



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**OBTENCIÓN DE TIAZO-OCRACEOLIDAS CON  
POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO CONTRA CÉLULAS  
CANCEROSAS DE MAMA.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**JENNER ANTONIO US MARTIN**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y

**OBTENCIÓN DE TIAZO-OCRACEOLIDAS  
CON POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO CONTRA  
CÉLULAS CANCEROSAS DE MAMA.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**JENNER ANTONIO US MARTIN**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**





Mérida, Yuc., 28 de enero de 2019  
Oficio Num.. PICQB/005/2019

**Asunto:** Autorización de digitalización

La tesis "Obtención de tiazolochraceolidas con potencial antiproliferativo contra células cancerosas de mama" presentada por el LQ. Jenner Antonio Us Martín, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis

Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón

Dr. Ángel Daniel Herrera España

**Sinodales:**

Dr. Gumersindo Mirón López

Dr. Rubén Marrero Carballo

Dra. Adriana Esparza Ruíz

Firmas

Adriana Esparza Ruiz

**ATENTAMENTE**  
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"

DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS  
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo  
MRSC



## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A todos los que contribuyeron para que fuese posible la realización de este trabajo, comenzando con las personas responsables de mi formación académica durante estos dos años de la maestría, hasta las personas que de manera más estrecha compartieron ideas y experiencia para la finalización de este documento.

A mis Directores de Tesis el **Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón** y el **Dr. Ángel Daniel Herrera España** por sus conocimientos, por su paciencia, por su apoyo y por su confianza al darme la oportunidad de formar parte de este proyecto.

Al Comité Revisor y H. Síno, **Dr. Gumersindo Mirón López, Dr. Rubén Marrero Carballo** y a la **Dra. Adriana Esparza Ruíz** por el tiempo dedicado en la revisión, corrección y recomendaciones realizadas para la mejora de este trabajo.

A la **M. en C. Sara Medina Gómez** por la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear presentes en este documento, así como los conocimientos brindados en esta técnica.

Al **M. en C. Manlio Joaquín Graniel Sabido**, la **M. en C. Jasmín Salazar Mendoza, Q. Marcelo Sosa Balam, Q Dianela Lara Nah**, y la **p.Q. Neira Noemi Us Martin** por su apoyo incondicional durante mi formación, sus consejos y conocimientos durante la realización de este trabajo.

A las autoridades de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán y la por permitir la realización de este trabajo en dichas instalaciones.



El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), bajo la dirección del Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón y el Dr. Ángel Daniel Herrera España, como parte del proyecto de investigación: “Desarrollo de compuestos con actividad antiproliferativa a partir de terpenoides y celastroloides aislados de Celastráceas de Yucatán.” Con registro SISTPROY en trámite financiado por la Facultad de Química con recursos propios.



## RESUMEN

Los triterpenos pentacíclicos hoy en día han tomado relevancia debido a su amplio espectro de actividades biológicas que presentan, e incluyen la toxicidad frente a células cancerosas. La ochraceolida A es un triterpeno de tipo lupano y con actividad citotóxica significativa frente a un número considerable de líneas celulares. Se ha encontrado que algunos derivados de triterpenos pentacíclicos que contienen algún heterociclo fusionado al anillo A de su esqueleto, mejoran la actividad citotóxica contra diversas líneas tumorales.

En el presente estudio se sintetizaron una serie de amidas alifáticas (6) y una serie de amidas aromáticas (9) derivadas de 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A. Todos los compuestos fueron identificados por EM, pf, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

La evaluación de la actividad contra las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa reveló que la introducción de un anillo tiazólico en el anillo A de la Ochraceolida A provocó un aumento en la actividad contra estas líneas celulares, pero con menoscabo de la selectividad. La conversión a amida del grupo amino en posición 2 del anillo tiazólico impacta en forma negativa la actividad citotóxica y antiproliferativa contra las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa. La actividad citotóxica y antiproliferativa es potenciada al introducir un segundo heterociclo  $\pi$  excedente desactivado al sistema aromático amida N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A).

## Abstract

Pentacyclic triterpenes are relevant natural products due their broad spectrum of biological activities, including activity against cancer cells. Ochraceolide A is a lupanic triterpene with significant cytotoxicity against several cancer cells. It has been reported that fusion of a heterocyclic ring at ring A of anticancer pentacyclic triterpenes increasing their cytotoxic activity.

In this work were synthesized 15 amides from 2'-aminotiazole[3,2-d]ochraceolide A. The amides corresponded to two series, one aliphatic (six) and one aromatic (nine). All compounds were characterized by MS, NMR-<sup>1</sup>H, NMR-<sup>13</sup>C, mp.

The cytotoxic tests performed using the cancer the cell lines MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa, revealed that the fusion of a thiazolic ring at A ring of ochraceodlide A increased the biological activity, while the selectivity decreasing. The transformation of amino group into amide group provokes the losing of cytotoxic and antiproliferative activities against the cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and SiHa. The introduction of a deactivated  $\pi$ -excedent heterocycle into the amide derivative, dramatically raise the antiproliferative and cytotoxic activities.



## Índice

	Pag.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	3
Triterpenos pentacíclicos como agentes anticancerosos	3
Ochraceolidas A–E	5
Modificación estructural de triterpenos pentacíclicos. Fusión de heterociclos al anillo A	7
<b>OBJETIVOS</b>	13
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
Modificación de triterpenos	16
Bromación de la ochraceolida A	16
Síntesis de 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A	16
Síntesis de <i>N</i> -(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) amidas alifáticas	16
Síntesis de amidas aromáticas	18
Evaluación de las actividades citotóxica y antiproliferativa	21
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	23
Obtención de 2-bromo ochraceolida A	23
Obtención de 2-aminotiazolochraceolida A	28
Síntesis de amidas alifáticas	37
Síntesis de amidas aromáticas	45
Elucidación estructural del compuesto <i>N</i> -(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida	54
Elucidación estructural del compuesto <i>N</i> -(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) benzamida	58
Actividad biológica exhibida de los compuestos obtenidos	64
<b>CONCLUSIONES</b>	69
<b>APENDICE</b>	71
<b>REFERENCIAS</b>	73



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la influencia de los productos naturales como fuentes de nuevos fármacos ha tenido gran impacto. Recientemente, los triterpenos pentacíclicos han tomado relevancia debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, que incluyen la toxicidad frente a células cancerosas.<sup>1,2</sup>

Un amplio número de estudios ha demostrado que los triterpenos, con esqueletos de tipo lupano, oleanano y ursano, tienen gran potencial en el tratamiento del cáncer.<sup>3,4</sup> Sin embargo, en muchos casos las concentraciones efectivas no son las adecuadas para su uso terapéutico. Por consiguiente, se ha tratado de encontrar derivados que mejoren sus propiedades farmacológicas e índice terapéutico, como es el caso de los derivados que contienen un heterociclo fusionado al anillo A de algún esqueleto triterpénico. De forma particular, la introducción de anillos de tipo tiazol, así como los derivados de estos con grupos lipofílicos en la posición *N*, presentan actividades anticancerígenas ( $CI_{50} < 10.0 \mu M$ ), observándose una mejora en la actividad en comparación con los triterpenos de partida.<sup>5</sup>

Ochraceolida A es un triterpeno de tipo lupano y con actividad citotóxica frente a un número considerable de líneas celulares.<sup>6,7</sup> Con el fin de generar nuevos agentes anticancerosos se planteó como objetivo de este trabajo modificar la actividad biológica de la Ochraceolida A, mediante la adición de un anillo 2-aminotiazólico fusionado al anillo A.

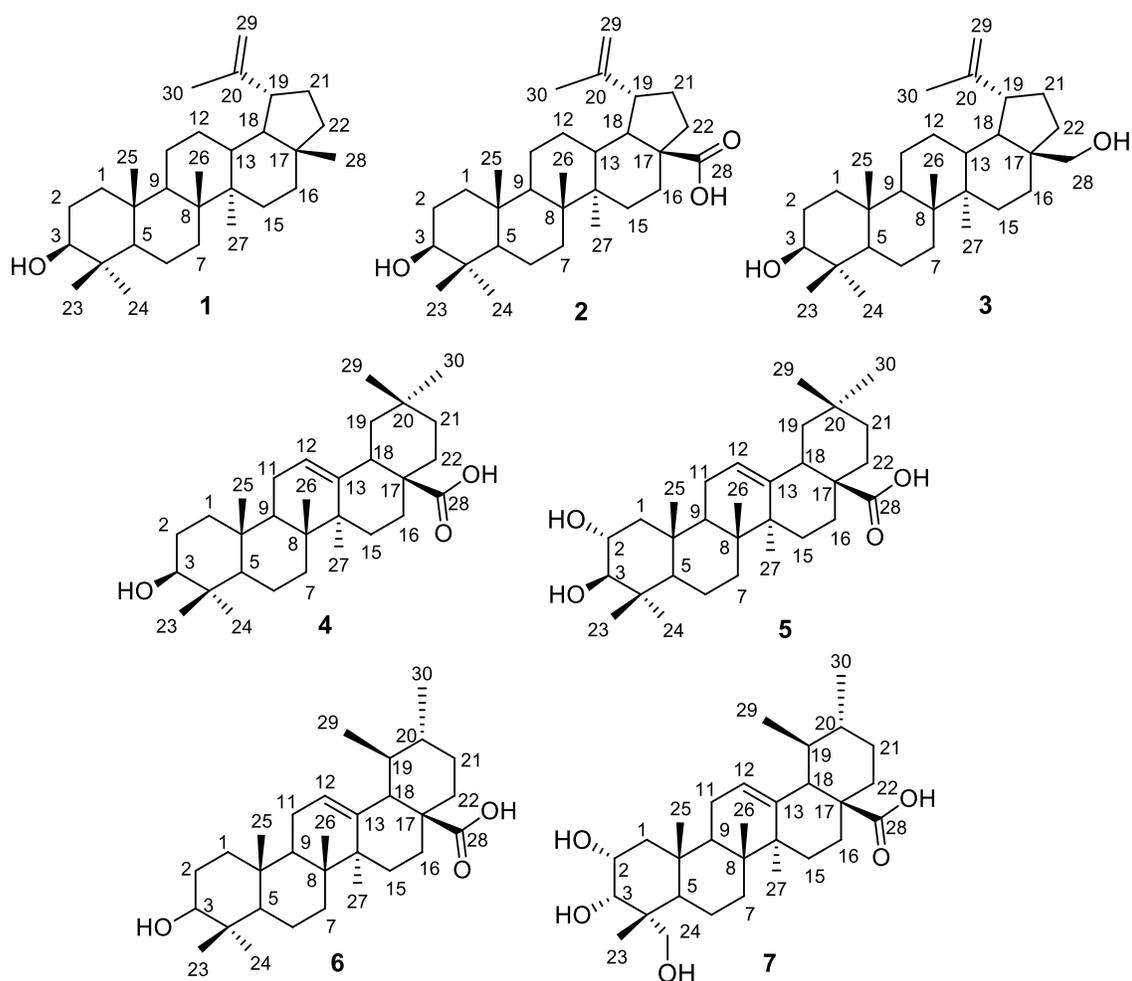


## ANTECEDENTES

### **Triterpenos pentacíclicos como agentes anticancerosos**

Los terpenoides son un grupo de metabolitos secundarios muy numerosos, hoy en día se cuenta con una amplia variedad de compuestos de esta naturaleza.<sup>1,2,8</sup> Entre los terpenoides se encuentran los triterpenos, los cuales poseen 30 átomos de carbono en su estructura base; los más abundante son aquellos con esqueleto de tipo dammarano, lupano, germanicano, oleano, taraxerano, ursano, glutinano y friedelano.<sup>2</sup> Los triterpenos pentacíclicos han tomado relevancia debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan.<sup>3</sup> Estos metabolitos secundarios han demostrado tener propiedades antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria y antitumoral, se ha demostrado que aquellos con esqueletos de tipo lupano, oleanano y ursano tienen un gran potencial en el tratamiento del cáncer.<sup>1,3-4,9-12</sup>

A continuación, se describen algunos de los terpenoides más estudiados que poseen estos esqueletos. Entre los triterpenos del tipo lupano se puede encontrar al lupeol (1), ácido betulínico (2) y betulina (3). Ejemplos representativos de triterpenos de tipo oleano son el ácido oleanólico (4) y el ácido malístico (5). Entre los de tipo ursano destacan el ácido ursólico (6) y el ácido asiático (7).<sup>1</sup> Estos compuestos se caracterizan por poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas y anticancerígenas.<sup>1,2</sup> De manera particular, el ácido betulínico, la betulina y lupeol presentan actividad anticancerígena y antiinflamatoria.<sup>3,8</sup>



**Figura 1.** Estructuras de triterpenos pentacíclicos con esqueletos de tipo lupano: lupeol (1), ácido betulínico (2) y betulina (3); oleanano: ácido oleanólico (4) ácido malístico (5); y ursano: ácido ursólico (6) y el ácido asiático (7).

El lupeol (1) presenta diversas actividades biológicas contra la inflamación, artritis, diabetes, hipercolesterolemia, enfermedades del corazón, toxicidad renal y toxicidad hepática.<sup>9,13-18</sup> Se ha encontrado que suprime la proliferación, invasión y metástasis en varios tipos de cáncer de mama y leucemia linfoblástica. Un estudio demostró que el lupeol induce la apoptosis de líneas celulares de cáncer de diversos orígenes histopatológicos, incluyendo leucemia linfoblástica (T-CEM,  $CI_{50} = 27.6 \mu M$ ), carcinoma de mama (MCF-7,  $CI_{50} = 50 \mu M$ ), carcinoma de pulmón (A-549,  $CI_{50} = 50 \mu M$ ), mieloma múltiple (RPMI 8226,  $CI_{50} = 37.5 \mu M$ ), carcinoma de cuello de útero (HeLa,  $CI_{50} = 50 \mu M$ ), y melanoma (G361,  $CI_{50} = 50 \mu M$ ).<sup>19-20</sup>

El ácido betulínico (2) posee actividad anti-VIH y anticáncer; es un agente citotóxico específico del melanoma, induciendo la apoptosis de este tipo de células en cultivos celulares e inhiben su crecimiento.<sup>11,21-23</sup> La betulina (3) tiene propiedades antimicóticas, antimicrobianas, antiinflamatoria, antiviral, hepatoprotectora,

gastroprotectora y anticancerígena. Modera la biosíntesis del colesterol y de los ácidos grasos, ha mostrado eficacia en el tratamiento de la diabetes tipo II mediante la promoción de la sensibilidad a la insulina de las células.<sup>24-29</sup> El ácido oleanólico (**4**) actúa sobre diversas etapas del desarrollo tumoral, inhibe el proceso de iniciación de tumores; y se demostró que induce la apoptosis de células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-453 con  $CI_{50}$  de 4.0 y 6.5  $\mu$ M, respectivamente).<sup>30,31</sup> El ácido malístico (**5**) induce apoptosis en células tumorales ( $CI_{50} = 25 \mu$ M) mediante la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Por otra parte, se ha visto que este compuesto inhibe la actividad de la DNA topoisomerasa, estrategia que ha sido empleada durante muchos años en el tratamiento de varios tipos de cánceres.<sup>32</sup>

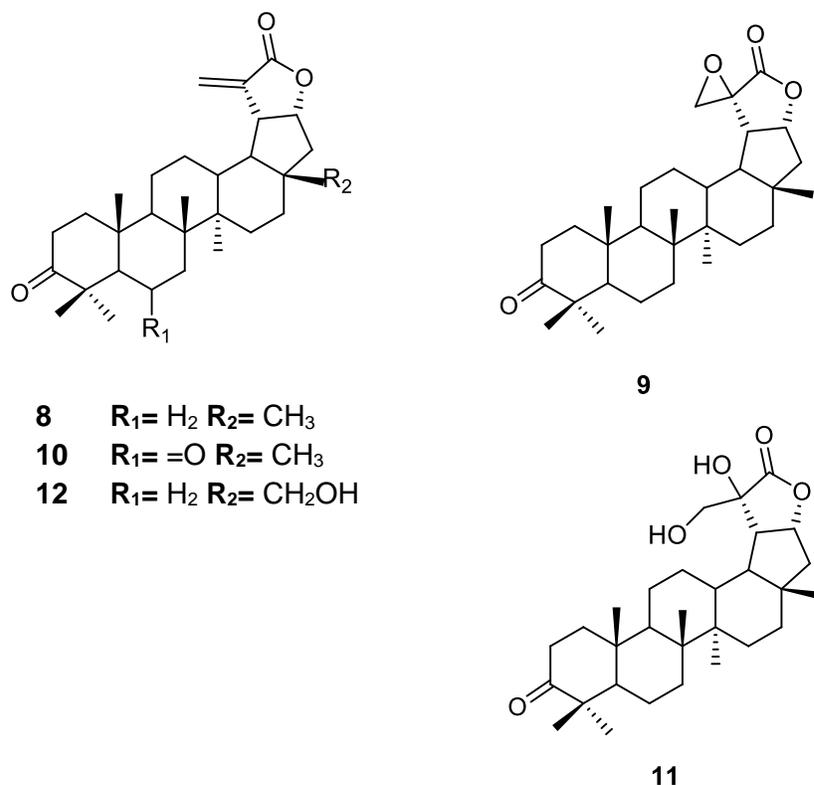
El ácido ursólico (**6**) ha mostrado tener actividades antiproliferativas contra células de cáncer de hígado (HepG2,  $CI_{50} = 87.3 \mu$ M) y de cáncer de mama (MCF7,  $CI_{50} = 14.3 \mu$ M).<sup>33</sup> Así como suprimir la proliferación de una gran variedad de células tumorales, inducir la apoptosis, la metástasis y la angiogénesis en modelos de cáncer con animales.<sup>34</sup> *In vitro*, ha demostrado inducir la apoptosis de células de leucemia humana (HL-60 y K562,  $CI_{50} = 15$  y  $10 \mu$ M, respectivamente), células de cáncer de endometrio humano (SNG-II,  $CI_{50} = 50 \mu$ M), células de melanoma humano (M4Beu,  $CI_{50} = 10 \mu$ M), células de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP,  $CI_{50} = 55$  y  $45 \mu$ M, respectivamente) y células de queratinocitos humanos (Ha-CaT,  $CE_{50} = 12.5 \mu$ M).<sup>35-42</sup>

El ácido asiático (**7**) ha demostrado reducir la inflamación, inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis a través de una vía dependiente de las mitocondrias.<sup>43</sup> Ha mostrado una inhibición del crecimiento celular de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231,  $CI_{50} = 5.9$  y  $8.1 \mu$ M, respectivamente). Su eficacia anticancerígena se atribuye a su capacidad para inhibir el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, p38 MAP y ERK quinasas en una variedad de células tumorales.<sup>44-46</sup> Se ha visto que induce la muerte celular apoptótica en el hepatoma humano y las células de glioma maligno a través de la mejora de la liberación de calcio intracelular e inhiben las células de cáncer de colon (HT-29,  $CI_{50} = 75.7 \mu$ M) *in vitro*.<sup>47-49</sup>

### Ochraceolidas A – E

Las ochraceolidas A-E (**8-12**, Figura 2) son triterpenos de tipos lupano que presentan una  $\gamma$ -lactona en el anillo F conocidos como lactonas terpénicas. Fueron aislados inicialmente de la corteza del tallo de *Kokoona ochrarea* (Elm.) Merrill. Adicionalmente, la ochraceolida A (**8**) se ha aislado de los tallos y corteza de *Lophopetalum wallichii* (*Celastraceae*), del tallo de *Cassine xylocarpa* y recientemente de la corteza del tallo de *Elaodendron trichotomum*; estudio en el cual se obtuvo a escala multigramo.<sup>7,50-52</sup> En cuanto a su actividad biológica, se ha evaluado la  $CI_{50}$  de la ochraceolida A contra las líneas celulares cancerosas humanas: leucemia linfocítica (P-388,  $CI_{50} = 0.5 \mu$ M),

carcinoma epidermoide oral humano (KB-3,  $Cl_{50} = 5.9 \mu\text{M}$ ), cáncer de mama (UISO-BCA-1,  $Cl_{50} = 22.1 \mu\text{M}$ ), cáncer de colon (UISO-COL-2,  $Cl_{50} = 15.03 \mu\text{M}$ ), fibrosarcoma humana (HT-1080,  $Cl_{50} = 21.2 \mu\text{M}$ ) y melanoma (UISO-MEL-2,  $Cl_{50} = 18.3 \mu\text{M}$ ).<sup>50</sup> Asimismo, se evaluó su actividad inhibitoria sobre la enzima farnesil transferasa (FPTasa) encontrándose que presenta una  $Cl_{50}$  de  $2.2 \mu\text{M}$ .<sup>7</sup>



**Figura 2.** Estructuras químicas de: ochraceolida A (**8**), ochraceolida B (**9**), ochraceolida C (**10**), ochraceolida D (**11**) y ochraceolida E (**12**).

La ochraceolida B (**9**) resultó ser activa contra las líneas celulares: leucemia linfocítica murina (P-388,  $Cl_{50} = 16.6 \mu\text{M}$ ) y carcinoma epidermoide oral humano (KB-3,  $Cl_{50} = 11.1 \mu\text{M}$ ). La ochraceolida C (**10**) fue activa contra: leucemia linfocítica murina (P-388,  $Cl_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ), carcinoma epidermoide oral humano (KB-3,  $Cl_{50} = 11.7 \mu\text{M}$ ), cáncer de mama (UISO-BCA-1,  $Cl_{50} = 9.6 \mu\text{M}$ ) y cáncer de colon (UISO-COL-2,  $Cl_{50} = 9.4 \mu\text{M}$ ).<sup>50</sup> ochraceolida D (**11**) resultó activa contra las líneas celulares de: cáncer de mama (BC1,  $Cl_{50} \geq 41.1 \mu\text{M}$ ); fibrosarcoma (HT-1080,  $Cl_{50} = 14.7 \mu\text{M}$ ); cáncer de pulmón (LU1  $Cl_{50} \geq 41.1 \mu\text{M}$ ); melanoma (Mel2,  $Cl_{50} \geq 41.1 \mu\text{M}$ ); cáncer de colon (Col-2,  $Cl_{50} \geq 41.1 \mu\text{M}$ ); cáncer epidermoide oral (KB,  $Cl_{50} \geq 41.1 \mu\text{M}$ ); leucemia linfocítica murina (P-388,  $Cl_{50} = 10.2 \mu\text{M}$ ); carcinoma epidermoide (A-431,  $Cl_{50} = 19.5 \mu\text{M}$ ); cáncer de próstata (LNCaP,  $Cl_{50} = 31.8 \mu\text{M}$ ); cáncer de mama dependiente de hormonas (ZR-75-1,  $Cl_{50} \geq 41.1 \mu\text{M}$ ) y glioma (U373,  $Cl_{50} = 8.0 \mu\text{M}$ ).<sup>6</sup> La ochraceolida E (**12**) fue activa contra

fibrosarcoma (HT-1080,  $CI_{50} = 26.2 \mu M$ ), glioblastoma (U373,  $CI_{50} = 18.3 \mu M$ ), melanoma (MEL-2,  $CI_{50} = 25.4 \mu M$ ) y cáncer de mama dependiente de hormonas (ZR-75-1,  $CI_{50} = 40.2 \mu M$ ).<sup>6</sup>

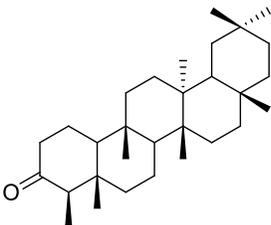
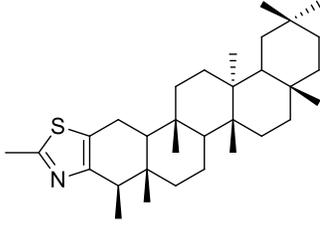
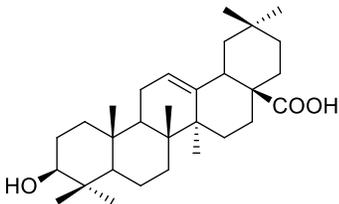
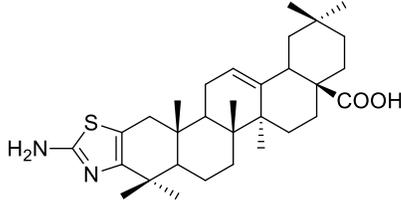
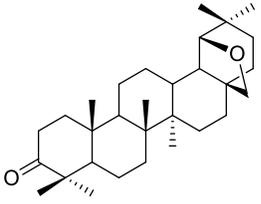
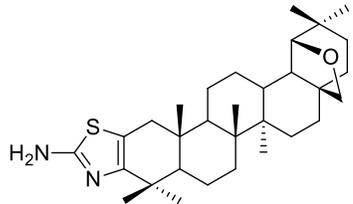
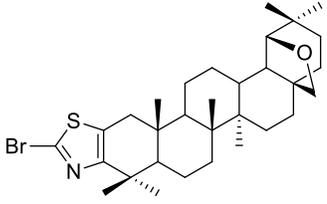
En estos estudios, se destaca que la presencia de una lactona con una insaturación exocíclica en  $\alpha$  en triterpenos de tipo lupano, puede ser de gran importancia para la actividad biológica.

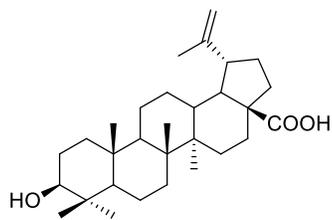
### **Modificación estructural de triterpenos pentacíclicos. Fusión de heterociclos al anillo A.**

Si bien está demostrado que muchos triterpenos pentacíclicos poseen diversas actividades biológicas de interés, en muchos casos las concentraciones efectivas no son lo suficientemente bajas para su uso terapéutico. Por lo cual, en las investigaciones actuales se han sintetizado derivados con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacológicas y su índice terapéutico, para que permitan generar nuevos fármacos. Recientemente, se ha encontrado que algunos derivados de triterpenos pentacíclicos que contienen algún heterociclo fusionado al anillo A de su esqueleto, presentan actividad citotóxica contra diversas líneas tumorales.<sup>53,54</sup> Se ha visto que los compuestos más activos son los que presentan los anillos de tipo indol, pirazol, isoxazol, triazol, pirazina, quinoxalina, pirimidina, triazina y tiazol.<sup>5,55-57</sup> También algunos derivados con anillos de tipo piridina se utilizan como bactericidas, fungicidas y agentes anticancerosos.<sup>58-60</sup> De forma similar, se sabe que los derivados de tiofeno presentan propiedades anticancerígenas y antimicrobianas.<sup>61-63</sup> De forma particular, el anillo tiazólico se encuentra presente en muchos compuestos que exhiben diferentes propiedades entre las que destacan los anticancerígenos, antivirales, antimicrobiano, antiulceroso y antiinflamatorios.<sup>61,64-68</sup>

Respecto a la introducción de anillo tiazólico en el anillo A del triterpeno pentacíclico se ha observado que mejora la actividad biológica como se muestra en las estructuras de la tabla 1.<sup>5,53,54,69,70</sup> Tal es el caso del ácido 2-aminotiazolbetulínico que resultó ser más activo contra células leucémicas ( $CI_{50} 3 \mu M$ ) que su precursor, el ácido betulínico.<sup>54</sup>

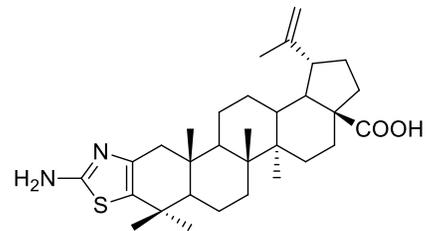
**Tabla 1.**-Triterpenos pentacíclicos con un anillo tiazólico fusionado el anillo A de su estructura.

Triterpeno base	Triterpeno con un anillo tiazólico en el anillo A
	
Friedelina	Tiazofriedelina
	
<p>Ácido Oleanólico Sin selectividad ante PTP1B</p>	<p>Ácido tiazoloeanólico Inhibe a la proteína tirosina fosfatasa PTP1B <math>CI_{50}</math> =1.92 <math>\mu</math>M</p>
	
<p>Alobetulona Citotoxicidad contra la línea celular leucemia linfoblástica aguda (CEM) <math>CI_{50}</math> =250 <math>\mu</math>M</p>	<p>2-aminotiazooalobetulona CEM <math>CI_{50}</math> =85 <math>\mu</math>M</p>
	
	<p>2-bromotiazooalobetulona CEM <math>CI_{50}</math> =150 <math>\mu</math>M</p>

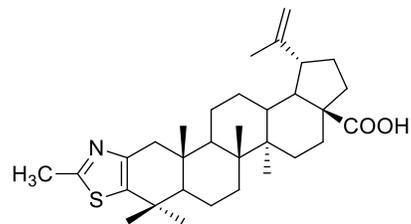


Ácido betulínico

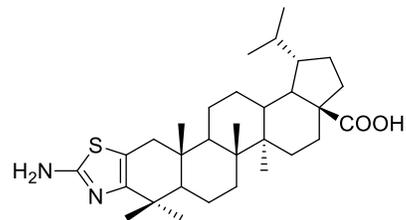
Citotoxicidad contra la línea celular leucemia  
linfoblástica aguda (CEM)  $CI_{50}$  = 250  $\mu$ M



Ácido 2-aminotiazolbetulínico



Ácido 2-metiltiazolbetulínico



Ácido 2-aminotiazolbetulínico

CEM  $CI_{50}$  = 3  $\mu$ M

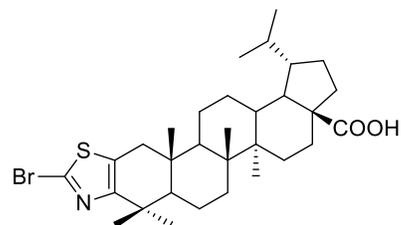
Cáncer de pulmón A549  $CI_{50}$  = 7  $\mu$ M

Cáncer de colon HCT116p53WT  $CI_{50}$  = 4.3  $\mu$ ML

Leucemia mieloide K562  $CI_{50}$  = 4.8  $\mu$ M

Fibroblastos humanos normales

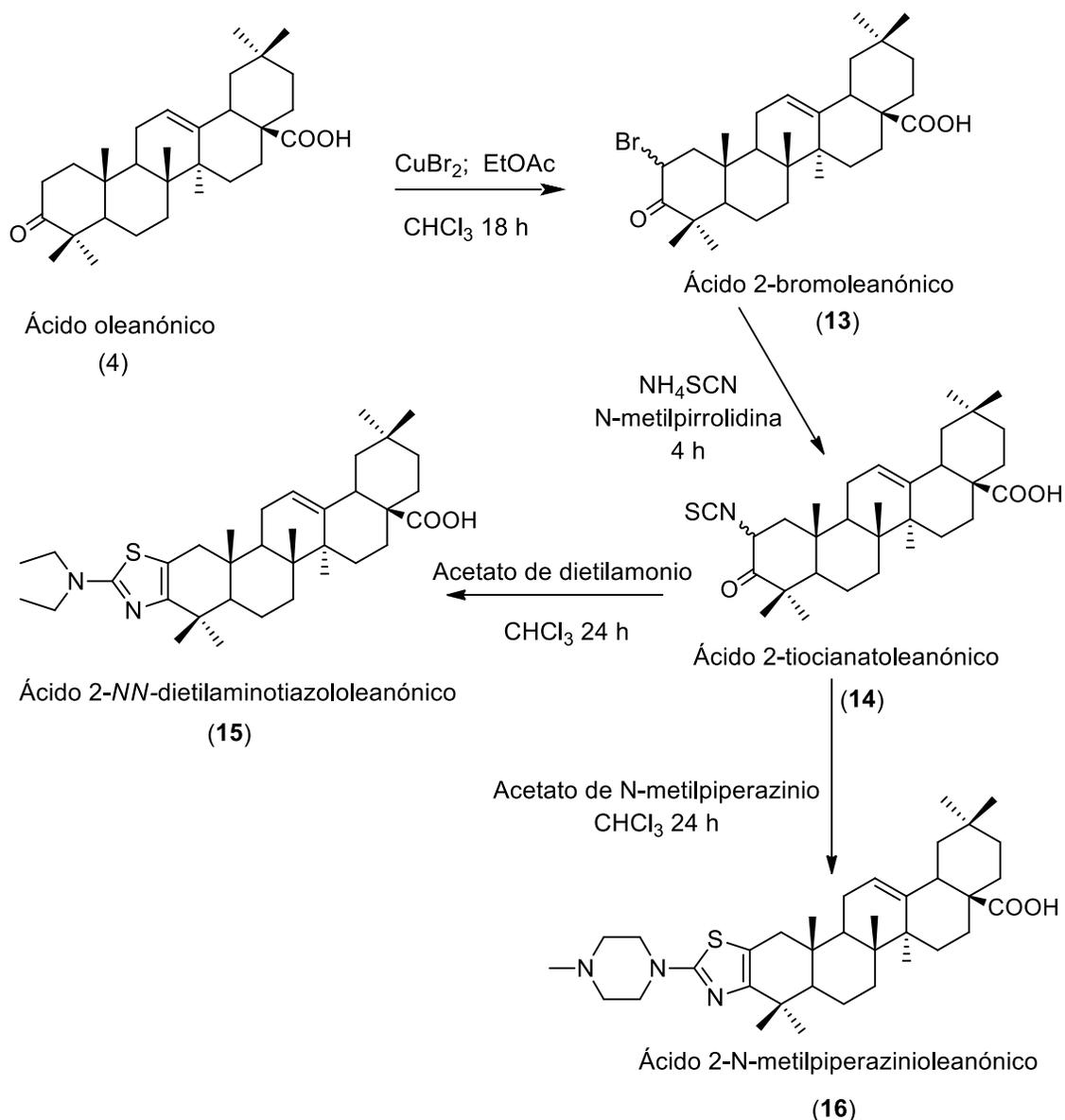
MRC-5  $CI_{50}$  = 15.7  $\mu$ M



Ácido 2-bromotiazolbetulínico

CEM  $CI_{50}$  = 11  $\mu$ M

En cuanto a la modificación de la lipofilia de derivados azólicos de triterpenos, recientemente, estudios de “pull-down” condujeron a la obtención de una serie de derivados citotóxicos del ácido 2-aminotiazololeanónico, con sustituyentes lipofílicos en la posición *N*. La ruta sintética para su obtención se presenta en el esquema 1.<sup>54</sup>



**Esquema 1.-** Síntesis de ácido 2-bromoleanónico (13), ácido 2-tiocianatoleanónico (14), ácido 2-*NN*-dietilaminotiazololeanónico (15) y ácido 2-*N*-metilpiperazinoleanónico (16) a partir del ácido oleanónico (4).

En este trabajo se observó que los compuestos: ácido 2-*NN*-dietilaminotiazololeanónico (15) y ácido 2-*N*-metilpiperazinoleanónico (16) presentan

actividad citotóxica contra células de leucemia T-linfoblástica ( $CI_{50} = 11.3 \mu\text{M}$ ) a una concentración menor que en el caso del ácido oleanónico ( $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ ). De forma particular, los intermediarios el ácido 2-bromoleanónico (**13**) y el ácido 2-tiocianoleanónico (**14**) mostraron mejora en la actividad con  $CI_{50}$  de 4.5 y 6.4  $\mu\text{M}$ , respectivamente.<sup>54</sup>



## **OBJETIVO**

Obtener amidas de tiazio-ochraceolida A con actividad antiproliferativa contra células cancerosas de mama.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer el procedimiento para fusionar un anillo 2-aminotiazólico al anillo A de ochraceolida A.
- Obtener una serie de amidas alifáticas y una serie de amidas aromáticas derivadas de 2-aminotiazolochraceolida A.
- Caracterizar los compuestos obtenidos por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar las actividades citotóxica y antiproliferativa de los compuestos obtenidos contra las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa.
- Evaluar la relación que guardan las características estructurales de los derivados obtenidos y su correspondiente actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los disolventes de grado industrial empleados para la extracción, separación y purificación fueron destilados previamente a su uso. Los reactivos y disolventes utilizados en las reacciones fueron de la marca Aldrich, con grado de pureza superior al 95%.

Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatofolios de aluminio impregnados con gel de sílice con aglutinante de yeso e indicador de fluorescencia y con un grosor de capa de 0.25 mm, marca Merck o Aldrich. Los agentes reveladores fueron UV a una longitud de onda corta (254 nm), de onda larga (366 nm) y así como óleum (ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico en proporciones 20:4:1, respectivamente).

Para las separaciones cromatográficas se utilizaron columnas de vidrio empacadas con gel de sílice para CCD grado estándar sin aglutinante con tamaño de partícula de 2-25  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro de 60 Å marca Aldrich y gel de sílice para cromatografía en columna (CC) con un tamaño de partícula 40-63  $\mu\text{m}$  (malla 230-400). Para la cromatografía de exclusión por tamaño se utilizó Sephadex lipofílico LH-20.

Los análisis de difracción de rayos X de monocristal se realizaron en un difractómetro de Bruker Smart Apex equipado con detector bidimensional de carga acoplada y con dispositivo de baja temperatura.

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y de RMN- $^{13}\text{C}$ , los experimentos mono y bidimensionales homo y heteronucleares se obtuvieron utilizando un equipo Bruker Avance III HD 400 MHz con una sonda dual de BBO de 5 mm con un gradiente protegido en z, empleando disolventes deuterados de acuerdo a la polaridad de la muestra o compuesto. Los desplazamientos químicos están reportados en ppm referidos a la señal residual del disolvente deuterado utilizado en cada caso.

Los análisis por espectrometría de masas (EM) se realizaron en un equipo de la marca JEOL GCMate II con impacto electrónico (IE) a 70 eV e inserción directa en una cámara de ionización a 300°C con una resolución de 3,000 al 10 % del pico y con un calibrador perfluoro queroseno de referencia.

El punto de fusión (pf) del producto sólido, se determinó en un equipo modelo AI 9100 de la marca Electrothermal y se reporta (°C) sin corrección.

El triterpeno Ochraceolida A empleado para las reacciones fue aislado y purificado en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química en la UADY e identificado por métodos espectroscópicos y espectrométricos.

## **Modificación de triterpenos**

### ***Bromación de ochraceolida A***

Se disolvió ochraceolida A (452 mg, 1 mmol) en 4 mL de tetrahidrofurano (THF) y se adicionó gota a gota una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio (375.95 mg, 1 mmol, en 1 mL de THF) con agitación por 10 minutos. Posteriormente, se dejó en agitación por 10 minutos adicionales y se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 mL); finalmente, se extrajo con diclorometano (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio.

### **Síntesis de 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A**

A un equivalente de 2-bromo ochraceolida A (630 mg, 11.84 mmol) en 9 mL de THF anhidro se adicionaron 10 equivalentes de tiourea (884.3 mg, 11.61 mmol). Posteriormente, se calentó a reflujo con agitación por 4 horas; y se adicionó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (20 mL); la fase orgánica se extrajo con diclorometano (3 x 30 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. La purificación se llevó a cabo por medio de una columna cromatográfica empacada con gel de sílice para CCD, con un sistema de hexano y acetato de etilo en polaridad creciente (rendimiento global del 80%).

**2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A (TZOc).** (480 mg, 80 %). Punto de fusión (pf) 314-318 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.32 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.69 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.19 (s, NH<sub>2</sub>), 4.94 (dd, *J* = 14.2, 7.2 Hz, 1H), 3.13 (dd, *J* = 10.3, 8.2 Hz, 1H), 2.53 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 2.17 (dd, *J* = 12.9, 7.4 Hz, 1-2H), 2.11 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 1.93 (td, *J* = 12.3, 3.7 Hz, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.89 (s, 6H), 0.81 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 164.9, 151.9, 139.2, 124.9, 115.8, 82.38, 52.5, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 44.0, 43.0, 40.9, 39.1, 38.5, 37.8, 37.0, 34.6, 33.4, 30.3, 27.8, 26.7, 22.1, 21.2, 19.55, 19.4, 16.2, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M+] de *m/z* 508.3124 calculado para C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S, encontrado *m/z* 508.3127.

### **Síntesis de N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) amidas alifáticas.**

A la mezcla de un equivalente de cloruro de ácido correspondiente (0.11 mmol) y un equivalente de trietilamina (0.11 mmol) se le adicionó 1.1 equivalente de 2-aminotiazolochraceolida A (50 mg, 0.0984 mmol) en 2 mL de diclorometano, con

agitación por 12 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó diclorometano (20 mL), y se lavó con HCl 1N (20 mL), salmuera (20 mL) y agua destilada (20mL); se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. La purificación se llevó a cabo por medio de una columna cromatográfica empacada con gel de sílice para CC con el sistema de hexano y acetato de etilo en polaridad creciente.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) acetamida (TZOcAc).** (10 mg, 18 %). pf 317-321 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.35 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 14.1, 7.3 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 10.5, 8.0 Hz, 1H), 2.71 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.21 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 2.18 (dd, *J* = 13.1, 7.1 Hz, 1H), 1.96 (td, *J* = 12.4, 4.0 Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 168.0, 139.2, 128.9, 124.9, 120.3, 82.3, 52.4, 52.2, 48.6, 47.8, 45.2, 44.0, 43.1, 41.0, 38.8, 38.5, 37.8, 36.1, 34.6, 33.2, 30.1, 29.8, 29.7, 26.7, 23.4, 22.2, 21.3, 19.5, 19.2, 16.2, 15.7, 14.3. EM (IE+): [M+] de *m/z* 550.3229, calculado para C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, encontrado *m/z* 550.3220.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) propionamida (TZOcPr).** (8 mg, 18 %). pf 323-326 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.35 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 14.1, 7.2 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 10.4, 8.1 Hz, 1H), 2.72 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.44 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.22 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 2.18 (dd, *J* = 12.6, 7.1 Hz, 1H), 1.96 (td, *J* = 12.4, 3.8 Hz, 1H), 1.25 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 171.1, 155.7, 149.3, 139.2, 125.0, 120.5, 82.3, 52.6, 52.3, 48.6, 47.9, 45.2, 44.0, 43.1, 41.0, 38.7, 38.6, 37.8, 36.5, 34.7, 33.3, 30.4, 29.8, 29.7, 27.8, 26.7, 22.4, 21.3, 19.5, 16.2, 15.7, 14.3, 9.2. EM (IE+): [M+] de *m/z* 564.3386, calculado para C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, encontrado *m/z* 564.3380.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) butiramida (TZOcBu)** (31.4 mg, 55 %). pf 299-302 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 14.2, 7.3 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 10.4, 8.0 Hz, 1H), 2.70 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.21 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 2.17 (dd, *J* = 12.8, 7.2 Hz, 1H), 1.95 (td, *J* = 12.4, 3.8 Hz, 1H), 1.74 (m, 2H), 1.20 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 170.3, 154.9, 150.7, 139.1, 125.0, 120.4, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 43.9, 43.1, 40.9, 38.7, 38.5, 38.3, 37.8, 36.7, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 26.6, 22.4, 21.3, 19.5, 19.4, 18.7, 16.1, 15.7, 14.2, 13.8. EM (IE+): [M+] de *m/z* 578.3542, calculado para C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, encontrado *m/z* 578.3550.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) isobutiramida (TZOciBu).** (32.5 mg, 57 %). pf 282-285 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.70 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 14.2, 7.2 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 10.3, 8.2 Hz, 1H), 2.71 (d, *J* = 15.6

Hz, 1H), 2.58 (hept, 1H), 2.21 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H), 2.17 (dd,  $J = 12.8, 7.3$  Hz, 1H), 1.95 (td,  $J = 12.4, 3.7$  Hz, 1H), 1.25 (d,  $J = 6.9$  Hz, 6H), 1.21 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.3, 171.4, 155.0, 150.7, 139.1, 125.0, 120.5, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 43.9, 43.1, 40.9, 38.7, 38.5, 37.8, 36.6, 35.6, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 26.6, 22.4, 21.3, 19.5, 19.4, 19.3, 19.2, 16.1, 15.7, 14.2. EM (IE+):  $[\text{M}^+]$  de  $m/z$  578.3542, calculado para  $\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ , encontrado  $m/z$  578.3560.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) pentanamida (TZOcPe).** (30.5 mg, 52 %). pf 284-287 °C. RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.34 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 5.71 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J = 14.2, 7.2$  Hz, 1H), 3.14 (dd,  $J = 10.4, 8.1$  Hz, 1H), 2.70 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.39 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.21 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 2.17 (dd,  $J = 12.9, 7.2$  Hz, 1H), 1.94 (td,  $J = 12.4, 3.7$  Hz, 1H), 1.68 (m, 2H), 1.19 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.91 (t,  $J = 7.3$  Hz, 6H), 0.87 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.4, 170.4, 154.8, 150.7, 139.1, 125.0, 120.4, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 43.9, 43.1, 40.9, 38.7, 38.5, 37.8, 36.7, 36.2, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 27.2, 26.6, 22.4, 22.3, 21.3, 19.5, 19.4, 16.1, 15.7, 14.2, 13.8. EM (IE+):  $[\text{M}^+]$  de  $m/z$  592.3699, calculado para  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ , encontrado  $m/z$  592.3705.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) 4-metilbutanamida (TZOcMeBu)** (30.9 mg, 53 %). pf 208-211 °C. RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.34 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 5.71 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J = 14.2, 7.2$  Hz, 1H), 3.14 (dd,  $J = 10.4, 8.1$  Hz, 1H), 2.70 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.26 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 2.22 (m, 1H), 2.21 (d,  $J = 13.0$  Hz, 1H), 2.17 (dd,  $J = 13.0, 7.2$  Hz, 1H), 1.95 (td,  $J = 12.4, 3.7$  Hz, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.10 (d, 6H), 0.99 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.4, 169.9, 154.9, 150.7, 139.1, 125.0, 120.4, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.7, 45.1, 43.9, 43.1, 40.9, 38.7, 38.5, 37.8, 36.7, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 26.6, 26.1, 22.5, 22.4, 21.3, 19.5, 19.4, 16.1, 15.7, 14.2. EM (IE+):  $[\text{M}^+]$  de  $m/z$  592.3699, calculado para  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ , encontrado  $m/z$  592.3690.

### Síntesis de amidas aromáticas.

A un equivalente de 2-aminotiazolochraceolida A (50 mg, 0.0984 mmol) en 1 mL de piridina se adicionaron dos equivalentes del cloruro de benzoilo correspondiente (0.1968 mmol), con agitación por 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó  $\text{H}_2\text{O}$  (Agua; 40 mL), la fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 50), posteriormente la fase orgánica se lavó con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL); se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y llevó a sequedad en un evaporador rotatorio. La purificación se llevó a cabo por medio de una columna cromatográfica empacada con gel de sílice para CC, con el sistema Hx:AcOEt en polaridad creciente.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) benzamida (TZOcBzA).** (42 mg, 70 %). pf 227-230 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.94 (dd, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 10.2, 8.3 Hz, 1H), 2.74 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.24 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.16 (dd, *J* = 12.8, 7.3 Hz, 1H), 1.94 (td, *J* = 12.3, 3.4 Hz, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.09 (s, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.82 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 164.3, 155.4, 151.0, 139.0, 132.7, 132.3, 128.9, 127.4, 125.0, 120.7, 82.3, 52.6, 52.2, 48.5, 47.8, 45.0, 43.9, 43.0, 40.9, 38.7, 38.4, 37.7, 36.7, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 26.6, 22.4, 21.2, 19.5, 19.4, 16.1, 15.6, 14.2. EM (IE+): [M<sup>+</sup>] de *m/z* 612.3386, calculado para C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, encontrado *m/z* 612.3375.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) 4-metilbenzamida (TZOcMeBzA).** (40.9 mg, 66 %). pf 247-250 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 14.2, 7.2 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 10.3, 8.2 Hz, 1H), 2.74 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.24 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.17 (dd, *J* = 12.8, 7.3 Hz, 1H), 1.95 (td, *J* = 12.4, 3.7 Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.09 (s, 6H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.82 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 164.1, 155.4, 151.0, 143.5, 139.1, 129.6, 129.4, 127.4, 125.0, 120.7, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.0, 43.9, 43.0, 40.9, 38.7, 38.5, 37.7, 36.7, 34.6, 33.3, 30.5, 27.8, 26.6, 22.5, 21.6, 21.3, 19.5, 19.4, 16.1, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M<sup>+</sup>] de *m/z* 626.3542, calculado para C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, encontrado *m/z* 626.3552.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) 4-metoxibenzamida (TZOcMeOBzA).** (31.5 mg, 50 %). pf 230-233 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.9 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.95 (dd, *J* = 14.2, 7.1 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.14 (dd, *J* = 10.1, 8.3 Hz, 1H), 2.74 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.24 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.17 (dd, *J* = 12.8, 7.3 Hz, 1H), 1.95 (td, *J* = 12.2, 3.5 Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 163.7, 163.2, 155.6, 150.9, 139.1, 129.4, 125.0, 124.4, 120.6, 114.2, 82.3, 55.6, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 43.9, 43.1, 40.9, 38.7, 38.5, 37.8, 36.7, 34.6, 33.3, 30.5, 27.8, 26.6, 22.5, 21.3, 19.5, 19.4, 16.1, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M<sup>+</sup>] de *m/z* 642.3491, calculado para C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, encontrado *m/z* 642.3482.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida *A*) 4-fluorobenbamida (TZOcFBzA).** (27 mg, 43 %). pf 232-235 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.00 (dd, *J* = 8.8, 5.2 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.34 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.71 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 14.2, 7.2 Hz, 1H), 3.15 (dd, *J* = 10.3, 8.1 Hz, 1H), 2.75 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.26 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 2.18 (dd, *J* = 12.8, 7.3 Hz, 1H), 1.96 (td, *J* = 12.4, 3.7 Hz, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 166.9, 164.3, 163.2, 155.9, 150.2, 139.1, 130.2, 130.1, 128.3, 125.0, 120.9, 116.4, 116.1, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.9, 45.1, 44.0, 43.1, 41.0, 38.7, 38.6, 37.8, 36.6,

34.6, 33.3, 30.5, 27.8, 26.7, 22.5, 19.5, 19.4, 16.2, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M+] de  $m/z$  630.3291, calculado para  $C_{38}H_{47}N_2O_3SF$ , encontrado  $m/z$  630.3283.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]jochraceolida A) 4-clorobenzamida (TZOcClBzA).** (41.4 mg, 65 %). pf 233-236 °C. RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.9 (d,  $J = 8.7$ , 2H), 7.45 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.34 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 5.71 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J = 14.2$ , 7.2 Hz, 1H), 3.14 (dd,  $J = 10.4$ , 8.1 Hz, 1H), 2.75 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.25 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.17 (dd,  $J = 12.7$ , 7.2 Hz, 1H), 1.95 (td,  $J = 12.4$ , 3.7 Hz, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.104 (s, 3H), 1.101 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN- $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171.4, 163.3, 155.6, 150.6, 139.2, 139.1, 130.6, 129.3, 129.0, 125.0, 121.0, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 43.9, 43.1, 40.9, 38.7, 38.5, 37.8, 36.6, 34.6, 33.3, 30.5, 27.8, 26.7, 22.4, 21.3, 19.5, 19.4, 16.1, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M+] de  $m/z$  646.2996, calculado para  $C_{38}H_{47}N_2O_3SCl$ , encontrado  $m/z$  646.2997.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]jochraceolida A) 4-nitrobenzamida (TZOcNOBzA).** (22 mg, 34 %). pf 218-221 °C. RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.35 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 8.19 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.35 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H), 4.97 (dd,  $J = 14.1$ , 7.2 Hz, 1H), 3.16 (dd,  $J = 10.2$ , 8.2 Hz, 1H), 2.77 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 2.28 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H), 2.19 (dd,  $J = 12.8$ , 7.3 Hz, 1H), 1.97 (td,  $J = 12.4$ , 3.7 Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.84 (s, 3H). RMN- $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171.4, 162.8, 156.3, 150.3, 149.7, 139.2, 137.8, 128.9, 125.0, 124.2, 121.4, 82.4, 52.5, 52.2, 48.6, 47.9, 45.2, 44.0, 43.1, 41.0, 38.8, 38.7, 37.8, 36.6, 34.6, 33.3, 30.5, 27.8, 26.7, 22.5, 21.3, 19.5, 16.2, 15.7, 14.3. EM (IE+): [M+] de  $m/z$  657.3236, calculado para  $C_{38}H_{47}N_3O_5S$ , encontrado  $m/z$  657.3248.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]jochraceolida A) furan-2-carboxamida (TZOcFurA).** (22 mg, 37 %). pf 238-241 °C. RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.54 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.57 (dd,  $J = 3.5$ , 1.7 Hz, 1H), 6.34 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H), 4.95 (dd,  $J = 14.2$ , 7.2 Hz, 1H), 3.15 (dd,  $J = 10.4$ , 8.1 Hz, 1H), 2.75 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.24 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.18 (dd,  $J = 12.8$ , 7.3 Hz, 1H), 1.95 (td,  $J = 12.4$ , 3.7 Hz, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN- $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  171.4, 154.9, 154.2, 151.1, 146.2, 145.4, 139.1, 125.0, 121.1, 116.8, 112.9, 82.3, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 44.0, 43.1, 40.9, 38.8, 38.5, 37.8, 36.7, 34.6, 33.3, 30.5, 27.8, 26.7, 22.5, 21.3, 19.5, 19.4, 16.2, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M+] de  $m/z$  602.3178, calculado para  $C_{36}H_{46}N_2O_4S$ , encontrado  $m/z$  602.3166.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]jochraceolida A) 5-metilfuran-2-carboxamida (TZOcMeFurA).** (37 mg, 60 %). pf 237-240 °C. RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.20 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 6.34 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.18 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 5.72 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 4.96 (dd,  $J = 14.2$ , 7.2 Hz, 1H), 3.15 (dd,  $J = 10.5$ , 8.0 Hz, 1H), 2.74 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.24 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 2.18 (dd,  $J = 12.8$ , 7.3 Hz, 1H), 1.96 (td,  $J = 12.4$ , 3.7 Hz, 2H), 1.25 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). RMN- $^{13}C$  (100

MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 156.1, 154.8, 154.2, 151.2, 144.5, 139.0, 125.0, 120.8, 118.1, 109.4, 82.3, 52.6, 52.2, 48.5, 47.8, 45.0, 43.9, 43.0, 40.9, 38.8, 38.4, 37.7, 36.7, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 26.6, 22.4, 21.2, 19.5, 19.4, 16.2, 15.7, 14.2, 13.9. EM (IE+): [M<sup>+</sup>] de *m/z* 616.3335, calculado para C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, encontrado *m/z* 616.3325.

***N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) 5-nitrofurán-2-carboxamida (TZOcNOFurA).** (17 mg, 26 %). pf 232-235 °C. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.43 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.96 (dd, *J* = 14.1, 7.2 Hz, 1H), 3.16 (dd, *J* = 10.4, 8.1 Hz, 1H), 2.76 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 2.26 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 2.18 (dd, *J* = 12.8, 7.3 Hz, 1H), 1.96 (td, *J* = 12.4, 3.7 Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.84 (s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.4, 154.5, 154.0, 151.7, 150.6, 146.8, 139.1, 125.0, 121.9, 117.8, 112.6, 82.4, 52.6, 52.2, 48.6, 47.8, 45.1, 44.0, 43.1, 40.9, 38.8, 38.6, 37.8, 36.7, 34.6, 33.3, 30.4, 27.8, 26.7, 22.5, 21.3, 19.54, 19.5, 16.2, 15.7, 14.2. EM (IE+): [M<sup>+</sup>] de *m/z* 647.3029, calculado para C<sub>36</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S, encontrado *m/z* 647.3032.

### **Evaluación de las actividades citotóxica y antiproliferativa**

Las líneas celulares utilizadas en los bioensayos fueron de adenocarcinoma de glándula mamaria (MCF-7, ATCC HTB-22), carcinoma metastásico de glándula mamaria (MDA-MB-231, ATCC HTB-26), carcinoma escamoso de cérvix (SiHa, ATCC HTB-35) y células normales de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Vero, ATCC CCL-81). Todas provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Al medio de cultivo se le adicionó 10,000 U de penicilina y 10 mg mL<sup>-1</sup> de estreptomina y 5 mg mL<sup>-1</sup> de anfotericina B. Las líneas celulares fueron incubadas en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C hasta la formación de una monocapa.

Las actividades citotóxica y antiproliferativa se evaluaron en placas de 96 pozos para cultivo celular. A cada pozo se le agregó 5,000 células usando medio DMEM adicionado con 10,000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomina y 5 mg/mL de anfotericina B, y se incubaron por 24 h. La citotoxicidad fue medida hasta que las células alcanzaron 90-100 % de confluencia en ausencia de SFB, en tanto que la actividad antiproliferativa fue realizada cuando las células alcanzaron un 50-60 % de confluencia, en presencia de SFB (10%).

Los experimentos se realizaron adicionando a cada tres pozos, posteriormente se adicionó a los pozos el compuesto a evaluar para alcanzar las siguientes concentraciones: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.65 µg/mL. En cada placa de 96 pozos se evaluaron seis compuestos, adicionalmente tres pozos fueron para el control positivo y

tres pozos para el control negativo sin tratamiento. Posteriormente a continuación las placas se incubaron por 48 horas tres días en una atmósfera con 95% de humedad y 5% CO<sub>2</sub> a 37° C. Seguidamente, se adicionó a cada pozo 100 µL del medio con 10 µL de Tetra Metil Tetrazolio (MTT) al 0.5% en amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7.2). Se incubó por 6 h a 37° C y se añadirá 100 µL de isopropanol acidificado (4% de HCl), se midió la densidad óptica (DO) a 590 nm usando un espectrofotómetro. Se utilizó Docetaxel como control positivo y como control negativo DMSO al 0.05%. Cada evaluación se realizó por triplicado y cada experimento se realizó en tres ocasiones. Los resultados están expresados en concentración citotóxica media 50 (CC<sub>50</sub>), determinados por la fórmula  $[(DO \text{ control negativo} - DO \text{ compuesto producto}) / DO \text{ control negativo}] \times 100$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se sintetizaron un total de 15 tiazoderivados de Ochraceolida A, los cuales fueron sometidos a pruebas para determinar su nivel de actividad contra células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231), cáncer cervicouterino (SiHa) y normales de riñón de mono verde africano (Vero).

Para la obtención de una serie de amidas alifáticas y aromáticas con potencial actividad antiproliferativa, derivadas del 2-aminotiazolochraceolida A, se utilizó 2.5 g de ochraceolida A; la cual fue obtenida de un trabajo previo<sup>52</sup> y fue caracterizada por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.

### Obtención de 2-bromo ochraceolida A (BrOc)

Con la finalidad de establecer un procedimiento para fusionar un anillo 2-aminotiazólico al anillo A de ochraceolida A, en primera instancia se llevó a cabo una bromación en la posición  $\alpha$  al carbonilo de este triterpeno (esquema 2). La reacción se realizó adicionando gota a gota un equivalente de tribromuro de feniltrimetilamonio a una solución que contenía un equivalente de ochraceolida A en THF y dejando en agitación por 10 minutos a temperatura ambiente. El crudo de reacción se analizó por RMN-<sup>1</sup>H.

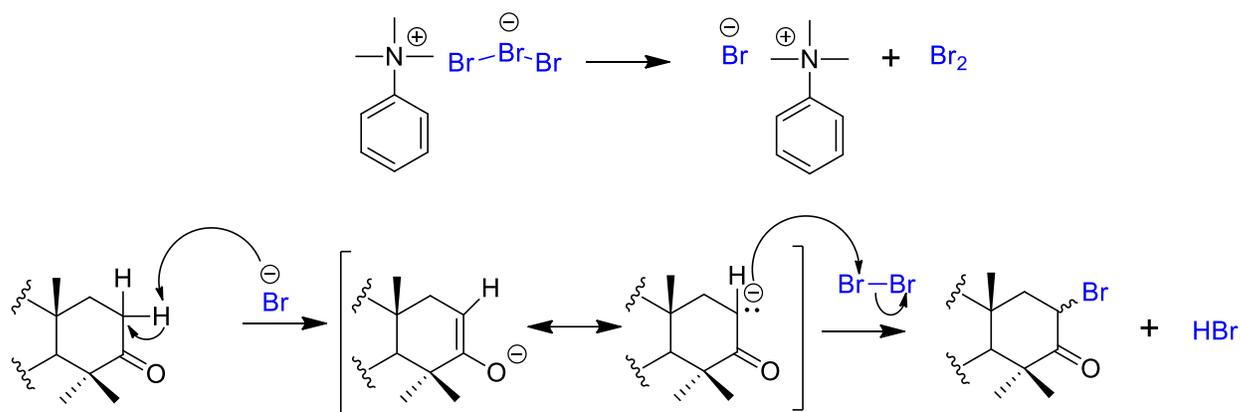


**Esquema 2.-** Reacción para la obtención de 2-bromo ochraceolida A (BrOc).

En la reacción de bromación para la obtención del 2-bromo ochraceolida A, se utilizó el reactivo de tribromuro de feniltrimetilamonio; este ha sido utilizado ampliamente en la literatura en la bromación de compuestos carbonílicos en la posición  $\alpha$ , en condiciones leves sin afectar al doble enlaces en la estructura.<sup>71-77</sup> Cabe mencionar que se evitó utilizar medios muy ácidos, procurando mantener la integridad de la lactona y el doble enlace en la ochraceolida A. Por lo que se utilizó THF como disolvente, el cual se ha

observado que evita reacciones colaterales del HBr generado en la reacción; el THF reacciona con el HBr formando 4-bromo-1-butanol.<sup>78</sup>

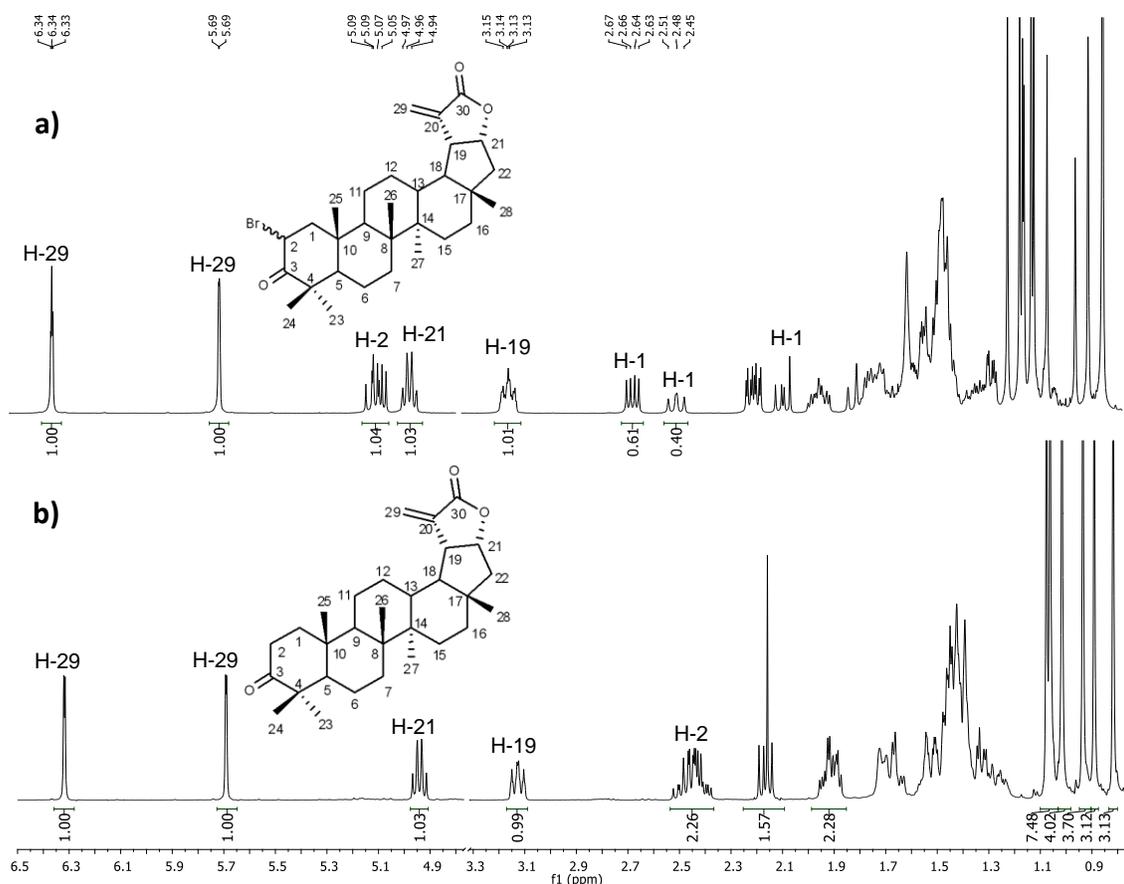
El mecanismo de reacción por el cual actúa el tribromuro de feniltrimetil amonio ha sido descrito en la literatura científica.<sup>79</sup> Este reactivo actúa por medio de la formación de intermediarios iónicos, formando bromuro de feniltrimetilamonio y bromo molecular. Este intermediario iónico reacciona con la ochraceolida A por medio de una bromación en  $\alpha$ -carbonilo, donde la desprotonación del carbono  $\alpha$  forma un ion enolato, posteriormente el ataque nucleofílico del ion enolato a la molécula de bromo genera una mezcla de epímeros y el HBr (esquema 3).



**Esquema 3.-** Mecanismo de reacción para la obtención de los epímeros 2-bromo ochraceolida A (**BrOc**).

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 3a) del crudo de reacción se pueden observar un mayor número de señales simples esperadas de grupos metilo entre 1.2 y 0.8 ppm, indicando, que el producto se encuentra como una mezcla. También, se pueden apreciar dos señales dobles con  $\delta$  6.32 ( $J = 1.8$  Hz) y  $\delta$  5.69 ( $J = 1.0$  Hz) características de protones vinílicos correspondientes a los protones H-29; lo que indicó que se mantuvo la insaturación en C20-C29. Las señales con  $\delta$  4.94 (m) y  $\delta$  3.12 (m) fueron proporcionales cada una a un protón y correspondientes a los metinos H-21 y H-19, respectivamente; por comparación con el espectro de ochraceolida A (Figura 3b) y tomando en cuenta las similitudes en desplazamiento químico de las señales en ambos espectros (Figura 3), se puede deducir que la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada se mantienen en la estructura del esqueleto triterpénico. Por otra parte, se puede observar la aparición de una señal con  $\delta$  5.09 que corresponde al protón en posición 2; este protón ipso al átomo de bromo electrón-atrayente experimenta un efecto de desapantallamiento. La presencia de dos señales dobles de dobles con  $\delta$  2.65 ( $J = 12.98, 6.31$  Hz) y  $\delta$  2.48 ( $J = 11.39, 13.14$  Hz) que en conjunto son proporcionales a un protón (0.6 y 0.4, respectivamente) y corresponden a uno de los protones en la posición uno los cuales están adyacentes al átomo de bromo (H-1), experimentando un

efecto de desapantallamiento; lo que indicó que el producto se encuentra como una mezcla de los epímeros: 2 $\alpha$ -bromo ochraceolida A y 2 $\beta$ -bromo ochraceolida A.

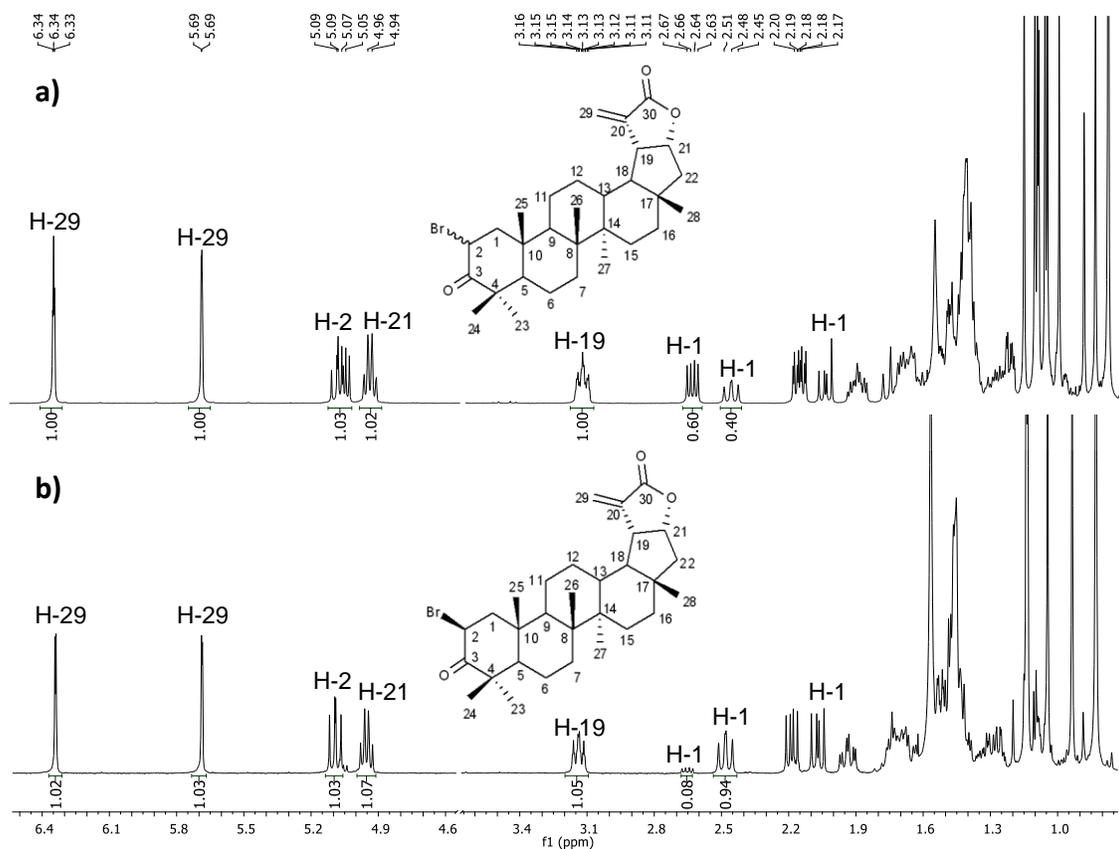


**Figura 3.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$ : **a)** crudo de reacción para la obtención de 2-bromo ochraceolida A y **b)** ochraceolida A; ambos en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

En una primera instancia se intentó separar los isómeros previo a las siguientes reacciones planteadas en el objetivo. El crudo de reacción se sometió a cromatografía en columna empacada con gel de sílice para CCD, empleando como fase móvil mezclas de Hx y AcOEt de polaridad creciente. De esta columna se obtuvo prácticamente puro sólo uno de estos epímeros y nuevamente la mezcla; las identidades de los compuestos fueron establecidos por experimentos de RMN.

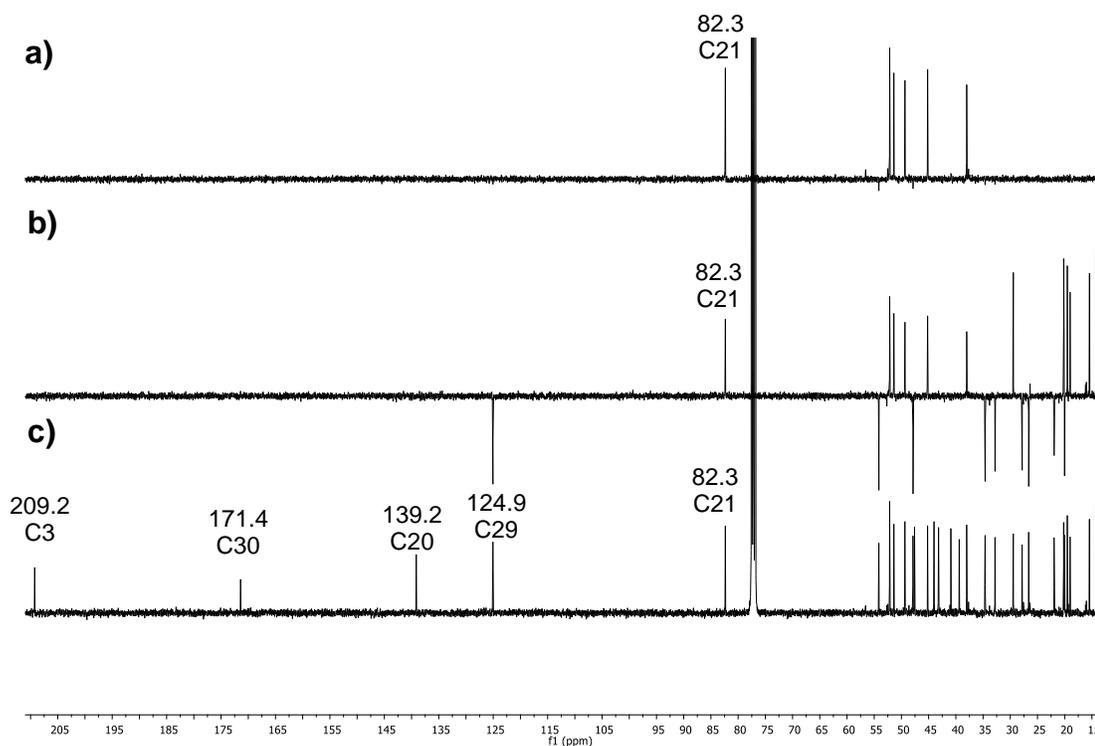
De la comparación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  del crudo de reacción (Figura 4a) y el epímero 2-bromo ochraceolida A (Figura 4b), se puede observar la presencia de dos señales dobles de dobles con  $\delta$  2.65 ( $J = 12.8, 6.3$  Hz) y  $\delta$  2.48 ( $J = 13.27, 11.49$  Hz) que en conjunto son proporcionales a un protón y corresponden a uno de los protones en la posición uno; en particular la señal con  $\delta$  2.48 tiene un aumento en su intensidad y del valor de su integral de 0.40 a 0.94. Asimismo, la señal con  $\delta$  2.65

disminuyó la intensidad de su señal y el valor de su integral de 0.60 a 0.08, lo que indicó que la purificación de uno de los epimeros de la 2-bromo ochraceolida A a un 92%, en relación a los dos compuestos.



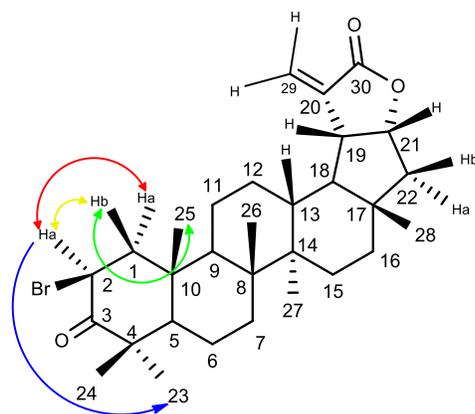
**Figura 4.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$ : **a)** crudo de reacción para la obtención de 2-bromo ochraceolida A y **b)** el epímero minoritario de la 2-bromo ochraceolida A; ambos a 400 MHz.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del epímero aislado 2-bromo ochraceolida A (Figura 5) se observan 30 señales, dos de ellas con  $\delta$  209.2 y  $\delta$  171.4 correspondientes a una cetona (C3) y una lactona (C30) presentes en la molécula; otras dos señales con  $\delta$  139.2 y  $\delta$  124.9 correspondientes a los carbonos vinílicos (C20 y C29, respectivamente) así como una señal a 82.3 correspondiente a un metino (C21). Con base en los experimentos DEPT de  $135^\circ$  y  $90^\circ$  se determinó la presencia de seis metilos, nueve metilenos, siete metinos y ocho carbonos cuaternarios, se pudo detectar la conversión de un grupo metileno a un grupo metino, al obtenerse 2-bromo ochraceolida A.

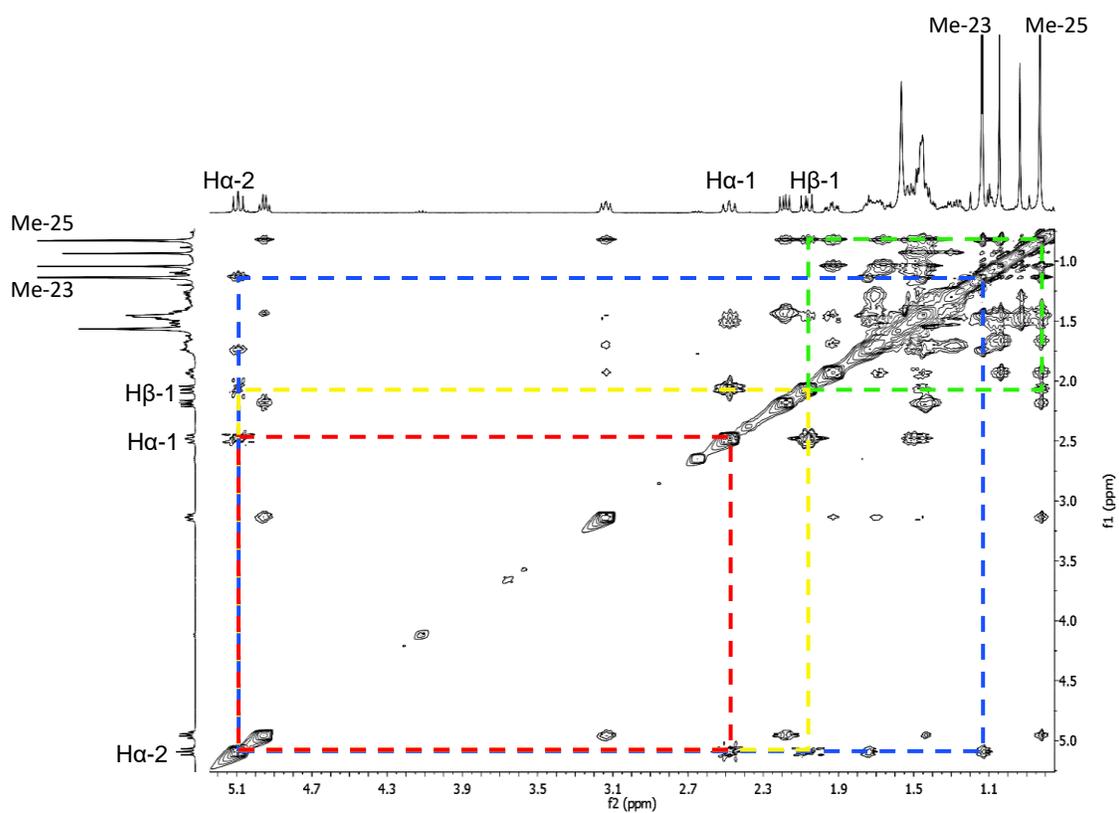


**Figura 5.** Espectro en  $\text{CDCl}_3$  de: **a)** DEPT  $90^\circ$ ; **b)** experimento DEPT  $135^\circ$ ; **c)** RMN- $^{13}\text{C}$  del epímero 2-bromo ochraceolida A.

Con la finalidad de establecer la orientación del átomo de bromo en este compuesto se llevó a cabo un experimento NOESY. En la figura 6 se presentan los acoplamientos de mayor relevancia. De forma particular se observó que la señal con  $\delta$  5.09, correspondiente al hidrógeno ipso al átomo de bromo (H-2), el cual interacciona con los dos protones de la posición 1 con  $\delta$  2.07 (H $\beta$ -1) y  $\delta$  2.48 (H $\alpha$ -1). De igual forma se puede apreciar que este protón (H-2) tiene un acoplamiento con la señal con  $\delta$  1.14 (metilo, C-23), metilo con orientación  $\beta$  en la posición 4 del anillo A del triterpeno (Figura 7). Asimismo, el protón H $\beta$ -1 correlaciona con la señal con  $\delta$  0.83 (metilo, C-25), cabe mencionar que no se observó acoplamiento alguno de los hidrógenos del grupo metilo (C-25) con el protón en la posición 2 (H-2). Con base en estas observaciones se dedujo que el átomo de bromo se encuentra en orientación  $\beta$  en la posición 2 del anillo A (Figura 6). Por lo tanto, el epímero aislado de la reacción de bromación corresponde a la 2 $\beta$ -bromo ochraceolida A.



**Figura 6.-** Principales acoplamiento observado en el experimento NOESY del compuesto 2β-bromo ochraceolida A.

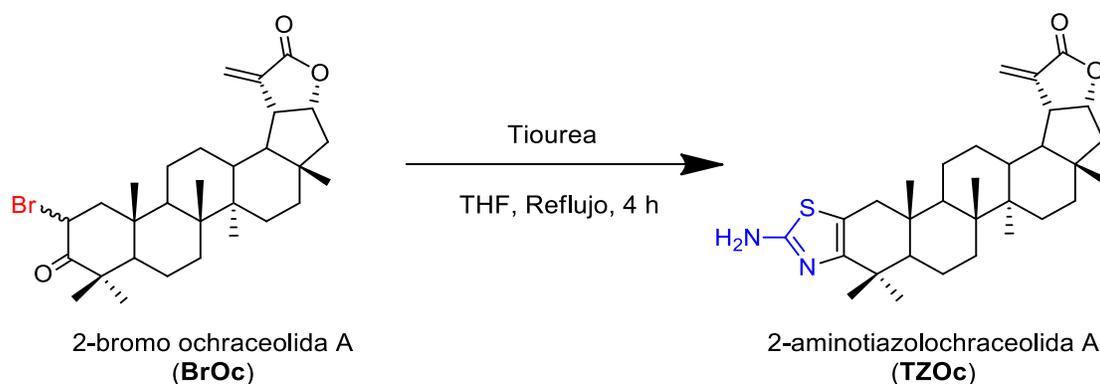


**Figura 7.-** Experimento NOESY del compuesto 2β-bromo ochraceolida A

### Obtención de 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc)

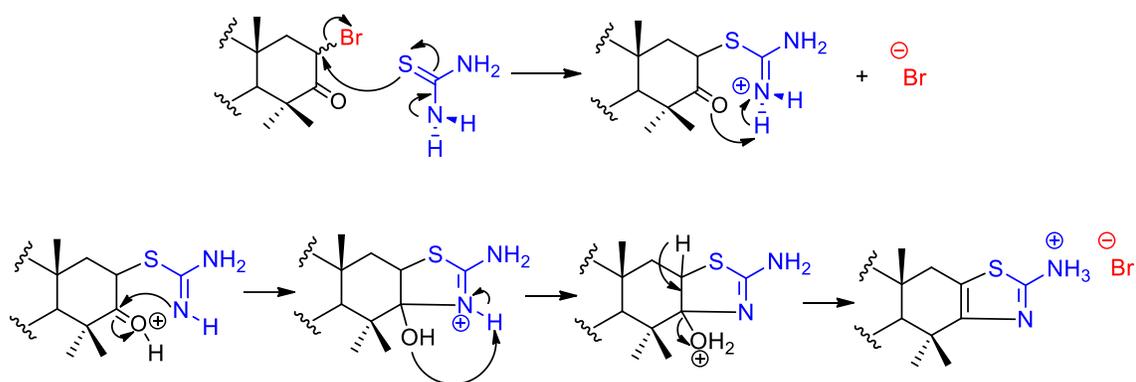
Una vez obtenida la 2-bromo ochraceolida A, se procedió a la fusión del anillo 2-aminotiazólico al anillo A de este triterpeno para formar la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc). Para esto no fue necesaria la purificación de los epímeros por lo que se hizo

reaccionar el crudo de la reacción de la obtención de 2-bromo ochraceolida A con tiourea en THF a reflujo (esquema 4).



**Esquema 4.-** Reacción para la obtención de 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc).

En cuanto a la introducción de un 2-aminotiazol a triterpenos pentacíclico se han descrito algunos ejemplos.<sup>53,54,69,80,81</sup> En estos utilizan tiourea y como disolvente metanol; para nuestro propósito se planteó utilizar las mismas condiciones únicamente cambiando el disolvente por uno aprótico, tratando de garantizar la estabilidad de la lactona. Este mecanismo de reacción por el cual se da la formación del 2-aminotiazol ha sido propuesto por Morales *et al.*<sup>82</sup> en 2006. Esta reacción transcurre por medio de la reacción de Hantzsch.<sup>73,82-84</sup> La formación del compuesto se explica mediante un mecanismo de dos pasos (esquema 5). La reacción transcurre por una ciclación de intermediarios formados por una reacción tipo  $\text{S}_{\text{N}}2$  de un  $\alpha$ -bromocetona con tiourea. Esto se debe a que la tiourea presenta un equilibrio tautomérico por el cual puede reaccionar de dos formas diferentes. Así, uno de estos tautómeros, con el grupo SH, reacciona con el carbono halógeno por medio de una reacción de sustitución nucleofílica.<sup>85</sup> La reacción inicia por medio un ataque del átomo de azufre a la  $\alpha$ -bromocetona expulsando al bromo, debido a que el S tiene un carácter más nucleofílico que el grupo amino. Seguido de una protonación del carbonilo, lo que incrementa la carga parcial positiva en este por efectos de resonancia, haciéndolo más atractivo a un ataque nucleofílico del nitrógeno de la tiourea. Con base en este mecanismo de reacción se propone que el grupo tiazol formado en el anillo A de la ochraceolida A el átomo de azufre queda unido directamente al C2 y el nitrógeno al C3 de la ochraceolida A.



**Esquema 5.-** Mecanismo de reacción para la obtención de 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc).

Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry

Para establecer una metodología que permitiera obtener el anillo aminotiazólico en el triterpeno y conservar la lactona fusionada al anillo E, se procedió a determinar las condiciones óptimas para esta reacción; se utilizaron diferentes números de equivalentes de tiourea a emplear en la reacción y se evaluó la necesidad de llevar a cabo la reacción en atmósfera de nitrógeno para prescindir de la humedad en el medio. En la tabla 2 y Figura 8 se puede observar que se obtiene un buen rendimiento, utilizando un equivalente de 2-bromo ochraceolida A y 10 equivalentes de tiourea; se observa una disminución de las señales con  $\delta$  5.5, 5.4 (H-2) y  $\delta$  1.14, 1.11 (H-24 y 23, respectivamente) correspondientes a la mezcla de epímeros de la 2-bromo ochraceolida A en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (figura 8, cuadros punteados); ya que se sabe que los rendimientos sobre el 90% son denominados excelentes, los rendimientos sobre el 80% muy buenos, sobre el 70% son buenos, alrededor del 50% son regulares, y debajo del 40% se consideran rendimientos malos.<sup>86</sup> Asimismo, se observa que no existe diferencia en llevar a cabo la reacción en un sistema abierto o en atmósfera de nitrógeno, al no interferir la humedad del medio en la reacción. Todas las reacciones se llevaron a cabo a reflujo por 4 horas.

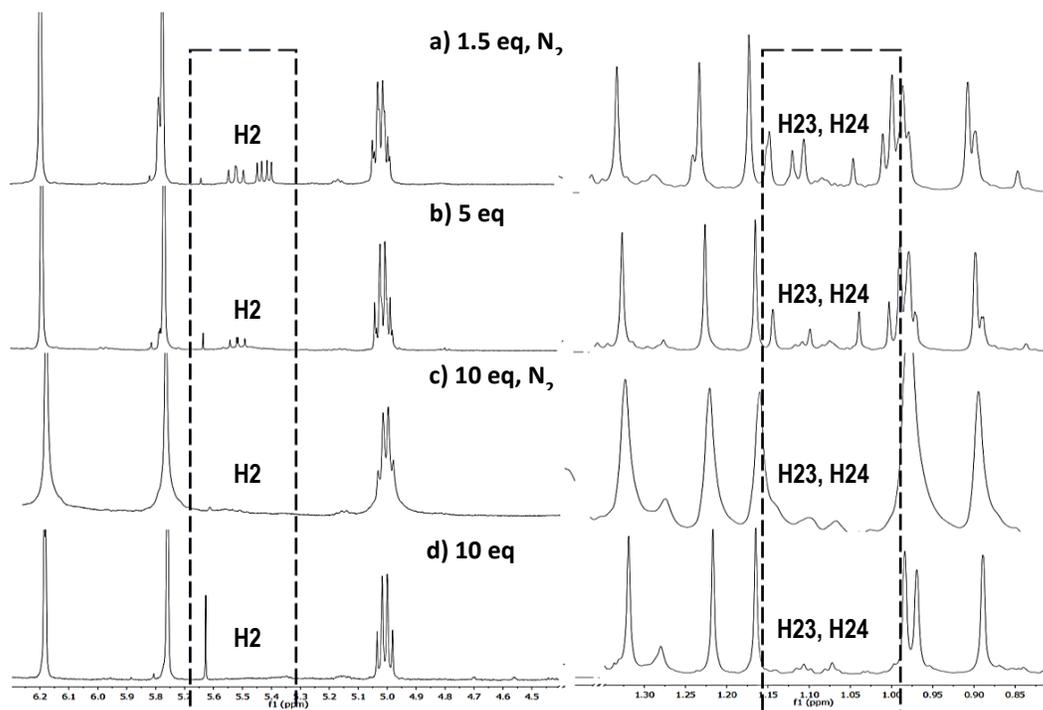
**Tabla 2.-** Condiciones de reacción para la obtención de 2-aminotiazolochraceolida A.

	Reactivos		Temperatura	Condición	Relación*
	2-bromo ochraceolida A (Equivalentes)	Tiourea (Equivalentes)			
a)	1	1.5	Reflujo	Atm N <sub>2</sub>	78 %
b)	1	5	Reflujo	Abierto	88 %
c)	1	10	Reflujo	Atm N <sub>2</sub>	B

d)	1	10	Reflujo	Abierto	B
----	---	----	---------	---------	---

\* Relación obtenida a través de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, con respecto a la cantidad de reactivo sobrante (figura 8).

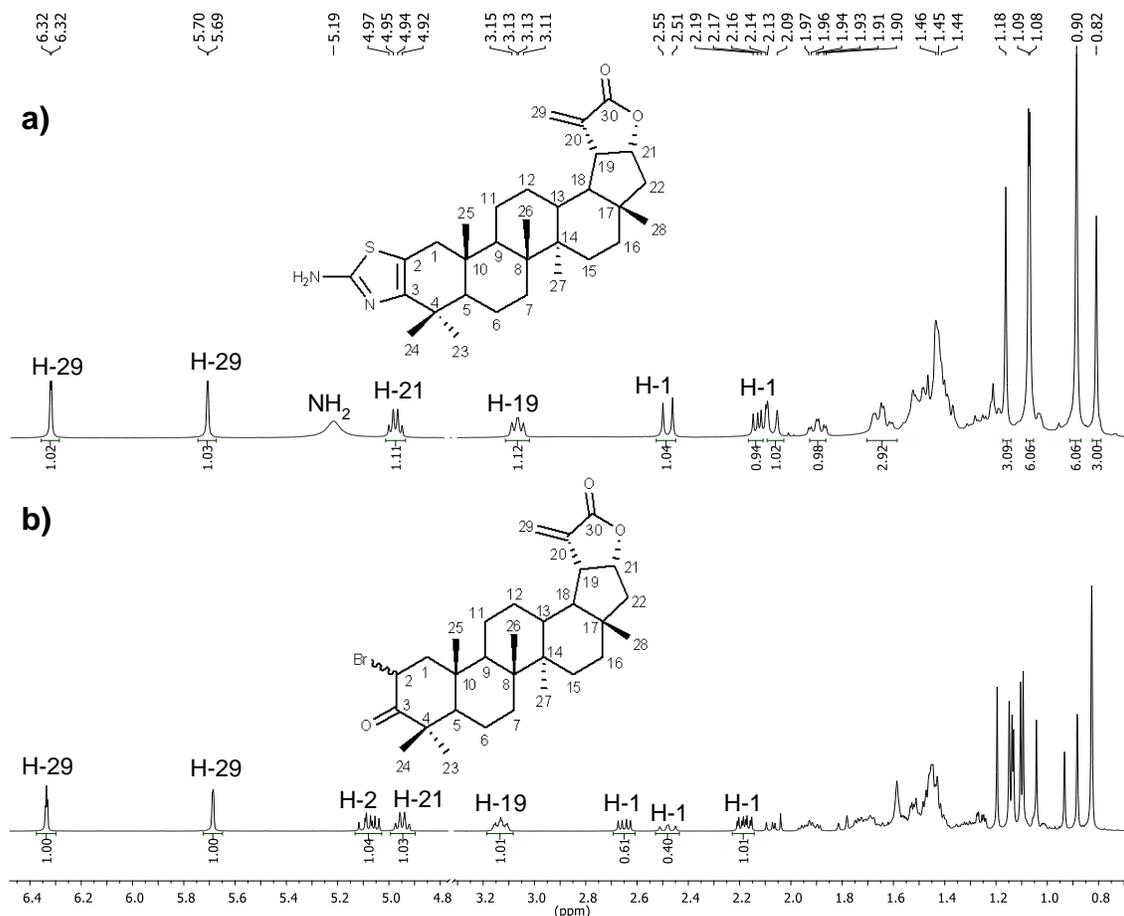
B = Relación no calculada debido a que desaparece la materia prima.



**Figura 8.-** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO; 400 MHz) del crudo de reacción con: **a)** 1.5 equivalentes de tiourea en una atm. de N<sub>2</sub>, **b)** 5 equivalentes de tiourea en un sistema abierto, **c)** 10 equivalentes de tiourea en una atm. de N<sub>2</sub> y **d)** 10 equivalentes de tiourea en un sistema abierto para la obtención de 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc).

El crudo de reacción se sometió a cromatografía en columna; la 2-aminotiazolochraceolida A se obtuvo con un 80 % de rendimiento global; dicho rendimiento se puede considerar como bueno, tomando en cuenta que es la primera vez que se realiza para este compuesto. Cabe mencionar que este procedimiento se podría optimizar aún más para obtener mejores rendimientos. El compuesto fue caracterizado por RMN. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 9a) se pueden observar dos señales características de protones vinílicos en C-29 ( $\delta$  6.32,  $J$  = 1.9 Hz y  $\delta$  5.69,  $J$  = 1.1 Hz), y los metinos H-21 y H-19 ( $\delta$  4.94 y  $\delta$  3.12, respectivamente). Los desplazamientos químicos de estas señales en comparación con los de la 2-bromo ochraceolida A resultaron ser muy similares (Figura 9b), lo cual nos permite suponer que se mantiene la insaturación en C20-C29 y la  $\gamma$ -lactona  $\alpha\beta$ -insaturada en la estructura del producto. Por otra parte, se observa una señal ancha con  $\delta$  5.19 correspondiente a los protones de un grupo amino (2H) lo cual es de esperarse al ser

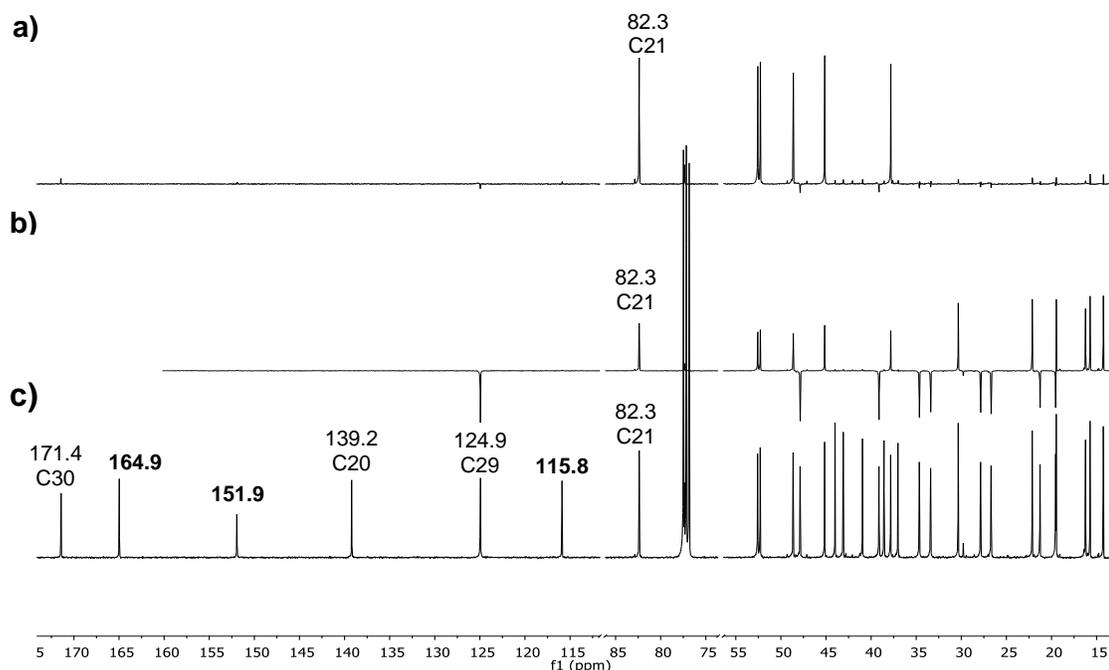
protones intercambiables con el medio. Asimismo, se observan dos señales dobles con  $\delta$  2.54 (1H, d,  $J = 15.35$  Hz, H $\beta$ -1) y  $\delta$  2.12 (1H, d,  $J = 15.35$  Hz, H $\alpha$ -1) correspondientes al grupo metileno en la posición uno. Cabe mencionar que se observó la desaparición de la señal con  $\delta$  5.05 (H-2) presente en el espectro de la 2-bromo ochraceolida A, correspondiente al protón ipso al bromo en la posición 2.



**Figura 9.-** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H: **a)** 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) y **b)** crudo de reacción para la obtención de 2-bromo ochraceolida A (BrOc); en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

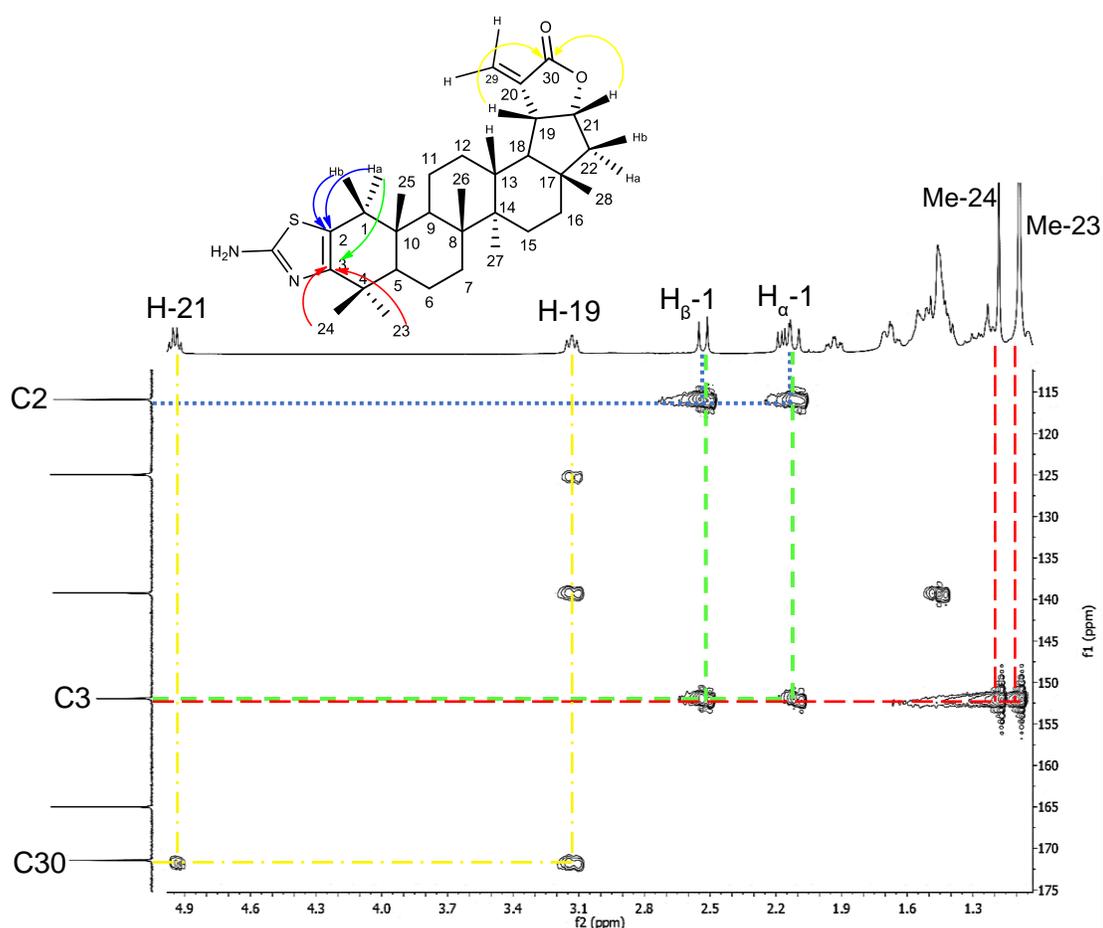
En el espectro de RMN -<sup>13</sup>C (Figura 10) se observaron 31 señales, una de ellas con  $\delta$  171.4 correspondiente al carbonilo de la lactona (C30), otras dos señales con  $\delta$  139.2 y  $\delta$  124.9 correspondientes a los carbonos vinílicos (C20 y C29, respectivamente), y una señal a 82.3 ppm correspondiente a un metino (C21). Los experimentos DEPT de 135° y 90° permitieron determinar la presencia de seis metilos, nueve metilenos, seis metinos y diez carbonos cuaternarios en la estructura del triterpeno. Se puede destacar la aparición de tres carbonos aromáticos con  $\delta$  164.9,  $\delta$  151.9 y  $\delta$  115.8 y la

desaparición del grupo carbonilo de tipo cetona (C3 en la 2-bromo ochraceolida A con  $\delta$  209.2).



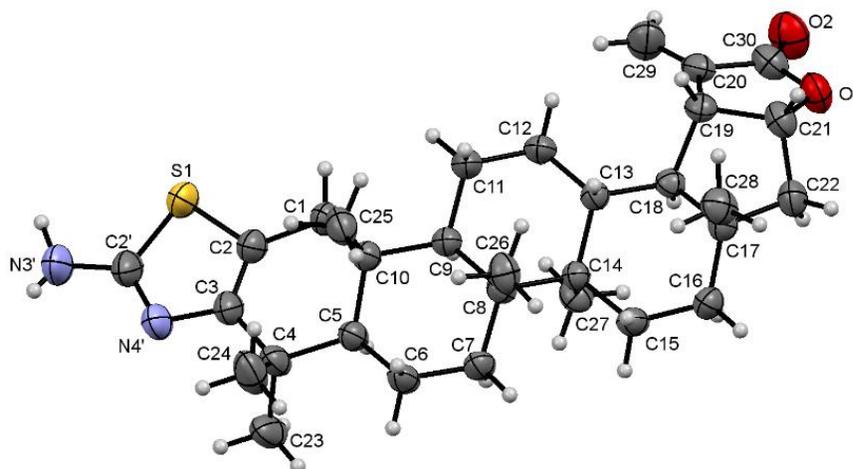
**Figura 10.** Espectros en  $\text{CDCl}_3$  de: **a)** DEPT  $90^\circ$ ; **b)** experimento DEPT  $135^\circ$ ; **c)** RMN- $^{13}\text{C}$  de 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) en  $\text{CDCl}_3$ .

Con la finalidad de establecer la posición de los carbonos aromáticos en este compuesto se realizó un experimento de HMBC (Figura 11). Se observó que las señales a  $\delta$  2.54 y  $\delta$  2.14, correspondientes a los protones del metileno en la posición 1 ( $\text{H}_\beta$  y  $\text{H}_\alpha$ , respectivamente), presentan correlación con los carbonos aromáticos a  $\delta$  151.9 (C3) y  $\delta$  115.8 (C2). Asimismo, los protones a  $\delta$  1.18 y  $\delta$  1.09, correspondientes a metilos geminales en posiciones 24 y 23, respectivamente; mostraron acoplamiento solamente con el carbono a  $\delta$  151.9 (C3). El tercer carbono aromático a  $\delta$  164.9 no mostró acoplamiento con ningún protón. Con base en estas observaciones se dedujo que la formación del heterocíclico aromático se realizó en la posición 2 y 3 para formar el 2-aminotiazolochraceolida A. Por otra parte, se observó que las señales a  $\delta$  4.94 y  $\delta$  3.12 ( $\text{H}-21$  y  $\text{H}-19$ , respectivamente) acoplaron con la señal con  $\delta$  171.42 (C30), confirmando que la  $\gamma$ -lactona  $\alpha\beta$ -insaturada se mantuvo en la estructura del esqueleto triterpénico.



**Figura 11.-** Experimento HMBC de la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc).

El compuesto 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc), se logró cristalizar por evaporación lenta de una solución de ésta, en una mezcla de hexano y acetato de etilo, lo que permitió la obtención de cristales de color blanco, con la calidad suficiente para ser analizados por difracción de rayos X de monocristal. La estructura obtenida se muestra en la figura 12; asimismo, los datos cristalográficos más importantes se proporcionan en la tabla 3. Se observa el átomo de azufre enlazado al carbono en la posición 2 y el átomo de nitrógeno al carbono en la posición 3 del triterpeno. El resultado de este análisis permitió establecer de forma inequívoca la identidad de la molécula, así como la configuración absoluta por medio de dispersión anómala, corroborando lo que se había determinado por experimentos de RMN. Es importante mencionar que es la primera vez que se obtiene la estructura por difracción de rayos X de un triterpeno con un anillo 2-amino tiazólico fusionado al anillo A de un triterpeno.



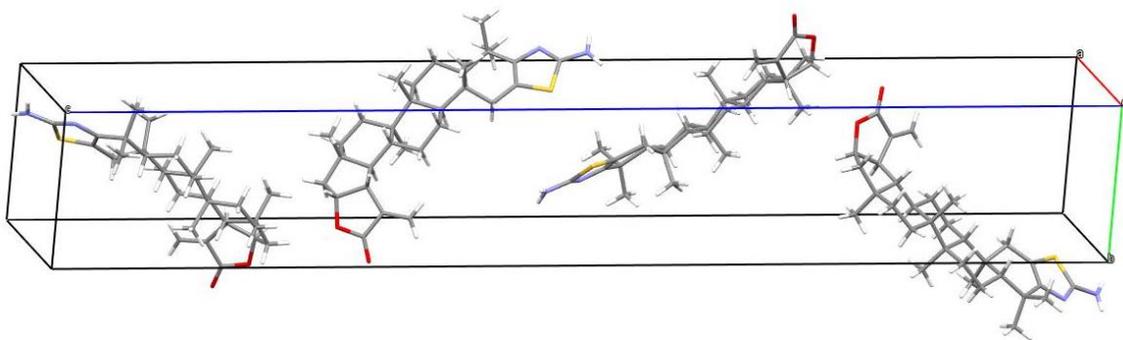
**Figura 12.** Estructura de la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) obtenida por difracción de rayos X de monocristal.

En los datos del sistema cristalino (Tabla 3) se puede observar que la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) tiene un sistema cristalino ortorrómbico por lo que contiene tres lados desiguales y cada lado se encuentra a  $90^\circ$  formando un prisma rectangular. En su celda unitaria podemos encontrar cuatro moléculas de 2-aminotiazolochraceolida A ( $Z= 4$ ) los cuales van formando lo que se le conoce como ejes tornillo obteniéndose un grupo espacial  $P2_12_12_1$  (Figura 13).

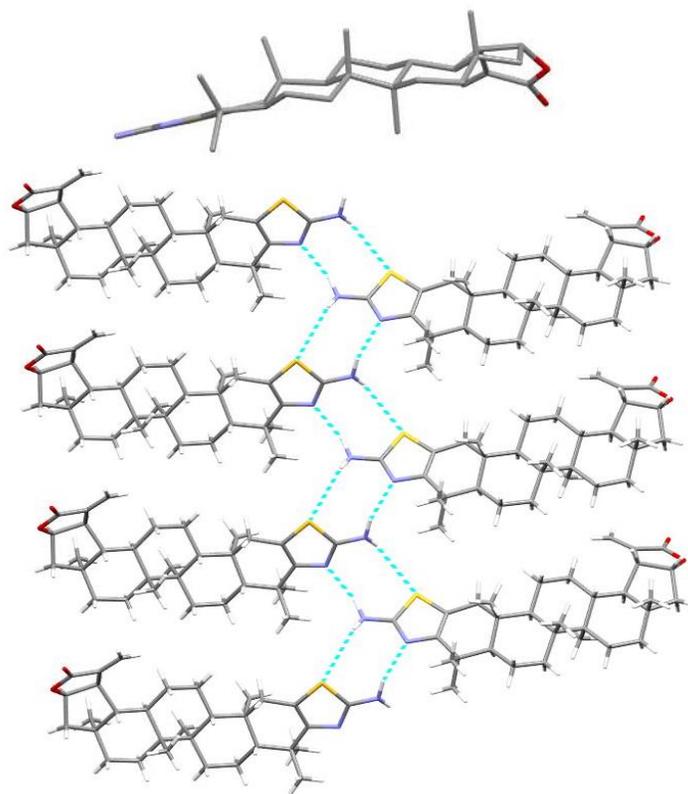
**Tabla 3.** Datos cristalográficos de la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc).

<b>Formula empírica</b>	<b><math>C_{31}H_{44}N_2O_2S</math></b>
<b>Sistema cristalino</b>	Ortorrómbico
<b>Grupo de espacio</b>	$P 2_1 2_1 2_1$
<b>Dimensiones por unidad de celda</b>	$a = 7.6419 \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ . $b = 7.853 \text{ \AA}$ $\beta = 90^\circ$ . $c = 52.971 \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$ .
<b>Volumen</b>	$3178.89 \text{ \AA}^3$
<b>Z</b>	4

El 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) cuenta con 7 anillos donde 3 ciclohexanos se encuentran en conformación de silla y uno en semisilla (anillo A); su anillo F se encuentra en forma de sobre con el carbono 17 fuera del plano (Figura 14), el anillo aromático y la lactona son planos. El compuesto se encuentra formando una red de puentes de hidrógeno entre el azufre y el nitrógeno del anillo tiazólico de la estructura con el grupo amino del 2-aminotiazol de otra molécula.



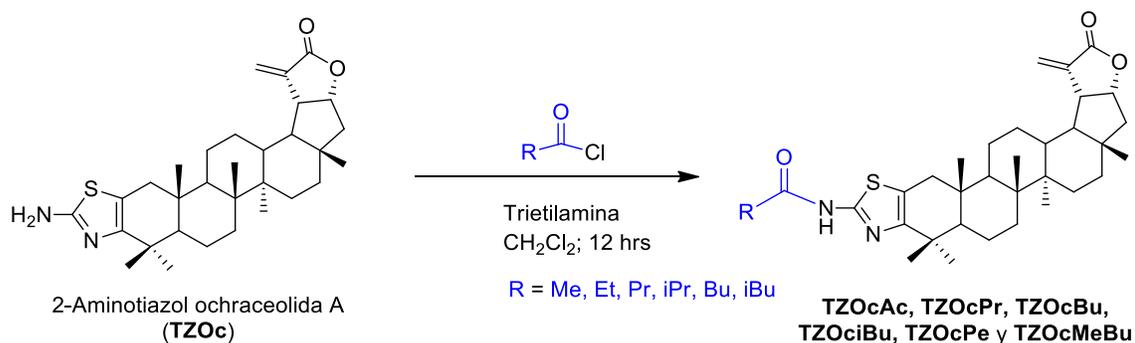
**Figura 13.** Celda unitaria del sistema cristalino de la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) obtenida por difracción de rayos X de monocristal.



**Figura 14.** Puentes de hidrógeno observados en la red cristalina de la 2-aminotiazolochraceolida A obtenida por difracción de rayos X de monocristal.

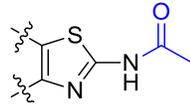
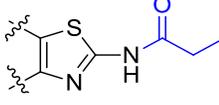
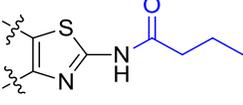
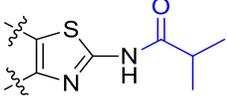
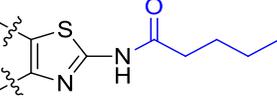
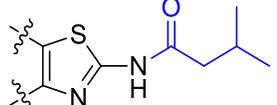
## Síntesis de Amidas alifáticas

Una vez obtenida la 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc), se procedió a la síntesis de la serie de amidas alifáticas (Esquema 6). Para ello, se hizo reaccionar un equivalente de TZOc con 1.1 equivalente de cloruro de ácido R-CO-Cl (R = Me, Et, Pr, iPr, Bu, iBu) en diclorometano. Este tipo de reacción ya ha sido descrito ampliamente en la literatura.<sup>87,88</sup> El crudo de reacción se sometió a cromatografía en columna; se purificaron los derivados **TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu**, los rendimientos se encuentran expuestos en la tabla 4. Los compuestos fueron caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H y RMN -<sup>13</sup>C.



**Esquema 6.-** Reacción para la obtención de la serie de amidas alifáticas **TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu**.

**Tabla 4.- Rendimientos obtenidos sobre los derivados de amidas alifáticas **TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu**.**

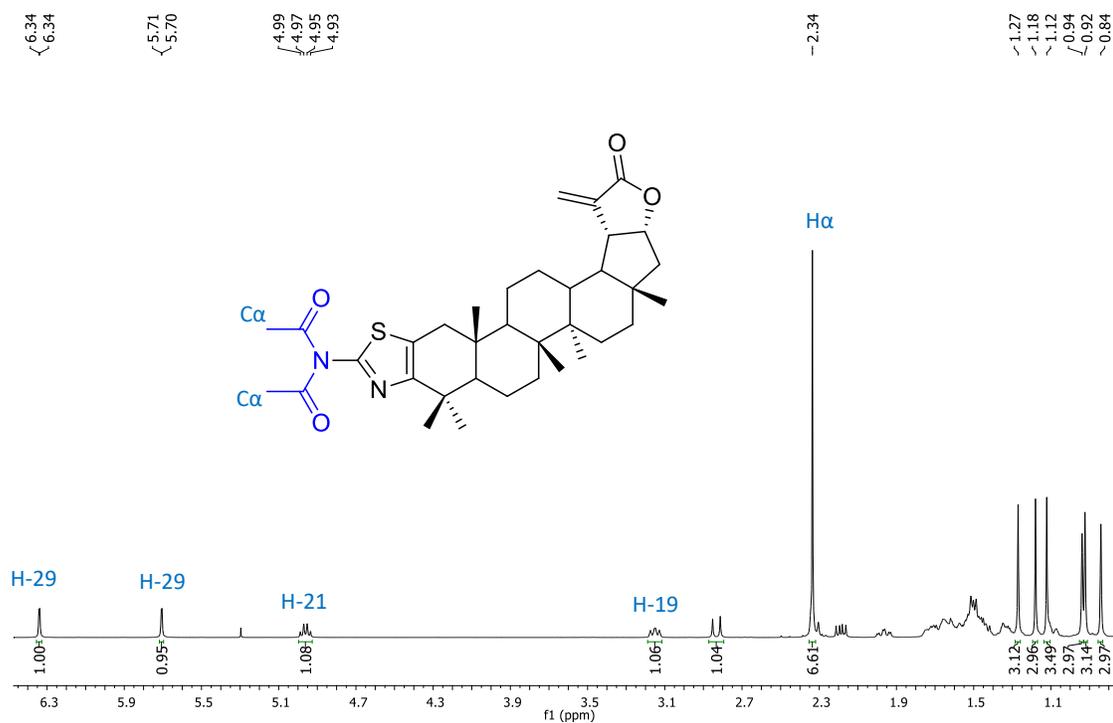
Compuesto		Rendimiento*
TZOcAc		18 %
TZOcPr		18 %
TZOcBu		55 %
TZOciBu		57 %
TZOcPe		52 %
TZOcMeBu		53 %

\*con base al producto aislado

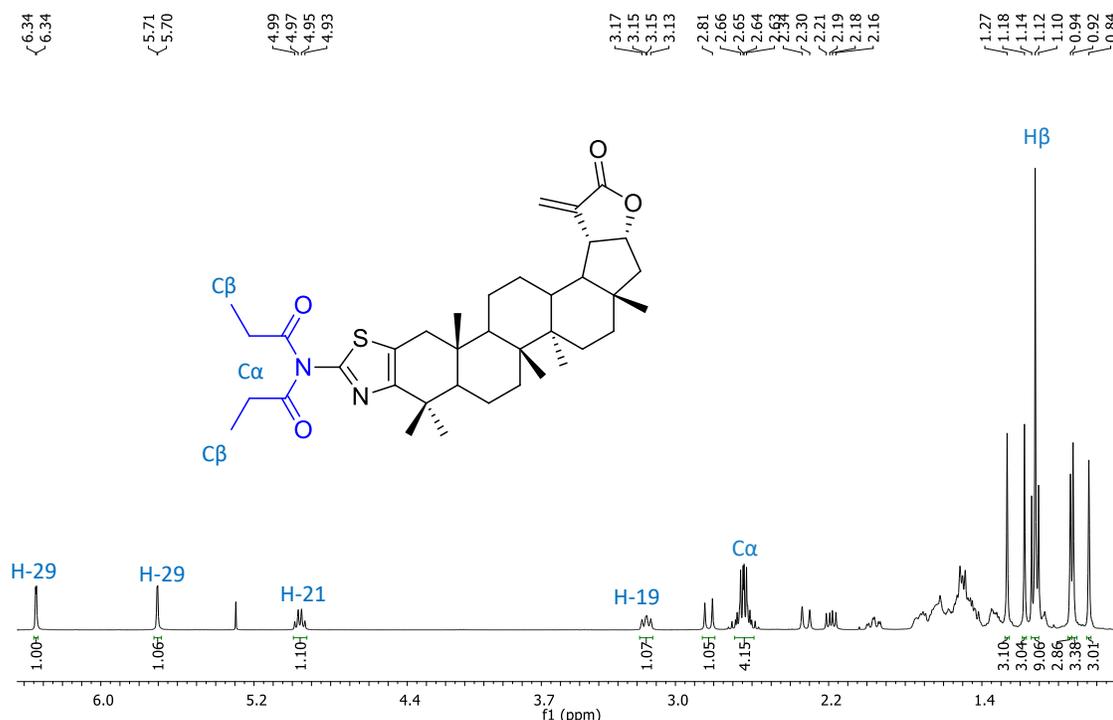
Como se observa en la tabla 4, los rendimientos obtenidos son moderados para las amidas alifáticas entre un 52 y 57 % utilizando un equivalente de Tiazo Ochr con 1.1 equivalente de cloruro de ácido correspondiente y trietilamina en diclorometano a excepción de los compuestos **TZOcAc** y **TZOcPr**.<sup>81,89-91</sup> Los rendimientos los podemos considerar como moderados por ser la primera vez que se sintetizan estos compuestos con estos productos de partida y si se compran con la literatura en los cuales se aprecia mejores resultados, a excepción de dos compuestos de los cuales se obtuvieron malos rendimientos. El bajo rendimiento de estos dos compuestos se puede deber a la formación de productos no deseados, como la posible apertura de la lactona en un medio ácido, debido a la posible descomposición de los cloruros de ácido en presencia de agua y la posterior formación de ácido clorhídrico. En el análisis por CCD se observó la formación de un compuesto de mayor polaridad y no fue posible su aislamiento. Otro de estos compuestos formados en ambas reacciones es una diamida. Las diamidas formadas fueron aisladas e identificadas por RMN-<sup>1</sup>H formando los compuestos **TZOc2Ac** y **TZOc2Pr** (figura 15 y 16, respectivamente); esto es posible debido a la adición de dos acilos al grupo 2-amino, se han obtenido este tipo de compuestos en reacciones utilizando condiciones similares en especial relacionado al uso de trietilamina.<sup>92-96</sup> Para la formación de los dos compuestos (**TZOcAc** y **TZOcPr**)

se probaron diferentes medios de reacción; primeramente en un sistema cerrado y abierto, diferentes cantidades de equivalentes de cloruro de ácido correspondiente (1, 1.1, 1.2, 1.5, 2 equivalentes) y de trietilamina utilizada (1, 1.1, 1.2, 1.5, 2 equivalentes) en diferentes tiempos de reacción monitoreados por CCD sin obtener buenos rendimientos para ambos compuestos. Se optó por cambiar la metodología utilizando piridina como base; es importante mencionar que con esta metodología no se obtuvo el resultado esperado, por lo que se obtuvieron rendimientos aún más bajos, además se observó la formación de las diamidas con el paso del tiempo.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 15) del compuesto **TZOc2Ac** se puede observar la aparición de una señal simple  $\delta$  2.34 (H $\alpha$ ) proporcional a 6H, correspondientes a dos grupos metilos del grupo amida. En el compuesto **TZOc2Pr** (Figura 16) se aprecian dos señales, un cuádruple a  $\delta$  2.65 (H $\alpha$ ,  $J = 7.2, 5.1$  Hz) proporcional a 4 H y una señal triple a  $\delta$  0.98 (H $\beta$ ,  $J = 7.3$  Hz) proporcional a 9 H, correspondiente a dos metilos del grupo amida y un metilo.



**Figura 15.-** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **TZOc2Ac** en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

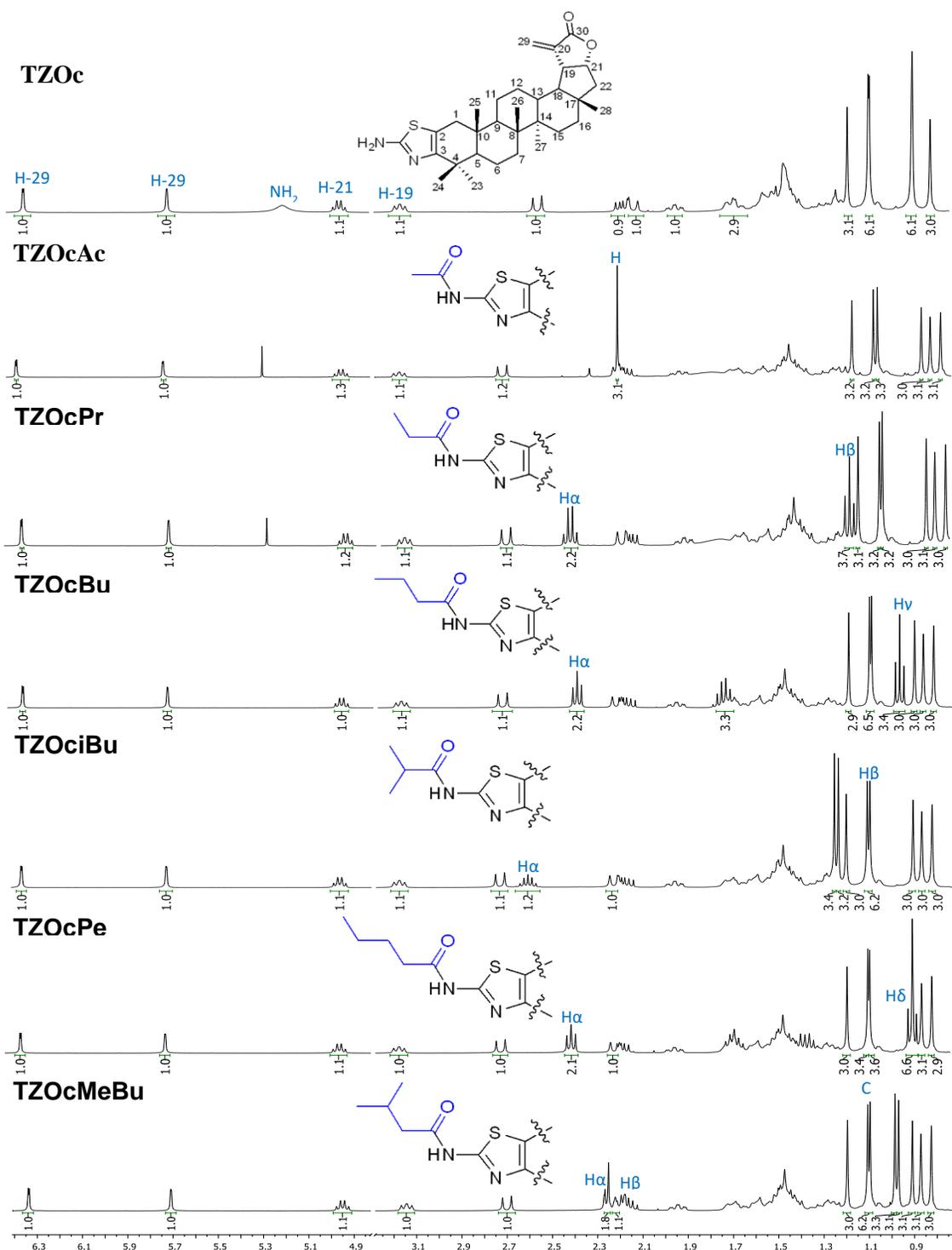


**Figura 16.-** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **TZOc2Pr** en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

De forma general, en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos **TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu** (Figura 17), se pueden observar dos señales dobles con  $\delta$  6.32 (1H-29,  $J = 1.9$  Hz) y  $\delta$  5.69 (1H-29,  $J = 1.3$  Hz), característicos de protones vinílicos, dos señales con  $\delta$  4.94 (m) y  $\delta$  3.12 (m) proporcionales cada una a un protón, correspondiente a los metinos H-21 y H-19, respectivamente. Los desplazamientos químicos de estas señales, en comparación con los de la 2-aminotiazolochraceolida A, resultaron ser muy similares, lo que permite suponer que se mantiene la insaturación en C20-C29 y la  $\gamma$ -lactona en la estructura. Adicionalmente, se observa la desaparición de la señal ancha con  $\delta$  5.19 presente en el espectro de 2-aminotiazolochraceolida A, correspondiente a los protones del grupo amino.

Por otra parte, se observó la aparición de señales características de protones alifáticos. En el compuesto **TZOcAc**, únicamente se observa la aparición de una señal simple con  $\delta$  2.22 (3H, C $\alpha$  con respecto al carbonilo), correspondientes a un grupo metilo del grupo amida. En el compuesto **TZOcPr**, se aprecian dos señales, un cuádruple con  $\delta$  2.45 (2H,  $J = 7.5$  Hz, C $\alpha$  con respecto al carbonilo) y una señal triple con  $\delta$  0.98 (3H,  $J = 7.6$  Hz, C $\beta$  con respecto al carbonilo), generados por el grupo etilo. Para el compuesto **TZOcBu**, se observa la aparición de dos señales triples con  $\delta$  2.38 (2H,  $J = 7.4$  Hz, C $\alpha$  con respecto al carbonilo) y  $\delta$  0.98 (3H,  $J = 7.4$  Hz, C $\gamma$  con respecto al carbonilo), correspondientes a la cadena de un propilo; la señal de los protones (2H) del carbono  $\beta$  aparece en la región característica de los metilenos. En el compuesto

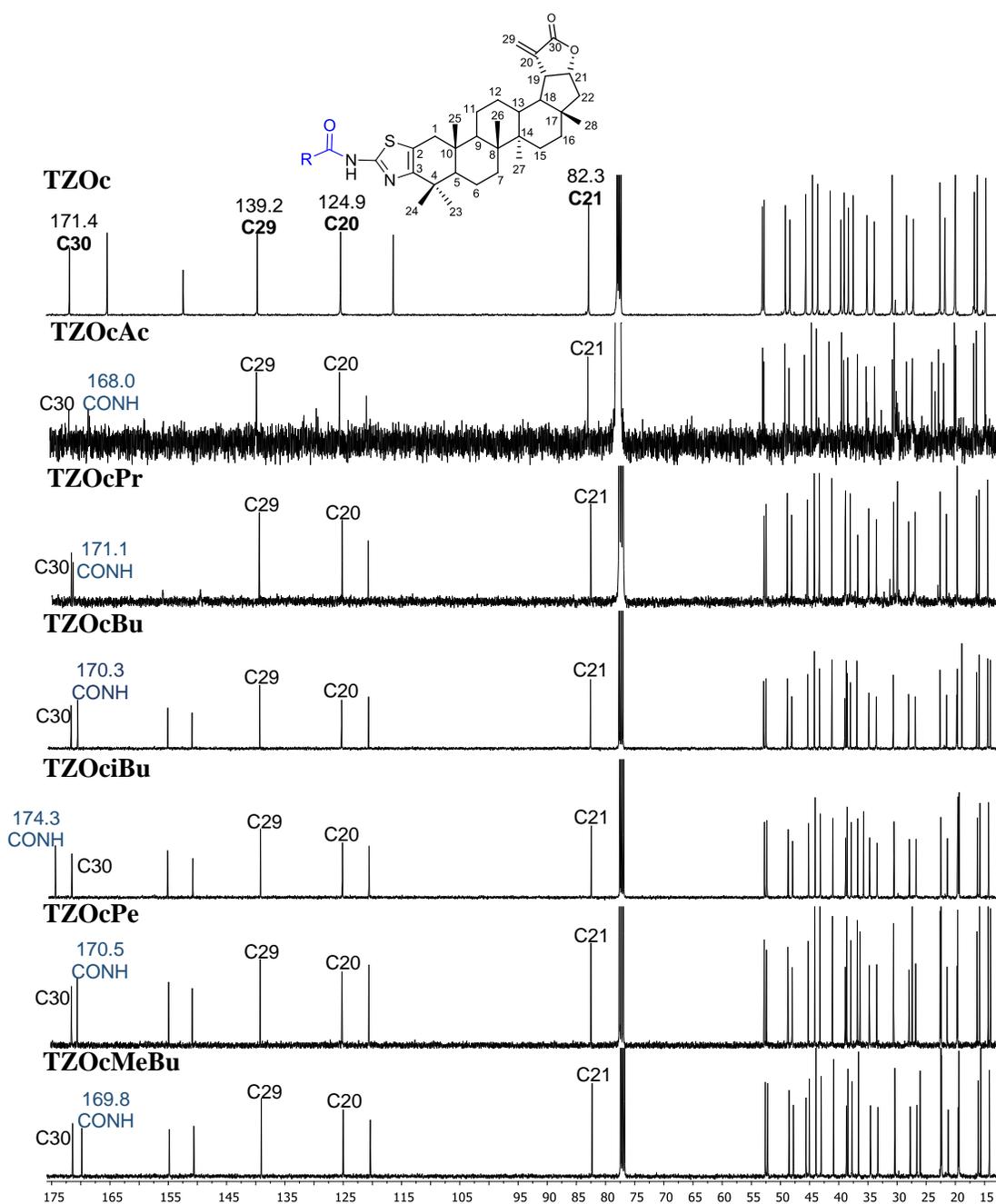
**TZOciBu**, se puede apreciar la señal séptuple con  $\delta$  2.58 (1H,  $J = 6.95$  Hz, C $\alpha$  con respecto al carbonilo) y una señal doble  $\delta$  1.10 (6H,  $J = 4.7$  Hz, C $\beta$  con respecto al carbonilo), característicos de un isopropilo. Para el compuesto **TZOcPe**, se observan dos señales triples  $\delta$  2.39 (2H,  $J = 7.5$  Hz, C $\alpha$  con respecto al carbonilo) y  $\delta$  0.91 (3H,  $J = 7.5$  Hz, C $\delta$  con respecto al carbonilo), correspondientes a la cadena de un butilo. Por último, en el compuesto **TZOcMeBu**, se observa la aparición de un doble  $\delta$  2.28 (2H,  $J = 6.2$  Hz, C $\alpha$  con respecto al carbonilo), una señal séptuple  $\delta$  2.22 (1H,  $J = 7.3$  Hz, C $\beta$  con respecto al carbonilo) y una señal doble  $\delta$  1.10 (6H,  $J = 4.2$  Hz, C $\gamma$  con respecto al carbonilo), característicos de un isobutil del grupo amida.



**Figura 17.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de la **TZOc**) 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A, **TZOcAc**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) acetamida, **TZOcPr**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) propionamida, **TZOcBu**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) butiramida, **TZOciBu**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida, **TZOcPe**) N-(2-

tiazolil[3,2-d]ochraceolida A)-pentanamida, **TZOcMeBu**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-metilbutanamida; todos en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

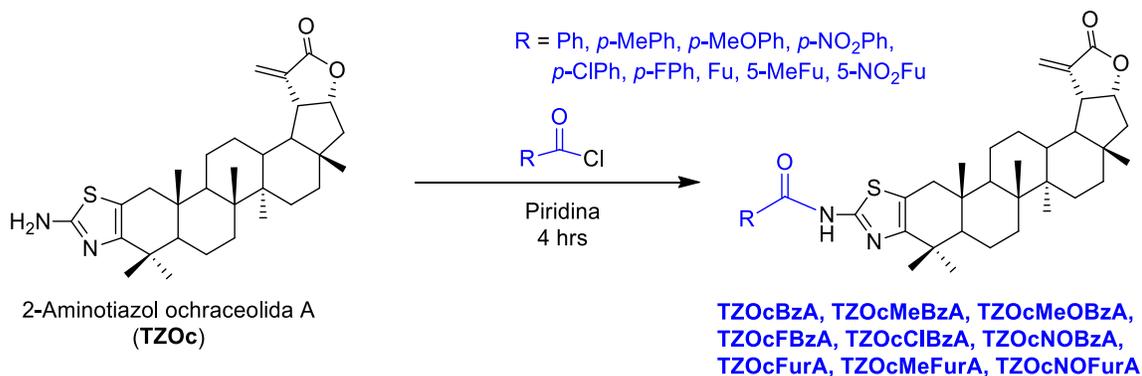
En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de los compuestos **TZOc**, **TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu** (Figura 18), se observan 31 señales para la 2-aminotiazolochraceolida A (**TZOc**), 33 señales para el compuesto **TZOcAc**, 34 señales para el compuesto **TZOcPr**, 35 señales para los compuestos **TZOcBu** y **TZOciBu**, 36 señales para los compuestos **TZOcPe** y **TZOcMeBu**; entre estas señales se pueden apreciar la señal  $\delta$  171.4 correspondiente a la lactona (C30); dos señales con  $\delta$  139.2 y  $\delta$  124.9 correspondientes a los carbonos vinílicos (C20 y C29, respectivamente). Se puede destacar la aparición de una señal en cada compuesto con  $\delta$  168.0,  $\delta$  171.1,  $\delta$  170.3,  $\delta$  174.3,  $\delta$  170.5 y  $\delta$  169.8 (**TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu**, respectivamente) correspondiente a cada carbonilo del grupo amida.



**Figura 18.** Espectro en  $\text{CDCl}_3$  de RMN- $^{13}\text{C}$  de la **TZOc**) 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A, **TZOcAc**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) acetamida, **TZOcPr**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) propionamida, **TZOcBu**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) butiramida, **TZOciBu**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida, **TZOcPe**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) pentanamida, **TZOcMeBu**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-metilbutanamida.

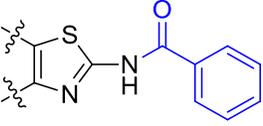
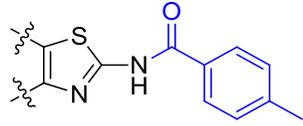
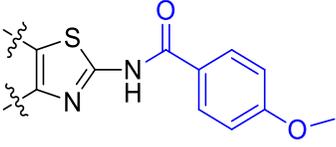
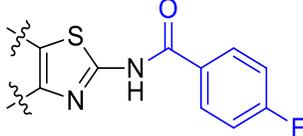
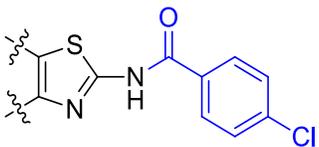
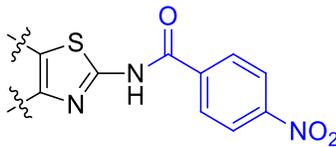
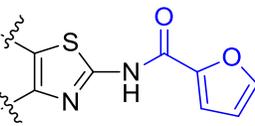
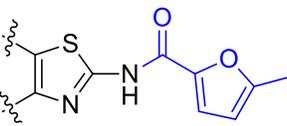
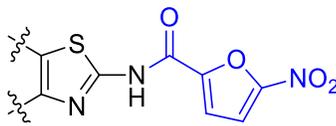
## Síntesis de Amidas aromáticas

Para la obtención de la serie de las amidas aromáticas (Esquema 7), se observó que utilizando las mismas condiciones en la síntesis de las amidas alifáticas, se obtenían bajos rendimientos para algunos compuestos. Esto motivó el uso de piridina como base y disolvente obteniéndose mejores rendimientos.<sup>83,97-100</sup> Para esto se hizo reaccionar un equivalente de 2-aminotiazolochraceolida A con 1.1 equivalente de cloruro de benzoilo *para* sustituido o furoilo sustituido en 5, según correspondiera (R = Ph, *p*-MeOPh, *p*-NO<sub>2</sub>Ph, *p*-ClPh, *p*-FPh, Fu, 5-MeFu, 5-NO<sub>2</sub>Fu) en piridina. El producto de cada reacción se sometió a cromatografía en columna; purificándose 9 derivados denominados **TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcFBzA**, **TZOcClBzA**, **TZOcNOBzA**, **TZOcFurA**, **TZOcMeFurA**, **TZOcNOFurA**, cuyos rendimientos se exponen en la tabla 5. Todos los productos fueron caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C.



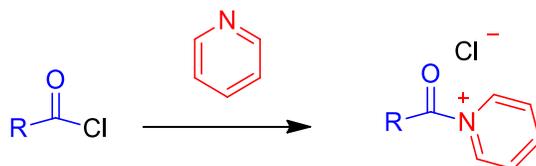
**Esquema 7.-** Reacción para la obtención de la serie de amidas aromáticas **TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcFBzA**, **TZOcClBzA**, **TZOcNOBzA**, **TZOcFurA**, **TZOcMeFurA**, **TZOcNOFurA**.

**Tabla 5.- Rendimientos obtenidos sobre los derivados de amidas aromáticas 7-15**

<b>Compuesto</b>		<b>Rendimiento*</b>
<b>TZOcBzA</b>		60 %
<b>TZOcMeBzA</b>		66 %
<b>TZOcMeOBzA</b>		50 %
<b>TZOcFBzA</b>		43 %
<b>TZOcClBzA</b>		65 %
<b>TZOcNOBzA</b>		34 %
<b>TZOcFurA</b>		37 %
<b>TZOcMeFurA</b>		60 %
<b>TZOcNOFurA</b>		26%

\*con base al producto aislado

Como se observa en la tabla 5, los rendimientos obtenidos para las amidas aromáticas se encuentran entre un 66 y 26 %. Se puede observar que son rendimientos poco mayores a los obtenidos en la síntesis de la serie de amidas alifáticas, pero aun los considerar como moderados al compararlos con la literatura donde se observan mejores resultados y por ser la primera vez que se realizan con estos productos de partida. Se observó que en esta metodología la piridina tiene un papel de gran importancia ya que reacciona con los cloruros de acilo para formar sales de acilo (Esquema 8).<sup>101,102</sup> Las sales de acilo generan un agente acilante aún más reactivo que el cloruro de acilo correspondiente, debido a que se retira más densidad electrónica del carbono Csp<sub>2</sub>, obteniéndose mayores rendimientos. Por otra parte, y de forma similar a la trietilamina, reaccionan con el HCl producido generando cloruro de piridinio.



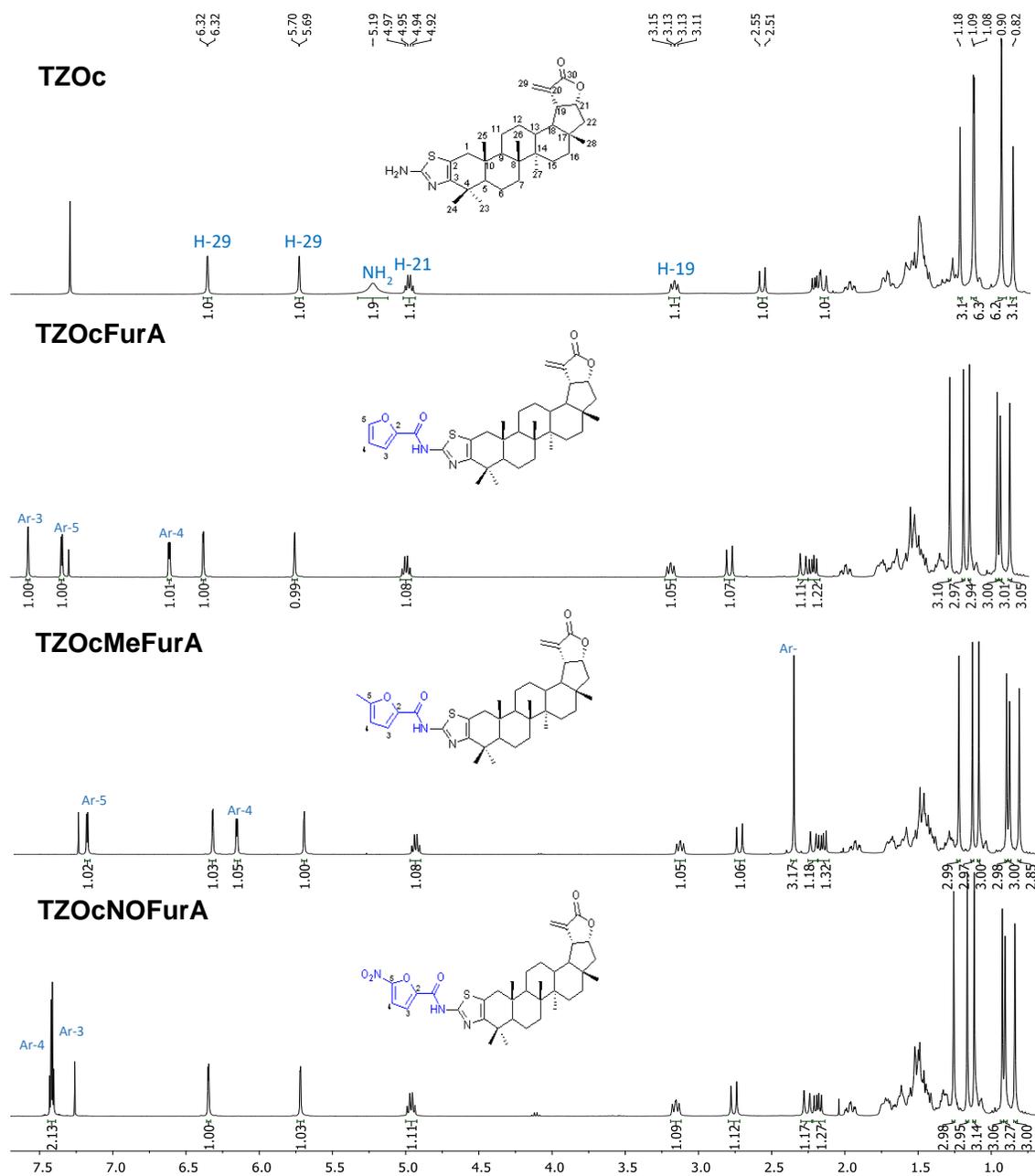
R = Ph, *p*-MePh, *p*-MeOPh, *p*-NO<sub>2</sub>Ph, *p*-ClPh, *p*-FPh, Fu, 5-MeFu, 5-NO<sub>2</sub>Fu

**Esquema 8.-** Formación de las sales de acilo.

En los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos **TZOc**, **TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcFBzA**, **TZOcCIBzA**, **TZOcNOBzA** (Figura 19) y **TZOc**, **TZOcFurA**, **TZOcMeFurA**, **TZOcNOFurA** (Figura 20), se pueden observar dos señales dobles con δ 6.32 (1H-29, *J* = 1.9 Hz) y δ 5.69 (1H-29, *J* = 1.3 Hz), característicos de protones vinílicos, dos señales con δ 4.94 (m) y δ 3.12 (m) proporcionales cada una a un protón, correspondiente a los metinos H-21 y H-19, respectivamente; los desplazamientos químicos de estas señales resultaron ser muy similares a las observadas en el espectro de la 2-aminotiazolochraceolida A, lo que permite concluir que se mantiene la insaturación en C20-C29 y la γ-lactona en la estructura. Como era de esperarse, se observó la desaparición de la señal ancha a δ 5.19 presente en el espectro de 2-aminotiazolochraceolida A, correspondiente a los protones de un grupo amino.



**TZOcNOBzA**) *N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) 4-nitrobenzamida; todos en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



**Figura 20.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de la **TZOc**) 2'-aminotiazol[3,2-*d*]ochraceolida A, **TZOcFurA**) *N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) furan-2-carboxamida, **TZOcMeFurA**) *N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) 5-metilfuran-2-carboxamida, **TZOcNOFurA**) *N*-(2-tiazolil[3,2-*d*]ochraceolida A) 5-nitrofuran-2-carboxamida; todos en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

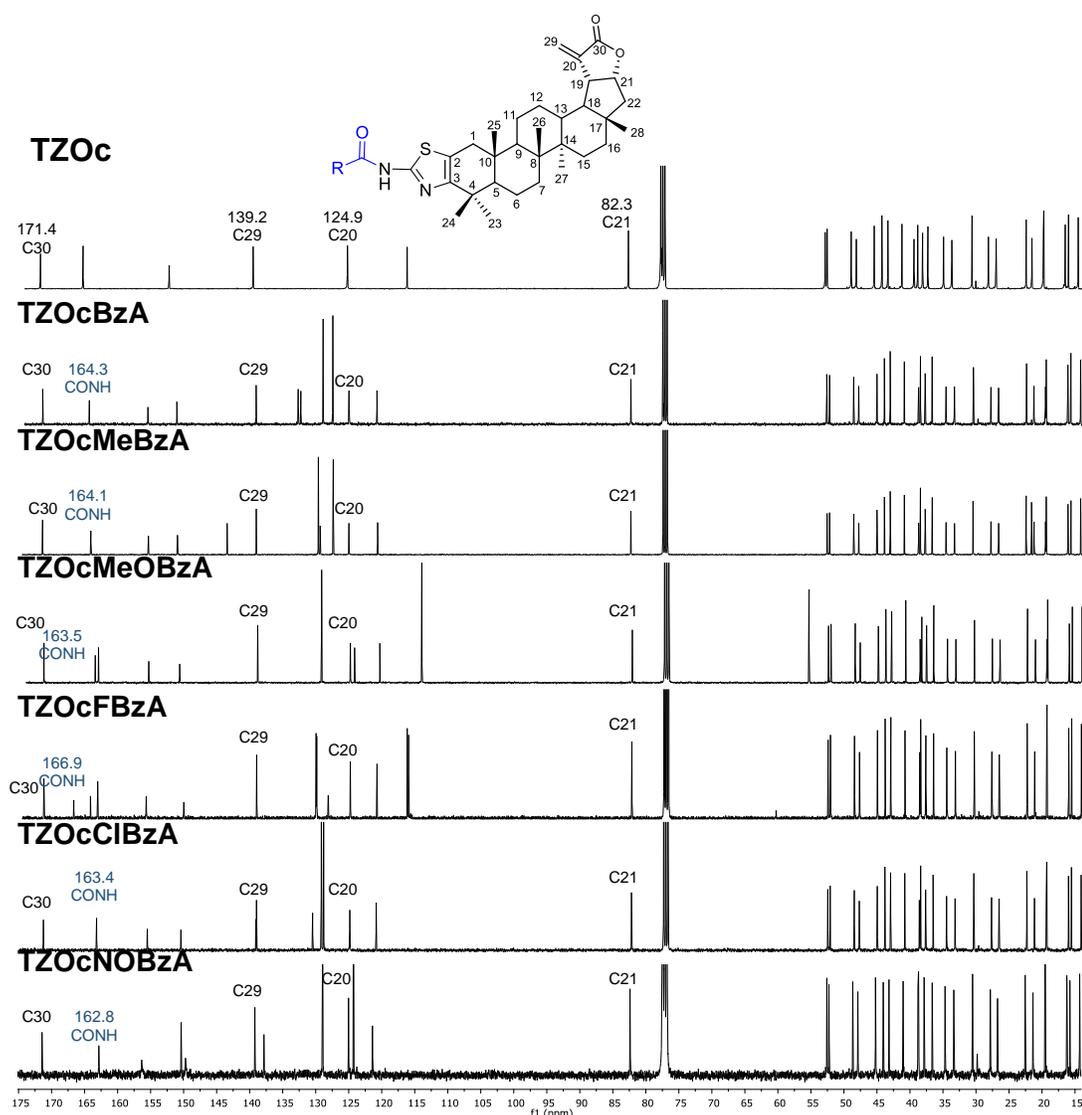
Se observó la aparición de señales de protones aromáticos. Para el compuesto **TZOcBzA**, tres señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.92 (Ar-2H,  $J_{orto} = 7.50$  Hz, d),  $\delta$  7.54 (Ar-1H,  $J_{para} = 7.17$  Hz, t) y  $\delta$  7.46 (Ar-2H,  $J_{meta} = 7.63$  Hz, t), correspondientes al grupo benzilo del grupo amida. En el compuesto **TZOcMeBzA**, se aprecia la aparición de dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.82 (Ar-2H,  $J_{orto} = 8.2$  Hz, d),  $\delta$  7.26 (Ar-2H,  $J_{meta} = 8.1$  Hz, d) y una señal simple con  $\delta$  2.40 (*p*-Me), correspondientes al grupo *p*-toluilo del grupo amida. Para el compuesto **TZOcMeOBzA**, se observan dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.90 (Ar-2H,  $J_{orto} = 8.8$  Hz, d),  $\delta$  6.95 (Ar-2H,  $J_{meta} = 8.8$  Hz, d) y una señal simple con  $\delta$  2.40 (*p*-OMe), correspondientes al grupo *p*-metoxibenzoilo del grupo amida. En el compuesto **TZOcFBzA**, únicamente se observan dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  8.00 (Ar-2H,  $J = 8.8, 5.2$  Hz, dd) y  $\delta$  7.18 (Ar-2H,  $J_{meta} = 8.6$  Hz, t), generados por el *p*-fluorbenzoilo del grupo amida. En el compuesto **TZOcClBzA**, se manifiestan dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.90 (Ar-2H,  $J_{orto} = 8.6$  Hz, d),  $\delta$  7.45 (Ar-2H,  $J_{meta} = 8.6$  Hz, d), correspondientes al *p*-clorobenzoilo del grupo amida. Por último, en el compuesto **TZOcNOBzA**, se puede apreciar la aparición de dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  8.36 (Ar-2H,  $J_{orto} = 8.8$  Hz, d),  $\delta$  8.19 (Ar-2H,  $J_{meta} = 8.8$  Hz, d), generados por el *p*-nitrobenzoilamida del grupo amino.

En el compuesto **TZOcFurA**, se aprecia la aparición de tres señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.54 (d,  $J = 0.9$  Hz, Ar3-1H), 7.31 (d,  $J = 3.5$  Hz, Ar5-1H), 6.57 (dd,  $J = 3.5, 1.7$  Hz, Ar4-1H) correspondientes al grupo furoilo del grupo amida. Para el compuesto **TZOcMeFurA**, se observan dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.20 (d,  $J = 3.4$  Hz, Ar5-1H), 6.18 (d,  $J = 3.4$  Hz, Ar4-1H), y una señal simple con  $\delta$  2.37 (Ar5-Me, 3H), correspondientes al grupo 5-metilfuroil del grupo amida. En el compuesto **TZOcNOFurA**, únicamente se observan dos señales de protones aromáticos con  $\delta$  7.43 (d,  $J = 3.8$  Hz, Ar4-1H), 7.41 (d,  $J = 3.8$  Hz, Ar3-1H), generados por el grupo 5-nitrofuroilo amida.

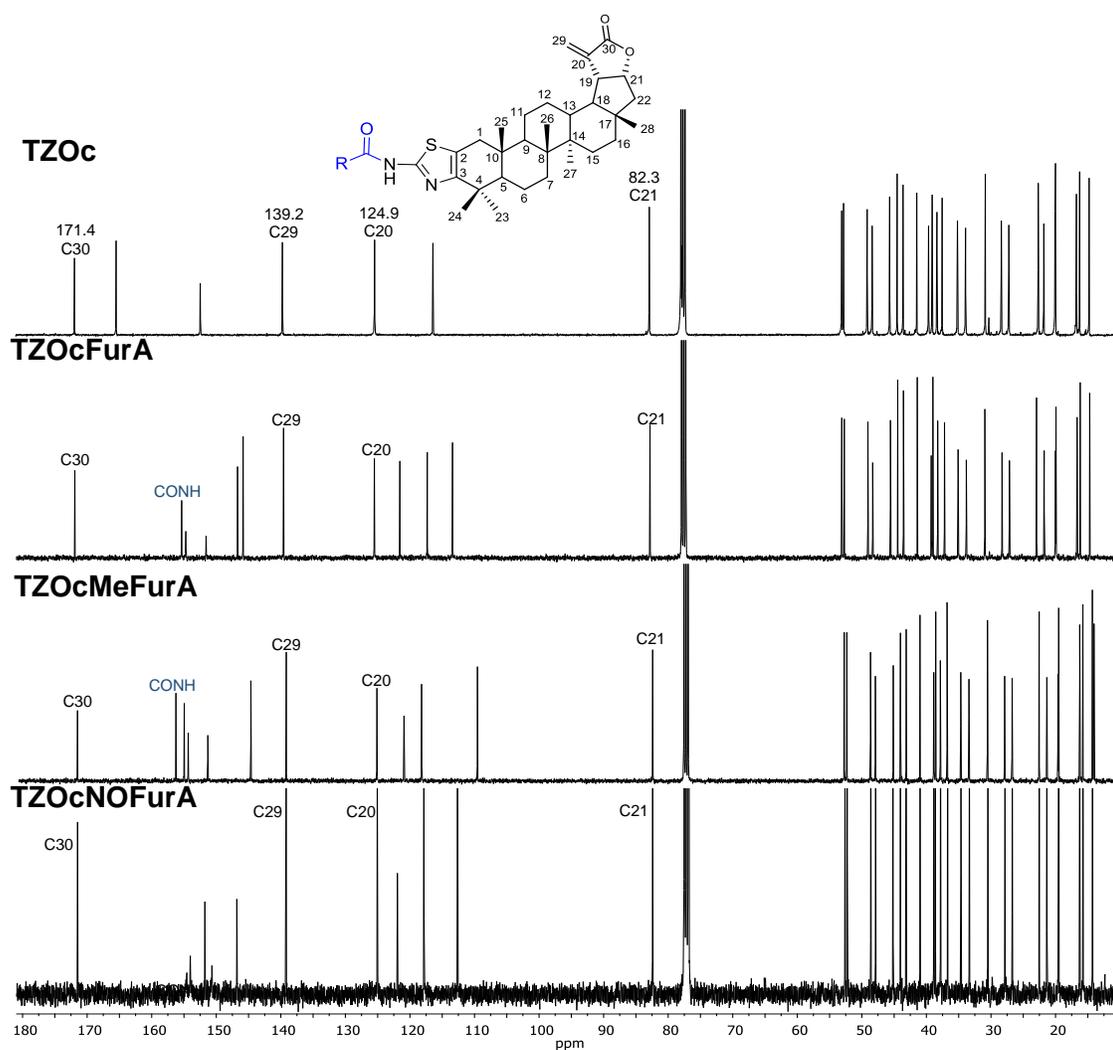
En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos **TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcFBzA**, **TZOcClBzA**, **TZOcNOBzA** y la 2-aminotiazolochraceolida A (Figura 21), se observan 31 señales para la 2-aminotiazolochraceolida A, 36 señales para los compuestos **TZOcBzA**, **TZOcClBzA** y **TZOcNOBzA**, 37 señales para los compuestos **TZOcMeBzA** y **TZOcMeOBzA**, 38 señales para el compuesto **TZOcFBzA**; se puede apreciar una de estas señales  $\delta$  171.4 correspondiente a la lactona (C30); dos señales con  $\delta$  139.2 y  $\delta$  124.9 correspondientes a los carbonos vinílicos (20 y 29, respectivamente) en todos los derivados. Para los compuestos **TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcClBzA** y **TZOcNOBzA**, se puede destacar la aparición de cuatro señales las cuales son equivalentes a seis carbonos aromáticos, debido a que cuatro carbonos son homotópicos generando únicamente dos señales, y la aparición de una señal en cada compuesto con  $\delta$  164.3,  $\delta$  164.1,  $\delta$  163.5,  $\delta$  166.9,  $\delta$

163.4 y  $\delta$  162.8 (**TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcFBzA**, **TZOcCIBzA**, **TZOcNOBzA**, respectivamente) correspondiente al carbonilo del grupo amida.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos **TZOcFurA**, **TZOcMeFurA**, **TZOcNOFurA** y la 2-aminotiazolochraceolida A (Figura 22), se observan 31 señales para la 2-aminotiazolochraceolida A, 36 señales para los compuestos **TZOcFurA** y **TZOcNOFurA**; 37 señales para los compuestos **TZOcMeFurA**; se puede apreciar una de estas señales con  $\delta$  171.4 correspondiente a la lactona (C30); dos señales con  $\delta$  139.2 y  $\delta$  124.9 correspondientes a los carbonos vinílicos (20 y 29, respectivamente) en todos los derivados. Para los compuestos **TZOcFurA**, **TZOcMeFurA** y **TZOcNOFurA** se puede destacar la aparición de cuatro carbonos aromáticos y la aparición de una señal en cada compuesto con  $\delta$  154.9,  $\delta$  156.1,  $\delta$  154.5 (**TZOcFurA**, **TZOcMeFurA** y **TZOcNOFurA**, respectivamente) correspondiente al carbonilo del grupo amida.



**Figura 21.** Espectro en  $\text{CDCl}_3$  de RMN- $^{13}\text{C}$  de la **TZOc**) 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A, **TZOcBzA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) benzamida, **TZOcMeBzA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-metilbenzamida, **TZOcMeOBzA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-metoxibenzamida, **TZOcFBzA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-fluorobenzamida, **TZOcClBzA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-clorobenzamida, **TZOcNOBzA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 4-nitrobenzamida; todos en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

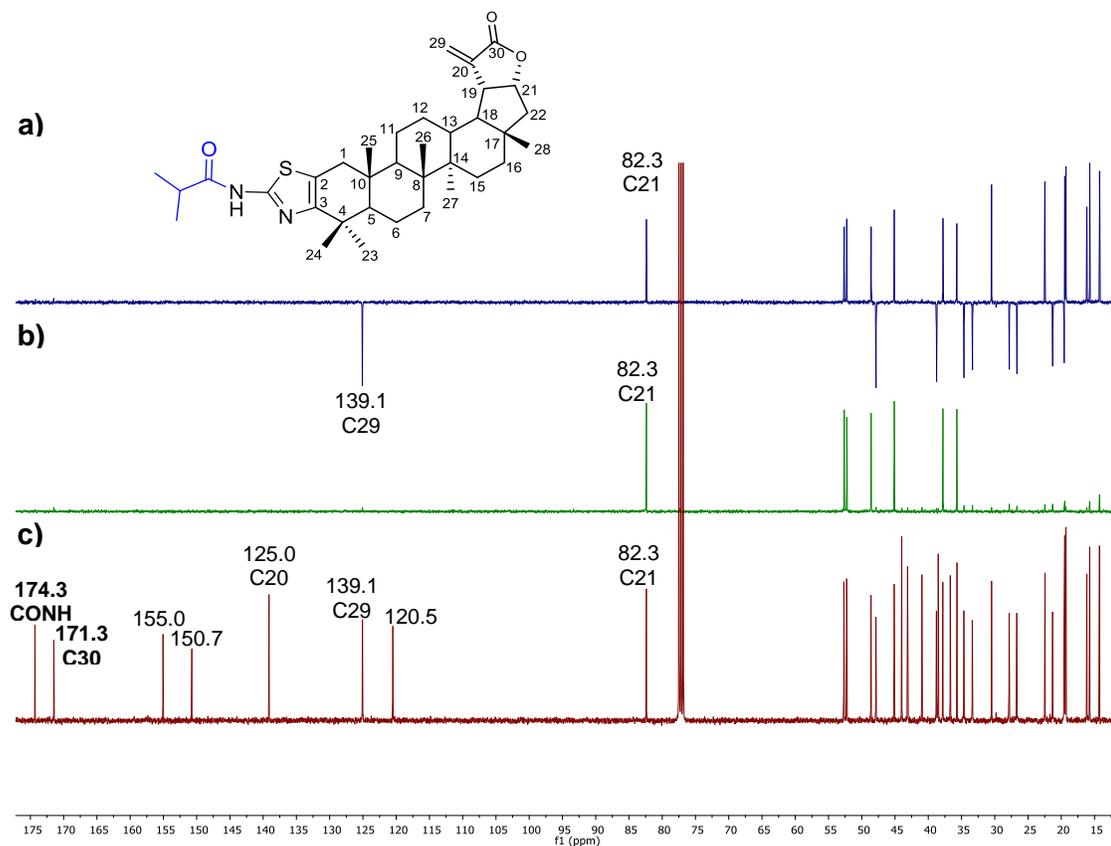


**Figura 22.** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de la **TZOc**) 2'-aminotiazol[3,2-d]ochraceolida A, **TZOcFurA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) furan-2-carboxamida, **TZOcMeFurA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 5-metilfuran-2-carboxamida, **TZOcNOFurA**) N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) 5-nitrofuran-2-carboxamida; todos en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

De la serie de amidas alifáticas (compuestos **TZOcAc**, **TZOcPr**, **TZOcBu**, **TZOciBu**, **TZOcPe** y **TZOcMeBu**) y las amidas aromáticas (compuestos **TZOcBzA**, **TZOcMeBzA**, **TZOcMeOBzA**, **TZOcFBzA**, **TZOcClBzA**, **TZOcNOBzA**, **TZOcFurA**, **TZOcMeFurA** y **TZOcNOFurA**) se presenta a continuación la elucidación estructural de dos de estos, como modelo por similitud se eligieron estos dos ejemplos: el compuesto **TZOciBu** (amida alifática) y el compuesto **TZOcBzA** (amida aromática); y de esta manera corroborar la obtención de los derivados de amida propuestas en los objetivos del presente trabajo.

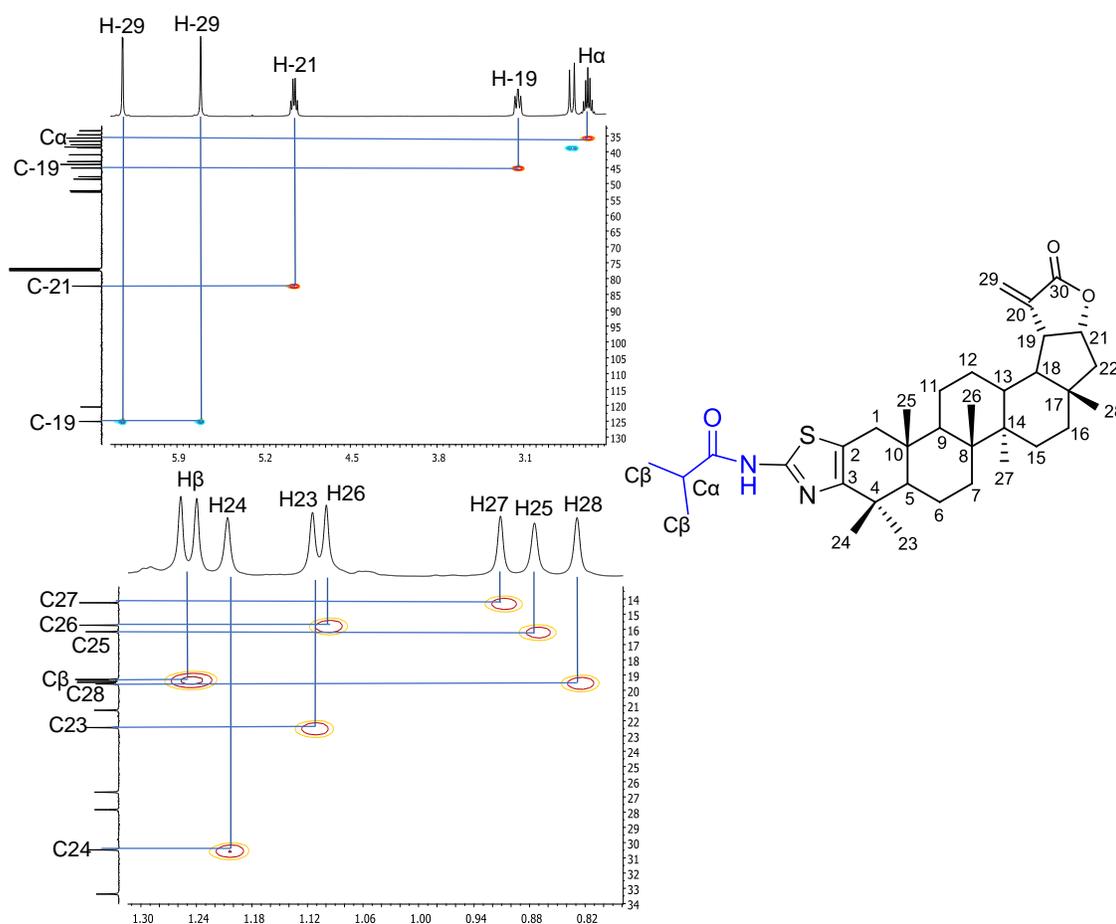
## Elucidación estructural del compuesto *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida

El compuesto *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida (compuesto **TZOciBu**) se obtuvo como un sólido de color anaranjado con un rendimiento del 57 %. Su identidad fue establecida por EM, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C (Figura 16 y 18). En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 23) se observan 35 señales, una de ellas con  $\delta$  171.4 correspondiente al carbonilo de la lactona (C30), otras dos señales con  $\delta$  139.1 y  $\delta$  125 correspondientes a los carbonos vinílicos (C20 y C29, respectivamente), y una señal con  $\delta$  82.3 correspondiente a un metino (C21). Los experimentos DEPT de 135° y 90° permitieron determinar la presencia de ocho metilos, nueve metilenos, siete metinos y 11 carbonos cuaternarios en la estructura del triterpeno. Se puede destacar la aparición de una señal con  $\delta$  174.3 correspondiente al carbonilo del grupo amida y la aparición de dos carbonos metílicos (6H,  $\delta$  1.25) con respecto a la 2-aminotiazolochraceolida A.



**Figura 23.** Espectro en CDCl<sub>3</sub> de: **a)** DEPT 90°; **b)** experimento DEPT 135°; **c)** RMN-<sup>13</sup>C de **TZOciBu**.

En el experimento de HSQC (Figura 24) se observó la correlación entre los protones de señales con  $\delta$  6.34 y 5.71 (H-29) y el carbono del metileno a  $\delta$  125. Por otra parte, el protón de señal con  $\delta$  3.15 (1H) mostró correlación con el carbono del metino de señal con  $\delta$  45.1. También se observó que el protón de señal con  $\delta$  4.96 (1H) presentó interacción con el metino de señal con  $\delta$  82.2 que de acuerdo con el desplazamiento debe de encontrarse unido a un átomo de oxígeno. Se puede destacar la aparición de una señal con  $\delta$  1.25 (1H) que presentó interacción con el metino con  $\delta$  35.6 correspondiente al metino del grupo isopropilo y una señal doble con  $\delta$  1.25 (6H) que presentó una correlación con los metilos con  $\delta$  19.2 y  $\delta$  19.3 pertenecientes al grupo isopropilo.

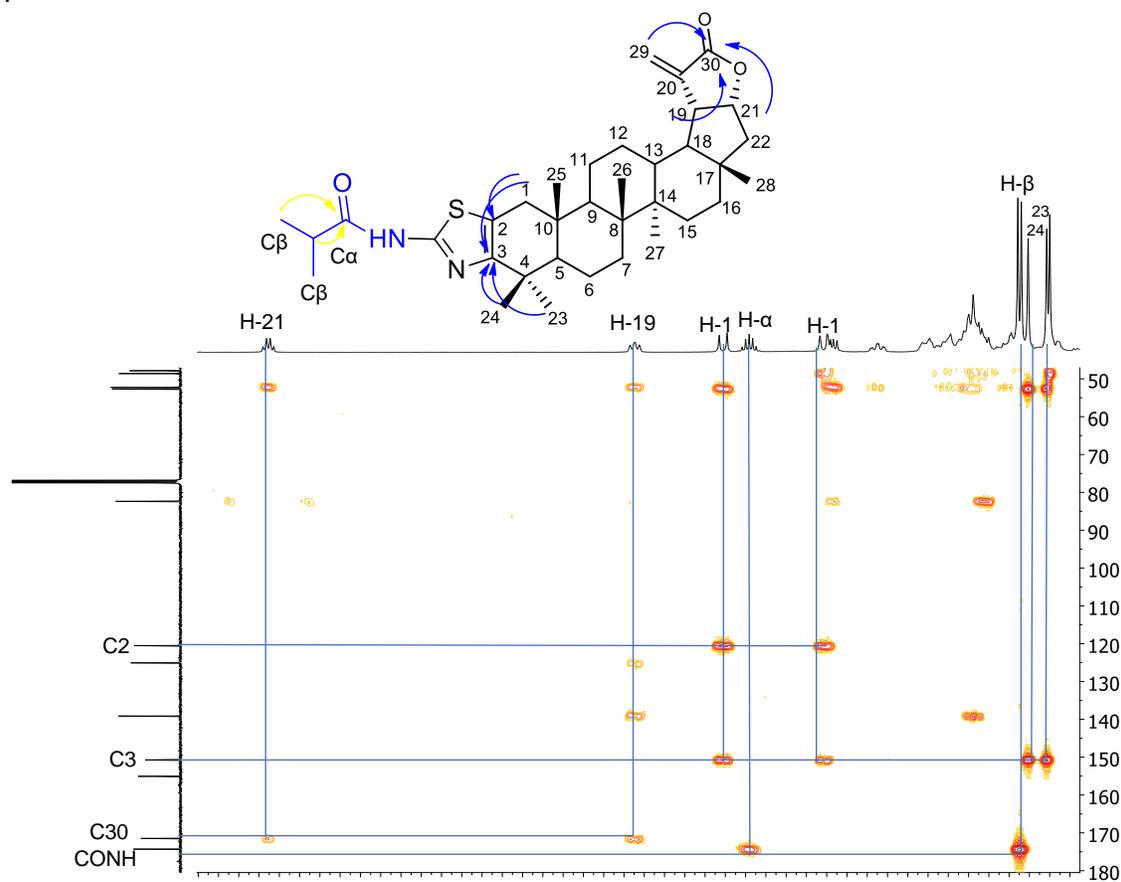


**Figura 24.** Ampliaciones del experimento HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) del compuesto TZOciBu.

En el experimento HMBC (Figura 25) se observó que el carbono del carbonilo (CONH) con señal con  $\delta$  174.3 presenta correlación con los protones de la señal con  $\delta$  1.25 correspondiente a metilos  $\beta$ -carbonilos (6H). Este mismo carbono tiene interacción con una señal séptuple a  $\delta$  2.58 (1H,  $J = 6.95$  Hz), el cual es generado por el protón  $\alpha$ -

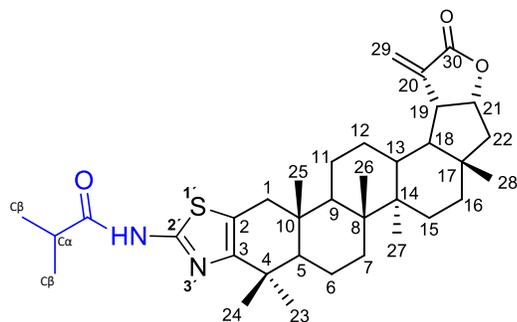
carbonilo del grupo amida. Por su parte, el carbonilo de éster ( $\delta$  171.4) presentó correlación con los protones de señales con  $\delta$  4.96 (H-21) y 3.15 (H-19), así como con los protones vinílicos H-29 ( $\delta$  6.34 y 5.71, respectivamente). Estas correlaciones confirmaron que el esqueleto del compuesto **TZOciBu** contiene a una lactona en su estructura.

Por otra parte, se observó que las señales a  $\delta$  2.71 y  $\delta$  2.21, correspondientes a los protones del metileno en la posición 1 (H $\beta$  y H $\alpha$ , respectivamente), presentan correlación con los carbonos aromáticos a  $\delta$  151.9 (C3) y  $\delta$  115.8 (C2). Asimismo, los protones a  $\delta$  1.21 y  $\delta$  1.11, correspondientes a metilos geminales en posiciones 24 y 23, respectivamente; mostraron acoplamiento solamente con el carbono a  $\delta$  151.9 (C3). El tercer carbono aromático a  $\delta$  155.0 no presentó acoplamiento con ningún protón.



**Figura 25.** Ampliaciones del experimento HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) del compuesto **TZOciBu**.

Con base en los datos expuestos anteriormente se estableció que la estructura del compuesto **TZOciBu** corresponde a *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida (Figura 26). Los datos espectroscópicos se encuentran en la tabla 6.



**Figura 26.** Estructura del *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) isobutiramida.

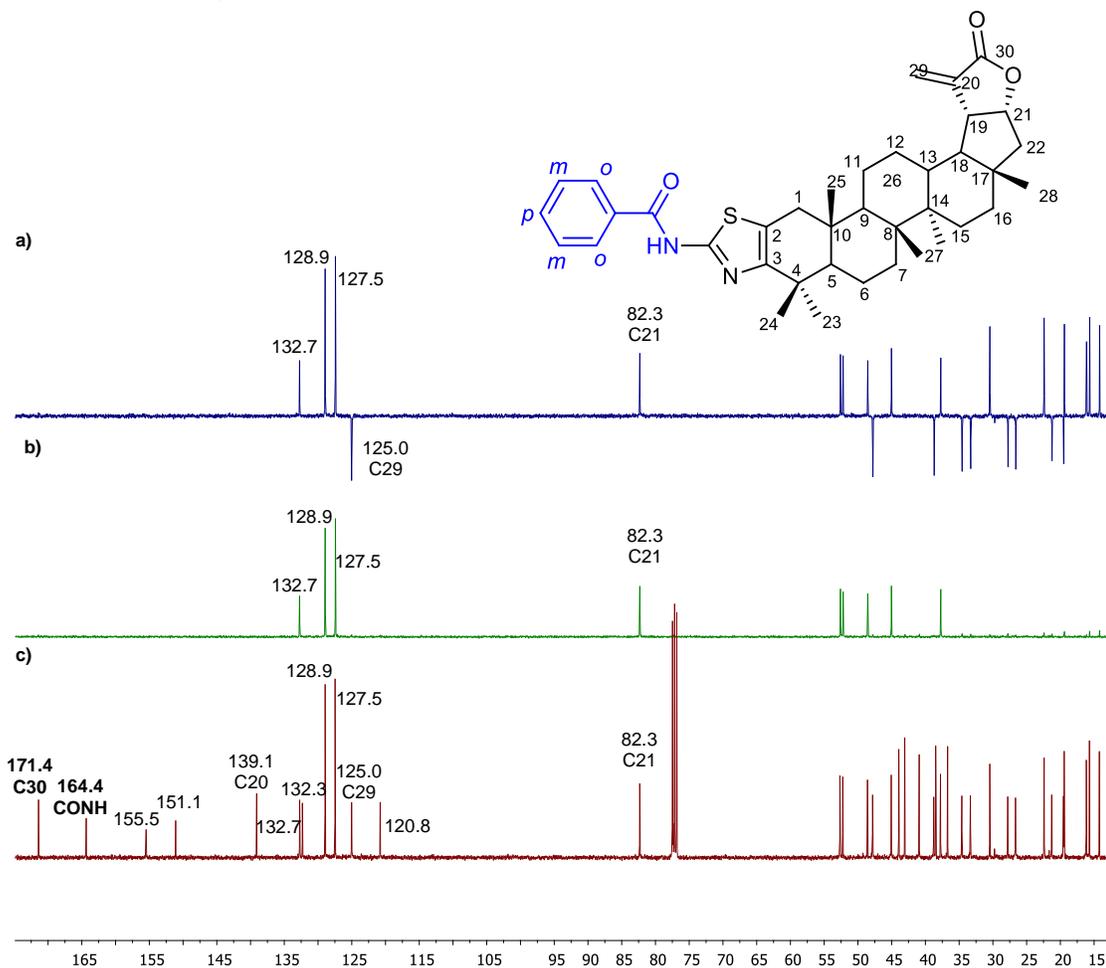
**Tabla 6.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) para el compuesto TZOciBu.

Posición	<sup>1</sup> Hδ (ppm)	<sup>13</sup> Cδ (ppm)
1	2.71 (1H, d, J = 15.6 Hz) 2.21 (1H, d, J = 13.9 Hz)	38.7
2	-	120.5
3	-	150.7
4	-	39.6
5	1.28 (1H, t, J = 3.2 Hz)	52.6
6	1.59 (2H, m)	19.5
7	1.47 (2H, m)	33.3
8	-	40.9
9	1.49 (1H, m)	48.6
10	-	38.5
11	1.61 (2H, m)	21.3
12	1.72 (2H, m)	27.8
13	1.95 (1H, td, J = 12.3, 3.6 Hz)	37.8
14	-	43.1
15	1.68 (2H, m)	26.6
16	1.43 (2H, m)	34.6
17	-	43.9
18	1.48 (1H, m)	52.2
19	3.15 (1H, m)	45.1
20	-	139.1
21	4.96 (1H, m)	82.3
22	2.17 (1H, d, J = 5.7 Hz) 1.42 (1H, d, J = 3.1 Hz)	47.8
23	1.11 (3H, s)	22.4
24	1.21 (3H, s)	30.4
25	0.87 (3H, s)	16.2
26	1.10 (3H, s)	15.7
27	0.91 (3H, s)	14.3
28	0.83 (3H, s)	19.5
29	6.34 (1H, d, J = 1.8 Hz) 5.71 (1H, d, J = 1.0 Hz)	125.0
30	-	171.4
C2'	-	155.0
CONH	-	174.3
Ca	2.58 (1H, Hept, J = 6.9 Hz)	35.6
Cβ	1.25 (6H, d, J = 6.9 Hz)	19.2
		19.3

## Elucidación estructural del compuesto *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) benzamida

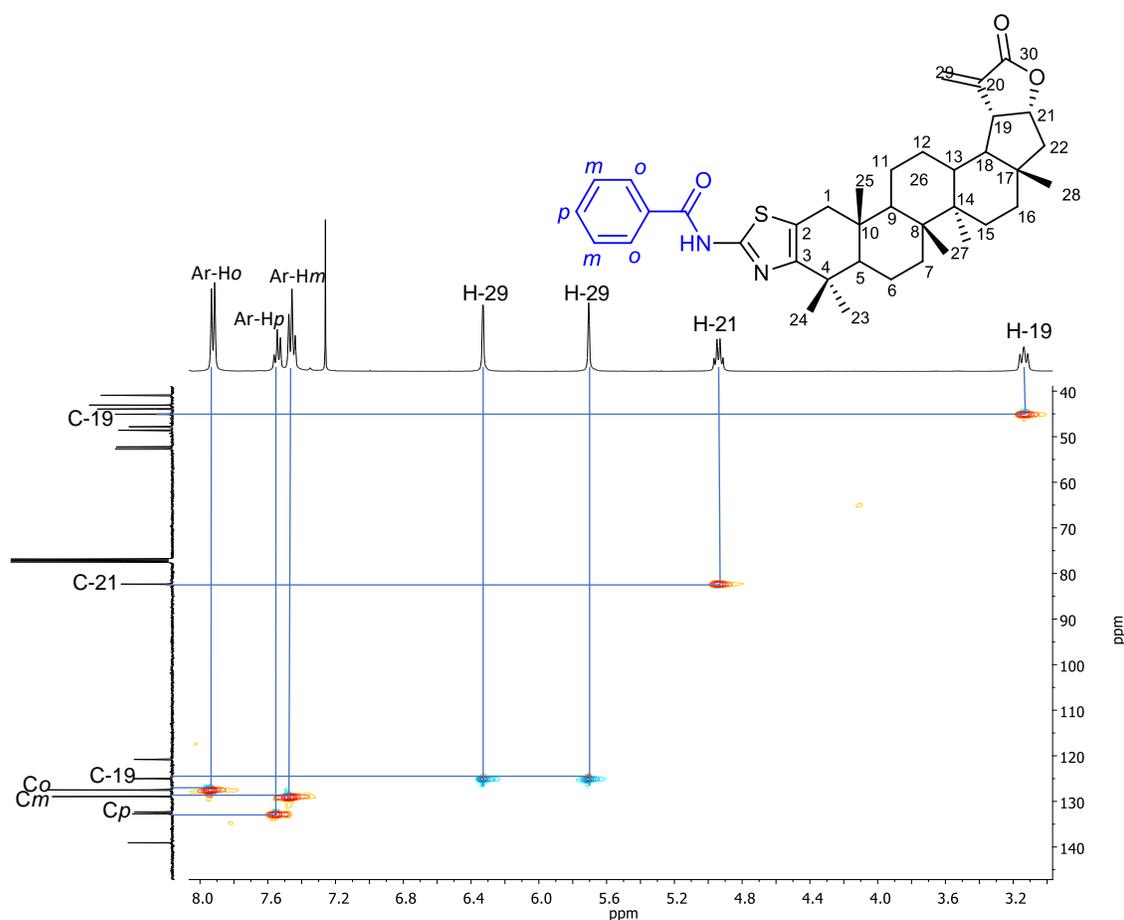
El compuesto *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) benzamida (compuesto **TZOcBzA**) se obtuvo como un sólido de color anaranjado con un rendimiento del 60 %. Cuya identidad fue establecida por EM, RMN-<sup>1</sup>H y RMN -<sup>13</sup>C (Figura 19 y 21).

En el espectro de RMN -<sup>13</sup>C (Figura 27) se observan 36 señales, una de ellas con  $\delta$  171.4 correspondiente al carbonilo de la lactona (C30), otras dos señales con  $\delta$  139.1 y  $\delta$  125 correspondientes a los carbonos vinílicos (C20 y C29, respectivamente) y una señal a 82.3 ppm correspondiente a un metino (C21). Los experimentos DEPT de 135° y 90° permitieron determinar la presencia de seis metilos, nueve metilenos, nueve metinos y 12 carbonos cuaternarios en la estructura del triterpeno. Se puede destacar la aparición de una señal a  $\delta$  164.4 correspondiente al carbonilo del grupo amida y la aparición de cuatro señales en la región de carbonos aromáticos equivalentes a seis carbonos, con respecto a la 2-aminotiazolochraceolida A.



**Figura 27.** Espectro en  $\text{CDCl}_3$  de: **a)** DEPT  $135^\circ$ ; **b)** experimento DEPT  $90^\circ$ ; **c)** RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto **TZOcBzA** en  $\text{CDCl}_3$ .

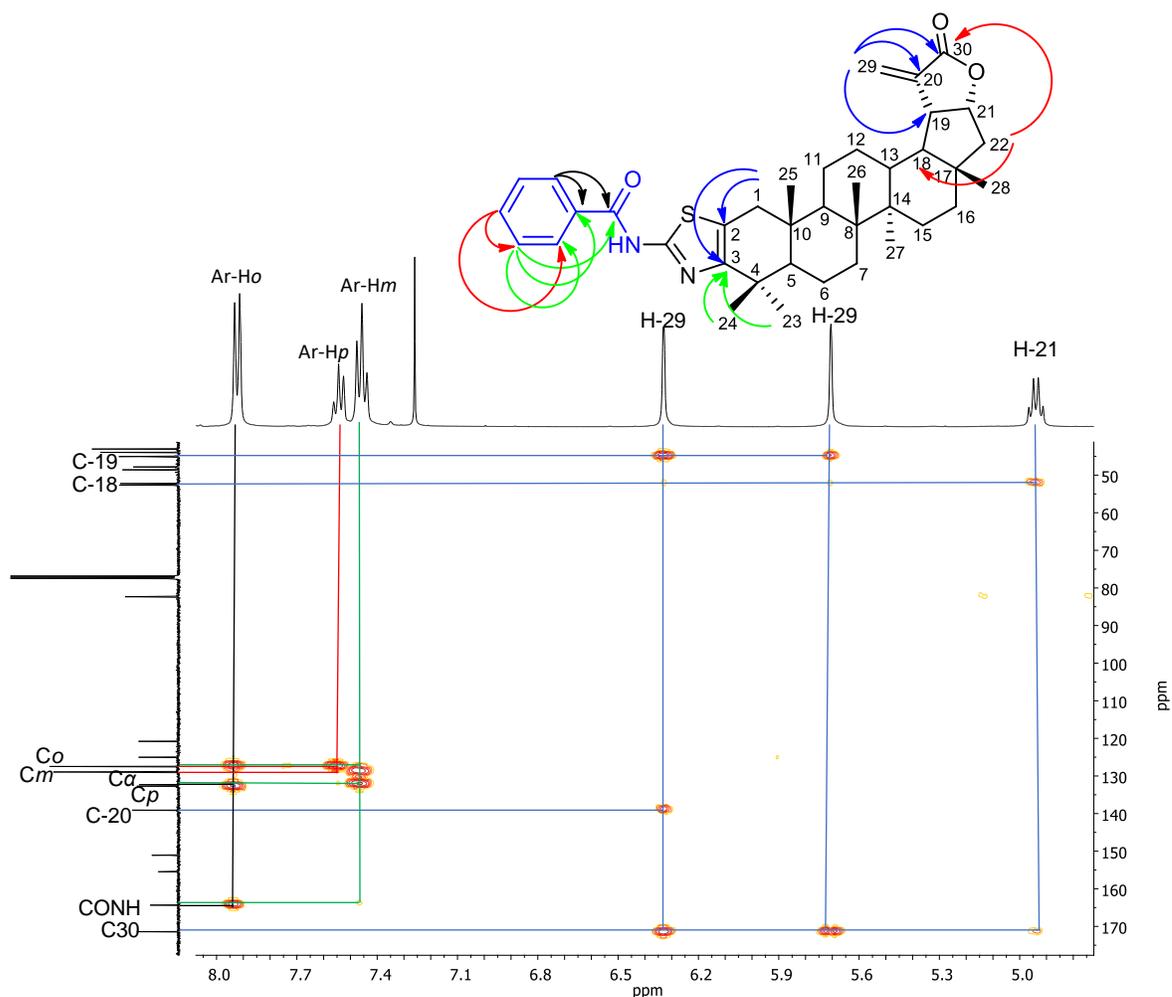
En el experimento de HSQC (Figura 28) se observó la correlación entre el protón de señales con  $\delta$  6.23 y 5.70 (H-29) y el metileno de señal con  $\delta$  125. Por otra parte, el protón de señal con  $\delta$  3.14 (1H) mostró correlación con el metino de señal con  $\delta$  45.1. También se observó que el protón de señal con  $\delta$  4.94 (1H) presentó interacción con el metino de señal con  $\delta$  82.3 que de acuerdo con el desplazamiento debe de encontrarse unido a un heteroátomo. Se puede destacar la correlación de tres señales de protones aromáticos a  $\delta$  7.92 (2H, d,  $J_{orto} = 7.50$  Hz),  $\delta$  7.54 (1H, t,  $J_{para} = 7.17$  Hz) y  $\delta$  7.46 (Ar-2H, t,  $J_{meta} = 7.63$  Hz), con los metinos ( $\delta$  127.5,  $\delta$  132.7 y  $\delta$  128.9, respectivamente) pertenecientes al grupo bencilo del grupo amida.



**Figura 28.** Ampliaciones del experimento HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) del compuesto **TZOcBzA**.

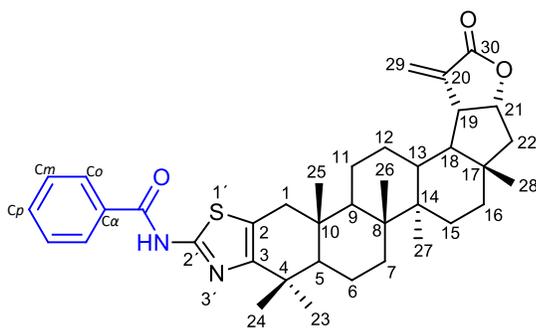
En el experimento HMBC (Figura 29) se observó que el carbonilo de la lactona ( $\delta$  171.4) presentó correlación con los protones de señales con  $\delta$  4.94 (H-21) y 3.14 (H-19), así como con los protones vinílicos H-29 ( $\delta$  6.33 y 5.70, respectivamente). Estas

correlaciones confirmaron que el esqueleto del compuesto **TZOcBzA** contiene a una lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en su estructura. De igual forma, se observó que las señales a  $\delta$  2.74 y  $\delta$  2.24, correspondientes a los protones del metileno en la posición 1 ( $H_\beta$  y  $H_\alpha$ , respectivamente), presentan correlación con los carbonos aromáticos con  $\delta$  151.1 (C3) y  $\delta$  120.8 (C2). Asimismo, los protones con  $\delta$  1.21 y  $\delta$  1.11, correspondientes a metilos geminales en posiciones 24 y 23, respectivamente; mostraron acoplamiento solamente con el carbono con  $\delta$  120.8 (C3). El tercer carbono aromático con  $\delta$  155.5 no mostró acoplamiento con ningún protón. Por otra parte, el carbono del carbonilo del grupo amida (CONH) con señal con  $\delta$  164.4 presentó correlación con dos protones aromáticos de señales con  $\delta$  7.92 (Ar-2H, d,  $J_{orto} = 7.50$  Hz) y  $\delta$  7.46 (Ar-2H, t,  $J_{meta} = 7.63$  Hz), correspondientes al grupo benzilo del grupo amida. Por su parte, se observó una correlación del protón  $\delta$  7.54 (Ar-1H, t,  $J_{para} = 7.17$  Hz) en posición *para* del grupo benzilo del grupo amida con los carbonos aromáticos con  $\delta$  127.5 y  $\delta$  128.9 (C<sub>o</sub> y C<sub>m</sub>, respectivamente), correspondientes al grupo benzilo del grupo amida.



**Figura 25.** Ampliaciones del experimento HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) del compuesto **TZOcBzA**.

Con base en los datos expuestos anteriormente se estableció que la estructura del compuesto **TZOcBzA** corresponde a *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) benzamida (Figura 26). Los datos espectroscópicos se encuentran en la tabla 7.



**Figura 26.** Estructura del *N*-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) benzamida (compuesto **TZOcBzA**).

**Tabla 7.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) para el compuesto TZOcBzA.

Posición	<sup>1</sup> Hδ (ppm)	<sup>13</sup> Cδ (ppm)
1	2.74 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz) 2.24 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)	38.8
2	-	120.8
3	-	151.1
4	-	36.7
5	1.29 (1H, t, <i>J</i> = 3.0 Hz)	52.7
6	1.59 (2H, m)	19.5
7	1.47 (2H, m)	33.3
8	-	40.9
9	1.49 (1H, m)	48.6
10	-	38.5
11	1.61 (2H, m)	21.3
12	1.71 (2H, m)	27.8
13	1.94 (1H, td, <i>J</i> = 12.3, 3.4 Hz)	37.8
14	-	43.1
15	1.67 (2H, m)	26.6
16	1.51 (2H, m)	34.6
17	-	43.9
18	1.47 (1H, m)	52.2
19	3.14 (1H, m)	45.1
20	-	139.1
21	4.94 (1H, m)	82.3
22	2.15 (1H, m) 1.40 (1H, m)	47.8
23	1.09 (3H, s)	22.4
24	1.20 (3H, s)	30.5
25	0.88 (3H, s)	16.2
26	1.09 (3H, s)	15.7
27	0.91 (3H, s)	14.2
28	0.82 (3H, s)	19.4
29	6.33 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz) 5.70 (1H, d, <i>J</i> = 1.0 Hz)	125.0
30	-	171.4
C2'	-	155.5
CONH	-	164.4
Cα	-	132.3
Co	7.92 (2H, d, <i>J</i> <sub>orto</sub> = 7.50 Hz)	127.5
Cm	7.46 (Ar-2H, t, <i>J</i> <sub>meta</sub> = 7.63 Hz)	128.9
Cp	7.54 (1H, t, <i>J</i> <sub>para</sub> = 7.17 Hz)	132.7

## Actividad biológica de los compuestos obtenidos

Se evaluó la susceptibilidad de dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), una de cáncer cervicouterino (SiHa) y una de células normales (Vero), a diferentes concentraciones de Ochraceolida A (Oc), 2-bromo ochraceolida A (BrOc), 2-aminotiazolochraceolida A (TZOc) y a 15 derivados obtenidos de este último compuesto.

La actividad citotóxica y antiproliferativa de cada compuesto fue evaluada con el fin de determinar si el efecto de los compuestos sobre las células se debe a una disminución de la tasa de crecimiento y no solo a una muerte celular generado por un efecto de toxicidad.

De manera general, en la industria si un compuesto es activo contra células cancerosas a una concentración  $\leq 10 \mu\text{M}$  se considera significativo; sin embargo, en el ámbito académico, en revistas de área de la Química de Productos Naturales, se considera a un compuesto activo contra células de cáncer, si tiene efecto sobre ellas a concentraciones  $\leq 30 \mu\text{M}$ .<sup>103</sup> Por tal motivo en el presente trabajo se consideraron cuatro niveles de actividad: Débil ( $30 - >20 \mu\text{M}$ ), moderada ( $20 - >10 \mu\text{M}$ ), alta ( $10 - >5 \mu\text{M}$ ) y altamente significativa ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ).

También se evaluó la selectividad de los compuestos para ejercer efecto sobre células cancerosas pues se considera que actividad que un compuesto exhibe contra células cancerosas no se debe a una acción citotóxica si presentan un índice de selectividad  $\geq 10$ .<sup>104</sup>

### Actividad citotóxica

Los resultados obtenidos (Tabla 8) muestran que las células cancerosas de mama altamente invasivas tipo triple negativo (MDA-MB-231) fueron susceptibles, en algún grado, a sólo el 11 % de los compuestos evaluados; en tanto que las de tipo hormonodependiente (MCF-7) y las células cancerosas de cérvix de útero (SiHa) lo fueron a un mayor número de compuestos (33 y 44 %, respectivamente).

Ochraceolida A sólo resultó ser activa, moderadamente, contra las células cancerosas correspondientes a la línea celular SiHa ( $18.0 \mu\text{M}$ ). La introducción del átomo de bromo en la posición 2 del anillo A del triterpeno provocó un ligero aumento de esta actividad ( $11.2 \mu\text{M}$ ), sucediendo lo mismo con la selectividad al pasar de 2.6 a 3.1. Es importante resaltar que la presencia del átomo de halógeno condujo a la aparición de citotoxicidad débil contra la línea celular MCF-7 ( $23.7 \mu\text{M}$ ), así como un incremento discreto de la citotoxicidad contra las células normales. La introducción de halógenos en moléculas bioactivas obedece a la necesidad de incrementar la lipofilicidad, con lo cual el

incremento observado en la actividad citotóxica podría estar asociada al incremento de esta característica fisicoquímica.<sup>105</sup>

La fusión del anillo tiazólico en las posiciones 2 y 3 del anillo A del triterpeno llevó a un incremento en la actividad citotóxica contra las cuatro líneas celulares utilizadas. En el caso de las células cancerosas hormonodependientes y las de cáncer de cuello uterino, la actividad se clasificó como alta, mientras que las consideradas como triple negativo fueron medianamente susceptibles al compuesto. Estos resultados son congruentes con los publicados en la literatura científica. Así se ha descrito que la introducción de un anillo heterocíclico al anillo A de un triterpeno aumenta su actividad citotóxica.<sup>104</sup>

Desafortunadamente, las células normales de riñón de mono verde presentaron una muy alta susceptibilidad a **TZOc** (4.4  $\mu\text{M}$ ), situación que llevó a una caída pronunciada de la selectividad, llegando a valores cercanos a cero. Esta pérdida de la selectividad puede ser aducida a la presencia del grupo amino en el anillo tiazólico, pues se ha descrito que sistemas de este tipo pueden generar “promiscuidad” en términos de actividad biológica.<sup>106</sup>

La conversión del grupo amino del tiazol en amida produjo, de manera general, la pérdida de la actividad biológica, así casi todas las amidas alifáticas y aromáticas resultantes, a excepción de cinco, fueron consideradas carentes de actividad citotóxica.

Los compuestos **TZOc**, **TZOcAc**, **TZOcBu**, **TZOcFurA** y **TZOcNOFurA** fueron los únicos que presentaron actividad citotóxica, en diferente grado, contra las células pertenecientes a las líneas celulares MCF-7 y SiHa, siendo esta última las más susceptible. Entre los cinco compuestos activos contra SiHa, el compuesto **TZOcBu** (propil amida) presentó alta actividad (8.6  $\mu\text{M}$ ) con un índice de selectividad significativo (20) y el compuesto **TZOcNOFurA** (nitrofuroil amida) exhibió actividad citotóxica altamente significativa (1.6  $\mu\text{M}$ ) aunque con un índice de selectividad ligeramente bajo (8). Estos resultados demuestran que la actividad citotóxica generada por el 2-aminotiazol fusionado al anillo triterpénico puede ser modulada a través de la transformación del grupo amino a amida alifática o heteroaromática.

**Tabla 8.-** Actividad citotóxica de ochraceolida A y sus derivados contra células cancerosas y normales.

Compuesto	Líneas celulares CC <sub>50</sub> μM (IS) <sup>a</sup>			
	MCF7	MDA-MB-231	SiHa	VERO
Oc	34.2 (1.3)	221.2 (0.2)	18.0 (2.6)	45.9
BrOc	23.5 (1.5)	94.3 (0.4)	11.2 (3.1)	34.5
TZOc	7.4 (0.6)	16.0 (0.3)	5.3 (0.8)	4.4
TZOcAc	90.9 (2.0)	181.8 (1.0)	181.8 (1.0)	181.8
TZOcPr	88.7 (2.0)	177.3 (1.0)	177.3 (1.0)	177.3
TZOcBu	27.00 (6.4)	86.5 (2.0)	8.6 (20.2)	173.0
TZOciBu	29.6 (5.9)	86.5 (2.0)	19.6 (8.8)	173.0
TZOcPe	168.81 (1.0)	168.9 (1.0)	47.3 (3.6)	168.9
TZOcMeBu	168.81 (1.0)	84.5 (2.0)	23.8 (7.1)	168.9
TZOcBzA	163.31 (1.0)	163.4 (1.0)	36.4 (4.5)	163.4
TZOcMeBzA	159.65 (1.0)	159.7 (1.0)	159.7 (1.0)	159.7
TZOcMeOBzA	155.68 (1.0)	155.8 (1.0)	155.8 (1.0)	155.8
TZOcFBzA	158.64 (1.0)	158.7 (1.0)	155.8 (1.0)	158.7
TZOcCIBzA	154.72 (1.0)	154.8 (1.0)	65.4 (2.4)	154.8
TZOcNOBzA	152.13 (1.0)	152.2 (1.0)	152.2 (1.0)	152.2
TZOcFurA	166.02 (0.5)	166.1 (0.5)	25.5 (3.3)	83.1
TZOcMeFurA	162.25 (1.0)	162.3 (1.0)	43.4 (3.7)	162.3
TZOcNOFurA	4.19 (3.0)	12.7 (1.0)	1.6 (8.0)	12.7
Docetaxel	0.01 (130)	0.19 (6.8)	0.22 (5.9)	1.3

<sup>a</sup>= Índice de selectividad

### Actividad Antiproliferativa

En general, los compuestos evaluados que exhibieron actividad citotóxica también presentaron actividad antiproliferativa, aunque a concentraciones más elevadas.

Al igual que en el caso de la citotoxicidad, la conversión del grupo amino, en la posición 2 del anillo tiazólico, a un grupo amida tuvo un impacto negativo profundo en la actividad antiproliferativa contra las líneas celulares utilizadas, observándose que casi todos los compuestos resultaron ser inactivos. La excepción fue el compuesto **TZOcNOFurA**, el cual resultó ser al final el de mayor actividad antiproliferativa significativa (2.9 μM).

**Tabla 9.-** Actividad antiproliferativa de ochraceolida A y sus derivados contra células cancerosas y normales.

Compuesto	Líneas celulares $CC_{50}$ $\mu$ M (IS) <sup>a</sup>			
	MCF7	MDA-MB-231	SiHa	VERO
Oc	110.6 (1.0)	221.2 (0.2)	33.2 (1.4)	110.6
BrOc	94.3 (0.3)	188.7 (0.2)	13.5 (2.6)	26.0
TZOc	20.7 (1.0)	22.8 (0.2)	6.9 (0.6)	19.7
TZOcAc	181.1 (1.0)	181.8 (1.0)	90.9 (2.0)	181.8
TZOcPr	177.3 (1.0)	177.3 (1.0)	88.7 (2.0)	177.3
TZOcBu	47.9 (1.8)	173.0 (1.0)	9.5 (18.1)	86.5
TZOciBu	86.5 (1.0)	173.3 (1.0)	16.6 (10.4)	86.5
TZOcPe	168.9 (1.0)	168.9 (1.0)	38.6 (4.4)	168.9
TZOcMeBu	84.5 (1.0)	168.9 (1.0)	18.6 (9.1)	84.5
TZOcBzA	163.4 (1.0)	163.4 (1.0)	29.9 (5.5)	163.4
TZOcMeBzA	159.7 (1.0)	159.7 (1.0)	79.9 (2.0)	159.7
TZOcMeOBzA	155.8 (1.0)	155.8 (1.0)	155.8 (1.0)	155.8
TZOcFBzA	158.7 (1.0)	158.7 (1.0)	79.4 (2.0)	158.7
TZOcClBzA	154.8 (1.0)	154.8 (1.0)	77.4 (2.0)	154.8
TZOcNOBzA	152.2 (1.0)	152.2 (1.0)	76.1 (2.0)	152.2
TZOcFurA	166.1 (1.0)	166.1 (1.0)	31.2 (2.7)	83.1
TZOcMeFurA	162.3 (1.0)	162.3 (1.0)	39.1 (4.2)	162.3
TZOcNOFurA	6.1 (1.0)	10.3 (0.3)	2.9 (4.4)	9.1
Docetaxel	0.01 (11)	0.06 (1.8)	0.09 (1.2)	0.11

<sup>a</sup> = Índice de selectividad



## CONCLUSIONES

1. El procedimiento para fusionar un anillo 2-aminotiazólico al anillo A de ochraceolida A involucra el uso de 2-bromo ochraceolida, por lo tanto, es crucial la introducción selectiva de bromo en el carbono dos del triterpeno en cuestión. De acuerdo con los ensayos realizados se concluye que es indispensable el uso de tribromuro de feniltrimetilamonio para tal fin.
2. Es indispensable el uso de un disolvente polar aprótico en la reacción de formación del anillo tiazólico para mantener intacta la lactona presente en la Ochraceolida A.
3. Para lograr la obtención de amidas derivadas de N-(2-tiazolil[3,2 d]ochraceolida A) es necesario mantener condiciones anhidras.
4. La introducción de un anillo tiazólico en el anillo A de la Ochraceolida A provocó un aumento en la actividad contra células cancerosas MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa con menoscabo de la selectividad.
5. La conversión a amida del grupo amino en posición 2 del anillo tiazólico impacta en forma negativa la actividad citotóxica y antiproliferativa de las amidas N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A) contra las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa.
6. La actividad citotóxica y antiproliferativa contra las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SiHa, así como la selectividad es potenciada al introducir un segundo heterociclo  $\pi$  excedente desactivado en un sistema aromático amida N-(2-tiazolil[3,2-d]ochraceolida A).



## APÉNDICE 1

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>An</b>	Acetona
<b>Hx</b>	Hexano
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>Me</b>	Metilo
<b>Et</b>	Etilo
<b>Pr</b>	Propilo
<b>iPr</b>	Isopropilo
<b>Bu</b>	Butilo
<b>iBu</b>	Isobutilo
<b><i>p</i>-MeOPh</b>	<i>p</i> -metoxifenilo
<b><i>p</i>-NO<sub>2</sub>Ph</b>	<i>p</i> -nitrofenilo
<b><i>p</i>-ClPh</b>	<i>p</i> -clorofenilo
<b><i>p</i>-FPh</b>	<i>p</i> -fluorfenilo
<b>Fu</b>	Furano
<b>5-MeFu</b>	5-metilfurano
<b>5-NO<sub>2</sub>Fu</b>	5-nitrofurano
<b>CC</b>	Columna cromatográfica
<b>CCD</b>	Cromatografía de capa delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografía de capa delgada preparativa
<b>δ</b>	Desplazamiento químico en partes por millón
<b>S</b>	Señal simple o singulete
<b>d</b>	Señal doble o doblete
<b>dd</b>	Señal doble de dobles
<b>ddd</b>	Señal doble de doble de dobles
<b>m</b>	Multiplete
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b>eV</b>	Electrovolts
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>IE<sup>+</sup></b>	Impacto electrónico
<b>Pf</b>	Punto de fusión
<b>[M<sup>+</sup>]</b>	Ión molecular
<b>m/z</b>	Relación masa carga
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de protón
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement By Polarization Transfer

<b>UV</b>	Espectroscopia ultravioleta-visible
<b>Hz</b>	Hertz
<b>Ppm</b>	Partes por millon
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria máxima media

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shanmugam, M. K.; Nguyen, A. H.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H.; Sethi, G. Targeted Inhibition of Tumor Proliferation, Survival, and Metastasis by Pentacyclic Triterpenoids: Potential Role in Prevention and Therapy of Cancer. *Cancer Lett.* **2012**, *320* (2), 158–170.
2. Yan, X. J.; Gong, L. H.; Zheng, F. Y.; Cheng, K. J.; Chen, Z. S.; Shi, Z. Triterpenoids as Reversal Agents for Anticancer Drug Resistance Treatment. *Drug Discov.* **2014**, *19* (4), 482–488.
3. Laszczyk, M. N. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Med.* **2009**, *75*, (15), 1549–1560.
4. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Holbeck, S.; Edward, A. Natural Products and Derivatives as Leads to Cell Cycle Pathway Targets in Cancer Chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets.* **2002**, *2*, 279–308.
5. Qian, S.; Li, H.; Chen, Y.; Zhang, W.; Yang, S.; Wu, Y. Synthesis and Biological Evaluation of Heterocyclic Ring-Substituted Maslinic Acid Derivatives as Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (11), 1743–1750.
6. Ngassapa, O.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Farnsworth, N. R.; Che, C.-T. Further Lupane Lactones from *Kokoona ochracea*. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, (10), 1676–1681.
7. Sturm, S.; Gil, R. R.; Chai, H. B.; Ngassapa, O. D.; Santisuk, T.; Reutrakul, V.; Howe, A.; Moss, M.; Besterman, J. M.; Yang, S. L.; Farthing, J. E.; Tait, R. M.; Lewis, J. A.; O'Neill, M. J.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. Lupane Derivatives from *Lophopetalum Wallichii* with Farnesyl Protein Transferase Inhibitory Activity. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59* (7), 658–663.
8. Paramasivan, K.; Mutturi, S. Progress in Terpene Synthesis. Strategies through Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Crit Rev Biotechnol.* **2017**, *37*, 8, 974–989.
9. Z. Ovesná, A. Vachalková, K. Horvatová, D. T. Pentacyclic Triterpenoic Acids: New Chemoprotective Compounds. Minireview. *Neoplasma* **2004**, *51*, 5, 327–333.
10. David Andersson, Å. N.; Rui-Dong, D. Ursolic Acid and Other Pentacyclic Triterpenoids Stimulate Intestinal Alkaline Sphingomyelinase in Vitro. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 103–108.
11. Fernandes, J.; Oliveira, R.; Rangel, M.; Wagner-souza, K.; Auxiliadora, M.; Kaplan, C.; Rocha, C. Pentacyclic Triterpenes from *Chrysobalanaceae* Species: Cytotoxicity on Multidrug Resistant and Sensitive Leukemia Cell Lines. *Cancer Lett.* **2003**, *190*, 165–169.
12. Taylor, P.; Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Ukiya, M.; Watanabe, K.; Kimura, Y. Triterpene Acids from the Leaves of *Perilla frutescens* and Their Anti-Inflammatory and Antitumor-Promoting Effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1, 85–90.
13. Mohammad, S.; Farrukh, Afaq Adhami, Vaqar Mustafa, Hasan, M. Lupeol Modulates NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt Pathways and Inhibits Skin Cancer in CD-1 Mice. *Oncogene.* **2004**, *23*, 5203–5214.
14. Geetha, T.; Varalakshmi, P. Anti-Inflammatory Activity of Lupeol and Lupeol Linoleate in Rats. *Ethnopharmacology.* **2001**, *76*, 77–80.
15. Sudhakar, V.; Ashok, S.; Kumar, P.; Varalakshmi, V. S. Protective Effect of Lupeol and Lupeol Linoleate in Hypercholesterolemia Associated Renal Damage.

- Mol Cell Biochem.* **2008**, *317*, 11–20.
16. Preetha, S. P.; Kanniappan, M.; Selvakumar, E.; Nagaraj, M.; Varalakshmi, P. Lupeol Ameliorates Aflatoxin B1-Induced Peroxidative Hepatic Damage in Rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **2006**, *143*, 333–339.
  17. Lima, L. M.; Perazzo, F. F.; Tavares, J. C. Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of the Ethanolic Extracts from *Zanthoxylum Riedelianum* (Rutaceae) Leaves and Stem Bark. *Pharmacol. Pharmacy.* **2007**, *59*, 8, 1151–1158.
  18. Arciniegas, A.; Teresa, R. A. M.; Pérez, C. A. L.; Romo de Viva, A. Anti-Inflammatory Constituents of *Mortonia Greggii* Gray. *Z. Naturforsch.* **2004**, *59*, 237–243.
  19. Saleem, M. Lupeol, a Novel Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Dietary Triterpene. *Cancer Lett.* **2009**, *285*, 2, 109–115.
  20. Cmoch, P.; Pakulski, Z.; Swaczynova, J. Synthesis of Lupane-Type Saponins Bearing Mannosyl and 3, 6-Branched Trimannosyl Residues and Their Evaluation as Anticancer Agents. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 995–1003.
  21. Kashiwada, Y.; Fujioka T.; Kilkuskle, R. E.; Cosentino, M.; Bus, M. L.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Lee, K. H. Anti-Aids Agents, 11. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-Hiv Principles from *Syzygium Claviflorum*, and the Anti-Hiv Activity of Structurally Related Triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 2, 243–247.
  22. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I. S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Dasgupta, T. K.; Pezzuto, J. M. Discovery of Betulinic Acid as a Selective Inhibitor Human Melanoma That Functions by Induction of Apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1947–1051.
  23. Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacortipasserini, C.; Formelli, F. Selective Cytotoxicity of Betulinic Acid on Tumor Cell Lines, but Not on Normal Cells. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17–25.
  24. Dehelean, C. A.; Alua, M.; Zupko, I.; Atena, G.; Cinta-pinزارu, S.; Munteanu, M. Study of the Betulin Enriched Birch Bark Extracts Effects on Human Carcinoma Cells and Ear Inflammation. *Chem. Cent. J.* **2012**, *6*, 137, 1–9.
  25. Gong, Y.; Raj, K. M.; Luscombe, C. A.; Gadawski, I.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S. L. The Synergistic Effects of Betulin with Acyclovir against Herpes Simplex Viruses. *Antivir. Res.* **2004**, *64*, 127–130.
  26. Miura, N.; Matsumoto, Y.; Miyairi, S.; Nishiyama, S.; Naganuma, A. Protective Effects of Triterpene Compounds Against the Cytotoxicity of Cadmium in HepG2 Cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 1324–1328.
  27. Drag, M.; Surowiak, P.; Drag-zalesinska, M.; Dietel, M.; Lage, H.; Oleksyszyn, J. Comparison of the Cytotoxic Effects of Birch Bark Extract, Betulin and Betulinic Acid Towards Human Gastric Carcinoma and Pancreatic Carcinoma Drug-Sensitive and Drug-Resistant Cell Lines. *Molecules.* **2009**, *14*, 1639–1651.
  28. Tang, J.; Li, J.; Qi, W.; Qiu, W.; Li, P.; Li, B.; Song, B. Article Inhibition of SREBP by a Small Molecule , Betulin , Improves Hyperlipidemia and Insulin Resistance and Reduces Atherosclerotic Plaques. *Cell Metab.* **2010**, *13*, 1, 44–56.
  29. Siman, P.; Filipová, A.; Tichá A.; Niang, M.; Bezrouk, A. Effective Method of Purification of Betulin from Birch Bark: The Importance of Its Purity for Scientific and Medicinal Use. *PLoS ONE.* **2016**, *11*, 5, 1–14.
  30. Zhang, P.; Li, H.; Chen, D.; Ni, J.; Kang, Y.; Wang, S. Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly (ADP-

- Ribose) Polymerase Cleavage. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 10, 803–809.
31. Hirai, Y.; Toriizuka, K.; Ida, Y.; Hidehiro, A. Achyranthoside H Methyl Ester, a Novel Oleanolic Acid Saponin Derivative from *Achyranthes fauriei* Roots, Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-453 Cells via a Caspase Activation Pathway. *J Nat Med.* **2009**, *63*, 181–188.
  32. Carvalho, J.; Ibeas, E.; Herna, M.; Ruiz-gutierrez, V.; Nieto, L. Acidic Triterpenes Compromise Growth and Survival of Astrocytoma Cell Lines by Regulating Reactive Oxygen Species Accumulation. *Cancer Res.* **2007**, *21*, 3741–3752.
  33. He, A.; HAI, R. L. Cranberry Phytochemicals: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 10–15.
  34. Liu, J. Review Article Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. *Ethnopharmacology.* **1995**, *49*, 57–68.
  35. Baek, J. H.; Lee, Y. S.; Kang, C. M.; Kim, J.-A.; Kwon, K. S.; Son, H. C.; Kim, K.-W. Intracellular  $Ca^{2+}$  Release Mediates Ursolic Acid-induced Apoptosis in Human Leukemic HL-60 Cells. *Int. J. Cancer.* **1997**, *728*, *73*, 725–728.
  36. Cells, K.; Liu, X.; Jiang, J. Induction of Apoptosis and Regulation of the MAPK Pathway by Ursolic Acid in Human Leukemia. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1192–1194.
  37. Komiya, T.; Udagawa, Y. Ursolic Acid Induces Bax-Dependent Apoptosis through the Caspase-3 Pathway in Endometrial Cancer SNG-II Cells. *Oncol. Reports.* **2005**, *13*, 51–57.
  38. Harmand, P.; Delage, C.; Simon, A. Ursolic Acid Induces Apoptosis through Mitochondrial Intrinsic Pathway and Caspase-3 Activation in M4Beu Melanoma Cells. *Int. J. Cancer.* **2005**, *114*, 1–11.
  39. Hsu, Y.; Kuo, P.; Lin, C. Proliferative Inhibition, Cell-Cycle Dysregulation, and Induction of Apoptosis by Ursolic Acid in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Life Sci.* **2004**, *75*, 2303–2316.
  40. Papoutsis, E. K. Z.; Aligiannis, H. P. N.; Moutsatsou, M. M. P. Ursolic Acid, a Naturally Occurring Triterpenoid, Demonstrates Anticancer Activity on Human Prostate Cancer Cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **2007**, *133*, 493–500.
  41. Harmand, P.; Duval, R.; Liagre, B.; Jayat-vignoles, C. A. L.; Beneytout, J.; Delage, C.; Simon, A. Ursolic Acid Induces Apoptosis through Caspase-3 Activation and Cell Cycle Arrest in HaCat Cells. *International journal of oncology* **2003**, *1* (24), 105–112.
  42. Choi, Y. H.; Baek, J. I. N. H.; Yoo, M.; Chung, H. Induction of Apoptosis by Ursolic Acid through Activation of Caspases and down-Regulation of c-IAPs in Human Prostate Epithelial Cells. *Int. J. Oncol.* **2000**, *17*, 3, 565–571.
  43. Ang, X. T.; Ang, X. Y.; Ung, H. J.; Im, S. K.; Ung, S. J. Asiatic Acid Induces Colon Cancer Cell Growth Inhibition and Apoptosis through Mitochondrial Death Cascade. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 8, 1399–1405.
  44. Hsu, Y.; Kuo, P.; Lin, L.; Lin, C. Asiatic Acid, a Triterpene, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Human Breast Cancer Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 1, 333–344.
  45. Gurfinkel, D. M.; Chow, S.; Hurren, R.; Gronda, M.; Henderson, C.; Berube, C.; Hedley, D. W.; Schimmer, A. D. Disruption of the Endoplasmic Reticulum and Increases in Cytoplasmic Calcium Are Early Events in Cell Death Induced by the Natural Triterpenoid Asiatic Acid. *Apoptosis.* **2006**, *11*, 9, 1463–1471.

46. Park, B. C.; Bosire, K. O.; Lee, E. S.; Lee, Y. S.; Kim, J. A. Asiatic Acid Induces Apoptosis in SK-MEL-2 Human Melanoma Cells. *Cancer Lett.* **2005**, *218*, 1, 81–90.
47. Lee, Y. S.; Jin, D. Q.; Kwon, E. J.; Park, S. H.; Lee, E. S.; Jeong, T. C.; Nam, D. H.; Huh, K.; Kim, J. A. Asiatic Acid, a Triterpene, Induces Apoptosis through Intracellular Ca<sup>2+</sup> Release and Enhanced Expression of p53 in HepG2 Human Hepatoma Cells. *Cancer Lett.* **2002**, *186*, 1, 83–91.
48. Cho, C. W.; Choi, D. S.; Cardone, M. H.; Kim, C. W.; Sinskey, A. J.; Rha, C. Glioblastoma Cell Death Induced by Asiatic Acid. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, *22*, 6, 393–408.
49. Bunpo, P.; Kataoka, K.; Arimochi, H.; Nakayama, H.; Kuwahara, T.; Vinitketkumnuen, U.; Ohnishi, Y. Inhibitory Effects of Asiatic Acid and CPT-11 on Growth of HT-29 Cells. *J. Med. Investig.* **2005**, *52*, 65–73.
50. Ngassapa, O. D.; Soejarto, D. D.; Che, C. T.; Pezzuto, J. M.; Farnsworth, N. R. New Cytotoxic Lupane Lactones from *Kokoona ochracea*. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54* (5), 1353–1359.
51. Callies, O.; Bedoya, L. M.; Beltrán, M.; Muñoz, A.; Calderón, P. O.; Osorio, A. A.; Jiménez, I. A.; Alcamí, J.; Bazzocchi, I. L. Isolation, Structural Modification, and HIV Inhibition of Pentacyclic Lupane-Type Triterpenoids from *Cassine xylocarpa* and *Maytenus cuzcoina*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (5), 1045–1055.
52. Us Martin, J. Obtención e Identificación de Terpenoides Del Extracto Diclorometánico de La Corteza de *Elaeodendron trichotomun*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán. **2016**, Mérida, Yucatán, México.
53. Xu, J.; Li, Z.; Luo, J.; Yang, F.; Liu, T.; Liu, M.; Qiu, W.; Tang, J. Synthesis and Biological Evaluation of Heterocyclic Ring-Fused Betulinic Acid Derivatives as Novel Inhibitors of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Med. Chem. Res.* **2012**, *55*, 3122–3134.
54. Lucie, A. B.; Adamek, R.; Kalina, P.; Drašar, P.; Dzubak, P.; Gurska, S.; Rehulka, J.; Hajduch, M.; Urban, M.; Sarek, J.; Borkova, L.; Adamek, R.; Kalina, P.; Dzubak, P.; Gurska, S. Synthesis and Cytotoxic Activity of Triterpenoid Thiazoles Derived from Allobetulin, Methyl Betulonate, Methyl Oleanonate, and Oleanonic Acid. *ChemMedChem* **2017**, *12* (5), 390–398.
55. Kang, X.; Hu, J.; Gao, Z.; Ju, Y.; Xu, C. Synthesis, Anti-Proliferative and Proapoptotic Activity of Novel Oleanolic Acid Azaheterocyclic Derivatives. *Medchemcomm* **2012**, *3* (10), 1245–1249.
56. Galaiko, N. V.; Nazarov, A. V.; Tolmacheva, I. A.; Slepukhin, P. A. Synthesis of Triterpene  $\alpha$ -Condensed Azoles. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50*, 1, 65–75.
57. Dinh, T.; Moons, N.; Kim, Y.; Borggraeve, W. De; Mashentseva, A.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; Dehaen, W. Bioorganic & Medicinal Chemistry Synthesis of Triterpenoid Triazine Derivatives from Allobetulone and Betulonic Acid with Biological Activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 1–9.
58. Malicorne, G.; Bompard, J.; Giral, L.; Despaux, E. Synthèse et Activité Anti-Bactérienne D'acides 4,7-Dihydro-4-Éthyl-7-oxothiéno(3,2-B)pyridine-6-Carboxyliques. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26* (1), 3–11.
59. Hargreaves, S. L.; Pilkington, B. L.; Russell, S. E.; Worthington, P. A. The Synthesis of Substituted Pyridylpyrimidine Fungicides Using Palladium-Catalysed Cross-Coupling Reactions. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (10), 1653–1656.
60. Ali, A. K.; Abdalghfar, H. S.; Mahmoud, K.; Ragab, E. A. Synthesis and

- Antitumor Activity of New Polysubstituted Thiophenes and 1,3,4-Thiadiazoles Incorporating 2,6-Pyridine Moieties. *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, *49*, 1458–1461.
61. Bondock, S.; Fadaly, W.; Metwally, M. A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Thiazole, Thiophene and Pyrazole Derivatives Containing Benzothiazole Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 9, 3692–3701.
62. Ye, D.; Zhang, Y.; Wang, F.; Zheng, M.; Zhang, X.; Luo, X.; Shen, X. Bioorganic & Medicinal Chemistry Novel Thiophene Derivatives as PTP1B Inhibitors with Selectivity and Cellular Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (5), 1773–1782.
63. Kulandasamy, R.; Vasudeva, A.; Stables, J. P. A New Class of Anticonvulsants Possessing 6 Hz Activity: 3, 4-Dialkyloxy Thiophene Bishydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 44, 4376–4384.
64. Zheng, S.; Zhong, Q.; Jiang, Q.; Mottamal, M.; Zhang, Q.; Zhu, N.; Burow, M. E.; Worthylake, R. A.; Wang, G. Discovery of a Series of Thiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (2), 191–196.
65. Bhuiyan, M. H.; Rahman, a. F. M. H. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Thiazole Derivatives. *J. Sci. Res.* **2010**, *3* (1), 22–29.
66. Hassan, F. A. Synthesis, Characterization, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of Some New Thiazole Derivatives. *Int. J. Applied Sci. Technol.* **2012**, *2*, 7, 180–187.
67. Ghaemmaghani, S.; May, B. C. H.; Renslo, A. R.; Prusiner, S. B. Discovery of 2-Aminothiazoles as Potent Antiprion Compounds. *J. Virol.* **2009**, *84* (7), 3408–3412.
68. Darwish, I. A.; Hussein, S. A.; Mahmoud, A. M.; Hassan, A. I. N-Bromosuccinimide/Fluorescein System for Spectrophotometric Determination of H<sub>2</sub>-Receptor Antagonists in Their Dosage Forms. *Res. Pharm. Sci.* **2010**, *1*, 2, 86–93.
69. Kametani, T.; Umezawa, O. NII-Electronic Library Service. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28* (6), 369–375.
70. Yasue, M.; Sakakibara, J. . K. T. . Syntheses of Nitrogen-Containing. II. Ring-A Fused Triterpene Containing Nitrogen. *J. Vet. Med. Sci.* **1996**, *58* (5), 481–484.
71. Sawa, M.; Mizuno, K.; Harada, H.; Tateishi, H.; Arai, Y.; Suzuki, S., Oue, M., Tsujiuchi, H., Furutanic, Y., K. S. Tryptamine-Based Human B<sub>3</sub>-Adrenergic Receptor Agonists. Part 3: Improved Oral Bioavailability via Modification of the Sulfonamide Moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1061–1064.
72. Javed, T.; Kahlon, S. S. Multi-Step Synthesis of Benzopyranones via a Key Step Involving Reaction of the Intermediate Compound with Phenyltrimethylammonium Tribromide. *Heterocycl. Chem* **2002**, *39*, 627–630.
73. Sukdolak, S.; Solujic, S.; Manojlovic, N. Hantzsch Reaction of 3-(2-Bromoacetyl)-4-Hydroxy-Chromen-2-One Synthesis of 3-(Thiazol-4-Yl)-4-Hydroxy Coumarines. *Heterocycl. Chem* **2004**, *41*, 593–596.
74. Baldwin, J. E.; Fryer, A. M.; Pritchard, G. J. Parallel Synthesis of Novel Heteroaromatic Acromelic Acid Analogues from Kainic Acid. *Org. Chem* **2001**, *66*, 2588–2596.
75. Derivatives, B.; Juo, W.; Lee, T.; Liu, W.; Ko, S.; Chittimalla, S. K.; Rao, C. P.; Liao, C. Facial Selectivity in the Nucleophilic Additions of Vinylmagnesium Bromide to Bicyclo[2.2.2]oct-5-En-2-One Derivatives. *J. Org. Chem* **2007**, *72*, 4, 7992–8004.
76. Vasquez-martinez, Y.; Ohri, R. V; Kenyon, V.; Holman, T. R.; Sepu, S.

- Structure–activity Relationship Studies of Flavonoids as Potent Inhibitors of Human Platelet 12-hLO, Reticulocyte 15-hLO-1, and Prostate Epithelial 15-hLO-2. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7408–7425.
77. Moreno, M. J. S.; Melo, S. M. L. . N. C. A New and Selective A'-Bromination of A, $\beta$ -Unsaturated Ketones. *SYNLETT* **1994**, 651–652.
78. Cabaj, J. E.; David Kairys, and T. R. B. Development of a Commercial Process to Produce Oxandrolone. *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 378–388.
79. Bellucci, G.; Bianchini, R.; Ambrosetti, R.; Ingrossog, G. Comparison of Molecular Bromine and Tribromide Ion as Brominating Reagents. 1. Kinetic Evidence for Different Mechanisms of Addition to Cyclohexene. *JOC* **1986**, *7*, 50, 3313–3318.
80. Qian, S.; Li, H.; Chen, Y.; Zhang, W.; Yang, S.; Wu, Y. Synthesis and Biological Evaluation of Heterocyclic Ring-Substituted Maslinic Acid Derivatives as Novel Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B. *J. Nat. Prod.* **2009**, *73* (11), 6618–6622.
81. Kishore, P.; Rajwinder, D.; Balakumar, K. Synthesis, Anti-Inflammatory Evaluation, and Docking Studies of Some New Thiazole Derivatives. *Med Chem Res* **2014**, *23*, 2780–2792.
82. Morales-bonilla, P.; Andrea, P.; Quintero-m, E. P. Reparation , Antimicrobial Activity , and Toxicity of 2-Amino-4-Arylthiazole Derivatives. *Heteroat. Chemistry* **2006**, *17* (4), 254–260.
83. Santiago, S. N.; Pietra, D.; Mulder-krieger, T.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aminothiazoles and Their Amide Derivatives on Human Adenosine Receptors . Lack of Effect of 2-Aminothiazoles as Allosteric Enhancers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *13*, 2079–2087.
84. Ran, K.; Gao, C.; Deng, H.; Lei, Q.; You, X.; Wang, N.; Shi, Y.; Liu, Z.; Wei, W.; Peng, C.; Xiong, L.; Xiao, K.; Yu, L. Identification of Novel 2-Aminothiazole Conjugated Nitrofurans as Antitubercular and Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (15), 3669–3674.
85. Borrell Bilbao, J. I.; Teixidó Closa, J. *Síntesis Orgánica*, 2 Ed.; SINTESIS; Madrid, España, 2003.
86. Vogel, A. I.; Tatchell, A. R.; Furnis, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th Editio.; Hall, P., Ed.; 1996.
87. WADE, J. L. G. *Química Orgánica Volumen 2. Pearson* **2012**, *2*, 7 Ed., 656.
88. McMurry, J. *Química Orgánica. Cengage Learn.* **2012**, *8 Ed.*, 1376.
89. Santiago, S. N.; Pietra, D.; Mulder-krieger, T.; Brussee, J.; Ijzerman, A. P. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aminothiazoles and Their Amide Derivatives on Human Adenosine Receptors . Lack of Effect of 2-Aminothiazoles as Allosteric Enhancers. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2079–2087.
90. Helal, C. J.; Sanner, M. A.; Cooper, C. B.; Gant, T.; Adam, M.; Lucas, J. C.; Kang, Z.; Kupchinsky, S.; Ahlijanian, M. K.; Tate, B.; Menniti, F. S.; Kelly, K.; Peterson, M. Discovery and SAR of 2-Aminothiazole Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 5/p25 as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (22), 5521–5525.
91. Thomas, K. D.; Adhikari, A. V.; Chowdhury, I. H.; Sumesh, E.; Pal, N. K. New Quinolin-4-Yl-1,2,3-Triazoles Carrying Amides, Sulphonamides and Amidopiperazines as Potential Antitubercular Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 6, 2503–2512.
92. Zhao, X. Z.; Maddali, K.; Metifiot, M.; Smith, S. J.; Vu, B. C.; Marchand, C.;

- Hughes, S. H.; Pommier, Y.; Jr, T. R. B.; Burke, T. R. Bicyclic Hydroxy-1H-Pyrrolopyridine-Trione Containing HIV-1 Integrase Inhibitors. **2012**, 5 (Figure 1), 157–165.
93. Garduño-castro, M. H.; Hernández-rodríguez, M. Application of Acyclic Chiral Auxiliaries on Alkylation Reactions. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 193–196.
94. Ng, K. S.; Laycock, D. E.; Alper, H. Synthesis of Enamides and Amides by Hydrozirconation-Acylation of Schiff Bases. *JOC* **1981**, 4, 2899–2901.
95. Heine, H. W.; Zibuck, R.; Vandenheuvel, W. J. A. Mechanisms for the Reactions of Nitrones with Aroyl Chlorides. **1982**, 3691–3694.
96. Bhat, S.; Sup, J.; Liu, J. O. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Tricyclic Thiazoles Are a New Class of Angiogenesis Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (9), 2733–2737.
97. Bhuiyan, M. M. H.; Rahman, A. F. M. H. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Thiazole Derivatives. *J. Sci. Res.* **2011**, 3. 1, 22–29.
98. Waissera, K.; Kune, J. Correlation of Structural Parameters with Antituberculous Activity in a Group of 2-Benzamidobenzothiazoles. **1991**, 56, 1, 2978–2985.
99. Li, L.; Zhang, C.; Song, H.; Tan, C.; Ding, H.; Jiang, Y. Discovery of Novel Dual Inhibitors of VEGFR and PI3K Kinases Containing 2-Ureidothiazole Scaffold. *Chinese Chem. Lett.* **2016**, 27 (1), 1–6.
100. Fatima, A.; Kulkarni, R.; Mantipragada, B. Design and Synthesis of N-Substituted Aminothiazole Compounds as Anti- Inflammatory Agents, **2015**, 7 (3), 212–220.
101. Boyd, Robert Neilson; Morrison, R. T. Química Organica. *Addison Wesley Longman* **1999**, 5 Ed.
102. N, A. N. J. C. L. Química Orgánica. *Reverté S.A.* **1986**, 2 Ed.
103. Gertsch, J. How Scientific Is the Science in Ethnopharmacology? Historical Perspectives and Epistemological Problems. *J Ethnopharm* **2009**, 122, 177–183.
104. Urban, M.; Vlk, M.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J. Cytotoxic Heterocyclic Triterpenoids Derived from Betulin and Betulinic Acid. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20 (11), 3666–3674.
105. Nogrady, T.; Weaver, D. F. *Medicinal Chemistry: Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach*, Oxford Uni.; Oxford University Press, 2005.
106. Devine, S. M.; Mulcair, M. D.; Debono, C. O.; Leung, E. W. W.; Nissink, W.; Lim, S. S.; Chandrashekar, I. R.; Vazirani, M.; Mohanty, B.; Scott, J.; Baell, J. B.; Scammells, P. J.; Norton, R. S.; Scanlon, M. J. Promiscuous 2-Aminothiazoles ( PrATs ): A Frequent Hitting Scaffold. *J. Med. Chem* **2015**, 58 (3), 1205–1214.





