



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

**“Metabolitos secundarios de plantas endémicas de la
región y derivados semisintéticos como fuente de
compuestos bioactivos”**

Farm. Florencia Antonella Musso

Directora: Dra. María Belén Faraoni

Co-Directora: Dra. María Alicia Volpe

INQUISUR-UNS-CONICET

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

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 6 de Septiembre de 2016 y el 15 de Marzo de 2022, bajo la dirección de la Dra. María Belén Faraoni y la co-dirección de la Dra. María Alicia Volpe.

Florencia A. Musso

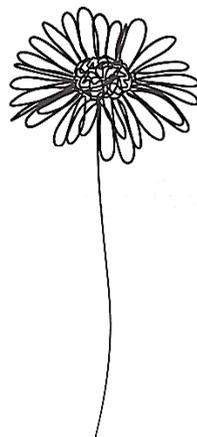


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

A mi hija Margarita...



Agradecimientos

En primer lugar, el mayor agradecimiento es para Dios, que sin dudas este trabajo es parte de los propósitos que Él tiene para mi vida.

En segundo lugar, agradecer profundamente a Belén, mi directora, con quien compartí todos estos años y me ayudó a resolver muchos enigmas de la química, a enfrentar situaciones difíciles y por sobre todas las cosas, quien me enseñó todo lo aprendido al día de hoy. Si bien un doctorado es una experiencia personal, pero a nivel profesional, es el director quien nos guía y en quienes nos sentimos “protegidos” y “a salvo” cuando las papas queman. Gracias Belén por tu paciencia, por tus consejos, por saber comprender muchas situaciones que atravesé y por la confianza que pusiste en mí desde el primer día.

También un especial agradecimiento a Mara, quien me acompañó y me supo guiar durante una parte de mi doctorado. De quien aprendí que un resultado negativo es un **buen resultado**. Una persona cálida que va para adelante cuando la química nos tira para atrás. Con quien aprendí tanto en tan poco tiempo y muchas charlas fugaces con ella eran suficientes para sentirme segura de lo que hacía. Gracias por tu confianza y por abrirme las puertas en la Planta.

Agradezco profundamente a mi esposo Adriél, quien me acompañó y me apoyó siempre, desde mi carrera de grado hasta el día de hoy, quien ha sido mi sostén cuando las cosas se complicaban. Gracias por tu interés y por escucharme SIEMPRE.

Gracias a mi hija Margarita, mi orgullo, por quien he sacado mis mayores fuerzas para seguir adelante y no tirar la toalla. Si bien llegó en mis últimos años de doctorado, siempre supo tenerme paciencia y entenderme en mis días más duros de trabajo, incluso supo esperarme siempre y adecuarse a mis horarios y disponibilidad.

Siguiendo con los agradecimientos familiares, a mis padres, Mario y Patricia, que siempre estuvieron atentos y expectantes al transcurso de mi formación y fueron partícipes en muchas tomas de decisiones que me llevaron a volcarme por la ciencia. Gracias por sus palabras justas en cada paso de mi vida. Gracias también a mi hermano Lucas, por estar a mi lado.

Gracias al grupo de investigación Pronabio, gracias a Paula por abrirme sus puertas y por seguir confiando en mí. ¡Gracias a mis compañeras, a las que están y a las que estuvieron y fueron un apoyo muy importante en estos años! De una u otra forma, fueron pilares importantes a la hora de charlar, reír, aconsejar, escuchar, acompañar y festejar. Gracias Vale, Juli, Naty, Brune, Ale, Sil, Marti, Braian, Meli. Gracias Vicky de Plapiqui por tu ayuda en la Planta.

También agradecer a todo el grupo del Instituto de Química del Sur, con quienes compartí charlas de pasillo, congresos, cursos, cátedras de docencia y demás. Agradecer a Darío y su grupo de investigación, y destacar su sincera predisposición a ayudarme siempre que necesité. Gracias a Tavo, nuestro personal de

apoyo, por ayudarme en la interpretación de algunos espectros importantes que necesité para los últimos resultados y por atender el teléfono en horas no laborales porque se complicaba con el RMN.

También, a las Dras. Andrea Vasconsuelo y Lorena Milanesi, con quienes compartimos algunas reuniones y llevamos adelante un trabajo colaborativo del cual aprendí muchísimo y hoy es parte de esta tesis.

Finalmente, agradecer al personal del LIUC, a la Universidad Nacional del Sur y a la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), por prestar sus instalaciones en las que desarrollé mi trabajo de tesis, y al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por el financiamiento de mi doctorado.

“Estas cosas os he hablado para que en mí tengáis paz. En el mundo tendréis aflicción; pero confiad, yo he vencido al mundo.”

-Jesús.

INDICE

	Página
Índice.....	1
Resumen	6
Abstract	8
Abreviaturas.....	10
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1 PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.....	14
I.1.1 Quimiotecas basadas en PNs	21
I.1.2 Búsqueda de metabolitos bioactivos. Criterios de selección de especies vegetales	24
I.2 TRITERPENOS	26
I.2.1 Modificaciones químicas de triterpenos pentacíclicos tipo lupano	28
I.3 FITOESTRÓGENOS.....	33
I.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS EVALUADAS	36
I.4.1 Efectos sobre la viabilidad en la línea celular de neuroblastoma humano IMR-32...36	
I.4.2 Efectos sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12	38
CAPITULO II. OBJETIVOS	40
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Parte A: Optimización de la obtención del sistema carbonílico α,β-insaturado a partir de lupeol.....	44
III.1 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Chuquiraga erinacea</i>	45
III.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Chuquiraga erinacea</i>.....	46
III.3 AISLAMIENTO DE LA MEZCLA DE TRITERPENOS MONOHIDROXILADOS	47
III.4 PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LUPEOL	49

III.4.1 Antecedentes de la técnica de cromatografía en columna con sílica gel impregnada con AgNO ₃	49
III.4.2 Aislamiento de lupeol mediante cromatografía en columna con sílica/AgNO ₃	50
III.5 OBTENCIÓN DEL SISTEMA CARBONÍLICO α,β-INSATURADO SOBRE LUPEOL COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN	52
III.5.1 Oxidación alílica de lupeol mediante la metodología convencional.....	54
III.5.2 Oxidación alílica de (-)- α -pineno mediante la metodología convencional	57
III.5.3 Oxidación alílica de (-)- α -pineno mediante la metodología catalítica.....	59
III.5.3.1 Síntesis y caracterización del sistema SeO ₂ /SiO ₂	61
III.5.3.2 Oxidación alílica de α -pineno mediante la utilización del sistema SeO ₂ /SiO ₂	63
III.5.3.3 Síntesis y caracterización del catalizador Pd/SeO ₂ /SiO ₂	64
III.5.3.4 Oxidación alílica de α -pineno mediante la utilización del catalizador Pd/SeO ₂ /SiO ₂	66
III.5.3.5 Oxidación alílica de lupeol mediante la utilización del catalizador Pd/SeO ₂ /SiO ₂	69
III.5.4 Oxidación alílica de la mezcla triterpénica monohidroxiada mediante la metodología convencional.....	70
III.6 CONCLUSIONES	75
Parte B: Síntesis de análogos a partir del bloque de construcción 30-oxolupeol y evaluación de la actividad biológica.....	77
III.7 SÍNTESIS DE ANÁLOGOS TRITERPÉNICOS BIOACTIVOS	78
III.7.1 Reacciones de ciclación sobre el sistema carbonílico α,β -insaturado de 30-oxolupeol (5).....	78
III.7.1.1 Introducción al uso de microondas.....	83
III.7.2 Síntesis de la oxima triterpénica 12.....	90
III.7.2.1 Obtención de 12 mediante el uso de microondas	93
III.7.3 Síntesis de aciloximas 13a-13e	94
III.7.3.1 Evaluación in vitro de la actividad neuroprotectora.....	96

III.7.4 Síntesis de azinas triterpénicas 15a-15o.....	99
III.7.4.1 Evaluación in vitro de la actividad neuroprotectora.....	106
III.8 CONCLUSIONES	109
Parte C: Estudio bioguiado y aislamiento de los metabolitos bioactivos de <i>Nicotiana glauca</i> (Graham).....	111
III.9 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Nicotiana glauca</i>	112
III.10 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Nicotiana glauca</i>	114
III.10.1 Efectos del extracto etanólico de <i>N. glauca</i> sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12.....	115
III.11 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Nicotiana glauca</i>	118
III.11.1 Efectos de los subextractos de <i>N. glauca</i> sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12.....	119
III.12 FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO DEL SUBEXTRACTO HEXÁNICO Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS.....	121
III.12.1 Fraccionamiento bioguiado de F3 y aislamiento de ácido palmítico	122
III.12.2 Efectos de ácido palmítico sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12	124
III.13 FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS.....	125
III.13.1 Fraccionamiento bioguiado de F5 y aislamiento de escopoletina	126
III.14 EFECTOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO, ÁCIDO PALMÍTICO Y ESCOPOLETINA DE <i>Nicotiana glauca</i> SOBRE CÉLULAS TUMORALES.....	128
III.15 CONCLUSIONES	131
CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	133
IV.1 MATERIAL GENERAL	134
IV.2 EQUIPOS	135
IV.3 MATERIAL VEGETAL.....	136
IV.4 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LUPEOL DE <i>Chuquiraga erinacea</i>	137

IV.5 OBTENCIÓN DEL SISTEMA CARBONÍLICO α,β-INSATURADO	138
IV.5.1 Procedimiento general para reacciones de oxidación alílica convencionales.....	138
IV.5.1.1 Preparación de 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al (5).....	139
IV.5.1.2 Oxidación alílica de α -pineno.....	140
IV.5.2 Síntesis de SeO ₂ /SiO ₂ y Pd/SeO ₂ /SiO ₂	141
IV.6 PREPARACIÓN, DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE ANÁLOGOS TRITERPÉNICOS	141
IV.6.1 Reacciones de ciclación sobre 30-oxolupeol (5)	141
IV.6.2 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-oxima (12).....	143
IV.6.3 Procedimiento general para la obtención de aciloximas triterpénicas (13a-13e) ..	144
IV.6.3.1 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-benzoiloxima (13a).....	144
IV.6.3.2 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(2-hidroxibenzoil)oxima (13b).....	145
IV.6.3.3 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(2-metilbenzoil)oxima (13c).....	146
IV.6.3.4 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(2-clorobenzoil)oxima (13d).....	147
IV.6.3.5 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(4-iodobenzoil)oxima (13e)	147
IV.6.4 Procedimiento general para la obtención de azinas triterpénicas (15a-15o)	148
IV.6.4.1 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-fenilazina (15a).....	149
IV.6.4.2 Preparación de lup-20(29)-en-30,3-(E,E)-(4'-hidroxifenil)azina (15b).....	150
IV.6.4.3 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-metoxifenil)azina (15c)	150
IV.6.4.4 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-metilfenil)azina (15d).....	151
IV.6.4.5 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-clorofenil)azina (15e)	152
IV.6.4.6 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-nitrofenil)azina (15f)	152
IV.6.4.7 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-hidroxifenil)azina (15g).....	153
IV.6.4.8 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-metoxifenil)azina (15h).....	154
IV.6.4.9 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-metilfenil)azina (15i)	155
IV.6.4.10 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-clorofenil)azina (15j).....	156
IV.6.4.11 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-nitrofenil)azina (15k)	156

IV.6.4.12 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-N,N-dimetilfenil)azina (15l)....	157
IV.6.4.13 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-hidroxi-3'-metilfenil)azina (15m)	158
IV.6.4.14 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-furfurilazina (15n)	159
IV.6.4.15 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-naftil)azina (15ñ).....	159
IV.6.4.16 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(5'-piperonil)azina (15o).....	160
IV.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS ANÁLOGOS TRITERPÉNICOS.....	161
IV.7.1 Células de neuroblastoma humano (modelo neuronal)	161
IV.7.2 Ensayo de reducción del MTT (viabilidad celular)	161
IV.8 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y METABOLITOS ACTIVOS DE <i>Nicotiana glauca</i>.....	162
IV.9 ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS EXTRACTOS DE <i>Nicotiana glauca</i> Y METABOLITOS AISLADOS.....	164
IV.9.1 Mioblastos esqueléticos murinos C2C12	164
IV.9.2 Células de Rabdomiosarcoma humano.....	164
IV.9.3 Morfología mitocondrial y nuclear de células	165
IV.9.4 Tinción roja MitoTracker	165
IV.9.5 Ensayos TUNEL.....	165
IV.9.6 Cuantificación de células apoptóticas	166
IV.9.7 Ensayo de actividad Caspasa-3/7.....	166
IV.9.8 Análisis estadístico.....	166
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168
ANEXO DE ESPECTROS	188

Resumen

El interés en contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas a partir de especies vegetales endémicas, implicó dos cursos de acción.

Por un lado, condujo a la síntesis de 23 derivados triterpénicos obtenidos a partir de lupeol (**1**), aislado de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea*. Teniendo en cuenta el importante contenido de **1** en dicha especie vegetal, y que este triterpeno presenta un grupo isopropenilo en el anillo E, cuyas modificaciones químicas son las menos reportadas, resultó interesante la modificación sintética del triterpeno natural.

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la purificación de **1**, mediante cromatografía en columna con sílica gel impregnada con AgNO₃, a partir de una mezcla de triterpenos monohidroxilados isómeros (**F1**). Luego, se realizó la oxidación alílica de **1**, para obtener el bloque de construcción **5** utilizado, posteriormente, para la síntesis de los derivados triterpénicos.

Se propuso la optimización de la reacción de oxidación, mediante la metodología catalítica, a través de la síntesis de un catalizador heterogéneo novedoso, Pd/SeO₂/SiO₂. Si bien esta metodología dio buenos rendimientos para el monoterpeneo α -pineno, utilizado como molécula modelo, para el triterpeno de interés **1**, los rendimientos fueron bajos, los tiempos de reacción elevados, y la conversión fue menor que con la metodología tradicional.

Teniendo en cuenta estos resultados, y la selectividad del SeO₂, utilizado como agente oxidante, el bloque de construcción **5** se obtuvo a través de la oxidación alílica convencional a partir de la mezcla de triterpenos (**F1**), y posterior purificación en dos etapas, con buenos rendimientos.

La acilación de la oxima **12**, obtenida por modificación química del carbono carbonílico de **5**, dio lugar a cinco aciloximas triterpénicas **13a-13e**. Por otro lado, el tratamiento de **5** con diferentes hidrazonas aromáticas, condujo a la obtención de dieciséis azinas triterpénicas **15a-15o**.

Para todos los derivados obtenidos se evaluó la actividad neuroprotectora. La mayoría de los derivados fueron más activos que el compuesto natural **1**. En el caso de las aciloximas, la acilación no resultó ser una estrategia adecuada para la búsqueda de nuevos derivados de lupeol con actividad neuroprotectora, ya que la oxima de partida fue la más activa. Por otro lado, las azinas **15c**, **15m** y **15n** fueron las que presentaron mayor actividad, sugiriendo que la presencia de un grupo fenilo *meta* o *para* sustituido por un grupo metoxilo, o de un grupo furano, es fundamental para esta actividad.

Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo bioguiado sobre la especie vegetal *Nicotiana glauca*, recolectada en la ciudad de Bahía Blanca, en búsqueda de los metabolitos bioactivos. El extracto etanólico (**EE**) obtenido a partir de las partes aéreas de la planta indujo apoptosis sobre células musculares normales.

Con el fin de encontrar los metabolitos responsables de dicha actividad, se llevó a cabo la partición del **EE** con solventes de polaridad creciente, la cual dio lugar a tres subextractos: hexánico (**SH**), clorofórmico (**SC**) y de acetato de etilo (**SAE**). Mediante el análisis de la actividad biológica para cada subextracto sobre las células mencionadas, se determinó una mayor inducción de apoptosis ejercida por el **SH**, seguida por el **SC** y en menor medida para el **SAE**.

El fraccionamiento bioguiado de los **SH** y **SC**, permitió el aislamiento de ácido palmítico (**AP**) y escopoletina (**ESC**) respectivamente, como los principales metabolitos responsables de la actividad apoptótica observada para cada subextracto.

Teniendo en cuenta la actividad observada sobre las células musculares normales, se llevó a cabo la evaluación del efecto biológico sobre células musculares tumorales de rhabdomiosarcoma humano. Cuando estas células fueron tratadas con **AP** y **ESC**, se observó una disminución en la viabilidad celular del 73% para **AP** y 85% para **ESC**.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se determinó que **AP** y **ESC** presentes en la especie vegetal *Nicotiana glauca*, serían los responsables de la inducción apoptótica observada sobre células musculares normales y patológicas.

Abstract

With the aim of contributing to the discovery of new bioactive molecules from endemic plant species two courses of action were implied.

At the first stage, we improve the synthesis of twenty-three triterpene derivatives obtained from lupeol (**1**), isolated from the plant species *Chuquiraga erinacea*. Taking into account its important content of **1**, and the isopropenyl group in the *E* ring of **1**, whose chemical modifications are few reported, the synthetic modification of the natural triterpene became interesting.

In the first place, **1** purification from a mixture of isomeric monohydroxylated triterpenes (**F1**) was optimized by column chromatography, with silica gel impregnated with AgNO₃. Then, the allylic oxidation of **1** was carried out, to obtain the building block **5** subsequently used for the synthesis of the triterpenic derivatives.

Additionally, the optimization of this oxidation reaction was proposed by catalytic methodology, through the synthesis of a novel heterogeneous catalyst, Pd/SeO₂/SiO₂. Although this methodology allow us to obtain profitable yields for the monoterpene α -pinene, used as a model molecule, we observed that for the triterpene of interest **1**, yields and conversion were lower, and reaction times were longer than with the traditional methodology.

Taking into account these results, and the selectivity of SeO₂, used as oxidizing agent, building block **5** was obtained through conventional allylic oxidation from the triterpene mixture (**F1**), and subsequent purification in two stages, with profitable yields.

The acylation of oxime **12**, obtained by chemical modification of the carbonyl carbon of **5**, gave rise to five triterpene acyloximes **13a-13e**. In addition, the treatment of **5** with different aromatic hydrazones led to obtain sixteen triterpenic azines **15a-15o**.

For all the derivatives obtained, the neuroprotective activity was evaluated. Most derivatives were more active than natural compound **1**. In the case of acyloximes, acylation did not represent an adequate strategy for the search for new lupeol derivatives with neuroprotective activity, since the starting oxime was the most active. On the other hand, azines **15c**, **15m** and **15n** showed the highest activity, suggesting that the presence of a *meta* or *para* phenyl group substituted by a methoxyl group or a furan group, is essential for this activity.

At the second stage, a bioguided test oriented to search bioactive metabolites was carried out on the plant species *Nicotiana glauca*, collected in the city of Bahía Blanca. The ethanolic extract (**EE**) obtained from the aerial parts of the plant induced apoptosis in normal muscle cells.

In order to find the metabolites responsible for this activity, **EE** was partitioned with increasing polarity solvents, which gave rise to three subextracts: hexane (**SH**), chloroform (**SC**) and ethyl acetate (**SAE**). Through biological activity analysis of each subextract on the mentioned cells, a greater induction of apoptosis performed by **SH** was determined, subsequently followed by **SC** and **SAE**.

The bioguided fractionation of **SH** and **SC** allowed the isolation of palmitic acid (**AP**) and scopoletin (**ESC**), respectively, as the main metabolites responsible for the apoptotic activity observed for each subextract.

Taking into account the activity observed on normal muscle cells, the evaluation of biological effect in human rhabdomyosarcoma tumor muscle cells was carried out. When these cells were treated with **AP** and **ESC**, a decrease in cell viability of 73% for **AP** and 85% for **ESC** was observed.

Taking into account the results obtained, it was determined that **AP** and **ESC**, present in the plant species *Nicotiana glauca*, would be responsible for the apoptotic induction observed in normal and pathological muscle cells.

ABREVIATURAS

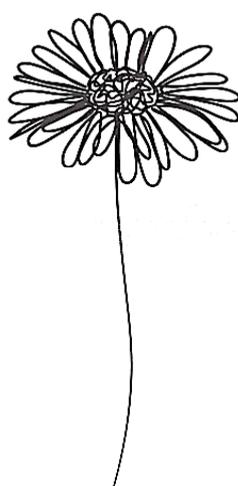
δ	Desplazamiento químico
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AcetilCoA	Acetilcoenzima A
ACP	Fosfatasa ácida
AL	Mirtenal
AP	Ácido palmítico
atm	Atmósferas
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AZT	Azidotimidina
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CS	Células satélite
Da	Dalton
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCU	N,N'-diciclohexilurea
DLB	Demencia con cuerpos de Lewy
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMF	N,N-Dimetilformamida
DRX	Difracción de rayos X
E2	17 β -estradiol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EE	Extracto etanólico
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
END	Enfermedades neurodegenerativas
EP	Enfermedad de Parkinson
ERs	Receptores estrogénicos
ESC	Escopoletina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GABA	Ácido gammaaminobutírico

CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HD	Enfermedad de Huntington
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HSP27	Proteína de choque térmico 27
ICP	Espectroscopía de plasma acoplado inducido
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MAO-B	Monoamino oxidasa-B
MEP	Metileritritol fosfato
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT	<i>Mitotracker Red</i>
MW	Microondas
NEOSY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NEQ	Nuevas entidades químicas
NOE	Efecto nuclear Overhauser
OL	Mirtenol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pf	Punto de fusión
PNs	Productos naturales
ppm	Partes por millón
<i>Rf</i>	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMS	Rabdomiosarcoma humano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S.D.	Desviación estándar
SAE	Subextracto de acetato de etilo
SC	Subextracto clorofórmico
SDH	Shikimato deshidrogenasa
SF	Subfracciones
SH	Subextracto hexánico

tan δ	Tangente de pérdida
TOF	Actividad específica
TPR	Reducción a temperatura programada
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
TRH	Terapia de reemplazo hormonal
TUNEL	<i>Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
UV	Ultravioleta

1

INTRODUCCIÓN



I.1 PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS

A lo largo de la historia, las plantas han constituido la principal fuente de medicamentos debido a la riqueza molecular y estructural que presentan. Al igual que otros seres vivos, las plantas poseen infinidad de células en las cuales se llevan a cabo numerosas reacciones químicas para la síntesis de sustancias complejas a partir de otras más simples. A este conjunto de reacciones se conoce como metabolismo, que, se puede clasificar en dos tipos: metabolismo primario y secundario. El primero, ocurre en todas las células y las moléculas producidas se denominan *metabolitos primarios*, de los cuales podemos mencionar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono, entre otros. Estos, están directamente implicados en el crecimiento, desarrollo y reproducción de la planta. Por otro lado, el metabolismo secundario implica moléculas de naturaleza química diversa, que si bien, no son vitales como las del metabolismo primario, cuentan con la capacidad de desarrollar funciones biológicas determinadas en la planta, tales como defensa contra depredadores y patógenos, adaptación al estrés ambiental, protección contra rayos UV, y atracción de insectos y polinizadores, entre otras [1-4]. Estos compuestos son conocidos como *metabolitos secundarios*, y a su vez como “productos naturales” (PNs), y su ocurrencia es característica de una familia taxonómica, género o especie particular.

La síntesis de PNs ocurre a partir de los metabolitos primarios, donde los intermediarios químicos más importantes son acetil-CoA, ácido shikímico, ácido mevalónico y metileritritol fosfato (MEP), los cuales se encuentran involucrados en distintas rutas biosintéticas compuestas por numerosos mecanismos y reacciones diferentes. A partir de ellos, se genera una serie de unidades básicas conocidas como bloques de construcción o “*building blocks*”, que se componen de un número muy pequeño de átomos de carbono (C1, C2, C5, C6) o por agrupaciones de estas unidades, por ejemplo, C6-C3. A partir de estas moléculas surgen los principales grupos de PNs tales como ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc.

Se estima que las plantas producen más de 30.000 metabolitos secundarios diferentes que son alojados en los distintos órganos, ya sea en las flores, en los frutos, en las hojas y tallos, o en las raíces [5,6]. Una vez biosintetizados, los PNs ejercen su función mediante la interacción con dominios proteicos de la planta, y a pesar de haber sido sintetizados por organismos vegetales, esta capacidad de unirse a proteínas les permite ejercer efectos sobre nuestro organismo de manera eficaz. Este fenómeno se debe, en primer lugar, a la gran similitud

existente entre los genomas de la mayoría de los organismos vivos, en especial, entre el genoma de los mamíferos y el genoma de las plantas [7]. A modo de ejemplo, se conoce que muchas especies vegetales sintetizan alcaloides para protegerse de ser devoradas por animales, por lo que estos metabolitos han evolucionado para unirse a las proteínas de dichos depredadores y ser venenosos para esos organismos. En segundo lugar, los PNs son considerados “moléculas pequeñas”, término utilizado en farmacología y bioquímica para referirse a los compuestos orgánicos no polímeros de bajo peso molecular (< 800 Da), por lo tanto, gracias a que cuentan con las dimensiones moleculares adecuadas para penetrar barreras biológicas, pueden llegar a sitios de acción intracelulares y ejercer su efecto. En este contexto, cabe mencionar las conocidas “reglas de Lipinski” o “reglas de los 5”, las cuales son consideradas un buen criterio predictivo para la selección de moléculas con utilidad terapéutica en los procesos de búsqueda de nuevos fármacos. Estas se basan en la predicción de la absorción oral en función al $\log P$ (logaritmo del cociente entre las concentraciones de una sustancia que se encuentra en las dos fases de una mezcla de solventes inmiscibles entre sí), en el peso molecular de la molécula y en los donantes y aceptores de enlaces de hidrógenos que posee. Sin embargo, en la quinta regla, establece que no es necesario aplicar las cuatro primeras a un PN o a cualquier molécula que sea reconocida por un sistema de transporte activo [8,9]. Se destaca, de esta manera, la particularidad que poseen los PNs cuando son considerados como nuevos fármacos, así como también sus propiedades intrínsecas y la gran riqueza estructural que poseen [5].

Desde hace cientos de años, muchas enfermedades son tratadas a partir de PNs, y los conocimientos sobre su utilización como medicamentos se han ido acumulando y poniendo en práctica gracias a los resultados de varios siglos de experimentación humana. Históricamente, las plantas se utilizaban para el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias a través de infusiones, tinturas, jarabes, pociones y aceites preparados a base de especies vegetales. Los primeros documentos que reportan el uso de plantas medicinales se remontan a más de 4000 años. Por ejemplo, en el año 2500 a.C., la civilización sumeria de Mesopotamia, mencionó diversas drogas vegetales como adormidera, belladona, cáñamo, azafrán, tomillo, entre otras, en una tableta de arcilla conocida como “Primer documento médico” [10,11]. Según la enciclopedia de drogas china, “*Pen-tsoo kang mu*”, que documenta alrededor de 1898 medicamentos herbales y 8160 recetas, el uso de hierbas medicinales se remonta al año 2000 a.C. [10]. En Egipto, el conocimiento de la medicina natural se establece desde el año 2900 a.C., pero fue en el año 1550 a.C. en el que la información fue registrada en el “*Ebers Papyrus*”, documento que contiene más de 700 medicamentos de origen vegetal [2]. La evidencia de la medicina basada en plantas, en la India, se ha encontrado en una colección de himnos

ayurvédicos del año 1000 a.C. que informaron el uso de 1000 hierbas diferentes como medicamentos [12]. Por otro lado, en el mundo occidental, el conocimiento sobre la terapéutica natural, surgió principalmente en las culturas griega y romana, las cuales aportaron criterios básicos para la recolección, almacenamiento y uso de plantas medicinales (año 100 d.C.) [2,10-14]. Durante la Edad Media, los monasterios ingleses, irlandeses, franceses y alemanes conservaron el conocimiento terapéutico basado en plantas occidentales, mientras que los árabes fueron los primeros en establecer reglas en la producción farmacéutica, desarrollando complejas formulaciones médicas, tales como bebidas fermentadas, jarabes, extractos en alcohol y agua destilada [2,11,15]. A partir del año 1450, luego de la invención de la imprenta, el empleo de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades comenzó a difundirse de manera escrita en las distintas culturas, permitiendo que toda la información sobre el uso de estas plantas se fuera transmitiendo más fácilmente de generación en generación [2,11].

Considerando que no se conocía información suficiente sobre las causas de las enfermedades, la utilización de plantas medicinales como remedios para tratarlas, era completamente empírico y sin conocimiento previo de los metabolitos activos presentes y los efectos adversos que estos podían causar [2,15]. Es por ello que alrededor de los siglos XVIII y XIX, los avances en el conocimiento científico llevaron a la elucidación de PNs a partir de las plantas, dando inicio a una nueva era en medicina, donde los fármacos podían ser obtenidos a partir de plantas medicinales y administrados en dosis precisas [2]. A partir de ese momento, se aisló una amplia gama de PNs, lo cual resultó importante, no solo debido a su contribución como medicamentos, sino también por convertirse en valiosas herramientas para el descubrimiento de nuevas funciones fisiológicas o para la evaluación del mecanismo de acción de otras moléculas. A continuación, se mencionan algunos ejemplos.

El glucósido cardiotónico conocido como **digitoxina**, fue aislado de la especie vegetal *Digitalis purpurea* L. (Plantaginaceae), más conocida como “dedalera”. Este fármaco ejerce su efecto sobre la contractibilidad del músculo del corazón, mejorando así la conducción cardíaca, por lo que fue utilizado durante muchos años para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (Figura 1). A su vez, el estudio farmacológico de la **digitoxina** permitió comprender el rol que cumple la bomba de sodio-potasio-ATPasa, la cual es bloqueada por la acción de la droga, desencadenando una serie de efectos sobre el músculo cardíaco [2,15]. Otro ejemplo muy conocido fue el aislamiento de **salicina** a partir de la corteza del sauce *Salix alba* L. (Salicaceae). Se trata de la molécula precursora del ácido salicílico, el cual posteriormente dio origen al ácido acetilsalicílico. En la antigüedad, Hipócrates, padre de la medicina,

recomendaba el uso del extracto del sauce para el tratamiento del dolor y la fiebre (Figura 1) [2,15,16].

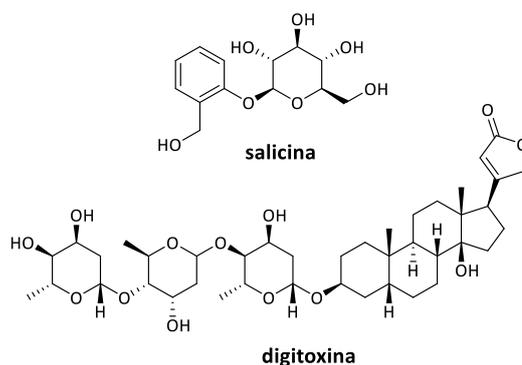


Figura 1. Fármacos naturales obtenidos a partir de plantas medicinales.

Los alcaloides **morfina** y **codeína** (Figura 2), compuestos mayoritarios del opio extraído de cápsulas inmaduras de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) más conocida como “adormidera”, interactúan con receptores opioides del sistema nervioso, por lo que son utilizados como analgésicos narcóticos para aliviar dolores intensos. A su vez, el estudio de la estructura de la molécula de **morfina** permitió comprender los subtipos de receptores opioides presentes en el organismo humano, y de esta manera comprender las vías de las endorfinas y encefalinas. La **papaverina**, otro alcaloide extraído del opio, es el precursor de los dos alcaloides mencionados anteriormente, y se la utiliza como relajante muscular (Figura 2) [2,15,16].

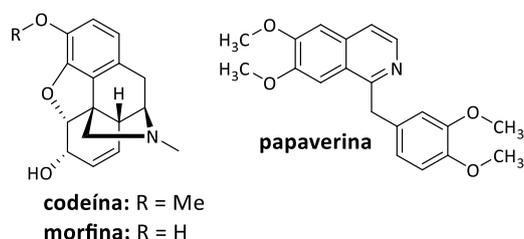


Figura 2. Opioides obtenidos de plantas medicinales.

El alcaloide quinolínico **quinina** (Figura 3), fue utilizado durante siglos como primera elección en el tratamiento de la malaria, y en 2004, fue aprobado por la FDA como fármaco antipalúdico [2]. Este alcaloide fue aislado de una planta nativa de la Cordillera de los Andes perteneciente al género *Cinchona* (Rubiaceae), la cual era empleada por los Incas para tratar la fiebre [16]. La **pilocarpina** (Figura 3) es un alcaloide que se encuentra en las hojas de *Pilocarpus jaborandi* (Rutaceae) y se ha utilizado para el tratamiento del glaucoma y la xerostomía, por su efecto agonista sobre los receptores muscarínicos del sistema nervioso parasimpático. No obstante, en 1998 se aprobó la preparación oral para el tratamiento del síndrome de Sjogren,

una enfermedad autoinmune que daña las glándulas salivales y lagrimales [15]. Los alcaloides indólicos, **vinblastina** y **vincristina** (Figura 3), extraídos de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), tienen un gran valor en el tratamiento del cáncer, en especial, para tratar la leucemia. Ambos compuestos se unen a la tubulina inhibiendo el ensamblamiento de los microtúbulos [16]. El alcaloide **galantamina** (Figura 3) fue aislado en 1952 a partir del extracto de *Galanthus worroniivii* (Amaryllidaceae), y actúa como inhibidor selectivo, competitivo y reversible de la enzima acetilcolinesterasa, mejorando la función cognitiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer y es uno de los medicamentos elegidos para el tratamiento de dicha enfermedad [16].

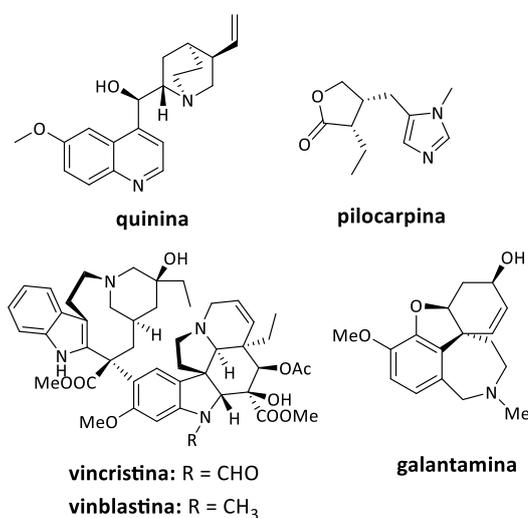


Figura 3. Alcaloides obtenidos de plantas medicinales.

El estudio de los efectos de depresión y parkinsonismo provocados por el uso del alcaloide **reserpina** (Figura 4), extraído de la raíz de *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae) y utilizado para el tratamiento de psicosis e hipertensión, dio lugar al descubrimiento de la disminución de dopamina como causante principal de la enfermedad de Parkinson. Otros alcaloides tales como **muscarina** (aislada del hongo *Amanita muscaria*, Amanitaceae), **nicotina** (metabolito secundario de la planta de tabaco *Nicotiana tabacum*, Solanaceae) y **tubocurarina** (extraída de *Chondrodendron tomentosum*, Menispermaceae) ayudaron a explorar los diferentes tipos de receptores de acetilcolina, implicados en diversas patologías (Figura 4) [17-20].

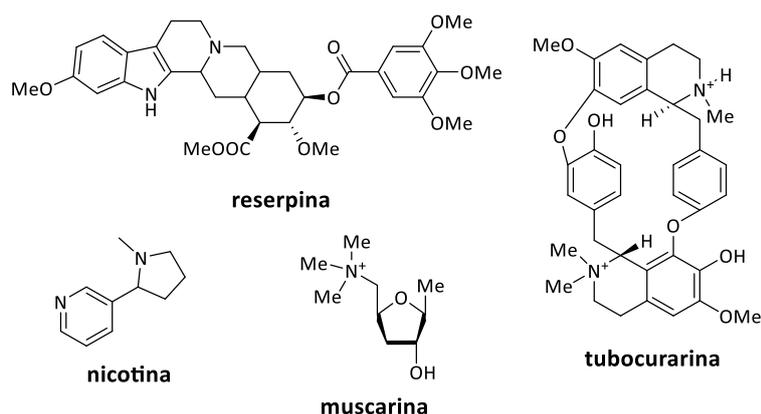


Figura 4. Alcaloides naturales utilizados como herramientas farmacológicas.

Estas investigaciones sobre plantas medicinales han llevado al descubrimiento de muchos fármacos o compuestos líderes de origen natural. Sin embargo, durante la década de 1990, surge una nueva metodología de síntesis orgánica conocida como “*química combinatoria*”, la cual permite obtener quimiotecas formadas por una gran cantidad de compuestos diferentes de manera rápida, simultánea y eficiente. Con el objetivo de acelerar los tiempos de obtención de nuevos derivados químicos, este fenómeno ocasionó que el interés hacia el empleo de plantas medicinales en la búsqueda de compuestos bioactivos se vea desplazado por la síntesis “*de novo*” [21]. Sin embargo, desde la fecha mencionada hasta el año 2019, solamente tres nuevos fármacos obtenidos por química combinatoria han sido aprobados por la FDA: **sorafenib** (Nexavar®) de Bayer, aprobado en 2005 como fármaco antitumoral; **vemurafenib** (Zelboraf®) de Roche, aprobado en 2011 para el tratamiento de melanoma; y **ataluren** (Translarna®) de PTC Therapeutics, aprobado en 2014 para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (Figura 5).

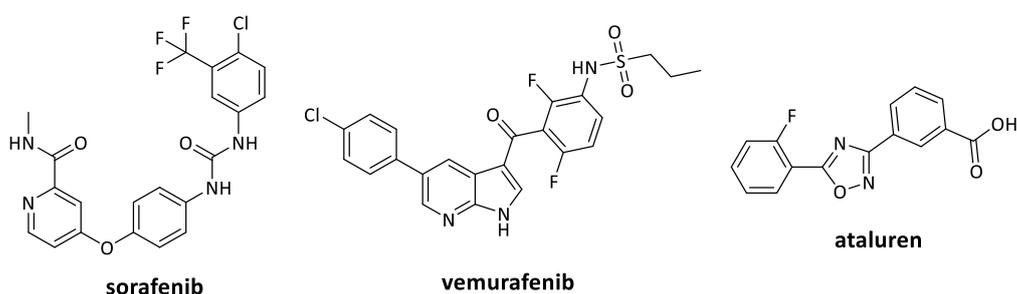


Figura 5. Fármacos aprobados por la FDA obtenidos mediante química combinatoria.

Esto se ve reflejado en el trabajo desarrollado por Newman y Cragg [22], quienes publicaron una serie de revisiones en las que se demuestra la importancia que posee la contribución de la naturaleza en relación al descubrimiento de nuevos fármacos [22-27]. En su

última revisión, se tuvieron en cuenta los fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas a lo largo de casi 39 años, entre las fechas (01-1981/09-2019). Las nuevas entidades químicas (**NEQ**) son clasificadas según las fuentes de las cuales provienen: **B**: biológico (péptido o proteína grande, >50 residuos, aislado de un organismo/línea celular o producido mediante técnicas biotecnológicas), **N**: producto natural, **NB**: producto natural “botánico” (mezclas de drogas vegetales), **ND**: derivado de un producto natural (modificación semisintética), **S**: droga totalmente sintética, **S***: elaborado por una síntesis total (el farmacóforo corresponde a un producto natural), **V**: vacuna. Además, introdujeron una subcategoría, **NM**, que corresponde a compuestos miméticos a un producto natural (**S/NM** o **S*/NM**). Esta última incluye a los inhibidores o antagonistas del objetivo molecular o análogos del sustrato endógeno del sitio. El análisis de los datos obtenidos por los autores indicó que, en los casi 39 años estudiados, fueron aprobadas un total de 1394 **NEQ**, desestimando las pertenecientes a los grupos **B** y **V**. En el gráfico de la Figura 6, se puede observar que, de las 1394 **NEQ**, el 33,3% corresponde a drogas totalmente sintéticas (**S**), sin tener ninguna relación con estructuras naturales; mientras que un 31,6% corresponde a productos naturales o derivados de ellos (**N**, **NB**, **ND**). Por otra parte, el 4,7% corresponde a moléculas sintéticas cuyo farmacóforo corresponde a un PN (**S***), y un 30,4% corresponde a las “imitaciones” de PNs (**S/NM**, **S*/NM**) (Figura 6).

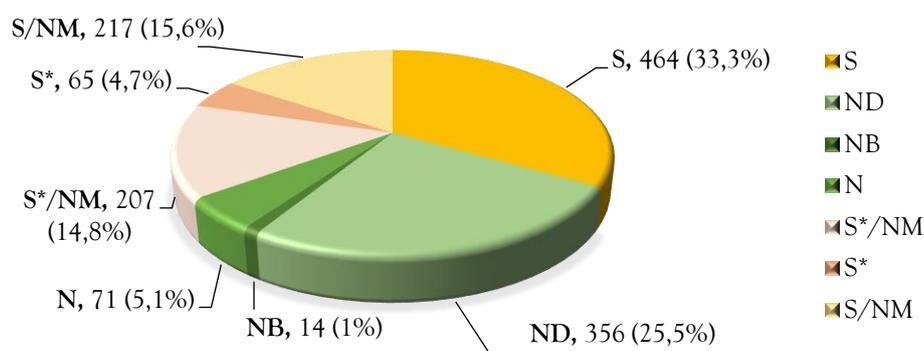


Figura 6. NEQ aprobadas durante el período 01-1981/09-2019, correspondientes a moléculas pequeñas.

Si se tiene en cuenta solamente las **NEQ** pertenecientes a las categorías **N**, **NB** y **ND**, sin incluir ninguna de las clasificaciones de productos inspirados por la naturaleza (**S***, **S*/NM** y **S/NM**), se cuenta con un total de 441 nuevas moléculas. Según el gráfico de barras de la Figura 7, se puede observar que, a lo largo de los años estudiados, ha prevalecido la aprobación de derivados semisintéticos de PNs (**ND**).

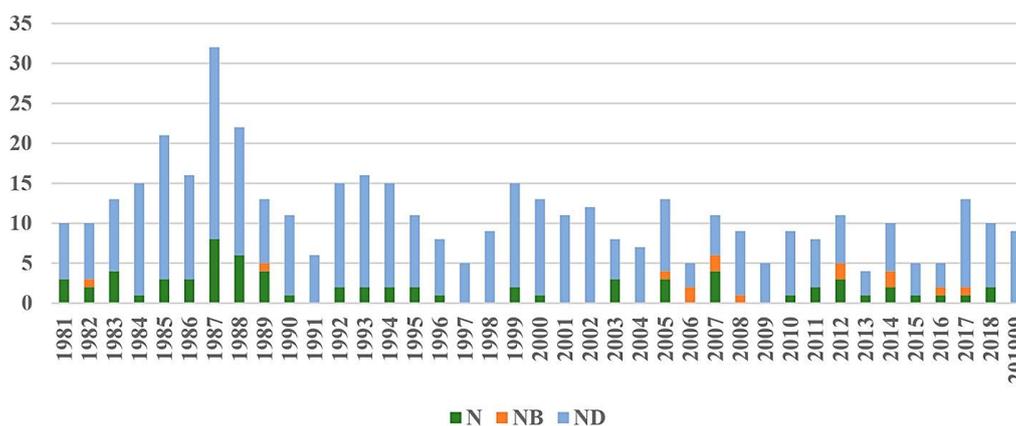


Figura 7. Porcentajes de NEQ (categorías N, NB y ND) aprobadas durante el período 01-1981 al 09-2019.

Estos datos confirman el notable rol que siguen ocupando los PNs en el desarrollo de nuevos fármacos, y sobre todo cuando se los utiliza como punto de partida para la obtención de compuestos semisintéticos. Teniendo en cuenta que existen entre 250 y 500 mil especies diferentes de plantas en el reino vegetal, y que sólo el 15% de ellas han sido investigadas farmacológicamente, es alentador saber que aún queda una enorme riqueza de nuevos compuestos bioactivos alojados en la naturaleza y que podrían ser utilizados como tal o como “cabezas de serie” para el descubrimiento de nuevos medicamentos [10,15,28].

I.1.1 Quimioteclas basadas en PNs

Teniendo en cuenta la ventaja estructural y biológica de los PNs, estas moléculas son consideradas importantes puntos de partida para el diseño de nuevos fármacos. A su vez, gracias a su capacidad para unirse a proteínas específicas, ya se encuentran biológicamente validados, lo cual les confiere una importante ventaja con respecto a las moléculas que son puramente sintéticas. Por lo tanto, la creación de quimioteclas bioactivas a partir de PNs resulta sumamente útil en el diseño de fármacos, ya que se logran obtener numerosas moléculas a través de pequeñas modificaciones químicas realizadas sobre el compuesto cabeza de serie, seleccionando los derivados que posean la acción terapéutica óptima. Por tal motivo, los objetivos principales de la semisíntesis radican en aumentar la potencia terapéutica, mejorar la biodisponibilidad y reducir los efectos adversos, entre otros. En este proceso, muchas veces se parte del conocimiento de la actividad biológica del compuesto de partida, sin embargo, puede ocurrir que los derivados obtenidos sean activos frente a nuevas actividades biológicas.

La importancia de esta estrategia se ve reflejada en los numerosos fármacos que se han ido aprobando a lo largo de los años. Uno de los ejemplos históricos más conocidos es el del antiinflamatorio **ácido acetilsalicílico**, comercializado bajo el nombre de Aspirina[®]. El glucósido **salicina** (Figura 1), aislado del sauce *Salix alba*, se hidroliza para dar el correspondiente azúcar y la aglicona, y por oxidación de esta última, se obtiene **ácido salicílico**. Con el fin de mejorar el sabor amargo y los efectos secundarios de este compuesto, se lo sometió a una acetilación, obteniéndose **ácido acetilsalicílico** (Figura 8) [29]. A su vez, se han informado otros derivados del **ácido salicílico** ampliamente utilizados debido a su eficacia terapéutica, tales como **difunisal**, inhibidor de las prostaglandinas asociadas con la inflamación, **ácido 4-aminosalicílico**, utilizado para el tratamiento de la tuberculosis gracias a su acción bacteriostática, **mesalazina**, **olsalazina** y **sulfasalazina**, importantes antiinflamatorios que poseen acción específica sobre inflamaciones intestinales como colitis ulcerosa (Figura 8) [30].

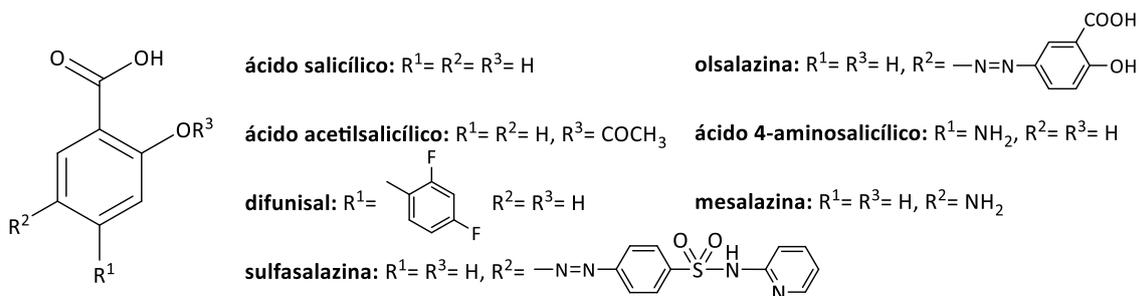


Figura 8. Fármacos derivados del ácido salicílico.

Un ejemplo más reciente, es el **paclitaxel** (Taxol[®]) (Figura 9), fármaco utilizado contra el cáncer de mama, aislado de la corteza de la conífera *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Para lograr la obtención de 1 g de este compuesto, se requiere de la corteza de aproximadamente tres árboles maduros de 100 años. Además, se sabe que un ciclo de tratamiento puede necesitar hasta 2 g del medicamento, por lo que su aislamiento no puede satisfacer las demandas del mercado. Si bien el **paclitaxel** se ha logrado obtener mediante síntesis total, esta resultó ser compleja, laboriosa y no fue comercialmente rentable debido a los altos costos del proceso [31]. La mejor síntesis de dicho fármaco fue lograda por Wender y col. (1997) quienes luego de 37 pasos, obtuvieron el producto de interés con un rendimiento global de 0,4% [32,33]. Afortunadamente, el hallazgo de un procedimiento sintético en pocas etapas a partir de una estructura análoga a **paclitaxel**, **10-deacetilbaccatina III** (Figura 9), que se encuentra en forma abundante en *T. brevifolia*, permitió obtener **paclitaxel** con rendimientos de hasta el 75% [15,31]. Sin embargo, uno de los problemas que existe en la administración intravenosa de este

potente anticancerígeno se debe, principalmente, a su baja solubilidad en agua. Por tal motivo, Arpicco y col. (2013), desarrollaron una estrategia mediante la cual se introdujo el polímero anfifílico polietilenglicol (PEG) en los carbonos 2' y/o 7 del fármaco mediante enlaces éster o carbamato, dando lugar a nuevos profármacos de **paclitaxel** altamente solubles en agua (Figura 9). Esta característica fue confirmada a través de estudios *in vitro*, los cuales, a su vez, demostraron la liberación lenta del fármaco y baja toxicidad [34].

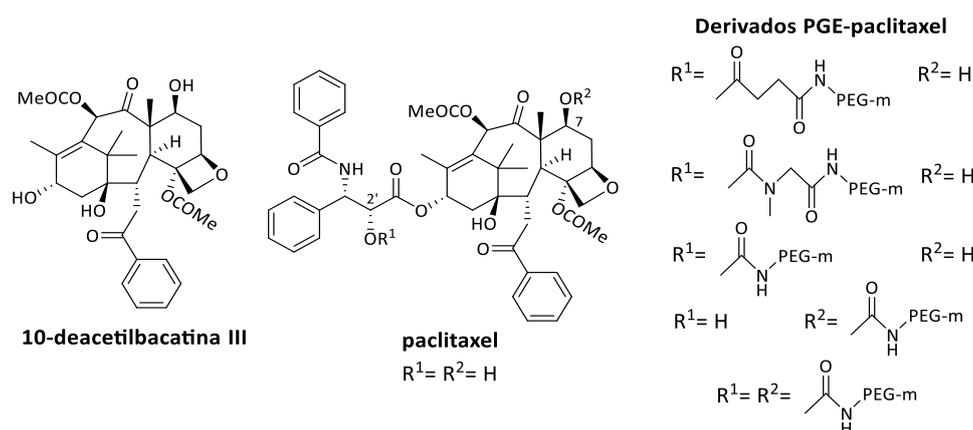


Figura 9. Estructura de **paclitaxel**, su precursor **10-deacetilbacatina III**, y derivados.

Otro caso reciente es el del **fosfato de oseltamivir** (Tamiflu[®]), un antiviral que inhibe las neuroaminidasas presentes en los virus de la influenza A y B. Para su síntesis a nivel industrial se emplea el metabolito secundario **ácido shikímico** que es aislado del anís estrellado chino, *Illicium verum* (Illiciaceae) [35]. Otros derivados del **ácido shikímico** han sido descritos por Díaz-Quiroz y col. (2018), quienes sintetizaron una serie de mono- y diamidas, las cuales mostraron una importante actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, por inhibición de la enzima shikimato deshidrogenasa (SDH) (Figura 10) [36].

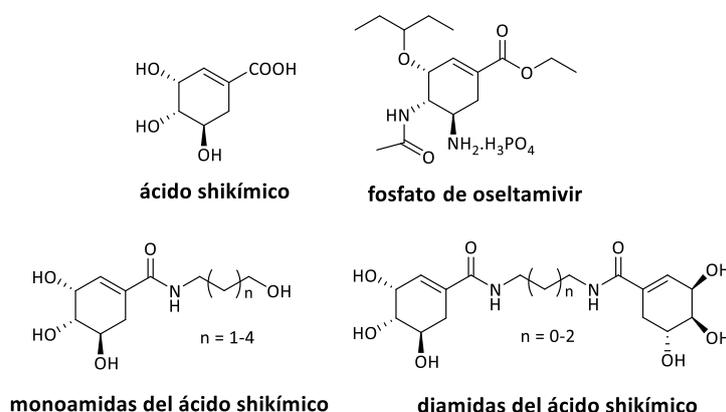


Figura 10. **Ácido shikímico** y sus derivados.

La **penicilina G** (Figura 11), producida por algunas especies de hongos del género *Penicillium*, fue el primer antibiótico utilizado para el tratamiento de diversas infecciones de origen bacteriano. Debido a la aparición de bacterias resistentes a la **penicilina G**, se han desarrollado numerosos derivados semisintéticos, entre ellos **amoxicilina** (Figura 11), el cual se ha convertido en un importante antibiótico de primera línea ampliamente utilizado en medicina [37].

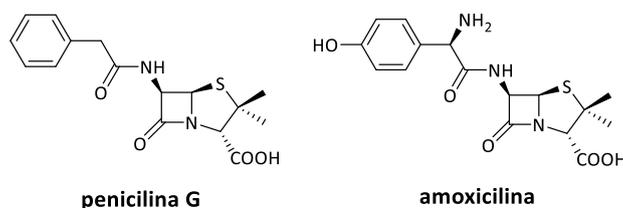


Figura 11. Antibióticos **penicilina G** y **amoxicilina**.

I.1.2 Búsqueda de metabolitos bioactivos. Criterios de selección de especies vegetales

A la hora de investigar una determinada especie vegetal desde el punto de vista farmacológico o fitoquímico, se deben emplear ciertos criterios de selección que pueden influir el curso del trabajo y el impacto del mismo [38-40], los cuales se detallan a continuación.

El criterio de **selección aleatoria** consiste en la selección y recolección de especies vegetales al azar, de acuerdo con la disponibilidad de las mismas. Si se realiza en regiones con alta diversidad, la probabilidad de encontrar sustancias novedosas, sean o no bioactivas, será mayor en este tipo de selección. Con este enfoque se puede, además, demostrar el potencial de diferentes especies vegetales que no habían sido investigadas aún [40]. Bajo el criterio de **selección quimiotaxonómica**, se seleccionan especies de una familia o género, para la cual existe algún conocimiento fitoquímico previo, de al menos una especie de la familia seleccionada [38]. El criterio de **selección ecológica** tiene como objetivo la evaluación del uso de plantas por parte de organismos, animales o primates, con el fin de combatir o controlar enfermedades y dolencias [38]. Por ejemplo, los metabolitos implicados en la defensa de las plantas contra patógenos microbianos, pueden ser útiles como fármacos antimicrobianos [40]. Finalmente, el criterio de **selección etnomédica**, consiste en la selección de especies vegetales según los usos medicinales tradicionales. Tiene en cuenta las indicaciones de grupos poblacionales en determinados contextos de uso, buscando los conocimientos locales en cuanto a su aplicación en determinadas enfermedades. A su vez, se basa en dos disciplinas, la **etnobotánica**, que se ocupa de la interrelación directa entre personas y plantas; y la **etnofarmacología** que se ocupa del estudio de las preparaciones medicinales utilizadas

tradicionalmente, las cuales incluyen plantas, animales, hongos o minerales [38]. Si bien se conoce la actividad biológica de la planta seleccionada, se desconoce el contenido de metabolitos activos, por lo que el estudio de la misma puede llegar a ser una fuente de compuestos con estructuras novedosas. Por otra parte, cabe resaltar que, el aporte de este criterio en el descubrimiento de fármacos ha sido muy importante, tal y como se refleja en los ejemplos citados anteriormente.

Una vez seleccionada la especie vegetal, continuando con la búsqueda de metabolitos bioactivos, se puede llevar a cabo un fraccionamiento bioguiado a través de ensayos adecuados, con el objetivo de aislar los compuestos puros responsables de una actividad determinada. Para ello, se procede a la preparación del extracto crudo y su fraccionamiento, mediante el uso de solventes de polaridad creciente. Tanto el extracto como las fracciones obtenidas, se pueden someter a un *screening* de bioactividad para seleccionar las fracciones activas, y a partir de la purificación de las mismas, elucidar el o los compuestos responsables de la actividad observada. Paralelamente, se pueden realizar ensayos presuntivos sobre las fracciones obtenidas para determinar las clases de metabolitos secundarios presentes en cada una, mediante la utilización de reactivos específicos de color. Finalmente, la determinación estructural de los compuestos obtenidos se logra mediante el uso de técnicas espectroscópicas, tales como RMN, CG-EM o CL-EM, entre otras.

En investigaciones previas llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación, se seleccionó para su estudio fitoquímico, la especie vegetal *Chuquiraga erinacea* (Asteraceae), recolectada en la zona del Salitral de la Vidriera (Prov. de Buenos Aires), seleccionada mediante el criterio de selección *aleatoria*. A partir del extracto crudo y posterior fraccionamiento guiado por el bioensayo de inhibición de acetilcolinesterasa, fueron aislados sus componentes activos, identificados como triterpenos pentacíclicos mono-, di- y trihidroxilados [41]. Teniendo en cuenta que lupeol fue el triterpeno aislado en mayor proporción, y considerando la importancia biológica que poseen los triterpenos tipo lupano, la cual será detallada más adelante, dicha especie vegetal fue una de las plantas seleccionadas para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Por otra parte, en investigaciones llevadas a cabo por Milanesi y col., se determinó el contenido de moléculas estructuralmente semejantes al 17 β -estradiol (E2), conocidas como *fitoestrógenos*, en extractos liposolubles de especies vegetales pertenecientes a la familia Solanaceae. A través de ensayos de competición, estas moléculas demostraron la capacidad de competir con E2 por la unión a receptores estrogénicos (ERs) de mamíferos [42-46]. Por tal motivo se ha generado un especial interés en el uso de solanáceas como posible alternativa para

la terapia de reemplazo hormonal (TRH), carcinogénesis, aterosclerosis y osteoporosis, entre otras [42-47,135,137]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se seleccionó la especie vegetal *Nicotiana glauca* (Solanaceae), utilizando el criterio de selección *quimiotaxonómico* y *etnomédico*, como segunda especie vegetal para su estudio biológico durante esta tesis doctoral.

I.2 TRITERPENOS

Los triterpenos constituyen uno de los PN's más abundantes en el reino vegetal, con aproximadamente 30.000 estructuras diferentes identificadas hasta la fecha. Se encuentran distribuidos principalmente en las superficies de las plantas, en cáscaras de fruta, en la corteza del tallo o en las hojas [48]. Este grupo de compuestos exhibe una amplia gama de propiedades biológicas, entre las que se destacan citotóxicas, antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias y neuroprotectoras [49-53]. A su vez, poseen una importante diversidad estructural, aunque en la naturaleza se encuentran más a menudo como estructuras tetra- o pentacíclicas. Desde el punto de vista biológico, estas últimas son las que han presentado mayor importancia en los últimos años [54]. Según la estructura de su esqueleto carbonado, los triterpenos pentacíclicos se pueden dividir en tres tipos principales: lupano, oleano y ursano (Figura 12), de los cuales los del tipo lupano han sido motivo de estudio por varios grupos de investigación, debido a su potencial terapéutico [48,49,54,55]. Los principales reportes pertenecen a **ácido betulínico**, **betulina** y **lupeol** (Figura 12). A continuación, se hace una breve revisión de cada uno de ellos.

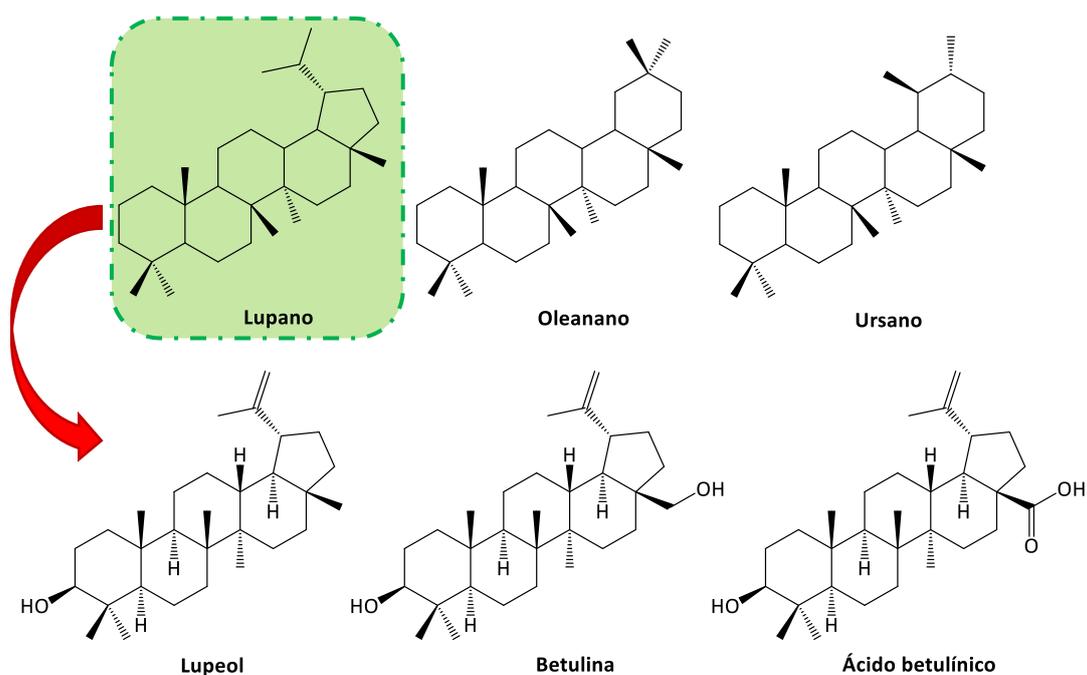


Figura 12. Principales tipos de triterpenos pentacíclicos y triterpenos de esqueleto lupano.

Betulina, lup-20(29)-en-3 β ,28-diol, se puede obtener de más de 200 especies de plantas, aunque la fuente más rica, con un 75% de contenido del triterpeno, es *Betula alba* L. (Betulaceae), más conocido como abedul blanco [51,56,57]. Este triterpeno posee numerosas actividades biológicas, entre las cuales se ha demostrado su potencial citotóxico sobre células malignas en varios tipos de tumores [58]. Además, se ha reportado su actividad antiviral, inhibiendo la reproducción de los virus ECHO-6 e influenza [59], actividad antiplasmodial contra parásitos causantes de la malaria [60], e inducción de efecto anticonvulsivo, uniéndose a receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) [61]. En cuanto a su efecto antinociceptivo, en un estudio desarrollado sobre ratones demostró ser más activo que la aspirina o el paracetamol [62]. A su vez, demostró resultados esperanzadores en cuanto a su actividad hepatoprotectora, tras la administración del extracto de la corteza de abedul, enriquecido en un 75% de **betulina**, a pacientes con hepatitis C [57]. Sin embargo, el uso principal de **betulina** es como materia prima para la síntesis de ácido betulínico, debido a que este último presenta una mayor bioactividad, y es obtenido de la naturaleza en menores cantidades [63].

El **ácido betulínico**, ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico, está presente en la corteza exterior de muchas especies de árboles, y como ya se mencionó, su cantidad en las plantas es relativamente baja [56], por lo que su obtención principal es a partir de betulina [63]. Existe una importante evidencia científica en la que se demuestra sus numerosas actividades biológicas [64,65]. El **ácido betulínico** ha demostrado ser un potencial agente antidiabético mediante la reducción de los valores de glucemia [66,67], estimulando la síntesis de glucógeno [68,69], y aumentando la biosíntesis, secreción y sensibilidad de la insulina [70]. Además, se ha demostrado su capacidad para disminuir la acumulación de grasa abdominal [71,72], y de triglicéridos plasmáticos y colesterol total, mediante diversos mecanismos [67,73,74]. Su actividad antiinflamatoria fue determinada a través de varios modelos experimentales, comparando su potencial antiinflamatorio al de los corticoides [75-79]. Posee a su vez, importante actividad antiviral, aunque los reportes existentes coinciden en que el efecto de sus análogos sintéticos es mucho mayor [64]. En cuanto a sus propiedades citotóxicas, el **ácido betulínico** demostró poseer actividad anticancerígena en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, en los cuales, sus derivados semisintéticos también han demostrado una mayor eficacia [51,52,58, 64,65,80-82].

Lupeol, 3 β -lup-20(29)-en-3-ol, se puede encontrar en numerosas especies vegetales, así como también en muchas frutas y verduras [83]. A su vez, se encuentra presente en diversas especies de la familia Asteraceae [84-89], siendo uno de los triterpenos pentacíclicos

mayoritarios en *Chuquiraga erinacea* [41]. Este triterpeno ha atraído cada vez más atención, debido a sus importantes propiedades biológicas, tales como antidiabética, antiinflamatoria, antiartrítica, antioxidante, antiinfecciosa y antiangiogénica, entre otras [48,83,90,91]. Además, en diversos estudios se ha observado que **lupeol** es beneficioso para el tratamiento de trastornos renales y hepáticos, así como también para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [48,83]. Por otra parte, a nivel celular, este triterpeno posee un efecto antiproliferativo a través de diversos mecanismos de acción, el cual ha sido determinado mediante ensayos *in vitro*, por lo que se lo considera un importante agente antitumoral [83]. En otros estudios se ha observado que el tratamiento tópico con gel de **lupeol** promueve el cierre de heridas cutáneas en ratas normoglucémicas, por lo que su actividad a nivel dermatológico resulta sumamente interesante [91]. En el trabajo de Laghari y col. (2011) se informa que este triterpeno juega un papel muy importante en la normalización del perfil lipídico y en la supresión de factores inmunes [90]. En cuanto a sus efectos a nivel cerebral, uno de los hallazgos importantes, es que **lupeol** posee la capacidad de preservar una población de neuronas de cerebelo, y de esta manera, promueve la neuroprotección al daño inflamatorio inducido [92]. A su vez, en un trabajo llevado a cabo por Ahmad y col. (2020) se ha observado que la administración de **lupeol** a ratones con enfermedad de Alzheimer, desencadena importantes efectos antioxidantes, antineuroinflamatorios y antiamiloidogénicos en los cerebros de dichos animales. Asimismo, en este trabajo, se vio que, al cabo de dos semanas de tratamiento con el triterpeno, se producen mejorías significativas en los animales enfermos. Por lo tanto, el tratamiento con **lupeol** no sólo mejora la memoria, sino también las funciones cognitivas de los animales analizados [93].

Como fueron mencionadas en el párrafo anterior, existen numerosas actividades biológicas para las cuales **lupeol** presenta una gran relevancia. Sin embargo, posee una baja biodisponibilidad [48], por lo que una de las estrategias utilizadas para mejorar dicha propiedad, así como también ciertos parámetros farmacológicos, es la modificación química de su estructura [83,94,95].

1.2.1 Modificaciones químicas de triterpenos pentacíclicos tipo lupano

Los triterpenos pentacíclicos tipo lupano poseen estructuras químicas interesantes a partir de las cuales se pueden sintetizar nuevas moléculas bioactivas. Si bien se destacan por sus numerosas actividades biológicas que han sido mencionadas anteriormente, muchos de ellos presentan una baja biodisponibilidad, escasa solubilidad en agua y acumulación intracelular insuficiente, por lo que su uso como agentes terapéuticos se ve limitado [48,96,97]. Por otra

parte, se ha observado que los análogos semisintéticos obtenidos a partir de modificaciones sencillas de sus estructuras han presentado una mejoría en dichas propiedades físicas y en su bioactividad [58,63,64,82,83]. Por lo tanto, la síntesis de nuevos derivados semisintéticos se ha convertido en una estrategia prometedora con el fin de potenciar las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de estos compuestos [58,97-99].

Las modificaciones químicas sobre el esqueleto lupano han involucrado, principalmente, tres posiciones específicas: el grupo hidroxilo unido al C-3, el grupo R unido al C-17 y la cadena lateral de isopropenilo unida al C-19 (Figura 13), siendo esta última la menos estudiada [97,99-102].

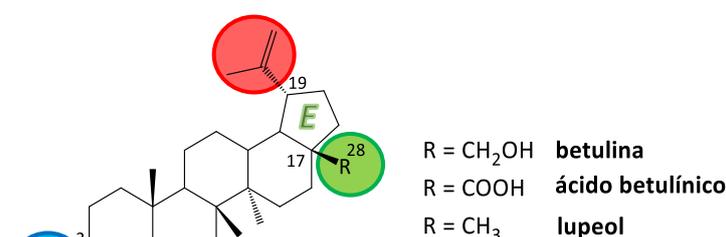


Figura 13. Blancos de modificación estructural de triterpenos tipo lupano.

Algunos derivados semisintéticos importantes se obtuvieron mediante la introducción de ciertos grupos funcionales en la posición C-3 [102]. Tal es el caso del **ácido 3-O-(3', 3'-dimetilsuccinil)betulínico**, también conocido como Bevirimat (Figura 14), el cual ha alcanzado los ensayos clínicos de Fase II. El mismo fue obtenido mediante la derivatización del ácido betulínico, el cual se había identificado como inhibidor débil de la replicación del virus VIH tipo 1. Bevirimat presentó un mecanismo de acción novedoso, bloqueando la maduración del virus e interrumpiendo la infectividad del mismo [103]. Sin embargo, en algunos pacientes, se observó resistencia del virus, por lo que tuvo que interrumpirse su desarrollo. Desde entonces, se ha trabajado en la síntesis de derivados de Bevirimat, los cuales se encuentran actualmente en estudio y se basan en la estructura triterpénica unida a través de distintos *linkers* al fármaco antiviral azidotimidina (AZT) [55].

Otro ejemplo de derivado semisintético es el **ácido 3-O-acetil-28-O-acetil-(2-amino-3-hidroxi-2-hidroxi-2-propil)betulínico**, más conocido como NVX-207 (Figura 14), en el cual no solo se modificó la posición C-3, sino también el C-28. Este nuevo compuesto presentó mayor citotoxicidad que el ácido betulínico en varias líneas de células tumorales humanas y caninas. Además, en un estudio de Fase I/II, el uso clínico de NVX-207 condujo a la remisión completa de tumores resistentes al tratamiento en perros [104].

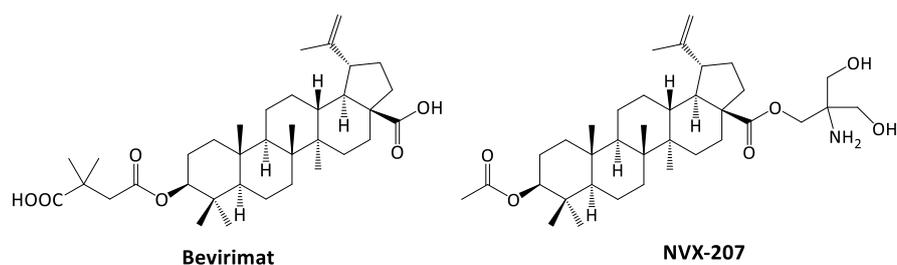


Figura 14. Derivados semisintéticos de ácido betulínico.

Teniendo en cuenta que las modificaciones sobre el grupo isopropenilo del C-19 han sido las menos reportadas, la obtención de nuevos derivados triterpénicos modificados en el anillo *E* resulta interesante. Por ejemplo, Le y col. (2021) obtuvieron el producto de oxidación del C-20 de lupeol mediante su tratamiento con Oxone[®], una sal triple de potasio, en ácido acético y calentamiento durante 3 h. A partir de este producto (**a**), y a través de diversas reacciones de condensación aldólica con diferentes benzaldehídos sustituidos, obtuvieron una serie de derivados, de los cuales **b**, mostró una actividad inhibitoria hacia la enzima α -glucosidasa mucho mayor que el oligosacárido acarbosa, utilizado como control (Figura 15). De esta forma, el compuesto **b** podría ser un potencial agente antidiabético [105]. Por otra parte, Chrobak y col. (2021) prepararon una serie de derivados de 3,28-O,O'-diacetilbetulina (**c**), los cuales fueron ensayados frente a diferentes líneas celulares de tipo tumoral. Para ello, llevaron a cabo la oxidación alílica del grupo isopropenilo del compuesto de partida (**c**) con ácido *m*-cloroperbenzoico a reflujo, y obtuvieron el alcohol alílico correspondiente (**d**). Posteriormente, la esterificación de este alcohol con distintos cloroformatos en benceno y en presencia de piridina dio lugar a distintos derivados, de los cuales el compuesto **e**, presentó una mayor actividad anticancerígena frente a todas las líneas celulares analizadas (Figura 15) [106].

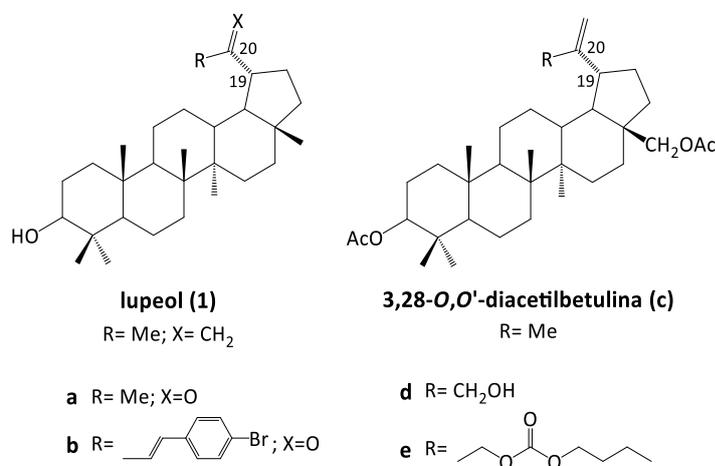


Figura 15. Estructura química de lupeol y 3,28-O,O'-diacetilbetulina (c), y derivados triterpénicos obtenidos mediante modificaciones químicas sobre el anillo *E*: (**a**), (**b**), (**d**) y (**e**).

Continuando con diferentes ejemplos, Callies y col. (2015) evaluaron la inhibición de la replicación del virus HIV-1 de 26 triterpenos pentacíclicos y 21 derivados semisintéticos de estos. Observaron que una nueva modificación sobre el grupo isopropenilo del C-19, como la oxidación del C-30 a un grupo carbonilo (Figura 16), favoreció significativamente la potencia biológica de dichos compuestos (**f**, **g** y **h**), en comparación con los que no poseían el C-30 oxidado, por lo tanto, concluyeron que el sistema carbonílico α,β -insaturado obtenido es fundamental para la actividad anti-HIV [100,107].

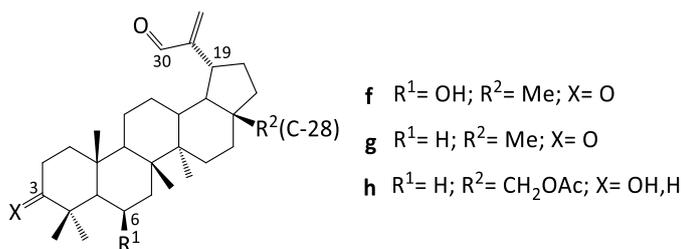


Figura 16. Derivados triterpénicos que poseen un sistema carbonílico α,β -insaturado.

Los sistemas carbonílicos α,β -insaturados le confieren, además, a este tipo de moléculas, otras propiedades biológicas importantes, tales como antitumorales, antimicrobianas, insecticidas y antioxidantes, entre otras [96,108,109]. Estas propiedades son producto de la interacción de estos sistemas con proteínas como enzimas, y radicales libres, gracias a que poseen un sitio electrofílico que los convierte en importantes aceptores de Michael [110-112].

Por ejemplo, Machado y col. (2017) sintetizaron una serie de derivados triterpénicos, de los cuales el compuesto carbonílico α,β -insaturado (**i**) (Figura 17), obtenido a través de la reacción de oxidación alílica de lupeol, resultó ser uno de los compuestos semisintéticos más potentes frente a la inhibición *in vitro* de los parásitos *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi* [111]. Por otro lado, Urban y col. (2006) observaron una importante actividad citotóxica sobre una línea celular de leucemia, del ácido 30-oxobetulínico y su derivado metilado en el C-28 (**j-k**) (Figura 17), ambos obtenidos a partir de la oxidación alílica del ácido betulínico [113]. Finalmente, los trabajos de Castro y col. (2014; 2018) muestran una serie de compuestos sintetizados a partir de calenduladiol. Uno de los más activos frente a la enzima butirilcolinesterasa, implicada en la enfermedad de Alzheimer, posee en su estructura un sistema carbonílico α,β -insaturado (**l**) (Figura 17) [101,114].

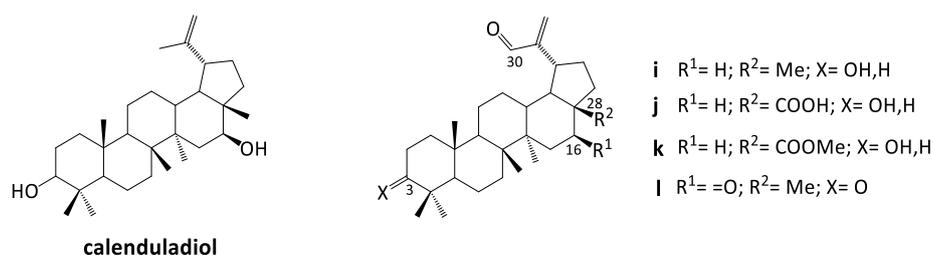


Figura 17. Estructura de calenduladiol y derivados triterpénicos bioactivos con sistemas carbonílicos α,β -insaturados.

Los sistemas carbonílicos α,β -insaturados no sólo demuestran tener un gran valor a nivel biológico, como se mencionó anteriormente, sino que a su vez, poseen una notable reactividad, lo cual los convierte en bloques de construcción de gran relevancia para la síntesis de estructuras químicas novedosas [115,116]. Por ejemplo, Saini y col. (2019), obtuvieron productos de ciclación a partir del compuesto carbonílico α,β -insaturado (**i**). Los derivados ciclados fueron sintetizados a través del tratamiento del compuesto carbonílico α,β -insaturado con tiourea y HCl (**m**); con 2,4-dinitrofenilhidracina (**n**); y con urea (**ñ**) (Figura 18). Tanto el compuesto **n** como **ñ**, mostraron un importante efecto inhibitor sobre células cancerígenas [95].

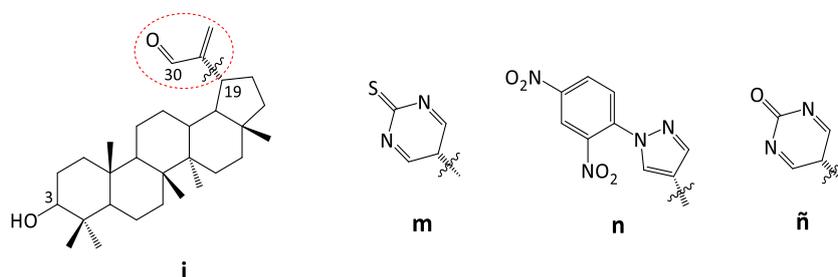


Figura 18. Derivados obtenidos a través de la ciclación del sistema carbonílico α,β -insaturado (**i**).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descriptos en cuanto a la importancia del sistema carbonílico α,β -insaturado de triterpenos, uno de los objetivos propuestos en esta tesis es la síntesis de este sistema mediante diferentes estrategias químicas. Con el fin de mejorar el potencial terapéutico del compuesto natural de partida se planteó además, el uso de este sistema carbonílico α,β -insaturado, como bloque de construcción para la obtención de nuevos derivados semisintéticos. 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.

I.3 FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos son compuestos polifenólicos no esteroideos que cuentan con una similitud estructural a los estrógenos humanos, específicamente con E2 de mamíferos (Figura 19), por lo que tienen la capacidad de unirse a ERs [43,44,117,118], y de esta forma ejercer una acción similar (efecto estrogénico), u opuesta (efecto antiestrogénico) a la de los estrógenos [119].

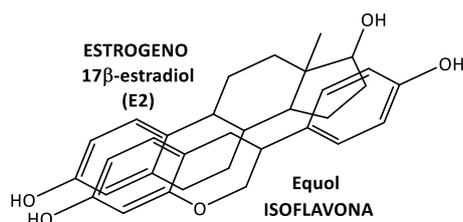


Figura 19. Similitud estructural de 17β-estradiol (estrógeno) y equol (fitoestrógeno).

Según su estructura química, los fitoestrógenos se pueden dividir en tres grupos principales: flavonoides, lignanos y estilbenos [120]. Dependiendo del carbono del anillo C al que está unido el anillo B, y del grado de insaturación y oxidación del anillo C, los flavonoides se pueden agrupar en isoflavonoides (isoflavonas y cumestanos), en los que el anillo B se encuentra unido a la posición 3 del anillo C, y en flavonas, flavanonas, flavonoles, flavanonoles, chalconas y antocianidinas, según las características estructurales del anillo C. En cuanto a la estructura química de los lignanos, poseen dos unidades de fenilpropano (C6-C3) conectadas a través de dos carbonos específicos en su estructura (C2-C2'). Por último, los estilbenos son compuestos fenólicos vegetales con un esqueleto C6-C2-C6, (Figura 20) [121,122].

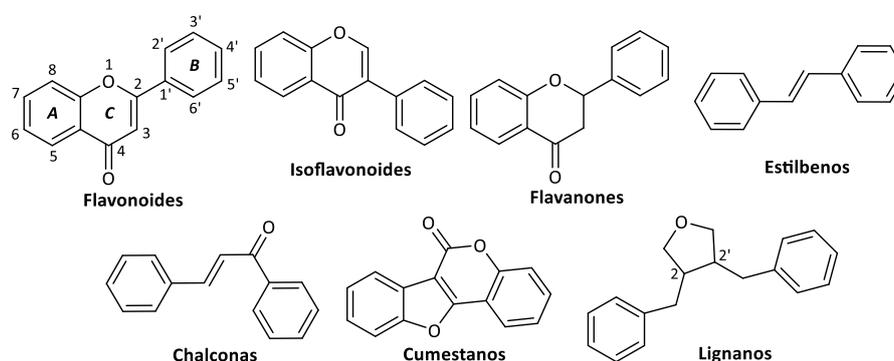


Figura 20. Estructuras químicas de los principales grupos de fitoestrógenos.

En cuanto a sus propiedades farmacológicas, estos metabolitos secundarios se han convertido, actualmente, en un foco de interés como alternativas para la TRH, aterosclerosis y

osteoporosis, gracias a sus acciones preventivas [47,118,123]. Se ha demostrado que alivian las molestias postmenopáusicas, aumentan la formación ósea y reprimen el tejido adiposo de forma similar a E2 [124]. Por ejemplo, las isoflavonas **daidzeína** y **genisteína** (Figura 21), son muy utilizadas en TRH por sus efectos favorables a nivel muscular y óseo. Estas dos, son las de mayor relevancia biológica y se encuentran principalmente en la soja [119,121,125-127].

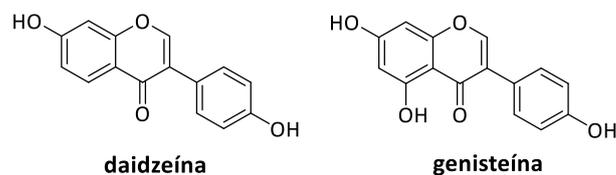


Figura 21. Isoflavonas de soja utilizadas en TRH.

En un estudio realizado por Oxfeldt y col. (2020) se demuestra que el extracto de trébol rojo, rico en ambas isoflavonas, disminuye los marcadores moleculares de la degradación de proteínas musculares, comparado con el placebo en mujeres posmenopáusicas tempranas. Asimismo, en dicho trabajo, se destacan diversos estudios llevados a cabo en animales, en los cuales se investigó la influencia de estas isoflavonas sobre el músculo esquelético. Los resultados fueron prometedores ya que se pudo observar una reducción de la atrofia muscular, una mejor respuesta anabólica al entrenamiento en ratas, acompañada de una mayor expresión de factores reguladores miogénicos, entre otros efectos beneficiosos. A su vez, cuando el ensayo fue realizado en humanos, se vio que la ingesta de suplementos de isoflavonas de soja durante seis meses, dio como resultado un aumento en la masa corporal magra en mujeres posmenopáusicas obesas-sarcopénicas [128].

No obstante, numerosos reportes científicos les atribuyen a los fitoestrógenos eventos de muerte celular [119,129-134], por lo que las terapias para el control y supresión de tumores celulares basadas en el consumo de fitoestrógenos o alimentos ricos en ellos, se encuentran en plena investigación y desarrollo [119]. Por tal motivo, el uso de estos compuestos naturales como sustitutos de tratamientos farmacológicos en la TRH resulta algo controversial, ya que las actividades biológicas manifestadas varían desde protección celular a muerte celular. Este efecto, dependerá del tipo de unión que ejerzan con los ERs, de la concentración de fitoestrógenos, de la concentración de estrógenos endógenos y de las características distintivas de un individuo, principalmente el género y el estado hormonal [119,129,130,135].

Los fitoestrógenos se pueden encontrar principalmente en semillas oleaginosas, soja, frutos secos, cereales, legumbres, frutas y vegetales, entre otros [136], así como también en

diversas especies vegetales, siendo las solanáceas un claro ejemplo de estas [42-46,135,137]. A continuación, se hace una breve descripción de esta familia.

La familia Solanaceae, comprende un grupo de plantas originarias de Europa y de América, por lo que su distribución es cosmopolita, con mayor incidencia en América Central y Sudamérica. Está conformada por más de 90 géneros y casi 3000 especies, en gran diversidad de hábitats, con variada morfología y ecología [138,139]. Las plantas de esta familia son una fuente importante de alimentos, ornamentación y especias [139,140]. Desde la antigüedad, el hombre las ha utilizado por sus propiedades farmacológicas, de las cuales podemos resaltar las propiedades analgésicas, antineoplásicas, hipoglucémicas, antimicrobianas y antiparasitarias, entre otras [139,140-143]. Por el contrario, al emplearse en exceso o en infusiones, resultan ser nocivas y venenosas, pudiendo llegar a causar la muerte [144,145]. Como se mencionó anteriormente, son numerosas las especies vegetales que conforman esta familia, pero en función de sus propiedades medicinales, las más importantes son las pertenecientes a los géneros *Solanum*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Withania*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon* y *Nicotiana* [138,139].

En los trabajos reportados por Milanesi y col., mencionados más arriba, se determinó la presencia de fitoestrógenos en los extractos liposolubles de las solanáceas *Solanum glaucophyllum* Desf. (*Solanum malacoxylon* Send.), *Lycopersicon esculentum* (Mill) y *Nicotiana glauca* (Graham), mediante ensayos de competición con anticuerpos policlonales específicos contra las hormonas esteroideas de mamíferos. El contenido determinado fue del orden de los nanogramos por kilogramo de planta y entre ellos se encuentran 7-dehidrocolesterol, 17 β -estradiol, estrona, vitamina D₃ y sus metabolitos hidroxilados. Además, se observaron otras moléculas que demostraron poseer la capacidad de unirse a ERs, pero no pudieron ser identificadas [42-46]. Estos resultados indican que dichas especies vegetales podrían ser utilizadas en la TRH, mejorando los síntomas de la menopausia, tales como osteoporosis o sarcopenia.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y considerando que los compuestos presentes en dichas especies vegetales podrían presentar efectos controversiales cuando se las utiliza en TRH, resulta interesante llevar a cabo una serie de ensayos bioguiados en los extractos de estas plantas, sobre células musculares esqueléticas las cuales son uno de los blancos donde se dirigen las TRH. Por lo tanto, otro de los objetivos planteados para esta tesis es el estudio bioguiado de los extractos de la especie vegetal *Nicotiana glauca*, con el fin de analizar el efecto biológico que estos ejercen sobre el músculo esquelético, y aislar los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad.

I.4 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS EVALUADAS

A continuación, se realiza una breve descripción de las actividades biológicas llevadas a cabo en esta tesis, en colaboración con diferentes grupos de investigación. Para ello, se tienen en cuenta las actividades biológicas más interesantes que presentan los compuestos triterpénicos pentacíclicos y los fitoestrógenos, las cuales fueron mencionadas a lo largo de esta introducción.

I.4.1 Efectos sobre la viabilidad en la línea celular de neuroblastoma humano IMR-32

En la actualidad, las enfermedades neurodegenerativas (END) han tomado gran relevancia en muchos países y se las relacionan con el envejecimiento como uno de los principales factores de riesgo, dado que estos trastornos ocurren principalmente en los ancianos. Las formas más comunes de END son la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington y la demencia con cuerpos de Lewy [146]. Estas enfermedades se caracterizan por manifestar ciertas características patológicas comunes, tales como la formación de agregados de proteínas insolubles en neuronas y células gliales. Sin embargo, se observa una gran diferencia en las características clínicas de los pacientes que las padecen, las cuales pueden ser movimientos piramidales y extrapiramidales, o problemas cognitivos y conductuales [146,147].

La EP fue descrita por James Parkinson en el año 1817 como "parálisis agitante" y constituye el segundo trastorno neurodegenerativo progresivo más prevalente luego de la EA, afectando al 2-3% de las personas mayores de 65 años. Si bien la causa de la EP aún no es muy clara, se ha demostrado que los defectos en la función mitocondrial, la regulación del hierro en el cerebro, la inflamación y los problemas del metabolismo energético son sustanciales en los mecanismos subyacentes [148]. Desde el punto de vista neuropatológico, la EP se caracteriza principalmente por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (Figura 22a), y la acumulación de agregados de la proteína α -sinucleína que forma los cuerpos de Lewy intracelulares en las regiones afectadas [148,149], dando lugar a una disfunción motora. Además de la pérdida de neuronas en la zona cerebral mencionada, otras áreas del cerebro también se ven afectadas en esta enfermedad devastadora, como la corteza cerebral y el hipocampo [150].

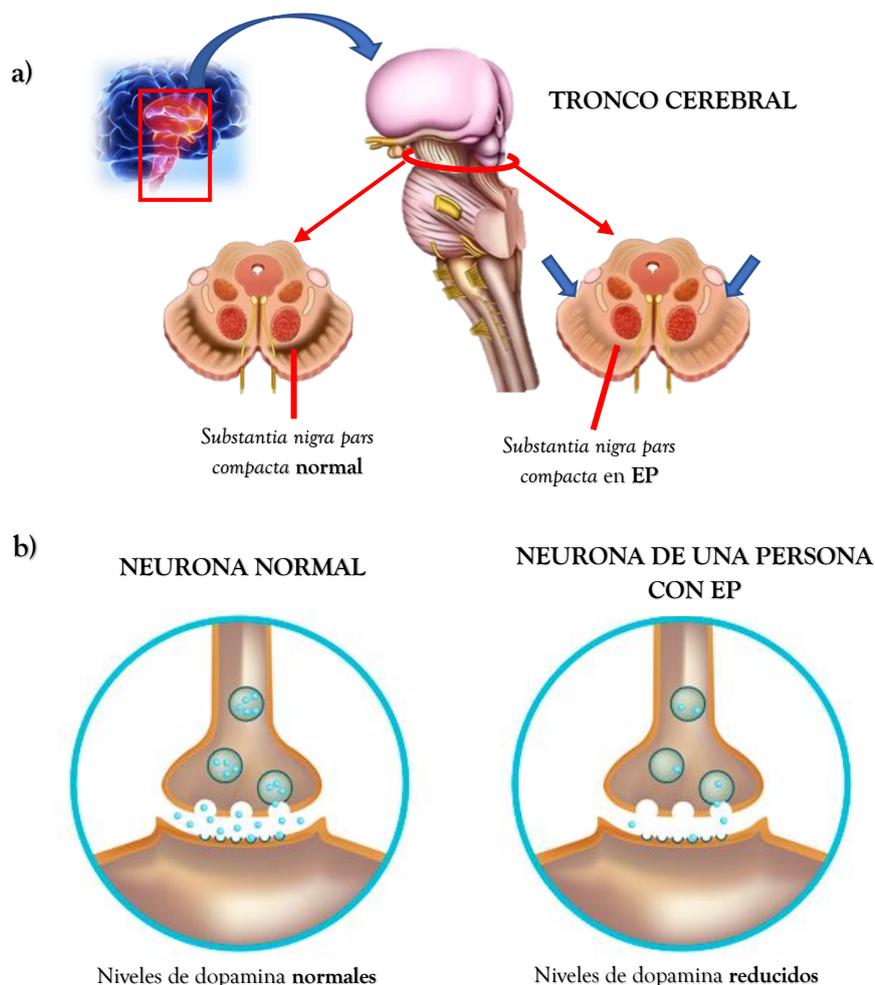


Figura 22. a) Pérdida de la *substantia nigra pars compacta* en una zona del tronco cerebral (EP) y b) disminución de los niveles de dopamina en neuronas dopaminérgicas.

Asimismo, la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Figura 22b), se asocia con la disminución de la actividad de la enzima catalasa y el aumento de la monoamino oxidasa-B (MAO-B) en las células gliales. Estos cambios enzimáticos conducen a un estrés oxidativo emergente a través de la formación de niveles más altos de quinonas, peróxidos y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), que luego contribuyen a la peroxidación de lípidos y proteínas, y finalmente a la muerte neuronal [146].

Los pacientes con EP presentan síntomas relacionados al deterioro motor, que incluyen temblores en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural, todos ellos secundarios al déficit del neurotransmisor dopamina. Además, estos pacientes manifiestan dificultades para hablar y deglutir, una expresión facial similar a una máscara y micrografía o escritura pequeña. Además, los síntomas motores suelen estar acompañados por fatiga, dolor, depresión y problemas cognitivos. Los tratamientos para la EP aprobados hasta la fecha, como la farmacoterapia y la neurocirugía, son sintomáticos y no existe terapia que modifique el curso

o cure la enfermedad. De hecho, el fármaco más empleado, levodopa, busca reponer los niveles de dopamina en defecto y de esta manera aliviar los síntomas motores típicos. Sin embargo, existe un importante enfoque reciente para este tratamiento, el cual se basa en el descubrimiento de nuevos fármacos beneficiosos, potenciales y modificadores de la enfermedad, dirigidos a los mecanismos subyacentes relacionados con el proceso neurodegenerativo de la EP [146,147].

El estrés oxidativo observado en la EP se ha investigado en modelos basados en toxinas como la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Figura 23). Particularmente, la 6-OHDA, un análogo hidroxilado de la dopamina, es una neurotoxina ampliamente utilizada en modelos experimentales de EP [151], ya que es capaz de inducir estrés oxidativo por incremento de las ROS y reproduce distintos eventos moleculares característicos de la EP. La neurodegeneración representada mediante un modelo basado en 6-OHDA puede imitar la patogenia de la EP idiopática tanto *in vitro* como *in vivo*.

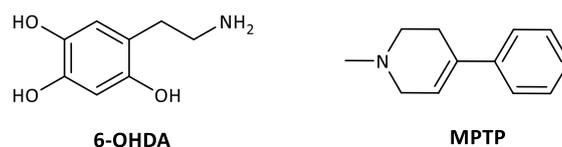


Figura 23. Toxinas utilizadas en modelos celulares de la EP.

Gracias a la colaboración con las Dras. Salvador y Alza (INIBIBB-CONICET, Bahía Blanca), quienes poseen experiencia en ensayos biológicos de neuroprotección sobre células neuronales, se evaluó la capacidad neuroprotectora *in vitro* de los nuevos derivados triterpénicos obtenidos, frente a la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en células de neuroblastoma humano, comparando la actividad observada con la de su precursor natural.

1.4.2 Efectos sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12

El tejido muscular es un órgano que comprende casi el 40% del peso total del cuerpo humano y está formado por tres tipos de músculos: liso, cardíaco y esquelético, siendo este último el que aporta la mayor proporción al sistema. El músculo esquelético se encuentra distribuido principalmente a lo largo de las extremidades del cuerpo humano, confiriéndole a los vertebrados la capacidad locomotora. Su función principal se basa en generar fuerza y potencia para el mantenimiento postural y movimiento. Cuando el músculo pierde su capacidad funcional, sea cual fuere la causa, se observa una pérdida progresiva del rendimiento muscular que afecta a los movimientos de rutina e independencia [119].

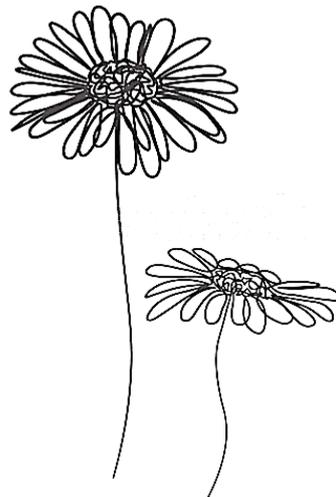
En los últimos años, se ha determinado la presencia de ERs en el músculo esquelético de ratón, humano y cerdo, así como en mioblastos de rata y ratón [152-155]. Por ejemplo, patologías degenerativas musculares como la sarcopenia, la cual se observa en mujeres menopáusicas, se encuentran relacionadas con la disminución de los niveles de estrógenos [156]. Además, se ha demostrado que los estrógenos son un factor importante en la protección del músculo contra el daño muscular inducido por el ejercicio [157]. Por lo tanto, la presencia de ERs en el tejido muscular esquelético y la capacidad de los fitoestrógenos para unirse a estos receptores, hacen de este tejido un objetivo para las acciones de estas moléculas.

El músculo esquelético adulto muestra una notable capacidad de adaptación a traumatismos y lesiones, así como también, de aumentar su tamaño. Sin embargo, las células musculares son células postmitóticas, por lo que carecen de la capacidad de replicarse y se encuentran formando una población estable y permanente. Por lo tanto, cualquier aumento en el número de células mionucleares requerido para el crecimiento o la reparación del músculo dañado depende de las células satélite (CS), que son las precursoras de las células miogénicas. Las CS existen en un estado inactivo o “de reposo” después del nacimiento y se localizan rodeando las fibras musculares [158]. Su proliferación ocurre en respuesta a estímulos fisiológicos, como el crecimiento, el ejercicio físico, o en casos de lesión muscular y enfermedades degenerativas, diferenciándose en células precursoras miogénicas o mioblastos, dando como resultado final, la regeneración del tejido muscular [159-161]. Asimismo, las CS expresan ERs, por lo que este grupo de células podría verse afectado por la acción de los fitoestrógenos.

Considerando los antecedentes mencionados, y en colaboración con las Dras. Milanesi y Vasconsuelo (INBIOSUR-CONICET, Bahía Blanca) se seleccionó la línea celular de mioblastos murinos C2C12, las cuales derivan de CS, para el análisis de los efectos biológicos ejercidos por los extractos de *Nicotiana glauca* y los metabolitos aislados a partir de ellos.

2

OBJETIVOS



El objetivo general de esta tesis es contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas a partir de especies vegetales endémicas. Para ello, se tomaron dos cursos de acción: el aprovechamiento del importante contenido de lupeol que posee la especie vegetal *Chiquiraga erinacea*, previamente reportado en trabajos de nuestro grupo de investigación, para la obtención de nuevos análogos semisintéticos bioactivos como un aporte al desarrollo de nuevas drogas para la industria farmacéutica, trabajando bajo los principios de la Química Verde; y el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de extractos bioactivos de la especie vegetal *Nicotiana glauca*, teniendo en cuenta sus antecedentes *quimiotaxonómicos* y *etnomédicos*, con el fin de descubrir potenciales efectos biológicos aún no conocidos de la planta. Esto último se llevó a cabo bajo el marco de un trabajo en colaboración con el grupo de investigación de las Dras. Milanesi y Vasconsuelo.

Para llevar a cabo el *primer objetivo general*, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Optimizar la purificación de lupeol mediante extracciones y técnicas cromatográficas específicas.
- ❖ Modificar el C-30 de la cadena lateral de lupeol a través de la reacción de oxidación alílica, empleando la metodología clásica de síntesis orgánica y la metodología de catálisis heterogénea.
- ❖ Purificar y aislar el producto de oxidación alílica, para ser utilizado como bloque de construcción en la síntesis de nuevos análogos triterpénicos.
- ❖ Caracterizar las nuevas entidades moleculares en forma completa con ayuda de diferentes técnicas de elucidación estructural.
- ❖ Evaluar y cuantificar la actividad neuroprotectora de los nuevos análogos triterpénicos obtenidos.

En cuanto al *segundo objetivo general*, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Recolectar la especie vegetal *Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae).
- ❖ Realizar un ensayo bioguiado sobre células musculares a partir del extracto etanólico y posterior fraccionamiento, con el fin de seleccionar los subextractos más activos.
- ❖ Aislar, identificar y caracterizar los metabolitos activos obtenidos luego del fraccionamiento bioguiado.

- ❖ Evaluar y cuantificar la actividad biológica de los metabolitos aislados a una concentración determinada sobre células musculares.

3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



PARTE A:

Optimización de la obtención del sistema carbonílico α,β -insaturado a partir de lupeol

III.1 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL *Chuquiraga erinacea*

En investigaciones llevadas a cabo en el grupo de investigación a partir de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea* D. Don subsp. *erinacea*, lupeol fue el triterpeno aislado en mayor proporción [41]. Considerando la importancia biológica que posee este triterpeno tipo lupano, dicha especie vegetal fue una de las plantas seleccionadas para el desarrollo de esta tesis. A continuación, se detalla una breve descripción botánica, fitoquímica y de los usos etnomedicinales de esta especie vegetal. La nomenclatura científica y sinónimos fueron tomados del “Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur” [162].

Familia: Asteraceae.

Sinónimos: *Chuquiraga ungui-cati* Ces., *Chuquiraga juniperina* Phil., *Chuquiraga erinacea* D. Don var. *unguis-cati* (Ces.) Hauman, *Chuquiraga erinacea* D. Don var. *mollior* Lorentz.

Nombres vulgares: “falsa uña de gato”, “romerillo”, “romerito”, “chilladora”, “chispeadora”, “chirriadera”, “rabiosa”, “ardegras”.

Distribución geográfica: se trata de una especie endémica de la Argentina y se distribuye desde la provincia de Jujuy hasta el norte de la provincia de Chubut, a lo largo de la provincia fitogeográfica del Monte. 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 [163].

Descripción botánica: Arbusto perenne de 40-150 cm de altura, con ramificación muy densa. Tallos robustos, muy ramificados y densamente hojosos en las ramas jóvenes (pelos finos y suaves). Sus hojas son color verde claro, aciculares muy agudas, rígidas, dispuestas de forma alterna sobre las ramas. Poseen una espina en el ápice y sus medidas van desde 5 a 15 mm de longitud por 0,5-1,5 mm de ancho. Las flores están agrupadas en capítulos amarillos-anaranjados muy numerosos, dispuestos en las puntas de las ramitas. El número de flores por capítulo varía de 5 a 9 y poseen corola tubulosa. El involucreo del capítulo es cilíndrico con varias series de brácteas. Los frutos son aquenios velludos, sedosos y rojizos. Están integrados por un conjunto de pelos plumosos (papus) casi tan largos como la corola. La floración se produce desde noviembre hasta marzo [163].

Composición química: [164,165]

- *Flavonoides:* quercetina-3-O-glucósido; quercetina-3-O-rutinósido; canferol; canferol-3-O-glucósido; canferol-3-O-rutinósido.
- *Triterpenos pentacíclicos:* lupeol, pseudotaraxasterol, taraxasterol, α -amirina, β -amirina (monohidroxilados); calenduladiol, faradiol (dihidroxilados); heliantriol

B2 (trihidroxilados); otros triterpenos pentacíclicos sustituidos: 6 β -hidroxitaraxasta-20-eno-3 β -O-palmitato y 6 β -hidroxitaraxasta-20-eno-3 β -O-acetato.

Usos etnomedicinales: Se utiliza para aliviar enfermedades del estómago, hígado (aumentando el flujo de la bilis) y riñón (propiedades diuréticas). También fortifica el cerebro y los nervios. Una costumbre muy particular entre los tehuelches, mapuches y pampas era la de mascar las hojas como excitante nervioso [166,167].

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 éstas ardían [167].



<<Arde (...) con suma facilidad, produciendo al quemarse fuertes detonaciones y humo negro en gran cantidad, por cuya propiedad la usan los indios para comunicarse a la distancia.>>

(Burmeister, 1888)

III.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Chuquiraga erinacea*

Teniendo en cuenta los trabajos llevados a cabo anteriormente por nuestro grupo de investigación sobre la especie vegetal *Chuquiraga erinacea*, se propuso la obtención del extracto etanólico (EE) de la planta teniendo en cuenta la metodología reportada [168].

Como material vegetal de partida se utilizaron las partes aéreas de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea* (211,8 g), las cuales fueron pulverizadas con el fin de aumentar la superficie de contacto con el solvente y mejorar, de esta forma, el proceso de extracción. Posteriormente, fue sometido a una extracción en caliente (digestión), utilizando EtOH como solvente. Este

tipo de extracción presenta la ventaja de ser más rápido y eficiente que la extracción a temperatura ambiente (maceración), ya que la temperatura facilita la solubilidad de muchos principios activos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que algunos metabolitos pueden presentar termosensibilidad. En estudios previos del grupo, se observó que este tipo de extracción no modifica las propiedades de los compuestos de interés de la planta [168]. Luego del filtrado y evaporación del solvente, el material vegetal se sometió a una segunda extracción a reflujo, mediante la utilización de EtOH recuperado, asegurándose de esta manera el agotamiento del material vegetal. El **EE** total obtenido (28,2 g), se logró con un rendimiento de 13,3% sobre material vegetal. Dicho extracto fue liofilizado, obteniéndose 24,8 g del mismo, (11,7% sobre material vegetal).

Considerando el perfil cromatográfico de la cromatografía en capa fina (CCF) del **EE**, en el cual se pudo observar que el triterpeno de interés es menos polar que otros metabolitos presentes, tales como los triterpenos di- y trihidroxilados, entre otros, se obtuvo el subextracto hexánico (**SH**). Para ello, una cantidad del **EE** (10 g) fue particionado con una mezcla de H₂O:MeOH (50:50) y hexano, obteniéndose el **SH** (63,3% sobre **EE** liofilizado). Según el análisis por CCF y por comparación con un testigo de lupeol, el **SH** mostró el triterpeno de interés, junto a otros triterpenos monohidroxilados de igual R_f . Este subextracto resultó tener un perfil cromatográfico más limpio en comparación al observado para el **EE**. De esta manera, se logró obtener un subextracto enriquecido en lupeol a partir del extracto crudo de la planta, lo cual permitiría una purificación más eficaz.

III.3 AISLAMIENTO DE LA MEZCLA DE TRITERPENOS MONOHIDROXILADOS

Con el objetivo de aislar la mezcla de triterpenos monohidroxilados, la cual contiene una importante cantidad de lupeol [41], se llevó a cabo un fraccionamiento del **SH**. Para ello, 3,5 g de **SH** se fraccionaron mediante una cromatografía en columna (CC) sobre sílica de fase normal, utilizando como eluyente una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente (Figura 24a). De esta cromatografía se obtuvieron 47 fracciones de 10 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF y comparadas con testigos. Las fracciones que contenían lupeol fueron agrupadas y evaporadas, dando lugar a un sólido banco, **F1** (773,5 mg, $R_f = 0,57$) (14% sobre **EE** liofilizado) (Figura 24b). El resto de las fracciones eluidas de la columna, que contenían los triterpenos di- y trihidroxilados, fueron agrupadas y evaporadas para su posterior conservación.

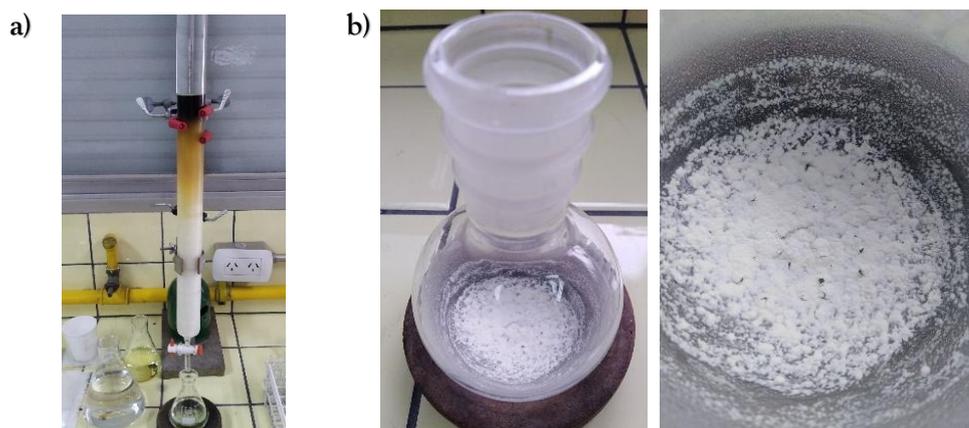


Figura 24. a) Cromatografía del SH de *Chuquiraga erinacea*; b) Mezcla de triterpenos monohidroxilados, F1.

Posteriormente, F1 fue analizada por espectroscopía RMN de ^1H , y teniendo en cuenta los trabajos previos del grupo de investigación [41,168], se pudo identificar la presencia de cinco triterpenos pentacíclicos monohidroxilados, los cuales corresponden a compuestos isómeros. El espectro de ^1H mostró señales ubicadas a campos mayores (0,50-2,50 ppm), las cuales corresponden al esqueleto triterpénico de estos isómeros, así como también el multiplete correspondiente al protón H-3 a 3,20 ppm. A campos más bajos, se observaron seis señales diferentes que fueron asignadas a los protones vinílicos de cada isómero (Figura 25). Las señales a 4,56 ppm y 4,68 ppm corresponden a los hidrógenos H-29a y H-29b de **lupeol** (1) (52,4% de abundancia), el multiplete a 4,60 ppm corresponde a los protones H-30 de **taraxasterol** (2) (4,7%), los dos tripletes a 5,13 ppm y 5,18 ppm corresponden a los hidrógenos H-12 de α -**amirina** (3a) (6,8%) y β -**amirina** (3b) (12,6%) respectivamente, y el doblete a 5,26 ppm asignado al protón H-21 de **pseudotaraxasterol** (4) (23,6%).

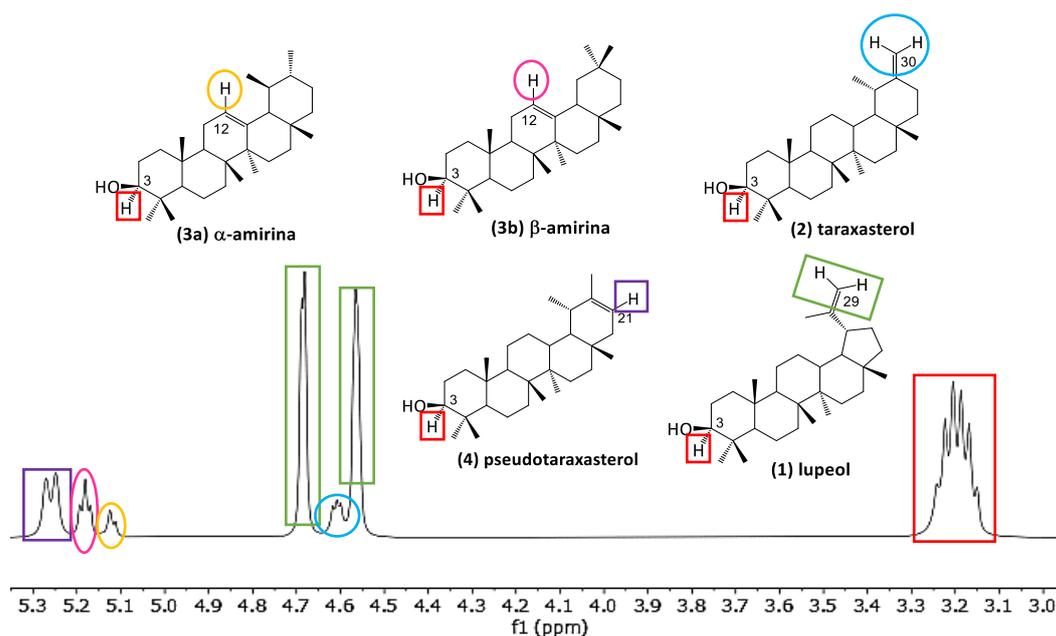


Figura 25. Espectro RMN de ^1H de F1 y estructuras de los triterpenos presentes.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la obtención del **SH** a partir del **EE** de *Chuquiraga erinacea*, permitió aislar la mezcla de triterpenos monohidroxilados a través de cromatografías más limpias y con una notable reducción de la cantidad de fases móvil (FM) y estacionaria (FE) utilizadas en las mismas, comparada con la metodología utilizada por Castro [168].

III.4 PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LUPEOL

Una vez obtenida la mezcla de triterpenos monohidroxilados, se propuso aislar lupeol a partir de la misma. Debido a que los cinco triterpenos poseen el mismo valor de R_f , la obtención de **1** puro fue posible a través del empleo de sílica impregnada con AgNO_3 (5%) mediante una cromatografía preparativa en capa fina (CPCF) [41]. Sin embargo, esta técnica presenta la desventaja de bajos rendimientos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se propuso llevar a cabo la purificación de **1** mediante CC con sílica impregnada en AgNO_3 . A continuación, se realiza una breve descripción de esta técnica.

III.4.1 Antecedentes de la técnica de cromatografía en columna con sílica gel impregnada con AgNO_3

La cromatografía provista por iones plata, separa los compuestos de acuerdo a su grado de insaturación, la distribución y la posición de los dobles enlaces dentro de la molécula. El mecanismo de separación radica en la capacidad de los electrones π de los dobles enlaces de los compuestos para interactuar con los iones plata en la FE (Figura 26) [169].

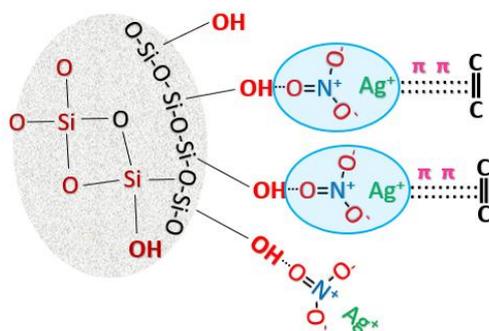


Figura 26. Interacción entre los iones plata, el soporte y los dobles enlaces C-C.

La incorporación de los iones plata en las columnas puede llevarse a cabo de dos maneras diferentes: impregnando el soporte de sílica gel con una sal de plata, o uniendo los

iones plata a la FE a través de una fase de intercambio iónico. La impregnación de columnas con iones plata generalmente se realiza con AgNO_3 en concentraciones de 5% a 10% con respecto a la masa de sílica gel a utilizar [169]. En nuestro caso, se utilizó el método de impregnación de la sílica, utilizando un 10% de AgNO_3 .

III.4.2 Aislamiento de lupeol mediante cromatografía en columna con sílica/ AgNO_3

Una muestra de **F1** (60 mg, 52,4% de lupeol) se sometió a una CC provista de sílica flash impregnada con AgNO_3 (10%). La impregnación de la sílica se realizó cuidadosamente, al resguardo de la luz, mediante el agregado de una solución acuosa-metanólica de AgNO_3 , como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Luego de la evaporación del solvente, la sílica impregnada se activó en estufa durante 1 h y transcurrido ese tiempo, se empaquetó la columna, la cual se mantuvo al resguardo de la luz durante todo su desarrollo. La muestra se sembró disuelta en el solvente de elución (CHCl_3); luego de la cromatografía se recolectaron 96 fracciones de 5 mL cada una. Estas fracciones se agruparon según su perfil de CCF en seis subfracciones (**SF1-SF6**), las cuales fueron diferenciadas por los colores que presentaron sus respectivas CCF, al darles calor durante el revelado (Figura 27). Mediante la comparación con un testigo de lupeol, se pudo confirmar preliminarmente la presencia de **1** en las **SF5** y **SF6**, observándose una mancha amarilla-verdosa que se tornó verde esmeralda, a medida que se le aumentó la temperatura.

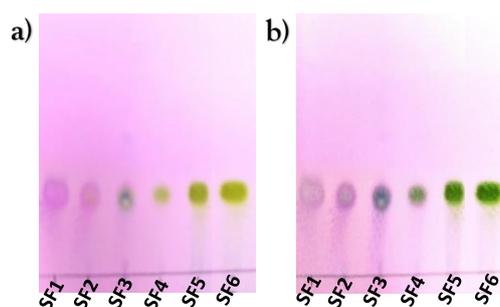


Figura 27. CCF de las distintas subfracciones eluidas de la cromatografía con sílica/ AgNO_3 , mostrando la variación de colores de las mismas, de menor (a) a mayor (b) efecto del calentamiento durante el revelado.

Posteriormente **SF1-SF6** fueron analizadas por RMM de ^1H . La composición de cada subfracción se puede ver detallada en la Tabla 1, así como el orden de elución y el peso obtenido de cada una. Dada la concentración de lupeol en la **SF5** y **SF6**, estas subfracciones fueron las de mayor interés.

Tabla 1. Subfracciones obtenidas de la cromatografía con sílica/AgNO₃.

SF	Triterpenos	Concentración Relativa (%)	Peso (mg)
1	β-amirina	32,6	3,4
	α-amirina	20,2	
	Compuesto ND ^a	47,2	
2	β-amirina	53	9,2
	α-amirina	21	
	pseudotaraxasterol	25,9	
3	pseudotaraxasterol	100	14,8
4	pseudotaraxasterol	26,7	1,5
	taraxasterol	41,7	
	lupeol	31,7	
5	taraxasterol	5,7	11,9
	lupeol	94,3	
6	lupeol	100	14,0

^a Compuesto de mayor R_f cuya estructura no fue identificada.

El espectro de la SF5, mostró la presencia de dos señales correspondientes a los protones olefínicos de 1 y de un multiplete a 4,60 ppm perteneciente a los protones olefínicos del compuesto 2. Se observó también una señal a 2,27 ppm correspondiente al H-19 del compuesto 2, además de las señales que pertenecen al esqueleto triterpénico de estos isómeros (Figura 28). El área de señales, en función al multiplete del protón H-3, indicó un 94,3% de 1, mientras que el 5,7% restante, correspondió a 2. Por otra parte, para la SF6 sólo se observaron las señales correspondientes a los hidrógenos olefínicos H-29a y H-29b de 1 en la zona de 4 y 5 ppm, además de las señales características del esqueleto triterpénico (Figura 28). Asimismo, el RMN de ¹³C de SF6 mostró 30 señales que se correspondieron con la estructura de 1 y estuvieron de acuerdo a los datos reportados [41,168].

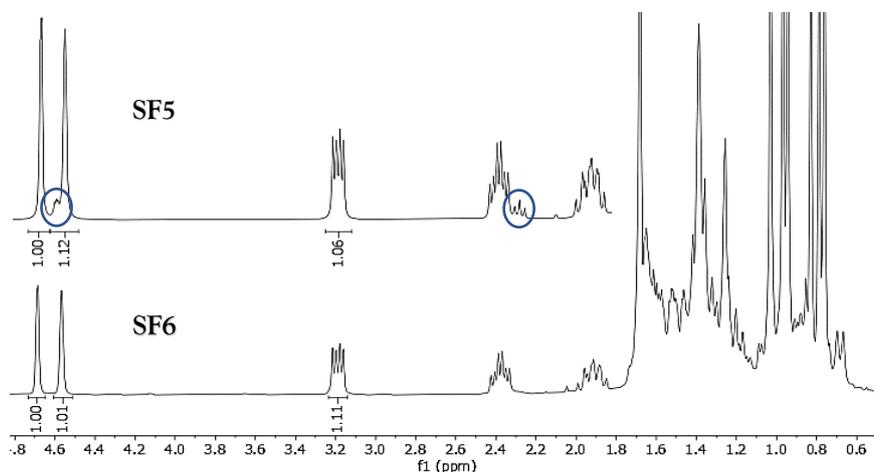


Figura 28. Espectros RMN de ¹H de SF5 y SF6 obtenidas de la cromatografía de la mezcla de terpenos monohidroxilados F1.

A partir de estos datos, se pudo determinar que SF6 contenía solo lupeol, como un sólido blanco de aspecto cristalino (pf: 206-210 °C) (Figura 29a y b). Esta técnica cromatográfica resultó efectiva para el aislamiento de este triterpeno, con un 45% de rendimiento sobre el total de la muestra sembrada. A su vez, cabe destacar que, luego de la cromatografía, se recuperó un 36% del solvente utilizado.

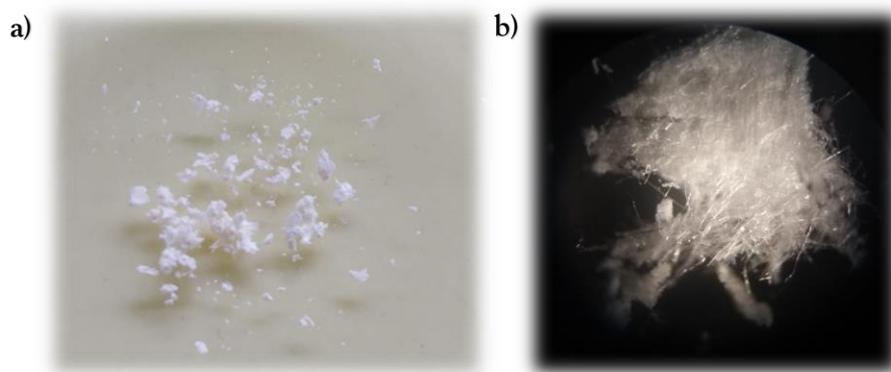


Figura 29. a) Sólido blanco cristalino correspondiente a lupeol puro. b) Cristales de lupeol observados bajo microscopio (10X).

Con estos resultados se pudo informar que el contenido de lupeol en *Chuquiraga erinacea* fue de 1750 $\mu\text{g/g}$ de planta seca [170]. A continuación, y a modo informativo, se menciona el contenido de este triterpeno en otras especies vegetales. Por ejemplo, en las hojas de *Quercus obtusata* (Fagaceae), más conocido como “encino blanco”, lupeol se encuentra presente en una concentración de 173,6 $\mu\text{g/g}$ de planta [171]. En frutos de *Olea europea* (Oleaceae), conocido como “olivo”, se determinó una concentración del triterpeno de 3 $\mu\text{g/g}$ de frutos; en *Mangifera indica* (Anacardiaceae) se encontró 180 $\mu\text{g/g}$ de pulpa de mango; en las hojas secas de la planta *Aloe vera* (Xanthorrhoeaceae) un total de 280 $\mu\text{g/g}$; en *Ulmus campestris* (Ulmaceae), conocido también como “olmo”, 880 μg de lupeol por gramo de corteza; y en aceite de *Panax quinquefolius* (Araliaceae), “Ginseng”, se determinó una concentración de lupeol de 152 $\mu\text{g/g}$ de aceite [90]. De esta forma, se ve reflejado el importante contenido de lupeol que posee nuestra especie vegetal en estudio, *Chuquiraga erinacea*.

III.5 OBTENCIÓN DEL SISTEMA CARBONÍLICO α,β -INSATURADO SOBRE LUPEOL COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN

Considerando los antecedentes mencionados en el Capítulo I en cuanto a las modificaciones químicas llevadas a cabo sobre triterpenos con esqueleto tipo lupano, se

propone la creación de un sistema carbonílico α,β -insaturado sobre la molécula de lupeol, debido a la importancia que poseen dichos sistemas. Este compuesto será utilizado luego como bloque de construcción en la síntesis de nuevos derivados bioactivos.

La obtención de un sistema carbonílico α,β -insaturado sobre la molécula de lupeol se realiza mediante una reacción de oxidación alílica del grupo isopropenilo contenido en el anillo E del esqueleto lupano. Para ello, generalmente se utilizan técnicas convencionales de síntesis orgánica [82,112,114-116], que son costosas en términos de energía y reactivos [73,172-174]. A su vez, estos últimos, suelen estar asociados a serios problemas de toxicidad [175].

Dentro de las metodologías de síntesis convencionales, una de las más conocidas y empleadas es la que utiliza calentamiento a reflujo y dióxido de selenio (SeO_2) como agente oxidante, principalmente por la alta regio- y quimioselectividad que posee dicho reactivo [174-177]. En 1932, Riley y col. informaron sobre el primer uso sintético general del SeO_2 como oxidante de aldehídos y cetonas. Las cetonas y aldehídos que poseían un grupo α -metileno se convirtieron en los correspondientes compuestos 1,2-dicarbonílicos con un rendimiento moderado a bueno [178]. A partir de este descubrimiento, el uso de SeO_2 se expandió rápidamente y se demostró que, además de los compuestos carbonílicos, los sustratos olefínicos se oxidaban en la posición alílica a los correspondientes alcoholes alílicos o enonas. La oxidación del grupo metileno adyacente a un grupo carbonilo o a un doble enlace de olefinas (posición alílica o bencílica) con SeO_2 se denomina oxidación de Riley [179]. Si bien se trata de una técnica efectiva, posee las desventajas mencionadas más arriba en cuanto a costos y toxicidad.

Teniendo en cuenta la importancia de los Principios de la Química Verde, se requiere la aplicación de nuevos enfoques sintéticos, más eficientes y respetuosos con el medio ambiente, como por ejemplo el empleo de catalizadores. Hasta el momento, el único reporte hallado en la literatura acerca de la oxidación alílica de triterpenos tipo lupano mediante el uso de la catálisis es el trabajo de da Silva Martins y col. (2016). En dicho trabajo, los autores estudian la oxidación de lupeol (**1**) mediante la utilización de modelos biomiméticos del citocromo P450 basados en porfirinas de manganeso y yodosilbenceno como agente oxidante, con el fin de obtener los compuestos **o** o **p**, siendo el compuesto **o** un producto de oxidación alílica (Figura 30). Sin embargo, estos catalizadores homogéneos resultaron ser inestables, descomponiéndose totalmente durante la reacción, por lo que la conversión de **1** se vio limitada, obteniéndose ambos productos con bajos rendimientos [99].

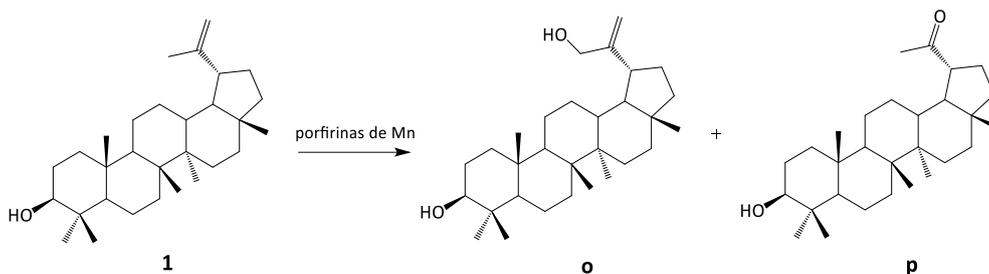


Figura 30. Productos obtenidos en la oxidación de **1** con porfirinas de manganeso.

Por tal motivo, una estrategia a considerar es el empleo de la catálisis heterogénea en reemplazo de la metodología clásica de síntesis, debido a que los catalizadores utilizados son de fácil separación y recuperación, y en muchos casos pueden reutilizarse [180]. Hasta el momento no se han encontrado estudios científicos asociados al empleo de catalizadores heterogéneos para el desarrollo de la oxidación alílica del grupo isopropenilo de triterpenos pentacíclicos, por lo que dicha estrategia resulta aún más interesante de desarrollar.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, y continuando con uno de los objetivos de esta tesis, en primer lugar se describe la obtención del compuesto carbonílico α,β -insaturado (**5**), mediante la oxidación alílica del C-30 de **1** a través de la metodología tradicional. En segundo lugar, se detalla los estudios llevados a cabo para la optimización de dicha técnica mediante el desarrollo de la metodología catalítica. Debido a que **1** es aislado a partir de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea* en varias etapas, (Secciones III.2 y III.4), la optimización de la técnica, se llevará a cabo con (-)- α -pineno como molécula modelo. Este monoterpene posee un grupo isopropenilo en su estructura, y es accesible comercialmente. Finalmente, se analiza la utilización de la metodología catalítica heterogénea para la oxidación alílica de **1** comparada con la metodología convencional.

III.5.1 Oxidación alílica de lupeol mediante la metodología convencional

En la literatura se pueden encontrar numerosos reportes de oxidaciones alílicas llevadas a cabo sobre compuestos triterpénicos empleando SeO_2 . A continuación, se citan algunos ejemplos. Neukirch y col. (2005) realizaron esta reacción sobre diversos triterpenos pentacíclicos, para lo cual utilizaron 2 eq de SeO_2 . Luego de 8 h de reacción, los productos obtenidos fueron los correspondientes compuestos carbonílicos α,β -insaturados con rendimientos de 60-75% [177]. Urban y col. (2006) sintetizaron el ácido 30-oxobetulínico, utilizando un gran exceso de SeO_2 , con un rendimiento del 52% [113]. Por otra parte, Barroso-González y col. (2009) oxidaron calenduladiol al aldehído alílico correspondiente, utilizando 1

eq de SeO_2 durante 10 h, obteniendo un 30,4% de rendimiento al producto final [110]. Años más tarde, el mismo grupo informó la obtención del aldehído alílico de lupeol, utilizando la técnica convencional con 1,2 eq de SeO_2 , obteniendo un 45% de rendimiento luego de 48 h de reacción [107]. Finalmente, Khan y col. (2014) realizaron la reacción de oxidación sobre lupeol, utilizando 1,1 eq de SeO_2 como agente oxidante y obtuvieron 30-oxolupeol en 48 h de reacción con rendimientos del 70% [115,116].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se hizo reaccionar **1** (1 eq) con SeO_2 (2,5 eq) y calentamiento a reflujo en EtOH, obteniéndose el compuesto carbonílico α,β -insaturado (**5**) (Figura 31).

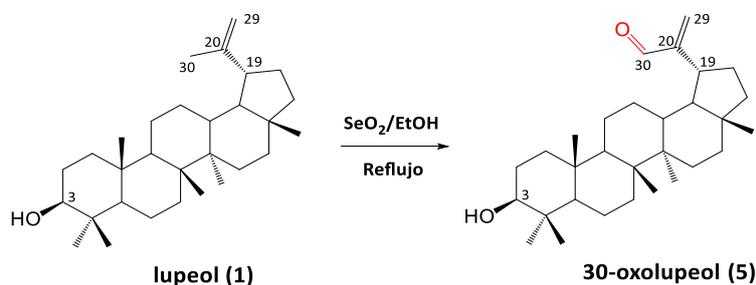


Figura 31. Reacción de oxidación alílica de lupeol.

La reacción fue monitoreada mediante CCF, observándose una mancha mayoritaria de R_f menor al de **1** ($R_f = 0,35$), y la desaparición total del compuesto de partida a las 24 h de reacción. La purificación del bruto de reacción mediante una CC sobre sílica de fase normal, utilizando como FM una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente, dio lugar a la obtención de un sólido blanco de aspecto brillante. El espectro de RMN de ^1H de este compuesto mostró una señal ubicada a 9,50 ppm que se corresponde con el protón de un aldehído (H-30), y dos señales a 6,28 ppm y 5,90 ppm correspondientes a los protones H-29a y H-29b. A diferencia del precursor **1**, estas señales se encuentran desplazadas a campos menores. Cabe resaltar que la señal correspondiente a los H-30 de **1** (1,68 ppm), no se observa en el espectro del compuesto oxidado, ya que corresponde a la señal 9,50 ppm comentada más arriba. El H-19 también se encuentra desplazado a campos menores con respecto a **1** (de 2,38 ppm a 2,75 ppm) (Figura 32a). A su vez, comparando el espectro de RMN de ^{13}C con el de **1**, se observó una nueva señal a 195,2 ppm (C-30), y el desplazamiento a campos menores de las señales de los carbonos C-20 (de 151,1 ppm a 157,3 ppm) y C-29 (de 109,5 ppm a 133,3 ppm) (Figura 32b). A partir de estos datos y por comparación con los datos reportados en bibliografía, se confirmó que se trataba

del producto de oxidación alílica de **1**, identificado como 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al, (**5**), (pf= 215-218; 70%).

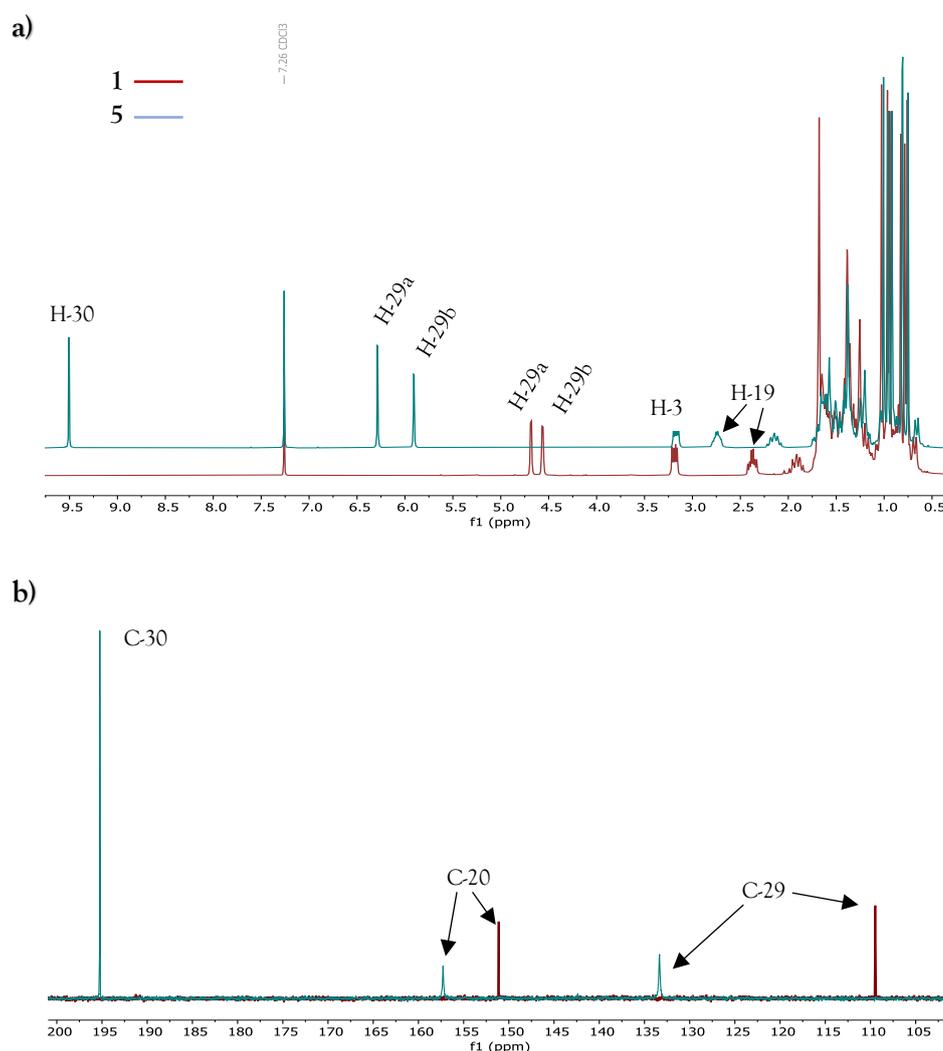


Figura 32. Comparación del espectro de RMN de ¹H y de una sección del RMN de ¹³C de **1** y **5**.

Resulta interesante hacer mención al mecanismo de la reacción de oxidación alílica a través del cual se ve reflejada la selectividad del SeO₂. En el primer paso se produce una reacción eno sobre el centro electrofílico del selenio. El ácido alilselenínico obtenido sufre un reordenamiento 2,3-sigmatrópico que se da a través de un estado de transición similar a una envoltura, obteniéndose el éster alilselenito, que luego de una hidrólisis da lugar al alcohol alílico. No obstante, la oxidación puede continuar hacia el producto carbonílico α,β -insaturado (Figura 33) [175].

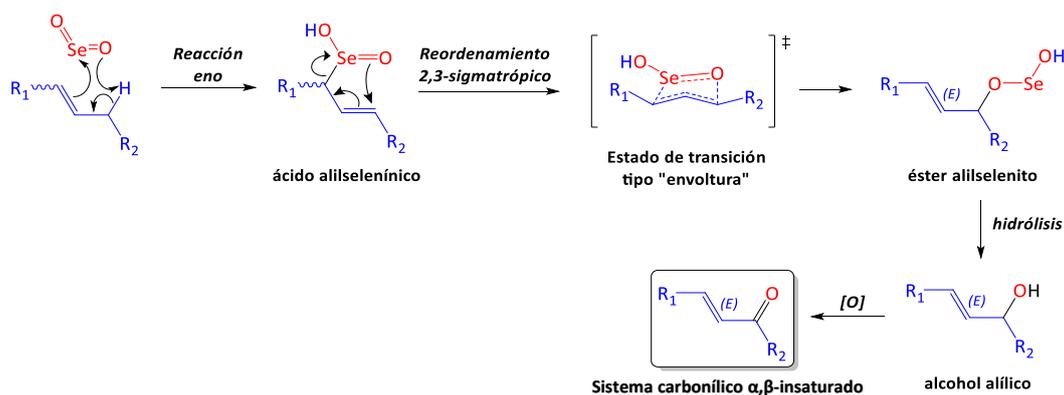


Figura 33. Mecanismo de oxidación alílica con SeO_2 .

Por otra parte, las oxidaciones alílicas con este agente oxidante son altamente regioespecíficas, y ocurren en la posición α del carbono más sustituido del doble enlace, con un orden de reactividad $\text{CH}_2 > \text{CH}_3 > \text{CH}$. A su vez, cuando el doble enlace está dentro de un anillo, la oxidación ocurre en la posición α hacia el extremo más sustituido del doble enlace y en el anillo cuando es posible [174,177,179].

A partir de estos resultados, se puede observar que la obtención del compuesto 5 mediante la metodología convencional fue lograda con buenos rendimientos. Sin embargo, como se mencionó más arriba, resulta necesario efectuar una optimización de dicha metodología, así como también la posibilidad de llevarla a cabo mediante técnicas que resulten amigables con el medio ambiente, tales como la catálisis heterogénea. A continuación, se detallan los estudios realizados para los fines mencionados, en los cuales se utiliza (-)- α -pineno como sistema modelo, como se comentó anteriormente.

III.5.2 Oxidación alílica de (-)- α -pineno mediante la metodología convencional

En primer lugar, se llevó a cabo la oxidación de α -pineno (1 eq) a través de la metodología clásica, utilizando SeO_2 (2,5 eq), EtOH como solvente, a reflujo. La reacción fue monitoreada mediante CG-EM, y se observó que, a tiempos cortos de reacción, la conversión fue baja, obteniéndose como producto principal mirtenol (OL) (Figura 34), mientras que mirtenal (AL), fue el otro producto obtenido (Tabla 2).

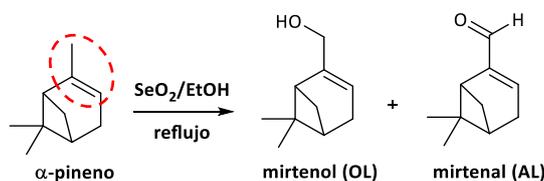


Figura 34. Productos de la oxidación alílica convencional de (-)- α -pineno con SeO_2 a reflujo.

Sin embargo, el rendimiento hacia **AL** fue aumentando con el tiempo, mientras que el rendimiento de **OL**, por el contrario, fue disminuyendo. Esta observación refleja que el aldehído se va formando a partir de la oxidación del alcohol, como está descripto más arriba en el mecanismo de la reacción (Figura 33). A las 13 h de reacción (entrada 5, Tabla 2), la selectividad a **AL** no superó el 56%, dando un 28% de rendimiento. Si bien el rendimiento de **AL** obtenido por Lin y col. (2017) a reflujo es elevado (70%), es importante señalar que estos autores llevaron a cabo la reacción utilizando 1,4-dioxano, un solvente no amigable con el medio ambiente [181].

Tabla 2. Oxidación alílica de α -pineno sobre SeO_2 mediante la metodología convencional.^a

Entrada	Tiempo (h)	Conversión ^b (%)	Selectividad mirtenol (%)	Selectividad mirtenal (%)
1	5	18	72	28
2	7	23	65	35
3	9	34	59	41
4	11	41	56	44
5	13	50	44	56

^a Condiciones de reacción: 1 eq de α -pineno, 2,5 eq de SeO_2 , en 35 mL de EtOH (0,02 M), 78 °C. ^b Conversión de α -pineno.

Según la regioselectividad del SeO_2 , analizada más arriba, el orden de reactividad de metilos, metilenos y metinos involucrados en la oxidación alílica para α -pineno se muestra en la Figura 35, siendo el metilo terminal el más reactivo por encontrarse en posición alfa al carbono más sustituido del doble enlace [174]. Teniendo en cuenta esta reactividad, la selectividad observada para los productos obtenidos en la reacción de oxidación de α -pineno, **AL** y **OL**, está de acuerdo con este orden.

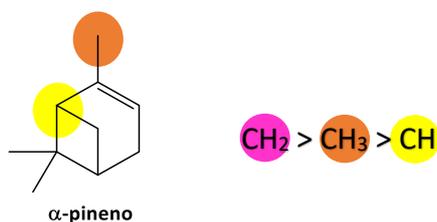


Figura 35. Orden de reactividad de metilos, metilenos y metinos en α -pineno frente a la oxidación alílica con SeO_2 .

En el contexto de optimizar la reacción de oxidación alílica convencional, se decidió emplear un reactor de acero (Parr), empleando sobrepresión, para llevar a cabo la reacción en fase líquida a temperaturas mayores que la correspondiente a la de reflujo. Para ello, se colocó

en el reactor una solución de α -pineno (1 eq) en EtOH con SeO_2 (2,5 eq), y se programó una temperatura de 134 °C y una presión de oxígeno de 6 atm. La reacción fue monitoreada mediante CG-EM, y se observó que, a las 5 h de reacción, la conversión lograda fue de un 41%, mientras que, para la metodología llevada a cabo a reflujo, dicha conversión se había logrado a tiempos mayores (11 h de reacción). En este caso, los únicos productos detectados fueron **AL** y **OL**, al igual que lo observado en la reacción llevada a cabo a reflujo, sin embargo, la selectividad fue notablemente mayor para el aldehído (84%) (Tabla 3). Al mismo tiempo de reacción, 5 h, el rendimiento de **AL** fue mayor cuando la reacción se llevó a cabo bajo 6 atm de presión de oxígeno (34%) que cuando se realizó a reflujo (5%). Además, cuando las comparaciones se realizan al mismo nivel de conversión (21-23%), podemos apreciar que el rendimiento de **AL** también es mayor para la reacción realizada bajo presión de oxígeno (15%), que para el caso de reflujo (8%).

Tabla 3. Oxidación alílica de α -pineno sobre SeO_2 en reactor Batch, a 6 atm de O_2 .^a

Entrada	Tiempo (h)	Conversión ^b (%)	Selectividad mirtenol (%)	Selectividad mirtenal (%)
1	2	5	58	42
2	3,5	21	29	71
3	5	41	16	84

^a Condiciones de reacción: 1 eq de α -pineno, 2,5 eq de SeO_2 , en 35 mL de EtOH (0,02 M), 134 °C, 6 atm de O_2 . ^b Conversión de α -pineno.

El alto rendimiento a **AL** alcanzado en condiciones Batch se debería tanto a la mayor temperatura de reacción como a la elevada concentración de O_2 en la fase líquida. Si bien con esta metodología se observó una interesante mejora tanto en el rendimiento al aldehído de interés, así como en los tiempos de reacción, para ambas metodologías se utilizaron condiciones estequiométricas de SeO_2 , lo cual no resulta amigable con el medio ambiente. Asimismo, si se quisiera aumentar la conversión y selectividad hacia el aldehído, resulta necesario emplear una mayor cantidad del agente oxidante, lo que daría como resultado un notable aumento de la relación α -pineno/ SeO_2 . Además, surgen otras desventajas propias de la utilización del SeO_2 como ya se comentó anteriormente. Por tales motivos, se llevó a cabo la búsqueda de un catalizador heterogéneo, que sea selectivo, activo, estable y reutilizable capaz de sustituir la metodología convencional. A continuación, se describe la metodología catalítica propuesta para llevar a cabo la oxidación alílica de α -pineno.

III.5.3 Oxidación alílica de (-)- α -pineno mediante la metodología catalítica

Según los numerosos reportes hallados en la literatura, se ha utilizado una gran variedad de catalizadores heterogéneos para llevar a cabo la oxidación alílica de α -pineno, con la utilización de oxígeno molecular [182-184]. En la mayoría de los trabajos, los principales productos obtenidos de la oxidación del α -pineno son verbenona y el verbenol (Figura 36). Rauchdi y col. (2018) estudiaron suspensiones de agua con nanopartículas de Ru estabilizadas como catalizadores y la utilización de un co-catalizador, hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*BuOOH) para la oxidación de α -pineno, e informaron un rendimiento relativamente alto de verbenona (39%) [182]. Por otra parte, Kholdeeva y col. (2014) estudiaron la oxidación de α -pineno sobre Cr-MOF y Fe-MOF, empleando también *t*BuOOH, y reportaron una conversión no mayor al 22% en tiempos de reacción prolongados (16 h), obteniendo una mezcla de varios productos de oxidación, principalmente verbenona y verbenol [183]. También se han estudiado, para la oxidación de α -pineno, catalizadores metálicos de Pt, Pd, Ru, Rh e Ir soportados sobre carbón activado. En todos estos casos, los principales productos fueron verbenona, verbenol y el epóxido correspondiente [184]. En resumen, los catalizadores heterogéneos estudiados conducen a la oxidación alílica de α -pineno, dando principalmente verbenona y verbenol entre otros productos (Figura 36).

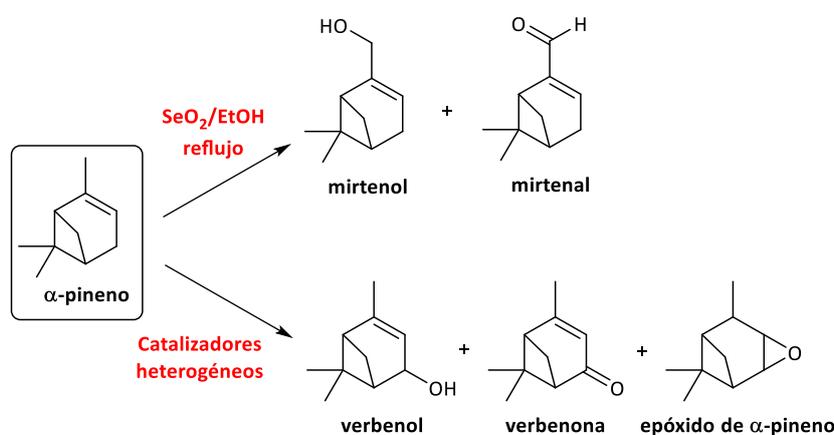


Figura 36. Principales productos de oxidación alílica de α -pineno mediante las metodologías convencional y catalítica.

Hasta el momento no se ha encontrado bibliografía relacionada al uso de catalizadores heterogéneos que conduzcan selectivamente a la oxidación alílica del grupo isopropenilo de α -pineno para la obtención de OL y AL. Por esta razón, se propuso obtener un catalizador heterogéneo que promueva la oxidación selectiva hacia los productos mencionados. Teniendo en cuenta los productos obtenidos en las reacciones de oxidación alílica de α -pineno convencionales mediante el uso de condiciones estequiométricas de SeO_2 , se sintetizó un catalizador basado en este agente oxidante. Para ello se soportó este óxido sobre un material

inerte, bajo la hipótesis de que el catalizador obtenido mantuviese la quimio- y regioselectividad características del SeO_2 [174-177]. A continuación, se describe el trabajo realizado para tal fin.

III.5.3.1 Síntesis y caracterización del sistema $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$

Siguiendo con los objetivos de esta parte de la tesis, se continuó con la preparación y caracterización de un sistema basado en SeO_2 soportado sobre SiO_2 , con una concentración teórica de 14% de SeO_2 . La selección de la sílica se basa en que es un material relativamente inerte, el cual es empleado como soporte en la formulación de numerosos materiales. Asimismo, una de las ventajas de este sistema se basa principalmente, en facilitar la posterior separación del SeO_2 del medio de reacción.

La preparación del sistema de SeO_2 soportado sobre sílica (que se denominará $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$) se llevó a cabo mediante el método de impregnación húmeda [185]. Para ello, a aproximadamente 2 g de SiO_2 se le agregó una solución de SeO_2 en EtOH absoluto (0,13 M), y se dejó en agitación a 40 °C, hasta evaporación del solvente. La mezcla obtenida fue calcinada en mufla durante 1 h. Para este sistema, se determinó el contenido de SeO_2 mediante espectroscopía de plasma con acoplamiento inductivo (ICP), y resultó ser de 14,6% p/p. Finalmente, se realizó la caracterización del catalizador a través de diversas técnicas las cuales son detalladas a continuación.

En primer lugar, se realizó un análisis de difracción de rayos X (DRX) de la muestra de SeO_2 comercial empleada en la preparación de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$, observándose un pico de difracción asignado a SeO_2 y a ácido selenioso (H_2SeO_3) (Figura 37a). Ambas especies generalmente coexisten, ya que la hidratación del óxido conduce al ácido. En cuanto al DRX de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ (Figura 37b), se observó un pico ancho, el cual, de acuerdo con lo reportado en la bibliografía, corresponde a SiO_2 [186]. Por otra parte, no se detectaron picos correspondientes a especies de selenio, probablemente debido a que dichas especies podrían estar muy dispersas sobre el soporte.

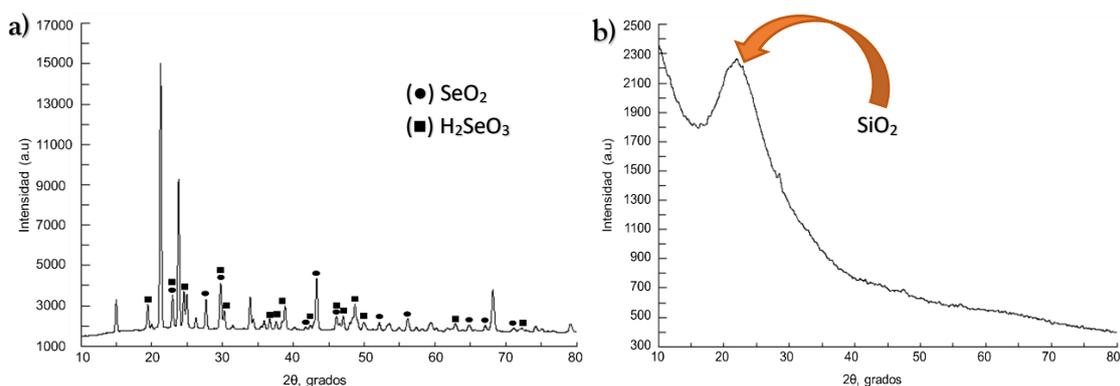
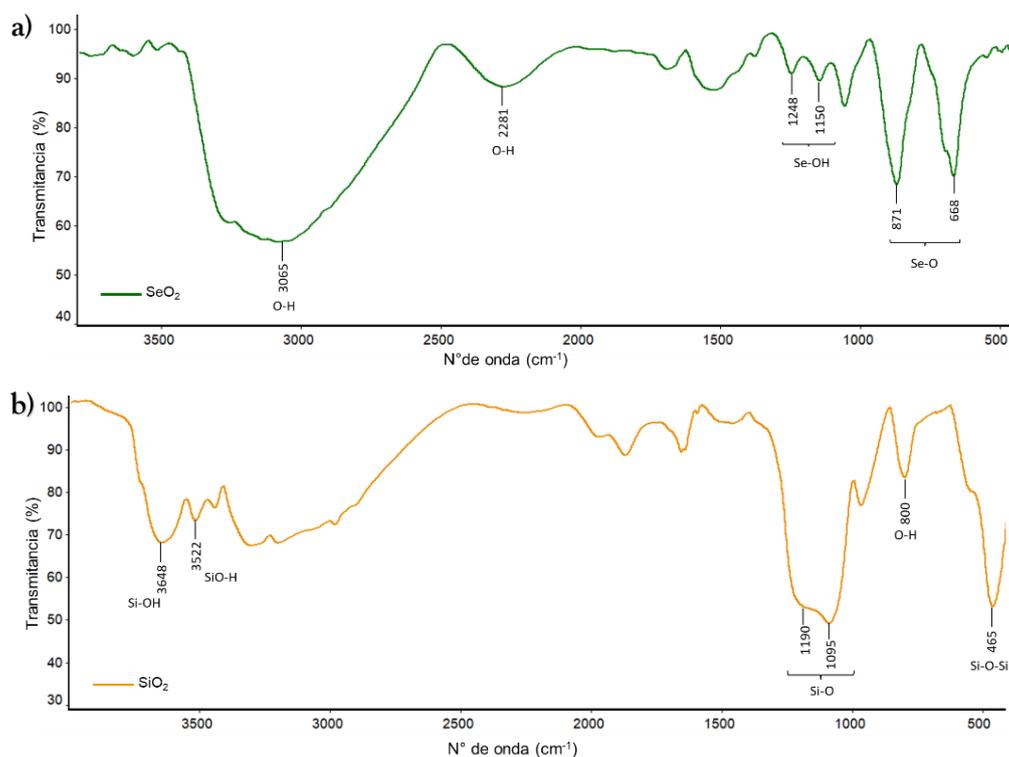


Figura 37. Patrones DRX de: a) SeO_2 y, b) $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$.

Los espectros FTIR correspondientes a SeO_2 y a SiO_2 coinciden con lo reportado en bibliografía [186,187]. Para el caso de SeO_2 (Figura 38a), se observaron bandas a 871 y 668 cm^{-1} , que se deben al estiramiento de Se-O, mientras que las de 1248 y 1150 cm^{-1} se asignan a la interacción Se-OH [187]. Por otro lado, el espectro FTIR correspondiente a SiO_2 mostró varias bandas (Figura 38b), siendo las más relevantes las correspondientes al estiramiento Si-O, ubicadas a 1190 y 1095 cm^{-1} [186]. Estas dos bandas se ven desplazadas (1193 y 1118 cm^{-1}) y su intensidad relativa se encuentra modificada en el espectro FTIR de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$, fenómenos que pueden deberse a la alta interacción entre ambos óxidos (Figura 38c). Además, para la muestra de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ se observaron las bandas de 894 y 671 cm^{-1} , que son características de las especies de SeO_2 .



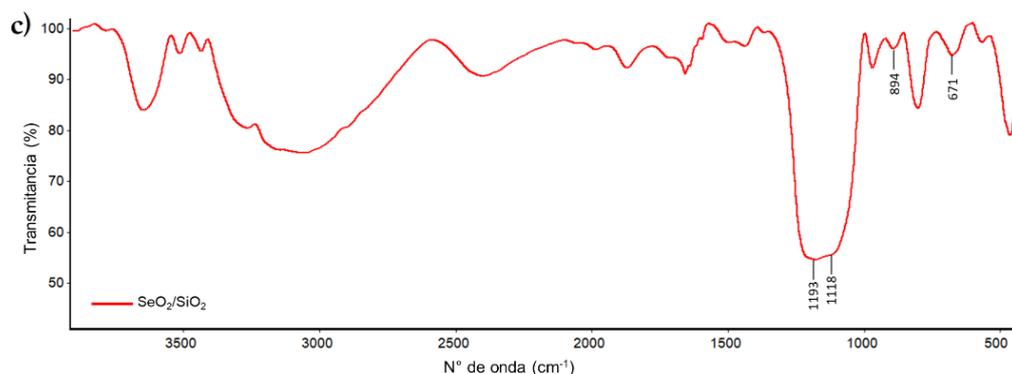


Figura 38. Espectros FTIR de: a) SeO₂, b) SiO₂ y, c) SeO₂/SiO₂.

Por último, se realizó la caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de la muestra SeO₂/SiO₂, no siendo posible diferenciar el soporte del SeO₂ dadas las similares densidades electrónicas que presentan ambos óxidos, lo que conlleva a un bajo contraste (Figura 39).

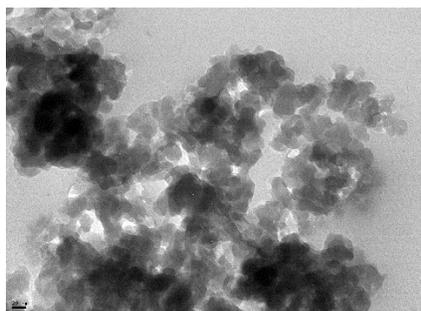


Figura 39. Imagen MET de SeO₂/SiO₂.

III.5.3.2 Oxidación alílica de α -pineno mediante la utilización del sistema SeO₂/SiO₂

Una vez finalizada la caracterización de SeO₂/SiO₂, se llevó a cabo la reacción de oxidación de α -pineno mediante la utilización de dicho sistema. Para ello, se utilizó el mismo reactor y se emplearon las mismas condiciones Batch ya descritas anteriormente. De esta forma, a una solución de α -pineno en EtOH (0,1M) se agregaron 400 mg de SeO₂/SiO₂, y se programó a 6 atm de presión de O₂, y 134 °C de temperatura. A través del monitoreo de la reacción mediante CG-EM, los resultados observados no fueron los esperados, ya que prácticamente no se logró conversión (3%), incluso después de 18 h. El motivo de este resultado se puede deber a que las especies activas de selenio, se encuentran diluidas por el soporte, y esto da como resultado una cantidad de fase activa insuficiente. Si bien sería lógico pensar en el agregado de una mayor cantidad de SeO₂ al soporte, esto no sería conveniente debido a la toxicidad del reactivo, y a que la relación SeO₂/ α -pineno resultante se acercaría a la relación

utilizada en la metodología convencional, lo cual se escaparía de los objetivos propuestos. Por tal motivo, la estrategia llevada a cabo, fue la introducción de una cantidad de Pd (1%), al sistema $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$, dado que se trata de un metal oxidante por excelencia. La incorporación de este metal dio como resultado un nuevo sistema binario heterogéneo, denominado Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$.

III.5.3.3 Síntesis y caracterización del catalizador Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$

Para la preparación de Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ se añadió una solución de Pd(acac)₂ en tolueno a una muestra de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ y se siguió el mismo método descrito más arriba para la preparación de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ (Sección *III.5.3.1*, pág. 61). Posteriormente, se midió el contenido de SeO_2 para este catalizador mediante ICP, el cual resultó ser de 14,4% p/p, mientras que el contenido de Pd fue cuantificado mediante espectroscopía de absorción atómica (EAA), dando una carga del metal de 0,98% p/p. Cabe destacar que las cargas de Pd y de SeO_2 son muy cercanas a los valores objetivo, por lo que el método de preparación se considera adecuado.

Para la caracterización de Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$, se utilizaron las mismas técnicas que para $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$. En este apartado, se hace mención a una muestra de Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ nuevo y a otra muestra del catalizador recuperado luego de la prueba catalítica. De todas maneras, más adelante se hará una breve discusión con respecto a Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ recuperado, así como el procedimiento llevado a cabo para su recupero.

El patrón de DRX obtenido para Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ nuevo resultó similar al de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$, aunque no se detectaron las señales correspondientes a Pd o a óxido de Pd. Esto, probablemente se deba a la alta dispersión de partículas de Pd desarrollada en esta muestra. Por el contrario, para la muestra de Pd/ $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ recuperado, se observaron señales de Pd metálico a 39,5 y 47,3 grados de $2\theta^\circ$, y a óxido de paladio a 28,6 grados de $2\theta^\circ$ (Figura 40), esto puede deberse a que las especies de Pd se encuentran muy dispersas en el catalizador nuevo y que, luego de la oxidación en fase líquida, se produzca una sinterización de las partículas del metal noble, dando lugar a partículas de Pd más grandes, responsables de los picos observados.

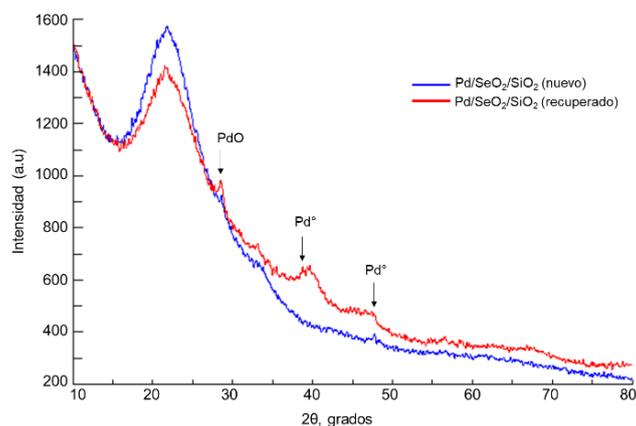


Figura 40. Patrones DRX de Pd/SeO₂/SiO₂ nuevo y Pd/SeO₂/SiO₂ recuperado.

Por otro lado, el espectro FTIR para el catalizador Pd/SeO₂/SiO₂ nuevo mostró un resultado similar al del catalizador SeO₂/SiO₂, mientras que no se detectaron diferencias entre el catalizador nuevo y el recuperado (Figura 41).

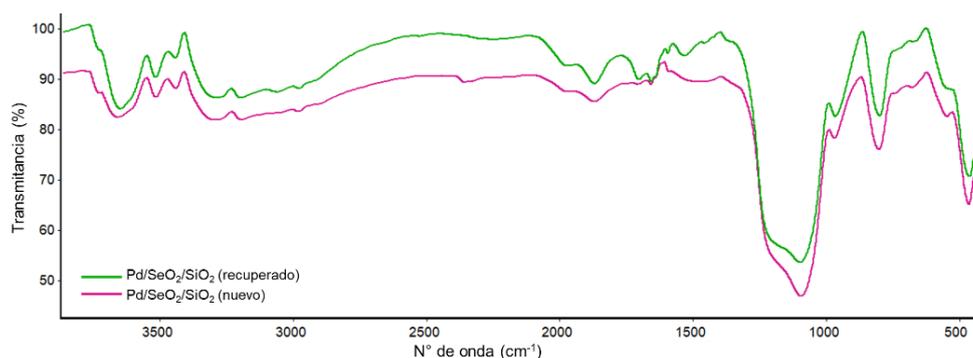


Figura 41. Espectros FTIR de Pd/SeO₂/SiO₂ nuevo y Pd/SeO₂/SiO₂ recuperado.

Cabe resaltar que el hecho de no haber detectado bandas correspondientes a los grupos C-H, C=O o C-OH sobre el espectro de la muestra recuperada, podría indicar que no se estaría produciendo una adsorción irreversible de reactivos, intermediarios o productos sobre el catalizador durante la reacción. Esto es importante, ya que en catalizadores metálicos soportados utilizados para reacciones en fase líquida que involucran aldehídos, alcoholes y ácidos, se han detectado bandas de adsorción asociadas a moléculas orgánicas, que se vinculan con fenómenos de desactivación del catalizador [188].

Por último, el análisis MET realizado tanto para Pd/SeO₂/SiO₂ nuevo como para el recuperado, determinó que las partículas de Pd del catalizador nuevo presentan un tamaño promedio (\bar{d}) de 2,9 nm, mientras que las que corresponden al catalizador recuperado, presentan dimensiones de 3,5 nm (Figura 42). A partir de estas observaciones, se define que en

las condiciones de reacción se produce un sinterizado de las partículas de metal noble, modificación morfológica que conduce a un aumento del tamaño las mismas.

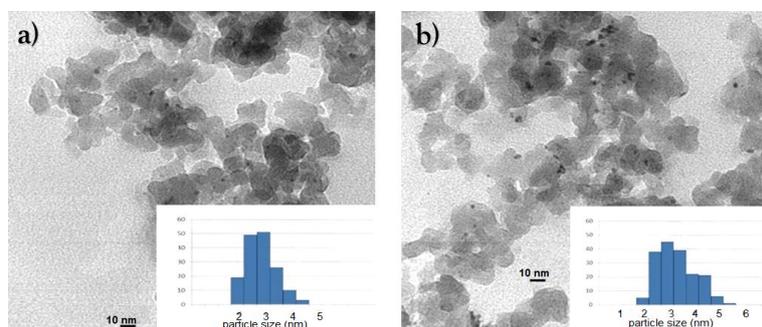


Figura 42. Imágenes MET de: a) Pd/SeO₂/SiO₂ nuevo y, b) Pd/SeO₂/SiO₂ recuperado.

III.5.3.4 Oxidación alílica de α -pineno mediante la utilización del catalizador Pd/SeO₂/SiO₂

Se llevó a cabo la reacción de oxidación de α -pineno mediante la metodología catalítica con la utilización del nuevo sistema binario. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para el caso del SeO₂/SiO₂ descritas más arriba. Los resultados obtenidos determinaron que la introducción de Pd al catalizador SeO₂/SiO₂ fue bastante efectiva, convirtiendo al catalizador resultante, en uno mucho más activo que el sistema libre de Pd. En la Tabla 4 y en la Figura 43 se puede apreciar que a las 15 h de reacción se alcanzó un nivel de conversión del 23% (entrada 4, Tabla 4), con una selectividad relativamente alta para AL (76%), siendo OL el otro producto. Asimismo, es importante señalar que no se detectó ningún otro co-producto.

Tabla 4. Oxidación alílica de α -pineno sobre Pd/SeO₂/SiO₂ mediante metodología catalítica.^a

Entrada	Tiempo (h)	Conversión ^b (%)	Selectividad mirtenol (%)	Selectividad mirtenol (%)
1	2	5	58	42
2	5	16	38	62
3	8	18	30	70
4	15	23	24	76

^a Condiciones de reacción: α -pineno en 35 mL de EtOH (0,1 M), 400 mg Pd/SeO₂/SiO₂, 134 °C, 6 atm de O₂. ^b Conversión de α -pineno.

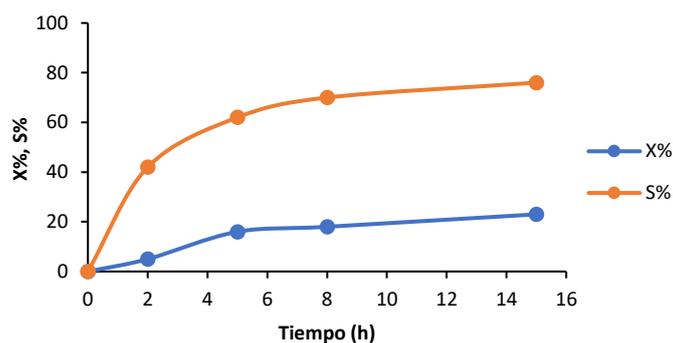


Figura 43. Porcentaje de conversión (X%) y selectividad (S%) hacia AL, en la oxidación alílica de α -pineno sobre Pd/SeO₂/SiO₂.

Es importante señalar que si bien, la conversión para esta reacción fue menor a la obtenida en la metodología tradicional (entrada 5, Tabla 2, pág. 58), la relación entre α -pineno/SeO₂ es mucho menor en la metodología catalítica como es de esperar (1:0,14 vs 1:2,5). Por otra parte, la selectividad relativamente alta hacia AL que se logra con el catalizador de Pd/SeO₂/SiO₂, resulta sumamente interesante, dado que en reportes previos sobre reacciones de oxidación alílica llevadas a cabo con catalizadores basados en Pd (o cualquier otro metal noble), indican que los principales productos de la oxidación alílica de α -pineno son verbenona y verbenol, detectándose, a su vez, epóxido de α -pineno [182-184].

Una posible interpretación de estos resultados sugiere que la oxidación llevada a cabo sobre Pd/SeO₂/SiO₂ probablemente esté gobernada por especies de selenio, lo que conduce a la oxidación alílica en la posición α del carbono más sustituido del doble enlace [174,175], permitiendo obtener el producto de oxidación de interés (AL), mientras que el Pd desempeñaría un papel “promotor” sobre el SeO₂. Con el fin de corroborar esta hipótesis, se llevó a cabo un análisis de la reducibilidad de los catalizadores a través de ensayos de reducción a temperatura programada (RTP), mediante el cual se mide la cantidad de especies reducibles en la muestra analizada. En el perfil del sistema SeO₂/SiO₂ (Figura 44a), se detecta un pico de consumo con un máximo a 290 °C, que sería debido a la reducción del SeO₂. Por otro lado, en el catalizador binario Pd/SeO₂/SiO₂ la temperatura de reducción es notablemente inferior (Figura 44b), mostrando un pico de reducción con un máximo a 270 °C. Esto demuestra un cambio en el patrón de reducción del SeO₂ soportado luego de la introducción del metal noble (Figura 44b), debido a que el Pd modifica fuertemente el carácter redox del SeO₂. En este sentido, se propone que el Pd jugaría un papel promotor sobre el SeO₂, originado a partir de una elevada interacción que modifica la reducibilidad de este último. Así, una vez finalizado

un ciclo de oxidación del monoterpeno, el Pd cataliza la oxidación de las especies reducidas del selenio, cerrando dicho ciclo. A su vez, si el rol de Pd como fase activa prevaleciera sobre el SeO_2 , se debería producir verbenona y verbenol, como fue observado para los catalizadores basados en metales nobles [182-184].

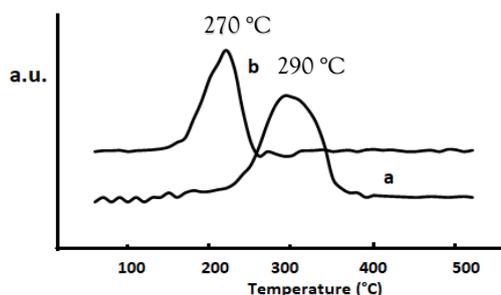


Figura 44. Perfiles RTP de: a) $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ y, b) $\text{Pd}/\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$.

A continuación, se detallan algunos comentarios sobre la reutilización del sistema $\text{Pd}/\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$. Una vez concluida la reacción de oxidación de α -pineno, el catalizador se retiró del reactor, se lavó con EtOH, se secó a 70 °C y se realizó una nueva prueba catalítica. La actividad de este catalizador luego de 8 h de reacción, fue casi la misma que la del catalizador nuevo (12% de conversión *vs.* 18%), lo que demuestra que se puede lograr la reutilización del mismo. Las modificaciones morfológicas observadas por MET para el catalizador recuperado, que se refieren a un mayor tamaño de partícula de Pd comparadas con el catalizador nuevo (Figura 42), no parecen ejercer efectos significativos sobre las propiedades catalíticas de $\text{Pd}/\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$.

Se calculó la dispersión metálica, D , para ambos catalizadores, nuevo y recuperado, a partir del valor d de cada muestra (obtenidos más arriba a través de MET). El parámetro D es adimensional y representa la relación entre átomos superficiales de Pd y átomos totales en el catalizador. Mediante la fórmula descripta por Scholten y col. (1985) (Ecuación 1) se calculó D , obteniéndose un valor de 0,3 para el catalizador recuperado y 0,4 para el catalizador nuevo, lo cual no representa una diferencia significativa [189].

$$D\% = 102,3 \times 1/d$$

Ecuación 1. Fórmula utilizada para el cálculo de $D\%$, a partir de d (nm).

Por otra parte, los valores de dispersión obtenidos fueron utilizados para el cálculo de actividad específica (TOF) para cada uno de los catalizadores. Los valores obtenidos de TOF

tampoco fueron muy diferentes, siendo de $5,24 \text{ h}^{-1}$ para el catalizador nuevo y $4,65 \text{ h}^{-1}$ para el catalizador recuperado. Por lo tanto, se establece que el sistema $\text{Pd}/\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ puede recuperarse y reutilizarse.

III.5.3.5 Oxidación alílica de lupeol mediante la utilización del catalizador $\text{Pd}/\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$

Teniendo en cuenta estos resultados, se llevó a cabo un ensayo sobre lupeol, utilizando el catalizador $\text{Pd}/\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$. Para ello se preparó una solución de **1** en EtOH (0,67 M) y se le agregaron 2,55 mg del catalizador bajo las mismas condiciones de reacción estudiadas (Tabla 4). Luego de 15 h de reacción, el bruto fue analizado mediante espectroscopía RMN de ^1H a través de la cual se determinó el porcentaje de conversión, que resultó ser de un 79%. A su vez, se pudo analizar la selectividad hacia los productos obtenidos, la cual fue de 95% hacia el alcohol alílico, y de 5% hacia el aldehído α,β -insaturado **5**. A partir de estos resultados, se determinó que si bien la conversión fue elevada, la selectividad hacia la obtención del compuesto de interés fue muy baja. Con el fin de comparar esta metodología con la técnica convencional de oxidación alílica de **1**, en la Figura 45 se detallan algunos parámetros obtenidos para cada método.

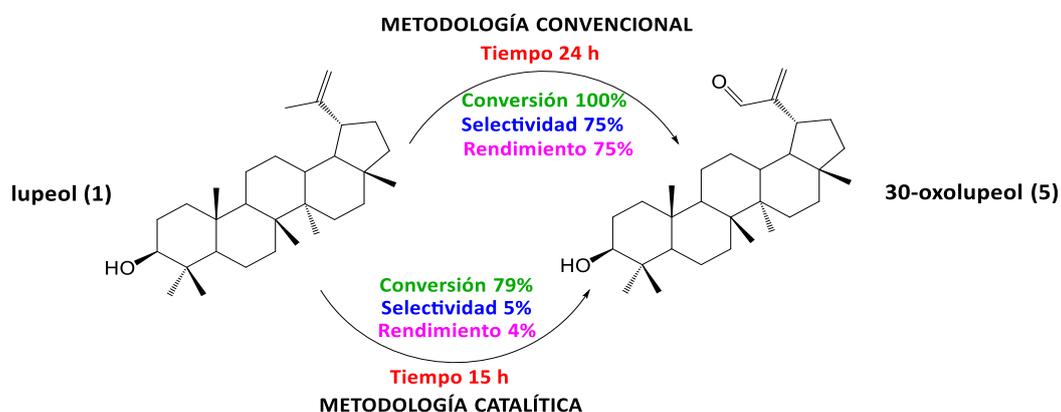


Figura 45. Comparación de las metodologías utilizadas para la oxidación alílica de lupeol.

El análisis de los resultados obtenidos tanto para la oxidación alílica de α -pineno como para lupeol, indica que la metodología catalítica arrojó una serie de ventajas, tales como buenos niveles de conversión, selectividad similar a la observada para la metodología tradicional (para el caso de α -pineno), un catalizador novedoso que resultó ser activo, reutilizable y de fácil recuperación, utilización de menores cantidades de SeO_2 , nula generación de compuestos tóxicos para el medio ambiente, utilización de un solvente inocuo, así como también el oxígeno

utilizado en las condiciones Batch. A su vez, cabe destacar que no fue necesaria la utilización de co-catalizadores como tBuOOH, como fue reportado para la oxidación alílica de α -pineno con catalizadores heterogéneos. Estas ventajas, se encuentran alineadas con los principios 1, 2, 5, 7 y 9 de la Química Verde [190]. Sin embargo, para llevar a cabo la oxidación alílica de lupeol, la sustitución de la metodología convencional por la catalítica, bajo estas condiciones, no podría efectuarse, principalmente debido a que no se lograron obtener buenos rendimientos hacia el producto de interés (**5**), los tiempos de reacción resultaron ser elevados, y la conversión resultó menor a la observada para la metodología clásica. A partir de estos resultados, para la obtención de **5**, será utilizada la metodología de oxidación alílica convencional.

Para trabajos futuros, resulta interesante optimizar ciertos parámetros de reacción o del catalizador, ya sea modificando las cargas utilizadas de cada agente oxidante (Pd o SeO₂), o de ambos; agregando otros metales oxidantes al sistema SeO₂/SiO₂; y/o variando el solvente, entre otras. De esta manera, se optimizaría la técnica, la cual podría ser aplicada a oxidaciones alílicas de numerosas estructuras orgánicas, bajo el marco de los Principios de la Química Verde.

III.5.4 Oxidación alílica de la mezcla triterpénica monohidroxilada mediante la metodología convencional

Considerando los resultados obtenidos para la metodología catalítica con respecto a la oxidación de **1**, y con el fin de obtener **5** para su utilización en la síntesis de derivados bioactivos, se decidió llevar a cabo la reacción de oxidación alílica mediante la metodología convencional, como se comentó más arriba.

Como se vio anteriormente, la oxidación alílica convencional de lupeol (**1**) dio buenos rendimientos en la obtención del bloque de construcción **5** (Sección III.5.1, pág. 54). Sin embargo, hay que considerar que la purificación de **1** es un procedimiento que se realiza en varias etapas. Considerando la selectividad del SeO₂, mencionada en la Sección III.5.1, se propuso llevar a cabo la reacción de oxidación alílica de la mezcla triterpénica **F1** (obtenida en la Sección III.3, pág. 47), como estrategia para la obtención y aislamiento de **5**. Así, se esperaba que los triterpenos más reactivos sean **1**, **2** y **4** (Figura 46).

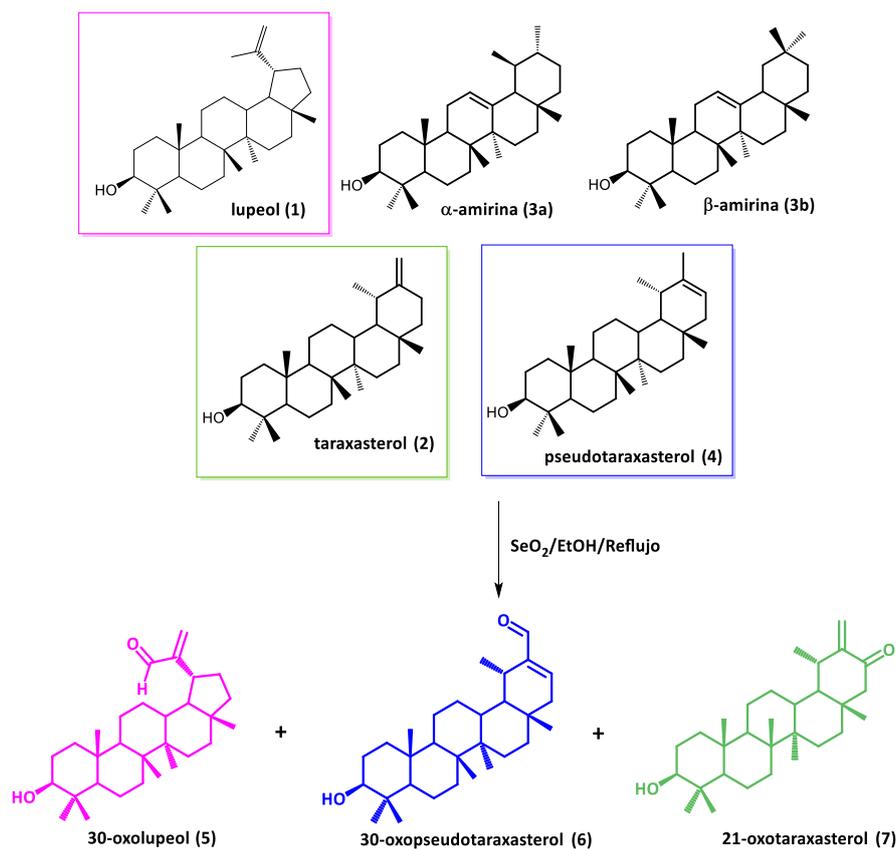
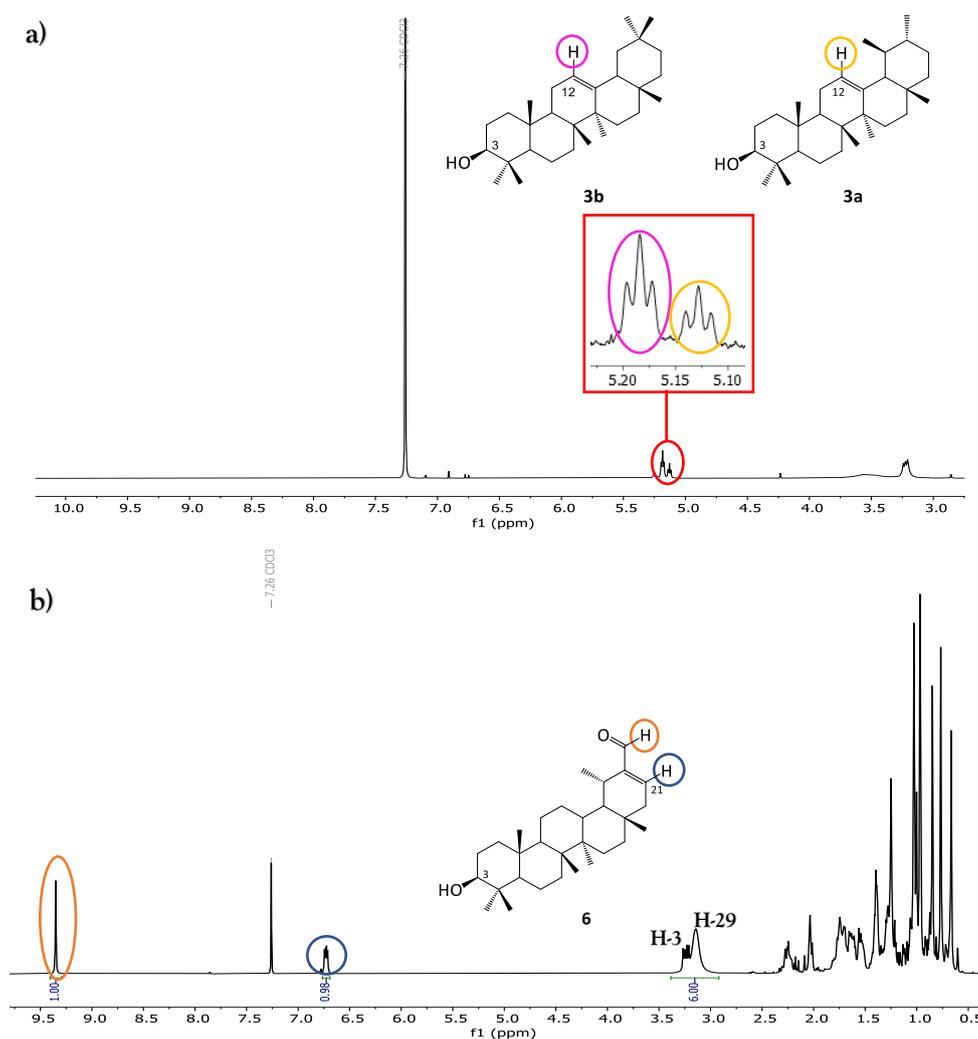


Figura 46. Selectividad de SeO_2 frente a la mezcla de triterpenos monohidroxilados F1.

Teniendo en cuenta lo mencionado, se hizo reaccionar **F1** (1 eq) con SeO_2 (2,5 eq) y calentamiento a reflujo en EtOH, para lograr la obtención del compuesto **5** (Figura 46). El monitoreo de la reacción mediante CCF y la comparación con un testigo de **5** y de **F1**, mostró 3 manchas mayoritarias a las 24 h de reacción. De estas tres, la de mayor R_f ($R_f = 0,57$), coincidió con el testigo **F1**, presentando una coloración fucsia permanente durante su revelado con calor, y resultó similar al color de revelado de **3a** y **3b** (Sección III.4.2, Figura 27, pág. 50). Por otro lado, de las dos manchas inferiores, ($R_f = 0,42$ y $0,35$), la de menor R_f fue la más intensa, y coincidió con el testigo de **5**. A través del análisis de RMN de ^1H del bruto de reacción, se observaron las señales pertenecientes a los protones vinílicos de los triterpenos **3a** y **3b**, lo cual demuestra, como se apreció a través de CCF, que estos triterpenos no reaccionaron. Esto puede deberse a que las amirinas presentan impedimento estérico en la zona del doble enlace que dificulta su reacción del SeO_2 , y por tal motivo las hace menos reactivas. A su vez, las señales de los protones vinílicos correspondientes a **1** y **4** se vieron desplazadas a campos menores. Estas señales podrían corresponderse con los productos de oxidación alílica de **1** y **4**, teniendo en cuenta, además, la presencia de dos singuletes, con una relación 9:1, en la zona de 9-10 ppm, característicos de protones de aldehídos. En cuanto al triterpeno **2**, no se observó la señal

correspondiente a los protones vinílicos ubicada a 4,60 ppm, por lo que se puede pensar que el mismo se oxidó al producto correspondiente (7), aunque, debido a su baja abundancia, no pudo ser identificado en el espectro.

Posteriormente se llevó a cabo la purificación de este bruto de reacción por CC con sílica flash y mezclas de Hex:AcOEt de polaridad creciente, de la cual se obtuvieron tres fracciones (F_A , F_B , F_C). El análisis espectroscópico de cada una de ellas, determinó que F_A corresponde a la mezcla de α - y β -amirinas (**3a** y **3b**) (Figura 47a); F_B al aldehído α,β -insaturado, producto de oxidación de **4**, esto es, a 30-oxopseudotaraxasterol (**6**) (Figura 47b), el cual se trataba del compuesto de $R_f = 0,42$. Por último, F_C corresponde una mezcla de dos aldehídos α,β -insaturados. El espectro de RMN de 1H de esta mezcla fue analizado y comparado con los espectros RMN de 1H de **5** (Sección III.5.1, pág. 54) y de F_B . A partir de estos datos, se confirmó que los compuestos presentes en F_C , se tratan de los productos de oxidación alílica de lupeol (**1**) y pseudotaraxasterol (**4**), identificados como **5** y **6** respectivamente, siendo **5** el mayoritario (90%) (Figura 47c).



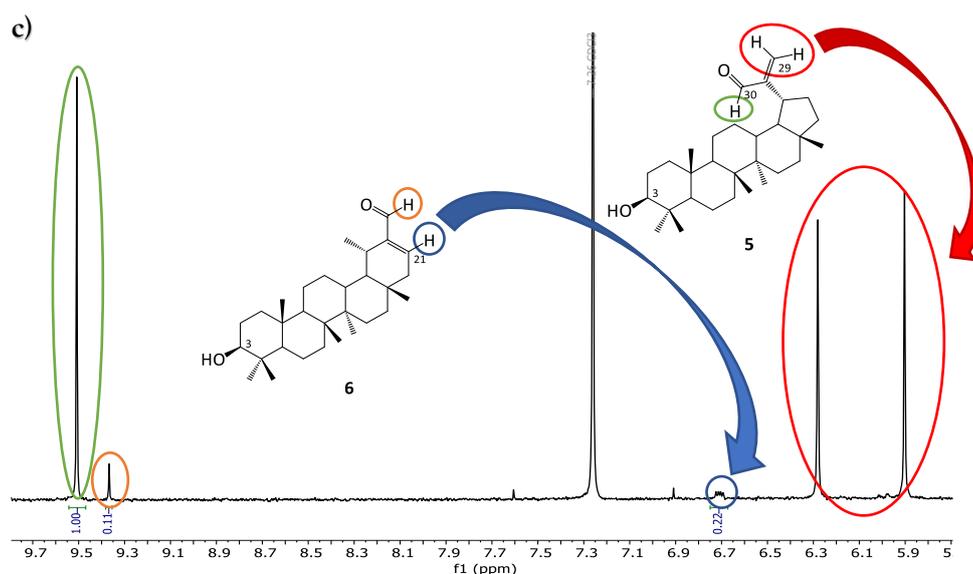


Figura 47. a) Sección del espectro RMN de ^1H de F_A (mezcla de amirinas), b) Espectro RMN de ^1H de F_B (compuesto **6**), y c) Sección del espectro RMN de ^1H de F_C (mezcla de **5** y **6**).

Luego de la identificación de **5** en F_C , se llevó a cabo la purificación del mismo. Considerando que la separación de **5** y **6** no pudo lograrse con efectividad mediante la cromatografía del bruto de reacción debido a que poseen R_f muy cercanos (R_f **5** = 0,35; R_f **6** = 0,42) (Figura 48), y teniendo en cuenta los resultados del aislamiento de **1** a través de la cromatografía con sílica impregnada con AgNO_3 , se llevó a cabo la purificación de **5** mediante dicha técnica.



Figura 48. CCF de **5** y F_C revelada con *p*-anisaldehído y calor.

Para ello, se siguió el mismo procedimiento que el descrito para **1** (Sección III.4.2). Se sembraron 60 mg de F_C que, como se dijo anteriormente, corresponde a la mezcla de **5** y **6**, en relación 9:1, respectivamente. Se colectaron 40 fracciones de 5 mL cada una, que fueron agrupadas en dos grupos (F_D y F_E), según el perfil de CCF. Por un lado, F_D mostró una sola mancha de R_f = 0,35, correspondiente al compuesto **5**, mientras que, para F_E , se observaron ambas manchas (R_f = 0,35 y 0,42). Mediante los espectros RMN de ^1H y ^{13}C de F_D se confirmó

las señales pertenecientes al compuesto **5**, que estuvieron de acuerdo con las asignadas en la Sección III.5.1. De esta forma el compuesto **5** fue obtenido puro con un 67%. Este rendimiento resulta similar al obtenido a partir de la reacción de oxidación alílica de lupeol puro (70%, Sección III.5.1, pág. 54), y a su vez, superior al informado por la mayoría de los autores citados más arriba (Urban 52%, Barroso-González 30,4%, Gutiérrez-Nicolás 45%).

A partir de este resultado, surge la comparación entre las dos posibles vías a seguir para la obtención y purificación de **5**, teniendo en cuenta que se parte de la mezcla triterpénica monohidroxilada (**F1**) en ambos casos: **a)** aislamiento de lupeol a partir de la mezcla triterpénica **F1**, oxidación alílica y posterior purificación de **5**; o **b)** oxidación alílica de la mezcla triterpénica **F1**, y posterior purificación de **5** en dos etapas. Analizando los rendimientos para cada paso, se calculó el rendimiento global de obtención de **5** puro para ambas vías, obteniéndose un rendimiento mayor para la vía **b)** (40% vs. 24%) (Figura 49).

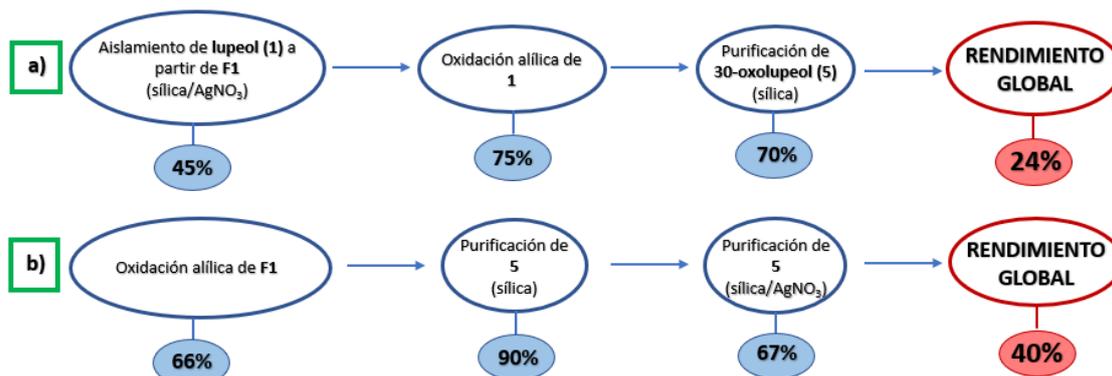


Figura 49. Rendimientos parciales y globales de las vías a) y b), para la obtención de **5** puro.

De la misma manera, para la técnica de purificación de **1** y **5** con AgNO₃, podemos encontrar ciertas diferencias, las cuales se analizan a continuación. El rendimiento obtenido en la purificación de **5** resultó ser mayor que el obtenido en la purificación de **1** con dicha técnica (67% vs. 45%). Asimismo, cabe destacar que la cromatografía llevada a cabo para la purificación de **5** resultó ser más rápida y más sencilla, que la llevada a cabo para la purificación de **1**. Esto se debe, en primer lugar, a que los valores de R_f de **5** y **6** presentan una cierta diferencia (0,35 vs. 0,42); por el contrario, para el caso de **1**, todos los triterpenos que conforman la mezcla poseen el mismo R_f (0,57). Por esto último, la elución de los compuestos **1-4** tuvo que llevarse a cabo de manera más cuidadosa. En segundo lugar, se debe al orden de elución de los compuestos, es decir, el compuesto **5** eluye en primer lugar, mientras que **1** es el último en

eluir. Finalmente, si bien para ambas cromatografías se utilizó CHCl_3 como FM, para el caso del aislamiento de **5**, se consumió aproximadamente un 10% menos de solvente (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación entre purificación de **1** y de **5** mediante CC con sílica gel impregnada con AgNO_3 (10%), para 60 mg de muestra sembrada.

Compuesto	Rendimiento (%)	Solvente consumido (mL)	Solvente recuperado (mL)	Orden de elución	Tiempo
1	45	420	150	Último	Mayor
5	67	375	135	Primero	Menor

A partir de estos resultados, se determina que la oxidación alílica de la mezcla triterpénica monohidroxilada a través de la metodología convencional y posterior purificación, es el método más conveniente para la obtención del bloque de construcción **5**, debido a las diversas ventajas que presenta en cuanto a la rapidez y sencillez con la que se logra. Este compuesto, será utilizado en reacciones posteriores para la obtención de nuevos derivados bioactivos.

III.6 CONCLUSIONES

Se obtuvo el subextracto hexánico (**SH**), a partir del extracto etanólico (**EE**) de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea*, el cual permitió el aislamiento de una mezcla de triterpenos monohidroxilados (**F1**) mediante cromatografías más limpias, y la utilización de menores cantidades de FM y FE.

Se logró aislar lupeol (**1**) mediante la técnica de CC con sílica gel impregnada con AgNO_3 , a partir de la mezcla de triterpenos monohidroxilados (**F1**), con un 45% de rendimiento, sobre el total de la muestra sembrada.

Con el fin de obtener el bloque de construcción **5** a partir de **1**, para su posterior uso en la síntesis de análogos triterpénicos, se propuso la optimización de la reacción de oxidación alílica mediante la metodología catalítica. Para ello, se sintetizó un catalizador heterogéneo novedoso, $\text{Pd/SeO}_2/\text{SiO}_2$ utilizando bajas cargas de SeO_2 .

El uso de este sistema binario catalítico para la oxidación alílica del monoterpeno α -pineno, utilizado como molécula modelo, dio buenos rendimientos. Sin embargo, para el triterpeno de interés **1**, los rendimientos fueron bajos, los tiempos de reacción elevados, y la conversión fue menor que con la metodología tradicional. Por tal motivo, la sustitución de la metodología convencional por la catalítica, para la oxidación alílica de lupeol, no pudo llevarse a cabo.

El uso del sistema catalítico binario, Pd/SeO₂/SiO₂, presentó una serie de ventajas las cuales se encuentran alineadas a varios Principios de la Química Verde: permitió prescindir del uso de co-catalizadores, no se observó la generación de especies tóxicas en la reacción, posibilitó el uso de solventes inocuos y resultó ser de fácil recupero y reutilizable.

Teniendo en cuenta estos resultados, y la selectividad del SeO₂, utilizado como agente oxidante, el bloque de construcción **5** se obtuvo a través de la oxidación alílica convencional a partir de la mezcla de triterpenos (**F1**), y posterior purificación en dos etapas, con buenos rendimientos.

Esta parte del trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- ❖ Castro, M. J.; Musso, F.; Vetere, V.; Faraoni, M. B. Novel Access to epilupeol through chemoselective hydrogenation of lupenone using platinum-based organotin catalysts. *Journal of Organometallic Chemistry*. **2019**, 880, 333-340.
- ❖ Musso, F. A.; Gutiérrez, V.; Volpe, M. A.; Faraoni, M. B. Allylic oxidation of α -pinene over supported SeO₂-based catalysts. *Latin American Applied Research*, **2022**. Aceptada.

PARTE B:

Síntesis de análogos a partir del bloque de construcción 30-oxolupeol y evaluación de la actividad biológica

III.7 SINTESIS DE ANÁLOGOS TRITERPÉNICOS BIOACTIVOS

Continuando bajo el marco del objetivo general de esta tesis, el cual se basa en el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas a partir de especies vegetales endémicas, se propone la síntesis de una serie de derivados triterpénicos a partir del bloque de construcción 30-oxolupeol (**5**), obtenido a través de la oxidación alílica de lupeol (**1**). Teniendo en cuenta la reactividad que poseen los sistemas carbonílicos α,β -insaturados y los reportes hallados en bibliografía, a continuación se describen las modificaciones químicas realizadas sobre **5** para la obtención de nuevos análogos triterpénicos bioactivos.

III.7.1 Reacciones de ciclación sobre el sistema carbonílico α,β -insaturado de 30-oxolupeol (**5**)

Dentro de los fármacos más utilizados por el ser humano, se destacan los compuestos que poseen uno o más heterociclos en su estructura, debido a las importantes ventajas que éstos les confieren a las moléculas. Entre ellas, podemos destacar una mayor bioactividad, mejores propiedades farmacológicas, nuevos mecanismos de acción, y un aumento en la estabilidad ante la degradación metabólica, entre otras [191]. A su vez, los derivados heterocíclicos aromáticos suelen tener bandas de absorción significativas cuando son irradiados con luz UV, por lo que se simplifica su detección en muchos estudios *in vivo* y pruebas clínicas posteriores. Todo esto, les confiere a estos derivados un gran potencial para su uso en la práctica farmacéutica [192].

Entre los numerosos análogos triterpénicos bioactivos hallados en la literatura, los derivados que poseen uno o varios anillos heterocíclicos en su esqueleto juegan un papel muy importante. Estos anillos heterocíclicos se caracterizan por poseer uno o más átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, o combinaciones de éstos, y son los principales responsables de brindarles a estos compuestos, sus propiedades bioactivas [192-201]. Muchos de estos compuestos triterpénicos heterocíclicos se han destacado como agentes antitumorales, antiosteoporosis, antiinflamatorios y antileishmaniales, entre otros [202]. Por ejemplo, Wu y col. (2016) sintetizaron una serie de derivados heterocíclicos pirazolínicos e isoxazolínicos a partir del ácido oleanólico (Figura 50), donde se observó que la mayoría de los compuestos obtenidos mostraron una mejor actividad inhibitoria de osteoclastos, uno de los principales responsables de la resorción ósea asociada a la osteoporosis, comparada con el triterpeno de partida. A su vez, se observó que los derivados de pirazol tuvieron mejores actividades inhibitorias que los derivados de isoxazol, especialmente el compuesto **q**, el cual contiene un grupo fenilsulfonilo en el anillo de pirazol (Figura 50) [200].

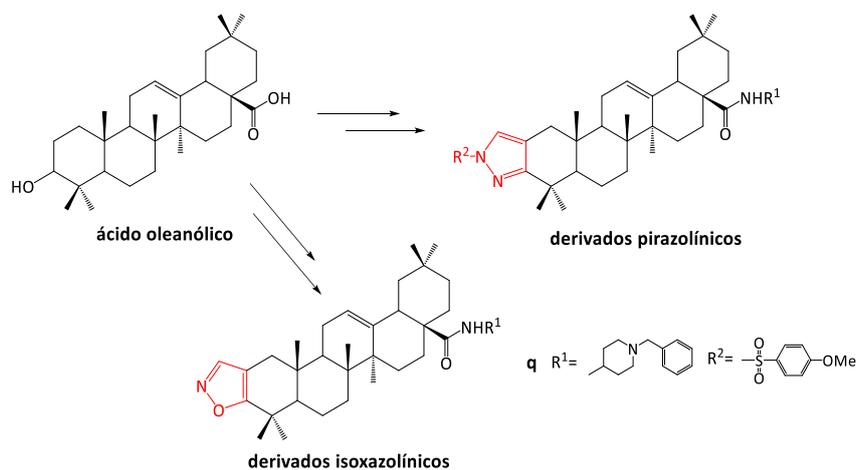


Figura 50. Derivados heterocíclicos bioactivos del ácido oleanólico.

Por otra parte, Haavikko y col. (2014), sintetizaron derivados heterocíclicos a partir de betulina, utilizando como bloque de construcción el ácido betulónico. De los numerosos análogos obtenidos, los compuestos **r** y **s** (Figura 51), mostraron una inhibición significativa del crecimiento del parásito *Leishmania donovani*, principal causante de la leishmaniasis vesical, de los cuales el compuesto **r** resultó ser el más selectivo (Figura 51) [195].

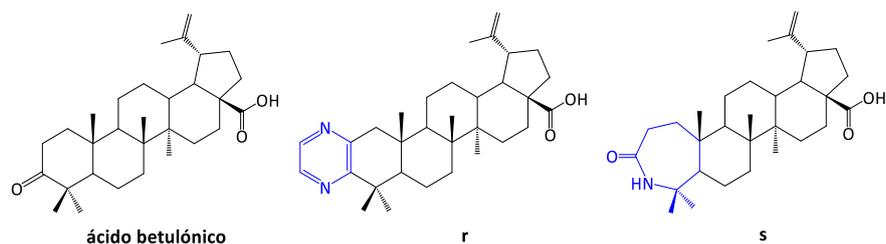


Figura 51. Derivados heterocíclicos bioactivos del ácido betulónico.

Una de las estrategias reportadas para la formación de derivados heterocíclicos de uno o más heteroátomos, es la utilización de sistemas carbonílicos α,β -insaturados como material de partida. Éstos, son un blanco favorable en las reacciones de cicloadición dipolar con diversos reactivos, para dar lugar a una gran variedad de análogos heterocíclicos bioactivos [203]. A continuación, se citan algunos ejemplos en los que se obtienen análogos triterpénicos con grupos heterocíclicos a partir del bloque de construcción **5**. Wal y col. (2010) describen la obtención de una serie de quinolinas sustituidas a partir de **5**, mediante la síntesis de Skraup con anilinas sustituidas. De las quinolinas obtenidas, **t₁** es la que presentó una importante actividad antipalúdica (Figura 52) [204]. Más tarde, Khan y col. (2014) sintetizaron una serie de derivados pirazolinicos *N*-acilados partiendo del bloque de construcción **5**, mediante una ciclación intramolecular entre el sistema carbonílico α,β -insaturado e hidrato de hidrazina, y

posterior tratamiento con diferentes ácidos carboxílicos. Los tres derivados mostrados en la Figura 52, **u**₁-**u**₃, ejercieron importantes efectos antidiabéticos [115,116].

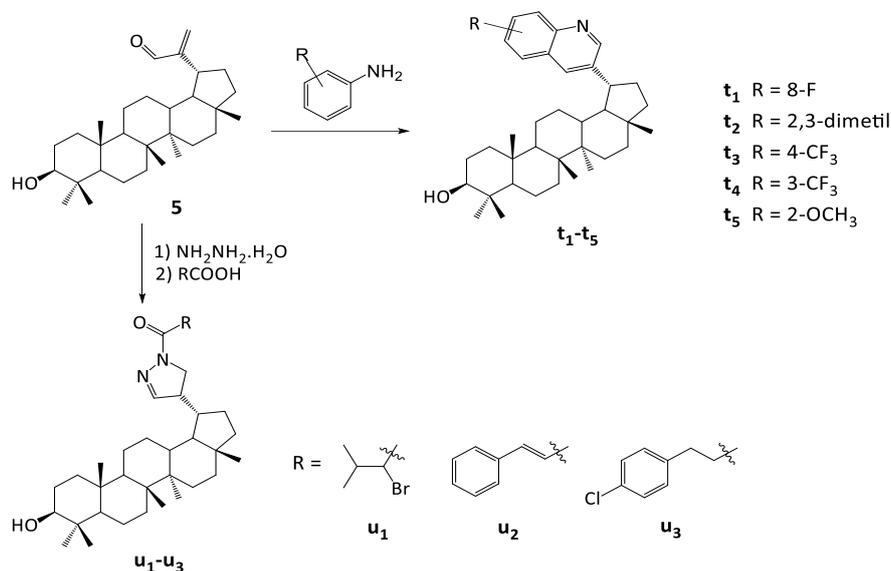


Figura 52. Derivados quinolínicos y pirazolínicos obtenidos a partir de 5.

Inspirados en estos antecedentes y continuando con los objetivos de esta tesis, se propuso la síntesis de pirazolininas triterpénicas *N*-sustituidas a partir del bloque de construcción 5 (Figura 53), siguiendo las condiciones propuestas por Khan y col. (2014).

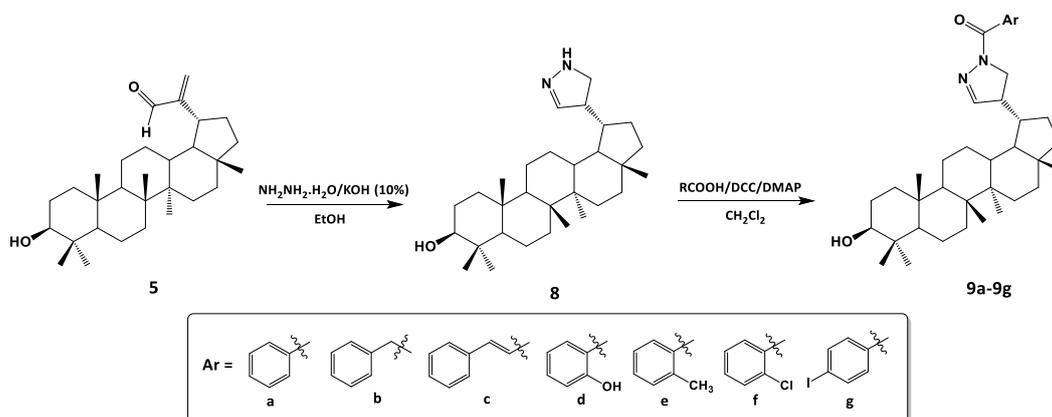


Figura 53. Esquema de síntesis propuesto para la obtención de pirazolininas triterpénicas *N*-sustituidas a partir del bloque de construcción 5.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de la pirazolinina triterpénica **8** (Figura 53). Para ello, a una solución de **5** en EtOH absoluto, se le agregó una solución etanólica de KOH (10%) y posteriormente hidrato de hidrazina (NH₂NH₂.H₂O) (1,1 eq). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h según lo descrito por Khan y col. (2014). La reacción fue

monitoreada por CCF, en la cual se observó la formación de dos productos de menor R_f que 5 ($R_f = 0,18$ y $0,11$), y compuesto de partida sin reaccionar ($R_f = 0,35$). El bruto de reacción fue analizado mediante RMN, y por comparación con lo reportado por dichos autores, no se observaron señales características del producto esperado (8), pero se observaron señales de un producto triterpénico mayoritario, diferente al de partida. Para determinar la estructura de dicho compuesto, se llevó a cabo la purificación del bruto de reacción mediante CC, pudiendo aislar sólo el de mayor R_f ($R_f = 0,18$), correspondiente al compuesto mayoritario (10,5%; $pf = 198-200$ °C). El producto obtenido fue identificado y caracterizado por RMN de 1H y ^{13}C . El espectro RMN de 1H mostró un singulete a 8,07 ppm y dos singuletes a 5,62 y 5,42 ppm, además de las señales correspondientes a los protones del esqueleto triterpénico (Figura 54). Por otra parte, el espectro de ^{13}C , mostró 30 señales, entre las que se encuentran las correspondientes a 163,9 ppm (C-30), 152,7 ppm (C-20) y 122,8 ppm (C-29). Considerando esta información se pensó que se trataba de la hidrazona de 5 (Figura 54), sin embargo, los protones del grupo amino no fueron observados en el RMN de 1H . Si bien se sabe que este tipo de protones muchas veces no se observan por diversos factores, resultó necesario otro análisis para confirmar la estructura.

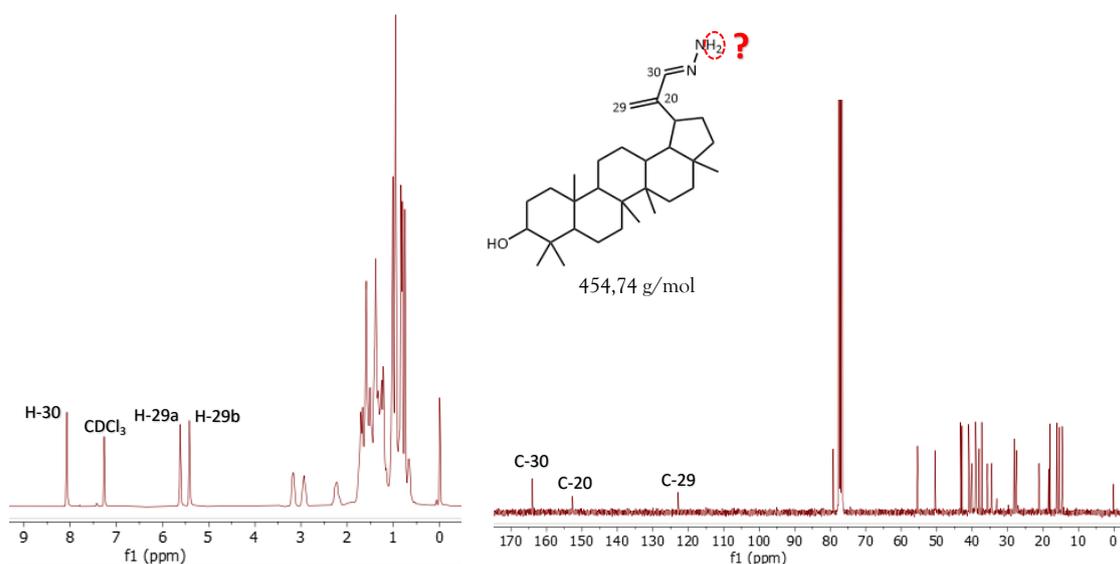


Figura 54. Espectros de 1H y ^{13}C del producto de reacción propuesto.

Para ello, se realizó un masas de alta resolución, observándose un peso molecular de 876,75 g/mol. De esta forma, se determinó que se trataba del dímero de la hidrazona triterpénica (10) (Figura 55). Esta estructura se encuentra de acuerdo con lo observado en los análisis de RMN. Si bien la misma posee 60 carbonos, al tratarse de una molécula simétrica,

solo se observan 30 señales en el RMN de ^{13}C , y 48 para el RMN de ^1H , de los 96 hidrógenos que conforman la molécula.

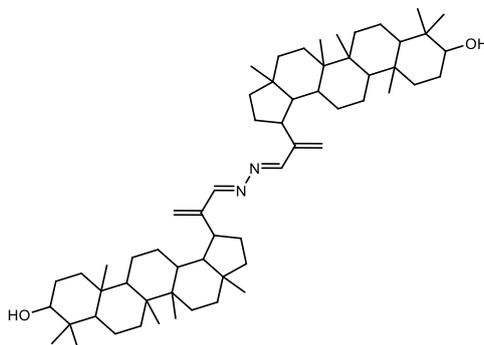


Figura 55. Estructura del dímero 10, obtenido en la reacción de síntesis de pirazolinas.

Teniendo en cuenta estos resultados, y luego de sucesivos intentos de optimizar la reacción mediante la variación de la temperatura, tiempos de reacción, relación molar, entre otras, no se pudo lograr la obtención de la pirazolina 8, obteniéndose, en la mayoría de los casos, el compuesto 10. Analizando el mecanismo de la reacción, se puede explicar la formación de este compuesto, a partir de una de las vías propuestas para la síntesis de pirazolinas, la cual se detalla a continuación (Figura 56) [205].

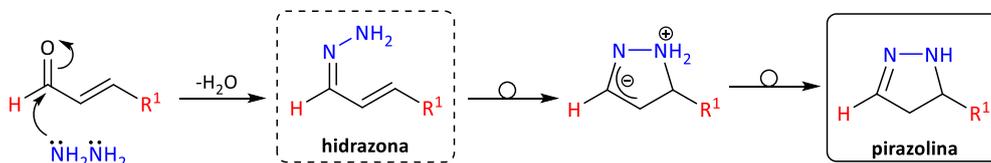


Figura 56. Mecanismo implicado para la formación de pirazolinas.

Para esta vía, se observa, en primer lugar, la formación de la hidrazona, la cual en el paso siguiente se cicla, y forma la pirazolina correspondiente. En nuestro caso, la ciclación de la hidrazona no ocurre, ya que no se observó pirazolina en ninguna de las reacciones llevadas a cabo. A partir de este mecanismo, se propone que la hidrazona de 5 estaría reaccionando con otra molécula del compuesto carbonílico α,β -insaturado (5), a través de un ataque nucleofílico al carbono carbonílico, para dar lugar al dímero 10 (Figura 55). De esta manera se confirmaría la formación de dicho producto.

No obstante, continuando con la propuesta de síntesis de análogos triterpénicos pirazolínicos mostrada en la Figura 53, se investigó nueva bibliografía y se propuso llevar a cabo la síntesis de la pirazolina N-acetilada (11) (Figura 57), en un solo paso, siguiendo las condiciones reportadas por Azarifar y col. (2003) e Insuasty y col. (2011). Teniendo en cuenta

que estos autores informan dicha síntesis mediante el uso de microondas (MW) [206,207], a continuación, se desarrolla una breve introducción sobre esta metodología de síntesis.

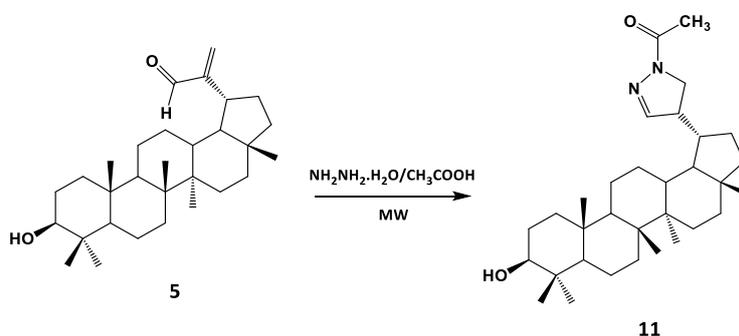


Figura 57. Esquema de síntesis propuesto para la obtención de la pirazolina triterpénica N-acetilada (11), a partir del bloque de construcción 5.

III.7.1.1 Introducción al uso de microondas

La síntesis por microondas (MW) representa un gran avance en la metodología tradicional de síntesis química. Se ha descubierto que el calentamiento por MW es una fuente térmica muy conveniente. La aplicación de la irradiación de MW ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos veinte años. Desde los primeros informes publicados sobre el uso de la irradiación de MW para llevar a cabo transformaciones químicas orgánicas, ya sea para activar o acelerar las reacciones, se han publicado más de seis mil artículos en este campo [208].

El calentamiento por medio de MW alcanza los materiales de forma eficiente (en la mayoría de los casos, solventes) mediante efectos de calentamiento dieléctrico. De esta manera, los materiales altamente dieléctricos, como los solventes orgánicos polares, permiten una fuerte absorción de las MW y, en consecuencia, un calentamiento rápido del medio. Por otro lado, los materiales no polares (transparentes a las MW) muestran solo pequeñas interacciones con este tipo de radiación (transmisión), las MW pasan a través de dichos materiales y esto los convierte en materiales adecuados para la construcción de reactores. Si la superficie del material refleja la radiación de MW, casi no se introduce energía en el sistema [209] (Figura 58).

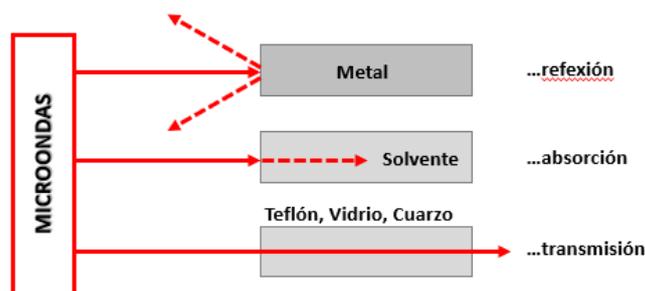


Figura 58. Interacción de diferentes materiales con MW: conductores eléctricos (metales), materiales absorbentes (solventes) y materiales de aislamiento (teflón, vidrio, cuarzo).

Teniendo en cuenta el calentamiento dieléctrico generado por el MW, para que un material pueda ser calentado eficientemente debe poseer ciertas propiedades dieléctricas. Estas propiedades dependen de cada sustancia y se basan en la capacidad que tienen de convertir energía electromagnética en calor. Esta capacidad está determinada por la llamada tangente de pérdida, $\tan \delta$. El valor de $\tan \delta$ se define como el cociente ϵ''/ϵ' , donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica (eficacia con que la radiación electromagnética se convierte en calor) y ϵ' es la constante dieléctrica, que describe la capacidad de las moléculas para polarizarse en un campo eléctrico [210,211]. Los valores de $\tan \delta$ para algunos solventes orgánicos de uso común se resumen en la Tabla 6 [209]. Esta tabla muestra la clasificación de los solventes en alta ($\tan \delta > 0,5$), media ($\tan \delta = 0,1-0,5$) y baja absorción de MW ($\tan \delta < 0,01$).

Tabla 6. Clasificación de solventes orgánicos según su eficacia de calentamiento en MW.

Alta (> 0,5)		Media (0,5 - 0,1)		Baja (< 0,1)	
Solvente	$\tan \delta$	Solvente	$\tan \delta$	Solvente	$\tan \delta$
Etilenglicol	1,350	2-butanol	0,447	Cloroformo	0,091
Etanol	0,941	Diclorobenceno	0,280	Acetonitrilo	0,062
Dimetil sulfóxido	0,825	N-metil-2-pirrolidina	0,275	Acetato de etilo	0,059
2-propanol	0,799	Ácido acético	0,174	Acetona	0,054
Ácido fórmico	0,722	Dimetilformamida	0,161	Tetrahidrofurano	0,047
Metanol	0,659	Dicloroetano	0,127	Diclorometano	0,042
Nitrobenceno	0,589	Agua	0,123	Tolueno	0,040
1-butanol	0,571	Clorobenceno	0,101	Hexano	0,020

Se requiere un solvente con un alto $\tan \delta$ para un calentamiento rápido en el campo de MW. Sin embargo, esto no significa que los solventes con valores bajos de $\tan \delta$ no puedan usarse para la síntesis de MW. Dado que es probable que los sustratos o los reactivos/catalizadores sean polares, las propiedades dieléctricas generales de una mezcla de reacción en la mayoría de los casos, permitirán un calentamiento suficiente por MW, incluso

con disolventes no polares. Sin embargo, si la mezcla no es polar, se pueden agregar elementos de calentamiento pasivos para ayudar al proceso de calentamiento [209,212].

Por otra parte, si se hace una comparación entre la síntesis asistida por MW y la técnica de síntesis mediante calentamiento convencional, surgen diversas ventajas. A continuación, se mencionan brevemente [208]:

- **Reacciones más rápidas:** se ha descubierto que las velocidades de reacciones químicas desarrolladas en MW pueden ser más rápidas que las llevadas a cabo mediante calentamiento convencional. Esto se debe a que el MW puede usar temperaturas más altas y, en consecuencia, las reacciones se completan en pocos minutos en lugar de horas.
- **Mejor rendimiento y mayor pureza:** se observa una menor formación de productos secundarios usando irradiación de MW, por ende, mayor rendimiento del producto principal.
- **Ahorro de energía:** el calentamiento mediante radiación de MW es un proceso altamente eficiente y resulta en un ahorro significativo de energía. Esto se debe principalmente a que las MW calientan solo la muestra y no el aparato, y, por lo tanto, el consumo de energía es menor.
- **Calentamiento uniforme y selectivo:** en el calentamiento convencional, las paredes del baño de aceite se calientan primero y luego el solvente. Como resultado de este calentamiento distribuido, siempre hay una diferencia de temperatura entre las paredes y el solvente. En el caso del calentamiento por MW, se genera una excitación de las moléculas de solvente y de las partículas de soluto, lo que resulta en un calentamiento uniforme (Figura 59).

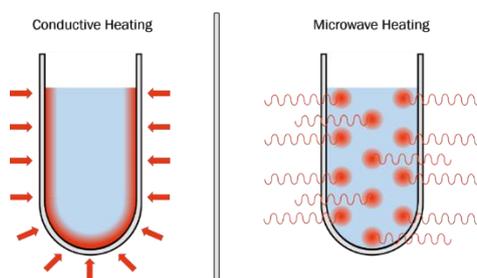


Figura 59. Calentamiento por MW vs. convencional.

- **Síntesis verde:** las reacciones realizadas con MW son más limpias y más ecológicas que los métodos de calentamiento convencionales. Las MW calientan los compuestos directamente, por lo tanto, el uso de solventes se puede reducir o eliminar. El uso de MW

también ha reducido la cantidad de purificación requerida para los productos finales de reacciones químicas que involucran solventes tóxicos.

- **Reproducibilidad:** las reacciones con calentamiento por MW son más reproducibles en comparación con el calentamiento convencional debido a un calentamiento uniforme y un mejor control de los parámetros del proceso.

Según estas ventajas, gracias al uso de MW en síntesis orgánica, se puede lograr una mayor reproducibilidad de las reacciones, y desarrollar rutas sintéticas más limpias y energéticamente más favorables [208]. Además, la síntesis de MW se considera un enfoque importante hacia la Química Verde, debido a que esta técnica es más ecológica y por ello, se está convirtiendo en el método de elección en la síntesis química moderna y el descubrimiento de fármacos.

Continuando con la obtención de la pirazolina *N*-acetilada (11), se mezcló 5 con $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1 eq), en ácido acético. La mezcla se irradió a 100 °C, a 300 W de potencia, en un tubo sellado en un reactor de MW. La reacción fue monitoreada mediante CCF, hasta observar la desaparición del compuesto de partida 5. Luego de 20 minutos de reacción, se observaron dos manchas, de las cuales la mayoritaria se encontraba cercana al punto de siembra, de menor R_f que 5 ($R_f = 0,06$). Para determinar la estructura de dicho compuesto, se llevó a cabo la purificación del bruto de reacción mediante CC. El producto obtenido fue identificado y caracterizado por RMN de ^1H y ^{13}C . El espectro RMN de ^1H mostró cinco singuletes, uno a 8,61 ppm que corresponde al H-30, otro a 7,34 ppm correspondiente al protón del grupo -NH-, los dos singuletes a 5,48 y 5,21 ppm de los H-29a y H-29b, y el singulete correspondiente al metilo del grupo acetilo ubicado a 2,30 ppm. Además, se observaron las señales correspondientes a los protones del esqueleto triterpénico en la zona comprendida entre 2,25 y 0,55 ppm (Figura 60). Asimismo, en el espectro RMN de ^{13}C , además de las señales características del esqueleto triterpénico, se observaron otras señales tales como 173,3 ppm del C=O del grupo acetilo; una señal a 150,8 ppm que corresponde al C-30, una señal ancha correspondiente al C-20 (146,6 ppm) y la señal a 120,9 ppm (ancha) correspondiente al C-29. De esta forma, se confirmó la obtención de la hidrazona triterpénica acetilada (11a) (Figura 60).

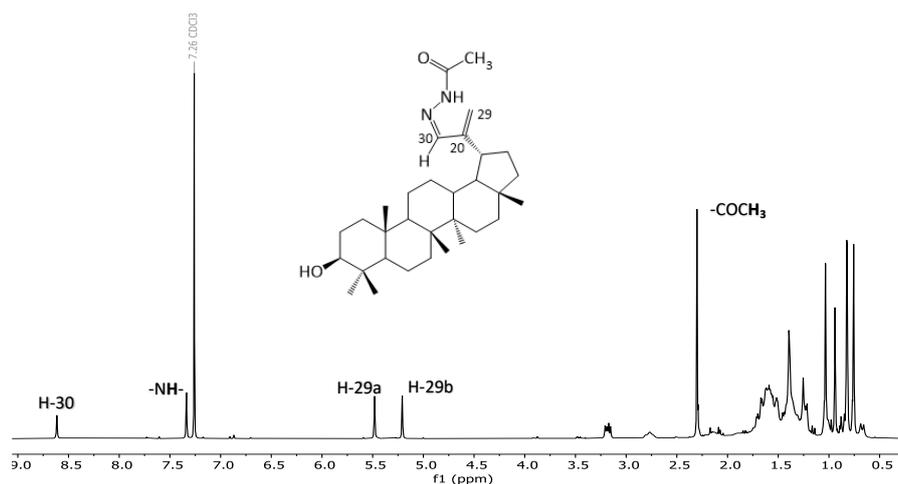
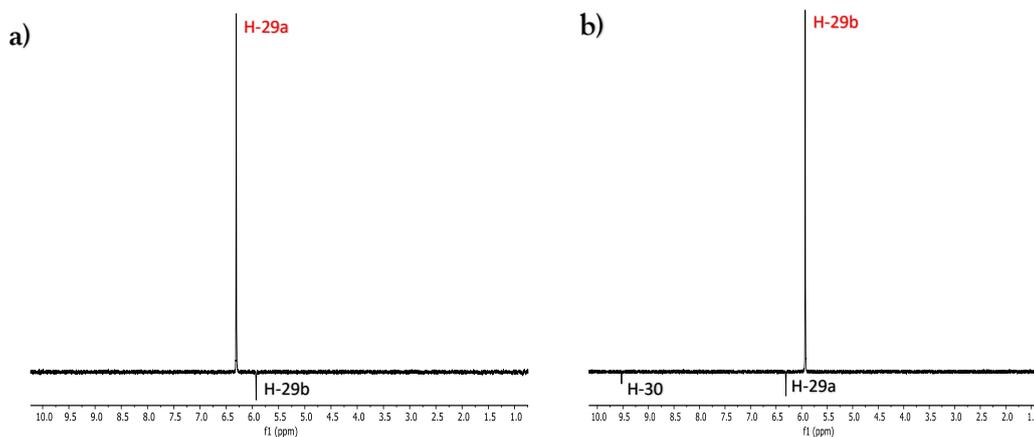


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H de la hidrazona *N*-acetilada (11a).

A partir de estos resultados, y luego de varios intentos de optimizar la reacción, tampoco se logró obtener la pirazolina *N*-acetilada 11.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y el mecanismo propuesto para las reacciones de ciclación mencionadas, en las cuales se vio reflejada la imposibilidad de que el bloque de construcción 5 sufra una ciclación que involucre el sistema carbonílico α,β -insaturado, se realizaron experimentos 1D y 2D a fin de confirmar la conformación de este sistema. En el experimento NOE selectivo 1D, se observó que al irradiar el H-29a, se genera un NOE con el H-29b lo cual era de esperarse, ya que ambos se encuentran en el C-29 (Figura 61a). Sin embargo, cuando se irradia el H-29b, se genera un NOE con el H-29a y, a su vez, con el H-30, debido a su cercanía con este último (Figura 61b). Finalmente, al irradiar el H-30, se generó un NOE con el H-29b como era de esperarse, y no con H-29a (Figura 61c), por lo que se confirma que este protón se encontraría a distancias mayores de 5Å con respecto al H-30. Esto indicaría que el conformero más estable correspondería a la conformación (s)-trans, como se puede observar en la Figura 61d.



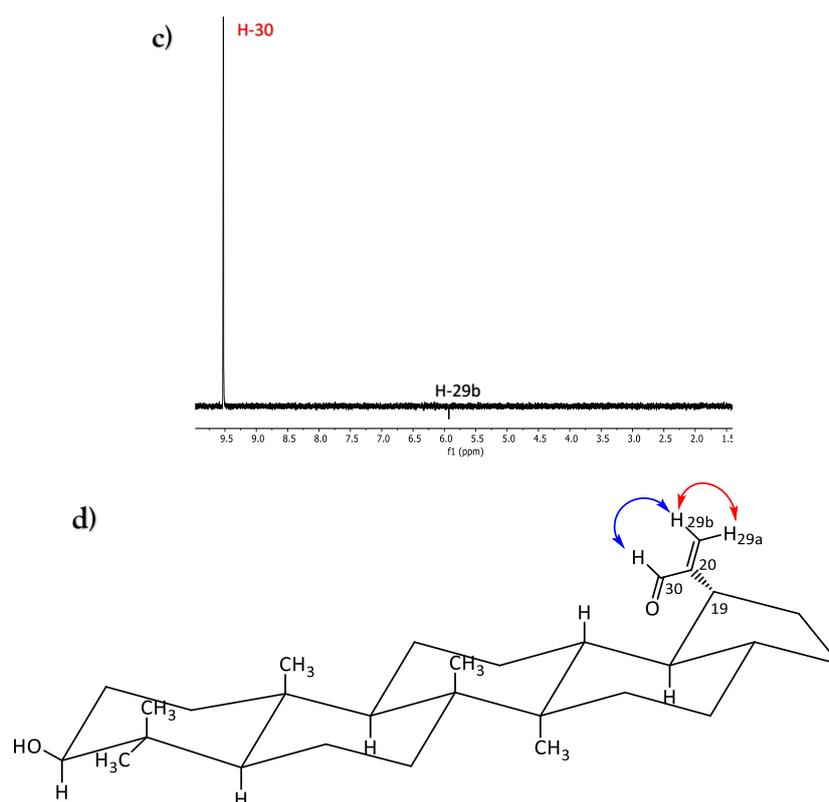


Figura 61. Espectro NOE del compuesto **5**: a) cuando se irradia H-29a; b) cuando se irradia H-29b; c) cuando se irradia H-30. d) Estructura y correlaciones NOE del compuesto **5**.

Con el fin de confirmar estos resultados, se realizó un experimento NOESY, el cual mostró una clara interacción entre el H-30 y el H-29b. Este espectro presentó señales de correlación entre H-30 (9,51 ppm) con H-29b (5,91 ppm), y este último con H-29a (6,28 ppm) (Figura 62). De esta forma se confirma la conformación (*s*)-trans de **5** como la más estable, la cual justifica la imposibilidad de dar reacciones de ciclación, como fue observado en los ensayos experimentales.

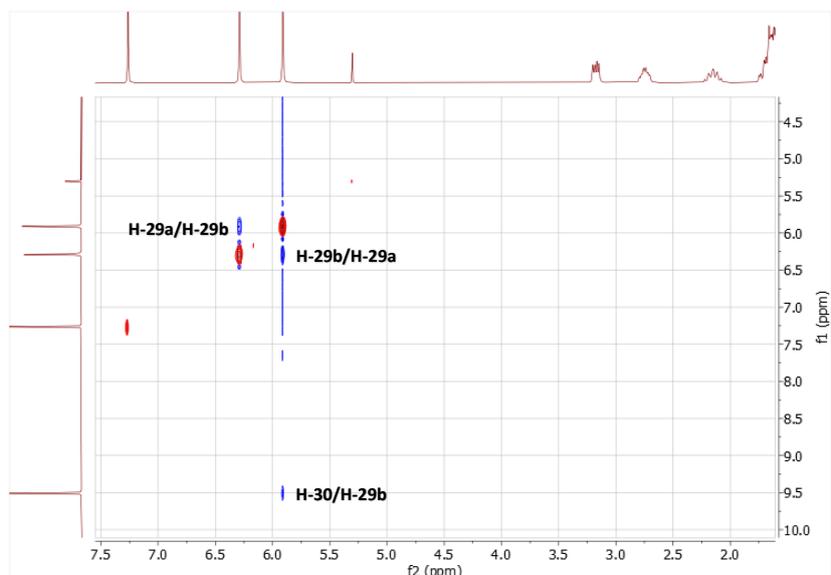


Figura 62. Sección del espectro NOESY del compuesto 5.

Estos resultados se pueden relacionar con el estudio realizado por Burns y col. (2000), donde se analiza la estructura de 30-oxolupeol (**5**) y la de su precursor lupeol (**1**). El autor menciona la libre rotación existente en el enlace del C-19~C-20 en ambas moléculas, y comenta que esta rotación se encuentra más restringida en el caso del compuesto carbonílico α,β -insaturado **5**. Informa para el compuesto **5**, que cuando el espectro de RMN de ^{13}C es llevado a cabo a bajas temperaturas ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$), se puede observar un desdoblamiento de señales en los carbonos C-18, C-19, C-20 y C-21, las cuales tienen una relación de 2:1, indicando la formación de otro conformero estable. A su vez, cuando el espectro se lleva a cabo a temperatura ambiente, se observan señales anchas para los C-12 y C-29, además de los mencionados anteriormente (C-18, C-19, C-20 y C-21), lo cual muestra un proceso conformacional lento entre dos o más conformeros, que involucra la rotación de la cadena lateral a través del enlace C-19~C-20. Según este autor, la conformación más estable se da cuando el grupo carbonilo se encuentra en *anti* al enlace olefínico (Figura 63). Finalmente, para corroborar estos resultados, llevaron a cabo estudios con modelos computacionales, y los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con los resultados espectroscópicos obtenidos por ellos [213]. Estos resultados, a su vez, están de acuerdo con los obtenidos por nosotros, confirmados por los espectros NOE y NOESY.

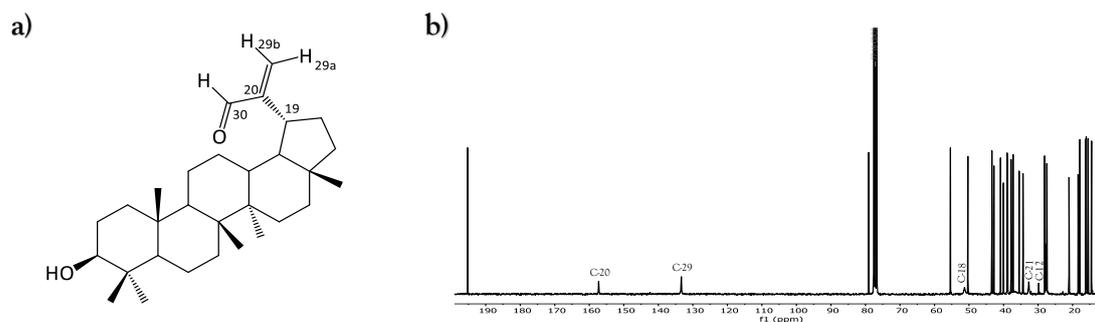


Figura 63. a) Conformero más estable de 30-oxolupeol (5), y b) espectro de ^{13}C de 5 a temperatura ambiente.

En nuestro caso, el espectro de RMN de ^{13}C obtenido para 5, a temperatura ambiente, mostró señales definidas para todos los carbonos, excepto para el C-12, C-18, C-20, C-21 y C-29 (Figura 63b), al igual que el informado por Burns. A partir de estos resultados, sabiendo que el conformero más estable de 5 es el (s)-trans, lo cual dificulta llevar a cabo la obtención de derivados que involucren la ciclación del sistema carbonílico α,β -insaturado, no se continuó con las reacciones de ciclación planteadas. Por tal motivo y con el fin de continuar con los objetivos de esta tesis, se propuso la síntesis de una serie de análogos mediante reacciones llevadas a cabo sobre el grupo carbonilo de 5. A continuación se detallan los derivados obtenidos.

III.7.2 Síntesis de la oxima triterpénica 12

Una de las estrategias llevadas a cabo para la obtención de derivados de 5 mediante reacciones que involucren al grupo carbonilo, fue la obtención de la oxima de 5.

Los grupos hidroxiimino son muy útiles como sintones para la obtención de nuevos análogos bioactivos sintetizados mediante reacciones de reducción, acilación, alquilación, ciclización, transposición de Beckmann, etc. [50]. Por ejemplo, la alquilación de la α -oximinocetona del ácido oleanólico (v) con cloruro de 2,4-diclorobencilo en presencia de K_2CO_3 en DMF dio el éter de la oxima (w), el cual resultó ser un potente inhibidor de la enzima glucógeno fosforilasa, la cual se encuentra implicada en patologías causadas por anomalías en el metabolismo del glucógeno (Figura 64) [214].

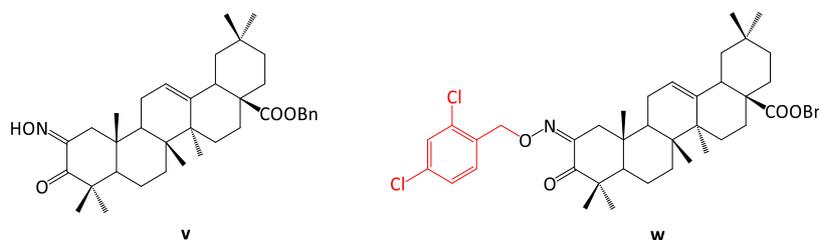


Figura 64. Derivado bioactivo de la oxima triterpénica del ácido oleanólico v.

Khant y col. (2018), obtuvieron la mezcla *Z, E* de oximas del ácido platánico (x_1, x_2), las cuales, por reducción con $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{TiCl}_3/\text{NH}_4\text{OAc}$ en MeOH, dieron las correspondientes aminas (y_1, y_2) con buenos rendimientos. A partir de ellas, se redujo el grupo éster del C-28 a alcohol, el cual fue posteriormente acetilado (z_1, z_2) (Figura 65). Tanto las aminas y_1 e y_2 como el derivado z_1 (*R*), presentaron una importante actividad citotóxica sobre distintas líneas celulares de carcinomas humanas, siendo z_1 el de mayor actividad [215].

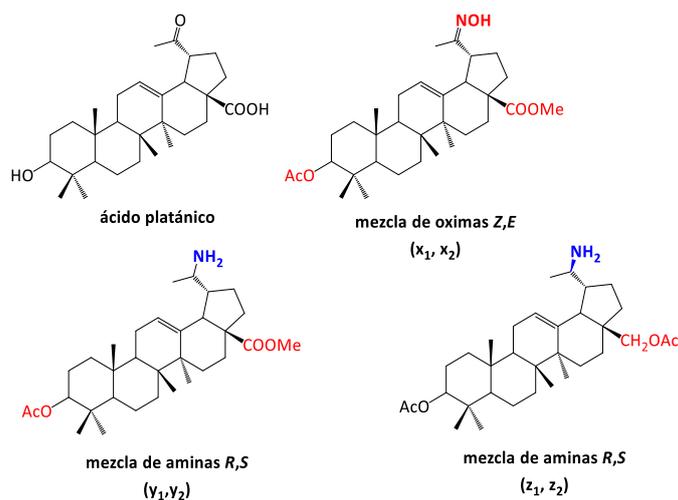


Figura 65. Derivados bioactivos obtenidos a partir de la reducción de la oxima triterpénica del ácido platánico.

Las oximas se pueden obtener fácilmente a partir de moléculas orgánicas mediante la reacción de un grupo carbonilo (cetona o aldehído) con hidroxilamina (NH_2OH). Por ejemplo, en el trabajo de Khan y col. (2014), obtuvieron la mezcla *Z* y *E* de oximas triterpénicas a partir del tratamiento de lupenona con cloruro de hidroxilamina, con un rendimiento del 90%, llevando a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 4 h (Figura 66) [116].

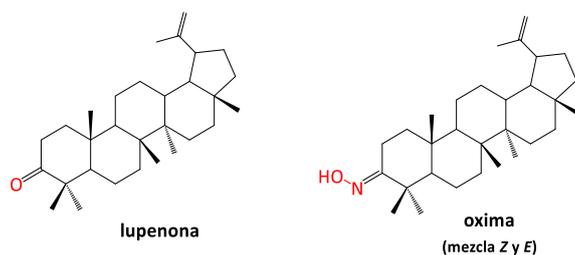


Figura 66. Mezcla *Z* y *E* de la oxima triterpénica obtenida a partir de lupenona.

Teniendo en cuenta este antecedente, se procedió a la obtención de la oxima de **5**. Para ello, a una solución etanólica de **5**, se le agregó $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (3,0 eq) y AcONa^+ (2 eq), y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta desaparición del compuesto de partida (Figura 67). En el trabajo de Khan y col. pudieron distinguir la mezcla isomérica (*Z* y *E*) a través

de valores distintos de R_f observados en la CCF. En nuestro caso, luego de 19 h de reacción, se observó una única mancha con un R_f diferente al triterpeno de partida ($R_f = 0,29$).

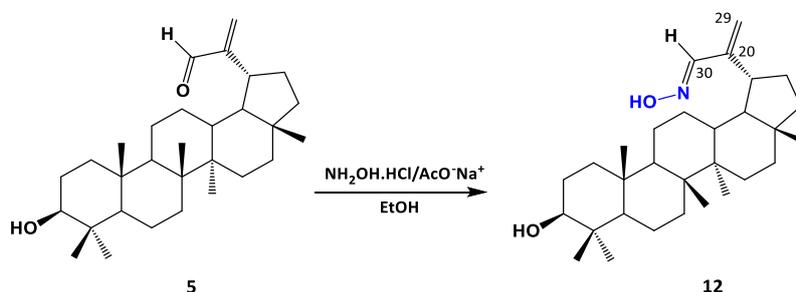
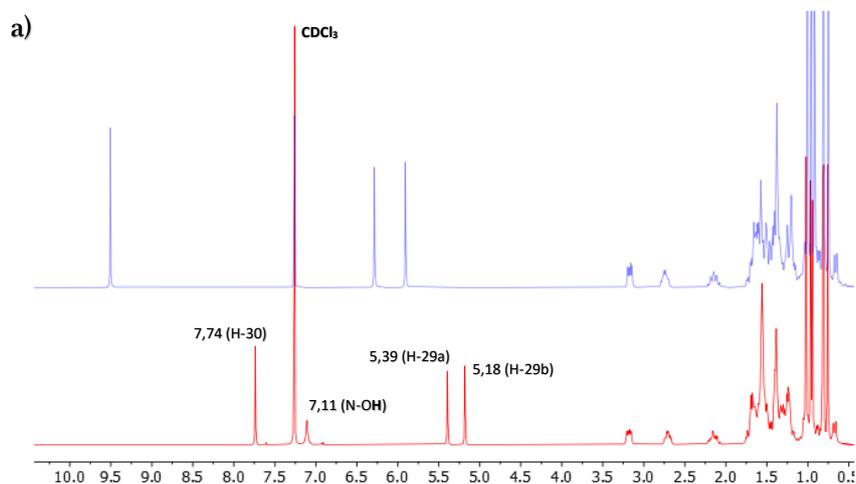


Figura 67. Síntesis de oxima (12) a partir del bloque de construcción 5.

Luego de la evaporación del solvente del bruto de reacción, el análisis espectroscópico por RMN permitió determinar un único compuesto, a diferencia de lo reportado por Khan y col. [116]. En el espectro RMN de ^1H , se observó un singulete a 7,74 ppm correspondiente al H-30, un singulete ancho característico del protón del grupo hidroxiiimino a 7,11 ppm, y dos singuletes a 5,39 y a 5,18 ppm, las cuales pertenecen a los protones H-29a y H-29b (Figura 68a). En el espectro de RMN de ^{13}C se observó una señal del C-30 unido al grupo hidroxiiimino (153,6 ppm), y dos señales a 149,4 y 119,3 ppm que corresponden a los C-20 y C-29. A diferencia del RMN de ^{13}C del precursor 5, estas señales se encuentran desplazadas a menores valores de ppm (Figura 68b). Para determinar la configuración del grupo hidroxiiimino, se tuvo en cuenta el estudio espectroscópico realizado por Castro y col. (2019) para oximas triterpénicas [170]. De esta manera, se estableció la configuración *E* para la oxima triterpénica 12.



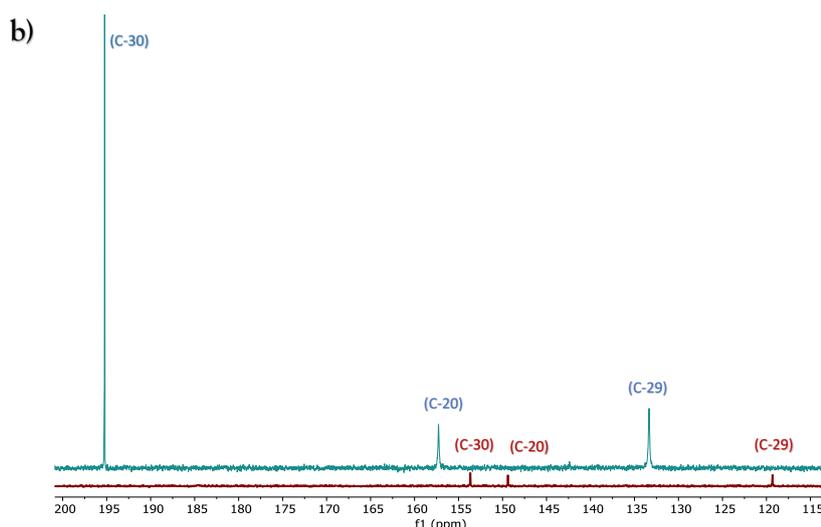


Figura 68. a) Espectro de RMN de ¹H de 5 (azul) y 12 (rojo); b) Sección del espectro de RMN de ¹³C de 5 (azul) y 12 (rojo).

De esta forma, se confirma la obtención de la oxima *E* (**12**) (pf = 241-244 °C), cuyo rendimiento resultó ser cuantitativo, sin necesidad de la purificación del bruto de reacción.

Teniendo en cuenta que el tiempo de reacción fue extenso (19 h), y que el solvente utilizado para la misma (EtOH) posee una alta eficacia de calentamiento en MW, como se comentó anteriormente (Tabla 6, pág. 84), se propuso optimizar el tiempo de reacción mediante el uso de MW. A continuación, se detalla el trabajo realizado para tal fin.

III.7.2.1 Obtención de **12** mediante el uso de microondas

Con el fin de optimizar el tiempo de reacción para la obtención de **12**, se llevó a cabo la misma en MW. Para ello, se disolvió el compuesto **5** en EtOH absoluto y se agregó NH₂OH.HCl (3 eq) y AcO⁻Na⁺ (2 eq). La mezcla se irradió a 70 °C a 300 W de potencia, en un tubo sellado en un reactor de MW. La reacción se monitoreó mediante CCF hasta la desaparición del compuesto de partida. Transcurridos 10 minutos de reacción, se observó una única mancha que coincidió con el testigo de **12**. Luego de la evaporación del solvente del bruto de reacción, el análisis espectroscópico permitió comprobar la presencia de **12** en forma cuantitativa.

A través de estos resultados, se puede afirmar que la preparación de **12** mediante el uso de MW se logró con el mismo rendimiento que el obtenido mediante calentamiento convencional; sin embargo, se logró optimizar el tiempo de la reacción, el cual fue de minutos. De esta forma, para la obtención de **12** se siguió la técnica de obtención por MW.

III.7.3 Síntesis de aciloximas 13a-13e

Como se mencionó anteriormente, el grupo hidroxiiimino puede reaccionar con diferentes reactivos para dar diversos tipos de análogos bioactivos. Por ejemplo, muchos autores les atribuyen cierta relevancia a los compuestos triterpénicos que poseen la función aciloxiiimino, dado a los numerosos antecedentes que presentan, relacionados a sus propiedades farmacológicas [50]. Estos compuestos resultaron ser buenos agentes antivirales, particularmente contra ciertos virus de influenza, HIV y enterovirus, entre otros. A su vez, presentan actividad citotóxica o antiproliferativa frente a numerosas líneas celulares cancerígenas. Por otro lado, mostraron ser potentes agentes hepatoprotectores, particularmente para el daño hepático causado por la acción del tetracloruro de carbono, y disminuyeron la antiulceración causada por la aplicación de indometacina o aspirina. Sin embargo, la actividad citotóxica y antiviral que presentan las oximas triterpénicas aciladas puede considerarse como el tipo de actividad biológica más importante y prometedora. En muchos casos, los efectos farmacológicos de dichos compuestos fueron comparables a los de los fármacos estándar correspondientes [50]. Si bien se citan numerosos derivados de este tipo, a modo de ejemplo se menciona uno de ellos. El derivado aciloxiiimino del éster del ácido oleanólico, cuya obtención se logró mediante la oxidación del OH del C-3 y posterior síntesis de la oxima correspondiente, para dar lugar al derivado acilado a través del tratamiento de esta última con ácido octanoico y los reactivos correspondientes (Figura 69). Este derivado, no sólo demostró baja toxicidad, sino que su acción analgésica resultó ser comparable con la actividad del antiinflamatorio diclofenac. A su vez, al administrarlo de forma combinada con morfina, se observó una potente actividad sinérgica [216].

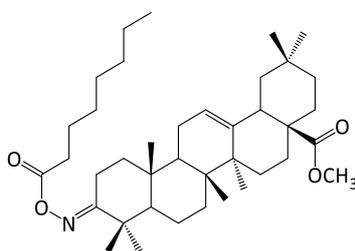


Figura 69. Derivado aciloxiiimino del éster del ácido oleanólico.

Si bien existen diversos métodos de obtención de aciloximas, en nuestro trabajo se llevó a cabo la reacción siguiendo la técnica reportada por Zhao y col. (2013) quienes hacen reaccionar oximas triterpénicas con diversos ácidos carboxílicos sustituidos en presencia de DCC, en CH_2Cl_2 y calentamiento a reflujo [217]. En nuestro caso, se trató la oxima **12** con

distintos ácidos benzoicos sustituidos y DCC, en CH_2Cl_2 a reflujo durante 8-11,5 h. Así, se logró la obtención de los análogos acilados **13a-13e**, cuyos rendimientos se pueden observar en la Figura 70.

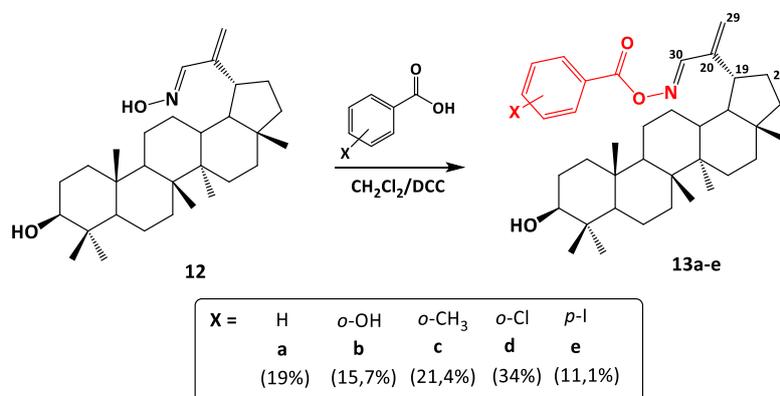


Figura 70. Obtención de las aciloximas **13a-13e** y rendimientos, a partir de la oxima **12**.

En todos los casos, el transcurso de la reacción fue monitoreado por CCF, donde se observó la formación de dos productos de diferentes R_f , y oxima sin reaccionar. Transcurrido el tiempo de reacción según cada derivado (sección Materiales y Métodos), el bruto de reacción fue analizado mediante RMN, identificando además del producto de acilación correspondiente, la formación de *N,N'*-diclohexilcarbodiimida (DCU). Este producto se forma a partir de la hidratación de la DCC durante el transcurso de la reacción (Figura 71).

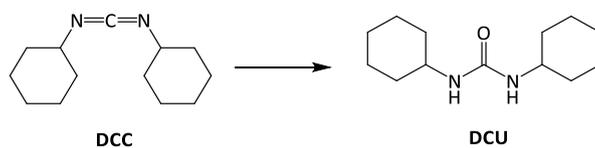


Figura 71. Estructuras químicas de DCC y DCU.

Luego de la purificación del bruto de reacción mediante CC, los productos obtenidos fueron caracterizados por RMN. En todos los casos fue necesaria una segunda purificación, debido a las trazas de DCU identificadas en el espectro RMN de ^1H . En función a la gran diferencia de tamaños moleculares entre la DCU y el producto triterpénico acilado, la repurificación fue llevada a cabo en columna sobre Sephadex LH-20, y MeOH como FM. Los productos obtenidos de la cromatografía fueron identificados y caracterizados por RMN de ^1H y ^{13}C . Los espectros de RMN de ^1H de los productos **13a-13e**, mostraron las señales características de los anillos aromáticos (8,10 a 6,90 ppm), un corrimiento a campos más bajos del H-30 comparado con el compuesto **12**, y la ausencia de la señal del H del grupo hidroxiimino de **12**. En cuanto a los protones vinílicos H-29a y H-29b, y los protones H-19 y

H-21, las señales sufrieron un desplazamiento a campos menores en comparación con lo observado para el compuesto de partida. En la siguiente tabla, se muestran los principales desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN de ^1H del compuesto de partida **12** y de los correspondientes derivados acilados (**13a-13e**) (Tabla 7).

Tabla 7. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H observados para **12** y **13a-13e**. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm, (multiplicidad).

POSICION	COMPUESTO					
	12	13a	13b	13c	13d	13e
H-30	7,74 (s)	8,12 (s)	8,14 (s)	8,08 (s)	8,07 (s)	8,10 (s)
H-29a	5,39 (s)	5,66 (s)	5,71 (s)	5,66 (s)	5,67 (s)	5,67 (s)
H-29b	5,18 (s)	5,44 (s)	5,48 (s)	5,43 (s)	5,44 (s)	5,45 (s)
H-19	2,71 (ddd)	2,92 (ddd)	2,89 (ddd)	2,93 (ddd)	2,88 (ddd)	2,90 (m)
H-21	2,24-2,08 (m)	2,42-2,20 (m)	2,41-2,21 (m)	2,40-2,26 (m)	2,38-2,19 (m)	2,40-2,18 (m)

Los espectros de RMN de ^{13}C de los productos **13a-13e** mostraron las señales características del anillo aromático (140,6 a 101,3 ppm), mientras que, a campos menores, se observaron las señales correspondientes a C-30, C-29 y C-20 con ciertas variaciones con respecto a las señales observadas para el compuesto de partida **12**, como era de esperar (Tabla 8).

Tabla 8. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C observados entre **12** y **13a-13e**. En CDCl_3 a 75MHz; δ en ppm.

POSICION	COMPUESTO					
	12	13a	13b	13c	13d	13e
C-30	153,7	159,8	162,2	159,7	160,1	160,1
C-29	119,3	124,1	124,9	123,8	124,5	124,5
C-20	149,4	149,2	148,9	149,3	149,0	149,1

III.7.3.1 Evaluación *in vitro* de la actividad neuroprotectora

Teniendo en cuenta los antecedentes en cuanto a la actividad neuroprotectora de lupeol, la cual fue comentada en el Capítulo I, y el contacto establecido con las Dras. Salvador y Alza (INIBIBB-CONICET, Bahía Blanca) quienes poseen experiencia en ensayos biológicos de neuroprotección sobre células neuronales, se propuso determinar esta actividad biológica de los triterpenos pentacíclicos sintetizados en esta tesis, para este tipo de células.

Por un lado, se evaluó la actividad del triterpeno pentacíclico natural lupeol (**1**) aislado de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea* y del bloque de construcción 30-oxolupeol (**5**); y, por otro lado, de los derivados semisintéticos obtenidos a partir de las transformaciones llevadas a

cabo sobre 5. Para todos estos compuestos se midió la actividad neuroprotectora *in vitro* sobre la línea celular de neuroblastoma humano IMR-32, frente a un modelo de parkinsonismo. En dicho modelo, las células son expuestas a un insulto citotóxico, como es la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Este metabolito se trata de un producto de oxidación de la dopamina y se puede encontrar en elevadas concentraciones en neuronas dopaminérgicas de pacientes que padecen la EP, contribuyendo de esta forma, a la muerte neuronal [218]. La consecuencia del aumento de la 6-OHDA, se traduce en una disminución de la viabilidad celular. En la búsqueda de nuevos agentes antiparkinsonianos resulta interesante el estudio de moléculas cuya acción revierta la toxicidad neuronal inducida por la 6-OHDA.

En este trabajo se estudió la capacidad que poseen los derivados triterpénicos de lupeol, de aumentar la viabilidad celular en condiciones de exposición a la 6-OHDA (con respecto al tratamiento con la neurotoxina sola), es decir, compuestos que presenten acción neuroprotectora. Para ello, las células de neuroblastoma humano IMR-32 fueron preincubadas con la oxima 12 y los derivados 13a-13e, a 10 μM y 50 μM por 30 minutos, y luego expuestas a 6-OHDA durante 24 h. Para evaluar la acción neuroprotectora de los compuestos, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción de MTT.

En la Figura 72 y en la Tabla 9 se presentan los valores de viabilidad celular correspondientes a los compuestos mencionados, los cuales, a su vez, fueron comparados con los datos obtenidos para 1 y 5. Los valores se expresan como % de reducción de MTT (viabilidad celular), donde el 100% corresponde a viabilidad celular óptima en condiciones control (exposición a 6-OHDA 25 μM , con una pérdida de la viabilidad celular de 40%).

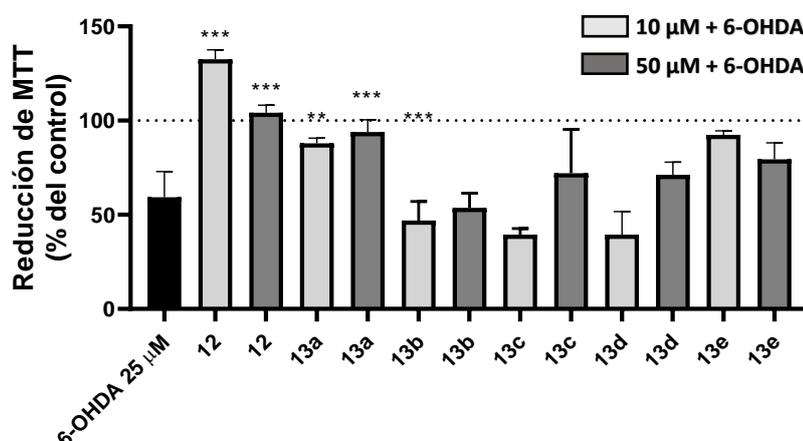
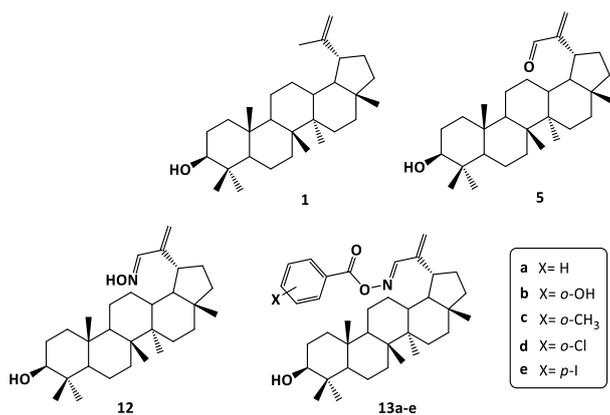


Figura 72. Gráfico de porcentajes de viabilidad celular para los compuestos 12 y 13a-13e.

Tabla 9. Valores de viabilidad celular ejercida por triterpenos tipo lupano frente a la línea celular IMR-32.^a

COMPUESTO	% REDUCCIÓN DE MTT	
	10 μM	50 μM
1	65,2	67,3
5	55,7	24,5
12	100	100
13a	88	93,9
13b	46,9	57,3
13c	39,4	72
13d	39,5	71
13e	92,4	79,5

^a células pretratadas con los compuestos (10 y 50 μM), posteriormente tratadas con 6-OHDA (25 μM), durante 24 h con pérdida de viabilidad del 40%.

Los resultados demostraron que los triterpenos **1** y **5** no ejercen efectos neuroprotectores sobre las células de neuroblastoma humano, cuando las mismas son expuestas a la 6-OHDA, durante 24 h de tratamiento con dicha toxina. Por el contrario, para la oxima **12**, se observó un aumento de la viabilidad celular cuando las células fueron pretratadas con el compuesto y expuestas a la 6-OHDA. Dicha actividad se observó a una concentración baja de **12** (10 μM), así como también a una concentración de 50 μM . Esto demuestra, que la modificación estructural realizada sobre el triterpeno de partida (**1**) mejoró notablemente la actividad biológica, siendo indispensable el grupo hidroxiiimino.

Por otra parte, de los compuestos **13a-13e**, sólo lograron revertir la pérdida de viabilidad celular **13a** a mayor concentración (50 μM) y en menor medida a 10 μM , y **13e** a 10 μM (Figura 72, Tabla 9). El resto de los derivados no fueron capaces de proteger a las neuronas del efecto tóxico de la 6-OHDA a ninguna de las concentraciones probadas. Esto se debe a que la viabilidad celular en presencia de estos derivados no presentó diferencias significativas con respecto a la condición de exposición a 6-OHDA. Por lo tanto, la acilación de la oxima no resultó ser una estrategia adecuada para la búsqueda de nuevos derivados de lupeol con actividad neuroprotectora.

Considerando estos resultados y debido a que las aciloximas **13a-13e** no fueron obtenidas con buenos rendimientos y que, a su vez, el proceso de purificación resultó dificultoso, no se continuó con la síntesis de derivados de este tipo.

III.7.4 Síntesis de azinas triterpénicas **15a-15e**

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se procedió con la obtención de nuevos análogos sintetizados a partir de la modificación del carbonilo del bloque de construcción **5**, los cuales son descriptos a continuación.

Las azinas son análogos 2,3-diaza del 1,3-butadieno y también se denominan diiminas enlazadas N–N (C=N–N=C). Este tipo de compuestos poseen propiedades biológicas interesantes. En la Figura 73 se muestran distintos ejemplos de azinas que demostraron actividades como antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas, entre otras (Figura 73) [219].

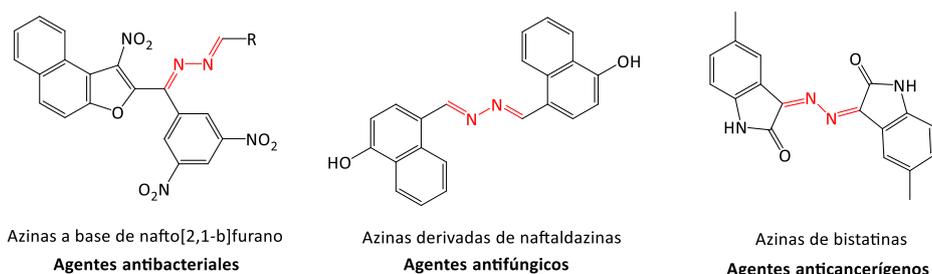


Figura 73. Azinas con importantes actividades terapéuticas.

Pokorny y col. (2018), sintetizaron una serie de azinas triterpénicas, mediante reacciones de condensación del grupo carbonilo α,β -insaturado del ácido betulínico con distintas hidrazonas aromáticas, mediante calentamiento a reflujo y tiempos de reacción de 2 a 6 h. Este procedimiento dio como resultado novedosas estructuras bioactivas, las cuales presentaron citotoxicidad selectiva hacia la línea celular leucémica CCRF-CEM (Figura 74) [112].

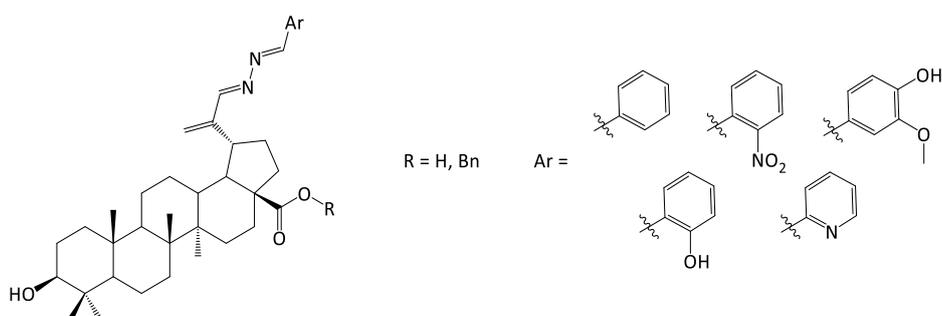


Figura 74. Azinas bioactivas derivadas del ácido 30-oxobetulínico.

Si bien se sabe que el grupo azina muchas veces resulta ser inestable, convirtiéndose en el aldehído original, en este caso, los autores explican que las estructuras triterpénicas sintetizadas poseen una importante estabilidad debido a la conjugación de los dobles enlaces con el anillo aromático. A su vez, la estructura triterpénica voluminosa funcionaría como un impedimento estérico ante posibles reacciones indeseadas [112].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se procedió a la síntesis de azinas a partir de la reacción entre **5** y diferentes hidrazonas. En primer lugar, se preparó una serie de hidrazonas aromáticas sustituidas (**14a-14o**), a partir de la reacción de condensación entre aldehídos aromáticos (**a-o**) con hidrato de hidrazina a temperatura ambiente, durante tiempos de reacción entre 30 minutos a 1 h (sección Materiales y Métodos) (Figura 75a). A través del monitoreo de la reacción mediante CCF, se observó la desaparición del aldehído de partida y la aparición de una nueva mancha de menor R_f en todos los casos, por lo que se pensó en la formación de un único producto, lo cual fue confirmado a través de espectroscopía RMN de ^1H . Todas las hidrazonas aromáticas se lograron sintetizar de manera cuantitativa, y fueron utilizadas para la síntesis de las azinas sin purificación previa. En segundo lugar, se llevó a cabo la síntesis de las azinas **15a** y **15b**. Para ello, a una solución de **5** en EtOH absoluto, se le añadió la hidrazona aromática correspondiente (**14a** o **14b**), y se llevó a calentamiento a reflujo durante 5-6 h. Luego de su purificación, los productos fueron obtenidos con rendimientos de 32 y 39% respectivamente (Tabla 10). Estos rendimientos resultaron mayores que los informados por Pokrny y col. para las azinas obtenidas a partir del ácido betulínico (18 y 20% respectivamente) [112]. Los datos espectroscópicos de RMN que permitieron identificar los productos se detallan más adelante.

Con el objetivo de optimizar esta síntesis, se adaptaron los parámetros de reacción para llevar a cabo la síntesis de las azinas asistida por MW. Cabe destacar que el solvente a utilizar (EtOH), se trata de un solvente adecuado para MW debido a sus características dieléctricas comentadas más arriba (Tabla 6, pág. 84). Por tales motivos, se preparó una solución de **5** en EtOH absoluto, y se le añadió la hidrazona aromática correspondiente (**14a** o **14b**). La mezcla se irradió en un tubo sellado a 70 °C, a 280 W de potencia, en un tubo sellado en un reactor de MW, durante 30 minutos (Figura 75).

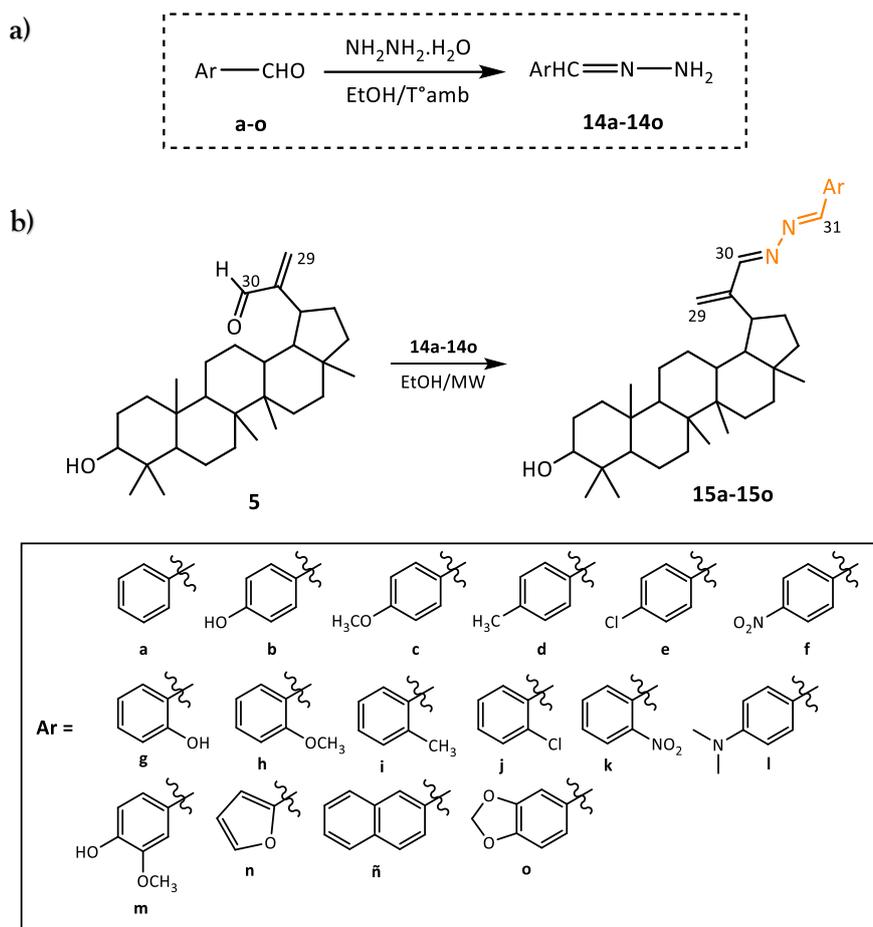


Figura 75. Esquema de síntesis para la obtención de: a) hidrazonas aromáticas sustituidas **14a-14o**, y b) azinas triterpénicas **15a-15o**.

Las reacciones fueron monitoreadas a través de CCF, mediante la cual se observó la formación de dos productos, uno de ellos de igual R_f ($R_f = 0,18$) para ambas reacciones. Además, se observó un pequeño porcentaje de compuesto de partida (**5**). La purificación de los brutos de reacción mediante CC permitió obtener los derivados **15a-15b** puros (determinados por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C , detallados más adelante), y un subproducto de reacción común para ambos casos, correspondiente al compuesto de $R_f = 0,18$. El análisis espectroscópico de RMN de ^1H y ^{13}C del subproducto permitió determinar, por comparación con estudios llevados a cabo en esta tesis, que se trataba del dímero **10**, obtenido también en reacciones anteriores (Figura 55, pág. 82). Este resultado está de acuerdo con Pokorny y col., quienes también informan la obtención de un dímero, entre otros subproductos de reacción [112].

En cuanto a la obtención de **15a** y **15b** mediante MW, en la Tabla 10 se comparan los rendimientos de obtención de cada derivado y los tiempos de reacción para cada técnica de síntesis (convencional y MW). En la misma se refleja que la preparación de **15a** mediante el

uso de MW se logró con un rendimiento similar al obtenido mediante calentamiento convencional (31,4% vs. 32%); sin embargo, el tiempo de reacción fue menor (30 minutos vs. 5 h). En cambio, para el derivado **15b**, el rendimiento fue mayor cuando fue sintetizado mediante MW (59,4% vs. 39%), así como el tiempo de reacción (30 minutos vs. 6 h).

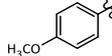
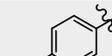
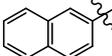
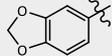
Tabla 10. Síntesis de azinas **15a** y **15b** mediante calentamiento a reflujo en EtOH; y mediante MW: 70°C/280W, EtOH y agitación magnética.

-Ar	COMPUESTO	Tiempo (h)	Rend. (%)
	15a	0,5 ^a 5 ^b	31,4 ^a 32 ^b
	15b	0,5 ^a 6 ^b	59,4 ^a 39 ^b

^a A través de MW. ^b Mediante calentamiento a reflujo.

Teniendo en cuenta esta mejoría, se decidió sintetizar el resto de análogos a través de MW. Para ello, se utilizó la misma técnica que para **15a** y **15b**, siguiendo la reacción mediante CCF. Los tiempos de reacción fueron de 5-30 minutos (Tabla 11) y en todos los casos, la purificación de la azina se llevó a cabo de la misma manera que para **15a** y **15b**, obteniéndose para cada una, el subproducto **10** ($R_f = 0,18$). Asimismo, en la mayoría de los casos se observó hasta un 20% de producto de partida (**5**) sin reaccionar.

Tabla 11. Síntesis de azinas **15a-15o** mediante MW: 70°C/280W, EtOH y agitación magnética.

-Ar	COMPUESTO	Tiempo (min)	Rend. (%)	-Ar	COMPUESTO	Tiempo (min)	Rend. (%)
	15a	30	31,4		15i	20	6,6
	15b	30	59,4		15j	7	57,5
	15c	20	32,1		15k	30	41,2
	15d	30	45,4		15l	25	25,2
	15e	8	13,3		15m	20	28,6
	15f	5	8,5		15n	8	43,6
	15g	20	55,2		15ñ	30	37,2
	15h	5	59,5		15o	10	40,6

El análisis espectroscópico de RMN de ^1H de las azinas obtenidas permitió identificar las estructuras mediante señales características, tales como los singuletes correspondientes a los H-30 y H-31 en valores que se encuentran entre 8,96 y 8,16 ppm, según cada caso; las señales correspondientes a los protones aromáticos, y los singuletes de los protones H-29a y H-29b entre 5,74 y 5,41 ppm. Las principales señales características de los espectros de ^1H de cada derivado se pueden observar en la Tabla 12.

Tabla 12. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^1H observados para 15a-15o. En CDCl_3 a 300MHz; δ en ppm.

COMPUESTO	POSICION			
	H-31	H-30	H-29a	H-29b
15a	8,55	8,21	5,66	5,47
15b	8,51	8,21	5,63	5,45
15c	8,52	8,21	5,63	5,45
15d	8,53	8,21	5,64	5,46
15e	8,51	8,20	5,67	5,48
15f	8,59	8,22	5,74	5,54
15g	8,69	8,20	5,71	5,51
15h	8,96	8,20	5,63	5,45
15i	8,84	8,23	5,65	5,48
15j	8,95	8,20	5,68	5,49
15k	8,96	8,16	5,71	5,50
15l	8,50	8,22	5,58	5,41
15m	8,48	8,21	5,63	5,45
15n	8,43	8,26	5,64	5,46
15ñ	8,71	8,27	5,68	5,50
15o	8,46	8,19	5,64	5,45

Por otra parte, en los espectros de ^{13}C , se apreció una notable diferencia sobre las señales correspondientes a los carbonos C-30, C-20 y C-29. A su vez, la señal del nuevo carbono generado en las azinas, C-31, coincidió con el desplazamiento del C-30. En cada derivado, se pudieron observar, además, las señales correspondientes al anillo aromático. En la Tabla 13, se detallan las diferencias entre los carbonos mencionados con respecto a su precursor, 5.

Tabla 13. Principales desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C observados entre 5 y 15a-15o. En CDCl_3 a 75MHz; δ en ppm.

COMPUESTO	POSICION		
	C-31/C-30	C-29	C-20
5	195,2	133,3	157,3
15a	164,9	123,5	152,6
15b	164,5	123,3	159,0
15c	164,4	123,0	161,3
15d	164,6	123,2	161,6
15e	165,3	123,9	160,2
15f	166,3	125,0	158,7

15g	165,6	124,7	164,9
15h	164,3	111,3	159,1
15i	164,8	123,2	160,1
15j	165,2	123,9	157,9
15k	165,5	124,6	156,5
15l	163,4	122,1	162,3
15m	164,3	123,0	161,6
15n	165,7	123,7	150,5
15ñ	165,0	123,6	161,6
15o	164,6	123,2	161,1

Se sabe que las azinas simétricas pueden presentarse como tres isómeros configuracionales: isómeros (*E,E*), (*E,Z*) y (*Z,Z*). Sin embargo, la forma termodinámicamente más estable es (*E,E*) [220]. Pokorny, informa esta configuración para las azinas obtenidas en su trabajo [112]. Para evaluar la configuración de las azinas obtenidas en nuestro trabajo, se realizó el experimento 2D, NOESY para la azina **15a**, en el cual no se observaron señales de correlación entre los protones H-30 (8,21 ppm) y H-31 (8,55 ppm), por lo que se pudo indicar tentativamente que la configuración de las azinas obtenidas es (*E,E*) (Figura 76).

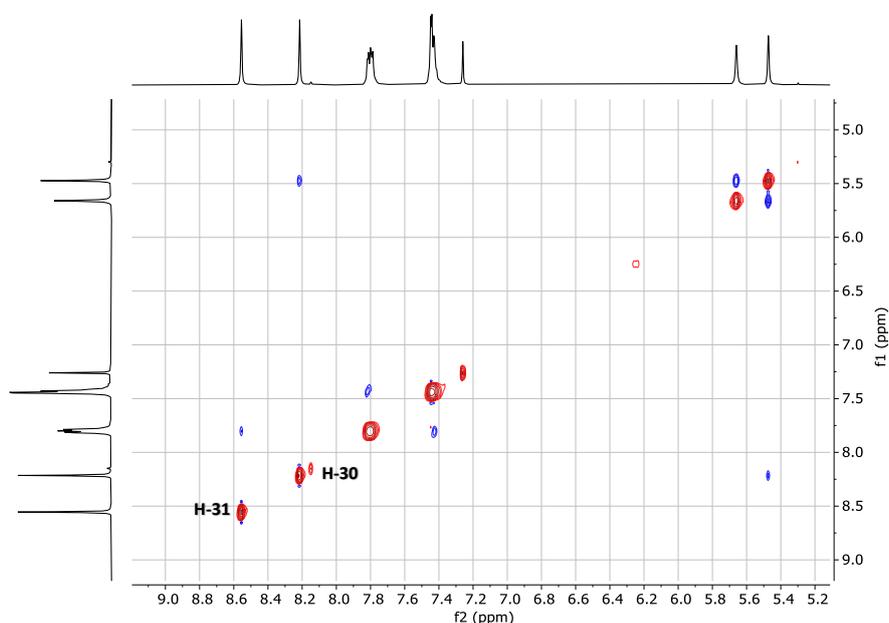


Figura 76. Sección del espectro NOESY del compuesto **15a**.

En nuestro trabajo se pueden observar algunas ventajas respecto al llevado a cabo por Pokorny y col. Por ejemplo, con respecto a los rendimientos de obtención de las azinas, en los casos en los que se utilizó la misma hidrazona aromática y la misma metodología de síntesis (calentamiento convencional), los rendimientos fueron mayores en nuestro trabajo que en el de Pokorny y col. A su vez, se lograron optimizar los tiempos de reacción mediante el uso de

MW, así como también los rendimientos hacia los productos. Por otro lado, como fue mencionado más arriba, dichos autores obtuvieron varios subproductos de reacción, entre los que se encuentran además del dímero de la azina, la hidrazona del ácido betulínico y el producto de reducción de Wolff-Kishner (ácido betulínico), los cuales suman un 51%. A diferencia de ellos, en nuestro caso, se obtuvo el dímero **10** como subproducto de reacción con rendimientos entre 30-40%, según el derivado. Sin embargo, este porcentaje fue menor cuando la reacción se llevó a cabo por MW (18-35%).

La formación del dímero **10** se podría explicar mediante el mecanismo de reacción propuesto por Lasri (Figura 77) [221]

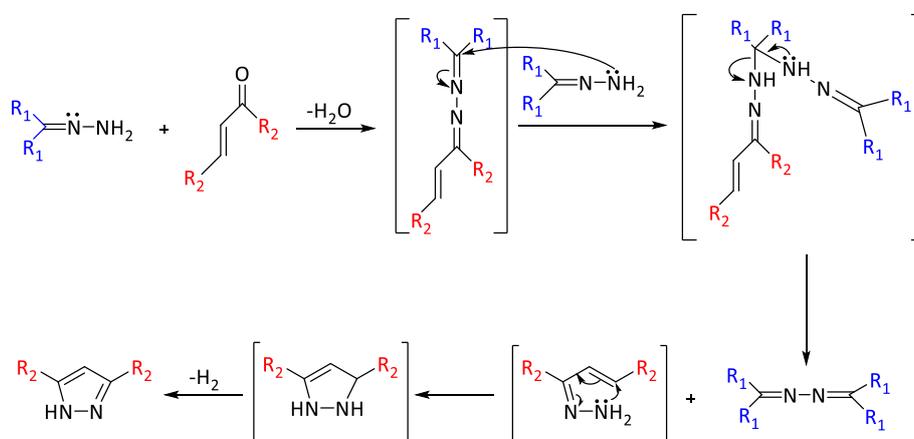


Figura 77. Mecanismo propuesto por Lasri para la síntesis de azinas y pirazoles.

Como se puede apreciar en el mecanismo de reacción, una vez formada la azina, esta reacciona con otra molécula de hidrazona de partida, y da lugar a dos productos, uno de ellos la hidrazona del compuesto carbonílico de partida. En nuestro caso, correspondería a la hidrazona triterpénica de **5**. Como se dijo anteriormente, esta hidrazona no se puede ciclar para dar el derivado pirazolínico, por lo que reaccionaría con **5** para formar, de esta manera, el dímero **10**. Esta hipótesis podría ser válida debido a que no hallamos hidrazona de **5** en ninguna de las reacciones, sino que se pudo observar el dímero como subproducto triterpénico. A su vez, a través del seguimiento del transcurso de la reacción mediante CCF y RMN de ^1H , se vio un cambio notable en la relación entre el dímero **10** y el compuesto de partida **5**. A mayores tiempos de reacción, se observó en todos los casos, que a medida que aumentaba la formación de **10**, disminuía la concentración de **5**.

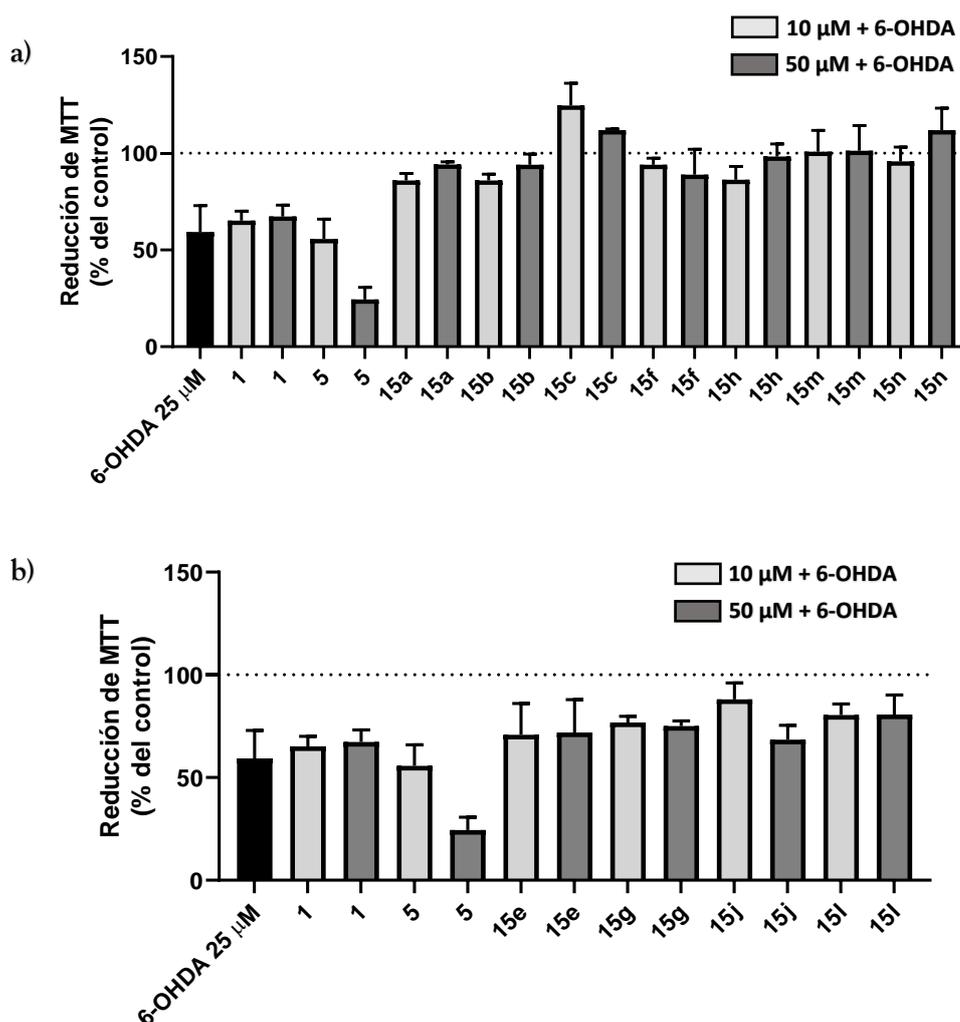
De esta manera, se lograron obtener 16 azinas triterpénicas, mediante MW con rendimientos moderados a buenos, a las cuales se les evaluará la actividad neuroprotectora. A continuación, se detalla dicho estudio.

III.7.4.1 Evaluación *in vitro* de la actividad neuroprotectora

Continuando con el objetivo de obtener compuestos biológicamente activos, se evaluó la actividad neuroprotectora de las azinas **15a-15o**, utilizando el mismo modelo neuronal de EP inducido por 6-OHDA, y las mismas condiciones detalladas más arriba (Sección III.7.3.1).

Para ello, las células de neuroblastoma humano IMR-32 fueron preincubadas con los derivados **15a-15o**, a 10 μM y 50 μM por 30 minutos, y luego expuestas a 6-OHDA durante 24 h. Para evaluar la acción neuroprotectora de los compuestos, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción de MTT.

En la Figura 78 y en la Tabla 14 se presentan los valores de viabilidad celular correspondientes a los compuestos mencionados, los cuales, a su vez, fueron comparados con los datos obtenidos para **1** y **5**. Los valores se expresan como % de reducción de MTT (viabilidad celular), donde el 100% corresponde a viabilidad celular óptima en condiciones control (exposición a 6-OHDA 25 μM , con una pérdida de la viabilidad celular de 40%).



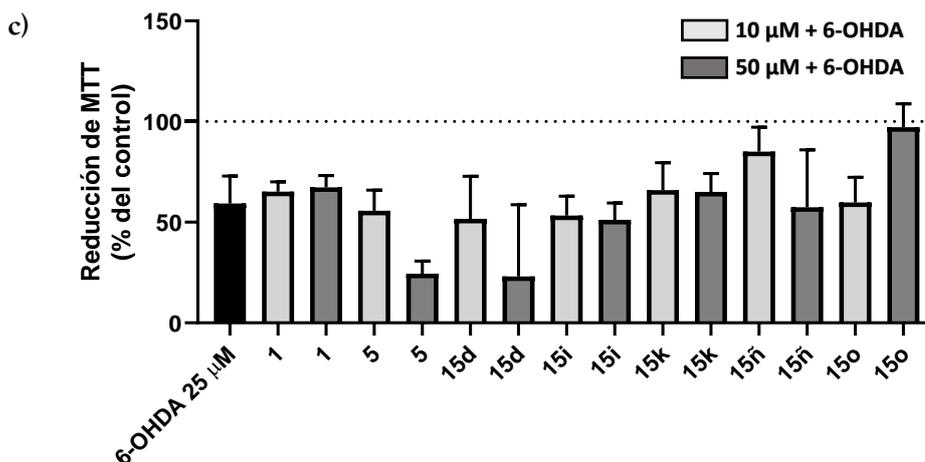
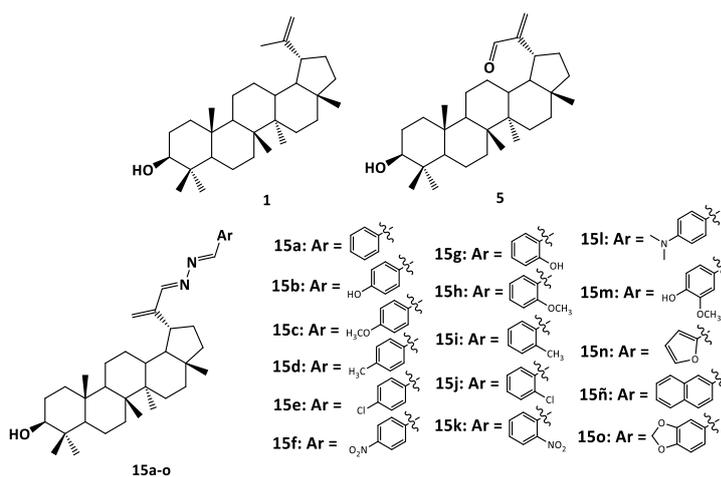


Figura 78. Gráficos de porcentajes de viabilidad celular para los compuestos 1, 5 y 15a-15o. a) Mayor actividad; b) Actividad media; y c) Baja actividad.

Tabla 14. Valores de viabilidad celular ejercida por triterpenos tipo lupano frente a la línea celular IMR-32.^a



COMPUESTO	% REDUCCIÓN DE MTT	
	10 µM	50 µM
1	65,2	67,3
5	55,7	24,5
15a	86	94,2
15b	86	94
15c	100	100
15d	51,7	23
15e	70,8	71,9
15f	94	88,9
15g	76,8	75
15h	86,3	98,3
15i	53,3	51,2
15j	88,1	68,5
15k	65,9	65
15l	80,4	80,7
15m	100	100

15n	95,8	100
15ñ	85	57,4
15o	59,8	97,2
^a células pretratadas con los compuestos (10 y 50 μM), posteriormente tratadas con 6-OHDA (25 μM), durante 24 h con pérdida de viabilidad del 40%.		

En base a los resultados de la Tabla 14, se puede concluir que los compuestos que demostraron ejercer la mayor actividad neuroprotectora son las azinas cuyos sustituyentes unidos al C-31 son anillos aromáticos funcionalizados con grupos metoxilo, hidroxilo y nitro; o un anillo aromático sin sustituyente; o un heterociclo furano.

Si bien la mayoría de los derivados analizados demostraron revertir la muerte celular inducida por 6-OHDA a ambas concentraciones, o al menos a 50 μM , cabe destacar que para el caso de los compuestos **15c** y **15m**, la actividad neuroprotectora fue óptima en la concentración más baja (10 μM). Ambos lograron revertir la pérdida de la viabilidad celular hasta recuperar los niveles del control (100%). Estructuralmente, **15c** y **15m** poseen un grupo metoxilo en *para* y *meta*, respectivamente, y éste último, a su vez, posee un hidroxilo en posición *para*. No obstante, cuando el hidroxilo se encuentra solo en *para* (**15b**), si bien el compuesto posee una importante actividad neuroprotectora, ésta no es tan elevada como en el caso del compuesto **15m**. Cabe mencionar que el compuesto **15h**, posee un grupo metoxilo en la estructura (*orto*), sin embargo, la actividad observada fue un poco menor que para los análogos **15c** y **15m**. Lo mismo ocurre para el caso de los sustituyentes nitro e hidroxilo, los cuales ejercen una mayor actividad cuando se encuentran en posición *para* (**15f**, **15b**), comparado con los derivados *orto*-sustituído (**15k**, **15g**). Finalmente, para el caso del compuesto **15n**, el cual se trata de una azina triterpénica con un heterociclo aromático unido al C-31 (furano), también resultó poseer una actividad neuroprotectora óptima. De esta forma se demuestra que el tipo de sustituyente unido al C-31 de la azina, afecta la actividad biológica de los derivados. Para el caso de que dicho sustituyente sea un anillo aromático, la posición y tipo de sustituyente es crucial para la actividad neuroprotectora.

Estos hallazgos sugieren que la modificación química del triterpeno natural lupeol dio lugar a nuevos derivados bioactivos, los cuales resultaron ser efectivos ante la actividad neuroprotectora en un modelo de neurotoxicidad por exposición a 6-OHDA. Los derivados **15c**, **15m** y **15n**, se podrían postular como agentes neuroprotectores prometedores y podrían proporcionar una plantilla útil para el desarrollo de nuevos fármacos.

De todas maneras, con el fin de hallar más derivados bioactivos, es necesario llevar a cabo más estudios enfocados en estrategias de síntesis. Por ejemplo, se puede variar la posición de los sustituyentes que contribuyeron a una mayor actividad sobre el anillo aromático, realizar

otras combinaciones entre dichos sustituyentes en el anillo, y/o trabajar con distintos furanos sustituidos, entre otros.

III.8 CONCLUSIONES

Se preparó una serie de derivados de lupeol (**1**), aislado a partir de la especie vegetal *Chuquiraga erinacea*. Para ello se utilizó el compuesto carbonílico α,β -insaturado (**5**) como bloque de construcción obtenido a partir de la oxidación alílica de **1**.

Se propuso llevar a cabo una serie de reacciones de ciclación sobre el sistema α,β -insaturado de **5**, a partir de las cuales se obtuvieron los derivados triterpénicos como el dímero (**10**) y la hidrazona acetilada (**11a**), con bajos rendimientos. A partir de estos resultados, se determinó que el conformero más estable de **5** corresponde al (*s*)-trans, justificando de esta manera, la imposibilidad de obtener los derivados heterocíclicos propuestos.

Teniendo en cuenta estos resultados, se llevaron a cabo reacciones sobre el carbono carbonílico del compuesto **5**, a partir de las cuales se obtuvo la oxima triterpénica (**12**) con rendimiento cuantitativo. La optimización de la reacción mediante MW, condujo a la obtención de **12** también cuantitativamente, pero en menores tiempos de reacción.

La acilación de **12**, dio lugar a **cinco** aciloximas **13a-13e**, las cuales fueron obtenidas con bajos rendimientos. A su vez, la mayoría de ellas, resultaron ser poco activas frente a los ensayos de reversión de muerte celular, mientras que su precursor (**12**) resultó ser muy activo frente al ensayo biológico mencionado.

Se sintetizaron **dieciséis** azinas triterpénicas **15a-15o** a partir de **5**, cuya metodología fue optimizada mediante MW. A diferencia de la metodología tradicional, se obtuvieron con mejores rendimientos, así como también, se logró una menor formación del subproducto **10**.

La actividad neuroprotectora de estas azinas resultó ser en general muy buena, destacándose **15c**, **15m** y **15n** como las azinas más activas frente a la reversión de la muerte celular. Se observó que el grupo metoxi en posición *para* o *meta* al anillo aromático unido al C-31 contribuye a una mayor actividad, así como también el anillo furano cuando se encuentra como sustituyente del C-31 de la azina.

Las azinas **15c**, **15m** y **15n** podrían ser consideradas como agentes neuroprotectores prometedores, y como fuente de inspiración para el desarrollo de nuevos fármacos.

En esta parte del trabajo de tesis, se sintetizaron **veintidós** derivados de lupeol, a través de modificaciones químicas sencillas, los cuales son informados por primera vez. Dada la importante actividad neuroprotectora de alguno de ellos, se concluye que la modificación química de lupeol a través de la obtención del bloque de construcción **5**, resultó ser una buena estrategia para la obtención de nuevos derivados bioactivos.

PARTE C:

Estudio bioguiado y aislamiento de los
metabolitos bioactivos de *Nicotiana glauca*
(Graham)

III.9 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL *Nicotiana glauca*

Siguiendo con los objetivos propuestos para esta tesis, se seleccionó para su estudio la especie vegetal *Nicotiana glauca* (Graham), haciendo uso de los criterios etnomédicos y quimiotaxonómicos. Los ensayos biológicos llevados a cabo para el estudio de esta especie vegetal fueron realizados por las Dras. Milanesi y Vasconsuelo (INBIOSUR-CONICET, Bahía Blanca).

A continuación, se detalla una breve descripción botánica, fitoquímica y de los usos etnomedicinales de esta especie vegetal. La nomenclatura científica y sinónimos fueron tomados del “Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur” [162].

Familia: Solanaceae.

Sinónimos: *Nicotidendron glauca* (Graham) Griseb., *Nicotiana glauca* Graham var. *decurrens*, *Nicotiana glauca* Graham var. *typica*, *Nicotiana glauca* Graham var. *grandiflora*, *Nicotiana glauca* Graham f. *lateritia*, *Acnistus virgatus* Griseb., *Siphaulax glabra* Raf., *Nicotiana glauca* Graham var. *angustifolia*.

Nombres vulgares: Palán-palán, palancho, tabaco moro, tabaco moruno, árbol gandul, gandul, jatun sairi (quechua), khonta sairi (Aymará), huaaca lamanaxanaxa (toba) [222].

Distribución geográfica: se trata de una especie nativa de Argentina. *N. glauca* figura en la lista de malezas en Argentina, Chile y Uruguay [223]. La especie fue reconocida en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Salta, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán y en Capital Federal. En la Patagonia, se está asilvestrando a lo largo de las carreteras y está siendo cultivada en urbanizaciones, por ejemplo, en Trelew (Chubut). Habita ampliamente en taludes, terraplenes, márgenes de camino, terrazas de ríos, preferentemente en arenales o sobre suelos rocosos o pedregosos y removidos.

Descripción botánica: Se trata de un arbusto perennifolio, muy ramificado de 1,5 a 6 m de alto. Corteza grisácea, fisurada. Hojas alternas, simples, verde-glaucas, de 5-20 cm de largo por 3-10 cm de ancho, con un pecíolo de 3-5 cm de largo, lámina ovada, elíptica o lanceolada, algo coriácea, borde entero. Flores en panículas cortas, terminales. Corola de color amarillo, de 2-4 cm de largo, estrecho, en forma de trompeta con 5 escotaduras, 5 estambres encerrados en el tubo de la corola, cáliz tubular con 5 lóbulos triangulares. El fruto es una cápsula ovoide, de 0,7-1,5 cm de largo. Semillas numerosas y pequeñas. Una planta adulta puede producir entre 10.000 y 1 millón de semillas. Florece en primavera y verano. Comienza la floración a partir del año de su germinación [162,222].

Composición química: [42,224,225]

- *Alcaloides*: anabasina; *N'*-nor-anabasina; anatabina; 2,3'-bipiridina; cotinina; miosmina; nicotina; nicotina; nor-nicotina; nicotina-1'-*N*-óxido; ácido nicotínico; 3-acilpiridina.
- *Amidas*: *N*-(2',6'-dietilfenil)-2-cloroacetamida; *N*-(butiloximetil)-*N*-(2',6'-dietilfenil)-2-cloroacetamida), *N*-(4-metoxicinamoil)-etilendiamina.
- *Ácidos grasos*: ácido palmítico; ácido linoleico; ácido oleico.
- *Cumarinas*: escopoletina.
- *Esteroides y secoesteroides*: β -sitosterol, daucosterol, 7-dehidrocolesterol, vitamina D₃; 25-(OH)-D₃; 1 α ,25-(OH)₂-D₃.
- *Flavonoides*: rutina.

Usos etnomedicinales: las hojas de *N. glauca* fueron muy utilizadas desde hace años por los indígenas Wichí, que habitaban en las provincias de Chaco, Salta y Formosa. Los Wichí utilizaban las hojas frescas aplicándolas de forma externa como antiinflamatorio, antirreumático, antiartrítico, como cicatrizante para curar mordeduras o heridas cortantes, curación de llagas, quemaduras, maduración de forúnculos y abscesos [222]. También, las hojas frescas se utilizaban para las paperas [226], y hervidas se aplicaban para tratar el acné y para calmar el dolor de muelas [227]. Asimismo, se aplicaban externamente en tratamiento de dolores de cabeza, cataplasmas en dolores reumáticos, heridas y úlceras, baños de asiento en hemorroides, asma, ictericia, fiebre y afecciones cardiovasculares [222,224].

Otros usos: Antigüamente, la planta se utilizaba en rituales. Desde 1690 se han utilizado extractos acuosos de hojas de *N. glauca* contra insectos masticadores y chupadores de las plantas comestibles. En varios países, incluso en Argentina se la cultiva como ornamental. También se utiliza como cultivo energético para la producción de biocombustible [222].



<<Su nombre botánico “*Nicotiana glauca*” alude a Jean Nicot, erudito y embajador francés, quien introdujo el tabaco a la corte real de Francia en 1560, y “*glauca*”, que significa “de color verdoso” en griego.>>

Para el desarrollo de este estudio bioguiado, nos basamos principalmente en los trabajos reportados por Milanesi y col., en los cuales se detecta la presencia de moléculas estructuralmente semejantes al 17β -estradiol en *N. glauca*, y en otras especies de Solanáceas [42-46]. Para ello, se utilizó el extracto lipofílico de la especie vegetal, obtenido mediante el método de Bligh and Dyer [44].

Con la intención de realizar un estudio bioguiado, en primer lugar, se llevó a cabo la obtención de un extracto crudo a partir de la especie vegetal (extracto etanólico), el cual posteriormente, fue sometido a un fraccionamiento a través de solventes de polaridad creciente. De esta forma, se logró la extracción de los distintos metabolitos de la especie vegetal, los cuales se fueron separando según su polaridad. Finalmente, de los subextractos obtenidos, se seleccionó el de mayor bioactividad, para su fraccionamiento y aislamiento del o los metabolitos responsables de la misma, los cuales son identificados mediante análisis espectroscópicos.

III.10 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Nicotiana glauca*

Teniendo en cuenta los antecedentes de la especie vegetal en cuanto a sus usos medicinales y composición química, se propuso la obtención del extracto etanólico (EE) de *N. glauca*, el cual será sometido a un análisis biológico sobre células musculares esqueléticas y a un fraccionamiento bioguiado en búsqueda de los metabolitos bioactivos.

Como primera etapa de este trabajo se procedió a la recolección del material vegetal a analizar, como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Posteriormente, se llevó a cabo la obtención del **EE**. Para ello, las partes aéreas de *N. glauca* se secaron en estufa y luego fueron pulverizadas. Teniendo en cuenta que algunos metabolitos pueden presentar propiedades termosensibles, se utilizaron bajas temperaturas de secado (50 °C). El material vegetal obtenido (126 g), se sometió a una extracción con EtOH a temperatura ambiente durante 10 días. Luego del filtrado y evaporación del solvente bajo presión reducida, se obtuvo el **EE** total (26,4 g) con un rendimiento de 21% sobre material vegetal seco.

III.10.1 Efectos del extracto etanólico de *N. glauca* sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12

Una vez obtenido el **EE**, se analizó su efecto sobre la línea celular C2C12, mediante los ensayos preliminares: tinciones con Mitotracker Red (MTT) y 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para evaluar las morfologías mitocondrial y nuclear, respectivamente. Transcurridas 2 h de exposición de las células al **EE**, se observaron cambios morfológicos, a nivel de los núcleos celulares, típicos de apoptosis, como la fragmentación/condensación de la cromatina (picnosis). Asimismo, a través de la tinción específica mitocondrial con MTT se pudieron detectar cambios morfológicos en las mitocondrias (picnosis) y redistribución celular de las mismas (agrupadas en torno de la región nuclear), ambas características típicas de apoptosis (Figura 79). Las células tratadas con el vehículo (CONTROL), mostraron una morfología y distribución uniforme de mitocondrias a través del citosol, dicho esto de otra manera, muestran una distribución de mitocondrias de tipo “tela de araña”, a la vez que los orgánulos presentan una morfología normal (Figura 79). Por otro lado, cuando se indujo la apoptosis con H₂O₂ (control positivo de apoptosis) o cuando fueron tratadas con el **EE**, se observó en ambas, un tamaño reducido de las mitocondrias y la agrupación característica de los orgánulos alrededor del núcleo con aspecto condensado o picnótico, lo que resultó en una fluorescencia más intensa sobre el núcleo (Figura 79). Como ya se mencionó, dichos eventos están asociados con la apoptosis.

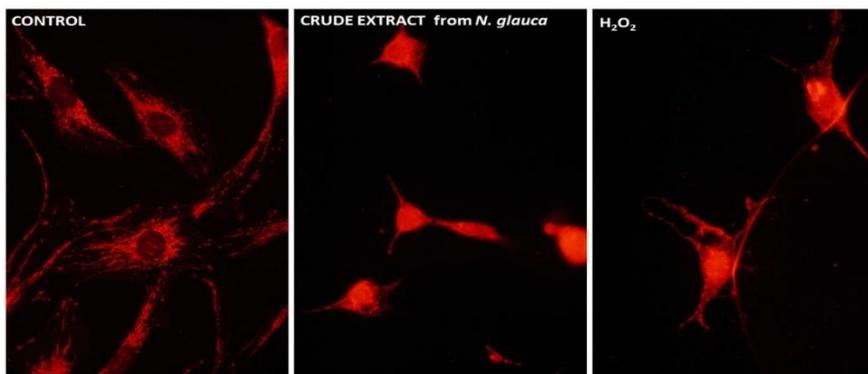


Figura 79. Cambios en la morfología y localización de las mitocondrias en las células musculares C2C12 inducidos por el EE de *N. glauca*. (Ampliación 63X).

Para confirmar si estas observaciones a nivel morfológico, se deben a un proceso apoptótico, se evaluaron los efectos del EE en las células C2C12 mediante el ensayo enzimático TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling). La degradación del ADN por acción de endonucleasas generando fragmentos oligonucleosomales, es característico de la apoptosis. Durante esta fragmentación quedan expuestos los extremos 3'-OHs de la cadena de ADN. En el ensayo de TUNEL la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal se une a dichos extremos dUTPs marcados con fluoróforos, lo que permite identificar específicamente células apoptóticas. Se utilizó esta técnica para confirmar que los extractos de *N. glauca* inducen apoptosis en las células C2C12. El resultado se expresa como porcentaje de células TUNEL positivas, las cuales fueron identificadas por fluorescencia verde en el núcleo (Figura 80). Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que en los ensayos anteriores, pero en este caso, las células fueron tratadas con el EE durante 1 h. Estas, exhibieron un gran aumento en la fragmentación del ADN ($63 \pm 9,09\%$ de células TUNEL positivas por encima del control), similar a los valores obtenidos luego del tratamiento con H_2O_2 durante 2 h (Figura 80).

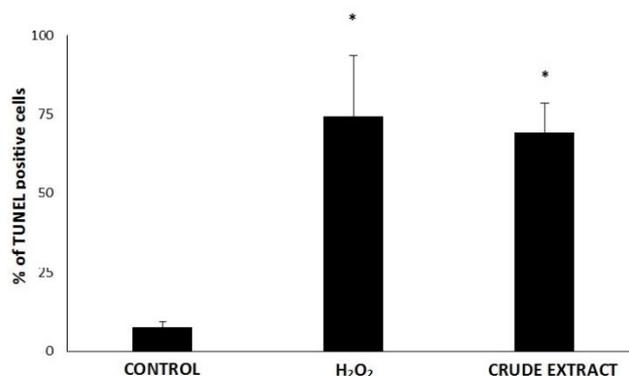




Figura 80. Ensayo enzimático TUNEL sobre células C2C12 tratadas con el extracto etanólico de *N.glauca*.

Por otra parte, con el fin de determinar el mecanismo molecular por el cual el EE ejerce apoptosis sobre las células C2C12, se investigó la participación de caspasas-3 y -7. Estas enzimas clivan una variedad de sustratos y eventualmente causan fragmentación del ADN, por lo tanto, dan lugar a la morfología característica de las células apoptóticas [228]. Además, una de las características más evidentes y específicas de apoptosis es la degradación del ADN, impulsada por la activación de caspasa-3, caspasa efectora central, que la convierte en un biomarcador de apoptosis [229]. Para ello, las células C2C12 se trataron como en los ensayos anteriores, con los estímulos indicados: células no tratadas (CONTROL), células incubadas con EE durante 1 a 2 h (EXTRACTO CRUDO), células tratadas con H₂O₂, 1 a 2 horas (H₂O₂) (Figura 81). Luego, se analizó la activación de caspasas utilizando el kit comercial Cell Event Caspase-3/7 (sección Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 81, el EE induce la activación de caspasas-3/7 (86 ± 7,21% de células positivas para caspasas, por encima del control) de manera similar a las células tratadas con H₂O₂.

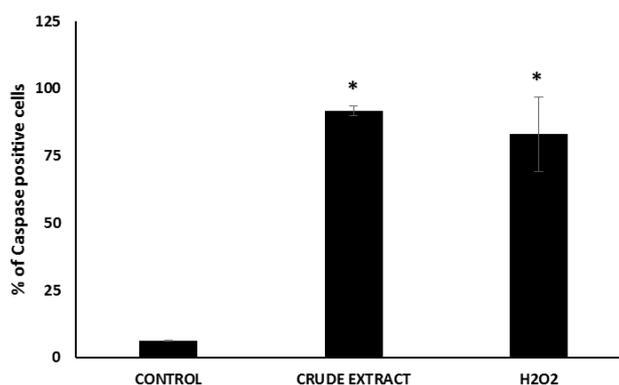


Figura 81. Activación de caspasas-3 y -7 por el extracto etanólico de *N. glauca* sobre células C2C12.

En función a estos resultados, se comprobó que la principal actividad ejercida por el EE de *N. glauca* es la inducción de la muerte celular, mediante un proceso apoptótico. Debido al interés por el estudio de esta especie vegetal, en función a la presencia de moléculas capaces

de unirse a ERs [42-46], estos resultados demuestran que la actividad apoptótica observada podría deberse a dichas moléculas, o a otras presentes en el extracto crudo.

Por tales motivos, resulta necesario continuar con el fraccionamiento bioguiado del **EE**, en búsqueda de los compuestos responsables de la actividad observada sobre las células C2C12.

III.11 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Nicotiana glauca*

Considerando el efecto ejercido por el **EE** sobre las células musculares esqueléticas, y continuando con los objetivos de esta tesis, se llevó a cabo el fraccionamiento del mismo mediante la utilización de solventes de polaridad creciente. De esta manera, los subextractos obtenidos se someterán a una serie de ensayos biológicos con el fin de seleccionar los más activos para la posterior elucidación de los metabolitos responsables de la actividad biológica observada.

Para ello, una cantidad del **EE** (4 g) fue particionado con solventes de polaridad creciente, hexano (**SH**), CHCl_3 (**SC**), AcOEt (**SAE**). Cada fracción fue evaporada al vacío, obteniéndose así los respectivos subextractos. En la Tabla 15, se muestran las cantidades obtenidas de cada uno, así como sus respectivos rendimientos calculados en base al **EE** total (Tabla15).

Tabla 15. Masa y rendimiento de los subextractos de *N. glauca*.

SUBEXTRACTO	Masa (mg)	RENDIMIENTO (%)*
SH	993	24,8
SC	28	0,7
SAE	164	4,1

* Sobre el **EE**.

Considerando la presencia de los compuestos informados para esta especie vegetal mencionados más arriba, y con el fin de obtener información preliminar de la presencia o ausencia de un determinado grupo fitoquímico en cada subextracto, se realizó una serie de ensayos presuntivos de tipo colorimétricos como primera aproximación. Para ello se siguieron los métodos estándar mediante CCF y los respectivos agentes reveladores indicados para cada tipo de compuesto [230]. Para cada ensayo, se realizó una CCF sembradas cada una con **SH**, **SC**, **SAE** y el o los testigos correspondientes para cada tipo fitoquímico. Se corrieron con la FM indicada por bibliografía consultada [230]. Cada placa fue rociada con el agente revelador según el grupo fitoquímico a determinar (sección Materiales y Métodos).

Para la identificación de *flavonoides*, se utilizó el reactivo Fast Blue Salt, el cual proporciona un color violeta/azul en el visible ante la presencia de estos compuestos. Los testigos utilizados fueron rutina, flavonoide reportado para la especie vegetal [224], y quercetina. Luego del revelado de la CCF, se pudo observar una coloración violeta muy tenue en el SAE. Tanto en el SH como en el SC no se observaron manchas características. En cuanto a los testigos utilizados, se observó únicamente una mancha coincidente a la quercetina en el SAE. De esta forma, se podría pensar que este subextracto contendría flavonoides.

Las estructuras *cumarínicas* se detectaron mediante la prueba de Bornträger, la cual se puede interpretar a través de manchas azules bajo luz UV (365 nm). Los testigos utilizados fueron escopoletina e isoescopoletina, la primera de ellas se encuentra informada para la planta [225]. La placa se analizó bajo luz UV (365 nm) y se observó una mancha azul brillante e intensa en el SC, y una mancha un poco más tenue en el SAE. Por comparación con los testigos, la mancha observada en el SC coincidió con el testigo de escopoletina. Estos resultados indicarían la presencia de cumarinas en los SC y SAE.

En el ensayo para *esteroides* se utilizó *p*-anisaldehído como agente revelador, el cual muestra diversas coloraciones para este tipo de compuestos en el visible, luego del calentamiento. Los testigos utilizados fueron 17 β -estradiol y β -sitosterol, este último se encuentra reportado para *N. glauca* [224]. Luego del revelado, los dos testigos fueron observados como manchas coloreadas en el visible, y coincidieron con manchas tenues observadas en SH. Para el SC, solo se observó β -sitosterol (mancha muy tenue), y para el SAE no se observaron manchas correspondientes a los testigos sembrados.

Estos resultados nos dan una idea de algunos grupos químicos que se pueden encontrar en cada subextracto, sin embargo, resulta necesario continuar con la evaluación biológica de cada uno y posterior fraccionamiento.

III.11.1 Efectos de los subextractos de *N. glauca* sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12

Luego de determinar algunos grupos fitoquímicos presentes en los subextractos y teniendo en cuenta los antecedentes de los mismos, resulta interesante conocer la actividad biológica ejercida por cada subextracto sobre las células musculares esqueléticas.

Para ello, cada subextracto fue analizado mediante el ensayo enzimático TUNEL con el fin de determinar la actividad ejercida sobre la línea celular C2C12, utilizando las mismas condiciones que las descriptas anteriormente para el EE. Mediante este ensayo se observó que

los subextractos inducen apoptosis sobre las células musculares (Figura 82). Los valores correspondientes a la cuantificación de dicha actividad se pueden ver en la Tabla 16 para cada subextracto, y con el fin de comparar, se menciona el valor obtenido anteriormente para el **EE**. Cabe resaltar que, de los tres subextractos, el **SH** mostró la mayor actividad apoptótica, siendo menor la apoptosis inducida por el **SC** y el **SAE**.

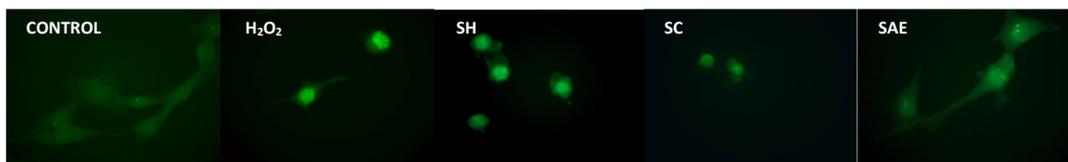


Figura 82. Ensayo enzimático TUNEL sobre células C2C12 tratadas con los subextractos de *N. glauca*.

Tabla 16. Resultados de los ensayos TUNEL para el **EE** y cada subextracto de *N. glauca*.

EXTRACTO	% DE CÉLULAS TUNEL POSITIVAS ^{a*}
EE	63
SH	98
SC	67
SAE	44,6
C ^b	6,3 ^c
H ₂ O ₂ ^d	74 ^e

^a a 2,5 mg/5mL isopropanol. ^{*} Respecto al control. ^b Control negativo. ^c 1x10⁻³ % isopropanol. ^d control positivo. ^e 0,5 mM.

Del mismo modo que con el **EE**, se midió la actividad de caspasas para cada subextracto. El ensayo indicó que el **SH** y, en menor medida, el **SC** (90 ± 4,6% y 55 ± 14% de las células positivas para caspasas por encima del control, respectivamente) indujeron apoptosis, activando las caspasas-3/7 (Figura 83).

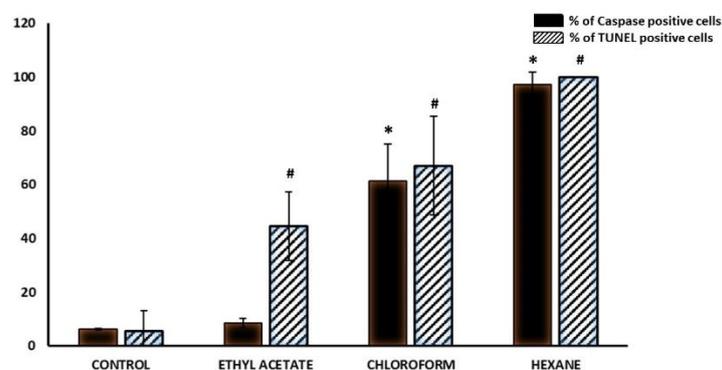


Figura 83. Activación de caspasas-3/7 en células C2C12 por los subextractos hexánico (**SH**), clorofórmico (**SC**) y de acetato de etilo (**SAE**) de *N. glauca* y porcentajes de células TUNEL positivas.

A partir de este ensayo, se puede observar apoptosis y que, a su vez, en dicho proceso están involucradas las caspasas. Su activación en respuesta al tratamiento con los **SH** y **SC** de *N. glauca* está de acuerdo con la destrucción de la cromatina evidenciada por los experimentos previamente mostrados. Si bien estos resultados sugieren que la actividad apoptótica ejercida por los subextractos de *N. glauca* involucra las vías de las caspasas, con este método no se pudo identificar la caspasa específica implicada.

Considerando estos resultados, se puede determinar que la apoptosis inducida en las células musculares está causada principalmente por compuestos que se encuentran en los **SH** y **SC**, por lo que se continuó con el fraccionamiento del **SH** y **SC**.

III.12 FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO DEL SUBEXTRACTO HEXÁNICO Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS

Dado que **SH** mostró una importante actividad apoptótica sobre las células musculares C2C12, se procedió a identificar y aislar los metabolitos responsables de dicha actividad mediante el fraccionamiento del subextracto. Para ello, 993 mg de **SH** se sometieron a una CC sobre sílica gel de fase normal, utilizando una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente como FM. De esta cromatografía se obtuvieron 70 fracciones de 10 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF. Según su similitud observada en el análisis de CCF, las fracciones fueron agrupadas dando lugar a **F1-F5**. Cabe resaltar que, teniendo en cuenta los reportes acerca de la composición química de la planta [224], para las CCF se hizo uso de testigos correspondientes a algunos ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido linoleico y ácido oleico, y para el caso de **F3**, se observó un R_f que coincidió con el R_f del testigo de ácido palmítico (**AP**) ($R_f = 0,74$). De todas maneras, para confirmar dicha estructura, son necesarios análisis espectroscópicos tales como RMN de ^1H y ^{13}C , y espectrometría de masas.

Con el fin de encontrar el/los compuestos responsables de la actividad ejercida por el **SH**, se analizaron estas fracciones a través del ensayo TUNEL, mediante el cual se cuantificó la apoptosis. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células TUNEL positivas (Figura 84), (**F1**: $13 \pm 3,5\%$; **F2**: $59 \pm 10\%$; **F3**: $89 \pm 9,5\%$; **F4**: $70 \pm 6,2\%$; **F5**: $38 \pm 2,6\%$, células TUNEL positivas).

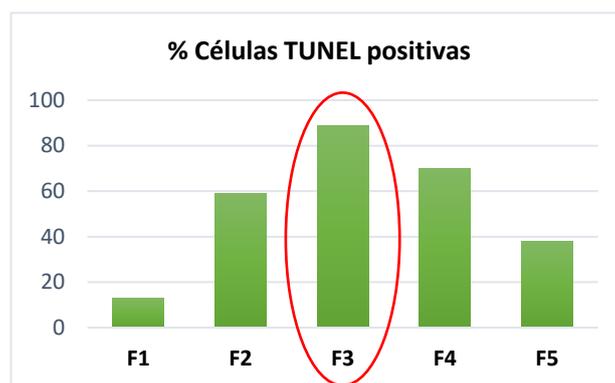


Figura 84. Porcentaje de células TUNEL positivas para las fracciones F1-F5 obtenidas del subextracto hexánico (SH) de *N. glauca*.

De esta manera, **F3** (6,7 % sobre el total del **SH**) fue seleccionada para llevar a cabo su fraccionamiento en búsqueda del/los metabolitos responsables de la actividad observada.

III.12.1 Fraccionamiento bioguiado de F3 y aislamiento de ácido palmítico

Considerando que **F3** resultó ser la fracción que presentó mayor actividad, se continuó con su fraccionamiento. Para ello, **F3** (66,4 mg) se sometió a una CC sobre sílica flash, utilizando como eluyente una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 62 subfracciones de 5 mL cada una, que fueron agrupadas en tres subfracciones (**SF1-SF3**) según su similitud observada en el análisis de CCF. Teniendo en cuenta que en la CCF de **F3** se observó la presencia de **AP**, para el caso de la CCF de **SF1-SF3**, se sembró el testigo confirmándose la presencia de este ácido graso en la **SF1**. Mediante un ensayo TUNEL se determinó que de las tres subfracciones analizadas, **SF1** (6,4 mg) resultó ser la más apoptótica (75% células TUNEL positivas). Luego de la evaporación de la misma, se obtuvo un sólido blanco de aspecto brillante. El análisis espectroscópico de este sólido a través de CG-EM, mostró la presencia de un único compuesto, el cual fue identificado por comparación con la base de datos del espectrómetro de masas y correspondió a ácido palmítico (**AP**) (6,4 mg, 0,033% sobre planta seca), como se había observado previamente en la CCF. Este ácido graso se encuentra de acuerdo con lo reportado por Silva y col. [224].

El espectro de masa de **AP** mostró un ion a m/z 256,4 (15%) el cual fue asignado como ion molecular. A partir de él, se observan las sucesivas fragmentaciones dando lugar a los iones mayoritarios de m/z 228 (20%), 185,2 (35%), 129 (52%), 73 (100%), 60 (76%) y 43 (59%). Asimismo, su estructura fue confirmada por espectroscopía RMN de ^1H y ^{13}C , los cuales mostraron señales características del **AP** (Figura 85) y están de acuerdo con los hallazgos

reportados en la literatura [231,232]. Así, en el espectro de ^1H , se puede observar un triplete de área 2 a 2,35 ppm, correspondiente a los hidrógenos H-2; un multiplete de área 2 a 1,62 ppm y corresponde a los hidrógenos H-3; un singulete amplio, que corresponde a los hidrógenos H-4 a H-15, cuya área es 24, y finalmente, un triplete en 0,88 ppm de área 3, asignada para los protones H-16. Para el caso del ^{13}C , se pudieron observar 11 señales bien definidas, en la zona que se encuentra entre 13 y 35 ppm. A su vez, en a 29,85 ppm se puede apreciar una señal ancha, correspondiente a los metilenos C-8, C-7, C-6 y C-5. A 179 ppm, se aprecia la señal correspondiente al carbono carbonílico, C-1 (Figura 85).

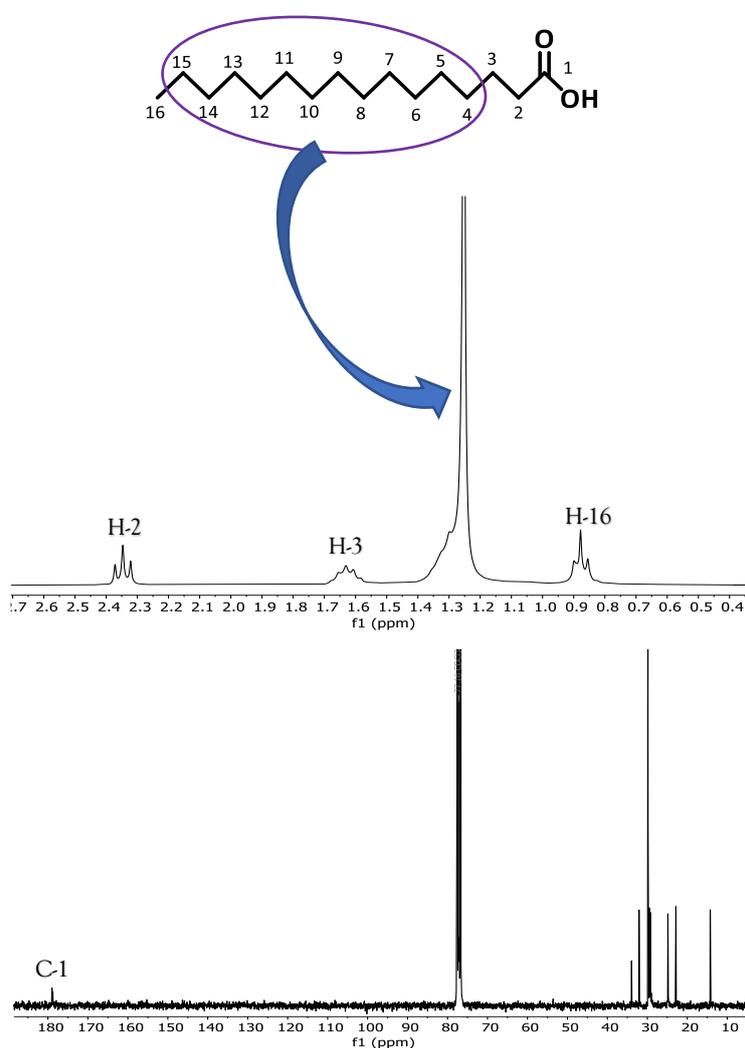


Figura 85. Estructura de ácido palmítico (AP) y espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

El AP se trata de un ácido graso de dieciséis átomos de carbono y es el principal ácido graso saturado presente en el organismo humano. El AP puede cumplir determinados roles fundamentales dentro del organismo humano, tales como la síntesis de moléculas involucradas

en diversos mecanismos fisiológicos y en la conformación de las membranas biológicas celulares, entre otros [233]. Sin embargo, existen reportes en los que se relaciona este ácido graso con fenómenos de toxicidad y apoptosis. Park y col. (2014) informaron que **AP** induce toxicidad y apoptosis, en las que podrían estar involucradas múltiples vías [234]. En células madre neurales, Yuan y col. (2013) observaron que **AP** disminuyó la viabilidad celular y aumentó la apoptosis de las células madre neurales de manera significativa en función de la dosis y el tiempo [235]. Por otra parte, Ji y col. (2005) observaron que en las células HepG2 (línea celular de hepatocarcinoma humano), el **AP** induce apoptosis. A su vez, **AP** inhibió el crecimiento celular de una manera dependiente del tiempo y de la dosis, e indujo cambios morfológicos que incluyeron hinchazón y disolución de la membrana. Los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 disminuyeron ligeramente, en contraste con los niveles de la proteína apoptótica Bax (proteína similar a Bcl-2), lo que resultó en una disminución significativa de la relación Bcl-2/Bax después del tratamiento [236].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, no resulta llamativo que este compuesto sea el principal responsable de la citotoxicidad observada, sin embargo, es importante recalcar que este efecto apoptótico desencadenado por **AP**, puede variar o no existir si se modifican las condiciones experimentales como concentraciones o la célula diana. Con el fin de confirmar estas observaciones, a continuación, se detallan los estudios que se llevaron a cabo para la evaluación de los efectos ejercidos por el **AP** aislado de la planta, sobre las células musculares normales.

III.12.2 Efectos de ácido palmítico sobre la línea celular de mioblastos murinos C2C12

Con el fin de evaluar los efectos de **AP** aislado de *N. glauca* sobre las células C2C12, éstas se incubaron con el ácido graso durante 1 h (PALMITIC ACID) y como condición control se utilizaron cultivos celulares de C2C12 sin ningún tratamiento (CONTROL) (Figura 86). Ambos cultivos fueron analizados por microscopia de fluorescencia utilizando las tinciones de MTT y DAPI, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se observaron características morfológicas asociadas a apoptosis a nivel nuclear y mitocondrial en las células tratadas con **AP**. A su vez en esta misma condición, mediante el ensayo de TUNEL se observó un gran aumento en la fragmentación del ADN ($74 \pm 11,09\%$ de células TUNEL positivas por encima del control). Además, se midió la actividad de caspasas en respuesta al tratamiento con **AP**, observándose una activación de caspasas-3/7 ($87 \pm 7,6\%$ de células positivas para caspasas por encima el control) (Figura 86).

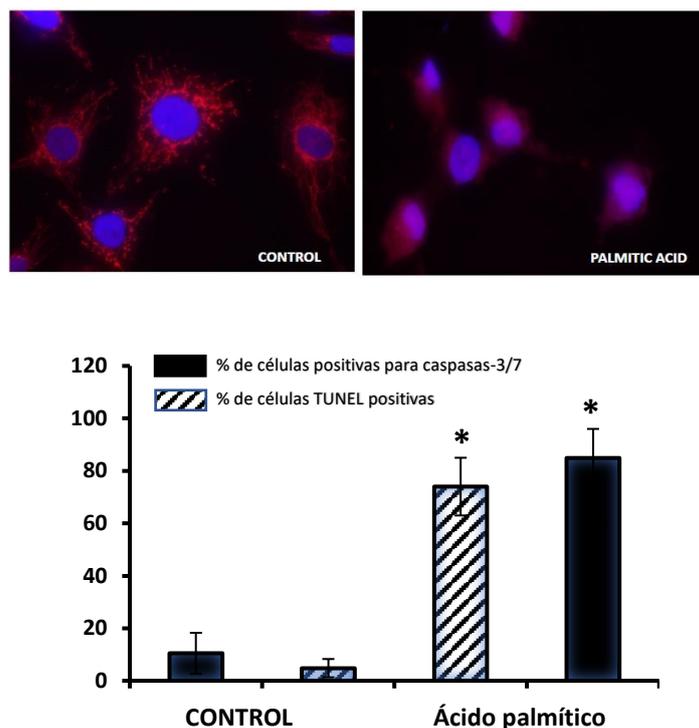


Figura 86. Activación de caspasas-3/7 en células C2C12 por ácido palmítico (AP) y porcentaje de células TUNEL positivas.

Estos resultados se condicen con los observados para la SF1, de la cual se aisló el AP. Por lo tanto, este ácido graso se trata del principal responsable de los efectos observados para el SH, manteniendo los efectos apoptóticos frente a esta línea celular.

III.13 FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO DEL SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS BIOACTIVOS

Luego del fraccionamiento bioguiado del SH, y teniendo en cuenta la apoptosis ejercida por los subextractos de *N. glauca* sobre las células musculares C2C12 (Tabla 16), se continuó con el estudio del SC, en búsqueda de los metabolitos responsables de la actividad, tal y como se realizó para el SH. Para ello, 28 mg de SC se sometieron a una CC sobre sílica gel de fase normal, utilizando una mezcla de Hex/AcOEt de polaridad creciente como FM. De esta cromatografía se obtuvieron 153 fracciones de 10 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas mediante CCF. Según su similitud observada en el análisis de CCF, las fracciones fueron agrupadas dando lugar a F1-F5. A su vez, teniendo en cuenta los reportes acerca de la composición química de la planta [224,225] y lo observado anteriormente en los ensayos presuntivos, para las CCF se hizo uso de un testigo de escopoletina (ESC), cuya mancha ($R_f = 0,47$) coincidió con una de las manchas observadas para F5. De todas maneras, para confirmar

dicha estructura, son necesarios análisis espectroscópicos tales como RMN de ^1H y ^{13}C , y espectroscopía de masas.

Con el fin de encontrar el/los compuestos responsables de la actividad ejercida por el SC, las fracciones **F1-F5** fueron analizadas por microscopia de fluorescencia utilizando las tinciones de MTT y DAPI. De las cinco fracciones analizadas, **F5** mostró una menor viabilidad celular. De esta manera, **F5** fue la fracción más activa, siendo seleccionada para llevar a cabo su fraccionamiento en búsqueda del/los metabolitos responsables de la actividad observada.

III.13.1 Fraccionamiento bioguiado de F5 y aislamiento de escopoletina

Considerando que **F5** resultó ser la fracción que presentó mayor actividad, se continuó con su fraccionamiento. Para ello, **F5** (24 mg) se sometió a una CC sobre sílica flash, utilizando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ de polaridad creciente como FM. De esta cromatografía se obtuvieron 122 fracciones de 5 mL cada una, que fueron agrupadas en cuatro subfracciones (**SF1-SF4**) según su similitud observada en el análisis de CCF. Teniendo en cuenta que en la CCF de **F5** se observó la presencia de **ESC**, para el caso de la CCF de **SF1-SF4**, se sembró el testigo confirmándose la presencia de esta cumarina en la **SF2**.

Mediante el análisis por microscopia de fluorescencia utilizando las tinciones de MTT y DAPI, se determinó que de las cuatro subfracciones analizadas, **SF2** (1,6 mg; 5,7% sobre el total del SC) resultó ser la más activa, mostrando una menor viabilidad celular. Considerando este resultado, se procedió al análisis de dicha subfracción.

El análisis espectroscópico de esta subfracción a través de CG-EM, mostró un pico mayoritario, el cual fue comparado con la base de datos del espectrómetro de masas, y correspondió a **ESC** ($t_{\text{R}} = 11,196$ min). El espectro de masas mostró un ion a m/z 192,1 (100%), el cual fue asignado como ion molecular, y a su vez, como pico base. A partir de éste, se observaron las sucesivas fragmentaciones dando lugar a los iones de m/z 177 (60%), 164 (25%), 149 (48%), 121 (21%), 79 (20%), 69 (37%) y 51 (25%). Sin embargo, la presencia de otro pico minoritario nos indicó que **ESC** no estaría pura, por lo que se continuó con su purificación.

Teniendo en cuenta que contamos con muy poca cantidad de masa (1,6 mg), se llevó a cabo una CCF preparativa, utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:5) como FM. De esta cromatografía se logró obtener un sólido de aspecto amarillo pálido que resultó ser **ESC** pura (1,1 mg, 0,006% sobre planta seca), como se había observado previamente en la CCF. Asimismo, su estructura fue confirmada por espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C (Figura 87), y están de acuerdo con lo reportado en la literatura [225,237]. Así, en el espectro de ^1H -RMN, se puede observar un

doblete de área 1 a 7,60 ppm, que corresponde al hidrógeno H-3; dos singuletes de área 1 a 6,92 y 6,85 ppm correspondientes a los hidrógenos aromáticos H-8 y H-5 respectivamente; un doblete de área 1 a 6,27 ppm asignado a H-4, un singulete ancho de área 1 a 6,14 ppm característico del hidrógeno del hidroxilo posicionado en el C-7, y finalmente, un singulete de área 3 a 3,96 ppm, asignada a los protones del grupo metoxilo unido al C-6 del anillo aromático (Figura 87). Para el ^{13}C , se pudieron observar 10 señales bien definidas, en la zona comprendida entre 50 y 165 ppm. Se pueden resaltar las señales a 161,6 ppm, la cual corresponde al carbono carbonílico C-2, y a 56,6 ppm correspondiente al grupo metoxilo ubicado en el C-6 del anillo aromática. Finalmente, entre 100 y 152 ppm, se aprecian las señales de los carbonos de los anillos que conforman la estructura de ESC (Figura 87).

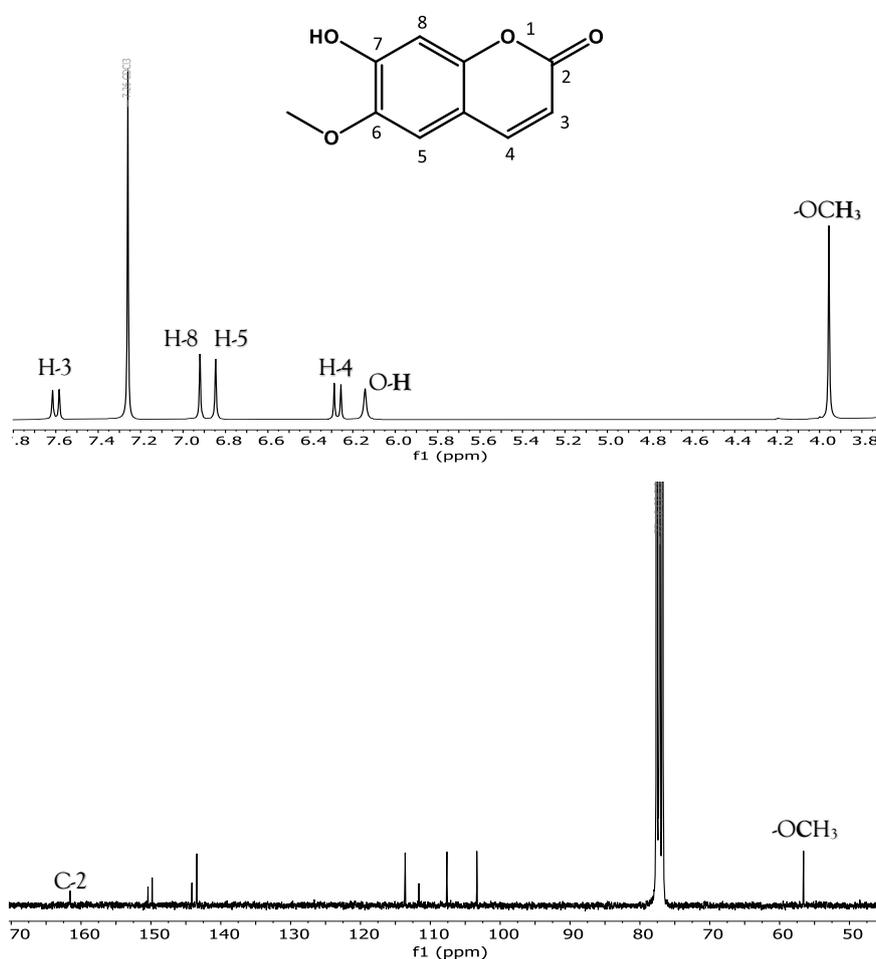


Figura 87. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de escopoletina (ESC).

La ESC es una 7-hidroxycumarina con un sustituyente metoxi en la posición 6 (Figura 87) y a su vez, se trata de un fitoestrógeno del tipo cumestano. Se puede encontrar en diversas plantas tales como la achicoria, diente de león, la ortiga, y en algunas especies de Solanáceas

[238,239]. Si bien existe un reporte en el cual se describe su aislamiento a partir de la especie vegetal *N. glauca*, a diferencia de nuestro trabajo, fue obtenida de los tallos de la planta y el rendimiento de obtención de ESC resultó similar al nuestro [225]. En cuanto a sus propiedades biológicas, por ejemplo, Pan y col. (2009) observaron que ESC tiene propiedades antiangiogénicas manifestadas principalmente a través de la inhibición de la migración y de la formación de tubos, a través de la disminución de la activación de ERK1/2. Por lo tanto, ESC puede ser potencialmente útil para el tratamiento de la angiogénesis y podría servir como base estructural para la síntesis de análogos sintéticos más potentes [240]. Por otra parte, gracias a su actividad contra células tumorales, Seo y col. (2016) sugieren que ESC podría ser útil para el tratamiento de muchos tumores [241]. Asimismo, Liu y col. (2001) observaron que ESC inhibe la proliferación de las células PC3 (adenocarcinoma de próstata humano), observándose cambios morfológicos típicos de apoptosis [242].

Teniendo en cuenta estos antecedentes y según los resultados obtenidos en nuestro trabajo, la ESC se trata del principal responsable de la actividad apoptótica observada para el SC de *N. glauca*, lo cual está de acuerdo con los trabajos bibliográficos que describen su rol en eventos de muerte celular.

Al igual que lo comentado anteriormente para el AP, es importante recalcar que este efecto apoptótico puede variar o no existir si se modifican las condiciones experimentales como concentraciones o la célula diana.

III.14 EFECTOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO, ÁCIDO PALMÍTICO Y ESCOPOLETINA DE *Nicotiana glauca* SOBRE CÉLULAS TUMORALES

A partir de los resultados obtenidos para las células normales y con el fin de aprovechar la actividad biológica desencadenada por los extractos y metabolitos de *N. glauca*, en esta parte del trabajo se analizó el efecto antiproliferativo/apoptótico sobre células tumorales. La línea celular utilizada para llevar a cabo los ensayos fue la línea celular RD, las cuales se corresponden a células de rhabdomiosarcoma (RMS) embrionario humano que poseen una alta tasa de proliferación. Antes de exponer los resultados, se presentará en forma breve la patología mencionada.

El rhabdomiosarcoma (RMS) es un tumor que se desarrolla en tejidos blandos del organismo, generalmente sobre los músculos, y se desarrolla más comúnmente en niños y adolescentes. Este cáncer infantil agresivo se origina en el músculo esquelético normal donde células miogénicas no lograron diferenciarse por completo [243], y se caracteriza por un

crecimiento local rápido y persistente, en general de mal pronóstico. Representa el 3,5% de los casos de cáncer en niños de 0 a 14 años y el 2% en adolescentes y adultos jóvenes de 15 a 19 años [244,245]. El tratamiento de RMS implica el uso de cirugía, quimioterapia y radioterapia o terapia de modalidad combinada [246-248], y está ligado a numerosos efectos secundarios inmediatos, los cuales se ven agravados por tratarse de pacientes muy jóvenes. Además de estos efectos, también pueden aparecer efectos adversos tardíos [249]. Por tal motivo, se enfatiza la necesidad de nuevos tratamientos, con el objetivo de minimizar el impacto a largo plazo de la terapia y mejorar la calidad de vida de los niños.

En este contexto, se evaluó la morfología mitocondrial por microscopía de fluorescencia utilizando la tinción MTT tras la exposición de la línea celular RD al **EE**, **AP** y **ESC**. En la Figura 88, se puede observar una morfología y distribución mitocondrial normal, tipo "tela de araña", en las células RD no tratadas (Control) (Figura 88a), mientras que, en las células tratadas con el **EE**, **AP** y **ESC** (Figuras 88b-d), se observó una distribución mitocondrial atípica (pérdida de la forma de "tela de araña") y un tamaño mitocondrial reducido, con un agrupamiento característico del orgánulo cerca del núcleo, lo que resultó en una fluorescencia más intensa sobre el núcleo.

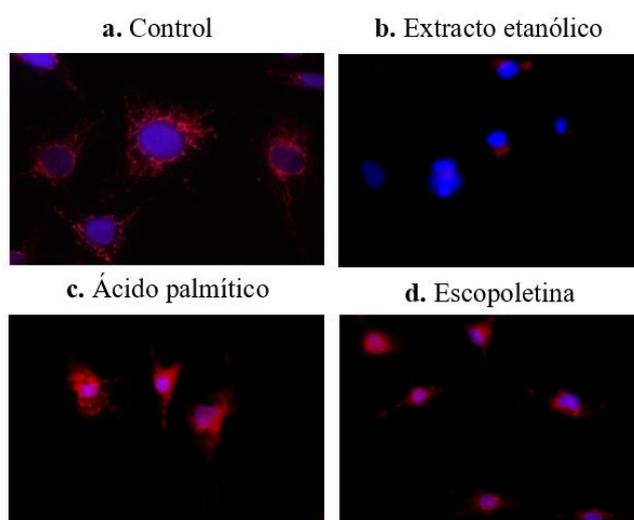


Figura 88. Cambios en la morfología y localización de las mitocondrias en las células RD inducidos por el extracto etanólico (**EE**), ácido palmítico (**AP**) y escopoletina (**ESC**) de *N. glauca*.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente para las células C2C12, en las cuales se observó morfología típica de apoptosis. Luego, se continuó con otros ensayos biológicos para confirmar dichos eventos celulares.

Para ello, las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos (**EE**, **AP**, **ESC**) durante 48 h, y luego se tiñeron con azul de metileno. Este colorante, ingresa a la célula viva y,

por acción de determinadas enzimas, puede oxidarse a un compuesto incoloro. En células muertas, la actividad enzimática se ve disminuida o nula, por lo que el azul de metileno no se reduce y las células mantienen el color azul. En la Figura 89 podemos observar las imágenes correspondientes a cada tratamiento, incluidas células no tratadas (Control), teñidas con azul de metileno, donde las flechas blancas indican células vivas, y las flechas negras células muertas. Esta técnica muestra claramente un número significativo de células muertas luego de los tratamientos con **AP** y **ESC**. En el tratamiento con el **EE** no se observaron células vivas (Figura 89). Mientras que, para el tratamiento con **AP** como para con **ESC**, se observaron células muertas durante las primeras 3 h hasta el final del ensayo (48 h).

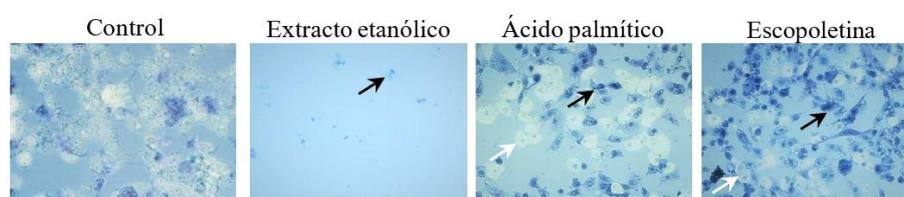


Figura 89. Tinción con azul de metileno de células RD tratadas con el extracto etanólico (**EE**), ácido palmítico (**AP**) y escopoletina (**ESC**) de *N. glauca*.

Estas observaciones indican una clara disminución de la viabilidad celular cuando las células tumorales de RMS son tratadas con los compuestos aislados de los **SH** y **SC** de *N. glauca*. La cuantificación arrojó un 73% de células muertas para **AP** y un 85% para **ESC**.

De esta manera, estos resultados están de acuerdo con los reportes comentados más arriba, los cuales sugieren que tanto **AP** como **ESC** son inductores apoptóticos. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para dilucidar las vías de señalización, que median el efecto de muerte celular observado sobre las células del músculo esquelético normal y patológico. De todas maneras, este hallazgo podría ser relevante para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos, evaluando de forma más profunda las actividades antitumorales del **AP** y **ESC**, así como el mecanismo molecular involucrado en dichos efectos.

Si bien estos dos metabolitos ya estaban informados como componentes de *N. glauca* [224,225], este hallazgo resulta muy importante para contribuir a los efectos específicos que pueden ejercer estos compuestos cuando la planta es utilizada para el tratamiento de ciertas patologías.

Teniendo en cuenta que **ESC** se trata de un fitoestrógeno con capacidad para unirse a ERs y desencadenar eventos celulares, podría tratarse de una de las moléculas no identificadas por Milanesi y col. Para confirmar esta observación, sería necesario llevar a cabo estudios más específicos.

Por otra parte, en los ensayos presuntivos llevados a cabo al principio del estudio, se observó la presencia de moléculas esteroidales en **SH** y **SC**, lo cual está de acuerdo con lo observado por Milanesi y col. [42]. Por este motivo, se realizó un análisis preliminar sobre el resto de las fracciones obtenidas de dichos subextractos, a través de CG-EM en búsqueda de este tipo de compuestos. De todas las fracciones analizadas, en la **F2** del **SH**, y en la **F2** del **SC**, se encontraron moléculas esteroidales tales como **campesterol**, **estigmasterol**, **sitosterol**, **ergosterol** y **deoxicorticosterona**, todas ellas en muy baja concentración. Por lo tanto, serían necesarios análisis químicos y biológicos más profundos, con el fin de determinar el rol bioactivo que cumplen estos metabolitos.

III.15 CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el ensayo bio guiado de la especie vegetal *Nicotiana glauca*, recolectada en hábitats naturales de Bahía Blanca. A partir de las partes aéreas, se obtuvo el extracto etanólico (**EE**), el cual indujo actividad apoptótica sobre células musculares normales, mediante la activación de caspasas-3/7.

Con el fin de determinar los metabolitos responsables de la actividad biológica observada, se particionó el **EE** con solventes de polaridad creciente, dando lugar a tres subextractos: hexánico (**SH**), clorofórmico (**SC**) y de acetato de etilo (**SAE**).

La detección preliminar de ciertos grupos fitoquímicos sobre los subextractos obtenidos, permitió observar la presencia de flavonoides en el **SAE**; cumarinas en el **SC** y **SAE**; y esteroides en el **SH** y **SC**.

A través del análisis de la actividad biológica para cada subextracto, se observó la inducción de apoptosis sobre las células musculares normales por parte de los tres subextractos, siendo el **SH** el más activo, seguido por el **SC** y en menor medida, por el **SAE**.

Continuando con la búsqueda de los metabolitos bioactivos, el fraccionamiento bio guiado del **SH** y **SC** permitió el aislamiento de ácido palmítico (**AP**) y escopoletina (**ESC**), respectivamente, como los principales responsables de la actividad apoptótica observada para cada subextracto. A su vez, el **AP** indujo apoptosis sobre las células musculares mediante la activación de caspasas-3/7.

Con el fin de aprovechar la actividad biológica desencadenada por los extractos y metabolitos de *N. glauca*, se analizó el efecto antiproliferativo/apoptótico sobre células tumorales de rhabdomyosarcoma humano. Luego del tratamiento de dichas células con el **EE**,

AP y ESC, se observó morfología típica de apoptosis. A su vez, se demostró una disminución de la viabilidad celular, cuantificando un 73% de células muertas para AP y un 85% para ESC.

Finalmente, se hallaron moléculas esteroidales en bajas concentraciones en otras subfracciones de los SH y SC, tales como **campesterol**, **estigmasterol**, **sitosterol**, **ergosterol** y **deoxicorticosterona**, lo cual se encuentra de acuerdo con los antecedentes de la planta.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se determinó que los metabolitos AP y ESC presentes en la especie vegetal *Nicotiana glauca*, serían los responsables de la inducción apoptótica observada sobre células musculares normales y patológicas. A su vez, dado que ESC se trata de un fitoestrógeno con capacidad para unirse a ERs y desencadenar eventos celulares, podría tratarse de una de las moléculas no identificadas por Milanesi y col.

Esta parte del trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y capítulo de libro:

- ❖ Musso, F.; Pronsato, L.; Milanesi, L.; Vasconsuelo, A.; Faraoni, M.B. Lipid Extracts of *Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae) induce apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Rodriguesia*. 2020; 71.
- ❖ Musso, F.; Lincor, D.; Vasconsuelo, A.; Pronsato, L.; Faraoni, M. B.; Milanesi, L. Adverse Effects in Skeletal Muscle Following the Medicinal Use of *Nicotiana glauca*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2019, 42, 671-679.
- ❖ The Role of Phytoestrogens in Apoptosis: Chemical Structures and Actions on Specific Receptors”. María Belén Faraoni, Florencia Musso. *Sex Steroids and Apoptosis in Skeletal Muscle: Molecular Mechanisms*. Andrea A. Vasconsuelo. Editorial: Bentham e-Books. (pp. 144 - 163), 2019. eISBN (Online): 978-981-14-1236-3; ISBN (Print): 978-9-81141235-6.

4

MATERIALES Y MÉTODOS



IV.1 MATERIAL GENERAL

Las CC fueron realizadas empleando sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) o Sephadex LH-20 (GE-Healthcare). Las CC tipo “flash” se llevaron a cabo usando sílica gel 60 (200-425 mesh, Merck). Para la cromatografía impregnada con AgNO_3 , se utilizó AgNO_3 Anedra y CHCl_3 puro (Sintorgan) sin contenido de EtOH. En las CC, para la siembra de las muestras solubles en el solvente de elución, se preparó una solución concentrada la cual se agregó a la columna. Para el caso de las muestras no solubles, se utilizó la técnica de preadsorción o “pastilla”, para la cual se agregó sílica gel a una solución concentrada de muestra, se evaporó el solvente y la sílica impregnada con la muestra o “pastilla”, se agregó a la columna. Para las CCF, cromatografías preparativas en capa fina (CPCF) y ensayos presuntivos se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm de espesor, Merck). Para la detección de compuestos y revelado de los cromatofolios se utilizó luz UV (254 y 360 nm) y solución de *p*-anisaldehído (5 mL *p*-anisaldehído, 5 mL H_2SO_4 concentrado, 1 mL de ácido acético glacial y 90 mL EtOH). En la mayoría de los casos, se utilizó la técnica de revelado por inmersión y calentamiento con pistola de aire caliente. Para realizar extracciones y CC se emplearon solventes puros destilados. Los R_f de los compuestos triterpénicos fueron calculados utilizando la FM Hex:AcOEt (80:20). El R_f de AP fue calculado utilizando la FM Hex:AcOEt (80:20). El R_f de ESC fue calculado utilizando la FM CH_2Cl_2 :MeOH (95:5).

Para las reacciones de oxidación alílica, se utilizó α -pineno (Riedel de Haden, 97%), EtOH absoluto (99,5%, Cicarelli) y SeO_2 (Merck, 98,0%).

Los catalizadores fueron sintetizados con sílica gel 60, 70-230 Mesh (Davison), la cual posee una superficie específica de 210 m²/g.

Para la evaluación de la viabilidad en células de neuroblastoma humano se empleó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (M2003), de Sigma-Aldrich (St. Louis. EE.UU.).

Para los ensayos biológicos sobre células musculares normales y patológicas, se utilizaron colorantes DAPI y MTT Red (CMXRos) de Molecular Probes (Eugene, EE. UU.). El kit de ensayo TUNEL es de Promega (Promega Corp., Madison, EE. UU.). El reactivo Cell Caspase-3/7 es de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.).

IV.2 EQUIPOS

Para el pesaje de muestras, reactivos y sílica se utilizaron una balanza analítica Adepturer OHAUS (sensibilidad 0,1 mg) y una balanza granataria Acculab V-600 (sensibilidad 0,01 g).

La evaporación de los solventes de extractos, fracciones de cromatografía o brutos de reacción se realizó en evaporador rotatorio marca Heidolph modelo Laborota 4000, a presión reducida, conectado a una bomba de vacío por cascada de agua marca Oakton modelo WP-15-1, manteniendo la temperatura del baño de agua entre 30 y 50 °C.

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro Bruker ARX 300 operado a 300 y 75 MHz para los núcleos ^1H y ^{13}C respectivamente. Los productos fueron registrados en cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,8% 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 , las multiplicidades se abrevian de la siguiente manera: s = singulete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete; *br s* = señal amplia. Se utilizaron programas NOE y NOESY.

Para los análisis correspondientes a las muestras y metabolitos de *N. glauca* por CG-EM, se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (7683B Series Autosampler y 7975C MSD) utilizando una columna capilar HP5-MS (30 m x 250 μm x 0,25 μm , Agilent). Los espectros de masas se registraron a 70 eV, en un rango de masas m/z de 35 a 700 uma, empujando helio como gas portador a 1,0 mL/min. Los espectros fueron comparados con los espectros almacenados en la base de datos (NBS75K.L MS DATA).

Para las reacciones de oxidación alílica de α -pineno llevadas a cabo mediante la metodología convencional con sobrepresión y la metodología catalítica, se utilizó un reactor Batch de 50 ml (Parr Model 4545) equipado con una camisa de calentamiento eléctrica y un agitador mecánico de cabeza. El reactor se conectó a un cilindro de oxígeno para mantener una presión de 6 atm. Antes de cada ensayo, el reactor se purgó cinco veces con oxígeno para eliminar el aire. La temperatura se ajustó a 134 °C y la velocidad de agitación fue de 620 rpm durante la reacción. El seguimiento de la reacción y la identificación de los productos se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer CLARUS 500 acoplado con un detector de espectroscopía de masas, provisto de una columna Elite-5 MS (60 m, 0,25 mm ID). La identificación de picos cromatográficos se logró de acuerdo a la librería NIST MS con coincidencias globales superiores a 900.

La concentración de SeO_2 en el catalizador heterogéneo y en el sistema $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ se midió mediante ICP en un aparato Shimadzu Simultaneous 9000, siguiendo el estándar EPA 200.7. La carga de Pd para el catalizador heterogéneo se determinó mediante EAA en un equipo A-Analyst Perkin Elmer.

Con respecto a los análisis de caracterización de los catalizadores heterogéneos, se utilizó un difractómetro PANalytical Empyrean 3, para los ensayos de DRX, mediante la utilización de radiación $\text{CuK}\alpha$ filtrada con Ni y un detector PIXcel 3D, operando a un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA, en el rango 2θ de 10° a 80° , utilizando un modo de escaneo continuo con una velocidad angular de escaneo de $0.02^\circ \text{ min}^{-1}$. Para los análisis de FTIR, se utilizó un aparato Nicolet Nexus, mediante el cual los espectros se obtuvieron con una resolución de 2 cm^{-1} mediante 50 barridos. Los tamaños de las partículas de Pd se determinaron con un microscopio electrónico de transmisión TEM JEOL 100 CX, a 100 kV. Se empleó el software Digital Micrograph para medir el tamaño de las partículas.

El análisis de reducibilidad de los catalizadores fue realizado mediante RTP, donde las muestras fueron calcinadas a 550°C en una atmósfera de aire cromatográfico durante 30 minutos, luego se purgó con N_2 a la misma temperatura. Las muestras fueron enfriadas a 80°C y el gas fue sustituido por una mezcla de Ar/H_2 (10%) con un flujo de $20 \text{ cm}^3/\text{min}$. La concentración de H_2 fue medida con un detector TCD mientras la muestra era calentada a $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

Las reacciones asistidas por MW fueron llevadas a cabo en un equipo CEM Discover Benchmate programable hasta 300 Watts de potencia. Los recipientes utilizados fueron viales cerrados de 10 mL de capacidad, con agitador magnético. La temperatura del equipo es monitoreada y controlada por un sensor infrarrojo (programable entre 25 y 250°C).

Los puntos de fusión (pf) fueron determinados por medio de un aparato de Reichert. Los extractos fueron liofilizados en liofilizador Rificor L-A-B4.

La nomenclatura de los compuestos fue determinada mediante el software ChemDraw Ultra 14.0.

IV.3 MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal *Chuquiraga erinacea* subsp. *erinacea* (Asteracea) fue recolectada en el mes de diciembre de 2014, en los alrededores de la ciudad de Bahía Blanca, principalmente en el salitral de la Vidriera (Ruta 3 Sur, Km. 30, $38^\circ 46' \text{ S}$, $62^\circ 30' \text{ O}$) e identificada por la Dra.

María Gabriela 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.

La especie estudiada *Nicotiana glauca* (Graham) fue recolectada en el mes de agosto de 2016, en zonas que se encuentran bordeando el Arroyo Napostá de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Las muestras de la planta se identificaron por comparación con el ejemplar del Herbario del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (BBB), Universidad Nacional del Sur, (8000) Bahía Blanca, Argentina. El nombre de la planta se verificó en el sitio web (www.theplantlist.org) del Royal Botanic Gardens, Kew, accediendo en agosto de 2017 y en el sitio web de The International Plant Name Index (IPNI), www.ipni.org, accediendo en mayo de 2019. Se guardó una muestra de herbario en el Herbario del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (BBB) de la Universidad Nacional del Sur.

IV.4 EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LUPEOL DE *Chuquiraga erinacea*

Las partes aéreas pulverizadas de *Chuquiraga erinacea* (211,8 g) fueron extraídas con EtOH (2,3 L) en caliente hasta agotamiento del material vegetal. Luego del filtrado y evaporación del solvente a 45 °C a presión reducida se recuperaron 1,6 L de EtOH, con el cual, el mismo material vegetal utilizado se sometió a una segunda extracción en caliente. Luego de la filtración y evaporación del solvente se recuperó 1,4 L del mismo y se obtuvieron 28,2 g de **EE** (13,3% sobre material vegetal). Este fue liofilizado durante 48 h, obteniéndose 24,8 g de **EE** liofilizado (11,7% sobre material vegetal).

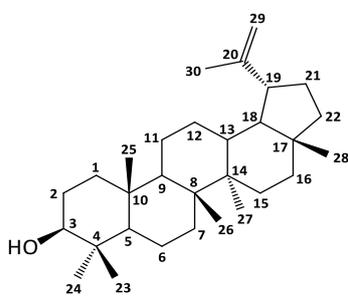
Para la partición del **EE** se utilizaron 10 g, y fueron particionados con 200 mL de una mezcla de H₂O:MeOH (50:50) y 260 mL de hexano en ampolla de decantación. La fase acuosa-metanólica se lavó dos veces con hexano (2x200 mL). Luego de la evaporación, se obtuvieron 6,9 g de **SH**. Este fue liofilizado durante 48 h, obteniéndose 6,3 g de **SH** (63,3% sobre **EE** liofilizado).

Una parte del **SH** (3,5 g) fue fraccionado mediante una CC sobre sílica de fase normal, utilizando como eluyente una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 47 fracciones de 10 mL cada una, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de CCF. Las fracciones que contenían lupeol (11 a 43), eluidas con Hex/AcOEt 95:5 fueron agrupadas y evaporadas, dando lugar a **F1** (773,5 mg, $R_f = 0,57$) (14% sobre **EE** liofilizado). Mediante el análisis por RMN de ¹H se determinó la presencia de una mezcla de cinco triterpenos monohidroxilados: lupeol (**1**) (52,4%),

taraxasterol (**2**) (4,7%), α -amirina (**3a**) (6,8%), β -amirina (**3b**) (12,6%), y pseudotaraxasterol (**4**) (23,6%).

Para la purificación de **1**, se tomaron 60 mg de **F1** (52,4% de lupeol) y se llevó a cabo una CC sobre sílica gel flash impregnada con AgNO_3 (10,0%). Para la impregnación de la sílica, se disolvieron 400 mg de AgNO_3 en 1,6 mL de H_2O , y luego se agregaron 7,5 mL de MeOH . Esta disolución fue agregada a 4 g de sílica flash contenidos en un balón de 200 mL provisto de un agitador y tapado con papel aluminio. Se evaporó al vacío (60 °C). Una vez evaporada la mezcla de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, se volcó la sílica a un cristizador, se tapó con papel aluminio y le llevó a estufa durante 1 h a 120 °C. Transcurrido ese tiempo, se preparó la columna, manteniéndola al resguardo de la luz, y se sembró la muestra disuelta en el solvente de elución (CHCl_3). Luego de la cromatografía se recolectaron 96 fracciones de 5 mL cada una las cuales fueron agrupadas en seis subfracciones según su perfil de CCF: **SF1** (3,4 mg; 5,7%); **SF2** (9,2 mg; 15,3%); **SF3** (14,8 mg; 24,7%); **SF4** (1,5 mg; 2,5%); **SF5** (11,9 mg; 19,8%) y **SF6** (14,0 mg; 23,3%). Luego del análisis espectroscópico de RMN, se determinó el contenido de lupeol en **SF6** con un 100% de pureza. Luego de la evaporación de cada subfracción, se recuperó un 36% de CHCl_3 .

El triterpeno pentacíclico **1** corresponde a un sólido blanco de aspecto cristalino (pf: 206-210 °C) y fue identificado en base a sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C .



Peso molecular: 426,73 g/mol

^1H -RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 4,68 (1H, *br s*, H-29a), 4,56 (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), 1,90 (1H, *m*, H-21a) 1,75-1,22 (25H, *m*), 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,97 (3H, *s*, H-23), 0,94 (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 en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 151,1 (C-20), 109,5 (C-29), 79,2 (C-3), 55,4 (C-5), 50,6 (C-9), 48,5 (C-18), 48,1 (C-19), 43,1 (C-17), 43,0 (C-14), 41,0 (C-8), 40,1 (C-22), 39,0 (C-1), 38,9 (C-4), 38,2 (C-13), 37,3 (C-10), 35,7 (C-16), 34,4 (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), 18,2 (C-28), 16,3 (C-25), 16,1 (C-26), 15,5 (C-24), 14,7 (C-27).

IV.5 OBTENCIÓN DEL SISTEMA CARBONÍLICO α,β -INSATURADO

IV.5.1 Procedimiento general para reacciones de oxidación alílica convencionales

A una solución del triterpeno o del monoterpeno en EtOH absoluto se le adicionó SeO_2 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 y se extrajo con CH_2Cl_2 . Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron con MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. Para el caso del triterpeno, el residuo se purificó por CC sobre sílica flash usando como eluyente Hex:AcOEt de polaridad creciente.

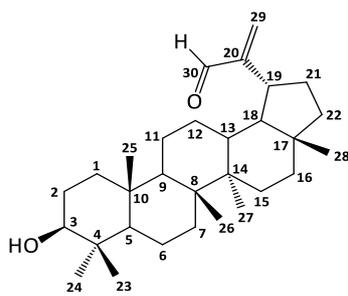
IV.5.1.1 Preparación de 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-30-al (5)

Metodología convencional a partir de 1: Una solución de **1** (500 mg, 1,17 mmol) en EtOH absoluto (20 mL) se trató con 2,5 equivalentes de SeO_2 (324,6 mg, 2,93 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 24 h. El crudo de reacción se trató con agua (80 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 120 mL). Luego de la purificación del bruto de reacción, se obtuvieron 361,5 mg de **5** (R = 70%), eluidos con Hex:AcOEt (90:10), como un sólido blanco de aspecto brillante (pf: 215-218 °C).

Metodología convencional a partir de la mezcla triterpénica monohdroxilada F1: Una solución de **F1** (500 mg, 1,17 mmol) en EtOH absoluto (20 mL) se trató con 2,5 equivalentes de SeO_2 (324,6 mg, 2,93 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 24 h. El crudo de reacción se trató con agua (80 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 120 mL). Luego de la purificación del bruto de reacción, se obtuvieron tres fracciones: **F_A** (95 mg, mezcla de **3a** y **3b**); **F_B** (61 mg de **6**) y **F_C** (195,7 mg, mezcla de **5** (90%) y **6** (10%).

La purificación de **F_C**, para el aislamiento de **5**, se llevó a cabo la misma técnica que para la purificación de **1** con AgNO_3 , mencionada más arriba. Para ello, se sembraron 60 mg de **F_C**, y se colectaron 40 fracciones de 5 mL cada una, que fueron agrupadas en dos grupos según el perfil de CCF. Se obtuvieron dos fracciones, **F_D** y **F_E**, de las cuales **F_D** correspondió a **5** puro (40,2 mg, R = 67%).

Metodología catalítica utilizando el catalizador Pd/SeO₂/SiO₂: A una solución de **1** (10 mg, 0,023 mmol) en EtOH absoluto (35 mL; 0,67M) se le añadieron 2,55 mg de Pd/SeO₂/SiO₂ y se colocó dentro de un reactor de acero (Parr). Se programó una temperatura de 134 °C y una presión de oxígeno de 6 atm. El análisis del bruto de reacción se llevó a cabo mediante RMN de ¹H. A las 15 h de reacción, se determinó la obtención de **5** (R = 5%) y alcohol alílico (R = 95%), siendo la conversión de 79%.



Peso molecular: 440,71 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 9,50 (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); 2,73 (1H, ddd, $J = 10,9, 10,9, 5,6$ Hz H-19); 2,24-2,06 (1H, m, $J = 11,1$ Hz, H-21a); 1,76-1,57 (5H, m); 1,50 (3H, br s); 1,47-1,39 (5H, m); 1,37 (4H, br s); 1,27-1,12 (5H, m); 1,00 (3H, s, H-23); 0,95 (3H, s, H-26); 0,91 (3H, s, H-27); 0,81 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28); 0,74 (3H, s, H-24); 0,65 (1H,

d, $J = 9,0$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 195,2 (C-30); 157,3 (C-20); 133,3 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 51,3 (C-18); 50,3 (C-9); 43,4 (C-17); 42,8 (C-14); 40,9 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 37,8 (C-13); 37,2 (C-10, C-19); 35,5 (C-16); 34,4 (C-7); 32,7 (C-21); 28,1 (C-23); 27,7 (C-12); 27,5 (C-15); 27,4 (C-2); 21,0 (C-11); 18,4 (C-6); 17,9 (C-28); 16,2 (C-25); 16,0 (C-26); 15,5 (C-24); 14,5 (C-27).

IV.5.1.2 Oxidación alílica de α -pineno

Metodología convencional: Una solución de α -pineno (95,4 mg, 0,7 mmol) en EtOH absoluto (35 mL; 0,02M) se trató con 2,5 eq de SeO_2 (194,2 mg, 1,75 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 13 h. El crudo de reacción se trató con agua (20 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). El monitoreo de la reacción, así como el análisis del bruto de reacción se llevó a cabo mediante CG-EM. Se determinó la obtención de **AL** (R = 28%) y **OL** (R = 22%), siendo la conversión de un 50%.

Metodología convencional con sobrepresión: Una solución de α -pineno (95,4 mg, 0,7 mmol) en EtOH absoluto (35 mL; 0,02M) se trató con 2,5 eq de SeO_2 (194,2 mg, 1,75 mmol) y se colocó dentro de un reactor de acero (Parr). Se programó una temperatura de 134 °C y una presión de oxígeno de 6 atm. El monitoreo de la reacción, así como el análisis del bruto de reacción se llevó a cabo mediante CG-EM. A las 5 h de reacción, se determinó la obtención de **AL** (R = 34%) y **OL** (R = 6,6%), siendo la conversión de 41%.

Metodología de oxidación alílica mediante el sistema $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$: A una solución de α -pineno (477 mg, 3,5 mmol) en EtOH absoluto (35 mL; 0,1M) se le añadieron 400 mg de $\text{SeO}_2/\text{SiO}_2$ y se colocó dentro de un reactor de acero (Parr). Se programó una temperatura de 134 °C y una presión de oxígeno de 6 atm. El monitoreo de la reacción, así como el análisis del bruto de reacción se llevó a cabo mediante CG-EM. A las 18 h de reacción, se determinó una conversión de 3%. No se lograron identificar los productos.

Metodología catalítica mediante el catalizador Pd/SeO₂/SiO₂: Una solución de α -pineno (477 mg, 3,5 mmol) en EtOH absoluto (35 mL; 0,1M) se le añadieron 400 mg de Pd/SeO₂/SiO₂ y se colocó dentro de un reactor de acero (Parr). Se programó una temperatura de 134 °C y una presión de oxígeno de 6 atm. El monitoreo de la reacción, así como el análisis del bruto de reacción se llevó a cabo mediante CG-EM. A las 15 h de reacción, se determinó la obtención de **AL** (R = 17,5%) y **OL** (R = 5,5%), siendo la conversión de 23%.

IV.5.2 Síntesis de SeO₂/SiO₂ y Pd/SeO₂/SiO₂

Se preparó un catalizador de SeO₂ soportado en sílica (SeO₂/SiO₂) a partir del método de impregnación húmeda. Para ello, a 2 g de SiO₂ se le agregó una solución de SeO₂ (288,5 mg; 2,6 mmol) en EtOH absoluto (20 mL; 0,13M) (99,5%, Cicarelli), y se dejó bajo agitación magnética a temperatura ambiente hasta la evaporación del solvente (24 h).

También se preparó un catalizador binario soportado sobre sílica (Pd/SeO₂/SiO₂). Para ello, a 2 g del sistema SeO₂/SiO₂ se le agregó una solución de 0,2 g de Pd(acac)₂ (200 mg; 0,66 mmol) (Aldrich, 99,9%) en tolueno (5 mL; 0,13M). Esta mezcla se dejó bajo agitación magnética a 40°C hasta la evaporación del solvente (24 h). La mezcla obtenida fue calcinada en mufla a 400°C durante 1 h.

El contenido de SeO₂ fue determinado mediante ICP, el cual resultó ser de 14,4% p/p, mientras que el contenido de Pd fue cuantificado mediante EAA, arrojando una carga de 0,98% p/p. Las muestras fueron analizadas por DRX, FTIR, MET y RTP.

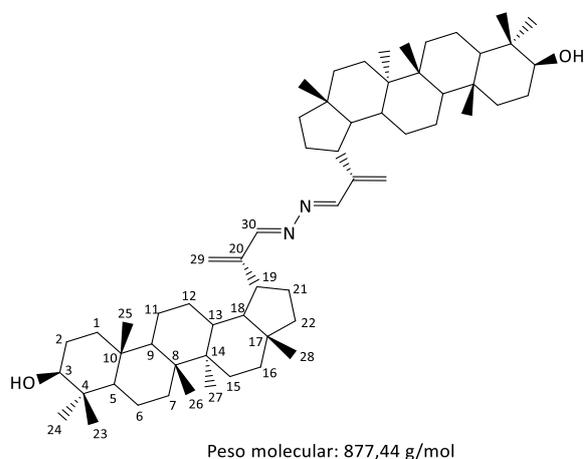
La actividad específica del catalizador de Pd/SeO₂/SiO₂, TOF, se midió según los moles de α -pineno convertidos por hora y por mol de Pd expuesto (h⁻¹).

IV.6 PREPARACIÓN, DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE ANÁLOGOS TRITERPÉNICOS

IV.6.1 Reacciones de ciclación sobre 30-oxolupeol (5)

Metodología para la preparación de pirazolinas: A una solución de **5** (30,0 mg, 0,068 mmol) en EtOH/KOH (10%) (15 mL) se le agregó 1,1 eq de NH₂NH₂.H₂O (2,40 mg, 0,0748 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El crudo de reacción se trató con agua (150 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 90 mL). Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron con MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El residuo se purificó por CC sobre sílica flash usando como eluyente Hex:AcOEt de polaridad creciente. Se

obtuvieron 6,3 mg de **10** (R = 10,5%) eluidos con Hex:AcOEt (90:10) como un sólido cristalino amarillento; pf: 198-200 °C.

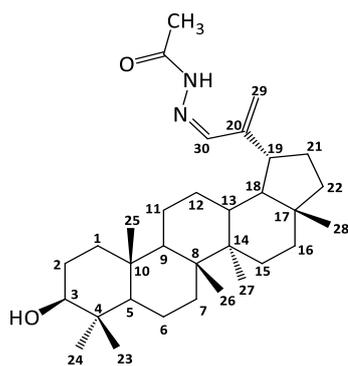


¹H-RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl₃): 8,07 (1H, s, H-30); 5,62 (1H, s, H-29a); 5,42 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, H-3); 2,93 (1H, ddd, $J = 10,8$ Hz, H-19); 2,34-2,11 (1H, m, H-21a); 1,83-1,64 (5H, m); 1,59 (3H, br s); 1,54-1,45 (5H, m); 1,38 (4H, br s); 1,30-1,11 (5H, m); 1,00 (3H, s, H-23); 0,95 (6H, br s, H-26, H-27); 0,84 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J =$

9,4 Hz, H-5).

¹³C-RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl₃): 163,9 (C-30); 152,7 (C-20); 122,9 (C-29); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-18); 50,4 (C-9); 43,2 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,9 (C-1); 38,0 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 33,1 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-12, C-15, C-2); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

Metodología para la preparación de pirazolina N-acetilada: A una solución de **5** (10,0 mg, 0,023 mmol) en ácido acético glacial (3 mL), se le agregó 1,1 eq de NH₂NH₂·H₂O (0,81 mg, 0,025 mmol). La mezcla de reacción se irradió en un tubo sellado a 100 °C durante 20 minutos, a 300 W de potencia, utilizando el método sps, en un reactor de MW. Transcurrido ese tiempo, el solvente fue removido a presión reducida. El residuo se trató con H₂O (30 mL) y se extrajo con AcOEt (3 × 20 mL). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. El residuo se purificó por CC sobre sílica flash usando como eluyente Hex:AcOEt de polaridad creciente. Se obtuvieron 2,5 mg de **11a** (R = 22,1%) eluidos con Hex:AcOEt (70:30) como un sólido cristalino amarillento; pf: 131-134 °C.



Peso molecular: 496,78 g/mol

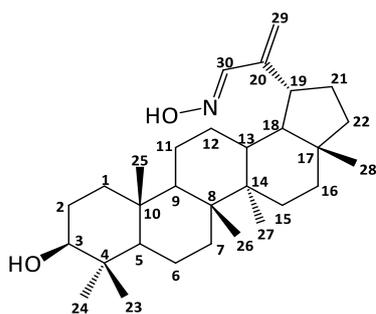
$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,62 (1H, s, H-30); 7,34 (1H, s, NH); 5,48 (1H, s, H-29a); 5,21 (1H, s, H-29b); 3,19 (1H, dd, $J = 5,3, 10,8$ Hz, H-3); 2,77 (1H, br s, H-19); 2,30 (3H, s, COCH_3); 1,86-1,65 (5H, m); 1,59 (6H, br s); 1,55-1,49 (3H, m); 1,39 (5H, br s); 1,32-1,19 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,97 (3H, s, H-26); 0,94 (3H, s, H-27); 0,82 (6H, s, H-25, H-28); 0,76 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 173,3 (COCH_3); 150,8 (C-30); 146,6 (C-20); 120,9 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,4 (C-18, C-9); 43,2 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,4 (C-7); 29,8 (C-21); 28,1 (C-23); 27,5 (C-15, C-12); 27,3 (C-2); 21,1 (C-11); 20,7 (COCH_3); 18,4 (C-6); 18,0 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.2 Preparación de lup-20(29)-en-30-*E*oxima (12)

Metodología convencional: A una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (5 mL) se le añadió una solución acuosa (2 mL) formada por 3 equivalentes de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (13,2 mg, 0,204 mmol) y 2 equivalentes de AcO^-Na^+ (11,2 mg, 0,136 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. El crudo de reacción se trató con agua (10 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron con MgSO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron hasta sequedad. Se obtuvieron 31 mg de **12** ($R = 100\%$) como un sólido blanco cristalino; pf: 241-244 °C.

Metodología por MW: A una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (3 mL) se añadió 3 equivalentes de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (13,2 mg, 0,204 mmol) y 2 equivalentes de AcO^-Na^+ (11,2 mg, 0,136 mmol). La mezcla de reacción se irradió en un tubo sellado a 70 °C durante 10 minutos, a 300 W de potencia, utilizando el método sps, en un reactor de MW. Transcurrido ese tiempo, el solvente fue removido a presión reducida. El residuo se trató con agua (10 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre MgSO_4 anhidro, se filtraron y concentraron hasta sequedad, obteniéndose 31 mg de **12** ($R = 100\%$).



Peso molecular: 455,73 g/mol
 H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-5).

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7,74 (1H, s, H-30); 7,11 (1H, br s, NOH); 5,39 (1H, s, H-29a); 5,18 (1H, s, H-29b); 3,18 (1H, dd, $J = 5,3, 10,8$ Hz, H-3); 2,71 (1H, ddd, $J = 5,3, 10,7$ Hz H-19); 2,24-2,08 (1H, m, H-21); 1,77-1,60 (5H, m); 1,56 (3H, br s); 1,51-1,43 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,35-1,15 (5H, m); 1,00 (3H, s, H-23); 0,97 (3H, s, H-26); 0,94 (3H, s, H-27); 0,82 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,76 (3H, s,

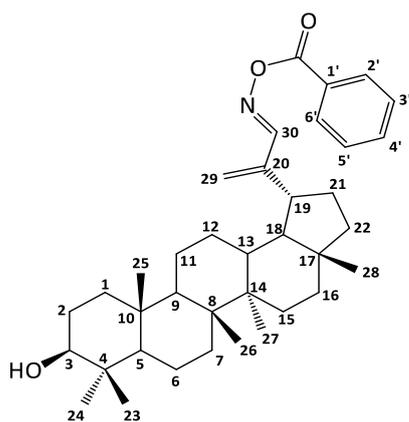
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 153,7 (C-30); 149,4 (C-20); 119,3 (C-29); 79,2 (C-3); 55,5 (C-5); 50,5 (C-18); 50,0 (C-9); 43,2 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 39,9 (C-22); 39,0 (C-4); 38,9 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,6 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-12); 27,5 (C-15); 27,4 (C-2); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,0 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.3 Procedimiento general para la obtención de aciloximas triterpénicas (13a-13e)

A una solución de **12** en CH_2Cl_2 (10 mL) se le adicionó 1,2 equivalentes del ácido benzoico correspondiente y 1,4 equivalentes de DCC. La mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo agitación magnética, durante 8-11,5 h. Transcurrido ese tiempo, el solvente fue removido a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por CC, en una primera etapa sobre sílica flash usando Hex:AcOEt como FM y luego, sobre Sephadex LH-20 utilizando MeOH como FM.

IV.6.3.1 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-benzoiloxima (13a)

Una solución de **12** (30 mg, 0,068 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) se trató con ácido benzoico (10,0 mg, 0,082 mmol) y DCC (19,6 mg, 0,095 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 10 h, obteniéndose 7,20 mg de **13a** ($R = 18,5\%$), eluidos con Hex:AcOEt (93:7) y posterior repurificación, como un sólido blanco amorfo; pf: 109-111 °C.



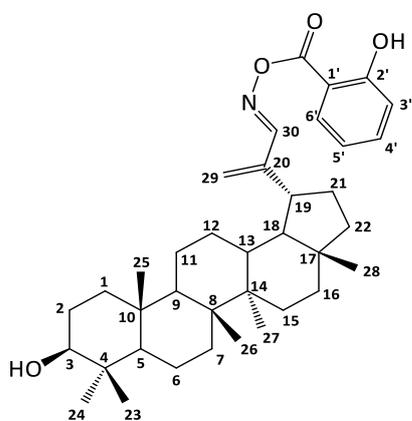
Peso molecular: 559,84 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,12 (1H, s, H-30); 8,09 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2', H-6'); 7,59 (1H, t, $J = 7,3$ Hz, H-4'); 7,47 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, H-3', H-5'); 5,66 (1H, s, H-29a); 5,44 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 5,4, 10,5$ Hz, H-3); 2,92 (1H, ddd, $J = 10,8, 10,5, 5,3$ Hz H-19); 2,41-2,20 (1H, m, H-21); 1,87-1,64 (5H, m); 1,58 (3H, br s); 1,52-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,33-1,20 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,97 (3H, s, H-26); 0,96 (3H, s, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,82 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,1 (CO); 159,8 (C-30); 149,2 (C-20); 133,4 (C-1'); 129,8 (C-2', C-6'); 129,1 (C-4'); 128,7 (C-3', C-5'); 124,1 (C-29); 79,2 (C-3); 55,5 (C-5); 50,5 (C-18); 50,3 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,9 (C-1); 38,0 (C-13); 37,3 (C-10); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,7 (C-21); 31,7 (C-19); 28,1 (C-23); 27,6 (C-12); 27,5 (C-15); 27,1 (C-2); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.3.2 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(2-hidroxibenzoil)oxima (13b)

Una solución de 12 (30 mg, 0,068 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) se trató con ácido salicílico (11,3 mg, 0,082 mmol) y DCC (19,6 mg, 0,095 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 9,5 h, obteniéndose 5,9 mg de 13b ($R = 15,7\%$) eluidos con Hex:AcOEt (92:8) y posterior repurificación, como un sólido amorfo amarillo pálido; pf: 111-114 °C.



Peso molecular: 575,83 g/mol

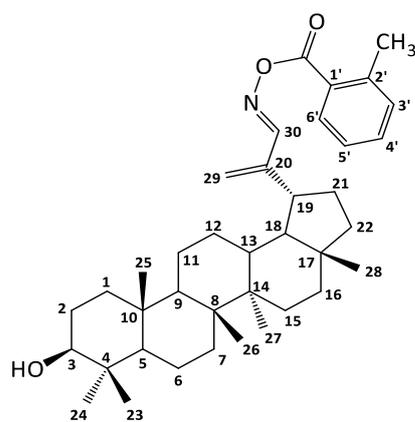
$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 10,67 (1H, s, Bz-OH); 8,14 (1H, s, H-30); 7,87 (1H, dd, $J = 8,5, 1,7$ Hz H-6'); 7,49 (1H, ddd, $J = 8,5, 7,2, 1,5$ Hz, H-5'); 7,02 (1H, dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, H-3'); 6,91 (1H, ddd, $J = 8,2, 7,2, 1,2$ Hz, H-4'); 5,71 (1H, s, H-29a); 5,48 (1H, s, H-29b); 3,18 (1H, dd, $J = 10,6, 5,3$ Hz, H-3); 2,89 (1H, ddd, $J = 12,9, 6,5, 6,5$ Hz, H-19); 2,41-2,21 (1H, m, H-21); 1,86-1,65 (5H, m); 1,64-1,54 (3H, m); 1,54-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,30-1,21 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s,

H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,82 (3H, s, H-28); 0,76 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 167,9 (CO); 162,2 (C-30); 160,4 (C-2'); 148,9 (C-20); 136,2 (C-4'); 129,5 (C-6'); 124,9 (C-29); 119,4 (C-5'); 118,1 (C-1'); 111,0 (C-3'); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-18); 50,3 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,9 (C-1); 38,0 (C-13); 37,3 (C-10); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,7 (C-21); 29,8 (C-19); 28,1 (C-23); 27,6 (C-15, C-12); 27,5 (C-2); 21,1 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.3.3 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(2-metilbenzoil)oxima (13c)

Una solución de **12** (30 mg, 0,068 mmol) en CH_2Cl_2 (10 mL) se trató con ácido o-toluico (11,16 mg, 0,082 mmol) y DCC (19,6 mg, 0,095 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 11,5 h, obteniéndose 8,35 mg de **13c** ($R = 21,4\%$) eluidos con Hex:AcOEt (93:7) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 105-108 °C.



Peso molecular: 573,86 g/mol

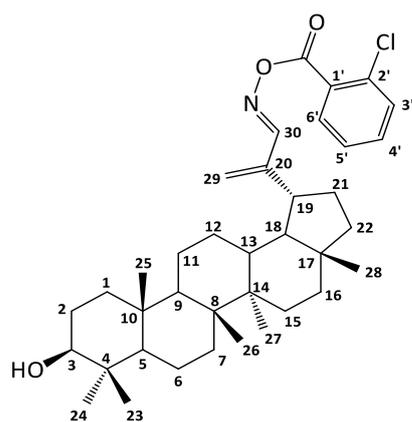
^1H -RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,08 (1H, s, H-30); 7,91 (1H, dd, $J = 7,7, 1,5$ Hz, H-6'); 7,43 (1H, ddd, $J = 8,4, 7,5, 1,5$ Hz, H-4'); 7,26 (2H, t, $J = 8,4$ Hz, H-3', H-5'); 5,66 (1H, s, H-29a); 5,43 (1H, s, H-29b); 3,18 (1H, dd, $J = 10,7, 5,4$ Hz, H-3); 2,93 (1H, ddd, $J = 10,6, 5,3, 5,3$ Hz H-19); 2,64 (3H, s, Bz- CH_3); 2,40-2,26 (1H, m, H-21); 1,82-1,65 (5H, m); 1,65-1,54 (3H, m); 1,54-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,30-1,21 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,82 (3H, s,

H-28); 0,76 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165,1 (CO); 159,7 (C-30); 149,3 (C-20); 140,6 (C-2'); 132,4 (C-4'); 131,9 (C-1'); 130,4 (C-6'); 128,5 (C-3'); 125,9 (C-5'); 123,8 (C-29); 79,2 (C-3); 55,5 (C-5); 50,5 (C-18); 50,3 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,9 (C-1); 37,9 (C-13); 37,3 (C-10); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,8 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,7 (C-11); 21,1 (C-19); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.3.4 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(2-clorobenzoil)oxima (13d)

Una solución de **12** (30 mg, 0,068 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se trató con ácido o-clorobenzoico (12,84 mg, 0,082 mmol) y DCC (19,6 mg, 0,095 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 10,5 h, obteniéndose 13,75 mg de **13d** (R = 34%) eluidos con Hex:AcOEt (94:6) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 106-109 °C.



Peso molecular: 594,28 g/mol

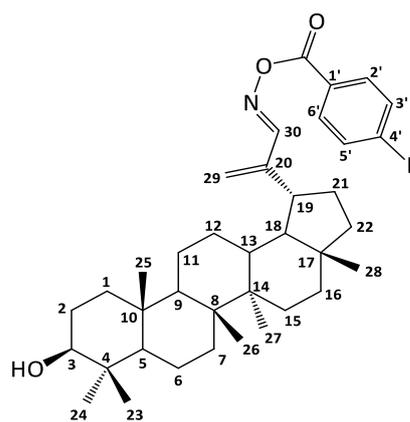
¹H-RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl₃): 8,07 (1H, s, H-30); 7,82 (1H, dd, $J = 7,3, 1,5$ Hz, H-6'); 7,52-7,40 (2H, m, H-3', H-5'); 7,35 (1H, ddd, $J = 7,7, 6,6, 2,1$, H-4'); 5,67 (1H, s, H-29a); 5,44 (1H, s, H-29b); 3,18 (1H, dd, $J = 10,7, 5,4$ Hz, H-3); 2,88 (1H, ddd, $J = 11,1, 6,7, 6,7$ Hz, H-19); 2,38-2,19 (1H, m, H-21); 1,82-1,60 (5H, m); 1,60-1,55 (3H, br s); 1,54-1,45 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,30-1,14 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, d, H-26, H-27); 0,83 (3H, s, H-25); 0,82 (3H, s, H-28); 0,76 (3H, s, H-24);

0,67 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, H-5).

¹³C-RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl₃): 163,7 (CO); 160,1 (C-30); 149,0 (C-20); 133,7 (C-2'); 132,8 (C-4'); 131,3 (C-6'); 131,1 (C-1'); 129,6 (C-3'); 126,8 (C-5'); 124,5 (C-29); 79,2 (C-3); 55,5 (C-5); 50,5 (C-18); 50,2 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,9 (C-1); 37,9 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,6 (C-16); 34,5 (C-7); 32,6 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,1 (C-15); 21,1 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.3.5 Preparación de lup-20(29)-en-30-E-O-(4-iodobenzoil)oxima (13e)

Una solución de **12** (30 mg, 0,068 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se trató con ácido p-iodobenzoico (20,3 mg, 0,082 mmol) y DCC (19,6 mg, 0,095 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 8 h, obteniéndose 5,18 mg de **13e** (R = 11,1%) eluidos con Hex:AcOEt (93:7) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 116-118 °C.



Peso molecular: 685,73 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,10 (1H, s, H-30); 7,81 (4H, q, $J = 8,6, 8,4, 8,4$ Hz, H-2', H-3', H-5', H-6'); 7,52-7,40 (2H, m, benceno); 7,39-7,31 (1H, m, benceno); 5,67 (1H, s, H-29a); 5,45 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,7, 5,3$ Hz, H-3); 2,97-2,80 (1H, m, H-19); 2,40-2,18 (1H, m, H-21); 1,90-1,64 (5H, m); 1,64-1,54 (3H, m); 1,53-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, *br s*); 1,30-1,12 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, d, H-26, H-27); 0,84 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24);

0,66 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 163,6 (CO); 160,1 (C-30); 149,1 (C-20); 138,0 (C-3', C-5'); 131,2 (C-2', C-6'); 128,5 (C-1'); 124,5 (C-29); 101,3 (C-4'); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-18); 50,3 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 40,9 (C-8); 40,0 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 37,9 (C-13); 37,3 (C-10); 35,6 (C-16); 34,4 (C-7); 32,5 (C-21); 28,1 (C-23); 27,5 (C-2, C-12); 26,3 (C-15); 24,6 (C-19); 21,1 (C-11); 18,4 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4 Procedimiento general para la obtención de azinas triterpénicas (15a-15o)

Preparación de hidrazonas aromáticas sustituidas: A una solución de aldehído aromático (**a-o**) (1 mmol) en EtOH absoluto (1 mL), se le adicionó 2 equivalentes de $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30-60 minutos hasta desaparición del material de partida. Transcurrido ese tiempo, el solvente de la mezcla de reacción fue removido a presión reducida obteniéndose las hidrazonas aromáticas sustituidas **14a-14o**.

Preparación de azinas a través de la metodología convencional: A una solución de **5** (1 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se le adicionó 1 equivalente de hidrazona aromática (**14a** o **14b**) preparadas previamente. La mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo agitación magnética, durante 5-6 h, respectivamente. Transcurrido ese tiempo, el solvente fue removido a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por CC sobre sílica flash usando Hex:AcOEt como FM.

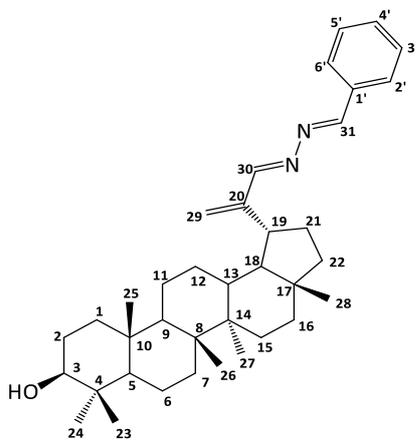
Preparación de azinas a través de la metodología por MW: A una solución de **5** (1 mmol) en EtOH absoluto (1 mL) se le adicionó 1 equivalente de las hidrazonas aromáticas **14a-14o** preparadas previamente. La mezcla de reacción se irradió en un tubo sellado a 70 °C,

durante 5-30 minutos, a 280 W de potencia, utilizando el método estándar, en un reactor de MW. Transcurrido ese tiempo, el solvente fue removido a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por CC sobre sílica flash usando Hex:AcOEt como FM. En algunos casos, la cromatografía se repitió para obtener los compuestos puros.

IV.6.4.1 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-fenilazina (15a)

Metodología convencional: Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de benzaldehído (**14a**) (8,2 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 5 h, obteniéndose 11,4 mg de **15a** (R = 32%) eluidos con Hex:AcOEt (90:10) y posterior repurificación, como un sólido cristalino amarillo pálido; pf: 126-128 °C.

Metodología por MW: Una solución de **5** (5 mg, 0,011 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de benzaldehído (**14a**) (1,35 mg, 0,011 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 30 minutos, obteniéndose 5,95 mg de **15a** (R = 31,4%).



Peso molecular: 542,85 g/mol

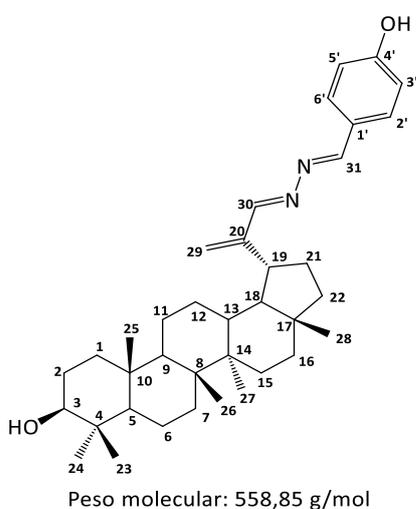
$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,55 (1H, s, H-31); 8,21 (1H, s, H-30); 7,80 (2H, dd, $J = 6,6, 3,0$ Hz, H-2', H-6'); 7,44 (3H, dd, $J = 5,1, 1,9$ Hz, H-3', H-4', H-5'); 5,66 (1H, s, H-29a); 5,47 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,8, 5,2$ Hz, H-3); 3,06-2,89 (1H, m, H-19); 2,36-2,15 (1H, m, H-21); 1,87-1,64 (5H, m); 1,61 (3H, br s); 1,54-1,43 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,33-1,15 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,9 (C-30, C-31); 161,5 (C-1'); 152,6 (C-20); 134,3 (C-3'); 131,2 (C-5'); 128,9 (C-6'); 128,6 (C-4'); 123,5 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,4 (C-7); 32,9 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.2 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-hidroxifenil)azina (15b)

Metodología convencional: Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-hidroxibenzaldehído (**14b**) (9,3 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 6 h, obteniéndose 14,8 mg de **15b** (R = 39%) eluidos con Hex:AcOEt (80:20) como un sólido cristalino amarillo claro; pf: 174-176 °C.

Metodología por MW: Una solución de **5** (5 mg, 0,011 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-hidroxibenzaldehído (**14b**) (1,5 mg, 0,011 mmol) de acuerdo al procedimiento general durante 30 minutos, obteniéndose 3,75 mg de **15b** (R = 59,4%).

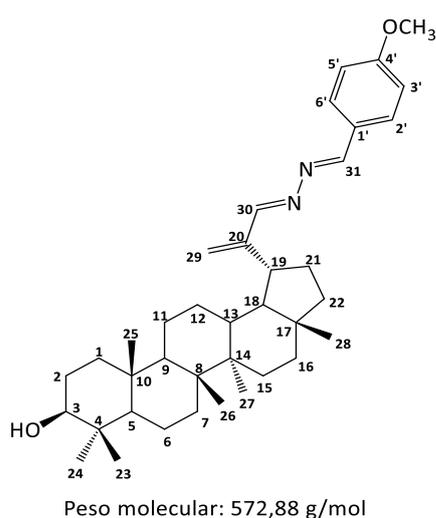


¹H-RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl₃): 8,51 (1H, s, H-31); 8,21 (1H, s, H-30); 7,68 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-2', H-6'); 6,86 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-3', H-5'); 6,71 (1H, br s, Bz-OH); 5,63 (1H, s, H-29a); 5,45 (1H, s, H-29b); 3,19 (1H, dd, $J = 10,8, 5,0$ Hz, H-3); 3,03-2,86 (1H, m, H-19); 2,34-2,13 (1H, m, H-21); 1,85-1,62 (5H, m); 1,60 (3H, br s); 1,53-1,42 (5H, m); 1,38 (4H, br s); 1,00 (5H, s); 0,96 (3H, s, H-23); 0,94 (3H, s, H-26, H-27); 0,84 (3H, s, H-25); 0,79 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-5).

¹³C-RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl₃): 164,5 (C-30, C-31); 161,6 (C-4'); 159,0 (C-20); 152,5 (C-1'); 130,6 (C-2'); 126,6 (C-6'); 123,3 (C-29); 116,0 (C-3', C-5'); 79,3 (C-3); 55,4 (C-5); 50,4 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 40,9 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,0 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,4 (C-7); 32,9 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,1 (C-11); 18,4 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.3 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-metoxifenil)azina (15c)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-metoxibenzaldehído (**14c**) (10,15 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 20 minutos, obteniéndose 12,5 mg de **15c** (R = 32,1%) eluidos con Hex:AcOEt (90:10) como un sólido amorfo amarillo pálido; pf: 122-125 °C.

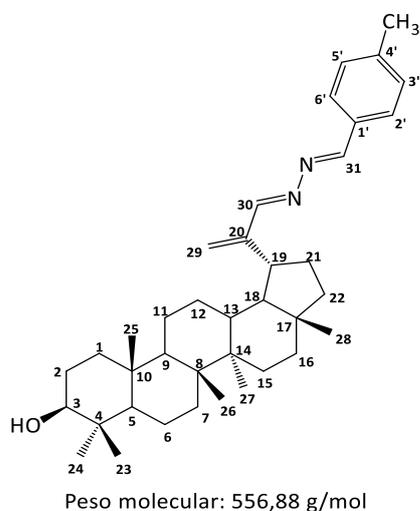


$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,52 (1H, s, H-31); 8,21 (1H, s, H-30); 7,75 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-2', H-6'); 6,95 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3', H-5'); 5,63 (1H, s, H-29a); 5,45 (1H, s, H-29b); 3,86 (3H, s, Bz-OCH₃); 3,17 (1H, dd, $J = 10,9, 5,1$ Hz, H-3); 3,06-2,86 (1H, m, H-19); 2,37-2,16 (1H, m, H-21); 1,90-1,63 (5H, m); 1,61 (3H, *br s*); 1,54-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, *br s*); 1,13-1,32 (5H, m); 1,00 (3H, s, H-23); 0,95 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,66 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,4 (C-30, C-31); 162,1 (C-4'); 161,3 (C-20); 130,2 (C-2', C-6'); 127,0 (C-1'); 123,0 (C-29); 114,4 (C-3', C-5'); 79,1 (C-3); 55,5 (C-5); 55,4 (C-18); 50,5 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 40,9 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 29,8 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,1 (C-11); 18,4 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.4 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-metilfenil)azina (15d)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-metilbenzaldehído (**14d**) (9,15 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 30 minutos, obteniéndose 17,2 mg de **15d** ($R = 45,4\%$) eluidos con Hex:AcOEt (94:6) como un sólido cristalino amarillo claro; pf: 110-113 °C.

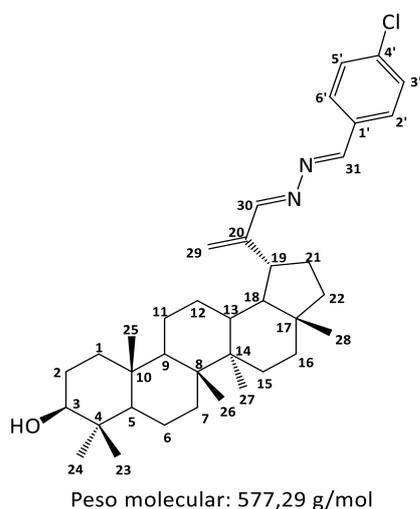


$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,53 (1H, s, H-31); 8,21 (1H, s, H-30); 7,69 (2H, d, $J = 7,8$ Hz, H-2', H-6'); 7,24 (2H, d, $J = 7,9$ Hz, H-3', H-5'); 5,64 (1H, s, H-29a); 5,46 (1H, s, H-29b); 3,24-3,09 (1H, m, H-3); 3,06-2,88 (1H, m, H-19); 2,41 (3H, s, Bz-CH₃); 2,32-2,15 (1H, m, H-21); 1,87-1,60 (5H, m); 1,57 (3H, *br s*); 1,54-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, *br s*); 1,14-1,30 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,6 (C-30, C-31); 161,6 (C-20); 141,6 (C-1'); 131,6 (C-4'); 129,6 (C-3', C-5'); 128,6 (C-2', C-6'); 123,2 (C-29); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,2 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 34,2 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,8 (C-19); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.5 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-clorofenil)azina (15e)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-clorobenzaldehído (**14e**) (10,52 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 8 minutos, obteniéndose 5,23 mg de **15e** (R = 13,3%) eluidos con Hex:AcOEt (95:5) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 113-115 °C.



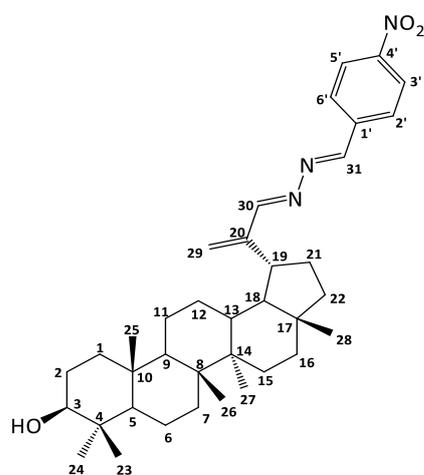
^1H -RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,51 (1H, s, H-31); 8,20 (1H, s, H-30); 7,74 (2H, d, $J = 8,3$, H-2', H-6'); 7,41 (2H, d, 8,5 Hz, H-3', H-5'); 5,67 (1H, s, H-29a); 5,48 (1H, s, H-29b); 3,26-3,10 (1H, m, H-3); 3,06-2,88 (1H, m, H-19); 2,36-2,15 (1H, m, H-21); 1,86-1,63 (5H, m); 1,58 (3H, *br s*); 1,54-1,41 (5H, m); 1,39 (4H, *br s*); 1,11-1,32 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165,3 (C-30, C-31); 160,2 (C-20); 137,1 (C-4'); 132,8 (C-1'); 129,7 (C-3', C-5'); 129,2 (C-2', C-6'); 123,9 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10); 36,7 (C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 24,8 (C-21); 21,2 (C-11); 18,4 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.6 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-nitrofenil)azina (15f)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-nitrobenzaldehído (**14f**) (11,25 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 5 minutos, obteniéndose 3,4 mg de **15f** (R = 8,5%) eluidos con

Hex:AcOEt (92:8) y posterior repurificación como un sólido amorfo amarillo pálido; pf: 123-125 °C.



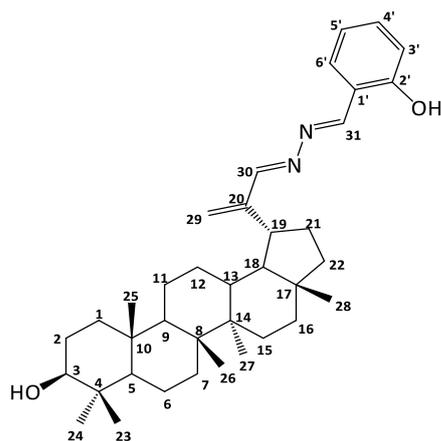
Peso molecular: 587,85 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,59 (1H, s, H-31); 8,22 (1H, s, H-30); 8,29 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3', H-5'); 7,97 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6'); 5,74 (1H, s, H-29a); 5,54 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,9, 5,2$ Hz, H-3); 3,05-2,87 (1H, m, H-19); 2,39-2,16 (1H, m, H-21); 1,90-1,60 (5H, m); 1,56 (3H, br s); 1,50-1,42 (5H, m); 1,40 (4H, br s); 1,12-1,32 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 166,3 (C-30, C-31); 158,7 (C-20); 149,2 (C-1'); 140,2 (C-4'); 129,1 (C-2', C6'); 125,0 (C-29); 124,2 (C-3', C-5'); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 29,8 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,4 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.7 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-hidroxifenil)azina (15g)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *o*-hidroxibenzaldehído (**14g**) (9,25 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 20 minutos, obteniéndose 21,0 mg de **15g** ($R = 55,2\%$) eluidos con Hex:AcOEt (95:5) como un sólido blanco cristalino; pf: 125-127 °C.



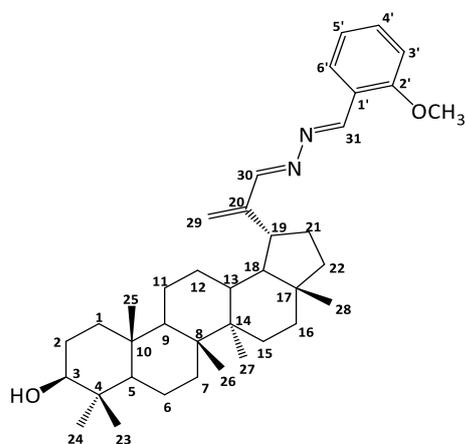
Peso molecular: 558,85 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 11,76 (1H, s, Bz-OH); 8,69 (1H, s, H-31); 8,20 (1H, s, H-30); 7,39-7,29 (2H, m, H-4', H-6'); 7,00 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-3'); 6,93 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H-5'); 5,71 (1H, s, H-29a); 5,51 (1H, s, H-29b); 3,24-3,08 (1H, m, H-3); 3,05-2,87 (1H, m, H-19); 2,35-2,15 (1H, m, H-21); 2,03-1,64 (5H, m); 1,59 (3H, br s); 1,54-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,31-1,19 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,8$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165,6 (C-30, C-31); 164,9 (C-20); 159,9 (C-2'); 152,3 (C-1'); 132,9 (C-20); 132,3 (C-6'); 124,7 (C-29); 119,5 (C-5'); 117,9 (C-4'); 117,1 (C-3'); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,8 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.8 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-metoxifenil)azina (15h)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *o*-metoxibenzaldehído (**14h**) (10,22 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 5 minutos, obteniéndose 23,2 mg de **15h** ($R = 59,5\%$) eluidos con Hex:AcOEt (92:8) como un sólido blanco amorfo; pf: 113-116 °C.



Peso molecular: 572,88 g/mol

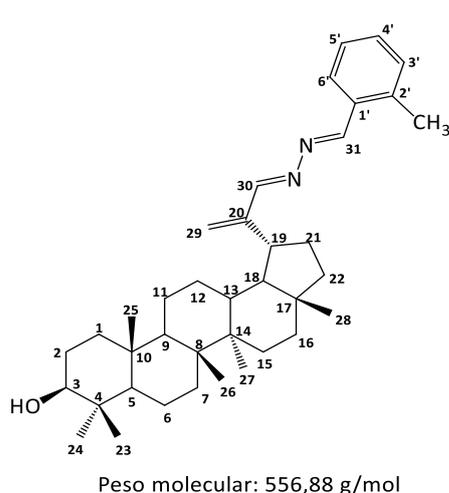
$^1\text{H-RMN}$ (δ , 300 MHz, CDCl_3): 8,96 (1H, s, H-31); 8,20 (1H, s, H-30); 8,04 (1H, dd, $J = 7,4, 1,8$ Hz, H-6'); 7,41 (1H, ddd, $J = 8,7, 7,4, 1,8$ Hz, H-5'); 7,00 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-4'); 6,93 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-3'); 5,63 (1H, s, H-29a); 5,45 (1H, s, H-29b); 3,89 (3H, s, Bz-OCH₃); 3,17 (1H, dd, $J = 10,9, 5,2$ Hz, H-3); 3,07-2,90 (1H, m, H-19); 2,36-2,18 (1H, m, H-21); 1,98-1,63 (5H, m); 1,59 (3H, br s); 1,53-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,29-1,12 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23);

0,95 (6H, s, H-26, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,9$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ , 75 MHz, CDCl_3): 164,3 (C-30, C-31); 159,1 (C-20); 157,4 (C-2'); 132,5 (C-1'); 127,4 (C-6'); 122,9 (C-4'); 120,9 (C-5'); 111,3 (C-29); 79,1 (C-3); 55,7 (C-18); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,8 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.9 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-metilfenil)azina (15i)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *o*-metilbenzaldehído (**14i**) (9,13 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 20 minutos, obteniéndose 2,5 mg de **15i** (R = 6,6%) eluidos con Hex:AcOEt (95:5) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 119-122 °C.

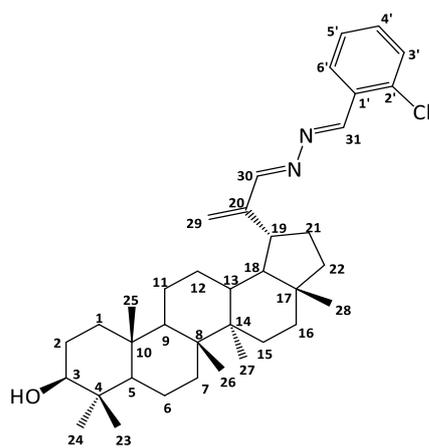


^1H -RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,84 (1H, s, H-31); 8,23 (1H, s, H-30); 8,00 (1H, dd, $J = 7,6, 1,6$ Hz, H-3'); 7,38-7,16 (3H, m, H-4', H-5', H-6'); 5,65 (1H, s, H-29a); 5,48 (1H, s, H-29b); 3,25-3,09 (1H, m, H-3); 3,06-2,88 (1H, m, H-19); 2,54 (3H, s, CH_3); 2,38-2,17 (1H, m, H-21); 1,90-1,60 (5H, m); 1,58 (3H, br s); 1,54-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,14-1,32 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,87 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,4$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,8 (C-30, C-31); 160,1 (C-20); 138,5 (C-1'); 132,4 (C-2'); 131,1 (C-3'); 130,8 (C-6'); 127,6 (C-4'); 126,4 (C-5'); 123,2 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 53,6 (C-18); 50,5 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 33,0 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 19,8 (Bz- CH_3); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.10 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-clorofenil)azina (15j)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *o*-clorobenzaldehído (**14j**) (10,52 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 7 minutos, obteniéndose 22,6 mg de **15j** (R = 57,5%) eluidos con Hex:AcOEt (95:5) como un sólido blanco cristalino; pf: 83-86 °C.



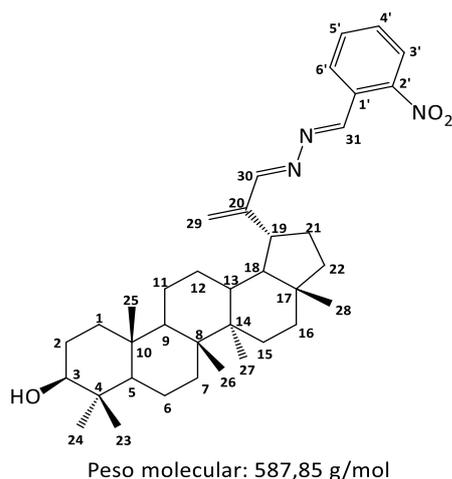
Peso molecular: 577,29 g/mol

¹H-RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl₃): 8,95 (1H, s, H-31); 8,20 (1H, s, H-30); 8,14 (1H, dd, $J = 7,4, 2,0$ Hz, H-3'); 7,46-7,27 (3H, m, H-4', H-5', H-6'); 5,68 (1H, s, H-29a); 5,49 (1H, s, H-29b); 3,24-3,10 (1H, m, H-3); 3,07-2,91 (1H, m, H-19); 2,38-2,17 (1H, m, H-21); 1,97-1,64 (5H, m); 1,57 (3H, *br s*); 1,54-1,42 (5H, m); 1,40 (4H, *br s*); 1,10-1,32 (5H, m); 1,03 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,87 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-5).

¹³C-RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl₃): 165,2 (C-30, C-31); 157,9 (C-20); 135,7 (C-1'); 132,0 (C-2'); 131,8 (C-3'); 130,2 (C-6'); 128,2 (C-4'); 127,1 (C-5'); 123,9 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10); 36,7 (C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,1 (C-21); 29,8 (C-23); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.11 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-nitrofenil)azina (15k)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *o*-nitrobenzaldehído (**14k**) (11,24 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 30 minutos, obteniéndose 16,5 mg de **15k** (R = 41,2%) eluidos con Hex:AcOEt (87:13) y posterior repurificación, como un sólido naranja claro cristalino; pf: 117-120 °C.

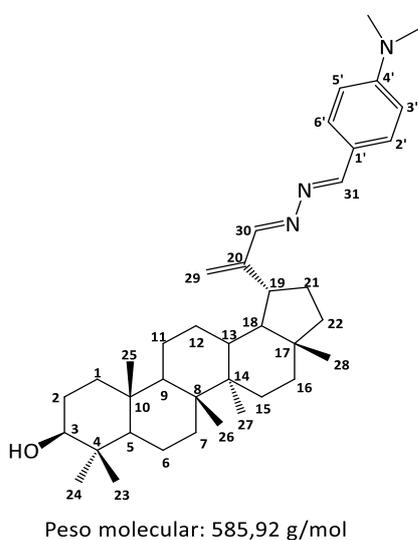


$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,96 (1H, s, H-31); 8,21 (1H, dd, $J = 7,8, 1,6$ Hz, H-3'); 8,16 (1H, s, H-30); 8,04 (1H, dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, H-6'); 7,68 (1H, t, $J = 7,3$ Hz, H-5'); 7,58 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, H-4'); 5,71 (1H, s, H-29a); 5,50 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,8, 5,3$ Hz, H-3); 3,05-2,88 (1H, m, H-19); 2,37-2,14 (1H, m, H-21); 1,87-1,60 (5H, m); 1,64-1,54 (3H, m); 1,53-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,18-1,31 (5H, m); 1,04 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165,5 (C-30, C-31); 156,5 (C-20); 149,1 (C-2'); 133,5 (C-1'); 131,1 (C-5'); 129,5 (C-6'); 129,3 (C-4'); 124,8 (C-3'); 124,6 (C-29); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 33,0 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.12 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-N,N-dimetilfenil)azina (151)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-dimetilaminobenzaldehído (**14I**) (11,1 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 25 minutos, obteniéndose 10,1 mg de **151** ($R = 25,2\%$) eluidos con Hex:AcOEt (92:8) como un sólido amarillo cristalino; pf: 123-125 °C.

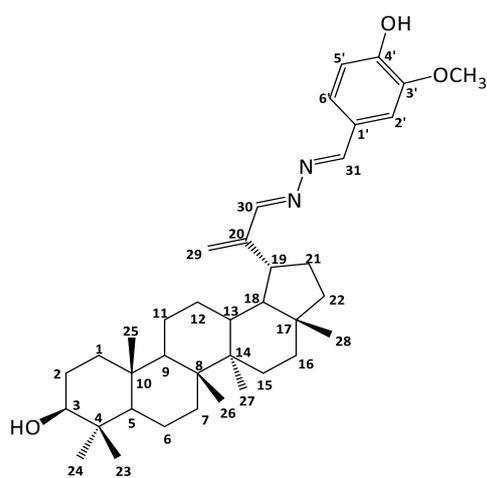


$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,50 (1H, s, H-31); 8,22 (1H, s, H-30); 7,67 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-2', H-6'); 6,70 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, H-3', H-5'); 5,58 (1H, s, H-29a); 5,41 (1H, s, H-29b); 3,23-3,11 (1H, m, H-3); 3,04 (6H, s, $\text{Bz-N}(\text{CH}_3)_2$); 3,03-2,98 (1H, m, H-19); 2,37-2,14 (1H, m, H-21); 1,99-1,64 (5H, m); 1,61 (3H, br s); 1,58-1,46 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,12-1,31 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,95 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,66 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 163,4 (C-30, C-31); 162,3 (C-20); 152,4 (C-4'); 130,2 (C-2', C-6'); 122,1 (C-29); 122,0 (C-1'); 111,8 (C-3', C-5'); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,3 ($\text{Bz-N}(\text{CH}_3)_2$); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,8 (C-16); 34,5 (C-7); 33,0 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.13 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(4'-hidroxi-3'-metilfenil)azina (15m)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de *p*-hidroxi-*m*-metoxibenzaldehído (**14m**) (11,3 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 20 minutos, obteniéndose 11,5 mg de **15m** (R = 28,6%) eluidos con Hex:AcOEt (82:18) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 123-125 °C.



Peso molecular: 588,88 g/mol

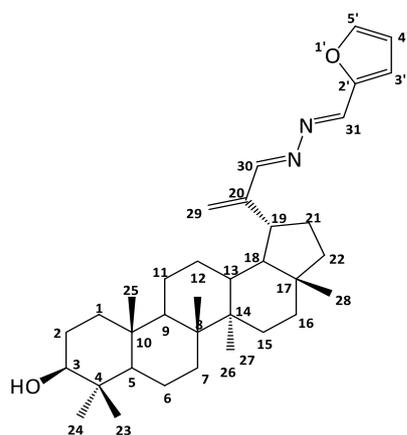
^1H -RMN (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,48 (1H, s, H-31); 8,21 (1H, s, H-30); 7,50 (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-6'); 7,18 (1H, dd, $J = 8,1, 1,8$ Hz, H-2'); 6,95 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-5'); 5,95 (1H, s, Bz-OH); 5,63 (1H, s, H-29a); 5,45 (1H, s, H-29b); 3,96 (3H, s, Bz-OCH₃); 3,23-3,11 (1H, m, H-3); 3,03-2,89 (1H, m, H-19); 2,35-2,15 (1H, m, H-21); 1,84-1,63 (5H, m); 1,58 (3H, *br s*); 1,54-1,41 (5H, m); 1,40 (4H, *br s*); 1,11-1,31 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,95 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28);

0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,3 (C-30, C-31); 161,6 (C-20); 148,8 (C-3'); 147,1 (C-4'); 126,9 (C-1'); 124,8 (C-6'); 123,0 (C-29); 114,5 (C-5'); 108,5 (C-2'); 79,1 (C-3); 56,2 (C-5); 55,4 (C-18); 50,5 (C-9); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 29,7 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.14 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-furfurilazina (15n)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de furfural (**14n**) (7,5 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 8 minutos, obteniéndose 15,8 mg de **15n** (R = 43,6%) eluidos con Hex:AcOEt (90:10) y posterior repurificación, como un sólido amarillo pálido cristalino; pf: 104-107 °C.



Peso molecular: 532,81 g/mol

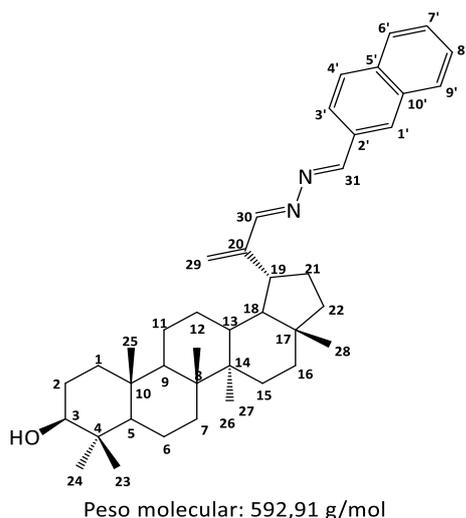
$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,43 (1H, s, H-31); 8,26 (1H, s, H-30); 7,59 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-5'); 6,86 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-3'); 6,53 (1H, dd, $J = 3,5, 1,8$ Hz, H-4'); 5,64 (1H, s, H-29a); 5,46 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,8, 5,2$ Hz, H-3); 3,01-2,83 (1H, m, H-19); 2,35-2,10 (1H, m, H-21); 1,90-1,63 (5H, m); 1,60 (3H, br s); 1,57-1,42 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,11-1,30 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,96 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,80 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,66 (1H, d, $J = 9,5$ Hz,

H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165,7 (C-30, C-31); 150,5 (C-20); 149,8 (C-2'); 145,7 (C-5'); 123,7 (C-29); 116,3 (C-3'); 112,3 (C-4'); 79,1 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 27,4 (C-21); 21,1 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,6 (C-27).

IV.6.4.15 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(2'-naftil)azina (15ñ)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de naftaldehído (**14ñ**) (11,6 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 30 minutos, obteniéndose 15,0 mg de **15ñ** (R = 37,2%) eluidos con Hex:AcOEt (95:5) como un sólido amarillo pálido cristalino; pf: 128-131 °C.

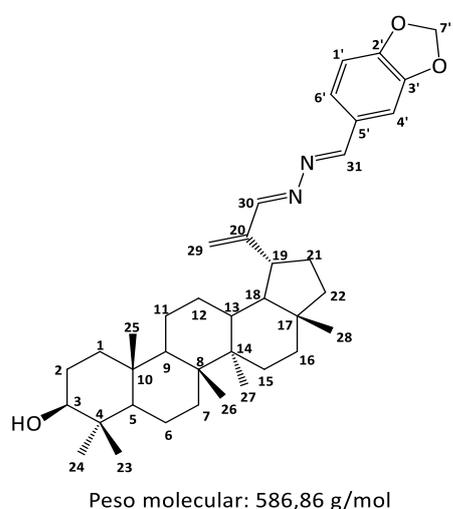


$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,71 (1H, s, H-31); 8,27 (1H, s, H-30); 8,13-8,02 (2H, m, H-1', H-4'); 7,94-7,81 (3H, m, H-3', H-6', H-9'); 7,59-7,47 (2H, m, H-7', H-8'); 5,68 (1H, s, H-29a); 5,50 (1H, s, H-29b); 3,23-3,10 (1H, m, H-3); 3,08-2,91 (1H, m, H-19); 2,36-2,19 (1H, m, H-21); 1,92-1,64 (5H, m); 1,58 (3H, br s); 1,55-1,45 (5H, m); 1,40 (4H, br s); 1,10-1,32 (5H, m); 1,04 (3H, s, H-23); 0,97 (6H, s, H-26, H-27); 0,88 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,67 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 165,0 (C-30, C-31); 161,6 (C-20); 135,0 (C-10'); 133,3 (C-5'); 132,1 (C-2'); 130,7 (C-1'); 128,8 (C-8'); 128,7 (C-4'); 128,1 (C-5'); 127,6 (C-3'); 126,7 (C-6'); 123,9 (C-7'); 123,6 (C-29); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,2 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,8 (C-16); 34,5 (C-7); 32,1 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.6.4.16 Preparación de lup-20(29)-en-30,31-(E,E)-(5'-piperonil)azina (15o)

Una solución de **5** (30 mg, 0,068 mmol) en EtOH absoluto (2 mL) se trató con la hidrazona de piperonal (**14o**) (11,20 mg, 0,068 mmol) de acuerdo al procedimiento general por MW durante 10 minutos, obteniéndose 16,2 mg de **15o** ($R = 40,6\%$) eluidos con Hex:AcOEt (93:7) y posterior repurificación, como un sólido blanco cristalino; pf: 106-109 °C.



$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 8,46 (1H, s, H-31); 8,19 (1H, s, H-30); 7,42 (1H, d, $J = 1,6$ Hz, H-4'); 7,18 (1H, dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, H-1'); 6,85 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-6'); 6,02 (2H, s, H-7'); 5,64 (1H, s, H-29a); 5,45 (1H, s, H-29b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,8, 5,1$ Hz, H-3); 3,04-2,86 (1H, m, H-19); 2,35-2,14 (1H, m, H-21); 1,91-1,61 (5H, m); 1,58 (3H, br s); 1,53-1,41 (5H, m); 1,39 (4H, br s); 1,12-1,30 (5H, m); 1,02 (3H, s, H-23); 0,95 (6H, s, H-26, H-27); 0,85 (3H, s, H-25); 0,81 (3H, s, H-28); 0,75 (3H, s, H-24); 0,66 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-

5).

^{13}C -RMN (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 164,6 (C-30, C-31); 161,1 (C-20); 150,4 (C-3'); 148,5 (C-2'); 128,9 (C-5'); 125,2 (C-6'); 123,2 (C-29); 108,5 (C-1'); 106,8 (C-4'); 101,7 (C-7'); 79,2 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9, C-18); 43,3 (C-17); 42,9 (C-14); 41,0 (C-8); 40,1 (C-22); 39,0 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,3 (C-10, C-19); 35,7 (C-16); 34,5 (C-7); 32,9 (C-21); 28,1 (C-23); 27,6 (C-2, C-12); 27,5 (C-15); 21,2 (C-11); 18,5 (C-6); 18,1 (C-28); 16,2 (C-25); 16,1 (C-26); 15,5 (C-24); 14,7 (C-27).

IV.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS ANÁLOGOS TRITERPÉNICOS

IV.7.1 Células de neuroblastoma humano (modelo neuronal)

La línea IMR-32 (CCL-127TM), ATCC®, son células neuroblásticas aisladas de tejido cerebral con neuroblastoma. Hay dos tipos celulares presentes. Predominan células pequeñas tipo neuroblasto y también se encuentran fibroblastos hialinos grandes.

Se cultivaron en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alta glucosa suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Los cultivos se renovaron cada 2 días con medio fresco. Para los ensayos de viabilidad celular, las células se cultivaron en placas de 96-wells (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania).

Los experimentos fueron realizados con cultivos de 80-90% de confluencia en DMEM libre de suero. Las células fueron pretratadas con los derivados de lupeol (10 y 50 μM) durante 1 h y luego expuestas a una concentración citotóxica de 6-OHDA (25 μM). Luego de 24 h, se realizó el ensayo de reducción de MTT para evaluar la viabilidad celular. A las concentraciones 10 y 50 μM los derivados triterpénicos no resultaron ser citotóxicos.

IV.7.2 Ensayo de reducción del MTT (viabilidad celular)

El reactivo MTT es una sal de tetrazolio color amarillo, que es capaz de reducirse a cristales de formazán color violeta cuando las células están viables. Las células IMR-32 fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Luego de 24 h, se trataron como se describió en IV.7.1 y se incubaron con MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml por 2 h a 37 °C en atmósfera de CO_2 5%. Una vez removido el medio de cultivo que contiene MTT, los cristales de formazán formados fueron disueltos con 200 μl de dodecil sulfato de sodio 20% (pH 4,6). La reducción del MTT se midió espectrofotométricamente a 570 nm. Los resultados se expresan como porcentaje del control.

IV.8 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y METABOLITOS ACTIVOS DE *Nicotiana glauca*

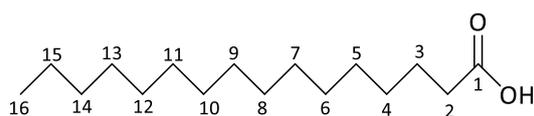
Las partes aéreas de *N. glauca* (126 g) fueron secadas en estufa a 50 °C durante 24 h. Posteriormente fueron pulverizadas y extraídas con EtOH (2 L) a temperatura ambiente durante 10 días. Luego del filtrado y evaporación del solvente a 45 °C a presión reducida, se obtuvieron 26,3 g de **EE** (21% sobre material vegetal).

Para el fraccionamiento del **EE** se utilizaron 4 g de este, y fueron particionados con 100 mL de H₂O, y solventes de polaridad creciente: hexano (320 mL), CHCl₃ (200 mL) y AcOEt (200 mL) en ampolla de decantación. La fase acuosa fue lavada dos veces con cada solvente. Luego de la evaporación, se obtuvieron los diferentes subextractos, los cuales fueron liofilizados durante 48 h. De esta forma se obtuvieron 993 mg de **SH** (24,8% sobre **EE**), 28 mg de **SC** (0,7% sobre **EE**), y 164 mg de **SAE** (4,1% sobre **EE**).

Para los ensayos presuntivos se utilizaron diferentes reactivos de color y diferentes sistemas de FM: Fast Blue (0,5 g de sal fast blue + 100 mL de H₂O) para flavonoides, FM: AcOEt:Ác. Fórmico:Ác. Acético glacial:H₂O (100:11:11:27); KOH (10%) (10 g de KOH + 100 mL de EtOH absoluto) para cumarinas, FM: tolueno:éter (1:1); *p*-anisaldehído para esteroides, FM:CHCl₃:MeOH:H₂O (64:50:10).

El **SH** (993 mg) fue fraccionado mediante CC sobre sílica gel de fase normal, utilizando como eluyente una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 70 fracciones de 10 mL cada una, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de CCF dando lugar a **F1** (66,4 mg, 6,7%), **F2** (108,7 mg, 10,9%), **F3** (66,4 mg, 6,7%), **F4** (56,2 mg, 5,7%) y **F5** (628,3 mg, 63,3%). El rendimiento de la cromatografía fue de 93,3% sobre el total de la muestra sembrada.

F3 (66,4 mg) fue sometida a una CC sobre sílica flash, utilizando como eluyente una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose 62 subfracciones de 5 mL cada una, las cuales fueron agrupadas en 3 subfracciones según su similitud en la CCF: **SF1** (6,4 mg), **SF2** (35,6 mg) y **SF3** (23,2 mg). El rendimiento de la cromatografía fue de 98,2% sobre el total de la muestra sembrada. El análisis espectroscópico de RMN de **SF1**, determinó el contenido de **AP** con un 100% de pureza (6,4 mg; 0,033% del material vegetal; pf: 63 °C). El ácido graso **AP** corresponde a un sólido blanco de aspecto brillante y fue identificado en base a sus datos de espectroscópicos de RMN de ¹H y ¹³C, y CG-EM.



Peso molecular: 256,43 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 2,34 (2H, t, $J = 7,1$ Hz, H-2); 1,63-1,53 (2H, m, H-3); 1,25 (24H, br s, H-4-H-15); 0,87 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, H-16).

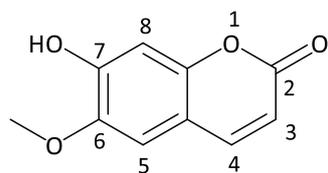
$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 178,97; 33,97; 32,08; 29,85; 29,74; 29,58; 29,51; 29,39; 29,21; 24,84; 22,84; 14,26.

EM: (EI, 70 eV) m/z a 256,4 $[\text{M}]^+$ (15%); 228 (20%), 185,2 (35%), 129 (52%), 73 (100%), 60 (76%) y 43 (59%).

El SC (28 mg) fue fraccionado mediante CC sobre sílica gel de fase normal, utilizando como eluyente una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente. De esta cromatografía se obtuvieron 153 fracciones de 10 mL cada una, que se reunieron en grupos según su similitud presentada en el análisis de CCF, dando lugar a F1 (1,5 mg, 5,4%), F2 (0,6 mg, 2,1%), F3 (0,95 mg, 3,4%), F4 (0,85 mg, 3,0%) y F5 (24,0 mg, 85,7%). El rendimiento de la cromatografía fue de 99,6% sobre el total de la muestra sembrada.

F5 (24 mg) fue sometida a una CC sobre sílica flash, utilizando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH de polaridad creciente, obteniéndose 122 subfracciones de 5 mL cada una, las cuales fueron agrupadas en 4 subfracciones según su similitud en la CCF: SF1 (0,5 mg), SF2 (1,6 mg), SF3 (9,2 mg) y SF4 (12,3 mg). El rendimiento de la cromatografía fue de 98,3% sobre el total de la muestra sembrada.

SF2 (1,6 mg) fue cromatografiada mediante CPCF, utilizando CH_2Cl_2 :MeOH (95:5) como FM. El análisis espectroscópico de RMN de la fracción obtenida, determinó ESC con un 100% de pureza (1,1 mg; 0,006% del material vegetal; pf: 202-204 °C). La cumarina ESC corresponde a un sólido amarillo pálido y fue identificado en base a sus datos de espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C , y CG-EM.



Peso molecular: 192,17 g/mol

$^1\text{H-RMN}$ (δ en ppm, 300 MHz, CDCl_3): 7,59 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-3); 6,92 (1H, s, H-8); 6,85 (1H, s, H-5); 6,27 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-4); 6,14 (1H, br s, -OH); 3,96 (3H, s, -OCH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (δ en ppm, 75 MHz, CDCl_3): 161,56; 150,42; 149,82; 144,12; 143,42; 113,60; 111,65; 107,63; 103,34; 56,57.

EM: (EI, 70 eV) m/z a 192,1 $[\text{M}]^+$ (100%), 177 (60%), 164 (25%), 149 (48%), 121 (21%), 79 (20%), 69 (37%) y 51 (25%).

IV.9 ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS EXTRACTOS DE *Nicotiana glauca* Y METABOLITOS AISLADOS

IV.9.1 Mioblastos esqueléticos murinos C2C12

Los mioblastos esqueléticos murinos C2C12 obtenidos de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.), se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, nistatina al 1% y estreptomycin al 2%.

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en el aire. Los cultivos se renovaron cada 2 días con medio fresco. Los tratamientos se realizaron con cultivos confluentes (120000 células/cm²) en medio sin suero durante 20 minutos antes de los tratamientos. Tanto **EE**, subextractos, subfracciones y **AP** se disolvieron a una concentración de 2,5 mg/5 ml de isopropanol. Luego, las células se expusieron (dilución 1:1000 en DMEM sin suero) a **EE**, **SH**, **SC**, **SAE**, **AP** o vehículo [0,001% isopropanol (control)] en los tiempos indicados; o fueron tratados con H₂O₂ 0,5 mM (control positivo de apoptosis). Después de los tratamientos, las células se lisaron usando un tampón (Tris - HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Na₂VO₄ 0,2 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, NaF 25 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, 1% NP40, 20 mg/ml de leupeptina y 20 mg/ml de aprotinina). Para los ensayos microscópicos, las células se cultivaron en portaobjetos de cámara.

IV.9.2 Células de rhabdomyosarcoma humano

La línea celular RD (CCL-136™), American Type Culture Collection (ATCC®), consiste en células de rhabdomyosarcoma de una niña caucásica de 7 años. Morfología: huso y gran adherente con algunas células multinucleadas, susceptibilidad a virus, inestable dentro de una línea de tallo bimodal hiper diploide de 49 y 50.

Se cultivaron en DMEM inactivado por calor (30 minutos, 56 °C) y suplementado con suero fetal bovino al 10%, nistatina al 1% y estreptomycin al 2%. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en el aire. Los cultivos se renovaron cada 2 días con medio fresco. Las células se cultivaron en placas de 3 cm y 6 cm para microscopía o en placas de 10 cm para ensayos de migración/proliferación (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Los tratamientos se realizaron con cultivos confluentes 70-80% (120000 células/cm²) en medio sin suero. Las concentraciones utilizadas en cada experimento fueron las mismas que las utilizadas para las células murinas C2C12. Tanto **EE**, **SH**, **SC**, **AP** y **ESC** se disolvieron a una concentración de 2,5 mg/5 ml de isopropanol, y las células se expusieron a

los diferentes tratamientos [dilución 1:1000 en DMEM sin suero; EE, SH, SC, AP, ESC o vehículo (0,001% de isopropanol, control)] en los tiempos indicados en cada ensayo.

IV.9.3 Morfología mitocondrial y nuclear de células

Después de los diferentes tratamientos, se observó morfología/distribución mitocondrial y nuclear en la línea celular C2C12 y RD, crecidas en placas de 3 cm con cubreobjetos. Para ello, se empleó el colorante MTT para la tinción selectiva de mitocondrias activas y el colorante DAPI para la tinción selectiva de núcleo. Los cubreobjetos con células adherentes se tiñeron con MTT, que se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se añadió al medio de cultivo celular a una concentración final de 1 $\mu\text{mol/L}$ en PBS 1X. Después de una incubación de 15 a 30 minutos a 37 °C, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron y se permeabilizaron con MeOH a -20 °C durante 30 minutos. Las células fijadas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con una dilución 1:500 de DAPI (5 mg/ml). Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio y se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse Ti-S) equipado con conjuntos de filtros estándar para capturar señales fluorescentes. Las imágenes fueron recolectadas usando una cámara digital.

IV.9.4 Tinción roja MitoTracker

Los cubreobjetos provistos de células adherentes se tiñeron con colorante rojo MitoTracker (sondas moleculares), se prepararon en sulfóxido de dimetilo y luego se añadieron al medio de cultivo celular a una concentración final de 1 mM/L. Después de 15 minutos de incubación a 37 °C, las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol frío. Finalmente, los cubreobjetos se analizaron por microscopía de fluorescencia como se describe.

IV.9.5 Ensayos TUNEL

Después de los tratamientos específicos, las células cultivadas sobre cubreobjetos se procesaron para la localización *in situ* de núcleos que exhiben fragmentación de ADN mediante la técnica de TUNEL con el uso del kit de detección de apoptosis DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Los protocolos se siguieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego, las células se analizaron con un microscopio de fluorescencia convencional (NIKON Eclipse Ti-S equipado con conjuntos de filtros estándar para capturar señales fluorescentes, y las imágenes se obtuvieron con una cámara digital). Se

contaron al menos 500 células de cada condición experimental y se identificaron células apoptóticas mediante tinción de núcleos (células TUNEL positivas). Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos apoptóticos.

IV.9.6 Cuantificación de células apoptóticas

Después de los tratamientos, las células se fijaron con MeOH frío y luego se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células fijas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con 1:500 de una solución de DAPI (5 mg/ml) y se lavaron con PBS. Las células se examinaron usando un microscopio de fluorescencia equipado con conjuntos de filtros estándar para capturar señales fluorescentes. Las imágenes fueron recolectadas usando una cámara digital. Las células apoptóticas se identificaron por la condensación y/o fragmentación de sus núcleos. Los resultados se expresaron como porcentaje de células apoptóticas. Se contó un mínimo de 500 células para cada tratamiento de al menos tres experimentos independientes.

IV.9.7 Ensayo de actividad Caspasas-3/7

Después de los tratamientos específicos, las células se marcaron con reactivo de caspasa-3/7, CellEvent™ 6 μM en PBS con calcio y magnesio durante 30 minutos a 37 °C en la oscuridad. El reactivo consiste en un péptido de cuatro aminoácidos (la secuencia de escisión de caspasa-3/7, DEVD) conjugado con un colorante de unión a ácido nucleico. Este sustrato permea las células y es intrínsecamente no fluorescente, porque el péptido DEVD inhibe la capacidad del tinte para unirse al ADN. Después de la activación de caspasa-3 o caspasa-7 en células apoptóticas, el péptido DEVD se escinde, lo que permite que el colorante se una al ADN y produzca una respuesta brillante y fluorogénica con una absorción/emisión máxima de aproximadamente 502/530 nm. Las células teñidas se analizaron con un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse Ti-S equipado con conjuntos de filtros estándar). Se contaron al menos 500 células de cada condición experimental y se identificó la activación de caspasas por fluorescencia verde en los núcleos (células caspasa-3/7 positivas). Los resultados se expresaron como porcentaje de células caspasa-3/7 positivas.

IV.9.8 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando paquetes estadísticos estándar (Sistema InfoStat, Córdoba, Argentina). Los valores se muestran como la media \pm desviación estándar

(S.D.) de al menos tres experimentos independientes. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Krause, J.; Tobi, G. Discovery, Development, and Regulation of Natural Products. Using Old Solutions to New Problems - Natural Drug Discovery in the 21st Century, 2013.
- [2] Bernardini, S.; Tiezzi, A.; Laghezza Masci, V.; Ovidi, E. Natural Products for Human Health: An Historical Overview of the Drug Discovery Approaches. *Natural Product Research*, 2017, 32, 1926-1950.
- [3] Thakur, M.; Bhattacharya, S.; Khosla, P. K.; Puri, S. Improving Production of Plant Secondary Metabolites through Biotic and Abiotic Elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2019, 12, 1-12.
- [4] Yang, L.; Wen, K.-S.; Ruan, X.; Zhao, Y.-X.; Wei, F.; Wang, Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 2018, 23, 762.
- [5] Gutiérrez Ravelo, A.; Estévez Braun, A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España)*, 2009, 103 (2), 409-419.
- [6] Priya, S.; Satheeshkumar, P. K. Natural Products from Plants. Functional and Preservative Properties of Phytochemicals, 2020, 145-163.
- [7] Breinbauer, R.; Manger, M.; Scheck, M.; Waldmann, H. Natural Product Guided Compound Library Development. *Current Medicinal Chemistry*, 2002, 9, 2129-2145.
- [8] Lipinski, C. A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004, 1, 337-341.
- [9] Jiménez, C. El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Anales de Química de la Real Sociedad Española de Química*, 2013, 109 (2), 134-141.
- [10] Mushtaq, S.; Abbasi, B. H.; Uzair, B.; Abbasi, R. Natural Products as Reservoirs of Novel Therapeutic Agents. *EXCLI Journal*, 2018, 17, 420-451.
- [11] Una farmacia en el monte, 1º ed., Reinoso, E.; Oliva, M. (eds.). Editorial Córdoba, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, 2019, 80 p. ISBN 978-987-47203-0-6.
- [12] Gurnani, N.; Mehta, D.; Gupta, M.; Mehta, B.K. Natural Products: Source of Potential Drugs. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 2014, 6 (6), 171-186.
- [13] Atanasov, A. G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E. H.; Rollinger, J. M.; Schuster, D.; Breuss, J. M.; Bochkov, V.; Mihovilovic, M. D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V. M.; Stuppner, H. Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review. *Biotechnology Advances*, 2015, 33, 1582-1614.
- [14] Jamshidi-Kia, F.; Lorigooini, Z.; Amini-Khoei, H. Medicinal Plants: Past History and Future Perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 2018, 7, 1-7.

- [15] Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2012, 2, 303-336.
- [16] Mesa Venegas 2017
- [17] Clark, A. M. *Pharmaceutical Research*, 1996, 13, 1133-1141.
- [18] Harvey, A. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, 2008, 13, 894-901.
- [19] Rishton, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *The American Journal of Cardiology*, 2008, 101, S43-S49.
- [20] Aftab, K. Natural products pharmacology. *Academia Journal of Medicinal Plants*, 2018, 6 (12), 402-403.
- [21] Barbero, C. A.; Furlan, R. L.; Mata, E. G. Química combinatoria. *Asociación Civil Ciencia Hoy, Ciencia Hoy*, 2011, 21 (124), 39-45.
- [22] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 2020, 83, 770-803.
- [23] Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*, 1997, 60, 52-60.
- [24] Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 2003, 66, 1022-1037.
- [25] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 2007, 70, 461-477.
- [26] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 2012, 75, 311-335.
- [27] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 2016, 79, 629-661.
- [28] Soejarto, D. D.; Fong, H. H. S.; Tan, G. T.; Zhang, H. J.; Ma, C. Y.; Franzblau, S. G.; Gyllenhaal, C.; Riley, M. C.; Kadushin, M. R.; Pezzuto, J. M.; Xuan, L. T.; Hiep, N. T.; Hung, N. V.; Vu, B. M.; Loc, P. K.; Dac, L. X.; Binh, L. T.; Chien, N. Q.; Hai, N. V.; Bich, T. Q.; Cuong, N. M.; Southavong, B.; Sydara, K.; Bouamanivong, S.; Ly, H. M.; Thuy, T. V.; Rose, W. C.; Dietzman, G. R. Ethnobotany/Ethnopharmacology and Mass Bioprospecting: Issues on Intellectual Property and Benefit-Sharing. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 100, 15-22.
- [29] Desborough, M. J. R.; Keeling, D. M. The Aspirin Story - from Willow to Wonder Drug. *British Journal of Haematology*, 2017, 177, 674-683.
- [30] Ekinci, D.; Şentürk, M.; Küfrevioğlu, Ö. İ. Salicylic Acid Derivatives: Synthesis, Features and Usage as Therapeutic Tools. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2011, 21, 1831-1841.

- [31] Centelles, J. J.; Imperial, S. Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Ámbito farmacéutico*, 2010, 29 (4), 68-75.
- [32] Wender, P. A.; Badham, N. F.; Conway, S. P.; Floreancig, P. E.; Glass, T. E.; Houze, J. B.; Krauss, N. E.; Lee, D.; Marquess, D. G.; McGrane, P. L.; Meng, W.; Natchus, M. G.; Shuker, A. J.; Sutton, J. C.; Taylor, R. E. The Pinene Path to Taxanes. 6. A Concise Stereocontrolled Synthesis of Taxol. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, 119, 2757-2758.
- [33] Barrales-Cureño, H.J.; Farrera, R.A.; Reyes, R.C.; et al. Generalidades del fármaco Taxol: una revisión sistemática. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 2016, 16 (1), 75-91.
- [34] Arpicco, S.; Stella, B.; Schiavon, O.; Milla, P.; Zonari, D.; Cattell, L. Preparation and Characterization of Novel Polyethylene Glycol Paclitaxel Derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 454, 653-659.
- [35] Singh, P.; Gupta, E.; Neha Mishra; Mishra, P. Shikimic Acid as Intermediary Model for the Production of Drugs Effective against Influenza Virus. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*, 2020, 245-256.
- [36] Díaz-Quiroz, D. C.; Cardona-Félix, C. S.; Viveros-Ceballos, J. L.; Reyes-González, M. A.; Bolívar, F.; Ordoñez, M.; Escalante, A. Synthesis, Biological Activity and Molecular Modelling Studies of Shikimic Acid Derivatives as Inhibitors of the Shikimate Dehydrogenase Enzyme of *Escherichia Coli*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2018, 33, 397-404.
- [37] Nathwani, D.; Wood, M. J. Penicillins. *Drugs*, 1993, 45, 866-894.
- [38] Albuquerque, U. P. de; Hanazaki, N. As Pesquisas Etnodirigidas Na Descoberta de Novos Fármacos de Interesse Médico e Farmacêutico: Fragilidades e Perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006, 16, 678-689.
- [39] Abreu Guirado, O. A.; Cuéllar Cuéllar, A.; Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista cubana de plantas medicinales*, 2008, 13 (3).
- [40] Bioactive compounds In phytomedicine, Ed: Iraj Rasooli. 2011. ISBN 978-953-307-805-2.
- [41] Vela Gurovic, M.S.; Metabolitos secundarios bioactivos aislados a partir de plantas de silvestres de la región de Bahía Blanca. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, 2009.
- [42] Skliar, M.; Curino, A.; Milanesi, L.; Benassati, S.; Boland, R. *Nicotiana Glauca*: Another Plant Species Containing Vitamin D3 Metabolites. *Plant Science*, 2000, 156, 193-199.
- [43] Milanesi, L.; Monje, P.; Boland, R. Presence of Estrogens and Estrogen Receptor-like Proteins in *Solanum Glaucophyllum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289, 1175-1179.
- [44] Milanesi, L.; Boland, R. Presence of Estrogen Receptor (ER)-like Proteins and Endogenous Ligands for ER in Solanaceae. *Plant Science*, 2004, 166, 397-404.

- [45] Milanesi, L.; Caracterización de hidroxilasas de vitamina D3 y proteínas ligadoras de 17β -estradiol y $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D3 en plantas. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, 2004.
- [46] Milanesi, L.; Vasconsuelo, A.; Stockman G.; Boland R.; Production of vitamin D compounds in plants: Biotechnological implications. *Metabolic Engineering and Molecular Farming-I*. Vol. 7. Plant Genetic Engineering. Houston, Texas: Studium Press, LLC. 2005, 189 – 223.
- [47] Patisaul, H. B.; Jefferson, W. The Pros and Cons of Phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2010, 31, 400-419.
- [48] J. C. Furtado, N.; Pirson, L.; Edelberg, H.; M. Miranda, L.; Loira-Pastoriza, C.; Preat, V.; Larondelle, Y.; André, C. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules*, 2017, 22, 400.
- [49] Hill, R. A.; Connolly, J. D. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 2013, 30, 1028-1065.
- [50] Bednarczyk-Cwynar, B.; Zaprutko, L. Recent Advances in Synthesis and Biological Activity of Triterpenic Acylated Oximes. *Phytochemistry Reviews*, 2014, 14, 203-231.
- [51] Hordyjewska, A.; Ostapiuk, A.; Horecka, A. Betulin and Betulinic Acid in Cancer Research. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2018, 12, 72-75.
- [52] Wang, W.; Wang, Y.; Liu, M.; Zhang, Y.; Yang, T.; Li, D.; Huang, Y.; Li, Q.; Bai, G.; Shi, L. Betulinic Acid Induces Apoptosis and Suppresses Metastasis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines in Vitro and in Vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 23, 586-595.
- [53] González-Cofrade, L.; de las Heras, B.; Apaza Ticona, L.; Palomino, O. M. Molecular Targets Involved in the Neuroprotection Mediated by Terpenoids. *Planta Medica*, 2019, 85, 1304-1315.
- [54] Harun, N. H.; Septama, A. W.; Ahmad, W. A. N. W.; Suppian, R. Immunomodulatory Effects and Structure-Activity Relationship of Botanical Pentacyclic Triterpenes: A Review. *Chinese Herbal Medicines*, 2020, 12, 118-124.
- [55] Hodon, J.; Borkova, L.; Pokorny, J.; Kazakova, A.; Urban, M. Design and Synthesis of Pentacyclic Triterpene Conjugates and Their Use in Medicinal Research. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 182, 111653.
- [56] Laszczyk, M. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Medica*, 2009, 75, 1549-1560.
- [57] Shikov, A. N.; Djachuk, G. I.; Sergeev, D. V.; Pozharitskaya, O. N.; Esaulenko, E. V.; Kosman, V. M.; Makarov, V. G. Birch Bark Extract as Therapy for Chronic Hepatitis C – A Pilot Study. *Phytomedicine*, 2011, 18, 807-810.
- [58] Hordyjewska, A.; Ostapiuk, A.; Horecka, A.; Kurzepa, J. Betulin and Betulinic Acid: Triterpenoids Derivatives with a Powerful Biological Potential. *Phytochemistry Reviews*, 2019, 18, 929-951.

- [59] Pavlova, N. I.; Savinova, O. V.; Nikolaeva, S. N.; Boreko, E. I.; Flekhter, O. B. Antiviral Activity of Betulin, Betulinic and Betulonic Acids against Some Enveloped and Non-Enveloped Viruses. *Fitoterapia*, 2003, 74, 489-492.
- [60] de A. Silva, J.; do Carmo, Dominique F. M.; Amaral, A. C.; Machado, M.; Lopes, D.; Echevarria, A.; Rosário, V. Evaluation of Antiplasmodial Activity of Extracts and Constituents from *Ampelozizyphus Amazonicus*. *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11, 244.
- [61] Muceniece, R.; Saleniece, K.; Rumaks, J.; Krigere, L.; Dzirkale, Z.; Mezhapuke, R.; Zharkova, O.; Klusa, V. Betulin Binds to γ -Aminobutyric Acid Receptors and Exerts Anticonvulsant Action in Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2008, 90, 712-716.
- [62] Souza, M. T. de; Buzzi, F. de C.; Filho, V. C.; Hess, S.; Delle Monache, F.; Niero, R. Phytochemical and Antinociceptive Properties of *Matayba Elaeagnoides* Radlk. Barks. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007, 62, 550-554.
- [63] Zhang, D.-M.; Xu, H.-G.; Wang, L.; Li, Y.-J.; Sun, P.-H.; Wu, X.-M.; Wang, G.-J.; Chen, W.-M.; Ye, W.-C. Betulinic Acid and Its Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Medicinal Research Reviews*, 2015, 35, 1127-1155.
- [64] Ríos, J.; Mániz, S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta Medica*, 2017, 84, 8-19.
- [65] Weber, L. A.; Meißner, J.; Delarocque, J.; Kalbitz, J.; Feige, K.; Kietzmann, M.; Michaelis, A.; Paschke, R.; Michael, J.; Pratscher, B.; Cavalleri, J.-M. V. Betulinic Acid Shows Anticancer Activity against Equine Melanoma Cells and Permeates Isolated Equine Skin in Vitro. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16.
- [66] Kim, S. J.; Quan, H. Y.; Jeong, K. J.; Kim, D. Y.; Kim, G. woon; Jo, H. K.; Chung, S. H. Beneficial Effect of Betulinic Acid on Hyperglycemia via Suppression of Hepatic Glucose Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 62, 434-442.
- [67] Silva, F. S. G.; Oliveira, P. J.; Duarte, M. F. Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64, 2991-3008.
- [68] Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Cheng, K.; Zhang, P.; Zhang, L.; Hao, J.; Zhang, L.; Ni, P.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Alexacou, K.-M.; Gimisis, T.; Hayes, J. M.; Oikonomakos, N. G. Naturally Occurring Pentacyclic Triterpenes as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Synthesis, Structure–Activity Relationships, and X-Ray Crystallographic Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51, 3540-3554.
- [69] Ha, D. T.; Tuan, D. T.; Thu, N. B.; Nhiem, N. X.; Ngoc, T. M.; Yim, N.; Bae, K. Palbinone and Triterpenes from Moutan Cortex (*Paeonia Suffruticosa*, Paeoniaceae) Stimulate Glucose Uptake and Glycogen Synthesis via Activation of AMPK in Insulin-Resistant Human HepG2 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19, 5556-5559.

- [70] Gomes Castro, A. J.; Silva Frederico, M. J.; Cazarolli, L. H.; Bretanha, L. C.; Tavares, L. de C.; Buss, Z. da S.; Dutra, M. F.; Pacheco de Souza, A. Z.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. M. B. Betulinic Acid and 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ Share Intracellular Signal Transduction in Glucose Homeostasis in Soleus Muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 48, 18-27.
- [71] de Melo, C. L.; Queiroz, M. G. R.; Arruda Filho, A. C. V.; Rodrigues, A. M.; de Sousa, D. F.; Almeida, J. G. L.; Pessoa, O. D. L.; Silveira, E. R.; Menezes, D. B.; Melo, T. S.; Santos, F. A.; Rao, V. S. Betulinic Acid, a Natural Pentacyclic Triterpenoid, Prevents Abdominal Fat Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 8776-8781.
- [72] Kim, J.; Lee, Y. S.; Kim, C.-S.; Kim, J. S. Betulinic Acid Has an Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase and Induces Adipocyte Lipolysis. *Phytotherapy Research*, 2011, 26, 1103-1106.
- [73] Lee, W. S.; Im, K.-R.; Park, Y.-D.; Sung, N.-D.; Jeong, T.-S. Human ACAT-1 and ACAT-2 Inhibitory Activities of Pentacyclic Triterpenes from the Leaves of *Lycopus Lucidus* TURCZ. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, 29, 382-384.
- [74] Jang, D. S.; Lee, G. Y.; Kim, J.; Lee, Y. M.; Kim, J. M.; Kim, Y. S.; Kim, J. S. A New Pancreatic Lipase Inhibitor Isolated from the Roots of *Actinidia Arguta*. *Archives of Pharmacal Research*, 2008, 31, 666-670.
- [75] Ryu, S.; Oak, M.-H.; Yoon, S.-K.; Cho, D.-I.; Yoo, G.-S.; Kim, T.-S.; Kim, K.-M. Anti-Allergic and Anti-Inflammatory Triterpenes from the Herb of *Prunella Vulgaris*. *Planta Medica*, 2000, 66, 358-360.
- [76] Tagawa, Y.; Yamashita, K.; Higuchi, Y.; Goto, Y. Improved Oxidation of Active Methyl Group of N-Heteroaromatic Compounds by Selenium Dioxide in the Presence of Tert-Butyl Hydroperoxide. *Heterocycles*, 2003, 60, 953.
- [77] Gautam, R.; Jachak, S. M. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. *Medicinal Research Reviews*, 2009, 29, 767-820.
- [78] del Carmen Recio, M.; Giner, R.; Máñez, S.; Gueho, J.; Julien, H.; Hostettmann, K.; Ríos, J. Investigations on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros Leucomelas**. *Planta Medica*, 1995, 61, 9-12.
- [79] Huguet, A.-I.; del Carmen Recio, M.; Máñez, S.; Giner, R.-M.; Ríos, J.-L. Effect of Triterpenoids on the Inflammation Induced by Protein Kinase C Activators, Neuronally Acting Irritants and Other Agents. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 410, 69-81.
- [80] Zhao, J.; Li, R.; Pawlak, A.; Henklewska, M.; Sysak, A.; Wen, L.; Yi, J.; Obmińska-Mrukowicz, B. Antitumor Activity of Betulinic Acid and Betulin in Canine Cancer Cell Lines. *In Vivo*, 2018, 32, 1081-1088.
- [81] Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. Chemistry, Biological Activity, and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection. *Medicinal Research Reviews*, 2003, 24, 90-114.

- [82] Sousa, J. L. C.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, A. M. S. Recent Developments in the Functionalization of Betulinic Acid and Its Natural Analogues: A Route to New Bioactive Compounds. *Molecules*, 2019, 24, 355.
- [83] Siddique, H. R.; Saleem, M. Beneficial Health Effects of Lupeol Triterpene: A Review of Preclinical Studies. *Life Sciences*, 2011, 88, 285-293.
- [84] Duan, D. D.; Bu, C. Y.; Cheng, J.; Wang, Y. N.; Shi, G. L. Isolation and Identification of Acaricidal Compounds in *Inula Japonica* (Asteraceae). *Journal of Economic Entomology*, 2011, 104, 375-378.
- [85] Silva, L. B.; Strapasson, R. L. B.; Riva, D.; Salvador, M. J.; Stefanello, M. É. A. Triterpenes from the Flowers of *Gochnatia Polymorpha* Subsp. *Floccosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2011, 21, 556-559.
- [86] Haque. Phytochemical Investigation of *Vernonia Cinerea* (Family: Asteraceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2012, 2 (06), 79-83.
- [87] Asgarpanah, J.; Dakhili, N.; Mirzaee, F.; Salehi, M.; Janipour, M.; Rangriz, E. Seed Oil Chemical Composition of *Platychaete Aucheri* (Boiss.) Boiss. *Pharmacognosy Journal*, 2015, 8, 42-43.
- [88] Bouattour, E.; Fakhfakh, J.; Frikha Dammak, D.; Jabou, K.; Damak, M.; Mezghani Jarraya, R. Hexane Extract of *Echinops Spinosissimus* Turra subsp. *Spinosus* from Tunisia: A Potential Source of Acetylated Sterols - Investigation of Its Biological Activities. *Chemistry & Biodiversity*, 2016, 13, 1674-1684.
- [89] Romo-Asunción, D.; Ávila-Calderón, M. A.; Ramos-López, M. A.; Barranco-Florido, J. E.; Rodríguez-Navarro, S.; Romero-Gomez, S.; Aldeco-Pérez, E. J.; Pacheco-Aguilar, J. R.; Rico-Rodríguez, M. A. Juvenomimetic and Insecticidal Activities of *Senecio Salignus* (Asteraceae) and *Salvia Microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 2016, 99, 345-351.
- [90] Laghari, A. H.; Memon, S.; Nelofar, A.; Khan, K. M. *Alhagi Maurorum*: A Convenient Source of Lupeol. *Industrial Crops and Products*, 2011, 34, 1141-1145.
- [91] Beserra, F. P.; Vieira, A. J.; Gushiken, L. F. S.; de Souza, E. O.; Hussni, M. F.; Hussni, C. A.; Nóbrega, R. H.; Martinez, E. R. M.; Jackson, C. J.; de Azevedo Maia, G. L.; Rozza, A. L.; Pellizzon, C. H. Lupeol, a Dietary Triterpene, Enhances Wound Healing in Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats with Modulatory Effects on Inflammation, Oxidative Stress, and Angiogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019, 1-20.
- [92] Oliveira-Junior, M. S.; Pereira, E. P.; de Amorim, V. C. M.; Reis, L. T. C.; do Nascimento, R. P.; da Silva, V. D. A.; Costa, S. L. Lupeol Inhibits LPS-Induced Neuroinflammation in Cerebellar Cultures and Induces Neuroprotection Associated to the Modulation of Astrocyte Response and Expression of Neurotrophic and Inflammatory Factors. *International Immunopharmacology*, 2019, 70, 302-312.
- [93] Ahmad, R.; Khan, A.; Lee, H. J.; Ur Rehman, I.; Khan, I.; Alam, S. I.; Kim, M. O. Lupeol, a Plant-Derived Triterpenoid, Protects Mice Brains against A β -Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration. *Biomedicines*, 2020, 8, 380.

- [94] Kumar, S.; Misra, N.; Raj, K.; Srivastava, K.; Puri, S. K. Novel Class of Hybrid Natural Products Derived from Lupeol as Antimalarial Agents. *Natural Product Research*, 2008, 22, 305-319.
- [95] Saini, M.; Khan, M. F.; Sangwan, R.; Khan, M. A.; Kumar, A.; Verma, R.; Ahmad, T.; Jain, S. Design, Synthesis and In-Vitro Antitumor Activity of Lupeol Derivatives via Modification at C-3 and C-30 Positions. *ChemistrySelect*, 2019, 4, 1800-1805.
- [96] Huang, L. R.; Luo, H.; Yang, X. S.; Chen, L.; Zhang, J. X.; Wang, D. P.; Hao, X. J. Enhancement of Anti-Bacterial and Anti-Tumor Activities of Pentacyclic Triterpenes by Introducing Exocyclic α,β -Unsaturated Ketone Moiety in Ring A. *Medicinal Chemistry Research*, 2014, 23, 4631-4641.
- [97] Grymel, M.; Zawojak, M.; Adamek, J. Triphenylphosphonium Analogues of Betulin and Betulinic Acid with Biological Activity: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*, 2019, 82, 1719-1730.
- [98] Orchel, A.; Kulczycka, A.; Chodurek, E.; Bębenek, E.; Borkowska, P.; Boryczka, S.; Kowalski, J.; Dzierżewicz, Z. Influence of Betulin and 28-O-Propynoylbetulin on Proliferation and Apoptosis of Human Melanoma Cells (G-361). *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014, 68, 191-197.
- [99] Martins, D. C. da S.; Silva, F. C.; Meireles, A. M.; Soares, É. A. R.; Silva, G. D. F.; Vieira-Filho, S. A.; Duarte, L. P.; Rebouças, J. S.; Idemori, Y. M. Selective Oxidation of Lupeol by Iodosylbenzene Catalyzed by Manganese Porphyrins. *Catalysis Communications*, 2016, 86, 104-107.
- [100] Callies, O.; Bedoya, L. M.; Beltrán, M.; Muñoz, A.; Calderón, P. O.; Osorio, A. A.; Jiménez, I. A.; Alcamí, J.; Bazzocchi, I. L. Isolation, Structural Modification, and HIV Inhibition of Pentacyclic Lupane-Type Triterpenoids from Cassine *Xylocarpa* and *Maytenus Cuzcoina*. *Journal of Natural Products*, 2015, 78, 1045-1055.
- [101] Castro, M. J.; Richmond, V.; Faraoni, M. B.; Murray, A. P. Oxidation at C-16 Enhances Butyrylcholinesterase Inhibition in Lupane Triterpenoids. *Bioorganic Chemistry*, 2018, 79, 301-309.
- [102] Bębenek, E.; Chrobak, E.; Marciniak, K.; Kadela-Tomanek, M.; Trynda, J.; Wietrzyk, J.; Boryczka, S. Biological Activity and In Silico Study of 3-Modified Derivatives of Betulin and Betulinic Aldehyde. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20, 1372.
- [103] Martin, D. E.; Salzwedel, K.; Allaway, G. P. Bevirimat: A Novel Maturation Inhibitor for the Treatment of HIV-1 Infection. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 2008, 19, 107-113.
- [104] Bache, M.; Bernhardt, S.; Passin, S.; Wichmann, H.; Hein, A.; Zschornak, M. P.; Kappler, M.; Taubert, H.; Paschke, R.; Vordermark, D. Betulinic Acid Derivatives NVX-207 and B10 for Treatment of Glioblastoma—An in Vitro Study of Cytotoxicity and Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15, 19777-19790.
- [105] Le, H.-T.-T.; Chau, Q.-C.; Duong, T.-H.; Tran, Q.-T.-P.; Pham, N.-K.-T.; Nguyen, T.-H.-T.; Nguyen, N.-H.; Sichaem, J. New Derivatives of Lupeol and Their Biological Activity. *Molbank*, 2021, 2021, M1306.

- [106] Chrobak, E.; Jastrzębska, M.; Bębenek, E.; Kadela-Tomanek, M.; Marciniak, K.; Latocha, M.; Wrzalik, R.; Kusz, J.; Boryczka, S. Molecular Structure, In Vitro Anticancer Study and Molecular Docking of New Phosphate Derivatives of Betulin. *Molecules*, 2021, 26, 737.
- [107] Gutiérrez-Nicolás, F.; Gordillo-Román, B.; Oberti, J. C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Á. G.; Joseph-Nathan, P. Synthesis and Anti-HIV Activity of Lupane and Olean-18-Ene Derivatives. Absolute Configuration of 19,20-Epoxyilupanes by VCD. *Journal of Natural Products*, 2012, 75, 669-676.
- [108] Heller, L.; Schwarz, S.; Perl, V.; Köwitsch, A.; Siewert, B.; Csuk, R. Incorporation of a Michael Acceptor Enhances the Antitumor Activity of Triterpenoic Acids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 101, 391-399.
- [109] Salvador, J. A. R.; Leal, A. S.; Valdeira, A. S.; Gonçalves, B. M. F.; Alho, D. P. S.; Figueiredo, S. A. C.; Silvestre, S. M.; Mendes, V. I. S. Oleanane-, Ursane-, and Quinone Methide Friedelane-Type Triterpenoid Derivatives: Recent Advances in Cancer Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 142, 95-130.
- [110] Barroso-González, J.; El Jaber-Vazdekis, N.; García-Expósito, L.; Machado, J.-D.; Zárate, R.; Ravelo, Á. G.; 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. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 16609-16620.
- [111] Machado, V. R.; Sandjo, L. P.; Pinheiro, G. L.; Moraes, M. H.; Steindel, M.; Pizzolatti, M. G.; Biavatti, M. W. Synthesis of Lupeol Derivatives and Their Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities. *Natural Product Research*, 2017, 32, 275-281.
- [112] Pokorný, J.; Krajčovicová, S.; Hajduch, M.; Holoubek, M.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Volna, T.; Popa, I.; Urban, M. Triterpenic Azines, a New Class of Compounds with Selective Cytotoxicity to Leukemia Cells CCRF-CEM. *Future Medicinal Chemistry*, 2018, 10, 483-491.
- [113] Sarek, J.; Urban, M.; Klinot, J.; Tislerová, I.; Biedermann, D.; Hajduch, M.; Cisarová, I. Reactions of Activated Lupane Oxo-Compounds with Diazomethane: An Approach to New Derivatives of Cytotoxic Triterpenes. *Synthesis*, 2006, 2006, 3979-3986.
- [114] Castro, M. J.; Richmond, V.; Romero, C.; Maier, M. S.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Á. G.; Faraoni, M. B.; Murray, A. P. Preparation, Anticholinesterase Activity and Molecular Docking of New Lupane Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, 22, 3341-3350.
- [115] Khan, M. F.; Maurya, C. K.; Dev, K.; Arha, D.; Rai, A. K.; Tamrakar, A. K.; Maurya, R. Design and Synthesis of Lupeol Analogues and Their Glucose Uptake Stimulatory Effect in L6 Skeletal Muscle Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24, 2674-2679.
- [116] Khan, M. F.; Mishra, D. P.; Ramakrishna, E.; Rawat, A. K.; Mishra, A.; Srivastava, A. K.; Maurya, R. Design and Synthesis of Lupeol Analogues and Their in Vitro PTP-1B Inhibitory Activity. *Medicinal Chemistry Research*, 2014, 23, 4156-4166.

- [117] Kuiper, G. G. J. M.; Lemmen, J. G.; Carlsson, B.; Corton, J. C.; Safe, S. H.; van der Saag, P. T.; van der Burg, B.; Gustafsson, J.-Å. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 1998, 139, 4252-4263.
- [118] Pilšáková, L.; Riečanský, I.; Jagla, F. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*, 2010, 651-664.
- [119] Faraoni, M. B.; Musso, F. The Role of Phytoestrogens in Apoptosis: Chemical Structures and Actions on Specific Receptors. En "Sex Steroids and Apoptosis in Skeletal Muscle: Molecular Mechanisms", Vasconsuelo, A. Ed: Bentham e-Books, 2019, 144 – 163. ISBN: 978-9-81141235-6.
- [120] Cos, P.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Berghe, D.V.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. Phytoestrogens: Recent Developments. *Planta Medica*, 2003, 69, 589-599.
- [121] Cornwell, T. Dietary Phytoestrogens and Health. *Phytochemistry*, 2004, 65, 995-1016.
- [122] Nikolić, I., Lj.; Savić-Gajić, I., M.; Tačić, A., D.; Savić, I., M. Classification and Biological Activity of Phytoestrogens: A Review. *Advanced Technologies*, 2017, 6, 96-106.
- [123] Glazier, M. G.; Bowman, M. A. A Review of the Evidence for the Use of Phytoestrogens as a Replacement for Traditional Estrogen Replacement Therapy. *Archives of Internal Medicine*, 2001, 161, 1161.
- [124] Song, W. O.; Chun, O. K.; Hwang, I.; Shin, H. S.; Kim, B.-G.; Kim, K. S.; Lee, S.-Y.; Shin, D.; Lee, S. G. Soy Isoflavones as Safe Functional Ingredients. *Journal of Medicinal Food*, 2007, 10, 571-580.
- [125] Jones, K. L.; Harty, J.; Roeder, M. J.; Winters, T. A.; Banz, W. J. In Vitro Effects of Soy Phytoestrogens on Rat L6 Skeletal Muscle Cells. *Journal of Medicinal Food*, 2005, 8, 327-331.
- [126] Moreira, A. C.; Silva, A. M.; Santos, M. S.; Sardão, V. A. Phytoestrogens as Alternative Hormone Replacement Therapy in Menopause: What Is Real, What Is Unknown. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 143, 61-71.
- [127] Zheng, W.; Hemker, M.; Xie, M.; Soukup, S.; Diel, P. Anabolic Activity of a Soy Extract and Three Major Isoflavones in C2C12 Myotubes. *Planta Medica*, 2018, 84, 1022-1029.
- [128] Oxfeldt, M.; Dalgaard, L. B.; Risikesan, J.; Johansen, F. T.; Hansen, M. Influence of Fermented Red Clover Extract on Skeletal Muscle in Early Postmenopausal Women: A Double-Blinded Cross-Over Study. *Nutrients*, 2020, 12, 3587.
- [129] Ramos, S. Effects of Dietary Flavonoids on Apoptotic Pathways Related to Cancer Chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18, 427-442.
- [130] Huang, W.-Y.; Cai, Y.-Z.; Zhang, Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*, 2009, 62, 1-20.

- [131] Sakamoto, T.; Horiguchi, H.; Oguma, E.; Kayama, F. Effects of Diverse Dietary Phytoestrogens on Cell Growth, Cell Cycle and Apoptosis in Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21, 856-864.
- [132] Virk-Baker, M.; Nagy, T.; Barnes, S. Role of Phytoestrogens in Cancer Therapy. *Planta Medica*, 2010, 76, 1132-1142.
- [133] Cai, X.; Ye, T.; Liu, C.; Lu, W.; Lu, M.; Zhang, J.; Wang, M.; Cao, P. Luteolin Induced G2 Phase Cell Cycle Arrest and Apoptosis on Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25, 1385-1391.
- [134] Obiorah, I. E.; Fan, P.; Jordan, V. C. Breast Cancer Cell Apoptosis with Phytoestrogens Is Dependent on an Estrogen-Deprived State. *Cancer Prevention Research*, 2014, 7, 939-949.
- [135] Kuhnle, G. G. C.; Dell'Aquila, C.; Aspinall, S. M.; Runswick, S. A.; Joosen, A. M. C. P.; Mulligan, A. A.; Bingham, S. A. Phytoestrogen Content of Fruits and Vegetables Commonly Consumed in the UK Based on LC-MS and ¹³C-Labelled Standards. *Food Chemistry*, 2009, 116, 542-554.
- [136] Thompson, L. U.; Boucher, B. A.; Liu, Z.; Cotterchio, M.; Kreiger, N. Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada, Including Isoflavones, Lignans, and Coumestan. *Nutrition and Cancer*, 2006, 54, 184-201.
- [137] Agradi, E.; Vegeto, E.; Sozzi, A.; Fico, G.; Regondi, S.; Tomè, F. Traditional Healthy Mediterranean Diet: Estrogenic Activity of Plants Used as Food and Flavoring Agents. *Phytotherapy Research*, 2006, 20, 670-675.
- [138] Shah, V.; Shah, N.; Patrekar, P. Medicinal Plants from Solanaceae Family. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2013, 6 (2), 143-151.
- [139] Yadav, R.; Rathi, M.; Pednekar, A.; Rewachandani, Y. A detailed review on Solanaceae family. *European journal of Pharmaceutical and medical research*, 2016, 3(1), 369-378.
- [140] Torres-Nagera, M.; López-López, L.; De La Cruz-Galicia, G.; Silva-Belmares, S. Solanáceas mexicanas: Una Fuente de Nuevos Agentes Farmacológicos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2013, 5 (10), 27-32.
- [141] Kumar, V.S.; Murugan, K. Taxonomic implications with special reference to stomatal variations in Solanum species using light and scanning electron microscope. *International Journal of Applied Biology and pharmaceutical technology*, 2015, 6 (2), 112-125.
- [142] Matias, L. J.; Mercadante-Simões, M. O.; Royo, V. A.; Ribeiro, L. M.; Santos, A. C.; Fonseca, J. M. S. Structure and Histochemistry of Medicinal Species of Solanum. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2016, 26, 147-160.
- [143] Royo, V. A.; Matias, L. J.; Rocha, J.; Menezes, E.; Júnior, A. de M.; de Oliveira, D. Phytochemistry in Medicinal Species of Solanum L. (Solanaceae). *Pharmacognosy Research*, 2019, 11, 47.

- [144] Guzmán, M.; Cazáres, L. Recursos fitogenéticos y sustentabilidad en Chiapas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, 2008. ISBN: 978-968-5149-81-5
- [145] Pomilio, A.; Falzoni, E.; Vitale, A. Toxic Chemical Compounds of the Solanaceae. *Natural Product Communications*, 2008, 3 (4), 593-628.
- [146] Özdemir, A.; Sever, B.; Altıntop, M.; Kaya Tilki, E.; Dikmen, M. Design, Synthesis, and Neuroprotective Effects of a Series of Pyrazolines against 6-Hydroxydopamine-Induced Oxidative Stress. *Molecules*, 2018, 23, 2151.
- [147] Alza, N. P.; Iglesias González, P. A.; Conde, M. A.; Uranga, R. M.; Salvador, G. A. Lipids at the Crossroad of α -Synuclein Function and Dysfunction: Biological and Pathological Implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, 13.
- [148] Lees, A. J.; Hardy, J.; Revesz, T. Parkinson's Disease. *The Lancet*, 2009, 373, 2055-2066.
- [149] Youdim, M. B. H.; Kupersmidt, L.; Amit, T.; Weinreb, O. Promises of Novel Multi-Target Neuroprotective and Neurorestorative Drugs for Parkinson's Disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2014, 20, S132-S136.
- [150] Braak, H.; Ghebremedhin, E.; Rüb, U.; Bratzke, H.; Del Tredici, K. Stages in the Development of Parkinson's Disease-Related Pathology. *Cell and Tissue Research*, 2004, 318, 121-134.
- [151] Tronci, E.; Francardo, V. Animal Models of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The 6-OHDA-Lesioned Rat and Mouse. *Journal of Neural Transmission*, 2017, 125, 1137-1144.
- [152] Barros, R. P. A.; Machado, U. F.; Gustafsson, J.-Å. Estrogen Receptors: New Players in Diabetes Mellitus. *Trends in Molecular Medicine*, 2006, 12, 425-431.
- [153] Kalbe, C.; Mau, M.; Wollenhaupt, K.; Rehfeldt, C. Evidence for Estrogen Receptor α and β Expression in Skeletal Muscle of Pigs. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, 127, 95-107.
- [154] Lemoine, S.; Granier, P.; Tiffocche, C.; Berthon, P. M.; Rannou-Bekono, F.; Thieulant, M.L.; Carré, F.; Delamarche, P. Effect of Endurance Training on Oestrogen Receptor Alpha Transcripts in Rat Skeletal Muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2002, 174, 283-289.
- [155] Milanesi, L.; Vasconsuelo, A.; de Boland, A. R.; Boland, R. Expression and Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor β in Murine C2C12 Cells and Skeletal Muscle Tissue. *Steroids*, 2009, 74, 489-497.
- [156] Milanesi, L.; de Boland, A. R.; Boland, R. Expression and Localization of Estrogen Receptor α in the C2C12 Murine Skeletal Muscle Cell Line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 104, 1254-1273.
- [157] Dionne I.J.; Kinaman K.A.; Poehlman E.T. Sarcopenia and muscle function during menopause and hormone-replacement therapy. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2000, 4 (3), 156-161.
- [158] Ryall, J. G.; Schertzer, J. D.; Lynch, G. S. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Age-Related Skeletal Muscle Wasting and Weakness. *Biogerontology*, 2008, 9, 213-228.
- [159] Campion, D. R. The Muscle Satellite Cell: A Review. *International Review of Cytology*, 1984, 225-251.

- [160] Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1961, 9, 493-495.
- [161] Chargé, S.; Rudnicki, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*, 2004, 84, 209-238.
- [162] 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.
- [163] Ezcurra, C. Revision del género *Chuquiraga* (compositae ~ mutisieae). *Darwiniana*, 1985, 26, 219-284.
- [164] Juárez, B. E.; Mendiondo, M. E. Flavonoid Chemistry of *Chuquiraga* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, 30, 371-373.
- [165] Gurovic, M.; Castro, M.; Richmond, V.; Faraoni, M.; Maier, M.; Murray, A. Triterpenoids with Acetylcholinesterase Inhibition from *Chuquiraga Erinacea* Don. Subsp. *Erinacea* (Asteraceae). *Planta Medica*, 2009, 76, 607-610.
- [166] Comechingonia. *Revista de Arqueología*. 2015, 19 (2). ISSN: 0326-7911
- [167] Usos tradicionales de las plantas en la meseta patagónica, Jardín Botánico de la Patagonia Extraandina, Cenpat Conicet, Icbg, 2002.
- [168] Castro, M.J.; Síntesis de derivados triterpénicos con potencial actividad anticolinesterasa. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur, 2015.
- [169] Ruiz-Gutierrez, V.; Perona, J. S. TRIGLYCERIDES | Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*, 2000, 4402-4411.
- [170] Castro, M. J.; Musso, F.; Vetere, V.; Faraoni, M. B. Novel Access to Epilupeol through Chemoselective Hydrogenation of Lupenone Using Platinum-Based Organotin Catalysts. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2019, 880, 333-340.
- [171] Sánchez-Burgos, J. A.; Ramírez-Mares, M. V.; Gallegos-Infante, J. A.; González-Laredo, R. F.; Moreno-Jiménez, M. R.; Cháirez-Ramírez, M. H.; Medina-Torres, L.; Rocha-Guzmán, N. E. Isolation of Lupeol from White Oak Leaves and Its Anti-Inflammatory Activity. *Industrial Crops and Products*, 2015, 77, 827-832.
- [172] Lempers, H. E. B.; Sheldon, R. A. Allylic Oxidation of Olefins to the Corresponding α,β -Unsaturated Ketones Catalyzed by Chromium Aluminophosphate-5. *Applied Catalysis A: General*, 1996, 143, 137-143.
- [173] Chen, J.; Chen, M.; Zhang, B.; Nie, R.; Huang, A.; Goh, T. W.; Volkov, A.; Zhang, Z.; Ren, Q.; Huang, W. Allylic Oxidation of Olefins with a Manganese-Based Metal-Organic Framework. *Green Chemistry*, 2019, 21, 3629-3636.
- [174] Młochowski, J.; Wójtowicz-Młochowska, H. Developments in Synthetic Application of Selenium(IV) Oxide and Organoselenium Compounds as Oxygen Donors and Oxygen-Transfer Agents. *Molecules*, 2015, 20, 10205-10243.

- [175] Nakada, M.; Nakamura, A. Allylic Oxidations in Natural Product Synthesis. *Synthesis*, 2013, 45, 1421-1451.
- [176] Page, P. C. B.; McCarthy, T. J. Oxidation Adjacent to CC Bonds. *Comprehensive Organic Synthesis*, 1991, 83-117.
- [177] 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*. *Chemistry & Biodiversity*, 2005, 2, 657-671.
- [178] Riley, H. L.; Morley, J. F.; Friend, N. A. C. 255. Selenium Dioxide, a New Oxidising Agent. Part I. Its Reaction with Aldehydes and Ketones. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1932, 1875.
- [179] Kurti, L.; Czako, B. Strategic applications of named reactions in organic synthesis : background and detailed mechanisms, Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 2005.
- [180] Sheldon, R. A.; Arends, I. W. C. E.; Hanefeld, U. *Green Chemistry and Catalysis*, 2007.
- [181] Lin, G.-S.; Duan, W.-G.; Yang, L.-X.; Huang, M.; Lei, F.-H. Synthesis and Antifungal Activity of Novel Myrtenal-Based 4-Methyl-1,2,4-Triazole-Thioethers. *Molecules*, 2017, 22, 193.
- [182] Rauchdi, M.; Ait Ali, M.; Roucoux, A.; Denicourt-Nowicki, A. Novel Access to Verbenone via Ruthenium Nanoparticles-Catalyzed Oxidation of α -Pinene in Neat Water. *Applied Catalysis A: General*, 2018, 550, 266-273.
- [183] Kholdeeva, O. A.; Skobelev, I. Y.; Ivanchikova, I. D.; Kovalenko, K. A.; Fedin, V. P.; Sorokin, A. B. Hydrocarbon Oxidation over Fe- and Cr-Containing Metal-Organic Frameworks MIL-100 and MIL-101—a Comparative Study. *Catalysis Today*, 2014, 238, 54-61.
- [184] Kuznetsova, L.I.; Kuznetsova, N.I.; Lisitsyn, A.S.; Beck, I.E.; Likholobov, V.A.; Ancel, J.E. Liquid-Phase Oxidation of α -pinene with Oxygen Catalyzed by Carbon-Supported Platinum Metals. *Kinetics and Catalysis*, 2007, 48 (1), 38-44.
- [185] Singh, J.; Sharma, M.; Kad, G. L.; Chhabra, B. R. Selective Oxidation of Allylic Methyl Groups over a Solid Support under Microwave Irradiation†. *Journal of Chemical Research*, 1997, 264-265.
- [186] Khan, A. S.; Khalid, H.; Sarfraz, Z.; Khan, M.; Iqbal, J.; Muhammad, N.; Fareed, M. A.; Rehman, I. U. Vibrational Spectroscopy of Selective Dental Restorative Materials. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2016, 52, 507-540.
- [187] Falk, M.; Giguère, P. A. Infrared spectra and structure of selenious acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 1958, 36, 1680-1685.
- [188] Piqueras, C. M.; Puccia, V.; Vega, D. A.; Volpe, M. A. Selective Hydrogenation of Cinnamaldehyde in Supercritical CO₂ over Me-CeO₂ (Me = Cu, Pt, Au): Insight of the Role of Me-Ce Interaction. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2016, 185, 265-271.

- [189] Scholten, J. J. F.; Pijpers, A. P.; Hustings, A. M. L. Surface Characterization of Supported and Nonsupported Hydrogenation Catalysts. *Catalysis Reviews*, 1985, 27, 151-206.
- [190] Green Chemistry: Principles, Applications, and Disadvantages. *Chemical Methodologies*, 2020, 4, 408-423.
- [191] Cabrele, C.; Reiser, O. The Modern Face of Synthetic Heterocyclic Chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, 2016, 81, 10109-10125.
- [192] Kvasnica, M.; Urban, M.; Dickinson, N. J.; Sarek, J. Pentacyclic Triterpenoids with Nitrogen- and Sulfur-Containing Heterocycles: Synthesis and Medicinal Significance. *Natural Product Reports*, 2015, 32, 1303-1330.
- [193] Xu, J.; Li, Z.; Luo, J.; Yang, F.; Liu, T.; Liu, M.; Qiu, W.-W.; Tang, J. Synthesis and Biological Evaluation of Heterocyclic Ring-Fused Betulinic Acid Derivatives as Novel Inhibitors of Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55, 3122-3134.
- [194] Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A. R.; Jing, Y. Synthesis of Novel Heterocyclic Oleanolic Acid Derivatives with Improved Antiproliferative Activity in Solid Tumor Cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11, 1726.
- [195] Haavikko, R.; Nasereddin, A.; Sacerdoti-Sierra, N.; Kopelyanskiy, D.; Alakurtti, S.; Tikka, M.; Jaffe, C. L.; Yli-Kauhaluoma, J. Heterocycle-Fused Lupane Triterpenoids Inhibit *Leishmania Donovanii* Amastigotes. *Med. Chem. Commun.*, 2014, 5, 445-451.
- [196] Sousa, M. C.; Varandas, R.; Santos, R. C.; Santos-Rosa, M.; Alves, V.; Salvador, J. A. R. Antileishmanial Activity of Semisynthetic Lupane Triterpenoids Betulin and Betulinic Acid Derivatives: Synergistic Effects with Miltefosine. *PLoS ONE*, 2014, 9, e89939.
- [197] Cui, H.-W.; He, Y.; Wang, J.; Gao, W.; Liu, T.; Qin, M.; Wang, X.; Gao, C.; Wang, Y.; Liu, M.-Y.; Yi, Z.; Qiu, W.-W. Synthesis of Heterocycle-Modified Betulinic Acid Derivatives as Antitumor Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 95, 240-248.
- [198] Borgati, T.; Pereira, G.; Brandão, G.; Santos, J.; Fernandes, D. A.; de Paula, R.; do Nascimento, M. F.; Soares, L.; Lopes, J. C.; de Souza Filho, J.; de Oliveira, A. Synthesis by Click Reactions and Antiplasmodial Activity of Lupeol 1,2,3-Triazole Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2017.
- [199] Laavola, M.; Haavikko, R.; Hämäläinen, M.; Leppänen, T.; Nieminen, R.; Alakurtti, S.; Moreira, V. M.; Yli-Kauhaluoma, J.; Moilanen, E. Betulin Derivatives Effectively Suppress Inflammation *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of Natural Products*, 2016, 79, 274-280.
- [200] Wu, J.; Bao, B.-H.; Shen, Q.; Zhang, Y.-C.; Jiang, Q.; Li, J.-X. Novel Heterocyclic Ring-Fused Oleanolic Acid Derivatives as Osteoclast Inhibitors for Osteoporosis. *MedChemComm*, 2016, 7, 371-377.
- [201] Borkova, L.; Adamek, R.; Kalina, P.; Drašar, P.; Dzubak, P.; Gurska, S.; Rehulka, J.; Hajduch, M.; Urban, M.; Sarek, J. Synthesis and Cytotoxic Activity of Triterpenoid Thiazoles Derived from Allobetulin, Methyl Betulonate, Methyl Oleanonate, and Oleanonic Acid. *ChemMedChem*, 2017, 12, 390-398.

- [202] Gubaidullin, R. R.; Yarmukhametova, D. S.; Nedopekina, D. A.; Khalitova, R. R.; Spivak, A. Yu. Effective Synthesis of Novel Furan-Fused Pentacyclic Triterpenoids via Anionic 5-Exo Dig Cyclization of 2-Alkynyl-3-Oxotriterpene Acids. *Arkivoc*, 2017, 100-116.
- [203] Eyfan, A. Synthesis of Heterocyclic Compounds from Alpha- Beta Unsaturated Carbonyl Compounds. *International journal and magazine of engineering technology management and research*, 2015, 2 (11), 1-5.
- [204] Wal, A.; Wal, P.; Rai, A. K.; Raj, K. Isolation and modification of pseudohybrid plant (Lupeol). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2010, 2 (1), 13-25.
- [205] Huang, Y. R.; Katzenellenbogen, J. A. Regioselective Synthesis of 1,3,5-Triaryl-4-Alkylpyrazoles: Novel Ligands for the Estrogen Receptor. *Organic Letters*, 2000, 2, 2833-2836.
- [206] Azarifar, D.; Ghasemnejad, H. Microwave-Assisted Synthesis of Some 3,5-Arylated 2-Pyrazolines. *Molecules*, 2003, 8, 642-648.
- [207] Insuasty, B.; García, A.; Quiroga, J.; Abonia, R.; Ortiz, A.; Nogueras, M.; Cobo, J. Efficient Microwave-Assisted Synthesis and Antitumor Activity of Novel 4,4'-Methylenebis[2-(3-Aryl-4,5-Dihydro-1H-Pyrazol-5-Yl)Phenols]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46, 2436-2440.
- [208] Nain, S.; Singh, R.; Ravichandran, S. Importance of Microwave Heating In Organic Synthesis. *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 2019, 94-104.
- [209] Kappe, C. O.; Stadler, A.; Dallinger, D. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH., 2012, 52. Weinheim, Alemania.
- [210] Kappe, C. O. *Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, 43, 6250-6284.
- [211] Galema, S. A. *Microwave Chemistry*. *Chemical Society Reviews*, 1997, 26, 233.
- [212] Nilsson, P.; Larhed, M.; Hallberg, A. Highly Regioselective, Sequential, and Multiple Palladium-Catalyzed Arylations of Vinyl Ethers Carrying a Coordinating Auxiliary: An Example of a Heck Triarylation Process. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123, 8217-8225.
- [213] Burns, D.; Reynolds, W. F.; Buchanan, G.; Reese, P. B.; Enriquez, R. G. Assignment Of ¹H And ¹³C Spectra and Investigation of Hindered Side-Chain Rotation in Lupeol Derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2000, 38, 488-493.
- [214] Chen, J.; Liu, J.; Zhang, L.; Wu, G.; Hua, W.; Wu, X.; Sun, H. Pentacyclic Triterpenes. Part 3: Synthesis and Biological Evaluation of Oleanolic Acid Derivatives as Novel Inhibitors of Glycogen Phosphorylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16, 2915-2919.
- [215] Kahnt, M.; Heller, L.; Al-Harrasi, A.; Schäfer, R.; Kluge, R.; Wagner, C.; Otgonbayar, C.; Csuk, R. Platanic Acid-Derived Methyl 20-Amino-30-Norlupan-28-Oates Are Potent Cytotoxic Agents Acting by Apoptosis. *Medicinal Chemistry Research*, 2018, 27, 1757-1769.

- [216] Bednarczyk-Cwynar, B.; Zaprutko, L.; Marciniak, J.; Lewandowski, G.; Szulc, M.; Kaminska, E.; Wachowiak, N.; Mikolajczak, P. L. The Analgesic and Anti-Inflammatory Effect of New Oleanolic Acid Acyloxyimino Derivative. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 47, 549-555.
- [217] Zhao, H.; Zhou, M.; Duan, L.; Wang, W.; Zhang, J.; Wang, D.; Liang, X. Efficient Synthesis and Anti-Fungal Activity of Oleanolic Acid Oxime Esters. *Molecules*, 2013, 18, 3615-3629.
- [218] Hernandez-Baltazar, D.; Zavala-Flores, L. M.; Villanueva-Olivo, A. El modelo de 6-hidroxi-dopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología*, 2017, 32, 533-539.
- [219] Chourasiya, S. S.; Kathuria, D.; Wani, A. A.; Bharatam, P. V. Azines: Synthesis, Structure, Electronic Structure and Their Applications. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17, 8486-8521.
- [220] Safari, J.; Gandomi-Ravandi, S. Structure, Synthesis and Application of Azines: A Historical Perspective. *RSC Adv.*, 2014, 4, 46224-46249.
- [221] Lasri, J.; Ismail, A. Metal-free and FeCl₃-catalyzed synthesis of azines and 3,5-diphenyl-1H-pyrazole from hydrazones and/or ketones monitored by high resolution ESI+MS. *Indian Journal of Chemistry*, 2018, 57B, 362-373.
- [222] Falasca, S.; Ulberich, A. La maleza *Nicotiana glauca* (Graham) como cultivo energético en sectores áridos y semiáridos de Argentina. *Zonas Áridas*, 2011, 15 (1), 148-168.
- [223] Marzocca, A. 1986. Manual de Malezas. 3ª ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- [224] Silva, K. N.; Agra, M.; Sidney, B.; Lima Diniz, B.; Ionardo, J. Estudio farmacobotánico de folhas de *Nicotiana glauca* (Solanaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 2007, 26 (3), 499-506.
- [225] Tabana, Y. M.; Hassan, L. E. A.; Ahamed, M. B. K.; Dahham, S. S.; Iqbal, M. A.; Saeed, M. A. A.; Khan, M. S. S.; Sandai, D.; Majid, A. S. A.; Oon, C. E.; Majid, A. M. S. A. Scopoletin, an Active Principle of Tree Tobacco (*Nicotiana Glauca*) Inhibits Human Tumor Vascularization in Xenograft Models and Modulates ERK1, VEGF-A, and FGF-2 in Computer Model. *Microvascular Research*, 2016, 107, 17-33.
- [226] Lahitte, H.; Hurrell, J. Plantas medicinales rioplatenses. Buenos Aires, L.O.L.A., 1998, 240.
- [227] Moerman, D. Native American Ethnobotany. Timber Press. Oregon. 1998.
- [228] Taylor, R. C.; Cullen, S. P.; Martin, S. J. Apoptosis: Controlled Demolition at the Cellular Level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9, 231-241.
- [229] Porter, A. G.; Jänicke, R. U. Emerging Roles of Caspase-3 in Apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 1999, 6, 99-104.
- [230] Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. *Plant Drug Analysis*, 1º ed.; Springer: Berlin, Alemania, 1984; 1-309.
- [231] Bordoloi, M.; Saikia, S.; Bordoloi, P. K.; Kolita, B.; Dutta, P. P.; Bhuyan, P. D.; Dutta, S. C.; Rao, P. G. Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Very Long Chain Alkane Derivatives from

Cinnamomum Obtusifolium, Elaeocarpus Lanceifolius and Baccaurea Sapida. *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1142, 200–210.

[232] Zhao, J.-W.; Chen, D.-S.; Deng, C.-S.; Wang, Q.; Zhu, W.; Lin, L. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Compounds Isolated from the Rhizome of *Ophiopogon Japonicas*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 17.

[233] Carta, G.; Murru, E.; Lisai, S.; Sirigu, A.; Piras, A.; Collu, M.; Batetta, B.; Gambelli, L.; Banni, S. Dietary Triacylglycerols with Palmitic Acid in the Sn-2 Position Modulate Levels of N-Acylethanolamides in Rat Tissues. *PLOS ONE*, 2015, 10, e0120424.

[234] Park, E.-J.; Lee, A. Y.; Park, S.; Kim, J.-H.; Cho, M.-H. Multiple Pathways Are Involved in Palmitic Acid-Induced Toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 67, 26–34.

[235] Yuan, Q.; Zhao, S.; Wang, F.; Zhang, H.; Chen, Z.-J.; Wang, J.; Wang, Z.; Du, Z.; Ling, E.-A.; Liu, Q.; Hao, A. Palmitic Acid Increases Apoptosis of Neural Stem Cells via Activating C-Jun N-Terminal Kinase. *Stem Cell Research*, 2013, 10, 257–266.

[236] Ji, J.; Zhang, L.; Wang, P.; Mu, Y.-M.; Zhu, X.-Y.; Wu, Y.-Y.; Yu, H.; Zhang, B.; Chen, S.-M.; Sun, X.-Z. Saturated Free Fatty Acid, Palmitic Acid, Induces Apoptosis in Fetal Hepatocytes in Culture. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2005, 56, 369–376.

[237] Khan, N. M.; Hossain, S. Scopoletin and β -sitosterol glucoside from roots of *Ipomoea digitata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2015, 4, 5-7.

[238] Firmansyah, A.; Winingsih, W.; Manobi, J. Review of Scopoletin: Isolation, Analysis Process, and Pharmacological Activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2020, 11, 12006–12019.

[239] Antika, L. D.; Tasfiyati, A. N.; Hikmat, H.; Septama, A. W. Scopoletin: A Review of Its Source, Biosynthesis, Methods of Extraction, and Pharmacological Activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2022, 77, 303–316.

[240] Pan, R.; Dai, Y.; Yang, J.; Li, Y.; Yao, X.; Xia, Y. Anti-Angiogenic Potential of Scopoletin Is Associated with the Inhibition of ERK1/2 Activation. *Drug Development Research*, 2009, 70, 214–219.

[241] Seo, E.-J.; Saeed, M.; Law, B.; Wu, A.; Kadioglu, O.; Greten, H.; Efferth, T. Pharmacogenomics of Scopoletin in Tumor Cells. *Molecules*, 2016, 21, 496.

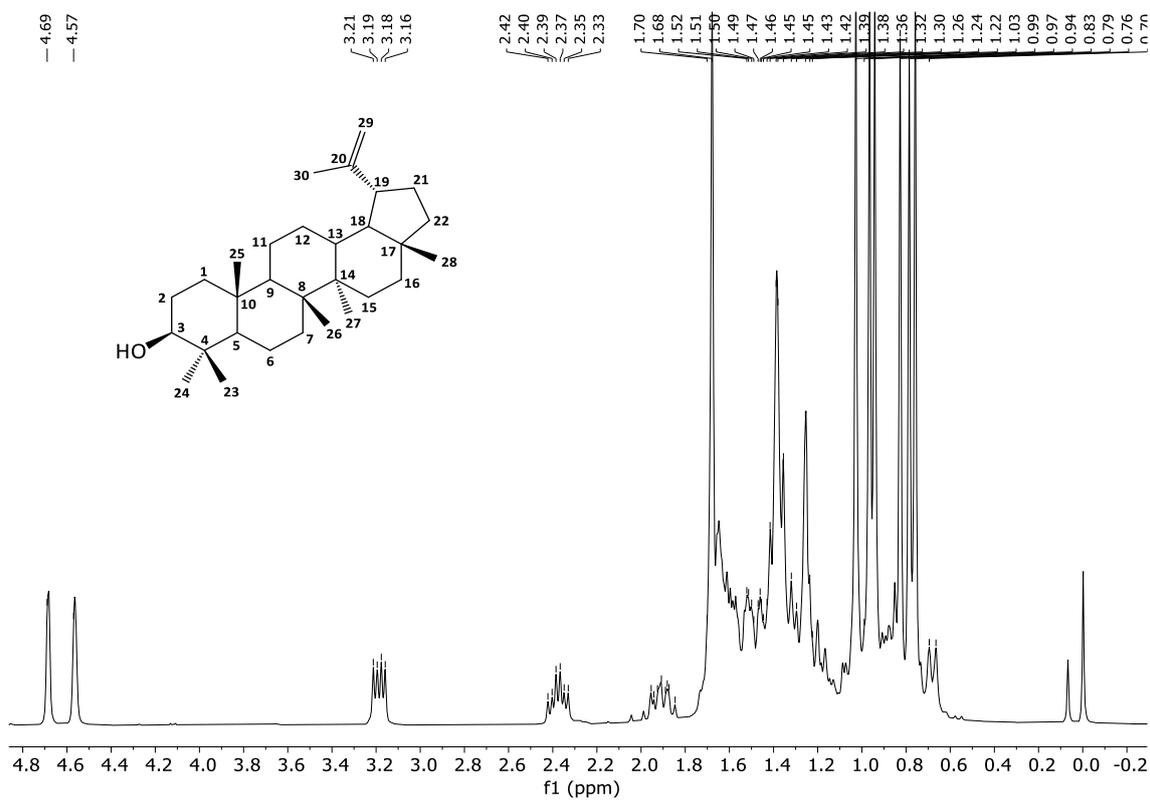
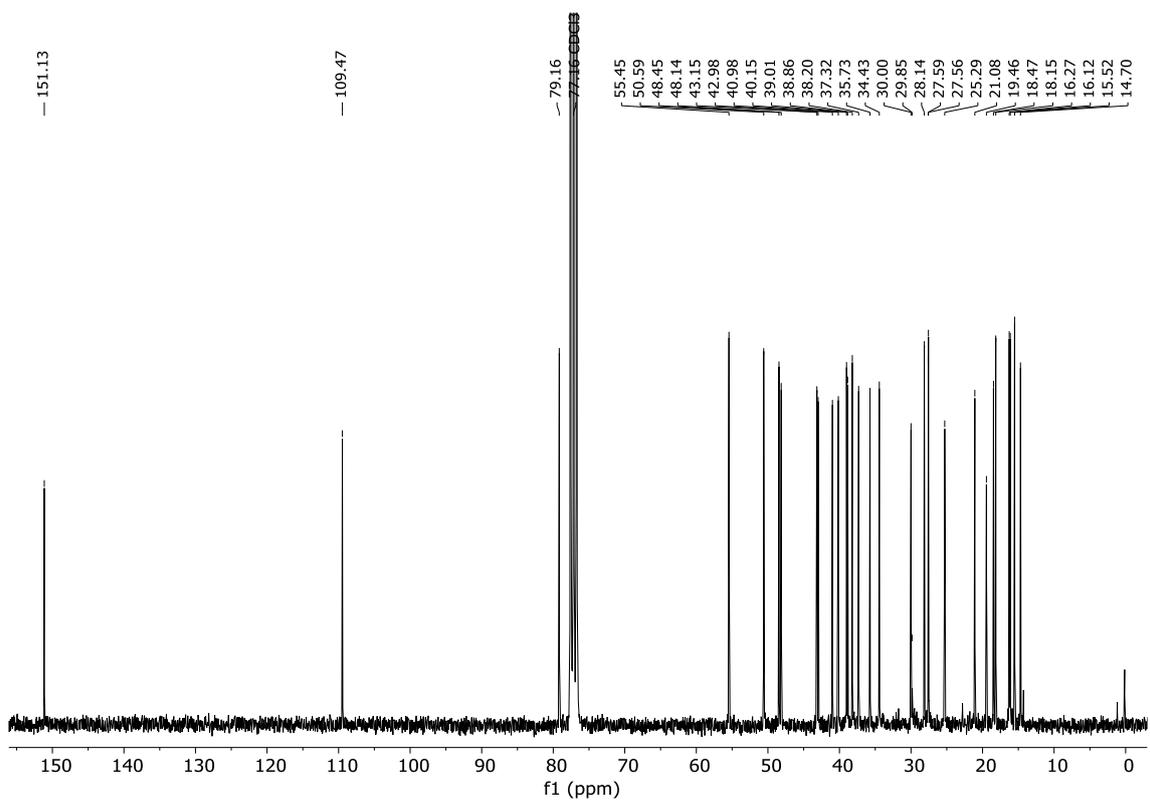
[242] Liu, X. L.; Zhang, L.; Fu, X.L.; Chen, K.; Qian, B.C. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(10), 929-33.

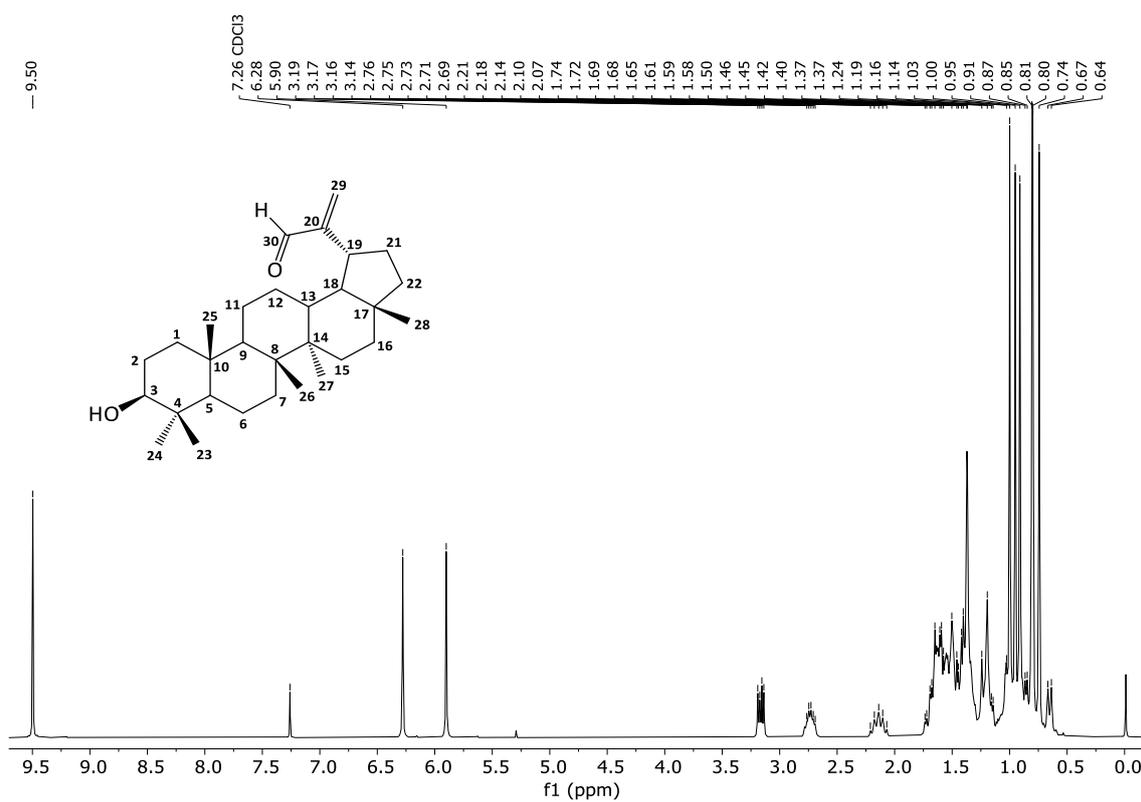
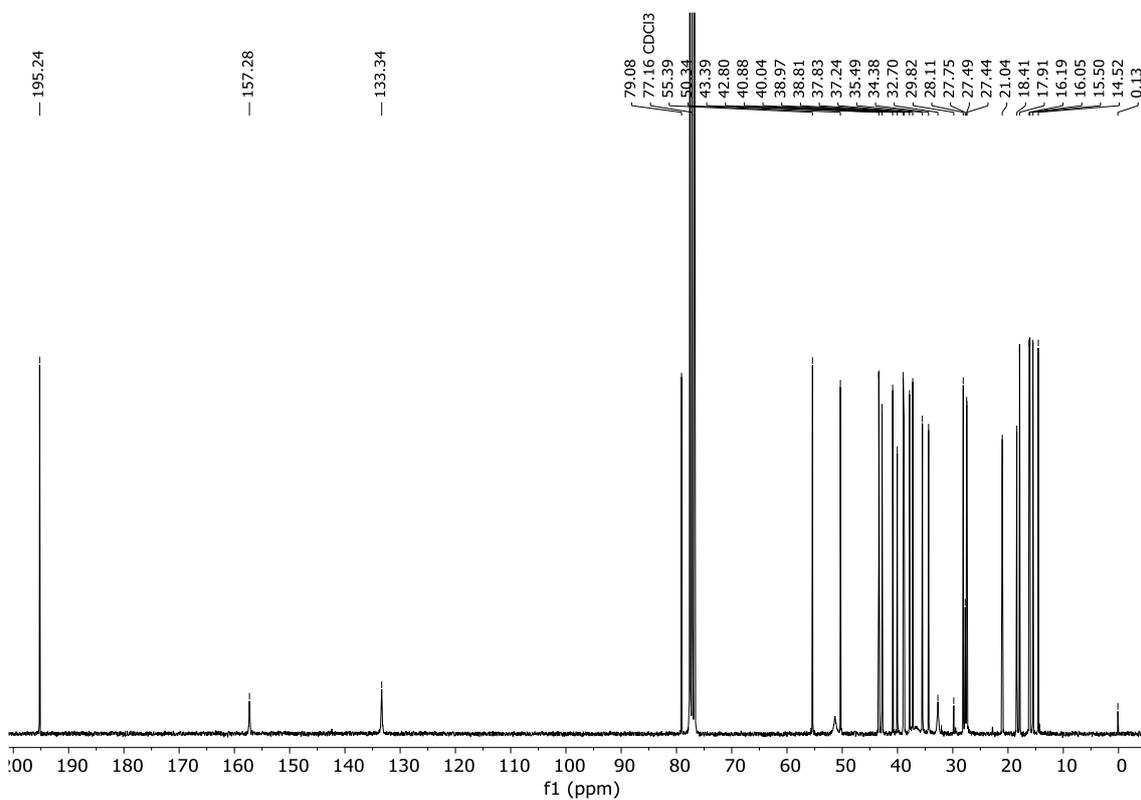
[243] Hettmer, S.; Wagers, A. J. Muscling in: Uncovering the Origins of Rhabdomyosarcoma. *Nature Medicine*, 2010, 16, 171–173.

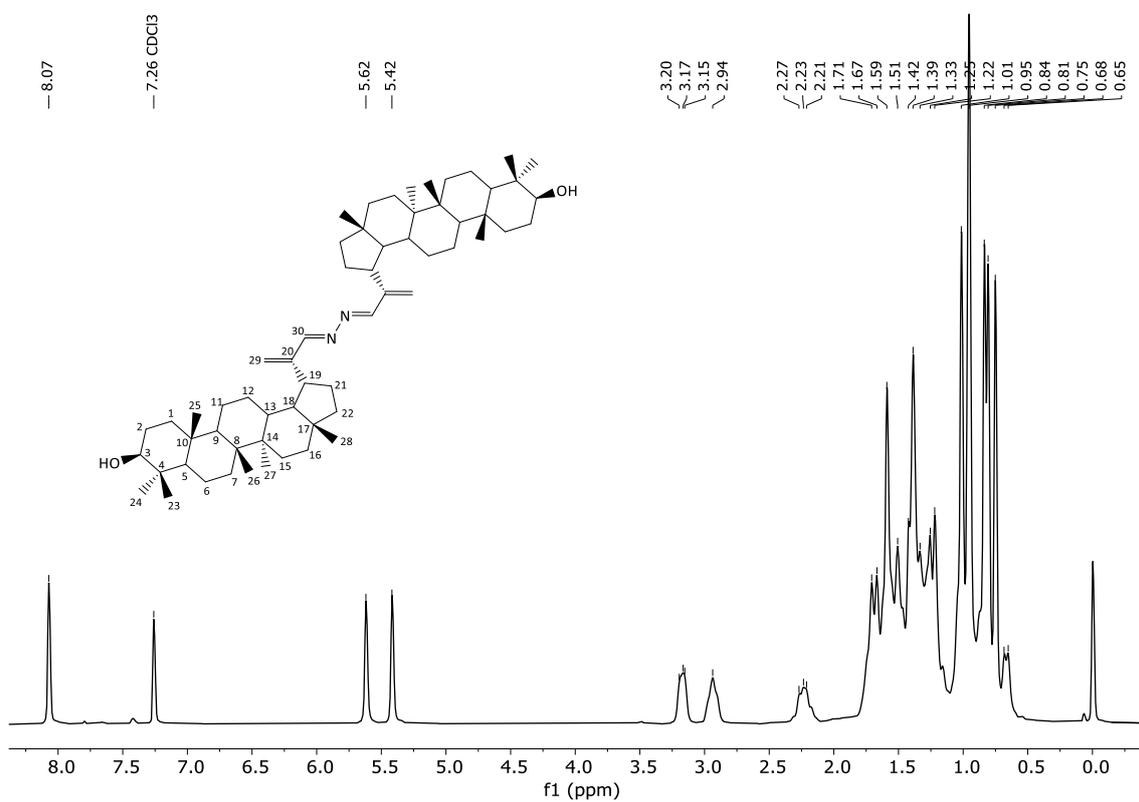
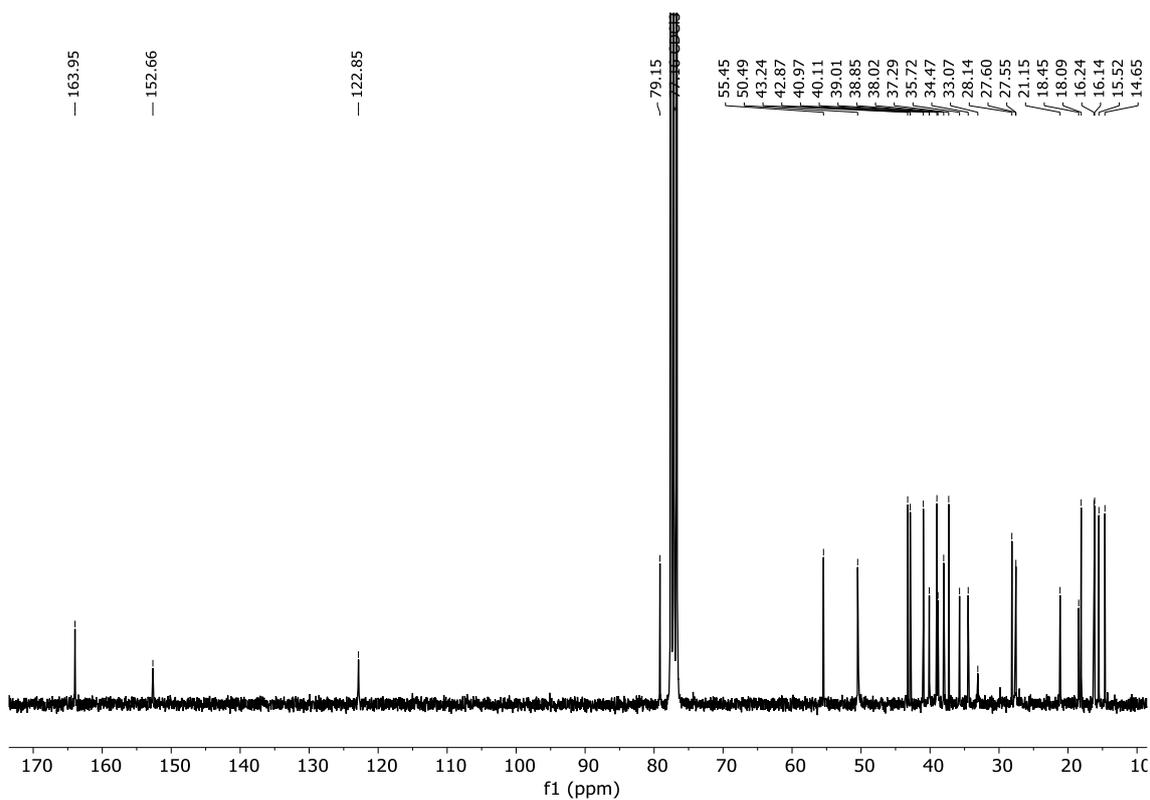
[244] Young, J. L.; Ries, L. G.; Silverberg, E.; Horm, J. W.; Miller, R. W. Cancer Incidence, Survival, and Mortality for Children Younger than Age 15 Years. *Cancer*, 1986, 58, 598–602.

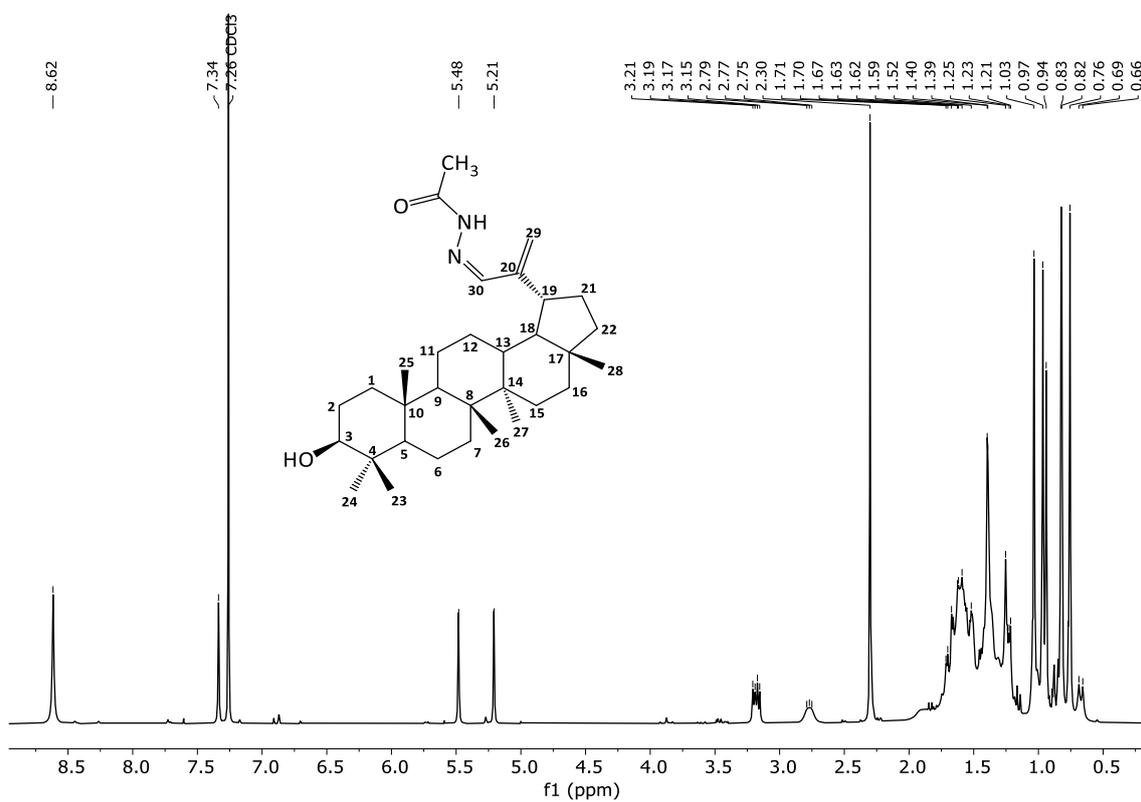
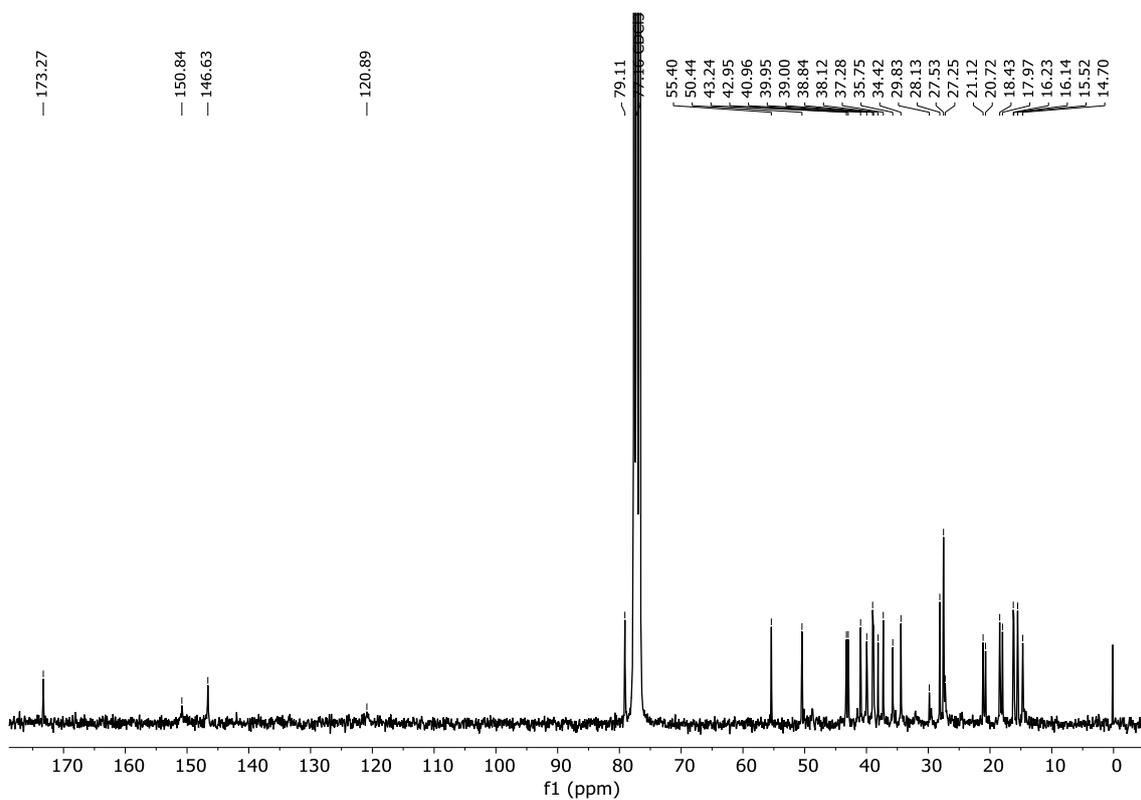
- [245] Ognjanovic, S.; Linabery, A. M.; Charbonneau, B.; Ross, J. A. Trends in Childhood Rhabdomyosarcoma Incidence and Survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 2009, 115, 4218–4226.
- [246] Donaldson, S. S.; Meza, J.; Breneman, J. C.; Crist, W. M.; Laurie, F.; Qualman, S. J.; Wharam, M. Results from the IRS-IV Randomized Trial of Hyperfractionated Radiotherapy in Children with Rhabdomyosarcoma—a Report from the IRSG 11 For a Complete List of the Members of the Children’s Oncology Group Soft Tissue Sarcoma Committee (Formerly Intergroup Rhabdomyosarcoma Group) Representing the Children’s Oncology Group and the Quality Assurance Review Center, See the Appendix. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, 2001, 51, 718–728.
- [247] Donaldson, S. S.; Anderson, J. R. Rhabdomyosarcoma: Many Similarities, a Few Philosophical Differences. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23, 2586–2587.
- [248] Stevens, M. C. G.; Rey, A.; Bouvet, N.; Ellershaw, C.; Flamant, F.; Habrand, J. L.; Marsden, H. B.; Martelli, H.; de Toledo, J. S.; Spicer, R. D.; Spooner, D.; Terrier-Lacombe, M. J.; van Unnik, A.; Oberlin, O. Treatment of Nonmetastatic Rhabdomyosarcoma in Childhood and Adolescence: Third Study of the International Society of Paediatric Oncology—SIOP Malignant Mesenchymal Tumor 89. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23, 2618–2628.
- [249] Malempati, S.; Hawkins, D. S. Rhabdomyosarcoma: Review of the Children’s Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee Experience and Rationale for Current COG Studies. *Pediatric Blood & Cancer*, 2012, 59, 5–10.

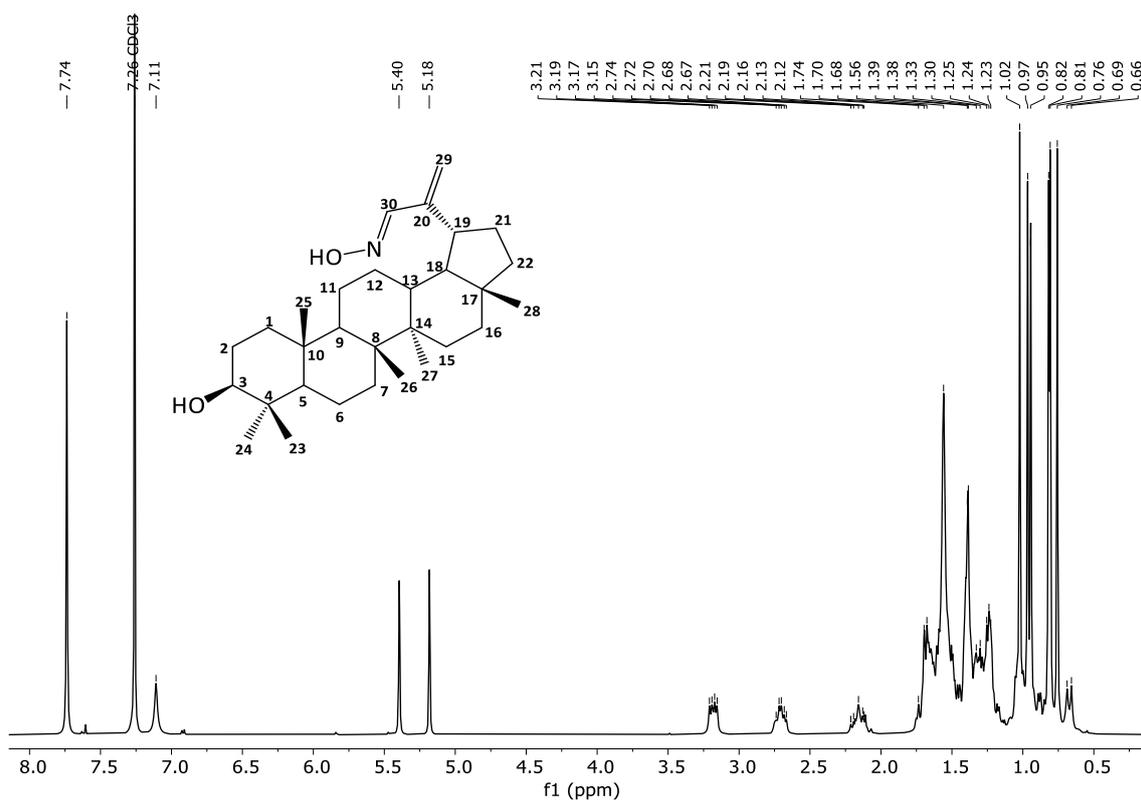
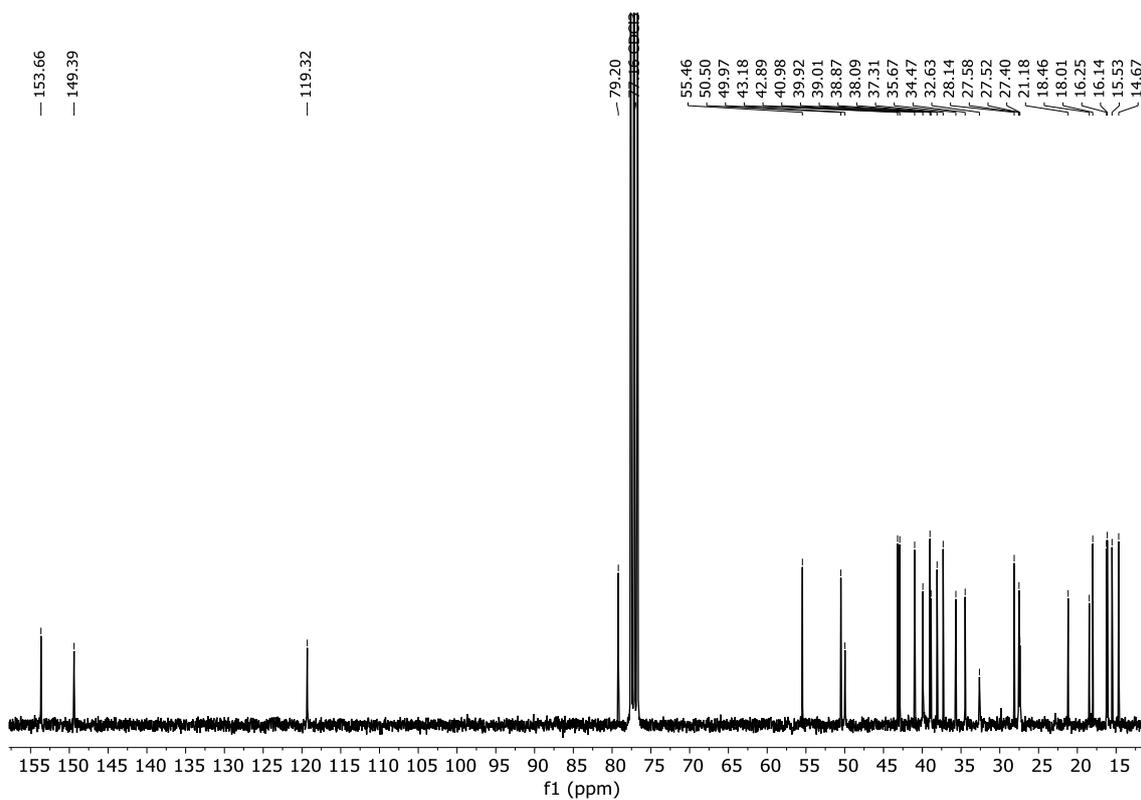
ANEXO DE ESPECTROS

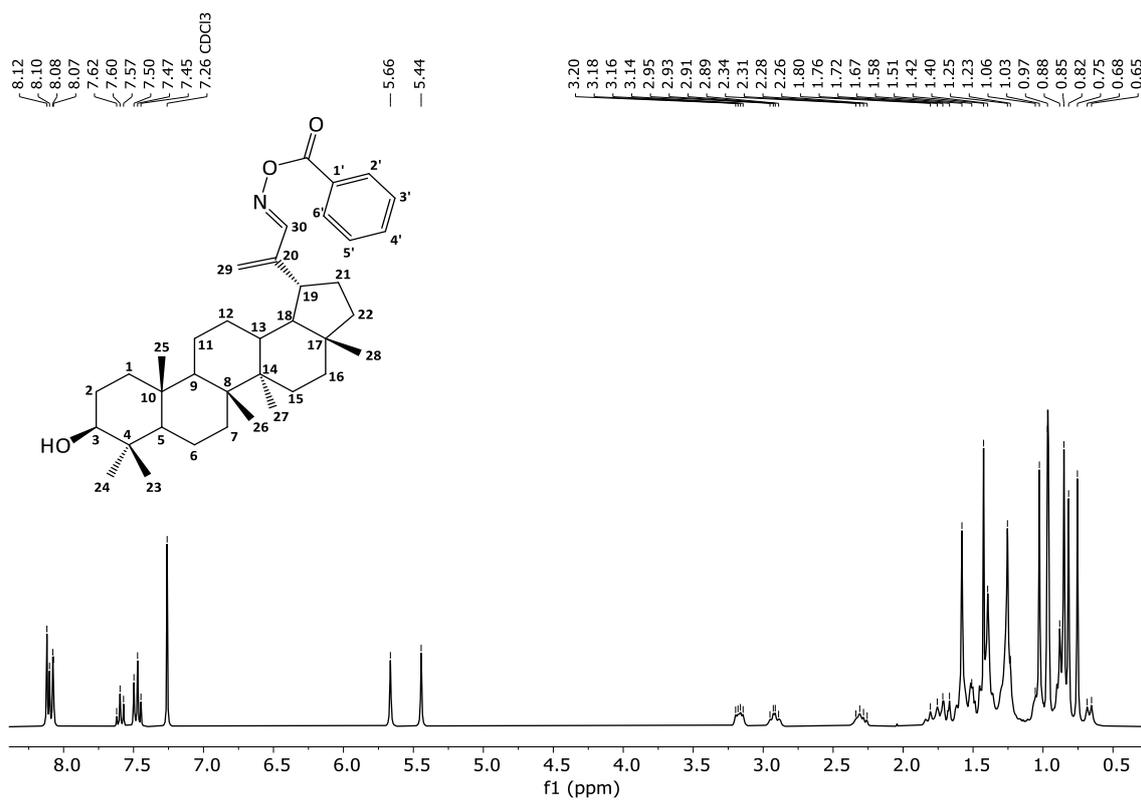
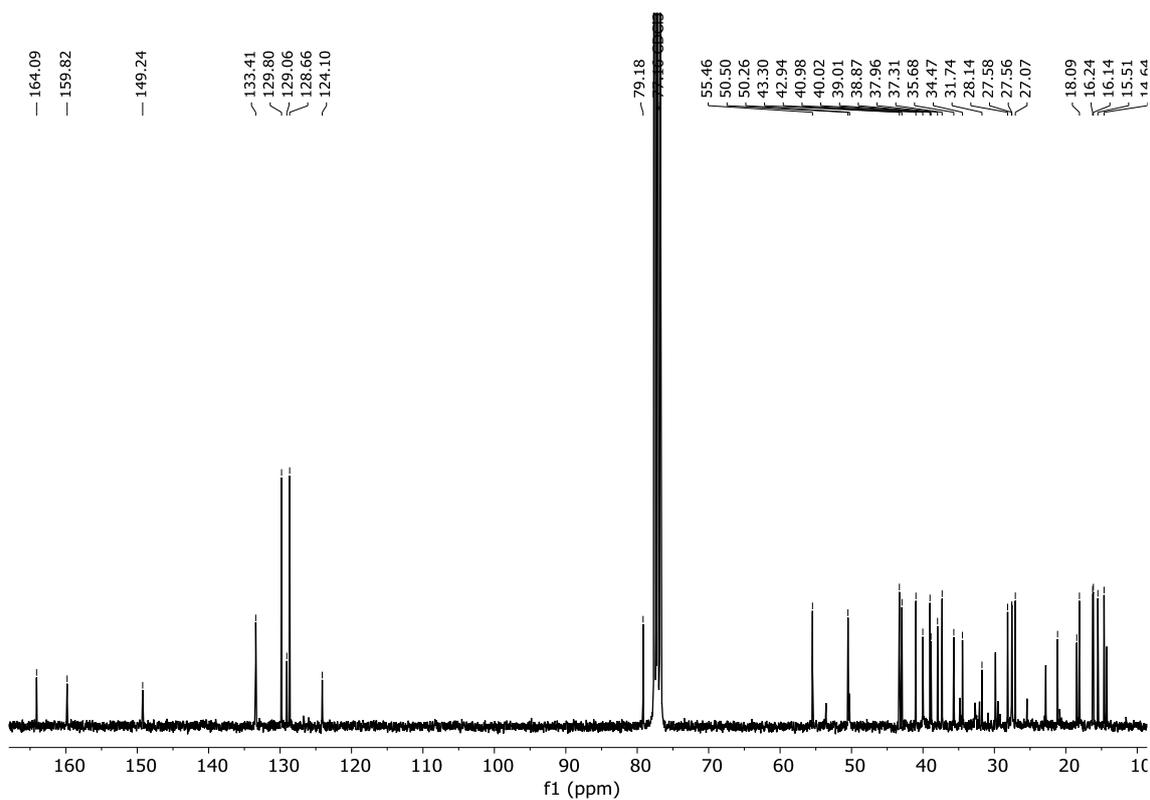
Espectro RMN de ^1H del compuesto 1 (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 1 (CDCl_3)

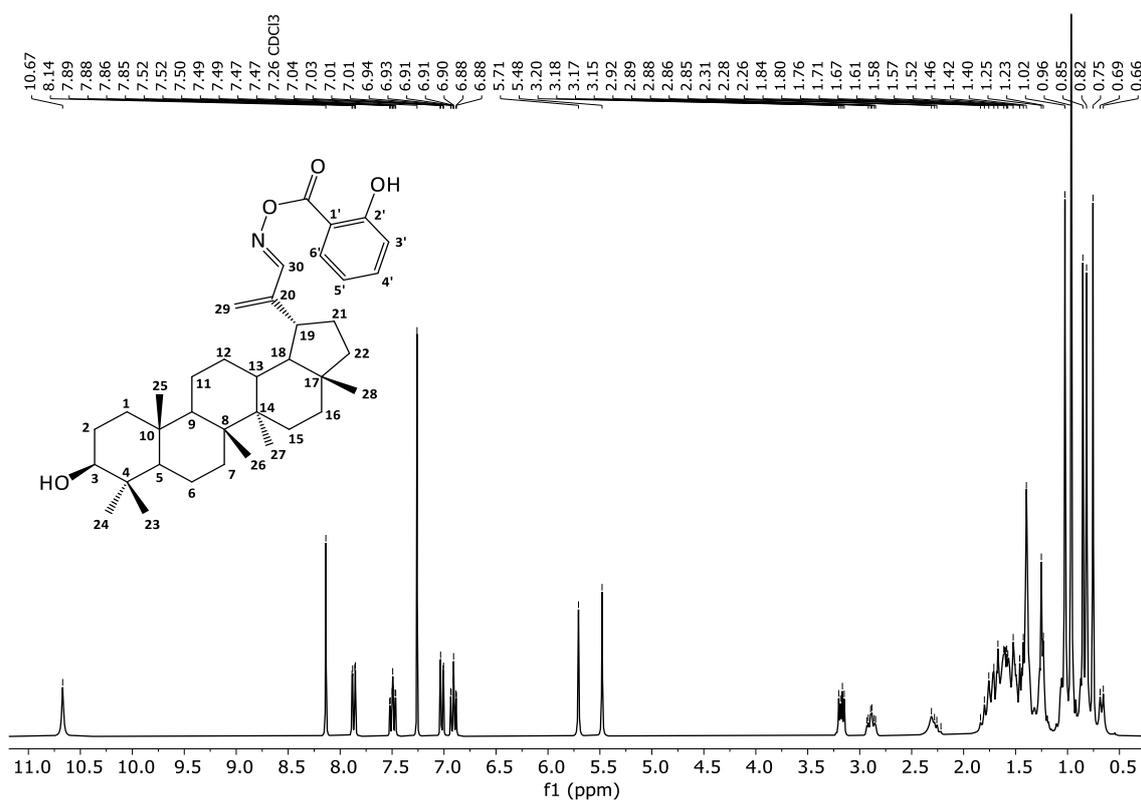
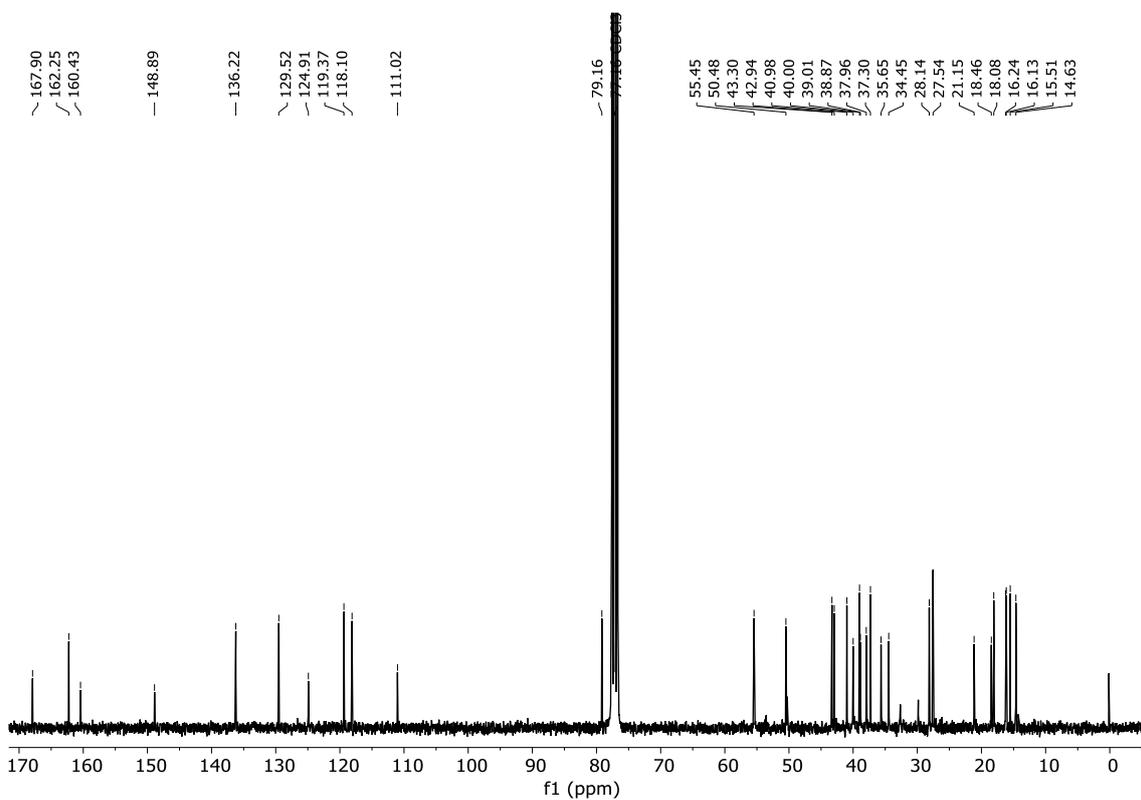
Espectro RMN de ^1H del compuesto 5 (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 5 (CDCl_3)

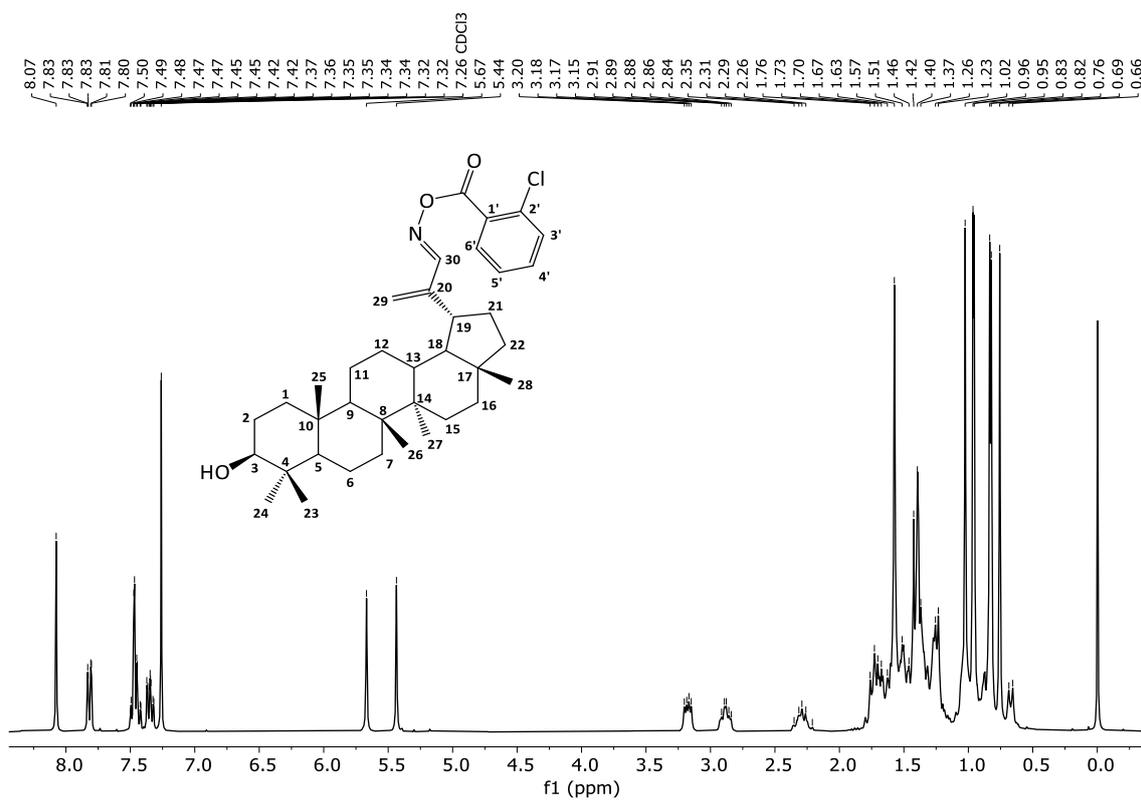
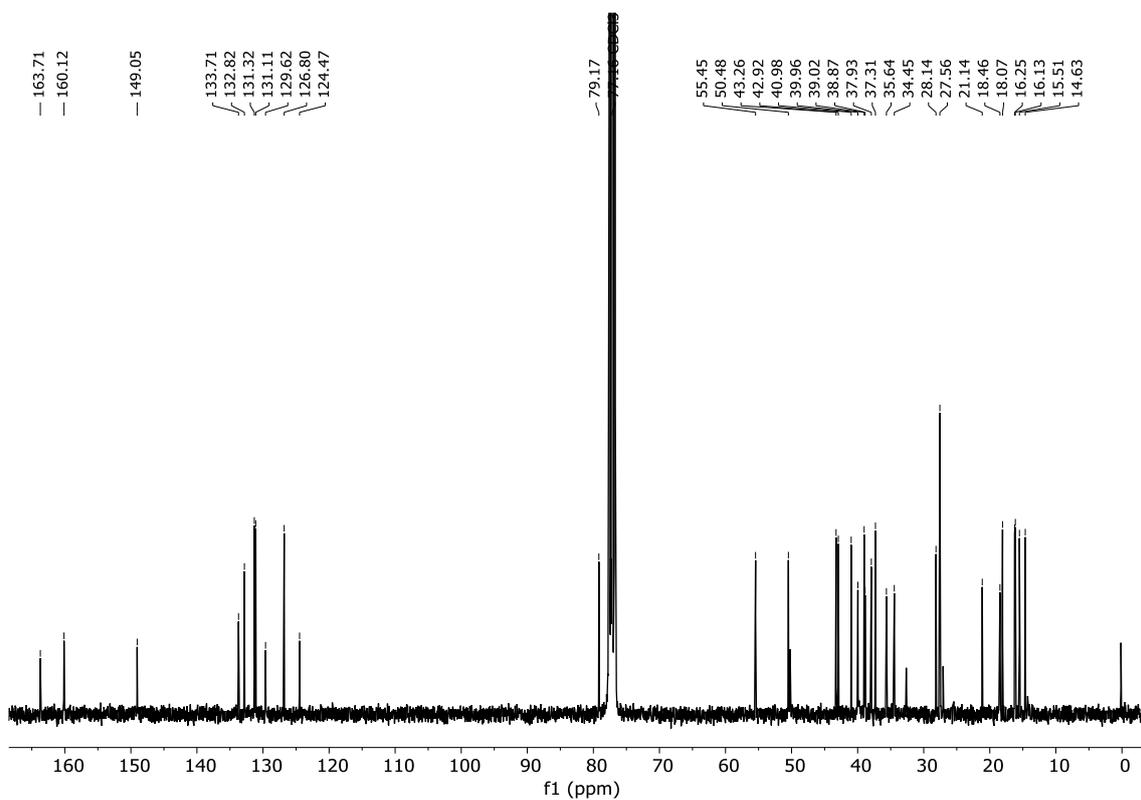
Espectro RMN de ^1H del compuesto 10 (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 10 (CDCl_3)

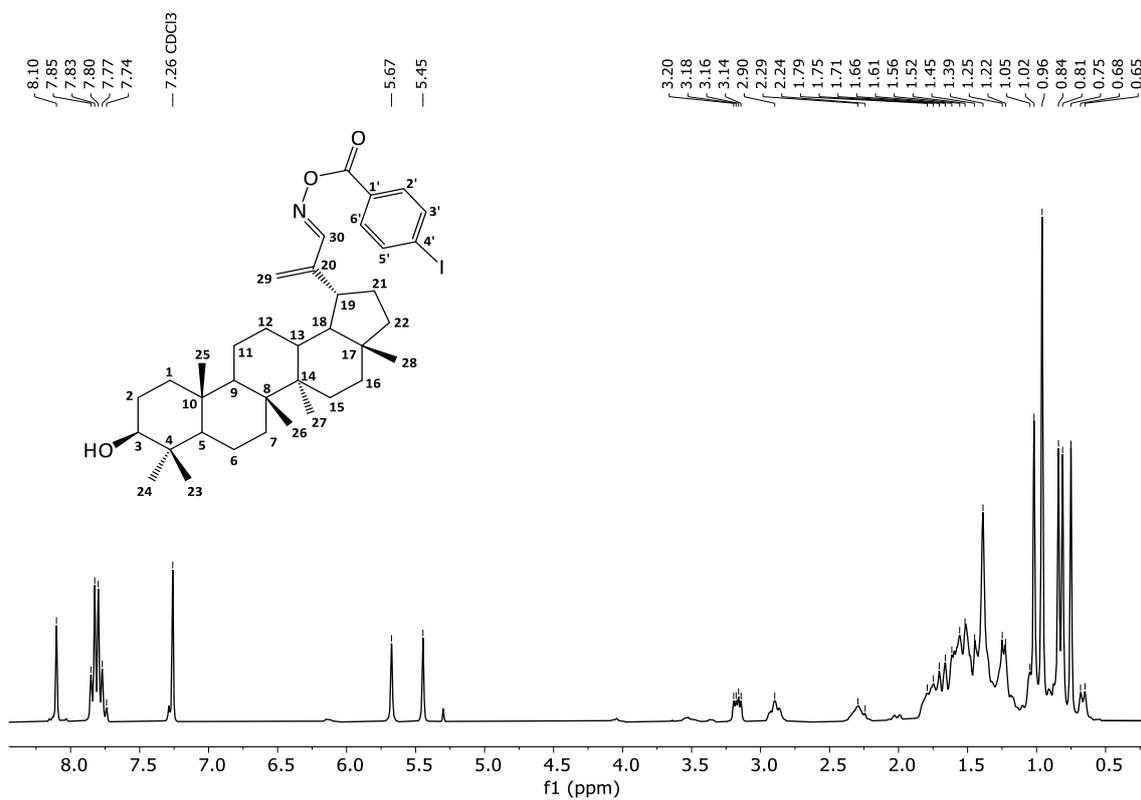
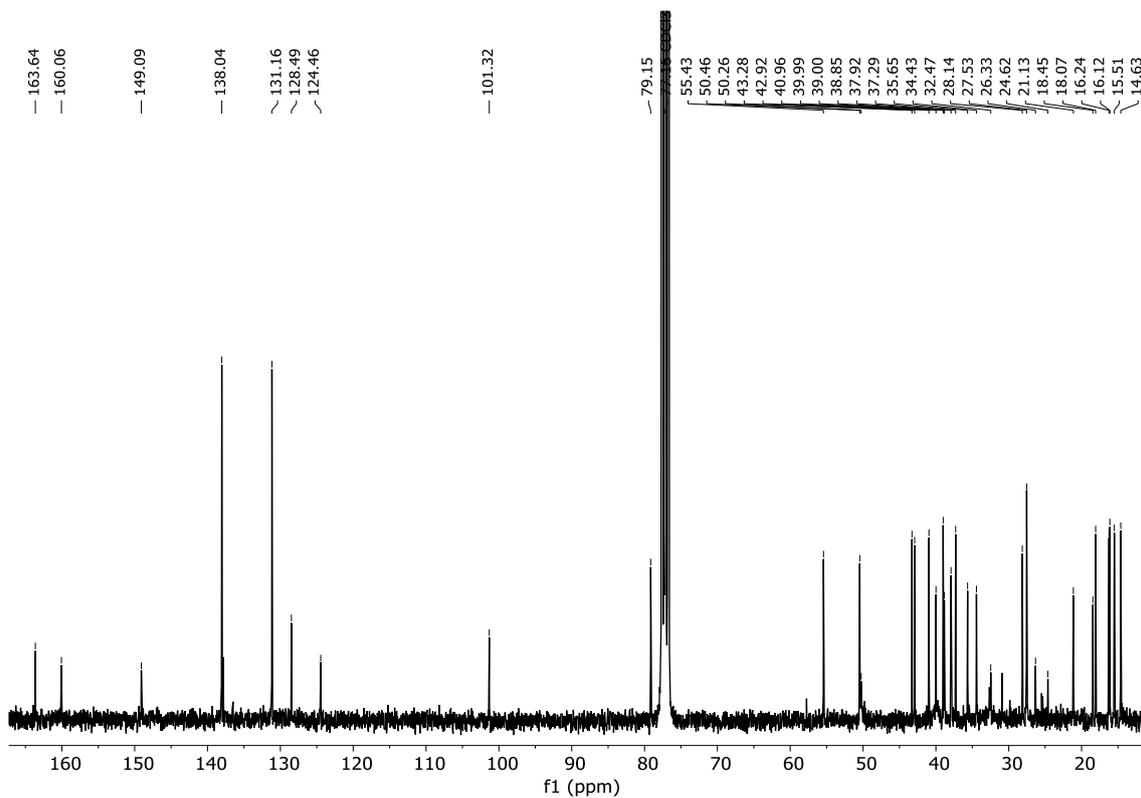
Espectro RMN de ^1H del compuesto 11a (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 11a (CDCl_3)

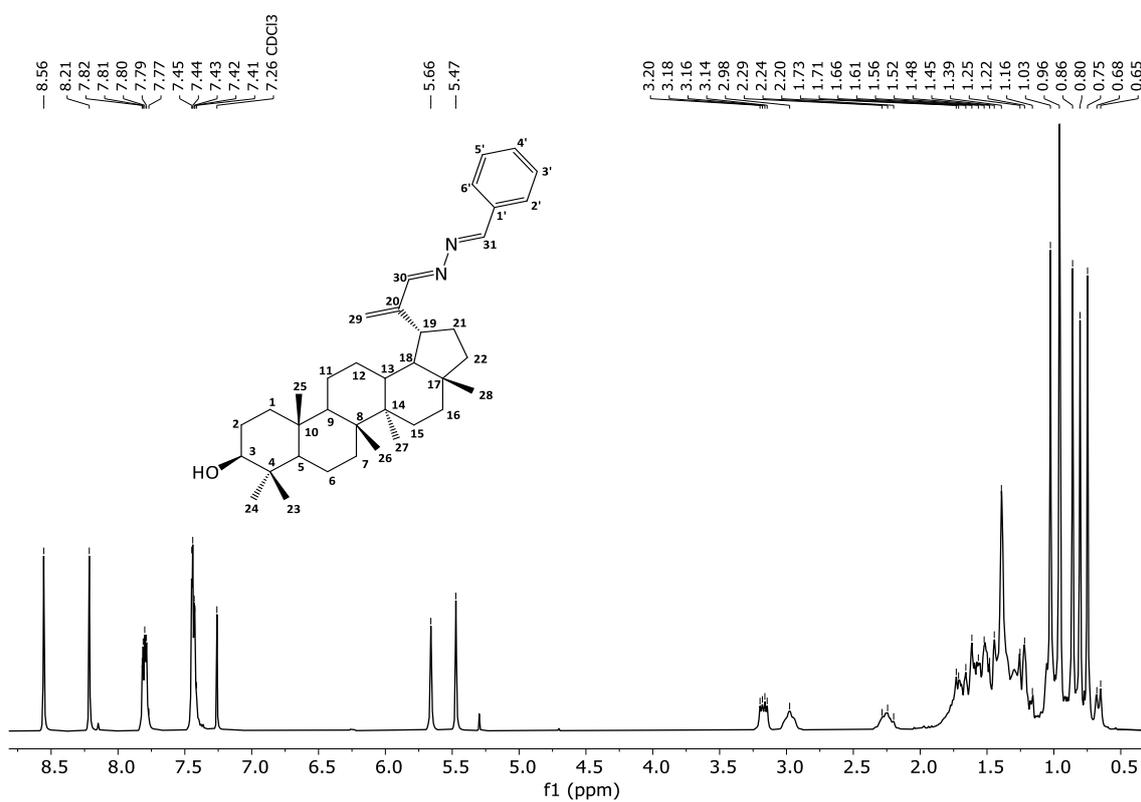
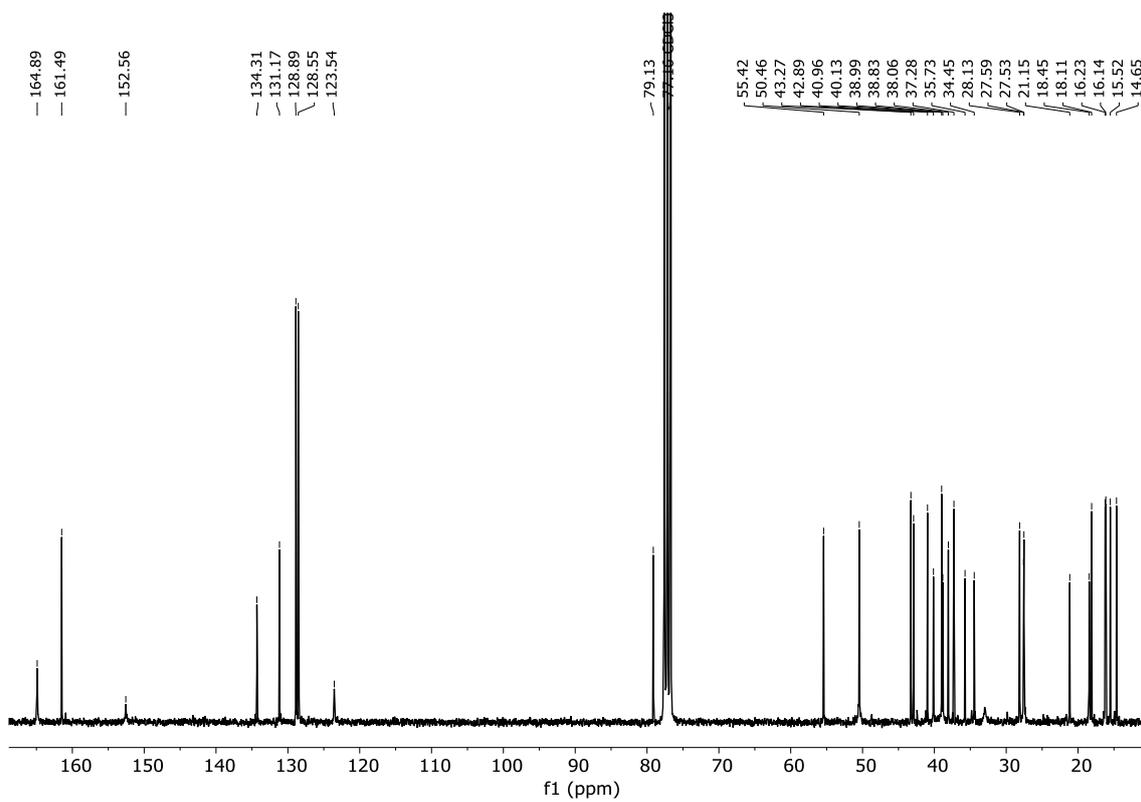
Espectro RMN de ^1H del compuesto 12 (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 12 (CDCl_3)

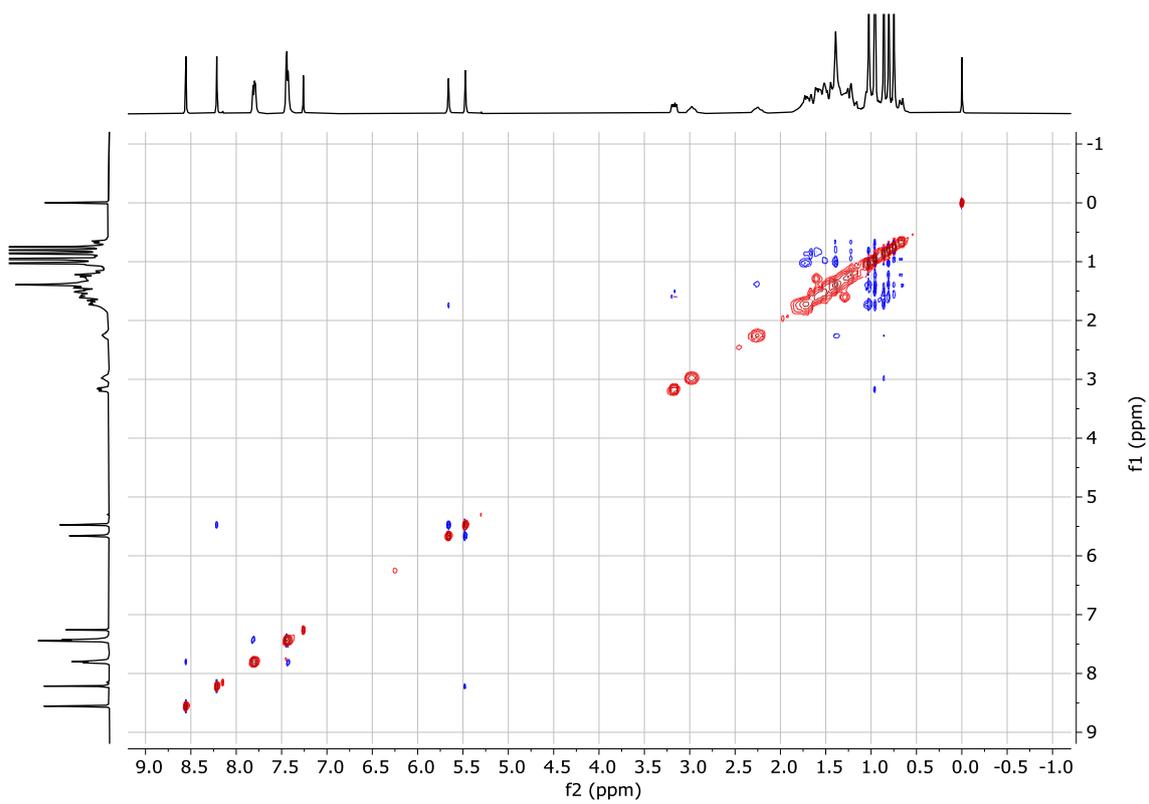
Espectro RMN de ^1H del compuesto 13a (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 13a (CDCl_3)

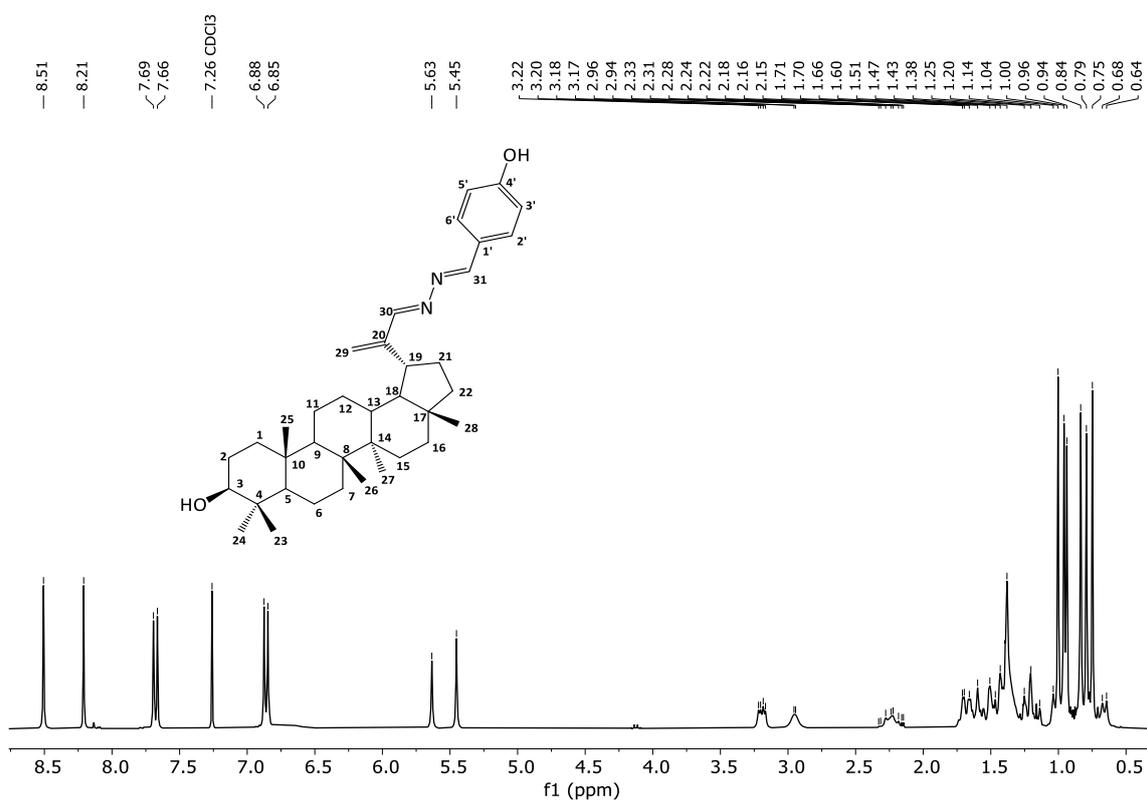
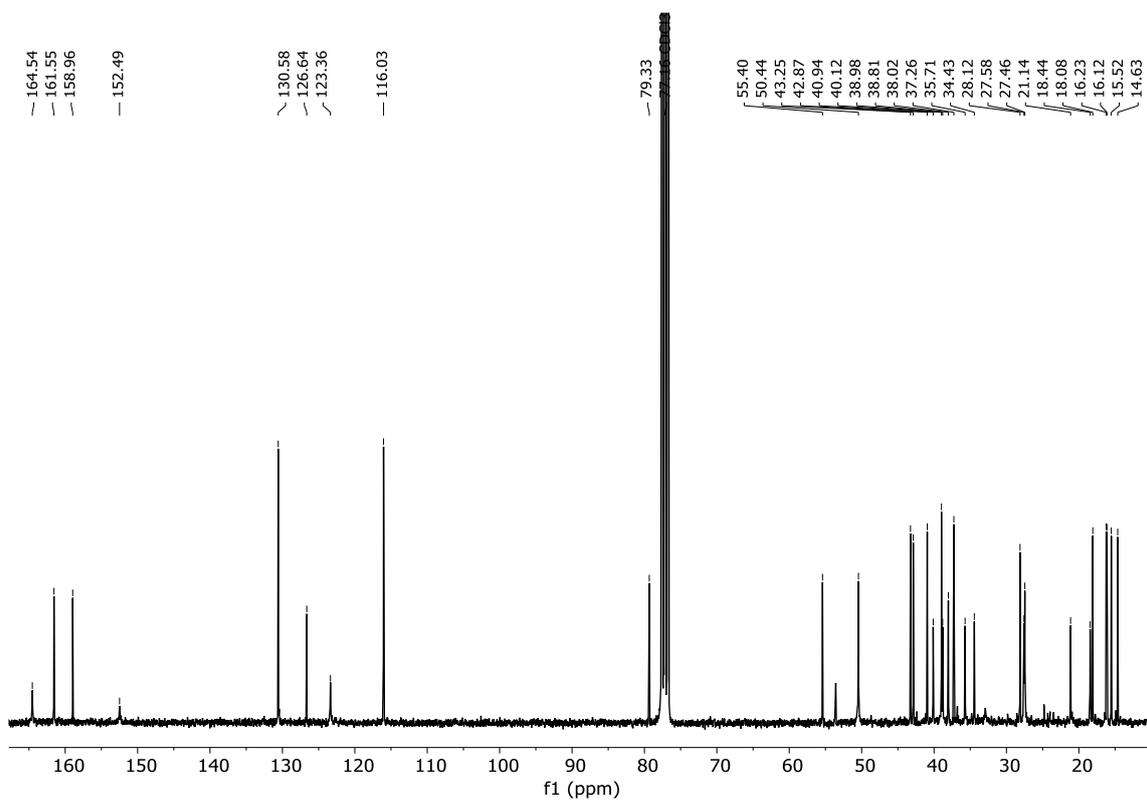
Espectro RMN de ^1H del compuesto 13b (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 13b (CDCl_3)

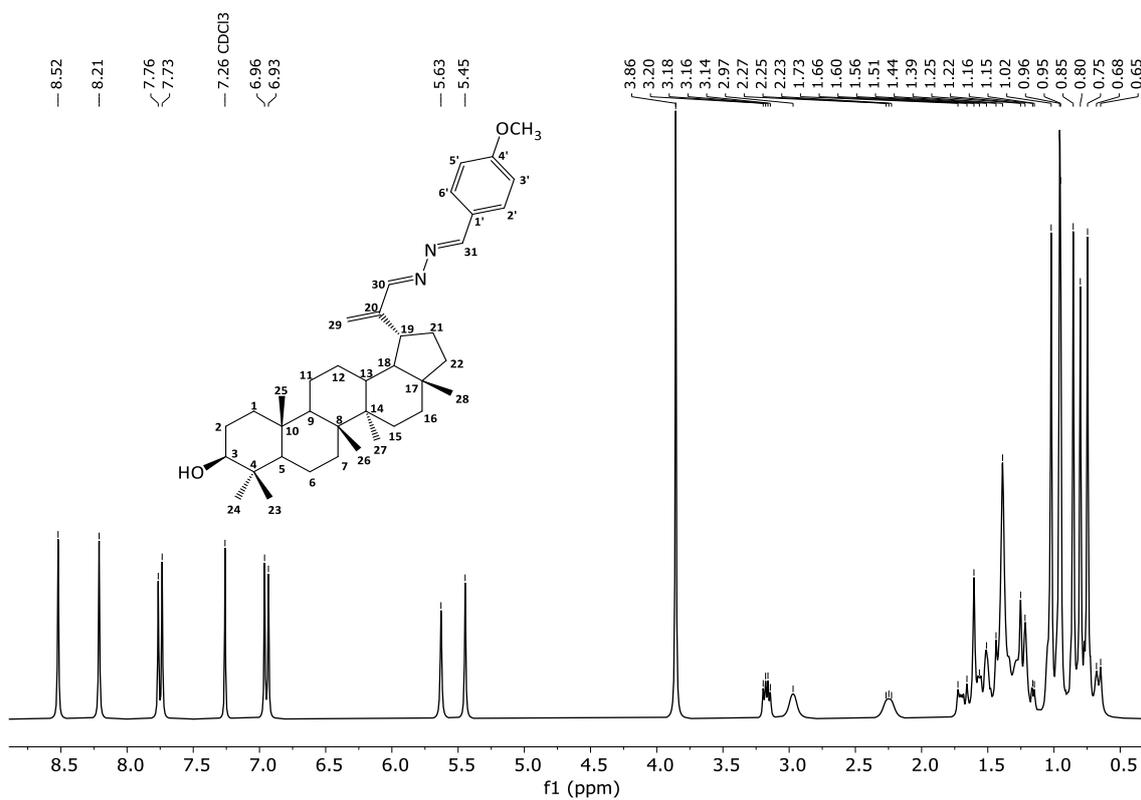
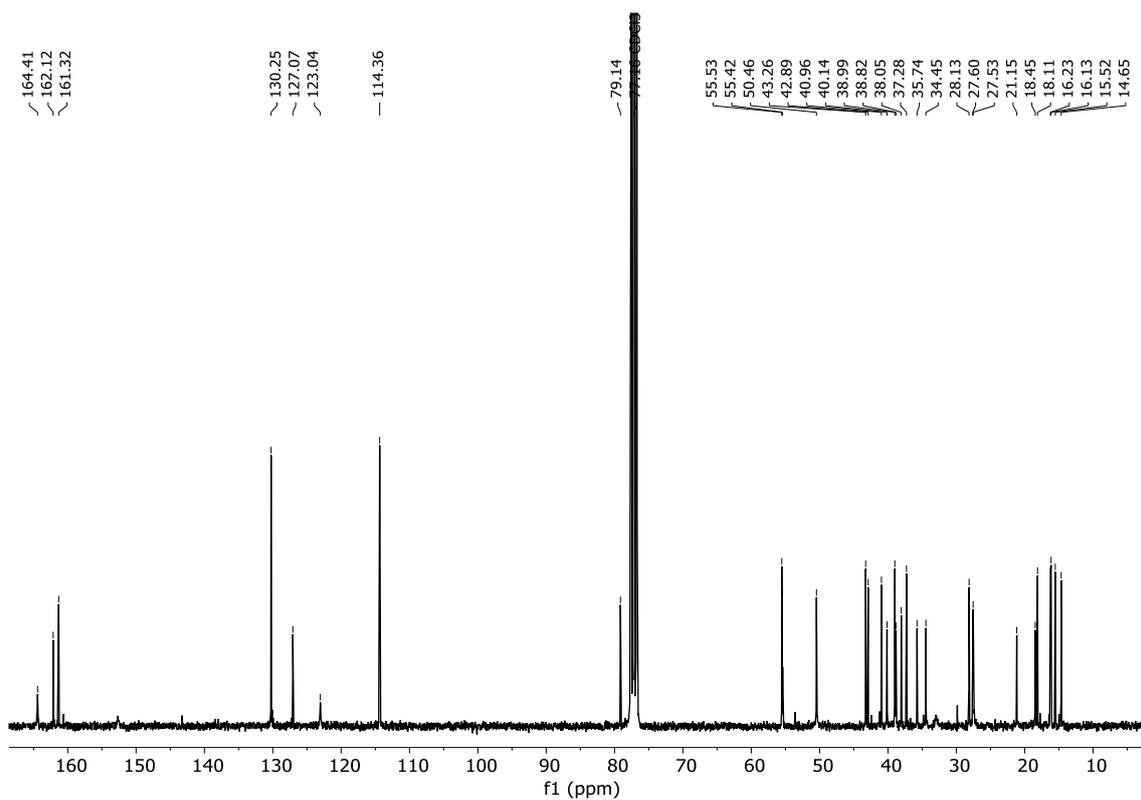
Espectro RMN de ^1H del compuesto 13d (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 13d (CDCl_3)

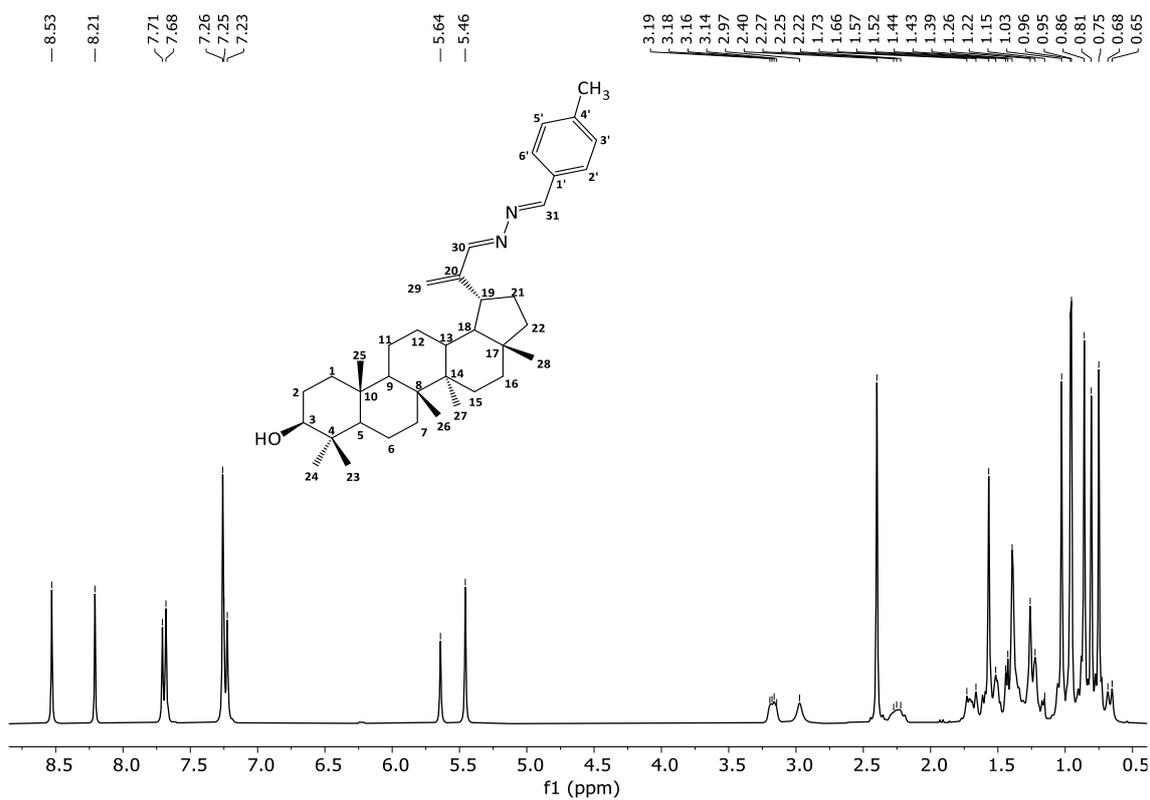
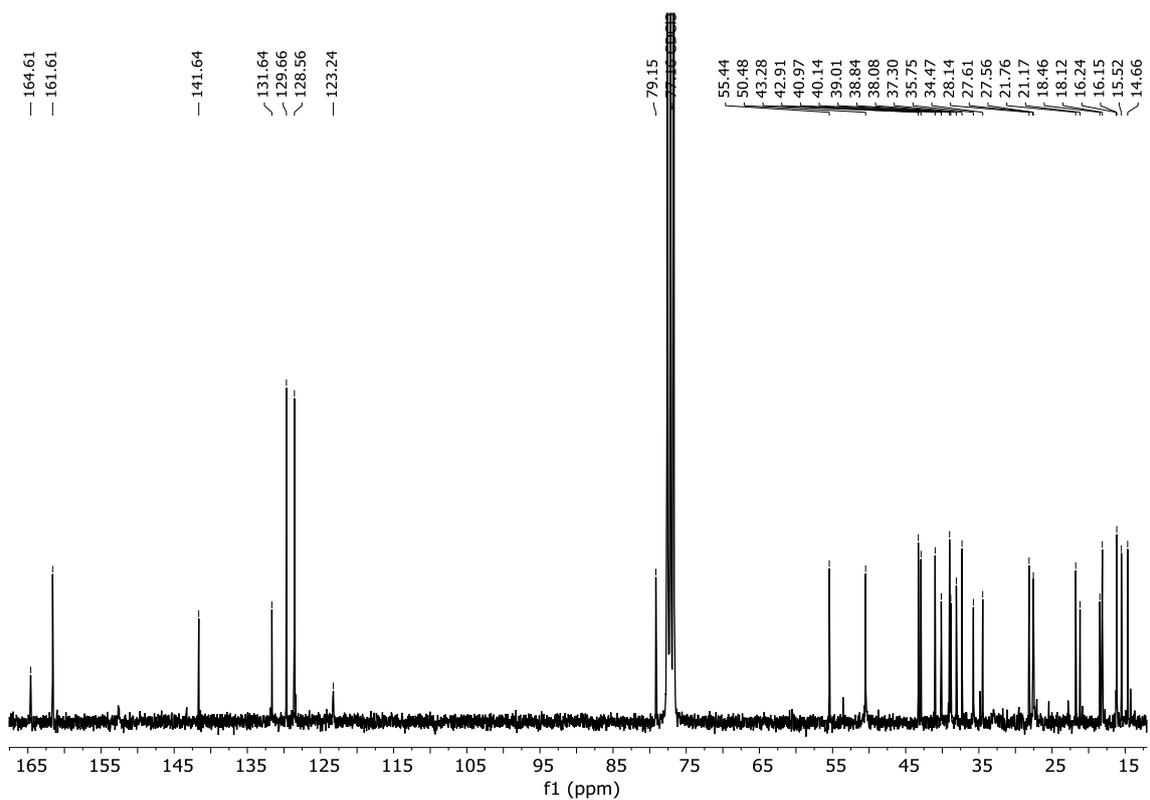
Espectro RMN de ^1H del compuesto 13e (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 13e (CDCl_3)

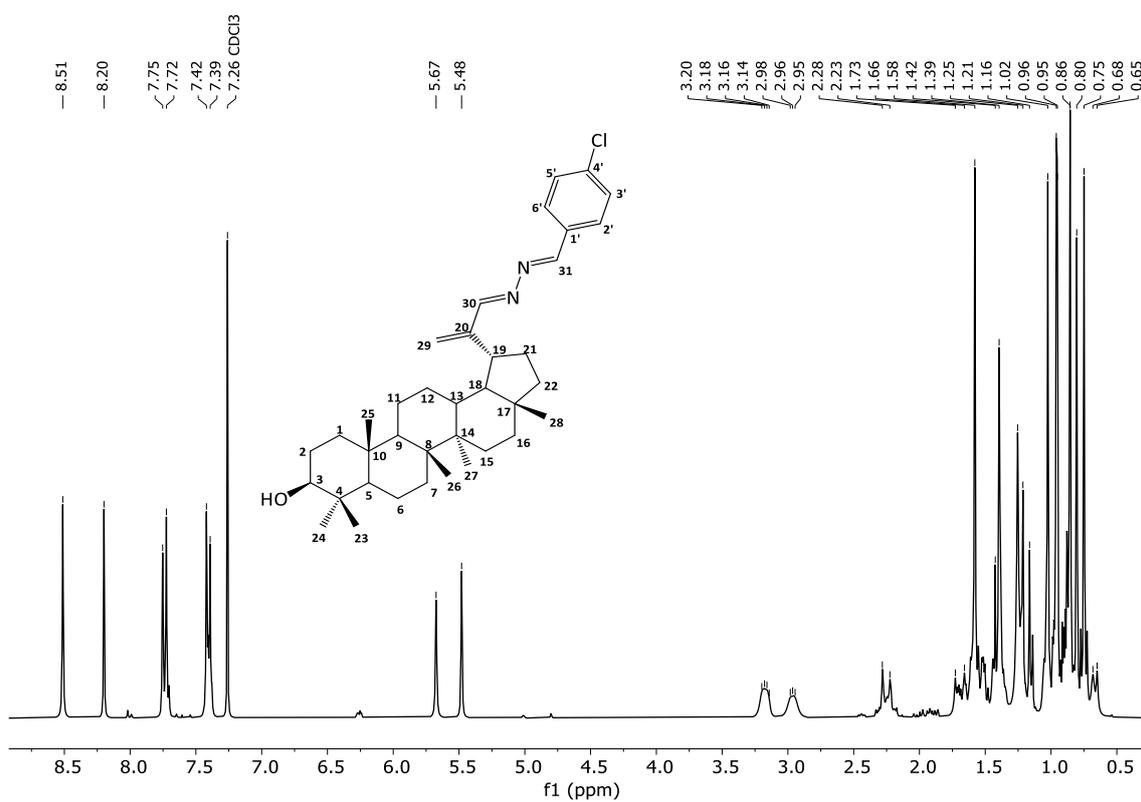
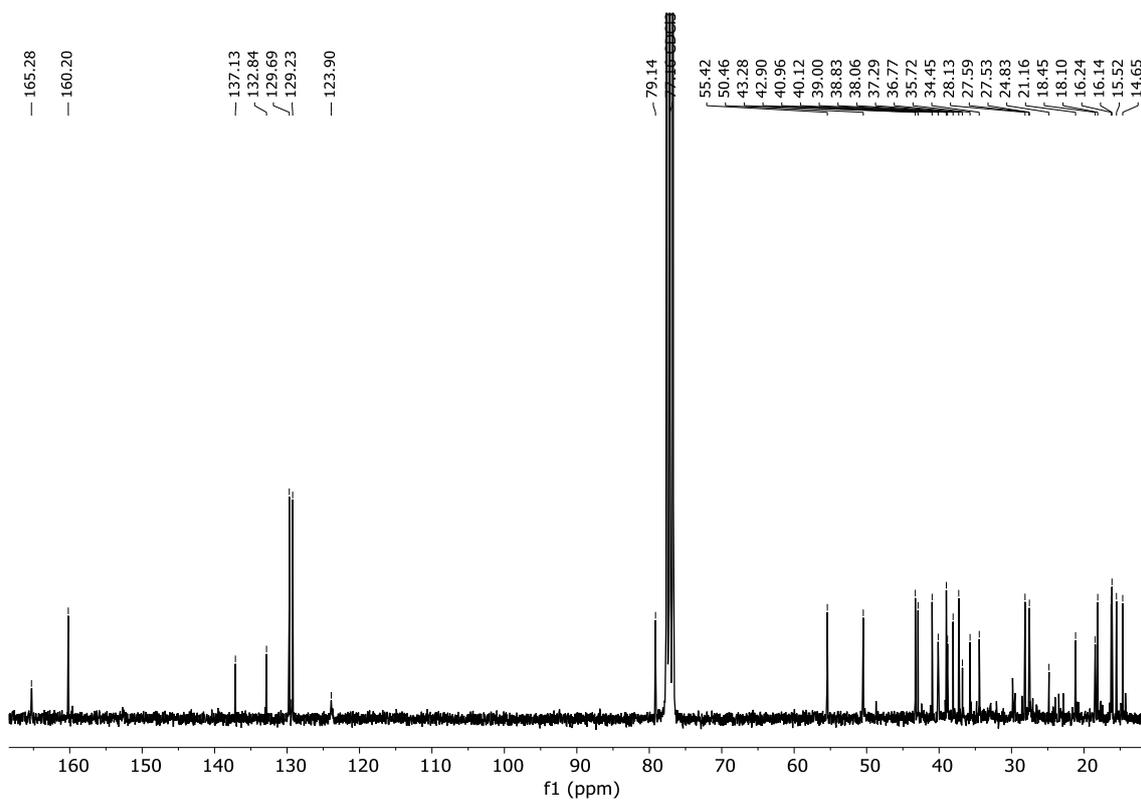
Espectro RMN de ^1H del compuesto 15a (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 15a (CDCl_3)

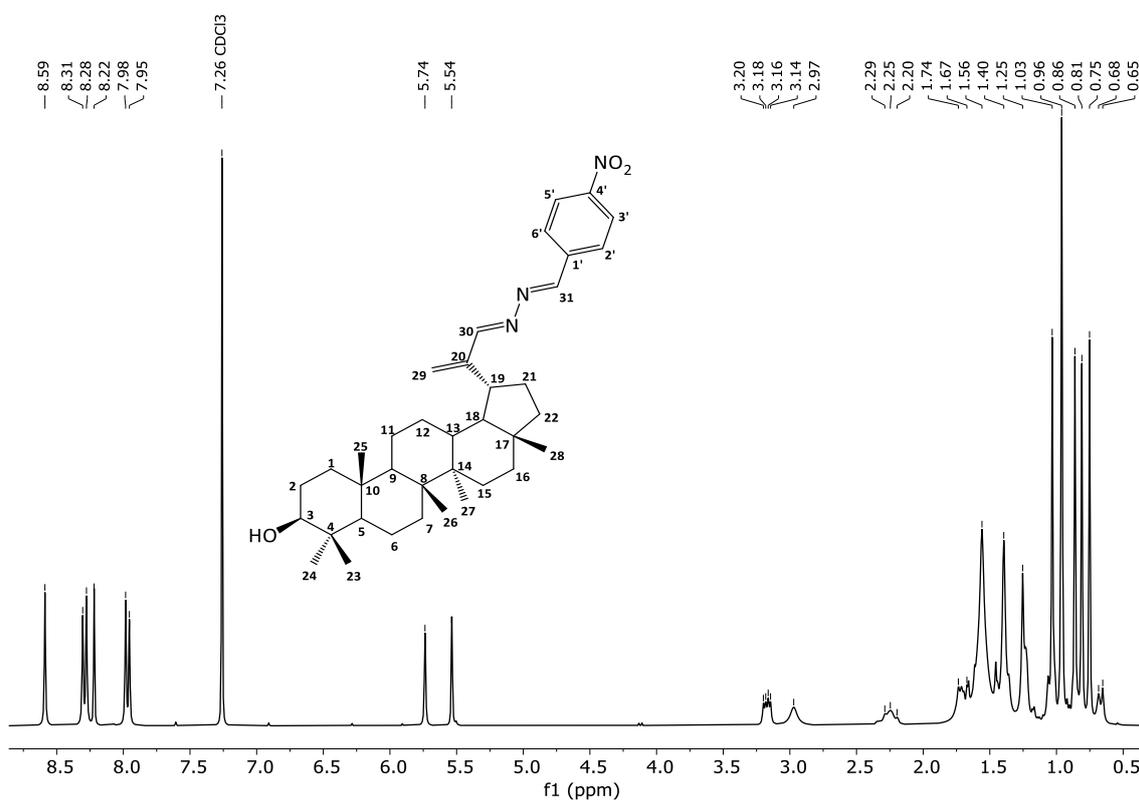
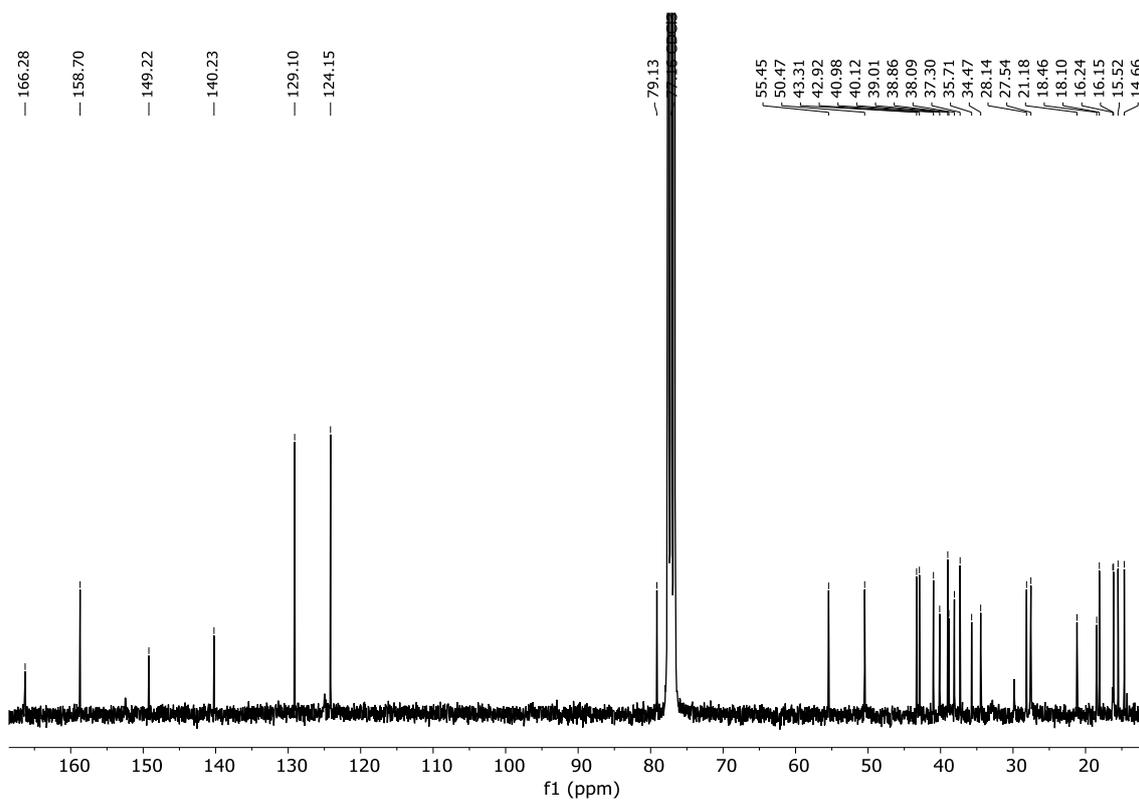
Espectro RMN NOESY del compuesto **15a** (CDCl₃)

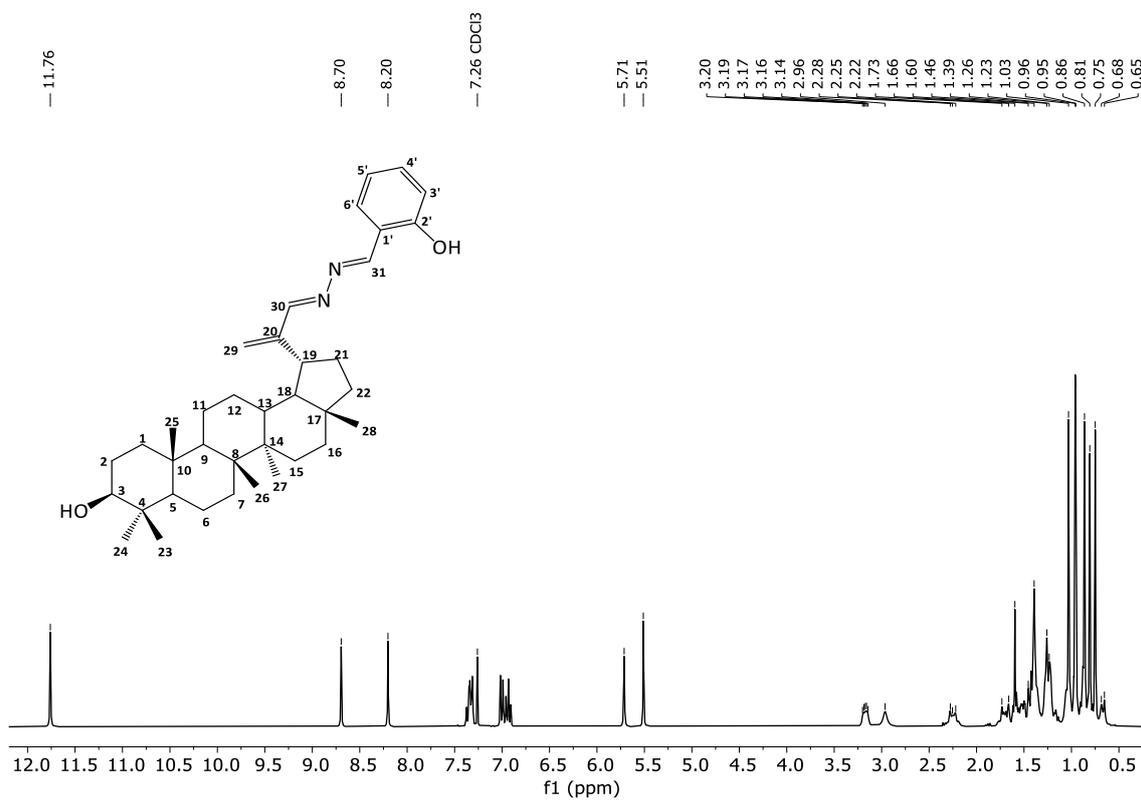
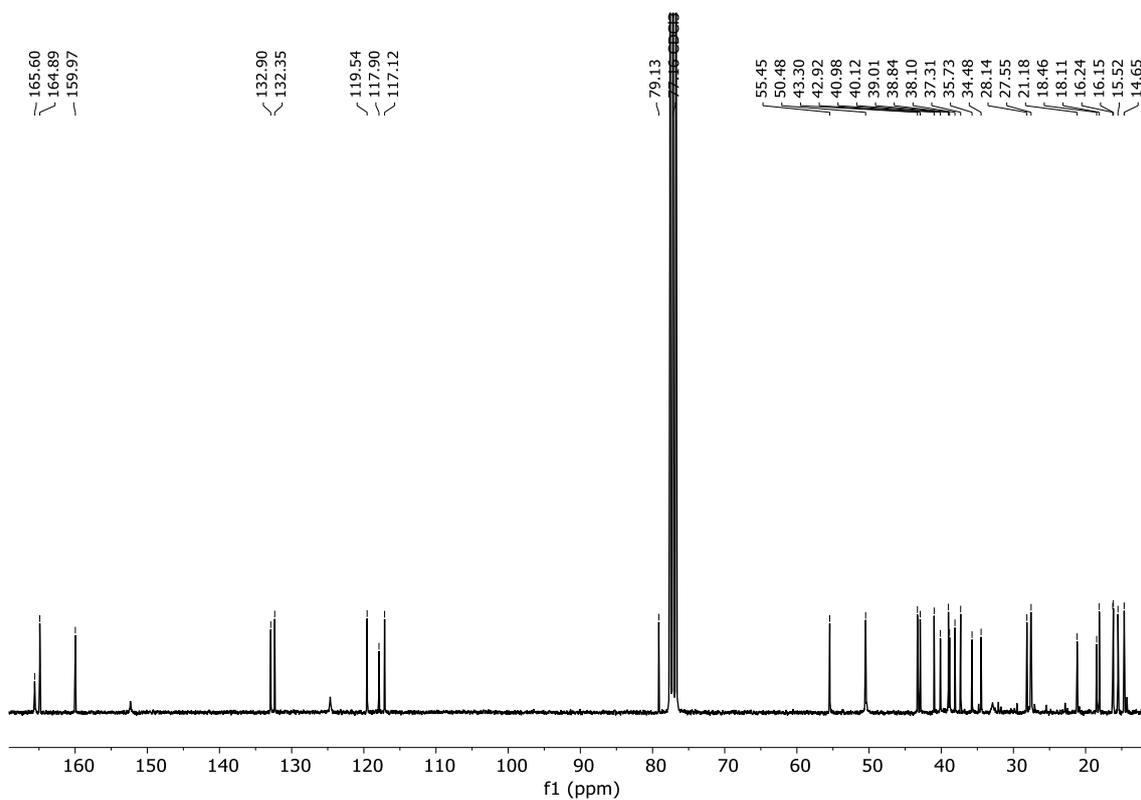
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15b** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15b** (CDCl_3)

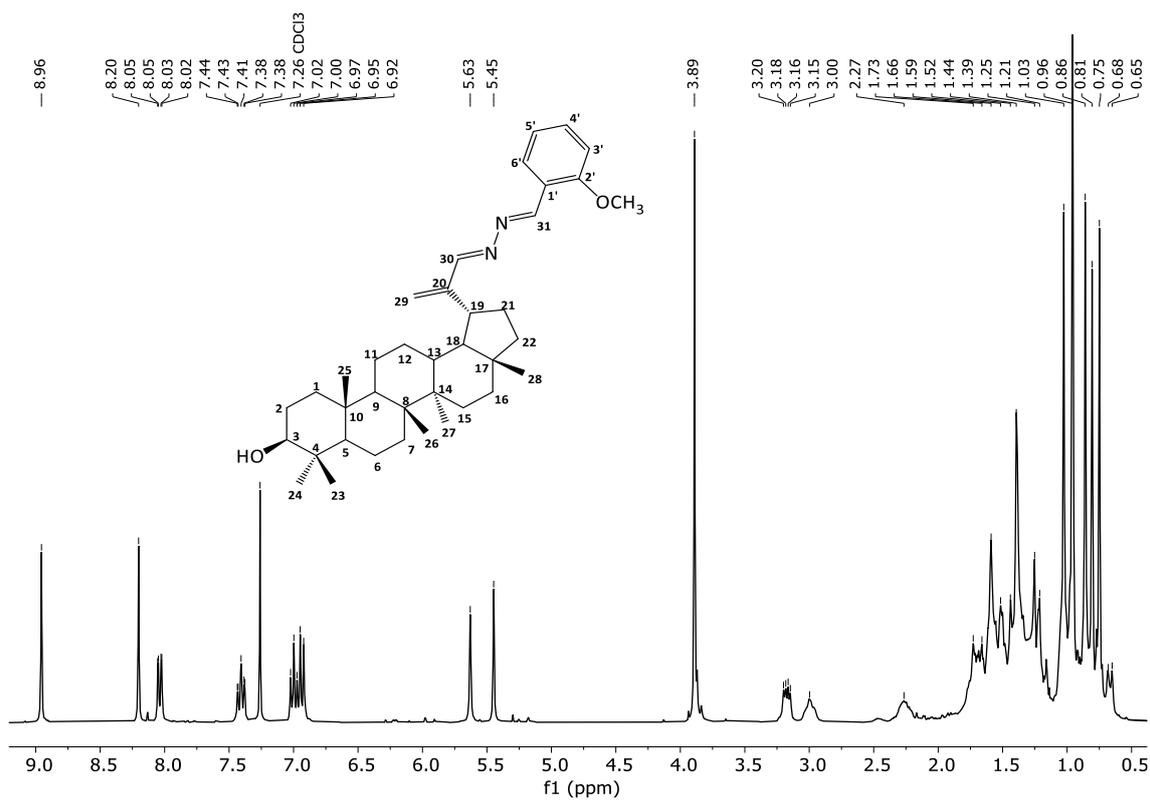
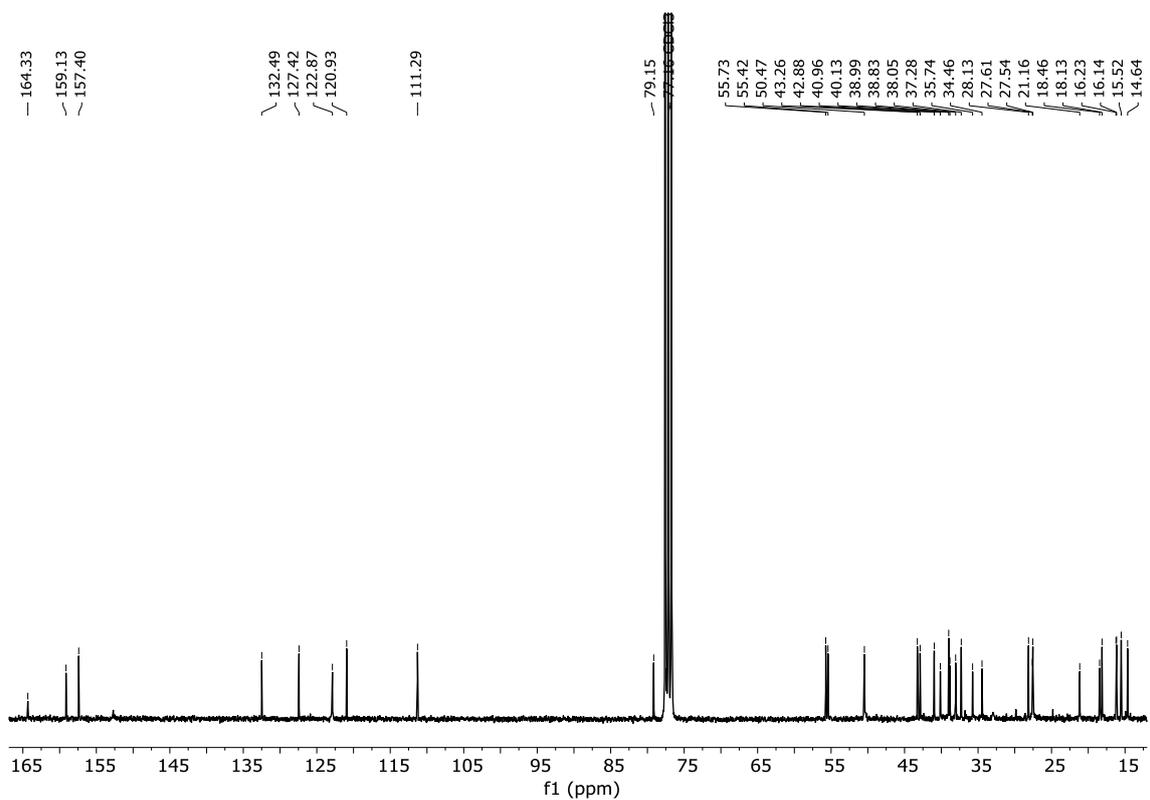
Espectro RMN de ^1H del compuesto 15c (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 15c (CDCl_3)

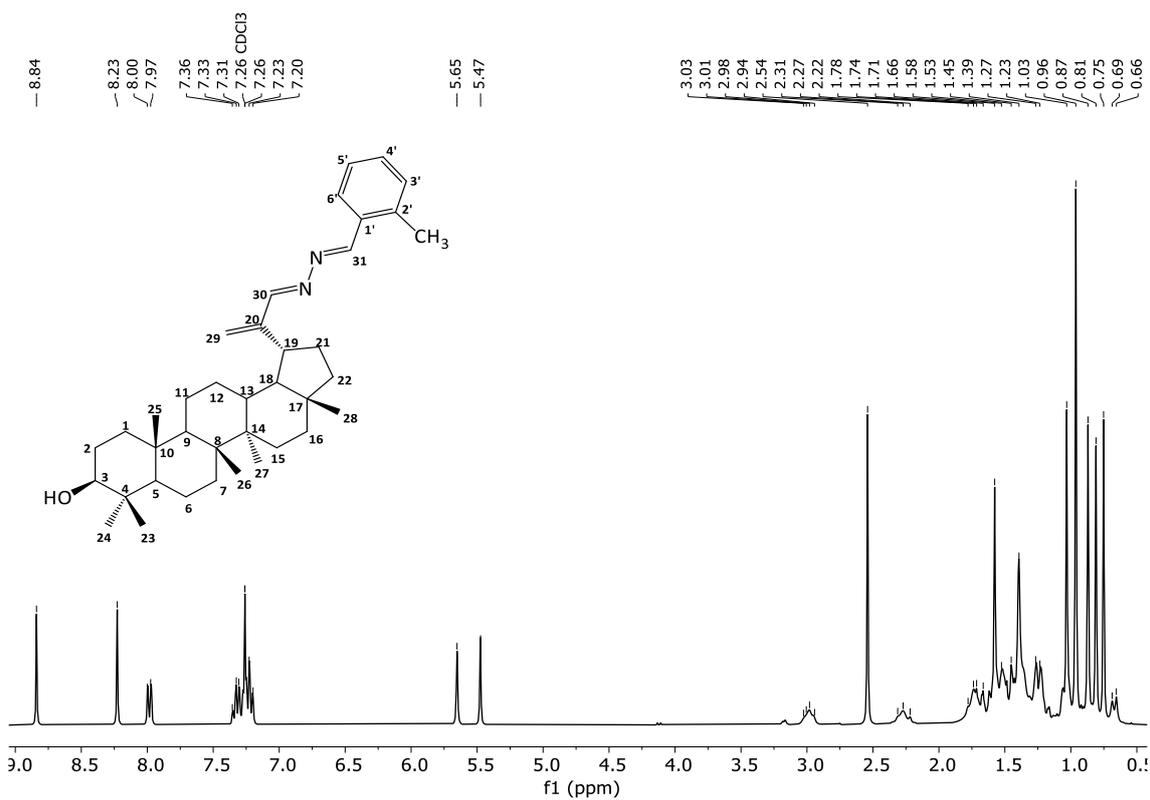
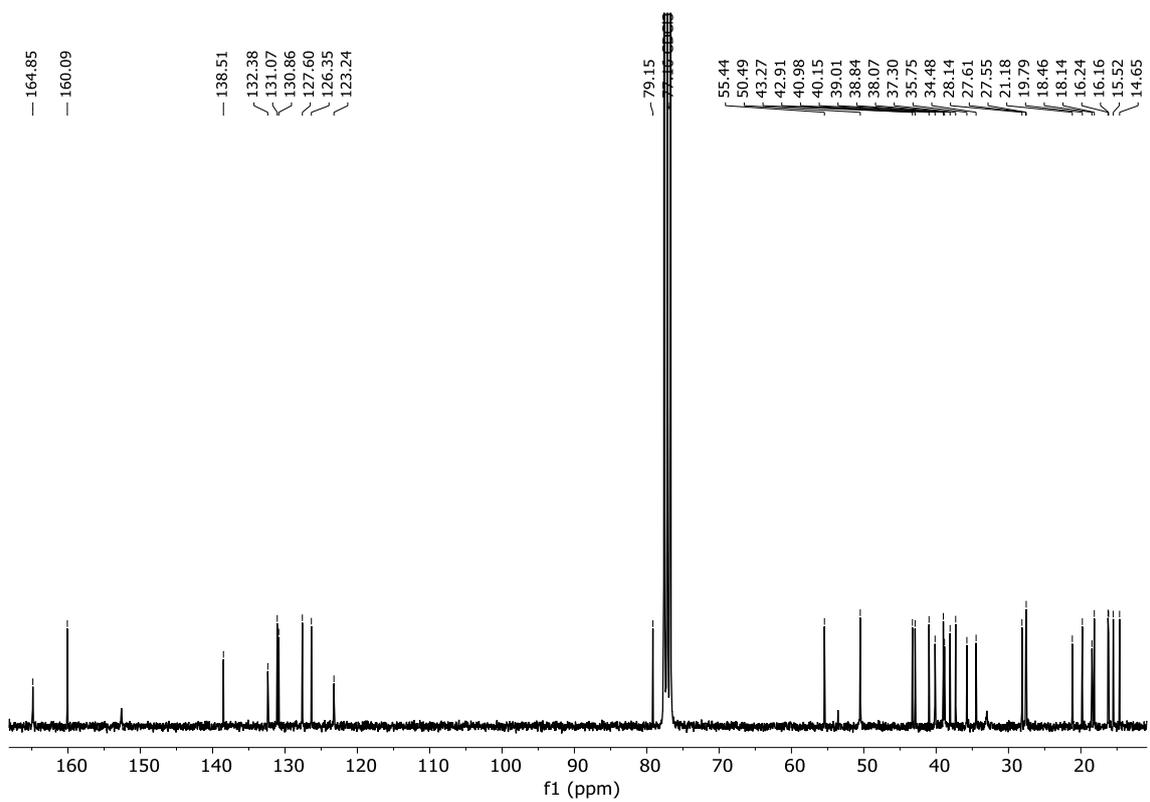
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15d** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15d** (CDCl_3)

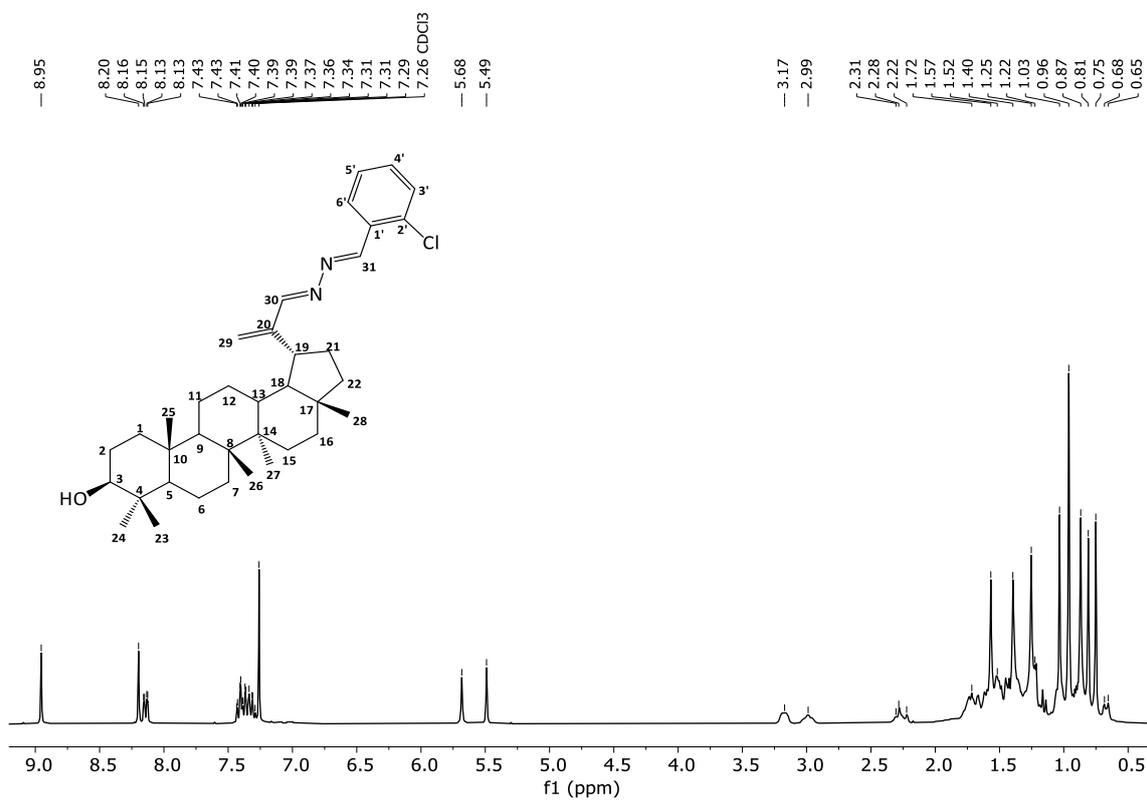
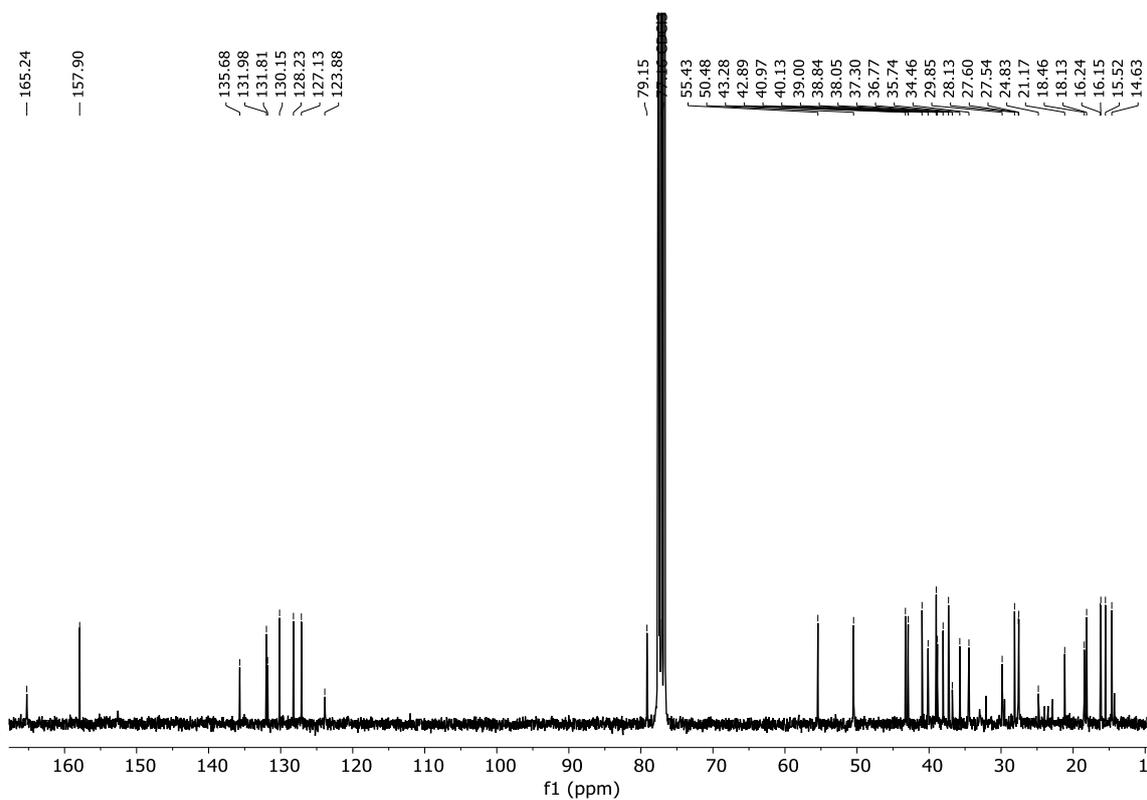
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15e** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15e** (CDCl_3)

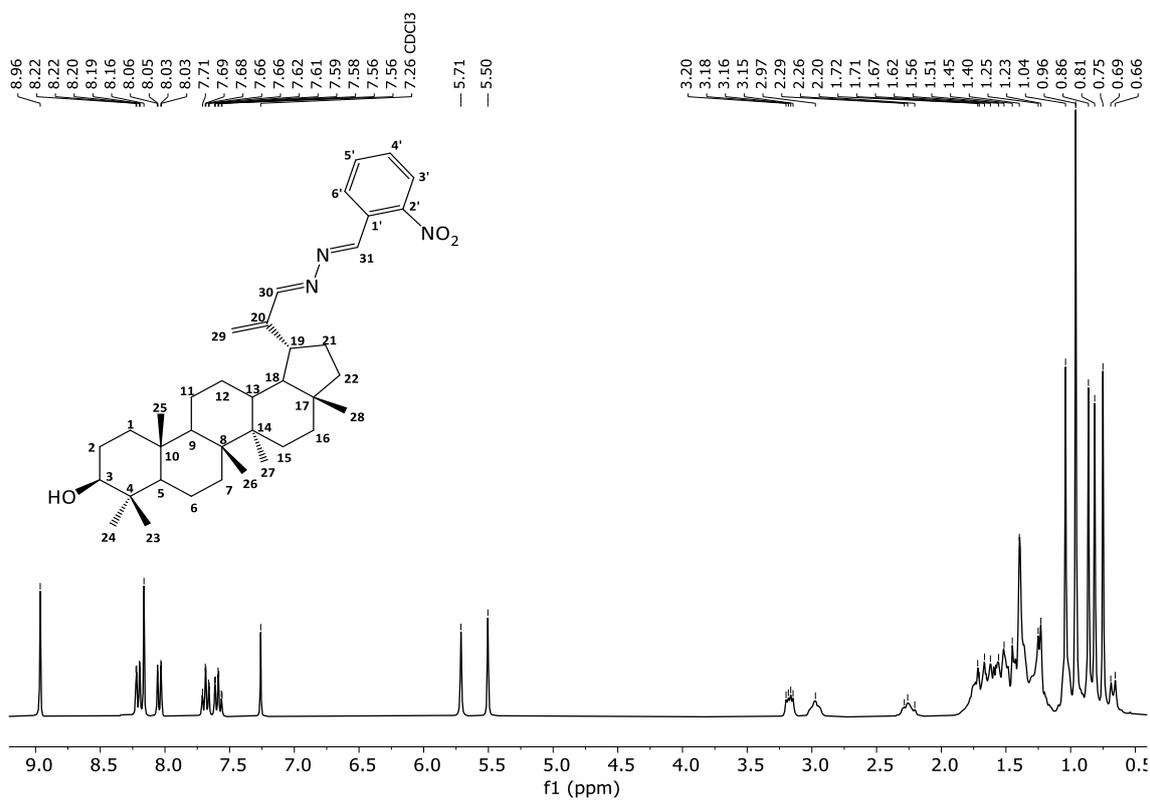
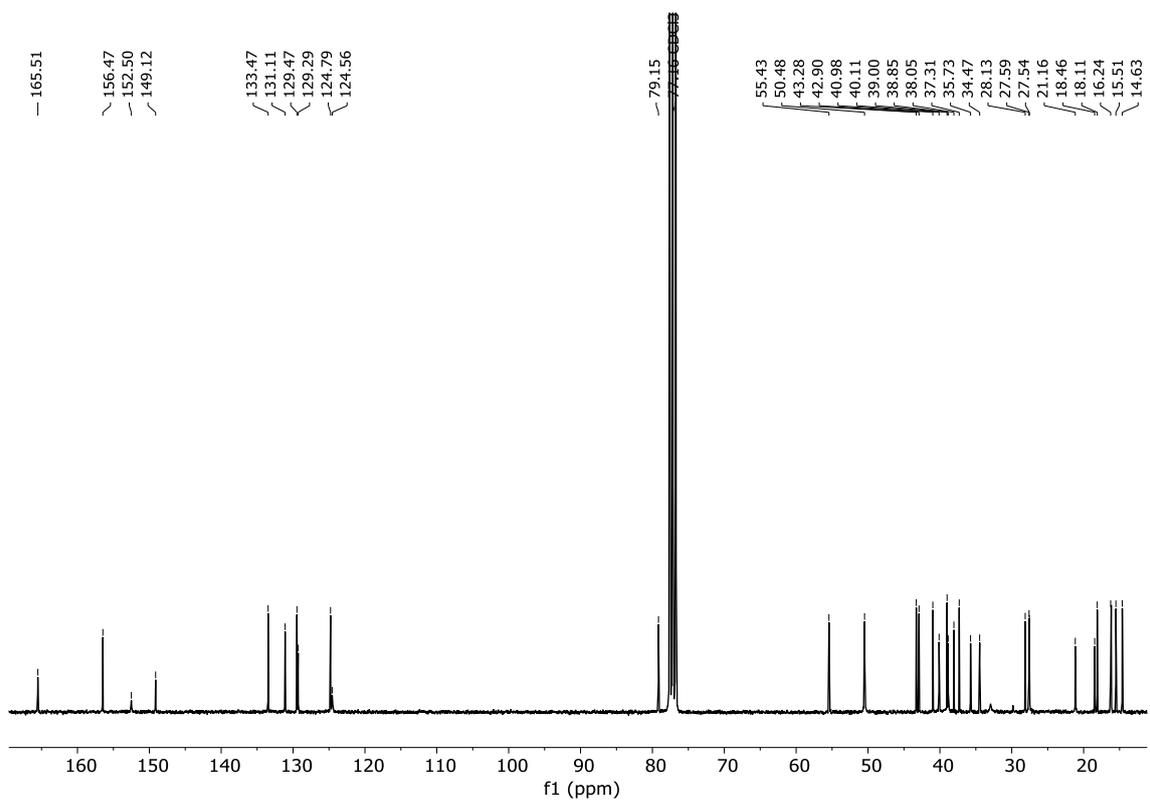
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15f** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15f** (CDCl_3)

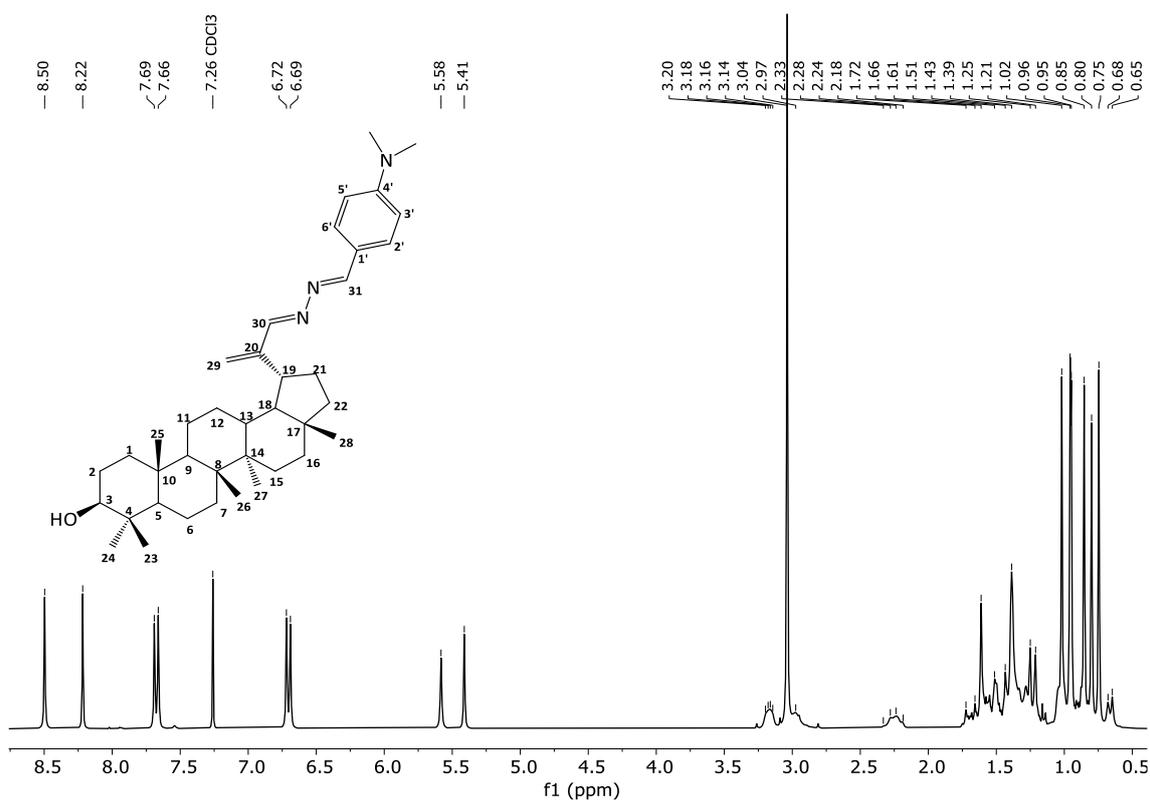
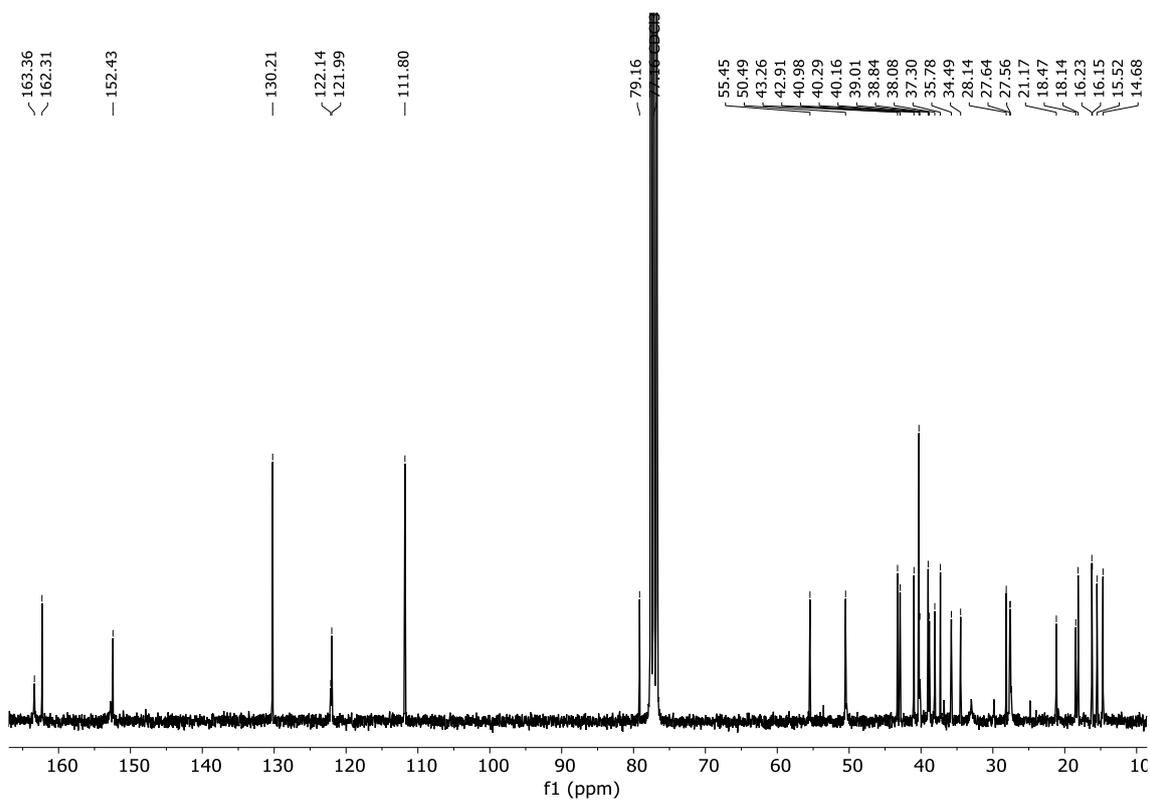
Espectro RMN de ^1H del compuesto 15g (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 15g (CDCl_3)

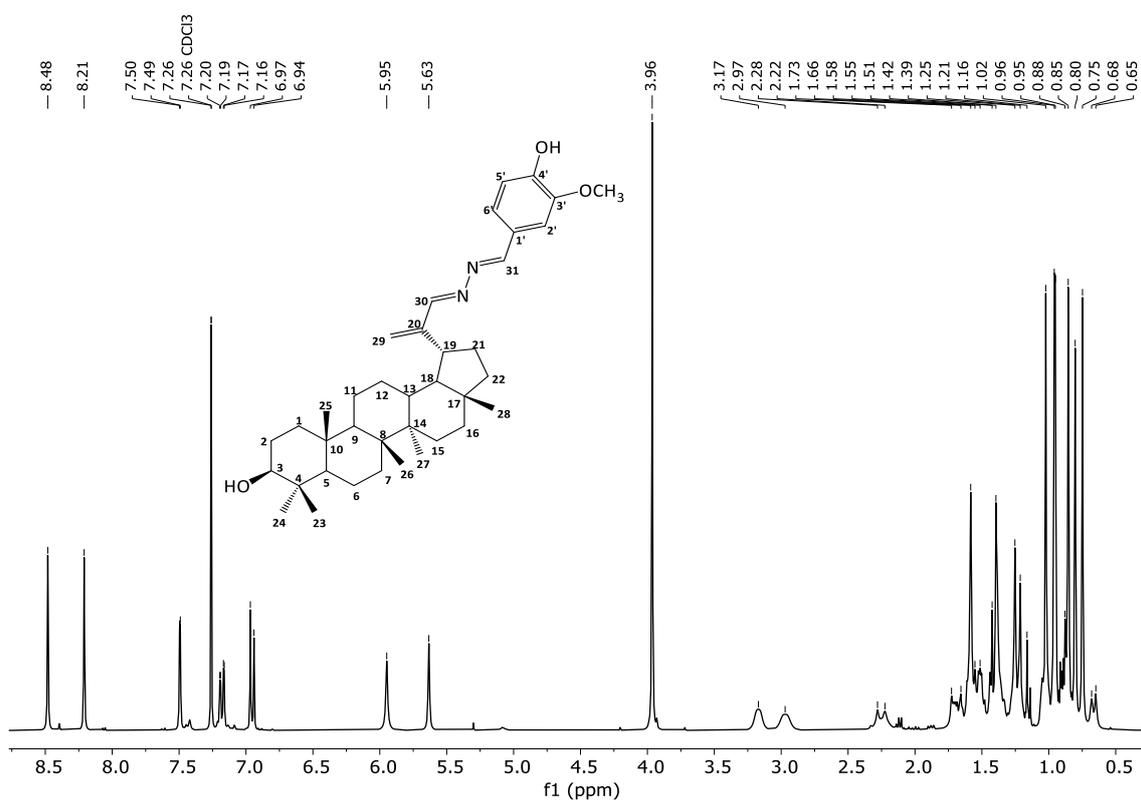
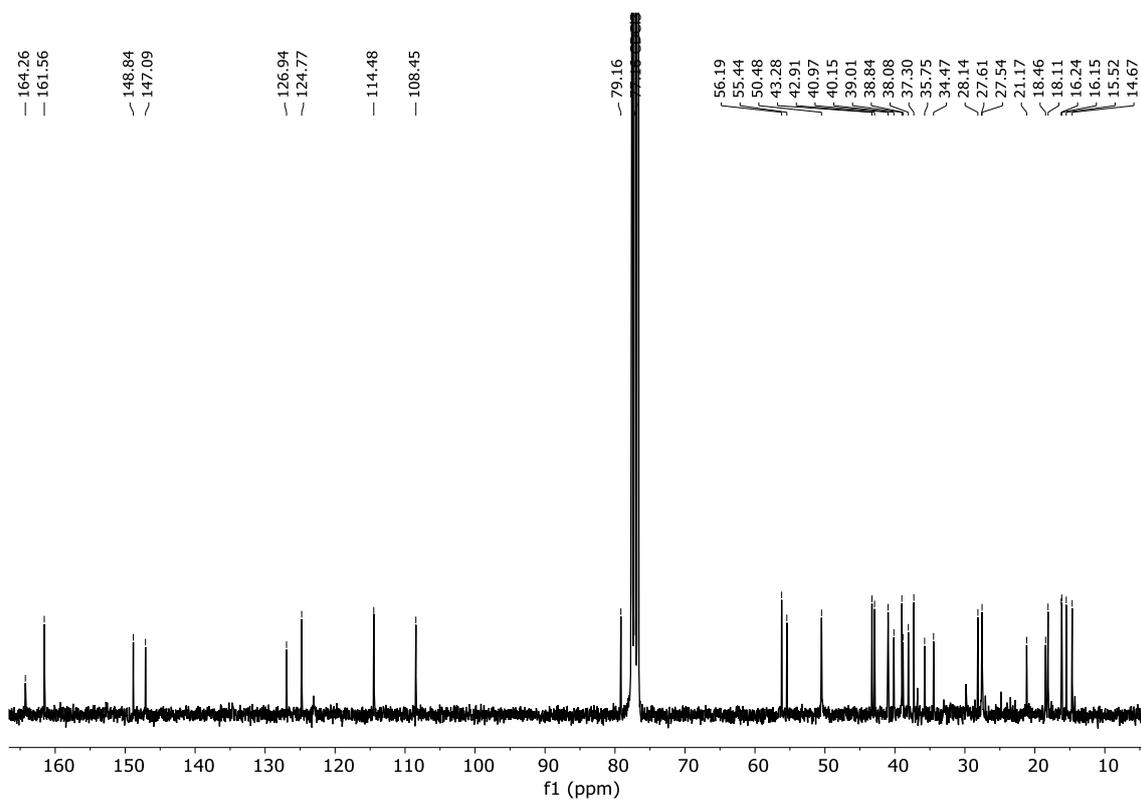
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15h** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15h** (CDCl_3)

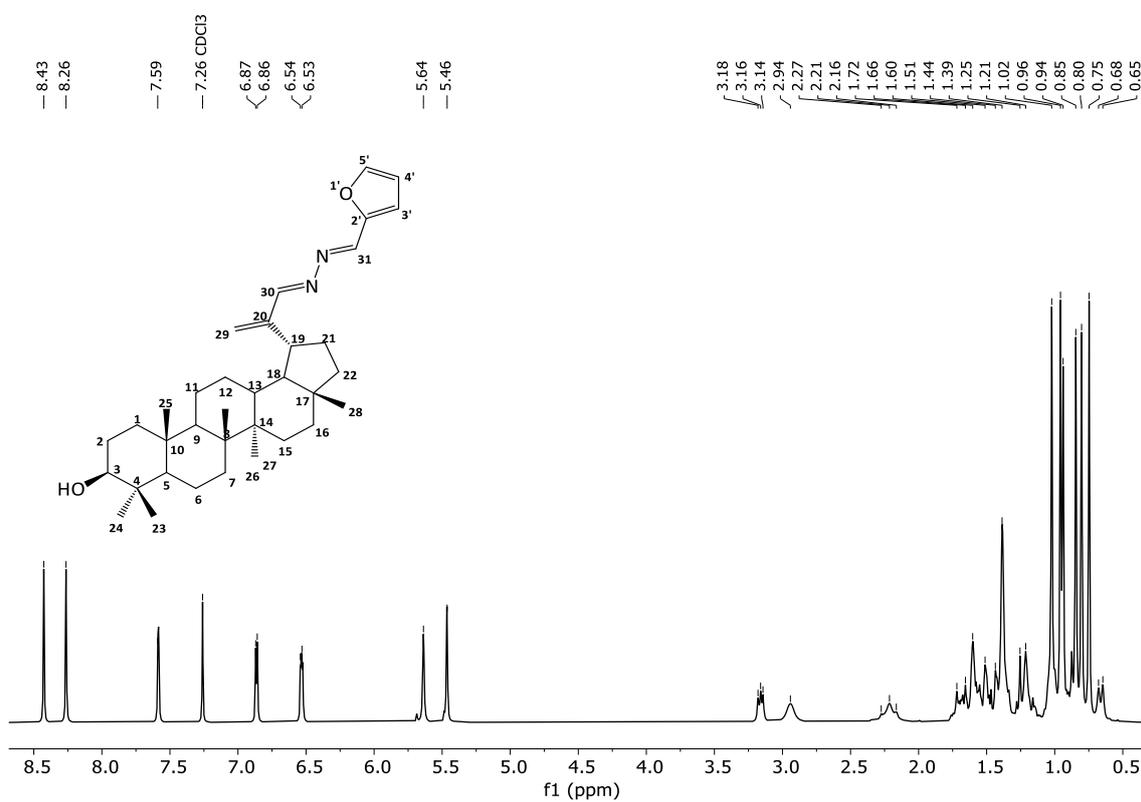
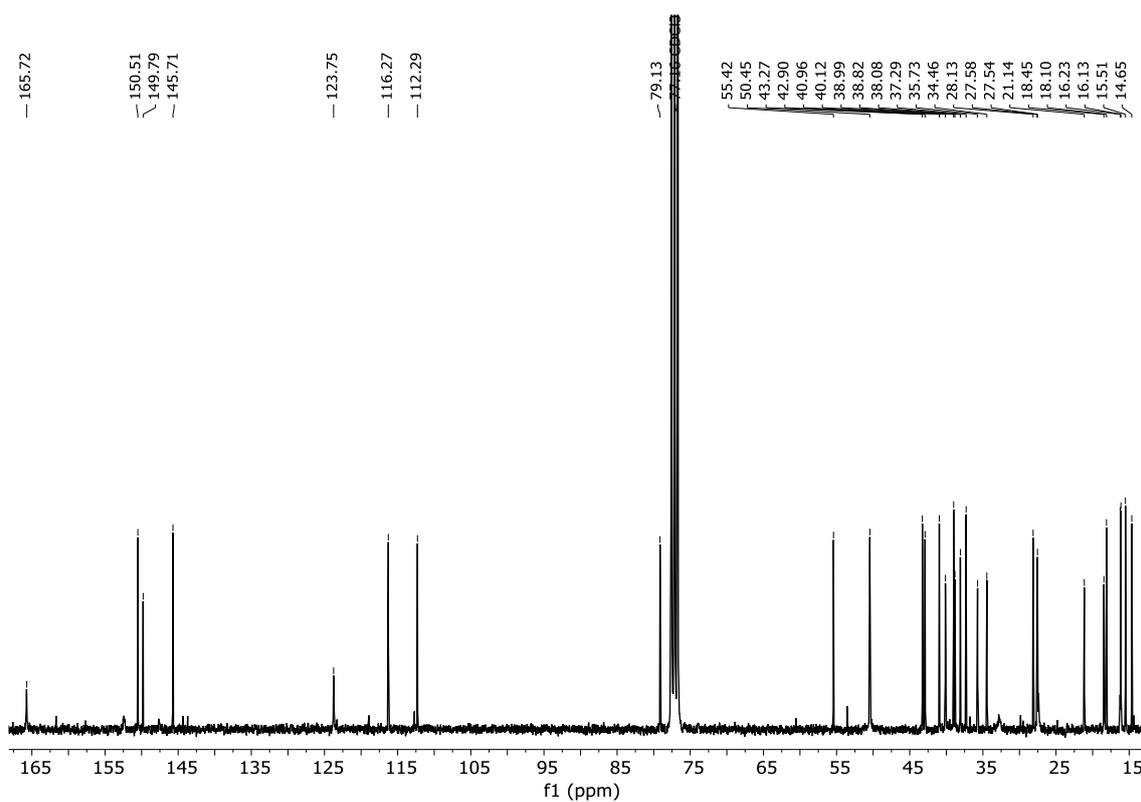
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15i** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15i** (CDCl_3)

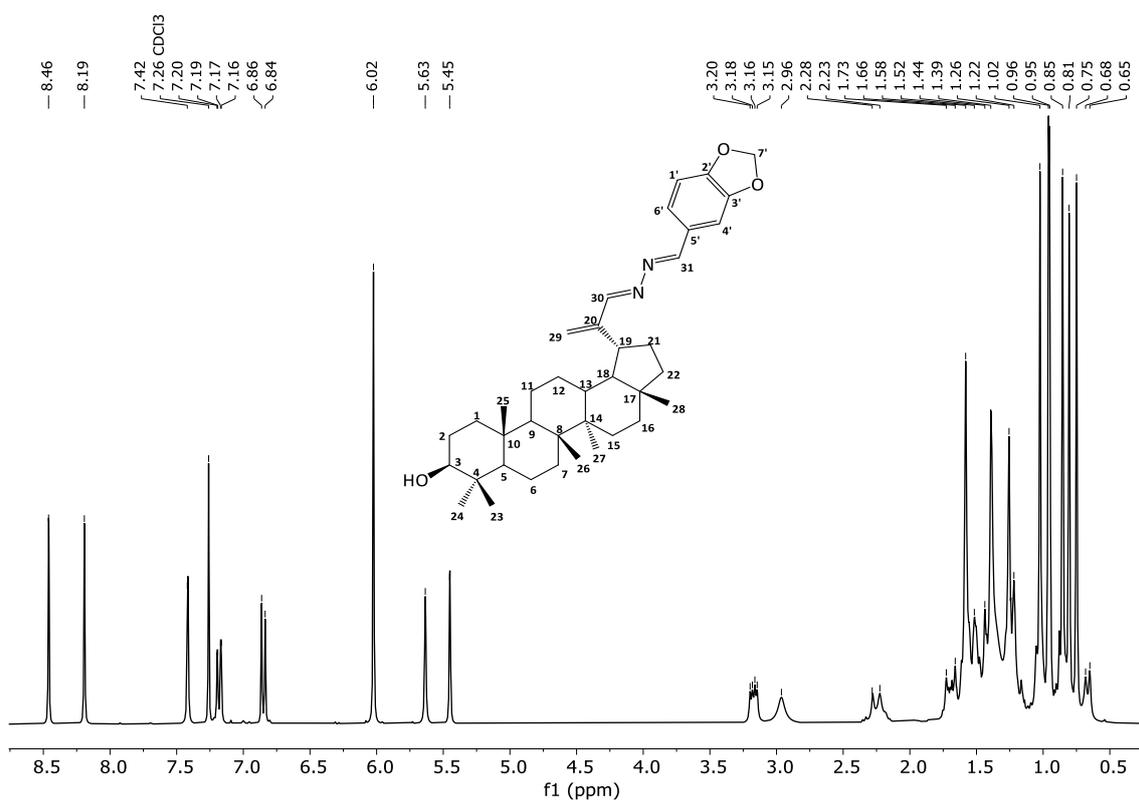
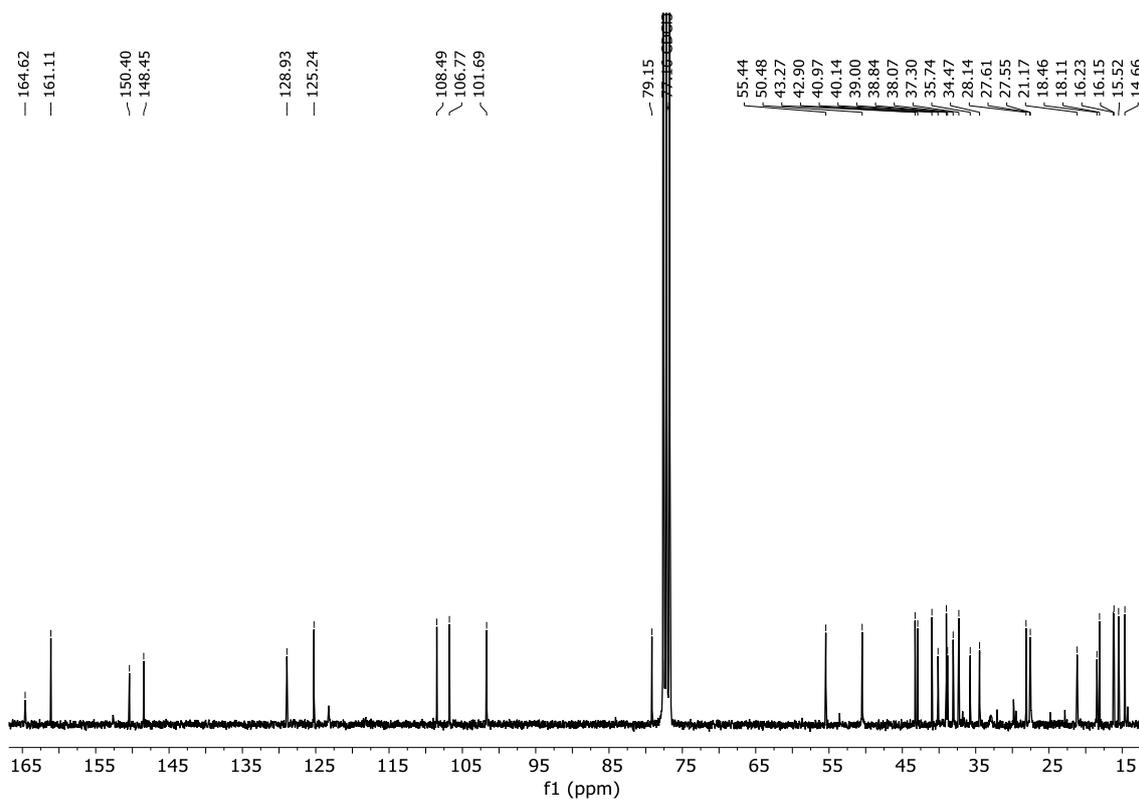
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15j** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15j** (CDCl_3)

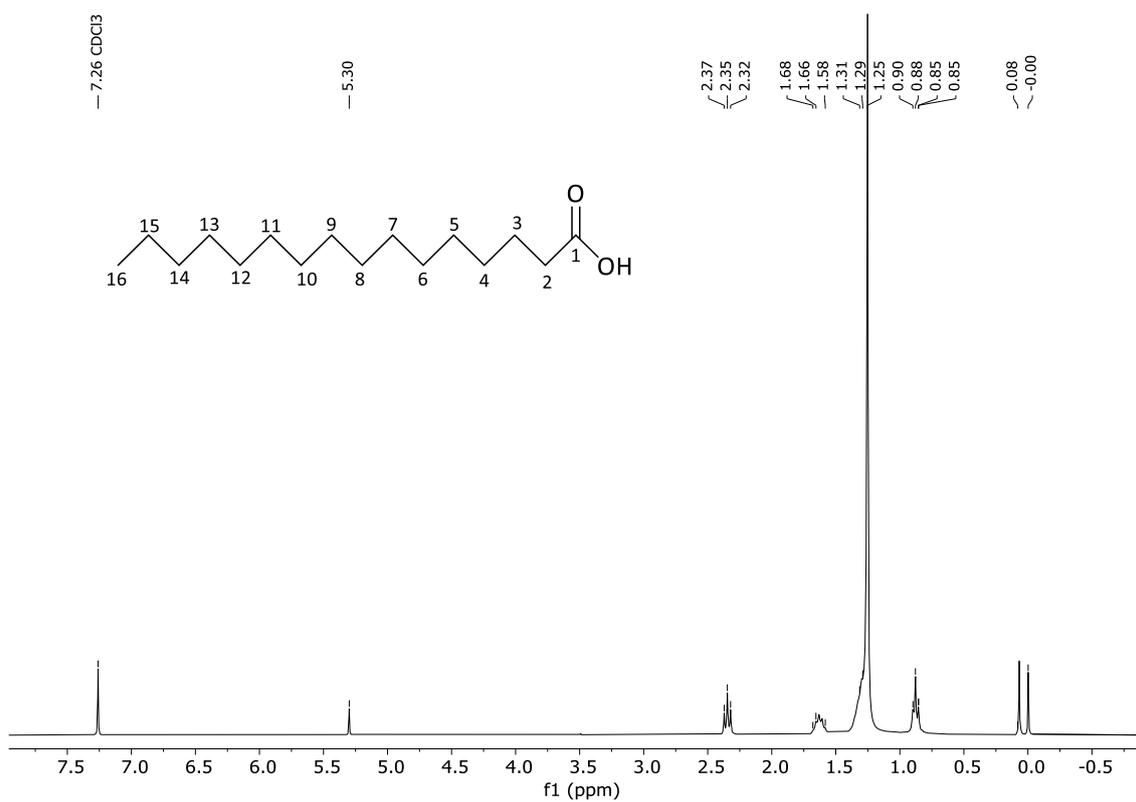
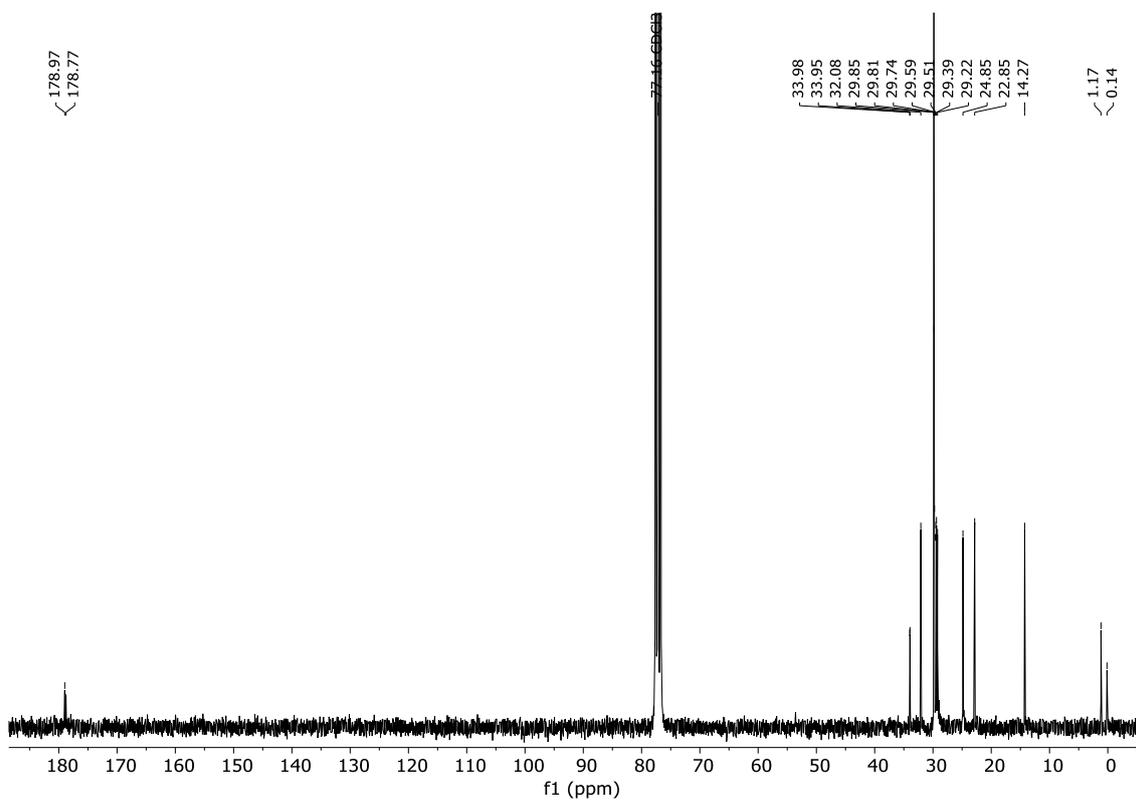
Espectro RMN de ^1H del compuesto **15k** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15k** (CDCl_3)

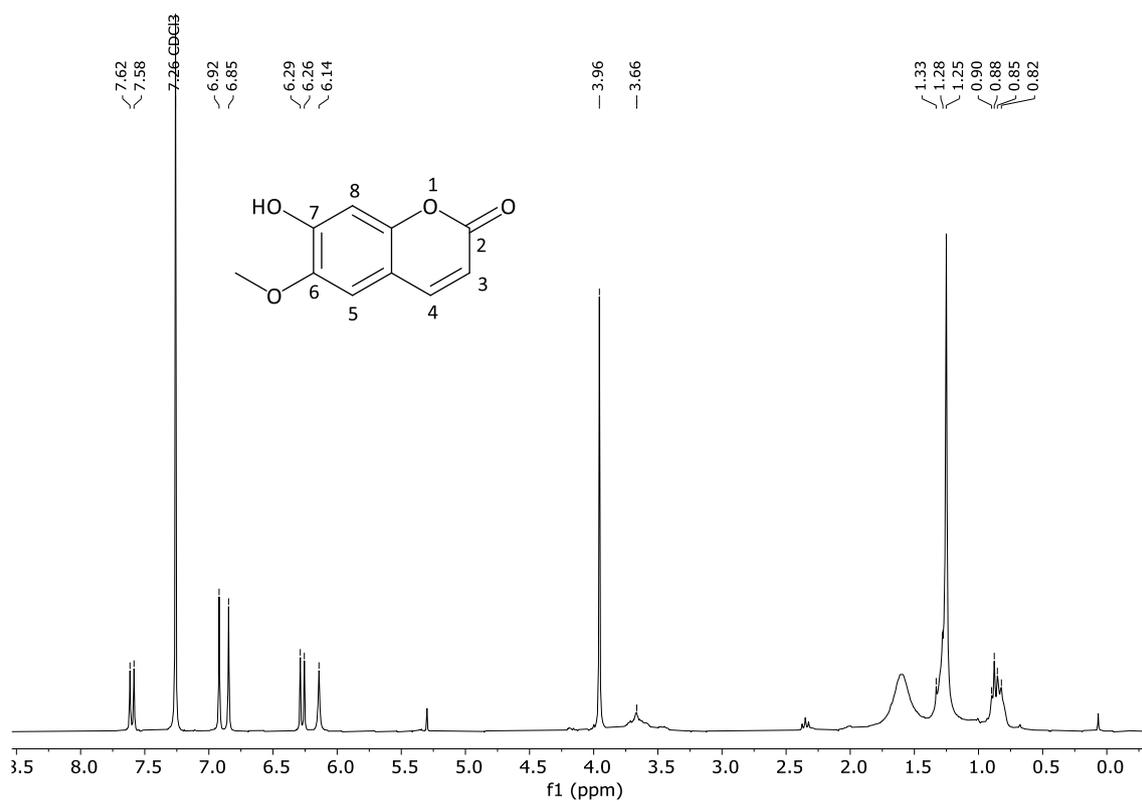
Espectro RMN de ^1H del compuesto 151 (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto 151 (CDCl_3)

Espectro RMN de ^1H del compuesto **15m** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15m** (CDCl_3)

Espectro RMN de ^1H del compuesto **15n** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15n** (CDCl_3)

Espectro RMN de ^1H del compuesto **15o** (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C del compuesto **15o** (CDCl_3)

Espectro RMN de ^1H de AP (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C de AP (CDCl_3)

Espectro RMN de ^1H de ESC (CDCl_3)Espectro RMN de ^{13}C de ESC (CDCl_3)