

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

En las últimas décadas, la detección de compuestos de origen natural inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (ACE) ha despertado interés ya que podría llevar al descubrimiento de compuestos líderes para el desarrollo de nuevas drogas, no sólo de aplicación potencial en Enfermedad de Alzheimer (EA) sino también en otras patologías relacionadas con desórdenes neuromusculares.

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. En trabajos realizados por el grupo en los últimos años se ha optimizado la extracción de triterpenos a partir de una planta endémica, *Chuquiraga erinacea* (Asteraceae) que se encuentra en la región y que ha mostrado capacidad de inhibir la enzima ACE.¹ Estos triterpenos se caracterizan por presentar esqueletos con grupos funcionales en posiciones poco comunes, estructuras que no pueden conseguirse comercialmente. En trabajos recientes se ha observado que la sulfatación realizada sobre uno de estos triterpenos naturales, el calenduladiol (**1**), condujo a un análogo (**2**) que era tres veces más activo que el calenduladiol, con un valor de IC₅₀ de 190 μ M.²

A partir de estos resultados, se propuso llevar a cabo modificaciones a esta estructura mediante reacciones químicas sobre los anillos A y D, así como sobre el grupo isopropenilo unido al anillo E, las cuales conducirían a la obtención de nuevos derivados, los cuales serían evaluados en su actividad inhibitoria de ACE.

Asimismo surgió el interés en profundizar el estudio de la inhibición de colinesterasa por parte de este tipo de compuestos incorporando la detección de la actividad inhibitoria de Butirilcolinesterasa (BuCE), otro tipo de colinesterasa cuyo sitio activo acepta sustratos más voluminosos. Los estudios realizados durante los últimos años, indican que BuCE tiene una mayor participación en la transmisión colinérgica de lo que se creía anteriormente y que su importancia aumenta a medida que la enfermedad progresa.³ Los estudios sugieren que la inhibición de ambas enzimas es una propiedad altamente deseada en la terapia de EA.

En primer lugar, se llevó a cabo la hidrogenación del doble enlace de la cadena lateral de **1**, permitiendo obtener el análogo **3**, mientras que la reacción de epoxidación de ese doble enlace condujo al epóxido **4**.⁴ El derivado sulfatado **5** se obtuvo a partir del correspondiente precursor hidroxilado en C-3 y C-16 (**3**) con excelente rendimiento, mediante la optimización de la reacción de sulfatación ya utilizada para la síntesis del disulfatado **2** (7 min, microondas vs. 18h a 90 °C),⁵ mientras que el derivado disulfatado **6**, fue obtenido por epoxidación de **2**, con buenos rendimientos (Fig. 1).

Por otra parte se decidió abordar nuevas modificaciones químicas sobre el triterpeno natural **1** y sobre la estructura molecular **7** ya reportada.⁶ La oxidación con el reactivo de Jones nos proporcionó dos nuevos compuestos: la dicetona **8**, y la dicetona **9** con un aldehído α, β insaturado en el C-30, respectivamente. Ambos derivados fueron tratados posteriormente con clorhidrato de hidroxilamina⁷, aislándose con muy buenos rendimientos las oximas con configuración *E* (compuestos **10** y **11**, respectivamente) (Fig.2).

Paralelamente, se obtuvieron también los ésteres **12-15** por esterificación con diferentes cloruros de ácidos (Fig.2).

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

Se determinó la actividad inhibitoria enzimática frente a la ACE y BuCE de todos los compuestos obtenidos cuantificando dicha actividad calculando su IC₅₀ (concentración inhibitoria al 50% de la respuesta enzimática), o bien el porcentaje de inhibición a una determinada concentración.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que la actividad inhibitoria de colinesterasa para este tipo de compuestos es incrementada en mayor medida por la introducción de grupos sulfatos en las posiciones 3 y 16 tanto sobre el triterpeno de

partida con una selectividad hacia BuCE (compuesto **2**), como del derivado de cadena lateral hidrogenada (compuesto **5**) el cual resultó ser el análogo más activo frente a las dos enzimas y selectivo hacia ACE.^{8,9}

También se pudo observar que la oxidación de la cadena lateral (compuestos **7** y **9**) aumenta la inhibición por parte de los derivados sin sulfatar.^{10,11}

Estos resultados, junto a otros obtenidos previamente, se encuentran actualmente en prensa en la revista Bioorganic Medicinal Chemistry.¹²

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

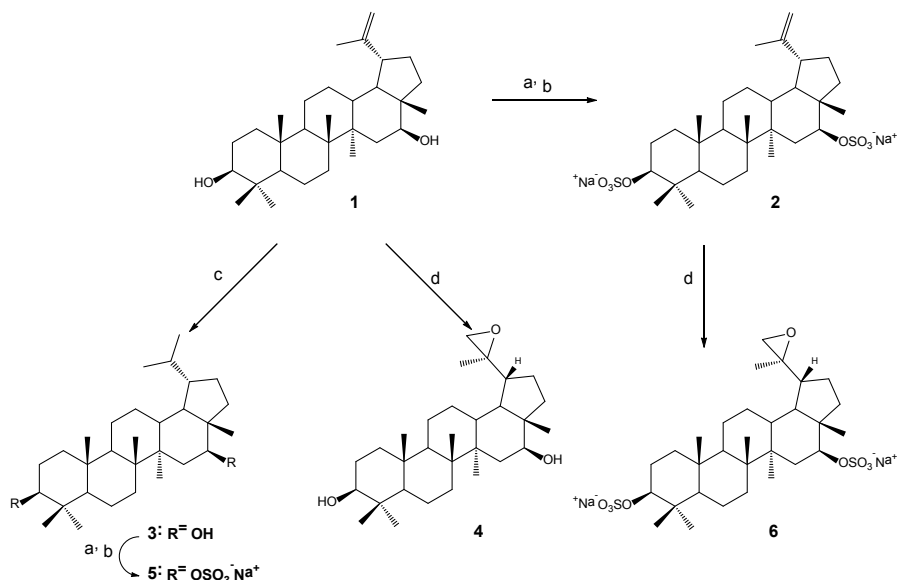


Figura 1: Reactivos y condiciones: (a) 8 equiv. Me₃N⁺SO₃⁻, DMF, MW, 7 min, 150 °C; (b) Amberlite CG-120 (MeOH); (c) H₂, Pd/C, EtOAc; (d) MCPBA, NaHCO₃, DCM.

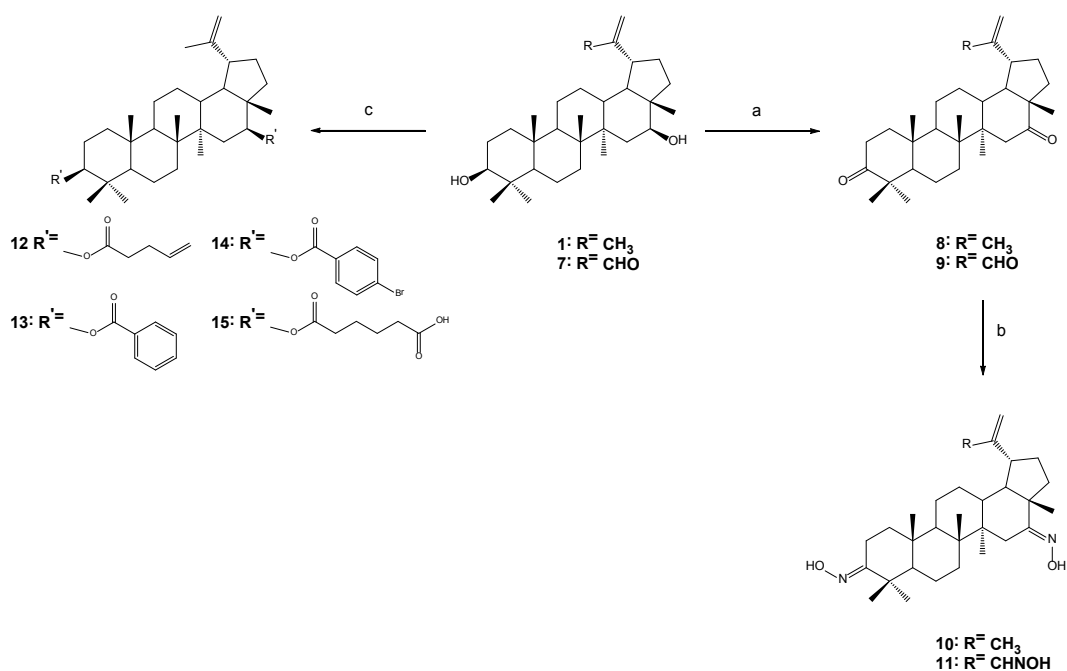


Figura 2: Reactivos y condiciones: (a) reactivo de Jones; (b) NH₂OH·HCl, NaOAc, EtOH/H₂O; (c) RCOCl or ArCOCl, Py, DMAP, DCM.

Como mencioné en el plan de trabajo correspondiente al período 2012-21013, realicé también investigaciones relacionadas con la Síntesis de Catalizadores Bimetálicos a partir de Compuestos Organometálicos a fin de concluir mis estudios referidos a este tema de investigación.

Estas investigaciones se basan en la síntesis de catalizadores bimetálicos quirales conteniendo metales de transición como Ni, Rh y Pt y derivados con ligandos orgánicos ópticamente activos de Ge y Sn, para llevar a cabo hidrogenaciones enantioselectivas de compuestos de interés industrial. El estudio de la actividad catalítica a partir de compuestos organometálicos con ligandos quirales tiene como requisito la pureza óptica de estos sustratos. Teniendo en cuenta la metodología desarrollada por nosotros, que nos permitió unir ligandos (-)-mentilo con retención de configuración a sistemas que tenían unido al átomo de estaño ligandos más voluminosos que los grupos metilo,¹³ se sintetizaron (-)-mentiltributilestaño y hexa(-)-mentildiestannano ópticamente puros, los cuales fueron utilizados para la preparación de catalizadores quirales a base de Pt soportados. Se llevó a cabo el estudio de la hidrogenación enantioselectiva en fase líquida de 3,4-hexanodiona empleando estos sistemas catalíticos organobimetálicos. Se observó que los mismos resultaron ser activos y enantioselectivos, obteniéndose un exceso enantiomérico del 25% para 4-hidroxi-3-hexanona, sin embargo los mismos mostraron una escasa capacidad enantiodiferenciadora a los correspondientes dioles (Fig. 3).¹⁴

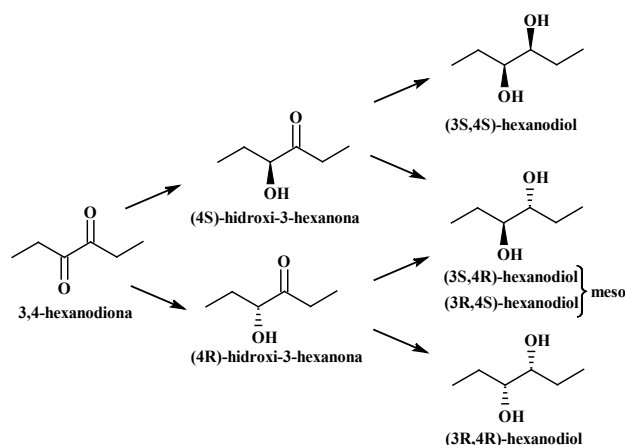


Figura 3. Hidrogenación de 3,4-hexanodiona

Estos sistemas fueron probados también en la hidrogenación de piruvato de etilo y acetofenona. En la hidrogenación de piruvato de etilo, se observó la formación preferencial del S-lactato de etilo, sin embargo los excesos enantioméricos obtenidos fueron bajos. En relación a la hidrogenación de acetofenona, estos sistemas resultaron ser activos, presentando una alta selectividad al feniletanol y enantioselectivos, obteniéndose excesos enantioméricos entre 17-24% para el (S)-feniletanol.¹⁵

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la hidrogenación en fase líquida de 3,4-hexanodiona empleando catalizadores quirales PtSn, se propuso la síntesis de compuestos organogermánicos para ser utilizados como modificadores quirales. Estos compuestos presentan grandes ventajas respecto a los de estaño principalmente debido a su mayor estabilidad y su no toxicidad. Un paso clave para la preparación de los catalizadores quirales es la síntesis de los compuestos organogermánicos ópticamente puros. Se propuso la síntesis de los derivados de tri(-)

-mentilgermanio por reacción directa entre el cloruro de (-)-mentilgermanio y GeCl_4 . A partir del cloruro de tri-(-)-mentilgermanio obtenido, el cual se logró obtener con retención de la configuración del grupo inductor de la quiralidad, se sintetizó el metiltri-(-)-mentilgermanio y el hidruro de tri-(-)-mentilgermanio. A partir de estos organogermánicos, se prepararon los sistemas $\text{Pt-Me}_3\text{GeMe}$ y $\text{Pt-Me}_3\text{GeH}$ los cuales, resultaron ser activos y enantioselectivos alcanzándose un exceso enantiomérico para 4-hidroxi-3-hexanona de 20 y 25%, respectivamente. El exceso enantiomérico para 3,4-hexanodiol fue del 10% para ambos sistemas, siendo este valor el doble del obtenido para sistemas organoestánicos similares.^{16,17}

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

Bibliografía

- 1- a) Vela Gurovic MS, *Tesis Doctoral*, UNS, 2009. b) Soto J, *Tesina de Licenciatura en Química*, UNS, 2012.
- 2- Vela, M.S.; Castro, M.J.; Richmond, V.; Faraoni, M.B.; Maier, M.S.; Murray, A.P. *Planta Med.*, 76, 607-61, 2010.
- 3- Grossberg, G.T. *Curr. Therap. Res.*, 64, 216, 2003.
- 4- Gutiérrez-Nicolás, F., Gordillo-Román, B., Oberti, J.C., Estévez-Braun A., Ravelo A.G., Joseph-Nathan, P., *J. Nat. Prod.*, 75, 669-676, 2012.
- 5- Richmond, V., Garrido, G.; Murray, A.P.; Maier, M.S. *Steroids*, 76, 1160-1165, 2011.
- 6 - 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.* 284, 24, 16609-16620, 2009.
- 7- Sun IC, Wang HK, Kashiwada Y, Shen J.K., Cosentino M, Chen CH, Yang LM, Lee KH, *J. Med. Chem.*, 41, 4648-4657, 1998.
- 8- M. Julia Castro, Ana Estévez Braun, Ángel G. Ravelo, A. Paula Murray, M. Belén Faraoni, III Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, *Revista de Fitoterapia 2012* (España), 12, (S1), página 115 (PO 57), Foz de Iguazú, Brasil, 2012.
- 9- M. Julia Castro, M. Belén Faraoni, A. Paula Murray. *Actas del XIX Simposio Nacional de Química Orgánica*, página 193 (PN-15), Mar del Plata, Buenos Aires, 2013.
- 10- M. Julia Castro, Ana Estévez Braun, Ángel G. Ravelo, A. Paula Murray, M. Belén Faraoni, III Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, *Revista de Fitoterapia 2012* (España), 12, (S1), página 55 (CO 13), Foz de Iguazú, Brasil, 2012.
- 11- M. Julia Castro, Ana Estévez Braun, Ángel G. Ravelo, A. Paula Murray, M. Belén Faraoni, *In Proceedings of the 17th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem.*, Sciforum Electronic Conference Series, Vol. 17, 2013, b009, 2013.
- 12- 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.*, 2014, en prensa.
- 13- Faraoni M.B., *Tesis Doctoral*, UNS, 2001.
- 14- Virginia Vetere, María B. Faraoni, Julio C. Podestá, Mónica L. Casella, *Applied Catalysis A: General*, 445– 446, 209– 214, 2012.
- 15- Virginia Vetere, María B. Faraoni, Julio C. Podestá, Mónica L. Casella, *15th International Congress on Catalysis*, Munich, Alemania, 2012.
- 16- Virginia Vetere, María B. Faraoni, Julio C. Podestá, Mónica L. Casella, *Actas del 17º Congreso Brasileño de Catálisis y VII Congreso de Catálisis del Mercosur*, Gramado, Brasil, 2013.
- 17- Virginia Vetere, María Belén Faraoni, Julio César Podestá, Mónica Laura Casella; "PtGe chiral catalysts to be used in enantioselective hydrogenation of 3,4-hexanedione", trabajo en revisión para ser enviado a publicar.

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

“Triterpenos de Origen Natural y Derivados Sintéticos Biológicamente Activos”

En la actualidad existen cinco drogas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de la EA, de las cuales se utilizan cuatro, en forma regular. Tres de ellas son inhibidores de ACE. Su utilización se basa en la evidencia de que los pacientes que poseen la EA padecen de un déficit colinérgico, lo que condujo a intentar aumentar la función colinérgica a fin de modular los síntomas de la enfermedad y de allí, la utilidad de los inhibidores de la enzima encargada de regular los niveles de acetilcolina en el cerebro.

Existen numerosos antecedentes de terpenoides naturales como inhibidores de colinesterasas. Entre ellos, los triterpenos pentacíclicos ácido ursólico, taraxerol, lupeol, esclavinas A y B, ácido sumarrésinólico entre otros.¹⁸⁻²² 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.²³ 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.^{24,25} Otro ejemplo es el caso de los triterpenos pentacíclicos del tipo oleanano y ursano para los cuales se sintetizaron 15 derivados diferentes a partir de una mezcla de α y β -amirina que mediante esterificación del hidroxilo en C-3 y oxidaciones en otras posiciones lograron incrementar la actividad antinociceptiva de esta mezcla.²⁶ A pesar del desarrollo que se ha observado en los últimos años en la síntesis de derivados de triterpenos, lo que ha aportado nuevos avances en el estudio farmacológico de estos compuestos, no se encuentran aún en la literatura estudios de estructura-actividad para triterpenos inhibidores de colinesterasa.

Tomando en cuenta la relevancia de los productos naturales como cabeza de serie para generar nuevas moléculas bioactivas, el objetivo de este plan continúa siendo la búsqueda de nuevos inhibidores de la enzimas Acetilcolinesterasa (ACE) y Butirilcolinesterasa (BuCE) que puedan ser utilizados como líderes para el desarrollo de terapias contra la Enfermedad de Alzheimer (EA).¹

A partir de la experiencia previa con *Chuquiraga erinacea* y el calenduladiol (**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, surge el interés en profundizar el estudio de la inhibición de colinesterasa por parte de este tipo de compuestos. Considerando que se cuenta con una fuente natural de la cual obtener el alcohol triterpénico **1** puro en cantidades adecuadas y que este compuesto no está comercialmente disponible, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtener nuevos derivados, ya sea con otros sustituyentes en las posiciones 3 y/o 16, así como con otros grupos funcionales en la cadena lateral, de manera de completar el estudio ya iniciado.
- Determinar sobre el triterpeno natural la posición (C-3 ó C-16) y la orientación (α ó β) más relevante del grupo hidroxilo en relación a la inhibición enzimática. Dichas modificaciones se llevarán a cabo utilizando reacciones

¹De acuerdo a los lineamientos del **PNCTI 2012-2015**, este proyecto de investigación se enmarca en el NSPE II.3.3.6. Salud, 9. Enfermedades crónicas, complejas con componentes multigénicos y asociadas a adultos: "Este núcleo está dedicado a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, y otras. Como resultado del aumento de la expectativa de vida y otros factores se cree que la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas se duplicará para el año 2025."

químicas anteriormente desarrolladas sobre esta estructura, y otras reportadas en la bibliografía para triterpenos con estructuras similares.

- Caracterizar las nuevas entidades moleculares en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural, evaluar su actividad inhibitoria *in vitro* frente a ACE y BuCE, y estudiar la cinética enzimática del inhibidor más potente al cual posteriormente se le realizará el *docking* molecular.
- Estudiar la correlación entre los cambios estructurales realizados sobre el triterpeno natural de partida y el aumento o disminución de la inhibición enzimática. Los resultados obtenidos a partir del estudio de estructura-actividad con todos los derivados semi-sintéticos permitirán el diseño racional de nuevos inhibidores.

Los estudios realizados hasta el momento permitieron establecer que la actividad inhibitoria de colinesterasa para este tipo de triterpenos es incrementada por la introducción de grupos sulfatos en las posiciones 3 y 16 tanto sobre el triterpeno de partida como del derivado de cadena lateral hidrogenada. Con el objeto de determinar qué posición (derivado sulfatado en C-3 ó en C-16) favorece más la interacción con la enzima, se propone el siguiente esquema de síntesis (Fig. 4). Para llegar a la obtención de 3-sulfatocalenduladiol (**20**) y 16-sulfatocalenduladiol (**21**) se obtendrán en principio los derivados monoacetilados **16** y **17**. En una experiencia previa, durante la síntesis del derivado diacetilado de calenduladiol, se observó la formación de los correspondientes derivados monoacetilados.²⁷ Estos compuestos que presentaban diferentes R_f en TLC, fueron separados por cromatografía en columna de silicagel y caracterizados por RMN. Se propone entonces, optimizar las condiciones de reacción de manera de obtener mayoritariamente los compuestos **16** y **17**, en cantidades suficientes para las siguientes etapas de síntesis y por separado. La sulfatación a partir de **16**, permitirá obtener el derivado **18**. La hidrólisis suave de **18** conducirá al análogo 3-sulfatocalenduladiol (compuesto **20**), utilizando condiciones ya reportadas para otros derivados.²⁸ La misma secuencia de síntesis pero sobre el derivado monoacetilado **17**, permitirá obtener el intermediario **19**, que por hidrólisis conducirá al análogo 16-sulfatocalenduladiol (compuesto **21**).

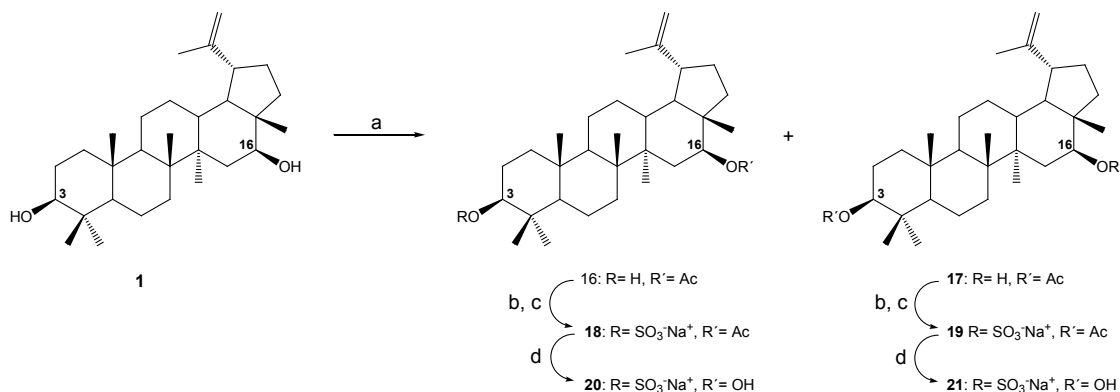


Figura 4. Reactivos y condiciones: (a) Ac₂O, Py, DMAP (b) 4 equiv. Me₃N.SO₃, DMF, MW, 7 min, 150 °C; (c) Amberlite CG-120 (MeOH); (d) BBTO, tolueno.

Se ha observado que la epimerización de los grupos hidroxilos en triterpenoides de la serie lupano puede resultar en una mejora de la actividad biológica de los mismos. Por ejemplo, Symon y col observaron un aumento de la actividad frente a melanoma para la serie 3β-hidroxi-, 3-ceto-, 3α-hidroxi derivados del ácido betulínico.²⁹ Otros autores informan también, que la estereoquímica del grupo hidroxilo en el C-3 puede modificar la actividad anti-inflamatoria de este tipo de triterpenos.³⁰ Considerando que la actividad inhibitoria de colinesterasa de calenduladiol (**1**) y de sus análogos podría ser modificada por la orientación de los sustituyentes en las posiciones 3 y 6, y que se dispone del compuesto **1** natural que tiene los hidroxilos en

las posiciones 3β y 16β , se propone dilucidar cuál es la orientación que más favorece la interacción de estos triterpenoides con la enzima.

Para llegar a la obtención de 3α -calenduladiol (**25**) y 16α -calenduladiol (**26**) se obtendrá en principio, a través de la oxidación con el reactivo de Jones, una mezcla de los derivados 3-oxocalenduladiol (**23**) y 16-oxocalenduladiol (**24**), los cuales serán separados por cromatografía. La reducción del grupo carbonilo de **23** y **24** se realizará en colaboración con la Dra. Virginia Vetere (CINDECA, UNLP), quien posee una amplia experiencia en hidrogenaciones quimio- y estereoselectivas de terpenos y terpenonas a través de catálisis heterogénea. En ambos casos se prevé obtener una mezcla en proporciones variables de *epicalenduladiol* (3 ó 16) y calenduladiol (**1**), los cuales serán separados por HPLC (Fig. 5). Esta secuencia de síntesis se realizará en primer término sobre el lupeol (**22**), extraído también de *Chuquiraga erinacea*, y una vez optimizadas las condiciones de reacción, se llevará a cabo sobre el calenduladiol (**1**).

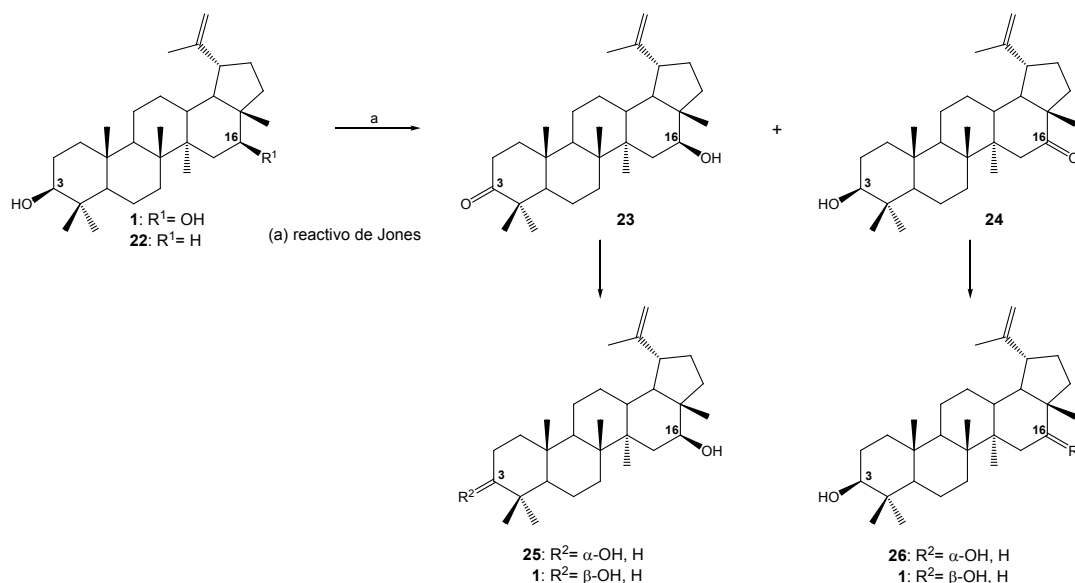


Figura 5

Las modificaciones químicas llevadas a cabo sobre el triterpeno natural **1** y sobre la estructura molecular **7**, nos permitieron obtener, a través de **8** y **9**, las correspondientes oximas (**10** y **11**) (ver informe). Teniendo en cuenta que éstas fueron obtenidas con muy buenos rendimientos y como un sólo isómero (*E*), se propone la reducción de las mismas con diferentes agentes reductores,^{7,31} a fin de evaluar el efecto de la incorporación de grupos amino en estas estructuras en la actividad inhibitoria de ACE y BuCE. La reducción se llevará a cabo en primer lugar sobre la oxima de lupeol (**27**), la cual será obtenida a partir de lupeol (**22**) por oxidación y posterior reacción con clorhidrato de hidroxilamina, y una vez optimizadas las condiciones de reacción para obtener **28**, se realizará sobre los derivados **10** y **11**, los cuales conducirán a las aminas **29** y **30**, respectivamente.

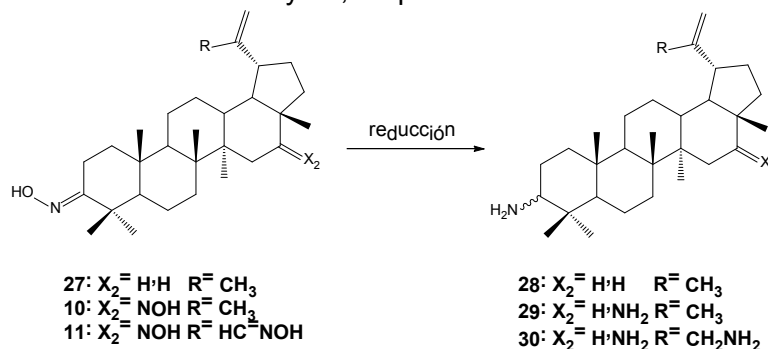


Figura 6

Las nuevas moléculas serán caracterizadas en forma completa utilizando principalmente RMN de ^1H y ^{13}C , EM, análisis elemental, etc.. Los análogos **16-30** serán evaluados como inhibidores de ACE y BuCE. La actividad inhibitoria de ACE (type IV-S de electric eel, E.C. 3.1.1.7) y BuCE (de suero equino, E.C. 3.1.1.8) se determinará por el método de Ellman.³²

Una vez determinado el tipo de inhibición de un inhibidor de interés, se procederá a estudiar su interacción con la enzima o con el complejo enzima-sustrato según el caso, utilizando la estructura de la enzima ACE del Protein Data Bank. Se buscará dilucidar si el inhibidor es capaz de entrar en la hendidura que contiene en su parte más profunda el sitio activo de la enzima o si es capaz de interaccionar con el PAS y, en cada caso qué tipo de interacciones son posibles. Con esta información se podrá analizar cuáles son las modificaciones que conviene realizar sobre la estructura del inhibidor de manera de potenciar su actividad.

Asimismo, todos los derivados obtenidos serán evaluados en su actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP). Esta parte del trabajo se desarrollará en colaboración con el grupo del Dr. Juan C. Calvo (IBYME, CONICET, UBA).

Parte del trabajo experimental será desarrollado por la alumna de Farmacia Natalia P. López, a quién se le otorgó una Beca de Entrenamiento para Alumnos Universitarios de la CIC, para el período 2013-2014. En 2015 iniciará su Tesis Doctoral dentro de nuestro grupo de investigación.

Este plan será financiado por la CIC, a través del Subsidio de Investigación otorgado recientemente del cual soy miembro integrante de Grupo de Investigación, por la ANPCyT y por la UNS.

Bibliografía

- 18- Chung Y, Heo H, Kim EK, Kim HK, Huh TL, Lim Y, Kim SK, Shin DH., *Molecules and Cells*, 11, 137-143, 2001.
- 19- Lee JH, Lee KT, Yang JH, Baek NI, Kim DK., *Arch. Pharm. Res* 27, 53-56, 2004.
- 20- Kosmulalage KS, Zahid S, Udenigwe CC, Akhtar S, Ata A, Samarasekera R., *Zeitschrift fur Naturforschung B.*, 62, 580-586, 2007.
- 21- Mehmood S, Riaz N, Nawaz SA, Afza N, Malik K, Choudhary MI, *Arch. Pharm. Res.*, 29, 195-198, 2006.
- 22- Calderón AL, Simithy J, Quaggio G, Espinosa A, López-Pérez JL, Gupta MP., *Nat. Prod. Comm.*, 4, 1323-1326, 2009.
- 23- Dzubak P, Hajdich M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L., *J. Nat. Prod. Rep.*, 23, 394-411, 2006.
- 24- Neukirch H, D'ambrosio M, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R, Guerriero, *Chem. Biodivers.*, 2, 657-671, 2005.
- 25- Sami A, Taru M, Salme K, Jari Y., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 1-13, 2006.
- 26- Soldi C, Pizzolatti M, Luiz A, Marcon R, Meotti F, Miotto L, Santos A., *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3377-3386, 2008.
- 27- Castro MJ, Murray AP, Faraoni MB., 15th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, ECSOC-15, 2011.
- 28- Garrido, G.; Murray, A.P.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Maier, M.S., *Steroids*, 68, 125-132, 2003.
- 29- Symon A. V., Kaplun., A. P., Vlasenkova N. K., Gerasimova G. K., Shon Le Bang, Litvin E. F., Kozlova L. M., Surkova E. L., Shvets V. I., *Russian J. of Bioorg. Chem.*, 29, 185-189, 2003.
- 30- Reyes C.P., Núñez M.J., Jiménez I.A., Busserolles J., Alcaraz M.J., Bazzocchi I.L., *Biorg. Med. Chem.*, 14, 1573-1579, 2006.
- 31- Kashiwada Y, Chiyo J, Ikeshiro Y, Nagao T, Okabe H, Cosentino M, Fowke K, Morris-Natschke SL, Lee KH, *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 1387-1390, 2000.
- 32- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM., *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95, 1961.