

ANÁLOGOS DE PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS. MODIFICACIONES QUÍMICAS DE TRITERPENOIDES, OBTENIDOS A PARTIR DE UNA ESPECIE VEGETAL ENDÉMICA DE LA REGIÓN

M. Julia Castro^{1a}, Florencia A. Musso^{2a}, Ana Paula Murray^{3a}, M. Belén Faraoni^{*4a}

Descripción del tema abordado

En nuestro país, contamos con un gran número de especies vegetales nativas que aún no han sido cabalmente estudiadas, con una riqueza potencial en estructuras y actividades biológicas aún por descubrir. Los triterpenos, abundantes en muchas plantas, han sido utilizados en varios casos como cabezas de serie para estudios de estructura-actividad de derivados semi-sintéticos de triterpenos bioactivos [1-5].

En trabajos realizados por el grupo en los últimos años se ha optimizado la extracción de triterpenos a partir de una planta endémica, *Chuquiragaerinacea* (Asteraceae) que se encuentra en la región y que ha mostrado capacidad de inhibir la enzima acetilcolinesterasa (ACE) [6]. Estos triterpenos se caracterizan por presentar esqueletos con grupos funcionales en posiciones poco comunes, estructuras que no pueden conseguirse comercialmente. Es de interés, la búsqueda de nuevos inhibidores de colinesterasa que puedan ser utilizados como líderes para el desarrollo de terapias contra la Enfermedad de Alzheimer. En trabajos recientes se ha observado que por modificaciones químicas realizadas sobre uno de estos triterpenos naturales, el calenduladiol, se obtienen análogos con mayor actividad inhibitoria de ACE y butirilcolinesterasa (BuCE) [7].

Objetivos

El objetivo general del grupo de investigación es contribuir al descubrimiento de moléculas bioactivas, que puedan significar un aporte para el desarrollo futuro de nuevas drogas con diversas aplicaciones (Enfermedad de Alzheimer y otras neurodegenerativas, desórdenes neuromusculares, antitumorales, antiinflamatorias, etc.) aprovechando la quimiodiversidad aportada por plantas endémicas de la región.

A partir de la experiencia previa con *Chuquiragaerinacea* y el calenduladiol (**2**, Fig. 1) abundante en sus extractos, así como la detección de actividad inhibitoria de ACE y BuCE de este metabolito y de los análogos obtenidos a partir de él, surgió el interés en optimizar la extracción de calenduladiol y otros triterpenos encontrados en la planta (lupeol (**1**) y heliantriol B2 (**3**), Fig. 1), y llevar a cabo modificaciones a estas estructuras mediante reacciones químicas sobre los anillos A y D, así como sobre el grupo isopropenilo unido al anillo E, las cuales llevarán a la obtención de nuevos derivados que serán caracterizados en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural (RMN 1D y 2D, EM, IR, etc), y evaluados frente a ACE, BuCE,

^a INQUISUR, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur (UNS)-CONICET, 0291-4595101, Avenida Alem 1253, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

¹ julia.castro@uns.edu.ar

² florencia.musso@uns.edu.ar

³ apmurray@uns.edu.ar

⁴ bfaraoni@criba.edu.ar

y a las líneas celulares de CaP, LNCaP (andrógeno dependiente) y PC-3 (andrógeno no dependiente). Los resultados obtenidos permitirán el diseño racional de nuevos compuestos bioactivos a partir de un estudio de estructura-actividad.

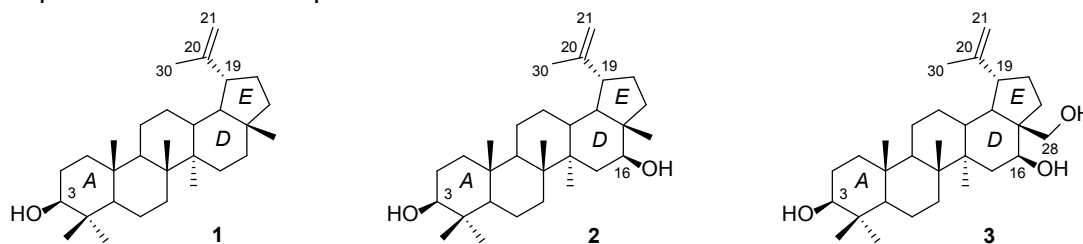


Figura 1. Estructura de lupeol (1), calenduladiol (2) y heliantriol B2 (3)

Métodos y Resultados

Se utilizó como fuente natural la especie *Chuquiragaerinacea* (Asteraceae), una especie endémica que se halla ampliamente distribuida en el sur de la provincia de Buenos Aires, que se recolectó en los alrededores de la ciudad de Bahía Blanca durante el período de floración (noviembre-diciembre). El material vegetal, siguiendo un procedimiento optimizado, fue sometido a una extracción con etanol y a sucesivas etapas de fraccionamiento hasta llegar al aislamiento de los triterpenos puros: lupeol (1), calenduladiol (2) y heliantriol B2 (3). En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de derivados mono-, di- y tricarbónicos de lupeol (1) y calenduladiol (2). Las reacciones de oxidación se llevaron a cabo mediante dos metodologías diferentes. Por un lado, la disolución del sustrato en acetona y su posterior tratamiento con el reactivo de Jones, condujo rápidamente a la oxidación del alcohol secundario en cetona, sin afectar el doble enlace presente en la molécula. Por otro lado, por tratamiento con SeO_2 del sustrato disuelto en etanol y posterior calentamiento a reflujo, se obtuvo un grupo aldehído en C-30 formando un sistema carbonílico α,β -insaturado (Fig 2).

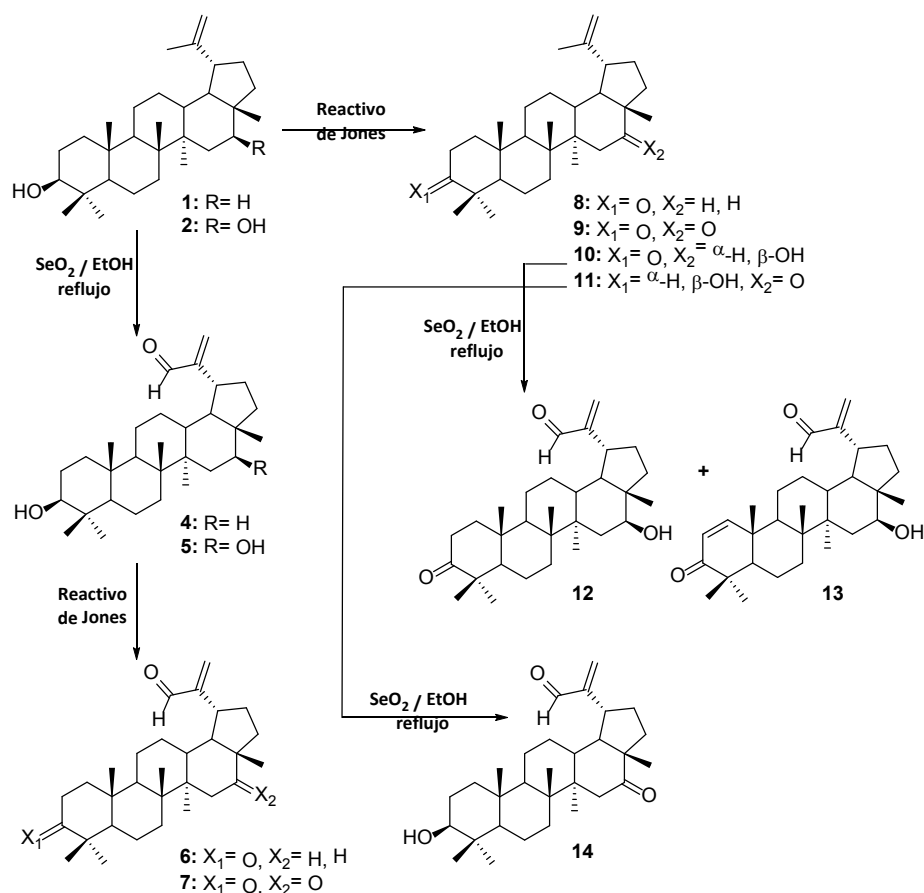
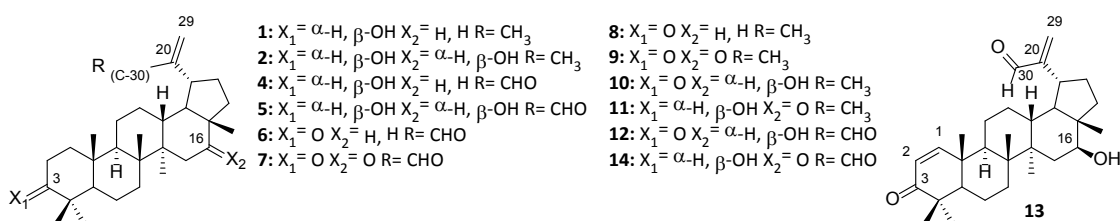


Figura 2. Esquema de síntesis de derivados carbonílicos de lupeol (**1**) y calenduladiol (**2**) Las nuevas entidades moleculares fueron caracterizadas en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural.

Todos los análogos obtenidos fueron evaluados en el grupo de investigación como potenciales inhibidores de ACE y BuCE, utilizando el método de Ellman [8]. Los resultados de la inhibición enzimática se presentan en la Tabla 1. Como se puede observar, los compuestos más activos frente a BuCE son los derivados de calenduladiol con un grupo carbonilo en C-16 y funcionalizados en C-3 y C-30 con diferentes grupos (metilo, hidroxilo o carbonilo). Estos resultados fueron corroborados a través de un estudio comparativo entre los análogos de lupeol y 16-oxocalenduladiol más activos, demostrando que aquellos derivados que presentan un grupo carbonilo en C-16 muestran una mayor inhibición enzimática respecto de los que tienen un metileno en la misma posición. Por lo tanto, en estos triterpenos tipo lupano, la presencia de un grupo carbonilo en C-16 es fundamental para lograr una mayor actividad y selectividad frente a BuCE.

Tabla 1. Inhibición de la actividad ACE y BuCE e índice de selectividad de **1, 2, 4-14**



| Compuesto | ACE ^a | | BuCE ^b | | Índice de selectividad ^c |
|----------------|------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | PI a 200 μ M | μ MIC ₅₀ (μ M) | PI a 200 μ M | μ MIC ₅₀ (μ M) | |
| 1 | 21,3 \pm 2,7 | >200 | 31,0 \pm 2,2 | >200 | |
| 2 | 8,1 \pm 0,2 | >200 | 42,0 \pm 0,8 | >200 | |
| 4 | 5,7 \pm 0,4 | - | 3,2 \pm 1,0 | - | |
| 5 | 43,5 \pm 1,1 | >200 | 42,0 \pm 4,4 | - | |
| 6 | n.i. | - | 28,9 \pm 3,1 | - | |
| 7 | 21,7 \pm 1,2 | >200 | 86,5 \pm 2,7 | 21,5 \pm 1,2 | >9,30 |
| 8 | 8,8 \pm 1,2 | - | 10,2 \pm 1,4 | - | |
| 9 | 6,4 \pm 0,3 | - | 61,4 \pm 0,5 | 154,6 \pm 2,3 | |
| 10 | 12,6 \pm 1,5 | >200 | 43,5 \pm 0,9 | >200 | |
| 11 | 40,2 \pm 2,1 | >200 | > 100 | 28,9 \pm 2,1 | >6,92 |
| 12 | n.i. | - | 35,3 | | |
| 13 | n.i. | - | 44,6 \pm 0,6 | >200 | |
| 14 | 29,7 \pm 0,8 | >200 | > 100 | 76,8 \pm 0,3 | >2,60 |
| Tacrina | - | 0,0029 \pm 0,002 | - | 0,004 \pm 0,001 | |

^aACE de anguila eléctrica. ^bBuCE de suero de caballo. ^cÍndice de selectividad = IC₅₀ (ACE)/IC₅₀ (BuCE).

Con el propósito de tener una visión molecular sobre el modo de acción de **7** y **11** como inhibidores de BuCE, se llevaron a cabo estudios de modelado molecular, los cuales justificaron la mayor selectividad de estos derivados 16-oxo sustituidos con esqueletolupano hacia BuCE, encontrándose diferencias en las interacciones generadas entre cada uno de estos análogos y los residuos del sitio enzimático. Los estudios de *docking* fueron realizados mediante una colaboración con la Dra. Victoria Richmond (UMYMFOR, UBA).

Por otro lado, considerando que los triterpenos presentan un enorme potencial como agentes quimiopreventivos y terapéuticos en diversos modelos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*, como consecuencia de la inhibición de moléculas claves de la señalización, mediadores de la inflamación, de la proliferación de células tumorales y de la angiogénesis [9, 10], se propuso la síntesis de análogos de lupeol y calenduladiol, a través de metodologías ya utilizadas por el grupo [7], y la determinación de la actividad citotóxica de triterpenos tipo lupano naturales y semisintéticos sobre células CaP, en colaboración con la Dra. Valeria Careaga (IBYME-CONICET, UBA). Los triterpenos naturales evaluados fueron lupeol (**1**), calenduladiol (**2**) y heliantriol B2 (**3**), mientras que los semisintéticos fueron obtenidos a partir de **1** y **2** por transformaciones de los grupos hidroxilo en C-3 y/o C-16 (compuestos **8**, **15-23**, Fig. 3 y 4). A todos estos compuestos, purificados por cromatografía y caracterizados por ¹H y ¹³C-RMN, se les midió *in vitro* la actividad citotóxica frente a dos líneas celulares de CaP, LNCaP (andrógeno dependiente) y PC-3 (andrógeno no dependiente). En la Tabla 2 se presentan los valores de IC₅₀ calculados para los derivados **8**, **15-23**, y se comparan con los correspondientes compuestos naturales (**1**, **2** y **3**).

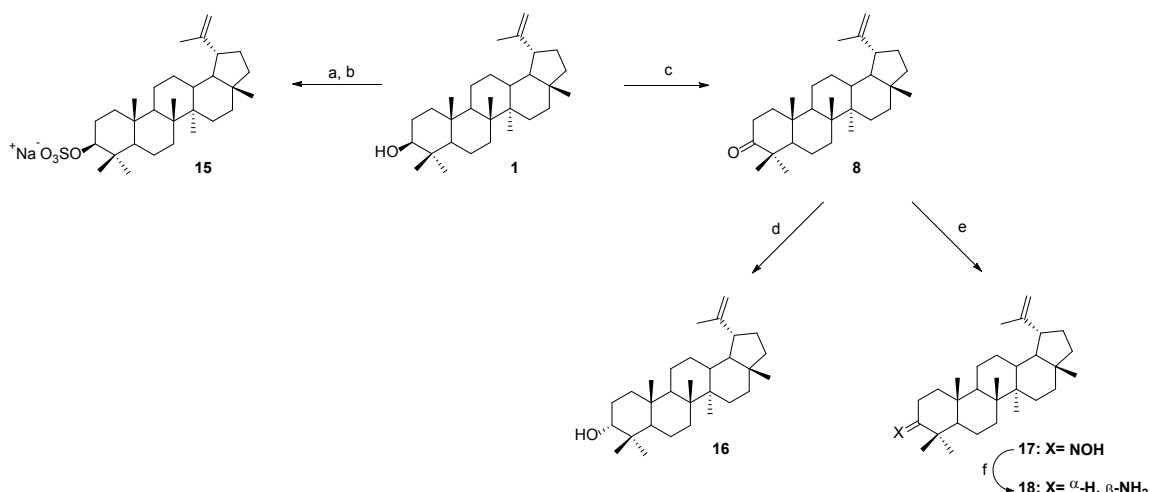


Figura 3. Síntesis de los compuestos **8**, **15-18**. Reactivos y condiciones: (a) 4 equiv. $\text{Me}_3\text{N} \cdot \text{SO}_3$, DMF, 7 min, 150°C , microondas. (b) Amberlite CG-120 (MeOH); (c) Reactivo de Jones, acetona; (d) NaBH_4 , MeOH; (e) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, NaOAc, EtOH/ H_2O ; (f) LiAlH_4 , THF.

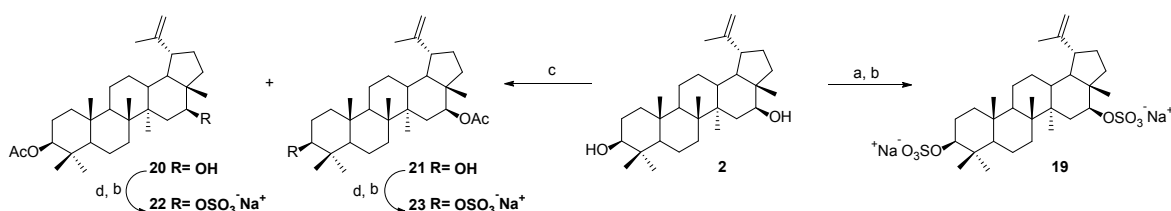
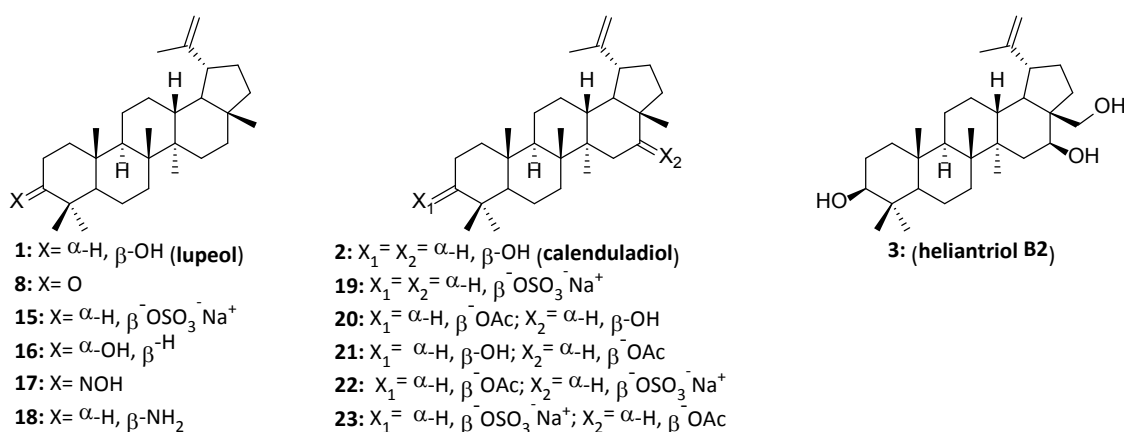


Figura 4. Síntesis de los compuestos **19-23**. Reactivos y condiciones: (a) 8 equiv. $\text{Me}_3\text{N} \cdot \text{SO}_3$, DMF, 7 min, 150°C , microondas; (b) Amberlite CG-120 (MeOH); (c) AcO, Py, DMAP, DCM; (d) 4 equiv. $\text{Me}_3\text{N} \cdot \text{SO}_3$, DMF, 7 min, 150°C , microondas.

Tabla 2. Citotoxicidad de triterpenos tipo lupano frente a las líneas celulares PC-3 y LNCaP



| Compuesto | IC_{50} (μM) PC-3 | LNCaP | Compuesto | IC_{50} (μM) PC-3 | LNCaP |
|-----------|--|-------|-----------|--|------------------|
| 1 | $100,0 \pm 1,09$ | >100 | 18 | $32,12 \pm 1,09$ | $42,09 \pm 1,16$ |

| | | | | | |
|-----------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------|--------------|
| 2 | 93,27 ± 1,11 | 73,52 ± 1,11 | 19 | 60,70 ± 1,08 | 45,79 ± 1,06 |
| 3 | 46,58 ± 1,10 | 42,81 ± 1,06 | 20 | >100 | >100 |
| 8 | >100 | >100 | 21 | >100 | >100 |
| 15 | 16,13 ± 1,10 | 7,43 ± 1,32 | 22 | 44,93 ± 1,10 | 38,43 ± 1,07 |
| 16 | >100 | >100 | 23 | 49,21 ± 1,06 | 41,13 ± 1,08 |
| 17 | >100 | >100 | Doxorrubicina | 1,89 ± 0,01 | 1,63 ± 0,01 |

Estos resultados demuestran que la sulfatación de lupeol (**1**) condujo al derivado más activo (**15**), con valores de IC₅₀ de 16,13 μM y 7,43 μM para las líneas celulares PC-3 y LNCaP, respectivamente.

Asimismo, se observó que la actividad citotóxica frente a las líneas celulares de CaP de los lupanos naturales (**1**, **2** y **3**), aumenta con el incremento de los grupos hidroxilos en la molécula, siendo el más activo el triol **3**, sin presentar selectividad hacia una línea celular en particular.

Conclusiones

Los resultados obtenidos, sugieren que los derivados triterpénicos con un grupo carbonilo en C-16 podrían proporcionar una plantilla útil para el desarrollo de nuevos inhibidores de BuCE más selectivos. La importancia de este hecho se debe a que la actividad de BuCE aumenta a medida que progresa la Enfermedad de Alzheimer, lo que indica que esta enzima puede desempeñar un papel importante en las últimas etapas de la enfermedad [11].

Asimismo, se observó que todos los derivados sulfatados sintetizados hasta el momento, compuestos **15**, **19**, **22** y **23**, presentaron una mejor actividad citotóxica frente a las líneas celulares de CaP que los lupanos naturales, compuestos **1** y **2**, resultando el más activo el derivado **15**. Estos resultados preliminares, nos permiten esbozar conclusiones respecto a la relación estructura-actividad para este tipo de triterpenos frente a las líneas celulares de CaP.

Bibliografía

[1] Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentina LM, Chen CH, Garren PE, Lee KH. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J Med Chem* **1996**; 39: 1016-1017.

[2] Sun IC, Wang HK, Kashiwada Y, Shen JK, Cosentino LM, Chen CH, Yang LM, Lee KH. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J Med Chem* **1998**; 41: 4648-4657.

[3] Qian K, Kim SY, Hung HY, Huang L, Chen CH, Lee KH. New betulinic acid derivatives as potent proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**; 21: 5944-5947.

[4] Kim DSHL, Pezzuto JM, Pisha E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**; 8: 1707-1712.

- [5] Santos RC, Salvador JAR, Marín S, Cascante M, Moreira JN, Dinis TCP. Synthesis and structure-activity relationship study of novel cytotoxic carbamate and N-acylheterocyclic bearing derivatives of betulin and betulinic acid. *Bioorg Med Chem***2010**; 18: 4385-4396.
- [6] Vela Gurovic MS, Castro MJ, Richmond V, Faraoni MB, Maier MS, Murray A P. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiragaerinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae). *Planta Med* **2010**; 76 (6), 607-610.
- [7] Castro MJ, Richmond V, Romero C, Maier MS, Estévez-Braun E, Ravelo AG, Faraoni MB, Murray AP. Preparation, anticholinesterase activity and molecular docking of new lupane derivatives. *Bioorg Med Chem***2014**; 22: 3341-3350.
- [8] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol***1961**; 7: 88-95.
- [9] Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, Tan BKH, 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: 158-170.
- [10] Ukiya M, Akihisa T, Tokuda, Hiroyuki Suzuki, Mukainaka T, Ichiishi E, Yasukawa K, Kasahara Y, Nishino H. Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Lett***2002**; 177: 7-12.
- [11] Agis-Torres A, Söllhuber M, Fernandez M, Sanchez-Montero JM. Multi-target-directed ligands and other therapeutic strategies in the search of a real solution for Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol***2014**; 12: 2-36.