

Artículo original

Síntesis de derivados nitrogenados de la podofilotoxina.**Synthesis of nitrogen derivatives from podophyllotoxin.****Santiago-Dugarte Carolina¹, Abad-Reyes Andrés¹, Bahsas Alí², Chacón-Morales Pablo¹.**¹Laboratorio de Productos Naturales. ²Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido septiembre 2013 - Aceptado enero 2014

RESUMEN

A partir de la resina comercial (Podofilina) de *Podophyllum emodi* se aisló la podofilotoxina (1). Este compuesto se utilizó como sustrato de partida para sintetizar la 7 β -azido-7-desoxipodofilotoxina (2), la *N*-metil-7-imino-7-desoxipodofilotoxina (3) y *N*-metil-7-amino-7-desoxi-neo-podofilotoxina (4). Todas las estructuras fueron determinadas mediante el análisis de sus espectros de infrarrojo por transformada de fourier (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (RMN) uni- y bi-dimensionales. Se discute brevemente la propuesta del mecanismo para la formación de los derivados nitrogenados (3) y (4).

PALABRAS CLAVE

Podofilotoxina, iminas, lactamas, Podofilina, *Podophyllum*.

ABSTRACT

The podophyllotoxin (1) isolated from the commercial resin (Podophyllin) of *Podophyllum emodi* was used as a starting material to synthesize nitrogen derivatives, 7 β -azide-7-deoxypodophyllotoxin (2), *N*-metil-7-imine-7-deoxypodophyllotoxin (3) and *N*-metil-7-amine-7-desoxy-neo-podophyllotoxin (4). All structures were determined by analysis of their FT-IR and uni- and bi-dimensional NMR spectra. A proposed mechanism for formation of compounds (3) and (4) is briefly discussed.

KEY WORDS

Podophyllotoxin, imine, lactam, Podophyllin, *Podophyllum*.

INTRODUCCIÓN

La podofilotoxina (1) es un metabolito secundario aromático que pertenece a la familia de los lignanos. La biosíntesis de estos compuestos proviene de la ruta del ácido shikímico, el cual evoluciona hasta formar un dímero constituido por unidades de fenilpropano [1]. Los lignanos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y poseen una gran diversidad estructural [1-3]. El compuesto (1) es el lignano más abundante aislado de la podofilina [4], una resina obtenida del extracto alcohólico de las raíces y rizomas de las especies del género *Podophyllum* [2-3]; especialmente en el *Podophyllum peltatum* Linnaeus (comúnmente conocido como Mandrake Americano ó Mayapple), distribuido en el este de Norte América y Canadá, y el *Podophyllum emodi* Wallich, proveniente del continente Asiático. Este compuesto es un producto natural de gran interés por su actividad antimetabólica, el cual es efectivo para diversos tipos de cánceres [5-6]. Debido a que es una sustancia altamente tóxica, no se permite su uso como fármaco sistémico, pero es el material de partida para la semi-síntesis de fármacos importantes en el tratamiento de células de cáncer de pulmón, testicular, leucemia, linfoma y sarcoma de Kaposi [3, 6-9]. Otra aplicación de la podofilotoxina (1), es en el tratamiento de la psoriasis vulgaris, donde se obtienen excelentes resultados [10]. Basado en lo anteriormente expuesto, se procedió a efectuar la síntesis de nuevos derivados de la podofilotoxina (1) con la finalidad de obtener compuestos que puedan presentar actividad biológica mejorada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipos. La determinación de los puntos de fusión se hizo en un instrumento Fisher-Johns modelo 12-144.

Los espectros de IR se realizaron en KBr en un espectrofotómetro Perkin–Elmer modelo FT-1725X. Para los espectros de RMN se utilizó un equipo Bruker-Avance DRX 400 de 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Las separaciones cromatográficas se hicieron en columnas empacadas con gel de sílice Merck 60 (63-200 μm , 70-230 mesh). Para la cromatografía de capa fina (TLC), se utilizaron placas Merck de gel de sílice HF 254 (0,25 mm espesor). Las placas fueron reveladas con una mezcla v/v de ácido acético-agua-ácido sulfúrico, con una proporción 20:4:1 ($\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{SO}_4$) y calentadas sobre placa térmica a 120 °C durante unos minutos. Las placas para cromatografía preparativa se montaron suspendiendo gel de sílice fluorescente (HF 254) en agua destilada (relación 1:2 p/p), y extendiendo luego la mezcla en piezas de vidrio. Las placas fueron activadas a 120 °C durante 24 horas.

Obtención de la podofilotoxina (1). Se disolvieron 100 g de resina comercial podofilina (Aldrich) de *Podophyllum emodi* W. (Berberidaceae), en acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) a 75 °C, seguidamente la solución se filtró por gravedad en caliente para luego realizar una extracción ácido-base con una disolución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 1 %, el solvente se evaporó al vacío en un rotavapor. El sólido impuro resultante fue recristalizado en benceno (C_6H_6) caliente, obteniéndose 25 g (25,0 %) de podofilotoxina (1). El proceso fue monitoreado por TLC y el compuesto fue purificado por cromatografía de columna. Se obtuvieron 21 g de un sólido blanco (P.F. = 182-183oC); IR $\text{vmax.}(\text{cm}^{-1})$: 3470 (-OH), 3008-2838 (C-H), 1760 (-O-CO-R), 1588 (C=C); RMN- ^1H (Tabla 1, Fig. 1, Fig. 2); RMN- ^{13}C (Tabla 1, Fig. 1).

Síntesis de la 7 β -azido-7-desoxipodofilotoxina (2). Se disolvieron 1,32 g (20,00 mmol) NaN_3 en 8 mL de CHCl_3 y se mezclaron con 1,60 g (3,86 mmol) de (1), seguidamente se agregaron gota a gota 1 mL (13 mmol) de ácido trifluoroacético ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). La mezcla de reacción fue agitada por 15 min a temperatura ambiente. Luego fue añadida una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 , la capa orgánica fue lavada con agua y secada con sulfato de magnesio (MgSO_4), luego el solvente se evaporó en un rotavapor. La formación del producto fue monitorizada por cromatografía de capa fina y éste fue purificado por cromatografía en placa preparativa para dar 1,58 g de un sólido amarillo (93,0 %); (P.F. = 192-194°C); IR $\text{vmax.}(\text{cm}^{-1})$: 2102 ($-\text{N}_3$), 1776 (-O-CO-R), 1588 (C=C); RMN- ^1H (Tabla 1, Fig. 1, Fig. 2); RMN- ^{13}C (Tabla 1, Fig. 1).

Síntesis de los productos N-metil-7-imino-7-desoxipodofilotoxina (3) y N-metil-7-amino-7-desoxi-neo-podofilotoxina (4). A una solución de 7 β -azido-7-desoxipodofilotoxina (2) (0,1 g, 0,23 mmol) en 20 mL de MeOH se añadieron 20 mg de Pd/C 10 %. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo corriente de hidrógeno por 72 h. El producto crudo fue filtrado y el solvente fue evaporado. La mezcla de reacción fue monitorizada por cromatografía de capa fina. Los productos (3) y (4) fueron separados mediante PTLC empleando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1). La N-metil-7-imino-7-desoxipodofilotoxina (3) se aisló como una resina de color amarillo; 3,2 mg (3,3 %) IR $\text{vmax.}(\text{cm}^{-1})$: 2916-2846 (C-H), 1772 cm^{-1} (-O-CO-R), 1588 cm^{-1} (C=C); RMN- ^1H (Tabla 1, Fig. 1, Fig. 2). La N-metil-7-amino-7-desoxi-neo-podofilotoxina (4) se aisló como una resina de color amarillo; 6,6 mg (6,7 %); IR $\text{vmax.}(\text{cm}^{-1})$: 2920-2850 (C-H), 1676 (-N-CO-R), 1590 (C=C); RMN- ^1H (Tabla 1, Fig. 1, Fig. 2); RMN- ^{13}C (Tabla 1, Fig. 1).

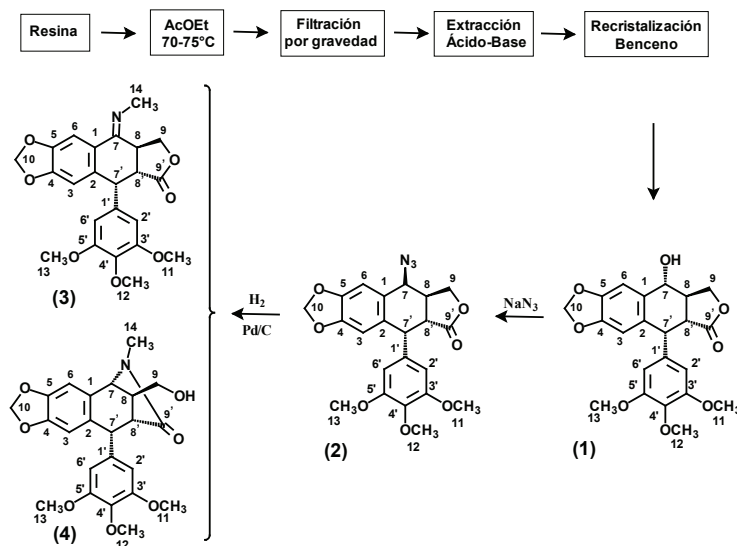


Fig. 1. Ruta para la obtención de los productos 1, 2, 3, y 4.

TABLA 1
Valores de Resonancia magnética (RMN).

Posición	δ_c				d_H (J en Hz)			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)
1	131,4	127,3	-	129,3	-	-	-	-
2	133,3	132,6	-	132,0	-	-	-	-
3	110,0	111,3	-	112,5	6,51 (s)	6,59 (s)	6,48 (s)	6,49 (s)
4	148,0	149,5	-	147,1	-	-	-	-
5	147,9	147,8	-	147,6	-	-	-	-
6	106,4	109,1	-	108,0	7,11 (s)	6,80 (s)	6,79 (s)	6,68 (s)
7	73,0	60,0	-	62,6	4,76 (d,7)	4,78 (d, 4)	-	4,10 (d, 1)
8	41,0	37,4	-	42,5	2,80 (m)	2,94 (m)	2,81 (m)	2,69 (m)
9	71,5	68,0	-	62,7	a 4,60 (m) b 4,08 (d,d 10; 9)	a 4,31 (m) b 4,31 (m)	a 4,32 (m) b 4,32 (m)	a 3,73 (m) b 3,73 (m)
10	101,6	102,3	-	101,9	a 5,98 (s) b 5,96 (s)	a 6,03 (s) b 6,01 (s)	a 5,97 (d, 1) b 5,94 (d, 1)	a 5,98 (d, 1) b 5,97 (d, 1)
11	56,5	56,8	-	57,1	3,76 (s)	3,74 (s)	3,73 (s)	3,77 (s)
12	60,9	61,2	-	61,6	3,81 (s)	3,79 (s)	3,79 (s)	3,83 (s)
13	56,5	56,8	-	57,1	3,76 (s)	3,74 (s)	3,73 (s)	3,77 (s)
14	-	-	-	28,1	-	-	2,56 (s)	2,73 (s)
1'	135,6	135,5	-	137,9	-	6,92 (d, 12,5)	-	-
2'	108,7	108,8	-	102,1	6,37 (s)	6,25 (s)	6,26 (s)	6,31 (s)
3'	152,8	153,1	-	153,9	-	-	-	-
4'	137,5	137,9	-	137,0	-	-	-	-
5'	152,8	153,1	-	153,9	-	-	-	-
6'	108,7	108,8	-	102,1	6,37 (s)	6,25 (s)	6,26 (s)	6,31 (s)
7'	44,3	44,2	-		4,6 (m)	4,60 (d, 5)	4,53 (d, 2)	4,31 (d, 1)
8'	45,5	41,7	-	51,8	2,80 (m)	3,18 (dd, 14; 5)	3,30 (dd, 4; 3)	2,52 (s)
9'	174,5	174,5	-	175,1	-	-	-	-
-OH	-	-	-	-	2,27 (s)	-	-	-

(1): Podofilotoxina RMN ^1H CDCl_3 , 400 MHz; RMN ^{13}C CDCl_3 , 100 MHz

(2): 7 β -azido-7-desoxipodofilotoxina RMN ^1H CDCl_3 , 400 MHz; RMN ^{13}C CDCl_3 , 100 MHz

(3): N-metil-7-imino-7-desoxipodofilotoxina RMN ^1H CDCl_3 , 400 MHz; RMN ^{13}C CDCl_3 , 100 MHz

(4): N-metil-7-amino-7-desoxi-neo-podofilotoxina RMN ^1H CDCl_3 , 400 MHz; RMN ^{13}C CDCl_3 , 100 MHz

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de RMN- ^1H (Fig. 1, Tabla 1) y RMN- ^{13}C (Fig. 1, Tabla 1) del compuesto (1) permitieron determinar el número de hidrógenos y de carbonos presentes en la molécula, y también, el grado de hibridación y tipo de sustitución de cada carbono, con lo cual fue posible establecer la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$. Esta fórmula molecular exige doce grados de insaturación. Una de las insaturaciones

corresponde a un grupo carbonilo [IR, ν_{max} : 1760 cm^{-1} (-O-CO-R); RMN- ^{13}C , δC : 174,5 (-O-CO-R; C-9')], ocho pertenecen a dos anillos aromáticos [IR, ν_{max} : 1588 cm^{-1} (C=C) y 756 cm^{-1} (=CH); RMN- ^{13}C , δC : 131,4 (=C<; C-1); δC : 133,3 (=C<; C-2); δC : 110,0 (=CH; C-3), δC : 148,0 (=C<; C-4), δC : 147,9 (=C<; C-5); δC : 106,4 (=CH; C-6); δC : 135,6 (=C<; C-1'); δC : 108,7 (=CH; C-2'/C-6'); δC : 152,8 (=CH; C-3'/C-5'); δC : 137,5 (=C<; C-4'); RMN- ^1H : δH : 6,51, s, (=CH; H-3); δH : 7,11, s, (=CH; H-6);

δ H: 6,37, s, (=CH; H-2'/H-6')). Dado que en los espectros IR y RMN-¹³C no existe evidencia de otros grupos funcionales que aporten insaturaciones se puede establecer que el compuesto es pentacíclico. La decima insaturación corresponde a la fusión del grupo metilendioxi [δ C: 101,6 (>CH₂; C-10); RMN-¹H: δ H: 5,98, s, (>CH₂, H-10a); δ H: 5,96 (s) (>CH₂; H-10b)] con el anillo aromático (esto se establece mediante las correlaciones C-4 ↔ H-10a-H-10b / C-5 ↔ H-10a-H-10b observadas en el espectro HMBC). La unión de los metinos δ C: 73,0 (>CH; C-7); δ C: 43,0 (>CH; C-8); δ C: 44,3 (>CH; C-7'); δ C: 45,5 (>CH; C-8') [RMN-¹H: δ H: 4,76 (d) (>CH, H-7); δ H: 2,80 (m) (>CH, H-8); δ H: 4,6 (m) (>CH, H-7'); δ H: 2,80 (m) (>CH, H-8')] y los carbonos aromáticos δ C: 131,4 (=C<; C-1); δ C: 133,3 (=C<; C-2) genera el anillo ciclohexánico; la conexión entre estos carbonos se confirma mediante las correlaciones C-2 ↔ H-7' ↔ C-8 / H-8 ↔ C-7 ↔ H-6 / C-8 ↔ H-8' / C-8' ↔ H-8 observadas en el espectro HMBC. La insaturación restante pertenece a la β -lactona formada por los metinos C-8, C-8', el carbonilo C-9' y el metileno oxigenado δ C: 71,5 (>CH₂; C-9) [RMN-¹H: δ H: 4,60 (m) (>CH₂, H-9a); δ H: 4,08 (d,d) (>CH₂, H-9b)]; la presencia de este anillo heterocíclico se confirma por medio de los cruces H-8' ↔ C9' ↔ H-9a ↔ C-8 del espectro HMBC. En el espectro RMN-¹H se observan dos singuletes a δ H: 3,81 (-OCH₃, H-12) y δ H: 3,76 (-OCH₃, H-11/H-13) [RMN-¹³C, δ C: 60,9 (-OCH₃; C-12); δ C: 56,5 (-OCH₃; C-11/C-13)] que integran para tres (3) y seis (6) protones respectivamente; éstos corresponden a los metilos del grupo trimetoxifenilo; la correlación H-8' ↔ C-1' ↔ H-7' del espectro HMBC. Por otro lado, según las correlaciones H-9b ↔ H-7 ↔ H-8' ↔ H-7' observadas en el espectro NOESY, quedó establecido que el grupo trimetoxifenilo, el carbonilo lactónico y el grupo hidroxilo están ubicados en posición α . Con ello fue posible concluir que el compuesto en estudio era la podofilotoxina (1).

El compuesto (2) (7 β -azido-7-desoxipodofilotoxina) se purificó como un sólido de color amarillo. El análisis comparativo de los espectros de RMN uni- y bidimensionales del compuesto frente a los del sustrato (1), puso en evidencia cuatro cambios significativos: la ausencia de banda de absorción de grupos -OH del espectro IR, la aparición de una banda intensa producto de la vibración de tensión del doble enlace acumulado del grupo -N₃ [ν max.: 2102 cm⁻¹ (-N₃)], la desaparición de la señal atribuida al protón hidroxílico observada en el espectro RMN-¹H de PPT (1) (Fig. 2) y la disminución de la constante de acoplamiento de H-7 (Tabla 1, Fig. 2), lo cual se debe a una variación en los ángulos diedros H-7[^]C-7

[^]C-8 [^]H-8. La estereoselectividad de esta reacción se debe a que al formarse el carbocatión bencílico por la salida del grupo -OH (luego de haber sido protonado), el ataque del -N₃ en la cara α se ve impedido por el efecto estérico que ocasiona el trimetoxifenilo.

La *N*-metil-7-imino-7-desoxipodofilotoxina (3) fue aislada como un sólido amarillo, al contrastar sus espectros de IR, RMN-¹H y ¹H-¹H COSY con los del compuesto (2) se pueden apreciar tantas diferencias que justifican la formación de la imina (3). En el espectro IR desaparece la señal del grupo -N₃ y espectro RMN-¹H se observa la ausencia del doblete correspondiente al protón H-7 y la aparición de un nuevo singulete metílico [δ H: 2,56 (=NCH₃, H-14)] (Fig. 2) cuyo desplazamiento químico concuerda con el de metilos unidos a nitrógenos imínicos [11].

La *N*-metil-7-amino-7-desoxi-neo-podofilotoxina (4) se aisló como un sólido amarillo, en su espectro RMN-¹³C se aprecia el apantallamiento de la señal asignada a C-9 (Tabla 1) [δ C: 62,0; Δ δ : -5,3 ppm respecto a C-9 en (1), δ C: 68,0], entendible en función de la apertura del anillo lactónico. Esto es congruente con la absorción de hidroxilo en el espectro IR [ν max: 3390 cm⁻¹ (O-H)] y el apantallamiento de los protones asignados como H-9a/H-9b que se observa en su espectro RMN-¹H (δ H: 3,73; Δ δ : -0,58 ppm respecto a H-9a/H-9b en (1), δ H: 4,31) (Fig. 2). Con base en el análisis de los espectros ¹H, ¹H-COSY, HMQC y HMBC se estableció la estructura de la lactama (4). La ubicación del anillo lactámico en la cara α de la molécula se justifica en función de tres argumentos elementales: Debido a que el carbonilo C-9' tiene orientación α , el nitrógeno ubicado en C-7 necesariamente debe estar en disposición α para que la lactamización se vea favorecida. La reducción de la imina (3) debe efectuarse en la cara β debido al impedimento estérico que ocasiona el grupo trimetoxifenilo en disposición α , esto obliga a que la amina resultante posea orientación α . La constante de acoplamiento del protón H-7 es muy pequeña (1 Hz, Tabla 1, Fig. 2) esto exige que el ángulo diedro H-7/ H-8 tenga un valor muy próximo a 90°; según lo indican los modelos de (4), esto se consigue cuando la β -lactama se encuentra en disposición α .

El mecanismo propuesto para la formación de los productos (3) y (4) a partir de la podofilotoxina (1) inicia con la sustitución nucleofílica S_N1 del grupo hidroxilo ubicado en C-7 formando el compuesto (2) (Fig. 3). La azida (2) es sometida a un proceso de hidrogenación catalítica (H₂ / Pd/C al 10 % / CH₃OH) pero en lugar de formarse la amina primaria, el grupo -N₃ se fragmenta liberando N₂ y promoviendo el ataque del nitrógeno restante al medio de reacción.

Así pues, en un proceso concertado, el oxígeno del CH_3OH sustrae el protón H-7 a la vez que se forma el doble enlace imídico y el nitrógeno ataca al metilo del CH_3OH , generando el producto (3) (Fig. 3). El compuesto (3) se reduce formando una *N*-metilamina que ataca intramolecularmente al carbonilo C-9' promoviendo la apertura del anillo lactónico y formando la β -lactama (4) (Fig. 3).

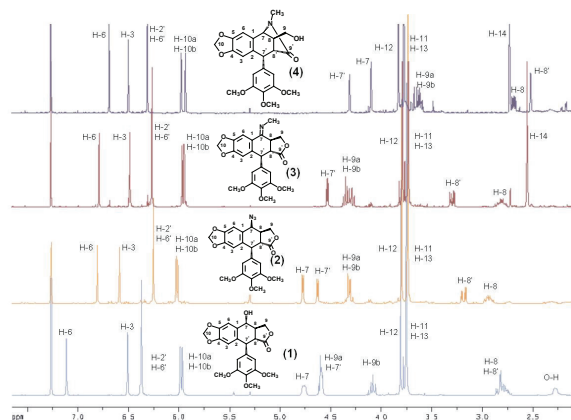


Fig. 2. Superposición de los espectros de RMN-¹H de (1), (2), (3) y (4).

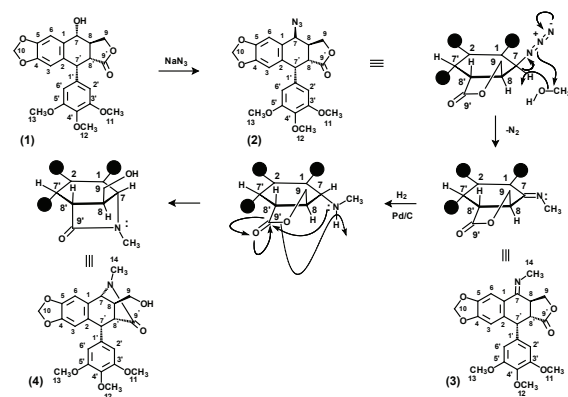


Fig. 3. Mecanismo propuesto para la formación de los productos (3) y (4).

CONCLUSIONES

La formación de los derivados (3) y (4) es novedosa, por esta razón este grupo de investigación está desarrollando actualmente experimentos orientados al estudio detallado del mecanismo y la optimización de los parámetros de la reacción para incrementar los rendimientos obtenidos. Esto permitirá efectuar ensayos de la actividad de los compuestos (3) y (4) frente a diferentes líneas de células cancerosas

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Tecnológico, Humanístico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA, Proyectos N° C-1808-12-08-A y C-1009-12-08-Ed).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Campbell M, Sainsbury M, Searle A. The biosynthesis and synthesis of shikimic acid, chorismic acid, and related compounds. University of Bath. England. 1992.
- [2] Gordaliza M, García P, Miguel del Corral J, Castro M, Gómez-Zurita M. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicol.* 2004; 44(4): 441-459.
- [3] Ayres D, Loike J. Lignans chemical, biological and clinical properties. Cambridge. University Press. 1990.
- [4] Jackson D, Dewick P. Aryltetralin Lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry.* 1984; 23(5): 1147-1152.
- [5] Cragg G, Newman D. Plants as a Source of Anti-cancer Agents. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 72-79.
- [6] Utsugi T, Shibata J, Sugimoto Y, Aoyagi K, Wierzba K, Kobunai T, *et al.* Antitumor Activity of a Novel Podophyllotoxin Derivative (TOP-53) Against Lung Cancer and Lung Metastatic Cancer. *Cancer Res.* 1996; 56: 2809-2814.
- [7] Xiao Z, Han S, Bastow K, Vance J, Sidwell R, Wang H, *et al.* Antitumor Agents. 234. Design Synthesis and Biological Evaluation of Novel 4 β -[(4''-Benzamido)-Amino]-4'-O-Demethylepipodophyllotoxin Derivatives. *J Med Chem.* 2004; 47(21): 5140-5148.
- [8] Huang T, Lee C, Chen L, Whan-Peng J., In Vitro Evaluation of GL33's Cancer Cell Killing and Apoptosis-Inducing Activity in Combination with other Chemotherapeutic Agents. *Apoptosis.* 2000; 5: 79-85.
- [9] Abad A, López-Pérez J, del Olmo E, Garcia-Fernández L, Francesch A, Andreu J, *et al.* Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins. *J Med Chem.* 2012; 55(15): 6724-6737.
- [10] Lassus A, Rosen B. Response of Solitary Psoriatic Plaques to Experimental Application of Podophyllotoxin. *Dermatologica.* 1986; 172: 319-322.
- [11] Silverstein R, Webster F. Spectroscopic Identification of Organic Compounds. 6ta Ed. New Yor (USA): J. Wiley Publisher; 1998.