

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

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 Por ejemplo, los derivados obtenidos a partir de faradiol con mejor actividad antiinflamatoria que el triterpeno de partida, o los derivados del ácido betulínico con mejor actividad citotóxica, antiviral, anti-inflamatoria y antimalárica.^{2,3}

A partir de la experiencia previa con *Chuquiraga erinacea* y el calenduladiol (**2**) abundante en sus extractos, así como la detección de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (ACE) y butirilcolinesterasa (BuCE) de este metabolito y de los análogos obtenidos a partir de él,^{4,5} surgió el interés en optimizar la extracción de 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 llevaron a la obtención de nuevos derivados que fueron evaluados en diferentes actividades biológicas.

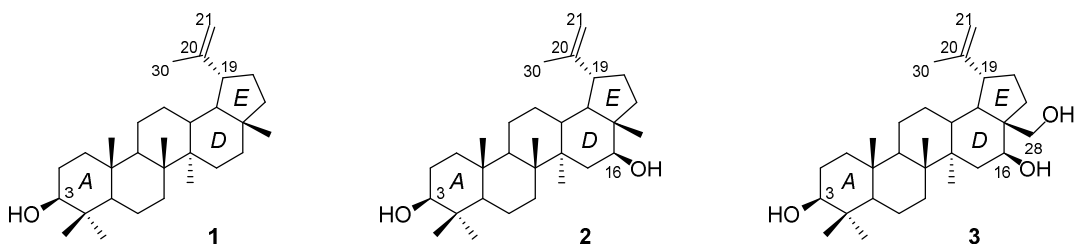


Figura 1. Estructura de lupeol (**1**), calenduladiol (**2**) y heliantriol B2 (**3**).

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 EtOH y posterior calentamiento a reflujo, se obtuvo un grupo aldehído en C-30 formando un sistema carbonílico α,β -insaturado (Fig 2).

Las nuevas entidades moleculares fueron caracterizadas en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural.

Todos los análogos obtenidos fueron evaluados como potenciales inhibidores de ACE y BuCE. 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, la presencia de un grupo carbonilo en C-16 en estos triterpenos tipo lupano es fundamental para lograr una mayor actividad y selectividad frente a BuCE.

Este hallazgo sugiere 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.⁶

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 utilizando tanto ACE

como BuCE, esperando encontrar diferencias en las interacciones generadas entre cada uno de estos análogos y los residuos del sitio enzimático, que justifiquen la mayor selectividad de estos derivados 16-oxo sustituidos con esqueleto lupano hacia BuCE. Los estudios de *docking* que fueron realizados mediante una colaboración con la Dra. Victoria Richmond (UMYFOR, UBA).

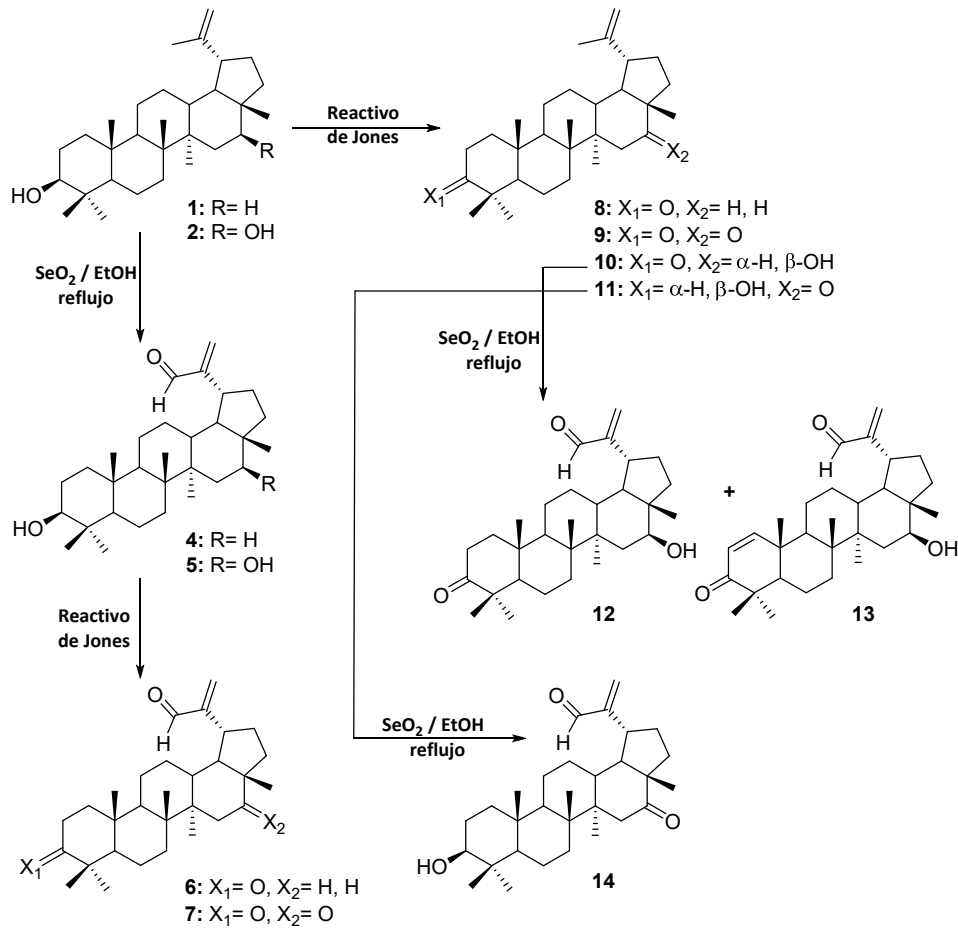


Figura 2. Esquema de síntesis de derivados carbonílicos triterpénicos

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	IC ₅₀ (μ M)	PI a 200 μ M	IC 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	

^a ACE de anguila eléctrica. ^b BuCE de suero de caballo. ^c Índice de selectividad = IC₅₀ (ACE)/IC₅₀ (BuCE).

Posteriormente, teniendo en cuenta que la hidrogenación selectiva de compuestos carbonílicos triterpénicos a los correspondientes alcoholes epímeros es una de las reacciones de interés en la transformación de productos naturales bioactivos⁷⁻⁹, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Virginia Vetere (CINDECA, UNLP), quién posee una amplia experiencia en hidrogenaciones quimio- y estereoselectivas de terpenos y terpenonas a través de catálisis heterogénea, se propuso el empleo de catalizadores heterogéneos para la reducción de estos derivados, lo cual constituye una alternativa atractiva a la utilización de hidruros inorgánicos ya que es posible tener un mejor control de la selectividad y minimizar la cantidad de residuos tóxicos. Se llevó a cabo la reducción de lupenona (**8**) utilizando catalizadores mono- y bimetálicos a base de Pt. Estos últimos fueron preparados mediante el agregado de Sn como segundo metal a través de una reacción superficial controlada entre el metal de transición y el metal electropositivo.

En primer lugar se llevó a cabo la reducción de lupenona utilizando un catalizador monometálico a base de Pt soportado sobre SiO₂ con un contenido metálico de 1% p/p (Pt). Como producto de esta reacción. Por espectroscopia de RMN de ¹H se observó una mezcla de 20,29-dihidrolupenona (**15**) obtenida por hidrogenación de la cadena lateral, 20,29-dihidroepilupeol (**16**) y 20,29-dihidrolupeol (**17**), aductos de hidrogenación tanto de la cadena lateral como del grupo carbonilo (Fig. 3). La purificación de esta mezcla por cromatografía en columna condujo a **15**, **16** y **17** con un rendimiento del 35,6%, 16,6% y 40,0% respectivamente.

Luego se empleó el sistema PtSn_{0,2} para la reducción de lupenona. El espectro de RMN de ¹H del bruto de reacción mostró la formación de una mezcla de alcoholes epímeros confirmando la reducción del grupo carbonilo, con una relación de epímeros $\alpha:\beta$ = 23:77. Se observó también un porcentaje de hidrogenación del doble enlace C=C (60,0%). Por lo tanto, la reducción de **8** condujo a la obtención de cuatro compuestos: **18** y **1**, aductos de hidrogenación del doble enlace C=O y, **16** y **17** productos de la reducción de los dobles enlaces C=C y C=O presentes en la estructura triterpénica (Fig. 3).

Los resultados con el catalizador de PtSn0,2 indicaron que si bien la presencia del Sn favorece la reducción del grupo carbonilo, la cantidad del mismo no es suficiente para que la hidrogenación sea completamente quimioselectiva. Por lo tanto, se decidió utilizar un nuevo sistema catalítico aumentando la relación molar Sn/Pt a 0,8 (PtSn0,8). El análisis de RMN de ^1H del bruto de reacción permitió confirmar que no hubo reducción del doble enlace C=C demostrando la quimioselectividad de este sistema. Además, la relación de epímeros $\alpha:\beta = 38:62$ (**18** y **1**) mostró un aumento en la proporción del epímero α deseado. Por lo tanto, el sistema bimetalico PtSn0,8 condujo a la reducción selectiva del grupo carbonilo obteniéndose una mezcla de los alcoholes triterpénicos lupeol (**1**) y *epilupeol* (**18**), los cuales fueron separados por cromatografía en columna, obteniéndose **18** con un 21,1% de rendimiento (Fig. 3).

En la Tabla 2 se presenta la composición de la mezcla de reacción en moles %, luego de 14 h. Como puede observarse, la presencia de Sn aumenta la selectividad hacia la hidrogenación de C=O.

El derivado **18** (*epilupeol*) fue evaluado *in vitro* como potencial inhibidor de las enzimas ACE y BuCE. Los resultados de actividad anticolinesterasa indicaron que la inversión de la configuración del C-3 no condujo a un aumento en la actividad inhibitoria, tanto frente a ACE como a BuCE, respecto de la observada para **1** (lupeol).^{4,10}

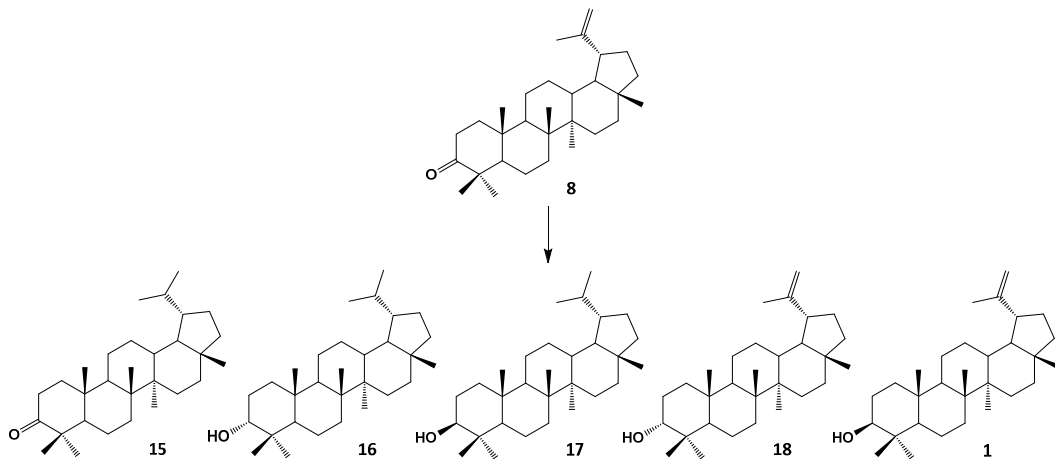


Figura 3. Productos de reducción catalítica de **8**

Tabla 2. Composición en moles % de la mezcla final luego de 14 h de reacción.

Catalizador	8	15	16	17	18	1
Pt	-	40,3	18,2	43,8	-	-
PtSn0,2	-	-	7,7	53,3	10,0	29,0
PtSn0,8	-	-	-	-	32,1	67,9

Por último, 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,^{11,12} se propuso determinar la actividad de triterpenos tipo lupano naturales y semisintéticos en este tipo de células tumorales, en colaboración con la Dra. Valeria Careaga (IBYME-CONICET, UBA) quien posee experiencia en ensayos biológicos sobre células CaP. Los triterpenos naturales evaluados fueron lupeol (**1**) y calenduladiol (**2**), aislados de la especie vegetal *C. erinacea*,

mientras que los semisintéticos fueron los obtenidos a partir de **1** y **2** por transformaciones de los grupos hidroxilo en C-3 y/o C-16 (Fig. 4 y 5). Para todos estos compuestos, purificados por cromatografía y caracterizados por ^1H y ^{13}C -RMN, se 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 3 se presentan los valores de IC_{50} calculados para los derivados **8**, **18-26**, y se comparan con los correspondientes compuestos naturales (**1** y **2**).

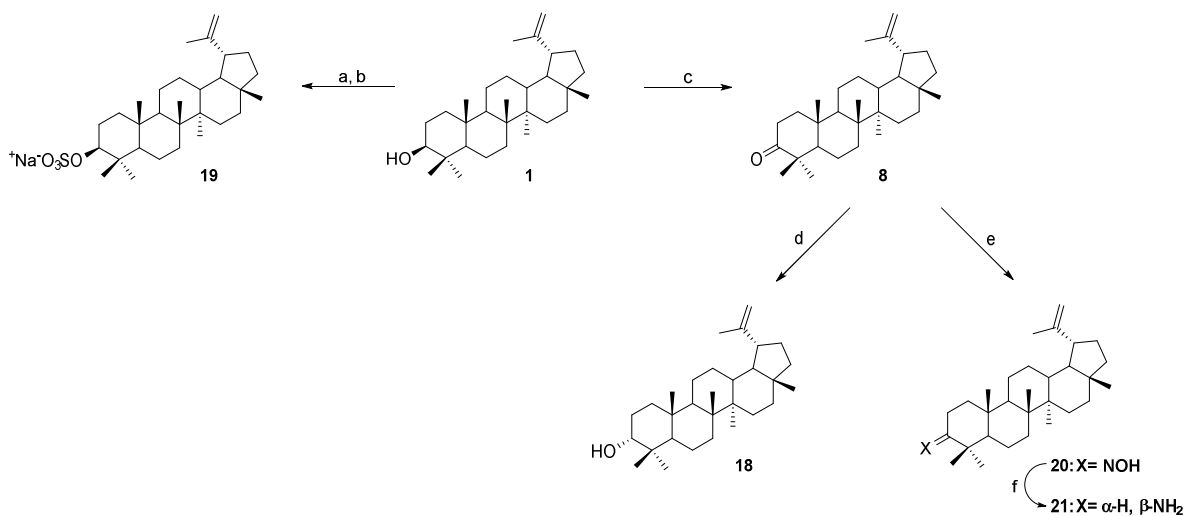


Figura 4. Synthesis of compounds **8**, **18-21**. Reagents and conditions: (a) 4equiv. $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF, 7 min, 150°C , microwave; (b) Amberlite CG-120 (MeOH); (c) Jones reagent, acetone; (d) $\text{PtSn}0.8/\text{SiO}_2$, $i\text{PrOH}$; (e) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$; (f) LiAlH_4 , THF.

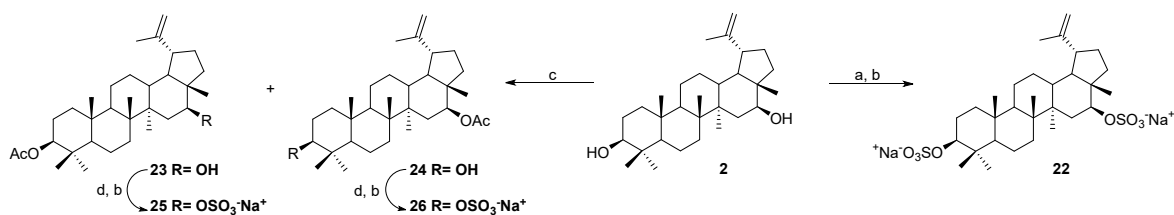


Figura 5. Synthesis of compounds **22-26**. Reagents and conditions: (a) 8 equiv. $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF, 7 min, 150°C , microwave; (b) Amberlite CG-120 (MeOH); (c) AcO , Py, DMAP, DCM; (d) 4 equiv. $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF, 7 min, 150°C , microwave.

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

Compuesto	IC_{50} (μM)		Compuesto	IC_{50} (μM)	
	PC-3	LNCaP		PC-3	LNCaP
1	100,0 \pm 1,09	>100	21	32,12 \pm 1,09	42,09 \pm 1,16
2	93,27 \pm 1,11	73,52 \pm 1,11	22	60,70 \pm 1,08	45,79 \pm 1,06
8	>100	>100	23	>100	>100
18	>100	>100	24	>100	>100
19	16,13 \pm 1,10	7,43 \pm 1,32	25	44,93 \pm 1,10	38,43 \pm 1,07
20	>100	>100	26	49,21 \pm 1,06	41,13 \pm 1,08

Los resultados demostraron que la sulfatación del grupo hidroxilo de **1** (compuesto **19**) significó un importante incremento en la citotoxicidad frente a PC-3 y LNCaP, con valores de IC₅₀ inferiores a 20 µM. Asimismo, el derivado disulfatado (**22**) presentó un moderado aumento de la citotoxicidad respecto de su análogo dihidroxilado (**2**) frente a ambas líneas celulares. Por otro lado, la sulfatación de sólo un grupo hidroxilo del compuesto **2**, produce cambios significativos en la actividad citotóxica frente a ambas líneas celulares (compuestos **25** y **26**).

Los derivados **8**, **18**, **20**, **23** y **24** resultaron inactivos frente a ambas líneas celulares con valores de IC₅₀ superiores a 100 µM, mientras que el derivado 3β-aminolupeol (**21**) resultó casi tres veces más activo que su análogo de partida (**1**).

En conclusión, la sulfatación de lupeol condujo al derivado más activo (**19**), con valores de IC₅₀ de 16,13 µM y 7,43 µM para las líneas celulares PC-3 y LNCaP, respectivamente, por lo que se podría postular como un agente anticancerígeno prometedor.^{13,14}

Estas investigaciones fueron financiadas por subsidios otorgados por la UNS, CIC y ANPCyT.

Bibliografía

- 1- Dzubak P, Hajdich M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L., *J. Nat. Prod. Rep.*, 23, 394-411, 2006.
- 2- Neukirch H, D'ambrosio M, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R, Guerriero, *Chem. Biodivers.*, 2, 657-671, 2005.
- 3- Sami A, Taru M, Salme K, Jari Y., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 1-13, 2006.
- 4- Vela, M.S.; Castro, M.J.; Richmond, V.; Faraoni, M.B.; Maier, M.S.; Murray, A.P. *Planta Med.*, 76, 607-61, 2010.
- 5- María Julia Castro, Victoria Richmond, Carmen Romero, Marta S. Maier, Ana Estévez-Braun, Ángel G. Ravelo, María Belén Faraoni, Ana Paula Murray, *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 3341-3350, 2014.
- 6- Castro, M.; Murray, A.; Faraoni, M.; *In Proceedings of the 18th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem.*, 1 - 30 November 2014; Sciforum Electronic Conference Series, Vol. 18, 2014, b035; doi:10.3390/ecsoc-18-b035.
- 7- A.V. Symon, A.P. Kaplun, N.K. Vlasenkova, G.K. Gerasimova, L.B. Shon, E.F. Litvin, L.M. Kozlova, E.L. Surkova, V.I. Shvets; *Russ. J. Bioorg. Chem.* 29 185-189, 2003.
- 8- C.P. Reyes, M.J. Núñez, I.A. Jiménez, J. Busserolles, M.J. Alcaraz, I.L. Bazzocchi; *Biorg. Med. Chem.* 14, 1573-1579, 2006.
- 9- M.J. Núñez, C.P. Reyes, I.A. Jiménez, L. Moujir, I.L. Bazzocchi; *J. Nat. Prod.* 68 (2005) 1018-1021.
- 10- María Julia Castro, Florencia Musso, Emilia Serrano, Ana Paula Murray, Virginia Vetere, María Belén Faraoni. *XIX Congreso Argentino de Catálisis y VIII Congreso de Catálisis del Mercosur*, 21 – 23 de Setiembre de 2015; Bahía Blanca, Buenos Aires. Libro de Actas XIX Congreso Argentino de Catálisis & VIII Congreso de Catálisis del Mercosur, pág 895-900.
- 11- Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, Tan BKH, Sethi G; *Cancer Lett*; 320: 158-170, 2012.
- 12- Ukiya M, Akihisa T, Tokuda, Hiroyuki Suzuki, Mukainaka T, Ichiishi E, Yasukawa K, Kasahara Y, Nishino H; *Cancer Lett*, 177: 7-12, 2002.
- 13- María Julia Castro, Valeria P. Careaga, Paula Sacca, Juan C. Calvo, Marta S. Maier, María B. Faraoni, Ana P. Murray. *Book of Abstracts of Trends in Natural Products Research*, 2014: página 68-69 (P-82).
- 14- M.J. Castro, V.P. Careaga, P. Sacca, J.C. Calvo, A.P. Murray, M.B. Faraoni, *XXIV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Congress Abstracts Book*, 2015: página 172 (PS105).

22. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO

“Análogos de productos naturales como fuente de compuestos bioactivos. Modificaciones químicas de lupeol y calenduladiol”

Objetivos

El objetivo general de este plan de investigación es contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas, como un aporte al desarrollo de nuevas drogas para la industria farmacéutica. Este plan propone estudiar modificaciones químicas de triterpenos pentacíclicos, tipo lupano, empleando estrategias clásicas en síntesis orgánica, en algunos casos comparadas con metodologías que utilizan catalizadores heterogéneos. A partir de este estudio se pretende seleccionar la metodología óptima para la obtención de moléculas reactivas que permitirán el diseño de nuevos análogos bioactivos.

Considerando que se cuenta con una fuente natural de la cual obtener lupeol (**1**) y calenduladiol (**2**) en cantidades adecuadas, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Modificar el C-30 de la cadena lateral de lupeol (**1**) y de calenduladiol (**2**) a través de la oxidación alílica, por un lado con SeO₂ (metodología clásica) y por el otro, empleando catalizadores de Pd o de Fe soportados (estrategia basada en catálisis heterogénea).

- Modificar el grupo isopropenilo de lupeol (**1**) y de calenduladiol (**2**) mediante el clivaje oxidativo del doble enlace C-C, a través de la ozonólisis del C-20 (metodología clásica) y también, haciendo uso de catalizadores de Ir soportados (estrategia basada en catálisis heterogénea).

- Emplear las estructuras **3–6** (ver esquema en la Fig. 1), de gran reactividad, como bloques de construcción para la obtención de nuevos análogos triterpénicos.

- Caracterizar las nuevas entidades moleculares en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural.

Antecedentes

Los productos naturales son apropiados para su posterior modificación durante el diseño de nuevos fármacos. La semisíntesis a partir de estas estructuras privilegiadas tiene como objetivo generar compuestos con mejor actividad biológica y propiedades farmacéuticas, y proporcionar una herramienta útil para realizar estudios de relación estructura-actividad (SAR). Estos productos ya han sido seleccionados evolutivamente para la unión a dominios de proteínas específicas [1]. Por lo tanto, ya están biológicamente validados, y las estructuras de estos productos naturales pueden proporcionar potentes puntos de partida para la obtención de quimiotecas activas.

Los triterpenos representan un grupo de metabolitos secundarios, abundantes en el reino vegetal. Existen más de 5000 triterpenoides descritos, con más de 100 esqueletos de carbono diferentes y estructuras cíclicas relativamente complejas [2]. Presentan un amplio espectro de actividades biológicas, entre las que se destacan antiinflamatoria [3,4], antiviral [5-7], citotóxica [8-10], antibacteriana [11] e inhibidora de enzimas implicadas en procesos neurodegenerativos [12,13].

El potencial terapéutico de los triterpenoides con esqueleto lupano ha sido estudiado por varios grupos de investigación. Los principales reportes pertenecen a lupeol (**1**, en la Fig. 1), betulina y ácido betulínico.

El lupeol, 3 β -lup-20(29)-en-3-ol, se encuentra en un gran cantidad de plantas, y junto a sus ésteres ha sido objeto de numerosos ensayos biológicos, principalmente en lo que respecta a sus propiedades antiinflamatorias [14]. Recientemente se ha reportado la síntesis de una serie de derivados heterocíclicos de lupeol inhibidores de óxido nítrico y de otras citoquinas proinflamatorias [15]. Las transformaciones sobre el anillo A, en algunos casos aumentaron la actividad antiinflamatoria. Teniendo en cuenta estas observaciones, resulta interesante la obtención de nuevos derivados de lupeol modificados en el anillo E como potenciales agentes antiinflamatorios.

Por otro lado, en estudios previos se logró la obtención de calenduladiol (**2**, en la Fig. 1) [16], una estructura novedosa para ser modificada sintéticamente dado que no se ha encontrado en la literatura antecedentes de análogos de este triterpeno tipo lupano. Se considera prometedora la síntesis de nuevos derivados de calenduladiol modificados en el anillo *E* como agentes antiinflamatorios.

En una primera etapa, se llevará a cabo la oxidación del grupo isopropenilo, unido al anillo *E* de ambos triterpenos, más específicamente sobre el C-20 y C-30.

La oxidación alílica con SeO_2 es una de las técnicas más tradicionales en síntesis orgánica para la llevar a cabo la oxidación del C-30, debido a su rendimiento y quimioselectividad [15,17-19]. Por otro lado, se encontró que el clivaje oxidativo (oxidación de C-20) puede llevarse a cabo con O_3 o $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$. Se observó que la reacción empleando O_3 da bajos rendimientos debido a la formación de productos secundarios [20], y que el sistema $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ si bien es quimioselectivo, lleva a una reacción muy lenta [21].

A partir de estas observaciones, y dado que se cuenta con experiencia directa en la preparación de catalizadores metálicos soportados para diferentes reacciones [22-25], resulta interesante llevar a cabo las transformaciones mencionadas anteriormente empleando metodologías de la catálisis heterogénea. Los catalizadores heterogéneos constituyen una alternativa atractiva a las metodologías clásicas de la Química Orgánica, basadas tradicionalmente en reactivos estequiométricos o catalizadores homogéneos. Los catalizadores heterogéneos son de fácil recuperación y pueden reusarse. No debe olvidarse la necesidad actual de contar con procesos sustentables y aceptables desde el punto de vista del medio ambiente, enmarcados en los principios de la Química Verde [26].

Para el caso de las oxidaciones de interés en este plan, los estudios previos empleando catalizadores heterogéneos no son numerosos. El clivaje oxidativo de olefinas ha sido llevado a cabo empleando partículas de Os o Ir soportados [27,28]. En cuanto a la oxidación alílica, el empleo de catalizadores heterogéneos es un área pobremente desarrollada [26, p. 519]. Se han realizado estudios empleando catalizadores basados en Pd [29]. Recientemente Skobelev y col [30,31], empleando catalizadores sólidos basados en Fe y Cr implementaron oxidaciones alílicas de alquenos, incluyendo monoterpenos.

Por todo lo expuesto sería deseable estudiar catalizadores heterogéneos que puedan reemplazar a los empleados en síntesis tradicionales en las reacciones de oxidación alílica y clivaje oxidativo propuestas.

En una segunda etapa, las estructuras obtenidas (**3-6**) a partir de estas oxidaciones, serán utilizadas como bloques de construcción para la síntesis de nuevos análogos triterpénicos (ver esquema Fig. 1), que probablemente posean actividad antiinflamatoria.

Actividades y Metodología

Se utilizará como fuente natural la especie *Chuquiraga erinacea* (Asteraceae), una especie endémica ampliamente distribuida en el sur de la provincia de Buenos Aires. A partir del material, siguiendo un procedimiento ya optimizado [16], se aislará el triterpeno **1** y **2**.

Los catalizadores a emplear no serán comerciales, sino que se sintetizarán para cada reacción estudiada.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los análogos que se sinteticen será llevada a cabo por la Dra. Fernanda Gumilar, investigadora del Dpto de Farmacia y Bioquímica de UNS, quién realizará los ensayos en animales de laboratorio en el marco de su propio plan de investigación.

a) Síntesis Orgánica

A continuación se describen las reacciones que se realizarán sobre los compuestos naturales **1** y **2**, y una vez seleccionada la mejor metodología para cada una de las modificaciones propuestas, se sintetizarán los análogos correspondientes (inciso d)).

La oxidación alílica de **1** y **2** para obtener **3** y **4** respectivamente, se realizará utilizando un exceso de SeO_2 y calentando a reflujo [17]. Por otro lado la ozonólisis sobre el doble enlace de

la cadena lateral de **1** y **2** conducirá a los correspondientes derivados **5** y **6** con un carbonilo en la posición 20, tal como ha sido reportado para el ácido betulínico [32]. En nuestro caso, los compuestos **5** y **6** serán obtenidos por burbujeo de ozono, haciendo uso de un ozonizador. Previo a la ozonólisis, se evaluará la conveniencia de proteger el grupo hidroxilo del C-3 (lupeol) y C-16 (calenduladiol) que no deben reaccionar.

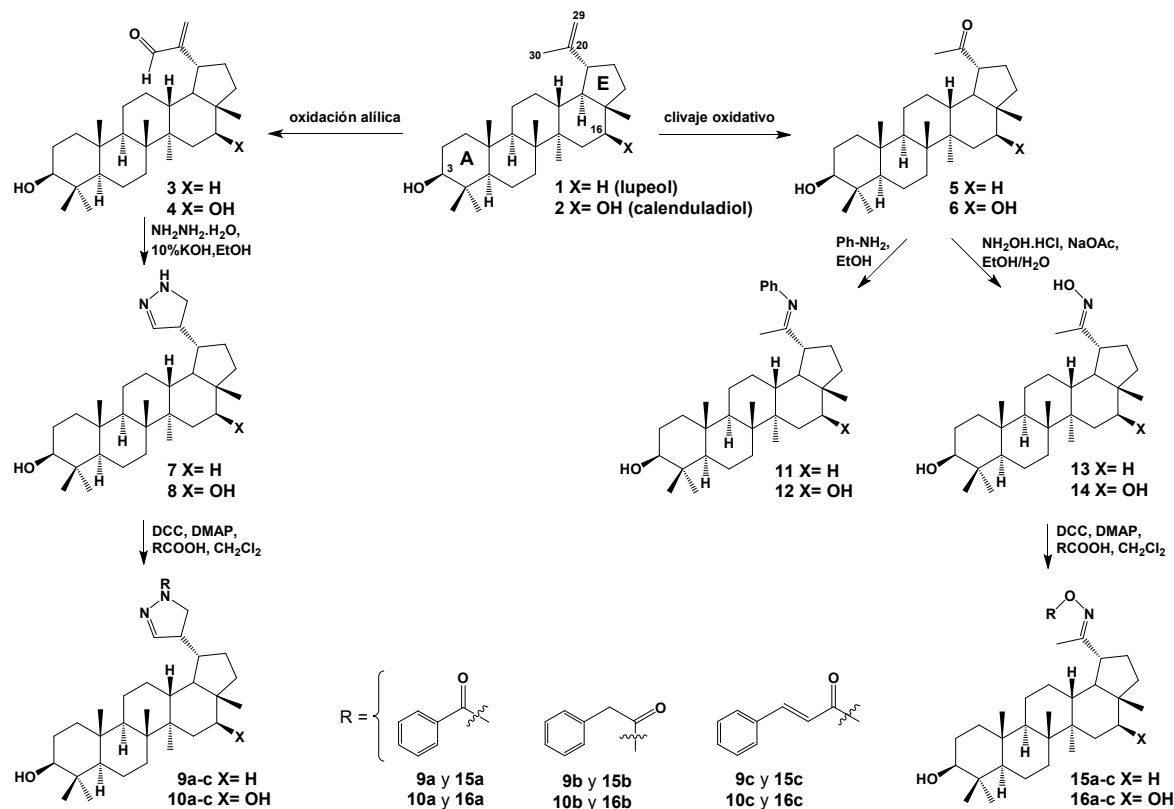


Figura 1. Síntesis de análogos de lupeol y calenduladiol

b) Catálisis heterogénea

b.1. Preparación y caracterización de catalizadores. Se prepararán dos familias de catalizadores: basados en Ir para realizar el clivaje oxidativo (síntesis de **5** y **6**) y basados en Pd o Fe para la oxidación alílica (obtención de **3** y **4**). Todos estarán constituidos por partículas de los respectivos metales soportados en MCM-41, Pd/MCM-41, Fe/MCM-41 e Ir/MCM-41. Se seguirán métodos de preparación para los cuales se cuenta con experiencia previa directa, como la impregnación húmeda a partir de acetil acetato del respectivo metal [33-34]. La caracterización pretende evidenciar el tamaño de las partículas de los distintos metales (mediante TEM), las propiedades redox (mediante TPR), las características morfológicas (sortimetría N₂), las especies químicas presentes (XPS). Las propiedades fisicoquímicas de los catalizadores se vincularán luego con las propiedades catalíticas de las muestras.

b.2. Reacciones catalíticas. Las reacciones se realizarán en fase líquida, en modo batch, empleando un solvente orgánico, una temperatura y un oxidante, seleccionados para cada reacción. Las experiencias se llevarán a cabo en un reactor Parr de pequeño volumen. Se utilizarán concentraciones diluidas de lupeol o calenduladiol (0.5-0.1 M) y cantidades de catalizador menores a 500 mg. De acuerdo a estimaciones ya realizadas, con esta relación sustrato /catalizador se estaría libre de barreras difusionales durante la reacción, por lo tanto podría realizarse un estudio cinético. Dicho estudio, complementado por la caracterización de los catalizadores, permitirá concluir en cuanto a la performance de cada catalizador, su selectividad, posible desactivación, actividad específica. Se pondrá énfasis en evaluar la posibilidad de reuso de los catalizadores. Se llevará a cabo el test de Sheldon para descartar el

leaching de los metales en el medio de reacción. Los reactivos y productos se analizarán mediante cromatografía gaseosa acoplada con detector por espectroscopía de masas.

c) Comparación de los resultados obtenidos a partir del desarrollo de las dos metodologías

La misma se realizará marcando las desventajas y ventajas en cada caso. Desde un punto de vista práctico esto permitirá seleccionar la mejor metodología para cada una de las modificaciones propuestas.

d) Síntesis de análogos de lupeol y calenduladiol

Cabe aclarar que las transformaciones que se describirán a continuación no serán implementadas con la metodología de la catálisis heterogénea.

A partir de las estructuras reactivas **3-6**, se llevará a cabo la síntesis de los análogos **7-16**. En primer lugar se obtendrán los derivados pirazolínicos de lupeol y calenduladiol por reacción de **3** y **4** con hidrato de hidrazina e KOH (compuestos **7** y **8**, respectivamente) [35]. La reacción de estos compuestos con diferentes ácidos carboxílicos, en presencia de DCC y DMAP, dará lugar a los correspondientes derivados **9a-c** y **10a-c** (ver esquema Fig. 1). En este caso se evaluará, previamente, la conveniencia de proteger el grupo hidroxilo del C-3 (lupeol) y C-16 (calenduladiol).

Sobre las estructuras **5** y **6** se llevarán a cabo dos transformaciones. Se obtendrán las iminas **11** y **12**, respectivamente, por condensación con anilina. Una vez optimizadas las condiciones de reacción, se sintetizará una serie de iminas por reacción con anilinas sustituidas. La reacción con clorhidrato de hidroxilamina dará lugar a las respectivas oximas **13** y **14**, las cuales serán modificadas con diferentes ácidos (benzoico, fenilacético y cinámico) a las correspondientes oximas aciladas **15a-c** y **16a-c** (ver esquema Fig. 1) [18]. En este caso también se evaluará previamente la conveniencia de proteger el grupo hidroxilo del C-3 (lupeol) y C-16 (calenduladiol).

Una vez optimizadas las condiciones de reacción a partir de los derivados **7** y **8**, y de las oximas **13** y **14**, se sintetizarán diversos análogos por reacción con los correspondientes ácidos, sustituidos en el anillo aromático.

A partir de las reacciones arriba descritas se obtendrán nuevas entidades moleculares que no registran antecedentes en la literatura. En cada caso se procederá a la purificación a partir de los brutos de reacción por métodos apropiados según el tipo de derivados. Se aplicará cromatografía en columna, en capa fina y/o HPLC preparativa sobre diversas fases estacionarias como silicagel de fase normal, reversa, LH-20, alúmina, etc.

Las nuevas moléculas serán caracterizadas en forma completa utilizando RMN de ^1H y ^{13}C (1D y 2D), EM, IR, y análisis elemental.

Este plan de trabajo corresponde al plan de investigación que está llevando a cabo a partir de abril de este año, bajo mi dirección, la tesista Farm. Florencia Musso (becaria de CONICET). Este trabajo se completará en los laboratorios de Catálisis de Plapiqui (CONICET-UNS), bajo la co-dirección de la Dra. M. Alicia Volpe.

Se prevé, para este período (2016-2017) la realización de la primera etapa de este plan.

Se cuenta con recursos financieros provenientes de subsidios vigentes otorgados por SGCyT-UNS, CIC y CONICET.

Bibliografía

- [1] Reymond JL, Van Deursen R, Blum LC, Ruddigkeit L. *Med Chem Commun*, **2010**; 1: 30-38.
- [2] Xu R, Facio GC, Matsuda SP. *Phytochem*, **2004**; 65: 261-291.
- [3] Sporn MB, Liby KT, Yore MM, Fu L, Lopchuk JM, Gribble GW. *J Nat Prod*, **2011**; 74: 537-545.
- [4] Braca A, Dal PF, Marzocco S, Autore G, Vassallo A, De TN. *Curr Drug Targets*, **2011**; 12: 302-321.
- [5] Barroso-González J, El Jaber-Vazdekis N, García-Expósito L, Machado JD, Zárate R, Ravelo AG, Estévez-Braun A, Valenzuela-Fernández A. *J Biol Chem*, **2009**; 284 (24): 16609-16620.
- [6] Meng Z, Li N, Zhang L, Ding A. *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan*, **2011**; 29: 1152-1154.
- [7] Cassels BK, Asencio M. *Phytochem Rev*, **2011**; 10: 545-564.
- [8] Csuk R, Sczepek R, Siewert B, Nitsche C. *Bioorg Med Chem*, **2013**; 2: 425-435.
- [9] Ding W, Sun M, Luo S, Xu T, Cao Y, Yan X, Wang Y. *Molecules*, **2013**; 18: 10228-10241.

- [10] Majeed R, Sangwan PL, Chinthakindi PK, Khan I, Dangroo NA, Thota N, Hamid A, Sharma PR, Saxena AK, Koul S. *Eur J Med Chem*, **2013**; 63: 782-792.
- [11] Rodrigues VG, Duarte LP, Silva GDF, Silva FC, Góes JV, Takahashi JA, Pimenta LPS. *Quim Nova*, **2012**; 35 (7): 1375-1380.
- [12] Vela Gurovic MS, Castro MJ, Richmond V, Faraoni MB, Maier MS, Murray A P. *Planta Med*, **2010**; 76 (6), 607-610.
- [13] Schwarz S, Dias Lucas S, Sommerwerk S, Csuk R. *Bioorg Med Chem*, **2014**; 22 (13): 3370-3378.
- [14] Nikiema J, Vanhaelen-Fastré R, Vanhaelen M, Fontaine J, De Graef C, Heenen M. *Phytother Res* **2001**; 15: 131-134.
- [15] Bhandari P, Patel NK, Bhutani KK. *Bioorg Med Chem L*, **2014**; 24: 3596-3599.
- [16] Castro MJ, Tesis doctoral **2015**, UNS.
- [17] Castro MJ, Richmond V, Romero C, Maier MS, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Faraoni MB, Murray AP *Bioorg Med Chem*, **2014**; 22: 3341-3350.
- [18] Khan MF, Mishra DP, Ramakrishna E, Rawat AK, Mishra A, Srivastava AK, Maurya R. *Med Chem Res*, **2014**; 23: 4156-4166.
- [19] Callies O, Bedoya LM, Beltrán M, Muñoz A, Calderón PO, Osorio AA, Jiménez IA, Alcamí J, Bazzocchi IL *J. Nat. Prod.* **2015**; 78(5): 1045-55.
- [20] Mikhallova LR, Khudobko MV, Baltina LA, Kukovinets OS, Mavrodlev VK, Gallin FZ. *Chem. Nat. Compd*, **2007**; 43 (5): 571-574.
- [21] Kim JY, Koo H-M, Kim DSHL. *Bioorg Med Chem Lett*, **2001**; 2405-2408.
- [22] Gutiérrez V, Diez A, Dennehy M, Volpe, M. *Microporous and Mesoporous Materials*, **2011**; 141: 201-213.
- [23] Gutiérrez V, Nador F, Radivoy G, Volpe MA, *Applied Catalysis A Gen*, **2013**, 464– 465, 109– 115.
- [24] Piqueras CM, Gutierrez V, Vega DA, Volpe MA. *Appl. Catal. A Gen*, **2013**; 467, 253– 260.
- [25] Diez A, Graziano-Mayer M, Radivoy G, Volpe M. *Appl. Catal. A Gen*, **2014**; 482: 24–30.
- [26] *Fine Chemicals Through Heterogeneous Catalysts*, Ed: R. Sheldon, H. van Bekkum, Wiley VHC, **2000**.
- [27] [Kobayashi S](#), [Endo M](#), [Nagayama S](#), *J Am Chem Soc*, **1999**; 121 (48), 11229–11230.
- [28] Cant N, Hall W, *J Catal*, **1972**; 27: 70-78.
- [29] Lyons, J, *J. Catal.* **1977**, 3, 245.
- [30] Skobelev IY, Sorokin AB, Kovalenko KA, Fedin VP, Kholdeeva OA, *J. Catal*, **2013**, 298: 61-69.
- [31] Kholdeeva OA, Skobelev IY, Ivanchikova ID, Kovalenko KA, Fedin VP, Sorokin AV, *Catal. Today*, **2014**, 238: 54–61.
- [32] Biedermann D, Eignerova B, Hajduch M, Sarek J, *Synthesis*, **2010**; 22: 3839-3848.
- [33] Lenz J, Campo B, Alvarez M, Volpe M. *J. Catal.* , **2009**, 267, 50-56.
- [34] Goetz J, Volpe M, Gigola C, Touroude R, *J. Catal.*, **1995**, 153, 86-83.
- [35] Khan MF, Maurya ChK, Dev K, Ahra D, Rai AK, Tamrakar AK, Maurya R, *Bioorg Med Chem Lett*, **2014**; 24: 2674-2679.