso de extracción y purificación del ácido de caracasina de la planta *Croton micans* Muell. Arg.
2. Realizar la hemisíntesis de derivados del ácido de caracasina a través de reacciones sobre el ácido carboxílico, los dobles enlaces y la cetona α , β -insaturada.
3. Caracterizar los derivados obtenidos mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C , HETCOR, FLOCK, IR y Espectrometría de Masas.
4. Evaluar la citotoxicidad de los derivados sintéticos sobre diversas líneas celulares de cáncer humano utilizando el método de MTT.
5. Evaluar la actividad antibacteriana de los derivados sintéticos utilizando el método de difusión sobre placas de agar.
6. Evaluar la actividad leishmanicida de los derivados sintéticos sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* utilizando el método del MTT.
7. Evaluar la actividad tripanocida de los derivados sintéticos sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* utilizando el método del MTT.

II.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.6.1 Sección químico-sintética

II.6.1.1 Extracción del ácido de caracasina (117)



(117)

Con la finalidad de optimizar el proceso de extracción y purificación del ácido de caracasina de la planta *Croton micans* Muell. Arg. se decidió evaluar varios métodos. El método optimizado consistió en la decocción de las hojas secas y molidas de la planta, seguido de extracción líquido-líquido con CHCl_3 y finalmente filtración mediante cromatografía en columna de sílica gel. Con la aplicación de este procedimiento se logró aislar el ácido de caracasina con alto grado de pureza y con rendimientos promedios de 0.66% respecto al material vegetal inicial y 70.7% respecto a la fracción clorofórmica. Los otros métodos de extracción probados generaron rendimientos menores, involucraban más pasos y en muchas ocasiones resultaba difícil purificar el ácido.

Uno de los procedimientos probados fue a través de la extracción ácido-base de un extracto metanólico de los tallos secos y molidos que se obtuvo mediante Soxhlet. Este extracto fue disuelto en CHCl_3 y extraído con NaHCO_3 10%.

Posteriormente, la fase acuosa se llevó a pH ácido con solución de HCl 10%, se extrajo con CHCl_3 , se evaporó el solvente a presión reducida y esta fracción se purificó mediante cromatografía en columna; el ácido se aisló con un rendimiento de 0.01% respecto al material vegetal inicial. Un método similar se llevó a cabo, pero esta vez partiendo de un extracto clorofórmico de los tallos obtenido mediante Soxhlet. Esta vez el rendimiento fue de 0.02%. Se repitieron ambos procedimientos con las hojas de la planta y se obtuvieron rendimientos similares. Otro procedimiento realizado fue la separación mediante cromatografía en columna de fase normal de un extracto metanólico de las hojas obtenido por maceración. Las fracciones de interés obtenidas de la columna fueron purificadas a través de otras técnicas cromatográficas. Se logró aislar el ácido de caracasina con un rendimiento de 0.60%. A pesar de que con este procedimiento se obtuvo un buen rendimiento, no fue seleccionado como el método de extracción más apropiado ya que involucraba un mayor número de pasos en comparación con el primero y el ácido de caracasina aislado no se obtenía totalmente libre de impurezas.

Una vez que el método de extracción del material de partida fue optimizado, se realizó varias veces para obtener la cantidad de ácido de caracasina necesaria para llevar a cabo las reacciones planteadas. El ácido fue caracterizado por medio de técnicas espectroscópicas de RMN (Tabla XVIII), IR y espectrometría de masas (Anexos 12-16).

Tabla XVIII. Datos de RMN ^{13}C y ^1H para el ácido de caracasina (**117**).

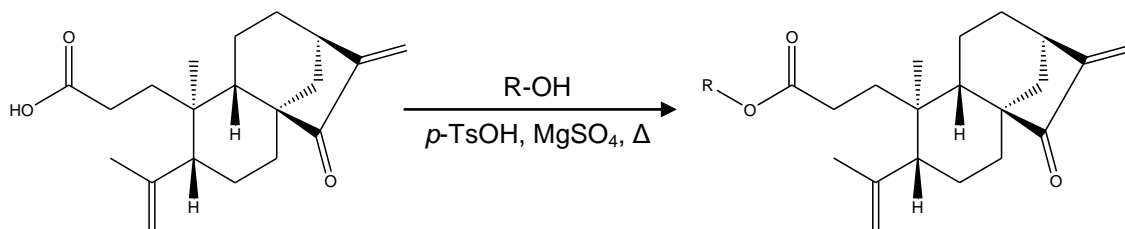
Posición	δ_{C} , ppm ^a	DEPT-135	δ_{H} , ppm (m) ^b
1	33.5	CH ₂	1.68 (m)
2	28.4	CH ₂	2.06 (m)
3	179.4	C	---
4	146.8	C	---
5	49.9	CH	2.05 (m)
6	24.7	CH ₂	1.53 (m)
7	32.1	CH ₂	1.27 (m)
8	51.9	C	---
9	43.4	CH	1.36 (m)
10	41.5	C	---
11	18.3	CH ₂	1.63 (m)
12	32.2	CH ₂	1.88 (m)
13	38.1	CH	3.04 (sa)
14	36.4	CH ₂	2.35 (d, $J= 12.1$ Hz)
15	210.3	C	---
16	149.3	C	---
17	114.7	CH ₂	5.98 (s), 5.24 (s)
18	23.4	CH ₃	1.72 (s)
19	114.1	CH ₂	4.86 (s), 4.60 (s)
20	21.6	CH ₃	1.04 (s)

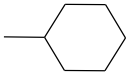
^a CDCl₃, 67.5 MHz

^b CDCl₃, 270 MHz

II.6.1.2 Reacciones sobre el ácido carboxílico

II.6.1.2a Hemisíntesis de ésteres del ácido de caracasina (II.2-II.8).



Compuesto	R
II.2	-CH ₃
II.3	-CH ₂ CH ₃
II.4	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
II.5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
II.6	-CH(CH ₃) ₂
II.7	
II.8	-CH ₂ Ph

Esquema 9: Hemisíntesis de ésteres

Los diferentes ésteres se sintetizaron a través de una reacción de esterificación tipo Fischer en la cual se empleó *p*-TsOH como catalizador ácido bajo condiciones de reflujo (Esquema 9). La reacción procede a través de una sustitución nucleofílica sobre el carbono acílico del ácido carboxílico como se muestra en la Figura 50. En el mecanismo de reacción cada paso es reversible, y tomando en cuenta el principio de Le Chatelier, la formación del éster se podría favorecer usando un exceso de los reactivos o eliminando uno de los productos a medida que se va formando.

En la mayoría de las reacciones llevadas a cabo se empleó un exceso del alcohol que sirvió de nucleófilo y a su vez de solvente y, por otro lado, el agua que se iba formando en el transcurso de la reacción se iba eliminando del medio con el MgSO_4 anhidro usado como desecante.

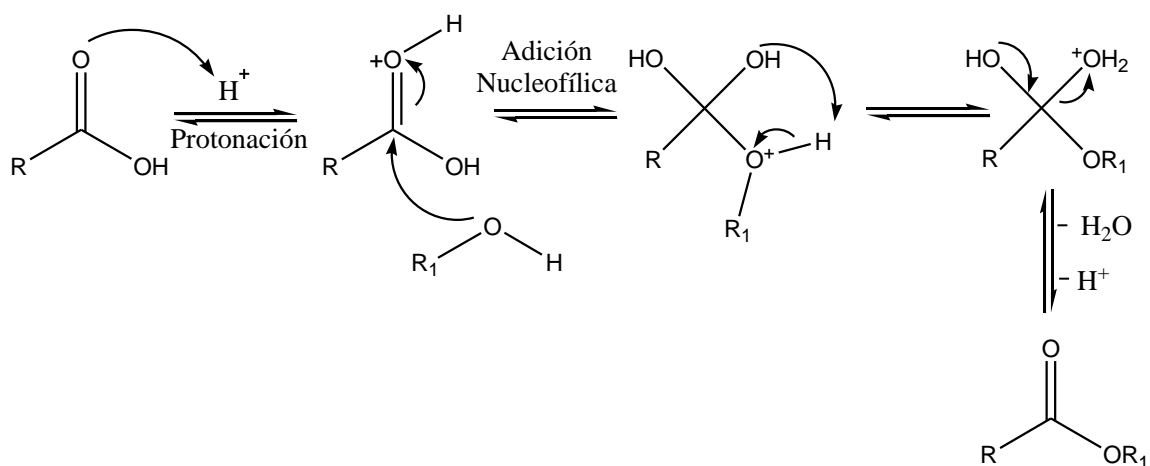


Figura 50: Mecanismo de la reacción de Fischer

A través de esta reacción se sintetizaron siete ésteres con rendimientos por encima del 50% (Tabla XIX). Estos compuestos se elucidaron a través de técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas (Anexos 17-40).

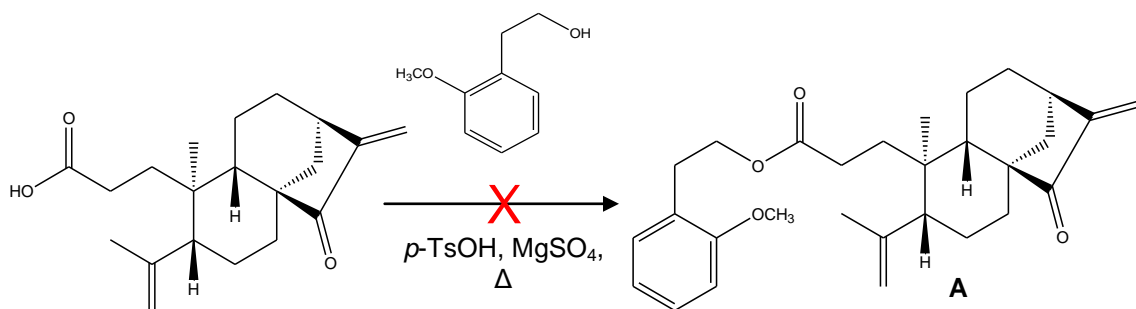
Tabla XIX: Características de los ésteres sintetizados.

Compuesto	R	Característica	Punto de fusión °C	Rendimiento %
II.2	-CH ₃	Sólido blanco	73-75	74.8
II.3	-CH ₂ CH ₃	Sólido blanco	107-109	70.1
II.4	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	Sólido blanco	101-105	78.9
II.5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Sólido blanco	100-103	90.2
II.6	-CH(CH ₃) ₂	Sólido blanco	107-110	60.6
II.7	-Cy	Sólido blanco	86-91	70.9
II.8	-CH ₂ C ₆ H ₅	Sólido blanco	83-87	53.8

En el caso de los compuestos II.2-II.6, el nucleófilo sirvió también de solvente, por lo tanto se encontraba en exceso. En la síntesis de los compuestos II.7 y II.8 no se aplicó el mismo procedimiento debido al alto punto de ebullición del ciclohexanol (161°C) y del alcohol bencílico (205°C), lo cual dificultaría su evaporación, en su lugar se empleó una cantidad equimolar de cada nucleófilo con respecto al ácido y se utilizó benceno como solvente.

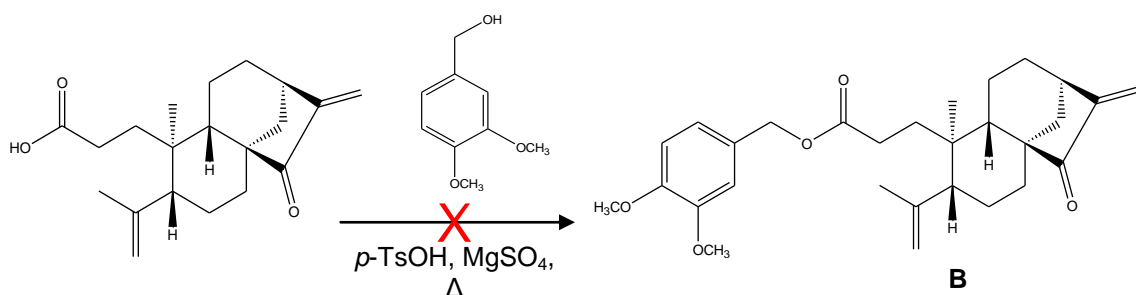
En los espectros de RMN ^{13}C de los compuestos sintetizados (Anexos 20, 23, 26, 29, 32, 36 y 40), se observa la presencia de una señal clave que confirma la obtención de los productos deseados, la señal del carbono acílico de cada éster la cual resuena entre 173-174 ppm, a diferencia de la señal del material de partida que aparece a 179.4 ppm, como es de esperarse para el caso de un ácido carboxílico. Adicionalmente, puede observarse para cada compuesto, la señal de los carbonos de la porción alcohólica del éster, destacando la señal del carbono enlazado al oxígeno (entre 50-70 ppm). En los espectros de RMN ^1H (Anexos 19, 22, 25, 28, 31, 35 y 39), de igual forma se distinguen las señales de los protones de la porción alcohólica de cada éster. En el caso del compuesto II.2 que corresponde al éster metílico, esta señal se observa a 3.61 ppm como un singlete que integra para tres protones. Para el compuesto II.3 se observa un cuarteto a 4.05 ppm ($J= 7.2$ Hz) y un triplete a 1.19 ppm ($J= 7.2$ Hz), señales correspondientes al grupo etoxi. Del mismo modo se pudieron asignar las señales para el resto de los compuestos. Los espectros de masas (Anexos 18, 21, 24, 27, 30, 33, 37 y 41) permitieron confirmar el peso molecular de cada uno de los ésteres sintetizados comprobando de este modo la obtención de los mismos.

Se intentó sintetizar un éster aromático sustituido (A) con la finalidad de observar el efecto de este grupo sobre la actividad biológica. Para ello, se hizo reaccionar el ácido de caracasina con *o*-metoxi-fenetilalcohol, siguiendo el mismo procedimiento descrito para los obtener los compuestos II.2-II.6; sin embargo, no se obtuvo el compuesto deseado, sino una mezcla de varios productos (Esquema 10).



Esquema 10: Aproximación de hemisíntesis del compuesto A.

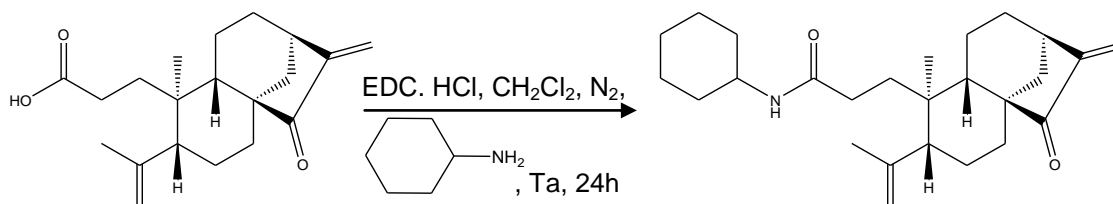
Una posible explicación para esto es que, bajo las condiciones aplicadas, se favoreció una reacción de eliminación en el alcohol para formar la olefina correspondiente, limitando la cantidad de nucleófilo que reaccionaría con el ácido para formar el compuesto A. Por esta razón, se seleccionó otro alcohol aromático, el 3,4-dimetoxi-bencilalcohol, disponible en el laboratorio. Se realizó el mismo procedimiento de síntesis descrito para los casos anteriores; sin embargo, se obtuvo nuevamente una mezcla de productos (Esquema 11).



Esquema 11: Aproximación de hemisíntesis del compuesto B.

Se repitió la reacción variando las condiciones y se obtuvo el mismo resultado.

II.6.1.2b Hemisíntesis de la ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9).



Esquema 12: Hemisíntesis de la ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9)

El compuesto II.9 se obtuvo a través de la activación del ácido de caracasina con el reactivo de acoplamiento EDC bajo atmósfera de N_2 y posterior reacción con ciclohexilamina (Esquema 12), de acuerdo al mecanismo descrito en la Figura 51.

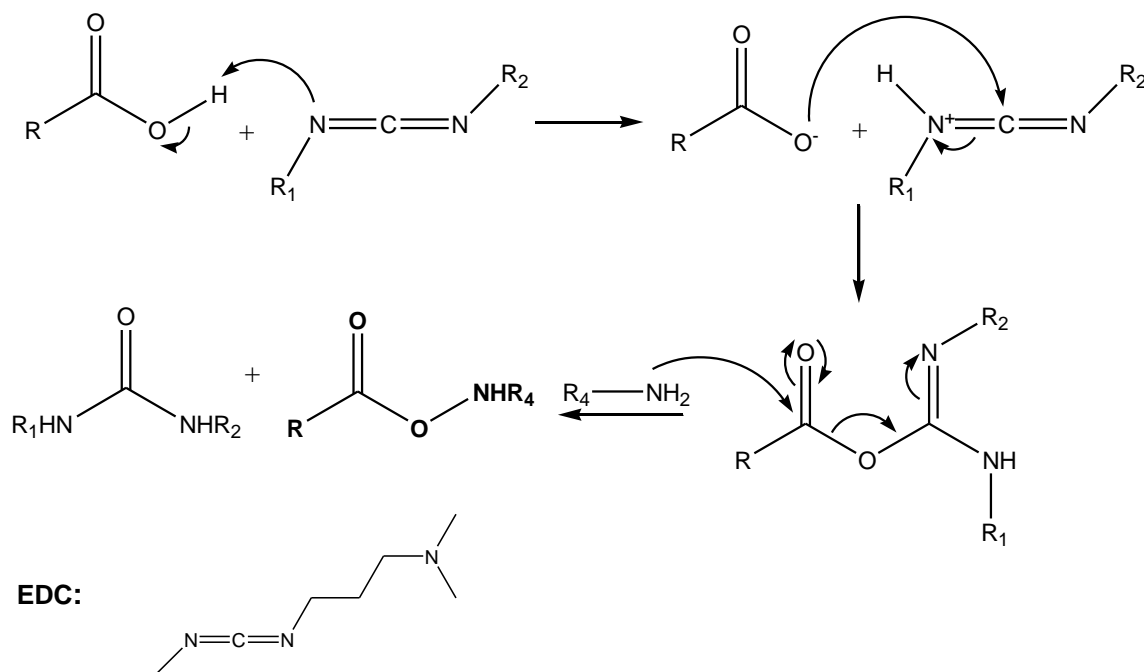
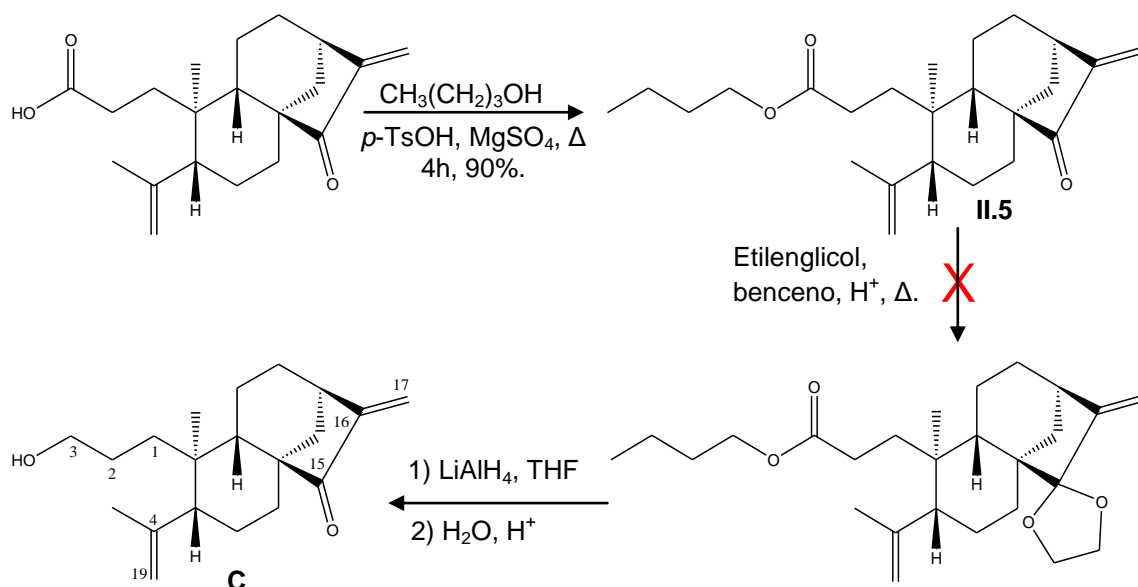


Figura 51: Mecanismo de la formación de amidas a partir de ácidos carboxílicos empleando EDC.

El producto se obtuvo como un caramelo amarillo claro con un rendimiento de 15.9%. En el espectro de RMN ^{13}C (Anexo 42) se observa la señal del carbono acílico (C-3) desplazada a 171.4 ppm, así como también otras cuatro señales que se asignaron a los carbonos del grupo ciclohexil de la amida. En el espectro de RMN ^1H (Anexo 41) la señal del metino enlazado al nitrógeno de la amida aparece como una señal multiplete que integra para un protón a 3.71 ppm. No fue posible tomar un espectro de masas para este compuesto que comprobara la masa molecular del mismo debido al bajo rendimiento con el cual se obtuvo el producto, sin embargo, con los datos espectroscópicos discutidos y el espectro DEPT-135 (Anexo 42) fue posible caracterizar al compuesto II.9.

II.6.1.2c Aproximaciones de hemisíntesis del *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-kaur-4(19),16(17)-dien-3-ol (**C**)



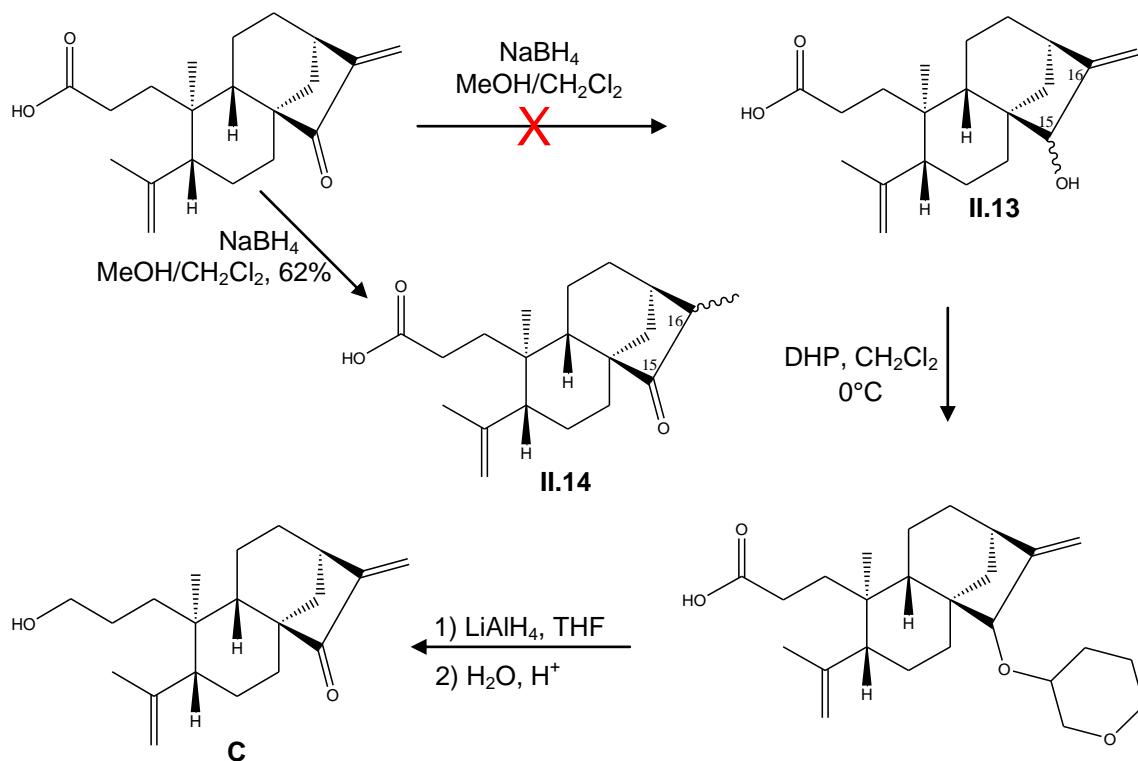
Esquema 13: Aproximación 1 de hemisíntesis del compuesto **C**.

Se intentó sintetizar el compuesto C correspondiente al derivado del ácido de caracasina con un grupo hidroxilo en la posición 3 obtenido a partir de la reducción del ácido carboxílico. La estrategia sintética planteada consistía en cuatro pasos: esterificación del ácido carboxílico con butanol, protección de la cetona en C-15 con etilenglicol, reducción del éster con LiAlH_4 y finalmente desprotección de la cetona para obtener el compuesto C (Esquema 13).

El primer paso se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito para obtener el compuesto II.5. Se decidió sintetizar el butil éster ya que fue la reacción de síntesis de ésteres con la cual se obtuvo mayor rendimiento (Tabla XIX). Esta vez el producto se obtuvo con un 90% de rendimiento.

El segundo paso consistía en la protección de la cetona en C-15 con etilenglicol para formar el cetal correspondiente. Se llevó a cabo la reacción mediante la disolución del ácido de caracasina en benceno, se acidificó el medio, se añadió una cantidad equimolar de etilenglicol y se colocó la reacción bajo reflujo mediante el uso de un aparato Dean Stark. Después de 6 horas de reacción no se había consumido el material de partida totalmente y mediante CCF se observó la formación de varios productos, por ello se decidió finalizar la reacción en este punto. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de sílica gel, sin embargo, el producto en mayor proporción correspondía la material de partida. Mediante el análisis de los espectros de RMN de los compuestos obtenidos se determinó que no se había formado el producto deseado.

Por esta razón, se cambió la estrategia y se propuso realizar una síntesis de cuatro pasos empezando con la reducción de la cetona en C-15 con NaBH_4 , posteriormente, se debía proteger el alcohol con DHP, realizar la reducción del ácido carboxílico con LiAlH_4 y desproteger el alcohol para formar el compuesto C (Esquema 14).



Esquema 14: Aproximación 2 de hemisíntesis del compuesto C.

El primer paso de la ruta propuesta ya había sido realizado en dos ocasiones para obtener el compuesto II.13 con rendimientos alrededor de 70%. Esta vez se repitió el mismo procedimiento, pero el NaBH_4 no se adicionó disuelto en MeOH como en los casos anteriores, sino que se adicionó lentamente al medio en forma sólida. El compuesto obtenido después de haber sido purificado,

mostraba características físicas y en CCF similares al compuesto II.13, por esta razón se continuó el esquema propuesto.

Para llevar a cabo el siguiente paso de la ruta de síntesis, se disolvió el compuesto obtenido en el primer paso en CH_2Cl_2 , se colocó en un baño de hielo, se le añadió el DHP (2 equiv.) y se dejó reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente. Después de purificar el residuo se obtuvo un sólido blanco, el cual fue identificado a través de RMN como el compuesto II.14 (Esquema 14).

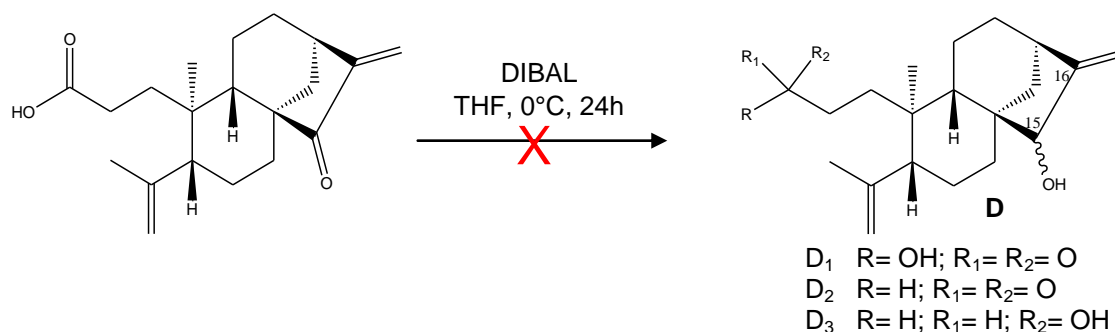
La reducción de aldehídos y cetonas α,β -insaturadas con el NaBH_4 generalmente conduce a la obtención del alcohol completamente saturado,¹²⁴ sin embargo, la formación de este compuesto se puede explicar a través de una reducción 1,4 del sistema conjugado.

Para tratar de explicar la regioselectividad del NaBH_4 en la reducción de aldehídos y cetonas α, β -insaturadas se han utilizado los conceptos de ácidos-bases “duros y blandos”. Se ha encontrado que los hidruros relativamente suaves se adicionan preferencialmente al sistema enona mediante una vía 1,4, mientras que los reactivos fuertes reaccionan con el carbono carbonílico (vía 1,2). Los borohidruros son considerados más suaves que los correspondientes hidruros de aluminio. El reemplazo de un grupo hidruro sobre el boro por un alcóxido lo convierte en un reactivo más fuerte, así el $\text{NaBH}(\text{OMe})_3$ generará mayor cantidad del producto de una reducción 1,2 comparado con el NaBH_4 y cuando se evita la formación de los alcóxiboratos predomina la reducción 1,4. Esto implica que la adición lenta del borohidruro a

la solución de sustrato debería ayudar a formar las especies alcoxiborato e incrementar la cantidad relativa de reducción 1,2.¹²⁶

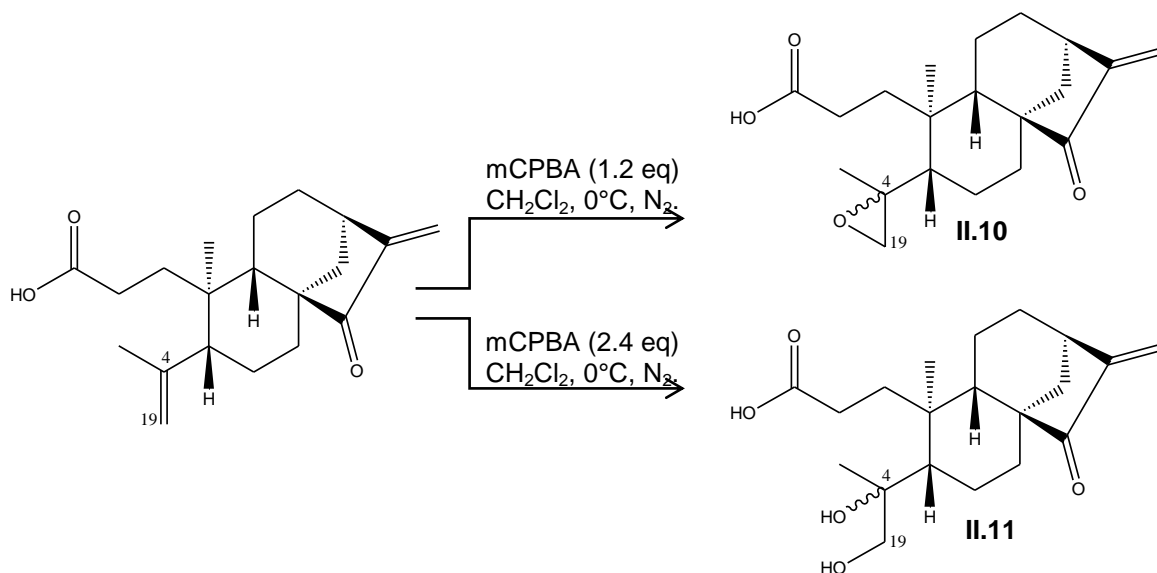
Como ya se mencionó, en el primer paso de la ruta sintética el NaBH₄ no se disolvió en MeOH como en el caso del procedimiento descrito para obtener el compuesto II.13, sino, que se adicionó directamente de forma lenta al medio de reacción. Esto favoreció la reducción 1,4 ya que el NaBH₄ actuó directamente sobre el sustrato sin que se formaran especies alcoxiborato que darían paso a la formación del producto deseado.

Además de las reacciones ya mencionadas, se hizo reaccionar el ácido de caracasina con DIBAL (3 equiv.) en THF a 0°C y luego a temperatura ambiente, para determinar si con este agente se podía reducir el ácido carboxílico al aldehído o al alcohol como se reporta en la literatura.^{127,128} Al realizar esta reacción se esperaba que el grupo carbonilo en la posición 15 fuera reducido al alcohol correspondiente, sin embargo, después de 24 horas de reacción no se había formado ninguno de los posibles productos (Esquema 15).



Esquema 15: Aproximación de hemisíntesis del compuesto D.

II.6.1.3 Reacciones sobre el doble enlace en la posición 4-19



Esquema 16: Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-4,19-epoxi-kaur-16(17)-*en*-3-oico (**II.10**) y del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-4,19-dihidroxi-kaur-16(17)-*en*-3-oico (**II.11**).

II.6.1.3a Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-4,19-epoxi-kaur-16(17)-*en*-3-oico (**II.10**)

La hemisíntesis del compuesto **II.10** se obtuvo a través de la reacción de Prilezhaev,¹²⁹ que consiste en la epoxidación de un alqueno por reacción con un perácido (Esquema 16). El oxígeno del grupo hidroxilo de un perácido es electrofílico a diferencia de un ácido carboxílico, por lo tanto, puede reaccionar con un alqueno por transferencia de un oxígeno para producir un epóxido y un ácido carboxílico. Se ha propuesto que la reacción cursa a través de un estado de transición como el que se muestra en la Figura 52, donde el oxígeno electrofílico se adiciona al doble enlace carbono-carbono y el protón simultáneamente migra al oxígeno del grupo acilo del perácido.

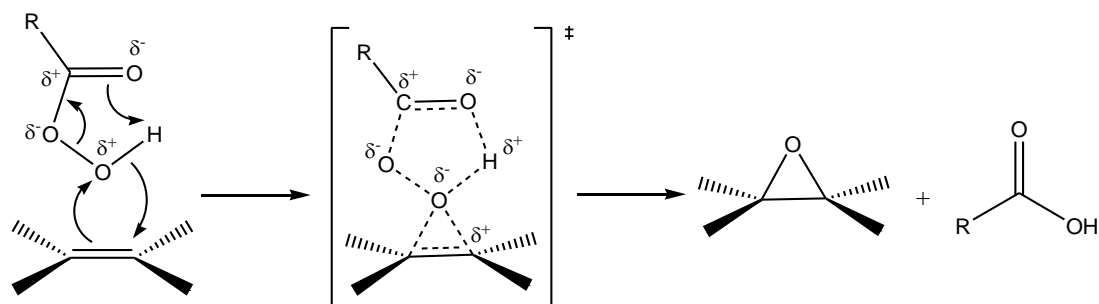


Figura 52: Mecanismo de la reacción de epoxidación de dobles enlaces con perácidos.

En el caso de la síntesis del compuesto II.10 se utilizó el ácido *meta*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) en una proporción ácido:*m*-CPBA (1:1.2), obteniéndose como producto el compuesto epoxidado en la posición 4,19 del ácido de caracasina con un rendimiento de 37.5%. La estructura de este compuesto fue comprobada a través del análisis de los datos espectroscópicos. En los espectros de RMN ^{13}C (Anexo 46) y DEPT-135 (Anexo 47) se observa la desaparición de las señales correspondientes a los carbonos olefínicos C-4 y C-19 presentes en el ácido y se observan dos nuevas señales correspondientes a un carbono cuaternario y uno metilénico a 58.2 y 55.9 ppm, respectivamente. Esto indicó que el doble enlace se había epoxidado. Adicionalmente, en el espectro de RMN ^1H (Anexo 45) se observan dos dobletes a 2.73 y 2.68 ppm ($J = 4.0$ y 4.4 Hz), que integran para dos protones y confirmaron la presencia del grupo metilénico del epóxido. En el espectro de masas (Anexo 44) se observa un $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 355.16 m/z que permitió establecer una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (332.43 g/mol), comprobando de este modo que se había obtenido el producto deseado.

II.6.1.3b Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-4,19-dihidroxi-kaur-16(17)-*en*-3-oico (II.11).

El compuesto II.11 se obtuvo mediante el mismo procedimiento empleado para sintetizar el compuesto II.10, sin embargo, en este caso se empleó una proporción ácido/*m*-CPBA (1:2.4), con la intención de observar si el alqueno en la posición 16-17 del ácido de caracasina también sería epoxidado. El resultado obtenido fue la formación de un diol en las posiciones 4 y 19 (Esquema 16). Este producto pudo formarse a partir de la síntesis del epóxido en el alqueno 4-19, el cual sufre posteriormente una reacción con agua resultando en la apertura del epóxido, manteniéndose el doble enlace del sistema α,β -insaturado intacto (Figura 53). Debido a que se utilizó un exceso del perácido, se piensa que esto pudo favorecer la protonación del epóxido formado en un primer paso y posterior apertura del mismo por ataque nucleofílico del agua.

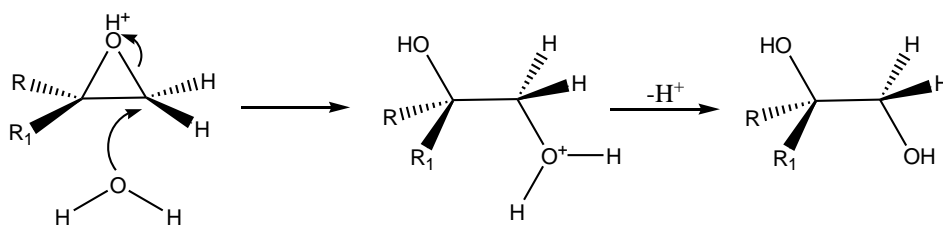


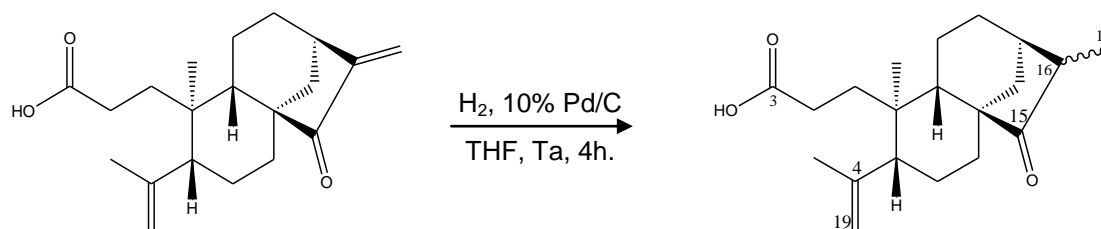
Figura 53: Mecanismo de la reacción de apertura de epóxidos

En el espectro de RMN ^{13}C (Anexo 50) y DEPT-135 (Anexo 51) se observan las señales de la olefina exocíclica a 149.7 (C-16) y 113.5 ppm (C-17) indicando que no hubo reacción sobre este grupo funcional. Adicionalmente, se pueden apreciar dos nuevas señales de carbonos oxigenados a campo medio, una a 76.87 ppm (C-4) correspondiente a un carbono cuaternario y otra a 70.4 ppm

(C-9) correspondiente a un carbono metilénico. Esta última señal se correlaciona en el espectro de RMN ^1H (Anexo 49) con un multiplete centrado en 3.30 ppm que integra para dos protones, indicando un grupo metileno hidroxilado en la estructura. Estos datos adicionados a la información obtenida a partir del espectro de masas (Anexo 48), donde se observa un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 373.17 m/z (350.45 g/mol), confirmaron la estructura del compuesto **II.11** el cual tiene una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$.

II.6.1.4 Reacciones sobre el doble enlace en 16-17

II.6.1.4a Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-kaur-4(19)-*en*-3-oico (II.12)



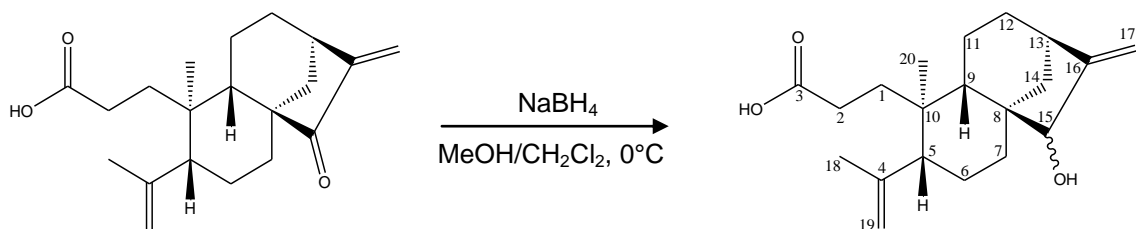
Esquema 17: Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-kaur-4(19)-*en*-3-oico (**II.12**)

El compuesto **II.12** se obtuvo a través de la hidrogenación catalítica del doble enlace en la posición 16-17 (Esquema 17). El producto se obtuvo como un sólido blanco con punto de fusión 169-171 °C y con un rendimiento de 84.3 %. En el espectro de RMN ^{13}C (Anexo 55) se observa claramente el desplazamiento a campo bajo de la señal de la cetona en C-15, la cual se desplaza desde 210.3 ppm en el ácido a 220.6 ppm en el compuesto **II.12**, indicando la pérdida de la conjugación con el doble enlace en 16-17. Por otro lado, se evidencia la presencia de una sola olefina en el producto por las

señales en 146.7 y 113.9 ppm correspondientes a los carbonos C-4 y C-19, respectivamente. El grupo metilo obtenido por la reducción del doble enlace exocíclico se observa en el espectro de RMN ^1H (Anexo 54), como una señal doblete que integra para tres protones a un desplazamiento de 1.09 ppm. El espectro de masas de este compuesto (Anexo 53) mostró un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 341.18 m/z (318.45 g/mol), que confirma una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$.

II.6.1.5 Reacciones sobre la cetona en C-15

II.6.1.5a Síntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-hidroxi-kaur-4(19),16(17)-dien-3-oico (II.13).

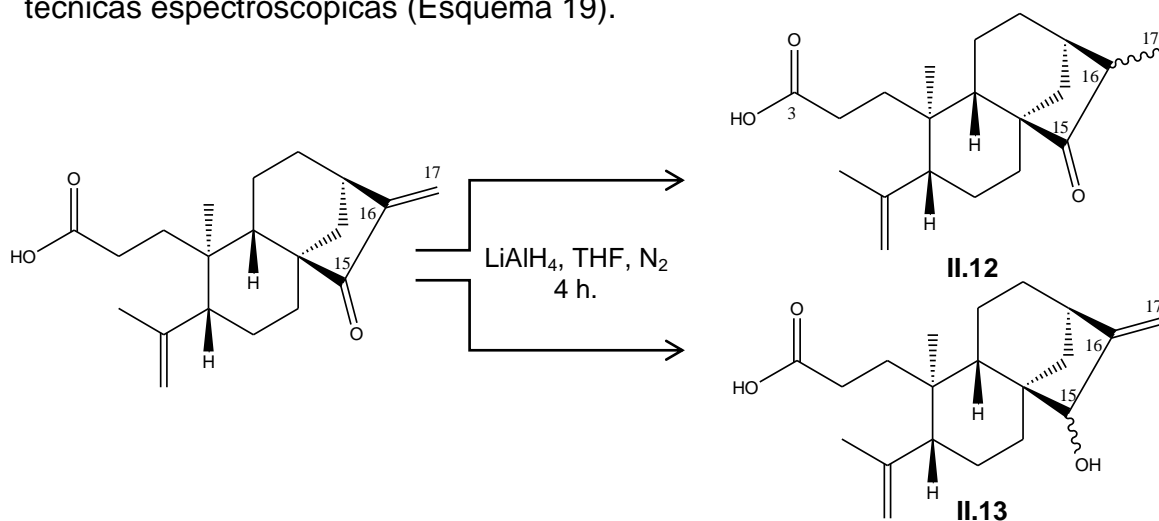


Esquema 18: Hemisíntesis del ácido 15-hidroxi-3,4-*seco-ent*-kaur-4,16-dien-3-oico (II.13).

El compuesto II.13 se obtuvo, a través de una reacción de reducción con NaBH_4 , como un sólido blanco con punto de fusión $143\text{-}145^\circ\text{C}$ y un rendimiento de 70.9% (Esquema 18). En el espectro de RMN ^{13}C (Anexo 60) se observa la desaparición de la señal del carbonilo en C-15 presente en el ácido. En su lugar se aprecia una nueva señal a 82.7 ppm correspondiente a un carbono metínico que se correlaciona en el espectro de RMN ^1H (Anexo 59) con una señal singlete a 3.78 ppm. Estas señales nos indicaron la presencia de un grupo

hidroxi en la posición 15. Adicionalmente, en el espectro de ^{13}C se observa un cambio en los desplazamientos de los carbonos C-16 y C17 (157.9 y 105.1 ppm) producto de la pérdida de la conjugación con el grupo carbonilo. El espectro de IR (Anexo 57) muestra bandas en 3423, 1701 y 1642 cm^{-1} . El espectro de masas (Anexo 58) mostró un $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 341.20 m/z (318.45 g/mol), que permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, confirmando la estructura del compuesto II.13.

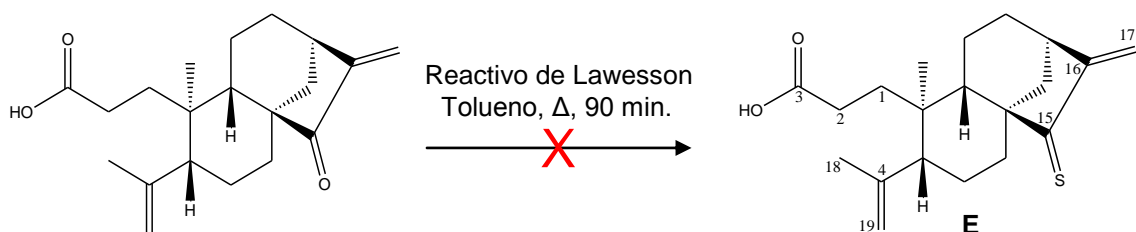
Los compuestos II.12 y II.13 también se obtuvieron al hacer reaccionar el ácido de caracasina con LiAlH_4 en THF seco bajo atmósfera de N_2 durante 4 horas. Bajo estas condiciones se obtuvo una mezcla de los dos productos los cuales fueron separados mediante cromatografía en columna y elucidados mediante técnicas espectroscópicas (Esquema 19).



Esquema 19: Hemisíntesis de los compuestos II.12 y II.13 por reducción del ácido de caracasina con LiAlH_4 .

Esta reacción se realizó con la finalidad de reducir el ácido carboxílico en C-3 además del grupo carbonilo en C-15, sin embargo, bajo las condiciones usadas se obtuvo una mezcla de los compuestos II.12 y II.13.

II.6.1.5b Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-kaur-15-tiona-4(19),16(17)-dien-3-oico (E).



Esquema 20: Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-kaur-15-tiona-4(19),16(17)-dien-3-oico (B).

Se intentó sintetizar el compuesto **E** a través de un reemplazo isostérico del oxígeno de la cetona por un azufre con el uso del reactivo de Lawesson (Esquema 20). Es conocido que los compuestos organosulfurados son valiosos no sólo por su rica y variada química, sino por que presentan muchas propiedades biológicas importantes.¹³⁰ La tionación es la conversión de un grupo carbonilo a tiocarbonilo y es un procedimiento comúnmente empleado para la preparación de compuestos organosulfurados.¹³¹ El reactivo de Lawesson (Figura 54) es el reactivo de selección para llevar a cabo muchas reacciones de tionación,¹³² debido principalmente a su disponibilidad comercial, simplicidad y conveniencia de uso; adicionalmente, las reacciones se realizan bajo condiciones suaves. Sin embargo, una de sus desventajas es la formación de subproductos o productos heterociclos intermedios estables.¹³³

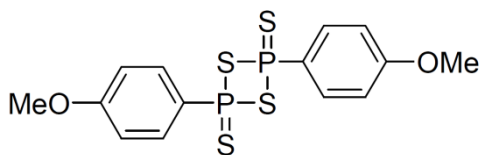


Figura 54: Reactivo de Lawesson

Para la síntesis del compuesto E, se siguió el procedimiento descrito por Sarek y colaboradores.¹³⁴ Se disolvió el ácido de caracasina en tolueno y posteriormente se le añadió el reactivo de Lawesson (1 equiv.). Se colocó en reflujo por 90 minutos y debido a que se observó mediante CCF la formación de diversos productos a pesar de que el compuesto de partida no se había consumido completamente, se terminó la reacción en este tiempo. Se purificó el residuo, sin embargo, debido a las pequeñas cantidades obtenidas de cada compuesto después de purificar no pudieron ser caracterizados. Se llevó a cabo la reacción nuevamente variando las condiciones, sin embargo, no se logró sintetizar el producto deseado.

La síntesis de tioacetonas α , β -insaturadas con el reactivo de Lawesson ha sido reportada en la literatura,^{133,134} sin embargo, se ha encontrado que en estas reacciones se producen diversos compuestos azufrados y generan bajos rendimientos. Una de las razones de esto, es que una vez que se forma la tioacetona α , β -insaturada, esta dimeriza con otra molécula similar para formar los correspondientes dímeros sulfuros, debido a que estos productos son muy inestables en muchos casos se descomponen regenerando el material de partida.¹³³

II.6.1.6 Reacciones sobre el sistema α, β -insaturado

Las reacciones que se llevaron a cabo sobre el sistema α, β -insaturado consistieron en reacciones de adición tipo Michael empleando diferentes nucleófilos. De manera general estas reacciones de adición 1,4 siguen el mecanismo descrito en la Figura 55.

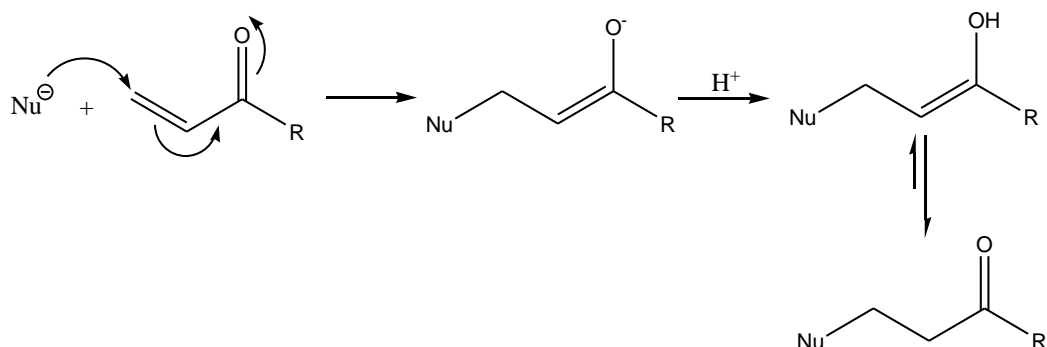
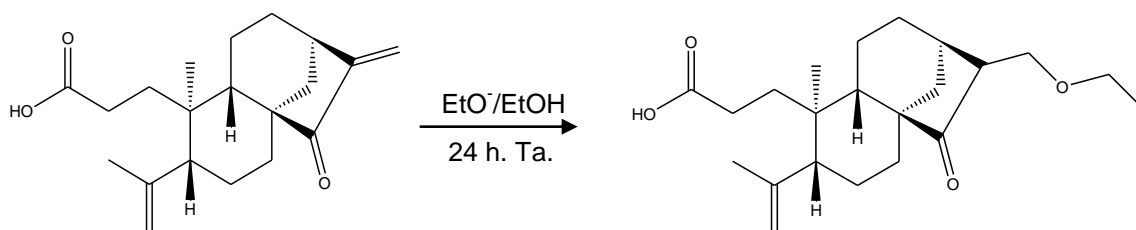


Figura 55: Mecanismo de adición nucleofílica 1,4.

II.6.1.6a Hemisíntesis ácido *ent*-3,4-*seco*-17-etoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14)

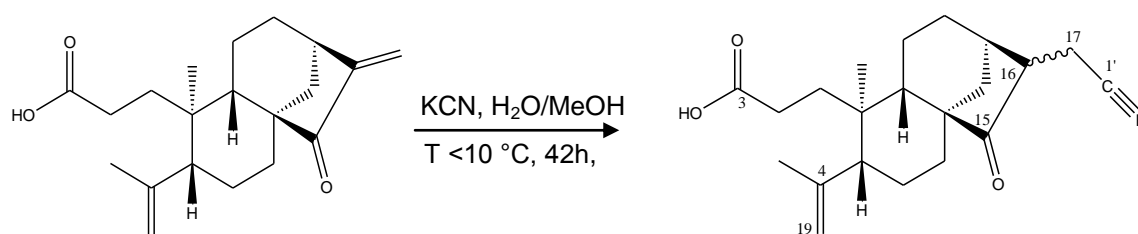


Esquema 21: Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-etoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14)

El compuesto II.14 se sintetizó a partir del tratamiento del ácido de caracasina con NaOEt en etanol (Esquema 21). Se obtuvo como un caramelo amarillo con un rendimiento de 18.6%. En el espectro de RMN ^{13}C (Anexos 64-65) del compuesto sintetizado se observa la señal del grupo carbonilo en C-15

desplazada a campo bajo, en 221.8 ppm, indicando la pérdida de la conjugación con el doble enlace en la posición 16-17. Por otro lado, se observan tres nuevas señales, dos de ellas a 66.7 y 15.6 ppm que corresponden al grupo etoxi del nucleófilo adicionado y la otra señal resuena a un desplazamiento de 69.9 ppm y corresponde al carbono metilénico C-17. En el espectro de RMN ^1H (anexo 63) las señales del grupo etoxi aparecen como un multiplete a 3.45 ppm y un triplete a 1.14 (d, $J= 10.3$ Hz). El espectro de masas (anexo 62) confirmó la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$ planteada para este compuesto, al mostrar un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 385.18 m/z (362.5 g/mol). El bajo rendimiento con que se obtuvo el compuesto II.14 puede explicarse en función de las condiciones suaves de reacción que se usaron durante la síntesis para evitar la posible esterificación del ácido carboxílico con el nucleófilo presente en el medio. Adicionalmente, después de purificar el producto se pudo recuperar parte del reactivo de partida, indicando que no reaccionó completamente.

II.6.1.6b Hemisíntesis ácido *ent*-3,4-*seco*-17-ciano-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.15)

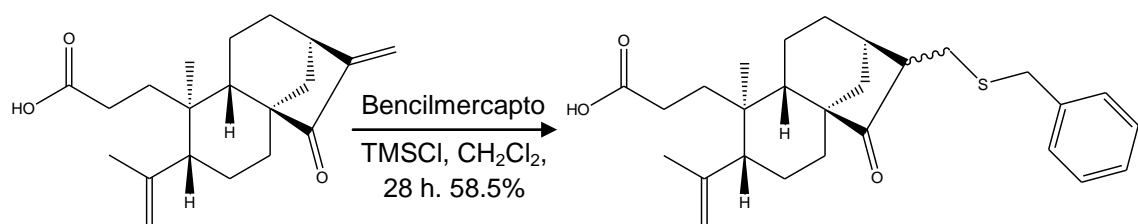


Esquema 22: Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-ciano-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.15)

La síntesis del compuesto II.15 se llevó a cabo a través de la adición 1,4 de KCN al sistema α,β -insaturado del ácido de caracasina (Esquema 22).

Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco con un punto de fusión 170-174 °C y 48.5% de rendimiento. En el espectro de RMN ^{13}C (Anexos 68-69) la señal del grupo carbonilo se observa a 219.3 ppm y se distingue una señal a 118.4 ppm que se atribuyó al carbono del grupo ciano adicionado. En el espectro de RMN ^1H (Anexo 67) se observa una señal doblete de doblete a 2.90 ppm ($J_1 = 17.36$ Hz; $J_2 = 3.6$ Hz) y un singlete ancho a 2.58 ppm que corresponden a los protones de las posiciones 16 y 17, respectivamente. Estas señales son claves para identificar la estructura del compuesto sintetizado. Su espectro de masas (Anexo 66) mostró un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 366.14 m/z (343.46 g/mol), que permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ indicando un total de ocho insaturaciones en la estructura. Con estos datos se confirma la estructura del compuesto **II.15** como el ácido *ent*-3,4-*seco*-17-ciano-15-oxo-kaur-4(19)-*en*-3-oico.

II.6.1.6c Síntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-bencilmercapto-15-oxo-kaur-4(19)-*en*-3-oico (II.16).

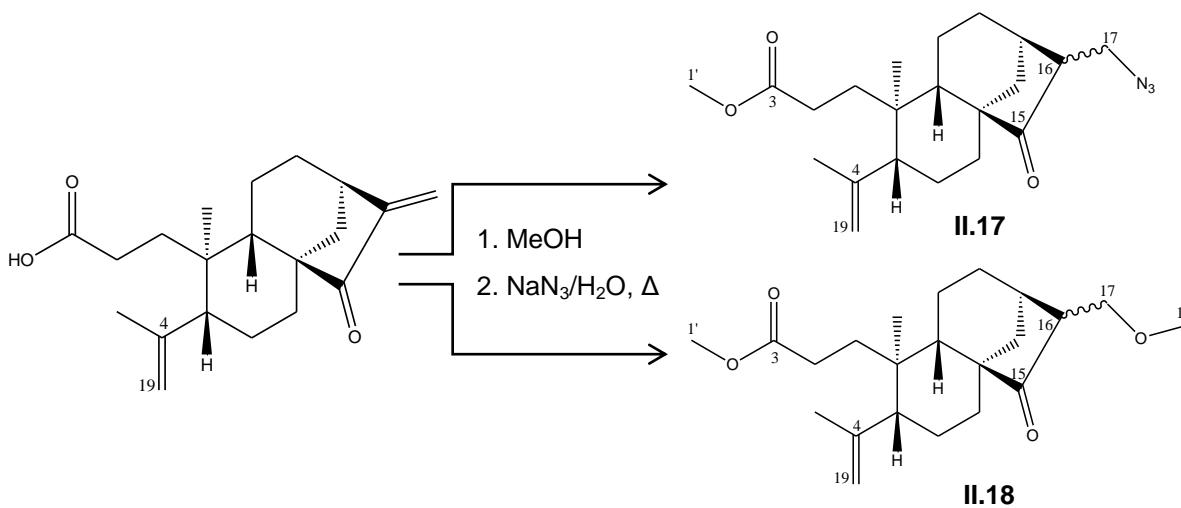


Esquema 23: Hemisíntesis del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-bencilmercapto-15-oxo-kaur-4(19)-*en*-3-oico (**II.16**).

Para la síntesis del compuesto II.16 se empleó el $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ con el fin de favorecer la reacción entre al ácido de caracasina y bencilmercapto a través de la activación del grupo carbonilo (Esquema 23).

El espectro de RMN ^{13}C (Anexo 72) muestra claramente cuatro señales en la zona aromática correspondientes al anillo bencénico del mercapto adicionado (δ_{C} 138.1, 128.7, 128.4 y 126.9 ppm). Estas señales se correlacionan con una señal multiplete a 7.28 ppm que integra para cinco protones en el espectro de RMN ^1H (Anexo 71). Adicionalmente, la señal del carbonilo en C-15 aparece desplazada hacia campo bajo (220.8 ppm), confirmando que ocurrió la adición 1,4 que derivó en la pérdida de la conjugación. Las señales de los carbonos 16 y 17 se observan a 53.3 y 37.1 ppm, respectivamente, y la señal del carbono metilénico C-1' puede distinguirse a un desplazamiento de 37.5 ppm; esta señal aparece en el espectro de protones como un singlete que integra para dos protones a 3.72 ppm. El compuesto se obtuvo como un caramelo rosado con un rendimiento de 58.5% y su espectro de masas (Anexo 70) mostró un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 463.19 m/z (440.64 g/mol) indicando 10 insaturaciones en la estructura.

II.6.1.6d Síntesis del éster metílico del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-azida-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.17) y del éster metílico del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-metoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18)



Esquema 24: Hemisíntesis del éster metílico del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-azida-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.17) y del éster metílico del ácido *ent*-3,4-*seco*-17-metoxi-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18).

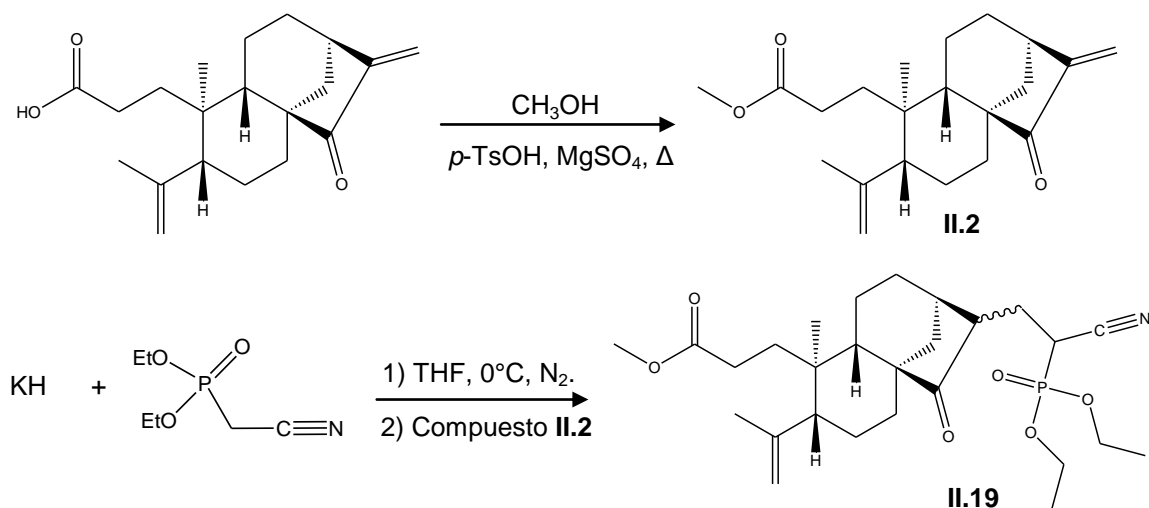
Los compuestos **II.17** y **II.18** se obtuvieron a partir de la reacción del ácido de caracasina con NaN₃ en metanol bajo condiciones de reflujo (Esquema 24). La idea inicial era llevar a cabo la reacción a temperatura ambiente para evitar la formación del éster metílico favorecida en condiciones de calentamiento. Sin embargo, bajo condiciones suaves no se observó la formación de ningún producto, por ello, fue necesario someter la reacción a reflujo, aunque esto implicara la formación del éster, que fue lo que efectivamente ocurrió. Adicionalmente, no sólo se formó el compuesto **II.17**, que era el esperado bajo esta condiciones, sino que también se sintetizó el compuesto **II.18**, producto de la adición 1,4 del grupo MeO⁻ formado por las condiciones básicas de reacción.

En el espectro de RMN ^1H (Anexo 73) del compuesto **II.17** puede observarse claramente que este compuesto está mezclado con un producto similar que se encuentra en menor proporción. Se observan las señales singletes a 4.87 y 4.65 ppm correspondientes a los protones olefínicos en la posición 19, sin embargo, estas señales integran cada una para tres protones. Por otro lado, se observan también dos señales singletes a 5.93 y 5.24 ppm que integra cada una para un protón, asignadas a los protones de la olefina en la posición 16-17. Estas dos últimas señales, no deberían aparecer en el espectro de ^1H si se hubiese llevado a cabo una adición 1,4 en el sistema α,β -insaturado. Pero considerando la intensidad más baja de estas señales y las señales con intensidad duplicada de los protones en la posición 19, nos hizo pensar en una mezcla entre el compuesto **II.17** y otro compuesto similar en el cual no había ocurrido la adición nucleofílica. Este segundo compuesto minoritario fue identificado fácilmente como el éster metílico del ácido de caracasina (**II.2**), debido a la aparición de una señal singlete a 3.61 ppm que integraba para 9 protones y que coincidía con la señal de los protones del grupo metilo del compuesto **II.2**. Estos datos nos indicaron que estábamos en presencia de una mezcla entre los compuestos **II.17** y **II.2**, encontrándose el compuesto **II.17** en una proporción doble con respecto al compuesto **II.2**. El espectro de RMN ^{13}C (Anexo 74) nos permitió corroborar la información obtenida a partir del espectro de protones. Efectivamente, se trata de una mezcla de dos compuestos, debido a la aparición de un conjunto de señales que tienen el doble de intensidad comparadas con otras señales que aparecen a desplazamientos similares pero que se observa claramente que tienen la mitad de la intensidad.

Se observa la señal de la cetona aislada 219.5 ppm (C-15) y la señal a 173.7 ppm correspondiente al éster metílico, la cual se observa duplicada. Se intentó purificar el compuesto, sin embargo, fue muy bajo el rendimiento del producto deseado. Por este motivo, no se realizó el espectro de masas ni se evaluó en las pruebas biológicas. A pesar de esto, se puede establecer la estructura del compuesto **II.17** como éster metílico del ácido *ent*-3,4-seco-17-azida-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-ino.

Por otro lado, el espectro de RMN ^1H (Anexo 76) del compuesto **II.18** claramente nos indicó la presencia de dos grupos metoxi en la estructura mediante la aparición de dos señales singletes que integra cada una para tres protones a desplazamientos de 3.34 y 3.61 ppm. Se observan solamente dos señales singletes a 4.86 y 4.64 ppm que nos indicaron la presencia de una sola olefina en la estructura. En el espectro de RMN de carbono (Anexo 77), al igual que en los compuestos anteriores, la señal del grupo carbonilo en C-15 aparece a 221.3 ppm, confirmando que ocurrió la adición nucleofílica 1,4. Adicionalmente, las señales de los dos grupos metoxi aparecen en 59.0 y 51.5 ppm confirmando la estructura propuesta para el compuesto **II.18**. Sumado a los datos ya explicados, el espectro de masas de este compuesto (Anexo 75) mostró un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 463.19 m/z (385.21 g/mol) que permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$ para el compuesto **II.18**.

II.6.1.6e Síntesis del éster metílico del ácido *ent*-3,4-*seco*-15-oxo-17-(1''-dietilfosfonato-1''-ciano)metil-kaur-4(19)-en-3-oico (II.19)



Esquema 25: Hemisíntesis del compuesto **II.19**.

El compuesto **II.19** se sintetizó a partir de la reacción entre el éster metílico del ácido de caracasina (**II.2**) y el fosfonato obtenido de la reacción entre el dietil cianometilfosfonato e hidruro de potasio (Esquema 25). Inicialmente, se quería sintetizar el compuesto **F** (Figura 55), producto de la reacción Wittig-Horner entre el fosfonato y la cetona en C-15, sin embargo, en lugar de llevarse a cabo la reacción de adición 1,2, se llevó a cabo una adición nucleofílica 1,4 sobre el sistema α, β -insaturado con el fosfonato formado, dando lugar a la formación del compuesto **II.19**.

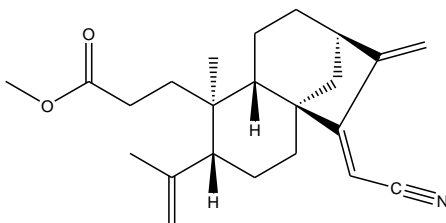


Figura 55: Estructura del compuesto **F**

El espectro de RMN ^1H (Anexo 79) de este compuesto mostraba un conjunto de señales complejas no esperadas. Se observaba una señal en 4.20 ppm que aparecía como un cuartete ($J= 7.0$ Hz), una señal multiplete a 3.76 ppm y una señal triplete a 1.38 ppm ($J= 7.1\text{Hz}$) que integraba para seis protones. Adicionalmente, se observaban solo dos señales singletes a desplazamientos de 4.88 y 4.65 que correspondían a los protones de la olefina en la posición 4-19. El espectro de RMN ^{13}C (Anexos 80 y 81), resultó bastante complejo, observándose un desdoblamiento de algunas de las señales. Por otro lado la señal de la cetona en C-15 aparecía desdoblada a desplazamientos de 222.0 y 220.4 ppm. Todo esto nos indicó, que el producto obtenido era otro compuesto que había sufrido una adición nucleofílica 1,4. Pensando en las posibles reacciones que podían haber ocurrido, propusimos la estructura del compuesto **II.19**, que se habría formado por la adición tipo Michael del fosfonato al sistema α,β -insaturado. Los datos espectroscópicos coincidían muy bien para este compuesto. El desdoblamiento de las señales en el espectro de carbono se explicaban por la presencia de un átomo de fósforo en la estructura, la cual fue confirmada a través de un espectro de masas que mostró un ión molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a 530.24 m/z (507.60 g/mol).

Analizando la estructura 3D del éster metílico, es posible que la reacción Wittig-Horner propuesta no se haya llevado a cabo debido a efectos estéricos alrededor del carbono carbonílico en C-15, el cual forma parte de un sistema bicíclico 3,2,1.

Este sistema impide o dificulta que se lleve a cabo la adición 1,2 con nucleófilos voluminosos, adicionalmente, la alta reactividad de un sistema α , β -insaturado para sufrir adiciones 1,4 y la falta de regioselectividad del fosfonato frente a este sistema, pudieron ejercer un efecto importante en la no obtención del producto deseado.

Se realizaron otras dos reacciones usando iluros de fósforo distintos y se obtuvo de igual forma los productos de adición nucleofílica 1,4.

II.6.2 Sección Biológica

Se evaluó la actividad citotóxica, antibacteriana, leishmanicida y tripanocida del ácido de caracasina (117) y de dieciocho análogos (II.2-II.19). Las estructuras de los compuestos evaluados se muestran en la Figura 56.

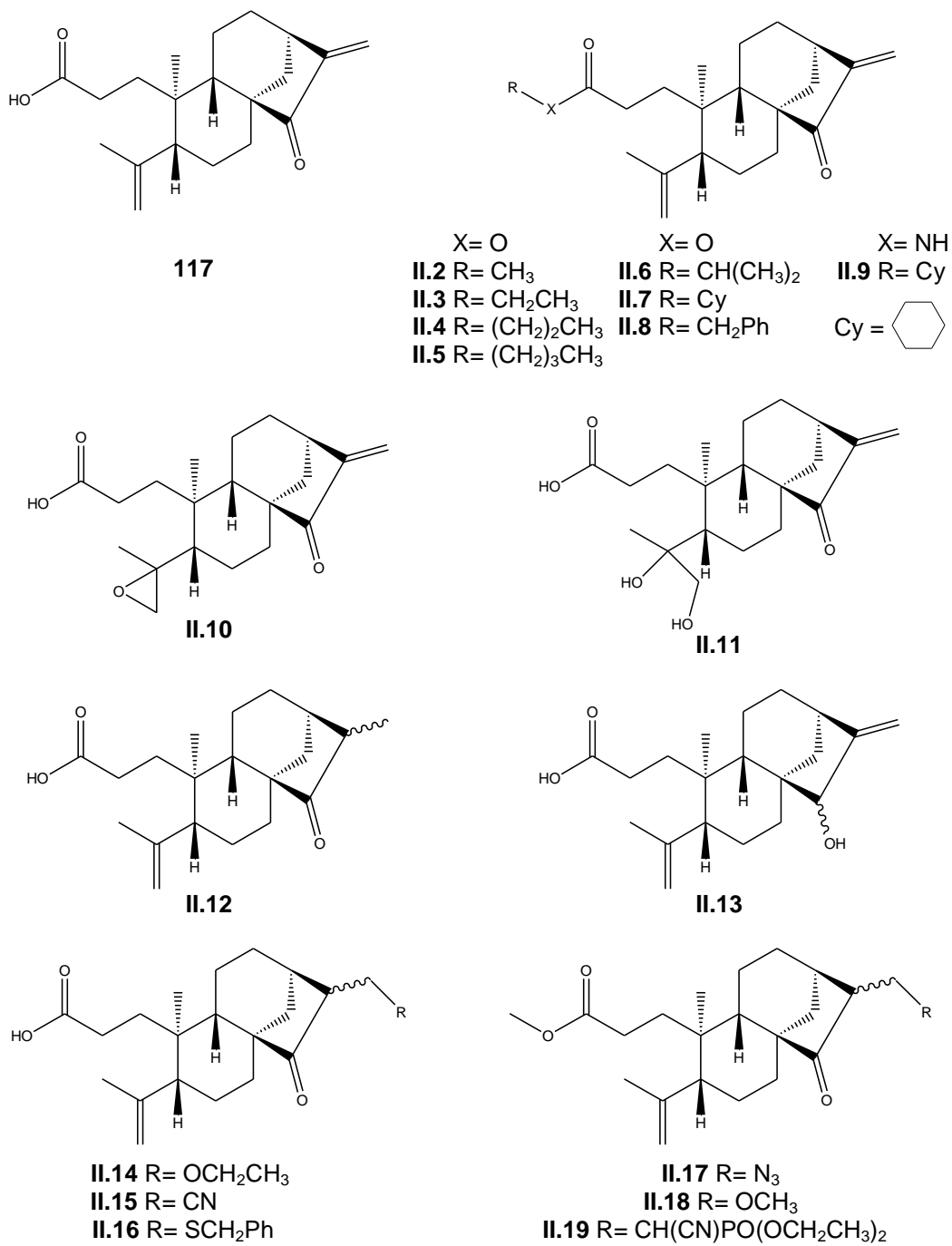


Figura 56: Estructuras del ácido de caracasina (117) y derivados sintetizados (II.2-II.19)

II.6.2.1 Evaluación de la actividad citotóxica

El ácido de caracasina y los análogos sintetizados fueron evaluados contra las líneas celulares de cáncer humano MCF-7 (carcinoma mamario) y PC3 (carcinoma de próstata), así como en fibroblastos dérmicos humanos, a través del método del MTT. Los valores de CI_{50} (μM) se muestran en la Tablas XX y XXI.

Tabla XX: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre la línea celular MCF-7 y sobre cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.

Compuesto	$CI_{50} \pm DE$ (μM)* MCF-7	$CI_{50} \pm DE$ (μM)* Fibroblastos	Selectividad
117	15.83 \pm 2.21	< 19.75	< 1.25
II.2	11.21 \pm 3.25	10.38 \pm 2.45	0.93
II.3	3.77 \pm 1.56	4.88 \pm 0.55	1.29
II.4	6.65 \pm 2.63	6.16 \pm 0.59	0.93
II.5	5.59 \pm 0.30	7.01 \pm 0.56	1.25
II.6	5.44 \pm 0.77	7.50 \pm 1.06	1.38
II.7	2.07 \pm 0.29	< 3.91	< 1.88
II.8	3.66 \pm 0.21	2.8 \pm 0.64	0.77
II.9	NE	NE	NE
II.10	22.63 \pm 6.85	25.87 \pm 3.01	1.14
II.11	46.30 \pm 4.11	21.19 \pm 1.17	0.46
II.12	109.58 \pm 2.27	---	---
II.13	86.83 \pm 12.24	206.94 \pm 27.32	2.38
II.14	NE	NE	NE
II.15	141.12 \pm 17.65	---	---
II.16	31.48 \pm 2.54	42.73 \pm 5.58	1.36
II.17	NE	NE	NE
II.18	NE	NE	NE
II.19	NE	NE	NE

NE: No evaluado.

DE: Desviación estándar

---: Sin efecto citotóxico a la concentración más alta ensayada.

* : Valores corregidos con los valores del control negativo empleado (DMSO).

Tabla XXI: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre la línea celular PC3 y sobre cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.

Compuesto	$CI_{50} \pm DE$ (μM)* PC3	$CI_{50} \pm DE$ (μM)* Fibroblastos	Selectividad
117	7.9 \pm 1.11	< 19.75	< 2.5
II.2	3.67 \pm 0.39	10.38 \pm 2.45	2.83
II.3	4.47 \pm 1.35	4.88 \pm 0.55	1.09
II.4	4.04 \pm 0.19	6.16 \pm 0.59	1.52
II.5	4.73 \pm 0.86	7.01 \pm 0.56	1.48
II.6	5.42 \pm 0.38	7.50 \pm 1.06	1.38
II.7	1.91 \pm 0.24	< 3.91	< 2.05
II.8	4.06 \pm 1.2	2.8 \pm 0.64	0.69
II.9	NE	NE	NE
II.10	6.74 \pm 1.29	25.87 \pm 3.01	3.84
II.11	29.2 \pm 4.09	21.19 \pm 1.17	0.73
II.12	---	---	---
II.13	136.64 \pm 30.25	206.94 \pm 27.32	1.51
II.14	NE	NE	NE
II.15	---	---	---
II.16	18.06 \pm 0.86	42.73 \pm 5.58	2.37
II.17	NE	NE	NE
II.18	NE	NE	NE
II.19	NE	NE	NE

NE: No evaluado.

DE: Desviación estándar

---: Sin efecto citotóxico a la concentración más alta ensayada.

* : Valores corregidos con los valores del control negativo empleado (DMSO).

La selectividad (S) de cada compuesto fue calculada a través de la siguiente ecuación:

$$S = \frac{CI_{50} \text{ de la línea control}}{CI_{50} \text{ de la línea tumoral}}$$

Las modificaciones realizadas sobre el ácido de caracasina estuvieron basadas en: (i) reacciones de esterificación sobre el ácido carboxílico y aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada del éster (II.2-II.8), (ii) reemplazo

isostérico del oxígeno de uno de los ésteres por un nitrógeno para obtener la amida correspondiente (II.9), (iii) reacciones de epoxidación y formación de dioles sobre el doble enlace en C4-C19 (II.10 y II.11), (iv) reducción del doble enlace en C16-C17 (II.12), (v) reducción del grupo carbonilo en C15 (II.13) y (vi) reacciones de adición nucleofílica 1,4 sobre el sistema α,β -insaturado con diferentes nucleófilos (II.14-II.19).

Al analizar los valores de CI_{50} (μM) mostrados en las Tablas XX y XXI, se puede observar que los siete ésteres sintetizados (II.2-II.8) resultaron ser agentes citotóxicos más potentes que el ácido de caracasina (117) sobre ambas líneas celulares. El ácido presentó valores de CI_{50} de (15.83 ± 2.21) y (7.9 ± 1.11) μM contra la líneas MCF-7 y PC3, respectivamente. El compuesto II.7 resultó el más potente de los ésteres, con valores de CI_{50} de (2.07 ± 0.29) μM para la línea MCF-7 y (1.91 ± 0.24) μM para la línea PC3, siendo estos valores 7.6 y 8.3 veces menores que los valores obtenidos para el ácido. Adicionalmente, este compuesto presentó una selectividad superior en comparación con el resto de los ésteres y superior a la del ácido en MCF-7. El compuesto II.2 correspondiente al metil éster fue más potente contra la línea PC3 que contra MCF-7 con un CI_{50} (3.67 ± 0.39) μM y una selectividad de 2.83, superior a la calculada para el ácido. El compuesto II.8, con un anillo aromático en su estructura, presentó valores de CI_{50} similares al resto de los ésteres de cadena alifática pero menor selectividad. No parece existir una relación entre el tamaño de la cadena hidrocarbonada del éster con la actividad biológica, aunque puede apreciarse una disminución de la potencia para los compuestos II.4, II.5 y II.6

con 3 y 4 átomos de carbonos. Debido a los resultados obtenidos con el compuesto II.7, se sintetizó el compuesto II.9, con la finalidad de analizar el efecto del reemplazo isostérico del átomo de oxígeno del éster por un nitrógeno; sin embargo, en estos momentos este compuesto está siendo evaluado y no se puede discutir nada al respecto. Los compuestos II.10 y II.11, productos de modificaciones del doble enlace en la posición 4-19, resultaron mucho menos potentes contra MCF-7 que el compuesto de partida. Sobre la línea PC3, el compuesto II.10 presentó un CI_{50} de $(6.74 \pm 1.29) \mu M$, siendo este valor parecido al obtenido con 117, aunque presentó mayor selectividad. El compuesto II.12 que se obtuvo por la reducción del doble enlace en C16-C17, no presentó efecto citotóxico a la más alta concentración probada. El compuesto II.13 con un grupo hidroxilo en C15 y los compuestos II.15 y II.16 los cuales se obtuvieron por adición nucleofílica 1,4 en la posición 17, sufrieron una disminución notable de la potencia sobre ambas líneas celulares. Estos últimos cuatro compuestos tienen en común la ausencia del sistema α, β -insaturado presente en el ácido de caracasina.

A partir de estos resultados, se puede realizar un análisis preliminar de la relación entre la estructura química de los diferentes compuestos con la actividad biológica. Las observaciones encontradas pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) La esterificación del ácido carboxílico en la posición 3 dio lugar a compuestos citotóxicos más potentes que el ácido de caracasina contra las

líneas celulares MCF-7 y PC3. El ciclohexil éster del ácido de caracasina (II.7) resultó ser el compuesto más potente de todos los derivados obtenidos.

2) Las modificaciones en el doble enlace de la posición 4-19 generaron compuestos con menor potencia. Posiblemente, el doble enlace en esta posición sea importante para la actividad biológica, aunque habría que hacer estudios con otros sustituyentes.

3) La pérdida del sistema α,β -insaturado disminuyó notablemente la potencia de los compuestos. Esto coincide con lo reportado en la literatura sobre la importancia de la unidad α -exometileno ciclopentanona para la actividad biológica.¹⁰⁶

II.6.2.2 Evaluación de la actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana de los derivados obtenidos a través del método de difusión sobre placas de agar contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25963) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579), y los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 10145). Los resultados se muestran en la Tabla XXII y se expresan como diámetros del halo de inhibición (mm). Se emplearon como controles positivos amikacina, ampicilina/sulbactam, ofloxacina y tilmicosin; como control negativo se empleó la mezcla de solventes usada para disolver las muestras.

Tabla XXII: Valores de diámetros del halo de inhibición (mm) de los derivados del ácido de caracasina sobre diversos microorganismos utilizando el método de difusión sobre placas de agar.

Compuesto	Microorganismos			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
117	22	24	22	30
II.2	22	12	15	15
II.3	---	---	---	---
II.4	20	12	---	---
II.5	---	---	---	---
II.6	---	15	---	15
II.7	12	30	28	30
II.8	24	15	22	15
II.9	15	15	16	12
II.10	20	25	18	18
II.11	20	---	15	---
II.12	20	---	---	18
II.13	15	12	12	20
II.14	10	12	14	15
II.15	---	---	---	20
II.16	20	22	25	15
II.17	NE	NE	NE	NE
II.18	12	13	15	15
II.19	---	---	---	---
Controles				
AN	32	16	22	16
SAM	---	18	---	12
OFX	28	25	24	15
TIL	32	23	18	18
S	---	---	---	---

Diámetro de inhibición expresado en mm a C = 2-5 mg/mL

--- = No inhibición; NE= No evaluado.

AN: amikacina (30µg); SAM: ampicilina/sulbactam (20µg), OFX: ofloxacina (5µg), tilmicosin (15 µg), S= CHCl₃/EtOH/Acetona (90:5:5).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla XXII, se puede observar que todos los compuestos a excepción de II.3, II.5 y II.19, presentaron actividad biológica específica contra los microorganismos empleados, evidenciándose para la mayoría de los compuestos una actividad biológica de amplio espectro, es decir, actividad biológica contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

En el caso de los compuestos II.2-II.6 puede observarse una relación entre el número de carbonos de la cadena hidrocarbonada del éster y la actividad antimicrobiana. Los compuestos II.2, II.4 y II.6 con números de carbonos impar resultaron activos, sin embargo, los compuestos II.3 y II.5 con dos y cuatro átomos de carbono, respectivamente, fueron inactivos. Por otro lado, el ciclohexil éster del ácido de caracasina (II.7) resultó el compuesto más potente de todos contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* con halos de inhibición de 30, 28 y 30 mm, respectivamente. Estos valores son superiores a los medidos para el ácido de caracasina y para los controles positivos. El compuesto II.8 también resultó activo sobre todos los microorganismos, resultando más potente que el ácido (117) contra *B. cereus*. Contra los microorganismos *E. coli* y *P. aeruginosa*, el compuesto II.8 presentó valores del diámetro del halo de inhibición similares a los medidos para los controles. Al comparar los resultados obtenidos para los compuestos II.7 y II.9, se encuentra que el ciclohexil éster (II.7) resultó ser mucho más potente que la ciclohexilamida (II.9) aunque esta última fue un poco superior contra *B. cereus*.

Las modificaciones sobre el doble enlace en la posición 4-19 no mejoró la potencia de los compuestos. Se observa que el compuesto II.10 resultó activo contra todos los microorganismos, con valores del halo de inhibición similares o menores al ácido de caracasina, mientras que el compuesto II.11 sólo resultó activo contra *B. cereus* y *E. coli*. La reducción del doble enlace en la posición 16-17 disminuyó la potencia del compuesto II.12 y este resultó inactivo contra *S. aureus* y *E. coli*, lo que sugiere que el doble enlace en esta posición es

importante. La pérdida de la conjugación por el sistema α , β -insaturado de los compuestos II.14-II.19 generó una disminución de la potencia. Sólo el compuesto II.16 presentó un halo de inhibición de 25 mm contra *E. coli*, siendo este valor superior al del ácido de caracasina y al de los controles. Adicionalmente, la presencia de un grupo $-\text{CN}$ en los compuestos II.15 y II.19 generó compuestos inactivos, solo II.15 presentó actividad sobre *P. aeruginosa*.

Estos resultados nos llevan a plantear las siguientes conclusiones preliminares:

- 1) Los ésteres del ácido de caracasina con números de átomos de carbonos pares en la cadena hidrocarbonada (II.3 y II.5) no presentaron actividad antibacteriana contra los microorganismos evaluados, mientras que los compuestos con números de átomos de carbonos impares (II.2, II.4 y II.6) resultaron activos contra algunos de los microorganismos, pero presentaron menor potencia al compararlos con el ácido de caracasina.
- 2) La conversión del ácido de caracasina a ciclohexil éster (II.7) mejoró notablemente la potencia contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.
- 3) El reemplazo isostérico del átomo de oxígeno en II.7 por nitrógeno (II.9) disminuyó la potencia al compararse con el ácido de caracasina y con II.7.
- 4) Las modificaciones sobre el doble enlace en la posición C4-C19 disminuyeron la potencia.
- 5) La pérdida del sistema α,β -insaturado generó una disminución de la potencia de los compuestos.

II.6.2.3 Evaluación de la actividad leishmanicida

El ácido de caracasina y sus análogos se evaluaron contra promastigotes de *Leishmania mexicana* a través del método del MTT. Los valores de CI_{50} obtenidos se muestran en la Tabla XXIII.

Tabla XXIII: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* y en cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.

Compuesto	$CI_{50} \pm DE$ (μM) <i>L. mexicana</i>	$CI_{50} \pm DE$ (μM) Fibroblastos	Selectividad
117	31.89 \pm 1.42	< 19.75	0.6 <
II.2	3.4 \pm 0.4	10.38 \pm 2.45	3.1
II.3	1.6 \pm 0.4	4.88 \pm 0.55	3.1
II.4	1.5 \pm 0.2	6.16 \pm 0.59	4.1
II.5	1.2 \pm 0.2	7.01 \pm 0.56	5.8
II.6	1.5 \pm 0.4	7.50 \pm 1.06	5.0
II.7	1.2 \pm 0.1	< 3.91	3.3<
II.8	0.6 \pm 0.3	2.8 \pm 0.64	4.7
II.9	NE	NE	NE
II.10	< 28.7	25.87 \pm 3.01	0.9 <
II.11	< 28.5	21.19 \pm 1.17	0.7 <
II.12	> 47.1	---	---
II.13	> 31.4	206.94 \pm 27.32	< 6.6
II.14	NE	NE	NE
II.15	> 43.7	---	---
II.16	22.1 \pm 2.4	42.73 \pm 5.58	1.9
II.17	NE	NE	NE
II.18	NE	NE	NE
II.19	NE	NE	NE

NE: No evaluado.

---: Sin efecto citotóxico a la concentración más alta ensayada.

En los resultados de la evaluación leishmanicida de los derivados del ácido de caracasina mostrados en la Tabla XXIV, se puede observar que los ésteres fueron los compuestos que resultaron más interesantes, siendo todos más potentes que el ácido de caracasina (117). Puede observarse una relación directa entre el valor de CI_{50} y el tamaño de la cadena hidrocarbonada del éster. Al pasar del compuesto II.2 al II.5, correspondientes al metil, etil, propil y butil éster del ácido de caracasina, el valor de CI_{50} disminuye, aumentando la potencia de cada compuesto. Al mismo tiempo que esto ocurre, también aumenta la selectividad. Para el compuesto II.6 se observa un valor de CI_{50} comparable al obtenido para II.4, pero presenta mayor selectividad. El compuesto II.7 presentó un CI_{50} de $(1.2 \pm 0.1) \mu\text{M}$ similar al obtenido para el compuesto II.5. Finalmente, el compuesto II.8 resultó el más potente de todos con un CI_{50} de $(0.6 \pm 0.3) \mu\text{M}$ y una selectividad de 4.7.

Las modificaciones sobre el doble enlace en C4-C19 (II.10 y II.11) generaron compuestos con valores de CI_{50} similares a 117. Las reacciones de reducción del doble enlace en C16-C17 y de la cetona en C15 que dieron lugar a los compuestos II.12 y II.13, respectivamente, disminuyeron la potencia en comparación con el ácido de caracasina. De los compuestos que se formaron por adición nucleofílica 1,4, sólo se han evaluado hasta el momento los derivados II.15 y II.16. El compuesto II.16 resultó más potente que el ácido con un valor de CI_{50} de $(22.1 \pm 2.4) \mu\text{M}$, mientras que II.15 presentó menor potencia. Estos resultados sugieren que la esterificación del grupo ácido carboxílico del ácido de caracasina mejora notablemente la potencia de los

compuestos frente a la forma promastigotes de *L mexicana*. Por otro lado, la potencia de los compuestos aumenta a medida que aumenta el tamaño de la cadena hidrocarbonada lineal del éster, en este caso hasta cuatro átomos de carbono. La presencia de un éster aromático en la estructura generó el compuesto más potente de todos. Las modificaciones sobre los dobles enlaces, el grupo carbonilo y el sistema α , β -insaturado generaron compuestos de menor potencia y baja selectividad, a excepción de II.16.

II.6.2.4 Evaluación de la actividad tripanocida

El ácido de caracasina y sus derivados se evaluaron contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a través del método del MTT. Los valores de CI_{50} obtenidos se muestran en la Tabla XXIV.

En la evaluación de la actividad tripanocida, se encontró que todos los ésteres (II.2-II.8) resultaron más potentes que el ácido de caracasina. El compuesto II.3, presentó un CI_{50} de (2.37 ± 0.37) μM y una selectividad de 2.3. Si se analizan con detalle los valores presentados en la Tabla XXII, se observa que a partir de tres átomos de carbono en la cadena del éster la potencia y la selectividad disminuyen a medida que aumenta el tamaño de la cadena hidrocarbonada.

El compuesto II.11 que presenta un diol en las posiciones C4 y C19, presentó un valor de CI_{50} menor que el ácido de caracasina, pero mucho mayor que el valor obtenido para los ésteres.

Tabla XXIV: Valores de CI_{50} (μM) obtenidos para los derivados del ácido de caracasina sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y en cultivos primarios de Fibroblastos dérmicos humanos.

Compuesto	$CI_{50} \pm DE$ (μM) <i>T. cruzi</i>	$CI_{50} \pm DE$ (μM) Fibroblastos	Selectividad
117	74.99 \pm 10.81	< 19.75	0.3 <
II.2	3.12 \pm 0.61	10.38 \pm 2.45	3.7
II.3	2.37 \pm 0.37	4.88 \pm 0.55	2.3
II.4	3.10 \pm 0.43	6.16 \pm 0.59	2.4
II.5	4.21 \pm 0.05	7.01 \pm 0.56	1.5
II.6	5.15 \pm 1.42	7.50 \pm 1.06	1.4
II.7	5.51 \pm 0.36	< 3.91	0.7<
II.8	4.12 \pm 0.36	2.8 \pm 0.64	0.7
II.9	NE	NE	NE
II.10	< 75.20	25.87 \pm 3.01	0.34<
II.11	42.57 \pm 13.96	21.19 \pm 1.17	0.5
II.12	> 78.5	---	---
II.13	> 78.5	206.94 \pm 27.32	> 2.6
II.14	NE	NE	NE
II.15	NE	NE	NE
II.16	39.34 \pm 3.41	42.73 \pm 5.58	1.1
II.17	NE	NE	NE
II.18	NE	NE	NE
II.19	NE	NE	NE

NE: No evaluado.

---: Sin efecto citotóxico a la concentración más alta ensayada.

Los compuestos II.12 y II.13 resultaron menos potentes que el ácido de caracasina, mientras que II.16 presentó un CI_{50} menor que 117 pero mayor que los ésteres.

Debido a que los compuestos II.9, II.10, II.14, II.15, II.17, II.18 y II.19 están siendo evaluados en estos momentos es difícil realizar una relación estructura química-actividad biológica; sin embargo, con los datos presentados en la Tabla XXIII se pueden realizar las siguientes observaciones:

- 1) La esterificación del ácido carboxílico mejoró notablemente la potencia.
- 2) A partir de tres átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada del éster se observa una disminución de la potencia y de la selectividad.
- 3) La pérdida de la conjugación del sistema α,β -insaturado por reducción de la cetona en C-15 y del doble enlace en C16-C17 disminuyó la potencia de los compuestos en comparación con el ácido de caracasina.

En general, el ácido de caracasina y todos los análogos evaluados, presentaron actividad contra las líneas celulares, microorganismos y protozoarios utilizados en este estudio. Con los resultados de la evaluación biológica de todos los compuestos sintetizados, se podría establecer un análisis de relación estructura química-actividad biológica en estudios posteriores. Estos resultados confirman el enorme potencial de los compuestos *ent*-3,4-*seco*-kauranos, en especial el ácido de caracasina y sus análogos, como agentes de gran interés por su amplia gama de actividades biológicas en química medicinal.

II.7 PARTE EXPERIMENTAL

II.7.1 Generalidades

La especie *Croton micans* Muell. Arg. fue colectada en el Edo. Aragua, recta Cumboto-Ocumare, antes de llegar al caserío Las Monjas, vía El Playón. Una muestra representativa de la misma se encuentra bajo el código MYF26071 en el Herbario Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

El material de vidrio, jeringas, cánulas, balones, etc., usados para las reacciones bajo condiciones anhidras, fueron secados en una estufa a 100°C por 12 horas antes de usarse.

Los disolventes y reactivos fueron adquiridos comercialmente de las casas Merck y Sigma-Aldrich.

El CH₂Cl₂ se secó a través de reflujo sobre pentóxido de fósforo y el THF se colocó en reflujo con pequeños trozos de sodio metálico y benzofenona como indicador.

Los espectros de RMN fueron tomados en un Espectrómetro JEOL ECLIPSE 270 (270 MHz para ¹H y 67.5 MHz para ¹³C) y en un Espectrómetro Bruker Advance DRX-400 (400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C). Se utilizó CDCl₃ y MeOD como solventes. El desplazamiento químico (δ) está reportado en ppm y se empleó como patrón interno trazas de los solventes utilizados.

Los espectros de masas de los compuestos II.2-II.8 se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP5973

en la Facultad de Ciencias, ULA. El cromatógrafo estaba equipado con una columna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm diámetro interno y espesor de película 0,25µm). Se empleó una temperatura inicial de 250 °C (0 min) y luego se calentó a razón de 5 °C/min hasta 300 °C. El inyector se mantuvo a 250 °C. La energía de ionización fue de 70 eV, con rango de escaneo, 40:500 amu; 3.9/s. Los espectros de masas del resto de los compuestos fueron tomados en el Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Los espectros de IR fueron tomados en un Espectrofotómetro FT-IR Thermo Nicolet Nexus 470.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Electrothermal y no fueron corregidos.

Las cromatografías en columna se realizaron empleando Sílica gel G60, 0,06-0,2 mm (70-230 mesh ASTM) Scharlau.

Las cromatografías en capa fina se realizaron en placas de sílica gel Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄, 20x20 cm, 0,20 mm de espesor.

Las cromatografías de placa preparativas se realizaron en placas de sílica gel 60. F₂₅₄, 20x20 cm, 0,25 mm de espesor, Merck.

Como agente revelador de las placas cromatográficas se empleó principalmente el reactivo *p*-anisaldehído (0.5 mL de *p*-anisaldehído, 85.0 mL de MeOH, 5.0 mL de H₂SO₄ y 10.0 mL de ácido acético glacial).

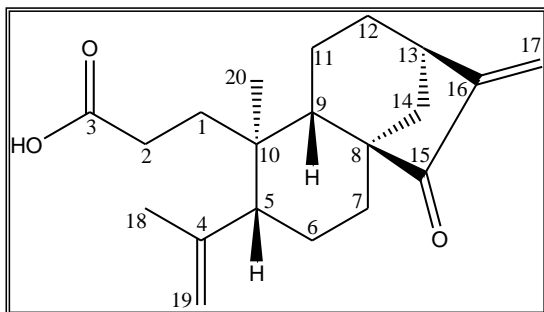
Se utilizó una lámpara de UV multibanda 254/365 nm modelo UVGL-25, un rotavapor BÜCHI R-114, Balanza analítica OHAUS y Balanza METTLER PC 2000.

Todos los solventes usados fueron grado analítico. Los solventes empleados para realizar los espectros de RMN fueron CDCl_3 y MeOD (Sigma-Aldrich).

La evaluación de la actividad citotóxica, leishmanicida y tripanocida fue realizada en el Laboratorio de Genómica y Proteómica, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), bajo la dirección del Dr. Iván Galindo y Katherine Figarella siguiendo el procedimiento descrito en la sección I.8.2.1. En el caso de la evaluación de la actividad tripanocida y leishmanicida, se determinó la viabilidad de estos parásitos a través del método MTT, con la consideración de que se estandarizaron las condiciones para éstas células cultivadas en suspensión y en medio de cultivo LIT (Liver infusion tryptose), suplementado con 10% de suero fetal bovino.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó en el Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar por la Dra. Antonieta Taddei, siguiendo el procedimiento descrito en la sección I.8.2.2.

II.7.2 Extracción y purificación del ácido de caracasina (117)



$C_{20}H_{28}O_3$

PM: 316.4364 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 133-134 °C

Rf: 0.58 (Hex/AcOEt 60:40)

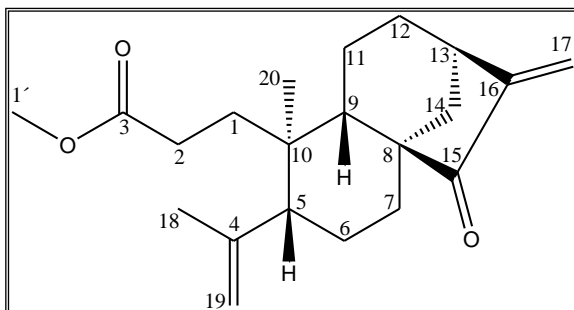
log P: 3.80

El ácido de caracasina se aisló de la planta *Croton micans* Muell. Arg. a través de la decocción de 80.0 g de hojas secas y molidas durante 15 minutos. Se dejó enfriar la solución acuosa y se filtró mediante vacío. Se realizaron particiones líquido-líquido con $CHCl_3$. la fase orgánica se desecó con $MgSO_4$ anhidro, se filtró por gravedad y el solvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo 748.0 mg de la fracción de $CHCl_3$. Esta fracción se filtró mediante columna cromatográfica en sílica gel y una fase móvil Hex/AcOEt (70:30). Se obtuvo 528.0 mg del ácido de caracasina lo que representa un rendimiento de 70.6% respecto a la fracción de $CHCl_3$ y un 0.66% respecto al material vegetal inicial.

Ácido de caracasina (117): Sólido blanco. IR ν_{max} : 3305, 2933, 2863, 1735, 1720, 1698, 1638, 1120, 936 cm^{-1} . RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 5.98 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 4.86 (s, 1H, H19), 4.60 (s, 1H, H19), 3.04 (sa, 1H, H13), 2.35 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H, H14), 2.06 (m, 2H, H2), 2.05 (m, 1H, H5), 1.88 (m, 2H, H12), 1.72 (s, 3H, H18), 1.68 (m, 2H, H1), 1.63 (m, 2H, H11), 1.53 (m, 2H, H6), 1.36 (m, 1H, H9), 1.27 (m, 2H, H7), 1.04 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 210.3 (C-15), 179.4 (C-3), 149.3 (C-16), 146.8 (C-4), 114.7 (C-17), 114.1 (C-19), 51.9 (C-8), 49.9 (C-5), 43.4 (C-9), 41.5 (C-10), 38.1 (C-

13), 36.4 (C-14), 33.5 (C-1), 32.2 (C-12), 32.1 (C-7), 28.4 (C-2), 24.7 (C-6), 23.4 (C-18), 21.6 (C-20), 18.3 (C-11). EM-IES: $m/z = 339.17$ $[M + Na]^+$ para la fórmula $C_{20}H_{28}O_3$.

II.7.3 Síntesis del metil éster del ácido de caracasina (II.2).



$C_{21}H_{30}O_3$

PM: 330.4631 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 73-75 °C

Rf: 0.63 (Hex/AcOEt 80:20)

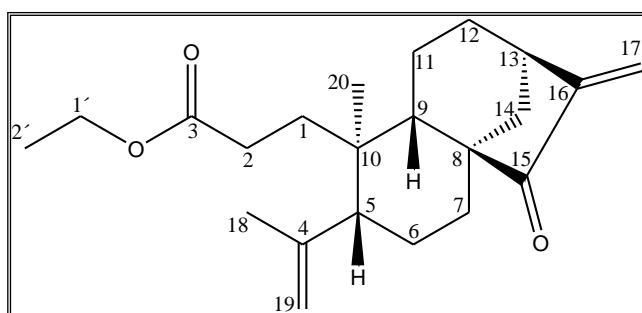
log P: 4.07

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1018 g, 0.3217 mmol) en metanol (5.0 mL). Posteriormente, se añadió el *p*-TsOH (0.0277 g, 0.1609 mmol) y una pequeña cantidad de $MgSO_4$ anhidro. Se sometió a reflujo por 9 horas bajo agitación magnética y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró por gravedad y el solvente fue evaporado a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (80:20). Se obtuvo 79.5 mg (74.8%) del compuesto **II.2**.

Metil éster del ácido de caracasina (II.2): Sólido blanco. IR ν_{max} : 2931, 2857, 1738, 1723, 1700, 1638, 1406, 1117, 932 cm^{-1} . RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 5.93 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 4.87 (s, 1H, H19), 4.65 (s, 1H, H19), 3.61 (s, 3H, H1'), 3.05 (sa, 1H, H13), 2.35 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H, H14), 2.06 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 1.87 (m, 2H, H12), 1.73 (s, 3H, H18), 1.68 (m, 2H, H1), 1.63 (m, 2H, H11), 1.53 (m, 2H, H6), 1.36 (m, 1H, H9), 1.28 (m, 2H, H7),

1.05 (s, 3H, H₂₀). RMN ¹³C (67.5 MHz, CDCl₃) δ ppm: 210.0 (C-15), 173.8 (C-3), 149.4 (C-16), 146.9 (C-4), 114.5 (C-17), 114.0 (C-19), 51.9 (C-8), 51.5 (C-1'), 50.0 (C-5), 43.5 (C-9), 41.5 (C-10), 38.2 (C-13), 36.5 (C-14), 33.8 (C-1), 32.3 (C-12), 32.1 (C-7), 28.4 (C-2), 24.8 (C-6), 23.4 (C-18), 21.6 (C-20), 18.4 (C-11).
EM-IE: $m/z = 330$ [M]⁺ para la fórmula C₂₁H₃₀O₃.

II.7.4 Síntesis del etil éster del ácido de caracasina (II.3).



C₂₂H₃₂O₃

PM: 344.4897 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 107-109 °C

Rf: 0.49 (Hex/AcOEt 90:10)

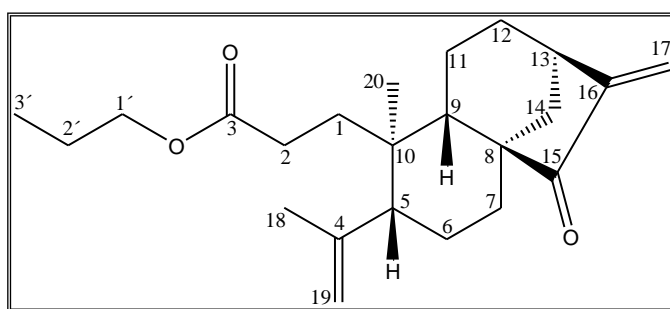
log P: 4.41

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1037 g, 0.3277 mmol) en etanol (5.0 mL). Seguidamente se añadió el *p*-TsOH (0.0282 g, 0.1638 mmol) y una pequeña cantidad de MgSO₄ anhidro. Se sometió a reflujo por 8 horas bajo agitación magnética; una vez frío, se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía en columna de fase normal empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10). El compuesto **II.3** se obtuvo como un sólido blanco en una cantidad de 79.1 mg (70.1%).

Etil éster del ácido de caracasina (II.3): Sólido blanco. RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm: 5.92 (s, 1H, H₁₇), 5.23 (s, 1H, H₁₇), 4.87 (s, 1H, H₁₉), 4.65 (s, 1H, H₁₉), 4.05 (c, $J = 7.2$ Hz, 1H, H_{1'}), 3.04 (sa, 1H, H₁₃), 2.37 (m, 2H, H₁₄), 2.06 (m, 2H, H₂), 2.02 (m, 2H, H₅), 1.87 (m, 2H, H₁₂), 1.72 (s, 3H, H₁₈), 1.67 (m, 2H, H₁), 1.64 (m, 2H, H₁₁), 1.52 (m, 2H, H₆), 1.33 (m, 1H, H₉), 1.27 (m, 2H,

H7), 1.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H2'), 1.04 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 209.6 (C-15), 173.4 (C-3), 149.1 (C-16), 146.7 (C-4), 114.4 (C-17), 113.9 (C-19), 60.5 (C-1'), 52.3 (C-8), 50.3 (C-5), 43.8 (C-9), 41.9 (C-10), 38.6 (C-13), 36.9 (C-14), 34.2 (C-1), 32.7 (C-12), 32.6 (C-7), 29.2 (C-2), 25.3 (C-6), 24.0 (C-18), 22.0 (C-20), 18.9 (C-11), 14.7 (C-2'). EM-IE: $m/z = 344.3$ $[\text{M}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$.

II.7.5 Síntesis del propil éster del ácido de caracasina (II.4).



$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$

PM: 358.5164 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 101-105°C

Rf: 0.52 (Hex/AcOEt 90:10)

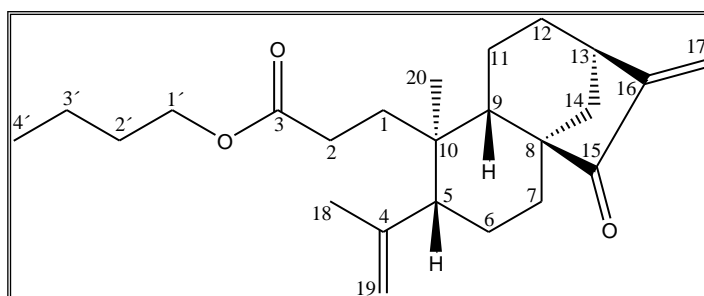
log P: 4.89

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1061 g, 0.3353 mmol) en propanol (5.0 mL). Se agitó durante 5 minutos, posteriormente, se añadió el *p*-TsOH (0.0289 g, 0.1678 mmol) y una pequeña cantidad de MgSO_4 anhidro. Se sometió a reflujo por 4 horas bajo agitación. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10). Se obtuvo 94.8 mg (78.9%) del compuesto **II.4**.

Propil éster del ácido de caracasina (II.4): Sólido blanco. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.93 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 4.87 (s, 1H, H19), 4.66 (s, 1H, H19), 3.96 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H1'), 3.05 (sa, 1H, H13), 2.36 (d, $J = 11.9$ Hz,

2H, H14), 2.07 (m, 2H, H2), 2.05 (m, 1H, H5), 1.89 (m, 2H, H12), 1.73 (s, 3H, H18), 1.70 (m, 2H, H1), 1.62 (m, 2H, H2'), 1.61 (m, 2H, H11), 1.53 (m, 2H, H6), 1.37 (m, 1H, H9), 1.27 (m, 2H, H7), 1.05 (s, 3H, H20), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H3'). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 209.7 (C-15), 173.4 (C-3), 149.1 (C-16), 146.6 (C-4), 114.4 (C-17), 113.9 (C-19), 66.2 (C-1'), 52.3 (C-8), 50.2 (C-5), 43.8 (C-9), 41.9 (C-10), 38.5 (C-13), 36.9 (C-14), 34.2 (C-1), 32.7 (C-12), 32.6 (C-7), 29.1 (C-2), 25.3 (C-6), 23.9 (C-18), 22.5 (C-2'), 22.0 (C-20), 18.9 (C-11), 10.9 (C-3'). EM-IE: $m/z = 358.3$ $[\text{M}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$.

II.7.6 Síntesis del butil éster del ácido de caracasina (II.5).



$\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_3$

PM: 372.5431 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 100-103°C

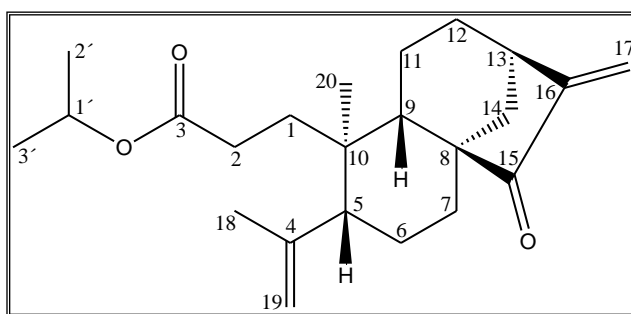
Rf: 0.54 (Hex/AcOEt 90:10)

log P: 5.31

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1036 g, 0.3274 mmol) en 5.0 mL de butanol. Se agitó durante 5 minutos, posteriormente, se añadió el *p*-TsOH (0.0282 g, 0.1638 mmol) y una pequeña cantidad de MgSO_4 anhidro. Se sometió a reflujo por 4 horas bajo agitación magnética. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10). El compuesto **II.5** se obtuvo como un sólido blanco en una cantidad de 110.0 mg (90.2%).

Butil éster del ácido de caracasina (II.5): Sólido blanco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.95 (s, 1H, H17), 5.26 (s, 1H, H17), 4.89 (s, 1H, H19), 4.67 (s, 1H, H19), 4.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 3.06 (sa, 1H, H13), 2.36 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H, H14), 2.08 (m, 2H, H2), 2.05 (m, 1H, H5), 1.89 (m, 2H, H12), 1.74 (s, 3H, H18), 1.68 (m, 2H, H1), 1.62 (m, 2H, H11), 1.57 (m, 2H, H2'), 1.54 (m, 2H, H6), 1.38 (m, 2H, H3'), 1.36 (m, 1H, H9), 1.29 (m, 2H, H7), 1.06 (s, 3H, H20), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H4'). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 210.4 (C-15), 174.0 (C-3), 149.2 (C-16), 146.8 (C-4), 114.6 (C-17), 113.9 (C-19), 64.2 (C-1'), 51.9 (C-8), 49.7 (C-5), 43.3 (C-9), 41.4 (C-10), 38.0 (C-13), 36.3 (C-14), 33.6 (C-1), 32.2 (C-12), 32.0 (C-7), 30.6 (C-2'), 28.6 (C-2), 24.6 (C-6), 23.5 (C-18), 21.6 (C-20), 19.1 (C3'), 18.3 (C-11), 13.7 (C-4'). EM-IE: $m/z = 372.3$ $[\text{M}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_3$.

II.7.7 Síntesis del isopropil éster de ácido de caracasina (II.6).



$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$

PM: 358.5164 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 107-110 °C

Rf: 0.51 (Hex/AcOEt 90:10)

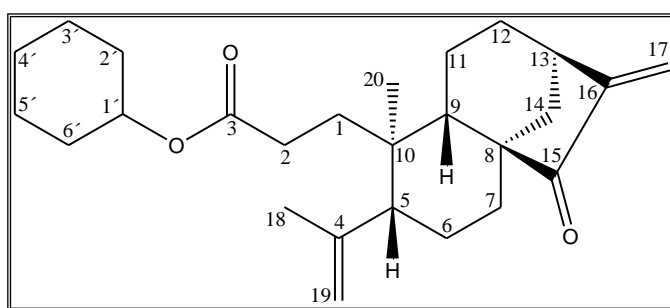
log P: 4.72

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1037 g, 0.3277 mmol) en 5.0 mL de isopropanol. Se añadió el *p*-TsOH (0.0284. 0.1649 mmol) y una pequeña cantidad de MgSO_4 anhidro. Se sometió a reflujo por 8 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna de

sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10). Se obtuvo una cantidad de 71.2 mg (60.6%) del compuesto **II.6**.

Isopropil éster del ácido de caracasina (II.6): Sólido blanco. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.93 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 4.93 (sept. $J = 6.2$ Hz, 1H, H1'), 4.88 (s, 1H, H19), 4.66 (s, 1H, H19), 3.04 (sa, 1H, H13), 2.36 (d, $J = 11.6$ Hz, 2H, H14), 2.07 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 1.87 (m, 2H, H12), 1.73 (s, 3H, H18), 1.67 (m, 2H, H1), 1.65 (m, 2H, H11), 1.52 (m, 2H, H6), 1.33 (m, 1H, H9), 1.28 (m, 2H, H7), 1.18 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H, H2', H3'), 1.04 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 210.5 (C-15), 173.5 (C-3), 149.3 (C-16), 146.9 (C-4), 114.6 (C-17), 114.0 (C-19), 67.6 (C-1'), 52.0 (C-8), 49.7 (C-5), 43.3 (C-9), 41.5 (C-10), 38.1 (C-13), 36.4 (C-14), 33.7 (C-1), 32.3 (C-12), 32.1 (C-7), 29.0 (C-2), 24.7 (C-6), 23.6 (C-18), 21.9 (C-2'), 21.9 (C-3'), 21.6 (C-20), 18.4 (C-11). EM-IE: $m/z = 358.3$ $[\text{M}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$.

II.7.8 Síntesis del ciclohexil éster del ácido de caracasina (II.7).



$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_3$

PM: 398.5806 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 86-91 °C

Rf: 0.37 (Hex/AcOEt 90:10)

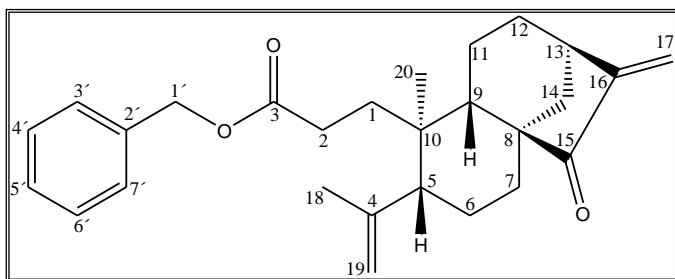
log P: 5.62

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1002 g, 0.3167 mmol) en 4.0 mL de benceno bajo agitación magnética. Se añadió gota a gota el ciclohexanol (0.033 mL, 0.3167 mmol), luego el *p*-TsOH (0.0273 g, 0.1585 mmol) y una pequeña cantidad de MgSO_4 anhidro. Se sometió a reflujo por 6 horas. Se dejó

enfriar a temperatura ambiente, se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10). Se obtuvo 89.5 mg (70.9%) del compuesto **II.7**.

Ciclohexil éster del ácido de caracasina (II.7): Sólido blanco. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.93 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 4.88 (s, 1H, H19), 4.67 (s, 1H, H19), 4.70 (m, 2H, H1'), 3.05 (sa, 1H, H13), 2.35 (m, 2H, H14), 2.25 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 1.91 (m, 2H, H12), 1.80 (m, 4H, H2', H6'), 1.73 (s, 3H, H18), 1.68 (m, 2H, H1), 1.61 (m, 2H, H11), 1.53 (m, 2H, H6), 1.50 (m, 4H, H3', H5'), 1.37 (m, 1H, H9), 1.27 (m, 2H, H7), 1.04 (s, 3H, H20), 0.89 (m, 2H, H4'). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 210.2 (C-15), 173.2 (C-3), 149.4 (C-16), 146.9 (C-4), 114.4 (C-17), 113.9 (C-19), 72.4 (C-1'), 51.9 (C-8), 49.8 (C-5), 43.4 (C-9), 41.5 (C-10), 38.1 (C-13), 36.4 (C-14), 33.8 (C-1), 32.3 (C-7), 32.1 (C-12), 31.7 (C-2'), 31.7 (C6'), 29.1 (C-2), 25.4 (C-6), 24.8 (C4'), 23.8 (C-3'), 23.8 (C5'), 23.7 (C-18), 21.5 (C-20), 18.4 (C-11). EM-IE: $m/z = 398.4$ $[\text{M}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_3$.

II.7.9 Síntesis del bencil éster del ácido de caracasina (II.8).



$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_3$

PM: 406.5595 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 83-87 °C

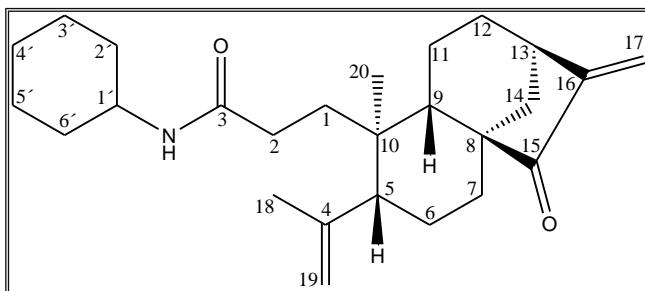
Rf: 0.50 (Hex/AcOEt 90:10)

log P: 5.80

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1048 g, 0.3312 mmol) en benceno (5.0 mL) bajo agitación magnética. Se añadió gota a gota el alcohol bencílico (34.0 μ L, 0.3312 mmol), luego el *p*-TsOH (0.0285 g, 0.1656 mmol) y una pequeña cantidad de MgSO₄ anhidro. Se sometió a reflujo por 2 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10). Se obtuvo 72.5 mg (53.8%) del compuesto **II.8**.

Bencil éster del ácido de caracasina (II.8): Sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.33 (sa, 5H, H3'. H4'. H5'. H6'. H7'), 5.93 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 5.06 (s, 2H, H1'), 4.86 (s, 1H, H19), 4.65 (s, 1H, H19), 3.04 (sa, 1H, H13), 2.35 (m, 2H, H14), 2.08 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 1.88 (m, 2H, H12), 1.72 (s, 3H, H18), 1.68 (m, 2H, H1), 1.63 (m, 2H, H11), 1.53 (m, 2H, H6), 1.36 (m, 1H, H9), 1.28 (m, 2H, H7), 1.04 (s, 3H, H20). RMN ¹³C (67.5 MHz, CDCl₃) δ ppm: 210.3 (C-15), 173.4 (C-3), 149.2 (C-16), 146.9 (C-4), 136.0 (C-2'), 128.6 (C-4', C-6'), 128.2 (C-5'), 128.1 (C-3', C-7'), 114.7 (C-17), 114.1 (C-19), 66.3 (C-1'), 51.9 (C-8), 49.9 (C-5), 43.4 (C-9), 41.5 (C-10), 38.1 (C-13), 36.5 (C-14), 33.7 (C-1), 32.3 (C-12), 32.1 (C-7), 28.7 (C-2), 24.8 (C-6), 23.4 (C-18), 21.6 (C-20), 18.4 (C-11). EM-IE: $m/z = 406.1$ [M]⁺ para la fórmula C₂₇H₃₄O₃.

II.7.10 Síntesis de la ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9).



$C_{26}H_{39}NO_2$

PM: 397.5958 g/mol

Aspecto físico: caramelo amarillo

Rf: 0.62 (Hex/AcOEt 60:40)

Rendimiento: 0.008 g (14.1%)

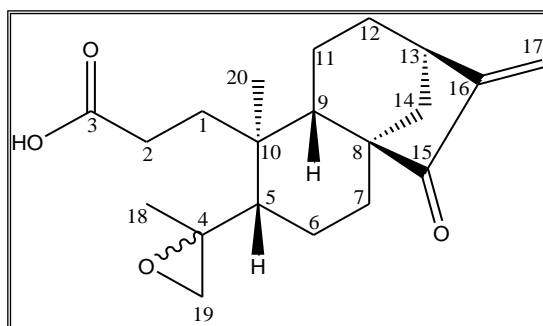
log P: 4.94

Se disolvió el ácido de caracasina (0.0500 g, 0.1580mmol) en CH_2Cl_2 (5.0 mL) y se colocó en un baño de hielo. Seguidamente, se añadió EDC (0.0350 g, 0.1826mmol) y se dejó reaccionar por 30 minutos bajo atmósfera de N_2 con agitación magnética. Después de este tiempo, se inyectó gota a gota ciclohexilamina (27.0 μ L, 0.236 mmol) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 24 horas. Se añadió agua (5.0 mL) para finalizar la reacción y se extrajo con CH_2Cl_2 . La capa orgánica fue lavada con una solución saturada de NaCl, desecada con $MgSO_4$, filtrada y el solvente fue evaporado a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil AcOEt/MeOH (90:10). Se obtuvo 10.0 mg (15.9%) del compuesto **II.9**.

Ciclohexilamida del ácido de caracasina (II.9): Caramelo amarillo. RMN 1H (270 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 5.93 (s, 1H, H17), 5.24 (s, 1H, H17), 4.88 (s, 1H, H19), 4.67 (s, 1H, H19), 3.71 (m, 2H, H1'), 3.05 (sa, 1H, H13), 2.36 (m, 2H, H14), 2.22 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 1.91 (m, 2H, H12), 1.83 (m, 4H, H2'. H6'), 1.75 (s, 3H, H18), 1.69 (m, 2H, H1), 1.66 (m, 2H, H11), 1.54 (m, 2H, H6), 1.51 (m, 4H, H3'. H5'), 1.36 (m, 1H, H9), 1.29 (m, 2H, H7), 1.05 (s, 3H, H20), 0.86 (m,

2H, H4'). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 209.7 (C-15), 171.4 (C-3), 149.1 (C-16), 147.0 (C-4), 114.4 (C-17), 113.7 (C-19), 52.3 (C-8), 50.5 (C-5), 48.4 (C-1'), 44.0 (C-9), 42.0 (C-10), 38.6 (C-13), 36.9 (C-14), 34.8 (C-1), 33.6 (C-2'), 33.6 (C-6'), 32.8 (C-7), 32.7 (C-12), 31.4 (C-2), 26.1 (C-6), 25.3 (C-4'), 25.3 (C-3'), 25.3 (C-5'), 23.9 (C-18), 22.1 (C-20), 19.0 (C-11).

II.7.11 Síntesis del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-4.19-epoxi-kaur-16(17)-en-3-oico (II.10).



$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$

PM: 332.4358 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 111-114 °C

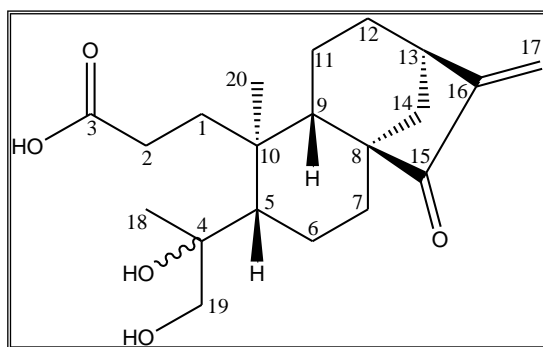
Rf: 0.28 (Hex/AcOEt 50:50)

log P: 2.67

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1072g, 0.3388 mmol) en CH_2Cl_2 seco (3.0 mL) y se enfrió en un baño de hielo bajo atmósfera de N_2 , se añadió gota a gota *m*-CPBA (0.0702 g, 0.40653 mmol, 1.2 equiv.) disuelto en CH_2Cl_2 (2mL) y se dejó reaccionar a una temperatura $< 3^\circ\text{C}$ por 4 horas. Después de este tiempo se dejó reaccionar por 20 horas a temperatura ambiente. Se le añadió 10 mL de solución de NaHSO_3 10% y se agitó por 10 minutos. Se realizaron extracciones con CHCl_3 y la fase orgánica obtenida fue lavada con NaHCO_3 y seguidamente desecada con MgSO_4 anhidro, filtrada y el solvente fue evaporado a presión reducida. Se obtuvo un caramelo incoloro el cual fue purificado mediante placa preparativa empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (50:50). Se obtuvo 42.2 mg (37.5%) del compuesto **II.10**.

Ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-4.19-epoxi-kaur-16(17)-*en*-3-oico (**II.10**): Sólido blanco. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 5.94 (s, 1H, H17), 5.26 (s, 1H, H17), 3.06 (sa, 1H, H13), 2.73 (d, $J = 4.0$. 1H, H19), 2.68 (d, $J = 4.2$. 1H, H19), 2.32 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H, H14), 2.03 (m, 2H, H2), 1.95 (m, 2H, H6), 1.81 (m, 2H, H12), 1.68 (m, 2H, H1), 1.63 (m, 2H, H11), 1.38 (m, 1H, H9), 1.33 (m, 2H, H7), 1.27 (s, 3H, H18), 1.16 (s, 3H, H20), 1.10 (m, 1H, H5). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 209.1 (C-15), 177.6 (C-3), 148.8 (C-16), 114.8 (C-17), 58.2 (C-4), 55.9 (C-19), 52.0 (C-8), 50.2 (C-5), 44.2 (C-9), 41.4 (C-10), 38.5 (C-13), 36.7 (C-14), 34.2 (C-1), 32.6 (C-12), 32.5 (C-7), 28.9 (C-2), 22.3 (C-20), 22.1 (C-6), 21.2 (C-18), 18.4 (C-11). EM-IES: $m/z = 355.16$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$.

II.7.12 Síntesis del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-4.19-dihidroxi-kaur-16(17)-*en*-3-oico (**II.11**).



$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$

PM: 350.4512 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 123-127 °C

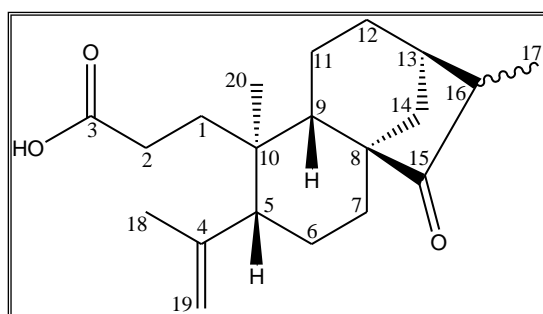
Rf: 0.26 (Hex/AcOEt 50:50)

log P: 2.03

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **II.10** pero esta vez se utilizó 2.4 equivalentes del *m*-CPBA (0.1319 g, 0.7645 mmol) y 0.1008g de ácido de caracasina (0.3190 mmol). Se obtuvo un caramelo incoloro el cual fue purificado mediante placa preparativa empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (50:50) para producir 29.1 mg (26.1%) del compuesto **II.11**.

Ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-4.19-dihidroxi-kaur-16(17)-en-3-oico (**II.11**): Sólido blanco. RMN ^1H (270 MHz, MeOD) δ ppm: 5.88 (s, 1H, H17), 5.31 (s, 1H, H17), 3.30 (m, 2H, H19), 3.08 (m, 1H, H13), 2.43 (d, $J= 11.9$. 2H, H14), 2.05 (m, 2H, H2), 2.00 (m, 2H, H6), 1.80 (m, 2H, H12), 1.70 (m, 2H, H1), 1.60 (m, 2H, H11), 1.32 (m, 2H, H7), 1.31 (m, 1H, H5), 1.29 (s, 3H, H18), 1.25 (m, 1H, H9), 1.13 (m, 2H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, MeOD) δ ppm: 210.8 (C-15), 177.9 (C-3), 149.7 (C-16), 113.5 (C-17), 76.8 (C-4), 70.5 (C-19), 52.6 (C-8), 45.1 (C-5), 43.2 (C-9), 41.2 (C-10), 38.7 (C-13), 36.5 (C-14), 34.5 (C-1), 32.9 (C-12), 32.5 (C-7), 29.1 (C-2), 22.7 (C-20), 21.8 (C-6), 21.5 (C-18), 18.4 (C-11). EM-IES: $m/z = 373.17$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$.

II.7.13 Síntesis del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (**II.12**).



$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$

PM: 318.4523g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 169-171 °C

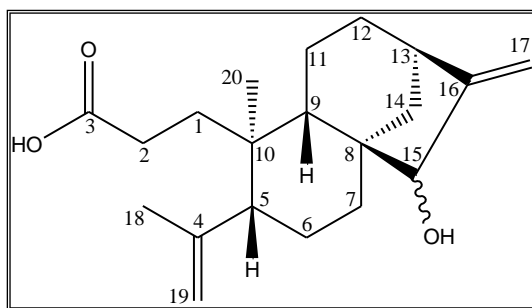
Rf: 0.60 (Hex/AcOEt 60:40)

log P: 4.65

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1002 g, 0.3166 mmol) en THF seco (5.0 mL) y posteriormente se le añadió Pd/C 10% (16.8 mg, 15.8 μmol). Se dejó reaccionar con agitación magnética bajo atmósfera de H_2 por 4 horas. Se filtró a través de celite y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel y una fase móvil Hexano/AcOEt (80:20). Se obtuvo 85.0 mg (84.3%) del compuesto **II.12**.

Ácido *ent*-3,4-seco-15-oxo-kaur-4(19)-en-3-oico (**II.12**): Sólido blanco. IRMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.87 (s, 1H, H19), 4.65 (s, 1H, H19), 2.42 (sa, 1H, H13), 2.39; 1.37 (m, 2H, H14), 2.29 (m, 2H, H2), 2.23 (m, 1H, H16), 2.05 (m, 1H, H5), 1.78; 1.26 (m, 1H, H7), 1.72 (s, 3H, H18), 1.67 (m, 2H, H6), 1.66 (m, 2H, H1), 1.56 (m, 2H, H12), 1.52; 1.23 (m, 2H, H11), 1.20 (m, 1H, H9), 1.09 (d, 1H, $J = 6.92$ Hz, 3H, H17), 1.03 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm): 224.6 (C-15), 179.8 (C-3), 146.7 (C-4), 113.9 (C-19), 52.0 (C-8), 49.6 (C-5), 47.7 (C-16), 43.2 (C-9), 41.0 (C-10), 37.1 (C-14), 34.8 (C-13), 33.3 (C-1), 32.7 (C-7), 28.3 (C-2), 24.9 (C-12), 24.5 (C-6), 23.3 (C-18), 21.6 (C-20), 18.1 (C-11), 10.0 (C-17). EM-IES: $m/z = 341.18$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$.

II.7.14 Síntesis del ácido *ent*-3,4-seco-15-hidroxi-kaur-4(19)-en-3-oico (**II.13**).



$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$

PM: 318.4523 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 143-145 °C

Rf: 0.38 (Hex/AcOEt 60:40)

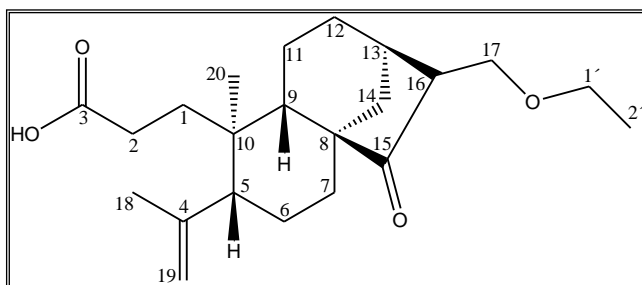
log P: 3.64

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1012 g, 0.3198 mmol) en 4.0 mL de una mezcla $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (50:50), se enfrió a 0°C y posteriormente se le añadió lentamente el NaBH_4 (0.0062 g, 0.1600 mmol) disuelto en MeOH (2 mL). Se dejó en agitación por 24 horas. Después de este tiempo se le añadió 6 mL de H_2O y se ajustó a pH 5 con solución de HCl 10% observándose la formación de un aceite ligeramente amarillo. Se extrajo con CHCl_3 , se desecó la fase

orgánica con MgSO₄, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvo un aceite incoloro el cual fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (70:30) para producir 72.2 mg (70.9 %) del compuesto **II.13**.

Ácido ent--3.4-seco-15-hidroxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.13): Sólido blanco. RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm: 5.08 (s, 1H, H17), 4.95 (s, 1H, H17), 4.86 (s, 1H, H19), 4.64 (s, 1H, H19), 3.78 (s, 1H, H15), 2.66 (sa, 1H, H9), 2.29 (m, 2H, H2), 2.05 (m, 1H, H5), 1.96; 1.06 (m, 2H, H14), 1.77; 1.46 (m, 2H, H7), 1.74 (m, 2H, H12), 1.72 (s, 3H, H18), 1.67; 1.25 (m, 2H, H1), 1.62 (m, 2H, H11), 1.54 (m, 2H, H6), 1.49 (m, 1H, H13), 1.00 (s, 3H, H20). RMN ¹³C (67.5 MHz, CDCl₃) δ ppm: 179.7 (C-3), 157.9 (C-16), 147.4 (C-4), 113.8 (C-19), 105.1 (C-17), 82.7 (C-15), 50.1 (C-5), 45.5 (C-8), 40.6 (C-10), 40.1 (C-9), 37.3 (C-1), 36.9 (C-13), 36.2 (C-14), 33.8 (C-12), 33.1 (C-7), 28.5 (C-2), 26.0 (C-6), 23.5 (C-18), 21.8 (C-20), 18.1 (C-11). EM-IES: *m/z* = 341.20 [M + Na]⁺ para la fórmula C₂₀H₃₀O₃.

II.7.15 Síntesis del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-17-etoxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14).



C₂₂H₃₄O₄

PM: 362.5051/mol

Aspecto físico: caramelo amarillo

Rf: 0.48 (Hex/AcOEt 60:40)

log P: 4.29

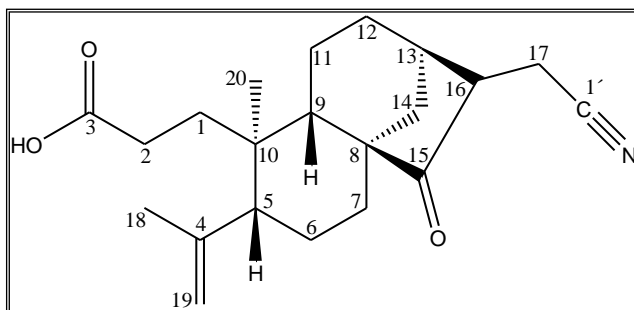
En un balón se pesó NaOH (0.0317 g, 0.7925 mmol) y se colocó en un baño de hielo. Se le añadió EtOH (50 µL, 0.8576 mmol) y se agitó hasta disolución

completa del NaOH. Posteriormente, se le añadió gota a gota el ácido de caracasina (0.1002g, 0.3167 mmol) disuelto en EtOH (5 mL) y se dejó llegar a temperatura ambiente. Se mantuvo la reacción bajo agitación magnética por 24 horas. Después de este tiempo, se le añadió agua (5 mL) a la mezcla de reacción y se ajustó a pH 7 con solución de HCl 10%. Se extrajo con CHCl₃. se desecó la fase orgánica con MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía de placa preparativa de fase normal empleando CHCl₃/AcOEt (70:30) para producir 21.4 mg (18.6%) del compuesto **II.14**.

Ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-etoxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.14): Caramelo amarillo. RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.87 (s, 1H, H19), 4.65 (s, 1H, H19), 3.45 (m, 2H, H17), 3.45 (m, 2H, H1'), 2.53 (sa, 1H, H13), 2.32 (m, 2H, H14), 2.25 (sa, 2H, H16), 2.10 (m, 2H, H2), 2.03 (m, 1H, H5), 1.72 (s, 3H, H18), 1.68 (m, 2H, H1), 1.64 (m, 2H, H12), 1.51 (m, 1H, H6), 1.49 (m, 2H, H11), 1.25 (m, 1H, H7), 1.23 (sa, 1H, H9), 1.14 (t, J= 10.3 Hz, 3H, H2'), 1.05 (s, 3H, H20). RMN ¹³C (67.5 MHz, CDCl₃) δ ppm: 221.8 (C-15), 177.8 (C-3), 146.6 (C-4), 113.9 (C-19), 69.9 (C-17), 66.7 (C-1'), 53.4 (C-16), 52.8 (C-8), 50.3 (C-5), 43.3 (C-9), 41.8 (C-10), 36.5 (C-14), 34.1 (C-13), 34.0 (C-1), 32.9 (C-7), 30.9 (C-12), 28.6 (C-2), 25.5 (C-6), 23.8 (C-18), 22.0 (C-20), 18.9 (C-11), 15.6 (C-2'). EM-IES: *m/z* = 385.18 [M + Na]⁺ para la fórmula C₂₂H₃₄O₄.

II.7.16 Síntesis del ácido *ent*-3,4-seco-15-oxo-17-ciano-kaur-4(19)-en-3-oico

(II.15).



$C_{21}H_{29}NO_3$

PM: 343.4618 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco

Punto de fusión: 170-174 °C

Rf: 0.43 (Hex/AcOEt 60:40)

log P: 4.14

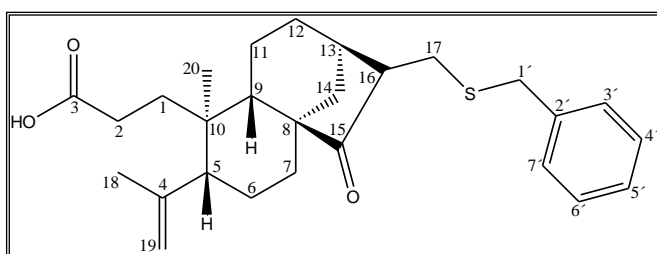
Se disolvió el ácido de caracasina (0.1002 g, 0.3167 mmol) en MeOH (2.0 mL) y se colocó en un baño de hielo bajo agitación magnética hasta una temperatura inferior a 10°C. Se le añadió gota a gota KCN (0.0309 g, 0.4750 mmol) disuelto en agua (5 mL) y se dejó llegar a temperatura ambiente. Se mantuvo bajo agitación magnética por 42 horas. Se añadieron gotas de una solución de H₂SO₄ 5 % hasta pH 3. Se extrajo con éter, se secó la fase orgánica con MgSO₄, se filtró y el solvente fue evaporado a presión reducida. Se obtuvo un caramelo de color amarillo claro que se purificó mediante cromatografía de placa preparativa sobre sílica gel usando una fase móvil Hexano/AcOEt (60:40) para producir 52.8 mg (48.5 %) del compuesto **II.15**.

Ácido ent-3,4-seco-15-oxo-17-ciano-kaur-4(19)-en-3-oico (**II.15**): Sólido blanco.

RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm: 4.89 (s, 1H, H19), 4.66 (s, 1H, H19), 2.90 (pseudo dd. $J_1= 17.36$ Hz; $J_2= 3.6$ Hz, 1H, H16), 2.77 (sa, 1H, H13), 2.58 (m, 1H, H17), 2.33 (m, 2H, H14), 2.22 (m, 2H, H12), 2.05 (m, 2H, H2), 2.02 (sa, 1H, H5), 1.72 (s, 3H, H18), 1.69 (m, 2H, H1), 1.67 (m, 2H, H11), 1.54 (m, 2H, H6), 1.46 (m, 1H, H9), 1.24 (m, 2H, H7), 1.05 (s, 3H, H20). RMN ¹³C (67.5 MHz,

CDCl₃) δ ppm: 219.3 (C-15), 179.5 (C-3), 146.3 (C-4), 118.4 (C-1'), 114.3 (C-19), 52.3 (C-16), 49.5 (C-8), 49.3 (C-5), 43.5 (C-9), 41.1 (C-10), 36.3 (C-14), 33.1 (C-13), 32.9 (C-1), 32.4 (C-7), 28.2 (C-2), 24.6 (C-6), 24.2 (C-12), 23.3 (C-18), 21.6 (C-20), 18.3 (C-11), 14.0 (C-17). EM-IES: $m/z = 366.14$ [M + Na]⁺ para la fórmula C₂₁H₂₉NO₃.

II.7.17 Síntesis del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-17-bencilmercapto-kaur-4(19)-en-3-oico (II.16).



C₂₇H₃₆O₃S

PM: 440.6409 g/mol

Aspecto físico: caramelo rosado

R_f: 0.48 (CHCl₃/AcOEt 80:20)

log P: 6.41

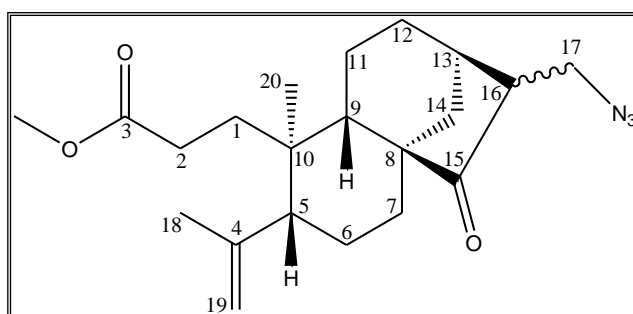
Se disolvió el ácido de caracasina (0.1050 g, 0.3318 mmol) en CH₂Cl₂ seco (5.0 mL) y se añadió (CH₃)₃SiCl (0.5 mL). Se dejó reaccionar bajo agitación magnética por 10 minutos y posteriormente se le añadió gota a gota bencilmercapto (78.0 μ L, 0.6644 mmol). Se colocó bajo reflujo por 10 horas y luego se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 14 horas. Se evaporó el solvente a presión reducida y el producto se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil CHCl₃/AcOEt (90:10). Se obtuvo 85.6 mg (58.5 %) del compuesto **II.16**.

Ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-17-bencilmercapto-kaur-4(19)-en-3-oico (**II.16**):

Caramelo rosado. RMN ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.28 (m, 2H, H3', H7'), 7.28 (m, 2H, H4', H6'), 7.28 (m, 1H, H5'), 4.86 (s, 1H, H19), 4.64 (s, 1H, H19), 3.72 (m, 2H, H1'), 2.99 (d, $J = 8.6$, 1H, H16), 2.59 (sa, 1H, H13), 2.38 (m, 2H,

H14), 2.31 (m, 2H, H17), 2.25 (m, 2H, H12), 2.03 (m, 2H, H2), 1.99 (m, 1H, H5), 1.71 (s, 3H, H18), 1.66 (m, 2H, H1), 1.63 (m, 2H, H11), 1.55 (m, 2H, H6), 1.49 (m, 1H, H9), 1.21 (m, 1H, H7), 1.00 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 220.8 (C-15), 179.0 (C-3), 146.4 (C-4), 138.1 (C-2'), 128.7 (C-3'. C-7'), 128.4 (C-4'. C-6'), 126.9 (C-5'), 114.0 (C-19), 53.3 (C-16), 52.9 (C-8), 50.1 (C-5), 43.8 (C-9), 41.5 (C-10), 37.5 (C-1'), 37.1 (C-17), 33.8 (C-14), 33.3(C-13), 33.1 (C-1), 28.8 (C-7), 28.6 (C-2), 25.4 (C-12), 24.6 (C-6), 23.8 (C-18), 22.0 (C-20), 19.0 (C-11). EM-IES: $m/z = 479.19$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{S}$.

II.7.18 Síntesis del éster metílico del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-17-azidokaur-4(19)-en-3-oico (II.17).



$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3$

PM: 373.4893 g/mol

Aspecto físico: aceite naranja

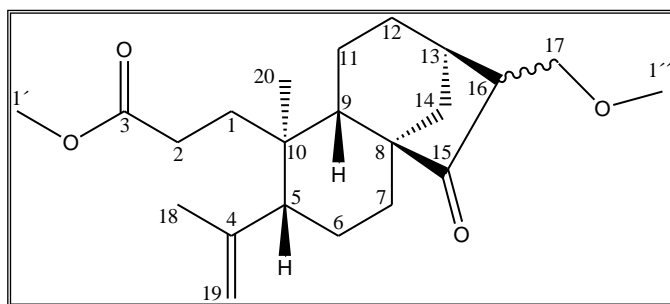
Rf: 0.62 (Hex/AcOEt 80:20)

Se disolvió el ácido de caracasina (0.1005 g, 0.3176 mmol) en MeOH (4.0 mL). Se le añadió gota a gota 2 equivalentes de NaN_3 (0.0413 g, 0.6352 mmol) disuelta en agua (2.0 mL). Se sometió a reflujo por 6 horas bajo agitación magnética y luego se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 15 horas. Se le añadió agua (5.0 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 . Se desecó la fase orgánica con MgSO_4 , se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvo un caramelo naranja claro que fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (90:10)

para producir 41.6 mg (35.1%) del compuesto **II.17** y 21.0 mg (18.2%) del compuesto **II.18**.

Éster metílico del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-azida-kaur-4(19)-en-3-oico (II.17): Aceite naranja. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.87 (s, 1H, H19), 4.65 (s, 1H, H19), 3.77 (dd, $J_1=12.8$ Hz; $J_2=4.4$ Hz, 1H, H16), 3.61 (s, 3H, H1'), 3.21 (dd, $J_1=12.9$ Hz; $J_2=10.0$ Hz, 2H, H17), 3.04 (sa, 1H, H13), 2.36 (m, 2H, H14), 2.24 (m, 2H, H12), 2.05 (m, 2H, H2), 2.01 (sa, 1H, H5), 1.72 (s, 3H, H18), 1.61 (m, 2H, H1), 1.65 (m, 2H, H11), 1.52 (m, 2H, H6), 1.43 (m, 1H, H9), 1.24 (m, 2H, H7), 1.01 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 219.5 (C-15), 173.7 (C-3), 146.3 (C-4), 113.9 (C-19), 53.5 (C-16), 52.7 (C-8), 51.9 (C-1'), 50.0 (C-5), 48.6 (C-17), 44.0 (C-9), 41.6 (C-10), 37.3 (C-14), 34.2 (C-1), 34.0 (C-7), 33.0 (C-13), 32.7 (C-12), 28.2 (C-2), 25.3 (C-6), 23.8 (C-18), 22.1 (C-20), 18.9 (C-11).

II.7.19 Síntesis del Éster metílico del ácido *ent*-3.4-seco-15-oxo-17-metoxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18).



$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$

PM: 362.503 g/mol

Aspecto físico: aceite incoloro

Rf: 0.62 (Hex/AcOEt 70:30)

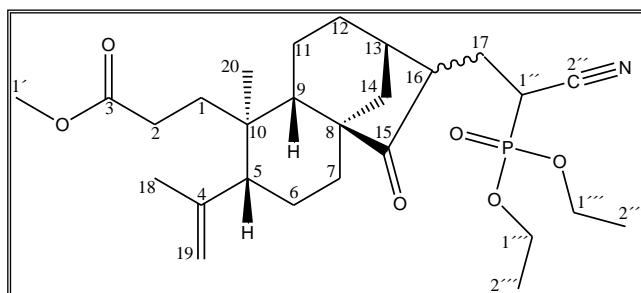
log P: 4.21

Ver metodología de síntesis descrita para el compuesto **II.17**.

Éster metílico del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-metoxi-kaur-4(19)-en-3-oico (II.18): Aceite incoloro. RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.86 (s, 1H, H19),

4.64 (s, 1H, H19), 3.61 (s, 3H, H1'), 3.41 (m, 2H, H17), 3.34 (s, 3H, H1'), 2.64 (sa, 1H, H13), 2.42 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H, H14), 2.22 (m, 2H, H16), 2.07 (m, 2H, H2), 2.00 (m, 1H, H5), 1.71 (s, 3H, H18), 1.69 (m, 2H, H1), 1.64 (m, 2H, H12), 1.51 (m, 1H, H6), 1.51 (m, 2H, H11), 1.28 (m, 1H, H7), 1.23 (sa, 1H, H9), 1.02 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl_3) δ ppm: 221.3 (C-15), 174.3 (C-3), 146.7 (C-4), 114.0 (C-19), 69.5 (C-17), 59.0 (C-2'), 53.9 (C-16), 52.5 (C-8), 51.5 (C-1'), 49.8 (C-5), 43.6 (C-9), 41.2 (C-10), 37.1 (C-14), 33.6 (C-1), 32.6 (C-7), 32.6 (C-13), 28.4 (C-2), 24.9 (C-12), 24.8 (C-6), 23.4 (C-18), 21.6 (C-20), 18.5 (C-11). EM-IES: $m/z = 385.21$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$.

II.7.20 Síntesis del éster metílico del ácido *ent*-3.4-*seco*-15-oxo-17-(1''-dietilfosfonato-1''-ciano)metil-kaur-4(19)-*en*-3-oico (II.19).



$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{NO}_6\text{P}$

PM: 507.5993 g/mol

Aspecto físico: caramelo amarillo

Rf: 0.46 (Hex/AcOEt 50:50)

log P: 5.18

Se pesó KH al 35% en aceite mineral (0.0385 g, 0.3362 mmol) en un balón de dos bocas y se lavó varias veces con hexano para eliminar el aceite. Se añadió THF seco (3 mL) y se colocó el balón en un baño de hielo y agitación magnética bajo atmósfera de N_2 . Una vez frío, se añadió gota a gota el dietil cianometilfosfonato (54.4 μL , 0.3362 mmol) y se dejó reaccionar por 40 minutos. Posteriormente, se añadió gota a gota el metil éster del ácido de caracasina (II.2) (0.101 g, 0.3056 mmol) disuelto en THF (3 mL), se mantuvo la

reacción en el baño de hielo por 30 minutos más y luego se dejó llegar a temperatura ambiente. A las 18 horas se añadió agua (5 mL) para finalizar la reacción y se agitó por 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa con CHCl_3 , se desecó la fase orgánica con MgSO_4 anhidro, se filtró por gravedad y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía de placa preparativa empleando una fase móvil Hexano/AcOEt (60:40) y se obtuvo 0.0287g (18.5%) del compuesto **II.19**.

Éster metílico del ácido ent-3.4-seco-15-oxo-17-(1''-dietilfosfonato-1''-ciano)metil-kaur-4(19)-en-3-oico (II.19): Caramelo amarillo. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 4.88 (s, 1H, H19), 4.65 (s, 1H, H19), 4.20 (c, $J= 7.0$ Hz, 4H, H1'''), 3.76 (m, 1H, H1''), 3.62 (s, 3H, H1'), 3.08 (m, 1H, H16), 2.62 (m, 1H, H13), 2.45 (m, 2H, H17), 2.27 (m, 2H, H14), 2.04 (m, 2H, H2), 2.02 (m, 2H, H5), 1.88 (m, 2H, H12), 1.74 (s, 3H, H18), 1.67 (m, 2H, H1), 1.66 (m, 2H, H11), 1.52 (m, 2H, H6), 1.38 (t, $J= 7.1$ Hz, 6H, H2'''), 1.30 (m, 1H, H9), 1.27 (m, 2H, H7), 1.02 (s, 3H, H20). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 221.2 (C-15), 174.2 (C-3), 146.5 (C-4), 116.0 (C-2''), 114.0 (C-19), 63.8 (C-1'''), 52.6 (C-8), 51.6 (C-1'), 50.0 (C-16), 49.5 (C-5), 43.3 (C-9), 41.1 (C-10), 36.7 (C-14), 36.6 (C-7), 34.3 (C-13), 33.4 (C-1), 32.5 (C-12), 28.7 (C-1''), 28.3 (C-2), 24.7 (C-6), 23.3 (C-18), 21.6 (C-20), 18.3 (C-11), 16.4 (C-2'''). EM-IES: $m/z = 530.24$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ para la fórmula $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{NO}_6\text{P}$.

II.8 CONCLUSIONES

- Se logró optimizar el proceso de extracción del ácido de caracasina a partir de las hojas de la planta *Croton micans* Muell. Arg., logrando un rendimiento de 0.66% respecto al material vegetal inicial.
- Se sintetizaron un total de dieciocho derivados ent-3,4-seco-kauranos a partir del ácido de caracasina: siete ésteres, una amida, un epóxido, un diol, un alcohol, una cetona saturada y seis compuestos formados a partir de reacciones de adición nucleofílica 1,4.
- Los resultados obtenidos indicaron que las reacciones de adición nucleofílica 1,4 en el sistema α , β -insaturado del ácido de caracasina se ven favorecidas frente a la adición nucleofílica 1,2.
- En la evaluación de la actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer humano MCF-7 y PC3, todos los compuestos evaluados resultaron activos.
- La esterificación del grupo carboxílico en el ácido de caracasina generó compuestos citotóxicos más potentes contra MCF-7 y PC3.
- En la evaluación de la actividad antibacteriana contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, los compuestos II.2, II.7, II.8, II.10, II.13, II.14, II.16 y II.18 presentaron una actividad biológica de amplio espectro contra todos los microorganismos evaluados, mientras que los compuestos II.3, II.5 y II.19 fueron inactivos.

- Los ésteres con números de átomos de carbono impares (II.2, II.4 y II.6) resultaron activos contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, sin embargo, los ésteres con números de carbonos pares (II.3 y II.5) fueron inactivos.
- La esterificación del grupo carboxílico en la posición 3 del ácido de caracasina aumentó notablemente la potencia de los compuestos frente a la forma promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- La potencia de los ésteres II.2-II.6 contra *L. mexicana*, aumenta a medida que crece el tamaño de la cadena hidrocarbonada, en este caso desde uno hasta cuatro átomos de carbono.
- En la evaluación de la actividad tripanocida, los ésteres II.2-II.8 resultaron más potentes que el ácido de caracasina, sin embargo, presentaron una baja selectividad.
- El compuesto II.3 correspondiente al metil éster, resultó el más potente contra *Tripanosoma cruzi* con un CI_{50} de $(2.37 \pm 0.37) \mu M$.
- En general, el ciclohexil éster del ácido de caracasina (II.7) resultó ser el compuesto más potente contra las líneas celulares MCF-7 y PC3, contra los microorganismos *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* y contra parásitos de *Leishmania mexicana*. Asimismo, fue uno de los más potentes contra *Tripanosoma cruzi*.

- Se encontró en la mayoría de los casos, que las modificaciones sobre el doble enlace en las posición 4-19, la reducción del doble enlace en la posición 16-17 y la pérdida de la conjugación en el sistema α,β -insaturado del ácido de caracasina, provocó una disminución en la potencia de los análogos del ácido de caracasina como agentes citotóxicos, antibacterianos, leishmanicidas y tripanocidas, destacando la importancia de estos grupos y de la unidad α -exometileno ciclopentanona para la actividad biológica.

II.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh. J Pharmacol. 2006; 1(2):35-41.
2. Balandrin NF, Kinghorn AD, Farnsworth NR. Human medicinal agents from plants. ACS Symposium Series. 1993; 534:2-12.
3. WHO. Monographs on selected medicinal plants. Vol.1. Ginebra, OMS. 1999.
4. Agra MF, Silva KN, Lima Diniz BIJ, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Braz J Pharmacogn. 2008; 18(3):472-508.
5. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. J Nat Prod. 2004; 67:2141-2153.
6. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. Nat Prod Rep. 2000; 17:215-234.
7. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod. 2003; 66:1022-1037.
8. Newman DJ, Cragg GM. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl Chem. 2005; 77(1):7-24.
9. Steinmann V. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. Acta Bot Mex. 2002; 61:61-93.
10. Municio AM. Ciencias de la Naturaleza: Botánica II. Vol. 5. Barcelona: Planeta; 1997. p.143.
11. Webster GL. Irritant plants in the spurge family (Euphorbiaceae). Clin Dermatol. 1986; 4(2):36-45.

12. Webster GL. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. *Taxon*. 1975; 24(5/6):593-601.
13. Webster GL. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann Missouri Bot Gard*. 1994; 81(1):33-144.
14. Hill A, Vélez H, Martínez M, Domínguez R, Suárez M. Tamizaje fitoquímico y antimicrobiano de la especie potencialmente medicinal, *Croton micradenus* Urb. *Memorias del X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina*, 19-20, (2001).
15. Riina R, Berry PE, Van Ee BW. Molecular phylogenetics of the dragon's blood *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. *Syst Bot*. 2009; 34(2):360-374.
16. Salatino A, Faria ML, Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem. Soc*. 2007; 18(1):11-33.
17. Fuentes JC, Castro V, Jakupovic J, Murillo R. Diterpenos y otros constituyentes de *Croton hirtus* (Euphorbiaceae). *Rev Biol Trop*. 2004; 52(1):269-285.
18. Municio AM. *Ciencias de la Naturaleza: Botánica II*. Vol. 5. Barcelona: Planeta; 1997. p.146.
19. Palmeira JSF, Alves VL, Moura FS, Vieira LFA, Conserva LM, Lemos RPL. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Braz J Pharmacogn*. 2006; 16(3):397-402.
20. De Marino S, Gala F, Zollo F, Vitalini S, Fico G, Visioli F, Iorizzi M. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri*

- (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules*. 2008; 13:1219-1229.
21. García PA, Braga de Oliveira A, Batista R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*. 2007; 12:455-483.
22. Ramos F, Takaishi Y, Kashiwada Y, Osorio C, Duque C, Acuña R, Fujimoto Y. *Ent*-3,4-seco-labdane and *ent*-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*. 2008; 69:2406-2410.
23. Roengsumran S, Petson A, Kuptiyanuwat N, Vilaivan T, Ngamrojnavanich N, Chaichantipyuth C, Phuthong S. Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry*. 2001; 56:103-107.
24. Block S, Baccelli C, Tinant B, Van Meervelt L, Rozenberg R, Habib Jiwan JL, Llabres G, De Pauw-Gillet MC, Quetin-Leclercq J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*. 2004; 65(8):1165-1171.
25. Ngadjui BT, Folefoc GN, Keumedjio F, Dengo E, Sondengam BL, Connolly J. D. Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the steam bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*. 1999; 51:171-174.
26. El Babili F, Moulis C, Bon M, Respaud M, Fouraste I. Three furano-diterpenes from the bark of *Croton campestris*. *Phytochemistry*. 1998; 48 (1): 165-169.
27. El Babili F, Fabre N, Moulis C, Fouraste I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fisioterapia*. 2006; 77:384-387.
28. Peres M, Delle Monache F, Bella Cruz A, Pizzolatti M, Yunes R. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 1997; 56:223-226.

29. Peres M, Pizzolatti M, Yunes R, Delle Monache F. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. *Phytochemistry*. 1998; 49(1):171-174.
30. Cai Y, Chen Z, Phillipson J. Diterpenes from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*. 1993; 32(3):755-760.
31. Silva R, Oliveira F, Cunha K, Maia J, Maciel M, Pinto A, Nascimento N, Santos F, Rao V. Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. *Vascul Pharmacol*. 2005; 43:11-18.
32. Pornpakakul S, Suwancharoen S, Chonvanich O, Roengsuman S. Seco-kaurane skeleton diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Chem of Nat Prod*. 2012; 48(4):583-586
33. Minh PT, Ngoc PH, Quang DN, Hashimoto T, Takaoka S, Asakawa Y. A novel *ent*-kaurane diterpenoid from the *Croton tonkinensis* GAGNEP. *Chem Pharm Bull*. 2003; 51(5):590-591.
34. Giang PN, Jin H.Z, Son PT, Lee JH, Hong YS, Lee JJ. *ent*-Kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS-induced NF- κ B activation and NO production. *J Nat Prod*. 2003; 66(9):1217-1220.
35. Minh PT, Ngoc PH, Taylor WC, Cuong NM. A new *ent*-kaurane diterpenoid from *Croton tonkinensis* leaves. *Fitoterapia*. 2004; 75(6):552-556.
36. Giang PM, Son PT, Lee JJ, Otsuka H. Four *ent*-kaurane-type diterpenoids from *Croton tonkinensis* GAGNEP. *Chem Pharm Bull*. 2004; 52(7):879-882.
37. Giang PM, Son PT, Hamada Y, Otsuka H. Cytotoxic diterpenoids from Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis* GAGNEP. *Chem Pharm Bull* 2005, 53(3):296-300.

38. Palazzino G, Federici E, Rosoanaivo P, Galeffi C, Delle Monache F. 3,4-seco diterpenes of *Croton geayi*. Gazz Chim Ital. 1997; 127:311-314.
39. Mohamed LE, El Nur EBE, Choudhary MI, Khan SN. Bioactive Natural Products from Two Sudanese Medicinal Plants *Diospyros mespiliformis* and *Croton zambesicus*. Rec Nat Prod 2009; 3(4):198-203.
40. Santos HS, Barros FWA, Albuquerque MRJ, Bandeira PN, Pessoa C, Braz-Filho R, Monte JQF, Leal-Cardoso JH, Telma LG, Lemos TLG. Cytotoxic Diterpenoids from *Croton argyrophylloides*. J Nat Prod 2009; 72(10):1884-1887.
41. Thongtan J, Kittakoop P, Ruangrunsi N, Saenboonrueng J, Thebtaranonth Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-seco-kaurane diterpenes from *Croton kongensis*. J Nat Prod. 2003; 66(6):868-70.
42. Chan W, Prince E, Manchand P, Springer J, Clardy J. The structure of crotofolin A, a diterpene with a new skeleton. J Am Chem Soc. 1975; 97(15):4437-4439.
43. Burke B, Chan W, Pascoe K, Blount J, Manchand P. The structure of crotofolin E, a novel tricyclic diterpene from *Croton corylifolius*. Tetrahedron Lett. 1979; 36:3345-3348.
44. Jogia MK, Andersen RJ, Parkanyi L, Clardy J, Dublin HT, Sinclair ARE. Crotofolane diterpenoids from the African shrub *Croton dichogamus* Pax. J. Org Chem. 1989; 54(7):1654-1657.
45. Tchissambou L, Chiaroni A, Riche C, Khuong-Huu F. Crotofolifuran and crotohaumanoxide, new diterpenes from *Croton haumanianus*. J Leonard. Tetrahedron. 1990; 46(15):5199-5202.

46. Kawakami S, Matsunami K, Otsuka H, Shinzato T, Takeda Y, Kawahata M, Yamaguchi K. A crotofolane-type diterpenoid and a rearranged nor-crotofolane-type diterpenoid with a new skeleton from the stems of *Croton cascarilloides*. *Tetrahedron Lett.* 2010; 51(33):4320-4322.
47. Mulholland DA, Langat MK, Crouch NR, Coley HM, Mutambi EM, Nuzillard JM. Cembranolides from the stem bark of the southern African medicinal plant, *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry.* 2010; 71:1381-1386.
48. Roengsumran S, Achayindee S, Petsom A, Pudhom K, Singtothong P, Surachetapan C, Vilaivan T. Two new cembranoids from *Croton oblongifolius*. *J Nat Prod.* 1998; 61:652-654.
49. Roengsumran S, Singtothong P, Pudhom K, Ngamrochanavanich N, Petsom A, Chaichantipyuth C. Neocrotocebranal from *Croton oblongifolius*. *J Nat Prod.* 1999; 62:1163-1164.
50. Thuong PT, Dao TT, Pham TH, Nguyen PH, Le TV, Lee KY, Oh WK. Crotonkinensins A and B, diterpenoids from the Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*. *J Nat Prod.* 2009; 72:2040–2042.
51. Adelekan AM, Prozesky EA, Hussein AA, Ureña LD, van Rooyen PH, Liles DC, Meyer JJ, Rodríguez B. Bioactive diterpenes and other constituents of *Croton steenkampianus*. *J Nat Prod.* 2008; 71(11):1919-1922.
52. Barbosa PR, Fascio M, Martins D, Guedes MLS, Roque NF. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). *Biochem Syst Ecol.* 2003; 31:307-308.
53. Maciel MAM, Pinto AC, Brabo SN, Silva MN. Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry.* 1998; 49(3):823-828.

54. Giang P M, Lee JJ, Son PT. Flavonoid glucosides from the leaves of *Croton tonkinensis* Gagnep. Euphorbiaceae. J Chem. 2004; 42(1):125-128.
55. Suárez AI, Chávez K, Delle Monache F, Vásquez L, Orsini G, Delannoy D, Compagnone RS. New 3,4-seco *ent*-kaurenes from *Croton caracasana* flowers. Nat Prod Comm. 2008; 3(3):319-322.
56. Suárez AI, Tapias E, Compagnone RS, Tillett S, Díaz B, Canelon D, Blanco Z. Chemical constituents from *Croton huberi*. Revista Facultad de Farmacia. 2006; 68(1-2):14-18.
57. Zou GA, Su ZH, Zhang HW, Wang Y, Yang JS, Zou ZM. Flavonoids from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. Molecules. 2010; 15:1097-1102.
58. Toscano V, Sobral Da Silva M, Agra M, da Silva R, Barbosa J, Braz R. Alkaloids and diterpenes from *Croton moritibensis*. Pharm Biol. 2004; 42(1):62-67.
59. Barbosa PS, Abreu AS, Batista EF, Guilhon GMSP, Müller AH, Arruda M.S.P, Santos LS, Arruda AC, Secco RS. Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. Biochem Syst Ecol. 2007; 35:887-890.
60. Suárez AI, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Tillett S, Delle Monache F, Di Giulio C, Bruges G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. J Ethnopharmacol. 2003; 88:11-14.
61. Suárez AI, Compagnone RS, Morale A, Pérez P, Mendoza R, Arvelo F, Ramírez J, Galindo I. Cytotoxic and proapoptotic activity of *ent*-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. Cancer Lett. 2005; 218:109-116,

62. Suárez AI, Vásquez LJ, Taddei A, Arvelo F, Compagnone RS. Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. J Essent Oil-Bear. Plants. 2008, 1(2):208-213.
63. Suárez AI, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone RS, Arvelo F. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. J Nat Prod. 2004; 18(5):421-426.
64. Mijares M, Martínez G, Chirinos P, Suárez A, Compagnone R, Blanco. Z, De Sanctis J. Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato de forbol miristato. Rev Fac Farmacia-UCV. 2012; 75(1). (En prensa).
65. Suárez AI, Vasquez LJ, Manzano MA, Compagnone RS. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. Flavour Fragr J. 2005; 20(6):611-614
66. Suárez AI, Blanco Z, Compagnone R, Salazar M, Zapata V, Alvarado, C. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. J Ethnopharmacol. 2006; 105:99-101.
67. Torrico F, Cepeda M, Guerrero G, Meléndez F, Blanco Z, Canelón DJ, Díaz B, Compagnone RS, Suárez AI. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. Braz J Pharmacog. 2007; 17(2):166-169.
68. Suárez AI, Compagnone RS, Tomassi A, Vasquez LJ. Essential oil composition of *Croton huberi* from Venezuela. J Essent Oil Bear PI. 2006; 9(1):75-80.

69. Suárez AI, Rivas D, Compagnone RS, Castillo A, Blanco Z. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Croton matourensis*. Rev Fac de Farmacia-UCV. 2009; 72(2):11-17.
70. Suárez AI, Chavez K, Mateu E, Orsini G, Compagnone RS, Arvelo F. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. Rec Nat Prod. 2010; 4(2):101-108.
71. Suárez AI, Chávez K, Mateu E, Compagnone RS, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis J. Cytotoxic activity of *seco ent*-kaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. Nat Prod Comm. 2009; 4(11):1547-1550.
72. Suárez AI, Mateu E, Chávez K, Riina R, Compagnone RS, Delle Monache F. New 3,4-*seco-ent*-kaurene dimers from *Croton micans*. Nat Prod Comm. 2012; 7(1):5-8.
73. Suárez AI, Oropeza M, Vásquez LJ, Tillett S, Compagnone RS. Chemical composition of the essential oil of *Croton gossypiifolius* from Venezuela. Nat Prod Comm. 2011; 6(1):97-99.
74. Márquez G. Estudio fitoquímico y farmacológico de los extractos apolares de *Croton pungens*. [Tesis]. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Química; 2011.
75. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod. 2003; 66:1022-1037.
76. Cragg GM, Newman DJ. Plants as source of anticancer agents. J Ethnopharmacol. 2005; 100:72-79.

77. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and anti-tumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc. 1971; 93(9):2325-27.
78. Rowinsky EK, Onetto N, Canetta RM, Arbuck SG, Taxol-the 1st of the texanes, an important new class of anti-tumor agents. Semin Oncol. 1992; 19:646-62.
79. Srivastava V, Singh A, Kumar J, Gupta M, Khanuja S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. Bioorg Med Chem. 2005; 13:5892-5908.
80. Creemers GJ, Bolis G, Gore M, Scarfone G, Lacave AJ, Guastalla JP, Despax R, Favalli G, Kreinberg R, VanBelle S, Hudson I, Verweij J, Huinink WWT. Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: Results of a large European phase II study. J Clin Oncol. 1996; 14:3056-3061.
81. Fuchs C, Mitchell EP, Hoff PM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. Cancer Treat Rev. 2006; 32(7):491-503.
82. Harvey AL. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery. Trends Pharmacol Sci. 1999; 20(5):196-198.
83. Pettit GR, Singh SB, Niven ML, Hamel E, Schmit JM. Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from *Combretum caffrum*. J Nat Prod. 1987; 50:119-120.
84. Ohsumi K, Nakagawa R, Fukuda Y, Hatanaka T, Morinaga Y, Nihei Y, Ohishi K, Suga Y, Akiyama Y, Tsuji T. New combretastatin analogues effective

- against murine solid tumors: design and structure-activity relationship. *J Med Chem.* 1998; 41(16): 705-706.
85. Pettit GR, Singh SB, Boyd MR, Hamel E, Pettit R, Schmit JM, Hogan F. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5 and A-6. *J Med Chem.* 1995; 38(10):1666-1672.
86. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.
87. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986; 89(2):271-277.
88. Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of tests methods. *Planta Med* 1987; 53(5):395-398.
89. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 3. 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. Appendix A, p. A.1.
90. Shiming L, Chih-Yu L, Chi-Tang H. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(12):4176–4185.
91. Henrick CA, Jefferies P R. The chemistry of the Euphorbiaceae. New flavones from *Ricinocarpus stylosus*. *Aust J Chem.* 1964, 17:934-942.
92. Tatum JH, Berry RE. Six new flavonoids from *Citrus*. *Phytochemistry.* 1972; 11:2283-2288.

93. Ferracin RJ, Das GF, Da Silva MF, Fernandes JB, Viera PC. Flavonoids from the fruits of *Murraya paniculata*. *Phytochemistry*. 1998; 47(3):393-396.
94. Reynolds WF, McLean S, Poplawski J, Enriquez RG, Escobar LI, Leon I. Total assignment of ¹³C and ¹H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ¹H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron*. 1986; 42(13):3419-3428.
95. Gaussian 09, Revision A.1. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
96. Yanai T, Tew DP, Handy NC. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-Attenuating Method (CAM-B3LYP). *Chem Phys Lett*. 2004; 393:51-57.
97. Hehre WJ, Radom L, Schleyer PvR, Pople JA. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. New York: Wiley; 1986. 548 pp.
98. Ditchfield R. Self-consistent perturbation theory of diamagnetism. *Mol Phys*. 1974; 27(4):789-807.
99. Wolinski K, Hinton JF, Pulay P. Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *J Am Chem Soc*. 1990; 112(23):8251-8260.
100. Ośmiałowski B, Kolehmainen E, Gawinecki R. GIAO/DFT calculated chemical shifts of tautomeric species. 2-Phenacylpyridines and (**Z**)-2-(2-hydroxy-2-phenylvinyl)pyridines. *Magn Reson Chem*. 2001; 39(6):334-340.

101. Miertus S, Scrocco E, Tomasi J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem Phys*. 1981; 55(1):117-129.
102. García PA, Braga de Oliveira A, Batista R. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*. 2007; 12:455-483.
103. Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica Orgánica*. 2a ed. Caracas: Universidad Central de Venezuela-Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico; 2002. p. 294.
104. Batista R, García PA, Castro MA, del Corral JMM, San Feliciano A, de Oliveira A. New oxidized *ent*-kaurane and *ent*-norkaurane derivatives from kaurenoic acid. *J Braz Chem Soc*. 2007; 18(3):622-627.
105. Bruno M, Rosselli S, Pibiri S, Piozzi F, Bondi ML, Simmonds MSJ. Semisynthetic derivatives of *ent*-kauranes and their antifeedant activity. *Phytochemistry*. 2001; 58(3):463-474.
106. Sun HD, Huang SX, Han QB. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Nat Prod Rep* 2006; 23:673-698.
107. He F, Xiao WL, Pu JX, Wu YL, Zhang HB, Li XN, Zhao Y, Yang LB, Chen GQ, Sun HD. Cytotoxic *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon sinuolata*. *Phytochemistry*. 2009; 70(11-12):1462-1466.
108. Oliveira AB, Hanson JR, Takahashi JA. The biotransformation of *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oic acid and its methyl ester by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry*. 1995; 40(2):439-442.

109. Fraga BM, Guillermo R, Hernández MG. The microbiological transformation of two 15 β -hydroxy-*ent*-kaurene diterpenes by *Gibberella fujikuroi*. *J Nat Prod.* 2004; 67(1):64-69.
110. Henrick CA, Jefferies PR. The chemistry of Euphorbiaceae VII. The diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. *Aust J Chem.* 1964; 17:915-933.
111. Mori K, Shiozaki M, Matsui M. Synthesis of kaurane derivatives with an oxygen function in ring A. *Agric Biol Chem.* 1972; 36(13):2539-2546
112. Bellino A, Venturella P. Some transformations of episideridiol in the synthesis of naturally occurring tetracyclic kaurene diterpenes. *J Nat Prod.* 1988; 51(6):1246-1248.
113. Corey EJ, Singh AK, Bakshi RK. Total synthesis of (\pm)-atractyligenin. *J Am Chem Soc.* 1987; 109(20): 6187-6189
114. Corey EJ, Perez AG, Lazerwith SE. An enantioselective synthetic route to atractyligenin using the oxazaborolidine-catalyzed reduction of β -silyl- or β -stannyl-substituted α,β -enones as a key step. *J Am Chem Soc.* 1997; 119(49):11769-11776.
115. Britton RA, Piers E, Patrick BO. Total synthesis of (\pm)-13-methoxy-15-oxozoapatlin, a rearranged kaurane diterpenoid. *J Org Chem.* 2004; 69(9):3068-3075.
116. Alonso R, Gomis H, Taddei A, Sajo C. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic diterpene derivatives obtained from (-)-kaur-9(11), 16-dien-19-oic acid against human cancer cell lines. *Lett Drug Des Discov.* 2005; 2(4):255-259.

117. Tao JC, Tian GQ, Zhang YB, Fu YQ, Dai GF, Wu Y. Synthesis and bioactivity of isosteviol derivatives: a facile method for preparation of *ent*-16 α -hydroxy-15 β -hydroxymethylbeyeran-19-oic acid. *Chinese Chem Lett.* 2005; 16(11):1441-1444.
118. Estevez-Braun A, Hueso-Falcón I, Girón N, Velasco P, Amaro L, Ravelo AG, de las Heras B, Hortelano S. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of *ent*-kaurane derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18:1724-1735.
119. Alves TMA, Chaves PPG, Santos LMST, Nagem TJ, Murta SMF, Geravolo IP, Romanha AJ, Zani CL. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 1995; 61(1):85-87.
120. Guhl F. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev Biomed,* 2009; 20:228-234.
121. Da Costa FB, Albuquerque S, Vichnewski W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspillioides* with trypanomisdal activity. *Planta Med* 1996; 62(6):557-559.
122. Takahashi JA, Vieira HS, Silva EA, Boaventura MAD, de Oliveira AB, Chiari E. Preparation and activity of diterpenoids against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Farmacog.* 2002; 12:118-120.
123. Boaventura MAD, Vieira HS, Takahashia JA, Oliveira AB, Chiaric E. Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. *J Braz Chem Soc.* 2002; 13(2):151-157.
124. Garcia-Granados A, Linan E, Martínez A, Rivas F, Mesa-Valle CM, Castilla-Calvente JJ, Osuna A. In vitro action of *ent*-manoyl oxides against *Leishmania donovani*. *J Nat Prod.* 1997; 60(1):13-16.

125. Loukaci A, Kayser O, Bindseil K.U, Siems K, Frevert J, Abreu PM. New trichothecenes isolated from *Holarrhena floribunda*. J Nat Prod. 2000; 63(1):52-56.
126. Trost BM, Fleming I. Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry. Vol. 8. 1a ed. Oxford: Elsevier; 1991. p. 536.
127. Miller AEG, Bliss JW, Schwatzman LH. Reductions with dialkylaluminum hydrides. J Org Chem. 1959; 24(5):627-630.
128. Zakharin LI, Khorlina IM. Reduction of esters of carboxylic acids into aldehydes with diisobutylaluminium hydride. Tetrahedron Lett. 1962; 3(14):619-620.
129. Laue T, Plagens A. Named organic reactions. 2a ed. England: John Wiley & Sons Ltd; 2005. P. 230-232.
130. Thomas JC. Thionation with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane. J Org Chem. 2002; 67(18):6461-6473
131. Brillon D. Recent developments in the area of thionation methods and related synthetic applications. Sulfur Rep. 1992; 12(2):297-338.
132. Cava MP, Levinson MI. Thionation reactions of Lawesson's reagents. Tetrahedron. 1985; 41(22):5061-5087.
133. Krstić NM, Bjelaković NS, Dabović MM, Pavlović VD. Thionation of some α,β -unsaturated steroidal ketones. Molecules. 2010; 15:3462-3477.
134. Kvasnica M, Rudovska I, Cisarova I, Sarek J. Reaction of lupane and oleanane triterpenoids with Lawesson's reagent. Tetrahedron. 2008; 64:3736-3743.