
Estudio fitoquímico de especies del noroeste argentino en busca de compuestos bioactivos



TESIS DOCTORAL

Sebastián Jorge Castro

**Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba**

2020

Documento maquetado con T_EX_S v.1.0.

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue financiado con becas de posgrado otorgadas por SECyT-UNC y CONICET, y realizado en el Grupo de Productos Orgánicos Naturales Bioactivos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba y en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET).

Directora

Dra. Viviana E. Nicotra

Comisión de Tesis

Dra. Ana N. Santiago
Dra. A. Mariel Agnese
Dr. Ramón Asís

Evaluador Externo

Dr. Ricardo L. E. Furlán

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

2020

*A Cecilia, mi dulce compañera de vida
Y a tí, lector carísimo.*

*“Dios me enseñó
cómo viven los animales,
tanto domésticos como salvajes.*

*Dios también me enseñó
los movimientos del viento;
me hizo conocer las distintas
clases de plantas y sus raíces.*

*Pero, sobre todo,
Dios me enseñó a conocer
el pensamiento de la gente.*

*Así aprendí a conocerlo todo,
tanto lo que se ve
como lo que no se ve.*

*La sabiduría,
que creó todo cuanto existe,
fue la que me regaló
ese conocimiento.”*

Libro de la Sabiduría

Agradecimientos

*Ser agradecido es reconocer
el amor de Dios
en todo lo que nos ha dado.
Y nos ha dado todo.*

Thomas Merton

Quisiera agradecer primero a Dios Padre por abrirme las puertas para concretar esta meta e impulsarme a desarrollar mis capacidades e inquietudes. También este trabajo no se hubiera podido realizar sin la participación de muchas personas que me brindaron su colaboración, sus conocimientos y su apoyo. Quisiera agradecerles a todos ellos, cuanto han hecho por mí, por haberme acompañado incondicionalmente hasta este momento tan importante de mi vida.

A SECyT-UNC y CONICET por las becas de posgrado y a la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme el espacio para realizar este trabajo y por la educación recibida.

A Mariel, Ana y Ramón por acompañarme en estos años, por alentarme a seguir adelante en cada encuentro y realizar muy buenos aportes a este trabajo. Gracias por tomarse el tiempo para leer este manuscrito y corregirlo. En especial quisiera agradecerle Ana por abrirnos las puertas de tu laboratorio cuando el nuestro fue remodelado.

Al Dr. Ricardo Furlán por aceptar ser evaluador externo de este trabajo de tesis doctoral y por tomarse el tiempo de leer este trabajo.

Quisiera agradecer muy especialmente a Viviana por haberme aceptado como su becario sin conocerme mucho. Siempre voy a recordar esa primera entrevista en el box del Doc. Estaba bastante nervioso! Me encontré con una persona muy humana y brillante que me abrió las puertas para empezar a trabajar. Gracias por tu acompañamiento, sobre todo en los primeros tiempos cuando todo era aprender de nuevo. Me ayudaste a tomar confianza en mi mismo y en mis capacidades. Gracias por tu amabilidad, paciencia y mucha confianza, lo que me permitió cometer mis errores, aprender y crecer. Todo lo que logré en estos 5 años son gracias a que me compartiste tus conocimientos sin reserva y me ayudaste en todo momento. Gracias también por las sugerencias de obras de teatro y de lugares para comer!

A Gloria Barboza por su imprescindible ayuda! No solo en la identificación y recolección del material vegetal, sino por invitarme a un viaje de campo del que tanto aprendí! Sos una persona muy talentosa y supiste transmitirme la pasión que le ponés a tu trabajo! Gracias por ayudarme a escribir las partes botánicas que se me complicaban en mis informes y trabajos. Gracias por tu empeño y dedicación todos estos años!

A Gloria Bonetto por los miles de espectros que realizaste y que, sin lugar a dudas, son parte fundamental de mi trabajo.

A Roberto Gil por ofrecer su tiempo para llevar a cabo mediciones de RDC en su laboratorio y enriquecer significativamente mi trabajo. A José Padrón por realizar las mediciones de actividad antiproliferativa y trabajar con nosotros a la distancia con suma profesionalidad. A Cinthia Stempin por sumarse al último pero con contribuciones sumamente significativas para medir la actividad tripanocida de mis compuestos.

Quiero agradecer también a los miembros del grupo de Productos Naturales. Gracias por hacer de este grupo un lugar muy agradable y divertido para trabajar. A lugares así siempre te dan ganas de ir y las horas se pasan volando. Quiero agradecer especialmente al "Doc", Juan Carlos, por brindarme sin reserva todos sus conocimientos! Gracias por ayudarme en cualquier cosa que necesitaba con gran generosidad! A Adriana por todo tu afecto, consejos y sugerencias; pero también por cocinarme cualquier capricho que se me antojaba (desde tiramisú hasta mollejas!!). Gracias por hacerme sentir tan cuidado! A Vero por darme una mano siempre que la necesitaba. A mis compañeros de laboratorio: Manu, Cari, Agus, Fede, Toni, Nati, Ro, Euge. Gracias por aguantarme todos los días y por ayudarme con mi trabajo. Todo lo que he crecido profesionalmente y todo lo que he aprendido ha sido gracias a uds. Gracias por tantos momentos juntos!!!

Je remercie également le Dr. Philippe Dauban de m'avoir permis d'effectuer un court séjour de recherche au sein de son équipe. Merci Philippe, vous avez fait part de bienveillance et de beaucoup de confiance, qui m'ont permis de faire mes erreurs, d'apprendre et de grandir. Mon travail s'est, sans aucun doute, enrichi de tout ce que j'ai pu faire pendant ce séjour. Merci aussi à Ben pour toutes vos suggestions pour mon travail. Merci également à Vincent, Ali, Alaric et Yanis! Merci de m'avoir fait sentir partie de votre groupe et de m'aider avec toutes les difficultés que j'ai eues. J'ai beaucoup appris de vous tous. Merci pour le déjeuner d'adieu, c'était un beau geste. Je vous souhaite de réussir dans tout ce que vous entreprenez!

A los miembros de la Comisión de Concientización y Ética Profesional (CEP), Naty, Coty, Tomás, Daniel, Lucía. Me gustó mucho compartir con uds este espacio en el que aprendí muchísimo y pude poner mi granito de arena en el desarrollo de nuestras actividades.

A todos los miembros del Departamento de Química Orgánica que de alguna manera u otra me ayudaron siempre para llevar a cabo mis experimentos. En especial gracias Lili por enseñarme a usar el HPLC con paciencia y dedicación. A los que me ayudaron

a tomar los espectros de UV (Hugo, Vir) y de IR (Marisa). Gracias a los compañeros de todos los días que me hicieron parte desde el comienzo Guido, Claudio, Diana, Noe, Tincho. Gracias a mis compañeros de docencia por su generosidad puesta a cada momento.

Gracias a mis padres por bancarme siempre en todos mis proyectos. Gracias por tenderme una mano en los comienzos de este trabajo que fue en medio de un cambio radical en mi vida. Sin su sostenimiento no hubiera podido comenzar lo que hoy llegó a su fin.

Gracias a mi comunidad en el Movimiento de la Palabra de Dios por ser sostén en medio de toda dificultad que atravesaba mi vida. Gracias por animarme cuando me cansaba y apoyarme con comprensión durante estos años.

Quiero agradecerte a vos amor de mi vida. Sos mi sol, sos mi vida. Esto lo logramos juntos! Gracias Ceci por bancarme tanto estos años... Gracias por estar ahí todos los días alentándome y entregando tu tiempo para que yo pudiera llegar a donde estoy hoy. Gracias por impulsarme a trabajar en Francia aunque la distancia fuese difícil. Gracias por bancarme especialmente en el año de escritura y perdón por los momentos en que estuve medio intenso... Gracias por hacerme un hombre feliz y confiado, listo para volar juntos hacia nuestros sueños! Gracias mi amor, te amo.

Gracias a los amigos que me ha dado la vida: Ale, Cristian, Agus, Fran, Lucas, Carlitos, JP, Jairo! Sale asado para festejar!

Y gracias a vos que estás leyendo esta tesis y que me olvidé de mencionarte sin querer... Muchas gracias por ser parte de esta hermosa etapa de mi vida!

Resumen

El presente trabajo de tesis doctoral abarca distintos aspectos de la química de productos naturales. Se trabajó con especies pertenecientes a dos grandes familias: Solanaceae y Asteraceae. Estas familias son importantes a nivel mundial por la gran diversidad de metabolitos secundarios que presentan y por la actividad biológica de los mismos. A su vez se seleccionaron especies endémicas o nativas del noroeste argentino; región biológicamente relevante por concentrar gran parte de la biodiversidad de nuestro país; como así también, región que se ve amenazada por la actividad antrópica corriendo el riesgo de perder especies previamente a que sean descritas por la ciencia. Luego, se llevó a cabo el estudio fitoquímico con el objetivo de aislar y caracterizar withanólidos (Solanaceae) y sesquiterpenos tipo eremofilano (Asteraceae). El estudio fitoquímico de especies pertenecientes a la Fam. Solanaceae permitió el aislamiento y la caracterización de 10 withanólidos, siendo 4 nuevos. Mientras que se aislaron y caracterizaron 16 sesquiterpenos a partir de *Senecio volckmannii* (Asteraceae), siendo 9 nuevos. En este último estudio resultó crucial la utilización de herramientas de elucidación estructural no convencionales tales como la medición de acoplamiento dipolar residual y la utilización de protocolos de cálculo como CASE-3D para la determinación de la estructura de una serie de sesquiterpenos para los que los parámetros convencionales de RMN resultaron insuficientes para arribar a una solución inequívoca.

Sobre un grupo de guaianólidos, lactonas sesquiterpénicas que se hallan en cantidad apreciable en especies del género *Stevia*, se llevaron a cabo reacciones de funcionalización de enlaces C(sp³)-H (aminación), con el objetivo de aumentar la diversidad estructural y evaluar cómo repercuten las modificaciones estructurales de dichos metabolitos en la actividad biológica ensayada. Se lograron aminorar posiciones terciarias, secundarias y alílicas del esqueleto guaianólido, así como también se obtuvo la formación de aziridinas sobre el doble enlace exocíclico de estos compuestos, obteniéndose un total de 9 compuestos nuevos. Éste, es el primer estudio que muestra que es posible aminorar enlaces C(sp³)-H de guaianólidos accediendo a nuevas regiones dentro del espacio químico biológicamente relevante.

En todos los casos se evaluó la actividad biológica de los compuestos aislados y de los derivados obtenidos teniendo en cuenta sus antecedentes. Se probó la actividad antiproliferativa sobre líneas celulares tumorales tanto de los withanólidos aislados como de los sesquiterpenos encontrados. Un grupo de withanólidos demostraron ser muy potentes y selectivos hacia las líneas ensayadas. Los resultados obtenidos permitieron plantear relaciones estructura-actividad que serán útiles a la hora de sintetizar nuevos derivados más efectivos o menos tóxicos. Por otra parte, se ensayó la actividad antipro-

liferativa y tripanocida para guianólidos naturales y sus respectivos derivados. Estos ensayos permitieron acceder a nuevos compuestos con propiedades biológicas mejoradas y con selectividad hacia células tumorales, así como también, hacia tripomastigotes de *T. cruzi*.

El trabajo presentado cobra relevancia ya que extiende los propios resultados a investigaciones de otras áreas tales como la botánica, espectroscopía, síntesis y química biológica, conduciendo a una participación interdisciplinaria e integrada de todas las partes involucradas.

Abstract

The search for small bioactive molecules and molecular diversity are constant sources of inspiration for organic chemists. The present work covers different aspects of the chemistry of natural products. We worked with species belonging to two large families: Solanaceae and Asteraceae. These families are important worldwide because of the great diversity of secondary metabolites they present and their biological activity. In turn, endemic or native species of northwestern Argentina were selected; biologically relevant region for concentrating much of the biodiversity of our country; as well as, region that is threatened by anthropic activity running the risk of losing species before they are described by science. Then, the phytochemical study was carried out to isolate and characterize withanolides (Solanaceae) and eremophilane sesquiterpenes (Asteraceae). The phytochemical study of species belonging to the Solanaceae family allowed the isolation and characterization of 10 withanolides, with 4 being new. While 16 sesquiterpenes were isolated and characterized from *Senecio volckmannii* (Asteraceae), 9 being new. In the latter study, the use of unconventional structural elucidation tools such as the measurement of residual dipolar couplings and the use of protocols such as CASE-3D for determining the structure of a series of sesquiterpenes for which the conventional NMR parameters were insufficient to arrive at an unequivocal solution.

On a group of guaianolides, sesquiterpene lactones that have been isolated in appreciable quantity in species of the genus *Stevia*, functionalization reactions of C(sp³)-H bonds were carried out to increase structural diversity and assess how structural modification of said metabolites affect the biological activity tested. Tertiary, secondary and allylic positions of the guaianolide scaffold were achieved, as well as the formation of aziridines on the exocyclic double bond of these compounds, obtaining a total of 9 new compounds. This is the first study that shows that it is possible to aminate C(sp³)-H bonds of guaianolides by accessing new regions within the biologically relevant chemical space.

In all cases, the biological activity of the isolated compounds and the derivatives obtained was evaluated taking into account their background. The antiproliferative activity on tumor cell lines of both isolated withanolides and sesquiterpenes found was tested. A group of withanolides proved to be very potent and selective towards the cell lines tested. The results obtained allowed us to propose structure-activity relationships that will be useful when synthesizing new more effective or less toxic derivatives. On the other hand, the antiproliferative and trypanocidal activity were tested for natural guaianolides and their derivatives. These assays allowed access to new compounds with improved biological properties and selectivity towards tumor cell lines, as well as to-

wards *T. cruzi* trypomastigotes.

The work presented becomes relevant since extending the results to research in other areas such as botany, spectroscopy, synthesis, and biological chemistry, leading to interdisciplinary and integrated participation of all parties involved.

Índice

Agradecimientos	IX
Resumen	XIII
Abstract	XV
1. Introducción	1
1.1. Productos Naturales	1
1.2. Desarrollo de medicamentos a partir de productos naturales	4
1.2.1. Síntesis basada en productos naturales	5
1.2.2. Síntesis combinatoria inspirada en productos naturales	9
1.3. Biodiversidad del noroeste argentino	11
1.4. Objetivos	13
1.4.1. Objetivos generales	13
1.4.2. Obejtivos específicos	13
I Familia Solanaceae	15
2. Familia Solanaceae: Introducción	17
2.1. Generalidades	17
2.2. Descripción breve de la familia	18
2.3. Clasificación y taxonomía	18
2.4. Fitoquímica de las Solanáceas	19
2.4.1. Withanólidos	20
2.4.2. Biosíntesis	25
2.4.3. Síntesis y derivatización de withanólidos	27
2.4.4. Actividad Biológica de los Withanólidos	28
3. Estudio fitoquímico de <i>Eriolarynx iochromoides</i> (Hunz.) Hunz. y <i>Jaborosa oxipetala</i> Speg. (Solanaceae)	31
3.1. El género <i>Eriolarynx</i>	31
3.1.1. Química del género <i>Eriolarynx</i>	31
3.1.2. Consideraciones quimiotaxonómicas	34

3.2. Estudio fitoquímico de <i>Eriolarynx iochromoides</i>	36
3.2.1. Resultados y Discusión	36
3.2.2. Parte experimental	47
3.2.3. Datos físicos y espectroscópicos de los compuestos nuevos aislados de <i>E. iochromoides</i>	49
3.3. El género <i>Jaborosa</i> Juss.	53
3.3.1. Química del género <i>Jaborosa</i>	55
3.3.2. Consideraciones Quimiotaxonómicas	55
3.4. Estudio fitoquímico de <i>Jaborosa oxipetala</i>	57
3.4.1. Resultados y Discusión	57
3.4.2. Parte Experimental	60
Parte I: Conclusiones parciales	61
II Familia Asteraceae	63
4. Familia Asteraceae: Introducción	65
4.1. Generalidades	65
4.2. Fitoquímica de la Familia Asteraceae	66
4.2.1. Sesquiterpenos	68
4.2.2. Lactonas sesquiterpénicas	70
5. Estudio Fitoquímico de <i>Senecio volckmannii</i> Phil.	73
5.1. El género <i>Senecio</i> L.	73
5.1.1. Usos medicinales y actividad biológica	73
5.1.2. Química del género <i>Senecio</i>	74
5.2. <i>Senecio volckmannii</i> Phil.	77
5.2.1. Antecedentes de estudios fitoquímicos	77
5.3. Resultados y Discusión	78
5.4. Parte Experimental	97
5.4.1. Material Vegetal	97
5.4.2. Extracción y purificación de metabolitos de interés	97
5.4.3. Datos físicos y espectroscópicos de los compuestos aislados	99
6. Elucidación estructural de sesquiterpenos asistida por computadora combinando parámetros de RMN isotrópicos y anisotrópicos	109
6.1. Acoplamiento Dipolar Residual	109
6.1.1. Introducción	109
6.1.2. El Acoplamiento Dipolar	110
6.1.3. Medios de alineamiento	112
6.1.4. Midiendo RDCs	115
6.1.5. Análisis de los datos	120
6.2. Elucidación estructural asistida por computadoras (CASE)	123

6.3. Estrategia y Objetivos	125
6.4. Resultados y Discusión	125
6.5. Parte Experimental	135
6.5.1. Procedimientos Generales	135
6.5.2. Procedimientos Computacionales	135
7. Derivatización de guaianólidos: funcionalización de enlaces C–H	137
7.1. Introducción	137
7.2. Aminación catalítica de enlaces C(sp ³)–H y aziridinación	138
7.2.1. Química de los nitrenos	139
7.2.2. Aplicaciones en la derivatización de productos naturales	142
7.3. Estrategia y Objetivos	148
7.4. Resultados y Discusión	151
7.4.1. Reacciones de aminación de ludartina	151
7.4.2. Reacciones de aminación de achalensólido	155
7.4.3. Reacciones de aminación de 11,13-dehidroachalensólido	158
7.5. Parte Experimental	160
7.5.1. Sustratos naturales	160
7.5.2. Procedimientos Generales	160
7.5.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos obtenidos	161
Parte II: Conclusiones parciales	171
III Actividad biológica de metabolitos secundarios y derivados	173
8. Actividad antiproliferativa	175
8.1. Introducción	175
8.2. Productos naturales con actividad citotóxica	177
8.3. Antecedentes	178
8.3.1. Actividad antiproliferativa de withanólidos	178
8.3.2. Actividad antiproliferativa de sesquiterpenos tipo eremofilano	181
8.3.3. Actividad antiproliferativa de lactonas sesquiterpénicas	182
8.4. Resultados y Discusión	184
8.4.1. Withanólidos	185
8.4.2. Sesquiterpenos tipo eremofilano	190
8.4.3. Lactonas sesquiterpénicas: Guaianólidos	192
8.5. Parte Experimental	196
8.5.1. Ensayos de actividad antiproliferativa	196
9. Actividad tripanocida	199
9.1. Introducción	199
9.2. Productos naturales con actividad tripanocida	203

9.2.1. Actividad tripanocida de lactonas sesquiterpénicas	204
9.3. Resultados y Discusión	206
9.4. Parte Experimental	209
9.4.1. Parásitos	209
9.4.2. Ensayos para evaluar <i>in vitro</i> la actividad antiprotozoaria	209
9.4.3. Análisis estadístico	209
Parte III: Conclusiones parciales	211
10. Conclusiones Generales y Proyecciones	213
10.1. Conclusiones generales	213
10.1.1. Fitoquímica	213
10.1.2. Biosíntesis	217
10.1.3. Quimiotaxonomía	218
10.1.4. Espectroscopía	220
10.1.5. Derivatización	220
10.1.6. Biología	220
10.2. Proyecciones	223
11. Materiales y Métodos	225
11.1. Procesamiento del material vegetal	225
11.1.1. Recolección de muestras vegetales	225
11.2. Solventes y Reactivos	225
11.3. Instrumental	225
11.3.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	225
11.3.2. Espectroscopía Infrarroja	226
11.3.3. Espectroscopia Ultravioleta	226
11.3.4. Rotación Óptica	226
11.3.5. Espectrometría de masas	226
11.4. Técnicas Cromatográficas	227
A. Producción Científica	229
A.1. Artículos publicados en revistas indexadas	229
A.2. Resúmenes publicados en Eventos Científicos	229
Bibliografía	231
Lista de acrónimos	266

Índice de figuras

1.1. Fuentes de moléculas aprobadas como fármacos por la FDA	3
1.2. Proceso en el desarrollo de un fármaco	5
1.3. Ejemplos de compuestos bioactivos obtenidos a partir de productos naturales por semisíntesis	6
1.4. Síntesis total divergente (DTS)	8
1.5. Simplificación estructural de la halicondrina B.	8
1.6. Estructura representativa de un withanólido (Withaferina A) y el esqueleto común propuesto para la síntesis de nuevos compuestos bioactivos. .	10
1.7. Síntesis orientada a la diversidad	11
2.1. Filogenia de las Solanáceas.	19
2.2. Ejemplos de alcaloides de la Fam. Solanaceae	20
2.3. Esqueleto withanólido y withaferina A	21
2.4. Estructuras generales de los withanólidos con una δ -lactona o un δ -lactol en la cadena lateral.	22
2.5. Estructuras generales de los withanólidos con una γ -lactona en la cadena lateral.	23
2.6. Posibles precursores biogénéticos de withanólidos	25
2.7. Descripción general de las reacciones catalizadas por DWF1/SSR1, SSR2 y 24ISO y el rol propuesto de 24ISO en la biosíntesis de withanólidos . .	26
2.8. Génesis de la funcionalización en los anillos A y B	27
3.1. Especies pertenecientes al género <i>Eriolarynx</i>	32
3.2. Compuestos aislados de <i>Eriolarynx lorentzii</i>	33
3.3. Withanólidos como marcadores quimiotaxonómicos.	35
3.4. Compuestos aislados de <i>Eriolarynx iochromoides</i>	36
3.5. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 1 (CDCl ₃ ; 400,03 MHz)	37
3.6. NOE relevantes para el compuesto 1	38
3.7. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 2 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	40
3.8. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 3 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	41
3.9. Espectro HMBC para el compuesto 4	43
3.10. NOE relevante para el compuesto 4	44
3.11. Espectro HMBC para el compuesto 5	44

3.12. NOE relevante para el compuesto 5	45
3.13. Especies pertenecientes al género <i>Jaborosa</i>	54
3.14. Esqueletos de withanólidos aislados en especies de <i>Jaborosa</i>	56
3.15. Compuestos aislados de <i>Jaborosa oxipetala</i>	58
3.16. Propuesta biosintética que vincula los compuestos 7 y 10 aislados de <i>Jaborosa oxipetala</i>	59
4.1. Ejemplos de especies pertenecientes a la Fam. Asteraceae	66
4.2. Ejemplos de las nueve mayores clases de metabolitos secundarios encontrados en especies de Asteraceae	67
4.3. Biosíntesis de farnesil difosfato, precursor de los sesquiterpenos.	69
4.4. El esqueleto tipo eremofilano desafiando la regla del isopreno	70
4.5. Esqueleto básico de un sesquiterpeno tipo eremofilano	70
4.6. Principales tipos de esqueletos de lactonas sesquiterpénicas en Asteraceae.	71
4.7. Ruta biosintética propuesta para las lactonas sesquiterpénicas.	72
5.1. Especies pertenecientes al género <i>Senecio</i>	74
5.2. Esqueletos de los tipos de sesquiterpenos encontrados en mayor proporción en <i>Senecio</i>	75
5.3. Esqueletos de las lactonas sesquiterpénicas y los furanoeremofilanólidos con frecuencia encontrados en el género <i>Senecio</i>	75
5.4. Ejemplos de alcaloides pirrolizidínicos encontrados en especies del género <i>Senecio</i>	76
5.5. <i>Senecio volckmannii</i> var. <i>volckmannii</i>	77
5.6. Compuestos aislados de <i>Senecio rosmarinus</i>	77
5.7. Compuestos aislados de <i>Senecio volckmannii</i>	78
5.8. Estructuras de mínima energía para el compuesto 12 (<i>cis</i> -decalina) y su epímero en C-10 (<i>trans</i> -decalina).	79
5.9. Espectro RMN- ¹ H del compuesto 12 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	80
5.10. Espectro COSY del compuesto 12 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	80
5.11. Espectro HMBC del compuesto 13 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	83
5.12. Espectro COSY del compuesto 13 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	84
5.13. NOE relevantes para compuesto 13 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	85
5.14. Espectro HMBC del compuesto 15 en mezcla con el compuesto 27 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	87
5.15. NOE relevantes para el compuesto 15 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	88
5.16. Espectro HMBC de la mezcla del compuesto 17 con el compuesto 18 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	90
5.17. NOE relevantes para el compuesto 17 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	91
5.18. Espectro HMBC de la mezcla del compuesto 19 con el compuesto 20 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	93
5.19. NOE relevantes para el compuesto 19 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	94
5.20. NOE relevantes para el compuesto 20 (CDCl ₃ ; 400,13 MHz)	95

6.1.	Representación de la interacción directa entre dos spines i y j que conduce a una división de la señal conocida como Acoplamiento Dipolar.	111
6.2.	Representación de moléculas pequeñas (bastones azules) en solución isotrópica (izquierda) y en presencia de una fase LLC de polímeros helicoidales (derecha)	112
6.3.	Representación de moléculas pequeñas (bastones azules) en solución isotrópica dentro de cavidades de un gel hinchado sin comprimir (arriba) y en condiciones anisotrópicas cuando el gel se comprime (abajo a la izquierda) o se estira (abajo a la derecha).	113
6.4.	Fotografía del fragmento de gel de PS entrecruzado en diferentes estados de hinchazón.	115
6.5.	Ilustración del ordenamiento molecular en la superficie del gel de PMMA.	116
6.6.	Representación gráfica de la superposición de los experimentos HSCQ-CLIP acoplado en F2 en condiciones isotrópicas y anisotrópicas para grupos CH ₃ , CH ₂ y CH.	117
6.7.	Representación gráfica de la superposición de los experimentos ¹ H, ¹³ C-HSQC BIRD escalados en J acoplados en F1 en condiciones isotrópicas (azul) y anisotrópicas (rojo) para grupos CH ₃ , CH ₂ y CH.	118
6.8.	Superposición de espectros de HSQC-CLIP, HSQC-JSB y HSQC-JSB-PS en condiciones isotrópicas y anisotrópicas. Se observan las diferencias en exactitud y precisión para cada espectro a la hora de extraer RDCs.	119
6.9.	Representación esquemática del método de ajuste SVD (<i>singular value decomposition</i>).	121
6.10.	Determinación de la configuración relativa de la estricnina utilizando la constitución molecular y sólo RDCs.	122
6.11.	Compuestos aislados de <i>Senecio volckmannii</i> . Se remarcan los compuestos elucidados utilizando RDCs y CASE-3D.	126
6.12.	Multiplicidad de la señal de RMN- ¹ H de H-4 del compuesto 14 obtenida mediante el <i>plug-in</i> de simulación de espín de MNova utilizando las constantes ³ J _{HH} experimentales extraídas como se describe en el texto. La señal es un dqd de 11,6; 6,6 y 4,1 Hz, respectivamente. Experimental en azul y simulado en rojo.	127
6.13.	A) Pico de cruce H-4/CH ₃ -14 para los compuestos 14 y 24 en el espectro DQF-PH-COSY de la mezcla (las diferentes intensidades se deben a la diferencia de concentración); B) Proyección en F2 del pico de cruce H-4/CH ₃ -14 en el espectro DQF-PH-COSY de la mezcla (14 , mayoritario en rojo; 24 en azul, minoritario); C) Ampliación del pico de cruce H-4/CH ₃ -14 de los isómeros 14 (arriba, 1,76/0,99 ppm) y 24 (abajo, 1,57/0,94 ppm) en la mezcla.	128
6.14.	Posibles diastereómeros para los compuestos 14 y 24	129
6.15.	Confórmeros de menor energía para los isómeros 14 y 24	131
7.1.	Diferentes estrategias para instalar una función amina	139
7.2.	Reordenamiento de Lossen	140

7.3. Estados energéticos de un nitreno.	140
7.4. Primeros desarrollos en reacciones de inserción de nitrenos catalizadas por metales en presencia de iminoiodinanos.	141
7.5. Mecanismo general de las reacciones de aminación de enlaces C–H y aziridinación por inserción de nitrenos.	144
7.6. Primeros desarrollos en la inserción de nitrenos catalizado por metales utilizando iminoiodinanos generados <i>in situ</i>	144
7.7. Aminación intermolecular diastereoselectiva catalizada con un complejo de rodio quiral.	145
7.8. Competencia entre aziridinación y aminación de enlaces C–H de sustratos que contienen dobles enlaces.	145
7.9. Quimioselectividad de la inserción de nitrenos modulada por la naturaleza del complejo metálico	145
7.10. Reacciones de aminación sobre productos naturales	146
7.11. Reacción de aminación de esclareólido.	146
7.12. Algunos ejemplos de reacciones de aminación de enlaces C–H catalizada con Rh(II) de diferentes diterpenos con esqueleto tipo abietano.	147
7.13. Especies de <i>Stevia</i> y sus correspondientes metabolitos secundarios mayoritarios.	149
7.14. Condiciones de reacción empleadas en este trabajo.	150
7.15. Productos obtenidos por aminación de L	152
7.16. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 29 (CDCl ₃ ; 500 MHz)	153
7.17. Espectro de correlación C-H a largo alcance (HMBC) del compuesto 29 (CDCl ₃ ; 300 MHz)	153
7.18. NOE relevante para el compuesto 29 utilizado para establecer la configuración de C-2.	154
7.19. NOE relevantes para establecer la orientación de la aziridina en el compuesto 31	154
7.20. Aminación catalítica intermolecular de L con sulfonimidamina	155
7.21. Espectro de correlación a largo alcance HMBC para el compuesto 33 (CDCl ₃ , 300 MHz)	156
7.22. Productos obtenidos por aminación de Ach	157
7.23. Aminación catalítica intermolecular de achalensólido con sulfonimidamina	158
7.24. Productos obtenidos por aminación de DHAch	158
8.1. Productos naturales aislados de plantas superiores con actividad anticancerígena	179
8.2. Ejemplos de withánolidos que presentan actividad antiproliferativa	180
8.3. Relaciones estructura-actividad sobre actividad antiproliferativa en withánolidos.	181
8.4. Algunos ejemplos de sesquiterpenos tipo eremofilano con actividad anticancerígena	182
8.5. Mecanismo de reacción para la adición de Michael de un grupo sulfidrilo sobre una α -metileno- γ -lactona	183

8.6. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad antiproliferativa . . .	184
8.7. Compuestos aislados de <i>Eriolarynx iochromoides</i>	188
8.8. Compuestos aislados de diferentes especies del género <i>Deprea</i>	189
8.9. Compuestos aislados de <i>Senecio volckmannii</i> evaluados para actividad antiproliferativa	190
8.10. Guaianólidos naturales y sus derivados	193
9.1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	201
9.2. Drogas actualmente en uso para el tratamiento de la enfermedad de Chagas	203
9.3. Lactonas sesquiterpénicas de diversos esqueletos con actividad tripanocida.	205
9.4. Actividad tripanocida de guaianólidos naturales: ludartina (L), achalensólido (Ach) y 11,13-dehidroachalensólido (DHAch). Test estadístico ANOVA de dos vías comparado contra DMSO ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$	207
9.5. Actividad tripanocida de Ludartina (L) y sus derivados. Test estadístico ANOVA de dos vías comparado con DMSO *** $p < 0,0005$. #N.d.: No determinado.	208
9.6. Estructura química de los compuestos ensayados frente a tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	208
10.1. Compuestos aislados de <i>Eriolarynx iochromoides</i>	214
10.2. Compuestos aislados de <i>Jaborosa oxipetala</i>	215
10.3. Compuestos aislados de <i>Senecio volckmannii</i>	216
10.4. Propuesta biosintética para los núcleos encontrados en <i>E. iochromoides</i> . .	217
10.5. Propuestas biosintéticas para los núcleos aislados de <i>J. oxipetala</i>	218
10.6. Propuestas biosintéticas para los sesquiterpeneos aislados de <i>S. volckmannii</i> .	219
10.7. Derivados obtenidos por aminación de los guaianólidos L, Ach y DHAch	221

Índice de Tablas

2.1. Géneros de la subfamilia Solanoideae que contienen withanólidos	24
3.1. Desplazamientos químicos en RMN- ¹ H en para los compuestos 1 y 2 (CDCl ₃ , 400,13 MHz).	39
3.2. Desplazamientos químicos en RMN- ¹ H para los compuestos 3 – 5 (CDCl ₃ , 400,13 MHz)	42
3.3. Desplazamientos químicos en RMN- ¹³ C para los compuestos 1 – 5 (CDCl ₃ , 100,03 MHz)	46
5.1. Desplazamientos químicos en RMN- ¹ H para los compuestos 12 – 15 (CDCl ₃ , 400,13 MHz)	81
5.2. Desplazamientos químicos en RMN- ¹³ C para los compuestos 12 – 20 (CDCl ₃ , 100,03 MHz)	81
5.3. Desplazamientos químicos en RMN- ¹ H para los compuestos 16 – 20 (CDCl ₃ , 400,13 MHz)	82
6.1. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 14	129
6.2. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 24	130
6.3. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 15	132
6.4. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 17	132
6.5. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 18	133
6.6. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 19	133
6.7. Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto 20	134
8.1. Actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de los compuestos 1 – 5 y D1 – D8 frente a líneas celulares tumorales humanas y una línea de fibroblasto humano	187
8.2. Actividad antiproliferativa (IC ₅₀) de 1 , 4 , 5 y D7 y controles positivos frente a las líneas celulares SW1573 y SW1573/Pgp	188
8.3. Actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> para los sesquiterpenos 12 , 22 y 23 frente a líneas tumorales humanas	191
8.4. Actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de los compuestos 29 – 37 frente a líneas celulares tumorales humanas y una línea de fibroblasto humano	194
8.5. Actividad antiproliferativa (IC ₅₀) de 29 , 30 y Ach ; y controles positivos frente a las líneas celulares SW1573 y SW1573/Pgp	195

Capítulo 1

Introducción

*“Junto al río, en su orilla...
crecerán toda clase de árboles...
sus frutos serán para comer
y sus hojas para sanar.”*

Ezequiel 47, 12 (LBLA, siglo VI a. C.)

1.1. Productos Naturales

El metabolismo primario de todos los organismos vivos consiste en la biosíntesis y descomposición de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Estos compuestos esenciales para la vida se los conoce como metabolitos primarios (Dewick, 2002). Por otra parte, el mecanismo por el cual un organismo biosintetiza compuestos denominados metabolitos secundarios o productos naturales, a menudo se encuentra que es exclusivo de un organismo o es una expresión de la individualidad de una especie y se conoce como “metabolismo secundario” (Dewick, 2002; Maplestone et al., 1992). Los metabolitos secundarios generalmente no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de un organismo y se producen para actuar como posible mecanismo de defensa contra los depredadores ayudando a la supervivencia de la especie. La biosíntesis de los productos naturales se deriva de los procesos fundamentales de la fotosíntesis, la glucólisis y el ciclo de Krebs (Dewick, 2002). Se puede constatar que aunque el número de bloques de construcción es limitado, la formación de nuevos metabolitos secundarios es infinita. Los bloques de construcción más importantes empleados en la biosíntesis de metabolitos secundarios son los derivados de los intermediarios: acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido shikímico, ácido mevalónico y 1-deoxixilulosa-5-fosfato. Están involucrados en innumerables vías biosintéticas, que involucran numerosos mecanismos y reacciones diferentes (por ejemplo, alquilación, descarboxilación, aldol, formación de bases de Schiff) (Dewick, 2002). Además de su función fisiológica en las plantas, los productos naturales también han tenido un fuerte impacto en la cultura humana, habiendo sido utilizados a lo largo de la historia como condimentos, pigmentos y medicamentos (Bernardini et al., 2018).

Los compuestos naturales presentan una enorme variabilidad estructural. En este

sentido, se les han colocado diversos adjetivos tales como: “estructuralmente diversos”, “*drug-like*”, “estructuras privilegiadas”, “estructuras validadas biológicamente”: términos que se utilizan para describirlos y resaltar sus propiedades estructurales únicas (Morrison y Hergenrother, 2014a; Newman y Cragg, 2012; Grabowski et al., 2008; Tajabadi et al., 2013). Estudios computacionales han demostrado que los productos naturales ocupan áreas más extensas y complementarias del espacio químico en comparación con los compuestos sintéticos, y típicamente poseen un mayor número de centros estereogénicos, diferentes proporciones de heteroátomos y esqueletos cíclicos más diversos (Grabowski et al., 2008; Maier, 2015). La diversidad química que los caracteriza, es el resultado de millones de años de evolución, que han modificado las rutas biosintéticas en respuesta a diversas tensiones bióticas y abióticas causadas por eventos naturales (por ejemplo, virus y cambios ambientales) o no naturales (por ejemplo, sustancias químicas o radiaciones) (Wetzel et al., 2011). Aún más, los productos naturales generalmente no son promiscuos, pero las pequeñas variaciones en sus estructuras y sustituyentes les permiten participar en diferentes objetivos biomoleculares con alta especificidad (Rodrigues et al., 2016; van Hattum y Waldmann, 2014). Esto sugiere que al imitar las propiedades estructurales de los productos naturales en síntesis orgánica, es posible aumentar la complejidad química de las quimiotecas, lo que a su vez puede resultar en un mayor número de compuestos potencialmente bioactivos.

Por las razones enumeradas anteriormente, se puede decir que los productos naturales son una fuente esencial y confiable de posibles medicamentos. En este sentido, a lo largo de los siglos, el ser humano ha confiado en la Naturaleza para la satisfacción de la mayoría de sus necesidades básicas, a saber: vivienda, alimentos, indumentaria, fragancias, y no menos importante, medicamentos para el tratamiento de enfermedades. Las plantas, en particular, han formado la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional, con los primeros registros que documentan los usos de aproximadamente 1000 sustancias derivadas de plantas de la Mesopotamia; y el Papiro Ebers que data de 1500 AC, en Egipto, documentando más de 700 drogas, la mayoría de ellas de origen vegetal. El primer registro de la Materia Medica China que documenta 52 recetas data de alrededor del año 1100 AC, y fue seguido por otros trabajos como el Herbario de Shennong (ca. 100 AC aprox, 365 fármacos) y el Herbario de Tang (659 AC; 850 fármacos). La documentación del sistema ayurvédico indio también data de antes del año 1000 AC (Charaka, Sushruta y Samhitas con 341 y 516 fármacos respectivamente) (Gurib-Fakim, 2006).

Por otra parte, los griegos y los romanos contribuyeron sustancialmente al desarrollo del uso de preparaciones a base de hierbas en el antiguo mundo occidental. Dioscórides, un médico griego (100 AC), registró con precisión la recolección, el almacenamiento y el uso de hierbas medicinales durante sus viajes con ejércitos romanos a lo largo del mundo conocido, mientras Galeno (130-200 AC) un practicante y profesor de farmacia y medicina en Roma, es bien conocido por sus complejas prescripciones y fórmulas utilizadas en la elaboración de fármacos. Sin embargo, fueron los árabes quienes conservaron gran parte de la experiencia grecorromana durante la Alta Edad Media (siglos V a XII), y quienes la expandieron para incluir el uso de sus propios recursos junto con hierbas chinas e indias desconocidas en el mundo grecorromano.

Los sistemas medicinales basados en plantas continúan hoy desempeñando un rol

importante en la atención médica, y su uso por diferentes culturas ha sido documentado ampliamente (Johnson, 2018; Moerman, 2009). La OMS (Organización Mundial de la Salud) estimó que aproximadamente el 65% de la población mundial depende de las plantas para la atención primaria de la salud, mientras que productos derivados de ellas también poseen un rol importante, aunque más indirecto, en los sistemas del resto de la población que reside mayormente en países desarrollados (Farnsworth et al., 1985).

La contribución valiosa de la naturaleza como fuente de nuevos fármacos ha sido revisada en varias oportunidades por Newman y Cragg (2016), teniendo en cuenta aquellos fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas entre 1981 y 2016. Según este trabajo y los anteriores publicados por los mismos autores, los productos naturales y las estructuras relacionadas o derivadas de productos naturales continúan teniendo un rol significativo en el descubrimiento y proceso de desarrollo de nuevos fármacos. De acuerdo a la clasificación realizada por los autores, que incluyeron sólo las NEQ (Nuevas Entidades Químicas), las fuentes de fármacos pueden ser: "V" (Vacunas), "B" (compuestos de origen biológico, como péptidos y proteínas aislados de organismos vivos o producidos mediante técnicas de biotecnología), "N" (Producto Natural), "NB" (Producto natural botánico, es decir, mezclas de drogas vegetales), "ND" (derivado de un producto natural y es generalmente semisintético), "S" (fármaco totalmente sintético, descubierto por *screening* al azar o modificación de un agente existente) y "S*" (obtenido por síntesis total pero el farmacóforo es un PN). Además incluyeron una subcategoría "NM" que hace referencia a aquellos inhibidores competitivos del sustrato natural. Según estos autores, sólo el 27% de las moléculas pequeñas, que fueron consideradas NEQ, aprobadas en el período 1981–2014 tuvieron origen estrictamente sintético ("S"), es decir, carecen de inspiración natural (Figura 1.1).

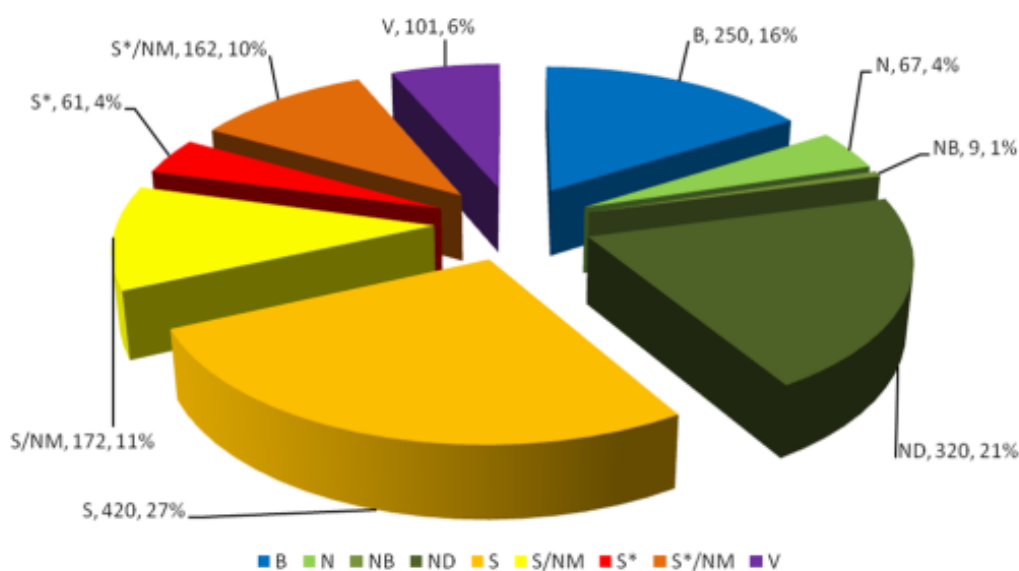


Figura 1.1: Fuentes de moléculas aprobadas como fármacos por la FDA. Fuente Newman y Cragg (2016)

1.2. Desarrollo de medicamentos a partir de productos naturales

Históricamente, los principales impedimentos para el desarrollo de un producto natural como compuesto líder, han sido la disponibilidad limitada y la complejidad estructural. Los productos naturales a menudo se producen en pequeñas cantidades siendo la biomasa limitada. No obstante, los avances recientes en síntesis orgánica, tanto en metodologías como en estrategias, están superando las barreras que presenta la complejidad estructural de la mayoría de los compuestos naturales. Por otra parte, los productos naturales pueden ser utilizados como plataformas para la síntesis de nuevos compuestos bioactivos con estructuras novedosas más allá de la imaginación del químico orgánico. Es por eso que los productos naturales han tenido un resurgimiento en los últimos años en el desarrollo y en el descubrimiento de fármacos. Si bien la probabilidad de que un producto natural aislado directamente sea el medicamento utilizado para el tratamiento de una enfermedad determinada en el futuro es relativamente bajo, estas moléculas naturales pueden servir como compuestos principales para el desarrollo de análogos, generados por diversas estrategias tales como biosíntesis combinatoria y/o química combinatoria, con propiedades farmacológicas optimizadas. En este sentido, es bueno tener en cuenta que el descubrimiento de nuevos fármacos y su proceso de desarrollo involucra de 10 a 15 años de investigaciones e inversiones del orden de los 2 billones de dólares (Patwardhan y Vaidya, 2010). Las etapas más representativas del desarrollo de un fármaco se indican en la figura 1.2. Dada la enorme inversión económica y de tiempo que se requiere para alcanzar la fase de comercialización, es fácil comprender la importancia de las fases iniciales (identificación y optimización de un “cabeza de serie” o “hit”) en el conjunto del proceso. Otro aspecto a destacar del mismo es que puede quedar interrumpido, o requerir la vuelta a una etapa anterior, si las propiedades de la molécula en desarrollo no son las adecuadas. Para mayor detalle sobre este proceso se puede consultar Delgado Cirilo et al. (2003). Por lo tanto, se requieren ensayos biológicos adecuados para la evaluación de las REA (Relación Estructura Actividad) de los productos naturales optimizados, y desde luego, se requiere un enfoque verdaderamente multidisciplinario y colaborativo para el descubrimiento y desarrollo de fármacos basados en productos naturales, que acompañe todas las etapas de su desarrollo.

Por otra parte, en el área de la química medicinal, los avances en los métodos computacionales, como los experimentos de cribado virtual de moléculas, ya han demostrado su eficiencia en la selección de moléculas candidatos a fármacos. Estos métodos son esenciales para entender la información estructural actualmente accesible, para comprender los eventos de reconocimiento molecular específico y para aclarar la función de las macromoléculas *target*. La idea común de todos los enfoques computacionales dentro del proceso temprano de descubrimiento de fármacos es minar bases de datos de compuestos de distinto peso molecular *in silico* y seleccionar un número limitado de candidatos propuestos para evaluar la actividad biológica deseada (Sliwoski et al., 2014; Rollinger et al., 2018).

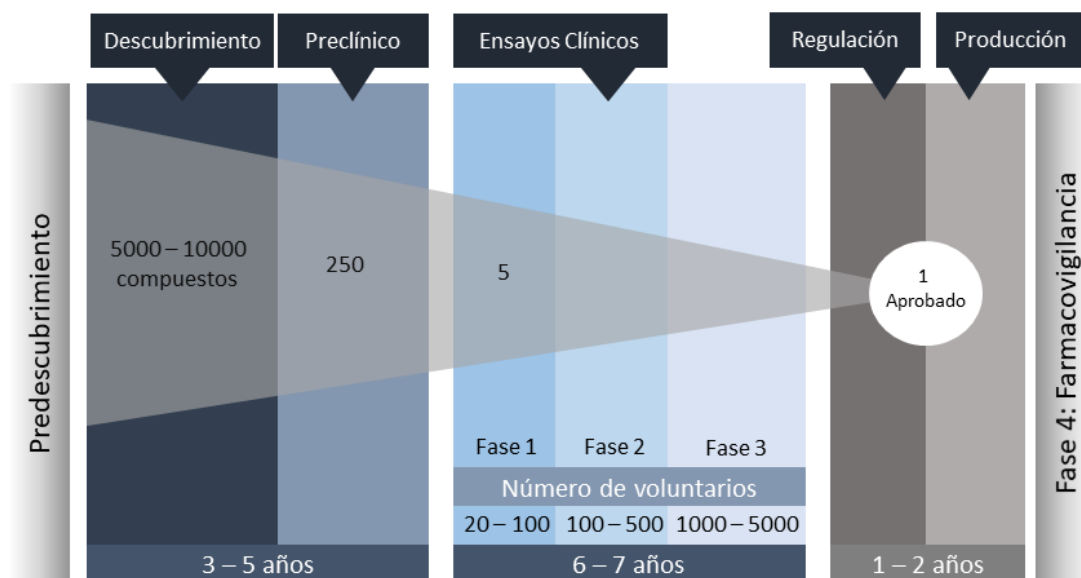


Figura 1.2: Proceso en el desarrollo de un fármaco

1.2.1. Síntesis basada en productos naturales

Tal como se dijo anteriormente, si bien muchos productos naturales a menudo exhiben una bioactividad altamente potente y selectiva, y pueden ser fuentes de potenciales fármacos; no obstante, éstos no fueron sometidos a una selección evolutiva para servir como medicamentos humanos. Luego, muchos de ellos no se han ajustado para poseer la potencia, la selectividad y las propiedades farmacocinéticas deseadas que debe tener un fármaco clínicamente útil. En este contexto, cobra relevancia los esfuerzos hechos por los químicos medicinales para elaborar estrategias de derivatización y/o síntesis de nuevos compuestos bioactivos a partir de productos naturales (Bauer y Bronstrup, 2014). Estas estrategias de optimización con frecuencia implican la modificación, eliminación o introducción de grupos funcionales y estereocentros o una remodelación más drástica del esqueleto básico para mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas.

1.2.1.1. Derivatización y Semisíntesis

Posiblemente, el enfoque más simple para optimizar una molécula líder es modificar el producto natural mediante simples transformaciones de grupos funcionales. Esto se puede lograr por métodos químicos y/o enzimáticos. Se pueden generar rápidamente grandes cantidades de análogos mediante tales enfoques semisintéticos; sin embargo, muchas transformaciones deseadas no pueden lograrse debido a incompatibilidades con grupos funcionales preexistentes o la falta de una reacción factible. Por lo tanto, la diversidad estructural de los análogos accesibles por derivatización es limitada. Existen numerosos ejemplos de este enfoque que incluyen taxanos (Kingston, 2011, 2008), camptotecinas (Rahier et al., 2011), y combretastatinas (Pinney et al., 2011).

Aunque el producto natural de interés puede no estar fácilmente disponible a partir

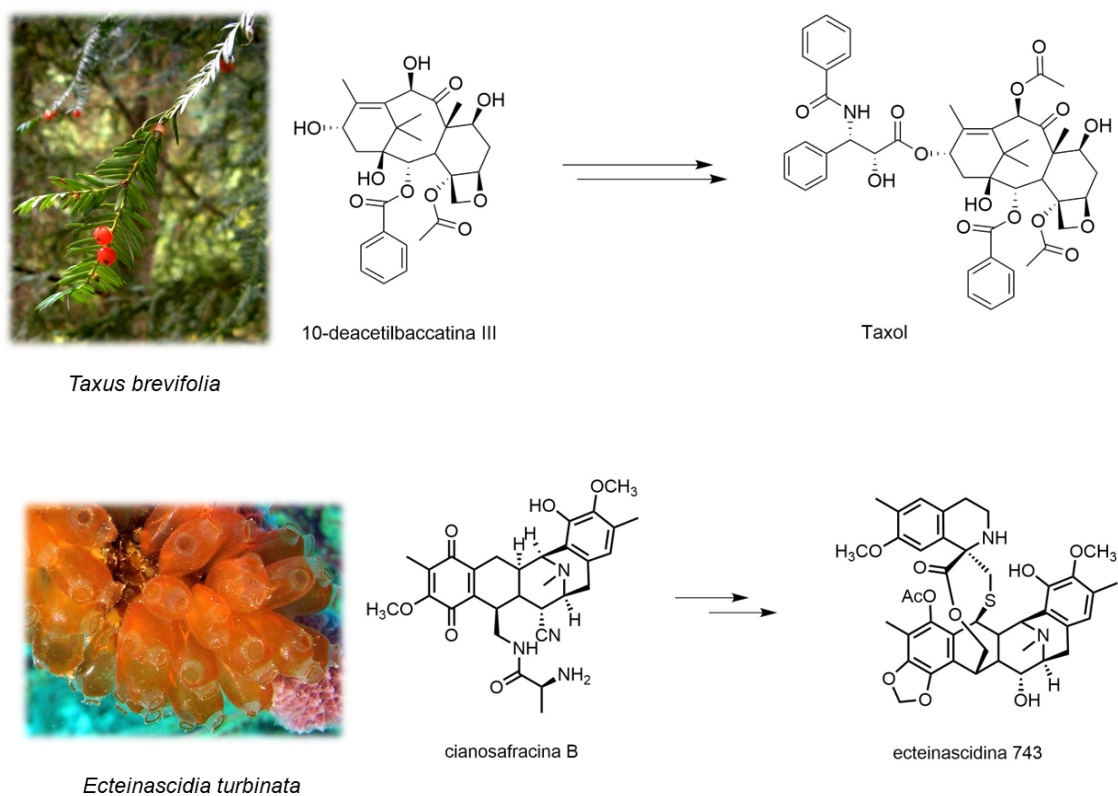


Figura 1.3: Ejemplos de compuestos bioactivos obtenidos a partir de productos naturales por semisíntesis

de la biomasa, a veces hay otro producto natural que puede servir como material de partida para la semisíntesis del objetivo. El desarrollo del paclitaxel se vio gravemente obstaculizado por la escasez de su fuente original, la corteza de *Taxus brevifolia*. El problema del suministro de compuestos y la producción comercial original se resolvieron mediante semisíntesis a partir de 10-desacetilbacatina III, que está fácilmente disponible en las partes aéreas de varias especies de *Taxus*, un recurso renovable (Figura 1.3). Los detalles de la obtención de paclitaxel y del desarrollo de derivados de taxanos se pueden encontrar en la literatura (Kingston, 2011, 2008).

Otro ejemplo destacado es el complejo alcaloide ecteinascidina 743 (ET-743, Yondelis) descubierto a partir del tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Rinehart et al., 1990; Wright et al., 1990). El problema del suministro de este compuesto para estudios avanzados se resolvió mediante el desarrollo de una ruta semisintética a partir del producto microbiano cianosafracina B (Figura 1.3) (Cuevas et al., 2000). Éste y otros aspectos de su descubrimiento y desarrollo se han investigado exhaustivamente (Henríquez et al., 2005).

1.2.1.2. Extractos químicamente modificados

Este proceso implica el tratamiento de un extracto vegetal o una fracción del mismo con reactivos químicos diseñados para realizar transformaciones específicas (Ramallo et al., 2011). La mezcla semisintética se produce mediante la transformación de grupos funcionales que son comunes en la naturaleza a restos menos comunes. El extracto diversificado resultante se procesa con fraccionamiento bioguiado. Usando este proceso, muchos derivados y metabolitos naturales inactivos pueden alterarse simultáneamente y sólo los productos que poseen la actividad deseada se aíslan y caracterizan. Esta estrategia es de reciente aplicación y a la fecha se han informado algunos ejemplos de generación de compuestos bioactivos a partir de la misma (Lopez et al., 2006).

1.2.1.3. Síntesis total

Desarrollar la síntesis total de productos naturales es un desafío interesante para los químicos sintéticos. Los productos naturales son, a menudo, moléculas estructuralmente complejas con numerosos estereocentros y su síntesis total proporciona nuevos conocimientos a la síntesis orgánica. La síntesis total también puede proporcionar información relevante en relaciones estructura-actividad y nuevos líderes terapéuticos (Molinski, 2014; Nicolaou et al., 2012). Aunque se han logrado grandes avances recientemente y se han sintetizado con éxito moléculas complejas, la síntesis total es a menudo demasiado costosa, lenta y de bajo rendimiento para su uso en la producción a escala industrial de productos naturales. Algunos autores afirman que los desarrollos en la escalabilidad de los métodos sintéticos harán que el suministro de productos naturales sea más accesible a través de la síntesis total en un futuro cercano (Kuttruff et al., 2014).

1.2.1.4. Síntesis total divergente

El proceso de síntesis total a menudo puede conducir a la identificación del farmacóforo, la porción subestructural de la molécula con las características esenciales necesarias para la actividad. Este conocimiento, combinado con una estrategia sintética que permite la introducción de variaciones estructurales profundas, permite la "edición molecular" de la complejidad estructural innecesaria (Figura 1.4). En algunos casos, esto ha resultado en la síntesis de análogos más simples que tienen similar o mejor actividad que el producto natural en sí. Aunque el término "Síntesis total divergente" DTS (*Diverted Total Synthesis*) fue acuñado por Danishefsky y sus colaboradores para describir este enfoque, la estrategia básica había sido practicada previamente por muchos grupos académicos e industriales. DTS implica la síntesis de un intermediario avanzado, de menor complejidad que el producto natural objetivo, que puede ser elaborado por diferentes secuencias sintéticas para producir múltiples análogos de complejidad variable que contienen el farmacóforo común. La síntesis se puede lograr tanto mediante la química medicinal convencional así como también con enfoques de química combinatoria (Danishefsky, 2010).

Uno de los ejemplos más notables es el del agente antitumoral halicondrina B, aislado de la esponja marina *Halichondria okadai* (Jackson et al., 2009; Towle et al., 2001). Las investigaciones iniciales encontraron que tenía una potente actividad anticancerígena e

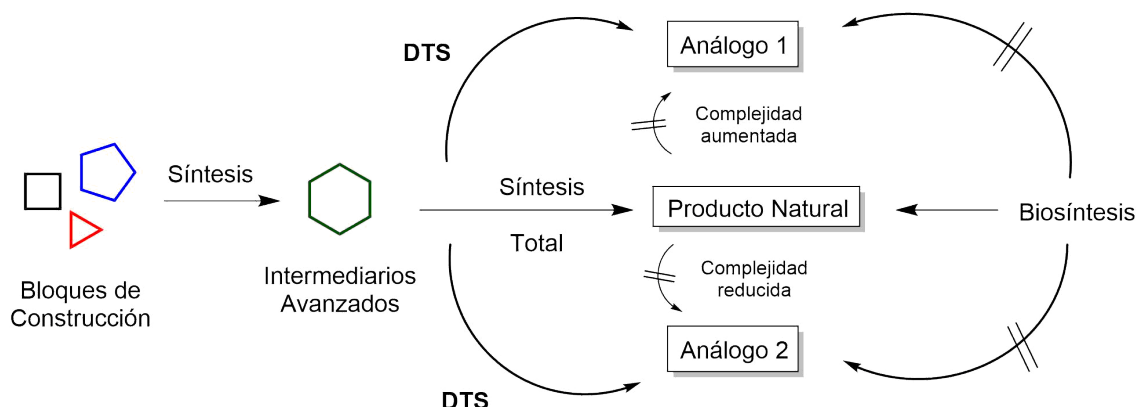


Figura 1.4: Síntesis total divergente (DTS)

indicaron que su mecanismo de acción antimitótico estaba dirigido a los microtúbulos. Estos estudios también sugirieron que sus interacciones con la tubulina diferían de las de otras clases de fármacos dirigidos a los microtúbulos como los taxanos, alcaloides de la vinca y eptonas; lo que estimuló el interés en la posibilidad de que la halicondrina B tuviera una actividad anticancerígena única y potencialmente mejorada en comparación con el resto de los fármacos antitubulínicos.

Sin embargo, la disponibilidad muy limitada de halicondrina B derivada de fuentes naturales representaba una barrera importante para su desarrollo. El establecimiento de una ruta sintética para su producción permitió la investigación de análogos sintéticos estructuralmente simplificados que retuvieron la actividad anticancerígena del compuesto original (Seletsky et al., 2004). Estos análogos incluían Eribulina (conocida como E7389), que podría producirse en cantidades suficientes para la investigación clínica (Figura 1.5). Zheng et al. (2004) modificaron la ruta para la síntesis total de halicondrina B para la obtención de análogos, y encontraron que la remoción de una larga región del esqueleto de la halicondrina B no afectaba drásticamente sus propiedades antimitóticas. Aún más, se logró una mayor estabilidad *in vivo* reemplazando la lactona por una cetona. Todos estos esfuerzos hicieron posible que el mesilato de eribulina (Halaven, Eisai) recibiera la aprobación regulatoria de la FDA (*Food and Drug Administration*) en noviembre de 2010 para pacientes con cáncer de mama metastásico.

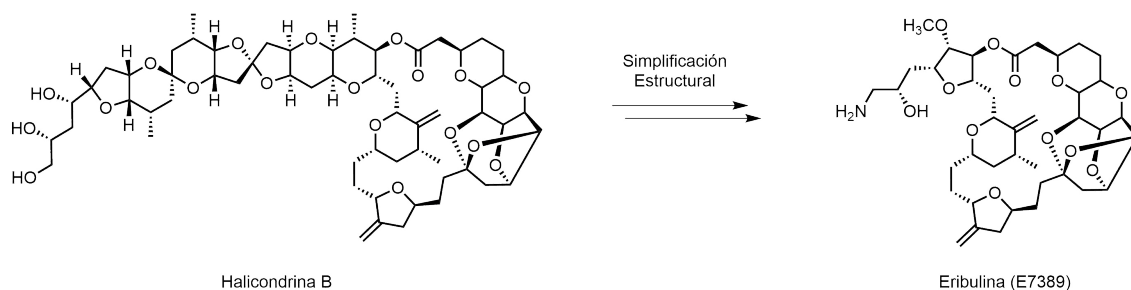


Figura 1.5: Simplificación estructural de la halicondrina B.

1.2.2. Síntesis combinatoria inspirada en productos naturales

La química combinatoria es un conjunto de técnicas desarrolladas para la síntesis simultánea o paralela de grandes colecciones de compuestos (bibliotecas químicas o quimiotecas), para el cribado de alto rendimiento o HTS (*High-Throughput Screening*) contra objetivos biológicos. Esta metodología se adoptó rápidamente en la industria farmacéutica y se utilizó para generar bibliotecas muy grandes de compuestos. Las expectativas de que la detección mediante HTS de un gran número de compuestos demostraría ser más eficiente y rentable que los enfoques tradicionales para el descubrimiento de fármacos llevaron al abandono o la falta de énfasis de la investigación en productos naturales en muchas empresas. Si bien hay argumentos en defensa de la química combinatoria, el número decreciente de nuevas entidades químicas indica que el uso de este enfoque para el descubrimiento de fármacos ha sido decepcionante (Class, 2002). Algunas de las quimiotecas así generadas han sido catalogadas como “mal diseñadas, poco prácticas y estructuralmente simplistas” (Borman, 2003). Esto es atribuido a la naturaleza de las bibliotecas combinatorias que comúnmente representan un área muy pequeña del espacio químico y carecen de las cualidades de los compuestos biológicos, como centros estereogénicos y sistemas complejos de anillos.

La síntesis combinatoria de bibliotecas inspiradas en productos naturales cubre un espectro de diferentes enfoques. Estos se pueden agrupar en tres categorías básicas, aunque las distinciones entre ellos a menudo son poco claras: Síntesis orientada a un *target* o TOS (*Target-Oriented Synthesis*), Síntesis orientada biológicamente o BIOS (*Biology-Oriented Synthesis*) y Síntesis orientada a la diversidad o DOS (*Diversity-Oriented Synthesis*).

1.2.2.1. Síntesis orientada a un *target*

En la TOS, una estructura objetivo (o estructuras) están en mente al comienzo del proyecto de síntesis. Estas estructuras se dividen racionalmente en sustratos de partida más simples y en bloques de construcción a través del proceso de análisis retrosintético. En la síntesis de moléculas complejas, el análisis retrosintético descompone una molécula en precursores simples o bloques de construcción, que luego se combinan de manera “convergente” (Schreiber, 2000).

1.2.2.2. Síntesis orientada biológicamente

Los productos naturales, como se indicó anteriormente, contienen estructuras químicas biológicamente relevantes. A su vez, estos compuestos naturales, y de manera similar, sus dianas moleculares (por ejemplo, proteínas) han evolucionado para ocupar sólo una pequeña fracción del vasto espacio químico. El enfoque BIOS, luego, se centra en la creación de bibliotecas de compuestos dentro del espacio químico ocupado por los productos naturales y otras moléculas biológicamente relevantes, como los fármacos (Kumar y Waldmann, 2009; Wetzal et al., 2011; Kaiser et al., 2008; Breinbauer et al., 2002a,b). Los esqueletos de los productos naturales se utilizan como bloques de construcción en la síntesis de bibliotecas centradas en la relevancia biológica. Estas bibliotecas de análisis de alta calidad aseguran una tasa de éxito del 0,5-2 % (Lee y Schneider, 2001) en ensayos biológicos. Es difícil comparar estas tasas con otros programas de des-

cubrimiento de fármacos porque los criterios que definen un éxito difieren entre los estudios y, a menudo, se definen en función de la actividad de la colección. Las bibliotecas de compuestos diseñadas con este método son a menudo complejas y sintéticamente exigentes, sin embargo, las tasas de acierto más altas reducen el tamaño de las bibliotecas necesarias para producir un compuesto líder. Esto puede equilibrar el mayor costo sintético de los miembros individuales de la biblioteca.

A modo de ejemplo de aplicación de este enfoque podemos citar el trabajo realizado por Svenda et al. (2015) quienes reportaron la síntesis de una colección de compuestos inspirada en withanólidos, una clase estructuralmente compleja de productos naturales con esqueleto tipo esteroidal, dotados de múltiples bioactividades. Según estos autores, algunos withanólidos comparten una unidad transhidrindano unida a una lactona α,β -insaturada como denominador estructural común, y la estructura de los withanólidos varía generalmente en los anillos A y B del esqueleto esteroidal (Figura 1.6). Así, los autores asumen que la bioactividad está codificada en la parte transhidrindano/dehidro- δ -lactona y está modulada adicionalmente por diferentes sustituyentes. Utilizando esta estructura común a los withanólidos los autores sintetizaron una biblioteca de compuestos. Finalmente, la investigación de la colección de compuestos para la modulación de la transducción de señales biológicas reveló nuevos y potentes moduladores de la señalización de Hedgehog.

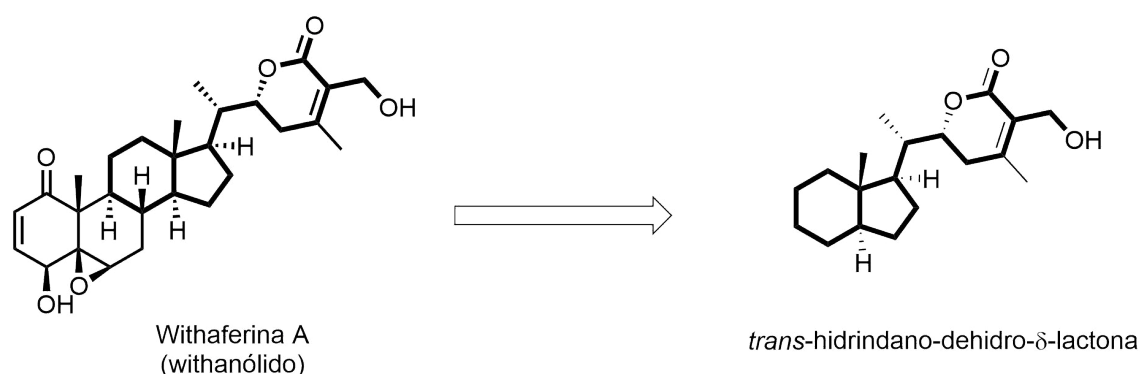


Figura 1.6: Estructura representativa de un withanólido (Withaferina A) y el esqueleto común propuesto para la síntesis de nuevos compuestos bioactivos según Svenda et al. (2015)

1.2.2.3. Síntesis orientada a la diversidad

Una estrategia diferente pero relacionada para el diseño y la generación de bibliotecas con diversidad estructural, es la síntesis orientada a la diversidad (Figura 1.7). La diferencia sustancial con el enfoque BIOS, es que el impulsor clave es el logro de compuestos que son químicamente diversos como sea posible. DOS se basa en la premisa de que las regiones del espacio químico, no definidas por productos naturales o fármacos conocidos, pueden ser regiones fértiles para descubrir nuevas moléculas pequeñas que modulan las biomoléculas de manera útil, ya sea como sondas de función o como fármacos. Los dos enfoques anteriores, basados en esqueletos de productos naturales conocidos, apuntan a poblar densamente una región específica del espacio químico que

es biológicamente relevante para un objetivo definido. Por el contrario, DOS apunta a lograr una cobertura diversa y desenfocada del espacio químico mediante la síntesis eficiente y divergente de grandes bibliotecas de compuestos estructuralmente complejos y estructuralmente diversos. Por lo tanto, aunque las moléculas pueden describirse como productos naturales, a menudo no se basan en esqueletos de productos naturales conocidos. Existen excelentes revisiones sobre el tema en la bibliografía, acerca de su relación con los productos naturales y sus aplicaciones a la genética química y al descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, en un trabajo reciente, [García et al. \(2016\)](#) comenzaron a partir de un sólo producto natural para obtener una biblioteca que consta de 16 esqueletos diferentes. Esto lo lograron mediante la transformación del alcaloide sinomenina mediante reacciones de distorsión anular. Las reacciones de fusión, expansión, escisión, contracción, desaromatización y reorganización de los anillos de la sinomenina generaron una biblioteca de 65 compuestos.

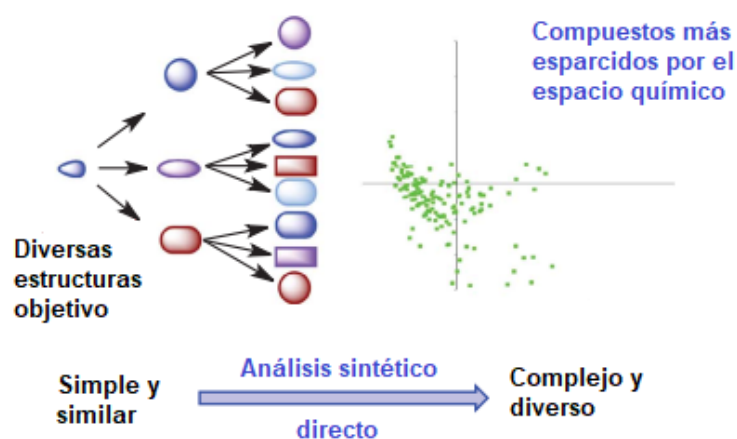


Figura 1.7: Síntesis orientada a la diversidad

1.3. Biodiversidad del noroeste argentino

La biodiversidad se define como la variabilidad de la vida, variabilidad que no se distribuye homogéneamente a lo largo del mundo ([Gaston, 2000](#)). Por eso es que podemos encontrar áreas con mayor número de especies que otras; podemos encontrar más especies en las regiones tropicales que en las templadas, como así también más en las regiones húmedas que en las áridas.

La preservación de la biodiversidad requiere del conocimiento y valoración del objeto de conservación. En este sentido, la creación de áreas protegidas es una de las estrategias globales y regionales actuales que busca reducir la pérdida de diversidad y asegurar su conservación ([Margules y Pressey, 2000](#)). Entre los criterios más empleados para fijar prioridades de conservación se encuentran la riqueza de las especies, la endemidad, la rareza de las especies y el grado de amenaza.

La pérdida de la biodiversidad es una gran preocupación para los biólogos y los químicos de productos naturales, ya que la extinción de una especie representa una pérdida irreparable para el planeta y para la sociedad. Con cada extinción, se pierde una parte de un ecosistema, lo que altera permanentemente la forma en que se estructura y cómo funciona ese ecosistema. Junto con cada extinción se encuentra la destrucción de cualquier número de microbiomas que existen dentro de ese organismo, o que dependen de él para continuar existiendo (por ejemplo, microbiomas de hongos coprófilos). Por lo tanto, los químicos de productos naturales son partes interesadas implícitas en la preservación de la biodiversidad, lo que hace que las asociaciones entre las investigaciones en productos naturales y la conservación de la biodiversidad sean lógicas y necesarias (Naman et al., 2017).

La flora de Argentina se caracteriza por una alta biodiversidad, con un 30 % de endemismos. Su diversidad biogeográfica proporciona una variada riqueza de recursos vegetales representados por más de 9000 especies de la flora vascular (Zuloaga et al., 2008). Dentro del territorio argentino, la región noroeste es la que combina un mayor índice de biodiversidad a nivel de familias, géneros y especies, junto con el número de especies endémicas del país (Zuloaga et al., 1999). Las especies endémicas están restringidas a un área geográfica determinada, lo que significa que se encuentran allí y en ninguna otra parte del mundo (Crowling, 2013). Estas especies representan el resultado de complejos procesos evolutivos y ecológicos que, a su vez, merecen una alta prioridad de conservación (Young et al., 2002). Además, las especies endémicas están en mayor riesgo de extinción que las especies más ampliamente distribuidas (Gaston, 1994; Mittermeier et al., 1998), ya que las especies de rango restringido son más vulnerables en escenarios de cambio ambiental y/o actividad antrópica. No obstante, las áreas de alto endemismo todavía están subrepresentadas en los sistemas de áreas protegidas de todo el mundo.

Finalmente, cabe destacar que cualquier manejo serio de las plantas vasculares de Argentina, así como la toma de decisiones en materia de conservación de su biodiversidad, debe establecerse sobre la base de un conocimiento detallado de la flora y además de los intereses económicos y sociales de la región (Godoy-Bürki et al., 2013; Zuloaga et al., 1999). El descubrimiento de nuevas entidades químicas obtenidas de fuentes vegetales puede ser un camino para demostrar el valor de las especies vegetales a conservar y preservar. Aquí subyace el valioso aporte de la fitoquímica.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivos generales

- Contribuir al conocimiento de la flora nativa del noroeste de Argentina, de gran interés por ser la región que combina el mayor índice de biodiversidad a nivel de familias, géneros y especies, junto con el mayor número de especies endémicas del país.
- Profundizar en la búsqueda de compuestos bioactivos de fuentes vegetales y la obtención de diversidad estructural a partir de la derivatización de los metabolitos secundarios aislados.

1.4.2. Objetivos específicos

- Realizar el estudio fitoquímico de especies de la región noroeste argentina:
 - Búsqueda de alcaloides pirrolizidínicos y sesquiterpenos habituales en la Fam. Asteraceae.
 - Búsqueda de withanólidos presentes en la Fam. Solanaceae.
- Utilizar experimentos no convencionales de RMN junto con protocolos de elucidación estructural asistida por computadora, en los casos en que la determinación estructural a través de parámetros convencionales de RMN sea ambiguo.
- Realizar modificaciones químicas de los metabolitos aislados en cantidades apreciables. Las modificaciones químicas estarán orientadas hacia la obtención de nuevos derivados aminados por reacciones de transferencia de nitreno catalizadas por complejos de Rh(II).
- Poner a disposición los metabolitos naturales y sus derivados obtenidos para probar actividad antiproliferativa y tripanocida de acuerdo a los antecedentes existentes de los compuestos ensayados. En función de los resultados obtenidos se buscará establecer relaciones estructura-actividad (REA).

Parte I

Familia Solanaceae

Capítulo 2

Familia Solanaceae: Introducción

*“Sé como el pájaro que,
deteniendo su vuelo un rato
en ramas demasiado débiles,
siente cómo ceden bajo su peso y,
sin embargo, canta
sabiendo que tiene alas...”*

Victor Hugo

2.1. Generalidades

La increíble diversidad morfológica y química, la importancia económica fundamental y la distribución mundial hacen de la Fam. Solanaceae una de las familias más fascinantes de plantas con flores en nuestro mundo.

Familia cosmopolita a la cual pertenecen 96 géneros y 2400 - 3000 especies (Hunziker, 2001; Barboza et al., 2016) que se halla mucho más diversificada en América del Sur que en cualquier otro continente. Sus especies habitan en zonas templadas a tropicales, prácticamente se encuentran ausentes en regiones muy frías. Se las puede hallar desde el nivel del mar hasta los 5000 m de altitud, en ambientes muy variados como selvas y bosques nublados, desiertos y semidesiertos, pampas y estepas.

Muchos de sus representantes constituyen la base de la alimentación humana, tales como la papa, la berenjena, el tomate, el tomate de árbol (género *Solanum*), los ajíes y pimientos (*Capsicum*), la uchuva (*Physalis*). Otros se destacan por sus usos medicinales o farmacéuticos, ya sea por ser fuente de alcaloides, como la belladona (*Atropa*), el beleño (*Hyoscyamus*), la mandrágora (*Mandragora*), el tabaco (*Nicotiana*), etc. y/o por sus propiedades alucinógenas o tóxicas, caso de las daturas (*Datura*), el duraznillo blanco (*Solanum glaucophyllum*), el chuscho (*Nierembergia linariaefolia*). Por último, varias especies son muy apreciadas como ornamentales, como las petunias (*Petunia*, *Calibrachoa*), los floripondios (*Brugmansia*), el jazmín del Paraguay (*Brunfelsia*), etc. (Matesevach Becerra y Barboza, 2013)

2.2. Descripción breve de la familia

Las Solanáceas son plantas herbáceas, subarbustos, arbustos, raro árboles o lianas. Pueden ser anuales, bienales o perennes, erguidas a decumbentes; a veces están provistas de tubérculos subterráneos. Las hojas varían desde herbáceas a coriáceas, o por excepción, pueden estar transformadas en espinas, son pecioladas o subsésiles, raramente sésiles, en ocasiones, aromáticas o fétidas; la lámina puede ser simple o compuesta. Las inflorescencias son solitarias, cimosas, terminales o axilares. Las flores son, en general, hermafroditas, de tamaño intermedio, fragantes (como en *Nicotiana*), fétidas (*Anthocercis*) o inodoras, actinomorfas, levemente a marcadamente zigomorfas (*Schizanthus*), pentámeras, raro tetrámeras. El cáliz es gamosépalo, persistente y puede ser acrescente muy a menudo; los lóbulos son en general más cortos que el tubo. La corola también gamopétala, puede ser campanulada, rotada, infundibuliforme, estrellada o tubular. El androceo posee los estambres unidos a la corola, a veces presenta estaminodios. El gineceo consta de dos carpelos, ovario súpero y numerosos óvulos; en su base se desarrolla un disco hipógino (nectario). Los frutos pueden ser cápsulas, bayas, drupas, diclesios o mericarpos; semillas discoidales o prismáticas con embrión linear o curvo (Barboza et al., 2016; Hunziker, 2001).

2.3. Clasificación y taxonomía

Reino: *Plantae*, Clase: *Equisetopsida* C. Agardh, Orden: *Solanales* Juss. ex Bercht & J. Presl, Familia: *Solanaceae* Juss.

Una clasificación tradicional de la familia (Hunziker, 2001), basada en evidencias morfológicas, reconocía seis subfamilias: *Cestroideae*, *Juanulloideae*, *Solanoideae*, *Salpiglossoideae*, *Schizanthoideae* y *Anthocercidoideae*. Al día de hoy se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar la filogenia de la Familia Solanaceae buscando sortear casos controversiales existentes en los sistemas de clasificación. Así es que Särkinen et al. (2013) han elaborado una clasificación filogenética sustancialmente diferente a Hunziker, basándose en un análisis genómico de regiones secuenciales del ADN. En su estudio, los autores realizaron una significativa contribución, que si bien no alcanzaron a ser muestreadas la totalidad de las especies de Solanaceae, se incluyeron géneros tradicionalmente excluidos de esta Familia (géneros pertenecientes a las familias Nolanaceae, Goetzeaceae, Duckeodendraceae y Sclerophylacaceae) y se mejoró la resolución respecto al linaje de la subfamilia Solanoideae (Figura 2.1). Más recientemente Ng y Smith (2016), construyeron una supermatriz clasificatoria comprendiendo mayor cantidad de taxones de Solanaeaceae aumentando el número de especies muestreadas. La matriz que obtuvieron contaba con 30,9% de datos faltantes, mejorando así la construida por Särkinen et al. (2013) que poseía 54,7% de datos faltantes. A pesar de la mayor resolución introducida y un mayor muestreo a nivel de especie, estos autores coinciden en que aún quedan mayores progresos por realizar para resolver nodos críticos.

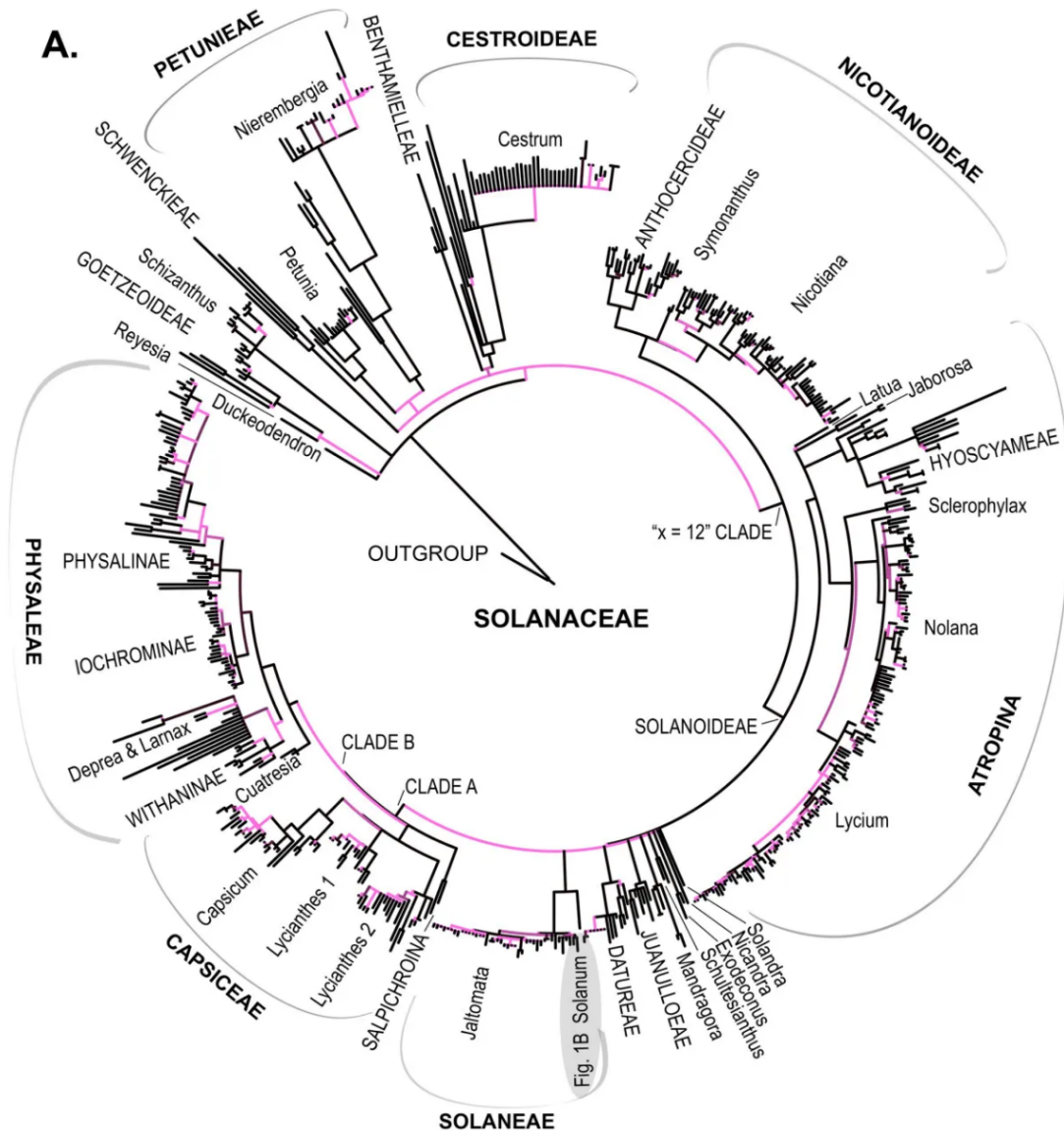


Figura 2.1: Filogenia de las Solanáceas. Relaciones filogenéticas entre clados principales de Solanaceae basadas en un análisis de máxima parsimonia de una supermatriz de 1076 taxones. Tomado de [Särkinen et al. \(2013\)](#)

2.4. Fitoquímica de las Solanáceas

Hunziker (2001) y Eich (2008) han proporcionado una revisión de la vasta literatura fitoquímica sobre los compuestos químicos encontrados en esta Familia. De acuerdo a esto, las Solanáceas se caracterizan por contener alcaloides y esteroides entre sus metabolitos secundarios más representativos. Nueve tipos de alcaloides han sido detectados en la familia; siendo los derivados del tropano los más comúnmente encontrados (algunos ejemplos pueden apreciarse en la Figura 2.2). Mientras que las lactonas esteroidales,

denominadas “withanólidos”, son los compuestos esteroidales característicos (Kirson y Glotter, 1981; Chen et al., 2011; Misico et al., 2011). Debido a que fueron de interés estos compuestos para el presente trabajo de tesis, a continuación, se describirán sus principales características.

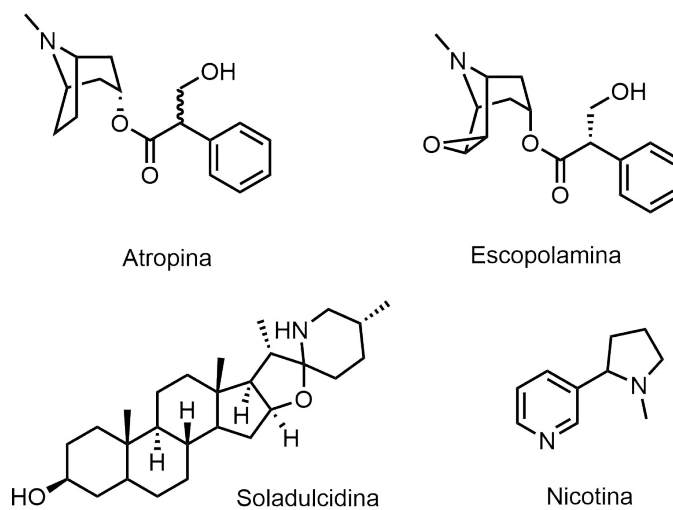


Figura 2.2: Ejemplos de alcaloides de la Fam. Solanaceae

2.4.1. Withanólidos

El primer withanólido aislado y caracterizado fue withaferina A (Figura 2.3), aislada en 1965 por Lavie (1965) de *Withania somnifera* (L.) Dunal y posteriormente por Kupchan (1969) de *Acnistus arborescens* (L.) Schlecht.

Los withanólidos son lactonas esteroidales con base en un esqueleto tipo ergostano de 28 átomos de carbono, en el cual el C-22 y el C-26 están apropiadamente oxidados para formar, en general, una δ -lactona (Figura 2.3). Los withanólidos se pueden clasificar, de acuerdo al arreglo específico de su cadena lateral, en dos grandes grupos: withanólidos con una δ -lactona o un δ -lactol en su cadena lateral (Grupo A, Figura 2.4) dividido en trece subgrupos, o bien, withanólidos con una γ -lactona en su cadena lateral (Grupo B, Figura 2.5), dividido en cinco subgrupos.

Más de 800 withanólidos han sido descritos, la mayoría de ellos en géneros pertenecientes a la subfamilia Solanoideae (Solanaceae). La ausencia hasta el momento de withanólidos en miembros de otras subtribus es llamativo. En la Tabla 2.1 se presentan los géneros de la subfamilia Solanoideae que contienen withanólidos, ordenados de acuerdo a la clasificación filogenética más reciente (Särkinen et al., 2013; Moré et al., 2015; Deanna et al., 2019). Como se desprende de dicha tabla, los withanólidos con esqueleto sin modificar son los más comunes, estando presentes en la mayoría de los géneros estudiados. Además, se observa que los tres géneros que mayor diversidad estructural de withanólidos presentan son los géneros *Jaborosa* Juss., *Datura* L. y *Physalis* L. presentes en el continente americano.

Cabe destacar que se ha detectado la presencia de withanólidos en algunos géneros

que no pertenecen a la familia Solanaceae, incluyendo especies del género *Tacca* J. R. Frost y G. Frost (Fam. Taccaceae) (Jiang et al., 2014; Liu et al., 2006; Yokosuka et al., 2003) y dos especies del género *Dioscorea* (Fam. Dioscoreaceae, anteriormente Taccaceae) (Kim et al., 2011; Shan et al., 2013), en las partes aéreas de *Senna siamea* (Fam. Leguminosae) (Srivastava et al., 1992) en la corteza de *Eucalyptus globulus* (Fam. Myrtaceae) (Vankar et al., 2009), en especies de *Ajuga* (Fam. Lamiaceae) (Riaz et al., 2004; Khan et al., 1999; Tomás et al., 1992) y de *Tricholepis eburnea* (Fam. Asteraceae) (Maher et al., 2018).

También se han detectado estructuras relacionadas en especímenes del Reino Animalia, como en la tortuga *Amyda japonica* (Fujimoto et al., 1985), en un coral blando del género *Minabea* (Ksebati y Schmitz, 1988), especies de corales del género *Paraminabea* (Chao et al., 2011) y *Sinularia* (Huang et al., 2017) y en una esponja del género *Strongylacidon* (Carney et al., 1993). Sin embargo, las estructuras de todos ellos se caracterizan por tener 27 átomos de carbono en lugar de 28, como es típico en los esteroides de origen animal.

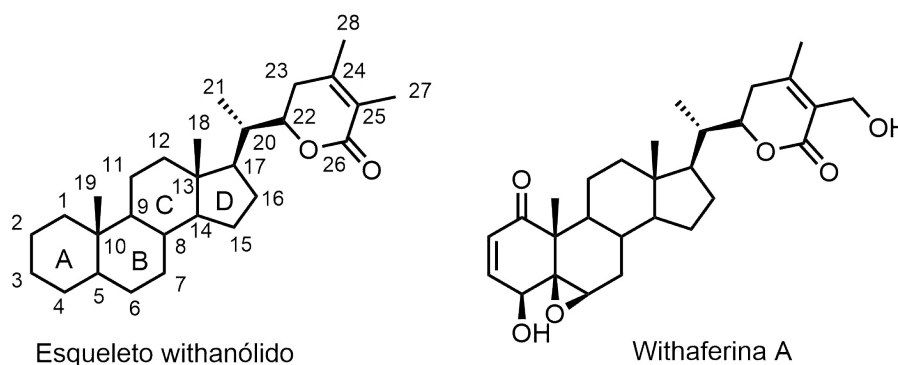


Figura 2.3: Esqueleto withanólido y withaferina A

La diversidad estructural y la variedad de actividades biológicas de los withanólidos, los han convertido en compuestos atractivos para su utilización como posibles candidatos a fármacos (Kalra y Kaushik, 2017).

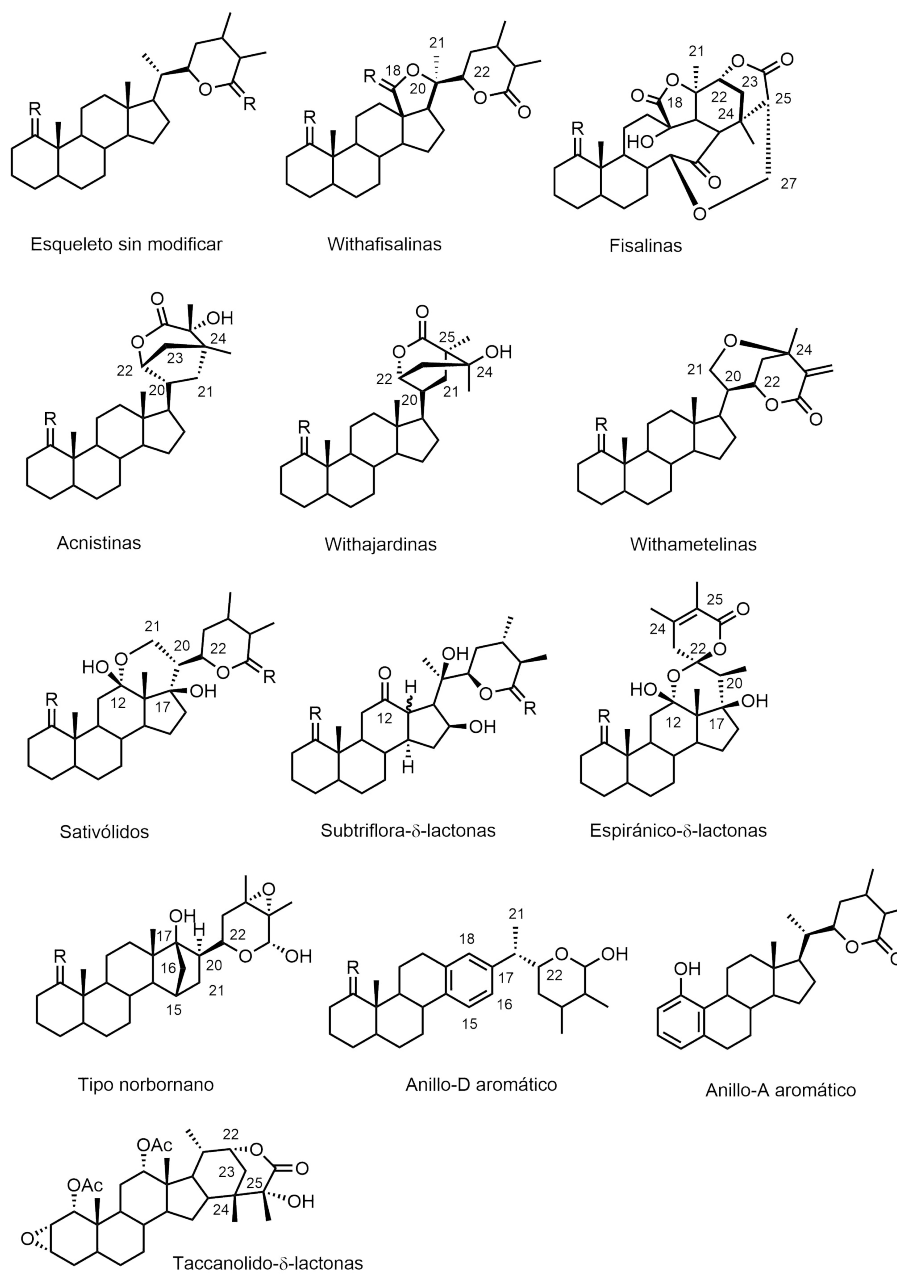


Figura 2.4: Estructuras generales de los withanólidos con una δ -lactona o un δ -lactol en la cadena lateral. Para mayor comprensión de los núcleos, se adicionó la numeración de posiciones relevantes en algunas estructuras.

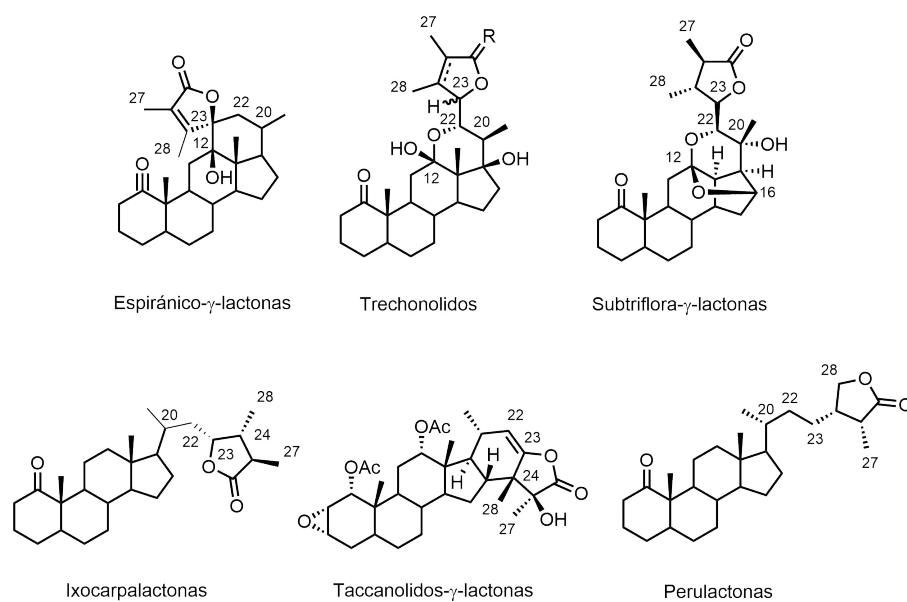


Figura 2.5: Estructuras generales de los withanólidos con una γ -lactona en la cadena lateral. Para mayor comprensión de los núcleos, se adicionó la numeración de posiciones relevantes en algunas estructuras.

Tabla 2.1: Géneros de la subfamilia Solanoideae que contienen withanólidos

Tribu (subtribu)	Género	Tipo de Withanólidos
Physalidae (Physalidinae)	<i>Physalis</i>	Fisalinas, neofisalinas, ciclofisalinas, withafisalinas, esqueleto sin modificar
	<i>Margaranthus</i>	Fisalinas, esqueleto sin modificar
	<i>Witheringia</i>	Fisalinas
	<i>Brachistus</i>	Fisalinas
Physalidae (Iochrominae)	<i>Acnistus</i>	Acnistinas, witafisalinas, esqueleto sin modificar
	<i>Iochroma</i>	Esqueleto sin modificar
	<i>Eriolarynx</i>	Withafisalinas, esqueleto sin modificar
	<i>Vassobia</i>	Esqueleto sin modificar
	<i>Dunalia</i>	Acnistinas, withafisalinas, esqueleto sin modificar
	Physalidae (Withaninae)	<i>Withania</i>
<i>Tubocapsicum</i>		Acnistinas
<i>Discopodium</i>		Acnistinas, esqueleto sin modificar
<i>Deprea</i>		Subtrifloralactonas, withajardinas, esqueleto sin modificar
<i>Aureliana</i>		Esqueleto sin modificar
Datureae	<i>Datura</i>	Withametelinas, esqueleto sin modificar
Hyoscyameae	<i>Hyoscyamus</i>	Esqueleto sin modificar
Lycieae	<i>Lycium</i>	Esqueleto sin modificar
Solaneae	<i>Solanum</i>	Esqueleto sin modificar
Generos no asignados a un clado	<i>Exodeconus</i>	Esqueleto sin modificar
	<i>Jaborosa</i>	Anillo A aromático, espiránico- γ -lactonas, esqueleto sin modificar, 15,21-ciclowithanolidos, sativolidos, espiránicos en C-22, trechonolidos
	<i>Nicandra</i>	Anillo D aromático, esqueleto sin modificar
	<i>Salpichroa</i>	Anillo D aromático, esqueleto sin modificar
	<i>Schraderanthus</i>	Fisalinas

2.4.2. Biosíntesis

Aunque la estructura y la actividad farmacológica de los withanólidos ha sido extensamente estudiadas en las últimas décadas, se han realizado pocos intentos para iluminar las rutas biosintéticas y la identificación de los genes reguladores claves implicados en la biosíntesis de estos compuestos. La diversidad de los withanólidos y su relación con su función en las plantas y su mecanismo de biosíntesis sigue siendo hoy poco conocido.

La estructura general de los withanólidos, como se dijo anteriormente, es un esqueleto esteroidal tipo ergostano de 28 átomos de carbono, con una cadena lateral que forma, por lo general, una δ -lactona entre C-22 y C-26. En función de su estructura base, los withanólidos comparten una ruta biogénica común con los fitosteroles; en donde, 24-metildesmosterol (Andrews-Smith et al., 1991) y 24-metilencolesterol (Lockley et al., 1976) serían precursores de los withanólidos; pero no el 24-(R/S)-metilcolesterol (campesterol y dehidrobrassicasterol) (Figura 2.7) (Lockley et al., 1976). Sostienen esta hipótesis, la ocurrencia de esteroides de 28 átomos de carbono, como 24-metilencolesterol y 24-metilencolesta-5,24-dien-3 β -ol en *Withania somnifera* (Lockley et al., 1976), Physalindicanol B de *Physalis minima* var. *indica* (Sinha et al., 1987) y *Datura metel* (Gupta et al., 1991), mientras que 24-metilencolesta-5,24-dien-3 β ,22 α ,26-triol se aisló de *Nicandra physalodes* (Andrews-Smith et al., 1991). Las estructuras se muestran en la figura 2.6.

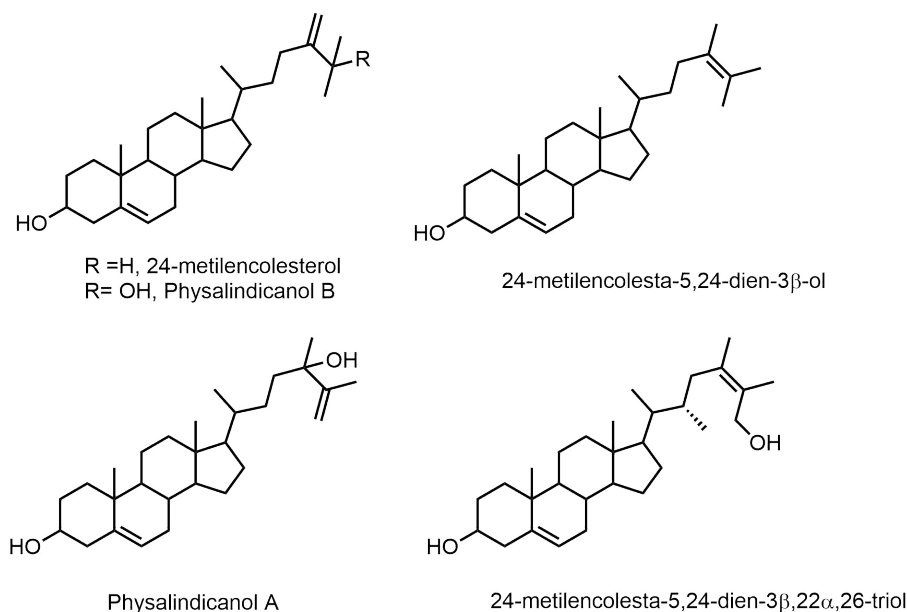


Figura 2.6: Posibles precursores biogénicos de withanólidos

El 24-metilencolesterol también es un intermediario en la biosíntesis de los brasinoesteroides, donde DWF1 es la enzima que cataliza la conversión de 24-metilencolesterol a campesterol, a través de la isomerización del doble enlace $\Delta^{24(28)}$ a $\Delta^{24(25)}$ resultando el intermediario 24-metildesmosterol, seguido por una reducción (Klahre et al., 1998; Choe et al., 1999; Takahashi et al., 2006). La isomerización de 24-metilencolesterol a

24-metildesmosterol ha sido propuesta como un paso clave en la biosíntesis de withanólidos; pero hasta la fecha no se ha caracterizado ningún gen o enzima para esta etapa de ramificación de la ruta general de los fitosteroles (Andrews-Smith et al., 1991).

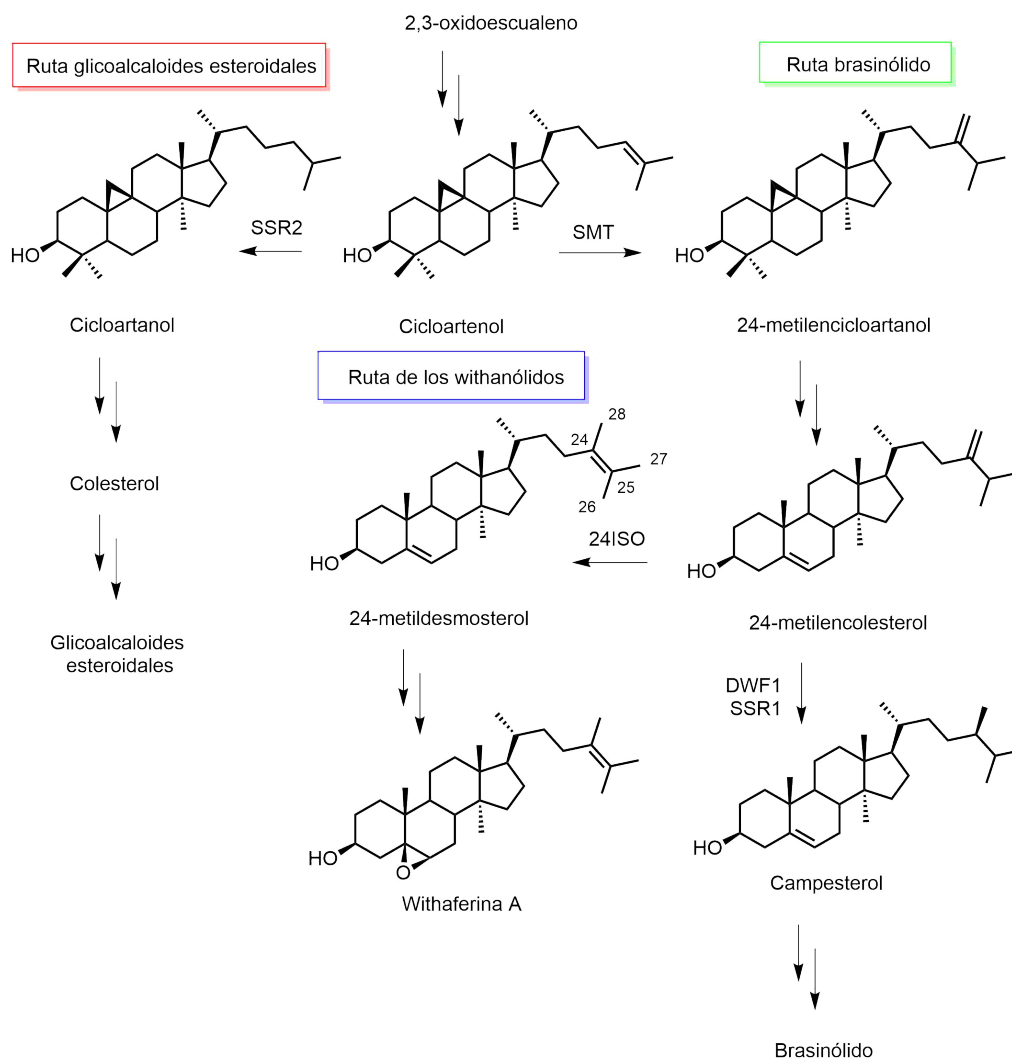


Figura 2.7: Descripción general de las reacciones catalizadas por DWF1/SSR1, SSR2 y 24ISO y el rol propuesto de 24ISO en la biosíntesis de withanólidos. SMT = esteroil metiltransferasa. Tomado de (Knoch et al., 2018)

En un estudio reciente, Knoch et al. (2018), a partir de datos del genoma y del transcriptoma de especies de la Fam. Solanaceae, identificaron una enzima clave en la biosíntesis de los withanólidos: un parálogo de DWF1 que codifica una esteroil 24-isomerasa (24ISO) (Figura 2.7). Los autores plantean que 24ISO se origina a partir de DWF1 después de dos eventos de duplicación consecutivos en plantas pertenecientes a la Fam. Solanaceae. Los withanólidos y 24ISO aparecen sólo en plantas medicinales de Solanaceae, no en cultivos como la papa y el tomate, lo que indicaría una selección negativa durante la domesticación. 24ISO es una enzima isomerasa única evolucionada a partir

de una reductasa y, como tal, ha mantenido la estructura de la oxidorreductasa. Usando el análisis filogenético, metabolómico y de expresión génica en combinación con expresión heteróloga y silenciamiento génico inducido por virus, los autores demuestran que 24ISO cataliza la conversión de 24-metilcolesterol a 24-metildesmosterol (ver figura 2.7).

Respecto a la génesis de la funcionalización de los anillos A y B, los grupos de [Gottlieb et al. \(1980\)](#) y [Velde y Lavie \(1981\)](#), propusieron una vía razonable que involucra en el primer paso la hidroxilación del sitio menos impedido del precursor esteroidal 5-en-3-ol (Figura 2.8). Una oxidación selectiva de este intermediario y posterior deshidratación da lugar al anillo 2,5-dien-1-ona, precursor de otros rearrreglos A-B descriptos. El aislamiento de withanólidos que contienen el sistema $1\alpha,3\beta$ -dihidroxi-5-en y el sistema 2-en-1-ona a partir de la misma planta (*Withania somnifera*) fueron evidencias de que esta hipótesis es correcta.

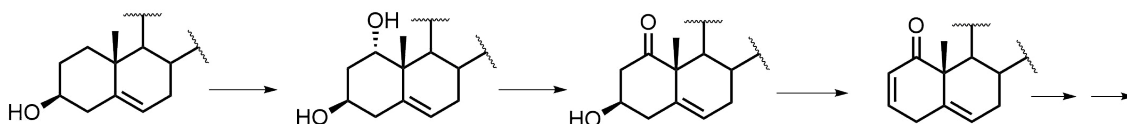


Figura 2.8: Génesis de la funcionalización en los anillos A y B

Una variedad de enzimas hidroxilantes específicas dan lugar posteriormente a la mayoría de las estructuras, si bien la disponibilidad de agua parece ser un factor determinante en el número y tipo de hidroxilaciones. Un hecho particularmente interesante entre las especies que producen withanólidos es la gran variabilidad en el tipo y en la cantidad de withanólidos en función de la época del año y del origen geográfico de las poblaciones estudiadas ([Burton y Oberti, 2000](#)).

La identificación de los genes responsables de la biosíntesis de los withanólidos permite manipular su producción mediante ingeniería metabólica. Esto proporciona una guía para la síntesis biomimética de withanólidos. La sobreexpresión de genes implicados en la biosíntesis de triterpenos puede aumentar la cantidad total de withanólidos en las plantas. Nuevos estudios sobre la identificación de genes relacionados con la generación de withanólidos en las plantas no sólo serían útiles para comprender la biosíntesis de los mismos, sino que también permitirían una ingeniería precisa de estos compuestos ([Dhar et al., 2014](#); [Bhat et al., 2012](#)).

2.4.3. Síntesis y derivatización de withanólidos

La primera síntesis de compuestos tipo colestano que contenían sistemas $5\beta,6\beta$, epoxi- 4β -hidroxi-2-en-1-ona y $5\beta,6\beta$ -epoxi-2-en-1-ona, fue llevada a cabo en 1974 por [Ikekawa y col.](#) y se basó en modificaciones apropiadas de (5α) - 6β -acetoxi- 1α - 2β -epoxicolestan-3-ona ([Ishiguro et al., 1974](#)). Simultáneamente el grupo de [Weissenberg et al. \(1974\)](#) también hicieron una propuesta sobre la síntesis de los anillos A y B en withaferina A y otros withanólidos.

A la fecha hay numerosos reportes de síntesis de withanólidos ([Kovganko y Kashkan, 1997](#); [Jana et al., 2011](#)). Las estrategias de síntesis a partir de precursores pregnanos involucran sucesivos pasos de protección y desprotección, generalmente sobre carbonos

quirales, haciendo que los rendimientos totales de reacción varíen según los métodos elegidos.

Cabe destacar recientes modificaciones sobre esqueletos de withanólidos con el objetivo de buscar diversidad estructural y explorar el espacio químico biológicamente relevante. Entre estas derivatizaciones encontramos transformaciones químicas como así también biotransformaciones. García y col. llevaron a cabo la derivatización química de Jaborosalactona 38 (García et al., 2012) y de Jaborosalactona 5 (García et al., 2014) para establecer relaciones estructura-actividad. Se llevaron a cabo reacciones de apertura de epóxido, reacciones de adición de Michael y reacciones de oxidorreducción sobre withanólidos con esqueleto sativólido y espiránico en C-23 respectivamente. Mientras que Casero et al. (2017) llevaron a cabo una estrategia de derivatización en condiciones amigables con el medio ambiente. La metodología desarrollada por los autores comprende un conjunto de reacciones simples entre el compuesto original (Withaferina A) y pequeños nucleófilos de azufre en medios hidroalcohólicos, a temperatura ambiente y en atmósfera al aire libre. Estos son algunos ejemplos; se puede encontrar en la literatura numerosas publicaciones sobre el tema (Misico et al., 2011).

Por otro lado, la modificación de productos naturales por microorganismos puede conducir a nuevas estructuras con potentes actividades biológicas. La aplicación de esta estrategia a withanolidos ha sido revisada por Anjaneyulu et al. (1998). El objetivo principal de la mayoría de los trabajos publicados en este campo, ha sido producir nuevos compuestos altamente oxigenados. Esto quiere decir, introducir grupos hidroxilo, regio y estereoselectivamente en posiciones difíciles de lograr por medios químicos y que además sean compuestos bioactivos que presenten una gran diversidad de propiedades biológicas (Basso et al., 2016).

Merecen un apartado especial técnicas biotecnológicas (Singh et al., 2015) tales como cultivo de raíces en cabellera mediante infección de brotes de *Withania somnifera* cultivados *in vitro* con *Agrobacterium rhizogenes* (Thilip et al., 2015), cultivos de órganos genéticamente transformados por la infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Ray y Jha, 1999), y cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (callos), con la finalidad de sobreproducción de metabolitos secundarios (withanólidos) o para el estudio de la biosíntesis de los mismos (Sangwan et al., 2014).

2.4.4. Actividad Biológica de los Withanólidos

Se encuentra bien reportado los usos en sistemas de medicina tradicional de muchas especies que contienen withanólidos entre sus metabolitos secundarios. Estos usos pueden ser rastreados hasta los withanólidos que los constituyen. *Withania somnifera*, por ejemplo, ha sido utilizada en la medicina Ayurvédica en la India desde tiempos antiguos. Posteriormente, se encontró evidencia de que sus usos medicinales estaban sustentados en los metabolitos secundarios que la constituyen (Dar et al., 2015; Kalra y Kaushik, 2017). Similares usos están registrados para *Datura metel* (Kadam et al., 2018) en la medicina tradicional china y varias especies del género *Physalis* en Asia y en América. Los withanólidos han demostrado ser activos no sólo en una amplia variedad de ensayos relacionados con enfermedades humanas, sino también en aplicaciones potenciales como agroquímicos naturales para el control de plagas y malezas. La actividad

biológica de los withanólidos en general, se ha revisado en varios trabajos (Budhiraja et al., 2000; Veleiro et al., 2005; Misico et al., 2011; Chen et al., 2011). A continuación, se presenta un breve resumen de algunas de estas actividades biológicas de los withanólidos de origen natural:

Actividad insecticida y antialimentaria Las propiedades insecticidas de los withanólidos fueron investigadas por primera vez a principios de 1960, a partir de los constituyentes de *Nicandra physalodes*. El principal componente de esta especie, Nicandrenona o Nic-1, fue el responsable de la actividad insecticida (Glatter, 1991). Desde entonces, varios estudios sobre actividad insecticida se han realizado sobre withanólidos. Bado et al. (2004) han estudiado por años el efecto antialimentario frente a distintos insectos de varios withanólidos con el anillo D aromático. Los resultados de la exposición de los insectos adultos frente a agua potable conteniendo withanólidos produjeron la mortalidad de los mismos en todos los casos. En estudios preliminares de relación estructura-actividad, se propuso que el sistema 2-en-1-ona en el anillo A y la presencia de un hemiacetal en la cadena lateral, eran importantes para ejercer un efecto antialimentario (Bado et al., 2004). Los resultados sugieren que los withanólidos con anillo D aromático podrían proporcionar protección contra la depredación de insectos fitófagos, actuando como una defensa química e inhibiendo la alimentación (Mareggiani et al., 2000).

Actividad fitotóxica Los withanólidos son productos naturales que exhiben una potente fitotoxicidad selectiva bajo condiciones de laboratorio, lo cual hace que el potencial alelopático de las especies de Solanaceae sea un buen tema de investigación. Un buen herbicida debe poseer un efecto fitotóxico selectivo en especies invasoras, mientras que no debe ejercer efectos deletéreos en cultivos comerciales. A la fecha se han reportado numerosos withanólidos aislados de especies de los géneros *Ichroma*, *Jaborosa* y *Salpichroa* con actividad fitotóxica selectiva hacia especies dicotiledóneas (Vaccarini y Bonetto, 2000; Nicotra et al., 2013, 2006).

Actividad tripanocida A partir de *Physalis angulata* se aislaron unos 10 withanólidos que se ensayaron *in vitro* como tripanocidas contra epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados indicaron que la actividad tripanocida contra tripomastigotes era mucho mayor que contra epimastigotes, lo que sugiere su potencial uso como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad del Chagas (Nagafuji et al., 2003).

Actividad leishmanicida La leishmaniasis es una enfermedad protozoaria con distribución endémica (88 países de todo el mundo, en particular en América y Asia). Cada año se reportan alrededor de 1,5 millones de nuevos casos. Debido al restringido número de fármacos disponibles, los nuevos compuestos de fuentes sintéticas o naturales son esenciales para controlar la enfermedad. A partir de *Physalis minima* se aislaron una serie de fisalinas que han sido examinadas como leishmanicidas en un ensayo *in vitro* (Choudhary et al., 2007). Algunas exhibieron interesantes actividades. Los resultados de esta investigación demostraron que la presencia del sistema 2-en-1-ona y 5 β ,6 β -epoxi es importante para la actividad (Cardona et al., 2006).

Actividad inhibitoria de colinesterasa Los inhibidores de la colinesterasa de origen natural son de especial interés en el desarrollo de fármacos, debido a la participación de la acetilcolinesterasa en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias relacionadas. Los inhibidores de acetilcolinesterasa activan las funciones centrales colinérgicas mediante el aumento de los niveles de acetilcolina en el cerebro. Withanólidos aislados de *Withania somnifera* resultaron ser moderados inhibidores de la enzima AChE. (Sehgal et al., 2012; Choudhury et al., 2004)

Sinaptogénesis y derivaciones neuríticas Facilitar la sinaptogénesis y la reconstrucción de las redes neuronales en el cerebro dañado es necesario para el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas. Varios withanólidos aislados del extracto metanólico de raíces de *Withania somnifera* han demostrado la regeneración y reconstrucción neurítico-sináptica de neuronas corticales dañadas, evitando la atrofia dendrítica y axonal (Kuboyama et al., 2005; Zhao et al., 2002)

Actividades relacionadas con el cáncer Los términos citotóxico, antitumoral y anticancerígeno tienen diferentes implicancias para describir la actividad de un determinado producto. Un agente citotóxico es aquel que es tóxico para las células tumorales de manera *in vitro*. Si esta actividad se mantiene al hacer un experimento *in vivo*, se dice que el producto tiene actividad antitumoral. El término anticancerígeno se reserva para aquellos productos que son tóxicos para las células tumorales en tratamientos clínicos (Evans, 1989). Numerosos trabajos sobre withanólidos se han enfocado en el estudio de actividades biológicas relacionadas al cáncer, la mayoría de ellas en citotoxicidad frente a líneas celulares (Chen et al., 2011; Misico et al., 2011). A lo largo de los años se han planteado muchas relaciones estructura-actividad, las cuales establecen que la presencia de una cetona alfa-beta insaturada en el anillo A y un 5 β ,6 β epóxido en el anillo B, son esenciales para que estos metabolitos posean propiedades antitumorales (Machin et al., 2010; Zhang et al., 2012)

Actividad quimiopreventiva Algunos withanólidos exhiben propiedades quimiopreventivas ya que inducen la enzima quinona reductasa o la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2). Estas enzimas promueven la transformación de compuestos tóxicos para el ADN, en otros inocuos y fáciles de eliminar. Por ejemplo, se observó que la Jaborosalactona P, produce una inducción significativa de la quinona reductasa en hígado y colon, pero no en pulmón, estómago o glándula mamaria de ratas (Misico et al., 2002; García et al., 2014).

Actividad inmunorregulatoria Estudios farmacológicos han demostrado la capacidad inmunomoduladora de los withanólidos. La artritis reumatoidea es una enfermedad autoinmune que tiene una alta asociación con las células T y B. De la especie *Withania coagulans*, una hierba medicinal utilizada para el tratamiento del reumatismo, bronquitis y enfermedades degenerativas, se aislaron unos diez withanólidos que exhibieron actividades relativamente buenas frente a la inhibición de la proliferación de células T y B. La presencia de un sistema 2,5-dien-1-ona en los anillos A y B, junto a un 17 β -OH y un grupo CH₃ en C-27, incrementan la actividad inmunorregulatoria (Maurya et al., 2008).

Capítulo 3

Estudio fitoquímico de *Eriolarynx iochromoides* (Hunz.) Hunz. y *Jaborosa oxipetala* Speg. (Solanaceae)

“Vive de tal modo que,
nada de lo que hagas deba merecer
el reproche o la condena de quienes te rodean”

Simone Weil

3.1. El género *Eriolarynx*

El género *Eriolarynx* comprende cuatro especies distribuidas en el norte de Argentina y en Bolivia: *E. lorentzii* (Dammer) Hunz. y *E. iochromoides* (Hunz.) Hunz., ambas endémicas del noroeste argentino; *E. fasciculata* (Miers) Hunz., endémica de las laderas rocosas y secas de los Andes de Bolivia; y *Eriolarynx australis* (Griseb.) J. M. H. Shaw que se extiende desde el sur de Bolivia hasta el noroeste argentino, a lo largo de las Yungas (ver Figura 3.1) (Hunziker, 1986; Matesevach Becerra y Barboza, 2013; Shaw, 2018).

3.1.1. Química del género *Eriolarynx*

De las cuatro especies que componen este género (ver Figura 3.1), *E. lorentzii* (subnom. *Vassobia lorentzii*) y *E. australis* (subnom. *Iochroma australe* Griseb., subnom. *Acnistus australis* (Griseb.) Griseb., subnom. *Dunalia australis* (Griseb.) Sleumer) han sido estudiadas fitoquímicamente (Misico et al., 2000; Vaccarini y Bonetto, 2000). De *E. lorentzii* Misico et al. (2000) pudieron aislar 7 withafisalininas y un withanólido con esqueleto normal (ver Figura 3.2). Mientras que Vaccarini y Bonetto (2000) encontraron withanólidos con esqueleto normal en *E. australis*.



(a) *Eriolarynx ichromoides*



(b) *Eriolarynx lorentzii*

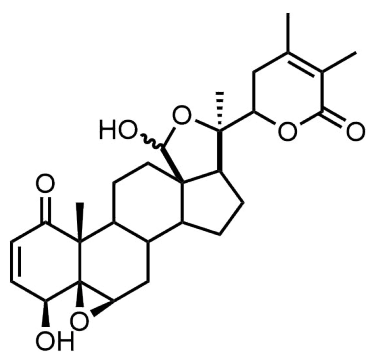
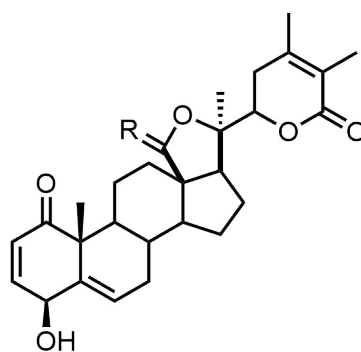


(c) *Eriolarynx fasciculata*

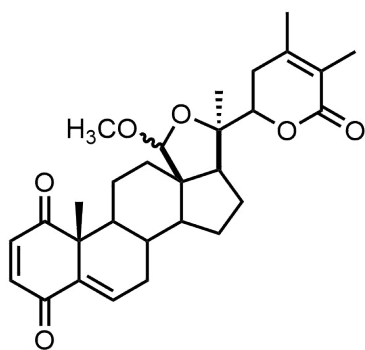


(d) *Eriolarynx australis*

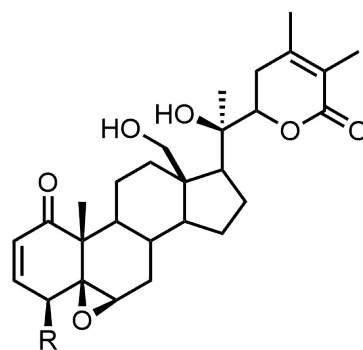
Figura 3.1: Especies pertenecientes al género *Eriolarynx*

(18*R/S*) Withafisalina F

R = H, OH; (18*R/S*) Withafisalina G
R = H, OCH₃; (18*R*) Withafisalina H
R = H, OCH₃; (18*S*) Withafisalina I
R = O Withafisalina J



(18*R*) Withafisalina K
(18*S*) Withafisalina L



18-hidroxi-withanólido D

Figura 3.2: Compuestos aislados de *Eriolarynx lorentzii* (Misico et al., 2000)

3.1.2. Consideraciones quimiotaxonómicas

La evaluación de la quimiotaxonomía de la familia Solanaceae muestra resultados interesantes a nivel de clados superiores, como sucede en el caso de la Tribu Physalidae, donde a nivel de las tres subtribus presentes, existen withanólidos con núcleos característicos para cada subtribu como se puede apreciar en la Figura 3.3. Se han encontrado withafisalinas en especies pertenecientes a las tres subtribus, en una proporción que hace posible plantear que estos compuestos podrían ser considerados marcadores quimiotaxonómicos a nivel tribal. Por otro lado, se han encontrado acnistinas tanto en la subtribu Withaninae y en Iochrominae; y fisalinas en la tribu Physalidinae. Por lo tanto las acnistinas podrían considerarse como marcadores quimiotaxonómicos a nivel de las subtribus Iochrominae y Withaninae; mientras que las Fisalinas como marcadores de la subtribu Physalidinae.

El género *Eriolarynx* pertenece a la subtribu Iochrominae. Los estudios fitoquímicos realizados a especies de este género respaldan las consideraciones quimiotaxonómicas previamente realizadas ya que los núcleos encontrados han sido withafisalinas y withanólidos relacionados. Por lo tanto, sería esperable que en la especie *Eriolarynx iochromoides* estos metabolitos secundarios estén presentes.

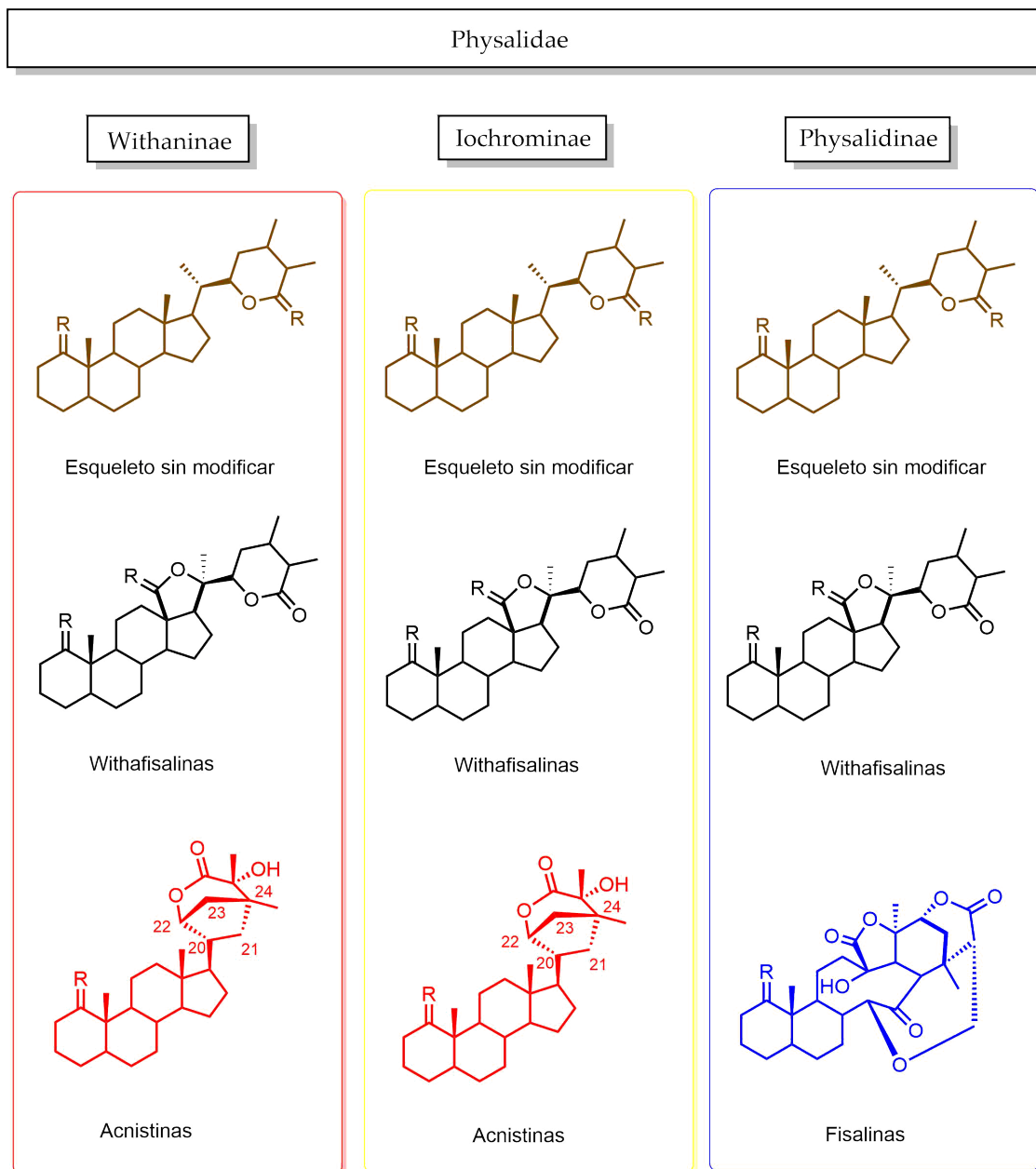


Figura 3.3: Withanólidos como marcadores quimiotaxonómicos. En el caso de la tribu Physalidae los withanólidos con esqueleto tipo withafisalina aparecen en las tres subtribus. Mientras que las fisalinas sólo han sido encontradas en la subtribu Physalidinae y las acnistinas sólo en Withanine y Ioichromine.

3.2. Estudio fitoquímico de *Eriolarynx ichromoides*

3.2.1. Resultados y Discusión

Como parte de nuestra búsqueda de withanólidos en Solanaceae se propuso el estudio fitoquímico de *Eriolarynx ichromoides*. La especie no presentaba antecedentes de estudios fitoquímicos.

Las partes aéreas de esta especie se secaron y se extrajeron con EtOH (Etanol). Luego de concentrar y desgrasar, el residuo fue fraccionado mediante una combinación de diferentes técnicas cromatográficas, para obtener finalmente el compuesto **1**, previamente aislado de *Acnistus australis* (Griseb.) (Kirson et al., 1970) y cuatro nuevos withanólidos (**2-5**). Como se puede observar, los compuestos **1** y **2** son withanólidos con esqueleto normal mientras que los compuestos **3-5** poseen esqueleto tipo withafisalina (Figura 3.4).

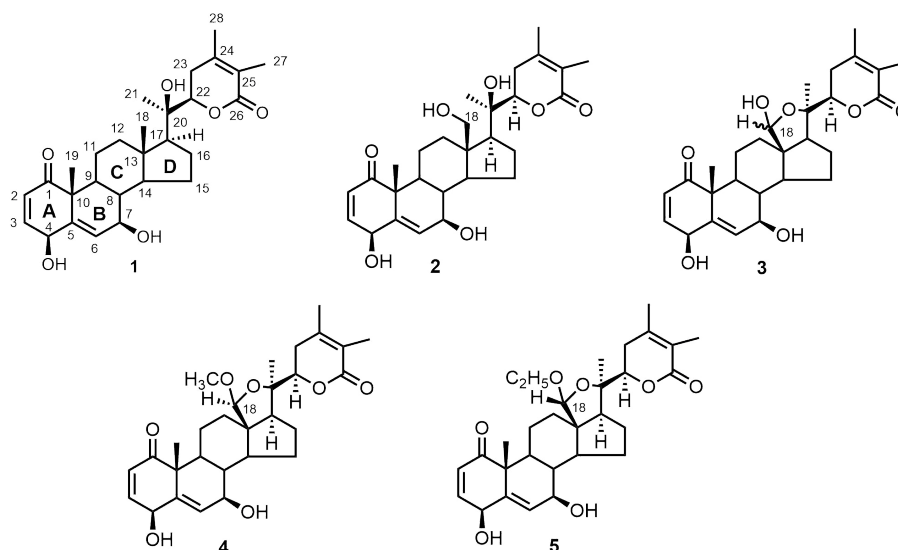


Figura 3.4: Compuestos aislados de *Eriolarynx ichromoides*

Si bien el compuesto **1** ya ha sido caracterizado previamente en la literatura, a continuación se presenta en detalle la elucidación estructural del mismo a modo de primera presentación espectroscópica de un withanólido en el presente trabajo de tesis doctoral. El compuesto **1** reveló una fórmula molecular de $C_{28}H_{38}O_6$ mediante análisis de HRMS (*High Resolution Mass Spectrometry*). Con respecto a los anillos A y B, en el espectro de RMN- 1H se observa la presencia de un sistema 1-oxo-2,5-dien-4,7-dihidroxi por las señales asignadas al H-2 a δ 5,90 ($J=10,1$ Hz), al H-3 a δ 6,71 (dd, $J=10,1; 4,4$ Hz) y al H-6 a δ 5,73 (d, $J=1,7$ Hz) (Figura 3.5). Las correlaciones observadas en el espectro $^1H, ^1H$ -COSY, entre los pares H-2/H-4 α , H-3/H-4 α dieron lugar a la asignación de H-4 a δ 4,59 (d, $J=4,3$ Hz). La multiplicidad de H-3 y el corrimiento químico de H-4 (característico de un protón unido a un carbono carbinólico) hizo posible establecer la presencia de un grupo OH en C-4. El mismo razonamiento puede ser aplicado al H-7 también

carbinólico con un corrimiento químico de δ 3,82 (d an., $J=8,4$ Hz).

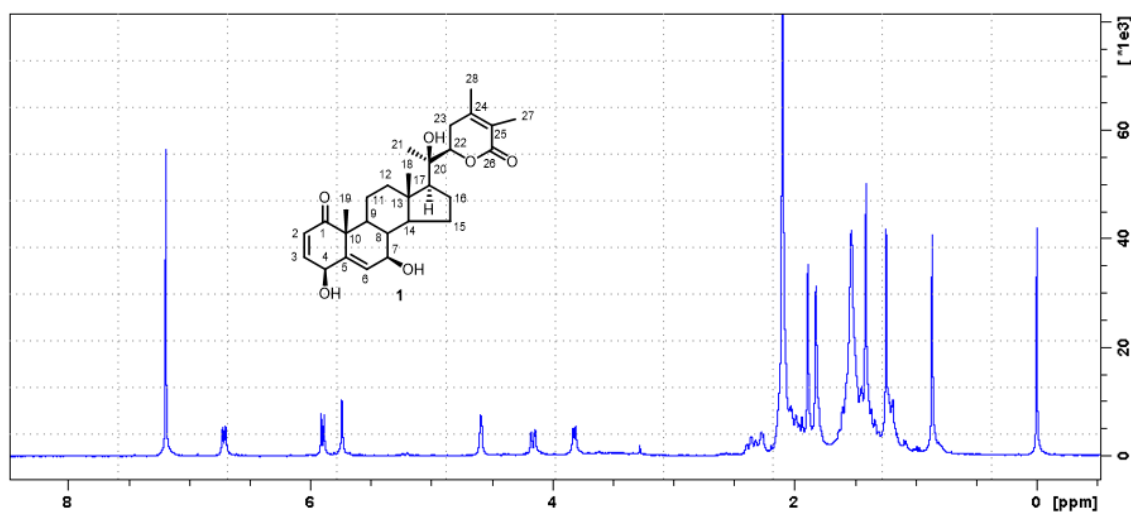


Figura 3.5: Espectro de RMN-¹H del compuesto 1 (CDCl₃; 400,03 MHz)

El patrón de sustitución de los anillos A y B fue confirmado por las señales en el espectro de RMN-¹³C a δ 203,1; 129,5; 142,9; 140,8; 133,9 asignadas a los C-1, C-2, C-3, C-5 y C-6, respectivamente. Otras señales características de este compuesto que se pueden mencionar son: a) una señal a δ 1,82 y a 1,89 correspondiente a los metilos 27 y 28 (corrimiento químico típico de metilos unidos a C sp²) y b) una señal a δ 166,9 en el espectro de RMN-¹³C. Estas señales permiten determinar la presencia de una δ lactona insaturada en la cadena lateral.

Si bien el compuesto 1 ya fue reportado por Kirson et al. (1970) como (17*S*,20*R*,22*R*)-4 β ,7 β ,20-trihidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienólido, en este estudio se confirmaron la orientación del grupo hidroxilo en posición C-7 y la orientación de la cadena lateral, mediante un experimento NOESY. La orientación β del grupo hidroxilo en C-7 fue ratificado mediante el NOE observado entre H-7 a δ 3,82 y las resonancias correspondientes a H-9 a δ 1,61 y H-14 a δ 1,21; mientras que la orientación β de la cadena lateral fue corroborada por el NOE observado entre H₃-18 a δ 0,86 y la señal correspondiente a H-22 a δ 4,16 (Figura 3.6)

El compuesto 2 reveló una fórmula molecular de C₂₈H₃₈O₇ mediante HRMS, con los corrimientos químicos en ¹H y en ¹³C siendo muy similares a los del compuesto 1 (ver Tabla 3.1 y Tabla 3.3). La única diferencia entre 2 y 1 fue la ausencia de la señal correspondiente al H₃-18 a campo alto en la región del espectro de RMN-¹H (Figura 3.7), y la aparición de una señal correspondiente a un metileno carbinólico [δ _H 3,60 (m, 2H) y δ _C 58,8] sugiriendo la presencia de un grupo hidroximetileno en el C-18. De acuerdo a lo anterior, la estructura propuesta para el compuesto 2 es (17*S*,20*R*,22*R*)-4 β ,7 β ,18,20-tetrahidroxi-1-oxo-witha-2,5,24-trienólido.

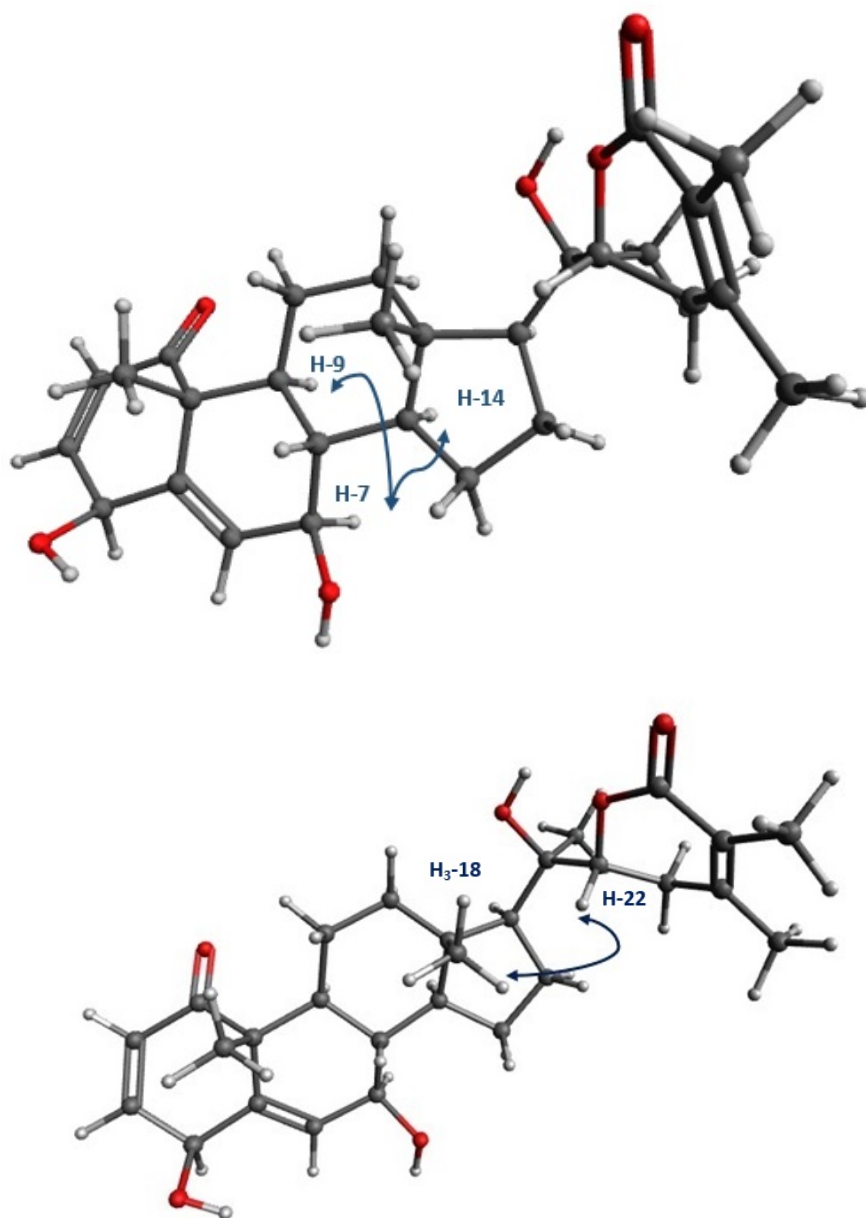


Figura 3.6: NOE relevantes para el compuesto 1

Tabla 3.1: Desplazamientos químicos en RMN-¹H en para los compuestos **1** y **2** (CDCl₃, 400,13 MHz).

posición	1	2
2	5,90 d (10,1)	5,90 d (10,2)
3	6,71 dd (10,1; 4,4)	6,71 dd (10,2; 4,6)
4	4,59 d (4,3)	4,59 d (3,3)
6	5,73 d (1,7)	5,73 s an.
7	3,82 d an. (8,4)	3,76 d (7,9)
8	1,42 m	1,47 m
9	1,61 m	1,66 m
11a	1,82 m	2,14 m
11b	1,53 m	1,52 m
12a	2,00 m	2,53 m
12b	1,32 dd (13,0; 3,3)	1,12 m
14	1,21 m	1,27 m
15a	2,13 m	-
15b	1,48 m	-
16a	1,96 m	-
16b	1,52 m	-
17	1,43 m	1,33 m
18	0,86 s	3,61 m
19	1,41	1,43 s
21	1,24	1,40 s
22	4,16 dd (13,3; 3,4)	4,24 dd (13,0; 3,5)
23a	2,36 t (14,2)	2,32 m
23b	2,06 m	2,08 m
27	1,82 s	1,83 s
28	1,89 s	1,91 s

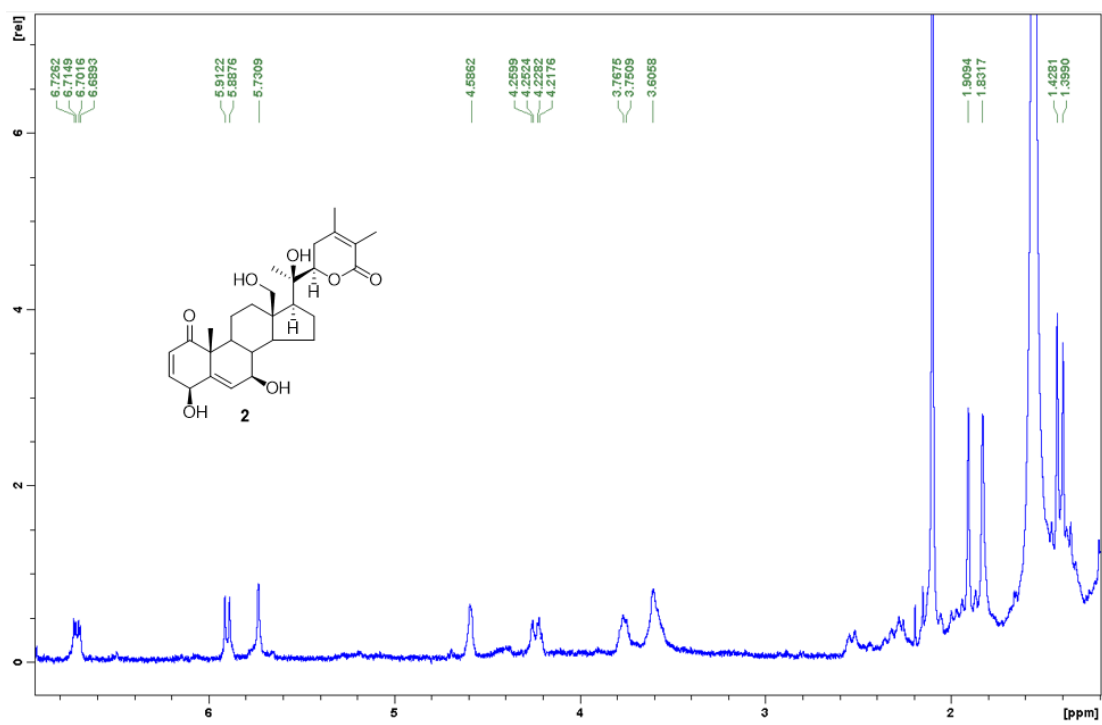


Figura 3.7: Espectro de RMN^{-1}H del compuesto 2 (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

Los compuestos **3–5** poseen el patrón característico de las withafisalininas. El hemiacetal presente en esta estructura se caracteriza por la ausencia del singlete del H₃-18 a campo alto en el espectro de ¹H-RMN (Figura 3.8); y por la aparición de dos señales correspondientes a metinos carbinólicos, indicando la presencia de una mezcla epimérica de hemiacetales en el C-18 (en el caso de los compuestos **4** y **5** esto no se observa ya que se encuentran alcoxilados). (Veras et al., 2004a) El espectro de HRMS del compuesto **3** mostró un ion molecular [M+Na]⁺ a *m/z* 507,2387; correspondiente a la fórmula molecular C₂₈H₃₆NaO₇. Los espectros en 1D y 2D de RMN para el compuesto **3** indicaron que éste posee tanto los anillos A-C como la cadena lateral semejantes a los compuestos **1** y **2**; sugiriendo que la diferencia estructural podría estar restringida al anillo adicional de 5 miembros típico de las withafisalininas. La ausencia de la señal para H₃-18 y la presencia de dos señales a δ 5,24 (60%) y 5,29 (40%) (Tabla 3.2) fueron indicativas de una función lactol en la posición C-18 y se asignaron a los epímeros 18*R* y 18*S*, respectivamente. El espectro de ¹³C-RMN mostró las señales para metino a δ 101,5 y 103,2 (C-18 *R/S*) y resonancias a δ 57,3/59,0; δ 56,4/56,7 y δ 85,0/85,1 asignadas a C-13, C-17 y C-20, respectivamente; confirmando así el anillo lactol de cinco miembros (Tabla 3.3). De acuerdo con lo anterior, la estructura del compuesto **3** fue establecida como (17*R*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-4β,7β,18α-trihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido/(17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-4β,7β,18β-trihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido.

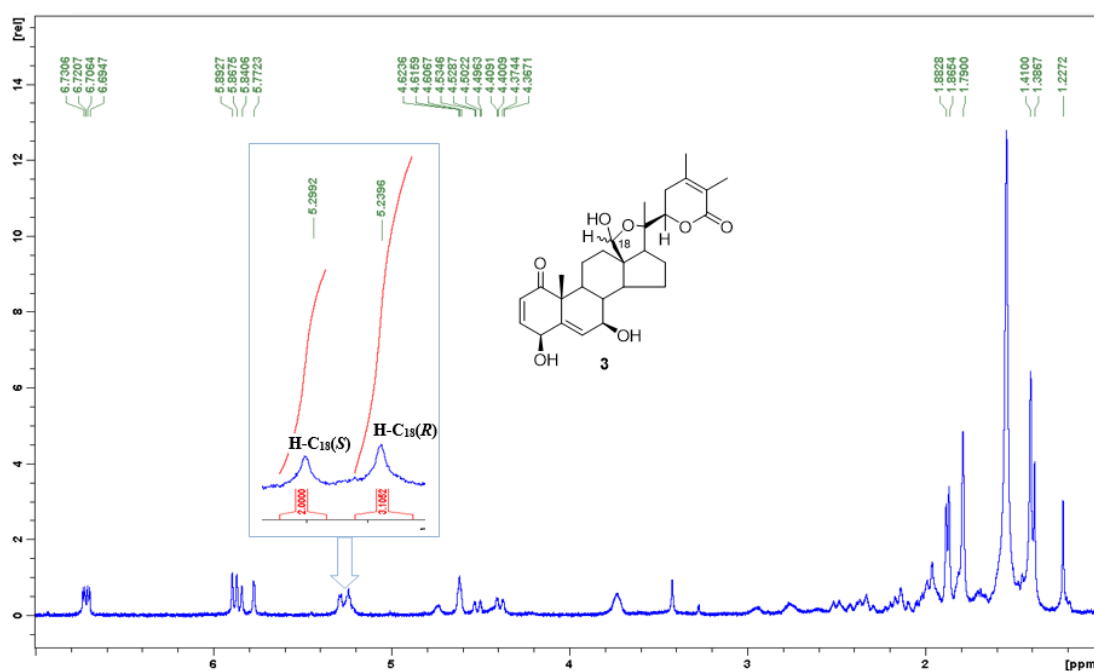


Figura 3.8: Espectro de RMN-¹H del compuesto **3** (CDCl₃; 400,13 MHz)

La similitud de los espectros de RMN-¹H para los compuestos **3-5** indicó que éstos poseen el mismo patrón de sustitución 1-oxo-2,5-diene-4β-7β-dihidroxi para los anillos A y B, la misma cadena lateral y las características espectroscópicas propias de las wit-

Tabla 3.2: Desplazamientos químicos en RMN-¹H para los compuestos 3 – 5 (CDCl₃, 400,13 MHz)

posición	3 (18R/18S)	4	5
2	5,88 d (10,0)	5,92 d (10,0)	5,88 d an. (10,2)
3	6,71 dd (10,0; 4,3)	6,73 dd (10,0; 4,4)	6,77 dd (10,2; 4,3)
4	4,62 m	4,62 s an.	4,66 d (4,1)
6	5,77 s an./5,84 s an.	5,78 d (1,7)	5,59 d d(2,0)
7	3,74 m/3,72 m	3,82 s an.	3,68 d (7,8)
8	1,59 m/1,98 m	1,64 m	1,24 m
9	1,71 m/1,69 m	1,72 m	1,71 m
11a	-	2,38 m	2,13 m
11b	-	1,44 m	1,75 m
12a	2,51 m/1,97 m	2,04 m	4,46 d an. (12,1)
12b	1,56 m/1,45 m	1,45 m	1,51 m
14	1,42 m/1,51 m	1,51 m	1,46 m
15a	-	1,79 m	1,62 m
15b	-	1,44 m	1,41 m
16a	-	2,11 m	1,78 m
16b	-	1,73 m	1,46 m
17	1,98 m/2,04 m	1,98 m	1,93 m
18	5,24 s/5,29 s	4,71 s	4,72 s
19	1,41 s/1,38 s	1,41 s	1,31 s
21	1,41 s/1,23 s	1,30 s	1,37 s
22	4,39 dd (13,4; 3,2)/4,51 dd (13,1; 2,2)	4,38 dd (13,0; 3,2)	4,58 dd (13,6; 3,2)
23a	2,33 m/2,42 m	2,37 t (13,0)	2,36 t (13,1)
23b	1,98 m/2,12 m	2,09 m	1,98 m
27	1,79 s an.	1,84 s an.	1,83 s an.
28	1,87 s an./1,88 s an.	1,88 s an.	1,87 s an.
OCH ₂ CH ₃	-	-	3,85 m – 3,28 m
OCH ₂ CH ₃	-	-	1,11 t (7,1)
OCH ₃	-	3,26 s	-
OH-18	4,73 m	-	-

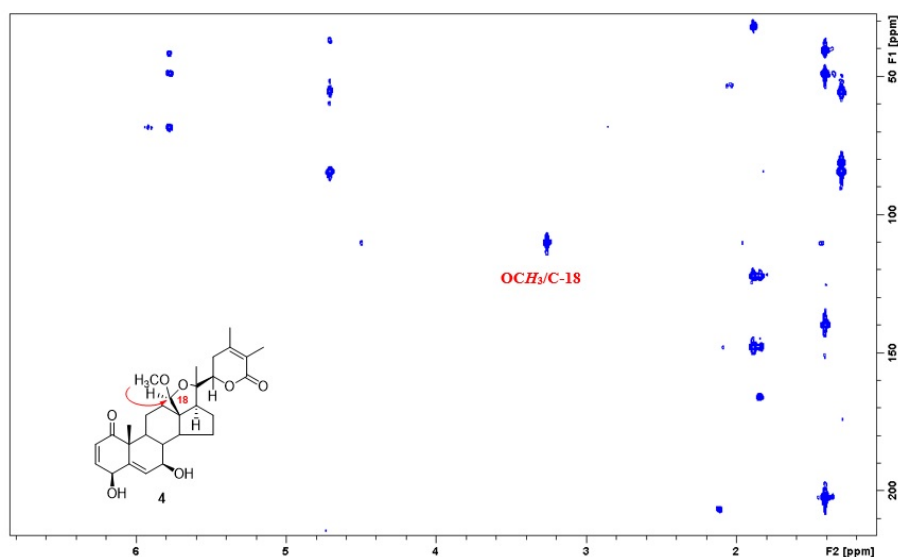


Figura 3.9: Espectro HMBC para el compuesto **4** (CDCl₃; 400,13 MHz)

hafisalinas. Las únicas diferencias entre los compuestos **3**, **4** y **5** fueron observadas en las inmediaciones de la posición C-18. El espectro de RMN-¹H para el compuesto **4** mostró las señales para H-18 y C-18 a δ 4,71 y δ 110,2, respectivamente. Además, las señales a δ _H 3,26 (s, 3H) y δ _C 55,1 sugirieron la presencia de un grupo OCH₃ en la posición C-18. La posición del grupo metoxi fue confirmada mediante correlaciones entre la señal de CH₃O y C-18 en el espectro HMBC (Figura 3.9); y la orientación β del grupo metoxi fue establecida mediante los NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) observados entre H-18 y H-11 β a δ 1,64 (Figura 3.10).

Para el compuesto **5**, su espectro de RMN-¹H mostró la señal a δ 4,72 asignada a H-18 y tres señales correspondientes a un grupo etoxi a δ 3,85 (m, 1H), 3,28 (m, 1H) y 1,11 (t; 7,1 Hz; 3H). Las señales a δ 107,5 (C-18), 64,7 (OCH₂CH₃) y 15,5 (OCH₂CH₃) observadas en el espectro de RMN-¹³C, y las correlaciones en el espectro HMBC entre el H-18 y (OCH₂CH₃) están de acuerdo con un grupo etoxi en la posición C-18 (Figura 3.11). La orientación α del grupo etoxi fue determinada a partir del NOE observado entre H-18 y H-8 (Figura 3.12). El espectro de HRMS están de acuerdo con la fórmula molecular propuesta para los compuestos **4** y **5**. Así, las estructuras para los compuestos **4** y **5** fueron establecidas como (17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-4 β ,7 β -dihidroxi-18 β -metoxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido y (17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-18 α -etoxi-4 β ,7 β -dihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido, respectivamente. La facilidad con la que hemiacetales como el compuesto **3**, reaccionan con alcoholes está bien documentada en la literatura (Misico et al., 2011) y sugiere la naturaleza artificial de los compuestos **4** y **5**.

Para todos los compuestos, el espectro IR acompañó la elucidación estructural realizada mediante RMN. Se observaron en aquél espectro señales correspondientes a grupo oxhidrilo (3650–3200 cm⁻¹), grupo carbonilo de cetona α,β -insaturada (\approx 1675 cm⁻¹), y grupo carbonilo de lactona de seis miembros α,β -insaturada (\approx 1720 cm⁻¹).

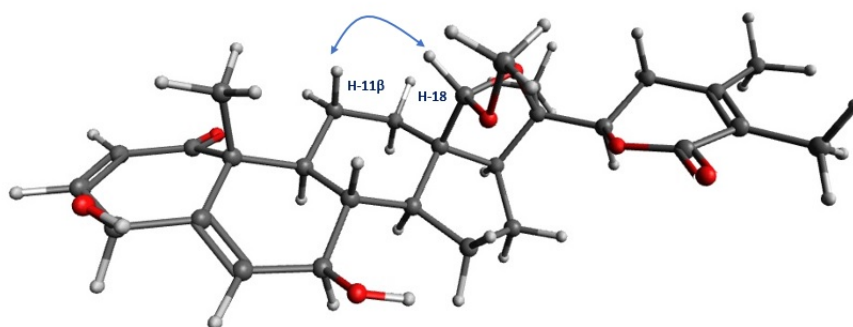


Figura 3.10: NOE relevante para el compuesto 4

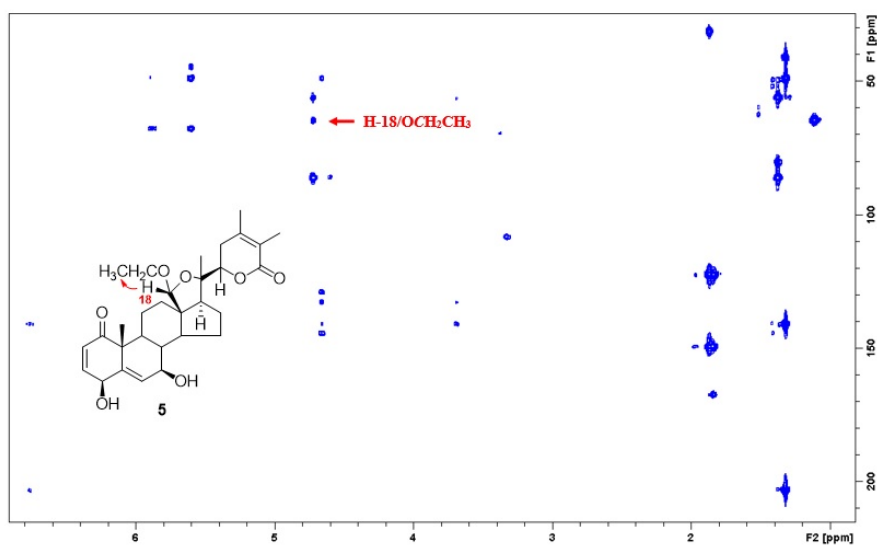


Figura 3.11: Espectro HMBC para el compuesto 5 (CDCl₃; 400,13 MHz)

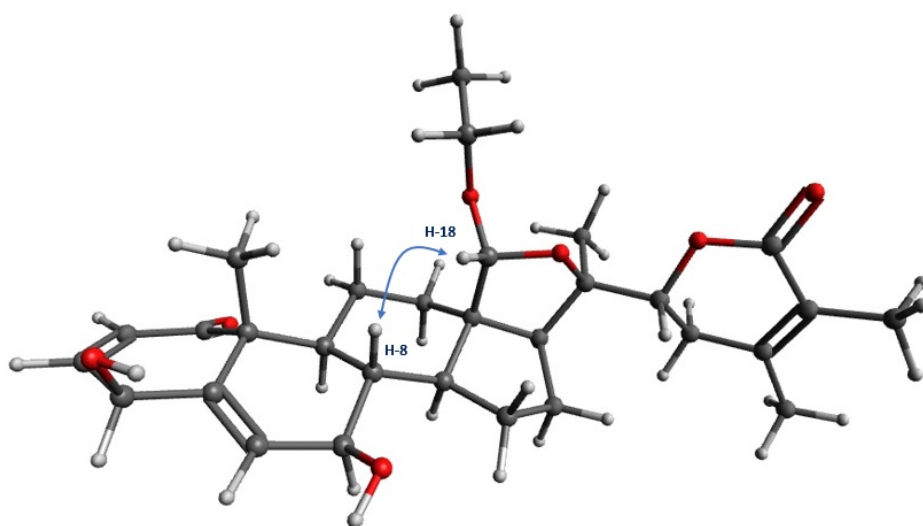


Figura 3.12: NOE relevante para el compuesto 5

Tabla 3.3: Desplazamientos químicos en RMN-¹³C para los compuestos 1 – 5 (CDCl₃, 100,03 MHz)

posición	1	2	3	18R/18S	4	5	posición	1	2	3	18R/18S	4	5
1	203,1	202,5	203,1/202,9	202,5	203,2	203,2	17	54,9	54,9 ^b	56,4/56,7	55,6	56,6	
2	129,5	128,8	128,9	128,9	128,9	128,9	18	14,1	58,8	101,5/103,2	110,2	107,5	
3	142,9	142,4	142,9	142,4	144,7	144,7	19	22,6	22,2	21,7/22,2	22,3	22,7	
4	69,0	68,4	68,3	68,5	67,8	67,8	20	75,5	75,4	85,0/85,1	84,5	86,2	
5	140,8	140,3	139,4/140,2	140,1	141,0	141,0	21	21,3	21,5	21,7/24,7	24,1	20,9	
6	133,9	133,4	133,7/134,4	133,4	132,8	132,8	22	81,3	80,7	80,5/80,4	81,0	80,3	
7	72,0	71,9	70,8/71,1	71,7	70,5	70,5	23	31,2	31,7	31,2/32,2	32,2	31,3	
8	41,25	41,0	42,0/41,2	41,4	44,9	44,9	24	149,1	148,8	148,5/149,7	148,1	149,5	
9	41,31	40,9	41,0/40,7	40,6	41,3	41,3	25	122,4	122,2	122,0	122,3	122,4	
10	49,4	49,0	49,1/49,0	48,9	48,9	48,9	26	166,9	166,8	166,4	166,1	167,4	
11	26,6	22,8 ^d	25,9 ^d	25,6	26,0	26,0	27	12,8	12,2	12,3	12,5	12,8	
12	40,3	34,8	34,7/37,0	36,9	35,0	35,0	28	20,9	20,4	20,2/20,3	20,4	20,8	
13	44,1	54,4	57,3/59,0	55,4	56,2	56,2	OCH ₂ CH ₃	-	-	-	-	64,7	
14	56,5	54,8 ^b	55,7/53,9	53,5	56,5	56,5	OCH ₂ CH ₃	-	-	-	-	15,5	
15	23,5	22,4 ^c	25,3 ^d	25,5	26,4	26,4	OCH ₃	-	-	-	55,1	-	
16	22,7	25,8 ^c	28,3 ^d	29,2	28,9	28,9							

^{b-d}Las asignaciones pueden ser intercambiadas.

En síntesis, en este estudio fitoquímico de la especie *E. iochromoides* fue posible aislar 5 withanólidos siendo cuatro nuevos (2-5) y uno ya conocido (1). Entre estos compuestos es posible plantear relaciones biosintéticas dado que se hallaron compuestos precursores de las withafisalinas encontradas. En este sentido, podemos observar que el compuesto 2 es un derivado del compuesto 1 en donde el C-18 ha sido oxidado a alcohol. Este último una vez oxidado a aldehído (compuesto que postulamos estaría presente pero no fue aislado) rápidamente daría lugar a la formación de un hemiacetal cíclico tal como se observa en el compuesto 3. Los compuestos 4 y 5 son artefactos producidos en el proceso de extracción-purificación realizado. De acuerdo a los antecedentes de actividad biológica para este tipo de productos naturales, se propuso ensayar la actividad antiproliferativa de los mismos. Los resultados de dichos ensayos se presentan en el capítulo 8. Este conjunto de resultados dieron lugar a un trabajo publicado (Castro et al., 2019).

3.2.2. Parte experimental

3.2.2.1. Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el mes de marzo de 2015 encontrándose la especie en estado de floración en Tafí del Valle, Tucumán. El lugar de recolección fue "La curva, viniendo desde Tafí del Valle rumbo al monumento del indio". Un ejemplar ha sido guardado en el Museo Botánico de Córdoba bajo el código Barboza et al. 4391. La especie fue identificada por la Dra. Gloria Barboza (IMBIV-CONICET, FCQ-UNC).

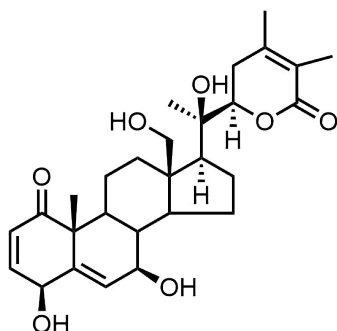
3.2.2.2. Extracción y purificación de metabolitos de interés

Las partes aéreas secas y pulverizadas de *Eriolarynx iochromoides* (130 g) fueron exhaustivamente extraídas mediante lixiviación con EtOH a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado a presión reducida. El residuo resultante (12,7 g) fue retomado en 160 mL de una mezcla 3:1 de EtOH-H₂O y lavado con Hx (Hexano) (5 x 400 mL). Luego de esto, el solvente orgánico (EtOH) fue evaporado a presión reducida. El residuo resultante se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM (Diclorometano) (5 x 300 mL). Las fases de DCM combinadas fueron secadas (Na₂SO₄), filtradas y evaporadas a sequedad a presión reducida. El residuo resultante (5,00 g) se procesó inicialmente utilizando una columna de Sephadex LH-20, usando MeOH (Metanol) como fase móvil. Las fracciones con perfil similar observado en CCD (Cromatografía en Capa Delgada) fueron combinadas y secadas para obtener una fracción de 2,6 g. Esta fracción fue purificada mediante CC (Cromatografía en Columna), utilizando una mezcla de Hx:AcOEt de polaridad creciente (100:0 a 0:100). Se obtuvieron cinco fracciones que contenían withanólidos (Fracciones I-V). La fracción I (200 mg) fue separada por CC usando como fase móvil una mezcla de Hx:AcOEt de polaridad creciente para dar dos nuevas fracciones que se separaron ulteriormente por CCD preparativa (DCM:MeOH) obteniéndose el compuesto 4 (5,3 mg) y el compuesto 5 (6,4 mg). La fracción II (270 mg) fue separada mediante CC utilizando una mezcla de DCM:MeOH de polaridad creciente (100:0 a 90:10) obteniéndose una fracción que posteriormente fue purificada mediante CCD preparativa (DCM:MeOH) para dar el compuesto 4 (14,6 mg). La fracción III (310 mg) se separó mediante CC usando DCM:MeOH en mezclas de polaridad creciente como fase

móvil. Se obtuvo de esta purificación el compuesto **3** (45 mg). La fracción IV (200 mg) fue separada mediante CC (DCM:MeOH) obteniéndose el compuesto **1** (30 mg) y una fracción impura (19 mg) que fue purificada mediante CCD preparativa (DCM:MeOH) para dar el compuesto **2** (1,5 mg). La fracción V (400 mg) fue una mezcla epimérica del compuesto **3**. Se determinó que todos los compuestos tenían una pureza mayor al 95 % mediante RMN-¹H.

3.2.3. Datos físicos y espectroscópicos de los compuestos nuevos aislados de *E. iochromoides*

3.2.3.1. Compuesto 2



[(17*S*,20*R*,22*R*)-4 β ,7 β ,18,20-tetrahidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trienólido]

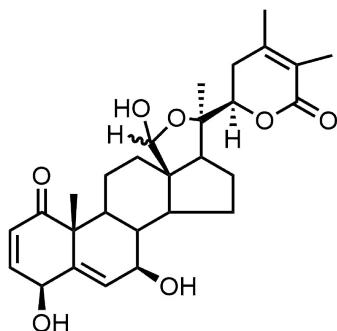
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +57$ (c 0,10; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 208 (3,77) nm; IR (película seca); ν_{\max} 3414 (OH st), 2974 (CH st), 2939 (CH st), 1687 (C=O st) cm^{-1} .

RMN-¹H (CDCl_3 ; 400,13 MHz) δ 6,71 (1H; dd; 10,2; 4,6; H-3); 5,90 (1H; d; 10,2; H-2); 5,73 (1H; sa; H-6); 4,59 (1H; d; 3,3; H-4); 4,24 (1H; dd; 13,0; 3,5; H-22); 3,76 (1H; d; 7,9; H-7); 3,61 (2H; m; H-18); 2,53 (1H; m; H-12a); 2,32 (1H; m; H-23a); 2,14 (1H; m; H-11a); 2,08 (1H; m; 23b); 1,91 (3H; s; H₃-28); 1,83 (3H; s; H₃-27); 1,66 (1H; m; H-9); 1,52 (1H; m; H-11b); 1,47 (1H; m; H-8); 1,43 (3H; s; H₃-19); 1,40 (3H; s; H₃-21); 1,33 (1H; m; H-17); 1,27 (1H; m; H-14); 1,12 (1H; m; H-12b).

RMN-¹³C (CDCl_3 ; 100,03 MHz) δ 202,5 (C; C-1); 166,8 (C; C-26); 148,8 (C; C-24); 142,4 (C; CH-3); 140,3 (C; C-5); 133,4 (CH; C-6); 128,8 (CH; C-2); 122,2 (C; C-25); 80,7 (CH-22); 75,4 (C; C-20); 71,9 (CH; C-7); 68,4 (CH; C-4); 58,8 (CH₂; C-18); 54,9 (CH; C-17); 54,8 (CH; C-14); 54,4 (C; C-13); 49,0 (C; C-10); 41,0 (CH; C-8); 40,9 (CH; C-9); 34,8 (CH₂; C-12); 31,7 (CH₂; C-23); 25,8 (CH₂; C-16); 22,8 (CH₂; C-11); 22,4 (CH₂; C-15); 22,2 (CH₃; C-19); 21,5 (CH₃; C-21); 20,4 (CH₃; C-28); 12,2 (CH₃; C-27).

HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 509,2494 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{NaO}_7$; 509,2510).

3.2.3.2. Compuesto 3: Withafisalina 1



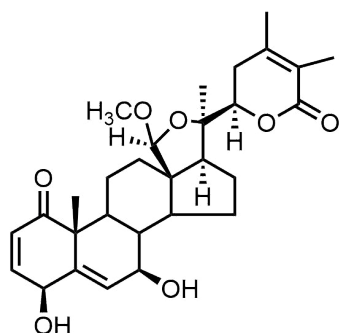
[(17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-4 β ,7 β ,18 α -trihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido/
(17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-4 β ,7 β ,18 β -trihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido]

Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +25,7$ (c 0,21, acetona); λ_{\max} (log ϵ) 210 (3,72) nm; IR (película seca); ν_{\max} 3420 (OH st), 2937 (CH st), 1690 (C=O st), 1385 (CH₃ δ sim) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 6,71 (1H; dd; 10,0; 4,3; H-3); 5,88 (d; 10; H-2); 5,77 (1H; s an.; H-6)/5,84 (1H; s an.; H-6); 5,24 (H; s; H-18)/5,29 (H; s; H-18); 4,73 (m; OH-18); 4,62 (1H; m; H-4); 4,51 (1H; dd; 13,1; 2,2; H-22)/4,39 (1H; dd; 13,4; 3,2; H-22); 3,74 (1H; m; H-7)/3,72 (1H; m; H-7); 2,51 (1H; m; H-12a)/1,97 (1H; m; H-12a); 2,33 (1H; m; H-23a)/2,42 (1H; m; H-23a); 1,98 (1H; m; H-23b)/2,12 (1H; m; H-23b); 1,98 (m)/2,04 (1H; m; H-17); 1,87 (3H; sa; H-28)/1,88 (3H; sa; H-28); 1,79 (3H; s an.; H-27); 1,71 (1H; m; H-9)/1,69 (1H; m; H-9); 1,59 (1H; m; H-8)/1,98 (1H; m; H-8); 1,56 (1H; m; H-12b)/1,45 (1H; m; H-12b); 1,42 (1H; m; H-14)/1,51 (1H; m; H-14); 1,41 (3H; s; H-19)/1,38 (3H; s; H-19); 1,41 (3H; s; H-21)/1,23 (3H; s; H-21).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 203,1 (C; C-1)/202,9 (C; C-1); 166,40 (C; C-26); 148,50 (C-24)/149,7 (C; C-24); 142,9 (CH; C-3); 139,40 (C; C-5)/140,2 (C; C-5); 133,70 (CH; C-6)/134,4 (CH; C-6); 128,90 (CH; C-2); 122,0 (C; C-25); 101,50 (C; C-18)/103,2 (C; C-18); 85,0 (C; C-20)/85,1 (C; C-20); 80,5 (CH; C-22)/80,4 (CH; C-22); 70,8 (CH; C-7)/71,1 (CH; C-7); 68,3 (CH; C-4); 57,3 (C; C-13)/59,0 (C; C-13); 56,4 (CH; C-17)/56,7 (CH; C-17); 55,7 (CH; C-14)/53,9 (CH; C-14); 49,1 (C; C-10)/49,0 (C; C-10); 42,0 (CH; C-8)/41,6 (CH; C-8); 41,0 (CH; C-9)/40,7 (CH; C-9); 34,7 (CH₂; C-12)/37,0 (CH₂; C-12); 31,2 (CH₂; C-23)/32,2 (CH₂; C-23); 28,30 (CH₂; C-16); 25,9 (CH₂; C-11); 25,3 (CH₂; C-15); 21,7 (CH₃; C-21)/24,7 (CH₃; C-21); 21,7 (CH₃; C-19)/22,2 (CH₃; C-19); 20,2 (CH₃; C-28)/20,3 (CH₃; C-28); 12,3 (CH₃; C-27).

HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 507,2387 (calculado para C₂₈H₃₆NaO₇; 507,2353).

3.2.3.3. Compuesto 4: 18 β -O-Metilwithafisalina 1

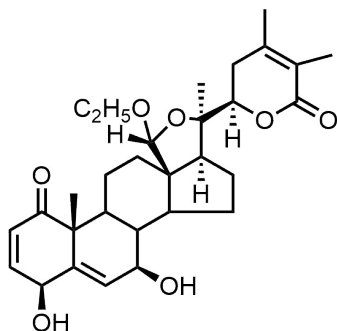
[(17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-4 β ,7 β -dihidroxi-18 β -metoxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido]

Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +88.73$ (c 0,11; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 202,5 (3,68) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3390 (OH st), 2940 (CH st), 2878 (CH st), 1684 (C=O st) cm^{-1} .

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 6,73 (1H; dd; 10,0; 4,4; H-3); 5,92 (1H; d; 10,0; H-2); 5,78 (1H; d; 1,7; H-6); 4,71 (1H; s; H-18); 4,62 (1H; s an.; H-4); 4,38 (1H; dd; 13,0; 3,2; H-22); 3,82 (1H; s an.; H-7); 3,26 (s; OCH₃); 2,38 (1H; m; H-11a); 2,37 (1H; t; 13,0; H-23a); 2,11 (1H; m; H-16a); 2,09 (1H; m; H-23b); 2,04 (1H; m; H-12a); 1,98 (1H; m; H-17); 1,88 (3H; s an.; H₃-28); 1,84 (3H; s an.; H₃-27); 1,79 (1H; m; H-15a); 1,73 (1H; m; H-16b); 1,72 (1H; m; H-9); 1,64 (1H; m; H-8); 1,51 (1H; m; H-14); 1,45 (1H; m; H-12b); 1,44 (1H; m; H-11b); 1,44 (1H; m; H-15b); 1,41 (3H; s; H₃-19); 1,30 (3H; s; H₃-21).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 202,5 (C; C-1); 166,1 (C; C-26); 148,1 (C; C-24); 142,4 (CH; C-3); 140,1 (C; C-5); 133,4 (CH; C-6); 128,9 (CH; C-2); 122,3 (C; C-25); 110,2 (CH; C-18); 84,5 (C; C-20); 81,0 (CH; C-22); 71,7 (CH; C-7); 68,5 (CH; C-4); 55,6 (CH; C-17); 55,4 (C; C-13); 55,1 (OCH₃); 53,5 (CH; C-14); 48,9 (C; C-10) 41,4 (CH; C-8); 40,6 (CH; C-9); 36,9 (CH₂; C-12); 32,2 (CH₂; C-23); 29,2 (CH₂; C-16); 25,6 (CH₂; C-11); 25,5 (CH₂; C-15); 24,1 (CH₃; C-21); 22,3 (CH₃; C-19); 20,4 (CH₃; C-28); 12,5 (CH₃; C-27).

HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 521,2481 (calculado para C₂₉H₃₈NaO₇; 521,2510).

3.2.3.4. Compuesto 5: 18 α -O-etil-withafisalina 1

[(17*S*,20*R*,22*R*)-18,20-epoxi-18 α -etoxi-4 β ,7 β -dihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trien-26,22-ólido]

Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +70$ (c 0,2; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 207 (3,76) nm; IR (película seca) ν 3387 (OH st), 2921 (CH st), 2851 (CH st), 1687 (C=O st), 1380 (CH₃ δ sim) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃, 400,13 MHz) δ 6,77 (1H; dd; 10,2; 4,3; H-3); 5,88 (d an.; 10;2) 5,59 (1H; d; 2,0; H-6); 4,72 (1H; s; H-18); 4,66 (1H; d; 4,1; H-4); 4,58 (1H; dd; 13,6; 3,2; H-22); 4,46 (1H; d an.; 12,1; H-12a); 3,85-3,28 (m; OCH²CH³); 3,68 (1H; d; 7,8; H-7); 2,36 (1H; t; 13,1; H-23a); 2,13 (1H; m; H-11a); 1,98 (1H; m; H-23b); 1,93 (1H; m; H-17); 1,87 (3H; s an.; H₃-28); 1,83 (3H; s an.; H₃-27); 1,78 (1H; m; H-16a); 1,75 (1H; m; H-11b); 1,71 (1H; m; H-9); 1,62 (1H; m; H-15a); 1,51 (1H; m; H-12b); 1,46 (1H; m; H-14); 1,46 (1H; m; H-16b); 1,41 (1H; m; H-15b); 1,37 (3H; s; H₃-21); 1,31 (3H; s; H₃-19); 1,24 (1H; m; H-8) 1,11 (t; 7,1; OCH₂CH₃).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 203,2 (C; C-1); 167,4 (C; C-26); 149,5 (C; C-24); 144,7 (CH; C-3); 141,0 (C; C-5); 132,8 (CH; C-6); 128,9 (CH; C-2); 122,4 (C; C-25); 107,5 (CH; C-18); 86,2 (C; C-20); 80,3 (CH; C-22); 70,5 (CH; C-7); 67,8 (CH; C-4); 64,7 (OCH₂CH₃); 56,6 (CH; C-17); 56,5 (CH; C-14); 56,2 (C; C-13); 48,9 (C; C-10); 44,9 (CH; C-8); 41,3 (CH; C-9); 35,0 (CH₂; C-12); 31,3 (CH₂; C-23); 28,9 (CH₂; C-16); 26,4 (CH₂; C-15); 26,0 (CH₂; C-11); 22,7 (CH₃; C-19); 20,9 (CH₃; C-21); 20,8 (CH₃; C-28); 15,5 (OCH₂CH₃); 12,8 (CH₃; C-27).

HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 535,2646 (calculado para C₃₀H₄₀NaO₇; 535,2666).

3.3. El género *Jaborosa* Juss.

Las Solanáceas que constituyen el género *Jaborosa* son hierbas sudamericanas de particular interés taxonómico, florístico y fitogeográfico. El género *Jaborosa* Juss. comprende 22 especies (23 taxones) distribuidas desde el sur de Perú y Bolivia hasta Tierra del Fuego en Argentina y el sur de Chile (Barboza, 2013). Las especies de *Jaborosa* son en su mayoría hierbas perennes rizomatosas que crecen, con la excepción de tres especies, principalmente en regiones semiáridas ubicadas a gran altura en los Andes o en latitudes altas en el desierto del Monte y la estepa patagónica templada de la Argentina más austral (Barboza y Hunziker, 1987). Las tres especies restantes se encuentran principalmente en los pastizales de tierras bajas, ya sea en las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (*J. integrifolia* Lam., *J. runcinata* Lam.) o en la región occidental del Chaco (*J. odonelliana* Hunz.). Las especies de *Jaborosa* exhiben una sorprendente variación interespecífica en los rasgos florales que van desde las flores blancas nocturnas con tubos de corola muy largos que están perfumados y producen abundante néctar, hasta las flores diurnas, granate oscuras con corolas rotadas que emiten olores desagradables y carecen o tienen un nectario reducido (Cocucci, 1999).

Argentina es el país con mayor número de especies, pues totaliza 21 del total de 23 del género; de aquéllas, 11 son endémicas de su territorio (*J. oxipetala*, *J. odonelliana*, *J. sativa*, *J. bergii*, *J. ameghinoi*, *J. kurtzii*, *J. riojana*, *J. lanigera*, *J. cabraerae*, *J. chubutensis* y *J. leucotricha*), 5 las comparte con Chile (*J. laciniata*, *J. reflexa*, *J. araucana*, *J. magellanica* y *J. caulescens* var. *caulescens* y var. *bipinnatifida*), y una con Uruguay (*J. integrifolia*), otra con Bolivia (*J. rotacea*), otra con Chile y Bolivia (*J. parviflora*), y una última con Perú, Bolivia y Chile (*J. squarrosa*). Por otro lado, Chile tiene 2 endemismos (*J. pinnata* y *J. volckmannii*). Las especies con área geográfica más extensa son dos endemismos argentinos: *J. bergii* y *J. leucotricha*, que habitan principalmente la Provincia del Monte. La especie más austral es *J. magellanica*, y la más boreal es *J. squarrosa*. A menudo las especies de *Jaborosa* viven en suelos pedregosos de las altas montañas, entre los 2500 y 4500 m.s.m., alcanzando *J. lanigera* los 5050 m.s.m.; unas 8 especies crecen en lugares áridos desde los 100 m.s.m. hasta los 2200 m.s.m. aproximadamente; otras son propias de zonas más húmedas como *J. odonelliana*, *J. oxipetala* y *J. sativa* (Barboza y Hunziker, 1987).

Tradicionalmente, el género *Jaborosa* estuvo agrupado junto a *Salpichroa* Miers y *Nectouxia* Knuth en la tribu Jaborosae Miers (Barboza y Hunziker, 1987; Hunziker, 2001). Sin embargo, recientes estudios moleculares posicionan a *Salpichroa* alejada de *Jaborosa*, en un pequeño clado denominado "Salpichroina" de posición no resuelta entre los clados Capsiceae y Physalideae (Olmstead et al., 2008; Särkinen et al., 2013). Por el contrario, *Jaborosa* se agruparía junto a las tribus *Hyoscyameae* y *Lycieae*, y los géneros *Nolana* L. f., *Sclerophylax* Miers y *Latua* Phil. en un clado moderadamente bien soportado denominado "Atropina" (Olmstead et al., 2008; Särkinen et al., 2013; Tu et al., 2008, 2010; Levin et al., 2011).

Recientes análisis filogenéticos basados en datos de genética molecular (marcadores plastidiales y nucleares) apoyan la monofilia del género *Jaborosa* con especies recuperadas en dos grandes clados bien soportados: clado "L" (Lowland clade, clado de la Llanura), reuniendo tres especies con flores esfingófilas (*J. integrifolia*, *J. odonelliana* y *J. runcinata*) y clado "A" (Andean clade, clado Andino) incluyendo el resto de las espe-

cies distribuidas principalmente a través de los Andes y en América del Sur (Moré et al., 2015). Estos hallazgos difieren ligeramente de la división anterior del género en dos secciones (sec. Jaborosa y sec. Lonchestigma (Dunal) Wettst.), división basada en rasgos palinológicos (Barboza, 1986) y morfológicos (Barboza y Hunziker, 1987). La sección Jaborosa se caracterizó entonces por hojas enteras y granos de polen lisos, porados e incluía a *J. integrifolia*, *J. odonelliana*, *J. oxipetala* y *J. runcinata*. Las especies restantes fueron colocadas en la sección Lonchestigma, caracterizada por hojas pinadas y granos de polen reticulados colporados. La única diferencia es que *J. oxipetala*, una especie pequeña de flores restringida al bosque nuboso de las Yungas de Argentina, se recupera por Moré et al. (2015) en el clado Andino y no en el clado de las Llanuras. Se realiza esta comparativa entre la nueva clasificación y la anterior a modo de facilitar al lector la correcta interpretación de los estudios fitoquímicos realizados previamente en especies del género *Jaborosa*, los cuales siguen la clasificación en secciones que hoy no se encuentra vigente.



(a) *Jaborosa volckmannii*



(b) *Jaborosa integrifolia*



(c) *Jaborosa rotacea*



(d) *Jaborosa sativa*

Figura 3.13: Especies pertenecientes al género *Jaborosa*

3.3.1. Química del género *Jaborosa*

El género *Jaborosa* ha sido ampliamente estudiado fitoquímicamente, estando más del 50 % de las especies analizadas hasta el momento. De estos estudios se desprende que los esqueletos de withanólidos que más frecuentemente se han encontrado en este género son (Figura 3.14):

- Para el género (clado) *Jaborosa* (Llanuras): anillo A aromático, espiránico- γ -lactonas, esqueleto sin modificar;
- Para el género (clado) *Jaborosa* (Andino): tipo norbornano, sativólidos, espiránico- γ -lactonas (espiránico en C-23), espiránico- δ -lactona (espiránico en C-22), trechonólidos, esqueleto sin modificar.

3.3.2. Consideraciones Quimiotaxonómicas

Algunos géneros de la familia Solanaceae contienen withanólidos con interesantes arreglos exclusivos que pueden considerarse a nivel genérico como marcadores quimiotaxonómicos. *Jaborosa* es un buen ejemplo dado que más del 50 % de las especies de este género han sido estudiadas. En este género, varios withanólidos con esqueleto modificado aparecen de manera repetitiva en diferentes especies, como los sativólidos, trechonólidos, withanólidos espiránicos en C-22 y withanólidos con esqueleto espiránico- γ -lactonas (Misico et al., 2011).

Los trechonólidos, sativólidos y los withanólidos espiránicos en C-22 son arreglos exclusivos de especies de *Jaborosa*, clado Andino ex sección *Lonchestigma*. Los trechonólidos son los más esparcidos en el género, estando presentes en 9 especies hasta el momento (*J. araucana*, *J. caulescens*, *J. laciniata*, *J. lanigera*, *J. leucotricha*, *J. magellanica*, *J. parviflora*, *J. rotacea* y *J. sativa*); los sativólidos aparecen en *J. caulescens*, *J. rotacea* y *J. sativa*, mientras que los withanólidos espiránicos en C-22 están sólo presentes en *J. kurtzii* y *J. rotacea* (Misico et al., 2011).

Withanólidos con esqueleto espiránico- γ -lactonas han sido aislados de *J. odonellilana*, *J. runcinata* y *J. integrifolia*, todas especies pertenecientes al clado de las Llanuras ex sección *Jaborosa*. Sólo un withanólido con este esqueleto ha sido aislado de *J. araucana* (clado Andino, ex sección *Lonchestigma*) (Misico et al., 2011).

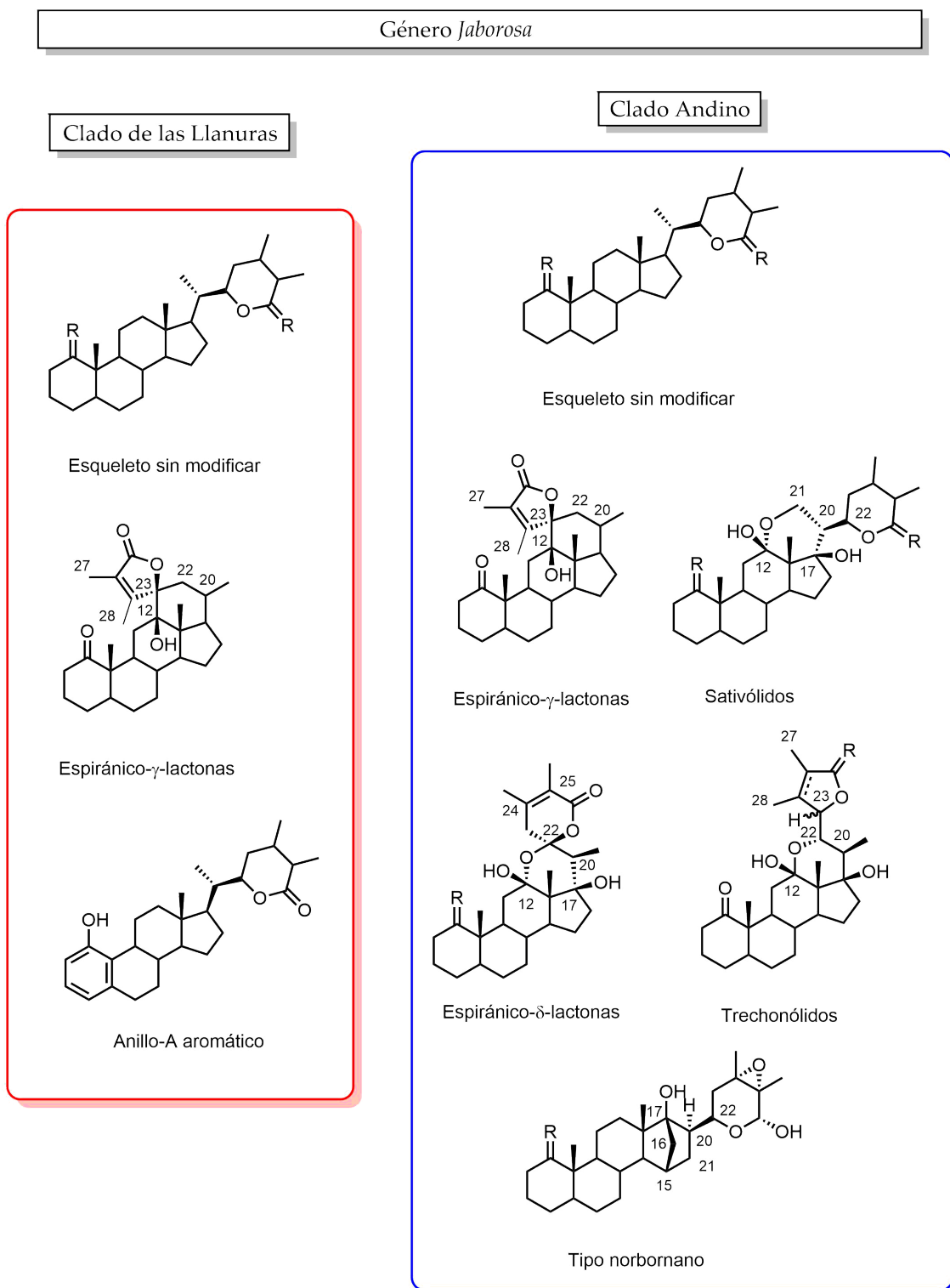


Figura 3.14: Esqueletos de withanólidos aislados en especies de *Jaborosa*

3.4. Estudio fitoquímico de *Jaborosa oxipetala*

3.4.1. Resultados y Discusión

Como parte de nuestra búsqueda de withanólidos en Solanaceae, se propuso el estudio fitoquímico de *Jaborosa oxipetala*. La especie no presentaba estudios fitoquímicos previos publicados.

Las partes aéreas de *Jaborosa oxipetala* se secaron y se extrajeron con EtOH. Luego de concentrar y desgrasar, el residuo fue fraccionado mediante una combinación de diferentes técnicas cromatográficas, para obtener finalmente los compuestos 6–11 (Figura 3.15).

Todos los compuestos fueron aislados previamente en otras especies del género *Jaborosa*: compuesto 6, (jaborosalactona 2, aislado de *J. runcinata* por [Cirigliano et al. \(1996\)](#)); compuesto 7 (jaborosalactona 27, aislado de *J. rotacea* por [Nicotra et al. \(2006\)](#)), compuesto 8 (jaborosotetrol, aislado de *J. magellanica* por [Fajardo et al. \(1991\)](#)); compuesto 9 (jaborosalactona S, aislado de *J. sativa* por [Bonetto et al. \(1995\)](#)); compuesto 10 (jaborosalactona 43, aislado de *J. kurtzii* por [Ramacciotti y Nicotra \(2007\)](#)); excepto 11, un triterpeno aislado de *Ficus microcarpa* o laurel de Indias (Fam. Moraceae) y en varias otras especies ([Chiang et al., 2005](#)).

Según los resultados obtenidos, *Jaborosa oxipetala* posee withanólidos con los siguientes esqueletos:

- Espiránico en C-23 (6): todos los withanólidos con este esqueleto contienen una cadena lateral con un enlace C-12 del núcleo esteroidal intacto y el C-23; y una lactona de 5 miembros. En este caso, los corrimientos químicos en RMN-¹³C para C-23 (δ 91,2) y C-26 (δ 173,9) fueron indicativos de la presencia de estas características estructurales.
- Espiránico en C-22 (7 y 10): Este grupo de withanólidos tiene un puente hemiacetálico entre lo que previamente debe haber sido una función cetona en C-12 y C-22. Esto da lugar a un nuevo anillo de seis miembros con un OH orientado beta en C-12 y un carbono espiránico en C-22 tras la formación de la δ -lactona. En este caso, los corrimientos químicos en RMN-¹³C para C-22 (δ 104) y C-26 (δ 165) y C-12 (δ 100,6) fueron indicativos de la presencia de estas características estructurales.
- Trechonólido (8): Caracteriza este esqueleto un enlace hemiacetálico que se habría formado por reacción de un grupo OH-22 y un grupo cetona en C-12, resultando en un nuevo anillo de seis miembros con un grupo OH-22 orientado beta. En este caso, los corrimientos químicos en RMN-¹³C para C-12 (δ 102,4) y C-26 (δ 175) fueron indicativos de la presencia de estas características estructurales. Un corrimiento químico en ¹³C para C-23 de \approx 82 ppm y la presencia de una lactona de cinco miembros, completan las características principales de este esqueleto.
- Sativólido (9): Estos withanólidos tienen un puente oxígeno entre C-21 y C-12 en el núcleo esteroidal. El anillo adicional de seis miembros (hemiacetal o acetal) es el resultado de la reacción entre una cetona en C-12 y un grupo OH-21. Los corrimientos químicos en RMN-¹H para H-21b (δ 3,98) y H-21a (δ 3,64), la ausencia

de un grupo metilo en C-21; junto con corrimientos químicos en RMN-¹³C para C-12 (≈ 100 ppm) y para C-21 (≈ 58 ppm) fueron indicativos de que se trataba de un withanólido tipo sativólido.

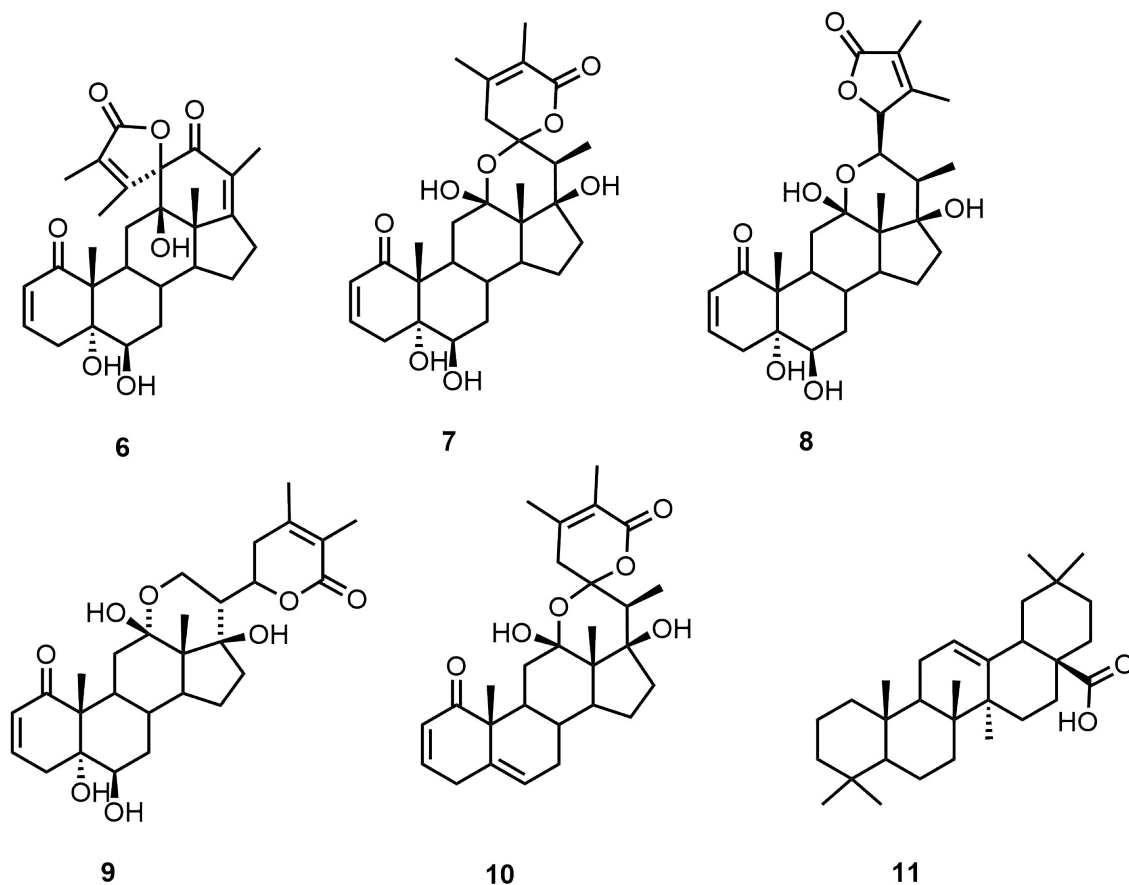


Figura 3.15: Compuestos aislados de *Jaborosa oxipetala*

Todos estos esqueletos han sido encontrados previamente en especies del género, entre los que se destaca el compuesto **8** con un esqueleto tipo trechonólido, esqueleto que ha sido reportado en la mayoría de las especies estudiadas de *Jaborosa*. Los compuestos aislados comparten el mismo patrón de sustitución, 1-oxo-2-en-5 α ,6 β -diol en los anillos A y B, salvo el compuesto **10** que presenta una doble ligadura entre las posiciones C-5 y C-6. La similitud estructural y los antecedentes biosintéticos (Misico et al., 2011) permiten proponer que los compuestos **7** y **10** están relacionados, siendo **10** un precursor de **7**. Como se puede observar en la Figura 3.16, la formación biogénica de un epóxido-5,6 a partir de **10** y la posterior apertura del mismo daría lugar a **7**.

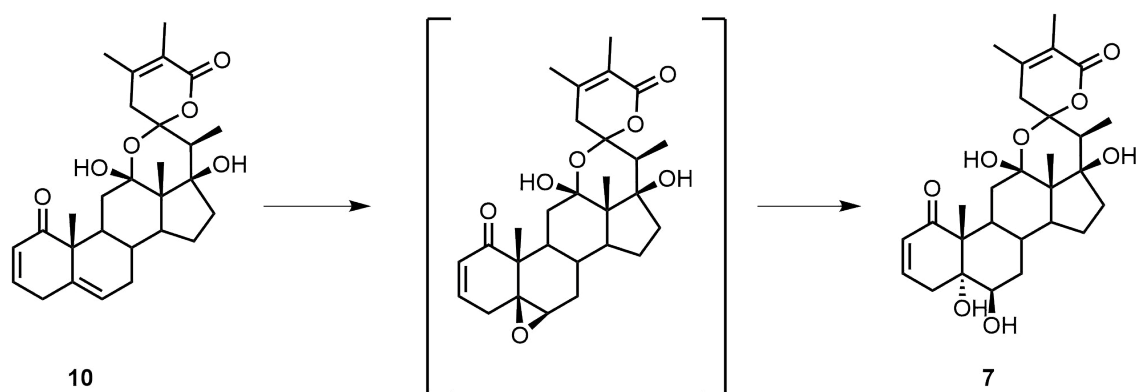


Figura 3.16: Propuesta biosintética que vincula los compuestos **7** y **10** aislados de *Jaborosa oxipetala*

Finalmente, la reciente propuesta de Moré et al. (2015) de colocar la especie en el clado Andino estaría respaldada por estos resultados salvo por la presencia del compuesto **6**, cuyo esqueleto espiránico- γ -lactona ha sido encontrado, en general, en especies del clado de las Llanuras.

3.4.2. Parte Experimental

3.4.2.1. Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el mes de marzo de 2015 encontrándose la especie en estado de floración en Dpto. Tafí del Valle: El Durazno Blanco, entre Km 45/44 de la RP 307, viniendo desde Tafí del Valle, Tucumán. Un ejemplar ha sido guardado en el Museo Botánico de Córdoba bajo el código Barboza et al. 4300 (CORD). La especie fue identificada por la Dra. Glora Barboza (IMBIV-CONICET, FCQ-UNC).

3.4.2.2. Extracción y purificación de metabolitos de interés

Las partes aéreas secas y pulverizadas de *Jaborosa oxipetala* (66 g) fueron exhaustivamente extraídas mediante lixiviación con EtOH a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado a presión reducida. El residuo resultante (4,8 g) fue retomado en 160 mL de una mezcla 3:1 de EtOH-H₂O y lavado con Hx (5 x 400 mL). Luego de esto, el solvente (EtOH) fue evaporado a presión reducida. El residuo resultante se diluyó con H₂O y se extrajo con DCM (5 x 300 mL). Las fases orgánicas (DCM) combinadas fueron secadas (Na₂SO₄), filtradas y llevadas a sequedad a presión reducida. El residuo resultante (1,44 g) se procesó inicialmente, utilizando una columna de exclusión molecular (Sephadex LH-20), usando MeOH como fase móvil. Las fracciones con perfil similar observado en CCD fueron combinadas y secadas para obtener una fracción (con contenido en withanólidos) de 1 g. Esta fracción fue purificada utilizando cromatografía en columna usando una mezcla de DCM:MeOH de polaridad creciente (100:0 a 80:20) obteniéndose cuatro fracciones conteniendo compuestos de interés (Fracciones I-IV). La fracción I (52,1 mg) fue separada mediante CC usando como fase móvil una mezcla de DCM:MeOH de polaridad creciente para dar dos nuevas fracciones que se separaron ulteriormente por CCD preparativa (DCM:MeOH) obteniéndose el compuesto **11** (9,6 mg). La fracción II (23,7 mg) fue separada mediante CC utilizando una mezcla de DCM:MeOH de polaridad creciente (100:0 a 90:10) obteniéndose el compuesto **7** (3 mg). La fracción III (46,6 mg) se separó mediante CC usando DCM:MeOH en mezclas de polaridad creciente como fase móvil. Se obtuvo de esta purificación el compuesto **10** (3 mg). La fracción IV (50,6 mg) fue separada mediante CC (DCM:MeOH) obteniéndose los compuestos **6** (6 mg), **8** (5 mg), **9** (0,5 mg). Se determinó que todos los compuestos tenían una pureza mayor al 95 % mediante RMN-¹H.

Parte I: Conclusiones parciales

Se llevó a cabo el estudio fitoquímico de dos especies endémicas del NOA pertenecientes a la Fam. Solanaceae: *Eriolarynx iochromoides* y *Jaborosa oxipétala*. De ellas se aislaron y caracterizaron 11 compuestos con esqueleto tipo withanólido, siendo 4 nuevos y 7 conocidos.

De *E. iochromoides* se aislaron 5 withanólidos entre los que se encuentran 3 con esqueleto tipo withafisalina y 2 withanólidos biosintéticamente relacionados a éstas. En este sentido, podemos observar que el compuesto **2** es un derivado del compuesto **1** en donde el C-18 ha sido oxidado a alcohol. Este último una vez oxidado a aldehído (compuesto que postulamos estaría presente pero no fue aislado) rápidamente daría lugar a la formación de un hemiacetal cíclico tal como se observa en el compuesto **3**. Los compuestos **4** y **5** son artefactos producidos en el proceso de extracción-purificación realizado (Figura 3.4).

Los resultados de este estudio son coherentes con la química ya reportada para el género *Eriolarynx*. En este sentido, las withafisalinas están distribuidas de manera limitada en el reino vegetal. Se han aislado exclusivamente en la tribu Physalideae, con más frecuencia en la subtribu Iochrominae, pero también en Physalidinae y en Withaninae (Mísico et al., 2011). Razón por la cual pueden ser consideradas marcadores quimiota-xonómicos a nivel tribal. Los resultados aquí obtenidos refuerzan esta propuesta.

De *J. oxipétala* se aislaron 5 withanólidos con diversidad estructural tal y como se observa en otras especies del género donde es frecuente encontrar withanólidos con esqueletos sativólido, trechonólido, espiránico en C-23 y espiránico en C-22. Todos los withanólidos aislados en esta especie, ya se encuentran descritos en la literatura; coincidiendo los datos espectroscópicos aquí obtenidos con los reportados. Aún así, estos resultados podrían ser de gran valor para la revisión botánica del género, revisión que se viene realizando en los últimos años y que tiene como propuesta más reciente la clasificación de las especies en dos clados: Andino y de las Llanuras. *J. oxipétala*, según esta clasificación, pertenecería al clado Andino. El resto de las especies que pertenecen a este clado comparten los mismos esqueletos de withanólidos que se encontraron en *J. oxipétala*, salvo por un sólo compuesto cuyo esqueleto es tipo espiránico- γ -lactona, hallado en especies del clado de las Llanuras (Moré et al., 2015).

Parte II

Familia Asteraceae

Capítulo 4

Familia Asteraceae: Introducción

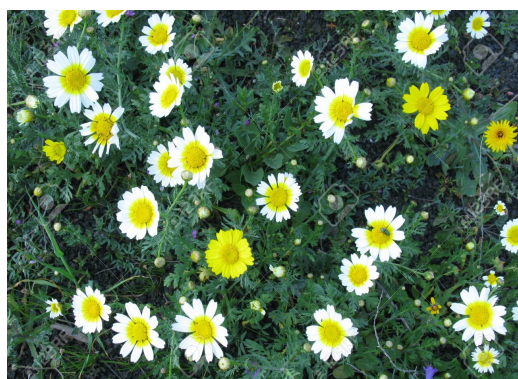
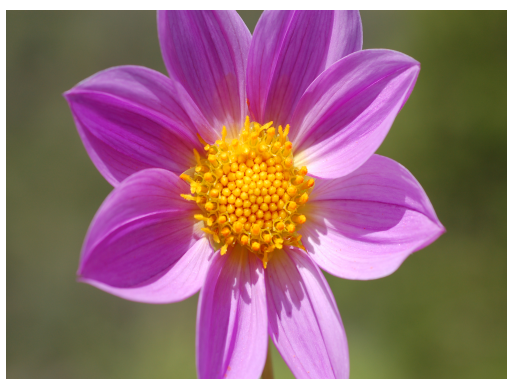
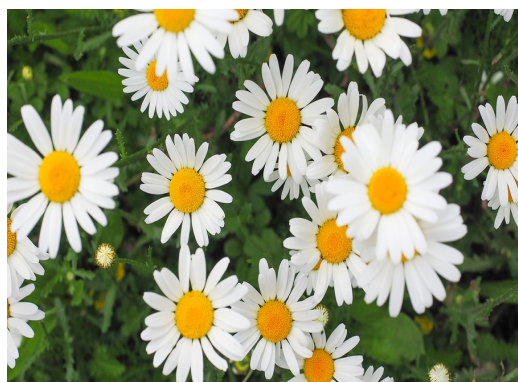
*"No hay rosas sin espinas",
es un dicho demasiado melancólico.
Digamos, en cambio:
"No hay espinas sin rosas".*

Chiara Lubich

4.1. Generalidades

Los crisantemos (*Chrisantemum* Neck. spp.), margaritas (*Bellis perennis* L.), dalias (*Dahlia* Cav. spp.), girasoles (*Helianthus annuus* L.), cardos (*Cardus* L. spp.), la achicoria (*Cichorium intybus* L.) y la lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Figura 4.1) son algunos de los representantes de la familia Asteraceae, familia que comprende tres subfamilias y 17 subtribus. Comúnmente llamada de las Compuestas, es la más numerosa entre las plantas vasculares, con cerca de 24000 especies y más de 1500 géneros (Funk et al., 2009). Se encuentra ampliamente distribuida en las regiones subtropicales, templado-cálidas y templadas de todos los continentes excepto la Antártida. Los principales ambientes ocupados por las Compuestas son los pastizales gramínicos, las estepas arbustivas y las regiones montañosas, siendo menos frecuentes en los claros de selvas. Se reconocen por su estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma séstil sobre un receptáculo ensanchado.

Considerando taxones nativos y adventicios, Asteraceae representa la familia vegetal más numerosa de la República Argentina, con 227 géneros, cinco son endémicos y cerca de 1400 especies (Cabrera, 1961; Zuloaga et al., 1999). De la totalidad de especies 92 son exóticas o adventicias y unas 382 son endémicas; de las especies endémicas un poco menos de la mitad pertenecen al género *Senecio* L. Se distribuye en la mayoría de los biomas, adaptándose a diferentes suelos, climas y relieves. Existen especies típicas de suelos salinos, de suelos húmedos e inundables (*Senecio bonariensis* Hook. & Arn., entre otros) de suelos rocosos, algunas son dunicolas (*Senecio crassiflorus* Poir.), otras habitan las selvas, las vegas altoandinas (*Senecio hieracium* J. Remy) o las orillas de los ríos. Asteraceae tiene adaptaciones particulares a estos distintos ambientes, por ejemplo en la provincia fitogeográfica de la Puna, al déficit de agua, a la baja humedad atmosférica,

(a) *Chrysanthemum coronarium*(b) *Dahlia sherffii*(c) *Bellis perennis*(d) *Lactuca sativa***Figura 4.1:** Ejemplos de especies pertenecientes a la Fam. Asteraceae

a la gran radiación solar y temperaturas nocturnas inferiores a 0 °C durante todo el año.

Algunas de estas adaptaciones morfológicas son tallos espiniformes, formación de braquiblastos, plantas acaudales (carecen de tallos y las hojas están dispuestas en una roseta basal. La roseta es una disposición circular de hojas que se encuentran a la misma altura, generalmente al ras del suelo, durante el invierno), hojas pequeñas, carnosas, enroscadas, espiniformes y escamiformes. También hay adaptaciones anatómicas, como gran desarrollo de escleréquima tal es el caso de *Senecio dryophyllus* Meyen & Walp (Katinas et al., 2007).

4.2. Fitoquímica de la Familia Asteraceae

La gran diversidad morfológica y geográfica de Asteraceae se refleja en su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios que incluyen: monoterpenos, sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenos, poliacetilenos, flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos, cumarinas y alcaloides pirrolizidínicos (estos alcaloides están confinados a Senecionineae y Eupatorieae). Las principales vías biosintéticas se derivan de acetyl-CoA y/o aminoácidos que conducen a una notable

cantidad de estructuras únicas aisladas de casi todas las tribus y géneros investigados. La figura 4.2 muestra un ejemplo de cada una de las principales clases de compuestos encontrados en Asteraceae (Anderberg et al., 2007).

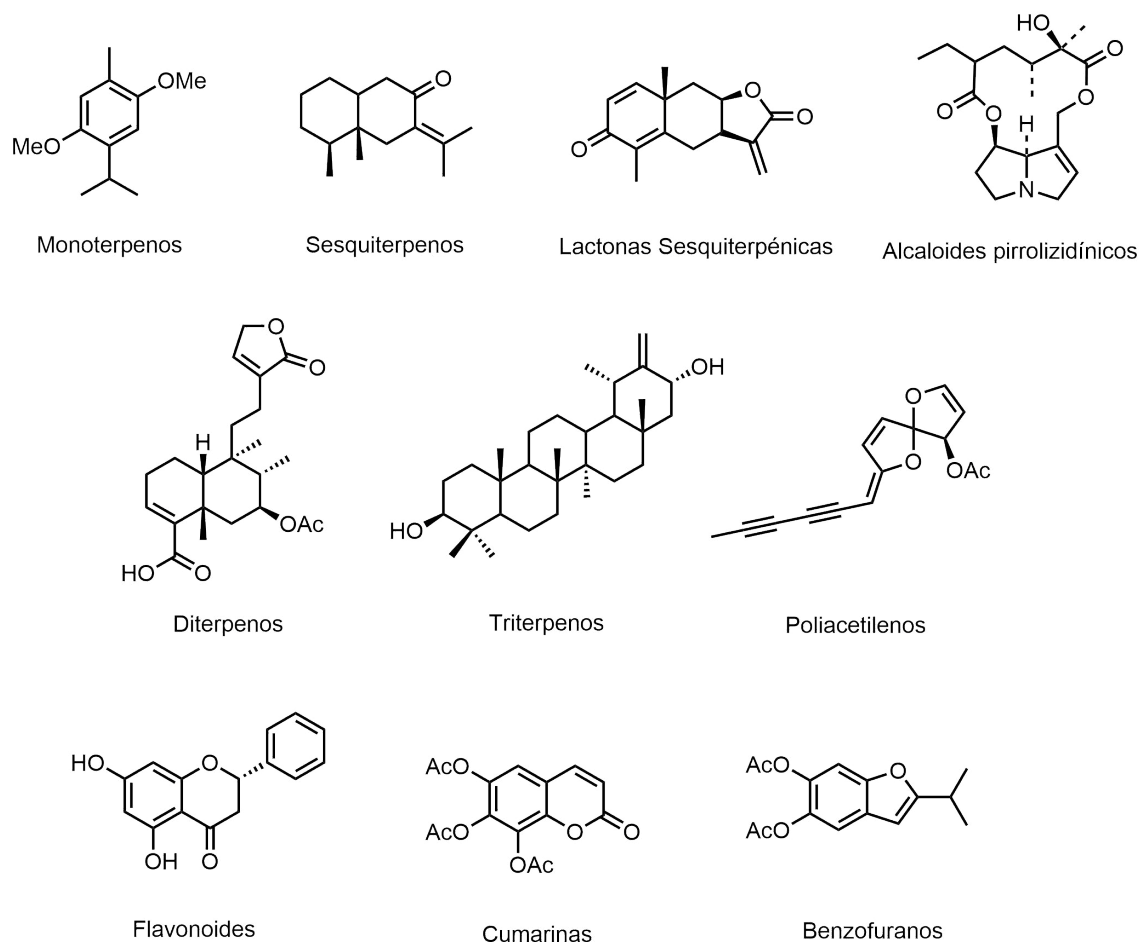


Figura 4.2: Ejemplos de las nueve mayores clases de metabolitos secundarios encontrados en especies de Asteraceae

Uno de los trabajos más sobresalientes sobre la química de Asteraceae, ha sido sin dudas el de Zdero y Bohlman (1990) en un artículo que resume hitos importantes en nuestra comprensión de la diversidad química encontrada en esta familia. Los autores describieron más de 7000 componentes identificados de más de 5000 especies estudiadas antes de 1990 y proporcionaron una evaluación amplia de los datos fitoquímicos disponibles. Los autores señalaron la especial tendencia a la acumulación de lactonas sesquiterpénicas y poliacetilenos, así como la aparición de muchos compuestos altamente oxidados, un patrón que hasta el día de hoy se considera el perfil químico característico compartido por la mayoría de las especies en Asteraceae.

Debido al interés que revisten para el presente trabajo de tesis doctoral, a continuación se describen las características principales de los sesquiterpenos, las lactonas sesquiterpénicas y los alcaloides pirrolizidínicos presentes en Asteraceae.

4.2.1. Sesquiterpenos

Los terpenos constituyen la familia más grande de sustancias de ocurrencia natural, se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y, en menor medida, en el reino animal. Se pueden clasificar de acuerdo al número de átomos de carbono en varios grupos, siendo los sesquiterpenos aquellos con 15 átomos de carbono en su estructura química. Hasta la fecha, representantes de estos terpenoides, que comprenden más de 200 diferentes esqueletos de carbono han sido aislados tanto de plantas marinas y terrestres, así como también de hongos y microorganismos.

Las plantas producen una amplia variedad de terpenos en comparación con animales y microbios, diferencia que refleja la compleja organización de su biosíntesis a nivel tisular, celular, subcelular y genético. La producción de grandes cantidades de terpenos, como así también su acumulación, emisión o secreción está asociada con la presencia de estructuras anatómicas altamente especializadas. La biosíntesis de terpenoides se organiza a nivel subcelular: los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se sintetizan en el citosol y en el retículo endoplasmático, mientras que los isoprenos, monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos se biosintetizan casi exclusivamente en los plástidos (Croteau et al., 2000).

La ruta biosintética para la síntesis de isopentenildifosfato (IPP), precursor fundamental de los terpenoides en el citosol, involucra la condensación de tres moléculas de acetil-CoA catalizada por tiolasa e hidroximetil-glutaril-CoA sintasa para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) el cual es reducido por HMG-CoA reductasa para originar ácido mevalónico (Figura 4.3). Dos fosforilaciones ATP dependientes y posterior decarboxilación de dicho ácido origina IPP. Estudios recientes han indicado que la biosíntesis de IPP puede proceder a través de dos vías independientes: de MVA en el citoplasma y de 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) en los plástidos (Adam y Zapp, 1998; Rohmer, 2003; Bick y Lange, 2003; Matusova et al., 2005).

La isomerización de IPP por la enzima IPP isomerasa produce el isómero alílico dimetilalildifosfato (DMAPP). El DMAPP se condensa con otra molécula de IPP para dar geranyl difosfato (GPP, C₁₀). La repetición del ciclo de reacción por adición de una molécula de IPP, catalizada por la enzima farnesil difosfato sintasa lleva a la formación de farnesil difosfato (FPP, C₁₅), precursor inmediato de la síntesis de sesquiterpenos (Figura 4.3) (Cane, 1990).

La gran diversidad de estructuras encontradas hasta la fecha hace posible agrupar estos compuestos de acuerdo a su tipo de esqueleto base en sesquiterpenos tipo: germacrano, eremofilano, bisabolano, humulano, drimano, herbertiano, eudesmano, entre otros. Entre ellos, los sesquiterpenos tipo eremofilano se caracteriza por no seguir la regla del isopreno tal y como lo hace el resto. En 1955, Robinson sugirió que los sesquiterpenos de este tipo eran, de hecho, los primeros de una nueva clase de sesquiterpenos, que no se basaban en el esqueleto más común, el eudesmano. Este punto de vista fue controvertido en ese momento porque desafiaba la regla del isopreno de que los terpenos pueden verse como múltiplos de subunidades de isopreno. Para ser específicos, el esqueleto eudesmano está compuesto por tres subunidades de isopreno, pero el esqueleto de tipo eremofilano contiene sólo dos subunidades de isopreno (Figura 4.4).

Los sesquiterpenos tipo eremofilano son compuestos bicíclicos, cuya estructura bá-

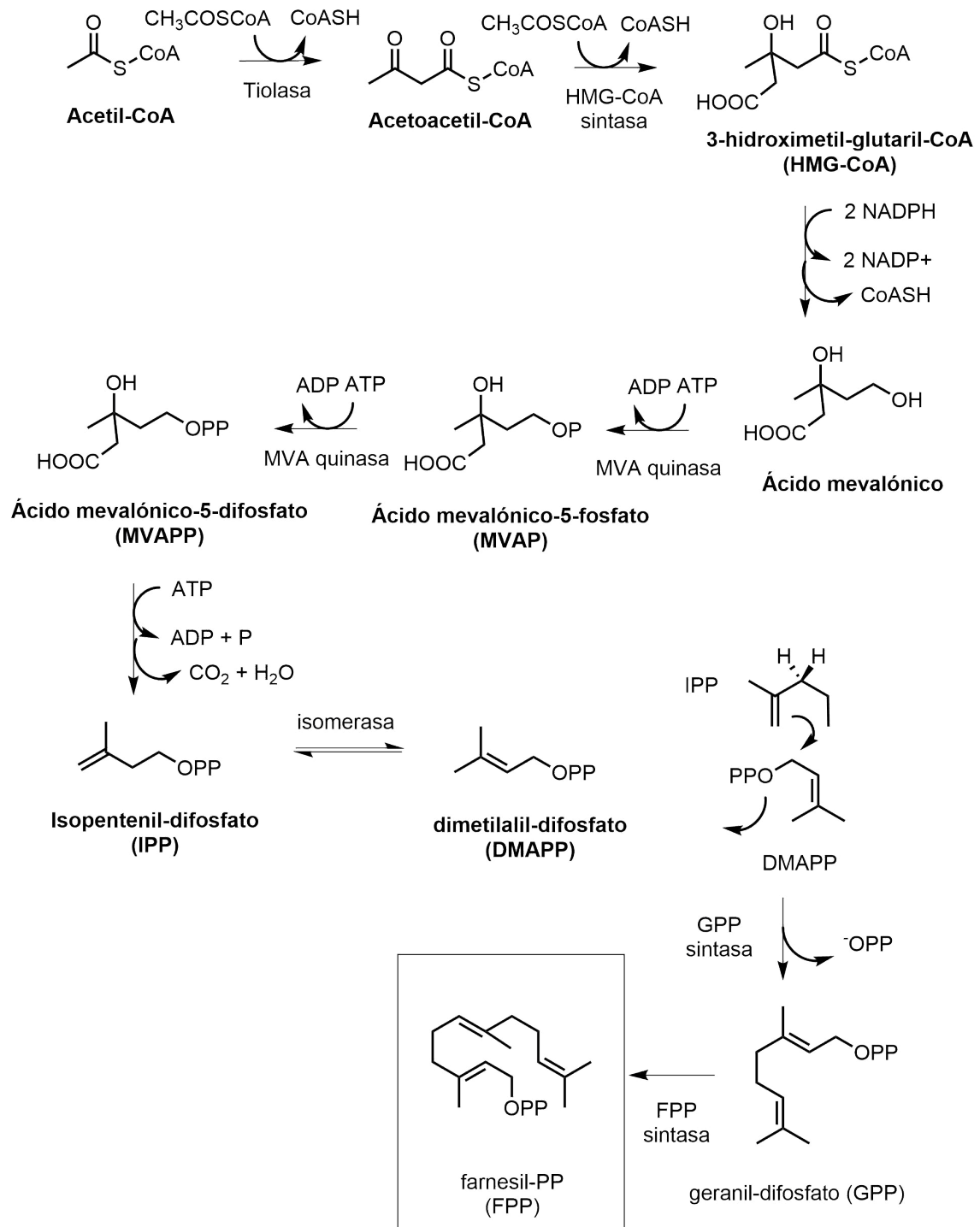


Figura 4.3: Biosíntesis de farnesil difosfato, precursor de los sesquiterpenos.

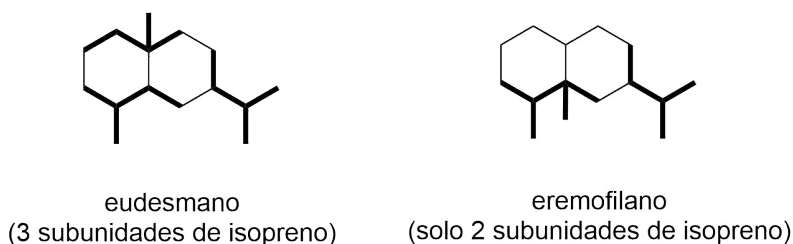


Figura 4.4: El esqueleto tipo eremofilano desafiando la regla del isopreno

sica se compone de dos anillos de seis miembros y cuatro grupos metilo (Figura 4.5). A menudo estos compuestos naturales se caracterizan por presentar funciones orgánicas tales como alcohol, ácido o lactona; o también, se presentan como furanoeremofilano o glicosidados. También se han reportado algunas estructuras especiales, tales como nor (dinor o trinor)-eremofilano, seco-eremofilano y eremofilanos dímeros. Estos compuestos son interesantes porque muchos de ellos poseen actividad biológica o terapéutica, incluyendo efectos antitumorales, antibacterianos y antiinflamatorios (Hou et al., 2014).

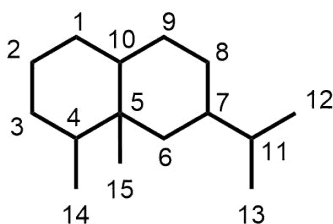


Figura 4.5: Esqueleto básico de un sesquiterpeno tipo eremofilano

4.2.2. Lactonas sesquiterpénicas

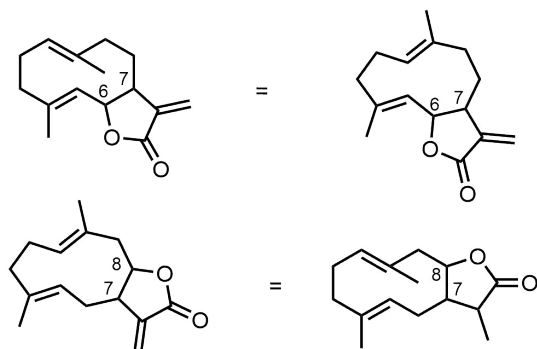
Las LS (Lactonas Sesquiterpénicas) son un grupo de compuestos naturales, generalmente incoloros y de sabor amargo. La mayoría de estos compuestos se han aislado de especies pertenecientes a la familia Asteraceae; sin embargo, también están presentes en las familias Apiaceae, Magnoliaceae y Lauraceae (Gonzalez et al., 2016). Se encuentran principalmente en las hojas y en las inflorescencias en una proporción de 0,001 % a 8 % del material vegetal seco (Chaturvedi, 2011). Algunas especies almacenan grandes cantidades de LS en tricomas foliares (Amorim et al., 2013). Las LS están presentes en plantas alimenticias como la lechuga, la achicoria y el anís estrellado (*Illicium verum*); y en muchas plantas medicinales como la matricaria (*Tanacetum parthenium*), qinghaosu (*Artemisia annua*) y la milenrama (*Achillea* spp.) (Chaturvedi, 2011).

Ha habido un creciente interés en las LS, principalmente por su importancia como marcadores químicos en estudios biosistemáticos y por su amplia gama de actividades biológicas. Entre las actividades exploradas para este grupo de compuestos, se han descrito propiedades antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes, antiulcerogénicas, molusquicidas, antihelmínticas, hepatoprotectoras y hepatoterapéuticas y antidepresivas. Además, juegan un papel importante en la interacción de las plantas

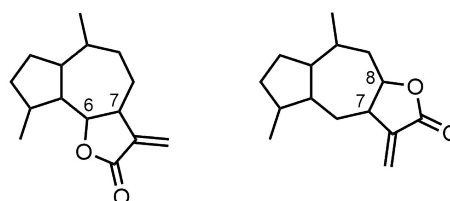
con los insectos actuando como atrayentes, disuasivos y antialimentarios (Chaturvedi, 2011; Amorim et al., 2013). Las LS se consideraban al principio como citotóxicas; pero las transformaciones químicas han mejorado sus actividades biológicas y disminuido su citotoxicidad, por lo que se les ha prestado una atención considerable nuevamente como posibles moléculas líderes.

Químicamente, las LS son compuestos de 15 átomos de carbono, siendo la mayoría cíclicos, con numerosas modificaciones, resultando en una amplia variedad de estructuras. Luego, en función de éstas últimas, se pueden clasificar en cuatro grandes grupos de acuerdo a su esqueleto básico: germacranólidos (anillo de 10 miembros), guaianólidos y pseudoguaianólidos (compuestos bicíclicos 5-7), y eudesmanólidos (compuestos bicíclicos 6-6) (Figura 4.6).

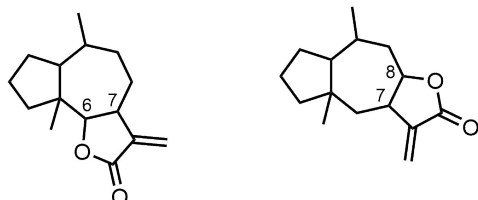
Germacranólidos



Guaianólidos



Pseudoguaianólidos



Eudesmanólidos

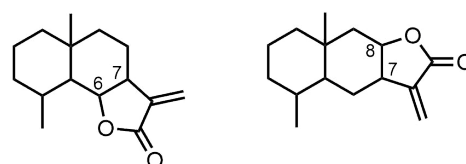


Figura 4.6: Principales tipos de esqueletos de lactonas sesquiterpénicas en Asteraceae.

Una característica distintiva de estos compuestos es la presencia de un anillo γ -lactona cerrado hacia C6 o C8. Esta γ -lactona contiene, en muchos casos, un grupo exo-metileno conjugado con el grupo carbonilo (Gonzalez et al., 2016; Picman, 1986). La estereoquímica de la lactonización puede ser α o β , ya que el anillo de la lactona puede ser fusionado con el resto del esqueleto en una configuración trans o cis (LS trans o cis fusionadas) (Gonzalez et al., 2016; Ahern y Whitney, 2014). La configuración trans es la más común y, como regla, el H-7 de la LS está orientado α (Fisher, 1990).

Desde una perspectiva biosintética, las lactonas sesquiterpénicas son un tipo o subclase de terpenoides cuya biosíntesis se realiza a partir de FPP (Farnesildifosfato) (15 átomos de carbono). Para la formación de las LS, el FPP sufre una ciclación sucesiva, hidroxilaciones dependientes de NADPH, oxidaciones dependientes de NADP⁺ y, final-

mente, lactonización del grupo hidroxilo en C-6 (o C-8) con el grupo carboxilo en C-12 a través de una reacción intramolecular para producir el típico anillo de cinco miembros o γ -lactona (Figura 4.7). Sin embargo, la biosíntesis de las LS aún no se conoce completamente.

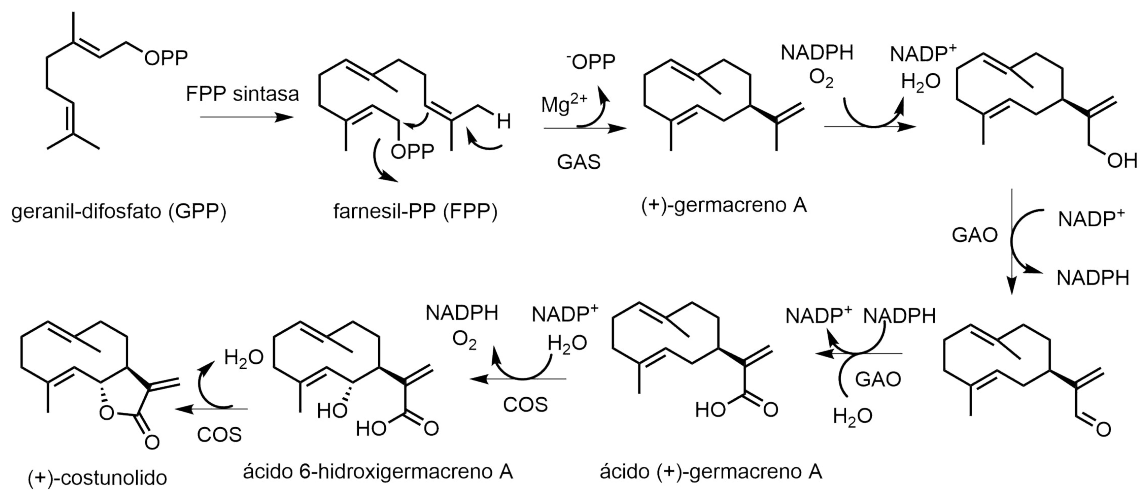


Figura 4.7: Ruta biosintética propuesta para las lactonas sesquiterpénicas.

Capítulo 5

Estudio Fitoquímico de *Senecio volckmannii* Phil.

“No hagas a los otros lo que no quieras que te hagan a ti” es uno de los principios más fundamentales de la ética. Pero es igualmente justificado afirmar: todo lo que hagas a otros te lo haces también a ti mismo.

Erich Fromm, *Ética y psicoanálisis*

5.1. El género *Senecio* L.

Senecio L. es el género con mayor número de especies de la tribu Senecioneae Bercht. & J. Presl. (Asteraceae), con aproximadamente 1250 especies representadas por hierbas, arbustos, enredaderas y árboles (Nordenstam, 20007). Es un género cosmopolita, hallándose en todo el mundo a excepción de las islas del Pacífico y del continente Antártico. La mayor concentración de especies se encuentra en las regiones montañosas de América, Asia y África. En Argentina existen 270 especies nativas (Cabrera et al., 1999), distribuidas en toda su geografía, principalmente en la Patagonia y en la Cordillera de los Andes. Algunos ejemplos de especies pertenecientes a este género se pueden observar en la Figura 5.1.

5.1.1. Usos medicinales y actividad biológica

Los extractos de hojas y raíces de algunas especies de *Senecio* se usan en medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes (Loizzo et al., 2004; Conforti et al., 2006), como vasodilatadores, antiinflamatorios, antieméticos, diuréticos y cardiotónicos (Muñoz et al., 1999; Arias Cassará et al., 2010), cicatrizante de heridas y en el tratamiento de la tos, bronquitis, asma y eczemas (Hammond et al., 1998; Uzun et al., 2004). Además, presenta actividad molusquicida (Grace y Khattab, 1998), antimicrobiana (Perez et al., 1999; El-Shazly et al., 2002) y citotóxica (Loizzo et al., 2007).



Figura 5.1: Especies pertenecientes al género *Senecio*

5.1.2. Química del género *Senecio*

El género *Senecio* ha sido ampliamente estudiado por sus metabolitos secundarios. Los constituyentes químicos del mismo incluyen alcaloides, terpenos, flavonoides y cumarinas, entre otros (Yang et al., 2011). Los sesquiterpenoides son los compuestos predominantes en el género, siendo los eremofilanos, cacaloles, bisabolanos y germacranos (Figura 5.2) los que se aislaron en mayor proporción y en mucha menor cantidad los eudesmanos, oplopanos, fomalairdanos, cariofilanos, humulanos, presilfiperfolanos, aromadendranos, himachalanos, africananos, pentalenanos, bakanos, valeranos y sesquiterpenos tipo benzofuranos.

Las lactonas sesquiterpénicas (LS) con esqueleto tipo eremofilano y los furanoeremofilanolidos (Figura 5.3) son otros dos grupos de productos naturales aislados con frecuencia de especies pertenecientes al género *Senecio* (Yang et al., 2011; Portero et al., 2012). Es sabido que las LS con este tipo de esqueleto, tienen propiedades citotóxicas, antitumogénicas, antibacterianas y antifúngicas, lo que sugiere su importancia evolutiva en plantas como defensas vegetales. Algunos furanoeremofilanolidos son efectivos para disuadir a los lepidópteros polífagos (Dominguez et al., 2008; Reina et al., 2012), también juegan un papel protector contra los herbívoros que habitan en el suelo (Speiser et

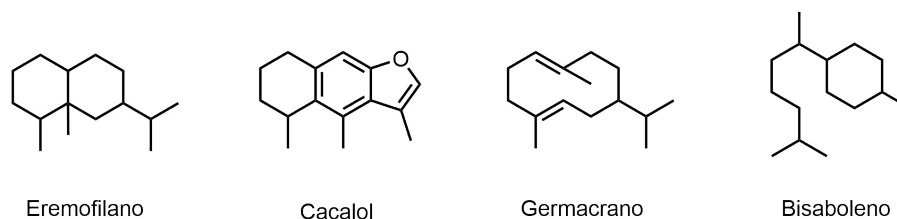


Figura 5.2: Esqueletos de los tipos de sesquiterpenos encontrados en mayor proporción en *Senecio*.

al., 1992) y tienen efectos antifúngicos (Arias Cassará et al., 2010), por lo tanto, se han propuesto como productos químicos defensivos.

Por otro lado, las especies del género *Senecio* se han caracterizado por poseer, en su mayoría, AP (Alcaloides Pirrolizidínicos). Es por ello que, algunas especies de *Senecio* tienen un impacto negativo en muchos países agrícolas, dado que estas plantas son responsables de más muertes de ganado que cualquier otra planta venenosa. Entre las estructuras más frecuentemente aisladas de especies de *Senecio* encontramos los alcaloides tipo senecionina, senecifilina, ridelina, retrorsina, jacobina e integerrimina (Figura 5.4) (Yang et al., 2011).

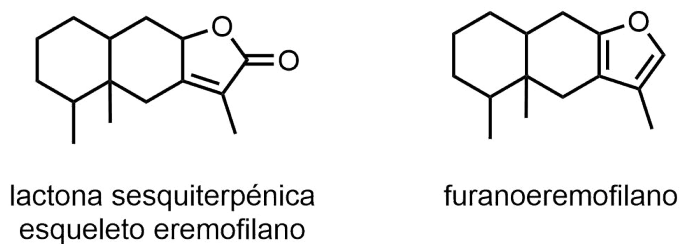


Figura 5.3: Esqueletos de las lactonas sesquiterpénicas y los furanoeremofilanólidos con frecuencia encontrados en el género *Senecio*

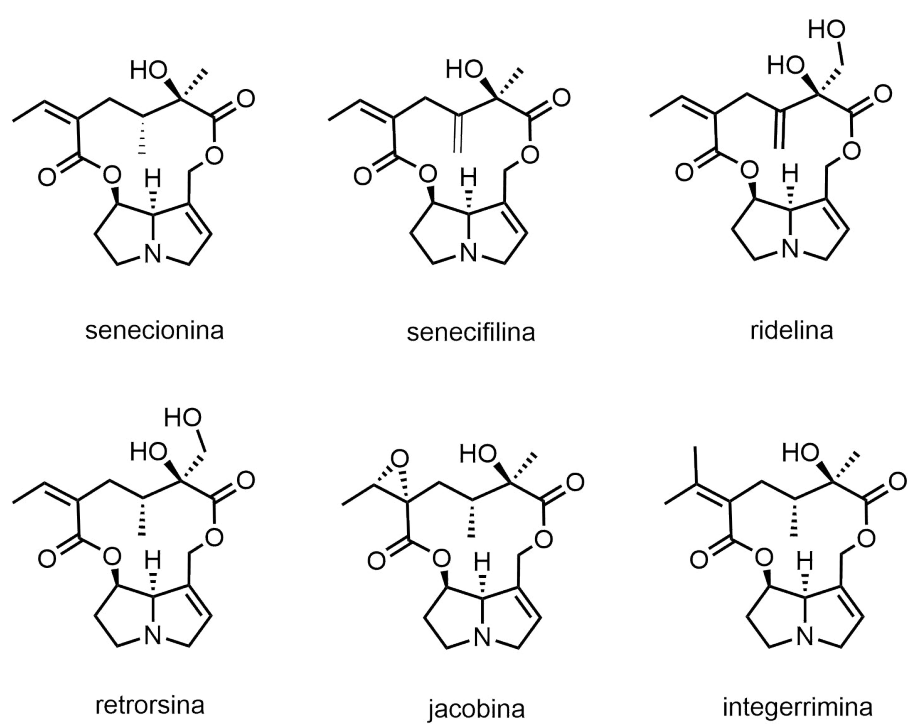


Figura 5.4: Ejemplos de alcaloides pirrolizidínicos encontrados en especies del género *Senecio*

5.2. *Senecio volckmannii* Phil.

Senecio volckmannii Phil. (syn. *S. rosmarinus* Phil. var. *rosmarinus*, *S. rosmarinus* Phil. var. *ascotanensis*, *S. spegazzinii* Cabrera) crece en las cordilleras de Chile (en las regiones de Atacama, Coquimbo, Antofagasta) y en regiones limítrofes de Argentina (de Jujuy a Neuquén) (Cabrera et al., 1999; Tortosa y Bartoli, 2006). Comprende dos variedades: var. *pinohachensis* Tortosa & Bartoli, endémica de Argentina (Neuquén) y var. *volckmannii* con una amplia distribución en Chile y en Argentina. Vegeta en la provincia biogeográfica Altoandina entre los 3300-4400 m.s.m., en pedregullales en los límites de la vegetación.



Figura 5.5: *Senecio volckmannii* var. *volckmannii*

5.2.1. Antecedentes de estudios fitoquímicos

Morales et al. (1986) pudieron aislar lactonas sesquiterpénicas a partir del extracto etanólico de las partes aéreas de *S. volckmannii* (subnom. *S. rosmarinus* ahora syn. de *S. volckmannii* var. *volckmannii*). Éstas se muestran en la Figura 5.6. Podemos observar que se trata de lactonas sesquiterpénicas con un esqueleto tipo eremofilano, esqueleto comúnmente encontrado en el género *Senecio*.

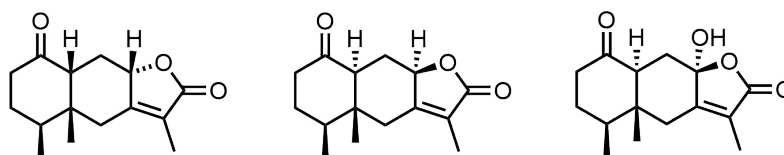


Figura 5.6: Compuestos aislados de *Senecio rosmarinus*

Por otra parte, Lizarraga et al. (2012) llevaron a cabo un estudio químico sobre extractos acuosos por infusión y decocción de las partes aéreas de *S. volckmannii* (subnom. *S. spegazzinii* ahora syn. de *S. volckmannii* var. *volckmannii*) con el objetivo de analizar la

presencia o ausencia de AP en el extracto. Los resultados fueron negativos, determinando así que el uso de infusiones de esta especie no es tóxico para su consumo humano; de acuerdo con su uso en la medicina tradicional andina para la cual no hay informes de eventos agudos no deseados después del consumo.

5.3. Resultados y Discusión

El procesamiento del extracto de DCM de las partes aéreas de *Senecio volckmannii* var. *volckmannii* dió como resultado nueve nuevos sesquiterpenos: cuatro sesquiterpenos tipo eremofilano (**12–15**), tres nor-sesquiterpenos (**16–19**) y dos lactonas sesquiterpénicas (**19** y **20**), junto con ocho compuestos conocidos (**21–28**) (Figura 5.7). Las estructuras de todos los compuestos nuevos fueron elucidadas en base a los espectros de UV, IR, HRMS y RMN; mientras que las estructuras de los compuestos conocidos fueron establecidas por comparación con los datos de RMN reportados en la literatura.

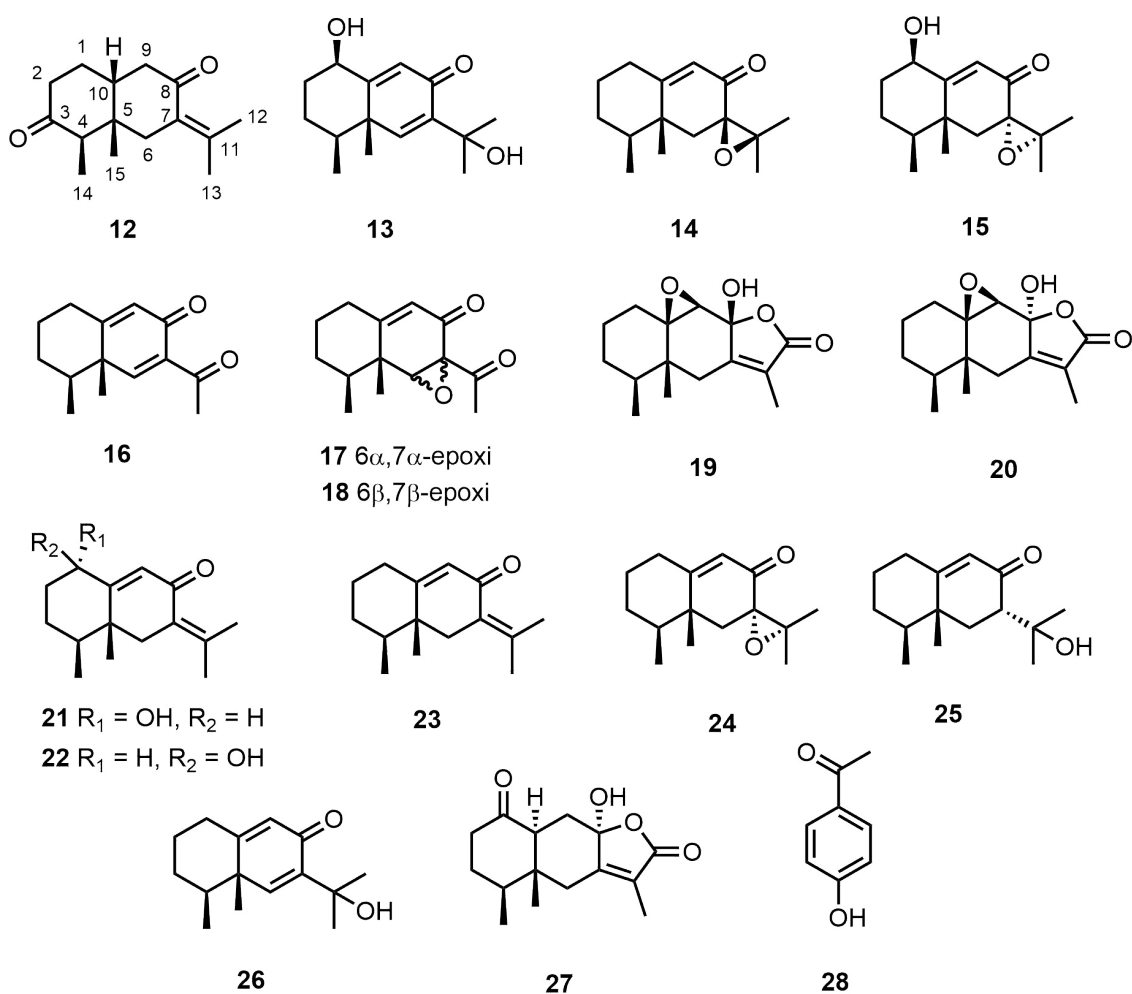


Figura 5.7: Compuestos aislados de *Senecio volckmannii*

El compuesto **12**, de fórmula molecular $C_{15}H_{22}O_2$ determinada por HRMS, mostró cuatro señales en el espectro de RMN- 1H para metilos: δ 2,01 (d, $J=2,2$ Hz), 1,79 (d, $J=1,4$ Hz), 1,02 (d, $J=6,6$ Hz), y 0,7 (s) (Tabla 5.1). Las resonancias a δ 2,01 y δ 1,79 son típicas de metilos unidos a carbonos vinílicos. El espectro de RMN- ^{13}C mostró quince señales correspondientes a cuatro metilos, cuatro metilenos, un metino, dos carbonilos y las señales esperadas correspondientes a un enlace olefínico tetrasustituido (Tabla 5.2).

Las señales de RMN- 1H y ^{13}C y el análisis de los espectros COSY, HSQC y HMBC sugirieron la presencia de un esqueleto sesquiterpeno tipo eremofilano estrechamente relacionado con fukinona (Naya et al., 1968). La principal diferencia observada entre fukinona y el compuesto **12** fue la señal correspondiente a un grupo carbonilo en δ 210,0 asignado a C-3. La posición del grupo carbonilo se confirmó mediante el análisis de los espectros COSY, HSQC y HMBC. Un examen detallado del espectro COSY del compuesto **12** condujo al establecimiento de tres sistemas de espín: un sistema $A_2B_2CD_2$ que consta de H₂-2 (δ 2,41 m), H₂-1 (δ 1,94 y 1,69 m), H-10 (δ 2,72; dd; $J = 12,6; 4,2$ Hz) y H₂-9 (δ 2,64 y 2,40 m), un sistema AB_3 que consiste en H-4 (δ 1,90 m) y H₃-14, y un $A_2B_3C_3$ que consiste en H₂-6 [δ 2,79 (d; 14,8 Hz) y 2,12 (d; 14,8 Hz)], H₃-12 y H₃-13, respectivamente (Figura 5.10). La orientación β del protón en C-10 (*cis*-decalina, ver Figura 5.8) se determinó por la multiplicidad y el valor de la constante de acoplamiento de H-10 [δ 2,72 (dd, $J = 12,6; 4,2$ Hz)]. La mayoría de los sesquiterpenos tipo eremofilano han sido descritos con los H₃-14 y H₃-15 orientados β en base a consideraciones biosintéticas (Cane, 1990; Cordell, 1976). Por lo tanto, la estructura del compuesto **12** fue establecida como (4*R*, 5*S*, 10*R*)-eremofilan-7(11)-en-3,8-diona.

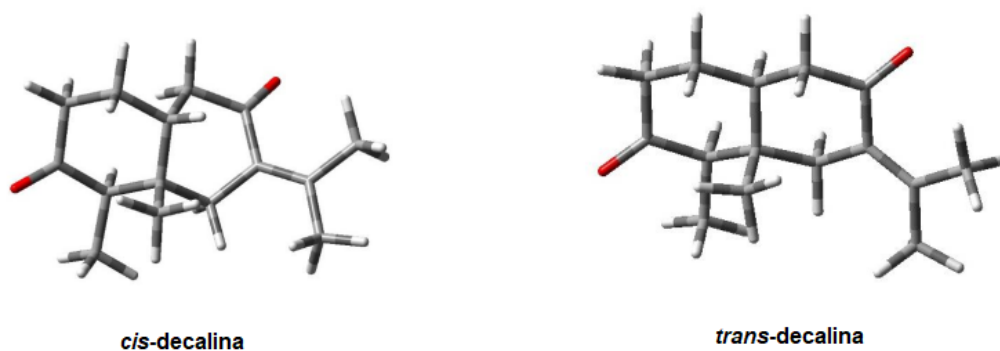


Figura 5.8: Estructuras de mínima energía para el compuesto **12** (*cis*-decalina) y su epímero en C-10 (*trans*-decalina).

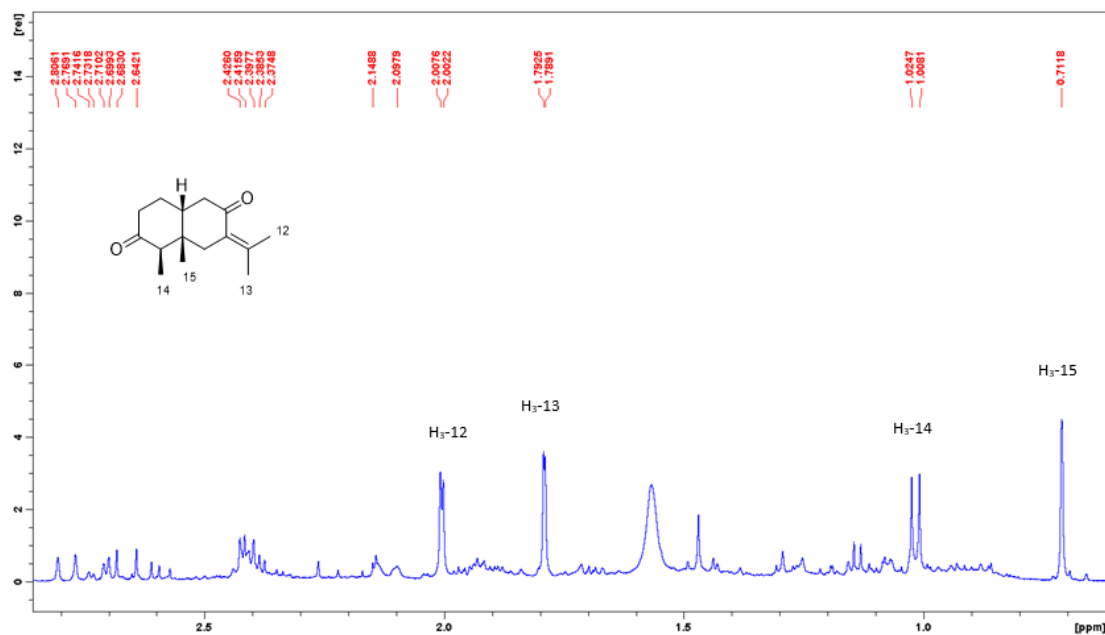


Figura 5.9: Espectro RMN¹H del compuesto 12 (CDCl₃; 400,13 MHz)

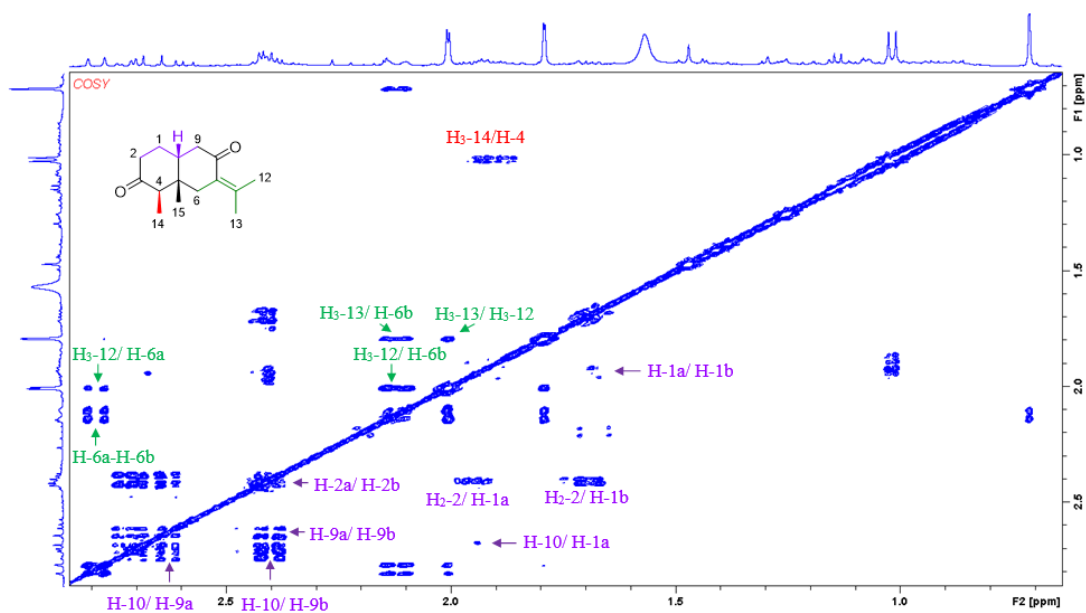


Figura 5.10: Espectro COSY del compuesto 12 (CDCl₃; 400,13 MHz)

Tabla 5.1: Desplazamientos químicos en RMN-¹H para los compuestos **12–15** (CDCl₃, 400,13 MHz)

posición	12	13	14	15
1a	1,94 m	4,46 t (2,6)	2,46 dd (12,5; 4,9)	4,35 s an.
1b	1,69 m	-	2,23 d an. (12,5)	-
2a	2,41 m	2,07 m	2,04 m	1,96 m
2b	2,41 m	1,62 m	1,43 m	1,68 m
3a	-	1,94 m	1,66 m	1,81 m
3b	-	1,47 m	1,50 m	1,36 m
4	1,90 m	1,51 m	1,76 m	1,48 m
6a	2,79 d (14,8)	6,86 s	2,10 d (15,0)	2,07 d (13,7)
6b	2,12 d an. (14,8)	-	2,09 d (15,0)	1,94 d (13,7)
9a	2,64 m	6,07 s	5,90 d (1,2)	5,91 s
9b	2,40 m	-	-	-
10	2,72 dd (12,6; 4,2)	-	-	-
12	2,01 d (2,2)	1,38 ^a m	1,31 s	1,24 s
13	1,79 d (1,4)	1,39 ^a m	1,44 s	1,39 s
14	1,02 d (6,6)	1,04 d (6,7)	0,99 d (6,6)	0,89 d (6,8)
15	0,71 s	1,26 s	1,13 s	1,28 s
OH-11	-	4,74 s	-	-

^aLas asignaciones pueden ser intercambiadas.**Tabla 5.2:** Desplazamientos químicos en RMN-¹³C para los compuestos **12–20** (CDCl₃, 100,03 MHz)

posición	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	31,8	73,8	33,4	72,6	32,5	33,7	33,7	31,1	32,7
2	41,7	34,9	29,7	33,1	27,7	26,9	29,1	24,5	24,6
3	210,1	25,3	30,9	24,2	30,1	30,5	30,7	30,2	30,8
4	42,15	41,8	40,4	42,6	41,2	38,4	40,6	36,1	44,0
5	42,22	44,1	42,8	41,1	43,9	41,4	41,6	43,5	40,5
6	43,1	151,3	37,3	41,5	159,8	66,8	66,2	28,6	36,2
7	144,6	141,4	66,3	66,8	136,6	63,7	63,5	157,2	157,2
8	203,4	188,8	195,7	196,2	184,1	n.d.	n.d.	98,3	102,7
9	37,9	127,0	123,7	127,4	124,9	121,0	120,5	64,3	64,8
10	55,6	166,5	173,0	167,7	168,0	167,0	169,5	69,1	67,1
11	130,1	72,2	65,3	65,2	199,3	201,6	202,2	123,6	123,8
12	23,6	29,2	19,4	18,8				171,9	171,9
13	22,6	29,3	21,8	21,2	30,9	28,38	28,3	8,8	8,6
14	15,3	16,5	17,0	15,1	16,1	16,1	15,8	16,2	16,3
15	11,9	19,0	21,5	20,0	16,9	18,0	15,7	17,8	17,8

Tabla 5.3: Desplazamientos químicos en RMN-¹H para los compuestos **16–20** (CDCl₃, 400,13 MHz)

posición	16	17	18	19	20
1a	2,44 m	2,35 m	2,26 m	1,95 m	1,94 m
1b	2,38 m	2,22 m	2,12 m	1,01 m	1,12 m
2a	2,00 m	1,80 m	1,93 m	1,70 m	1,46 m
2b	1,41 m	1,38 m	1,38 m	1,21 m	n.d.
3a	1,61 m	1,57 m	1,53 m	1,46 m	1,50 m
3b	1,61 m	1,39 m	1,35 m	1,21 m	1,15 m
4	1,55 m	1,87 m	1,69 m	1,22 m	1,73 m
6a	7,67 s	3,42 s an.	3,49 s an.	2,43 d (13,0)	2,34 d (14,8)
6b				2,11 d an. (13,0)	2,28 d an. (14,8)
9	6,12 s	5,71 d (1,8)	5,74 s an.	3,27 s	3,30 s
13	2,57 s	2,27 s	2,26 s	1,74 d (0,8)	1,73 d (1,6)
14	1,11 d (5,9)	1,05 d (6,8)	0,97 d (6,8)	0,87 d (6,0)	0,92 d (6,8)
15	1,19 s	1,15 s	1,24 s	1,07 s	0,96 s

La fórmula molecular del compuesto **13** se determinó por HRMS como $C_{15}H_{22}O_3$. Sus espectros de RMN 1H y ^{13}C están estrechamente relacionados con los del compuesto **26**, una hidroxieremofilan-6,9-dien-8-ona previamente aislada de *Senecio desfontainei* (Ahmed, 1991); difiriendo sólo en el patrón de sustitución del anillo A (Tablas 5.1, 5.3 y 5.2). Los datos espectroscópicos de RMN del compuesto **13** sugirieron la presencia de un grupo hidroxilo en C-1 [δ_H 4,46 (t, $J = 2,6$ Hz), δ_C 73,8]. La ubicación de este grupo fue respaldada por las correlaciones de HMBC entre las señales de H-1, con C-3 en δ 25,3, C-5 en δ 44,1 y C-9 en δ 127,0; y por el acoplamiento alílico entre la señal del H-1 y H-9 en el espectro COSY (Figura 5.11 y Figura 5.12). La orientación β del grupo hidroxilo en C-1 se estableció mediante el análisis de la constante de acoplamiento (t, $J = 2,6$ Hz) y se confirmó por el NOE observado entre H-1 y H-4 a δ 1,51 m (Figura 5.13). Por lo tanto, la estructura del compuesto **13** se estableció como (4*S*,5*S*)-1 β ,11-dihidroxieremofilan-6,9-dien-8-ona.

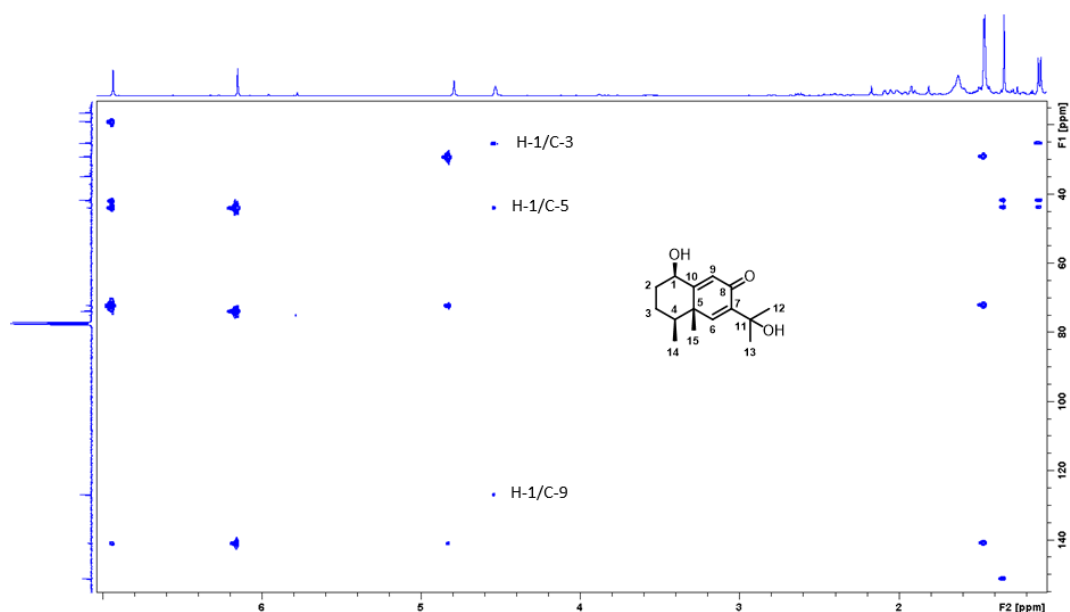


Figura 5.11: Espectro HMBC del compuesto **13** ($CDCl_3$; 400,13 MHz)

Ruiz-Vásquez et al. (2017) informaron un constituyente de *Senecio adenotrichius* con la misma estructura que el compuesto **13**, pero inconsistente con los datos espectroscópicos informados. El desplazamiento químico de C-11 (δ 83,5) se ajusta a la presencia de un grupo hidroperoxi en C-11 en lugar de un grupo hidroxilo (Arciniegas et al., 2003).

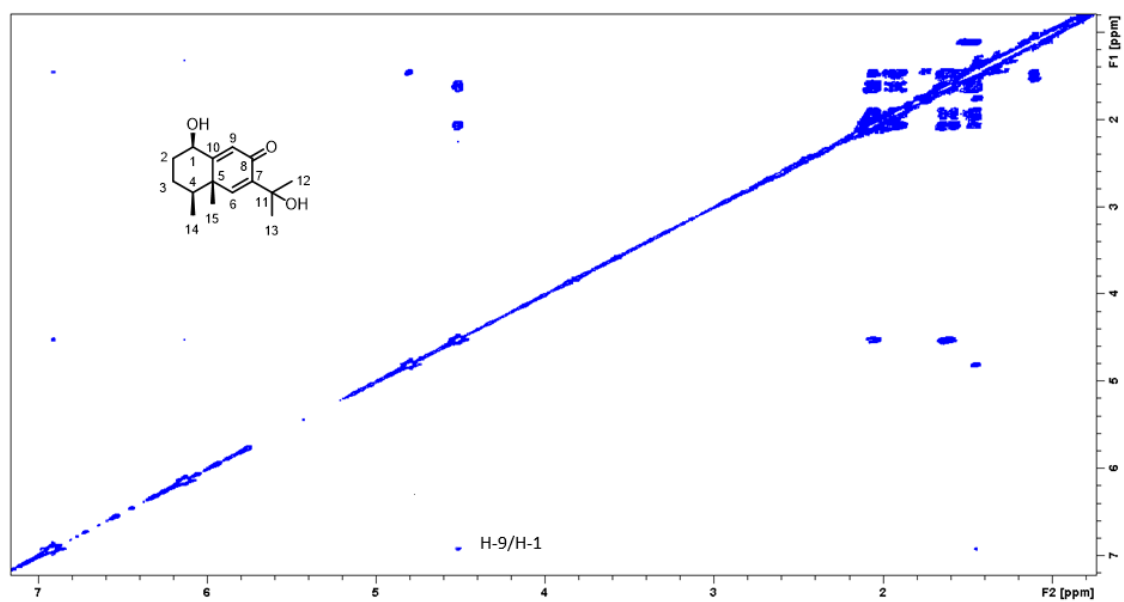


Figura 5.12: Espectro COSY del compuesto 13 (CDCl₃; 400,13 MHz)

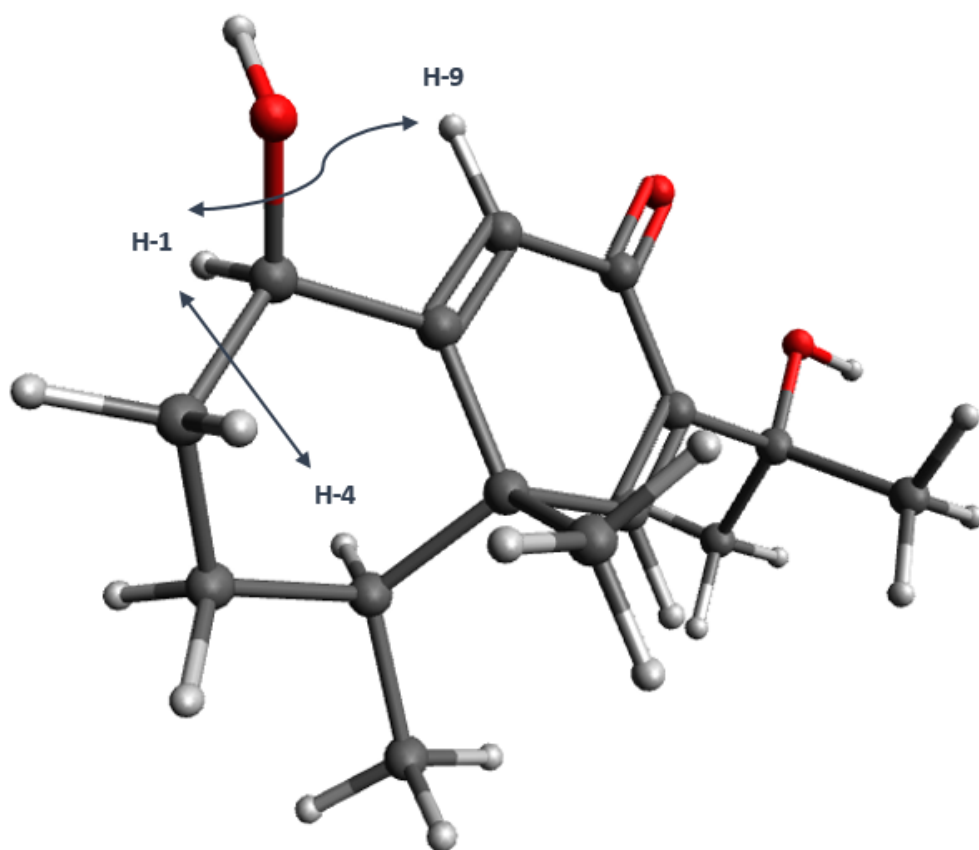
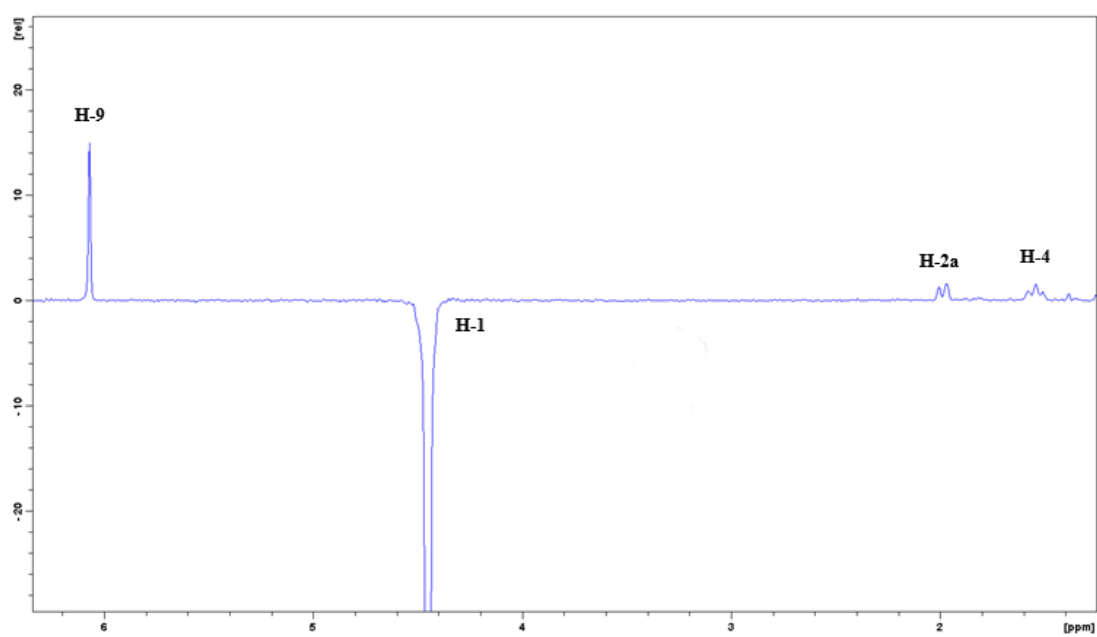


Figura 5.13: NOE relevantes para compuesto 13 (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

La fórmula molecular del compuesto **14** fue $C_{15}H_{23}O_2$, determinada por HRMS. La inspección de los datos espectroscópicos de RMN en 1D y 2D sugirió que el compuesto **14** tenía señales casi idénticas para todos los carbonos y protones que el compuesto ligudicina A (compuesto **24**) (Tan et al., 2003), indicando el mismo esqueleto y patrón de sustitución. La única diferencia entre los compuestos **14** y **24** fue el desplazamiento químico de C-4, C-6, C-14 y C-15 de δ 40,4; δ 37,3; δ 17,0 y δ 21,5 a δ 43,4; δ 40,4; δ 15,2 y δ 18,0; respectivamente. La similitud en los datos de RMN de ambos compuestos sugirió que la diferencia estructural podría restringirse a la orientación del grupo 7,11-epoxi. Para confirmar esta suposición, se aplicó una combinación de herramientas de RMN como el análisis de las constantes de acoplamiento $^3J_{HH}$, DQF-Phase Sensitive COSY, y acoplamiento dipolar residual (RDC) a los compuestos **14** y **24** (estos resultados son presentados en el Capítulo 6).

El compuesto **15** no se pudo obtener en forma pura por CCD en fase reversa o normal. En consecuencia, se caracterizó a partir de 2,2 mg de una mezcla de los compuestos **15** y **27** en una relación 3:2. El compuesto **15** reveló una fórmula molecular de $C_{15}H_{22}O_3$ por HRMS, con los datos de RMN 1H y ^{13}C (Tablas 5.1, 5.3 y 5.2) siendo muy comparables con los compuestos **14** y **24**. La única diferencia entre **15** y **14** y **24** fue la presencia de señales correspondientes a un metino oxigenado asignado a C-1 (δ_H 4,35 s an. y δ_C 72,6) en **15**. El grupo hidroxilo se ubicó en C-1 por las correlaciones en el espectro HMBC entre las señales de H-1 y C-3 a δ 24,2; C-5 a δ 41,1 y C-9 a δ 127,4 (Figura 5.14). La orientación β del grupo hidroxilo en C-1 se estableció mediante el análisis de la constante de acoplamiento y se confirmó mediante el NOE observado entre H-1 y H-4 a δ 1,48 m y H-9 a δ 5,91 (Figura 5.15); mientras que la orientación del grupo epóxido no pudo ser confirmada mediante NOE, ya que los mismos fueron no concluyentes. La orientación α de este grupo fue propuesta en base a la aplicación de técnicas computacionales de elucidación estructural (CASE-3D) (estos resultados son presentados en el Capítulo 6).

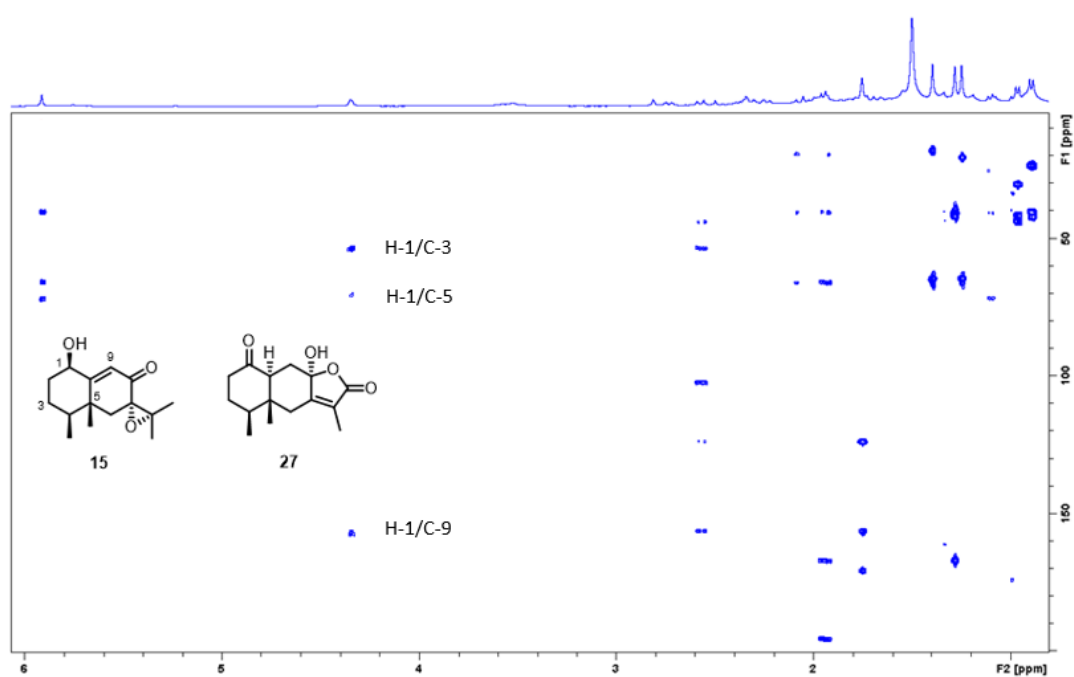


Figura 5.14: Espectro HMBC del compuesto 15 en mezcla con el compuesto 27 (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

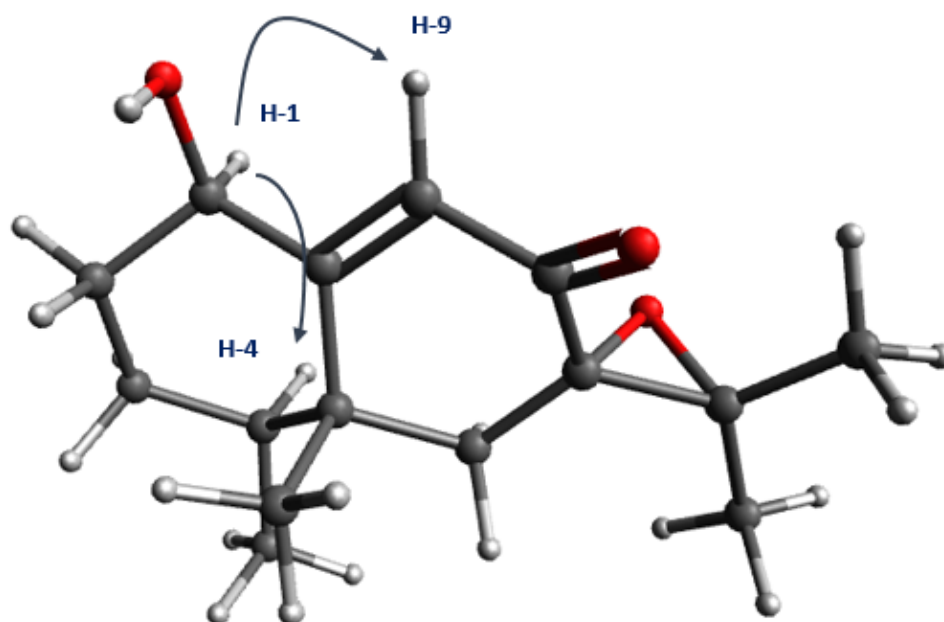
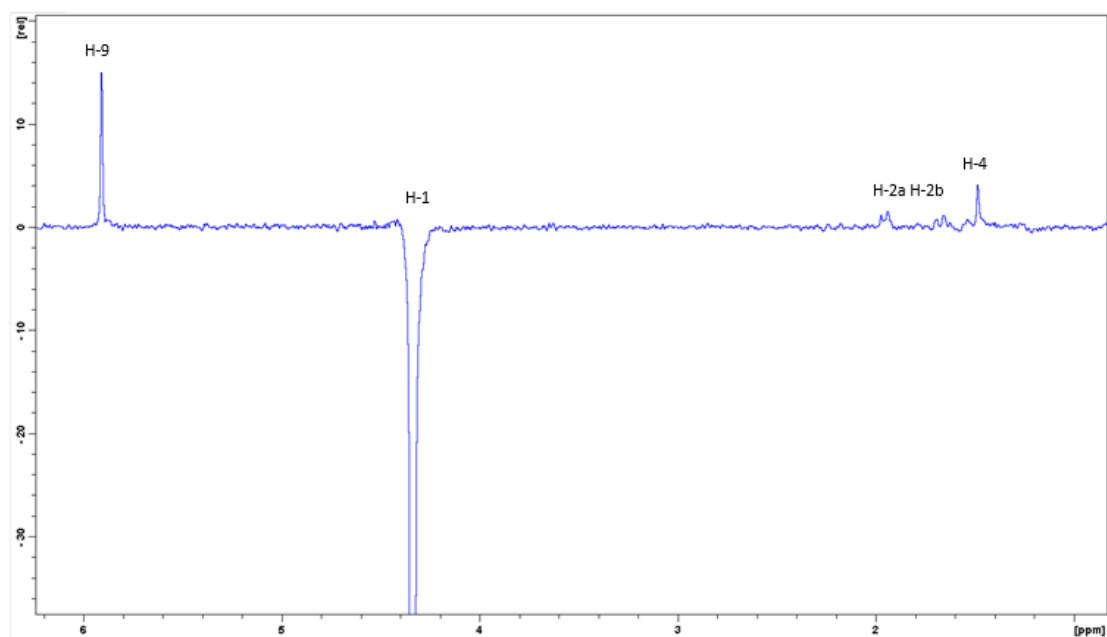


Figura 5.15: NOE relevantes para el compuesto 15 (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

El compuesto **16** fue caracterizado como un nor-sesquiterpeno de acuerdo a su fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_2$ determinada por HRMS. Excepto por la ausencia de señales correspondientes a un grupo hidroxilo, las señales RMN 1H y ^{13}C de **16** (Tablas 5.1, 5.2 y 5.3) son casi superponibles con las de 3 β -hidroxil-11-noreremofilan-6,9-dien-8,11-diona aislado de *Ligularia japonica* (Xu y Hu, 2009), indicando que comparten el mismo esqueleto sesquiterpenoide. Por lo tanto, la estructura del compuesto **16** fue propuesta como (4*S*,5*S*)-11-noreremofilan-6,9-dien-8,11-diona.

Los compuestos **17** y **18** no pudieron obtenerse en forma pura por CCD en fase normal o reversa. En consecuencia, estos compuestos se caracterizaron a partir de 3 mg de una mezcla en una relación 3:2. La fórmula molecular de los componentes de la mezcla se determinó inequívocamente por UPLC-HRMS como $C_{14}H_{18}O_2$, lo que indica que **17** y **18** son estereoisómeros de esqueleto nor-sesquiterpeno. Los espectros de RMN 1H y ^{13}C de **17** están estrechamente relacionados con los del compuesto **16**, lo que indica que las diferencias estructurales entre estos nor-sesquiterpenos se restringirían al anillo B. Además de la presencia de una función cetona α,β -insaturada en el anillo B [δ_H 5,71 (d, $J = 1,8$ Hz, H-9), δ_C 121,0 (C-9) y δ_C 167,0 (C-10)], un grupo epóxido fue evidente en el espectro de RMN- 1H a partir del singlete en δ 3,42 correspondiente a H-6, y de acuerdo con las señales en δ 66,8 y δ 63,7 en el espectro de RMN- ^{13}C . La ubicación del grupo 6,7-epoxi fue confirmada por los picos de correlación cruzada entre H-6, con C-5 a δ 41,4, C-10 a δ 167,0 y C-15 a δ 18,0 en el espectro de HMBC (Figura 5.16). La orientación del grupo epóxido fue establecida a partir de un experimento NOESY, en el que la correlación NOE observada para H-6 con H₃-15 en δ 1,15 indicaría la orientación α (Figura 5.17). Los datos de RMN 1H y ^{13}C del isómero **18** fueron casi idénticos a los del compuesto **17**, diferenciándose sólo en la orientación del grupo 6,7-epoxi. Dado que los compuestos **17** y **18** no se pudieron obtener en forma pura y se caracterizaron a partir de una mezcla, sus estructuras se propusieron en función de un estudio CASE-3D (ver Capítulo 6) como (4*S*,5*R*)-6 α ,7 α -epoxi-11-noreremofilan-9-en-8,11-diona y (4*S*,5*R*)-6 β ,7 β -epoxi-11-noreremofilan-9-en-8,11-diona, respectivamente.

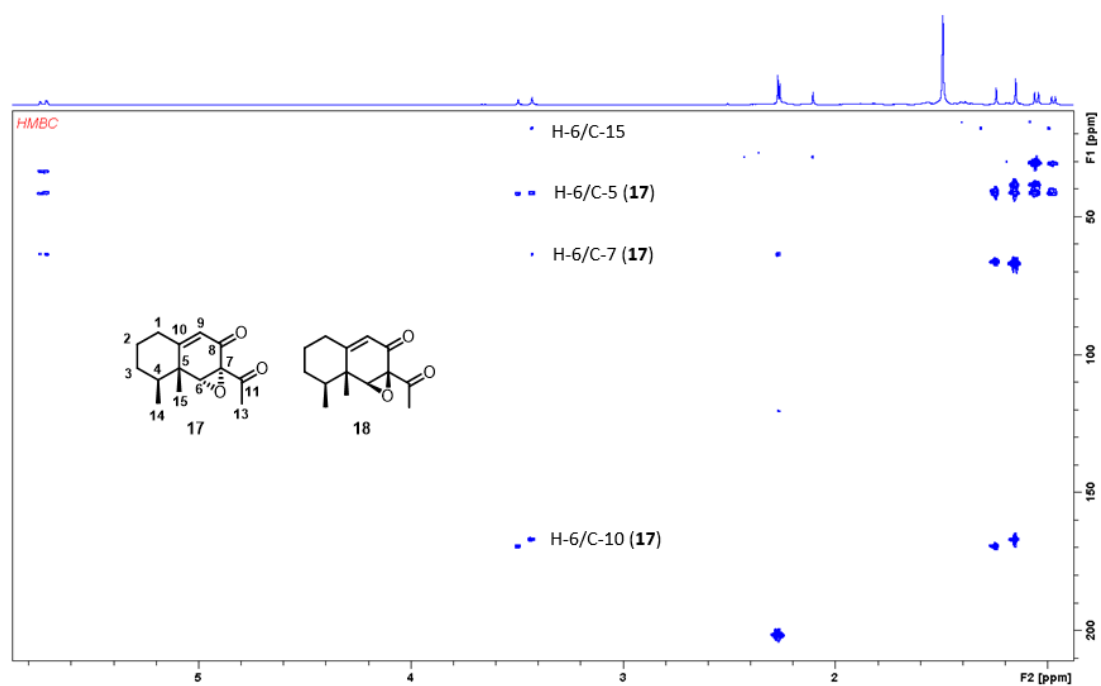


Figura 5.16: Espectro HMBC de la mezcla del compuesto **17** con el compuesto **18** (CDCl₃; 400,13 MHz)

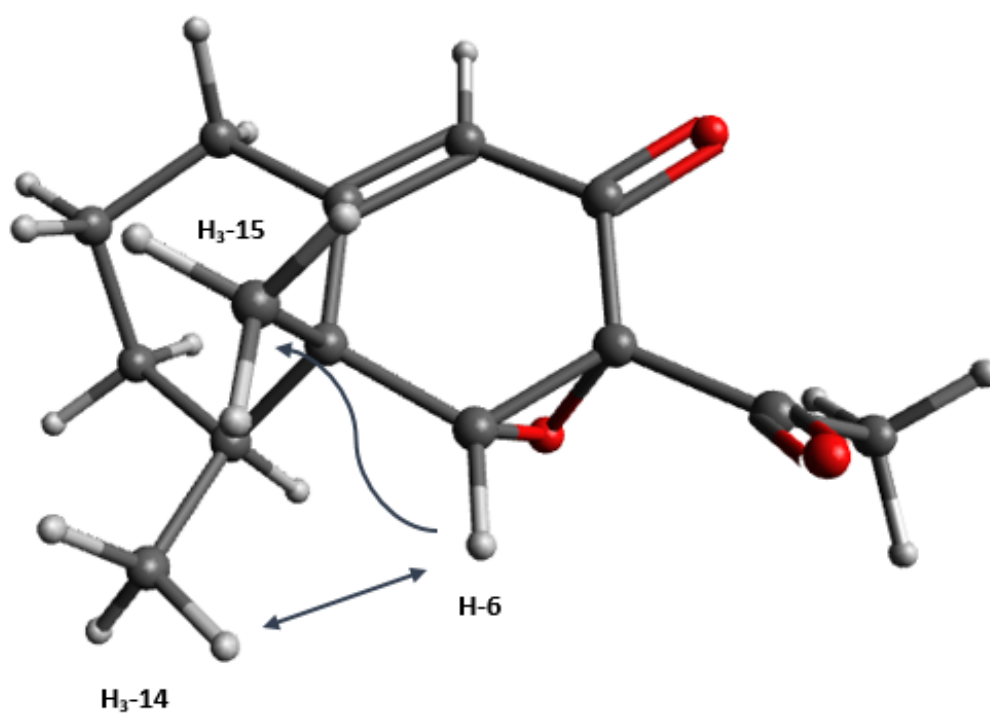
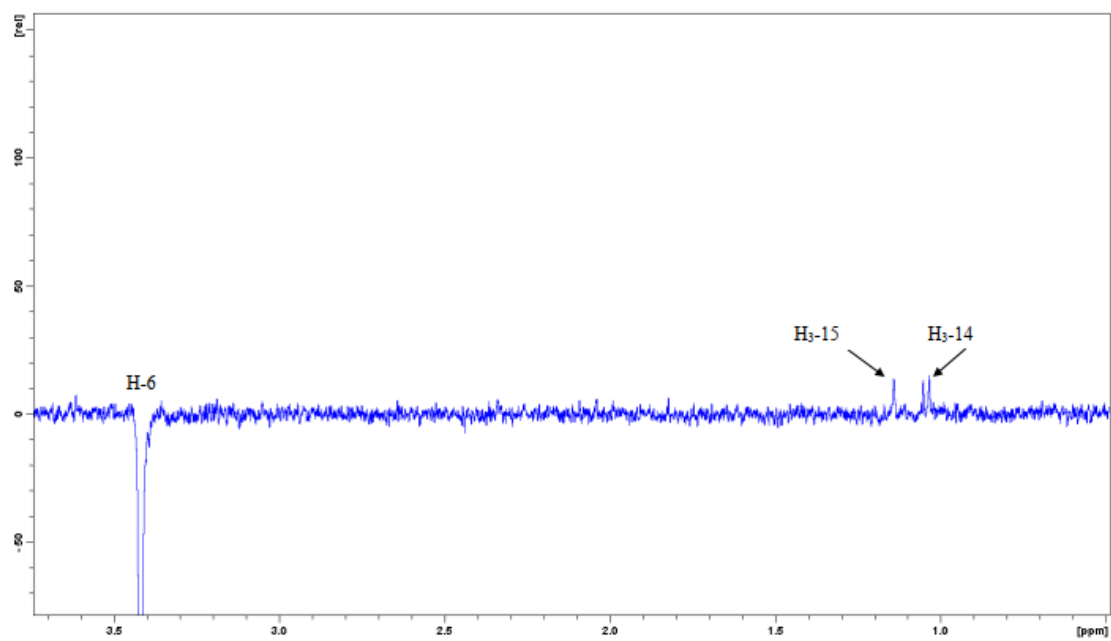


Figura 5.17: NOE relevantes para el compuesto 17 (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

Finalmente, los compuestos **19** y **20** tampoco pudieron ser aislados en forma pura mediante CCD en fase normal o reversa. Por lo tanto, se caracterizaron a partir de 2,2 mg de una mezcla en una proporción 5:2. La fórmula molecular de estos compuestos se determinó mediante UPLC-HRMS como $C_{15}H_{22}O_4$, lo que indica que **19** y **20** también son isómeros. El espectro de RMN- 1H de **19** exhibió sólo tres señales correspondientes a grupo metilo en δ 1,74 (d, $J = 0,8$ Hz), δ 0,87 (d, $J = 6,8$ Hz), y δ 1,07 s, correspondientes a H_3 -13, H_3 -14 y H_3 -15 de una lactona sesquiterpénica con esqueleto eremofilano similar al compuesto **27** aislado de *S. rosmarinus* (Morales et al., 1986). La presencia de una lactona insaturada hidroxilada en C-8 se confirmó por las señales en δ 157,2; δ 98,3; δ 123,6; δ 171,9 y δ 8,6 en el espectro de RMN- ^{13}C (Tabla 5.2), que fueron asignados a C-7, C-8, C-11, C-12 y C-13, respectivamente. Además, un singlete a δ 3,27 en el espectro de RMN- 1H y las resonancias a δ 64,3 y δ 69,1 en el espectro de RMN- ^{13}C fueron consistentes con la presencia de un grupo epóxido. La posición de este grupo en C-9 y C-10 se estableció mediante la correlación HMBC entre la señal de H-9 y C-1 en δ 31,1; C-8 en δ 98,3 y C-7 en δ 157,2 (Figura 5.18). La orientación de los grupos 8β -hidroxi y $9\beta,10\beta$ -epoxi se determinó en base a los NOE observados entre H_3 -15 y las señales correspondientes a H-6a a δ 2,43 (d, $J = 13,0$ Hz) y H-6b a δ 2,11 (d an., $J = 13,0$ Hz) en el experimento NOESY (Figura 5.19). Los datos de RMN casi idénticos para los compuestos **19** y **20** (Tablas 5.2 y Tabla 5.3) indicaron que las diferencias estructurales estaban restringidas a la orientación del grupo hidroxilo en C-8 y el grupo epóxido en las posiciones C-9 y C-10. Para el compuesto **20**, la orientación α del grupo hidroxilo en C-8 se confirmó mediante un pico de correlación cruzada observado entre H_3 -13 a δ 1,73 y la resonancia correspondiente a H_3 -15 a δ 0,96 (Figura 5.20); mientras que la orientación del grupo epóxido no pudo ser confirmada en base a los NOE observados. Por lo que, fue realizado un análisis utilizando CASE-3D, análogo al utilizado en los compuestos **14** y **15**, pero sólo utilizando corrimientos químicos en ^{13}C y 1H predichos a nivel DFT (los resultados se muestran en el capítulo 6). Por lo tanto, la estructura química de los compuestos **19** y **20** se estableció como (4*S*,5*R*)- $9\beta,10\beta$ -epoxi- 8β -hidroxi-eremofilano-12,8-olido y (4*S*,5*R*)- $9\beta,10\beta$ -epoxi- 8α -hidroxi-eremofilano-12,8-olido, respectivamente.

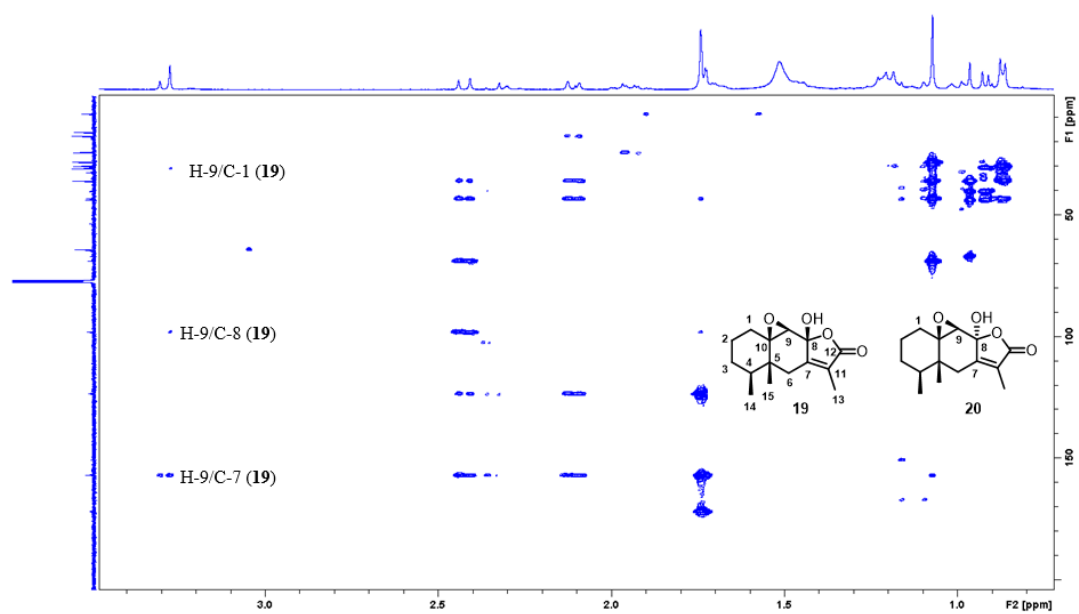


Figura 5.18: Espectro HMBC de la mezcla del compuesto **19** con el compuesto **20** (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

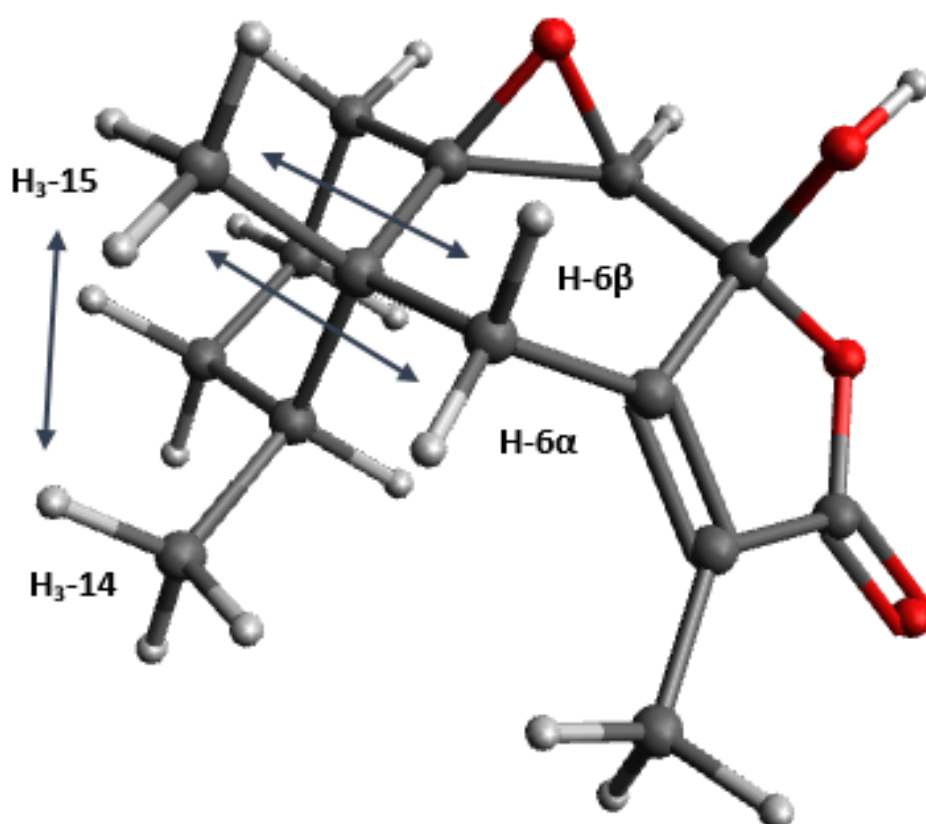
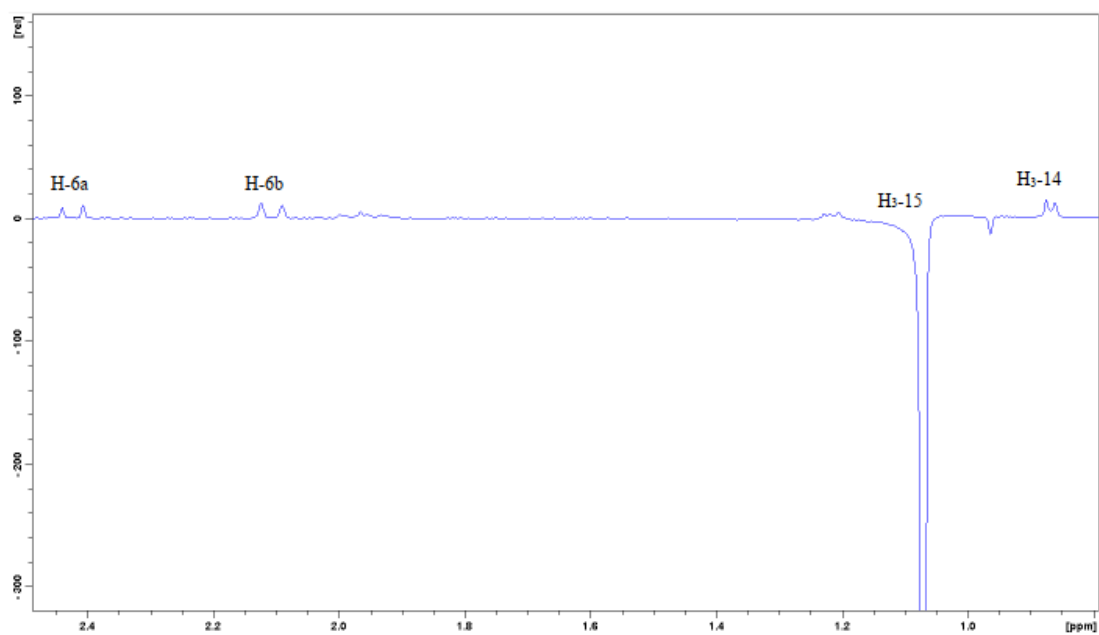


Figura 5.19: NOE relevantes para el compuesto 19 (CDCl₃; 400,13 MHz)

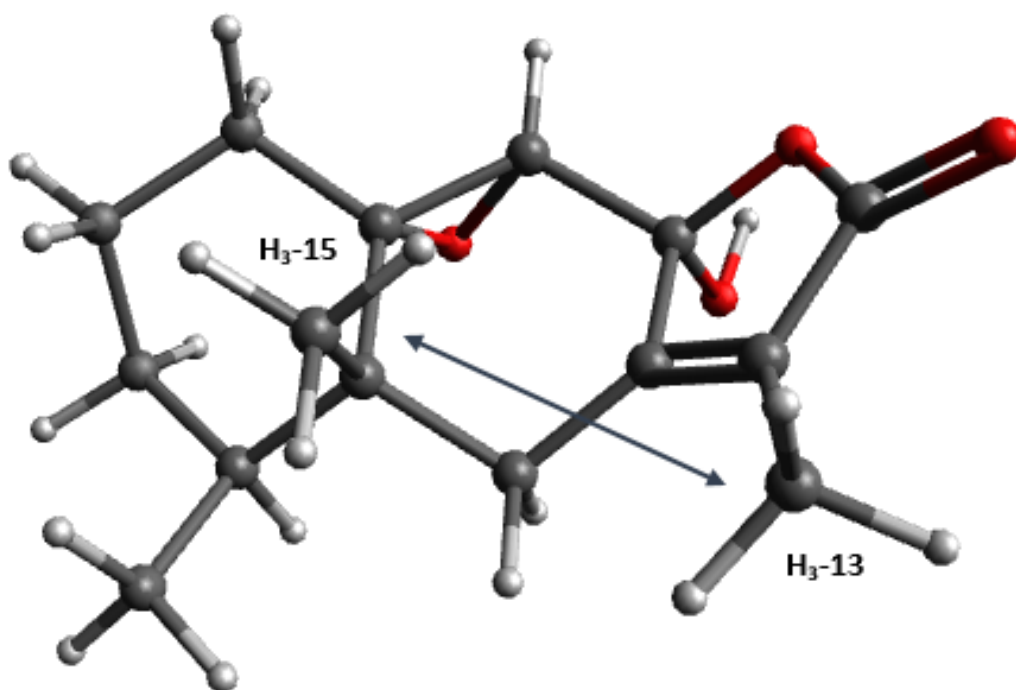
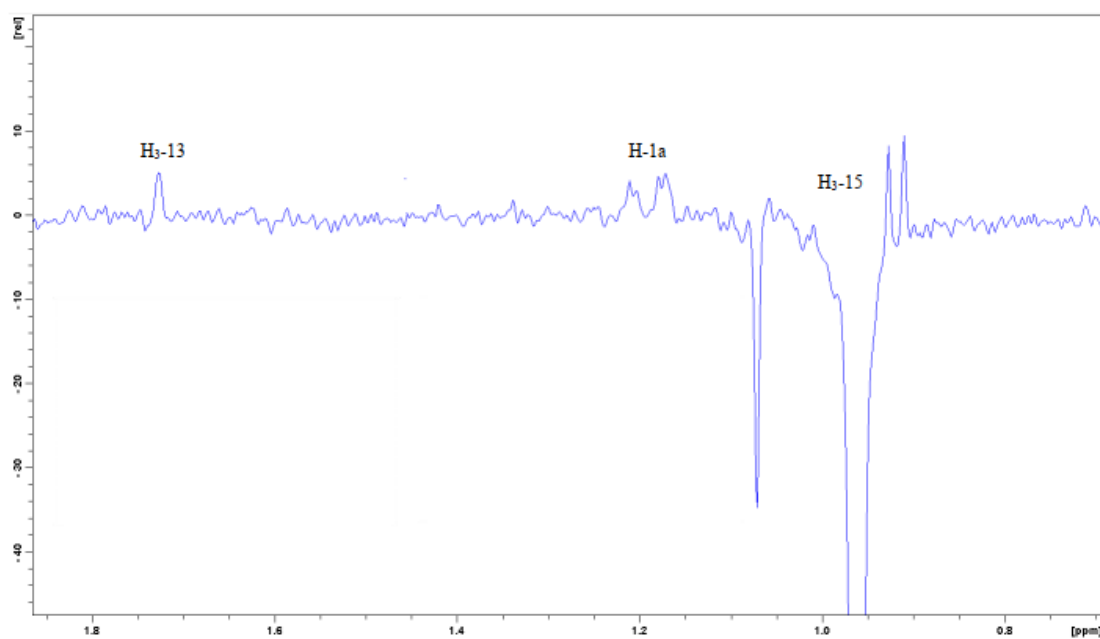


Figura 5.20: NOE relevantes para el compuesto 20 (CDCl_3 ; 400,13 MHz)

Además de los 9 nuevos compuestos aislados (compuestos 12–20), también se pudieron identificar en esta especie seis sesquiterpenoides conocidos (compuestos 21–27) mediante comparación con datos espectroscópicos publicados. Así la identidad de estos compuestos fue reconocida como 1 α -hidroxi y 1 β -hidroxidehidrofukinona (compuestos 21 y 22) (Bohlmann y Knoll, 1979), dehidrofukinona (compuesto 23, compuesto mayoritario) (Naya et al., 1972), ligudicina A y ligudicina C (compuestos 24 y 25) (Tan et al., 2003), 11-hidroxi-eremofilan-6,9-dien-8-ona (compuesto 26) (Naya et al., 1968), istabulina A (compuesto 27) (Budesinsky et al., 1984) y 4-hidroxiacetofenona (compuesto 28). Se ha informado de la presencia de 4-hidroxiacetofenona y derivados en varias especies de *Senecio* (Ruiz-Vásquez et al., 2017; Loyola et al., 1985; Urones et al., 1987).

Por otra parte, la ocurrencia de alcaloides pirrolizidínicos se ha informado en la mayoría de las especies del género *Senecio*. Por esta razón, se procesaron 200 g de las partes aéreas de *Senecio volckmannii* utilizando una metodología específica para su extracción (Segall, 1979). Este extracto se analizó por RMN-¹H y CG/MS, y sorprendentemente, no se observaron alcaloides. En otras especies del género *Senecio*, como *S. chionophilus*, también se ha informado la ausencia de estos alcaloides (Gu et al., 2004).

En síntesis, podemos decir que los componentes principales obtenidos en el estudio fitoquímico de la especie *Senecio volckmannii*, son eremofilanos, metabolitos ampliamente distribuidos en la naturaleza, estando presentes en hongos endofíticos como el microorganismo *Xylariaceous* como así también en plantas superiores (Fraga, 2011). Numerosos sesquiterpenoides de tipo eremofilano han sido reportados, no sólo en el género *Senecio* (Yang et al., 2011) sino también en numerosas especies del género *Ligularia* (Wu et al., 2016), entre otros.

5.4. Parte Experimental

5.4.1. Material Vegetal

El material vegetal fue recolectado en el mes de febrero de 2001 encontrándose la especie en estado de floración. El lugar de recolección fue “El Portezuelo de la Laguna Brava”, Departamento Vinchina, La Rioja. La especie fue identificada por la Dra. Gloria Barboza (IMBIV-CONICET, FCQ-UNC). Un ejemplar ha sido guardado en el Museo Botánico de Córdoba bajo el código CORD 00040584, Barboza et al. 263.

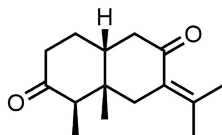
5.4.2. Extracción y purificación de metabolitos de interés

Las partes aéreas de *S. volckmannii* se dejaron secar en ambiente adecuadamente ventilado. Luego, éstas fueron finamente molidas obteniéndose 250 g de material vegetal pulverizado. Este material fue exhaustivamente extraído con Hx y DCM (3 x 500 mL); y luego, el extracto de DCM, secado sobre Na₂SO₄ y filtrado, fue llevado a sequedad a presión reducida. El residuo resultante (6 g) fue fraccionado utilizando cromatografía en columna de exclusión molecular (Sephadex LH-20), utilizando MeOH como fase móvil. Las fracciones con similar perfil en CCD fueron combinadas y reducidas a cuatro fracciones (I-IV), con la fracción II conteniendo sesquiterpenos y la fracción III 4-hidroxiacetofenona (200 mg). La fracción II fue subsecuentemente fraccionada empleando cromatografía en columna con silica gel 60 como fase estacionaria. La elución con una mezcla de Hx-AcOEt de polaridad creciente (100:0 a 0:100) dio como resultado seis fracciones (1-6). De éstas, la fracción 1 fue el sesquiterpeno ya conocido dehidrofuquinona (**23**) (321,5 mg). La fracción 2 (62 mg) fue purificada utilizando CCD. Preparativa con una mezcla de DCM/MeOH (99,7:0,3) para obtener dos subfracciones (1a y 1b). Ambas subfracciones fueron fraccionadas mediante HPLC en fase reversa, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de MeCN/H₂O (60:40) a un flujo de 1 mL/min. De la subfracción 1a se aisló el compuesto **25** (2,4 mg), mientras que de la subfracción 1b, el compuesto **16** (2,5 mg) y una mezcla (3 mg), que no pudo ser separada mediante CCD en fase normal ni en fase reversa. El espectro de RMN-¹H de esta mezcla indicó que estaba constituida por los compuestos **17** y **18** en una relación 3:2. La fracción 3 (42,4 mg) fue procesada utilizando HPLC en fase reversa para obtener el compuesto **26** (21 mg), y dos subfracciones que fueron purificadas mediante CCD preparativa con MeOH/H₂O (99:1) para dar compuestos **14** (8,1 mg) y **24** (2,6 mg), respectivamente. La fracción 4 (59,5 mg) fue separada mediante CCD preparativa utilizando DMC/MeOH (99,0:1,0), obteniéndose los compuestos **26** (16,7 mg) y **1** (7,5 mg). La fracción 5 (88,8 mg) se separó mediante CCD preparativa con DCM/MeOH (99,4:0,6) como fase móvil, obteniéndose el compuesto **21** (5,0 mg). Finalmente, la fracción 6 (477,6 mg) fue fraccionada utilizando cromatografía radial (CR) con DCM/MeOH de polaridad creciente (100,0–90:10) como fase móvil, obteniéndose dos subfracciones (6a y 6b). Estas subfracciones se purificaron utilizando cromatografía en columna (silica gel 60 G) utilizando mezclas de DCM/MeOH de polaridad creciente (100:0–80:20) para dar los compuestos **16** (0,7 mg) y **22** (1,5 mg) a partir de la subfracción 6a; y dos fracciones impuras a partir de la subfracción 6b, la cual fue subsecuentemente purificada utilizando HPLC en fase reversa para dar el compuesto **13** (2,8 mg), **27** (1,6 mg) y dos mezclas que no pudieron

purificarse utilizando esta técnica ni con CCD preparativa en fase normal o reversa, las cuales consistían en: la primera, una mezcla de los compuestos **27** y **15** en una relación 3:2 (2,2 mg); mientras que la segunda mezcla consistía en los compuestos **19** y **20** en una relación 5:2 (2,9 mg). La búsqueda de alcaloides pirrolizidínicos se llevó a cabo utilizando el procedimiento de [Segall \(1979\)](#) a partir de 200 g de material vegetal.

5.4.3. Datos físicos y espectroscópicos de los compuestos aislados

5.4.3.1. Compuesto 12



(4R,5S,10R)-eremofilan-7(11)-en-3,8-diona.

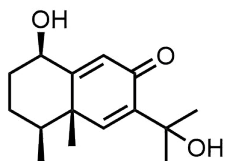
Sólido amorfo; $[\alpha]_{270}^{21} -2$ (c 0,1; CHCl₃); λ_{\max} (log ϵ) 247,5 (3,34) nm, 206,0 (3,35) nm; IR (película seca) ν_{\max} 2963 (C-H st); 2927,54 (C-H st); 2870 (C-H st); 1712 (C=O); 1682 (C=O α,β -insaturado) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 2,79 (H; d; 14,8; H-6a); 2,72 (H; dd; 12,6; 4,2; H-10); 2,64 (H; m; H-9a); 2,41 (2H; m; H₂-2); 2,40 (H; m; H-9b); 2,12 (H; d an.; 14,8; H-6b); 2,01 (3H; d; 2,2; H₃-12); 1,94 (H; m; H-1a); 1,90 (H; m; H-4); 1,79 (3H; d; 1,4; H₃-13); 1,69 (H; m; H-1b); 1,02 (3H; d; 6,6; H₃-14); 0,71 (3H; s; H₃-15).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 210,1 (C; C-3); 203,4 (C; C-8); 144,6 (C; C-7); 130,1 (C; C-11); 55,6 (CH; C-10); 43,1 (CH₂; C-6); 42,22 (C; C-5); 42,15 (CH; C-4); 41,7 (CH₂; C-2); 37,9 (CH₂; C-9); 31,8 (CH₂; C-1); 23,6 (CH₃; C-12); 22,6 (CH₃; C-13); 15,3 (CH₃; C-14); 11,9 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 257,1502 (calculado para C₁₅H₂₂NaO₂; 257,1512).

5.4.3.2. Compuesto 13



(4*S*,5*S*)-1 β ,11-dihydroxieremofilan-6,9-dien-8-ona.

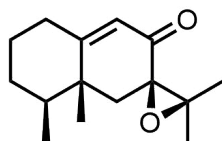
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} -7$ (c 0,3; CHCl₃); λ_{\max} (log ϵ) 243,5 (3,40) nm; 206 (3,38) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3356 (OH); 2928 (C-H st); 2856 (C-H st); 1740 (C=C); 1660 (C=O); 1616 (C=C) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 6,86 (H; s; H-6a); 6,07 (H; s; H-9a); 4,74 (s; OH-11); 4,46 (H; t; 2,6; H-1); 2,07 (H; m; H-2a); 1,94 (H; m; H-3a); 1,62 (H; m; H-2b); 1,51 (H; m; H-4); 1,47 (H; m; H-3b); 1,39 (3H; s; H₃-13); 1,38 (3H; s; H₃-12); 1,26 (3H; s; H₃-15); 1,04 (3H; d; 6,7; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 188,8 (C; C-8); 166,5 (C; C-10); 151,3 (C-6); 141,4 (C; C-7); 127,0 (CH; C-9); 73,8 (CH; C-1); 72,2 (C; C-11); 34,9 (CH₂; C-2); 29,2 (CH₃; C-12); 29,2 (CH₃; C-13); 25,3 (CH₂; C-3); 19,0 (CH₃; C-15); 16,5 (CH₃; C-14).

HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 257,1502 (calculado para C₁₅H₂₂NaO₂; 257,1512).

5.4.3.3. Compuesto 14



(4*S*,5*R*)-7 β ,11 β -epoxieremofil-9-en-8-ona

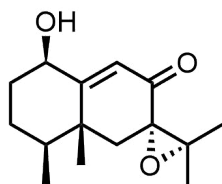
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21}$ -24 (c 0,2; CHCl₃); λ_{\max} (log ϵ) 256,3 (3,23), 205,2 (3,15); IR (película seca) ν_{\max} 2924 (C-H st), 2856 (C-H st), 1682 (C=O), 1626 (C=C) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 5,90 (1H; d; 1,2; H-9a); 2,46 (1H; dd; 12,5; 4,9; H-1a); 2,23 (1H; d an.; 12,5; H-1b); 2,10 (1H; d; 15,0; H-6a); 2,09 (1H; d; 15,0; H-6b); 2,04 (1H; m; H-2a); 1,76 (1H; m; H-4); 1,66 (1H; m; H-3a); 1,50 (1H; m; H-3b); 1,44 (3H; s; H₃-13); 1,43 (H; m; H-2b); 1,31 (3H; s; H₃-12); 1,13 (3H; s; H₃-15); 0,99 (H; d; 6,6; H-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 195,7 (C; C-8); 173,0 (C; C-10); 123,7 (C; C-9); 66,3 (C; C-7); 65,3 (C; C-11); 42,8 (C; C-5); 40,4 (CH; C-4); 37,3 (CH₂; C-6); 33,4 (CH₂; C-1); 30,9 (CH₂; C-3); 29,7 (CH₂; C-2); 21,8 (CH₃; C-13); 21,5 (CH₃; C-15); 19,4 (CH₃; C-12); 17,0 (CH₃; C-14).

HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 235,1697 (calculado para C₁₅H₂₃NaO₂; 235,1693).

5.4.3.4. Compuesto 15



(4*S*,5*R*)-1β-hidroxi-7α,11α-epoxieremofil-9-en-8-ona

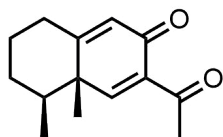
Compuesto caracterizado en mezcla con el compuesto 27.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 5,91 (H; s; H-9); 4,35 (H; s an.; H-1); 2,07 (1H; d; 13,7; H-6a); 1,96 (H; m; H-2a); 1,94 (H; d; 13,7; H-6b); 1,81 (H; m; H-3a); 1,68 (H; m; H-2b); 1,48 (H; m; H-4); 1,39 (3H; s; H₃-13); 1,36 (H; m; H-3b); 1,28 (3H; s; H₃-15); 1,24 (3H; s; H₃-12); 0,89 (3H; d; 6,8; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 196,2 (C; C-8); 167,7 (C; C-10); 127,4 (CH; C-9); 72,6 (CH; C-1); 66,8 (C; C-7); 65,2 (C; C-11); 42,6 (CH; C-4); 41,5 (CH₂; C-6); 41,1 (C; C-5); 33,1 (CH₂; C-2); 24,2 (CH₂; C-3); 24,2 (CH₂; C-3); 21,2 (CH₃; C-13); 20,0 (CH₃; C-15); 15,1 (CH₃; C-14).

HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 273,1443 (calculado para C₁₅H₂₂NaO₃; 273,1461).

5.4.3.5. Compuesto 16



(4S,5S)-11-noreremofilan-6,9-diene-8,11-diona.

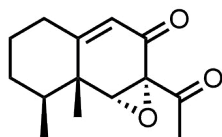
Sólido amorfo; $[\alpha]_{270}^{21} - 9$ (c 0,03; CHCl_3); λ_{max} (log ϵ) 243,50 (3,86) nm; 234,50 (3,86) nm; 212,50 (4,00) nm; IR (película seca) ν_{max} 2928 (C-H st), 2858 (C-H st), 2360 (C-H st), 2339 (C-H st), 1696 (C=O), 1658 (C=O α,β -insaturado) cm^{-1} .

RMN- ^1H (CDCl_3 ; 400,13 MHz) δ 7,67 (H; s; H-6); 6,12 (H; s; H-9); 2,57 (3H; s; H₃-13); 2,44 (H; m; H-1a); 2,38 (H; m; H-1b); 2,00 (H; m; H-2a); 1,61 (2H; m; H₂-3); 1,55 (H; m; H-4); 1,41 (H; m; H-2b); 1,19 (3H; s; H₃-15); 1,11 (3H; d; 5,9; H₃-14).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 ; 100,03 MHz) δ 199,3 (C; C-11); 184,1 (C; C-8); 168,0 (C; C-10); 159,8 (CH; C-6); 136,6 (C; C-7); 124,9 (CH; C-9); 43,9 (C; C-5); 41,2 (CH; C-4); 32,5 (CH₂; C-1); 30,9 (CH₃; C-13); 30,1 (CH₂; C-3); 27,7 (CH₂; C-2); 16,9 (CH₃; C-15); 16,1 (CH₃; C-14).

HRESIMS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 241,1206 (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NaO}_2$; 241,1199).

5.4.3.6. Compuesto 17



(4*S*,5*R*)-6 α ,7 α -epoxi-11-noreremofilan-9-ene-8,11-diona.

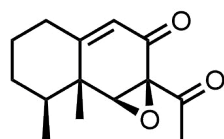
Compuesto caracterizado en mezcla con el compuesto **16**.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 5,71 (H; d; 1,8; H-9a); 3,42 (H; s an.; H-6a); 2,35 (H, m; H-1a); 2,27 (3H; m; s; H₃-13); 2,22 (H; m; H-1b); 1,87 (H; m; H-4); 1,80 (H; m; H-2a); 1,57 (H; m; H-3a); 1,39 (H; m; H-3b); 1,38 (H; m; H-2b); 1,15 (3H; s; H₃-15); 1,05 (3H; d; 6,8; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 201,6 (C; C-11); 167,0 (C; C-10); 121,0 (CH; C-9); 66,8 (CH; C-6); 41,4 (C; C-5); 38,4 (CH; C-4); 33,7 (CH₂; C-1); 30,5 (CH₂; C-3); 28,4 (CH₃; C-13); 26,9 (CH₂; C-2); 18,0 (CH₃; C-15); 16,1 (CH₃; C-14).

HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 257,1129 (calculado para C₁₄H₁₈NaO₃; 257,1148).

5.4.3.7. Compuesto 18



(4*S*,5*R*)-6 β ,7 β -epoxi-noreremofilan-9-en-8,11-diona.

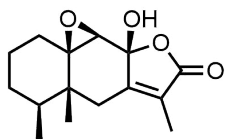
Compuesto caracterizado en mezcla con el compuesto 15.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 5,74 (H; s an.; H-9); 3,49 (H; s an.; H-6); 2,26 (3H; s; H₃-13); 2,26 (H; m; H-1a); 2,12 (H; m; H-1b); 1,93 (H; m; H-2a); 1,69 (H; m; H-4); 1,53 (H; m; H-3a); 1,38 (H; m; H-2b); 1,35 (H; m; H-3b); 1,24 (3H; s; H₃-15); 0,97 (3H; d; 6,8; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 202,2 (C; C-11); 169,5 (C; C-10); 120,5 (CH; C-9); 66,2 (CH; C-6); 63,5 (C; C-7); 41,6 (C; C-5); 40,6 (CH; C-4); 33,7 (CH₂; C-1); 30,7 (CH₂; C-3); 29,1 (CH₂; C-2); 28,3 (CH₃; C-13); 15,8 (CH₃; C-14); 15,7 (CH₃; C-15).

HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 235,1319 (calculado para C₁₄H₁₈NaO₃; 235,1329).

5.4.3.8. Compuesto 19



(4*S*,5*R*)-9β,10β-epoxi-8β-hidroxi-eremofilan-12,8-olido.

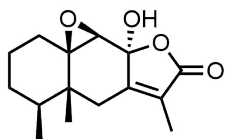
Compuesto caracterizado en mezcla con el compuesto 20.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 3,27 (H; s; H-9); 2,43 (H; d; 13,0; H-6a); 2,11 (H; d an.; 13,0; H-6b); 1,95 (H; m; H-1a); 1,74 (3H; d; 0,8; H₃-13); 1,70 (H; m; H-2a); 1,46 (H; m; H-3a); 1,22 (H; m; H-4); 1,21 (H; m; H-3b); 1,21 (H; m; H-2b); 1,07 (3H; s; H₃-15); 1,01 (H; m; H-1b); 0,87 (3H; d; 6,0; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 171,9 (C; C-12); 157,2 (C; C-7); 123,6 (C; C-11); 98,3 (C; C-8); 69,1 (C; C-10); 64,3 (CH; C-9); 43,5 (C; C-5); 36,1 (CH; C-4); 31,1 (CH₂; C-1); 30,2 (CH₂; C-3); 28,6 (CH₂; C-6); 24,5 (CH₂; C-2); 17,8 (CH₃; C-15); 16,2 (CH₃; C-14); 8,8 (CH₃; C-13).

HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 287,1239 (calculado para C₁₅H₂₀NaO₄; 287,1254).

5.4.3.9. Compuesto 20



(4*S*,5*R*)-9β,10β-epoxi-8α-hidroxi-eremofilan-12,8-olido.

Compuesto caracterizado en mezcla con el compuesto 20.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 3,30 (H; s; H-9a); 2,34 (H; d; 14,8; H-6a); 2,28 (H; d an.; 14,8; H-6b); 1,94 (H; m; H-1a); 1,73 (H; m; H-4); 1,73 (3H; d; 1,6; H₃-13); 1,50 (H; m; H-3a); 1,46 (H; m; H-2a); 1,15 (H; m; H-3b); 1,12 (H; m; H-1b); 0,96 (3H; s; H₃-15); 0,92 (3H; d; 6,8; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 171,9 (C; C-12); 157,2 (C; C-7); 123,8 (C; C-11); 102,7 (C; C-8) 44,0 (CH; C-4); 40,5 (C; C-5); 36,2 (CH₂; C-6); 32,7 (CH₂; C-1); 30,8 (CH₂; C-3); 24,6 (CH₂; C-2); 17,8 (CH₃; C-15); 16,3 (CH₃; C-14); 8,6 (CH₃; C-13).

HRESIMS *m/z* [M+Na]⁺ 287,1235 (calculado para C₁₅H₂₀NaO₄; 287,1254).

Capítulo 6

Elucidación estructural de sesquiterpenos asistida por computadora combinando parámetros de RMN isotrópicos y anisotrópicos

“El verdadero amor comienza cuando no se busca nada a cambio”

Antoine de Saint-Exupery

Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo son fruto de una colaboración con el Dr. Roberto R. Gil (Carnegie Mellon University, Pittsburg, USA), con el Dr. Armando Navarro-Vázquez (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil) y con la Dra. Manuela E. García (Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV-CONICET, Argentina).

6.1. Acoplamiento Dipolar Residual

6.1.1. Introducción

El desarrollo de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en solución ha contribuido profundamente a la determinación estructural de productos naturales a nivel de resolución atómica. Cuando se trata del análisis de moléculas orgánicas pequeñas, los químicos tienen acceso a una amplia gama de experimentos multinucleares y multidimensionales de RMN. Hoy en día, la constitución de una molécula se puede determinar directamente utilizando una serie de experimentos de correlación homonucleares (^1H a ^1H ; ^{13}C a ^{13}C) y heteronucleares (^1H a ^{13}C ; ^{15}N ; ^{31}P ; etc.) tales como COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY, HSQC-COSY, INADEQUATE y variantes de ADEQUATE, entre otros. El análisis combinando todos estos datos puede ser rea-

lizado manualmente o de manera automatizada utilizando programas de elucidación estructural asistida por computadoras (*Computer Assisted Structure Elucidation*, CASE). Una vez que la constitución de una molécula es conocida sin ambigüedades, la determinación de la configuración relativa y la conformación preferencial es una tarea más desafiante, la cual es resuelta utilizando el efecto nuclear de Overhauser (NOE) y las constantes de acoplamiento 3J ($^3J_{\text{HH}}$ y $^3J_{\text{CH}}$). También se pueden utilizar desarrollos más recientes de la aplicación de cálculos de DFT de corrimientos químicos en ^1H y ^{13}C . Las constantes de acoplamiento 3J así como el NOE son parámetros locales de RMN. Solamente pueden ser utilizados para obtener información sobre distancias y ángulos de enlace entre átomos vecinos o cercanos. La configuración relativa entre estereocentros ubicados de forma remota se realiza utilizando un conjunto de correlaciones de carácter local. Sin embargo, si se pierde la comunicación entre átomos magnéticamente activos por la presencia de espaciadores planos, magnéticamente inactivos, aquirales, o demasiado largos, etc., se pierde la comunicación entre los estereocentros ubicados remotamente. La determinación inequívoca de la configuración molecular ya no es posible, lo que lleva, en muchos casos, a más de una solución que satisface los datos de RMN convencionales (NOE y J). Para superar problemas como éstos, es necesario tener acceso a los parámetros de RMN de carácter no local que permitan determinar la configuración relativa de los estereocentros, independientemente de la distancia entre ellos. En este contexto, los acoplamientos dipolares residuales (RDCs) pueden proporcionar un complemento valioso para la elucidación estructural de moléculas complejas (Gil et al., 2014; Gil y Navarro-Vázquez, 2017).

6.1.2. El Acoplamiento Dipolar

Todos hemos experimentado la interacción de dos dipolos jugando con imanes permanentes. Si un polo norte se acerca a un polo sur, sentimos una fuerza atractiva y, de manera similar, cuando dos polos idénticos se unen, sentimos una fuerza repelente. Los espines nucleares no son más que pequeños imanes con rotación inherente a la frecuencia de Larmor. La figura 6.1 muestra el principio básico de cómo la interacción dipolar afecta los espectros de RMN. Debido al campo magnético estático, B_0 , dos espines i y j , están en promedio orientados paralelos o antiparalelos entre sí y B_0 . El campo magnético producido por el espín i ahora se suma al campo magnético estático que siente el espín j y provoca un cambio en su frecuencia de resonancia, fenómeno denominado acoplamiento dipolar. Dependiendo de la distancia entre los dos espines (R) y el ángulo θ del vector internuclear con respecto a B_0 , la intensidad y el signo de este campo magnético adicional varían. La fórmula para el cálculo del acoplamiento dipolar es (Thiele, 2008):

$$D_{ij} = \frac{\gamma_i \gamma_j \mu_0 \hbar}{16\pi^2} \left\langle \frac{1}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \right\rangle \quad (6.1)$$

donde μ_0 es la permeabilidad del vacío, γ la constante giromagnética de los núcleos correspondientes (i y j), y \hbar la constante de Planck dividida por 2π . Los corchetes angulares en esta ecuación indican un promedio en el tiempo que conduce a acoplamientos dipolares escalados. El valor del acoplamiento resultante depende de la distancia entre

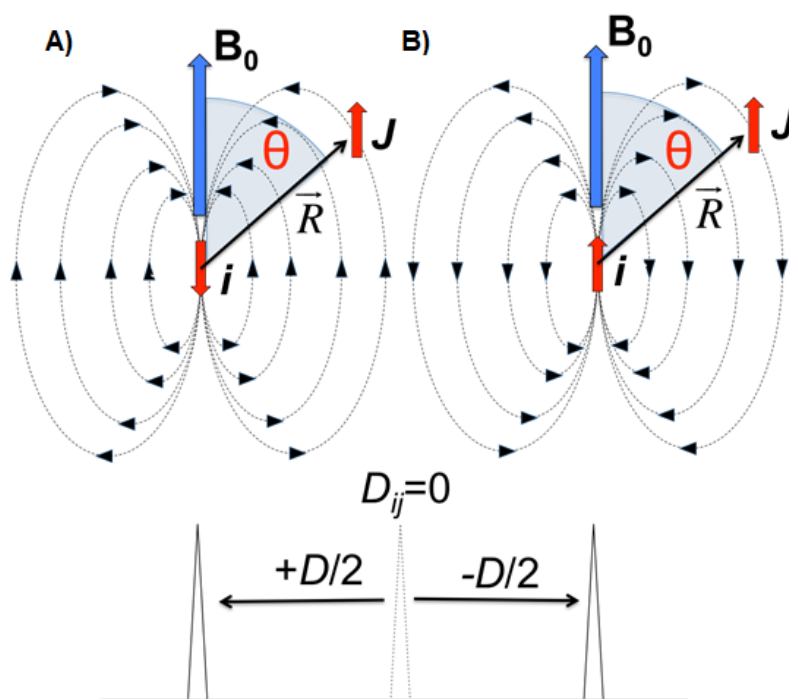


Figura 6.1: Representación de la interacción directa entre dos espines i y j que conduce a una división de la señal conocida como Acoplamiento Dipolar (D). Cada interacción de los dos estados del espín i (A y B) con el espín J contribuye con $D/2$ al total.

los dos núcleos, así como de la dirección de su vector internuclear en relación al campo magnético externo, B_0 . Si se toma la distancia C-H como fija, entonces, el acoplamiento dipolar residual dependerá únicamente del ángulo entre los vectores internucleares respecto de B_0 .

La ecuación 6.1 es válida sólo para acoplamientos débiles, de esta forma pueden ser usados acoplamientos homonucleares y heteronucleares a largo alcance (Verdier et al., 2003). Los acoplamientos dipolares resultantes en estado sólido son del orden de los kHz, lo que conduce a líneas anchas en los espectros perdiendo resolución en cuanto al desplazamiento químico. En soluciones isotrópicas, las interacciones dipolares dependientes del ángulo generalmente promedian a cero, debido a la distribución uniforme de todas las orientaciones (difusión browniana rotacional). Como resultado de este movimiento isotrópico, los espectros de RMN de alta resolución muestran señales delgadas en solución, lo que permite la resolución de moléculas complejas. Sin embargo, se pierde información estructural valiosa sobre la orientación de los vectores internucleares. Para medir la información estructural deseada sin una pérdida significativa en la resolución, se debe alcanzar un estado intermedio entre el sólido y el líquido, lo cual se logra utilizando medios de alineamiento, donde las moléculas adoptarán una orientación preferencial con respecto al campo magnético externo, teniendo sus giros erráticos de manera anisotrópica. Se observa entonces una "fracción" del acoplamiento dipolar original, llamado Acoplamiento Residual Dipolar (*Residual Dipolar Coupling*, RDC). En

el mejor de los casos, los acoplamientos dipolares se reducen aproximadamente tres órdenes de magnitud; de varios kHz a unos pocos Hz.

6.1.3. Medios de alineamiento

Vivimos en una sociedad en donde las personas y los vehículos no pueden moverse libremente en cualquier dirección. Suponiendo que las personas y los automóviles no vuelan, los movimientos se limitan a un espacio en dos dimensiones. A diferencia de las moléculas en solución, los automóviles tienen que moverse en rutas y calles; y las personas tienen que caminar restringidas por paredes de edificios y casas, por fuera y por dentro. A nivel molecular, es experimentalmente posible manipular estas probabilidades de orientación exponiendo las moléculas en solución a un medio que es anisotrópico, lo mismo que en el ejemplo descrito anteriormente para personas y vehículos. Podemos crear columnas flotantes usando soluciones liotrópicas de cristales líquidos (*Lytropic Liquid Crystalline solutions, LLC*) de polímeros helicoidales en disolventes orgánicos que se orientan con el campo magnético (Figura 6.2). También podemos producir cavidades (oblatos o prolatos) estirando o comprimiendo geles de polímeros hinchados en diferentes disolventes orgánicos, como muestra la Figura 6.3 (Böttcher y Thiele, 2012; Canales et al., 2012; Schmidts, 2017).

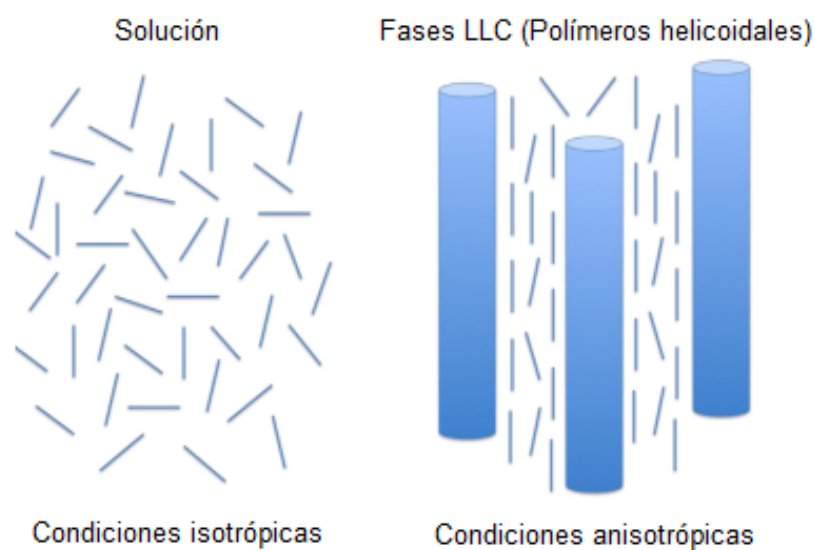


Figura 6.2: Representación de moléculas pequeñas (bastones azules) en solución isotrópica (izquierda) y en presencia de una fase LLC de polímeros helicoidales (derecha)

En una solución isotrópica, todas las orientaciones se distribuirán por igual, lo que dará como resultado $\langle \cos^2 \theta \rangle = 1/3$, un acoplamiento dipolar nulo. Por lo tanto, el alineamiento parcial debe realizarse para producir valores medibles. Cuando las moléculas se ven obligadas a adoptar un grado de alineamiento (u orientación) exponiéndolas a

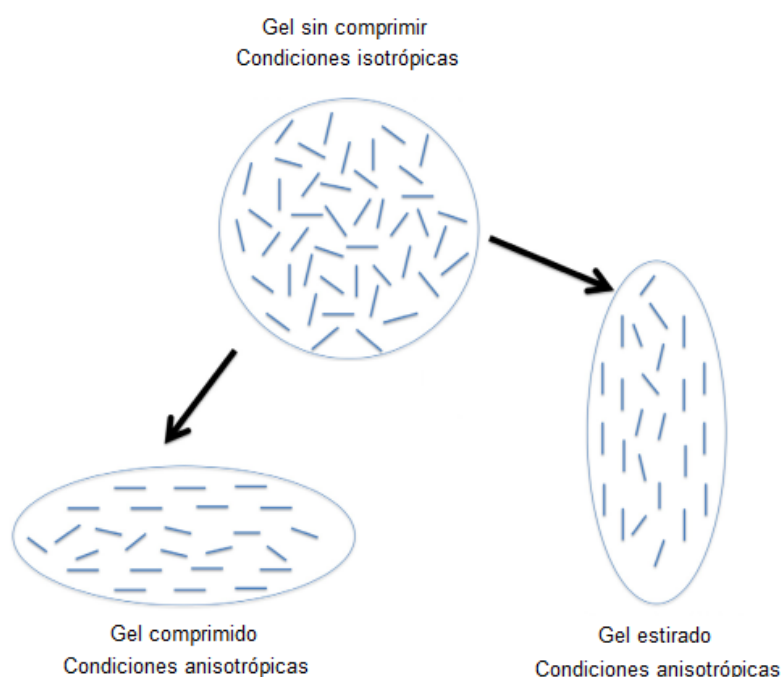


Figura 6.3: Representación de moléculas pequeñas (bastones azules) en solución isotrópica dentro de cavidades de un gel hinchado sin comprimir (arriba) y en condiciones anisotrópicas cuando el gel se comprime (abajo a la izquierda) o se estira (abajo a la derecha).

un medio anisotrópico, se observa un valor de D_{ij} parcialmente promediado (no nulo). Por razones prácticas, el grado de orden deseado para aplicar el acoplamiento dipolar al análisis estructural de moléculas pequeñas tiene que ser del orden de 0,01 a 0,1%. En estas condiciones experimentales, las moléculas pasan el 99,90–99,99% del tiempo en comportamiento isotrópico, lo que lleva a espectros de RMN con líneas delgadas. De esta manera, la extracción de acoplamientos dipolares resulta sencillo. Es importante aclarar que el grado de orden inducido por cristales líquidos está en el rango de 15-20%, y extraer RDCs utilizando estos medios alineantes para moléculas orgánicas de tamaño medio o grande es una tarea muy complicada. La potencia de utilizar medios de alineamiento débiles se basa en el hecho de que: a) se pueden obtener espectros simplificados, b) los RDCs mantienen la misma información angular que el acoplamiento dipolar original y, como se indicó anteriormente, c) esta información no es de carácter local (Figura 6.2).

Aunque los RDCs se usaron ampliamente en el análisis de biomoléculas desde 1997, su aplicación al análisis estructural de moléculas pequeñas comenzó en 2003. El principal obstáculo para usar RDCs en moléculas orgánicas pequeñas fue la falta de medios de alineamiento débiles compatibles con solventes orgánicos, mientras que la comunidad de RMN biomolecular ya tenía acceso a una amplia variedad de medios de orientación compatibles con agua. El año 2003, exactamente 40 años después de que Saupe y

Englert publicaran un artículo que mostraba el alineamiento del benceno en un cristal líquido, fue el año en que despegó la aplicación de RDC a moléculas orgánicas pequeñas. Estos compuestos tuvieron que esperar 40 años para un medio de alineamiento débil compatible con solventes orgánicos, cuando se introdujo en 2003 el uso de fases LLC en CDCl_3 de poli(γ -bencil-L-glutamato) (PBLG) (Marx y Thiele, 2008; Ndukwe et al., 2019). Poco después, otros homopolipéptidos, tales como poli- γ -etil-L-glutamato (PELG) (Hansmann y Larem, 2016) y poli- ϵ -carbocenciloxi-L-lisina (PCBLL), también se informaron como medios alineantes compatibles con CDCl_3 . PBLG también forma fases de LLC en DMF y en mezclas de hasta 50 % de $\text{DMSO-}d_6$ en CDCl_3 . El principal problema de estas primeras fases de LLC fue el grado relativamente alto de alineamiento, del orden de 0,1 %, cuando el grado deseado para moléculas pequeñas es de 0,01 %. En los últimos años, se informó de una serie de otras fases de LLC basadas en polímeros helicoidales con un grado de alineamiento mucho más débil (poliacetilenos, poliguandinas y poliisocianuros) (Dama y Berger, 2012; Arnold et al., 2010; Li et al., 2017). Todas estas fases de LLC son quirales, y los enantiómeros están alineados en ellas muestran diferentes conjuntos de RDCs debido a diferentes orientaciones diastereomorfos de cada enantiómero con la fase quiral. En el año 2015, se informó una nueva fase de LLC basada en óxido de grafeno en mezclas de agua y solventes polares (DMSO, acetona y acetonitrilo) (Zong et al., 2016).

Otro grupo importante de medios de alineamiento para moléculas orgánicas pequeñas son los geles de alineamiento tensados (SAG) (Luy et al., 2004). En 2004 se informó por primera vez un gel de poliestireno (PS) entrecruzado con divinilbenceno, hinchado en CDCl_3 y estirado dentro de un tubo de 5 mm como un nuevo tipo de medio de alineamiento para moléculas orgánicas pequeñas compatible con solventes orgánicos (Figura 6.4). Se introdujo una varilla de PS de 4 mm de diámetro y 10 mm de longitud en el tubo de RMN de 5 mm. Se añadió CDCl_3 al tubo y el gel se hinchó hasta que tocó la pared del tubo, pero el gel continuó hinchándose en dirección vertical, por lo tanto se estiró. El gel hinchado llenó un volumen de aproximadamente 4 cm de altura en el tubo de RMN. La muestra se puede introducir con el disolvente durante el proceso de hinchamiento o se puede difundir lentamente en el gel. La capacidad de ajuste del grado de alineamiento en este método podría lograrse variando la densidad de entrecruzamiento del gel o el tamaño de la varilla de polímero introducida en el tubo. Este experimento fue el comienzo del desarrollo de una metodología actualmente muy exitosa para alinear y medir los RDC en pequeñas moléculas orgánicas (Figura 6.3).

A la fecha, se han desarrollado dispositivos muy ingeniosos para estirar o comprimir diferentes tipos de geles de polímeros flexibles con grados variables de alineamiento. Uno de los métodos utilizados para estirarlos utiliza un tubo flexible de un elastómero perfluorado fabricado por DuPont (Kalrez[®]) y el otro es un método para comprimir reversiblemente geles de poli(metil metacrilato) (PMMA) hinchados en CDCl_3 (ver Figura 6.5) (Gil et al., 2008) y geles de poli(metacrilato de hidroxietilo) (poliHEMA) hinchados en $\text{DMSO-}d_6$ (Gil-Silva et al., 2016). La mayoría de estos geles se pueden lavar para eliminar los monómeros residuales; otros están entrecruzados con radiación lo que produce geles libres de monómeros. En la mayoría de los casos la muestra puede recuperarse por lavado de los geles, siendo posible volverlos a utilizar. En la etapa actual del desarrollo de esta técnica, la metodología que utiliza geles es muy robusta en términos de prepara-

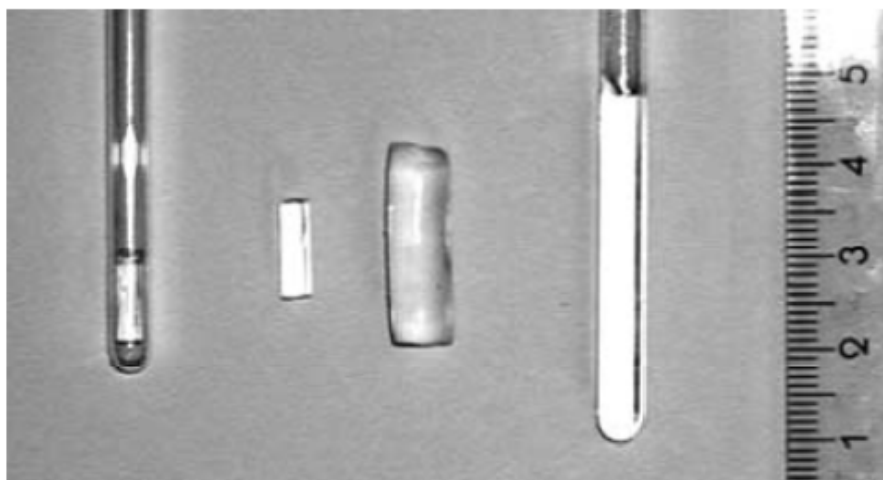


Figura 6.4: Fotografía del fragmento de gel de PS entrecruzado en diferentes estados de hinchamiento. De izquierda a derecha: polímero no hinchado en un tubo estándar de 5 mm, distintos grados de hinchamiento isotrópico, hinchamiento anisotrópico en el tubo de RMN (Luy et al., 2004).

ción de muestras, homogeneidad del gel y recopilación de datos de RDC. De hecho, el principal impedimento para que esta técnica sea accesible para los químicos es la falta de geles disponibles comercialmente. Sólo los polímeros de bajo peso molecular PBLG y PELG son comercializados actualmente.

6.1.4. Midiendo RDCs

Los RDCs pueden ser positivos o negativos, y cuando están presentes en el espectro de RMN, suman o restan a la constante de acoplamiento J correspondiente al par de espines que conducen al acoplamiento dipolar. En el espectro de RMN de la muestra en medio anisotrópico, en lugar del acoplamiento J , se observa un desdoblamiento total equivalente a $T = J + D$. El valor de D se puede extraer del espectro de RMN tomado en condiciones isotrópicas para medir los valores de acoplamiento escalar J y luego obtener D como T menos J . La forma más popular y fácil de medir RDC es el acoplamiento dipolar ^1H - ^{13}C de un enlace ($^1D_{\text{CH}}$) a la abundancia natural del ^{13}C , usando un experimento tipo HSQC que muestra los acoplamientos protón-carbono en F2 o en F1. El acoplamiento escalar de un enlace protón-carbono J ($^1J_{\text{CH}}$) están en el rango de 120–150 Hz. Con un grado de alineamiento de 0,01 % los valores de $^1D_{\text{CH}}$ son del orden de -40 a $+40$ Hz, dependiendo del tamaño y la forma de las moléculas. Como el $^1J_{\text{CH}}$ es lo suficientemente grande, el valor de $^1D_{\text{CH}}$ y su signo se pueden extraer fácilmente de los experimentos de HSCQ acoplados de la muestra en condiciones isotrópicas y anisotrópicas de acuerdo con la ecuación $^1T_{\text{CH}} = ^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$. El $^1J_{\text{CH}}$ siempre es positivo; por lo tanto, el signo del $^1D_{\text{CH}}$ se puede extraer directamente. Los experimentos en 2D más populares para medir $^1D_{\text{CH}}$ son el HSQC-CLIP acoplado en F2 (^1H F2-coupled CLIP ^1H , ^{13}C -HSQC) (Figura 6.6) (Enthart et al., 2008) y HSQC-JSB, un HSQC acoplado en F1 J -escalado aplicando un filtro BIRD en su adquisición (^1H F1-coupled J -scaled

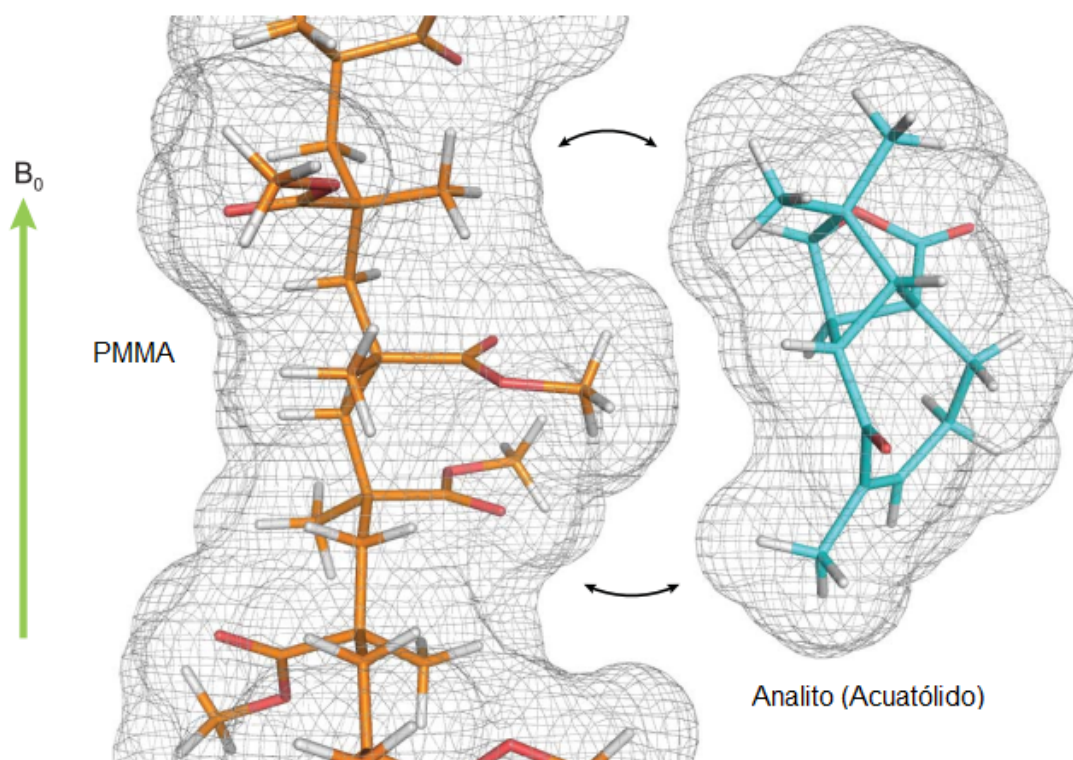


Figura 6.5: Ilustración del ordenamiento molecular en la superficie del gel de PMMA. El filamento de PMMA se muestra a lo largo de B_0 . La rotación del analito (acuatólido) está restringida en la superficie del polímero debido a oclusión estérica, lo que lleva a un alineamiento molecular parcial.

BIRD ^1H , ^{13}C -HSQC) (Figura 6.7) (Zangger, 2015). Ambos experimentos tienen sus pros y contras. Cuando los RDCs se miden a partir de cortes en F2 en moléculas ricas en electrones, tales como esteroides, diterpenos y triterpenos, las interacciones dipolares protón-protón amplían significativamente las señales, lo que dificulta la extracción de los acoplamientos. Además, debido a esta ampliación, el error de la medición es normalmente mayor. Sin embargo, a partir de cortes en F2, es posible medir el acoplamiento protón-carbono de cada protón diastereotópico de los grupos CH_2 (Figura 6.6). Dado que los acoplamientos se miden en F2 sin desacoplamiento en ^{13}C , el tiempo de adquisición se puede establecer lo suficiente como para obtener una buena resolución en F2. Además, el experimento es rápido ya que 256 incrementos en F1 son suficientes para obtener espectros de buena calidad.

Por otro lado, el experimento HSQC-JSB (Figura 6.7) proporciona valores de acoplamiento muy precisos, pero lleva mucho tiempo. Para lograr la resolución digital deseada, es necesario un mínimo de 1024 incrementos en F1. La resolución puede mejorarse aún más solapando las señales usando una ventana espectral en F1 no mayor a 100 ppm y escalando $^1J_{\text{CH}}$ o $^1T_{\text{CH}}$ por un factor de 4. El filtro BIRD elimina las interacciones protón-carbono de largo alcance ($^nJ_{\text{CH}}$ y $^nT_{\text{CH}}$) en F1, dando lugar a multipletes

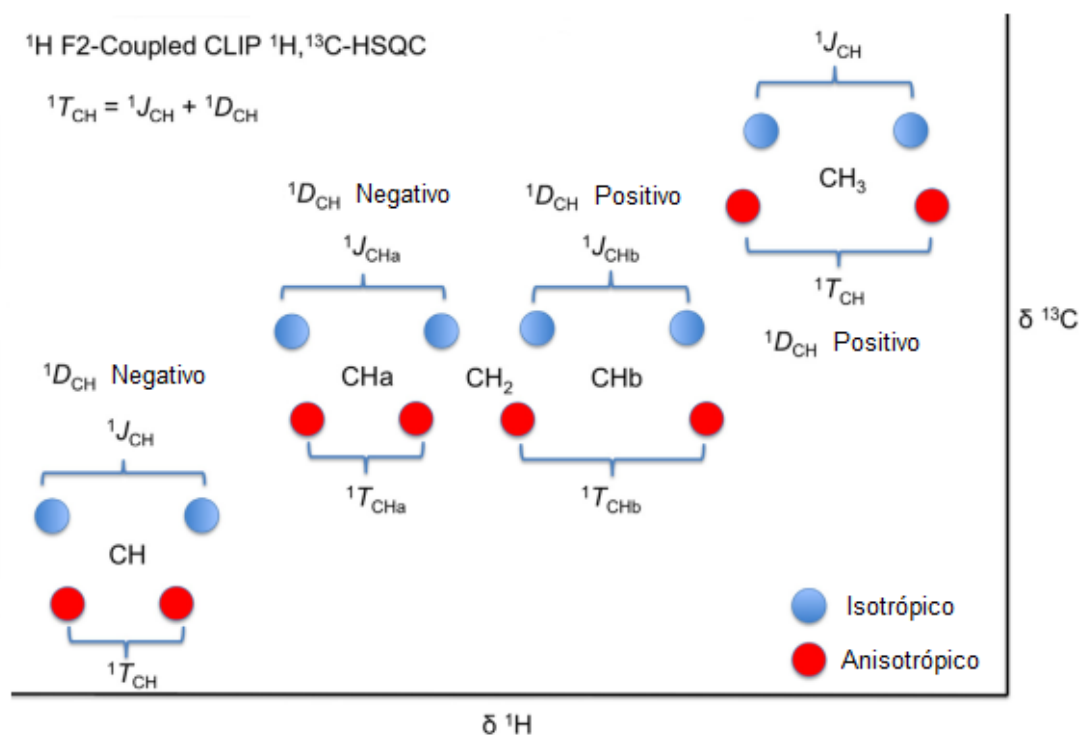


Figura 6.6: Representación gráfica de la superposición de los experimentos HSQC-CLIP acoplado en F1 en condiciones isotrópicas (azul) y anisotrópicas (rojo) para grupos CH₃, CH₂ y CH. Los acoplamientos CH individuales para grupos CH₂ pueden medirse independientemente.

agudos que sólo contienen información sobre $^1J_{\text{CH}}$ en condiciones isotrópicas y $^1T_{\text{CH}}$ en condiciones anisotrópicas.

Para ejemplificar esta secuencia operativa se puede tomar como ejemplo a un estudio realizado sobre la estricnina. Con la finalidad de evaluar la precisión y exactitud obtenidas por la aplicación de diferentes secuencias de pulso para la extracción de los datos, los Dres. Gil y García¹ tomaron experimentos HSQC-CLIP (acoplados en F2), HSQC-JSB (acoplados en F1) y HSQC-JSB-PS (*Pure Shift*) utilizando un gel de PMMA comprimido (anisotrópico) y estirado (isotrópico) (Figura 6.8). Los autores concluyeron que la mejor manera de medir con precisión los RDCs es extraer cortes en F1 individuales del experimento de HSQC en cada corrimiento químico de protón y medir manualmente la división de la señal ($^1J_{\text{CH}} + D_{\text{CH}}$) después de corregir apropiadamente la fase y la línea de base de cada corte.

¹Estudios no publicados

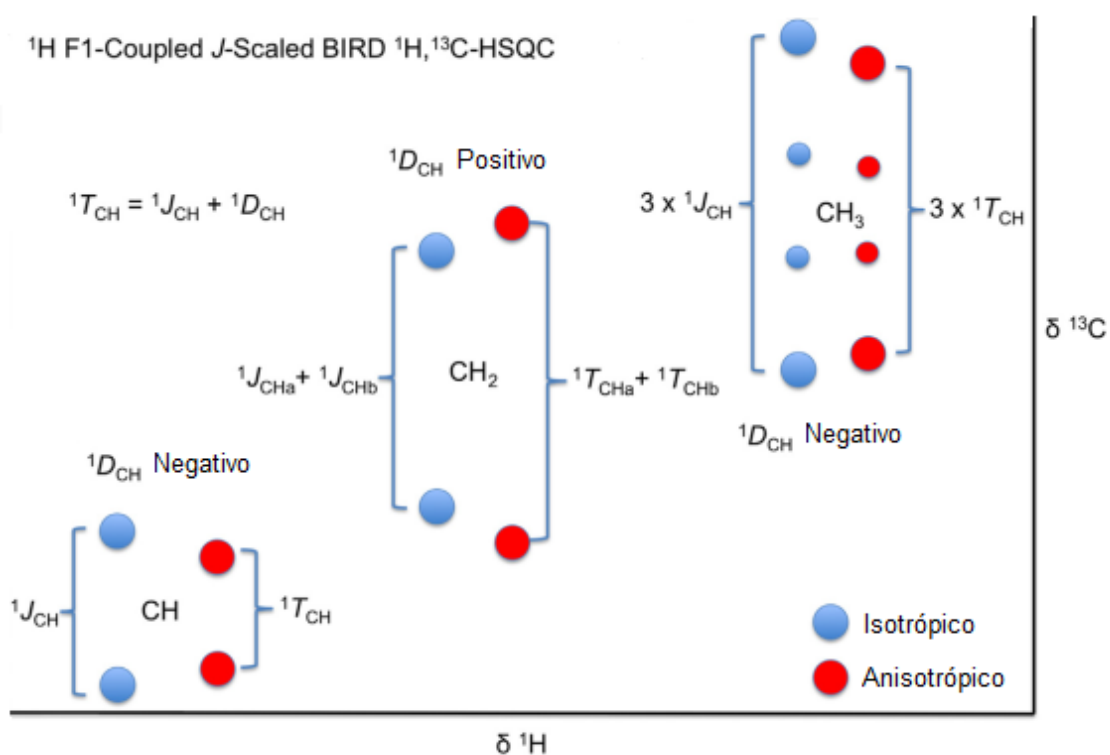


Figura 6.7: Representación gráfica de la superposición de los experimentos ¹H,¹³C-HSQC BIRD escalados en *J* acoplados en F1 en condiciones isotrópicas (azul) y anisotrópicas (rojo) para grupos CH₃, CH₂ y CH.

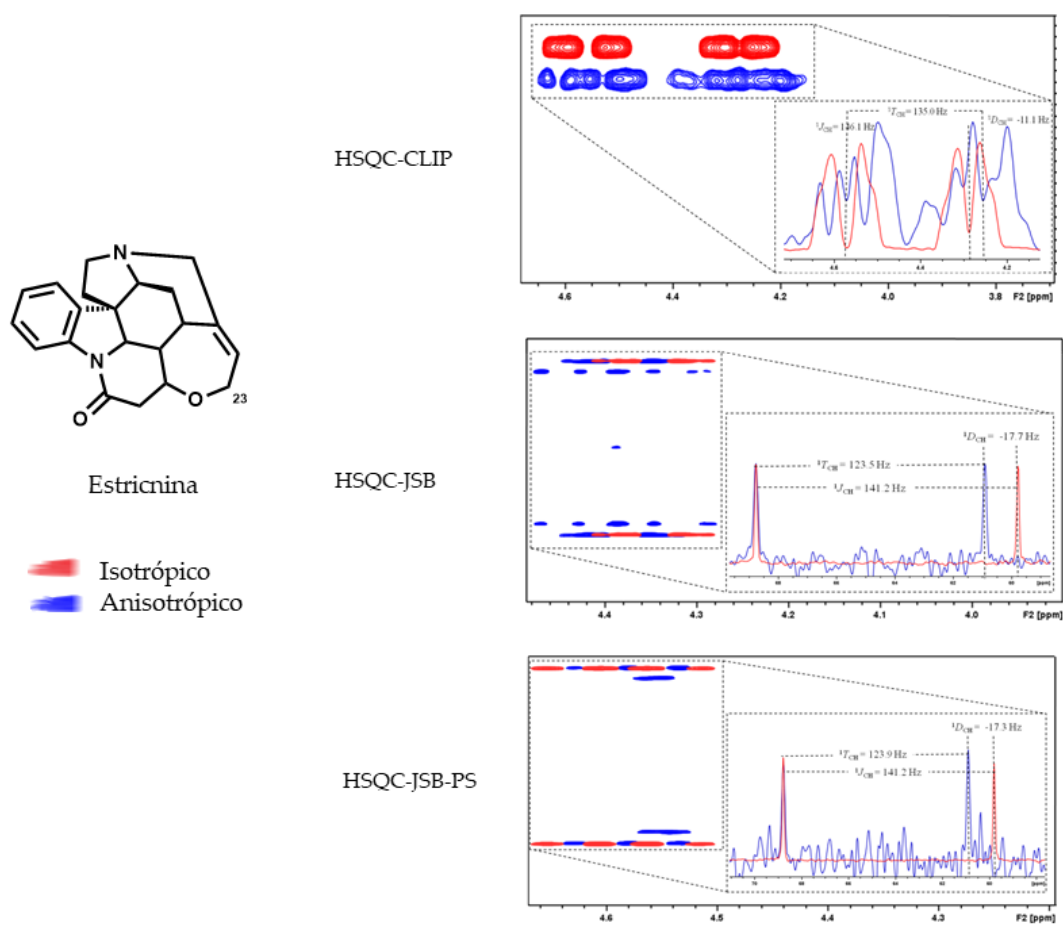


Figura 6.8: Superposición de espectros de HSQC-CLIP, HSQC-JSB y HSQC-JSB-PS en condiciones isotrópicas y anisotrópicas. Se observan las diferencias en exactitud y precisión para cada espectro a la hora de extraer RDCs.

6.1.5. Análisis de los datos

Se define al tensor de alineamiento \hat{A} como:

$$\hat{A} = \hat{P} - \frac{1}{3}\hat{1}$$

donde \hat{P} es el tensor de probabilidad y $\hat{1}$ el tensor unidad. En condiciones isotrópicas $\hat{A} = 0$, ya que para una molécula en solución, la probabilidad de que los vectores internucleares apunten en cualquier dirección en el espacio es la misma; luego el grado de alineamiento es cero. Para determinar el tensor de alineamiento de una molécula dada expuesta a condiciones anisotrópicas, necesitamos al menos cinco valores de D_{ij} independientes. Por independientes nos referimos a valores de D_{ij} de vectores internucleares no paralelos con la condición de que no haya más de tres vectores en el mismo plano. Los vectores paralelos tendrán el mismo ángulo y con respecto al campo magnético B_0 , independientemente de la orientación de la molécula y proporcionarán la misma información angular. Es necesario aclarar que los RDCs codifican sólo para la orientación relativa y no para la orientación absoluta de los vectores internucleares. La determinación de la configuración absoluta no es posible mediante esta técnica (Gil et al., 2014).

Para determinar la configuración relativa de moléculas rígidas o semirígidas, primero necesitamos conocer su constitución. En otras palabras, utilizando experimentos convencionales de correlación de RMN en 2D, necesitamos saber cómo están conectados los átomos en la molécula. Si usásemos, por ejemplo $^1D_{ij}$ RDCs, primero debemos asignar los RDCs para cada enlace C-H de la molécula. Entonces todas las geometrías posibles tienen que ser generadas por cualquier método computacional, siendo DFT el más preciso. Para n carbonos quirales, el número total de diastereómeros a generar es igual a $2^n/2$ (ya que la mitad del conjunto comprende enantiómeros de la otra mitad). El tensor \hat{A} contiene la información sobre la distribución rotacional de cada vector internuclear R_{ij} , que en condiciones anisotrópicas no es la misma en todas las direcciones. Si la molécula es rígida, la distribución rotacional de todos sus vectores internucleares puede describirse mediante el mismo tensor de alineamiento. Como no conocemos la configuración relativa correcta (orientación relativa de los átomos en el espacio), el tensor \hat{A} no se conoce *a priori*. Por lo tanto, un procedimiento de ajuste de los datos de RDC a todas las estructuras posibles, es aquel en el que se minimiza la diferencia entre el D_{ij}^{exp} y los valores calculados de RDC D_{ij}^{calc} en función de la matriz del tensor de alineamiento. Esto se realiza normalmente utilizando un procedimiento denominado *Singular Value Decomposition* (SVD) (ver Figura 6.9). La calidad del ajuste se evalúa utilizando el factor de calidad Q de Cornilescu definido como (Cornilescu et al., 1998) :

$$Q = \sqrt{\frac{\sum_{ij}(D_{ij}^{exp} - D_{ij}^{calc})^2}{\sum_{ij}(D_{ij}^{calc})^2}}$$

En el caso ideal donde los valores de D_{ij}^{exp} y D_{ij}^{calc} son idénticos, Q debería ser cero, pero nunca es cero. Los errores en la medición de los valores de D_{ij} y las imprecisiones en las estructuras calculadas evitan que Q sea nulo. Sin embargo, un Q menos de 0,05 se

considera un ajuste excelente, y un Q entre 0,05 y 0,10 se considera un ajuste razonablemente bueno para moléculas pequeñas. En el proceso de discriminación estructural, es importante que todas las opciones estructurales sean consideradas en el ajuste. El que tenga el factor Q más bajo dentro de una buena puntuación de ajuste debe ser la estructura correcta. En la figura 6.9 se muestra una descripción gráfica de los procedimientos de ajuste. Un conjunto completo de estructuras y los datos de RDC se introducen en el software para realizar el ajuste SVD de los datos de RDC a cada estructura posible. El software más popular para realizar esta tarea es MSpin, aunque también puede utilizarse PALES (Zweckstetter y Bax, 2000). MSpin está disponible comercialmente, mientras que PALES es de distribución gratuita. Otros científicos prefieren escribir su propio código, por lo general, en lenguaje Python, para realizar el ajuste. El programa resolverá el conjunto de ecuaciones y generará un tensor de alineamiento para cada estructura del conjunto; los RDC se volverán a calcular a partir de este tensor. Luego, los datos calculados y experimentales se comparan usando el factor Q de Cornilescu. Una buena forma de presentar el resultado es utilizando un gráfico de barras con el valor de Q para cada estructura tal como se muestra en la parte inferior de la figura 6.9.

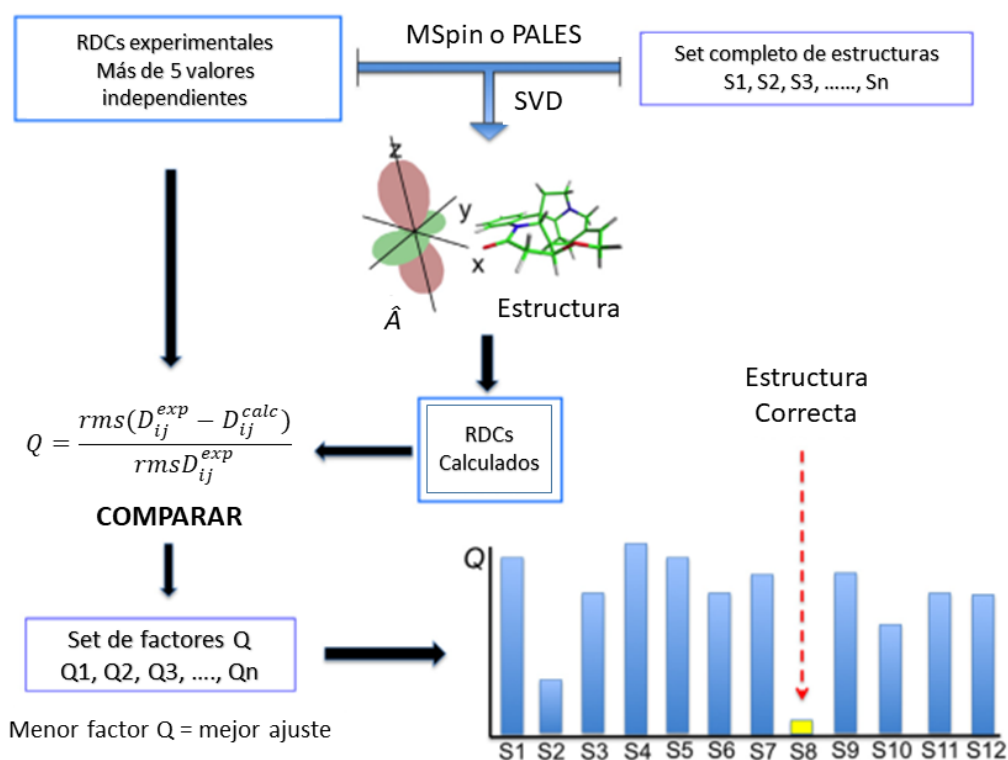


Figura 6.9: Representación esquemática del método de ajuste SVD (*singular value decomposition*)

Para estructuras muy rígidas o para estructuras rígidas que contienen fragmentos flexibles muy pequeños, un solo tensor define los movimientos generales de todos los vectores internucleares en el espacio conformacional. La metodología ha demostrado ser muy robusta y directa en estos casos particulares. Si se puede medir un buen conjunto

de RDCs, la única información necesaria es la constitución molecular. Luego, se generan todas las configuraciones posibles, y la configuración relativa se puede determinar de una sola vez, sin la necesidad de realizar un análisis de constantes de acoplamiento o experimentos NOE. Un buen ejemplo de esto se muestra en la figura 6.10, donde la estructura tridimensional del alcaloide estricnina se resuelve utilizando solo RDCs de protón-carbono de un enlace. Los datos fueron recolectados utilizando un experimento HSQC-JSB (Snider et al., 2012).

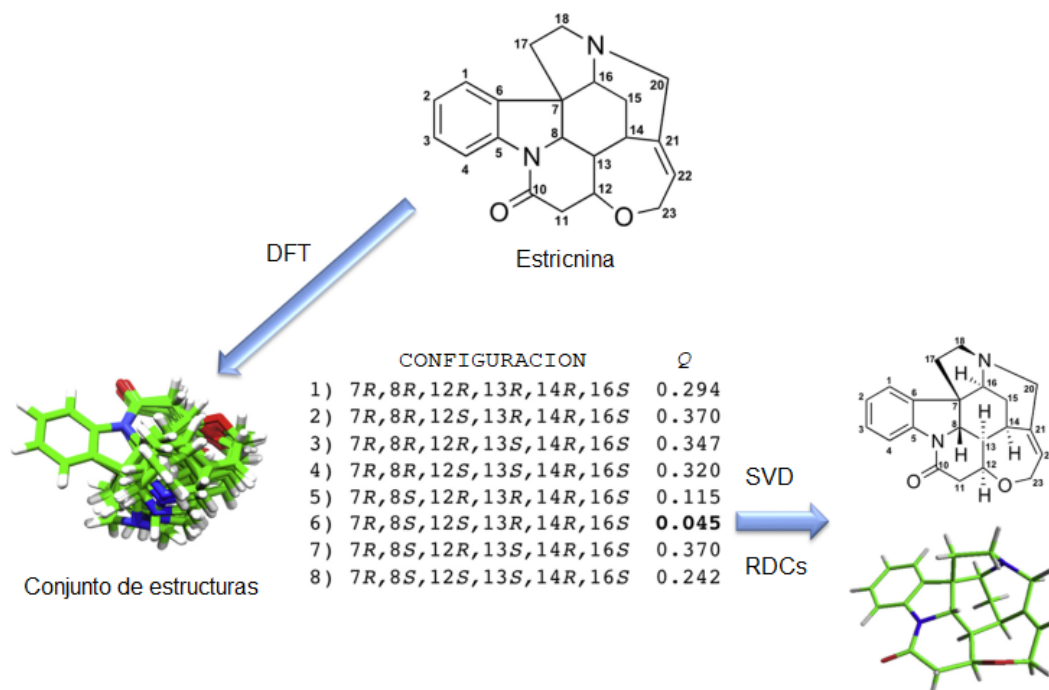


Figura 6.10: Determinación de la configuración relativa de la estricnina utilizando la constitución molecular y sólo RDCs.

6.2. Elucidación estructural asistida por computadoras (CASE)

La automatización completa de la elucidación estructural de productos naturales puede considerarse un santo grial en química. Pero, ¿qué tan lejos estamos de lograr este objetivo al considerar el estado actual del arte? Aunque el análisis de rayos X de un solo cristal proporcionará directamente la configuración relativa e incluso absoluta (Flack y Bernardinelli, 2008) de productos naturales, la cristalización es con frecuencia una tarea engorrosa, sino imposible, debido a la cantidad de compuesto disponible, generalmente muy pequeña, y a que los cristales deben ser aptos para dicha técnica. Por lo tanto, la RMN en estado líquido se ha convertido en la metodología preferida para la elucidación estructural de productos naturales, aunque otras metodologías en estado sólido, como la difracción de rayos-X de polvos (García et al., 2009) o las esponjas moleculares (Inokuma et al., 2013) están abriendo caminos prometedores. La determinación de la constitución molecular mediante RMN es hoy en día una tarea mucho más fácil y libre de errores debido a las mejoras significativas en la sensibilidad de la técnica, así como del desarrollo de programas de pulso de RMN en 2D. Sin embargo, la elucidación estructural utilizando espectroscopia de RMN puede llevar mucho tiempo, y desde los primeros años de uso de esta técnica, se hizo evidente la posibilidad de utilizar sistemas informáticos expertos para ayudar a los espectroscopistas a manejar la información contenida en los espectros de RMN. Diferentes metodologías y algoritmos desarrollados a lo largo de los años (Jaspars, 1999; Elyashberg et al., 2012; Troche-Pesqueira et al., 2017; Elyashberg et al., 2009) se han materializado hoy en programas de software de elucidación estructural asistida por computadora (CASE) (Elyashberg et al., 2004; Masui y Hong, 2006). Estos programas pueden resolver eficientemente la constitución de moléculas de complejidad media utilizando un conjunto estándar de experimentos de RMN en 2D homonucleares y heteronucleares. En un procedimiento CASE típico, se genera una lista de diferentes constituciones moleculares para la misma fórmula molecular a partir del análisis de las correlaciones espectroscópicas. Luego, las diferentes constituciones se clasifican de acuerdo con las predicciones empíricas de desplazamientos químicos, en su mayoría desplazamientos de ^{13}C , aunque también se ha propuesto el uso de predicciones de DFT (Buevich y Elyashberg, 2016). Sin embargo, en la mayoría de los casos después de que se determina la constitución, la presencia de centros estereogénicos requiere la determinación de la configuración relativa. Clásicamente, la configuración relativa se establece sobre la base de información espacial, como distancias internucleares determinadas a partir de experimentos de NOE o información angular de acoplamiento escalares vecinales.

En la última década, dos nuevas metodologías han ingresado a la caja de herramientas de los químicos de productos naturales. Una es la predicción de los desplazamientos químicos y los acoplamiento escalares a través de cálculos DFT (Bifulco et al., 2007; Lodewyk et al., 2012; Kutateladze y Mukhina, 2014). El uso de corrimientos químicos en ^{13}C es particularmente atractivo, ya que son lo suficientemente precisos para distinguir entre las diferencias en los cambios debidos a cambios configuracionales/conformacionales y pueden medirse con alta precisión a partir de espectros de RMN- ^{13}C desacoplados en protones. Los estimadores estadísticos como DP4 (Smith y Goodman, 2010; Ermanis et al., 2016) y sus versiones mejoradas (Grimblat et al., 2015; Ermanis et al.,

2017; Grimblat et al., 2019) recientemente han tenido mucho éxito, ya que permiten una estimación de la probabilidad relativa de que diferentes configuraciones correspondan a un espectro de RMN- ^{13}C dado. Otra nueva metodología al alcance los químicos es el uso de parámetros anisotrópicos de RMN tal y como se explicó anteriormente, metodología que ha probado su utilidad en la determinación estructural de productos naturales (Schuetz et al., 2007; García et al., 2009; Waratchareeyakul et al., 2017).

En cualquier caso, el problema de la flexibilidad molecular debe ser enfrentado ya que para las moléculas flexibles los parámetros observados de RMN son el resultado del promedio conformacional en la escala de tiempo de RMN. Para la mayoría de las moléculas orgánicas, los pozos en la superficie potencial son lo suficientemente profundos como para aproximarse a la dinámica molecular completa como saltos instantáneos entre conformaciones discretas. En el caso más favorable, las amplitudes conformacionales pueden estimarse bien a partir de datos de modelado molecular, generalmente a nivel DFT. Sin embargo, en otros casos, por ejemplo, cuando están presentes enlaces puente hidrógeno intramoleculares, o en solventes altamente coordinados como DMSO, las energías DFT están lejos de ser lo suficientemente precisas. En este caso, se necesita la deconvolución conformacional mediante la optimización de mínimos cuadrados de las amplitudes conformacionales para ajustarse a los datos informados. Este es el concepto detrás de la popular metodología NAMFIS (Cicero et al., 1995; Gil y Navarro-Vázquez, 2017).

En una contribución reciente, Troche-Pesqueira et al. (2017) propusieron un nuevo protocolo basado en el uso de RDCs de un enlace ($^1D_{\text{CH}}$) para la determinación automática de la configuración relativa. Este protocolo comenzó con la adquisición de un conjunto estándar de experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) así como la medición de $^1D_{\text{CH}}$ RDCs a través de experimentos HSQC acoplados en F1 utilizando geles de PMMA o poli(2-hidroxietilmetacrilato) reversiblemente compresibles para la adquisición de RDCs en solventes orgánicos o cromoglicato disódico en el caso de muestras solubles en agua.

A partir del set de espectros de RMN, la constitución se determina utilizando un software CASE disponible comercialmente. La constitución se clasifica según las predicciones empíricas del corrimiento químico en ^{13}C , y la estructura con mejor puntuación se almacena en forma de un archivo SDF junto con una lista de asignaciones de corrimiento químico en ^1H y ^{13}C (Dalby et al., 1992). Este protocolo extendido, denominado a partir de ahora CASE-3D, comienza con la generación de geometría en 3D iniciales para cada estructura diastereomérica. El software LigPrep de Schrödinger se empleó para llevar a cabo dicha tarea (Ligprep, 2017). Los conjuntos conformacionales para cada diastereómero se generan luego mediante una búsqueda conformacional utilizando mecánica molecular. Las amplitudes conformacionales en estos conjuntos pueden entonces optimizarse para ajustarse a los datos experimentales de RDC mediante el uso de la aproximación de un sólo tensor (Burnell y De Lange, 1980), mediante la optimización simultánea de los componentes del tensor de alineamiento y la población de los conformeros (Sánchez-Pedregal et al., 2009). Dado que las incertidumbres en las mediciones de RDC y las deficiencias en los modelos propuestos pueden compensarse artificialmente aumentando las amplitudes conformacionales de las conformaciones espurias, el número de conformaciones estadísticamente relevantes se seleccionaron mediante el uso

del Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). El AIC es una medida de la bondad del ajuste de un modelo estadístico para un conjunto dado de datos. Como tal, el AIC proporciona un medio para seleccionar un modelo por sobre otro (aquel con el menor valor AIC), pero no es una prueba del modelo en el sentido de prueba de hipótesis.

En definitiva, el algoritmo utilizado por Troche-Pesqueira et al. (2017) se basa en la generación de combinaciones de conjuntos de m confórmeros a partir de un grupo inicial de n confórmeros según lo determinado por una búsqueda conformacional utilizando mecánica molecular. Para evitar tiempos de cálculo excesivos, la generación de conjuntos se detiene cuando el AIC ya no disminuye a medida que aumenta el número de conformaciones. El procedimiento se repite para todas las configuraciones, y finalmente la configuración que posee el menor AIC se informa como la mejor solución al problema estructural.

En este trabajo de tesis se mostrará cómo el protocolo CASE-3D reportado por Troche-Pesqueira et al. (2017) puede utilizarse fácilmente con datos de RMN tales como desplazamientos químicos en ^{13}C , en combinación con $^1D_{\text{CH}}$ RDCs y $^3J_{\text{HH}}$.

6.3. Estrategia y Objetivos

En los últimos años, la medición de acoplamientos dipolares residuales (RDCs) se convirtió en un herramienta extremadamente poderosa para el análisis constitucional, conformacional y configuracional de moléculas orgánicas pequeñas (Gil et al., 2014). El poder de la técnica radica, tal como se dijo anteriormente, en la determinación de la configuración relativa de centros localizados remotamente. Este trabajo se focalizó en el uso conjunto de esta metodología y el protocolo CASE 3D para la elucidación estructural de un grupo de sesquiterpenos aislados de *Senecio volckmannii*.

La medición de los RDCs fue llevada a cabo por el Dr. Roberto Gil y la Dra. Manuela García. Mientras que los cálculos de DFT y la aplicación del protocolo CASE-3D fue llevada a cabo por el Dr. Armando Navarro-Vázquez.

6.4. Resultados y Discusión

A partir del estudio fitoquímico de *Senecio volckmannii* (Capítulo 5) se aislaron y caracterizaron un grupo de sesquiterpenos tipo eremofilano (Figura 6.11). Sin embargo, para los compuestos **14**, **15**, **17–20**, no fue posible arribar a una estructura de manera inequívoca utilizando información obtenida a partir de experimentos NOESY y del análisis/predicción de constantes de acoplamiento 3J . Por tal motivo, se recurrió a otras herramientas de elucidación estructural que estuvieron a nuestro alcance.

La determinación estructural del compuesto **14** se logró utilizando diversas estrategias de análisis espectroscópico en RMN y de cálculo computacional. En primera instancia, se observó que este compuesto no descrito hasta el momento, presentaba similitudes en los datos de RMN con el compuesto **24**, reportado bajo el nombre Ligudicina A (Tan et al., 2003), que también se aisló en este estudio fitoquímico. Estas similitudes sugirieron que la diferencia estructural entre ellos, podría restringirse a la orientación

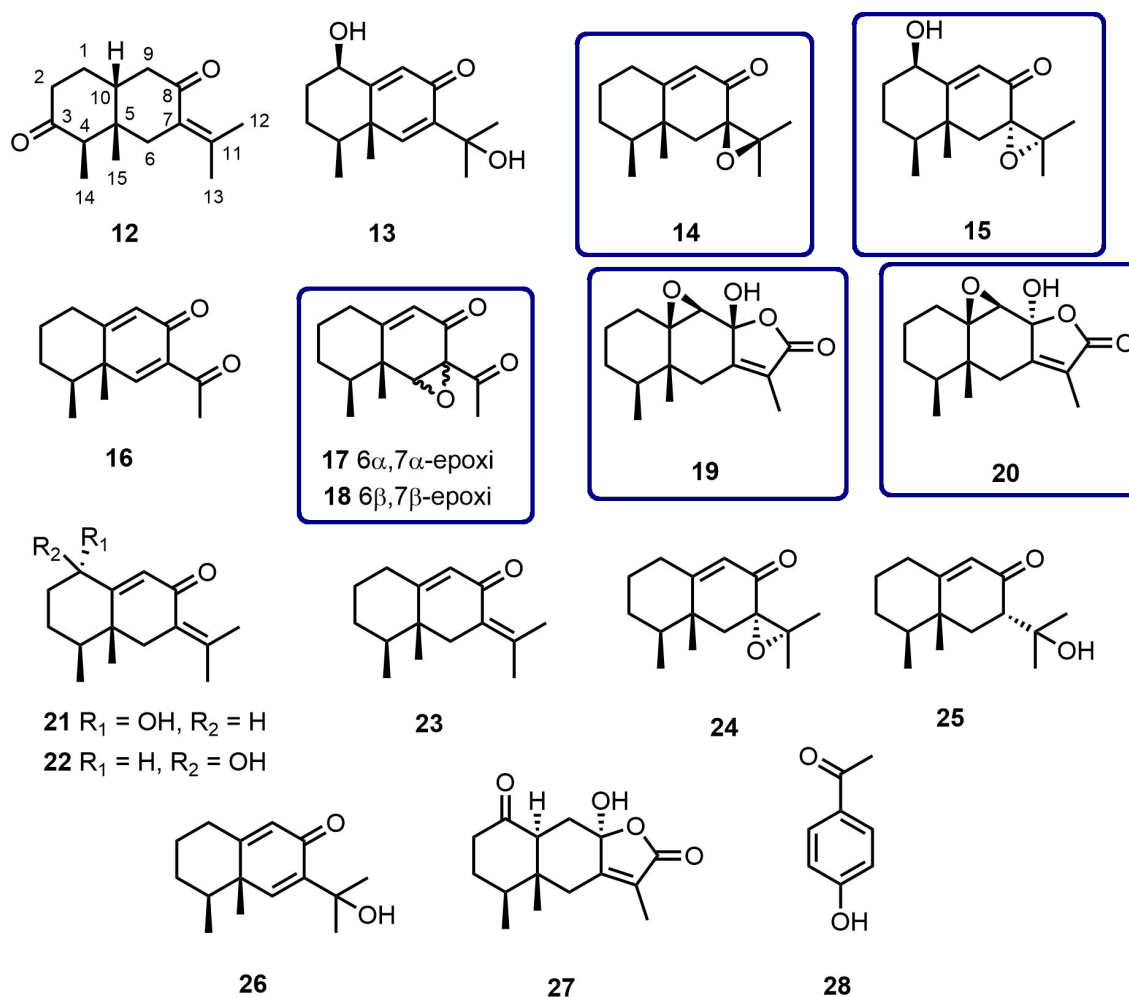


Figura 6.11: Compuestos aislados de *Senecio volckmannii*. Se remarcan los compuestos elucidados utilizando RDCs y CASE-3D.

del grupo 7,11-epoxi. Para confirmar esta suposición, se aplicó una combinación de herramientas de RMN, como el análisis de constantes de acoplamiento $^3J_{HH}$, experimentos DQF-Phase Sensitive COSY y la medición del acoplamiento residual dipolar (RDC) de los compuestos en estudio.

La señal en el espectro RMN- 1H para el H-4 del compuesto **24** se encuentra superpuesta con las señales correspondientes a H-3a, H-3b y H-2b, impidiendo la extracción directa de las constantes de acoplamiento J del espectro 1D. Sin embargo, esta señal apareció sin solaparse en el espectro del compuesto **14**. Por lo tanto, las constantes de acoplamiento que involucran H-3a, H-3b, H-4 y CH₃-14 se extrajeron de la siguiente manera: a) una constante de acoplamiento de 6,6 Hz para H-4/CH₃-14 se extrajo directamente del doblete a 0,99 ppm correspondiente a CH₃-14; b) se extrajo directamente una constante de acoplamiento a partir de la señal de H-4 y fue asignada al acoplamiento entre H-4 y uno de los protones H-3; c) Si la distancia en Hz entre los dos

picos externos al multiplete de H-4 es 35,5 Hz y corresponde a la suma de todas las constantes de acoplamiento, entonces la otra constante H-4/H-3 se puede calcular como $35,5 - (6,6 * 3 + 4,1) = 11,6$ Hz. Este valor indica claramente que H-4 está involucrado en una relación transdiaxial con uno de los protones en C-3 (Figura 6.12).

Estos tres valores de J junto con los desplazamientos químicos correspondientes para H-3a, H-3b, H-4 y CH₃-14 se introdujeron en el módulo de simulación de espín de MNova (la multiplicidad simulada vs. la experimental para la señal de H-4 se muestra en la Figura 6.12) usando un valor de ancho de línea de 1,5 Hz. Como se puede observar en la figura 6.12, se obtuvo una excelente coincidencia con los datos experimentales. El espectro DQF-Phase Sensitive COSY de una mezcla 77,5:22,5 de **14** y **24** mostró una intensidad de pico cruzado similar para H-4 y CH₃-14 en ambos compuestos (Figura 6.13); evidencia clara de que **14** y **24** comparten la misma configuración relativa en los estereocentros C-4 y C-5. En consecuencia, la única diferencia entre estos dos compuestos debería ser la configuración del resto 7,11-epoxi. Suponiendo que la configuración relativa informada para el resto epoxi del compuesto **24** se determinó correctamente, podríamos inferir que la única opción restante para el grupo epoxi del compuesto **14** es la configuración opuesta.

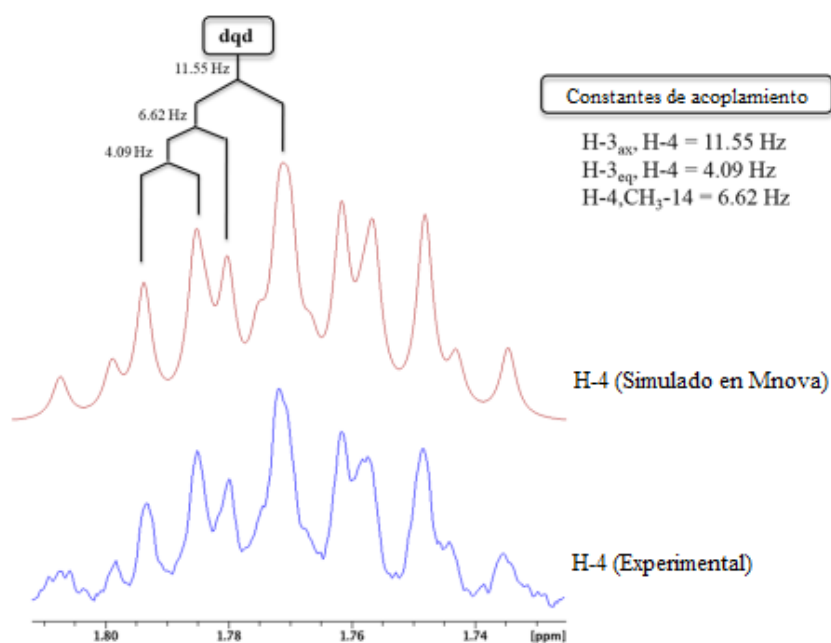


Figura 6.12: Multiplicidad de la señal de RMN-¹H de H-4 del compuesto **14** obtenida mediante el *plug-in* de simulación de espín de MNova utilizando las constantes ³J_{HH} experimentales extraídas como se describe en el texto. La señal es un dqd de 11,6; 6,6 y 4,1 Hz, respectivamente. Experimental en azul y simulado en rojo.

El espectro NOESY informado para **24** mostró un NOE para CH₃-15 con CH₃-13 y CH₃-14 (Tan et al., 2003). Para el compuesto **14**, el NOE con CH₃-13 está ausente. Sin embargo, la intensidad de la señal de NOE en moléculas pequeñas, a menudo,

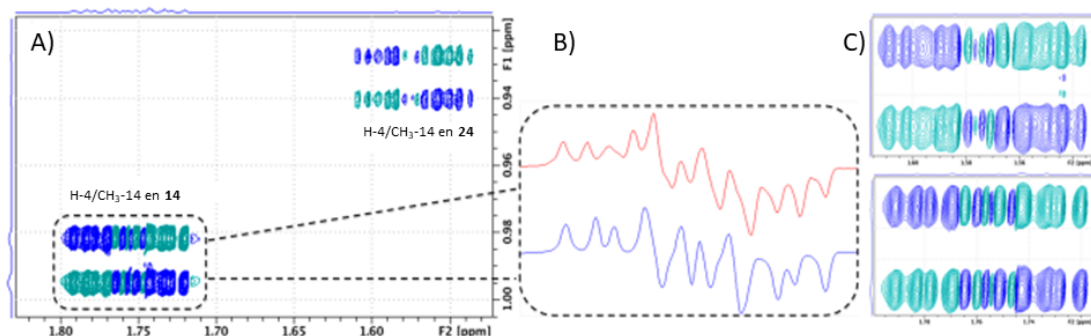


Figura 6.13: A) Pico de cruce H-4/CH₃-14 para los compuestos **14** y **24** en el espectro DQF-PH-COSY de la mezcla (las diferentes intensidades se deben a la diferencia de concentración); B) Proyección en F2 del pico de cruce H-4/CH₃-14 en el espectro DQF-PH-COSY de la mezcla (**14**, mayoritario en rojo; **24** en azul, minoritario); C) Ampliación del pico de cruce H-4/CH₃-14 de los isómeros **14** (arriba, 1,76/0,99 ppm) y **24** (abajo, 1,57/0,94 ppm) en la mezcla.

es minúscula debido a la pobre eficiencia del mecanismo de relajación dipolo-dipolo, factor que limita la distancia máxima a la que se puede observar un NOE (Neuhaus y Williamson, 2000). Esto nos llevó a considerar otras técnicas potentes y modernas, como la medición de RDCs, para determinar con precisión la configuración relativa de ambos compuestos.

Para obtener los RDCs experimentales de los compuestos **14** y **24**, se midieron las constantes de acoplamiento ¹H-¹³C (¹J_{CH}) a partir de experimentos HSQC acoplados en F1 en medio isotrópico y el acoplamiento total (¹T_{CH} = ¹J_{CH} + ¹D_{CH}) en medio anisotrópico, para ambas moléculas. Se usaron geles de PMMA de compresión reversible compatibles con CDCl₃ como medio de alineamiento para inducir anisotropía. Estos geles ofrecen la ventaja adicional de una fácil recuperación del compuesto al dializar el gel después de la medición de RDC (Gil et al., 2008). Para aumentar la precisión de la medición y facilitar la extracción de RDC experimentales, se utilizaron experimentos HSQC-JSB con desacoplamiento homonuclear de protones (*Pure-shift*) (Castañar et al., 2016). Fue interesante observar que, aunque tienen la misma constitución molecular, el compuesto **14** no se alineaba correctamente (con valores muy bajos de RDCs) mientras que el compuesto **24** mostraba buenos valores de RDC. El modelado molecular de estos dos compuestos, como se muestra a continuación, reveló propiedades geométricas interesantes que explican esta observación.

Utilizando el protocolo CASE-3D, la estructura 2D de los compuestos **14** y **24** se introdujo en los programas Ligprep/Maestro para generar automáticamente todas las configuraciones posibles y los conjuntos conformacionales respectivos usando el campo de fuerza MMFF94 (StereoFitter, 2018). Dado que estas estructuras tienen tres carbonos estereogénicos, se generaron cuatro posibles diastereoisómeros (Figura 6.14). Se ignoró el hecho de que **14** y **24** comparten la misma configuración en el anillo A para evitar cualquier sesgo en la determinación de las estructuras correctas de estos compuestos. La búsqueda conformacional se realizó utilizando mecánica molecular (MMFF94) para la geometría de todas las configuraciones (se puede consultar la parte experimental, sec-

ción 6.5, y la información suplementaria de [Castro et al. \(2018\)](#) para más detalles). Se encontraron dos conformeros principales para cada distereoisómero. Estas dos conformaciones se denominaron extendida y plegada, en las cuales H-6 β adopta una posición ecuatorial o axial, respectivamente. Como parte del protocolo CASE-3D, los corrimientos químicos en ^1H y ^{13}C se calcularon al nivel DFT B3LYP/6-31G*. Luego, se ajustaron las estructuras (configuración/conformaciones) a los RDC y los corrimientos químicos en ^1H y ^{13}C experimentales utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) para la selección del modelo implementado por StereoFitter ([Akaike, 1974](#)).

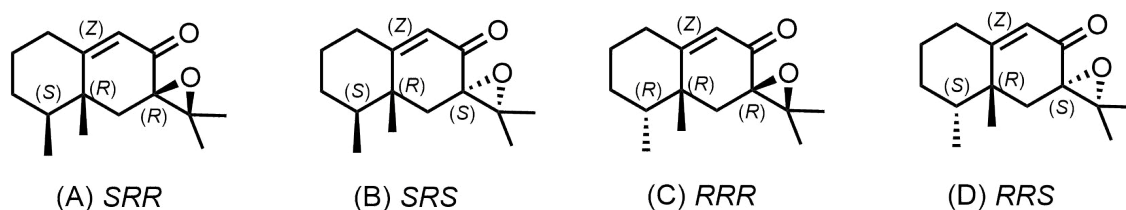


Figura 6.14: Posibles diastereómeros para los compuestos **14** y **24**

Los cuatro diastereómeros se nombraron utilizando los descriptores *R/S* en lugar de los números de carbono en orden ascendente, por ejemplo: 4*R*,5*R*,7*R* se nombra como *RRR* (Figura 6.14). El ajuste de parámetros múltiples de RMN (RDC, desplazamientos químicos en ^1H y ^{13}C) de los compuestos **14** y **24** a cada conjunto de estructuras descartó claramente las configuraciones *RRR* (**C**) y *RRS* (**D**) con AIC muy alto y valores de baja probabilidad, como se muestra en las tablas 6.1 y 6.2. Los datos del compuesto **14** ajustaron mejor para la configuración *SRR* (**A**), mientras que para el compuesto **24** el ajuste multiparamétrico indicó la configuración *SRS* (**B**), como se informó anteriormente ([Tan et al., 2003](#)).

Tabla 6.1: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **14**

	RDCs (compuesto 14)	RDCs + ^{13}C + ^1H (ajuste combinado para 14)			
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>R</i>	0,7	$1,0 \times 10^2$	33,8	$1,0 \times 10^2$
B	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i>	1,1	$8,2 \times 10^1$	46,1	$2,1 \times 10^{-1}$
C	4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>R</i>	2,3	$4,5 \times 10^1$	68,6	$2,7 \times 10^{-6}$
D	4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i>	3,9	$2,0 \times 10^1$	83,8	$1,4 \times 10^{-9}$

Como se mencionó anteriormente, la búsqueda conformacional encontró dos conformeros por cada diastereómero. Las moléculas muestran flexibilidad en el anillo que contiene el grupo epoxi que conduce a una forma plegada y a una forma extendida como se muestra en la figura 6.15. Los ajustes seleccionaron la forma plegada para el compuesto **14**; pero para el compuesto **24** la forma extendida fue la preferida, de acuerdo con la diferencia de energía entre las dos formas (ΔH_0 de -1,9 kcal/mol para **14** y 4,3 kcal/mol para **24** según los cálculos DFT M062X/6-31G**). Estos resultados pueden

Tabla 6.2: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **24**

		RDCs (compuesto 24)		RDCs + ^{13}C + ^1H (ajuste combinado para 24)	
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 7 <i>R</i>	0,5	$9,9 \times 10^1$	41,1	$1,7 \times 10^0$
B	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i>	0,5	$1,0 \times 10^2$	32,9	$1,0 \times 10^2$
C	4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>R</i>	2,6	$3,5 \times 10^1$	71,0	$5,4 \times 10^{-7}$
D	4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i>	1,6	$5,8 \times 10^1$	89,8	$4,4 \times 10^{-11}$

explicar por qué el compuesto **14** se alinea mal en geles de PMMA/ CDCl_3 en comparación con el compuesto **24**. En el mismo grado de anisotropía proporcionado por el gel de PMMA, el grado de alineamiento de una molécula dada depende en gran medida de su forma y tamaño. Las moléculas de forma muy pequeña y redondeada se alinean mal, y en muchos casos los valores de RDCs son muy pequeños y están dentro del margen de error. En comparación con el compuesto **24**, el compuesto **14** muestra pequeños valores de $^1D_{\text{CH}}$ RDCs. Esto ahora se explica claramente por la forma casi globular adoptada por la conformación de menor energía del compuesto **14** (forma plegada) que es mucho menos anisotrópica que la forma extendida del compuesto **24**, explicando por qué **24** muestra valores de RDC mayores que **14** (ver elipsoides de giro en la figura 6.15). Estos resultados también concuerdan con la observación de un pico de NOE entre CH_3 -15 y CH_3 -13 en **24** y no en **14**. En el compuesto **14**, las distancias interprotónicas CH_3 -13/ CH_3 -15 son superiores a $5,0 \text{ \AA}$ mientras que en **24** pueden ser tan pequeñas como $\sim 2,6 \text{ \AA}$, lo que explica la observación de un pico de NOE. Teniendo en cuenta todas las observaciones anteriores, la estructura del compuesto **14** se establece como rel-(4*S*,5*R*)-7 β ,11 β -epoxieremofil-9-en-8-ona.

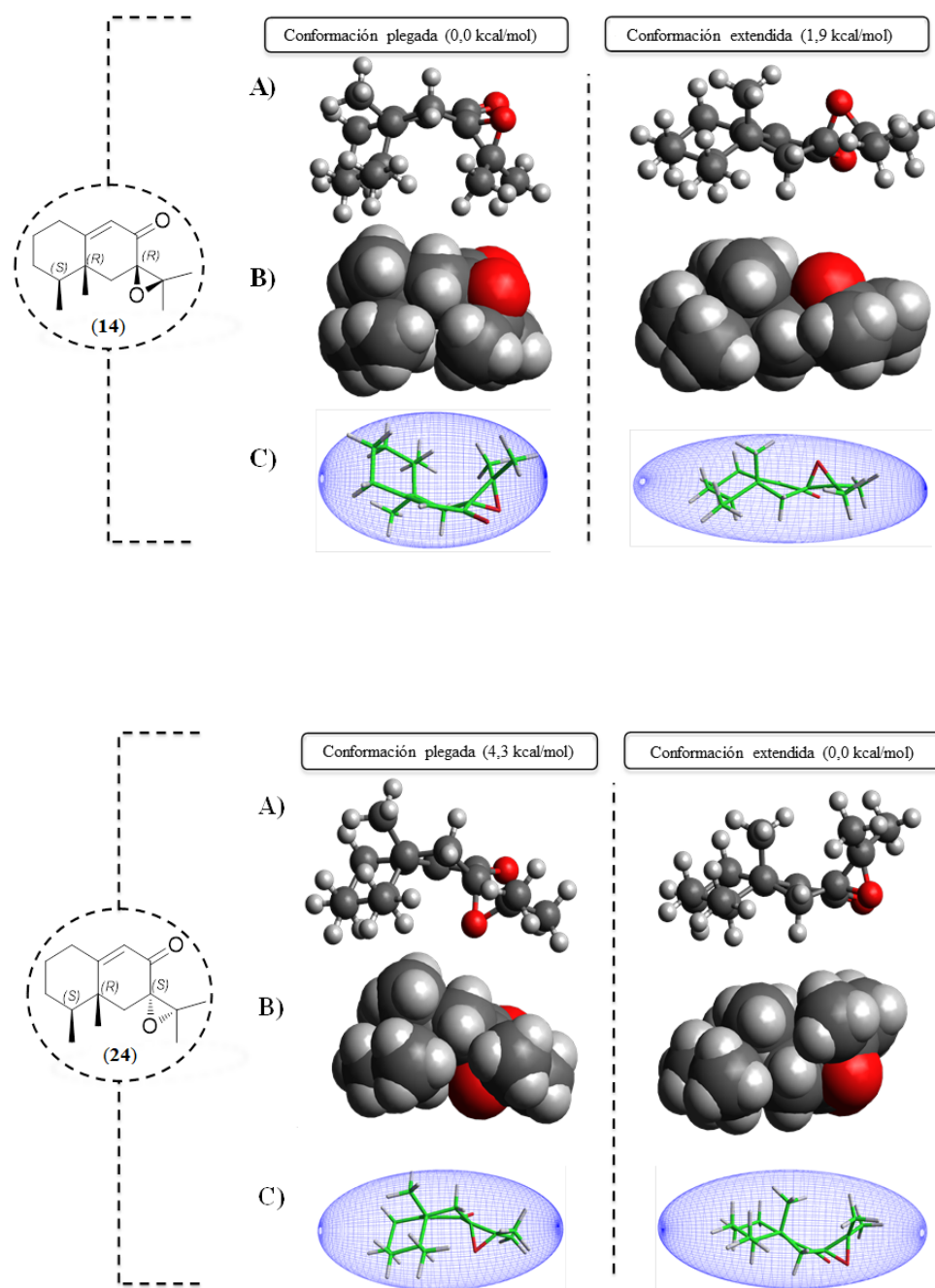


Figura 6.15: Conórmeros de menor energía para los isómeros 14 y 24. Diferentes representaciones de las moléculas para visualizar formas y tamaños moleculares producidos por la flexibilidad del grupo epoxi (A: bolas y palos; B: esferas de van der Waals; C: elipsoides de giro).

Según se describió en el capítulo 5, el compuesto **15** no pudo obtenerse puro por ninguna técnica de separación cromatográfica. Consecuentemente, fue caracterizado a partir de una mezcla 3:2 de los compuestos **15** y **27**. En la elucidación de la estructura de este compuesto no fue posible establecer la orientación del grupo epoxi a partir de los NOE observados. Luego, se llevó a cabo un estudio de los desplazamientos químicos en ^1H y ^{13}C , utilizando el protocolo CASE-3D, el cual seleccionó la orientación α para el grupo epoxi (Tabla 6.3). En consecuencia, el compuesto **15** se caracterizó completamente como rel-(4S,5R)-1 β -hidroxi-7 α ,11 α -epoxieremófil-9-en-8-ona.

Tabla 6.3: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **15**

		^{13}C (compuesto 15)		$^{13}\text{C} + ^1\text{H}$ (ajuste combinado para 15)	
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	1R,4S,5R,7R	28,4	$1,1 \times 10^0$	57,5	$4,4 \times 10^{-1}$
B	1R,4S,5R,7S	19,4	$1,0 \times 10^2$	46,7	$1,0 \times 10^2$
C	1S,4S,5R,7R	44,7	$3,3 \times 10^{-4}$	77,1	$2,5 \times 10^{-5}$
D	1S,4S, 5R,7S	36,5	$1,9 \times 10^{-2}$	63,8	$2,0 \times 10^{-2}$
E	1R,4S,5S,7R	43,7	$5,4 \times 10^{-4}$	73,3	$1,7 \times 10^{-4}$
F	1R,4S,5S,7S	54,3	$2,1 \times 10^{-6}$	82,1	$2,1 \times 10^{-6}$
G	1S,4S,5S,7R	41,4	$1,7 \times 10^{-3}$	82,3	$1,9 \times 10^{-6}$
H	1S,4S,5S,7S	56,8	$7,4 \times 10^{-7}$	95,7	$2,3 \times 10^{-9}$

Los compuestos **17** y **18** tampoco pudieron obtenerse en forma pura. Luego, estos compuestos se caracterizaron a partir de una mezcla de ambos con una relación 3:2. Los espectros de RMN en ^1H y ^{13}C , fueron muy similares entre ambos compuestos, diferenciándose solamente en la orientación del grupo 6,7-epoxi. Sobre la base de los análisis realizados utilizando el protocolo CASE-3D (Tablas 6.4 y 6.5), las estructuras de estos compuestos se establecieron como rel-(4S,5R)-6 α ,7 α -epoxi-11-noreremofilan-9-en-8,11-diona y rel-(4S,5R)-6 β ,7 β -epoxi-11-noreremofilan-9-en-8,11-diona.

Tabla 6.4: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **17**

		^{13}C (compuesto 17)		$^{13}\text{C} + ^1\text{H}$ (ajuste combinado para 17)	
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	4S,5R,7R,8R	14,6	$1,0 \times 10^2$	28,8	$9,7 \times 10^1$
B	4S,5R,7S,8S	18,4	$1,5 \times 10^1$	28,8	$1,0 \times 10^2$
C	4S,5S,7R,8R	38,3	$7,0 \times 10^{-4}$	62,7	$4,4 \times 10^{-6}$
D	4S,5S,7S,8S	53,2	$4,0 \times 10^{-7}$	67,4	$4,2 \times 10^{-7}$

Finalmente, los compuestos **19** y **20** tampoco pudieron obtenerse en forma pura por CCD de fase normal o reversa. Por lo tanto, se caracterizaron a partir de 2,2 mg de una mezcla 5:2 de ambos. Los espectros de RMN muy similares para ambos compuestos in-

Tabla 6.5: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **18**

		¹³ C (compuesto 18)		¹³ C + ¹ H (ajuste combinado para 18)	
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>	22,9	4,4 × 10 ¹	47,1	3,8 × 10 ⁻²
B	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i>	21,2	1,0 × 10 ²	31,4	1,0 × 10 ²
C	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>	55,7	3,2 × 10 ⁻⁶	82,0	1,0 × 10 ⁻⁹
D	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i>	78,2	4,2 × 10 ⁻¹¹	94,8	1,7 × 10 ⁻¹²

dicaron que las diferencias estructurales estaban restringidas a la orientación del grupo hidroxil en C-8 y/o al grupo epoxi en C-9 y C-10. Para el compuesto **20**, la orientación α del grupo 8-hidroxil se confirmó por NOE (ver Capítulo 5), mientras que la orientación del grupo epoxi no pudo ser establecida de acuerdo a los NOE observados. Por lo tanto, se realizó un análisis utilizando el protocolo CASE-3D, análogo al que se utilizó para los compuestos **14** y **15**; pero sólo sobre la base de predicciones de corrimiento químico en ¹H y ¹³C a nivel de DFT. Al ajustar los datos de desplazamiento químico de ¹³C sólo se seleccionaron las configuraciones de **19** y **20** como rel-(4*S*,5*R*)-9 β ,10 β -epoxi-8 β -hidroxieremofil-12,8-ólido y rel-(4*S*,5*R*)-9 β ,10 β -epoxi-8 α -hidroxieremofil-12,8-ólido, respectivamente, con una probabilidad relativa de más de 100:1 (Tablas 6.6 y 6.7). Sumando los desplazamientos químicos en ¹H el ajuste resultó en una capacidad de selección mucho mayor.

Tabla 6.6: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **19**

		¹³ C (compuesto 19)		¹³ C + ¹ H (ajuste combinado para 19)	
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	12,2	1,0 × 10 ²	44,2	1,0 × 10 ²
B	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	44,7	8,4 × 10 ⁻⁶	93,5	2,0 × 10 ⁻⁹
C	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	62,0	1,5 × 10 ⁻⁹	124,7	3,3 × 10 ⁻¹⁶
D	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	22,7	5,0 × 10 ⁻¹	93,4	2,0 × 10 ⁻⁹
E	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	42,9	2,1 × 10 ⁻⁵	102,5	2,1 × 10 ⁻¹¹
F	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	80,7	1,3 × 10 ⁻¹³	160,5	5,5 × 10 ⁻²⁴
G	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	40,5	6,9 × 10 ⁻⁵	91,9	4,3 × 10 ⁻⁹
H	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	39,9	9,6 × 10 ⁻⁵	80,7	1,2 × 10 ⁻⁶

Tabla 6.7: Parámetros de RMN para el ajuste del compuesto **20**

		¹³ C (compuesto 20)		¹³ C + ¹ H (ajuste combinado para 20)	
		AIC	Prob. Rel. (%)	AIC	Prob. Rel. (%)
A	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	59,4	5,8 × 10 ⁻⁸	94,7	8,9 × 10 ⁻¹⁰
B	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	16,9	1,0 × 10 ⁻²	43,8	1,0 × 10 ⁻²
C	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	36,5	5,4 × 10 ⁻³	83,2	2,8 × 10 ⁻⁷
D	4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	44,7	8,8 × 10 ⁻⁵	85,7	7,8 × 10 ⁻⁸
E	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	71,4	1,5 × 10 ⁻¹⁰	117,6	9,5 × 10 ⁻¹⁵
F	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>	83,6	3,2 × 10 ⁻¹³	151,1	5,0 × 10 ⁻²²
G	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	54,3	7,4 × 10 ⁻⁷	88,8	1,7 × 10 ⁻⁸
H	4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>	44,6	9,5 × 10 ⁻⁵	79,7	1,6 × 10 ⁻⁶

6.5. Parte Experimental

6.5.1. Procedimientos Generales

Los espectros de RMN se registraron en un equipo Bruker AVANCE II AV-400 que funciona a 400,13 MHz para ^1H y 100,63 MHz para ^{13}C , mientras que los espectros 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se obtuvieron usando el software estándar de Bruker. Los corrimientos químicos se informan en ppm (δ) respecto de TMS. Las mediciones de RDC se registraron en un equipo Bruker AVANCE III, que funciona a 500,13 MHz para ^1H , 125,76 MHz para ^{13}C y 76,77 MHz para ^2H y en un equipo Bruker AVANCE II AV-400 (400,13 MHz para ^1H y 100,03 MHz para ^{13}C). Los acoplamientos dipolares residuales para un enlace protón-carbono ($^1D_{\text{CH}}$) se midieron con el experimento protón-acoplado en F1 HSQC BIRD J -escalado (Thiele y Bermel, 2012), a partir de la biblioteca de secuencias de pulsos de Bruker, utilizando un factor de escalado para J , factor κ , de 4 y la transferencia INEPT optimizada para una constante de acoplamiento ^1H - ^{13}C de 145 Hz. Se utilizaron un total de 1024 incrementos en F1. Se obtuvieron condiciones anisotrópicas usando geles de PMMA reticulados e hinchados en CDCl_3 usando el método de compresión/relajación reversible como se describió anteriormente (Gil et al., 2008). Los geles de PMMA, los dispositivos de compresión y el programa StereoFitter están disponibles comercialmente en MestreLab Research.

6.5.2. Procedimientos Computacionales

Las geometrías para todas las formas diastereoisoméricas de los compuestos 14, 15, 19, 20 y 24 se generaron utilizando el programa Schrödinger Ligprep (Ligprep, 2017). Se exploró el espacio conformacional utilizando el campo de fuerzas MMFF94 (Halgren, 1996) y el algoritmo de mínimos múltiples de MonteCarlo (Chang et al., 1989) en MacroModel (MacroModel, 2017). Las configuraciones por debajo de un umbral de 21 kJ/mol se mantuvieron.

Los desplazamientos químicos en ^1H y ^{13}C se calcularon utilizando en Gaussian09 al nivel de DFT (GIAO/B3LYP 6-31G*) . Las conformaciones del compuesto 14 se refinaron *in vacuo* a nivel de teoría M062X/6-31+G**, usando una cuadrícula ultrafina de Gaussian09 (Frisch et al., 2016). Las frecuencias vibratorias armónicas se calcularon al mismo nivel de teoría y se verificaron como mínimos en la superficie de energía potencial. Los RDCs experimentales y los corrimientos químicos se ajustaron a los conjuntos conformacionales utilizando el procedimiento recientemente descrito implementado en el programa StereoFitter (Navarro-Vázquez et al., 2018). En este procedimiento, se obtuvo la conformación mejor puntuada para cada configuración particular minimizando las diferencias cuadráticas (χ^2) entre los RDCs experimentales y calculados y los datos de desplazamiento químico. El sobreajuste se evita utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) para la selección del modelo. Las configuraciones se clasifican según sus diferencias de AIC. Estas diferencias se pueden interpretar en términos de probabilidades definidas como $\frac{p_i}{p_{min}} = e^{(AIC_i - AIC_{min})/2}$ donde $\frac{p_i}{p_{min}}$ es la probabilidad relativa del mejor modelo para la configuración i -ésima de recuperar la información perdida con respecto a la de la configuración con mejor puntuación. Durante el procedimiento de ajuste, los apantallamientos químicos fueron transformados en corrimientos químicos

mediante el uso de una relación lineal $\delta = a\zeta + b$ donde la pendiente a y la ordenada al origen b fueron obtenidas ajustando los corrimientos químicos experimentales de RMN- ^1H y ^{13}C de β -pineno para calcular los apantallamientos exactamente al mismo nivel de teoría (Forsyth y Sebag, 1997). Los RDCs y los corrimientos químicos se ponderaron en el procedimiento de ajuste utilizando errores estándar de 0,15 y 2 ppm para los desplazamientos en ^1H y ^{13}C , respectivamente; mientras que los RDCs se ponderaron con un error estándar de 1,2 Hz. Además, los RDCs y los cambios químicos de protones diasterotópicos y grupos metilepoxi se promediaron durante el procedimiento de ajuste para evitar la asignación *a priori* de estos grupos.

Capítulo 7

Derivatización de guaianólidos: funcionalización de enlaces C–H

“El amor es el significado ultimado de todo lo que nos rodea. No es un simple sentimiento, es la verdad, es la alegría que está en el origen de toda creación”

R. Tagore

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos durante una estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Philippe Dauban, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, Francia.

7.1. Introducción

La última década ha sido testigo de una explosión de interés en las reacciones que efectúan la funcionalización directa de enlaces C–H no activados (Yu y Shi, 2010; Li, 2015). Más allá de la variedad cada vez más amplia de nuevas y diversas transformaciones de enlaces C–H informadas por grupos de investigación de todo el mundo, las mejoras continuas de los métodos existentes han ampliado su alcance y la compatibilidad de grupos funcionales hasta el punto de que las aplicaciones en la síntesis de moléculas complejas son cada vez más factibles. En este sentido, los avances en catálisis organometálica han sido de gran ayuda para investigar el campo de la funcionalización catalítica de enlaces C–H. La posibilidad de convertir directamente un enlace C–H a un enlace C–C o C–X (X: O, N, etc.) se informó hace mucho tiempo con el descubrimiento, por ejemplo, de la reacción de Hofmann-Löffler-Freytag o la reacción de Barton. Sin embargo, el uso de complejos de metales de transición ha permitido a los químicos mejorar significativamente la selectividad y el alcance de las reacciones de funcionalización de enlaces C–H (Davies et al., 2011). Con este rápido progreso, en la comunidad de la química medicinal se ha llegado a la conclusión de que los métodos que funcionalizan enlaces C–H ofrecen la oportunidad de explorar el espacio químico de manera más efectiva que confiar únicamente en los enfoques sintéticos convencionales. En particular, la disponibilidad de estas nuevas y poderosas metodologías ha permitido la aplicación de

una estrategia sintética conocida como funcionalización de última etapa o funcionalización *late-stage* (*Late-stage functionalization*, LSF) en la cual los enlaces C–H son considerados como “grupos funcionales” y como puntos de diversificación potenciales para generar nuevos análogos a partir de una estructura líder, sin recurrir a su síntesis *de novo* (Wencel-Delord y Glorius, 2013; Masood et al., 2012). Varias aplicaciones relevantes en síntesis resaltan muy bien que las reacciones de funcionalización de enlaces C–H son ahora parte de la caja de herramientas de los químicos sintéticos (Yamaguchi et al., 2012; Cernak et al., 2016). De particular relevancia es la posibilidad de aplicar estas transformaciones a productos naturales complejos y a drogas farmacéuticas. En consecuencia, la funcionalización *late-stage* de enlaces C–H abre oportunidades únicas para aumentar la diversidad molecular y mejorar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los compuestos bioactivos (Michaudel et al., 2014; Robles y Romo, 2014).

Entre los muchos obstáculos para identificar candidatos a fármacos prometedores, el rápido crecimiento de la diversidad molecular se reconoce como uno de los posibles cuellos de botella (Dolle et al., 2010; Thompson y Ellman, 1996; Schreiber, 2009; Galloway y Spring, 2011). Este objetivo puede ser alcanzado mediante una gran diversidad de enfoques (Morton et al., 2009; Medeiros et al., 2010; Charest et al., 2005; Chernyak y Gevorgyan, 2010; Pelish et al., 2001) entre los cuales, el reemplazo selectivo de enlaces C–H inertes de esqueletos bioactivos representa una estrategia única para acceder a nuevos compuestos (Boger y Brotherton, 1984; Wang et al., 2008; Wasa et al., 2009). Si un producto natural está disponible en cantidades suficientes a través de su aislamiento, la funcionalización directa de enlaces C–H (funcionalización de última etapa) puede proporcionar rápidamente análogos de una manera más rentable que la síntesis *de novo* paralela para cada nuevo análogo (Morrison y Hergenrother, 2014b). El acceso a esta clase de derivados ayudará a comprender la gama completa de las propiedades biológicas del producto natural derivatizado, y en última instancia, contribuirá en el descubrimiento de nuevas dianas biológicas (Carlson, 2010).

7.2. Aminación catalítica de enlaces C(sp³)–H y aziridinación

La función amina juega un papel vital en la química orgánica y en la biología. De hecho, el átomo de nitrógeno está presente en muchos compuestos tales como aminoácidos, alcaloides, penicilinas; así como en muchos otros principios activos (Hili y Yudin, 2006). De hecho, un estudio reciente de las drogas aprobadas por la FDA ha demostrado la importancia primordial del nitrógeno en la química medicinal. Más del 80 % de los medicamentos de moléculas pequeñas contienen al menos un átomo de nitrógeno, y el 59 % de ellos posee un heterociclo de nitrógeno (Vitaku et al., 2014). Su pKa ubicado en el rango de pH fisiológico es adecuado para optimizar la biodisponibilidad de los compuestos biológicamente activos. Además, su capacidad para llevar una carga positiva, así como su papel como donante y/o aceptor de enlaces de hidrógeno, promueven la interacción entre el compuesto bioactivo y su objetivo biológico. Durante años, la importancia del nitrógeno ha inspirado a los químicos que han asumido el reto de desarrollar numerosas metodologías para la formación de enlaces C–N, lo que permite su incorporación eficiente en moléculas tan complejas como variadas. Entre los métodos utilizados principalmente se encuentran la aminación reductiva de derivados

carbonílicos (ampliamente utilizados en la industria debido a sus condiciones suaves), la sustitución nucleofílica o la alquilación de iminas (Figura 7.1). Sin embargo, notamos que una de las principales limitaciones de estas metodologías es la presencia necesaria de un grupo funcional introducido de antemano, y cuyo intercambio o reducción resulta en la formación de un enlace C-N.

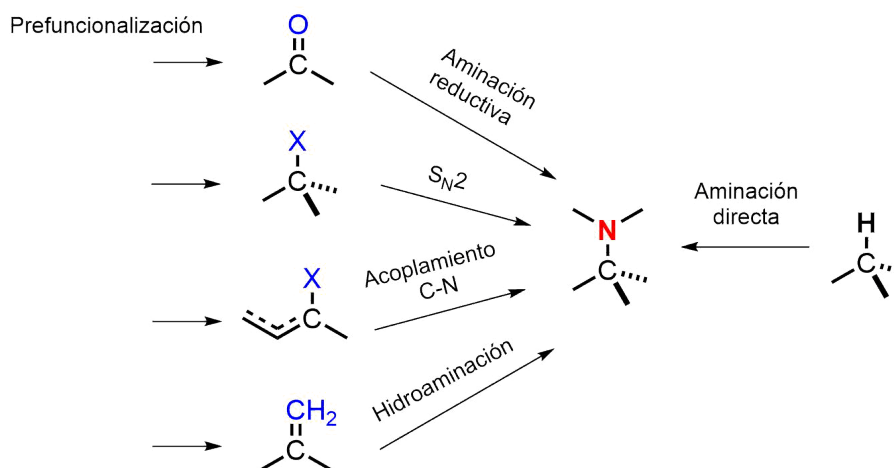


Figura 7.1: Diferentes estrategias para instalar una función amina

Más recientemente, se han aprovechado las propiedades de los complejos de metales de transición para desarrollar métodos de conversión directa y altamente controlada de un enlace C-H a un enlace C-N. Los primeros ejemplos de una reacción de aminación de enlaces C-H catalizada por un metal de transición se describieron a fines de la década de 1960 de manera independiente por tres grupos de investigación (Kwart y Kahn, 1967; Breslow y Sloan, 1968; Carr et al., 1969). Pero es sólo en las últimas décadas que la funcionalización regioselectiva de enlaces C-H, y su aplicación en síntesis total, han experimentado un verdadero auge (Dyker, 1999; Dick y Sanford, 2006; Hinman y Bois, 2003; Chen y Baran, 2009). Entre estos diferentes estudios, los que se basan en inserciones de nitreno en enlaces C-H, probablemente se destacan como los métodos de elección para la aminación de enlaces C(sp³)-H (Collet et al., 2009).

7.2.1. Química de los nitrenos

Un nitreno (Lwowski, 1970; Dequierez et al., 2012) es considerado como el análogo de nitrógeno del carbeno, ya que al igual que este último, es una especie neutra electrodeficiente. Este término fue utilizado por primera vez en 1891 por Tiemann durante el estudio del reordenamiento de Lossen (Figura 7.2).

Los nitrenos son compuestos monovalentes neutros de nitrógeno en los que este último tiene seis electrones de valencia. Por lo tanto, carece de dos electrones y de dos enlaces. Esta deficiencia de electrones y enlaces hace que los nitrenos sean especies altamente reactivas. Luego, demuestran una gran capacidad para insertarse en varios tipos de enlaces: enlaces C=C (aziridinación), enlaces C-H (aminación) o, más formalmente, C-CO (reordenamiento). Los nitrenos existen en dos estados diferentes dependiendo de

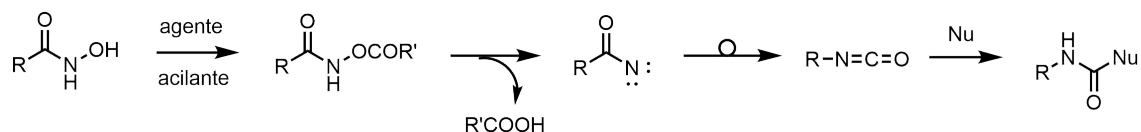


Figura 7.2: Reordenamiento de Lossen

los orbitales ocupados por los dos electrones no apareados (Figura 7.3):

- un estado triplete, el más estable, donde los 2 electrones están en dos orbitales diferentes: esto da al nitreno un carácter radical, que a menudo es problemático en algunas reacciones estereoselectivas.
- un estado singlete en el que los dos electrones están apareados: el nitreno tenderá a reaccionar de acuerdo con procesos concertados estereoespecíficos.

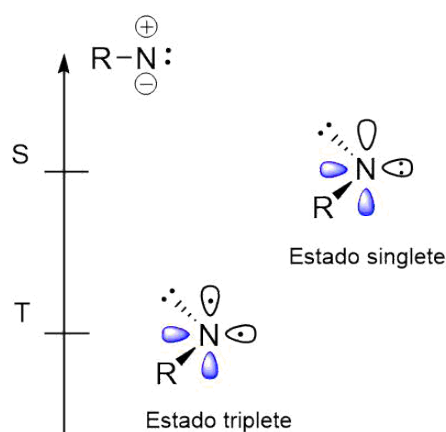


Figura 7.3: Estados energéticos de un nitreno.

La química sintética de los nitrenos ha tenido sus primeros desarrollos significativos desde la década de 1950 después del trabajo de [Smith y Brown \(1951\)](#), [Smolinsky \(1960\)](#), [Breslow y Sloan \(1968\)](#) y [Anastassiou et al. \(1965\)](#). Estos investigadores informaron la generación de diferentes clases de nitrenos, en condiciones térmicas o fotoquímicas, para la adición de alquenos o la inserción de enlaces C–H. Los rendimientos y selectividades de estas reacciones son moderados debido a la alta reactividad y la falta de selectividad de los nitrenos libres generados. Estos últimos tienden a relajarse hasta el estado de triplete, más estable termodinámicamente. La aparición de la química organometálica permitió controlar mejor su reactividad: esto fue demostrado por primera vez por [Kwart y Kahn \(1967\)](#). Los nitrenos pueden generarse a partir de diferentes precursores tales como azidas ([Intrieri et al., 2014](#)), *N*-sulfoniloxicarbamatos ([Lwowski et al., 1963](#); [Barani et al., 1994](#)) o haloaminas ([Jeong et al., 1998](#); [Chanda et al., 2001](#)), pero son los iminiodinanos ([Abramovitch et al., 1974](#); [Mansuy et al., 1984](#)) los que han dado

los mayores avances en el campo. Estos son reactivos de yodo hipervalentes particularmente útiles para las reacciones de aziridinación y aminación catalizadas por metales de transición de enlaces C-H (Breslow y Gellman, 1983; Evans et al., 1994; Müller et al., 1996).

Los primeros estudios relacionados con su uso han sido descritos por Mansuy et al. (1984) y Breslow y Gellman (1983), que ilustran la reactividad de estas entidades oxidantes para la aziridinación de olefinas y la aminación de enlaces C(sp³)-H (Figura 7.4).

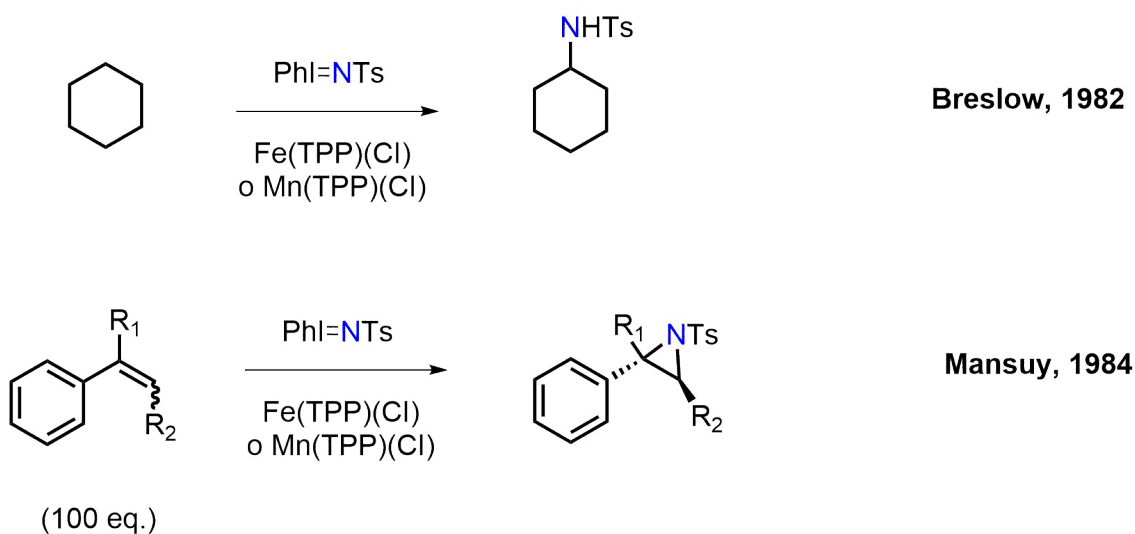


Figura 7.4: Primeros desarrollos en reacciones de inserción de nitrenos catalizadas por metales en presencia de iminoiodanos.

A pesar de una reactividad interesante, el uso de iminoiodanos tiene algunas desventajas: son compuestos inestables, difíciles de aislar y caracterizar adecuadamente, por ello se llevaron a cabo numerosos esfuerzos para su generación en el transcurso de la reacción. En este sentido, su formación *in situ* fue informada por primera vez, a principios de la década de 2000, por el Dr. Che y el Dr. Du Bois en las reacciones de aminación C(sp³)-H, y por el laboratorio del Dr. Dauban, por otro lado, para reacciones de aziridinación de olefinas.

Entre los desarrollos más importantes de esta metodología podemos citar los esfuerzos de: Yu et al. (2000) que han descrito la aminación intermolecular de enlaces C-H bencílicos catalizada con Rh combinando una sulfonamida y PhI(OAc)₂; mientras que Espino y Du Bois (2001) han desarrollado la aminación intramolecular de carbamatos y sulfamatos catalizados por un complejo binuclear de Rh(II) en presencia de PhI(OAc)₂. El grupo del Dr. Dauban ha desarrollado aziridinaciones intra/intermoleculares de olefinas con sulfamatos y sulfonamidas, catalizadas por un complejo de Cu(I) en presencia de iodosobenceno con interesantes resultados (Dauban et al., 2001; Duran et al., 2002; Es-téoule et al., 2007).

Estos últimos trabajos han permitido mejorar la reproducibilidad de los rendimientos de las reacciones, pero también permitieron aumentar la elección de precursores de

nitrenos. De hecho, además de las sulfonamidas (Yu et al., 2000; Dauban et al., 2001), podrían utilizarse sulfamatos y carbamatos (Espino et al., 2001), ureas y guanidinas (Kim et al., 2006) o carbamimidatos (Grelrier et al., 2017). Además, varios complejos metálicos derivados de: rodio (Au et al., 2000; Espino y Du Bois, 2001), plata (Alderson et al., 2014), rutenio (Milczek et al., 2008), manganeso (Clark et al., 2018; Paradine et al., 2015), cobre (Barman y Nicholas, 2011), hierro (Paradine y White, 2012) o cobalto (Lu et al., 2011) son capaces de catalizar estas reacciones. Esto permitió el desarrollo de metodologías eficientes, quimioselectivas y diastereoselectivas de aziridinación o aminación de enlaces C–H. Además, el uso de sulfonimidamidas (Liang et al., 2008), análogos quirales de las sulfonamidas, en combinación con un complejo de rodio quiral ha llevado al desarrollo de reacciones intermoleculares altamente estereoselectivas (Figura 7.7).

Para las reacciones intramoleculares de aminación C(sp³)–H, dos tipos de precursores de nitrenos se usan comúnmente en la síntesis total o en etapas múltiples (Darses et al., 2017): carbamatos, cuya inserción en enlaces C–H resulta en la posición β (sustitución 1,2) conduce a la formación de oxazolidinonas y sulfamatos para los cuales la aminación en la posición γ (sustitución 1,3) permite la formación de anillos de 6 miembros.

Desde el punto de vista de la reactividad, la naturaleza electrodeficiente de los nitrenos guía la reacción de aminación a los enlaces C(sp³)–H ricos en electrones. Por lo tanto, la funcionalización será preferentemente en la posición terciaria, bencílica y α a un éter; pero, sin embargo, sigue siendo posible en posiciones secundarias no activadas. La quimioselectividad de las reacciones de aminación de enlaces C–H es bastante buena, excepto en el caso de aminación alílica donde la aziridinación de la olefina puede ser altamente competitiva (Figura 7.8) (Li et al., 2013).

No obstante, la quimio y la regioselectividad pueden ser moduladas por la naturaleza de los ligandos transportados por el metal (Figura 7.9) (Hazelard et al., 2017). Como se evidencia a continuación en los resultados de la aminación de sulfamatos insaturados, la quimioselectividad está a favor de la aminación intramolecular de enlaces C(sp³)–H cuando los ligandos del complejo de dirodio son de tipo carboxamidato, aunque la formación de un anillo de 5 miembros está en desventaja, y a favor de la aziridinación cuando son del tipo carboxilato. De forma similar, recientemente, esta quimioselectividad a favor de la aminación C(sp³)–H también ha sido informada por White, durante la aminación intramolecular de enlaces C–H catalizada por un complejo de manganeso (Paradine et al., 2015).

7.2.2. Aplicaciones en la derivatización de productos naturales

Tal y como se dijo al comienzo de este capítulo, la aplicación de este enfoque único para la funcionalización de productos naturales ofrece un mayor número de sitios potenciales para la derivatización mientras se mantiene la bioactividad deseada, ya que la aminación de sitios no activados no perturba directamente los grupos funcionales existentes que a menudo son necesarios para la bioactividad. Dentro de esta perspectiva, Li et al. (2013) desarrollaron un reactivo alquinilsulfamato que permitió la aminación intermolecular de enlaces C–H y la aziridinación de dobles enlaces de productos naturales para el estudio de relaciones estructura actividad. Además, demostraron la capacidad de estas condiciones de reacción para suministrar productos aminados en posiciones

C-H bencílicas y alílicas (Figura 7.10).

Los autores destacan que si bien los rendimientos de las reacciones llevadas a cabo son bajos, la recuperación del material de partida fue excelente. Esta situación la califican como tolerable teniendo en cuenta que el sustrato natural se encuentra aislado en cantidades limitadas. Además, en comparación con los rendimientos generales que probablemente se obtendrían mediante síntesis *de novo*, el rendimiento de estos derivados es bastante aceptable en función del objetivo propuesto.

Chen et al. (2009) llevaron a cabo la aminación intermolecular de esclareólido (Figura 7.11), una lactona sesquiterpénica disponible comercialmente. La reacción fue llevada a cabo en las condiciones de Du Bois (Fiori y Du Bois, 2007) y obtuvieron un derivado aminado con muy buen rendimiento (basado en la sulfonamida). En este caso, los autores estudiaron los efectos de la liberación de la tensión anular para explicar la diferencia en reactividad de un enlace C-H axial vs. un enlace C-H ecuatorial. En este sentido, por motivos electrónicos, los enlaces C-H del metileno en C-2 en el anillo A, pueden considerarse más reactivos que el resto, ya que están más alejados del anillo de lactona tomador de electrones. Teniendo en cuenta la liberación de tensión, el enlace C-H ecuatorial es el menos impedido estéricamente y, debido a la presencia de dos interacciones 1,3-diaxiales del hidrógeno axial en la posición C-2 se espera que sea el más propenso a los efectos de la liberación de tensión en el estado de transición. Esto explicaría la obtención de un único producto de manera regio y estereoselectiva.

Por otra parte, Lapuh et al. (2019) realizaron la síntesis de derivados de abietanos utilizando catalizadores de Rh(II) y oxidantes de iodo hipervalente (Figura 7.12). Se realizaron inserciones de nitreno intermolecular e intramolecular a partir de diversos esqueletos diterpenoides. Se aislaron casi 20 derivados aminados con rendimientos entre 12% y 86%; y con altos niveles de regio, quimio y estereoselectividad. La diferencia en la regioselectividad observada, los autores la adjudican a factores estéricos y estereoelectrónicos.

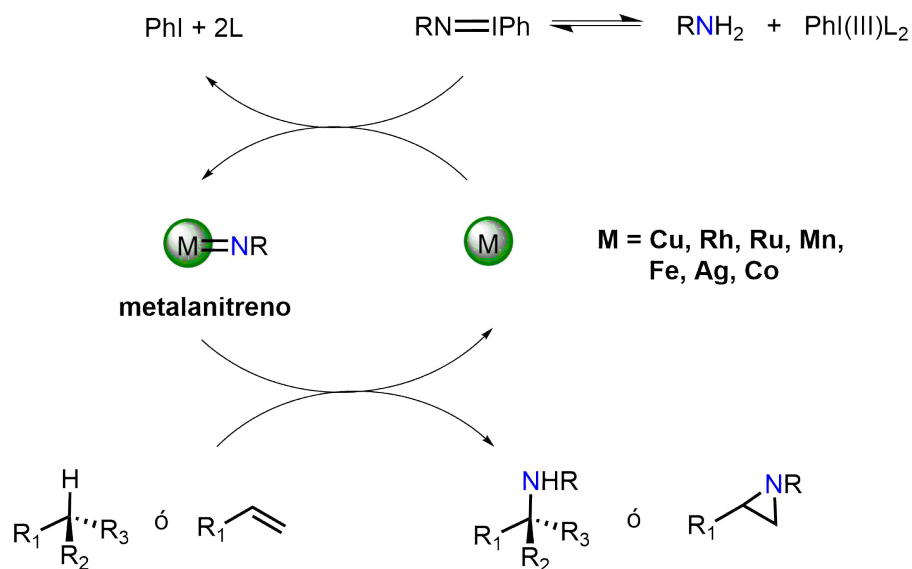


Figura 7.5: Mecanismo general de las reacciones de aminación de enlaces C–H y aziridinación por inserción de nitrenos.

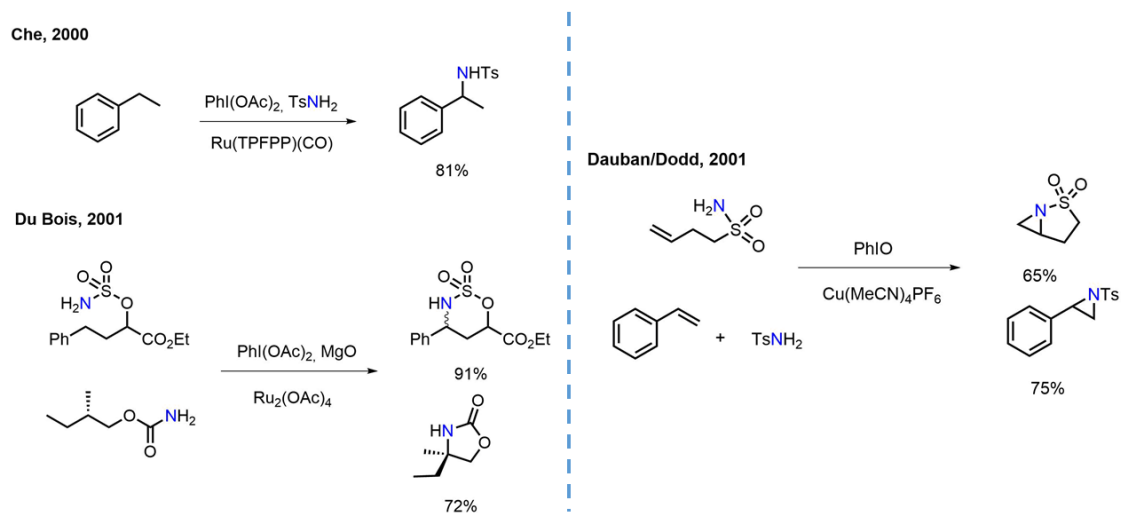


Figura 7.6: Primeros desarrollos en la inserción de nitrenos catalizado por metales utilizando iminoiodanos generados *in situ*.

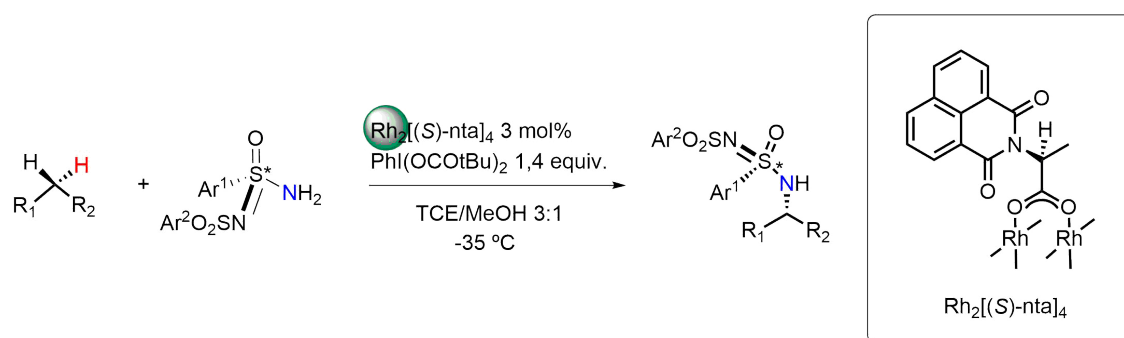


Figura 7.7: Aminación intermolecular diastereoselectiva catalizada con un complejo de rodio quiral.

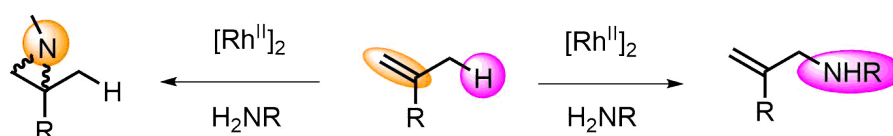


Figura 7.8: Competencia entre aziridinación y aminación de enlaces C-H de sustratos que contienen dobles enlaces.

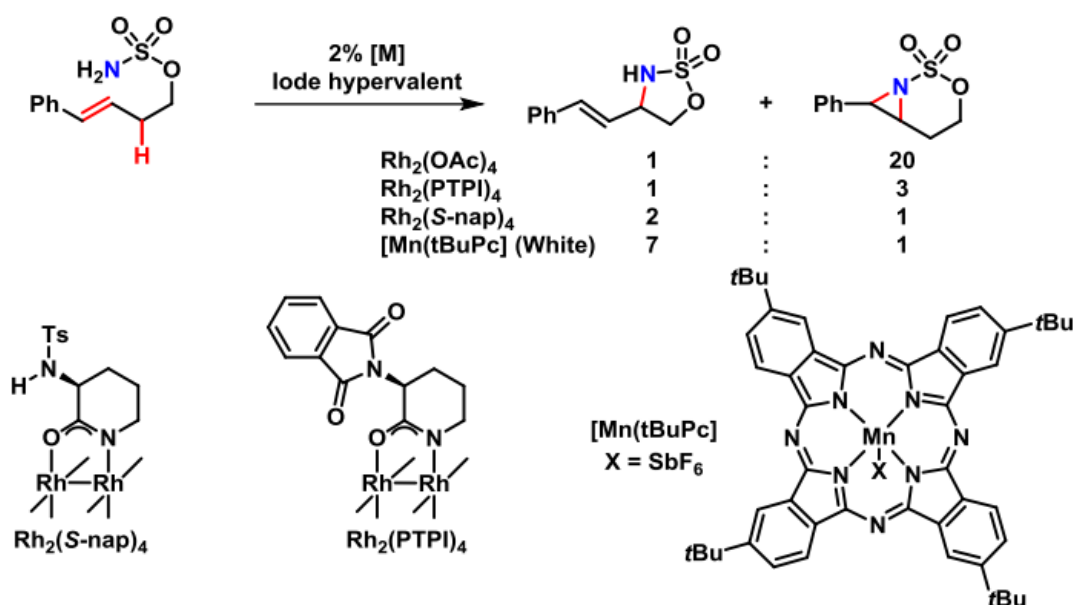


Figura 7.9: Quimioselectividad de la inserción de nitrenos modulada por la naturaleza del complejo metálico

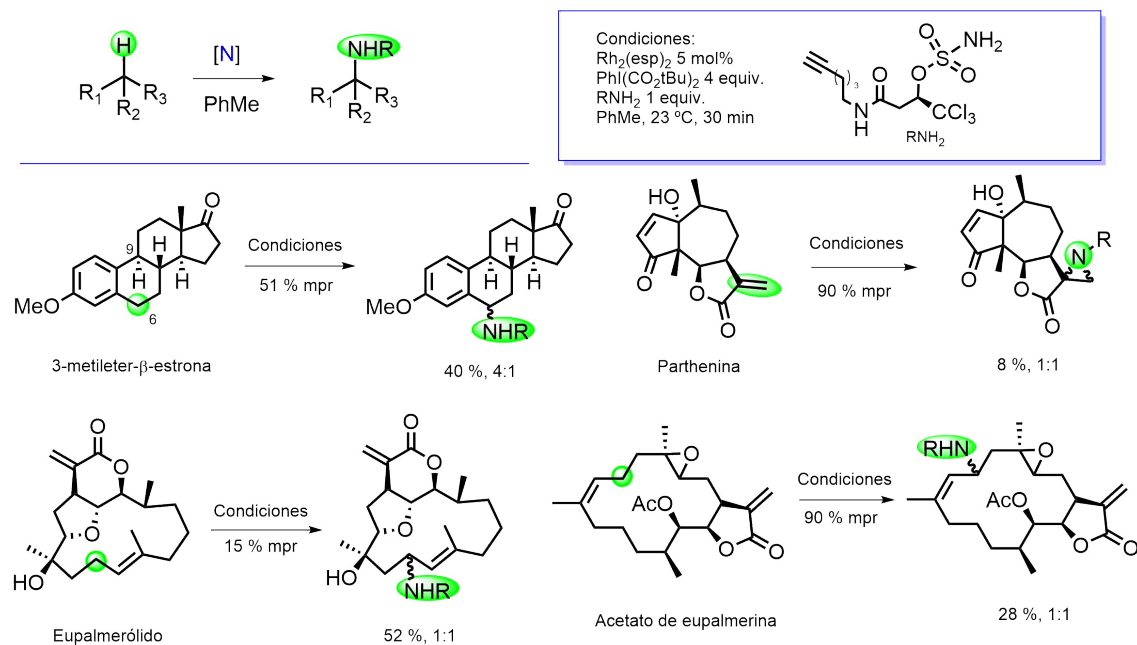


Figura 7.10: Reacciones de aminación sobre productos naturales.
 $R=SO_3CH(CCl_3)CH_2C(O)NH(CH_2)_4CCH$

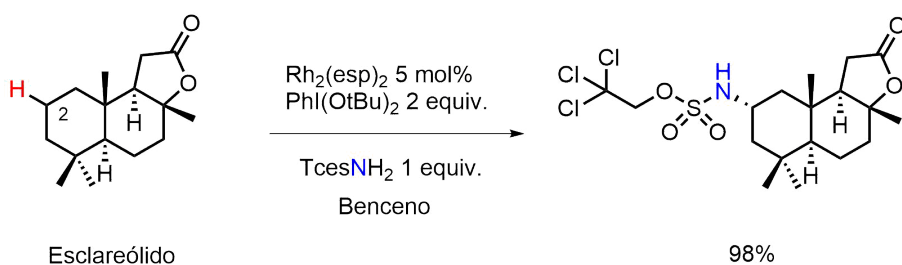


Figura 7.11: Reacción de aminación de esclareólido.

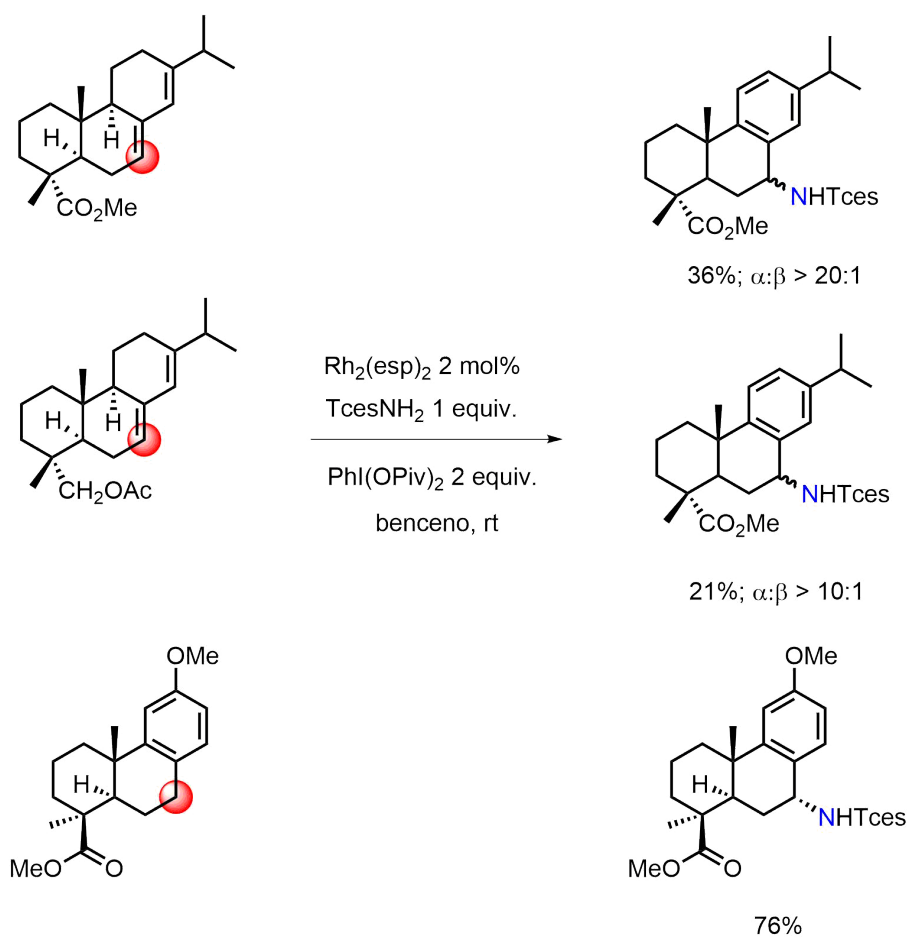


Figura 7.12: Algunos ejemplos de reacciones de aminación de enlaces C-H catalizada con Rh(II) de diferentes diterpenos con esqueleto tipo abietano.

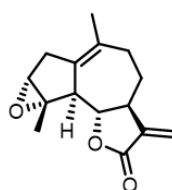
7.3. Estrategia y Objetivos

Por todo lo dicho anteriormente, llevar a cabo reacciones que instalen directamente una función amina en esqueletos naturales que no lo posean resultó ser sumamente atractivo. En orden a ello, la funcionalización de enlaces C–H capturó nuestra imaginación; buscando que la presencia de un átomo de N potencie la actividad biológica de los compuestos naturales seleccionados. Los sustratos naturales elegidos para este propósito fueron obtenidos de dos especies de la Fam. Asteraceae: ludartina (**L**), aislada previamente por nuestro grupo a partir de las partes aéreas de *Stevia yaconensis* var. *subeglandulosa* (Sosa et al., 1989), achalensólido (**Ach**) y 11,13-dehidroachalensólido (**DHAch**), ambos aislados previamente por nuestro grupo a partir de *Stevia achalensis* (Oberti et al., 1983). Estos compuestos fueron seleccionados para llevar a cabo reacciones de aminación/aziridinación en base a dos criterios: se trata de compuestos que pueden ser obtenidos en cantidad apreciable y que las especies de donde se aislan son especies pertenecientes a la flora del noroeste argentino, flora de interés en el presente trabajo de tesis doctoral. Además, estos tres compuestos poseen pocos antecedentes de derivatización. De hecho sólo existen reportes previos de modificaciones de **L** sobre el doble enlace exocíclico del anillo butirolactona a través de reacciones de adición de Michael (Lone et al., 2013a, 2014), y reacciones de apertura del grupo epóxido del anillo A (Adekenov, 2013). Por otra parte, sólo existe un reporte previo de derivatización de **Ach** referido a una reacción de biorreducción (Bustos et al., 2014), y ningún antecedente para **DHAch**.

Luego, se propuso la derivatización de estos tres guaianólidos utilizando reacciones de aminación en condiciones reportadas por Du Bois (Fiori y Du Bois, 2007) y por Dauban (Liang et al., 2008). Para ello se utilizaron catalizadores de Rh(II) en presencia de un oxidante de iodo hipervalente y de un sulfamato (TcesNH₂ o PhsNH₂) o una sulfonimidamina (S*NH₂) como precursores de nitreno (Figura 7.14).



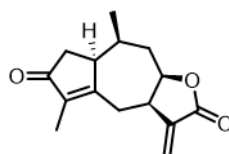
Stevia yaconensis var. *subeglandulosa* Hieron.



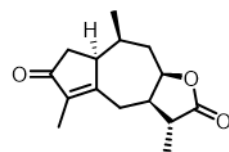
Ludartina (L)



Stevia achalensis Hieron.



Achalensólido (Ach)



11,13-dehidroachalensólido (DHach)

Figura 7.13: Especies de *Stevia* y sus correspondientes metabolitos secundarios mayoritarios.

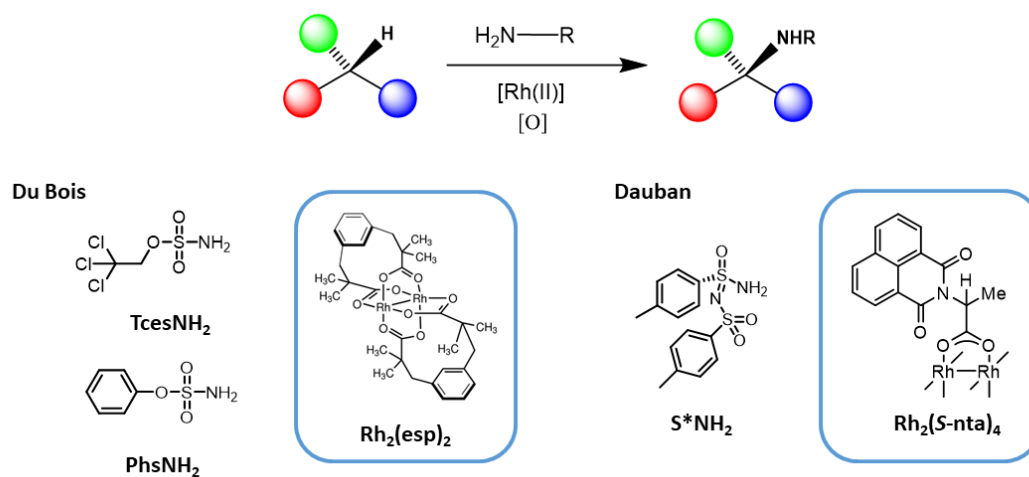
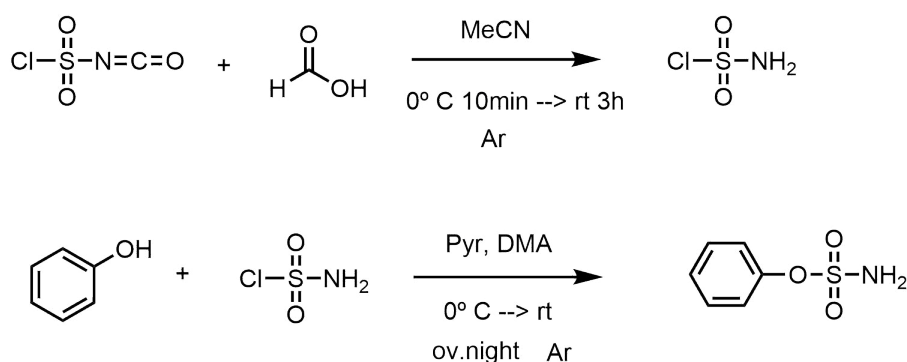


Figura 7.14: Condiciones de reacción empleadas en este trabajo. TcesNH₂: tricloroetoxisulfonamida; PhsNH₂: fenilsulfamato; S*NH₂: *S*-*N*-(*p*-toluensulfonyl)-*p*-toluensulfonimidamida.

7.4. Resultados y Discusión

En el presente trabajo se realizó la síntesis de derivados aminados de guaianólidos. Para ello, como primer paso se purificaron las tres lactonas sesquiterpénicas: **L**, **Ach** y **DHach**, siguiendo la metodología reportada (Fiori y Du Bois, 2007; Liang et al., 2008). Una vez obtenidos los compuestos naturales puros se realizaron las reacciones propuestas, siguiendo un protocolo simple en presencia de un catalizador de Rh (II), un oxidante de iodo hipervalente y una fuente de nitreno de acuerdo a lo descrito anteriormente (Figura 7.14). Cabe aclarar que tanto TcesNH₂ (tricloroetoxisulfonamida) como S*NH₂ (sulfonimidamida) se obtuvieron comercialmente, mientras que PhsNH₂ (fenilsulfamato) fue sintetizado previo a su utilización de acuerdo a la siguiente reacción:



7.4.1. Reacciones de aminación de ludartina

Se investigó la posibilidad de derivatizar (**L**) utilizando reacciones de inserción de nitrenos en enlaces C(sp³)-H catalizada por complejos de Rh(II). Todas las reacciones fueron desarrolladas bajo condiciones estequiométricas con respecto al sustrato natural de partida; utilizándose las tres fuentes de nitreno propuestas (TcesNH₂, PhsNH₂ y S*NH₂) y siguiendo los protocolos establecidos en bibliografía.

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de aminación empleando TcesNH₂ siguiendo las condiciones previamente reportadas por el grupo del Dr. Du Bois (Roizen et al., 2013; Fiori y Du Bois, 2007). Como producto de reacción se obtuvo el compuesto **29** con un rendimiento aislado de 25,7% y un 98,2% de conversión. El porcentaje de conversión se calculó como: %conv. = [(moles sustrato inicial - moles sustrato sin reaccionar)/moles sustrato inicial]*100. El compuesto **29** que reveló una fórmula molecular de C₁₇H₂₀Cl₃NO₆S por HRMS, es un derivado de **L** donde observamos la sustitución selectiva del enlace H-2 y la obtención de un único estereoisómero (Figura 7.15). El análisis de los espectros de RMN en 1D y 2D, sugirieron que la formación del nuevo enlace C-N se encuentra en la posición C-2 [δ_{H} 4,60 (d, $J = 6,20$ Hz); δ_{C} 57,2] (Figura 7.16). La localización de este enlace fue corroborada a través de las correlaciones observadas en un experimento HMBC entre la señal del H-2 y C-1, C-3, C-4 y C-10 (Figura 7.17). Y la orientación β del sustituyente en posición C-2 fue propuesta teniendo en consideración el NOE observado entre N-H (δ 5,30) y H-6 (δ 3,62), posible únicamente en estas condiciones (Figura 7.18).

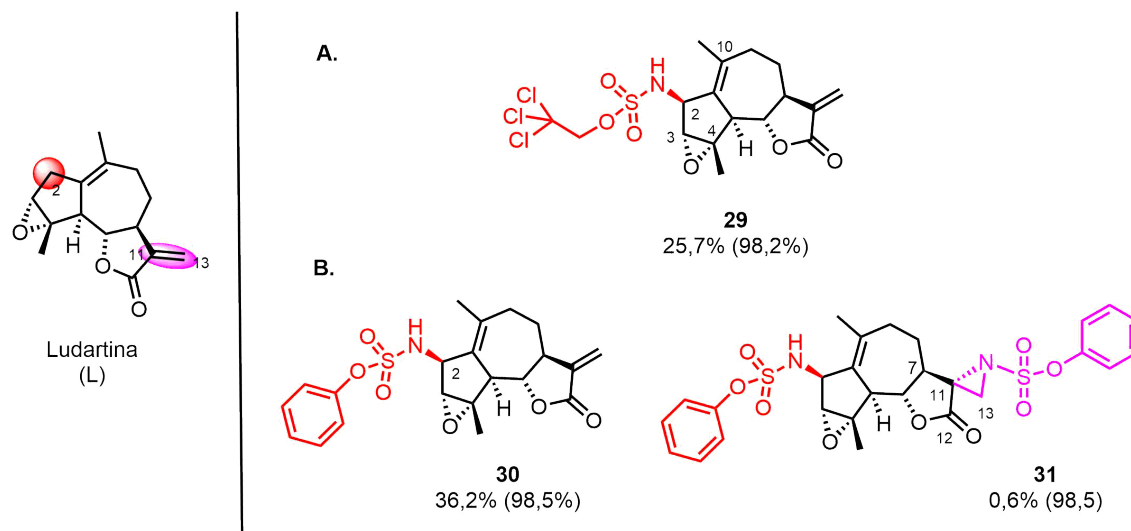


Figura 7.15: Productos obtenidos por aminación de L. Condiciones: $\text{Rh}_2(\text{esp})_2$ 2 mol %; Tces NH_2 (A) o Phs NH_2 (B) 1,2 equiv.; PhI(OPiv) $_2$ 2 equiv.; benceno; rt. Se muestra el % de rendimiento aislado y entre paréntesis el % de conversión.

En segundo lugar, se llevó a cabo la reacción de aminación utilizando Phs NH_2 . En este caso, se obtuvieron como productos los compuestos **30** (36,2%) y **31** (0,6%) con un 98% de conversión (Figura 7.15).

El compuesto **30** reveló una fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S}$ por HRMS. El sitio de sustitución fue el mismo que en el caso del compuesto **29**, en la posición C-2 [δ_{H} 4,54 (d, $J = 5,7$ Hz); δ_{C} 56,8]; el cual se determinó mediante el análisis de un espectro HMBC en el que se observaron las correlaciones entre la señal de H-2 con C-3 y C-4. La configuración de C-2 fue establecida mediante un experimento NOESY. En este espectro se observó NOE entre NH (δ 5,41) y H-6 (δ 3,57), posible únicamente en estas condiciones.

El compuesto **31**, de fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$ por HRMS, fue aislado con muy bajo rendimiento, posiblemente se forme a continuación del compuesto **29** por reacción del doble enlace exocíclico de éste con una nueva molécula de Phs NH_2 para dar lugar a una aziridina. Mediante experimentos de HMBC y HSQC fue posible determinar la presencia y la posición de la nueva aziridina formada. La señal en RMN- ^1H de δ 2,83 s y δ 2,84 s asignada a H-13a y H-13b respectivamente, mostraba en el espectro HMBC correlación con C-12 y C-7. A su vez, los corrimientos químicos en RMN- ^{13}C para C-13 (δ 36,7) y para C-11 (δ 50,0) evidenciaban la desaparición del doble enlace exocíclico. Por lo tanto, se propuso la formación de la aziridina involucrando las posiciones C-11 y C-13. La orientación de dicha aziridina fue propuesta en base a un experimento NOESY, en donde se observa NOE entre H-13a y H-13b, H-6 y H-7 (Figura 7.19).

En función de los resultados hasta aquí obtenidos, podemos sugerir que la cara α del anillo A de L se encuentra impedida estéricamente por el grupo epóxido, dirigiendo la reacción de aminación, bajo las condiciones ensayadas, hacia la sustitución selectiva del enlace C-H β . Esta sugerencia también la propusieron Lone et al. (2016) con lo observado

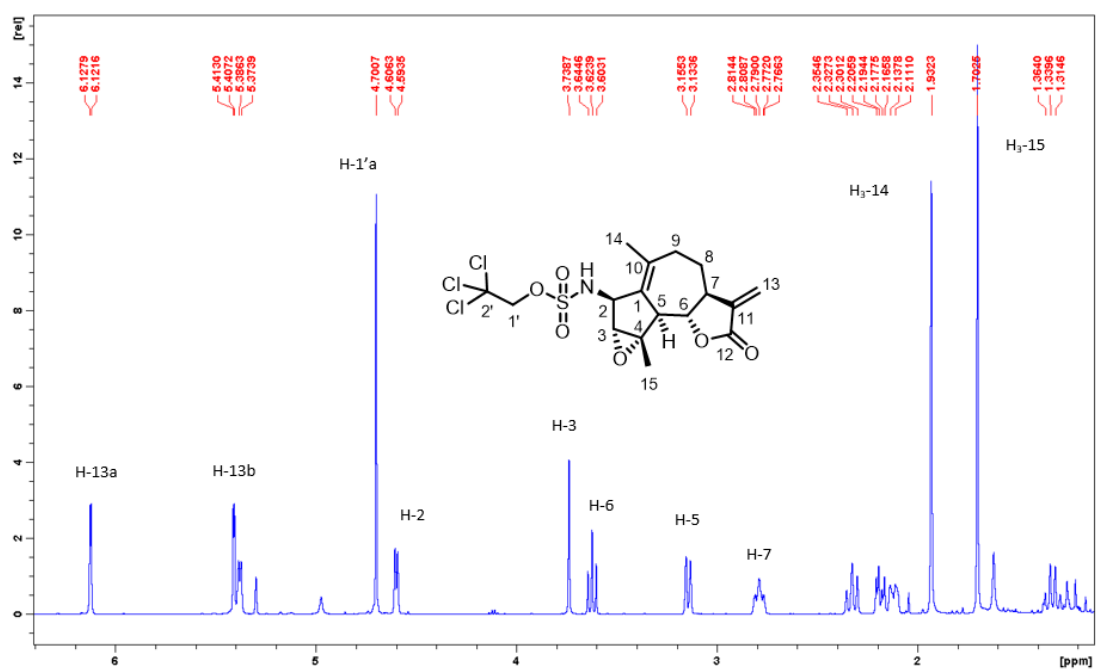


Figura 7.16: Espectro de RMN-¹H del compuesto **29** (CDCl₃; 500 MHz)

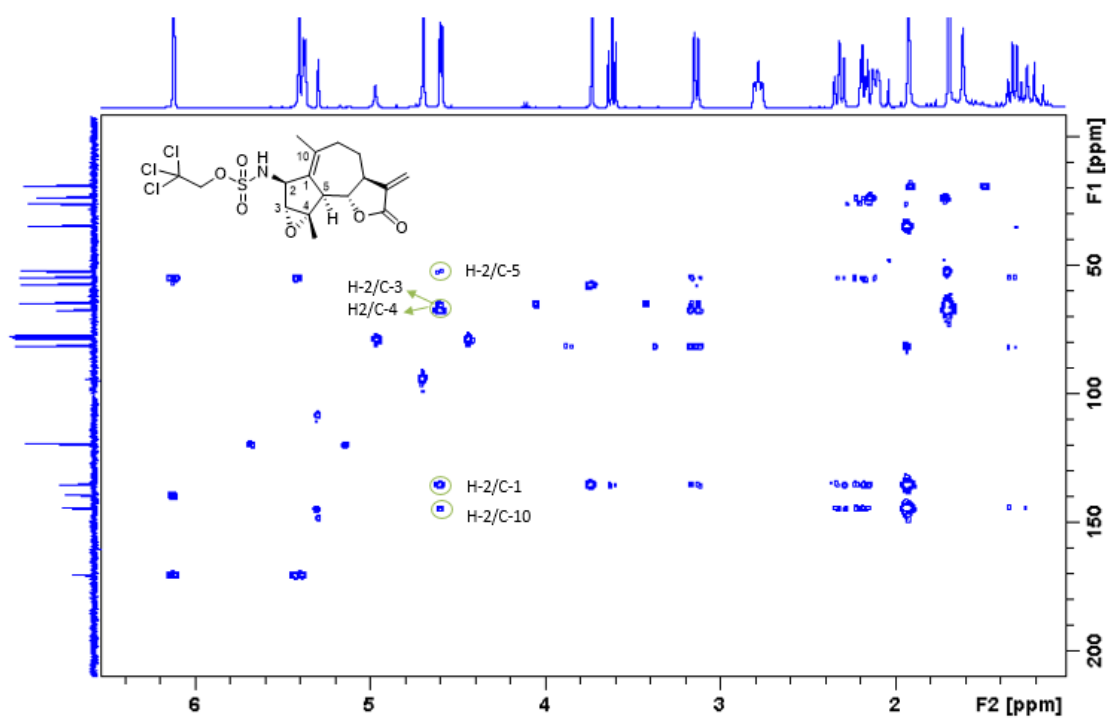


Figura 7.17: Espectro de correlación C-H a largo alcance (HMBC) del compuesto **29** (CDCl₃; 300 MHz)

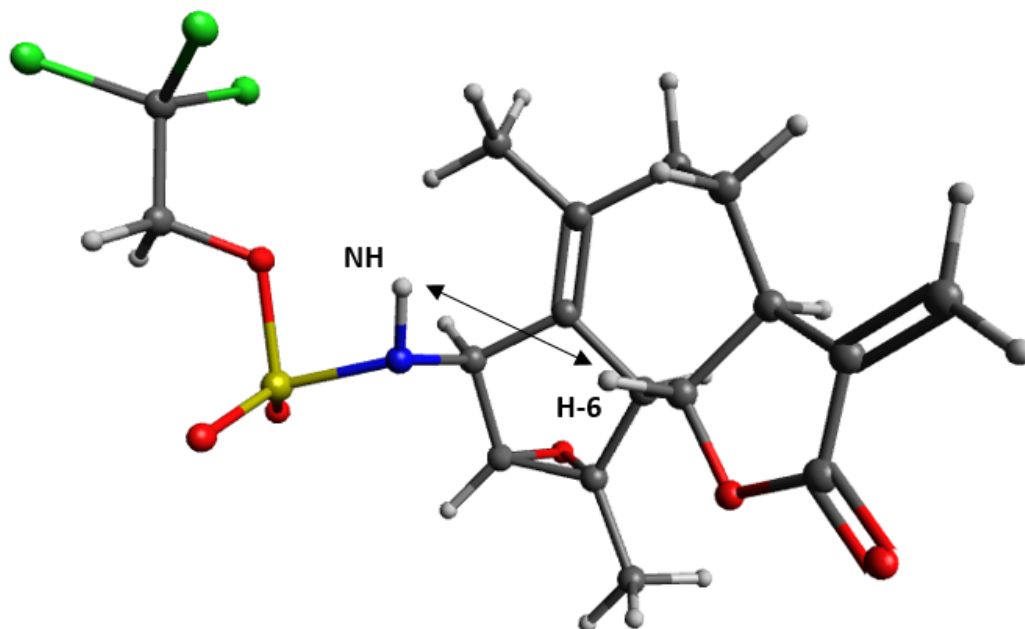


Figura 7.18: NOE relevante para el compuesto 29 utilizado para establecer la configuración de C-2.

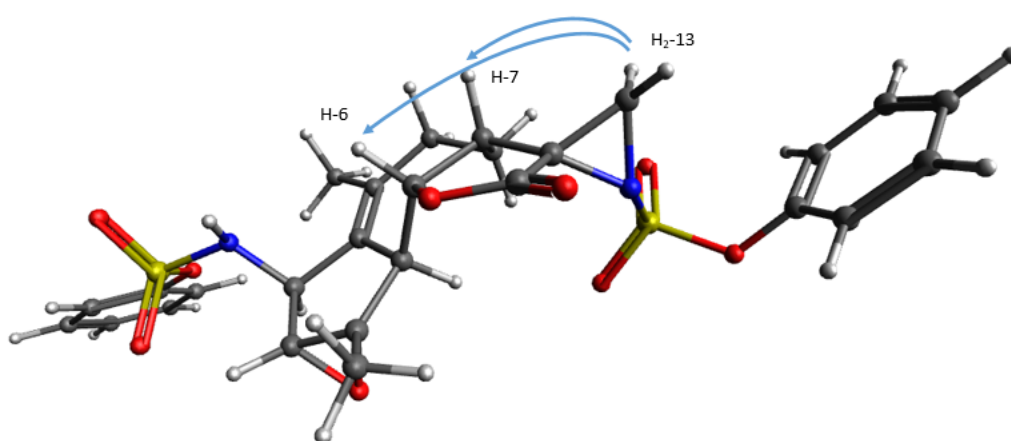


Figura 7.19: NOE relevantes para establecer la orientación de la aziridina en el compuesto 31.

en reacciones de epoxidación del doble enlace 1-10 de **L**, donde sólo obtienen un único producto que posee un β -epóxido en las posiciones C1-C10.

Cuando se aplicaron las condiciones de reacción reportadas por el grupo del Dr. Dauban ($\text{Rh}_2(\text{S-nta})_4$, sulfonimidamida (S^*NH_2)) (Buendia et al., 2015, 2016; Darses et al., 2013), sorpresivamente no se pudo aislar ningún producto de aminación (Figura 7.20). En este caso, proponemos que las condiciones utilizadas favorecen la descomposición de ludartina y/o el sustrato no resulta accesible para el precursor de nitreno estéricamente demandante S^*NH_2 .

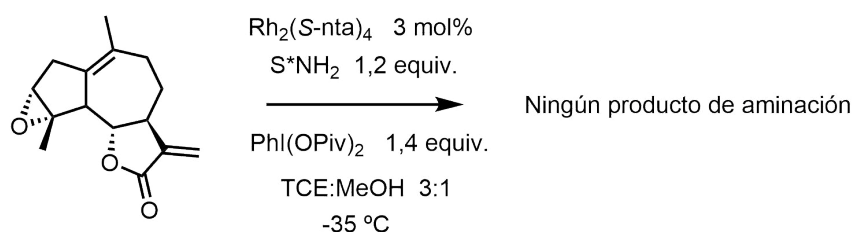


Figura 7.20: Aminación catalítica intermolecular de **L** con sulfonimidamida. TCE: 1,1,2,2-tetracloroetano. S^* : (*S*)-(N-(p-toluensulfonyl)-p-toluensulfonimidoil)

7.4.2. Reacciones de aminación de achalensólido

Se investigó la aminación de **Ach** siguiendo los mismos protocolos utilizados para **L**. En primer lugar, la reacción utilizando TcesNH_2 dio como productos a los compuestos **32** (26 %) y **33** (7,4 %) con un 95,1 % de conversión (Figura 7.22).

El compuesto **32** reveló una fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{NO}_6\text{S}$ por HRMS. El análisis de los espectros de RMN en 1D y 2D informó la desaparición de las señales características de los protones vinílicos del doble enlace exocíclico del anillo butirolactona de **Ach**. A su vez, se observaron señales correspondientes a la formación de un aziridina que involucraría las posiciones C-11 (δ_{C} 49,6) y C-13 (δ_{C} 36,6). La orientación de la aziridina formada fue propuesta en base a los NOE observados entre H-13a y H-13b, H-6a, H-7 y CH_3 -14.

El compuesto **33**, de fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_3\text{NO}_8\text{S}$ se trata del producto de apertura de la aziridina mediado por el ataque del ácido pivaloico, ácido liberado *in situ* en el transcurso de la reacción, sobre el C-13. La apertura de la aziridina en el compuesto **33**, fue propuesta en base al análisis de los espectros de RMN en 1D y 2D. La presencia del grupo pivaloilo fue propuesta en base a las siguientes observaciones: una señal a 1,24 ppm en el espectro de RMN- ^1H que integra para 9 H asignada a tres grupos metilos (H_3 -3''), y una señal a 177,4 ppm en el espectro de RMN- ^{13}C asignada a carbonilo de grupo éster (C-1'') junto a un carbono cuaternario a 39,0 ppm (C-2''). Además, se observaron correlaciones en el espectro HMBC entre H_2 -13 y C-12, C-1'' que sustentan la estructura propuesta (Figura 7.21). A su vez, se observa NOE entre H-13a con H-6a y H-6b sugiriendo que la orientación del enlace C-N es α .

Cabe destacar que, en esta reacción, no fue posible aislar ningún producto de aminación en otras posiciones tales como posiciones terciarias (C-10) o secundarias del esqueleto guaianólido de **Ach**.

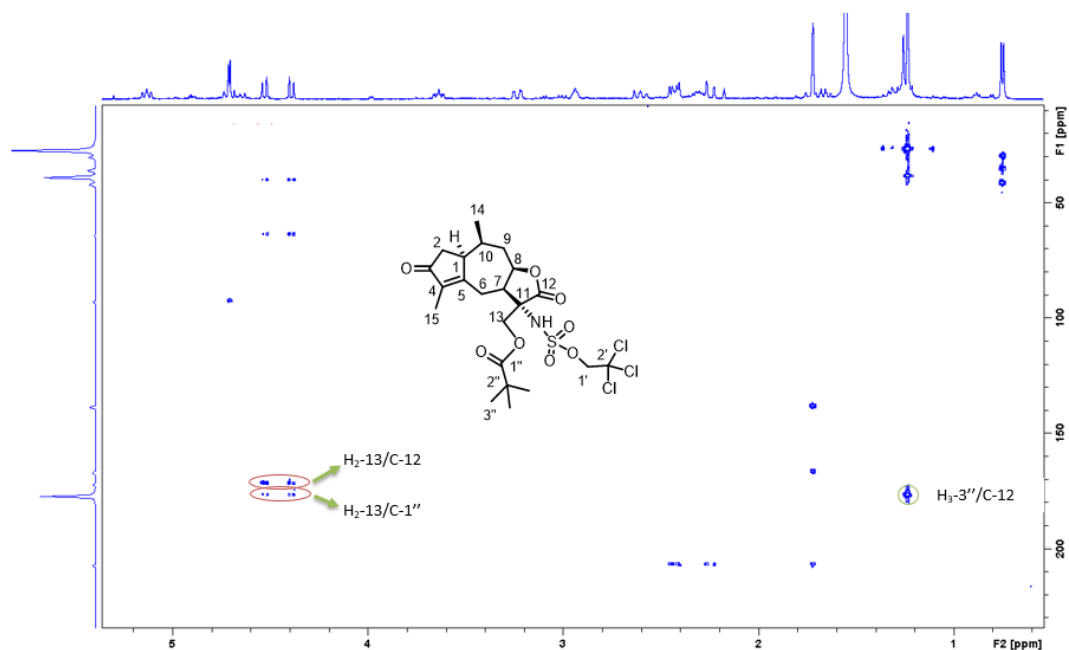


Figura 7.21: Espectro de correlación a largo alcance HMBC para el compuesto **33** (CDCl₃, 300 MHz)

En segundo lugar, se llevó a cabo la reacción de aminación de **Ach** utilizando PhsNH₂. La misma dio como productos a los compuestos **34** (11,7%) y **35** (16%) con un 97,6% de conversión (Figura 7.22).

El compuesto **34** reveló una fórmula molecular C₂₆H₃₃NO₈S por HRMS. El análisis de los espectros de RMN en 1D y 2D indicó que este compuesto posee un nuevo enlace C–N en posición C-11, por apertura de una aziridina (no aislada) que se formó entre las posiciones C-11 y C-13 de manera similar al compuesto **33**. El espectro de correlación C–H a largo alcance HMBC mostró correlaciones claves entre H₂-13 y C-12, C-1'' que sustentan la estructura propuesta. La orientación del enlace C–N fue propuesta en función del NOE observado entre H-13b con H-6a y H-6b.

El compuesto **35** mostró una fórmula molecular C₂₁H₂₃NO₆S por HRMS. El análisis de los espectros de RMN en 1D y 2D indicaron que el esqueleto guaianólido del **Ach** solamente se modificó alrededor del CH₃-14: se observa la desaparición de la señal correspondiente al metino CH-10 y un cambio en la multiplicidad del CH₃-14 (δ_H 1,13 s). Con lo cual se propuso la presencia de un nuevo enlace C–N en posición C-10 (δ_C 60,5). Así es que en este caso observamos la inserción del nitreno en una posición terciaria del esqueleto de **Ach** con conservación de la stereoquímica tal como es esperable de acuerdo al mecanismo de reacción involucrado.

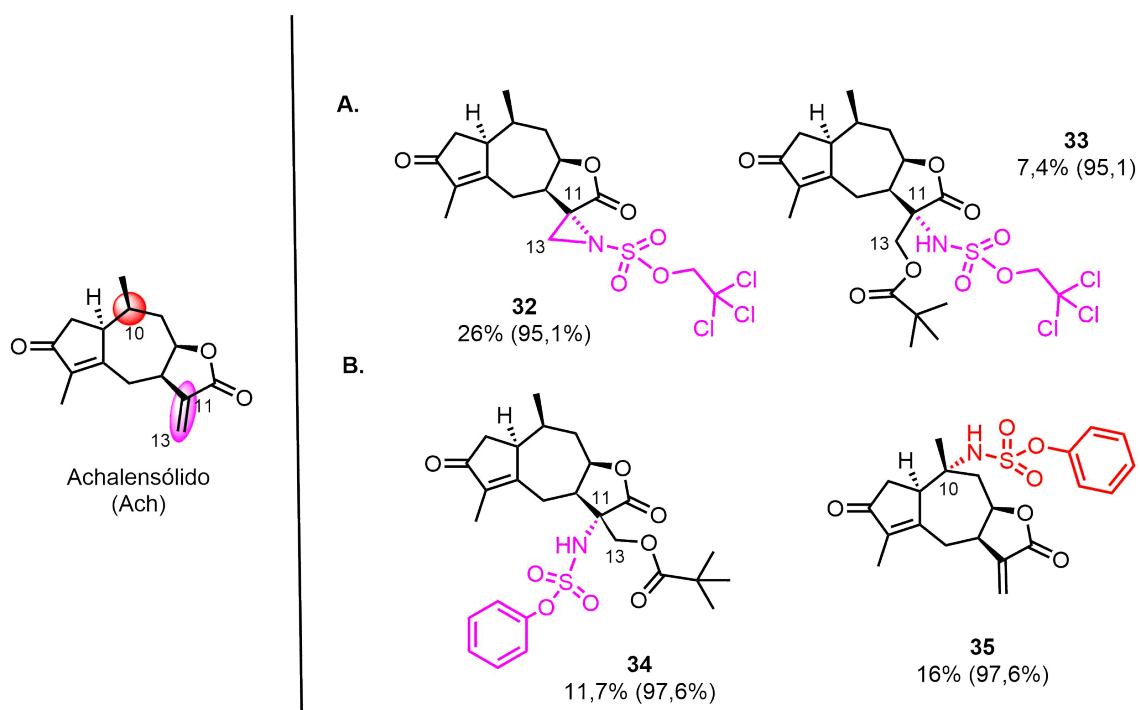


Figura 7.22: Productos obtenidos por aminación de Ach. Condiciones: Rh₂(esp)₂ 2 mol%; TcesNH₂ (A) o PhsNH₂ (B) 1,2 equiv.; PhI(OPiv)₂ 2 equiv.; benceno; rt. Se muestra el % de rendimiento aislado y entre paréntesis el % de conversión.

Se llevó a cabo la reacción de aminación de **Ach** utilizando como fuente de nitreno a S^*NH_2 . En este caso tampoco la reacción tuvo lugar. Nuevamente, suponemos que el sustrato o bien se descompone o existen problemas de impedimento estérico que impiden el acercamiento de los reactivos para dar lugar a la reacción.



Figura 7.23: Aminación catalítica intermolecular de **Ach** con sulfonimidamida. TCE: 1,1,2,2-tetracloroetano. S^* : (S)-(N-(p-toluensulfonil)-p-toluensulfonimidoil)

7.4.3. Reacciones de aminación de 11,13-dehidroachalensólido

Se investigaron las reacciones de aminación de **DHAch** siguiendo los mismos protocolos anteriormente detallados. Cuando se hizo reaccionar **DHAch** con $TcesNH_2$, se obtuvo el compuesto **36** (6,3%), que reveló una fórmula molecular $C_{17}H_{22}Cl_3NO_6S$ por HRMS. El análisis de los espectros de RMN en 1D y 2D indicó que, llamativamente, el sitio de sustitución fue la posición C-1: no se observa señal para un metino en C-1, posición con un desplazamiento químico en ^{13}C de 70,1 ppm.

La reacción de aminación de **DHAch** utilizando $PhsNH_2$ como fuente de nitreno arrojó los mismos resultados. Se obtuvo el producto de sustitución en la posición C-1, compuesto **37** (31,4%) que reveló una fórmula molecular $C_{21}H_{25}NO_6S$ por HRMS. Cabe destacar que en este caso no se aísla ningún producto de aminación en la posición C-10 (posición CH terciaria), situación esperable dado lo observado en la reacción de **Ach** en estas mismas condiciones.

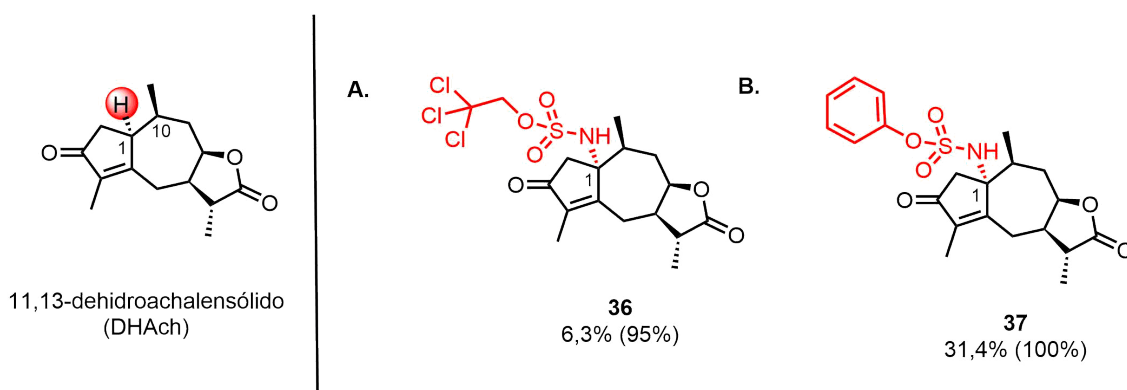


Figura 7.24: Productos obtenidos por aminación de **DHAch**. Condiciones: $Rh_2(esp)_2$ 2 mol%; $TcesNH_2$ (A) o $PhsNH_2$ (B) 1,2 equiv.; $PhI(OPiv)_2$ 2 equiv.; benceno; rt. Se muestra el % de rendimiento aislado y entre paréntesis el % de conversión.

La aminación utilizando S^*NH_2 no fue llevada a cabo en este caso por falta de sus-

trato de partida. Pero estimamos que sucedería lo mismo que en los casos anteriores, dado que no hay razones para suponer que hayan cambiado las interacciones estéricas desfavorables o la estabilidad del compuesto en las condiciones de reacción.

7.5. Parte Experimental

7.5.1. Sustratos naturales

Los compuestos naturales fueron obtenidos a partir de la purificación de extractos vegetales de *Stevia yaconensis* var. *subeglandulosa* y de *Stevia achalensis* según está descrito en la literatura con ligeras modificaciones (Sosa et al., 1989; Oberti et al., 1983).

7.5.2. Procedimientos Generales

7.5.2.1. Aminación utilizando TcesNH₂ ó PhsNH₂

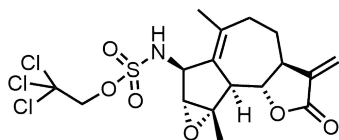
Las reacciones se realizaron en un tubo de reacción limpio y seco. El sustrato natural (1 equiv., 0,2 mmol) se disolvió en benceno seco. TcesNH₂ ó PhsNH₂ (1,5 equiv.), Rh₂(esp)₂ (0,02 equiv.) y PhI(OPiv)₂ (2 equiv.) fueron agregados sucesivamente, y la solución se agitó por 4 h a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 2 mL de una solución saturada de tiourea y 5 mL de DCM. El contenido del tubo fue trasvasado posteriormente a una ampolla de decantación, y la fase orgánica fue recuperada. La fase acuosa fue particionada utilizando DCM (2 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron utilizando una solución saturada de NaHCO₃ (10 mL), posteriormente se secaron utilizando Mg₂SO₄, se filtraron y se llevaron a sequedad a presión reducida. El residuo obtenido se fraccionó a través de cromatografía en columna flash en fase normal utilizando Silica Gel 60 como fase estacionaria y una mezcla de Hx:AcOEt de polaridad creciente como fase móvil, obteniéndose el producto deseado.

7.5.2.2. Aminación intermolecular utilizando Sulfoimidamida

En un tubo limpio y seco se introducen 100 mg de tamices moleculares activados de 4 Å, Rh₂[(S)-nta]₄ (7,7 mg; 0,006 mmol) y (-)-S-N-(*p*-toluensulfonyl)-*p*-toluensulfonimidamida (S*NH₂) (78 mg; 0,24 mmol). Se tapa el tubo con un septum de goma y se purga con Ar. Posteriormente, se agrega 0,75 mL de 1,1,2,2-tetracloroetano y 0,25 mL de metanol, ambos anhidros y desgasificados, bajo atmósfera de Ar. Luego, la mezcla se agita por 5 min antes de agregar el sustrato natural (0,2 mmol). El tubo es llevado a -78 °C, y finalmente se agrega bis(*tert*-butilcarboniloxi)iodobenceno (115 mg, 0,28 mmol). La mezcla de reacción se agita a -35 °C por 3 días. Posteriormente, se diluye con DCM (3 mL), se remueven los tamices moleculares mediante filtración y se lleva a sequedad la solución filtrada. El residuo obtenido se purifica utilizando cromatografía en columna flash (PET:AcOEt en mezclas de polaridad creciente como fase móvil).

7.5.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos obtenidos

7.5.3.1. Compuesto 29



2-(((2,2,2-tricloroetoxi)sulfonil)amino)-ludartina

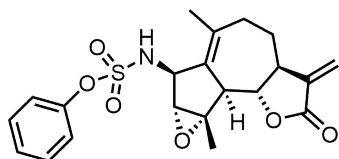
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +15,9$ (c 0,32; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 212,5 (3,40) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3198 (NH st); 1674 (C=O st); 1362 (SO₂-N st as); 1179 (SO₂-N st sim); 1068 (C-Cl st); 765 (C-Cl st); cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 6,12 (1H; d; 3,0; H-13a); 5,41 (1H; d; 3,0; H-13b); 5,38 (1H; d; 6,2; H-1'b); 4,70 (1H; s; H-1á); 4,60 (1H; d; 6,2; H-2); 3,74 (s an.; H-3); 3,62 (1H; t; 10,2; H-6); 3,15 (1H; d; 10,9; H-5); 2,79 (1H; t an.; 11,0; H-7); 2,33 (1H; t; 13,2; H-9a); 2,18 (1H; dd; 14,0; 5,5; H-9b); 2,12 (1H; d an; 13,4; H-8a); 1,94 (3H; s; H-14); 1,70 (3H; s; H-15), 1,34 (1H; t; 12,4; H-8b).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 169,6 (C; C-12); 143,8 (C; C-10); 138,7 (C; C-11); 134,6 (C; C-1); 93,4 (C; C-2'); 80,8 (CH; C-6); 78,0 (CH₂; C-1'); 66,8 (CH; C-4); 64,3 (CH; C-3); 56,9 (CH; C-2); 54,30 (CH; C-7); 51,7 (CH; C-5); 34,2 (CH₂; C-9); 25,4 (CH₂; C-8); 23,0 (CH₃; C-14); 18,5 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 471,9904 (calculado para C₁₇H₁₉Cl₃NO₆S; 470,0004).

7.5.3.2. Compuesto 30



2-N-fenilsulfonil-ludartina

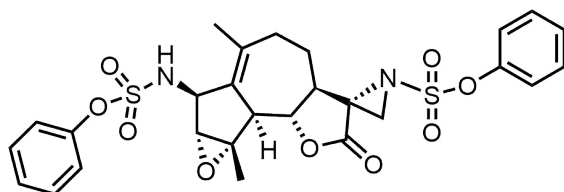
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 11,31$ (c 0,11; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 211 (3,27) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3239,88 (NH st); 1755 (C=O st); 1358,58 (SO₂-N st as); 1148 (SO₂-N st sim) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 7,33 (2H; t; 7,5; H-3'); 7,23 (2H; m; H-2'); 7,22 m (1H; m; H-4'); 6,03 (H; d; 3,1; H-13a); 5,41 (H; d; 5,7; NH); 5,30 (H; d; 3,1; H-13b); 4,54 (H; d; 5,7; H-2); 3,57 (H; t; 10,8; H-6a); 3,52 (H; s; H-3); 3,05 (H; d; 10,8; H-5); 2,69 (H; t an.; 10,9; H-7); 2,23 (H; t an.; 13,2; H-9a); 2,07 (H; m; H-9b); 2,02 (H; m; H-8a); 1,81 (3H; s; H₃-14); 1,60 (3H; s; H₃-15); 1,22 (H; m; H-8b).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 169,3 (C; C-12); 150 (C; C-1'); 143,6 (C; C-10); 138,8 (C; C-11); 134,9 (C; C-1); 130,0 (2CH; C-3'); 127,2 (CH; C-4'); 121,6 (2CH; C-2'); 118,5 (C; C-13); 80,6 (CH; C-6); 66,8 (C; C-4); 64,1 (CH; C-3); 57,2 (CH; C-2); 54,5 (CH; C-7); 51,9 (CH; C-5); 34,3 (CH₂; C-9); 25,4 (CH₂; C-8); 23,1 (CH₃; C-14); 18,5 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 416,1140 (calculado para C₂₁H₂₂NO₆S; 416,1173).

7.5.3.3. Compuesto 31



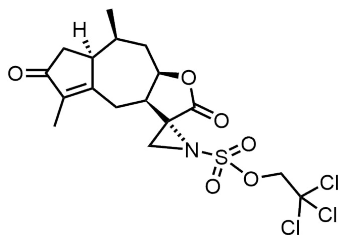
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 2,91$ (c 0,14; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 211, 5 (3,36) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3271 (NH st); 1783 (C=O st); 1366 (SO₂-N st as); 1148 (SO₂-N st sim) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ En un rango de 7,25–7,49 (H-2'; H-3'; H-4'); 4,84 (H; d; 5,2; NH); 4,61 (H; d 5,2; H-2a); 3,90 (H; t; 10,2; H-6a); 3,65 (H; s; H-3a); 3,14 (H; d; 11,9; H-5); 2,88 (H; t; 10,7; H-7); 2,84 (H; s; H-13b); 2,83 (H; s; H-13a); 2,24 (H; m; H-9a); 2,13 (H; td; 14,9; 5,4; H-9b); 1,94 (H; m; H-8a); 1,87 (3H; s; H₃-14); 1,66 (3H; s; H₃-15); 1,14 (H; m; H-8b).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 168,7 (C; C-12); en un rango de 121,7–149,5 (C-1'; C-2'; C-3'; C-4'); 144,1 (C; C-10); 134,3 (C; C-1); 79,1 (C; C-6); 66,3 (C; C-4); 64,3 (CH; C-3); 56,8 (CH; C-2); 51,6 (C; C-5); 50,0 (C; C-11); 49,6 (C; C-7); 36,8 (C; C-13); 33,8 (CH₂; C-9); 24,1 (CH₂; C-8); 22,5 (CH₃; C-14); 18,3 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 587,1139 (calculado para C₂₇H₂₇NO₉S₂; 587,1163).

7.5.3.4. Compuesto 32



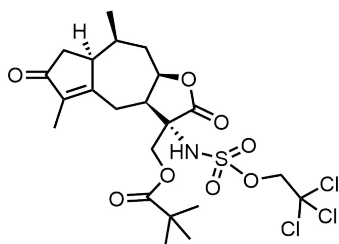
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 43,3$ (c 0,23; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 211,5 (3,36) nm; IR (película seca) ν_{\max} 1692,27 (C=O st); 1637,20 (C=O st); 1379 (SO₂-N st as); 1182,66 (SO₂-N st sim); 1085 (C-Cl st) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 5,20 (H; ddd; 12,2; 8,3; 3,3; H-8a); 4,92 (H; d; 10,8; H-1á); 4,88 (H; d; 10,8; H-1'b); 3,48 (H; ddd; 13,4; 8,3; 4,0; H-7); 3,10 (H; s; H-13a); 3,03 (H; m; H-1); 2,99 (H; s; H-13b); 2,88 (H; dd; 18,0; 3,4; H-6a); 2,71 (H; t an.; 17,0; H-6b); 2,42 (H; m; H-9a); 2,41 (H; m; H-2a); 2,33 (H; m; H-10); 2,30 (H; d; 18,9; H-2b); 1,72 (3H; s; H₃-15); 1,54 (H; m; H-9b); 0,75 (3H; d; 6,6; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 207,6 (C; C-3); 169,8 (C; C-12); 166,0 (C; C-5); 139,0 (C; C-4); 92,5 (C; C-2'); 80,3 (CH₂; C-1'); 78,9 (C; C-8); 49,6 (C; C-11); 41,9 (CH; C-1); 38,1 (CH₂; C-2); 37,0 (CH₂; C-9); 36,6 (CH₂; C-13); 33,8 (C; C-7); 30,1 (CH; C-10); 29,4 (C; C-6); 14,7 (CH₃; C-14); 8,1 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 469,9984 (calculado para C₁₇H₁₉Cl₃NO₆S; 470,0004).

7.5.3.5. Compuesto 33



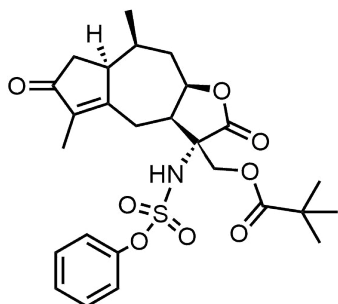
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 19,9$ (c 0,30; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 239,5 (3,62) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3239 (NH st); 1781 (C=O st); 1742 (C=O st); 1695 (C=O st); 1383 (SO₂-N st as); 1183,36 (SO₂-N st sim); 1091 (C-Cl st) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 5,13 (H; ddd; 15,3; 9,4; 1,9; H-8a); 4,72 (H; d; 11,0; H-1a); 4,69 (H; d; 11,0; H-1b); 4,53 (H; d; 11,6; H-13a); 4,39 (H; d; 11,6; H-13b); 3,64 (H; ddd; 13,6; 9,4; 3,3; H-7); 3,23 (dd; 17,3; 3,3; H-6a); 2,94 (H, m; H-1); 2,60 (H; t an.; 15,7; H-6b); 2,43 (H; m; H-9a); 2,43 (H; m; H-2a); 2,30 (H; m; H-10); 2,24 (H; m; H-2b); 1,73 (3H; s; H₃-15); 1,66 (H; m; H-9b); 1,24 (9H; s; H₃-3''), 0,75 (3H; d; 6,5; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 207,9 (C; C-3); 177,4 (C; C-1''); 172,7 (C; C-12); 167,2 (C; C-5); 139,1 (C; C-4); 93,2 (C; C-2'); 78,9 (CH₂; C-1'); 78,8 (C; C-8); 64,3 (CH₂; C-13); 44,4 (C; C-11); 42,0 (CH; C-1); 40,6 (CH; C-7); 39,0 (C; C-2''); 37,9 (CH₂; C-2); 35,8 (CH₂; C-9); 30,0 (CH; C-10); 27,2 (CH₃; C-3''); 25,9 (CH₂; C-6); 14,7 (CH₃; C-14); 8,33 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 572,0663 (calculado para C₂₂H₂₉Cl₃NO₈S; 572,0685).

7.5.3.6. Compuesto 34



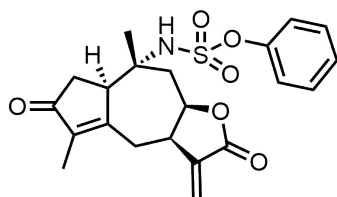
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} +24,9$ (c 0,33; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 239 (3,11) nm; IR (película seca) ν_{\max} 1769 (C=O st); 1738 (C=O st); 1668 (C=O st); 1379 (SO₂-O st as); 1169 (SO₂-O); 1149 (SO₂-N st sim) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 7,33 (2H; t; 7,8; H-3'); 7,24 (H; m; H-4'); 7,22 (2H; m; H-2'); 4,95 (H; t an.; 13,4; H-8a); 4,43 (H; d; 11,6; H-13a); 4,33 (H; d; 11,6; H-13b); 3,20 (H; ddd; 13,6; 9,6; 3,4; H-7); 3,09 (H; dd; 17,4; 2,7; H-6a); 2,72 (H; m; H-1); 2,34 (H; m; H-2a); 2,49 (H; t an.; 15,7; H-6b); 2,33 (H; m; H-9a); 2,19 (H; m; H-10); 2,16 (H; m; H-2b); 1,66 (3H; s; H₃-15); 1,56 (H; m; H-9b); 1,15 (9H; s; H₃-3''); 0,66 (3H; d; 6,6; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 208,2 (C; C-3); 177,7 (C; C-1''); 172,5 (C; C-12); 167,8 (C; C-5); 149,8 (C; C-1'); 138,6 (C; C-4); 130,4 (CH; C-3'); 127,9 (CH; C-4'); 122,2 (CH; C-2'); 79,0 (CH; C-8); 64,5 (CH₂; C-13); 42,2 (CH; C-1); 41,6 (CH; C-7); 38,2 (C; C-2''); 38,1 (CH₂; C-2); 36,1 (CH₂; C-9); 30,3 (CH; C-10); 27,4 (CH₃; C-3''); 26,2 (CH₂; C-6); 15,1 (CH₃; C-14); 8,6 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 518,1887 (calculado para C₂₆H₃₂NO₈S; 518,1854).

7.5.3.7. Compuesto 35



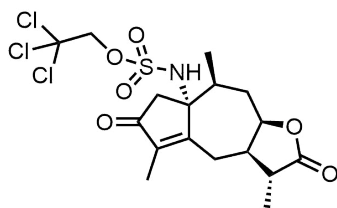
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 9,34$ (c 0,44; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 237,5 (3,14) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3228 (NH st); 1761 (C=O st); 1694 (C=O st); 1381 (SO₂-O st as); 1192 (SO₂-O st sim) ; 1150 (SO₂-N st sim) cm^{-1} .

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 7,34 (2H; m; H-3'); 7,25 (2H; m; H-2'); 7,24 (H; m; H-4'); 6,35 (H; d; 2,2; H-13a); 5,68 (H; d; 2,2; H-13b); 5,28 (H; ddd; 12,3; 8,5; 2,8; H-8a); 3,48 (H; m; H-7); 3,34 (H; m; H-1); 2,89 (H; m; 9a); 2,87 (H; m; H-6a); 2,60 (H; dd; 18,4; 13,4; H-6b); 2,40 (2H; m; H₂-2); 1,84 (H; dd; 15,3; 12,3; H-9b); 1,69 (3Hs; H₃-15); 1,13 (3H; s; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 206,3 (C; C-3); 168,8 (C; C-12); 164,9 (C; C-5); 150,1 (C; C-1'); 140,4 (C; C-4); 138,3 (C; C-11); 130,4 (CH; C-3'); 127,4 (CH; C-4'); 124,5 (CH₂; C-13); 121,5 (CH; C-2'); 75,7 (CH; C-8); 60,5 (C; C-10); 47,9 (CH; C-1); 41,6 (CH₂; C-9); 38,2 (CH; C-7); 37,2 (CH₂; C-2); 32,4 (CH₂; C-6); 22,6 (CH₃; C-14); 8,81 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 416,1177 (calculado para C₂₁H₂₂NO₆S; 416,1173).

7.5.3.8. Compuesto 36



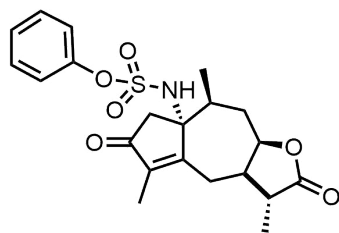
Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} + 1,59$ (c 0,33; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 231,5 (3,30) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3235 (NH st); 1768 (C=O st); 1711 (C=O st); 1382 (SO₂-O st as); 1354 (SO₂-N st as); 1180 (SO₂-N st sim) 1046 (C-Cl) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 4,54 (H; m; H-8a); 4,54 (H; m; H-1á); 2,91 (H; dd; 14,4; 2,8; H-6a); 2,84 (H; d; 18,2; H-2a); 2,74 (H; dd; 14,4; 4,5; H-6b); 2,65 (H; m; H-7); 2,34 (H; d; 18,2; H-2b); 2,17 (H; m; H-11); 1,88 (H; m; H-10); 1,79 (3H; s; H₃-15); 1,32 (H; m; H-9b); 1,32 (3H; d; 6,9; H₃-13); 1,22 (3H; d; 6,9; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 203,4 (C; C-3); 177,6 (C; C-12); 161,3 (C; C-5); 147,3 (C; C-4); 93,2 (C; C-2'); 79,5 (C; C-8); 78,0 (C-1'); 70,1 (C; C-1); 45,0 (C; C-7); 42,0 (CH₂; C-2); 35,3 (CH; C-10); 34,7 (CH; C-11); 33,9 (CH₂; C-9); 23,0 (CH₂; C-6); 18,2 (CH₃; C-14); 13,7 (CH₃; C-13); 9,6 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 472,0103 (calculado para C₁₇H₂₁Cl₃NO₆S; 472,0161).

7.5.3.9. Compuesto 37



Sólido amorfo; $[\alpha]_D^{21} - 1,86$ (c 0,2; acetona); λ_{\max} (log ϵ) 232,5 (3,63) nm; IR (película seca) ν_{\max} 3232 (NH st); 1769 (C=O st); 1708 (C=O st); 1354 (SO₂-N st as); 1149 (SO₂-N st sim) cm⁻¹.

RMN-¹H (CDCl₃; 400,13 MHz) δ 7,30 (2H; m; H-3'); 7,20 (2H; m; H-3'); 7,07 (2H; d an.; 7,8; H-2'); 4,45 (H; ddd; 11,4; 7,6; 4,4; H-8a); 2,80 (H; d; 18,1; H-2a); 2,78 (H; m; H-6a); 2,68 (H; dd; 14,3; 4,4; H-6b); 2,55 (H; m; H-7); 2,27 (H; d; 18,1; H-2b); 2,10 (H; m; H-11); 1,84 (H; m; H-10); 1,73 (3H; s; H₃-15); 1,58 (H; dd; 14,3; 4,1; H-9a); 1,25 (H; m; H-9b); 1,23 (3H; d; 6,9; H₃-13); 1,11 (3H; d; 6,9; H₃-14).

RMN-¹³C (CDCl₃; 100,03 MHz) δ 204,0 (C; C-3); 177,6 (C; C-12); 162,0 (C; C-5); 149,8 (C; C-1'); 143,2 (C; C-4); 129,9 (CH; C-3'); 127,0 (CH; C-4'); 121,2 (CH; C-2'); 79,6 (CH; C-8); 70,1 (C; C-1); 44,9 (CH; C-7); 41,9 (CH₂; C-2); 35,1 (CH; C-10); 34,7 (CH; C-11); 33,8 (CH₂; C-9); 22,7 (CH₂; C-6); 17,7 (CH₃; C-14); 13,2 (CH₃; C-13); 9,0 (CH₃; C-15).

HRESIMS m/z [M-H] 418,1230 (calculado para C₂₁H₂₄NO₆S; 418,1330).

Parte II: Conclusiones parciales

Se realizó el estudio fitoquímico de *Senecio volckmannii* (Asteraceae), especie nativa del NOA, en búsqueda de sesquiterpenos tipo eremofilano y alcaloides pirrolizidínicos. Se aislaron y caracterizaron un total de 17 compuestos: nueve nuevos sesquiterpenos junto a ocho compuestos conocidos. Los compuestos con estructura novedosa presentaron esqueleto tipo eremofilano, nor-sesquiterpeno y lactona sesquiterpénica, esqueletos típicos encontrados en otras especies del mismo género y en el género *Ligularia* (Asteraceae) (remitirse a la Figura 5.7). Cabe destacar que, si bien los AP han sido reportados en la mayoría de las especies de *Senecio*, en este estudio fitoquímico no se encontraron evidencias de que estuvieran presentes.

Por otra parte, los resultados aquí obtenidos acompañan el análisis quimiotaxonómico realizado por [Zhao et al. \(2015\)](#). Estos autores investigaron el perfil de sesquiterpenos de 149 especies del género *Senecio* con el objetivo de conocer su valor como marcadores quimiotaxonómicos. Siete secciones químicas principales fueron reconocidas dentro del género *Senecio* en base al perfil fitoquímico de las especies analizadas, realizando así una clasificación química de las mismas. En este sentido, la especie *Senecio volckmannii* fue analizada por [Zhao et al. \(2015\)](#) (subnom. *Senecio rosmarinus*), siendo colocada en la sección "Eremofilanólido", sección que incluye especies que contienen sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas tipo eremofilano.

Dado que para algunos compuestos aislados su estructura no pudo ser determinada inequívocamente mediante parámetros clásicos de RMN tales como el análisis de las constantes de acoplamiento y de los NOE observados, se llevó a cabo la elucidación estructural utilizando mediciones de RDCs y cálculos computacionales bajo el protocolo CASE-3D. Así, con la aplicación de estos recursos se pudo arribar con precisión y exactitud a la estructura de 6 sesquiterpenos nuevos. Estos resultados resaltan la utilidad que tienen estas herramientas para evitar errores en la elucidación estructural de moléculas complejas.

Finalmente, mediante un trabajo de derivatización de guaianólidos aislados en abundantes cantidades, se llevaron a cabo reacciones de aminación *late-stage* con el propósito de obtener una pequeña quimioteca en donde se pretendió variar el patrón de sustitución del esqueleto guaianólido, con el fin último de probar actividad biológica y poder establecer relaciones estructura-actividad. Las reacciones de aminación de enlaces C-H catalizadas por Rh(II) demostraron ser una herramienta útil para acceder a derivados funcionalizados en posiciones difícilmente accesibles mediante síntesis convencional. En este contexto, y desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, la eficiencia global de la reacción en términos de rendimiento químico se vuelve

menos importante que la exploración del espacio químico biológicamente relevante.

Se obtuvieron 9 compuestos aminados a partir de tres guaianólidos: L, Ach y DHAch (remitirse a las Figuras 7.15, 7.22 y 7.24). Se pudieron aminorar posiciones secundarias, alílicas y/o terciarias de los sustratos naturales de partida. Además, se observó la formación de aziridinas, resultado esperado dada la competencia que existe entre la reacción de aminación y de aziridinación para sustratos con dobles enlaces. Por sobre todos los compuestos obtenidos se destacan aquellos cuyo sustrato de partida fue DHAch. Estos productos muestran la aminación de un enlace C-H cuyo C es cabeza de puente. Como es de esperar para reacciones de este tipo, en el caso de sustratos deficientes en electrones y estéricamente condicionados, se obtienen, generalmente, rendimientos bajos de aminación tal como vemos en los resultados aquí presentados. Sin embargo, los rendimientos aislados para cada producto obtenido en este trabajo se acercan a aquellos alcanzados en la aminación de otros productos naturales ([Chiappini y Mack, 2018](#)). La reacción de aminación intermolecular es particularmente desafiante y, hasta ahora, este enfoque ha sido poco utilizado en derivatización de productos naturales y raramente de guaianólidos. En este contexto, la contribución aquí realizada puede considerarse la primera aplicación de esta metodología a la aminación de enlaces C(sp³)-H en guaianólidos.

Parte III

Actividad biológica de metabolitos secundarios y derivados

Capítulo 8

Actividad antiproliferativa

*“Amar a alguien es decirle:
tú no morirás jamás.”*

Gabriel Marcel

Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo son fruto de una colaboración con el Dr. José M. Padrón (Universidad de La Laguna, La Laguna, Tenerife, España) y con la Dra. Carina Casero (Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV-CONICET, Argentina).

8.1. Introducción

Cáncer es un término colectivo utilizado para hacer referencia a un grupo de enfermedades que se caracterizan por la pérdida de control del crecimiento, división y propagación de un grupo de células, lo que lleva a un tumor primario que invade y destruye los tejidos adyacentes. También puede propagarse a otras regiones del cuerpo a través de un proceso conocido como metástasis, que es la causa del 90 % de las muertes por cáncer. El cáncer sigue siendo una de las enfermedades más difíciles de tratar y es responsable del 16,3 % de todas las muertes en todo el mundo, y esta incidencia está aumentando debido al envejecimiento de la población en la mayoría de los países, pero especialmente en los países desarrollados¹.

El cáncer es causado por anomalías del material genético de las células afectadas. La tumorigénesis es un proceso de varios pasos que implica la acumulación de mutaciones sucesivas en oncogenes y genes supresores que desregulan el ciclo celular. Los eventos tumorigénicos incluyen cambios a pequeña escala en secuencias de ADN, como mutaciones puntuales; aberraciones cromosómicas a gran escala, tales como translocaciones, deleciones y amplificaciones; y cambios que afectan la estructura de la cromatina y están asociados con el control epigenético disfuncional, como la metilación aberrante de ADN o la acetilación de histonas (Avendaño y Menéndez, 2008).

Se estima que los casos de cáncer a nivel mundial han aumentado a 18,1 millones de casos nuevos y a 9,6 millones de muertes en 2018. Uno de cada 5 hombres y una

¹<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

de cada 6 mujeres en todo el mundo desarrollan cáncer durante su vida, y uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres mueren a causa de esta enfermedad. En todo el mundo, el número total de personas que viven dentro de los 5 años de un diagnóstico de cáncer, llamado período de prevalencia de 5 años, se estima en 43,8 millones (Bray et al., 2018). Según las últimas estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) en base a datos disponibles a nivel mundial para el año 2018, Argentina presenta una tasa de incidencia de 212 casos por cada 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción de piel no melanoma), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta, ubicándola a su vez en el séptimo lugar en Latinoamérica².

La terapia contra el cáncer se basa en la cirugía y la radioterapia, que son, cuando es posible, intervenciones regionales bastante exitosas; y en la quimioterapia sistémica. Aproximadamente la mitad de los pacientes con cáncer no se curan con estos tratamientos y pueden obtener solo una supervivencia prolongada o ningún beneficio. El objetivo de la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos para el cáncer actualmente en uso clínico es matar las células tumorales malignas mediante la inhibición de algunos de los mecanismos implicados en la división celular. En consecuencia, los compuestos antitumorales desarrollados a través de este enfoque son citostáticos o citotóxicos. Cabe destacar que, el conocimiento de la biología del tumor se ha disparado en las últimas décadas y esto puede allanar el camino para fármacos contra el cáncer más activos y dirigidos (Bradbury, 2007).

La quimioterapia se basa fundamentalmente en el uso de fármacos con actividad antiproliferativa, siendo los compuestos más utilizados hoy los que pertenecen al grupo de los citotóxicos. La mayoría de los cánceres carecen de una única diana vital y específica que los haga sensibles a un fármaco en particular sin atacar a las células sanas. Por ello, la especificidad en la quimioterapia contra el cáncer solo puede conseguirse limitadamente, explotando las sutiles diferencias existentes entre las células cancerosas y las normales. Existen dos grupos de agentes quimioterapéuticos: los que actúan sobre el ADN celular, como los inhibidores o antimetabolitos de la síntesis de ADN que disparan la apoptosis y los que, por el contrario, no dañan el ADN sino que actúan sobre componentes citoplasmáticos como el citoesqueleto y los microtúbulos, estructuras esenciales para la división celular. Los tratamientos contra el cáncer basados en la combinación de fármacos, con diferentes dianas celulares y mecanismos de acción farmacológica, incrementan la especificidad de acción y la efectividad de la quimioterapia. Ya en la década de los 60, el uso combinado de fármacos citotóxicos demostró ser mucho más efectivo, tanto para el tratamiento de cánceres metastásicos como para evitar la reaparición de tumores en pacientes a los que se les ha extirpado un tumor.

En los últimos años se ha producido una revolución en el tratamiento del cáncer, la terapia de diana específica (*targeted-therapy*). Este nuevo enfoque ha surgido debido a los estudios de biología celular y molecular de tumores, que ha permitido identificar nuevas dianas de acción citotóxica en células cancerosas con potencial interés terapéutico. Las nuevas dianas identificadas son en su mayoría elementos pertenecientes a las redes de señalización intercelular encargadas del control de la proliferación, supervivencia y

²<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

muerte celular, que están alteradas en las células tumorales.

8.2. Productos naturales con actividad citotóxica

En la década de los 50, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) de los EE.UU inició un programa de búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos de plantas. Más de 400.000 compuestos, tanto naturales como sintéticos, fueron evaluados por su actividad anticancerígena, incluyendo cerca de 180.000 compuestos derivados de microorganismos y 114.000 extractos de plantas. Este programa representó un esfuerzo combinado de diversas organizaciones de investigación en el área de la química medicinal, industrias y centros, tanto farmacéuticos como químicos (Ma y Wang, 2009).

A partir de entonces, se han aprobado más de 20 fármacos anticancerígenos procedentes de productos naturales o derivados semi-sintéticos de estos, para su uso clínico. Entre éstos podemos nombrar a: Trabectedin (2007), Romidepsin (2010), Trastuzumab-DM1 (2013) y Ceritinib (2014) desarrollados en los últimos años. Recientemente, se ha publicado que más del 70 % de las nuevas entidades químicas aprobadas como fármacos anticancerígenos entre 1940-2014, son productos naturales, análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos (Newman y Cragg, 2016). En definitiva estos datos reafirman claramente la importancia y la utilidad que los productos naturales y sus derivados tienen en el diseño de drogas anticancerígenas.

Entre los productos naturales con potencial uso clínico, podemos destacar diversos alcaloides (Tringali, 2001), como la **camptotecina**, un alcaloide pirano-indolizinoquinolina, aislado por primera vez de la madera y la corteza de *Camptotheca acuminata*. El **topotecan**, un derivado de la camptotecina, recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de mama y ovario, siendo su mecanismo de acción la inhibición de la topoisomerasa I, esencial en el proceso de replicación del ADN. Por otra parte, la camptotecina es capaz de inhibir el fenotipo MDR mediado por la glicoproteína P (P-gp) (Chauvier et al., 2002). La 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (**SN-38**) presentó actividad frente al carcinoma de pulmón y el tratamiento combinado de **SN-38** con otros agentes anticancerígenos ha dado excelentes resultados en el tratamiento del carcinoma de pulmón de células no-pequeñas. Un derivado de la camptotecina, el **irinotecan** se usa en clínica para el tratamiento del cáncer de colon y recto (Srivasta et al., 2005).

Por otro lado, **ellipticina** es un alcaloide antineoplásico presente en numerosas especies de la familia Apocyanaceae. Diversos derivados de la ellipticina que poseen el núcleo piridocarbazol, han demostrado una significativa selectividad en líneas tumorales de leucemia, adenocarcinoma y sarcoma. Estos compuestos actúan como agentes intercalantes del ADN, lo que favorece su estructura planar, impidiendo la síntesis del ADN y ARN. Las harringtoninas son un grupo de alcaloides con núcleo de cefalotaxina, aislados de diversas especies de *Cephalotaxus*, de las cuales el más activo de ellos, la **homoharringtonina**, ha sido seleccionada pasado los estudios clínicos y se comercializa como mepesuccinato de omacetaxina, indicada para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (Cragg y Newman, 2005).

La **colchicina** y alcaloides relacionados se han aislado del bulbo o semillas de *Colchicum autumnale* y de algunas especies de *Liliaceae*. La colchicina no se utiliza como

antitumoral debido a su elevada toxicidad, pero es empleada como referencia en la evaluación de otros posibles fármacos con mecanismo similar, inhibidor de las tubulinas y los microtúbulos. Un derivado, la **democolchicina** es usado actualmente para el tratamiento de la leucemia mielocítica (Unnati et al., 2013).

Los **alcaloides de la vinca**, aislados de *Catharanthus roseus*, son un grupo de metabolitos (vincristina, vinblastina, leurosina y leurosidina) extremadamente activos. Estos agentes actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Se utilizan principalmente en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de una gran variedad de tipos de cáncer, como por ejemplo leucemias, linfomas, cáncer testicular, cáncer de mama, de pulmón y el sarcoma de Kaposi (Haque y Saba, 2010; Ma y Wang, 2009).

La **podofilotoxina** es un lignano fenilpropanoide, aislado de *Podophyllum peltatum*. Los primeros ensayos de este metabolito en humanos no mostraron una respuesta significativa. Modificaciones posteriores, dieron lugar a metabolitos más activos, destacando el **etopósido**, empleado actualmente en clínica, que fue el primer inhibidor de la topoisomerasa II, enzima implicada en la replicación del ADN durante el ciclo celular (Gordaliza et al., 2004).

El **taxol**, diterpeno que se obtiene de diversas especies de *Taxus*, presenta mayor actividad en tumores sólidos que en leucemias, utilizándose en el tratamiento del cáncer de ovario y mama. Cabe destacar que en la actualidad existen 23 taxanos en fase de desarrollo preclínico como potenciales fármacos antitumorales.

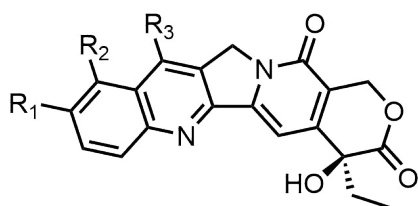
El uso de agentes químicos citotóxicos que destruyan las células cancerosas han constituido la gran esperanza en el tratamiento del cáncer desde hace algunas décadas. Los agentes quimioterapéuticos deben actuar con una cierta especificidad, provocando una situación en la que la dosis empleada suponga más beneficio que los efectos secundarios tóxicos. Así, el ensayo inicial más común de la actividad anticancerígena de un compuesto o un extracto, es su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales en cultivo.

8.3. Antecedentes

A continuación se describirán los principales antecedentes de actividad antiproliferativa para los tres grupos de compuestos naturales que fueron de interés para este trabajo de tesis doctoral.

8.3.1. Actividad antiproliferativa de withanólidos

Entre algunos estudios destacados en actividad antiproliferativa de withanólidos podemos encontrar los siguientes. Del extracto metanólico de *Tubocapsicum anomalum* se aislaron 17 withanólidos, de los cuales, tubocapsenólido A (Figura 8.2) resultó el más potente por su actividad citotóxica frente a distintas líneas celulares tumorales con valores de IC_{50} inferiores a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hsieh et al., 2007). En un trabajo más reciente se estudió su mecanismo de acción en células MDAMB-231 receptores negativos de estrógeno, observándose que induce apoptosis y la detención del ciclo celular, efectos que están relacionados con la inhibición de las proteínas de choque térmico Hsp90 y Hsp70. Los autores consideran que ésta puede ser una estrategia novedosa en el tratamiento del



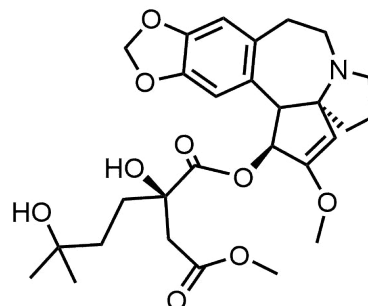
Camptotheca acuminata

$R_1=R_2=R_3=H$ **Camptotecina**

$R_1=CH_3N(CH_3)_2$, $R_2=R_3=H$ **Topotecan**

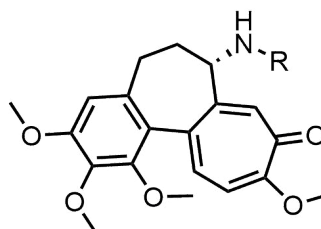
$R_1=H$, $R_2=COO(C_5H_{10}N)_2$, $R_3=CH_2CH_3$ **Irinotecan**

$R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=CH_2CH_3$ **SN-38**



especies de *Cephalotaxus*

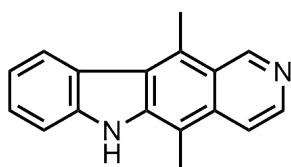
Harringtonina



Colchicum autumnale

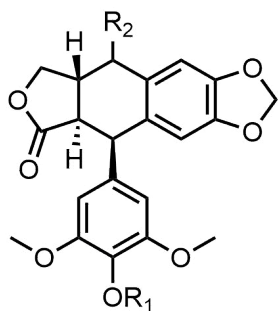
$R=CH_3CO$ **Colchicina**

$R=CH_3$ **Democolchicina**



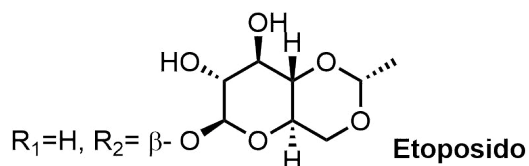
especies de Apocynaceae

Ellipticina

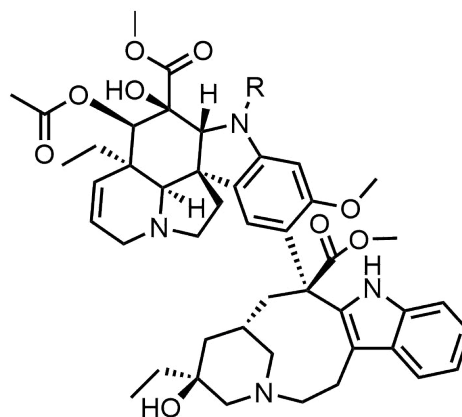


Podophyllum peltatum

$R_1=CH_3$, $R_2=\alpha-OH$ **Podophyllotoxina**



$R_1=H$, $R_2=\beta-O$ **Etoposido**



Catharanthus roseus

$R=Me$ **Vinblastina**

$R=CHO$ **Vincristina**

Figura 8.1: Productos naturales aislados de plantas superiores con actividad anticancerígena

cáncer (Chen et al., 2008).

La withaferina A (Figura 8.2), compuesto mayoritario de *Withania somnifera*, ha mostrado actividad citotóxica frente a una gran variedad de líneas celulares tumorales (Jayaprakasam et al., 2003). Se ha demostrado que suprime el factor NF- κ B que activa y regula la expresión de genes en células cancerígenas (Ichikawa et al., 2006), así mismo, se ha descrito que este compuesto actúa como inhibidor proteosomal, lo que contribuye a la actividad antitumoral *in vivo* (Yang et al., 2007). Se ha descrito también la activación selectiva de apoptosis por parte de la withaferina A en células de cáncer de próstata (Srinivasan et al., 2007) y de leucemia (Malik et al., 2007).

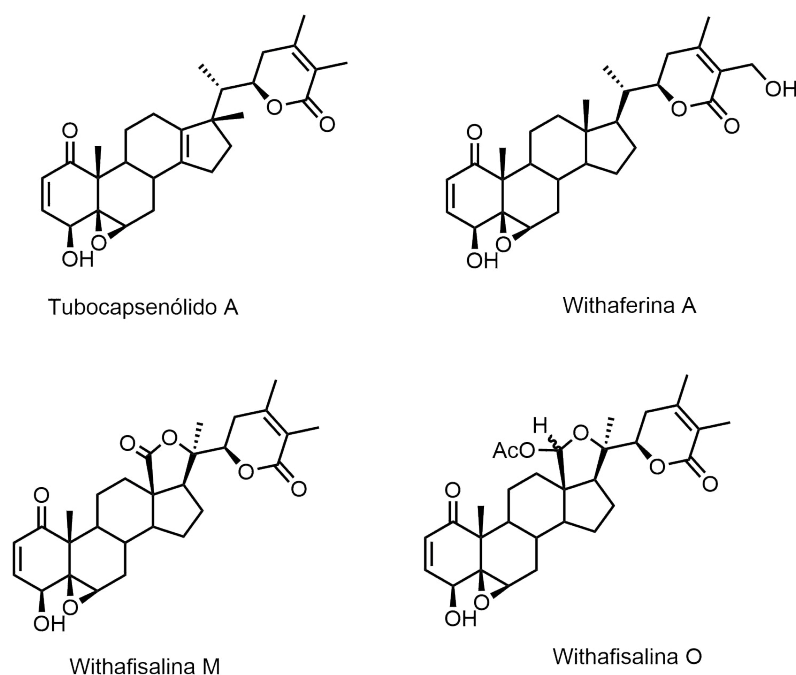


Figura 8.2: Ejemplos de withánolidos que presentan actividad antiproliferativa

Veras et al. (2004a) informaron por primera vez sobre la citotoxicidad de withanólidos con esqueleto tipo withafisalina. Estos autores evaluaron el potencial citotóxico del extracto etanólico de las hojas de *Acnistus arborescens* y luego aislaron las withafisalinas M y O (Figura 8.2), activas contra el cáncer de pulmón humano (Lu1), el cáncer de próstata humano dependiente de hormonas (LNCaP) y el cáncer de mama humano dependiente de estrógenos (MCF7); mostrando potentes habilidades citotóxicas (Veras et al., 2004a,b; Rocha et al., 2006).

Se han realizado numerosos estudios más sobre la actividad antitumoral de los withanólidos. La mayoría de los withanólidos exhiben actividad citotóxica frente a distintas líneas celulares de cáncer, pero usualmente no son selectivas y de moderada potencia (dentro del rango micromolar). Los estudios previos de actividad citotóxica y las relaciones estructura actividad hasta ahora realizadas (ver Figura 8.3), han indicado que la citotoxicidad depende principalmente del patrón de sustitución de los anillos A y B, con la presencia de una cetona α,β -insaturada en el anillo A y un grupo epóxido $5\beta,6\beta$ o un

doble enlace Δ^{5-6} siendo importantes para mostrar actividad antiproliferativa (Zhang et al., 2014, 2012; Machin et al., 2010).

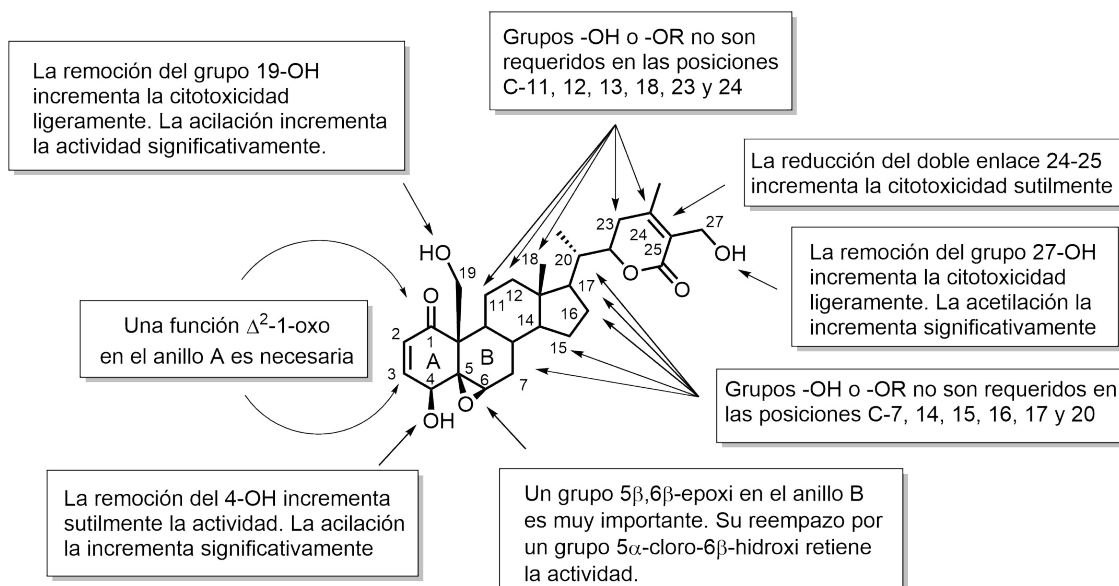


Figura 8.3: Relaciones estructura-actividad sobre actividad antiproliferativa en withanólidos. Fuente (Zhang et al., 2012)

8.3.2. Actividad antiproliferativa de sesquiterpenos tipo eremofilano

En los últimos años, muchos investigadores han informado que los sesquiterpenos tipo eremofilano poseen actividad anticancerígena potencial al inhibir la proliferación de varias células cancerosas *in vitro* (Hou et al., 2014). Wang et al. (1991) reportaron la presencia de este tipo de metabolitos secundarios en las partes aéreas de *Ligularia veitchiana* y evaluaron la actividad citotóxica de los mismos. Los autores encontraron que estos metabolitos poseen una actividad moderada frente a células de cáncer de pulmón (A549) y de estómago (BCG823). De *Senecio oldhamianus* fue aislado un nuevo sesquiterpeno tipo eremofilano con actividad citotóxica sobre dos líneas celulares tumorales humanas: células de hepatoma humano SMMC-7721 y en la línea celular HO-8910, con valores de IC_{50} de 24,9 μM y 19,4 μM respectivamente (Wang et al., 2004). 3 α -agenloiloxi-7 β H-8-oxoeremofila-9,11(13)-dien-12-al aislado de *Ligularia lingiana* mostró una fuerte actividad (IC_{50} 0,05; 0,44; y 0,31 μM) contra líneas tumorales humanas HeLa, HL60 y Jurkat (Saito et al., 2014). A partir de las partes aéreas de *Ligularia sagitta* se obtuvieron un grupo de sesquiterpenos tipo eremofilano. Uno de ellos, sagittacin E, presentó actividad citotóxica moderada frente a tres líneas de cáncer humano: HL-60 (leucemia aguda), SMMC-7721 (cáncer hepático) y HeLa (carcinoma cervical), con un IC_{50} de 13 μM en los tres casos (Chen et al., 2014).

Estos datos sugieren que los sesquiterpenos de esta clase pueden tener una actividad citotóxica de amplio espectro pero moderada.

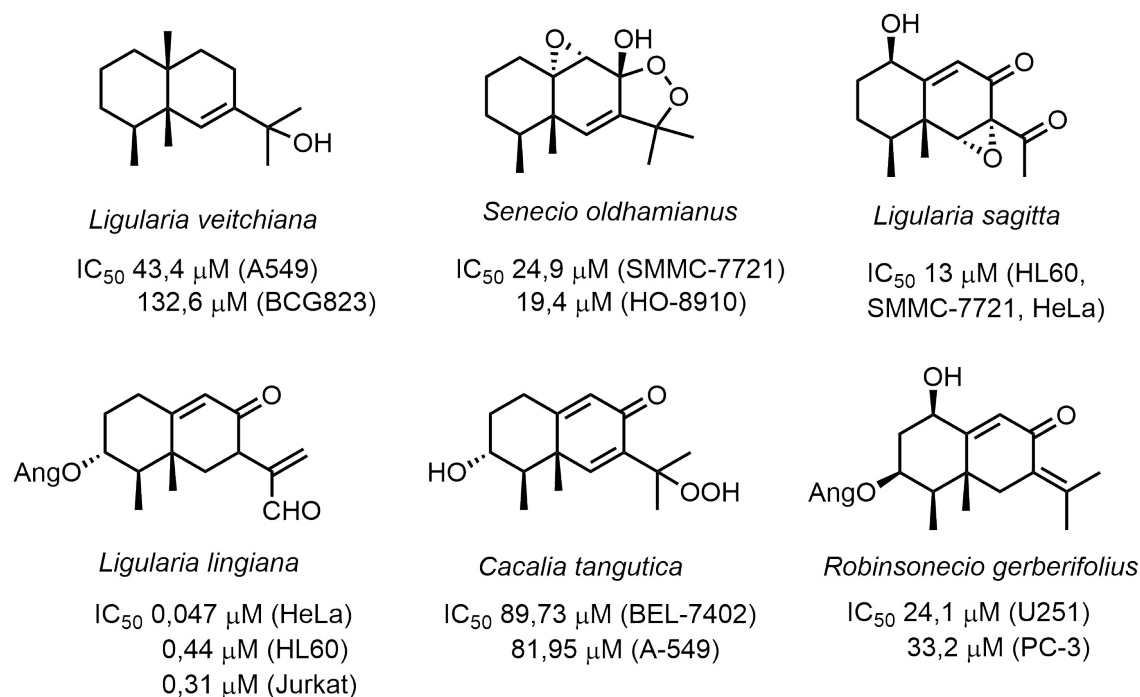


Figura 8.4: Algunos ejemplos de sesquiterpenos tipo eremofilano con actividad anticancerígena

8.3.3. Actividad antiproliferativa de lactonas sesquiterpénicas

Las LS presentan una gran diversidad estructural y una amplia gama de propiedades biológicas, con potentes efectos antiinflamatorios y anticancerígenos que son de particular interés. La actividad biológica de las SL se atribuye principalmente al grupo α -metileno- γ -lactona (α M γ L) en su estructura. El grupo α M γ L actúa como un aceptor de Michael y reacciona con nucleófilos (grupos sulfhidrilo o amino) en enzimas, factores de transcripción y otras proteínas, alquilándolos irreversiblemente (ver Figura 8.5) (Arantes et al., 2011; Schmidt, 2006). La alquilación interrumpirá la función adecuada de la macromolécula biológica debido a cambios estéricos y químicos. Este se considera el principal mecanismo de acción de las LS que subyace a su citotoxicidad. También explica el daño de la pared celular en microbios y la prevalencia de dermatitis de contacto en humanos. Sin embargo, otros factores pueden influir en la potencia de las LS: número de grupos alquilantes (presencia de un anillo ciclopentenona α,β -insaturado), lipofilia, geometría molecular y tamaño, entorno químico, otros grupos funcionales cercanos al α M γ L y a la naturaleza del grupo sulfhidrilo con el que reaccione (Ghantous et al., 2010).

Se ha llevado a cabo una extensa investigación para caracterizar los mecanismos moleculares de las actividades anticancerígenas de estos compuestos y su uso potencial como agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos (Zhang et al., 2005). Se ha demostrado que el tratamiento de células tumorales con LS interrumpe su estado redox y causa estrés oxidativo, con el inicio posterior de la vía de apoptosis intrínseca (Sun et al., 2010). Otros estudios han demostrado que uno de los *targets* comunes de las LS

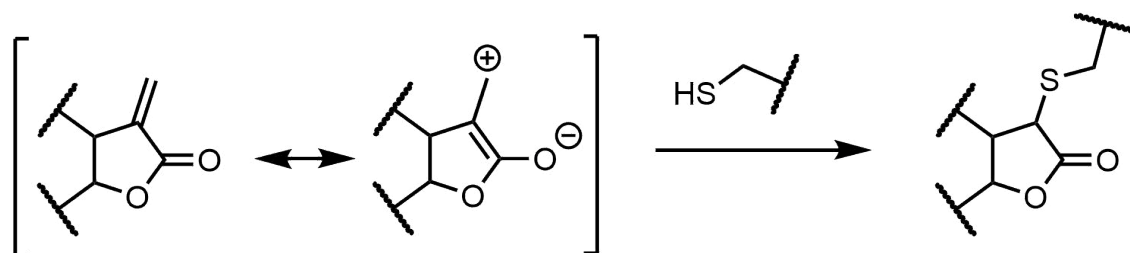


Figura 8.5: Mecanismo de reacción para la adición de Michael de un grupo sulfidrilo sobre una α -metilen- γ -lactona

es inhibir la vía del Factor Nuclear κ B (NF- κ B). La inhibición de la vía de señalización del NF- κ B es uno de los mecanismos más estudiados por los cuales las LS producen sus efectos anticancerígenos. El NF- κ B en las células cancerosas tiene un papel importante en la inhibición de la apoptosis, la inducción de metástasis, la proliferación celular, la transformación celular, la invasión, la resistencia a la quimioterapia y la resistencia a la radioterapia (Kreuger et al., 2012). Siedle et al. (2004) realizaron un estudio exhaustivo sobre la importancia estructural de varias LS en términos de capacidad para inhibir la expresión del factor nuclear NF- κ B. Descubrieron, basándose en el análisis de más de 100 LS para seis familias, que la familia de los guaianólidos muestra la mayor eficacia, y también que la presencia de un grupo carbonilo α , β -insaturado es más importante para la citotoxicidad que los grupos α M γ L. Esto también es una consecuencia de su capacidad para la adición de Michael con proteínas y enzimas que contienen cisteína. La evidencia sugiere que dos grupos de cisteína (Cys 38 y Cys 120) en la subunidad p65 son los objetivos de la acción inhibitoria (Chen et al., 1998; García-Piñeres et al., 2001; Ly β et al., 1998). Otros mecanismos de acción que se pueden señalar son la modulación epigenética de la expresión génica, inhibición de la bomba ATPasa-Ca²⁺ del retículo sarcoendoplasmático y la vía de señalización p53 (Anesini et al., 2018).

Al principio, las LS no despertaron ningún interés en la industria farmacéutica porque con frecuencia son altamente citotóxicas. Sin embargo, la posibilidad de introducir modificaciones estructurales para mejorar sus propiedades farmacológicas (eficacia, selectividad, solubilidad y toxicidad) ha modificado radicalmente el panorama y ha hecho posible su aplicación terapéutica. En este sentido, las modificaciones simples realizadas en el anillo de lactona (apertura, dehidrogenación) o en los grupos funcionales (OH, COOH) prodían ser una estrategia para mejorar las actividades biológicas o reducir su toxicidad (Adekenov, 2016; Khlebnikov et al., 2019).

Actualmente, algunas LS están siendo evaluadas en ensayos clínicos para terapias contra el cáncer. Como ejemplos alusivos podemos citar: **Tapsigargina** es un potente inhibidor no competitivo de la ATPasa-Ca²⁺ del retículo sarcoendoplasmático que conduce a apoptosis. Un profármaco de tapsigargina, bajo el nombre de Mipsagargin, se ha desarrollado para atacar los vasos sanguíneos de las células cancerosas y se encuentra en ensayos clínicos de fase II (Doan y Christensen, 2015). La **artemisinina** es un compuesto antimalárico, originalmente extraído para este uso en la década de 1970 por Youyou Tu, quien recibió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2015 por su trabajo. Este compuesto también ha demostrado actividad anticancerígena y se encuentra en ensayos

clínicos para el cáncer de mama y de colon. **Arglabina** es una LS aislada por primera vez de *Artemisia glabella* una especie nativa de Kazajstán, que muestra actividad antitumoral prometedora contra diferentes líneas de tumores. Se han obtenido muchos derivados, y los que tienen átomos de bromo o de cloro y un epóxido en C3-C4 muestran una mejora en la actividad antitumoral. Dimetilamino-arglabina, uno de estos derivados, se ha utilizado para tratar los cánceres de pulmón, hígado y ovario; y se encuentra bajo estudio clínico en fase I y II. Este compuesto ha sido patentado en EEUU y ha sido registrado como medicamento antitumoral en la Federación Rusa, Kazajstán, Uzbekistán, Tayikistán, la República de Kirguiz y Georgia. Arglabina actúa como antitumoral por un mecanismo diferente a la artemisinina, la tapsigargina y el partenólido. Inhibe la farne-siltransferasa, que es una enzima que se ha demostrado que participa en la formación de tumores malignos.

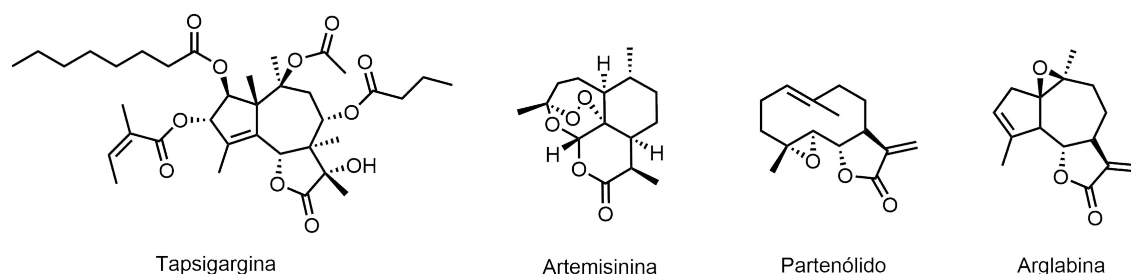


Figura 8.6: Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas con actividad antiproliferativa

8.4. Resultados y Discusión

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los metabolitos aislados de *Senecio volckmanni*, *Eriolarynx iochromoides* y de los guaianólidos 11,13-dehidroachalensólido (DHACH), achalensólido (ACH) y ludartina (L) junto con sus derivados, mediante una colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. José M. Padrón, en BioLab, Instituto de Bioorgánica “Antonio Gonzalez” (IUBO-AG), Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Universidad de La Laguna, La Laguna, Islas Canarias, España.

Se realizaron ensayos *in vitro* de actividad antiproliferativa frente a un panel representativo de diversas líneas de células tumorales humanas: A549 (carcinoma de alvéolo pulmonar), HBL-100 (mama), HeLa (cuello uterino), SW1573 (pulmón), T-47D (mama, distinta invasividad, sin receptor de estrógeno) y WiDr (colon). Las muestras fueron evaluadas según el método colorimétrico de sulforrodamida B del Instituto Nacional de Cáncer (EE.UU), descrito en bibliografía (Skehan et al., 1990). En los casos en que los compuestos resultaron fuertemente activos, se realizaron ensayos para determinar la selectividad de los mismos frente a células de fibroblastos humanos (células BJ-hTERT). Además, se evaluó la interacción de los compuestos más activos con glicoproteína P (P-gp). Esta proteína es un transportador de membrana que funciona como una barrera biológica extruyendo toxinas y xenobióticos fuera de la célula. Crea un flujo de expulsión de la célula dependiente de ATP con una amplia especificidad de sustratos. Uno de los mecanismos de resistencia de las células cancerosas a los medicamentos incluye

la sobreexpresión de P-gp. Luego, en los proyectos de descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos, es relevante saber si son sustratos de P-gp o no (Chang et al., 2006). Como modelo para probar el efecto de la sobreexpresión de P-gp en nuestros compuestos, se utilizó un ensayo basado en líneas celulares. Para este propósito, se usó una línea celular de tipo salvaje (*wild-type*) (SW1573) y su variante de P-gp sobreexpresada (SW1573/Pgp) (Bergman et al., 2003). Además, los compuestos se probaron contra ambas líneas celulares en presencia o ausencia de verapamilo (un conocido inhibidor de P-gp y CYP3A4/5) en una concentración de 10 μM (Castaing et al., 2007). Se utilizaron como patrones de referencia en este ensayo, vinblastina (VB) y paclitaxel (PTX), fármacos que interactúan con microtúbulos. Para una mejor comparación de los datos, se definió el factor de resistencia (Rf) para un compuesto dado como la relación entre los valores de IC_{50} (definido como la concentración de compuesto que inhibe al 50 % el crecimiento celular) en la sobreexpresión de P-gp y la línea celular tipo salvaje ("*wild-type*").

8.4.1. Withanólidos

En este trabajo de tesis doctoral se aislaron withanólidos con diversos esqueletos a partir de dos especies pertenecientes a la familia Solanaceae. De *Eriolarynx ichromoides* se aislaron y caracterizaron withafisalininas y withanólidos relacionados; mientras que de *Jaborosa oxipetala* se obtuvieron withanólidos con esqueleto tipo sativólido, espiránico en C-22, espiránico en C-23, y trechonólido (ver Capítulo 3).

En función de las relaciones estructura-actividad reportadas en la bibliografía para actividad antiproliferativa de withanólidos (ver Figura 8.3), se decidió ensayar la actividad antiproliferativa de los compuestos aislados de *E. ichromoides*. La actividad antiproliferativa de withanólidos con esqueleto tipo withafisalininas ya ha sido previamente demostrada encontrando muy buenos resultados (Rocha et al., 2006).

En todos los withanólidos aislados y caracterizados a partir de *J. oxipetala*, se obtuvieron esqueletos con un grupo 5,6-diol en el anillo B del esqueleto esteroideal (excepto el compuesto **10**, ver Figura 3.15 del Capítulo 3). Este patrón de sustitución ha demostrado tener nula potencia antiproliferativa en ensayos realizados con withanólidos que poseen arreglos estructurales semejantes (Machin et al., 2010; Zhang et al., 2012, 2014). Luego, los compuestos aislados de *J. oxipetala* no fueron ensayados para actividad antiproliferativa.

Para ampliar el abanico de compuestos y así poder establecer relaciones estructura-actividad, como así también evaluar la actividad antiproliferativa de withanólidos con esqueletos novedosos, se sumaron a este ensayo withanólidos aislados por la Dra. Carina Casero (FCQ-UNC, IMBIV-CONICET) de diferentes especies del género *Deprea* (Solanaceae): dos withafisalininas aisladas de *D. bitteriana*, dos 13,14-secowithafisalininas aisladas de *D. cuyacensis* y cuatro fisangulidinas aisladas de *D. zamorae* (Figura 8.8) (Casero et al., 2015). Por lo tanto, el panel de compuestos a ensayar se extendió a: 2 withanólidos con esqueleto sin modificar (compuestos **1** y **2** de la Figura 8.7), 7 withafisalininas (compuestos **3–5** de la Figura 8.7; y compuestos **D1–D4** de la Figura 8.8) y 4 fisangulidinas (compuestos **D5–D8** Figura 8.8), en total.

Los resultados de las ensayos de actividad antiproliferativa (Tabla 8.1) se expresan

como 50 % de inhibición del crecimiento (IC_{50}) y se calcularon de acuerdo al NCI (Monks et al., 1991). En esta evaluación, cisplatino (droga anticancerígena) fue utilizado como compuesto de referencia para obtener información sobre la potencia de las moléculas en estudio. A partir de los resultados obtenidos es posible agrupar estos compuestos en tres grandes grupos: withanólidos con potente actividad antiproliferativa (compuestos **1**, **4**, **5** y **D7**) con valores de IC_{50} por debajo de $10 \mu M$ en la mayoría de las líneas celulares, withanólidos con actividad moderada (compuestos **2**, **3** y **D5**) y withanólidos inactivos frente a las líneas celulares tumorales ensayadas (compuestos **D1–D4**, **D6** y **D8**). El compuesto **5** resultó ser el más potente de todos los compuestos ensayados frente a todas las líneas celulares tumorales con valores de IC_{50} entre $2,4$ y $6,1 \mu M$. Por otra parte, el compuesto **4** exhibió una potente actividad frente a 5 líneas tumorales (A549, HBL-100, HeLa, SW1573, y T-47D) con valores de IC_{50} que van entre $3,1$ y $3,9 \mu M$; y el compuesto **D7** mostró una potente actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares HeLa, SW1573 y T-47D con valores de IC_{50} entre $3,3–6,4 \mu M$.

Además de las células tumorales, los compuestos **1**, **3–5**, **D5** y **D7** (compuestos activos contra todas las líneas celulares) se probaron contra la línea celular no tumoral BJ-hTERT para evaluar su selectividad. Los resultados (Tabla 8.1) indican que todos los compuestos excepto **D7** son 2–10 veces más selectivos hacia las células cancerosas.

A partir de los datos obtenidos de actividad antiproliferativa, se pueden inferir las siguientes relaciones estructura-actividad. Al considerar el subconjunto de withanólidos **1–5**, observamos que el grupo metil o etil acetal favorece la actividad ensayada. Los acetales **4** y **5** son más activos que el hemiacetal **3**. Las diferencias en la actividad podrían estar relacionadas con la lipofiliidad de estos compuestos, los cuales poseen valores de $cLogP$ de $-0,07$; $0,54$ y $0,93$; para los compuestos **3–5** respectivamente. Finalmente, los resultados obtenidos en este ensayo indican claramente que un grupo hidroxilo en posición C-4 es esencial y marca la diferencia en actividad entre los compuestos **1–5** y **D1–D4**.

Las fisangulidinas comprenden un grupo de withanólidos apenas explorado con respecto a su actividad biológica. Hasta el momento, los únicos informes existentes pertenecen a las fisangulidinas A–C, que han mostrado actividad antiproliferativa significativa contra varias líneas celulares de cáncer (Jin et al., 2012; Reyes-Reyes et al., 2013). Esto podría deberse al hecho de que poseen una cetona α,β -insaturada en el anillo A y un grupo $5\beta,6\beta$ -epoxi en el anillo B, que sería el patrón de sustitución clave de los withanólidos activos (ver Figura 8.3). En el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa para las fisangulidinas **D5–D8**, withanólidos con otro patrón de sustitución en los anillos A y B. Sólo las fisangulidinas **D5** y **D7** mostraron ser activos, siendo en algunas líneas celulares **D7** más activo que **D5**. Estos resultados sugieren que el tipo de cadena lateral presente en las fisangulidinas no afecta la actividad resultante y que un arreglo 1-oxo-2,4-dieno-6 β -hidroxi en el anillo A y B juega un papel clave en la actividad antiproliferativa.

Por otra parte, se realizaron ensayos para evaluar la interacción de los compuestos **1**, **4–5** y **D7** con P-gp. La tabla 8.2 los valores experimentales de IC_{50} obtenidos luego de exponer por 48 h los compuestos con la línea celular tipo salvaje y la línea celular SW1573 que sobreexpresa P-gp (SW1573/Pgp), y en la presencia (+) o en la ausencia (-) de verapamilo. Todos los compuestos muestran valores de R_f bajos, lo que indica que

Tabla 8.1: Actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos 1–5 y D1–D8 frente a líneas celulares tumorales humanas y una línea de fibroblasto humano^a

Compuesto	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	BJ-hTERT
1	15±3,6	4,8±0,3	5,3±0,8	4,1±1,0	15±0,3	16±0,2	51±8,8
2	36±5,6	34±0,8	24±1,2	44±1,3	>100	>100	n.e.
3	18±3,1	19±2,2	14±0,9	12±1,3	19±5,0	28±6,5	48±7,6
4	3,1±0,6	3,6±0,4	3,2±0,7	3,3±0,6	3,9±1,0	14±0,3	41±8,9
5	2,8±0,1	3,2±0,3	2,5±0,03	2,4±0,9	4,7±1,0	6,1±1,9	12±4,7
D1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.e.
D2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.e.
D3	66±15	>100	92±11	>100	>100	>100	n.e.
D4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.e.
D5	13±1,4	20±5,4	20±3,5	22±2,6	27±6,3	27±0,8	90±9,7
D6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.e.
D7	13±2,4	13±3,7	3,3±0,2	4,4±1,9	6,4±0,9	16±4,6	5,3±1,7
D8	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.e.
Cisplatino	4,9±0,2	1,9±0,2	1,8±0,5	2,7±0,4	17±3,3	23±4,3	14±2,4

^aValores expresados como IC₅₀ y su desviación estándar.

Los valores están expresados en μM y definidos como la media de dos o tres experimentos. N.e.: no ensayado.

no hay efecto de la P-gp en su actividad biológica. En general, los resultados indican que nuestros compuestos no son sustratos de P-gp; por lo tanto, la farmacocinética de los compuestos ensayados puede ser mejor que la de los agentes quimioterapéuticos clásicos, ya que se anticipa que no tendrá lugar la extrusión de estos agentes citotóxicos mediada por P-gp.

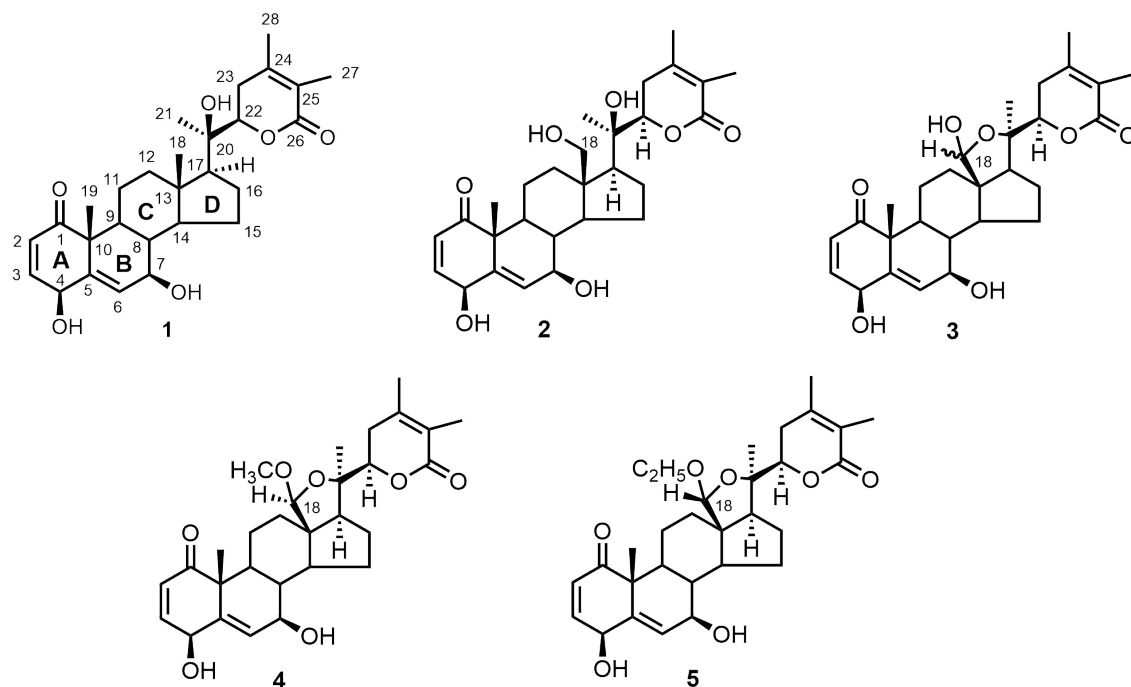


Figura 8.7: Compuestos aislados de *Eriolarynx ichromoides*

Tabla 8.2: Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de 1, 4, 5 y D7 y controles positivos frente a las líneas celulares SW1573 y SW1573/Pgp^a

	-Verapamil			+Verapamil		
	SW1573	SW1573/Pgp	Rf	SW1573	SW1573/Pgp	Rf
1	3,4±0,1	3,2±0,2	0,9	4,2±0,7	3,2±0,03	0,8
4	3,0±0,5	3,3±0,5	1,1	3,5±0,4	2,3±0,1	0,7
5	2,1±0,3	2,3±0,05	1,1	3,9±0,01	1,7±0,2	0,4
D7	4,1±1,5	4,5±0,4	1,1	5,5±1,2	2,7±0,8	0,5
PTX	1,5x10 ⁻³ ±0,5x10 ⁻³	0,196±0,053	128	1,6x10 ⁻³ ±0,2x10 ⁻³	4,2x10 ⁻³ ±0,9x10 ⁻³	2,6
VB	0,9x10 ⁻³ ±0,3x10 ⁻³	2,051±0,682	2388	0,8x10 ⁻³ ±0,2x10 ⁻³	1,0x10 ⁻³ ±0,5x10 ⁻³	1,3

^aValores expresados en concentración μ M y su desviación estándar. PTX = Paclitaxel, VB = Vinblastina.

Representan la media de los valores obtenidos en al menos dos experimentos independientes.

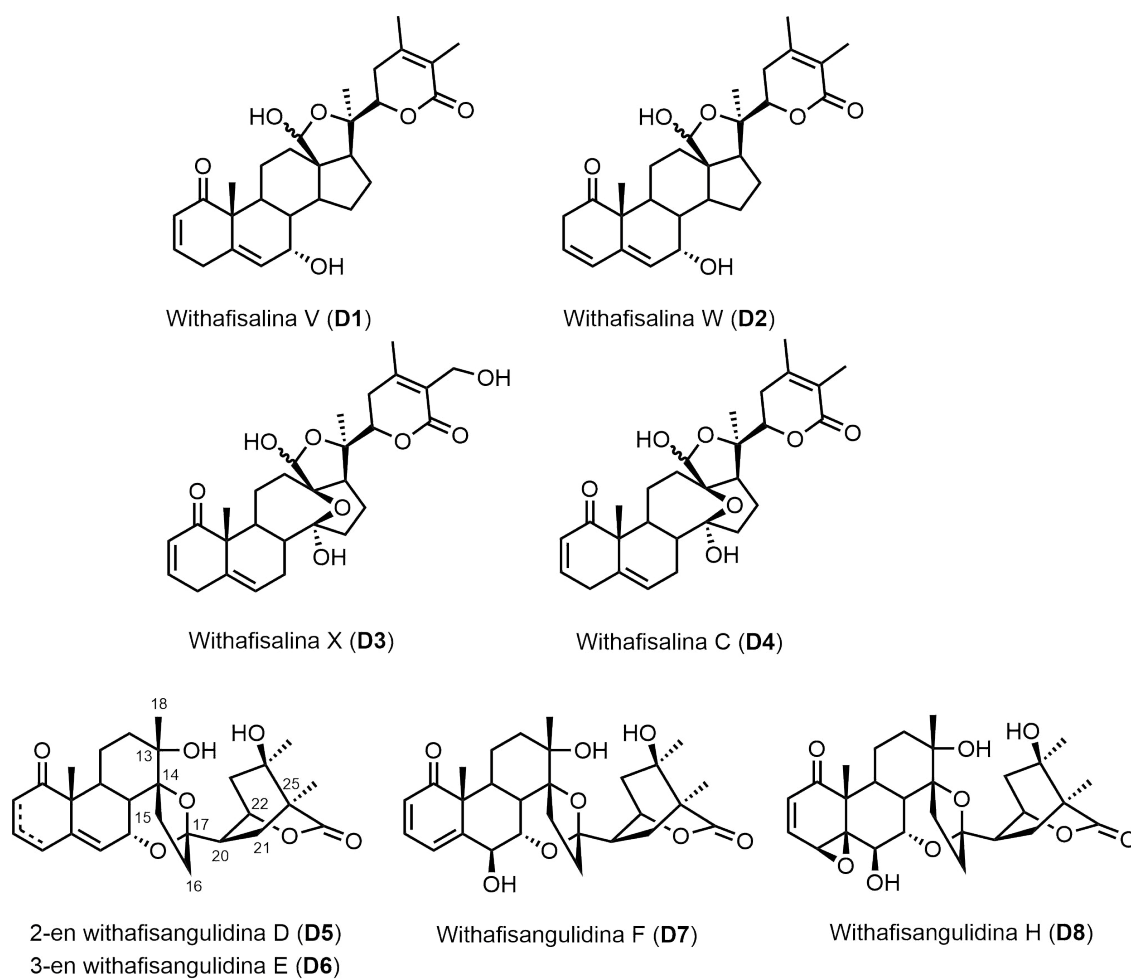


Figura 8.8: Compuestos aislados de diferentes especies del género *Deprea*

8.4.2. Sesquiterpenos tipo eremofilano

El estudio fitoquímico de la especie *Senecio volckmannii* dio como resultado el aislamiento y la caracterización de nueve nuevos sesquiterpenos tipo eremofilano junto con siete sesquiterpenoides ya reportados y 4-hidroxiacetofenona (ver capítulo 5). Hasta el momento de este estudio, solamente dehidrofukinona (compuesto **23**, Figura 8.9) presentaba estudios previos de actividad antiproliferativa, siendo activo frente a la línea tumoral celular Raji (Ponomarenko et al., 2016). Teniendo en cuenta la actividad antiproliferativa demostrada por varios sesquiterpenos tipo eremofilano, se evaluó esta actividad en un grupo de compuestos aislados de *Senecio volckmannii*, los compuestos **12**, **13**, **16**, **21**, **22**, **23**, **25**, **26** y **27** (Figura 8.9). Cabe destacar que los compuestos **12**, **13** y **16** son compuestos nuevos, mientras que los compuestos **22**, **25**, **26** y **27**, si bien se caracterizaron previamente, no existen reportes previos de actividad antiproliferativa ensayada con ellos.

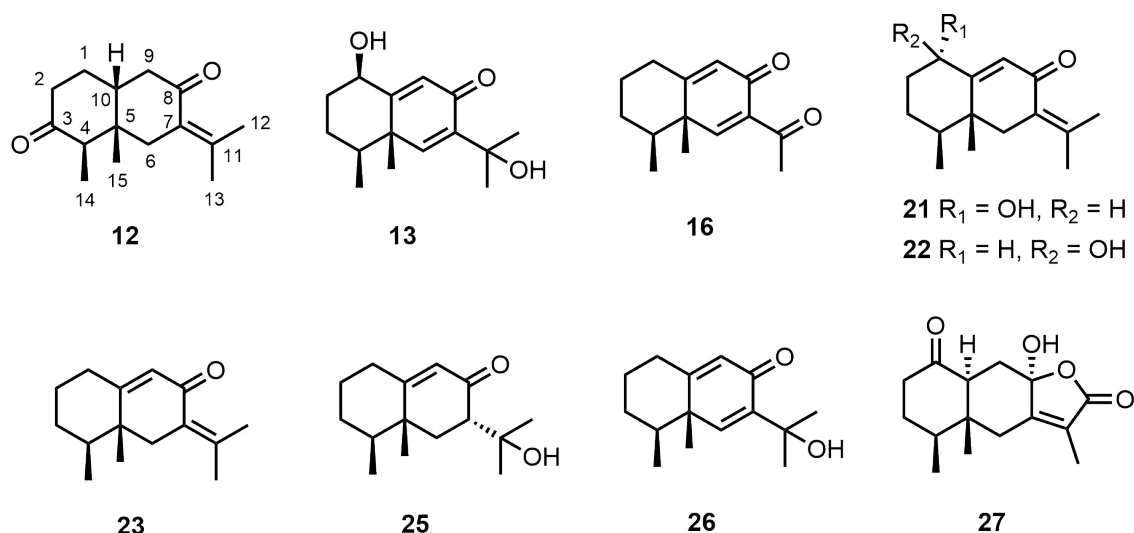


Figura 8.9: Compuestos aislados de *Senecio volckmannii* evaluados para actividad antiproliferativa

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiproliferativa se muestran en la tabla 8.3. De la misma se desprende que los compuestos **12**, **22** y **23** mostraron actividad moderada, con valores de IC_{50} en el rango de $63\text{-}99\ \mu\text{M}$, $34\text{-}94\ \mu\text{M}$ y $31\text{-}60\ \mu\text{M}$, respectivamente; mientras que el resto de los compuestos resultaron ser inactivos en todas las líneas celulares tumorales ensayadas. En general, los datos obtenidos mostraron que la línea celular HeLa fue la más sensible a los compuestos ensayados.

Los resultados nos permiten proponer algunas relaciones estructura actividad: el grupo isopropenilo en C-7 parece ser necesario para la actividad antiproliferativa observada ya que los tres compuestos activos comparten esta característica estructural. Además, en el patrón de sustitución de la decalina, la presencia de un grupo hidroxilo en C-1 también contribuye a la bioactividad. Sin embargo, la orientación del grupo hidroxilo (α o β) es decisiva, ya que el sesquiterpeno **22**, el compuesto más activo, posee el grupo hidroxilo con orientación β , mientras que su epímero en C-1, el compuesto **21**, resultó

Tabla 8.3: Actividad antiproliferativa *in vitro* para los sesquiterpenos **1**, **11** y **12** frente a líneas tumorales humanas^a.

Compuesto	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
12	99±1,2	>100	88±21	>100	>100	>100
22	50±0,8	52±2,1	31±4,6	38±5,0	59±4,8	60±9,5
23	94±8,9	>100	35±8,0	34±7,5	>100	>100
cisplatino	4,9±0,2	1,9±0,2	1,8±0,5	2,7±0,4	17±3,3	23±4,3

^aValores expresados como IC₅₀ y su desviación estándar.

Los valores están expresados en μM y definidos como la media de dos o tres experimentos.

inactivo en este ensayo.

Por último, teniendo en cuenta los antecedentes de actividad antiproliferativa para este tipo de compuestos naturales, los resultados obtenidos en el presente estudio, están dentro de los valores de IC₅₀ esperables, es decir, valores que indican que los sesquiterpenos tipo eremofilano poseen actividad antiproliferativa moderada.

8.4.3. Lactonas sesquiterpénicas: Guaianólidos

Tal como se mostró anteriormente, las LS han demostrado tener un gran potencial como compuestos antiproliferativos. Luego, se evaluó esta actividad en un grupo de guaianólidos naturales: Ludartina (**L**), Achalensólido (**Ach**), 11,13-dehidroachalensólido (**DHAch**); y sus correspondientes derivados aminados, compuestos **29–31**, **33–37** (Figura 8.10).

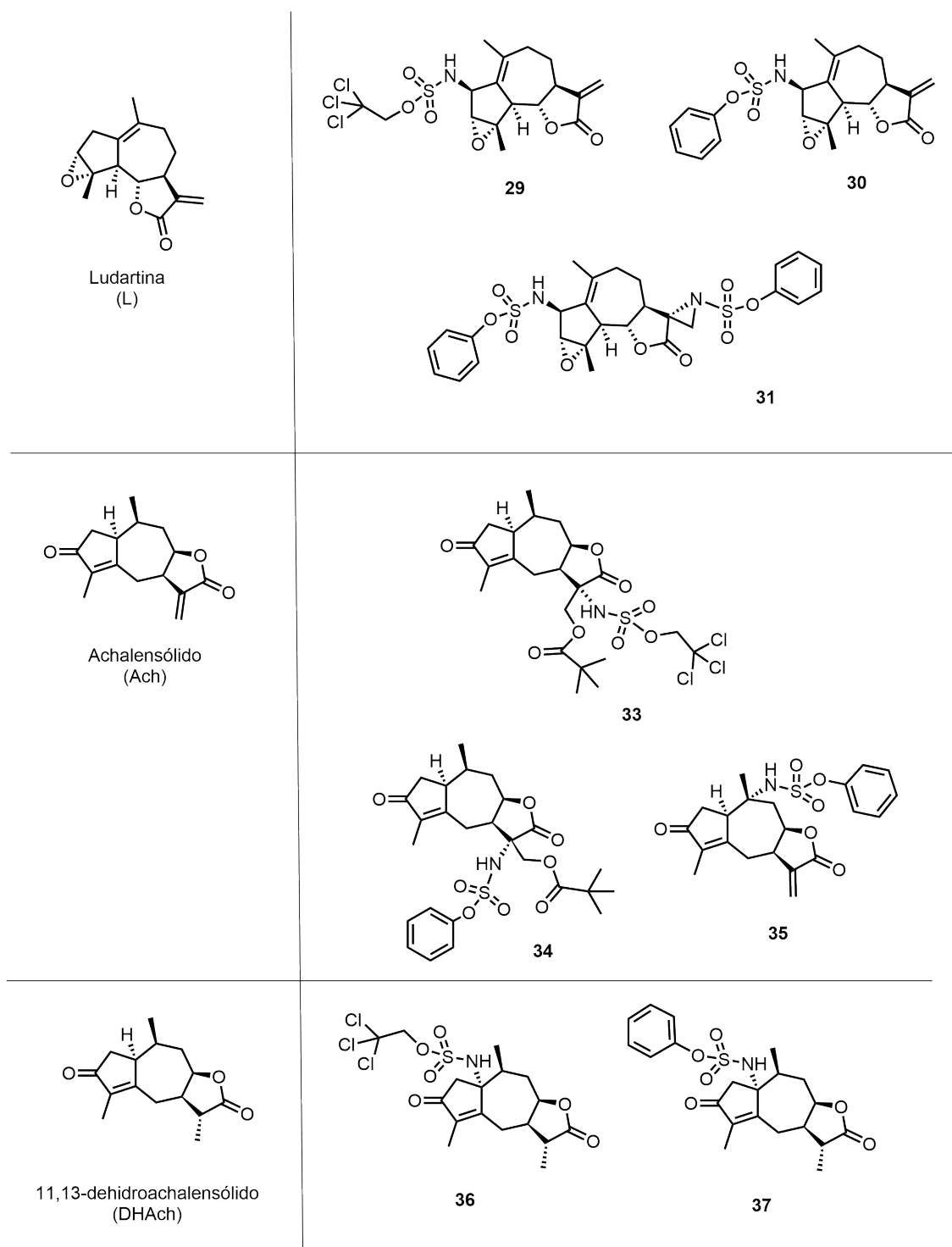
Hasta la fecha, solamente **L** presenta antecedentes de evaluación de su actividad antiproliferativa. **L** muestra valores de IC_{50} de 6,6 μM y 19,0 μM contra melanoma de ratón (B16F10) y carcinoma epidermoide humano (A-431) en el ensayo MTT ([Lone et al., 2013b](#)). En otro estudio se demostró que **L** presenta actividad citotóxica frente a tres líneas celulares de cáncer: A549 (pulmón), THP-1 (leucemia), PC-3 (próstata), HCT-116 (colon); con muy buenos valores de IC_{50} 7,4; 3,1; 7,5; 6,9 μM respectivamente ([Lone et al., 2013a](#)). Además, [Bai et al. \(2016\)](#) demostraron que el tratamiento con **L** inhibe la proliferación, invasión y migración de las células de cáncer de ovario a través de la regulación negativa de pFAK (proteínquinasa) y MMP (metaloproteínasa de matriz).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.4. En general, los compuestos más activos mostraron una potencia comparable a la del cisplatino. Estas sustancias que comprenden los compuestos **Ach**, **29** y **30**, causaron una inhibición significativa del crecimiento celular con valores de IC_{50} por debajo de 10 μM en la mayoría de las líneas celulares. En el grupo de compuestos con actividad moderada encontramos a **L**, **31**, **33**, **35**; con valores de IC_{50} entre 10 y 50 μM . Mientras que en el grupo de compuestos que resultaron inactivos encontramos a **DHAch**, **36** y **37**. Cabe destacar que el compuesto **34**, resultó activo únicamente frente a dos líneas celulares: HeLa y SW1573.

Además de las células tumorales, los compuestos **Ach**, **29** y **30**, se probaron contra la línea celular no tumoral Bj-hTERT para evaluar su selectividad. Los resultados obtenidos (Tabla 8.4) indican que estos compuestos son inactivos frente a células de fibroblasto humano, indicando selectividad hacia células tumorales humanas.

A partir de los valores de IC_{50} obtenidos en este ensayo, se pueden inferir las siguientes relaciones estructura-actividad. Del grupo de los guaianólidos naturales, **Ach** resultó ser el más activo con valores de IC_{50} entre 3,3 y 18 μM ; mientras que **DHAch** fue inactivo en todas las líneas ensayadas. Esto nos permite afirmar que la ausencia de actividad antiproliferativa en este metabolito estaría ligada a la presencia/ausencia de un grupo α -metileno- γ -lactona en la molécula, que, de no estar presente (como en el caso de **DHAch**) el compuesto resulta inactivo; resultado que también, como se dijo anteriormente, se ha encontrado en otras LS. A su vez, la formación de un enlace C-N en posición C10 no ofrece derivados de **DHAch** activos, los compuestos **36** y **37** resultaron inactivos en todas las líneas celulares ensayadas.

Para **L** y sus derivados (compuestos **29** y **30**) se puede observar un significativo cambio en los valores de IC_{50} tras la formación de un nuevo enlace C-N. De hecho, tanto el compuesto **29** como el **30** son de entre 5 a 10 veces más potentes que **L**. De los derivados obtenidos a partir de **Ach**, el compuesto **35** resultó ser el más potente de los tres, con valores de IC_{50} entre 5,6 y 17 μM . Esto quizá sea consecuencia de que en los compuestos **33** y **34** se ha modificado el doble enlace exocíclico, mientras que en **35** la α -metileno- γ -lactona se encuentra intacta. De hecho, se puede observar una clara

**Figura 8.10:** Guaianólidos naturales y sus derivados

disminución de la actividad antiproliferativa de los compuestos **33** y **34** comparados con **Ach**. Llamativamente el compuesto **33**, aunque no posea una doble ligadura exocíclica, permanece moderadamente activo; mientras que el compuesto **34** es inactivo en todas las líneas celulares salvo en dos de ellas: HeLa y SW1573.

Por otra parte, del conjunto de compuestos ensayados, se probó si los compuestos **29**, **30** y **Ach**, los más activos de la serie, podrían interactuar con P-gp. La tabla 8.5 muestra los valores experimentales de IC₅₀ obtenidos luego de exponer por 48 h los compuestos con la línea celular tipo salvaje ("*wild type*") y la línea celular SW1573 que sobreexpresa P-gp, y en presencia (+) o en la ausencia (-) de verapamilo. Todos los compuestos muestran valores de Rf bajos, lo que indica que no son sustratos de P-gp.

Tabla 8.4: Actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos **29–37** frente a líneas celulares tumorales humanas y una línea de fibroblasto humano^a

Compuesto	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	BJ-hTERT
L	8,9±1,2	17±0,1	13±1,7	10±2,8	28±1,5	17±3,8	n.t.
Ach	3,3±0,3	6,0±1,0	5,4±1,5	4,9±1,8	18±1,6	4,5±0,4	>100
DHAch	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.t.
29	1,9±0,4	1,8±0,1	2,0±0,02	2,0±0,04	4,7±2,1	2,7±0,3	>100
30	3,0±0,5	3,2±0,5	3,3±0,4	2,5±3,2	7,8±2,0	3,8±0,8	>100
31	28±5,1	22±4,7	18±2,3	21±3,6	41±3,4	27±1,2	n.t.
33	36±4,8	50±1,6	14±2,0	36±6,9	56±6,6	47±2,5	n.t.
34	>100	>100	29±7,5	83±24	>100	>100	n.t.
35	5,6±0,5	13±3,0	15±2,0	6,8±1,4	17±0,2	12±2,5	n.t.
36	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.t.
37	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.t.
Cisplatino	4,9±0,2	1,9±0,2	1,8±0,5	2,7±0,4	17±3,3	23±4,3	14±2,4

^aValores expresados como IC₅₀ (50 % de inhibición del crecimiento) y su desviación estándar.

Los valores están expresados en μM y definidos como la media de dos o tres experimentos

Tabla 8.5: Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de **29**, **30** y **Ach**; y controles positivos frente a las líneas celulares SW1573 y SW1573/Pgp^a

	-Verapamil			+Verapamil		
	SW1573	SW1573/Pgp	Rf	SW1573	SW1573/Pgp	Rf
29	1,2±0,3	1,4±0,1	1,2	0,66±0,11	1,3±0,2	2,0
30	0,64±0,08	1,1±0,1	1,8	0,96±0,11	1,4±0,1	1,5
Ach	3,1±0,1	5,1±0,5	1,6	3,7±0,7	3,5±0,2	1,0
PTX	1,5±0,5	196±53	128	1,6±0,2	4,2±0,9	2,6
VB	0,9±0,3	2051±682	2388	0,8±0,2	1,0±0,5	1,3

^aValores expresados en concentración μM y su desviación estándar. PTX = Paclitaxel, VB = Vinblastina. Representan la media de los valores obtenidos en al menos dos experimentos independientes.

8.5. Parte Experimental

8.5.1. Ensayos de actividad antiproliferativa

Los ensayos fueron llevados a cabo por el grupo de investigación dirigido por el Dr. José M. Padrón en el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC), Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Todos los compuestos de partida fueron productos químicos grado analítico disponibles comercialmente y se utilizaron sin purificación adicional. Los medios RPMI 1640 se adquirieron de los laboratorios Flow (Irvine, Reino Unido), suero bovino fetal (FBS) de Gibco (Isla Grande, NY), ácido tricloroacético y glutamina de Merck (Darmstadt, Alemania) y penicilina G, estreptomina, dimetil sulfóxido y sulforodamina B (SRB) de Sigma (St Louis, MO).

8.5.1.1. Siembra y cultivo de células

Se realizaron ensayos *in vitro* frente a un panel representativo de líneas de células tumorales: A549 (pulmón), HBL-100 (mama), HeLa (cuello uterino), SW1573 (pulmón) y su correspondiente variante con Pgp sobreexpresada (SW1573/Pgp), T-47D (mama), WiDr (colon) y BJ-hTERT (fibroblasto humano). Las células se mantuvieron en matraces de cultivo de 25 cm² en RPMI 1640 suplementado con FBS al 5 % y L-glutamina a 2 mM en una incubadora a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad. Las células en crecimiento exponencial se tripsinizaron y se resuspendieron en medios que contenían antibióticos (100 unidades de penicilina G y 0,1 mg de estreptomina por mL). Las suspensiones de células individuales se contaron con Moxi Z. Después del recuento, se hicieron diluciones para proporcionar las densidades celulares apropiadas para la inoculación en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las células se inocularon en un volumen de 100 μL por pocillo a densidades de 2500 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573) o 5000 (SW1573/Pgp, T-47, WiDr y BJ-hTERT) por pocillo, en función de sus tiempos de duplicación.

8.5.1.2. Prueba de quimiosensibilidad

Las pruebas de quimiosensibilidad se realizaron utilizando el ensayo sulforodamina B (SRB) del Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU., con ligeras modificaciones (Miranda et al., 2006). Brevemente, los compuestos puros se disolvieron inicialmente en DMSO a 400 veces la concentración de prueba máxima final deseada. Las células de control fueron expuestas a una concentración equivalente de DMSO (0,25 % V/V, control negativo). Cada compuesto se probó por triplicado a diferentes diluciones en el rango 1–100 μM. El tratamiento farmacológico se inició el día 1 después de la siembra y los tiempos de incubación fueron de 48 h. El cisplatino se usó como fármaco de referencia para las pruebas antiproliferativas, el verapamilo se usó como un inhibidor del transporte de P-gp y sus soluciones madre se prepararon en DMSO a 40 mM. El paclitaxel y la vinblastina se usaron como controles positivos en los experimentos SW1573/Pgp y se disolvieron inicialmente en DMSO en una solución madre de 4 mM. El medio de cultivo celular que contiene verapamilo se preparó agregando la concentración final de verapamilo 10 μM. Luego se realizó el ensayo de SRB. Las células se precipitaron con

25 μL de solución de ácido tricloroacético helado (50 % P/V) y se fijaron durante 60 min a 4 °C. Luego, las placas se enjuagaron con agua, después de lo cual se añadieron 25 μL de una solución de sulforhodamina B (SRB) (0,4 % P/V en ácido acético al 1 %) durante 15 min. La SRB no unida se enjuagó con ácido acético (1 % V/V). La SRB unida se disolvió con 150 μL de solución de Tris (10 mM, pH 10,5). La densidad óptica de cada pocillo se determinó a 530 y 620 nm usando un lector de microplacas PowerWave XS. La longitud de onda dual se utilizó para reducir la interferencia óptica causada por rayaduras, huellas dactilares u otra materia que absorba la luz por igual en ambas longitudes de onda. Se corrigieron los valores para la densidad óptica de fondo de los pocillos que contenían solo medio. La actividad antiproliferativa, expresada como IC_{50} (50 % de inhibición del crecimiento), se calculó de acuerdo a las fórmulas del NCI de la siguiente manera. El porcentaje de crecimiento (PG) se calculó en relación con las células de control no tratadas (C) en cada uno de los niveles de concentración del compuesto en función de la diferencia de densidad óptica al comienzo (T_0) y al final de la exposición con el compuesto (T). Por lo tanto, si T es mayor o igual que T_0 , el cálculo es $\text{PG} = 100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$. Si T es menor que T_0 , que denota muerte celular, el cálculo es $\text{PG} = 100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$. El efecto se define como PG, donde el 50 % de inhibición del crecimiento (IC_{50}) representa la concentración a la cual PG es +50. Con estos cálculos, un valor de PG de 0 corresponde al número de células presentes al comienzo de la exposición al compuesto, mientras que los valores de PG negativos denotan la muerte neta de células.

Capítulo 9

Actividad tripanocida

*“No me den fórmulas ciertas,
porque no espero acertar siempre.
No me muestren lo que esperan de mí,
porque voy a seguir a mi corazón.
No me hagan ser lo que no soy,
no me inviten a ser igual,
porque soy diferente.
No se amar por la mitad,
no se vivir de mentira.”*

Clarice Lispector

Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo son fruto de una colaboración con la Dra. Cinthia Stempin (Universidad Nacional de Córdoba, CIBICI-CONICET, Argentina).

9.1. Introducción

Las enfermedades tropicales desatendidas son un grupo de 17 infecciones parasitarias que afectan a personas de bajos recursos, principalmente de países en vías de desarrollo, causando grandes problemas físicos, económicos y de salud en los pacientes y sus comunidades. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas infecciones incluyen dengue, rabia, tracoma, tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), leishmaniasis, lepra, enfermedad de Chagas, úlcera de Buruli, equinococosis, filariasis linfática, oncocercosis, esquistosomiasis, dracunculosis (enfermedad del gusano de Guinea), trematodiasis transmitida por alimentos, teniasis / cisticercosis, infección por helmintos transmitidos por el suelo y pian o frambesia trópica (WHO, 2013).

La tripanosomiasis americana, por primera vez descrita por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909, es una infección transmitida por vectores, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Esta enfermedad, endémica de América Latina, afecta a más de 8 millones de personas y casi 30 millones viven en áreas de riesgo actualmente. Originalmente la enfermedad se halló en América del Sur y Central, pero debido a las migraciones se ha registrado en todos los continentes. La endemicidad de

la enfermedad es un fenómeno complejo que tiene su origen en la historia, cuando la acumulación de granos se desarrolló en las antiguas poblaciones humanas sedentarias, facilitando su interacción con los vectores. De hecho, experimentos de paleobiología han detectado la presencia del protozoo en poblaciones humanas desde hace 9000 años, específicamente en tejidos recolectados de momias de la región andina (Aufderheide et al., 2004; Araujo et al., 2009). Particularmente, la enfermedad de Chagas constituye un problema sanitario de gran relevancia para nuestro país, estimándose en la actualidad un número que alcanza al millón y medio de personas afectadas en Argentina.

En su ciclo natural, *T. cruzi* se transmite a los mamíferos salvajes, sus huéspedes vertebrados, por los insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Fam. Reduviidae). La proximidad de las poblaciones humanas a los hábitats naturales del insecto, provocó el surgimiento de otro ciclo del parásito: el doméstico, en el que los huéspedes vertebrados son humanos y sus animales domésticos (Noireau et al., 2005). Se sabe que *T. cruzi* tiene las siguientes tres formas morfológicas principales durante su ciclo de vida (Figura 9.1): el epimastigote (replicativo, no infeccioso), que se encuentra en el intestino medio del vector invertebrado; el tripomastigote (no replicativo, infeccioso), que es la forma del parásito que se encuentra en ambos huéspedes; y el amastigote (replicativo, infeccioso), que es la forma intracelular que se encuentra sólo en mamíferos, y la más difícil de alcanzar con medicamentos (Tanowitz et al., 1992; Teixeira et al., 2006).

T. cruzi puede transmitirse a través de vías diferentes a la propagación vectorial. Estas vías tienen un papel importante en países no endémicos y una importancia creciente en áreas endémicas. Se estima que la tasa de transmisión de madre a hijo es de aproximadamente 4,7 % (rango 3,9–5,6 %) y que esta tasa podría ser mayor en países endémicos que en países no endémicos (5 % vs 2,7 %). El principal determinante biológico para la transmisión congénita es la parasitemia materna, que podría ser tan alta como 31 % cuando *T. cruzi* es detectable por PCR, aunque la transmisión también es posible cuando la PCR es negativa. Además, este parásito puede transmitirse a través de la sangre y productos derivados de la sangre; la tasa de transmisión estimada por unidad de sangre infectada es del 10 al 25 %. Las tasas de infección después del trasplante de órganos sólidos de un donante infectado parecen ser más bajas para los receptores de riñón (0–19 %) que para los receptores de hígado (0–29 %) y los receptores de corazón (75–100 %). Otros modos de transmisión menos frecuentes incluyen el consumo de alimentos y bebidas contaminados (transmisión oral) y accidentes de laboratorio (Pérez-Molina y Molina, 2018).

El mal de Chagas evoluciona en múltiples etapas hacia una parasitosis sistémica crónica, siendo esta última etapa fatal en el 30-40 % de los pacientes infectados. Llamativamente, la enfermedad generalmente no se detecta hasta esta etapa, tomando muchos años (a veces hasta 30) para alcanzar la etapa crónica, después de lo cual el inicio de la enfermedad es rápido y los pacientes mueren de insuficiencia cardíaca causada por daño del parásito en el sistema cardíaco, incluso con tratamiento¹. Los pocos síntomas aparentes al comienzo de una infección con *T. cruzi* incluyen fiebre, malestar general y dolor, que pueden diagnosticarse como muchas otras enfermedades infecciosas como el dengue o la gripe. El estreñimiento, así como el dolor de pecho y la fatiga, cuando se

¹<https://www.who.int/chagas/en/>

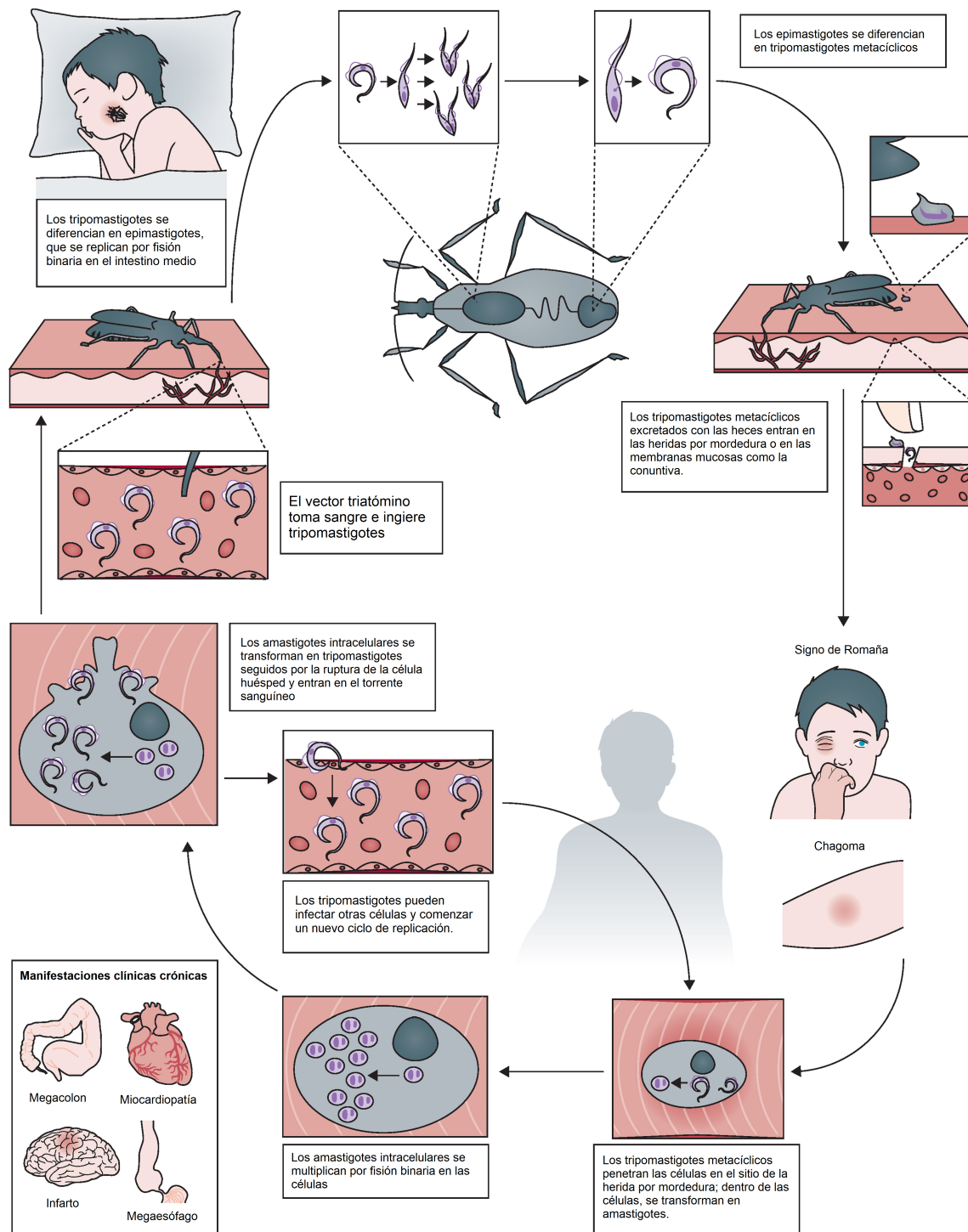


Figura 9.1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de (Pérez-Molina y Molina, 2018).

manifiestan en personas de edad avanzada, pueden estar asociados con problemas de envejecimiento y no con los síntomas de la etapa tardía de la enfermedad de Chagas. La fase asintomática de la enfermedad puede persistir durante décadas antes de que comiencen las primeras manifestaciones, o puede durar toda la vida del huésped, lo que ocurre en la mayoría de los casos (Develoux et al., 2009). Esta situación asintomática puede ser una explicación de la dificultad para encontrar plantas medicinales utilizadas popularmente para tratar la enfermedad de Chagas. En tales casos, las plantas utilizadas para otras enfermedades por protozoos, especialmente aquellas con similitudes taxonómicas, pueden mostrar mejores resultados (Kayser et al., 2003). Por otra parte, los factores socioeconómicos en los países donde la enfermedad es endémica influyen en el nivel de financiamiento para investigación y desarrollo que las compañías farmacéuticas dedicarán a encontrar nuevos medicamentos para enfermedades olvidadas porque la mayoría de las personas infectadas viven con menos de U\$S 2 por día y no pueden pagar tratamientos costosos. Además, la larga fase crónica asintomática hace que sea difícil estimar con precisión el número de pacientes, que es más alto de lo que muestran los datos oficiales.

En los últimos años, se ha logrado un progreso importante en el conocimiento de la biología y la bioquímica de *T. cruzi*. Estos esfuerzos han llevado a la identificación de objetivos potenciales para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas. La biosíntesis de ergosterol, las vías de la tripanotona y la cruzipaina (cisteinproteasa) y el metabolismo redox dependiente de tioles son considerados los objetivos bioquímicos más prometedores para el diseño racional de fármacos actualmente (Maya et al., 2007). En este sentido, para la selección de compuestos prometedores diversas organizaciones, entre las que se encuentran la DNDi (Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Desatendidas) o el GHIT (Fondo Global de Tecnología Innovadora en Salud), sugieren los siguientes criterios (Katsuno et al., 2015):

1. Actividad tripanocida $\leq 10 \mu\text{M}$ contra células de parásitos;
2. Selectividad 10 veces mayor en potencia contra parásitos que frente a células de mamíferos;
3. En un modelo de ratones con la enfermedad de Chagas, un compuesto debe demostrar una reducción del 80 % de la carga parasitaria en órganos y tejidos, o no debería detectarse ningún parásito en el final del tratamiento y un aumento de la vida útil con hasta 10 dosis a 50 mg/kg administrados por vía oral.

Actualmente sólo existen dos fármacos aprobados para el tratamiento de pacientes infectados: benznidazol y nifurtimox (Figura 9.2), los cuales lamentablemente exhiben efectos adversos significativos y, debido al desarrollo de resistencia, se están volviendo menos efectivos (Campos et al., 2014; Mejia et al., 2012; Sepúlveda-Boza y Cassels, 1996). Resulta entonces imperiosa la búsqueda de nuevos fármacos antichagásicos activos sobre blancos terapéuticos clásicos y nuevos.

En este sentido, en un intento por encontrar nuevas terapias, se han diseñado y evaluado drogas sintéticas, ya sea solas o en combinación con otras drogas, contra este parásito (Buckner y Navabi, 2010; Araujo et al., 2000; Benaim et al., 2006; Gerpe et

al., 2008). La ventaja de las drogas sintéticas es que, debido a las estructuras químicas conocidas de benznidazol y nifurtimox, las alteraciones de sus esqueletos estructurales básicos o la construcción de nuevas moléculas con grupos funcionales similares pueden garantizar una alta actividad (Rodríguez et al., 2009; Boaiani et al., 2009). Además se han utilizado diferentes estrategias de diseño y descubrimiento de fármacos que han demostrado su eficacia, como la simplificación molecular, el uso de estructuras privilegiadas, los profármacos, la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) y el acoplamiento molecular (*molecular docking*) en la búsqueda de nuevos compuestos biactivos frente a *T. cruzi* (Buckner y Navabi, 2010; Pauli et al., 2017). Aún así, nuevos estudios son necesarios, sobre todo la búsqueda de compuestos antichagásicos no tóxicos que resulten prometedores para pruebas preclínicas.

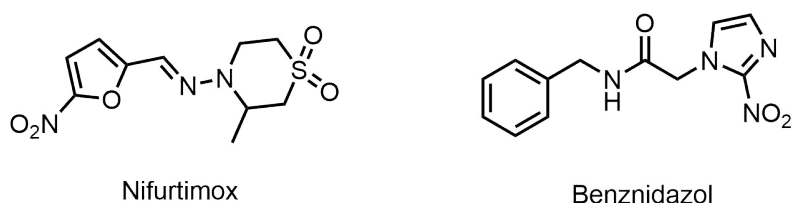


Figura 9.2: Drogas actualmente en uso para el tratamiento de la enfermedad de Chagas

9.2. Productos naturales con actividad tripanocida

Las plantas han sido el principal suministro de nuevos metabolitos secundarios, contribuyendo con varios compuestos con actividad tripanocida. En consecuencia, la búsqueda de productos naturales brinda la oportunidad de descubrir nuevas moléculas de estructura única con alta actividad y selectividad hacia el patógeno, que pueden optimizarse aún más mediante procedimientos sintéticos para obtener nuevos compuestos bioactivos. Para la enfermedad de Chagas, la posibilidad de desarrollar nuevos medicamentos ha llevado al estudio farmacológico de casi 400 especies pertenecientes a más de 100 familias de plantas en los últimos 15 años contra *T. cruzi* (Izumi et al., 2011; Neto et al., 2019) y a la evaluación de la potencial actividad antichagásica de sus metabolitos secundarios (Salem y Werbovetz, 2006; Tempone et al., 2007; Saeidnia et al., 2013).

Se han identificado muchas sustancias con la actividad deseada, pero su utilidad potencial está limitada en muchos casos por su baja potencia, biodisponibilidad y / o solubilidad en sangre, lo que indica la necesidad de manipulaciones estructurales racionales, preferiblemente basadas en mecanismos que, en general, faltan. Además, para fines prácticos, los compuestos naturales aislados con actividad antitripanosoma que muestren valores de concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) por encima de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no deben considerarse candidatos prometedores a fármacos, porque seguramente se producirán reacciones inespecíficas y niveles celulares inviables en los estudios *in vivo*.

Una serie de investigaciones que tratan sobre compuestos anti-*T. cruzi* eficaces describen el aislamiento de terpenoides y esteroides, alcaloides, flavonoides y lignanos entre los compuestos activos (Tempone et al., 2007). Entre las subclases de terpenoides, los triterpenos y las lactonas sesquiterpénicas (LS) demostraron tener potencial como

compuestos líderes para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos contra *T. cruzi*.

9.2.1. Actividad tripanocida de lactonas sesquiterpénicas

El potencial antiprotozoario de las lactonas sesquiterpénicas (LS) ha atraído un renovado interés a partir del desarrollo del fármaco antipalúdico artemisinina, aislado de la hierba medicinal china *Artemisia annua*. A partir de entonces, se han descrito otras series de LS con actividad antiprotozoaria.

Frank et al. (2013) aislaron nuevas LS anti-tripanosómicas mediante técnicas guiadas a partir del extracto orgánico de *Smallanthus sonchifolius*, que proporcionó tres compuestos activos contra epimastigotes de *T. cruzi*: enhidrina (IC₅₀ 0.84 μM), uvedalina (IC₅₀ 1.09 μM) y polimatina B (IC₅₀ 4.90 μM), de los cuales sólo los dos primeros compuestos presentaron actividad contra los tripomastigotes de *T. cruzi* 33.4 μM y 25.0 μM, respectivamente. Estos compuestos han sido propuestos como moléculas líderes para desarrollar nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas. Por otra parte, mediante esta misma metodología, peruvina y psilostachina, compuestos aislados de *Ambrosia tenuifolia*, fueron probadas contra epimastigotes de *T. cruzi* observándose valores bajos de IC₅₀ 6,2 μM y 4,4 μM, respectivamente. Además, los autores señalan que psilostachina fue más activa contra tripomastigotes con un IC₅₀ de 2,7 μM comparado con 200 μM alcanzado por peruvina (Sulsen et al., 2008).

Schmidt et al. (2002) informaron sobre la actividad tripanocida de LS con esqueleto tipo helenanólido y eudesmanólido, aisladas de especies de *Arnica* e *Inula* (Asteraceae). Todos los compuestos probados (helenalina, mexicanina I, 11α,13-dihidrohelenalinacetato, chamissonólido, ivalina y isoalantolactona) se encontraron activos frente a tripomastigotes de *T. cruzi*. Helenalina fue la LS más activa, con un valor de IC₅₀ de 0,69 μM. Estos autores han encontrado que la saturación de la ciclopentenona o el resto α-metilen-γ-lactona da como resultado una disminución dramática de la actividad.

Helenalina y mexicanina I también se probaron contra epimastigotes de *T. cruzi*. Ambos compuestos fueron citotóxicos para los parásitos, con valores de IC₅₀ de 1,9 y 3,8 μM, respectivamente. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observó desorganización nuclear y la vacuolización citoplasmática, que explicarían un efecto apoptótico de los compuestos sobre los parásitos (Jimenez-Ortiz et al., 2005).

Según lo informado por Jimenez et al. (2014), dehidroleucodina y helenalina inducen la muerte celular programada en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. En contraste, benznidazol y nifurtimox no inducen la muerte celular programada, lo que indicaría un mecanismo de acción diferente al de los fármacos convencionales. Además, según este estudio, una combinación de dehidroleucodina con benznidazol o nifurtimox indujo una disminución más pronunciada de la viabilidad del parásito.

En otro estudio, las actividades anti-*T. cruzi* y citotóxicas de una serie de 15 LS naturales (todos aislados de la familia Asteraceae) y un estudio QSAR fue realizado por Fabian et al. (2013). Se encontró una actividad tripanocida significativa contra epimastigotes de *T. cruzi* y altos valores de selectividad para las LS enhidrina (IC₅₀ = 0.84 μM), estafietina (IC₅₀ = 0.24 μM) y eupahakononina B (IC₅₀ = 0.78 μM). Un modelo que utiliza descriptores moleculares en 3D permitió establecer una alta correlación de la actividad

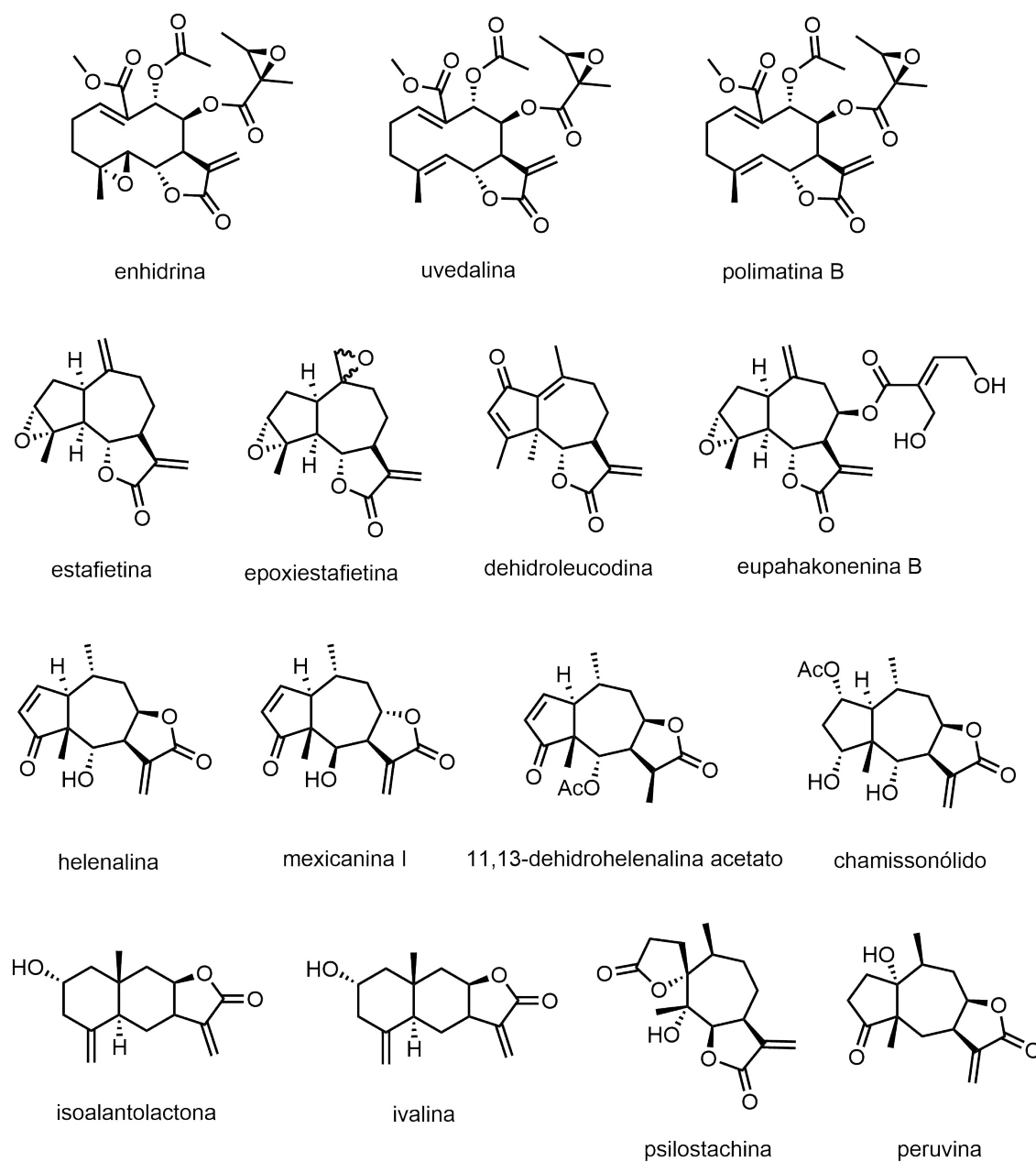


Figura 9.3: Lactonas sesquiterpénicas de diversos esqueletos con actividad tripanocida.

observada y la disposición espacial atómica de las LS estrechamente relacionadas con los parámetros estéricos. Recientemente, un estudio realizado por [Sülsen et al. \(2019\)](#) evaluó la actividad tripanocida de estafietina y cuatro derivados semisintéticos de ésta frente a tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*. Epoxiestafietina resultó ser el compuesto más activo de la serie con un IC_{50} para tripomastigotes de $18,7 \mu\text{g}/\text{mL}$ y sobre amastigotes, $2,0 \mu\text{g}/\text{mL}$; mientras que registraron valores de IC_{50} $25,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $28,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ para estafietina frente a tripomastigotes y amastigotes, respectivamente.

La mayoría de las actividades biológicas de las LS se explican por la formación de enlaces covalentes entre una γ -lactona insaturada con nucleófilos biológicos, como residuos cisteína en proteínas. Los estudios de relación estructura-actividad sobre la actividad antiprotozoaria de las LS han demostrado que la actividad está relacionada principalmente con la presencia de grupos carbonilo α, β -insaturados reactivos y un grupo metileno exocíclico en la γ -lactona. La alta citotoxicidad de las LS generalmente se ha asociado con una potente actividad en células de mamíferos. Hay algunos ejemplos de esta clase de compuestos que son considerablemente más tóxicos para los parásitos, que muestran buenos índices de selectividad, como las LS con esqueleto tipo furonoheliangólido y guaianólido. Por el contrario, muchas LS presentan actividades tripanocidas prometedoras, pero una potente citotoxicidad para las células de mamíferos. El último inconveniente justifica el desempeño de otros estudios como la síntesis de análogos por modificaciones químicas, con el objetivo de mejorar su selectividad y disminuir su citotoxicidad.

Los resultados de esta pequeña búsqueda en la literatura muestran como las LS son un grupo de moléculas líderes con actividad tripanocida significativa. Sin embargo, se necesita más investigación para lograr resultados aún más concluyentes y aprender más sobre su mecanismo de acción y su biodisponibilidad. Las investigaciones en esta área realizadas principalmente por la academia alentarán a la industria farmacéutica a desarrollar nuevos fármacos tripanocidas.

9.3. Resultados y Discusión

Teniendo en cuenta los antecedentes de actividad tripanocida para lactonas sequiterpénicas (LS), se propuso llevar a cabo ensayos para explorar esta actividad en un grupo de guaianólidos naturales y algunos derivados semisintéticos, mediante una colaboración con el grupo dirigido por la Dra. Cinthia Stempin (FCQ-UNC, CIBICI-CONICET).

Como primer paso en este estudio, se planteó la evaluación de la actividad tripanocida de tres LS naturales (Figura 9.6): Ludartina (**L**) (obtenida de *Stevia yaconensis* var. *subeglandulosa* Hieron.), Achalensólido (**Ach**) y 11,13-dehidroachalensólido (**DHAch**) (obtenidos de *S. achalensis* Hieron.); y dos derivados semisintéticos de **L** (compuestos **29** y **30**) obtenidos mediante reacciones de inserción de nitreno (ver Capítulo 7). Para ello, se realizaron ensayos sobre tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen, obtenidos a partir de cultivos celulares de monocapas de células Vero. Los ensayos fueron realizados por triplicado *in vitro* en presencia de distintas concentraciones de compuesto ensayado (entre 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los cultivos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con una concentración de $1,5 \times 10^6$ parásitos/mL durante 24 h; y se contaron los parásitos vivos utilizando una cámara de Neubauer. En estos ensayos se utilizó benznidazol como compuesto de referencia.

La evaluación de la actividad tripanocida arrojó resultados preliminares interesantes. El efecto de los compuestos naturales y de sus derivados sobre tripomastigotes se muestran en la Figura 9.4 (compuestos naturales) y en la Figura 9.5 (**L** y sus derivados).

Para el grupo de compuestos naturales (ver Figura 9.4), se observó que tanto **L** como **Ach** poseen actividad tripanocida, mientras que **DHAch** es inactivo. Estos resultados

coinciden con reportes previos que indican que la saturación del doble enlace exocíclico en LS, acarrea, en general, una disminución o pérdida de la actividad tripanocida (Sülsen y Martino, 2018; Muschietti y Ulloa, 2016; Schmidt et al., 2009). Si bien se trata de un estudio preliminar, se estimó el valor de IC_{50} para **L** en $3,95 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($16,01 \mu\text{M}$), para **Ach** en $4,39 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($18,03 \mu\text{M}$) y para **DHAch** en $177,81 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($>100 \mu\text{M}$). Resulta llamativo que **L** haya resultado más activo que estafietina (IC_{50} $102,31 \mu\text{M}$) (Sülsen et al., 2019), siendo que son isómeros de posición; indicando que un doble enlace C1–C10 incrementa 6 veces la actividad respecto de un doble enlace exocíclico C10–C14.

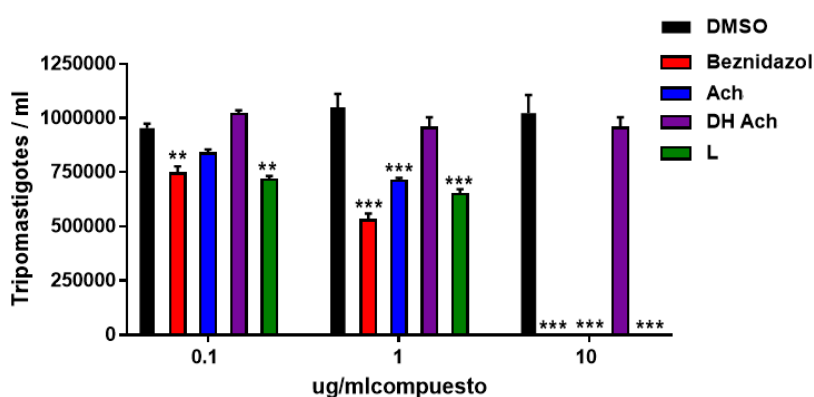


Figura 9.4: Actividad tripanocida de guanidólidos naturales: ludartina (**L**), achalensólido (**Ach**) y 11,13-dehidroachalensólido (**DHAch**). Test estadístico ANOVA de dos vías comparado contra DMSO ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

Por otra parte, los compuestos obtenidos a partir de **L** por reacciones de inserción de nitreno (compuestos **29** y **30**) ofrecieron muy buenos resultados (ver Figura 9.5). Si bien el compuesto **29** a $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ es menos activo que **L**, rápidamente éste llega al 100 % de inhibición a $5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Se están desarrollando ensayos a concentraciones entre 1 y $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ del compuesto **29** tendientes a explorar este comportamiento.

En función de los criterios adoptados por la DNDi y el GHIT se tuvo en cuenta el IC_{50} en μM para realizar comparaciones entre **L** y sus derivados. Tanto el compuesto **29** como el **30** presentan una mejora en la bioactividad ensayada, con valores de IC_{50} inferiores al compuesto natural de partida (Ludartina presentó un IC_{50} de $16,05 \mu\text{M}$). El compuesto **29** fue el más activo de la serie contra la forma infectiva del *T. cruzi*, con una $IC_{50} = 8,33 \mu\text{M}$; mientras que el compuesto **30** presenta una $IC_{50} = 12,72 \mu\text{M}$, que es inferior a **L** pero superior al compuesto **29** (ver Figura 9.6). A partir de lo anteriormente observado podemos decir que las modificaciones introducidas en la estructura de **L** permitieron encontrar compuestos nuevos con actividad tripanocida mejorada. El valor de IC_{50} para la droga de referencia en este ensayo (benznidazol) fue de $8,08 \mu\text{M}$.

Finalmente, cabe aclarar que, como se trata de ensayos preliminares, queda por evaluar la actividad tripanocida de todos los compuestos a otras concentraciones para comprender en profundidad su comportamiento.

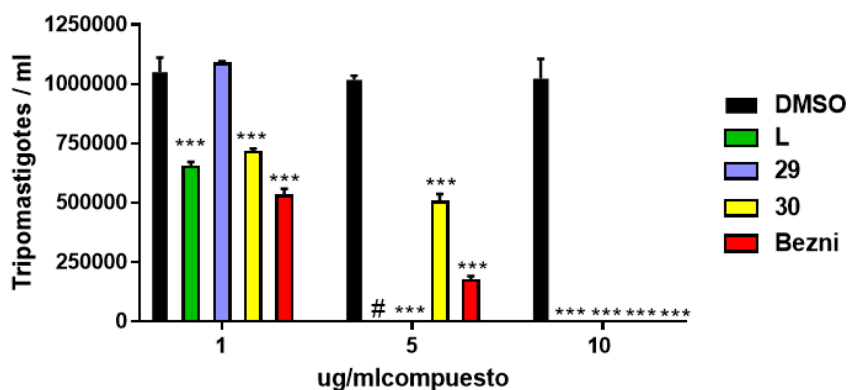


Figura 9.5: Actividad tripanocida de Ludartina (L) y sus derivados. Test estadístico ANOVA de dos vías comparado con DMSO *** $p < 0,0005$. #N.d.: No determinado.

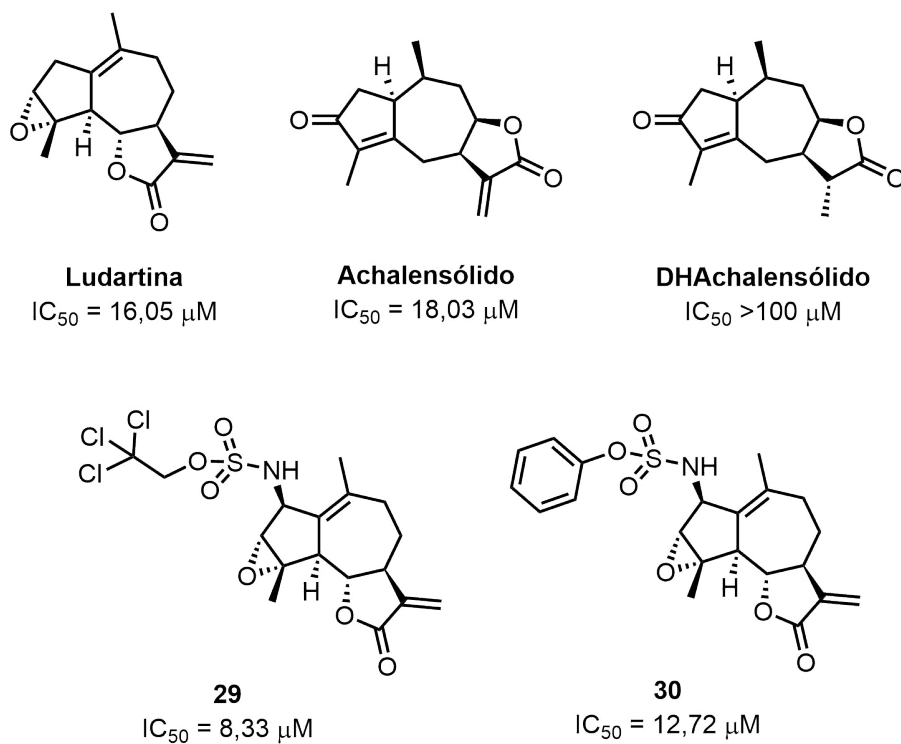


Figura 9.6: Estructura química de los compuestos ensayados frente a tripomastigotes de *T. cruzi*. Se muestra el valor de IC_{50} calculado para cada uno definido como la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de la población.

9.4. Parte Experimental

9.4.1. Parásitos

Los efectos de los compuestos naturales (11,13-dehidroachalensólido, Achalensólido y Ludartina) y derivados semisintéticos (compuesto **29** y compuesto **30**) fueron evaluados sobre el estadio infectivo tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Tulahuen.

La obtención de los tripomastigotes involucró dos instancias de infección: en la primera instancia, los tripomastigotes se obtuvieron de sangre de ratones infectados al día 11 post infección. La sangre obtenida con heparina fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos e incubada a 37 °C durante 2 h. Luego de ese tiempo, se tomó el plasma conteniendo los parásitos, se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 10 minutos y el pellet conteniendo los parásitos se disolvió en medio de cultivo RPMI conteniendo 10 % de suero bovino fetal (SBF). En la segunda instancia, dichos tripomastigotes, fueron utilizados para infectar cultivos de la línea celular Vero a fin de replicar al parásito. Para ello, las células Vero en una confluencia del 40 % fueron infectadas con los parásitos obtenidos como se indicó previamente. Luego de 48 h, las células se lavaron para eliminar todos los parásitos extracelulares y se colocó medio de cultivo DMEM completo. Se incubaron 5 días más para permitir la replicación y la liberación de tripomastigotes al medio de cultivo. Se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min. Los parásitos obtenidos fueron contados en cámara de Neubauer y utilizados para los experimentos posteriores o congelados para su conservación a -80 °C (Stempin et al., 2017; Márquez et al., 2018).

9.4.2. Ensayos para evaluar *in vitro* la actividad antiprotozoaria

Los efectos tripanocidas de los compuestos naturales y derivados, se evaluaron en tripomastigotes obtenidos como se mencionó anteriormente, se resuspendieron en medio RPMI completo, se contaron y la concentración de parásitos se ajustó a $1,5 \times 10^6$ /mL (Esteva et al., 2002). Los parásitos se sembraron (100 μ l/pocillo) por triplicado en una microplaca de 96 pocillos, y se agregaron 100 μ L de cada compuesto/pocillo (1 a 100 μ g/mL, concentración final) de las distintas diluciones de compuestos, beznidazol o DMSO se utilizaron como control. Las placas se incubaron durante 24 h, y los parásitos vivos restantes se contaron en una cámara de Neubauer como está descrito en la bibliografía (Sülsen et al., 2007). El porcentaje de inhibición se calculó como $100 - [(\text{parásitos vivos en los pocillos después del tratamiento compuesto})/(\text{parásitos vivos en pocillos no tratados}) \times 100]$.

9.4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el test ANOVA de dos vías a través del programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Valores de p $** < 0,005$; $*** < 0,0005$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Parte III: Conclusiones parciales

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad biológica de diferentes tipos de compuestos naturales y sobre derivados aminados de guaianólidos.

Actividad antiproliferativa

Los ensayos de actividad antiproliferativa sobre un grupo de withanólidos aislados a partir de las partes aéreas de *Eriolarynx ichromomides* (Solanaceae), mostraron que estos compuestos presentan actividad moderada a potente sobre un panel representativo de líneas tumorales de cáncer humano. Los compuestos más activos fueron withafisalinas con un grupo etil o metil acetal en C-18 y un patrón de sustitución 1-oxo-2,5-dien-4 β ,5 β -dihidroxi en los anillos A y B. Se propone que las diferencias en la bioactividad podrían estar relacionadas a una diferencia en la lipofilicidad de las moléculas, tal y como se observa al comparar los valores de cLogP de estos compuestos. Además, al comparar los resultados obtenidos con el grupo de withafisalinas aisladas de especies de *Deprea*, se concluye que un grupo hidroxilo en posición C-4 es esencial para la potencia de la actividad ensayada en withafisalinas.

La evaluación de la actividad antiproliferativa de fisangulidinas de especies de *Deprea* mostró que sólo dos de ellas resultaron activas, sugiriendo que el tipo de cadena lateral en estos compuestos no altera la actividad resultante y que un arreglo 1-oxo-2,4-dieno-6 β en el anillo A y B juega un papel importante en la actividad antiproliferativa de esta clase de withanólidos. De esta manera, a través de estos estudios se pudo contribuir a ampliar el espectro de bioactividad para fisangulidinas, withanólidos poco explorados hasta el momento.

Por otra parte, los ensayos de selectividad frente a células de fibroblasto humano indicaron que los compuestos más activos sería selectivos hacia las células cancerosas. Además, se ensayó si estos compuestos interactúan con la glicoproteína-P. Los resultados indican que nuestros compuestos no serían sustratos de P-gp, por lo tanto, no serían extruidos de la célula tumoral. Esto marca una diferencia significativa con los compuestos de referencia utilizados (vinblastina y paclitaxel) mostrando que los withanólidos poseerían mejores propiedades farmacocinéticas.

Los ensayos de actividad antiproliferativa sobre un grupo de sesquiterpenos aislados de *Senecio volckmannii*, mostraron que estos compuestos poseen una actividad moderada. Arreglos estructurales específicos conducen a mejorar la potencia biológica de estos compuestos tales como la posesión de un grupo isopropenilo en C-7; y un grupo β -OH

en posición C-1.

Finalmente, se evaluó la actividad antiproliferativa sobre un grupo de guaianólidos naturales y sus derivados aminados. Los sustratos naturales de partida que resultaron con potencia antiproliferativa presentan en su esqueleto un grupo α -metileno- γ -lactona, grupo que asegura la bioactividad en estos compuestos (Arantes et al., 2011; Schmidt, 2006). Las reacciones de formación de un nuevo enlace C–N que no modificaron el doble enlace exocíclico, condujeron a la obtención de derivados con mayor potencia antiproliferativa que los correspondientes sustratos de partida. Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran claramente que las modificaciones introducidas en la estructura química de los metabolitos potencia la bioactividad ensayada.

Actividad tripanocida

En un estudio preliminar, se ensayó la actividad tripanocida de tres guaianólidos naturales sin antecedentes de estudios para esta bioactividad. Se probó la actividad de un grupo de compuestos a tres concentraciones diferentes buscando observar su influencia sobre una población de tripomastigotes de *T. cruzi*. Los resultados muestran que el grupo α -metileno- γ -lactona es esencial para la actividad de estas lactonas sesquiterpénicas. Los compuestos naturales con esta característica estructural, **L** y **Ach**, demostraron ser potentes inhibidores del crecimiento de tripomastigotes de *T. cruzi*. Además, aquellos obtenidos por aminación catalítica de **L** resultaron ser más potentes que el sustrato natural. En general, se pudo observar que las modificaciones introducidas en el esqueleto natural favorecieron la actividad ensayada, siendo estos productos de 1,3 a 2 veces más potentes. No obstante, tal como se mencionó anteriormente este estudio constituyó un primer acercamiento a la búsqueda de compuestos líderes con actividad tripanocida; resta en un futuro ampliar el ensayo a otras concentraciones y profundizar en aspectos relacionados al mecanismo de acción.

Capítulo 10

Conclusiones Generales y Proyecciones

*Solo quien pasa por el hielo del dolor
llega al incendio del amor.*

Chiara Lubich

10.1. Conclusiones generales

La Química de Productos Naturales es una disciplina científica en la que confluyen, como aguas de distintas corrientes o ríos que se unen para un cauce común, otras ramas de la Química Orgánica. Este trabajo de tesis doctoral pone de manifiesto dicha confluencia, dado que sus resultados fueron fruto del aporte conjunto de distintas “corrientes”: estudios fitoquímicos, análisis biosintéticos, concordancias quimiotaxonómicas, estudios espectroscópicos convencionales y no convencionales, estudios de actividad biológica y de derivatización de compuestos de origen vegetal. Estos distintos “ríos” permitieron el abordaje y la resolución de la totalidad de los objetivos propuestos.

10.1.1. Fitoquímica

Para este trabajo resultó de interés el estudio fitoquímico de especies nativas y/o endémicas del NOA pertenecientes a las Fam. Asteraceae y Solanaceae, que no tuvieron estudios fitoquímicos previos, o bien, cuyo estudio haya sido incompleto. Luego, se propuso el estudio fitoquímico de *Eriolarynx iochromoides* y *Jaborosa oxipétala* con el objetivo de aislar withanólidos, lactonas esteroidales frecuentemente encontradas en especies que pertenecen a la Fam. Solanaceae. Los estudios aquí reportados mostraron que estas especies son ricas en withanólidos con diversidad de arreglos estructurales. Dichos resultados están de acuerdo con la química de especies de los mismos géneros previamente estudiadas.

De *E. iochromoides* se aislaron tres nuevos withanólidos con esqueleto tipo withafisalina junto con dos withanólidos con esqueleto no modificado reportados en la literatura

(Figura 10.1). Los hemiacetales en C-18 son altamente reactivos frente a alcoholes simples lo que explica la formación de acetales derivados de metanol y etanol, dos alcoholes utilizados en el proceso de aislamiento de estos compuestos.

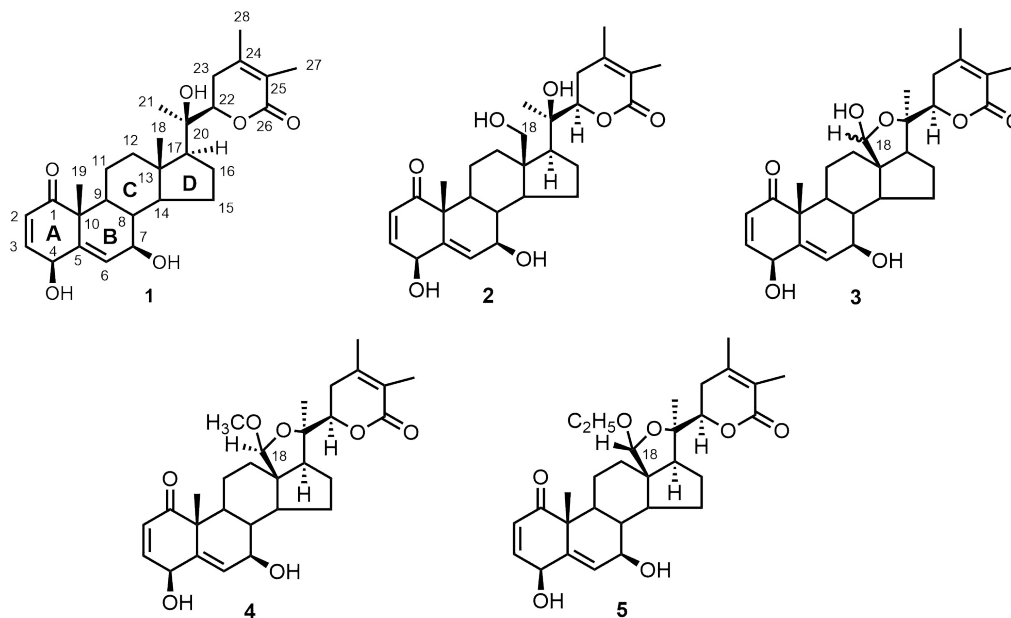


Figura 10.1: Compuestos aislados de *Eriolarynx ichromoides*

De *J. oxipetala* se aislaron withanólidos con esqueletos tipo sativólido, trechonólido, espiránico en C-23 y espiránico en C-22. Todos ellos ya reportados en otras especies de *Jaborosa*.

Del estudio fitoquímico de *Senecio volckmannii* se aislaron y caracterizaron sesquiterpenos: cuatro sesquiterpenos tipo eremofilano (12–15), tres nor-sesquiterpenos (16–19) y dos lactonas sesquiterpénicas (19 y 20), junto con ocho compuestos conocidos (21–28) (Figura 10.3)

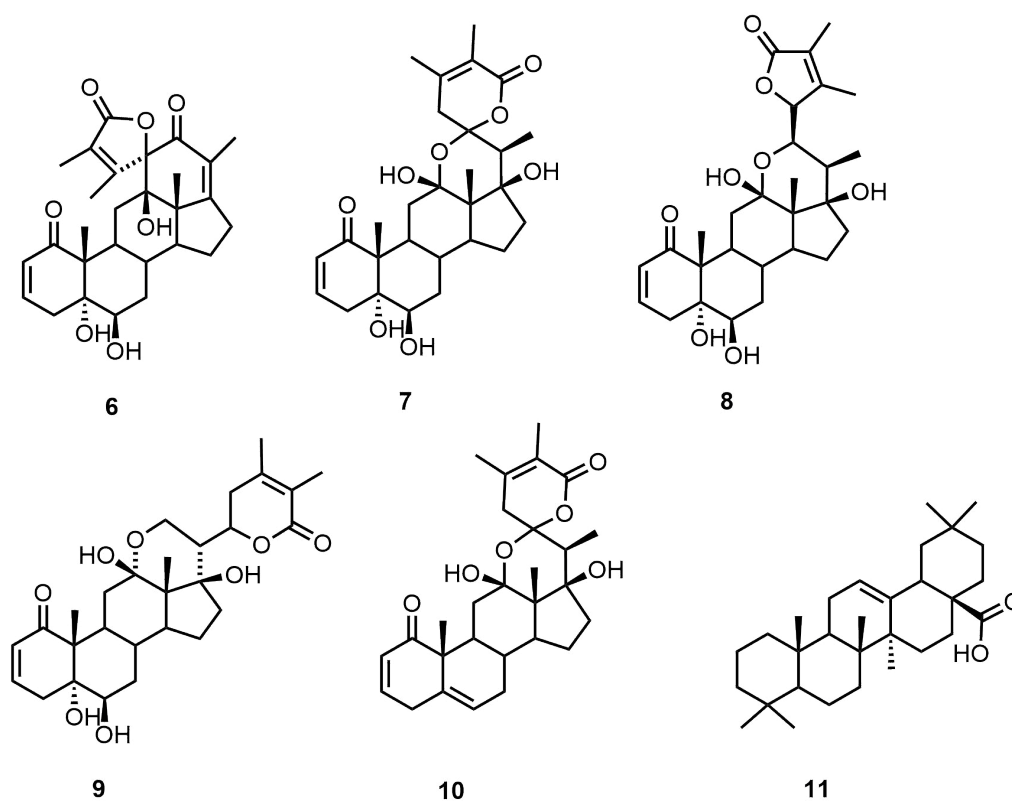


Figura 10.2: Compuestos aislados de *Jaborosa oxipetala*

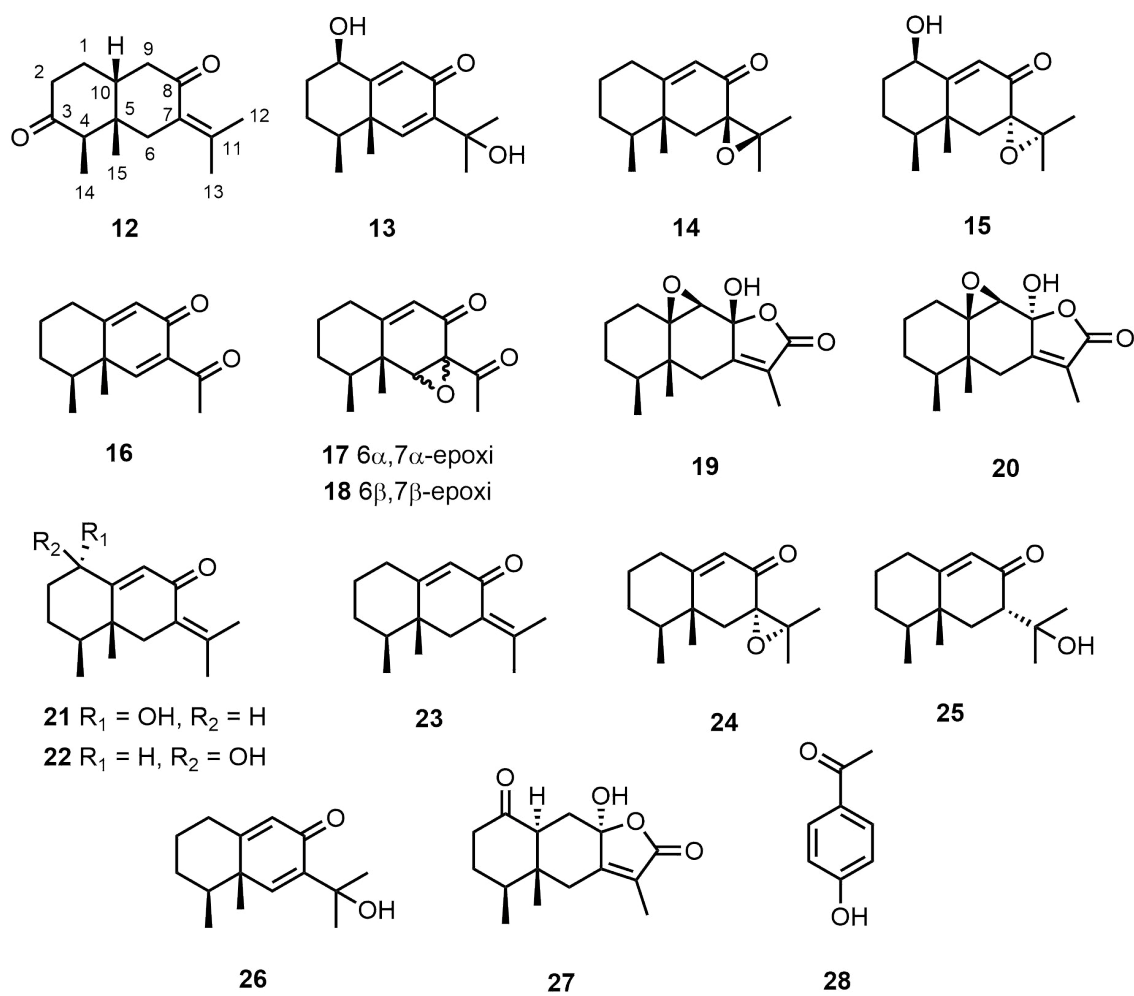


Figura 10.3: Compuestos aislados de *Senecio volckmannii*

10.1.2. Biosíntesis

El conocimiento de la biosíntesis de metabolitos secundarios en muchas ocasiones ha sido útil para plantear la síntesis total de productos naturales, como así también, para el diseño de nuevas moléculas que interfieran con un determinado proceso metabólico. A pesar de que, entre los numerosos tipos de sustancias producidas por las plantas, algunos carezcan de una función definida en el metabolismo, su abundancia o ausencia proporcionan a una planta características químicas útiles para su clasificación o su aprovechamiento para el hombre.

A lo largo del estudio de las especies pertenecientes a la Fam. Solanaceae se observó la aparición de núcleos específicos: withanfisalinas en el caso de *E. ichromoides* y sativólido, trechonólido, espiránico C-23 y espiránico C-22 para *J. oxipetala*.

En el caso de las withafisalinas aisladas de *E. ichromoides* tal como es evidente por los metabolitos aislados en el presente trabajo, el esqueleto withafisalina se formaría por oxidación de la posición C-18 hasta aldehído para dar lugar al característico anillo hemiacetálico resultado del ataque nucleofílico del OH-20.

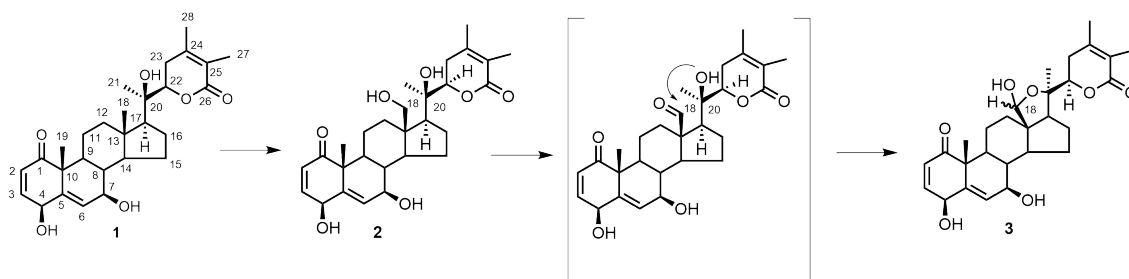


Figura 10.4: Propuesta biosintética para los núcleos encontrados en *E. ichromoides*

Para el caso de los compuestos aislados de *J. oxipetala* en todos ellos, la posición C-12 resulta clave. Partiendo de un esqueleto normal, la unión hemiacetálica se genera a partir de una función cetona sobre C-12 y un hidroxilo en C-21, para dar lugar al esqueleto sativólido; o un hidroxilo sobre C-22 para generar el esqueleto trechonólido. Cuando el C-12 participa de una unión C-12/C-23, la formación de dicho enlace involucraría un carbonilo en C-12, el cual sería atacado por un enolato, dando origen al núcleo espiránico C-23. Por lo tanto, los compuestos precursores de todos los compuestos aislados, tendrían una función cetona en C-12 y las posiciones C-21 o C-22 oxigenadas (ver Figura 10.5). Esta propuesta biosintética se elaboró en base a estudios previos (Misico et al., 2011).

Para el caso de los sesquiterpenos aislados de *S. volckmannii* se propone una ruta biosintética para los metabolitos aislados, que involucra como metabolito precursor a la dehidrofukinona, sesquiterpeno aislado en apreciable cantidad comparado con el resto; y que ha sido encontrado en numerosas especies del género *Senecio*. Luego, a partir de dehidrofukinona podría suceder la epoxidación del doble enlace C7-C11 para dar lugar a epóxidos con diferentes orientaciones. A partir de aquí pueden ocurrir dos cosas: a) la apertura del epóxido permitiría la formación de un grupo de compuestos que tienen en común la formación de un doble enlace entre C6-C7. Los núcleos así formados se

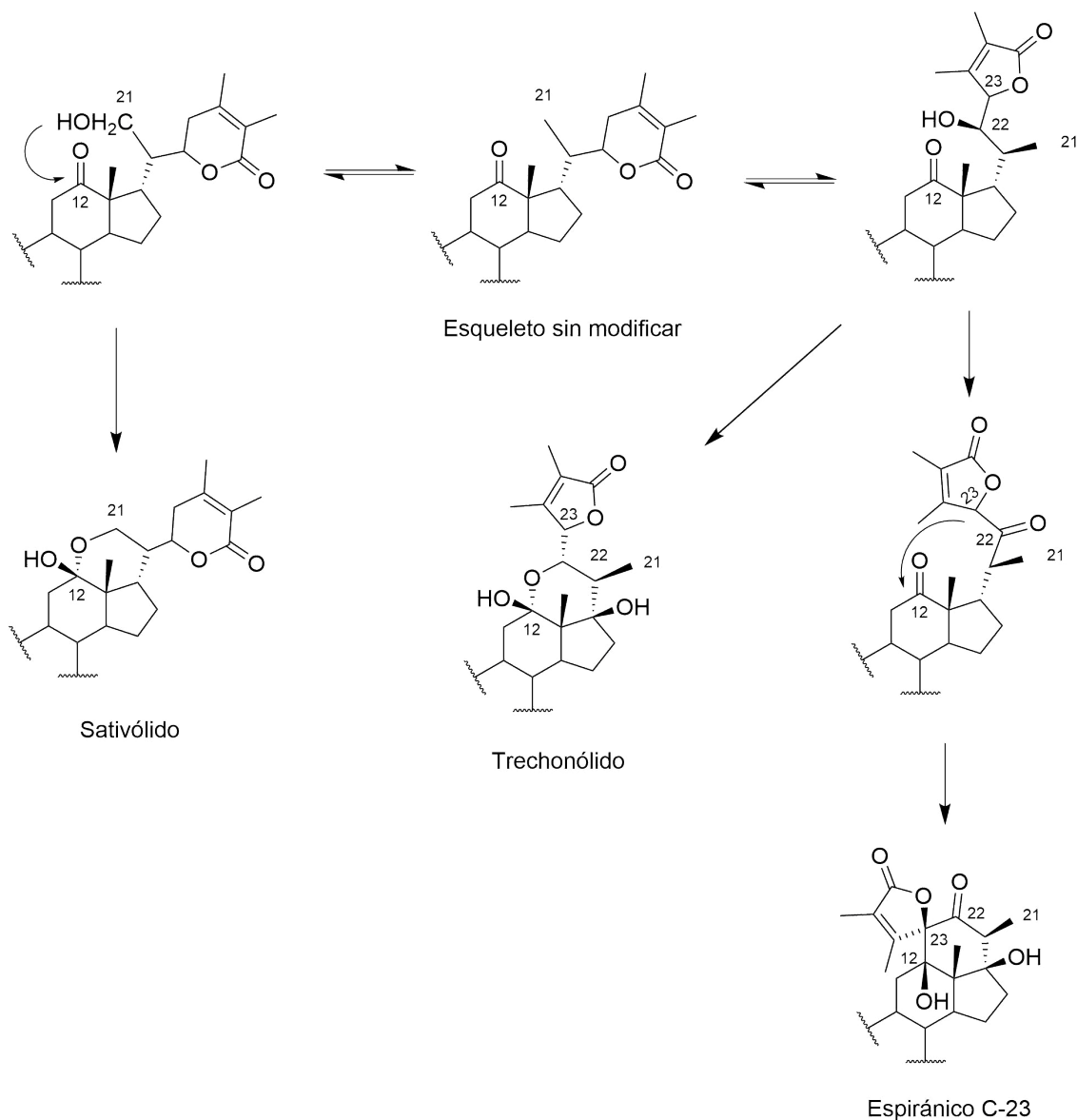


Figura 10.5: Propuestas biosintéticas para los núcleos aislados de *J. oxipetala*

oxidarían *a posteriori* para obtener compuestos con una función cetona en C11 y/o a continuación se epoxidaría el doble enlace C6-C7. b) la oxidación de la posición C1 de la dehidrofukinona o del derivado epoxidado de la dehidrofukinona. Estas relaciones biosintéticas entre los metabolitos aislados se encuentran esquematizadas en la figura 10.6.

10.1.3. Quimiotaxonomía

La clasificación más reciente de la Fam. Solanaceae está basada en un análisis genómico de regiones secuenciales del ADN (Särkinen et al., 2013). Este estudio realmente

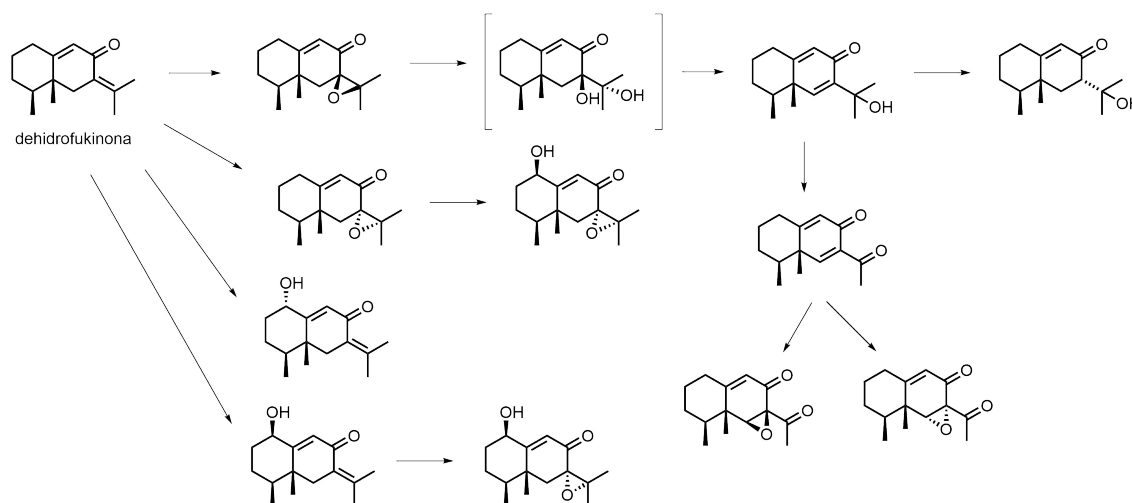


Figura 10.6: Propuestas biosintéticas para los sesquiterpenos aislados de *S. volckmannii*.

completo ayudó a integrar muchos estudios filogenéticos previamente publicados para esta familia. A la fecha se han descrito más de 800 withanólidos con una aparición casi exclusiva en la familia Solanaceae, subfamilia Solanoideae. El hecho de conocer el contenido de withanólidos de más de 60 especies de la subfamilia Solanoideae hace posible realizar algunas consideraciones quimiotaxonómicas. Hay casos donde se han encontrado arreglos estructurales exclusivos de un género o en una tribu en particular, lo cual convierte a estos withanólidos en marcadores quimiotaxonómicos a nivel genérico o tribal respectivamente.

Jaborosa es un buen ejemplo de esto, ya que contiene arreglos exclusivos a nivel genérico con aparición en varias especies: trechonólidos, sativólidos, espiránicos en C-23 y espiránicos en C-22.

El esqueleto trechonólido es el más difundido en el género estando presente en la mayoría de las especies que pertenecen al clado Andino (*J. integrifolia*, *J. lanciniata*, *J. lanigera*, *J. leucotricha*, *J. magellanica*, *J. parviflora*, *J. rotacea*, *J. sativa*, *J. cabrerana* y *J. oxipetala*).

El esqueleto sativólido puede ser encontrado en seis especies (*J. caulescens*, *J. rotacea*, *J. sativa*, *J. cabrerana*, *J. reflexa* y *J. oxipetala*) y los withanólidos espiránicos en C-22 están presentes en *J. rotacea*, *J. kurtzii* y *J. oxipetala*. Los withanólidos espiránicos en C-23, en cambio, fueron aislados en cuatro especies (*J. integrifolia*, *J. odonelliana*, *J. runcinata* y *J. oxipetala*). Los hallazgos aquí presentados muestran que *J. oxipetala* presenta withanólidos comunes a los dos clados (ex secciones) en los que se agrupan las especies del género *Jaborosa*; situación presentada también por *J. integrifolia*. La similitud estructural entre los compuestos 6 y 8 aislados en *J. oxipetala*, sugieren que estos compuestos pueden haber tendido un precursor biosintético común; y probablemente tanto *J. oxipetala* como *J. integrifolia* puedan ser especies que vinculen ambos clados.

Por otra parte, fruto del estudio fitoquímico de *Eriolarynx iochromoides* se pudieron aislar y caracterizar un grupo 3 de withafisalininas. Esto permite reafirmar la condición de marcadores a nivel de tribu para este tipo de esqueleto withanólido.

En cuanto a los sesquiterpenos tipo eremofilano aislados de *S. volckmannii*, los mis-

mos son marcadores quimiotaxonómicos de la familia Asteraceae. Además, estos resultados están de acuerdo con los estudios quimiotaxonómicos realizados por Zhao et al. (2015) que establecen que *S. volckmannii* pertenece a la sección "eremofilanólido", sección química dentro del género *Senecio* que incluye especies que contienen sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas con esqueleto tipo eremofilano.

Todos estos hallazgos, sin lugar a duda podrán ayudar a los botánicos como elementos a tener en cuenta para la ubicación de las especies vegetales, especialmente cuando se encuentran en una posición incierta dentro de la sistemática de Solanaceae y Asteraceae.

10.1.4. Espectroscopía

En el caso de los sesquiterpenos tipo eremofilano aislados de *S. volckmannii*, no fue posible establecer la configuración de algunos centros quirales presentes en dichas moléculas haciendo uso de métodos convencionales de RMN. Por ello, se aplicó una metodología que combinó los aportes del cálculo computacional y la medición de parámetros de RMN en medios anisotrópicos tales como los acoplamientos dipolares residuales (RDCs). Dicho estudio permitió resolver la dificultad registrada en los casos en que la orientación de grupos epóxidos resultaba desafiante. Dado el uso reciente de estas metodologías combinadas, la resolución de la configuración de sesquiterpenos tipo eremofilano antes mencionada permitió validar estas nuevas estrategias de elucidación estructural.

10.1.5. Derivatización

Se llevó a cabo la funcionlización *late-stage* de tres guaianólidos naturales: L, Ach, DHAch. Estas LS se obtienen en abundante cantidad a partir de *Stevia yaconensis* var. *subglandulosa* (L) y de *S. achalensis* (Ach y DHAch). Las reacciones que se llevaron a cabo establecieron nuevos enlaces C-N en la estructura natural y, en algunos casos, no se modificaron los grupos funcionales presentes en la molécula. El panel de compuestos obtenidos se caracteriza por poseer posiciones terciarias, secundarias o alílicas aminadas como así también aziridinación de doble enlace en algunos casos. Este sería el primer reporte de reacciones de aminación catalizada por complejos de Rh(II) de guaianólidos para la funcionalización de enlaces C(sp³)-H (Figura 10.7).

10.1.6. Biología

La actividad biológica y la diversidad estructural de los productos naturales son insuperables por cualquier librería de compuestos sintéticos disponible. Como tales, estas estructuras privilegiadas sirven como plataformas importantes y prevalidas biológicamente para el diseño de librerías de compuestos en la búsqueda de nuevos fármacos. Los avances recientes se han centrado en mejorar la potencia, la selectividad y la farmacocinética de los productos naturales bioactivos a través de la modificación estructural, lo que lleva a la aparición de una serie de compuestos líderes. En este trabajo se realizaron estudios de actividad antiproliferativa y de actividad tripanocida de acuerdo a los antecedentes que presentaban los metabolitos ensayados.

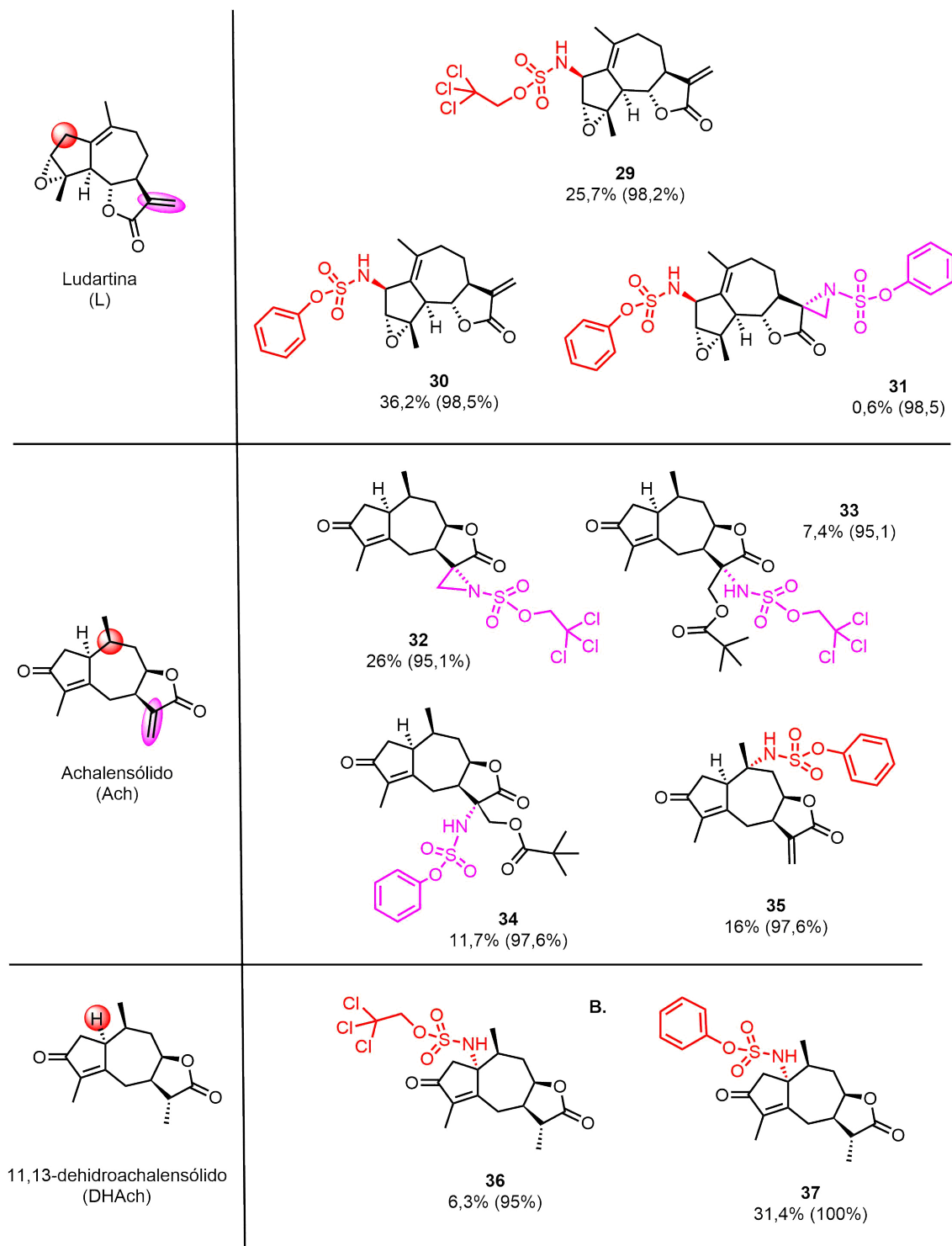


Figura 10.7: Derivados obtenidos por aminación de los guaianólidos L, Ach y DHAch

Sobre withanólidos aislados de *E. iochromoides* y de especies del género *Deprea* se realizaron ensayos de actividad antiproliferativa sobre un panel representativo de líneas tumorales de cáncer humano: A549 (carcinoma de alvéolo pulmonar), HBL-100 (mama), HeLa (cuello uterino), SW1573 (pulmón), T-47D (mama, distinta invasividad, sin receptor de estrógeno) y WiDr (colon). Este estudio permitió establecer algunas relaciones estructura-actividad. Los resultados más relevantes sugieren que los withanólidos tipo withafisalina con una función acetal son los más activos. Además, un grupo hidroxilo en la posición C-4 sería esencial para la actividad de este tipo de compuestos. Para el caso de los withanólidos tipo fisangulidina un arreglo 1-oxo-2,4-dieno-6 β en el anillo A y B juega un papel importante en la actividad antiproliferativa de esta clase de compuestos.

El análisis de la selectividad de los compuestos activos frente a todas las líneas tumorales indicó que los withanólidos son selectivos hacia células cancerosas. Además, los compuestos más activos no son sustratos de P-gp, indicando que los compuestos ensayados pueden ser mejores que los agentes quimioterapéuticos clásicos, ya que no tendría lugar la extrusión de los agentes citotóxicos por parte de P-gp. Así, por medio de estos ensayos podemos decir que los withanólidos analizados serían muy buenos candidatos a líderes, que luego de modificaciones adecuadas podrían convertirse en compuestos líderes prometedores.

Ensayos semejantes fueron realizados para los compuestos aislados de *S. volckmannii*. Los resultados obtenidos indican que algunos de estos compuestos son moderadamente activos frente al panel celular ensayado. Los resultados obtenidos permiten establecer algunas relaciones estructura-actividad: el grupo isopropenilo en C-7 sería necesario para la actividad antiproliferativa; además, la presencia de un grupo hidroxilo en C-1 con orientación β mejoraría la actividad.

Para el caso de los guaianólidos naturales y sus derivados aminados, los resultados obtenidos indican que las modificaciones introducidas en los esqueletos naturales mejoran significativamente la actividad antiproliferativa siempre y cuando el grupo α -metileno- γ -lactona no sea alterado. Es decir, la introducción de un átomo de N altera profundamente las propiedades biológicas de estas moléculas. Es interesante notar que los compuestos más activos resultaron ser selectivos hacia células tumorales y, además, no son sustratos de P-gp. Ambos resultados muestran claramente la potencialidad que tienen estos compuestos como agentes bioactivos. Por lo tanto, resulta altamente prometedor continuar explorando este tipo de reacciones, buscando mejorar sus rendimientos y explorar nuevos sitios de sustitución. A su vez, los ensayos de actividad tripanocida indicaron que estos compuestos (naturales y derivados) son activos contra tripomastigotes de *T. cruzi* inhibiendo su crecimiento. En este caso también se observó como la aminación mejoró significativamente la actividad ensayada.

En síntesis, en el presente capítulo se señalaron los alcances de los resultados obtenidos por su valor en el área de la fitoquímica, la quimiotaxonomía, la biosíntesis, la actividad biológica y la semisíntesis, tendientes a mejorar las propiedades químicas que ayuden al aprovechamiento de los metabolitos secundarios aquí estudiados. Dichos alcances responden a los objetivos planteados para este trabajo de tesis doctoral. Por otra parte, y como se decía al comienzo, el enfoque de este trabajo implicó la confluencia de distintas disciplinas científicas demostrando que la investigación en productos naturales

es una tarea multidisciplinaria.

10.2. Proyecciones

Desde luego este trabajo deja “puertas abiertas”, futuras posibilidades que de darse lo enriquecerían aún más. En este sentido, resulta interesante el estudio fitoquímico de la especie *E. fasciculata* sin estudios previos al día de la fecha. De esta forma, se completaría el panel de withanólidos que caracterizarían al género *Eriolarynx*, y que serviría para acompañar los estudios quimiotaxonómicos y filogenéticos que en la actualidad se están realizando sobre *Iochrominae*. En el mismo sentido, completar el estudio fitoquímico de las especies del género *Jaborosa*, podría aportar algunas luces al oscuro panorama que hoy rodea a la posición filogenética de dicho género en el árbol filogenético de la Fam. Solanaceae.

Las reacciones de aminación catalizadas por complejos de Rh(II) pueden ser mejoradas buscando otras condiciones de reacción que aumenten la quimioselectividad en los casos en que la aziridinación es una competencia para la aminación. Para ello se pueden evaluar otras fuentes de nitreno, como así también otros complejos de Rh(II) diferentes a los aquí utilizados.

Resulta crucial conocer el mecanismo por el cual los compuestos ensayados ejercen su actividad antiproliferativa y tripanocida. En el caso de los estudios de actividad antiproliferativa sobre líneas tumorales humanas, sería interesante llevar a cabo un estudio del ciclo celular buscando establecer como estos compuestos lo modifican. Una vez que se conozca cual es el *target* de acción de estos compuestos se podrá realizar el diseño de modificaciones racionales tendientes a mejorar su bioactividad. Para el caso de los ensayos de actividad tripanocida sería interesante evaluar la actividad sobre otros estadios del parásito tal como la epimastigote, como así también llevar adelante ensayos que determinen el mecanismo de acción de estos compuestos. Una vez determinado el blanco de acción será relevante también el estudio *in silico* de la interacción de estos compuestos con su proteína blanco. El conocimiento que arrojan estos estudios disminuye el tiempo y los costos en el diseño de nuevos compuestos bioactivos. En este contexto, en una futura estancia post-doctoral se propone la evaluación *in silico* de inhibidores de cruzipaina, cisteínproteasa principal del parásito *T. cruzi*.

Capítulo 11

Materiales y Métodos

11.1. Procesamiento del material vegetal

11.1.1. Recolección de muestras vegetales

En todos los casos las especies se recolectaron entre los meses de diciembre y marzo (temporada de verano), debido a que las especies se encontraban en estado de floración o fructificación. Las muestras vegetales fueron recolectadas e identificadas por la Dra. Glora Barboza (IMBIV-CONICET). Las muestras se dejaron secar en la oscuridad y en ausencia de humedad. Una vez secas, se pulverizaron utilizando un molino y se guardaron hasta su utilización al abrigo de la luz y en condiciones de baja humedad. La cantidad de material vegetal de cada especie utilizado, puede consultarse en la parte experimental del capítulo correspondiente.

11.2. Solventes y Reactivos

Todos los solventes utilizados para la purificación fueron destilados antes de ser utilizados: AcOEt, Hx, MeOH, DCM. Para las cromatografías en fase normal, las mezclas de solventes más utilizadas fueron: Hx:AcOEt (en gradiente de polaridad creciente, 1:0 a 0:1) y DCM:MeOH (en gradiente de polaridad creciente, 1:0 a 4:1). Para las cromatografías CCD en fase reversa y cromatografías líquidas de alta performance (HPLC), se emplearon mezclas de CH₃CN:H₂O en diferentes proporciones.

11.3. Instrumental

11.3.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN-¹H, y ¹³C y los experimentos en dos dimensiones fueron tomados a temperatura ambiente (25 °C) en un equipo Bruker Avance II AV-400 (400,13 MHz para ¹H y 100,03 MHz para ¹³C) y Bruker AVANCE II 500 MHz (BBO-ATM probe o BBI-ATM probe, operando a 500,13 MHz para ¹H y 125,76 MHz para ¹³C). Para el cálculo de RDCs, los experimentos de HSQC protón-acoplado y protón-desacoplado

fueron colectados en un equipo Bruker AVANCE III, operando a 500,13 MHz para ^1H y 125,76 MHz para ^{13}C y 76,77 MHz para ^2H .

Los espectros de RMN se llevaron a cabo en cloroformo deuterado (CDCl_3 , 99,8 % Sigma Aldrich) empleando TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se describen en ppm y están referenciados respecto a la señal del TMS. Las constantes de acoplamiento (J) en los espectros de RMN- ^1H se expresan en Hertz (Hz). Las asignaciones de los distintos protones y carbonos se llevaron a cabo mediante el análisis de los experimentos de correlación homo y heteronucleares COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

11.3.2. Espectroscopía Infrarroja

Los espectros de IR fueron tomados utilizando un microscopio Thermo Scientific Nicolet iN10 FT-IR. Los productos se disolvieron en cloroformo grado espectroscópico en todos los casos y se aplicaron en forma de película sobre una placa espejada. Los valores de número de onda se expresan en cm^{-1} .

11.3.3. Espectroscopia Ultravioleta

Los espectros UV-vis fueron tomados utilizando un espectrofotómetro Shimadzu-260 con celdas de cuarzo de 1 mL de volumen y 1 cm de paso óptico empleando MeOH grado espectroscópico como disolvente. Los valores de la longitud de onda máxima de absorción (λ) se expresan en nm.

11.3.4. Rotación Óptica

La actividad óptica se midió en un polarímetro Jasco P-1010. Las medidas se tomaron usando la línea D del sodio (589 nm), a una temperatura de 24 °C. Los compuestos se disolvieron en CHCl_3 o Acetona grado HPLC. La longitud de la celda empleada para las medidas es de 10 cm, y la concentración de cada muestra se expresa en g/100 mL de disolución.

Las mediciones de Dispersión Óptica Rotatoria se hicieron en un espectrofotómetro Jasco J-810, empleando cloroformo como solvente, en las longitudes de onda especificadas en cada caso, para obtener indirectamente (utilizando las relaciones de Kramers-Kronig) los valores de rotación óptica específica en muestras de muy baja concentración (menor a 1 mg/mL).

11.3.5. Espectrometría de masas

Los espectros de masas de alta resolución se realizaron empleando las técnicas de ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) o electrospray (ESI) en un espectrómetro HRQTOFMS (Micro TOFQ II Bruker Daltonics). Las señales se describen en unidades de carga/masa (m/z) y entre paréntesis se indica el ión al que corresponde y las intensidades relativas de cada señal respecto al pico base.

11.4. Técnicas Cromatográficas

La cromatografía es un método de separación que se basa en las diferentes afinidades de un compuesto por una fase móvil y otra estacionaria. Para purificar los metabolitos secundarios se emplearon una combinación de estas técnicas cromatograficas:

- Cromatografía líquida al vacío (CLV) o cromatografía vacuum: Se utilizó Sílica Gel 60 Merck 0,063-0,2 mm (70-230 mesh) como fase estacionaria y para las pastillas de siembra.
- Cromatografía en columna (CC) en fase normal: En este caso se empleó Sílica Gel 60 G (70-230 mesh ASTM; 0.063-0,200 mm de diámetro de partícula o 230-400 mesh ASTM; 0,040-0,063 mm), Merck. El gel de sílice se suspende en un eluyente o permanece seco. La muestra a separar se aplica como cabeza, adsorbida en sílica (pastilla de siembra).
- Cromatografía de exclusión molecular (CEM): En este tipo de cromatografía se utilizó como fase estacionaria Sephadex LH-20 (Sigma) que requiere una previa estabilización del polímero en una suspensión con MeOH (4,1 mL/g) durante, al menos, 12 h. A continuación, se vierte en la columna y se deja reposar 1h. Los sistemas que normalmente son utilizados para estabilizar y luego eluir la columna son Hx-DCM-MeOH (2:1:1) y MeOH. La muestra a separar se filtra y se disuelve en el sistema de elución a una concentración no superior al 5% del volumen muerto de la columna. Estas columnas pueden reutilizarse tras lavarse con MeOH y estabilizarse con el eluyente a utilizar.
- Cromatografía en capa delgada (CCD) en fase normal: Se utilizaron con fines analíticos para hacer el seguimiento de CLV, CC, CR, reacciones y con fines preparativos. En todos los casos se utilizaron cromatofolios base aluminio o vidrio (20x20 cm) de sílica gel 60 G (Merck) de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia de 254 nm (F₂₅₄). La detección de los compuestos en las placas se realizó por fluorescencia, empleando una lámpara ultravioleta a una longitud de onda de 254 o 360 nm, o bien, utilizando indicador de anisaldehído con posterior calentamiento a 120 ° C.
- Cromatografía centrífuga radial (CR): Se utilizó un Cromatotrón modelo 7924T de Harrison Research. Se emplearon discos de un espesor de 1 mm preparados con Sílica Gel 60 G PF₂₅₄ Merck (contiene yeso como ligante).
- Cromatografía líquida de alta performance (HPLC): Se utilizó un equipo con bomba binaria, desgasificador de solvente y autosampler Agilent Series 1200 L, Santa Clara, CA, EEUU. Se utilizó una columna Phenomenex (C18, 100 x 2,10 mm, 2,6 μm) a 35 °C, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de acetonitrilo y agua.

Apéndice A

Producción Científica

*Pones tu pie en el camino y si no cuidas tus pasos,
nunca sabes a donde te pueden llevar.*

John Ronald Reuel Tolkien, El Señor de los
Anillos

A.1. Artículos publicados en revistas indexadas

- Castro, S. J.; Casero, C. N.; Padrón, J. M.; Nicotra, V. E.; “Selective Antiproliferative Withanolides from Species in the Genera *Eriolarynx* and *Deprea*” *J. Nat. Prod.* **2019**. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00117
- Castro, S. J.; García, M. E.; Padrón, J. M.; Navarro-Vázquez, A.; Gil, R. R.; Nicotra, V. E.; “Phytochemical Study of *Senecio volckmannii* Assisted by CASE-3D with Residual Dipolar Couplings and Isotropic ¹H/¹³C NMR Chemical Shifts” *J. Nat. Prod.* **2018**. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00162.

A.2. Resúmenes publicados en Eventos Científicos

- “Aminación catalítica de guaianólidos para la obtención de nuevos compuestos bioactivos” Sebastián J. Castro; Viviana E. Nicotra; José M. Padrón; Benjamin Darses; Philippe Dauban. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica. 5 al 8 de noviembre de 2019. Mendoza, Argentina.
- “Análisis estructural de sesquiterpenos de *Senecio volckmannii* mediante acoplamiento residual dipolar”. Sebastián J. Castro; Chakicherla Gayathri; Roberto R. Gil; Manuela E. García. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. 8 al 11 de noviembre de 2017. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.
- “Withafisalinas y withanólidos relacionados de *Eriolarynx iochromoides* (Solana-ceae)”. Sebastián J. Castro y Viviana E. Nicotra. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. 8 al 11 de noviembre de 2017, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

- “Sesquiterpenos tipo eremofilano de *Senecio volckmannii*. Evaluación de su actividad antiproliferativa.” Sebastián J. Castro; José M. Padrón; Viviana E. Nicotra. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica. 8 al 11 de noviembre de 2017. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.
- “Estudio fitoquímico preliminar de la especie *Senecio volckmannii* (Asteraceae)”. Sebastián J. Castro; Viviana E. Nicotra. VII Jornadas de Posgrado y I Jornada de Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. 6 al 8 de abril de 2016, Córdoba, Argentina.

Bibliografía

Y así, del mucho leer y del poco dormir, se le secó el cerebro de manera que vino a perder el juicio.

Miguel de Cervantes Saavedra

- ABRAMOVITCH, R. A., BAILEY, T. D., TAKAYA, T. y UMA, V. Reaction of methanesulfonyl nitrene with benzene. Attempts to generate sulfonyl nitrenes from sources other than the azides. *J. Org. Chem.*, vol. 39(3), páginas 340–345, 1974.
- ADAM, K.-P. y ZAPP, J. Biosynthesis of isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, vol. 48, páginas 953–959, 1998.
- ADEKENOV, S. M. Synthesis of new derivatives of natural guaianolides. *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 48(6), páginas 876–882, 2013.
- ADEKENOV, S. M. Chemical modification of arglabin and biological activity of its new derivatives. *Fitoterapia*, vol. 110, páginas 196–205, 2016.
- AHERN, J. R. y WHITNEY, K. D. Sesquiterpene lactone stereochemistry influences herbivore resistance and plant fitness in the field. *Ann. Bot.*, vol. 113, 2014.
- AHMED, A. A. Eremophilanes from *Senecio desfontainei*. *J. Nat. Prod.*, vol. 54(1), páginas 271–272, 1991.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*, vol. 19, páginas 716–723, 1974.
- ALDERSON, J. M., PHELPS, A. M., SCAMP, R. J., DOLAN, N. S. y SCHOMAKER, J. M. Ligand-controlled, tunable silver-catalyzed C–H amination. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136(48), páginas 16720–16723, 2014.
- AMORIM, M. H. R., DA COSTA, R. M. G., LOPES, C. y BASTOS, M. M. S. M. Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 43, páginas 559–579, 2013.
- ANASTASSIOU, A. G., SIMMONS, H. E. y MARSH, F. D. Cyanonitrene. Reaction with saturated hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 87, páginas 2296–2297, 1965.

- ANDERBERG, A. A., BALDWIN, B. G., BAYER, R. G., BREITWIESER, J., JEFFREY, C., DILLON, M. O., ELDENAS, P., FUNK, V., GARCIA-JACAS, N., HIND, D. J. N., KARIS, P. O., LACK, H. W., NESOM, G., NORDEMSTAM, B., OBERPRIELER, C., PANERO, J. L., PUTTOCK, C., ROBINSON, H., STUESSY, T. F., SUSANNA, A., URTUBEY, E., VOGT, R., WARD, J. y WATSON, L. E. Compositae. En *Flowering Plants. Eudicots: The Families and Genera of vascular plants* (editado por J. W. Kadereit y C. Jeffrey), vol. 8, capítulo 4. Springer, Berlín, Heidelberg, 2007.
- ANDREWS-SMITH, W., GILL, H. K., SMITH, R. W. y WHITING, D. A. Stages in the biosynthesis of the epoxy lactol side chain of Nic-1, insect antifeedant steroid of *Nicandra physaloides*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, páginas 291–296, 1991.
- ANESINI, C. A., ALONSO, M. R. y MARTINO, R. F. Antiproliferative and cytotoxic activities. En *Sesquiterpene Lactones. Advances in their chemistry and biological aspects* (editado por V. P. Sülsen y V. S. Martino), capítulo 13, página 303. Springer, Cham, Suiza, 2018.
- ANJANEYULU, A. S. R., RAO, D. S. y LEQUESNE, P. W. Withanolides, biologically active natural steroidal lactones: A review. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 20, páginas 135–261, 1998.
- ARANTES, F. F. P., BARBOSA, L. C. A., MALTHA, C. R. A., DEMUNER, A. J., FIDENCIO, P. H. y CARNEIRO, J. W. M. A quantum chemical and chemometric study of sesquiterpene lactones with cytotoxicity against tumor cells. *J. Chemometrics*, vol. 25(8), páginas 401–407, 2011.
- ARAUJO, A., JANSEN, A. M., REINHARD, K. y FERREIRA, L. F. Paleoparasitology of Chagas disease: A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 104, páginas 9–16, 2009.
- ARAUJO, M. S. S., MARTINS-FILHO, O. A., PEREIRA, M. E. S. y BRENER, Z. A combination of benzimidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45(6), páginas 819–824, 2000.
- ARCINIEGAS, A., PÉREZ-CASTORENA, A. L., REYES, S., CONTRERAS, J. L. y DE VIVAR, A. R. New oplopane and eremophilane derivatives from *Robinsonecio gerberifolius*. *J. Nat. Prod.*, vol. 66(2), páginas 225–229, 2003.
- ARIAS CASSARÁ, M. L., BORKOSKY, S. A., SIERRA, M. G., BARDÓN, A. y YBARRA, M. I. Two new furanoeremophilanes from *Senecio santelisis*. *Chem. Biodivers.*, vol. 7(7), páginas 1745–1753, 2010.
- ARNOLD, L., MARX, A., THIELE, C. M. y REGGELIN, M. Polyguanidines as chiral orienting media for organic compounds. *Chem. Eur. J.*, vol. 16, páginas 10342–10346, 2010.
- AU, S. M., HUANG, J. S., CHE, C. M. y YU, W. Y. Amidation of unfunctionalized hydrocarbons catalyzed by ruthenium cyclic amine or bipyridine complexes. *J. Org. Chem.*, vol. 65(23), páginas 7858–7864, 2000.
- AUFDERHEIDE, A. C., SALO, W., MADDEN, M., STREITZ, J., BUIKSTRA, J., GUHL, F., ARRIAZA, B., REINER, C., JR., L. E. W., FORNACIARI, G. y ALLISON, M. A 9000-year record of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101(7), páginas 2034–2039, 2004.

- AVENDAÑO, C. y MENÉNDEZ, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1ra edición, 2008.
- BADO, S., MAREGGIANI, G., AMIANO, N., BURTON, G. y VELEIRO, A. S. Lethal and sublethal effects of withanolides from *Salpichroa organifolia* and analogues on *Ceratitits capitata*. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52(10), páginas 2875–2878, 2004.
- BAI, L., WANG, H., ZHANG, L. Y., WANG, A. H. y BAI, J. Ludartin treatment exhibits promising inhibitory effect on the epithelial ovarian cancer growth and metastasis. *Bangladesh J. Pharmacol.*, vol. 11(3), páginas 646–651, 2016.
- BARANI, M., FIORAVANTI, S., PELLACANI, L. y TARDELLA, P. A. Cs₂CO₃ or CaO as promoters of ethyl N-[(4-methylphenyl)sulphonyl]oxycarbamate in amination reactions. *Tetrahedron*, vol. 50(38), páginas 11235 – 11238, 1994.
- BARBOZA, G. y HUNZIKER, A. T. Estudios sobre solanaceae XXV. Revision de *Jaborosa Kurtziana*, vol. 19, páginas 77–153, 1987.
- BARBOZA, G. E. Estudios palinologicos en *Jaborosa* Juss. y *Trechonaetes* Miers. (Solana-ceae). *Bol. Acad. Nac. Ci. Republ. Argent.*, vol. 57, páginas 357–376, 1986.
- BARBOZA, G. E. Dicotyledoneae, Solanaceae. En *Flora Argentina* (editado por F. O. Zuloaga, M. J. Belgrano y A. M. Anton), vol. 13, capítulo Jaborosa, página 303. IBODA-IMBIV, San Isidro, 2013.
- BARBOZA, G. E., HUNZIKER, A. T., BERNARDELLO, G., COCUCCHI, A. A., CARRIZO GARCÍA, C., FUENTES, V., DILLON, M., BITTRICH, V., COSA, M. T., R, S., ROMANUTTI, A., ARROYO, S. y ANTON, A. M. The families and genera of vascular plants (Flowering plants, Eudicots). En *Solanaceae* (editado por K. K), páginas 295–357. Springer International Publishing, Switzerland, 2016.
- BARMAN, D. N. y NICHOLAS, K. M. Copper-catalyzed intramolecular C–H amination. *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2011(5), 2011.
- BASSO, A. V., NICOTRA, V. E., PARRA, A., MARTINEZ, A. y FERNÁNDEZ-VIVAS, A. Biotransformation of salpichrolides A, C and G by three filamentous fungi. *J. Nat. Prod.*, vol. 79, páginas 1658–1667, 2016.
- BAUER, A. y BRONSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, páginas 35–60, 2014.
- BENAIM, G., SANDERS, J. M., GARCIA-MARCHAN, Y., COLINA, C., LIRA, R., CALDERA, A. R., PAYARES, G., SANOJA, C., BURGOS, J. M., LEON-ROSSELL, A., CONCEPCION, J. L., SCHIJMAN, A. G., LEVIN, M., OLDFIELD, E. y URBINA, J. A. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.*, vol. 49, páginas 892–899, 2006.
- BERGMAN, A. M., PINEDO, H. M., TALIANIDIS, I., VEERMAN, G., LOVES, W. J., VAN DER WILT, C. L. y PETERS, G. J. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, vol. 88, páginas 1963–1970, 2003.

- BERNARDINI, S., TIEZZI, A., MASCI, V. L. y OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Nat. Prod. Res.*, vol. 32(16), páginas 1926–1950, 2018.
- BHAT, W. W., LATTO, S., RAZDAN, S., DHAR, N., RANA, S., DHAR, R. S., KHAN, S. y VISHWAKARMA, R. A. Molecular cloning, bacteria expression and promoter analysis of squalene synthase from *Withania somnifera* (L.) dunal. *Gene*, vol. 499, páginas 25–36, 2012.
- BICK, J. A. y LANGE, B. M. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 415, páginas 146–154, 2003.
- BIFULCO, G., DAMBRUOSO, P., GOMEZ-PALOMA, L. y RICCIO, R. Determination of relative configuration in organic compounds by NMR spectroscopy and computational methods. *Chem. Rev.*, vol. 107(9), páginas 3744–3779, 2007.
- BOAIANI, M., BOIANI, L., MERLINO, A., HERNANDEZ, P., CHIDICHIMO, A., CAZZULO, J. J., CERECETTO, H. y GONZALEZ, M. Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as antitrypanosomatid agents: synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, páginas 4426–4433, 2009.
- BOGER, D. L. y BROTHERTON, C. E. Total synthesis of azafluoranthene alkaloids: rufescine and imeluteine. *J. Org. Chem.*, vol. 49, páginas 4050–4055, 1984.
- BOHLMANN, F. y KNOLL, K. H. Zwei neue Eremophilan-derivate aus *Senecio suaveolens*. *Liebigs Ann. Chem.*, páginas 470–472, 1979.
- BONETTO, G. M., GIL, R. R., OBERTE, J. C., VELEIRO, A. S. y BURTON, G. Novel withanolides from *Jaborosa sativa*. *J. Nat. Prod.*, vol. 58(5), páginas 705–711, 1995.
- BORMAN, S. The many faces of combinatorial chemistry. *Chem. Eng. News*, vol. 81(43), páginas 45–56, 2003.
- BÖTTCHER, B. y THIELE, C. M. Determining the stereochemistry of molecules from residual dipolar couplings (RDCs). *eMagRes*, vol. 1, páginas 169–180, 2012.
- BRADBURY, R. H. Cancer. En *Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 1. Springer-Verlag, 2007.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. y JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, páginas 394–424, 2018.
- BREINBAUER, R., MANGER, M., SCHECK, M. y WALDMANN, H. Natural product guided compound library development. *Curr. Med. Chem.*, vol. 9, páginas 2129–2145, 2002a.
- BREINBAUER, R., VETTER, I. R. y WALDMANN, H. From protein domains to drug candidates – Natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 41(16), páginas 2878–2890, 2002b.

- BRESLOW, D. S. y SLOAN, M. F. A new synthesis of sulfonylnitrenes. *Tetrahedron Letters*, vol. 9(51), páginas 5349–5352, 1968.
- BRESLOW, R. y GELLMAN, S. H. Intramolecular nitrene carbon-hydrogen insertions mediated by transition-metal complexes as nitrogen analogs of cytochrome P-450 reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105(22), páginas 6728–6729, 1983.
- BUCKNER, F. S. y NAVABI, N. Advances in chagas disease drug development: 2009–2010. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 23(6), páginas 609–616, 2010.
- BUDESINSKY, M., HOLUB, M., SAMAN, D., SMITALOVA, Z., ULUBELEN, A. y OKSUZ, S. Structure of istabulin A and istabulin B – two sesquiterpene lactones from *Smyrniium olusatrum*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, vol. 49(5), páginas 1311–1317, 1984.
- BUDHIRAJA, R. D., KRISHAN, P. y SUDHIR, S. Biological activity of withanolides. *J. Sci. Ind. Res.*, vol. 59, páginas 904–911, 2000.
- BUENDIA, J., DARSE, B. y DAUBAN, P. Tandem Catalytic C(sp³)-H Amination/Sila-Sonogashira Hagihara Coupling Reactions with Iodine Reagents. *Angew. Chemie*, vol. 54, páginas 5697–5701, 2015.
- BUENDIA, J., GRELIER, G., DARSE, B., JARVIS, A. G., TARAN, F. y DAUBAN, P. The multiple facets of iodine(iii) compounds in an unprecedented catalytic auto-amination for chiral amine synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 55, páginas 7530–7533, 2016.
- BUEVICH, A. V. y ELYASHBERG, M. E. Synergistic combination of CASE algorithms and DFT chemical shift predictions: A powerful approach for structure elucidation, verification, and revision. *J. Nat. Prod.*, vol. 79(12), páginas 3105–3116, 2016.
- BURNELL, E. E. y DE LANGE, C. A. Effects of interaction between molecular internal motion and reorientation on NMR of anisotropic liquids. *J. Magn. Reson.*, vol. 39, páginas 461–480, 1980.
- BURTON, G. y OBERTI, J. C. Withanolidos en Solanaceae. *Kurtziana*, vol. 28(1), páginas 81–93, 2000.
- BUSTOS, D. A., SALEM, R., VARELA, P., PACCIARONI, A., SOSA, V. y BUSTOS, D. Bioreduction of (-)-achalensolide using pure strains of *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. *Org. Chem. Indian J.*, vol. 10(4), páginas 140–144, 2014.
- CABRERA, A. L. Compuestas argentinas: Clave para la determinación de los géneros. *Revista Mus. Argent. Ci. Nat., Bot.*, vol. 2, páginas 291–362, 1961.
- CABRERA, A. L., FREIRE, S. E. y ESPINAR, L. A. Flora fanerogámica argentina. En *Asteraceae, parte 13* (editado por A. T. Hunziker), vol. 62, página 180. CONICET, 1999.
- CAMPOS, M. C. O., LEON, L. L., TAYLOR, M. C. y KELLY, J. M. Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 193(1), páginas 17–19, 2014.

- CANALES, A., JIMÉNEZ-BARBERO, J. y MARTÍN-PASTOR, M. Review: Use of residual dipolar couplings to determine the structure of carbohydrates. *Magn. Reson. Chem.*, vol. 50, páginas S80–S85, 2012.
- CANE, D. E. Enzymatic formation of sesquiterpenes. *Chem. Rev.*, vol. 90, páginas 1089–1103, 1990.
- CARDONA, D., QUINONES, W., TORRES, F., ROBLEDO, S., VELEZ, I. D., CRUZ, V., NOTARIO, R. y ECHEVERRI, F. Leishmanicidal activity of withajardins and acnistins. An experimental and computational study. *Tetrahedron*, vol. 62(29), páginas 6822–6829, 2006.
- CARLSON, E. E. Natural products as chemical probes. *ACS Chem. Biol.*, vol. 5, páginas 639–653, 2010.
- CARNEY, J. R., SCHEUER, P. J. y KELLY-BORGES, M. Three unprecedented chloro steroids from the Maui sponge *Strongylacidon* spp.: kiheisterones C, D and E. *J. Org. Chem.*, vol. 58(12), páginas 3460–3462, 1993.
- CARR, D., SEDEN, T. P. y TURNER, R. W. A convenient synthesis of n-arylsulphonyl sulphoximines. *Tetrahedron Letters*, vol. 10, páginas 477–478, 1969.
- CASERO, C. N., NOVILLO, J. N., GARCÍA, M. E., OBERTI, J. C., NICOTRA, V. E., PEÑÉÑORY, A. B. y BISOGNO, F. R. Mild Thio-Diversification of Bioactive Natural Products. Withaferin A: A Case study. *ChemistrySelect*, vol. 2(32), páginas 10470–10475, 2017.
- CASERO, C. N., OBERTI, J. C., OROZCO, C. I., CÁRDENAS, A., BRITO, I., BARBOZA, G. E. y NICOTRA, V. E. Withanolides from three species of the genus *Deprea* (Solanaceae). Chemotaxonomical considerations. *Phytochemistry*, vol. 110, páginas 83–90, 2015.
- CASTAÑAR, L., GARCÍA, M., HELLEMANN, E., NOLIS, P., GIL, R. R. y PARELLA, T. One-shot determination of residual dipolar couplings: application to the structural discrimination of small molecules containing multiple stereocenters. *J. Org. Chem.*, vol. 81(22), páginas 11126–11131, 2016.
- CASTAING, M., LOISEAU, A. y CORNISH-BOWDEN, A. Synergy between verapamil and other multidrug-resistance modulators in model membranes. *J. Biosci.*, vol. 32(4), páginas 737–746, 2007.
- CASTRO, S. J., CASERO, C. N., PADRÓN, J. M. y NICOTRA, V. E. Selective antiproliferative withanolides from species in the genera *Eriolarynx* and *Deprea*. *J. Nat. Prod.*, vol. 82(5), páginas 1338–1344, 2019.
- CASTRO, S. J., E., G. M., PADRÓN, J. M., NAVARRO-VÁZQUEZ, A., GIL, R. R. y NICOTRA, V. E. Phytochemical study of *Senecio volckmannii* assisted by CASE-3D with residual dipolar couplings and isotropic $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR chemical shifts. *2018*, vol. 81(11), páginas 2329–2337, 2018.
- CERNAK, T., DYKSTRA, K. D., TYAGARAJAN, S., VACHAL, P. y KRŠKA, S. W. The medicinal chemist's toolbox for late stage functionalization of drug-like molecules. *Chemical Society Reviews*, vol. 45(3), páginas 546–576, 2016.

- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 1(2), páginas 159–218, 1909.
- CHANDA, B. M., VYAS, R. y BEDEKAR, A. V. Investigations in the transition metal catalyzed aziridination of olefins, amination, and other insertion reactions with bromamine-T as the source of nitrene. *J. Org. Chem.*, vol. 66(1), páginas 30–34, 2001.
- CHANG, C., BAHADDURI, P. M., POLLI, J. E., SWAAN, P. W. y EKINS, S. Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metab. Dispos.*, vol. 34(12), páginas 1976–1984, 2006.
- CHANG, G., GUIDA, W. C. y STILL, W. C. An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, páginas 4379–4386, 1989.
- CHAO, C.-H., CHOU, K.-J., WEN, Z.-H., WANG, G.-H., WU, Y.-C., DAI, C.-F. y SHEU, J.-H. Paraminabeolides A-F, cytotoxic and anti-inflammatory marine withanolides from the soft coral *Paraminabea acronocephala*. *J. Nat. Prod.*, vol. 74(5), páginas 1132–1141, 2011.
- CHAREST, M. G., LERNER, C. D., BRUBAKER, J. D., SIEGEL, D. R. y MYERS, A. G. A convergent enantioselective route to structurally diverse 6-deoxytetracycline antibiotics. *Science*, vol. 308(5720), páginas 395–398, 2005.
- CHATURVEDI, D. Sesquiterpene Lactones: Structural diversity and their biological activities. En *Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry* (editado por V. K. Tiwari y B. B. Mishra), páginas 313–334. Research Signpost, Kerala, India, 2011.
- CHAUVIER, D., KEGELAER, G., MORJANI, H. y MANFAIT, M. Reversal of multidrug resistance-associated protein-mediated daunorubicin resistance by camptothecin. *J. Pharm. Sci.*, vol. 91, páginas 1765–1775, 2002.
- CHEN, F. E., HUANG, D. B., CHEN, Y. Q. y GHOSH, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. *Nature*, vol. 391, páginas 410–413, 1998.
- CHEN, J.-J., CHEN, C.-J., YAO, X.-J., JIN, X.-J. y GAO, K. Eremophilane-type sesquiterpenoids with diverse skeletons from *Ligularia sagitta*. *J. Nat. Prod.*, vol. 77(6), páginas 1329–1335, 2014.
- CHEN, K. y BARAN, P. S. Total synthesis of eudesmane terpenes by site-selective C–H oxidations. *Nature*, vol. 459(7248), páginas 824–828, 2009.
- CHEN, K., ESCHENMOSER, A. y BARAN, P. S. Strain-release in C–H bond activation? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 48(51), páginas 9705–9708, 2009.
- CHEN, L.-X., HE, H. y QIU, F. Natural withanolides: An overview. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, páginas 705–740, 2011.

- CHEN, W., CHANG, F., CHEN, Z. H. J., WU, Y. y WU, C. Tubocapsenolide A, a novel withanolide, inhibits proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-231 cells by thiol oxidation of heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, vol. 283, páginas 17184–17193, 2008.
- CHERNYAK, N. y GEVORGYAN, V. General and efficient copper-catalyzed three-component coupling reaction towards imidazoheterocycles: One-pot synthesis of alpidem and zolpidem. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 49(15), páginas 2743–2746, 2010.
- CHIANG, Y. M., CHANG, J. Y., KUO, C. C., CHANG, C. Y. y KUO, Y. H. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, vol. 66(4), páginas 495–501, 2005.
- CHIAPPINI, N. D. y MACK, J., J. B. C.; DU BOIS. Intermolecular $c(sp^3)$ -H amination of complex molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 57(18), páginas 49656–4959, 2018.
- CHOE, S., DILKES, B. P., GREGORY, B. D., ROSS, A. S., YUAN, H., NOGUCHI, T., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, S., TANAKA, A., YOSHIDA, S., TAX, F. E. y FELDMANN, K. A. The arabidopsis dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.*, vol. 119(3), páginas 897–908, 1999.
- CHOUHDARY, M. I., YOUSUF, S., SAMREEN, AHMED, S. y UR RAHMAN, A. New leishmanicidal physalins from *Physalis minima*. *Nat. Prod. Res.*, vol. 21(10), páginas 877–883, 2007.
- CHOUHDURY, M., YOUSUF, S., NAWAZ, S. A., AMHED, S. y RAHMAN, A. U. Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 52, páginas 1358–1361, 2004.
- CICERO, D. O., BARBATO, G. y BAZZO, R. NMR analysis of molecular flexibility in solution: A new method for the study of complex distributions of rapidly exchanging conformations. Application to a 13-residue peptide with an 8-residue loop. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117(3), páginas 1027–1033, 1995.
- CIRIGLIANO, A. M., VELEIRO, A. S., BONETTO, G. M., OBERTI, J. C. y BURTON, G. Spiranoïd withanolides from *Jaborosa runcinata* and *Jaborosa araucana*. *J. Nat. Prod.*, vol. 59(8), páginas 717–721, 1996.
- CLARK, J. R., FENG, K., SOOKEZIAN, A. y WHITE, M. C. Manganese-catalysed benzylic $C(sp^3)$ -H amination for late-stage functionalization. *Nature Chemistry*, vol. 10(6), páginas 583–591, 2018.
- CLASS, S. Pharmaceutical review. *Chem. Eng. News*, vol. 80, página 39, 2002.
- COCUCCI, A. A. Evolutionary radiation in neotropical solanaceae. En *Solanaceae IV: Advances in biology and utilization* (editado por M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester y J. P. Jessop), páginas 9–22. Royal Botanic Gardens, Kew, 1999.
- COLLET, F., DODD, R. H. y DAUBAN, P. Catalytic c - h amination: recent progress and future directions. *Chem. Commun.*, vol. 34, páginas 5061–5074, 2009.

- CONFORTI, F., LOIZZO, M. R., STATTI, G. A., HOUGHTON, P. J. y MENICHINI, F. Biological properties of different extracts of two *Senecio* species. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, páginas 1–8, 2006.
- CORDELL, G. A. Biosynthesis of Sesquiterpenes. *Chemical Reviews*, vol. 76(4), páginas 425–460, 1976.
- CORNILESCU, G., MARQUARDT, J. L., OTTIGER, M. y BAX, A. Validation of protein structure from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, páginas 6836–6837, 1998.
- CRAGG, G. M. y NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharm.*, vol. 100, páginas 72–79, 2005.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M. y LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). En *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (editado por B. Curchanan, W. Gruissem y R. Jones), capítulo 14, páginas 1250–1318. American Society of Plant Physiologist, 2000.
- CROWLING, R. W. Endemism. En *Encyclopedia of Biodiversity* (editado por S. A. Levin), páginas 228–236. Academic Press, San Diego, second edición, 2013.
- CUEVAS, C., PÉREZ, M., MARTÍN, M. J., CHICHARRO, J. L., FERNÁNDEZ-RIVAS, C., FLORES, M., FRANCESH, A., GALLEGO, P., ZARZUELO, M., DE LA CALLE, F., GARCÍA, J., POLANCO, C., RODRÍGUEZ, I. y MANZANARES, I. Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafraicin B. *Org. Lett.*, vol. 2(16), páginas 2545–2548, 2000.
- DALBY, A., NOURSE, J. G., HOUNSHELL, W. D., GUSHURST, A. K. I., GRIER, D. L., LELAND, B. A. y LAUFER, J. Description of several chemical structure file formats used by computer programs developed at molecular design limited. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 32(3), páginas 244–255, 1992.
- DAMA, M. y BERGER, S. Polyacetylenes as a new alignment medium to measure residual dipolar couplings for chiral organic molecules. *Tetrahedron Lett.*, vol. 53, páginas 6439–6442, 2012.
- DANISHEFSKY, S. On the potential of natural products in the discovery of pharma leads: a case for reassessment. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 27(8), páginas 1114–1116, 2010.
- DAR, N. J., HAMID, A. y AHMAD, M. Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the indian ginseng. *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72(23), páginas 4445–4460, 2015.
- DARSES, B., JARVIS, A. G., MAFROUD, A.-K., ESTENNE-BOUHTOU, G., DARGAZANLI, G. y DAUBAN, P. Asymmetric synthesis of amines through rhodium-catalyzed C-H amination with sulfonimidoilnitrenes. *Synthesis*, vol. 45(15), páginas 2079–2087, 2013.
- DARSES, B., RODRIGUES, R., NEUVILLE, L., MAZURAS, M. y DAUBAN, P. Transition metal-catalyzed iodine(III)-mediated nitrene transfer reactions: efficient tools for challenging syntheses. *Chem. Comm.*, vol. 53(3), páginas 493–508, 2017.

- DAUBAN, P., SANIÈRE, L., TARRADE, A. y DODD, R. H. Copper-catalyzed nitrogen transfer mediated by iodosylbenzene $\text{PhI}=\text{O}$. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123(31), páginas 7707–7708, 2001.
- DAVIES, H. M. L., BOIS, J. D. y YU, J. Q. C–H functionalization in organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, páginas 1855–2038, 2011.
- DEANNA, R., LARTER, M. D., BARBOZA, G. E. y SMITH, S. D. Repeated evolution of a morphological novelty: A phylogenetic analysis of the inflated fruiting calyx in the Physalideae tribe (Solanaceae). *Am. J. Bot.*, vol. 106(2), páginas 270–279, 2019.
- DELGADO CIRILO, A., MINGUILLÓN LLOMBART, C. y JOGLAR TAMARGO, J. *Introducción a la química terapéutica*. Diego de Santos, segunda edición, 2003.
- DEQUIREZ, G., PONS, V. y DAUBAN, P. Nitrene chemistry in organic synthesis: Still in its infancy? *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 51(30), páginas 7384–7395, 2012.
- DEVELOUX, M., LESCURE, F.-X., LOUP, G. L. y PIALOUX, G. Maladie de Chagas. *Rev. Med. Interne*, vol. 30(8), páginas 686–695, 2009.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, LTD, 2da edición, 2002.
- DHAR, N., RANA, S., RAZDAN, S., BHAT, W. W., HUSSAIN, A., DHAR, R. S., VAISHNAVI, S., HAMBID, A., VISHWAKARMA, R. y LATTOO, S. K. Cloning and functional characterization of three branch point oxidosqualene cyclases from *Withania somnifera* (L.) dunal. *J. Biol. Chem.*, vol. 289(24), páginas 17249–17267, 2014.
- DICK, A. R. y SANFORD, M. S. Transition metal catalyzed oxidative functionalization of carbon-hydrogen bonds. *Tetrahedron*, vol. 62, páginas 2439–2463, 2006.
- DOAN, N. T. Q. y CHRISTENSEN, S. B. Thapsigargin, origin, chemistry, structure-activity relationships and prodrug development. *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, páginas 5501–5517, 2015.
- DOLLE, R. E., BOURDONNEC, B. L., WORM, K., MORALES, G. A., THOMAS, C. J. y ZHANG, W. Comprehensive survey of chemical libraries for drug discovery and chemical biology: 2009. *J. Comb. Chem.*, vol. 12(6), páginas 765–806, 2010.
- DOMINGUEZ, D. M., REINA, M., VILLARROEL, L., FAJARDO, V. y GONZÁLEZ-COLOMA, A. Bioactive furanoeremophilanes from *Senecio otites* Kunze ex DC. *Z. Naturforsch.*, vol. 63c, páginas 837–842, 2008.
- DURAN, F., LEMAN, L., GHINI, A., BURTON, G., DAUBAN, P. y DODD, R. H. Intramolecular $\text{PhI}=\text{O}$ mediated copper-catalyzed aziridination of unsaturated sulfamates: a new direct access to polysubstituted amines from simple homoallylic alcohols. *Org. Lett.*, vol. 4(15), páginas 2481–2483, 2002.
- DYKER, G. Transition metal catalyzed coupling reactions under c–h activation. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 38, páginas 1698–1712, 1999.

- EICH, E. *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites*. Springer, Berlín, 2008.
- EL-SHAZLY, A., DORAL, G. y WINK, M. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Senecio aegyptus* var. *discoideus* Bois. *Z. Naturforsch*, vol. 57c, páginas 434–439, 2002.
- ELYASHBERG, M., BLINOV, K., MOLODTSOV, S., SMURNYY, Y., WILLIAMS, A. J. y CHURANOVA, T. Computer-assisted methods for molecular structure elucidation: Realizing a spectroscopist's dream. *J. Cheminf.*, vol. 1(3), 2009.
- ELYASHBERG, M. E., BLINOV, K. A., WILLIAMS, A. J., MOLODTSOV, S. G., MARTIN, G. E. y MARTIROSIAN, E. R. Structure Elucidator: a versatile expert system for molecular structure elucidation from 1D and 2D NMR data and molecular fragments. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 44, páginas 771–792, 2004.
- ELYASHBERG, M. E., WILLIAMS, A. y BLINOV, K. *Contemporary computer-assisted approaches to molecular structure elucidation*. Royal Society of Chemistry, London, 2012.
- ENTHART, A., FREUDENBERGER, J. C., FURRER, J., KESSLER, H. y LUY, B. The CLIP/CLAP-HSQC: pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings. *J. Magn. Reson.*, vol. 192, páginas 314–322, 2008.
- ERMANIS, K., PARKES, K. E. B., AGBACK, T. y GOODMAN, J. M. Expanding DP4: application to drug compounds and automation. *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, páginas 3943–3949, 2016.
- ERMANIS, K., PARKES, K. E. B., AGBACK, T. y GOODMAN, J. M. Doubling the power of DP4 for computational structure elucidation. *J. Org. Chem.*, vol. 15, páginas 8998–9007, 2017.
- ESPINO, C. G. y DU BOIS, J. A Rh-catalyzed C–H insertion reaction for the oxidative conversion of carbamates to oxazolidinones. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 40(3), páginas 598–600, 2001.
- ESPINO, C. G., WEHN, P. M., CHOW, J. y DU BOIS, J. Synthesis of 1,3-difunctionalized amine derivatives through selective C-H bond oxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123(28), páginas 6935–6936, 2001.
- ESTÉOULE, A., DURÁN, F., RETAILLEAU, P., DODD, R. H. y DAUBAN, P. Enantioselective intramolecular copper-catalyzed aziridination of sulfamates. *Synthesis*, páginas 1251–1260, 2007.
- ESTEVA, M., RUIZ, A. M. y STOKA, A. M. *Trypanosoma cruzi*: methoprene is a potent agent to sterilize blood infected with trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, vol. 100(4), páginas 248–251, 2002.
- EVANS, D. A., BILODEAU, M. T. y FAUL, M. M. Development of the copper-catalyzed olefin aziridination reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116(7), páginas 2742–2753, 1994.

- EVANS, W. *Trease and Evans Pharmacognosy*. Bailliere Tindall, London, RU, 13 edición, 1989.
- FABIAN, L., SULSEN, V., FRANK, F., CAZORLA, S., MALCHIODI, E., MARTINO, V., LIZARRAGA, E., CATALÁN, C., MOGLIONI, A., MUSCHIETTI, L. y FINKIELSZTEIN, L. *In silico* study of structural and geometrical requirements of natural sesquiterpene lactones with trypanocidal activity. *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 13(10), páginas 1407–1414, 2013.
- FAJARDO, V., PODESTA, F., SHAMMA, M. y FREYER, A. J. New withanolides from *Jaborosa magellanica*. *J. Nat. Prod.*, vol. 54(2), páginas 554–563, 1991.
- FARNSWORTH, N. R., AKERELE, O., BINGEL, A. S., SOEJARTO, D. D. y GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 63(6), páginas 965–81, 1985.
- FIORI, K. W. y DU BOIS, J. Catalytic intermolecular amination of C-H bonds: Method development and mechanistic insights. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129(3), páginas 562–568, 2007.
- FISHER, N. H. Sesquiterpene lactones: Biogenesis and biomimetics transformations. En *Biochemistry of the mevalonic acid pathway to terpenoids* (editado por G. Towers y H. Towers), páginas 161–201. Plenum Press, Nueva York, 1990.
- FLACK, H. D. y BERNARDINELLI, G. The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. *Chirality*, vol. 20, páginas 681–690, 2008.
- FORSYTH, D. A. y SEBAG, A. B. Computed ¹³C-NMR chemical shifts via empirically scaled GIAO shieldings and molecular mechanics geometries. conformation and configuration from ¹³C shifts. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119(40), páginas 9483–9494, 1997.
- FRAGA, B. M. Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, páginas 1580–1610, 2011.
- FRANK, F. M., ULLOA, J., CAZORLA, S. I., MARAVILLA, G., MALCHIODI, E. L., GRAU, A., MARTINO, V., CATALAN, C. y MUSCHIETTI, L. V. Trypanocidal activity of *Smallanthus sonchifolius*: identification of active sesquiterpene lactones by bioassay-guided fractionation. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, páginas 1–8, 2013.
- FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., SCUSERIA, G. E., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., SCALMANI, G., BARONE, V., MENNUCCI, B., PETERSSON, G. A., NAKATSUJI, H., CARICATO, M., LI, X., HRATCHIAN, H. P., IZMAYLOV, A. F., BLOINO, J., ZHENG, G., SONNENBERG, J. L., HADA, M., EHARA, M., TOYOTA, K., FUKUDA, R., HASEGAWA, J., ISHIDA, M., NAKAJIMA, T., HONDA, Y., KITAO, O., NAKAI, H., VREVEN, T., MONTGOMERY, J., J. A., PERALTA, J. E., OGLIARO, F., BEARPARK, M. J., HEYD, J., BROTHERS, E. N., KUDIN, K. N., STAROVEROV, V. N., KOBAYASHI, R., NORMAND, J., RAGHAVACHARI, K., RENDELL, A. P., BURANT, J. C., IYENGAR, S. S., TOMASI, J., COSSI, M., REGA, N., MILLAM, N. J., KLENE, M., KNOX, J. E., CROSS, J. B., BAKKEN, V., ADAMO, C., JARAMILLO, J., GOMPERS, R., STRATMANN, R. E., YAZYEV, O., AUSTIN, A. J., CAMMI, R., POMELLI, C., OCHTERSKI, J. W., MARTIN, R. L., MOROKUMA, K., ZAKRZEWSKI, V. G., VOTH, G. A., SALVADOR, P.,

- DANNENBERG, J. J., DAPPRICH, S., DANIELS, O., A. D. AND FARKAS, FORESMAN, J. B., ORTIZ, J. V., CIOSLOWSKI, J. y FOX, D. J. Gaussian09, Revision A.02. 2016. Gaussian Inc.: Wallingford, CT.
- FUJIMOTO, Y., IWADATE, H., IKEKAWA, N., KIHIRA, K. y HOSHITA, T. Structure of the steroidal lactone isolated from turtle bile: (22S,25R)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestano-26,22-lactone. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, páginas 2701–2704, 1985.
- FUNK, V. A., SUSANNA, A., STUESSY, T. F. y BAYER, R. J., editores. *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy, Vienna, Austria, 2009. ISBN 9783950175431.
- GALLOWAY, W. R. J. D. y SPRING, D. R. Better leads come from diversity. *Nature*, vol. 470, página 43, 2011.
- GARCIA, A., DROWN, B. S. y HERGENROTHER, P. J. Access to structurally complex compound collection via ring distortion of the alkaloid sinomenine. *Org. Lett.*, vol. 18(19), páginas 4852–4855, 2016.
- GARCÍA, M. E., BARBOZA, G. E., OBERTI, J. C., RÍOS-LUCI, C., PADRÓN, J. M., NICOTRA, V. E., ESTÉVEZ-BRAUN, A. y RAVELO, A. G. Antiproliferative activity of withanolide derivatives from *Jaborosa cabreræ* and *Jaborosa reflexa*. Chemotaxonomic considerations. *Phytochemistry*, vol. 76, páginas 150–157, 2012.
- GARCÍA, M. E., NICOTRA, V. E., OBERTI, J. C., RÍOS-LUCI, C., LEÓN, L. G., MARLER, L., LI, G., PEZZUTO, J. M., VAN BREEMEN, R. B., PADRÓN, J. M., HUESO-FALCÓN, I. y ESTÉVEZ-BRAUN, A. Antiproliferative and quinone reductase-inducing activities of withanolides derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 82, páginas 68–81, 2014.
- GARCÍA, M. E., PAGOLA, S., NAVARRO-VÁZQUEZ, A., PHILLIPS, D. D., GAYATHRI, C., KRAKAUER, H., STEPHENS, P. W., NICOTRA, V. E. y GIL, R. R. Stereochemistry determination by powder X-ray diffraction analysis and NMR spectroscopy residual dipolar couplings. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, páginas 5670–5674, 2009.
- GARCÍA-PIÑERES, A. J., CASTRO, V., MORA, G., SCHMIDT, T. J., STRUNCK, E., PAHL, H. L. y MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J. Biol. Chem.*, vol. 276, páginas 39713–39720, 2001.
- GASTON, K. J. *Rarity*. Chapman and Hall, 1994.
- GASTON, K. J. Global patterns in biodiversity. *Nature*, vol. 405(6783), páginas 220–227, 2000.
- GERPE, A., ODREMAN-NUÑEZ, I., DRAPER, P., BOIANI, L., URBINA, J. A., GONZÁLEZ, M. y CERECETTO, H. Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 16(1), páginas 569 – 577, 2008.

- GHANTOUS, A., GALI-MUHTASIB, H., VUORELA, H., SALIBA, N. A. y DARWICHE, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov. Today*, vol. 15(15-16), páginas 668–678, 2010.
- GIL, R. R., GAYATHRI, C., TSAREVSKY, N. y MATYJASZEWSKI, K. Stretched poly(methyl methacrylate) gel aligns small organic molecules in chloroform. Stereochemical analysis and diastereotopic proton NMR assignment in ludartin using residual dipolar couplings and 3J coupling constant analysis. *J. Org. Chem.*, vol. 73, páginas 840–848, 2008.
- GIL, R. R., GRIESINGER, C., NAVARRO-VÁZQUEZ, A. y SUN, H. Structure elucidation of small organic molecules assisted by NMR in aligned media. En *Structure Elucidation in Organic Chemistry: The search for the right tools* (editado por M. M. Cid y J. Bravo), capítulo 8, páginas 279–323. Wiley-VCH, Weinheim, 1ra edición, 2014.
- GIL, R. R. y NAVARRO-VÁZQUEZ, A. Application of residual dipolar couplings to the structural analysis of natural products. En *Modern NMR Approaches to the Structure Elucidation of Natural Products. Data Acquisition and Applications to Compound Classes*, vol. 2, páginas 117–176. The Royal Society of Chemistry, 2017.
- GIL-SILVA, L. F., SANTAMARIA-FERNÁNDEZ, R. y NAVARRO-VÁZQUEZ, R. R., A. GIL. Collection of NMR scalar and residual dipolar couplings using a single experiment. *Chem. Eur. J.*, vol. 22, páginas 472–476, 2016.
- GLOTTER, E. Withanolides and related ergostane-type steroids. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 8, páginas 415–440, 1991.
- GODOY-BÜRKI, A. C., ORTEGA-BAES, P., SAJAMA, J. M. y AEGESEN, L. Conservation priorities in the Southern Central Andes: mismatch between endemism and diversity hotspots in the regional flora. *Biodivers. Conserv.*, vol. 23, páginas 81–107, 2013.
- GONZALEZ, G. F. P., DOS SANTOS, F. A. y COSTA, F. B. D. Sesquiterpene Lactones: More than protective plant compounds with high toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 35, páginas 18–37, 2016.
- GORDALIZA, M., GARCÍA, P. A., DEL CORRAL, J. M., CASTRO, M. A. y GÓMEZ-ZURITA, M. A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicol.*, vol. 44, páginas 441–459, 2004.
- GOTTLIEB, H. E., KIRSON, I., GLOTTER, E., RAY, A. B., SAHAI, M. y ALI, A. Perulactone, a new ergostane-type steroid from *Physalis peruviana* (Solanaceae). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1980.
- GRABOWSKI, K., BARINGHAUS, K.-H. y SCHNEIDER, G. Scaffold diversity of natural products: inspiration for combinatorial library design. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 25, páginas 892–904, 2008.
- GRACE, M. H. y KHATTAB, A. M. Chemical constituents and molluscicidal activity of *Senecio cineraria*. *Egypt. J. Pharm. Sci.*, vol. 39, páginas 253–266, 1998.

- GRELIER, G., REY-RODRIGUEZ, R., DARSEZ, B., RETAILLEAU, P. y DAUBAN, P. Catalytic intramolecular C(sp³)-H amination of carbamimidates. *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2017(14), 2017.
- GRIMBLAT, N., GAVÍN, J. A., HERNÁNDEZ DANARAS, A. y SAROTTI, A. M. Combining the power of *J* coupling and DP4 analysis on stereochemical assignments: the *J*-DP4 methods. *Org. Lett.*, vol. 21(11), páginas 4003–4007, 2019.
- GRIMBLAT, N., ZANARDI, M. M. y SAROTTI, A. M. Beyond DP4: an improved probability for the stereochemical assignment of isomeric compounds using quantum chemical calculations of NMR shifts. *J. Org. Chem.*, vol. 80(24), páginas 12526–12534, 2015.
- GU, J.-Q., WANG, Y., FRANZBLAU, S. G., MONTENEGRO, G. y TIMMERMANN, B. N. Constituents of *Senecio chionophilus* with potential antitubercular activity. *J. Nat. Prod.*, vol. 67(9), páginas 1483–1487, 2004.
- GUPTA, M., BAGCHI, A. y RAY, A. B. Additional withanolides of *Datura metel*. *J. Nat. Prod.*, vol. 54(2), páginas 599–602, 1991.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27(1), páginas 1–93, 2006.
- HALGREN, T. A. J. Merck Molecular Force Field. I. Basis, form, scope, parametrization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.*, vol. 17, páginas 490–519, 1996.
- HAMMOND, G. B., FERNANDEZ, I. D., VILLEGAS, L. F. y VAISBERG, A. J. A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas. *Ethnopharmacol.*, vol. 61, páginas 17–30, 1998.
- HANSMANN, S. y LAREM, C. M., T. THIELE. Enantiodifferentiating properties of the alignment media PELG and PBLG— A comparison. *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2016, páginas 1324–1329, 2016.
- HAQUE, I.-U. y SABA, H. Vinblastine: A review. *J. Chem. Soc. Pak.*, vol. 32, páginas 245–258, 2010.
- VAN HATTUM, H. y WALDMANN, H. Biology-Oriented Synthesis: Harnessing the power of evolution. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136(34), páginas 11853–11859, 2014.
- HAZELARD, D., NOCQUET, P.-A. y COMPAIN, P. Catalytic C–H amination at its limits: Challenges and solutions. *Org. Chem. Front.*, vol. 4(12), 2017.
- HENRÍQUEZ, R., FAIRCLOTH, G. y CUEVAS, C. Ecteinascidin 743 (ET-743; yondelis), Aplidin and Kahalalide F. En *Anticancer agents from natural products* (editado por G. M. Cragg, D. G. I. Kingston y D. J. Newman), capítulo 12. CRC Press, Boca Raton, FL, 2005.
- HILL, R. y YUDIN, A. K. Making carbon-nitrogen bonds in biological and chemical synthesis. *Nat. Chem. Biol.*, vol. 2(6), páginas 284–287, 2006.
- HINMAN, A. y BOIS, J. D. A stereoselective synthesis of (-)-tetrodotoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, páginas 11510–11511, 2003.

- HOU, C., KULKA, M., ZHANG, J., LI, Y. y GUO, F. Occurrence and biological activities of eremophilane-type sesquiterpenes. *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 14, páginas 664–677, 2014.
- HSIEH, P.-W., HUANG, Z.-Y., CHEN, J.-H., CHANG, F.-R., WU, C.-C., YANG, Y.-L., CHIANG, M. Y., YEN, M.-H., CHEN, S.-L., YEN, H.-F., LÜBKEN, T., HUNG, W.-C. y WU, Y.-C. Cytotoxic withanolides from *Tubocapsicum anomalum*. *J. Nat. Prod.*, vol. 70(5), páginas 747–753, 2007.
- HUANG, C. Y., SU, J. H., LIAW, C. C., SUNG, P. J., CHIANG, P. L., HWANG, T. L., DAI, C. F. y SHEU, J. H. Bioactive steroids with methyl ester group in the side chain from a reef soft coral *sinularia brassica* cultured in a tank. *Marine Drugs*, vol. 15(9), páginas 1–11, 2017.
- HUNZIKER, A. T. Estudios sobre Solanaceae. XXIV. Sobre una nueva especie de *Vassobia* del noroeste argentino. *Lorentzia*, vol. 6, páginas 3–6, 1986.
- HUNZIKER, A. T. *Genera Solanacearum. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system*. A.R.G. Gantner Verlag K.-G., Ruggell, 2001. ISBN 3-904144-77-4.
- ICHIKAWA, H., TAKADA, Y., SHISHODIA, S., JAYAPRAKASAM, B., NAIR, M. G. y AGGARWAL, B. B. Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation and NF- κ B-regulated gene expression. *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5(6), páginas 1434–1445, 2006.
- INOKUMA, Y., YOSHIOKA, S., ARIYOSHI, J., ARAI, T., HITORA, Y., TAKADA, K., MATSUNAGA, S., RISSANEN, K. y FUJITA, M. X-ray analysis on the nanogram to microgram scale using porous complexes. *Nature*, vol. 495(7442), páginas 461–466, 2013.
- INTRIERI, D., ZARDI, P., CASELLI, A. y GALLO, E. Organic azides: Energetic reagents for the intermolecular amination of C-H bonds. *Chem. Commun.*, vol. 50(78), páginas 11440–11453, 2014.
- ISHIGURO, M., KAJIKAWA, A., HARUYAMA, T., MORISAKI, M. y IKEKAWA, N. Synthetic studies of withanolide part 1 synthesis of AB ring moiety of withaferin A. *Tetrahedron Lett.*, vol. 15, páginas 1421–1424, 1974.
- IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, B. P. D., JUNIOR, V. F. V. y NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, páginas 809–823, 2011.
- JACKSON, K. L., HENDERSON, J. A. y PHILLIPS, A. J. The halicondrins and E7389. *Chem. Rev.*, vol. 109(7), páginas 3044–3079, 2009.
- JANA, C. K., HOECHER, J., WOODS, T. M., JESSEN, H. J., NEUBURGER, M. y GADEMANN, K. Synthesis of withanolide A, biological evaluation of its neurotogenic properties, and studies on secretase inhibition. *Angew. Chem., Int. Ed.*, vol. 50(36), páginas 8407–8411, 2011.

- JASPARS, M. Computer assisted structure elucidation of natural products using two-dimensional NMR spectroscopy. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 16, páginas 241–248, 1999.
- JAYAPRAKASAM, B., ZHANG, Y., SEERAM, N. P. y NAIR, M. G. Growth inhibition of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Life Sci.*, vol. 74, páginas 125–132, 2003.
- JEONG, J. U., TAO, B., SAGASSER, I., HENNIGES, H. y SHARPLESS, K. B. Bromine-catalyzed aziridination of olefins. A rare example of atom-transfer redox catalysis by a main group element. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120(27), páginas 6844–6845, 1998.
- JIANG, J. H., YANG, H. M., WANG, Y. L. y CHEN, Y. G. Phytochemical and pharmacological studies of the genus *Tacca*: A review. *Tropical J. Pharm. Res.*, vol. 13(4), páginas 635–648, 2014.
- JIMENEZ, V., KEMMERLING, U., PAREDES, R., MAYA, J. D., SOSA, M. A. y GALANTIA, N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: A new therapeutic target? *Phytomedicine*, vol. 21, páginas 1411–1418, 2014.
- JIMENEZ-ORTIZ, V., BRENGIO, S. D., GIORDANO, O., TONN, C., SÁNCHEZ, M., BURGOS, M. H. y SOSA, M. A. The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. *J. Parasitol.*, vol. 91, páginas 170–174, 2005.
- JIN, Z., MASHUTA, M. S., STOLOWICH, N. J., VAISBERG, A. J., STIVERS, N. S., BATES, P. J., LEWIS, W. H. y HAMMOND, G. B. Physangulidines A, B, and C: Three New Antiproliferative Withanolides from *Physalis angulata* L. *Org. Lett.*, páginas 1230–1233, 2012.
- JOHNSON, T. *CRC Ethnobotany Desk Reference*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1ra edición, 2018.
- KADAM, S. D., CHAVHAN, S. A., SHINDE, S. A. y SAPKAL, P. N. Pharmacognostic review of *Datura*. *Int. J. Pharmacogn. Chinese Med.*, vol. 2(4), página 145, 2018.
- KAISER, M., WETZEL, S., KUMAR, K. y WALDMANN, H. Biology-Oriented Synthesis of compound libraries. *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, páginas 1186–1201, 2008.
- KALRA, R. y KAUSHIK, N. *Withania somnifera* (Linn.) Dunal: A review of chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry Rev.*, vol. 16(5), páginas 953–987, 2017.
- KATINAS, L., GUTIÉRREZ, D. G., GROSSI, M. A. y CRISCI, J. V. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, vol. 42(1-2), páginas 113–130, 2007.
- KATSUNO, K., BURROWS, J. N., DUNCAN, K., VAN HUIJSDUIJNEN, R. H., KANEKO, T., KITA, K., MOWBRAY, C. E., SCHMATZ, D., WARNER, P. y SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 14(11), páginas 751–758, 2015.
- KAYSER, O., KIDERLEN, A. F. y CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.*, vol. 90, páginas S55–S62, 2003.

- KHAN, P. M., MALIK, A., AHMAD, S. y NAWAZ, H. R. Withanolides from *Ajuga parviflora*. *J. Nat. Prod.*, vol. 62, páginas 1290–1292, 1999.
- KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., KISHKENTAeva, A. S., SHAIMERDENOVA, Z. R., ATAZHANOVA, G. A., ADEKENOV, S. M., KIRPOTINA, L. N. y QUINN, M. T. Inhibition of T cell receptor activation by semi-synthetic sesquiterpene lactone derivatives and molecular modeling of their interaction with glutathione and tyrosine kinase ZAP-70. *Molecules*, vol. 24, página 350, 2019.
- KIM, K. H., CHOI, S. U., CHOI, S. Z., SON, M. W. y LEE, K. R. Withanolides from the rhizomes of *Dioscorea japonica* and their cytotoxicity. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, páginas 6980–6984, 2011.
- KIM, M., MULCAHY, J. V., ESPINO, C. G. y DU BOIS, J. Expanding the substrate scope for C–H amination reactions: oxidative cyclization of urea and guanidine derivatives. *Org. Lett.*, vol. 8(6), páginas 1073–1076, 2006.
- KINGSTON, D. G. I. A natural love of natural products. *J. Org. Chem.*, vol. 73, páginas 3975–3984, 2008.
- KINGSTON, D. G. I. Taxol and its analogs. En *Anticancer agents from natural products* (editado por G. M. Cragg, D. G. I. Kingston y D. J. Newman). CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
- KIRSON, I. y GLOTTER, E. Recent developments in naturally occurring ergostane-type steroids. A review. *J. Nat. Prod.*, vol. 44(6), páginas 633–647, 1981.
- KIRSON, I., LAVIE, D., ALBONICO, S. M. y JULIANI, H. R. The withanolides of *Acnistus australis* (Griseb.). *Tetrahedron*, vol. 26, páginas 5062–5069, 1970.
- KLAHRE, U., NOGUCHI, T., FUJIOKA, S., TAKATSUTO, S., YOKOTA, T., NOMURA, T., YOSHIDA, S. y CHUA, N.-H. The arabidopsis DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *The Plant Cell*, vol. 10(10), páginas 1677–1690, 1998.
- KNOCH, E., SUGAWARA, S., MORI, T., POULSEN, C., FUKUSHIMA, A., HARHOLT, J., FUJIMOTO, Y., UMEMOTO, N. y SAITO, K. Third DWF1 paralog in Solanaceae, sterol $\Delta 24$ -isomerase, branches withanolide biosynthesis from the general phytosterol pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 115(34), páginas E8096–E8103, 2018.
- KOVGANKO, N. V. y KASHKAN, Z. N. Advances in the chemical synthesis of withanolides. *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 33(2), páginas 133–145, 1997.
- KREUGER, M. R. O., GROOTJANS, S., BIAVATTI, M. W., VANDENABEELE, P. y D'HERDE, K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anticancer Drugs*, vol. 23, páginas 883–896, 2012.
- KSEBATI, M. B. y SCHMITZ, F. J. Minabeolides: a group of withanolides from soft coral, *Minabea* sp. *J. Org. Chem.*, vol. 53(17), páginas 3926–3929, 1988.

- KUBOYAMA, T., TOHDA, C. y KOMATSU, K. Neuritic regeneration and synaptic reconstruction induced by withanolide A. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 144(7), páginas 961–971, 2005.
- KUMAR, K. y WALDMANN, H. Synthesis of natural product inspired compound collections. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48(18), páginas 3224–3242, 2009.
- KUPCHAN, S. M., ANDERSON, W. K., BOLINGER, P., DOSKOTCH, R. W., SMITH, R. M., SAENZ-RENAULD, J. A., SCHNOES, H. K., BURLINGAME, A. L. y SMITH, D. H. Tumor inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and structural and spectral studies of withaferin A and withacnistin. *J. Org. Chem.*, vol. 34(12), páginas 3858–3866, 1969.
- KUTATELADZE, A. G. y MUKHINA, O. A. Relativistic force field: parametric computations of proton-proton coupling constants in ^1H NMR spectra. *J. Org. Chem.*, vol. 79, páginas 8397–8406, 2014.
- KUTTRUFF, C. A., EASTGATE, M. D. y BARAN, P. S. Natural products synthesis in the age of scalability. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31(4), páginas 419–432, 2014.
- KWART, H. y KAHN, A. A. Copper-catalyzed decomposition of benzenesulfonyl azide in hydroxylic media. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 89, páginas 1950–1951, 1967.
- LAPUH, M. I., DANA, A., DI CHENNA, P. H., DARSE, B., DURÁN, F. J. y DAUBAN, P. Late-stage C-H amination of abietane diterpenoids. *Org. Biomol. Chem.*, vol. 17(19), páginas 4736–4746, 2019.
- LAVIE, D., GLOTTER, E. y SHVO, Y. 1371. Constituents of *Withania somnifera* Dun. Part IV. The structure of withaferin A. *J. Chem. Soc.*, páginas 7517–7531, 1965.
- LEE, M.-L. y SCHNEIDER, G. Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: Application in the design of natural product-based combinatorial libraries. *J. Comb. Chem.*, vol. 3, páginas 284–289, 2001.
- LEVIN, R. A., BERNARDELLO, G., WHITING, C. y MILLER, J. S. A new generic circumscription in tribe Lycieae (Solanaceae). *Taxon*, vol. 40, páginas 681–690, 2011.
- LI, G.-W., CAO, J.-M., ZONG, W., HU, L., HU, M.-L., LEI, X., SUN, H. y TAN, R. X. Helical polyisocyanopeptides as lyotropic liquid crystals for measuring residual dipolar couplings. *Chemistry*, vol. 23(32), páginas 7653–7656, 2017.
- LI, J., CISAR, J. S., ZHOU, C. Y., VERA, B., WILLIAMS, H., RODRÍGUEZ, A. D., CRAVATT, B. F. y ROMO, D. Simultaneous structure-activity studies and arming of natural products by C-H amination reveal cellular targets of eupalmerin acetate. *Nature Chemistry*, vol. 5(6), páginas 510–517, 2013.
- LI, J. J., editor. *C–H Bond Activation in Organic Synthesis*. CRC Press, Boca Raton, 2015.
- LIANG, C., COLLET, F., ROBERT-PEILLARD, F., MÜLLER, P., DODD, R. H. y DAUBAN, P. Toward a synthetically useful stereoselective C-H amination of hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130(1), páginas 343–350, 2008.

- LIGPREP. Schrödinger release 2017-3. 2017. Schrödinger, LLC, New York.
- LIU, H.-Y., NI, W., XIE, B.-B., ZHOU, L.-Y., HAO, X.-J., WANG, X. y CHEN, C.-X. Five new withanolides from *Tacca plantaginea*. *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 54(7), páginas 992–995, 2006.
- LIZARRAGA, E., CASTRO, F., FERNÁNDEZ, F., DE LAMPASONA, M. P. y CATALÁN, C. A. N. Antioxidant, Hemolytic and Cytotoxic Activities of *Senecio* Species used in Traditional Medicin of Northwestern Argentina. *Nat. Prod. Commun.*, vol. 7(5), páginas 607–608, 2012.
- LOCKLEY, W. J. S., REES, H. H. y GOODWIN, T. W. Biosynthesis of steroidal withanolides in *Withania somnifera*. *Phytochemistry*, vol. 15(6), páginas 937–939, 1976.
- LODEWYK, M. W., SIEBERT, M. R. y TANTILLO, D. J. Computational prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts: a useful tool for natural product, mechanistic, and synthetic organic chemistry. *Chem. Rev.*, vol. 112(3), páginas 1839–1862, 2012.
- LOIZZO, M. R., STATTI, G. A., TUNDIS, R., CONFORTI, F., BONESI, M., AUTELITANO, G., HOUGHTON, P. J., MILJKOVIC-BRAKE, A. y MENICHINI, F. Antibacterial and antifungal activity of *Senecio inaequidens* DC. and *Senecio vulgaris* L. *Phytherapy Research*, vol. 18, páginas 777–779, 2004.
- LOIZZO, M. R., TUNDIS, R., STATTI, G. A. y MENICHINI, F. Jacaranona: A cytotoxic constituent from *Senecio ambiguus* subsp. *ambiguus* (Biv.) DC. against renal adenocarcinoma aCHN and prostate carcinoma LNCaP cells. *Arch. Pharm. Res.*, vol. 30, páginas 701–707, 2007.
- LONE, S., BHAT, K., MALIK, F. y KHUROO, M. Diastereoselective Synthesis of 1,10 β -Epoxy-11R,13-dihydroamino Analogs of Ludartin as Anti-breast Cancer Agents. *Planta Med. Int. Open*, vol. 3(03), páginas e51–e54, 2016.
- LONE, S. H., BHAT, K. A., MAJEED, R., HAMID, A. y KHUROO, M. A. Synthesis and biological evaluation of amino analogs of Ludartin : Potent and selective cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23(17), páginas 4931–4934, 2013a.
- LONE, S. H., BHAT, K. A., MAJEED, R., HAMID, A. y KHUROO, M. A. Click chemistry inspired facile synthesis and bioevaluation of novel triazolyl analogs of ludartin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 24(4), páginas 1047–1051, 2014.
- LONE, S. H., BHAT, K. A., NASEER, S., RATHER, R. A., KHUROO, M. A. y TASDUQ, S. A. Isolation, cytotoxicity evaluation and HPLC-quantification of the chemical constituents from *Artemisia amygdalina* Decne. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 940, páginas 135–141, 2013b.
- LOPEZ, S. N., RAMALLO, I. A., SIERRA, M. G., ZACCHINO, S. A. y FURLAN, R. L. E. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104(2), páginas 441–444, 2006.

- LOYOLA, L. A., PEDREROS, S. y MORALES, G. P-hidroxyacetophenone derivatives from *Senecio graveolens*. *Phytochemistry*, vol. 24, páginas 1600–1602, 1985.
- LU, H., JIANG, H., WOJTAS, L. y PETER ZHANG, X. Chemoselective intramolecular allylic C–H amination vs. C=C aziridination through Co(ii)-based metalorradical catalysis. *Chemical Science*, vol. 2, páginas 2361–2366, 2011.
- LUX, B., KOBZAR, K. y KESSLER, H. An easy and scalable method for the partial alignment of organic molecules for measuring residual dipolar couplings. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 43, páginas 1092–1094, 2004.
- LWOWSKI, W., editor. *Nitrenes*. Interscience, New York, 1970.
- LWOWSKI, W., MARICICH, T. J. y MATTINGLY, T. W. Carbethoxynitrene. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, páginas 1200–1202, 1963.
- LY β , G., KNORRE, A., SCHMIDT, T. J., PAHL, H. L. y MERFORT, I. The anti-inflammatory sesquiterpene helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. *J. Biol. Chem.*, vol. 273, páginas 33508–33516, 1998.
- MA, X. y WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. *Drug Discov. Today*, vol. 14, páginas 1136–1142, 2009.
- MACHIN, R. P., VELEIRO, A. S., NICOTRA, V. E., OBERTI, J. C. y PADRÓN, J. M. Antiproliferative activity of withanolides against human breast cancer cell lines. *J. Nat. Prod.*, vol. 73(5), páginas 966–968, 2010.
- MACROMODEL. Schrödinger release 2017-3. 2017. Schrödinger, LLC, New York.
- MAHER, S., RASOOL, S., MEHMOOD, R., PERVEEN, S. y TAREEN, R. B. Trichosides A and B, new withanolide glucosides from *Tricholepis eburnea*. *Nat. Prod. Res.*, vol. 32(1), páginas 1–6, 2018.
- MAIER, M. E. Design and synthesis of analogues of natural products. *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, páginas 5302–5343, 2015.
- MALIK, F., KUMAR, A., BHUSHAN, S., KHAN, S., BHATIA, A., SURI, K. A., QAZI, G. N. y SINGH, J. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic cell death of human myeloid leukemia HL-60 cells by a dietary compound withaferin A with concomitant protection by *N*-acetyl-cysteine. *Apoptosis*, vol. 12(11), páginas 2115–2133, 2007.
- MANSUY, D., MAHY, J.-P., DUREAULT, A., BEDI, G. y BATTIONI, P. Iron- and manganese-porphyrin catalyzed aziridination of alkenes by tosyl- and acyl-iminoiodobenzene. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, páginas 1161–1163, 1984.
- MAPLESTONE, R. A., STONE, M. J. y WILLIAMS, D. H. The evolutionary role of secondary metabolites – A review. *Gene*, vol. 115, páginas 151–157, 1992.

- MAREGGIANI, G., PICOLLO, M. I., ZERBA, E., BURTON, G., TETTAMANZI, M. C., BENEDETTI-DOCTOROVICH, M. O. V. y VELEIRO, A. S. Antifeedant activity of withanolides from *Salpichroa organifolia* on *Musca domestica*. *J. Nat. Prod.*, vol. 63, página 1113, 2000.
- MARGULES, C. R. y PRESSEY, R. L. Systematic conservation planing. *Nature*, vol. 405, páginas 243–253, 2000.
- MÁRQUEZ, J. D. R., ANA, Y., BAIGORRÍ, R. E., STEMPIN, C. C. y CERBAN, F. M. Mammalian target of rapacymycin inhibitor in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages leads to an intracellular profile that is detrimental for infection. *Front. Immunol.*, vol. 9, página 313, 2018.
- MARX, A. y THIELE, C. Orientational properties of poly- γ -benzyl-L-glutamate: Influence of molecular weight and solvent on order parameters of the solute. *Chem. Eur. J.*, vol. 15, páginas 254–260, 2008.
- MASOOD, M. A., FARRANT, E., MORAO, I., BAZIN, M., PEREZ, M., BUNNAGE, M. E., FANCY, S.-A. y PEAKMAN, T. Lead diversification. Application to existing drug molecules: Mifepristone 1 and antalarmin 8. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, páginas 723–728, 2012.
- MASUI, H. y HONG, H. Spec2D: a structure elucidation system based on ^1H NMR and ^1H - ^1H COSY spectra in organic chemistry. *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 46, páginas 775–787, 2006.
- MATESEVACH BECERRA, M. y BARBOZA, G. E. Dicotyledoneae, Solanaceae. En *Flora Argentina* (editado por F. O. Zuloaga, M. J. Belgrano y A. M. Anton), vol. 13, capítulo Eriolarynx, páginas 138–139. IBODA–IMBIV, San Isidro, 2013.
- MATUSOVA, R., RANI, K., VERSTAPPEN, F. W. A., FRANSSEN, M. C. R., BEALE, M. H. y BOUWMEESTER, H. J. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.*, vol. 139, páginas 920–934, 2005.
- MAURYA, R., AKANSHA, JAYENDRA, SINGH, A. B. y SRIVASTAVA, A. K. Coagulanolide, a withanolide from *Withania coagulans* fruits and antihyperglycemic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18(24), páginas 6534–6537, 2008.
- MAYA, J. D., CASSELS, B. K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., FERREIRA, J., FAÜNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A. y MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol. A*, vol. 146(4), páginas 601–620, 2007.
- MEDEIROS, M. R., NARAYAN, R. S., MCDUGAL, N. T., SCHAUS, S. E. y PORCO, J. A. Skeletal diversity via cationic rearrangements of substituted dihydropyrans. *Org. Lett.*, vol. 12(14), páginas 3222–3225, 2010.
- MEJIA, A. M., HALL, B. S., TAYLOR, M. C., GÓMEZ-PALACIO, A., WILKINSON, S. R., TRIANA-CHÁVEZ, O. y KELLY, J. M. Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily

- acquired trait that can arise independently in a single population. *J. Infect. Dis.*, vol. 206(2), 2012.
- MICHAUDEL, Q., JOURNOT, G., REGUEIRO-REN, A., GOSWAMI, A., GUO, Z., TULLY, T. P., ZOU, L., RAMABHADRAN, R. O., HOUK, K. N. y BARAN, P. S. Improving physical properties via C–H oxidation: chemical and enzymatic approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 53, páginas 12091–12096, 2014.
- MILCZEK, E., BOUDET, N. y BLAKEY, S. Enantioselective C–H amination using cationic ruthenium(ii)-pybox catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47(36), páginas 6825–6828, 2008.
- MIRANDA, P. O., PADRÓN, J. M., PADRÓN, J. I., VILLAR, J. y MARTÍN, V. S. Prins-type synthesis and SAR study of cytotoxic alkyl chloro dihydropyrans. *Chem. Med. Chem.*, vol. 1(3), páginas 323–329, 2006.
- MISICO, R., NICOTRA, V., OBERTI, J. C., BARBOZA, G., GIL, R. R. y BURTON, G. Withanolides and related steroids. En *Progress in the chemistry of organic natural products* (editado por A. Kinghorn, H. Falk y J. Kobayashi), vol. 94, páginas 127–129. Springer-Verlag, 2011. ISBN 9783709107478.
- MISICO, R. I., GIL, R. R., OBERTI, J. C., VELEIRO, A. S. y BURTON, G. Withanolides from *Vassobia lorentzii*. *J. Nat. Prod.*, vol. 63(10), páginas 1329–1332, 2000.
- MISICO, R. I., SONG, L. L., VELEIRO, A. S., CIRIGLIANO, A. M. y TETTAMANZI, M. C. Induction of quinone reductase by withanolides. *J. Nat. Prod.*, vol. 65(5), páginas 677–680, 2002.
- MITTERMEIER, R. A., MYERS, N., THOMSEN, J. B., FONSECA, G. A. B. D. y OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conserv. Biol.*, vol. 12, páginas 516–520, 1998.
- MOERMAN, D. E. *Native American medicinal plants: an ethnobotanical dictionary*. Timber Press, 2009.
- MOLINSKI, T. F. All natural: The renaissance of natural products chemistry. *J. Org. Chem.*, vol. 79(15), página 6765, 2014.
- MONKS, A., SCUDIERO, D. A., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., VISTICA, D. T., HOSE, C., LANGLEY, J., CRONISE, P., VAIGRO-WOLFF, M., GRAY-GOODRICH, M., CAMPBELL, H., MAYO, M. R. y BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 83, páginas 757–766, 1991.
- MORALES, G. B., BORQUEZ, J. R., MANCILLA, A. P., PEDREROS, S. T. y LOYOLA, L. A. M. An eremophilanolide from *Senecio rosmarinus*. *Phytochemistry*, vol. 25(10), páginas 2412–2414, 1986.
- MORÉ, M., COCUCCHI, A. A., SÉRSIC, A. N. y BARBOZA, G. E. Phylogeny and floral trait evolution in *Jaborosa* (Solanaceae). *Taxon*, vol. 64(3), páginas 523–534, 2015.

- MORRISON, K. C. y HERGENROTHER, P. J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, páginas 6–14, 2014a.
- MORRISON, K. C. y HERGENROTHER, P. J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, páginas 6–14, 2014b.
- MORTON, D., LEACH, S., CORDIER, C., WARRINER, S. y NELSON, A. Synthesis of natural-product-like molecules with over eighty distinct scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, páginas 104–109, 2009.
- MÜLLER, P., BAUD, C. y JACQUIER, Y. A method for rhodium(ii)-catalyzed aziridination of olefins. *Tetrahedron*, vol. 52(5), páginas 1543–1548, 1996.
- MUÑOZ, O., MONTES, M. y WILKOMIRSKY, T. *Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología*. Editorial Universitaria, 1999.
- MUSCHIETTI, L. V. y ULLOA, J. L. Natural sesquiterpene lactones as potential trypanocidal therapeutic agents: a review. *Nat. Prod. Comm.*, vol. 11(10), páginas 1569–1578, 2016.
- NAGAFUJI, S., OKABE, H., AKAHANE, H. y ABE, F. Trypanocidal constituents in plants 4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 27(2), páginas 193–197, 2003.
- NAMAN, C. B., LEBER, C. A. y GERWICK, W. H. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. En *Microbial Resources* (editado por I. Kurtböke), capítulo 5, páginas 103 – 120. Academic Press, 2017.
- NAVARRO-VÁZQUEZ, A., GIL, R. R. y BLINOV, K. Computer-assisted 3D structure elucidation (CASE-3D) of natural products combining isotropic and anisotropic NMR parameters. *J. Nat. Prod.*, vol. 81, páginas 203–210, 2018.
- NAYA, K., TAKAGI, I., KAWAGUCHI, Y. y ASADA, Y. The structure of fukinone, a constituent of *Petasites japonicus* Maxim. *Tetrahedron*, vol. 24, páginas 5971–5879, 1968.
- NAYA, K., TSUJI, K. y HAKU, U. The constituents of *Arctum lappa* L. *Chemistry Letters*, vol. 1(3), páginas 235–236, 1972.
- NDUKWE, I. E., WANG, X., PELCZER, I., REIBARKH, M., WILLIAMSON, R. T., LIU, Y. y MARTIN, G. E. PBLG as a versatile liquid crystalline medium for anisotropic NMR data acquisition. *Chem. Commun.*, vol. 55, páginas 4327–4330, 2019.
- NETO, R. N. M., SETUBAL, R. F. B., HIGINO, T. M. M., DE CASTRO, M. C. A. B., DA SILVA, L. C. N. y DOS SANTOS ALIANÇA, A. S. Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and Chagas disease. *Front. Pharmacol.*, vol. 10, página 477, 2019.
- NEUHAUS, D. y WILLIAMSON, M. P. *The Nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2da edición, 2000.

- NEWMAN, D. J. y CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, vol. 75(3), 2012.
- NEWMAN, D. J. y CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, vol. 79, páginas 629–661, 2016.
- NG, J. y SMITH, S. D. Widespread flower color convergence in Solanaceae via alternate biochemical pathways. *New Phytologist*, vol. 209(1), páginas 407–417, 2016.
- NICOLAOU, K. C., HALE, C. R. H., NILEWSKI, C. y IOANNIDOU, H. A. Constructing molecular complexity and diversity: Total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41(15), páginas 5185–5238, 2012.
- NICOTRA, V. E., BASSO, A. V., RAMACCIOTTI, N. S. y MISICO, R. I. Withanolides with phytotoxic activity from two species of the genus *Salpichroa*: *S. origanifolia* and *S. tristis* var. *lechmannii*. *J. Nat. Prod.*, vol. 76(12), páginas 2219–2225, 2013.
- NICOTRA, V. E., RAMACCIOTTI, N. S., GIL, R. R., OBERTI, J. C., FERESIN, G. E., GUERRERO, C. A., BAGGIO, R. F., GARLAND, M. T. y BURTON, G. Phytotoxic Withanolides from *Jaborosa rotacea*. *J. Nat. Prod.*, vol. 69, páginas 783–789, 2006.
- NOIREAU, F., DE-LA FUENTE, A. L. C., LOPES, C. M. y DIOTAIUTI, L. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 77, páginas 431–436, 2005.
- NORDENSTAM, B. The families and genera of vascular plants (Flowering plants, Eudicots). En *Asterales* (editado por K. K.), páginas 208–241. Springer International Publishing, Switzerland, 20007.
- OBERTI, J. C., SOSA, V. E., HERZ, W., PRASAD, J. S. y GOEDKEN, V. L. Crystal Structure and Stereochemistry of Achalensolide, a New Guaianolide from *Stevia achalensis*. *J. Org. Chem.*, vol. 48, páginas 4038–4043, 1983.
- OLMSTEAD, R. G., BOHS, L., MIGID, H. A., SANTIAGO-VALENTIN, E., GARCIA, V. F. y COLLIER, S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, vol. 57(4), páginas 1159–1181, 2008.
- PARADINE, S. M., GRIFFIN, J. R., ZHAO, J., PETRONICO, A. L., MILLER, S. M. y WHITE, C. M. A manganese catalyst for highly reactive yet chemoselective intramolecular C(sp³)-H amination. *Nat. Chem.*, vol. 7, páginas 987–994, 2015.
- PARADINE, S. M. y WHITE, M. C. Iron-catalyzed intramolecular allylic C-H amination. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134(4), páginas 2036–2039, 2012.
- PATWARDHAN, B. y VAIDYA, A. Natural products drug discovery: accelerating the clinical candidate development using reverse pharmacology approaches. *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 48, páginas 220–227, 2010.

- PAULI, I., FERREIRA, L. G., DE SOUZA, M. L., OLIVA, G., FERREIRA, R. S., DESOY, M. A., SLAFER, B. W., DIAS, L. C. y ANDRICOPULO, A. D. Molecular modeling and structure-activity relationships for a series of benzimidazole derivatives as cruzain inhibitors. *Future Med. Chem.*, vol. 9(7), páginas 641–657, 2017.
- PELISH, H. E., WESTWOOD, N. J., FENG, Y., KIRCHHASEN, T. y SHAIR, M. D. Use of biomimetic diversity-oriented synthesis to discover galanthamine-like molecules with biological properties beyond those of the natural product. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123(27), páginas 6740–6741, 2001.
- PEREZ, C., AGNESE, A. y CABRERA, J. L. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): Chemical composition and antimicrobial activity test. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 66, páginas 91–96, 1999.
- PÉREZ-MOLINA, J. A. y MOLINA, I. Chagas disease. *Lancet*, vol. 391(10115), páginas 82–94, 2018.
- PICMAN, A. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 14(3), páginas 255–281, 1986.
- PINNEY, K. G., PETTIT, G. R., TRAWICK, M. L. y JELINEK, C. The discovery and development of the combretastatins. En *Anticancer agents from natural products* (editado por G. M. Cragg, D. G. I. Kingston y D. J. Newman). CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
- PONOMARENKO, L. P., KALINOVSKY, A. I., BERDYSHEV, D. V., KUZMICH, A. S., MENCHINSKAYA, E. S., PISLYAGIN, E. A., KIM, N. Y., GLAZUNOV, V. P., DMITRENOK, P. S., SILCHENKO, A. S., AVILOV, S. A., GOROVOY, P. G. y STONIK, V. A. Chemical constituents of *Ligularia alticola* Worosch. leaves and their biological activities. *Phytochemistry Letters*, vol. 15, páginas 46–52, 2016.
- PORTERO, A. G., GONZÁLEZ-COLOMA, A., REINA, M. y DÍAZ, C. E. Plant defensive sesquiterpenoids from *Senecio* species with biopesticide potential. *Phytochem. Rev.*, vol. 11, páginas 391–403, 2012.
- RAHIER, N. J., THOMAS, C. J. y HECHT, S. M. Camptothecin and its analogs. En *Anticancer agents from natural products* (editado por G. M. Cragg, D. G. I. Kingston y D. J. Newman). CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
- RAMACCIOTTI, N. S. y NICOTRA, V. E. Whitanolides from *Jaborosa kurtzii*. *J. Nat. Prod.*, vol. 70(9), páginas 1513–1515, 2007.
- RAMALLO, I. A., SALAZAR, M. O., MENDEZ, L. y FURLAN, R. L. E. Chemically engineered extracts: Source of bioactive compounds. *Acc. Chem. Res.*, vol. 44(4), páginas 241–250, 2011.
- RAY, S. y JHA, S. Withanolide synthesis in cultures of *Withania somnifera* transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, vol. 146(1), páginas 1–7, 1999.

- REINA, M., SANTANA, O., DOMINGUEZ, D. M., VILLARROEL, L., FAJARDO, V., RODRIGUEZ, M. L. y GONZÁLEZ-COLOMA, A. Defensive sesquiterpenes of *Senecio candidans* and *S. magellanicus*, and their structure-activity relationships. *Chem. Biodivers.*, vol. 9, páginas 625–643, 2012.
- REYES-REYES, E. M., JIN, Z., VAISBERG, A. J., HAMMOND, G. B. y BATES, P. J. Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells. *J. Nat. Prod.*, vol. 76(1), páginas 2–7, 2013.
- RIAZ, N., MALIK, A., NAWAZ, S. A., MUHAMMAD, P. y CHOUDHARY, M. I. Cholinesterase-inhibiting withanolides from *Ajuga bracteosa*. *Chem. Biodivers.*, vol. 1, páginas 1289–1295, 2004.
- RINEHART, K. L., HOLT, T. G., FREGEAU, N. L., STROH, J. G., KEIFER, P. A., SUN, F., LI, L. H. y MARTIN, D. G. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759a, 759b, and 770: potent antitumor agents from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.*, vol. 55(15), páginas 4512–4515, 1990.
- ROBLES, O. y ROMO, D. Chemo- and site-selective derivatization of natural products enabling biological studies. *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, páginas 318–334, 2014.
- ROCHA, D. D., MILITAO, G. C. G., VERAS, M. L., PESSOA, O. D. L., SILVEIRA, E. R., ALVES, A. P. N. N., DE-MORAES, M. O., PESSOA, C. y COSTA-LUTUFO, L. V. Selective cytotoxicity of withaphysalins in leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci.*, vol. 79, páginas 1692–1701, 2006.
- RODRIGUES, T., REKER, D., SCHNEIDER, P. y SCHNEIDER, G. Counting on natural products for drug design. *Nat. Chem.*, vol. 8(6), páginas 531–541, 2016.
- RODRIGUEZ, J., ARAN, V. J., BOIANI, L., OLEA-AZAR, C., LAVAGGI, M. L., GONZALEZ, M., CERECETTO, H., MAYA, J. D., CARRASCO-POZO, C. y COSOY, H. S. New potent 5-nitroindazole derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: synthesis, biological evaluation, and mechanism of action studies. *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 17, páginas 8186–8196, 2009.
- ROHMER, M. Mevalonate-independent methylerythriol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Pure Appl. Chem.*, vol. 75, páginas 375–387, 2003.
- ROIZEN, J. L., ZALATAN, D. N. y DU BOIS, J. Selective intermolecular amination of C-H bonds at tertiary carbon centers. *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 52(43), páginas 11343–11346, 2013.
- ROLLINGER, J. M., STUPPNER, H. y LANGER, T. Virtual Screening for the Discovery of Bioactive Natural Products. *Progress in Drug Research*, vol. 65, páginas 333–364, 2018.
- RUIZ-VÁSQUEZ, L., OLMEDA, A. S., ZÚÑIGA, G., VILLARROEL, L., ECHEVERRI, L. F., GONZÁLEZ-COLOMA, A. y REINA, M. Insect Antifeedant and Ixodidical Compounds from *Senecio adenotrichius*. *Chem. Biodivers.*, vol. 14(1), página 179, 2017.

- SAEIDNIA, S., GOHARI, A. R. y HADDADI, A. Biogenetic trypanocidal sesquiterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs—A mini review. *Daru. J. Pharm. Sci.*, vol. 21, páginas 1–9, 2013.
- SAITO, Y., SASAKI, Y., KOMIYAMA, T., OHSAKI, A., OKAMOTO, Y., GONG, X., KURODA, C. y TORI, M. Structure and cytotoxic evaluation of five 12-oxygenated eremophilanes from *Ligularia lingiana*. *Tetrahedron*, vol. 70(35), páginas 5878–5883, 2014.
- SALEM, M. M. y WERBOVETZ, K. A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, páginas 2571–2598, 2006.
- SANGWAN, N. S., SABIR, F., MISHRA, S., BANSAL, S. y SANGWAN, R. S. Withanolides from *Withania somnifera* Dunal: Development of cellular technology and their production. *Recent Patents on Biotechnology*, vol. 8(1), páginas 25–35, 2014.
- SÄRKINEN, T., BOHS, L. y OLMSTEAD, S., RICHARD G. AND KNAPP. A phylogenetic framework for evolutionary study of the nightshades (Solanaceae): a dated 1000-tip tree. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 13(1), página 214, 2013.
- SCHMIDT, T. J. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 33, páginas 309–392, 2006.
- SCHMIDT, T. J., BRUN, R., WILLUHN, G. y KHALID, S. A. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, vol. 68, páginas 750–751, 2002.
- SCHMIDT, T. J., NOUR, A. M. M., KHALID, S. A., KAISER, M. y BRUN, R. Quantitative structure-antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones. *Molecules*, vol. 14, páginas 2062–2076, 2009.
- SCHMIDTS, V. Perspectives in the application of residual dipolar couplings in the structure elucidation of weakly aligned small molecules. *Magn. Reson. Chem.*, vol. 55, páginas 54–60, 2017.
- SCHREIBER, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, vol. 287(5460), páginas 1964–1969, 2000.
- SCHREIBER, S. L. Molecular diversity by design. *Nature*, vol. 457, páginas 153–154, 2009.
- SCHUETZ, A., JUNKER, J., LEONOV, A., LANGE, O. F., MOLINSKI, T. F. y GRIESINGER, C. Stereochemistry of sagittamide A from residual dipolar couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129(49), páginas 15114–15115, 2007.
- SEGALL, H. J. Preparative isolation of pyrrolizidine alkaloids derived from *Senecio vulgaris*. *J. Liquid Chromatography*, vol. 2(9), páginas 1319–1323, 1979.
- SEHGAL, N., GUPTA, A., KHADER, R., JOSHI, S. D., MILLS, J. T., HAMEL, E., KHANNA, P., JAIN, S. C., THAKUR, S. S. y RAVINDRANATH, V. *Withania somnifera* and reverses Alzheimer's disease pathology by enhancing low-density lipoprotein receptor-related protein in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109(9), páginas 3510–3515, 2012.

- SELETSKY, B. M., HAWKINS, L. D., PALME, M. H., HABGOOD, G. J., DiPIETRO, L. V., TOWLE, M. J., SALVATO, K. A., WELS, B. F., AALFS, K. K., KISHI, Y., LITTLEFIELD, B. A. y YU, M. J. Structurally simplified macrolactone analogues of halicondrin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 14, páginas 5547–5550, 2004.
- SEPÚLVEDA-BOZA, S. y CASSELS, B. K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica*, vol. 62(2), páginas 98–105, 1996.
- SHAN, X., LIANG, J., DING, L., WANG, X. y PENG, S. A novel withanolide glucoside from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. *Chin. J. Org. Chem.*, vol. 33, páginas 1349–1351, 2013.
- SHAW, J. Iochroma reshuffle. *The Plantsman*, vol. 17(2), páginas 124–125, 2018.
- SIEDLE, B., GARCÍA-PIÑERES, A. J., MURILLO, R., SCHULTE-MÖNTING, J., CASTRO, V., RÜNGELER, P., KLAAS, C. A., DA COSTA, F. B., KISIEL, W. y MERFORT, I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B. *J. Med. Chem.*, vol. 47, páginas 6042–6054, 2004.
- SINGH, P., GULERI, R., SINGH, V., KAUR, G., KATARIA, H., SINGH, B., KAUR, G., KAUL, S. C., WADHWA, R. y PATI, P. K. Biotechnological interventions in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 31(1-2), páginas 1–20, 2015.
- SINHA, S. C., ALI, A., BAGCHI, A., SAHAI, M. y RAY, A. B. Physalindicanols, new biogenic precursors of C28-steroidal lactones from *Physalis minima* var. *indica*. *Planta Medica*, vol. 53(1), páginas 55–57, 1987.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., McMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J. T., BOKESCH, H., KENNEY, S. y BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82(13), páginas 1107–1112, 1990.
- SLIWOSKI, G., KOTHIWALE, S., MEILER, J. y LOWE, E. W. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.*, vol. 66(1), páginas 334–395, 2014.
- SMITH, P. A. S. y BROWN, B. B. The reaction of aryl azides with hydrogen halides. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73(6), páginas 2438–2441, 1951.
- SMITH, S. G. y GOODMAN, J. M. Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculations: the DP4 probability. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, páginas 12946–12959, 2010.
- SMOLINSKY, G. Electrophilic substitution at a saturated carbon by electron deficient nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 82(17), páginas 4717–4719, 1960.
- SNIDER, J. D., TROCHE-PESQUEIRA, E., WOODRUFF, S. R., GAYATHRI, C., TSAREVSKY, N. V. y GIL, R. R. New strategy for RDC-assisted diastereotopic proton assignment using a combination of *J*-scaled BIRD HSQC and *J*-scaled BIRD HMQC/HSQC. *Magn. Reson. Chem.*, vol. 50(S1), páginas S86–S91, 2012.

- SOSA, V. E., OBERTI, J. C., GIL, R. R., RUVEDA, E. A., GOEDKEN, V. L., ALICIA, B., RREZ, G. y HERZ, W. 10-Epideoxycumambrin B and other Constituents of *Stevia yaconensis* var. *subeglandulosa*. *Phytochemistry*, vol. 28(7), páginas 1925–1929, 1989.
- SPEISER, B., HARMATHA, J. y ROWELL-RAHIER, M. Effects of pyrrolizidine alkaloids and sesquiterpenes on snail feeding. *Oecologia*, vol. 92, páginas 257–265, 1992.
- SRINIVASAN, S., RANGA, R., BURIKHANOV, R., HAN, S. y CHENDIL, D. Par-4-dependent apoptosis by the dietary compound withaferin A in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, vol. 67, páginas 246–253, 2007.
- SRIVASTA, V., NEGI, A. S., KUMAR, J. K., GUPTA, M. M. y KHANUJA, S. P. S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 13, página 5892, 2005.
- SRIVASTAVA, C., SIDDIQUI, I. R., SINGH, J. y TIWARI, H. P. An antifeedant and insecticidal steroid and a new hydroxyketone from *Cassia siamea* bark. *J. Indian Chem. Soc.*, vol. 69, página 111, 1992.
- STEMPIN, C. C., ROJAS MARQUEZ, J. D., ANA, Y. y CERBAN, F. M. GRAIL and Otubain-1 are related to T cell hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, páginas 1–16, 2017.
- STEREOFITTER. Mestrelab research S. L. 2018. Santiago de Compostela, España.
- SÜLSEN, V. y MARTINO, V. Overview. En *Sesquiterpene Lactones. Advances in their chemistry and biological aspects* (editado por V. Sülsen y V. Martino), páginas 3–17. Springer, Cham, Switzerland, 2018.
- SÜLSEN, V. P., CAZORLA, S. I., FRANK, F. M., REDKO, F. C., ANESINI, C. A., COUSSIO, J. D., MALCHIODI, E. L., MARTINO, V. S. y MUSCHIETTI, L. V. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from argentine medicinal plants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 77, páginas 654–659, 2007.
- SULSEN, V. P., FRANK, F. M., CAZORLA, S. I., ANESINI, C. A., MALCHIODI, E. L., FREIXA, B. y MARTINO, V. S. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52(7), páginas 2415–2419, 2008.
- SÜLSEN, V. P., LIZARRAGA, E. F., ELISO, O. G., CERNY, N., ALBERTI, A. S., BIVONA, A. E., MALCHIODI, E. L., CAZORLA, S. I. y CATALÁN, C. Activity of estafietin and analogues on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania braziliensis*. *Molecules*, vol. 24, página 1209, 2019.
- SUN, Y., CLAIR, D. K. S., XU, Y., CROOKS, P. A. y CLAIR, W. H. S. A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, vol. 70(7), páginas 2880–2890, 2010.
- SVENDA, J., SHEREMET, M., KREMER, L., MAIER, L., BAUER, J. O., STROHMANN, C., ZIEGLER, S., KUMAR, K. y WALDMANN, H. Biology-Oriented Synthesis of a Withanolide-Inspired Compound Collection Reveals Novel Modulators of Hedgehog Signaling. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 54, páginas 1–8, 2015.

- SÁNCHEZ-PEDREGAL, V. M., SANTAMARÍA-FERNÁNDEZ, R. y NAVARRO-VÁZQUEZ, A. Residual dipolar couplings of freely rotating groups in small molecules. stereochemical assignment and side-chain conformation of 8-phenylmenthol. *Org. Lett.*, vol. 11(7), páginas 1471–1474, 2009.
- TAJABADI, F. M., CAMPITELLI, M. R. y QUINN, R. J. Scaffold Flatness: Reversing the Trend. *Springer Science Reviews*, vol. 1(1-2), páginas 141–151, 2013.
- TAKAHASHI, K., NASU, K., MASHINO, T., MORISAKI, M., HARA, N. y FUJIMOTO, Y. Metabolic conversion of 24-methyl- δ^{25} -cholesterol to 24-methylcholesterol in higher plants. *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 14(3), páginas 732–738, 2006.
- TAN, A.-M., HE, H.-P., YANG, H., ZHANG, M., WANG, Z.-T. y HAO, X.-J. Chemical constituents of *Ligularia dictyoneura*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, vol. 38(12), páginas 924–926, 2003.
- TANOWITZ, H. B., KIRCHHOFF, L. V., SIMON, D., MORRIS, S. A., WEISS, L. M. y WITTNER, M. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 5, páginas 400–419, 1992.
- TEIXEIRA, A. R. L., NASCIMENTO, R. J. y STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease: A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 101, páginas 463–491, 2006.
- TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P., MADY, C. y FERNANDES, F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for american trypanosomiasis. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, vol. 5, páginas 222–235, 2007.
- THIELE, C. M. Residual Dipolar Couplings (RDCs) in organic structure determination. *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2008, páginas 5673–5685, 2008.
- THIELE, C. M. y BERMEL, W. Speeding up the measurement of one-bond scalar (1J) and residual dipolar couplings (1D) by using non-uniform sampling (NUS). *J. Magn. Reson.*, vol. 216, páginas 134–43, 2012.
- THILIP, C., SOUNDAR RAJU, C., VARUTHARAJU, K., ASLAM, A. y SHAJAHAN, A. Improved agrobacterium rhizogenes-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment. *3 Biotech*, vol. 5(6), páginas 949–956, 2015.
- THOMPSON, L. A. y ELLMAN, J. A. Synthesis and applications of small molecule libraries. *Chem. Rev.*, vol. 96(1), páginas 555–600, 1996.
- TOMÁS, J., CAMPS, F., CLAVERIA, E., COLL, J. y MESSEGUER, J. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* *in vivo* and *in vitro* cultures. *Phytochemistry*, vol. 31(5), páginas 1585–1591, 1992.
- TORTOSA, R. D. y BARTOLI, A. *Senecio rosmarinus* y *S. spegazzinii*: Sinónimos de *S. volckmannii* (Asteraceae, Senecioneae. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, vol. 41(1-2), páginas 123–125, 2006.

- TOWLE, M. J., SALVATO, K. A., BUDROW, J., WELS, B. F., KUZNETSOV, G., AALFS, K. K., WELSH, S., ZHENG, W., SELETSKY, B. M., PALME, M. H., HABGOOD, G. J., SINGER, L. A., DIPETRO, L. V., WANG, Y., CHEN, J. J., QUINCY, D. A., DAVIS, A., YOSHIMATSU, K., KISHI, Y., YU, M. J. y LITTLEFIELD, B. A. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer Res.*, vol. 61(3), páginas 1013–1021, 2001.
- TRINGALI, C. *Bioactive compounds from natural sources*. Taylor & Francis, Nueva York, 2001.
- TROCHE-PESQUEIRA, E., ANKLIN, C., GIL, R. R. y NAVARRO-VÁZQUEZ, A. Computer-assisted 3D structure elucidation of natural products using residual dipolar couplings. *Angew. Chem.*, vol. 129, páginas 3714–3718, 2017.
- TU, T., DILLON, M. O., SUN, H. y WEN, J. Phylogeny of *Nolana* (Solanaceae) of the Atacama and peruvian deserts inferred from sequences of four plastid markers and the nuclear LEAFY second intron. *Molec. Phylogen. Evol.*, vol. 49, páginas 561–573, 2008.
- TU, T., VOLIS, S., DILLON, M. O., SUN, H. y WEN, J. Dipersals of Hyoscyameae and Mandragoreae (Solanaceae) from the new world to Eurasia in the early miocene and their biogeographic diversification within Eurasia. *Molec. Phylogen. Evol.*, vol. 57, páginas 1226–1237, 2010.
- UNNATI, S., RIPAL, S., SANJEEV, A. y NIYATI, A. Novel anticancer agents from plant sources. *Chin, J. Nat. Med.*, vol. 11(1), páginas 16–23, 2013.
- URONES, J. G., TERESA, J. D., MARCOS, I. S., MORO, R. F., BARCALA, P. B. y CUADRADO, M. J. S. Acetophenones and Terpenoids From *Senecio gallicus*. *Phytochemistry*, vol. 26(4), páginas 1113–1115, 1987.
- UZUN, E., SARIYAR, G., ADSERSEN, A., KARAKOV, B., OTUK, G., OKTAYOGLU, E. y PIRILDAR, S. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 95, páginas 287–296, 2004.
- VACCARINI, C. E. y BONETTO, G. M. Selective phytotoxic activity of withanolides from *Iochroma australe* to crop and weed species. *J. Chem. Ecol.*, vol. 26(9), páginas 2187–2196, 2000.
- VANKAR, P. S., SRIVASTAVA, J., MOLCANOV, K. y KOJIC-PRODIC, B. Withanolide A series steroidal lactones from *Eucalyptus globulus* bark. *Phytochem. Lett.*, vol. 2, página 67, 2009.
- VELDE, V. V. y LAVIE, D. New withanolides of biogenetic interest from *Withania somnifera*. *Phytochemistry*, vol. 20(6), páginas 1359–1364, 1981.
- VELEIRO, A. S., OBERTI, J. C. y BURTON, G. Chemistry and bioactivity of withanolides from southamerican Solanaceae. En *Studies in Natural Products Chemistry* (editado por A. ur Rahman), vol. 32, páginas 1019–1052. Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2005.

- VERAS, M., BEZERRA, M., LEMOS, T., UCHOA, D., BRAZ-FILHO, R., CHAI, H.-B., CORDELL, G. y PESSOA, O. Cytotoxic Withaphysalins from the Leaves of *Acnistus arborescens*. *J. Nat. Prod.*, vol. 67(4), páginas 710–713, 2004a.
- VERAS, M. L., BEZERRA, M. Z. B., LEMOS, T. L. G., DE, D. E., UNCHOA, A., BRAZ-FILHO, R., CHAI, H. B., CORDELL, G. A. y PESSOA, O. D. L. Cytotoxic withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens*. *J. Nat. Prod.*, vol. 67, páginas 710–713, 2004b.
- VERDIER, L., SAKHAIL, P., ZWECKSTETTER, M. y GRIESINGER, C. Measurement of long range H,C couplings in natural products in orienting media: a tool for structure elucidation of natural products. *J. Magn. Reson.*, vol. 163, páginas 353–359, 2003.
- VITAKU, E., SMITH, D. T. y NJARDARSON, J. T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns and frequency of nitrogen heterocycles among U. S. FDA approved pharmaceuticals. *J. Med. Chem.*, vol. 57, páginas 10257–10274, 2014.
- WANG, C. F., ZHAO, Y., LIU, Y. Z. y ZHANG, Z. Z. Two new eremophilane-type sesquiterpenoids from the rhizomes of *Ligularia veitchiana*. *Phytochemistry*, vol. 31(1), páginas 199–201, 1991.
- WANG, C. M., YANG, H., WEI, Y. M., JIA, Z. J. y ZHENG, R. L. In vitro effects on proliferation, telomerase activity and apoptosis of an eremophilanoid sesquiterpene from *Senecio oldhamianus* Maxim. in cultured human tumor cell lines. *Pharmazie*, vol. 59(10), páginas 802–806, 2004.
- WANG, D.-H., WASA, M., GIRI, R. y YU, J.-Q. Pd(ii)-catalyzed cross-coupling of sp^3 C-H bonds with sp^2 and sp^3 boronic acids using air as the oxidant. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130(23), páginas 7190–7191, 2008.
- WARATCHAREEYAKUL, W., HELLEMANN, E., GIL, R. R., CHANTRAPROMMA, K., LANGAT, M. K. y MULHOLLAND, D. A. Application of residual dipolar couplings and selective quantitative noe to establish the structures of tetranortriterpenoids from *xylocarpus rumphii*. *J. Nat. Prod.*, vol. 80(2), páginas 391–402, 2017.
- WASA, M., ENGLE, K. M. y YU, J.-Q. Pd(0)/PR₃-catalyzed intermolecular arylation of sp^3 C-H bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131(29), páginas 9886–9887, 2009.
- WEISSENBERG, M., GLOTTER, E. y LAVIE, D. The synthesis of the ring A/B in withaferin A and other withanolides. *Tetrahedron Letters*, vol. 15(35), páginas 3063–3066, 1974.
- WENCEL-DELORD, J. y GLORIUS, F. C–H bond activation enables the rapid construction and late-stage diversification of functional molecules. *Nature Chemistry*, vol. 5, páginas 369–375, 2013.
- WETZEL, S., BON, R. S., KUMAR, K. y WALDMANN, H. Biology–Oriented Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50(46), páginas 10800–10826, 2011.
- WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *Second WHO report on neglected diseases*, páginas 1–153, 2013.

- WRIGHT, A. E., FORLEO, D. A., GUNAWARDANA, G. P., GUNASEKERA, S. P., KOEHN, F. E. y McCONNELL, O. J. Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian *Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.*, vol. 55(15), páginas 4508–4512, 1990.
- WU, L., LIAO, Z., LIU, C., JIA, H. y SUN, J. Eremophilane sesquiterpenes from genus *Ligularia*. *Chem. Biodiversity*, vol. 13, páginas 645–671, 2016.
- XU, J.-Q. y HU, L.-H. New Eremophilane Sesquiterpenes from *Ligularia japonica*. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 92, páginas 357–361, 2009.
- YAMAGUCHI, J., YAMAGUCHI, A. D. y ITAMI, K. C-H Bond Functionalization: Emerging Synthetic Tools for Natural Products and Pharmaceuticals. *Angew. Chemie*, vol. 51, páginas 8960–9009, 2012.
- YANG, H., SHI, G. y DOU, Q. P. The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound withaferin A isolated from "indian winter cherry". *Mol. Pharmacol.*, vol. 71, páginas 426–437, 2007.
- YANG, Y., ZHAO, L., WANG, Y.-F., CHANG, M.-L., HUO, C.-H., GU, Y.-C., SHI, Q.-W. y KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research on plants from the genus *Senecio*. *Chem. Biodivers.*, vol. 8, páginas 13–72, 2011.
- YOKOSUKA, A., MIMAKI, Y. y SASHIDA, Y. Chantriolides A y B, two new withanolide glucosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri*. *J. Nat. Prod.*, vol. 66, páginas 876–878, 2003.
- YOUNG, K. R., ULLOA, C. U., LUTEYN, J. L. y KNAPP, S. Plant evolution and endemism in Andean South America: An introduction. *Bot. Rev.*, vol. 48, páginas 4–21, 2002.
- YU, J.-Q. y SHI, Z., editores. *Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlín, Alemania, 2010.
- YU, X. Q., HUANG, J. S., ZHOU, X. G. y CHE, C. M. Amidation of saturated C–H bonds catalyzed by electron-deficient ruthenium and manganese porphyrins. A highly catalytic nitrogen atom transfer process. *Org. Lett.*, vol. 2(15), páginas 2233–2236, 2000.
- ZANGGER, K. Pure shift NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 86-87, páginas 1–20, 2015.
- ZDERO, C. y BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Pl. Syst. Evol.*, vol. 171, páginas 1–14, 1990.
- ZHANG, H., CAO, C.-M., GALLAGHER, R. J. y TIMMERMANN, B. N. Antiproliferative withanolides from several Solanaceous species. *Nat. Prod. Res.*, vol. 28(22), páginas 1941–1951, 2014.
- ZHANG, H., SAMADI, A. K., COHEN, M. S. y TIMMERMANN, B. N. Antiproliferative withanolides from the Solanaceae : A structure-activity study. *Pure Appl. Chem.*, vol. 84(6), páginas 1353–1367, 2012.

- ZHANG, S., WON, Y.-K., ONG, C.-N. y SHEN, H.-M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem.*, vol. 5(3), páginas 239–249, 2005.
- ZHAO, G., CAO, Z., ZHANG, W. y ZHAO, H. The sesquiterpenoids and their chemotaxonomic implications in *Senecio* L. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 59, páginas 340–347, 2015.
- ZHAO, J., NAKAMURA, N., HATTORI, M., KUBOYAMA, T., TOHDA, C. y KOMATSU, K. Withanolide derivatives from the roots of *Withania somnifera* and their neurite outgrowth activities. *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 50, páginas 760–765, 2002.
- ZHENG, W., SELETSKY, B. M., PALME, M. H., LYDON, P. J., SINGER, L. A., CHASE, C. E., LEMELIN, C. A., SHEN, Y., DAVIS, H., TREMBLAY, L., TOWLE, M. J., SALVATO, K. A., WELS, B. F., AALFS, K. K., KISHI, Y., LITTLEFIELD, B. A. y YU, M. J. Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 14(22), páginas 5551–5554, 2004.
- ZONG, W., LI, G.-W., CAO, J.-M., LEI, X., HU, M.-L., SUN, H., GRIESINGER, C. y TAN, R. X. An alignment medium for measuring residual dipolar couplings in pure DMSO: Liquid crystals from graphene oxide grafted with polymer brushes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 55(11), páginas 3690–3693, 2016.
- ZULOAGA, F. O., MORRONE, O. y BELGRANO, M. J. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*, vol. 107, páginas 609–967, 2008.
- ZULOAGA, F. O., MORRONE, O. y RODRIGUEZ, D. Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. *Kurtziana*, vol. 27(1), páginas 17–167, 1999.
- ZWECKSTETTER, M. y BAX, A. Prediction of sterically induced alignment in a dilute liquid crystalline phase: Aid to protein structure determination by NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, páginas 3791–3792, 2000.

Lista de acrónimos

AcOEt	Acetato de Etilo
ADEQUATE	<i>Adequate Double Quantum Transfer Experiment</i>
AP	Alcaloides Pirrolizidínicos
BIOS	<i>Biology-Oriented Synthesis</i>
CASE	<i>Computer Assisted Structure Elucidation</i>
CC	Cromatografía en Columna
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DMAPP	Dimetilalildifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDI	Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Desatendidas
DOS	<i>Diversity-Oriented Synthesis</i>
DTS	<i>Diverted Total Synthesis</i>
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	Farnesildifosfato
GHIT	Fondo Global de Tecnología Innovadora en Salud
GPP	Geranilpirofosfato
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>

HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
Hx	Hexano
Hz	Hertz
INADEQUATE	<i>Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment</i>
IPP	Isopentenildifosfato
IR	Infrarrojo
LS	Lactonas Sesquiterpénicas
LSF	<i>Late Stage Functionalization</i>
MeOH	Metanol
MVA	Acido mevalónico
NEQ	Nuevas Entidades Químicas
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
P-GP	Glicoproteína P
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTX	Paclitaxel
RDC	<i>Residual Dipolar Coupling</i>
REA	Relación Estructura Actividad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TOS	<i>Target-Oriented Syntesis</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
VB	Vinblastina

*–¿Qué te parece desto, Sancho? – Dijo Don Quijote –
Bien podrán los encantadores quitarme la ventura,
pero el esfuerzo y el ánimo, será imposible.*

*Segunda parte del Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes*

*–Buena está – dijo Sancho –; fírmela vuestra merced.
–No es menester firmarla – dijo Don Quijote–,
sino solamente poner mi rúbrica.*

*Primera parte del Ingenioso Caballero
Don Quijote de la Mancha
Miguel de Cervantes*

