



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE CUMARINAS DERIVADAS DE
LUPEOL**

TESIS

PRESENTADA POR

JORGE MARCELO SOSA BALAM

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE CUMARINAS DERIVADAS DE
LUPEOL**

TESIS

PRESENTADA POR

JORGE MARCELO SOSA BALAM

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020



Mérida, Yuc., 16 de diciembre de 2020

Oficio Num.: PICQB/308/2020

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis "Síntesis de cumarinas derivadas de lupeol" presentada por Jorge Marcelo Sosa Balam, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis


Dr. Rubén Marrero Carballo


Dr. Gonzalo Joaquín Meha Rejón

Sinodales

Dr. Rolando David Cáceres Castillo


Dr. Rolando David Cáceres Castillo

Dr. Ramiro Quijano Quiñones


Dr. Ramiro Quijano Quiñones

Dra. Susana Rincón Arriaga


Dra. Susana Rincón Arriaga

**ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"**



**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

c.c. Archivo
MRSC

AGRADECIMIENTOS

A todos los que contribuyeron para que fuese posible la realización de este trabajo, comenzando con las personas responsables de mi formación académica durante los dos años del posgrado, hasta las personas que de manera más estrecha compartieron ideas y experiencia para la finalización de este documento.

A mis Directores de Tesis el Dr. Rubén Marrero Carballo y el Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón por sus conocimientos, por su paciencia, por su apoyo y por su confianza al darme la oportunidad de formar parte de este proyecto.

Al Dr. Gumersindo Mirón López y a la M en C Wendy C. Manzanarez por la realización de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear presentes en este documento así como los conocimientos brindados en esta técnica.

Al M. en C. Manlio Joaquín Graniel Sabido por la realización de los experimentos de masas presentes en este documento.

A la Dra. Jasmín Salazar Mendoza por su amistad, su apoyo incondicional, sus consejos y valiosos conocimientos durante la realización de este trabajo.

A la M en C Dianela Lara Nah, M en C, Karla Daniela Chikani, M en C Jenner Us Martin, al M en C Vicente de Jesús L. Saenz, por el compañerismo, amistad y conocimientos que enriquecieron este trabajo.

Al Comité Revisor y H. sínodo, Dr. Rolando David Cáceres Castillo, Dr. Ramiro Quijano Quiñonez, Dra Susana Rincón Arriaga por el tiempo dedicado en la revisión, corrección y recomendaciones realizadas para la mejora de este trabajo.

A las autoridades de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán por permitir la realización de este trabajo en dichas instalaciones.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Rubén Marrero Carballo y el Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón y formó parte del Proyecto “Generación de diversidad esquelética en lupanos como herramienta en la búsqueda de nuevos agentes anticancerosos” (CB-2013-01, No. 221886) financiado por el CONACYT, con el apoyo de una beca (No. 787964) concedida por el CONACYT.

RESUMEN

Muchas librerías moleculares están compuestas por moléculas que poseen un bajo grado de complejidad estructural. Por ello estrategias como la síntesis orientada a la diversificación molecular (DOS) utiliza productos naturales como punto de partida para la síntesis de moléculas complejas con potenciales actividades biológicas. El lupeol es un producto natural considerado como una molécula privilegiada por poseer una amplia gama de actividades biológicas, entre ellos actividad anticancerígena, y por las modificaciones que pueden realizarse en el anillo A y sobre el doble enlace exocíclico, permitiendo la generación de derivados con estructuras más complejas con posibles mejoras en las actividades biológicas. Aplicando la estrategia DOS de fusión de anillo, mediante dos reacciones dominó, se modificó el lupeol obtenido del extracto metanólico de las cáscaras de *Chrysophyllum cainito*, fusionando cumarinas en el anillo A obteniendo un total de ocho cumarinas sustituidas con grupos carbonilo (cetona, ácido carboxílico y nitrilo) en posición 3 y grupos fenilo, TMS y butilo en posición 5, con rendimientos que van del 34% al 91%. Sin embargo, las cumarinas 3,5 sustituidas fusionadas al anillo A de lupeol no fueron activas contra las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, ATCC HTB-22, MDA-MB 231, ATCC HTB-26) y cérvix. Sin embargo, estos derivados no mostraron toxicidad sobre células normales a altas concentraciones (>100 μM) por lo que cabe la posibilidad de evaluarlas en otros blancos como las involucradas en procesos inflamatorios.

ABSTRACT

Many molecular libraries are composed of molecules that have a low degree of structural complexity. For this reason, strategies such as diversification molecular oriented to synthesis (DOS) use natural products as a starting point for the synthesis of complex molecules with potential biological activities. Lupeol is a natural product considered as a privileged molecule due to its wide range of biological activities, including anticancer activity, and for the modifications that can be made in the A ring and on the exocyclic double bond, allowing the generation of derivatives with structures more complex with possible improvements in biological activities. Applying the DOS strategy of ring fusion, through two domino reactions, the lupeol obtained from the methanolic extract of the shells of *Chrysophyllum cainito* was modified, fusing coumarins in ring A obtaining a total of eight coumarins substituted with carbonyl groups (ketone, carboxylic acid and nitrile) in position 3 and phenyl, TMS and butyl groups in position 5, with yields ranging from 34% to 91%. However, the 3,5 substituted coumarins fused to the A ring of lupeol were not active against breast cancer cell lines (MCF-7, ATCC HTB-22, MDA-MB 231, ATCC HTB-26) and cervix. However, these derivatives did not show toxicity on normal cells at high concentrations ($> 100 \mu\text{M}$), so it is possible to evaluate them in other targets such as those involved in inflammatory processes.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
INDICE	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Modificaciones estructurales de productos naturales	3
Cumarinas como potenciales agentes anticancerígenos	6
Reacciones dominó	12
El lupeol como molécula privilegiada	16
Las microondas en la síntesis química	19
HIPÓTESIS	23
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Material vegetal	29
Extracción, fraccionamiento y obtención de acetato de lupeol	29
Obtención de lupeol	30
Obtención de lupenona	30
Síntesis de alcoholes propargílicos	30
Síntesis de PVEs	31
Síntesis de salicilaldehídos	32
Síntesis de cumarinas	33
Método A	33
Método B	34
Síntesis de Acetato de piperidina	35
Método C	35
Evaluación de la actividad anticancerígena	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Purificación e identificación de acetato de lupeol	38
Hidrólisis y oxidación de acetato de lupeol	39
Obtención de alcoholes propargílicos	40
Identificación del alcohol propargílico 1	42
Identificación del alcohol propargílico 2	46
Identificación del alcohol propargílico 3	47
Obtención de PVEs	49
Identificación de los PVEs	51
Obtención de Salicilaldehídos	56
Identificación de los salicilaldehídos	59
Obtención de cumarinas	64
Identificación de las cumarinas	68
Pruebas biológicas	78
CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS	83

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, los productos naturales han sido una fuente abundante de compuestos que tienen aplicaciones en los campos de la medicina, farmacia y biología. Un número importante de nuevos fármacos comercializados han sido obtenidos de fuentes naturales. Sin embargo, algunos de estos compuestos fueron modificados estructuralmente para mejorar las actividades biológicas, mientras que otros han sido utilizados como modelos para diseñar nuevos compuestos. Actualmente el 41% de los fármacos contra el cáncer y 65% de los fármacos antibacterianos son productos naturales o derivados de los mismos.^{1,2}

Actualmente se han desarrollado estrategias que se han centrado en la modificación de productos naturales viables como puntos de partida para obtener derivados y/o análogos de los mismos con posibles mejoras en las actividades biológicas que poseen. Una de estas estrategias es la síntesis orientada a la diversificación (DOS). A su vez, una estrategia dentro de la DOS, es la fusión de anillos a producto natural para generar derivados estructuralmente más complejos y con mejor actividad.¹

Hoy en día la industria farmacéutica utiliza la hibridación molecular (HM) usando prototipos (estructuras químicas definidas, de origen natural o sintético; que exhiben alguna actividad farmacológica *in vivo*) para generar fármacos más potentes y con menos efectos secundarios. La HM utiliza los principios de la estrategia DOS de fusionar distintos compuestos bioactivos en una sola molécula, siendo una alternativa eficaz para diseñar racionalmente las estructuras moleculares de nuevos compuestos prototipo. Un ejemplo de HM es la síntesis de benorilato, un fármaco antiinflamatorio, analgésico y antipirético obtenido a partir de la reacción de paracetamol (analgésico y antipirético) con cloruro de ácido acetilsalicílico (antiinflamatorio, antipirético y analgésico). El benorilato combina las acciones farmacológicas del paracetamol y el ácido acetilsalicílico, lo cual resulta ventajoso ya que se utiliza un solo fármaco en lugar de dos para aliviar síntomas de dolor y fiebre.³

El lupeol es un triterpeno pentacíclico que destaca por sus actividades antiinflamatorias y anticancerígenas, además es una molécula selectiva ya que no presenta toxicidad en células normales. El lupeol puede encontrarse en forma de acetato en plantas como *Chrysophyllum cainito*, una especie que pertenece a la familia Sapotaceae, es comúnmente conocido como caimito o “manzana estrella”, esta especie es generalmente considerada como nativa de las Antillas mayores y naturalizadas en el centro y sur de América. *C. cainito* es valorada por ser un árbol ornamental así como una fuente de alimento por sus frutos comestibles. La fruta madura se consume para aliviar la inflamación en la laringitis, neumonía y se administra como tratamiento contra la diabetes mellitus. Recientemente se ha encontrado que las cáscaras de *C. cainito* es una fuente

abundante de compuestos triterpénicos entre las que destaca el acetato de lupeol como compuesto mayoritario.^{4,5}

El lupeol posee una estructura susceptible a ser modificado mediante la estrategia DOS para generar derivados con el fin de mejorar las actividades biológicas. El anillo A de lupeol puede sufrir modificaciones de fusión, escisión o expansión lo que permitiría generar librerías moleculares. Por otro lado, las cumarinas también poseen una amplia variedad de propiedades biológicas y farmacológicas como antiinflamatorias, antibióticas y anticancerígenas.⁶

Por todo lo anterior, la presente propuesta plantea la posibilidad de modificar el anillo A del lupeol mediante la fusión de cumarinas para obtener una serie de cumarinas derivadas de lupeol con actividad biológica contra el cáncer de mama.

ANTECEDENTES

Modificaciones estructurales de productos naturales

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades, la atención se ha dirigido tradicionalmente a moléculas con actividades biológicas específicas y a la generación de colecciones de moléculas similares a los fármacos. Algunos métodos para la síntesis y modificación de productos naturales son: la modificación estructural del esqueleto base, el uso de bloques de construcción derivados de productos naturales para síntesis combinatoria, y la síntesis de oligómeros con restricciones quirales y conformacionales.^{1,7}

La modificación estructural del esqueleto base consiste en tomar moléculas pequeñas con diversidad esquelética y estereoquímica con funcionalidades que permitan uniones intramoleculares para sintetizar una variedad de moléculas similares pero con diversas propiedades. Por ejemplo, Kumar *et al.*⁸ sintetizaron un dieno esteroidal que se convierte mediante la reacción de Diels-Alder en un policiclo puente y luego a un biciclo fusionado, conteniendo este último un paraciclofano (**Figura 1**).⁸

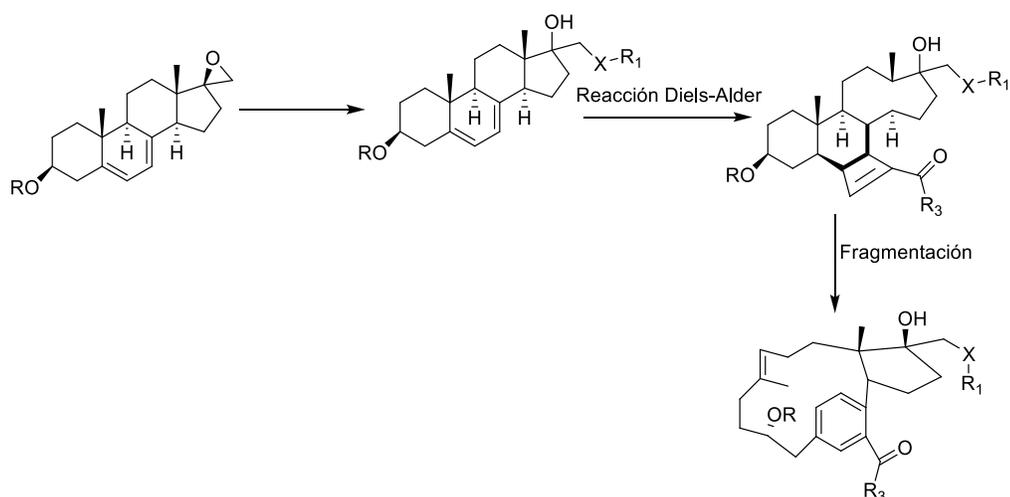


Figura 1. Modificación del esqueleto base para la obtención de paraciclofanos.

El uso de bloques de construcción derivados de productos naturales para síntesis combinatoria, consiste en la fragmentación química de estructuras complejas para obtener las moléculas precursoras que dieron origen a dicha estructura, para posteriormente modificarlos y recombinarlos. Por ejemplo, el sorafeno A fue sometido a una reducción y posteriormente a una sililación del 1,17-diol para originar el *tert*-butildimetilsililo (TBS), finalmente una última reducción proporcionó dos fragmentos precursoros modificados (**Figura 2**).⁹

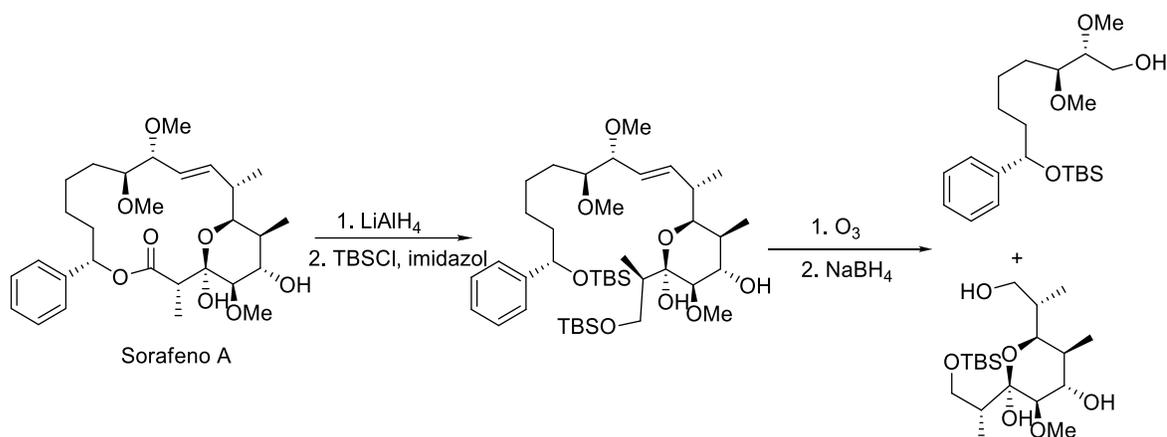


Figura 2. Obtención de los bloques de construcción de Sorafenio A.

La oligomerización es la estrategia sintética mediante el cual la naturaleza deriva moléculas con diversas funciones. Con sólo una pequeña colección de unidades monoméricas, y los procesos de formación de enlaces compatibles con el entorno celular, la unión secuencial o montaje modular (oligomerización) resulta en productos que tienen gran diversidad molecular y funcional. Ejemplo de esto incluye a los polímeros biológicos complejos como proteínas, ácidos nucleicos e hidratos de carbono, así como de moléculas pequeñas de productos naturales (ácidos grasos, policétidos y terpenos). En contraste con lo que ocurre en la naturaleza actualmente esta estrategia es utilizada *in vitro* para la obtención de una diversidad de moléculas, de esta manera se han obtenido compuestos como β -péptidos, peptoides y ácidos nucleicos peptídicos (**Figura 3**).¹⁰

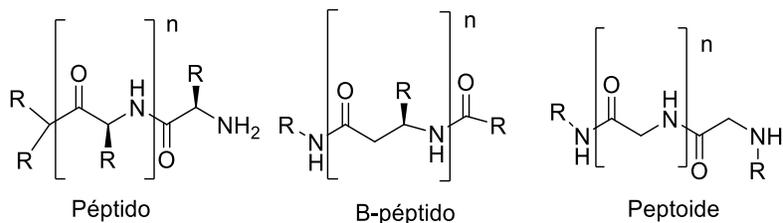


Figura 3. Obtención de péptidos y peptoides por oligomerización.

Una estrategia que recientemente ha tenido auge para llevar a cabo la síntesis de una diversidad de moléculas, tanto simples como complejas, a partir de los productos naturales que pueden ser útiles como fármacos, es la síntesis orientada a la diversidad (DOS), esta estrategia utiliza reacciones quimioselectivas en donde las estructuras de anillo de los productos naturales fácilmente disponibles, se alteran de forma sistemática a través de reacciones que distorsionan el sistema de anillos (por ejemplo, la escisión de anillo, expansión de anillo, fusión de anillo, reordenamientos de anillo y combinaciones de los mismos (**Figura 4**)).¹

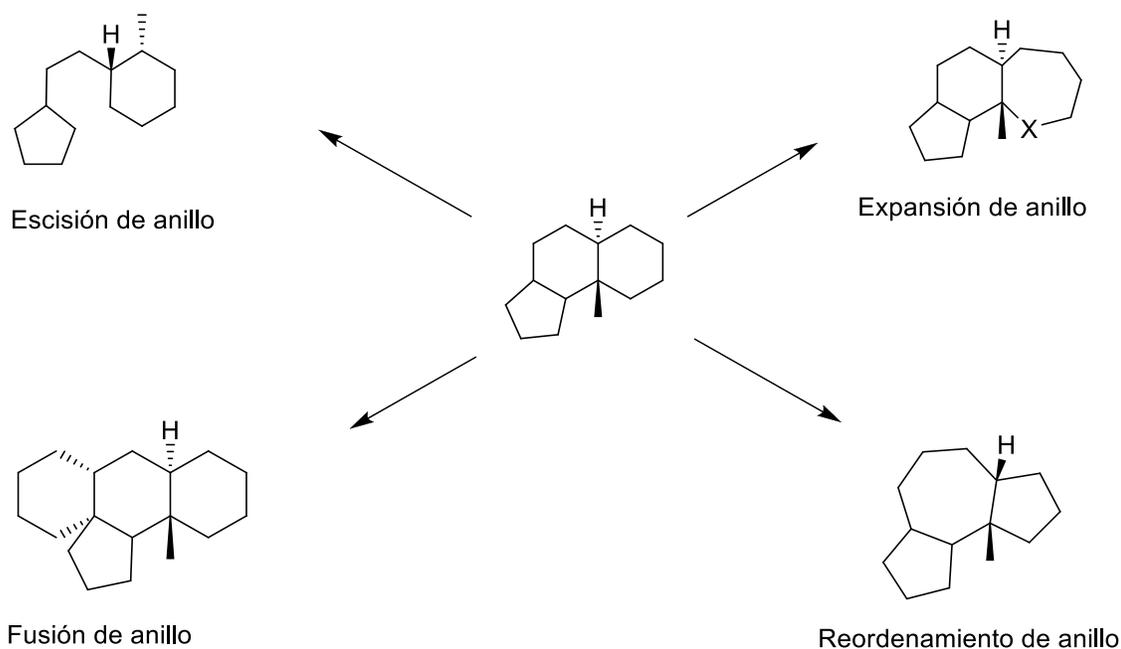


Figura 4. Modificación de productos naturales por distorsión de anillos.

La DOS tiene como objetivo llenar un nuevo espacio químico con moléculas que contienen un alto grado de diversidad estructural. Las bibliotecas derivadas de la estrategia DOS resultantes han sido de gran valor para el descubrimiento de varias moléculas bioactivas y agentes terapéuticos, convirtiendo la DOS en una herramienta esencial en la bioquímica y el descubrimiento de fármacos. Sin embargo, el principal desafío es la forma de diseñar y sintetizar bibliotecas de moléculas con la máxima diversificación molecular. Es así como se ha desarrollado una estrategia derivado de la DOS que se basa en la construcción de bibliotecas de compuestos poliheterocíclicos con una alta relevancia biológica (pDOS). La pDOS tiene como objetivo explorar las regiones bioactivas en el espacio químico mediante el uso de “estructuras privilegiadas” unidas a productos naturales. Una “estructura privilegiada” es una estructura molecular única capaz de proporcionar ligandos de alta afinidad para más de un tipo de receptor. Un ejemplo de “estructura privilegiada” es el benzopirano, el cual ha sido modificado, a su vez con la introducción de más heterociclos para generar mayor diversidad molecular (**Figura 5**).¹¹

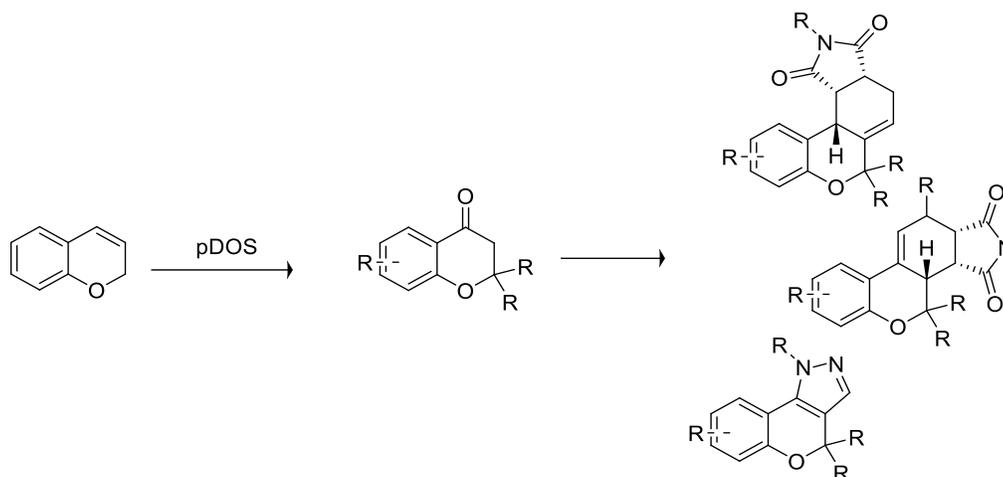


Figura 5. Obtención de moléculas derivadas del benzopirano mediante la fusión de anillos.

Cumarinas como potenciales agentes anticancerígenos

Las cumarinas, que poseen un núcleo de benzopirano, pueden ser utilizadas en la estrategia de fusión de anillos a productos naturales para generar derivados con propiedades biológicas de interés farmacológico.⁶

Las cumarinas (1,2-benzopirona o 2*H*-cromen-2-ona) (**1**) y sus derivados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y muchas de ellas exhiben una amplia diversidad de actividades biológicas. Las cumarinas son metabolitos secundarios presentes en semillas, raíces y hojas de muchas especies de plantas. Algunas cumarinas aisladas de plantas incluyen la warfarina (**2**), umbelliferona (7-hidroxycumarina) (**3**), aesculetina (6,7-dihidroxycumarina) (**4**), herniarina (7-methoxycumarina) (**5**), psoraleno (**6**) e imperatorina (**7**). Se han encontrado derivados de cumarinas con numerosas aplicaciones terapéuticas incluyendo la fotoquimioterapia, terapia antitumoral y anti-VIH, así como estimulantes del sistema nervioso central, actividad antibacteriana, antiinflamatoria y anticoagulante.^{12,13}

El patrón de sustituciones en la estructura química de las cumarinas influye en las propiedades farmacológicas y bioquímicas, incluyendo las aplicaciones terapéuticas. Algunas cumarinas presentan propiedades citostáticas (inhibidores del crecimiento), mientras que otros tienen actividades citotóxicas.¹²

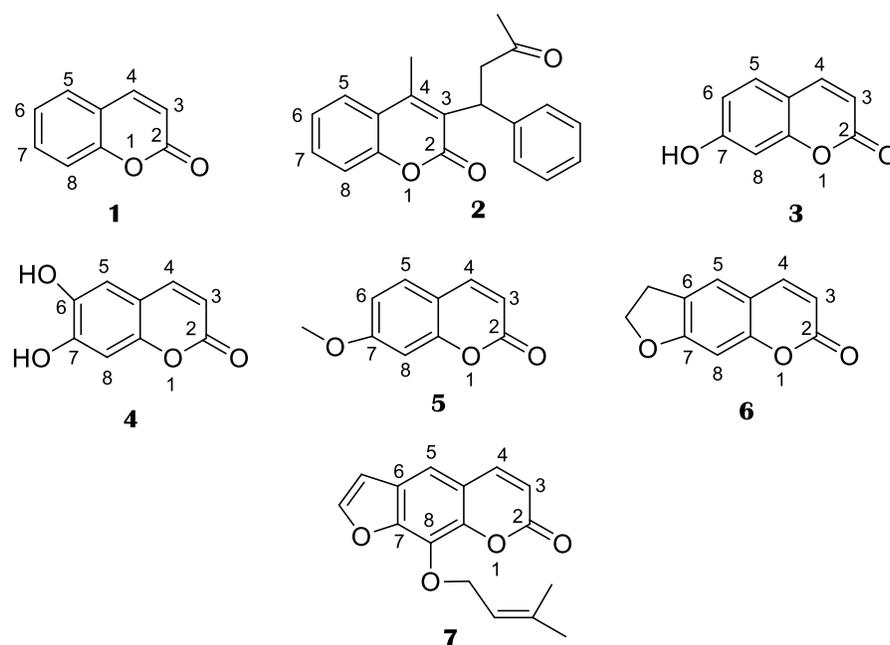


Figura 6. Cumarinas naturales aisladas de plantas con diversas aplicaciones terapéuticas.

Se ha reportado que la 7-hidroxycumarina (umbelliferona), posee actividad citostática en líneas celulares de cáncer humano, tales como A549 (pulmón, $IC_{50}=1.85 \mu M$), A427 (pulmón, $IC_{50}=1 \mu M$) además se ha reportado la actividad contra el cáncer de próstata y carcinoma de células renales metastásico en los ensayos clínicos.^{14,15}

Otros derivados de cumarinas obtenidas sintéticamente con actividad anticancerígena son la 4-(3-bromopropoxi)-2*H*-cromen-2-ona (**Figura 7**) que presenta una marcada inhibición de las líneas celulares MGC-803 (cáncer de estómago, $IC_{50}=47.7 \mu M$) y la 7-(2-bromoetoxi)-2*H*-cromen-2-ona (**Figura 7**) que inhibe el crecimiento de la línea celular MCF-7 (cáncer de mama, $IC_{50} 48.3 \mu M$).¹⁶



7-(2-bromoetoxi)-2*H*-cromen-2-ona

4-(3-Bromopropoxi)-2*H*-cromen-2-ona

Figura 7. Cumarinas sustituidas en posiciones C7 y C4 con actividad anticancerígena.

Se ha demostrado que las hidroxycumarinas con un grupo nitro en el anillo aromático son agentes antiproliferativos selectivos que median la apoptosis en las células de carcinoma

renal, a través de la modulación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos. Además se ha encontrado que la antimutagenicidad de esta clase de compuestos se relaciona con la presencia de funciones polares en los carbonos 3, 4 y 7. Un derivado que resulto activo es la 8-nitro-7-hidroxicumarina (**Figura 8a**) mostrando citotoxicidad en las líneas celulares K562 (eritroleucemia humana, $IC_{50}=475 \mu M$) y EJ (carcinoma de vejiga humana, $IC_{50}=880 \mu M$), además de actividad antiproliferativa en las líneas K562 ($IC_{50}=100 \mu M$) y HL-60 (leucemia promielocítica humana, $IC_{50}=100 \mu M$).¹⁷⁻¹⁸

Otra cumarina con actividad citotóxica es la *N*-(8-aminooctil)-4-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida (**Figura 8b**) que fue activo contra las líneas celulares de cáncer de próstata DV 145 ($GI_{50}<10 \mu$), los grupos polares en la posición 3 de la cumarina son importantes para la actividad citotóxica.¹⁹

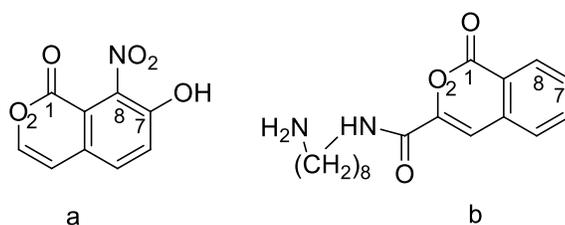


Figura 8. Cumarinas sustituidas con actividad citotóxica: a) 8-nitro-7-hidroxicumarina, b) *N*-(8-aminooctil)-4-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromeno-3-carboxamida.

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8.8 millones de defunciones. El cáncer es la tercera causa de muerte en México, con 12% de todas las defunciones. Las principales neoplasias causantes de muerte en nuestro país son: cáncer de pulmón, mama, colorrectal, próstata y estómago. Cada año se estiman 148 mil nuevos casos de cáncer (65.5 mil en hombres y 82.4 mil en mujeres). El cáncer de mama es el más frecuente, se estima que ocurren 15 decesos al día por este tipo de cáncer. Investigaciones recientes informan de que aproximadamente un tercio de los pacientes con cáncer de mama posmenopáusicas tienen tumores dependientes de hormonas que implican la estimulación del receptor de estrógeno.^{12,20}

Los estudios clínicos que se centran en el uso de agentes terapéuticos que previenen la síntesis y la acción de los estrógenos (antagonistas ER) son muy exitosos en el tratamiento del cáncer de mama. La estrategia actual implica, por lo tanto, el desarrollo de antagonistas de ER como un nuevo enfoque para el tratamiento de mujeres posmenopáusicas con tumores de mama dependientes de hormonas. Los altos niveles de estrógeno como resultado de su síntesis *in situ* están asociados con el crecimiento de tumores en tejidos dependientes de endocrinos. Los estrógenos se forman

exclusivamente en tejidos periféricos, y existen dos vías asociadas con su síntesis en dichos tejidos, las vías de la aromatasa y sulfatasa.¹²

La vía de la aromatasa implica la conversión del precursor de andrógenos, androstenediona, secretada principalmente por la corteza suprarrenal, a la estrona por el complejo enzimático de la aromatasa (AR), mientras que la vía de la estrona sulfatasa (E1-STS) implican la conversión de la estrona formada a través de la ruta de la aromatasa a estrona sulfato (E1S) por las enzimas sulfotransferasas. En los tumores de mama, la actividad de esta última enzima es mayor que la de la anterior, lo que resulta en un mal pronóstico. La vía E1-STS se considera la fuente principal que conduce a la formación de estrógenos, lo que causa una baja tasa de respuesta en pacientes con tumores de mama ER+ a un inhibidor de AR altamente potente. Además, los estudios han demostrado que la terapia endocrina que involucra la inhibición de enzimas dentro de la cascada biosintética de esteroides puede ser una vía para controlar la enfermedad. Este enfoque ha llevado al desarrollo de nuevas cumarinas como STS, así como inhibidores de AR.¹²

Los inhibidores de la aromatasa (IA) incluyen medicamentos que se usan actualmente para el tratamiento del cáncer de mama dependiente de hormonas, que implica el bloqueo de la acción del estrógeno en las células tumorales al prevenir la biosíntesis del estrógeno. La IA previene el cáncer de mama mediante la reducción de la proliferación celular, que implica la reducción del nivel de estrógeno y, por lo tanto, la prevención de la formación de metabolitos genotóxicos del estrógeno. En mujeres posmenopáusicas, los IA tienen el potencial de suprimir los niveles de estrógeno circulante en aproximadamente >96.7-98.9% y también anular la producción de estrógenos autocrinos y paracrinos por las células estromales peritumorales ubicadas en sitios primarios y metastásicos del tumor.¹²

Varios derivados de cumarinas son inhibidores esteroidales de STS y se evaluaron para la terapia del cáncer de mama; sin embargo, todavía no se ha demostrado una clara evidencia de IA como agente antineoplásico para el cáncer. Los estudios han demostrado que los sustratos de benzopirano, como la 4-bencil-3-(4'-clorofenil)-7-metoxi-cumarina, son un IA competitivo más potente que varios IA conocidos, como la aminoglutetimida, con respecto al sustrato de andrógenos (**Figura 9**). La interacción específica con la AR muestra una reducción adicional por varias mutaciones en la unión en la región activa del sitio de AR. Además, la 4-bencil-3-(4'-clorofenil)-7-metoxi-cumarina suprimió la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 ($IC_{50}=0.08 \mu\text{M}$) positivas para AR y ER. No es citotóxico en concentraciones de hasta $40 \mu\text{M}$, no es un inhibidor de la esteroide 5α -reductasa y tampoco es un ligando de REs, $ER\alpha$ y $ER\beta$, o receptor de andrógenos.¹²

Los derivados de cumarinas 3,4,7 trisustituidas, son potentes inhibidores de la aromatasa, pueden no ser citotóxicos, pero pueden ser útiles en la supresión de los tumores de mama AR y ER positivos. Los estudios SAR de la 4-bencil-3-(4-clorofenil)-7-metoxi-cumarina revelaron que los anillos de la cumarina imitan los anillos A y B, mientras que el grupo 3-(4-clorofenilo) imita el anillo D de la androstenediona (**Figura 9**). El grupo carbonilo de la lactona es determinante en la actividad inhibitoria de las cumarinas. Además, se requieren interacciones lipofílicas π - π de un grupo fenoxi o benciloxi.¹²

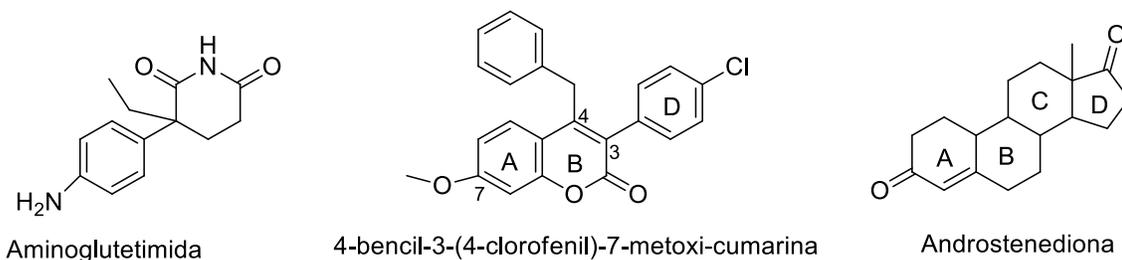


Figura 9. Farmacóforo propuesto para cumarinas inhibidoras de la aromatasa (AR) basados en la androstenediona.

Durante las últimas décadas, la aplicación de bioconjugados (es decir, biomoléculas con estructuras orgánicas no naturales) en biología molecular y celular ha aumentado significativamente. Los estudios han demostrado que el acoplamiento del agente citotóxico con las hormonas esteroideas mejora la actividad antitumoral y la selectividad diana del conjugado como resultado de una unión suficiente al RE, permitiendo la acumulación selectiva de los conjugados en las células ricas en RE.¹²

Recientemente se han obtenido cumarinas conjugadas como la 3-(((17-hidroxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-il)oxi)metil)-2*H*cromen-2-ona (**8**), 3-(((17-hidroxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-il)oxi)metil)-8-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (**9**) y (E)-3-(((17-(hidroxiimino)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-il)oxi)metil)-8-metoxi-2*H*-cromen-2-ona (**10**). Las comparaciones de los valores de GI50 entre los conjugados mostraron que el conjugado **8** tiene la actividad antiproliferativa más alta contra las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-435 mientras que los conjugados **9** y **10** mostraron las actividades antiproliferativas más altas contra MDA-MB-231/ATCC. En cuanto a la distinción entre líneas celulares de cáncer de mama no invasivas e invasivas, el conjugado **9** parece ser activo contra ambos tipos, mientras que el conjugado **8** tiene la menor actividad inhibitoria contra las líneas celulares no invasivas MDA-MB-231/ATCC y NCI-7/ADR-RES entre los conjugados. En general, se demostró que la citotoxicidad se produjo en alrededor de 100 μ M para todos los conjugados. También se observó que el conjugado **10** mostró la mayoría de las propiedades citostáticas.¹²

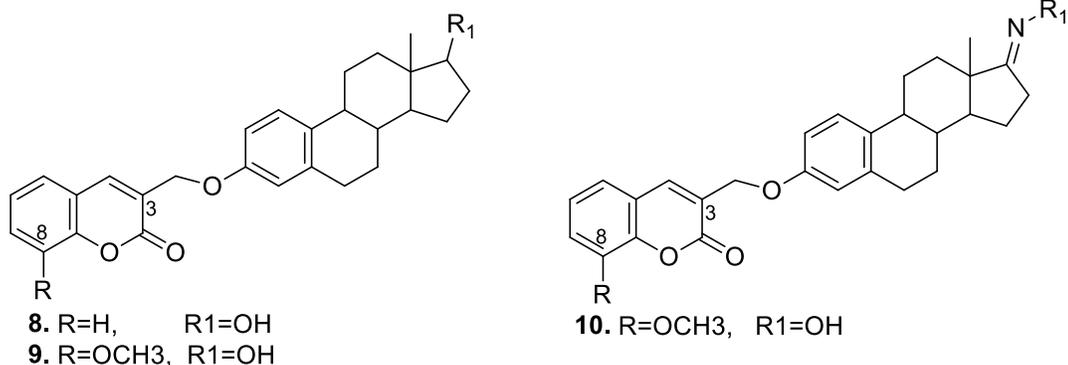


Figura 10. Estructuras de conjugados cumarina-estradiol con actividad biológica contra el cáncer de mama.

Debido a las propiedades de las cumarinas son ampliamente utilizadas en productos farmacéuticos así como en aditivos de alimentos, perfumes, cosméticos y agroquímicos; lo que ha aumentado el interés por su síntesis. Existen diferentes rutas sintéticas para la obtención de cumarinas y sus derivados, las más conocidas incluyen las reacciones de Pechmann, Perkin y Wittig.²¹

La reacción Pechmann es el método más usado para sintetizar cumarinas, ya que implica la condensación de fenoles con ésteres β -cetónicos en presencia de una variedad de agentes de condensación ácidos en exceso (ácido sulfúrico, pentóxido de fósforo, ácido trifluoroacético, entre otros) obteniéndose buenos rendimientos de cumarinas 4-sustituidas (**Figura 11**). La reacción de Pechmann se ha realizado con éxito usando radiación de microondas y en líquidos iónicos como alternativas a los métodos convencionales.²²

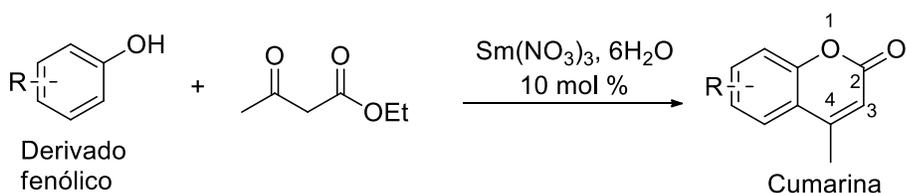


Figura 11. Reacción de Peachman para la síntesis de cumarinas 4-sustituidas.

La reacción de Perkin es útil para la síntesis de ácidos aromáticos [α , β] insaturados y consiste en la condensación de un anhídrido de ácido carboxílico con un aldehído aromático en presencia de una base débil como acetato de sodio o potasio o trietilamina. Este método se utiliza para la obtención de cumarinas no sustituidas generadas por la reacción de un salicilaldehído, acetato de sodio y anhídrido acético (**Figura 12**).²³

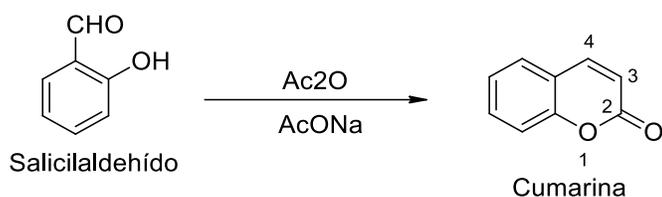


Figura 12. Reacción de Perkin para síntesis de cumarinas no sustituidas.

La reacción de Wittig es un método sintético efectivo para la obtención de cumarinas monosustituidas en posiciones 5, 6, 7 y 8, este método involucra la reacción de salicilaldehído con carboximetilentrifenilfosforano ($\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$) en *N,N*-dietilanilina (Et_2NPh) bajo reflujo (**Figura 13**).²⁴

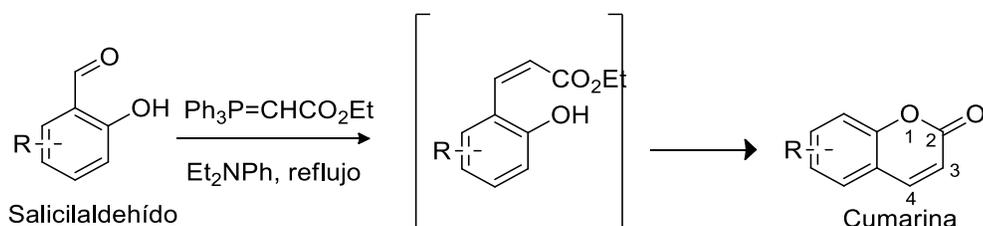


Figura 13. Reacción de Wittig para la síntesis de cumarinas monosustituidas en el anillo aromático.

Reacciones Dominó

La química orgánica sintética, en particular, ha centrado su atención durante muchos años en los productos naturales, debido al interés social que despiertan por su amplio campo de aplicaciones, sobre todo en la medicina y la biología. Sin embargo, la síntesis total, pese a los éxitos logrados hasta la fecha, todavía no ha alcanzado el nivel de perfección de la naturaleza. Si se observa el progreso de las metodologías empleadas en la obtención de los productos naturales, se comprueba un empleo frecuente de grupos protectores, y de transformaciones químicas que requieren de una purificación en cada una de las etapas sintéticas. Ambos factores, unidos a un número relativamente grande de pasos sintéticos, contribuyen a disminuir su eficiencia, incrementándose los residuos obtenidos y reduciéndose, en muchos casos de forma drástica, el rendimiento del proceso global.^{25,26}

La “síntesis ideal” de un compuesto dado debe llevarse a cabo en una sola operación sintética con un rendimiento del 100%, a partir de sustancias de partida asequibles y sin generar residuos. Además, debe ser sencilla, segura, económicamente aceptable y respetuosa con el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de que hoy en día se ha alcanzado un nivel de sofisticación en cuanto a la síntesis de compuestos, aún se está lejos de llegar a la síntesis ideal. No obstante, se han desarrollado rutas sintéticas que

intentan cumplir con algunos aspectos de la síntesis ideal, tratando de imitar a la naturaleza. Una de las rutas sintéticas que han tenido auge en los últimos años son las reacciones dominó o en cascada.²⁷

Una reacción dominó es aquella en la que se producen dos o más transformaciones químicas de forma consecutiva, sin que ello suponga la adición de más reactivos o catalizadores. Es decir, aquella en la que la formación de una especie inicial dé lugar a las sucesivas transformaciones que conducen al producto final. Las ventajas de utilizar este tipo de reacciones es el ahorro de tiempo, trabajo, reactivos y la menor generación de residuos.^{25,26}

En 1901 Willstätter sintetizó el alcohol tropino a partir de su cetona en forma de tropinona, que en ese momento era difícil de sintetizar. La síntesis complicada de Willstätter de tropinona (un intermediario para sintetizar alcaloides como la cocaína) a partir de cicloheptanona requirió 15 pasos y tuvo un rendimiento general de 0.75%. Años más tarde en 1917 Robinson aportó quizás el trabajo base de las reacciones dominó, con la síntesis de la tropinona basada en dos reacciones de Mannich sucesivas y que implicaba la formación de dos ciclos y cuatro nuevos enlaces (**Figura 14**) con un rendimiento del 40% en sus primeros intentos, con el paso de los años se mejoró hasta un 90%.^{28,29}

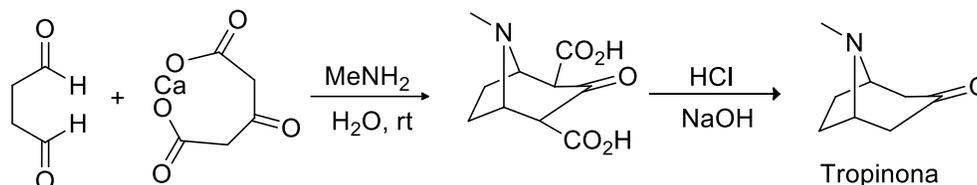


Figura 14. Síntesis de la tropinona llevado a cabo por Robinson mediante una reacción dominó.

Hacia el año de 1971 se produjo la aportación más intuitiva de los procesos dominó cuando Johnson y colaboradores dieron a conocer la síntesis de la progesterona, que obtuvieron mediante un proceso dominó basado en intermediarios carbocatiónicos, con lo que se hacen patentes las ventajas de este tipo de metodología sintética (**Figura 15**). En una única etapa, se consigue la formación del esqueleto tetracíclico de la progesterona mediante un procedimiento experimental sencillo, y lo más importante, con estereoquímica definida (se generan seis nuevos estereocentros, de los cuales, solo uno no posee una configuración estereoquímica definida).²⁶

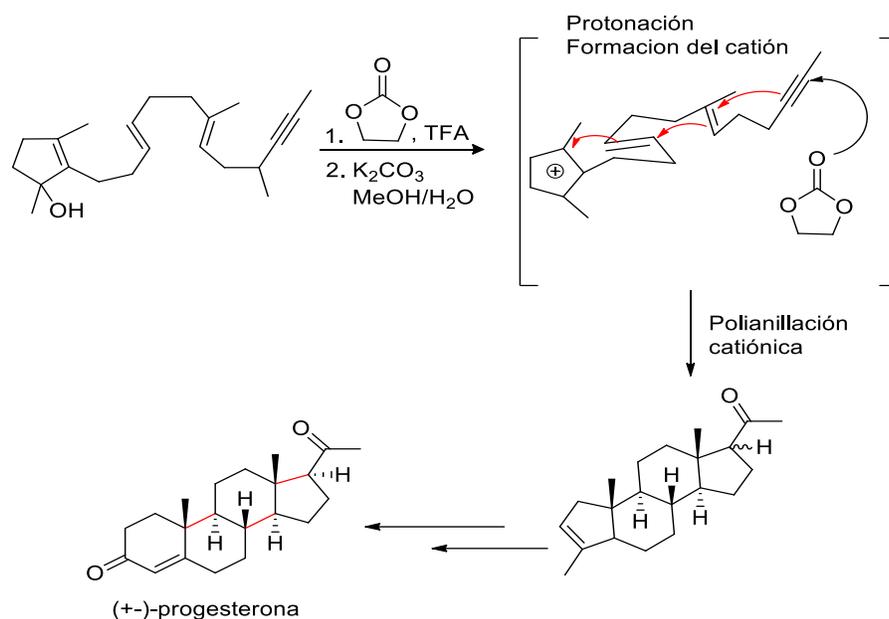


Figura 15. Anillación Dominó mediante intermedios catiónicos diseñada por Johnson para la síntesis de progesterona.

Los salicilaldehídos, son un importante bloque de construcción para la preparación de flavonoides, cumarinas, cromenos, catecoles y micotoxinas. Por ello son utilizados en las reacciones de Perkin y Wittig para la obtención de cumarinas. Sin embargo, en años recientes se han desarrollado nuevas metodologías para la síntesis de cumarinas mediante reacciones dominó. Los salicilaldehídos pueden ser sintetizados a partir de propargil vinil éteres (PVEs) funcionalizados, mediante una reacción dominó promovido por microondas. A su vez, las cumarinas pueden ser sintetizadas mediante una segunda reacción dominó utilizando salicilaldehídos y derivados carbonílicos. En esta reacción ocurre una condensación Knoevenagel y posteriormente una lactonización. Así, a partir de dos procesos dominó consecutivos se pueden obtener cumarinas 3,5,8-sustituidas (**Figura 16**).^{30,31}

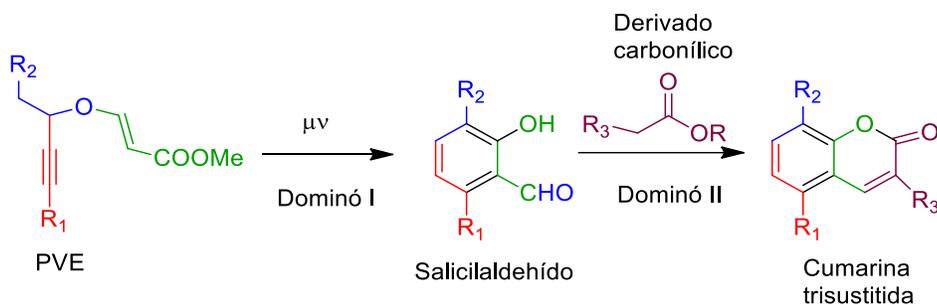


Figura 16. Síntesis de cumarinas 3,5,8-trisustituidas mediante reacciones Dominó a partir de PVEs funcionalizados.

El patrón de sustitución que implican las posiciones C3, C5 y C8 apenas es representativo en las cumarinas naturales, así como en las sintéticas, y sus actividades biológicas no han sido estudiadas a fondo, esto debido al difícil acceso a esta familia de cumarinas tri-sustituidas por metodologías de síntesis estándar. Por lo que las reacciones dominó resuelven en gran manera el problema, permitiendo la obtención de cumarinas tri-sustituidas diversificando este tipo de moléculas, permitiendo el estudio de las posibles actividades biológicas que pudieran presentar.³¹ En la **Tabla 1** se sintetizan las ventajas y desventajas de los diferentes métodos para la síntesis de cumarinas.

Tabla 1. Comparación de las diferentes reacciones para la síntesis de cumarinas.

Reacción	Ventajas	Desventajas
Pechmann	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempos de reacción relativamente cortos 20 a 90 min depende de la sustitución del fenol. 2. Se requiere temperaturas de 75-15 °C. 3. Rendimientos de 45-98% 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Requiere catalizadores ácidos como H₂SO₄, P₂O₅, AlCl₃, TFA en exceso o catalizadores como Sm(NO₃)₃.6H₂O y BiCl₃. 2. Solo se obtienen cumarinas sustituidas en posición 4 con grupos OH o MeO en posiciones C5, C6 y C7.
Perkin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solo se requiere de salicilaldehídos simples y anhídrido acético. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solo se obtienen cumarinas simples (no sustituidas). 2. Tiempos de reacción largos (6 horas aprox.) 3. Se requiere temperaturas por encima de 180 °C. 4. Rendimientos de 10-53%.
Wittig	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempos de reacción de 15 min a 6 horas dependiendo de los sustituyentes del salicilaldehído. 2. Se puede dirigir la sustitución de la cumarina en las posiciones C5, C6, C7 y C8. 3. Rendimientos de 59-96% 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se requieren altas temperaturas, 210-215 °C. 2. Solo se obtienen cumarinas monosustituidas.
Dominó	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempos de reacción de una hora utilizando microondas. 2. Se pueden utilizar salicilaldehídos 3,6-disustituidos. 3. Se obtienen cumarinas 3,5,8-trisustituidas. 4. Se requieren cantidades pequeñas de disolventes y reactivos. 5. Se puede realizar la reacción desde el PVE hasta la cumarina sin necesidad de purificar los intermediarios, ahorrando tiempo y trabajo de purificación. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempos de reacción variables de 2 a 16 horas por reflujo, dependiendo de la reactividad del derivado carbonílico. 3. Rendimientos variables de 30-70%.

El Lupeol como molécula privilegiada

El lupeol es un triterpeno pentacíclico que ha sido aislado en diversas familias de plantas incluso en propóleos; la pulpa de mango, las raíces de zanahorias, las semillas de soya, melón y las plantas de aloe. Generalmente el lupeol se encuentra en las plantas en forma de acetato (**Figura 17**).³²

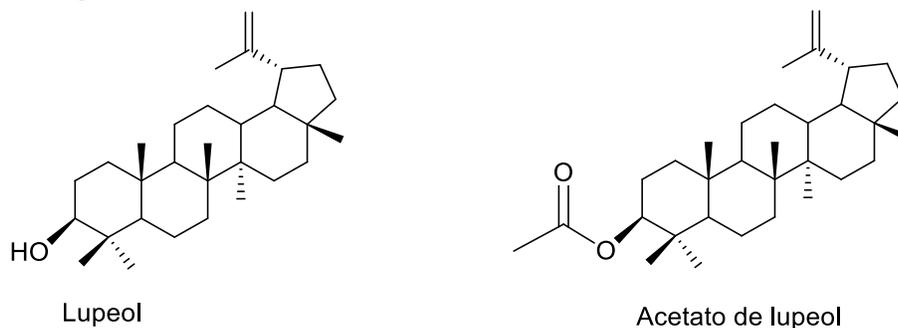


Figura 17. Estructuras químicas de los triterpenos pentacíclicos lupeol y acetato de lupeol.

Una de las actividades biológicas más importantes del lupeol es su marcada actividad antiinflamatoria, por ejemplo, inhibe la actividad de lipoxigenasas causantes del asma (15-sLO, IC₅₀=35 μM). Además, el tratamiento con lupeol (10-100 μM) muestra un decrecimiento en la generación de citoquinas pro-inflamatorias tales como el factor α de necrosis tumoral (TNFα) que se asocia al cáncer.³³

Recientemente se han llevado a cabo estudios para investigar la relación estructura-actividad de lupeol en diversas líneas celulares de cáncer humano. Un estudio realizado demostró que induce la apoptosis de líneas celulares HL-60 asociadas a las células de leucemia humana. Este estudio mostró que el lupeol induce la formación de núcleos hipodiploides y fragmentación de ADN (una característica de la apoptosis) de una manera dependiente de la dosis y el tiempo. Otros estudios, mostraron que el lupeol induce la muerte de líneas celulares de cáncer de diversos orígenes histopatológicos, incluyendo leucemia linfoblástica T-CEM (IC₅₀=50 μM), carcinoma de pulmón A-549 (IC₅₀=50 μM), mieloma múltiple RPMI 8226 (IC₅₀=50 μM), el carcinoma cervical HeLa (IC₅₀=37 μM), y G361 de melanoma maligno (IC₅₀=50 μM).³³

Se ha reportado que el lupeol posee actividad antiproliferativa en líneas celulares MCF-7 (IC₅₀=2.32 μM) y MDA-MB-231 (IC₅₀=4.47 μM) asociados al cáncer de mama inhibiendo la enzima aromatasas (AR).³⁴

El acetato de lupeol muestra actividades biológicas similares a los de lupeol pero con mejor biodisponibilidad. Este triterpeno presenta actividad antiinflamatoria mediante la regulación de TNF-alfa e IL-2 mRNA específico, además de la regulación positiva de la

síntesis de IL-10 Mrna en estudios realizados en la especie *Himatanthus drasticus*. Estudios preliminares han demostrado que el acetato de lupeol puede ser eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide.^{35,36} Otra característica que destaca del lupeol es su selectividad ya que se ha demostrado que no exhibe toxicidad en células y tejidos normales aún a dosis altas.³³

Debido a que el lupeol posee una gran variedad de actividades biológicas y que su estructura permite modificaciones en el anillo A y en el doble enlace exocíclico, además de su selectividad, se puede considerar como una molécula privilegiada (**Figura 18**).^{32,37} Las propiedades calculadas a partir de la estructura de lupeol muestran que tiene un peso molecular de 426.7174 (g /mol), un donador de H, un aceptor de H, masa exacta 426.386166 y 10 centros estereogénicos definidos.³³ La estrategia DOS de fusión de anillo puede aplicarse a la molécula de lupeol para generar derivados con posibles mejoras en las actividades antiinflamatorias y anticancerígenas.¹

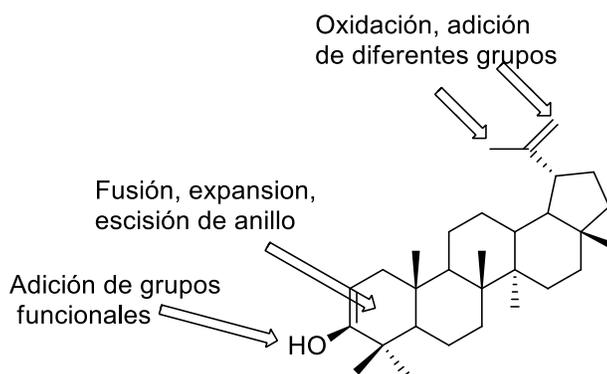


Figura 18. Sitios de las posibles modificaciones de lupeol para la generación de derivados.

Algunas modificaciones en el anillo A de lupeol mediante la fusión de anillos incluyen la fusión de anillos de indol y pirazina para mejorar la actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO). El óxido nítrico (NO) es una citosina que actúa como mediador proinflamatorio y, a baja concentración, regula la homeostasis fisiológica en el sistema cardiovascular. La sobreproducción de NO por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) generalmente destruye los tejidos funcionales normales durante la inflamación aguda y crónica. Los derivados indólicos **11** y **12** fueron activos a $IC_{50}=27.8 \mu M$ y $IC_{50}=25.9 \mu M$ respectivamente, mientras que los derivados **13** y **14** fueron activos a $IC_{50}=23.9 \mu M$ y $IC_{50}=22.6 \mu M$ respectivamente, el derivado de pirazina **15** fue activo a $IC_{50}=25.9 \mu M$. Todos los derivados fueron evaluados sobre células RAW 264.7 y presentaron citotoxicidad.³⁸

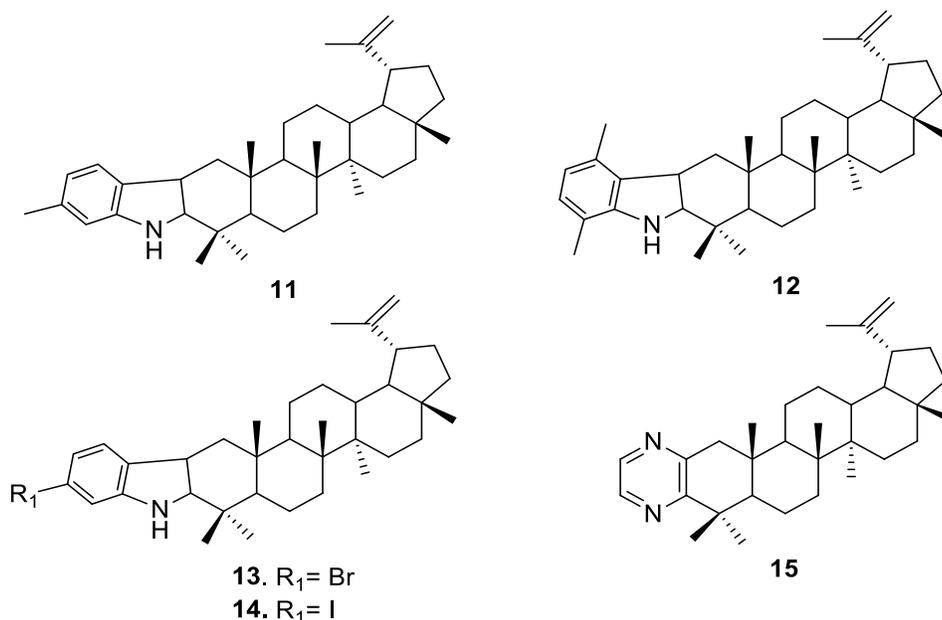


Figura 19. Derivados indólicos y de pirazina con actividad antiinflamatoria fusionados al anillo A de lupeol.

En investigaciones recientes se ha propuesto optimizar la estructura química de lupeol, mediante estudios Docking, para aumentar la afinidad de los derivados contra los receptores ER- α y HER2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) asociados al cáncer de mama dependientes de estrógenos. Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que el derivado de lupeol con un grupo amino (**Figura 20 a**) y un grupo etilo (**Figura 20 b**) en la posición C3 proporciona la mayor afinidad con una energía libre de enlace y constante de disociación -12.24 kcal/mol y 1.07 nM para ER- α así como -9.63 kcal/mol y 86.94 nM para HER2, respectivamente. La modificación de la posición C3 con grupos más lipófilos tiene el potencial de aumentar aún más la afinidad de los derivados de lupeol, por lo que se abre camino a potenciales modificaciones en el anillo A de lupeol.³⁹

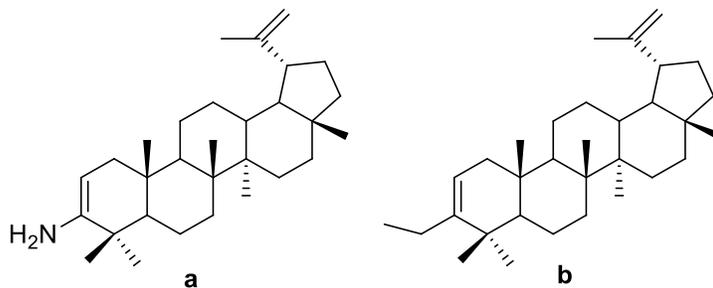


Figura 20. Derivados de lupeol propuestos con posible actividad contra receptores ER- α y HER2.

Las microondas en la síntesis química

La química de microondas implica el uso de radiaciones de microondas para realizar reacciones químicas, y esencialmente se refiere al análisis químico y a la síntesis química. Las microondas se encuentran en el espectro electromagnético entre las ondas infrarrojas y las ondas de radio. Tienen longitudes de onda entre 0.01 y 1 metro, y operan en un rango de frecuencia entre 0.3 y 30 Ghz. Sin embargo, para su uso en reacciones de laboratorio, se prefiere una frecuencia de 2.45 Ghz, ya que esta frecuencia tiene la profundidad de penetración adecuada para las condiciones de reacción de laboratorio. Más allá de 30 Ghz, el rango de frecuencia de microondas se superpone con el rango de frecuencia de radio.^{40,41}

El mecanismo de calentamiento por microondas implica la agitación de moléculas polares o iones que oscilan bajo el efecto de un campo eléctrico o magnético oscilante. En presencia de un campo oscilante, las partículas intentan orientarse con el campo. Sin embargo, las fuerzas de resistencia como la interacción entre partículas y la resistencia eléctrica restringe el movimiento de las partículas, por lo tanto, se convierten en movimientos aleatorios que a su vez generan calor.^{40,41}

Las moléculas polares son el material ideal para el método de polarización dipolar. Al exponerse a un campo electromagnético oscilante de frecuencia apropiada, las moléculas polares intentan seguir el campo y alinearse en fase con el campo. Sin embargo, debido a las fuerzas intermoleculares, las moléculas polares experimentan inercia y son incapaces de seguir el campo. Esto resulta en el movimiento aleatorio de las partículas, que a su vez genera calor. La polarización dipolar puede generar calor mediante la interacción entre moléculas de solventes polares tales como agua, metanol y etanol y/o por la interacción entre moléculas de soluto polar como el amoníaco y el ácido fórmico.⁴⁰

En un proceso de calentamiento tradicional el calor pasa de fuera del recipiente hacia el interior de forma que la temperatura más elevada se encuentra en la zona cercana a las paredes (más cercana a la fuente de calor) y se va difundiendo hacia la disolución y los reactivos lo que lleva a tiempos más largos de calentamiento. En un proceso de calentamiento por microondas la radiación incide directamente en las moléculas del interior del medio, produciéndose un calentamiento interno que conduce a un aumento rápido de la temperatura que se propaga de dentro hacia fuera (**Figura 21**), esto implica la excitación solo del disolvente y las partículas de soluto, lo que resulta en un calentamiento uniforme del disolvente. Esta característica resulta vital en el procesamiento de múltiples reacciones simultáneamente como las reacciones en cascada o en reacciones de ampliación que requieren condiciones de calentamiento idénticas.^{40,41}

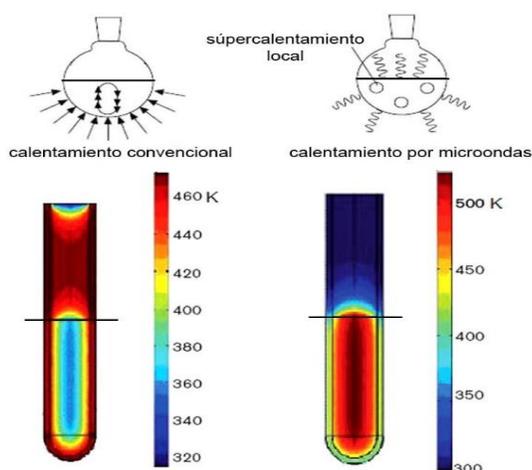
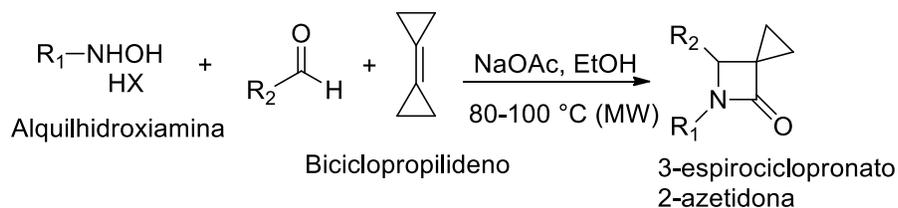


Figura 21. Propagación de la temperatura por calentamiento convencional y por microondas.

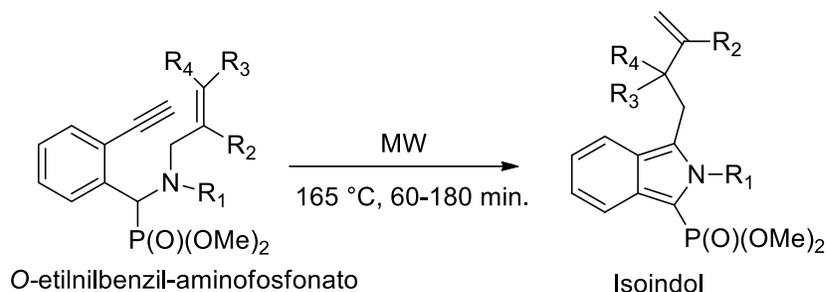
Las reacciones promovidas por radiación de microondas resultan útiles en reacciones de anillación, por ejemplo en las reacciones de anillación de tipo Friedel-Crafts para la obtención de isoquinolinas, las microondas al ser absorbidas selectivamente ya sean por el disolvente, el sustrato o ambas, acelera el tiempo de reacción y se obtienen mayores rendimientos (38%-79%) comparado con el calentamiento convencional (18%-41%).⁴²

En años recientes la síntesis dominó asistida por microondas, ha cobrado auge debido a que se obtienen productos en tiempos de reacción cortos y con mejores rendimientos comparados con el calentamiento convencional. Por ejemplo, en una reacción Dominó asistida por microondas de tres componentes (clorhidratos de alquilhidroxilamina con formaldehído o un alquil glioxilato y biciclopropilideno) para proporcionar 3-espirociclopropanato 2-azetidonas en presencia de acetato de sodio en etanol durante 15-120 min proporcionó las β -lactamas con un rendimiento de 49% a 78% (**Esquema 1**). Mientras que con el calentamiento tradicional a 45 °C, la cicloadición 1,3-dipolar de la N-metil-C-(etoxicarbonil)nitrona en biciclopropilideno requiere 16 días, y solo se generaron espirociclopropanatos piperidonas.⁴³



Esquema 1. Reacción Dominó asistido por microondas para la obtención de espirociclopropanato 2-azetidonas.

Otro ejemplo de reacciones Dominó son las anillaciones de reordenamiento como las reacciones a alta temperatura de los *o*-etilnilbencil-aminofosfonatos para producir isoindoles mediante calentamiento por microondas con rendimientos del 40%-98% a 165 °C durante 60-80 minutos. El mecanismo de reacción propuesto incluye una adición, el desplazamiento [1,3]-alquilo y la aromatización basada en el desplazamiento [1,5]-H (**Esquema 2**).⁴³



Esquema 2. Anillación de reordenamiento a alta temperatura para la obtención de isoindoles.

Las reacciones dominó proporcionan una alta complejidad molecular. Además de la economía de formación de enlaces (múltiples formaciones de enlaces carbono-carbono o heteroátomo). La reacción dominó asistida por microondas tiene intrínsecamente las siguientes ventajas: la rápida optimización de los procedimientos, la alta selectividad y eficiencia de la reacción, el patrón de reacción consecutivo, la economía de la estructura (complejidad estructural), y es amigable con el medio ambiente.⁴³

Por lo tanto, la combinación de calentamiento por microondas y reacciones dominó abre numerosas opciones para idear nuevas metodologías de síntesis sostenibles en química orgánica que están orientadas a la diversidad molecular aumentando la complejidad de las librerías moleculares lo que a su vez generan posibles moléculas con aplicaciones biológicas.⁴³

HIPÓTESIS

Es posible la obtención de cumarinas 3,5 sustituidas fusionadas al anillo A de lupeol potencialmente activas contra células de cáncer de mama a partir de PVEs funcionalizados mediante reacciones dominó promovidos por microondas.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente la estrategia DOS tiene un gran valor en la química y bioquímica, debido a que es una herramienta esencial en la síntesis de moléculas bioactivas con aplicaciones farmacológicas. Una de las ventajas DOS es la obtención de una diversidad de moléculas parecidas a los fármacos a partir de la modificación de los productos naturales disponibles lo que permite la construcción de bibliotecas moleculares. Otra ventaja es que permite la identificación de compuestos bioactivos.

El lupeol y las cumarinas trisustituidas tienen actividades biológicas importantes como antiinflamatorios y anticancerígenos, se ha demostrado que ambas moléculas presentan actividad contra células de cáncer de mama. El mecanismo de acción de ambas moléculas consiste en la inhibición de la aromatasa que restringe la producción de estrógenos causantes del cáncer de mama. Además estas moléculas poseen estructuras susceptibles a ser modificadas. Una de las estrategias DOS que puede ser utilizado en estas moléculas es la fusión de anillos, por lo que se plantea que a partir del anillo A del lupeol es posible fusionar cumarinas 3,5 sustituidas, usando PVEs que son fácilmente sintetizados a partir de derivados de carbonilos mediante reacciones dominó.

Las cumarinas 3,5 sustituidas no han sido estudiadas a fondo debido a que son difíciles de sintetizar por métodos convencionales. Sin embargo, algunas cumarinas trisustituidas han mostrado ser activas contra células de cáncer. Por lo que las reacciones dominó abren camino para la obtención de estos derivados que pueden ser potencialmente activos contra células de cáncer de mama al estar fusionados en el anillo A de lupeol.

OBJETIVO GENERAL

Obtener una serie de cumarinas sustituidas en posiciones 3,5 fusionadas al anillo A de lupeol que sean potencialmente activas contra células de cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener acetato de lupeol del extracto metanólico de las cáscaras maduras del fruto de *Chrysophyllum cainito*.
- Obtener lupenona a partir de la hidrólisis y oxidación de acetato de lupeol.
- Modificar la lupenona hasta transformarla en tres diferentes propargilviniléteres de lupeol, a partir de alcoholes propargílicos.
- Sintetizar nueve cumarinas a partir de los tres propargilviniléteres lupánicos obtenidos mediante dos reacciones dominó consecutivas.
- Evaluar la actividad biológica contra células de cáncer de mama.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los disolventes empleados para la extracción, separación y purificación fueron destilados en el laboratorio previamente a su uso.

Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatofolios de aluminio impregnados de gel de sílice de GF254 de 0.25 mm de grosor marca Merck. Para la purificación de los compuestos se utilizó cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice para CCD grado estándar sin aglutinante con tamaño de partícula 2-25 μm y tamaño de poro de 60 Å marca Aldrich. Los agentes reveladores utilizados fueron UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm) y óleum (ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico en proporciones 20:4:1).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se obtuvieron utilizando un equipo de RMN Bruker modelo Ultrashield Avance 400 de 400 MHz con una sonda BBO de 5 mm en solución de cloroformo deuterado.

Los espectros de masas (EM) se realizaron en un espectrómetro de masas JEOL GC-Matell. La técnica utilizada fue impacto electrónico (EI, 70 eV) por inserción a cámara a 300 °C, las muestras fueron disueltas en CH_2Cl_2 .

Las reacciones asistidas por radiación de microondas se llevaron a cabo en un reactor de microondas de haz focalizado modelo Discover, marca CEM, con frecuencia del magnetrón de 2 455 MHz y potencia de 300 W \pm 10.

Material vegetal

El material vegetal (frutos de *Chrysophyllum cainito*) fue recolectado en el mes de marzo de 2015 en la calle 37-A y 34 colonia San Ramón norte, en la ciudad de Mérida, Yucatán, México, (21°01'40.90" N 89° 36' 20. 70" O). *C. cainito* fue identificado por sus características particulares de sus hojas (verde en el haz y dorado en el envés) y sus frutos (baya globosa de cáscara morada) reportados en la literatura.⁴

Extracción, fraccionamiento y obtención de acetato de lupeol

La extracción de las cáscaras secas y molidas (170 g) se realizó, con un equipo Soxhlet, utilizando metanol (MeOH) como disolvente. El extracto fue llevado a sequedad en un evaporador rotatorio obteniéndose 55.68 g de residuo (32.75%). Posteriormente, el residuo fue redisolto en MeOH:H₂O (1:3) para realizar una extracción líquido-líquido con diclorometano (DCM) y la fase orgánica fue llevado a sequedad.

La fase orgánica se redisolvió con MeOH y se calentó a 125 °C hasta disolver completamente el extracto, seguidamente el extracto se llevó a refrigeración hasta obtener un precipitado blanco. Finalmente el precipitado obtenido se filtró a vacío, realizando tres lavados con metanol y se obtuvo en total 21.7 g del precipitado (12.78%).

Se tomó 3.1 g del precipitado obtenido y se fraccionó en una columna con gel de sílice para CCD, la cual fue eluída con una fase móvil de hexano:acetato de etilo (Hx:AcOEt) en proporciones 99.5:0.5, 99:1 (x4). Se recolectaron 50 fracciones, éstas fueron analizadas por CCD y posteriormente reunidas por similitud en cinco fracciones nombradas desde A a E. Este procedimiento fue repetido cinco veces obteniendo un total de 4.0 g (2.3 %) de acetato de lupeol (Fracción D).

Obtención de lupeol

Se disolvió acetato de lupeol (4.01 g, 4.2 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (24 mL, 296 mmol) posteriormente se añadieron 100 mL de una solución de KOH al 5% en etanol y se llevó a reflujo por 2 horas. Al término del tiempo de reacción se realizó una CCD observándose la formación del producto. Seguidamente el crudo de la reacción se acidificó con una solución de HCl al 10% hasta pH=6. Finalmente se realizó una extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂ (x3), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó en un rotavapor, obteniéndose 3.63 g.

Obtención de lupenona

Se disolvió lupeol (3.6 g, 8.5 mmol) en 140 mL de acetona, la solución se enfrió a 5 °C y se le añadió gota a gota reactivo de Jones hasta que la solución permaneciera naranja, la mezcla se dejó con agitación por 30 minutos, al término del tiempo de reacción se realizó una CCD para verificar la formación del producto. Posteriormente se añadió MeOH hasta que la mezcla se tornó de color verde y se formara un precipitado. Seguidamente se agregó agua destilada a la mezcla hasta disolver el precipitado y realizó una extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂ (x4), la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio.

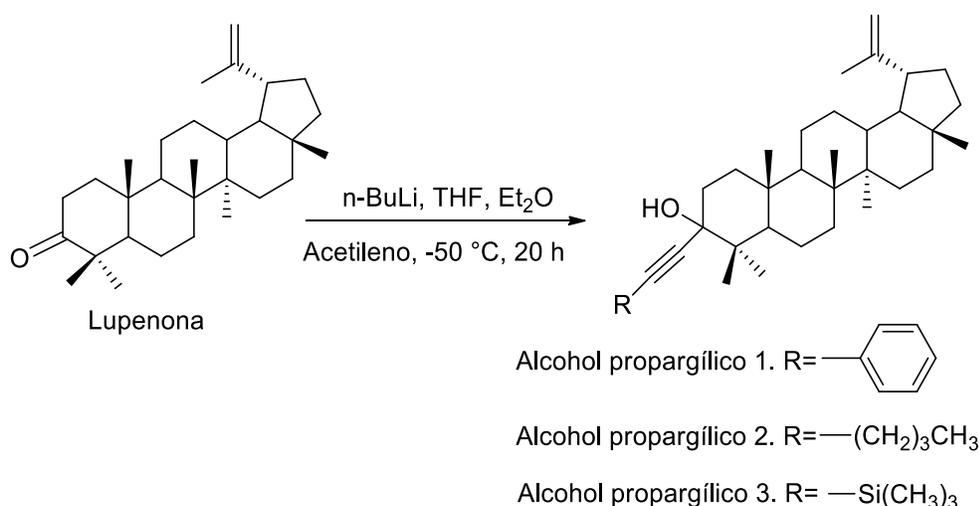
El residuo (3.5 g) se sometió a cromatografía en columna con gel de sílice para CCD, eluyendo con Hx:AcOEt en proporciones 99:1 (x2) y 98:2 (x2). Obteniéndose el producto (3.4 g, rendimiento: 94%).

Síntesis de alcoholes propargílicos

Se agregó el acetileno correspondiente (fenilacetileno 151 µL, 1.37 mmol; 1-hexino 139 µL, 1.21 mmol; TMSA 171 µL, 1.21 mmol), 12 mL de THF anhidro y 7 mL de Et₂O anhidro a un matraz en atmósfera inerte (nitrógeno), esta mezcla se llevó a agitación,

posteriormente la mezcla se enfrió a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se añadió gota a gota *n*-BuLi en hexano (2 M) (631 μL , 1.26 mmol), la temperatura se mantuvo por 1 hora. Se agregó gota a gota lupenona (398 mg, 0.97 mmol; 327 mg, 0.77 mmol; 331 mg, 0.78 mmol respectivamente) disuelta en Et_2O anhidro a una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, la reacción se dejó evolucionar por 20 horas (**Esquema 3**). Posteriormente se realizó una CCD para verificar la formación del producto, la reacción se detuvo con una solución saturada de NH_4Cl . El producto se extrajo con CH_2Cl_2 (3X) y se llevó a sequedad.

El crudo de reacción obtenido fue purificado en una columna empacada con gel de sílice para CCD, eluyendo con Hx:AcOEt en proporciones 95:5 y 90:10 (4X). Obteniendo 3-etinilfenil-lupeol (**alcohol propargílico 1**, 574 mg, rendimiento: 68%) 3-hexinil-lupeol (**alcohol propargílico 2**; 855 mg, rendimiento: 60%) y 3-etiniltrimetilsilano-lupeol (**alcohol propargílico 3**; 856 mg, rendimiento: 82%) respectivamente.

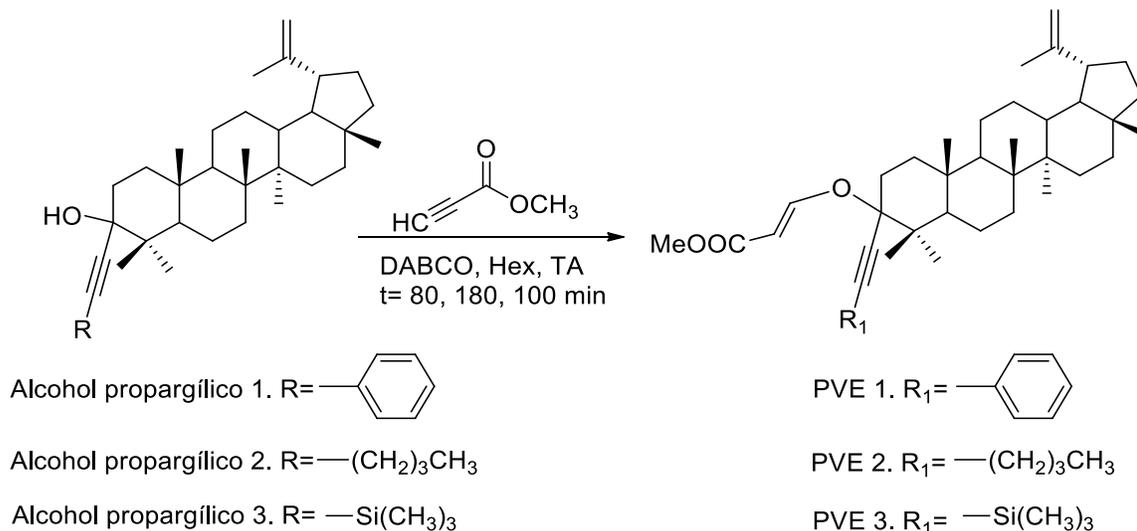


Esquema 3. Síntesis de alcoholes propargílicos 1, 2 y 3 a partir de lupenona utilizando *n*-BuLi como base, bajo atmósfera inerte.

Síntesis de PVEs

Se agregó el respectivo alcohol propargílico (1, 2, 3) correspondiente (521 mg, 1 mmol; 242 mg, 0.48 mmol; 329 mg, 0.63 mmol) disuelto en 3.5 mL de hexano anhidro y DABCO (0.01 mmol, 11 mg; 7 mg; 7 mg) a un matraz en atmósfera inerte (nitrógeno) con agitación constante a temperatura ambiente (TA). Se agregó gota a gota 1.98 mmol de propiolato de metilo cada 20 minutos monitoreando la reacción por CCD hasta la desaparición del alcohol propargílico correspondiente utilizando en total 7.91 mmol (704 μL), 17.78 mmol (1.5 mL) y 10 mmol (897 μL) y un tiempo de reacción de 80 min, 180 min y 100 min respectivamente (**Esquema 4**).

El crudo de reacción obtenido se llevó a sequedad y fue purificado en una columna empacada con gel de sílice para CCD, eluyendo con Hx:AcOEt en proporciones 98:2, 96:4, 95:5 y 94:6. Obteniendo el PVE metil 3-(2-feniletinil)oxiacrilato de lupeol (**PVE 1**; 520 mg, rendimiento: 86 %), el PVE metil 3-(2-hexinil)oxiacrilato de lupeol (**PVE 2**; 513 mg, rendimiento: 60%) y metil 3-((2-trimetilsilil)etnil)oxiacrilato de lupeol (**PVE 3**; 712 mg, rendimiento: 93%) respectivamente.

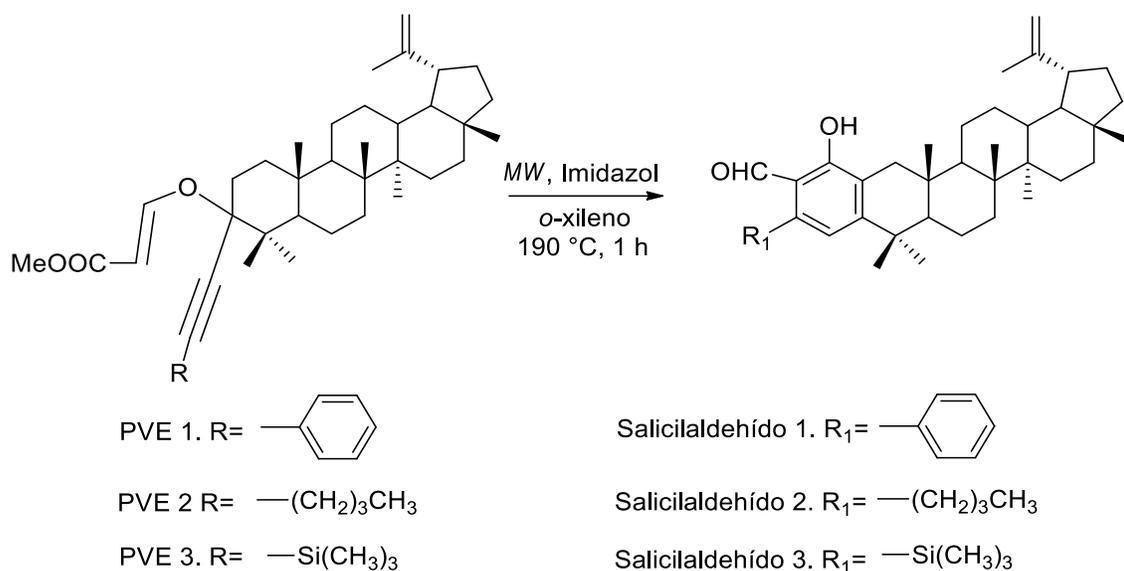


Esquema 4. Síntesis de PVEs a partir de los alcoholes propargílicos obtenidos, bajo atmosfera inerte.

Síntesis de salicilaldehídos

Se agregó al respectivo PVE (520 mg, 0.85 mmol; 425 mg, 0.81 mmol; 337 mg, 0.55 mmol), imidazol (6 mg, 0.09 mmol; 5 mg, 0.08 mg; 4 mg, 0.06 mmol) y 5 mL de *o*-xileno en un tubo de reacción para microondas. Posteriormente se colocó el tubo en el equipo de microondas y se programó la temperatura a 190° C, potencia de 250 W y tiempo de 60 minutos (**Esquema 5**). Al término del tiempo de reacción se realizó una CCD al crudo de reacción para verificar la formación del producto.

El crudo de reacción obtenido se llevó a sequedad y posteriormente fue purificado en una columna empacada con gel de sílice para CCD, eluyendo con Hx:AcOEt en proporciones 100:0 (3X), 99.5:0.5 (4X) y 99:1. Obteniendo 3-hidroxi-(1-fenil)-2-carbaldehído[2,3]lupeol (**Salicilaldehído 1**; 520 mg, rendimiento: 96%), 3-butil-1-hidroxi-2-carbaldehído[2,3]lupeol (**Salicilaldehído 2**; 322 mg, rendimiento: 71%) y 1-hidroxi-3-(trimetilsilil)-2-carbaldehído[2,3]lupeol (**salicilaldehído 3**; 558 mg, rendimiento: 82%) respectivamente.



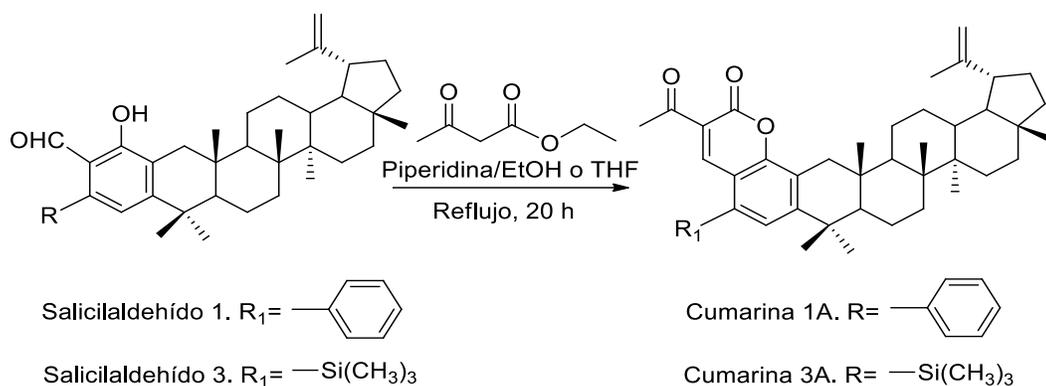
Esquema 5. Síntesis de salicilaldehídos a partir de PVEs promovidos por microondas.

Síntesis de cumarinas

Método A

Se agregó el salicilaldehído (1 y 3) correspondiente (122 mg, 0.19 mmol; 125 mg, 0.2 mmol), acetoacetato de etilo (AcOEt) (27 μL , 0.21 mmol;), piperidina (1 mL, 0.01 mmol) y etanol seco (9 mL) grado reactivo (para el salicilaldehído 3 se utilizó 6 mL de THF anhidro) a un matraz en atmósfera inerte (nitrógeno), la mezcla se llevó a reflujo con agitación constante por 20 horas. Al término del tiempo de reacción se realizó una CCD para verificar la formación del producto (**Esquema 6**).

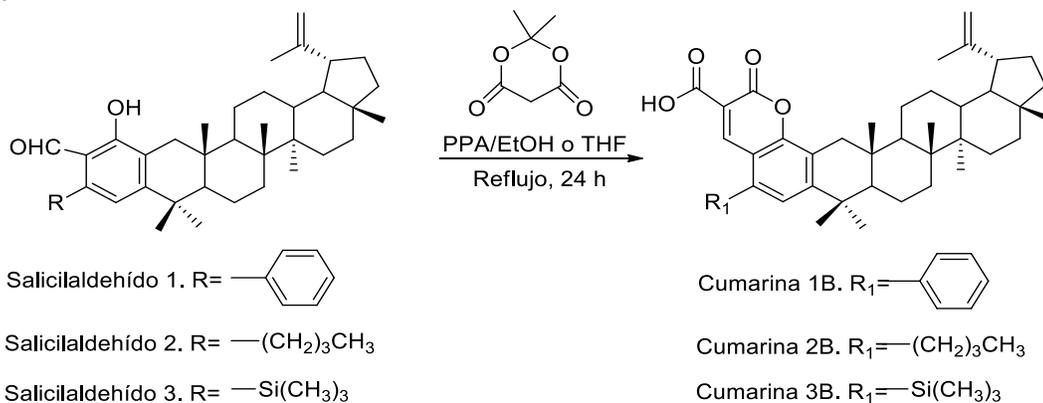
El crudo de reacción obtenido se llevó a sequedad y posteriormente fue purificado en una columna empacada con gel de sílice para CCD, eluyendo con Hx:AcOEt en proporciones 96:4, 94:6, 93:7 y 92:8. Obteniendo la cumarina 3-acetil-5-fenil-2H-lupeol[2,3]cromen-2-ona (**cumarina 1A**; 95.6 mg, rendimiento: 76 %) y la cumarina 3-acetil-5-(trimetilsilil)-2H-lupeol[2,3]cromen-2-ona (**cumarina 3A**, 116 mg, rendimiento: 91%). Para la purificación de la cumarina 3A se utilizó una fase móvil de Hx:CH₂Cl₂ en proporciones 60:40, 50:50 y 40:60 (x3).



Esquema 6. Síntesis de las cumarinas 1A y 3A a partir de los salicilaldehídos 1 y 3.

Método B

Se agregó el salicilaldehído correspondiente (135 mg, 0.20 mmol; 72 mg, 1.11 mmol; 125 mg, 0.20 mmol), ácido de meldrum (AM) (39 mg, 0.27 mmol; 21 mg, 0.14 mmol; 37 mg, 0.26 mmol), acetato de piperidina (PPA) (6 mg, 0.04 mmol; 3 mg, 0.02 mmol; 6 mg, 0.04 mmol) y 4 mL de etanol seco grado reactivo (para el salicilaldehído 3 se utilizó 4 mL de THF) a un matraz en atmósfera inerte (nitrógeno), la mezcla se llevó a reflujo con agitación constante por 24 horas. Al término del tiempo de reacción se realizó una CCD al crudo de reacción para verificar la formación del producto (**Esquema 7**). El crudo de reacción obtenido se llevó a sequedad y posteriormente fue purificado en una columna empacada con gel de sílice para CCD, eluyendo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ en proporciones 100:0 y 98:2 (x3). Obteniendo ácido 5-fenil-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carboxílico (**cumarina 1B**; 51 mg, rendimiento: 38%), ácido 5-butil-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carboxílico (**cumarina 2B**; 39 mg, rendimiento: 53%) y ácido 2-oxo-5-(trimetilsilil)-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carboxílico (**cumarina 3B**; 47 mg, rendimiento: 37%) respectivamente.



Esquema 7. Síntesis de cumarinas 1B, 2B y 3B a partir de los salicilaldehídos 1, 2 y 3.

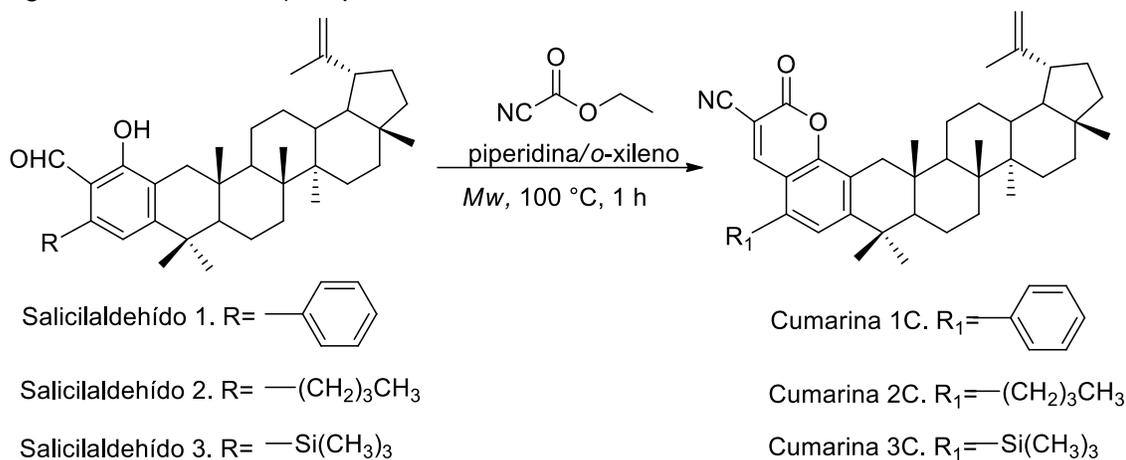
Síntesis de Acetato de piperidina

Se agregó ácido acético (600 μ L, 10 mmol), piperidina (1 mL, 10 mmol) y 20 mL de éter etílico en un matraz a 0 °C (baño agua/hielo), la mezcla se dejó en agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se dejó 30 minutos más en agitación hasta la formación de un precipitado blanco. El precipitado se decantó y se lavó con éter etílico (3 x 20 mL) a presión reducida hasta sequedad. Finalmente el precipitado se dejó secar en un rotavapor y el producto (acetato de piperidina, 975 mg; rendimiento: 90%) se guardó en un matraz bajo atmósfera inerte (nitrógeno).

Método C

Se agregó el respectivo salicilaldehído (115 mg, 0.18 mmol; 100 mg, 0.16 mmol; 185 mg, 0.29 mmol), cianoacetato de etilo (21 μ L, 0.27 mmol; 22 μ L, 0.17 mmol; 34 μ L, 0.32 mmol), piperidina (1 μ L, 0.01 mmol; 2 μ L, 0.02 mmol) y 4 mL de *o*-xileno a un tubo de reacción para microondas. El equipo se programó a una temperatura de 100 °C, potencia de 300 W, un tiempo de 60 minutos y agitación máxima. Al término del tiempo de reacción se realizó una CCD al crudo de reacción para verificar la formación del producto (**Esquema 8**).

El crudo de reacción obtenido se llevó a sequedad y posteriormente fue purificado en una columna empacada con gel de sílice para CCD, utilizando una fase móvil de Hx:AcOEt en proporciones 95:5, 94:6 (x2) y 93:7 (x2). Obteniendo las cumarinas 5-fenil-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carbonitrilo (**cumarina 1C**; 91 mg, rendimiento: 79%), 5-butiril-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carbonitrilo (**cumarina 2C**; 35 mg, rendimiento: 36%) y 2-oxo-5-(trimetilsilil)-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carbonitrilo (**cumarina 3C**; 75.8 mg, rendimiento: 41%) respectivamente.



Esquema 8. Síntesis de las cumarinas 1C, 2C y 3C a partir de los salicilaldehídos 1, 2 y 3.

Evaluación de la actividad anticancerígena

Las líneas celulares utilizadas en los bioensayos fueron de edema carcinoma de glándula mamaria (MCF-7, ATC CHTB-22), carcinoma metastásico de glándula mamaria (MDA-MB-231, ATCC HTB-26), carcinoma escamoso de cérvix (SIHA, ATCC HTB-35) y células normales de riñón de *Cercopithecus aethiops* (Vero, ATCC CCL-81). Todas provenientes de la American Type Culture Collection (HTCC). Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Al medio de cultivo se le adicionó 10 000 U de penicilina y 10 mg mL⁻¹ de estreptomina y 5 mg mL⁻¹ de anfotericina B. Las líneas celulares fueron incubadas en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37 °C hasta la formación de una monocapa.⁴⁴

Las actividades citotóxica y antiproliferativa se evaluaron en placas de 96 pozos para cultivo celular. A cada pozo se le agregó 5 000 células usando medio DMEM adicionado con 10 000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 5 mg/mL de anfotericina B, y se incubaron por 24 h.⁴⁴

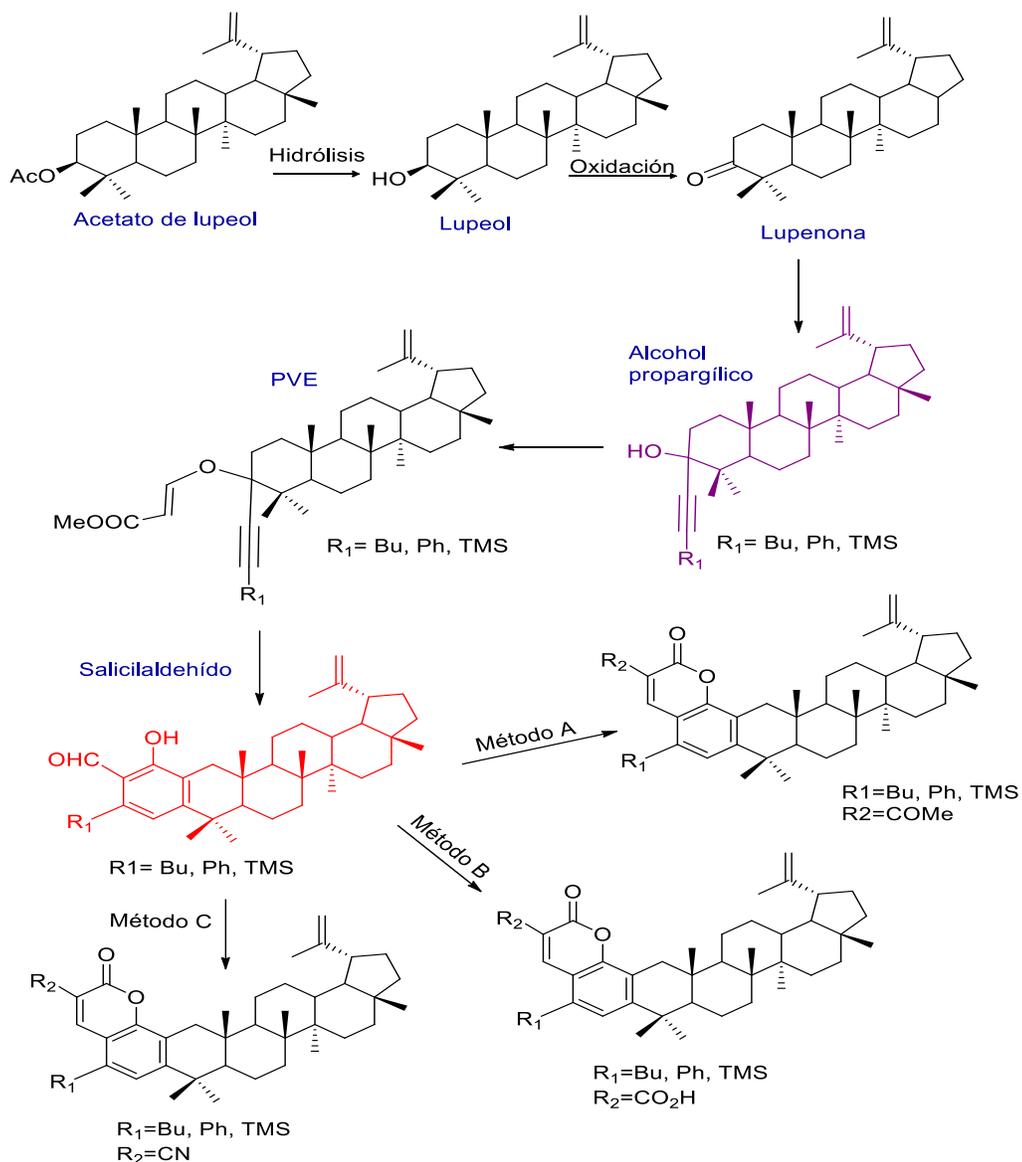
La citotoxicidad fue medida en ausencia de SFB hasta que las células alcanzaron 100% de confluencia, en tanto que la actividad antiproliferativa fue cuantificada cuando las células alcanzaron un 50-60% de confluencia al adicionar 10% de SFB.⁴⁴

Posteriormente se adicionó a los pozos el compuesto a evaluar para alcanzar las siguientes concentraciones: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.65 µg/mL a continuación las placas se incubaron por tres días en una atmósfera con 95% de humedad y 5% CO₂ a 37° C. Seguidamente, se adicionó a cada pozo 100 µL del medio con 10 µL de MTT al 0.5% en amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7.2). Se incubó por 6 h a 37° C y se añadió 100 µL de isopropanol acidificado (4% de HCl), se midió la densidad óptica (DO) a 590 nm usando un espectrofotómetro. Se utilizó docetaxel como control positivo y como control negativo DMSO al 0.05%. Cada evaluación se realizó por triplicado.⁴⁴

Los resultados están expresados en concentración citotóxica 50 o concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), determinados por la fórmula [(DO control negativo – DO producto)/ DO control negativo] x 100.⁴⁴

RESULTADOS Y DISCUSION

Para la obtención de las cumarinas se procedió a aislar el acetato de lupeol de las cáscaras secas y molidas de *Chrysophyllum cainito*. Posteriormente se llevaron a cabo seis pasos de reacción sobre el acetato de lupeol: hidrólisis, oxidación, síntesis de alcoholes propargílicos, síntesis de PVEs, síntesis de salicilaldehídos y finalmente la síntesis de cumarinas. La ruta completa de síntesis se presenta en el **Esquema 9**.



Esquema 9. Esquema general de reacciones para la obtención de cumarinas 3,5-sustituidas fusionadas al anillo A de lupeol.

Purificación e identificación de acetato de lupeol

Después de tratar los frutos de *C. cainito* recolectados, como se describe en la metodología, se obtuvo una mezcla de triterpenos. La mezcla de triterpenos se purificó mediante cromatografía en columna y se obtuvo la fracción **D**.

La fracción **D** se obtuvo como un sólido blanco amorfo y en cuyo espectro de RMN-¹H (**Figura 22**) se observó un par de señales con δ 4.57 y δ 4.69 correspondientes a protones olefínicos exocíclicos. Se observó una señal múltiple con δ 4.47 correspondiente a un protón geminal a un grupo carboxilo y una señal doble de dobles de dobles con δ 2.38 que corresponde a un protón unido al carbono que soporta a un grupo isopropilidénico. También se observó la presencia de 8 señales simples, características de metilos terciarios, con δ 0.78, 0.83, 0.84, 0.85, 0.93, 1.03, 1.68 y 2.04. La comparación de los desplazamientos de las señales con las descritas en la literatura^{45,46} llevó a confirmar que la fracción **D** se trata de acetato de lupeol.

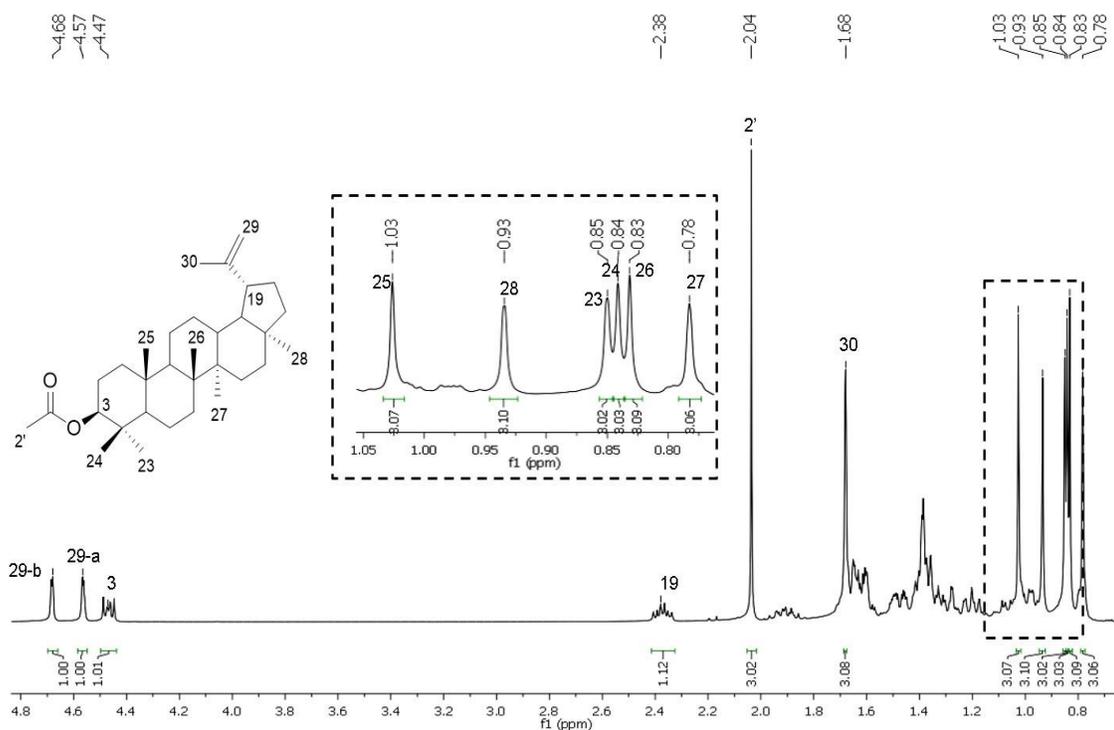


Figura 22. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de acetato de lupeol aislado de *Chrysophyllum cainito*.

Hidrólisis y oxidación de acetato de lupeol

La reacción utilizada para obtener lupeol fue la hidrólisis básica de acetato de lupeol con etanol, KOH y reflujo, esta reacción es irreversible y asegura rendimientos por arriba del 90%.⁴⁷ La oxidación de lupeol a 3-cetolupeol o lupenona se llevó a cabo utilizando el reactivo de Jones, que es un reactivo específico para oxidar alcoholes secundarios a cetonas. La lupenona es el intermediario clave para sintetizar derivados heterocíclicos sobre el anillo A de lupeol.⁴⁸ El rendimiento de la hidrólisis y oxidación fue de 93%, lo que indica que es una reacción cuantitativa.⁴⁹

Comparando el espectro de RMN-¹H de acetato de lupeol con el espectro obtenido después de la hidrólisis, se puede observar la desaparición de la señal simple con δ 2.04 que corresponde al grupo metilo del éster. También se puede observar en el espectro de lupeol que la señal del protón 3 con δ 3.18 se encuentra desplazado hacia campos más altos, esto se debe a que el protón se encuentra menos desapantallado por la ausencia del éster y solo es afectado por el efecto electrosuministrador del oxígeno. Las señales obtenidas en el espectro de RMN-¹H fueron comparadas con las descritas en la literatura, de tal manera que se confirmó que se obtuvo lupeol como producto de la hidrólisis (**Figura 23**).⁵⁰

Comparando el espectro de lupeol con el espectro obtenido después de la oxidación, se puede observar que el único cambio es la ausencia de la señal con δ 3.18 que correspondía al protón 3, lo que indica la presencia de un carbono cuaternario. Las señales obtenidas se compararon con la literatura para confirmar la obtención de lupenona (**Figura 23**).^{51,52}

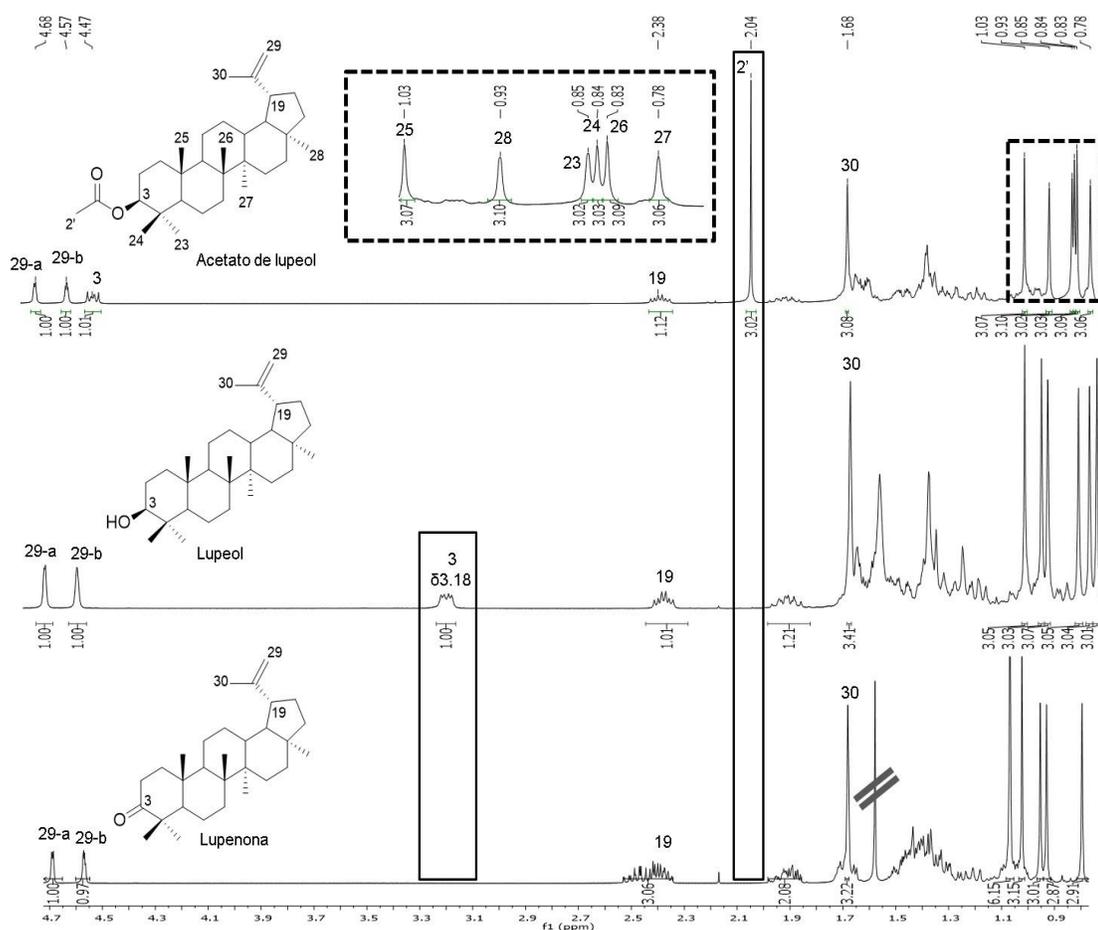
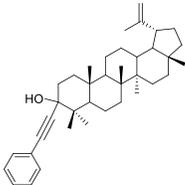
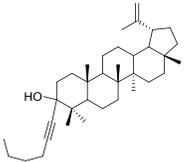
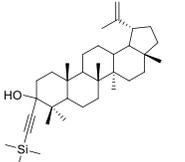


Figura 23. Comparación de los espectros de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de acetato de lupeol, lupeol y lupenona.

Obtención de alcoholes propargílicos

Para la obtención de los alcoholes propargílicos; se mezcló el acetileno correspondiente, THF, éter, *n*-BuLi y lupenona bajo atmósfera inerte como se describe en la metodología.⁵³ Se obtuvieron tres compuestos identificados como **alcohol propargílico 1** (3-etinilfenil-lupeol), **alcohol propargílico 2** (3-hexinil-lupeol) y **alcohol propargílico 3** (3-etiniltrimetilsilano-lupeol), los rendimientos obtenidos de cada alcohol se pueden observar en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Rendimientos para los alcoholes propargílicos obtenidos.

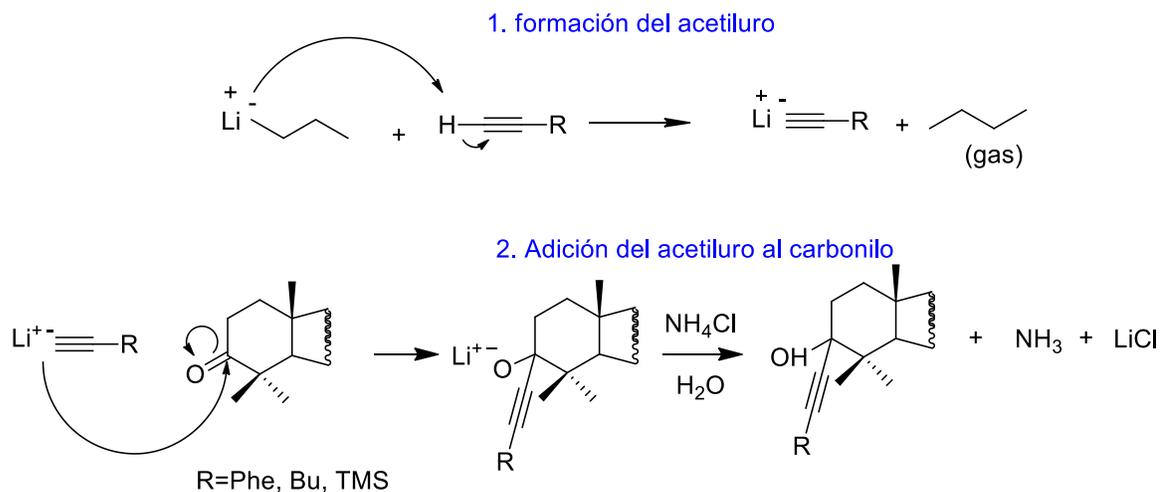
Producto	Peso (mg)	Rendimiento (%)
 Alcohol propargílico 1	574	68 ^a
 Alcohol propargílico 2	855	60 ^b
 Alcohol propargílico 3	856	82 ^b

a. Dos repeticiones b. Cuatro repeticiones

De acuerdo al mecanismo de reacción la obtención de los alcoholes propargílicos ocurre en dos etapas. En la primera etapa se forma el acetiluro, promovido por el *n*-BuLi que actúa como una base fuerte que abstrae el protón del acetileno correspondiente, en este punto las bajas temperaturas (<75 °C) mantienen relativamente estable los aniones de litio formados lo que se refleja en los rendimientos.^{54,55} En la segunda etapa el acetiluro se adiciona al carbonilo de la lupenona formando un alcóxido estabilizado por el litio, la posterior adición de ácido permite la protonación del alcóxido para formar el respectivo alcohol (**Esquema 10**).⁵⁶

Los rendimientos obtenidos para los alcoholes propargílicos 1 y 2 (68 y 60% respectivamente) indican que el acetiluro no se formó en suficiente cantidad para adicionarse al carbonilo de la lupenona. Lo anterior pudo deberse a la estabilidad de los acetiluros formados, se ha reportado en la literatura⁵⁷ que el TMSA es más estable debido a la presencia del átomo de silicio que estabiliza la carga del anión del triple enlace, por lo que se obtuvo el producto (alcohol propargílico 3) con el mayor rendimiento (82%), seguido por el fenilacetileno sustituido por un grupo fenilo que puede deslocalizar las cargas negativas y por último el 1-hexino.⁵⁴

La humedad es un factor importante que afecta los rendimientos ya que destruye el n-BuLi.⁵⁴ Sin embargo, se descarta este factor ya que se secaron los disolventes para eliminar cualquier rastro de humedad lo cual se observa en el rendimiento del alcohol propargílico 3. En general los rendimientos se pueden considerar buenos ya que se ha reportado en la literatura que los rendimientos para la síntesis de alcoholes propargílicos utilizando n-BuLi como base van de 59% al 91%.^{54,55}



Esquema 10. Mecanismo de reacción para la síntesis de alcoholes propargílicos.

Se ha reportado en la literatura que las reacciones por esta metodología no se completan debido a la dificultad de mantener las temperaturas por debajo de -70°C ,⁵⁴ en este caso la temperatura fue mantenida entre -55°C y -50°C debido a que en trabajos previos⁵⁸ se observó que la lupenona pierde reactividad a temperaturas por debajo de estas. Sin embargo, se pudo recuperar lupenona que no reaccionó y se volvió a utilizar en otra reacción.

Identificación del alcohol propargílico 1

Para la identificación del producto se realizaron experimentos de masas, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C los cuales se analizan a continuación:

En el espectro de masas (**Figura 24**) se puede observar el ión molecular 526 m/z que corresponde al peso molecular del producto esperado (526.4 g/mol). Además se pueden observar los fragmentos más representativos del esqueleto de lupeol: 369, 424, 220, 218, 203, 202, 189 y 135 m/z, estos se encuentran reportados en la literatura.^{59,60} Adicionalmente se puede observar un fragmento de 511 m/z que corresponde a la pérdida de un grupo metilo a partir del ión molecular y un fragmento de 101 m/z que corresponde a la pérdida del fenilacetileno.

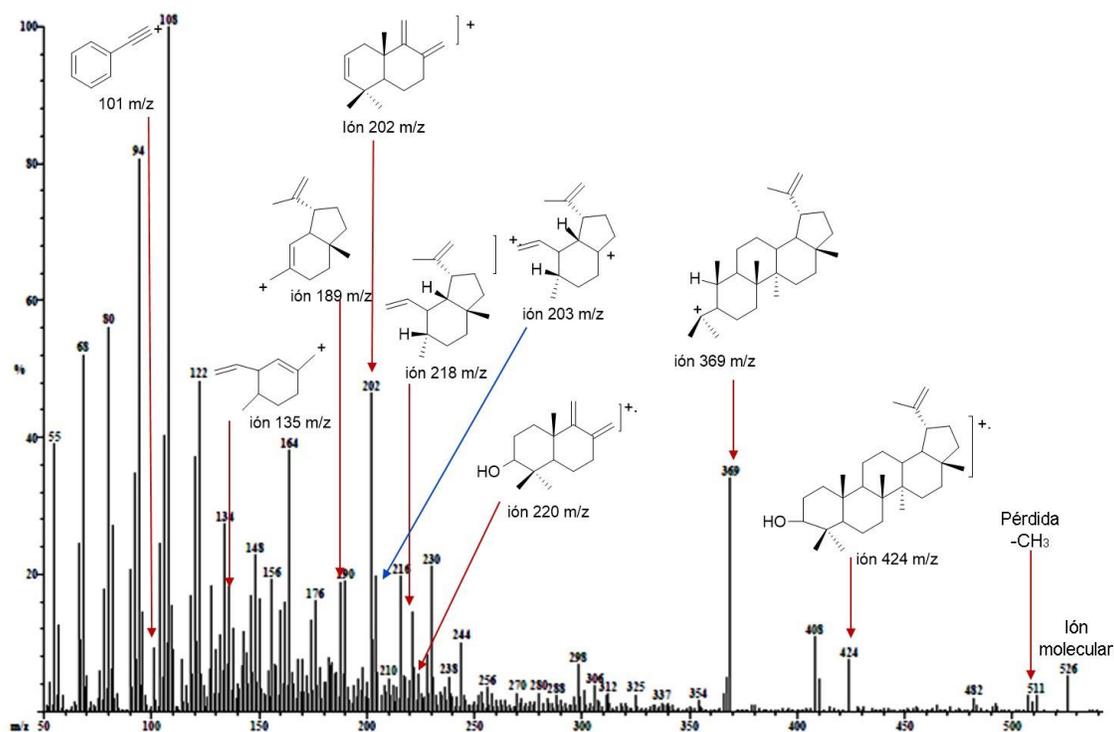


Figura 24. Espectro de masas del alcohol propargílico 1 (fragmentos representativos).

Las señales características del alcohol propargílico 1 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ7.44 (2H, m, H-4', H-5'), 7.32 (3H, m, H-5', H-6', H-7'), 4.69 (1H, d, H-29a), 4.57 (1H, m, H-29b), 2.38 (1H, m, H-19), 1.92 (2H, m, H-21), 1.68 (3H, s, H-30), 1.11 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, s, H-24), 0.87 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-28); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.2 (C-1), 32.8 (C-2), 76.3 (C-3), 42.1 (C-4), 53.5 (C-5), 18.7 (C-6), 34.4 (C-7), 40.9 (C-8), 50.7 (C-9), 37.3 (C-10), 21.0 (C-11), 25.2 (C-12), 38.1 (C-13), 42.9 (C-14), 27.6 (C-15), 35.7 (C-16), 43.1 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.1 (C-20), 29.9 (C-21), 40.1 (C-22), 26.0 (C-23), 17.7 (C-24), 16.6 (C-25), 16.1 (C-26), 14.6 (C-27), 18.7 (C-28), 109.4 (C-29), 19.4 (C-30), 92.8 (C-1'), 85.7 (C-2'), 123.3 (C-3'), 131.6 (C-4', C-8'), 128.2 (C-5', C-7'), 128.4 (C-6').

Comparando el espectro de RMN-¹H de lupenona (**Figura 25**) con el espectro del alcohol propargílico 1, se puede observar la aparición de dos señales múltiples con δ7.32 (H-5', H-6', H-7') y δ7.44 (H-4', H-8') que integran para tres y dos protones respectivamente, éstas señales están desplazadas hacia la zona donde comúnmente aparecen señales aromáticas, lo que sugiere que el producto formado posee un grupo fenilo como sustituyente, además se puede observar que las señales de la estructura base de la lupenona (metilos terciarios, protones olefinicos) se mantienen sin cambios.

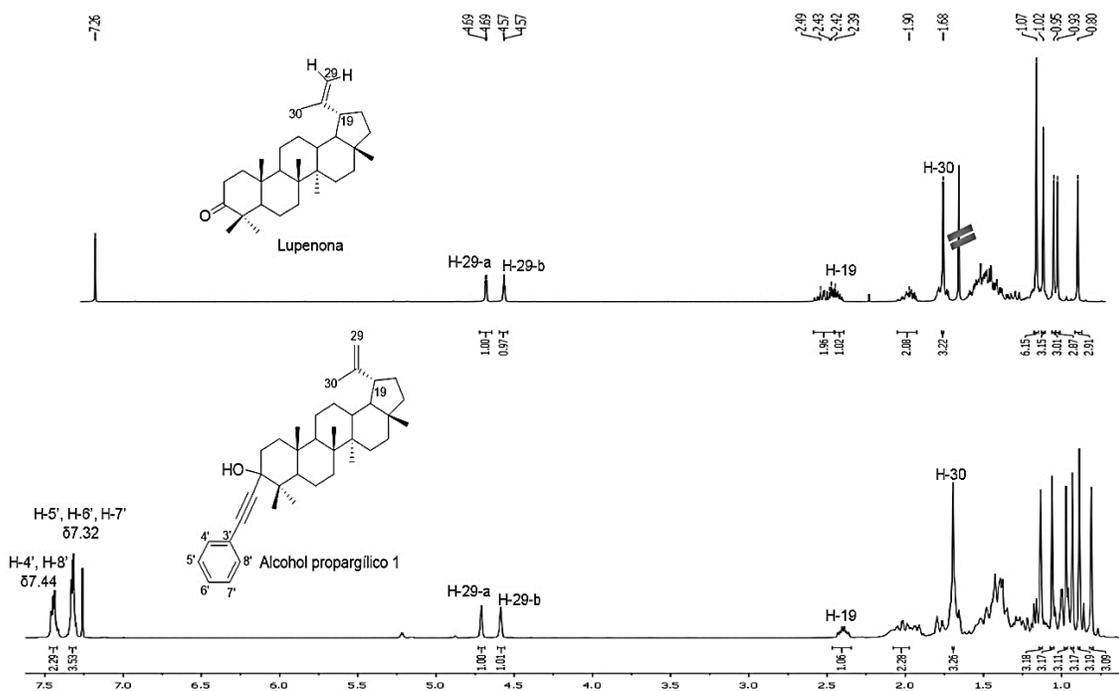


Figura 25. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de lupenona y alcohol propargílico 1.

El alcohol propargílico 1 presenta un total de 38 carbonos, sin embargo, en el espectro de RMN-¹³C (**Figura 26**) aparecen 36 señales, esto se explica por la presencia de dos señales equivalentes en el anillo aromático. Las señales que aparecen con δ 85.7 (C2') y 92.8 (C1') son características de triples enlaces, mientras que las señales con δ 123.3 (C-3'), 131.6 (C-4', C-8'), 128.2 (C-5', C7') y 128.4 (C-6') son características de carbonos aromáticos lo que refuerza que la molécula obtenida está sustituida por un fenilacetileno. Además en el HMBC se pueden observar las correlaciones de los protones H-2 (δ 2.00 y δ 1.78) con el carbono C-3 (δ 92.8) lo que indica que el fenilacetileno está en la posición 3 del lupeol (**Figura 27**).

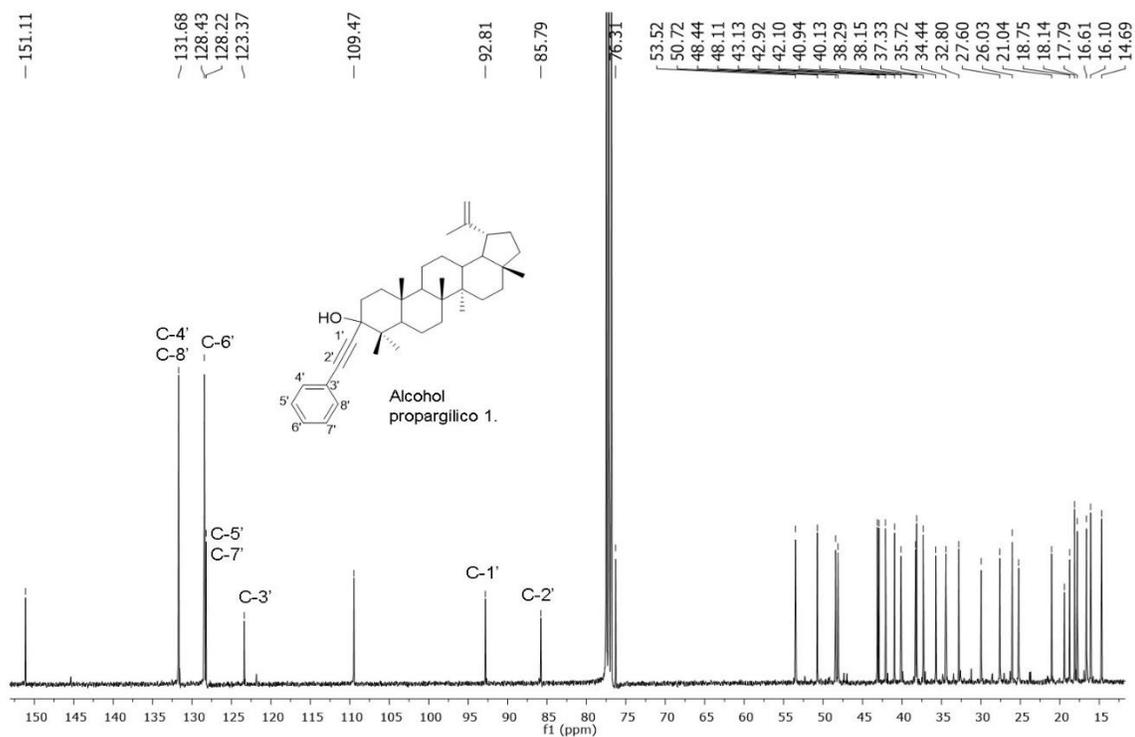


Figura 26. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del alcohol propargilico 1.

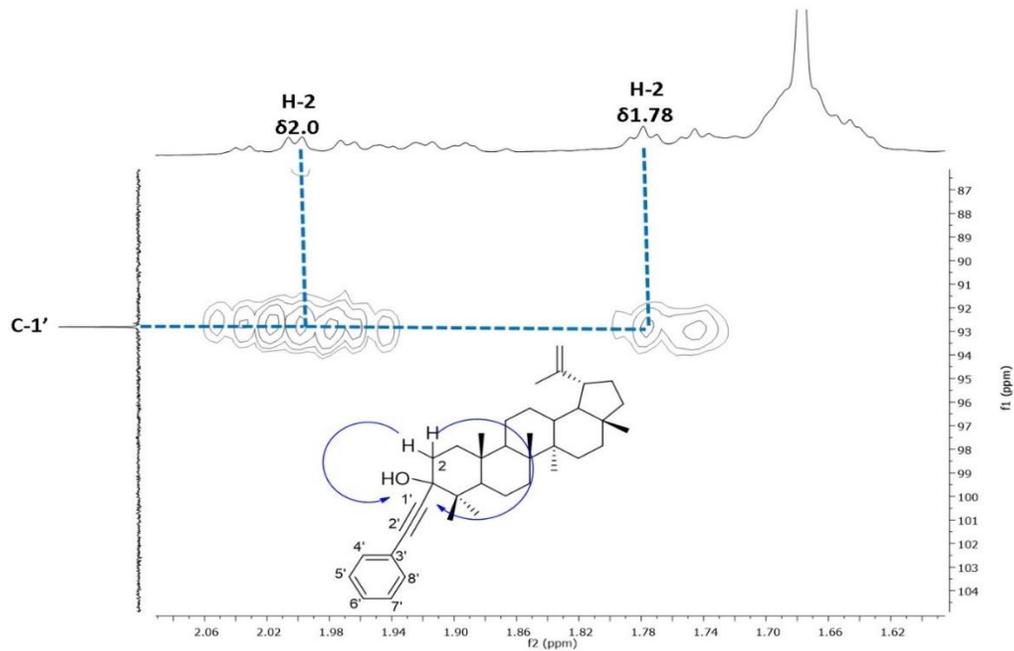


Figura 27. HMBC del alcohol propargilico 1, correlación del carbono C-1' con los protones H-2.

Identificación del alcohol propargílico 2

Para la identificación del producto se realizaron experimentos de masas, RMN-¹H y RMN-¹³C, los cuales se analizan a continuación:

En el espectro de masas (**Figura 28**) puede observarse el ión molecular 507 m/z que corresponde al peso molecular del producto esperado (506.8 g/mol). Además se puede observar los fragmentos más representativos del esqueleto de lupeol: 492, 369, 218, 203, 189 y 135 m/z, estos se encuentran reportados en la literatura. Adicionalmente se puede observar un fragmento de 81 m/z y un fragmento de 56 m/z que corresponde a la pérdida de hexino y a un grupo butilo respectivamente.

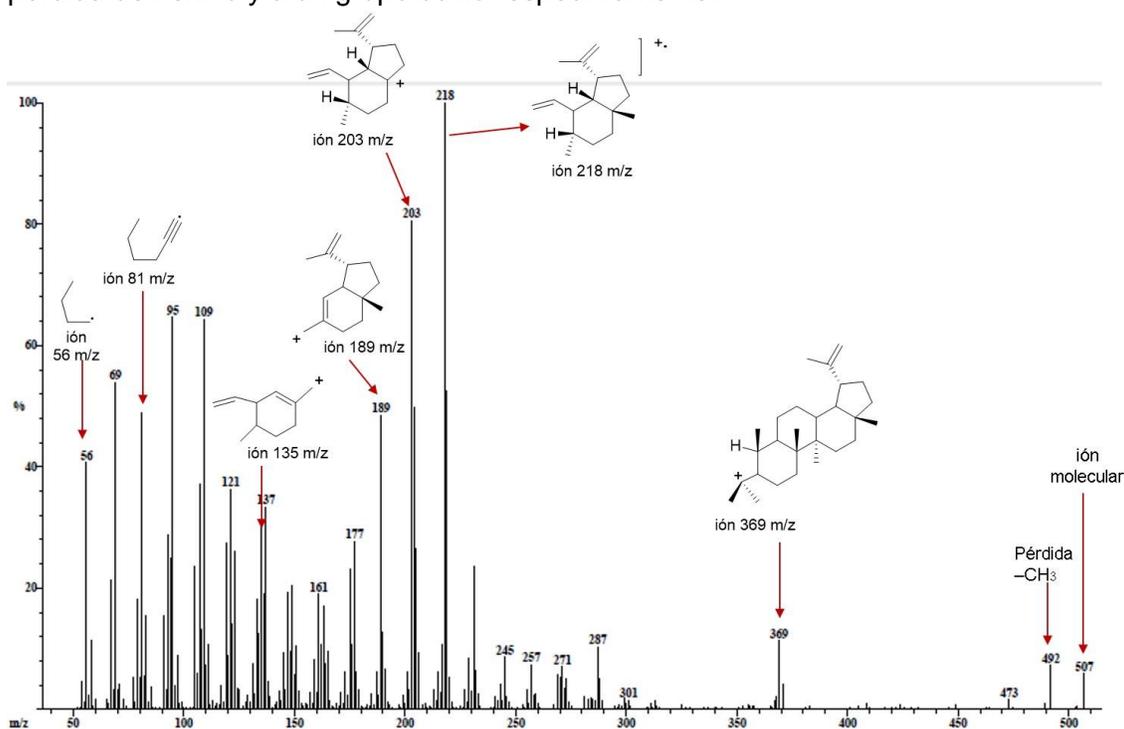


Figura 28. Espectro de masas del alcohol propargílico 2 (fragmentos representativos).

Las señales características del alcohol propargílico 2 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ4.68 (1H, d, H-29a), 4.56 (1H, m, H-29b), 2.38 (1H, m, H-19), 2.23 (2H, t, H-3'), 1.90 (2H, m, H-21), 1.67 (3H, s, H-30), 1.52 (2H, m, H-4'), 1.39 (2H, m, H-5'), 1.02 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, t, H-6'), 0.83 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.4 (C-1), 32.6 (C-2), 76.2 (C-3), 41.8 (C-4), 53.3 (C-5), 18.8 (C-6), 34.7 (C-7), 41.1 (C-8), 51.0 (C-9), 37.3 (C-10), 21.2 (C-11), 25.4 (C-12), 38.3 (C-13), 43.0 (C-14), 27.7 (C-15), 35.9 (C-16), 43.3 (C-17), 48.6 (C-18), 48.3 (C-19), 151.1 (C-20), 29.9 (C-21), 38.4 (C-22), 25.9 (C-23), 17.7 (C-24), 16.7 (C-25), 16.2 (C-26), 14.5 (C-27), 18.3 (C-

28), 109.7 (C-29), 19.6 (C-30), 92.0 (C-1'), 80.5 (C-2'), 19.5 (C-3'), 29.7 (C-4'), 21.4 (C-5'), 14.0 (C-6').

Comparando el espectro de RMN-¹H del alcohol propargílico 2 con el espectro de lupenona (**Figura 29**), se puede observar la aparición de dos señales triples, una con δ 2.23 que integra para dos protones correspondiente al protón H-3' característico de señales α a un triple enlace y una señal triple con δ 0.92 que integra para tres protones que corresponde al metilo terminal de la cadena alifática lo que confirmaría la presencia del hexino en la molécula. Además, las señales de los metilos terciarios y los protones del doble enlace (H-29) permanecen sin cambios en la molécula.

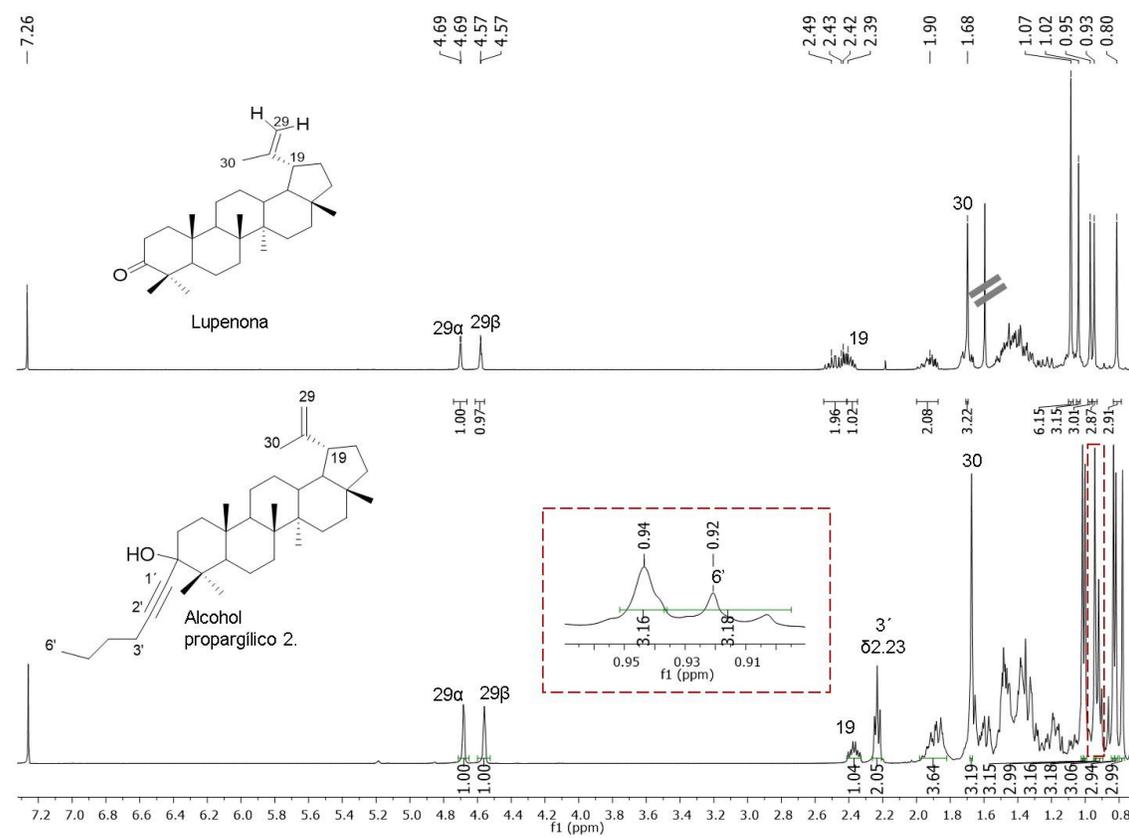


Figura 29. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de lupenona y alcohol propargílico 2.

Identificación del alcohol propargílico 3

Para la identificación del producto se realizaron experimentos de masas, RMN-¹H y RMN-¹³C, los cuales se analizan a continuación:

En el espectro de masas (**Figura 30**) puede observarse el ión molecular 523 m/z que corresponde al peso molecular del producto esperado (522.9 g/mol). Además se puede

observar los fragmentos más representativos del esqueleto lupano: 369, 203 y 135 m/z, estos se encuentran reportados en la literatura. Adicionalmente se pueden observar los fragmentos 508 m/z (pérdida de $-\text{CH}_3$), 450 m/z (corresponde a la pérdida del TMS en la molécula), 97 m/z y 73 m/z, estos últimos característicos del TMS.

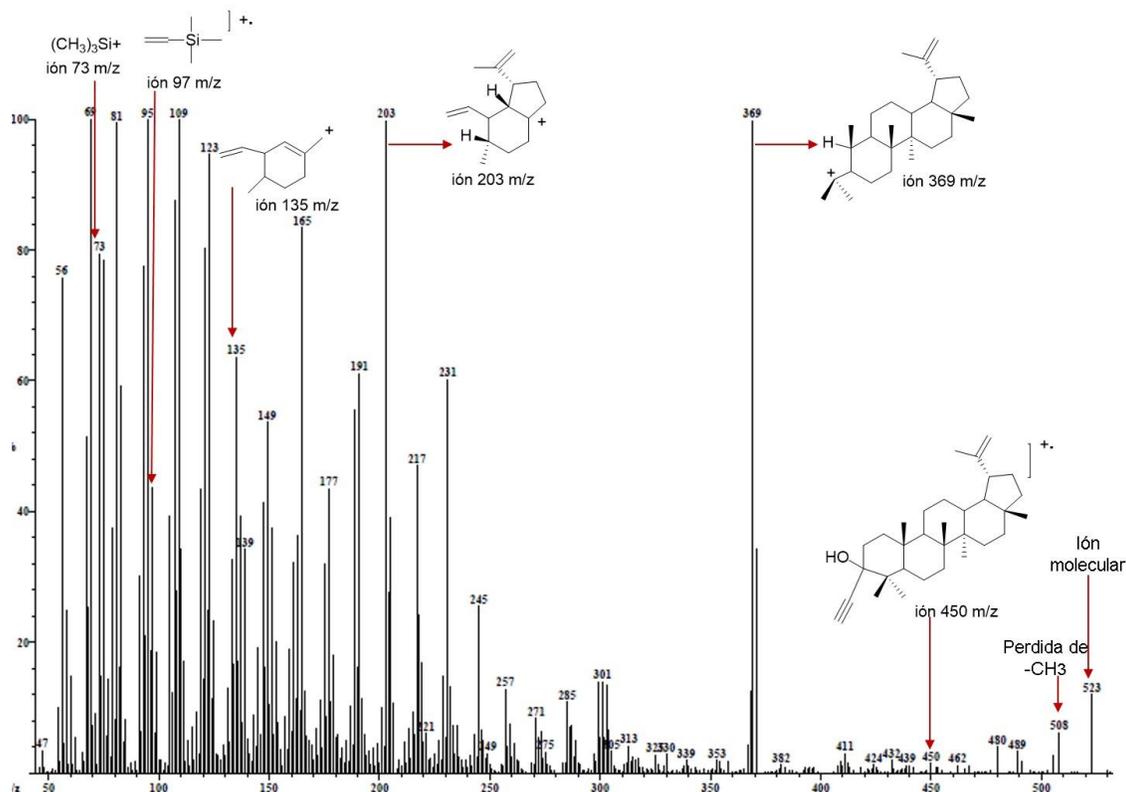


Figura 30. Espectro de masas del alcohol propargílico 3 (fragmentos representativos).

Las señales características del alcohol propargílico 3 se asignaron de la siguiente manera; RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.70 (1H, d, H-29a), 4.57 (1H, m, H-29b), 2.38 (1H, m, H-19), 1.92 (2H, m, H-21), 1.69 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-23), 1.02 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-27), 0.84 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-28), 0.18 (9H, s, H-4', H-5', H-6'); RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 38.4 (C-1), 32.6 (C-2), 76.2 (C-3), 41.8 (C-4), 53.3 (C-5), 18.8 (C-6), 34.7 (C-7), 41.1 (C-8), 51.0 (C-9), 37.3 (C-10), 21.2 (C-11), 25.4 (C-12), 38.3 (C-13), 43.0 (C-14), 27.7 (C-15), 35.9 (C-16), 43.3 (C-17), 48.6 (C-18), 48.3 (C-19), 151.2 (C-20), 30.1 (C-21), 38.4 (C-22), 25.9 (C-23), 17.7 (C-24), 16.7 (C-25), 16.2 (C-26), 14.5 (C-27), 18.3 (C-28), 109.7 (C-29), 19.6 (C-30), 109.6 (C-1'), 90.4 (C-2'), 0.30 (C-4', C-5', C-6').

Comparando el espectro de RMN- ^1H de lupenona con el espectro del alcohol propargílico 3 (**Figura 31**), puede observarse la aparición de una señal simple a campo alto con δ 0.18 que integra para nueve protones, esta señal corresponde a protones muy apantallados que están enlazados directamente con la señal con δ 0.30 en el espectro

^{13}C . La intensidad de la señal sugiere que no se trata de señales residuales del TMS. Además la integral corrobora que la señal pertenece a tres grupos metilo perteneciente al etiniltrimetilsilano. Las señales características del esqueleto lupano permanecen sin cambios por lo que se confirmaría la obtención del alcohol propargílico 3.

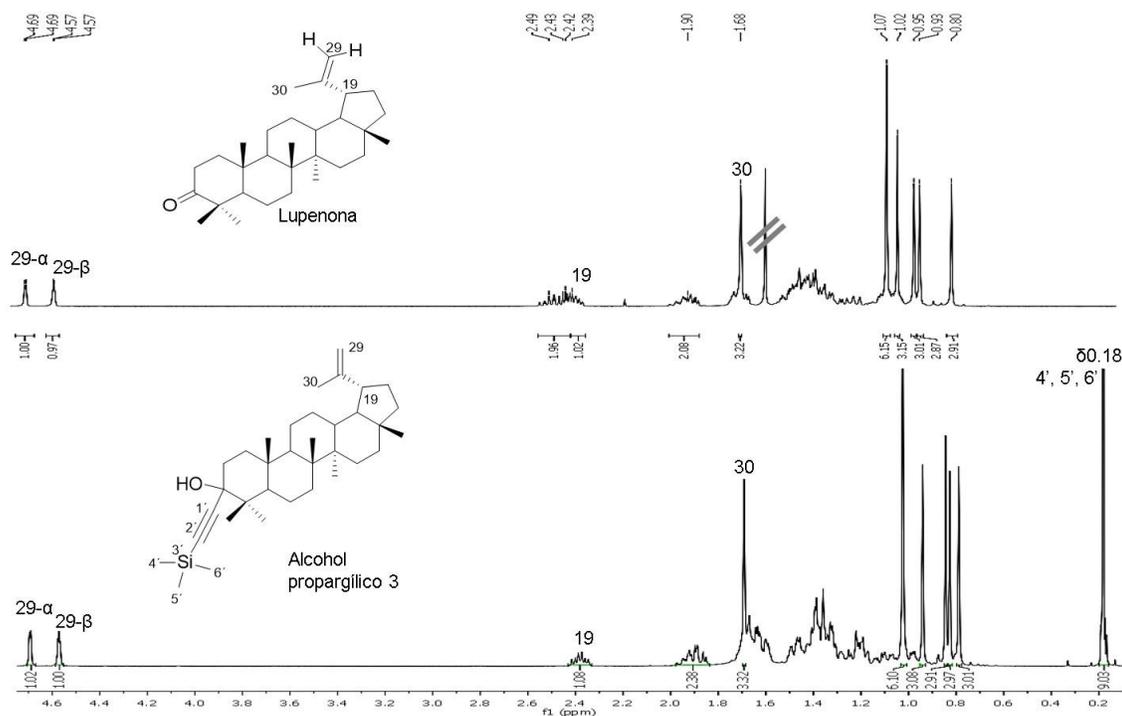
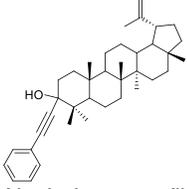
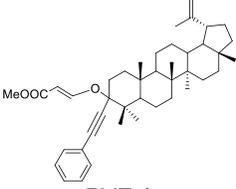
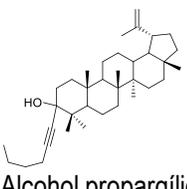
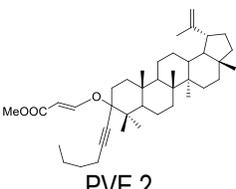
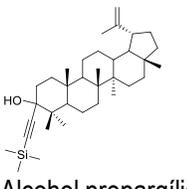
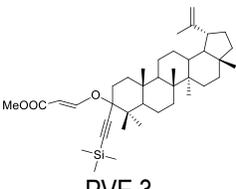


Figura 31. Espectros de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de lupenona y el alcohol propargílico 3.

Obtención de PVEs

Para la obtención de los respectivos PVE's se mezcló el alcohol propargílico correspondiente (1, 2 y 3), DABCO y metil propiolato, bajo atmósfera inerte, como se describe en la metodología,⁵³ se obtuvo metil 3-(2-feniletinil)oxiacrilato de lupeol (PVE 1), metil 3-(2-hexinil)oxiacrilato de lupeol (PVE 2) y metil 3-((2-trimetilsilil)etinil)oxiacrilato de lupeol (PVE 3), respectivamente; los rendimientos obtenidos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Rendimientos para los PVE's sustituidos obtenidos.

Sustrato	Producto	Rendimiento (%)
 Alcohól propargílico 1	 PVE 1	86 ^a
 Alcohól propargílico 2	 PVE 2	60 ^b
 Alcohól propargílico 3	 PVE 3	93 ^c

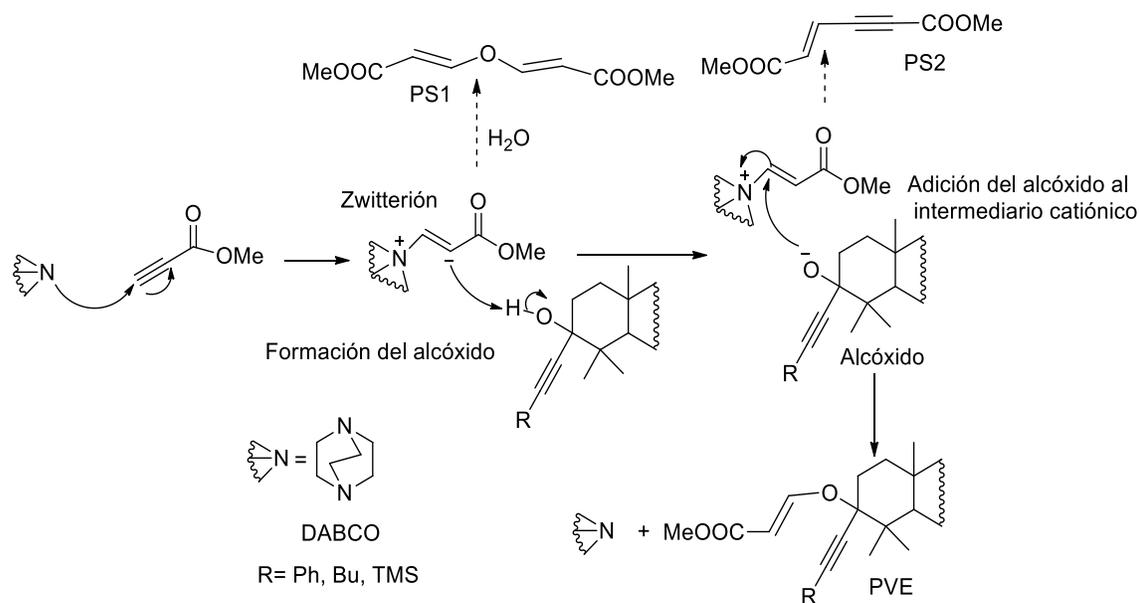
a. una repetición b. tres repeticiones c. dos repeticiones

El PVE 3 se obtiene con excelente rendimiento, el PVE 1 con un rendimiento muy bueno, mientras que el rendimiento del PVE 2 fue regular; comparado con los rendimientos de hasta 93% de PVEs similares a los obtenidos experimentalmente.^{49,61} El rendimiento reportado para el PVE 1 por Tejedor et al. Es de 74% utilizando el mismo sustrato (alcohól propargílico 1), los mismos reactivos y las mismas condiciones de reacción, por lo que en este trabajo se ha conseguido aumentar hasta el 86%, posiblemente debido a un mejor control de las condiciones de reacción, además esta reacción solo se llevó a cabo una vez.⁶²

Para la obtención de PVEs se ha propuesto un mecanismo de reacción catalizada por una base de Lewis (generalmente aminas terciarias) que se añade al triple enlace del acetileno para formar un zwitterión, que es más básico que el catalizador inicial (es decir, la amina terciaria). En esta etapa, las cantidades traza de agua producen trazas del compuesto **PS1**, por lo que las condiciones de reacción anhidras son esenciales. El zwitterión reacciona en presencia del alcohol formando un alcóxido. El resultado de la reacción se determina por la cantidad de alcóxido formado y por la velocidad de reacción relativa de su adición nucleofílica al intermedio catiónico (típicamente un derivado de β -amonioacrilato) para formar el PVE; si la velocidad de formación del alcóxido no es

suficiente para adicionarse al intermediario catiónico, el acetileno aun presente en el medio se condensa con el intermediario catiónico formándose el dímero **PS2 (Esquema 11)**. También es importante señalar que la estereoquímica de los dobles enlaces formados son predominantes o exclusivamente E.⁶¹

En la síntesis de los PVE 1 y 3 se observó la ausencia del producto de partida una vez alcanzado 8 equivalentes de metil propiolato, dando por hecho que la reacción se completó. Sin embargo, en la síntesis del PVE 2, al llegar a los 8 equivalentes la reacción no se completaba y al adicionar más equivalentes de metil propiolato no se observaban cambios en la proporción del producto esperado, pero si aumentaba la proporción de un producto secundario (PS2). Lo anterior indica que probablemente el alcohol propargílico 2, el cual posee un grupo butilo, es menos reactivo y por lo tanto el metil propiolato se autocondensaba mucho más rápido de lo que se formaba el respectivo alcóxido, por lo que al adicionar más equivalentes de metil propiolato se favorecía más la formación del producto PS1.



Esquema 11. Mecanismo de reacción para la síntesis de PVEs a partir de los alcoholes propargílicos.

Identificación de los PVEs

Las señales características del PVE 1 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ8.15 (1H, d, H-1'), 7.48 (2H, m, H-8', H-12'), 7.35 (3H, m, H-9', H-10', H-11'), 5.38 (1H, d, H-2'), 4.69 (1H, d, H-29a), 4.57 (1H, m, H-29b), 3.69 (3H, s, H-4'), 2.39 (1H, m, H-19), 1.92 (1H, m, H-21), 1.68 (3H, s, H-30), 1.08 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-24), 0.88 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-

28); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.1 (C-1), 30.9 (C-2), 87.5 (C-3), 42.6 (C-4), 53.7 (C-5), 18.6 (C-6), 34.5 (C-7), 41.1 (C-8), 50.9 (C-9), 37.3 (C-10), 21.2 (C-11), 25.3 (C-12), 38.3 (C-13), 43.1 (C-14), 27.7 (C-15), 35.9 (C-16), 43.3 (C-17), 48.6 (C-18), 48.2 (C-19), 151.2 (C-20), 30.1 (C-21), 40.3 (C-22), 26.2 (C-23), 18.4 (C-24), 16.8 (C-25), 16.2 (C-26), 14.9 (C-27), 18.3 (C-28), 109.7 (C-29), 19.6 (C-30), 159.8 (C-1'), 98.6 (C-2'), 168.9 (C-3'), 51.3 (C-4'), 87.5 (C-5'), 91.2 (C-6'), 129.0 (C-7'), 132.0 (C-8', C-12'), 128.6 (C-9', C-11'), 128.7 (C-10').

Las señales características del PVE 2 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ8.12 (1H, d, H-1'), 5.34 (2H, d, H-2'), 4.72 (1H, d, H-29a), 4.60 (1H, m, H-29b), 3.71 (3H, s, H-4'), 2.42 (1H, m, H-19), 2.35 (2H, t, H-7'), 1.94 (2H, m, H-21), 1.60 (3H, s, H-30), 1.53 (2H, m, H-8'), 1.28 (2H, m, H-9'), 1.05 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-24), 0.97 (3H, s, H-10'), 0.87 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-28); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.4 (C-1), 32.5 (C-2), 87.0 (C-3), 41.8 (C-4), 53.3 (C-5), 18.8 (C-6), 34.7 (C-7), 41.1 (C-8), 51.0 (C-9), 37.3 (C-10), 21.2 (C-11), 25.4 (C-12), 38.3 (C-13), 43.0 (C-14), 27.7 (C-15), 35.9 (C-16), 43.3 (C-17), 48.6 (C-18), 48.3 (C-19), 151.0 (C-20), 30.1 (C-21), 38.4 (C-22), 25.8 (C-23), 17.3 (C-24), 16.6 (C-25), 16.1 (C-26), 14.5 (C-27), 18.3 (C-28), 109.5 (C-29), 19.4 (C-30), 159.8 (C-1'), 98.0 (C-2'), 168.6 (C-3'), 51.1 (C-4'), 90.0 (C-5'), 87.1 (C-6'), 19.6 (C-7'), 29.9 (C-8'), 21.5 (C-9'), 14.1 (C-10').

Las señales características del PVE 3 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ8.06 (1H, d, H-1'), 5.33 (2H, d, H-2'), 4.70 (1H, d, H-29a), 4.57 (1H, m, H-29b), 3.68 (3H, s, H-4'), 2.37 (1H, m, H-19), 1.92 (2H, m, H-21), 1.69 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-27), 0.88 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-26), 0.79 (3H, s, H-28), 0.18 (9H, s, H-7', H-8', H-9'); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.3 (C-1), 32.5 (C-2), 76.10 (C-3), 41.0 (C-4), 53.2 (C-5), 18.7 (C-6), 34.6 (C-7), 41.0 (C-8), 51.8 (C-9), 37.3 (C-10), 21.0 (C-11), 25.3 (C-12), 38.2 (C-13), 42.9 (C-14), 27.5 (C-15), 35.7 (C-16), 43.1 (C-17), 48.5 (C-18), 48.1 (C-19), 151.1 (C-20), 30.0 (C-21), 38.3 (C-22), 25.8 (C-23), 17.5 (C-24), 16.7 (C-25), 16.1 (C-26), 14.4 (C-27), 18.4 (C-28), 109.5 (C-29), 19.5 (C-30), 159.8 (C-1'), 98.2 (C-2'), 168.7 (C-3'), 51.1 (C-4'), 90.3 (C-5'), 87.3 (C-6'), 1.30 (C-7', C-8', C-9').

El PVE 1 obtenido fue identificado por RMN-¹H, RMN-¹³C y HMBC. En el espectro de RMN-¹H (**Figura 32**) se puede observar una señal doble con δ8.15 que corresponde al protón H-1' del doble enlace. El desplazamiento con δ8.15 de dicho protón se debe a que se encuentran en posición β al carbonilo α-β insaturado y al efecto electrostractor del átomo de oxígeno del éter. También se pueden observar una señal doble con δ5.38 que corresponde al protón H-2', el desplazamiento de esta señal es característico de protones α de un carbonilo α-β insaturado. Además se puede observar una señal simple con δ3.69 (H-4') que corresponde al metilo terminal del éster.

En los espectros de RMN-¹H del PVE 2 y PVE 3 (**Figura 32**) se pueden observar las señales correspondientes a los dobles enlaces δ8.11 (H-1') y 5.34 (H-2'); δ8.05 (H-1') y 5.34 (H-2') respectivamente. Además se puede observar la señal con δ3.69 que corresponde al metilo terminal del éster en ambos productos. También se puede diferenciar las señales de los sustituyentes del PVE 2, la señal triple con δ2.3 (H-7') corresponde al metileno α al triple enlace y la señal triple con δ0.97 (H-10') corresponde al metilo terminal de la cadena alifática. Mientras que para el PVE 3 la señal con δ0.18 (H-7', H-8' y H-9') corresponde a los metilos unidos al silicio.

Analizando el espectro de RMN-¹³C del PVE 1 (**Figura 33**) se pueden observar 40 señales, sin embargo, el PVE 1 tiene 42 carbonos en su estructura, esto se debe al grupo fenilo de la molécula que presenta dos carbonos equivalentes. Las señales con δ 98.6 (C-2') y 159.8 (C-1') son característicos de carbonos α y β insaturados a un grupo carbonilo. Además se puede observar una señal con δ 168.9 (C-3') que corresponde a un carbonilo de éster y una señal con δ 51.3 (C-4') que corresponde al metilo terminal del éster. Al comparar las señales de carbono obtenidas del PVE 1 con el alcohol propargílico 1 (**Figura 19**) se puede observar que las señales del tripe enlace (C-5' y C-6') y las señales aromáticas (C-7' a la C-12') permanecen en la molécula por lo que se confirma la obtención del respectivo PVE.

Para identificar la posición de los sustituyentes se analizó el experimento HMBC donde se puede observar las correlaciones de los protones H-2 con el carbono C-5' del tripe enlace (**Figura 34**), además se puede observar la correlación del protón H-1' del doble enlace del éster con el carbono C-3 de lupeol (**Figura 35**) lo que confirmaría que el fenilacetileno y el éster vinílico se encuentran sobre el carbono 3 del lupeol.

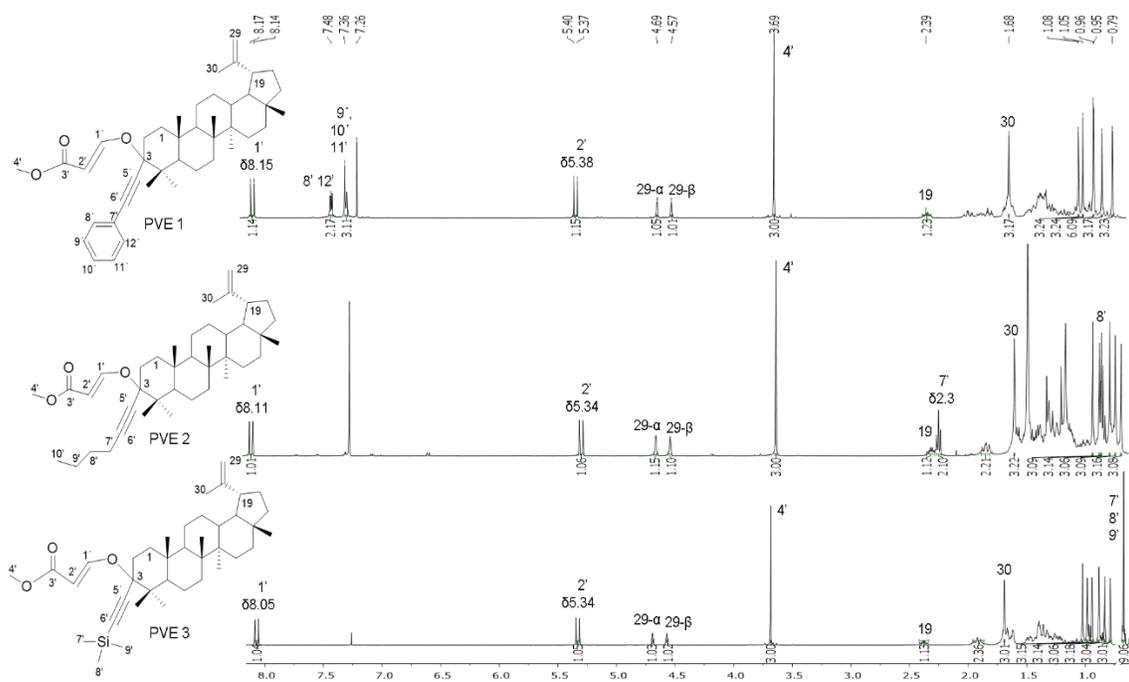


Figura 32. Espectros de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de los PVE 1, 2 y 3.

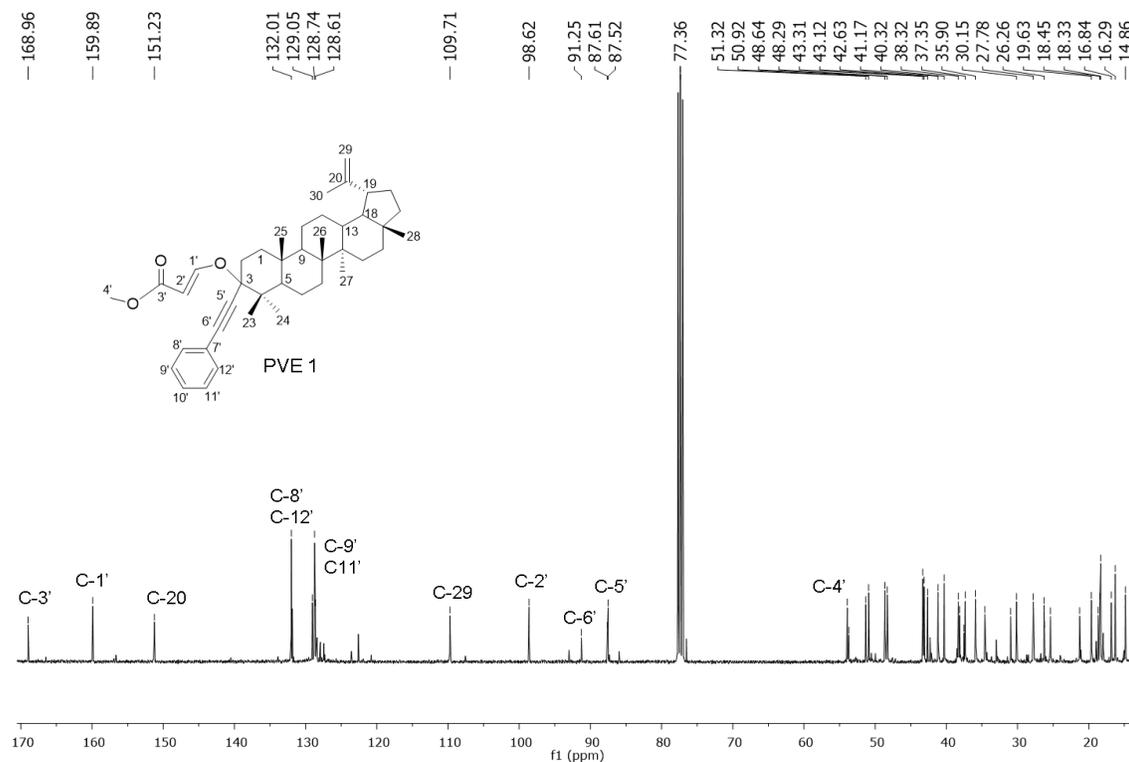


Figura 33. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del PVE 1.

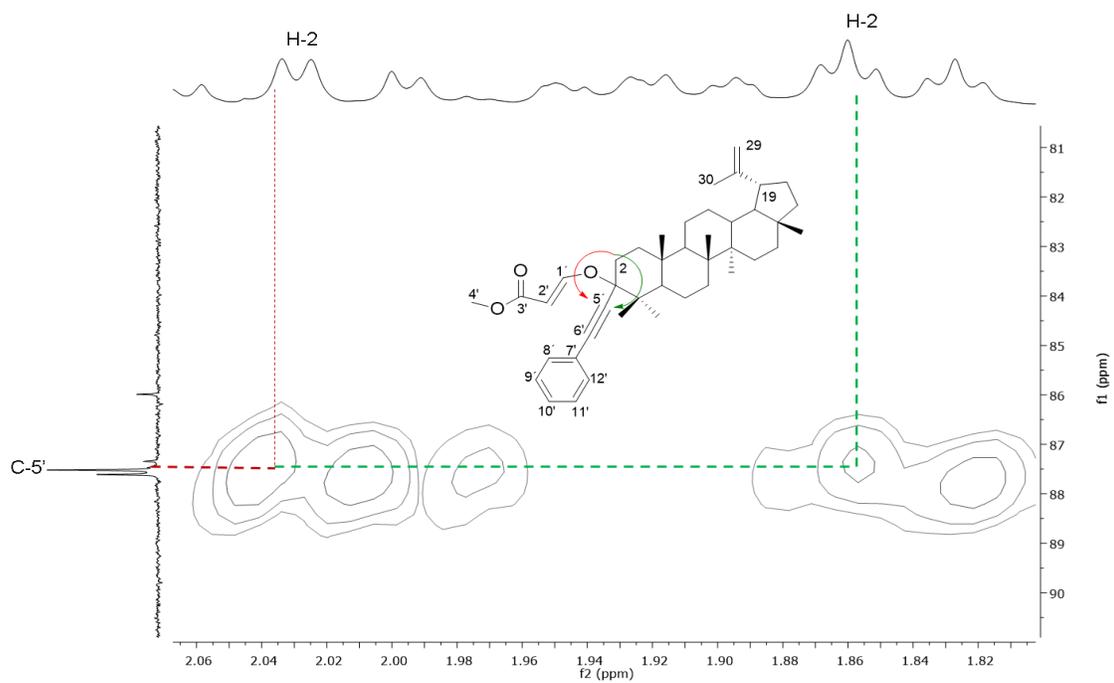


Figura 34. HMBC del PVE 1, correlación de los protones H-2 con el carbono C-5'.

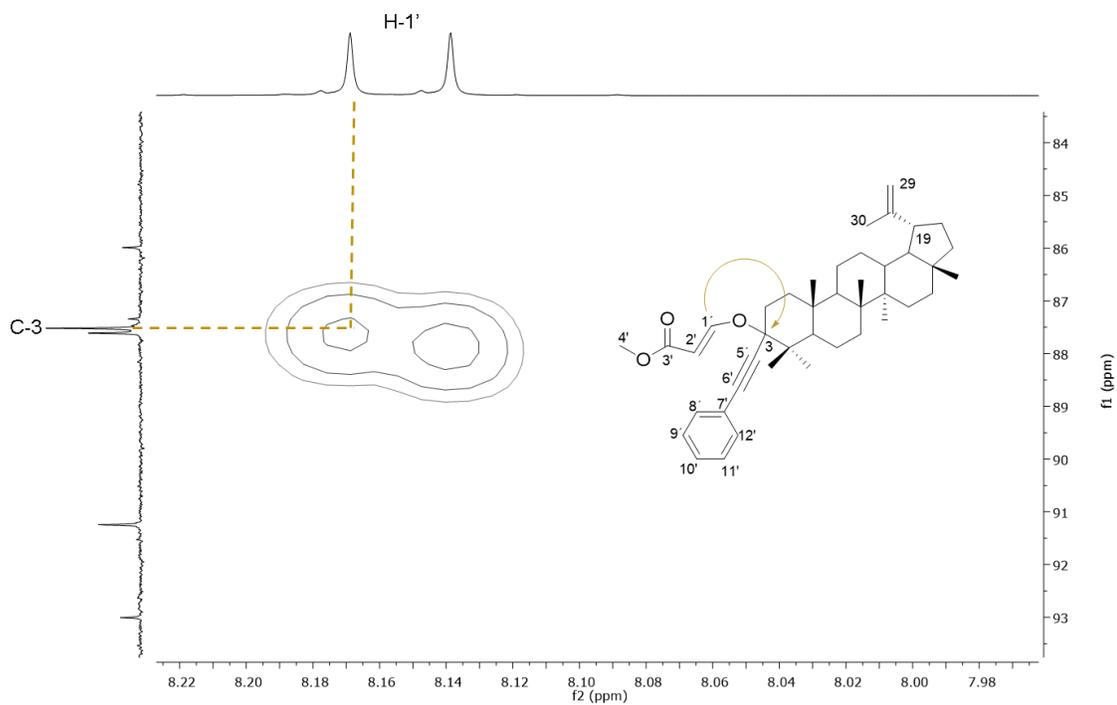


Figura 35. HMBC del PVE 1, correlación del protón H-1' con el carbono C-3.

Además de los PVEs obtenidos también se aisló el producto **PS2** que fue identificado por RMN-¹H (**Figura 36**). Este producto resulta de la dimerización de propiolato de metilo por lo que se confirmaría que la síntesis de los PVES se lleva a cabo mediante el mecanismo propuesto en la literatura.⁶¹

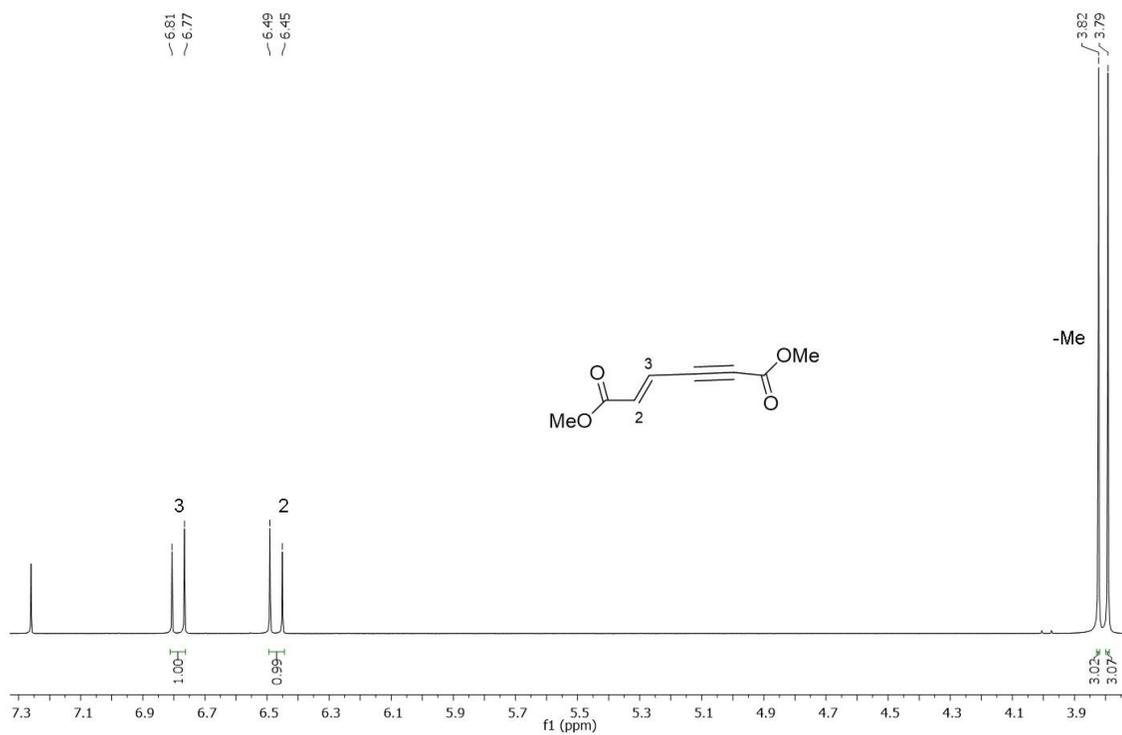
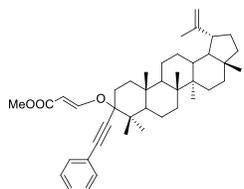
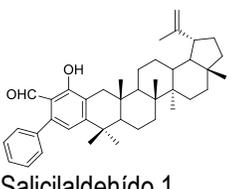
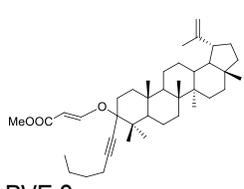
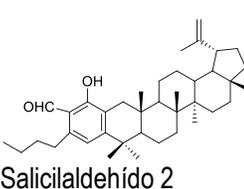
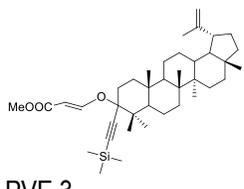


Figura 36. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) del producto secundario PS2.

Obtención de Salicilaldehídos

Para la síntesis de salicilaldehídos se adicionaron los respectivos PVEs obtenidos anteriormente, imidazol y *o*-xileno en un tubo de reacción para microondas y el equipo se programó de acuerdo a lo descrito en la metodología.³¹ De esta manera se obtuvieron 3-hidroxi-(1-fenil)-lupeol[2,3]-2-carbaldehído (salicilaldehído 1), 3-butil-1-hidroxi-lupeol[2,3]-2-carbaldehído (salicilaldehído 2) y 1-hidroxi-3-(trimetilsilil)-lupeol[2,3]-2-carbaldehído (salicilaldehído 3). Los rendimientos obtenidos para los salicilaldehídos se muestran en la **Tabla 4**. Las reacciones para la síntesis de los tres salicilaldehídos fueron realizadas una sola vez.

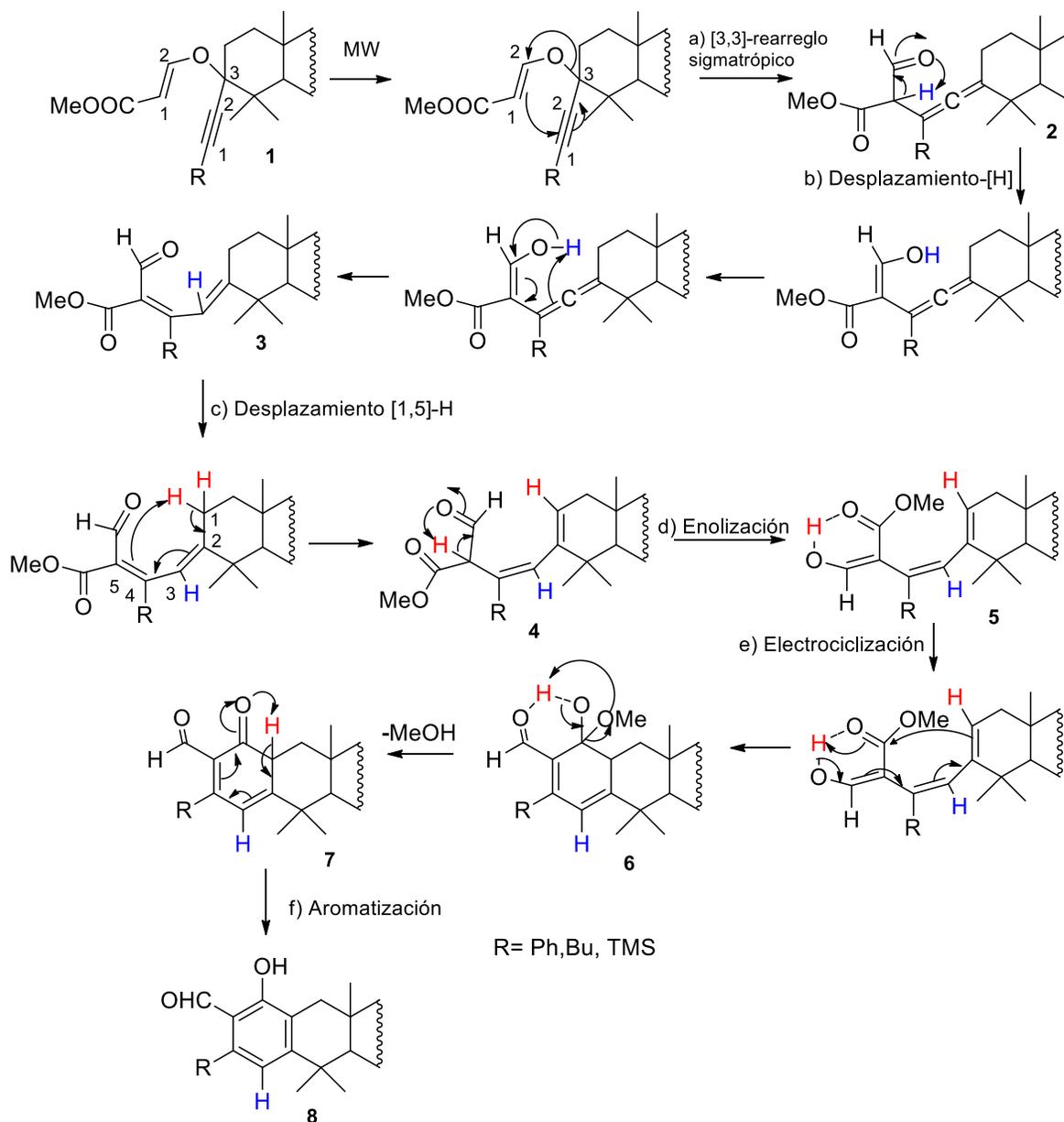
Tabla 4. Rendimientos para los salicilaldehídos obtenidos.

Sustrato	Producto	Rendimiento (%)
 PVE 1	 Salicilaldehído 1	96
 PVE 2	 Salicilaldehído 2	76
 PVE 3	 Salicilaldehído 3	82

El salicilaldehído 1 se obtiene con excelente rendimiento, en este caso el rendimiento obtenido para el salicilaldehído 1 es prácticamente idéntico al reportado por Tejedor et al. (95%).⁶² El rendimiento del salicilaldehído 3 puede considerarse muy bueno, mientras que el rendimiento del salicilaldehído 2 puede considerarse bueno considerando que los anillos de salicilaldehídos se encuentran fusionados al anillo A de lupeol y que el mecanismo de reacción para su obtención es complejo. Además se han reportado salicilaldehídos sustituidos similares a los obtenidos experimentalmente con la diferencia que estos no están fusionados a ningún anillo con rendimientos que van de 53% hasta un 80%.³¹

Recientemente se ha descrito un mecanismo de reacción para la obtención de salicilaldehídos mediante reacciones dominó asistido por microondas (**Esquema 12**). En este mecanismo la reacción inicia mediante un rearrreglo [3,3] sigmatrópico asistido por microondas del compuesto **1** de partida para generar el intermedio alénico **2**, que se reordena mediante un desplazamiento de hidruro pseudopericíclico para generar el intermedio dienilo **3** favorecido por la alta temperatura. Posteriormente ocurre una reacción tándem de isomerización-desplazamiento [1,5] de hidruro-enolización para generar el dienil enol **5** una especie clave para las siguientes reacciones. A partir del

dienil enol **5** ocurre una 6π -electrociclización para generar el intermedio **6** que por eliminación de metanol genera el intermedio **7** que finalmente se aromatiza para generar el compuesto deseado **8**.⁶³



Esquema 12. Mecanismo propuesto para la síntesis de salicilaldehídos asistido por microondas a partir de PVEs.

Las reacciones de rearrreglo sigmatrópicas pueden llevarse a cabo por métodos de calentamiento convencionales, sin embargo se requieren tiempos de reacción muy

largos (36 horas hasta 4 días para moléculas más complejas) y solo se obtendría el aleno como producto final (**5**) por lo que se tendría que purificar y realizar las siguientes reacciones por separado hasta obtener el salicilaldehído. Utilizando el microondas el tiempo de reacción se acorta a tan solo unos minutos, además, la radiación incide directamente sobre el disolvente calentando de manera uniforme y constante el medio de reacción alcanzando temperaturas superiores a los 190° C en cuestión de minutos, lo que favorece las reacciones dominó ajustando las condiciones de reacción como el tiempo, temperatura y presión así como el uso de disolventes con puntos de ebullición elevados, obteniendo el salicilaldehído sin necesidad de purificar los productos intermedios.⁶⁴

Debido a que la reacción dominó involucra a seis reacciones fue necesario utilizar una hora para promover la formación completa de los salicilaldehídos. De igual forma los rendimientos obtenidos para la síntesis de los salicilaldehídos 1, 2 y 3 corresponde al rendimiento total de las seis reacciones que tienen lugar de forma consecutiva, por lo que los rendimientos pueden ser considerados como excelentes. Los salicilaldehídos obtenidos (1, 2 y 3) fueron identificados por RMN-¹H (**Figura 37**).

Identificación de los salicilaldehídos

Las señales características del salicilaldehído 1 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ12.35 (1H, s, OH), 9.75 (1H, s, H-CO), 7.38 (2H, m, H-7', H-11'), 7.43 (3H, m, H-8', H-9', H-10'), 6.87 (1H, s, H-4'), 4.72 (1H, d, H-29a), 4.60 (1H, m, H-29b), 3.17 (1H, d, H-1b), 2.42 (1H, m, H-19), 1.92 (1H, d, H-1a), 1.90 (1H, m, H-21), 1.71 (3H, s, H-30), 1.26 (3H, s, H-23), 1.25 (3H, s, H-24), 1.13 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-27), 0.83 (6H, s, H-25, H-28); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.4 (C-1), 120.3 (C-2), 155.6 (C-3), 38.0 (C-4), 52.7 (C-5), 21.7 (C-6), 33.6 (C-7), 40.9 (C-8), 49.3 (C-9), 35.6 (C-10), 20.3 (C-11), 25.4 (C-12), 38.3 (C-13), 43.1 (C-14), 27.6 (C-15), 35.7 (C-16), 43.2 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.0 (C-20), 29.9 (C-21), 38.4.3 (C-22), 32.8 (C-23), 24.9 (C-24), 16.2 (C-25), 15.8 (C-26), 14.7 (C-27), 18.2 (C-28), 109.6 (C-29), 19.4 (C-30), 161.5 (C-1'), 143.6 (C-2'), 123.5 (C-3'), 114.9 (C-4'), 196.6 (C-5'), 138.4 (C-6'), 130.3 (C-7', C-11'), 128.4 (C-8', C-10'), 128.0 (C-9').

Las señales características del salicilaldehído 2 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ12.35 (1H, s, OH) 10.17 (1H, s, H-5'), 6.69 (1H, s, H-4'), 4.70 (1H, d, H-29a), 4.59 (1H, m, H-29b), 3.06 (1H, d, H-1b), 2.85 (2H, m, H-6'), 2.40 (1H, m, H-19), 1.94 (2H, m, H-21), 1.82 (1H, d, H-1a), 1.70 (3H, s, H-30), 1.61 (2H, m, H-7'), 1.40 (2H, m, H-8'), 1.21 (6H, s, H-23, H-24), 1.10 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, s, H-9'), 0.81 (3H, s, H-28), 0.77 (3H, s, H-25); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.4 (C-1), 119.7 (C-2), 156.2 (C-3), 38.2 (C-4), 52.6 (C-5), 21.1 (C-6), 33.6 (C-7), 40.9 (C-8), 49.3 (C-9), 35.5 (C-10), 20.3 (C-11), 25.4 (C-12), 38.2 (C-13), 43.0 (C-14), 27.6 (C-15), 35.6 (C-16), 43.2 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.0 (C-20), 29.9 (C-21), 40.1

(C-22), 32.6 (C-23), 24.8 (C-24), 16.1 (C-25), 15.8 (C-26), 14.7 (C-27), 18.2 (C-28), 109.6 (C-29), 19.4 (C-30), 162.1 (C-1'), 143.0 (C-2'), 122.1 (C-3'), 114.7 (C-4'), 194.6 (C-5'), 37.8 (C-6'), 31.9 (C-7'), 22.7 (C-8'), 14.0 (C-9').

Las señales características del salicilaldehído 3 se asignaron de la siguiente manera; RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ12.35 (1H, s, OH) 10.17 (1H, s, H-5'), 6.69 (1H, s, H-4'), 4.70 (1H, d, H-29a), 4.58 (1H, m, H-29b), 3.11 (1H, d, H-1b), 2.40 (1H, m, H-19), 1.92 (1H, m, H-21), 1.87 (1H, d, H-1a), 1.69 (3H, s, H-30), 1.23 (6H, s, H-23, H-24), 1.10 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-27), 0.81 (3H, s, H-28), 0.77 (3H, s, H-25), 0.39 (9H, s, H-6', H-7', H-8'); RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ38.4 (C-1), 120.4 (C-2), 154.5 (C-3), 37.8 (C-4), 52.7 (C-5), 21.6 (C-6), 33.6 (C-7), 40.9 (C-8), 49.3 (C-9), 35.5 (C-10), 20.2 (C-11), 25.4 (C-12), 38.4 (C-13), 43.0 (C-14), 27.6 (C-15), 35.7 (C-16), 43.1 (C-17), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 151.0 (C-20), 29.9 (C-21), 38.4.1 (C-22), 32.7 (C-23), 24.9 (C-24), 16.2 (C-25), 15.8 (C-26), 14.7 (C-27), 18.2 (C-28), 109.6 (C-29), 19.4 (C-30), 162.4 (C-1'), 141.3 (C-2'), 125.7 (C-3'), 125.4 (C-4'), 196.2 (C-5'), 1.30 (C-6', C-7', C-8')

En el espectro de RMN-¹H del salicilaldehído 1 (**Figura 37**), se puede observar la aparición de tres señales simples con δ12.35, 9.75 y 6.87. La señal con δ12.35 es provocado por el protón del hidroxilo en posición 1' que forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del aldehído, esto provoca un desapantallamiento del protón lo que hace que se desplace hacia campo bajo. La señal con δ9.75 (H-5') es característico de un protón de aldehído mientras que la señal con δ6.87 (H-4') corresponde a un protón aromático característico de benzaldehídos. También puede observarse la aparición de dos señales dobles con δ3.17 (H-1b) y δ1.92 (H-1a) provocados por la desaparición de los protones H-2 del esqueleto triterpénico, estos protones sólo correlacionan entre ellos mismos provocando el desdoblamiento característico. El desplazamiento hacia campo bajo del protón metilénico H-1b se debe a la influencia del anillo aromático y a su interacción espacial con el OH, mientras que la señal H-1a está menos desplazada debido a que no presenta una interacción espacial directa con el OH debido a que este protón estaría orientado hacia atrás. También se puede observar la desaparición de las señales dobles con δ5.37 y δ8.14 que correspondían a los protones vinílicos del PVE 1 y la señal simple con δ3.69 que correspondía al metilo terminal del éster. Las señales aromáticas del sustituyente (H-6' al H-11') y las señales características del esqueleto pentacíclico se mantienen sin cambios por lo que se confirmaría que se obtuvo el salicilaldehído.

En el espectro de RMN-¹H (**Figura 37**) del salicilaldehído 2, se puede observar la aparición de las mismas señales (OH; δ12.35, HCO; δ10.17, H-4'; δ6.69, H-1b; δ3.17, H-1a; δ1.82) que en el espectro del salicilaldehído 1. La diferencia radica en las señales del sustituyente, en este caso se observa la desaparición de la señal triple con δ 2.35 que correspondía a los protones metilénicos α al triple enlace y la aparición de una señal múltiple con δ 2.85 que corresponde a los protones en posición 6' del butilo, el

desplazamiento hacia campos más bajos de los protones del butilo se debe al desapantallamiento provocado por su cercanía al anillo aromático del hidroxibenzaldehído. También se observa que las señales del esqueleto pentacíclico se mantienen sin cambios por lo que se confirmaría la obtención del salicilaldehído.

En el espectro de RMN- ^1H del salicilaldehído 3 (**Figura 37**), se puede observar la aparición de las mismas señales que en el espectro de los salicilaldehídos anteriores. La única diferencia se encuentra en el sustituyente, en este caso se observa una señal simple con $\delta 0.39$ (H-6', H-7' y H-8') característica de los protones de metilos unidos al silicio. Además se puede observar que las señales características del esqueleto pentacíclico se mantienen sin cambios por lo que se confirmaría la identidad del respectivo salicilaldehído.

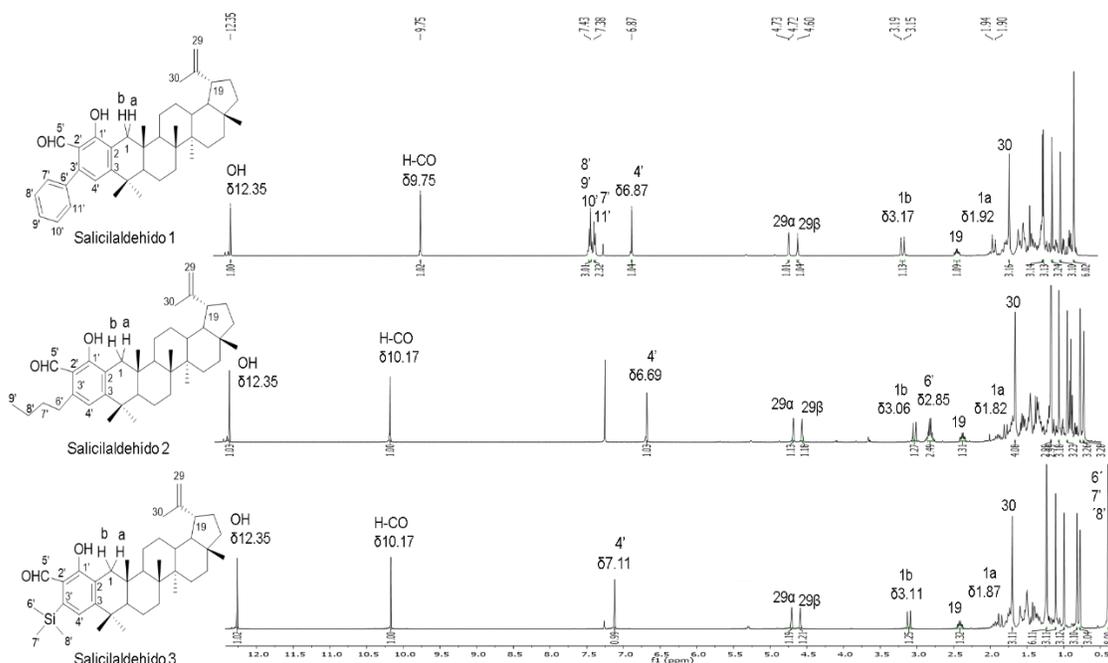


Figura 37. Espectros de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de los salicilaldehídos 1, 2 y 3.

Para confirmar la fusión del anillo de benzaldehído en el anillo A de lupeol se realizó el HSQC y HMBC. En el HMBC se puede observar la correlación del protón H-4' con los carbonos C-2, C-4 del anillo triterpénico, así como las correlaciones con los carbonos C-2' y C-3' del benzaldehído (**Figura 38**). También se puede observar las correlaciones del protón del grupo hidroxilo con los carbonos C-1', C-2 y C-3' (**Figura 39**); así como las correlaciones del protón H-1 con los carbonos C-1', C-3, C-4', C-5, C10 y C-25 (**Figura 40**). Por último se puede observar las correlaciones del protón del aldehído (H-5') con los carbonos C-1' y C3' por lo que se confirmaría la formación del anillo de benzaldehído a partir del PVE en el anillo A de lupeol (**Figura 41**).

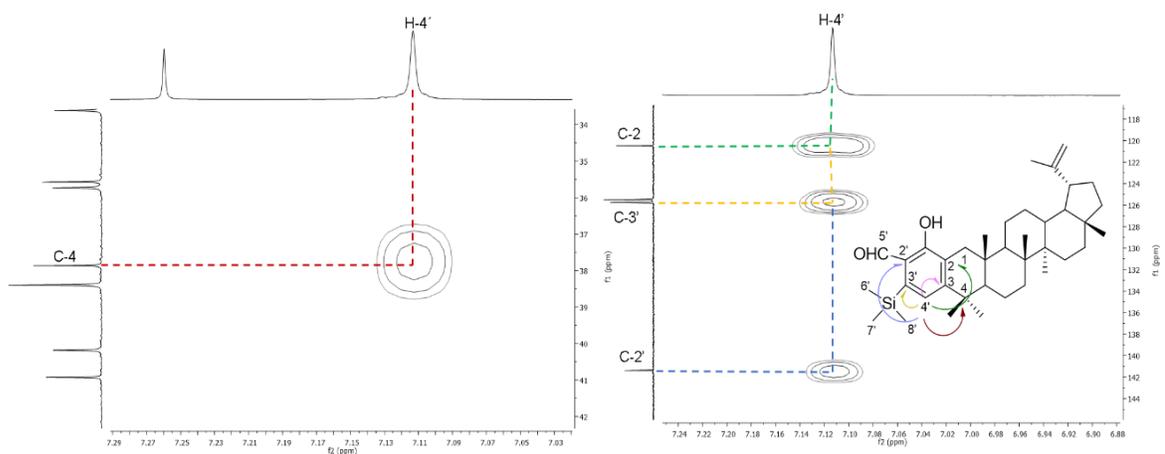


Figura 38. HMBC del salicinaldehído 3, correlación del protón H-4' con los carbonos C-2, C-4, C-2' y C-3'.

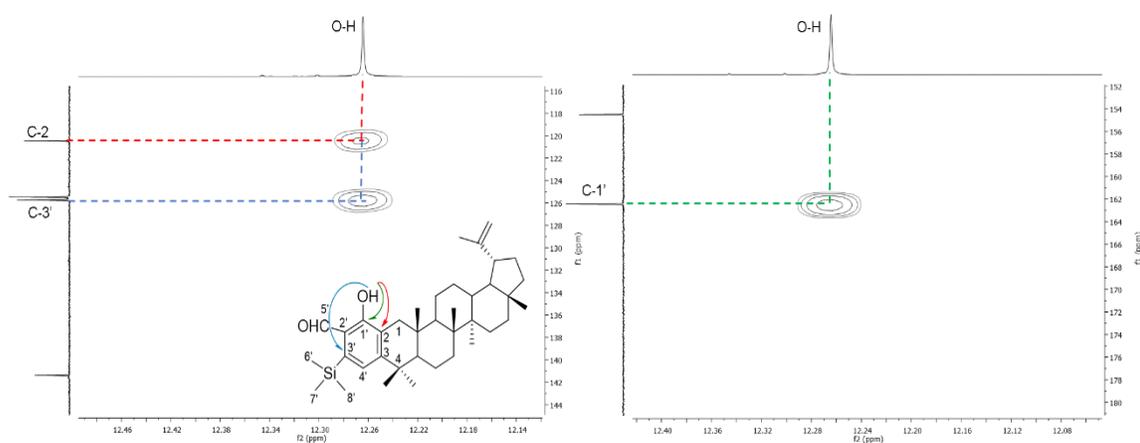


Figura 39. HMBC del salicinaldehído 3, correlación del protón O-H con los carbonos C-1', C-2 y C-3'.

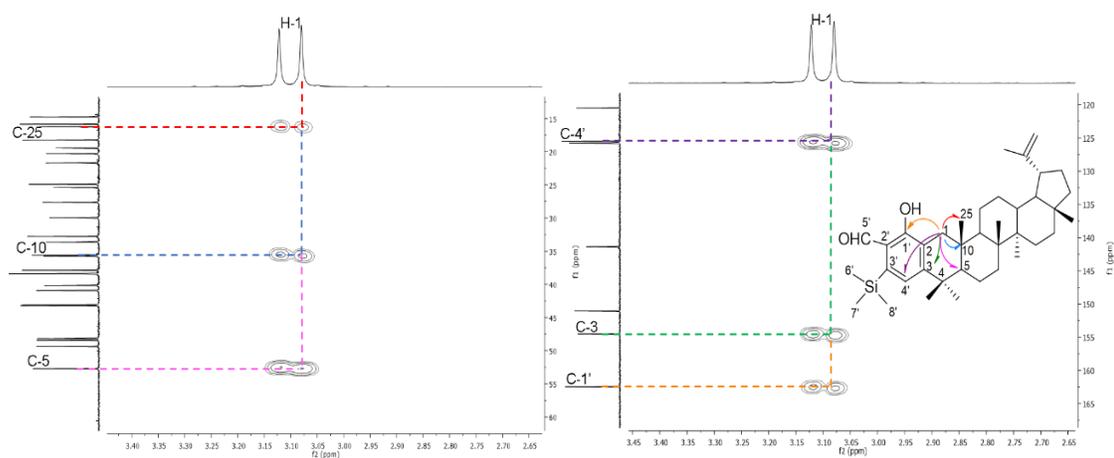


Figura 40. HMBC del salicilaldehído 3, correlación del protón H-1 con los carbonos C-1', C-3, C-4', C-5, C-10 y C-25.

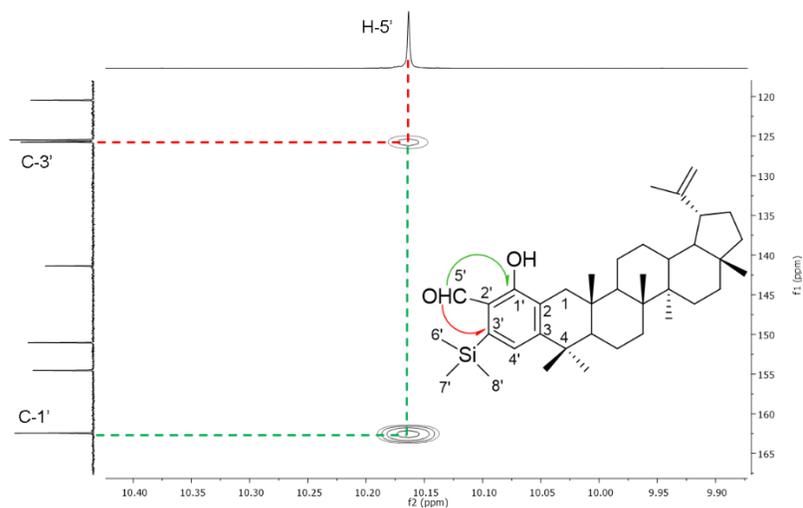


Figura 41. HMBC del salicilaldehído 3, correlación del protón H-5' con los carbonos C-1' y C-3'.

Obtención de cumarinas

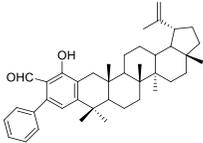
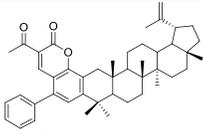
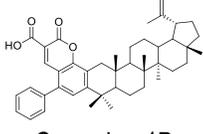
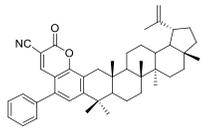
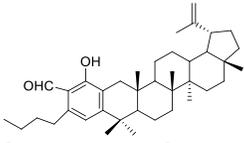
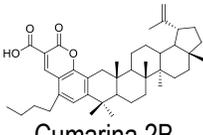
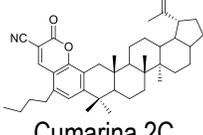
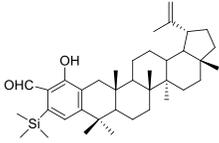
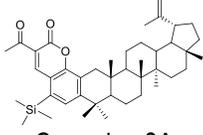
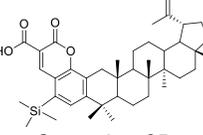
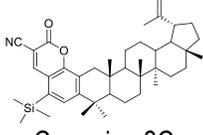
Para la obtención de cumarinas se aplicaron tres métodos (método A, B y C) como se describe en la metodología y se obtuvieron las cumarinas 3-acetil-5-fenil-2H-cromen-2-ona[2,3]lupeol (1A), 3-acetil-5-(trimetilsilil)-2H-cromen-2-ona[2,3]lupeol (3A), ácido 5-fenil-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carboxílico (1B), ácido 5-butil-2-oxo-2H-lupeol [2,3]cromeno-3-carboxílico (2B), ácido 2-oxo-5-(trimetilsilil)-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carboxílico (3B), 5-fenil-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carbonitrilo (1C), 5-butil-2-oxo-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carbonitrilo (2C) y 2-oxo-5-(trimetilsilil)-2H-lupeol[2,3]cromeno-3-carbonitrilo (3C).

Los métodos utilizados están reportados en la literatura y son utilizados para obtener cumarinas 3,5 sustituidas por reacciones dominó.³¹ Los rendimientos de las cumarinas (todas la reacciones se realizaron una sola vez) se presentan en la **Tabla 5**.

Como se puede observar en la **Tabla 5** los rendimientos van desde bajos, 36% para la cumarina 2C, a excelentes para la cumarina 3A (91%). Dentro de un método los rendimientos también son dispares, la cumarina 1C se obtuvo con un rendimiento bueno (79%) comparado con una cumarina 3,5,8 sustituida no fusionada reportado en la literatura (57%)³¹, mientras la cumarina 2C fue obtenida con un rendimiento bajo (36%).³¹ Sin embargo, en la literatura se reporta una cumarina similar a la cumarina 2C con un rendimiento más bajo (22%)³¹. En el caso de la cumarina 3C no se logró completar el tiempo de reacción de 1h debido a fallos en el equipo de microondas por lo que el tiempo de reacción fue de 20 min por lo que no se descarta que este factor haya afectado el rendimiento del producto (41%).

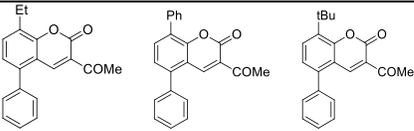
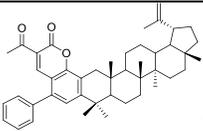
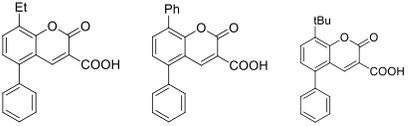
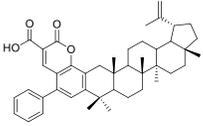
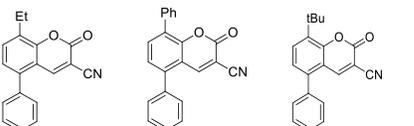
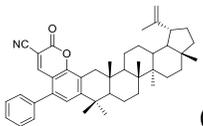
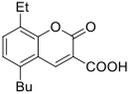
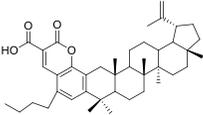
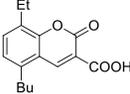
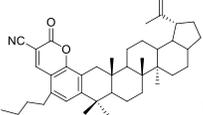
La cumarina 1A se obtuvo con un rendimiento bueno (76%) comparado con una cumarina similar (70%) reportado en la literatura³¹. La cumarina 1B (37%) y la cumarina 2B (53%) se obtuvieron con rendimientos bajo y moderado respectivamente, comparados con cumarinas similares (47% y 27%) reportados en la literatura³¹(**Tabla 6**).

Tabla 5. Rendimientos de cumarinas 3,5 sustituidas derivadas de lupeol.

Sustrato	Condiciones	Producto	Rendimiento (%)
 Salicilaldehído 1	Método A AcOEt, piperidina, EtOH Reflujo, N ₂ , 20 horas.	 Cumarina 1A	76
	Método B AM, PPA, EtOH Reflujo, N ₂ , 24 horas.	 Cumarina 1B	38
	Método C Cianoacetato de etilo, piperidina, o-xileno, MW (100° C, 300 W, 1 hora)	 Cumarina 1C	79
 Salicilaldehído 2	Método B AM, PPA, EtOH Reflujo, N ₂ , 24 horas.	 Cumarina 2B	53
	Método C Cianoacetato de etilo, piperidina, o-xileno, MW (100° C, 300 W, 1 hora)	 Cumarina 2C	36
 Salicilaldehído 3	Método A AcOEt, piperidina, THF Reflujo, N ₂ , 20 horas.	 Cumarina 3A	91
	Método B AM, PPA, THF Reflujo, N ₂ , 24 horas.	 Cumarina 3B	37
	Método C Cianoacetato de etilo, piperidina, o-xileno, MW (100° C, 300 W, 1 hora)	 Cumarina 3C	41*

*El tiempo de reacción fue de 20 min.

Tabla 6. Comparación de rendimientos de cumarinas 3,5,8 sustituidas reportadas en la literatura³¹ con las cumarinas 3,5 sustituidas fusionadas al anillo A de lupeol.

Cumarinas 3,5,8 sustituidas reportadas en la literatura	Rendimiento (%)	Cumarinas 3,5 sustituidas fusionadas al anillo A de lupeol	Rendimiento (%)
	70; 67; 38	 Cumarina 1A	76
	47; 42; 43	 Cumarina 1B	38
	57; 50; 53	 Cumarina 1C	79
	27	 Cumarina 2B	53
	22	 Cumarina 2C	36

De lo anterior (**Tabla 6**) se deduce que las reacciones son muy sustrato dependientes, es decir, pequeñas variaciones en los sustituyentes provoca grandes cambios en los rendimientos, esto se explica por los sustituyentes en las posiciones C3 y C6 de los salicilaldehídos que ejercen cierto impedimento estérico para estas reacciones, que se reflejan en los rendimientos de las cumarinas (22%-70%), ligeramente más bajos que los reportados para los derivados de salicilaldehídos con estas posiciones libres.

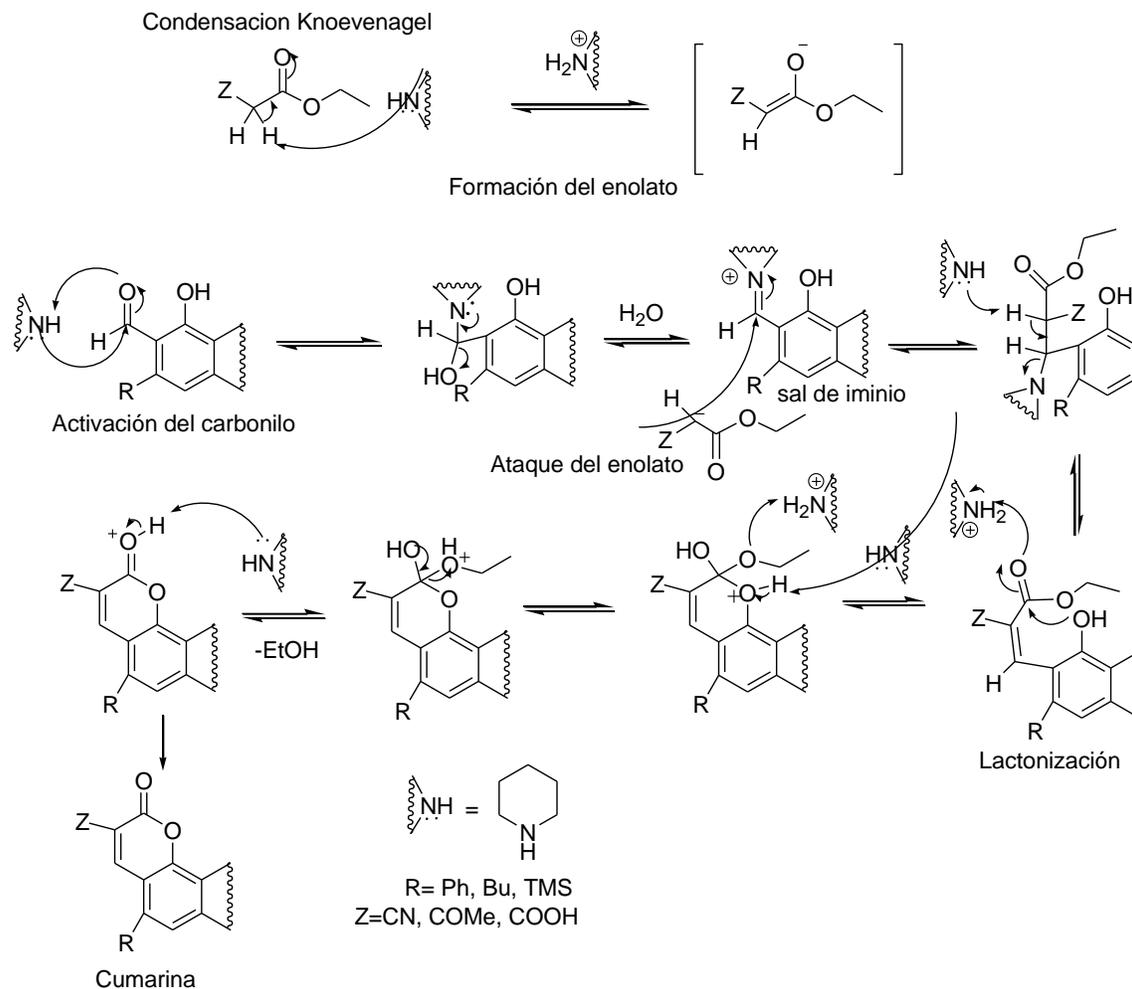
En el método C fue necesario utilizar radiación por microondas para promover la reacción, debido a que el cianoacetato de etilo es el derivado carbonílico menos reactivo y los protones α -carbonílicos son menos ácidos por lo que se requiere mayor energía, la radiación de microondas tiene la propiedad de transferir energía directamente a los reactantes, provocando el supercalentamiento instantáneo que promueve las transformaciones químicas en menor tiempo comparado al observado en las metodologías que involucran transferencia de calor.⁴¹

La cumarina 2A no se logró obtener, descartando posibles errores experimentales, pues se usó la misma metodología y los mismos reactivos para sintetizar las cumarinas 1A y 3A. La única diferencia entre los salicilaldehído 1, 2 y 3, es el sustituyente sobre el anillo aromático, un fenilo para 1, un butilo para 2 y un trimetilsilano para 3. Teniendo en cuenta que el grupo trimetilsilano es el más voluminoso de los tres y el que mejor rendimiento genera, se descarta algún efecto estérico importante. En vista que no se obtuvo la cumarina se cambiaron los disolventes, pensando en un posible problema de solubilidad, pero tampoco se obtuvo la cumarina deseada. Finalmente, se cambiaron las concentraciones de los reactivos para promover la reacción, sin embargo, tampoco se logró obtener la cumarina (**Tabla 7**). Así, en este punto la única explicación posible es que haya algún efecto electrónico no contemplado que impida que la reacción ocurra.

Tabla 7. Condiciones de reacción para la síntesis de la cumarina 2A.

Salicilaldehído 2 (mg)	Disolvente	EAA (mol)	Piperidina (mol)	Tiempo (h)
90	EtOH	1.58×10^{-4}	6.12×10^{-6}	24
90	EtOH	1.58×10^{-4}	6.12×10^{-6}	48
90	THF	1.58×10^{-4}	6.12×10^{-6}	24
90	THF/EtOH	3.16×10^{-4}	12.24×10^{-6}	24

El mecanismo de reacción propuesto para la síntesis de las cumarinas involucra una reacción dominó, donde tienen lugar de forma consecutiva, una condensación Knoevenagel y una reacción de lactonización. La condensación Knoevenagel es catalizada por una base generalmente aminas secundarias (en este caso piperidina o acetato de piperidina) que abstrae el protón más ácido del derivado carbonílico formando un enol. Posteriormente la base activa al carbonilo del salicilaldehído adicionándose a este, posteriormente se elimina una molécula de agua formando una sal de iminio, un intermediario estable, posteriormente el enolato ataca al carbono activado y la base es expulsada de la molécula formando como producto un derivado carbonílico α - β insaturado. La presencia de la base en el medio permite un ataque intramolecular 1,6 del hidroxilo sobre el carbonilo formado, la posterior desprotonación del OH y la formación de etanol permite la formación de la cumarina (**Esquema 13**).⁶⁵



Esquema 13. Mecanismo de reacción para la síntesis de las cumarinas.

Identificación de las cumarinas

En el espectro de RMN-¹H de la cumarina 1A (**Figura 42**) se puede observar tres señales simples. Las señales con δ 8.51 y δ 7.30 corresponden a protones aromáticos (H-4' y H-6' respectivamente) características de cumarinas, la señal H-4' se encuentra más desplazado debido a que se encuentra conjugado con los carbonilos de la lactona y la cetona. La señal con δ 2.67 corresponde al metilo terminal de una cetona (H-10'). También se puede observar las señales aromáticas del fenilo (H-12' al H-16') y las señales características del esqueleto lupano.

En el espectro de RMN-¹H de la cumarina 3A (**Figura 42**) se puede observar las tres señales simples mencionadas anteriormente aunque ligeramente más desplazadas de manera que H-4' y H-6' aparecen con un δ 8.76 y δ 7.47 respectivamente y la señal del metilo terminal de la cetona (H-10') aparece con δ 2.72. La señal con δ 0.42 corresponde

a los metilos del TMS (H-11', H-12' y H-13'). Además se puede observar que las señales características del esqueleto lupano permanecen sin cambios.

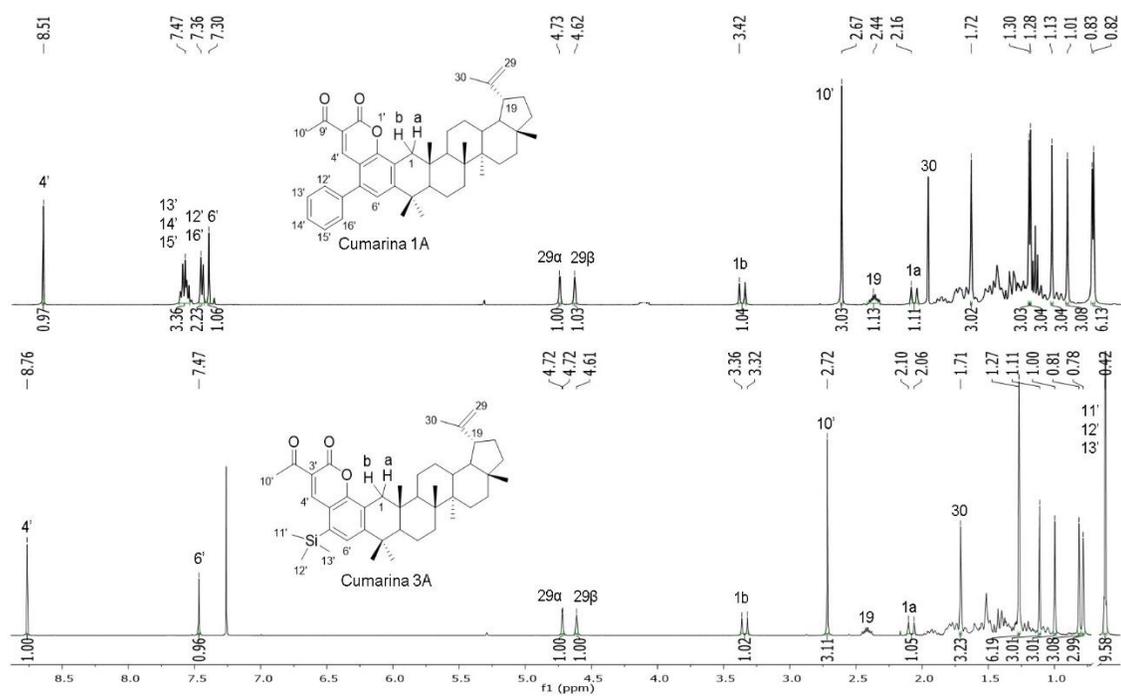


Figura 42. Espectros de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) de las cumarinas 1A y 3A.

En el espectro de RMN-¹³C (**Figura 43**) de la cumarina 1A se puede observar señales con δ 195.9, 159.5, 146.5, 124.9 y 30.6 que corresponden a un carbonilo de cetona (C-9'), a un carbonilo de lactona (C-2'), a señales aromáticas de cumarinas (C-12' y C-13') y a una señal de metilo terminal de cetona (C-10') respectivamente.

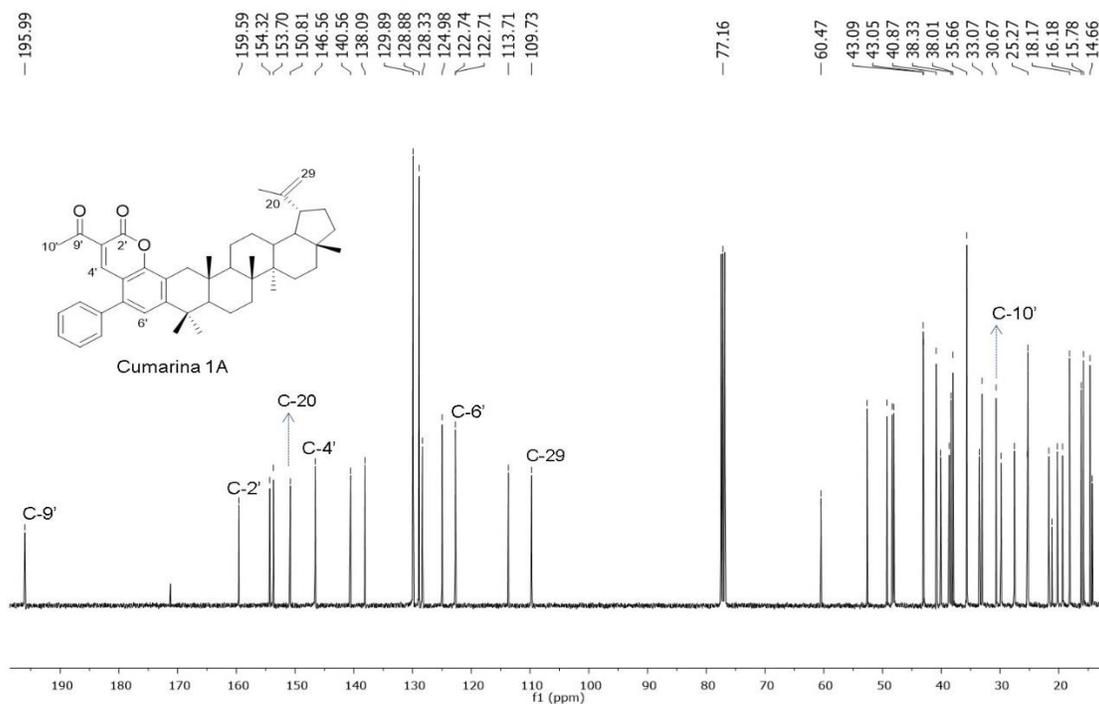


Figura 43. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de la cumarina 1A.

Para confirmar la estructura de las cumarinas sintetizadas, se realizaron los experimentos, HSQC y HMBC de la cumarina 1A (**Figura 44**). La **Tabla 8** presenta las asignaciones del HSQC para esta cumarina.

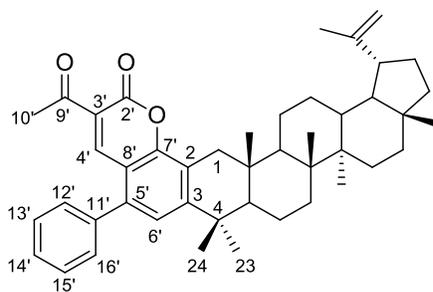


Figura 44. Posiciones más representativas del anillo de cumarina fusionada al anillo A de lupeol (cumarina 1A).

Tabla 8. HSQC del anillo de cumarina fusionada al anillo A de lupeol (cumarina 1A).

Posición	^{13}C (δ = ppm)	^1H (δ = ppm)
1	38.6	2.14, 3.39
2	122.7	q
3	153.7	q
4	38.0	q
23	33.0	1.30
24	25.2	1.28
2'	159.5	C=O (lactona)
3'	122.7	q
4'	146.5	8.52
5'	138.0	q
6'	124.9	7.30
7'	154.3	q
8'	113.7	q
9'	195.9	C=O (cetona)
10'	30.6	2.67
11'	140.5	q
12', 16'	129.8	7.35 (o)
13', 15'	128.8	7.46 (p)
14'	128.3	7.49 (m)

Una vez identificados los carbonos con sus respectivos protones se procedió a analizar el HMBC para poder asignar las señales con mayor detalle. En el experimento HMBC se puede observar las correlaciones del protón H-4' con los carbonos C-8', C-3', C-11' (**Figura 45**), C-7', C-2' y C-9' (**Figura 46**) y las correlaciones del protón H-6' con los carbonos C-4 (**Figura 47**), C-8', C-2' y C-5' (**Figura 48**) por lo que a través del experimento HMBC se lograron asignar las señales en dichas posiciones. De esta manera se confirma la fusión de las cumarinas en el anillo A de lupeol.

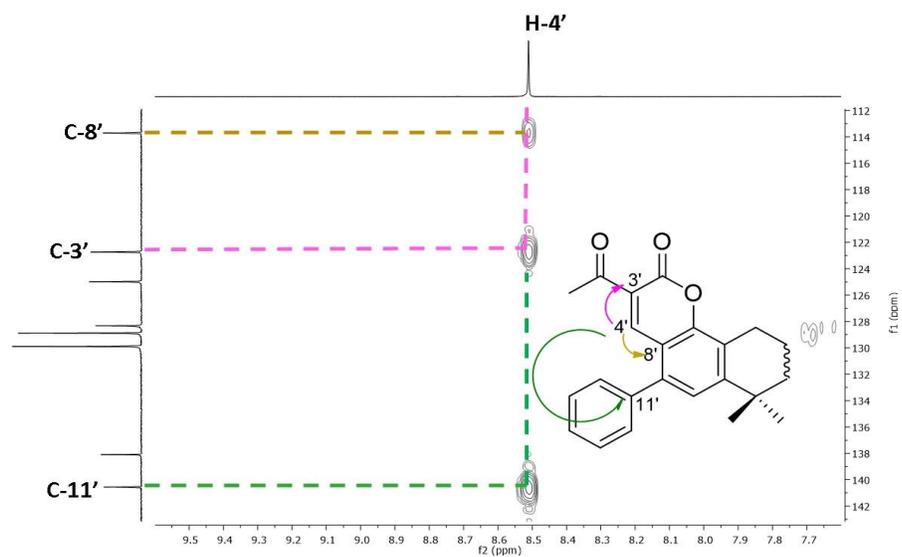


Figura 45. HMBC de la cumarina 1A, correlación del protón H-4' con los carbonos C-8', C-3' y C-11'.

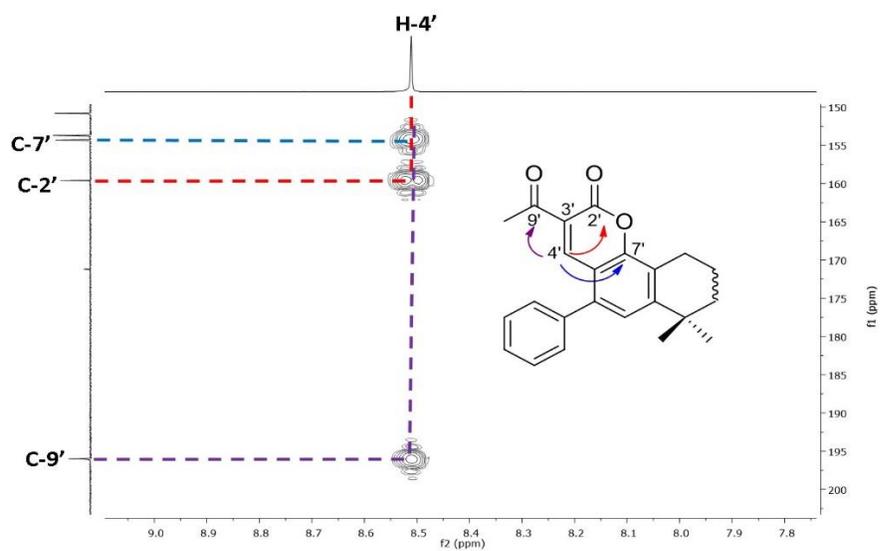


Figura 46. HMBC de la cumarina 1A, correlación del protón H-4' con los carbonos C-7', C-2' y C-9'.

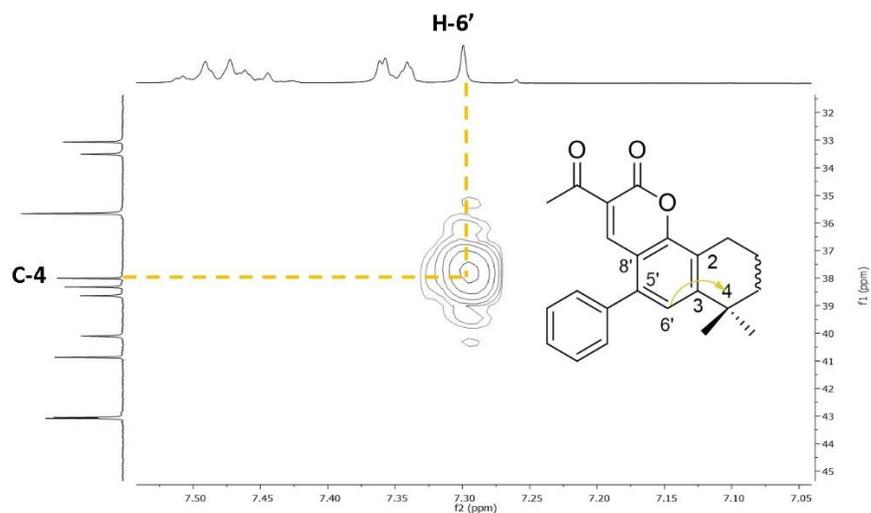


Figura 47. HMBC de la cumarina 1A, correlación del protón H-6' con el carbono C-4.

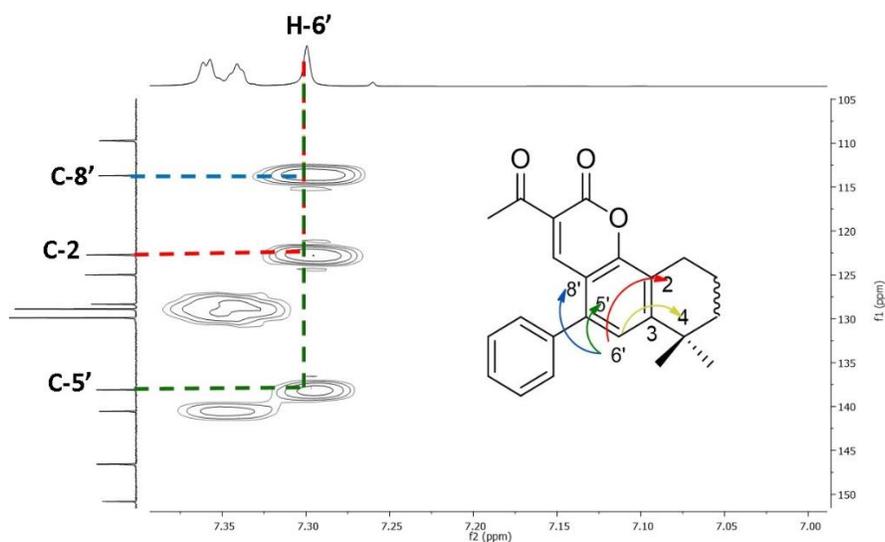


Figura 48. HMBC de la cumarina 1A, correlación del protón H-6' con los carbonos C-8', C-2 y C-5'.

En los espectros de RMN-¹H (**Figura 49**) de las cumarina 1B, 2B y 3B se puede observar las señales aromáticas correspondientes a los protones H-4' (δ 8.91; δ 9.07; δ 9.11 respectivamente) y H-6' (δ 7.36; δ 7.25; δ 7.58 respectivamente). Las diferencias en las señales para cada cumarina radican en los sustituyentes de tal forma que en la cumarina 1B se puede observar las señales aromáticas del fenilo (H-11' y H-15'), en la cumarina 2B se observa una señal triple (H-13') y una señal múltiple (H-10') correspondientes al

butilo mientras que para la cumarina 3B se observa una señal simple con $\delta 0.4$ (H-10', H-11' y H-12') que corresponde a los metilos del TMS.

Además se puede observar la aparición de una señal ancha con $\delta 12.39$ (H-9') en el espectro de la cumarina 1B. Esta señal apenas es visible e integra para un solo protón lo que indica que puede tratarse de un protón de ácido carboxílico. Sin embargo, esta señal no aparece en los espectros de las cumarina 2B y 3B, lo que refuerza la presencia del ácido carboxílico debido a que este tipo de protones generalmente son intercambiables con los protones residuales de disolventes deuterados como el cloroformo, por ello no pueden apreciarse en los espectros obtenidos.

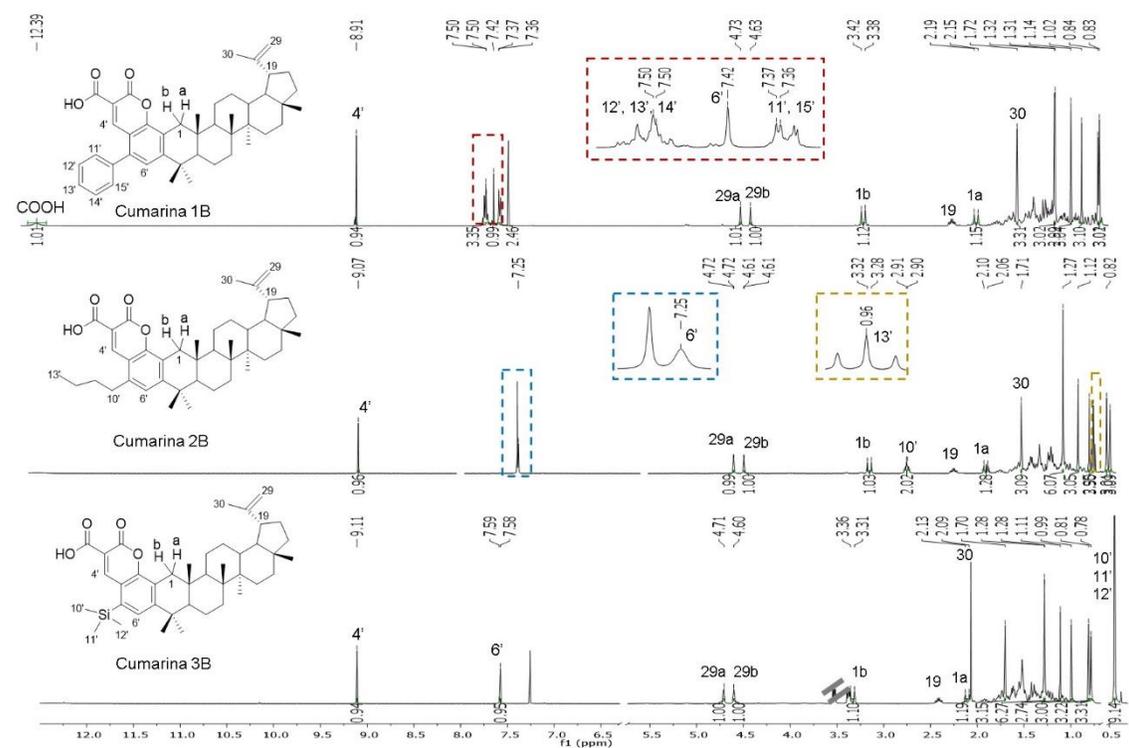


Figura 49. Espectros de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de las cumarinas 1B, 2B y 3B.

Para confirmar la presencia del ácido carboxílico en las moléculas obtenidas se procedió a analizar el espectro de RMN- ^{13}C de la cumarina 2B (**Figura 50**). En el espectro se puede observar dos señales con $\delta 164.6$ (C-9') y $\delta 163.6$ (C-2') correspondientes a un carbonilo de ácido carboxílico y una lactona respectivamente. Además se observan las señales de los carbonos aromáticos C-4' y C-6' ($\delta 148.6$ y $\delta 125.4$ respectivamente) características de cumarinas. Además se puede observar las señales del grupo butilo (C-10' y C-13') lo que confirmaría que se logró obtener las cumarinas sustituidas por un ácido carboxílico y un grupo butilo.

En el experimento HMBC de la cumarina 2B (**Figura 51**) el protón H-4' correlaciona con los carbonos C-2', C-3', C-5', C-7', C-9' además de una correlación a larga distancia (efecto w) con C-2 del anillo A de lupeol. El protón H-6' correlaciona con los carbonos C-4', C-7' (correlaciones a larga distancia), C-8' y C-10' además se observa correlaciones con C-2 y C-4 pertenecientes al anillo A de lupeol (**Figura 51**). Lo que confirma la fusión de la cumarina sustituida en el anillo A de lupeol

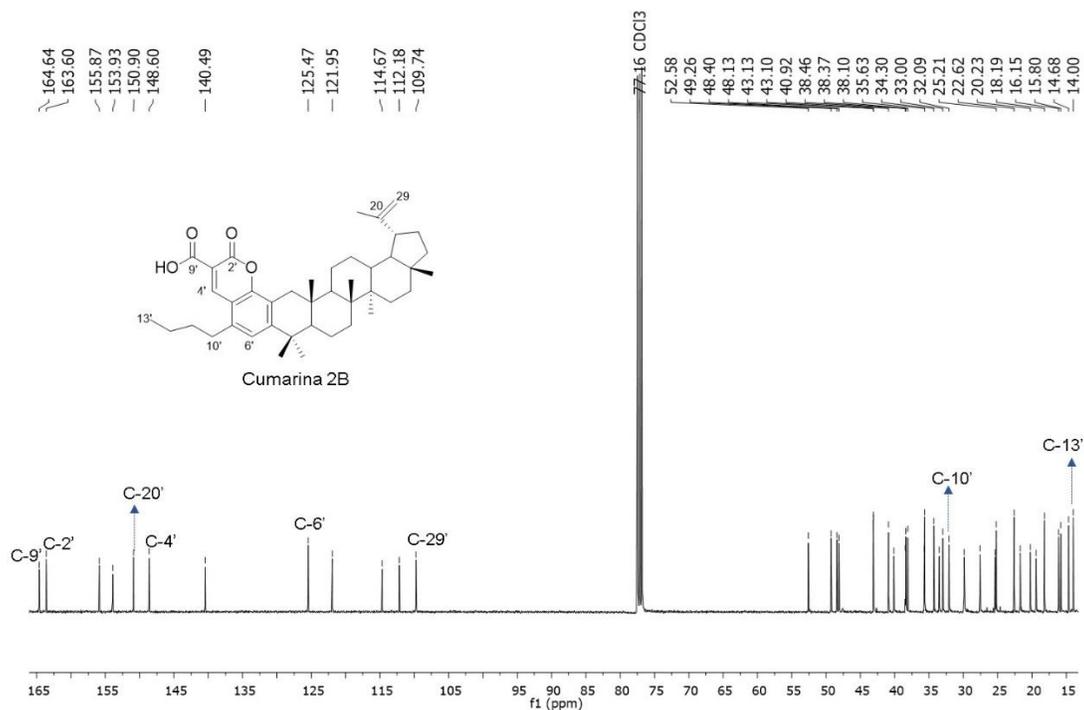


Figura 50. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de la cumarina 2B.

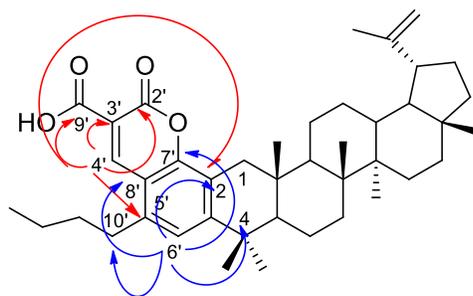


Figura 51. HMBC de la cumarina 2B, correlaciones del protón H-4' y H-6'.

En los espectros de RMN-¹H (**Figura 52**) de las cumarinas 1C, 2C y 3C se puede observar las señales aromáticas correspondientes a los protones H-4' (δ8.23, δ8.38 y δ8.80, respectivamente) y H-6' (δ7.35, δ7.17 y δ7.45, respectivamente). Al igual que con

las cumarinas obtenidas por los métodos A y B, las diferencias en las señales para cada cumarina radican en los sustituyentes de tal forma que en la cumarina 1C se puede observar las señales aromáticas del fenilo (H-11' al H-15'), en la cumarina 2C se observa una señal triple (H-13') y una señal múltiple (H-10') correspondientes al butilo mientras que para la cumarina 3B se observa una señal simple con δ 0.4 (H-10', H-11' y H-12') que corresponde a los metilos del TMS.

Para confirmar la presencia del grupo ciano en la molécula se procedió a analizar el espectro de RMN- ^{13}C de la cumarina 1C (**Figura 53**). En el espectro se puede observar una señal con δ 114.4 (C-9'), característica de nitrilos, además se puede observar la señal con δ 157.0 que corresponde a la lactona (C-2') y las señales aromáticas correspondientes a los carbonos C-4' (δ 150.9) y C-6' (δ 125.5) características de cumarinas, presentes en todas las moléculas obtenidas. Lo anterior confirma la presencia de un grupo CN en las cumarinas obtenidas.

En el experimento HMBC de la cumarina 1C (**Figura 54**) el protón H-4' correlaciona con los carbonos C-2', C-3', C-5', C-7', C-9' además de una correlación a larga distancia (efecto w) con C-2 del anillo A de lupeol. El protón H-6' correlaciona con el carbono C-7' (correlación a larga distancia), C-8' y C-10' además se observa correlaciones con C-2 y C-4 pertenecientes al anillo A de lupeol (**Figura 54**) confirmando la fusión de la cumarina sustituida en el anillo A de lupeol.

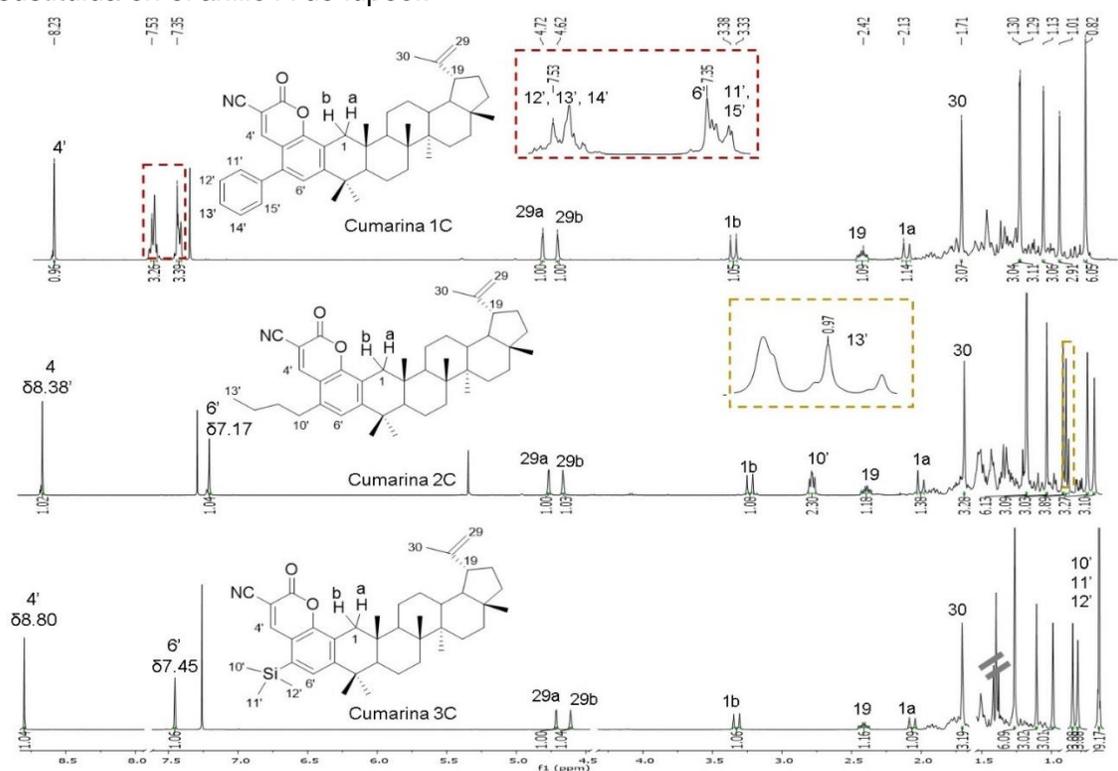


Figura 52. Espectros de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de las cumarinas 1C, 2C y 3C.

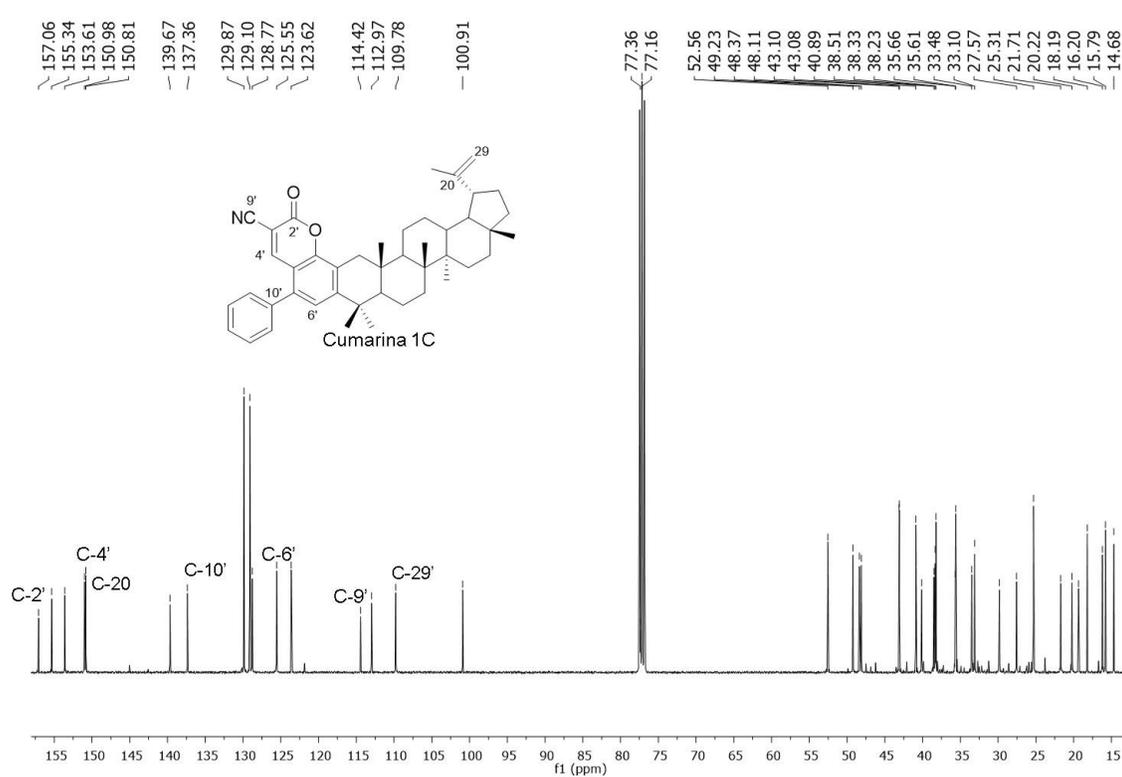


Figura 53. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de cumarina 1C.

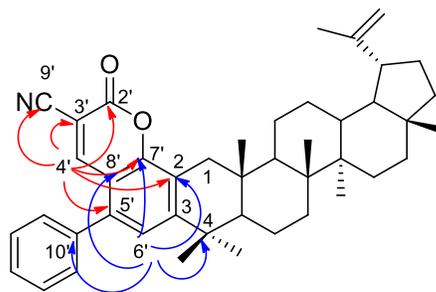


Figura 54. HMBC de la cumarina 1C, correlaciones del protón H-4' y H-6'.

Pruebas biológicas

Un total de ocho cumarinas derivadas de lupeol así como los intermediarios (alcoholes propargílicos, Pves y salicilaldehídos) fueron evaluados para determinar su actividad antiproliferativa y citotóxica contra tres líneas de células cancerosas y una línea de células normales. Las líneas celulares cancerosas utilizadas corresponden a células de adenocarcinoma de glándula mamaria con receptor estrogénico expresado (MCF-7, ATCC HTB-22), de carcinoma metastásico de glándula mamaria sin expresión de receptores de estrógeno, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (MDA-MB 231, ATCC HTB-26) y escamosas de carcinoma grado II de cuello de útero, así como células epiteliales normales de riñón de *Cercopithecus aetiops*.

Los compuestos fueron evaluados a una concentración inicial de 100 µg/mL (~150 µM) debido a que está descrito que se considera activo aquel compuesto que presenta actividad a 25 µM.⁶⁶

Es importante mencionar que el mecanismo de acción de los compuestos antineoplásicos incluyendo el docetaxel, control positivo utilizado en los ensayos, se basa en la modulación de la actividad de los receptores de estrógenos de membrana presentes en las células cancerosas al enlazarse con éstos.⁶⁷ Los mecanismos de acción del lupeol y las cumarinas 3,4 sustituidas se basan en la inhibición de la aromatasa y la sulfatasa responsables de la producción de estrógenos que conducen a la aparición del cáncer de mama.^{11,34} Por lo que se podría pensar que al unir estas moléculas simulando a los bioconjugados de cumarinas que presentaron actividad biológica contra líneas celulares MDA-MB-231 podrían presentar actividad anticancerígenas contra células de cáncer de mama.¹²

Se ha descrito en la literatura científica que el lupeol ha sido evaluado contra líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y HeLa, esta última correspondiente a células de cáncer cérvico uterino, exhibiendo IC₅₀ de 2.32, 4.47 y 10.2 µM, respectivamente.³⁴ Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis señalaron que los derivados del lupeol evaluados no presentaron actividad a la concentración inicial utilizada, por lo consiguiente fueron considerados inactivos frente a las células cancerosas de mama y cuello de útero. Así, tomando en consideración la actividad del lupeol y el volumen molecular del mismo, es posible proponer que la falta de actividad de los compuestos evaluados esté asociado al aumento en el volumen molecular, el cual aumentó significativamente al fusionar el sistema cumarina al anillo A del lupeol.

Por último, es importante resaltar el hecho que la ausencia de actividad de los compuestos contra células normales abre la posibilidad de que éstos sean selectivos contra otro tipo de blancos, por ejemplo como inhibidores del óxido nítrico (NO) asociado a la actividad antiinflamatoria.³⁸ Los procesos inflamatorios están mediados por una

variedad de moléculas de señalización producidas por leucocitos, macrófagos, mastocitos, plaquetas y linfocitos. Los macrófagos juegan un papel crucial en la modulación del inicio y perpetuación de la respuesta inflamatoria. La activación de estas células provoca la liberación de eicosanoides, NO y citocinas proinflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina (IL-1 β). El NO produce un aumento en la síntesis de prostaglandinas (PGE₂), la sobreproducción de estas últimas llevan a procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos. Cuando se estimularon macrófagos con la misma cantidad de lipopolisacárido en presencia de lupeol (1 -100 μ M), se observó una inhibición dependiente de la concentración de la producción de PGE₂. Además redujo significativamente los factores TNF- α e IL-1 β (10-100 μ M). Sin embargo, los resultados demostraron que se necesitan concentraciones cercanas a los 100 μ M para observar la actividad inhibitoria del lupeol.⁶⁸ Algunos estudios sobre la actividad antiinflamatoria de las cumarinas sugieren que estos deben contener grupos polares como sustituyentes, en este caso las cumarinas obtenidas experimentalmente poseen grupos como -COOH, -CO y CN. Por todo lo anterior, las cumarinas derivadas de lupeol pueden ser candidatas para futuros estudios enfocados en la actividad antiinflamatoria.⁶⁹

CONCLUSIONES

El acetato de lupeol está presente en grandes cantidades en las cáscaras del fruto *Chrysophyllum cainito* (2.4 %).

Es factible transformar el grupo acetato en la posición 3 del acetato de lupeol en un propargilviniléter (PVE) en una secuencia de cuatro pasos con buenos rendimientos.

Los PVEs derivados del acetato de lupeol reaccionan favorablemente a través de dos reacciones dominó para convertirse en cumarinas, así fue posible obtener ocho cumarinas 3,5 sustituidas fusionadas al anillo A de lupeol.

Ninguna de las cumarinas sintetizadas mostró actividad contra células de adenocarcinoma de mama, carcinoma metastásico de glándula mamaria y cérvix, y ninguna presentó toxicidad contra células sanas a la máxima concentración ensayada (100 μ M).

REFERENCIAS

1. Huigens, R.; Morrison, K.; Hicklin, R.; Flood, T.; Richter, M.; Hergenrother, P. A ring-distortion strategy to construct stereochemically complex and structurally diverse compounds from natural products. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 195-202.
2. Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, *9*, 767-776.
3. Melo, C.; Leite, C.; Santos, V.; Maia, G.; Gonsalves, A.; Drug development by molecular hybridization: a Medicinal Chemistry practice class using paracetamol and sulfadiazine tablets and the virtual toolscifinder®. *Quim. Nova* . 2015, *38*, 868-873.
4. Shailajan, S.; Gurjar, D. Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Chrysophyllum cainito* Linn. Leaves. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **2014**, *26*, 1, 106-111.
5. Anzanelo, N.; Rocha, L.; Da Silva G.; Martin, Z.; Delle, F.; Cechinel, V.; Lins, N. *Chrysophyllum cainito* leaves are effective against pre-clinical chronic pain models: Analysis of crude extract, fraction and isolated compounds in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *184*, 30-41.
6. Salem, M.; Marzouk, M.; El-Kazak, A. Synthesis and Characterization of Some New Coumarins with In Vitro Antitumor and Antioxidant Activity and High Protective Effects against DNA Damage. *Moléculas*, **2016**, *21*, 249.
7. Rafferty, R.; Hicklin, R.; Maloof, K.; Hergenrother, P. Synthesis of Complex and Diverse Compounds through Ring Distortion of Abietic Acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 220-224.
8. Kumar, N.; Kiuchi, M.; Tallarico, J.; Schreiber, S. Small-molecule diversity using a skeletal transformation strategy. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 13, 2535-2538.
9. Niggemann, J.; Katrin, M.; Frank, R.; Zander, N.; Höfle, G. Natural product-derived building blocks for combinatorial synthesis. Part 1. Fragmentation of natural products from myxobacteria. *J. Chem. Soc.* **2002**, *22*, 2490–2503.
10. Aquino, C.; Sarkar, M.; Chalmers, M.; Mendes, K.; Kodadek, T.; Micalizio, G. A biomimetic polyketide-inspired approach to small-molecule ligand discovery. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 2, 99.
11. Kim, J.; Kim, H.; Bum, S. Privileged Structures: Efficient Chemical “Navigators” toward Unexplored Biologically Relevant Chemical Spaces. *J. Am. Chem.* **2014**, *136*, 42, 14629-14638.
12. Musa, M.; Cooperwood, J.; Khan, M. A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 26, 2664-2679.
13. Ouyang, G.; Li, C.; Yang, J.; Li, L.; Song, X.; Jiang, Y.; Chen, N.; Ma, J.; Zhang, D. Bioactive Coumarins from the Stems of *Clausena emarginata*. *Chem. Biodiversity.* **2016**, *13*, 1-8.

14. Soto, M.; Díaz, K.; Cuautle, P.; Torres, V.; López, J.; Mandoki, J.; Molina, J. Single-cell microinjection assay indicates that 7-hydroxycoumarin induces rapid activation of caspase-3 in A549 cancer cells. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *10*, 1789-1795.
15. Jiménez, F.; López, J.; Nieto, A.; Velasco, M.; Molina, J.; Mendoza, N.; García, M.; Elizalde, P.; León, F.; Mandoki, J. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer*, **2001**, *34*, 185-194.
16. Sai, Z.; Dong, F.; Hui, S.; Xiao, Y.; Ying, L.; Yan, Z.; Hong, L. Synthesis and bioactivity of novel coumarin derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2016**, *52*, 6, 374–378.
17. Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 887-916.
18. Egana, D.; Paraic, J.; Cookec, D.; O’Kennedy, R. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. *Cancer Lett.* **1997**, *118*, 201-211.
19. Matiadis, D.; Stefanou, V.; Athanasellis, G.; Hamilakis, S.; McKee, V.; Igglessi, O.; Markopoulos, J. Synthesis, X-ray crystallographic study, and biological evaluation of coumarin and quinolinone carboxamides as anticancer agents. *Monatsh Chem.* **2013**, *144*, 1063-1069.
20. Juntos contra el cáncer. <http://juntoscontraelcancer.mx/panorama-del-cancer-en-mexico/> (consultado noviembre de 2018).
21. De, S.; Gibbs, R. An Efficient and Practical Procedure for the Synthesis of 4-Substituted Coumarins. *Synthesis*. **2005**, *8*, 1231-1233.
22. Bahekar, S.; Shinde, D. Samarium(III) catalyzed one-pot construction of coumarins. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7999–8001.
23. Aslam, K.; Khosa, M.; Jahan, N.; Nosheen, S. Synthesis and applications of coumarin. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2010**, *23*, 4, pp.449-454.
24. Harayama, T.; Nakatsuka, K.; Nishioka, H.; Murakami, K.; Hayashida, N.; Ishii, H. Convenient synthesis of a simple coumarin from salicylaldehyde and Wittig Reagent. II: Synthesis of bromo and methoxycarbonylcoumarins. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 10, 2170-2173.
25. Tietze, L. Domino Reactions in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 115-136.
26. Otero, J.; Granja, J. Aprendiendo de la naturaleza: reacciones en cascada en síntesis. *An. Quím.* **2012**, *108*, 2, 106–113.
27. Wender, P.; Miller, B. Synthesis at the molecular frontier. *Nature*. **2009**, *460*, 7252, 197-201.
28. Humphrey, A.; O’Hagan, D. Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 494–502.
29. Robinson, R. A Synthesis of Tropinone. *J. Chem. Soc. Trans.* **1917**, *111*, 762-768.

30. Vashishtha, M.; Mishra, M.; Shah, D. Organobase catalysis using 1-(2-pyrimidyl) piperazine in micellar medium: An approach for better performance and reusability of organobase. *Green Chem.* **2016**, *18*, 5, 1339-1354.
31. Tejedor, D.; Cotos, L.; García, F. Coupled Domino Processes: Synthesis of 3,5,8 Trisubstituted Coumarins from Propargyl Vinyl Ethers. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8853-8858.
32. Gallo, M.; Sarachine, M. Biological Activities of Lupeol. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.*, **2009**, *3*, 1, 46-66.
33. Saleem, M. Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. *Cancer Lett.* **2009**, *285*, 2, 109-115.
34. Jafri, L.; Saleem, S.; Kondrytuk, T.; Haq, I.; Ullah, N.; Pezzuto J.; Mirza, B. *Hedera nepalensis* K. Koch: A Novel Source of Natural Cancer Chemopreventive and Anticancerous Compounds. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 447-453.
35. Lucetti, D. L.; Lucetti, E. CP.; Bandeira, M. A.; Veras, H. N.; Silva, A. H.; AM Leal, L. H.; Lopes, A. A.; Alves, V. CC.; Silva, G. S.; Brito, G. A.; Viana, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *J. Inflammation.* **2010**, *7*, 1-11.
36. Wang, W.; Chuang, H.; Chen, C.; Chen, W.; Hwang, J. Lupeol acetate ameliorates collagen-induced arthritis and osteoclastogenesis of mice through improvement of microenvironment. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *79*, 231-240.
37. Wal, A.; Wal, P.; Rai, A.; Raj, K. Isolation and modification of pseudohybrid plant (Lupeol). *J. Pharm. Sci. & Res.* **2010**, *2*, 1, 13-25.
38. Bhandari, P.; Kumar, N.; Kumar, K. Synthesis of new heterocyclic lupeol derivatives as nitric oxide and pro-inflammatory cytokine inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3596-3599.
39. Fadhil, M.; Sutomo, S. Chemical structure optimization of lupeol as ER- α and HER2 inhibitor. *Asian J Pharm Clin Res.* **2018**, *11*, 6, 298-303.
40. Gawande, M.; Shelke, S.; Zboril, R.; Varma, R. Microwave-Assisted Chemistry: Synthetic Applications for Rapid Assembly of Nanomaterials and Organics. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1338-1348.
41. Gaba, M.; Dhingra, N. Microwave Chemistry: General Features and Applications. *Ind J Pharm Edu Res.* **2011**, *45*, 2, 175-183.
42. Kokui, T.; China, H.; Okada, Y. Microwave Irradiation Effect on Friedel-Crafts Type Cyclization Reaction. *Curr. Microwave Chem.* **2018**, *5*, 1, 32-38.
43. Dobrzanski, B. Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials, InTech: India, 2011, pp 673-674, 676, 691.
44. Florento, L.; Matias, R.; Tũaño, Elena.; Santiago, K.; de la Cruz, F.; Tuazon, A. Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach. *Int J Biomed Sci* **2012**, *8*, 1, 76-80.

45. Lakshmi¹, V.; Mahdi, A.; Ahmad, M.; Agarwal S.; Srivastava, A. Antidiabetic Activity of Lupeol and Lupeol Esters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bangladesh Pharm. J.* **2014**, *17*, 2, 138-146.
46. Jamal, A.; Yaacob, W.; Laily, B. A Chemical Study on *Phyllanthus reticulatus*. *J. Phys. Sci.* **2008**, *19*, 2, 45-50.
47. Suwito¹, H.; Heffen, W.; Cahyana, H.; Suwarso, W. Isolation, Transformation, Anticancer, and Apoptosis Activity of Lupeyl Acetate From *Artocarpus integrus*. *AIP Conf. Proc.* **2016**, *1718*, 1, 080004.
48. Bhandari, P.; Patel, N.; Bhutani, K. Synthesis of new heterocyclic lupeol derivatives as nitric oxide and pro-inflammatory cytokine inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 15, 3596-3599.
49. Vogel, A.; Textbook of practical organic chemistry, 5th ed.; Longman: London, 1989; pp 33.
50. Malca, G.; Hennig, L.; Sieler, J.; Bussmann, R. Constituents of *Corynaea crassa* "Peruvian Viagra". *Rev. bras. farmacogn.* **2015**, *25*, 92-97.
51. Wang, H.; Wang, K. Lupene-type triterpenoids from *celastrus oblancheifolius*. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, *52*, 4, 6654-665.
52. Venkata, C.; Prakash, S.; Prakash, I. Isolation and Structural Characterization of Lupane Triterpenes from *Polypodium Vulgare*. *Res. J. Pharmaceutical Sci.* **2012**, *1*, 1, 23-27.
53. Tejedor, D.; Cotos, L.; Méndez, G.; García, F. General Synthesis of Substituted 1,2 Dihydropyridines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10655-10661.
54. Midland, M.; Alfonso, A., Cable, J. Synthesis of Alkyl 4-Hydroxy-2-alkynoates. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 28-29.
55. Kotani, S.; Kukita, K.; Tanaka, K.; Ichibakase, T.; Nakajima, M. Lithium Binaphtholate-Catalyzed Asymmetric Addition of Lithium Acetylides to Carbonyl Compounds. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11, 4817-25.
56. Gessner, V.; Däschlein, C.; Strohmam, C. Structure Formation Principles and Reactivity of Organolithium Compounds. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3320-3334.
57. Sandtorv, A.; Bjorsvik, H. Scope and Mechanistic Limitations of a Sonogashira Coupling Reaction on an Imidazole Backbone. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 4658-4666.
58. Basto Mijangos, H. N. introducción de una amina homoalílica en lupeol aislado de *Chrysophyllum cainito*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, noviembre 2017.
59. Mathe, C.; Culioli, G.; Archier, P.; Vieillescazes, C. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1023*, 277-285.
60. Assimopoulou, A.; Papageorgiou, V. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomed. Chromatogr.* **2005**, *19*, 285-311.

61. Tejedor, D.; Álvarez, S.; López, J.; Martín, V.; García, F. A Robust and General Protocol for the Lewis-Base-Catalysed Reaction of Alcohols and Alkyl Propiolates. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *1*, 198-205.
62. Tejedor, D.; Delgado, S.; Marrero, R.; Dapuerto, R.; Mena, G.; García, F. Diversifying complexity by domino benzannulation of polycyclic natural products. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, *10*, pp 5328-5336.
63. Tejedor, D.; Mendez, G.; Cotos, L.; Ramirez, M.; García F. A Microwave-Assisted Domino Rearrangement of Propargyl Vinyl Ethers to Multifunctionalized Aromatic Platforms. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3318-3321.
64. Majetich, G.; Hicks, R. Applications of microwave-accelerated organic synthesis. *Radial. Phys. Chem.* **1995**, *45*, *4*, 567-579.
65. Kürti, L. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis, Elsevier Academic Press: California, 2005; pp 242-243.
66. Cos, P.; Vlietinck, A.; Vanden, D.; Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 290-302.
67. Hanauske, A.; Depenbrock, H.; Shirvani, D.; Rastetter, J. Effects of the microtubule-disturbing agents docetaxel (Taxotere), vinblastine and vincristine on epidermal growth factor-receptor binding of human breast cancer cell lines *in vitro*. *Eur J Cancer.* **1994**, *30*, *11*, 1688-94.
68. Fernández M.; de las Heras, B.; García, M.; Sáenz, M.; Villar, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J Pharm Pharmacol.* **2001**, *53*, 533-539.
69. Hadjipavlou, D.; Litinas, K.; Kontogiorgisa, C. The Anti-inflammatory Effect of Coumarin and its Derivatives. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med. Chem.* **2007**, *6*, *4*, 293-306.

