



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIA QUÍMICAS E INGENIERÍA
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA

TESIS

**SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE NUEVOS DERIVADOS DE
FERRUGINOL BASADOS EN FARMACÓFOROS DE TIPO AMINO ALCOHOL.**

**Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

Elizabeth Sánchez Bustos

Tijuana, Baja California

Diciembre 2009

RESUMEN

La utilización de los productos naturales como fuente potencial para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos permanece activa, sobre todo para el tratamiento de cáncer y enfermedades infecciosas, donde el 60% y 75% de los fármacos, respectivamente, provienen de productos de origen natural. Los ensayos de actividad antitumoral *in vitro* desempeñan un papel significativo tanto en la evaluación aleatoria de nuevos productos (“random screening”) como en el diseño racional de nuevos compuestos anticancerígenos. En este trabajo se ha planteado llevar a cabo la modulación de la actividad antitumoral de ferruginol, mediante bioensayos antiproliferativos y modificaciones estructurales de los farmacóforos que presenta. Para la síntesis y evaluación biológica de estos compuestos se realizaron 3 etapas que se describen a continuación: 1. Síntesis de ferruginol, utilizando como material de partida el producto natural ácido dehidroabietico. 2. Generación y caracterización estructural de derivados de tipo aminoalcohol, mediante transformaciones químicas de ferruginol, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. 3. Evaluación antiproliferativa de los derivados obtenidos. Para esta etapa, se desarrolló un diseño experimental para evaluar la citotoxicidad de los productos obtenidos frente a líneas celulares tumorales de origen humano: Ovario (A2780), Mama (HDL-100), Pulmón (SW1573), Mama (T47D) y Colon (WiDr). Este procedimiento se compone de tres pasos fundamentalmente: 1. Cultivo celular, tripsinización, viabilidad celular y recuento; 2. Siembra, establecimiento de controles y adición de productos para el examen de citotoxicidad; 3. Determinación del GI_{50} mediante el método colorimétrico SRB. Todos los valores de GI_{50} , fueron determinados siguiendo el protocolo del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) con pequeñas modificaciones.

Todos los productos de interés fueron sintetizados y caracterizados satisfactoriamente. En el estudio biológico de los compuestos obtenidos, se encontraron valores de GI_{50} en un rango activo de 1.4 a 2.5 μM . La poca diferencia de actividad antiproliferativa entre los aminoalcoholes con disposición espacial R y S, indica que no existe estereoselectividad en esta respuesta biológica de los isómeros sintetizados. Estos resultados sugieren que la cadena lateral incorporada sobre el anillo aromático de ferruginol, es importante que presente grupos de tipo alcohol secundario y aminas secundarios con anillos aromáticos. Finalmente se pudo observar que la línea celular tumoral mas sensible frente a los productos ensayados fue la de ovario (A2780) y la que ofreció mayor resistencia fue la de pulmón (SW1573).

Conclusiones: Con estos resultados biológicos preliminares, se establece la gran importancia de la presencia de la cadena lateral de tipo β -aminoalcohol sobre el sistema aromático de ferruginol, ya que con esta transformación química est

ÍNDICE

I. CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	6
<i>I.1. Objetivo General</i>	9
<i>I.2. Objetivos Específicos</i>	9
<i>I.3. Metas</i>	9
II. CAPITULO II: SEMISÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE FERRUGINOL	11
<i>II.1. Antecedentes</i>	12
<i>II.2. Parte experimental</i>	30
III. CAPITULO III : SÍNTESIS DE DERIVADOS TIPO AMINOALCOHOL	38
<i>III.1. Antecedente</i>	39
<i>III.2. Parte Experimental</i>	52
IV. CAPITULO IV : EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL IN VITRO	59
<i>IV.1. Antecedente</i>	60
<i>IV.2. Parte Experimental</i>	60
<i>IV.3. Discusión de Resultados</i>	67
V. CAPITULO V: CONCLUSIONES	68
IV. APENDICES	69

I. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la quimioterapia la principal fuente de agentes citotóxicos anticancerosos provienen de plantas, microorganismos, y, recientemente, de una gran diversidad de organismos marinos. Aun y cuando la nueva tecnología de la química combinatorial y las técnicas de **barrido de alto** resolución (high-throughput screening) representan un avance importante en el descubrimiento de compuestos bioactivos, el papel de los productos naturales como precursores de nuevos citotóxicos no debería ser descartado. El número de estudios de especies microbianas aun son escasos, y los ecosistemas marinos son un campo bastante extenso sin explorar.

En la actualidad alrededor de la mitad de los medicamentos anticancerosos de uso clínico provienen de productos naturales, y se ha estimado que cerca del 60% de nuevas entidades químicas en el periodo de 1981-2002 son productos naturales o han sido derivados de compuestos naturales. A pesar de esto, las compañías farmacéuticas últimamente han perdido el interés por el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos a partir de productos naturales y se han enfocado en la química combinatorial y **la síntesis de barrido de alta resolución** (high-throughput screening) para la síntesis de una vasta librería de compuestos. La principal razón de la falta de interés por el uso de productos naturales como candidatos líderes es el uso de rutas sintéticas, ya que estas suelen ser largas y difíciles de escalar debido a la complejidad estructural de los compuestos. Consecuentemente, en el 2001 la FDA reportó que el registro de nuevas entidades químicas disminuyó de 37 a 16 registros, y que este valor seguía a la baja. Razón por la cual la industria farmacéutica reconsidera y retoma el interés hacia la investigación de productos naturales, como sustancias líderes para la generación de nuevas entidades químicas biológicamente activas.^{1,2} Razón por la cual se propone el la modificación de productos naturales, las cuales se establecen en base al conjunto de rasgos estéricos y electrónicos de la estructura necesarios para proporcionar la actividad biológica, es decir, el farmacóforo. Un ejemplo de esto, es la generación de agentes citotóxicos β -amino alcoholes, a partir de estudios de semisintéticos o de síntesis parcial de análogos de diterpenos abietánicos, ya que diversos estudios se ha demostrado que poseen una amplia gama de actividades biológicas tales como:

¹ Cragg, G.M.; Newman, D.J.; Snader, K.M. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 50-60

² Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1002-1027.

antibiótica, antitumoral, anti-vírica, antimalaria, y antioxidante. Alguno de los compuestos que han cautivado la atención de investigadores por su efectividad en ensayos biológicos, son: Ferruginol y Sugiol.^{3,4}

En el 2006 que se publico la generación de análogos de tipo aminoalcohol a partir de Sugiol diterpeno de tipo abietano aislado de s. *clevelandii*, y que mediante una serie de transformaciones se funcionalizó la posición 11 del anillo “C” del diterpeno, para generar una cadena lateral periférica de tipo β -aminoalcohol. Estos análogos en estudios in Vitro frente a distintas líneas tumorales, principalmente de ovario, colon, pulmón y mama presentaron valores de IC₅₀ alrededor de de 1.5 y 6.0 μ M.⁵ Debido a esto y considerando que Ferruginol posee un valor de GI₅₀ biológicamente aceptable, se considero el proponer una ruta sintética generar una serie de aminoalcoholes derivados de Ferruginol, y posteriormente realizar ensayos biológicos correspondientes, para poder determinar la relación estructura actividad existente en los compuestos generados.

³ Nicolaou, K. C.; Pfefferkon, J.A.; Roecker, A.J.; Cao, G.Q.; Barluenga, S.; Mitchell, H.J *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9954, **2000**

⁴ Brohm, D.; Metzger, S.; Bhargava, A.; Müller, O.; Lieb, F.; Waldman, H. *Angew. Chem. Int Ed.* **41**, 307, **2002**

⁵ Cordova, I. et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 41, 1327-1332

I.1. Objetivo General

Sintetizar y evaluar la actividad antitumoral de análogos de ferruginol, mediante modificaciones estructurales y bioensayos antiproliferativos de diterpenos de tipo abietano.

I.2. Objetivos Específicos

En este proyecto proponemos la generación de sustancias “líderes” de tipo antitumoral, mediante la quimiomodulación de la actividad antiproliferativa de diterpenos de tipo abietano que presentaron un IG_{50} entre 1.5 y 6.0 μM en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- 1) Sintetizar una familia de diterpenos abietánicos funcionalizados en el anillo “C”, con cadenas de tipo amino alcohol, a partir de ácido dehidroabiético.
- 2) Caracterizar estructuralmente todos los intermediarios y productos obtenidos.
- 3) Llevar a cabo bioensayos antitumorales con distintas líneas celulares de cáncer humano de los productos obtenidos.
- 4) Establecer que factores estructurales rigen la actividad antiproliferativa de estos compuestos semisintéticos.

I.3. Metas

Aplicar con éxito nuevas metodologías sintéticas en la modificación estructural de productos naturales bioactivos.

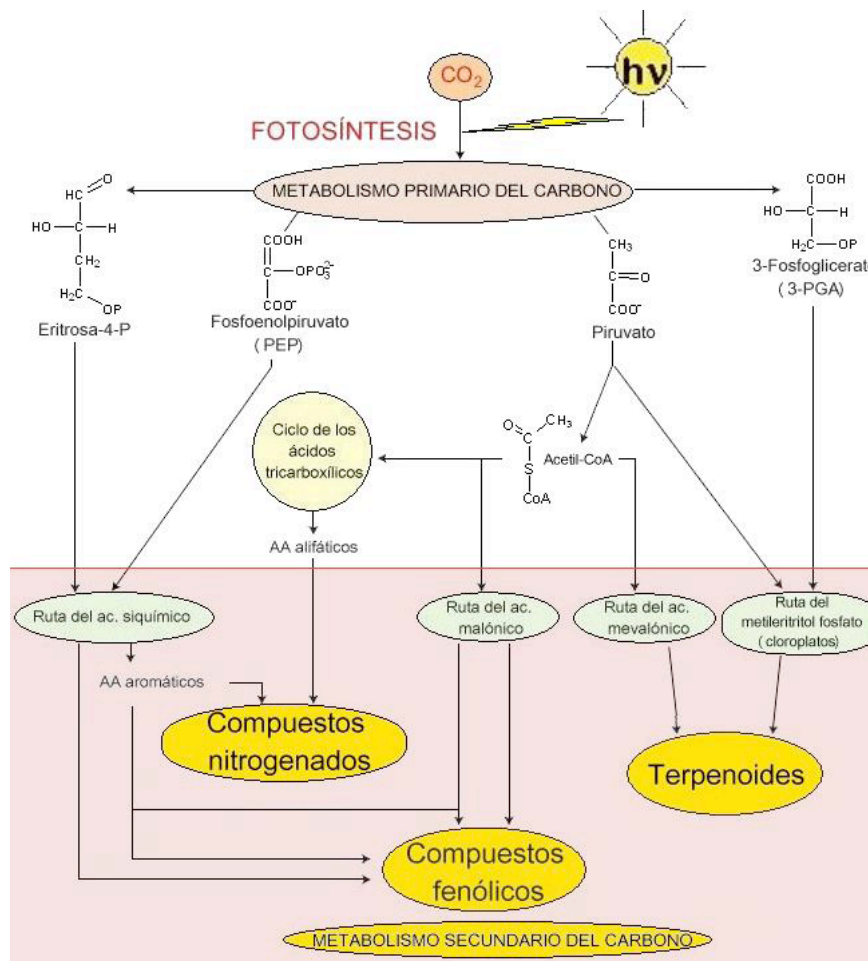
1. Complementar estos estudios con técnicas bioinformáticas (QSAR), para determinar la influencia de los factores de tipo electrónico, inductivo, estereoquímico y de reactividad química sobre la bioactividad anticancerosa observada.

2. Mediante los resultados obtenidos de estructura-actividad biológica, determinar qué parámetros estructurales de los compuestos estudiados influyen en la actividad citotóxica.
3. Mediante la quimiomodulación de los compuestos de interés, generar sustancias “líderes” que puedan conducirnos en un futuro a la generación de nuevos agentes antineoplásicos
4. Obtención de tesis de maestría, presentación de resultados preliminares en congreso y publicación de resultados finales

II. CAPITULO II: SEMISÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE FERRUGINOL

II.1.Antecedentes

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en la estructura de membranas).

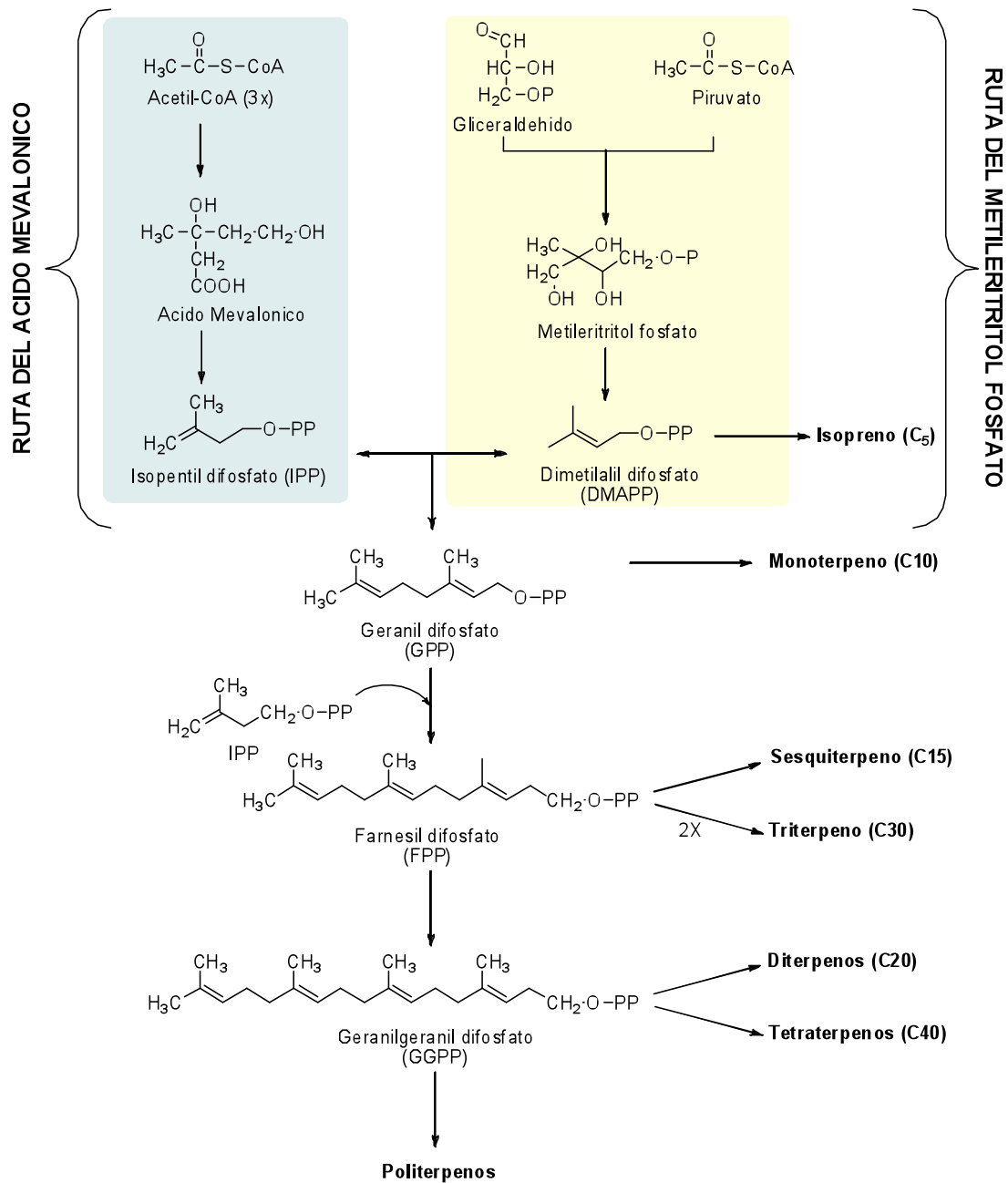


Esquema 1

Elementos del metabolismo del carbono en relación con las rutas de síntesis de metabolitos secundarios

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (esquema 2). De esta forma, los terpenos se clasifican por el

número de unidades de isopreno (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno.



Esquema 2

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Esquema 2).

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos (Esquema 2).

El grupo de los terpenos, como antes se menciona, incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), latex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial.

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc.

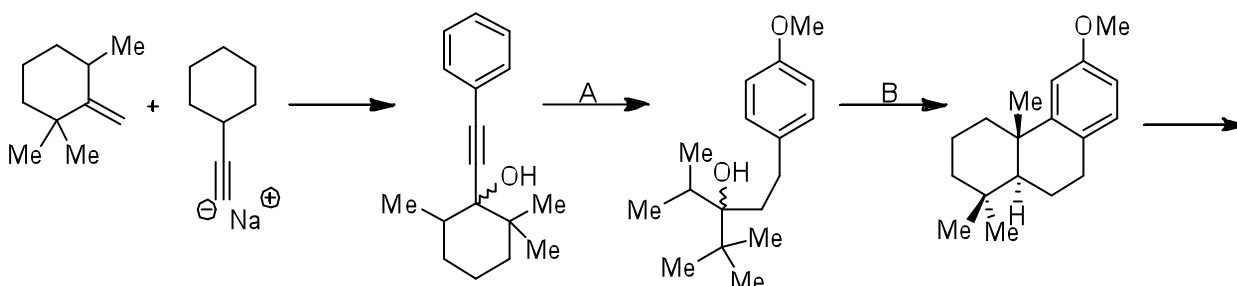
Los terpenos se clasifican según las unidades de isopreno que contienen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos. En esta ocasión centraremos nuestro interés particular en los **Diterpenos**, terpenos donde 20 C tienen cuatro unidades de isopreno, debido a la actividad biológica que presenta como antimicrobiano, antiulcerogénico, cardiovascular entre otras. Un ejemplo de compuestos del tipo abietano que ha atraído la atención de los investigadores es el ácido abiético (incluir estructura), principal componente de resinas de ciertas coníferas, además se considera uno de los compuestos bioactivos de tipo diterpeno abietánico de

mayor importancia en la química sintética, debido a que en diversos estudios se ha reportado que posee importante actividad antimicrobiana, antialérgica, antiinflamatoria, anticonvulsivante, antitumoral⁶ entre otras. Por lo anterior, este ha sido precursor principal de diversos productos naturales, concretamente en la síntesis de ácido dehidroabiético.

El ácido dehidroabiético se obtiene fácilmente por deshidrogenación catalítica de resinas ácidas de tipo abietano⁷. Uno de los derivados más importantes de ácido dehidroabiético es Ferruginol, este en diversos estudios ha mostrado poseer importante actividad biológica tal como antibiótica, antitumoral, anti-vírica, anti malaria, antioxidante, además de poseer un valor de GI₅₀ de 18 μ m ante células de tumor sólido. Debido a esto Ferruginol se considera como un intermediario o precursor importante para la generación de nuevos derivados diterpénicos, en este documento se describe la síntesis parcial de diterpenos bioactivos de tipo aminoalcohol, donde se sugiere ácido dehidroabiético como material de partida para la obtención del intermediario principal Ferruginol y, a partir de este una serie de derivados de tipo amino alcohol, los cuales se ensayaron en diversas líneas celulares con la finalidad determinar la relación estructura actividad existente en los compuestos generados.

Síntesis de Ferruginol

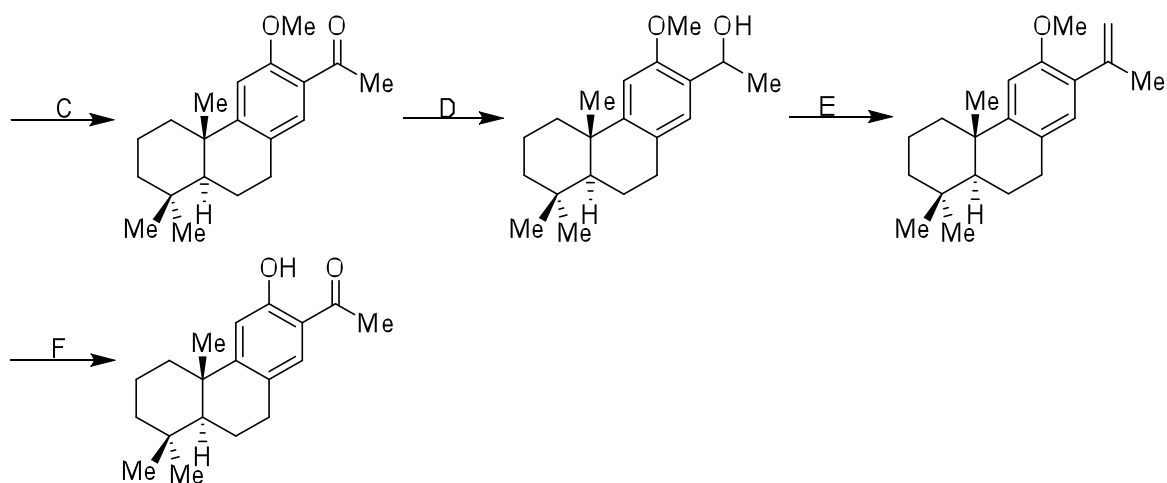
Una de las primeras propuestas sintéticas de Ferruginol, fue elaborada por los investigadores *King y col.*,⁸ donde utilizan la ruta Bogert-Cook para la construcción de sistemas octahidrofenantreno.



⁶ M.A.González et al. *Tetrahedron*, **2008**, 64, 445-467

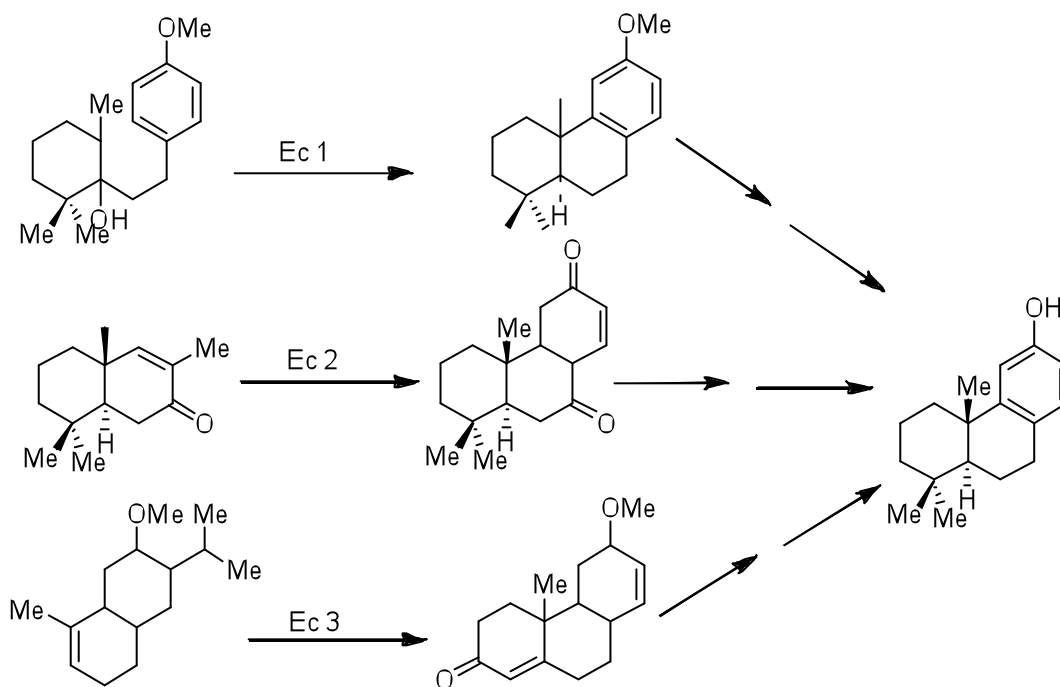
⁷ Monteiro, S. et al. *New Journal of Chemistry*. **2001**, 25, 1091-1097.

⁸ King, F.E.; King, T.J.; Topliss, J.G. *J. Org. Chem.*, **1957**, 573.



Esquema 3

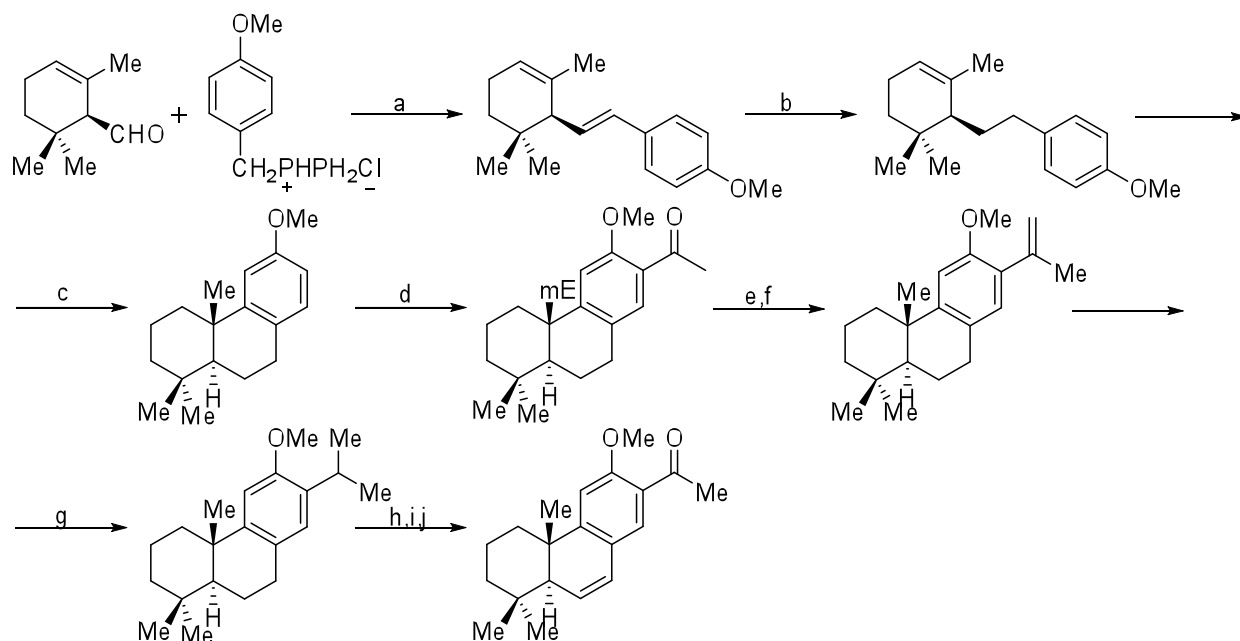
Así mismo *King y col*⁹ en 1957 propusieron diversas permutaciones en el orden de ensamblaje de los tres anillos como una aproximación sintética de Ferruginol, esto mediante la ciclación de los anillos AC→ABC (Ec 1), con ausencia de estereoselectividad entre los anillos A/B. (Esquema 4).



Esquema 4

⁹ (a) King, F.E.; King, T.J. *Chem. Ind. (London)*, **1954**, 108; (b) King, F. E.; King, T.J.; Topliss, J.G. *Chem. Ind. (London)*, **1957**, 573.

Siguiendo con el esquema de ciclación AC→ABC y empleando como material de partida el (S)-(-)- α -ciclocitral, *Pan y col*¹⁰, se propone realizar la síntesis estereoselectiva de (-)-6,7,6,7-didehidro-12-O-metil Ferruginol, donde se resalta la formación del anillo B como el paso clave de la síntesis, que se logra mediante catálisis ácida con BF₃Et₂O en CH₂Cl₂ obteniendo 90% del isómero *trans*. (Esquema 5).

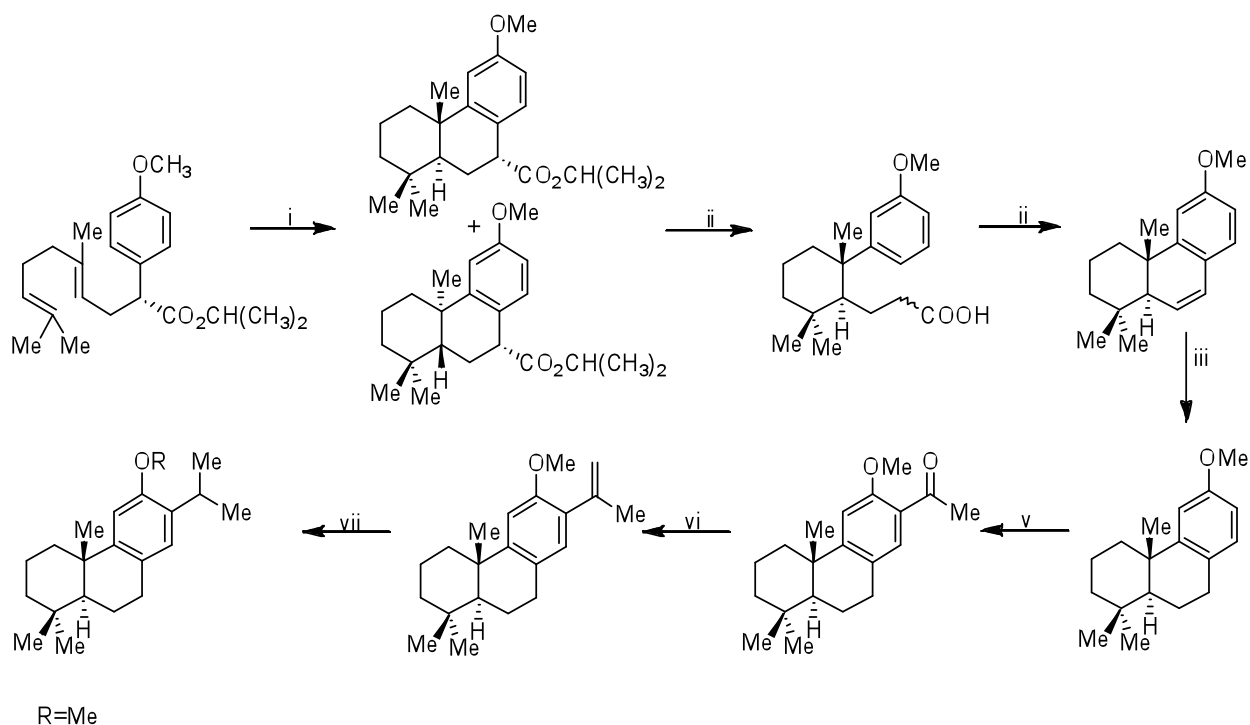


Esquema 5

Masahiro Tada, Sei Nishiiri y Col.,¹¹ proponen una de las reacciones de síntesis más efectivas para la ciclación de polienos, la ciclación asimétrica de polienos biogenéticamente modificados, para la obtención de varios diterpenos abietánicos como ((+)-Ferruginol, (-)- Ferruginol y (±)- Ferruginol). (Esquema 6).

¹⁰ Gan, Y.; Li, A.; Pan, X.; Chan, A.S.C.; Yang, T.K. *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, 11, 781.

¹¹ Tada, M., Nishiiri, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, 1, 2657-2664.

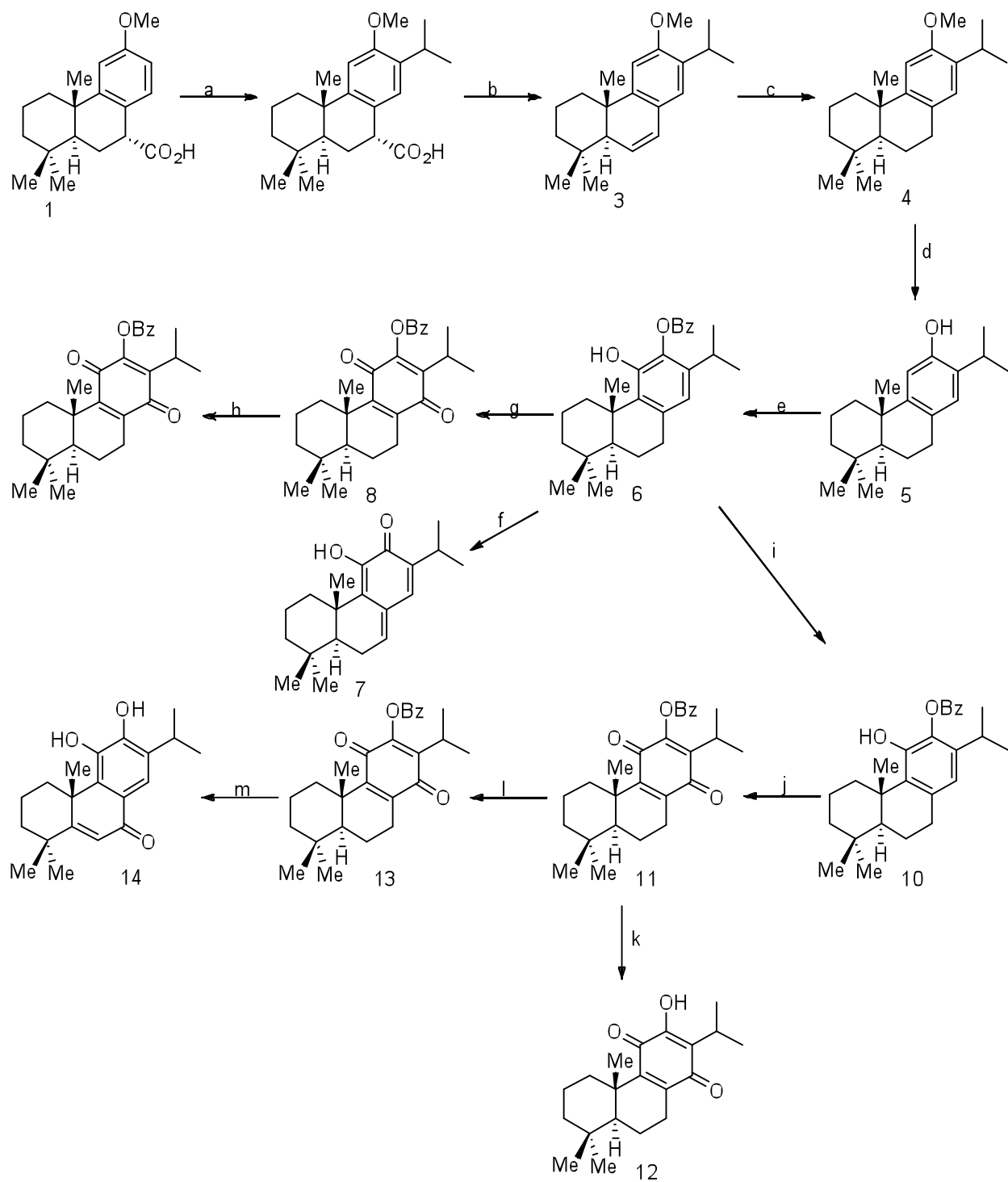


Esquema 6

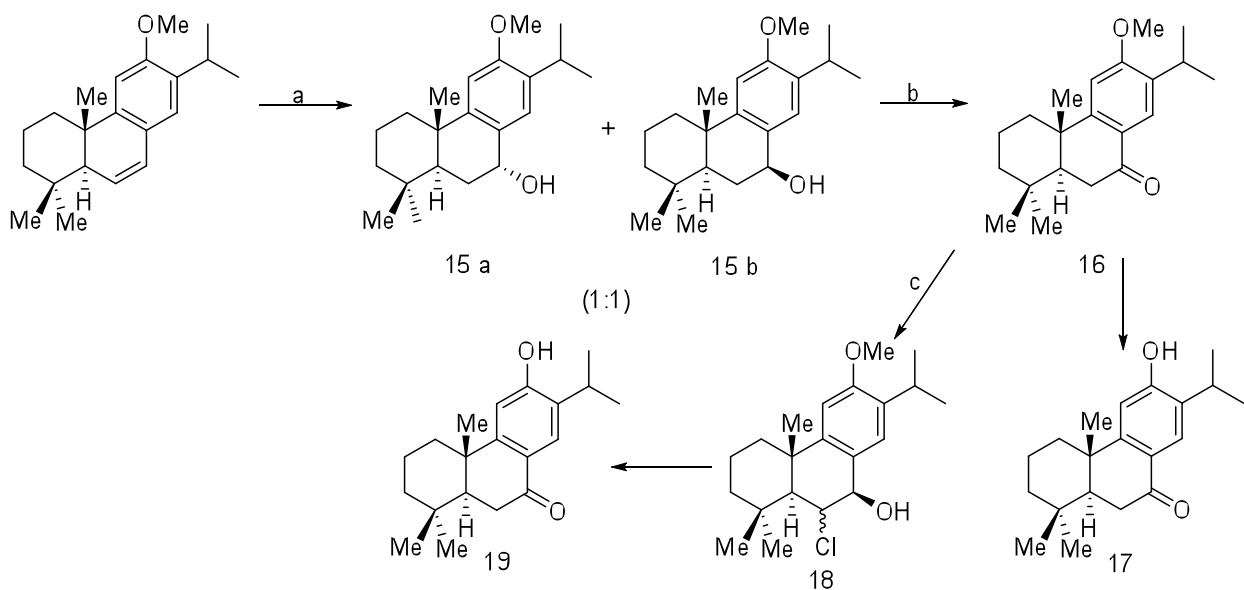
Otro de los estudios de síntesis de diterpenos mediante ciclación de polienos se observa en la síntesis de *Zhixiang Yang y Col.*,¹² sintetizaron 12 diterpenos abietánicos, a partir 3 rutas sintéticas a las que denominaron A,B, y C y estas tiene como común denominador un compuesto tricíclico (3), considerado un intermediario principal, este fue preparado a partir del ácido (1) en dos pasos. Para la ruta A proponen la síntesis de Ferruginol (94.9%) a partir de 3. De tal manera que esta propuesta te permite obtener Ferruginol eficientemente en 3 pasos. En cambio para la ruta B y C se propone la generación del intermediario metil eter Sugiol (85.2%) y 6β-hidroxiferruginol (72.4%) respectivamente. (Esquema 7)

¹² Z.Yang et al., *Biorg. Med. Chem.*, **2001**,9, 347-356

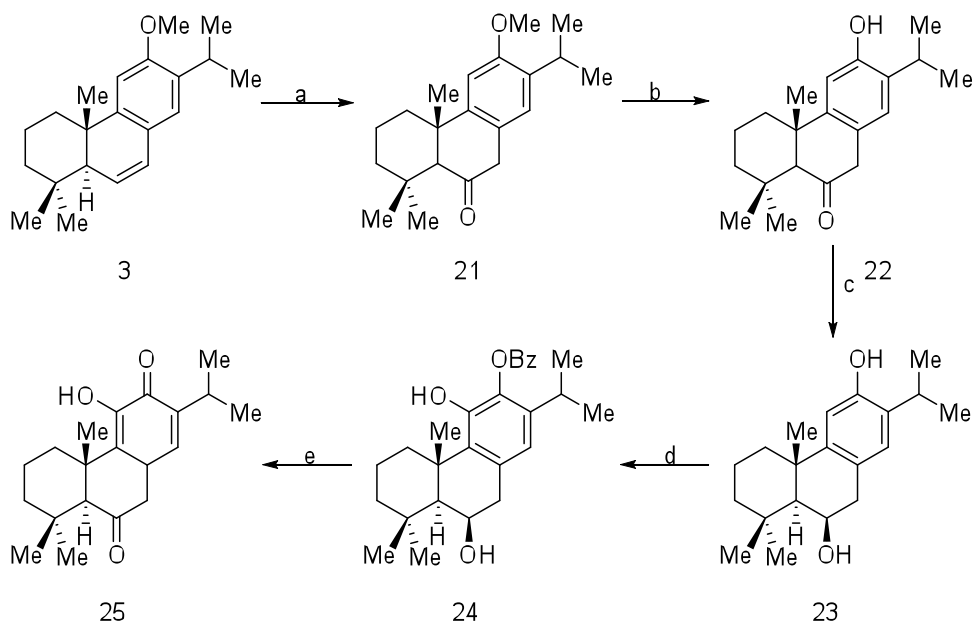
A)



B)



C)

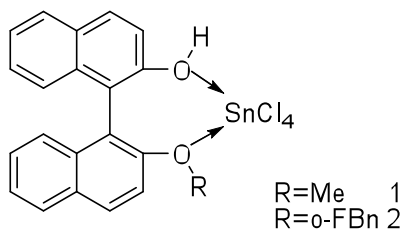


Esquema 7

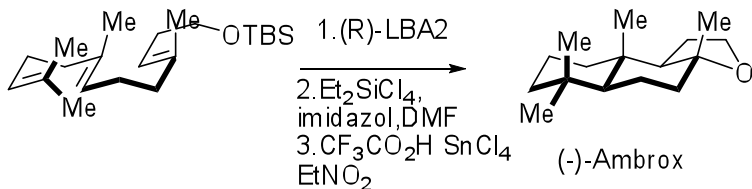
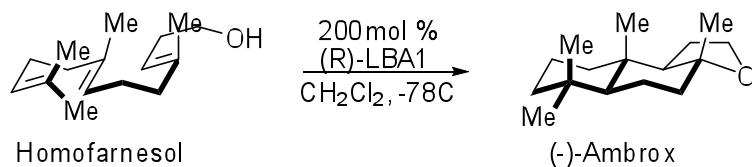
Resulta importante recordar la síntesis en la que Yamamoto utilizó LBA1 para la primera ciclación biomimética enantioselectiva de poliprenoides como una ciclasa artificial para la síntesis de (-)-ambrox. La ciclación de homofarnesol promovida por LBA con un exceso enantiomérico del 42%. Esta ciclación enantioselectiva fue mejorada en 2002 cuando se utilizó LAB2 como promotor de la ciclación. Así mismo

Yamamoto utiliza también LBA2 para la ciclaciones enantioselectiva de poliprenoides donde el grupo terminal es un anillo aromático en lugar grupos hidroxilos nucleofilicos terminales los cuales se presentan en la estructura de homofarnesol.¹³ (Esquema 8)

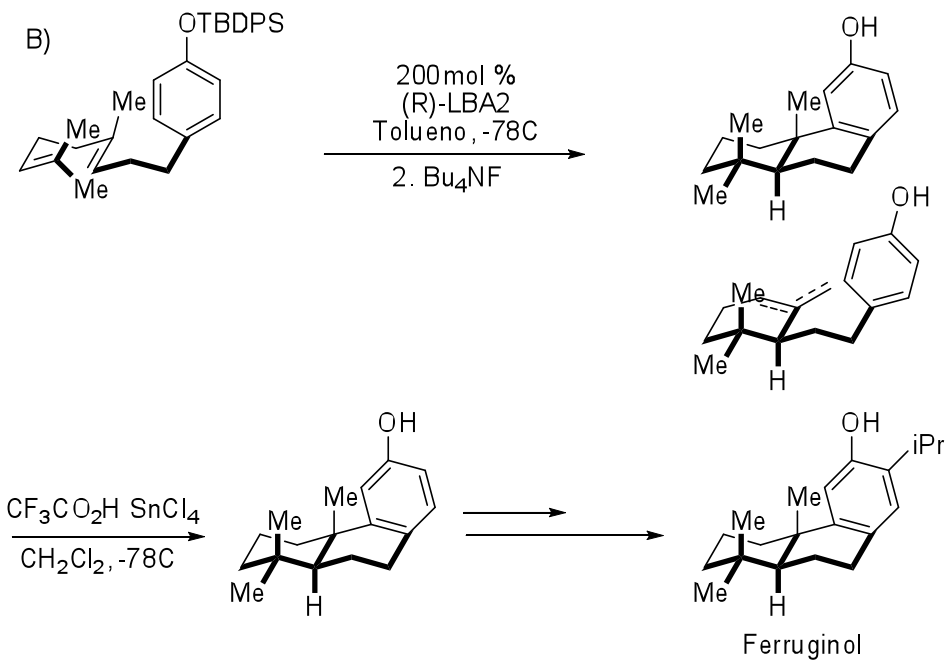
Catalizador Yamamoto LBA



A)



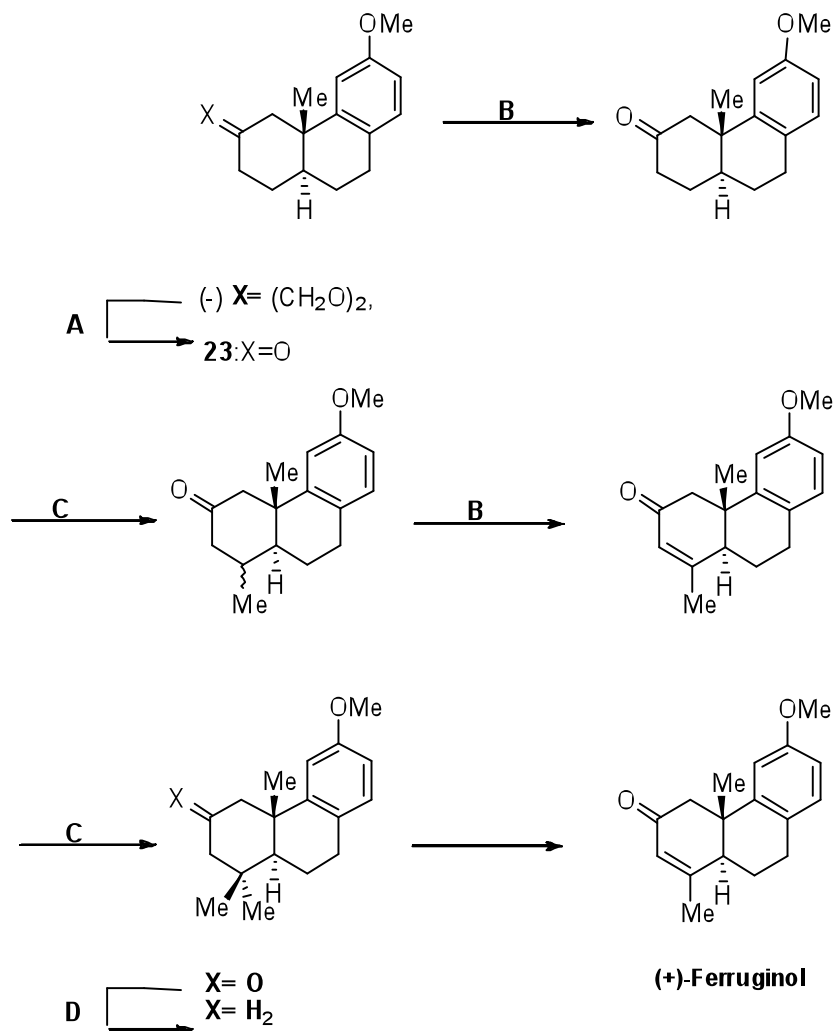
B)



Esquema 8

¹³ Yoder, R.A; xxxxxxxx, 2005,XXX-XXX

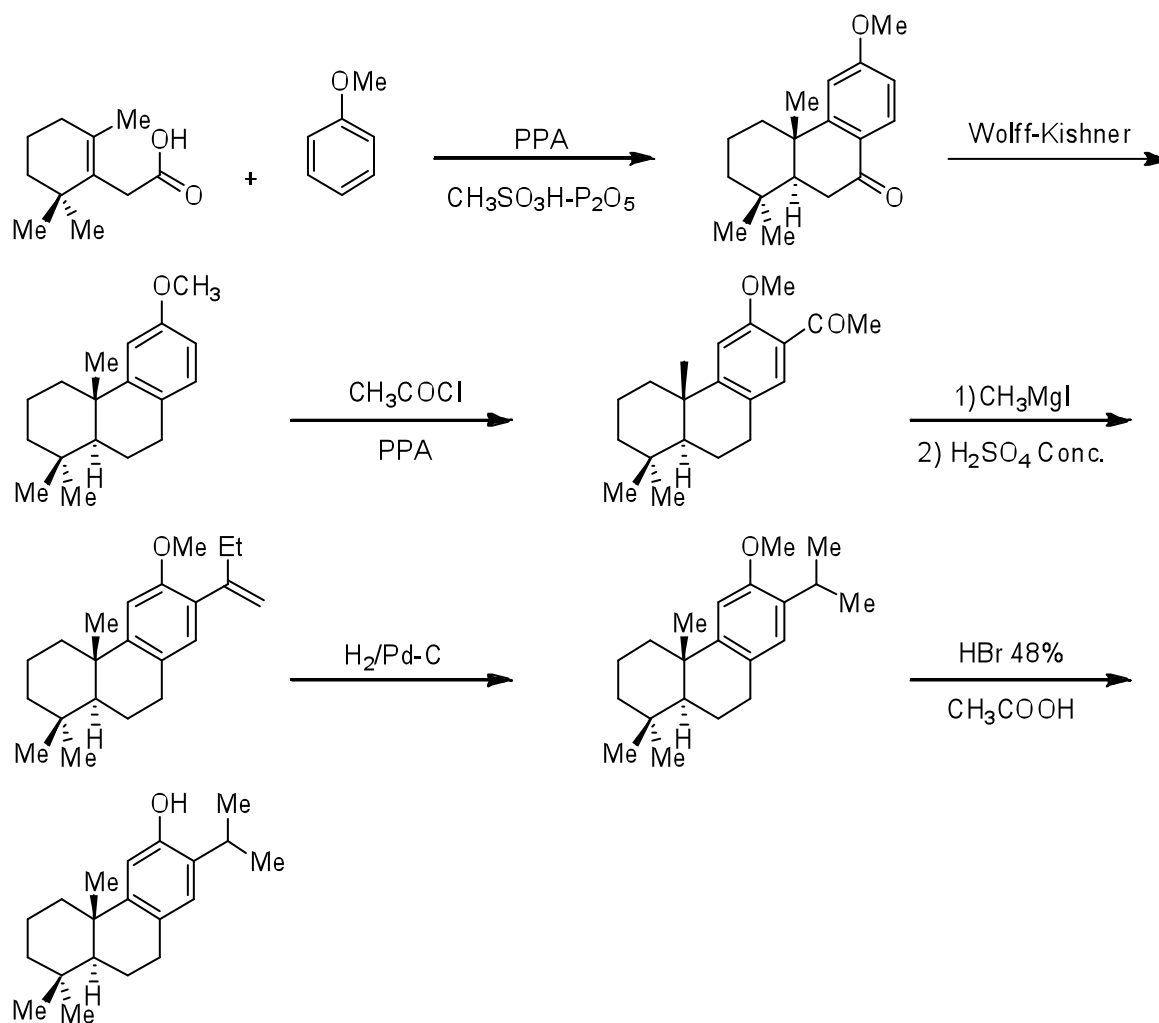
Cabe mencionar que la utilización de centros esterogénicos cuaternarios y/o terciarios, además de reacciones retroaldol y alquilaciones Friedel-Crafts para la síntesis diastereocontrolada de diterpenos como (+)-Ferruginol (Esquema 9) fue de gran éxito para Hiroshi Nagata, Norio Miyazawa y Kunio Ogasawara¹⁴, ya que la construcción de centros quirales utilizadas en este estudio les permitió generar grupos funcionales con estereoquímica de un producto natural



Esquema 9

¹⁴ Nagata, H.; Miyazawa, N.; Ogasawara, K. *Org. Lett.*, **2001**, 3, 11, 1737-1740

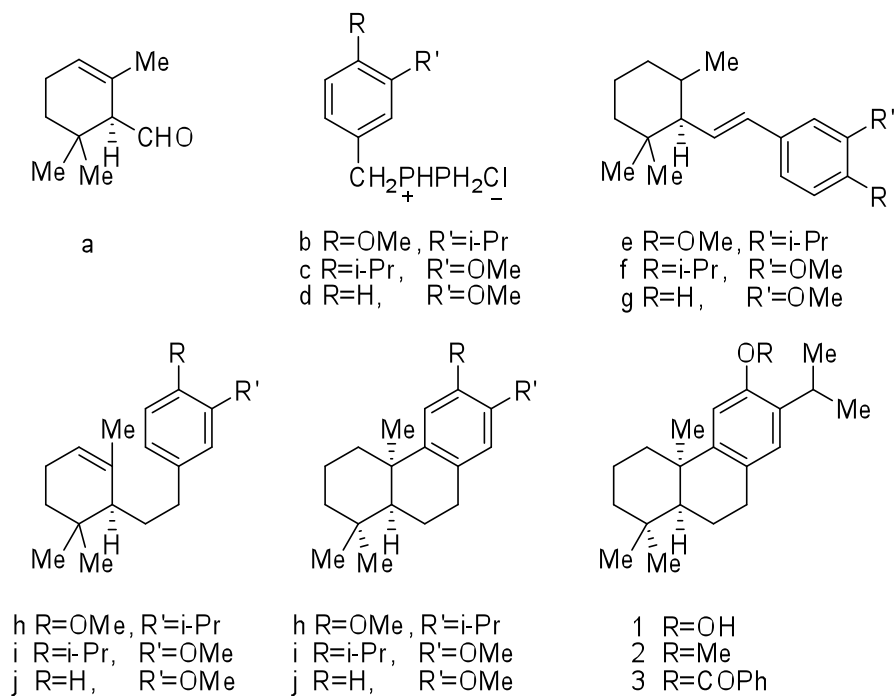
Debido a la necesidad por mejorar la eficiencia sintética se han utilizado reacciones en cascada (domino) como herramienta básica, tal es el caso de Shanta. S. Bhar y M.M.V. Ramana¹⁵, quienes proponen la generación de 5 intermediarios vía acilación-cicloalquilación en cascada para la obtención de (±)-Ferruginol. (Esquema 10)



Esquema 10

¹⁵ S.Bahr, Shanta; Ramana, M.M.V., *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 8935-8937

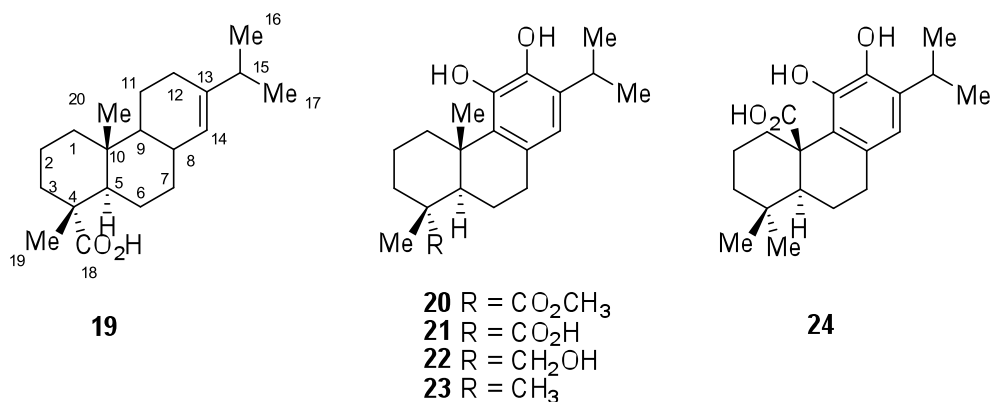
Takashi Matsumoto y Shuji Usui¹⁶ en 1979 para complementar estudios realizados sobre diterpenos tricíclicos poli oxigenados proponen la síntesis total de (+)-Ferruginol, (+), sempervirol y (+)-13-metoxypodocarpa-8,11,13-trieno, la cual es transformada fácilmente al intermediario (+)-podocarpa-8(14)-en-13-ona que se caracteriza por poseer una estructura típica de diterpenos de origen natural. En esta propuesta sintética utilizaron ácido(±)-α-ciclogeránico (a) para la obtención de R-(-)-α-ciclocitral (b) quien mediante una reacción de Witting en hexano y en presencia de butil litio genera 3-(3-isopropil-4-metoxiestiril)-2,4,4-trimetilciclohexeno (c), que fue sometido a una hidrogenación catalítica parcial para de esta forma obtener el correspondiente derivado dihidro (d,e,f). Posteriormente provocaron la ciclación intramolecular del compuesto (d) y (e) al utilizar cloruro de aluminio anhidro. Y por último llevaron a cabo un desmetilación con tribromuro de boro y de esta forma obtuvieron (+)-Ferruginol y (+)-Serpemvirol.



Esquema 11

¹⁶ Matsumoto, T; Usui, S.; *Bulletin of Chemical Society of Japan*; **1979**; 52; 1; 212-215.

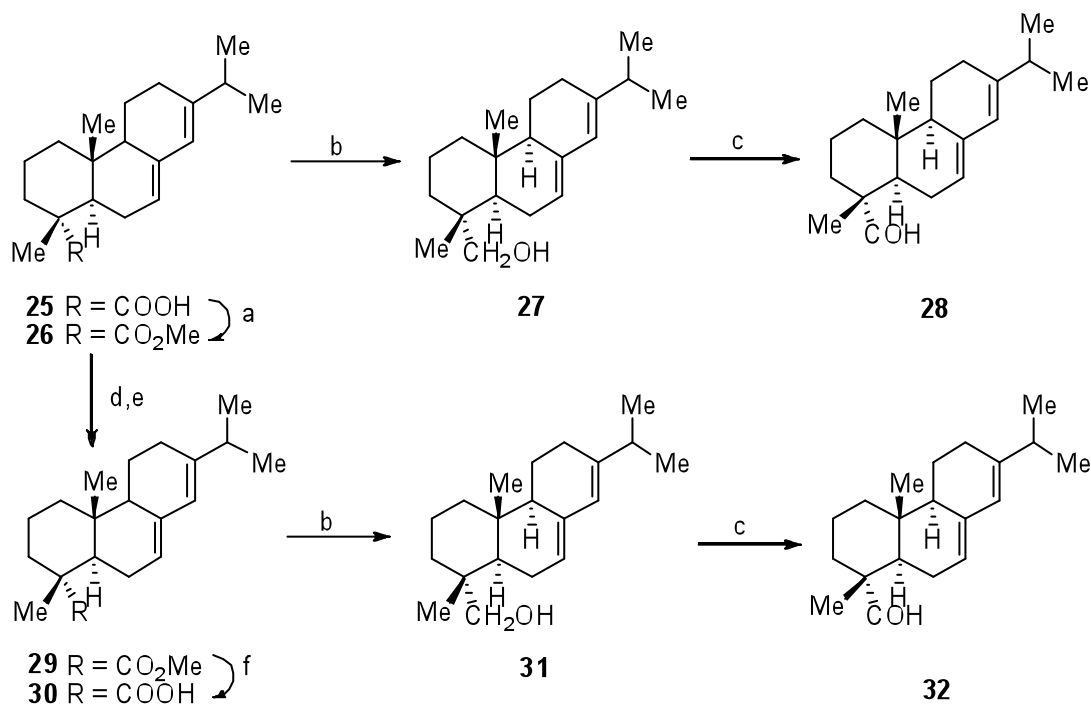
Se conoce que el ácido abiético es uno de los diterpenos abietánicos con mayor diversidad en propiedades biológicas de esta familia de compuestos, lo cual fue tomado en consideración por B. Gigante y colaboradores¹⁷ para la propuesta sintética reportada en el 2003 donde se utiliza como material de partida, ácido abiético (19), para la generación de compuestos biológicamente activos de tipo catecol, los cuales en los ensayos biológicos fueron comparados contra ácido carnosólico, que se tomó como referencia, observando cómo resultados compuestos con actividad biológica prometedora tales como antifúngico, antitumoral, antimutagénico, antiviral, antiproliferativo y como inhibidor de óxido nítrico en general la respuesta es mucho mejor que la observada con ácido carnosólico. Cabe mencionar que en este artículo se propone a Ferruginol como uno de los intermediarios principales para la generación de uno de los derivados que presento mayor actividad biológica.



Continuando con la búsqueda de derivados de diterpenos bioactivos M.A. González¹⁸ propone la generación de una serie de derivados oxigenados en el C-18, los cuales fueron sometidos a evaluación biológica(los resultados se mencionan en el capítulo III). arrojo un valor de IC₅₀ de 5.6 ± 0.5 µg/mL. Sin embargo el abietano que mostró mayor potencial de actividad antitumoral en células HeLa y menor efecto

¹⁷ B.Gigante; et al; *Bioor. Med. Chem*; **2003**;11;1631-1638

¹⁸ M.A.González; et al; *European Medicinal Chemistry*; **2009**;1-6

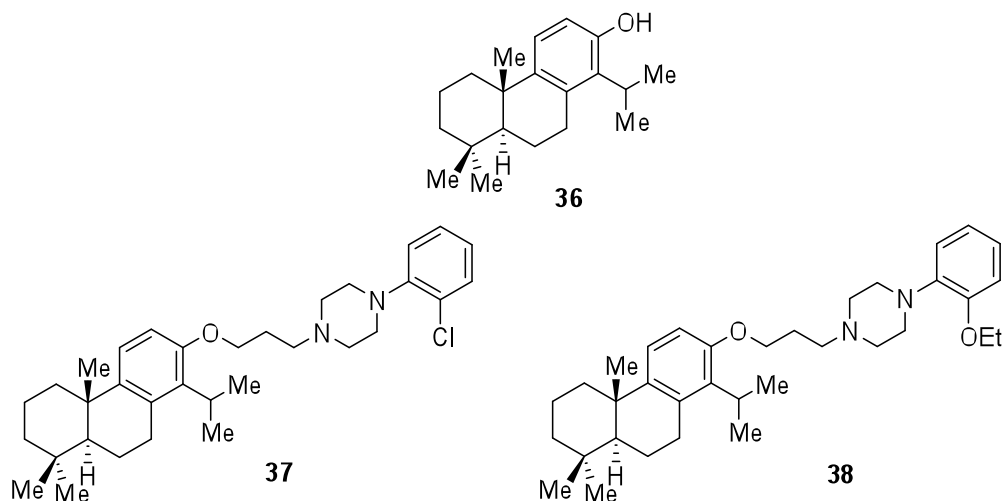


Esquema 12

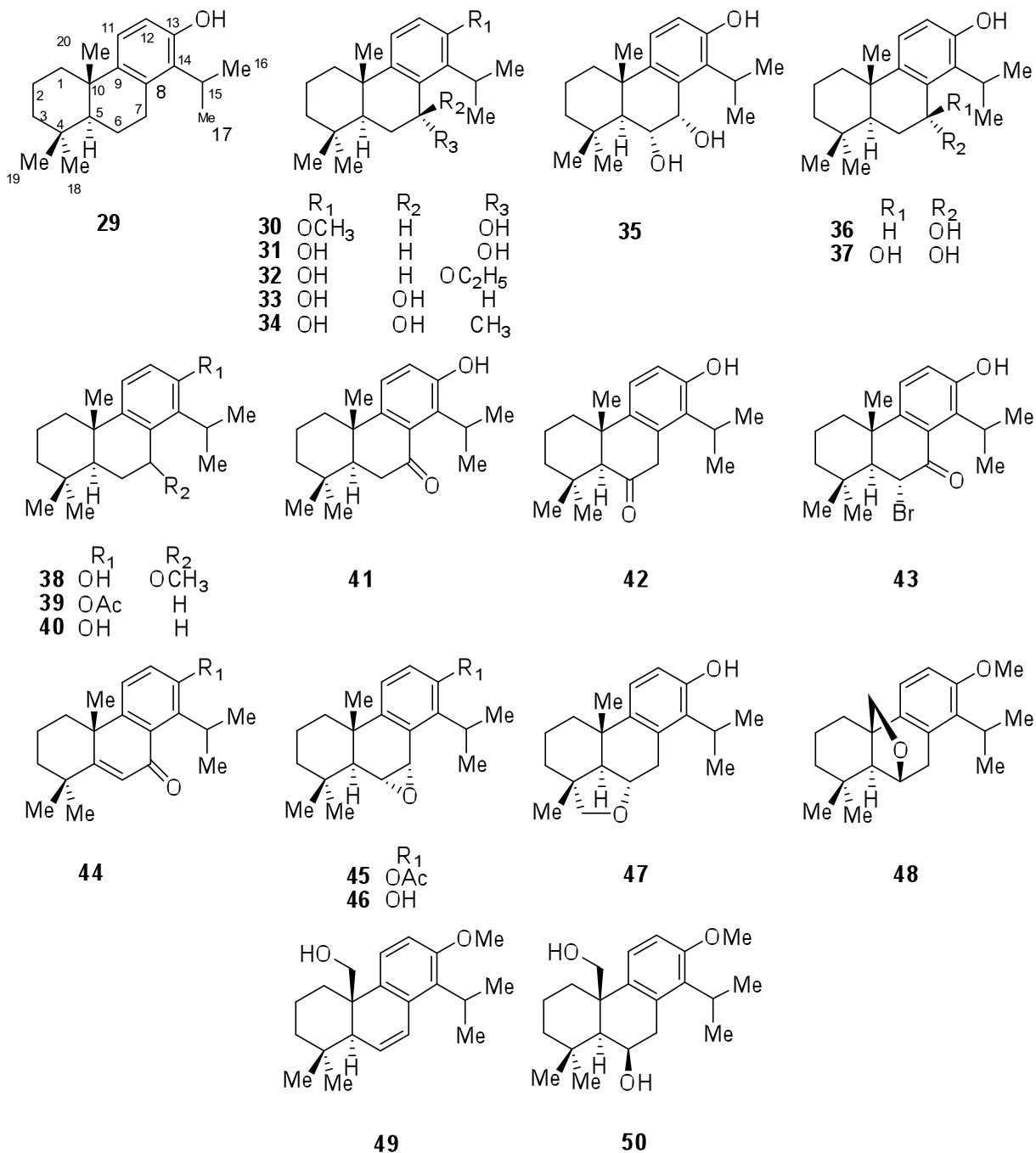
Reactivos y condiciones: a) LiOH, Me₂SO₄, DMF; b) LiAlH₄, THF; c) PCC/Al₂O₃; d) HBr, AcOH; e) LiOH, DMF; f) KOH, MeOH, H₂O

Debido a los resultados de actividad biológica de Totarol (36) y de sus derivados en estudios *in vitro* Clarkson y col.,¹⁹ propusieron la síntesis de nuevos derivados de Totarol de tipo β-amino alcohol (37,38). Estos últimos al ser ensayados biológicamente arrojaron un valor de IC₅₀ antiplasmódica en el rango de 0.6 – 3.0 mM, los valores de actividad contra cepas sensibles a cloroquinonas y *Plasmodium falciparum* se reportan como similares. Clarkson y col., señalan que la actividad se favorece cuando se incluyen núcleos de piperacina con sustituyentes -Cl o -OEt en la posición orto del anillo aromático de piperacina. En cuanto a los estudios de citotoxicidad ante líneas celulares de mamíferos se encontró que la actividad citotóxica es muy baja.

¹⁹ C Clarkson et al. *Bioorg.Med.Chem.* **2003**,11 ,4417-4422,

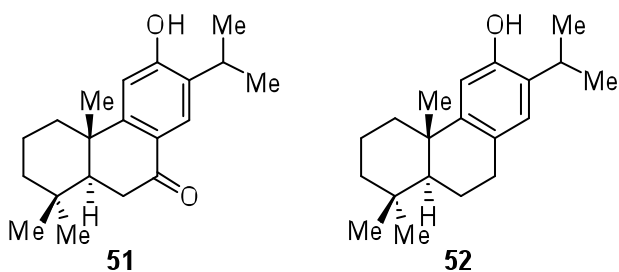


G.B. Evans y colaboradores se han dedicado en gran medida en la generación de derivados diterpénicos de Totarol, esto debido a los resultados observados previamente. En esta ocasión propusieron realizar modificaciones sintéticas en el anillo B del diterpeno para de esta forma modificar la lipofilidad de Totarol y sus derivados, de tal manera que en ensayos in vitro fue posible observar que con estas modificaciones algunos derivados retienen mas la actividad antibacteriana contra β -lactamasas- positivas, *Enterococcus faecalis* resistentes a altos niveles de gentamicina, *Staphylococcus aureus* meticilin resistentes, no obstante *Klebsiella pneumoniae* fue resistente ante todos los compuesto ensayados.



Así mismo, en este artículo se hace referencia a las propiedades estructurales de Sugiol (51) y Ferruginol (52), ya que estos compuestos son semejantes estructuralmente a Totarol, sin embargo se conoce que Sugiol es inactivo contra bacterias Gram- positivas. En contraste, Ferruginol que es estructuralmente idéntico a Sugiol excepto que este posee un grupo metileno en lugar de un grupo carbonilo en el

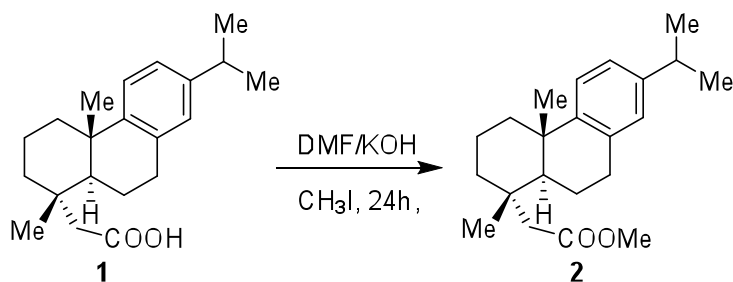
C-7, es activo frente a una variedad de bacterias Gram- positivas utilizando una concentración aproximada de 8 µg/mL. La pérdida de actividad antibacteriana, es consecuencia de la presencia de un centro SP^2 en el anillo B de Totarol. Esto con lleva a: (1) la planaridad del anillo B, (2) la alteración en el impedimento estérico entre el metileno del C-7 y el grupo isopropilo del C-14, el cual puede tener efectos posteriores en el arreglo espacial del grupo isopropilo y el grupo fenólico, (3) cambios electrónicos en el anillo aromático, uno o más de estos efectos podrían afectar las propiedades biológicas de los compuestos.²⁰



²⁰ G.B. Evans *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*; **2000**; 8; 1663-1675.

II.2. Parte experimental

Metilación de ácido dehidroabiético

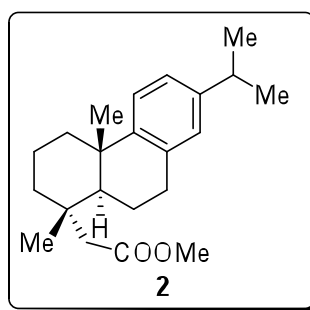


Adicionar a un matraz bola 10 mL de dimetilformamida (DMF) y 1.1g de hidróxido de potasio, agitar durante 10 minutos. Después se adicionar a la mezcla, 1.5 g de ácido dehidroabiético y 0.07 mL de yoduro de metilo. Dejar en agitación a temperatura ambiente por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo adicionar a la mezcla 100 mL de agua, realizar extracciones con diclorometano (5 x 100 mL), posteriormente realizar lavados con brine (4 x 50 mL), por último secar con sulfato de magnesio anhidro.

Dehidroabietato de metilo

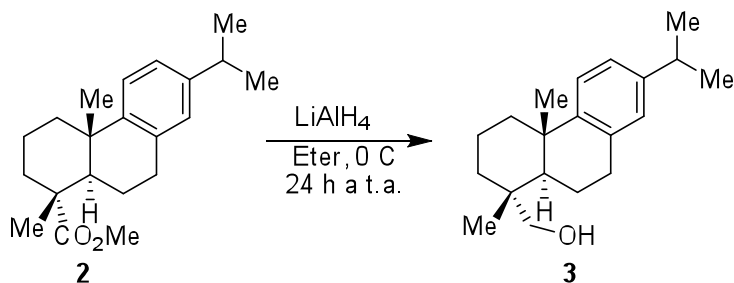
Formula Molecular: $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$
Aspecto Físico: Sólido Blanco

Punto de Fusión: 58°C



IR cm^{-1} : 2928.89, 1727.51, 1497.75, 1459.29, 1246.8, 1125.90, 822.93
E/M alta resolución: $[\text{M}^+ + 1]$ m/z 315.2299
EM m/z (%): 314 (15), 299 (17), 239 (100), 197 (5), 155 (3), 129 (3), 55 (5)
RMN ^1H δ : 3.69 (CO_2CH_3), 7.28 - 6.93 (aromático)

Reducción con LiAlH₄



Disolver LiAlH₄ en éter y cerrar herméticamente, a la mezcla adicionar el sustrato (2) con jeringa en 40 mL de Éter, bajo atmosfera de nitrógeno a 0°C. Dejar la mezcla en agitación por una hora. Transcurrido el tiempo adicionar lentamente 1.8 mL de agua, 1.8 mL de NaOH 15% y 5.4 mL de agua, todo esto a 0°C. Concentrar en rotaevaporador y comprobar mediante espectroscopia la presencia de (3).

18-Hidroxi-8,11,13-abietatrieno

Formula Molecular: C₂₀H₃₀O

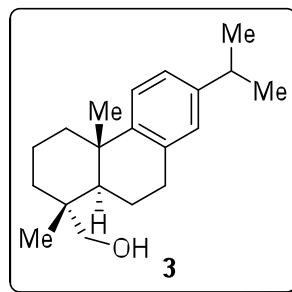
Aspecto Físico: Acetite amarillo

IR cm⁻¹:

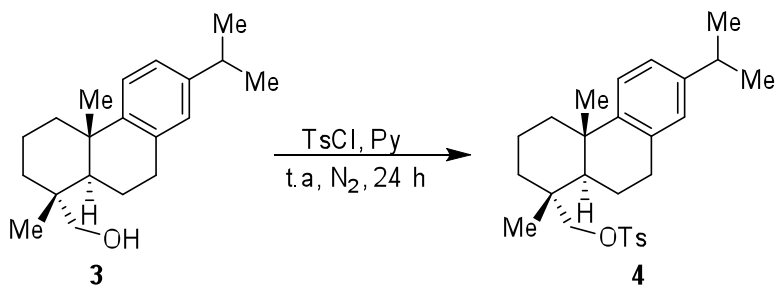
E/M alta resolución: [M+1] m/z 287.2383

EM m/z (%) 286 (23), 271 (60), 253 (100), 239 (8), 197 (8), 159 (32), 129 (14), 55 (11).

RMN ¹H δ : 5.324 (OH) , 7.21 – 6.91 (aromáticos), 3.2 (H16), 2.2 (H19)



Tosilación de alcohol

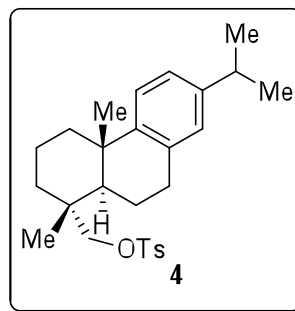


Disolver 4.9 mg del sustrato (3), 14.8 g de cloruro de tosilo en 27 mL de piridina, dejar en agitación a 25°C y con atmosfera de nitrógeno durante 24 h. A la mezclar de reacción adicionar 500 mL de diclorometano, lavar con NaHCO₃ (3 x 350 mL), seguido de un lavado con cloruro de sodio concentrado (3x 350 mL). Secar con MgSO₄ anhidro y concentrar.

18-Tosil-8,11,13-abietatrieno (4)

Formula Molecular: C₂₇H₃₆O₃S

Aspecto Físico: Solido amorfo



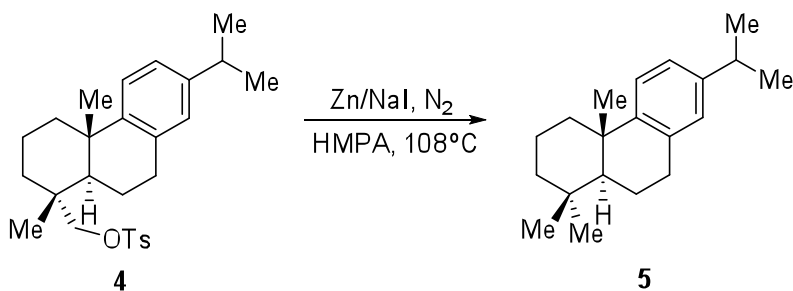
IR cm⁻¹: 2936, 1599, 1496, 1357, 1216, 1178, 964, 844, 761, 667

E/M alta resolución: [M+1] m/z 287.2383

EM m/z (%) 440 (7), 425 (1), 268 (25), 253 (100), 211 (7), 173 (7), 143 (5), 129 (4), 91 (12), 55 (3).

RMN ¹H δ : 7.79 (H29-25) , 7.58 (H28-26,), 7.00 (H12), 3.7 (H15), 2.88 (H21), 2.48 (H31), 1.24 (H22-30), 0.98 (H20), 0.93 (H19) .

Reducción de 18-Tosil-8,11,13-abietatrieno.

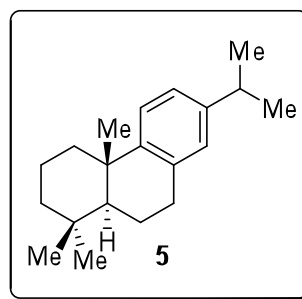


En un matraz bola colocar 3.5 g del sustrato (4) y 193 mL de HMPA, agitar y burbujear nitrógeno, posteriormente adicionar NaI y Zn, y la reacción se deja en agitación a 160°C con atmosfera de nitrógeno.

Dehidroabietatrieno (5)

Formula Molecular:

Aspecto Físico:



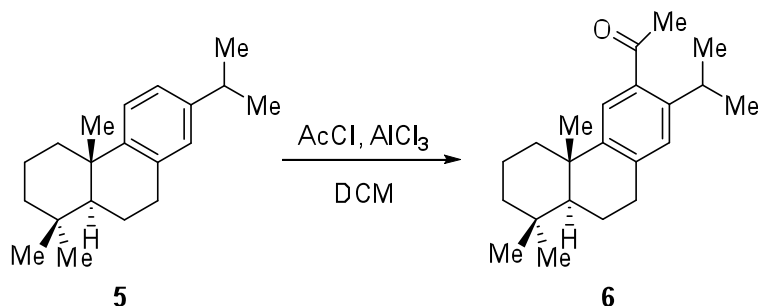
IR cm⁻¹:

E/M alta resolución:

EM m/z (%)

RMN ¹H δ :

Acilación Friedel- Craft

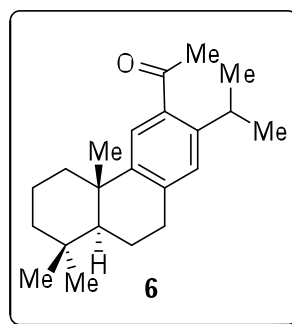


Adicionar a 0°C 4.1 g de AlCl_3 a una solución de 2 g del sustrato (5), 62 mL de diclorometano y 2.5 mL de AcCl , dejar en agitación durante 2 horas a 0°C y después por 20 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 20 horas adicionar a la mezcla de reacción

12Acetil-8,11,13-abietatrieno (6)

Formula Molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}$

Aspecto Físico: Aceite amarillo



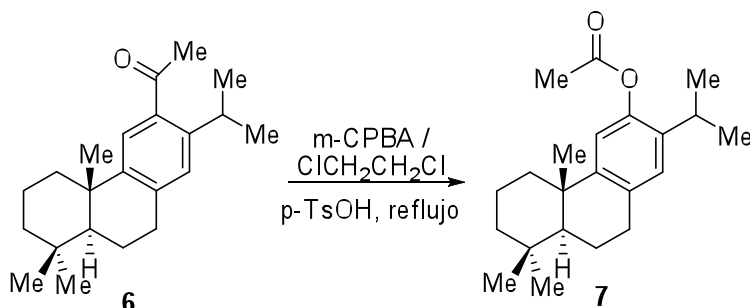
IR cm^{-1} : 2950, 1682, 1496, 1460, 1261, 1125

E/M alta resolución: $[\text{M}+1]$ m/z 313

EM m/z (%) 313 (18), 312 (76), 297 (100), 273 (4), 255 (7), 229 (26), 215 (37), 201 (28), 141 (4), 129 (4), 91 (2), 55 (5)

RMN ^1H δ : 7.28 (H11), 7.068 (H14), 3.48 (H20), 2.8 (H8), 2.5 (H22), 1.16 (H21,23), 1.12 (H15), 1.05 (H16), 0.932 (H17)

Oxidación Baeyer-Villiger de (7)

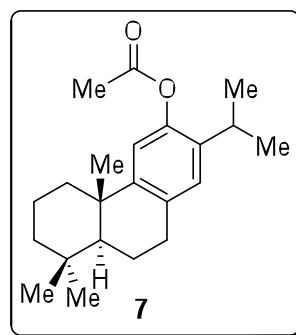


Mezclar 0.4029 g del sustrato (7) , 35 mL de dicloroetano, 0.722 g de m- CPBA y ácido p- toluensulfónico (cantidad catalítica) , durante 6 horas a reflujo. Posteriormente realizar lavados con NaI 40% y 50 mL de una solución de NaHSO₃ 10%, dejar en agitación durante 30 minutos. Separar las fases y realizar lavados a la fase acuosa con diclorometano, reunir las porciones orgánicas y lavar con NaCl saturado, K₂CO₃ 2%, NaHCO₃ 10% y por ultimo con NaCl saturado. Por último secar y concentrar.

12Acetil-8,11,13-abietatrieno (6)

Formula Molecular: C₂₂H₃₂O₂

Aspecto Físico: Aceite amarillo



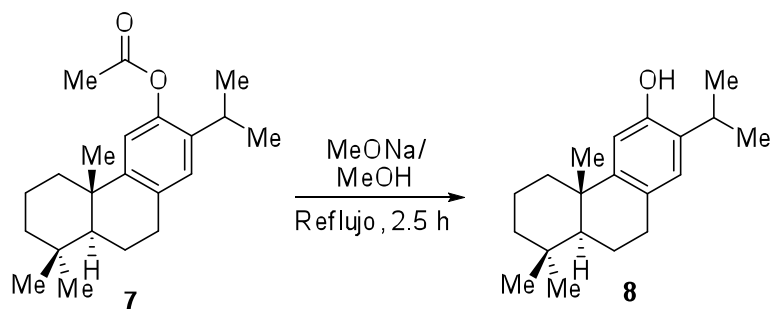
IR cm⁻¹: 3364.95, 2956, 1681,1609, 1458,1357, 1262, 751

E/M alta resolución: [M+1] m/z 329

EM m/z (%) 313 (18), 312 (77), 297 (100), 286 (23), 271 (25), 255 (7), 229 (17), 215 (39), 201 (31), 187 (10), 141 (5), 129 (5), 109 (4), 55 (8)

RMN ¹H δ : 6.96 (H11), 6.85 (H14), 2.94 (H18), 2.91 (H8), 2.33 (H22),1.20 (H19,20), 0.98 (H15,16)

Saponificación de (8) para obtener Ferruginol (9)

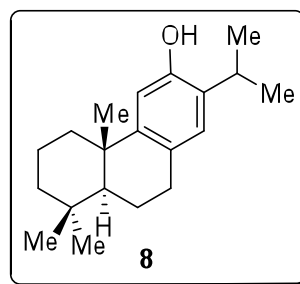


Adicionar a un matraz bola 0.242 g de sustrato (8), 0.358 g de Metoxido de Sodio y 6 mL de metanol, agitar y dejar en reflujo por 3 horas. Al crudo de reacción adicionar 12 mL de NH_4Cl saturado, y 12 mL de éter y separar las fases, y lavar la fase acuosa con éter. A la fase etérea realizar lavados con NH_4Cl , NaCl saturado, por ultimo secar con MgSO_4 y concentrar.

Ferruginol (9)

Formula Molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$

Aspecto Físico: Aceite amarillo



IR cm^{-1} : 3400,1700,1625,1505,1460,1416,1365,756

E/M alta resolución: $[\text{M}+1]$ m/z 286.2324,

EM m/z (%) 280 $[\text{M}^+]$ (100), 271 (65), 201 (61), 189 (56), 175 (49), 149 (25), 69 (34), 55 (15)

RMN ^1H δ : 0.95 (3H, s, Me-18), 0.97 (3H, s, Me-19), 1.21 (3H, s, Me-20), 1.25 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Me-16), 1.27 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Me-17), 2.16 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-1 β), 3.17 (1H, HEPT, $j = 6.8$ Hz, H-15), 4.98 (1H, s, O-H), 6.66 (1H, s, H-11), 6.89 (1H, s, H-14)

III.CAPITULO III : SÍNTESIS DE DERIVADOS TIPO AMINOALCOHOL

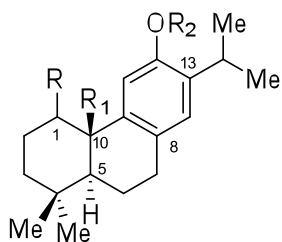
III.1. Antecedente

Se conoce una gran cantidad de productos naturales que poseen actividad biológica diversa, sin embargo de los productos naturales los terpenos han captado el interés de los científicos, quienes los han colocado en una posición especial dentro de los productos naturales. Ya que cantidad de estos compuestos exhiben actividades biológicas de interés como antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antitumorales y propiedades insecticidas. El interés en este tipo de productos naturales se ha manifestado en un gran número de artículos de revistas científicas donde se menciona desde el aislamiento, síntesis y evaluación biológica de estos compuestos. El género *Salvia*, con aproximadamente 700 especies, y miembro de la familia *Lamiaceae*, que es una de las más extensas. De este género se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, pertenecientes a diversos grupos químicos, como aceites esenciales, compuestos terpenoides y derivados fenólicos, los cuales ocupan un lugar destacado en las farmacopeas de muchos países en todo el mundo.([Gibbs, 1974](#); [Banthorpe et al., 1989](#); [Luis et al.,1992](#); [Ulubelen and Topcu, 1992](#)). Los componente aislados de muchas especies de *Salvia* poseen actividad antioxidante significativa en sistemas enzima dependiente y enzimas -independientes ([Dorman et al., 1995](#);[Hohmann et al., 1999](#); [Lu and Foo, 2001](#); [Malencic et al.,2000](#); [Zupko et al., 2001](#)). Del extracto etanólico de *Salvia lavandulaefolia* se han reportado constituyentes individuales de aceites esenciales (monoterpenos, 1,8-cineol, linalool, α - y β -pineno), y hierbas (el monoterpeno fenolicos carvacrol, la flavona luteolina y el acido fenolico rosmarinico) han sido reportados como antioxidantes (([Adam et al., 1998](#); [Dorman et al., 1995](#); [Lu and Foo, 2001](#); [Malencic et al., 2000](#); [Perry et al., 2001](#); [Zupko et al., 2001](#)) . El ácido Rosmarínico (ácido α -O-Cafeoil-3,4-dihidroxifenilico) se encuentra principalmente en especies de *Boraginaceae* y subfamilias *Nepetoidae* de *Lamiaceae* ([Peterson and Simmonds, 2003](#)).

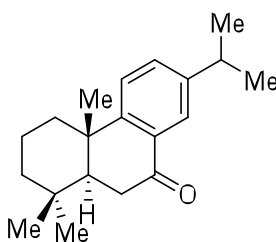
En el 2003 Ayhan Ulubelen en conjunto con su grupo de investigación²¹, quienes motivados por conocer las propiedades químicas y biológicas de 7 tipos de especies de *Salvia* de la región de Turquía, se dedicaron al aislamiento, purificación y evaluación de

²¹ A.Ulubelen; *Phytochemistry*, **2003**; 64; 395-399.

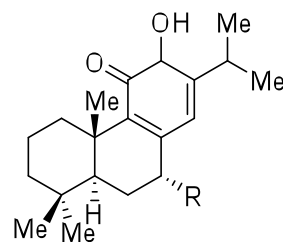
actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en estas especies. Se encontró que los metabolitos poseen actividad cardiovascular y antibacteriana. Los metabolitos aislados en su mayoría son diterpenos abietánicos como Ferruginol (8), Sugiol (12), 6,7-dehidrooleanona (13), abietanos reordenados 4,14-dihidroxisaportoquinona (14), aetiopinona (15), dihidroxisapriparaquinona (16), estos se caracterizaron por ser cardioactivos (antihipertensivos y vasodepresores) y algunos presentan también actividad antibacteriana. Sin embargo algunos solo se caracterizaron por poseer actividad antibacteriana, tal es el caso, de horminona (10), 7-acetilhorminona (11), 1-oxoferruginol (9), candidisiol (17), ácido 6 β -hidroxiisopimarico (18). En cuanto a los ensayos de bioactividad, en especial los de líneas celulares de cáncer no fueron reportados.



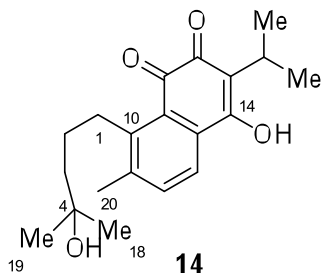
8 R = R₂ = H ; R₁ = Me
9 R = O ; R₁ = Me ; R₂ = H



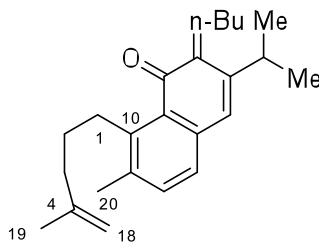
12



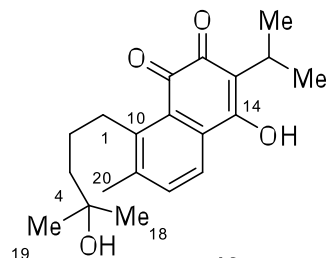
10 R = OH
11 R = OAc
13 R = H



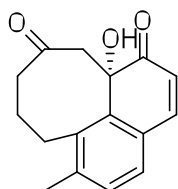
14



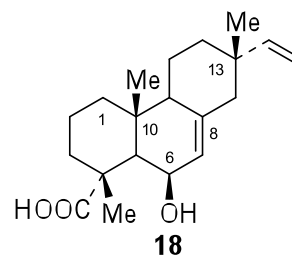
15



16



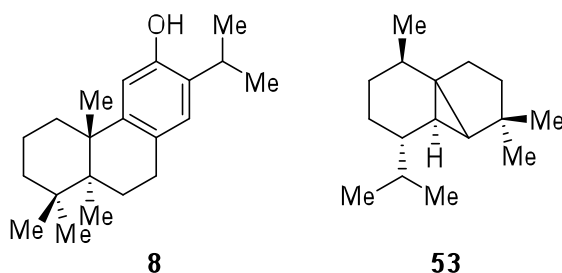
17



18

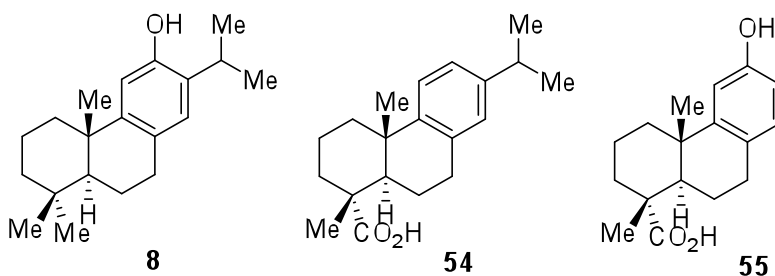
Ferruginol, fue aislado por primera vez de *Podocarpus ferruginea*, es un diterpeno aromático del tipo abietano que también se ha aislado de familias de *Cupressaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae*.

Ferruginol se caracteriza por la diversidad biológica que posee: antibacteriano, efecto cardiovascular, antioxidante, antiplasmodial, antitumoral, antihipertensivo, insecticidad, entre otras. Una de las investigaciones donde se demostró que Ferruginol es un compuesto bioactivo fue la realizada por Bin Wu²² y su grupo de investigación quienes reportan el aislamiento e identificación de compuestos con actividad insecticida contra *L. migratoria*; un insecto polimórfico responsable de importantes plagas en la agricultura. Los compuestos identificados en los extractos obtenidos de *Cryptomerua japonica* II y, que se consideran responsables de la actividad insecticida son (+)-Ferruginol (52) y (-)-cubenol (53). Estos inhiben a *L. migratoria* únicamente cuando se encuentran combinadas. Ambos compuestos muestran un efecto de sinergismo alto. Lo cual indica la presencia de diferentes sitios activos para cada compuesto en esta especie de insectos.



Una de las actividades biológicas de Ferruginol y de ácido abiético que se ha reportado con mayor frecuencia es la antimicrobiana, la cual se considera que es ocasionada por la presencia de un anillo aromático con un grupo isopropilo en su estructura, y esta se ve incrementada cuando el grupo isopropilo se encuentra en posición orto a un grupo hidroxilo, como se observa en la estructura de Ferruginol, Totarol, ácido Pisiférico entre otros.

²² B.Wu; et al; *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **2008**, 72 (2); 611-614



En estudios recientes se ha publicado que Ferruginol en el modelo de ulcera inducida por HCl/ EtOH en ratones indica que Ferruginol previene la formación de lesiones y puede favorecer o promover los mecanismos protectores de la mucosa gástrica.

En el año de 2004 O. Albornoz²³ y col., demostraron que Ferruginol posee notable actividad antiulcerogénica y que este efecto que puede conseguirse al usar una dosis que fluctúe entre 25 y 100 mg/kg del mismo, lo que es de gran importancia para las industrias farmacéuticas o laboratorios que pretendan diseñar un nuevo fármaco a partir de este compuesto. De acuerdo a los ensayos realizados de citotoxicidad del Ferruginol sobre fibroblastos, se analizó la relación concentración del compuesto/viabilidad celular y los resultados observados son que a una concentración aproximada de 22 μM es posible disminuir en un 50% la viabilidad celular. De igual forma se determinó la citotoxicidad de Ferruginol en células tumorales gástricas (AGS), los resultados obtenidos permiten observar que las muestras tratadas con concentraciones de 0,1; 0,5; 1,0 y 4 μM de Ferruginol presentan un grado de protección mayor que el control al daño inducido por Taurocolato de sodio sobre las células gástricas. También se observa que a concentraciones más altas empleadas en el estudio, Ferruginol resultó ser más dañino sobre las células gástricas que el Taurocolato de sodio.

Para explicar el mecanismo de acción gastroprotectora de diterpenos, solo se ha utilizado el modelo de ulcera inducida en animales, por lo cual Rodríguez, J y col., realizaron una evaluación del mecanismo gastroprotector y curación de ulcera gástrica

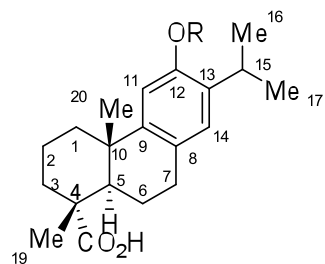
²³ O.C. Albornoz Troncoso y Colaboradores, Tesis de Grado Químico Farmacéutico, **2004**.

utilizando modelos in vitro. De estos pudieron apreciar que el efecto de Ferruginol en prevenir la inducción de la lipoperoxidación de la membranas de eritrocitos humanos, el contenido de glutatión reducido en células gastroepiteliales, además de la capacidad de liberación de radicales libres. Así mismo señalan que Ferruginol inhibió fuertemente la lipoperoxidación en la membrana de eritrocitos aproximadamente es cerca de 190 campos más activo que el compuesto catequina de referencia.²⁴

Dentro del mismo contexto Espinoza, M y col; publicaron en el 2008 la generación de nuevos derivados gastroprotectores de Ferruginol con citotoxicidad selectiva contra células de cáncer gástrico, mediante una síntesis parcial se obtuvieron 17 derivados. Algunos de estos compuestos fueron más activos como agentes protectores que sus precursores. Sin embargo, ciertos derivados resultaron poseer menor efecto citotóxicos que Ferruginol contra fibroblastos normales y células de cáncer gástrico. Como resultado interesante se tiene que el derivado 12-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D- galactopiranosiloxi)-abieta-8,11,13-trieno, es igual de activo que Ferruginol como protector de la mucosa gástrica, además es citotóxicamente selectivo contra células cancerosas gástricas. Debido a que varios derivados mostraron valores bajos de citotoxicidad y por el contrario se observó que poseen excelente actividad gastroprotectora, por tanto se estableció que estos efectos no están relacionados. Por otra parte Espinoza, M y col., establecen que el efecto gastroprotector de los derivados de tipo ester alifático depende de la longitud de la cadena, ya que la mejor actividad se observó en cadenas de C₁₆ y C₁₈. Para ester de cadena corta el efecto se puede observar si en su estructura poseen heteroátomos de Cl. Para ester aromáticos, la presencia de grupos dinitro o un átomo de nitrógeno en el anillo aromático enriquece la actividad gastroprotectora.²⁵

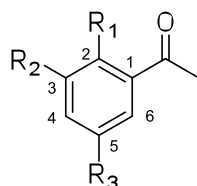
²⁴ J.A. Rodríguez, et al ; Life Sciencies; **2006**,78,2503-2509.

²⁵ Espinoza,M; et al; Planta Medica; **2008**;74; 802-803.

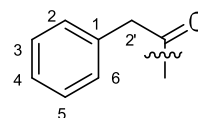


8	R
55	H Ferruginol
56	ClCH ₂ -CO
57	ICH ₂ -CO
58	(CH ₃) ₂ CHCO
59	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO
60	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO
61	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CO
	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CH-CH ₂ -CH=CH(CH ₂) ₇ CO

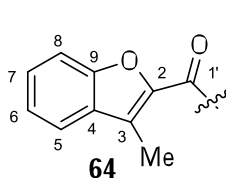
18



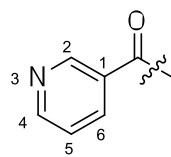
62	R ₁	R ₂	R ₃
63	OH	H	H
		NO ₂	NO ₂



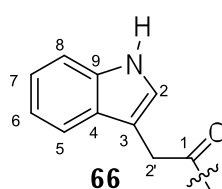
68



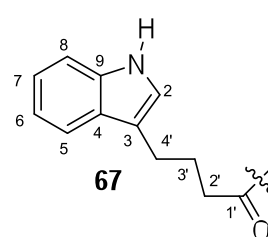
64



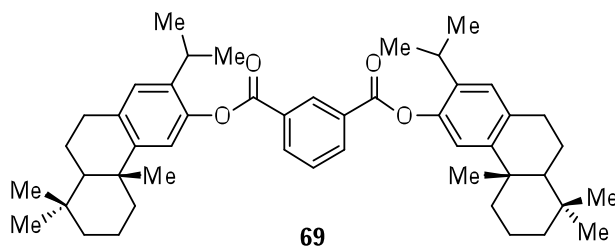
65



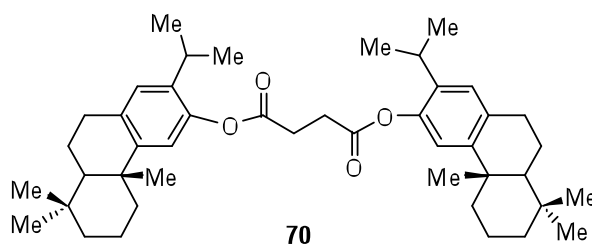
66



67



69

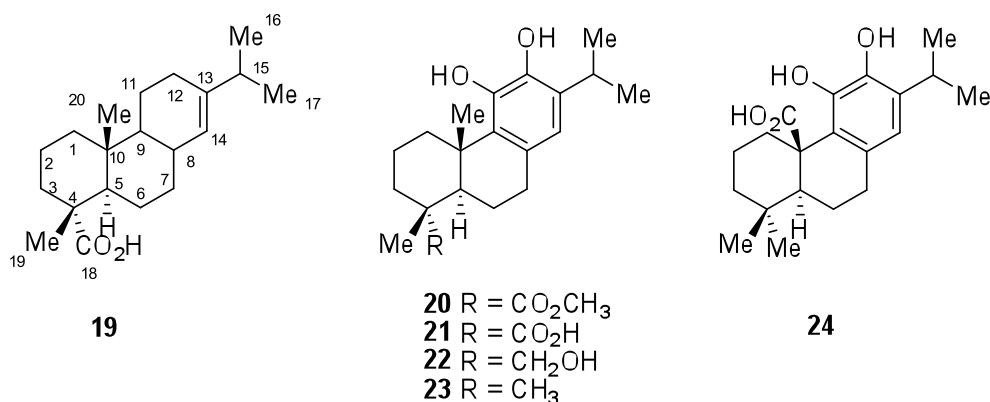


70

Se conoce que el ácido abiético es uno de los diterpenos abietánicos con mayor diversidad en propiedades biológicas de esta familia de compuestos, lo cual fue tomado en consideración por B. Gigante y colaboradores²⁶ para la propuesta sintética reportada en el 2003 donde se utiliza como material de partida, ácido abiético (19), para la generación de compuestos biológicamente activos de tipo catecol, los cuales en los ensayos biológicos fueron comparados contra ácido carnosólico, que se tomó como

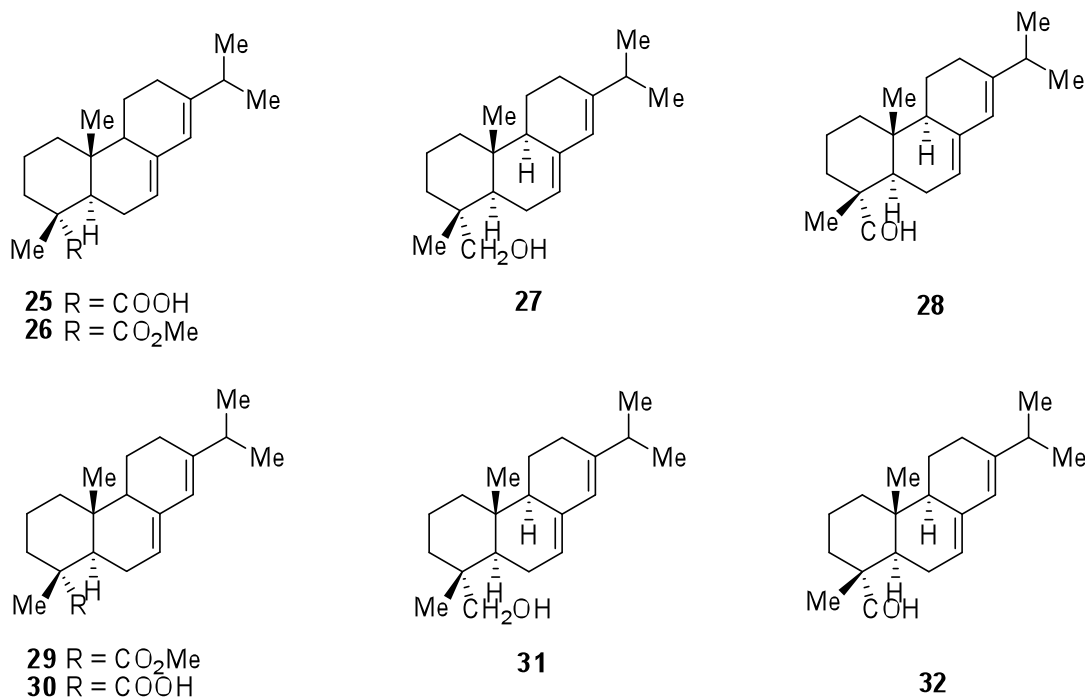
²⁶ B.Gigante; et al; *Bioor. Med. Chem*; **2003**;11;1631-1638

referencia, observando cómo resultados compuestos con actividad biológica prometedora tales como antifúngico, antitumoral, antimutagénico, antiviral, antiproliferativo y como inhibidor de óxido nítrico en general la respuesta es mucho mejor que la observada con ácido carnosólico. Cabe mencionar que en este artículo se propone a Ferruginol como uno de los intermediarios principales para la generación de uno de los derivados que presento mayor actividad biológica.

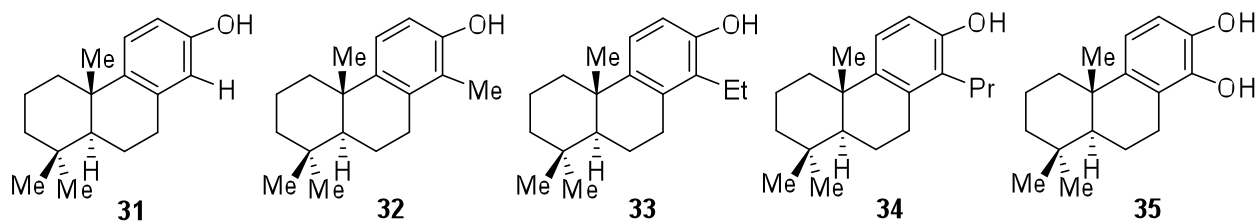


Continuando con la búsqueda de derivados de diterpenos bioactivos a partir de ácido abiético M.A. González²⁷ propone la generación de una serie de derivados oxigenados en el C-18, los cuales fueron sometidos a evaluación biológica. Los derivados del 18 al 25 se sometieron a ensayos *in vitro* para observar el potencial antitumoral y la actividad citotóxica en las líneas celulares de tumor HeLa y líneas celulares Vero respectivamente. Como resultado de este ensayo el abietano (21) arrojó un valor de IC₅₀ de 5.6 ± 0.5 µg/mL. Sin embargo el abietano que mostró mayor potencial de actividad antitumoral en células HeLa y menor efecto citotóxico en células no-cancerosas (línea celular Vero) fue el abietano (19) con un valor de IC₅₀ de 3.6 ± 0.1 µg/mL y 49.4 ± 3 µg/mL respectivamente.

²⁷ M.A.González; et al; *European Medicinal Chemistry*; **2009**;1-6



Totarol se ha considerado uno de los diterpenos de tipo abietánico de mayor interés debido a la variedad de actividades biológicas que posee, razón por la cual G.B. Evans propuso la funcionalización del anillo “C” de Totarol (36) para la generación de nuevos derivados (31,32,33,34,35) y como resultado obtuvieron que estos son responsables de la inhibición del crecimiento de bacterias Gram-positivas arrojando valores de MIC 7mM. Estos resultados fueron obtenidos en términos de relación estructura actividad, donde se resalta que es esencial la presencia del grupo fenol para potencializar la actividad antibacteriana de estos compuestos.²⁸

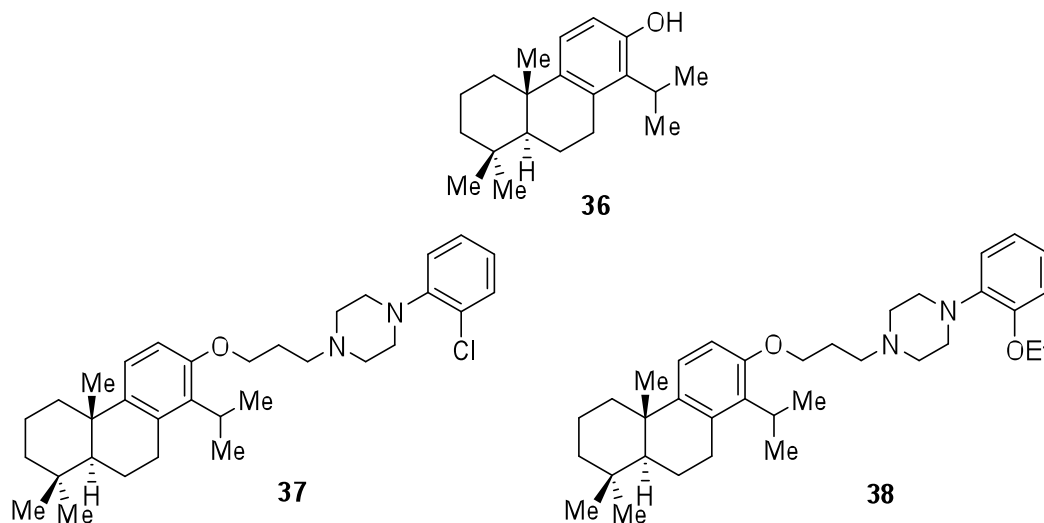


Debido a los resultados de actividad biológica de Totarol (36) y de sus derivados en estudios in vitro Clarkson y col.,²⁹ propusieron la síntesis de nuevos derivados de Totarol de tipo β-amino alcohol (37,38). Estos últimos al ser ensayados biológicamente

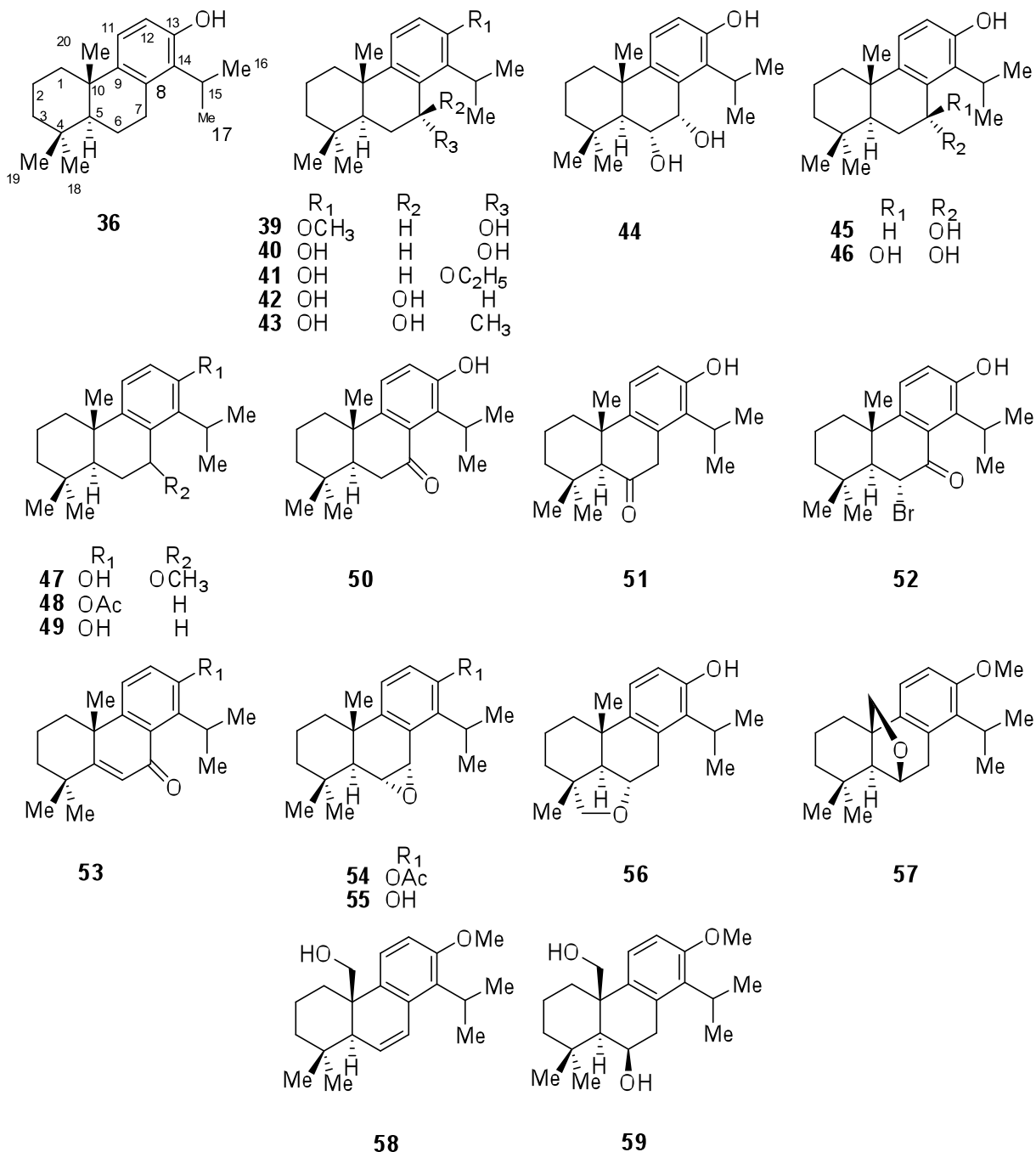
²⁸ G.B. Evans *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*; **1999**;7; 1953-1964.

²⁹ C Clarkson *et al*. *Bioorg.Med.Chem.* **2003**,11 ,4417-4422,

arrojaron un valor de IC_{50} antiplasmódica en el rango de 0.6 – 3.0 mM, los valores de actividad contra cepas sensibles a cloroquinonas y *Plasmodium flaciparum* se reportan como similares. Clarkson y col., señalan que la actividad se favorece cuando se incluyen núcleos de piperacina con sustituyentes -Cl o -OEt en la posición orto del anillo aromático de piperacina. En cuanto a los estudios de citotoxicidad ante líneas celulares de mamíferos se encontró que la actividad citotóxica es muy baja.

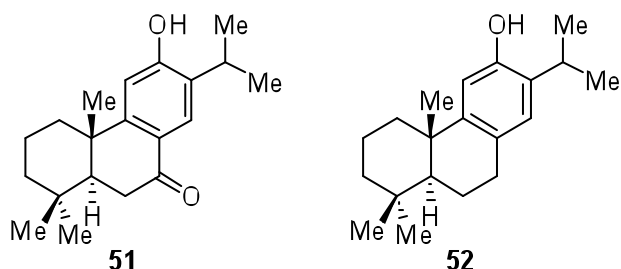


G.B. Evans y colaboradores se han dedicado en gran medida en la generación de derivados diterpénicos de Totarol, esto debido a los resultados observados previamente. En esta ocasión propusieron realizar modificaciones sintéticas en el anillo B del diterpeno para de esta forma modificar la lipofilicidad de Totarol y sus derivados, de tal manera que en ensayos in vitro fue posible observar que con estas modificaciones algunos derivados retienen mas la actividad antibacteriana contra β -lactamasas- positivas, *Enterococcus faecalis* resistentes a altos niveles de gentamicina, *Staphylococcus aureus* meticilin resistentes, no obstante *Klebsiella pneumoniae* fue resistente ante todos los compuesto ensayados.

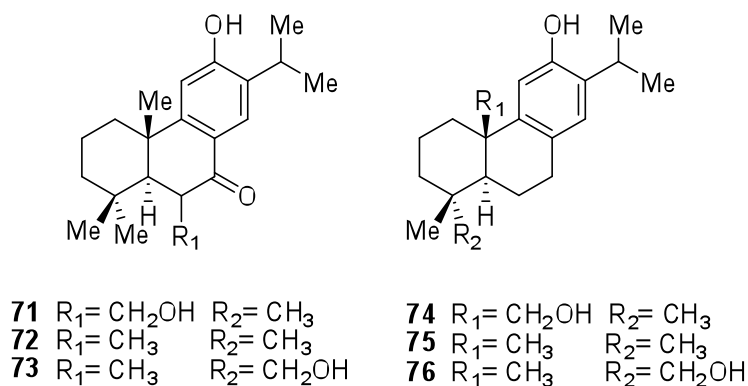


Así mismo, en este artículo se hace referencia a las propiedades estructurales de Sugiol (51) y Ferruginol (52), ya que estos compuestos son semejantes estructuralmente a Totarol, sin embargo se conoce que Sugiol es inactivo contra bacterias Gram- positivas. En contraste, Ferruginol que es estructuralmente idéntico a Sugiol excepto que este posee un grupo metileno en lugar de un grupo carbonilo en el C-7, es activo frente a una variedad de bacterias Gram- positivas utilizando una

concentración aproximada de 8 µg/mL. La pérdida de actividad antibacteriana, es consecuencia de la presencia de un centro SP^2 en el anillo B de Totarol. Esto con lleva a: (1) la planaridad del anillo B, (2) la alteración en el impedimento estérico entre el metileno del C-7 y el grupo isopropilo del C-14, el cual puede tener efectos posteriores en el arreglo espacial del grupo isopropilo y el grupo fenólico, (3) cambios electrónicos en el anillo aromático, uno o más de estos efectos podrían afectar las propiedades biológicas de los compuestos.³⁰



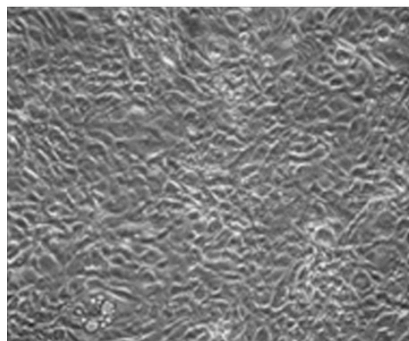
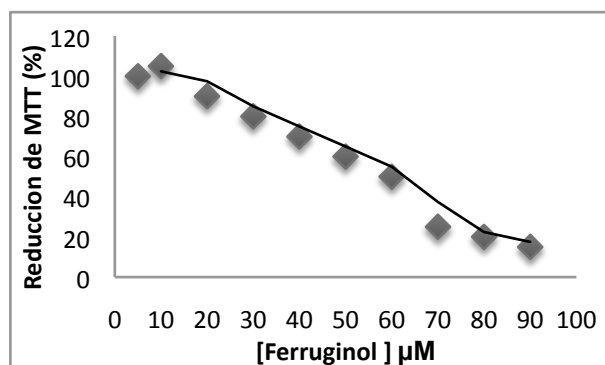
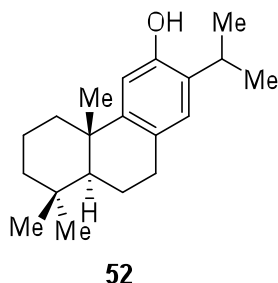
En la búsqueda por la generación de nuevos derivados de tipo abietano biológicamente activos, K-H. Son³¹ y colaboradores encontraron que los extractos metanólicos de *Sequoia Sempervirens* inhiben fuertemente el crecimiento de células tumorales de colon, mama y pulmón con valores de GI_{50} son 2-5µg/ mL. Los extractos obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas que muestran la presencia de cuatro compuestos conocidos: Ferruginol, 18-hidroxiferruginol, Sugiol, 6α-hidroxisugiol y un nuevo diterpeno al que se le denomino 20-hidroxiferruginol.



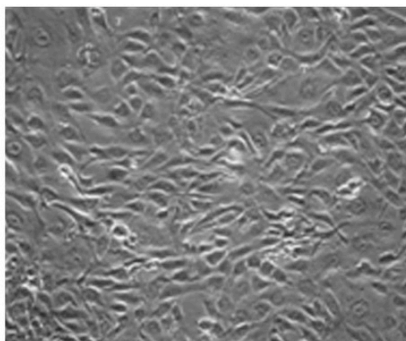
³⁰ G.B. Evans *et al*, *Bioorg. Med. Chem.*; **2000**; 8; 1663-1675.

³¹ K-H. Son *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**,15, 2019-2021,

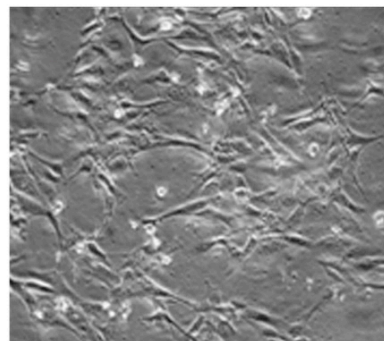
Por su parte Marcelo Obispo de Jesús³² y *col.*, enfocaron sus estudios en el aislamiento de Ferruginol a partir del árbol Chileno (Podocarpaceae). Los compuestos obtenidos fueron ensayados posteriormente al proceso de aislamiento y como resultado se obtuvo que de estos compuestos Ferruginol sea biológicamente activo ante células humanas andrógeno- independiente de cáncer de próstata, en otras palabras Ferruginol induce la muerte celular vía activación de la enzima caspasa, la cual actúa como inductor apoptótico **esquema x**. Se considera que Ferruginol desencadena la relación inhibición/disminución de regulación de Ras/PI3K, STAT 3/5, la proteína tirosina fosfatasa y proteína cinasa relacionadas con el ciclo de regulación. El efecto tóxico de Ferruginol en un ambiente reducido fue dramáticamente impedido, lo cual indica que al menos en parte, la actividad antitumoral de Ferruginol podría estar relacionada con la modificación del estado redox.



Control



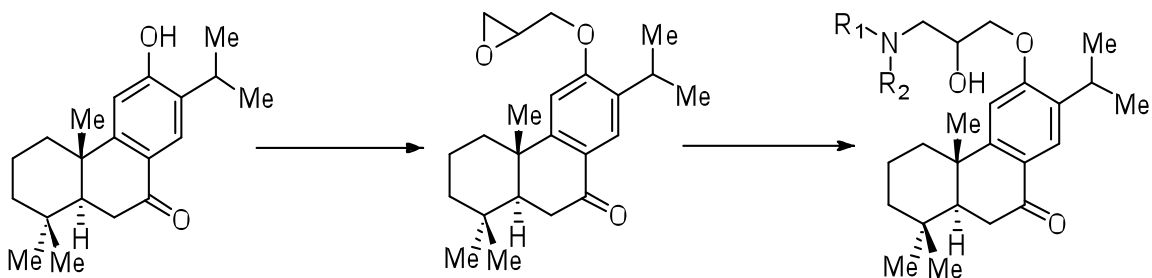
25 μM Ferruginol



50 μM Ferruginol

³² M.Obispo de Jesús et al ; Biochimie; **2008**; 90 ;843-854.

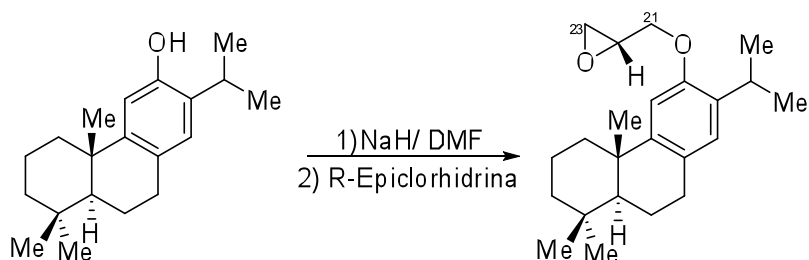
En el 2006 Córdova I. y colaboradores³³ demuestran la relación estructura actividad análogos de tipo beta amino alcohol a partir de Sugiol utilizando la estrategia de síntesis que se muestra en el esquema 8. Realizaron un estudio estructura actividad de los compuestos en tres líneas celulares de tumor solido de humano.



³³ I. Córdova, L.G. León, F. León, L. San Andrés, J.G. Luis, J.M. Padrón; *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**,41,11, 1327-1332.

III.2. Parte Experimental

O-Alquilación de Ferruginol R



A una suspensión de Ferruginol (9) 74.4 mg y 212 mg de NaH 60% en 2 mL de Dimetilformamida, se le adiciono 51 μ L de R- epiclorhidrina 0°C y bajo atmosfera de nitrógeno la mezcla de reacción se deja 20 h a 55°C. Transcurrido este tiempo se deja enfriar la mezcla de reacción, se elimina el disolvente en rotaevaporador, se redisuelve el producto en acetato de etilo, lavar con agua, secar el extracto orgánico con sulfato de magnesio anhidro y concentrar en rotaevaporador. El crudo de reacción se purifica en columna utilizando n- hexano y éter 30%.

O-Alquilacion de Ferruginol "R"

ormula Molecular: $C_{23}H_{34}O_2$
Aspecto Físico: Sólido amorfo
blanco

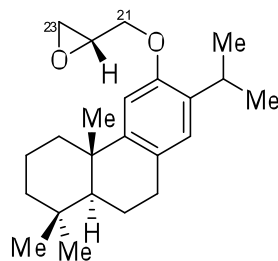
Punto de Fusión:

IR cm^{-1} : 2957, 1692, 1612, 1457, **1249**, **1122**, 850

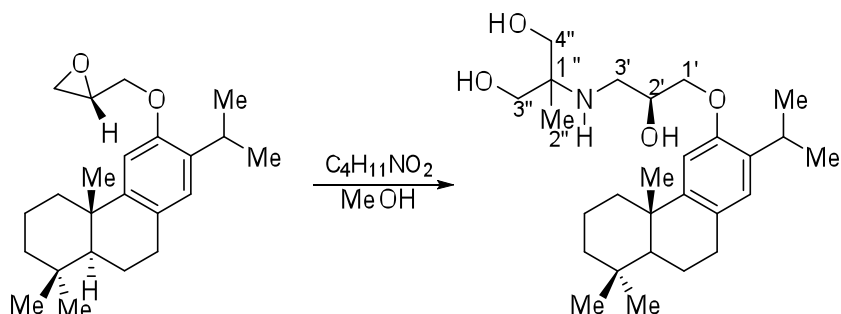
E/M alta resolución: $[M+1] m/z$ 343.25

EM m/z (%) : 344 (100), 327 (45), 285 (4), 271 (7), 257 (13), 245 (19), 231 (13), 189 (8), 147 (6), 91 (1), 55 (4).

RMN 1H δ : 6.9 (H11), 6.8 (H14), 4.22 (H20), 4.20 (H20), **3.38 (H23)**, 3.30 (H8), 2.93 (H23), 2.70 (H15), 1.19 (H19), 1.09 (H18), 0.96 (H20), 0.96 (H 16, 17)



Derivatización de epóxido R.



A una disolución de 48 mg (0.1346 mmol) del epóxido R en 55 mL de metanol, se adiciona 27 mg (0.1481 mmol, 1.1 eq.) de n-fenilpropanol. La mezcla obtenida se somete a reflujo 20h. Enfriar el sistema y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica en columna con n-hexano/ acetato de etilo 20%.

Derivatización de epóxidos R

Formula Molecular: $C_{27}H_{45}NO_2$

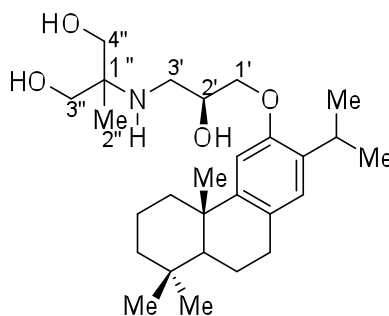
Aspecto Físico: Aceite incoloro

IR cm^{-1} : 3366.56, 2926.72, 1613.53, 1570, **1500**, 1463, **1248**, **1046**, 733

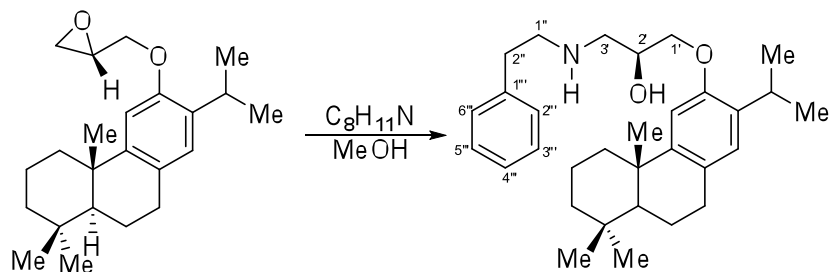
E/M alta resolución: [M+1] m/z 419.3

EM m/z (%) : 419(1), 416(100), 286(6), 271(3), 165(4), 144(2), 13(8), 118(13), 87(3), 55(2)

RMN 1H δ : 7.93(H14), 6.74(H11), **4.19(H2')**, **4.10(H1')**, **3.6(H3'', H4'')**, 3.23(H15), **2.96(H3')**, 2.90(H7), 2.80(H7), **2.83(H3')**, 2.69(H6), 2.65(H6), 2.28(H1), 1.85(H5), 1.7(H2), 1.55(H3), 1.3(H3), 1.25(H16, H17, H20), 0.99(H19), 0.93(H18).



Derivatización de epóxido R.



A una disolución de 48 mg (0.1346 mmol) del epóxido R en 55 mL de metanol, se adiciono 27 mg (0.1481 mmol, 1.1 eq.) de n-fenilpropanol. La mezcla obtenida se somete a reflujo 20h. Enfriar el sistema y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica en columna con n-hexano/ acetato de etilo 20%.

Derivatización de epóxidos R

Formula Molecular: $C_{31}H_{42}NO_2$

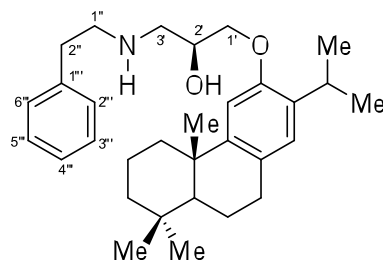
Aspecto Físico: Aceite incoloro

IR cm^{-1} :

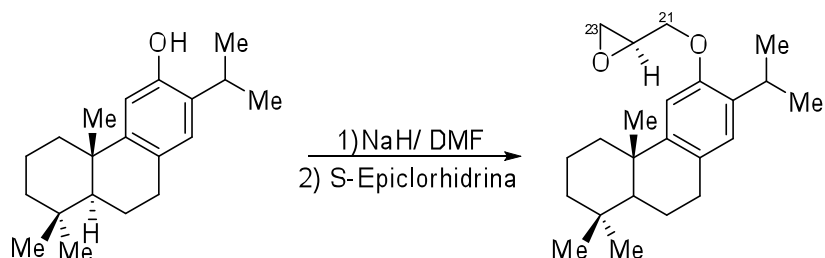
E/M alta resolución: $[M+1]$ m/z 463.34

EM m/z (%) : 463(3),384(0.5),373(26),372(100),286(25),271(6),134(19),105(17),86(12),55(2)

RMN 1H δ : 7.34(H5'''),7.32(H5'''),7.24(H6'''),6.88(H14),6.74(H11),4.12(H2'),4.06(H1'),4.01(H1'),3.50(OH),2.8(H3'),2.7(H1''),2.71(H2''),2.26(H1),2.20(H1),1.8(H5),3.05(H15),1.16(H16),1.11(H17),0.98(H18,H19).



O-Alquilación de Ferruginol S



A una suspensión de Ferruginol (9) 74.4 mg y 212 mg de NaH 60% en 2 mL de Dimetilformamida, se le adiciono 51 μ L de S-epiclorhidrina 0°C y bajo atmosfera de nitrógeno la mezcla de reacción se deja 20 h a 55°C. Transcurrido este tiempo se deja enfriar la mezcla de reacción, se elimina el disolvente en rotaevaporador, se redisuelve el producto en acetato de etilo, lavar con agua, secar el extracto orgánico con sulfato de magnesio anhidro y concentrar en rotaevaporador. El crudo de reacción se purifica en columna utilizando n- hexano y éter 30%.

O-Alquilacion de Ferruginol S

Formula Molecular: $C_{23}H_{34}O_2$

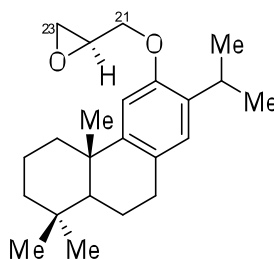
Aspecto Físico: Sólido amorfo blanco

IR cm^{-1} : 2957.41, 1692.55, 1500.88, 1457.29, 1211.47

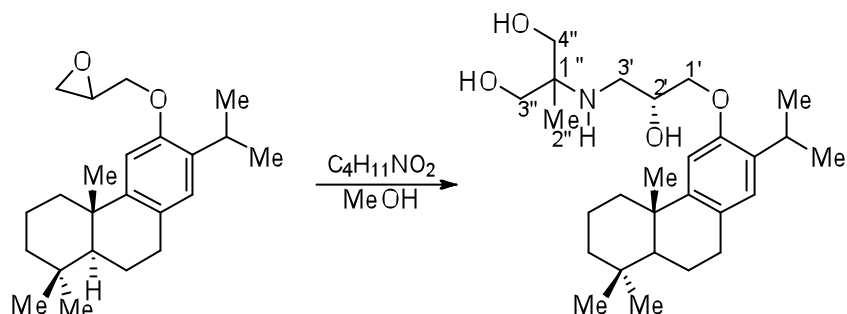
E/M alta resolución: $[M+1] m/z$ 416.314

EM m/z (%) : 344 (100), 327 (45), 285 (4), 271 (7), 257 (13), 245 (19), 231 (13), 189 (8), 147 (6), 91 (1), 55 (4).

RMN 1H δ : 6.9 (H11), 6.8 (H14), 4.22 (H20), 4.20 (H20), 4 (H20), **3.38 (H23)**, 3.30 (H8), 2.93 (H23), 2.70 (H15), 1.19 (H19), 1.09 (H18), 0.96 (H20), 0.96 (H 16, 17)



Derivatización de epóxido S.



A una disolución de 48 mg (0.1346 mmol) del epoxido en 55 mL de metanol, se adiciono 27 mg (0.1481 mmol, 1.1 eq.) de n-fenilpropanol. La mezcla obtenida se somete a reflujo 20h. Enfriar el sistema y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica en columna con n-hexano/ acetato de etilo 20%.

Derivatización de epóxidos S

Formula Molecular: $C_{27}H_{45}NO_2$

Aspecto Físico: Aceite incoloro

IR cm^{-1} :

3366.56, 2926.72, 1613.53, 1570, **1500**, 1463, **1248**, **1046**, 733

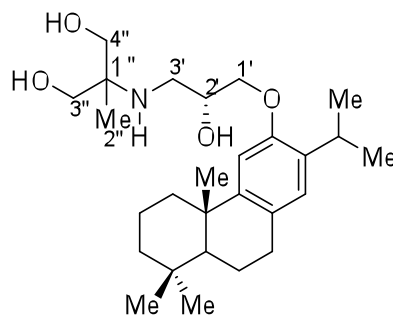
E/M alta resolución: $[M+1] m/z$ 419.3

EM m/z (%) :

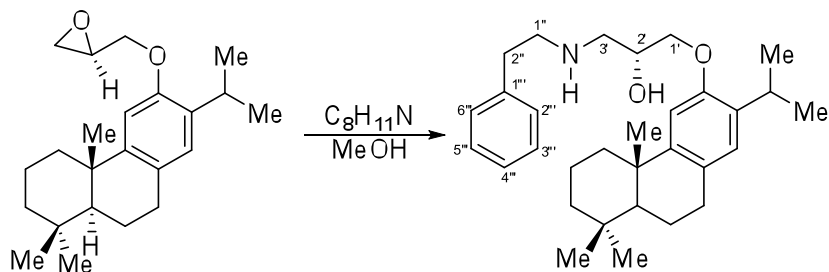
419(1), 416(100), 286(6), 271(3), 165(4), 144(2), 13(8), 118(13), 87(3), 55(2)

RMN 1H δ :

7.93(H14), 6.74 (H11), **4.19(H2')**, **4.10 (H1')**, **3.6 (H3'',H4'')**, 3.23 (H15), **2.96 (H3')**, 2.90 (H7), 2.80(H7), **2.83(H3')**, 2.69 (H6), 2.65 (H6), 2.28 (H1), 1.85 (H5), 1.7 (H2), 1.55 (H3), 1.3 (H3), 1.25 (H16,H17,H20), 0.99 (H19), 0.93 (H18).



Derivatización de epóxido S.



A una disolución de 48 mg (0.1346 mmol) del epoxido en 55 mL de metanol, se adiciono 27 mg (0.1481 mmol, 1.1 eq.) de n-fenilpropanol. La mezcla obtenida se somete a reflujo 20h. Enfriar el sistema y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica en columna con n-hexano/ acetato de etilo 20%.

Derivatización de epóxidos S

Formula Molecular: $C_{31}H_{42}NO_2$

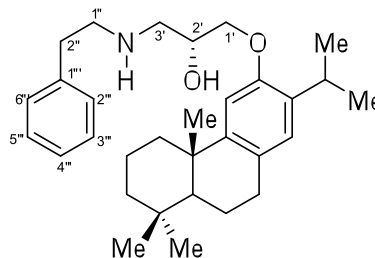
Aspecto Físico: Aceite incoloro

IR cm^{-1} :

E/M alta resolución: $[M+1] m/z$ 463.34

EM m/z (%) : 463(3),384(0.5),373(26),372(100),286(25),271(6),134(19),105(17),86(12),55(2)

RMN 1H δ : 7.34(H5''),7.32(H5''),7.24(H6''),6.88(H14),6.74(H11),4.12(H2'),4.06(H1'),4.01(H1'),3.50(OH),2.8(H3'),2.7(H1''),2.71(H2''),2.26(H1),2.20(H1),1.8(H5),3.05(H15),1.16(H16),1.11(H17),0.98(H18,H19).



IV. CAPITULO IV : EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL IN VITRO

IV.1. Antecedente

Los ensayos de actividad antitumoral in vitro desempeñan un papel significativo tanto en la evaluación aleatoria de nuevos productos (“random screening”) como en el diseño racional de nuevos compuestos anticancerígenos. Los ensayos in vitro se pueden clasificar en dos grupos según estén basados a) en células o b) en dianas moleculares. Las técnicas modernas de biología molecular permiten caracterizar e introducir una variedad de dianas moleculares (enzimas, ARN, ADN, etc.) en las diferentes líneas celulares para el desarrollo racional de nuevos fármacos.

IV.2. Parte Experimental

1. CULTIVO DE CÉLULAS, TRIPSINIZACIÓN, VIABILIDAD CELULAR Y RECuento

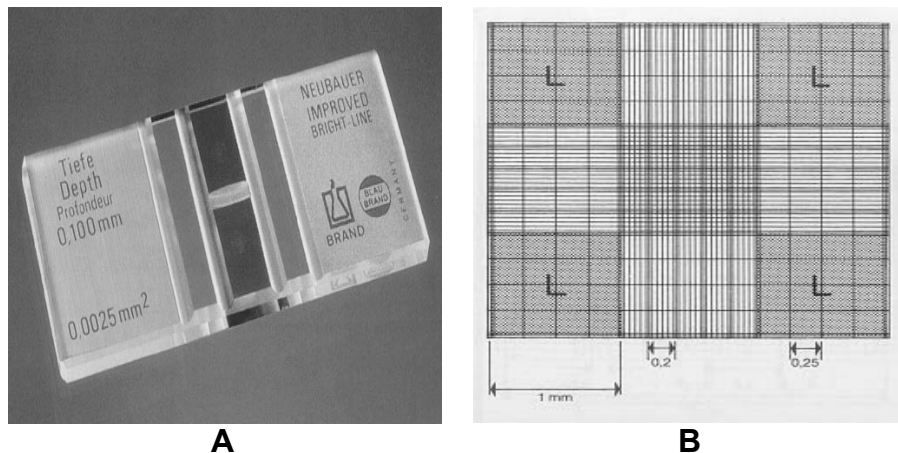
Las células se cultivan en frascos estériles especialmente tratados para el cultivo celular. Dependiendo del tipo de línea celular las células se adhieren a la superficie del frasco (tumores sólidos) o se conservan en suspensión (leucemias). En cualquier caso las células se mantienen en medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado por calor (contiene factores de crecimiento) y 2 mM en *L*-glutamina. En cada caso particular se adicionarán requerimientos nutricionales específicos para la línea celular en cuestión. Los medios de cultivo más habituales son DMEM y RPMI 1640. Los frascos de cultivo se incuban a 37 °C, 95% de humedad y 5% de atmósfera de CO₂.

Las células flotantes se recogen en un tubo por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en medio de cultivo fresco. Por el contrario, las células que crecen en una monocapa (adheridas a la superficie del frasco) pueden ser recogidas por tripsinización. En este caso se sigue el siguiente protocolo:

- Aspirar el medio de cultivo
- Lavar las células con 2–3 mL de PBS (estéril)

- Aspirar el PBS
- Añadir 0.5–1 mL de disolución de tripsina-EDTA (estéril)
- Incubar a 37 °C durante 1 min.
- Recoger las células con 5–10 mL de medio de cultivo fresco.
- Colocar la suspensión en un tubo de 15 mL estéril.

Para determinar la densidad de las células viables en una suspensión se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de recuento celular de la que existen numerosas variantes, entre ellas la que empleamos (cámara de Neubauer), hasta equipos automáticos de recuento celular como el "Cell Coulter". La cámara de Neubauer es una cámara de recuento adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen (Figura 1). Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.



Esquema 13: A) Cámara de Neubauer. B) Detalle de la cuadrícula.

	L1	L2	L3	L4	Promedio
Total					

Si contamos las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de N células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

Concentración en la suspensión (células / mL) = 10000 x (N/4) x factor dilución

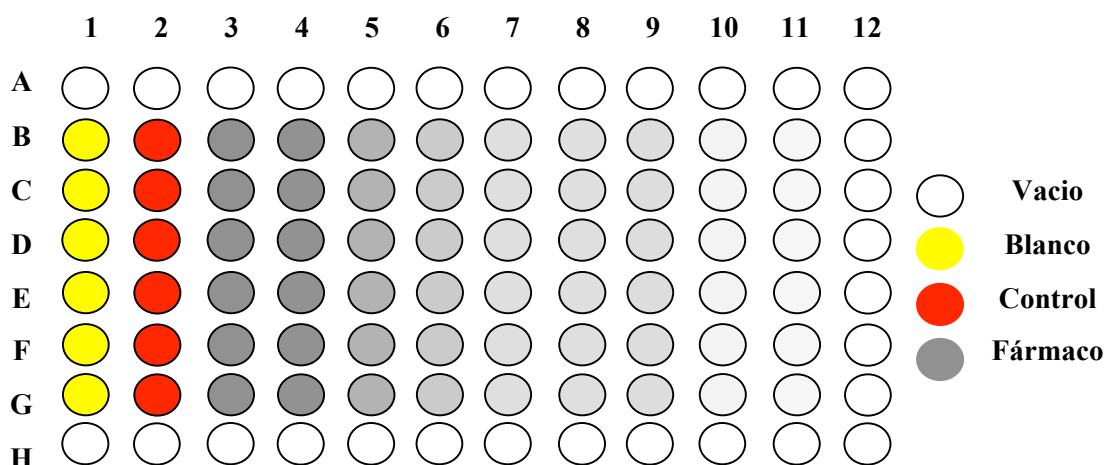
Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Existen otros métodos de determinación de la viabilidad celular como el más preciso de la tinción con yoduro de propidio.

- Mezclar en un tubo de 1.5 mL, 100 µL de disolución de azul tripán y 100 µL de suspensión de células
- Homogeneizar la mezcla y colocar 10 µL en la cámara de Neubauer
- Contar las células viables y anotar el resultado
- Calcular el volumen a utilizar para la siembra en placas de 96 pocillos

2. SIEMBRA, ESTABLECIMIENTO DE CONTROLES Y ADICIÓN DE PRODUCTOS PARA EL EXAMEN DE CITOTOXICIDAD

Para realizar los ensayos de citotoxicidad las células se cultivan en placas de 96 pocillos de fondo plano en diferentes densidades, dependiendo de su tiempo de duplicación. Tal como se muestra en la Figura 2, de la placa de 96 pocillos las filas superior e inferior y la última columna de la derecha no serán utilizadas para cultivar células, debido al efecto de evaporación del disolvente. De este modo la primera columna de la izquierda contendrá únicamente medio de cultivo (blanco), la segunda columna se destinará a cultivar las células que no serán expuestas a los fármacos (control), y las columnas siguientes contendrán las células que serán expuestas a

concentraciones decrecientes del fármaco utilizado en cada caso. Para cada fármaco o combinación binaria de estos se utilizarán tres filas, es decir, cada serie de diluciones del fármaco será evaluada por triplicado.



Esquema 14 Esquema del experimento.

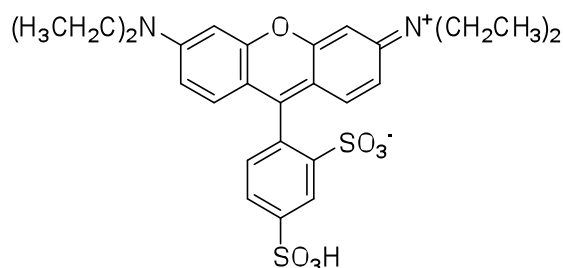
Las células pueden ser expuestas a los fármacos como agentes separados o como combinaciones binarias o ternarias durante diferentes periodos de tiempo (1, 4, 24, 48 ó 72h). Los fármacos a evaluar se disuelven en DMSO a 400 veces la máxima concentración de ensayo. Esta disolución stock se conserva a -70°C . Para los productos puros la concentración máxima de ensayo es $100\ \mu\text{M}$, mientras que para los extractos de productos naturales es $250\ \mu\text{g/mL}$.

- Sembrar $100\ \mu\text{L}$ de suspensión de células en el recuadro B2 a G11
- Calcular el volumen de disolución de fármaco (DMSO) a diluir en $1\ \text{mL}$ de medio de cultivo (dilución madre)
- Preparar 8 diluciones seriadas
- Añadir $100\ \mu\text{L}$ de las dilución al pocillo correspondiente
- Incubar durante 48 h

Conc. Stock	Volumen dilución madre	Volumen stock en dilución madre

3. DETERMINACIÓN DE IC₅₀ MEDIANTE EL MÉTODO COLORIMÉTRICO SRB

Entre las técnicas de medida de la proliferación celular distinguimos métodos directos (recuento de células), radiactivos (³H-timidina) y espectrofotométricos (colorimétricos y fluorimétricos). La técnica de la sulforrodamina B (SRB) es un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la unión electrostática de la SRB (Figura 3) a los aminoácidos básicos fijados con ácido tricloroacético (TCA). Esta técnica es sensible, rápida y sencilla cuando la comparamos con otras como por ejemplo bromo deoxiuridina (BrdU) o MTT y sus variantes el XTT o el MTS.



Esquema 15 Estructura de la SRB.

- Añadir 25 µL de disolución fría de TCA al 50% (se conserva en nevera) a cada pocillo
- Fijar a 4 °C (nevera) durante 1 h
- Lavar generosamente con agua del grifo
- Secar la placa golpeando sobre papel de filtro
- Añadir 25 µL de disolución de SRB 0.4% y teñir durante 15 min
- Lavar el exceso de SRB con disolución de AcOH al 1%
- Secar la placa golpeando sobre papel de filtro
- Añadir 150 µL de disolución de TRIS 10 mM

- Leer absorbancia a 492 nm
- Dibujar la curva dosis-respuesta
- Calcular la IC₅₀

Ejemplo práctico de citotoxicidad.

Se ensaya la citotoxicidad de un fármaco frente a una línea celular representativa de tumor sólido humano. Tras exponer las células durante 48 h a una serie de diluciones seriadas del fármaco se procedió con el método colorimétrico SRB. Los valores de absorbancia obtenidos se muestran en la Tabla 1. Se requiere dibujar la curva dosis-respuesta y determinar la IC₅₀.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B	0,003	1,543	0,133	0,147	0,154	0,168	0,771	1,321	1,536	1,523	1,567	0,000
C	0,004	1,501	0,145	0,152	0,159	0,171	0,773	1,305	1,528	1,542	1,535	0,000
D	0,003	1,598	0,137	0,148	0,163	0,187	0,782	1,286	1,549	1,550	1,588	0,000
E	0,005	1,521	0,140	0,142	0,159	0,178	0,787	1,297	1,532	1,567	1,585	0,000
F	0,003	1,577	0,142	0,150	0,161	0,170	0,775	1,311	1,522	1,544	1,549	0,000
G	0,002	1,565	0,132	0,145	0,155	0,172	0,777	1,308	1,515	1,512	1,516	0,000
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>D₁</i>	<i>D₂</i>	<i>D₃</i>	<i>D₄</i>	<i>D₅</i>	<i>D₆</i>	<i>D₇</i>	<i>D₈</i>	<i>D₉</i>	

Tabla 1. Diseño de placa y absorbancia de cada pocillo a 492 nm.

Solución:

En primer lugar se calcula el valor promedio de absorbancia para cada grupo de seis valores (Blanco, Control y Dosis D₁–D₉).

	B	C	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₇	D ₈	D ₉
Media	0,003	1,551	0,138	0,147	0,159	0,174	0,778	1,305	1,530	1,540	1,557

El segundo paso consiste en sustraer el valor promedio de absorbancia del blanco (pocillos con medio, sin células y sin fármaco, B₂–G₂).

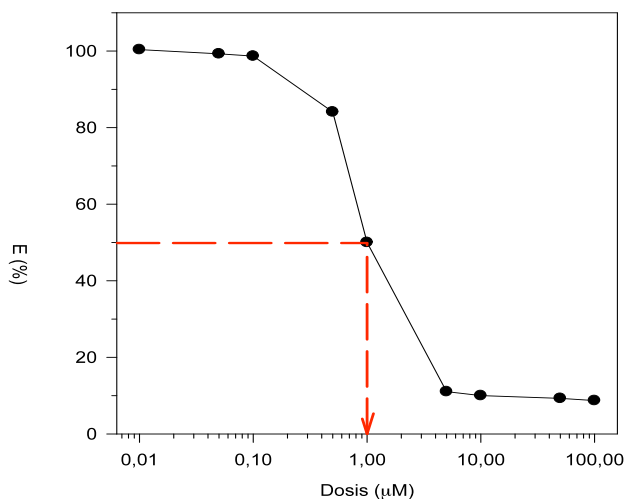
	C	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₇	D ₈	D ₉
Media – B	1,548	0,135	0,144	0,155	0,171	0,774	1,301	1,527	1,536	1,553

Para cada dosis calculamos el efecto en porcentaje mediante la siguiente fórmula. De esta forma el valor de E para el control (C) es 100%.

$$E_i(\%) = 100 \times D_i / C$$

	C	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₇	D ₈	D ₉
E_i(%)	100	8,7	9,3	10,0	11,1	50,0	84,1	98,7	99,3	100,4
Dosis (μM)		100	50	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01

La representación del efecto en el eje Y y la dosis en el eje X en escala logarítmica debe proporcionar la curva dosis-respuesta. Por extrapolación se obtiene la IC₅₀, que en nuestro ejemplo es 1 μM.



IV.3. Discusión de Resultados

Después de caracterizar y evaluar los productos de tipo aminoalcohol mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y sus estudios biológicos, se encontraron valores de GI₅₀ en un rango activo de 1.4 a 2.5 μg/mL. La poca diferencia de actividad antiproliferativa entre los aminoalcoholes R y S, indica que no existe estereoselectividad en esta respuesta biológica de los isómeros sintetizados. Se plantea como trabajo futuro la elaboración de un mayor número de derivados para ver si el comportamiento es similar.

GI ₅₀					
Línea celular	A2780	HBL-100	SW1573	T-47D	WiDr
(R)AA	1.4	2.0	2.0	1.9	1.7
(S)AA	1.6	1.8	2.5	2.3	2.0

V. CAPITULO V: CONCLUSIONES

Empleando al diterpeno ácido dehidroabietico como material de partida, se llevó a cabo la síntesis química de ferruginol y la derivatización del mismo para generar.....sus estructuras moleculares

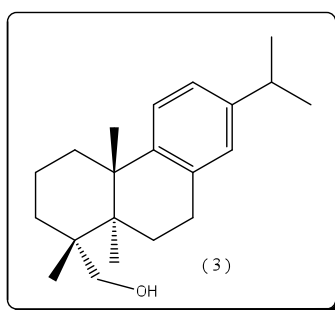
La poca diferencia de actividad antiproliferativa entre los aminoalcoholes con disposición espacial R y S, indica que no existe estereoselectividad en esta respuesta biológica de los isómeros sintetizados.

Estos resultados sugieren que la cadena lateral incorporada sobre el anillo aromático de ferruginol, es importante que presente grupos de tipo alcohol secundario y aminas secundarios con anillos aromáticos.

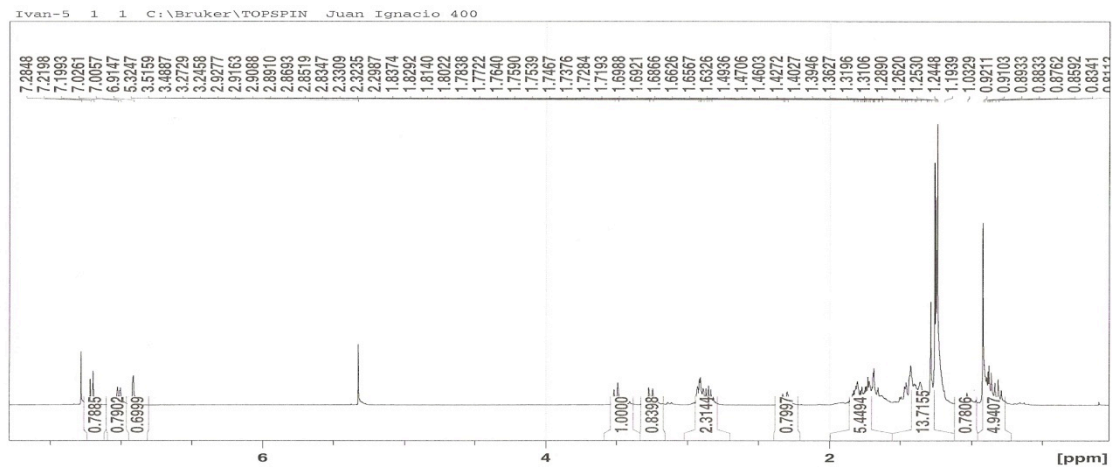
Con los datos biológicos obtenidos en estos experimentos se establece que la línea celular tumoral mas sensible frente a los productos ensayados fue la de ovario (A2780) y la que ofreció mayor resistencia fue la de pulmón (SW1573).

Con estos resultados biológicos preliminares, se establece la gran importancia de la presencia de la cadena lateral de tipo β -aminoalcohol sobre el sistema aromático de ferruginol, ya que con esta transformación química estructural, se modula favorablemente la actividad antiproliferativa.

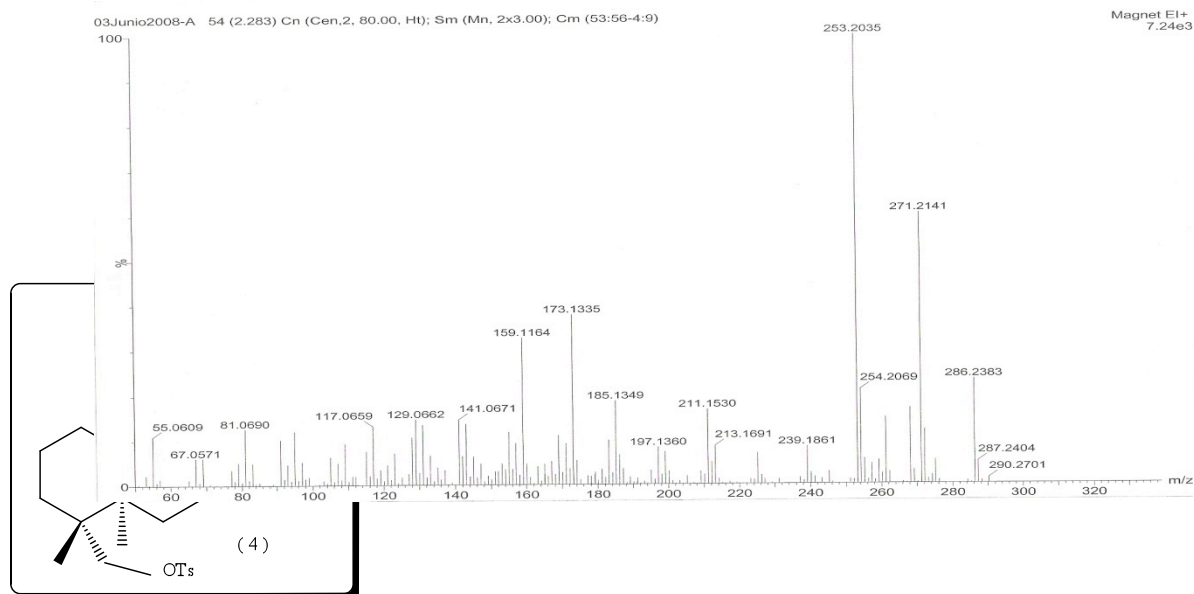
IV. APENDICES



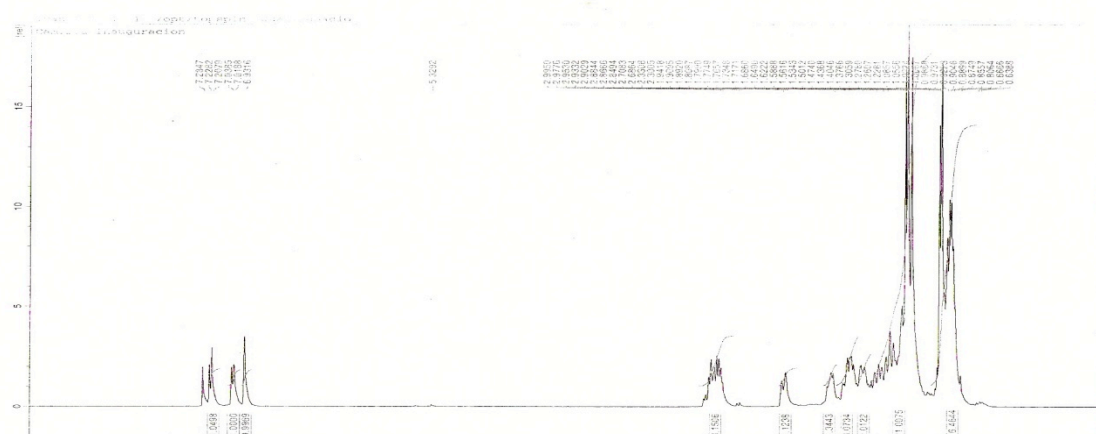
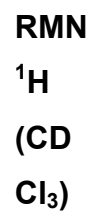
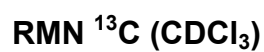
RMN 1H (CDCl₃)



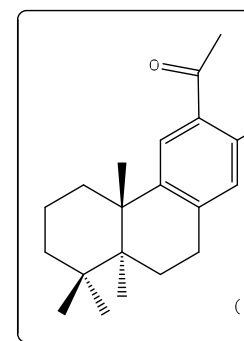
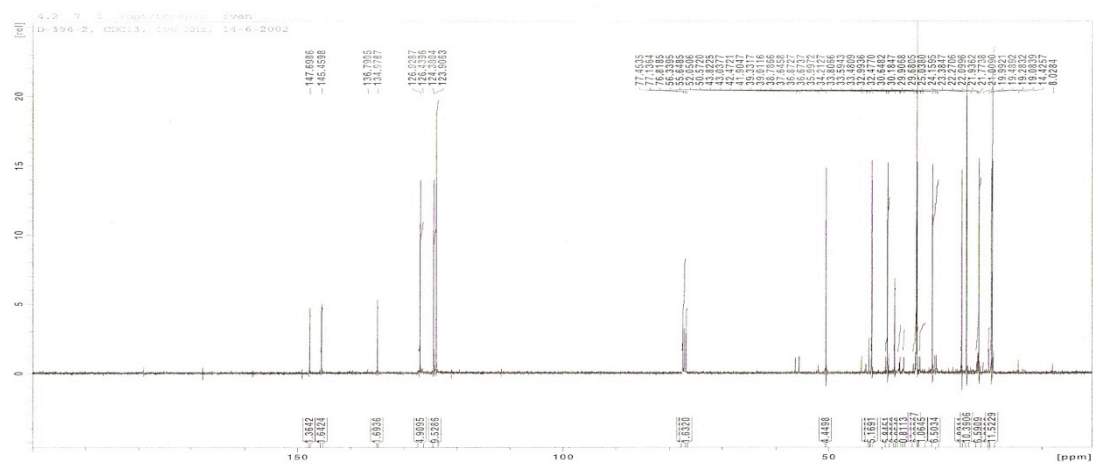
MS-LC



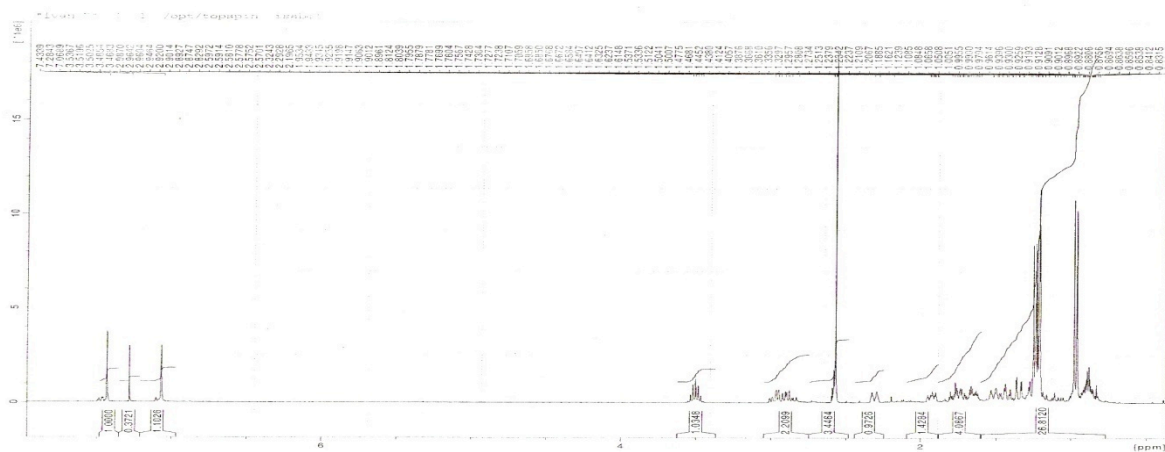
RMN ^1H (CDCl_3)



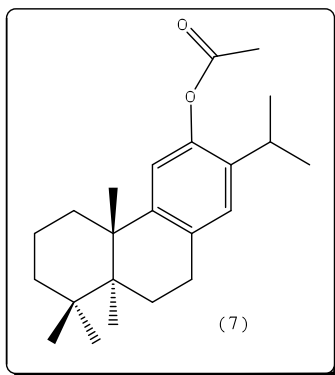
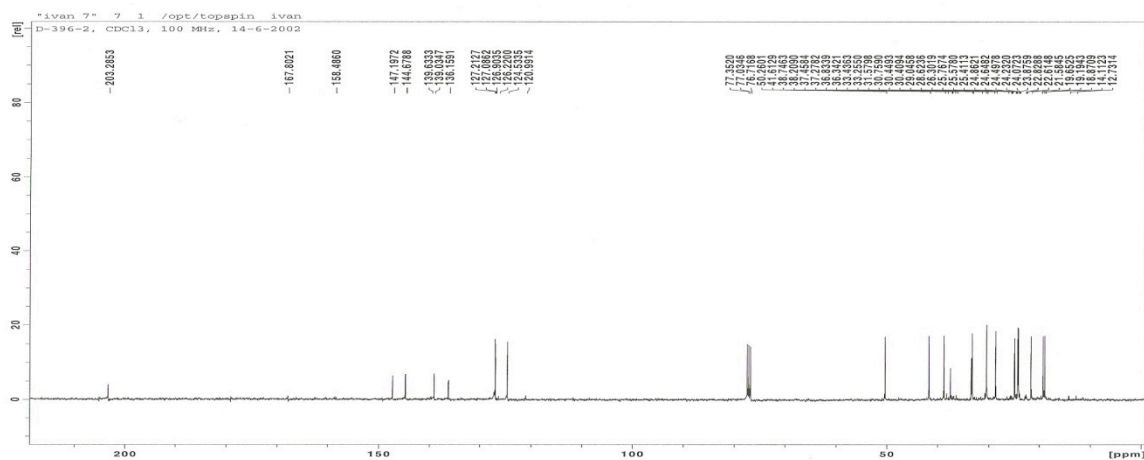
RMN ^{13}C (CDCl_3)



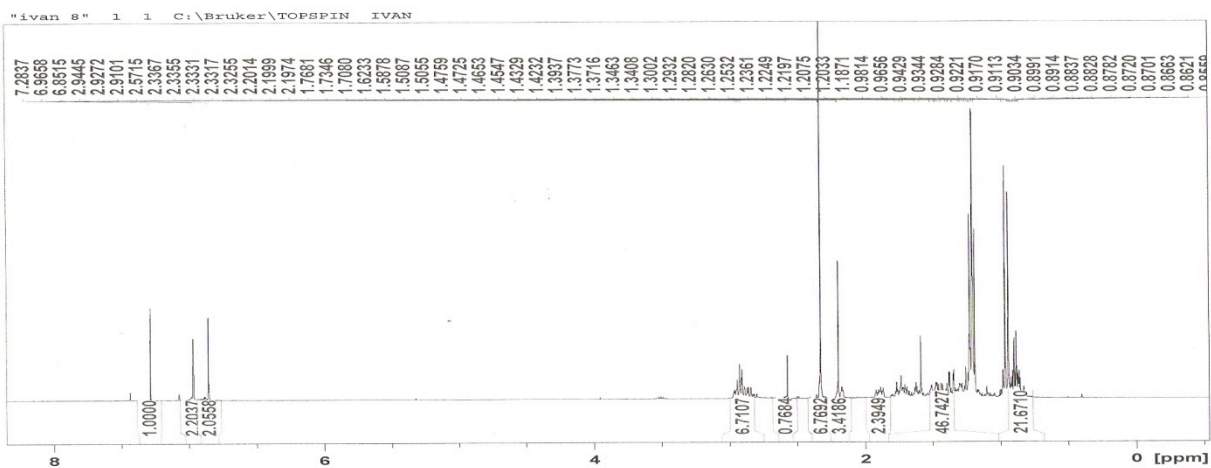
RMN ^1H (CDCl_3)



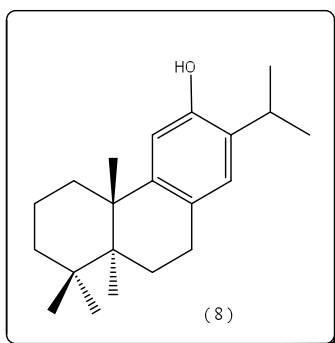
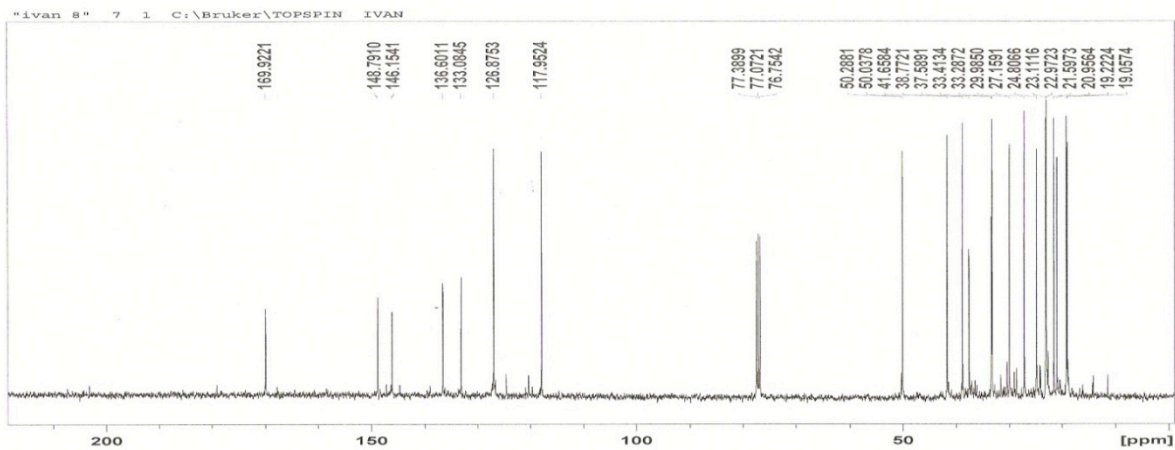
RMN ^{13}C (CDCl_3)



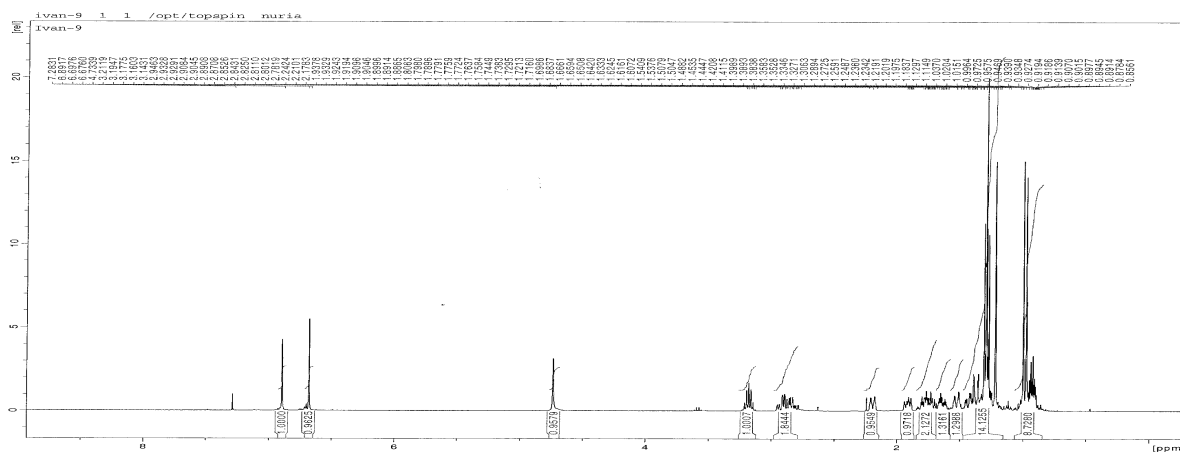
RMN ^1H (CDCl_3)



RMN ^{13}C (CDCl_3)

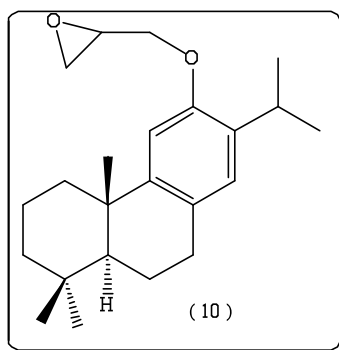
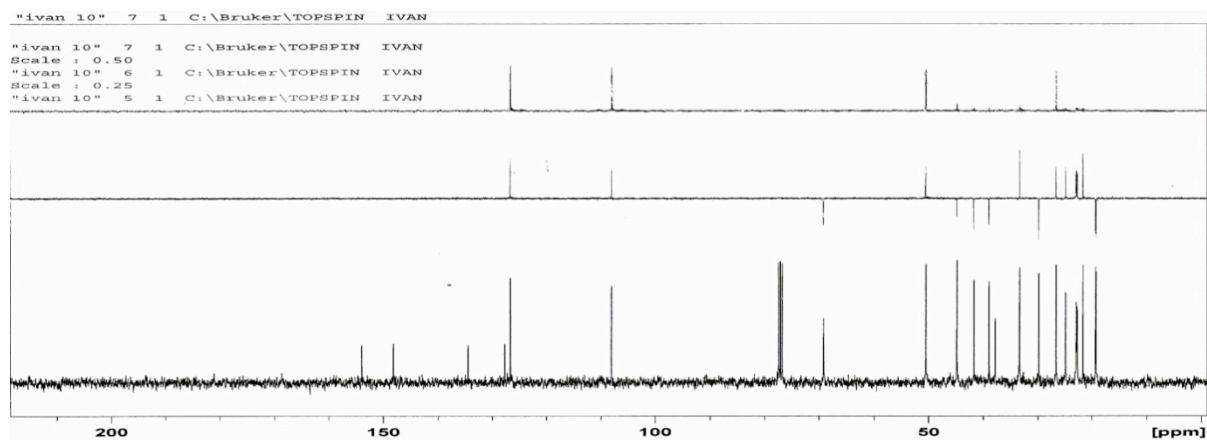


RMN ¹H (CDCl₃)



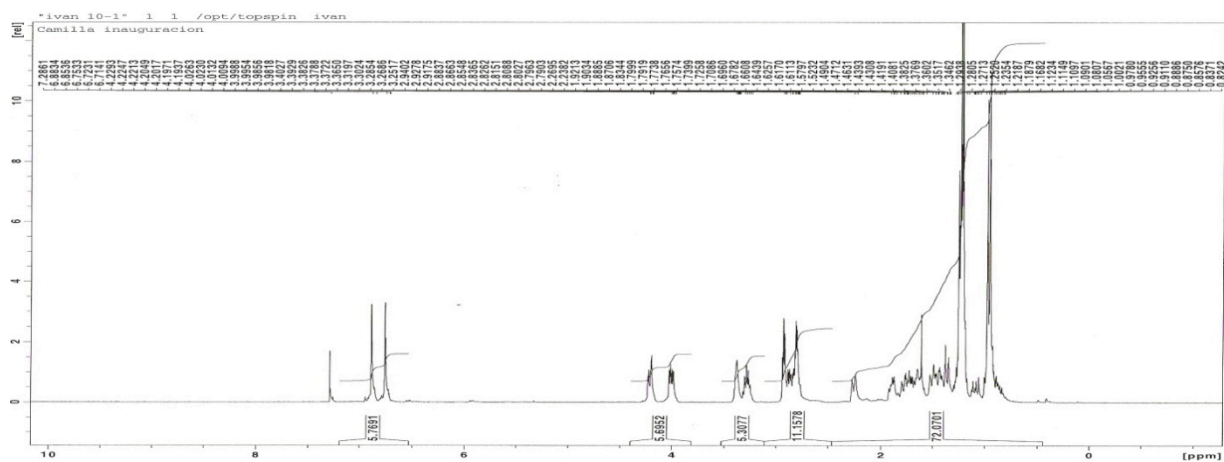


RMN DEPT ^{13}C

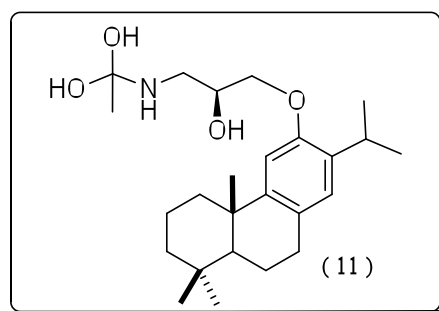
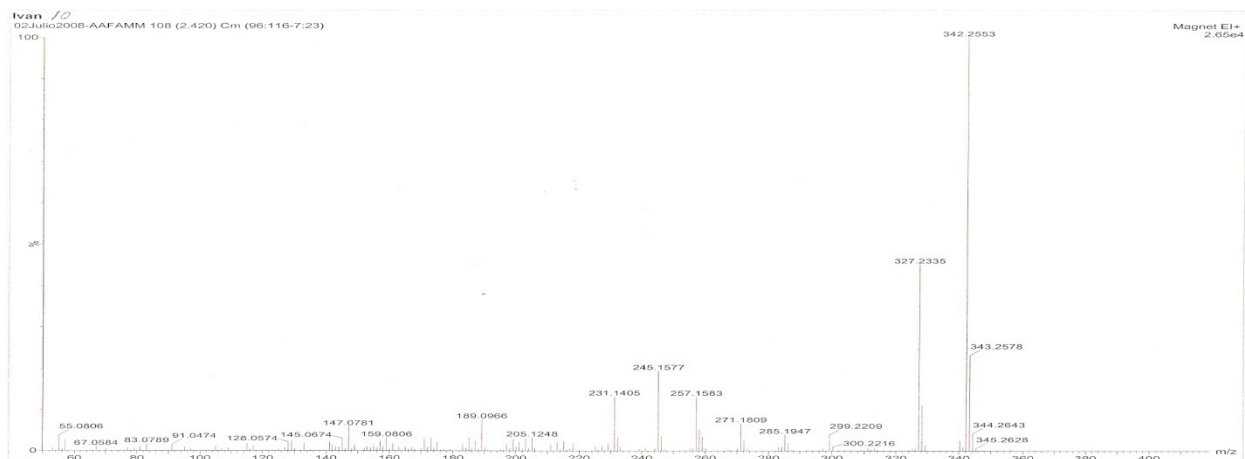


Epóxido S

RMN ^1H (CDCl_3)

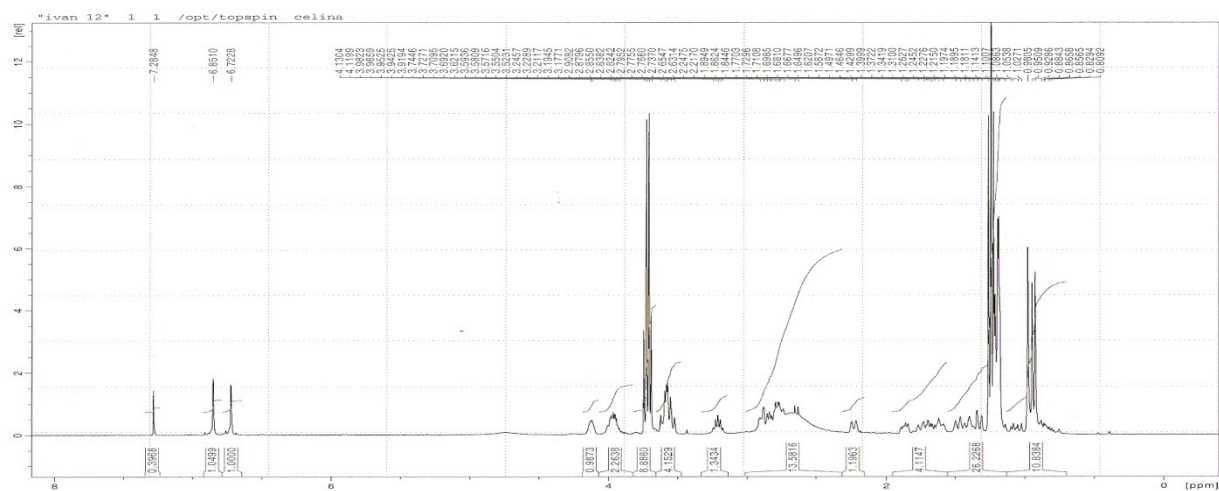


Masas

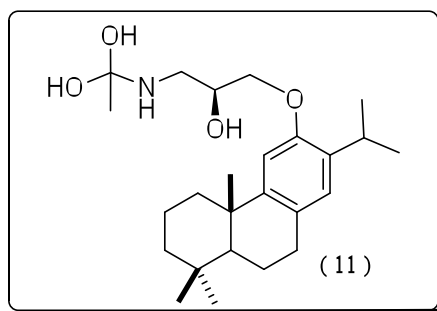


Aminoalcohol S Propanodiol

RMN ^1H (CDCl_3)

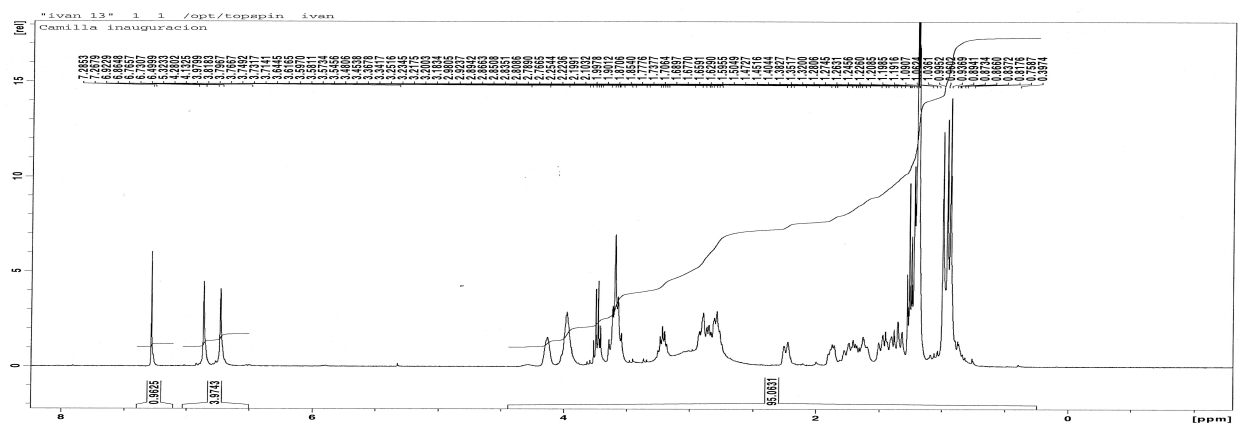


DEPT ^{13}C RMN

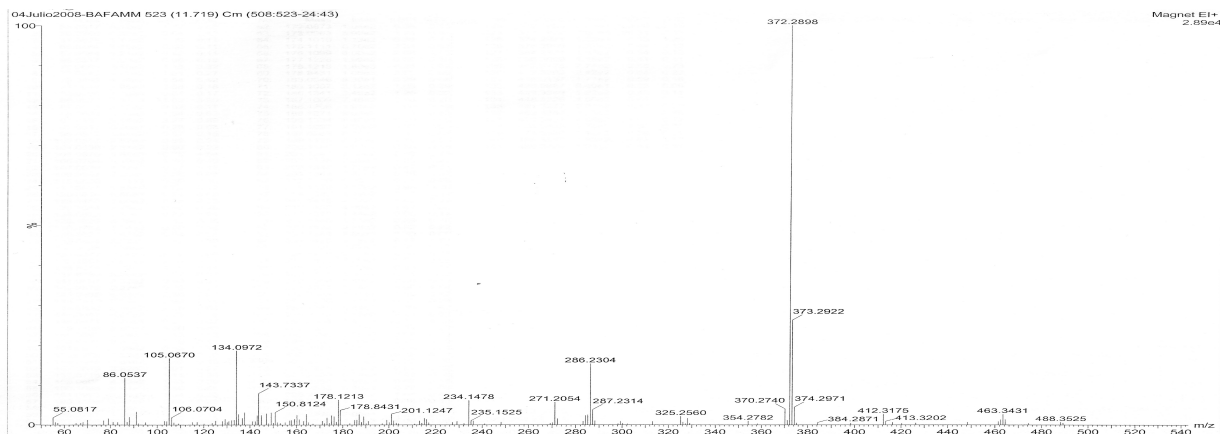


Aminoalcohol R Propanodiol

RMN ^1H (CDCl_3)



Masas



Índice de Esquemas

Esquema 1	12
Esquema 2	13
Esquema 3	16
Esquema 4	16
Esquema 5	17
Esquema 6	18
Esquema 7	20
Esquema 8	21
Esquema 9	22
Esquema 10	23
Esquema 11	24
Esquema 12	26

