



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

Síntesis de derivados triterpénicos con potencial
actividad anticolinesterasa

María Julia Castro

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2015

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 22 de Diciembre de 2009 y el 11 de Febrero de 2015, bajo la dirección de la Dra. María Belén Faraoni y la co-dirección de la Dra. Ana Paula Murray.

M. Julia Castro



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo la calificación de(.....)

A mi abuela Delia...

Agradecimientos

Antes de comenzar con los agradecimientos personales quiero dar gracias especialmente a Dios...

En primer lugar quiero agradecer a Belén, por acompañarme con total dedicación y compromiso en el transcurso de estos años. Por confiar en mí, transmitirme ilusión en cada nuevo desafío que afrontamos, por su tiempo y consejos, por apoyarme siempre. Le agradezco por el interés que mostró por mi persona, por su cariño y humanidad.

Agradezco a Paula por introducirme en el valioso mundo de los productos naturales y por todo lo que me ha enseñado durante estos años, permitiéndome ser parte de este grupo de investigación. A las chicas del laboratorio, las que están – Silvana y Florencia- y las que estuvieron -Cristina, Janeth, Natalia y Vanesa-, porque más que compañeras de trabajo, fueron compañeras de una etapa de mi vida. Y muy especialmente a Naty y a Vale, por la amistad que nos une.

A mis padres, que siempre me iluminaron el camino a seguir, me transmitieron los valores personales, respeto, dedicación y perseverancia. Son los pilares fundamentales de haber alcanzado un logro como este. Gracias por estar siempre... Mis hermanos, Sole, Paula, Magui y Juan, siempre al lado mío.

Doy gracias a Agustín, por su amor incondicional, por estar siempre a mi lado, por escucharme y aconsejarme, por su calma y tranquilidad, por alentarme y ser mi sostén.

Al Prof. Ángel Ravelo y a la Prof. Ana Estévez Braun, quienes permitieron que logre ampliar mis conocimientos atravesando las fronteras de mi querido País, y junto a ellos a todo el grupo de investigación de la Universidad de La Laguna, por su cariño y calidez humana. Agradecida eternamente por todo lo que me han brindado.

A la Dra. Victoria Richmond por realizar el modelado molecular, a la Dra. Virginia Vetere por llevar a cabo las reacciones catalíticas, a la Dra. Valeria Careaga por los ensayos de citotoxicidad, y a la Dra. Gabriela Murray por la identificación del material vegetal. A todas ellas muy agradecida por su tiempo y disposición.

A los orgánicos del INQUISUR, por todo lo compartido y por el compañerismo brindado.

A toda la Comisión de Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas, al INQUISUR y al Departamento de Química.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos.....	2
I.1.1 Quimiotecas basadas en estructuras privilegiadas.....	10
I.1.2 Etapas en la búsqueda de metabolitos bioactivos en plantas.....	12
I.2 Triterpenoides como compuestos líderes para el diseño de análogos bioactivos.....	14
I.3 Enfermedad de Alzheimer.....	17
I.3.1 Etiología de la Enfermedad de Alzheimer.....	18
I.3.2 Rol de las colinesterasas en la enfermedad de Alzheimer.....	22
I.3.3 Inhibidores de colinesterasa en la terapia de la Enfermedad de Alzheimer.....	25
I.3.4 Inhibidores de colinesterasa de origen natural.....	26
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	30
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
III.1 Antecedentes en la búsqueda de inhibidores de ACE de la especie <i>C. erinaceae</i>	34
III.2 Modificaciones de triterpenos pentacíclicos tipo lupano.....	37
III.2.1 Optimización de la extracción, aislamiento y purificación de metabolitos secundarios...38	
III.2.2 Modificación de la cadena lateral.....	39
III.2.2.1 Hidrogenación del doble enlace.....	40
III.2.2.2 Oxidación alílica.....	40
III.2.2.3 Epoxidación del doble enlace.....	42
III.2.3 Sulfatación de alcoholes triterpénicos.....	43
III.2.3.1 Introducción a los métodos de sulfatación.....	44

III.2.3.2	Introducción al uso del microondas.....	45
III.2.3.3	Preparación de análogos sulfatados.....	46
III.3	Estudios <i>in vitro</i> de ACE y BuCE.....	51
III.3.1	Caracterización cinética de la inhibición de ACE.....	53
III.3.2	Estudios de acoplamiento molecular o <i>docking</i>	54
III.4	Esterificación de alcoholes triterpénicos.....	57
III.4.1	Preparación de ésteres de calenduladiol y de análogos.....	59
III.4.2	Estudios <i>in vitro</i> de ACE y BuCE.....	61
III.5	Compuestos carbonílicos triterpénicos y oximas	
III.5.1	Compuestos carbonílicos.....	64
III.5.1.1	Preparación de derivados mono-, di- y tricarbonílicos.....	66
III.5.2	Oximas triterpénicas.....	73
III.5.2.1	Preparación de oximas triterpénicas.....	74
III.5.3	Estudios <i>in vitro</i> de ACE y BuCE.....	78
III.5.3.1	Caracterización cinética de la inhibición de BuCE.....	80
III.5.3.2	Estudios de modelado molecular.....	81
III.6	Reducciones	
III.6.1	Alcoholes triterpénicos epímeros.....	85
III.6.1.2	Reducciones catalíticas.....	88
III.6.2	Aminas triterpénicas.....	95
III.6.2.1	Preparación de aminas triterpénicas	96
III.7	Citotoxicidad frente a PC-3 y LNCaP de triterpenoides naturales y semisintéticos.....	98
III.8	Conclusiones.....	101

CAPÍTULO IV. EXPERIMENTAL

IV.1	General	
IV.1.1	Materiales.....	104
IV.1.2	Equipos.....	104
IV.1.3	Material vegetal.....	105

IV.2 Extracción y aislamiento de lupeol (1) y calenduladiol (5) de <i>Chuquiraga erinacea</i>	105
IV.3 Preparación, datos físicos y espectroscópicos de análogos triterpénicos.....	107
IV.3.1 Preparación de 20,29-dihidrolupano-3 β ,16 β -diol (9).....	107
IV.3.2 Procedimiento general de reacciones de oxidación alílica.....	107
IV.3.2.1 Preparación de 3 β ,16 β -dihidroxilup-20(29)-en-30-al (10).....	108
IV.3.2.2 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β ,30-triol (11).....	108
IV.3.2.3 Preparación de 3 β -hidroxilup-20(29)-en-30-al (31).....	109
IV.3.2.4 Preparación de 16 β -hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (37).....	109
IV.3.2.5 Preparación de 3 β -hidroxi-16-oxo-lup-20(29)-en-30-al (38).....	110
IV.3.3 Preparación de 20S,29-epoxilupano-3 β ,16 β -diol (12).....	111
IV.3.4 Procedimiento general de reacciones de sulfatación.....	112
IV.3.4.1 Preparación de 3 β -hidroxilup-20(29)-en sulfato de sodio (13).....	112
IV.3.4.2 Preparación de 3 β ,16 β -dihidroxilup-20(29)-en disulfato de sodio (8).....	113
IV.3.4.3 Preparación de 3 β ,16 β -dihidroxi-20,29-dihidrolupano disulfato de sodio (14).....	113
IV.3.4.4 Preparación de 3 β ,16 β -dihidroxilup-20(29)-en-30-al disulfato de sodio (15).....	114
IV.3.4.5 Preparación de 3 β ,16 β ,30-trihidroxilup-20(29)-en trisulfato de sodio (17).....	114
IV.3.4.6 Preparación de 3 β -O-acetil-16 β -hidroxilup-20(29)-en sulfato de sodio (28).....	115
IV.3.4.7 Preparación de 16 β -O-acetil-3 β -hidroxilup-20(29)-en sulfato de sodio (29).....	116
IV.3.5 Preparación de 3 β ,16 β ,30-trihidroxilup-20(29)-en-3,16-disulfato de sodio (17).....	116
IV.3.6 Preparación de 20S,29-epoxilupano-3 β ,16 β -diol disulfato de sodio (18).....	117
IV.3.7 Procedimiento general de reacciones de acetilación.....	118
IV.3.7.1 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol diacetato (19).....	118
IV.3.7.2 Preparación de 16 β -hidroxilup-20(29)-en-3 β -il acetato (20) y 3 β -hidroxilup-20(29)-en-16 β ol (21).....	119
IV.3.7.3 Preparación de 30-oxolup-20(29)-en-3 β ,16 β -diol diacetato (22).....	120
IV.3.7.4 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β ,30-triol triacetato (23).....	120
IV.3.8 Procedimiento general de reacciones de esterificación.....	121
IV.3.8.1 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol dipent-4-enoato (24).....	121
IV.3.8.2 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol dibenzoato (25).....	122
IV.3.8.3 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol di-p-bromobenzoato (26).....	123
IV.3.8.4 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol dihemiadipato (27).....	124
IV.3.9 Procedimiento general de reacciones de oxidación con el reactivo de Jones.....	124

IV.3.9.1 Preparación de lup-20(29)-en-3-ona (30).....	125
IV.3.9.2 Preparación de 3-oxolup-20(29)-en-30-al (32).....	125
IV.3.9.3 Preparación de lup-20(29)-eno-3,16-diona (33).....	126
IV.3.9.4 Preparación de 3,16-dioxolup-20(29)-en-30-al (36).....	127
IV.3.10 Procedimiento general para la obtención de oximas.....	128
IV.3.10.1 Preparación de lup-20(29)-en-3 <i>E</i> -oxima (40).....	128
IV.3.10.2 Preparación de 3 <i>E</i> -hidroxiiminolup-20(29)-en-16-ona (41).....	128
IV.3.10.3 Preparación de lup-20(29)-en-3 <i>E</i> ,16 <i>E</i> -dioxima (42).....	129
IV.3.10.4 Preparación de lup-20(29)-en-3 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,30-trioxima (44).....	130
IV.3.11 Preparación de lup-20(29)-en-3 α -ol (<i>epilupeol</i>) (45).....	131
IV.3.12 Procedimiento general de reacciones de hidrogenación catalítica.....	131
IV.3.12.1 Preparación de 20,29-dihidrolupan-3-ona (46), 20,29-dihidrolupan-3 α -ol (47) y 20,29-dihidrolupan-3 β -ol (48).....	132
IV.3.13 Preparación de lup-20(29)-en-3 β -amino (50).....	133
 IV.4 Actividades biológicas	
IV.4.1 Ensayo de inhibición <i>in vitro</i> de colinesterasas.....	134
IV.4.2 Caracterización cinética de la inhibición de las colinesterasas.....	135
IV.4.3 Determinación de modelado molecular.....	135
IV.4.4 Actividad citotóxica.....	136
IV.4.5 Citotoxicidad sobre células tumorales.....	137
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
 ANEXO DE ESPECTROS	149
 ANEXO DE PUBLICACIONES	194

Resumen

El interés en triterpenos bioactivos condujo al diseño de una serie de cuarenta y tres derivados de lupeol (**1**) y calenduladiol (**5**), aislados a partir de la especie vegetal *Chuquiraga erinaceae*. El triterpeno natural **5** presentó un segundo grupo hidroxilo en C-16, además del hidroxilo en C-3 y del grupo isopropenilo en el anillo *E*, característico de este tipo de alcoholes triterpénicos, ofreciendo una estructura novedosa para ser modificada sintéticamente.

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la técnica de extracción y purificación reportada anteriormente para el aislamiento de **5**. La sulfatación de los alcoholes **9-12**, obtenidos por modificación química del grupo isopropenilo de **5**, dio lugar a los derivados sulfatados **14-17**. En cambio, el análogo **18** fue preparado por epoxidación del grupo isopropenilo de calenduladiol disulfatado (**8**). Los triterpenos **5**, **10** y **11** fueron tratados con anhídrido acético rindiendo los ésteres **19-23**; el tratamiento de **5** con los correspondientes cloruros de ácido dio lugar a los ésteres **24-27**. Los derivados carbonílicos **10**, **30-39** fueron obtenidos por oxidación alílica y/o con el reactivo de Jones de **1** y **5**. Las cetonas **30** y **33**, así como el aldehído **36** fueron tratados con cloruro de hidroxilamina a fin de obtener las oximas correspondientes (**40-44**).

Por otro lado, teniendo en cuenta que la inversión de la configuración del C-3 incrementa la actividad antituberculosa y citotóxica en los alcoholes 3α -triterpénicos, se llevó a cabo la síntesis de estos alcoholes desde sus epímeros 3β más disponibles. Se estudiaron distintos sistemas catalíticos para la reducción quimio- y estereoselectiva de la cetona **30**. El sistema bimetálico $\text{PtSn}_{0,8}/\text{SiO}_2$ resultó ser quimioselectivo dando lugar a **45** con una estereoselectividad interesante. Finalmente, la reducción de la oxima **40** rindió una mezcla de aminas isómeras (**49** y **50**) la cual pudo ser separada por cromatografía.

Todos los derivados obtenidos fueron evaluados frente a las enzimas acetil- y butirilcolinesterasa (ACE y BuCE). El compuesto **14**, con dos grupos sulfato y un grupo isopropilo unido a C-19, mostró la inhibición más potente frente a ACE. El estudio cinético enzimático y el modelado molecular revelaron que **14** se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato, produciendo un complejo inactivo. Por otro lado, los derivados **35** y **36** mostraron la mayor actividad y selectividad frente a BuCE, sugiriendo que la presencia de un grupo carbonilo en C-16 es fundamental para esta actividad. El estudio cinético enzimático y el modelado molecular revelaron que estos inhibidores presentan afinidad por el sitio activo de la enzima y, por lo tanto, compiten con el sustrato por el acceso al mismo.

Por último, se determinó la actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) de derivados de **1** y **5**, resultando el lupeol sulfatado (**13**), el inhibidor más potente.

Abstract

The interest in bioactive triterpenes prompted to synthesize a set of forty-three derivatives from lupeol (**1**) and calenduladiol (**5**), isolated from *Chuquiraga erinacea*. Natural triterpene **5** presented a second hydroxyl group at C-16, in addition to the hydroxyl at C-3 and isopropenyl moiety in the ring *E*, characteristic of this type of triterpene alcohols, providing a novel structure to be modified synthetically.

Optimization of the extraction and purification technique previously reported for the isolation of **5**. Sulfation of alcohols **9-12**, obtained by chemical modification of the isopropenyl moiety of **5**, afforded sulfated derivatives **14-17**. However, derivative **18** was prepared by epoxidation of the isopropenyl moiety of disulfate calenduladiol (**8**). Triterpenes **5**, **10** and **11** were treated with acetic anhydride yielding the esters **19-23**; the treatment of **5** with the corresponding acyl chlorides afforded the esters **24-27**. Carbonyl derivatives **10**, **30-39** were obtained by allylic oxidation and/or with Jones reagent of **1** and **5**. Ketones **30** and **33**, and aldehyde **36** were treated with hydroxylamine chloride in order to obtain the corresponding oximes (**40-44**).

Taking into account that conversion of the stereochemistry of C-3 increases the antitubercular and cytotoxic activity in the 3α -triterpenic alcohols, the synthesis of these alcohols from the most available epimers 3β was carried out. In this work different catalytic systems have been studied for the chemo- and stereoselective reduction of ketone **30**. The PtSn_{0,8}/SiO₂ bimetallic system proved to be chemoselective leading **45** with an interesting stereoselectivity. Finally, the reduction of the oxime **40** yielded a mixture of isomeric amines (**49** and **50**), which could be separated by chromatography.

All the derivatives obtained were tested for their inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). Compound **14**, with two sulfate groups and an isopropyl group attached to C-19, showed the most potent inhibition for AChE. Enzyme kinetic study and molecular modeling revealed that **14** was able to bind to the complex enzyme-substrate producing an inactive complex. On the other hand, derivatives **35** and **36**, showed the highest activity and selectivity against BChE, suggesting that the presence of a carbonyl group at C-16 is essential for this activity. Enzyme kinetic study and molecular modelling revealed that these inhibitors have an affinity for the active site of the enzyme and, therefore, compete with the substrate for access to it.

Finally, the cytotoxic activity was determined against cancer cell lines prostate (PC-3 and LNCaP) of derivatives **1** and **5**, being sulfated lupeol (**13**), the most potent inhibitor.

ABREVIATURAS

Aβ	Péptido beta-amiloide
AC	Acetilcolina
ACE	Acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
AMCPB	Ácido m-cloroperbenzoico
ATCI	Ioduro de acetiltiocolina
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BC	Butirilcolina
BTCI	Ioduro de butiriltiocolina
BuCE	Butirilcolinesterasa
CaP	Cáncer de próstata
CAS	<i>Catalytic Active Site</i>
CC	Cromatografía en columna
δ	Desplazamiento químico
DCM	Diclorometano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DTNB	Ácido 5,5'-bisdinitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EIMS	<i>Electron Ionization Mass Spectroscopy</i>

EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GNC	<i>Cyclic Nucleotide-Gated</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HR-ESI-MS	<i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
iACE	Inhibidores de acetilcolinesterasa
IC₅₀	Concentración que inhibe al 50% la actividad enzimática máxima
IFN-γ	Interferón-gamma
J	Constante de acoplamiento
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOD-<i>d</i>₄	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MEP	Metileritritol fosfato
MW	Microondas
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

NEQ	Nuevas entidades químicas
NFTs	<i>Neurofibrillary tangles</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	<i>Perypherical Anionic Site</i>
p.f.	Puntos de fusión
PI	Porcentaje de inhibición
PN	Producto natural
PPA	Proteína precursora amiloide
ppm	Partes por millón
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PTK	Proteína tirosina quinasa
QOMS/M	Química organometálica de superficies sobre metales
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i>
Sin.	Sinónimos
THF	Tetrahidrofurano
Tc	<i>Torpedo californica</i>
UV	Espectroscopía ultravioleta
VCD	<i>Vibrational Circular Dichroism</i>

Capítulo I

Introducción

I.1 Los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos

La secuenciación del genoma y la comprensión a nivel molecular de los procesos biológicos, han llevado al descubrimiento de innumerables dianas biológicas de interés terapéutico. Estudios farmacológicos realizados sobre estos blancos, utilizando ligandos de moléculas pequeñas, sirvieron de herramienta para comprender sus funciones y validar su potencial terapéutico. Asimismo, el acceso a tecnologías de selección de alto rendimiento ("*High Throughput Screening*") facilitó el descubrimiento de muchas de estas moléculas [1]. Sin embargo, varias clases de objetivos demostraron ser especialmente desafiantes en estos esfuerzos, y algunos incluso han sido catalogados como "*undruggable*". A pesar de esta clasificación, la identificación de pequeñas moléculas que sean útiles para unirse a este tipo de dianas consiste, en esencia, en el reconocimiento a nivel molecular de una sustancia química; por lo que, recurrir al espacio químico puede servir de estrategia para el hallazgo de nuevas entidades moleculares capaces de convertirse en potentes agentes terapéuticos.

El concepto de espacio químico abarca el conjunto de todas las moléculas orgánicas que pueden ser consideradas en la búsqueda de nuevos fármacos. Teóricamente, se considera que el espacio químico está formado por $\sim 10^{60}$ moléculas de menos de 500 Dalton. Hasta el momento sólo se ha explorado un mínimo porcentaje del mismo (menos del 1%); sin embargo, la mayoría de estos compuestos serán biológicamente inertes, ya que no tendrán la capacidad de interactuar con ningún blanco farmacológico. Surge entonces la necesidad de restringir el espacio químico a las zonas biológicamente relevantes, es decir, donde se encuentran incluidos los productos naturales (PNs), que han co-evolucionado con los sitios de unión a proteínas y ácidos nucleicos en el curso de evolución de la vida [2]. Este hecho es importante por dos motivos, por un lado porque la mayoría de las dianas farmacológicas son proteínas y los PNs tienen capacidad de enlazarse a ellas [3]. Por otro lado, dado que la estructura de un PN se asemeja a los intermediarios biosintéticos o metabolitos endógenos, puede valerse de mecanismos de transporte activo para acceder a ciertas células u órganos donde ejercer su acción. Los criterios predictivos para la selección de moléculas con utilidad terapéutica en los procesos de búsqueda de nuevos fármacos postulados por Lipinski como "la regla de los 5", establecen en su quinta regla, que es innecesaria la aplicación de las cuatro primeras a un PN o a cualquier molécula que sea reconocida por un sistema de transporte activo [4]. En sus estudios, Ganesan destaca la extraordinaria capacidad de la naturaleza para compensar las características de los PNs biológicamente activos cuando no cumplen con las reglas de Lipinski, concediéndoles la posibilidad de ser utilizados como fármacos [5].

Los PNs, además de ser considerados como estructuras privilegiadas seleccionadas por la evolución para unirse a macromoléculas biológicas, ofrecen tres importantes características estructurales como son diversidad, complejidad estructural y quiralidad, responsables del éxito que presentan como fuente de fármacos.

Históricamente los productos aislados de plantas, animales y microorganismos han contribuido al tratamiento de las enfermedades humanas [6,7]. Los primeros registros corresponden al año 2600 a.C. en Mesopotamia, donde se enumeran unas 1000 sustancias de origen vegetal utilizadas como medicamentos. Estas incluyen aceites extraídos de *Cupressus sempervirens*, varias especies de *Commiphora*, *Glycyrrhiza glabra* y *Papaver somniferum* utilizados para el tratamiento de la tos, el resfrío y la inflamación. La medicina egipcia data del año 2900 a.C., pero el mejor registro conocido es el del "Papiro de Ebers" del año 1500 a.C., que documenta más de 700 medicamentos, en su mayoría de origen vegetal. La medicina china también ha sido ampliamente reportada, con el primer informe en el año 1100 a.C. de 52 recetas para tratar diferentes enfermedades [8]. Asimismo, los antecedentes del sistema ayurvédico de la India son anteriores al año 1000 a.C. [9]. Los griegos y los romanos contribuyeron sustancialmente al desarrollo racional del uso de los medicamentos a base de hierbas en el antiguo mundo occidental, indicando con precisión la recolección, el almacenamiento y el empleo de plantas medicinales (año 100 d.C.) [8].

La utilización de los PNs como medicamentos se ha descrito a lo largo de la historia en forma de medicinas tradicionales, remedios, pociones y aceites, en la mayoría de los casos, sin identificar el compuesto natural bioactivo. Su principal fuente de conocimiento ha sido a través de la experiencia humana mediante prueba y error. Durante siglos el hombre ha ido descubriendo las propiedades de las plantas por medio de ensayos de palatabilidad, en búsqueda de remedios disponibles para el tratamiento de enfermedades, empleándolas en forma de extractos crudos o semi-puros [10]. A comienzos del siglo XX, la teoría que postula la acción del fármaco sobre un receptor revolucionó el pensamiento del uso de drogas. La idea de que el efecto de los compuestos en el cuerpo humano es mediado por interacciones específicas entre la molécula del fármaco y macromoléculas biológicas (proteínas o ácidos nucleicos), estimuló a los científicos a pensar que, en un extracto, un compuesto químico en particular, sería el responsable de la actividad biológica, considerando de gran relevancia la identificación y el aislamiento del compuesto puro [11].

Las prácticas medicinales tradicionales han sido la base de los primeros medicamentos, seguido por estudios químicos, farmacológicos y clínicos [12]. Probablemente el más conocido de los ejemplos

sea el de **salicina**, aislada de la corteza del árbol *Salix alba* L. (Salicaceae), utilizada antiguamente para tratar la fiebre y, posteriormente indicada para el tratamiento sintomático de las molestias reumáticas [13]. Otros ejemplos son los alcaloides isoquinolínicos **morfina** y **codeína**, aislados a partir del opio extraído de cápsulas inmaduras de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae). Estos alcaloides interactúan con los receptores opioides distribuidos en el sistema nervioso, por lo que son ampliamente utilizados como analgésicos narcóticos; además, codeína se utiliza por su efecto antitusivo [13]. De la especie *Digitalis purpurea* L. (Plantaginaceae) se obtuvo uno de los componentes activos, **digitoxina**, un glucósido cardiotónico eficaz para mejorar la conducción cardíaca [13]. **Pilocarpina**, obtenida de las hojas del arbusto tropical *Pilocarpus jaborandi* (Rutaceae), es un alcaloide derivado de L-histidina, agonista no selectivo de los receptores muscarínicos del sistema nervioso parasimpático, utilizado en casos de glaucoma y xerostomía [13]. El alcaloide quinolínic **quinina**, aislado de la corteza de especies de *Cinchona* (Rubiaceae), fue aprobado como fármaco antimalárico por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos en el año 2004. La corteza ha sido utilizada por grupos indígenas de la región amazónica para el tratamiento de la fiebre, y se introdujo en Europa a principios del año 1600 para tratar la malaria [14] (Figura 1).

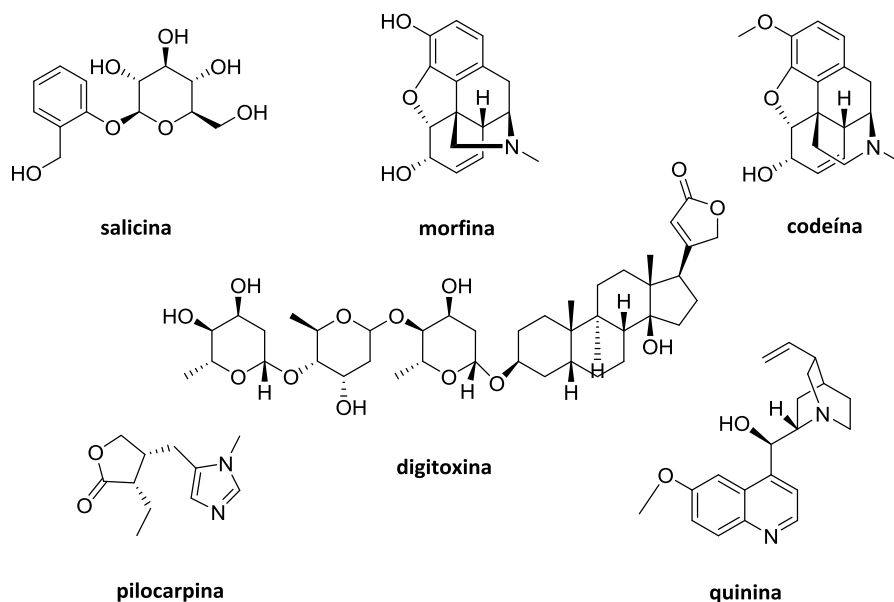


Figura 1. Primeros fármacos naturales obtenidos de plantas medicinales

Los metabolitos secundarios son PNs que surgen en organismos vivos mediante un proceso de biosíntesis a cargo de sistemas enzimáticos complejos desarrollados durante un largo proceso de evolución [15]. Por lo general no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un

organismo sino que cumplen funciones complementarias a las vitales, tales como comunicación intra e interespecífica, defensa contra radiación, congelación, y ataque de depredadores, patógenos o parásitos [16]. La síntesis de los metabolitos secundarios transcurre a partir de metabolitos primarios, sirviéndose la naturaleza de una serie de unidades básicas como material de construcción (*building blocks*). Si bien el número de bloques de construcción es limitado, la formación de nuevos metabolitos secundarios es infinita [17]. Los bloques de construcción más importantes empleados derivan de los intermediarios acetil-CoA, ácido shikímico, ácido mevalónico, y metileritritol fosfato (MEP), los cuales están involucrados en distintas rutas biosintéticas, con la participación de numerosos mecanismos y reacciones diferentes. A partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de metabolitos secundarios como son los policétidos, esteroides y terpenoides, fenilpropanoides, alcaloides, y péptidos.

Los metabolitos secundarios son biosintetizados para ejercer su función interaccionando con los dominios proteicos de las proteínas del organismo en el cual fueron sintetizados; y aunque estos productos de origen natural no hayan co-evolucionado con las proteínas humanas pueden ejercer un efecto similar en humanos. Sus estructuras químicas características y la gran variedad de actividades biológicas los distinguen por presentar cualidades moleculares más similares a los fármacos (*“drug-like”*) y ser más *“biológicamente amigables”* (*“biologically friendly”*) a diferencia de los compuestos puramente sintéticos [18]. Estas propiedades intrínsecas de los metabolitos secundarios les conceden un rol potencial en el descubrimiento de fármacos [16].

Por ejemplo, **ciclosporina A** (Figura 2), un péptido cíclico aislado del hongo *Tolypocladium inflatum*, demostró tanto *in vitro* como en un modelo de ratón, una potente inhibición en la formación de anticuerpos, interfiriendo en la liberación de mediadores de la inflamación. A partir de 1973 se ha convertido en el prototipo de una nueva generación de inmunosupresores [19,20].

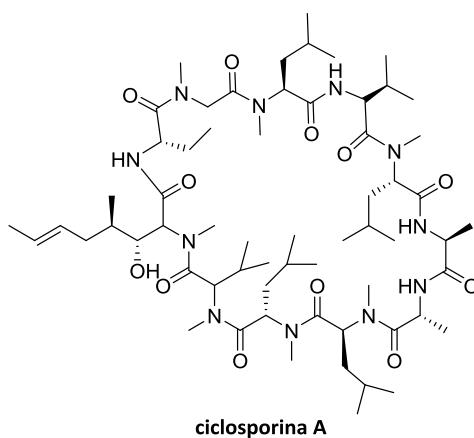


Figura 2. Péptido inmunosupresor de origen natural

Además de su contribución directa como fármacos, los PNs pueden ser útiles herramientas farmacológicas, ya que pueden ser utilizados para revelar un aspecto novedoso de la fisiología. Por ejemplo, **digitoxina** (Figura 1), mostró la función que cumple la bomba sodio-potasio-ATPasa, debido a la afinidad que presenta el fármaco por una de las conformaciones de esta proteína, bloqueándola y por tanto desencadenando una serie de efectos importantes en los músculos, especialmente en el corazón; de aquí su efecto cardiotónico. La estructura de **morfina** (Figura 1), condujo al hallazgo de diferentes tipos de receptores opioides como consecuencia de la gran variedad de respuestas farmacológicas causadas por la administración de este compuesto. Los alcaloides **muscarina** (aislada del hongo *Amanita muscaria*), **tubocurarina** (aislada de *Chondrodendron tomentosum*, Menispermaceae) y **nicotina** (encontrada principalmente en la planta del tabaco *Nicotiana tabacum*, Solanaceae), sirvieron para estudiar los diferentes tipos de receptores de acetilcolina, cuyas alteraciones están asociadas a trastornos severos tales como enfermedades neurodegenerativas [21] (Figura 3).

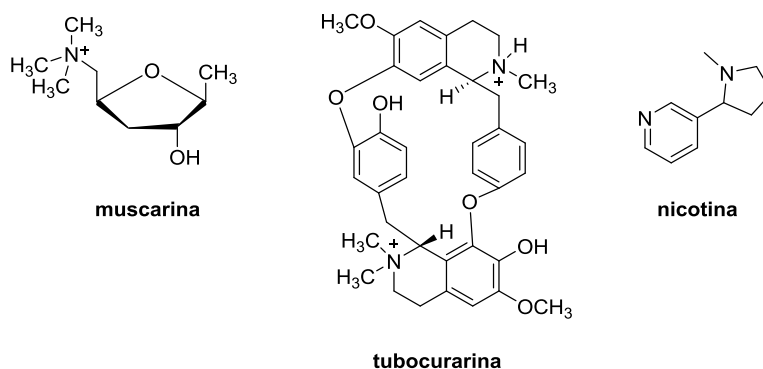


Figura 3. Alcaloides naturales que actúan sobre receptores de acetilcolina

Las actividades biológicas altamente selectivas y específicas de los PNs, basadas en mecanismos de acción, contribuyen a la búsqueda sistemática de moléculas pequeñas inhibitoras de los procesos bioquímicos [22]. Las sondas farmacológicas favorecen la comprensión de los mecanismos biológicos, cooperando en el diseño de mejores medicamentos. Tal es el caso de **genisteína**, una isoflavona que se encuentra naturalmente en la soja (*Glycine max*, Fabaceae) y que actúa como inhibidor de varias proteínas tirosina quinasas (PTK), enzimas esenciales que participan en la transducción de la señal intracelular [23]. Esta isoflavona ha sido utilizada para investigar la interacción entre la PTK y los canales de nucleótidos cíclicos-dependientes (GNC) presentes en los sistemas olfativo y visual de mamíferos [24,25]. Otro ejemplo es la actividad inhibitoria de la enzima HMG-CoA reductasa mostrada por estatinas

como **lovastatina**, aislada de especies de *Aspergillus*, las cuales se emplean como fármacos hipocolesterolemiantes [14] (Figura 4).

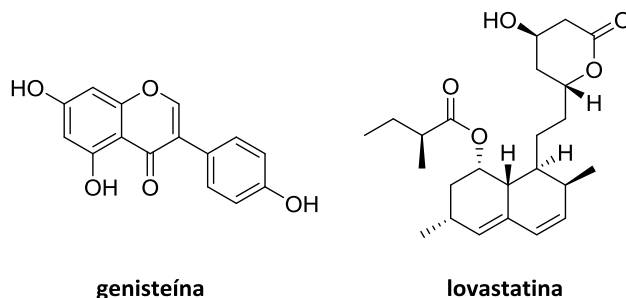


Figura 4. Metabolitos secundarios que actúan como sondas farmacológicas

Claramente, los PNs pueden ser útiles por su accionar directo como agentes terapéuticos, o servir de herramientas farmacológicas calificadas para revelar algún aspecto de la fisiología o como estructuras privilegiadas capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos. Posiblemente, ésta sea una de las razones del éxito en el descubrimiento de fármacos, representando, los PNs o sus derivados sintéticos, más del 45% de los medicamentos más vendidos en la actualidad.

Newman y Cragg en sus últimas investigaciones [26], presentaron un análisis actualizado del papel fundamental que constituyen los PNs en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, teniendo en cuenta aquellos medicamentos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas entre los años 1981 y 2010. El estudio pone en evidencia la continua contribución de la naturaleza, no sólo como fuente de potenciales agentes quimioterapéuticos, sino también como compuestos líderes que aportan una cierta inspiración para la semisíntesis o síntesis total de nuevos fármacos. En este análisis los autores incluyeron sólo las nuevas entidades químicas (NEQ) y clasificaron las fuentes de fármacos de la siguiente manera: **N**: producto natural, **NB**: producto natural botánico (mezclas de drogas vegetales), **ND**: derivado de productos naturales (semisíntesis), **S**: producto sintético, **S***: compuesto sintetizado utilizando un farmacóforo de un producto natural, **NM**: mimético a un producto natural (S/NM o S*/NM). Este análisis indicó que, mientras que el 66% de las 1073 moléculas son “formalmente sintéticas”, el 16% corresponde a moléculas sintéticas que contienen farmacóforos que derivan directamente de PNs, que pertenecen a S* o S*/NM. Además, el 14% son en realidad inspiradas en un producto inhibidor natural del objetivo molecular de interés o imitan al sustrato endógeno del sitio activo (S/NM). Por lo tanto, sólo el 36% de las 1073 NEQ pueden clasificarse de origen verdaderamente

sintético (es decir, carentes de inspiración natural), tal como se observa en la Figura 5. El estudio confirma que alrededor de un 64% de las NEQ identificadas entre los años 1981 y 2010 son PNs, análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos, especialmente en el área del cáncer y de los antibacterianos donde el porcentaje de medicamentos clasificados como estrictamente sintéticos corresponde sólo a un 20% y a un 25%, respectivamente.

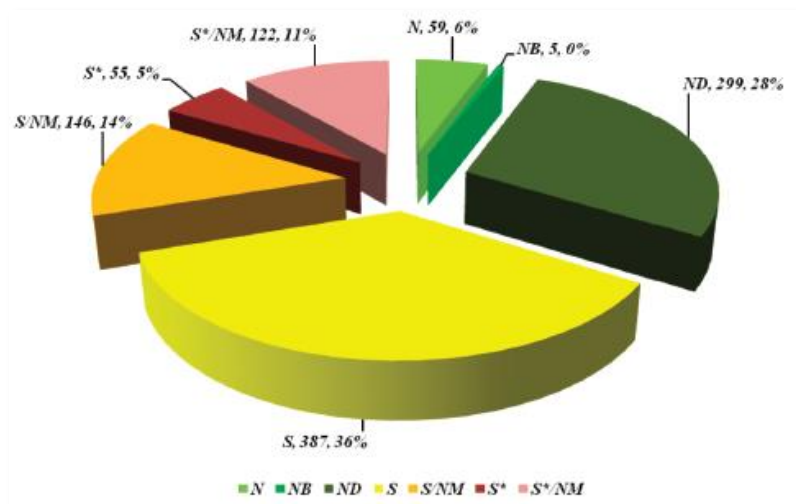


Figura 5. Nuevas entidades químicas aprobadas en el período 1981-2010 [26]

En sus estudios, Newman y Cragg, también destacan que de las NEQ aprobadas en los últimos 30 años, los PNs están implicados hasta en un 50% de las moléculas pequeñas aprobadas en el período 2000-2010. Esto se demuestra claramente en la Figura 6 que describe únicamente los productos “N” con cifras que oscilan desde un mínimo de 20,8% en el año 2009 a un máximo de 50% en el año 2010, con una media y una desviación estándar para esos 11 años de $36,5 \pm 8,6$, sin incluir ninguna de las clasificaciones de productos inspirados por la naturaleza (S*, S*/NM, y S/NM). En el año 2010 la mitad de las veinte moléculas pequeñas aprobadas fueron incluidas en algunas de las categorías “N”, es decir que fueron PNs o estuvieron inspirados en ellos, incluyendo la mayoría de los agentes antitumorales.

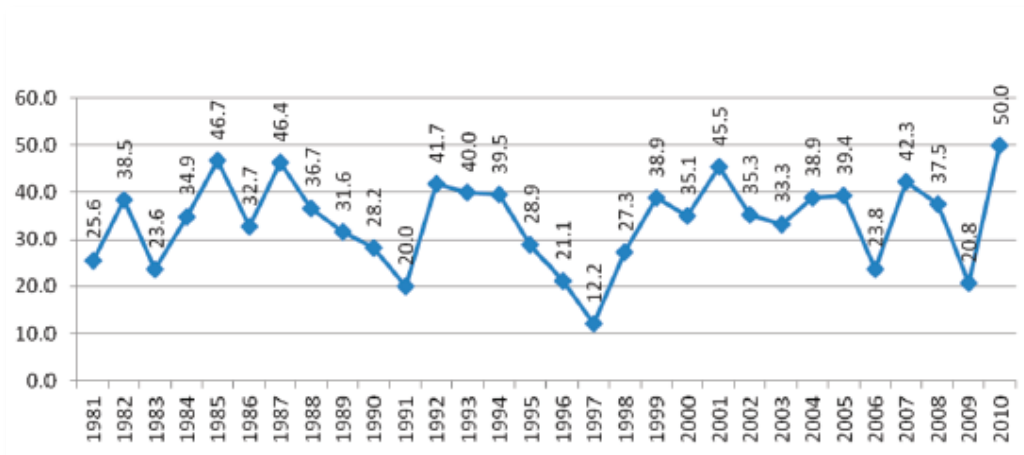
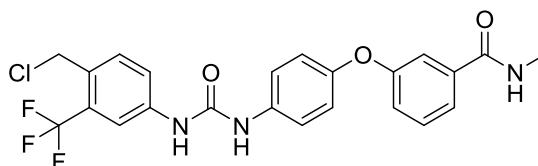


Figura 6. Porcentajes N/NB/ND por año, 1981-2010 [26]

El gran auge que tuvo la química combinatoria durante el período 1980-1990, responsable de la síntesis de millones de compuestos muy similares aportados a la literatura, condujo a los químicos a pensar que este método innovador resolvería el problema del suministro de fármacos. Sin embargo, estas expectativas no se han cumplido, y el número de NEQs introducidas anualmente por este tipo de síntesis ha declinado. Sólo una nueva entidad química producto de la síntesis de *novο* mediante química combinatoria ha sido aprobada por la FDA en el año 2005: **sorafenib** (Figura 7), un inhibidor de quinasa utilizado para el tratamiento del carcinoma de células renales [26].



sorafenib

Figura 7. Antineoplásico obtenido por química combinatoria

En este contexto, es claro que el número de compuestos no determina la calidad de las quimiotecas moleculares, sino que ésta viene determinada por la diversidad y las características similares que tengan las moléculas con los fármacos actuales, como tamaño, solubilidad, heterociclos, centros quirales, etc. Muchas de las características estructurales comunes a los PN han demostrado ser de gran relevancia para el descubrimiento de fármacos. Esto ha provocado un renovado interés por los PN en la búsqueda de diversidad química y la obtención de nuevos *cabezas de serie*. En los últimos años, se ha

planteado un nuevo enfoque en el cual se utiliza la química combinatoria para optimizar la estructura de un compuesto natural bioactivo y obtener nuevos análogos [27-30].

I.1.1 Quimiotecas basadas en estructuras privilegiadas

Los PNs son considerados compuestos líderes 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). La característica clave en el empleo de los compuestos de origen natural como plataformas estructurales de productos biológicamente activos, se basa en que han sido seleccionados evolutivamente para la unión a dominios de proteínas específicas, como se ha señalado anteriormente. Por lo tanto, ya están biológicamente validados, y las estructuras de estos PNs pueden proporcionar potentes puntos de partida para la obtención de quimiotecas activas. La modificación de un PN puede ser útil para aumentar la potencia terapéutica, mejorar la biodisponibilidad, reducir los efectos adversos o suplir la escasez del compuesto natural debido al bajo rendimiento y/o al alto costo de la síntesis total. A continuación se muestran algunos ejemplos.

Paclitaxel (Taxol) es el medicamento para el cáncer de mama más ampliamente utilizado, aislado de la corteza del *Taxus brevifolia* (Taxaceae) [31]. Está presente en cantidades limitadas en el árbol, por lo que su aislamiento a partir de la fuente natural no es un método viable para proporcionar cantidades suficientes del metabolito y satisfacer las demandas del mercado. Si bien se ha logrado su obtención mediante síntesis total, ésta es ineficiente y muy costosa [32]. **Bacatina III**, mucho más abundante en el *T. brevifolia*, presenta una estructura análoga a paclitaxel, por lo que se puede transformar en el metabolito activo mediante semisíntesis [33] (Figura 8).

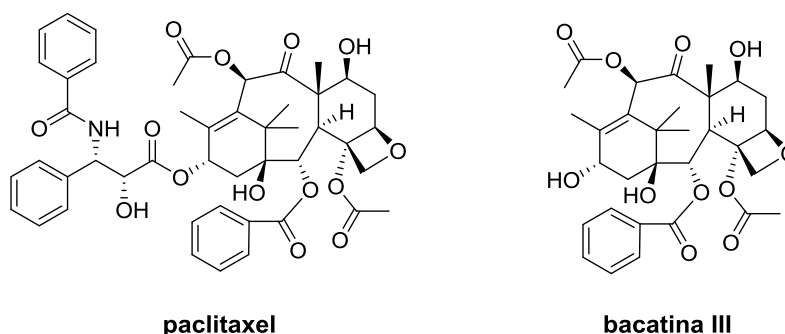


Figura 8. Bacatina III como precursor para la obtención de paclitaxel

Diosgenina, una sapogenina esteroidea con actividad estrogénica, obtenida de los tubérculos de diferentes especies de *Dioscorea* (Dioscoreaceae) que crecen en México y América Central, puede utilizarse para reducir el nivel de colesterol sérico. Sin embargo, su función principal es como precursor en la semisíntesis de **progesterona**, hormona empleada como anticonceptivo oral femenino [34]. Originalmente, esta hormona fue sintetizada a partir de colesterol, sin embargo éste método resultó de muy baja eficiencia [35]. Progesterona, a su vez, es un intermediario clave para la obtención de la hormona esteroidea **cortisona**, un importante agente antiinflamatorio [36,37] (Figura 9).

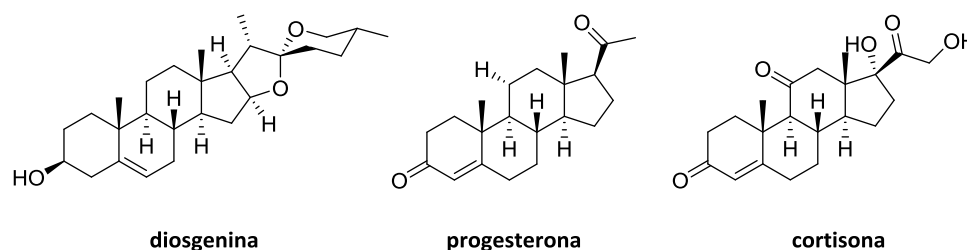


Figura 9. Precursores esteroidales y cortisona

Fosfato de oseltamivir (Tamiflu), es un inhibidor de las neuraminidasas presentes en el virus de la gripe, desarrollado para el tratamiento y la profilaxis de los virus de influenza A y B [38]. El material de partida para la síntesis de Tamiflu es el **ácido shikímico**, un importante intermediario bioquímico presente en plantas y microorganismos, como se mencionó anteriormente [39]. Este metabolito secundario aislado del anís estrellado japonés *Illicium verum* (Illiciaceae), presenta una limitada disponibilidad a partir de la especie vegetal, por lo tanto en los últimos años han sido utilizados numerosos métodos de síntesis alternativos al uso del ácido shikímico [40-42] (Figura 10).

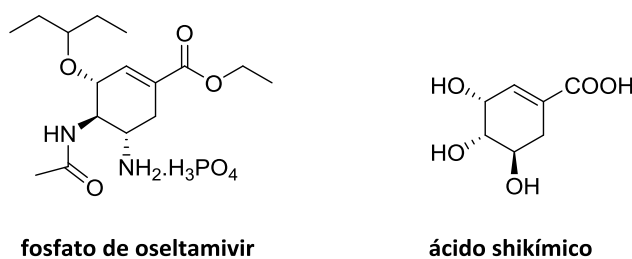


Figura 10. Ácido shikímico, material de partida para la síntesis de fosfato de oseltamivir

Podofilotoxina, aislada de la resina de varias especies vegetales del género *Podophyllum* (Berberidaceae) y **camptotecina** obtenida de la corteza y de las hojas del árbol *Camptotheca acuminata*

(Cornaceae), son agentes antineoplásicos que resultaron muy tóxicos y no lo suficientemente solubles en agua para su aplicación clínica. A través de modificaciones químicas realizadas para mejorar el perfil farmacológico y la solubilidad, se obtuvieron **etopósido** (Vepesid) y **topotecán** (Hycamtin) respectivamente, con altos índices terapéuticos [43,44] (Figura 11).

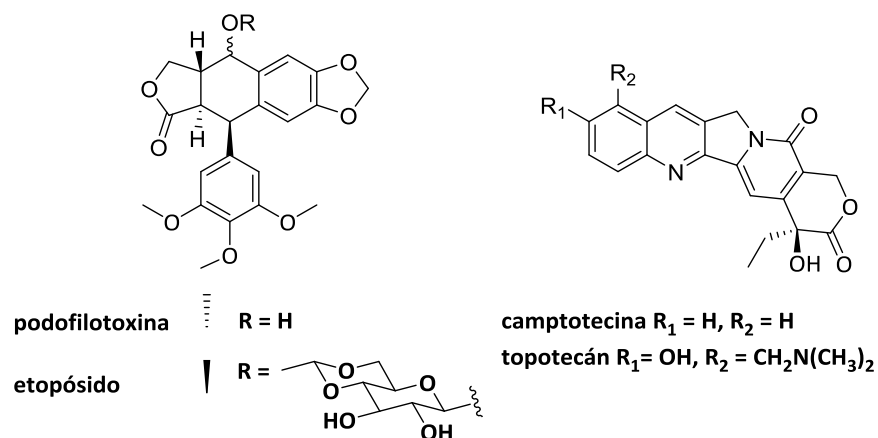


Figura 11. Agentes antineoplásicos de origen natural y semisintéticos

Guanidina es un producto natural aislado de *Galega officinalis* L. (Fabaceae) que presenta actividad hipoglucémica, sin embargo, es muy tóxica para uso clínico [45]. Se han sintetizado varios derivados de guanidina, entre la que se destaca **metformina** (una dimetilbiguanidina), clínicamente adecuada para el tratamiento de la diabetes de tipo II [46] (Figura 12).

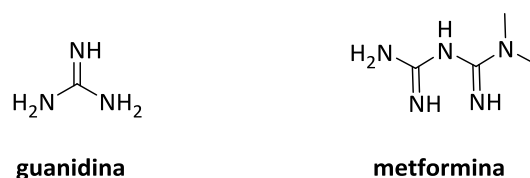


Figura 12. Hipoglucemiantes de origen natural y semisintético

1.1.2 Etapas en la búsqueda de metabolitos bioactivos en plantas

En las últimas décadas la investigación en el campo de los PNs bioactivos se ha facilitado por el desarrollo de tecnologías incluyendo nuevos métodos de aislamiento, técnicas más sensibles para la determinación estructural, así como sistemas específicos para bioensayos de alto rendimiento. Varias etapas se cumplen en el proceso de investigación de plantas, constituyendo el primer paso la selección de especies vegetales a partir de las cuales se realiza la búsqueda del metabolito secundario bioactivo.

Los principales criterios que se pueden tener en cuenta para esta selección son: aleatorio, quimiotaxonómico, ecológico y etnomédico [47]. El criterio *aleatorio*, consiste en la selección y recolección al azar de especies vegetales para su estudio, de acuerdo con la disponibilidad de la especie. Cuando la recolección se lleva a cabo en regiones con alta diversidad y endemismo la probabilidad de encontrar nuevas sustancias, bioactivas o no, es ciertamente mayor utilizando este criterio de selección [48]. El criterio *quimiotaxonómico*, selecciona las plantas pertenecientes a una familia o género que son conocidas por sintetizar cierta clase de metabolitos, especialmente aquellos identificados por poseer actividades biológicas interesantes [47]. El criterio *ecológico*, se fundamenta en observaciones de interacciones entre los organismos en su entorno. Por ejemplo, los metabolitos involucrados en la defensa de las plantas contra agentes microbianos patógenos pueden ser útiles como fármacos antimicrobianos en los seres humanos [47]. El criterio *etnomédico*, selecciona las plantas teniendo en cuenta la información acerca del uso de esa especie vegetal en la medicina tradicional. El aporte de este criterio en el descubrimiento de fármacos ha sido muy importante y varios ejemplos han sido citados anteriormente [47].

A partir de la especie vegetal seleccionada se prepara un extracto y se realiza su fraccionamiento mediante diferentes técnicas de purificación. Las fracciones obtenidas son sometidas a un *screening* de bioactividad para determinar qué fracciones serán estudiadas en detalle y llegar a la obtención del compuesto puro responsable de la actividad biológica detectada. A partir de la fracción activa, inicialmente se realiza una rápida identificación de los compuestos ya conocidos que presentan antecedentes de la actividad biológica estudiada. Actualmente se han desarrollado tecnologías que facilitan este paso, tal como el sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). A su vez el acceso a información confiable ofrecida en la base de datos también resulta útil para la identificación de compuestos conocidos. Finalmente se realiza el aislamiento, purificación y determinación estructural de compuestos nuevos, favorecida ésta última por los avances en técnicas espectroscópicas.

En la presente tesis, la especie vegetal utilizada (*Chuquiraga erinaceae* subsp. *erinaceae*), recolectada en la zona del Salitral de la Vidriera (Pcia. De Buenos Aires), fue seleccionada por el grupo de investigación utilizando el criterio *aleatorio* y fue evaluada la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (ACE) [49]. A partir del extracto y posterior fraccionamiento guiado por el bioensayo de inhibición enzimática, fueron aislados sus componentes activos, identificados como triterpenoides pentacíclicos.

I.2 Triterpenoides como compuestos líderes para el diseño de análogos bioactivos

Los triterpenos representan un amplio grupo de metabolitos secundarios, muy abundantes en el reino vegetal. En los últimos años, han tomado relevancia debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, entre las que se destacan antiinflamatoria [50,51], antiviral [52-54], citotóxica [55-57], antibacteriana [58] e inhibidora de enzimas implicadas en procesos neurodegenerativos [59,60].

Existen más de 5000 triterpenoides descritos hasta el momento, con más de 100 esqueletos de carbono diferentes y estructuras cíclicas relativamente complejas [61]. La mayoría de estos triterpenoides son, funcionalmente alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos (en estado libre), o pueden encontrarse también como glicósidos o ésteres [62].

El potencial terapéutico de los triterpenoides con esqueleto lupano ha sido motivo de estudio por varios grupos de investigación. Los principales reportes pertenecen a **lupeol**, **betulina** y **ácido betulínico** (Figura 13), en los cuales se describe el aislamiento y purificación a partir de especies vegetales, transformaciones químicas y biotecnológicas para la obtención de análogos, así como estudios SAR que revelan qué porción de la molécula es imprescindible para una determinada actividad biológica.

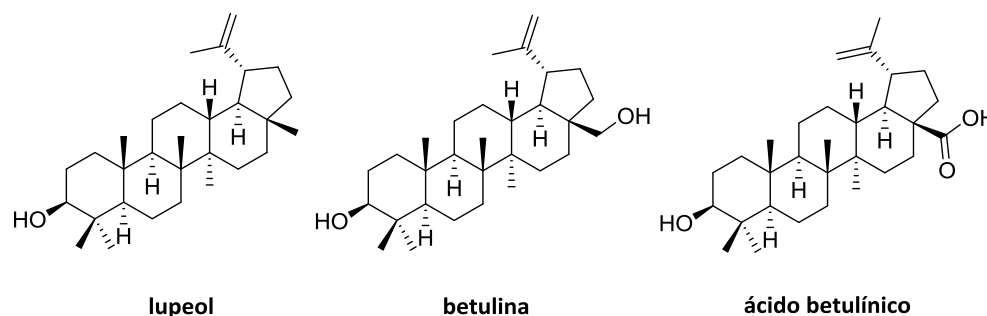


Figura 13. Triterpenoides con esqueleto lupano

El lupeol, 3 β -lup-20(29)-en-3-ol, se encuentra en una 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 [63]. Se ha comprobado que suprime la producción de superóxido en neutrófilos humanos, proceso que se relaciona con la inflamación especialmente en el campo dermatológico [64]. También reestablece daños inducidos en la peroxidación de las membranas y en los sistemas antioxidantes en eritrocitos de ratas [65] y reduce las alteraciones producidas en animales con artritis inducida [66]. Recientemente se ha reportado la semisíntesis de una serie de heterociclos derivados de lupeol inhibidores de óxido nítrico y de citoquinas proinflamatorias [67]. Por otro lado, se han estudiado diversas actividades farmacológicas *in vitro* y en condiciones *in vivo* asociadas con la

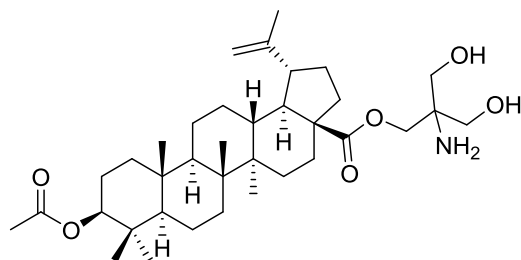
inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis de una variedad de células tumorales. Por ejemplo, Saleem y *col.* determinaron que este triterpenoide podría inducir la muerte de células de adenocarcinoma de páncreas humano mediante la inhibición de la vía de señalización Ras, así como la inhibición de la proliferación de células de cáncer de próstata humano por la orientación de la señalización β -catenina [68]. En sus últimas investigaciones, Liu y *col.* proponen la estructura de lupeol como agente potencial para la quimioprevención del carcinoma de vesícula biliar humana [69]. Por su parte, Khan y *col.* han diseñado una serie de ésteres y amidas de lupeol con actividad inhibitoria de la proteína tirosina-fosfatasa IB (PTP-1B) asociada a la diabetes mellitus tipo II [70].

La betulina, lup-20(29)-en-3 β ,28-diol, aislada de la corteza de *Betula papyrifera* (Betulaceae) y especies afines, ha mostrado un efecto inhibidor sobre la activación del virus Epstein-Barr y actividad bacteriostática frente a *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* [71]. Además, se ha informado que presenta acción protectora frente a la toxicidad del cadmio, observándose que los grupos hidroxilos (C-3 y C-28) y el grupo isopropenilo (C-19) son fundamentales para dicha actividad [72]. Sin embargo, el principal uso de este triterpenoide es servir de materia prima para la obtención del ácido betulínico [73].

El ácido betulínico, ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico, fue descrito por primera por Retzlaff en el año 1902 quien extrajo una sustancia desconocida de la especie *Gratiola officinalis* (Plantaginaceae) a la que llamó "graciolón". Más tarde, en el año 1944, Barton y Jones utilizaron constantes físicas para identificar correctamente al "graciolón" como ácido betulínico. Actualmente este triterpenoide natural se obtiene a escala industrial a partir de la extracción de la corteza del abedul (*Betula pubescens*, Betulaceae) [74], o bien mediante modificación química de la betulina [73].

El ácido betulínico es un compuesto especialmente prometedor debido a su capacidad para inducir apoptosis en células cancerígenas, presentando especificidad por las células de melanoma [75,76]. Un aspecto interesante, desde el punto de vista clínico, es el aumento de su efectividad a pH menor de 6,8, lo cual ocurre en la mayoría de los tumores [77]. Las células cancerosas que sufren hiperplasia muestran una elevada sensibilidad al ácido betulínico, mientras que la sensibilidad en las células no cancerosas permanece sin cambios. Estos y otros resultados alentadores han postulado al ácido betulínico como un buen candidato para el tratamiento clínico de varios tipos de cáncer. Por otro lado, modificaciones estructurales en el esqueleto lupano han proporcionado derivados con mejores propiedades farmacocinéticas, nuevos mecanismos de acción, y menos efectos secundarios. Si bien la mayoría de las derivatizaciones se han llevado a cabo por aproximaciones sintéticas tales como las realizadas por el grupo de Majeed [57], los procesos de biotransformación también se han utilizado para

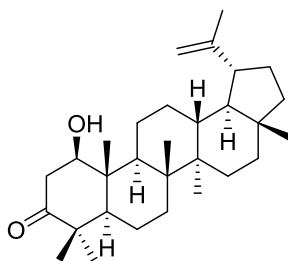
favorecer la modificación en ciertas posiciones de la estructura, las cuales serían más difíciles de funcionalizar por métodos químicos [78]. Cabe mencionar un derivado del ácido betulínico con actividad antitumoral, el **NVX-207** (Figura 14), considerado un buen candidato para su evaluación clínica [57].



NVX-207

Figura 14. Antitumoral derivado del ácido betulínico

Se han identificado otros triterpenoides con actividad antitumoral. El estudio de la especie *Phyllanthus pulcher* (Phyllanthaceae), condujo al aislamiento de una serie de triterpenoides pentacíclicos con esqueleto lupano mediante el ensayo bioguiado de actividad citotóxica contra tres líneas celulares de cáncer humano: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón) y DU-145 (cáncer de próstata). El triterpenoide natural **glochidonol** (Figura 15), con una estructura similar al lupeol pero con un hidroxilo en el C-1 y un carbonilo en el C-3, fue el responsable de la actividad más potente de los triterpenoides aislados por Bagalkotkar y *col.*, con valores de IC₅₀ en el rango 7,5-13,4 µg/mL (17,1-30,5 µM) [79].



glochidonol

Figura 15. Antitumoral aislado de *Phyllanthus pulcher*

Los triterpenos con esqueleto ursano y oleanano también han sido ampliamente documentados sobre todo como antitumorales [80,81]. Los **ácidos oleanólico** y **ursólico** están presentes en una gran

cantidad de alimentos, plantas y otros vegetales, y son los componentes mayoritarios de algunas plantas medicinales, y están distribuidos por todo el mundo. El **CDDO**, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleano-1,9(11)dien-28-oico, es un derivado semisintético del **ácido oleanólico**, capaz de inducir diferenciación celular y apoptosis. Esta molécula multifuncional estimula la diferenciación monocítica en células de leucemia mieloide humanas [82], diferenciación adipogénica de fibroblastos 3T3-L1 de ratón, diferenciación neuronal de células PC12 de rata. También induce inhibición de la proliferación en una amplia serie de líneas cancerígenas humanas por mecanismos apoptóticos. El metil éster del CDDO, **CDDO-Me**, provoca citotoxicidad y diferenciación en células de leucemia mieloide, así como frente a líneas celulares de cáncer de pulmón [83]. Otro derivado del CDDO, el CDDO-imidazolido (**CDDO-Im**), induce también apoptosis en la línea celular LLC-B (células de leucemia linfática crónica de tipo B) a concentraciones del orden micromolar [82] (Figura 16).

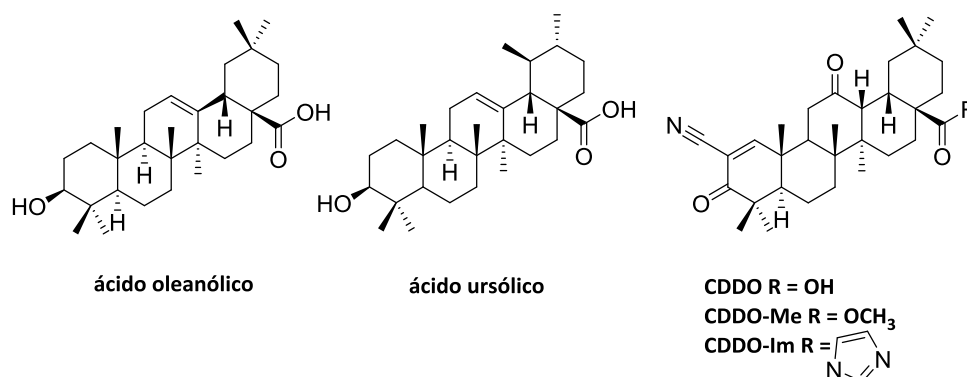


Figura 16. Antitumorales de origen natural y semisintéticos

1.3 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que está asociado con deterioro de la memoria y déficit cognitivo. La prevalencia de la enfermedad, aumenta con la edad, y por lo general se diagnostica en personas mayores de 65 años. Se estima que alrededor de 36 millones de personas en todo el mundo padecen la enfermedad y se espera que la cifra aumente significativamente en los próximos 50 años debido al aumento de la esperanza de vida en la población. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que en el año 2040, el 71% de los casos de demencia se producirán en los países en desarrollo [84].

La EA presenta dos características patológicas principales: depósitos extracelulares de péptido beta-amiloide ($A\beta$) conocidos como placas seniles, y ovillos neurofibrilares (NFTs, *neurofibrillary tangles*)

resultado de la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada [85] (Figura 17). Esta acumulación de proteínas patógenas se cree que es la causa, o al menos el factor principal, que conduce a un deterioro cognitivo y, posteriormente a una disfunción o muerte neuronal en pacientes con EA. [86].

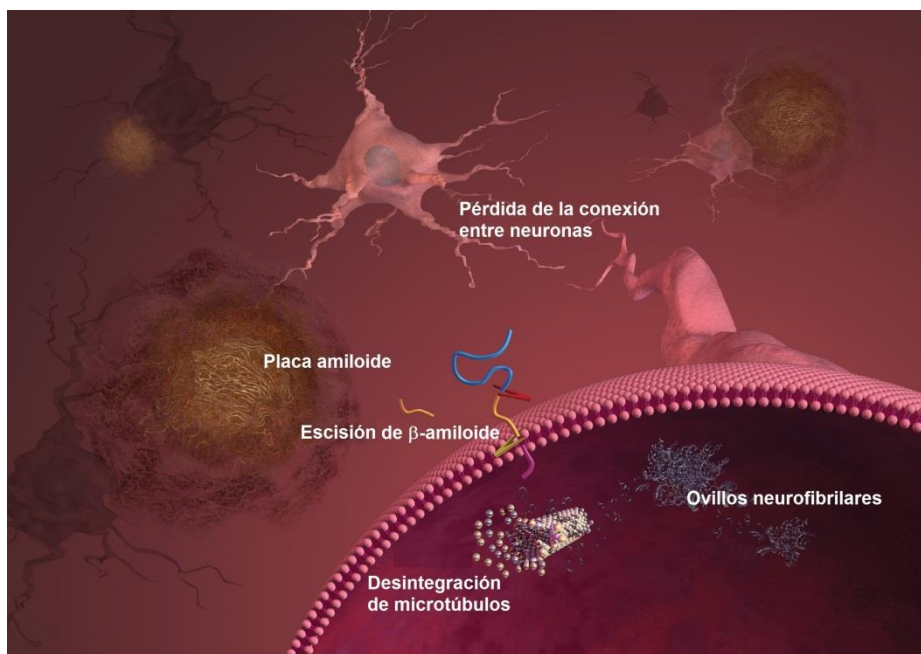


Figura 17. Acumulación de proteínas patógenas en la EA

Aunque la patogénesis exacta de la EA aún no ha sido completamente aclarada, se considera como una enfermedad multifactorial o de múltiples niveles [86]. Por lo tanto se han reconocido diversas causas implicadas en el desarrollo de la misma proporcionando estrategias farmacológicas con múltiples objetivos, todas ellas actualmente en estudio. Los factores asociados a la EA se agrupan en endógenos y ambientales, y éstos incluyen procesos tan diversos como la edad, la formación de radicales libres y el estrés oxidativo, los defectos en la bioenergética celular y la disfunción mitocondrial, lesiones del aparato de Golgi, entre otros. En un 3% de los casos se producen mutaciones genéticas relacionadas al metabolismo amiloide, como las mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora amiloide (PPA), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) [85].

I.3.1 Etiología de la enfermedad de Alzheimer

Las placas seniles, también denominadas placas amiloides, son estructuras esféricas localizadas en el espacio extracelular que desplazan las terminaciones nerviosas. Estas estructuras están formadas

por un núcleo central de péptido A β rodeado por conglomerados de terminaciones nerviosas degenerativas. El A β es un péptido pequeño (39-43 aminoácidos de longitud) generado a partir de una proteína mucho mayor, la PPA, ampliamente expresada en el cerebro. La escisión secuencial de PPA es un proceso complejo que comprende dos rutas (la α y la β), y están involucradas tres tipos de enzimas llamadas secretasas. La ruta α implica la escisión secuencial de PPA por una α -secretasa y una γ -secretasa, originando un péptido soluble con conformación de hélice α de naturaleza no amiloide, α PPA, con un importante rol en la plasticidad sináptica y la protección de las neuronas contra la excitotoxicidad. Por otro lado, la ruta β involucra la proteólisis secuencial de PPA por la enzima β -secretasa (o BACE-1), seguido de una escisión adicional por γ -secretasa, generando A β insoluble con conformación de hoja plegada β , altamente fibrilogénico y fácilmente capaz de ser depositado en placas amiloides. Debido a que las fibrillas de amiloide son estructuras resistentes a las proteasas, una vez iniciada su formación no se puede invertir este proceso, constituyendo un sitio de nucleación para una mayor agregación (Figura 18). La toxicidad de A β_{42} , la principal especie formada a través de la ruta β , se debe a la tendencia que presenta a agregarse formando oligómeros insolubles que se depositan en el cerebro en forma de placas seniles. La expresión y actividad de la enzima β -secretasa incrementa con el aumento de la edad, contribuyendo a una mayor incidencia de demencia en ancianos. Varias investigaciones han sugerido que la sobreproducción de A β produce efectos tóxicos en las neuronas conduciendo a la disfunción sináptica, formación de NFTs y, eventualmente, pérdida neuronal [84].

Si bien la hipótesis amiloide postula que la agregación excesiva y crónica de A β , desencadena una cascada patogénica que conduce a la fisiopatología de la EA [84], en un modelo de ratón se ha observado que las placas amiloides también se asocian con alteraciones neuronales leves del envejecimiento normal y no necesariamente se correlacionan con el grado de deterioro cognitivo [85]. Esto sugiere una independencia de la toxicidad de A β , asumiendo que los oligómeros solubles de A β o la agregación de prefibrillas son el hecho principal responsable de la neurotoxicidad [85]. Otros estudios han demostrado que la distribución de la proteína tau se corresponde mejor con la severidad clínica de la EA [86].

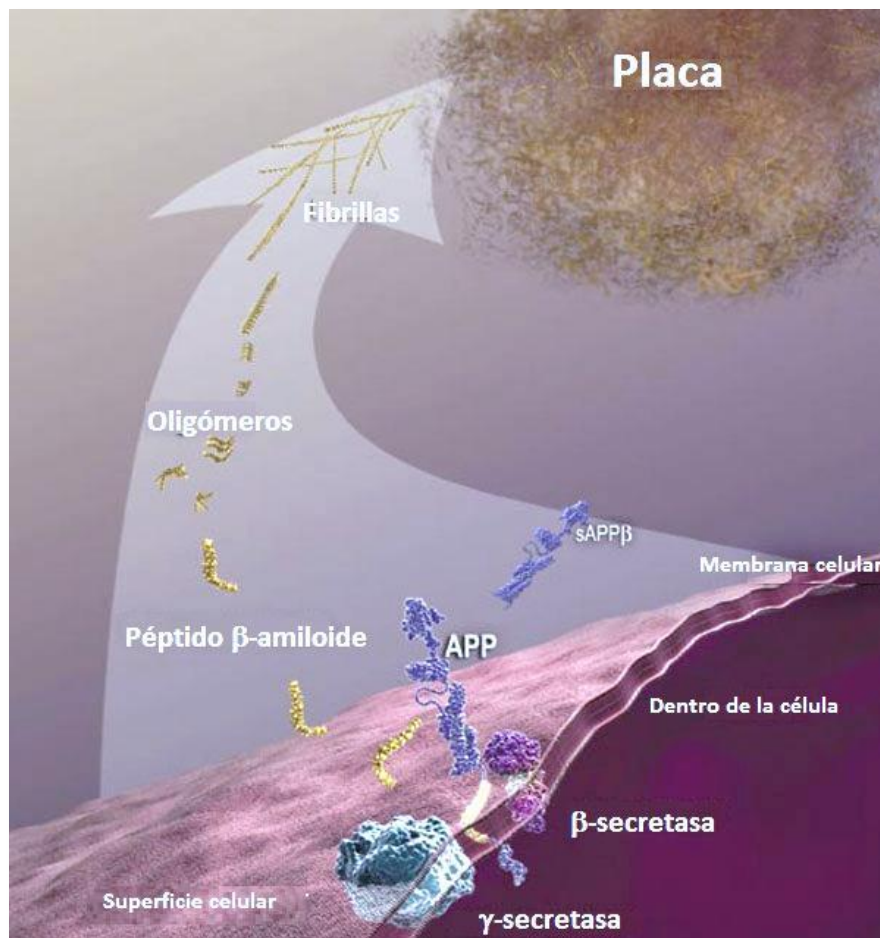


Figura 18. Cascada Amiloide. Formación de la placa amiloide

El degeneramiento neurofibrilar en pacientes con EA se caracteriza por la presencia de NFTs compuestos principalmente por proteína tau fosforilada en el citoplasma de las neuronas. Esta proteína estabiliza los microtúbulos, mantiene la forma neuronal y participa en el transporte axonal. En la neurona sana, se une a microtúbulos mediante mecanismos enzimáticos de fosforilación y defosforilación; en cambio, si la proteína no es defosforilada no se une a microtúbulos adecuadamente y se polimeriza en filamentos que forman los NFTs dentro de la neurona (Figura 19). La fosforilación anómala excesiva y la posterior agregación en ovillos intracelulares conduce a disfunción del transporte axonal, alteraciones sinápticas, activación de la microglía y los astrocitos, pérdida neuronal progresiva asociada a deficiencias múltiples en los neurotransmisores y fallo cognitivo [87,88].

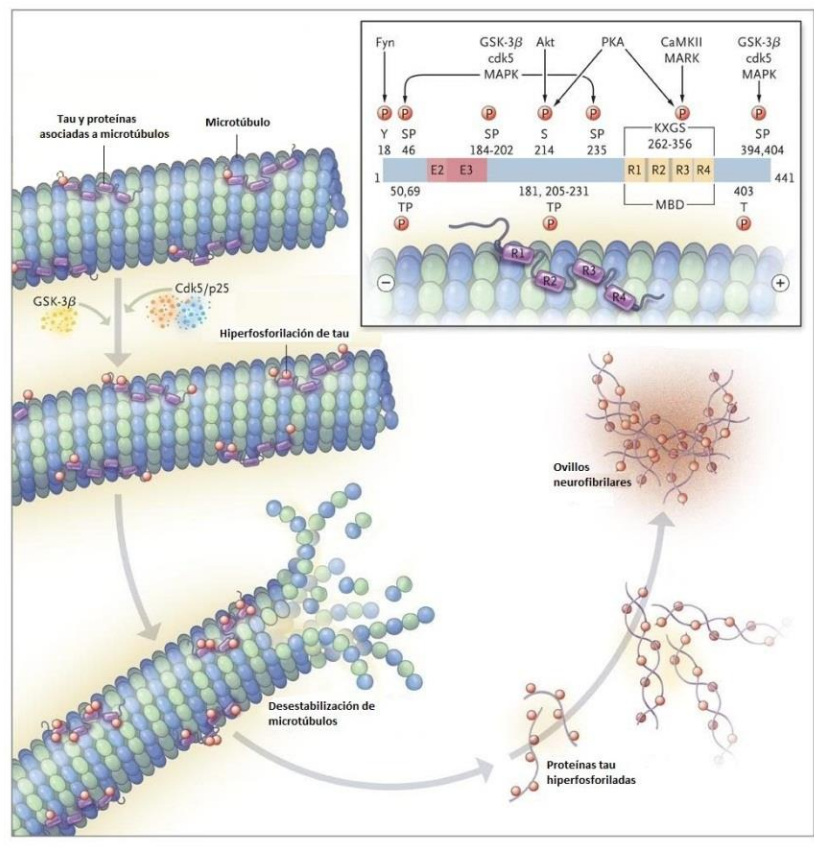


Figura 19. Desintegración de microtúbulos en la EA. Rol de la proteína tau

Los pacientes con EA presentan además alteraciones de la transmisión nerviosa de los sistemas colinérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, dopaminérgico y noradrenérgico. Específicamente el sistema colinérgico cumple un rol esencial en los procesos de aprendizaje y memoria, y la disfunción de este proceso está estrechamente relacionada con la patología y la evolución de la enfermedad [87]. Por lo tanto, la hipótesis colinérgica postula que la restauración de la neurotransmisión colinérgica es una estrategia útil para mejorar la disponibilidad de acetilcolina (AC) sináptica y el deterioro de la memoria en pacientes con EA. Bajo este principio se promovió la utilización de inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), la cual degrada por hidrólisis el neurotransmisor AC (Figura 20). La inhibición de esta enzima conduce a un aumento de la concentración del neurotransmisor y a la mejora del déficit colinérgico [84].

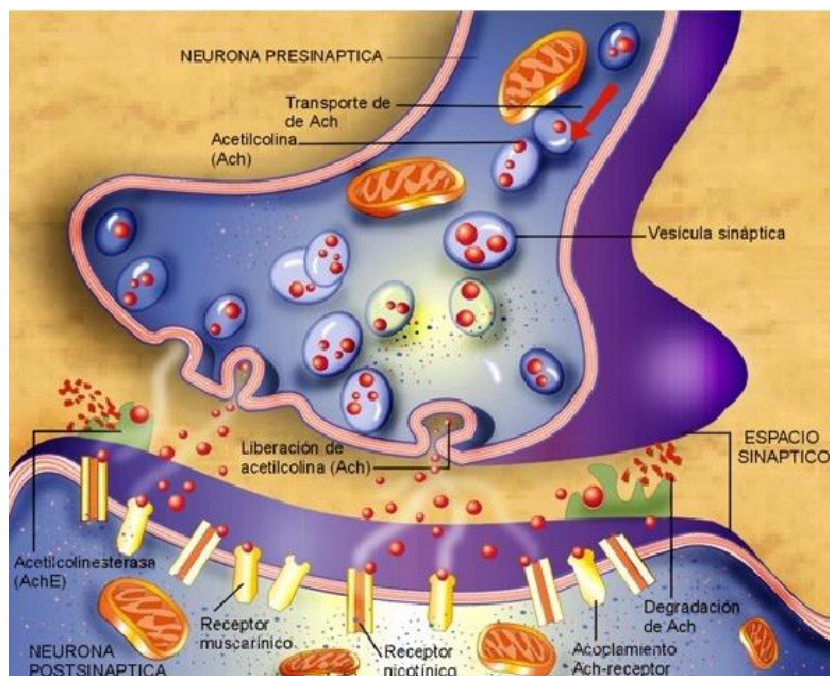


Figura 20. Sinapsis colinérgica

1.3.2 Rol de las colinesterasas en la enfermedad de Alzheimer

La enzima ACE (EC 3.1.1.7) pertenece a la súper familia de proteínas α/β hidrolasas. Su principal función fisiológica es la rápida hidrólisis de la AC en la sinapsis y unión neuromuscular, lo que resulta en la terminación del impulso nervioso. La estructura tridimensional de la ACE ha sido determinada por primera vez en *Torpedo californica* (*Tc*) en 1991. Esta enzima contiene dos sitios de unión: el sitio activo catalítico (CAS, *catalytic active site*) situado en el fondo de una profunda y estrecha cavidad, y el sitio aniónico periférico (PAS, *peripheral anionic site*) ubicado en la entrada de la misma cavidad. En el CAS, donde se produce la hidrólisis de la AC, hay cuatro subsitios principales: el “sitio esterático”, el “agujero oxianiónico”, el “bolsillo acilo” y el “subsitio aniónico”. El “sitio esterático” contiene la maquinaria catalítica de la enzima, que depende de la tríada catalítica Ser200, His440, Glu327. El “agujero oxianiónico” lo constituyen los residuos Gly118, Gly199 y Ala201, y son los responsables de estabilizar el intermediario de AC formado durante la hidrólisis por interacciones puente de hidrógeno. El “bolsillo acilo” ubicado en el fondo de la cavidad está formado por los residuos Phe288 y Phe290, y se cree que su rol es limitar la dimensión de los sustratos que puedan ingresar al CAS. El “subsitio aniónico” incluye Trp84, un residuo clave para la interacción con el grupo amonio cuaternario del sustrato AC y otros ligandos a través de la interacción π -catión, situado cerca de la parte inferior de la cavidad. Además, este

subsitio contiene otro residuo aromático, Phe330, también implicado en dicha interacción [88-89]. La Figura 21 representa los distintos subsitios descritos.

Por otra parte, el PAS, no es un área bien definida y es variable entre las ACEs. En *Tc* está constituido por los residuos aromáticos y carboxílicos Asp72, Tyr70, Tyr121, Trp279 y Phe290. Entre estos residuos de aminoácidos, el Trp279 es un residuo clave, responsable de la función de adhesión de la ACE. El PAS se une al sustrato transitoriamente como el primer paso del proceso catalítico, mejorando la eficacia catalítica a través de la unión al sustrato en su trayecto hacia el sitio activo [88,89] (Figura 21).

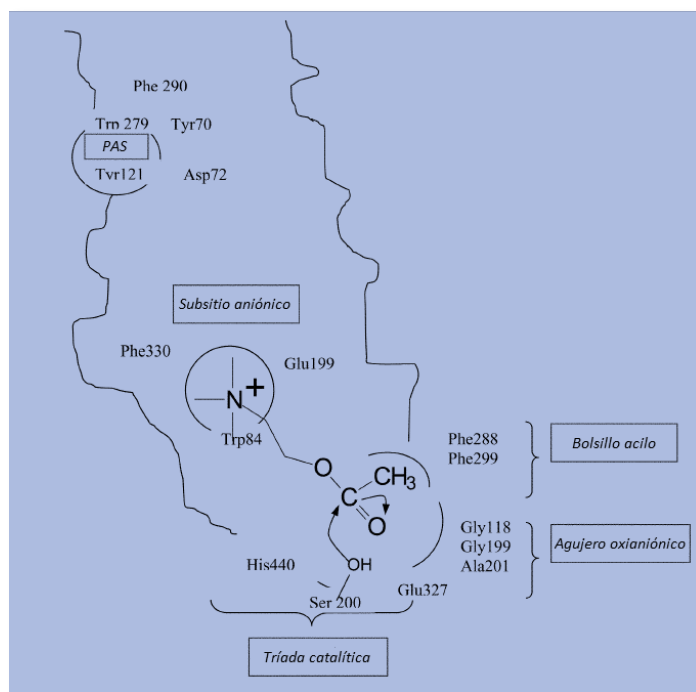


Figura 21. Los sitios de unión en la cavidad de ACE de *Torpedo californica*

Además de ACE, otro tipo de colinesterasa es butirilcolinesterasa (BuCE, EC 3.1.1.8). La estructura de BuCE humana (*HuBuCE*) es similar a la de *TcACE* con lo cual, la tríada catalítica consiste en Ser198, His438, Glu325. BuCE, sin embargo, carece de seis de los catorce residuos aromáticos presentes en ACE que bordean la cavidad hacia el sitio activo. Mientras que en ACE el espacio disponible para la unión del sustrato está restringido por la presencia de dos grupos aromáticos (Phe288 y Phe299) cuyas cadenas laterales sobresalen hacia el canal, en BuCE, en cambio, éstos fueron reemplazados por dos residuos de aminoácidos alifáticos, Leu286 y Val288, creando un mayor espacio para la unión de

sustratos más voluminosos. Esto justifica que BuCE pueda hidrolizar tanto AC como butirilcolina (BC), mientras que ACE hidroliza sólo AC [90].

La terapia colinérgica para la EA inicialmente se basó en la inhibición de ACE por ser la principal enzima implicada en la hidrólisis de AC en el cerebro normal. Sin embargo, AC también es sustrato de BuCE como se dijo anteriormente. El rol de BuCE en cerebros normales, envejecidos y/o enfermos se ha mantenido en gran medida desconocido, y durante mucho tiempo ha habido poco interés en el diseño, síntesis y desarrollo de inhibidores selectivos de BuCE, excepto en la industria agrícola donde los inhibidores de BuCE se han utilizado como insecticidas [90]. En los últimos años surgieron evidencias que afirman que BuCE presenta funciones específicas. En el transcurso de la EA, la actividad ACE disminuye en el hipocampo y la corteza cerebral, a valores muy inferiores de los normales. Por el contrario, la actividad de BuCE aumenta continuamente hasta un 90% a medida que transcurre la enfermedad. Es probable que, debido a estas alteraciones en la proporción de ACE/BuCE en la etapa avanzada de la enfermedad, BuCE reemplace a ACE en la hidrólisis de AC, convirtiéndose en otro potencial blanco en la terapia de la EA [87,91].

Varios estudios han sugerido que la actividad aumentada de colinesterasas en pacientes con Alzheimer no sólo provoca la disminución de los niveles de AC en el cerebro mediante un proceso catalítico, sino también es responsable de “acciones no colinérgicas” involucradas en la actividad pro-agregante del péptido A β . La interacción del péptido con el PAS de la ACE acelera significativamente la agregación del péptido tóxico como consecuencia de la catálisis de cambios conformacionales en las fibrillas del péptido A β hacia la hoja β . Por lo tanto, aquellos inhibidores que se unan al PAS de la enzima disminuirán la proporción de agregación del péptido, facilitando la disolución del mismo. Esta estrategia representa una nueva área de investigación para el tratamiento de la EA basada en ambas hipótesis, la colinérgica y la amiloidea, utilizando inhibidores que se unan tanto al CAS como al PAS. En los últimos años, diferentes grupos de investigación han centrado sus estudios en el diseño, síntesis y evaluación de agentes duales inhibidores de ACE como posibles fármacos [85,87,88,90,91].

Al igual que ACE, BuCE se asocia con las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares. Estudios realizados sobre cultivos de tejidos en presencia de BuCE y el péptido A β , demostraron un incremento notable de neurotoxicidad del péptido A β . Este hecho sugiere que, inhibidores específicos de BuCE no sólo mejoran la cognición, a través del aumento en la concentración de AC, sino también reducen los productos de hidrólisis tóxicos. Es posible que los agentes terapéuticos capaces de inhibir tanto ACE y

BuCE proporcionen beneficios adicionales en la EA, no sólo por la mejora en la transmisión colinérgica, sino también por retardar el proceso patológico de la enfermedad [86].

1.3.3 Inhibidores de colinesterasa en la terapia de la enfermedad de Alzheimer

El hallazgo de moléculas inhibidoras de enzimas constituye un aspecto importante en el proceso de descubrimiento de un fármaco. Las enzimas son esenciales para la vida humana ya que participan en la mediación de los procesos, incluyendo el metabolismo, la transducción de la señal celular y el desarrollo del ciclo celular. El mal funcionamiento de estos sistemas bioquímicos a menudo conduce a enfermedades como consecuencia de la disfunción, sobreexpresión, o hiperactivación de las enzimas implicadas. La comprensión de las enfermedades a nivel molecular ha proporcionado varios inhibidores de enzimas [91].

Una de las principales causas de la pérdida de memoria en pacientes con enfermedad de Alzheimer es la deficiencia del neurotransmisor AC en el cerebro. La mejora de los niveles del neurotransmisor es uno de los enfoques más eficaces para el tratamiento de esta enfermedad [92,93]. La mayoría de los medicamentos actualmente disponibles para el tratamiento de la EA se basan principalmente en la terapia con inhibidores de ACE (iACE) que aumentan la acción fisiológica de la AC.

Cuatro fármacos fueron aprobados por la FDA, **tacrina**, **donepecilo**, **rivastigmina** y **galantamina** (Figura 22); sin embargo, su utilidad clínica es limitada en gran parte debido a los efectos adversos periféricos derivados de la activación excesiva de los sistemas colinérgicos, tales como confusión, alucinaciones, cambios repentinos en el comportamiento, náuseas, entre otros. Tacrina y donepecilo, ambos de origen sintético, fueron los primeros fármacos aprobados para el tratamiento de la pérdida cognitiva en los años 1993 y 1996, respectivamente. Si bien tacrina proporcionó una mejora cognitiva en 5-40% de pacientes con síntomas de EA leve a moderado después del tratamiento, fue retirada del mercado debido a su hepatotoxicidad, reacciones adversas gastrointestinales y baja biodisponibilidad por vía oral [94]. Por otro lado, donepecilo presenta mejores propiedades que tacrina, con menor toxicidad y mayor selectividad para ACE. No produce hepatotoxicidad, y tiene escasos efectos secundarios, todos ellos relacionados con el sistema gastrointestinal.

Rivastigmina fue aprobada en el año 2000, diseñada a partir de la estructura de fisostigmina, un alcaloide natural iACE. Inhibe ambas colinesterasas, ACE y BuCE, con similar afinidad y no provoca daño hepático, causando efectos secundarios colinérgicos como náuseas y vómitos [84,89].

Galantamina, un alcaloide natural obtenido por primera vez a partir de *Galanthus* spp., fue aprobada en el año 2001. Es un iACE relativamente selectivo, y presenta acción prolongada, con menor actividad inhibitoria de BuCE y algunos efectos secundarios gastrointestinales.

Por otra parte, **huperzina A** (Figura 22), un alcaloide aislado por primera vez de *Huperzia* spp., es un iACE comercializado en China desde el año 1994, como suplemento dietético para incrementar la memoria y tratar los síntomas de EA, pero aún no fue aprobado por la FDA. Este alcaloide ha demostrado ser un inhibidor selectivo y potente de ACE, con capacidad de modificar el metabolismo de PPA hacia el proceso no amiloidogénico vía α -secretasa [89].

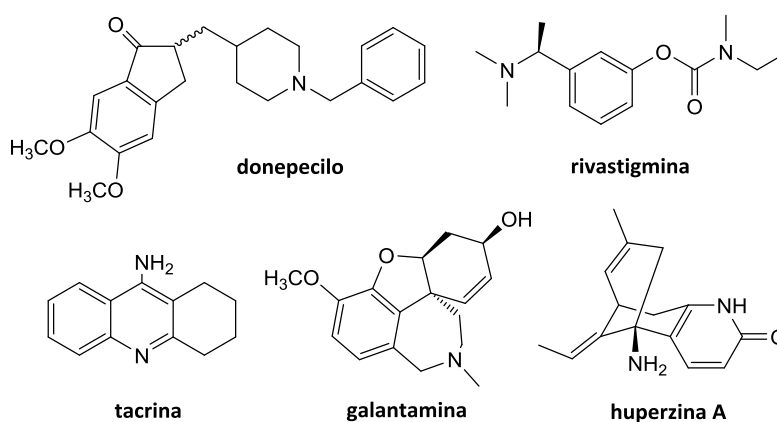


Figura 22. Fármacos iACE de origen natural y sintético

El uso de inhibidores de colinesterasas ofrece una estrategia beneficiosa tanto para el tratamiento de los síntomas psiquiátricos como los conductuales; sin embargo no hay evidencia de la superioridad de un agente terapéutico frente a otro respecto al resultado cognitivo, conductual o funcional. Varios agentes dirigidos al tratamiento de la EA actualmente se encuentran en ensayos clínicos aunque el porcentaje que llega con éxito a ser postulado como fármaco es muy bajo, característica común para los medicamentos que tienen como diana terapéutica el cerebro [84].

1.3.4 Inhibidores de colinesterasa de origen natural

Teniendo en cuenta que la mayoría de los fármacos aprobados para la EA se encuentran relacionados con un compuesto de origen natural, varios grupos de investigación han centrado sus estudios en estructuras naturales como fuentes potenciales de nuevos y más eficientes iACE [95]. Estos estudios condujeron al descubrimiento de un importante número de metabolitos secundarios, caracterizados por su capacidad para inhibir la ACE. Por otro lado, el hecho de que un número

significativamente relevante de trabajos de investigación ha sido registrado en este campo en las últimas décadas, puede ser claramente atribuido al desarrollo de métodos colorimétricos que permiten una detección rápida y fácil de un gran número de muestras. Entre los PNs, los alcaloides se consideran candidatos prometedores para su uso en el tratamiento de la enfermedad. Dado que estas estructuras contienen nitrógeno, se unen al sitio activo de ACE mediante la interacción del nitrógeno cargado positivamente con los residuos del CAS actuando como inhibidores competitivos del sustrato natural (AC). El sitio de unión periférico de ACE, permite que la enzima sea inhibida por otros compuestos diferentes a los alcaloides, principalmente terpenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos, que interactúan con residuos no polares presentes en el PAS.

Los alcaloides de tipo isoquinolina de la familia Amaryllidaceae han sido ampliamente reportados como iACE [89,96]. El aislamiento de galantamina estimuló a la investigación fitoquímica de otros géneros de la familia Amaryllidaceae, con el fin de obtener compuestos con la misma actividad biológica. Un estudio de la especie *Narcissus* spp. condujo al descubrimiento de alcaloides iACE con estructuras similares a galantamina, siendo los más activos **sanguinina**, **11β-hidroxisgalantamina** y **11α-hidroxisgalantamina**, con valores de $IC_{50} = 0,10, 1,61$ y $9,01 \mu M$, respectivamente. De la misma especie se obtuvieron otros alcaloides con esqueleto similar a licorina aunque mostraron efectos anti-ACE más débiles, siendo el de mayor actividad inhibitoria **assoanina** ($IC_{50} = 3,87 \mu M$) (Figura 23) [89].

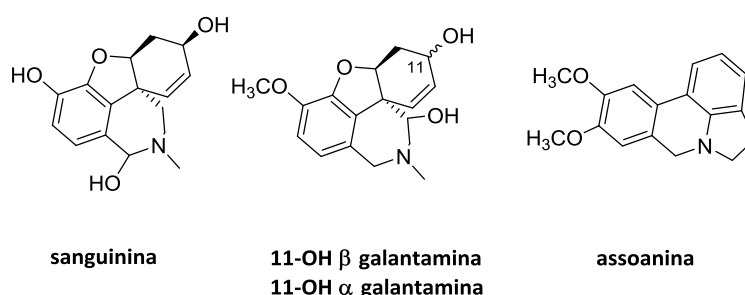


Figura 23. Alcaloides aislados de la familia Amaryllidaceae con potente actividad anti-ACE

Los alcaloides esteroidales se encuentran en un número relativamente pequeño de familias de plantas tales como Buxaceae, principalmente en los géneros *Buxus* y *Sarcococca*. El género *Sarcococca* presenta alcaloides esteroidales con sustituyentes mono- o dimetilamino en la posición C-3 y/o C-20 del esqueleto esteroidal. Varios alcaloides de este género han sido informados por presentar actividad anticolinesterasa, con valores de IC_{50} entre $0,5$ y $249 \mu M$ para ACE, siendo **(+)-phulchowkiamida A** el más

activo ($IC_{50} = 0,5 \mu M$); mientras que el rango de inhibición de BuCE fue de 0,3 a 200 μM , siendo **hookerianamida I** el de menor IC_{50} (0,3 μM). A pesar de que el rango de inhibición es similar para ambas enzimas, estos tipos de alcaloides son, en general, selectivos a BuCE. La selectividad puede ser explicada teniendo en cuenta que la cavidad de BuCE es mayor respecto de la de ACE, como se dijo anteriormente, permitiendo difundir más fácilmente a este tipo de alcaloides más voluminosos [84] (Figura 24).

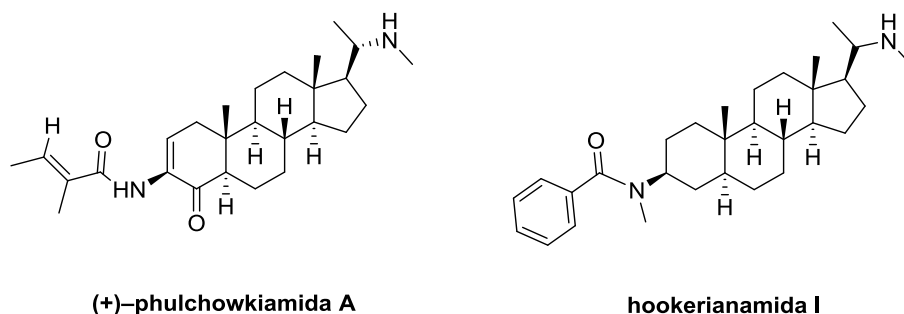


Figura 24. Alcaloides esteroidales anti-ACE y anti-BuCE

Dentro de los triterpenoides, el **ácido glicirretínico** aislado de la raíz de *Glycyrrhiza uralensis* (Fabaceae), fue utilizado como material de partida para el desarrollo de inhibidores selectivos. Se prepararon 36 derivados semisintéticos (ésteres, ésteres de aminoácidos, amidas, y derivados con restos voluminoso en la posición C-30) mediante modificaciones de las posiciones C-3 y C-30 de la estructura triterpénica. La determinación de la actividad inhibitoria de colinesterasas mostró que la mitad de los análogos inhibieron tanto ACE como BuCE con buenos valores de constantes de inhibición, otro parámetro utilizado para cuantificar la actividad enzimática ($K_i = 5,4$ a 41,8 μM). En particular dos de éstos, uno con un grupo 1,3-diaminopropil y otro, con un grupo 1H-benzotriazolil, inhibieron BuCE selectivamente con valores de $K_i = 5,43$ y 9,81 μM , respectivamente [60] (Figura 25).

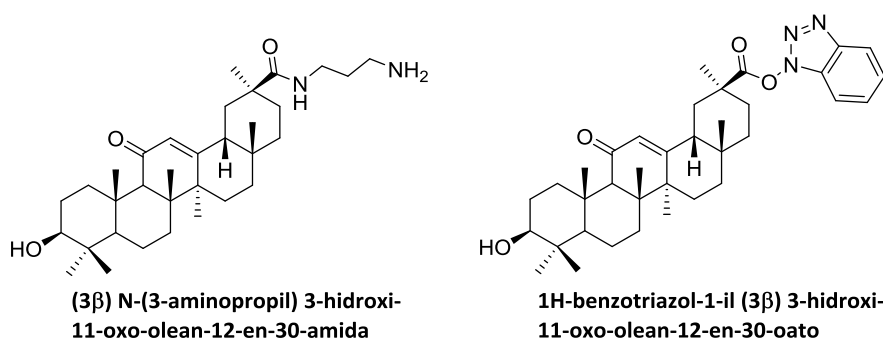


Figura 25. Estructuras de derivados glicirriténicos selectivos frente a BuCE

Estudios de *docking* para estos dos análogos, revelaron interacciones de cada uno de ellos con el sitio activo de BuCE, lo que explica la inhibición de la enzima. Estos estudios demostraron también que ambas estructuras no ensamblaban correctamente en la cavidad de ACE, justificando la selectividad BuCE/ACE observada.

En el curso de esta tesis, se aislaron alcoholes triterpénicos pentacíclicos con esqueleto lupano, que presentaron moderada actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas. El interés por el incremento de la actividad biológica llevó a la obtención de derivados semisintéticos, mediante diferentes estrategias químicas, a partir de estas estructuras naturales. Una vez más, la naturaleza podría contribuir al descubrimiento de fármacos ofreciendo como herramienta las *estructuras privilegiadas* de los PNs, como compuestos líderes para la obtención de quimiotecas bioactivas.

Capítulo II

Objetivos

La búsqueda de nuevas moléculas con actividad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE), a partir de metabolitos aislados mediante el fraccionamiento bioguiado de extractos activos de especies vegetales endémicas, que puedan significar un aporte para el desarrollo de nuevos fármacos eficaces para el tratamiento de la EA, es el objetivo general del grupo de investigación. Resultados previos obtenidos con triterpenos pentacíclicos naturales aislados de la especie vegetal *C. erinaceae* así como con análogos semisintéticos, incrementaron el interés en el estudio de estos metabolitos, planteando como hipótesis de esta tesis, que la actividad inhibitoria de colinesterasas depende de los grupos funcionales presentes en el esqueleto carbonado. A partir de esta hipótesis, el objetivo de esta tesis es la obtención de nuevos derivados cuya actividad biológica y potencial terapéutico sean mayores que los observados para los compuestos naturales de partida.

Se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar la técnica de extracción y purificación de calenduladiol a partir de la especie vegetal *C. erinaceae* recolectada en los alrededores de la ciudad de Bahía Blanca.
- Sulfatar las posiciones C-3, C-16 y/o C-30 de los derivados de calenduladiol preparados a partir de modificaciones en la cadena lateral de la estructura triterpénica.
- Esterificar los grupos hidroxilos libres de calenduladiol y de los análogos obtenidos anteriormente.
- Oxidar el/los grupo/s hidroxilo/s presente/s en lupeol, calenduladiol y sus correspondientes análogos, para la obtención de compuestos carbonílicos triterpénicos. Preparar oximas utilizando como sintones los compuestos carbonílicos sintetizados.
- Invertir la configuración del C-3 y/o C-16 de lupeol y calenduladiol, mediante la reducción de las cetonas correspondientes.
- Reducir las oximas obtenidas a las correspondientes aminas.
- Caracterizar las nuevas entidades moleculares en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural.
- Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria frente a ACE y BuCE determinando su IC_{50} , o bien el PI a una determinada concentración, de todos los compuestos obtenidos.
- Estudiar la cinética enzimática en presencia de los inhibidores semisintéticos más activos. Evaluar el tipo de inhibición por el cual estos análogos interaccionan con ACE y BuCE.
- Realizar el *docking* con los inhibidores más activos para estudiar la interacción de cada uno de ellos con las enzimas.

- Analizar la correlación entre los cambios estructurales realizados sobre los triterpenos naturales y el aumento o disminución de la inhibición enzimática. Los resultados obtenidos a partir del estudio SAR permitirán el diseño racional de nuevos inhibidores que puedan contribuir al desarrollo futuro de nuevas fármacos para la Enfermedad de Alzheimer.

Teniendo en cuenta los antecedentes de actividad citotóxica para este tipo de estructuras, se plantea un objetivo adicional:

- Determinar la actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) de derivados seleccionados.

Capítulo III
Resultados y
discusión

III.1 Antecedentes en la búsqueda de inhibidores de ACE de la especie *Chuquiraga erinaceae*

En la investigación de metabolitos secundarios bioactivos, en particular, inhibidores de las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE), de origen natural y/o semisintético, la biodiversidad de la región de Bahía Blanca ofrece una fuente natural útil para el hallazgo de nuevas moléculas bioactivas. En el marco de una tesis doctoral realizada en el grupo de investigación, fue seleccionada para su estudio la especie vegetal *Chuquiraga erinaceae* D. Don subsp. *erinaceae*. La selección de esta especie se llevó a cabo a partir de un *screening* inicial realizado sobre los extractos obtenidos de partes aéreas de la planta [49].

A continuación se detalla una breve descripción botánica, fitoquímica y de los usos etnomedicinales de la especie vegetal. La nomenclatura científica y sinónimos fueron tomados del “Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur” [96].



Sin.: *Chuquiraga erinaceae* D. Don subsp. *mollior* Lorentz, *Chuquiraga erinaceae* D. Don var. *unguis-cati* (Ces.), Hauman, *Chuquiraga juniperina* Phil., hom. illeg., *Chuquiraga juniperina* Decne., *Chuquiraga unguiscati* Ces.

Nombre vulgar: “romerillo”, “romerito”, “falsa uña de gato”, “monte chirriador”, “ardegras”.

Descripción botánica y distribución: Arbusto endémico de 0,80 a 1,80 m de altura. Tallos robustos muy ramificados y densamente hojosos en las ramas nuevas. Las hojas son alternas aciculares rígidas y de color verde claro, de 5 a 15 mm de longitud. Las flores son amarillas con corola tubulosa y se encuentran agrupadas en capítulos dispuestos en el extremo de ramitas cortas. El número de flores por capítulo varía de 5 a 9. El involucro del capítulo es cilíndrico con varias series de brácteas. El fruto es un aquenio velludo, con papus casi tan largo como la corola. Esta especie es característica de la provincia fitogeográfica del Monte, crece desde la provincia de Jujuy hasta el norte de la provincia de Chubut. Se encuentra ampliamente distribuida en el sur de la provincia de Buenos Aires y oeste de la provincia de La Pampa. Habita en suelos arenosos o pedregosos y en terrenos salitrosos con vegetación xerófila. Florece desde noviembre hasta marzo.

Composición química: flavonoides: quercetina-3-*O*-glucósido; quercetina-3-*O*-rutinósido; canferol; canferol-3-*O*-glucósido; canferol-3-*O*-rutinósido. En un estudio comparativo con otras especies se sugirió la presencia de triterpenos pentacíclicos como lupeol, 6 β -hidroxitaraxasta-20-eno-3 β -*O*-palmitato y 6 β -hidroxitaraxasta-20-eno-3 β -*O*-acetato.

Usos etnomedicinales: las hojas se utilizan para aliviar enfermedades del estómago, hígado y riñón. También fortifica el cerebro y los nervios [97].

Otros usos: los indígenas utilizaban las ramas y hojas secas para iniciar el fuego y para hacer señales de humo debido a la facilidad con la que ardían [97].

El fraccionamiento de los extractos obtenidos a partir de la especie vegetal en estudio, guiado por el bioensayo de inhibición enzimática, condujo al aislamiento de los compuestos presentes en las fracciones activas, que resultaron ser triterpenos pentacíclicos mono-, di- y trihidroxilados. Estos metabolitos fueron identificados como lupeol (**1**), pseudotaraxasterol (**2**), taraxasterol (**3**), α -y β -amirina (**4**), calenduladiol (**5**), faradiol (**6**) y heliantriol B2 (**7**) (Figura 26), reconociendo una mayor proporción en el extracto de lupeol y calenduladiol.

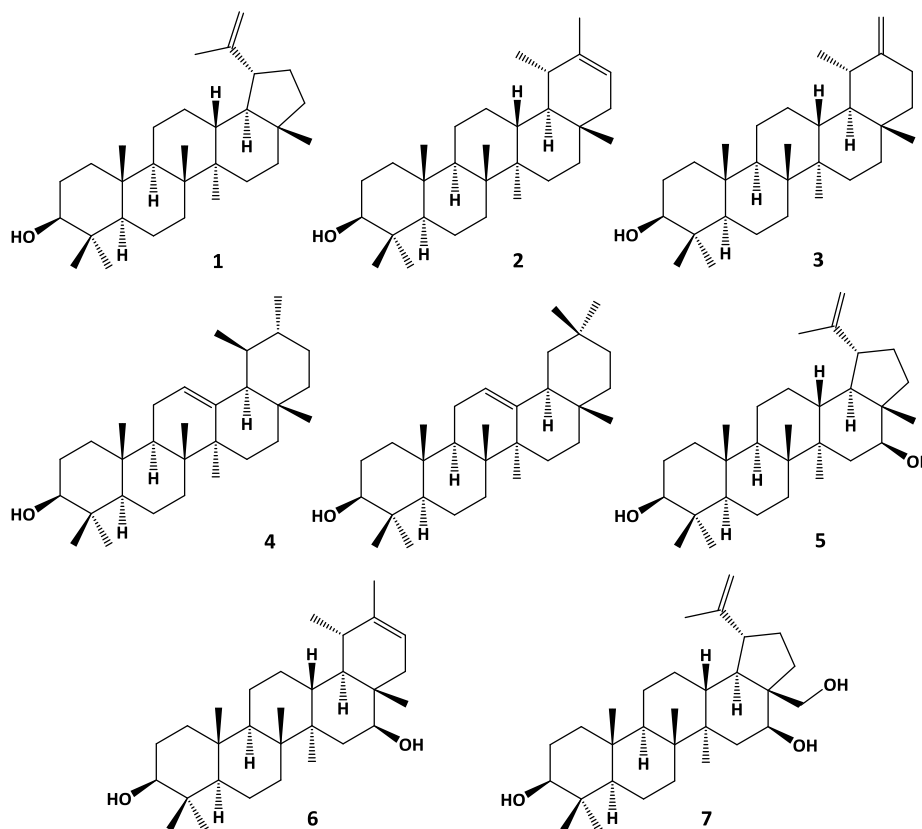


Figura 26. Triterpenos aislados de *C. erinaceae*

Los triterpenos **1** y **4-7** exhibieron inhibición de ACE en el ensayo preliminar sobre cromatografía en capa fina. Debido a la naturaleza de estos compuestos, la determinación cuantitativa de la actividad se vio dificultada por limitaciones en la solubilidad de las muestras en el medio acuoso en que se realiza

el ensayo. A pesar de esto, se pudieron registrar los porcentajes de inhibición (PI), resultando ser el más activo el compuesto **5** con un 31,2% de inhibición a 0,5 mM. Los triterpenos **6** y **7** no mostraron efecto inhibitorio en las mismas condiciones experimentales, mientras que **1** y **4** revelaron una débil actividad a 1 mM. En todos los casos fue necesario el agregado de un cosolvente orgánico (2,5% MeOH) para poder solubilizar las muestras en el buffer.

Teniendo en cuenta la escasa solubilidad de estos triterpenoides, se propuso la derivatización a compuestos más hidrofílicos, y en lo posible, más potentes como inhibidores de ACE (iACE). En ese contexto, se preparó a partir de **5**, el correspondiente derivado disulfatado (**8**) (Figura 27) y se evaluó su actividad inhibitoria. El análogo **8** fue disuelto en el buffer utilizado en el ensayo *in vitro* sin necesidad del agregado de cosolvente orgánico, lo que demuestra su mayor solubilidad en un medio acuoso en comparación con los triterpenos naturales. Los resultados indicaron que **8** incrementó su actividad inhibitoria 3 veces más respecto de su análogo desulfatado (**5**), presentando un $IC_{50} = 0,190$ mM. Observando los resultados se pudo concluir que la sulfatación mejoró no sólo la solubilidad sino la capacidad de inhibir la enzima. Este fue el primer triterpeno sulfatado reportado como iACE [59]. Asimismo, metabolitos sulfatados reportados por otros grupos de investigación (Figura 27), han recibido especial atención debido al amplio espectro de actividades biológicas que se les atribuye, tales como anti-HIV [98], inhibición de la proteína tirosina quinasa [99,100], así como antiviral [101]. Entre estas moléculas polares, los esteroides constituyen uno de los grupos más numerosos, encontrándose ampliamente distribuidos en organismos marinos. La mayor parte de ellos han sido aislados a partir de estrellas de mar y ofiuros y de algunas especies de esponjas [102]. También existen antecedentes que describen la participación de este tipo de moléculas en un gran número de procesos biológicos, incluyendo regulación hormonal, desintoxicación, reconocimiento molecular y señalización celular [103].

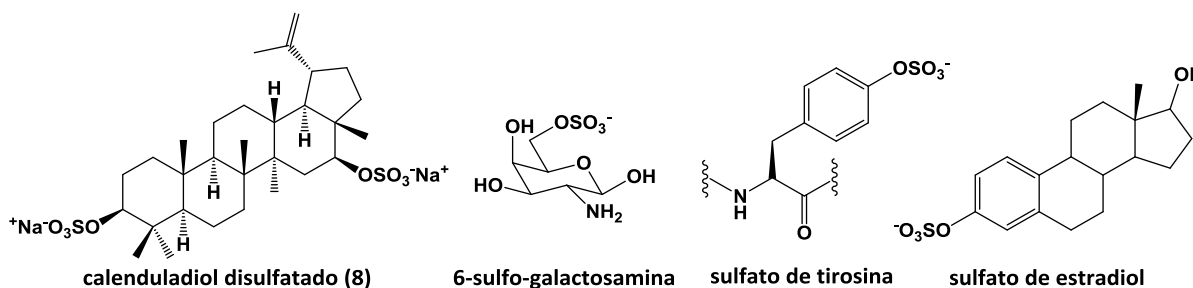


Figura 27. Ésteres sulfatados de origen natural y semisintético bioactivos

Dada la creciente información sobre la importancia de estos ésteres, existe un gran interés en la síntesis de moléculas sulfatadas. Numerosos grupos de investigación describen la preparación de

compuestos sulfatados obtenidos a partir de semisíntesis de moléculas naturales aisladas de plantas y de organismos marinos [104-108].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planteó como objetivo general de esta tesis, la obtención de análogos semisintéticos más activos como inhibidores de colinesterasas. En particular, se propuso la preparación de una quimioteca de derivados a partir de los triterpenoides naturales **1** y **5** aislados de la especie vegetal en estudio. Desde el punto de vista sintético, lupeol resultó apropiado como sintón o cabeza de serie por ser el componente mayoritario en la planta. Además, este producto natural exhibe una amplia gama de actividades biológicas que fueron presentadas en el capítulo I de esta tesis. Desde el punto de vista estructural, calenduladiol presenta un segundo grupo hidroxilo como sustituyente en C-16, además del hidroxilo en C-3 característico de los alcoholes triterpénicos, ofreciendo una estructura novedosa para ser modificada sintéticamente. Asimismo, al no estar comercialmente disponible, existen escasos antecedentes de derivados semisintéticos de este triterpeno.

III.2 Modificaciones de triterpenos pentacíclicos tipo lupano

Para la obtención de derivados semisintéticos se empleó la regla de las mínimas modificaciones, que consiste en la preparación de análogos muy parecidos al cabeza de serie, y al que se llega mediante mínimos cambios a través de reacciones sencillas, con el objetivo de que pequeñas modificaciones en la estructura química pueden provocar grandes variaciones en su actividad biológica. Estos resultados podrían ser útiles como información de los requerimientos estructurales esenciales para mantener buenos niveles de bioactividad.

El análisis del esqueleto lupano permite reconocer distintas zonas de posible interacción con la diana o receptor (Figura 28). Las modificaciones en estas regiones por semisíntesis mediante manipulaciones químicas selectivas que conduzcan a cambios en la polaridad, hidrofilia, capacidad de formación de puentes hidrógeno (donor o aceptor), impedimento estérico, etc., serán útiles para posteriores estudios SAR.

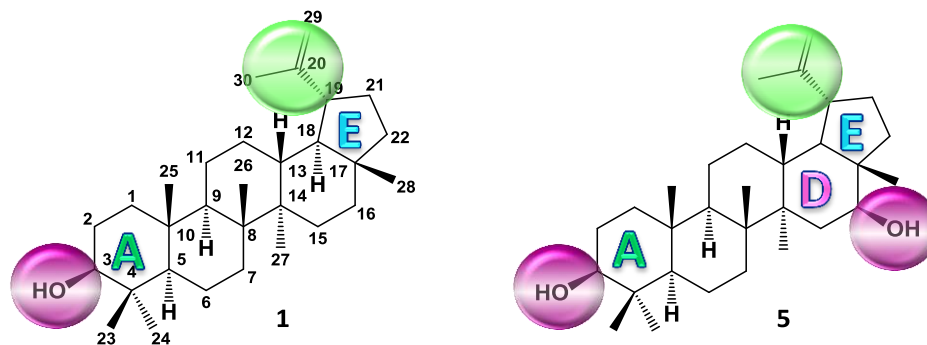


Figura 28. Blancos de modificación estructural de esqueletos tipo lupano de lupeol (**1**) y calenduladiol (**5**)

En los siguientes puntos se procederá a describir las transformaciones llevadas a cabo en los anillos *A* y *E* de lupeol (**1**) y *A*, *D* y *E* de calenduladiol (**5**). Las modificaciones químicas realizadas sobre lupeol fueron útiles tanto para optimizar las técnicas de preparación de algunos análogos para luego emplearlas sobre calenduladiol, como para comparar los resultados de actividad biológica obtenidos entre estos derivados y los provenientes de **5**.

III.2.1 Optimización de la extracción, aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

Como primera etapa de este trabajo se llevó a cabo la recolección del material vegetal. Para su identificación se contó con el asesoramiento de un botánico experimentado del Departamento de Biología de la UNS (Dra. María Gabriela Murray, Laboratorio de Plantas Vasculares) que colabora regularmente con el grupo. La recolección se realizó en el Salitral de la Vidriera de la ciudad de Bahía Blanca durante el período de floración.

Con el fin de disponer de los metabolitos secundarios en cantidades necesarias para la posterior preparación de análogos semisintéticos, se optimizó la técnica de extracción y purificación utilizada anteriormente por el grupo [49,109]. En primer lugar, las partes aéreas de la planta (800 g) fueron pulverizadas para aumentar la superficie de contacto con el solvente y posteriormente fueron sometidas a una extracción en caliente con etanol, hasta agotamiento del material vegetal. Este tipo de extracción presenta la ventaja de ser más rápida y eficiente respecto de la extracción a temperatura ambiente; sin embargo debe tenerse en cuenta que algunos metabolitos pueden presentar propiedades termo-sensibles. Mediante la comparación de los R_f de la cromatografía en capa fina de las muestras extraídas a temperatura ambiente y a temperatura de reflujo, se confirmó que el aumento de la temperatura durante la extracción no modifica las propiedades de los compuestos que constituyen el material vegetal. Esta modificación del proceso de extracción, proporcionó una importante mejora en el

rendimiento de extracto obtenido, así como también un menor tiempo de extracción (de 14 días a menos de 24 horas).



El extracto etanólico obtenido (25,0 g) fue fraccionado mediante cromatografía en columna sobre sílica de fase normal con vacío, utilizando como eluyente una mezcla de *n*-Hex:AcOEt de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 41 fracciones, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de cromatografía en capa fina. Las fracciones que contenían lupeol (**1**) (F5-F7) fueron sometidas a repetidas purificaciones



mediante cromatografía en columna sobre sílica flash obteniéndose 3,3 g (13,2%) de una mezcla enriquecida en **1** (70,0%). Por RMN de ^1H

se confirmó que los triterpenos monohidroxilados **2** (17,0%) y **4** (13,0%) acompañaban al lupeol. Los valores de R_f semejantes de estos alcoholes imposibilitó la separación de los mismos mediante esta técnica cromatográfica. Anteriormente, la obtención de **1** puro había sido posible con el empleo de sílica impregnada con AgNO_3 (5,0%) mediante cromatografía en capa fina preparativa [49]. Sin embargo, esta



técnica presenta la desventaja de bajos rendimientos (0,06%), por lo que se decidió utilizar para las posteriores reacciones de semisíntesis mezclas enriquecidas en **1**. Por otro lado, las fracciones que presentaron calenduladiol (**5**) (F25-F36) fueron purificadas mediante cromatografía usando como soporte Sephadex LH-20 (*n*-Hex: CH_2Cl_2 :MeOH) y cromatografías en columna sobre sílica flash (CH_2Cl_2 :MeOH), obteniéndose 1,2 g (4,8%) puros de **5**. Anteriormente, la purificación de este triterpeno se había logrado mediante el uso de HPLC aunque con bajos rendimientos (0,16%) [49].

III.2.2 Modificación de la cadena lateral

El incremento de la actividad inhibitoria de ACE debido a la sulfatación de calenduladiol incentivó a extender el estudio sobre el triterpeno lupano **5**, diseñando nuevos análogos bioactivos a partir de pequeñas modificaciones químicas en la cadena lateral.

III.2.2.1 Hidrogenación del doble enlace

La presencia de un doble enlace situado en la cadena lateral de la estructura triterpénica le confiere la posibilidad de generar interacciones π con la molécula diana o receptor. Su hidrogenación no sólo puede modificar esta capacidad para unirse a su receptor sino también puede alterar su conformación en el espacio. Con el fin de evaluar el efecto que tiene sobre la actividad anticolinesterasa este cambio estructural en el esqueleto lupano, se llevó a cabo la reducción del doble enlace de **5** con paladio sobre carbono al 10% (Pd-C) en atmósfera de hidrógeno, dando lugar al compuesto **9** con un 64,7% de rendimiento (Figura 29).

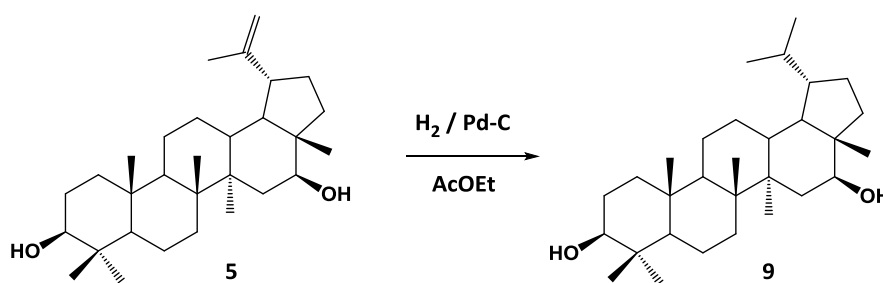


Figura 29. Hidrogenación del doble enlace

La estructura de **9** fue confirmada por sus datos espectroscópicos. En el espectro de RMN de ^1H se observó la desaparición de las señales de los protones olefínicos (H-29) (δ_{H} 4,67 y 4,55), y la aparición de dos dobletes de área 3 cada uno: a δ_{H} 0,85 ($J = 7,1$ Hz) y a δ_{H} 0,75 ($J = 5,1$ Hz) correspondientes a H-29 y a H-30, respectivamente. Asimismo, se observó en el espectro de RMN de ^{13}C el desplazamiento a mayores campos de las señales de C-20 y C-29 (δ_{C} 150,0 a 29,3 y δ_{C} 109,8 a 15,5, respectivamente).

El derivado **9** fue preparado por primera vez en el año 1964 por Baddeley y *col.* Su síntesis sirvió como estrategia para confirmar la presencia del doble enlace en la cadena lateral de calenduladiol aislado de *Beyeria leschenaultii* [110]; sin embargo, sus datos espectroscópicos no habían sido informados.

III.2.2.2 Oxidación alílica

En el año 2005, Neukirch y *col.*, publicaron la síntesis de 30-oxocalenduladiol, un aldehído α,β -insaturado con actividad antiinflamatoria [111]. Más tarde, Barroso-González y *col.*, reportaron este derivado como un agente útil para el tratamiento de la infección HIV-1, justificando que la presencia del grupo formilo en el C-30 conjugado con un doble enlace es fundamental para que este tipo de alcoholes

triterpénicos presenten esta actividad [52]. En base a estos antecedentes, resultó interesante oxidar el C-30 para dar lugar a un aldehído α,β -insaturado, y evaluar la capacidad como inhibidor de colinesterasas.

La oxidación alílica de **5**, utilizando un exceso de dióxido de selenio (SeO_2) como reactivo oxidante y calentando a reflujo, condujo al compuesto **10**. El rendimiento de la reacción fue mucho mayor (96,6%) que lo informado en bibliografía (65,0% Neukirch y 30,4% Barroso-González) (Figura 30).

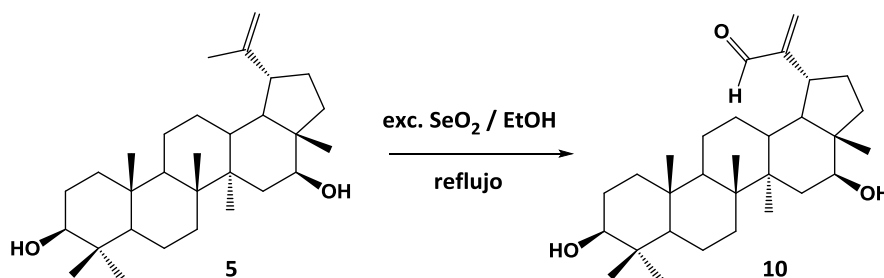


Figura 30. Oxidación alílica, obtención del aldehído

Los datos espectroscópicos del compuesto **10** coincidieron con los datos reportados en bibliografía, observándose en el espectro de RMN de ^1H la aparición de un singulete a δ_{H} 9,51 correspondiente al protón del aldehído (H-30), así como el desplazamiento químico de las señales de los protones vinílicos a campos más bajos, de δ_{H} 4,67 a 6,27 y de δ_{H} 4,55 a 5,91. Estos parámetros se repitieron en el espectro de RMN de ^{13}C : se observó una nueva señal a δ_{C} 195,0 (C-30), y el desplazamiento a campos menores de las señales de C-20 (δ_{C} 150,0 a 156,5) y C-29 (δ_{C} 109,8 a 133,4).

Por otro lado, la oxidación alílica de **5** utilizando un defecto de SeO_2 (0,5 equivalentes) condujo a la obtención de un alcohol primario (compuesto **11**) (Figura 31). Si bien el rendimiento de la reacción no fue bueno (20,2%), durante la reacción no se observó la aparición del aldehído **10**. Los datos espectroscópicos de **11** coincidieron con los datos reportados por Neukirch [111], quien sintetizó el mismo compuesto en dos pasos: primero obtuvo **10**, y por reducción del carbonilo obtuvo **11** con un rendimiento total de un 14,3%.

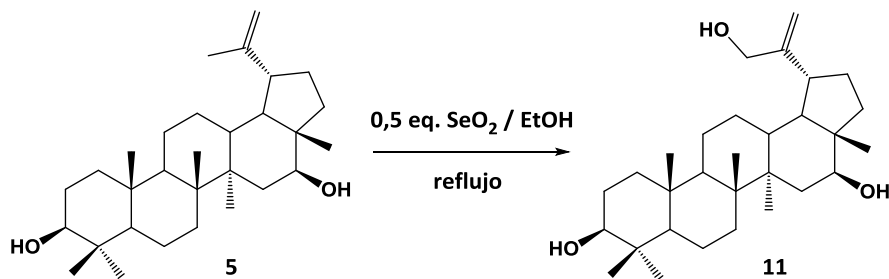


Figura 31. Oxidación alílica, obtención del alcohol primario

El análisis espectroscópico permitió confirmar la obtención de **11**, con la aparición de las señales correspondientes a los protones del metileno del C-30, caracterizadas por un sistema AB a δ_H 4,11 y 4,13 (d_{AB} , $J = 14,0$ Hz, H-30a,b) en el espectro de RMN de 1H y una señal a δ_C 65,3 correspondiente al C-30 en el espectro de RMN de ^{13}C .

III.2.2.3 Epoxidación del doble enlace

Los epóxidos son grupos funcionales muy reactivos por estar formados por ciclos tensionados, con capacidad de interactuar con la molécula diana mediante enlaces covalentes muy difíciles de romper. Con el fin de evaluar la introducción de este grupo funcional en este tipo de moléculas, una solución de **5** en CH_2Cl_2 fue tratada con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB) en presencia de bicarbonato sódico, obteniéndose el derivado epoxidado **12** con un rendimiento moderado (57,5%) (Figura 32).

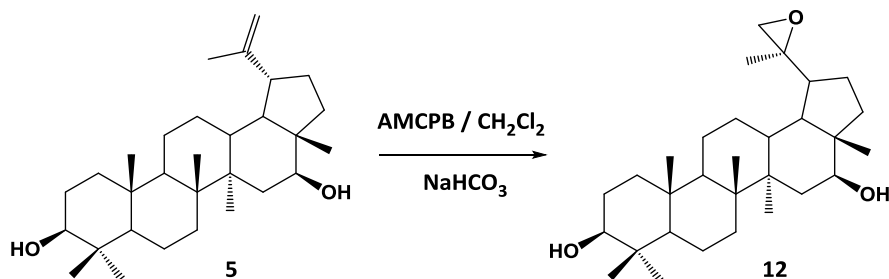


Figura 32. Epoxidación del doble enlace

El análisis espectroscópico del compuesto **12** permitió confirmar su estructura. En el espectro de RMN de 1H aparecieron dos dobletes correspondientes a los protones geminales del metileno del epóxido centrados en δ_H 2,60 y 2,56 ($J = 4,8$ Hz). Las señales más características observadas en el espectro de RMN de ^{13}C fueron a δ_C 60,1 (C-20) y a δ_C 57,1 (C-29) desplazadas a campos altos respecto del triterpeno de partida **5**.

La determinación estereoquímica de este tipo de moléculas fue estudiada por Gutiérrez-Nicolás y *col.* quienes utilizaron la técnica de dicroísmo circular vibracional (VCD) para establecer la configuración absoluta del C-20 de los 20,29-epoxilupanos derivados obtenidos por semisíntesis. La configuración determinada confirmada por difracción de rayos X fue para todos los derivados 20-(S) [112] (Figura 33).

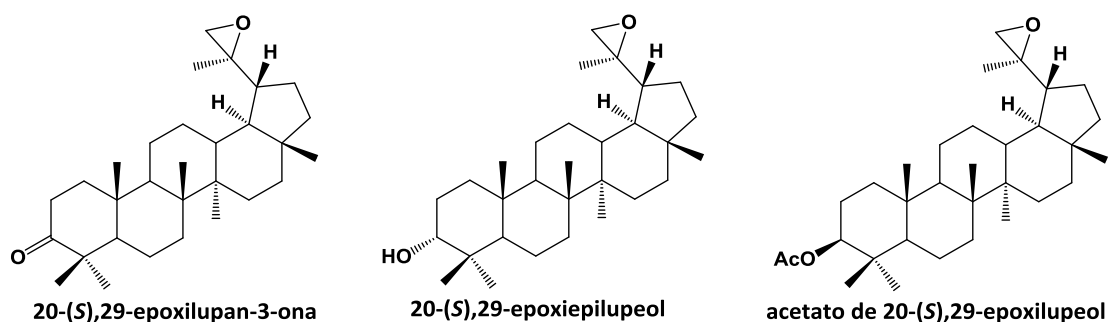


Figura 33. 20,29-epoxilupanos derivados con configuración 20-(S)

Por comparación de los datos espectroscópicos reportados para estos derivados con los obtenidos para el compuesto **12**, fue posible asignar la configuración absoluta del C-20 de calenduladiol epoxidado. La concordancia en los desplazamientos químicos determinó para el C-20, la configuración absoluta (S). Este hecho demuestra la estereoselectividad de esta reacción para este tipo de moléculas.

A continuación se presenta el desarrollo de una quimioteca de derivados sulfatados que fueron preparados a partir de los análogos obtenidos anteriormente por modificación de la cadena lateral de calenduladiol. Asimismo se presentan los resultados de actividad y cinética enzimática de estos derivados.

III.2.3 Sulfatación de alcoholes triterpénicos

Al comienzo de este capítulo se planteó la sulfatación como estrategia para mejorar la solubilidad de las moléculas en el medio acuoso del ensayo de inhibición. Si bien es una transformación simple que ocurre en un solo paso, la presencia de este grupo funcional altera drásticamente las propiedades fisicoquímicas de la molécula. En general, la presencia de sulfatos libres (o sus sales), genera una alta polaridad en la molécula y su consiguiente disolución en agua, dificultando de esta manera su aislamiento y purificación [113]. Asimismo, los ésteres sulfatos son muy lábiles en condiciones ácidas y calor, lo que limita la manipulación química de otros grupos funcionales en presencia de dicho grupo

[100]. Teniendo en cuenta estas dificultades, la introducción del grupo sulfato debe plantearse en la última etapa de una ruta sintética, siempre que sea posible. Este hecho fue tenido en cuenta para la preparación de los análogos sulfatados presentados en esta tesis.

En el punto siguiente se introduce a cerca de la reacción de sulfatación. Luego se describen los resultados obtenidos en la búsqueda de la optimización de la sulfatación de alcoholes triterpénicos y se detalla la preparación de derivados mono-, di- y trisulfatados.

III.2.3.1 Introducción a los métodos de sulfatación

Existen diferentes reactivos y condiciones de reacción para la síntesis de moléculas orgánicas sulfatadas, entre los cuales se destacan ácido sulfúrico [114], ácido sulfúrico y *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida (DCC) [115], ácido clorosulfúrico [116], etc. Sin embargo, la gran reactividad de estas sustancias promueve la formación de productos secundarios indeseados.

Una manera de evitar estos inconvenientes es utilizar trióxido de azufre (SO₃) en forma de complejo. El SO₃ se combina con bases de Lewis, formando compuestos de coordinación, conocidos como aductos o complejos (Figura 34). Las bases empleadas pueden ser aminas o amidas terciarias, éteres y tioéteres. La reactividad del complejo es inversamente proporcional a la fuerza de la base utilizada, haciéndolo menos reactivo y por lo tanto más selectivo cuando se usa una base fuerte, logrando controlar las condiciones de reacción para obtener el producto deseado. Estos aductos son fáciles de sintetizar, sólidos a temperatura ambiente, y estables a altas temperaturas [114].

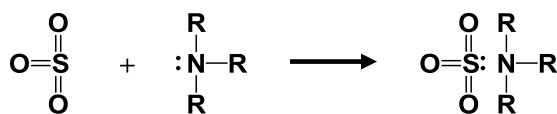


Figura 34. Formación del complejo de sulfatación (SO₃·NR₃)

Los tiempos de reacción en las sulfataciones dependen, en mayor medida, de la temperatura del medio de reacción. Anteriormente, las sulfataciones se realizaban a temperatura ambiente por lo que se requerían largos períodos de tiempo para que la reacción transcurra; más tarde esta dificultad se evitó trabajando a reflujo. El uso de solventes ternarios también favorece la disminución de los tiempos de reacción, tal como se reportó para la sulfatación de colesterol y lanosterol, observándose la transformación cuantitativa en sólo 20 minutos de reacción, utilizando SO₃·Py, en una mezcla de benceno, piridina y anhídrido acético a 60 °C [117]. Actualmente se utilizan complejos de SO₃ con aminas

en solventes altamente polares, como DMF o DMA, que permitan trabajar a temperaturas más altas [113].

Para la sulfatación de pequeñas moléculas orgánicas con múltiples hidroxilos, teóricamente se deberían aplicar las mismas condiciones de reacción que las utilizadas para la obtención de un compuesto monosulfatado, aumentando la proporción de agente sulfatante. Sin embargo, a medida que el número de hidroxilos incrementa, la sulfatación se dificulta progresivamente debido al carácter negativo que adquiere la molécula por cada sulfato presente en la misma. Esto provoca una disminución en los rendimientos de la reacción dando lugar a numerosos subproductos, y largos tiempos de reacción aun trabajando a altas temperaturas [113]. En este punto, varios autores coinciden que para obtener mejores rendimientos es necesario utilizar un exceso de reactivo sulfatante y, en general, altas temperaturas, mientras que los tiempos de reacción pueden variar dependiendo de la naturaleza del sustrato [105,106,118].

Durante el desarrollo de otra tesis doctoral dentro del grupo de investigación, se probó la sulfatación de alcoholes triterpénicos monohidroxilados (**1-4**) en DMF (ver Figura 26), utilizando el complejo sintético trióxido de azufre-trietilamina ($\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) a 60 °C [49]. En todos los casos, la sulfatación no se completó a pesar de varias horas de reacción (alrededor de 50 horas). La presencia de dos grupos metilos en C-4 adyacentes al hidroxilo en posición 3 β en estos triterpenos naturales, podrían ser los responsables del bajo rendimiento de la reacción debido al impedimento estérico de estos grupos. Asimismo, se debe considerar el grupo sulfato, muy voluminoso, comparable a un grupo *t*-butilo [119].

Posteriormente, se utilizó el complejo comercial trióxido de azufre-trimetilamina ($\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_3$) para sulfatar **5**. La reacción se llevó a cabo en DMF, a 90 °C y utilizando 6 equivalentes de complejo. Al cabo de 18 horas se observó la formación del derivado disulfatado **8** con un 90,0% de rendimiento [59]. El aumento de la temperatura favoreció la obtención del análogo con mejores rendimientos; sin embargo los tiempos de reacción continuaron siendo largos. Esta limitación llevó a la búsqueda de una técnica alternativa para este tipo de síntesis que brinde resultados rápidamente, sea eficiente y aplicable a moléculas polihidroxiladas.

III.2.3.2 Introducción al uso del microondas

La síntesis orgánica asistida por microondas se caracteriza por la aceleración de la reacción producida como consecuencia de la velocidad de calefacción, la cual no puede ser reproducida mediante

calefacción clásica y origina una disminución notable de los tiempos de reacción. Este hecho evita la descomposición térmica de los reactivos o productos sensibles y permite la obtención de mayores rendimientos en condiciones de reacción más suaves. Las reacciones con microondas normalmente se llevan a cabo a temperaturas optimizadas, para que la reacción se produzca mediante el mecanismo deseado. Además, el aumento de temperatura es uniforme, ya que la radiación atraviesa las paredes del tubo de reacción. De esta manera, se evita la formación de productos secundarios y favorece a transformaciones más limpias [120].

La síntesis de análogos sulfatados mediante el uso de microondas fue utilizada por otros grupos de investigación [105,107]; en particular Richmond y *col.* recientemente utilizaron esta técnica para obtener en un solo paso esteroides polisulfatados [121].

En base a estos antecedentes, se propuso utilizar esta técnica para la sulfatación de calenduladiol (**5**) y sus análogos (**9-12**), esperando observar una disminución en los tiempos de reacción con buenos rendimientos.

III.2.3.3 Preparación de análogos sulfatados

En primer lugar, la reacción se llevó a cabo utilizando lupeol (**1**) como material de partida, con el fin de probar esta nueva metodología para este tipo de compuestos. Se disolvió el compuesto **1** en DMF anhidra y se agregaron 4 equivalentes del complejo $\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_3$. La mezcla se irradió a 150 °C durante 7 minutos, en un tubo sellado en un reactor de microondas. Mediante cromatografía en capa fina se observó la aparición de una mancha con un R_f diferente al triterpeno de partida. Posteriormente el residuo se eluyó a través de una columna de intercambio iónico de Amberlita CG-120 (forma sodio) y se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash con mezclas CH_2Cl_2 :MeOH. El rendimiento de la reacción fue del 96,2%. El análisis espectroscópico de este compuesto permitió comprobar la transformación de **1** en el sulfato de lupeol (**13**).

En vista de este resultado, se decidió sulfatar **9-12**, utilizando las condiciones de reacción usadas para **1**. Previamente se sulfató calenduladiol (**5**) a fin de probar esta técnica con triterpenos dihidroxilados. En la Tabla 1 se detallan las condiciones experimentales y los rendimientos obtenidos en cada caso.

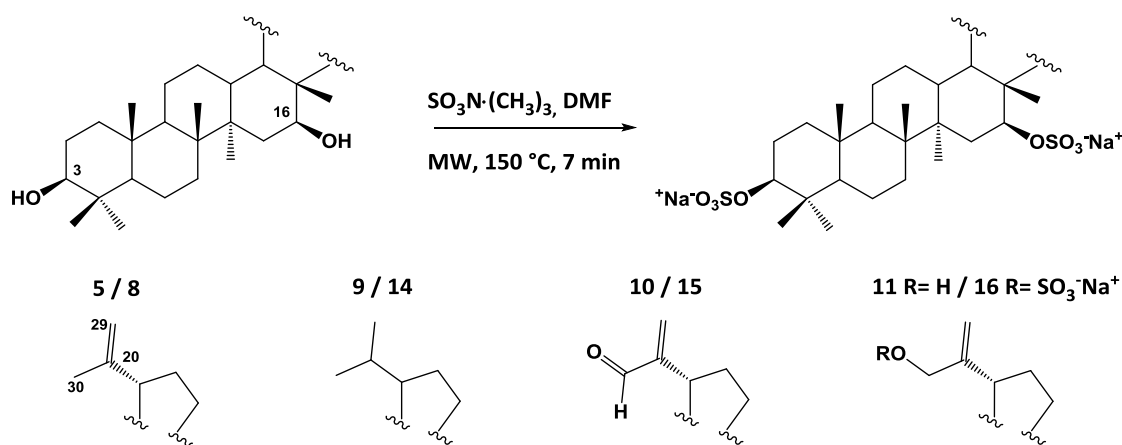
Tabla 1. Condiciones de reacción para la sulfatación de los compuestos **5, 9-12**

Sustrato / Producto	Triterpeno : $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$	Tiempo (min)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Rendimiento (%)
5 / 8	1 : 8	7	150	93,1
9 / 14	1 : 8	7	150	70,4
10 / 15	1 : 8	7	150	88,8
11 / 16	1 : 12	7	150	20,0
12 / 18	1 : 8	7	150	-

La sulfatación de los triterpenos **5, 9-11** condujo a la obtención de los correspondientes análogos di- y tri-sulfatados **8, 14-16** (Figura 35). Se puede observar que la sulfatación del análogo epoxidado **12** no condujo al derivado **18**, por el contrario se produjo la apertura del epóxido resultando una mezcla de productos sulfatados. Este hecho sería lógico teniendo en cuenta la gran reactividad que presentan estos grupos funcionales oxigenados. La obtención de este análogo se plantea más adelante mediante otra ruta sintética alternativa.

Como se observa en la Tabla 1, la preparación de **8** mediante el uso de microondas se logró con un rendimiento similar al obtenido mediante calentamiento convencional; sin embargo, el tiempo de reacción fue de sólo minutos.

La sulfatación de los triterpenos dihidroxilados **9** y **10** se logró con buenos rendimientos. En cambio, cuando la reacción se llevó a cabo sobre el triol **11**, se obtuvo el derivado trisulfatado **16** sólo con un 20,0% de rendimiento. Se pudo comprobar que la polisulfatación se dificulta a medida que el número de hidroxilos en la molécula aumenta, tal como se describió anteriormente [113].


Figura 35. Obtención de análogos sulfatados de calenduladiol **8, 14-16**

Teniendo en cuenta el bajo rendimiento obtenido para **16**, se propuso una ruta sintética alternativa, considerando que no es la más favorable, que involucró dos etapas: la reducción del carbonilo (C-30) del triterpeno disulfatado **15** al alcohol primario y su posterior sulfatación (Figura 36).

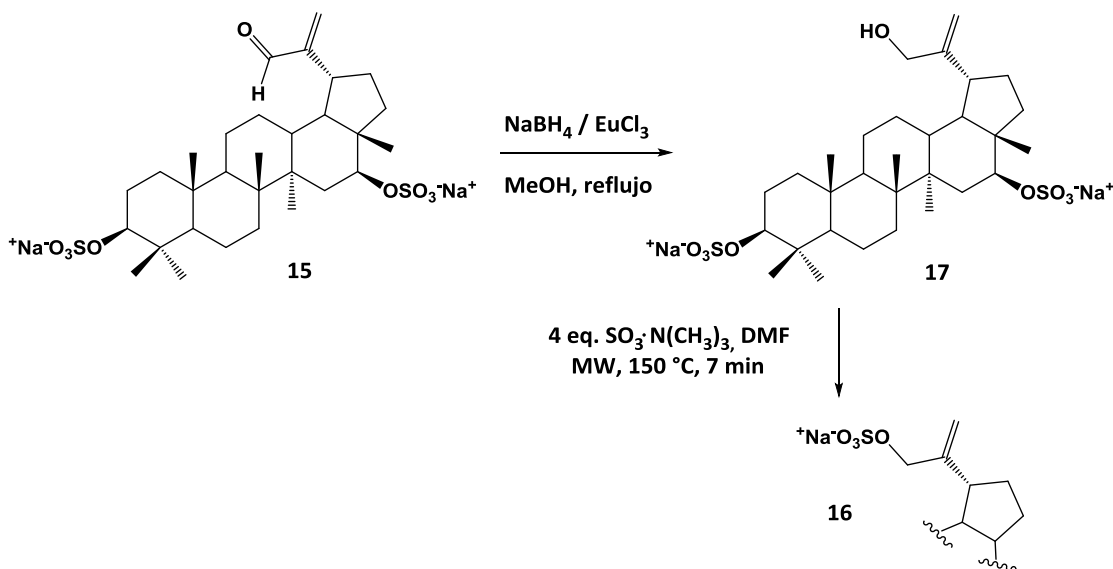


Figura 36. Nueva ruta sintética para la obtención de **16**

La reducción del carbonilo de **15** se llevó a cabo utilizando la reacción de Luche [122]. Esta reacción conduce a alcoholes a través de la reducción selectiva de cetonas o aldehídos α,β -insaturados, en presencia de un cloruro de lantánido. Debido a la quimioselectividad de esta reacción es posible obtener un alcohol en presencia de un doble enlace.

El tratamiento de una solución de **15** en MeOH anhidro con EuCl_3 y NaBH_4 , calentando a reflujo durante varias horas, condujo a la obtención del alcohol intermediario **17** con un 51,1% de rendimiento. Posteriormente, se sulfató el hidroxilo libre utilizando 4 equivalentes de complejo sulfatante rindiendo el derivado trisulfatado **16** con un 50,0% de rendimiento.

Considerando la primera ruta sintética planteada anteriormente, a partir del triterpeno natural **5** se obtuvo **16** en dos pasos con un rendimiento total de un 4% (ver Figuras 31 y 35). En cambio, si bien la última vía sintética se llevó a cabo en cuatro etapas, el rendimiento total de la misma fue superior (22,0% a partir de **5**) (ver Figuras 30, 35 y 36).

El análisis espectroscópico de RMN de ^{13}C de los derivados disulfatados **8**, **14** y **15** permitió confirmar la presencia de dos grupos sulfatos mediante la observación de los desplazamientos químicos del C-3 y C-16. En el caso del análogo **16** se corroboró también el desplazamiento del C-30 (δ_{C} 65,3 a

71,3) junto con el desplazamiento del C-20 (δ_c 154,2 a 151,0) y C-29 (δ_c 107,5 a 110,4). A continuación, se muestran las señales más características de RMN de ^{13}C , organizadas de a pares, a fin de comparar los δ_c de cada alcohol de partida con los de su análogo sulfatado (Tabla 2).

Tabla 2. Desplazamientos químicos característicos de RMN de ^{13}C de los alcoholes triterpénicos (**5**, **9-11**) y sus análogos sulfatados (**8**, **14-16**)

Posición	Compuesto							
	5 ^a	8 ^b	9 ^a	14 ^b	10 ^a	15 ^b	11 ^a	16 ^b
C-3	78,9	87,6	79,1	87,8	79,1	87,9	79,1	87,6
C-16	77,0	85,9	77,5	86,3	77,0	85,9	77,4	85,8

^a Registrado a 75 y 100 MHz en CDCl_3 . ^b Registrado a 75 MHz en $\text{MeOD}-d_4$.

La introducción de dos grupos sulfatos en los alcoholes triterpénicos **5**, **9** y **10** también fue confirmada mediante la observación de los desplazamientos químicos de H-3 y H-16 en el espectro de RMN de ^1H . Para el derivado trisulfatado **16** se observó, además, el corrimiento de las señales correspondientes a los protones del metileno del C-30 (δ_H 4,11 y 4,13 a δ_H 4,47). En la Tabla 3 se muestran los desplazamientos químicos observados para H-3 y H-16 en las moléculas sulfatadas y se comparan con los alcoholes triterpénicos de partida.

Tabla 3. Desplazamientos químicos característicos de RMN de ^1H de los alcoholes triterpénicos (**5**, **9-11**) y sus análogos sulfatados (**8**, **14-16**)

Compuesto	Posición	
	H-3	H-16
5^a	3,13 dd (10,9, 5,3)	3,55 dd (1,2, 4,7)
8^b	3,91 dd (11,4, 4,2)	4,32 t (8,0)
9^a	3,19 dd (11,2, 4,8)	3,56 dd (11,0, 4,8)
14^b	3,93 dd (11,5, 4,2)	4,30 dd (9,7, 6,2)
10^a	3,16 dd (5,1, 10,5)	3,66 dd (4,8, 11,1)
15^b	3,92 dd (11,5, 4,3)	4,49 t (7,8)
11^a	3,18 dd (10,7, 5,2)	3,62 dd (11,1, 4,7)
16^b	3,92 dd (11,1, 4,0)	4,37 t (8,2)

^a Registrado a 300 y 400 MHz en CDCl_3 . ^b Registrado a 300 MHz en $\text{MeOD}-d_4$.

El análisis espectroscópico del derivado **17** permitió confirmar la reducción del grupo carbonilo a alcohol primario y la presencia de los grupos sulfatos unidos a C-3 y C-16, comprobando la estabilidad de los mismos en las condiciones de reacción. En el espectro de RMN de ^1H se observó la aparición de las señales correspondientes a los protones del metileno del C-30, caracterizadas por un sistema AB a δ_{H} 4,03 y 4,06 (d_{AB} , $J = 13,5$ Hz, H-30a,b), un doble doblete a δ_{H} 3,91 ($J = 10,9, 3,8$ Hz, H-3) y un triplete a δ_{H} 4,34 ($J = 7,7$ Hz, H-16). Estas señales se correspondieron con las señales observadas en el espectro de RMN de ^{13}C : a δ_{C} 65,3, 87,6 y 85,8.

Considerando que la síntesis del derivado **18** propuesta a partir de la sulfatación del análogo epoxidado **12** no condujo al producto esperado como se dijo anteriormente (pág. 47), se propuso la obtención de **18** a partir de la epoxidación de la cadena lateral del triterpeno disulfatado **8**, teniendo en cuenta que esta secuencia de síntesis no es la más conveniente. En la Figura 37 se observa la síntesis para la obtención de este análogo.

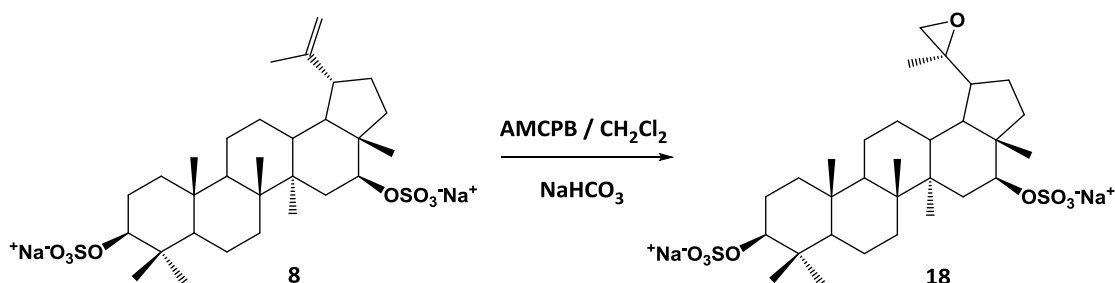


Figura 37. Síntesis del derivado **18**

El compuesto **8** disuelto en CH_2Cl_2 se trató con una solución de AMCPB y NaHCO_3 , y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente. Luego del tratamiento de la muestra y de su purificación se obtuvo el compuesto **18** con un rendimiento muy bajo (10,0%). A través de esta vía se logró la preparación del triterpeno epoxidado disulfatado (**18**) necesario para completar el estudio de la actividad enzimática de los derivados de calenduladiol y sus análogos sulfatados. La estructura del análogo **18** fue corroborada a través de los datos espectroscópicos. Una vez más, la concordancia en los desplazamientos químicos determinó para el C-20 la configuración absoluta (S).

En la siguiente tabla se observan los datos espectroscópicos más relevantes de **18** tanto de ^1H como de ^{13}C , y se comparan con **8**, confirmando la permanencia de los grupos sulfatos unidos a C-3 y C-16 (Tabla 4).

Tabla 4. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C observados en **8** y **18**

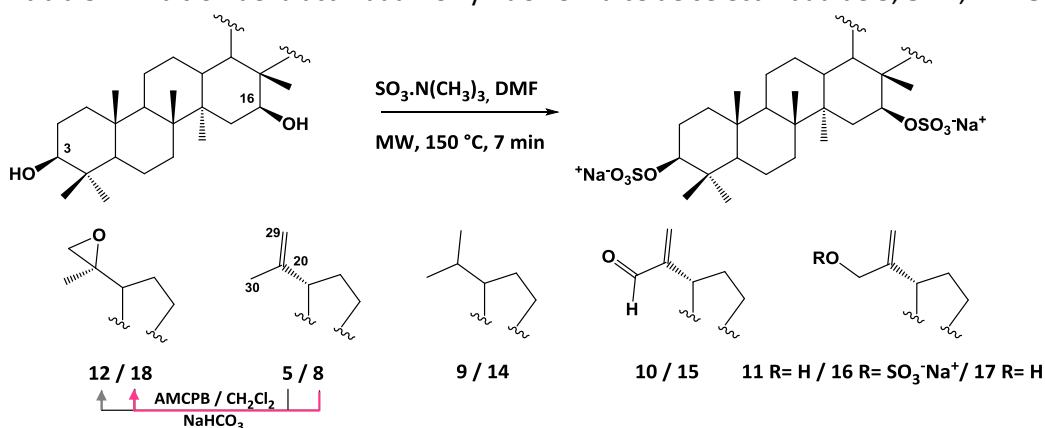
Posición	Compuesto 8		Compuesto 18	
	δ_c^a	δ_H^b (J en Hz)	δ_c^a	δ_H^b (J en Hz)
3	87,6	3,91 dd (11,4, 4,2)	87,5	3,90 dd (11,4, 4,2)
16	85,9	4,32 t (8,0)	85,6	4,29 t (8,0)
20	151,2	-	61,5	-
29	110,5	4,71, 4,59	58,0	2,64
30	19,5	1,69	18,5	1,23

^a Registrado a 75 MHz en MeOD- d_4 . ^b Registrado a 300 MHz en MeOD- d_4 .

III.3 Estudios *in vitro* de ACE y BuCE

Se evaluó la actividad inhibitoria de ACE para los compuestos **9-12** y **14-18** y se comparó con los datos de actividad del triterpeno natural **5** y su análogo disulfatado **8** previamente reportados por el grupo de investigación [59]. La inhibición de ACE fue determinada por el método de Ellman (ver parte experimental) utilizando tacrina como compuesto de referencia. En un ensayo preliminar, se determinó el PI a una concentración fija, de todos los derivados. Los compuestos **9-12**, **14** y **16-18** mostraron mejor inhibición que **5**, bajo las mismas condiciones experimentales. Luego, se determinó la concentración requerida para el 50% de inhibición de ACE (IC_{50}) de esos compuestos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Como se puede observar en la tabla, la mayoría de los compuestos testeados mostraron una débil inhibición de ACE, con valores de IC_{50} superiores a 200 μM . La sulfatación de los grupos hidroxilos rindió mejores inhibidores de ACE, cuando la cadena lateral no se encontraba oxidada (**8** vs **5**, **14** vs **9**). Por otro lado, se observó que los compuestos no sulfatados, condujeron a una mayor inhibición cuando la cadena lateral estaba oxidada (**10**, **11**, **12** vs **5**). El compuesto **14**, con dos grupos sulfato en C-3 y C-16 y un grupo isopropilo unido a C-19, demostró la inhibición más potente para ACE con un valor de IC_{50} de 58,8 μM . Aunque **14** fue menos activo que el compuesto de referencia, fue capaz de inhibir la enzima más eficientemente que **8** ($IC_{50} = 190,0 \mu\text{M}$), mostrando la importancia del grupo isopropilo en lugar de un grupo isopropenilo en la molécula. El derivado **14** fue seleccionado para los estudios cinéticos y para el *docking* de la inhibición de ACE [124].

Tabla 5. Inhibición de la actividad ACE y BuCE e índice de selectividad de **5**, **8-12**, **14-18**


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)	
5	8,1 \pm 0,2	>200	42,0 \pm 0,8	>200	
8	71,0 \pm 1,7	190 \pm 3,0	78,5 \pm 1,3	64,3 \pm 1,2	2,95
9	24,3 \pm 1,8	>200	14,3 \pm 1,9	-	
10	43,5 \pm 1,1	>200	42,0 \pm 4,4	>200	
11	40,4 \pm 0,7	>200	32,0 \pm 0,9	-	
12	24,3 \pm 1,4	>200	19,4 \pm 1,3	-	
14	98,9 \pm 2,9	58,8 \pm 1,4	87,8 \pm 1,8	104,2 \pm 1,2	0,56
15	6,1 \pm 1,4	-	18,4 \pm 2,3	-	
16	12,9 \pm 0,1	>200	50,2 \pm 6,9	>200	
17	10,8 \pm 2,6	>200	56,8 \pm 0,5	188,4 \pm 1,1	>1,70
18	13,7 \pm 1,2	>200	43,7 \pm 1,3	>200	
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).

Los compuestos **5**, **8-12** y **14-18** también fueron evaluados como potenciales inhibidores de BuCE en ensayos preliminares (PI a una concentración fija) y comparados con **5** (Tabla 5). Los valores de IC₅₀ fueron determinados sólo para aquellos análogos que presentaron mejor inhibición que **5** en el ensayo preliminar (**8**, **10**, **14**, **16-18**). Como se puede observar en la tabla, los compuestos sulfatados **8**, **14** y **17** exhibieron inhibición de BuCE con valores de IC₅₀ más bajos que 200 μ M mostrando selectividad hacia esta enzima. El compuesto más activo fue el derivado **8** con un IC₅₀ = 64,3 μ M y un índice de selectividad de 2,95. Este resultado es interesante ya que BuCE tiene la capacidad *in vitro* de retrasar el inicio y la velocidad de formación del péptido β amiloide, un acontecimiento central en la patogénesis de la

enfermedad de Alzheimer [123]. Una vez más, la sulfatación del grupo hidroxilo en C-3 y C-16 demostró ser una buena estrategia para incrementar la inhibición enzimática de estos triterpenos (**8 vs 5**, **14 vs 9**, **16 vs 11** y **18 vs 12**) [124].

La Figura 38 describe sintéticamente las modificaciones químicas realizadas en el triterpeno natural **5** que han conducido a un incremento de la actividad anticolinesterasa. Este análisis es útil para futuras semisíntesis planteadas sobre **5** y sus análogos.

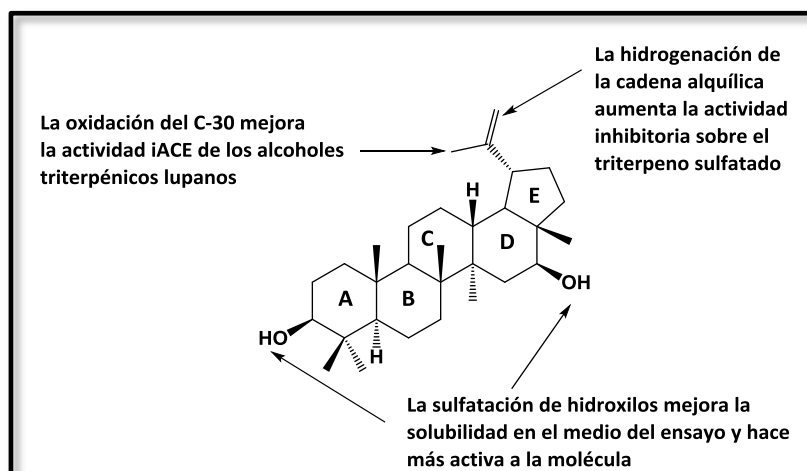


Figura 38. Relación estructura-actividad de ACE y BuCE del esqueleto lupano

III.3.1 Caracterización cinética de la inhibición de ACE

El derivado disulfatado **14** con una cadena lateral saturada en su anillo E, fue identificado como el inhibidor más potente de ACE. Por lo tanto, como se dijo anteriormente, fue elegido para determinar el mecanismo de inhibición enzimática mediante un estudio cinético de inhibición de ACE. Con este objetivo, se midió la velocidad inicial de la reacción a concentraciones variables del sustrato, manteniendo fija la concentración del inhibidor (49 y 125 μM de **14**). Los resultados obtenidos se presentan en forma de gráfico de *Lineweaver-Burk* (Figura 39), con los valores de $1/V$ vs $1/[S]$. El gráfico de doble-recíproca mostró que tanto los valores K_m y V_{max} , aumentan con el incremento de la concentración del inhibidor, pero la relación entre ellos (K_m/V_{max}) es constante. La relación K_m/V_{max} determina la pendiente de la recta, con lo cual, dado que las pendientes de la curva son independientes de la concentración del inhibidor, se puede afirmar que este compuesto es un inhibidor acompetitivo de la enzima. La regresión no lineal de los datos utilizando el programa GradPad Prism 5 condujo al mismo resultado, la cual se ajustó a un modelo de tipo acompetitivo y permitió estimar un valor de $\alpha K_i = 144,4 \mu\text{M}$. Por lo tanto, el estudio cinético de inhibición sugirió que el triterpeno sulfatado **14** no se une a la

enzima libre, sino que se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato, produciendo un complejo inactivo.

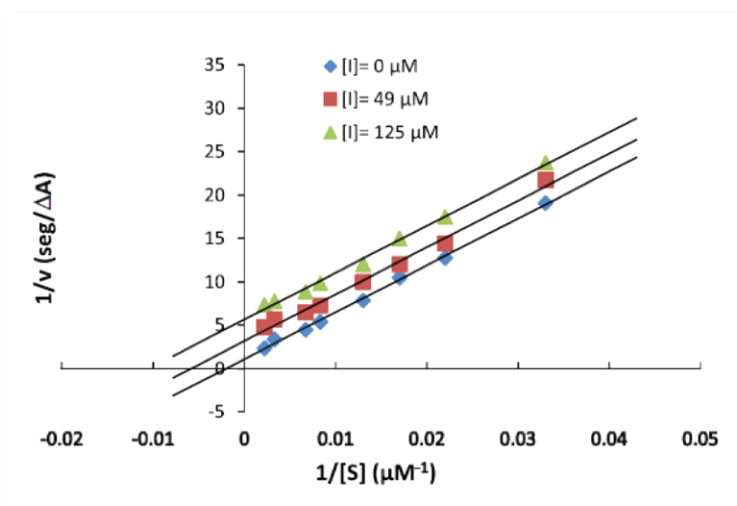


Figura 39. Gráfica de *Lineweaver-Burk* para la inhibición de ACE del compuesto **14**

III.3.2 Estudios de acoplamiento molecular o *docking*

Se realizaron estudios de modelado molecular con el propósito de tener mayor información sobre la forma de unión y las interacciones entre la enzima y el compuesto **14**, y obtener una visión estructural de su mecanismo de inhibición. Los estudios de *docking* fueron realizados mediante una colaboración con la Dra. Victoria Richmond (UMYMFOR, UBA). Se utilizó el complejo ACE-AC, de acuerdo al mecanismo de inhibición enzimática observado. La enzima utilizada para el modelado molecular fue la estructura cristalográfica de la ACE de la *Torpedo californica* complejada con la acetilcolina reportada en el Protein Data Bank. Los mejores resultados del modelado molecular fueron observados para el *cluster* N° 1 de menor energía (-4,54 kcal/mol) y para el *cluster* N° 3 (-4,10 kcal/mol) que presentó el mayor número de conformeros [125,126].

La conformación adoptada en el *cluster* N° 1 se muestra en la Figura 40 A. Una parte del triterpenoide **14** se encuentra sumergido en el sitio aromático de la enzima, lo que explica el mecanismo de inhibición acompetitivo de **14**. El compuesto penetra en el sitio periférico a través del anillo A y se une a la enzima en la entrada de la garganta, cerca de la superficie de la enzima, dejando los anillos D y E fuera del bolsillo. Las principales interacciones hidrofóbicas entre el esqueleto hidrocarbonado del inhibidor y la proteína fueron observadas con los residuos: Gln74, Phe290, Phe331 y Tyr334 (Figura 41 A). El *docking* también demostró que la afinidad de **14** para el complejo enzima-sustrato es favorecida

por las interacciones puente hidrógeno que involucran al grupo sulfato del anillo A. El grupo sulfato de la posición C-3 se acerca al residuo Tyr121. La distancia entre el oxígeno del sulfato del inhibidor y el grupo hidroxilo de Tyr121 es de 2,41 Å [124].

La conformación adoptada en el *cluster* N° 3 se muestra en la Figura 40 B. El triterpenoide se localiza en la entrada de la garganta, exponiendo su lado alifático a la enzima. Las principales interacciones hidrofóbicas entre el esqueleto hidrocarbonado del inhibidor **14** y la proteína fueron las observadas para los residuos: Gln74, Trp279, Ile287, Phe290, Tyr334 (Figura 41 B). La unión es también asistida por uniones puente hidrógeno entre el oxígeno del grupo sulfato del C-3 y el hidrógeno de la cadena lateral del grupo amida de Gln74 (1,87 Å) [124].

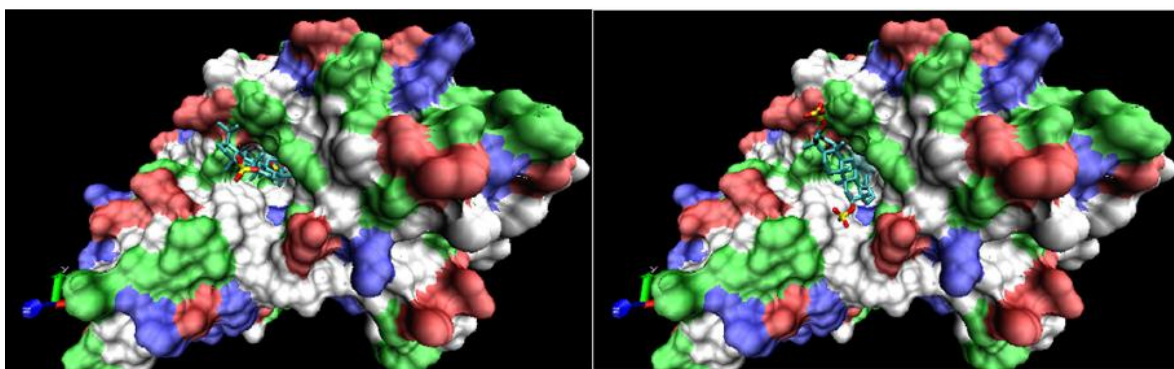


Figura 40. Conformación adoptada por el compuesto **14**. (A) *Cluster* N° 1 (izquierda). (B) *Cluster* N° 3 (derecha). Azul: residuos básicos, rojo: residuos ácidos, verde: residuos polares

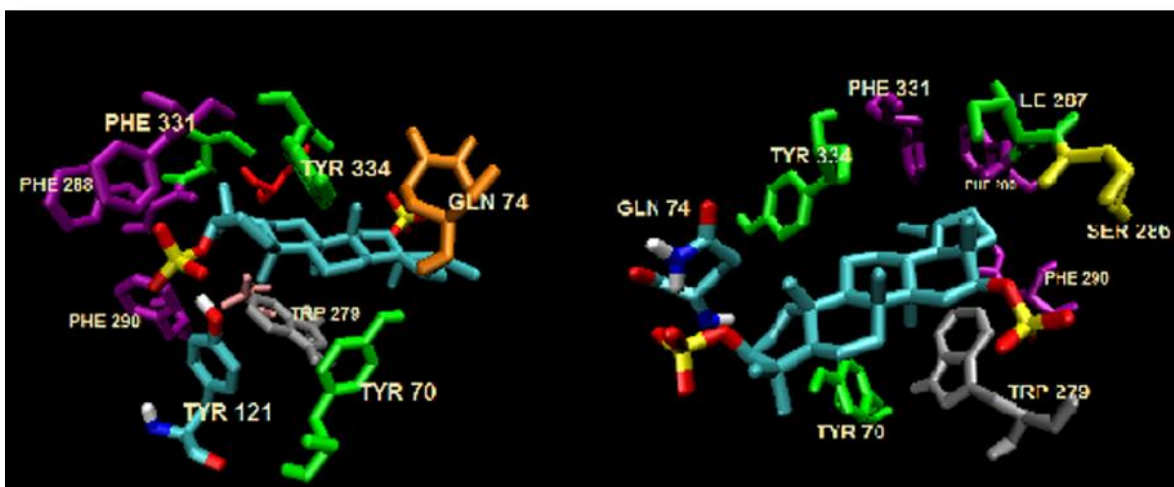


Figura 41. *Docking* del compuesto **14** mostrando las interacciones con la enzima ACE: (A) *Cluster* N° 1 (izquierda). (B) *Cluster* N° 3 (derecha)

En ambos casos, las interacciones principales son hidrofóbicas debido a la cantidad de residuos aromáticos ubicados en el sitio periférico. Estos resultados coinciden con los reportados recientemente por este grupo para un inhibidor esteroide disulfatado de la ACE [121].

Los estudios de *docking* permitieron establecer la orientación del inhibidor **14** en relación con la ACE, así como su conformación cuando están unidos entre sí. Estos resultados permitieron identificar interacciones hidrofóbicas en el interior de la cavidad aromática, y uniones puente hidrógeno que actuarían como factores estabilizantes en el complejo enzima-sustrato inhibidor. Para confirmar la estabilidad del complejo enzima-sustrato inhibidor sería necesario realizar estudios de dinámica molecular que corroboren estas interacciones.

III.4 Esterificación de alcoholes triterpénicos

La identificación de ácido betulínico como agente anti-HIV despertó el interés por el desarrollo de compuestos más potentes basados en esqueletos lupano. En este contexto, Kashiwada y *col.* prepararon una serie de derivados de ácido betulínico mediante esterificación del grupo hidroxilo del C-3 utilizando diferentes anhídridos, resultando el más activo el **3-O-(2',2'-dimetilsuccinil)-betulínico**, también conocido como PA-457 (Bevirimat) (Figura 42). Este derivado presentó mayor actividad que su compuesto de partida con un $IC_{50} = 10,3$ nM, valor comparable con el de los medicamentos aprobados para el tratamiento del SIDA tales como zidovudina (AZT, $IC_{50} = 4,3$ nM) e indinavir ($IC_{50} = 8,8$ nM) [127]. Posteriormente, Sun y *col.* sintetizaron diferentes mono-, di- y triésteres a partir de ácido betulínico y análogos por esterificación del grupo hidroxilo del C-3, C-28 y/o C-30. Los resultados obtenidos fueron útiles para demostrar la influencia del número y de la ubicación de los grupos acilos en la actividad biológica estudiada. Entre ellos, el **ácido 3,28-O-di(3',3'-dimetilglutaril)-betulínico** resultó ser el más activo ($EC_{50} = 0,66$ nM) [128] (Figura 42).

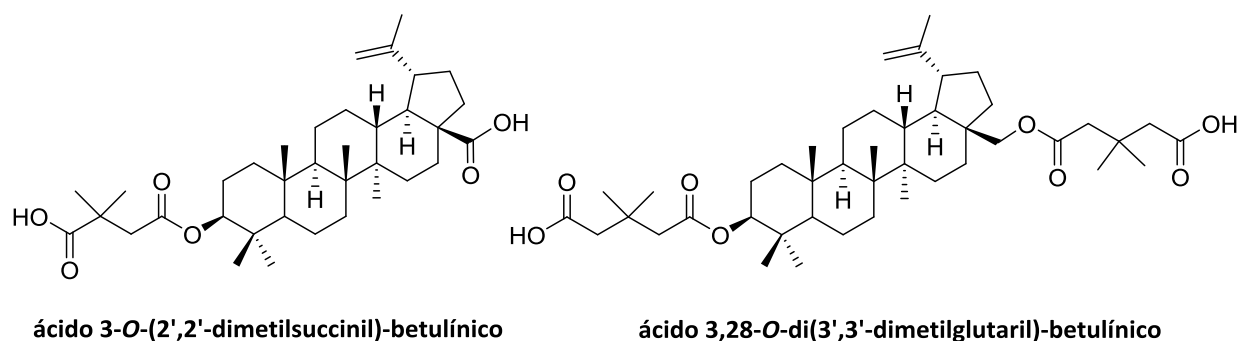


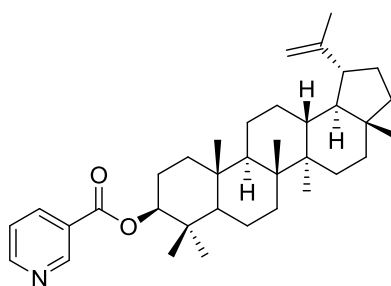
Figura 42. Ésteres triterpénicos derivados de ácido betulínico con actividad anti-HIV

A partir de estos resultados, el diseño, síntesis y evaluación de la actividad biológica de ésteres derivados de ácido betulínico han sido ampliamente estudiados. Por ejemplo, en el año 2011 Qian y *col.* reportaron la síntesis y actividad anti-HIV de 22 nuevos derivados de ácido betulínico. A partir del estudio SAR determinaron que las posiciones C-3 y C-30 constituyen farmacóforos responsables de la actividad biológica, observando un incremento de la misma con la presencia de cadenas lipofílicas o aromáticas en estas posiciones [129].

En el campo de los agentes antiinflamatorios, los resultados obtenidos por Nikiema y *col.* para el hemisuccinato de lupeol contribuyeron al desarrollo de estas investigaciones demostrando que la esterificación del triterpeno aumenta la eficiencia del fármaco original, incrementando su

biodisponibilidad, penetración y retención en la membrana celular, justificando su utilidad como profármaco [130].

El interés de Reddy y *col.* en los ésteres de lupeol, surgió a partir de los datos de actividad hipocolesterolemizante informados por el grupo de Sudhakar para el éster linoleato [131], así como de sus características de profármaco reportadas por el mismo grupo [132]. Ellos prepararon ésteres análogos de lupeol empleando ácidos aromáticos y alifáticos a fin de estudiar *in vivo* la actividad antihiperlipidémica y antidislipidémica, resultando ser más activo el derivado del ácido nicotínico [133] (Figura 43).



3-O-nicotinato de lupeol

Figura 43. Éster semisintético con actividad antihiperlipidémica y antidislipidémica

Por su parte, Khan y *col.* prepararon análogos de lupeol por esterificación del anillo A y del resto isopropenilo con diferentes ácidos carboxílicos, e investigaron su actividad inhibitoria de proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B) [70].

Otros ésteres con esqueleto lupano han sido aislados de su fuente natural como metabolitos secundarios. Por ejemplo de la corteza del abedul de *Betula neoalaskana* (Betuláceae) se obtuvo el triterpeno **3-O-cafeato de betulina**, con actividad antiproliferativa, responsable de la bioactividad determinada para el extracto de abedul [134]. Por su parte, el metabolito **21-hidroxilup-20(29)-en-3β-il palmitato** aislado de *Rauvolfia vomitoria* (Apocynaceae) presentó actividad antiartrítica superior a la reportada para lupeol [62,73] (Figura 44).

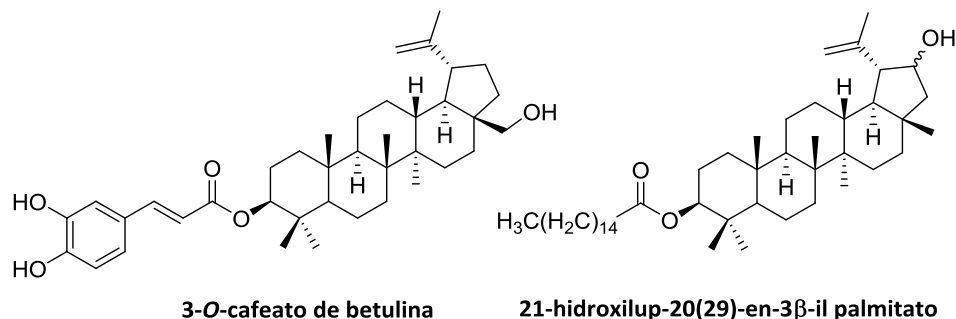
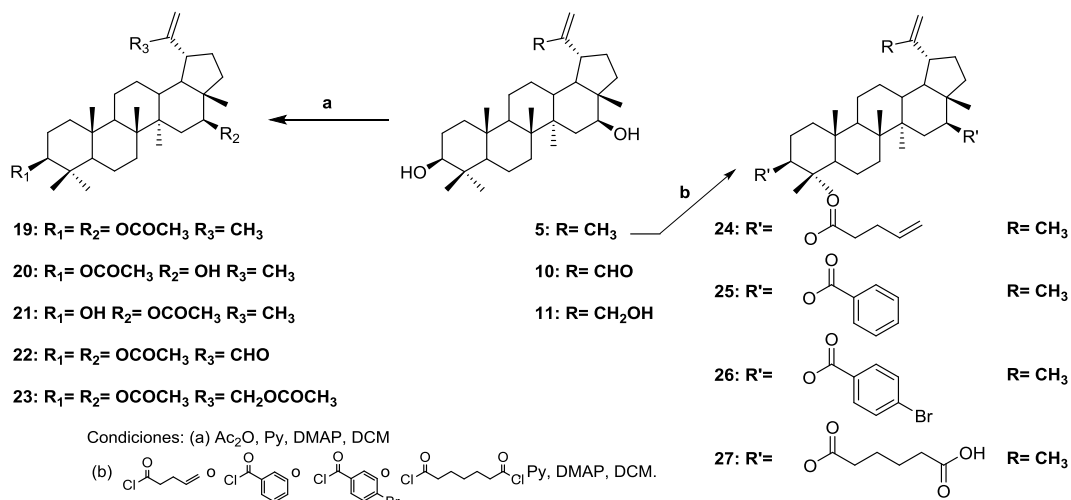


Figura 44. Ésteres naturales con actividad antiproliferativa y antiartrítica

Si bien son numerosos los ejemplos que describen la preparación de ésteres a partir de esqueletos tipo lupano en la búsqueda de análogos bioactivos más potentes, en particular lupeol, betulina y ácido betulínico (ver Figura 13, pág. 14), no se han encontrado antecedentes referidos a la obtención de este tipo de compuestos derivados de calenduladiol. En este sentido, se decidió emprender la síntesis de análogos mediante esterificación de los grupos hidroxilos de C-3 y/o C-16 de calenduladiol y de los derivados de este triterpeno obtenidos anteriormente por modificación de la cadena lateral.

III.4.1 Preparación de ésteres de calenduladiol y de análogos

Para la síntesis de ésteres acetilados se utilizó como material de partida calenduladiol (**5**) y los derivados **10** y **11** preparados anteriormente por oxidación de la cadena lateral. La obtención del análogo diacetilado **19** se logró mediante el tratamiento del diol **5** con un exceso de anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente. Durante el transcurso de la reacción se observó por cromatografía en capa fina la formación de tres productos de reacción, reconocidos por presentar diferentes R_f . Posteriormente, estos productos fueron separados mediante cromatografía en columna sobre silica flash y caracterizados mediante RMN, identificando además del diéster (**19**) (51,0%), los monoésteres 3-*O*-acetil (**20**) y 16-*O*-acetil (**21**) derivados de calenduladiol. Bajo las mismas condiciones anteriores se obtuvo el diacetilado **22** partiendo del diol **10**, y el triacetilado **23** a partir del triol **11**. Por otra parte, el tratamiento del diol **5** con los correspondientes cloruros de acilo en piridina, proporcionó los ésteres **24**, **25** y **26**. El diácido **27** se preparó mediante la reacción de **5** con cloruro de adipóilo y posterior hidrólisis del cloruro de acilo intermedio (Figura 45).


Figura 45. Ésteres de calenduladiol y de análogos

El análisis espectroscópico de los compuestos **19-27** confirmó la presencia de los grupos ésteres en las posiciones C-3 y/o C-16. Las señales de RMN de ¹H y ¹³C fueron inequívocamente asignadas mediante el análisis de las correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC. En la siguiente tabla se muestran los desplazamientos más característicos de RMN de ¹³C para estos compuestos (Tabla 6).

Tabla 6. Principales desplazamientos químicos de RMN de ¹³C de los ésteres **19-27**

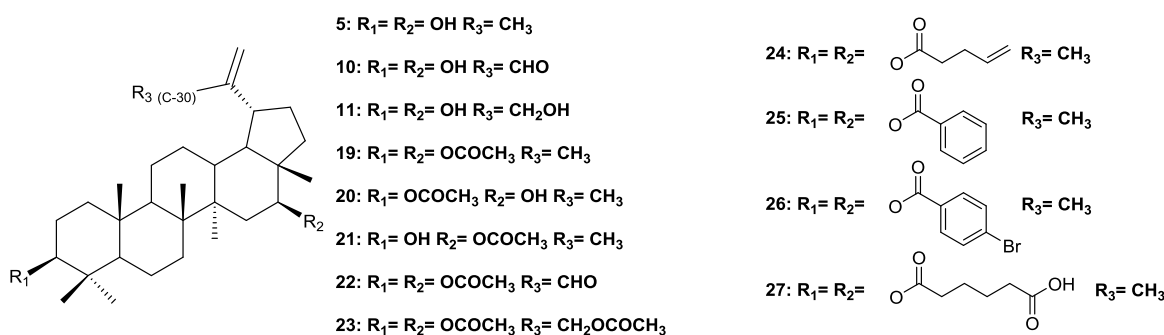
Compuesto	Posición			
	C-3	C-16	COR'	COR'
19 ^a	81,0	79,3	171,1, 170,8	21,5, 21,5
20 ^b	81,1	77,2	171,2	21,5
21 ^c	79,0	79,2	170,9	21,5
22 ^c	81,0	78,9	171,2, 170,9	21,5, 21,5
23 ^{*c}	81,0	79,0	171,2, 170,9	21,5, 21,5
24 ^a	81,0	79,2	173,0, 172,7	34,2, 34,2
25 ^a	81,7	80,0	166,4, 166,2	131,2, 131,2
26 ^b	82,2	80,6	165,1, 164,9	133,1, 133,0
27 ^d	82,3	80,6	175,0, 174,9	34,6, 34,6

^a Registrado a 75 MHz en CDCl₃. ^b Registrado a 100 MHz en CDCl₃. ^c Registrado a 150 MHz en CDCl₃. ^d Registrado a 75 MHz en MeOD-*d*₄. **23**^{*} R_{3(C-30)} COR' = 170,8; COR' = 21,2.

III.4.2 Estudios *in vitro* de ACE y BuCE

Se evaluó la actividad inhibitoria de ACE y BuCE de los ésteres obtenidos (**19-27**) y se comparó con los datos de actividad del triterpeno natural **5** y sus análogos **10** y **11** (Tabla 7). El ensayo de inhibición fue determinado por el método de Ellman utilizando tacrina como compuesto de referencia. En todos los casos fue necesario el agregado de MeOH como cosolvente (2,5%) para poder solubilizar las muestras en el buffer. En un ensayo preliminar se determinó el PI a una concentración fija de todos los derivados. Sólo el diéster hemiadipato (**27**) mostró mejor inhibición que su compuesto de partida (**5**), por lo que posteriormente se calculó el IC₅₀ de este compuesto, para ambas enzimas.

Tabla 7. Inhibición de la actividad ACE y BuCE e índice de selectividad de **5**, **10**, **11** y **19-27**



Compuesto	ACE ^a		BuCE ^b	
	PI a 200 μM	IC ₅₀ (μM)	PI a 200 μM	IC ₅₀ (μM)
5	8,1 ± 0,2	>200	42,0 ± 0,8	>200
10	43,5 ± 1,1	>200	42,0 ± 4,4	-
11	40,4 ± 0,7	>200	32,0 ± 0,9	-
19	3,3 ± 1,0	-	35,2 ± 3,0	-
20	1,9 ± 1,0	-	46,2 ± 3,2	>200
21	5,6 ± 1,3	-	51,2 ± 2,2	>200
22	6,8 ± 0,9	-	45,8 ± 2,2	>200
23	7,2 ± 0,8	-	n.d. ^d	-
24	6,4 ± 0,1	-	29,3 ± 3,5	-
25	3,9 ± 0,6	-	39,9 ± 2,1	-
26	n.i. ^c	-	18,4 ± 1,0	-
27	20,2 ± 1,0	>200	89,2 ± 1,6	80,6 ± 1,3
tacrina	-	0,0029 ± 0,002	-	0,004 ± 0,001

^a ACE de anguila eléctrica. ^b BuCE de suero de caballo. ^c n.i. no inhibe. ^d n.d. no determinado.

Como se puede observar en la tabla, con excepción del compuesto **27** que exhibió una débil actividad anti-ACE con un valor de IC_{50} superior a 200 μM , en el resto de los casos la esterificación disminuyó la capacidad de inhibición de la enzima. Cuando se evaluó la actividad anti-BuCE prácticamente no se observaron cambios al comparar la inhibición de los alcoholes libres y sus análogos esterificados, excepto **27** que mostró un leve incremento de actividad inhibitoria con un valor de $IC_{50} = 80,6 \mu M$.

En vista de que la esterificación disminuyó la actividad inhibitoria en la mayoría de los casos frente a la enzima ACE, se planteó mejorar la actividad de estos compuestos. Teniendo en cuenta que los monoésteres **20** y **21** presentan un hidroxilo libre (C-16 en **20** y C-3 en **21**), se propuso la sulfatación de este grupo funcional esperando un incremento en su actividad biológica de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente para los derivados sulfatados de calenduladiol. En este contexto, en primer lugar se optimizó la obtención de los derivados monoacetilados seleccionando condiciones de reacción que disminuyeran la formación del diéster. El agregado de 1 equivalente de anhídrido acético en piridina manteniendo la reacción a 0°C favoreció la formación de estos derivados con un mejor rendimiento. La purificación de esta mezcla por cromatografía en columna sobre sílica flash, usando como eluyente CH_2Cl_2 , condujo a la obtención de **20** (25,0%) y **21** (25,0%) puros. Posteriormente, se disolvió cada éster en DMF anhidra y se agregaron 4 equivalentes del complejo $SO_3 \cdot N(CH_3)_3$. La mezcla de reacción se irradió a 150 °C durante 7 minutos, en un tubo sellado en un reactor de microondas. El residuo se eluyó a través de una columna de intercambio iónico de Amberlita CG-120 (forma sodio) y se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash con mezclas $CH_2Cl_2:MeOH$, obteniéndose en cada caso el producto de monosulfatación **28** y **29**, con un rendimiento del 43,8 y 27,3% respectivamente (Figura 46).

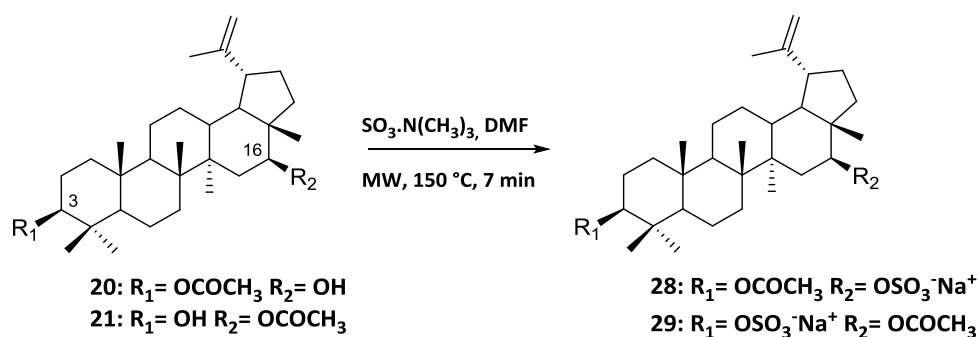


Figura 46. Sulfatación de los monoésteres **20** y **21**

Los datos espectroscópicos permitieron confirmar la obtención de los productos de sulfatación. En el espectro de RMN de 1H del compuesto **28** se observó principalmente el desplazamiento de la señal

de δ_H 3,61 a 4,37 (t, $J = 7,4$ Hz), mientras que el espectro de RMN de ^{13}C mostró el corrimiento de la señal de δ_C 77,2 a 85,9 ppm, indicando la sulfatación de la posición 16. Por otro lado, los espectros de RMN de 1H y ^{13}C del compuesto **29** mostraron el desplazamiento de la señal de δ_H 3,22-3,15 a 3,96 (dd, $J = 11,5, 4,4$ Hz) y de δ_C 79,0 a 87,5 respectivamente, confirmando la sulfatación de la posición 3.

Se determinó la actividad anti-colinesterasa de **28** y **29** bajo las mismas condiciones de ensayo que las utilizadas para los demás ésteres. Para ambos análogos sulfatados se observó un incremento de actividad anti-ACE respecto de sus ésteres de partida **20** y **21**, con valores de PI de 30,5 y 28,3% respectivamente calculados a una concentración fija, aunque los valores de IC_{50} se mantuvieron por encima de 200 μM . Frente a BuCE la sulfatación no representó un aumento significativo de la actividad inhibitoria, comparados con sus ésteres de partida, con valores de PI = 56,3% para **28** y 46,1% para **29**, calculados a 200 μM . Por lo tanto, la sulfatación del grupo hidroxilo libre de este tipo de ésteres sólo confiere incrementos de actividad frente a ACE, manteniendo prácticamente constante la actividad frente a BuCE, disminuyendo por lo tanto la selectividad hacia esta enzima.

Los resultados obtenidos muestran que los derivados esterificados conducen, en general, a inhibidores selectivos frente a BuCE, aunque con una moderada actividad. La síntesis de estos análogos aportan a la bibliografía antecedentes sobre la preparación de ésteres de calenduladiol, no descartándose la posibilidad de que puedan presentar otras actividades biológicas.

La siguiente figura representa un resumen de los resultados de actividad anti-colinesterasa obtenidos con los ésteres triterpénicos preparados en esta sección (Figura 47).

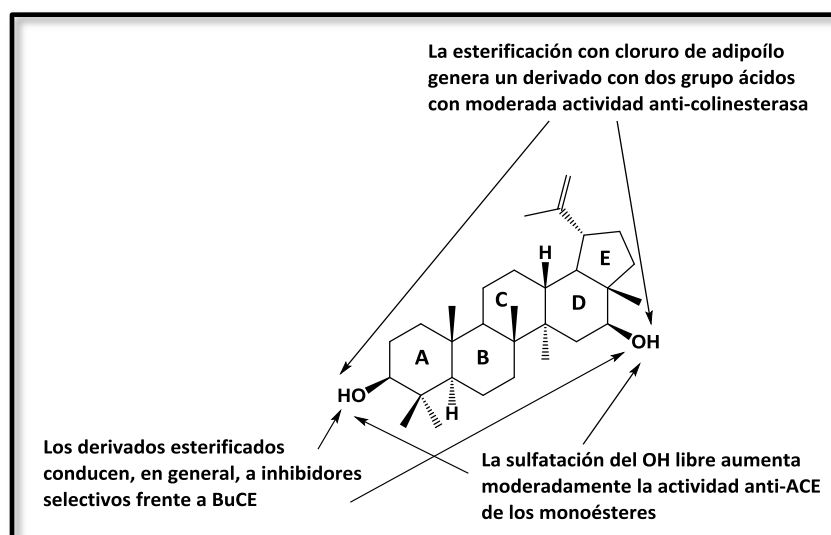


Figura 47. Efectos de la esterificación de **5**, **10** y **11** en la actividad anti-colinesterasa

III.5 Compuestos carbonílicos triterpénicos y oximas

III.5.1 Compuestos carbonílicos

Investigaciones preliminares sobre el ácido betulínico han demostrado que pequeñas modificaciones en la estructura triterpénica pueden conducir a derivados potencialmente importantes, especialmente útiles para ser desarrollados como fármacos antitumorales. Estas observaciones fueron realizadas por Kim y *col.* en sus esfuerzos por obtener compuestos activos contra las líneas celulares de melanoma (MEL-2) y carcinoma epidermoide de boca (KB). Entre los derivados obtenidos por semisíntesis, el **ácido 3-oxolup-20(29)-en-28-oico** (Figura 48) presentó mayor actividad contra las dos líneas celulares, aunque con pérdida de selectividad hacia MEL-2 respecto del ácido betulínico [135].

Posteriormente, Santos y *col.* llevaron a cabo un estudio de transformaciones químicas sencillas sobre betulina y ácido betulínico, aislados de especies vegetales, en búsqueda de agentes quimioterapéuticos. Los resultados *in vitro* de actividad citotóxica sugirieron que los nuevos derivados de tipo lupano podían inhibir el crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer a concentraciones micromolares y eran prometedores agentes anticancerígenos. En particular, el **2-hidroxi-28-(1H-triazol-1-il)-lup-1,20(29)-dien-3,28-diona** (Figura 48) resultó hasta 12 veces más potente que su compuesto de partida (ácido betulínico) frente a la línea celular humana de cáncer de próstata PC-3 ($IC_{50} = 1,8 \mu M$). Además determinaron que la citotoxicidad presentada por este tipo de compuestos era selectiva ya que las células no tumorales toleraban dosis sustancialmente mayores que las células tumorales [136].

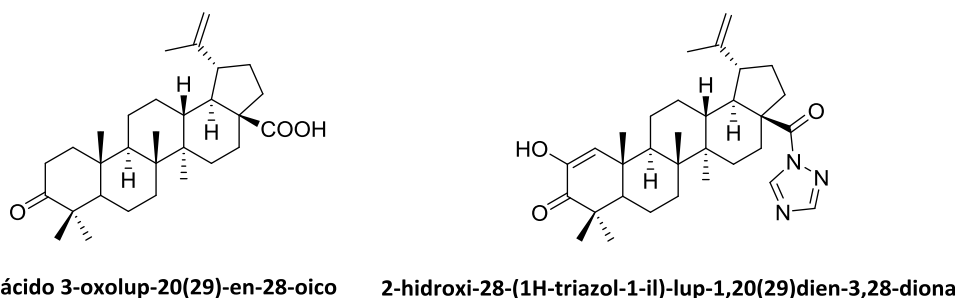


Figura 48. Análogos semisintéticos derivados del ácido betulínico con actividad anticancerígena

El aislamiento del metabolito natural **28-hidroxi-3-oxolup-20(29)-en-30-al** (Figura 49) de la corteza de *Acacia mellifera* (Fabaceae) llevó al descubrimiento de un agente citotóxico contra la línea celular de cáncer de pulmón NSCLC-N6 [137]. Más tarde, Chen y *col.* identificaron este mismo triterpeno en el extracto de metanol de *Fokienensis microtropis* (Celastraceae), reportando su capacidad para inducir apoptosis en células humanas HL60 de leucemia, para mediar la escisión de PARP (proteína

involucrada en varios procesos celulares) y para regular las proteínas Bax (proteínas que participan en el procesos de apoptosis) [138]. Impulsados por estos antecedentes, Grosh y *col.* diseñaron la síntesis de este triterpeno a partir de ácido betulínico, reemplazando el aislamiento del mismo desde fuentes naturales a fin de obtener cantidades suficientes para posteriores ensayos biológicos [139]. Una serie de pasos secuenciales estuvieron implicados en la síntesis del derivado, desde el aislamiento del metabolito secundario de *Bischofia javanica* (Phyllanthaceae), incluyendo la transformación del grupo ácido de la posición C-28 al alcohol primario, posterior protección de los hidroxilos libres (C-3 y C-28) mediante esterificación, oxidación de la posición alílica (C-30), hidrólisis de los grupos ésteres y posterior esterificación selectiva del hidroxilo de C-28, oxidación del grupo hidroxilo libre y finalmente desprotección de C-28. A pesar de los numerosos pasos de síntesis, esta ruta resultó más eficiente y económica que el aislamiento del triterpeno de sus fuentes naturales. Tanto el triterpeno dicarbonílico sintetizado como sus precursores, exhibieron actividad antiproliferativa contra las células de eritroleucemia (MEL), leucemia murina (WEHI3) y leucemia mieloide humana (K562) [139].

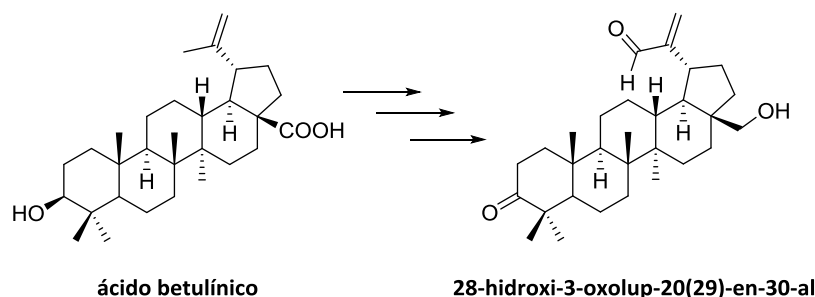
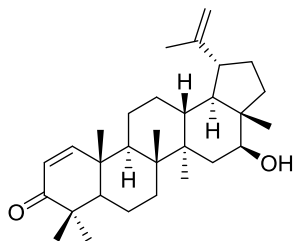


Figura 49. Derivado semisintético obtenido a partir de ácido betulínico con actividad citotóxica

La presencia de un grupo carbonilo en C-30 de estas estructuras genera un sistema carbonílico α,β -insaturado que presenta una gran reactividad, resultando útil como sintón para la obtención de análogos triterpénicos. Por ejemplo, Khan y *col.* diseñaron derivados obtenidos por modificación de la cadena lateral de lupeol mediante la ciclación del sistema carbonílico α,β -insaturado, determinando para todos los análogos actividad estimulante *in vitro* de la captación de glucosa en las células del músculo esquelético L6, con muy buenos resultados [140].

El estudio fitoquímico de la especie vegetal *Stauntonia obovatifolia* (Lardizabalaceae) llevado a cabo por Wei y *col.*, condujo al aislamiento de varios triterpenos tipo lupano. Entre ellos, el metabolito **16 β -hidroxilupan-1,20(29)-dien-3-ona** (Figura 50) con un sistema carbonílico α,β -insaturado en el anillo A presentó actividad anti-HIV [141].



16β-hidroxilupan-1,20(29)-dien-3-ona

Figura 50. Metabolito secundario aislado de *S. obovatifolia* con actividad anti-HIV

Los lupanos de origen natural o semisintético anteriormente mencionados, tienen en común la presencia de grupos carbonílicos en C-3 y/o C-30 que le confieren a la molécula características químicas favorables para cada actividad biológica estudiada. Este hecho despertó interés por el desarrollo de derivados carbonílicos triterpénicos dirigidos al hallazgo de nuevos inhibidores de colinesterasas.

III.5.1.1 Preparación de derivados mono-, di- y tricarbonílicos

A continuación se describe el diseño y la preparación de mono- y dicetonas mediante oxidación de uno o dos grupos hidroxilos presentes en los anillos *A* y/o *D* de lupeol (**1**) y calendadiol (**5**). Asimismo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los derivados de ácido betulínico y considerando la presencia del grupo isopropenilo en el anillo *E* de los triterpenos naturales, se planteó la introducción de un grupo formilo en C-30 mediante oxidación alílica. Estas transformaciones rindieron 10 derivados mono-, di- y tricarbonílicos diferentes (**10, 30-39**), de los cuales 5 no se encuentran reportados en la literatura, que fueron evaluados frente a las enzimas ACE y BuCE, contribuyendo los resultados obtenidos a estudios SAR.

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. El viraje del color azul al verde durante el transcurso de la reacción como consecuencia de la reducción del agente oxidante (Cr (VI) a Cr (III)), facilitó el seguimiento de la reacción.

Por otro lado, por tratamiento con SeO₂ 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.

En la Figura 51 se describen los principales productos obtenidos por oxidación de los triterpenos naturales (**1** y **5**).

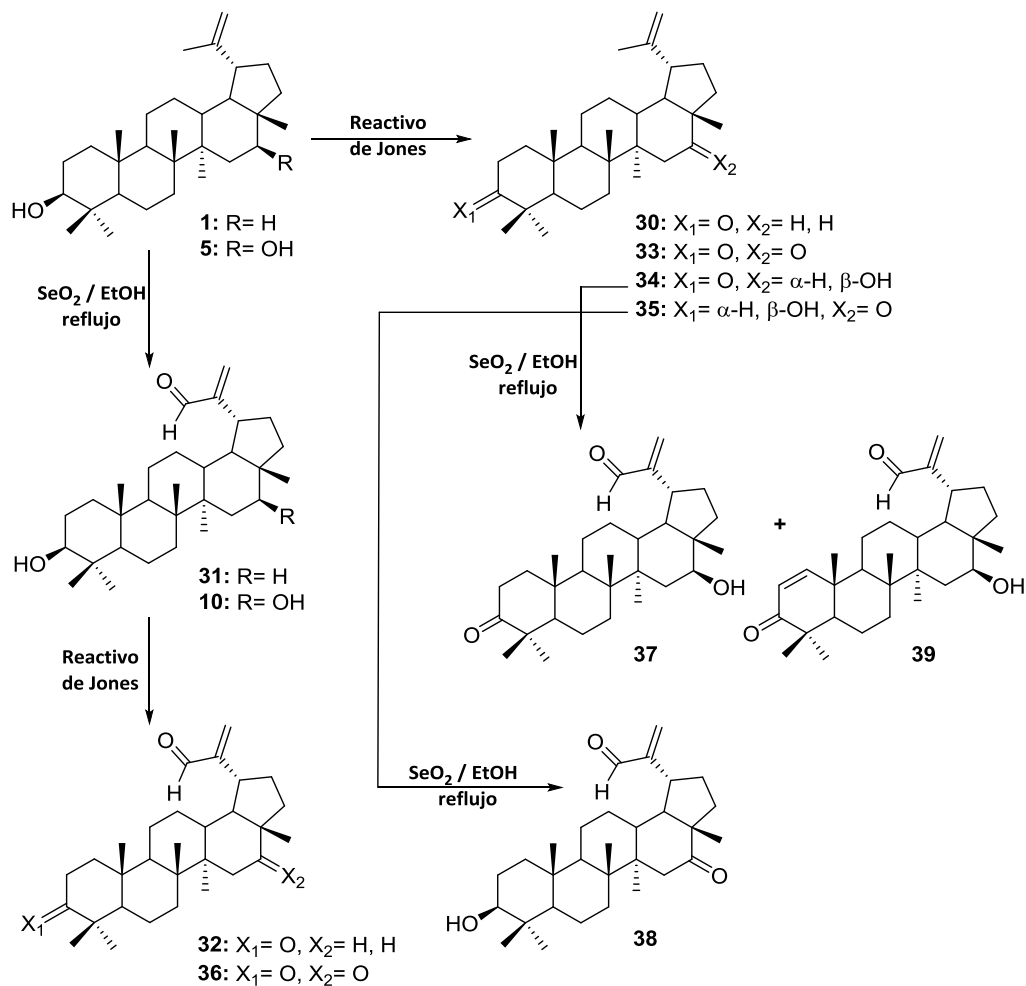


Figura 51. Esquema de síntesis de derivados carbonílicos triterpénicos

Como primera etapa en el desarrollo de estos análogos se utilizó lupeol (**1**) como material de partida. La transformación en la cetona **30** (lup-20(29)-en-3-ona, lupenona) se llevó a cabo casi cuantitativamente (93,5% de rendimiento) mediante la oxidación de **1** con el reactivo de Jones. Se han encontrado antecedentes que reportan el aislamiento de esta cetona triterpénica durante el estudio de la composición química de distintas especies vegetales [137,142]. Su obtención por semisíntesis también ha sido informada por distintos grupos de investigación para su utilización posterior como sintón en la elaboración de otros derivados lupano [67,140,143]. La coincidencia de los datos espectroscópicos de **30** con los datos encontrados en bibliografía permitió confirmar su estructura [142].

Durante el desarrollo de derivados de lupeol con actividad anti-HIV, Gutiérrez-Nicolás y *col.*, sintetizaron **3-oxolup-1,20(29)-dien-30-al** a través de la oxidación alílica de lupenona, obtenida a partir de lupeol mediante oxidación con el reactivo de Jones. En este caso se llegó al producto de eliminación como consecuencia de la presencia de un grupo carbonilo en el C-3 de la molécula, conduciendo a la

formación de un compuesto carbonílico α,β -insaturado [112] (Figura 52). Teniendo en cuenta este antecedente, la síntesis de **32** se planteó a partir de lupeol mediante el camino inverso utilizado por estos autores: a partir de **1** se obtuvo el derivado **31** (3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al) con un 43,6% de rendimiento mediante oxidación alílica. La estructura de este análogo fue confirmada por RMN de ^1H y ^{13}C , coincidiendo sus datos espectroscópicos con los reportados en bibliografía [144]. La oxidación de **31** con el reactivo de Jones dio lugar a la formación de un único producto de oxidación, el derivado **32** (3-oxolup-20(29)-en-30-al) (53,0%) (Figuras 51 y 52).

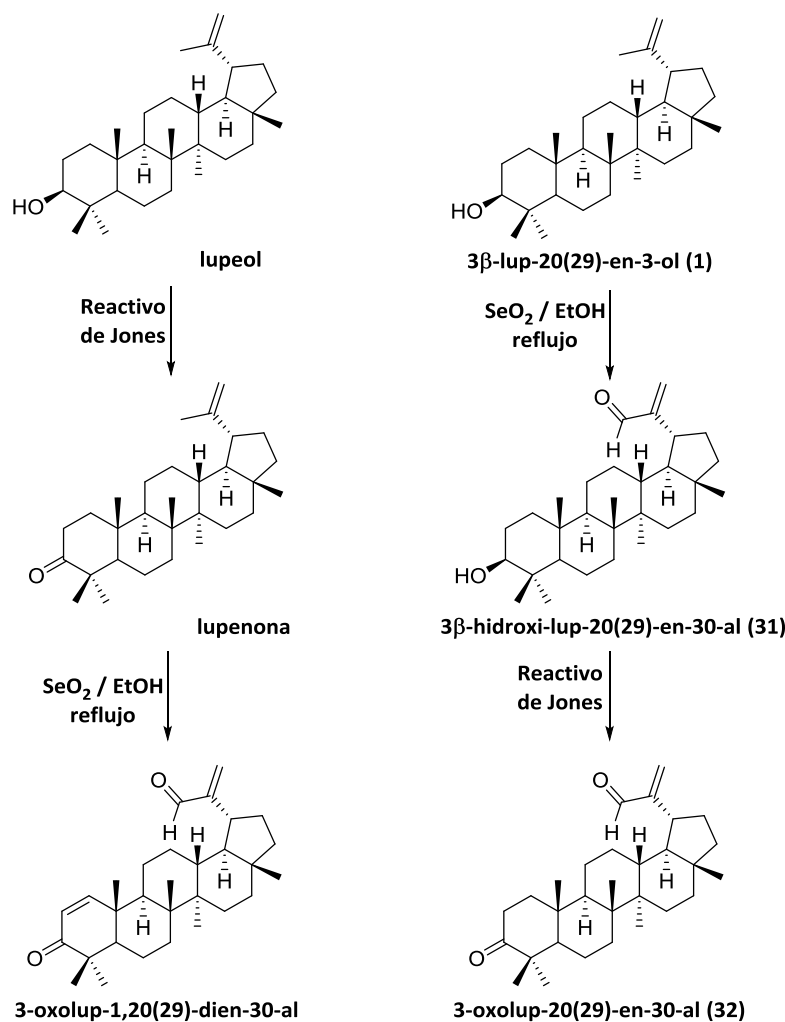
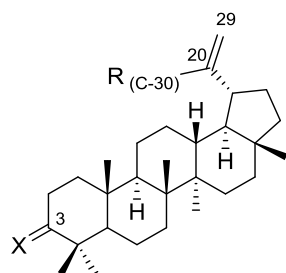


Figura 52. Síntesis del producto de eliminación a partir de lupeol, obtenido por Gutiérrez-Nicolás y *col.*

Este triterpeno fue reportado anteriormente por el grupo de Mutai y *col.* como un metabolito secundario aislado de la especie vegetal *A. mellifera* [137]. La confirmación de la estructura de **32** fue realizada a partir de los datos espectroscópicos informados por estos autores.

En la siguiente tabla se presentan los principales desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **1** y de sus análogos obtenidos por oxidación (**30-32**) (Tabla 8).

Tabla 8. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de **1** y **30-32**



1: X= α -H, β -OH, R= CH_3

31: X= α -H, β -OH, R= CHO

30: X= O, R= CH_3

32: X= O, R= CHO

Compuesto	Posición			
	3	20	29	30
1 (δ_{H}) ^a	3,18 (dd 10,9, 5,3)	-	4,66 (<i>br s</i>), 4,57 (<i>br s</i>)	1,63 (s)
1 (δ_{C}) ^b	79,2	151,1	109,5	19,5
30 (δ_{H}) ^a	-	-	4,67 (<i>br s</i>), 4,54 (<i>br s</i>)	1,63 (s)
30 (δ_{C}) ^b	218,0	150,8	109,5	19,8
31 (δ_{H}) ^c	3,17 (dd 5,3, 10,6)	-	6,28 (<i>br s</i>), 5,90 (<i>br s</i>)	9,51 (s)
31 (δ_{C}) ^b	79,1	157,4	133,3	195,2
32 (δ_{H}) ^c	-	-	6,28 (<i>br s</i>), 5,91 (<i>br s</i>)	9,51 (s)
32 (δ_{C}) ^b	218,2	157,3	133,3	195,2

^a Registrado a 400 MHz en CDCl_3 . ^b Registrado a 75 MHz en CDCl_3 . ^c Registrado a 300 MHz en CDCl_3 .

Como segunda etapa, para obtener los derivados carbonílicos **33-39** se utilizó calenduladiol (**5**) como material de partida. En primer lugar, se propuso la obtención de la cetona **33** (lup-20(29)-en-3,16-diona) por reacción de **5** con el reactivo de Jones. Durante el transcurso de la reacción se observó por cromatografía en capa fina la presencia de tres manchas, dos de ellas con R_f muy similares (0,47 y 0,51) y con distinta coloración luego de su revelado, y la tercera con un R_f mayor (0,75). La purificación de este bruto de reacción por cromatografía en columna condujo a **33** con un 42,0% de rendimiento (correspondiente a la mancha de mayor R_f) y a una mezcla de cetonas (**34** y **35**), las cuales fueron identificadas a través de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C como monohidroxi-monoceto derivados, por comparación entre el diol **5** y la dicetona **33** (Figura 53, correspondiente a RMN de ^1H). La estructura de **33** fue confirmada a partir de los datos espectroscópicos obtenidos (ver Tabla 9). Si bien la síntesis de

este análogo fue reportada por Baddeley y *col.* en el año 1964, sus datos espectroscópicos no habían sido informados [110].

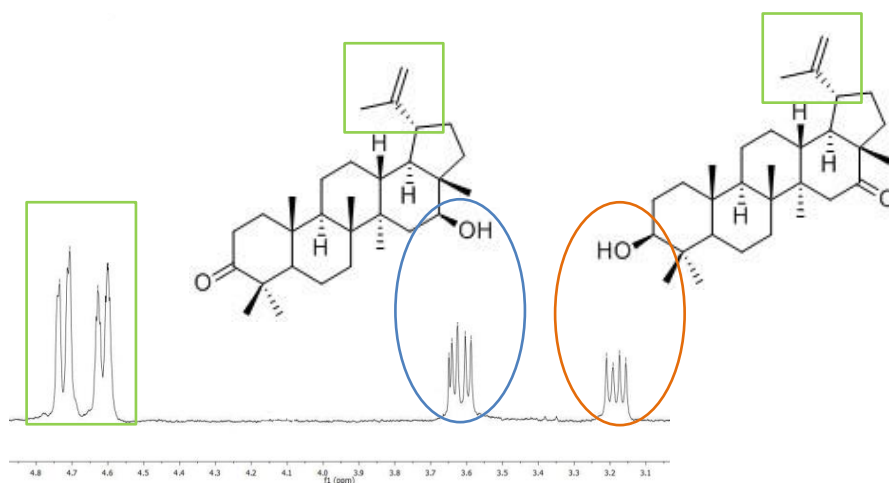


Figura 53. Señales de RMN de ^1H (H-3, H-16 y H-29) que confirman la presencia de una mezcla de monohidroxi-monoceto derivados (**34** y **35**)

Por otro lado, la obtención del derivado **36** (3,16-dioxolup-20(29)-en-30-al) se llevó a cabo en dos etapas teniendo en cuenta la ruta sintética utilizada para obtener **32** (ver Figura 51). En primer lugar, se obtuvo el aldehído **10** bajo las mismas condiciones usadas anteriormente (pág. 41) y, su posterior oxidación con el reactivo de Jones condujo al derivado tricarbónico **36** con un 26,0% de rendimiento. La estructura de este análogo fue corroborada a partir de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (ver Tabla 9).

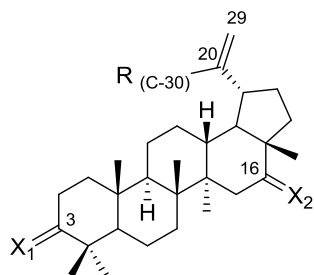
Teniendo en cuenta el interés por obtener derivados triterpénicos dicarbónicos con un sistema carbonílico α,β -insaturado en el C-30 y un grupo carbonilo en el C-3, así como también en el C-16, necesarios para completar los estudios SAR, se propuso la obtención de los derivados **37** y **38**. La síntesis de estos derivados se llevó a cabo variando condiciones de reacción a la metodología aplicada para la obtención de **36**. A una disolución de **10** en acetona se le agregó cuidadosamente gota a gota el reactivo de Jones manteniendo la reacción en agitación y a 0°C . El seguimiento de la reacción, mediante cromatografía en capa fina, permitió observar la formación de varios productos. La purificación de este bruto de reacción condujo mayoritariamente al compuesto de partida (**10**) y a una mezcla de **37** y **38**, la cual no pudo ser separada por cromatografía.

Estos resultados llevaron a plantear la obtención de estos análogos a partir de otra vía sintética. Se propuso la oxidación alílica de las cetonas **34** y **35**, considerando que no es la ruta más favorecida

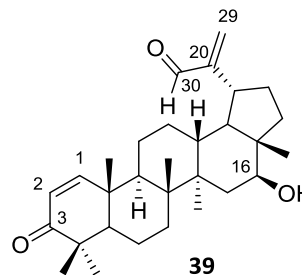
debido a la posible formación del producto de eliminación para la cetona **34**, sin embargo ofrece la posibilidad de obtener los análogos **37** y **38** por separado.

Teniendo en cuenta que las cetonas **34** y **35** fueron obtenidas como subproductos en la preparación de la dicetona **33**, se optimizaron las condiciones de reacción para favorecer la formación de las mismas. Esta síntesis se repitió hasta lograr las cantidades necesarias de las cetonas a fin de continuar con la secuencia propuesta. Luego de minuciosas cromatografías se aisló la cetona **34**, 16 β -hidroxilup-20(29)-en-3-ona, y la cetona **35**, 3 β -hidroxilup-20(29)-en-16-ona, identificadas a través de RMN de ^1H y ^{13}C (ver Tabla 9). Los datos espectroscópicos de **34** se correspondieron con el metabolito natural aislado de la especie vegetal *Acacia cedilloi* (Fabaceae) denominado resinona [145]. Luego se llevó a cabo la oxidación con SeO_2 de ambas cetonas siguiendo la metodología reportada por Gutiérrez-Nicolás, observándose para la cetona **34** la formación de dos productos los cuales fueron purificados e identificados a través de RMN de ^1H y ^{13}C como **37** (16 β -hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al) (13,7%) y **39** (16 β -hidroxi-3-oxo-lup-1,20(29)-dien-30-al) (18,7%). La cetona **35** condujo únicamente al producto de oxidación alílica, el derivado **38** (3 β -hidroxi-16-oxo-lup-20(29)-en-30-al) (47,2%).

En la siguiente tabla se muestran los principales desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del material de partida (**5**) y de los correspondientes derivados obtenidos por oxidación (**10**, **33-39**) (Tabla 9).

Tabla 9. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de **5**, **10** y **33-39**


- 5:** $X_1 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $X_2 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $R = \text{CH}_3$
10: $X_1 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $X_2 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $R = \text{CHO}$
33: $X_1 = \text{O}$ $X_2 = \text{O}$ $R = \text{CH}_3$
34: $X_1 = \text{O}$ $X_2 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $R = \text{CH}_3$
35: $X_1 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $X_2 = \text{O}$ $R = \text{CH}_3$
36: $X_1 = \text{O}$ $X_2 = \text{O}$ $R = \text{CHO}$
37: $X_1 = \text{O}$ $X_2 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $R = \text{CHO}$
38: $X_1 = \alpha\text{-H}$, $\beta\text{-OH}$ $X_2 = \text{O}$ $R = \text{CHO}$



Compuesto	Posición				
	3	16	20	29	30
5 (δ_{H}) ^a	3,13 (dd 10,9, 5,3)	3,55 (dd 11,2, 4,7)	-	4,67 (<i>br s</i>), 4,55 (<i>br s</i>)	1,64 (s)
5 (δ_{C}) ^b	78,9	77,0	150,0	109,8	19,4
10 (δ_{H}) ^c	3,16 (dd 10,5, 5,1)	3,66 (dd 11,1, 4,8)	-	6,27 (<i>br s</i>), 5,91 (<i>br s</i>)	9,51 (s)
10 (δ_{C}) ^b	79,1	77,0	156,5	133,4	195,0
33 (δ_{H}) ^a	-	-	-	4,73 (<i>br s</i>), 4,62 (<i>br s</i>)	1,65 (s)
33 (δ_{C}) ^d	217,8	215,8	148,8	110,8	19,0
34 (δ_{H}) ^a	-	3,61 (dd 10,6, 4,7)	-	4,71 (<i>br s</i>), 4,60 (<i>br s</i>)	1,68 (s)
34 (δ_{C}) ^c	218,0	77,2	150,0	110,0	19,5
35 (δ_{H}) ^c	3,19 (dd 10,9; 5,2)	-	-	4,74 (<i>br s</i>), 4,63 (<i>br s</i>)	1,66 (s)
35 (δ_{C}) ^b	79,0	216,1	148,9	110,8	19,3
36 (δ_{H}) ^e	-	-	-	6,29 (<i>br s</i>), 5,98 (<i>br s</i>)	9,52 (s)
36 (δ_{C}) ^f	217,9	215,4	156,2	133,3	194,8
37 (δ_{H}) ^c	-	3,68 (dd 11,2, 4,8)	-	6,29 (<i>br s</i>), 5,93 (<i>br s</i>)	9,52 (s)
37 (δ_{C}) ^b	217,9	76,9	156,2	135,5	195,0
38 (δ_{H}) ^c	3,17 (dd 10,6, 4,9)	-	-	6,28 (<i>br s</i>), 5,97 (<i>br s</i>)	9,52 (s)
38 (δ_{C}) ^b	79,0	215,5	156,5	132,4	194,7
39 (δ_{H}) ^c	-	3,69 (dd 11,2, 4,8)	-	6,30 (<i>br s</i>), 5,95 (<i>br s</i>)	9,53 (s)
39 (δ_{C}) ^b	205,5	76,9	156,2	132,4	195,0

^a Registrado a 400 MHz en CDCl_3 . ^b Registrado a 75 MHz en CDCl_3 . ^c Registrado a 300 MHz en CDCl_3 . ^d Registrado a 100 MHz en CDCl_3 . ^e Registrado a 600 MHz en CDCl_3 . ^f Registrado a 150 MHz en CDCl_3 .

A partir de los datos espectroscópicos informados por Gutiérrez-Nicolás y Wei [112,141] se llevó a cabo la asignación completa del análogo **39**. La Figura 54 muestra los desplazamientos químicos más

característicos de RMN de ^1H donde se observa, además de las señales detalladas en la Tabla 9, las señales correspondientes al sistema carbonílico α,β -insaturado del anillo A.

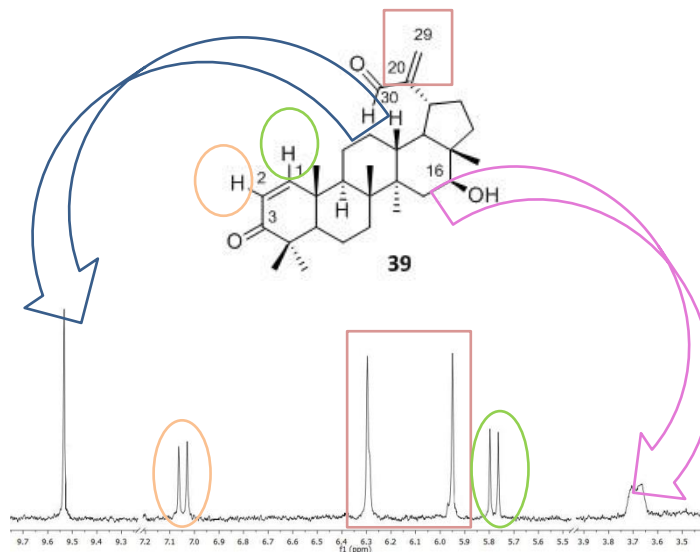


Figura 54. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H que ayudan a la elucidación de **39**

III.5.2 Oximas triterpénicas

En la búsqueda de potentes agentes terapéuticos dirigidos al tratamiento de diversas enfermedades, las oximas triterpénicas han sido objeto de estudio de diferentes grupos de investigación. Por ejemplo, Mukherjee y *col.* diseñaron oximas derivadas de ácido betulínico y observaron que el grupo hidroxiimino presente en la posición C-3 es esencial para la actividad citotóxica frente las líneas celulares de cáncer de pulmón A549 [146]. Asimismo, los resultados obtenidos por Kim y *col.* demostraron el potencial antitumoral de estos derivados frente las líneas celulares de melanoma (MEL-2) y carcinoma epidermoide de boca (KB) [135]. Por otro lado, debido a la reactividad que presenta el grupo hidroxiimino, estas moléculas son especialmente útiles como sintones para la obtención de nuevos análogos bioactivos sintetizados a partir de reacciones de reducción, acilación, ciclización, etc. de este grupo funcional [147]. Por ejemplo, recientemente Khan y *col.* reportaron la síntesis de amidas de lupeol a partir de las oximas correspondientes, con actividad inhibitoria de la proteína tirosina quinasa fosfatasa-1B (PTB-1B), asociada con la diabetes mellitus tipo II [70].

A fin de extender la búsqueda de inhibidores de colinesterasas, y teniendo en cuenta que no se han encontrado reportes en bibliografía sobre oximas preparadas a partir de calenduladiol, se planteó el

diseño de este tipo de análogos utilizando dos de los derivados carbonílicos anteriormente preparados, el compuesto **33** el cual contiene dos grupos carbonilos capaces de reaccionar, y el análogo **36** que presenta dos grupos carbonilos y un sistema carbonílico α,β -insaturado.

III.5.2.1 Preparación de oximas triterpénicas

En sus estudios, Khan y *col.* observaron que el tratamiento de lupenona con cloruro de hidroxilamina dio lugar a la oxima de lupeol como una mezcla isomérica (*E* y *Z*) la cual pudo ser distinguida a través de los valores de R_f ; sin embargo, no pudo ser identificado cada isómero a través del espectro de RMN de ^1H [70]. Por otro lado, Gutiérrez-Nicolás informó la síntesis de la oxima de lupeol como un solo producto [112]. A partir de estos antecedentes se decidió llevar a cabo la síntesis de esta oxima, con el propósito de comprobar la formación de uno o de los dos isómeros posibles.

La síntesis de **40** (lup-20(29)-en-3-oxima) se llevó a cabo mediante el agregado de cloruro de hidroxilamina y acetato de sodio a una solución etanólica de **30**, manteniendo la mezcla en agitación a temperatura ambiente [70,112]. El seguimiento de la reacción, por cromatografía en capa fina, mostró la obtención de un solo producto, a diferencia de lo reportado por Khan [70]. Luego del tratamiento de la mezcla y posterior purificación se obtuvo **40** con un 31,1% de rendimiento, confirmando su estructura por RMN. La configuración del grupo hidroxiiimino fue determinada teniendo en cuenta el estudio espectroscópico realizado por Richmond y *col.* para oximas esteroidales [148]. En el espectro de RMN de ^1H se analizaron las señales correspondientes a los protones adyacentes al grupo hidroxiiimino observándose la desprotección del H-2 β (δ_{H} 2,45 a δ_{H} 3,01-2,91). La asignación de esta señal fue confirmada mediante su correlación con el carbono cuaternario de la oxima (C-3) en el espectro HMBC. Esta desprotección se debe al efecto electrónico que ejerce la proximidad del oxígeno de la oxima, indicando la configuración *E* de la misma.

Siguiendo la misma metodología que la utilizada para lupenona, se planteó la reacción con el derivado dicarbonílico **33**. El seguimiento de la reacción por cromatografía en capa fina permitió observar la formación de un producto mayoritario al cabo de 36 horas de agitación a temperatura ambiente. La purificación del bruto de reacción rindió el análogo **41** con un 25,0% de rendimiento (ver Figura 59). En el espectro de RMN de ^1H las señales más importantes observadas fueron un singulete ancho a δ_{H} 8,44 mostrando la presencia del protón del grupo hidroxiiimino, un doble triplete a δ_{H} 2,95 ($J = 15,3, 4,7$ Hz) y un multiplete a δ_{H} 2,31-2,22 pertenecientes a H-2 β y H-2 α respectivamente y, un doblete

a δ_H 2,71 ($J = 13,6$ Hz) y otro a δ_H 1,81 ($J = 13,6$ Hz) correspondientes a H-15 que indicaron la presencia del grupo carbonilo en C-16 (Figura 55).

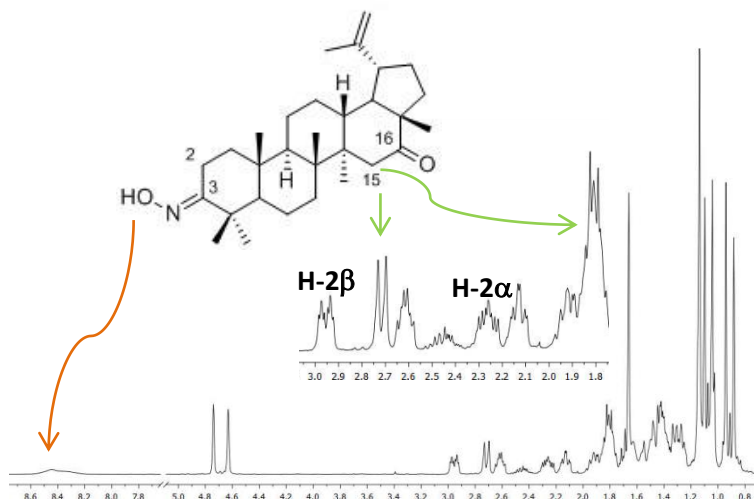


Figura 55. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H que confirman la estructura de **41**

Estas observaciones fueron corroboradas a través del espectro de RMN de ^{13}C que mostró una señal a δ_C 167,0 característica de un carbono cuaternario de oxima (C-3) y otra a δ_C 216,0 propia de un grupo carbonilo (C-16), confirmando la formación de 3*E*-hidroxiiminolup-20(29)-en-16-ona (**41**) (Figura 56).

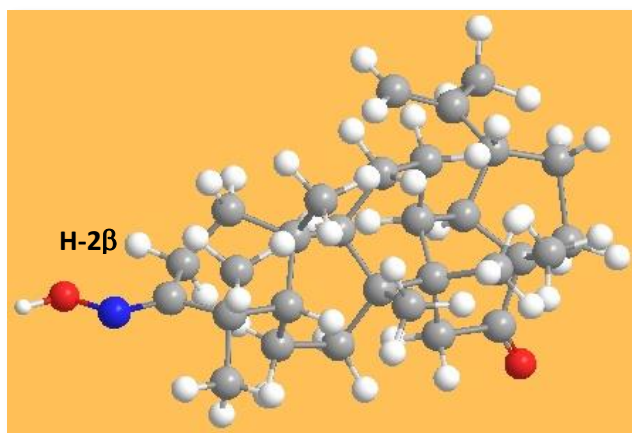


Figura 56. Estructura tridimensional del isómero *E* de **41**

Teniendo en cuenta estos resultados, se planteó la síntesis de la dioxima **42** utilizando la misma metodología pero calentando a reflujo. El bruto de reacción reveló un producto mayoritario con un R_f menor que el correspondiente al derivado **41**. Luego de su purificación se obtuvo **42** (lup-20(29)-en-3,16-

dioxima) con un 35,0% de rendimiento (ver Figura 59). El análisis espectroscópico permitió confirmar la estructura de **42**, observándose en el espectro de RMN de ^1H dos singuletes anchos característicos del protón del grupo hidroxiiimino a δ_{H} 9,68 y a δ_{H} 9,58, y dos dobletes a δ_{H} 2,90 ($J = 13,4$ Hz) y a δ_{H} 1,93 ($J = 13,4$ Hz) que correlacionaron en el espectro de HSQC con el C-15 (δ_{C} 27,4), además de las señales pertenecientes a H-2 que confirman la configuración *E* del grupo hidroxiiimino del C-3 (Figura 57). La desprotección observada para el H-15 β respecto del sustrato de partida indicó la proximidad del oxígeno del grupo hidroxiiimino a ese protón determinándose la configuración *E* también en C-16.

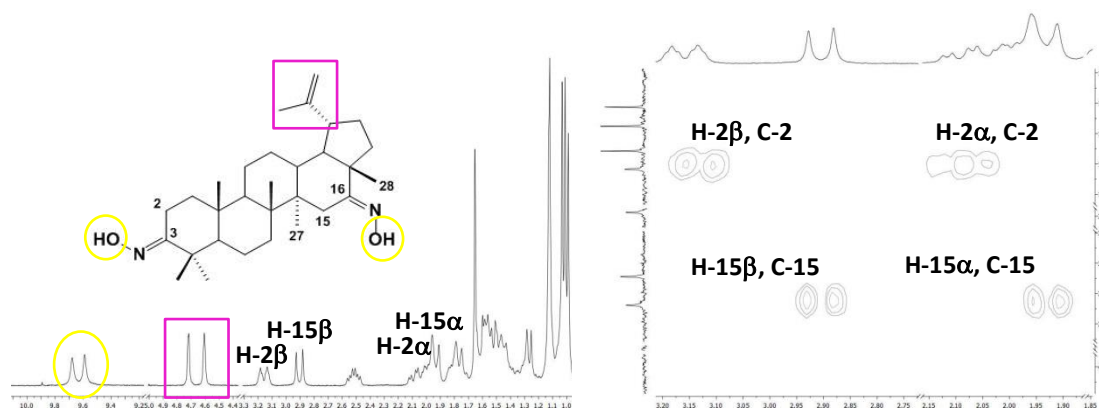


Figura 57. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y correlaciones HSQC de **42**

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron dos señales de carbono cuaternario unido a un grupo hidroxiiimino, confirmando a través de las correlaciones observadas en el espectro de HMBC la posición de los mismos (C-3 δ_{C} 167,2 y C-16 δ_{C} 165,2) (Figura 58).

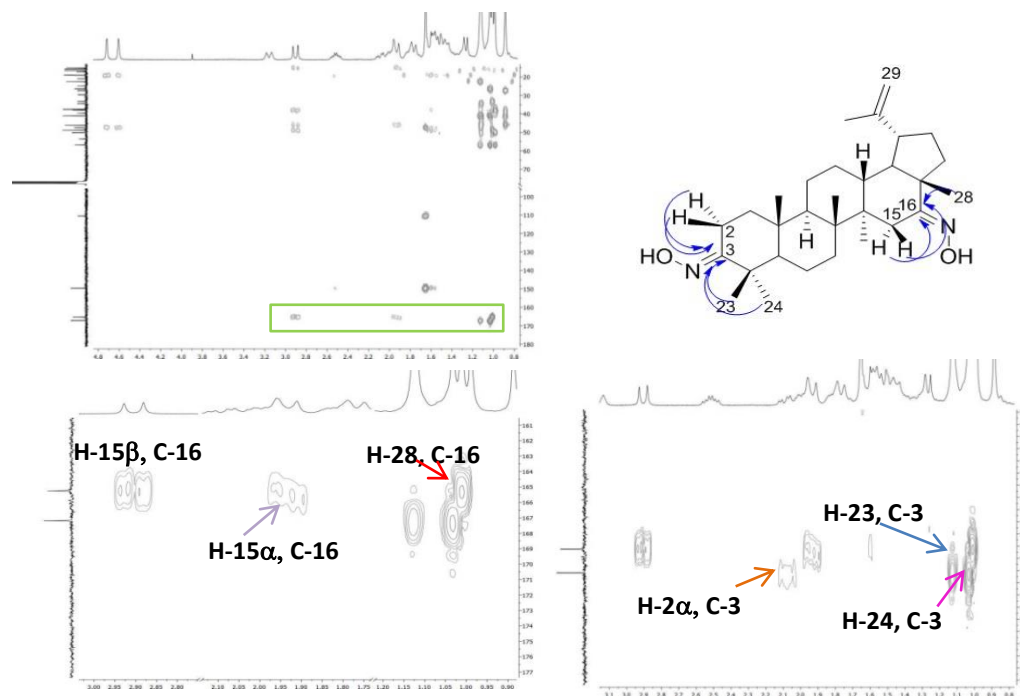


Figura 58. Principales correlaciones HMBC de **42**

Posteriormente, el tratamiento del derivado tricarbónico **36** con cloruro de hidroxilamina calentando a reflujo dio lugar a la formación de dos productos de reacción identificados mediante cromatografía en capa fina. La purificación y caracterización de estos compuestos a través del análisis espectroscópico permitió reconocer el análogo dihidroxiimino **43** (3,30-dihidroxiimino-lup-20(29)-en-16-ona) (23,0%) y el derivado trihidroxiimino **44** (lup-20(29)-en-3,16,30-trioxima) (31,0%) (ver Figura 59). La similitud de las señales observadas en el espectro de RMN de ^1H de **43** respecto de **41**, permitió determinar que uno de los grupos hidroxiimino se encontraba en la posición 3 (*E*); mientras que el corrimiento de las señales de los protones del grupo isopropenilo (H-30 δ_{H} 9,51 a 7,73 y H-29 δ_{H} 6,27 a 5,39 y δ_{H} 5,91 a 5,22) indicó que la ubicación del segundo grupo hidroxiimino era en C-30. Estas observaciones fueron confirmadas a través de RMN de ^{13}C donde se observaron dos señales correspondientes al carbono cuaternario del grupo hidroxiimino (C-3 δ_{C} 167,3 y C-30 δ_{C} 152,8) y el desplazamiento a campos mayores de C-20 (δ_{C} 156,2 a 151,0) y C-29 (δ_{C} 133,3 a 120,4).

Los datos espectroscópicos de **43** correspondientes a los grupos hidroxiiminos de C-3 y C-30 coincidieron con los observados para **44**. El tercer grupo hidroxiimino fue asignado de acuerdo a las siguientes señales características: dos dobletes a δ_{H} 2,99 ($J = 15,5$ Hz) y a δ_{H} 1,96 ($J = 15,5$ Hz) que

correlacionaron con el C-15 (δ_c 28,2), y una señal de carbono cuaternario a δ_c 166,4 propia de un grupo hidroxiimino, confirmando la ubicación de este grupo en C-16 (E).

La siguiente figura describe la síntesis de las oximas **41-44** a partir de los derivados di- y tricarbónicos de calenduladiol (**33** y **36**) (Figura 59).

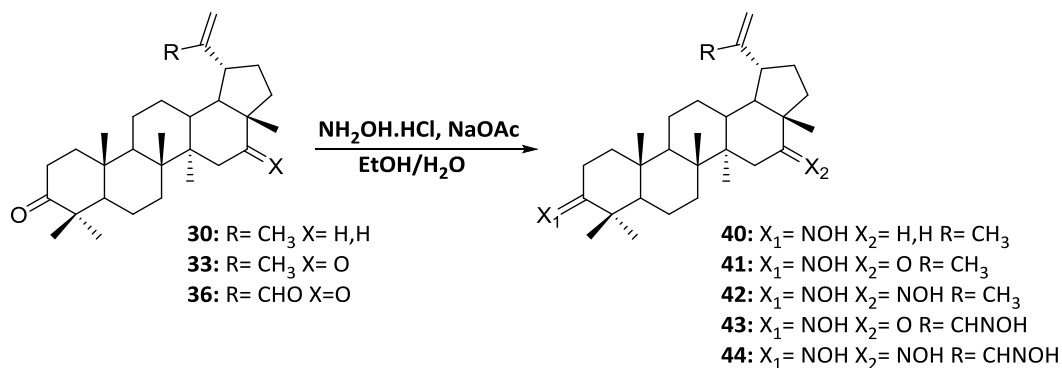
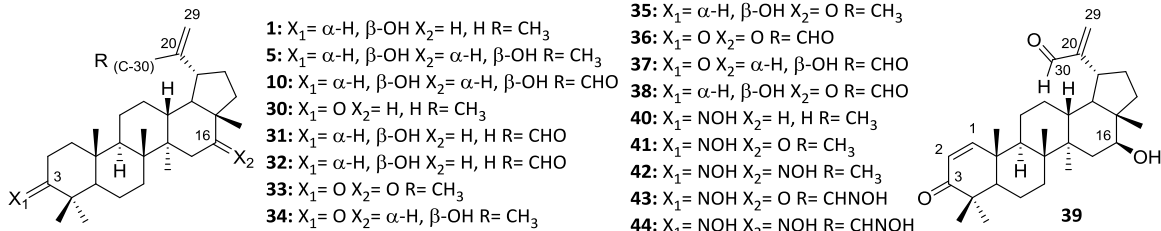


Figura 59. Obtención de oximas de lupeol y calenduladiol a partir de compuestos carbonílicos

III.5.3 Estudios *in vitro* de ACE y BuCE

Se evaluó la actividad inhibitoria de ACE de los derivados mono-, di- y tricarbónicos y de las oximas obtenidos anteriormente (**10**, **30-44**) y se comparó con los datos de actividad de los sustratos de partida naturales (**1** y **5**). La inhibición de ACE fue determinada por el método de Ellman utilizando tacrina como compuesto de referencia. Los compuestos carbonílicos derivados de calenduladiol **10**, **34-36** y **39** mostraron un incremento en el PI respecto del triterpeno natural (**5**). Para estos análogos se determinó el valor de IC₅₀, exhibiendo en todos los casos una débil inhibición de ACE con valores superiores a 200 μ M (Tabla 10).

En una segunda etapa, todos los análogos obtenidos fueron evaluados como potenciales inhibidores de BuCE. En primer lugar se determinó el PI a una concentración fija. Los derivados carbonílicos **33-36**, **38** y **39**, y las oximas **40-43** mostraron mejor inhibición que los sustratos de partida (**1** y **5**) bajo las mismas condiciones experimentales. Posteriormente se determinó el IC₅₀ para los mismos, presentando los derivados **33**, **35**, **36**, **38**, **41** y **43** valores de IC₅₀ menores a 200 μ M con selectividad hacia BuCE. Los compuestos más activos fueron **35** y **36** con valores de IC₅₀ de 28,9 y 21,5 μ M e índices de selectividad mayores a 6,92 y 9,30, respectivamente. Los resultados de la inhibición enzimática de BuCE se presentan en la Tabla 10, en la página siguiente.

Tabla 10. Inhibición de la actividad ACE y BuCE e índice de selectividad de **1, 5, 10, 30-44**


Compuesto	ACE ^a		BuCE ^b		Índice de selectividad ^c
	PI a 200 μM	IC ₅₀ (μM)	PI a 200 μM	IC ₅₀ (μM)	
1	21,3 ± 2,7	>200	31,0 ± 2,2	>200	
5	8,1 ± 0,2	>200	42,0 ± 0,8	>200	
10	43,5 ± 1,1	>200	42,0 ± 4,4	-	
30	8,8 ± 1,2	-	10,2 ± 1,4	-	
31	5,7 ± 0,4	-	3,2 ± 1,0	-	
32	n.i.	-	28,9 ± 3,1	-	
33	6,4 ± 0,3	-	61,4 ± 0,5	154,6 ± 2,3	
34	12,6 ± 1,5	>200	43,5 ± 0,9	>200	
35	40,2 ± 2,1	>200	> 100	28,9 ± 2,1	>6,92
36	21,7 ± 1,2	>200	86,5 ± 2,7	21,5 ± 1,2	>9,30
37	n.i.	-	35,3		
38	29,7 ± 0,8	>200	> 100	76,8 ± 0,3	>2,60
39	n.i.	-	44,6 ± 0,6	>200	
40	5,3 ± 1,0	-	43,7 ± 0,4	>200	
41	7,6 ± 1,2	-	82,8 ± 0,9	83,7 ± 0,1	
42	2,4 ± 1,0	-	47,4 ± 0,7	>200	
43	n.i.	-	55,1 ± 1,2	174,2 ± 0,1	
44	4,3 ± 1,5	-	29,2 ± 1,0	-	
Tacrina	-	0,0029 ± 0,002	-	0,004 ± 0,001	

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

En base a los resultados observados en la tabla, se puede concluir que 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, carbonilo o hidroxiimino). 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 (Figura 60). 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 EA, lo que indica que esta enzima puede desempeñar un papel importante en las últimas etapas de la enfermedad.

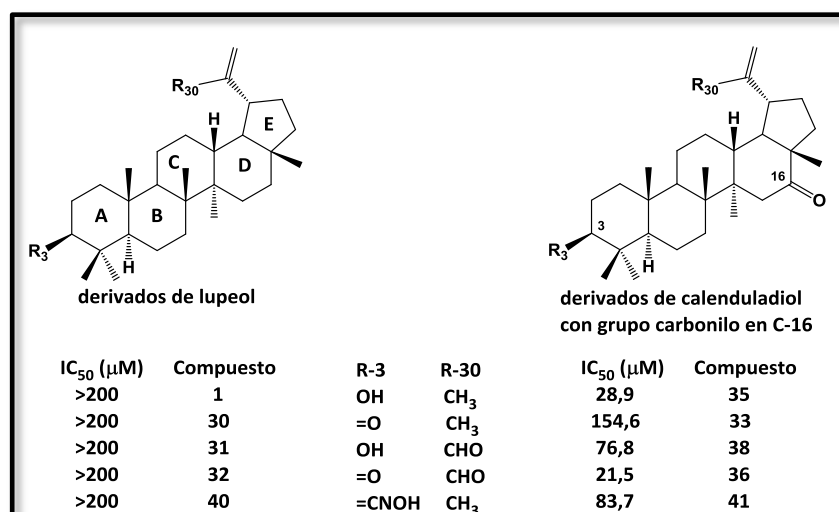


Figura 60. Estudio comparativo de actividad anti-BuCE entre análogos de lupeol y calenduladiol con un grupo carbonilo en C-16

III.5.3.1 Caracterización cinética de la inhibición de BuCE

Los compuestos carbonílicos **35** y **36**, identificados como los inhibidores más potentes frente a BuCE, fueron elegidos para determinar el mecanismo de inhibición enzimática mediante el estudio cinético de esta enzima. Con este objetivo se midió la velocidad inicial de la reacción de inhibición a concentraciones variables del sustrato, manteniendo fija la concentración del inhibidor (10 y 75 μM de **35**, y 20 y 70 μM de **36**). Los resultados se presentan en forma de gráfico de *Lineweaver-Burk* (Figura 61), con los valores de $1/V$ vs $1/[S]$. Para ambos análogos, el gráfico de doble-recíproca mostró que la V_{max} no varía al cambiar la concentración del inhibidor, gráficamente representado por rectas que se cortan en el mismo punto (para $X = 0$). Esto explica que el inhibidor no altera la catálisis del complejo enzima-sustrato ya que no puede unirse a este complejo. Sin embargo, la K_m varía, observándose en la gráfica los

distintos puntos de corte para $y = 0$, demostrando que el inhibidor interfiere con la unión del sustrato. La relación $\alpha K_m/V_{max}$ determina la pendiente de la recta, la cual depende de la concentración del inhibidor, por lo tanto, la eficacia de este tipo de inhibidores competitivos depende de su concentración respecto a la del sustrato. La regresión no lineal de los datos utilizando el programa GradPad Prism 5 condujo al mismo resultado, el cual se ajustó a un modelo de tipo competitivo y permitió estimar los valores de K_i , siendo de $51,16 \mu\text{M}$ para **35** y de $32,70 \mu\text{M}$ para **36**. Por lo tanto, el estudio cinético de inhibición sugirió que tanto el análogo **35** como el **36** presentan afinidad por el sitio activo de la enzima y, por lo tanto, compiten con el sustrato por el acceso al mismo.

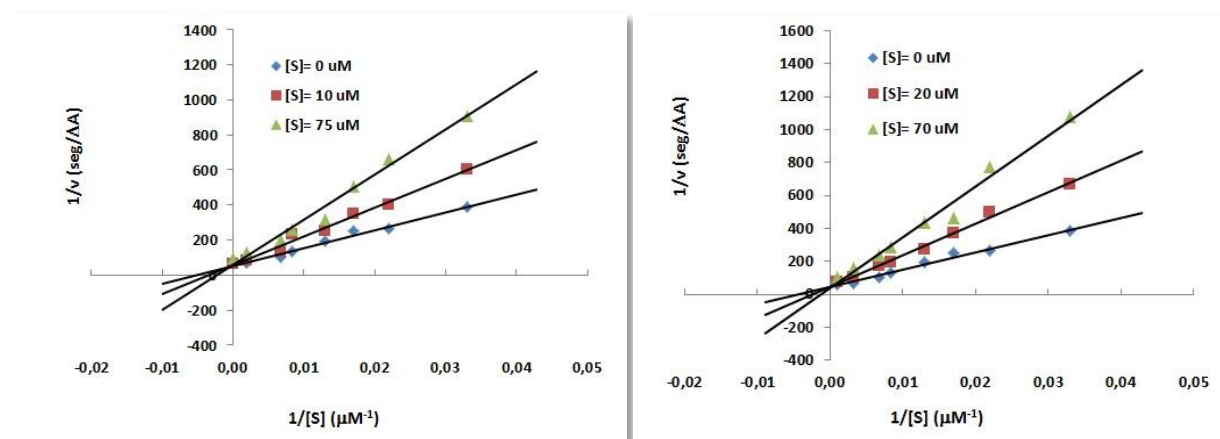


Figura 61. Gráfica de *Lineweaver-Burk* para la inhibición de BuCE de los compuestos **35** y **36**

III.5.3.2 Estudios de modelado molecular

Con el propósito de tener una visión molecular sobre el modo de acción de **35** y **36** 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 esqueletos lupano hacia BuCE. Los estudios de *docking* que fueron realizados mediante una colaboración con la Dra. Victoria Richmond (UMYMFOR, UBA), se llevaron a cabo con las enzimas libres (sin AC). Esto se debe a que los derivados carbonílicos **35** y **36** inhiben a la BuCE de manera competitiva mientras que en el caso de la ACE, aunque no la inhiben, también se realizó el análisis computacional con la enzima sin sustrato. En el caso del *docking* realizado con la ACE la enzima utilizada para el modelado molecular correspondió a la estructura cristalográfica de la ACE de la *Torpedo californica* libre (entrada 2ACE) [149] y para el *docking* realizado con la BuCE, la enzima BuCE humana

(entrada 1P0I) [150], ambas reportadas en el Protein Data Bank. La restricción conformacional que presentan estas moléculas condujo en todos los casos a un único *cluster* de confómeros.

Los estudios de acoplamiento con BuCE indicaron interacciones entre cada inhibidor y el PAS, y entre éste y el CAS; esto último explica el mecanismo competitivo con el que inhiben la enzima. Específicamente para el compuesto **35** se observó que penetra en el bolsillo a través del anillo A, acomodando los anillos A y B cerca del sitio activo de la BuCE y los anillos D y E dentro del sitio periférico. Las principales interacciones hidrofóbicas entre el esqueleto hidrocarbonado del inhibidor y la proteína fueron observadas con los residuos: Val288, Phe398, Leu286, Phe329 y Pro285. Además, los resultados del *docking* mostraron que la afinidad del inhibidor por la enzima se encuentra favorecida por enlaces de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del anillo A con el carbonilo de Leu286, y entre el grupo carbonilo del anillo D y el hidroxilo de Thr120, a una distancia de 2,18 y 2,26 Å respectivamente (Figura 62).

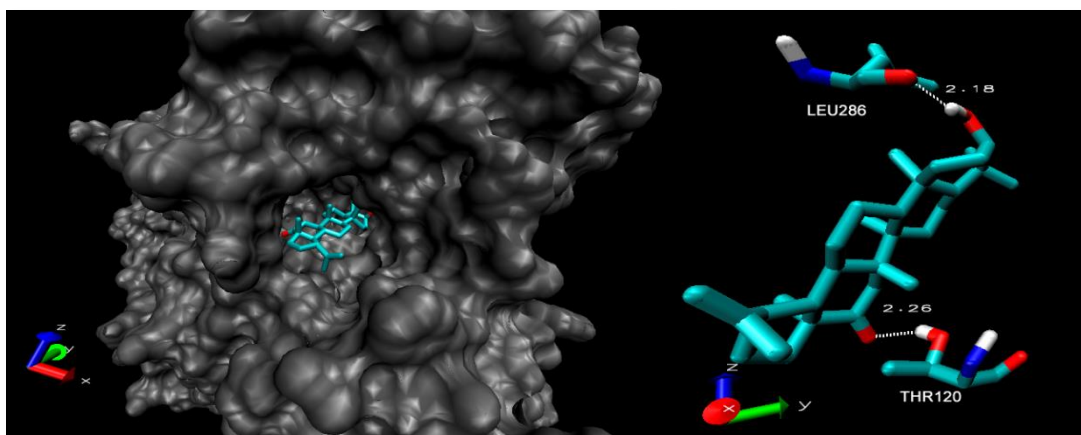


Figura 62. Resultados del *docking* para el compuesto **35**. (A) Ingreso al bolsillo de BuCE (izquierda). (B) Enlaces de hidrógeno con BuCE (derecha)

El *docking* del compuesto **36** mostró que, al igual que **35**, el triterpeno ingresa al bolsillo de la enzima por el anillo A, adoptando una conformación similar a la del análogo hidroxilado en C-3, **35**. Las interacciones hidrofóbicas entre el esqueleto hidrocarbonado lupano del inhibidor y la enzima fueron principalmente con los residuos: Ala328, Trp430, Asp70, Trp82 y Tyr332. También se observaron enlaces de hidrógeno, en este caso involucrando dos de los tres grupos carbonilo presentes en el triterpeno: entre el carbonilo del anillo A y el grupo amino de Trp82 y el hidroxilo de Tyr440, y entre el carbonilo del anillo E y el grupo amino de Thr120, a una distancia de 2,11, 2,01 y 2,24 Å respectivamente (Figura 63).

Estos resultados muestran que el enlace de hidrógeno adicional observado para **36** podría estar otorgándole a este derivado una mayor estabilidad en el sitio activo de BuCE, lo cual se correlaciona con los resultados de la inhibición *in vitro* que establecen que **36** es levemente más activo que **35**.

La presencia de interacciones con residuos en el fondo de la cavidad observada para los compuestos **35** y **36** parece ser necesaria para bloquear la acción de la tríada catalítica de BuCE y lograr un aumento de la actividad inhibitoria de estos compuestos. Sin embargo diferentes grupos funcionales participan en estas interacciones en cada caso; por lo tanto, estos estudios no son suficientes para justificar el aumento de la actividad inhibitoria debido a la presencia del grupo carbonilo en C-16 como demostró el estudio *in vitro*.

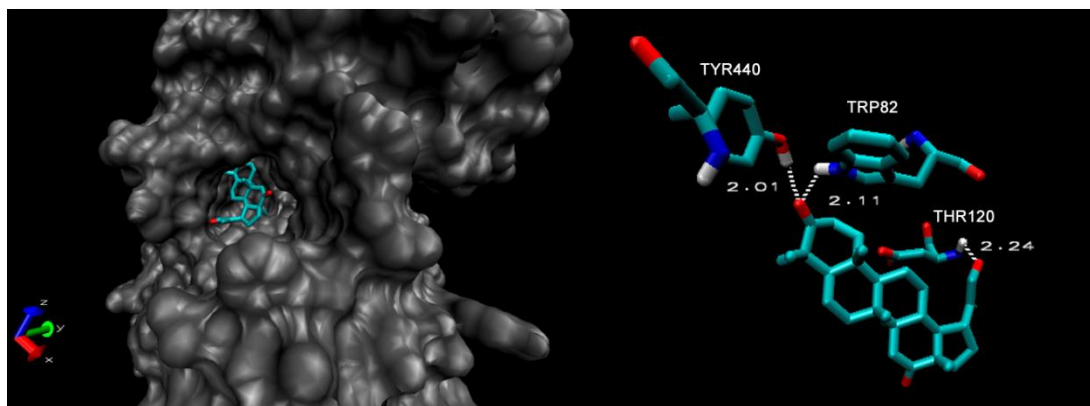


Figura 63. Resultados del *docking* para el compuesto **36**. (A) Ingreso al bolsillo de BuCE (izquierda). (B) Enlaces de hidrógeno con BuCE (derecha)

El modelado molecular del compuesto **35** con ACE sólo mostró interacciones hidrofóbicas; en cambio en el *docking* del derivado **36** se observó un enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la cadena lateral (C-30) y el grupo amino de Phe288 (1,88 Å), además de interacciones hidrofóbicas entre los anillos B, C y D y residuos aromáticos del PAS. Estos resultados muestran claras diferencias en el número de interacciones entre cada estructura triterpénica y ambas colinesterasas. Cabe destacar que al realizar el estudio computacional con el bolsillo de la ACE sin su sustrato -la AC-, el ligando puede acomodarse mejor y dar lugar a mejores interacciones. Con lo cual, aun en la más favorable de las situaciones frente a la ACE, se observan menos interacciones entre cada derivado y esta enzima, pudiendo explicar la selectividad de los mismos.

Los resultados de modelado molecular revelaron que los análogos lupanos **35** y **36** presentan mayor número de interacciones en el sitio activo de BuCE. Este hecho es lógico teniendo en cuenta que

estas estructuras voluminosas se alojan mejor en el sitio activo de esta enzima, donde el volumen de la cavidad es 200 Å mayor que el de ACE, facilitando las interacciones enzima-inhibidor. Sin embargo, estudios de dinámica molecular son necesarios para verificar la estabilidad de los complejos de enzima-inhibidor obtenidos en los estudios de *docking* y para revelar el mecanismo que justifique que todos los derivados obtenidos (**10, 30-44**) sean completamente inactivos frente a ACE según los ensayos *in vitro*. Asimismo, este estudio podría mostrar interacciones que no fueron reconocidas en el *docking* de estos compuestos que expliquen el incremento de la actividad anti-BuCE en los 16-oxo derivados obtenidos.

III.6 Reducciones

III.6.1 Alcoholes triterpénicos epímeros

En los últimos años, varios grupos de investigación han observado que la conversión estereoquímica de los carbonos unidos a grupos hidroxilos en triterpenos de la serie lupano conduce a una mejora de la actividad biológica estudiada. Por ejemplo, Symon y *col.* establecieron un aumento de la actividad frente a células de melanoma humano para la serie 3 β -hidroxi-, 3-ceto-, 3 α -hidroxi derivados de ácido betulínico [151]. En sus estudios, Reyes y *col.* determinaron que la orientación del grupo hidroxilo del C-3 puede modificar la actividad antiinflamatoria de este tipo de triterpenos [152]. Previamente, los mismos autores reportaron el aislamiento de una serie de triterpenos tipo lupano durante el estudio fitoquímico de especies de *Maytenus*, y entre ellos destacaron el ácido 3-*epi*betulínico, 28,30-dihidroxilup-20(29)-en-3-ona, nepeticina y glochidonol por exhibir actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer humano de cuello uterino (HeLa) y de laringe (Hep-2), siendo el más activo el ácido 3-*epi*betulínico (Figura 64) [153].

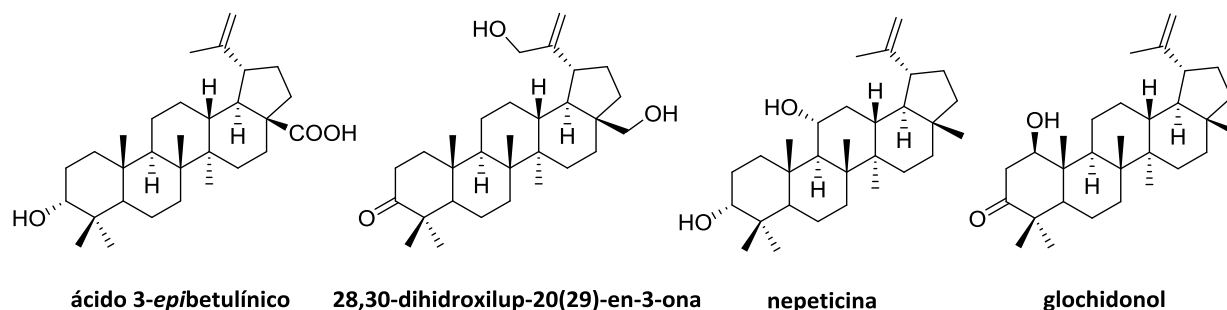


Figura 64. Triterpenos tipo lupano bioactivos

Akihisa y *col.* llevaron a cabo el estudio de la especie *Chrysanthemum morifolium*, una Asteraceae utilizada en la medicina china tradicional, que condujo al aislamiento de veintiseis 3 β -hidroxi triterpenos. La semisíntesis a partir de uno de ellos con esqueleto lupano, lupeol, condujo al análogo con configuración α , *epi*-lupeol. Los ensayos de actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* revelaron que la conversión de la estereoquímica del C-3 incrementa significativamente la actividad (MIC lupeol > 64 μ g/ml y MIC *epi*-lupeol = 4 μ g/ml) [154].

Teniendo en cuenta las observaciones realizadas por estos autores y que no son muchos los antecedentes que reportan el aislamiento de 3 α -hidroxitriterpenos tipo lupano, lo que demuestra que son menos comunes en la naturaleza, resulta interesante la síntesis desde sus epímeros 3 β , más

disponibles. El triterpeno natural calenduladiol (**5**) aislado de la especie *C. erinaceae* presenta una estructura novedosa para la obtención de alcoholes epímeros debido a la presencia de un segundo grupo hidroxilo en el C-16 ofreciendo un centro adicional de epimerización. Hasta el presente, existen dos reportes en literatura sobre el aislamiento de 3-epicalenduladiol a partir de especies de *Maytenus* (Celastraceae) [152,155], sin registros de ningún tipo de actividad biológica. Se planteó entonces invertir la configuración de C-3 y C-16 del triterpeno natural y evaluar la actividad inhibitoria enzimática para dilucidar cuál es la orientación en cada posición que favorece más la interacción de estos triterpenos con las enzimas.

Se han investigado distintas técnicas para la síntesis de alcoholes triterpénicos. Por ejemplo, los hidruros inorgánicos, como el NaBH_4 , se utilizan para la reducción de cetonas triterpénicas conduciendo a una mezcla de alcoholes epímeros $\alpha:\beta$. En particular, este agente reductor fue reportado para la obtención de lupeol y ácido betulínico con una alta quimio- y diastereoselectividad hacia el epímero β [135,143]. Symon y *col.*, por su parte, estudiaron dos métodos para la obtención de ácido 3α -betulínico y compuestos relacionados a partir de los epímeros 3β : sustitución nucleofílica bimolecular y reducción estereoselectiva de 3-cetoderivados [151]. Tanto la sustitución del grupo hidroxilo a través de la reacción de Mitsunobu y posterior hidrólisis como la sustitución del derivado tosilado, condujeron a los productos de $\Delta^{2,3}$ eliminación y en ninguno de los casos se obtuvo el producto de sustitución nucleofílica bimolecular esperado. Por otro lado, la hidrogenación catalítica de ácido betulínico sobre Ni Raney resultó sólo en la reducción del doble enlace isopropenilo de la cadena lateral, mientras que el uso de 5% de Ru-C dio una mezcla 60:40 ($\alpha:\beta$) de epímeros de ácido 20,29-dihidrobetulínico como consecuencia de la hidrogenación de los dobles enlaces C=O y C=C. Finalmente, la reducción de ácido betulínico con L-Selectride, un agente reductor voluminoso, condujo a los correspondientes epímeros de ácido betulínico con una mayor quimio- y similar estereoselectividad [151].

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta la continua colaboración con el grupo de investigación de 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, se propuso llevar a cabo la epimerización de las estructuras triterpénicas mediante hidrogenaciones catalíticas. El empleo de catalizadores heterogéneos para la reducción de estos compuestos 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. Estos sistemas cuentan además con la ventaja conocida de la fácil recuperación y reutilización del catalizador.

Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar se probaron condiciones de reacción utilizando como material de partida lupenona (**30**) (obtenida por oxidación de lupeol purificado por HPLC), debido a que presenta en su estructura sólo un posible centro de epimerización, simplificando su conversión a los correspondientes alcoholes isómeros.

Con el fin de obtener una muestra de *epilupeol* que sirva de referencia para el monitoreo de las reacciones catalíticas, se llevó a cabo la reducción de lupenona (**30**) con NaBH₄, teniendo en cuenta que este agente reductor es selectivo al epímero β. Para ello, una solución de **30** en MeOH anhidro se trató con NaBH₄ a temperatura ambiente. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina hasta la desaparición del sustrato de partida. El espectro de RMN de ¹H del bruto de reacción mostró la formación de una mezcla de isómeros α:β (**45** y **1**) en relación 10:90. La purificación por cromatografía en columna sobre sílica flash utilizando *n*-Hex:AcOEt 95:5 como fase móvil, condujo a la obtención de lupeol (**1**, *R_f* = 0,36) y *epilupeol* (**45**, *R_f* = 0,49). En la siguiente figura se presentan las principales señales observadas en los espectros de RMN de ¹H para cada uno de los alcoholes (Figura 65).

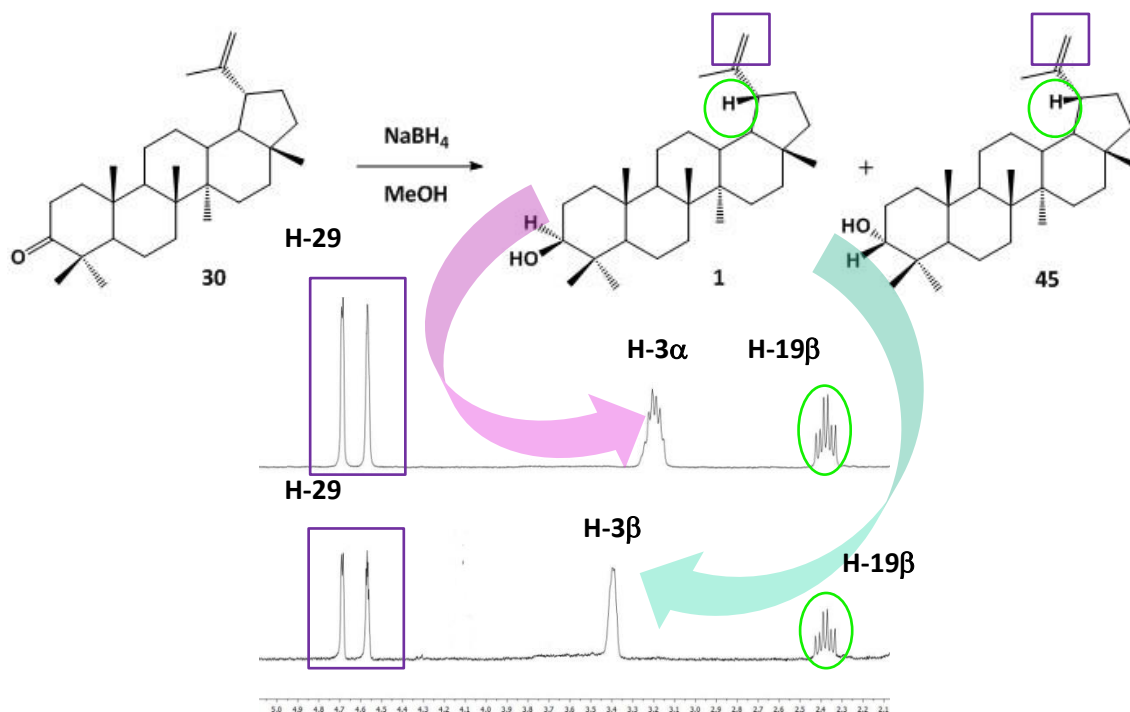


Figura 65. Principales desplazamientos químicos en los espectros de RMN de ¹H de **1** y **45**

El espectro de RMN de ^1H de **45** mostró un singulete ancho a δ_{H} 3,40 correspondiente al protón metínico geminal al grupo hidroxilo, el cual coincidió con el desplazamiento químico reportado para este triterpeno [143], confirmando la obtención del epímero 3α ; mientras que la señal de este protón para el epímero 3β correspondió a un doble doblete a δ_{H} 3,18 ($J = 10,6, 5,6$ Hz), tal como se indica en el espectro del compuesto **1**. En ambos casos se observaron las señales de los protones olefínicos a δ_{H} 4,66 y δ_{H} 4,57 como dos singuletes anchos y la señal del protón lupenilo H-19 β a δ_{H} 2,38 (ddd, $J = 11,2, 11,0, 5,7$ Hz), justificando la presencia del doble enlace en la cadena lateral.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el estudio de reducciones catalíticas del sustrato triterpénico lupenona (**30**). Teniendo en cuenta que el producto de hidrogenación buscado requiere una alta quimio- y estereoselectividad, fue de vital importancia el diseño de sistemas catalíticos que, además de activos, sean selectivos.

III.6.1.2 Reducciones catalíticas

Symon y *col.* revelaron que el tratamiento de cetonas triterpénicas con Ni Raney hidrogena el doble enlace presente en el anillo lupano, mientras que el grupo carbonilo permanece intacto [151]. Este hecho llevó a utilizar un metal más activo que reaccionara con el grupo carbonilo del C-3. Con este propósito se preparó un catalizador monometálico a base de Pt soportado sobre SiO_2 con un contenido metálico de 1% p/p (Pt/ SiO_2). La reacción de hidrogenación se llevó a cabo en un reactor tipo autoclave, a 10 atmósferas de presión de H_2 y a 100 °C, usando 0,7 mmol de sustrato/g de catalizador y 2-propanol como solvente. La evolución de la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina utilizando como testigo *epilupeol* preparado anteriormente, observándose la conversión total del sustrato a las 14 horas de reacción. Los productos fueron identificados por RMN de ^1H y ^{13}C como 20,29-dihidrolupan-3-ona (**46**) (35,6%) obtenida por hidrogenación de la cadena lateral, 20,29-dihidro*epilupeol* (**47**) (16,6%) y 20,29-dihidrolupeol (**48**) (40,0%), aductos de hidrogenación tanto de la cadena lateral como del grupo carbonilo (Figura 66).

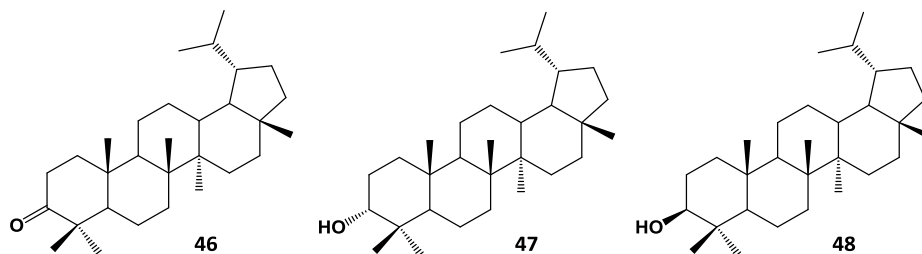


Figura 66. Productos de la reducción catalítica con Pt/SiO₂ de **30**

En el espectro de RMN de ¹H del bruto de reacción, la desaparición de los protones olefínicos y la protección del protón metínico H β -19 confirmaron la reducción total del doble enlace C=C. La proporción de epímeros α : β (**47** y **48**) obtenida correspondió a 32:68 (Figura 67).

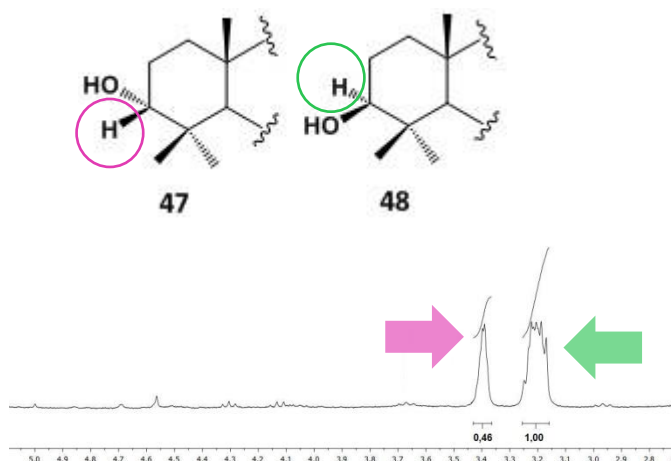


Figura 67. Relación de epímeros α : β obtenidos con Pt/SiO₂

Los resultados demostraron que el Pt resultó más eficiente que el Ni para la reducción del grupo carbonilo; sin embargo, no fue selectivo hacia este grupo funcional conduciendo en todos los casos a productos de hidrogenación del doble enlace del grupo isopropenilo.

A partir del resultado obtenido con el catalizador monometálico, se propuso diseñar un sistema catalítico quimioselectivo al grupo carbonilo. El nuevo sistema se preparó mediante el agregado de un segundo metal más electropositivo (Sn) que genera una modificación electrónica y geométrica de los sitios activos para la hidrogenación, favoreciendo la reducción del doble enlace C=O en presencia del doble enlace C=C. La modificación electrónica se debe a la diferencia de electronegatividad entre los dos metales que forman el catalizador bimetalico (Pt-Sn) conduciendo a la polarización del enlace carbonilo,

originando una alta selectividad a la obtención de alcoholes insaturados. La función que cumple el metal electropositivo sobre la superficie del metal de base consiste en actuar como electrófilo o sitio ácido de Lewis para la adsorción y activación del enlace C=O a través de uno de los pares de electrones libres del oxígeno. Los efectos geométricos generados se originarían por la dilución de los átomos de Pt debido a la presencia de Sn, dificultando la adsorción a través del doble enlace C=C de la cadena lateral y por lo tanto su hidrogenación (Figura 68).

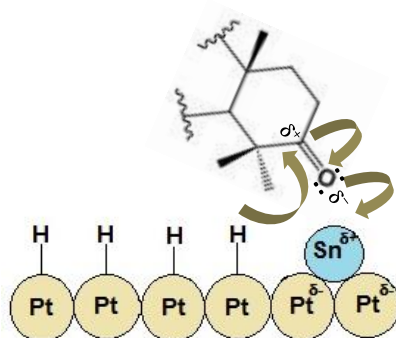


Figura 68. Efectos electrónicos y geométricos producidos por el Sn en el sistema bimetalítico PtSn

La preparación del catalizador se llevó a cabo a través de una reacción superficial controlada entre el metal de transición y el metal electropositivo, haciendo uso de técnicas derivadas de la química organometálica de superficies sobre metales (QOMS/M). Los detalles de la preparación y caracterización de estos sistemas pueden consultarse en un trabajo reciente publicado por Vetere y *col.* [156]. El catalizador bimetalítico consistió en Pt soportado sobre SiO₂ con una relación molar Sn/Pt = 0,2 (PtSn_{0,2}/SiO₂ 1% Pt). La hidrogenación de lupenona (**30**) se llevó a cabo bajo las mismas condiciones experimentales utilizadas con el catalizador monometálico. 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 por este sistema catalítico, con una relación $\alpha:\beta = 23:77$. Se observaron también las señales correspondientes a los protones olefínicos H-29. La relación de áreas entre estos protones (H-29a o H-29b) y el protón H-3 ($\alpha + \beta$), indicó que hubo un porcentaje de hidrogenación del doble enlace C=C (61,0%) por lo que este sistema no resultó completamente quimioselectivo. Por lo tanto, la reducción de **30** condujo a la obtención de 4 compuestos: **1** y **45**, aductos de hidrogenación del doble enlace C=O y, **47** y **48** productos de la reducción de los dobles enlaces C=C y C=O presentes en la estructura triterpénica. La Figura 69 muestra las principales señales observadas en el espectro de RMN de ¹H del bruto de

reducción, observándose la señal correspondiente de H-3 β a δ_H 3,40 y H-3 α a δ_H 3,20, además de las señales a δ_H 4,69 y δ_H 4,56 pertenecientes a los protones de la olefina terminal.

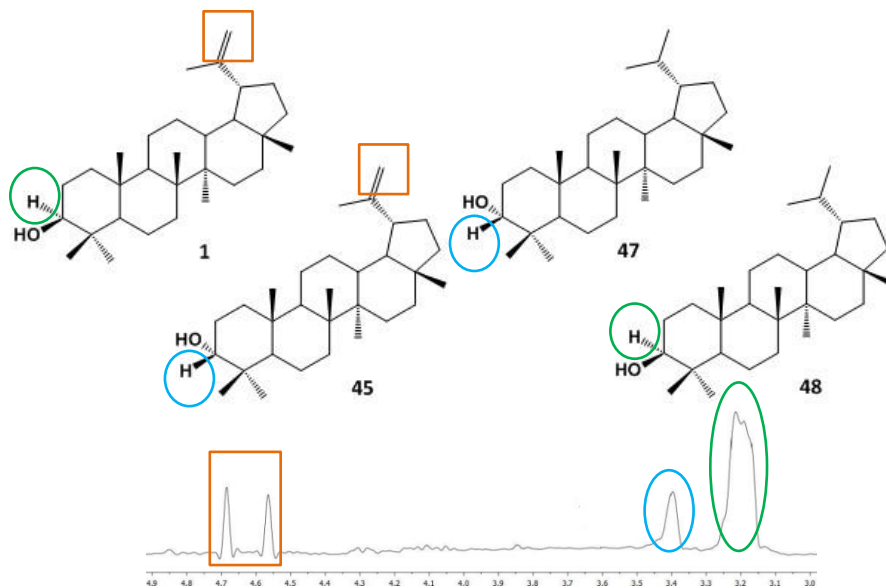


Figura 69. Principales desplazamientos químicos en el espectro de RMN de ^1H del bruto de reacción con $\text{PtSn}_{0,2}/\text{SiO}_2$

Los resultados con el catalizador de $\text{PtSn}_{0,2}$ 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 quimioselectiva. Por lo tanto, se decidió preparar un nuevo sistema catalítico aumentando la relación molar Sn/Pt a 0,8 ($\text{PtSn}_{0,8}/\text{SiO}_2$ 1% Pt). La reacción, que se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que con el sistema $\text{PtSn}_{0,2}$, se siguió por cromatografía en capa fina. Los productos de hidrogenación con este sistema revelaron dos manchas con una coloración verde que coincidieron con el testigo de lupeol (L) (**1**) y *epilupeol* (**45**), a diferencia de los productos obtenidos por reducción con $\text{PtSn}_{0,2}$ que exhibieron además dos manchas con una coloración violeta correspondientes al testigo 20,29-dihidrolupeol (LH) y al 20,29-dihidro*epilupeol* (Figura 70).

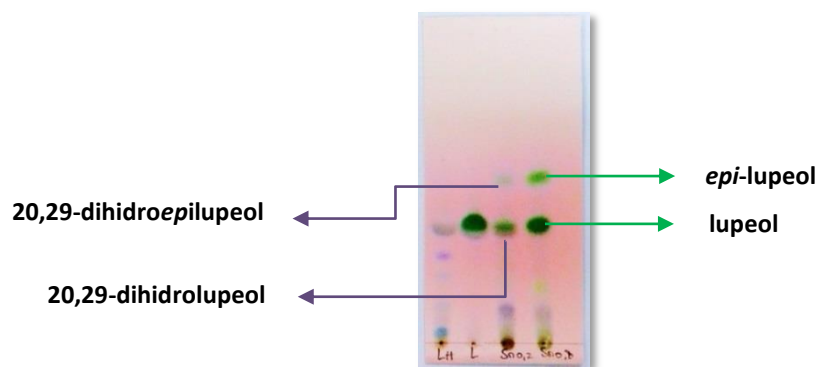


Figura 70. Cromatografía en capa fina, de izquierda a derecha: 20,29-dihidrolupeol (LH), lupeol (L), bruto PtSn_{0,2} y bruto PtSn_{0,8}

Esta característica en la coloración de las manchas, observada en la cromatografía en capa fina para el sistema PtSn_{0,8}, indicó, por lo tanto, la ausencia de producto de hidrogenación del doble enlace C=C. El análisis de RMN de ¹H del bruto de reacción permitió confirmar esta observación a través de la relación de áreas entre los protones: H-19β:H-3α:H-3β:H-29a:H-29b, demostrando la quimioselectividad de este sistema (Figura 71). Por RMN de ¹H también se pudo observar que la relación de epímeros (**45** y **1**) fue α:β = 38:62, mostrando un aumento en la proporción del epímero α con el sistema PtSn_{0,8} respecto de los estudiados anteriormente (Figura 71).

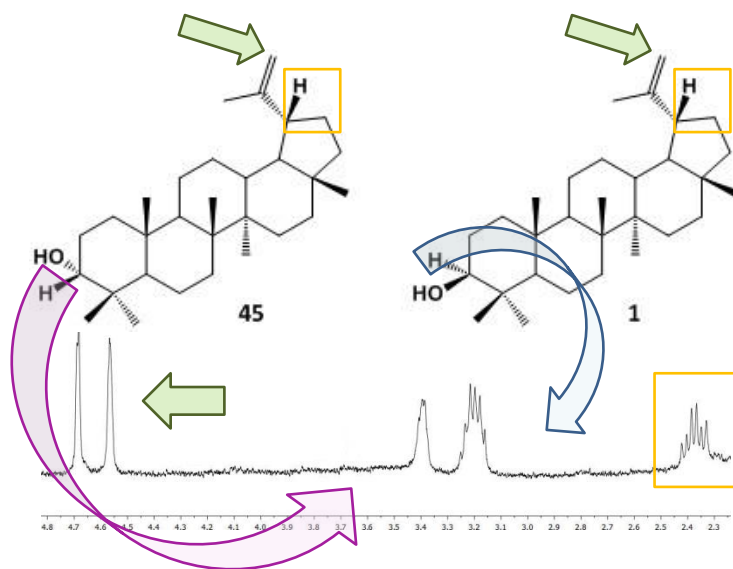


Figura 71. Principales desplazamientos químicos en el espectro de RMN de ¹H del bruto de reacción con PtSn_{0,8}

Una interpretación gráfica de la hidrogenación de **30** con el catalizador $\text{PtSn}_{0,8}/\text{SiO}_2$ sugiere que la molécula de lupenona podría aproximarse al catalizador por una u otra cara, ya que en ambas existe cierto impedimento estérico. Sin embargo, la cantidad de lupeol obtenido, superior a la de *epi*lupeol, parece indicar que probablemente la molécula de lupenona pueda aproximarse a la superficie catalítica, en forma preferencial, en una orientación paralela, con uno de los grupos metilos unidos al C-4 apuntando hacia el catalizador. De esta forma la cetona podría formar un complejo de adsorción en el cual el átomo de oxígeno, polarizado negativamente, reacciona con un átomo de hidrógeno obteniéndose lupeol, con el grupo hidroxilo en posición ecuatorial (Figura 72).

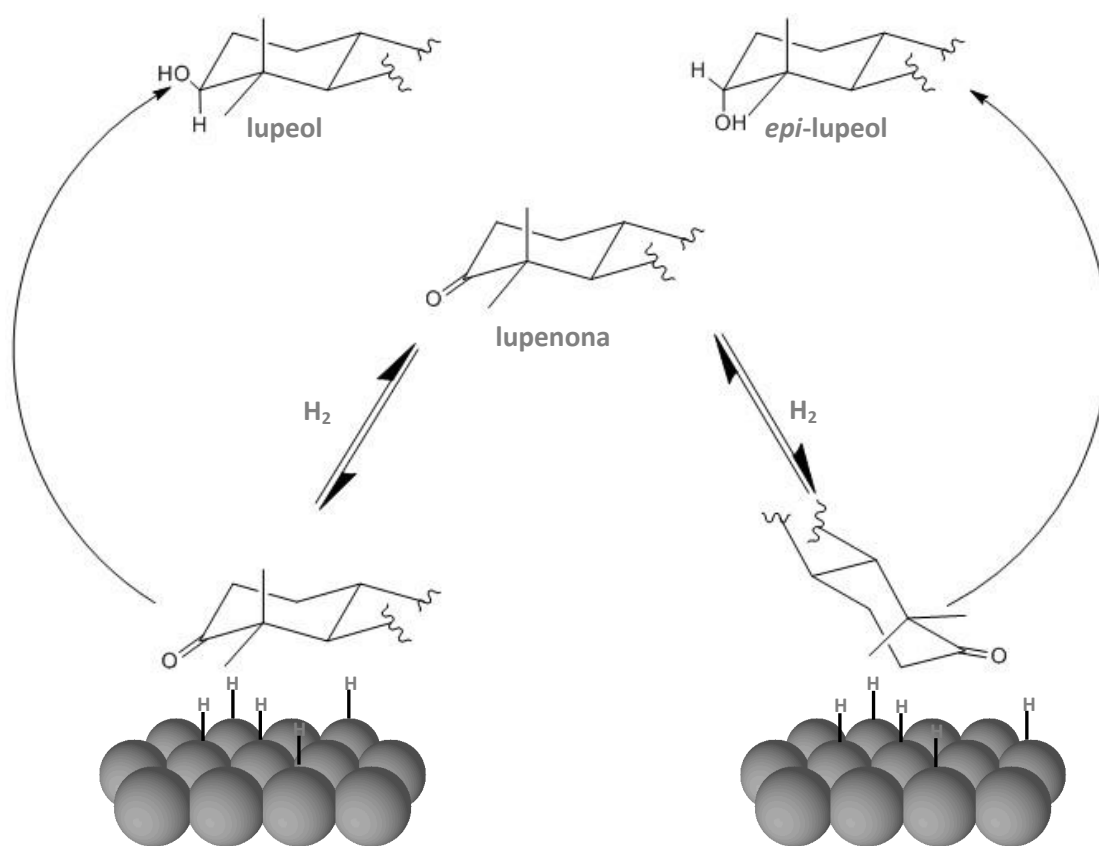


Figura 72. Representación esquemática de la adsorción de lupenona al catalizador $\text{PtSn}_{0,8}$ a través de sus dos caras

Al comparar los resultados de hidrogenación obtenidos para la lupenona, se puede observar que existe una gran diferencia entre el comportamiento del NaBH_4 y los catalizadores heterogéneos utilizados. El NaBH_4 es un compuesto activo que reduce rápida y específicamente el grupo $\text{C}=\text{O}$ conduciendo a la formación del alcohol insaturado, lupeol, como producto mayoritario. Tal como se ha

indicado anteriormente, cuando se emplea el catalizador monometálico Pt/SiO₂, los productos obtenidos en mayor proporción resultan de la hidrogenación de la cadena lateral. En cambio, con el uso de los catalizadores modificados con Sn, se observa un aumento de los productos de reducción del grupo carbonilo, variando la proporción de los epímeros según el porcentaje de Sn utilizado (PtSn_{0,2} α:β = 23:77, PtSn_{0,8} α:β = 38:62). Una probable explicación de este hecho podría deberse a que el Sn, al acelerar la velocidad de hidrogenación como consecuencia del aumento de la electrofilia del grupo carbonilo, disminuye la posibilidad de obtener el producto termodinámicamente más estable (OH ecuatorial, β) conduciendo a una mayor proporción del epímero α. Además, una mayor proporción de Sn explicaría un incremento del epímero deseado.

La Figura 73 muestra los espectros de RMN de ¹H de todos los sistemas de reducción química y catalítica utilizados, pudiéndose observar en cada uno de ellos los principales productos obtenidos.

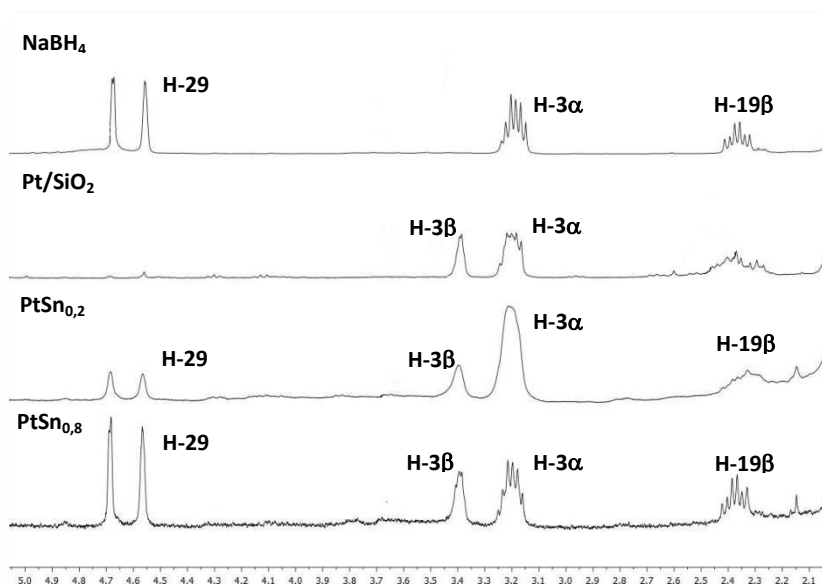


Figura 73. Espectros de RMN de ¹H de los productos de reducción de **30** con los diferentes sistemas utilizados

Continuando con el objetivo propuesto en esta tesis dirigido a la búsqueda de nuevos inhibidores de colinesterasas, se determinó la actividad *in vitro* de ACE y BuCE de los análogos obtenidos por reducción catalítica de lupenona (**45-48**) a través del PI para cada enzima calculado a una concentración fija, observándose en todos los casos una débil inhibición tanto de ACE como de BuCE. A pesar de estos resultados, con el fin de profundizar en las bases estructurales responsables de la actividad inhibitoria de triterpenos tipo lupano, se pensó que el estudio de la actividad anticolinesterasa de los alcoholes

epímeros de calenduladiol (**5**) podrían proporcionar resultados más trascendentes considerando la presencia de un segundo grupo hidroxilo en C-16.

En este contexto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la epimerización del grupo hidroxilo de lupeol llevada a cabo a través de la reducción catalítica de lupenona, se propone, a futuro, utilizar el sistema bimetálico $\text{PtSn}_{0,8}$ para la síntesis de los isómeros 3-*epi*- y 16-*epi*calenduladiol a partir de la reducción de los derivados carbonílicos **34** y **35**, respectivamente. Los resultados de actividad inhibitoria enzimática de estos análogos permitirán determinar qué orientación en cada posición (C-3 y C-16) es la más favorecida para la interacción de estos triterpenos con las enzimas.

III.6.2 Aminas triterpénicas

En los últimos años, la introducción de grupos alquilamino durante el proceso de síntesis de fármacos ha llamado considerablemente la atención. Diversos estudios han demostrado que la incorporación de grupos amino conduce a una mejora de las actividades anti-HIV, antitumoral y anticolinesterasa evaluadas para estos derivados triterpénicos [55,60,157]. Por ejemplo, la búsqueda de agentes con actividad antitumoral derivados del ácido betulínico, inspiró a Yang y *col.* a diseñar nuevos triterpenos mediante la introducción de grupos amino en la posición C-28 por tratamiento del grupo ácido presente en la estructura triterpénica con dibromoalcanos de diferente longitud y posterior reacción con aminas secundarias. El estudio de la actividad antitumoral contra las líneas celulares MGC-803, PC-3, A375, Bcap-37, y A431 sugirió que la presencia de este grupo funcional conduce a una mayor actividad antiproliferativa [157]. Posteriormente, estudios realizados por otros autores sobre hidroxipropargilaminas derivadas de la betulina, obtenidas mediante la reacción de Mannich, mostraron similares resultados [55].

Desde el punto de vista de sustratos inhibidores de colinesterasas, la importancia de la presencia de un grupo amino en la molécula se debe a que, a pH fisiológico, la protonación de este grupo básico facilita su interacción con el CAS de la enzima. Estudios recientes sobre una serie de amino derivados del ácido glicirretínico, preparados a partir de la introducción de grupos aminos en la cadena lateral del anillo oleanólico, ha llevado al descubrimiento de inhibidores selectivos contra BuCE. Los estudios de *docking* que muestran las interacciones iónicas entre la amina protonada y los residuos de aminoácidos del sitio activo de BuCE justifican el mecanismo de inhibición de este tipo de compuestos [60].

III.6.2.1 Preparación de aminas triterpénicas

La incorporación de grupos amino directamente unidos al esqueleto lupano conduce a la obtención de 3-amino derivados triterpénicos, los cuales presentan interesante actividad antitumoral y antiangiogénica [135,158]. Kim y *col.* informaron la síntesis del **ácido 3β-aminobetulónico** mediante aminación reductiva del **ácido betulónico** utilizando NH_4OAc y NaBH_3CN en MeOH [135]. Posteriormente, Mukherjee y *col.* reportaron la síntesis del **ácido 20,29-dihidro-3-aminobetulónico** a partir de la reducción de la oxima triterpénica con LiAlH_4 en THF, rindiendo principalmente el isómero β [158] (Figura 74). Más tarde, esta metodología fue utilizada por Misra y *col.* quienes sintetizaron 3β-aminolupeol como parte de la síntesis de híbridos derivados de lupeol y lupenona [159].

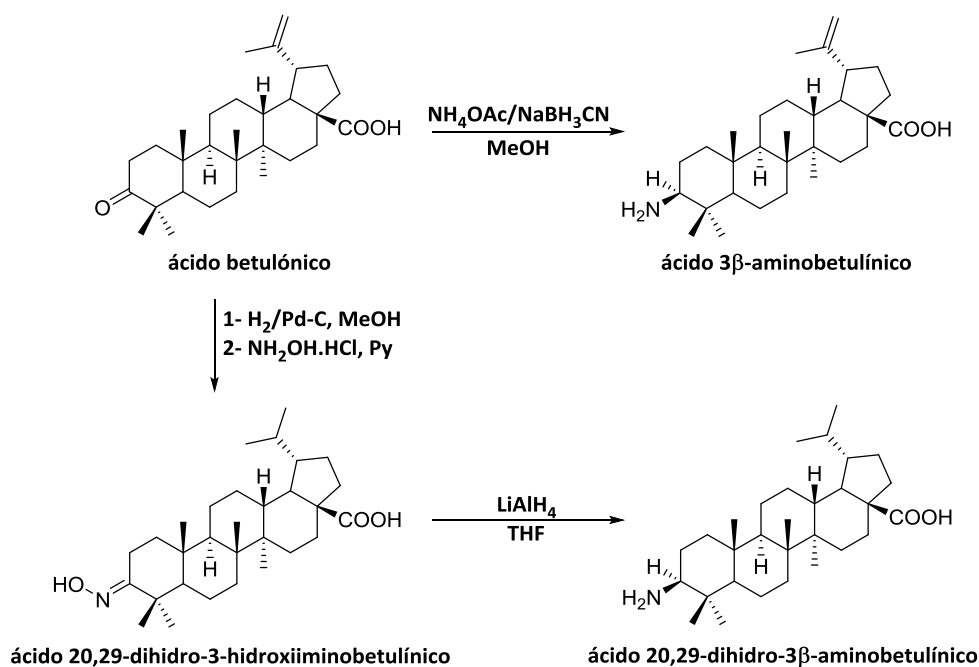


Figura 74. Síntesis de derivados de ácido 3β-aminobetulónico a través de diferentes vías

Continuando con la búsqueda de inhibidores de colinesterasas que puedan significar un aporte para el tratamiento de la EA, resultó interesante el diseño de la síntesis de aminas derivadas de los triterpenos naturales lupeol (**1**) y calenduladiol (**5**), a partir de la reducción de las oximas correspondientes, para su posterior evaluación enzimática. Teniendo en cuenta la metodología propuesta por Misra se llevó a cabo la reducción de la oxima **40** en THF con calentamiento a reflujo durante 7 horas. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina observándose la aparición de dos manchas. El espectro de RMN de ^1H del bruto de reacción mostró la formación de una mezcla de

isómeros $\alpha:\beta = 27:73$ (**49** y **50**), confirmados por el desplazamiento químico de los protones metínicos geminales al grupo amino: a δ_H 3,05 (H-3 β) y a δ_H 2,90 (H-3 α) (Figura 75). La purificación de la mezcla de reacción por cromatografía en columna rindió 3 α -aminolupeol (**49**) (6,0%) y 3 β -aminolupeol (**50**) (24,7%).

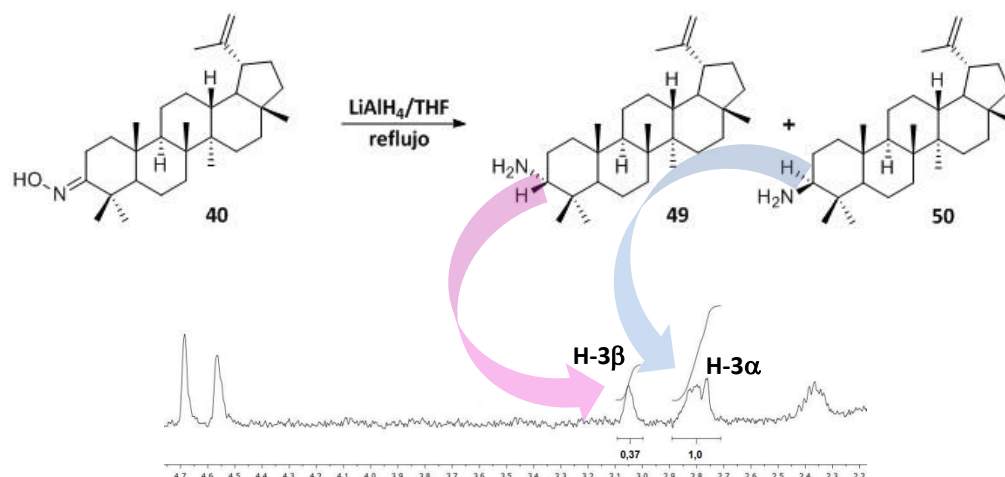


Figura 75. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H del bruto de reacción de **40**

La escasa cantidad de muestra del isómero α (**49**) impidió su caracterización espectroscópica, sin embargo, fue posible asignar de manera completa las señales correspondientes al isómero β (**50**) las cuales fueron confirmadas por los datos de RMN reportados por Misra [158].

Por otro lado, se evaluó *in vitro* la actividad inhibitoria de ACE y BuCE para el 3 β -aminolupeol (**50**) a una concentración fija, y se comparó con los datos de actividad del triterpeno natural **1**. Los resultados indicaron una débil inhibición de ACE (PI = 33,6%) con un valor de IC_{50} superior a 200 μM , mientras que se detectó una mayor inhibición para BuCE, con un PI de 57,4% y un $\text{IC}_{50} = 107,8 \pm 0,1$.

Este resultado sugiere que la presencia de un grupo amino en la estructura triterpénica favorece la inhibición de BuCE, posiblemente debido a la interacción iónica del grupo nitrogenado y el CAS de la enzima.

Se propone, a futuro, llevar a cabo la síntesis de las aminas derivadas del triterpeno natural calenduladiol (**5**) a partir de la reducción de la oximas correspondientes (**41-44**). Asimismo se repetirá la síntesis de 3 α -aminolupeol (**49**) con el fin de obtener cantidades suficientes para su caracterización y evaluación biológica. Los resultados de actividad inhibitoria de las nuevas aminas permitirá evaluar si se mantiene la selectividad hacia BuCE observada en el 3 β -aminolupeol, tal como lo reportado por Schwarz para aminas derivadas del ácido glicirretínico [60].

III.7 Citotoxicidad frente a PC-3 y LNCaP de triterpenos naturales y semisintéticos

Cada año, casi 700.000 hombres son diagnosticados con cáncer de próstata (Cap) en el mundo, y más de 200.000 mueren por causa de la enfermedad. En Argentina, el CaP es el más frecuente de todos los tumores que afecta a los hombres, principalmente de edad avanzada. Según el Ministerio de Salud de la Nación, en el año 2010 este tipo de tumor causó 3937 muertes. Debido a la complejidad y a la especificidad de esta enfermedad, es escaso el número de fármacos eficaces dirigidos al tratamiento de la misma, siendo necesario el hallazgo de nuevas entidades químicas capaces de convertirse en potentes agentes antitumorales.

Los triterpenos de origen vegetal 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 [160,161]. Por ejemplo, el triterpeno tipo lupano **glochidonol**, mencionado anteriormente, aislado durante el estudio fitoquímico de las raíces de *Phyllanthus pulcher* (Euphorbiaceae) mostró actividad citotóxica contra tres líneas celulares de cáncer humano, con valores de IC₅₀ entre 17,1 y 30,5 μM (Figura 76) [78].

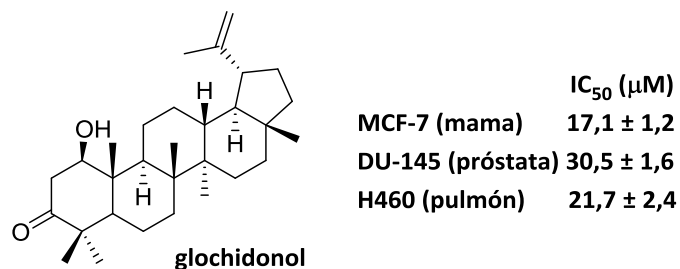
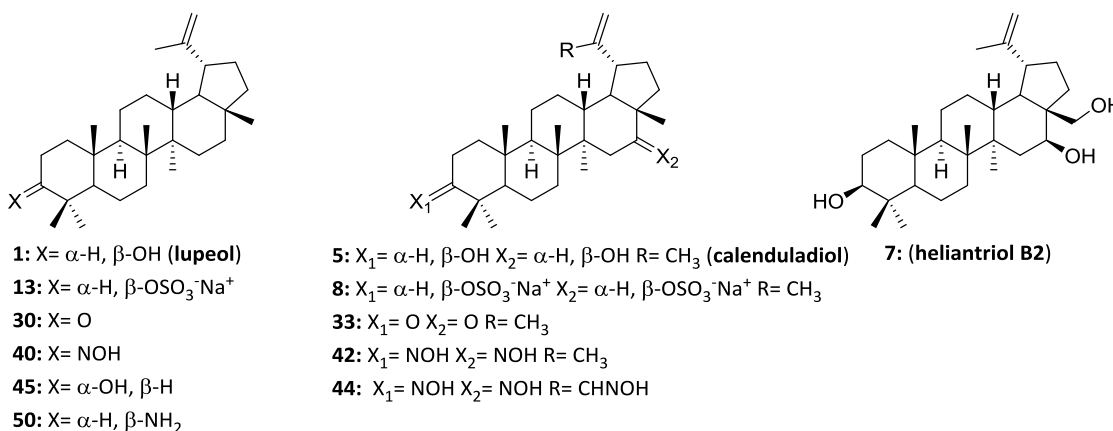


Figura 76. Metabolito secundario con actividad citotóxica

Los triterpenos sintéticos también representan prometedores agentes anticancerígenos como se ha mencionado en el Capítulo I. Tal es el caso de los derivados de ácido oleanólico como CDDO, CDDO-Im y CDDO-Me, los cuales han demostrado inducir la apoptosis de una amplia variedad de células cancerosas en cultivo, en particular, las células de CaP (LNCaP, ALVA31, DU1-45, PC-3, y PPC1) [162]. Por otro lado, derivados de ácido betulínico sintetizados para ser evaluados *in vitro* frente a las líneas de cáncer humano MGC-803, PC-3, A375, BCAP-37 y A431, exhibieron actividad antitumoral moderada a alta en comparación con el triterpeno natural [157].

Teniendo en cuenta los antecedentes de actividad citotóxica para este tipo de estructuras y el contacto establecido con la Dra. Valeria Careaga (IBYME-CONICET, UBA) quien posee experiencia en ensayos biológicos sobre células CaP, se propuso determinar la actividad de triterpenos tipo lupano naturales y semisintéticos en este tipo de células tumorales. Los triterpenos naturales evaluados fueron lupeol (**1**), calenduladiol (**5**) y heliantriol B2 (**7**), aislados de la especie vegetal *C. erinacea*, mientras que los semisintéticos fueron los obtenidos a partir de **1** y **5** por transformaciones de los grupos hidroxilo en C-3 y/o C-16, y en el grupo isopropenilo de la cadena lateral. Para todos estos compuestos 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 11 se presentan los valores de IC₅₀ calculados para los derivados **8**, **13**, **30**, **33**, **40**, **42**, **44**, **45** y **50**, y se comparan con los correspondientes compuestos naturales (**1**, **5** y **7**).

Tabla 11. Citotoxicidad de triterpenos tipo lupano frente a las líneas celulares PC-3 y LNCaP



Compuesto	IC ₅₀ (μ M)		Compuesto	IC ₅₀ (μ M)	
	PC-3	LNCaP		PC-3	LNCaP
1	100,0 \pm 1,09	>100	33	>100	94,05 \pm 1,07
5	93,27 \pm 1,11	73,52 \pm 1,11	40	>100	>100
7	46,58 \pm 1,10	42,81 \pm 1,06	42	>100	>100
8	60,70 \pm 1,08	45,79 \pm 1,06	44	91,84 \pm 1,09	>100
13	16,13 \pm 1,10	7,43 \pm 1,32	45	>100	>100
30	>100	>100	50	32,12 \pm 1,09	42,09 \pm 1,16

Los resultados demostraron que la actividad citotóxica frente a las líneas celulares de CaP de los lupanos naturales (**1**, **5** y **7**) aumenta con el incremento de grupos hidroxilos en la molécula, siendo más activo el triol **7**, sin presentar selectividad hacia una línea celular en particular. Estos resultados son consistentes con los reportados durante el estudio de actividad citotóxica frente a líneas celulares de leucemia humana para este triterpeno [163].

La sulfatación del grupo hidroxilo de **1** (compuesto **13**) significó un importante incremento en la citotoxicidad frente a PC-3 y LNCaP, con valores de IC_{50} inferiores a 20 μ M. Asimismo, el derivado disulfatado (**8**) presentó un moderado aumento de la citotoxicidad respecto de su análogo dihidroxilado (**5**) frente a ambas líneas celulares.

Tanto las cetonas **30** y **33** como las oximas triterpénicas **40**, **42** y **44** resultaron inactivas frente a ambas líneas celulares con valores de IC_{50} superiores a 100 μ M, mientras que el derivado 3β -aminolupeol (**50**) resultó casi tres veces más activo que su análogo de partida (**1**). Finalmente, el derivado **45**, epímero de **1**, no mostró cambios significativos en la actividad citotóxica manteniendo valores de IC_{50} del mismo orden que **1**.

En conclusión, el incremento en el número de grupos hidroxilos en este tipo de moléculas triterpénicas naturales (**1**, **5** y **7**) aumenta la actividad citotóxica frente a las dos líneas celulares CaP evaluadas. Por otro lado, la sulfatación de lupeol condujo al derivado más activo (**13**), con valores de IC_{50} de 16,13 μ M y 7,43 μ M para las líneas celulares PC-3 y LNCaP, respectivamente, por lo que se podría postular como un agente anticancerígeno prometedor.

III.8 Conclusiones

Se preparó una serie de derivados de lupeol (**1**) y calenduladiol (**5**), aislados a partir de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea*. El triterpeno natural **5** presentó un segundo grupo hidroxilo en C-16, además del hidroxilo en C-3 y el grupo isopropenilo del anillo *E*, característico de este tipo de alcoholes triterpénicos, ofreciendo una estructura novedosa para ser modificada sintéticamente. La optimización de la técnica de extracción y purificación permitió obtener **5** con un mejor rendimiento que lo reportado anteriormente.

El uso de microondas para la síntesis de los análogos sulfatados (**8**, **13-18**) condujo a una disminución en los tiempos de reacción y a la obtención de estos derivados con buenos rendimientos. El análogo **14**, con dos grupos sulfato en C-3 y C-16 y un grupo isopropilo unido a C-19, mostró la inhibición más potente para ACE ($IC_{50} = 58,8 \mu M$). Este derivado fue capaz de inhibir la enzima más eficientemente que **8** ($IC_{50} = 190,0 \mu M$), demostrando la importancia del grupo isopropilo en lugar de un grupo isopropenilo en la molécula. El estudio cinético enzimático indicó que **14** inhibe a la enzima a través de un mecanismo incompetitivo, lo cual fue confirmado por el *docking* que reveló que **14** se une reversiblemente al complejo enzima-sustrato, produciendo un complejo inactivo. El compuesto más activo frente a BuCE fue el derivado **8** ($IC_{50} = 64,3 \mu M$). La sulfatación del grupo hidroxilo en C-3 y C-16 demostró ser una buena estrategia para incrementar la inhibición enzimática de estos triterpenos.

La esterificación de los grupos hidroxilos de C-3 y/o C-16 de calenduladiol y de los derivados de este triterpeno obtenidos anteriormente por modificación de la cadena lateral, condujo a una serie de ésteres (**19-29**) que resultaron ser inhibidores selectivos frente a BuCE.

Se sintetizaron derivados mono-, di- y tricarbónicos (**10**, **30-39**) mediante oxidación alílica y/o con el reactivo de Jones de **1** y **5**. A partir de **30**, **33** y **36** se obtuvieron las correspondientes oximas (**40-44**). Los resultados de actividad inhibitoria mostraron que los compuestos con un grupo carbonilo en C-16 son más activos frente a BuCE. Estos resultados fueron corroborados a través de un estudio comparativo entre los análogos de lupeol y 16-oxocalenduladiol. El estudio cinético enzimático indicó que este tipo de derivados inhibe a la enzima a través de un mecanismo competitivo, observándose en el *docking* de los inhibidores más activos (**35** y **36**) la afinidad de éstos con el CAS de la enzima, compitiendo con el sustrato por el acceso al mismo.

Se estudió la inversión de la configuración del C-3 mediante la reducción quimio- y estereoselectiva de la cetona **30** utilizando distintos sistemas catalíticos. El sistema bimetalico PtSn_{0,8}/SiO₂ resultó ser quimioselectivo dando lugar al 3 α -lupeol (**45**) con una relación de epímeros α : β = 38:62.

La oxima **40** fue utilizada como sintón para la obtención de aminas. La reducción del grupo hidroxiimino rindió una mezcla de aminas isómeras (**49** y **50**) la cual pudo ser separada por cromatografía. Los resultados *in vitro* de la actividad inhibitoria de ACE y BuCE de 3 β -aminolupeol (**50**) indicaron la selectividad del amino derivado hacia BuCE. Esto sugiere que la presencia de un grupo amino en la estructura triterpénica favorece la inhibición de la enzima, posiblemente debido a la interacción iónica del grupo nitrogenado y el CAS de la enzima.

En este trabajo de tesis se sintetizaron cuarenta y tres derivados de lupeol y calenduladiol, a través de modificaciones químicas y catalíticas, de los cuales veintiséis son informados por primera vez. Los resultados de actividad inhibitoria de estos análogos mostraron una selectividad hacia BuCE para la mayoría de los compuestos evaluados. La importancia de este resultado se debe a que esta enzima tiene la capacidad, *in vitro*, de retrasar el inicio y la velocidad de formación del péptido β amiloide, un acontecimiento central en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

Por último, se determinó la actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP) de derivados de **1** y **5**, resultando más activo el lupeol sulfatado (**13**).

Este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- Vela Gurovic MS, Castro MJ, Richmond V, Faraoni MB, Maier MS, Murray AP. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from Chuquiraga erinacea D. Don. subsp. erinacea (Asteraceae). *Planta Med* **2010**; 76: 607-610.

- Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* **2013**; 11: 388-413.

- 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.

Capítulo IV
Parte experimental

IV.1 General

IV.1.1 Materiales

Las cromatografías en columna (CC) fueron realizadas empleando sílica gel 60 (230-400 mesh o 70-230 mesh, Merck) o Sephadex LH-20 (GE-Healthcare). Las cromatografías en columna tipo “flash” se llevaron a cabo usando sílica gel 60 (200-425 o 425-600 mesh, Merck). Las columnas de cromatografía líquida al vacío se llevaron a cabo con sílica gel 60 (230-400 mesh, Merck). Para extracción en fase sólida (SPE) se empleó un cartucho de sílica gel de fase reversa C-18 (LiChroPrep RP-18, 40-63 μm , Merck). Se realizó por única vez cromatografía preparativa en capa fina (CPCF) para lo cual se utilizó una placa (20 x 20 cm) de gel de sílice de fase reversa de 0,25 mm de espesor con indicador de fluorescencia a 254 nm, de Merk (TLC de aluminio RP-18 F₂₅₄). Para las cromatografías analíticas en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm de espesor, Merck) y de sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄s (Merck). Para la detección de compuestos y el revelado de los cromatofolios se utilizó luz U.V. (254 y 360 nm) y solución de *p*-anisaldehído (5 ml *p*-anisaldehído, 5 ml H₂SO₄ concentrado, 1 ml de ácido acético glacial y 90 ml EtOH).

Para realizar extracciones y CC se emplearon solventes puros destilados, mientras que para la purificación de muestras por HPLC se utilizaron solventes grado HPLC. Para las reacciones en atmósfera de N₂ se utilizaron solventes secados sobre molecular-sieves.

IV.1.2 Equipos

El análisis de las muestras por HPLC se llevó a cabo mediante un sistema Agilent 1260 Infinity equipado con un detector de arreglo de diodos, con una columna Agilent Zorbax[®] SB-C-18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μm) protegida con un guardacolumna Zorbax[®] SB-C-8 (2,1 x 12,5 mm; 5 μm). Con fines semipreparativos se empleó un sistema Varian[®] PrepStar SD-1 con un sistema de bombeo Dynamax[®] y un detector de absorbancia Dynamax[®] modelo UV-1, con una columna UltraSep ES[®] 100 RP-18 (250 x 20 mm, 10 μm) o una columna LiChroSorb[®] RP-18 (7 μm)/LiChroCart (250 x 10 mm, Merck).

Los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en la Universidad de La Laguna en un espectrómetro VG Autospec. Los métodos de ionización empleados fueron de impacto electrónico (IE) utilizando potenciales de ionización de 70 eV, y electrospray (ESI). La determinación de las fórmulas

moleculares, de fragmentos y/o iones moleculares, se realizaron en espectrómetros LCT Premier XE (Waters) y Fisons Instruments VG Autospec.

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro Bruker AMK 600 operado a 600 y 150 MHz para ^1H y ^{13}C respectivamente, o en un espectrómetro Bruker Avance 400 operado a 400 y 100 MHz para los mismos núcleos, o en un espectrómetro Bruker AMK 500 operado a 500 y 125 MHz para los mismos núcleos o en un espectrómetro Bruker ARX 300 operado a 300 y 75 MHz para los mismos núcleos. Los productos fueron registrados en solventes deuterados tales como cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,8% D) (Aldrich), metanol deuterado ($\text{MeOD-}d_4$, 99,8% D) (Aldrich), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$, 99,9% D) (Aldrich), con TMS como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. En los experimentos de RMN ^1H , la multiplicidad de las señales se indicó por las abreviaturas: (s) singulete, (d) doblete y (m) multiplete. Se utilizaron programas COSY, DEPT, HSQC, HMBC.

Los espectros UV y las mediciones de actividad enzimática se registraron en un espectrofotómetro JASCO V-630BIO, equipado con controlador de temperatura Peltier. Las reacciones asistidas por microondas fueron llevadas a cabo en reactor CEM Discover.

Los puntos de fusión (pf) fueron determinados por medio de un aparato de Reichert.

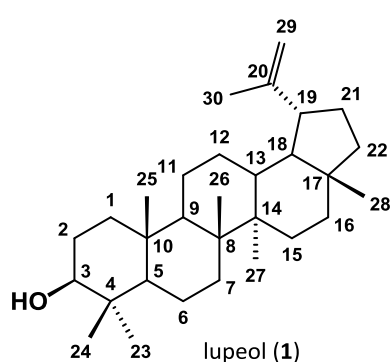
IV.1.3 Material vegetal

La especie estudiada *Chuquiraga erinacea* subsp. *erinacea* (Asteracea) fue recolectada en los alrededores de la ciudad de Bahía Blanca, principalmente en el salitral de la Vidriera (Ruta 3 Sur, Km. 30, 38° 46' S, 62° 30' O) e identificada por la Dra. M.G. Murray, especialista del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS, quien colabora en este aspecto con el grupo de investigación desde hace varios años.

IV.2 Extracción y aislamiento de lupeol (1) y calenduladiol (5) de *Chuquiraga erinaceae*

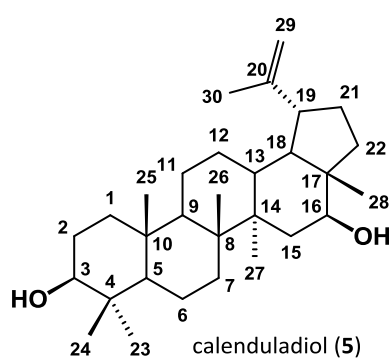
Las partes aéreas pulverizadas de *C. erinaceae* (800 g) fueron extraídas con EtOH (4,0 L) en caliente hasta agotamiento del material vegetal. Luego del filtrado y evaporación del solvente a 45 °C a presión reducida, se obtuvieron 25,0 g de extracto etanólico. El extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna sobre sílica de fase normal con vacío, usando como eluyente una mezcla de *n*-

Hex:AcOEt de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 41 fracciones de 700 mL cada una, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de la cromatografía en capa fina. Las fracciones 5 a 7 (4,0 g) presentaron lupeol (**1**) y fueron sometidas a sucesivas cromatografías flash para su purificación obteniéndose 3,3 g (13,2%) de una mezcla enriquecida en **1** (70%). Las fracciones 25 a 36 (3,0 g) presentaron calenduladiol (**5**) y fueron sometidas a cromatografía de exclusión por tamaño (LH-20, 22,0 cm de altura x 4,5 cm de ancho) con una mezcla *n*-Hex:CH₂Cl₂:MeOH (2:1:1). Las fracciones recolectadas se observaron desprovistas de su coloración verdosa y luego de evaporar el solvente a presión reducida (1,5 g) fueron purificadas mediante cromatografía en columna sobre sílica flash usando CH₂Cl₂:MeOH como fase móvil. Fueron aislados 1,2 g (4,8%) de **5** con un 100% de pureza. Los triterpenos lupanos aislados **1** y **5** fueron identificados en base a sus datos de RMN de ¹H y ¹³C.



¹H-RMN (δ , 400 MHz, CDCl₃): 4,66 (1H, *br s*, H-29a), 4,57 (1H, *br s*, H-29b), 3,18 (1H, *dd*, $J = 10,6$ Hz, 5,6 Hz, H-3), 2,38 (1H, *ddd*, $J = 11,2$ Hz, 11,0 Hz, 5,7 Hz, H-19), 1,63-1,25 (25H, *m*), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,98 (3H, *s*, H-23), 0,95 (3H, *s*, H-27), 0,83 (3H, *s*, H-25), 0,79 (3H, *s*, H-28), 0,76 (3H, *s*, H-24).

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 151,1 (C-20), 109,5 (C-29), 79,2 (C-3), 55,5 (C-5), 50,6 (C-9), 48,5 (C-18), 48,1 (C-19), 43,2 (C-17), 43,0 (C-14), 41,0 (C-8), 40,2 (C-22), 39,0 (C-1), 38,9 (C-4), 38,2 (C-13), 37,3 (C-10), 35,7 (C-16), 34,5 (C-7), 30,0 (C-21), 28,1 (C-23), 27,6 (C-2), 27,6 (C-15), 25,3 (C-12), 21,1 (C-11), 19,5 (C-30), 18,5 (C-6), 18,1 (C-28), 16,3 (C-25), 16,1 (C-26), 15,5 (C-24), 14,5 (C-27).



¹H-RMN (δ , 400 MHz, CDCl₃): 4,67 (1H, *br s*, H-29a), 4,55 (1H, *br s*, H-29b), 3,55 (1H, *dd*, $J = 11,2$ Hz, 4,7 Hz, H-16), 3,13 (1H, *dd*, $J = 10,9$ Hz, 5,3 Hz, H-3), 2,45 (1H, *ddd*, $J = 11,0$ Hz, 11,0 Hz, 5,8 Hz, H-19), 1,96-1,88 (1H, *m*, H-21a), 1,64 (3H, *s*, H-30), 1,63-1,46 (8H, *m*), 1,42-1,30 (6H, *m*), 1,29-1,10 (6H, *m*), 1,00 (3H, *s*, H-27), 0,95 (3H, *s*, H-25), 0,93 (3H, *s*, H-23), 0,79 (3H, *s*, H-26), 0,75 (3H, *s*, H-28), 0,72 (3H, *s*, H-24), 0,64 (1H, *d*, $J = 9,7$ Hz, H-5).

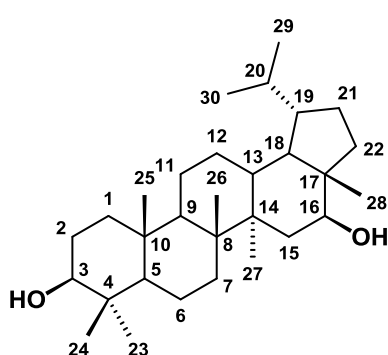
¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 150,0 (C-20), 109,8 (C-29), 78,9 (C-3), 77,0 (C-16), 55,4 (C-5), 50,1 (C-9), 48,6 (C-17), 47,8 (C-18), 47,6 (C-19), 44,1 (C-14), 41,0 (C-8), 38,9 (C-1), 38,8 (C-4), 37,8 (C-22), 37,3 (C-13), 37,2

(C-15), 36,9 (C-10), 34,3 (C-7), 30,0 (C-21), 28,1 (C-23), 27,4 (C-2), 24,8 (C-12), 20,9 (C-11), 19,4 (C-30), 18,4 (C-6), 16,2 (C-26), 16,2 (C-25), 16,0 (C-27), 15,5 (C-24), 11,8 (C-28).

IV.3 Preparación, datos físicos y espectroscópicos de análogos triterpénicos

IV.3.1 Preparación de 20,29-dihidrolupano-3 β ,16 β -diol (**9**)

Una solución de **5** (40,0 mg, 0,09 mmol) en AcOEt seco (5 mL) se hidrogenó en presencia de cantidades catalíticas de Pd/C 10%. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y calentamiento hasta la desaparición del material de partida confirmado por cromatografía en capa fina (24 horas). Luego de la eliminación del solvente, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como eluyente *n*-Hex:AcOEt. Se obtuvieron 26,0 mg de **9** (R = 64,7%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (85:15) como un sólido amorfo blanco; pf: 250-252°C.



¹H-RMN (δ , 400 MHz, CDCl₃): 3,56 (1H, dd, *J* = 11,0, 4,8 Hz, H-16), 3,19 (1H, dd, *J* = 11,2, 4,8 Hz, H-3), 1,88-1,79 (2H, m), 1,70-1,51 (11H, m), 1,47-1,37 (5H, m), 1,30-1,26 (5H, m), 1,04 (3H, s, H-27), 0,97 (6H, s, H-23, H-25), 0,85 (3H, d, *J* = 7,1 Hz, H-29), 0,84 (3H, s, H-26), 0,76 (6H, s, H-24, H-28), 0,75 (3H, d, *J* = 5,1 Hz, H-30), 0,68 (1H, d, *J* = 9,9 Hz, H-5).

¹³C-RMN (δ , 100 MHz, CDCl₃): 79,1 (C-3), 77,5 (C-16), 55,4 (C-5), 49,9 (C-9), 48,8 (C-17), 47,3 (C-18), 44,5 (C-19), 44,3 (C-14), 41,1 (C-8), 39,0 (C-4), 39,0 (C-1), 38,2 (C-22), 37,2 (C-10), 37,2 (C-13), 36,9 (C-15), 34,5 (C-7), 29,3 (C-20), 28,1 (C-23), 27,5 (C-2), 26,6 (C-21), 23,1 (C-30), 22,2 (C-12), 21,0 (C-11), 18,5 (C-6), 16,2 (C-25, C-26), 16,1 (C-27), 15,5 (C-29), 15,2 (C-24), 12,2 (C-28).

EIMS *m/z* (%): 444 [M]⁺ (68), 429 (4), 426 (42), 411 (10), 207 (100), 189 (56); HR-EIMS *m/z*: 444,3982 (calculado para C₃₀H₅₂O₂ [M]⁺ 444,3967).

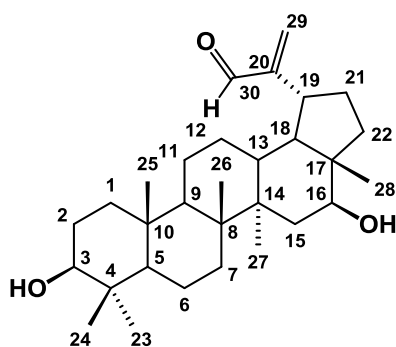
IV.3.2 Procedimiento general de reacciones de oxidación alílica

A una solución del triterpeno en EtOH (5 mL) se le adicionó SeO₂ y se calentó a reflujo hasta la desaparición del material de partida. Luego, la mezcla de reacción se enfrió y el EtOH se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se trató con agua (20 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron con MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron hasta

sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como eluyente *n*-Hex:AcOEt.

IV.3.2.1 Preparación de 3 β ,16 β -dihidroxilup-20(29)-en-30-al (**10**)

Una solución de **5** (60,0 mg, 0,14 mmol) en EtOH se trató con 2,5 equivalentes de SeO₂ (38,5 mg, 0,35 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 59,8 mg de **10** (R = 96,6%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (70:30) como un sólido amorfo amarillo; pf: 218°C-220°C.

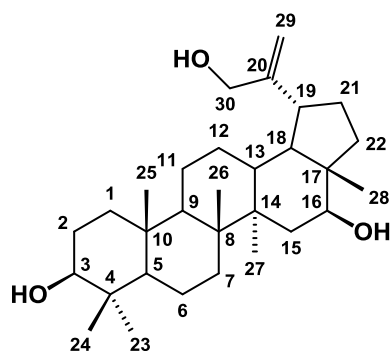


¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 9,51 (1H, s, H-30), 6,27 (1H, *br s*, H-29a), 5,91 (1H, *br s*, H-29b), 3,66 (1H, dd, *J* = 11,1, 4,8 Hz, H-16), 3,16 (1H, dd, *J* = 10,5, 5,1 Hz, H-3), 2,86 (1H, ddd, *J* = 10,8, 10,5, 5,7 Hz, H-19), 2,24-2,17 (1H, m, H-21a), 1,75-1,50 (9H, m), 1,49-1,37 (7H, m), 1,35-1,18 (6H, m), 1,02 (3H, s, H-23), 0,96 (6H, s, H-25, H-27), 0,82 (3H, s, H-26), 0,81 (3H, s, H-28), 0,75 (3H, s, H-24), 0,66 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-5).

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 195,0 (C-30), 156,5 (C-20), 133,4 (C-29), 79,1 (C-3), 77,0 (C-16), 55,5 (C-5), 50,0 (C-9, C-18), 49,0 (C-17), 44,0 (C-14), 41,1 (C-8), 39,0 (C-4), 38,9 (C-1), 37,9 (C-22), 37,3 (C-10), 37,1 (C-13, C-19), 37,1 (C-15), 34,4 (C-7), 32,5 (C-21), 28,1 (C-23), 27,5 (C-2), 27,2 (C-12), 21,0 (C-11), 18,4 (C-6), 16,2 (C-26), 16,1 (C-25, C-27), 15,5 (C-24), 11,7 (C-28).

IV.3.2.2 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β ,30-triol (**11**)

Una solución de **5** (86,0 mg, 0,19 mmol) en EtOH (10 mL) se trató con 0,5 equivalentes de SeO₂ (10,8 mg, 0,10 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 18,0 mg de **11** (R = 20,2%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (65:35) como un sólido amorfo blanco; pf: 249°C-250°C.



¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 4,96 (1H, *br s*, H-29a), 4,91 (1H, *br s*, H-29b), 4,11, 4,13 (2H, d_{AB}, *J* = 14,0 Hz, H-30a,b), 3,62 (1H, dd, *J* = 11,1, 4,7 Hz, H-16), 3,18 (1H, dd, *J* = 10,7, 5,2 Hz, H-3), 2,40 (1H, ddd, *J* = 11,8, 11,8, 5,1 Hz, H-19), 2,17-2,01 (1H, m, 21a), 1,63-1,23 (20H, m), 1,04 (3H, s, H-23), 1,00 (3H, s, H-27), 0,97 (3H, s, H-25), 0,83 (3H, s, H-26), 0,79 (3H, s, H-28), 0,76 (3H, s, H-24), 0,68 (1H, d, *J* = 9,1 Hz).

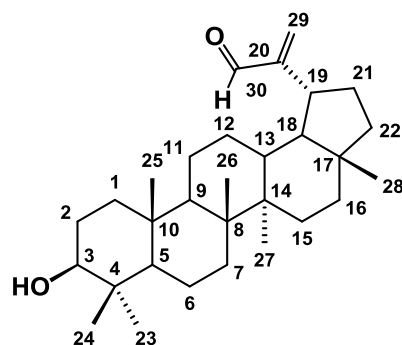
¹³C-RMN (δ , 100 MHz, CDCl₃): 154,2 (C-20), 107,5 (C-29), 79,1 (C-3), 77,4 (C-16), 65,3 (C-30), 55,5 (C-5), 50,2 (C-9), 48,8 (C-17), 48,5 (C-18), 44,2 (C-14), 43,6 (C-13), 41,2 (C-8),

39,0 (C-4), 38,9 (C-1), 37,8 (C-22), 37,4 (C-10), 37,3 (C-19), 37,1 (C-15), 34,5 (C-7), 32,0 (C-21), 28,2 (C-23), 27,6 (C-2), 26,5 (C-12), 21,2 (C-11), 18,5 (C-6), 16,3 (C-25, C-26), 16,2 (C-27), 15,5 (C-24), 11,7 (C-28).

EIMS m/z (%): 458 $[M]^+$ (40), 440 (100), 425 (14), 382 (21), 207 (66), 189 (58); **HR-EIMS m/z** : 458,3753 (calculado para $C_{30}H_{50}O_3 [M]^+$ 458,3760).

IV.3.2.3 Preparación de 3 β -hidroxilup-20(29)-en-30-al (31)

Una solución de **1** (40,0 mg, 0,09 mmol) en EtOH se trató con 2,5 equivalentes de SeO_2 (24,2 mg, 0,22 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 18,0 mg de **31** (R = 43,6%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (80:20) como un sólido amorfo blanco.

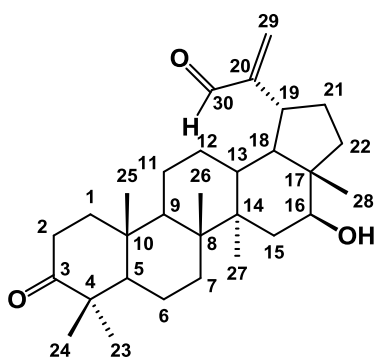


1H -RMN (δ , 300 MHz, $CDCl_3$): 9,51 (1H, s, H-30), 6,28 (1H, *br s*, H-29a), 5,90 (1H, *br s*, H-29b), 3,17 (1H, dd, $J = 10,6, 5,3$ Hz, H-3), 2,75 (1H, ddd, $J = 10,9, 10,9, 5,6$ Hz H-19), 2,15 (1H, t, $J = 11,1$ Hz, H-21a), 1,70-1,60 (5H, m), 1,55 (3H, *br s*), 1,52-1,41 (5H, m), 1,38 (4H, *br s*), 1,30-1,19 (5H, m), 1,01 (3H, s, H-23), 0,96 (3H, s, H-26), 0,92 (3H, s, H-27), 0,82 (3H, s, H-25), 0,81 (3H, s, H-28), 0,75 (3H, s, H-24), 0,66 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ , 75 MHz, $CDCl_3$): 195,2 (C-30), 157,4 (C-20), 133,3 (C-29), 79,1 (C-3), 55,4 (C-5), 50,4 (C-9, C-18), 43,4 (C-17), 42,8 (C-14), 40,9 (C-8), 40,1 (C-22), 39,0 (C-4), 38,9 (C-1), 37,9 (C-13), 37,3 (C-10, C-19), 35,5 (C-16), 34,4 (C-7), 28,1 (C-21, C-23), 27,5 (C-2, C-12), 27,5 (C-15), 21,1 (C-11), 18,5 (C-6), 17,9 (C-28), 16,2 (C-25), 16,1 (C-26), 15,5 (C-24), 14,6 (C-27).

IV.3.2.4 Preparación de 16 β -hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (37)

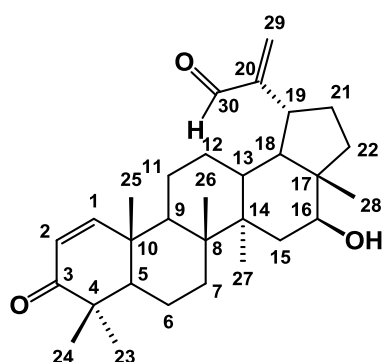
Una solución de **34** (7,8 mg, 0,02 mmol) en EtOH se trató con 3,0 equivalentes de SeO_2 (5,9 mg, 0,05 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 1,1 mg de **37** (R = 13,7%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (85:15) como un sólido amorfo blanco; pf: 200°C-201°C. Además se aislaron 1,5 mg de 16 β -hidroxi-3-oxo-lup-1,20(29)-dien-30-al (**39**) (R = 18,7%) eluidos con Hex:AcOEt (83:17).



¹H-RMN (37) (δ , 300 MHz, CDCl₃): 9,52 (1H, s, H-30), 6,29 (1H, *br s*, H-29a), 5,93 (1H, *br s*, H-29b), 3,69 (1H, dd, $J = 11,2, 4,8$ Hz, H-16), 2,86 (1H, ddd, $J = 10,8, 10,5, 5,7$ Hz, H-19), 2,47-2,40 (2H, m, H-2), 1,74-1,26 (20H, m), 1,07 (3H, s, H-23), 1,06 (3H, s, H-24), 1,02 (3H, s, H-27), 0,98 (3H, s, H-25) 0,92 (3H, s, H-26), 0,83 (3H, s, H-28).

¹³C-RMN (37) (δ , 75 MHz, CDCl₃): 205,5 (C-3), 195,0 (C-30), 156,2 (C-20), 135,5 (C-29), 76,9 (C-16), 53,5 (C-5), 49,2 (C-9, C-17, C-18),

44,8 (C-4), 44,1 (C-14), 41,9 (C-8), 39,7 (C-1), 37,9 (C-22), 37,1 (C-13, C-19), 37,0 (C-10), 36,9 (C-15), 33,6 (C-7), 34,2 (C-2), 31,7 (C-21), 26,7 (C-23), 27,1 (C-12), 21,1 (C-24), 21,3 (C-11), 19,7 (C-6), 16,0 (C-25), 15,8 (C-27), 15,8 (C-26), 11,6 (C-28).



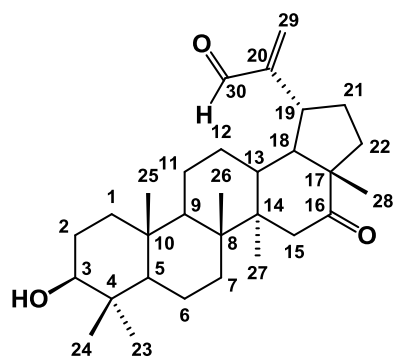
¹H-RMN (39) (δ , 300 MHz, CDCl₃): 9,53 (1H, s, H-30), 7,05 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-1), 6,30 (1H, *br s*, H-29a), 5,95 (1H, *br s*, H-29b), 5,78 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-2), 3,69 (1H, dd, $J = 11,2, 4,8$ Hz, H-16), 2,94-2,82 (1H, m, H-19), 2,00-1,26 (16H, m), 1,13 (3H, s, H-23), 1,10 (3H, s, H-26), 1,08 (3H, s, H-24), 1,05 (3H, s, H-25) 0,96 (3H, s, H-27), 0,85 (3H, s, H-28).

¹³C-RMN (39) (δ , 75 MHz, CDCl₃): 205,5 (C-3), 195,0 (C-30), 160,0 (C-

1), 156,2 (C-20), 132,4 (C-29), 125,4 (C-2), 76,9 (C-16), 53,6 (C-5), 49,0 (C-17, C-18), 44,8 (C-4), 44,2 (C-9), 44,1 (C-14), 41,9 (C-8), 39,6 (C-10), 37,9 (C-22), 37,3 (C-13, C-19), 36,9 (C-15), 33,9 (C-7), 31,7 (C-21), 27,9 (C-23), 27,1 (C-12), 21,5 (C-24), 21,3 (C-11), 19,3 (C-25), 19,1 (C-6), 16,6 (C-26), 14,3 (C-27), 11,8 (C-28).

IV.3.2.5 Preparación de 3 β -hidroxi-16-oxo-lup-20(29)-en-30-al (38)

Una solución de **35** (14,0 mg, 0,03 mmol) en EtOH se trató con 3,0 equivalentes de SeO₂ (10,6 mg, 0,09 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 6,8 mg de **39** (R = 47,2%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (70:30) como un sólido amorfo blanco; pf: 179-180°C.

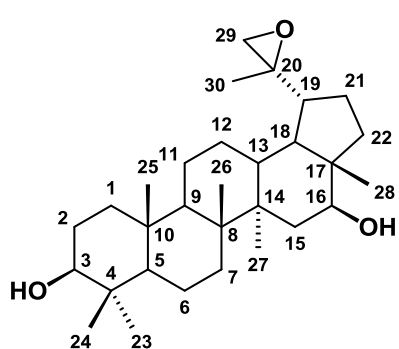


$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, CDCl_3): 9,52 (1H, s, H-30), 6,28 (1H, *br s*, H-29a), 5,97 (1H, *br s*, H-29b), 3,17 (1H, dd, $J = 10,6, 4,9$ Hz, H-3), 2,99 (1H, ddd, $J = 10,9, 10,8, 6,0$ Hz, H-19), 2,73 (1H, d, $J = 13,8$ Hz, H-15a), 2,17-2,08 (2H, m), 2,06-1,87 (2H, m), 1,82 (1H, d, $J = 14,4$ Hz, H-15b), 1,73-1,45 (8H, m), 1,44-1,34 (4H, m), 1,26 (3H, s), 1,13 (3H, s, H-26), 1,09 (3H, s, H-28), 0,97 (3H, s, H-23), 0,88 (3H, s, H-27), 0,83 (3H, s, H-25), 0,76 (3H, s, H-24), 0,66 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, CDCl_3): 215,5 (C-16), 194,7 (C-30), 156,5 (C-20), 132,4 (C-29), 79,0 (C-3), 56,9 (C-5), 55,3 (C-17), 49,9 (C-9, C-18), 47,8 (C-14), 45,0 (C-15), 41,1 (C-8), 39,0 (C-1), 38,8 (C-4), 37,3 (C-13), 37,2 (C-10, C-19), 34,3 (C-7), 31,3 (C-22), 29,8 (C-21), 28,1 (C-23), 27,5 (C-2), 27,1 (C-12), 20,8 (C-11), 18,3 (C-6), 18,0 (C-28), 16,5 (C-26), 16,1 (C-25), 15,5 (C-24), 15,4 (C-27).

IV.3.3 Preparación de 20S,29-epoxilupano-3 β ,16 β -diol (12)

Una solución de **5** (169,0 mg, 0,38 mmol) en CH_2Cl_2 (5 mL) se trató con una solución al 10% de Na_2CO_3 (6 mL). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y luego se agregó lentamente una solución al 70% de AMCPB (98,4 mg, 0,57 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) a 5 °C. La mezcla se agitó a 5 °C durante 4 horas. Luego la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución al 5% de Na_2SO_3 , luego con una solución saturada de NaHCO_3 y finalmente con agua. Posteriormente, estos extractos se secaron sobre MgSO_4 anhidro y el solvente se evaporó hasta sequedad. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como eluyente *n*-Hex:AcOEt. Se obtuvieron 100,7 mg de **12** (R = 57,5%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (75:25) como un sólido amorfo blanco; pf: 195-197 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, CDCl_3): 3,51 (1H, dd, $J = 10,9, 4,5$ Hz, H-16), 3,12 (1H, dd, $J = 10,4, 5,5$ Hz, H-3), 2,60 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-29a), 2,56 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-29a), 1,92-1,87 (1H, m, H-12a), 1,74-1,44 (10H, m), 1,34 (3H, s, H-6a, H-7), 1,27-1,20 (5H, m), 1,18 (3H, s, H-30), 1,12-1,05 (3H, m), 0,97 (3H, s, H-27), 0,92 (3H, s, H-25), 0,91 (3H, s, H-23), 0,78 (3H, s, H-26), 0,70 (3H, s, H-24), 0,67 (3H, s, H-28), 0,63 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, CDCl_3): 78,8 (C-3), 76,7 (C-16), 60,1 (C-20), 57,1 (C-29), 55,3 (C-5), 49,8 (C-9), 49,0 (C-17), 48,9 (C-19), 46,0 (C-18), 43,9 (C-14), 40,9 (C-8), 38,8 (C-1), 38,8 (C-4), 37,5 (C-22), 37,1 (C-10), 36,6

(C-15), 36,5 (C-13), 34,2 (C-7), 28,0 (C-23), 27,3 (C-2), 26,4 (C-21), 26,2 (C-12), 20,9 (C-11), 18,3 (C-6), 18,3 (C-30), 16,1 (C-26), 16,1 (C-27), 16,0 (C-25), 15,4 (C-24), 11,7 (C-28).

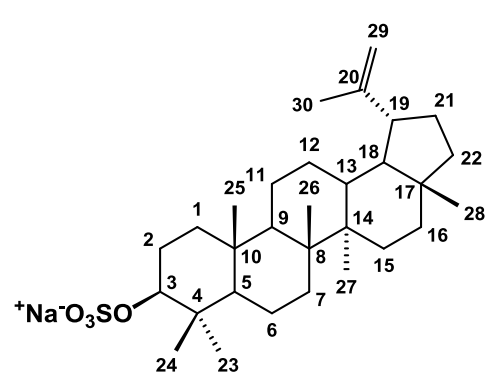
EIMS m/z (%): 458 $[M]^+$ (17), 440 (29), 425 (14), 400 (20), 382 (36), 207 (100), 189 (88); **HR-EIMS m/z :** 458,3749 (calculado para $C_{30}H_{50}O_3 [M]^+$ 458,3760).

IV.3.4 Procedimiento general de reacciones de sulfatación

A una solución del triterpeno en DMF anhidra (4 mL), se agregó el complejo $Me_3N \cdot SO_3$. La mezcla de reacción se irradió a 150 °C durante 7 min en un tubo sellado en un reactor de microondas. Al cabo de ese tiempo, la mezcla se enfrió con agua (1 mL) y el solvente se eliminó en speed-vac. El residuo se disolvió en MeOH y se eluyó a través de una columna de intercambio iónico de Amberlita CG-120 (forma sodio). Se recolectaron las primeras fracciones y luego se evaporó el solvente a presión reducida. El bruto de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash con mezclas CH_2Cl_2 :MeOH.

IV.3.4.1 Preparación de 3 β -hidroxilup-20(29)-en sulfato de sodio (**13**)

Una solución de **1** (38,3 mg, 0,09 mmol) en DMF se trató con 4 equivalentes del complejo $Me_3N \cdot SO_3$ (48,8 mg, 0,36 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 45,7 mg de **13** (R = 96,2%) eluidos con CH_2Cl_2 :MeOH (90:10) como un sólido amorfo de color blanco.

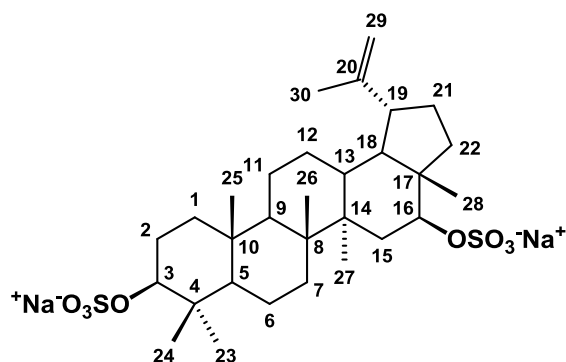


1H -RMN (δ , 400 MHz, MeOD- d_4): 4,73 (1H, *br s*, H-29a), 4,61 (1H, *br s*, H-29b), 4,00-3,93 (1H, *m*, H-3), 2,45 (1H, *ddd*, $J = 11,0, 11,0, 5,7$ Hz, H-19), 1,72 (3H, *s*, H-30), 1,63-1,25 (29H, *m*), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,98 (3H, *s*, H-23), 0,95 (3H, *s*, H-27), 0,83 (3H, *s*, H-25), 0,79 (3H, *s*, H-28), 0,76 (3H, *s*, H-24).

^{13}C -RMN (δ , 75 MHz, MeOD- d_4): 151,9 (C-20), 110,1 (C-29), 87,6 (C-3), 57,2 (C-5), 51,8 (C-9), 50,1 (C-18), 49,4 (C-19), 43,4 (C-17), 43,3 (C-14), 41,0 (C-8), 40,6 (C-22), 39,6 (C-1), 39,5 (C-4), 38,2 (C-13), 37,6 (C-10), 35,5 (C-7, C-16), 30,9 (C-2), 28,7 (C-15, C-23), 28,6 (C-21), 26,4 (C-12), 21,9 (C-11), 19,4 (C-30), 18,4 (C-6), 18,2 (C-28), 16,8 (C-25), 16,6 (C-26), 15,2 (C-24), 15,0 (C-27).

IV.3.4.2 Preparación de 3β,16β-dihidroxilup-20(29)-en disulfato de sodio (8)

Una solución de **5** (100,0 mg, 0,23 mmol) en DMF se trató con 8 equivalentes del complejo $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (244,0 mg, 1,8 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 136,1 mg de **8** ($R = 93,1\%$) eluidos con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (80:20) como un sólido amorfo de color blanco; pf: 143-144°C.



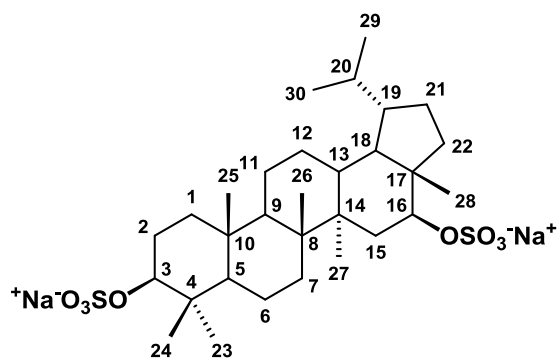
$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, MeOD-d_4): 4,71 (1H, *br s*, H-29a), 4,59 (1H, *br s*, H-29b), 4,32 (1H, *t*, $J = 8,0$ Hz, H-16), 3,91 (1H, *dd*, $J = 11,4, 4,2$ Hz, H-3), 2,52 (1H, *ddd*, $J = 10,8, 10,8, 5,4$, Hz, H-19), 2,11-2,06 (1H, *m*, H-2a), 2,01-1,87 (1H, *m*, H-21a), 1,69 (3H, *br s*, H-30), 1,69-1,64 (6H, *m*), 1,59-1,16 (13H, *m*), 1,07 (3H, *s*, H-27), 1,05 (3H, *s*, H-24), 1,01 (3H, *s*, H-23), 0,89 (3H, *s*, H-26), 0,85 (3H, *s*, H-

28), 0,81 (3H, *s*, H-25), 0,78 (1H, *s*, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, MeOD-d_4): 151,2 (C-20), 110,5 (C-29), 87,6 (C-3), 85,9 (C-16), 57,2 (C-5), 51,3 (C-9), 49,8 (C-17), 49,2 (C-18), 49,1 (C-19), 45,3 (C-14), 42,2 (C-8), 39,8 (C-1), 39,6 (C-4), 38,9 (C-15), 38,8 (C-13), 38,1 (C-10), 35,6 (C-7), 35,5 (C-22), 30,7 (C-21), 28,6 (C-23), 26,0 (C-12), 25,4 (C-2), 22,0 (C-11), 19,5 (C-30), 19,4 (C-6), 16,7 (C-25), 16,7 (C-26), 16,6 (C-27), 16,3 (C-24), 12,9 (C-28).

IV.3.4.3 Preparación de 3β,16β-dihidroxi-20,29-dihidrolupano disulfato de sodio (14)

Una solución de **9** (22,2 mg, 0,05 mmol) en DMF se trató con 8 equivalentes del complejo $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (53,9 mg, 0,40 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 22,8 mg de **14** ($R = 70,4\%$) eluidos con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (85:15) como un sólido amorfo blanco; pf: 136-138 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, MeOD-d_4): 4,30 (1H, *dd*, $J = 9,7, 6,2$ Hz, H-16), 3,93 (1H, *dd*, $J = 11,5, 4,2$ Hz, H-3), 2,15-1,28 (24H, *m*), 1,09 (3H, *s*, H-27), 1,04 (3H, *s*, H-24), 1,02 (3H, *s*, H-23), 0,90 (3H, *s*, H-26), 0,89 (3H, *d*, $J = 6,9$ Hz, H-30), 0,87 (3H, *d*, $J = 6,9$ Hz, H-29), 0,81 (6H, *s*, H-25, H-28).

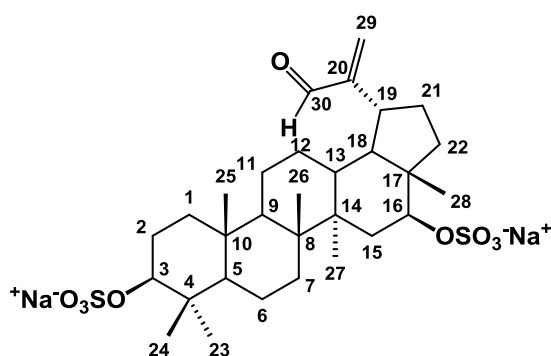
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, MeOD-d_4): 87,8 (C-3), 86,3 (C-16), 57,2 (C-5), 51,0 (C-9), 49,8 (C-17), 45,8 (C-18), 45,4 (C-19), 42,3 (C-14), 39,8 (C-8), 39,7 (C-4), 39,6 (C-1), 39,5 (C-15), 38,5 (C-10), 38,1 (C-13), 35,6 (C-22), 35,5 (C-7), 30,5 (C-20), 28,7 (C-23), 27,7 (C-21), 25,4 (C-

2), 23,3 (C-30), 22,8 (C-12), 22,1 (C-11), 19,4 (C-6), 16,8 (C-26), 16,7 (C-25), 16,6 (C-27), 16,2 (C-29), 15,4 (C-24), 13,3 (C-28).

HRMS (ESI) m/z : 625,2633 [M – Na]⁺ (calculado para C₃₀H₅₀O₈NaS₂ 625,2845).

IV.3.4.4 Preparación de 3β,16β-dihidroxilup-20(29)-en-30-al disulfato de sodio (15)

Una solución de **10** (20,0 mg, 0,04 mmol) en DMF se trató con 8 equivalentes del complejo Me₃N·SO₃ (47,5 mg, 0,35 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 25,7 mg de **15** (R = 88,8%) eluidos con CH₂Cl₂:MeOH (80:20) como un sólido amorfo blanco; pf: 107-108 °C.



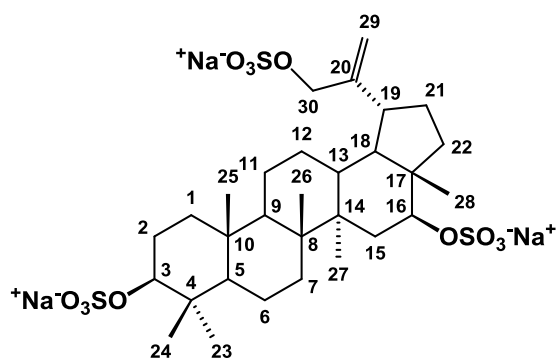
¹H-RMN (δ, 300 MHz, MeOD-d₄): 9,49 (1H, s, H-30), 6,42 (1H, *br s*, H-29a), 6,05 (1H, *br s*, H-29b), 4,49 (1H, t, *J* = 7,8 Hz, H-16), 3,92 (1H, dd, *J* = 11,5, 4,3 Hz, H-3), 2,86 (1H, ddd, *J* = 10,7, 10,6, 5,7 Hz, H-19), 2,17-1,97 (3H, m), 1,73-1,66 (8H, m), 1,48-1,38 (5H, m), 1,29 (5H, s), 1,07 (3H, s, H-27), 1,04 (3H, s, H-24), 1,02 (3H, s, H-23), 0,87 (6H, s, H-26, H-28), 0,80 (3H, s, H-25).

¹³C-RMN (δ, 75 MHz, MeOD-d₄): 196,7 (C-30), 157,8 (C-20), 135,2 (C-29), 87,9 (C-3), 85,9 (C-16), 57,2 (C-5), 51,1 (C-9), 50,6 (C-18), 48,8 (C-17), 45,1 (C-14), 42,2 (C-8), 39,8 (C-1), 39,6 (C-4), 38,9 (C-15, C-19), 38,5 (C-13), 38,1 (C-10), 35,6 (C-7), 35,5 (C-22), 33,1 (C-21), 28,7 (C-23), 28,3 (C-12), 25,4 (C-2), 22,0 (C-11), 19,4 (C-6), 16,7 (C-26), 16,7 (C-27), 16,6 (C-25), 16,2 (C-24), 12,8 (C-28).

HRMS (ESI) m/z : 637,2214 [M – Na]⁺ (calculado para C₃₀H₄₆O₉NaS₂ 637,2481).

IV.3.4.5 Preparación de 3β,16β,30-trihidroxilup-20(29)-en trisulfato de sodio (17)

Una solución de **11** (10,0 mg, 0,02 mmol) en DMF se trató con 12 equivalentes del complejo Me₃N·SO₃ (35,6 mg, 0,26 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 3,3 mg de **17** (R = 20,0%) eluidos con CH₂Cl₂:MeOH (70:30) como un sólido amorfo blanco; pf: 100-102 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, MeOD- d_4): 5,04 (1H, *br s*, H-29a), 4,97 (1H, *br s*, H-29b), 4,47 (2H, *br s*, H-30a,b), 4,37 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H-16), 3,92 (1H, dd, $J = 11,1, 4,0$ Hz, H-3), 2,44-2,53 (1H, m, H-19), 2,19-2,03 (4H, m), 1,70 (9H, m), 1,46 (6H, s), 1,32 (3H, s), 1,08 (6H, s, H-24, H-27), 1,02 (3H, s, H-23), 0,89 (3H, s, H-26), 0,85 (3H, s, H-28), 0,81 (3H, s, H-25).

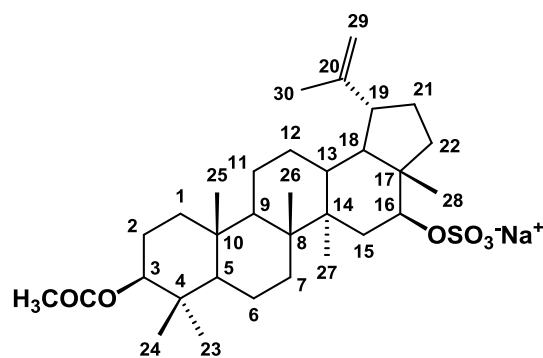
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, MeOD- d_4): 151,0 (C-20), 110,4 (C-29), 87,6 (C-3), 85,8 (C-16), 71,3 (C-30), 57,2 (C-5), 51,3 (C-9), 49,8 (C-17), 49,2 (C-18), 45,3 (C-14), 45,2 (C-13), 42,3 (C-8), 39,6 (C-1, C-4), 38,8 (C-19), 38,7 (C-15), 38,2 (C-10), 35,7 (C-7), 35,7 (C-22), 30,8 (C-21), 28,7 (C-23), 27,7 (C-12), 25,4 (C-2), 22,2 (C-11), 19,4 (C-6), 16,8 (C-25), 16,7 (C-26), 16,6 (C-27), 16,3 (C-24), 12,8 (C-28).

HRMS (ESI) m/z : 741,1781 [$M - \text{Na}$] $^-$ (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_{12}\text{Na}_2\text{S}_3$ 741,2025).

Por otro lado, el derivado trisulfatado también se obtuvo a partir del análogo disulfatado **16**: una solución de **16** (11,4 mg, 0,02 mmol) en DMF se trató con 4 equivalentes del complejo $\text{Me}_3\text{N}.\text{SO}_3$ (9,2 mg, 0,07 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 6,6 mg de **17** ($R = 50,0\%$).

IV.3.4.6 Preparación de 3 β -O-acetil-16 β -hidroxilup-20(29)-en sulfato de sodio (**28**)

Una solución de **20** (10,0 mg, 0,02 mmol) en DMF se trató con 4 equivalentes del complejo $\text{Me}_3\text{N}.\text{SO}_3$ (10,8 mg, 0,08 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 5,3 mg de **28** ($R = 43,8\%$) eluidos con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (85:15) como un sólido amorfo blanco; pf: 136-138 °C.



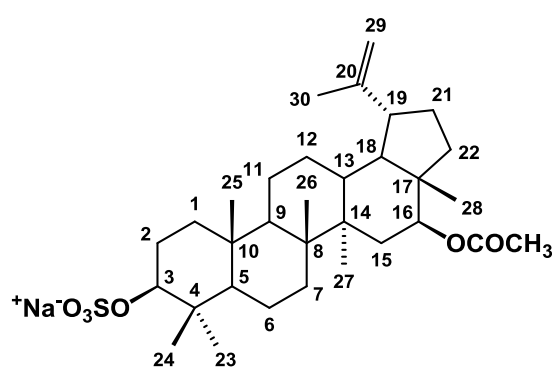
$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, MeOD- d_4): 4,75 (1H, *br s*, H-29a), 4,63 (1H, *br s*, H-29b), 4,48 (1H, dd, $J = 10,1, 6,6$ Hz, H-3), 4,37 (1H, t, $J = 7,4$ Hz, H-16), 2,56 (1H, ddd, $J = 11,6, 11,6, 6,2$ Hz, H-19), 1,76 (3H, *br s*), 1,74 (3H, s, H-30), 1,69-1,61 (5H, m), 1,53-1,41 (8H, m), 1,33 (3H, *br s*), 1,12 (3H, s, H-26), 1,10 (3H, s, H-27), 1,04 (3H, m), 0,94 (3H, s, H-25), 0,90 (3H, s, H-24), 0,90 (3H, s, H-23), 0,89 (3H, s,

H-28), OAc-3 [2,05 (3H, s)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, MeOD-*d*₄): 150,9 (C-20), 110,0 (C-29), 85,9 (C-16), 82,1 (C-3), 56,5 (C-5), 50,9 (C-9, C-19), 49,2 (C-18), 48,9 (C-17), 45,3 (C-14), 42,2 (C-8), 38,9 (C-1, C-15), 38,7 (C-13), 38,4 (C-4), 37,9 (C-10), 35,6 (C-22), 35,4 (C-7), 30,7 (C-21), 28,4 (C-23), 25,9 (C-12), 24,6 (C-2), 22,0 (C-11), 19,4 (C-30), 19,2 (C-6), 16,8 (C-24), 16,6 (C-25), 16,5 (C-26), 16,2 (C-27), 12,8 (C-28), OAc-3 [172,9 (s), 21,0 (c)].

IV.3.4.7 Preparación de 16 β -O-acetil-3 β -hidroxilup-20(29)-en sulfato de sodio (29)

Una solución de **21** (8,0 mg, 0,02 mmol) DMF se trató con 4 equivalentes del complejo Me₃N \cdot SO₃ (10,8 mg, 0,08 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 3,3 mg de **29** (R = 27,3%) eluidos con CH₂Cl₂:MeOH (85:15) como un sólido amorfo blanco; pf: 136-137 °C.

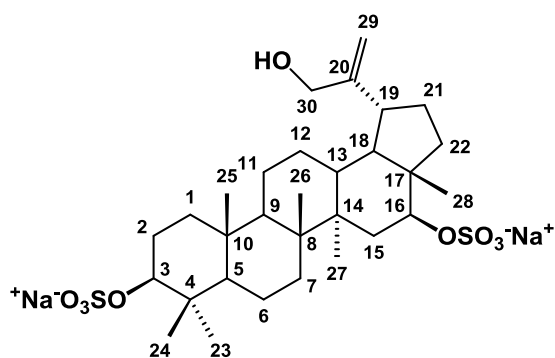


¹H-RMN (δ , 300 MHz, MeOD-*d*₄): 4,91 (1H, *br s*, H-16), 4,76 (1H, *br s*, H-29a), 4,64 (1H, *br s*, H-29b), 3,96 (1H, *dd*, *J* = 11,5, 4,4 Hz, H-3), 2,55 (1H, *ddd*, *J* = 11,6, 11,1, 5,6 Hz, H-19), 1,77-1,75 (2H, *m*), 1,74 (3H, *s*, H-30), 1,62-1,32 (20H, *m*), 1,12 (6H, *s*, H-24, H-27), 1,06 (3H, *s*, H-23), 0,93 (3H, *s*, H-26), 0,92 (3H, *s*, H-25), 0,85 (3H, *s*, H-28), OAc-16 [2,03 (3H, *s*)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, MeOD-*d*₄): 151,0 (C-20), 110,7 (C-29), 87,5 (C-3), 80,7 (C-16), 57,2 (C-5), 51,3 (C-9), 50,0 (C-19), 49,2 (C-18), 48,9 (C-17), 45,3 (C-14), 42,2 (C-8), 39,8 (C-1), 39,6 (C-4), 38,8 (C-13), 38,7 (C-15), 38,1 (C-10), 35,4 (C-22), 34,6 (C-7), 30,8 (C-21), 28,7 (C-23), 26,0 (C-12), 25,4 (C-2), 22,0 (C-11), 19,5 (C-30), 19,4 (C-6), 16,7 (C-25), 16,7 (C-26), 16,6 (C-27), 16,3 (C-24), 13,1 (C-28), OAc-16 [172,6 (s), 21,2 (c)].

IV.3.5 Preparación de 3 β ,16 β ,30-trihidroxilup-20(29)-en-3,16-disulfato de sodio (17)

Una solución de **15** (40,0 mg, 0,06 mmol) en MeOH anhidro (1,5 mL) se trató con EuCl₃ (15,5 mg) en MeOH (1 mL). Luego, la mezcla se agregó lentamente a una solución de NaBH₄ (2,5 mg) en MeOH anhidro. La reacción se calentó a reflujo hasta la desaparición del material de partida confirmado por cromatografía en capa fina (24 horas). El bruto de reacción se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando CH₂Cl₂:MeOH como fase móvil. Se obtuvieron 20,5 mg de **17** (R = 51,1%) eluidos con CH₂Cl₂:MeOH (75:25) como un sólido amorfo blanco; pf: 130-131 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, MeOD- d_4): 4,95 (1H, *br s*, H-29a), 4,34 (1H, *t*, $J = 7,7$ Hz, H-16), 4,03, 4,06 (2H, d_{AB} , $J = 13,5$ Hz, H-30a,b), 3,91 (1H, *dd*, $J = 10,9, 3,8$ Hz, H-3), 2,40 (1H, *ddd*, $J = 10,6, 10,0, 5,7$ Hz, H-19), 2,16-2,01 (2H, *m*, H-2a, H-21a), 1,78-1,63 (6H, *m*), 1,55-1,37 (7H, *m*), 1,29 (8H, *d*, $J = 5,6$ Hz), 1,08 (3H, *s*, H-27), 1,07 (3H, *s*, H-24), 1,02 (3H, *s*, H-23), 0,88 (3H, *s*, H-26), 0,84 (3H, *s*, H-

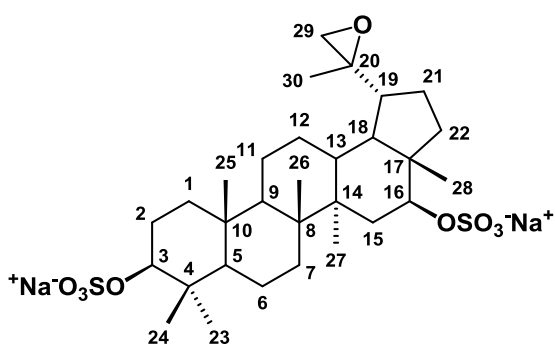
28),81 (3H, *s*, H-25).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, MeOD- d_4): 155,4 (C-20), 107,4 (C-29), 87,6 (C-3), 85,8 (C-16), 65,0 (C-30), 57,2 (C-5), 51,3 (C-9), 49,8 (C-17), 49,2 (C-18), 45,2 (C-14), 44,7 (C-13), 42,3 (C-8), 39,9 (C-1), 39,6 (C-4), 38,8 (C-19, C-15), 38,1 (C-10), 35,6 (C-7), 35,5 (C-22), 32,6 (C-21), 28,7 (C-23), 27,4 (C-12), 25,4 (C-2), 22,1 (C-11), 19,4 (C-6), 16,7 (C-25, C-26), 16,6 (C-27), 16,3 (C-24), 12,7 (C-28).

HRMS (ESI) m/z : 639,2689 [M – Na] $^-$ (calculado para C₃₀H₄₈O₉NaS₂ 639,2637).

IV.3.6 Preparación de 20S,29-epoxilupano-3 β ,16 β -diol disulfato de sodio (18)

Una solución de **8** (40,0 mg, 0,06 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) se trató con una solución al 70% de AMCPB (21,4 mg, 0,12 mmol) y una solución al 10% de Na₂CO₃ (6 mL). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 12 horas. Al cabo de ese tiempo, la fase acuosa se extrajo con *n*-BuOH (3 x 15 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una solución al 5% de Na₂SO₃, luego con una solución saturada de NaHCO₃ y finalmente con agua. Posteriormente, estos extractos se secaron sobre MgSO₄ anhidro y el solvente se evaporó hasta sequedad. El producto de reacción se purificó por cromatografía preparativa RP TLC usando como eluyente MeOH:H₂O (65:35) obteniéndose 6,0 mg de **18** (R = 10,0%) como un sólido amorfo blanco, pf: 134-135 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, MeOD- d_4): 4,29 (1H, *t*, $J = 8,0$ Hz, H-16), 3,90 (1H, *dd*, $J = 11,4, 4,2$ Hz, H-3), 2,64 (2H, *br s*, H-29), 1,77-1,61 (13H, *m*), 1,38-1,26 (10H, *m*), 1,23 (3H, *s*, H-30), 1,06 (3H, *s*, H-27), 1,04 (3H, *s*, H-24), 1,01 (3H, *s*, H-23), 0,88 (3H, *s*, H-26), 0,80 (3H, *s*, H-28), 0,78 (3H, *s*, H-25).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, MeOD- d_4): 87,5 (C-3), 85,6 (C-16), 61,5 (C-20), 58,0 (C-29), 57,2 (C-5), 51,1 (C-9), 50,4 (C-18), 49,4 (C-17), 47,3 (C-19), 45,2 (C-14), 42,3 (C-8),

39,8 (C-1), 39,6 (C-4), 38,7 (C-15), 38,1 (C-10), 38,0 (C-13), 35,5 (C-7), 35,4 (C-22), 28,7 (C-23), 27,7 (C-21), 27,0 (C-12), 25,4 (C-2), 22,1 (C-11), 19,4 (C-6), 18,5 (C-30), 16,7 (C-25), 16,7 (C-26), 16,5 (C-27), 16,2 (C-24), 12,9 (C-28).

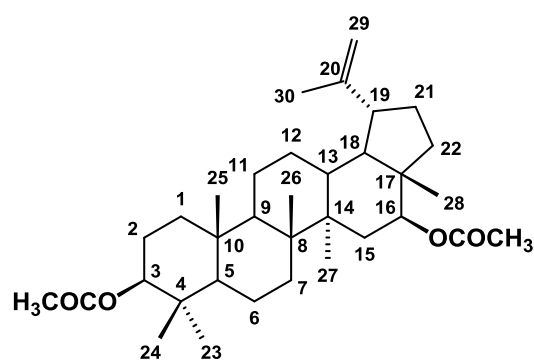
HRMS (ESI) m/z : 639,2695 [M – Na]⁺ (calculado para C₃₀H₄₈NaO₉S₂ 639,2637).

IV.3.7 Procedimiento general de reacciones de acetilación

A una disolución del triterpeno en piridina (1 mL), se le adicionó DMAP y Ac₂O. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas hasta la desaparición del material de partida. Transcurrido ese tiempo se le agregó a la mezcla agua y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con una solución saturada de NaHCO₃, se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como eluyente CH₂Cl₂.

IV.3.7.1 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol diacetato (19)

Una solución de **5** (20,0 mg, 0,04 mmol) en piridina se trató con DMAP y un exceso de Ac₂O (1,2 mL, 12,7 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 12,1 mg de **19** (R = 51,0%), como un sólido amorfo blanco; pf: 105-107 °C.



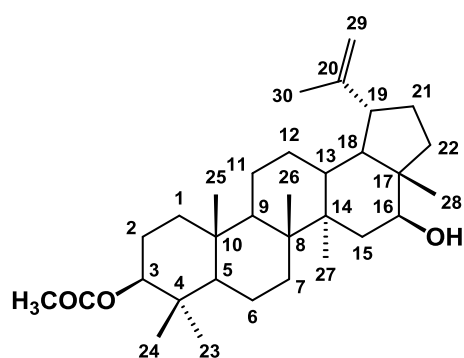
¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 4,87 (1H, dd, J = 11,7, 4,9 Hz, H-16), 4,71 (1H, *br s*, H-29a), 4,61 (1H, *br s*, H-29b), 4,46 (1H, dd, J = 10,5, 5,3 Hz, H-3), 2,48 (1H, ddd, J = 11,0, 10,7, 5,1 Hz, H-19), 1,99-1,86 (1H, *m*, H-21a), 1,68 (3H, *s*, H-30), 1,64 (*s*, 5H), 1,60-1,23 (13H, *m*), 1,19-1,11 (2H, *m*), 1,05 (6H, *s*, H-25, H-27), 0,85 (3H, *s*, H-24), 0,84 (6H, *s*, H-23, H-28), 0,83 (3H, *s*, H-26), 0,80 (1H, *d*, J = 10,1 Hz), OAc [2,01

(3H, *s*), 2,04 (3H, *s*)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 150,0 (C-20), 110,1 (C-29), 81,0 (C-3), 79,3 (C-16), 55,6 (C-5), 50,1 (C-9), 48,0 (C-17), 47,7 (C-18), 47,5 (C-19), 44,4 (C-14), 41,2 (C-8), 38,6 (C-1), 38,0 (C-4), 37,8 (C-22), 37,6 (C-13), 37,2 (C-10), 34,4 (C-7), 33,7 (C-15), 29,9 (C-21), 28,1 (C-23), 24,9 (C-12), 23,9 (C-2), 21,0 (C-11), 19,4 (C-30), 18,3 (C-6), 16,6 (C-24), 16,3 (C-26), 16,2 (C-25), 16,1 (C-27), 12,9 (C-28), OAc-3 [171,1 (*s*), 21,5 (*c*)], OAc-16 [170,8 (*s*), 21,5 (*c*)].

IV.3.7.2 Preparación de 16β-hidroxilup-20(29)-en-3β-il acetato (**20**) y 3β-hidroxilup-20(29)-en-16β-il acetato (**21**)

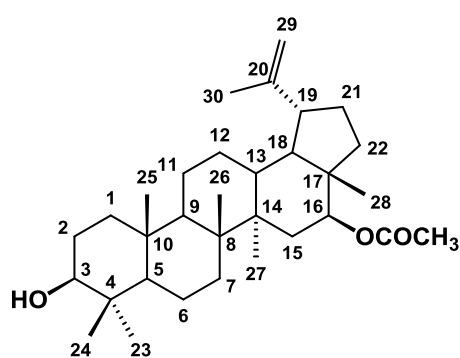
Una solución de **5** (50,0 mg, 0,11 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) se trató con piridina (0,5 mL), DMAP y Ac₂O (0,01mL, 0,11 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 13,9 mg de **20** (R = 25,0%) y 13,7 mg de **21** (R = 25,0%) como sólidos amorfos blancos; pf (**20**): 110-111°C, pf (**21**): 110-112 °C.



¹H-RMN (20**)** (δ , 500 MHz, CDCl₃): 4,70 (1H, *br s*, H-29a), 4,59 (1H, *br s*, H-29b), 4,46 (1H, *dd*, $J = 10,9, 5,5$ Hz, H-3), 3,61 (1H, *dd*, $J = 10,6, 4,3$, H-16), 2,49 (1H, *ddd*, $J = 11,0, 11,0, 6,0$ Hz, H-19), 1,68 (3H, *s*, H-30), 1,65-1,61 (4H, *m*), 1,58 (3H, *s*), 1,54 (2H, *m*), 1,40 (6H, *m*), 1,32-1,18 (6H, *m*), 1,03 (3H, *s*, H-27), 0,98 (3H, *s*, H-25), 0,85 (3H, *s*, H-24), 0,84 (3H, *s*, H-23), 0,83 (3H, *s*, H-26), 0,79 (3H, *s*, H-28), 0,76 (1H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H-5), OAc-3 [2,04 (3H, *s*)].

¹³C-RMN (20**)** (δ , 100 MHz, CDCl₃): 150,1 (C-20), 110,0 (C-29), 81,1 (C-3), 77,2 (C-16), 55,6 (C-5), 50,1 (C-9), 48,8 (C-17), 47,9 (C-19), 47,8 (C-18), 44,2 (C-14), 41,1 (C-8), 38,6 (C-1), 38,0 (C-4), 37,9 (C-22), 37,4 (C-13), 37,2 (C-10), 37,0 (C-15), 34,3 (C-7), 30,1 (C-21), 28,1 (C-23), 24,9 (C-12), 23,8 (C-2), 21,0 (C-11), 19,5 (C-30), 18,3 (C-6), 16,6 (C-24), 16,3 (C-26), 16,3 (C-25), 16,1 (C-27), 11,8 (C-28), OAc-3 [171,2 (*s*), 21,5 (*c*)].

EIMS m/z (20**):** 484 [M]⁺ (36), 466 (6), 424(57), 216 (44), 207 (50), 189 (82), 203 (41); **HR-EIMS m/z :** 484,3940 (calculado para C₃₂H₅₂O₃ [M]⁺ 484,3916).



¹H-RMN (21**)** (δ , 600 MHz, CDCl₃): 4,87 (1H, *dd*, $J = 11,3, 4,6$ Hz, H-16), 4,70 (1H, *br s*, H-29a), 4,59 (1H, *br s*, H-29b), 3,22-3,15 (1H, *m*, H-3), 2,48 (1H, *ddd*, $J = 11,3, 10,4, 6,0$ Hz, H-19), 1,67 (3H, *s*, H-30), 1,65-1,60 (4H, *m*), 1,57 (8H, *s*), 1,45-1,24 (9H, *m*), 1,04 (3H, *s*, H-27), 1,03 (3H, *s*, H-25), 0,96 (3H, *s*, H-23), 0,84 (3H, *s*, H-28), 0,82 (3H, *s*, H-26), 0,75 (3H, *s*, H-24), 0,68 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz), OAc-16 [2,02 (3H, *s*)].

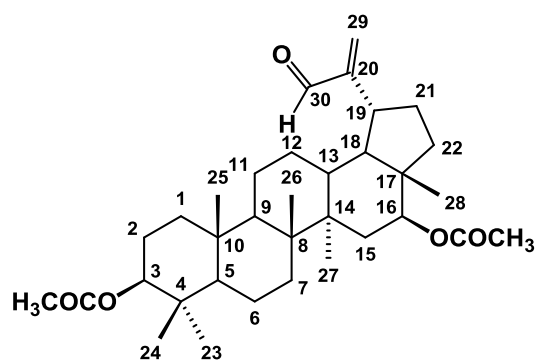
¹³C-RMN (21**)** (δ , 150 MHz, CDCl₃): 150,0 (C-20), 110,1 (C-29), 79,2 (C-16), 79,0 (C-3), 55,4 (C-5), 50,0 (C-9), 47,9 (C-18), 47,6 (C-19), 47,5 (C-17), 44,3 (C-14), 41,1 (C-8), 39,0 (C-4), 38,8 (C-1), 37,8 (C-22), 37,5 (C-13), 37,2 (C-10), 34,4 (C-7), 33,6 (C-15), 29,8 (C-21), 28,1 (C-23), 27,5 (C-2), 24,8 (C-12), 20,9 (C-11), 19,4

(C-30), 18,4 (C-6), 16,2 (C-26), 16,1 (C-24), 16,1 (C-25), 15,5 (C-27), 12,9 (C-28), OAc-16 [170,9 (s), 21,5 (c)].

EIMS m/z (21): 484 [M]⁺ (28), 466 (26), 424(16), 216 (26), 207 (6), 203 (42), 189 (90); **HR-EIMS m/z :** 484,3924 (calculado para C₃₂H₅₂O₃ [M]⁺ 484,3916).

IV.3.7.3 Preparación de 30-oxolup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol diacetato (22)

Una solución de **10** (20,0 mg, 0,04 mmol) en piridina se trató con un exceso de Ac₂O (1,2 mL, 12,7 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 17,1 mg de **22** (R = 70,0%) como un sólido amorfo blanco; pf: 109-110 °C.



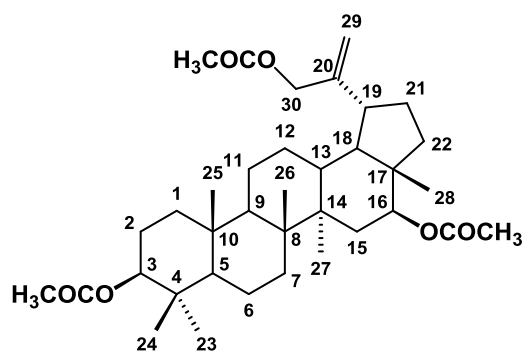
¹H-RMN (δ , 600 MHz, CDCl₃): 9,51 (1H, s, H-30), 6,30 (1H, *br s*, H-29b), 5,95 (1H, *br s*, H-29b), 4,92 (1H, dd, $J = 11,3$, 4,7, H-16), 4,45 (1H, dd, $J = 11,0$, 4,6 Hz, H-3), 2,87 (1H, *br s*, H-19), 1,63-1,61 (5H, m), 1,52-1,50 (5H, m), 1,30-1,21 (8H, m), 1,25 (3H, s), 1,02 (6H, s, H-25, H-27), 0,87 (3H, s, H-28), 0,83 (6H, s, H-23, H-26), 0,82 (3H, s, H-24), 0,77-0,75 (1H, d, $J = 11,1$ Hz, H-5), OAc [2,04 (3H, s), 2,02 (3H, s)].

¹³C-RMN (δ , 150 MHz, CDCl₃): 195,0 (C-30), 156,5 (C-20), 133,4 (C-29), 81,0 (C-3), 78,9 (C-16), 55,4 (C-5), 49,8 (C-9, C-18), 47,7 (C-17), 44,0 (C-14), 41,0 (C-8), 38,5 (C-1), 37,9 (C-4), 37,8 (C-22), 37,1 (C-10, C-13, C-19), 34,3 (C-7), 33,5 (C-15), 29,8 (C-21), 28,0 (C-23), 23,8 (C-2, C-12), 21,0 (C-11), 18,2 (C-6), 16,6 (C-24), 16,3 (C-26), 16,1 (C-25), 15,9 (C-27), 12,8 (C-28), OAc-3 [171,2 (s), 21,5 (c)], OAc-16 [170,9 (s), 21,5 (c)].

HR-EIMS m/z : 540,3807 (calculado para C₃₄H₅₂O₅ [M]⁺ 540,3815).

IV.3.7.4 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β ,30-triol triacetato (23)

Una solución de **11** (20,0 mg, 0,04 mmol) en piridina (1 mL) se trató con un exceso de Ac₂O (1,2 mL, 12,7 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 19,0 mg de **23** (R = 72,0%) como un sólido amorfo blanco; pf: 107-108 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 600 MHz, CDCl_3): 4,97 (1H, *br s*, H-29a), 4,95 (1H, *br s*, H-29b), 4,87 (1H, *dd*, $J = 11,2, 4,7$ Hz, H-16), 4,57, 4,55 (2H, d_{AB} , $J = 14,0$ Hz, H-30a,b), 4,46 (1H, *dd*, $J = 11,5, 5,2$ Hz, H-3), 4,25-4,18 (2H, *m*), 1,04 (6H, *s*, H-25, H-27), 0,85 (3H, *s*, H-24), 0,84 (6H, *s*, H-23, H-28), 0,83 (3H, *s*, H-26), OAc [2,10 (3H, *s*), 2,04 (3H, *s*), 2,04 (3H, *s*)].

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 150 MHz, CDCl_3): 148,5 (C-20), 110,9 (C-29), 81,0 (C-3), 79,0 (C-16), 68,3 (C-30), 55,4 (C-5), 49,9 (C-9), 48,6 (C-18), 47,4 (C-17), 44,2 (C-14), 41,1 (C-8), 38,8 (C-13), 38,5 (C-1), 37,9 (C-4), 37,6 (C-22), 37,4 (C-10), 37,1 (C-19), 34,3 (C-7), 33,6 (C-15), 29,8 (C-21), 28,1 (C-23), 23,9 (C-12), 23,8 (C-2), 21,1 (C-11), 18,2 (C-6), 16,6 (C-24), 16,3 (C-26), 16,2 (C-25), 16,1 (C-27), 12,7 (C-28), OAc-3 [171,2 (*s*), 21,5 (*c*)], OAc-16 [170,9 (*s*), 21,5 (*c*)], OAc-30 [170,8 (*s*), 21,2 (*c*)].

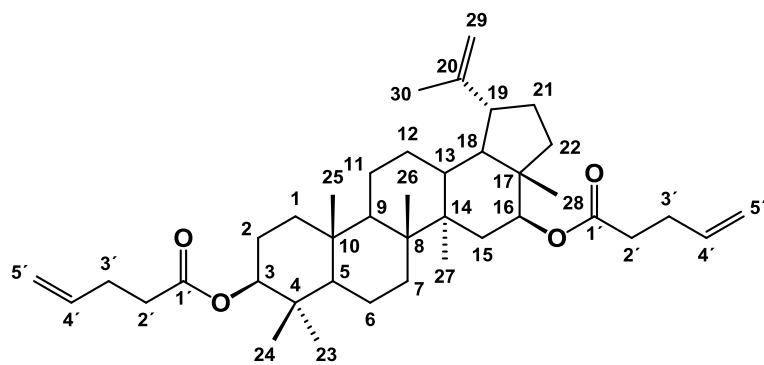
EIMS m/z : 542 [$\text{M} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$] $^+$ (4), 524 (54), 464 (30), 189 (82); **HR-EIMS m/z :** 542,3990 (calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_5$ [$\text{M} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}$] $^+$ 542,3971).

IV.3.8 Procedimiento general de reacciones de esterificación

A una solución de **5** en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL) se le adicionó Et_3N , el cloruro de ácido correspondiente y DMAP. La reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, la reacción se enfrió con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (5 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con una solución saturada de NaHCO_3 , luego se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se filtraron. Posteriormente se removió el solvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como eluyente *n*-Hex:AcOEt.

IV.3.8.1 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol dipent-4-enoato (**24**)

Una solución de **5** (60,0 mg, 0,14 mmol) en CH_2Cl_2 se trató con Et_3N (75 μL , 0,54 mmol), cloruro de 4-pentenoilo (35 μL , 0,54 mmol) y DMAP de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 9,9 mg de **24** ($R = 12,1\%$) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10) como un sólido amorfo de color blanco; pf: 240-241 °C.



¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 4,88 (1H, dd, J = 11,4, 4,9 Hz, H-16), 4,71 (1H, *br s*, H-29a), 4,60 (1H, *br s*, H-29b), 4,48 (1H, dd, J = 10,3, 5,1 Hz, H-3), 2,53-2,48 (1H, m, H-19), 1,95-1,89 (1H, m, H-21a), 1,68 (3H, *s*, H-30), 1,65-1,60 (4H, m), 1,50-1,30 (10H, m),

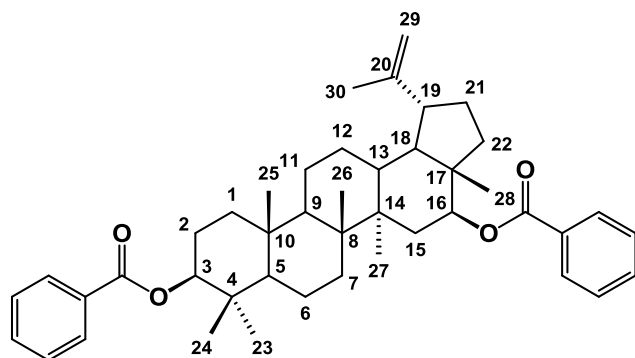
1,26 (5H, m), 1,04 (6H, *s*, H-25, H-27), 0,86 (3H, *s*, H-24), 0,85 (3H, *s*, H-28), 0,84 (6 H, *s*, H-23, H-26), OPent [5,87-5,78 (4H, m, H-4'), 5,08 (1H, *br s*, H-5'), 5,02 (2H, *br s*, H-5'), 4,98 (1H, *br s*, H-5'), 2,39 (4H, d, J = 5,7 Hz, H-2'), 2,38 (4H, d, J = 6,7 Hz, H-3'),].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 150,0 (C-20), 110,1 (C-29), 81,0 (C-3), 79,2 (C-16), 55,5 (C-5), 50,0 (C-9), 48,0 (C-18), 47,7 (C-19), 47,5 (C-17), 44,4 (C-14), 41,2 (C-8), 38,5 (C-1), 38,0 (C-4), 37,8 (C-22), 37,5 (C-13), 37,2 (C-10), 34,4 (C-7), 33,7 (C-15), 29,9 (C-21), 28,1 (C-23), 24,8 (C-12), 23,9 (C-2), 21,0 (C-11), 19,4 (C-30), 18,3 (C-6), 16,7 (C-24), 16,3 (C-26), 16,2 (C-25), 16,1 (C-27), 13,0 (C-28), OPent-3 [173,0 (*s*), 137,0 (*d*), 115,5 (*t*), 34,2 (*t*), 29,2 (*t*)], OPent-16 [172,7 (*s*), 137,0 (*d*), 115,5 (*t*), 34,2 (*t*), 29,2 (*t*)].

EIMS m/z : 606 [M]⁺ (0,1), 506 (67), 406(51), 363 (48), 216 (89), 203 (100), 189 (84).

IV.3.8.2 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol dibenzoato (25)

Una solución de **5** (50,0 mg, 0,11 mmol) en CH₂Cl₂ se trató con Et₃N (62 μ L, 0,45 mmol), un exceso de cloruro de benzoílo (50 μ L, 0,43 mmol) y DMAP de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 30,0 mg de **25** (R = 40,8%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10) como un sólido amorfo de color blanco; pf: 219-220 °C.



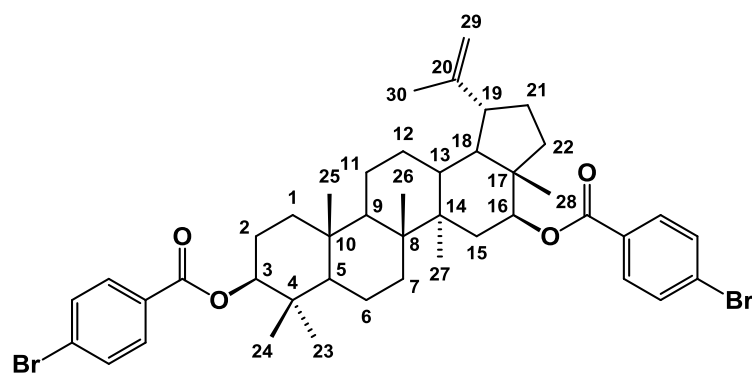
¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 5,13 (1H, dd, J = 11,3, 4,9 Hz, H-16), 4,74 (1H, *br s*, H-29a), 4,72 (1H, dd, J = 9,9, 4,9 Hz, H-3), 4,63 (1H, *br s*, H-29b), 2,54 (1H, ddd, J = 11,0, 10,9, 5,3 Hz, H-19), 1,99-1,91 (1H, m, H-21a), 1,81-1,76 (5H, m), 1,72 (3H, *s*, H-30), 1,60-1,34 (16H, m), 1,14 (3H, *s*, H-27), 1,09 (3H, *s*, H-25), 1,01 (3H, *s*, H-28), 1,00 (3H, *s*, H-24), 0,93 (3H, *s*, H-23), 0,92 (3H, *s*, H-26), OBz [8,05 (4H, 2d, J = 6,9 Hz), 7,50 (2H, 2d, J = 7,3 Hz), 7,45 (4H, 2d, J = 7,5 Hz)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 149,9 (C-20), 110,2 (C-29), 81,7 (C-3), 80,0 (C-16), 55,6 (C-5), 50,0 (C-9), 48,1 (C-18), 47,8 (C-17), 47,7 (C-19), 44,5 (C-14), 41,2 (C-8), 38,6 (C-1), 38,3 (C-4), 37,9 (C-22), 37,6 (C-13), 37,3 (C-10), 34,4 (C-7), 33,7 (C-15), 29,9 (C-21), 28,2 (C-23), 24,8 (C-12), 23,9 (C-2), 21,1 (C-11), 19,4 (C-30), 18,3 (C-6), 16,9 (C-24), 16,3 (C-26), 16,2 (C-25), 16,1 (C-27), 13,2 (C-28), OBz-3 [166,4 (s), 132,8 (d), 131,2 (s), 129,7 (d), 128,4 (d)], OBz-16 [166,2 (s), 132,8 (d), 131,2 (s), 129,7 (d), 128,4 (d)].

HR-EIMS m/z : 650,4365 (calculado para C₄₄H₅₈O₄ [M]⁺ 650,4335).

IV.3.8.3 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol di-*p*-bromobenzoato (26)

Una solución de **5** (50,0 mg, 0,11 mmol) en CH₂Cl₂ se trató con Et₃N (93 μ L, 0,68 mmol), un exceso de cloruro de *p*-bromobenzoílo (50 μ L, 0,34 mmol) y DMAP, y se agitó a 0°C bajo atmósfera de N₂ durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo la muestra se trató de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 38,5 mg de **26** (R = 42,2%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10) como un sólido amorfo de color blanco; pf: 109-110 °C.



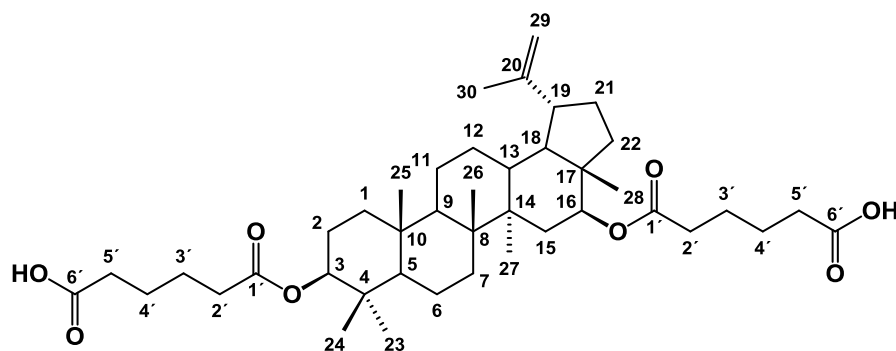
¹H-RMN (δ , 400 MHz, CDCl₃): 5,12 (1H, dd, J = 11,3, 4,6 Hz, H-16), 4,74 (1H, *br s*, H-29a), 4,71 (1H, dd, J = 10,6, 5,4 Hz, H-3), 4,63 (1H, *br s*, H-29b), 2,54 (1H, ddd, J = 10,8, 10,6, 4,9 Hz, H-19), 2,00-1,93 (1H, m, H-21a), 1,81-1,75 (4H, m), 1,71 (3H, s, H-30), 1,60 (1H, d, J = 11,2 Hz, H-18), 1,56 (3H, s), 1,53-1,24 (12H, m), 1,13 (3H, s, H-27), 1,10 (3H, s, H-25), 0,99 (6H, s, H-24, H-28), 0,92 (6H, s, H-23, H-26), 0,87 (1H, d, J = 7,5 Hz, H-5), *O-p*-BrBz [7,32 (2H, d, J = 7,8 Hz), 7,67 (2H, d, J = 7,7 Hz), 7,96 (2H, dd, J = 7,6 Hz), 8,16 (2H, d, J = 13,6 Hz)].

¹³C-RMN (δ 100 MHz, CDCl₃): 149,9 (C-20), 110,3 (C-29), 82,2 (C-3), 80,6 (C-16), 55,5 (C-5), 50,0 (C-9), 48,0 (C-18), 47,7 (C-17), 47,6 (C-19), 44,5 (C-14), 41,2 (C-8), 38,5 (C-1), 38,3 (C-4), 37,9 (C-22), 37,5 (C-10), 37,2 (C-13), 34,3 (C-7), 33,6 (C-15), 29,8 (C-21), 28,2 (C-23), 24,7 (C-12), 23,8 (C-2), 21,0 (C-11), 19,4 (C-30), 18,3 (C-6), 16,9 (C-24), 16,3 (C-26), 16,2 (C-25), 16,1 (C-27), 13,2 (C-28), *O-p*-BrBz-3 [165,1 (s), 135,8 (d), 133,1 (s), 132,6 (d), 122,5 (s)], *O-p*-BrBz-16 [164,9 (s), 133,0 (s), 130,1 (d), 128,3 (d), 122,5 (s)].

EIMS m/z : 606 [M-(*p*-Br-OBz)]⁺ (72), 604 (69), 591 (13), 589 (14), 405 (18), 390 (13), 189 (77), 187 (49), 184 (100), 182 (99).

IV.3.8.4 Preparación de lup-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol dihemiadipato (27)

Una solución de **5** (30,0 mg, 0,07 mmol) en CH₂Cl₂ se trató con Et₃N (62 μ L, 0,45 mmol), dicloruro de adipoilo (5 μ L, 0,03 mmol) y DMAP, y se calentó a reflujo bajo atmósfera de N₂ durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo la muestra se trató de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 33,8 mg de **29** (R = 71,3%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10) como un sólido amorfo de color blanco; pf: 97-98 °C.



¹H-RMN (δ , 300 MHz, MeOD-*d*₄): 4,91 (1H, dd, *J* = 11,3, 4,6 Hz, H-16), 4,76 (1H, *br s*, H-29a), 4,64 (1H, *br s*, H-29b), 4,49 (1H, dd, *J* = 10,3, 5,5 Hz, H-3), 2,57 (1H, ddd, *J* = 11,1, 10,3, 6,2

Hz, H-19), 2,07-1,96 (1H, m), 1,81-1,78 (4H, m), 1,74 (3H, s, H-30), 1,69-1,66 (3H, m), 1,59-1,32 (13H, m), 1,12 (6H, s, H-25, H-27), 0,94 (3H, s, H-26), 0,93 (3H, s, H-28), 0,91 (3H, s, H-23), 0,90 (3H, s, H-24), OAdip [2,37-2,31 (8H, m), 1,69-1,66 (8H, m)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, MeOD-*d*₄): 151,0 (C-20), 110,7 (C-29), 82,3 (C-3), 80,6 (C-16), 56,7 (C-5), 51,3 (C-9), 49,1 (C-18), 48,9 (C-19), 48,5 (C-17), 45,4 (C-14), 42,2 (C-8), 39,5 (C-1), 38,9 (C-4), 38,8 (C-13, C-22), 38,2 (C-10), 35,3 (C-15), 34,6 (C-7), 30,8 (C-21), 28,5 (C-23), 26,0 (C-12), 24,7 (C-2), 22,0 (C-11), 19,5 (C-30), 19,2 (C-6), 17,0 (C-24), 16,7 (C-26), 16,6 (C-25), 16,3 (C-27), 13,2 (C-28), OAdip-3 [177,3 (s, C6'), 175,0 (s, C1'), 35,2 (t), 34,6 (t), 25,7 (t), 25,6 (C-4'), 25,5 (t)], OAdip-16 [177,3 (s, C-6'), 174,9 (s, C-1'), 35,2 (t), 34,6 (t), 25,7 (t), 25,5 (t)].

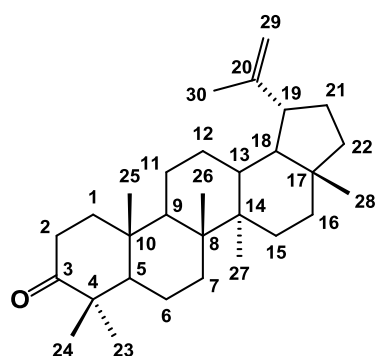
HR-EIMS *m/z*: 589,4897 (calculado para C₄₁H₆₁O₆ [M-CO₂H]⁺ 589,4985).

IV.3.9 Procedimiento general de reacciones de oxidación con el reactivo de Jones

A una solución del triterpeno en acetona (3 mL) a 0°C, se le adicionó gota a gota el reactivo de Jones hasta que la solución se tornó de un color anaranjado. La reacción se agitó durante 30 minutos y luego se trató la mezcla con *i*-PrOH (2 mL). El residuo se filtró a través de Florisil y se lavó sucesivas veces con AcOEt. Luego se removió el solvente y se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como fase móvil *n*-Hex:AcOEt.

IV.3.9.1 Preparación de lup-20(29)-en-3-ona (lupenona) (30)

Una solución de **1** (50,0 mg, 0,12 mmol) en acetona se trató con el reactivo de Jones de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 47,4 mg de **30** (R = 95,3%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10).

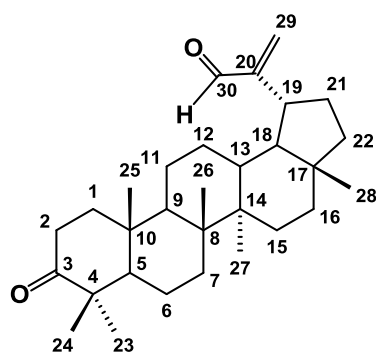


$^1\text{H-RMN}$ (δ , 400 MHz, CDCl_3): 4,67 (1H, *br s*, H-29a), 4,54 (1H, *br s*, H-29b), 2,41 (1H, *m*, H-19), 1,63-1,25 (27H, *m*), 1,03 (6H, *s*, H-23, H-26), 0,96 (3H, *s*, H-24), 0,94 (3H, *s*, H-27), 0,85 (3H, *s*, H-25), 0,83 (3H, *s*, H-28).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, CDCl_3): 218,0 (C-3), 150,8 (C-20), 109,5 (C-29), 55,0 (C-5), 49,9 (C-9), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 47,4 (C-4), 43,1 (C-17), 43,1 (C-14), 40,9 (C-8), 40,1 (C-22), 39,7 (C-13), 38,2 (C-1), 36,9 (C-10), 35,7 (C-16), 34,2 (C-2), 33,7 (C-7), 29,9 (C-21), 27,5 (C-15), 26,8 (C-23), 25,2 (C-12), 21,6 (C-24), 21,1 (C-11), 19,8 (C-30), 19,8 (C-6), 18,1 (C-28), 16,0 (C-25), 16,2 (C-26), 15,9 (C-27).

IV.3.9.2 Preparación de 3-oxolup-20(29)-en-30-al (32)

Una solución de **31** (15,0 mg, 0,03 mmol) en acetona se trató con el reactivo de Jones de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 7,9 mg de **32** (R = 53,0%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (95:5).

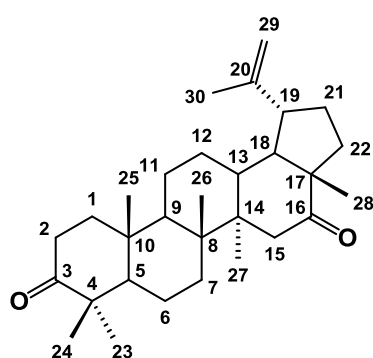


$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, CDCl_3): 9,51 (1H, *s*, H-30), 6,28 (1H, *br s*, H-29a), 5,91 (1H, *br s*, H-29b), 2,76 (1H, *ddd*, $J = 10,9, 10,7, 5,8$ Hz, H-19), 2,50-2,37 (2H, *m*), 1,87 (1H, *ddd*, $J = 13,2, 7,5, 4,4$ Hz, H-1a), 1,76-1,62 (4H, *m*), 1,56 (2H, *m*), 1,54-1,25 (15H, *m*), 1,08 (2H, *br s*), 1,06 (3H, *s*, H-26), 1,05 (3H, *s*, H-23), 1,02 (3H, *s*, H-24), 0,93 (3H, *s*, H-27), 0,91 (3H, *s*, H-25), 0,83 (3H, *s*, H-28).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ , 75 MHz, CDCl_3): 218,2 (C-3), 195,2 (C-30), 157,3 (C-20), 133,3 (C-29), 55,1 (C-5), 49,8 (C-9, C-18), 47,5 (C-4), 43,4 (C-14), 42,9 (C-17), 40,9 (C-8), 40,1 (C-22), 39,8 (C-1), 38,0 (C-13, C-19), 37,0 (C-10), 35,5 (C-16), 34,3 (C-2), 33,7 (C-7), 27,5 (C-12, C-15), 26,7 (C-21, C-23), 21,6 (C-11), 21,2 (C-24), 19,8 (C-6), 17,9 (C-28), 16,0 (C-25), 15,9 (C-26), 14,5 (C-27).

IV.3.9.3 Preparación de lup-20(29)-eno-3,16-diona (33)

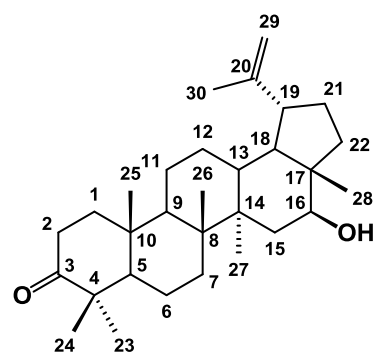
Una solución de **5** (50,0 mg, 0,11 mmol) en acetona se trató con el reactivo de Jones de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 20,8 mg de **33** (R = 42,0%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10); pf: 137-138°C. Como subproducto de la reacción se obtuvieron las cetonas **16β-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (34)** ($R_f = 0,47$) y **3β-hidroxi-lup-20(29)-en-16-ona (35)** ($R_f = 0,51$), las cuales fueron repurificadas por cromatografía en columna, eluyendo con una mezcla *n*-Hex:AcOEt (93:7); pf **34**: 154-156°C y pf **35**: 154-155°C.



$^1\text{H-RMN (33)}$ (δ , 400 MHz, CDCl_3): 4,73 (1H, *br s*, H-29a), 4,62 (1H, *br s*, H-29b), 2,71 (1H, *d*, $J = 13,6$ Hz, H-15a), 2,61 (1H, *ddd*, $J = 10,9, 10,8, 6,3$ Hz, H-19), 2,47-2,40 (2H, *m*, H-2), 2,14 (1H, *ddd*, $J = 11,9, 11,6, 9,8$ Hz, H-13), 1,97-1,91 (3H, *m*), 1,83 (1H, *s*, H-15b), 1,79 (1H, *s*, H-22a), 1,70 (1H, *d*, $J = 10,5$ Hz, H-18), 1,65 (3H, *s*, H-30), 1,47-1,32 (12H, *m*), 1,14 (3H, *s*, H-26), 1,09 (3H, *s*, H-28), 1,06 (3H, *s*, H-23), 1,01 (3H, *s*, H-24), 0,93 (3H, *s*, H-25), 0,90 (3H, *s*, H-27).

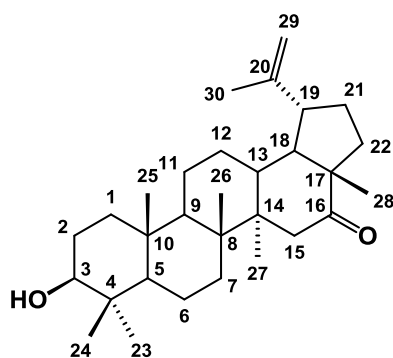
$^{13}\text{C-RMN (33)}$ (δ , 100 MHz, CDCl_3): 217,8 (C-3), 215,8 (C16), 148,8 (C-20), 110,8 (C-29), 56,7 (C-17), 54,8 (C-5), 49,4 (C-9), 49,4 (C-18), 48,1 (C-14), 47,4 (C-4, C-19), 44,9 (C-15), 41,0 (C-8), 39,6 (C-1), 37,7 (C-13), 36,9 (C-10), 34,1 (C-2), 33,6 (C-7), 31,2 (C-22), 28,6 (C-21), 26,8 (C-23), 24,8 (C-12), 21,3 (C-11), 21,1 (C-24), 19,7 (C-6), 19,0 (C-30), 18,1 (C-28), 16,3 (C-26), 16,0 (C-25), 15,4 (C-27).

EIMS m/z (33): 438 [M^+] (74), 395 (18), 247 (72), 229 (42), 205 (30); **HR-EIMS m/z :** 438,3484 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_2$ [M^+] 438,3498).



$^1\text{H-RMN (34)}$ (δ , 400 MHz, CDCl_3): 4,71 (1H, *br s*, H-29a), 4,60 (1H, *br s*, H-29b), 3,61 (1H, *dd*, $J = 10,6, 4,7$ Hz, H-16), 2,50-2,42 (3H, *m*), 2,04-1,89 (3H, *m*), 1,68 (3H, *s*, H-30), 1,53-1,26 (17H, *m*), 1,07 (6H, *s*, H-23, H-27), 1,02 (3H, *s*, H-24), 1,00 (3H, *s*, H-25), 0,93 (3H, *s*, H-26), 0,80 (3H, *s*, H-28).

$^{13}\text{C-RMN (34)}$ (δ , 100 MHz, CDCl_3): 218,2 (C-3), 150,0 (C-20), 110,0 (C-29), 77,2 (C-16), 55,1 (C-5), 49,5 (C-9), 48,8 (C-17), 47,8 (C-18), 47,7 (C-19), 47,5 (C-4), 44,3 (C-14), 41,0 (C-8), 39,8 (C-1), 37,8 (C-22), 37,5 (C-13), 37,0 (C-10), 37,0 (C-15), 34,2 (C-2), 33,7 (C-7), 30,0 (C-21), 26,8 (C-23), 24,9 (C-12), 21,5 (C-11), 21,2 (C-24), 19,8 (C-6), 19,5 (C-30), 16,2 (C-25), 16,1 (C-27), 15,9 (C-26), 11,8 (C-28).

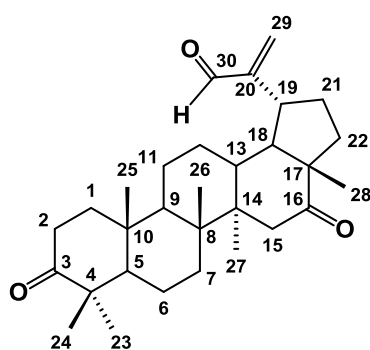


$^1\text{H-RMN}$ (**35**) (δ , 300 MHz, CDCl_3): 4,74 (1H, *br s*, H-29a), 4,63 (1H, *br s*, H-29b), 3,19 (1H, *dd*, $J = 10,9, 5,2$ Hz, H-3), 2,71 (1H, *d*, $J = 13,9$ Hz, H-15a), 2,61 (1H, *ddd*, $J = 11,3, 10,9, 6,0$ Hz, H-19), 2,12 (1H, *ddd*, $J = 12,5, 12,0, 4,1$ Hz, H-13), 1,83-1,86 (3H, *m*), 1,66 (3H, *s*, H-30), 1,61-1,54 (9H, *m*), 1,44-1,36 (8H, *m*), 1,11 (3H, *s*, H-26), 1,10 (3H, *s*, H-28), 0,97 (3H, *s*, H-23), 0,90 (3H, *s*, H-27), 0,85 (3H, *s*, H-25), 0,77 (3H, *s*, H-24), 0,68 (1H, *d*, $J = 9,5$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (**35**) (δ , 75 MHz, CDCl_3): 216,1 (C-16), 148,9 (C-20), 110,8 (C-29), 79,0 (C-3), 56,7 (C-5), 55,3 (C-17), 50,1 (C-9), 49,6 (C-18), 48,2 (C-14), 47,5 (C-19), 45,0 (C-15), 41,2 (C-8), 39,0 (C-1), 38,9 (C-4), 37,6 (C-13), 37,3 (C-10), 34,3 (C-7), 31,3 (C-22), 28,7 (C-21), 28,1 (C-23), 27,5 (C-2), 24,8 (C-12), 20,8 (C-11), 19,1 (C-30), 18,4 (C-6), 18,1 (C-28), 16,6 (C-26), 16,1 (C-25), 15,5 (C-24), 15,5 (C-27).

IV.3.9.4 Preparación de 3,16-dioxolup-20(29)-en-30-al (**36**)

Una solución de **10** (50,0 mg, 0,11 mmol) en acetona se trató con el reactivo de Jones de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 12,9 mg de **36** ($R = 26,0\%$) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (90:10); pf: 143-144°C.



$^1\text{H-RMN}$ (**36**) (δ , 600 MHz, CDCl_3): 9,52 (1H, *s*, H-30), 6,29 (1H, *br s*, H-29a), 5,98 (1H, *br s*, H-29b), 3,02 (1H, *br s*, H-19), 2,74 (1H, *d*, $J = 13,8$, H-15a), 2,48 (1H, *ddd*, $J = 15,9, 15,7, 8,6$ Hz, H-2a), 2,42-2,37 (1H, *m*, H-2b), 2,17-2,13 (2H, *m*), 2,00-1,94 (2H, *m*), 1,90-1,86 (1H, *m*), 1,85 (1H, *d*, $J = 13,8$ Hz, H-15b), 1,51-1,42 (5H, *m*), 1,38-1,24 (8H, *m*), 1,13 (6H, *s*, H-23, H-26), 1,07 (3H, *s*, H-28), 1,02 (3H, *s*, H-24), 0,93 (3H, *s*, H-25), 0,89 (3H, *s*, H-27).

$^{13}\text{C-RMN}$ (**36**) (δ , 150 MHz, CDCl_3): 217,9 (C-3), 215,4 (C-16), 194,8 (C-30), 156,2 (C-20), 133,3 (C-29), 56,9 (C-17), 54,8 (C-5), 49,2 (C-9, C-18), 47,7 (C-14), 47,4 (C-4), 44,9 (C-15), 41,0 (C-8), 39,6 (C-1), 37,3 (C-13, C-19), 36,9 (C-10), 34,2 (C-2), 33,6 (C-7, C-22), 31,3 (C-12, C-21), 26,8 (C-23), 21,2 (C-11), 21,2 (C-24), 19,6 (C-6), 18,1 (C-28), 16,3 (C-26), 15,9 (C-25), 15,4 (C-27).

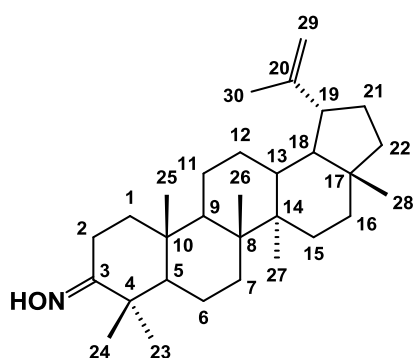
EIMS m/z : 452 $[\text{M}]^+$ (100), 437 (20), 434 (31), 247 (15), 205 (17); **HR-EIMS** m/z : 452,3284 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$ 452,3290).

IV.3.10 Procedimiento general para la obtención de oximas

A una solución del compuesto carbonílico en EtOH (2 mL) se le adicionó NH₂OH.HCl y una solución de NaOAc en H₂O. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente o se calentó a reflujo según cada caso hasta la desaparición del sustrato de partida. Transcurrido ese tiempo, el solvente fue removido a presión reducida. El residuo se trató con H₂O (10 mL) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre MgSO₄ anhidro, luego se filtraron y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando *n*-Hex:AcOEt.

IV.3.10.1 Preparación de lup-20(29)-en-3E-oxima (40)

Una solución de **30** (40,0 mg, 0,09 mmol) en EtOH se trató con 3 equivalentes de NH₂OH.HCl (18,8 mg, 0,27 mmol) y una solución de NaOAc (11,6 mg, 0,18 mmol) de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 12,9 mg de **40** (R = 31,1%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (95:5).

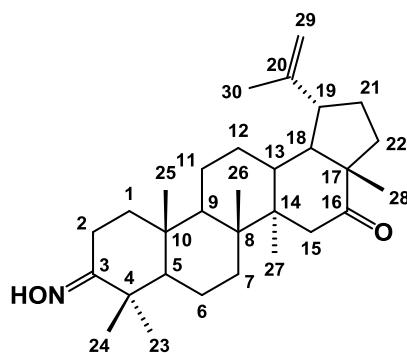


¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 4,69 (1H, *br s*, H-29a), 4,57 (1H, *br s*, H-29b), 3,01-2,91 (1H, *m*, H-2b), 2,47-2,19 (3H, *m*, H-2a, H-6b, H-19), 1,66 (3H, *s*, H-30), 1,63-1,26 (21 H, *m*), 1,14 (3H, *s*, H-23), 1,06 (3H, *s*, H-24), 1,04 (3H, *s*, H-25), 0,93 (6H, *s*, H-26, H-27), 0,79 (3H, *s*, H-28). NOH [8,26 (1H, *s*)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 167,4 (C-3), 151,0 (C-20), 109,5 (C-29), 55,6 (C-5), 50,2 (C-9), 48,4 (C-18), 48,1 (C-19), 43,1 (C-17), 43,1 (C-14), 41,0 (C-8), 40,4 (C-22), 38,9 (C-1, C-4), 38,3 (C-13), 37,4 (C-10), 35,7 (C-16), 34,5 (C-7), 30,0 (C-21), 27,6 (C-23), 27,6 (C-2, C-15), 25,3 (C-12), 23,0 (C-24), 21,7 (C-11), 19,8 (C-30), 18,2 (C-6, C-28), 16,1 (C-26), 16,1 (C-25), 14,6 (C-27).

IV.3.10.2 Preparación de 3E-hidroxiimino-oxolup-20(29)-en-16-ona (41)

Una solución de **33** (30,0 mg, 0,07 mmol) en EtOH se trató con 6 equivalentes de NH₂OH.HCl (28,3 mg, 0,42 mmol) y una solución de NaOAc (18,0 mg, 0,28 mmol), manteniendo la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 36 horas. El tratamiento de la mezcla de reacción se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 10,8 mg de **41** (R = 25,0%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (87:13); pf: 159-160 °C.



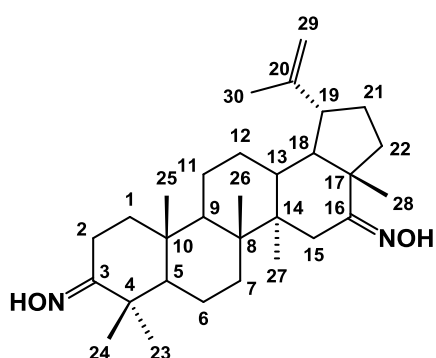
¹H-RMN (δ , 400 MHz, CDCl₃): 4,74 (1H, *br s*, H-29a), 4,63 (1H, *br s*, H-29b), 2,95 (1H, *dt*, $J = 15,3, 4,7$ Hz, H-2b), 2,71 (1H, *d*, $J = 13,6$ Hz, H-15a), 2,61 (1H, *ddd*, $J = 10,6, 10,6, 6,1$ Hz, H-19), 2,73-2,58 (1H, *m*, H-15a), 2,31-2,22 (1H, *m*, H-13), 2,13 (1H, *ddd*, $J = 12,0, 11,6, 3,5$, H-6b), 1,97-1,70 (6H, *m*), 1,66 (3H, *s*, H-30), 1,55-1,26 (11H, *m*), 1,14 (6H, *s*, H-23, H-26), 1,10 (3H, *s*, H-28), 1,04 (3H, *s*, H-24), 0,94 (3H, *s*, H-25), 0,88 (3H, *s*, H-27).

¹³C-RMN (δ , 100 MHz, CDCl₃): 216,0 (C-16), 167,0 (C-3), 148,8 (C-20), 110,8 (C-29), 56,6 (C-17), 55,4 (C-5), 49,7 (C-18), 49,5 (C-9), 48,2 (C-14), 47,5 (C-19), 45,0 (C-15), 41,2 (C-8), 40,4 (C-4), 38,8 (C-1), 37,7 (C-13), 37,3 (C-10), 33,9 (C-7), 31,2 (C-22), 28,7 (C-21), 27,5 (C-23), 24,8 (C-12), 23,1 (C-24), 21,1 (C-11), 19,1 (C-2), 19,1 (C-30), 18,2 (C-28), 17,2 (C-6), 16,5 (C-26), 15,8 (C-25), 15,4 (C-27).

EIMS m/z (%): 453 [M]⁺ (2), 438 (79), 437 (100), 435 (24), 247 (57), 108 (93); **HR-EIMS m/z :** 444,3557 (calculado para C₃₀H₄₇NO₂ [M]⁺ 444,3567).

IV.3.10.3 Preparación de lup-20(29)-en-3E,16E-dioxima (42)

Una solución de **33** (45,0 mg, 0,10 mmol) en EtOH se trató con 6 equivalentes de NH₂OH.HCl (39,8 mg, 0,60 mmol) y una solución de NaOAc (33,8 mg, 0,40 mmol), calentando a reflujo durante 18 horas. El tratamiento de la mezcla de reacción se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 16,8 mg de **42** (R = 35,0%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (85:15); pf: 179-180 °C.

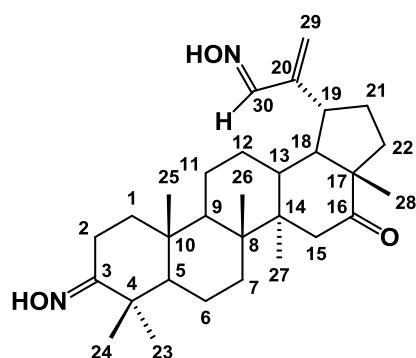


¹H-RMN (δ , 300 MHz, CDCl₃): 4,72 (1H, *br s*, H-29a), 4,61 (1H, *br s*, H-29b), 2,90 (1H, *d*, $J = 13,4$ Hz, H-15a), 2,52 (1H, *ddd*, $J = 10,9, 10,9, 5,6$ Hz, H-19), 2,14-1,88 (4H, *m*), 1,84-1,74 (3H, *m*), 1,65 (3H, *s*, H-30), 1,62-1,33 (12H, *m*), 1,27 (2H, *d*, $J = 11,0$ Hz), 1,12 (6H, *s*, H-23, H-26), 1,03 (3H, *s*, H-24), 1,01 (3H, *s*, H-28), 0,99 (3H, *s*, H-25), 0,89 (3H, *s*, H-27), NOH [9,68 (1H, *s*), 9,58 (1H, *s*)].

¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 167,2 (C-3), 165,2 (C-16), 149,6 (C-20), 110,5 (C-29), 56,7 (C-5), 50,1 (C-18), 50,0 (C-9), 48,8 (C-17), 47,4 (C-19), 46,1 (C-14), 41,1 (C-8), 41,1 (C-4), 39,7 (C-1), 37,9 (C-13), 37,5 (C-10), 34,5 (C-7), 33,3 (C-22), 29,6 (C-21), 27,4 (C-15), 26,4 (C-23), 24,8 (C-12), 22,6 (C-24), 20,9 (C-11), 19,2 (C-30), 18,9 (C-2), 18,9 (C-28), 17,2 (C-6), 16,6 (C-26), 15,8 (C-25), 15,1 (C-27).

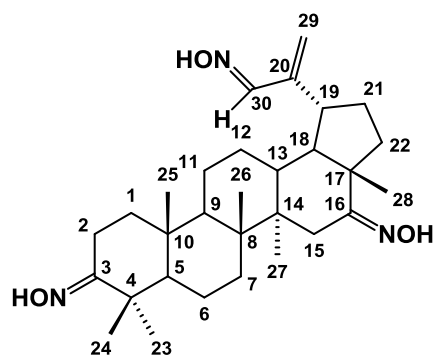
IV.3.10.4 Preparación de lup-20(29)-en-3E,16E,30-trioxima (44)

Una solución de **36** (20,0 mg, 0,04 mmol) en EtOH se trató con 9 equivalentes de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y una solución de NaOAc (7,5 mg, 0,08 mmol), calentando a reflujo durante 30 horas. El tratamiento de la mezcla de reacción se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento general obteniéndose 5,0 mg de **43** (3E,30-dihidroxiimino-lup-20(29)-en-16-ona) (R = 23,0%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (80:20) y 6,7 mg de **44** (R = 31,0%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (75:25); pf **43**: 187-189°C y pf **44**: 201-202°C.



$^1\text{H-RMN}$ (43) (δ , 400 MHz, CDCl_3): 7,73 (1H, s, H-30), 5,39 (1H, *br s*, H-29a), 5,22 (1H, *br s*, H-29b), 2,97-2,91 (2H, m, H-6a, H-19), 2,73 (1H, d, $J = 13,5$ Hz, H-15a), 2,30-2,21 (1H, m, H-13), 2,13 (3H, *br s*), 1,52-1,40 (7H, m), 1,35-1,22 (8H, m), 1,13 (6H, s, H-23, H-26), 1,12 (3H, s, H-24), 1,04 (3H, s, H-28), 0,93 (3H, s, H-25), 0,88 (3H, s, H-27).

$^{13}\text{C-RMN}$ (43) (δ , 75 MHz, CDCl_3): 216,0 (C-16), 167,3 (C-3), 152,8 (C-30), 151,0 (C-20), 120,4 (C-29), 56,8 (C-17), 55,4 (C-5), 49,5 (C-18), 47,9 (C-14), 45,0 (C-15), 41,1 (C-8), 40,3 (C-4), 38,8 (C-1), 37,5 (C-13), 37,3 (C-10), 33,9 (C-7), 31,1 (C-22), 29,8 (C-12), 27,5 (C-23), 26,5 (C-21), 23,1 (C-24), 21,1 (C-11), 19,1 (C-2), 18,0 (C-28), 17,1 (C-6), 16,5 (C-26), 15,8 (C-25), 15,4 (C-27).



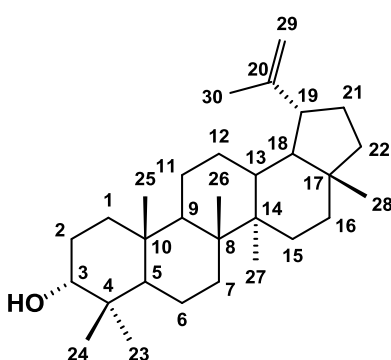
$^1\text{H-RMN}$ (44) (δ , 300 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): 7,71(1H, s, H-30), 5,38 (1H, *br s*, H-29a), 5,20 (1H, *br s*, H-29b), 3,03-2,87 (3H, m, H-6a, H-15a, H-19), 2,38-1,77 (8H, m), 1,68-1-43 (9H, m), 1,33 (3H, s), 1,20 (3H, s, H-26), 1,17 (3H, s, H-23), 1,08 (3H, s, H-24), 1,06 (3H, s, H-28), 0,99 (3H, s, H-25), 0,92 (3H, s, H-27).

$^{13}\text{C-RMN}$ (44) (δ , 75 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): 167,2 (C-3), 166,4 (C-16), 152,8 (C-30), 150,7 (C-20), 120,4 (C-29), 56,6 (C-5), 51,1 (C-18), 49,8 (C-9), 49,6 (C-19), 46,5 (C-8, C-17), 42,1 (C-14), 41,0 (C-4), 39,7 (C-1), 39,2 (C-13), 38,2 (C-10), 35,1 (C-7), 34,2 (C-22), 30,7 (C-12), 28,2 (C-15, C-23), 27,7 (C-21), 23,5 (C-24), 22,2 (C-2), 20,2 (C-11), 19,3 (C-28), 17,9 (C-6), 16,8 (C-26), 16,2 (C-25), 15,3 (C-27).

EIMS m/z (%): 497 $[\text{M}]^+$ (47), 482 (11), 480 (100), 462 (24); **HR-EIMS m/z :** 497,3618 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$ 497,3617).

IV.3.11 Preparación de lup-20(29)-en-3 α -ol (*epilupeol*) (**45**)

Una solución de **30** (50,0 mg, 0,12 mmol) en MeOH anhidro (20 mL) fue tratada con NaBH₄ (50 mg). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 horas, hasta la desaparición del producto de partida observado por cromatografía en capa fina. Al cabo de ese tiempo, la reacción se detuvo mediante el agregado de H₂O destilada (20 mL) y de CH₂Cl₂ (20 mL) observándose la formación de un sólido blanco. La mezcla se filtró, y la fase orgánica fue secada sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se secó el solvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando como eluyente *n*-Hex:AcOEt. Se obtuvieron 2,3 mg de **45** (R = 4,6%) eluidos con *n*-Hex:AcOEt (95:45) y 27,0 mg de **1** (R = 53,8%), eluidos con la misma polaridad de solventes.



¹H-RMN (δ , 400 MHz, CDCl₃): 4,69 (1H, *br s*, H-29a), 4,56 (1H, *br s*, H-29b), 3,40 (1H, *br s*, H-3), 2,38 (1H, *ddd*, $J = 11,2, 11,0, 5,7$ Hz, H-19), 1,63-1,25 (27H, *m*), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,96 (3H, *s*, H-23), 0,94 (3H, *s*, H-27), 0,85 (3H, *s*, H-25), 0,83 (3H, *s*, H-28), 0,79 (3H, *s*, H-24).

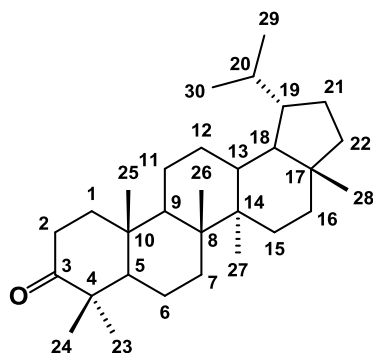
¹³C-RMN (δ , 75 MHz, CDCl₃): 151,2 (C-20), 109,5 (C-29), 76,4 (C-3), 50,4 (C-9), 48,5 (C-5), 48,2 (C-18), 48,2 (C-19), 43,2 (C-17), 43,1 (C-14), 41,2 (C-8), 40,2 (C-22), 38,2 (C-13), 37,7 (C-4), 37,3 (C-10), 35,8 (C-16), 34,3 (C-7), 31,7 (C-1), 30,0 (C-21), 28,4 (C-23), 27,6 (C-15), 25,4 (C-2), 25,3 (C-12), 22,3 (C-24), 21,0 (C-11), 19,4 (C-30), 18,4 (C-6), 18,2 (C-28), 16,3 (C-25), 16,1 (C-26), 14,8 (C-27).

IV.3.12 Procedimiento general de reacciones de hidrogenación catalítica

Una solución de **30** (60,0 mg, 0,14 mmol) en 2-propanol fue hidrogenada a 10 atmósferas de presión de H₂ y a 100 °C, usando 0,7 mmol de sustrato/g de catalizador, en un reactor tipo autoclave, durante 14 horas. Al cabo de ese tiempo, la mezcla de reacción se filtró para separar el catalizador y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando *n*-Hex:AcOEt.

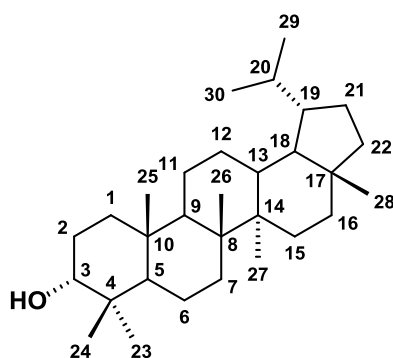
IV.3.12.1 Preparación de 20,29-dihidrolupan-3-ona (**46**), 20,29-dihidrolupan-3 α -ol (**47**) y 20,29-dihidrolupan-3 β -ol (**48**)

La hidrogenación de **30** se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento general utilizando el catalizador Pt/SiO₂, obteniéndose 11 mg de **46** (R = 35,6%), 5 mg de **47** (R = 16,6%) y 12 mg de **48** (20,29-dihidrolupan-3 β -ol) (R = 40,0%).



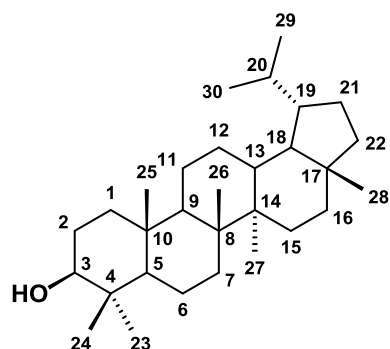
¹H-RMN (46) (δ , 400 MHz, CDCl₃): 2,41 (1H, m, H-19), 1,63-1,25 (27H, m), 1,04 (3H, s, H-26), 0,94 (6H, s, H-23, H-27), 0,87 (3H, s, H-28), 0,85 (3H, s, H-25), 0,84 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, H-29), 0,76 (3H, d, $J = 5,1$ Hz, H-30), 0,75 (3H, s, H-24).

¹³C-RMN (46) (δ , 75 MHz, CDCl₃): 218,3 (C-3), 55,1 (C-5), 49,6 (C-9), 47,7 (C-18), 47,5 (C-4), 44,8 (C-19), 43,3 (C-17), 43,3 (C-14), 41,0 (C-8), 40,5 (C-22), 39,7 (C-1), 38,1 (C-13), 37,0 (C-10), 35,6 (C-16), 34,3 (C-2), 33,8 (C-7), 29,5 (C-20), 27,5 (C-15), 27,0 (C-12), 26,8 (C-23), 23,1 (C-30), 22,1 (C-21), 21,6 (C-11), 21,2 (C-24), 19,8 (C-6), 18,2 (C-28), 16,1 (C-26), 16,0 (C-25), 15,3 (C-29), 14,5 (C-27).



¹H-RMN (47) (δ , 400 MHz, CDCl₃): 3,39 (1H, *br s*, H-3), 1,63-1,25 (28H, m), 1,04 (3H, s, H-26), 0,94 (6H, s, H-23, H-27), 0,85 (3H, s, H-25), 0,84 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, H-29), 0,83 (3H, s, H-28), 0,76 (3H, d, $J = 5,1$ Hz, H-30), 0,75 (3H, s, H-24).

¹³C-RMN (47) (δ , 75 MHz, CDCl₃): 77,4 (C-3), 50,1 (C-9), 49,2 (C-5), 47,8 (C-18), 44,9 (C-19), 43,3 (C-14, C-17), 41,3 (C-8), 40,6 (C-22), 38,0 (C-13), 37,7 (C-4), 37,5 (C-10), 35,7 (C-16), 34,5 (C-7), 33,4 (C-1), 29,5 (C-20), 28,3 (C-23), 27,5 (C-15), 27,0 (C-21), 25,6 (C-2), 23,1 (C-29), 22,3 (C-24), 22,1 (C-12), 21,0 (C-11), 18,5 (C-6), 18,2 (C-28), 16,2 (C-25), 16,0 (C-26), 15,3 (C-30), 14,7 (C-27).

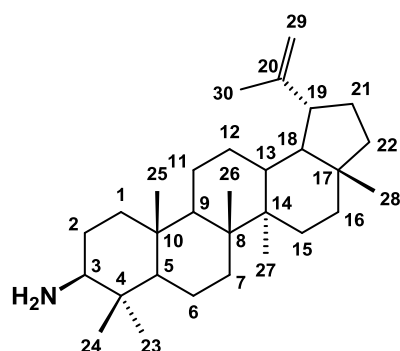


$^1\text{H-RMN}$ (48) (δ , 400 MHz, CDCl_3): 3,19 (1H, *br s*, H-3), 1,63-1,25 (28H, *m*), 1,04 (3H, *s*, H-26), 0,94 (6H, *s*, H-23, H-27), 0,85 (3H, *s*, H-25), 0,84 (3H, *d*, $J = 7,1$ Hz, H-29), 0,77 (3H, *s*, H-28), 0,76 (3H, *d*, $J = 5,1$ Hz, H-30), 0,75 (3H, *s*, H-24).

$^{13}\text{C-RMN}$ (48) (δ , 75 MHz, CDCl_3): 79,2 (C-3), 55,4 (C-5), 50,3 (C-9), 47,8 (C-18), 44,9 (C-19), 43,3 (C-43,3), 43,2 (C-14), 41,0 (C-8), 40,6 (C-22), 39,0 (C-1), 38,9 (C-4), 38,0 (C-13), 37,3 (C-10), 35,7 (C-16), 34,5 (C-7), 29,5 (C-20), 28,1 (C-23), 27,6 (C-2, C-15), 27,0 (C-12), 23,1 (C-30), 22,1 (C-21), 21,1 (C-11), 18,5 (C-6), 18,2 (C-28), 16,2 (C-26), 16,1 (C-26), 15,5 (C-24), 15,3 (C-29), 14,6 (C-27).

IV.3.13 Preparación de lup-20(29)-en-3 β -amino (50)

Una solución de **40** (18,0 mg, 0,04 mmol) en THF anhidro (5 mL) fue agregada a una solución de LiAlH_4 en THF (0,40 mmol, 5 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 7 horas. Al cabo de ese tiempo, al crudo de reacción se le agregó una solución saturada de cloruro de amonio y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 \times 15 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron sobre CaCl_2 anhidro, se filtraron, y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica flash usando CH_2Cl_2 :MeOH. Se obtuvieron 4,3 mg de **50** ($R = 24,7\%$) eluidos con CH_2Cl_2 :MeOH (80:20).



$^1\text{H-RMN}$ (δ , 400 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): 4,72 (1H, *br s*, H-29a), 4,60 (1H, *br s*, H-29b), 2,90 (1H, *dd*, $J = 10,7, 4,9$ Hz, H-3), 2,44 (1H, *ddd*, $J = 11,0, 11,0, 5,5$ Hz, H-19), 1,72 (3H, *s*, H-30), 1,63-1,25 (25H, *m*), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,98 (3H, *s*, H-23), 0,95 (3H, *s*, H-27), 0,83 (3H, *s*, H-25), 0,79 (3H, *s*, H-28), 0,76 (3H, *s*, H-24).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ 75 MHz, $\text{MeOD-}d_4$): 151,9 (C-20), 110,1 (C-29), 61,4 (C-3), 56,8 (C-5), 51,7 (C-9), 50,1 (C-18), 49,4 (C-19), 43,5 (C-17), 43,3 (C-14), 41,0 (C-8), 40,6 (C-22), 39,5 (C-1), 39,4 (C-4), 38,2 (C-13), 37,6 (C-10), 35,5 (C-16), 35,3 (C-7), 30,9 (C-2), 28,6 (C-21), 28,2 (C-15, C-23), 24,6 (C-12), 21,8 (C-11), 19,3 (C-30), 18,4 (C-6), 18,1 (C-28), 16,5 (C-25), 16,2 (C-26), 15,1 (C-24), 15,0 (C-27).

IV.4 Actividades biológicas

IV.4.1 Ensayo de inhibición *in vitro* de colinesterasas

Para la detección de iACE y la cuantificación de la actividad antiACE se utiliza el método de Ellman. Este método se basa en utilizar acetiltiocolina como sustrato de la enzima ACE en lugar del sustrato natural AC. La cantidad de tiocolina liberada cuando la acetiltiocolina es hidrolizada por ACE, es cuantificada colorimétricamente mediante su reacción con el ácido 5,5'-bisdinitrobenzoico (DTNB). El producto de esta reacción es un anión de color amarillo que presenta una longitud de onda de absorción máxima a 405 nm (Figura 77).

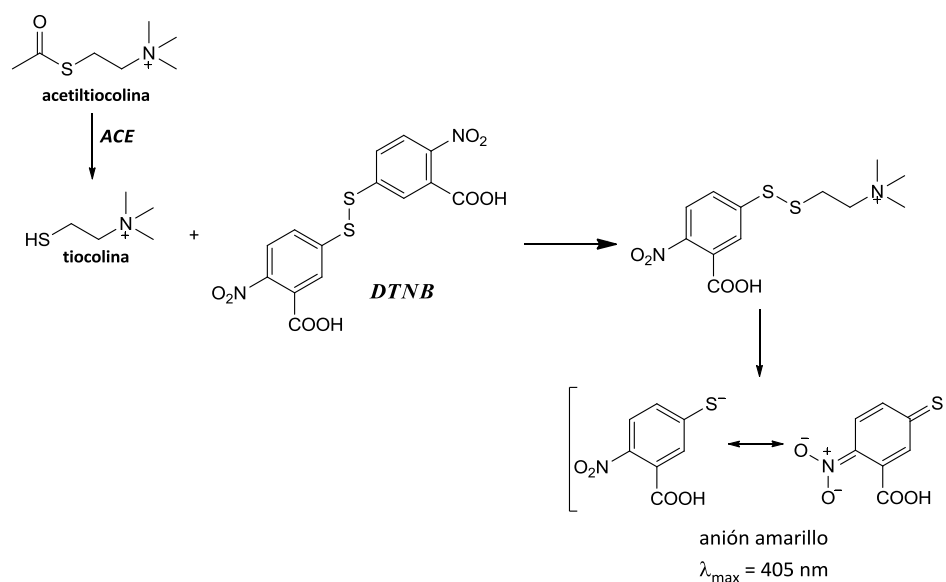


Figura 77. Método de Ellman para iACE.

Cuanto mayor sea la cantidad de sustrato hidrolizado por ACE, mayor será la absorbancia de la muestra. En ausencia de un inhibidor, la curva de absorbancia vs tiempo tiene pendiente positiva y permite medir la velocidad inicial de la enzima. En cambio, en presencia de un inhibidor la pendiente de la curva disminuye, ya que la actividad enzimática es menor, siendo cero para el 100% de inhibición.

Este método ha sido adaptado para medir la actividad de la enzima BuCE, modificando el sustrato empleado. En lugar de acetiltiocolina, se utiliza para el ensayo butiriltiocolina, manteniendo iguales los mismos parámetros.

Para el ensayo se utilizaron la enzima acetilcolinesterasa (ACE) de anguila eléctrica *Torpedo californica* (500 U, Sigma) y la enzima butirilcolinesterasa (BuCE) de suero equino (300 U, MP Biomedicals). La actividad inhibitoria de ACE y BuCE fue determinada *in vitro* mediante el método de Ellman. Cada enzima liofilizada fue disuelta en buffer A (8 mM K_2HPO_4 ; 2,3 mM NaH_2PO_4) para obtener una solución stock de 5/3 U/ml. Una dilución posterior de las soluciones se realizó con buffer B (8 mM K_2HPO_4 ; 2,3 mM NaH_2PO_4 ; 0,15 M NaCl; 0,05 Tween 20; pH 7,6), para así alcanzar una concentración de 0,126/0,06 U/ml. Las muestras se disolvieron en buffer fosfato B con 2,5 % de MeOH como cosolvente cuando fue necesario. La solución de la enzima (300 μ l) y de la muestra (300 μ l) fueron mezcladas en un tubo de ensayo y se incubaron por 60/120 min a temperatura ambiente. Con el agregado de la solución de sustrato (600 μ l; 0,5 mM DTNB; 0,6 mM ATCI/BTCI; 0,1 M Na_2HPO_4 ; pH 7,5) se inició la reacción. La absorbancia se midió a 405 nm por 180 s a 27°C.

La actividad enzimática fue calculada por comparación de las velocidades de reacción entre la muestra y el blanco. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. La concentración de muestra que determina el 50 % de inhibición (IC_{50}) fue calculada por regresión no lineal de la curva respuesta vs log (concentración) con GraphPad Prism 5. Tacrina se empleó como inhibidor de colinesterasa de referencia. DTNB, ATCI, BTCI y tacrina se adquirieron de Sigma.

IV.4.2 Caracterización cinética de la inhibición de las colinesterasas

El estudio cinético para la inhibición de ACE se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de incubación descriptas anteriormente, usando nueve concentraciones de sustrato (desde 0,015 mM a 0,6 mM) en ausencia o en presencia de dos concentraciones (49 y 125 μ M) del inhibidor (compuesto **14**). La constante de inhibición aparente y los parámetros cinéticos fueron calculados mediante el módulo de “*Enzyme kinetics*” de GraphPad Prism. El tipo de inhibición se determinó mediante la gráfica doble recíproca de *Lineweaver – Burk*, así como también evaluando el modelo que mejor se ajustaba a los datos obtenidos empleando el mismo programa. Del mismo modo, se llevó a cabo el estudio cinético para la inhibición de la BuCE con los derivados **35** y **36**.

IV.4.3 Determinación de modelado molecular

La enzima utilizada en las simulaciones fue la estructura cristalográfica de la ACE de *Torpedo californica* complejada con la acetilcolina disponible en el Protein Data Bank (PDB). La optimización de la geometría del compuesto **14** se realizó con cálculos semiempíricos (AM1) y luego utilizando el método

ab initio de Hartree-Fock utilizando la base de 6-31+G(d) ambos incorporados en el programa Gaussian 03 (Frisch 2004). Las cargas del derivado disulfatado se realizaron mediante el cálculo cargas RESP.

Los cálculos computacionales de *docking* se llevaron a cabo utilizando el programa AutoDock 4.2. Se utilizó el programa AutoDock Tools para preparar, iniciar y analizar los resultados de *docking*.

El espacio de simulación fue determinado por una caja de dimensiones 26,25 Å x 24 Å x 34,5 Å que incluye el sitio activo y el sitio periférico de la ACE. Para disminuir el tiempo de cálculo en el AutoDock, el programa auxiliar AutoGrid 4 es el encargado de hacer un pre-cálculo de energía dentro del espacio de simulación. Este programa mide la energía de interacción entre una sonda y la macromolécula en puntos equidistantes espaciados por 0,375 Å, lo que determina una grilla tridimensional. Las sondas utilizadas varían según los diferentes tipos de átomos presentes en los ligandos. Por lo tanto, se generan tantas grillas como tipos atómicos presentes en el ligando. Finalmente estos mapas de interacción son los que utilizará AutoDock para determinar la energía total de interacción entre la enzima y el ligando durante la evaluación de *docking*.

En cada evaluación de *docking*, la posición inicial del triterpeno fue al azar. Se realizaron un total de 256 evaluaciones de *docking*, las cuales generaron 256 conformeros utilizando el algoritmo genético lamarkiano como algoritmo de búsqueda. Los parámetros utilizados en el algoritmo fueron los establecidos por default en el programa AutoDock 4.2 (posición y conformación inicial al azar, translaciones de 2,0 Å, velocidad de mutación de 0,02, velocidad de entrecruzamiento de 0,8, velocidad de búsqueda local de 0,6 y 2,500,000 evaluaciones de energía). Luego del *docking*, los 256 conformeros generados fueron asignados a grupos de acuerdo a la desviación de la raíz cuadrática media de los residuos (RMSD) respecto del conformero más estable dentro del *cluster*. El orden obtenido para los diferentes *clusters* se determinó de acuerdo a la energía del conformero más estable dentro de cada grupo.

Para el *docking* realizado con la ACE de los derivados **35** y **36** se utilizó ACE de la *Torpedo californica* libre y para el *docking* realizado con la BuCE, la enzima BuCE humana, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

IV.4.4 Actividad citotóxica

Para los ensayos de actividad biológica, se utilizaron dos líneas celulares transformadas con distinta sensibilidad a andrógenos:

PC-3: línea celular establecida a partir de metástasis de médula ósea, proveniente de adenocarcinoma de próstata humano. No expresa receptor de andrógenos. Esta línea se utilizó como modelo del fenotipo andrógeno independiente.

LNCaP: línea celular proveniente de adenocarcinoma de próstata humano, respondedor a andrógenos, de un paciente con diagnóstico confirmado de metástasis de próstata. Expresa receptor de andrógenos. Esta línea se utilizó como modelo de fenotipo andrógeno dependiente.

Ambas líneas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las células crecieron en forma de monocapa hasta confluencia, cultivadas en medio RPMI-1640 con un suplemento de 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina y 25 mM de buffer HEPES (EMEVE Medios, Lab MicroVet SRL, CABA, Argentina) a 37 °C en una incubadora con 5% CO₂.

IV.4.5 Citotoxicidad sobre células tumorales

Se determinó la citotoxicidad de las células utilizando un ensayo de MTS para células vivientes. Se sembraron, 1×10^4 células LNCaP ó 7×10^3 células PC-3 en 100 µL en medio de cultivo celular, en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Luego de 24 horas de incubación, el medio fue removido y las células se trataron con distintas concentraciones de los triterpenos (por triplicado) diluidos en medio RPMI-1640 sin SFB. Se utilizaron pocillos con medio sin suero como control negativo. Las células con los distintos tratamientos se incubaron durante 24 horas, en estufa a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂.

Al cabo de ese tiempo, la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo colorimétrico del MTS utilizando el kit Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Rápidamente, se agregaron 20 µl de reactivo MTS a cada pocillo, y las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C.

Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de microplatos (Devices). Los datos fueron procesados con el programa GraphPad Prism 5, de manera de obtener gráficos de absorbancia vs concentración, relativizando los resultados al control (tomándolo como 100% de células vivas). Luego, se calculó el IC₅₀ (dosis del compuesto para reducir el número de células viables en un 50%).

***Referencias
Bibliográficas***

- [1] Lazo JS, Brady LS, Dingleline R. Building a pharmacological lexicon: small molecule discovery in academia. *Mol Pharmacol* **2007**; 72: 1-7.
- [2] Reymond JL, Van Deursen R, Blum LC, Ruddigkeit L. Chemical space as a source for new drugs. *Med Chem Commun* **2010**; 1: 30-38.
- [3] Bauer RA, Wurst JM, Tan DS. Expanding the range of 'druggable' targets with natural product based libraries: an academic perspective. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, 14 (3): 308-314.
- [4] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **1997**; 23: 3-25.
- [5] Ganesan A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **2008**; 12: 306-317.
- [6] Lahlou, M. Screening of natural products for drug discovery. *Expet Opin on Drug Discov* **2007**; 2 (5): 697-705.
- [7] Patwardhan B, Vaidya ADB, Chorghade M. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science* **2004**; 86 (6): 789-799.
- [8] Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl Chem* **2005**; 77: 7-24.
- [9] Kapoor LD. **1990**. Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants. Boca Raton, FL: CRS Press.
- [10] Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J Nat Prod* **2011**; 74: 1539-1555.
- [11] Lahlou, M. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol Pharm* **2013**; 4: 17-31.
- [12] Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* **2004**; 67: 2141-2153.
- [13] Der Marderosian A, Beutler JA *The review of natural products, Facts and Comparisons* **2002**; 13-43.
- [14] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* **2013**; 1830: 3670-3695.
- [15] Colegate SM, Molyneux RJ. **2008**. Bioactive natural products: detection, isolation and structure determination. CRC Press: Boca Raton, 421-437.
- [16] Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2012**, 2: 303-336.
- [17] Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2005**; 4: 206-220.
- [18] Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* **2005**; 78: 431-441.
- [19] Borel JF. **1986**. Immunological properties of cyclosporin (Sandimmune). En: Advances in Immunopharmacology, Vol. 3, Pergamon Press, 239 pp.
- [20] Dreyfuss M, Harris E, Hofman H, Hobel H, Pache W, Tschertter H. Cyclosporin A and C, new metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex. Pers.) Rifai. *Eur J Appl Microbiol* **1976**; 3: 125.
- [21] Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *Am J Cardiol* **2008**; 101: 43D-49D.

- [22] Bol D, Ebner R. Gene expression profiling in the discovery, optimization and development of novel drugs: one universal screening platform. *Pharmacogenomics* **2006**; 7: 227-235.
- [23] Gryniewicz G, Achmatowicz O, Pucko W. Bioactive isoflavone - genistein; synthesis and prospective applications *Herba Pol.* **2000**; 46: 151-160.
- [24] Molokanova E, Savchenko A, Kramer RH Interactions of cyclic nucleotide-gated channel subunits and protein tyrosine kinase probed with genistein. *J Gen Physiol* **2000**; 115: 685-696.
- [25] Molokanova E, Kramer RH. Mechanism of inhibition of cyclic nucleotide-gated channel by protein tyrosine kinase probed with genistein. *J Gen Physiol* **2001**; 117: 219-234.
- [26] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **2012**; 75: 311-335.
- [27] Lee ML, Schneider G. Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *J Comb Chem* **2001**; 3: 284-289.
- [28] Ganesan A. Natural products as a hunting ground for combinatorial chemistry. *Curr Opin Biotechnol* **2004**; 15: 584-590.
- [29] Ortholand JY, Ganesan A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future *Curr Opin Chem Biol* **2004**; 8: 271-280.
- [30] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **2007**, 70: 461-477.
- [31] Kingston DGI. Recent advances in the chemistry of Taxol. *J Nat Prod* **2000**; 63: 726-734.
- [32] Nicolau KC, Guy RK. **1995**. The total synthesis of paclitaxel by assembly of the ring system. Taxane anticancer agents, basic science and current status. En: Georg GI, Chen TT, Ojima I, Vyas DM (eds) ACS Symposium Series 583 (Taxane Anticancer Agents, Basic Science and Current Status). American Chemical Society, Washington DC.
- [33] Ulukan H, Swaan PW. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential *Drugs* **2002**; 62: 2039-2057
- [34] Wall ME, Wani MC, Brown DM, Fullas F, Olwald JB, Josephson FF, Thornton NM, Pezzuto JM, Beecher CWW, Farnsworth NR, Cordell GA, Kinghorn AD. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomed* **1996**; 3: 281-285.
- [35] Applezweig N. **1962**. Steroid Drugs. McGraw Hill Book Company.
- [36] Mancera O, Zaffaroni A, Rubin BA, Sondheimer F, Rosenkranz G, Djerassi C. Steroids XXXVII. A ten step conversion of progesterone to cortisone. *J Am Chem Soc* **1952**; 74: 3711-3712.
- [37] Mancera O, Ringold HJ, Djerassi C, Rosenkranz G, Sondheimer F. Steroids XLIII. A ten step conversion of progesterone to cortisone. The differential reduction of pregnane-3,20-diones with sodium borohydride. *J Am Chem Soc* **1953**; 75: 1286-1290.
- [38] Ward P, Small I, Smith J, Suter P, Dutkowski R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 55: i5-i21.
- [39] Abrecht S, Harrington P, Iding H, Karpf M, Trussardi R, Wirz B, Zutter U. The synthetic development of the anti-influenza neuraminidase inhibitor oseltamivir phosphate (Tamiflu): A challenge for synthesis and process research. *Chimia* **2004**; 58: 621-629.

- [40] Ishikawa H, Suzuki T, Orita H, Uchimarui T, Hayashi Y. High-yielding synthesis of the anti-influenza neuraminidase inhibitor (–)-oseltamivir by two “one-pot” sequences. *Chem Eur J* **2010**; 16 (42): 12616-12626.
- [41] Reháč J, Huťka M, Latika A, Brath H, Almássy A, Hajzer V, Durmis J, Toma S, Sebesta R. Thiol-free synthesis of oseltamivir and its analogues via organocatalytic michael additions of oxycetaldehydes to 2-acylaminonitroalkenes. *Synthesis* **2012**; 44: 2424-2430.
- [42] Weng J, Li YB, Wang RB, Li FQ, Liu C, Chan ASC, Lu G. A practical and azide-free synthetic approach to oseltamivir from diethyl D-tartrate. *J Org Chem* **2010**; 75 (9): 3125-3128.
- [43] Lee KH, Xiao Z. **2005**. Podophyllotoxins and analogs. En: Anticancer agents from natural products, 71-88.
- [44] Rahier NJ, Thomas CJ, Hecht SM. **2005**. Camptothecin and its analogs. En: Anticancer agents from natural products, 5-21.
- [45] Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Pract Diab Int* **2004**; 21: 115-117.
- [46] Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents. *J Drugs* **2005**; 65: 385-411.
- [47] Sneader W. **1996**. Drug prototypes and their exploitation. Wiley, 362-366.
- [48] Ramos Barbosa WL, Soares do Nascimento M, do Nascimento Pinto L, Costa Maia FL, Sousa AJA, Silva Junior JOC, Monteiro MM, Ribeiro de Olivera D. **2012**. Selecting medicinal plants for development and use in primary health care. En: Rasooli I (Ed.) Bioactive compounds in Phytomedicine. InTech, pp 1-24.
- [49] Vela Gurovic MS. Metabolitos secundarios bioactivos aislados a partir de plantas de silvestres de la región de Bahía Blanca. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur **2009**.
- [50] Sporn MB, Liby KT, Yore MM, Fu L, Lopchuk JM, Gribble GW. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J Nat Prod* **2011**; 74: 537-545.
- [51] Braca A, Dal PF, Marzocco S, Autore G, Vassallo A, De TN. Triterpene derivatives as inhibitors of protein involved in the inflammatory process: molecules interfering with phospholipase A2, cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Curr Drug Targets* **2011**; 12: 302-321.
- [52] Barroso-González J, El Jaber-Vazdekis N, García-Expósito L, Machado JD, Zárate R, Ravelo AG, Estévez-Braun A, Valenzuela-Fernández A. The lupane-type triterpene 30-oxo-calenduladiol is a CCR5 antagonist with anti-HIV-1 and anti-chemotactic activities. *J Biol Chem* **2009**; 284 (24): 16609-16620.
- [53] Meng Z, Li N, Zhang L, Ding A. *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan* **2011**; 29: 1152-1154.
- [54] Cassels BK, Asencio M. Anti-HIV activity of natural triterpenoids and hemisynthetic derivatives 2004–2009. *Phytochem Rev* **2011**; 10: 545-564.
- [55] Csuk R, Szczepek R, Siewert B, Nitsche C. Cytotoxic betulin-derived hydroxypropargylamines trigger apoptosis. *Bioorg Med Chem* **2013**; 2: 425-435.
- [56] Ding W, Sun M, Luo S, Xu T, Cao Y, Yan X, Wang Y. A 3D QSAR study of betulinic acid derivatives as anti-tumor agents using topomer CoMFA: model building studies and experimental verification. *Molecules* **2013**; 18: 10228-10241.

- [57] Majeed R, Sangwan PL, Chinthakindi PK, Khan I, Dangroo NA, Thota N, Hamid A, Sharma PR, Saxena AK, Koul S. Synthesis of 3-O-propargylated betulinic acid and its 1,2,3-triazoles as potential apoptotic agents. *Eur J Med Chem* **2013**; 63: 782-792.
- [58] Rodrigues VG, Duarte LP, Silva GDF, Silva FC, Góes JV, Takahashi JA, Pimenta LPS. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. *Quim Nova* **2012**; 35 (7): 1375-1380.
- [59] Vela Gurovic MS, Castro MJ, Richmond V, Faraoni MB, Maier MS, Murray A P. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae). *Planta Med* **2010**; 76 (6), 607-610.
- [60] Schwarz S, Dias Lucas S, Sommerwerk S, Csuk R. Amino derivatives of glycyrrhetic acid as potential inhibitors of cholinesterases. *Bioorg Med Chem* **2014**; 22 (13): 3370-3378.
- [61] Xu R, Facio GC, Matsuda SP. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochem* **2004**; 65: 261-291.
- [62] Hill RA, Connolly JD. Triterpenoids. *Nat Prod Rep* **2013**; 30: 1028-1065.
- [63] Dewick PM. **2009**. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach, 3rd edition. Wiley, 550 pp.
- [64] Hasmeda M, Kweifio-Okai G, Polya GM. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med* **1999**; 65 (1): 14-28.
- [65] Vidya L, Lenin M, Varalakshmi P. Evaluation of the effect of triterpenes on urinary risk factors of stone formation in pyridoxine deficient hyperoxaluric rats. *Phytother Res* **2002**; 16: 514-518.
- [66] Geetha T, Varalakshmi P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia* **1998**; 69 (1): 13-19.
- [67] Bhandari P, Patel NK, Bhutani KK. Synthesis of new heterocyclic lupeol derivatives as nitric oxide and pro-inflammatory cytokine inhibitors. *Bioorg Med Chem L* **2014**; 24; 3596-3599.
- [68] Saleem M, Kaur S, Kweon MH, Adhmi VM, Afaq F, Mukhtar H. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. *Carcinog* **2005**; 26: 1956-1964.
- [69] Liu Y, Bi T, Shen G, Li Z, Wu G, Wang Z, Qian L, Gao Q. Lupeol induces apoptosis and inhibits invasion in gallbladder carcinoma GBC-SD cells by suppression of EGFR/MMP-9 signaling pathway. *Cytotechnology* **2014**.
- [70] Khan MF, Mishra DP, Ramakrishna E, Rawat AK, Mishra A, Srivastava AK, Maurya R. Design and synthesis of lupeol analogues and their in vitro PTP-1B inhibitory activity. *Med Chem Res* **2014**; 23: 4156-4166.
- [71] Krasutsky P, Carlson R M. Preparation of triterpene derivatives having fungicidal activity against yeast. *PCT Int Appl WO 2002026761*, **2002**, [CA 2002, 136, 294955].
- [72] Hiroya K, Takahashi T, Miura N, Naganuma A, Sakamoto T. Synthesis of betulin derivatives and their protective effects against the cytotoxicity of cadmium. *Bioorg Med Chem* **2002**; 10: 3229-3236.
- [73] Krasutsky PA. Birch bark research and development. *Nat Prod Rep* **2006**; 23 (6): 919-942.
- [74] Urban M, Sarek J, Klinot J, Korinkova G, Hajduch M. Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. *J Nat Prod* **2004**; 67: 1100-1107.

- [75] Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell A C, Beecher WW, Fong HH, Kinghorn D, Brown DM, Wani MC, Wall ME, Hieken TJ, Das Gupta TK, Pezzuto JM. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* **1995**; 1 (10): 1046-1051.
- [76] Zuco V, Supino R, Righetti RC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett* **2002**; 175 (1): 17-25.
- [77] Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, Bashford CL. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med T* **2000**; 6: 15-19.
- [78] Cano-Flores A. Biotransformation of triterpene with different microorganisms. *Rev Mex Cienc Farm* **2013**; 44 (2): 7-16.
- [79] Bagalkotkar G, Chuan TS, Khalivulla SI, Hamzah AS, Shaari K, Lajis NH, Saad MS, Stanslas J. Isolation and cytotoxicity of triterpenes from the roots of *Phyllanthus pulcher* Wall. ex Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Pharm Pharmacol* **2011**; 5 (2): 183-188.
- [80] Novotny, L.; Vachalkova, A.; Biggs, D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. *Neoplasm* **2001**; 48: 241-246.
- [81] Pedersen IM, Kitada S, Schimmer A, Kim Y, Zapata JM, Charboneau L, Rassenti L., Andreeff M, Bennett F, Sporn MB, Liotta LD, Kipps TJ, Reed JC. The triterpenoid CDDO induces apoptosis in refractory CLL B cells. *Blood* **2002**; 100: 2965-2972.
- [82] Kim KB, Lotan R, Yue P, Sporn MB, Suh N, Gribble GW, Honda T, Wu GS, Hong WK, Sun SY. Identification of a novel synthetic triterpenoid, methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate, that potently induces caspase-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2002**; 3: 177-184.
- [83] Konrath EL, dos Santos Passos C, Klein-Junior LC, Henriques AT. Alkaloids as source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol* **2013**; 65: 1701-1725.
- [84] Viayna E, Sabate R, Muñoz-Torrero D. Dual inhibitors of β -amyloid aggregation and acetylcholinesterase as multi-target anti-Alzheimer drug candidates. *Curr Top Med Chem* **2013**; 13: 1820-1842.
- [85] Tayeb HO, Yang HD, Price BH, Tarazi FI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Ther* **2012**; 134: 8-25.
- [86] 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.
- [87] Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem* **2013**; 70: 165-188.
- [88] Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* **2006**; 23: 181-199.
- [89] Carmo Carreiras M, Mendes E, Jesus Perry M, Francisco AP, Marco-Contelles J. The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics. *Curr Top Med Chem* **2013**; 13: 1745-1770.

- [90] Nakao Y, Fusetani N. Enzyme inhibitors from marine invertebrates. *J Nat Prod* **2007**; 70: 689-710.
- [91] Fang L, Chen Y, Zhang Y. Advances in the researches on cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Yaouxue Jinzhan* **2009**; 33: 289-296.
- [92] Tumiatti V, Minarini A, Bolognesi ML, Milelli A, Rosini M, Melchiorre C. Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* **2010**; 17: 1825-1838.
- [93] Leon R, Garcia AG, Marco-Contelles J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev* **2013**; 33: 139-189.
- [94] Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* **2013**; 11: 388-413.
- [95] Jin Z. Muscarine, imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. *Nat Prod Rep* **2009**; 26: 382-445.
- [96] Zuloaga F, Morrone O, Belgrano M. Catálogo de las Plantas Vasculares del Conosur (CENPAT-CONICET-ICBG). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden **2008**; 107: 1-3486.
- [97] Casamiquela RM, Beeskow AM, Stanganelli M, Mavrek V. Usos tradicionales de las plantas en la meseta patagónica. Jardín Botánico de la Patagonia Extraandina **2002**; 1-21.
- [98] McKee TC, Cardellina JH, Riccio R, D'Auria MV, Iorizzi M, Minale L. HIV-inhibitory natural products 11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J Med Chem* **1994**; 37: 793-797.
- [99] Fu X, Schmitz FJ, Lee RH, Papkoff JS, Slate DL. Inhibition of protein tyrosine kinase pp60v-src: sterol sulfates from the brittle star *Ophiarachna incrassata*. *J Nat Prod* **1994**; 57: 1591-1594.
- [100] Whitson EL, Bugni TS, Chockalingam PS, Concepcion GP, Harper MK, He M, et al. Spheciosterol sulfates, PCK_inhibitors from a Philippine sponge *Sphaciospongia* sp. *J Nat Prod* **2008**; 71: 1213-1217.
- [101] Comin MJ, Maier MS, Roccatagliata AJ, Pujol CA, Damonte EB. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. *Steroids* **1999**; 64: 335-340.
- [102] Maier MS, Murray AP. Secondary metabolites of biological significance from echinoderms. Biomaterials from aquatic and terrestrial organism **2006**; 15: 559-593. Ed Milton Fingerman and Rachakonda Nagabhushanam, Science Publishers Inc., Enfield, New Hampshire, USA. (ISBN 1578084296).
- [103] Simpson LS, Widlanski TS. A comprehensive approach to the synthesis of sulfate esters. *J Am Chem Soc* **2006**; 128: 1605-1610.
- [104] Harney DW, Macrides TA. Synthesis of an isomeric mixture (24RS, 25RS) of sodium scymnol sulfate. *Steroids* **2008**; 73: 424-429.
- [105] Garrido Santos GA, Murray AP, Pujol CA, Damonte EB, Maier MS. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids* **2003**; 68: 125-132.
- [106] Bureeva S, Andia-Pravdivy J, Symon A, Bichucher A, Moskaleva V, Popenko V, Shpak A, Shvets V, Kozlovb L, Kaplun A. Selective inhibition of the interaction of C1q with immunoglobulins and the classical pathway of complement activation by steroids and triterpenoids sulfates. *Bioor Med Chem* **2007**; 15: 3489-3498.
- [107] Richmond V, Garrido Santos G, Murray AP, Maier MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of 2 β ,3 α -disulfoxy-5 α -cholestan-6-one. *Steroids* **2011**; 76: 1160-1165.

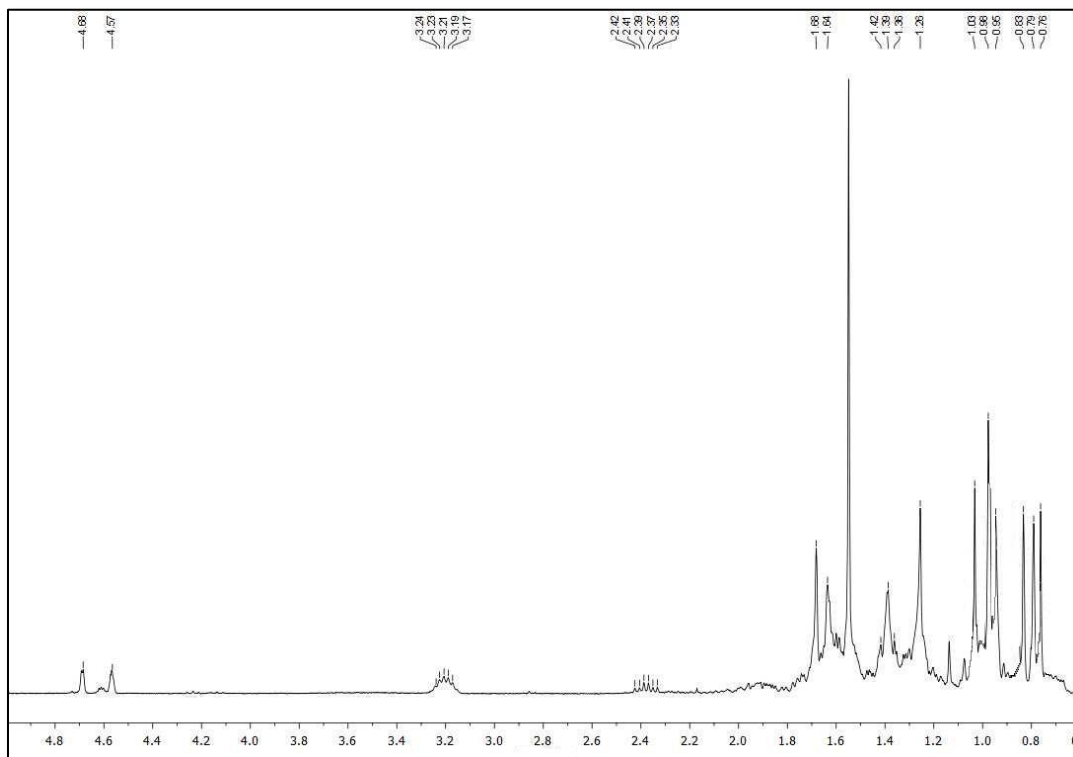
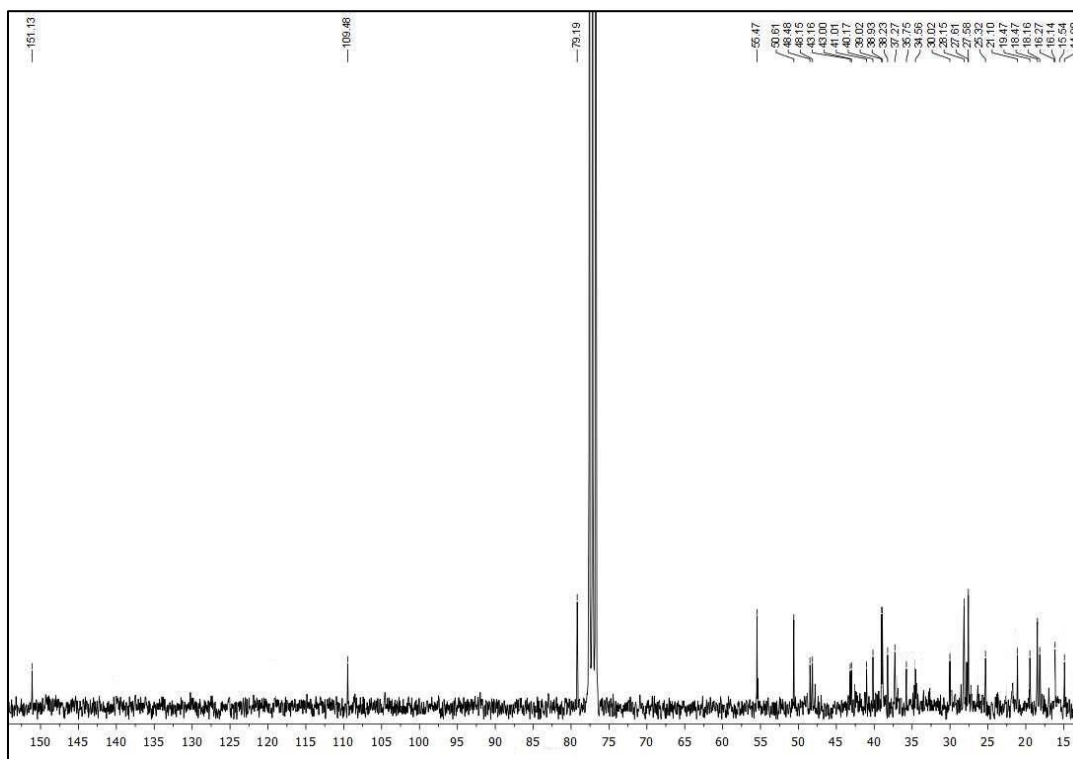
- [108] Elbandy M, Miyamoto T, Lacaille-Dubois MA. Sulfated lupane triterpene derivatives and a flavone C-glycoside from *Gypsophila repens*. *Chem Pharm Bull* **2007**; 55 (5): 808-811.
- [109] Soto J. Optimización de la extracción y purificación de calenduladiol a partir de *Chuquiraga erinacea*. Síntesis de derivados sulfatados de calenduladiol como estrategia para la obtención de inhibidores de ACE. Tesina de grado. Universidad Nacional del Sur **2012**.
- [110] Baddeley GV, Bealino AJ, Jefferies PR, Retallack RW. Chemistry of the euphorbiaceae VI. A triterpene from *Beyeria lescieenaultii*. *Aus J Chem* **1964**; 17: 908-914.
- [111] Neukirch H, D'Ambrosio M, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R, Guerriero A. Improved Anti-Inflammatory Activity of Three New Terpenoids Derived, by Systematic Chemical Modifications, from the Abundant Triterpenes of the Flowery Plant *Calendula officinalis*. *Chem Biodivers* **2005**; 2: 657-671.
- [112] Gutiérrez-Nicolás F, Gordillo-Román B, Oberti JC, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Joseph-Nathan P. Synthesis and Anti-HIV Activity of Lupane and Olean-18-ene Derivatives. Absolute Configuration of 19,20-Epoxyilupanes by VCD. *J Nat Prod* **2012**; 75: 669-676.
- [113] Raghuraman A, Riaz A, Hindle M, Desai UR. Rapid and efficient microwave-assisted synthesis of highly sulfated organic scaffolds. *Tetrahedron Lett* **2007**; 48: 6754-6758.
- [114] Gilbert EE. The reactions of sulfur trioxide, and its adducts, with organic compounds. *Chem Rev* **1962**; 62 (6): 549-589.
- [115] Mumma, RO. Preparation of sulfate esters. *Lipids* **1966**; 1: 221-223.
- [116] Ho KL, Murphy MB, Wan Y, Fong BMW, Tam S, Giesy JP, Leung KSY, Lam MHW. Synthesis and characterization of bromophenol glucuronide and sulfate conjugates for their direct LC-MS/MS quantification in human urine as potential exposure markers for polybrominated diphenyl ethers. *Anal Chem* **2012**; 84: 9881-9888.
- [117] Sobel AE, Spoerri PE. Steryl sulfates. I. Preparation and properties. *J Am Chem Soc* **1941**; 63: 1259-1261.
- [118] Comin MJ, Maier MS, Roccatagliata AJ, Pujol CA, Damonte EB. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. *Steroids* **1999**; 64: 335-340.
- [119] Bordwell FG, Osborne CE. Sulfonation of olefins. VIII. Formation of unsaturated sulfonic acids. *J Am Chem Soc* **1959**; 81: 1995-2000.
- [120] Kappe CO, Dallinger D. Controlled microwave heating in modern organic synthesis: highlights from the 2004-2008 literature. *Mol Divers* **2009**; 13: 71-193.
- [121] Richmond V, Murray AP, Maier MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of polyhydroxylated sulfated steroids: structure/activity studies. *Steroids* **2013**; 78 (11): 1141-1147.
- [122] Luche JL. Lanthanides in organic chemistry. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones. *J Am Chem Soc* **1978**; 100 (7): 2226-2227.
- [123] Podoly E, Bruck T, Diamant S, Melamed-Book N, Weiss A, Huang Y, Livnah O, Langermann S, Wilgus H, Soreq H. *Neurodegener Dis* **2008**; 5:232-236.
- [124] 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.

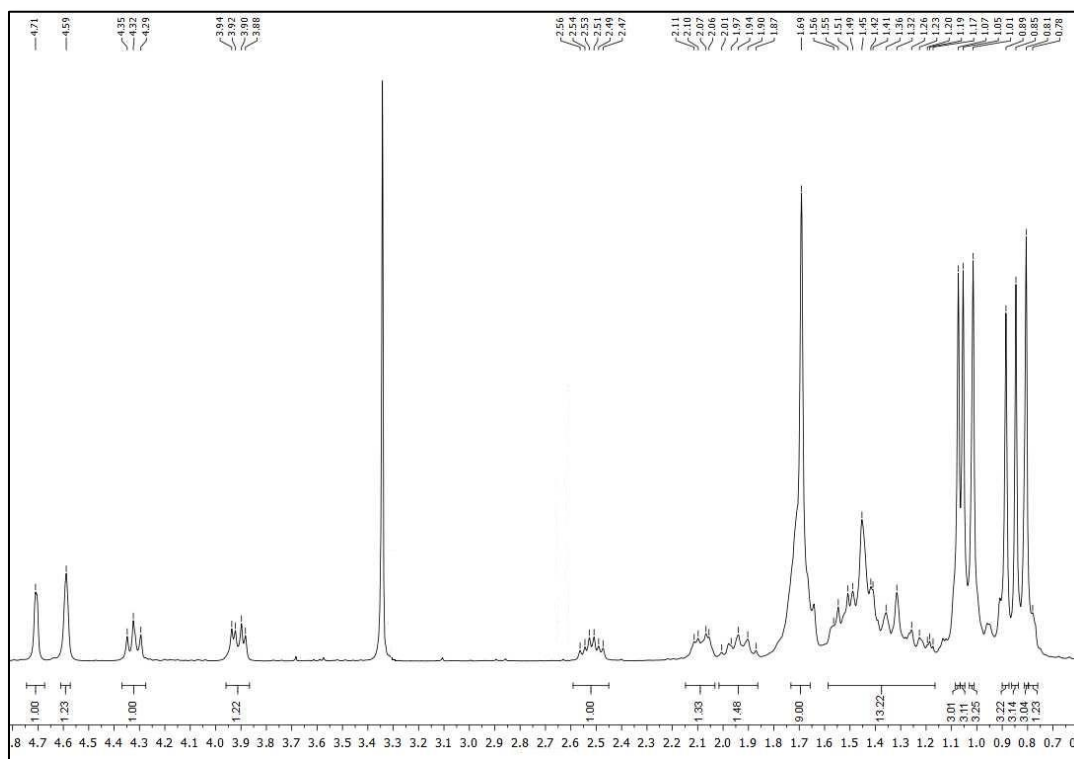
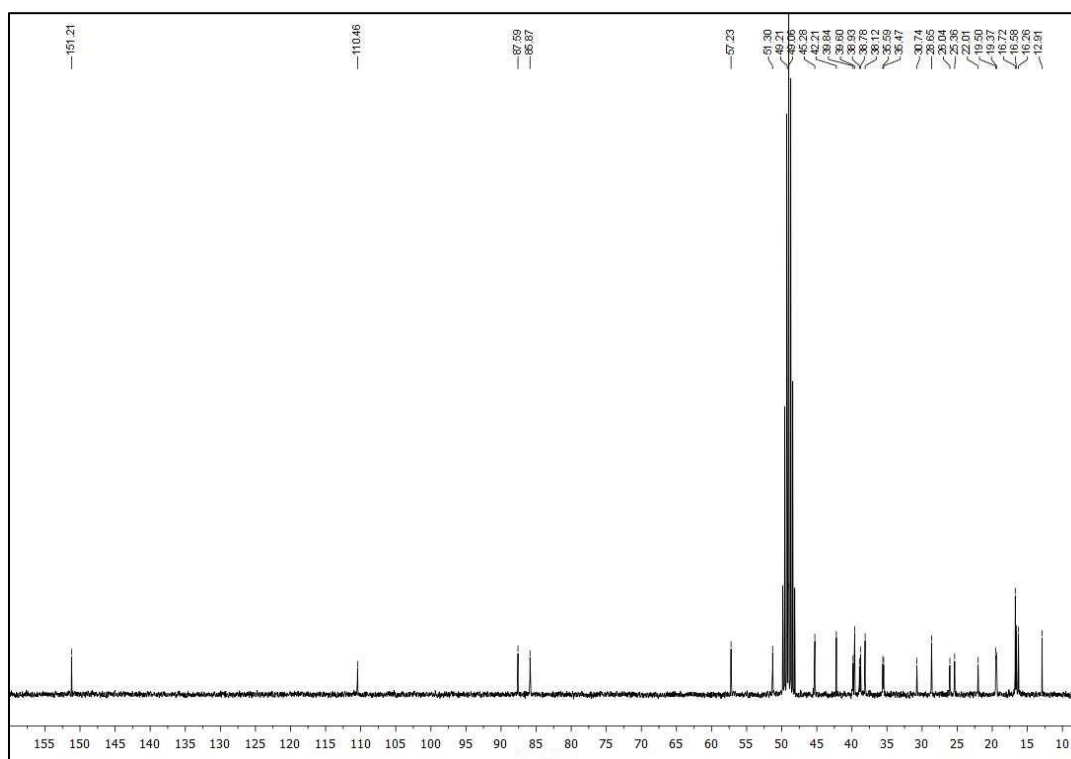
- [125] Chang MW, Belew RK, Carroll KS, Olson AJ, Goodsell DS. *J Comput Chem* **2008**; 29: 1753-1761.
- [126] Cosconati S, Forli S, Perryman A, Harris R, Goodsell DS, Olson A. *Expert Opin Drug Discov* **2010**; 5: 597-607.
- [127] Kashiwada Y, Hashimota F, Cosentina LM, Chen CH, Garren PE, Lee KH. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J Med Chem* **1996**; 39: 1016-1017.
- [128] Sun IC, Wang HK, Kashiwada Y, Shen JK, Cosentino LM, Chen CH, Yang LM, Le KH. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J Med Chem* **1998**; 41: 4648-4657.
- [129] 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.
- [130] Nikiema J, Vanhaelen-Fastre´ R, Vanhaelen M, Fontaine J, De Graef C, Heenen M. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on keratinocyte proliferation. *Phytother Res* **2001**; 15: 131-134.
- [131] Sudhahar V, Kumar S A, Varalakshmi P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sci* **2006**; 78: 1329-1335.
- [132] Sudhahar V, Kumar S A, Mythili Y, Varalakshmi P. Remedial effect of lupeol and its ester derivative on hypercholesterolemia-induced oxidative and inflammatory stresses. *Nutr Res* **2007**; 27: 778-787.
- [133] Reddy KP, Singh AB, Puri A, Srivastava AK, Narender T. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**; 19: 4463-4466.
- [134] Kolomitsyn IV, Holy J, Perkins E, Krasutsky PA. Analysis and antiproliferative activity of bark extractives of *Betula neolaskana* and *B. papyrifera*. Synthesis of the most active extractive component-betulin 3-caffeate. *Nat Prod Commun* **2007**; 2: 17-26.
- [135] Kim DSHL, Pezzuto JM, Pisha E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**; 8: 1707-1712.
- [136] 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.
- [137] Mutai C, Abatis D, Vagias C, Moreauc D, Roussakisc C, Roussis V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochem* **2004**; 65 (8): 1159-1164.
- [138] Chen IH, Du YC, Lu MC, Lin AS, Hsieh PW, Wu CC, Chen SL, Yen HF, Chang FR, Wu YC. Lupane-type triterpenoids from *Microtropis fokienensis* and *Perrottetia arisanensis* and the apoptotic effect of 28-hydroxy-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al. *J Nat Prod* **2008**; 71 (8): 1352-1357.
- [139] Ghosh P, Mandal A, Ghosh J, Pal C, Nanda AK. Synthesis of bioactive 28-hydroxy-3-oxolup-20(29)-en-30-al with antileukemic activity. *J Asian Nat Prod Res* **2012**; 14 (2):141-53.
- [140] Khan MF, Maurya CK, Dev K, Arha D, Rai K, Tamrakar AK, Maurya R. Design and synthesis of lupeol analogues and their glucose uptake stimulatory effect in L6 skeletal muscle cells. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, 24: 2674-2679.
- [141] Wei Y, Ma C, Chen D, Hattori M. Anti-HIV-1 protease triterpenoids from *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *Intermedia*. *Phytochem* **2008**; 69: 1875-1879.

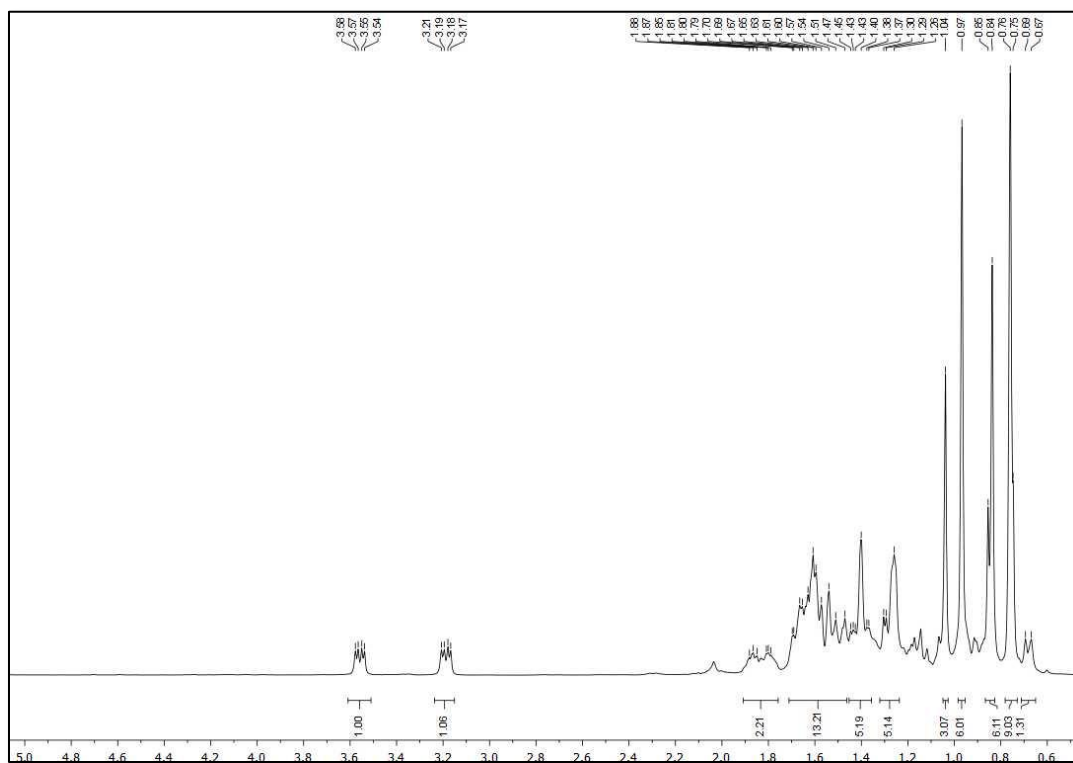
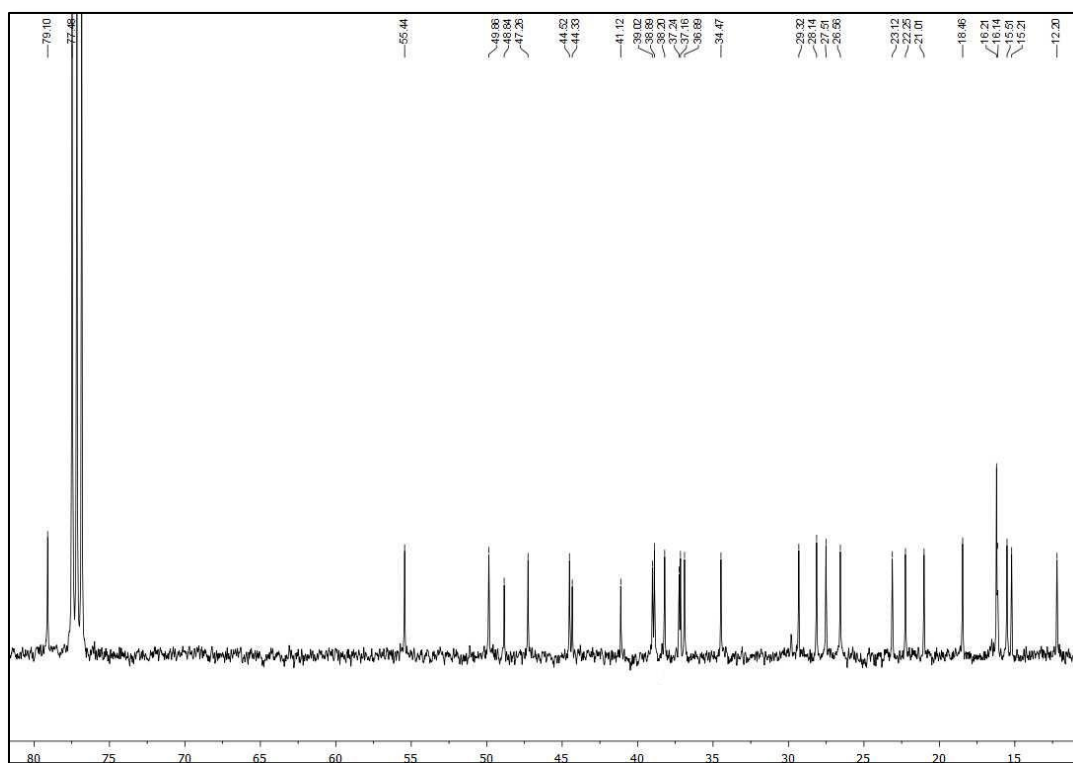
- [142] Prachayasittikul S, Saraban P, Cherdtrakulkiat R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. New bioactive triterpenoids and antimalarial activity of *Diospyros rubra* Lec. *Excli Journal* **2010**; 9: 1-10.
- [143] Yasukawa K, Yu SY, Yamanouchi S, Takido M, Akihisa T, Tamura T. Some lupane-type triterpenes inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Phytomed* **1995**; 4: 309-313.
- [144] Burns D, Reynolds WF, Buchanan G, Reese PB, Enriquez RG. Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn Reson Chem* **2000**; 38: 488-493.
- [145] Pecha GG, Britoa WF, Menea GJ, Quijanob L. Constituents of *Acacia cedilloi* and *Acacia gaumeri*. Revised structure and complete NMR assignments of resinone. *Z Naturforsch* **2002**; 57c: 773-776.
- [146] Mukherjee R, Jaggi M, Siddiqui MJA, Srivastava SK, Rajendran P, Vardhan A, Burman A. Synthesis and cytotoxic activity of 3-O-acyl/3-hydrazine/2-bromo/20,20-dibromo betulinic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**; 14: 4087-4091.
- [147] Bednarczyk-Cwynar B, Zaprutko L. Recent advances in synthesis and biological activity of triterpenic acylated oximes. *Phytochem Rev* **2014**; 1-29.
- [148] Richmond V, Careaga VP, Sacca P, Calvo JC, Maier MS. Synthesis and cytotoxic evaluation of four new 6E-hydroximinosteroids. *Steroids* **2014**; 84: 7-10.
- [149] Raves ML, Harel M, Pang YP, Silman I, Kozikowski AP, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol* **1997**; 4 (1): 57-63.
- [150] Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon FJ. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *Biol Chem* **2003**; 278: 41141-41147.
- [151] Symon AV, Kaplun, AP, Vlasenkova NK, Gerasimova GK, Shon LB, Litvin EF, Kozlova LM, Surkova EL, Shvets VI. Epimerization of hydroxyl group in lupan series triterpenoids. *Russ J Bioorg Chem* **2003**; 29: 185-189.
- [152] Reyes CP, Núñez MJ, Jiménez IA, Busserolles J, Alcaraz MJ, Bazzocchi IL. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. *Bioorg Med Chem* **2006**; 14: 1573-1579.
- [153] Núñez MJ, Reyes CP, Jiménez IA, Moujir L, Bazzocchi IL. Lupane triterpenoids from *Maytenus* species. *J Nat Prod* **2005**; 68: 1018-1021.
- [154] Akihisa T, Franzblau SG, Ukiya M, Okuda H, Zhang F, Yasukawa K, Suzuki T, Kimurac Y. Antitubercular activity of titerpenoids from Asteraceae flowers. *Biol Pharm Bull* **2005**; 28 (1): 158-160.
- [155] Vazdekis NEJ, Chávez H, Estévez-Braun A, Ravelo AG. Triterpenoids and a lignan from the aerial parts of *Maytenus apurimacensis*. *Nat Prod* **2009**; 72 (6): 1045-1048.
- [156] Vetere V, Merlo AB, Casella ML. Chemoselective hydrogenation of aromatic ketones with Pt-based heterogeneous catalysts. Substituent effects. *Appl Catal A: Gen* **2015**; 491: 70-77.
- [157] Yang S, Liang N, Li H, Xue W, Hu D, Jin L, Zhao Q, Yang S. Design, synthesis and biological evaluation of novel betulinic acid derivatives. *Cem Cent J* **2012**; 6: 141-149.
- [158] Mukherjee R, Jaggi M, Rajendran P, Srivastava SK, Siddiqui MJ, Vardhan A, Burman AC. Synthesis of 3-O-acyl/3-benzylidene/3-hydrazone/3-hydrazine/17-carboxyacryloyl ester derivatives of betulinic acid as anti-angiogenic agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**; 14: 3169-3172.

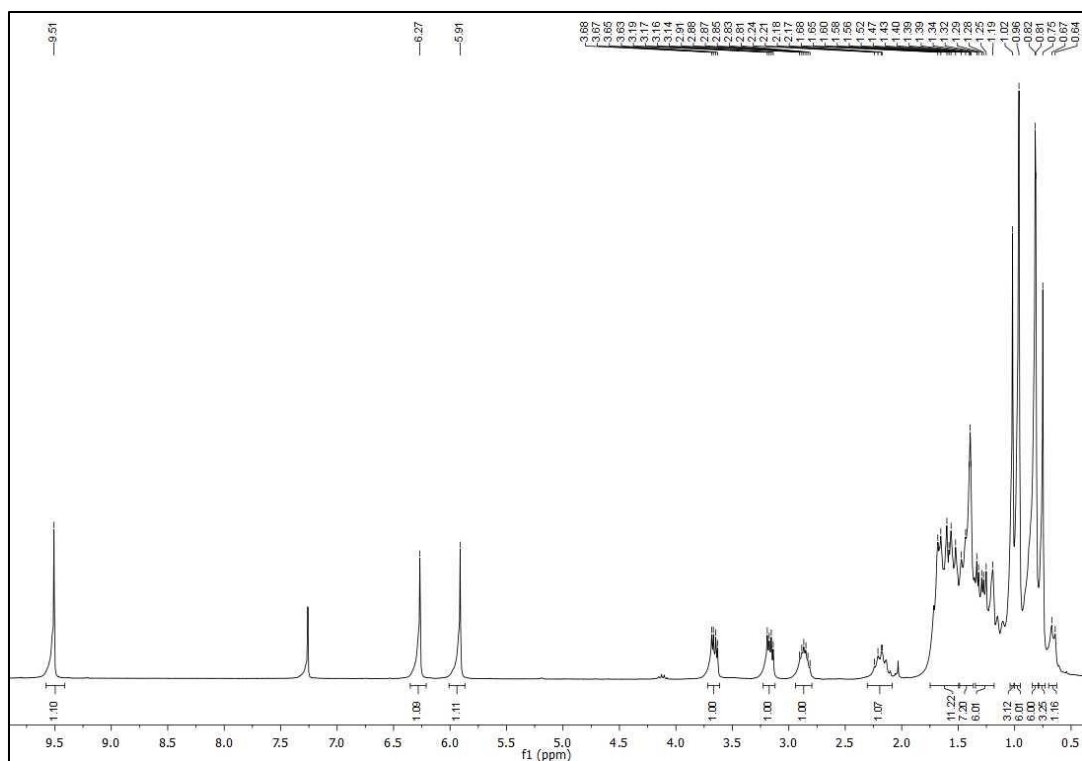
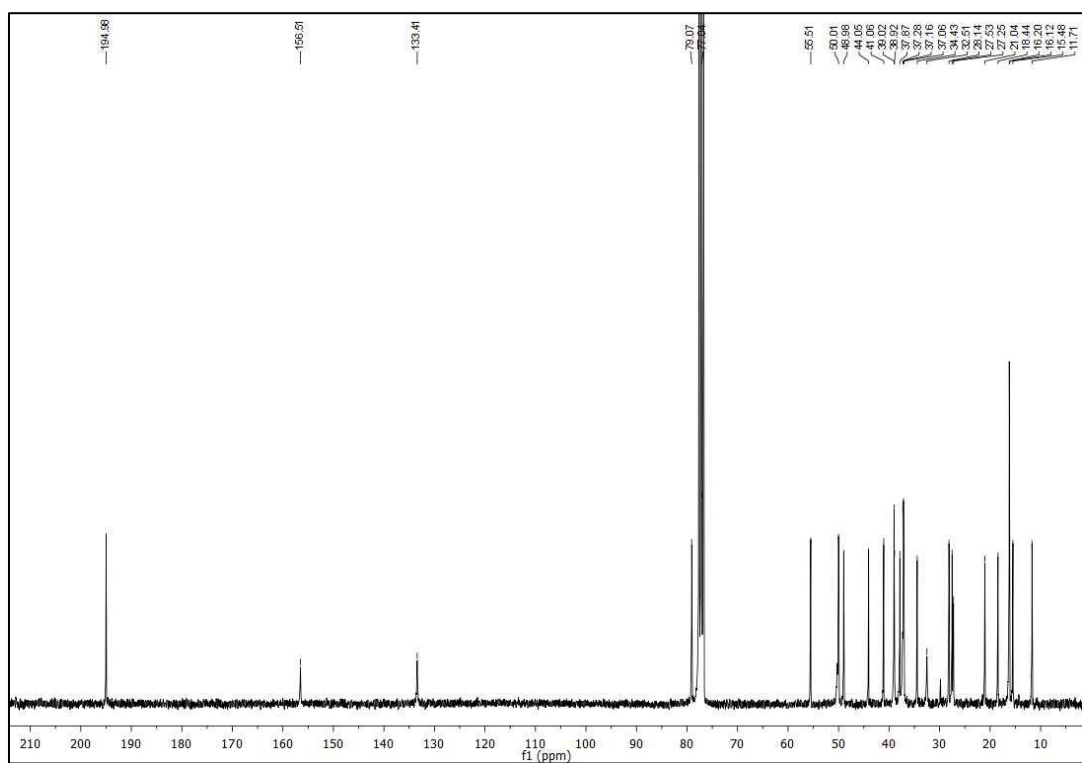
- [159] Misra N, Kumar S, Raj K. Novel class of hybrid natural products derived from lupeol/lupenone (part II). *Indian J Chem* **2011**; 50B: 275-283.
- [160] Shanmugam MK, Nguyen AH, Kumar AP, Tan BKH, Sethi G. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Lett* **2012**; 320: 158-170.
- [161] 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.
- [162] Hyer ML, Shi R, Krajewska M, Meyer C, Lebedeva IV, Fisher PB, Reed JC. Apoptotic activity and mechanism of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic-acid and related synthetic triterpenoids in prostate cancer. *Cancer Res* **2008**; 68 (8): 2927-2933.
- [163] Vela Gurovic MS, Díaz Lanza AM, Boyano Adánez MC, Estañ Omaña MC, Gañán Gómez I, Murray AP, Sancho López P. Cytotoxic effects induced by combination of heliantriol B2 and dequalinium against human leukemic cell lines. *Phytother Res* **2011**; 25: 603-610.

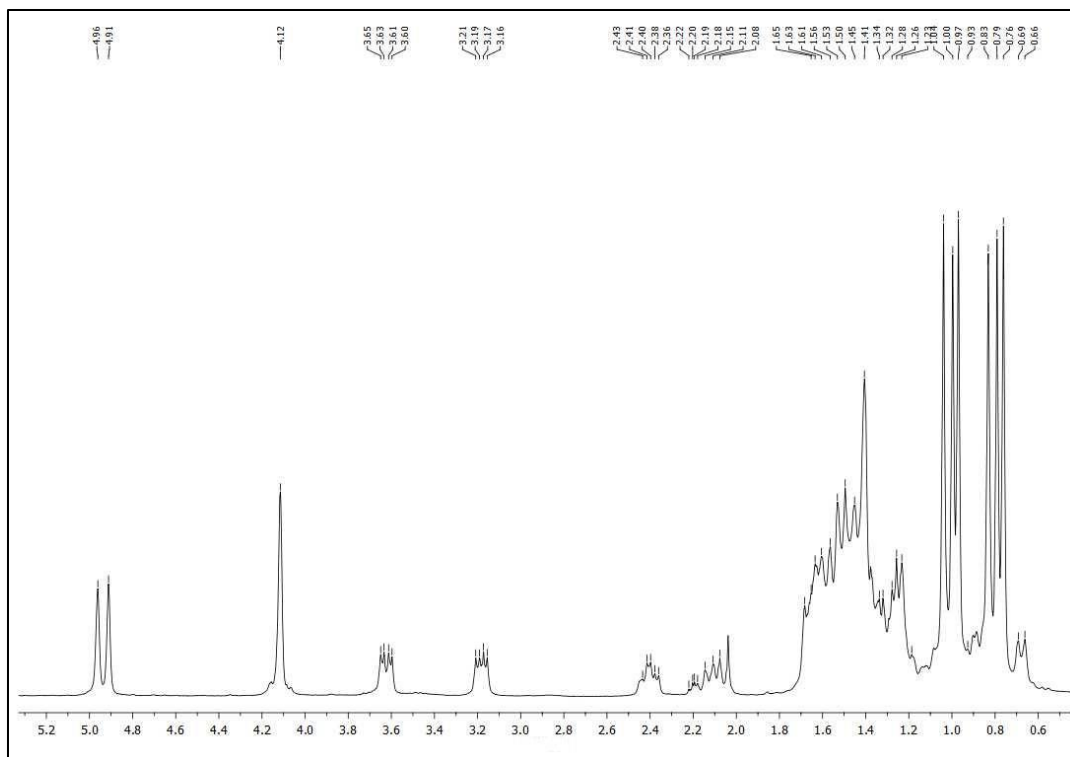
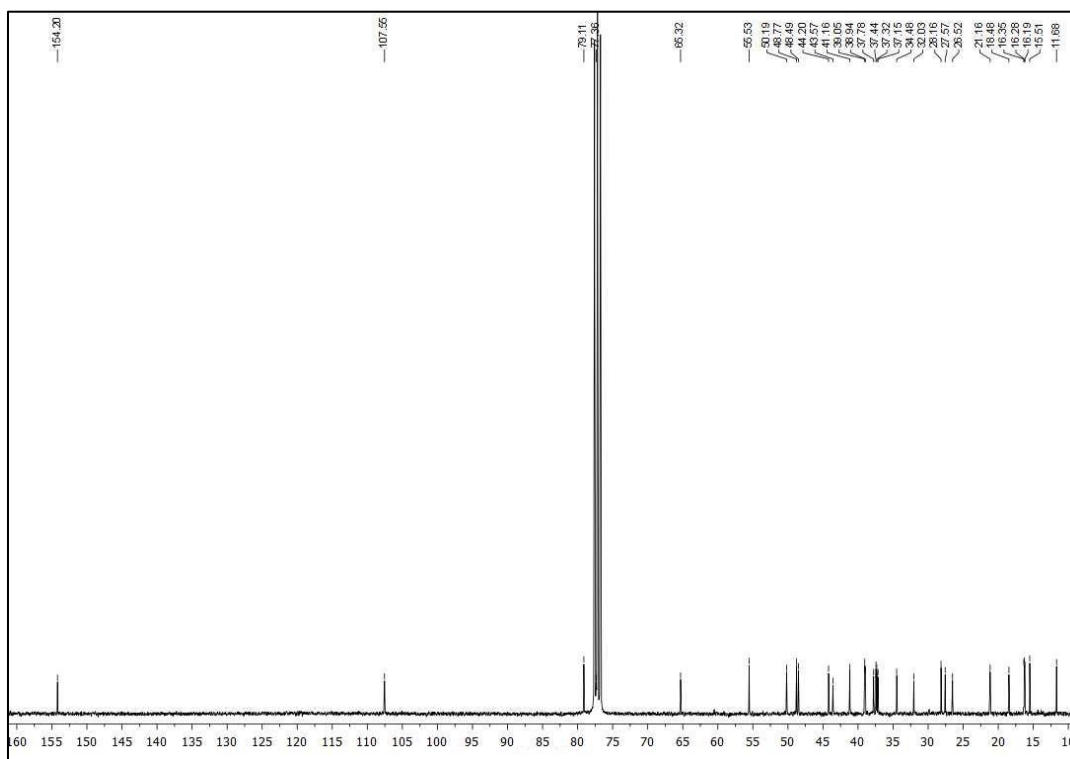
Anexo
de
Espectros

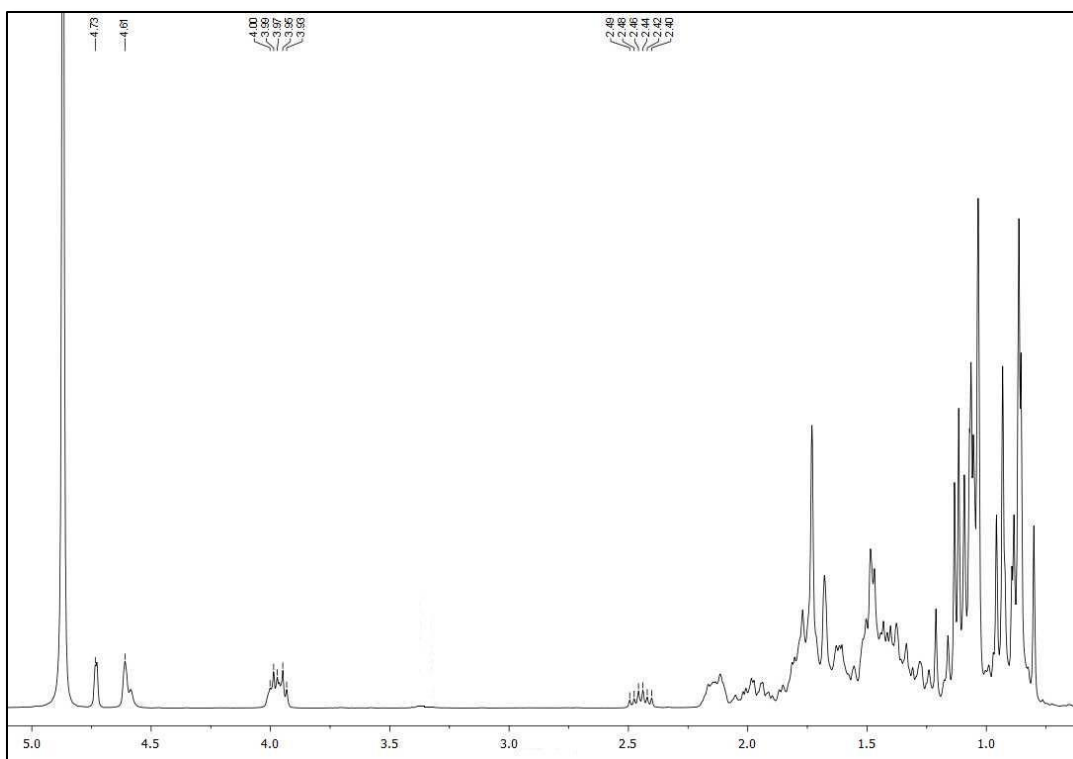
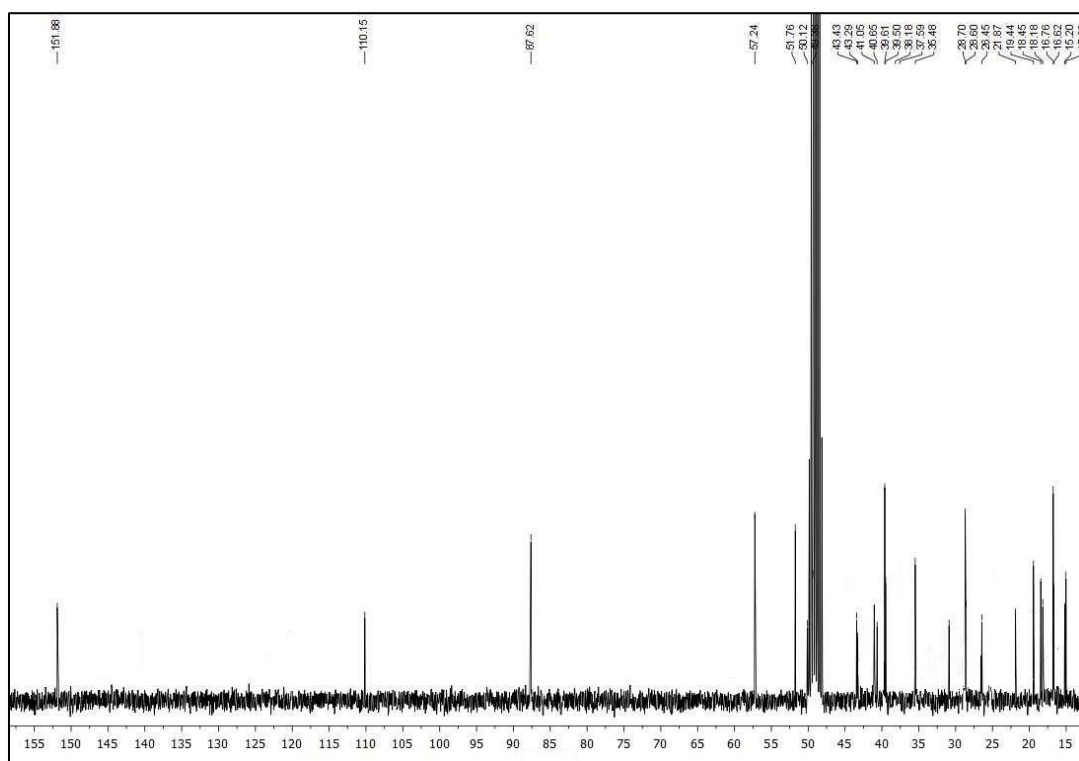
Espectro de RMN de ^1H del compuesto **1** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **1** (CDCl_3)

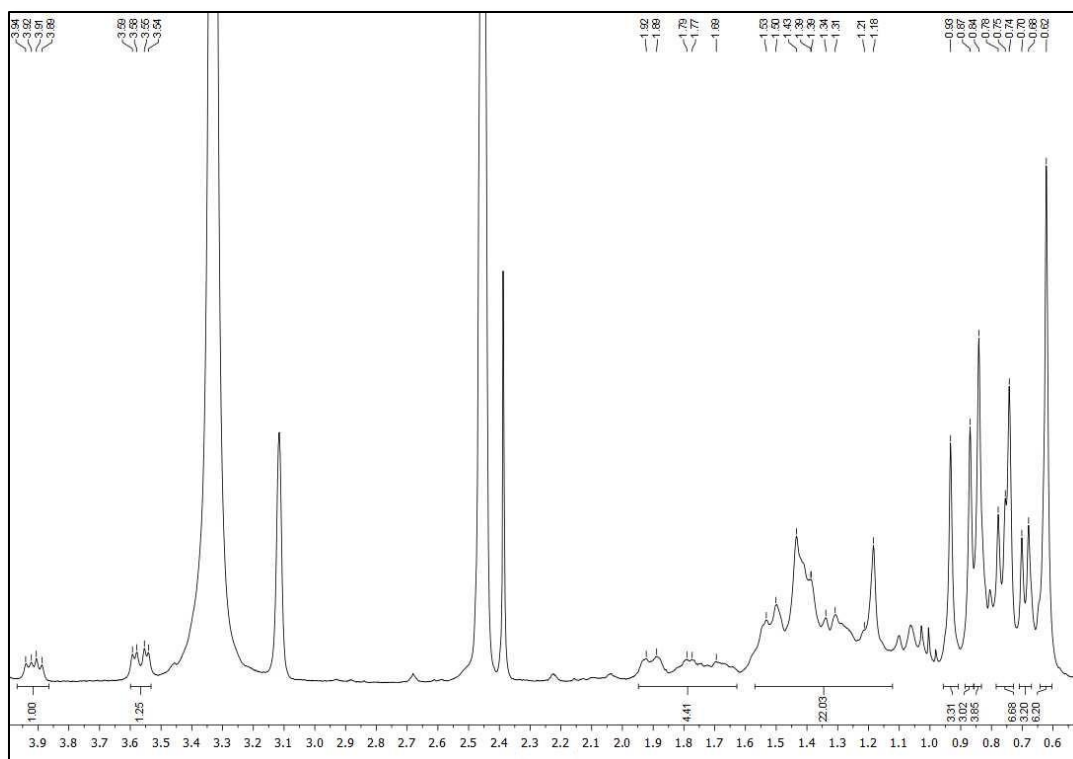
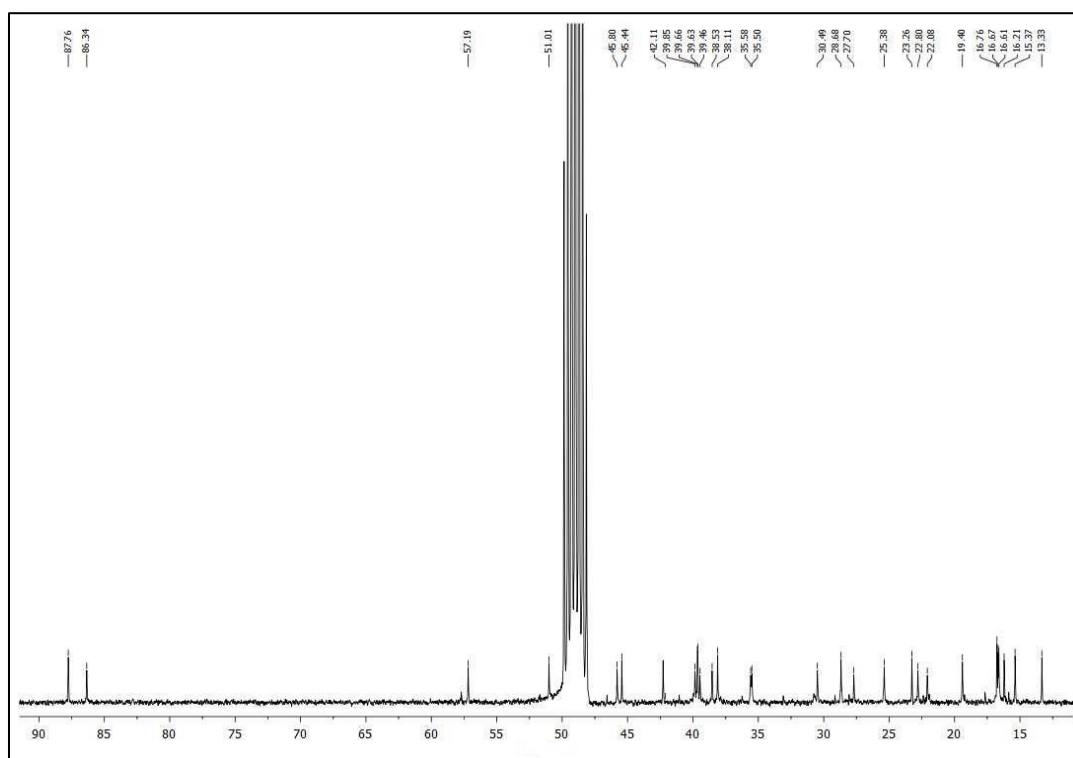
Espectro de RMN de ^1H del derivado **8** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **8** (MeOD- d_4)

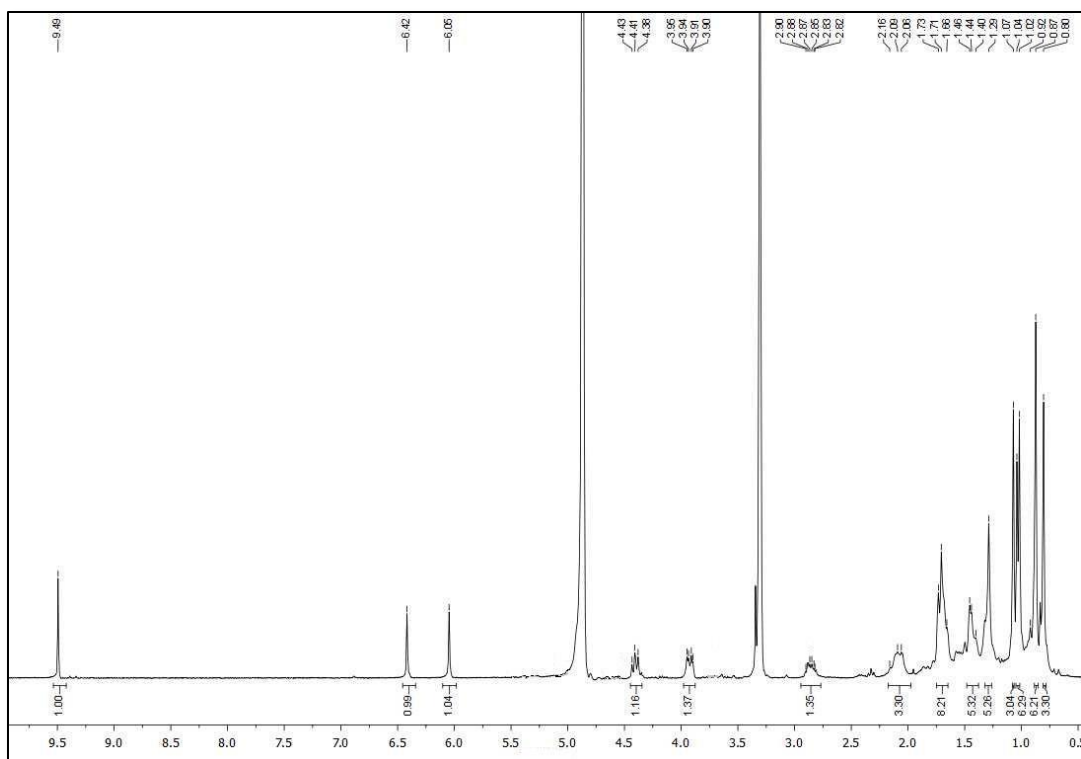
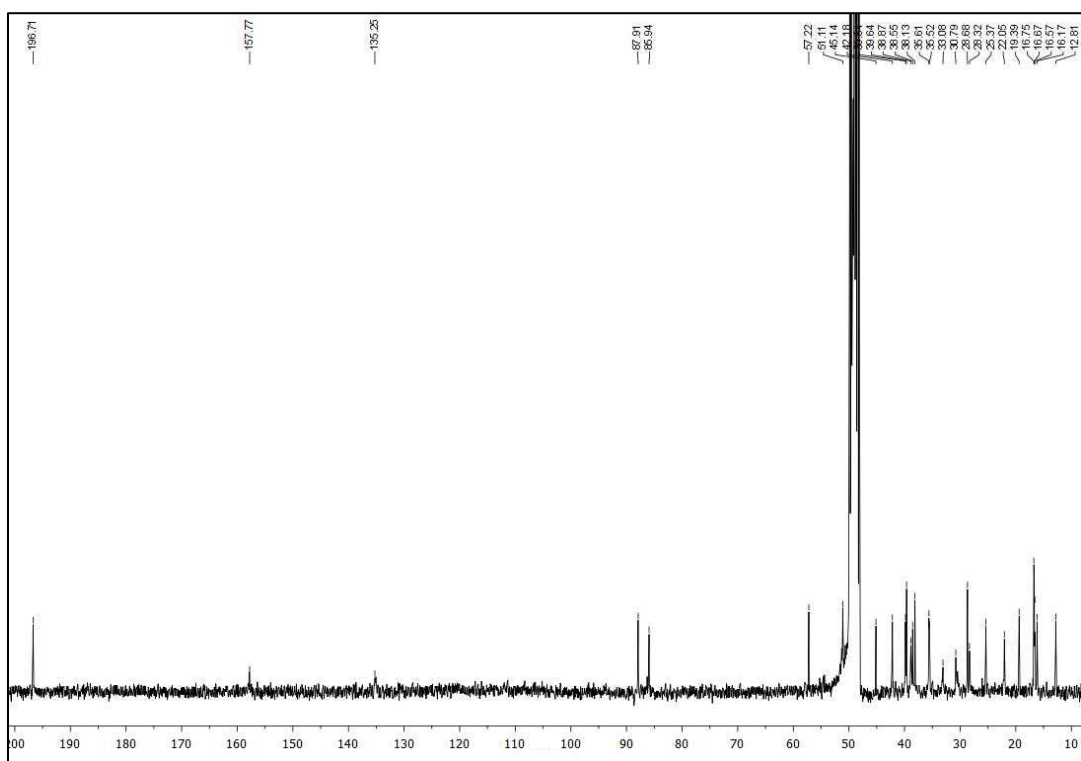
Espectro de RMN de ^1H del derivado **9** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **9** (CDCl_3)

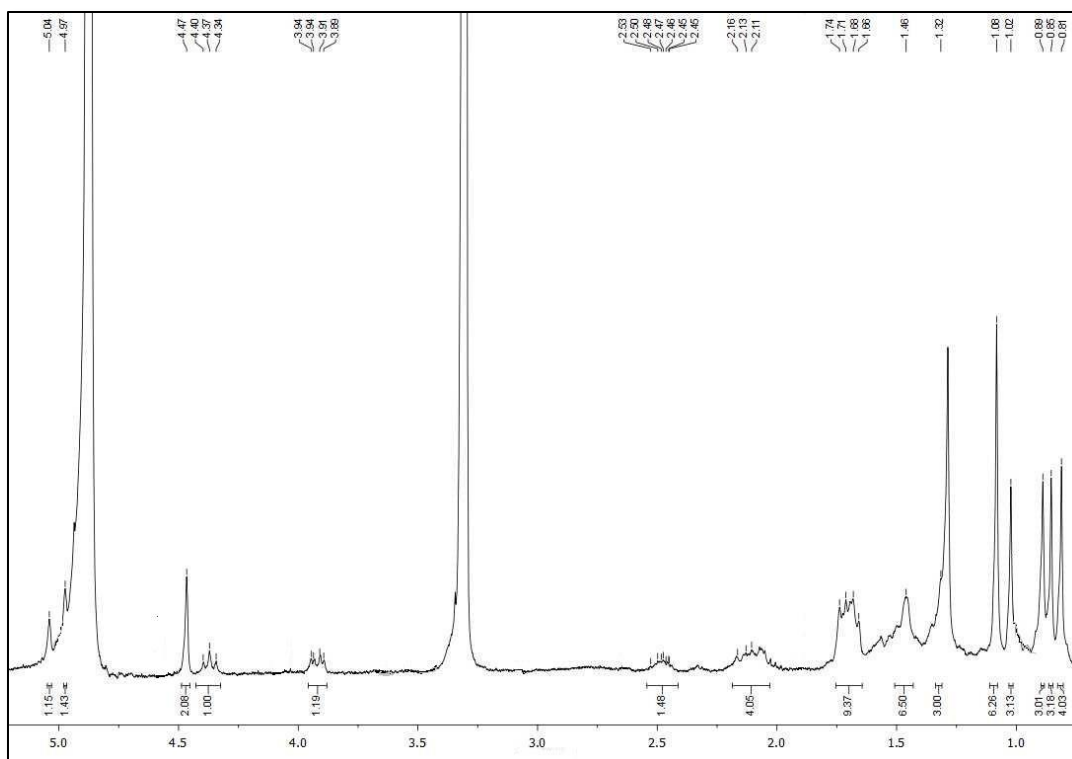
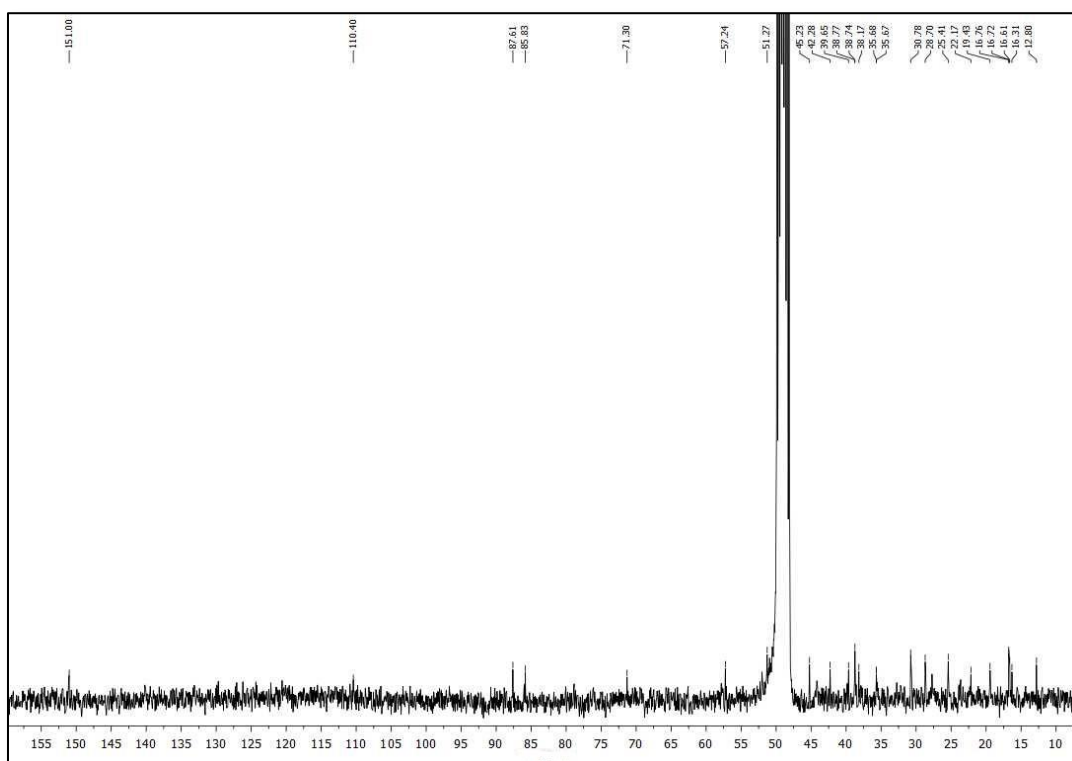
Espectro de RMN de ^1H del derivado **10** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **10** (CDCl_3)

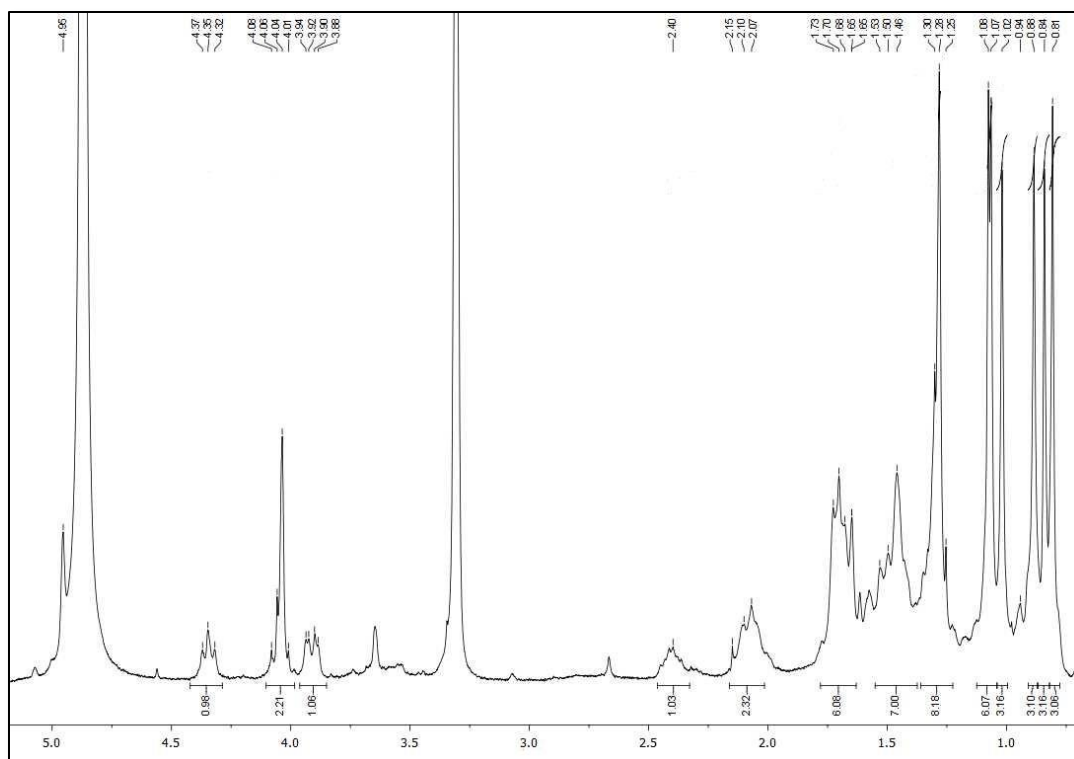
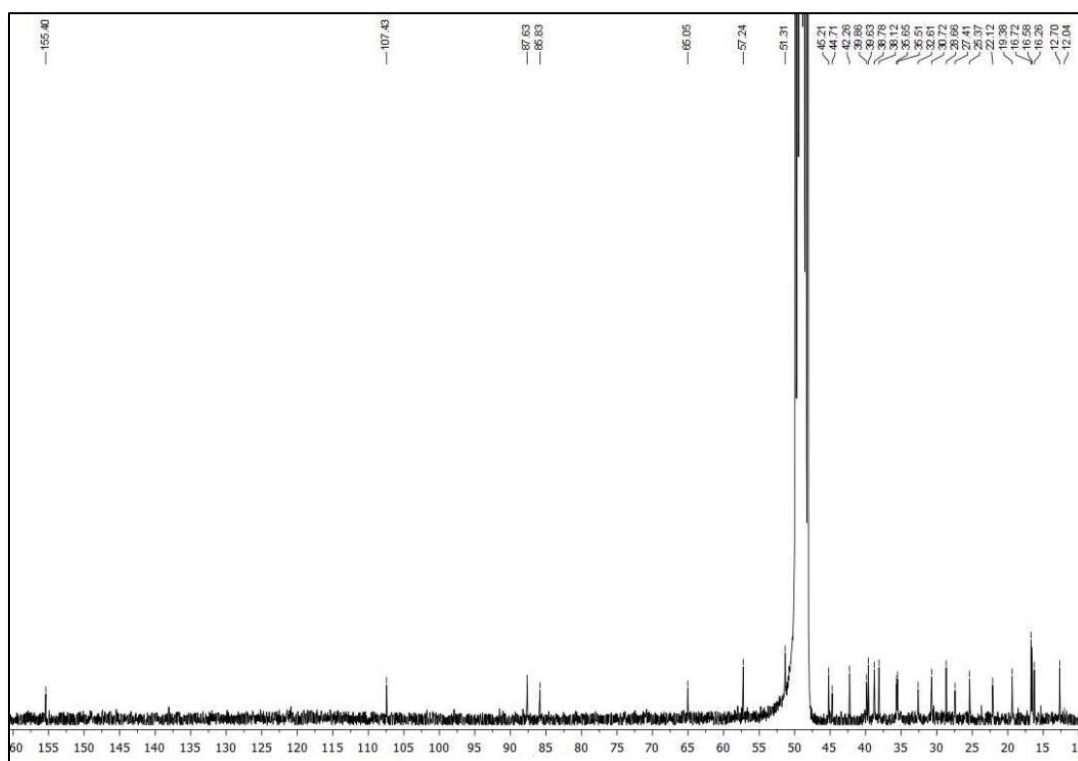
Espectro de RMN de ^1H del derivado **11** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **11** (CDCl_3)

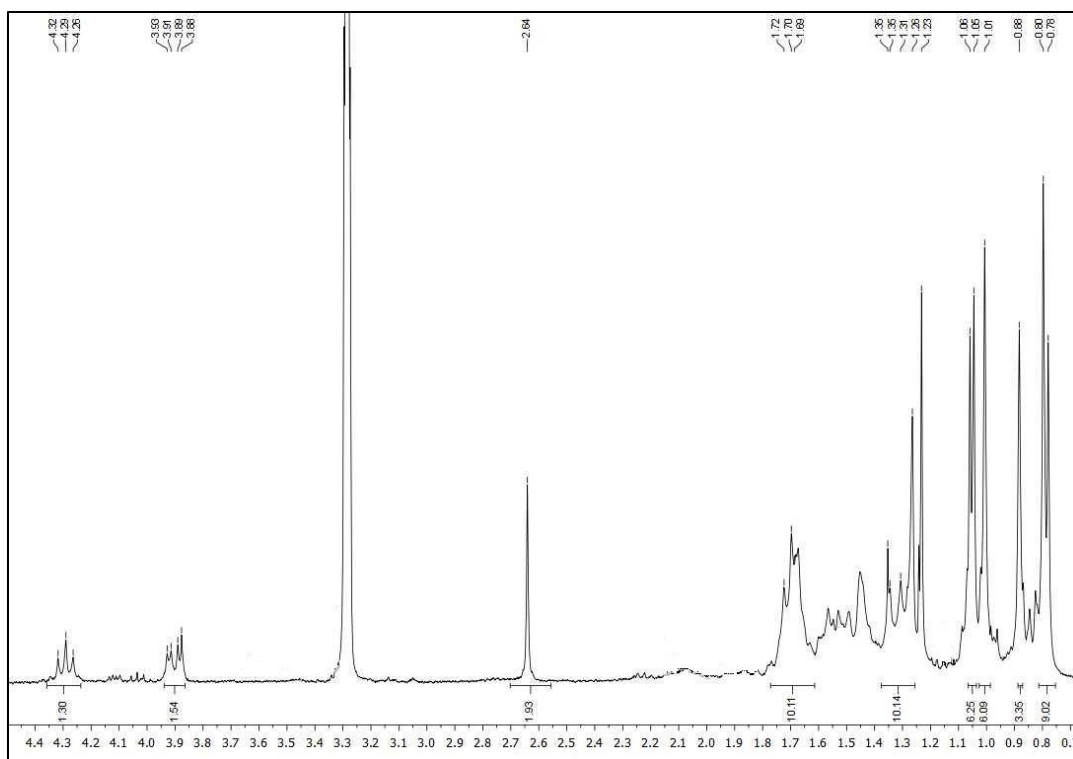
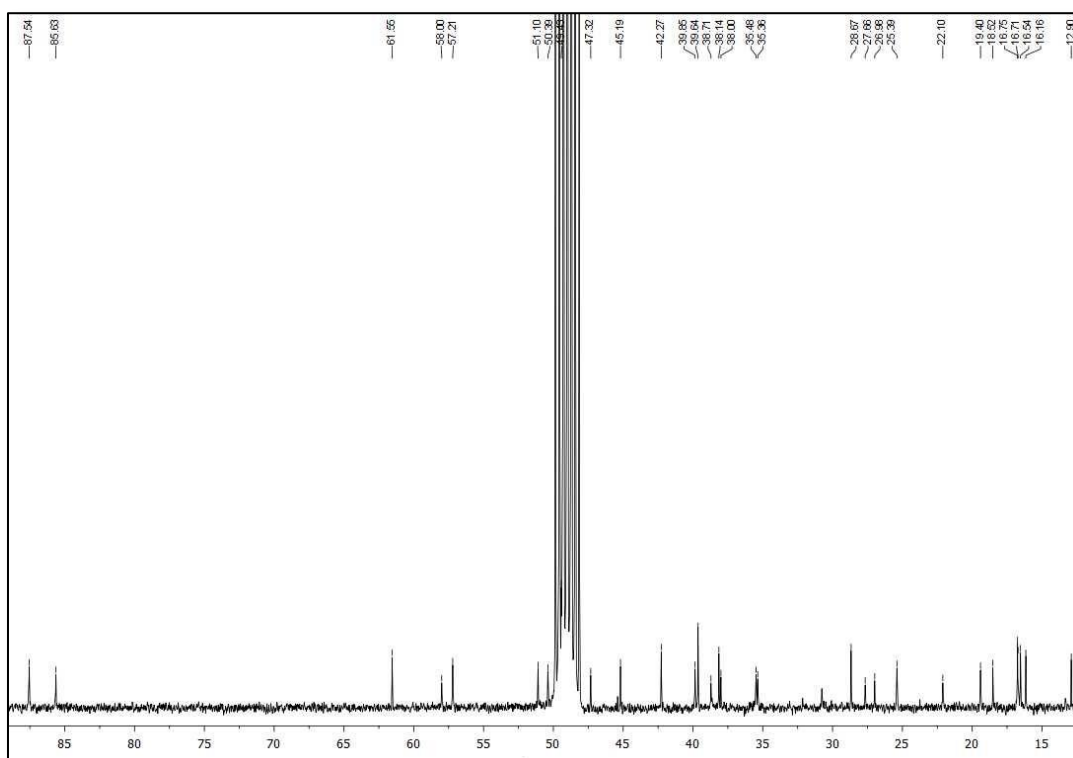
Espectro de RMN de ^1H del derivado **13** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **13** (MeOD- d_4)

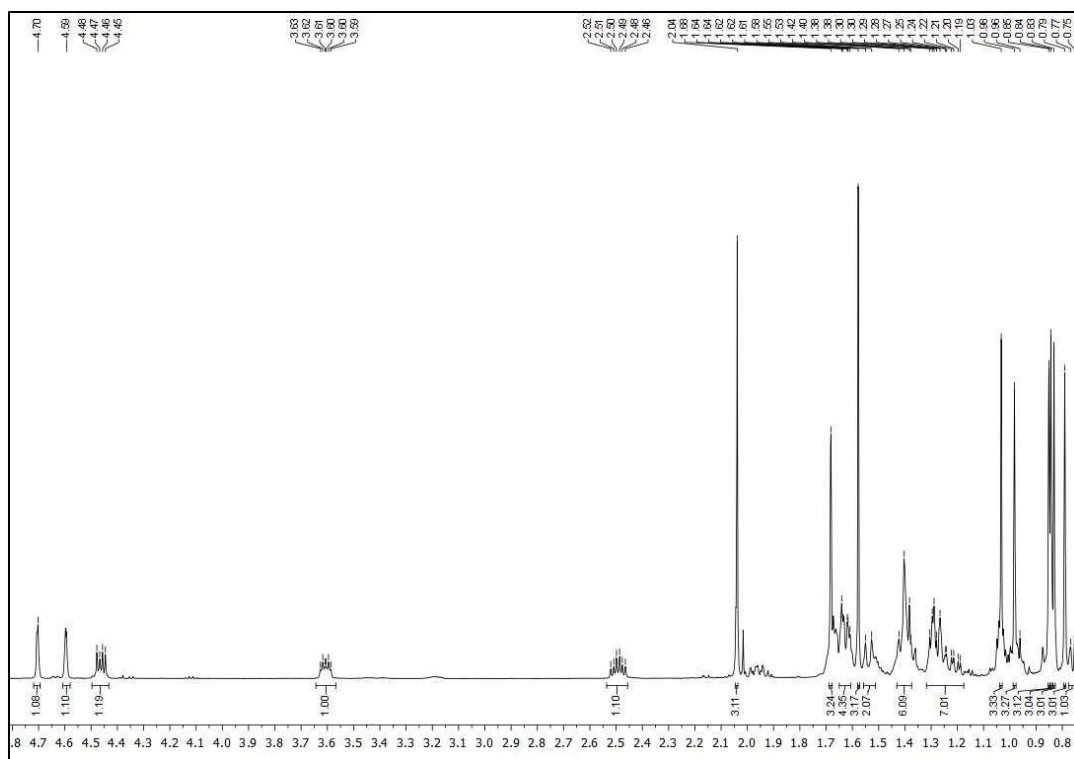
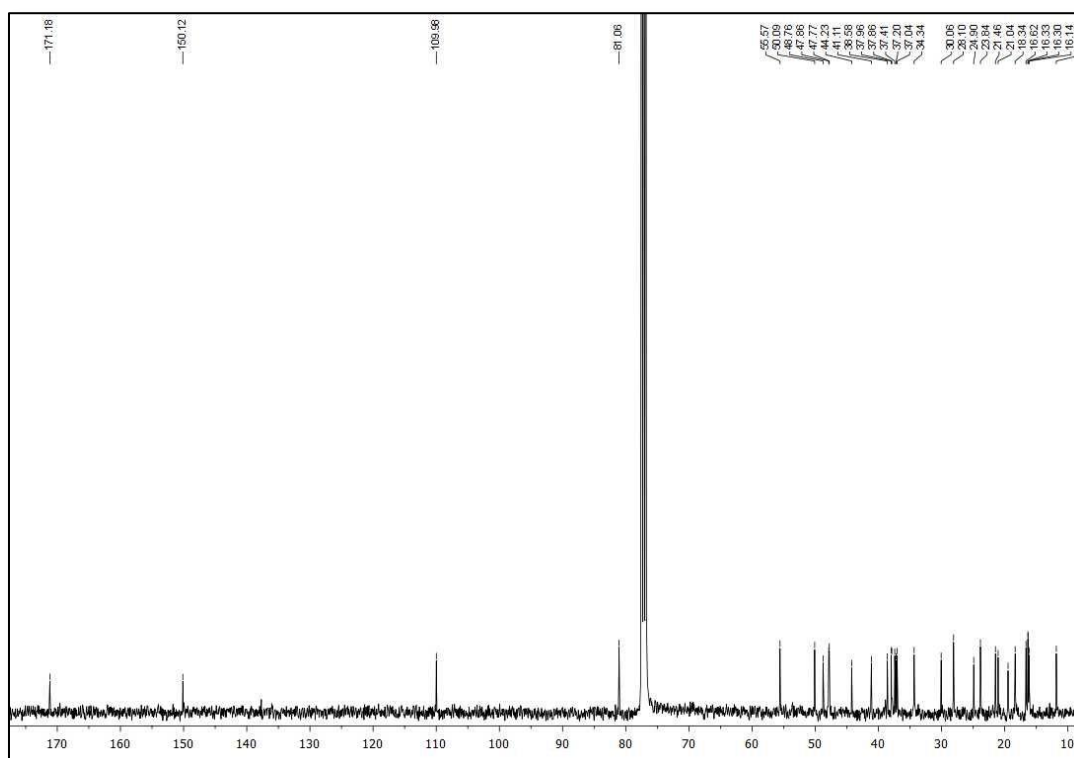
Espectro de RMN de ^1H del derivado **14** ($\text{DMSO}-d_6$)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **14** ($\text{MeOD}-d_4$)

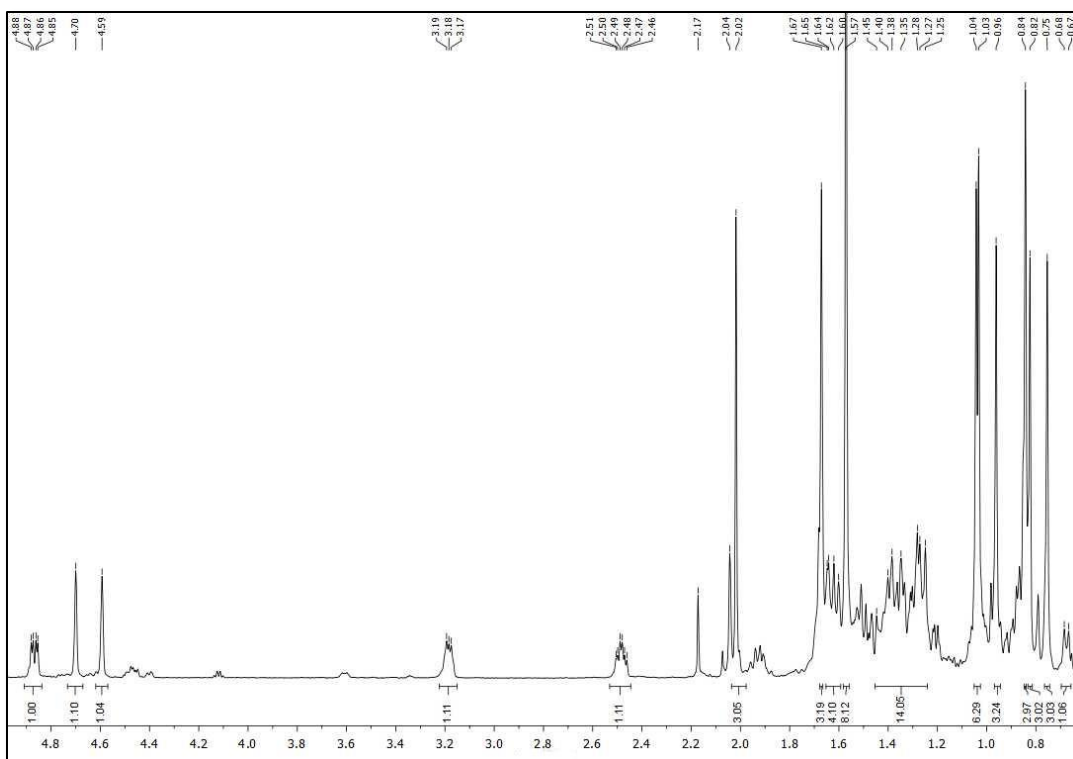
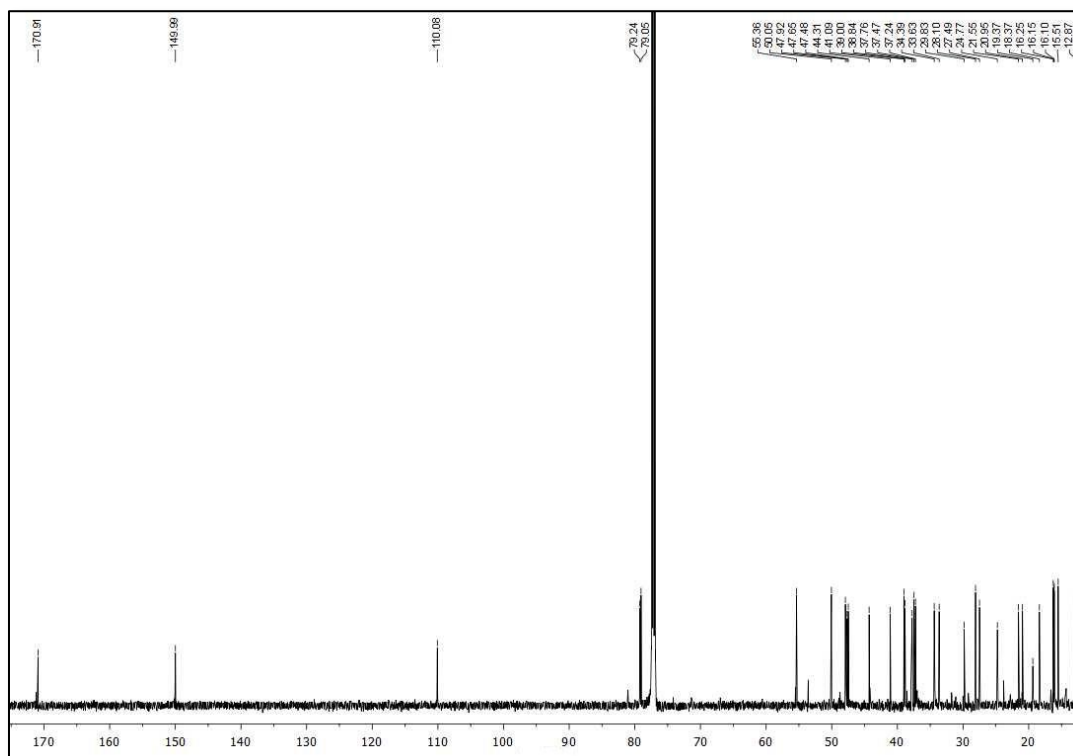
Espectro de RMN de ^1H del derivado **15** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **15** (MeOD- d_4)

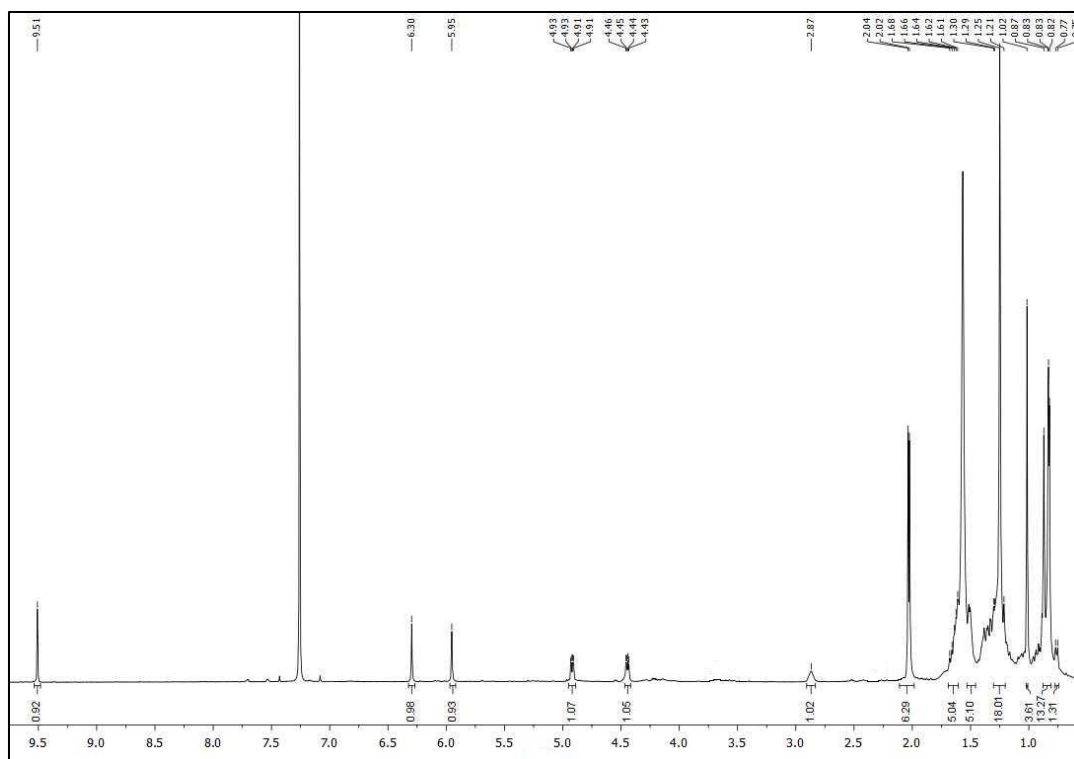
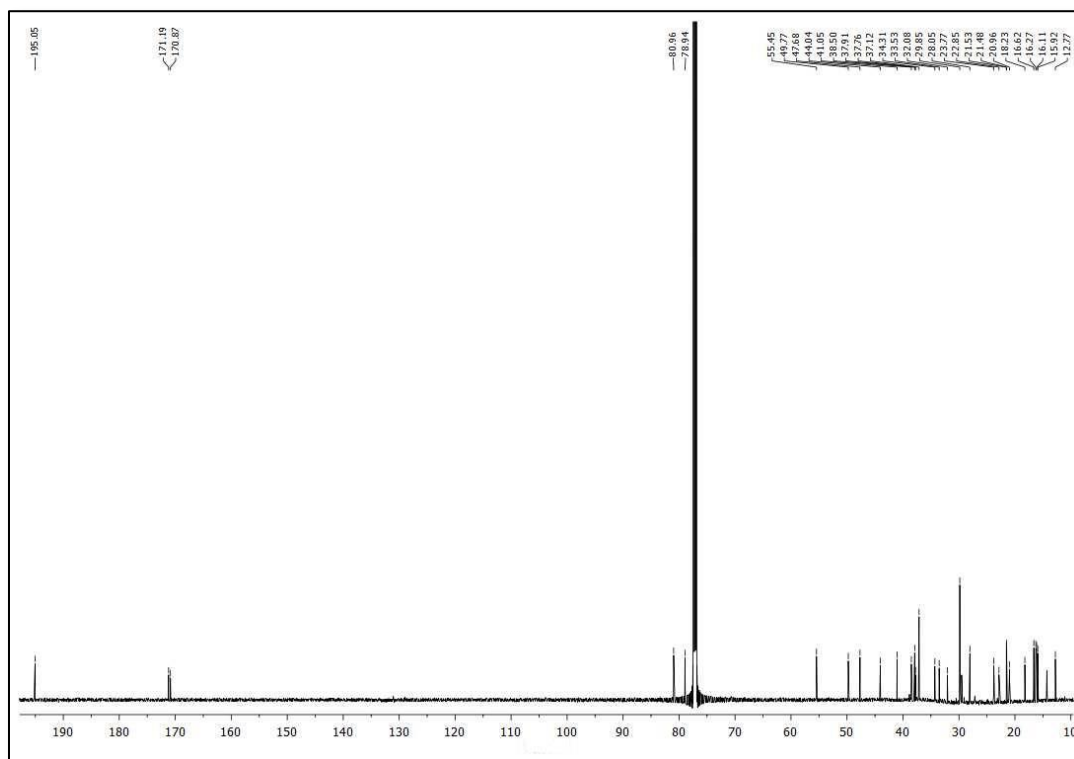
Espectro de RMN de ^1H del derivado **16** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **16** (MeOD- d_4)

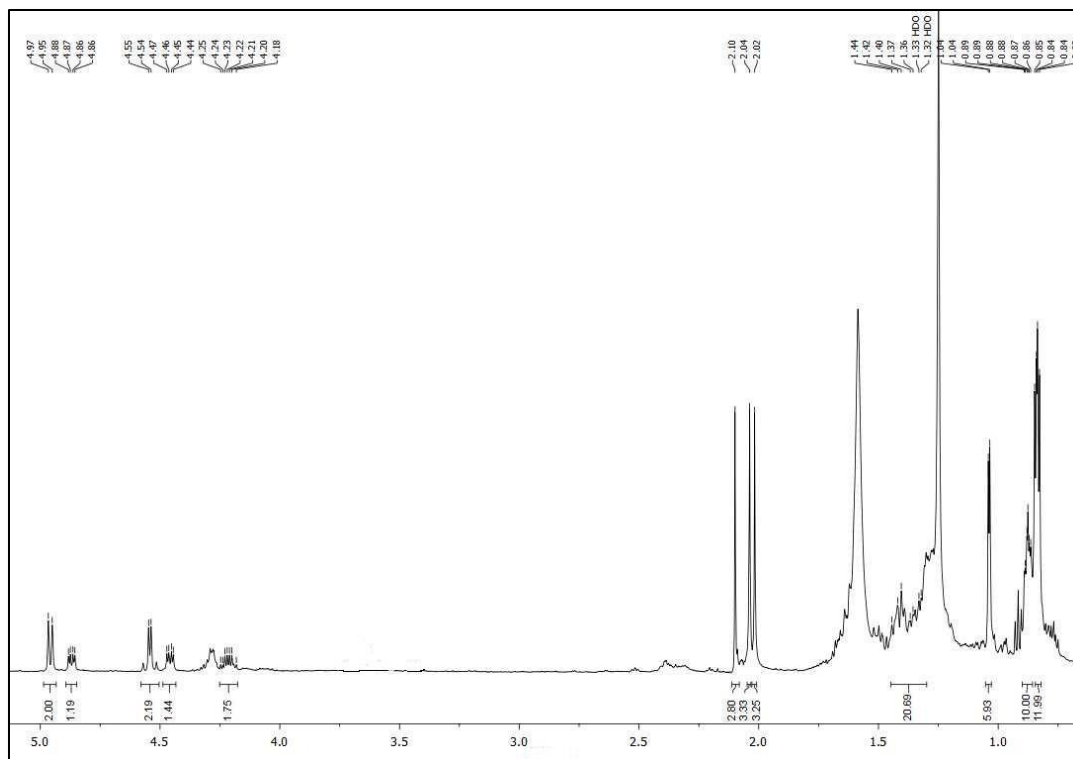
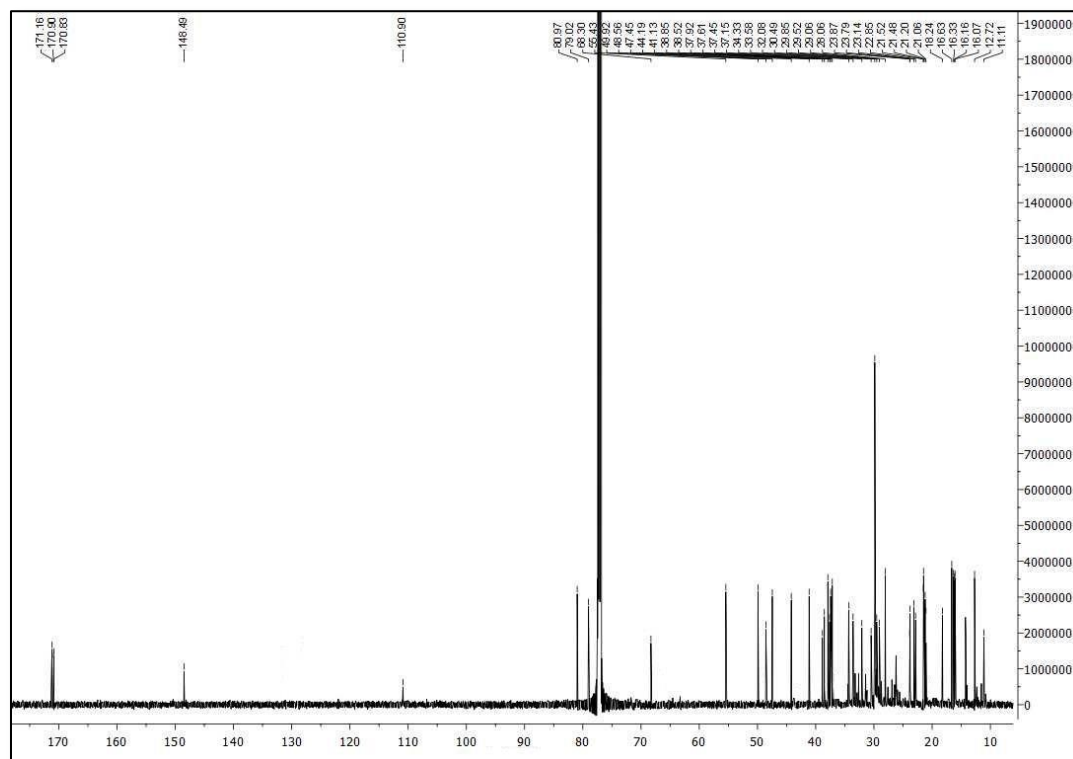
Espectro de RMN de ^1H del derivado **17** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **17** (MeOD- d_4)

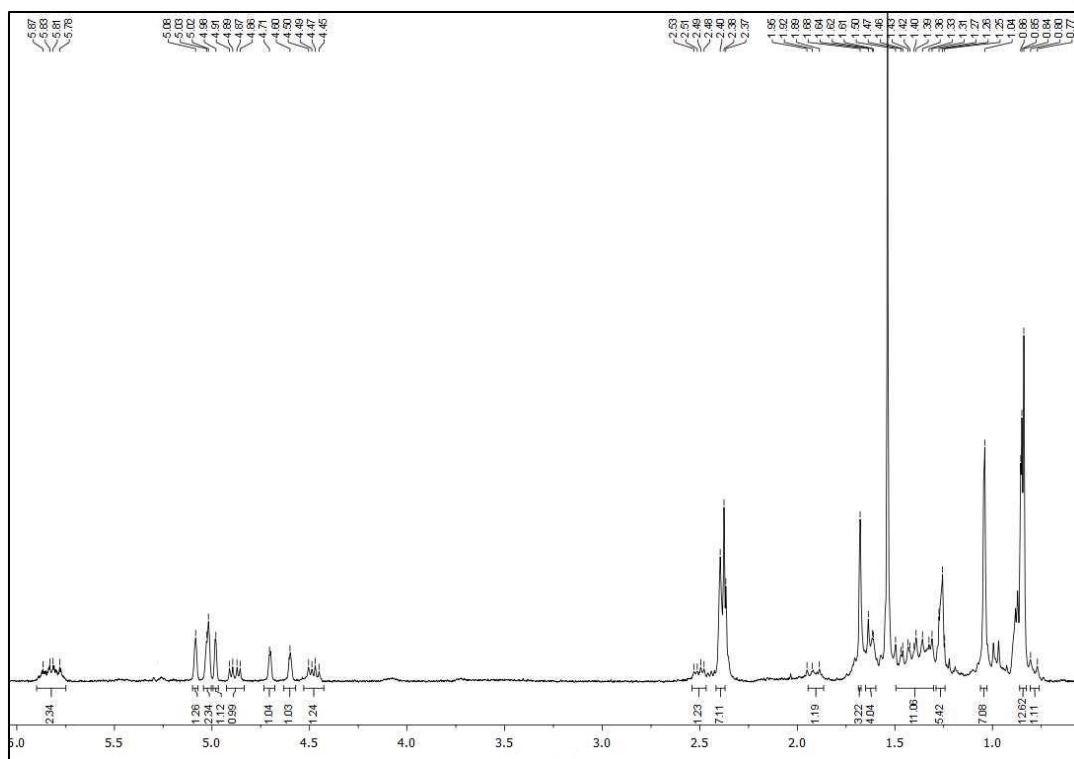
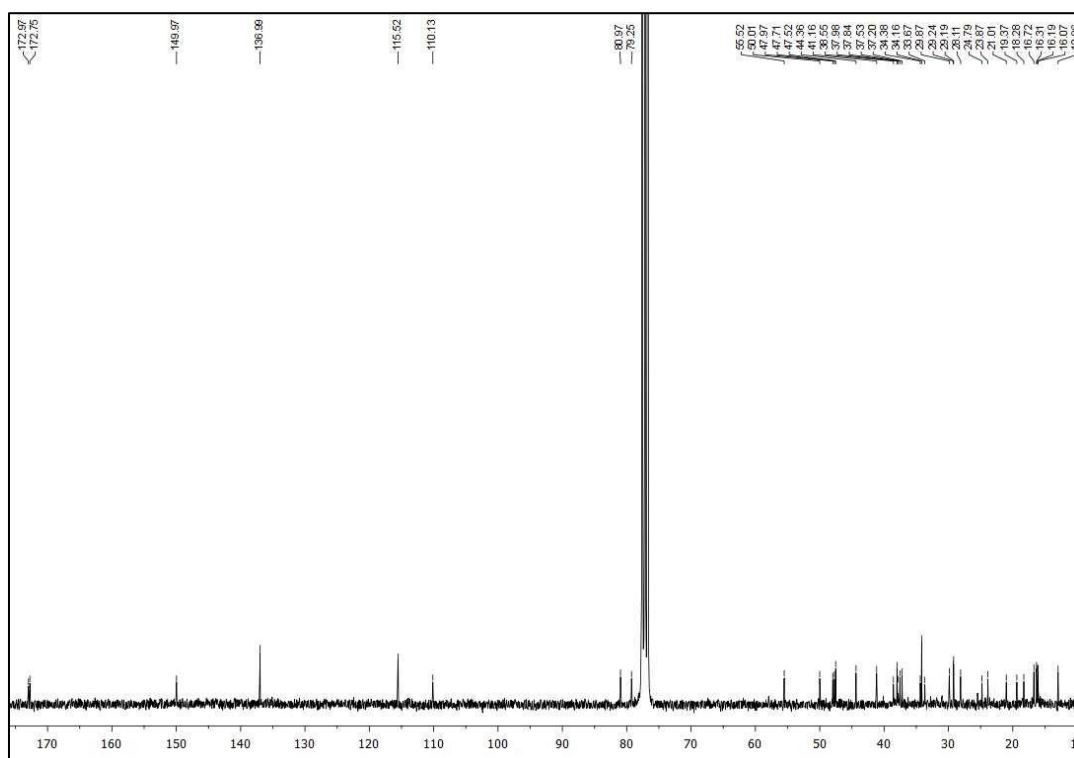
Espectro de RMN de ^1H del derivado **18** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **18** (MeOD- d_4)

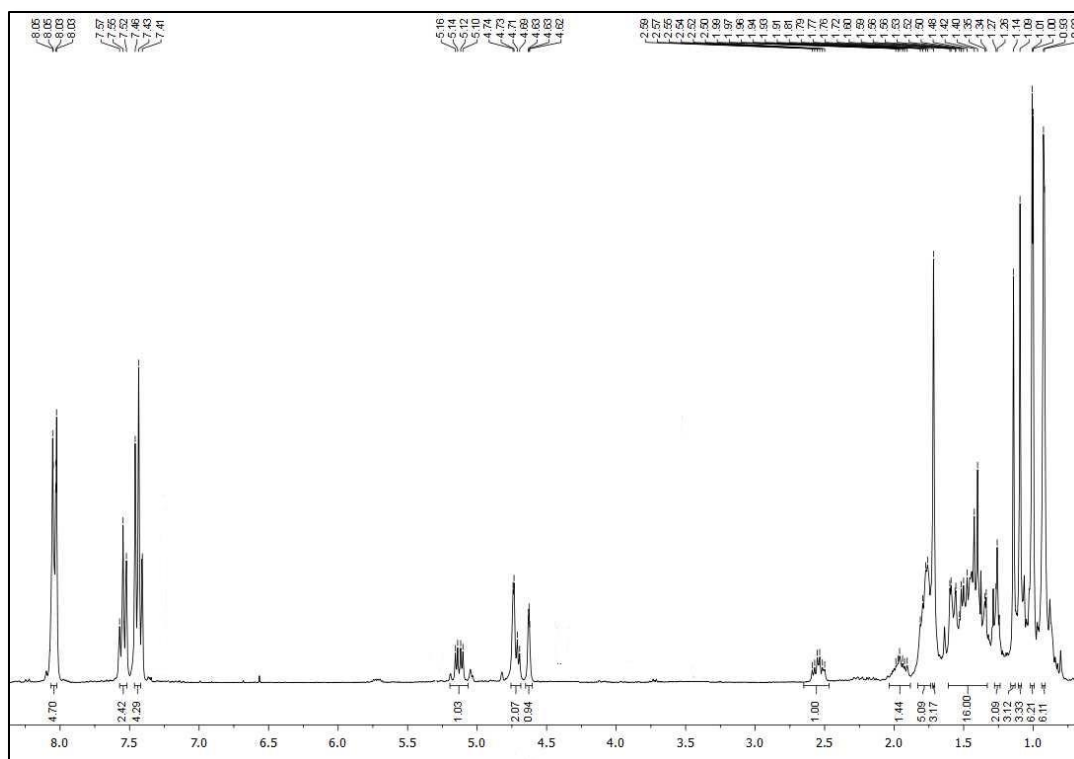
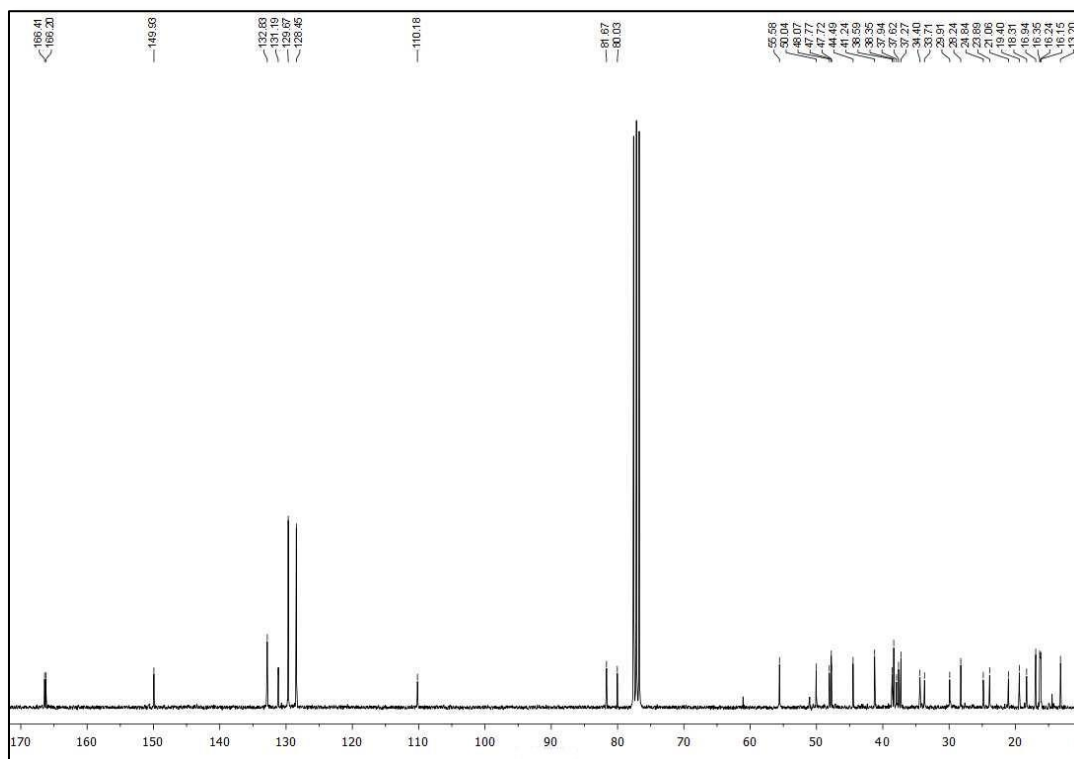
Espectro de RMN de ^1H del derivado **20** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **20** (CDCl_3)

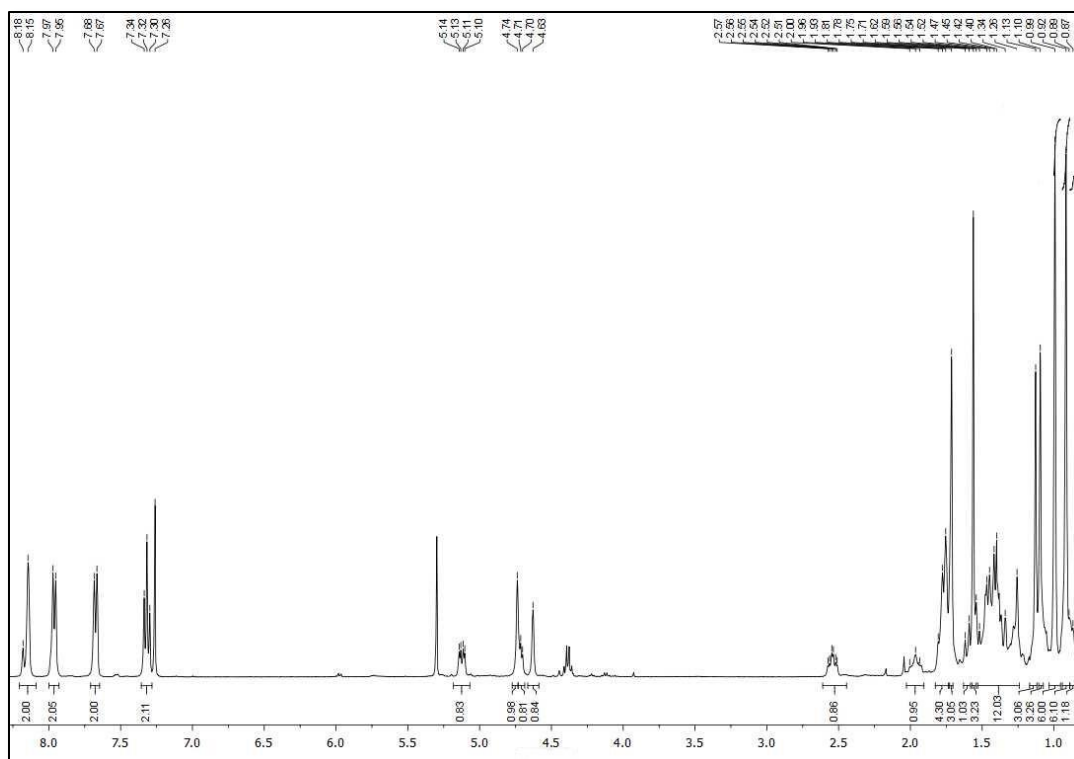
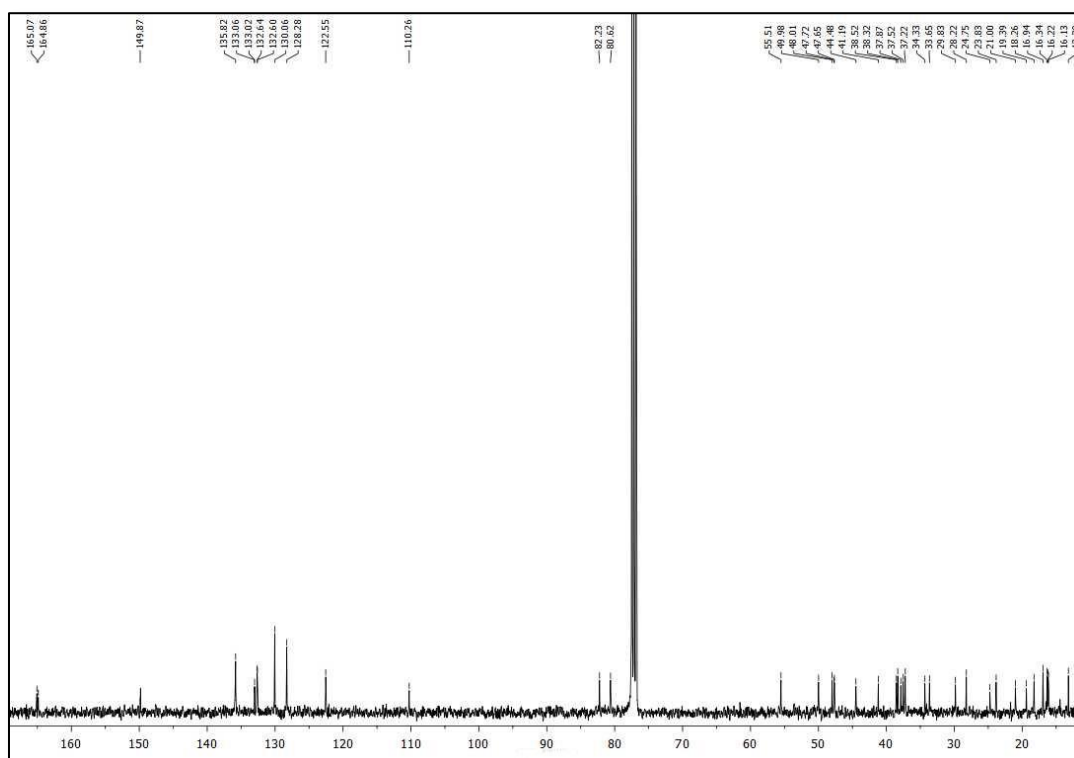
Espectro de RMN de ^1H del derivado **21** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **21** (CDCl_3)

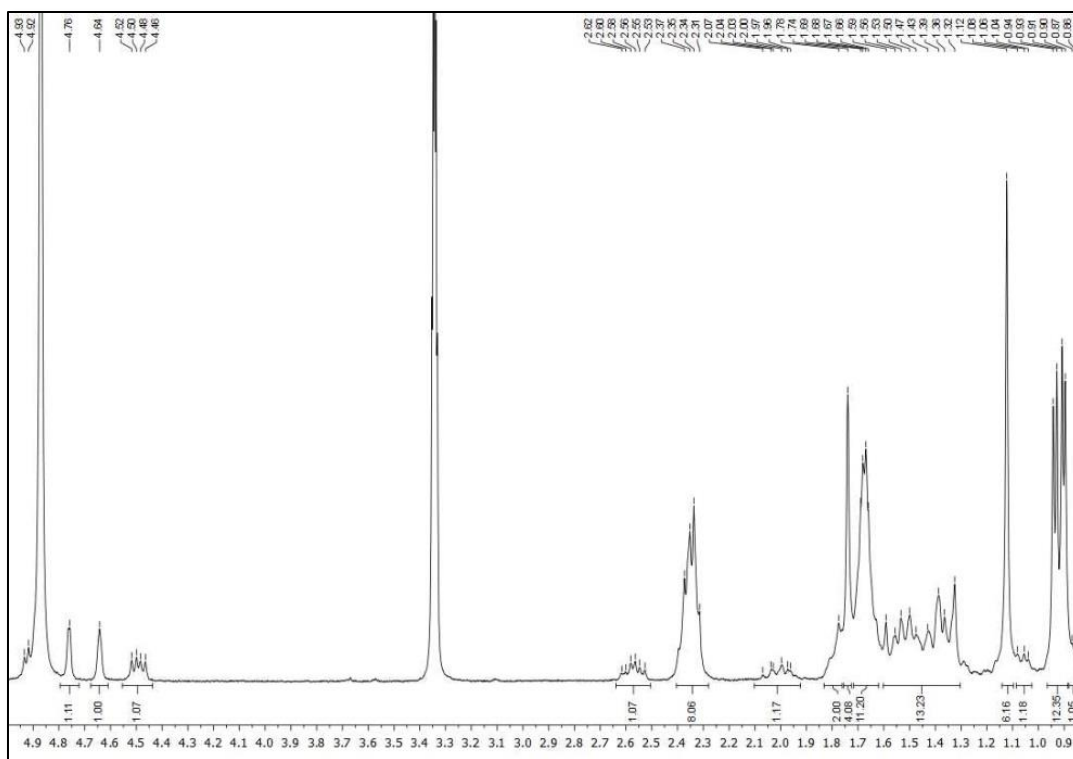
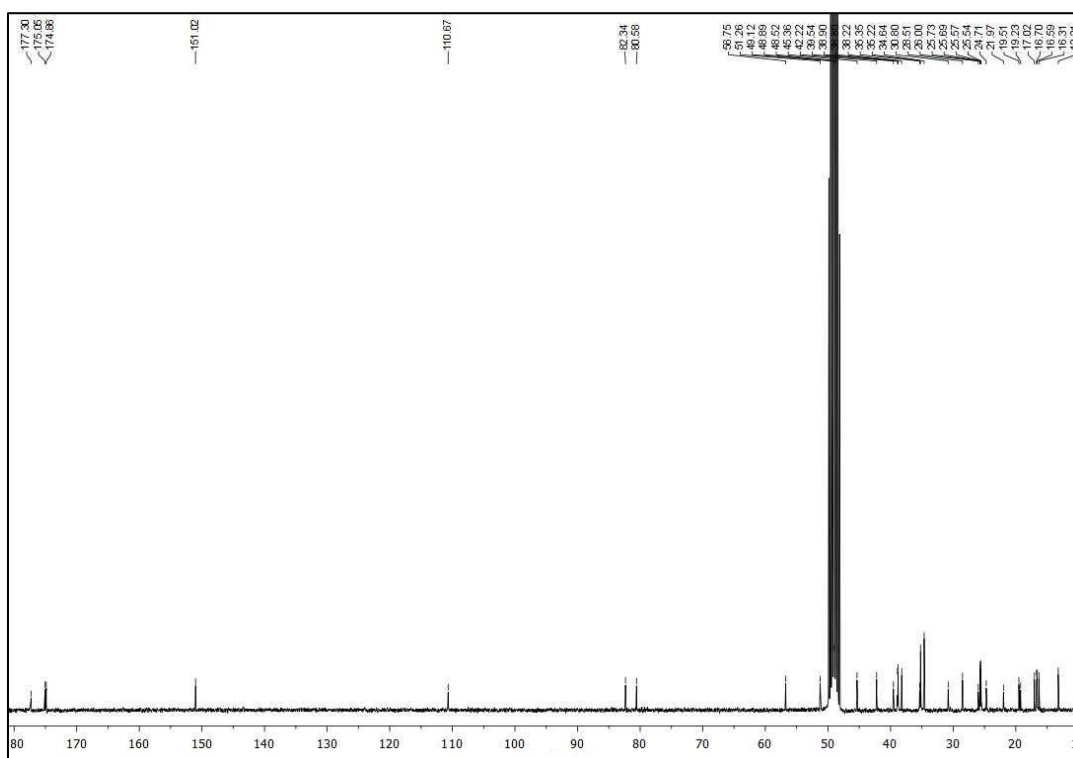
Espectro de RMN de ^1H del derivado **22** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **22** (CDCl_3)

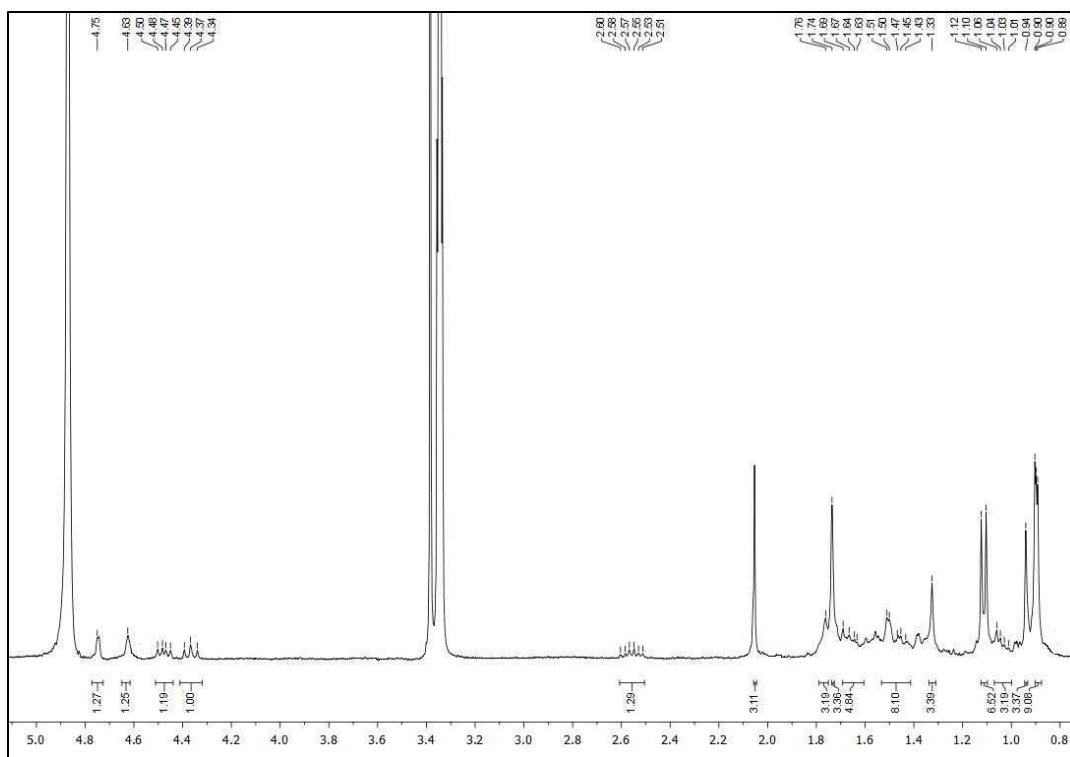
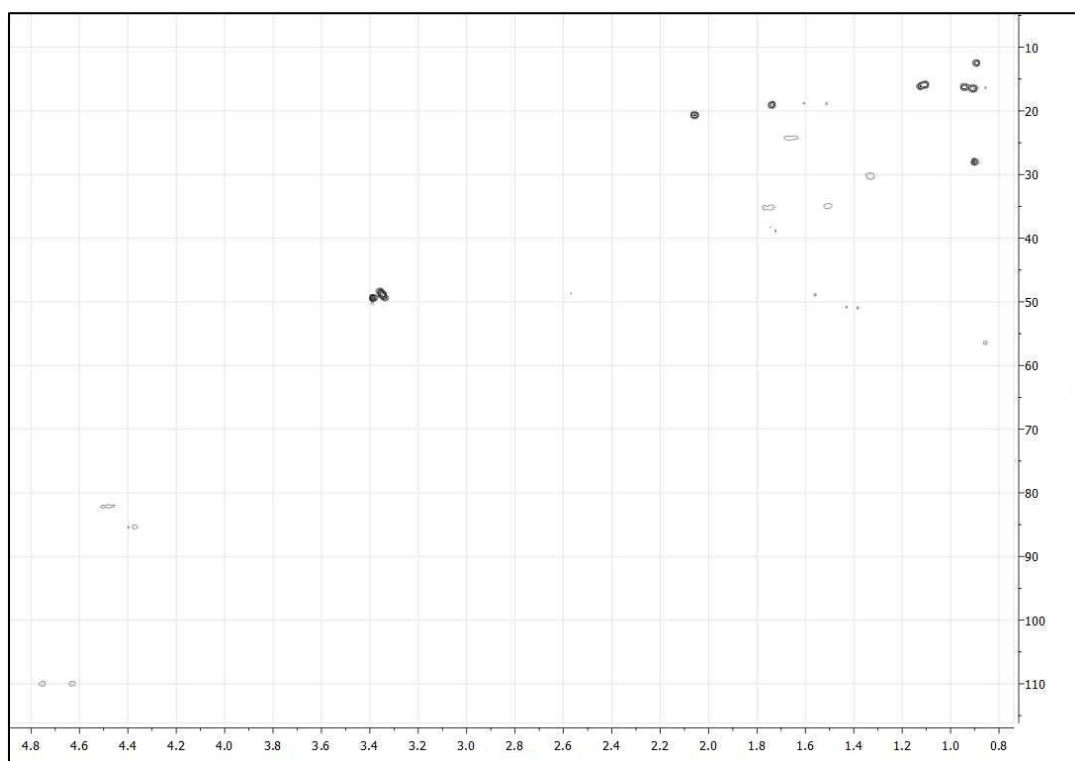
Espectro de RMN de ^1H del derivado **23** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **23** (CDCl_3)

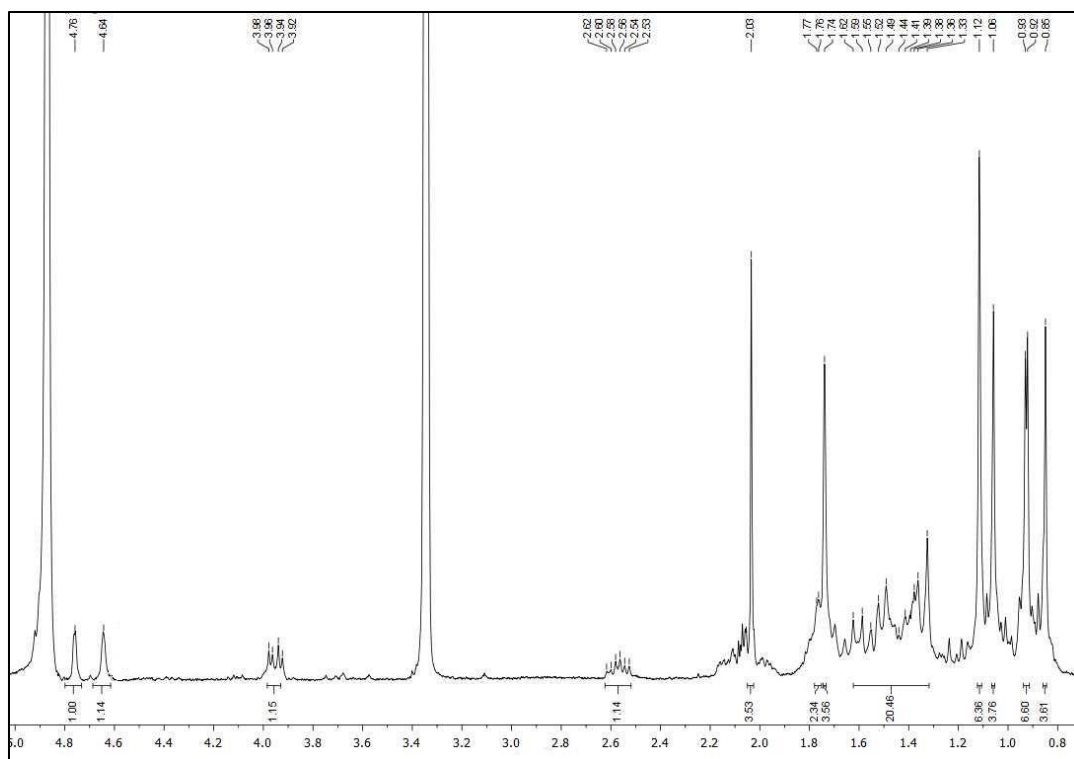
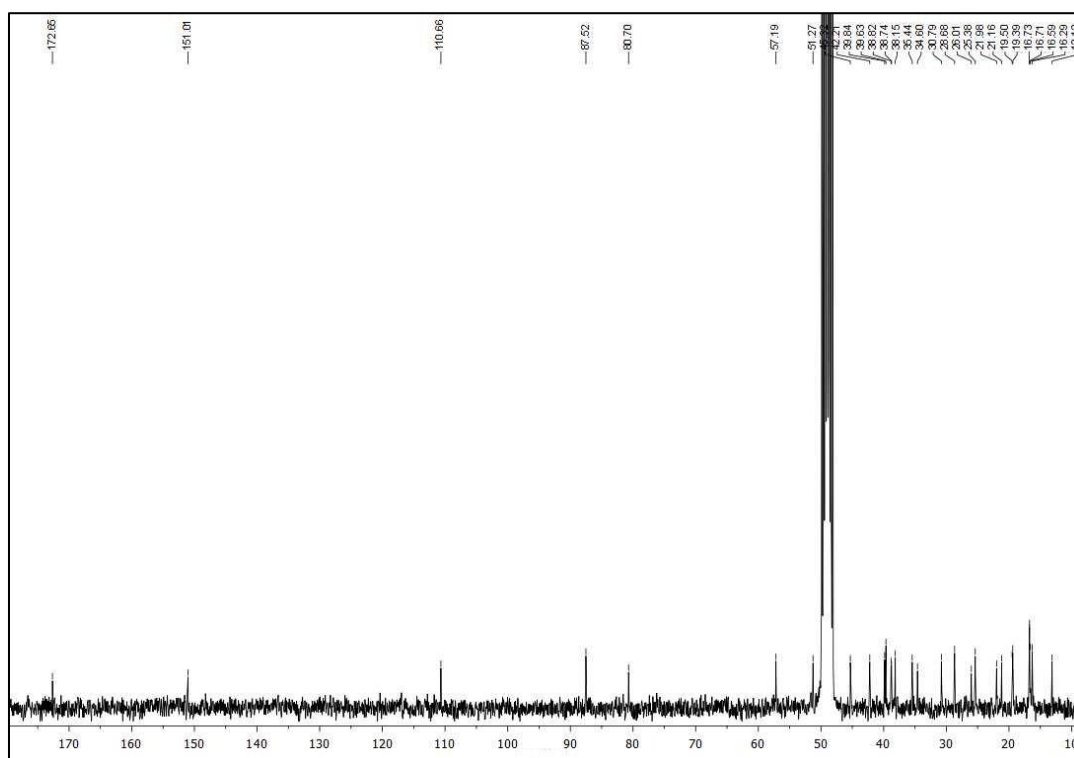
Espectro de RMN de ^1H del derivado **24** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **24** (CDCl_3)

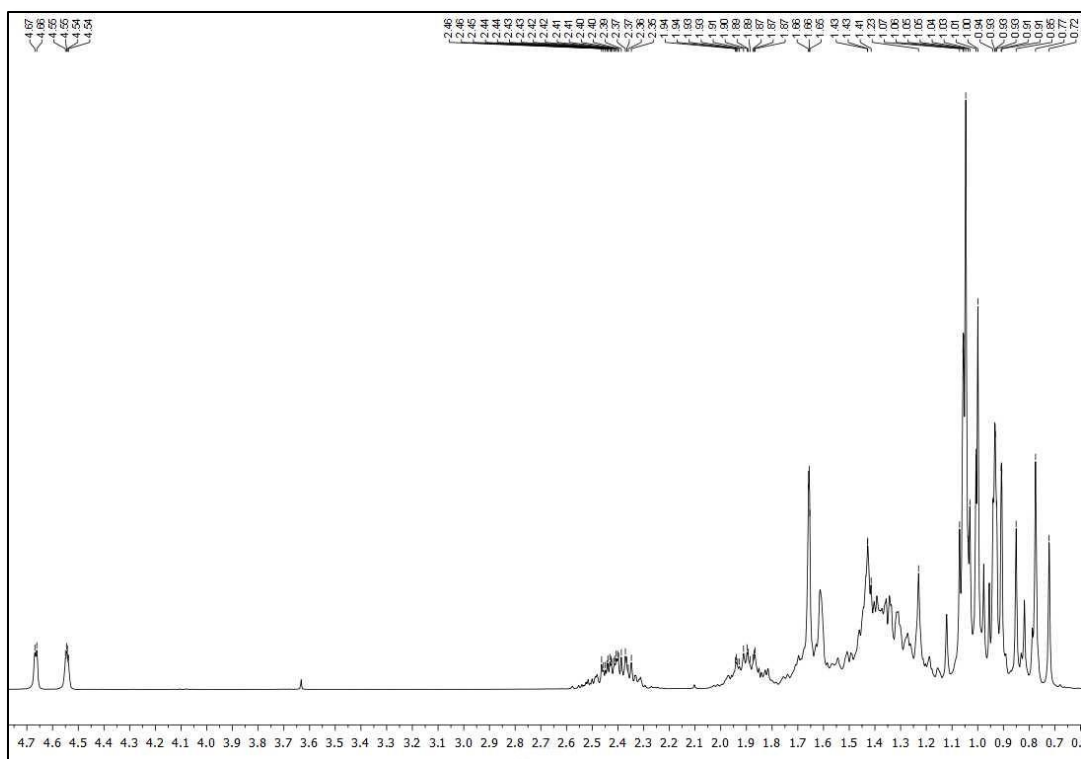
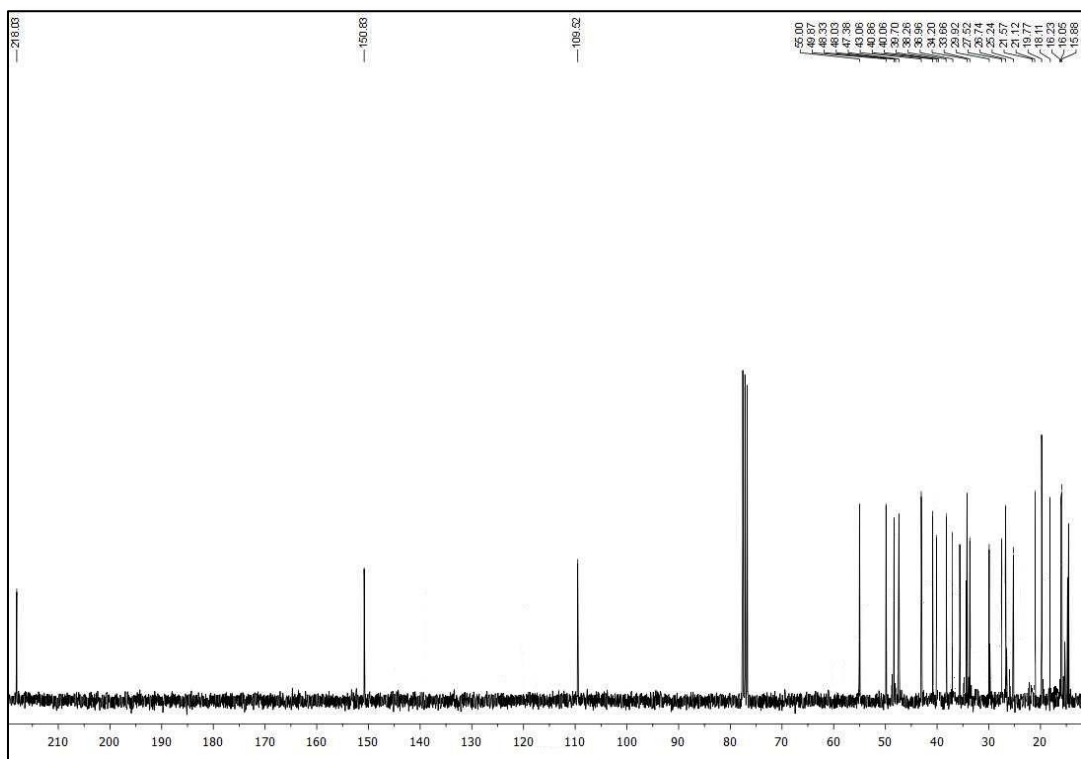
Espectro de RMN de ^1H del derivado **25** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **25** (CDCl_3)

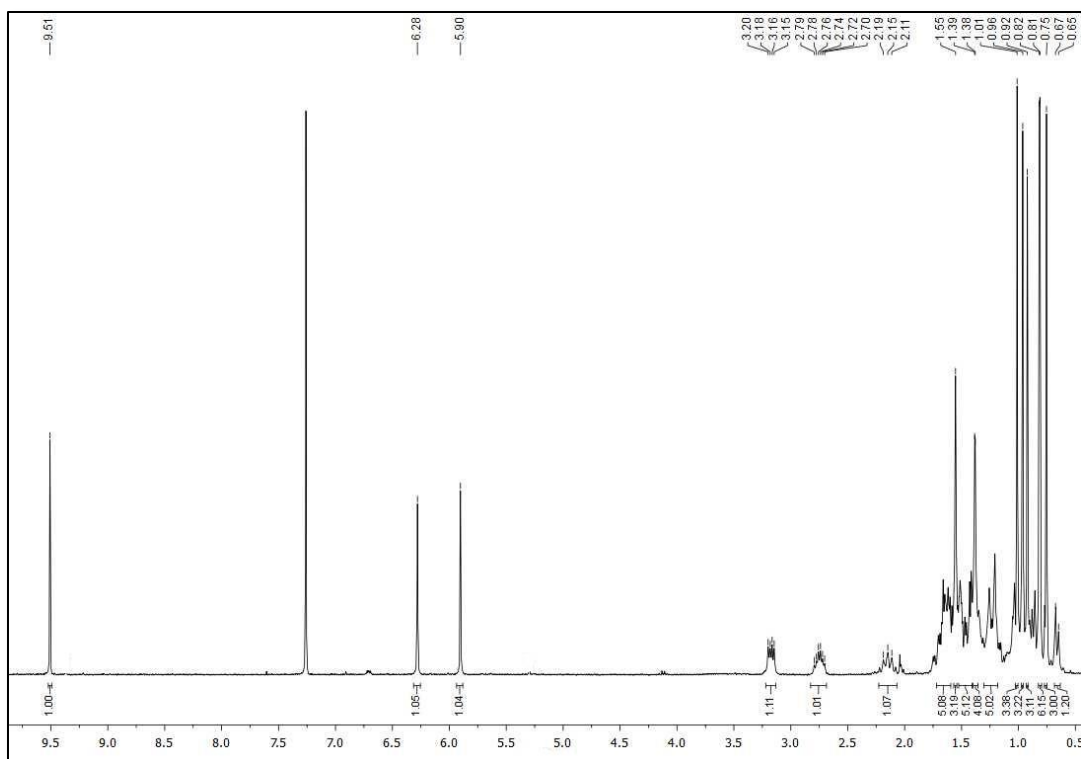
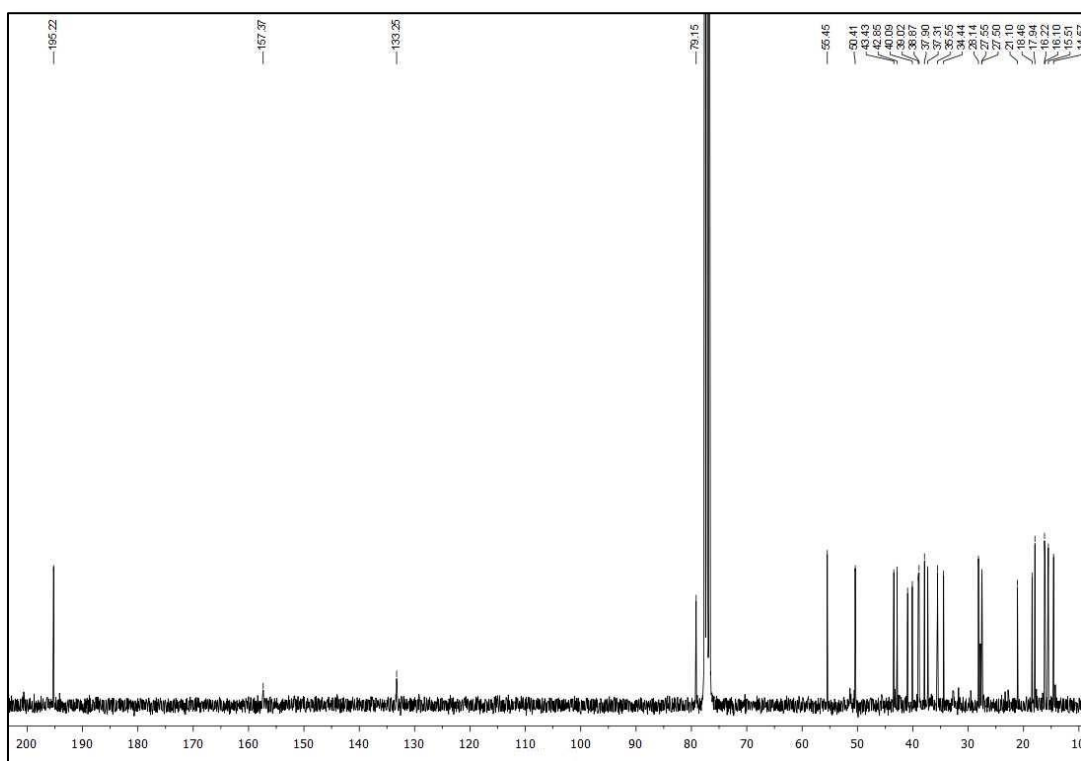
Espectro de RMN de ^1H del derivado **26** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **26** (CDCl_3)

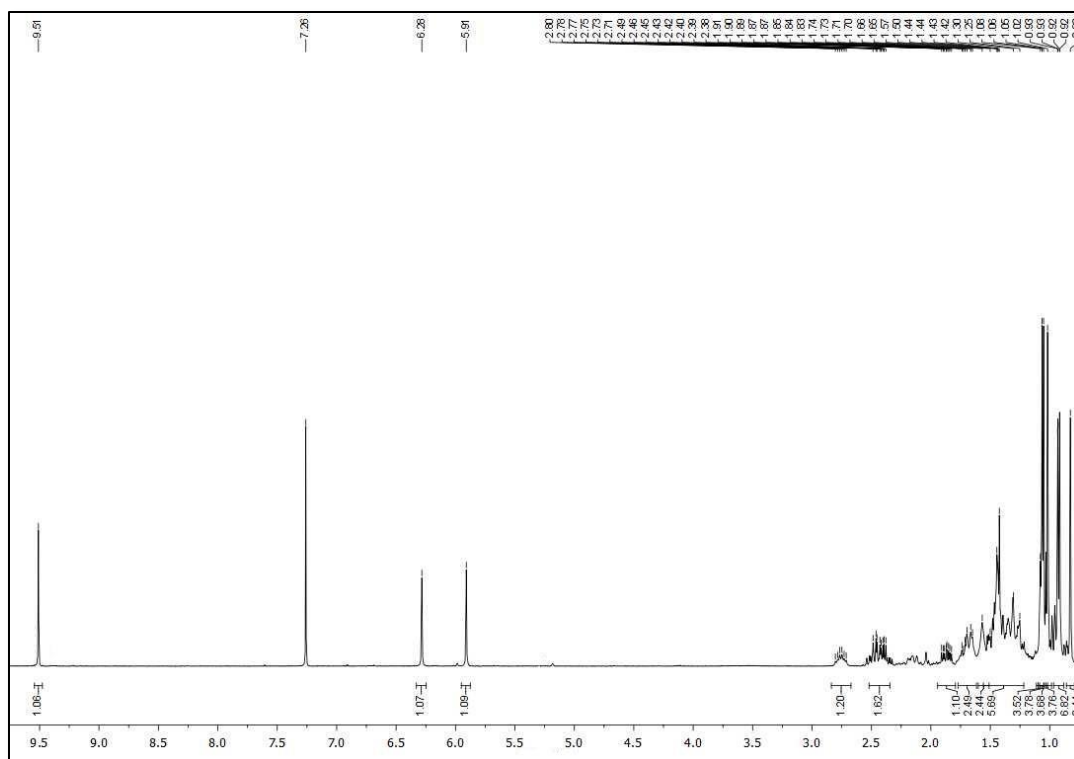
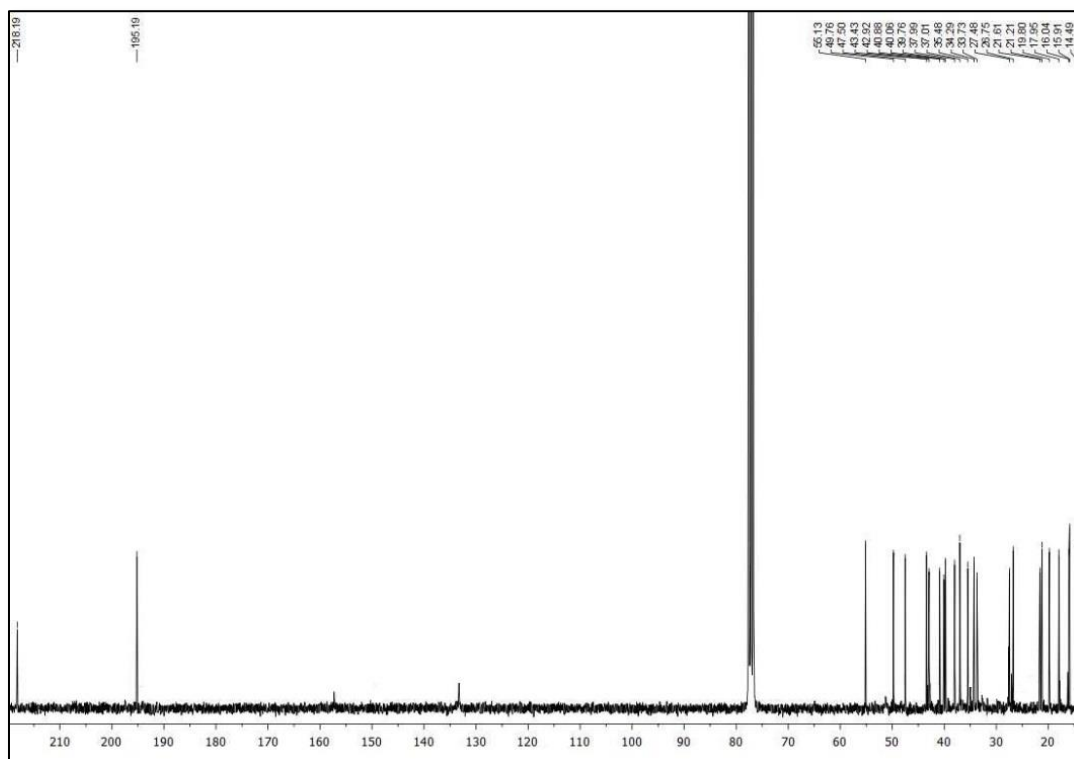
Espectro de RMN de ^1H del derivado **27** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **27** (MeOD- d_4)

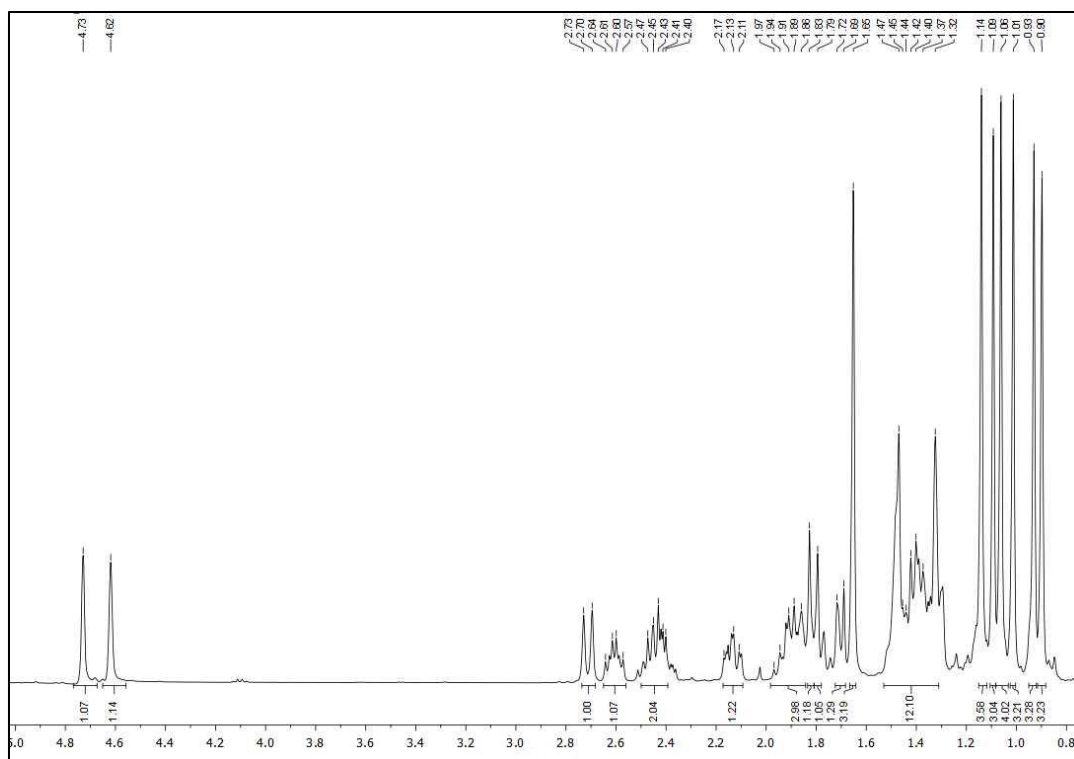
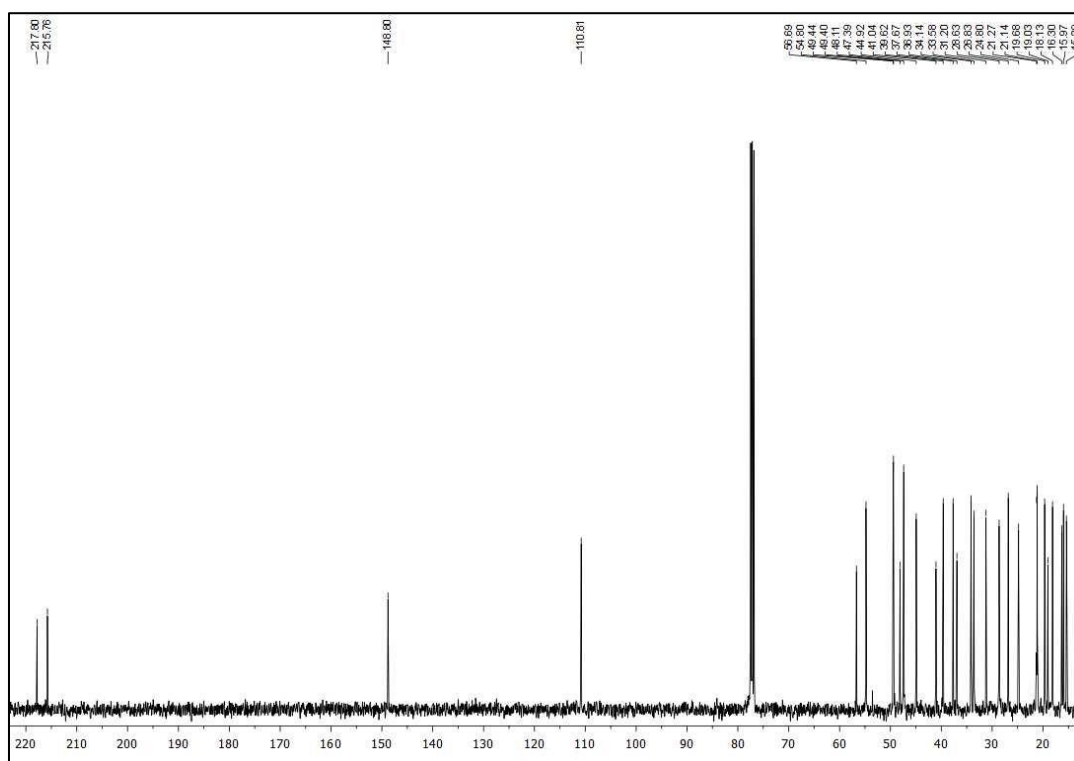
Espectro de RMN de ^1H del derivado **28** (MeOD- d_4)Espectro HSQC del derivado **28** (MeOD- d_4)

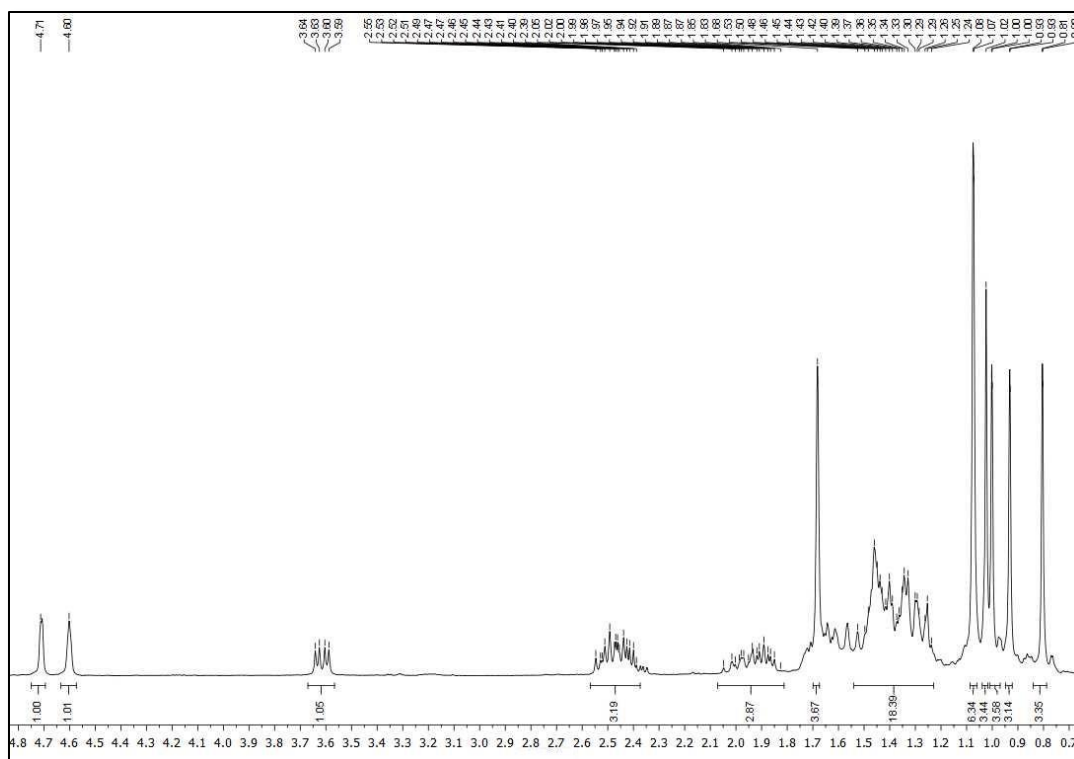
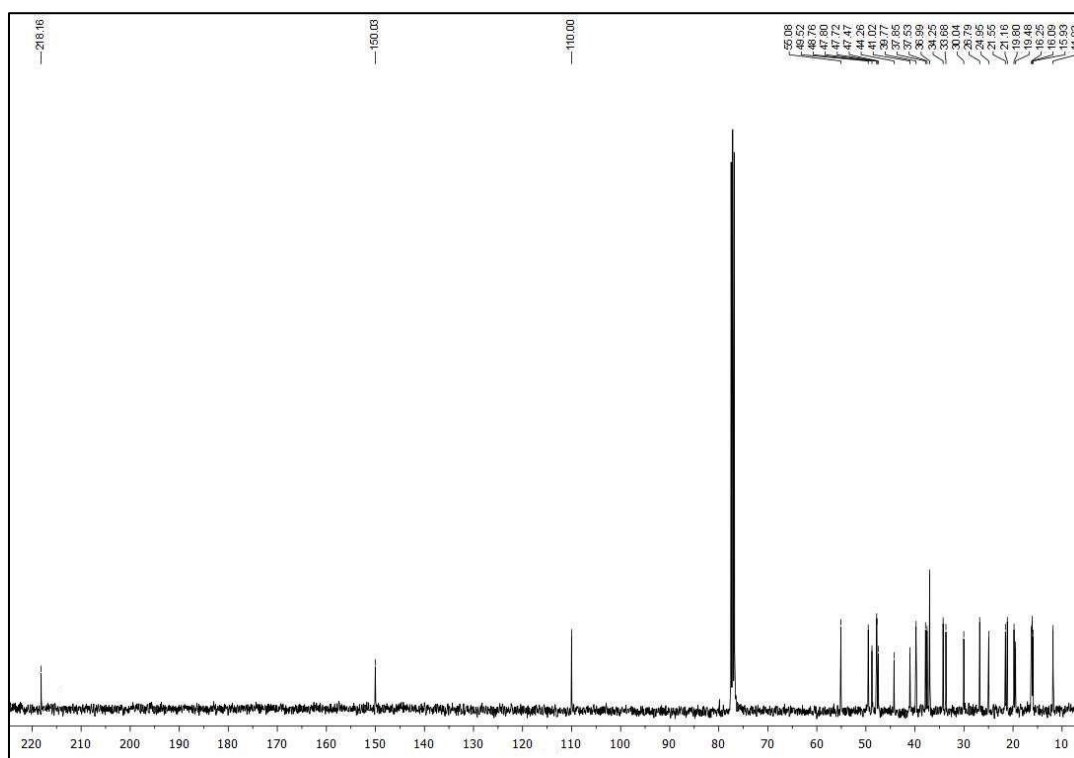
Espectro de RMN de ^1H del derivado **29** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **29** (MeOD- d_4)

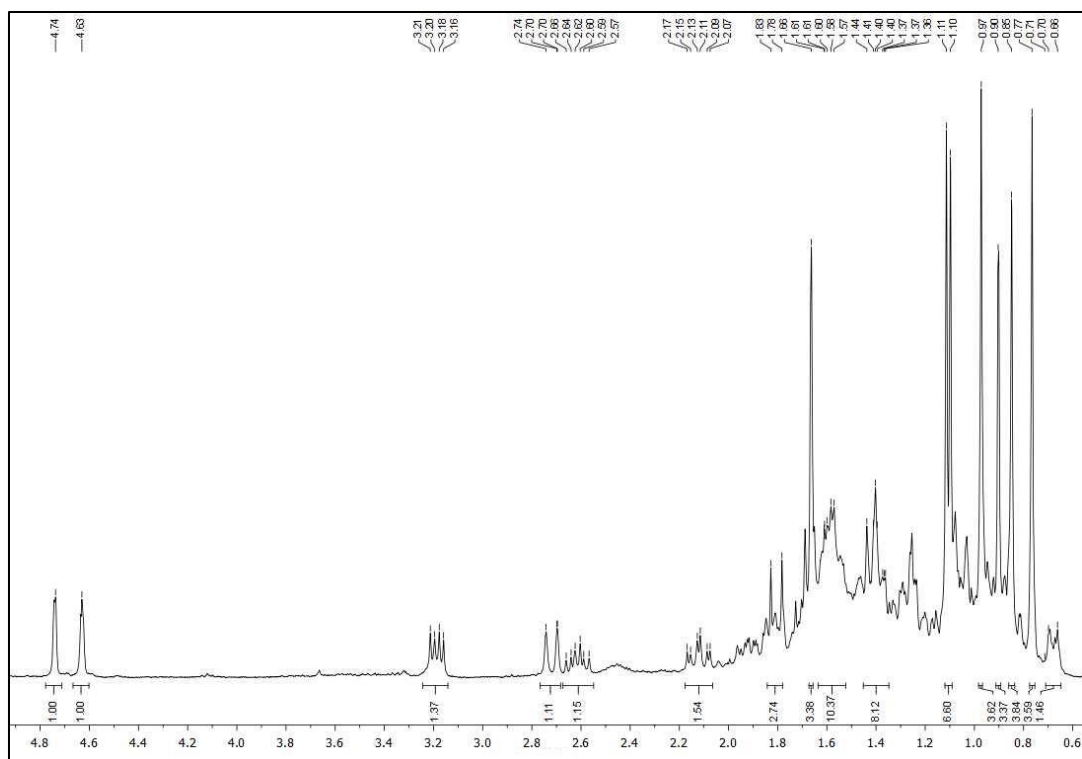
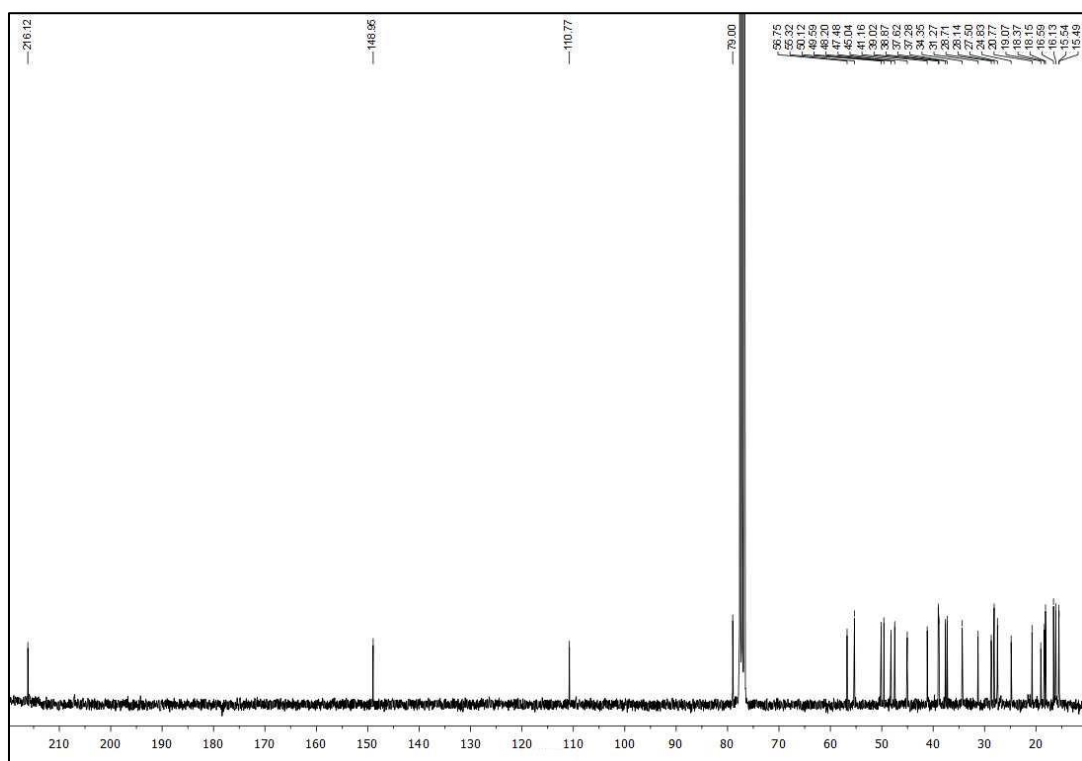
Espectro de RMN de ^1H del derivado **30** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **30** (CDCl_3)

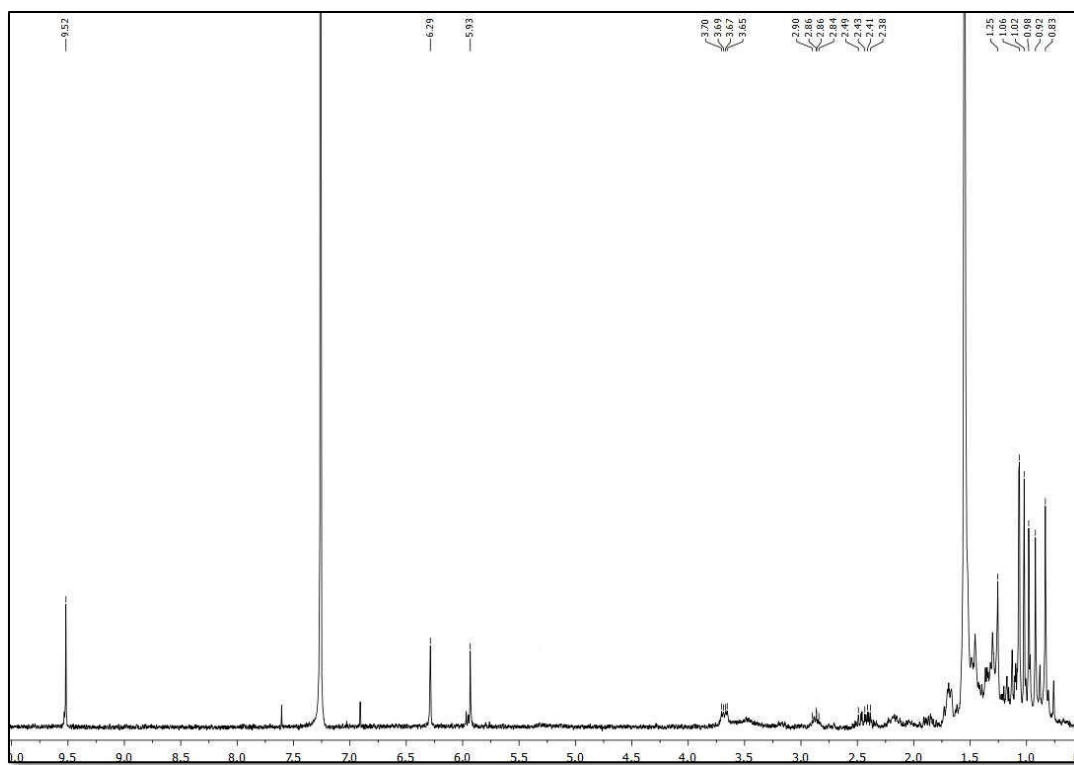
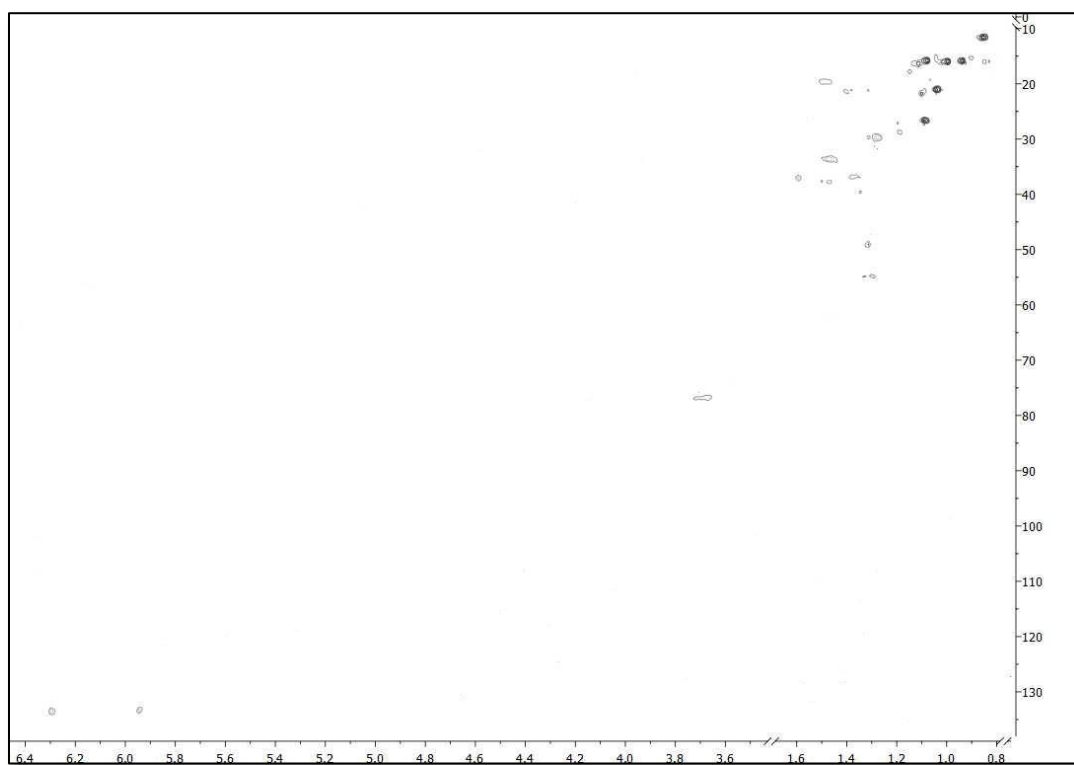
Espectro de RMN de ^1H del derivado **31** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **31** (CDCl_3)

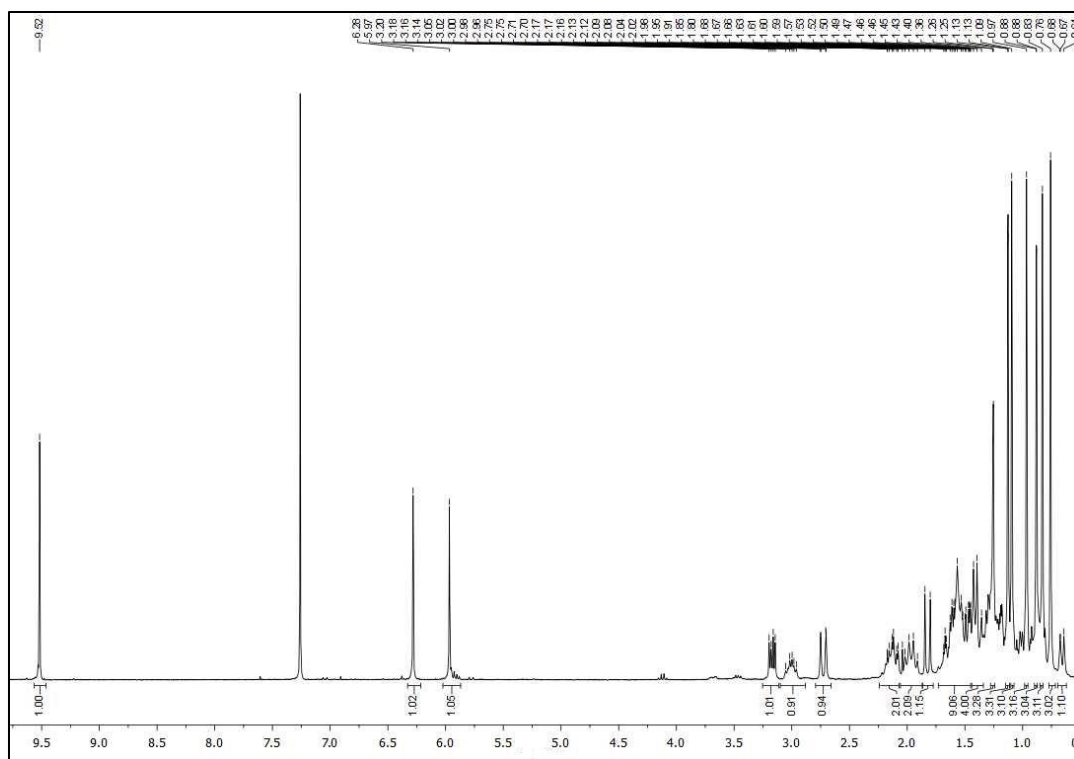
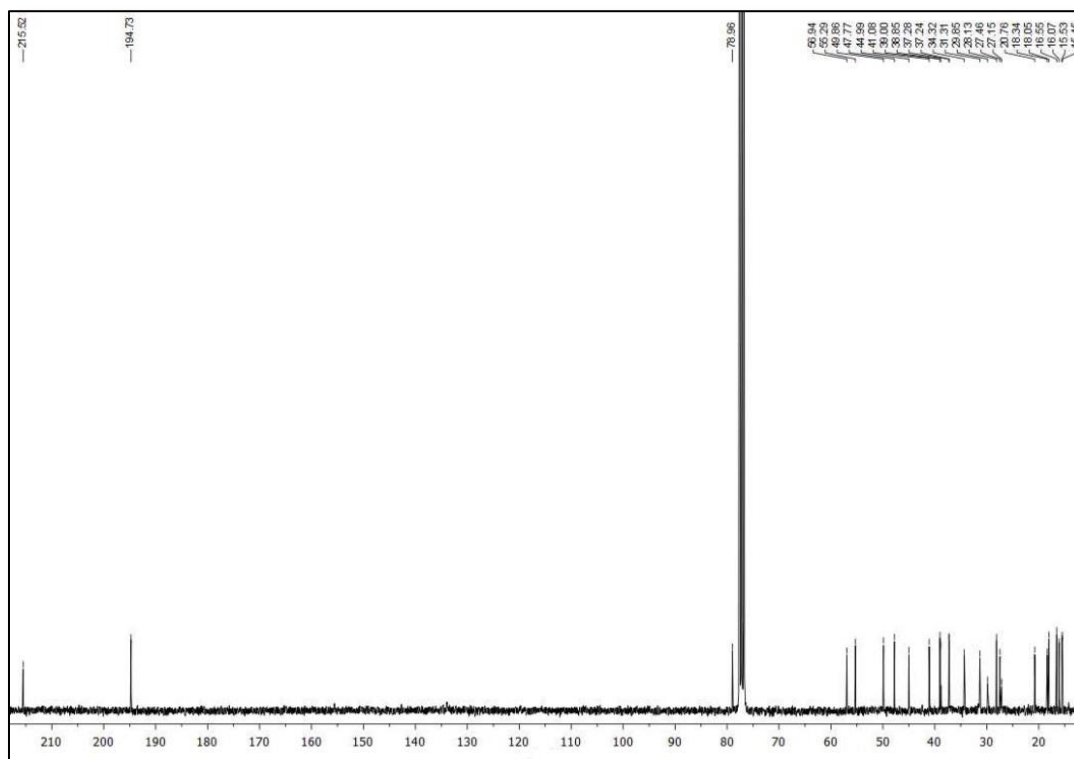
Espectro de RMN de ^1H del derivado **32** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **32** (CDCl_3)

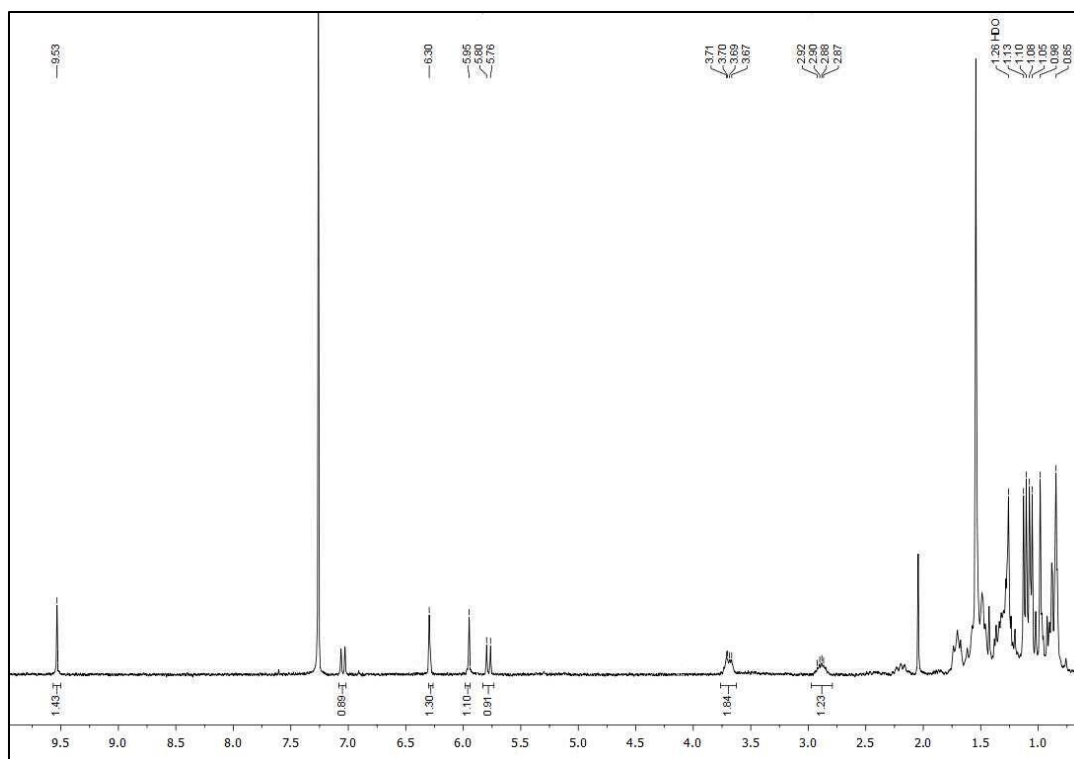
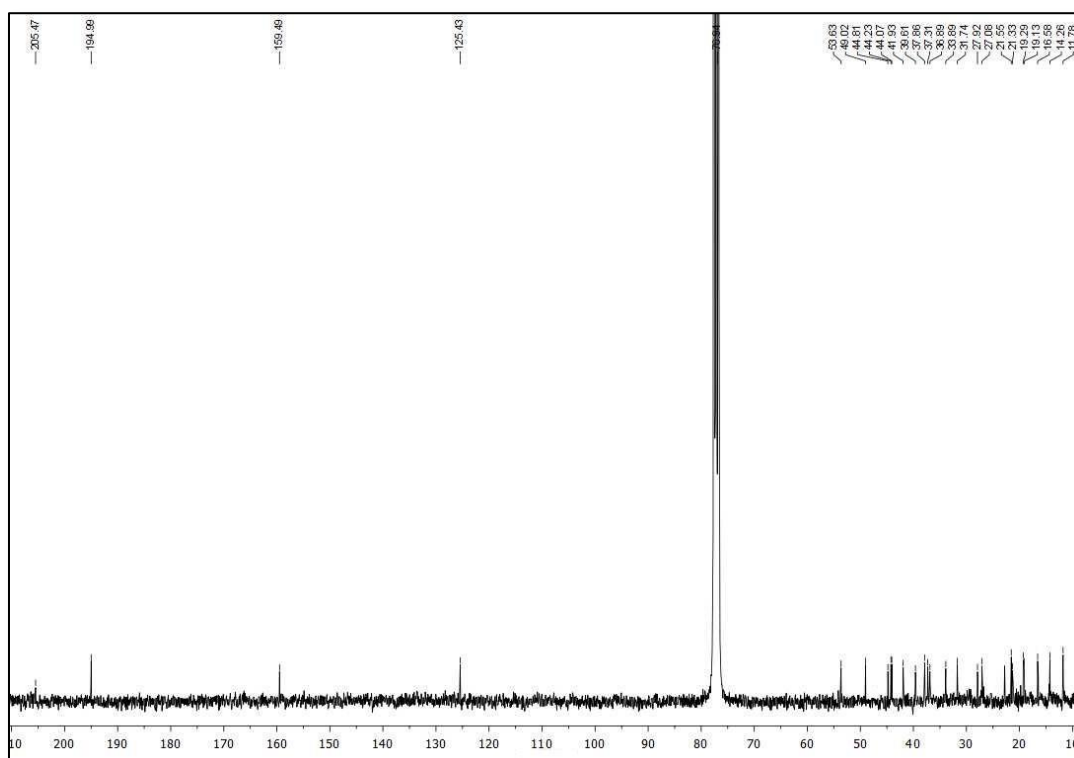
Espectro de RMN de ^1H del derivado **33** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **33** (CDCl_3)

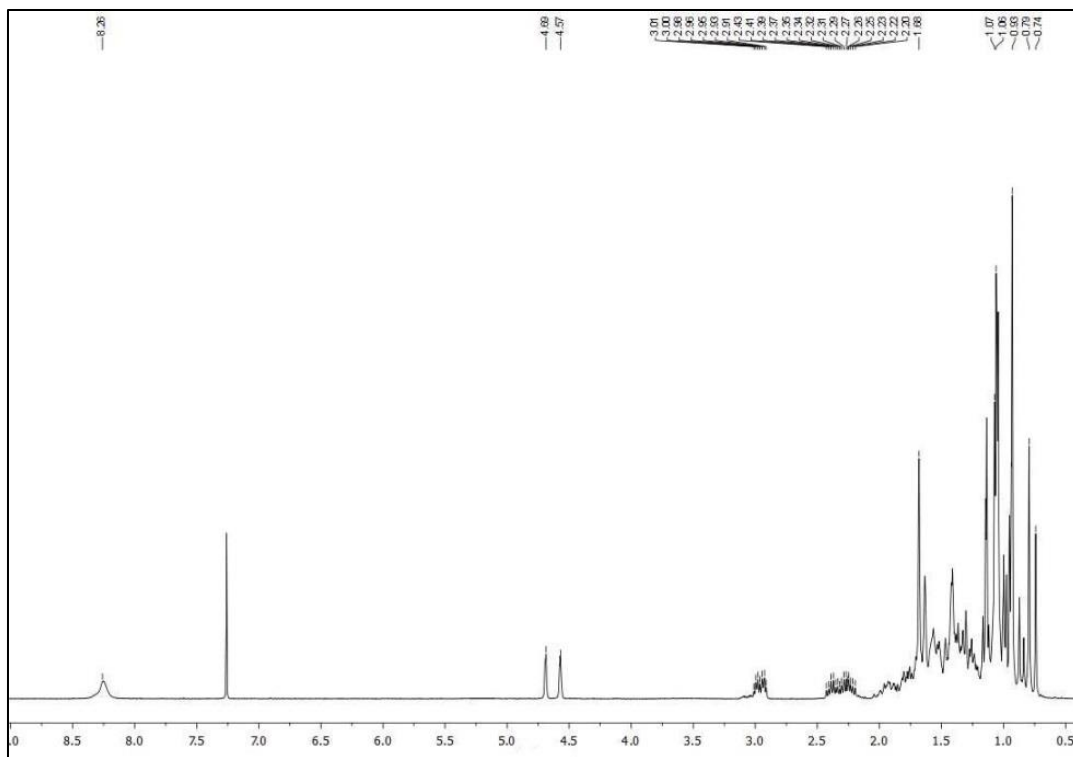
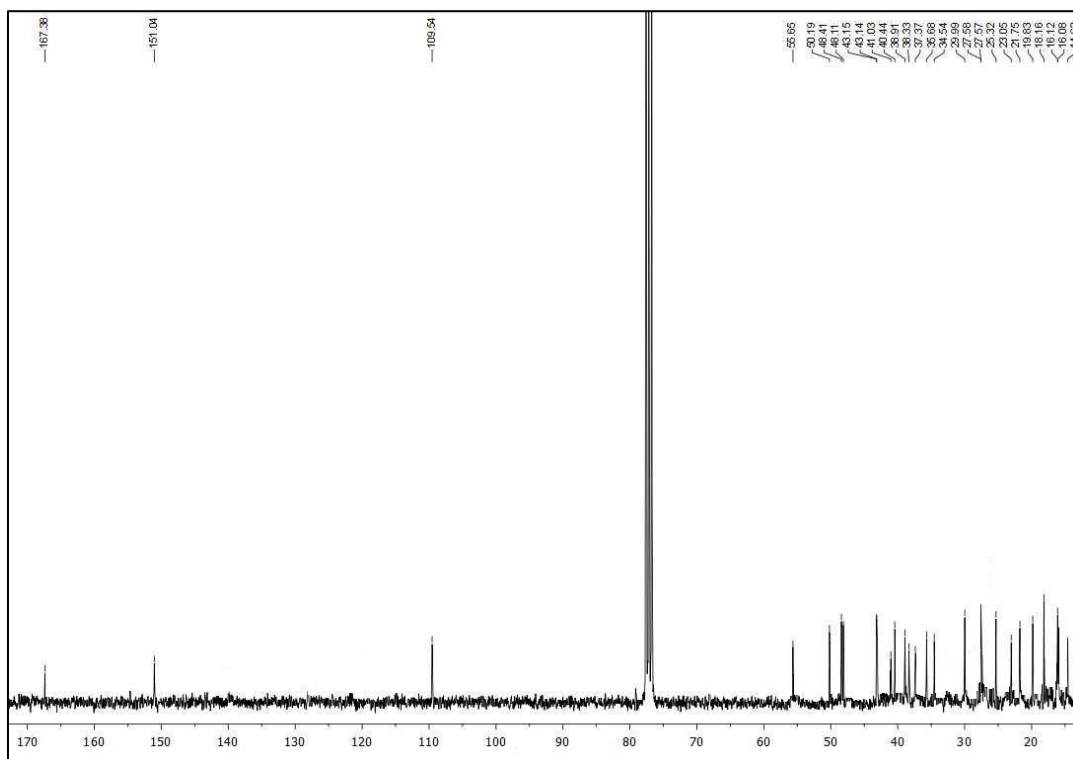
Espectro de RMN de ^1H del derivado **34** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **34** (CDCl_3)

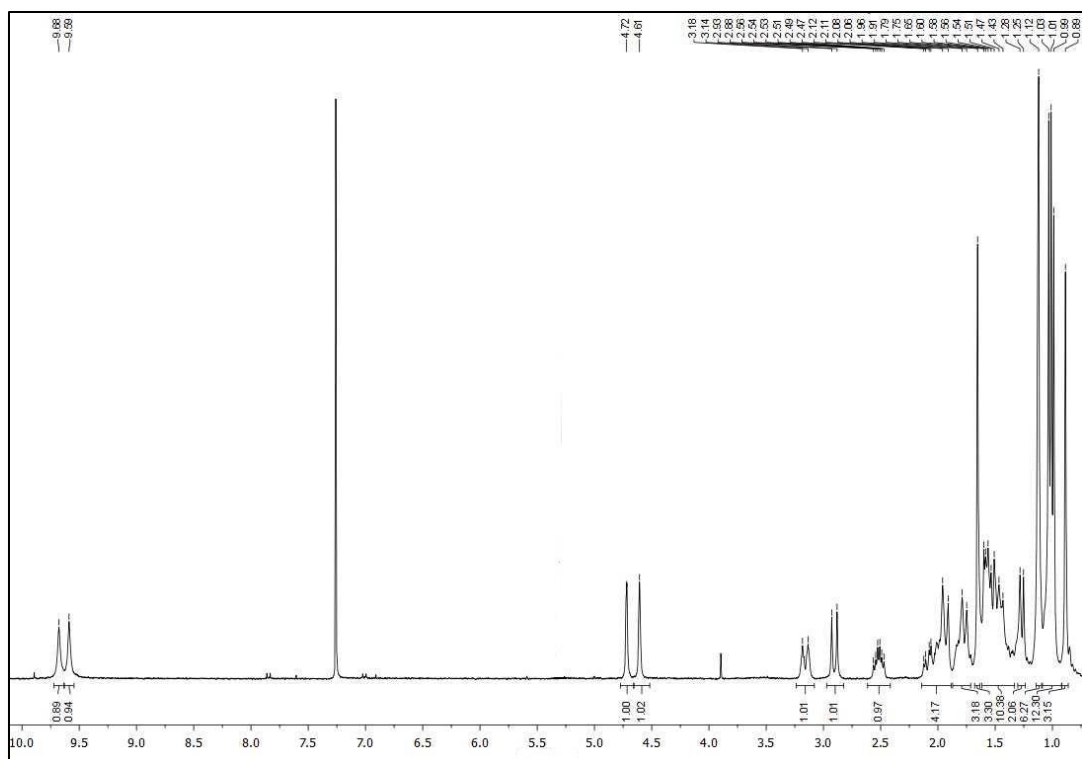
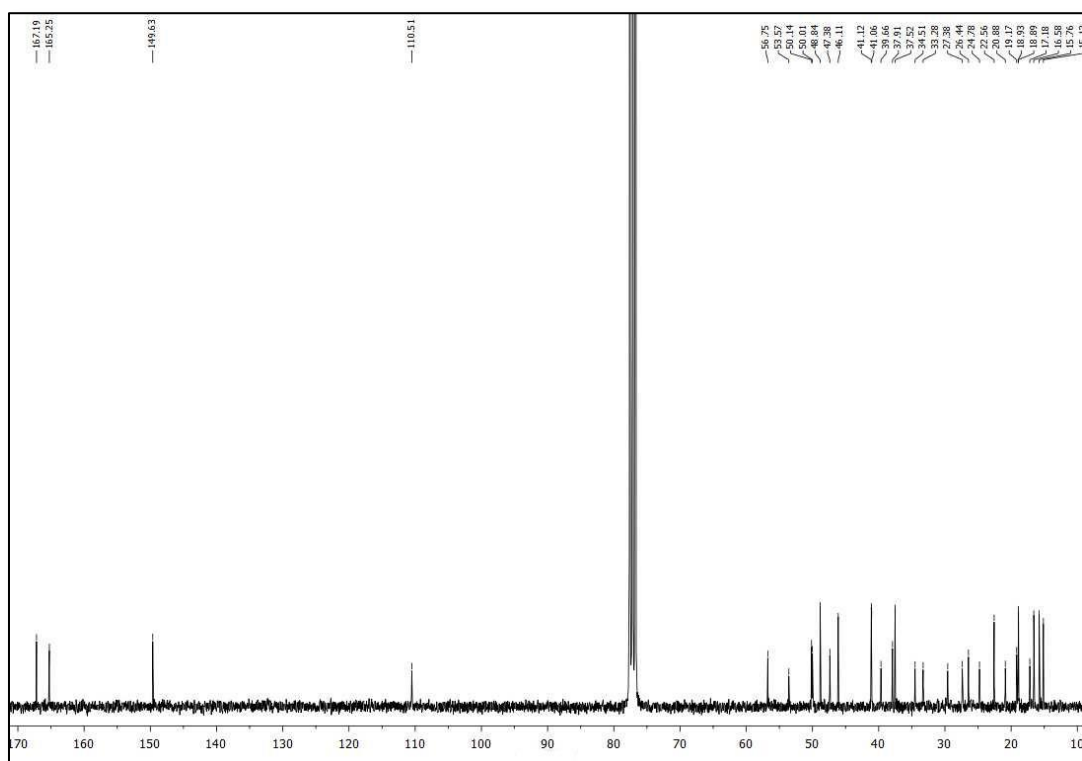
Espectro de RMN de ^1H del derivado **35** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **35** (CDCl_3)

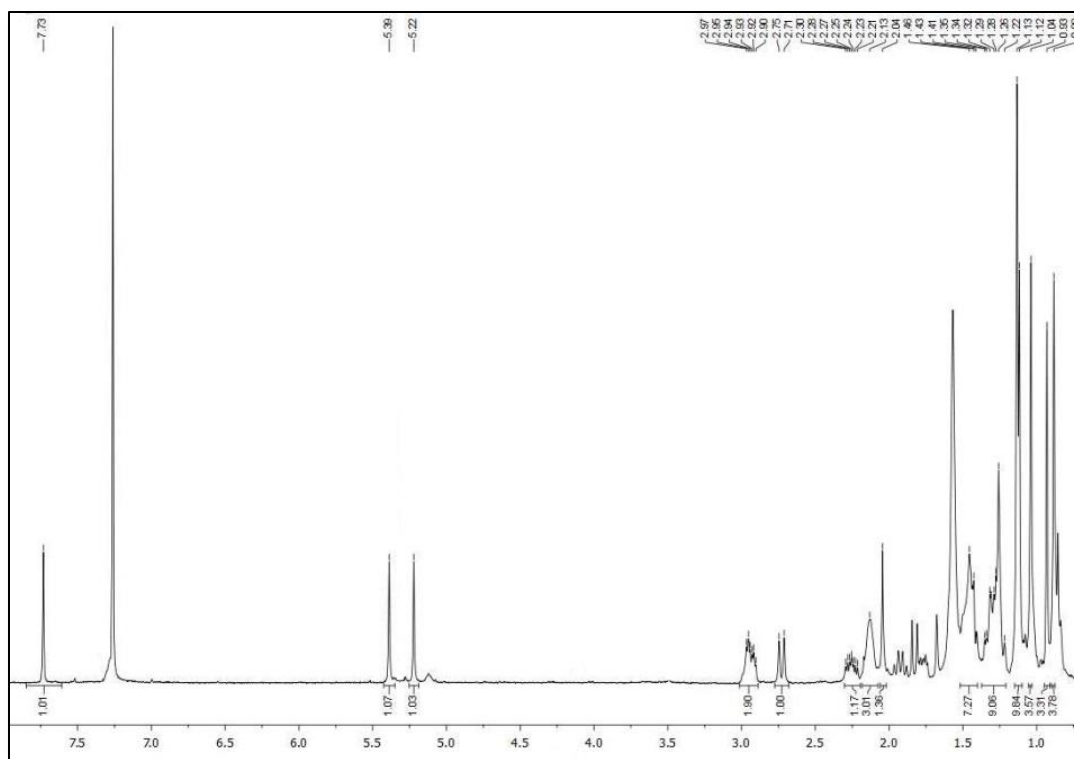
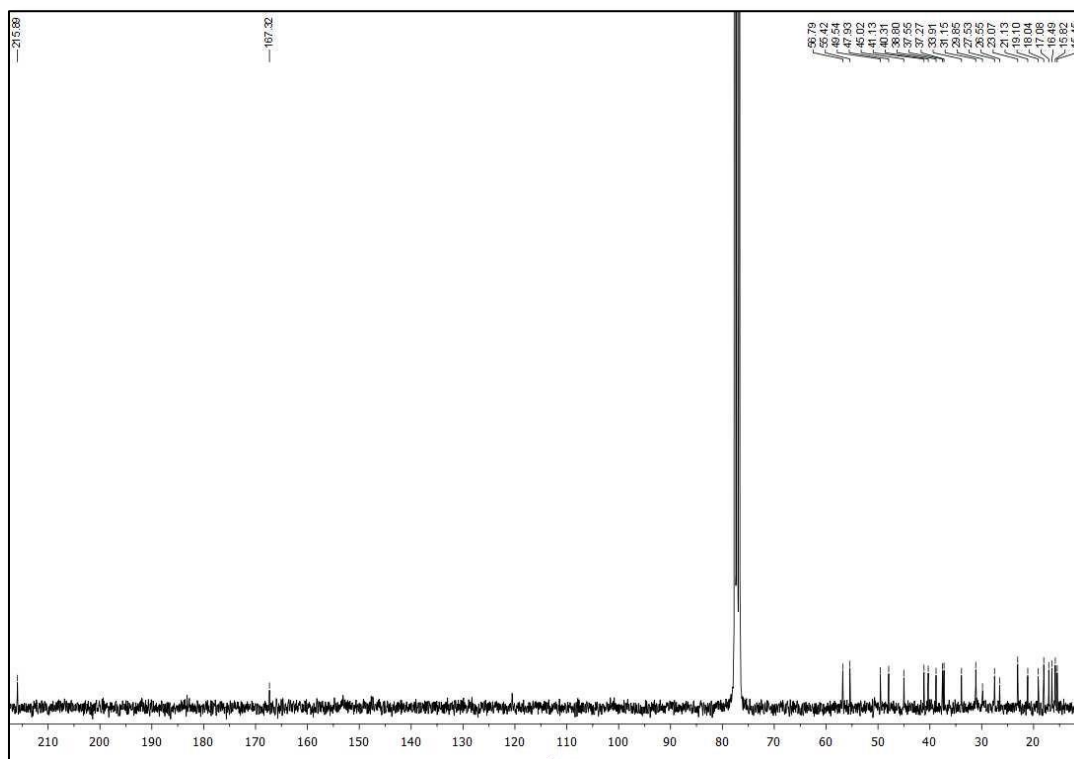
Espectro de RMN de ^1H del derivado **37** (CDCl_3)Espectro HSQC del derivado **37** (CDCl_3)

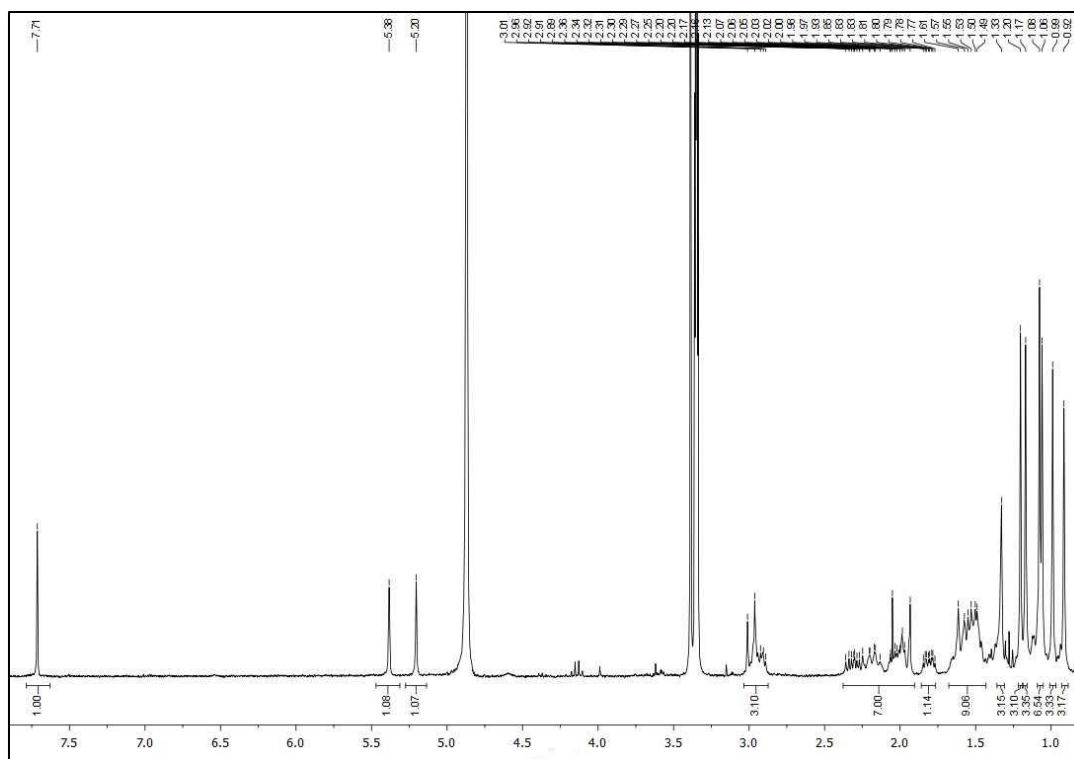
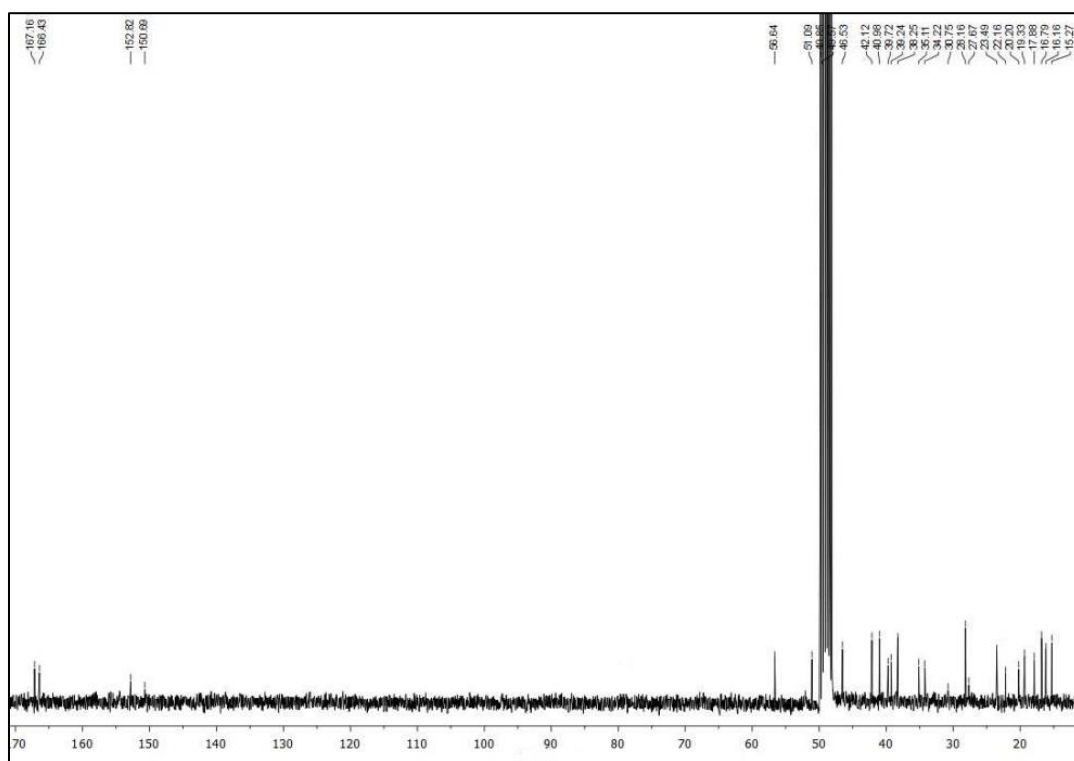
Espectro de RMN de ^1H del derivado **38** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **38** (CDCl_3)

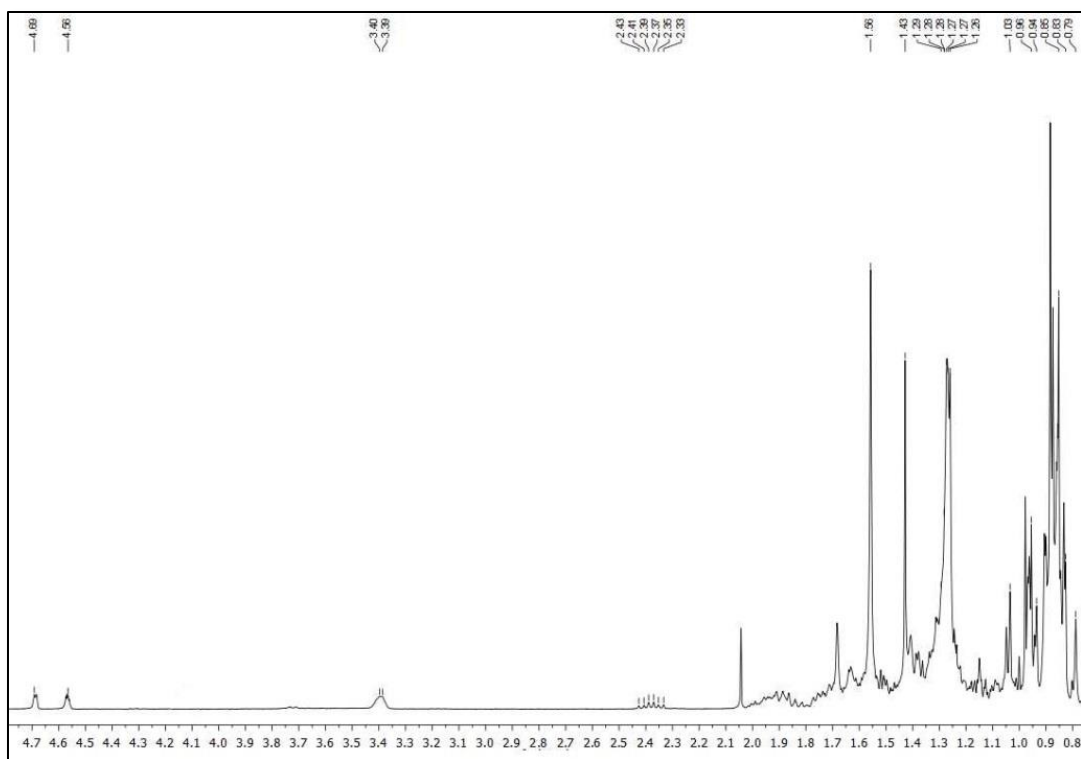
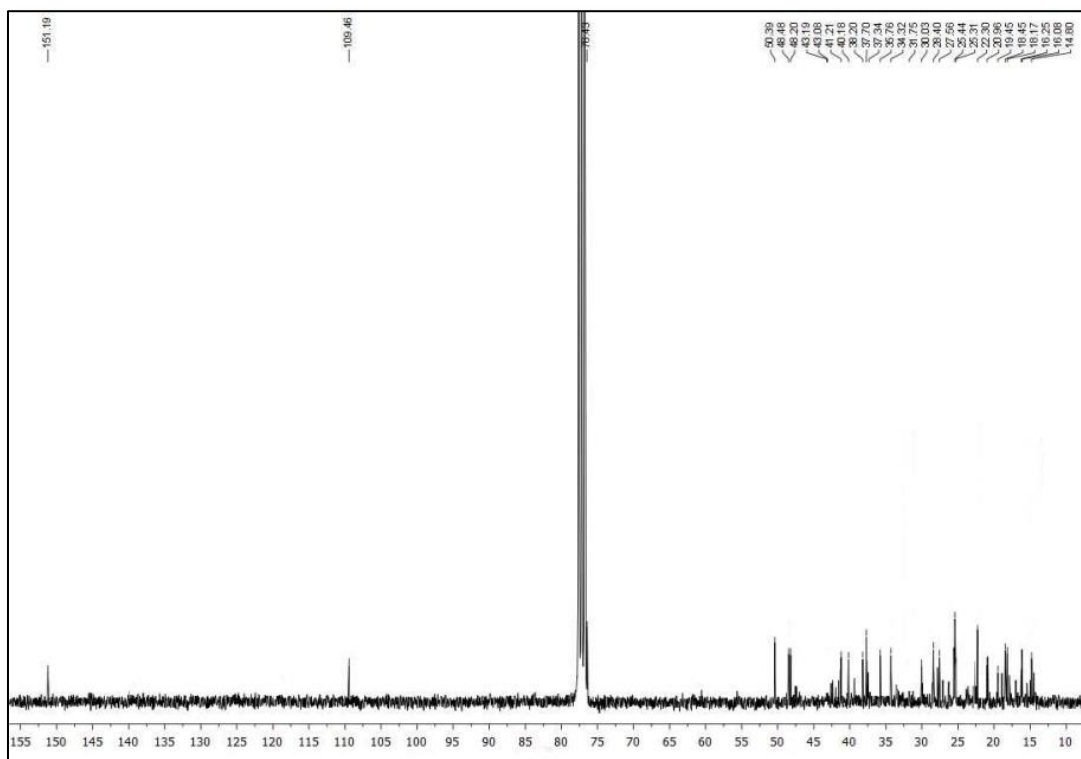
Espectro de RMN de ^1H del derivado **39** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **39** (CDCl_3)

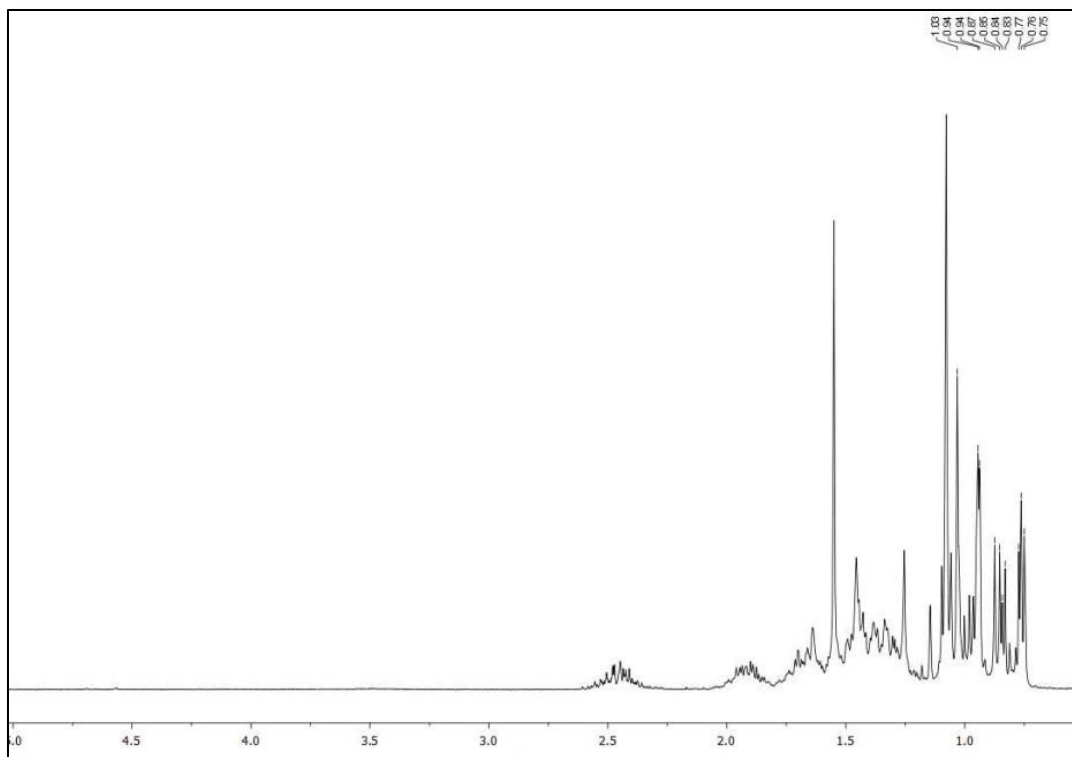
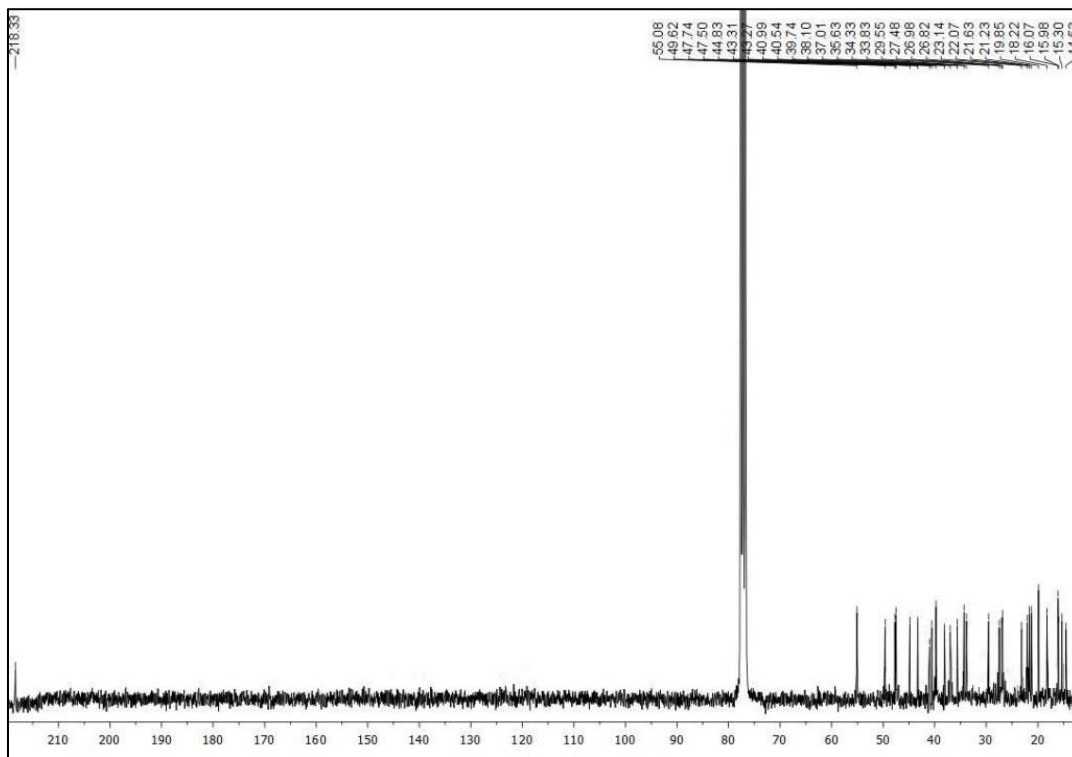
Espectro de RMN de ^1H del derivado **40** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **40** (CDCl_3)

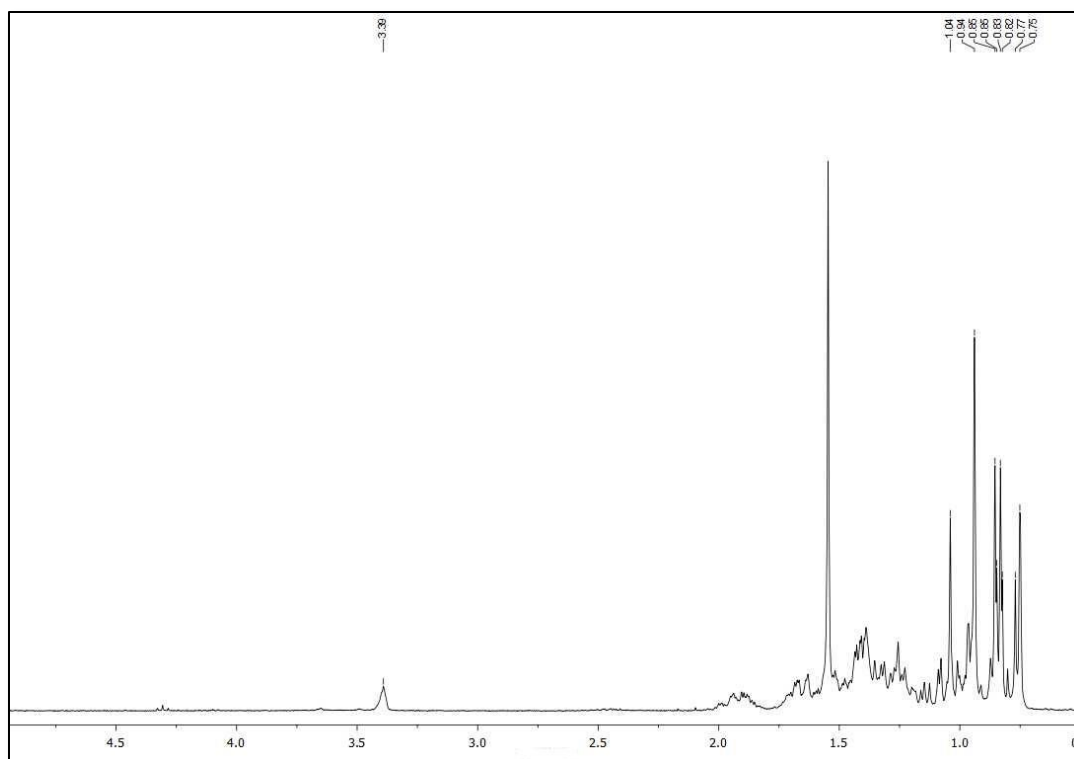
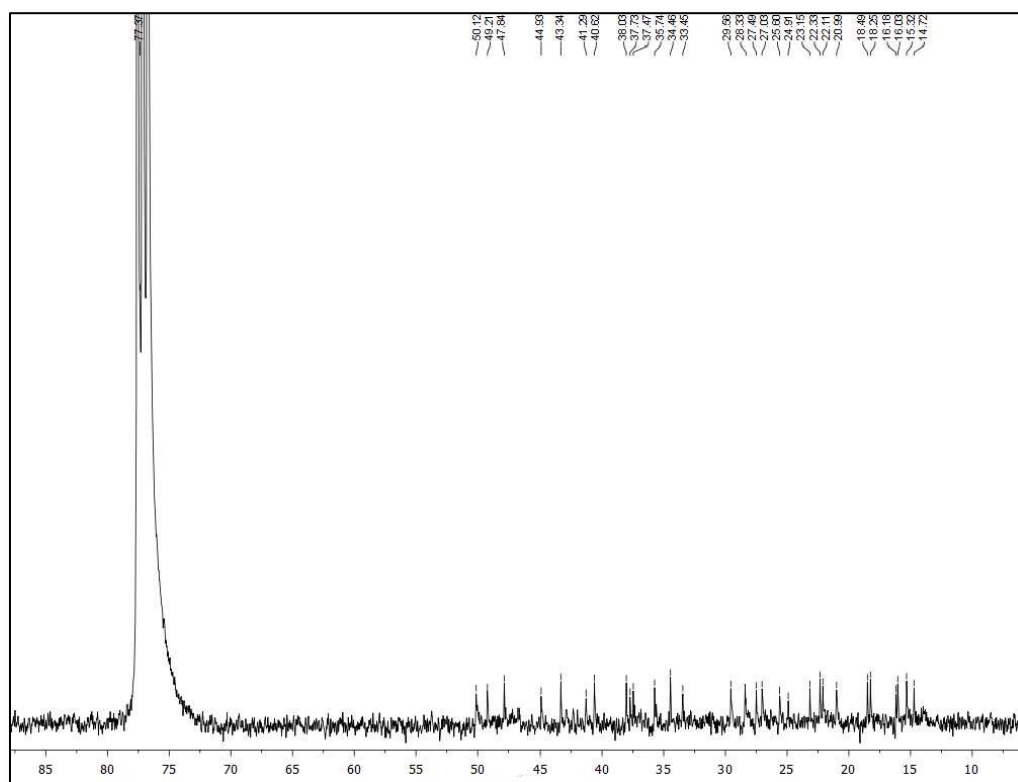
Espectro de RMN de ^1H del derivado **42** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **42** (CDCl_3)

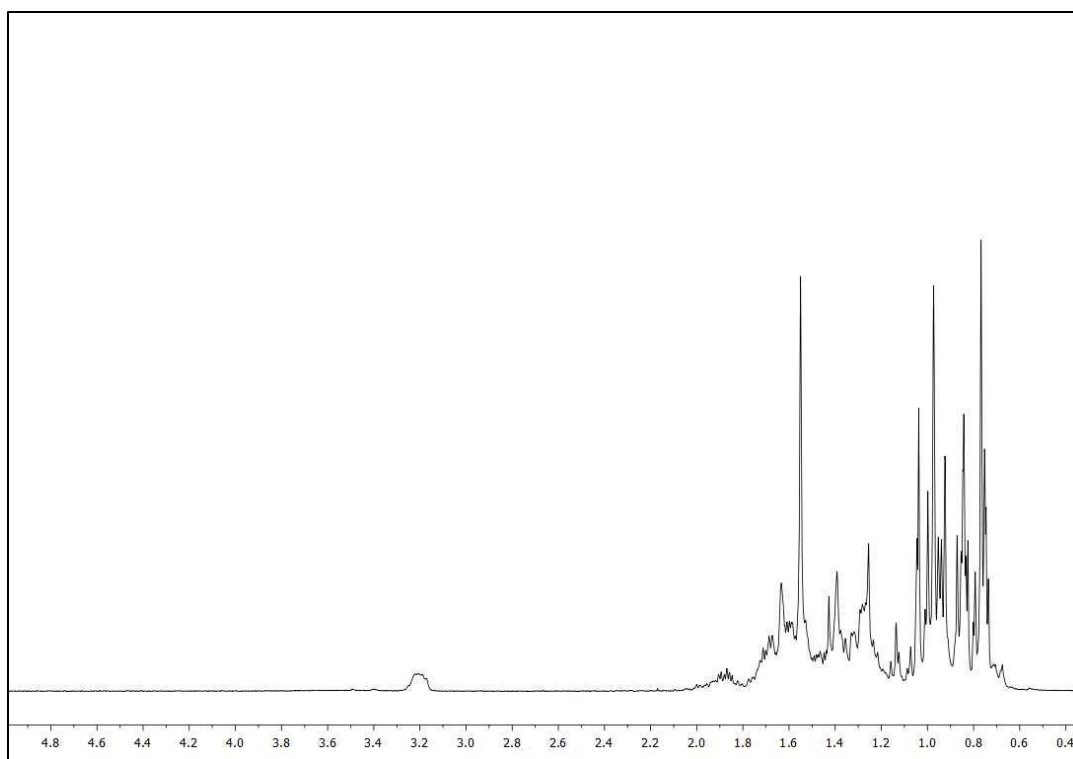
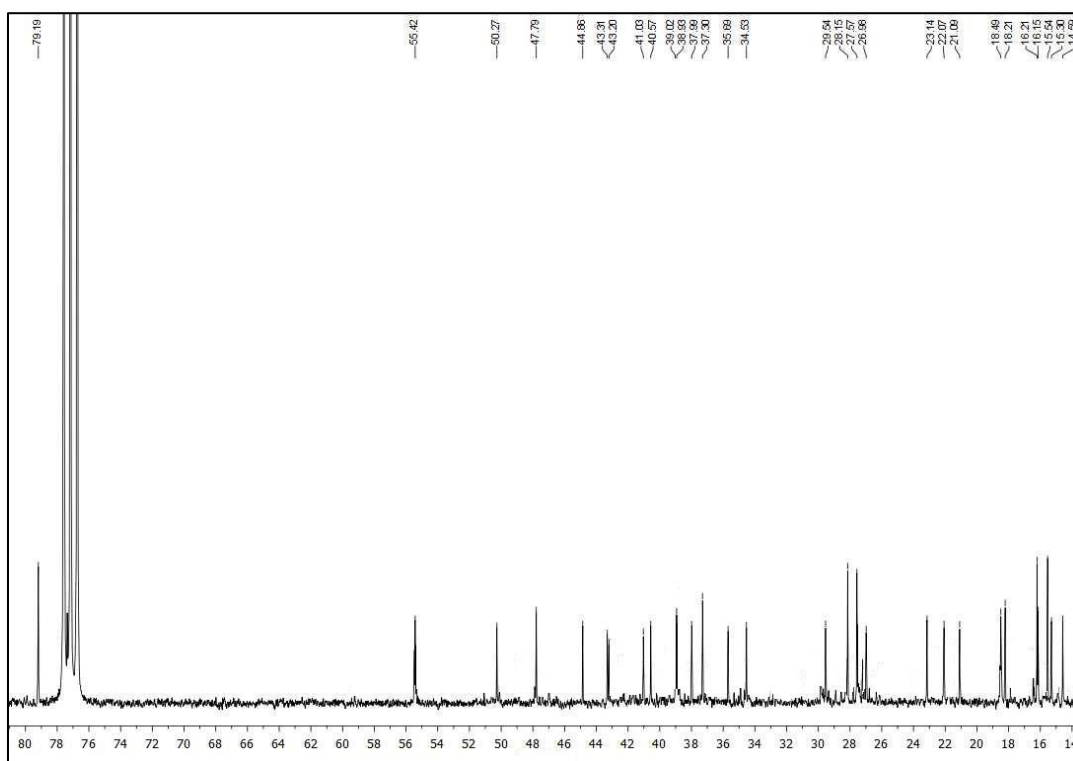
Espectro de RMN de ^1H del derivado **43** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **43** (CDCl_3)

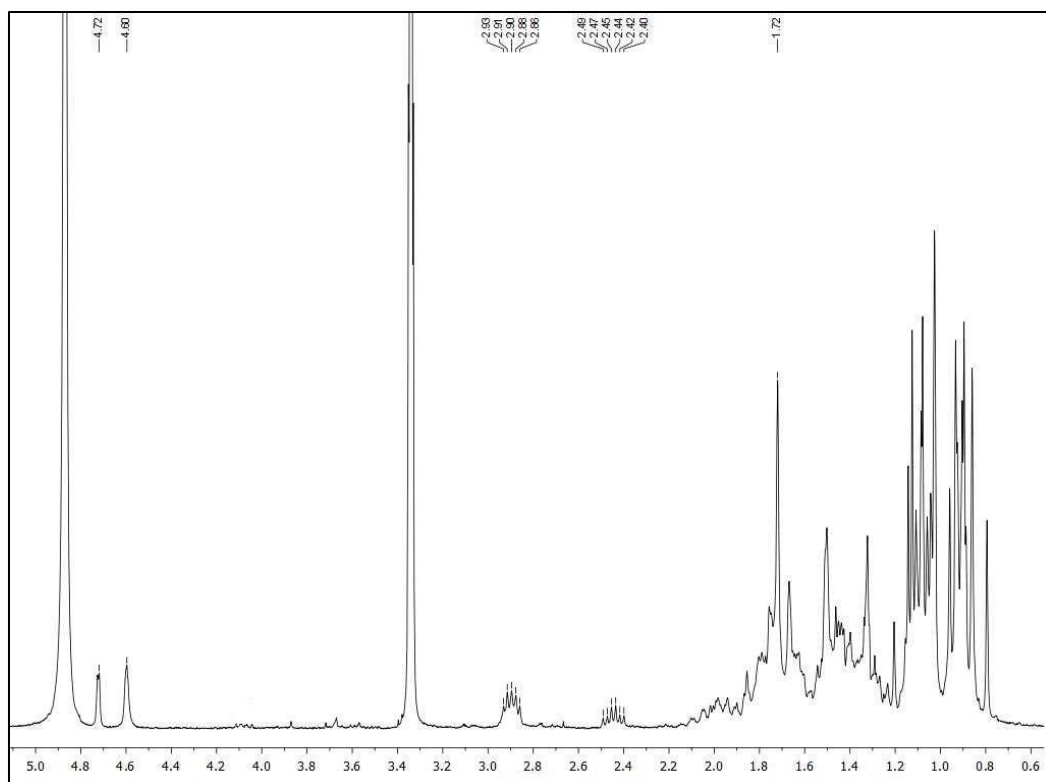
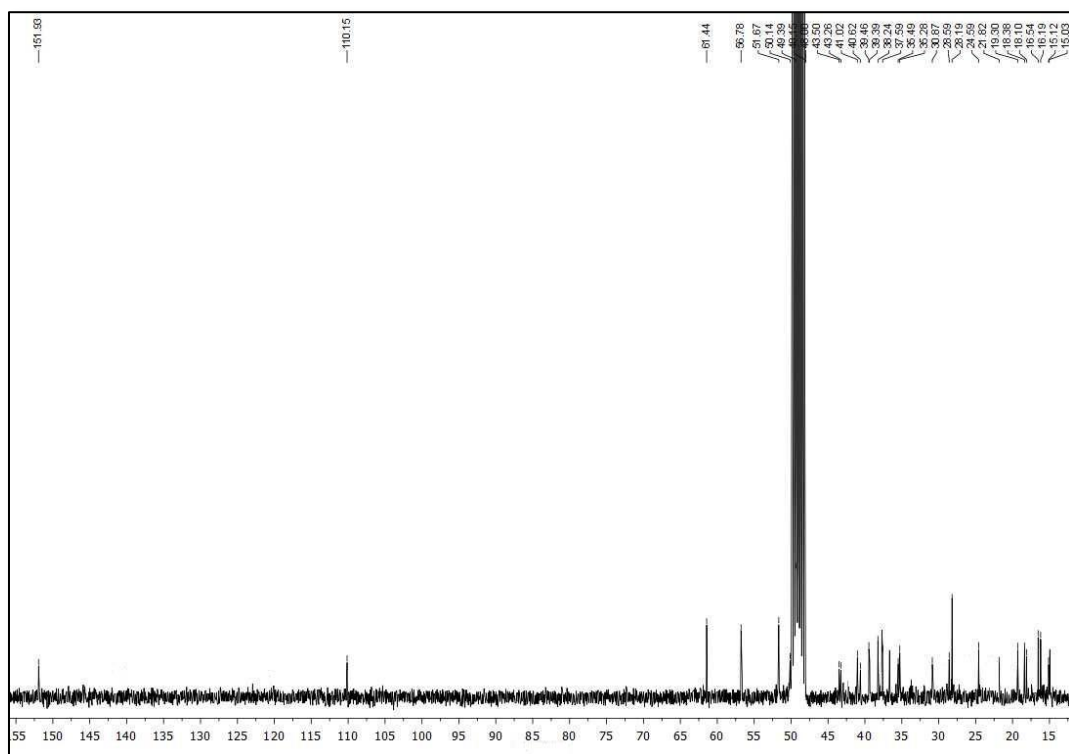
Espectro de RMN de ^1H del derivado **44** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **44** (MeOD- d_4)

Espectro de RMN de ^1H del derivado **45** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **45** (CDCl_3)

Espectro de RMN de ^1H del derivado **46** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **46** (CDCl_3)

Espectro de RMN de ^1H del derivado **47** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **47** (CDCl_3)

Espectro de RMN de ^1H del derivado **48** (CDCl_3)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **48** (CDCl_3)

Espectro de RMN de ^1H del derivado **50** (MeOD- d_4)Espectro de RMN de ^{13}C del derivado **50** (MeOD- d_4)

Anexo
de
Publicaciones

Planta Medica

Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research

Editor-in-Chief

Luc Pieters, Antwerp, Belgium

Senior Editor

Adolf Nahrstedt, Münster, Germany

Review Editor

Matthias Hamburger, Basel, Switzerland

Editors

Wolfgang Barz, Münster, Germany
Rudolf Bauer, Graz, Austria
Veronika Butterweck, Gainesville FL, USA
João Batista Calixto, Florianopolis, Brazil
Thomas Efferth, Mainz, Germany
Jerzy W. Jaroszewski, Copenhagen, Denmark
Ikhlas Khan, Oxford MS, USA
Wolfgang Kreis, Erlangen, Germany
Irmgard Merfort, Freiburg, Germany
Kurt Schmidt, Graz, Austria
Thomas Simmet, Ulm, Germany
Hermann Stuppner, Innsbruck, Austria
Yang-Chang Wu, Kaohsiung, Taiwan
Yang Ye, Shanghai, China

Editorial Offices

Claudia Schärer, Basel, Switzerland
Tess De Bruyne, Antwerp, Belgium

Advisory Board

Giovanni Appendino, Novara, Italy
John T. Arnason, Ottawa, Canada
Yoshinori Asakawa, Tokushima, Japan
Lars Bohlin, Uppsala, Sweden
Gerhard Bringmann, Würzburg, Germany
Reto Brun, Basel, Switzerland
Mark S. Butler, Singapore, R. of Singapore
Ihsan Calis, Ankara, Turkey
Salvador Cañigueral, Barcelona, Spain
Hartmut Derendorf, Gainesville, USA
Verena Dirsch, Vienna, Austria
Jürgen Drewe, Basel, Switzerland
Roberto Maffei Facino, Milan, Italy
Alfonso Garcia-Piñeres, Frederick MD, USA
Rolf Gebhardt, Leipzig, Germany
Clarissa Gerhäuser, Heidelberg, Germany
Jürg Gertsch, Zürich, Switzerland
Simon Gibbons, London, UK
De-An Guo, Shanghai, China
Leslie Gunatilaka, Tuscon, USA
Solomon Habtemariam, London, UK
Andreas Hensel, Münster, Germany
Werner Herz, Tallahassee, USA
Kurt Hostettmann, Geneva, Switzerland
Peter J. Houghton, London, UK
Jinwoong Kim, Seoul, Korea
Gabriele M. König, Bonn, Germany
Ulrich Matern, Marburg, Germany
Matthias Melzig, Berlin, Germany
Dulcie Mulholland, Guildford, UK
Eduardo Munoz, Cordoba, Spain
Kirsi-Maria Oksman-Caldentey, Espoo, Finland
Ana Maria de Oliveira, São Paulo, Brazil
Nigel B. Perry, Dunedin, New Zealand
Joseph Pfeilschifter, Frankfurt, Germany
Peter Proksch, Düsseldorf, Germany
Thomas Schmidt, Münster, Germany
Volker Schulz, Berlin, Germany
Hans-Uwe Simon, Bern, Switzerland
Leandros Skaltsounis, Athens, Greece
Han-Dong Sun, Kunming, China
Benny K. H. Tan, Singapore, R. of Singapore
Ren Xiang Tan, Nanjing, China
Deniz Tasmemir, London, UK
Nunziatina de Tommasi, Salerno, Italy
Arnold Vlietinck, Antwerp, Belgium
Angelika M. Vollmar, München, Germany
Heikki Vuorela, Helsinki, Finland
Jean-Luc Wolfender, Geneva, Switzerland
De-Quan Yu, Beijing, China

Publishers

**Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York**
Rüdigerstraße 14
D-70469 Stuttgart
Postfach 30 11 20
D-70451 Stuttgart

Thieme Publishers

333 Seventh Avenue
New York, NY 10001, USA
www.thieme.com

Reprint

© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
Reprint with the permission
of the publishers only

Triterpenoids with Acetylcholinesterase Inhibition from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae)

María Soledad Vela Gurovic¹, María Julia Castro¹, Victoria Richmond², María Belén Faraoni¹, Marta S. Maier², Ana Paula Murray¹

¹ INQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina

² UMYMFOR-Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Abstract

A bioactivity-guided approach was taken to identify the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory agents in the ethanolic extract of *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* leaves using a bioautographic method. This permitted the isolation of the pentacyclic triterpenes calenduladiol (1), faradiol (2), heliantriol B2 (3), lupeol (4), and a mixture of α - and β -amyrin (5a and 5b) as active constituents. Pseudotaraxasterol (6) and taraxasterol (7) were also isolated from this extract and showed no activity at the same analytical conditions. Compound 1 showed the highest AChE inhibitory activity with 31.2% of inhibition at 0.5 mM. Looking forward to improve the water solubility of the active compounds, the sodium sulfate ester of 1 was prepared by reaction with the $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ complex. The semisynthetic derivative disodium calenduladiol disulfate (8) elicited higher AChE inhibition than 1 with 94.1% of inhibition at 0.5 mM ($\text{IC}_{50} = 0.190 \pm 0.003$ mM). Compounds 1, 2, 3, 5, 6, and 7 are reported here for the first time in *C. erinacea*. This is the first report of AChE inhibition from calenduladiol (1) as well as from a sulfate derived from a natural product.

Key words

acetylcholinesterase inhibitors · *Chuquiraga erinacea* · Asteraceae · pentacyclic triterpenes · Alzheimer's disease

Abbreviations

AChE: acetylcholinesterase
AD: Alzheimer's disease
ATCI: acetylthiocholine iodide
DTNB: 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>

The enzyme acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7.) terminates the impulse transmission by rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. According to the cholinergic hypothesis, the selective and irreversible deficiency of cholinergic functions leads to memory impairment in Alzheimer's disease (AD). An important therapeutic strategy for activating central cholinergic functions has been the use of AChE inhibitors. Since currently

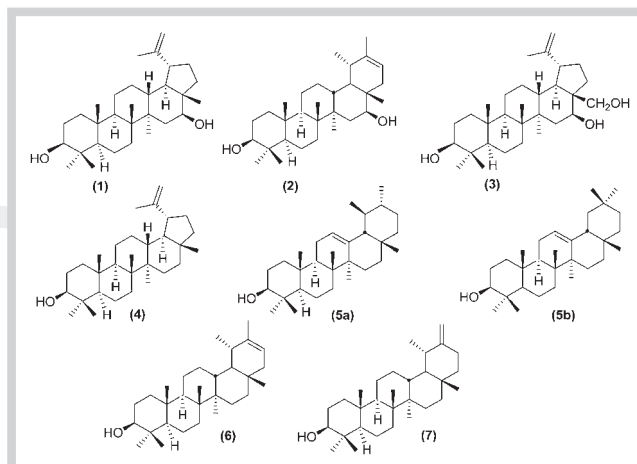


Fig. 1 Chemical structures of compounds 1–7.

available drugs for the treatment of AD are frequently associated with adverse drug effects and bioavailability problems, the search of AChE inhibitors still draws attention [1–3].

C. erinacea subsp. *erinacea* (Asteraceae) is an endemic species widely distributed in Argentina, locally known as “Romerillo”, “Trifrif mamüll” (araucanian language), “Monte chirriador” and “Ardegras” [4–6]. Natives used to burn the dried leaves and twigs to produce smoke signals. Its leaves are consumed locally in infusion or decoction to relieve stomach, hepatic and kidney diseases, and to strength brain and nerves [5]. The flavonoid profiles of some species of this genus, including both subspecies of *C. erinacea*, *erinacea* and *hystrix*, have been described in the past [7]. The presence of lupeol, 3 β -acetoxy-6 β -hydroxytaraxasta-20-ene and 6 β -hydroxytaraxasta-20-ene 3 β -palmitate in this species has been suggested by Flagg et al. [8] in a study based on LC-MS analysis.

In the course of our ongoing search of AChE inhibitors from a natural origin [9], we found that the ethanolic extract from leaves of *C. erinacea* inhibited AChE, with $\text{IC}_{50} = 7.26$ mg/mL in a spectrophotometric assay using Ellman's colorimetric method [10]. The present study describes the bioactivity-guided isolation of AChE inhibitors present in this extract.

A bioautographic method adapted from Ellman's method was used for the detection of AChE inhibition in the fractions and sub-fractions obtained during the chromatographic separation of the extract [11]. This led us to the isolation of the active compounds identified as pentacyclic triterpenes on the basis of spectroscopic evidence. ¹H and ¹³C NMR and comparison with bibliographic data, permitted the identification of calenduladiol (1), faradiol (2), heliantriol B2 (3), lupeol (4), and a mixture of α - and β -amyrin (5a and 5b; Fig. 1) [12–15]. Pseudotaraxasterol (6) and taraxasterol (7) were also isolated from the active fraction of the extract but showed no enzymatic inhibition. Compounds 1–7 have been isolated from several Asteraceae plants like *Calendula officinalis* and *Helianthus annuus* [16–19]. Anti-inflammatory activity of compounds 1, 2, 3, 4, 5a, and 5b has been reported in the literature [13, 20–23] as well as antitumor activity for compounds 1, 2, 3, 6, and 7 [20, 23, 24–26].

Even though 6 β -hydroxytaraxasta-20-ene 3 β -palmitate has been proposed as a chemotaxonomic marker for the *Chuquiraga* genus [8], neither this compound nor any other 6 β -hydroxy taraxastane type triterpene were present in our samples of *C. erinacea* subsp.

Inhibitor	Inhibition (%) \pm S.D. ^{a, b}	IC ₅₀ \pm S.D. ^a
Ethanol extract	n.d. ^e	7.26 \pm 0.69 mg/mL
1	31.2 \pm 0.6 (0.5 mM)	n.d.
2	0 (0.5 mM)	–
3	0 (0.5 mM)	–
4	30.5 \pm 0.5 (1.0 mM)	n.d.
5a/b	13.4 \pm 0.3 (1.0 mM)	n.d.
8^c	94.1 \pm 0.4 (0.5 mM)	0.190 \pm 0.003 mM
eserine ^d	98.34 \pm 0.25 (0.05 mM)	0.10 \pm 0.02 μ M

^a Samples were dissolved in buffer with MeOH as cosolvent (final conc. 0.5%). Values represent the mean of three replicates \pm standard deviation. ^b Calculated as compared to control (without inhibitor) enzyme activity (assumed to be 0% inhibition). ^c Without MeOH as cosolvent. ^d Positive control. ^e n.d. not determined

Table 1 *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity.

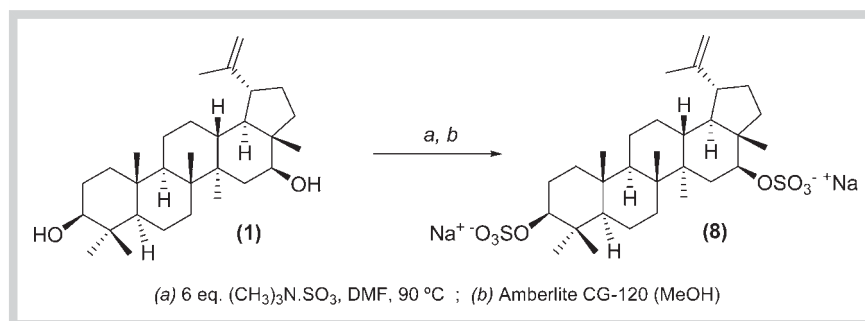


Fig. 2 Treatment of calenduladiol (**1**) resulting in a disodium salt (**8**).

erinacea. This absence was confirmed by the exploration of the ¹³C NMR spectra of the triterpene fractions obtained during the fractionation stages. The presence of a 6 β -hydroxy group would be detected as a signal at 67–68 ppm. Since all the ¹³C NMR spectra showed no signals at that region we confirmed our observation.

The inhibitory activity against AChE of some ursane, taraxane, and lupane-type pentacyclic triterpenes has been recently reported; particularly lupeol exerts a moderate inhibitory activity while ursolic acid has shown a higher AChE inhibition [27–29]. Even though lupeol was one of the active compounds isolated from *C. erinacea*, compounds **1**, **2**, **3**, **5a**, and **5b** also exhibited AChE inhibition in the preliminary assay over TLC. In order to quantify the enzymatic inhibition of these compounds the percentage of AChE inhibition was determined (Table 1). Calenduladiol (**1**) resulted to be the most active compound with a 31.2% of inhibition at 0.5 mM. Compounds **2** and **3** showed no inhibitory effect at the same experimental conditions, while lupeol (**4**) and the mixture of α - and β -amyrin (**5a** and **5b**) elicited a weak activity at 1 mM. The determination of IC₅₀ values for these compounds was limited by their poor solubility in the aqueous media required for the enzymatic assay.

Looking for an improvement of the water solubility of this type of compound and, if possible, of the enzymatic inhibition, we decided to prepare the sodium sulfate ester of **1**, the most active triterpene. The commercially available trimethylamine-sulfur trioxide complex was chosen as the sulfating reagent [30]. Treatment of **1** with an excess of the reactive afforded the ammonium sulfate intermediate, which was transformed via ion exchange into the disodium salt **8** (Fig. 2). Compound **8** was obtained in good yield and characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy (Table 2). The assignments of the NMR signals were derived from ¹H-¹H COSY, HETCOR, COLOC, and NOESY experiments. Disodium calenduladiol disulfate (**8**) showed two methine signals at δ 3.91 (H-3)

and 4.33 (H-16) ppm, characteristic of the presence of two sulphate groups at C-3 and C-16. This was in accordance with the chemical shifts observed for C-3 (87.6 ppm) and C-16 (85.9 ppm) in the ¹³C NMR spectrum.

The percentage of AChE inhibition of compound **8** was 94.2% at 0.5 mM (Table 1) and the solubility in the buffer was much better than that observed for triterpenes **1**–**5**. In this case we were able to determinate an IC₅₀ value of 0.190 \pm 0.003 mM.

Compounds **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, and **7** are reported here for the first time in *C. erinacea*. Besides, this is the first report of AChE inhibition from calenduladiol (**1**) and its new derivative disodium calenduladiol disulfate (**8**). Our results indicate that sulfation could be a promising strategy for the enhancement of pharmacological properties of triterpene alcohols.

Materials and Methods

NMR spectra were recorded on a Bruker ARX 300 spectrometer. HPLC was performed in a KONIK KNK-500-A chromatograph with UV detector (254 nm) and a C₁₈ column (Gemini 110 Å, 5 μ m, 250 \times 10.0 mm; Phenomenex). UV spectra were recorded on a GBC Spectral UV-VIS spectrophotometer.

Silicagel 60 (70–230 mesh; Fluka) was used for column chromatography. Analytical TLC was performed on Silicagel 60 F₂₅₄ sheets (0.2 mm thickness; Merck). Preparative TLC plates (20 \times 20 cm) were prepared with 5% AgNO₃ in silicagel 60 for TLC (2 mm thickness). The p-anisaldehyde-acetic acid spray reagent, Liebermann-Burchard reagent, and UV light (254 and 366 nm) were used for detection. AChE, ATCl, DTNB, eserine (99% pure), (CH₃)₃N.SO₃, and Amberlite CG-120 (Na⁺ form) were purchased from Sigma.

C. erinacea subsp. *erinacea* was collected in August 2006 at the Departamento Utracan, La Pampa province. A voucher specimen

Table 2 ^1H and ^{13}C NMR data for compound **8**.

Carbon	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ (J in Hz)
1	39.9 t	1.72; 0.95
2	25.4 t	1.73; 2.07
3	87.6 d	3.91 dd (11.3; 4.3)
4	39.6 s	–
5	57.3 d	0.8
6	19.4 t	1.55
7	35.6 t	1.72
8	42.2 s	–
9	51.3 d	1.35
10	38.1 s	–
11	22.0 t	1.45
12	26.1 t	1.69; 1.51
13	38.8 d	1.70
14	45.3 s	–
15	38.9 t	1.66
16	85.9 d	4.33 dd (10.0; 7.5)
17	^c	–
18	49.3 d	1.52
19	49.0 d	2.51 ddd (10.5; 10.5; 5.3)
20	151.2 s	–
21	30.8 t	1.40; 1.94
22	35.5 t	1.43
23	28.7 q	1.02 s
24	16.3 q	1.06 s
25	16.7q ^d	0.81 s
26	16.7q ^d	0.89 s
27	16.6 q	1.08 s
28	12.9 q	0.85 s
29	110.4 t	4.56 bs; 4.69 bs
30	19.5 q	1.69 s

^a Recorded at 75 MHz in methanol- d_4 ; multiplicity by DEPT. ^b Recorded at 300 MHz in methanol- d_4 . ^c Under solvent peak, δ_{C} 49.3 ppm (pyridine- d_5). ^d Chemical shifts are interchangeable

(MGM436) was identified by Dr. María G. Murray and deposited in the “Herbario del Departamento de Biología – Universidad Nacional del Sur (BBB)”.

Dried leaves (193 g) of *C. erinacea* were extracted at r.t. with EtOH (3 × 500 mL, 24 h each) yielding 13.4 g of extract which was partitioned between H₂O/MeOH 7:3 (1 L) and hexane, CH₂Cl₂, AcOEt, and *n*-butanol (1 L each) affording five subextracts. Hexane and dichloromethane extracts showed enzymatic inhibition.

Dichloromethane extract (2.15 g) was subjected to column chromatography (5.5 × 53 cm, silica gel 60) eluting with mixtures of CH₂Cl₂/MeOH (2 mL/min). Fifty fractions (100 mL) were collected and monitored by TLC (SiO₂, hexane/EtOEt 1:1). Two groups of active fractions were detected. The fractions of the first group (225 mg, R_f 0.23), eluted with CH₂Cl₂/MeOH 99.9:0.1 (200 mL), were combined and purified by HPLC (MeOH 100%, 1 mL/min) yielding 129.0 mg of **1** (R_t 18.0 min) and 10.3 mg of **2** (R_t 20.8 min). The second group (36 mg, R_f 0.14), eluted with CH₂Cl₂/MeOH 99:1 (200 mL), was submitted to HPLC purification (MeOH:H₂O 95:5, 1 mL/min) affording 12.0 mg of **3** (R_t 21.8 min).

Hexane extract (2.34 g) was subjected to column chromatography (5.5 × 53 cm, silicagel 60), eluted with hexane-AcOEt mixtures (2 mL/min) and 55 fractions of 100 mL were collected and combined on the basis of TLC profiles (SiO₂, hexane/EtOEt 1:1). Active fractions (500 mg, R_f 0.53) were eluted with hexane/AcOEt 99:1 (300 mL). Recromatography of those fractions (silicagel,

2.5 × 45 cm, hexane/AcOEt 99:1, 1.5 mL/min) afforded an active subfraction (150 mg, R_f 0.53, 200 mL) which was further purified on preparative AgNO₃-silicagel TLC plates eluting with CHCl₃. This procedure afforded four bands R_f: 0.22, 0.30, 0.42, and 0.55 which corresponded to **4** (9.2 mg), **7** (2.8 mg), **6** (17.3 mg) and a mixture (8.2 mg) of **5a** and **5b** (19:81), respectively.

(CH₃)₃N.SO₃ (134 mg, 0.961 mmol) was added to a solution of **1** (70.8 mg, 0.16 mmol) in dry DMF (1.2 mL) under nitrogen. The reaction mixture was stirred at 90 °C for 18 h then diluted with MeOH (2 mL) and eluted through Amberlite CG-120 (Na⁺ form) with MeOH (100 mL). Further purification by column chromatography on silicagel using CH₂Cl₂/MeOH 8:2 (2.5 mL/min) as eluent gave pure **8** (93 mg, 90%, 100 mL) as a white solid (mp 143–4 °C). Copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence.

Compounds **1–5** and **8** (purity > 94%) were screened for AChE inhibition. Enzyme activity was calculated by comparing reaction rates for the samples to the blank as previously reported [9]. AChE used was from electric eel. IC₅₀ values were determined with probit analysis (EPA Probit 1.4). Eserine (99% pure; Aldrich) was used as a positive control. All the determinations were performed in triplicate. The TLC assay with detection of AChE inhibition was carried out by a previously reported method [11].

Supporting information

Detailed protocol for the *in vitro* AChE assay and NMR spectra (^1H , ^{13}C , DEPT135, COSY, and HETCOR) of compound **8** are available as Supporting Information.

Acknowledgements

This work was supported by CONICET, Universidad Nacional del Sur, Universidad de Buenos Aires and ANPCYT. A.P. Murray and M.S. Maier are Research Members of the National Research Council of Argentina (CONICET).

References

- Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* 2006; 23: 181–199
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Menichini F. Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1209–1228
- Orhan G, Orhan I, Subutay-Öztekin N, Ak F, Sener B. Contemporary anti-cholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer’s disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2009; 4: 43–51
- Forcone A. Hierbas y arbustos frecuentes en el Valle Inferior del río Chubut, 1st edition. Bahía Blanca, Argentina: EdiUNS; 2004: 1–116
- Casamiquela RM, Beeskow AM, Gavirati M, Stanganelli M, Mavrek V. Usos Tradicionales de las Plantas en la Meseta Patagónica. CENPAT – CONICET – ICBG; 2002: 1–51
- Zuloaga FO, Morrone O. Asteraceae. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden, Vol. 74. St. Louis, Missouri, USA: Missouri Botanical Garden; 1999: 1–255
- Juárez BE, Mendiondo ME. Flavonoid chemistry of *Chuquiraga* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol* 2002; 4: 371–373
- Flagg ML, Valcic S, Montenegro G, Gomez M, Timmermann N. Pentacyclic triterpenes from *Chuquiraga ulicina*. *Phytochemistry* 1999; 52: 1345–1350
- Murray AP, Vela Gurovic MS, Rodriguez SA, Murray MG, Ferrero AA. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity in essential oils from *Schinus areira* L. and *Schinus longifolia* (Lindl.) Speng. *Nat Prod Commun* 2009; 4: 873–876

- 10 Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88–95
- 11 Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A* 2001; 915: 217–223
- 12 Wenkert E, Baddeley GV, Burfitt IR, Moreno LN. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally-occurring substances LVII. Triterpenes related to lupane and hopane. *Org Magn Reson* 1978; 11: 337–343
- 13 Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med* 1994; 60: 516–520
- 14 Reynolds WF, Mc Lean S, Poplawski J, Enriquez RG, Escobar L, Leon I. Total assignment of ^{13}C and ^1H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ^1H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron* 1986; 42: 3419–3428
- 15 Mahato BS, Kundo AP. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 1994; 37: 1517–1575
- 16 Zimmermann J. Triterpenediols. VII. Triterpenes and pigments in flowers and fruits. *Helv Chim Acta* 1944; 27: 332–334
- 17 St. Pyrek J. Terpenes of compositae plants. Part XI. Structures of helianthriols Bo, B1, B2 and A1, new pentacyclic triterpenes from *Helianthus annuus* L. and *Calendula officinalis* L. *Pol J Chem* 1979; 53: 2465–2490
- 18 Kasprzyk Z, Pyrek J, Jolad SD, Steelink C. Identity of calenduladiol and thurberin: a lupenediol found in marigold flowers and organ pipe cactus. *Phytochemistry* 1970; 9: 2065–2066
- 19 Dutta CP, Ray LPK, Roy DN. Taraxasterol and its derivatives from *Cirsium arvense*. *Phytochemistry* 1972; 11: 2267–2269
- 20 Yasukawa K, Akihisa T, Oinuma H, Kasahara Y, Kimura Y, Yamanouchi S, Kumaki K, Tamura T, Takido M. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1329–1331
- 21 Geetha T, Varalakshmi P. Antiinflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 76: 77–80
- 22 Holanda Pinto SA, Pinto LM, Cunha GM, Chaves MH, Santos FA, Rao VS. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology* 2008; 16: 48–52
- 23 Rajic A, Akihisa T, Ukiya M, Yasukawa K, Sandeman RM, Chandler DS, Polya GM. Inhibition of trypsin and chymotrypsin by anti-inflammatory triterpenoids from compositae flowers. *Planta Med* 2001; 67: 599–604
- 24 Ukiya M, Akihisa T, Tokuda H, Suzuki H, 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
- 25 Yasukawa K, Akihisa T, Oinuma H, Kaminaga T, Kanno H, Kasahara Y, Tamura T, Kamaki K, Yamanouchi S. Inhibitory effect of taraxastane-type triterpenes on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 1996; 53: 341–344
- 26 Ovesná Z, Vachálková A, Horváthová K. Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma* 2004; 51: 407–414
- 27 Chung YK, Heo HJ, Kim HK, Huh TL, Lim Y, Kim SK, Shin DH. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol Cells* 2001; 11: 137–143
- 28 Lee JH, Lee KT, Yang JH, Baek NI, Kim DK. Acetylcholinesterase inhibitors from the twigs of *Vaccinium oldhami* Miquel. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 53–67
- 29 Kosmulalage KS, Zahid S, Udenigwe CC, Akhtar S, Ata A, Samarasekera R. Glutathione S-transferase, acetylcholinesterase inhibitory and antibacterial activities of chemical constituents of *Barleria prionitis*. *Z Naturforsch B* 2007; 62b: 580–586
- 30 Fieser M. Fieser and Fieser's reagents for organic synthesis, Vol. 1. New York: Wiley Interscience; 1967: 1–1457

received August 19, 2009
 revised October 13, 2009
 accepted October 18, 2009

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1240582>
 Published online November 16, 2009
Planta Med 2009; 75: 1–4
 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ·
 ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Dr. Ana P. Murray
 INQUISUR – Departamento de Química
 Universidad Nacional del Sur
 Av. Alem 1253
 B8000CPB Bahía Blanca
 Argentina
 Phone: + 54 29 14 59 51 01 ext. 35 38
 Fax: + 54 29 14 59 51 87
 apmurray@uns.edu.ar

Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy

Ana Paula Murray^{a,b,*}, María Belén Faraoni^{a,c}, María Julia Castro^a, Natalia Paola Alza^a and Valeria Cavallaro^a

^aINQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina; ^bResearch Member of CONICET; ^cResearch Member of CIC

Abstract: As acetylcholinesterase (AChE) inhibitors are an important therapeutic strategy in Alzheimer's disease, efforts are being made in search of new molecules with anti-AChE activity. The fact that naturally-occurring compounds from plants are considered to be a potential source of new inhibitors has led to the discovery of an important number of secondary metabolites and plant extracts with the ability of inhibiting the enzyme AChE, which, according to the cholinergic hypothesis, increases the levels of the neurotransmitter acetylcholine in the brain, thus improving cholinergic functions in patients with Alzheimer's disease and alleviating the symptoms of this neurological disorder. This review summarizes a total of 128 studies which correspond to the most relevant research work published during 2006-2012 (1st semester) on plant-derived compounds, plant extracts and essential oils found to elicit AChE inhibition.

Keywords: Alzheimer's Disease, acetylcholinesterase inhibitors, secondary metabolites, plant extracts, essential oils.

INTRODUCTION

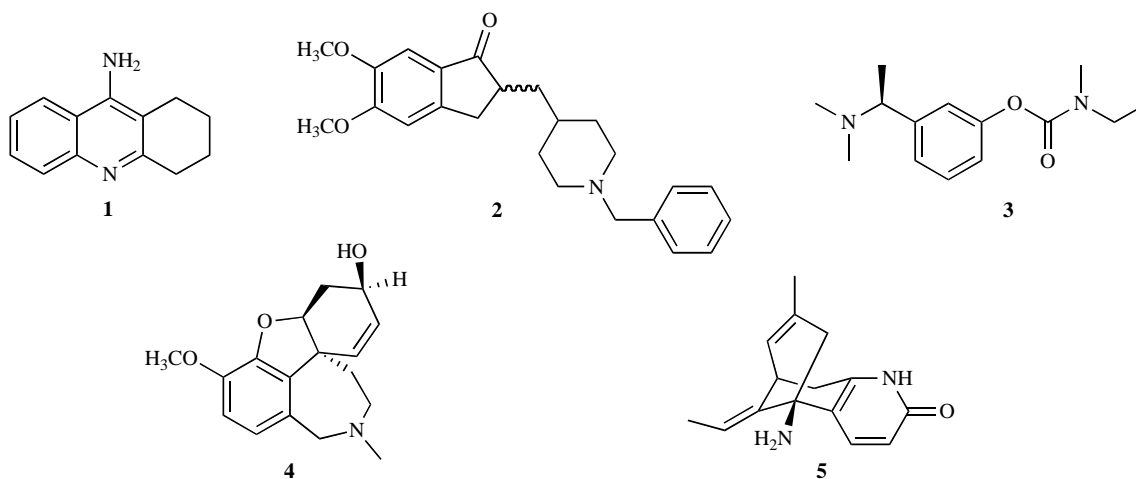
Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder associated with memory impairment and cognitive deficit. It is characterized by low levels of acetylcholine in the brain of AD patients. According to the cholinergic hypothesis, the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), an enzyme that catalyzes acetylcholine hydrolysis, increases the levels of acetylcholine in the brain, thus improving cholinergic functions in AD patients. Furthermore, although the general consensus concludes that AChE inhibitors (AChEi) can alleviate AD symptoms, they neither delay nor reverse the disease progress. Most of the drugs currently available for the treatment of AD are AChEi: tacrine (**1**), donepezil (**2**), rivastigmine (**3**) and galanthamine (**4**), all of which have limited effectiveness and some kind of side effect [1]. Tacrine (**1**) and donepezil (**2**), both from synthetic origin, were the first drugs approved for the treatment of cognitive loss in AD patients by US-FDA in 1993 and 1996, respectively. Rivastigmine (**3**) was approved in 2000 (US-FDA) and was designed from the lead compound physostigmine, a natural AChEi alkaloid. Galanthamine (**4**), a natural alkaloid first obtained from *Galanthus* spp. was approved by US-FDA in 2001. Huperzine A (**5**), an alkaloid found in *Huperzia* spp., is an AChEi commercialized as a dietary supplement for memory support and it is used to treat AD symptoms in China. This alkaloid has been thoroughly studied with promising results yielded particularly from the evaluation of cognitive

performance of animals as well as from studies on its efficacy, tolerance and safety.

Taking into account that inhibitors **3**, **4** and **5** are related to natural products and that AChEi are an important therapeutic strategy for the treatment of AD, many research groups have focused their studies on naturally-occurring compounds from plants as potential sources of either new or more effective AChEi. These studies led to the discovery of an important number of secondary metabolites as well as plant extracts, both of which are characterized by their ability to inhibit AChE. On the other hand, the fact that a significantly relevant number of research papers has been recorded in this field during the last decades can be clearly attributed to the development of colorimetric methods which allow a rapid and facile screening of a large number of samples. Ellman's method is the most widely used for the detection of AChEi, even in complex mixtures, and for the quantification of anti-AChE inhibitory activity [2-6].

Several reviews on the newly discovered AChEi obtained from plants, fungus and marine organisms have also been published over the last years [7-10]. The majority of these AChEi belong to the alkaloid group, including indole, isoquinoline, quinolizidine, piperidine and steroidal alkaloids. On the other hand, several non-alkaloidal and potent AChEi have been obtained from natural sources, including terpenoids, flavonoids and other phenolic compounds. Interestingly, although literature demonstrates to be rich in the study on AChEi obtained from plants, this issue keeps on being the center of attention for research as confirmed by the increasing number of studies published every year. Therefore, the purpose of this review is to provide a comprehensive summary of the literature, particularly that published during 2006-2012 (1st semester) on plant-derived compounds, plant

*Address correspondence to this author at the INQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina; Tel: 54 291 4595101 ext. 3538; Fax: 54 291 4595187; E-mail: apmurray@uns.edu.ar



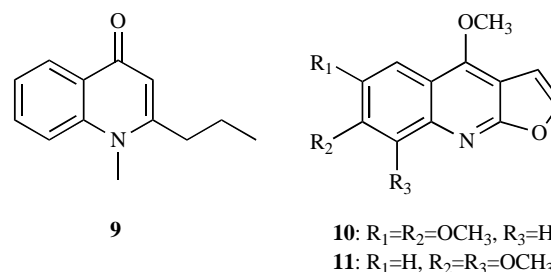
extracts and essential oils which have been reported to inhibit AChE. Readers interested not only in previous findings but also in synthetic/semisynthetic AChEi or natural AChEi of fungal, marine or microbial origin are recommended to see the above-mentioned reviews [i.e. 7-10]. For the sake of brevity and in order to focus our attention on the most relevant findings, only those research papers reporting quantified results (IC_{50} and/or percentage of inhibition at a given concentration) were included. Extracts or essential oils with $IC_{50} > 0.5$ mg/ml were considered weakly active and were therefore not taken into account in the present review. With a few exceptions, only molecules with $IC_{50} < 50$ μ M have been considered. Furthermore, unless otherwise stated, those results on AChE inhibition included in the present review refer to *in vitro* assays carried out with AChE from electric eel.

ALKALOIDS WITH AChE INHIBITORY ACTIVITY

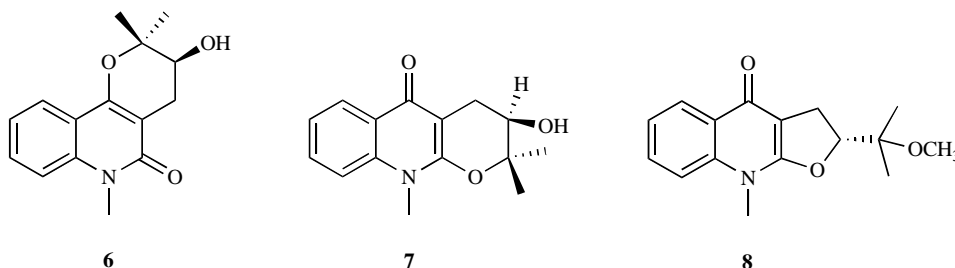
The quinoline alkaloids 3-hydroxy-2,2,6-trimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-c] quinoline-5-one (**6**), ribalinine (**7**) and methyl isoplatydesmine (**8**) isolated from the aerial parts of *Skimmia laureola* (Rutaceae) were found to be linear mixed inhibitors of AChE with $K_i = 110.0$, 30.0 and 30.0 μ M, respectively [11]. These alkaloids were also observed to evidence butyrylcholinesterase (BChE) inhibition.

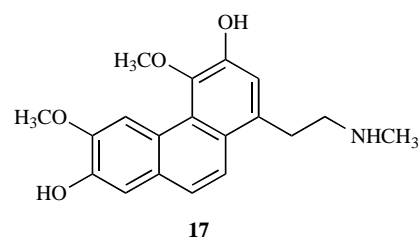
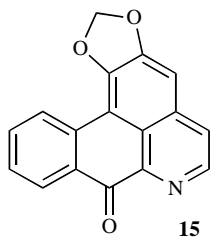
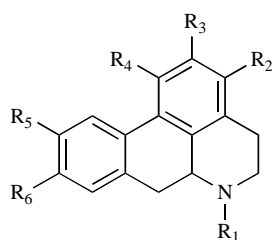
On the other hand, of the several alkaloids that were isolated from the active extracts of *Esenbeckia leiocarpa* (Rutaceae), leptomerine (**9**) and kokusaginine (**10**) with IC_{50} values of 2.5 and 46 μ M, respectively, were observed to elicit AChE inhibitory activity [12]. The isolation of

skimmianine (**11**), a furoquinoline alkaloid with very low AChE inhibitory activity, was also reported by the same authors. This alkaloid was observed in another Rutaceae, *Zanthoxylum nitidum*, exhibiting a moderate AChE inhibitory activity ($IC_{50} = 8.6$ μ g/ml) [13].

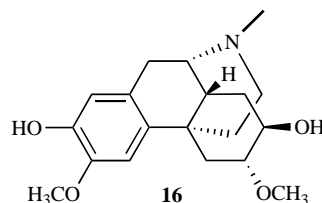


Nelumbo nucifera is a well-known medicinal plant belonging to the Nelumbonaceae family which was studied due to its therapeutic potential [14]. N-methylasimilobine (**12**), an aporphine alkaloid with an $IC_{50} = 1.5$ μ g/ml which was found to be a non-competitive inhibitor, was recently isolated from this plant [15]. In a random screening, two extracts of *Beilschmiedia* species were observed to exhibit AChE inhibition and a phytochemical study of *B. alloiophylla* and *B. kunstleri* revealed the presence of several alkaloids with IC_{50} values ranging between 2.0 and 10.0 μ M [16]. The most potent AChEi were found to be 2-hydroxy-9-methoxyaporphine (**13**), laurotetanine (**14**), liriodenine (**15**) and oreobelline (**16**) ($IC_{50} = 2.0$ -5.0 μ M), with anti-AChE activity comparable to huperzine A ($IC_{50} = 1.8$ μ M). A significant AChE inhibitory activity was also observed in





- 12: R₁=CH₃, R₂=R₅=R₆=H, R₃=OH, R₄=OCH₃
 13: R₁=CH₃, R₂=R₄=R₅=H, R₃=OH, R₆=OCH₃
 14: R₁=R₂=H, R₃=R₄=R₅=OCH₃, R₆=OH
 18: R₁=CH₃, R₂=H, R₃=R₆=OH, R₄=R₅=OCH₃
 19: R₁=CH₃, R₂=H, R₃=R₅=OCH₃, R₄=R₆=OH
 20: R₁=R₂=R₅=R₆=H, R₃=OH, R₄=OCH₃
 21: R₁=H, R₂=R₃=OCH₃, R₄=OH, R₅+R₆=OCH₂O

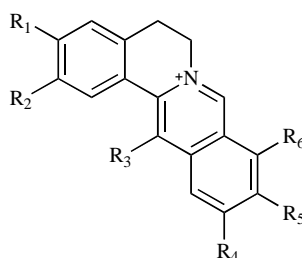
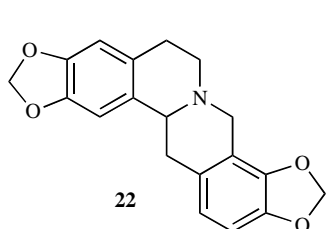


secoboldine (**17**), boldine (**18**), isoboldine (**19**), asimilobine (**20**) and 3-methoxynordomesticine (**21**) (IC₅₀ = 8.4 - 10.0 μM).

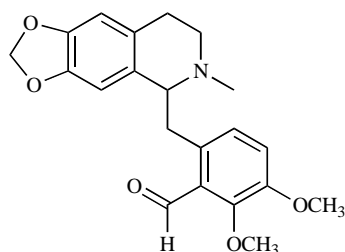
Research on plants from the genus *Corydalis* (Papaveraceae) which are used for the treatment of memory dysfunction in folk medicine reported the presence of benzyloisoquinoline alkaloids with anti-AChE activity [7]. The ethanolic extract obtained from the tuber of *C. turtchaninovii* previously found to elicit AChE inhibition was selected to carry out a chemical study which led to the isolation of the isoquinoline alkaloids stylophine (**22**), epiberberine (**23**), pseudodehydrocorydaline (**24**), pseudocopsitine (**25**) and pseudoberberine (**26**). In the assay with mouse brain cortex as a source of AChE enzyme, the IC₅₀ values obtained for each of these alkaloids were 15.8, 6.5, 8.4, 4.3 and 4.5 μM, respectively [17]. In addition, alkaloids **25** and **26**, the two most active compounds, were found to elicit anti-amnesic activity [17, 18]. Alkaloids with benzyloisoquinoline skeleton from *Corydalis* species having aromatic methylenedioxy groups and a quaternary atom of

nitrogen were observed to show the strongest AChE inhibition [7, 17, 18]. In a more recent work, six protoberberine alkaloids **23**, **27** - **31**, were identified in rhizomes of *Coptis chinensis* which are traditionally used in Chinese medicine for the treatment of various diseases. *Coptis* rhizomes and their alkaloids were reported to have cognitive-enhancing and neuroprotective effects and the analysis of the anti-AChE activity of these alkaloids showed that the IC₅₀ values of berberine (**27**), palmatine (**28**), jateorrhizine (**29**), coptisine (**30**) and groenlandicine (**31**) ranged between 0.44 and 0.80 μM while that of epiberberine (**23**) was slightly higher (IC₅₀ = 1.07 μM) [19]. Of these alkaloids, compounds **27**, **30** and **31** were observed to have an aromatic methylenedioxy group. In this study groenlandicine (**31**) and berberine (**27**) were found to be the most active as BChE inhibitors and epiberberine (**23**) was observed to significantly inhibit β-secretase (BACE1) [19].

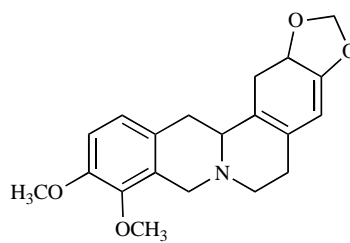
The alkaloids (+)-canadoline (**32**) and (+)-canadine (**33**), both isolated from *Corydalis cava* and with an IC₅₀ = 20.1



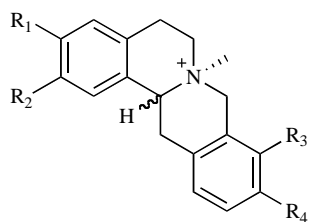
- 23: R₁=R₂=OCH₃, R₃=R₄=H, R₅+R₆=OCH₂O
 24: R₁=R₂=OCH₃, R₃=CH₃, R₄=R₅=OCH₃, R₆=H
 25: R₁+R₂=OCH₂O, R₃=R₆=H, R₄+R₅=OCH₂O
 26: R₁+R₂=OCH₂O, R₃=R₆=H, R₄=R₅=OCH₃
 27: R₁+R₂=OCH₂O, R₃=R₄=H, R₅=R₆=OCH₃
 28: R₁=R₂=R₅=R₆=OCH₃, R₄=R₃=H
 29: R₁=OH, R₂=R₅=R₆=OCH₃, R₃=R₄=H
 30: R₁+R₂=OCH₂O, R₃=R₄=H, R₅+R₆=OCH₂O
 31: R₁=OH, R₂=OCH₃, R₃=R₄=H, R₅+R₆=OCH₂O
 34: R₁=R₆=OCH₃, R₂=R₅=OH, R₃=R₄=H



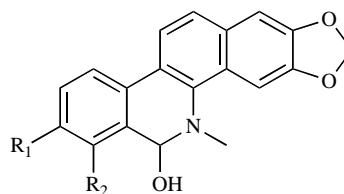
32



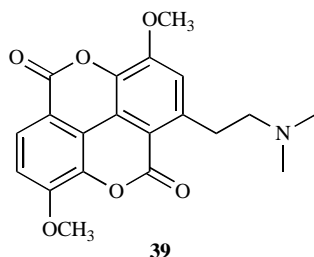
33



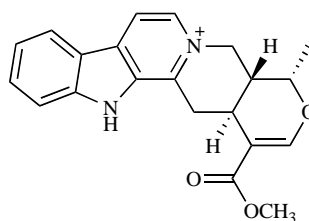
35: R₁=OCH₃, R₂=R₃=OH, R₄=OCH₃
 36: R₁=R₃=OCH₃, R₂=R₄=OH



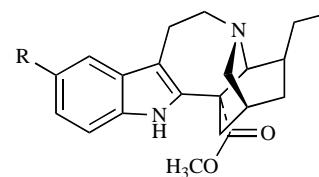
37: R₁=R₂=OCH₃
 38: R₁+R₂=OCH₂O



39



40



41: R = H
 42: R = OCH₃
 43: R = OH

and 12.4 μM , respectively, were observed to elicit a moderate inhibitory activity when tested with AChE from human blood.

On the other hand, *Stephania venosa* (Menispermaceae), a Thai medicinal plant, was found to show a high AChE inhibitory activity. The ethanolic extract of *S. venosa* was subjected to bioassay-guided fractionation to identify AChEi [21]. The following moderately active quaternary protoberberine alkaloids could be isolated: stepharanine (**34**), cyclanoline (**35**) and *N*-methyl stepholidine (**36**) with IC₅₀ values of 14.10, 9.23 and 31.30 μM , respectively. A similar fractionation approach was followed to identify the compounds responsible for AChE inhibition in *Chelidonium majus* (Papaveraceae) [22]. Three active constituents were identified, namely 8-hydroxydihydrochelerythrine (**37**), 8-hydroxydihydrosanguinarine (**38**) and berberine (**27**). Compounds **37** and **38**, with no previous record as AChEi, were found to elicit significant anti-AChE activity with an IC₅₀ = 0.61 and 1.37 μM , respectively.

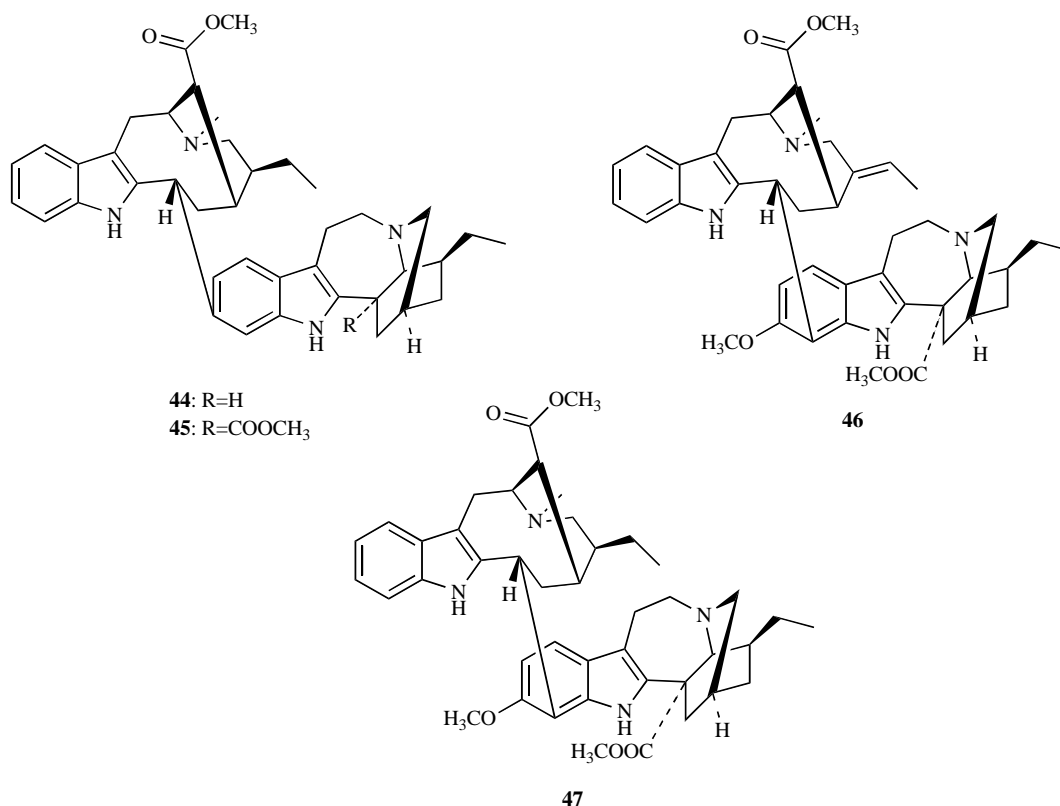
Taspine (**39**) was isolated from the alkaloid-enriched extract obtained from *Magnolia x soulangiana* (Magnoliaceae) [23]. This alkaloid was found not only to show a dose-dependent and long-lasting inhibitory effect on AChE (IC₅₀ = 0.33 μM) but also to be more potent than galanthamine (IC₅₀ = 3.2 μM) although its inhibitory activity is comparable to that of tacrine (IC₅₀ = 0.22 μM). Similar observations were obtained when the *in vitro* assay was performed with human AChE (IC₅₀ = 0.54 μM). Compound **39** resulted to be inactive against BChE, acting as a selective AChEi.

Catharanthus roseus (Apocynaceae) is a plant mainly known as a source of vincristine and vinblastine, two alkaloids found in its leaves and appreciated as anticancer compounds. Several other compounds with biological importance can be also found in *C. roseus*. For example, the alkaloid serpentine (**40**), isolated from the roots of this plant,

was reported to be a potent *in vitro* AChEi (IC₅₀ = 0.775 μM) compared with physostigmine (IC₅₀ = 6.45 μM) [24].

A bioassay-guided fractionation from the stems of *Ervatamia hainanensis* (Apocynaceae), a plant used in traditional Chinese medicine, allowed the isolation of several monoterpenoid indole alkaloids, some of them showing a potent AChE inhibitory activity [25]. For example, coronaridine (**41**) and voacangine (**42**), differing from each other only by the methoxy group attached to the aromatic ring, were observed to have an IC₅₀ = 8.6 and 4.4 μM , respectively, these values being similar to that of galanthamine (3.2 μM). On the other hand, 10-hydroxycoronaridine (**43**) was found to evidence a reduced AChE inhibition (IC₅₀ = 29 μM), which was attributed to the introduction of a hydroxyl group to the aromatic ring. The indole alkaloids coronaridine (**41**) and voacangine (**42**), both detected in the stalks of *Tabernaemontana australis* (Apocynaceae), had been formerly identified as AChEi but no inhibition values were reported [26].

The genus *Tabernaemontana* is known for the wide variety of unusual bioactive indole alkaloids it produces. Among them, the bisindole alkaloids isolated from *T. divaricata* roots are an interesting example of new structures with potent AChE inhibitory activity. The crude alkaloid extract obtained from the root of *T. divaricata* was found to yield four bisindole alkaloids **44** - **47** [27]. The analysis of AChE inhibition revealed that 19,20-dihydrotabernamine (**44**) and 19,20-dihydroervahanine A (**45**) strongly inhibit AChE, with an IC₅₀ = 0.227 and 0.071 μM , respectively, thus showing that they are significantly more active than galanthamine (IC₅₀ = 0.594 μM). The fact that inhibition was found to be higher for compound **45** than for compound **44** suggests that the introduction of a carbomethoxy group at C16' increases the enzymatic inhibition. In addition, taking into account that conodurine (**46**) and tabernaegantine (**47**)

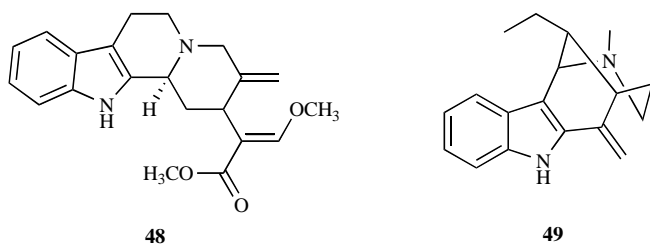


were found to show no activity in AChE, it was suggested that the substitution at C11' and C12' is relevant for AChE inhibitory activity [27].

Uncaria rhynchophylla (Rubiaceae) is a Chinese medicine herb used to treat epilepsy. The alkaloid fraction from *U. rhynchophylla* is known for its antiepileptic and neuroprotective effects. Geissoschizine methyl ether (**48**), a strong AChEi, as well as six other weakly active alkaloids were recently isolated from this herb [28]. The active compound **48** was observed to inhibit AChE in a reversible and non-competitive way with an $IC_{50} = 3.7 \mu\text{g/ml}$.

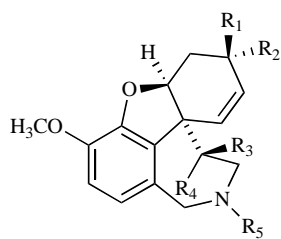
The study of AChE inhibitory activity of Brazilian apocynacea *Himatanthus lancifolius*, commonly known as "agoniada", led to the identification of active extracts in this plant and allowed the isolation of uleine (**49**), an active indole alkaloid, at a high concentration in the alkaloid fraction. The IC_{50} value observed for this alkaloid was $0.45 \mu\text{M}$ [29].

As to the Amaryllidaceae family, phytochemical research conducted in the last decades on this family revealed several

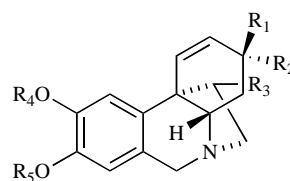


alkaloids with moderate or potent inhibition of AChE [3, 7, 30]. In the search of new natural sources of galanthamine and other Amaryllidaceae alkaloids with anti-AChE activity, bulbs and leaves of *Hippeastrum papilio* collected in the South of Brazil were studied. Galanthamine (**4**), the already known alkaloids narwedine (**50**), haemanthamine (**51**), 11-hydroxyvittatine (**52**), 8-*O*-demethylmaritidine (**53**) and vittatine (**54**) as well as the new alkaloid 11 β -hydroxygalanthamine (**55**) were all isolated and of all of them galanthamine was obtained in significant amounts [31]. Compound **55** was observed to elicit AChE inhibition as other galanthamine-type alkaloids do, with an $IC_{50} = 14.5 \mu\text{M}$. Furthermore, because habranthine, epimer of **55**, was observed to have an anti-AChE activity similar to that of galanthamine, it was concluded that β configuration at C11 is unfavorable for the interaction with AChE [3, 31]. Other potent AChEi, such as *N*-allylnorgalanthamine (**56**) and *N*-(14-methylallyl)norgalanthamine (**57**), were isolated from *Leucojum aestivum*, an amaryllidacea used for the industrial extraction of galanthamine [32]. *N*-alkylated galanthamine derivatives **56** and **57** were isolated together with galanthamine (**4**), epinorgalanthamine (**58**), narwedine (**50**) and lycorine (**59**), from the mother liquors obtained after the industrial production of galanthamine. Alkaloids **56** and **57**, with IC_{50} values of 0.18 and 0.16 μM , respectively, resulted to be ten times more potent AChEi than galanthamine ($IC_{50} = 1.82 \mu\text{M}$).

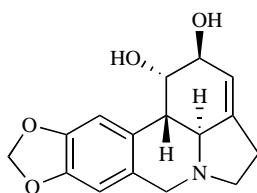
The chemical investigation of *Galanthus rizehensis*, a wild-growing species from Turkey, allowed the isolation of two new Amaryllidaceae alkaloid *N*-oxides, incartine *N*-oxide (**60**) and lycorine *N*-oxide (**61**) and seven



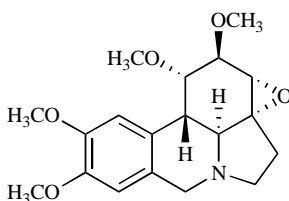
- 50: $R_1+R_2=O$, $R_3=R_4=H$, $R_5=CH_3$
 55: $R_1=R_3=OH$, $R_2=R_4=H$, $R_5=CH_3$
 56: $R_1=OH$, $R_2=R_3=R_4=H$, $R_5=-CH_2CH=CH_2$
 57: $R_1=OH$, $R_2=R_3=R_4=H$, $R_5=-CH_2C(CH_3)=CH_2$
 58: $R_1=R_3=R_4=R_5=H$, $R_2=OH$



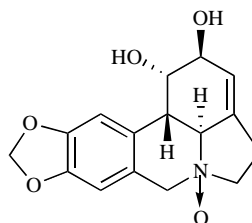
- 51: $R_1=OCH_3$, $R_2=H$, $R_3=OH$, $R_4+R_5=CH_2$
 52: $R_1=R_3=OH$, $R_2=H$, $R_4+R_5=CH_2$
 53: $R_1=OH$, $R_2=R_3=R_5=H$, $R_4=CH_3$
 54: $R_1=OH$, $R_2=R_3=H$, $R_4+R_5=CH_2$



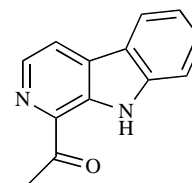
59



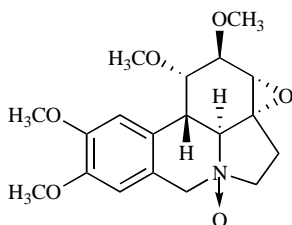
60



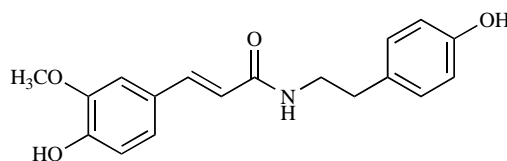
61



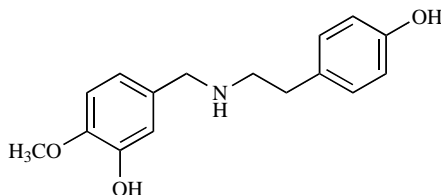
62



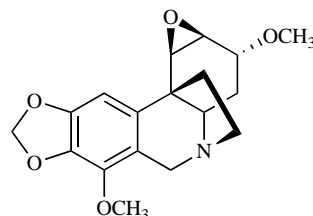
63



64



65



66

known alkaloids namely, 1-acetyl- β -carboline (**62**), incartine (**63**), *N*-trans feruloyltyramine (**64**), lycorine (**59**), *O*-methylincartine (**65**), vittatine (**54**) and 11-hydroxyvittatine (**52**) [33]. The potential of these alkaloids as AChEi was analyzed but only incartine *N*-oxide (**60**) was observed to elicit a moderate inhibitory activity ($IC_{50} = 34.50 \mu M$), incartine (**63**) was observed to be weakly active ($IC_{50} = 106.97 \mu M$) and the other alkaloids were found to be inactive. In a bioassay-guided fractionation of an active extract obtained from bulbs of *Nerine bowdenii*, the Amaryllidaceae alkaloid undulatine (**66**) was identified as the most active component of the alkaloid fraction, with an $IC_{50} = 37 \mu M$ [34].

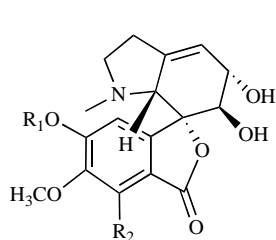
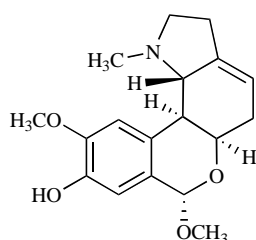
Although benzylphenethylamine alkaloids were considered to belong exclusively to the Amaryllidaceae, some of them

have been found to belong to other families [35]. A new example of this exception was found through the chemical investigation of *Hosta plantaginea* (Liliaceae) [36]. Seventeen benzylphenethylamine alkaloids, including five new alkaloids, **67-71**, along with twelve known compounds [7-deoxy-*trans*-dihydronarciclasine, *O*-methyllycorine, albomaculine, haemanthamine, *O*-demethylhaemanthamine, 8-*O*-demethylmaritadine, haemanthidine, yemenine C, lycorine, pseudolycorine, ungeremine (**72**) and norsanguinine (**73**)] were obtained. Some of these alkaloids were analyzed to determine whether they are AChEi or not. Ungeremine (**72**) ($IC_{50} = 3.85 \mu M$), norsanguinine (**73**) ($IC_{50} = 1.43 \mu M$) and 8-demethoxy-10-*O*-methylhostasine (**69**) ($IC_{50} = 2.32 \mu M$) were all found to be potent AChE inhibitors.

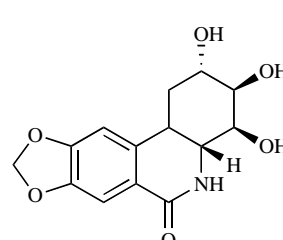
After the isolation of the potent AChEi huperzine A (**5**) from *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), several plants belonging to the genus *Lycopodium* have been investigated in an attempt to find alkaloids with unusual skeletons that could have AChE inhibitory activity [7, 8, 37]. Five new *Lycopodium* alkaloids, 11 α -hydroxyfawcettidine (**74**), 2 α ,11 α -dihydroxyfawcettidine (**75**), 8 α ,11 α -dihydroxyfawcettidine (**76**), 2 β -hydroxylycothunine (**77**) and 8 α -hydroxylycothunine (**78**), with the fawcettimine skeleton were isolated from *L. serratum*, along with three known alkaloids, lycothunine (**79**), serratine (**80**) and serratanidine (**81**) [38]. AChE inhibitory activity was analyzed for the alkaloid lycoposerramine-H (**82**) previously isolated from *L. serratum* [39] and for compounds **74**, **75**, **78**. Alkaloids **75** and **82** were observed to inhibit AChE with an IC₅₀ = 27.9 and 16.7 μ M, respectively, while **74** and **78** were observed to show no anti-AChE activity. In another study, three new alkaloids (**83** - **85**) were isolated from *L. carinatum*, a species collected in Malaysia [40]. Carinatamins A (**83**) and B (**84**) were observed to inhibit AChE from bovine erythrocytes with an IC₅₀ = 4.6 and 7.0 μ M, respectively, whereas carinatumin C (**85**) was observed to show no inhibition (IC₅₀ > 100 μ M). Alkaloids **83** and **84** were observed to exhibit an AChE inhibitory activity similar to that of huperzine A and huperzine B (IC₅₀ = 0.8 and 8.0 μ M). Alkaloids from *L. casuarinoides* were also isolated and three new compounds, lycoparins A-C (**86** - **88**), were characterized, of which lycoparin C (**88**) was found to show a moderate AChE inhibitory activity (from bovine erythrocytes) with an IC₅₀ = 25 μ M [41]. Lycoparin A (**86**) and lycoparin B (**87**), both having a carboxylic acid at C-15 and one or two *N*-methyl groups, were found to show no inhibitory activity.

As to *Sarcococca* and *Buxus* species (Buxaceae), they are known to produce steroidal alkaloids, some of which were

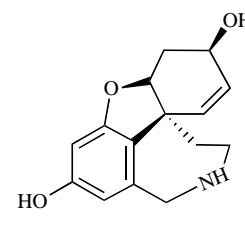
observed to evidence strong AChE inhibition [7, 42, 43]. New steroidal alkaloid AChEi from *S. saligna* and *S. hookeriana* were recently found. In the case of *S. saligna*, the study –which was a continuation of previous research [44, 45]– of the bioactive steroidal alkaloids of this species allowed the isolation of five new compounds (**89-93**) and two already known bases (**94** and **95**) [46]. The new alkaloids 5,14-dehydro-*N*_a-demethylsaracodine (**89**), 14-dehydro-*N*_a-demethylsaracodine (**90**), 16-dehydrosarcovagine (**91**), 2,3-dehydrosarsalignone (**92**) and 14,15-dehydrosarcovagine D (**93**), as well as the known compounds sarcovagine C (**94**) and salignarine C (**95**) were analyzed as anti-AChE agents. Only **91**, **92** and **95** were observed to exhibit significant AChE inhibition (IC₅₀ = 12.5, 7.0 and 19.7 μ M, respectively). Compounds **89** - **92**, **94** and **95** were also found to elicit strong and selective BChE inhibition [46]. The bioassay-guided chemical investigation of *S. hookeriana* allowed the isolation of two new pregnane-type steroidal alkaloids, hookerianamide H (**96**) and hookerianamide I (**97**) together with the known alkaloids *N*_a-methylepipachysamine D (**98**), sarcovagine C (**94**) and dictyophlebine (**99**) [47]. Compounds **94**, **96**, **97**, **98** and **99** were tested for their inhibitory properties towards AChE and all of them were observed to elicit significant inhibitory activity (IC₅₀ 2.9 – 34.1 μ M) as well as a potent anti-BChE activity (IC₅₀ 0.3 – 3.6 μ M). Further studies on *S. hookeriana* yielded two new 5 α -pregnane-type steroidal alkaloids, hookerianamides J (**100**) and K (**101**) [48]. Furthermore, eight known steroidal alkaloids, hookerianamide H (**96**) and hookerianamide I (**97**), chonemorphine (**102**), *N*-methylpachysamine A (**103**), epipachysamine-*E*-5-en-4-one (**104**), vagenine A (**105**), 2,3-dehydrosarsalignone (**92**) and sarcovagine C (**94**), were isolated and characterized. Alkaloids **94**, **100**, **101**, **102**, **103** and **104** were analyzed as AChEi. Compounds **100**, **101**, **102**

67: R₁ = H, R₂ = OCH₃68: R₁ = H, R₂ = H69: R₁ = CH₃, R₂ = H70: R₁ = CH₃, R₂ = OCH₃

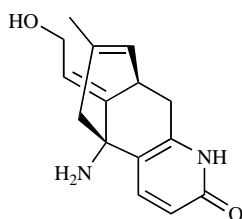
71



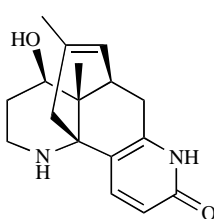
72



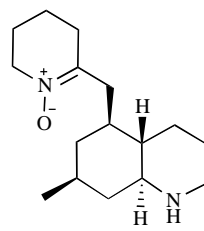
73



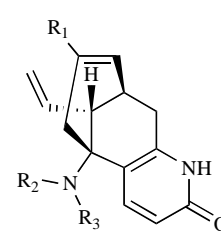
83

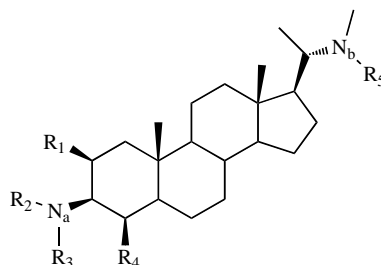


84



85

86: R₁ = COOH, R₂ = R₃ = CH₃87: R₁ = COOH, R₂ = CH₃, R₃ = H88: R₁ = CH₂OH, R₂ = R₃ = H



89: R₁=R₃=R₄=H, R₂=CH₃, R₅=COCH₃, Δ^{5,6}, Δ^{14,15}

90: R₁=R₃=R₄=H, R₂=CH₃, R₅=COCH₃, Δ^{14,15}

91: R₁=R₃=R₄=H, R₂=COCH₃, R₅=CH₃, Δ^{16,17}

92: R₁=R₃=H, R₂=COCCH₃=CHCH₃, R₄=O, R₅=CH₃, Δ^{2,3}, Δ^{5,6}

93: R₁=R₃=H, R₂=COCCH₃=CHCH₃, R₄=O, R₅=CH₃, Δ^{2,3}, Δ^{14,15}

94: R₁=R₃=H, R₂=COCCH₃=CHCH₃, R₄=OCOCH₃, R₅=CH₃

95: R₁=OH, R₂=COCCH₃=CHCH₃, R₃=R₄=H, R₅=CH₃, Δ^{5,6}

96: R₁=R₃=H, R₂=COH, R₄=O, R₅=CH₃, Δ^{2,3}

97: R₁=R₄=R₅=H, R₂=PhCO, R₃=CH₃

98: R₁=R₄=H, R₂=PhCO, R₃=R₅=CH₃

99: R₁=R₃=R₄=H, R₂=R₅=CH₃

100: R₁=R₃=H, R₂=COCH=C(CH₃)₂, R₄=OH, R₅=CH₃, Δ^{16,17}

101: R₁=R₄=H, R₂=R₃=R₅=CH₃, Δ^{4,5}, Δ^{14,15}

102: R₁=R₂=R₃=R₄=H, R₅=CH₃

103: R₁=R₄=H, R₂=R₃=R₅=CH₃

104: R₁=R₃=R₅=H, R₂=COCH=C(CH₃)₂, R₄=O, Δ^{5,6}

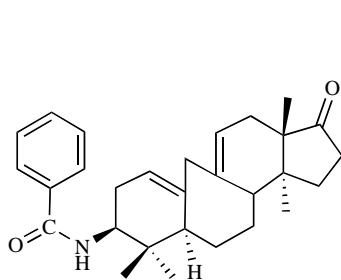
105: R₁=R₅=H, R₂=COCH=C(CH₃)₂, R₄=OCOCH₃

and **103** were observed to inhibit AChE moderately (IC₅₀ 22.1 – 48.5 μM) while **104** and **94** were found to be more active inhibitors (IC₅₀ 9.9 and 8.1 μM, respectively).

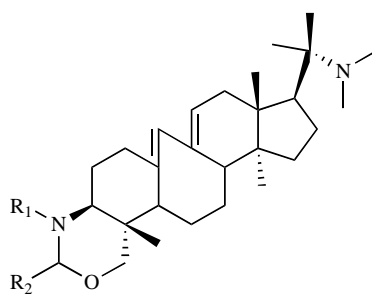
Phytochemical research on *Buxus hyrcana* allowed the identification of several Buxus alkaloids with cholinesterase inhibitory activity [43, 49]. Three new triterpenoidal alkaloids, namely 17-oxo-3-benzoylbuxadine (**106**), buxhyrcamine (**107**) and 31-demethylcyclobuxoviridine (**108**) along with sixteen known compounds, all tested as AChEi, were isolated and characterized in a recent study on *B. hyrcana* collected from Iran [50]. Weak AChE inhibitory activity was observed for N₆-dimethylcyclobuxoviridine

(**109**), papillozine C (**110**), cyclobuxophylline O (**111**) and arbora-1,9(11)-dien-3-one (**112**) (IC₅₀ = 35.4 - 47.9 μM). In the same *in vitro* assay, 17-oxo-3-benzoylbuxadine (**106**), buxhyrcamine (**107**), homomoenjodaramine (**113**), buxmicrophylline F (**114**), buxrugulosamine (**115**), moenjodaramine (**116**) and N₂₀-formyl-buxaminol E (**117**) were observed to show moderate AChE inhibition (IC₅₀ = 17.6 - 25.5 μM) while spirofor nabuxine (**118**) was found to elicit a strong AChE inhibitory activity (IC₅₀ = 6.3 μM).

The crude methanolic extract of *B. natalensis*, a plant used to improve memory in the elderly by traditional healers in South Africa, was found to elicit AChE inhibition (IC₅₀ =



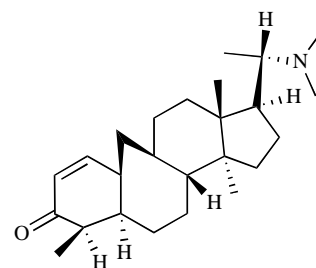
106



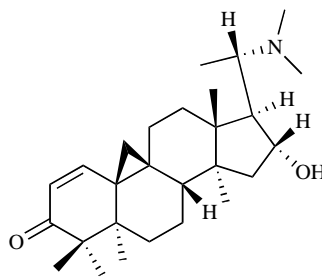
107: R₁=R₂=H

113: R₁=R₂=CH₃

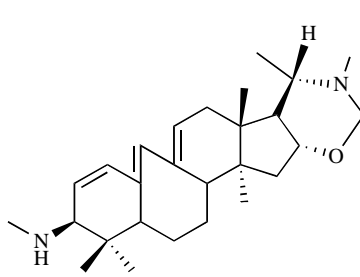
116: R₁=CH₃, R₂=H



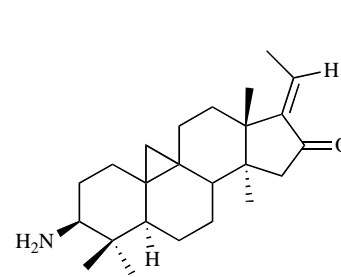
108



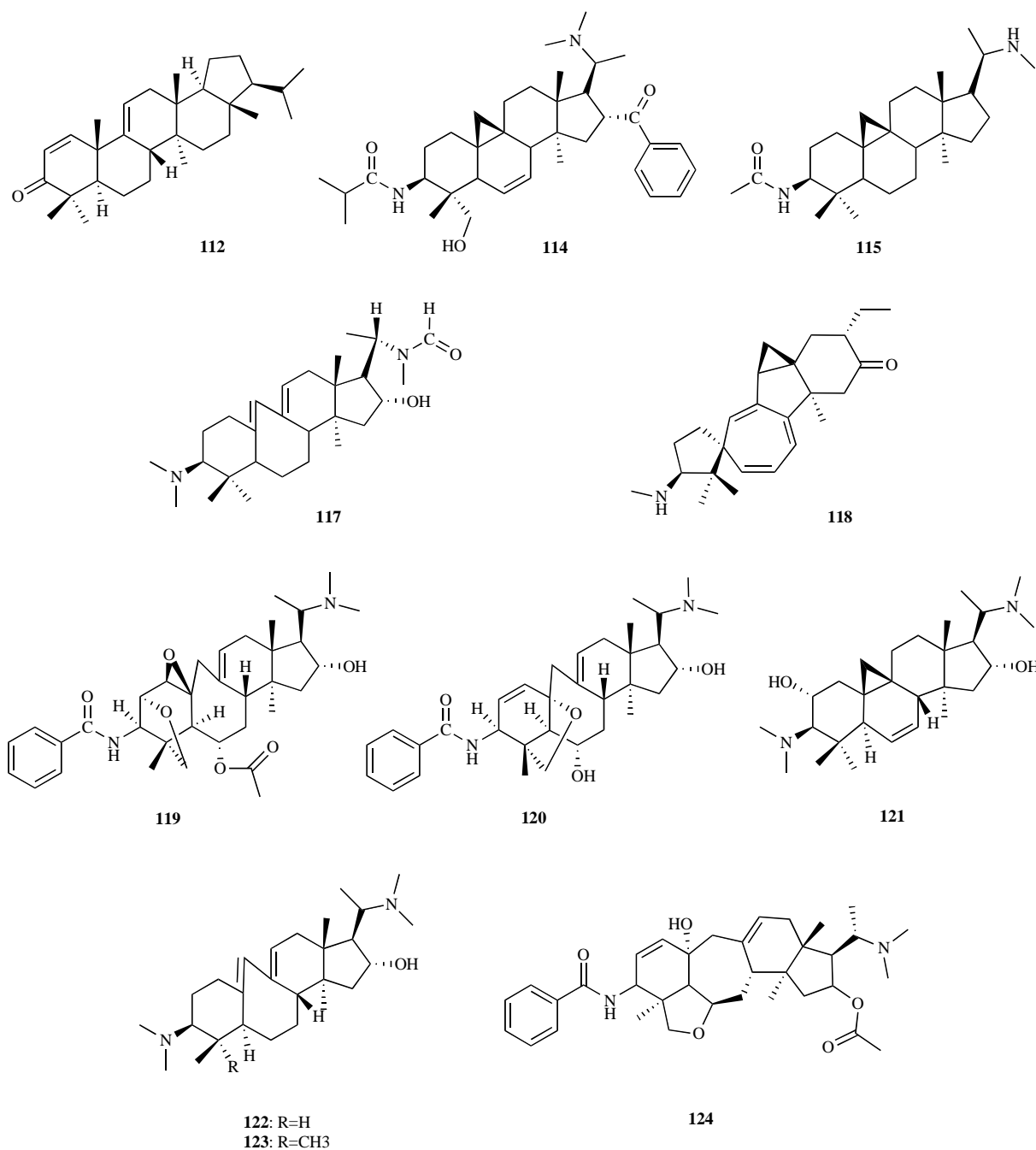
109



110

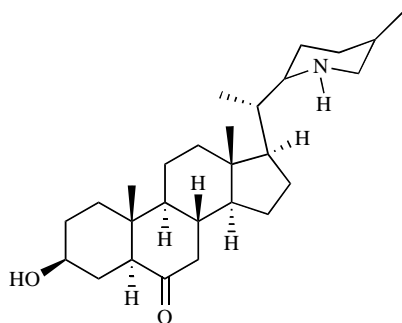


111

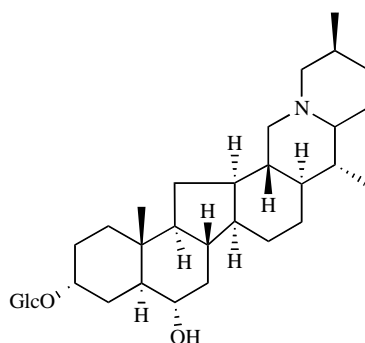


28 µg/mL). The phytochemical study of this extract yielded seven compounds **119** - **125** which were found to show either moderate or strong AChE inhibition [51]. The alkaloids *O*²-natafuranamine (**119**), *O*¹⁰-natafuranamine (**120**), cyclonatinol (**121**) and 31-demethylbuxaminol (**122**) were isolated and characterized for the first time while buxaminol A (**123**) was isolated for the first time as a natural product. Buxafuranamide (**124**) and buxalongifolamidine (**125**) were already known compounds. Compounds **119**, **120** and **124** were observed to exhibit a significantly higher AChE inhibitory activity compared to the rest, with IC₅₀ values of 3.0, 8.5, and 14.0 µM, respectively. Compounds **121**, **122**, **123** and **125** were observed to be less effective as AChEi (IC₅₀ = 22.9 – 30.2 µM).

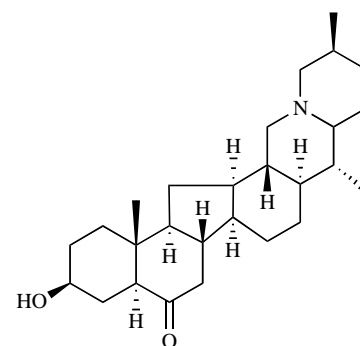
The bulbs of *Fritillaria* species (Liliaceae) which are known to be a traditional medicinal herb called “Beimu” in



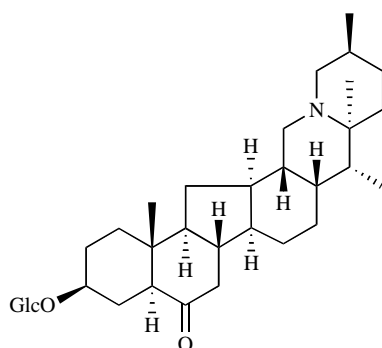
126



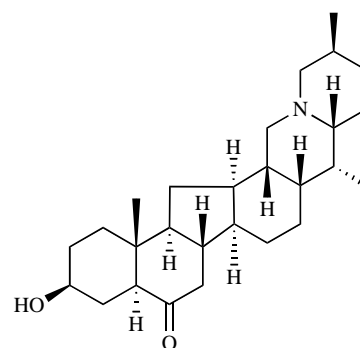
127



128



129

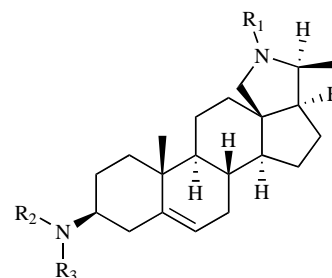


130

China are used as an antitussive, antiasthmatic and expectorant agent. In the past, in a chemical study carried out on alkaloids from *F. imperialis* bulbs new steroidal alkaloids with weak AChE inhibition and great selectivity towards BChE were identified [52]. Thus, taking into account this previous study, the bulbs from five *Fritillaria* species were studied and their alkaloids were identified and evaluated as cholinesterase inhibitors. Eighteen alkaloids were isolated and their effects on human whole blood cholinesterase were assayed. Results showed that *N*-demethyl-puqietinone (**126**) from *F. puziensis*, hupeheninoside (**127**) from *F. hupehensis*, ebeiedinone (**128**) from *F. ebeiensis* var. *purpurea*, yibeinoside A (**129**) from *F. pallidiflora* and chuanbeinone (**130**) from *F. delavayi* showed good AChE inhibition, with IC_{50} values of 6.4, 16.9, 5.7, 6.5 and 7.7 μ M, respectively. However, all of them were weaker AChEi than galanthamine ($IC_{50} = 1.9 \mu$ M). Compounds **127**, **128**, **129** and **130** were found to be stronger inhibitors on plasma BChE than galanthamine, the positive control [53].

In addition, the following steroidal alkaloids: conessine (**131**), isoconessimine (**132**), conessimin (**133**), conarrhimin (**134**) and conimin (**135**) were isolated in a bioassay-guided fractionation from the seeds of *Holarrhena antidysenterica* (Apocynaceae), a common Tibetan drug [54]. Compounds **131**, **133**, **134** and **135** were identified as active constituents against AChE. Conessimin (**133**) was found to be the strongest AChE inhibitor with an $IC_{50} = 4 \mu$ M whereas conessine (**131**), conarrhimin (**134**) and conimin (**135**) were found to be moderate AChE inhibitors ($IC_{50} = 21 - 28 \mu$ M). These findings indicate that the elimination of the *N*-methyl

group of pyrrolidine moiety induces a significant increase of activity while the cleavage of either one or two *N*-methyl groups at C-3 position reduces the inhibitory potency. Compound **133** was selected for a kinetic study through which it was demonstrated that its AChE inhibitory activity is both reversible and non-competitive. Molecular docking simulations of these compounds with AChE helped to understand their interactions with AChE and were consistent with the experimental results obtained [54].



131: $R_1=R_2=R_3=CH_3$

132: $R_1=R_2=CH_3, R_3=H$

133: $R_2=R_3=CH_3, R_1=H$

134: $R_1=R_2=R_3=H$

135: $R_1=R_3=H, R_2=CH_3$

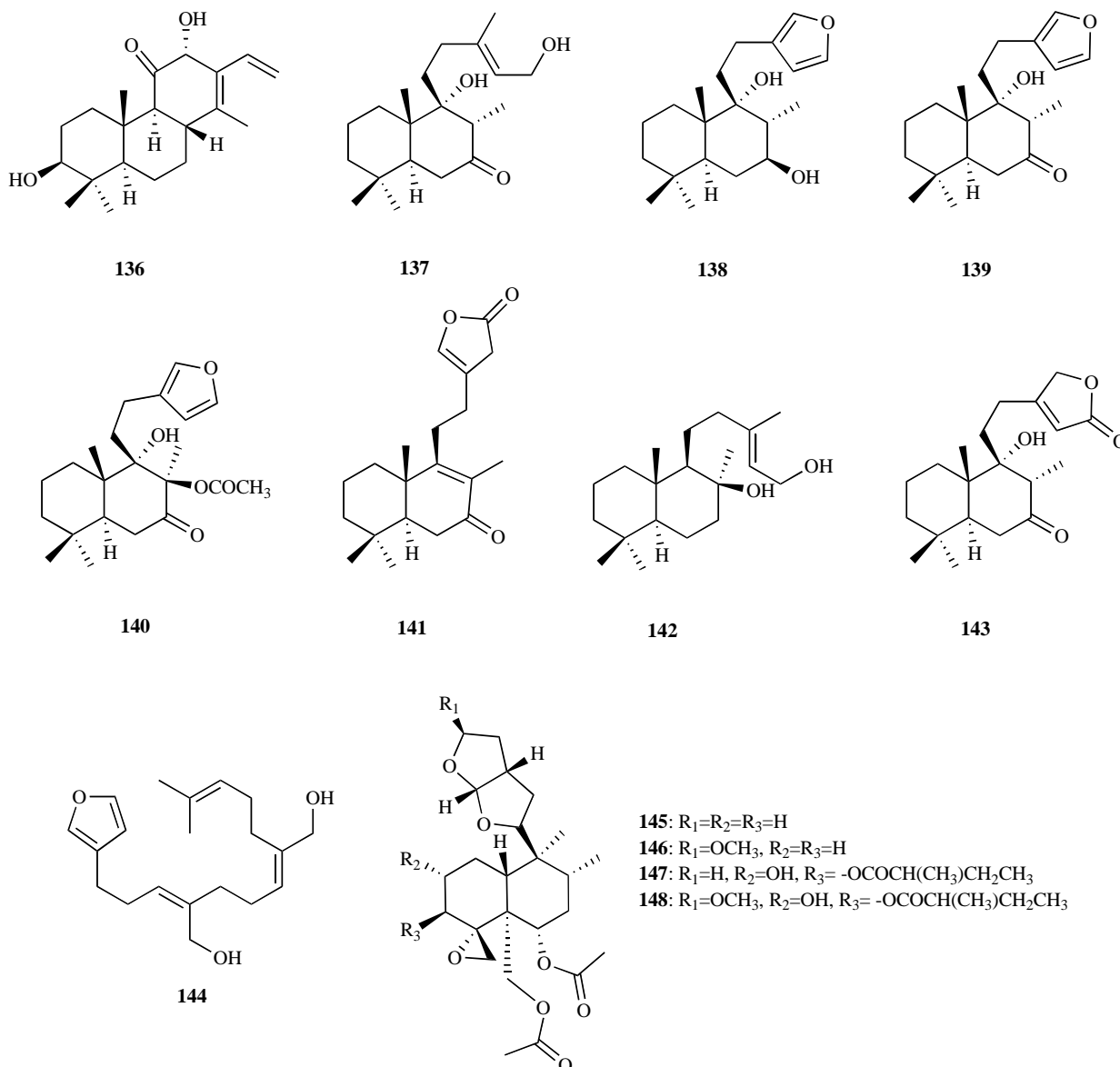
NON-ALKALOIDAL COMPOUNDS WITH AChE INHIBITORY ACTIVITY

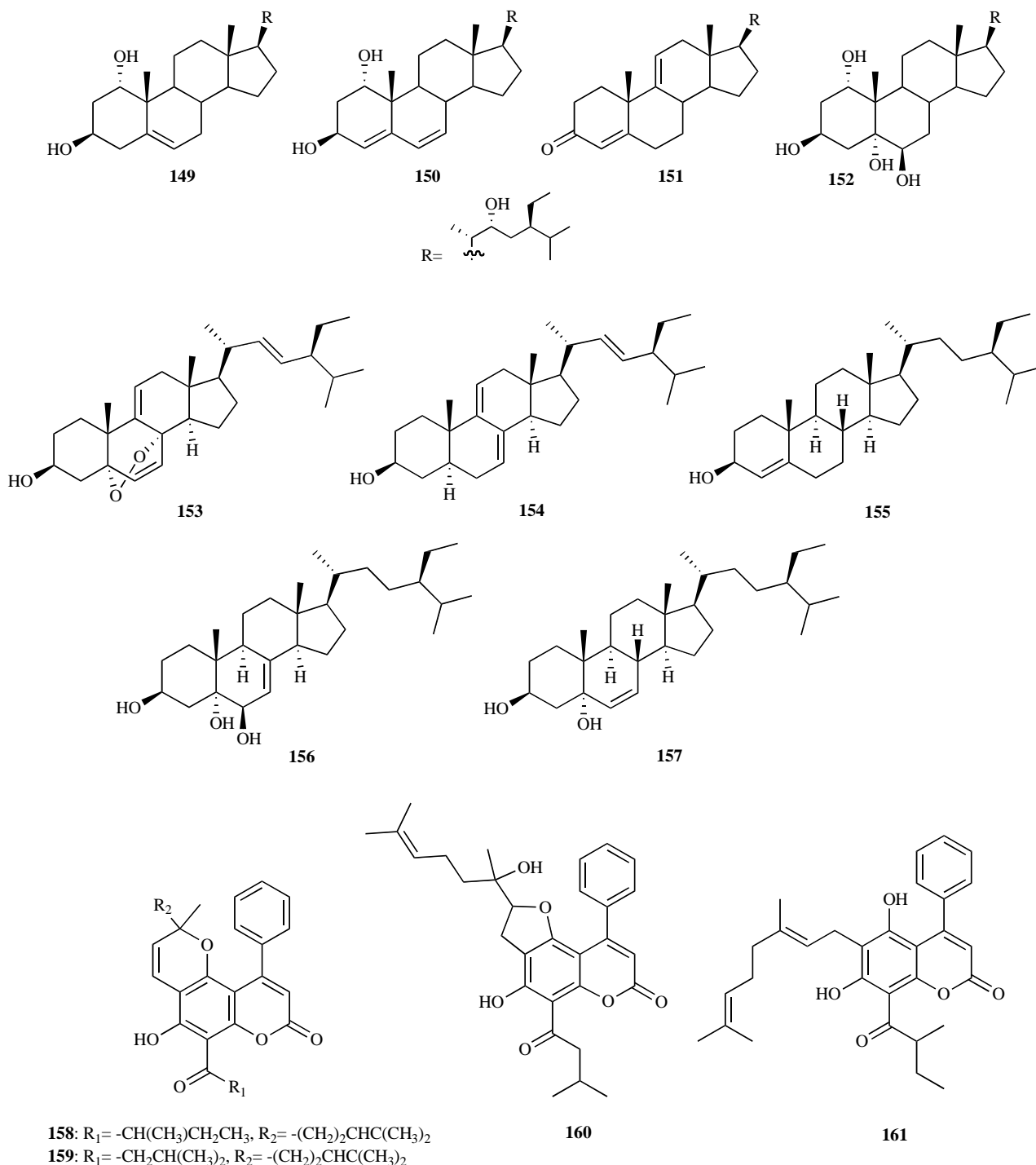
In spite of the fact that the majority of the most potent inhibitors known to date are alkaloids, several non-alkaloidal

AChEi from the plant kingdom and with different structural characteristics (terpenoids, sterols, flavonoids and phenolic compounds, etc) have been recognized as promising lead compounds as anti-AD agents [7-10]. Until 2006 only a few diterpenoids demonstrated to inhibit AChE [7]. However, further recent research has reported a larger number of compounds belonging to this group with the ability to exert either moderate or strong AChE inhibitory activity. In addition, a new cassane diterpene named niloticane (**136**) was isolated from the ethyl acetate bark extract of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana* (Fabaceae), a plant used in African traditional medicine [55]. Niloticane (**136**) was found to show an AChE inhibitory activity similar to that of the positive control galanthamine ($IC_{50} = 4$ and $2 \mu M$, respectively). In addition, one new (**137**) and six known (**138** - **143**) labdane-type diterpenoids were identified as AChE inhibitors present in an active extract obtained from *Leonurus heterophyllus* (Lamiaceae) by bioassay-guided fractionation [56]. Anti-AChE activity in **137** - **143** was

analyzed in rat brain cortex as a source of AChE enzyme. Leoheteronin A (**141**) and leopersin G (**143**), both having a 15,16 epoxy group, were observed to be strong inhibitors with IC_{50} values of 11.6 and $12.9 \mu M$, respectively. The new compounds leoheteronin F (**137**) and leoheteronin D (**142**) were found to show moderate inhibition with IC_{50} values of 16.1 and $18.4 \mu M$, respectively. Leoheterin (**138**), hispanone (**139**) and galeopsin (**140**), all having a furan ring at the side chain, were found to be weakly active ($IC_{50} = 38.5 - 42.7 \mu M$).

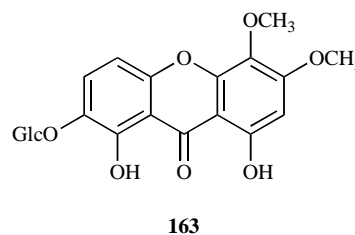
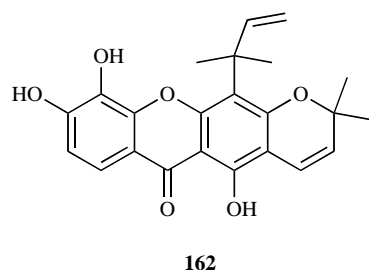
Asparagus adscendens (Asparagaceae) is a medicinal plant traditionally used as a nerve tonic and remedy for memory impairments in Pakistan. Conyopodiol (**144**), which was isolated from the chloroform fraction of the methanolic extract of *A. adscendens*, was found to elicit AChE and BChE inhibition with an $IC_{50} = 2.17$ and $11.21 \mu M$, respectively. This dual cholinesterase inhibitor was also observed to show potential as a bivalent ligand in molecular docking studies. Four non-competitive AChEi **145** - **148**





were obtained in the chemical investigation of *Ajuga bracteosa* (Lamiaceae), another medicinal plant from Pakistan [58]. The diterpenoid dihydroajugapitin (**148**) was found to be the most active against AChE with an IC₅₀ = 14.0 μM. Compared to compound **148**, lupulin A (**147**), clerodin A (**146**) and dihydroclerodin (**145**) were observed to be less efficient inhibitors (IC₅₀ = 19.2, 26.5 and 35.2, respectively) and diterpenoids **145** - **148** were observed to elicit BChE inhibition. These findings indicate that the presence of a methoxy group at C-15 increases cholinesterase inhibitory potential.

From the methanolic extract of *Haloxylon recurvum* (Chenopodiaceae), a plant used in Pakistan for the treatment of several neuronal disorders, four new C-24 alkylated sterols **149** - **152** and five known sterols **153** - **157** were isolated [59]. Compounds **149** - **157** were analyzed as AChEi and were found to inhibit AChE in a concentration-dependent manner acting as non-competitive inhibitors. Haloxysterol B (**150**) and haloxysterol C (**151**), whose IC₅₀ values were 0.89 and 1.0 μM, respectively, were found to be the most active AChE inhibitors. Their inhibitory activity was observed to be similar to that of galanthamine (IC₅₀ 0.5

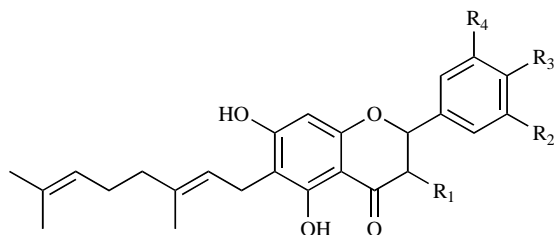


μM). Haloxysterol A (**149**) and 24-ethyl-cholest-6-ene-3,5-diol (**157**) were also observed to show potent AChE inhibition with IC_{50} values of 8.3 and 3.5 μM , respectively. Haloxysterol D (**152**), 5 α ,8 α -epidioxy-(24*S*)-ethyl-cholest-6,9(11),22(*E*)-triene-3 β -ol (**153**), (24*S*)-ethyl-cholest-7,9(11),22(*E*)-triene-3 β -ol (**154**), lawsaritol (**155**) and 24-ethyl-cholest-7-ene-3,5,6-triol (**156**) were found to elicit a moderate anti-AChE activity (IC_{50} = 13.7 - 26.4 μM).

On the other hand, a bioassay-guided fractionation on the bark of *Mesua elegans* (Clusiaceae) allowed the isolation of the anti-AChE components responsible for the activity observed for the extract. Mesuagenin B (**158**) was the most potent inhibitor (IC_{50} = 0.7 μM) and mesuagenin A (**159**), mesuagenin D (**160**) and 5,7-dihydroxy-8-(3-methylbutanoyl)-6-[(*E*)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl]-4-phenyl-2H-chromen-2-one (**161**) were observed to elicit strong AChE inhibition with IC_{50} values of 1.06, 8.73 and 3.06 μM , respectively [60]. This bioassay-guided study is the first report of 4-phenylcoumarins as AChEi.

In the past, some examples of xanthenes with moderate AChE inhibitory activity were reported [7]. Further recent research introduced two new xanthenes, **162** and **163**, to this group of AChEi also with moderate inhibitory activity. Macluraxanthone (**162**) which was obtained from the root of *Maclura pomifera* (Moraceae) was found to elicit non-competitive AChE inhibition (IC_{50} = 8.47 μM) [61]. Furthermore, docking studies yielded results supporting *in vitro* results. Triptexanthoside C (**163**) which was isolated from the methanolic extract of *Gentianella amarella* ssp. *acuta* (Gentianaceae) was observed to elicit AChE inhibition with an IC_{50} = 13.8 μM [62].

The methanolic extract of *Paulownia tormentosa* fruits, with a potent inhibitory activity against AChE, was subjected to bioactivity-guided fractionation which allowed the identification of some geranylated flavonoids, such as



164: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_4=\text{OH}$, $\text{R}_3=\text{OCH}_3$

165: $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{R}_4=\text{OH}$, $\text{R}_3=\text{OCH}_3$

166: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$, $\text{R}_3=\text{R}_4=\text{OH}$

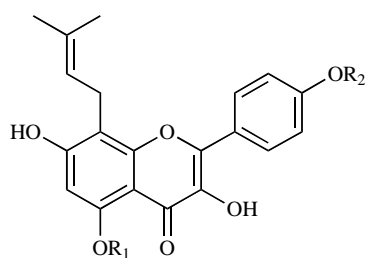
cholinesterase inhibitors, of which the most active resulted to be 6-geranyl-3,3',5,5',7-pentahydroxy-4'-methoxyflavane (**164**), 6-geranyl-3',5,5',7-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanone (**165**) and diplacone (**166**), which were observed to show mixed-type inhibition of human AChE with IC_{50} = 15.6, 22.9 and 7.2 μM , respectively [63]. In addition, the fact that these compounds were also observed to elicit significant BChE inhibition makes them interesting as potential dual inhibitors.

The flavonols present in *Sophora flavescens* (Fabaceae) were studied for several biological activities relevant for AD. Sophoflavescenol (**167**), icaritin (**168**), demethylanhydroicaritin (**169**), 8-C-lavandurylkaempferol (**170**) and kaempferol (**171**) were all found to be good AChE inhibitors, with IC_{50} values of 8.37, 6.47, 6.67, 5.16 and 3.31 μM , respectively [64]. Compounds **167-171** were also found to elicit significant BChE and BACE1 inhibition.

The methanol extract from roots of *Morus lhou* (Moraceae), a polyphenol-rich plant, was found to yield nine flavonoids (**172** - **180**) of which eight showed AChE inhibition [65]. A new flavone, 5'-geranyl-4'-methoxy-5,7,2'-trihydroxyflavone (**172**), was identified as the most potent inhibitor (IC_{50} = 10.95 μM). 5'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyflavone (**173**), kuwanon U (**174**), kuwanon E (**175**), morusin (**176**), cyclomorusin (**178**), neocyclomorusin (**179**) and kuwanon C (**180**) were all observed to be moderate AChE inhibitors (IC_{50} = 16.21 - 36.4 μM) and morusinol (**177**) was observed to be weakly active (IC_{50} = 173.49 μM). C-3 prenylated flavones **176**, **178**, **179** and **180** were found to be noncompetitive inhibitors whereas those unsubstituted at C-3 **172-175** were mixed inhibitors. Flavonoids **172** - **180** were also found to inhibit BChE [65].

On the other hand, three potent AChEi were obtained from *Broussonetia papyrifera*, another plant belonging to the Moraceae family. From the ethanolic extract of the roots of *B. papyrifera* which was found to elicit cholinesterase inhibitory activity, prenylated flavonols **181** - **183** were isolated and characterized [66]. 8-(1,1-dimethylallyl)-5'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxyflavonol (**181**), papyriflavonol (**182**) and brousoflavonol (**183**) were observed to inhibit human erythrocyte AChE with IC_{50} values of 0.82, 3.1 and 2.7 μM , respectively. Compound **181**, the most potent, acted as a time-dependent, slow reversible inhibitor.

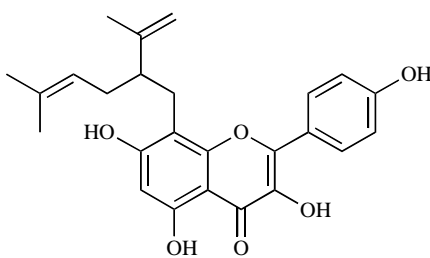
Isoorientin (**184**) and isovitexin (**185**) were identified as the compounds responsible for the AChE inhibition observed in the extracts from flowers and rhizomes of *Iris pseudopumila* (Iridaceae) from Italy [67]. Compound **184**



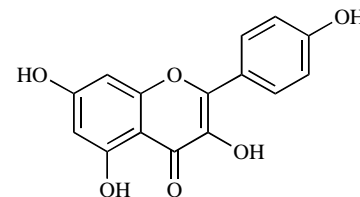
167: R₁=CH₃, R₂=H

168: R₁=H, R₂=CH₃

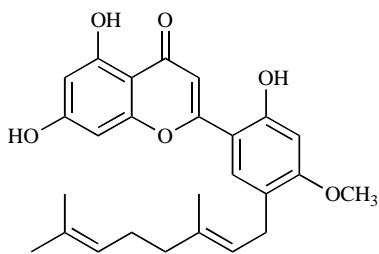
169: R₁=R₂=H



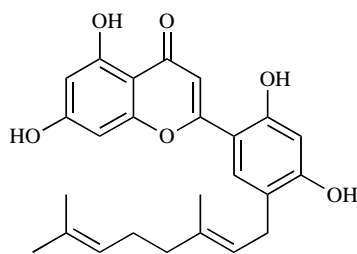
170



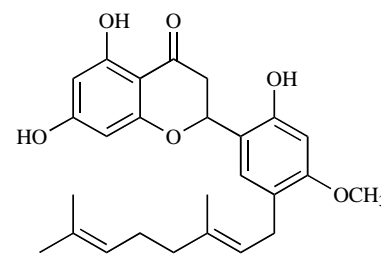
171



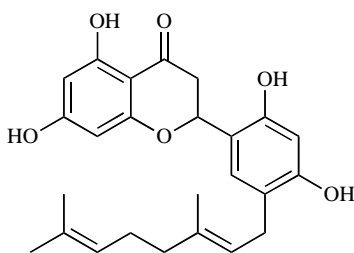
172



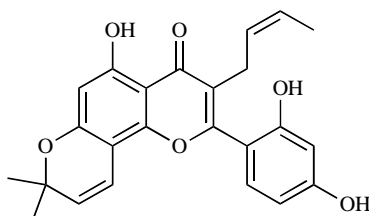
173



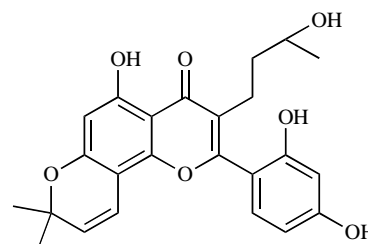
174



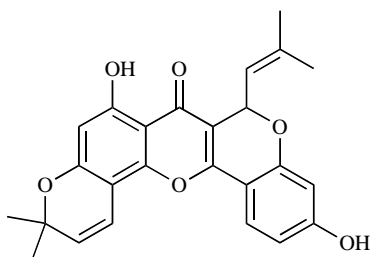
175



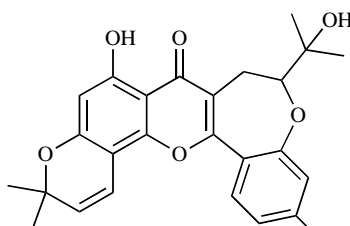
176



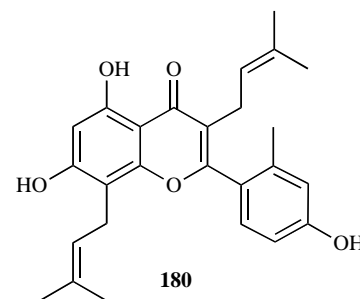
177



178



179

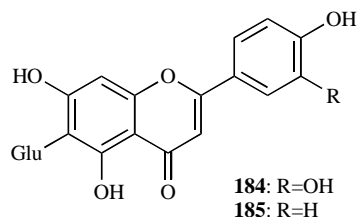
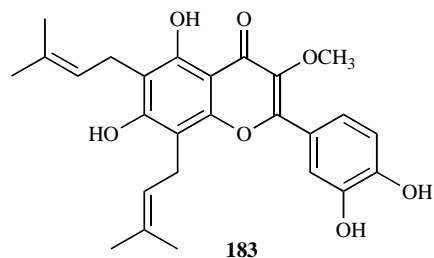
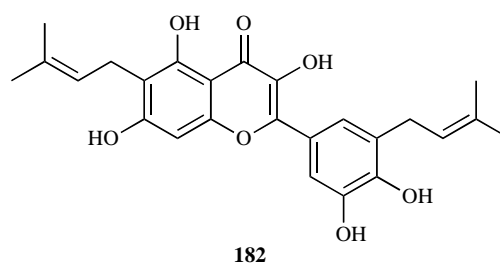
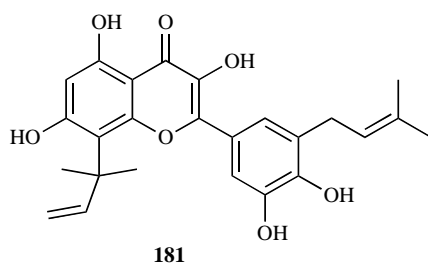


180

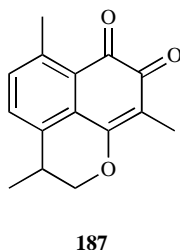
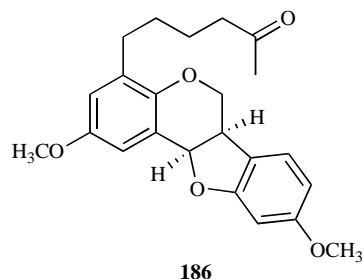
was observed to be the highest inhibitor with an IC₅₀ = 26.8 μM while **185**, lacking the 3'-hydroxy group in ring B, was observed to show an IC₅₀ value of 36.4 μM. Both compounds were also found to have the ability of significantly inhibiting BChE.

On the other hand, a pterocarpan with moderate AChE inhibition was isolated from the polar extract of *Zygophyllum*

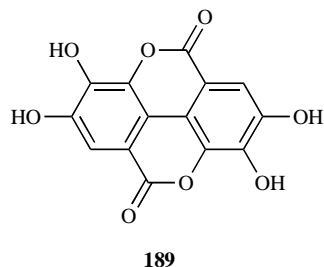
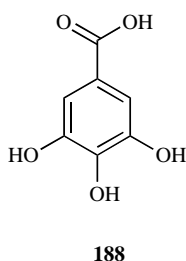
eurypterum (Zygophyllaceae) collected in Pakistan. Atricarpan D [(-)-2,9-dimethoxy-4-(5-oxohexyl)pterocarpan] (**186**) was observed to inhibit AChE with an IC₅₀ = 20.5 μM [68]. Interestingly, three other pterocarpan with similar structure were obtained along with atricarpan D but they were found to be inactive against AChE. Nevertheless, the four pterocarpan were all found to be BChE inhibitors.



A study conducted on AChE and BChE inhibitory activity of coumarins and naphthoquinones obtained from *Mansonia gagei* (Sterculiaceae) proposed a novel class of cholinesterase inhibitor, mansonones or 1,2-naphthoquinones [69]. The level of cholinesterase inhibition observed in this study seemed to correlate to the presence of a fused pyran ring and a substituent at C-6 being present in the molecule. Mansonone E (**187**) was observed to be the most active AChE ($IC_{50} = 23.5 \mu M$) and BChE inhibitor.



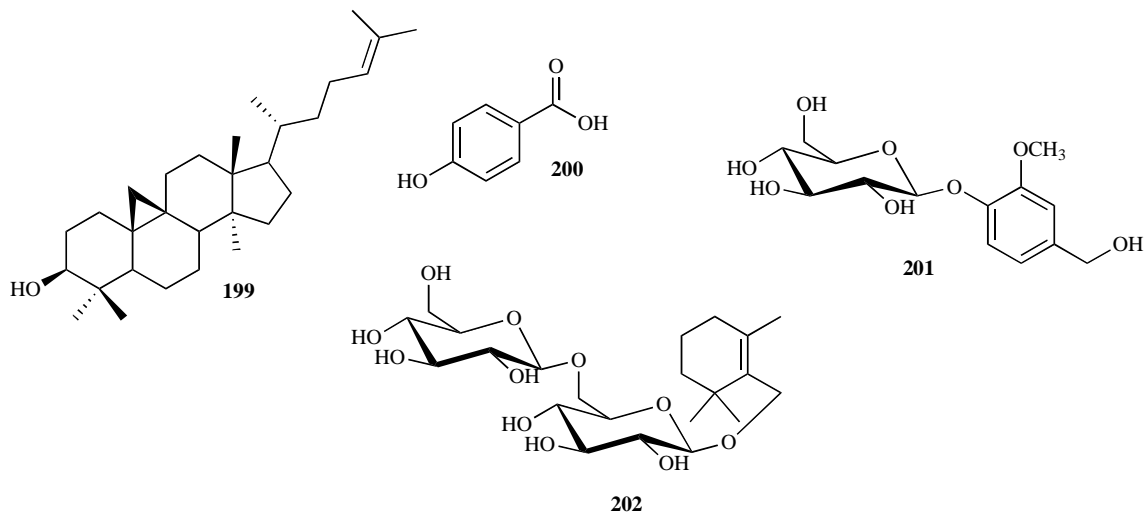
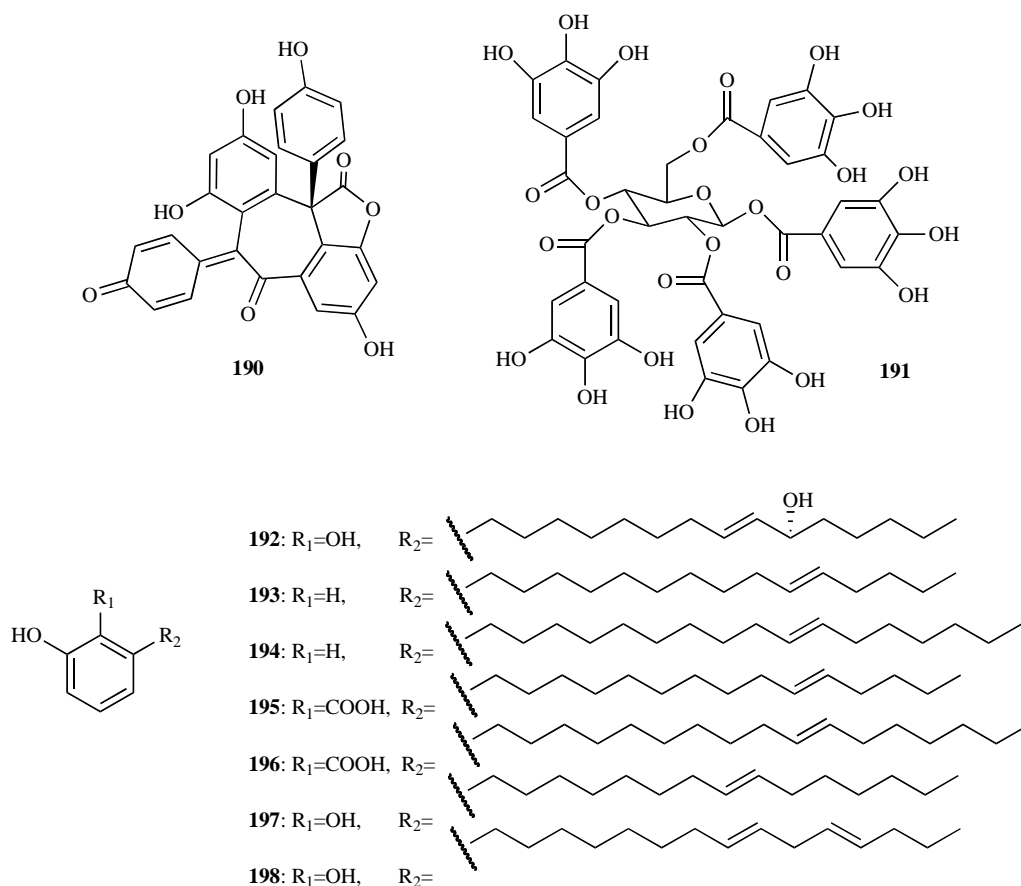
In several studies published during the period covered in the present review various phenolic compounds with different structural characteristics were reported as AChEi. Some of them are structurally simple such as gallic acid (**188**, $IC_{50} = 5.85 \mu M$) and ellagic acid (**189**, $IC_{50} = 45.63 \mu M$) [70]. Hopeahainol A (**190**), which was identified as a new compound isolated from *Hopea hainensis*, was observed



to elicit a notable AChE inhibition ($IC_{50} = 4.33 \mu M$) with respect to huperzine A ($IC_{50} = 1.6 \mu M$), as a reversible mixed-type inhibitor [71].

The bioassay-guided fractionation of the extract from *Terminalia chebula* (Combretaceae) fruits allowed the isolation of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (**191**) which demonstrated to be a significant AChE inhibitor ($IC_{50} = 29.9 \mu M$) [72]. This gallotanin which has been also isolated from other different sources and which is known by its diverse biological activities, was observed to exert good BChE inhibition and potent antioxidant activity (FRAP assay) in this study.

The bioassay-guided extraction of the stem bark of *Knema laurina* (Myristicaceae) yielded two active fractions (dichloromethane and hexane) which were subjected to chromatographic separation. That latter yielded five alkenyl phenol and salicylic acid derivatives **192** - **196**, of which **192** and **193** were new compounds [73]. Compounds **192**, **195** and **196**, all having salicylic acid moiety, were observed to strongly inhibit AChE with an $IC_{50} = 3.182$, 2.172 and 0.573 μM , respectively. Compounds **193** and **194**, with no carboxyl moiety, were observed to be good AChE inhibitors ($IC_{50} = 17.224$ and 13.114 μM , respectively). These findings suggest that the acidic group is key to good AChE inhibition. It was also observed that anti-AChE activity dramatically decreased when the acidic and the phenolic hydroxy group were methylated. Two catechol alkenyls were isolated from the fruits of *Semecarpus anacardium* (Anacardiaceae), a species used in Ayurvedic medicine for retarding and treatment of memory loss [74]. Compounds **197** and **198** were identified as active components of the dichloromethane extract through a fractionation guided by the detection of AChE inhibition. Microplate assay revealed that these catechol alkenyls are moderate and weak selective AChEi. Compound **197**, with a double bond in the aliphatic chain, was identified as a stronger inhibitor ($IC_{50} = 39.7 \mu M$) with respect to compound **198**, with two double bonds in the aliphatic chain ($IC_{50} = 108 \mu M$).



On the other hand, four structurally diverse AChEi were isolated from the polar extract of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) stamens [75]. Cycloartenol (**199**), *p*-hydroxybenzoic acid (**200**), vanilloside (**201**) and nuciferoside (**202**) were found to elicit good and noncompetitive inhibition against AChE with an IC₅₀ = 11.89, 20.07, 4.55 and 3.2 μM, respectively. In the same study, compounds **199**, **200** and **202** were observed to exert moderate BChE inhibition and compounds **199** - **202** were found to show no inhibition against BACE1.

PLANT EXTRACTS, FRACTIONS AND ESSENTIAL OILS WITH AChE INHIBITORY ACTIVITY

Table 1 summarizes the studies published from 2006 to 2012 on plant extracts, fractions and essential oils that have been found to be good AChE inhibitors (IC₅₀ < 500 μg/mL). Those plants included in other recent reviews were omitted [76, 77]. Extracts and fractions under further phytochemical studies that led to the discovery of AChE inhibitors were also omitted. Whenever possible, reference is made to the

Table 1. Plant Extracts, Fractions and Essential Oils with AChE Inhibitory Activity

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC ₅₀	Refs.
Acanthaceae					
<i>Andrographis paniculata</i>	H ₂ O:EtOH	Aerial		222.41 µg/ml	[78]
Amaranthaceae					
<i>Salsola oppositifolia</i>	Alkaloids	Aerial		70.0 µg/ml	[79]
<i>Salsola soda</i>	Alkaloids	Aerial		64.1 µg/ml	[79]
<i>Salsola tragus</i>	Alkaloids	Aerial		30.2 µg/ml	[79]
Amaryllidaceae					
<i>Crinum jagus</i>	MeOH	Leaf	74.25 (42 µg/ml)		[80]
<i>Crinum moorei</i>	50% MeOH PE DCM EtOH	Bulb		21.5 µg/ml 18.9 µg/ml 2.9 µg/ml 22.5 µg/ml	[81]
<i>Nerine undulata</i>	Alkaloids	Bulb		14.3 µg/ml ^a	[82]
<i>Scadoxus multiflorus</i>	Alkaloids	Bulb		313.5 µg/ml ^a	[82]
<i>Sprekelia formosissima</i>	Alkaloids	Bulb		209.7 µg/ml ^a	[82]
<i>Zephyranthes grandiflora</i>	Alkaloids	Bulb		39.2 µg/ml ^a	[83]
Anacardiaceae					
<i>Harpephyllum caffrum</i>	DCM MeOH	Leaf Stem bark Leaf		0.17 mg/ml 0.02 mg/ml 0.12 mg/ml	[84]
<i>Pistacia atlantica</i>	H ₂ O	Leaf		0.87 µg/ml	[85]
<i>Pistacia lentiscos</i>	H ₂ O	Leaf		13.67 µg/ml	[85]
<i>Sclerocarya birrea</i>	DCM MeOH	Young stem Leaf Operculum Young stem		0.15 mg/ml 0.10 mg/ml 0.35 mg/ml 0.47 mg/ml	[84]
<i>Spondias mombin</i>	MeOH	Root bark	64.77 (42 µg/ml)		[80]
Apiaceae					
<i>Centella asiatica</i>	H ₂ O:EtOH	Whole plant		106.55 µg/ml	[78]
Apocynaceae					
<i>Geissospermum vellosii</i>	Alkaloids	Stem bark		2.9 µg/ml	[86]
Araceae					
<i>Colocasia antiquorum</i>	50% MeOH PE DCM	Tuber		7.9 µg/ml 6.4 µg/ml 168.1 µg/ml	[81]
<i>Pinellia ternata</i>	Alkaloids	Tuber		56.2 µg/ml	[87]
Areaceae					
<i>Phoenix dactylifera</i>	Hexane	Seed	52.96 (300 µg/ml)		[88]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC ₅₀	Refs.
Asparagaceae					
<i>Leopoldia comosa</i>	Hexane	Bulb		104.9 µg/ml	[89]
Asphodelaceae					
<i>Aloe ferox</i>	50% MeOH PE DCM	Leaf		84.0 µg/ml 37.7 µg/ml 62.6 µg/ml	[81]
Asteraceae					
<i>Achyrocline tomentosa</i>	Organic	Aerial		0.4847 mg/ml	[90]
<i>Arnica chamissonis</i> ssp. <i>foliosa</i>	MeOH Hexane	Flower		43 µg/ml 29 µg/ml	[91]
<i>Chromolaena tequendamensis</i>	MeOH	Whole plant		359.36 mg/l	[92]
<i>Eupatorium viscidum</i>	Organic	Aerial		0.4792 mg/ml	[90]
<i>Pulicaria stephanocarpa</i>	CHCl ₃	Leaf	61.43 (0.2 mg/ml)		[93]
<i>Schistocarpha sinforosi</i>	MeOH	Whole plant		145.31 mg/l	[92]
<i>Trichocline reptans</i>	Organic	Aerial		0.1118 mg/ml	[90]
Berberidaceae					
<i>Berberis darwinii</i>	MeOH	Stem bark		1.23 µg/ml	[94]
Boraginaceae					
<i>Onosma bracteata</i>	MeOH	Leaf	59.73 (250 µg/ml)		[95]
Buddlejaceae					
<i>Buddleja salviifolia</i>	DCM:MeOH (1:1)	Whole plant		0.05 mg/ml	[96]
Burseraceae					
<i>Boswellia socotranao</i>	CHCl ₃	Resin	71.21 (0.2 mg/ml)		[93]
Cistaceae					
<i>Cistus laurifolius</i>	EtOH	Leaf	80.07 (200 µg/ml)		[97]
Combretaceae					
<i>Terminalia bellirica</i>	MeOH	Fruit		14.37 µg/ml	[70]
Convolvulaceae					
<i>Evolvulus alsinoides</i>	H ₂ O:EtOH	Whole plant		141.76 µg/ml	[78]
<i>Ipomoea asarifolia</i>	MeOH	Leaf		0.12 µg/ml	[98]
Crassulaceae					
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	EtOAc	Leaf		0.16 mg/ml	[98]
Cucurbitaceae					
<i>Eureiandra balfourii</i>	MeOH	Tuber	58.61 (0.2 mg/ml)		[93]
Cupressaceae					
<i>Juniperus phoenicea</i>	EtOH	Leaf	53.44 (400 µg/ml)		[99]
<i>Juniperus turbinata</i>	Phenolic	Leaf	83.84 (400 µg/ml)		[99]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC ₅₀	Refs.
Ericaceae					
<i>Rhododendron yedoense</i> var. <i>poukhanense</i>	80% MeOH	Bark		169.01 µg/ml	[100]
Eucommiaceae					
<i>Eucommia ulmoides</i>	H ₂ O	Bark		172 µg/ml	[101]
Euphorbiaceae					
<i>Alchornia laxiflora</i>	MeOH	Stem bark	41.12 (42 µg/ml)		[80]
<i>Cephalocroton socotranus</i>	CHCl ₃	Bark	51.1 (0.2 mg/ml)		[93]
<i>Jatropha curcas</i>	MeOH	Leaf		0.25 mg/ml	[98]
<i>Jatropha gossypifolia</i>	MeOH	Leaf		0.05 mg/ml	[98]
Fabaceae					
<i>Acacia nilotica</i>	H ₂ O	Root		0.079 mg/ml ^b	[102]
<i>Acacia raddiana</i>	H ₂ O	Bark		33.91 µg/ml	[85]
<i>Cassia obtusifolia</i>	EtOH	Seed		81.6 µg/ml ^c	[103]
<i>Chamaecrista mimosoides</i>	DCM:MeOH (1:1) H ₂ O	Root		0.03 mg/ml 0.35 mg/ml	[96]
<i>Genista tenera</i>	EtOAc	Aerial	77.0 (70 µg/ml)		[105]
<i>Peltophorum pterocarpum</i>	MeOH	Leaf Stem bark	49.5 (42 µg/ml) 68.85 (42 µg/ml)		[80]
<i>Schotia brachypetala</i>	DCM:MeOH (1:1) H ₂ O	Bark		0.27 mg/ml 0.49 mg/ml	[96]
<i>Senna alata</i>	EtOAc	Leaf		0.08 mg/ml	[98]
<i>Spatholobus suberectus</i>	H ₂ O EtOH	Whole plant		85 µg/ml 9 µg/ml	[104]
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	EtOAc Alkaloids	Seed		53.00 µg/ml 9.23 µg/ml	[106]
Gobulariaceae					
<i>Globularia alypum</i>	H ₂ O	Root		16.67 µg/ml	[85]
Guttiferaceae					
<i>Callophyllum inophyllum</i>	MeOH	Root bark	56.52 (42 µg/ml)		[80]
Hypericaceae					
<i>Hypericum perforatum</i>	MeOH	Whole plant		178 µg/ml	[91]
Illiciaceae					
<i>Illicium verum</i>	H ₂ O:EtOH Butanol EtOAc CHCl ₃ Oil	Fruit		58.67 µg/ml 44.94 µg/ml 83.75 µg/ml 103.03 µg/ml 39.89 µg/ml	[107]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC ₅₀	Refs.
Lamiaceae					
<i>Cyclotrichium niveum</i>	EtOAc	Whole plant	83.11 (250 µg/ml)		[108]
	DCM		70.82 (250 µg/ml)		
<i>Hyssopus officinalis</i>	Hexane	Whole plant	55.0 (400 µg/ml)		[91]
<i>Lavandula viridis</i>	MeOH	Aerial		244.55 µg/ml	[109]
<i>Marrubium vulgare</i>	Acetone	Aerial	62.70 (25 µg/ml)		[110]
<i>Origanum ehrenbergii</i>	Essential oil	Aerial		0.3 µg/ml	[111]
<i>Origanum majorana</i>	Essential oil	Leaf		36.40 µg/ml	[112]
<i>Origanum syriacum</i>	Essential oil	Aerial		1.7 µg/ml	[111]
<i>Pycnostachys reticulata</i>	50% MeOH	Leaf		28.8 µg/ml	[81]
	EtOH		8.8 µg/ml		
<i>Salvia chionantha</i>	Essential oil	Aerial	56.7 (500 µg/ml)		[113]
<i>Salvia fruticosa</i>	DCM	Whole plant	51.07 (100 µg/ml)		[114]
<i>Salvia lerifolia</i>	Essential oil	Aerial		0.32 µl/ml	[115]
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	H ₂ O	Root		50 µg/ml	[104]
	EtOH		5 µg/ml		
<i>Teucrium royleanum</i>	MeOH	Whole plant	52.4 (40 µg/0.2ml)		[116]
Menispermaceae					
<i>Stephania pierrei</i>	EtOH	Tuber		5.68 µg/ml	[117]
<i>Tinospora cordifolia</i>	MeOH	Stem		38.36 µg/ml	[118]
Moraceae					
<i>Dorstenia gigas</i>	CHCl ₃	Leaf	65.12 (0.2 mg/ml)		[93]
<i>Ficus religiosa</i>	MeOH	Stem bark		73.69 µg/ml	[118]
Myristicaceae					
<i>Myristica fragrans</i>	H ₂ O:EtOH	Seed		133.28 µg/ml	[78]
<i>Embelia ribes</i>	MeOH	Root		23.04 µg/ml	[118]
Orchidaceae					
<i>Orchis mascula</i>	MeOH	Root	56.99 (250 µg/ml)		[119]
Paeoniaceae					
<i>Paeonia lactiflora</i>	H ₂ O	Root		20 µg/ml	[104]
	EtOH		8 µg/ml		
<i>Paeonia veitchii</i>	H ₂ O	Root		14 µg/ml	[104]
	EtOH		45 µg/ml		
Papaveraceae					
<i>Corydalis intermedia</i>	MeOH	Whole plant	84 (100 µg/ml)		[120]
	H ₂ O	Tuber	97 (100 µg/ml)		
		Whole plant	57 (100 µg/ml)		
		Tuber	78 (100 µg/ml)		

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC ₅₀	Refs.
Papaveraceae					
<i>Corydalis solida</i> ssp. <i>laxa</i>	MeOH	Whole plant	89 (100 µg/ml)		[120]
	H ₂ O	Tuber	96 (100 µg/ml)		
		Whole plant	78 (100 µg/ml)		
		Tuber	85 (100 µg/ml)		
<i>Corydalis solida</i> ssp. <i>slivenensis</i>	MeOH	Whole plant	82 (100 µg/ml)		[120]
	H ₂ O	Tuber	97 (100 µg/ml)		
		Whole plant	48 (100 µg/ml)		
		Tuber	87 (100 µg/ml)		
Phyllanthaceae					
<i>Emblica officinalis</i>	MeOH	Fruit		29.26 µg/ml	[70]
Pinaceae					
<i>Pinus halepensis</i>	EtOH	Needle	60.15 (200 µg/ml)		[121]
	Essential oil	Twig	83.91 (200 µg/ml)		
<i>Pinus heldreichii</i> subsp. <i>leucodermis</i>	Essential oil	Needle		51.1 µg/ml	[122]
<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>nigra</i>	Essential oil	Needle		94.4 µg/ml	[122]
<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>calabrica</i>	Essential oil	Needle		101.5 µg/ml	[122]
<i>Pinus pinaster</i>	Pycnogenol	Bark	63.33 (200 µg/ml)		[121]
Piperaceae					
<i>Piper nigrum</i>	EtOH	Fruit		30.67 µg/ml	[117]
Poaceae					
<i>Cymbopogon jawarancusa</i>	MeOH	Whole plant	72.36 (250 µg/ml)		[95]
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Essential oil	Fresh leaf (mountain reg./ desert reg.)		0.26 / 0.67 mg/ml	[123]
		Dried leaf (mountain reg./ desert reg.)		0.44 / 0.52 mg/ml	
		Dried root (mountain reg./ desert reg.)		0.27 / 0.32 mg/ml	
<i>Cymbopogon schoenanthus</i>	Hexane	Shoot (mountain reg./ desert reg.)		0.50 / 0.54 mg/ml	[124]
	DCM			0.57 / 0.30 mg/ml	
	EtOAc			0.23 / 0.30 mg/ml	
	MeOH			0.23 / 0.25 mg/ml	
	H ₂ O			0.46 / 0.04 mg/ml	
Polygonaceae					
<i>Fallopia multiflora</i>	H ₂ O	Root		13 µg/ml	[104]
	EtOH			65 µg/ml	
<i>Rheum palmatum</i>	H ₂ O	Root and Rizhome		32 µg/ml	[104]
	EtOH			18 µg/ml	
<i>Ruprechtia apetala</i>	EtOH	Aerial		0.0779 mg/ml	[90]
Portulacaceae					
<i>Portulaca oleracea</i>	Alkaloids	Upper part		29.4 µg/ml	[87]

Table 1. contd....

Family and Botanical Name	Type of Extract (Solvent)	Plant's Parts	AChE Inhibition (%)	IC ₅₀	Refs.
Rhamnaceae					
<i>Rhamnus prinoides</i>	H ₂ O	Root		0.201 mg/ml ^b	[102]
Rosaceae					
<i>Leucosidea sericea</i>	PE	Leaf		0.16 mg/ml	[125]
	DCM	Stem		0.14 mg/ml	
	MeOH			0.24 mg/ml	
	PE			0.26 mg/ml	
Rubiaceae					
<i>Galium odoratum</i>	Hexane	Whole plant	53.1 (400 µg/ml)		[91]
<i>Morinda citrifolia</i>	EtOH	Fruit		138.4 µg/ml	[126]
	CHCl ₃			78.11 µg/ml	
<i>Morinda lucida</i>	MeOH	Leaf	40.15 (42 µg/ml)		[80]
Rutaceae					
<i>Citrus aurantifolia</i>	Essential oil	Leaf		139 µg/ml	[127]
<i>Citrus medica</i>	Essential oil	Peel		171.3 µg/ml	[128]
<i>Ruta graveolens</i>	MeOH	Whole plant	59.1 (100 µg/ml)		[91]
	Hexane			34 µg/ml	
<i>Zanthoxylum coco</i>	Organic	Aerial		0.1579 mg/ml	[90]
Solanaceae					
<i>Solanum leucocarpum</i>	MeOH	Whole plant		204.59 mg/l	[92]
<i>Withania somnifera</i>	MeOH	Root		33.38 µg/ml	[118]
<i>Witheringia coccoloboides</i>	MeOH	Whole plant		220.68 mg/l	[92]
Valerianaceae					
<i>Nardostachys jatamansi</i>	H ₂ O:EtOH	Rhizome		130.11 µg/ml	[78]
	MeOH			47.21 µg/ml	[118]
Zingiberaceae					
<i>Kaempferia parviflora</i>	EtOH	Rhizome		20.64 µg/ml	[117]

DCM: dichloromethane; MeOH: methanol; EtOH: ethanol; PE: petroleum ether; EtOAc: ethyl acetate

^aHuman blood AChE.

^bBovine erythrocyte AChE.

^cMouse brain homogenized.

part of the plant used in each study reported. AChE inhibitory activity is reported in the same way as it was reported by authors and IC₅₀ values were chosen instead of inhibition percentages when both were available.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

CONICET, CIC, UNS and ANPCYT.

REFERENCES

- [1] Chopra, K.; Misra, S.; Kuhad, A. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **2011**, *12*, 335-350.
- [2] Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, *7*, 88-95.
- [3] Lopez, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.*, **2002**, *71*, 2521-2529.
- [4] Rhee, I.K.; van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae

- using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *915*, 217-223.
- [5] Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.*, **2002**, *13*, 51-54.
- [6] Di Giovanni, S.; Borloz, A.; Urbain, A.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Carrupt, P.A.; Reist, M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2008**, *33*, 109-119.
- [7] Houghton, P.J.; Ren, Y.; Howes, M.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 181-199.
- [8] Williams, P.; Sorribas, A.; Howes, M.J. Natural Products as a source of Alzheimer's drugs leads. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 48-77.
- [9] Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **2007**, *14*, 289-300.
- [10] Orhan, G.; Orhan, I.; Subutay-Oztekin, N., Ak, F.; Sener, B. Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent. Pat. CNS Drug. Discov.*, **2009**, *4*, 43-51.
- [11] Rahman, A.U.; Khalid, A.; Sultana, N., Ghayur, M.N.; Mesaik, M.A.; Khan, M.R.; Gilani, A.H.; Choudhary, M.I. New natural cholinesterase inhibiting and calcium channel blocking quinoline alkaloids. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2006**, *21*, 703-710.
- [12] Cardoso-Lopes, E.M.; Maier, J.A.; da Silva, M.R.; Regasini, L.O.; Simote, S.Y.; Lopes, N.P.; Pirani, J.R.; da Silva Bolzani, V.; Marx Young, M.C. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer Disease. *Molecules*, **2010**, *15*, 9205-9213.
- [13] Yang, Z.; Zhang, D.; Ren, J.; Yang, M. Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*, 722-725.
- [14] Mukherjee, P.K.; Mukherjee, D.; Maji, A.K.; Rai, S.; Heinrich, M. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) - phytochemical and therapeutic profile. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2009**, *61*, 407-422.
- [15] Yang, Z.; Zhang, X.; Du, J.; Ma, Z.J.; Guo, F.; Li, S.; Yao, X.J. An aporphine alkaloid from *Nelumbo nucifera* as an acetylcholinesterase inhibitor and the primary investigation for structure-activity correlations. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26*, 387-392.
- [16] Mollataghi, A.; Coudiere, E.; Hadi, A.H.; Mukhtar, M.R.; Awang, K.; Litaudon, M.; Ata, A. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 298-302.
- [17] Hung, T.M.; Na, M.; Dat, N.T.; Ngoc, T.M.; Youn, U.; Kim, H.J.; Min, B.S.; Lee, J.; Bae, K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovi*. *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, *119*, 74-80.
- [18] Hung, T.M.; Ngoc, T.M.; Youn, U.J.; Min, B.S.; Na, M.; Thuong, P.T.; Bae, K. Anti-amnesic activity of pseudocoptisine from *Corydalis tuber*. *Biol. Pharm. Bull.*, **2008**, *31*, 159-162.
- [19] Jung, H.A.; Min, B.S.; Yokozawa, T.; Lee, J.H.; Kim, Y.S.; Choi, J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.*, **2009**, *32*, 1433-1438.
- [20] Chlebek, J.; Macáková, K.; Cahlíkovi, L.; Kurfürst, M.; Kunes, J.; Opletal, L. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* (Fumariaceae). *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 607-610.
- [21] Ingkaninan, K.; Phengpa, P.; Yuenyongsawad, S.; Khorana, N. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2006**, *58*, 695-700.
- [22] Cho, K.M.; Yoo, I.D.; Kim, W.G. 8-Hydroxydihydrochelerythrine and 8-Hydroxydihydroanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus* L. *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, *29*, 2317-2320.
- [23] Rollinger, J.M.; Schuster, D.; Baier, E.; Ellmerer, E.P.; Langer, T.; Stuppner, H. Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Magnolia x soulangiana*. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 1341-1346.
- [24] Pereira, D.M.; Ferreres, F.; Oliveira, J.M.; Gaspar, L.; Faria, J.; Valentão, P.; Sottomayer, M.; Andrade, P.B. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 646-652.
- [25] Zhan, Z.J.; Yu, Q.; Wang, Z.L.; Shan, W.G. Indole alkaloids from *Ervatamia hainanensis* with potent acetylcholinesterase inhibition activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 6185-6187.
- [26] Andrade, M.T.; Lima, J.A.; Pinto, A.C.; Rezende, C.M.; Carvalho, M.P.; Epifanio, R.A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miens that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 4092-4095.
- [27] Ingkaninan, K.; Changwijit, K.; Suwanborirux, K. Vobasinyliboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2006**, *58*, 847-852.
- [28] Yang, Z.; Duan, D.Z.; Du, J.; Yang, M.J.; Li, S.; Yao, X.J. Geissoschizine methyl ether, a corynanthean-type indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, *26*, 22-28.
- [29] Seidl, C.; Correia, B.L.; Stinghen, A.E.; Santos, C.A. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Z. Naturforsch. C.*, **2010**, *65*, 440-444.
- [30] Jin, Z. Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, *24*, 886-905.
- [31] de Andrade, J.P.; Berkov, S.; Viladomat, F.; Codina, C.; Zuanazzi, J.A.; Bastida, J. Alkaloids from *Hippeastrum papillo*. *Molecules*, **2011**, *16*, 7097-7104.
- [32] Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 2263-2266.
- [33] Sarikaya, B.B.; Kaya, G.I.; Onur, M.A.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J.; Somer, N.U. Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. *Phytochem. Lett.*, **2012**, *5*, 367-370.
- [34] Rijn, R.M.; Rhee, I.K.; Verpoorte, R. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat. Prod. Res.*, **2010**, *24*, 222-225.
- [35] Mulholland, D.A.; Crouch, N.; Decker, B.; Smith, M. T. The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2002**, *30*, 183-185.
- [36] Wang, Y.H.; Zhang, Z.K.; Yang, F.M.; Sun, Q.Y.; He, H.P.; Di, Y.T.; Mu, S.Z.; Lu, Y.; Chang, Y.; Zheng, Q.T.; Ding, M.; Dong, J.H.; Hao, X.J. Benzylphenethylamine Alkaloids from *Hosta plantaginea* with Inhibitory Activity against Tobacco Mosaic Virus and Acetylcholinesterase. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1458-1461.
- [37] Ma, X.; Gang, D.R. The Lycopodium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 752-772.
- [38] Katakawa, K.; Nozoe, A.; Kogure, N.; Kitajima, M.; Hosokawa, M.; Takayama, H. Fawcettimine-related alkaloids from *Lycopodium serratum*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1024-1028.
- [39] Takayama, H.; Katakawa, K.; Kitajima, M.; Yamaguchi, K.; Aimi, N. Ten new Lycopodium alkaloids having the lycopodane skeleton isolated from *Lycopodium serratum* Thunb. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2003**, *51*, 1163-1169.
- [40] Choo, C.Y.; Hirasawa, Y.; Karimata, C.; Koyama, K.; Sekiguchi, M.; Kobayashi, J.; Morita, H. Carinatamins A-C, new alkaloids from *Lycopodium carinatum* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 1703-1707.
- [41] Hirasawa, Y.; Kato, E.; Kobayashi, J.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Shiro, M.; Morita, H. Lycoparins A-C, new alkaloids from *Lycopodium casuarinoides* inhibiting acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 6167-6171.
- [42] Howes, M.-J.R.; Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors of natural origin. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.*, **2009**, *3*, 67-86.
- [43] Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Fokou, P.A.; Sewald, N. Terpenoid alkaloids of the Buxaceae family with potential biological importance. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, *25*, 612-630.
- [44] Rahman, A.U.; Ul-Haq, Z.; Khalid, A.; Anjum, S.; Khan, M.R.; Choudhary, M.I. Pregnane-Type steroidal alkaloids of *Sarcococca saligna*: a new class of cholinesterase inhibitors. *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 678-688.
- [45] Rahman, A.U.; Feroz, F.; Ul-Haq, Z.; Nawaz, S.A.; Khan, M.R.; Choudhary, M.I. New steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *Nat. Prod. Res.*, **2003**, *17*, 235-241.
- [46] Rahman, A.U.; Feroz, F.; Naeem, I.; Ul-Haq, Z.; Nawaz, S.A.; Khan, N.; Khan, M.R.; Choudhary, M.I. New pregnane-type

- steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna* and their cholinesterase inhibitory activity. *Steroids*, **2004**, *69*, 735-741.
- [47] Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Choudhary, M.I.; Naz, Q.; Fekam, F.B.; Rosenthal, P.J.; Sewald, N. Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2007**, *55*, 1397-1401.
- [48] Devkota, K.P.; Lenta, B.N.; Wansi, J.; Choudhary, M.I.; Kisangau, D.P.; Naz, Q.; Samreen; Sewald, N. Bioactive 5 α -Pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1481-1484.
- [49] Ata, A. In *Studies in Natural Products Chemistry*, 1st Edition, Vol. 38, Rahman, A.U., Ed.; Elsevier B.V.: Amsterdam, **2012**; pp. 225-245.
- [50] Ata, A.; Iverson, C.D.; Kalhari, K.S.; Akhter, S.; Betteridge, J.; Meshkatsadat, M.H.; Orhan, I.; Sener, B. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus hyrcana* and their enzyme inhibitory, anti-fungal and anti-leishmanial activities. *Phytochemistry*, **2010**, *71*, 1780-1786.
- [51] Matochko, W.L.; James, A.; Lam, C.W.; Kozera, D.; Ata, A.; Gengan, R. Triterpenoidal alkaloids from *Buxus natalensis* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 1858-1862.
- [52] Rahman, A.U.; Akhtar, M.N.; Choudhary, M.I.; Tsuda, Y.; Sener, B.; Khalid, A.; Parvez, M. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, *50*, 1013-1016.
- [53] Lin, B.Q.; Ji, H.; Li, P.; Fang, W.; Jiang, Y. Inhibitors of acetylcholine esterase *in vitro* - Screening of steroidal alkaloids from *Fritillaria* species. *Planta Med.*, **2006**, *72*, 814-818.
- [54] Yang, Z.; Duan, D.Z.; Xue, W.W.; Yao, X.J.; Li, S. Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure-activity relationships. *Life Sci.*, **2012**, *90*, 929-933.
- [55] Eldeen, I.M.; Van Heerden, F.R.; Van Staden, J. *In vitro* biological activities of niloticane, a new bioactive cassane diterpene from the bark of *Acacia nilotica* subsp. *kraussiana*. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *128*, 555-560.
- [56] Hung, T.M.; Luan, T.C.; Vinh, B.T.; Cuong, T.D.; Min, B.S. Labdane-type diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* and their cholinesterase inhibitory activity. *Phytother. Res.*, **2011**, *25*, 611-614.
- [57] Khan, I.; Nisar, M.; Khan, N.; Saeed, M.; Nadeem, S.; Fazal-ur-Rehman; Ali, F.; Karim, N.; Kaleem, W.A.; Qayum, M.; Ahmad, H.; Khan, I.A. Structural insights to investigate Conyopodioidol as a dual cholinesterase inhibitor from *Asparagus adscendens*. *Fitoterapia*, **2010**, *81*, 1020-1025.
- [58] Riaz, N.; Nawaz, S.A.; Mukhtar, N.; Malik, A.; Afza, N.; Ali, S.; Ullah, S.; Muhammad, P.; Choudhary, M.I. Isolation and enzyme-inhibition studies of the chemical constituents from *Ajuga bracteosa*. *Chem. Biodivers.*, **2007**, *4*, 72-83.
- [59] Ahmed, E.; Nawaz, S.A.; Malik, A.; Choudhary, M.I. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 573-580.
- [60] Awang, K.; Chan, G.; Litaudon, M.; Ismail, N.H.; Martin, M.T.; Gueritte, F. 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 7873-7877.
- [61] Khan, M.T.; Orhan, I.; Senol, F.S.; Kartal, M.; Sener, B.; Dvorská, M.; Smejkal, K.; Slapetová, T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.*, **2009**, *181*, 383-389.
- [62] Urbain, A.; Marston, A.; Sintro Grilo, L.; Bravo, J.; Purev, O.; Purevsuren, B.; Batsuren, D.; Reist, M.; Carrupt, P.-A.; Hostettmann, K. Xanthenes from *Gentianella amarella* ssp. *acuta* with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 895-897.
- [63] Cho, J.K.; Ryu, Y.B.; Curtis-Long, M.J.; Ryu, H.W.; Yuk, H.J.; Kim, D.W.; Kim, H.J.; Lee, W.S.; Park, K.H. Cholinesterase inhibitory effects of geranylated flavonoids from *Paulownia tormentosa* fruits. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *25*, 2595-2602.
- [64] Jung, H.A.; Jin, S.E.; Park, J.S.; Choi, J.S. Antidiabetic complications and anti-alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure-activity relationship. *Phytother. Res.*, **2011**, *25*, 709-715.
- [65] Kim, J.Y.; Lee, W.S.; Kim, Y.S.; Curtis-Long, M.J.; Lee, B.W.; Ryu, Y.B.; Park, K.H. Isolation of cholinesterase-inhibiting flavonoids from *Morus thou*. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, *59*, 4589-4596.
- [66] Ryu, H.W.; Curtis-Long, M.J.; Jung, S.; Jeong, I.Y.; Kim, D.S.; Kang, K.Y.; Park, K.H. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem.*, **2012**, *132*, 1244-1250.
- [67] Conforti, F.; Rigano, D.; Menichini, F.; Loizzo, M.R.; Senatore, F. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia*, **2009**, *80*, 62-67.
- [68] Ahmad, V.U.; Iqbal, S.; Nawaz, S.A.; Choudhary, M.I.; Farooq, U.; Ali, S.T.; Ahmad, A.; Bader, S.; Kousar, F.; Arshad, S.; Tareen, R.B. Isolation of four new pterocarpanes from *Zygophyllum eurypterum* (syn. *Z. atriplicoides*) with enzyme-inhibition properties. *Chem. Biodivers.*, **2006**, *3*, 996-1003.
- [69] Changwong, N.; Sabphon, C.; Ingkaninan, K.; Sawasdee, P. Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activities of Mansorins and Mansonones. *Phytother. Res.*, **2012**, *26*, 392-396.
- [70] Nag, G.; De, B. Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Embllica officinalis* and some phenolic compounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2011**, *3*, 121-124.
- [71] Ge, H.M.; Zhu, C.H.; Shi, D.H.; Zhang, L.D.; Xie, D.Q.; Yang, J.; Ng, S.W.; Tan, R.X. Hopeahainol A: An acetylcholinesterase inhibitor from *Hopea hainanensis*. *Chemistry*, **2008**, *14*, 376-381.
- [72] Sancheti, S.; Um, B.H.; Seo, S.H. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. *S. Afr. J. Bot.*, **2010**, *76*, 285-288.
- [73] Akhtar, M.N.; Lam, K.W.; Abas, F.; Maulidiani, H.; Ahmad, S.; Shah, S.A.; Rahman, A.U.; Choudhary, M.I.; Lajis, N.H. New class of acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Knema laurina* and their structural insights. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 4097-4103.
- [74] Adhami, H. R.; Linder, T.; Kaehlig, H.; Schuster D.; Zehl, M.; Krenn, L. Catechol alkenyls from *Semecarpus anacardium*: Acetylcholinesterase inhibition and binding mode predictions. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*, 142-148.
- [75] Jung, H.A.; Jung, Y.J.; Hyun, S.K.; Min, B.S.; Kim, D.W.; Jung, J.H.; Choi, J.S. Selective cholinesterase inhibitory activities of a new monoterpene diglycoside and other constituents from *Nelumbo nucifera* stamens. *Biol. Pharm. Bull.*, **2010**, *33*, 267-272.
- [76] Adewusi, E.A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. *Afr. J. Biotechnol.*, **2010**, *9*, 8257-8276.
- [77] Barbosa Filho, J.M.; Medeiros, K.C.P.; Diniz, M.F.; Batista, L.M.; Athayde-Filho, P.F.; Silva, M.S.; da-Cunha, E.V.L.; Silva Almeida, J.R.G.; Quintans-Júnior, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Braz. J. Pharmacogn.*, **2006**, *16*, 258-285.
- [78] Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Houghton, P.J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Phytother. Res.*, **2007**, *21*, 1142-1145.
- [79] Tundis, R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Loizzo, M.R.; Bonesi, M.; Statti, G.; Menichini, F. A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (Chenopodiaceae) in the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2009**, *24*, 818-824.
- [80] Elufioye, T.O.; Obuoto, E.M.; Sennuga, A.T.; Agbedahunsi, J.M.; Adesanya, S.A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some selected Nigerian medicinal plants. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2010**. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000400002.
- [81] Fawole, O.A.; Amoo, S.O.; Ndhkala, A.R.; Light, M.E.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *127*, 235-241.
- [82] Cahlíková, L.; Benešová, N.; Macáková, K.; Urbanová, K.; Opletal, L. GC/MS analysis of three Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 1255-1258.
- [83] Cahlíková, L.; Valterová, I.; Macáková, K.; Opletal, L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2011**. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000089.

- [84] Moyo, M.; Ndhkala, A.R.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chem.*, **2010**, *123*, 69-76.
- [85] Benamar, H.; Rached, W.; Derdour, A.; Marouf, A. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Biol. Sci.*, **2010**, *10*, 1-9.
- [86] Lima, J.A.; Costa, R.S.; Epifânio, R.A.; Castro, N.G.; Rocha, M.S.; Pinto, A.C. *Geissospermum vellosii* stem bark. Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacol. Biochem. Be.*, **2009**, *92*, 508-513.
- [87] Yang, Z.; Zhang, D.; Ren, J.; Yang, M.; Li, S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of the total alkaloid from traditional Chinese herbal medicine for treating Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*, 734-738.
- [88] Sekeroglu, N.; Senol, F.S.; Orhan, I.E.; Gulpinar, A.R.; Kartal, M.; Sener, B. *In vitro* prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food Res. Int.*, **2012**, *45*, 197-203.
- [89] Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Frega, N.G.; Menichini, F. Radical scavenging activity and cholinesterase inhibitory activity of *Leopoldia comosa* (L.) bulbs. *Progr. Nutr.*, **2011**, *13*, 300-303.
- [90] Carpinella, M.C.; Androne, D.G.; Ruiz, G.; Palacios, S.M. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. *Phytother. Res.*, **2010**, *24*, 259-263.
- [91] Wszelaki, N.; Kuciun, A.; Kiss, A.K. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharm.*, **2010**, *60*, 119-128.
- [92] Niño, J.; Hernández, J.A.; Correa, Y.M.; Mosquera, O.M. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **2006**, *101*, 783-785.
- [93] Bakthir, H.; Ali, N.A.A.; Arnold, N.; Teichert, A.; Wessjohann, L. Anticholinesterase activity of endemic plant extracts from Soqotra. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **2011**, *8*, 296-299.
- [94] Habtemariam, S. The therapeutic potential of *Berberis darwinii* stem-bark: Quantification of berberine and *in vitro* evidence for Alzheimer's disease therapy. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*, 1089-1090.
- [95] Ashraf, M.; Ahmad, K.; Ahmad, I.; Ahmad, S.; Arshad, S.; Shah, S.M.; Nasim, F. Acetylcholinesterase and NADH oxidase inhibitory activity of some medicinal plants. *J. Med. Plant. Res.*, **2011**, *5*, 2086-2089.
- [96] Adewusi, E.A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.*, **2011**, *77*, 638-644.
- [97] Akkol, E.K.; Orhan, I.E.; Yeşilada, E. Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. leaves. *Food Chem.*, **2012**, *131*, 626-631.
- [98] Feitosa, C.M.; Freitas, R.M.; Luz, N.N.N.; Bezerra, M.Z.B.; Trevisan, M.T.S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Braz. J. Biol.*, **2011**, *71*, 783-789.
- [99] Tavares, L.; McDougall, G.J.; Fortalezas, S.; Stewart, D.; Ferreira, R.B.; Santos, C.N. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chem.*, **2012**, *135*, 562-570.
- [100] Lee, S.-H.; Sancheti, S.A.; Bafna, M.R.; Sancheti, S.S.; Seo, S.-Y. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* bark. *J. Med. Plants Res.*, **2011**, *5*, 248-254.
- [101] Kwon, S.-H.; Lee, H.-K.; Kim, J.A.; Hong, S.I.; Kim, S.-Y.; Jo, T.-H.; Park, Y.-I.; Lee, C.-K.; Kim, Y.-B.; Lee, S.-Y.; Jang, C.-G. Neuroprotective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. bark on amyloid beta₂₅₋₃₅-induced learning and memory impairments in mice. *Neurosci. Lett.*, **2011**, *487*, 123-127.
- [102] Crowch, C.M.; Okello, E.J. Kinetics of acetylcholinesterase inhibitory activities by aqueous extracts of *Acacia nilotica* (L.) and *Rhamnus prinoides* (L'Hér.). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **2009**, *3*, 469-475.
- [103] Kim, D.H.; Yoon, B.H.; Kim, Y.W.; Lee, S.; Shin, B.Y.; Jung, J.W.; Kim, H.J.; Lee, Y.S.; Choi, J.S.; Kim, S.Y.; Lee, K.T.; Ryu, J.H. The seed extract of *Cassia obtusifolia* ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine or transient cerebral hypoperfusion in mice. *J. Pharmacol. Sci.*, **2007**, *105*, 82-93.
- [104] Lin, H.Q.; Ho, M.T.; Lau, L.S.; Wong, K.K.; Shaw, P.C.; Wan, D.C. Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, *175*, 352-354.
- [105] Rauter, A.P.; Martins, A.; Lopes, R.; Ferreira, J.; Serralheiro, L.M.; Araújo, M.E.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F.V.; Goulart, M.; Thomas-Oates, J.; Rodrigues, J.A.; Edwards, E.; Noronha, J.P.; Pinto, R.; Mota-Filipe, H. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *J. Ethnopharmacol.*, **2009**, *122*, 384-393.
- [106] Satheeshkumar, N.; Mukherjee, P.K.; Bhadra, S.; Saha, B.P. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents. *Phytomedicine*, **2010**, *17*, 292-295.
- [107] Bhadra, S.; Mukherjee, P.K.; Kumar, N.S.; Bandyopadhyay, A. Anticholinesterase activity of standardized extract of *Illicium verum* Hook. f. fruits. *Fitoterapia*, **2011**, *82*, 342-346.
- [108] Orhan, I.; Senol, F.S.; Gulpinar, A.R.; Kartal, M.; Sekeroglu, N.; Deveci, M.; Kan, Y.; Sener, B. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food Chem. Toxicol.*, **2009**, *47*, 1304-1310.
- [109] Costa, P.; Gonçalves, S.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Romano, A. Inhibitory effect of *Lavandula viridis* on Fe²⁺-induced lipid peroxidation, antioxidant and anti-cholinesterase properties. *Food Chem.*, **2011**, *126*, 1779-1786.
- [110] Orhan, I.E.; Belhattab, R.; Şenol, F.S.; Gulpinar, A.R.; Hoşbaş, S.; Kartal, S. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind. Crop. Prod.*, **2010**, *32*, 566-571.
- [111] Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Conforti, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; Saab, A.M.; Statti, G.A.; Cindio, B.; Houghton, P.J.; Menichini, F.; Frega, N.G. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem.*, **2009**, *117*, 174-180.
- [112] Mossa, A.T.; Nawwar, G.A. Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2011**, *30*, 1501-1513.
- [113] Tel, G.; Oztürk, M.; Duru, M.E.; Harmandar, M.; Topçu, G. Chemical composition of the essential oil and hexane extract of *Salvia chionantha* and their antioxidant and anticholinesterase activities. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*, 3189-3193.
- [114] Şenol, F.S.; Orhan I.; Celep F.; Kahraman, A.; Doğan, M.; Yilmaz, G.; Şener, B. Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chem.*, **2010**, *120*, 34-43.
- [115] Loizzo, M.R.; Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M., Conforti, F.; Nadjafi, F.; Statti, G.A.; Frega, N.G.; Menichini, F. *In vitro* biological activity of *Salvia leriifolia* benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *J. Oleo Sci.*, **2009**, *58*, 443-446.
- [116] Ahmad, B.; Mukarram Shah, S.M.; Khan, H.; Hassan Shah, S.M. Enzyme inhibition activities of *Teucrium royleanum*. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2007**, *22*, 730-732.
- [117] Tappayuthpijarn, P.; Itharat, A.; Makchuchit, S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Thai traditional nootropic remedy and its herbal ingredients. *J. Med. Assoc. Thai.*, **2011**, *94*, S183-S189.
- [118] Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S.L.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K.; Deepak, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*, 359-363.
- [119] Ashraf, M.; Ahmad, K.; Ahmad, I.; Ahmad, S.; Arshad, S.; Shah, S.M.; Nasim, F. Acetylcholinesterase and NADH oxidase inhibitory activity of some medicinal plants. *J. Med. Plant. Res.*, **2011**, *5*, 2086-2089.
- [120] Adersen, A.; Gauquin, B.; Gudiksen, L.; Jäger, A.K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction

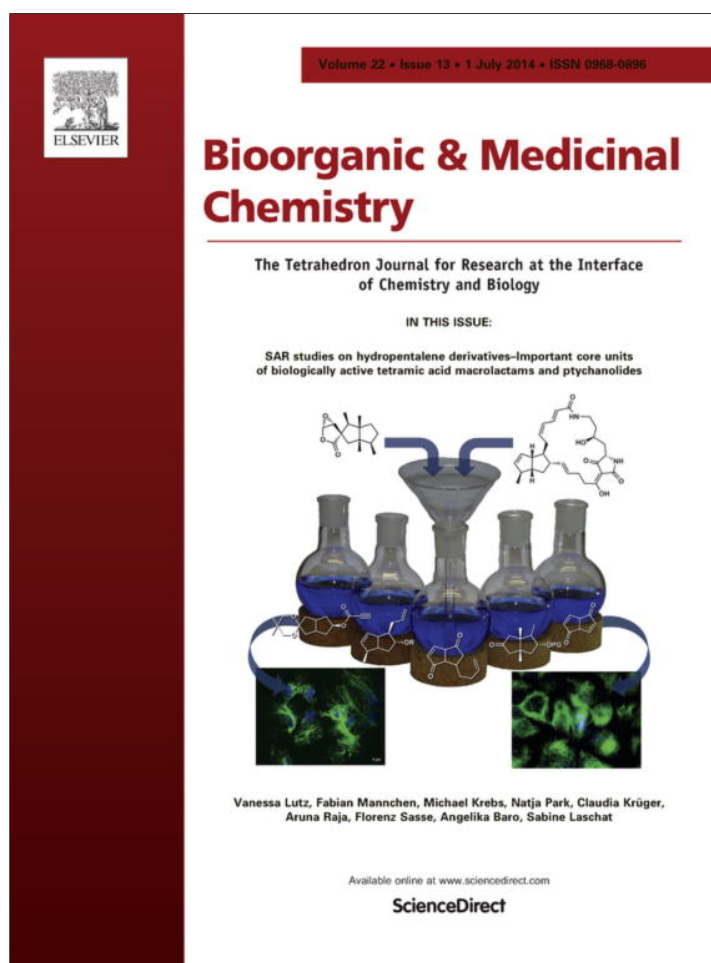
- for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *104*, 418-422.
- [121] Ustun, O.; Senol, F.; Kurkcuoglu, M.; Orhan, I.; Kartal, M.; Baser, K. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Ind. Crop. Prod.*, **2012**, *38*, 115-123.
- [122] Bonesi, M.; Menichini, F.; Tundis, R.; Loizzo, M.R.; Conforti, F.; Passalacqua, N.G.; Statti, G.A.; Menichini, F. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2010**, *25*, 622-628.
- [123] Khadri, A.; Serralheiro, M.L.M.; Nogueira, J.M.F.; Neffati, M.; Smiti, S.; Araújo, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food Chem.*, **2008**, *109*, 630-637.
- [124] Khadri, A.; Neffati, M.; Smiti, S.; Falé, P.; Lino, A.R.L.; Serralheiro, A.M.; Araújo, M.E.M. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2010**, *43*, 331-336.
- [125] Aremu, A.O.; Amoo, S.O.; Ndhkala, A.R.; Finnie, J.F.; Stadenm J.V. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food Chem. Toxicol.*, **2011**, *49*, 1122-1128.
- [126] Pachauri, S.D.; Tota, S.; Khandelwal, K.; Verma, P.R.; Nath, C.; Hanif, K.; Shukla, R.; Saxena, J.K.; Dwivedi, A.K. Protective effect of fruits of *Morinda citrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: A behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *J. Ethnopharmacol.*, **2012**, *139*, 34-41.
- [127] Chaiyana, W.; Okonogi, S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine*, **2012**, *19*, 836-839.
- [128] Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; de Cindio, B.; Loizzo, M.R.; Conforti, F.; Statti, G.A.; Menabeni, R.; Bettini, R.; Menichini, F. Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Nat. Prod. Res.*, **2011**, *25*, 789-799.

Received: October 02, 2012

Revised: February 25, 2013

Accepted: February 25, 2013

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Preparation, anticholinesterase activity and molecular docking of new lupane derivatives



María Julia Castro^a, Victoria Richmond^b, Carmen Romero^c, Marta S. Maier^b, Ana Estévez-Braun^c, Ángel G. Ravelo^c, María Belén Faraoni^a, Ana Paula Murray^{a,*}

^a INQUISUR-CONICET, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, B8000CPB Bahía Blanca, Argentina

^b UMYMFOR (CONICET-UBA), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 1428 Buenos Aires, Argentina

^c Instituto Universitario de Bio-Organica (CIBICAN), Av. Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206, Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2014

Revised 16 April 2014

Accepted 25 April 2014

Available online 5 May 2014

Keywords:

Alzheimer's disease

Cholinesterase inhibitors

Lupane derivatives

Triterpenoids

Molecular modeling

ABSTRACT

A set of twenty one lupane derivatives (**2–22**) was prepared from the natural triterpenoid calenduladiol (**1**) by transformations on the hydroxyl groups at C-3 and C-16, and also on the isopropenyl moiety. The derivatives were tested for their inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and some structure–activity relationships were outlined with the aid of enzyme kinetic studies and docking modelization. The most active compound resulted to be 3,16,30-trioxolup-20(29)-ene (**22**), with an IC₅₀ value of 21.5 μM for butyrylcholinesterase, which revealed a selective inhibitor profile towards this enzyme.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Triterpenoids are naturally occurring compounds with ubiquitous distribution and a wide range of biological activities.^{1–3} Pentacyclic triterpenoids provide privileged structures for further modifications and structure activity relationship (SAR) studies.^{4–6} Lupanes in particular, have attracted attention since they exhibit a broad range of biological and pharmacological properties such as antitumor, anti-inflammatory, anti-HIV, anticholinesterase, insecticidal and antimalarial activities.^{2,3,7–15}

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder associated with memory impairment and cognitive deficit. It is characterized by low levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the brain of AD patients. The inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme that catalyzes ACh hydrolysis, is the most used therapeutic strategy used to treat AD. AChE inhibitors can alleviate AD symptoms by improving cholinergic functions in AD patients. In the healthy brain, butyrylcholinesterase (BChE), another enzyme, is involved in the metabolic degradation of ACh. BChE activity increases as AD progresses. Therefore,

the concurrent inhibition of both AChE and BChE should provide additional benefits in the treatment of AD.^{16–19}

Our interest in bioactive triterpenes, prompted us to synthesize a series of derivatives from natural calenduladiol (**1**), isolated from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae).^{11–13,20} Calenduladiol (**1**) is a pentacyclic triterpenoid belonging to the lupane type (Fig. 1). In a previous work, we observed the enhancement of the inhibitory activity against AChE of **1** by the introduction of sulfate groups when it was treated with the sulfating reagent Me₃N·SO₃ and the analogue **2** was obtained.¹³ In this paper we report the preparation of 21 lupane derivatives (**2–22**) from compound **1** and their ability to inhibit AChE and BChE. Furthermore, we have studied the kinetic of the AChE inhibition for the most active derivative (**10**) and the key binding interactions between this compound and AChE through docking modelization.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

In order to analyze the role of the hydroxyl groups at C-3 and C-16, and also the importance of the isopropenyl moiety in the anticholinesterase activity, we have carried out the transformations shown in Schemes 1 and 2.

* Corresponding author. Tel.: +54 291 4595101.

E-mail address: apmurray@uns.edu.ar (A.P. Murray).

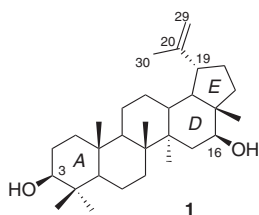


Figure 1. Structure of calenduladiol (1).

The starting calenduladiol **1**, was obtained in good yield from the ethanolic extract of *C. erinacea* subsp. *erinacea*, as previously reported.¹³ Allylic oxidation of **1** with 2.5 equiv of SeO_2 afforded the corresponding α,β -unsaturated aldehyde **3** in very good yield while the treatment of **1** with a 0.5 equiv of SeO_2 rendered the allylic alcohol **4** as the major product. Reduction of the double bond of **1** was carried out by catalytic hydrogenation yielding the derivative **5** (Scheme 1).

Treatment of diols **1**, **3** and **5** with 8 equiv of trimethylamine-sulfur trioxide complex ($\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$) for 7 min at 150 °C under MW irradiation afforded the corresponding ammonium sulfates, which were transformed via ion exchange into the disodium salts **2**, **7** and **10**, respectively (Scheme 1). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **2**, **7**, and **10**, confirmed that sulfate groups were located at C-3 and C-16. Resonances showing H-3 α at δ_{H} 3.91 ppm (dd, $J = 4.2, 11.4$ Hz) and H-16 α at δ_{H} 4.32 ppm (t, $J = 8.0$ Hz) for compound **2**, H-3 α at δ_{H} 3.92 ppm (dd, $J = 4.3, 11.5$ Hz) and H-16 α at δ_{H} 4.49 ppm (t, $J = 7.8$ Hz) for compound **7** and H-3 α at δ_{H} 3.93 ppm (dd, $J = 4.2, 11.5$ Hz) and H-16 α at δ_{H} 4.30 ppm (dd, $J = 6.2, 9.7$ Hz) for compound **10** were characteristic of the presence of two sulfate groups at C-3 and C-16, both of them in β orientation. This was in accordance with the chemical shifts observed for C-3 (δ_{C} 87.6 ppm (**2**), 87.9 ppm (**7**) and 87.8 ppm (**10**)) and C-16 (δ_{C} 85.8 ppm (**2**), 85.9 ppm (**7**) and 86.3 ppm (**10**)) which were unequivocally assigned from the HSQC and HMBC spectra.

Compounds **1** and **2** were converted into the epoxy derivatives **6** and **11**, respectively, by treatment with MCPBA. The 20-(*S*) configuration of these compounds was assigned on the basis of our previous work with similar 20,29-epoxylupanes using VCD.¹²

The trisulfated derivative **8** was obtained by sulfation of triol **4** with $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (12 equiv) (Scheme 1). The downfield shift of 8.5 ppm for C-3, 8.4 ppm for C-16 and 6 ppm for C-30 in the ^{13}C NMR spectrum of compound **8**, compared to compound **4**,

confirmed that the sulfate groups were located at C-3, C-16 and C-30. Considering that this synthetic route gave an overall yield of 4%, from compound **1** in two steps, we decided to try an alternative path by the reduction of aldehyde **7**. Although this route involved four steps, the overall yield was 22% from **1**. Intermediate alcohol **9** was obtained by treatment of **7** with NaBH_4 and EuCl_3 without affecting sulfate groups attached to C-3 and C-16.²¹ A subsequent reaction of **9** with $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (4 equiv) rendered the trisulfated **8** (Scheme 1).

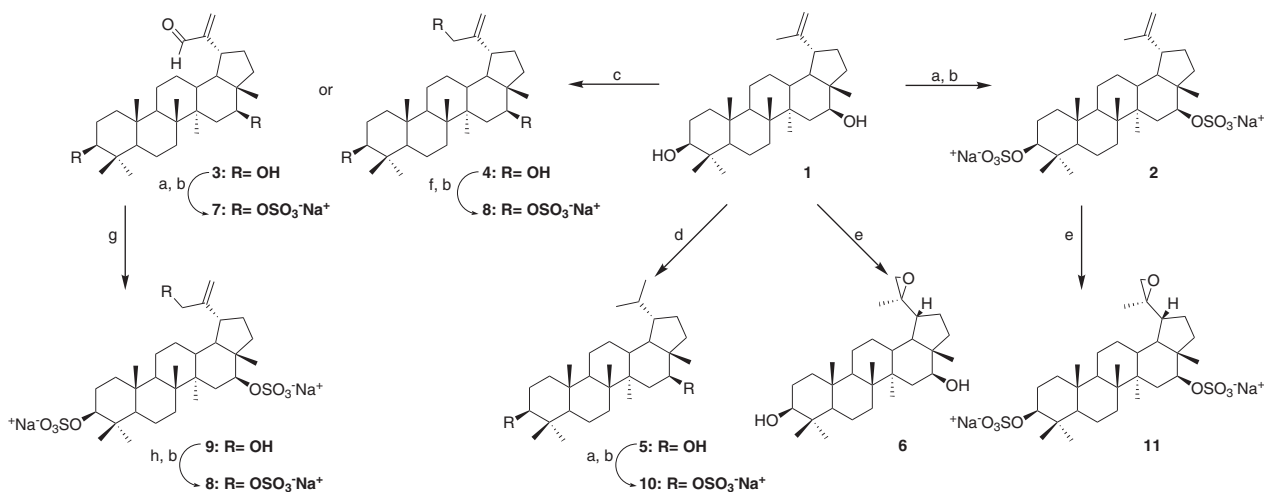
Diols **1** and **3** were treated with an excess of acetic anhydride in pyridine to yield the diacetylated compounds **12** and **15**, respectively, while the triacetylated compound (**16**) was obtained from triol **4** using the same reaction conditions (Scheme 2). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **12**, **15**, and **16**, confirmed that two acetoxy groups were located at C-3 and C-16, both of them with a β orientation. ^1H and ^{13}C signals were unequivocally assigned with the analyses of HSQC and HMBC correlations.

When **1** was treated with 1 equiv of acetic anhydride, a 1:1 mixture of the monoacetates **13** and **14** was obtained. Both monoacetylated derivatives were separated and purified by flash chromatography. The spectroscopic data of **13** revealed that the 16 β hydroxyl group remained free while the acetoxy group was attached to C-3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **14** confirmed that, in this case, the acetoxy group was attached to C-16.

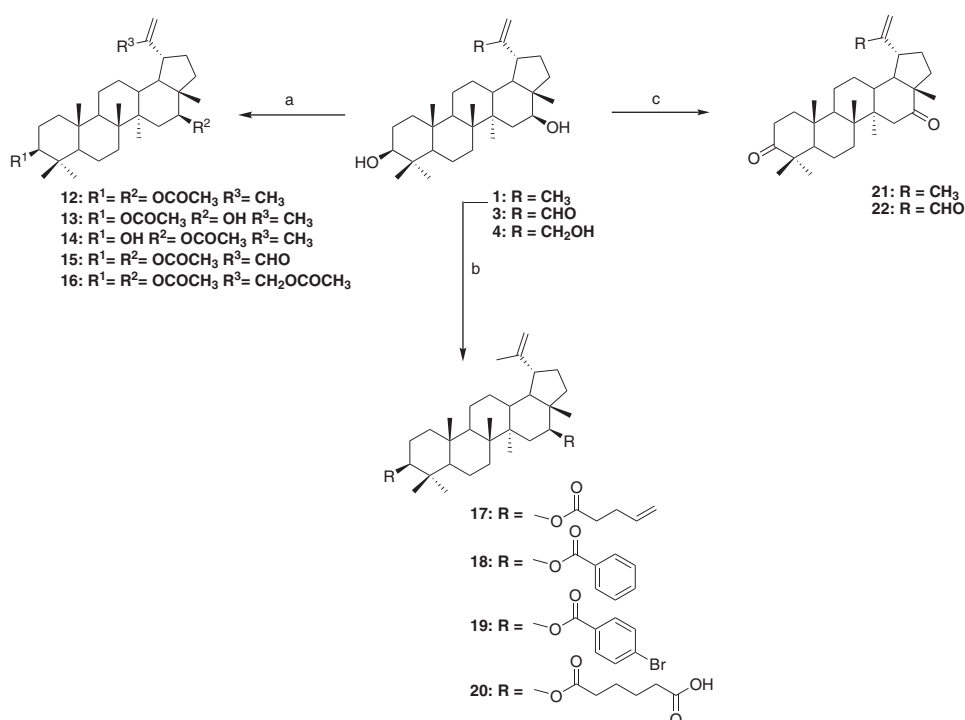
Treatment of diol **1** with the corresponding acyl chlorides in pyridine and DMAP, afforded the esters **17**, **18** and **19**. The diacid **20** was prepared by reaction of **1** with adipoyl chloride and subsequent hydrolysis of the intermediate acyl chloride (Scheme 2). Finally, diketones **21** and **22** were prepared from **1** and **3**, respectively, by oxidation with Jones reagent in acetone.

2.2. In vitro inhibition studies on AChE and BChE

The AChE inhibitory activity of compounds **3–22** was evaluated and compared to that of natural triterpenoid **1** and analogue **2**, previously prepared by our group.¹³ The AChE inhibition was determined by Ellman's method with eserine and tacrine as reference compounds.²² In a preliminary assay the inhibition percentage at a fixed concentration was determined for all the derivatives. Compounds **3–6**, **8–11**, **20** and **22** showed better inhibition than **1**, under the same experimental conditions. The concentration required for 50% AChE inhibition (IC_{50}) was then determined for those compounds. The results for AChE inhibition are summarized in Table 1.



Scheme 1. Preparation of compounds **2–11**. Reagents and conditions: (a) 8 equiv $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF, MW, 7 min, 150 °C; (b) Amberlite CG-120 (MeOH); (c) SeO_2 , EtOH, reflux; (d) H_2 , Pd/C, EtOAc; (e) MCPBA, NaHCO_3 , DCM; (f) 12 equiv $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF, MW, 9 min, 150 °C; (g) NaBH_4 , EuCl_3 , MeOH; (h) 4 equiv $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$, DMF, MW, 7 min, 150 °C.



Scheme 2. Preparation of compounds **12–22**. Reagents and conditions: (a) Ac₂O, Py, DMAP, DCM; (b) RCOCl or ArCOCl, Py, DMAP, DCM; (c) Jones reagent, acetone.

Table 1
Inhibition of AChE and BChE activity and selectivity index

Compounds	AChE ^a		BChE ^b		Selectivity index ^c
	% Inhibition at 200 μM	IC ₅₀ (μM)	% Inhibition at 200 μM	IC ₅₀ (μM)	
1	8.1 ± 0.2	>200	42.0 ± 0.8	>200	
2	71.0 ± 1.7	190.0 ± 3.0 ^d	78.5 ± 1.3	64.3 ± 1.2	2.95
3	43.5 ± 1.1	>200	42.0 ± 4.4	—	
4	40.4 ± 0.7	>200	32.0 ± 0.9	—	
5	24.3 ± 1.8	>200	14.3 ± 1.9	—	
6	24.3 ± 1.4	>200	19.4 ± 1.3	—	
7	6.1 ± 1.4	—	18.4 ± 2.3	—	
8	12.9 ± 0.1	>200	50.2 ± 6.9	>200	
9	10.8 ± 2.6	>200	56.8 ± 0.5	188.4 ± 1.1	>1.70
10	98.9 ± 2.9	58.8 ± 1.4	87.8 ± 1.8	104.2 ± 1.2	0.56
11	13.7 ± 1.2	>200	43.7 ± 1.3	>200	
12	3.3 ± 1.0	—	35.2 ± 3.0	—	
13	1.9 ± 1.0	—	46.2 ± 3.2	>200	
14	5.6 ± 1.3	—	51.2 ± 2.2	>200	
15	6.8 ± 0.9	—	45.8 ± 2.2	>200	
16	7.2 ± 0.8	—	—	—	
17	6.4 ± 0.1	—	29.3 ± 3.5	—	
18	3.9 ± 0.6	—	39.9 ± 2.1	—	
19	n.i. ^e	—	18.4 ± 1.0	—	
20	20.2 ± 1.0	>200	89.2 ± 1.6	80.6 ± 1.3	>2.48
21	6.4 ± 0.3	—	33.4 ± 0.5	—	
22	21.7 ± 1.2	>200	86.5 ± 2.7	21.5 ± 1.2	>9.30
Eserine	—	0.011 ± 0.001	—	0.014 ± 0.001	
Tacrine	—	0.029 ± 0.002	—	0.004 ± 0.001	

^a AChE from electric eel.

^b BChE from horse serum.

^c Selectivity index = IC₅₀ (AChE)/IC₅₀ (BChE).

^d From Ref. 13.

^e n.i. no inhibition.

Most of the tested compounds were observed to elicit a weak AChE inhibition, with IC₅₀ values higher than 200 μM. In general, when the hydroxyl groups were acylated (**12–19**) the inhibition of ACE was of the same order than that of the starting compound **1**. Also, sulfation of those groups was observed to render better ACE inhibitors, as long as the side chain was not oxidized (**2** vs **1**,

10 vs **5**). On the other hand, for non-sulfated compounds, when the side chain was oxidized a higher inhibition was observed compared to the natural triterpenoid (**3**, **4**, **6** vs **1**). Compound **10**, with two sulfate groups at C-3 and C-16 and an isopropyl group attached to C-19, showed the most potent inhibition for AChE with an IC₅₀ value of 58.8 μM. Even if **10** was found to be less active than

the reference compounds, it was able to inhibit the enzyme more effectively than **2** ($IC_{50} = 190.0 \mu\text{M}$), showing the importance of the isopropyl group instead of the isopropenyl moiety in the activity. Derivative **10** was selected for the kinetic study of AChE inhibition and also for molecular docking.

Compounds **2–22** were also evaluated as potential BChE inhibitors in a preliminary assay (percentage of BChE inhibition at a fixed concentration) and compared to **1** (Table 1). Most of the derivatives exhibited higher inhibition of BChE than that observed for AChE. The IC_{50} values were determined only for those analogues that exhibited better inhibition than **1** in the preliminary assay (**2, 8–11, 13–15, 20** and **22**). As shown in Table 1, compounds **2, 9, 10, 20** and **22** exhibited BChE inhibition with IC_{50} values lower than $200 \mu\text{M}$. Again, the sulfation of the hydroxyl groups proved to be a successful strategy to increase enzyme inhibition of these triterpenoids (**2** vs **1**, **10** vs **5**). The most active compound resulted to be **22**, 3,16,30-trioxolup-20(29)-ene, with an IC_{50} value of $21.5 \mu\text{M}$, which revealed a selective inhibitor profile towards BChE. This result is interesting because BChE has the ability of delaying the onset and decreasing the rate of $A\beta$ fibril formation in vitro, a central event in the pathogenesis of AD.^{23,24}

2.3. Kinetic characterization of AChE inhibition

Disodium 3,16-disulfate with a saturated lateral chain **10** was identified as the most potent AChE inhibitor. Thus, it was chosen for the determination of the inhibitor type kinetic study. Enzyme activity was evaluated at different fixed substrate concentrations and increasing inhibitor concentrations and the data obtained were used to elucidate the enzyme inhibition mechanism. The results are illustrated in the form of Lineweaver–Burk plots (Fig. 2). The double-reciprocal plots show that both K_m and V_{max} values are enhanced with increasing concentration of **10**, but the ratio of K_m/V_{max} is still unchanged. The slopes are independent of the concentration of the inhibitor, which indicate that this compound is an uncompetitive inhibitor of the enzyme. Compound **10** does not bind to the free enzyme but binds reversibly to the enzyme–substrate complex, yielding an inactive complex.

Replots of the $1/v$ versus concentration of compound **10** gave an estimate of the inhibition constant αK_i of $144.4 \mu\text{M}$.

2.4. Molecular modeling study

Molecular docking studies were performed to obtain more information about the binding mode and the interactions between

the enzyme and compound **10**—the most active of the tested group—and to gain a structural insight into the inhibition mechanism. The docking studies were performed with the AChE complexed with acetylcholine according to the enzyme inhibition mechanism of **10**. Table 2 summarizes the docking results of the derivative **10**. Two hundred and fifty-six docking runs with **10** generated 256 conformers that were clustered according to their similarity, rendering four clusters. The best results of the docking were the conformations of cluster N°1, the cluster with the lowest energy, and cluster N°3, the largest one because solutions that are found many times in reiterated docking experiments typically correspond to compounds with better free energy of binding.^{25,26}

The conformation adopted in cluster N°1 is shown in Figure 3A. Part of the triterpenoid is buried into the aromatic gorge, explaining the acompetitive inhibition mechanism of the AChE. It penetrates the peripheral site through A ring and binds the enzyme at the entrance of the gorge near the enzyme surface leaving rings D and E out of the pocket. The main hydrophobic interactions between the hydrocarbon skeleton of the inhibitor and the protein were observed with the residues: GLN74, PHE290, PHE331 and TYR334 (Fig. 4A). The docking simulation also showed that the affinity of **10** for the complex enzyme–substrate is favored by hydrogen bonding interactions, which involve the sulfate group at ring A. Sulfate group at C-3 come close to TYR121. The distance between the sulfate oxygen of the inhibitor and hydroxyl group of the TYR121 is 2.41 \AA .

The conformation of cluster N°3 is shown in Figure 3B. The triterpenoid is located at the entrance of the gorge exposing its aliphatic side to the enzyme. The main hydrophobic interactions between the hydrocarbon skeleton of the inhibitor **10** and the protein were observed with the residues: GLN74, TRP279, ILE287, PHE290, TYR334 (Fig. 4B). Binding is also assisted by a hydrogen bond between the sulfate group oxygen at C-3 and the hydrogen of the amide group side chain of GLN74 (1.87 \AA).

In both cases the major interactions are hydrophobic due to the many aromatic residues located at the peripheral site. These results agree with those recently reported by our group for a disulfated steroidal inhibitor of the AChE.²⁷ This study revealed that the $2\beta,3\alpha$ -dihydroxy- 5α -cholestan-6-one disulfate penetrates the gorge of the AChE through its side chain due to its high hydrophobic character whereas ring A substituted with two sulfate groups is placed out of the pocket. This compound mainly showed hydrophobic interactions between the side chain and rings C and D with the aromatic residues of the enzyme. The disulfated cholestane, that also showed an acompetitive mechanism of action, is buried into the peripheral site, such as compound **10**.

The docking studies allowed us to establish the orientation of the inhibitor **10** relative to the AChE as well as its conformation when bound to each other. This study allowed identifying hydrophobic interactions inside the aromatic gorge and hydrogen bonding interactions acting as stabilizing factors in the enzyme–substrate–inhibitor complex. Further molecular dynamics studies of this complex as starting point are necessary to check the complex inhibitor–enzyme stability, to determinate if the enzyme

Table 2

Summary of the docking results of disodium 3 β ,16 β -dihydroxy-20,29-dihydrolupane disulfate (**10**)

Compound	Total number of cluster	Docking statistics		Energy (kcal/mol)
		Cluster rank	Number of runs in the cluster	
10	4	1	71	−4.54
		2	25	−4.16
		3	159	−4.10
		4	1	−3.46

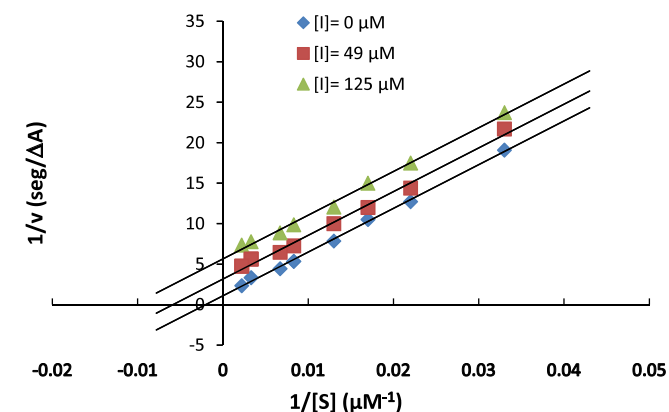


Figure 2. Lineweaver–Burk plots of the inhibition of AChE by compound **10** with acetylthiocholine (S) as substrate. Linear regression equations: $y = 539.81x + 1.0878$ ($R^2 = 0.9975$); $y = 539.92x + 3.1565$ ($R^2 = 0.9913$); $y = 539.89x + 5.6472$ ($R^2 = 0.9951$) for 0, 49 and $125 \mu\text{M}$, respectively.

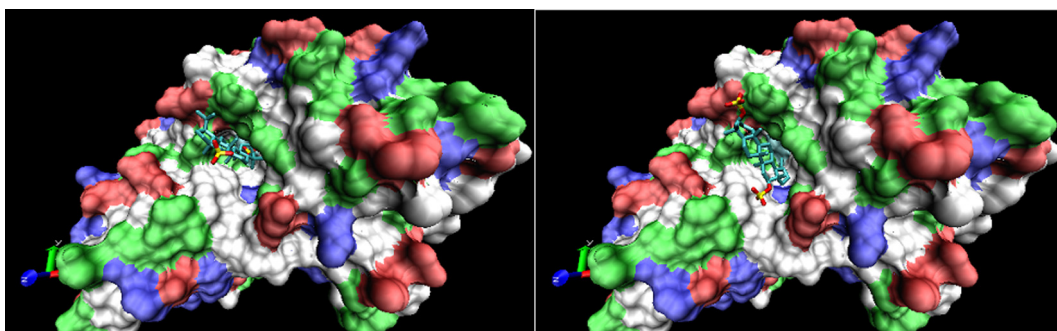


Figure 3. Docking results for compound **10**: (A) Cluster N° 1 (left), (B) Cluster N° 3 (right). Blue: basic residues, red: acid residues, green: polar residues.

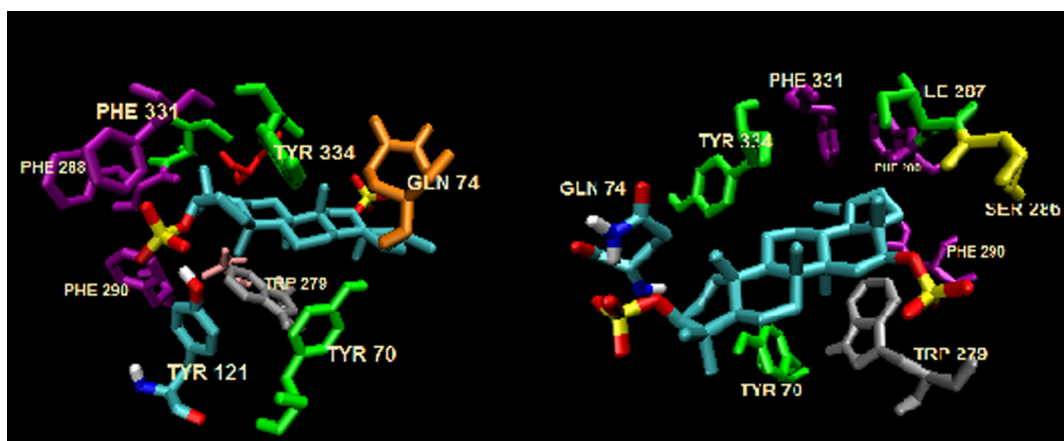


Figure 4. Docking of compound **10** showing the interactions with AChE: (A) Cluster N° 1 (left), (B) Cluster N° 3 (right).

undergoes structural rearrangements and verify the distances and an angles observed in the interactions are within a suitable range.

3. Conclusion

In summary, a set of lupane derivatives (**2**–**22**) has been synthesized from calenduladiol (**1**), a triterpenoid with the uncommon feature of being hydroxylated at C-16, which is not commercially available. These compounds have been prepared by simple reactions with moderate to good yields, rendering twenty one triterpenoids, seventeen new and four known compounds. All of them were tested for in vitro anticholinesterase activity against AChE and BChE. Compound **10** was identified as the most effective AChE inhibitor. A kinetic study of inhibition of AChE and molecular modeling indicated that **10** was able to bind to the complex enzyme–substrate with hydrophobic and hydrogen bonding interactions acting as stabilizing factors in the enzyme–substrate–inhibitor complex. On the other hand, compound **22**, resulted to be the most active against BChE showing also selectivity towards this enzyme, an interesting results considering that the role of BChE is more relevant as the disease progresses. The findings of the present study suggest that this trioxolupane may provide a useful template for the development of new lupane derivatives with improved and selective BChE inhibition.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. NMR measurements, including COSY, HSQC, HMBC experiments, were carried out on Bruker ARX300, Bruker

Avance 400, Bruker AMK 500 and/or Bruker AMK 600 spectrometers. NMR spectra were recorded in CDCl₃, MeOD or DMSO-*d*₆. Chemical shifts are given in ppm (δ) with TMS as an internal standard. High- and low-resolution mass spectra were obtained on a VG Autospec spectrometer and a LCT Premier XE (Waters) spectrometer. UV spectra were recorded on a JASCO V-630BIO spectrophotometer. Microwave assisted reactions were carried out in a CEM Discover reactor.

Silica gel 60 (0.2–0.63 mm, Merck) was used for column chromatography. Silica gel 60 (200–425 mesh, Aldrich) was used for flash chromatography. Analytical TLC was performed on Silicagel 60 F₂₅₄ sheets (0.2 mm thickness, Merck). *p*-Anisaldehyde-acetic acid spray reagent and UV light (254 and 366 nm) were used for detection.

All chemicals and solvents were analytical grade and solvents were purified by general methods before being used. The commercially available trimethylamine-sulfur trioxide complex (Me₃N·SO₃) was purchased from Aldrich. AChE from electric eel (type VI-S), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide (ATCI), butyrylthiocholine iodide (BTCl), tacrine and eserine were purchased from Sigma. BChE (horse serum) was purchased from MP Biomedicals. Calenduladiol (**1**), used as starting material for the preparation of compounds **2**–**22**, was extracted from aerial parts of *C. erinacea* subsp. *erinacea* as previously described.¹³ ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** can be found in the [Supplementary data](#).

All derivatives were rigorously characterized by NMR spectroscopy and mass spectrometry. The NMR data of derivatives **2**, **3** and **4** were identical to those previously reported.^{13,21} In the case of compounds **3**, **4** and **12** we have completed the NMR data available in the literature.^{21,28} Compounds **5**–**11**, **13**–**22** are described here for the first time and bidimensional NMR spectra (COSY, HMBC, HSQC) were used for the unequivocal assignments of all carbons

and representative protons. Selected NMR spectra are included in the [Supplementary data](#).

4.2. Preparation of 3 β ,16 β -dihydroxylup-20(29)-en-30-al (3)

A solution of **1** (60.0 mg, 0.14 mmol) in EtOH (5 mL) was treated with SeO₂ (38.5 mg, 0.35 mmol). The reaction mixture was heated under reflux until the disappearance of the starting material was confirmed by TLC (24 h). Then, the reaction mixture was cooled and EtOH was removed under reduced pressure. The crude was treated with water (20 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 30 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column flash chromatography on silica gel with hexane/AcOEt (7:3) to afford 60.0 mg of compound **3** (97%). Compound **3** showed identical spectroscopic data to those previously reported.²¹ ¹H and ¹³C NMR spectra of **3** can be found in the [Supplementary data](#).

4.3. Preparation of lup-20(29)-en-3 β ,16 β ,30-triol (4)

A solution of **1** (86.0 mg, 0.19 mmol) in EtOH (10 mL) was treated with SeO₂ (10.8 mg 0.10 mmol). The reaction mixture was heated under reflux for 24 h. Then, the reaction mixture was cooled and EtOH was removed under reduced pressure. The crude was treated with water (20 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 30 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column flash chromatography on silica gel with hexane/AcOEt (6.5:3.5) to afford 17.8 mg of compound **4** (20.2%) as an amorphous white solid, together with unreacted starting compound **1**. Compound **4** showed identical spectroscopic data to those previously reported.²¹ EIMS *m/z* (%): 458 [M]⁺ (40), 440 (100), 425 (14), 382 (21), 207 (66), 189 (58); HR-EIMS *m/z*: 458.3753 (calcd for C₃₀H₅₀O₃ [M]⁺ 458.3760). ¹H and ¹³C NMR spectra of **4** can be found in the [Supplementary data](#).

4.4. Preparation of 20,29-dihydrolup-3 β ,16 β -diol (5)

A solution of **1** (40.0 mg, 0.09 mmol) in dry AcOEt (5 mL) was hydrogenated in the presence of catalytic amount of Pd/C 10%. The reaction mixture was stirred until the disappearance of the starting material was confirmed by TLC (24 h). After elimination of the solvent the residue obtained was submitted to column flash chromatography on silica gel with hexane/AcOEt (8.5:1.5) to afford 26.1 mg (65%) of compound **5** as a white amorphous solid, mp 250–252 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.75 (3H, d, *J* = 5.1 Hz, H-30), 0.76 (6H, s, H-24, H-28), 0.84 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, d, *J* = 7.1 Hz H-29), 0.97 (6H, s, H-23, H-25), 1.04 (3H, s, H-27), 3.19 (1H, dd, *J* = 4.8, 11.2 Hz, H-3), 3.56 (1H, dd, *J* = 4.8, 11.0 Hz, H-16); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 79.1 (C-3), 77.5 (C-16), 55.4 (C-5), 49.9 (C-9), 48.8 (C-17), 47.3 (C-18), 44.5 (C-19), 44.3 (C-14), 41.1 (C-8), 39.0 (C-4), 39.0 (C-1), 38.2 (C-22), 37.2 (C-10), 37.2 (C-13), 36.9 (C-15), 34.5 (C-7), 29.3 (C-20), 28.1 (C-23), 27.5 (C-2), 26.6 (C-21), 23.1 (C-30), 22.2 (C-12), 21.0 (C-11), 18.5 (C-6), 16.2 (C-25, C-26), 16.1 (C-27), 15.5 (C-29), 15.2 (C-24), 12.2 (C-28); EIMS *m/z* (%): 444 [M]⁺ (68), 429 (4), 426 (42), 411 (10), 207 (100), 189 (56); HR-EIMS *m/z*: 444.3982 (calcd for C₃₀H₅₂O₂ [M]⁺ 444.3967).

4.5. Preparation of 20S,29-epoxylup-3 β ,16 β -diol (6)

MCPBA (98.4 mg, 0.57 mmol) and 6 mL of a 10% Na₂CO₃ solution were added to a solution of **1** (169.0 mg, 0.38 mmol) in CH₂Cl₂ (5 mL). The reaction mixture was stirred vigorously at 5 °C for 4 h, and then the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 20 mL).

The combined organic extracts were washed successively with 5% Na₂SO₃ solution, saturated NaHCO₃ solution and water, dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated to dryness. The reaction product was purified by column flash chromatography on silica gel using hexane/AcOEt (7.5:2.5) to give 101.6 mg (58%) of compound **6** as an amorphous white solid, mp 195–197 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.68 (3H, s, H-28), 0.70 (3H, s, H-24), 0.78 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-27), 1.18 (3H, s, H-30), 2.56 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-29b), 2.60 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-29a) 3.12 (1H, dd, *J* = 5.5, 10.4 Hz, H-3), 3.51 (1H, dd, *J* = 4.5, 10.9 Hz, H-16); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 78.8 (C-3), 76.7 (C-16), 60.1 (C-20), 57.1 (C-29), 55.3 (C-5), 49.8 (C-9), 49.0 (C-17), 48.9 (C-19), 46.0 (C-18), 43.9 (C-14), 40.9 (C-8), 38.8 (C-1), 38.8 (C-4), 37.5 (C-22), 37.1 (C-10), 36.6 (C-15), 36.5 (C-13), 34.2 (C-7), 28.0 (C-23), 27.3 (C-2), 26.4 (C-21), 26.2 (C-12), 20.9 (C-11), 18.3 (C-6), 18.3 (C-30), 16.1 (C-26), 16.1 (C-27), 16.0 (C-25), 15.4 (C-24), 11.7 (C-28); EIMS *m/z* (%): 458 [M]⁺ (17), 440 (29), 425 (14), 400 (20), 382 (36), 207 (100), 189 (88); HR-EIMS *m/z*: 458.3749 (calcd for C₃₀H₅₀O₃ [M]⁺ 458.3760).

4.6. General procedures for the preparation of the sulfated compounds 2, 7, 8 and 10

A solution of Me₃N·SO₃ and **1**, **3**, **5** or **9** in dry DMF was placed in a microwave-special closed vial and the solution was irradiated for 7 min at 150 °C in a microwave reactor. The reaction mixture was then cooled to room temperature and quenched with water (1 mL). After evaporation to dryness the residue was eluted through Amberlite CG-120 (sodium form) with MeOH, evaporated under reduced pressure and purified by column flash chromatography on silica gel with CH₂Cl₂/MeOH mixtures as eluent to afford the sulfated compounds.

4.6.1. Disodium 3 β ,16 β -dihydroxylup-20(29)-ene disulfate (2)

Following the general procedure, a solution of **1** (100.0 mg, 0.23 mmol) in DMF (4 mL) was treated with Me₃N·SO₃ (244.0 mg, 1.81 mmol). Purification of the resulting crude by flash chromatography with CH₂Cl₂/MeOH (4:1) afforded 135.9 mg (93%) of compound **2** as a white amorphous solid. Its ¹H and ¹³C NMR data were identical to those previously reported.¹³

4.6.2. Disodium 3 β ,16 β -dihydroxylup-20(29)-en-30-al disulfate (7)

Compound **3** (20.0 mg, 0.04 mmol) in DMF (2 mL) was treated with Me₃N·SO₃ (47.5 mg, 0.35 mmol) according to the general procedure. Purification of the resulting crude by flash chromatography with CH₂Cl₂/MeOH (4:1) afforded 25.8 mg (89%) of compound **7** as a white amorphous solid, mp 107–108 °C; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.80 (3H, s, H-25), 0.87 (6H, s, H-26, H-28), 1.02 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-24), 1.07 (3H, s, H-27), 2.86 (1H, ddd, *J* = 5.7, 10.6, 10.7 Hz, H-19), 3.92 (1H, dd, *J* = 4.3, 11.5 Hz, H-3), 4.49 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-16), 6.05 (1H, br s, H-29a), 6.42 (1H, br s, H-29b), 9.49 (1H, s, H-30); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 196.7 (C-30), 157.8 (C-20), 135.2 (C-29), 87.9 (C-3), 85.9 (C-16), 57.2 (C-5), 51.1 (C-9), 50.6 (C-18), 48.8 (C-17), 45.1 (C-14), 42.2 (C-8), 39.8 (C-1), 39.6 (C-4), 38.9 (C-15), 38.9 (C-19), 38.5 (C-13), 38.1 (C-10), 35.6 (C-7), 35.5 (C-22), 33.1 (C-21), 28.7 (C-23), 28.3 (C-12), 25.4 (C-2), 22.0 (C-11), 19.4 (C-6), 16.7 (C-27), 16.7 (C-26), 16.6 (C-25), 16.2 (C-24), 12.8 (C-28); HRMS (ESI) *m/z*: 637.2214 (calcd for C₃₀H₄₆NaO₉S₂ [M–Na][–] 637.2481).

4.6.3. Trisodium 3 β ,16 β ,30-trihydroxy-lup-20(29)-ene trisulfate (8)

Compound **4** (10.0 mg, 0.02 mmol) in DMF (1 mL) was treated with Me₃N·SO₃ (35.6 mg, 0.26 mmol) according to the general procedure. Purification of the resulting crude by flash chromatography

with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (7:3) afforded 3.3 mg (20%) of compound **8** as a white amorphous solid. Alternatively, a solution of **9** (11.4 mg, 0.02 mmol) in DMF (1 mL) was treated with $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (9.2 mg, 0.07 mmol) to give 8.3 mg (50%) the same product **8**. Mp 100–102 °C; ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 0.81 (3H, s, H-25), 0.85 (3H, s, H-28), 0.89 (3H, s, H-26), 1.02 (3H, s, H-23), 1.08 (6H, s, H-24, H-27), 2.41–2.53 (1H, m, H-19), 3.92 (1H, dd, J = 4.0, 11.1 Hz, H-3), 4.37 (1H, t, J = 8.2 Hz, H-16), 4.97 (1H, br s, H-29a), 5.04 (1H, br s, H-29b), 4.47 (2H, br s, H-30); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 151.0 (C-20), 110.4 (C-29), 87.6 (C-3), 85.8 (C-16), 71.3 (C-30), 57.2 (C-5), 51.3 (C-9), 45.3 (C-14), 45.2 (C-13), 42.3 (C-8), 39.6 (C-1), 39.6 (C-4), 38.8 (C-19), 38.7 (C-15), 38.2 (C-10), 35.7 (C-7), 35.7 (C-22), 30.8 (C-21), 28.7 (C-23), 27.7 (C-12), 25.4 (C-2), 22.2 (C-11), 19.4 (C-6), 16.8 (C-25), 16.7 (C-26), 16.6 (C-27), 16.3 (C-24), 12.8 (C-28); HRMS (ESI) m/z : 741.1781 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_3$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$ 741.2025).

4.6.4. Disodium 3 β ,16 β -dihydroxy-20,29-dihydrolupane disulfate (**10**)

Compound **5** (22.2 mg, 0.05 mmol) in DMF (2 mL) was treated with $\text{Me}_3\text{N}\cdot\text{SO}_3$ (53.9 mg, 0.40 mmol) according to the general procedure. Purification of the resulting crude by flash chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8.5:1.5) afforded 22.7 mg (70%) of compound **10** as a white amorphous solid, mp 136–138 °C; ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 0.81 (6H, s, H-25, H-28), 0.87 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-29), 0.89 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-30), 0.90 (3H, s, H-26), 1.02 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-24), 1.09 (3H, s, H-27), 3.93 (1H, dd, J = 4.2, 11.5 Hz, H-3), 4.30 (1H, dd, J = 6.2, 9.7 Hz, H-16); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 87.8 (C-3), 86.3 (C-16), 57.2 (C-5), 51.0 (C-1), 45.8 (C-18), 45.4 (C-19), 42.3 (C-14), 39.8 (C-8), 39.7 (C-4), 39.6 (C-1), 39.5 (C-15), 38.5 (C-10), 38.1 (C-13), 35.6 (C-22), 35.5 (C-7), 30.5 (C-20), 28.7 (Me-23), 27.7 (C-21), 25.4 (C-2), 23.3 (Me-30), 22.8 (C-12), 22.1 (C-11), 19.4 (C-6), 16.8 (C-26), 16.7 (C-25), 16.6 (C-27), 16.2 (C-29), 15.4 (C-24), 13.3 (C-28); HRMS (ESI) m/z : 625.2633 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{NaO}_8\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$ 625.2845).

4.7. Preparation of disodium 3 β ,16 β ,30-trihydroxy-lup-20(29)-ene 3,16-disulfate (**9**)

31.0 mg (0.12 mmol) of EuCl_3 in dry MeOH (1 mL) were added to a solution of compound **7** (80.0 mg, 0.12 mmol) in dry MeOH (3 mL). Then, the mixture was added slowly to a solution of NaBH_4 (4.5 mg, 0.12 mmol) in MeOH (1 mL). The reaction mixture was stirred and heated under reflux until disappearance of the starting material by TLC (24 h). Then, the reaction mixture was filtered, evaporated under reduced pressure and purified by column flash chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (7.5:2.5) to give 40.9 mg (51%) of compound **9** as a white amorphous solid, mp 130–131 °C; ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 0.81 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-28), 0.88 (3H, s, H-26), 1.02 (3H, s, H-23), 1.07 (3H, s, H-24), 1.08 (3H, s, H-27), 2.41 (1H, ddd, J = 5.7, 10.0, 10.6 Hz, H-19), 3.91 (1H, dd, J = 3.8, 10.9 Hz, H-3), 4.34 (1H, t, J = 7.7 Hz, H-16), 4.95 (1H, br s, H-29b), 4.03, 4.06 (2H, d_{AB} , J = 13.5 Hz, H-30a,b); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 155.4 (C-20), 107.4 (C-29), 87.6 (C-3), 85.8 (C-16), 65.0 (C-30), 57.2 (C-5), 51.3 (C-9), 45.2 (C-14), 44.7 (C-13), 42.3 (C-8), 39.9 (C-1), 39.6 (C-4), 38.8 (C-19, C-15), 38.1 (C-10), 35.6 (C-7), 35.5 (C-22), 32.6 (C-21), 28.7 (C-23), 27.4 (C-12), 25.4 (C-2), 22.1 (C-11), 19.4 (C-6), 16.7 (C-25, C-26), 16.6 (C-27), 16.3 (C-24), 12.7 (C-28). HRMS (ESI) m/z : 639.2689 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NaO}_9\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$ 639.2637).

4.8. Preparation of disodium 3 β ,16 β -dihydroxy-20S,29-epoxylupane disulfate (**11**)

MCPBA (21.4 mg, 0.12 mmol) and 6 mL of 10% Na_2CO_3 were added to a solution of **2** (40.0 mg, 0.06 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL).

The reaction mixture was stirred vigorously at room temperature for 12 h, and then the aqueous layer was extracted with *n*-BuOH (3 \times 15 mL). The combined organic extracts were washed successively with 5% Na_2SO_3 solution, saturated NaHCO_3 solution and water, dried over anhydrous MgSO_4 and evaporated to dryness. The reaction product was purified by preparative-RP TLC with $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (6.5:3.5) to give 4.0 mg (10%) of compound **11** as an amorphous white solid, mp 134–135 °C; ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 0.78 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-28), 0.88 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-24), 1.06 (3H, s, H-27), 1.23 (3H, s, H-30), 2.64 (2H, br s, H-29) 3.90 (1H, dd, J = 4.2, 11.4 Hz, H-3), 4.29 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-16); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 87.5 (C-3), 85.6 (C-16), 61.5 (C-20), 58.0 (C-29), 57.2 (C-5), 51.1 (C-9), 50.4 (C-18), 49.4 (C-17), 47.3 (C-19), 45.2 (C-14), 42.3 (C-8), 39.8 (C-1), 39.6 (C-4), 38.7 (C-15), 38.1 (C-10), 38.0 (C-13), 35.5 (C-7), 35.4 (C-22), 28.7 (C-23), 27.7 (C-21), 27.0 (C-12), 25.4 (C-2), 22.1 (C-11), 19.4 (C-6), 18.5 (C-30), 16.7 (C-25), 16.7 (C-26), 16.5 (C-27), 16.2 (C-24), 12.9 (C-28). HRMS (ESI) m/z : 639.2695 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NaO}_9\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$ 639.2637).

4.9. General procedures for the preparation of the acetylated compounds 12–16

To a solution of **1**, **3** or **4** in pyridine were added a catalytic amount of DMAP and Ac_2O . The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h until disappearance of the starting material. Then, water was added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 \times 30 mL). The combined organic extracts were washed with a saturated solution of NaHCO_3 , dried over MgSO_4 , filtered, and concentrated. The residue was purified by flash chromatography with CH_2Cl_2 as eluent to afford the desired acetate.

4.9.1. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol diacetate (**12**)

Following the general procedure, a solution of **1** (20.0 mg, 0.05 mmol) in pyridine (1 mL) was treated with Ac_2O (1.2 mL, 12.7 mmol) to give after purification 12.1 mg (51%) of compound **12** as white amorphous solid, mp 105–107 °C. ^1H and ^{13}C NMR spectra of **12** are included in the [Supplementary data](#).

4.9.2. 3 β -Acetoxy-16 β -hydroxy-lup-20(29)-ene (**13**) and 3 β -hydroxy-16 β -acetoxy-lup-20(29)-ene (**14**)

Following the general procedure, a solution of **1** (50.0 mg, 0.11 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL) and pyridine (0.5 mL) was treated with Ac_2O (11 μL , 0.11 mmol) to give after purification 13.7 mg (25%) of compound **13** and 13.7 mg (25%) of compound **14** as white amorphous solids. Compound **13**: mp 110–111 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.79 (3H, s, H-28), 0.83 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-23), 0.85 (3H, s, H-24), 0.98 (3H, s, H-25), 1.03 (3H, s, H-27), 1.68 (3H, s, H-30), 2.04 (3H, s, OCOCH_3), 2.49 (1H, ddd, J = 6.0, 11.0, 11.0 Hz, H-19), 3.61 (1H, dd, J = 4.3, 9.8 Hz, H-16), 4.46 (1H, dd, J = 5.4, 10.9 Hz, H-3), 4.59 (1H, br s, H-29a), 4.70 (1H, br s, H-29b); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.2 (OCOCH_3), 150.1 (C-20), 110.0 (C-29), 81.1 (C-3), 77.2 (C-16), 55.6 (C-5), 50.1 (C-9), 48.8 (C-17), 47.9 (C-19), 47.8 (C-18), 44.2 (C-14), 41.1 (C-8), 38.6 (C-1), 38.0 (C-4), 37.9 (C-22), 37.4 (C-13), 37.2 (C-10), 37.0 (C-15), 34.3 (C-7), 30.0 (C-21), 28.1 (C-23), 24.9 (C-12), 23.8 (C-2), 21.5 (OCOCH_3), 21.0 (C-11), 19.5 (C-30), 18.3 (C-6), 16.6 (C-24), 16.3 (C-26), 16.3 (C-25), 16.1 (C-27), 11.8 (C-28); EIMS m/z : 484 $[\text{M}]^+$ (36), 466 (6), 424(57), 216 (44), 207 (50), 189 (82), 203 (41); HR-EIMS m/z : 484.3940 (calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$ 484.3916). Compound **14**: mp 110–112 °C ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 0.75 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-28), 0.96 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-25), 1.04 (3H, s, H-27), 1.67 (3H, s, H-30), 2.02 (3H, s, OCOCH_3), 2.48 (1H, ddd, J = 6.0, 10.4, 11.3 Hz, H-19), 3.17–3.19 (1H, m, H-3), 4.59 (1H, br s, H-29a),

4.70 (1H, br s, H-29b), 4.87 (1H, dd, $J = 4.6, 11.3$ Hz, H-16); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.9 (OCOCH₃), 150.0 (C-20), 110.1 (C-29), 79.2 (C-16), 79.0 (C-3), 55.4 (C-5), 50.0 (C-9), 47.9 (C-18), 47.6 (C-19), 47.5 (C-17), 44.3 (C-14), 41.1 (C-8), 39.0 (C-4), 38.8 (C-1), 37.8 (C-22), 37.5 (C-13), 37.2 (C-10), 34.4 (C-7), 33.6 (C-15), 29.8 (C-21), 28.1 (C-23), 27.5 (C-2), 24.8 (C-12), 21.5 (OCOCH₃), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.4 (C-6), 16.2 (C-26), 16.1 (C-24), 16.1 (C-25), 15.5 (C-27), 12.9 (C-28); EIMS m/z : 484 [M]⁺ (28), 466 (26), 424(16), 216 (26), 207 (6), 203 (42), 189 (90); HR-EIMS m/z : 484.3924 (calcd for C₃₂H₅₂O₃ [M]⁺ 484.3916).

4.9.3. 3 β ,16 β -Diacetoxy-lup-20(29)-en-30-ol (15)

Following the general procedure, a solution of **3** (20.0 mg, 0.04 mmol) in pyridine (1 mL) was treated with Ac₂O (1.2 mL, 12.7 mmol) to give after purification 16.6 mg (70%) of compound **15** as a white amorphous solid, mp 109–110 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 0.82 (3H, s, H-24), 0.83 (6H, s, H-23, H-26), 0.87 (3H, s, H-28), 1.02 (6H, s, H-25, H-27), 2.02 (3H, s, OCOCH₃), 2.04 (3H, s, OCOCH₃), 4.45 (1H, dd, $J = 4.6, 11.0$ Hz, H-3), 4.92 (1H, dd, $J = 4.7, 11.3$ Hz, H-16), 5.95 (1H, br s, H-29a), 6.30 (1H, br s, H-29b), 9.51 (1H, s, H-30); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 195.0 (C-30), 171.2 (OCOCH₃ (C-3)), 170.9 (OCOCH₃ (C-16)), 156.3 (C-20), 132.5 (C-29), 81.0 (C-3), 78.9 (C-16), 55.4 (C-5), 49.8 (C-9, C-18), 47.7 (C-17), 44.0 (C-14), 41.0 (C-8), 38.5 (C-1), 37.9 (C-4), 37.8 (C-22), 37.1 (C-10, C-13, C-19), 34.3 (C-7), 33.5 (C-15), 29.8 (C-21), 28.0 (C-23), 23.8 (C-2, C-12), 21.5 (OCOCH₃), 21.5 (OCOCH₃), 21.0 (C-11), 18.2 (C-6), 16.6 (C-24), 16.3 (C-26), 16.1 (C-25), 15.9 (C-27), 12.8 (C-28). HR-EIMS m/z : 540.3807 (calcd for C₃₄H₅₂O₅ [M]⁺ 540.3815).

4.9.4. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β ,30-triol triacetate (16)

Following the general procedure, a solution of **4** (20.0 mg, 0.04 mmol) in pyridine (1 mL) was treated with Ac₂O (1.2 mL, 12.7 mmol) to give after purification 18.4 mg (72%) of compound **16** as a white amorphous solid, mp 107–108 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 0.83 (3H, s, H-26), 0.84 (6H, s, H-23, H-28), 0.85 (3H, s, H-24), 1.04 (6H, s, H-25, H-27), 2.02 (3H, s, OCOCH₃), 2.04 (3H, s, OCOCH₃), 2.10 (3H, s, OCOCH₃), 4.46 (1H, dd, $J = 5.2, 11.5$ Hz, H-3), 4.57, 4.55 (2H, d_{AB}, $J = 14.0$ Hz, H-30a,b), 4.87 (1H, dd, $J = 4.7, 11.2$ Hz, H-16), 4.95 (1H, br s, H-29a), 4.97 (1H, br s, H-29b); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.2 (OCOCH₃ (C-3)), 170.9 (OCOCH₃ (C-16)), 170.8 (OCOCH₃ (C-30)), 148.5 (C-20), 110.9 (C-29), 81.0 (C-3), 79.0 (C-16), 68.3 (C-30), 55.4 (C-5), 49.9 (C-9), 48.6 (C-18), 47.4 (C-17), 44.2 (C-14), 41.1 (C-8), 38.8 (C-13), 38.5 (C-1), 37.9 (C-4), 37.6 (C-22), 37.4 (C-10), 37.1 (C-19), 34.3 (C-7), 33.6 (C-15), 29.8 (C-21), 28.1 (C-23), 23.9 (C-12), 23.8 (C-2), 21.5 (OCOCH₃), 21.5 (OCOCH₃), 21.2 (OCOCH₃ (C30)), 21.1 (C-11), 18.2 (C-6), 16.6 (C-24), 16.3 (C-26), 16.2 (C-25), 16.1 (C-27), 12.7 (C-28); EIMS m/z : 542 [M - C₂H₂O]⁺ (4), 524 (54), 464 (30), 189 (82); HR-EIMS m/z : 542.3990 (calcd for C₃₄H₅₄O₅ [M - C₂H₂O]⁺ 542.3971).

4.10. General procedure for the preparation of the acylated compounds 17–20

To a solution of **1** in dry CH₂Cl₂ (5 mL) were added the corresponding acid chloride, Et₃N and a catalytic amount of DMAP. The reaction mixture was stirred under N₂ atmosphere at the appropriate temperature. The progress of the reaction was monitored by TLC. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ solution (5 mL). The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). The combined organic extracts were washed with a saturated solution of NaHCO₃, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The crude was purified by flash chromatography on silica gel with hexane/AcOEt (9:1) to afford the desired ester.

4.10.1. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol di-4-pentenoate (17)

Following the general procedure, to a solution of **1** (60.0 mg, 0.14 mmol) in CH₂Cl₂ were added Et₃N (75 μL , 0.54 mmol) and 4-pentenoyl chloride (35 μL , 0.54 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h to give after purification 9.9 mg (12%) of compound **17** as a white amorphous solid, mp 240–241 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.84 (6 H, s, H-23, H-26), 0.85 (3H, s, H-28), 0.86 (3H, s, H-24), 1.04 (6H, s, H-25, H-27), 1.68 (3H, s, H-30), 2.38 (4H, d, $J = 6.7$ Hz, H-3', H-3''), 2.39 (4H, d, $J = 5.7$ Hz, H-2', H-2''), 2.50 (1H, m, H-19), 4.48 (1H, dd, $J = 5.1, 10.3$ Hz, H-3), 4.60 (1H, br s, H-29a), 4.71 (1H, br s, H-29b), 4.88 (1H, dd, $J = 4.9, 11.4$ Hz, H-16), 4.98 (1H, br s, H-5'a), 5.02 (2H, br s, H-5'b, H-5''a), 5.08 (1H, br s, H-5''b), 5.82 (2H, m, H-4', H-4''); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.0 (C-1'(C-3)), 172.7 (C-1''(C-16)), 150.0 (C-20), 137.0 (C-4', C-4''), 115.5 (C-5', C-5''), 110.1 (C-29), 81.0 (C-3), 79.2 (C-16), 55.5 (C-5), 50.0 (C-9), 48.0 (C-18), 47.7 (C-19), 47.5 (C-17), 44.4 (C-14), 41.2 (C-8), 38.5 (C-1), 38.0 (C-4), 37.8 (C-22), 37.5 (C-13), 37.2 (C-10), 34.4 (C-7), 34.2 (C-2', C-2''), 33.7 (C-15), 29.9 (C-21), 29.2 (C-3', C-3''), 28.1 (C-23), 24.8 (C-12), 23.9 (C-2), 21.0 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 16.7 (C-24), 16.3 (C-26), 16.2 (C-25), 16.1 (C-27), 13.0 (C-28). EIMS m/z : 606 [M]⁺ (0.1), 506 (67), 406(51), 363 (48), 216 (89), 203 (100), 189 (84). HR-EIMS m/z : 606.4668 (calcd for C₄₀H₆₂O₄ [M]⁺ 606.4648).

4.10.2. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol dibenzoate (18)

Following the general procedure described above, to a solution of **1** (50.0 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ were added Et₃N (62 μL , 0.45 mmol) and an excess of benzoylchloride (50 μL , 0.43 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h to give after purification 30.1 mg (41%) of compound **18** as a white amorphous solid, mp 219–220 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-24), 1.01 (3H, s, H-28), 1.09 (3H, s, H-25), 1.14 (3H, s, H-27), 1.72 (3H, s, H-30), 2.54 (1H, ddd, $J = 5.3, 10.9, 11.0$ Hz, H-19), 4.63 (1H, br s, H-29a), 4.72 (1H, dd, $J = 4.9, 9.9$ Hz, H-3), 4.74 (1H, br s, H-29b), 5.13 (1H, dd, $J = 4.9, 11.3$ Hz, H-16), 7.41–7.46 (4H, m, H-3', H-3'', H-5', H-5''), 7.52–7.57 (2H, m, H-4', H-4''), 8.02–8.05 (4H, m, H-2', H-2'', H-6', H-6''); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 166.4 (ArCO (C-3)), 166.2 (ArCO (C-16)), 149.9 (C-20), 132.8 (d), 131.2 (C-1', C-1''), 129.7 (C-2', C-2'', C-6', C-6''), 128.4 (C-3', C-3'', C-5', C-5''), 110.2 (C-29), 81.7 (C-3), 80.0 (C-16), 55.6 (C-5), 50.0 (C-9), 48.1 (C-18), 47.8 (C-17), 47.7 (C-19), 44.5 (C-14), 41.2 (C-8), 38.6 (C-1), 38.3 (C-4), 37.9 (C-22), 37.6 (C-13), 37.3 (C-10), 34.4 (C-7), 33.7 (C-15), 29.9 (C-21), 28.2 (C-23), 24.8 (C-12), 23.9 (C-2), 21.1 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 16.9 (C-24), 16.3 (C-26), 16.2 (C-25), 16.1 (C-27), 13.2 (C-28). HR-EIMS m/z : 650.4365 (calcd for C₄₄H₅₈O₄ [M]⁺ 650.4335).

4.10.3. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol di-*p*-bromobenzoate (19)

Following the general procedure, to a solution of **1** (50.0 mg, 0.11 mmol) in CH₂Cl₂ were added Et₃N (93 μL , 0.68 mmol) and *p*-bromobenzoyl chloride (50 μL , 0.34 mmol). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 48 h to give after purification 38.5 mg (42%) of compound **19** as a white amorphous solid, mp 109.0–109.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (6H, s, H-23, H-26), 0.99 (6H, s, H-24, H-28), 1.10 (3H, s, H-25), 1.13 (3H, s, H-27), 1.71 (3H, s, H-30), 2.54 (1H, ddd, $J = 4.9, 10.6, 10.8$ Hz, H-19), 4.63 (1H, br s, H-29a), 4.72 (1H, dd, $J = 5.4, 10.6$, H-3), 4.74 (1H, br s, H-29b), 5.12 (1H, dd, $J = 4.6, 11.3$ Hz, H-16), 7.30–7.34 (2H, m, *p*-BrBz), 7.67 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, *p*-BrBz), 7.96 (2H, dd, $J = 7.6$ Hz, *p*-BrBz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.1 (ArCO (C-3)), 164.9 (ArCO (C-16)), 149.9 (C-20), 135.8, 133.1, 133.0, 132.6, 130.1, 128.3 (*p*-BrBz), 110.3 (C-29), 82.2 (C-3), 80.6 (C-16), 55.5 (C-5), 50.0 (C-9), 48.0 (C-18), 47.7 (C-17), 47.6 (C-19), 44.5 (C-14), 41.2 (C-8), 38.5 (C-1), 38.3 (C-4), 37.9 (C-22),

37.5 (C-10), 37.2 (C-13), 34.3 (C-7), 33.6 (C-15), 29.8 (C-21), 28.2 (C-23), 24.7 (C-12), 23.8 (C-2), 21.0 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 16.9 (C-24), 16.3 (C-26), 16.2 (C-25), 16.1 (C-27), 13.2 (C-28); EIMS m/z : 606 [M-(O-*p*-Br-Bz)]⁺ (72), 604 (69), 591 (13), 589 (14), 405 (18), 390 (13), 189 (77), 187 (49), 184 (100), 182 (99). HR-EIMS m/z : 806.2475 (calcd for C₄₄H₅₆Br₂O₄ [M]⁺ 806.2545).

4.10.4. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol dihemidiadipate (20)

Following the general procedure, to a solution of **1** (30.0 mg, 0.07 mmol) in CH₂Cl₂ were added Et₃N (62 μ L, 0.41 mmol) and adipoyl chloride (25 μ L, 0.15 mmol). The reaction mixture was stirred under reflux for 24 h. Hydrolysis of the intermediate acyl chloride took place during the work-up in the aqueous media, to give after purification 33.6 mg (71%) of compound **20** as a white amorphous solid, mp 97–98 °C; ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.90 (3H, s, H-24), 0.91 (3H, s, H-23), 0.93 (3H, s, H-28), 0.94 (3H, s, H-26), 1.12 (6H, s, H-25, H-27), 1.66–1.69 (8H, m, hemidiadip.), 1.74 (3H, s, H-30), 2.31–2.37 (8H, m, hemidiadip.), 2.57 (1H, ddd, J = 6.2, 10.3, 11.1 Hz, H-19), 4.49 (1H, dd, J = 5.5, 10.3 Hz, H-3), 4.64 (1H, br s, H-29a), 4.76 (1H, br s, H-29b); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 177.3 (COOH \times 2), 175.0 (C-1'(C-3)), 174.9 (C-1''(C-16)), 151.0 (C-20), 110.7 (C-29), 82.3 (C-3), 80.6 (C-16), 56.7 (C-5), 51.3 (C-9), 49.1 (C-18), 48.9 (C-19), 48.5 (C-17), 45.4 (C-14), 42.2 (C-8), 39.5 (C-1), 38.9 (C-4), 38.8 (C-13, C-22), 38.2 (C-10), 35.3 (C-15), 35.2 (C-5', C-5''), 34.6 (C-7), 34.6 (C-2', C-2''), 30.8 (C-21), 28.5 (C-23), 26.0 (C-12), 25.7 (C-3', C-3''), 25.6 (C-4') 25.5 (C-4''), 24.7 (C-2), 22.0 (C-11), 19.5 (C-30), 19.2 (C-6), 17.0 (C-24), 16.7 (C-26), 16.6 (C-25), 16.3 (C-27), 13.2 (C-28). HR-EIMS m/z : 589.4897 (calcd for C₄₁H₆₁O₆ [M-CO₂H]⁺ 589.4985).

4.11. General procedure for the preparation of compounds 21 and 22

To a solution of **1** or **3** in acetone (3 mL) was added dropwise the Jones reagent at 0 °C, until the solution changed from colorless to orange. The reaction was stirred for 30 min and quenched with *i*-PrOH (2 mL), filtered through Florisil and washed several times with AcOEt. The solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography on silica gel with hexane/AcOEt (9:1) to afford the desired ketone.

4.11.1. Lup-20(29)-en-3,16-dione (21)

Following the general procedure, a solution of **1** (50.0 mg, 0.11 mmol) in acetone was treated with Jones reagent to yield after purification 20.8 mg (42%) of compound **21**, mp 137–138 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-25), 1.01 (3H, s, H-24), 1.06 (3H, s, H-23), 1.09 (3H, s, H-28), 1.14 (3H, s, H-26), 1.65 (3H, s, H-30), 2.61 (1H, ddd, J = 6.3, 10.8, 10.9 Hz, H-19), 2.71 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-15a), 4.62 (1H, br s, H-29a), 4.73 (1H, br s, H-29b); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 217.8 (C-3), 215.8 (C16), 148.8 (C-20), 110.8 (C-29), 56.7 (C-17), 54.8 (C-5), 49.4 (C-9), 49.4 (C-18), 48.1 (C-14), 47.4 (C-4, C-19), 44.9 (C-15), 41.0 (C-8), 39.6 (C-1), 37.7 (C-13), 36.9 (C-10), 34.1 (C-2), 33.6 (C-7), 31.2 (C-22), 28.6 (C-21), 26.8 (C-23), 24.8 (C-12), 21.3 (C-11), 21.1 (C-24), 19.7 (C-6), 19.0 (C-30), 18.1 (C-28), 16.3 (C-26), 16.0 (C-25), 15.4 (C-27); EIMS m/z : 438 [M]⁺ (74), 395 (18), 247 (72), 229 (42), 205 (30); HR-EIMS m/z : 438.3484 (calcd for C₃₀H₄₆O₂ [M]⁺ 438.3498).

4.11.2. 3,16-Dioxo-lup-20(29)-en-30-al (22)

Following the general procedure, a solution of **3** (50.0 mg, 0.11 mmol) in acetone as treated with Jones reagent to yield after purification 12.9 mg (26%) of compound **22**, mp 143.0–143.5 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-25), 1.02 (3H, s, H-24), 1.07 (3H, s, H-28), 1.13 (6H, s, H-23, H-26), 2.48 (1H, ddd, J = 8.6, 15.7, 15.9 Hz, H-19), 2.74 (1H, d, J = 13.8 Hz, H-15a),

5.98 (1H, br s, H-29a), 6.29 (1H, br s, H-29b), 9.52 (1H, s, H-30); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 217.9 (C-3), 215.4 (C-16), 194.8 (C-30), 156.2 (C-20), 133.3 (C-29), 56.9 (C-17), 54.8 (C-5), 49.2 (C-9, C-18), 47.7 (C-14), 47.4 (C-4), 44.9 (C-15), 41.0 (C-8), 39.6 (C-1), 37.3 (C-13, C-19), 36.9 (C-10), 34.2 (C-2), 33.6 (C-7, C-22), 31.3 (C-12, C-21), 26.8 (C-23), 21.2 (C-11), 21.2 (C-24), 19.6 (C-6), 18.1 (C-28), 16.3 (C-26), 15.9 (C-25), 15.4 (C-27); EIMS m/z : 452 [M]⁺ (100), 437 (20), 434 (31), 247 (15), 205 (17); HR-EIMS m/z : 452.3284 (calcd for C₃₀H₄₄O₃ [M]⁺ 452.3290).

4.12. Biological activity

4.12.1. Inhibition assay on AChE and BChE in vitro

Electric eel (*Torpedo californica*) AChE and horse serum BChE were used as source of both the cholinesterases. AChE and BChE inhibiting activities were measured in vitro by the spectrophotometric method developed by Ellman with slight modification.²²

The lyophilized enzyme, 500U AChE/300U BChE, was prepared in buffer A (8 mM K₂HPO₄, 2.3 mM NaH₂PO₄) to obtain 5/3 U/mL stock solution. Further enzyme dilution was carried out with buffer B (8 mM K₂HPO₄, 2.3 mM NaH₂PO₄, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6) to produce 0.126/0.06 U/mL enzyme solution. Samples were dissolved in buffer B with 2.5% of MeOH as cosolvent, except for compounds **2** and **7–11** that were dissolved in buffer B without cosolvent. Enzyme solution (300 μ L) and sample solution (300 μ L) were mixed in a test tube and incubated for 60/120 min at room temperature. The reaction was started by adding 600 μ L of the substrate solution (0.5 mM DTNB, 0.6 mM ATCl/BTCl, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7.5). The absorbance was read at 405 nm for 180 s at 27 °C. Enzyme activity was calculated by comparing reaction rates for the sample to the blank. All the reactions were performed in triplicate. IC₅₀ values were determined with GraphPad Prism 5. Eserine (99%) and tacrine (99%) were used as reference AChE/BChE inhibitors.

4.12.2. Kinetic characterization of AChE inhibition

The enzyme reaction was carried out at three fixed inhibitor (compound **10**) concentrations (0, 49 and 125 μ M). In each case the initial velocity measurements were obtained at varying substrate (*S*) (acetylthiocholine) concentrations and the reciprocal of the initial velocity ($1/v$) was plotted as a function of the reciprocal of [*S*]. The double-reciprocal (Lineweaver–Burk) plot showed a pattern of parallels lines with the same slopes, characteristic of an uncompetitive inhibitor. The data of the enzyme activity at different fixed substrate concentrations with increasing inhibitor concentrations were analyzed with GraphPad Prism 5. The nonlinear regression of these data fitted with uncompetitive inhibition with a $R^2 = 0.9859$. The calculated K_i was 144.4 μ M.

4.12.3. Molecular docking determinations

Torpedo californica AChE crystal structure was chosen to perform the docking studies given that this was the enzyme used in the in vitro assays. Structure of Protein Data Bank (PDB) entry 2ACE—complexed with acetylcholine—was used for the docking simulations of compound **10**.²⁹ Geometry optimization was performed with semiempirical calculations (AM1) and the Hartree–Fock method and the 6-31+G (d) basis set incorporated in the Gaussian 03 program.^{30–32} The charges of the ligand were obtained using the standard RESP procedure.³³

Docking studies were performed with version 4.2.5.1 of the program AutoDock, using the implemented empirical free energy function.³⁴ The graphical user interface program AutoDock Tools was used to prepare, run and analyze the docking simulations. The simulation space was defined as a 26.25 \times 24 \times 34.5 Å box which included the active site and the peripheral site. Atomic interaction energy on a 0.375 Å grid was calculated with the

auxiliary program Autogrid 4 using probes corresponding to each map type found in the inhibitor. All rotatable dihedrals in **10** were allowed to rotate freely. The starting position of the inhibitor was outside the grid on a random position.

The triterpenoid was docked by the Lamarckian genetic algorithm protocol. A total of 256 independent simulations with a population size of 150 members were run for **10** using AutoDock 4.2.5.1 with default parameters (random starting position and conformation, translation step of 2.0 Å, mutation rate of 0.02, crossover rate of 0.8, local search rate 0.06 and 2,500,000 energy evaluations). After docking, the 256 conformers generated for the inhibitor were assigned to clusters based on a tolerance of 2.0 Å all atom root-mean-square deviation (rmsd) in position from the lowest-energy solution. The clusters were also ranked according to the energies of their representative conformations, which were the lowest-energy solutions within each cluster.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Research Council of Argentina (CONICET), Universidad Nacional del Sur (Argentina), Spanish MINECO (SAF 2012-37344-C03-C01), EU Research Potential (FP7-REGPOT-2012-61367-IMBRAIN), ANPCYT (Argentina) and Scientific Research Commission (CIC, Argentina). M.J.C. and V.R. are grateful to CONICET for their doctoral fellowships. M.J.C. thanks ULL financial support for a short stay. M.B.F. is a Research Member of CIC. A.P.M. and M.S.M. are Research Members of CONICET.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.04.050>. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

References and notes

- Hill, R. A.; Connolly, J. D. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *1028*, 30.
- Laszczyk, M. N. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1549.
- Kuo, R.-Y.; Qian, K.; Morris-Natschke, K. L.; Lee, K.-H. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1321.
- Sporn, M. B.; Liby, K. T.; Yore, M. M.; Fu, L.; Lopchuk, J. M.; Gribble, G. W. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 537.
- Majeed, R.; Sangwan, P. L.; Chinthakindi, P. K.; Khan, I.; Dangroo, N. A.; Thota, N.; Hamid, A.; Sharma, P. R.; Saxena, A. K.; Koul, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 782.
- Yang, S.; Liang, N.; Li, H.; Xue, W.; Hu, D.; Jin, L.; Zhao, Q.; Yang, S. *Chem. Cent. J.* **2012**, *6*, 141.
- Kommerer, H.; Kaluderovic, G. N.; Kalbitz, J.; Draeger, B.; Paschke, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3346.
- Lan, P.; Wang, J.; Zhang, D. M.; Shu, C.; Cao, H. H.; Sun, P. H.; Wu, X. M.; Ye, W. C.; Chen, W. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2490.
- Santos, R. C.; Salvador, J. A. R.; Marín, S.; Cascante, M.; Moreira, J. N.; Dinis, T. C. *P. Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4385.
- Nguemfo, E. L.; Dimo, T.; Dongmo, A. B.; Azebaze, A. G. B.; Alaoui, K.; Asongalem, A. E.; Cherrah, Y.; Kamtchouing, P. *Inflammopharmacology* **2009**, *17*, 37.
- Barroso-González, J.; El Jaber-Vazdekis, N.; García-Expósito, L.; Machado, J. D.; Zárate, R.; Ravelo, A. G.; Estévez-Braun, A.; Valenzuela-Fernández, A. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16609.
- Gutiérrez-Nicolás, F.; Gordillo-Román, B.; Oberti, J. C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Joseph-Nathan, P. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 669.
- Vela Gurovic, M. S.; Castro, M. J.; Richmond, V.; Faraoni, M. B.; Maier, M. S.; Murray, A. P. *Planta Med.* **2010**, *76*, 607.
- González-Coloma, A.; López-Balboa, C.; Santana, O.; Reina, M.; Fraga, M. B. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 245.
- Kumar, S.; Misra, N.; Raj, K.; Srivastava, K.; Puri, S. K. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 305.
- Selkoe, D. J. *Science* **2012**, *2012*, 1488.
- Léon, R.; García, A. G.; Marco-Contelles, J. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 139.
- Tayeb, H. O.; Yang, H. D.; Price, B. H.; Tarazi, F. I. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *134*, 8.
- Greig, N. H.; Lahiri, D. K.; Sambamurti, K. *Int. Psychogeriatr.* **2002**, *14*, 77.
- Vela Gurovic, M. S.; Díaz Lanza, A. M.; Boyano Adánez, M. C.; Estañ Omaña, M. C.; Gañán Gómez, I.; Murray, A. P.; Sancho López, P. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 603.
- Neukirch, H.; D'Ambrosio, M.; Sosa, S.; Altinier, G.; Della Loggia, R.; Guerriero, A. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 657.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- Podoly, E.; Bruck, T.; Diamant, S.; Melamed-Book, N.; Weiss, A.; Huang, Y.; Livnah, O.; Langermann, S.; Wilgus, H.; Soreq, H. *Neurodegener. Dis.* **2008**, *5*, 232.
- Diamant, S.; Podoly, E.; Friedler, A.; Ligumsky, H.; Livnah, O.; Soreq, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 8628.
- Chang, M. W.; Belew, R. K.; Carroll, K. S.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 1753.
- Cosconati, S.; Forli, S.; Perryman, A.; Harris, R.; Goodsell, D. S.; Olson, A. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5*, 597.
- Richmond, V.; Garrido San, G.; Murray, A. P.; Maier, M. S. *Steroids* **2011**, *76*, 1160.
- Wenkert, E.; Baddeley, G. V.; Burfitt, I. R.; Moreno, L. N. *Org. Magn. Reson.* **1978**, *11*, 337.
- Raves, M. L.; Harel, M.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57.
- Dewar, M. J. S.; Zebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, *23*, 69.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03, Revision C.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2004.
- Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9620.
- Auto-Dock 4.2 The Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, MB-5, La Jolla, CA, 2013.