

UCH-FC
DOC-a
A-816
C.

**RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
ALGUNOS ANÁLOGOS DE BOLDINA. MECANISMOS DE
OXIDACION DE LA BOLDINA**



**Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Química**

Facultad de Ciencias

por

VICTOR MARCELO ASENCIO OPORTO

Enero , 2001

Director de Tesis: Dr. Bruce K. Cassels Niven

Co-Director de Tesis: Dr. Hernán Speisky Cosoy

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Doctorado presentada por el candidato

VICTOR MARCELO ASECIO OPORTO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para
optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el
día 9 de noviembre del 2001

Director de Tesis

Dr. Bruce K. Cassels Niven

Bruce K. Cassels Niven
.....

Co-Director: Dr. Hernán Speisky

.....

Comisión de evaluación de la Tesis

Dr. Antonio Zanocco (Presidente)

Antonio Zanocco
.....

Dra. Luz María Pérez

Luz María Pérez
.....

Dr. Aurelio San Martín

Aurelio San Martín
.....

Dr. Luis Nuñez

Luis Nuñez
.....

Dr. Fernando Castañeda

Fernando Castañeda
.....

En este arduo y prolongado periplo académico, que ya frisa la estación de desembarco, ha entrecruzado mi vida con otras. Pocos, no muchos, de éstos encuentros fueron casuales, otros intensos, algunos descuidados y otros diligentes; algunos sin temor cariñosos y otros en extremo violentos; sin embargo las más de las veces fueron una mezcla aleatoria de todo lo anterior, lo que sin duda y gracias a Dios, ha enriquecido mi existencia. Me veo en la indeclinable y muy agradable situación de agradecerle aquellos toques a algunas personas:



A Oriana porque es el amor, mi amor. Por su constante apoyo durante todos estos años.

A Fernando, Daniela y Pablo, mis hijos, quienes me han enseñado que la vida no es tan complicada como creo que es.

A Carlos Asencio por enseñarme que la mejor tierra es aquella en la que no se ha cultivado nada, y por su fundamental apoyo en los primeros años de mi vida universitaria.

A mis amigos: Carola y Carolina, Pilar, Erika, Beatriz, Junia, Marly y Alejandra. A los únicos e inigualables Patricio, Gerald, Marcos, Tomas, Mariano, Bruce, Carlos, Cristian y Pablo (Rulux). Particularmente a Claudio, cuya singular y sincera manera de practicar la amistad sólo es superada por su capacidad de coquetear con las féminas.

A mis amigos de la Universidad de Rouen: Remi, Cecile, Anne Bion (a l'appareil), Corinne, Elsa, David, Dr. Abdeslam Chagraoui, Mme Jeannette Arbaoui y Dr. Philippe Verité, especialmente a Karinne Laude por su invaluable ayuda y amistad.

A Dr. Bruce K. Cassels, por su constante buen ejemplo científico y ético a lo largo de todos estos años. Esperando haber sido digno de todo su apoyo le expreso mi sincera gratitud.

A Dr. Hernán Speisky y Dra Inés Jiménez por enseñarme las múltiples aristas del trabajo científico y especialmente lo referente a la evaluación farmacológica.

A mi comisión de evaluación quienes se prodigaron de sobremanera para que éste escrito alcanzara la forma aceptable que tiene. Particularmente a la Dra. Luz Maria Perez Roepke por su gran contribución a la parte farmacológica.

C'EST DUR, PEUT-ETRE TRES DUR, MAIS C'EST LA VIE D'ARTISTE.

P. Protais.

Esta tesis esta dedicada al Dr. Philippe Protais.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	i
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	ii
RESUMEN	iv
SUMMARY	vi
INDICE DE GRÁFICOS.....	viii
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Características generales de las reacciones radicalarias.....	1
1.1.1 Revisión de algunos conceptos útiles.....	1
1.1.2 Fuentes de radicales libres iniciadores.....	2
1.1.3 Activación o inhibición de un proceso radicalario.....	3
1.1.4 Estabilidad de radicales libres.....	4
1.2 Radicales libres en el medio biológico y sistemas antioxidantes.....	7
1.2.1 Formación de oxígeno radicalario <i>in vivo</i> y especies reactivas del oxígeno.....	7
1.2.2 Especies reactivas del oxígeno (EROs). Participación de metales en reacciones de tipo Fenton.	9
1.2.3 El radical hidroxilo y el proceso de oxidación lipídica ("lipoperoxidación").....	10
1.2.4 Sistemas defensivos: los antioxidantes.....	12
1.2.5 Proteínas y enzimas complejantes de metales.....	13
1.2.6 Glutación y análogos simplificados.....	14
1.2.7 Vitamina C (ácido ascórbico), un antioxidante hidrosoluble.....	16
1.2.8 Vitamina E (α -tocoferol), un antioxidante liposoluble.....	17
1.3 Aporfinas como antioxidantes.....	20
1.3.1 La boldina.....	20
1.3.2 Relaciones estructura-actividad antioxidante de aporfinas.....	21
1.4 Objetivos generales.....	24
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1 Aislamiento de precursores y preparación de derivados.....	26
2.1.1 Nomenclatura utilizada.....	26
2.1.2 Caracterización de los compuestos obtenidos	26
2.1.3 Aislamiento de precursores	27
2.1.4 Métodos utilizados en la preparación de los derivados de aporfinas.....	29
2.1.5 Evaluación del coeficiente de reparto.....	33
2.2 Evaluación de la actividad antioxidante.....	35
2.2.1 Descoloración de soluciones de radicales catiónicos generados a partir del ácido 2,2'-azo- <i>bis</i> (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).....	35
2.2.3 Determinación de la actividad residual de lisozima en presencia de radicales libres generados por la termólisis de AAP (2,2'-azo- <i>bis</i> -amidinopropano).....	37

2.2.4	Protección de membranas microsomales por aporfinas contra radicales hidroxilo generados a partir de una reacción de tipo Fenton.....	38
2.2.5	Tratamiento de datos.....	40
3.0	RESULTADOS.....	41
3.1	Aislamiento de precursores y preparación de derivados.....	41
	Boldina, [(S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina].....	41
	Laurolicina, [(S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi- <i>nor</i> -aporfina].....	43
	Laurotetanina, [(S)-1,2,10-trimetoxi-9-hidroxiaporfina].....	44
	Pukateína, (R)-11-hidroxi-1,2-metilendioxiaporfina.....	45
	2,9- <i>O,O'</i> -Diacetilboldina, (S)-1,10-dimetoxi-2,9-diacetiloxiaporfina.....	46
	<i>O,O'</i> -Dipivaloilboldina, (S)-1,10-dimetoxi-2,9-dipivaloiloxiaporfina.....	47
	<i>O,O'</i> -Bis-(3-etoxicarbonilpropanoato) de boldina.....	48
	Glaucina, (S)-2,9- <i>O,O'</i> -dimetilboldina, (S)-1,2,9,10-tetrametoxiaporfina.....	49
	Predicentrina, (S)-9- <i>O</i> -metilboldina, (S)-2-hidroxi-1,9,10-trimetoxiaporfina.....	50
	<i>N</i> -Metillaurotetanina, (S)-9-hidroxi-1,2,10-trimetoxiaporfina.....	51
	Yoduro de <i>N</i> -metilboldinio, yoduro de (S)-2,9-dihidroxi-1,10- <i>O,O',N</i> -trimetilaporfinio.....	52
	Yoduro de <i>N</i> -metilglaucinio, yoduro de (S)-2,9- <i>O,O',N</i> -trimetilaporfinio.....	53
	Yoduro de (S)- <i>N</i> -metilpredicentrinio, yoduro de (S)-2-hidroxi-1,6a,9,10- <i>O,O,O,N</i> -tetrametilaporfinio.....	54
	Xantoplanina, yoduro de <i>N,N</i> -dimetillaurotetaninio, yoduro de (S)-9-hidroxi-1,2,6a,10- <i>O,O,O,N</i> -tetrametilaporfinio].....	55
	<i>N</i> -Etilaurolicina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi- <i>N</i> -etil- <i>nor</i> -aporfina.....	56
	<i>N-n</i> -Propillaurolicina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi- <i>N-n</i> -propil- <i>nor</i> -aporfina.....	57
	<i>N</i> -Alillaurolicina, (S)- <i>N</i> -alil-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi- <i>nor</i> -aporfina.....	58
	3-Cloroboldina, (S)-3-cloro-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina.....	59
	3-Bromoboldina, (S)-3-bromo-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina.....	60
	3-Yodoboldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-3-yodoaporfina.....	61
	8-Bromopukateína, (R)-8-bromo-11-hidroxi-1,2-metilendioxiaporfina.....	62
	8-Nitrosoboldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-8-nitrosoaporfina.....	63
	8-Aminoboldina, (S)-8-amino-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina.....	64
	<i>O,O'</i> -Diacetil-6a,7-dideshidroboldina, 2,9-diacetoxi-1,10-dimetoxi-6a,7-dideshidroaporfina.....	65
	6a,7-Dideshidroboldina, 2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-6a,7-dideshidroaporfina.....	66
	8-(9- <i>O</i> -Boldinoxiboldina).....	67
3.2	Evaluación del coeficiente de reparto de algunos derivados.....	69
3.2.1	Determinación de las absorptividades y las longitudes de onda de absorción máxima.....	69
3.2.3	Determinación de la constante de reparto (K_{rep}) y cálculo de la lipofilia aparente ($\log K_{rep}$).....	70
3.3	Evaluación de actividad antioxidante.....	71
3.3.1	Resultados: Descoloración de soluciones de ABTS.....	71
3.3.2	Comentario de los resultados obtenidos con ABTS.....	74
3.3.3	Resultados obtenidos en la protección de lisozima.....	75

3.3.4	Comentarios de los resultados obtenidos en la protección de la lisozima.....	80
3.3.5	Resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación de microsomas hepáticos.....	83
3.3.6	Comentarios de los resultados de inhibición de la oxidación lipídica.....	85
4.0	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	90
4.1	Hemisíntesis de derivados de la boldina y de la pukateína.....	90
4.2	Estudios de oxidación de la boldina.....	98
4.3	Determinación del coeficiente de reparto.....	113
4.4	Discusión de la evaluación del comportamiento antioxidante de las aporfinas en diferentes sistemas.....	117
4.4.1	Descoloración de ABTS.....	117
4.4.2	Protección de lisozima por aporfinas.....	120
4.4.3	Inhibición de la oxidación lipídica por derivados de la boldina.....	124
4.5	Relaciones entre la lipofilia y las potencias antioxidantes en los ensayos de oxidación de lisozima y microsomas hepáticos.....	125
5.0	COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.....	130
6.0	BIBLIOGRAFIA	133

AGRADECIMIENTOS

Estas investigaciones fueron financiadas parcialmente por los siguientes proyectos:

**Relaciones estructura-actividad antioxidante de algunos análogos de boldina.
Mecanismo de oxidación**

Proyecto FONDECYT 2960005, 1996-1998 (Investigador principal)

Molecular basis of ligand selectivity of enzymes and receptors: Approaches from the micromolecular standpoint.

Proyecto Cátedra Presidencial en Ciencias (otorgado a Dr. Bruce K. Cassels), 1997-1999

Evaluación y caracterización de la actividad antioxidante de boldina, un alcaloide presente en *Peumus boldus* Mol. (boldo), FONDECYT N° 1047-91

El autor agradece las becas otorgadas por los siguientes organismos:

Beca para estudios de post grado.

CONICYT 1993-1996, Chile

Beca Embajada de Francia

Diciembre 1995-mayo 1996, estadía de investigación, Universidad de Rouen, Francia.

Beca Proyecto de Término de Tesis

CONICYT 1998-1999

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Publicaciones:

The methylation of boldine with diazomethane

M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky

Boletín de la Sociedad Chilena de Química (1993) 38:331

Structure-antioxidative relationships in benzyloquinoline alkaloids

E.A. Lissi, V. Cantillan, L.A. Videla, M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky.

Pharmacological Research (1995) 31:103.

Structure of boldine hydrochloride [(S)-1,10-dimethoxy-2,9-dihydroxyaporphinium chloride] (boldine hydrochloride), C₁₉H₂₂NO₄⁺Cl⁻

M. Asencio, B.K. Cassels, V. Manríquez, D.Boys.

Acta Crystallographica, section C (1996) C52:1581.

Dopaminergic pharmacology and antioxidant properties of pukateine, a natural product lead for the design of agents increasing dopamine neurotransmission

F.A. Dajas-Bailador, M. Asencio, C. Bonilla, M.C. Scorza, C. Etcheverry, M. Reyes-Parada, R. Silveira, P. Protais, G.Russell, B.K. Cassels, F. Dajas, *General Pharmacology*

(1999) 32(3):373.

Presentaciones a congresos:

(R)- y (S)-coclaurina de corteza de boldo

M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky, A.Valenzuela

I Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 1992, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

Boldina: relaciones estructura-actividad antioxidante

H. Speisky, L.A. Videla, V. Cantillana, P. Conget, B.K. Cassels, M. Asencio, E.A. Lissi.

I Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 1992, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

Metilación de la boldina con diazometano

M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky.

XX Jornadas Chilenas de Química, 1993, Punta de Tralca, Chile.

Relaciones estructura-actividad antioxidante de alcaloides bencilisoquinolínicos

B.K. Cassels, M. Asencio, P. Conget, H. Speisky, L.A. Videla, E.A. Lissi.

II Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 1994, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Hemisíntesis de ésteres de boldina y de algunas N-alkil-nor-boldinas

M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky, E. Sobarzo.

XXI Jornadas Chilenas de Química, 1997, Termas de Puyehue, Osorno, Chile.

Preparación de derivados halogenados de predicentrina

J.J. López, C. Hurtado, M. Asencio, B.K. Cassels.

XXIII Congreso Latinoamericano de Química, 1998, Rio Grande, Puerto Rico.

Análisis de las aguas madres de recristalización de la boldina como una fuente potencial de alcaloides bencilisoquinolínicos

G. Larenas, M. Asencio, B.K. Cassels.

IV Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 1998, Universidad de Talca, Talca, Chile.

Sobre la decoloración de radicales libres derivados del ácido 2,2'-azobis[3-etilbenzotizolin-6-sulfónico] (ABTS) por algunos análogos de boldina.

M. Asencio, B.K. Cassels, I. Jiménez, H. Speisky.

IV Simposio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, 1998, Universidad de Talca, Talca, Chile.

Caracterización preliminar de productos de oxidación de boldina

M. Asencio, B.K. Cassels, I. Jiménez, H. Speisky.

XXIII Jornadas Chilenas de Químicas, 1999, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Coefficientes de partición de boldina y algunos de sus derivados

M. Asencio, B.K. Cassels, I. Jiménez, H. Speisky.

XXIII Jornadas Chilenas de Químicas, 1999, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.



RESUMEN

La aceptación generalizada del rol que cumplen los radicales libres oxigenados y las reacciones radicalarias en una amplia gama de procesos patológicos han promovido, entre otros intereses, la búsqueda de moléculas con propiedades antioxidantes como potenciales agentes terapéuticos. Dentro de las estructuras estudiadas, tanto sintéticas como las de origen natural, se puede mencionar a los alcaloides aporfínicos que constituyen un grupo relativamente nuevo de antioxidantes, entre los cuales se puede destacar la (*S*)-boldina (1,10-dimetoxi-2,9-dihidroxiaporfina) alcaloide principal de hojas y corteza de boldo (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) un potente antioxidante en modelos bióticos y abióticos. Sin embargo, este compuesto posee una farmacocinética desfavorable asociada a la presencia de grupos fenólicos conjugables, lo que limita su potencial aplicación terapéutica o como herramienta farmacológica.

En la presente investigación se propuso la síntesis de una serie de moléculas derivadas de boldina, la evaluación de sus propiedades antioxidantes (decoloración de ABTS, protección de lisozima e inhibición de la oxidación lipídica en microsomas hepáticos) y la determinación de sus lipofilias (medidas como el logaritmo de la constante de reparto entre *n*-octanol-solución amortiguadora a pH fijo). Se estudió además la oxidación controlada de boldina en presencia de radicales provenientes de azo-*bis*-amidinopropano (AAP) y HO[•], bajo condiciones similares a aquellas a las que se efectuaron los estudios de evaluación de actividad antioxidante (protección de lisozima e inhibición de la oxidación lipídica). Se complementó el estudio de la oxidación en estas condiciones utilizando también agentes químicos como HgCl₂ y O₂.

Los resultados indican que la boldina y aquellos derivados que presentan grupos fenólicos libres en su estructura son activos como antioxidantes en los tres sistemas de evaluación, y algunos derivados presentan mayor potencia que la boldina y los antioxidantes de referencia (Trolox®, BHT o α -tocoferol). Sin embargo, en el ensayo de inhibición de la oxidación lipídica, compuestos no fenólicos tales como la glaucina (2,9-*O,O'*-dimetoxiboldina) y la 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina también presentan una interesante actividad antioxidante, lo que podría implicar la participación del hidrógeno bencílico en C-6a y la mayor lipofilia que presentan estos compuestos. Por otra parte se pudo determinar que los derivados halogenados de la boldina en C-3 (con halógeno = Cl, Br o

I) son activos antioxidantes en los tres sistemas, aunque de forma particular en la inhibición de la lipoperoxidación donde dos de ellos (3-cloro- y 3-bromoboldinas) sobrepasan la potencia de la boldina. Esto se atribuye, por una parte, a sus mayores lipofilias con respecto al alcaloide precursor lo que aumentaría sus concentraciones en membranas biológicas (de manera análoga a lo que ocurre con la 2,9-O,O'-dimetoxiboldina). En segundo término, se propone que existe una estabilización extra que les imprimen los halógenos unidos al C-3, a través del efecto capto-dativo, lo que haría que estas haloboldinas, en particular, sean más reactivas que su análogo no halogenado, la boldina.

Los estudios de oxidación de la boldina ya sea utilizando oxidantes químicos (HgCl_2 por ejemplo) o radicales libres provenientes de la descomposición térmica del azo-bis-amidinopropano (AAP) o de radicales hidroxilo (HO^\bullet) generados por la mezcla de sulfato ferroso y agua oxigenada, permitieron identificar un par de productos: la 6a,7-dideshidrobaldina (obtenida con HO^\bullet , O_2 y HgCl_2) y la 8-(9-boldinoxi)baldina (obtenida con AAP). Ambas estructuras fueron caracterizadas por las técnicas usuales. Se propone además que dichos productos fenólicos deberían ser activos como antioxidantes lo que podría dar cuenta de la mayor potencia como antioxidante de la boldina en relación a los compuestos de referencia. Finalmente se analizaron las relaciones entre la potencia antioxidante y la lipofilia molecular en los ensayos de protección de la lisozima e inhibición de la lipoperoxidación. En el primero de éstos, un aumento excesivo de la lipofilia conlleva una disminución de la potencia antioxidante, determinándose que la mayor actividad requiere una lipofilia semejante a la que posee la 3-clorobaldina. En el caso de la inhibición de la lipoperoxidación se determinó que el aumento de la lipofilia, con respecto a la boldina, ya sea por bloqueo de las funciones fenólicas o por la introducción de halógenos, produce potencias antioxidantes mayores.

A modo de conclusión, en el presente trabajo se prepararon y caracterizaron 22 sustancias derivadas de boldina. Se midieron las actividades antioxidantes y las lipofilias de muchas de ellas y se establecieron relaciones estructura-actividad antioxidante de las que se dedujo las características estructurales que aumentan la potencia en determinados sistemas.

Palabras claves: boldina, antioxidante, oxidación, lipofilia, lipoperoxidación.

SUMMARY

The general acceptance of the role of oxygen-centered free radicals and free radical reactions in a broad range of pathological processes has prompted, among other interests, a search for molecules with antioxidant properties as potential therapeutic agents. Of the many structures studied, of either synthetic or natural origin, aporphine alkaloids may be mentioned as a relatively novel group of antioxidants among which (*S*)-boldine (1,10-dimethoxy-2,9-dihydroxyaporphine), the main alkaloid in the leaves and bark of boldo (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) stands out as a potent antioxidant in biotic and abiotic models. Nevertheless, this compound exhibits unfavorable pharmacokinetics associated with the presence of conjugatable phenol groups, which limit its potential in therapeutics or as a pharmacological tool.

In this investigation the synthesis of a series of boldine-derived molecules was proposed, the assessment of their antioxidative properties (ABTS radical bleaching, lysozyme protection against free-radical induced inactivation, and inhibition of lipid oxidation in liver microsomes) and the determination of their lipophilicities (taken as the logarithm of their partition coefficients between *n*-octanol and a buffer solution at fixed pH). The controlled oxidation of boldine in the presence of free radicals derived from azo-*bis*-amidinopropane (AAP) or HO[•] free radicals, under similar conditions to those in which the antioxidative activity was determined (lysozyme protection and inhibition of lipid oxidation) was also investigated. This latter study was complemented with a study of the oxidation of boldine using HgCl₂ or O₂ as chemical oxidants.

The results indicate that boldine and its derivatives bearing free phenol groups on their structures behave like antioxidants in all three assay systems, and some derivatives are more potent than boldine or the reference antioxidants (Trolox®, BHT or α -tocopherol). Nevertheless, in the lipid oxidation inhibition assay, non-phenolic compounds such as glaucine (2,9-*O,O'*-dimethoxyboldine) and 2,9-*O,O'*-dipivaloylboldine also exhibit an interesting antioxidative activity, which might implicate participation by the benzylic hydrogen atom at C-6a and the greater lipophilicity of these derivatives. On the other hand, it could be shown that boldine derivatives bearing a halogen atom at C-3 (with halogen = Cl, Br or I) are active antioxidants in all three systems, although this is

particularly apparent in the inhibition of lipid peroxidation, where two of them (3-chloro- and 3-bromoboldine) surpass the potency of boldine. This is attributed, in the first place, to their greater lipophilicities with regard to the precursor alkaloids, which would raise their concentrations in biomembranes (as in the case of 2,9-*O,O'*-dimethoxyboldine). Secondly, an extra stabilization is proposed *via* a captodative effect involving the halogen atoms bound to C-3, which would make these haloboldines more reactive toward free radicals than their unhalogenated analog, boldine.

The boldine oxidation studies, using "chemical" oxidants (HgCl_2 for example) or free radicals originating in the thermal decomposition of AAP, or hydroxyl radicals (HO^\bullet) generated by a mixture of ferrous sulfate and hydrogen peroxide, led to the identification of two products: 6a,7-didehydroboldine (obtained with HO^\bullet , O_2 , and HgCl_2) and 8-(9-boldinoxy)boldine (obtained with AAP). Both structures were characterized by the usual methods. It is also suggested that these phenolic products should have antioxidative activity which might explain the higher potency of boldine as an antioxidant than the reference compounds. Finally, the relationships between antioxidative potency and molecular lipophilicity were analyzed for the lysozyme protection and lipoperoxidation inhibition assays. In the former, an excessive increase in lipophilicity leads to a decrease in antioxidative potency, with the greatest activity occurring at a lipophilicity resembling that of 3-chloroboldine. In the case of lipoperoxidation inhibition, it was found that increasing lipophilicity with regard to boldine, achieved by blocking the phenol groups or by the introduction of halogen atoms, leads to increased antioxidative potencies.

In conclusion, this work involved the preparation and characterization of 22 substances derived from boldine. The antioxidative activities and lipophilicities of many of them were determined and structure-activity relationships were established, making it possible to deduce the structural features which lead to increased potency in particular systems.

Keywords: boldine, antioxidant, oxidation, lipophilicity, lipoperoxidation.

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de : boldina, *N*-metillaurotetanina, predicentrina y glaucina (n = 4). (70)*

Gráfico 2 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: boldina, yoduro de *N*-metilboldinio y yoduro de *N*-metilglaucinio (n = 4). (70)*

Gráfico 3 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: glaucina, 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina y 2,9-*O,O'*-diacetilboldina (n = 4). (71)*

Gráfico 4 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: boldina, 3-cloro-, 3-bromo- y 3-yodoboldinas (n = 4). (71)*

Gráfico 5: Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: boldina, pukateína y 8-bromopukateína . (72)*

Gráfico 6: Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de : boldina y trolox® . (72)*

Gráfico 7: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos con lisozima y al co-incubar la enzima con diferentes concentraciones de AAP. Se incluye una línea teórica de 100% de actividad (AT lisozima). (74)*

Gráfico 8: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con diferentes concentraciones de boldina en presencia de AAP 100 μM . (74)*

Gráfico 9: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, trolox® o BHT 100 μM en presencia de AAP 100 μM . (75)*

Gráfico 10: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, *N*-metillaurotetanina, predicentrina o glaucina 100 μM en presencia de AAP 100 μM . (75)*

Gráfico 11: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, *N*-metillaurotetanina y predicentrina en presencia de AAP 100 μM . (76)*

Gráfico 12: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 3-bromoboldina, 3-yodoboldina o *N*-alil-norboldina 100 μM en presencia de AAP 100 μM . (76)*

Gráfico 13: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 3-cloroboldina, 3-bromoboldina o 3-yodoboldina 50 μM en presencia de AAP 100 μM . (77)*

Gráfico 14: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 3-cloroboldina, 3-bromoboldina o 3-yodoboldina 25 μM en presencia de AAP 100 μM . (77)*

Gráfico 15: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 8-nitrosoboldina u 8-aminoboldina 50 μM en presencia de AAP 100 μM . (78)*

Gráfico 16: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración de boldina o glaucina. (85)*

Gráfico 17: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración de boldina, predicentrina o *N*-metillaurotetanina. (85)*

Gráfico 18: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración de boldina, 3-cloro-, 3-bromo- o 3-yodoboldinas. (86)*

Gráfico 19: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración de boldina, 2,9-O,O'-dipivaloilboldina o *N*-alil-nor-boldina. (86)*

Gráfico 20: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración de boldina, α -tocoferol o trolox®. (87)*

Gráfico 21: Relación entre la inversa de la concentración de semi-inhibición en la protección de lisozima en función del logaritmo de la constante de reparto (K_{rep}) de boldina y algunos de sus derivados. (125)*

Gráfico 22: Relación entre la inversa de la concentración de semi-inhibición de la lipoperoxidación en función del logaritmo de la constante de reparto (K_{rep}) de boldina y algunos de sus derivados *O*-metilados. (126)*

Gráfico 23: Relación entre la inversa de la concentración de semi-inhibición de la lipoperoxidación en función del logaritmo de la constante de reparto (K_{rep}) de boldina y algunos de sus derivados *O*-metilados. (124)*

* = NÚMERO DE PÁGINA

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Longitudes de onda de absorbancia máxima y absortividades molares (ϵ) en *n*-octanol y en tampón de fosfato de boldina y algunos de sus derivados. Absortividades molares, obtenidas por cálculo de la pendiente del gráfico absorbancia / concentración de cada uno de los compuestos evaluados.

ND : no determinado (69)*

Tabla 2 : Concentraciones en octanol ($[X]_{\text{oct}}$) y concentraciones en la fase acuosa ($[X]_{\text{aq}}$) de boldina y algunos de sus derivados, constantes de reparto (K_{rep}) y lipofilias moleculares ($\log K_{\text{rep}}$) calculadas a partir de estos datos. (69)*

Tabla 3: Parámetros de las ecuaciones ($Y = A + BX + CX^2$) utilizados para el ajuste de las curvas obtenidas experimentalmente en los ensayos de inhibición de la lisozima ($p < 0,005$). (79)*

Tabla 4: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina, BHT y trolox. ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) de los diferentes compuestos a 100 μM . $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina o trolox con respecto al del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando 100 μM de cada antioxidante). (80)*

Tabla 5: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina. ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de boldina. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina con respecto al del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando 100 μM de cada antioxidante). (80)*

Tabla 6: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina y sus derivados *O*-metilados ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos evaluados. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina o sus derivados *O*-metilados con respecto al del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando 100 μM de cada antioxidante). (80)*

Tabla 7: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina y sus derivados halogenados ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos evaluados. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina o sus derivados halogenados con respecto al del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando 100 μM de cada antioxidante). (81)*

Tabla 8: $t_{1/2}$ para boldina y algunos de sus derivados. ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos evaluados). (81)*

Tabla 9: IC_{50} de algunas aporfina calculados en función de la concentración utilizada de aporfina versus la actividad residual a tiempo = 2 horas. Los IC_{50} se informan como el promedio \pm desviación estándar. (83)*

Tabla 10 : Porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica en microsomas hepáticos por los diferentes compuestos evaluados a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (n = 4). (84)*

Tabla 1: Concentraciones de semi-inhibición (IC_{50}) para los diferentes compuestos evaluados en el proceso de lipoperoxidación. N = número de datos considerados. (88).

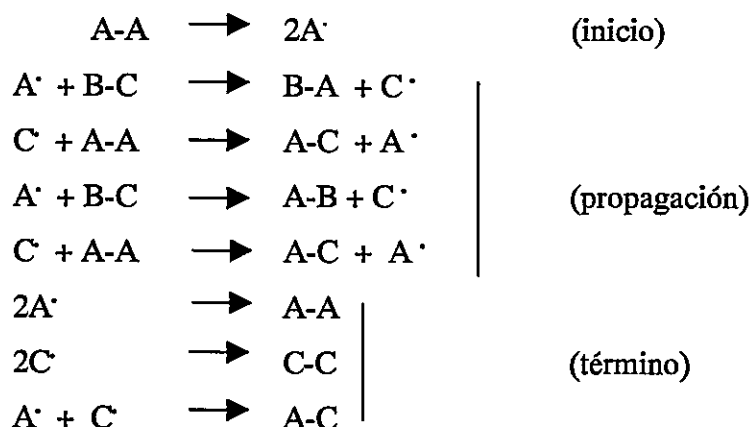
*** NÚMERO DE PÁGINA.**

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de las reacciones radicalarias

1.1.1 Revisión de algunos conceptos útiles

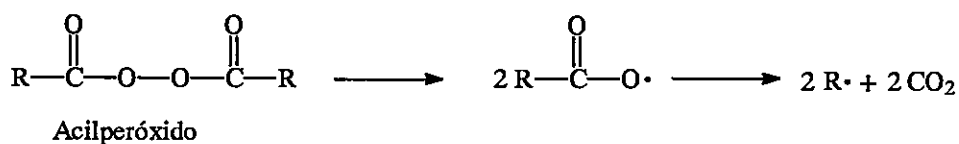
Ciertos aspectos de las reacciones en las que participan radicales libres son únicos en comparación con otros procesos químicos conocidos debido a que éstas involucran reacciones en cadena; es decir el mecanismo de reacción consiste de un ciclo repetitivo de pasos que conducen a la formación de algunos productos por cada evento de iniciación. El mecanismo hipotético se ilustra en la siguiente secuencia de reacciones.



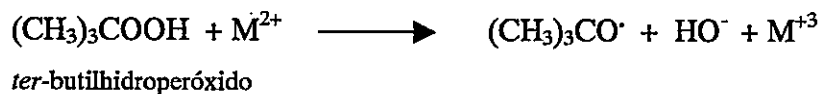
El paso en el cual se genera $A\cdot$ se denomina de iniciación. En las etapas siguientes una secuencia de dos reacciones se repite (etapa de propagación) un número finito de veces (longitud de cadena) hasta que la reacción llega a la etapa de término. En la última etapa es donde ocurren reacciones que hacen disminuir las concentraciones de uno o más intermediarios claves de la etapa de propagación.

1.1.2 Fuentes de radicales libres iniciadores

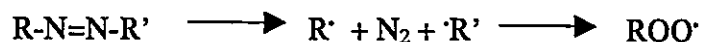
Algunos compuestos son reconocidos como fuentes de radicales libres. Entre ellos se cuentan los peróxidos, los azocompuestos y las nitrosoanilidas, los cuales son utilizados en síntesis y en los procedimientos de evaluación de actividad antioxidante. La característica común a estos reactivos es que la generación de los radicales libres se realiza a una relativamente baja temperatura debido a la labilidad de ciertos enlaces. Por ejemplo, en los peróxidos el enlace oxígeno-oxígeno posee una energía de disociación de aproximadamente 30 Kcal/mol y en consecuencia la energía de activación para la formación de los radicales libres es baja. El mecanismo por el cual los diacilperóxidos producen radicales alquílicos involucra la formación de radicales carboxílicos que rápidamente pierden CO₂ produciendo en forma cuantitativa los correspondientes radicales alquílicos.



La descomposición de los peróxidos, como por ejemplo el *ter*-butilhidroperóxido, puede efectuarse también a través de excitación fotoquímica o por la presencia de iones metálicos (normalmente, metales de transición). Bajo estas condiciones un radical alcoxilo se genera junto a un anión hidroxilo producto de la reducción a un electrón por el metal.



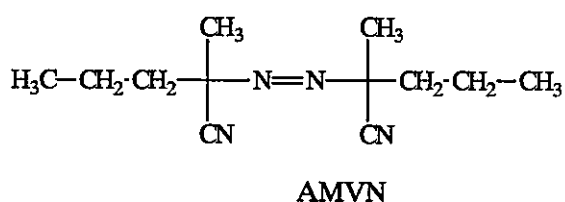
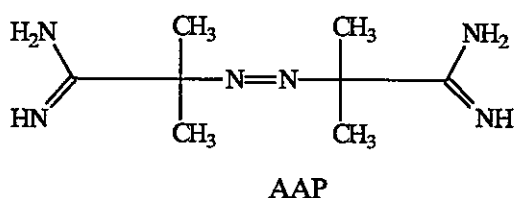
De manera análoga los azocompuestos generan radicales libres en presencia de metales, por inducción fotoquímica o por el efecto de la temperatura. Los productos de la homólisis conducen a la formación de nitrógeno gaseoso y de los respectivos radicales alquílicos, los cuales en presencia de O₂, rápidamente dan lugar a su conversión en ROO·.



En el proceso de descomposición térmica de este tipo de compuestos se ha determinado que la temperatura de formación de radicales libres depende de la naturaleza de los grupos sustituyentes. Así, por ejemplo, el azometano no produce radical metilo hasta que la temperatura alcanza 400 °C. Sin embargo, para la mayor parte de los azocompuestos, los fragmentos radicalarios se producen a una temperatura de alrededor de 100 °C como en el caso del alilazopropano:



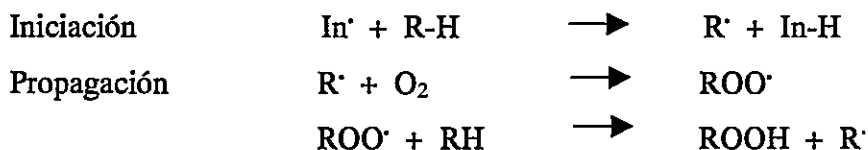
Sin embargo, en la familia de los azocompuestos hay algunos que se descomponen a menor temperatura. Entre éstos se puede mencionar el azo-*bis*-amidinopropano (AAP), un compuesto que se descompone a temperaturas mínimas de entre 35-40 °C y que además presenta una buena solubilidad en agua, y su contraparte liposoluble el azo-*bis*- α -metilvaleronitrilo (AMVN) (Yamamoto *et al.*, 1984).



1.1.3 Activación o inhibición de un proceso radicalario

El curso de las reacciones que transcurren a través de radicales libres puede ser modificado variando las concentraciones de las especies radicalarias en cualquiera de sus tres etapas. La mayor parte de las reacciones radicalarias necesita de la presencia de una molécula iniciadora, que puede provenir de la descomposición de alquilperóxidos o azocompuestos, los que promueven activamente los procesos radicalarios. Al contrario, una reacción en cadena puede ser "retardada" por inhibidores, moléculas lo suficientemente reactivas para combinarse con los radicales formados en la etapa de iniciación y detener la reacción en cadena. Para ilustrar los sitios de acción de estos

compuestos inhibidores (antioxidantes) consideremos el proceso de autooxidación, donde participa activamente la molécula de oxígeno, la que al reaccionar con radicales alquílicos forma radicales alquilperóxidos y contribuye con ello a la propagación de la reacción en cadena:

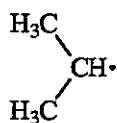


Un antioxidante puede actuar ya sea capturando los radicales libres formados en la etapa de iniciación o inactivando los radicales (peróxidos) formados en la fase propagativa. Si actúa en la fase de iniciación, el antioxidante se denomina con el nombre genérico de sustractor de radicales libres (*free radical scavenger*) y *chain breaker* si lo hace en la fase propagativa. La reacción de un antioxidante con un radical libre reactivo produce un nuevo radical el cual, sin embargo, es mucho menos reactivo como consecuencia de determinadas características estructurales y/o electrónicas que lo estabilizan tales como persistencia, resonancia o fenómenos capto-dativos (Kjorth *et al.*, 1984).

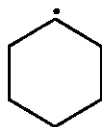
1.1.4 Estabilidad de radicales libres

Se reconoce que factores como el impedimento estérico, la deslocalización de espín (resonancia) y los fenómenos capto-dativos contribuyen a la estabilidad de radicales libres, hechos que sirven para explicar la baja reactividad que presentan los productos radicalarios que se forman por reacción de los antioxidantes con radicales libres propagadores de cadena.

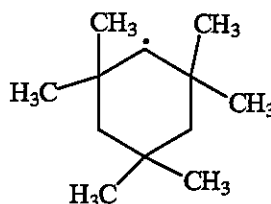
La presencia de sustituyentes alrededor de un centro radicalario puede inhibir estéricamente sus reacciones reduciendo su reactividad y dando lugar a radicales persistentes. Los radicales libres persistentes más comunes son terciarios (e.g. el hexametilciclohexilo) y en ellos la compresión estérica es significativa. Al contrario, los radicales centrados sobre un átomo de carbono primario o secundario son no persistentes (como por ejemplo el radical isopropilo, y el ciclohexilo) como los que se muestran a continuación:



no persistente

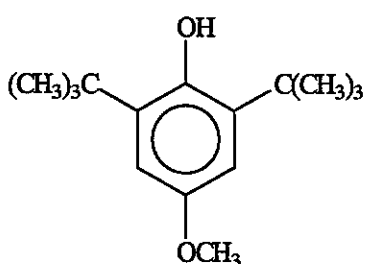


no persistente

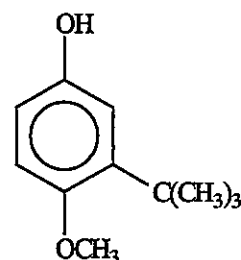
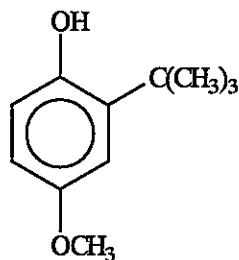


persistente

Al comparar compuestos antioxidantes se descubren características estructurales que son comunes a muchos de ellos: la presencia de grupos fenólicos unidos a un sistema aromático sustituido en *orto* y *para*. Dos antioxidantes comunmente utilizados como conservantes de alimentos que ilustran estas características estructurales son los fenoles que se conocen como BHT (3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxitolueno) y BHA (mezcla de 3- y 4-*ter*-butilhidroxianisoles).

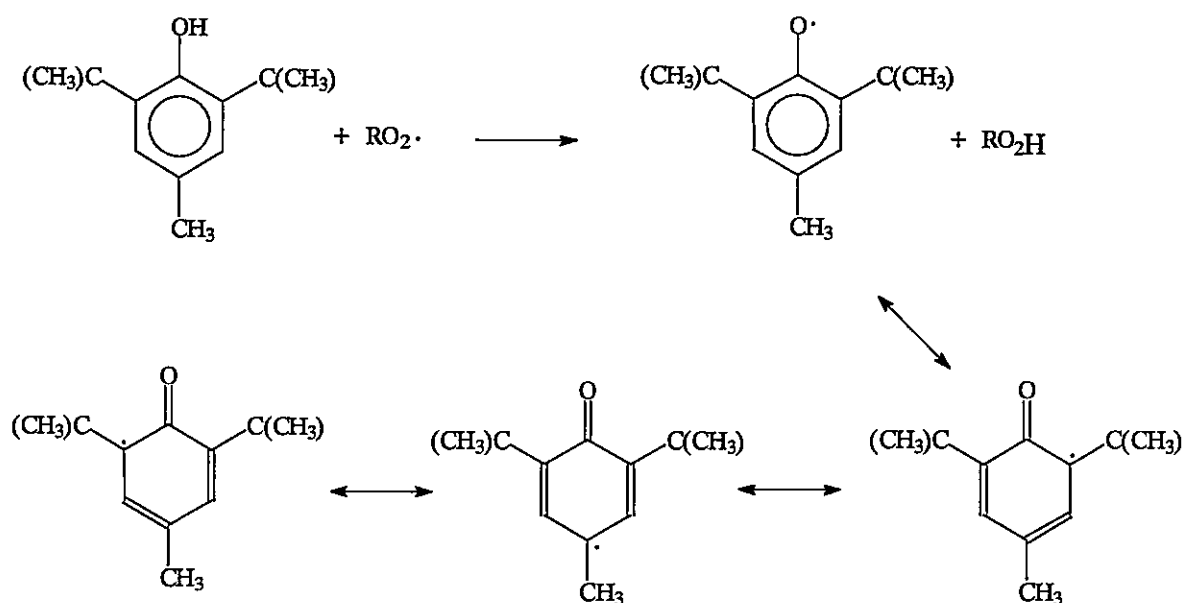


BHT

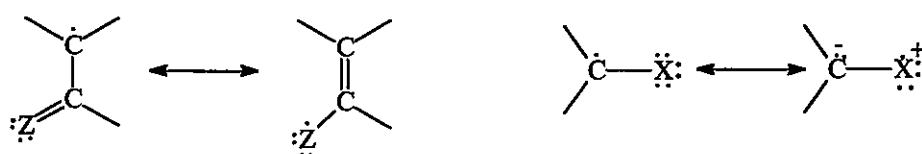


BHA

Los radicales generados por la sustracción de átomos de hidrógeno desde los grupos fenólicos por alquilperóxidos (RO_2^\cdot), son relativamente estables, debido a la deslocalización de espín en un sistema aromático, el cual presenta grupos voluminosos en las posiciones de mayor densidad de espín que reducen a niveles insignificantes la reactividad en estas posiciones. Todo esto contribuye a la mayor estabilidad termodinámica y cinética que presentan estos radicales con relación a aquellos que les dieron origen.

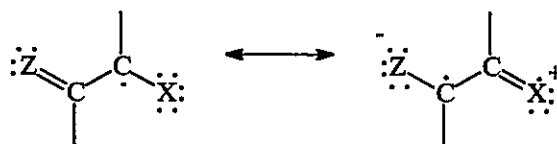


Un mecanismo adicional de estabilización de radicales libres es debido a la presencia simultánea de grupos dadores y aceptores de electrones en la vecindad del sitio radicalario de la molécula. Este efecto se conoce como *mero-estabilización* (Baldock *et al.*, 1974) o estabilización *capto-dativa* (Viehe *et al.*, 1979), y es el resultado del efecto combinado de ambos sustituyentes (dadores o aceptores π).



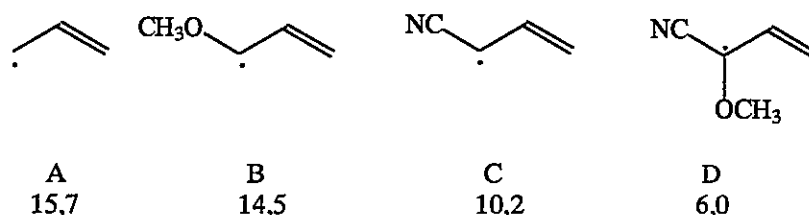
Estabilización por un aceptor π

Estabilización por un dador π



Estabilización combinada por un dador π y un aceptor π .

Una comparación de las energías rotacionales en radicales alílicos (A-D) (expresadas en KJ/mol) proporciona evidencia para el efecto capto-dativo ya que el decrecimiento de las energías rotacionales en esta serie se explica por la disminución del carácter π del carbono sustituido (con ciano y metoxi).



El decrecimiento del carácter π refleja la disminución de la interacción del centro radicalario con el doble enlace adyacente, por lo que este enlace puede rotar con mayor facilidad en esta serie de compuestos. El hecho que la disminución de la energía rotacional en C y D sea más pronunciada que en A y B indica el efecto sinérgico de ambos grupos y que es característico del efecto capto-dativo que producen los sustituyentes en estas posiciones (Kjorth *et al.*, 1984).

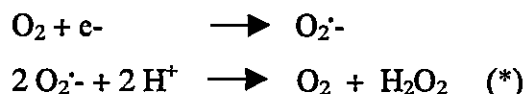
Estas interacciones inductivas y de resonancia permiten explicar la estabilidad adicional que poseen los radicales libres formados en los antioxidantes y que les permiten actuar como inhibidores, en sentido amplio, en las reacciones radicalarias.

1.2 Radicales libres en el medio biológico y sistemas antioxidantes.

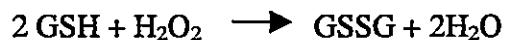
1.2.1 Formación de oxígeno radicalario *in vivo* y especies reactivas del oxígeno.

El interés en los radicales libres y su participación en el metabolismo humano surgió inicialmente por el descubrimiento de la enzima superóxidodismutasa (SOD), una enzima específica para un sustrato radicalario. Esta macromolécula está presente en todas las células humanas y tiene por función remover radicales superóxido (O_2^-) producidos por la reducción a un electrón del oxígeno en la cadena respiratoria. El O_2^- es convertido en oxígeno molecular (O_2) y agua oxigenada (H_2O_2), a través de un proceso

de dismutación. En ausencia de SOD y a pH fisiológico, este proceso ocurre a una velocidad aproximadamente cuatro órdenes de magnitud menor.



La SOD opera junto a otras dos enzimas que permiten transformar el agua oxigenada de las células: la catalasa y la glutatión peroxidasa (GP). La primera descompone el H_2O_2 según las dos reacciones descritas precedentemente (*); mientras que esta última elimina el agua oxigenada oxidando el glutatión (GSH) a glutatión oxidado (GSSG):



El H_2O_2 producida por la acción de la GP puede atravesar con facilidad las membranas subcelulares, y en presencia de metales de transición, puede generar radicales libres. Sin embargo, esta molécula no presenta pares electrónicos desapareados y no puede ser descrita como un radical libre.

Existe en la literatura el término "*especies reactivas del oxígeno*" (EROs) para describir colectivamente no solo al O_2^- y al HO^\cdot (ambos radicales), sino que también al H_2O_2 . El ácido hipocloroso (HOCl , producido en el medio biológico por la mieloperoxidasa), y el peroxinitrito (ONOO^\cdot) también pueden ser incluidos en esta lista debido a que son poderosos agentes oxidantes. Otra especie reactiva del oxígeno, no radicalaria, es el oxígeno singulete $^1\text{O}_2$, una forma del oxígeno electrónicamente excitada y capaz de reaccionar mucho más rápido con las moléculas biológicas que el oxígeno "normal" ($^3\text{O}_2$, triplete en su estado basal). Por ejemplo, el oxígeno singulete reacciona directamente con las cadenas laterales de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas lipídicas para producir lipoperóxidos.

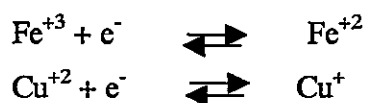
Para que se produzca un aumento de la concentración de EROs *in vivo*, debe necesariamente ocurrir una falla en las defensas enzimáticas que regulan la concentración y/o una sobreproducción de EROs. Con respecto al segundo punto, se pueden señalar al menos tres factores que inciden en la sobreproducción de los precursores de EROs:

- 1.- La excesiva exposición a altas concentraciones de oxígeno
- 2.- Adición de ciertos xenobióticos que incrementan la formación de EROs (Ejs.: aloxano, paraquat o adriamicina)
- 3.- Activación de los fagocitos en sitios localizados, ya que el modo de acción bactericida de éstos incluye la formación de EROs.

En adición, las células contienen pequeñas cantidades de hierro almacenadas para la síntesis de ferroproteínas necesarias para el metabolismo celular. La existencia de tales "depósitos" puede explicar en parte porqué la SOD y las enzimas que transforman el H_2O_2 son importantes inhibidores de procesos radicalarios intracelulares, ya que la reacción de estos iones con H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ puede producir EROs a través de una reacción de tipo Fenton, que se discutirá en el siguiente párrafo. Se puede añadir que, como las células no cuentan con vías de eliminación de hierro y sólo disminuyen la concentración de este elemento cuando se dividen, aquellas que no se dividen, como la mayoría de las neuronas, acumulan hierro hasta que mueren, lo que puede resultar en la superación de la capacidad de almacenamiento de hierro en forma no reactiva a través de la formación de su complejo con ferritina.

1.2.2 Especies reactivas del oxígeno (EROs). Participación de metales en reacciones de tipo Fenton.

Muchos metales de transición tales como el hierro (+2 y +3) y el cobre (+1 y +2) tienen dos o más estados de oxidación:



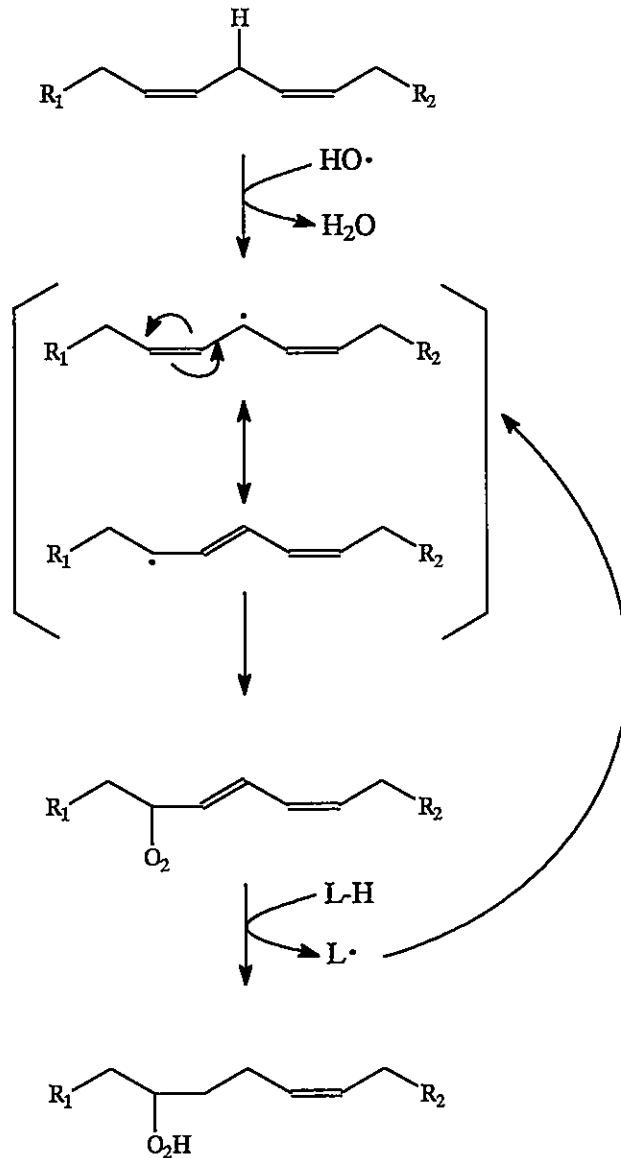
Los iones Fe^{+2} al igual que los iones Cu^+ reaccionan con H_2O_2 para formar especies reactivas, entre las cuales se cuenta el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) cuya formación se describe por una reacción de tipo Fenton (Aruoma *et al.*, 1990).



La generación de radicales hidroxilos y otras especies reactivas oxigenadas parece dar cuenta de una parte importante de la toxicidad observada cuando O_2^- y H_2O_2 se generan en cantidades excesivas *in vivo*, ya que pueden actuar conjuntamente con los iones metálicos como agentes que conducen a procesos radicalarios sobre las biomoléculas.

1.2.3 El radical hidroxilo y el proceso de oxidación lipídica ("lipoperoxidación")

Quizás el daño biológico mejor caracterizado que produce el HO^\cdot (pero no necesariamente el más importante) resulta de su habilidad para actuar como iniciador en procesos radicalarios en cadena sobre los lípidos presentes en la mayoría de las células (oxidación lipídica; lipoperoxidación). El proceso comienza cuando el HO^\cdot es generado dentro o en las cercanías de membranas biológicas constituidas en una alta proporción por una bicapa lipídica, donde el radical hidroxilo reacciona con las cadenas alquénlicas que las constituyen. El radical hidroxilo sustrae un átomo de hidrógeno de uno de los átomos de carbono en la cadena lateral (de preferencia desde una posición bis-alílica) formando agua y un radical centrado sobre átomos de carbono en la membrana. Los nuevos radicales libres generados tienen su espín localizado en un residuo de un ácido graso poliinsaturado que puede generar estructuras radicalarias diénicas las cuales pueden tener diferentes destinos. Una de las rutas posibles de reacción conduce al entrecruzamiento entre cadenas laterales y otra es la reacción del radical lipídico con oxígeno, para producir radicales libres lipoperoxilos. A su vez, los radicales libres peroxilos pueden reaccionar con proteínas de membranas o con residuos de ácidos grasos adyacentes sustrayendo otros átomos de hidrógeno, lo que genera otro radical libre propagando la reacción en cadena.

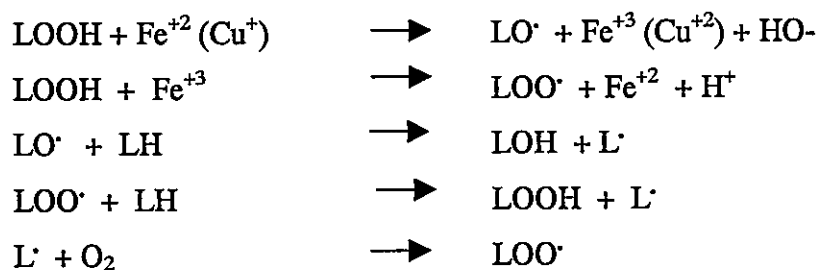


Representación esquemática de la oxidación de lípidos (L-H) inducida por radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$).

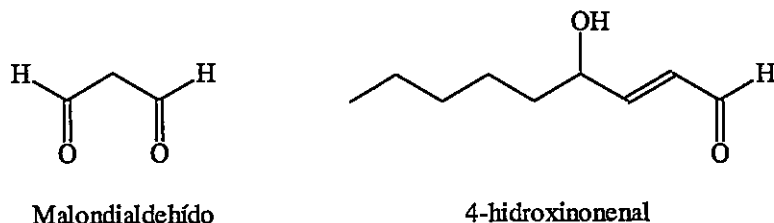
A menudo un radical hidroxilo en condiciones aeróbicas puede convertir cientos de residuos de ácidos grasos en hidroperóxidos lipídicos ("lipoperóxidos") (Halliwell y Gutteridge, 1989). La acumulación de lipoperóxidos y sus productos de evolución posterior en una membrana puede llevar a una disfunción celular y a un colapso total de la integridad de la membrana plasmática.

Adicionalmente, los lipoperóxidos pueden descomponerse por la presencia de metales (M^{+n}) tales como Fe^{+2} y Cu^+ los que pueden acelerar el proceso lipoperoxidativo por al

menos dos razones: Pueden participar en la formación de especies capaces de sustraer átomos de hidrógeno o catalizar la descomposición de los lipoperóxidos en los correspondientes radicales peroxilos (Lípido-O-O \cdot) y alcoxilos (Lípido-O \cdot) manteniendo la fase propagativa de las reacciones en cadena, lo que se representa mediante las siguientes ecuaciones.



Los productos terminales de estos procesos, catalizados por iones metálicos, son productos de transformación de hidroperóxidos que incluyen el aldehído citotóxico malondialdehído, hidrocarburos gaseosos como etano y pentano (Halliwell y Gutteridge, 1989), y otros productos más reactivos (y por ende más tóxicos) como el 4-hidroxinonenal (Curzio, 1988; Esterbauer, 1989).



1.2.4 Sistemas defensivos: los antioxidantes.

La palabra antioxidante puede ser definida funcionalmente de varias maneras, aplicándose a menudo el término a un inhibidor de la cadena radicalaria (como el α -tocoferol, en un proceso determinado como la lipoperoxidación). Sin embargo, una definición más amplia debería ser como sigue: *Un antioxidante es cualquier sustancia que, encontrándose en bajas concentraciones comparadas a la de un sustrato oxidable, previene o disminuye significativamente la oxidación del sustrato.* En el contexto biológico el término "sustrato oxidable" incluye la mayoría de las biomoléculas que

componen las células vivas. Por su parte, en el grupo de los antioxidantes que se encuentran en el medio biológico, se incluyen enzimas que previenen la acumulación de las moléculas (por ejemplo O_2^- y H_2O_2) o iones (Fe^{+2} y Cu^+) que pueden formar especies radicalarias y/o acelerar la descomposición de los intermediarios. En el grupo de las enzimas se encuentra la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, mencionadas en la sección 1.2.1, las proteínas que acumulan o transportan hierro (transferrina, ferritina) y cobre (metalotioneína y ceruloplasmina). Adicionalmente en el medio biológico existen compuestos como la Vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y el glutatión que actúan inhibiendo el proceso radicalario en las fases de iniciación y/o de propagación una vez que éste ha comenzado.

1.2.5 Proteínas y enzimas complejantes de metales

Una de las defensas primarias más importantes en la prevención de eventos radicalarios, es evitar el contacto del O_2^- y de H_2O_2 con metales redox activos como Fe^{+2} y Cu^+ , cuya reacción produce $HO\cdot$. A nivel biológico, esto se efectúa a través de la complejación u oxidación de los iones metálicos con proteínas específicas (Halliwell y Gutteridge, 1990).

Una proteína que transporta hierro en el plasma es la transferrina, la cual se encuentra normalmente cargada en un 20 a 30 % lo que parece indicar que la concentración de los iones Fe^{+2} es muy baja en el plasma. El hierro complejado en esta forma no participa en la formación de $HO\cdot$, ni tampoco en la oxidación de lípidos (Aruoma y Halliwell, 1987). Una segunda proteína que es capaz de enlazar iones de hierro es la lactoferrina que se encuentra presente en ciertas secreciones humanas (leche, saliva, lágrimas y fluidos nasales) y que es liberada por neutrófilos activados. Se ha demostrado que los iones de hierro unidos a la lactoferrina, al igual que en el caso de la transferrina, no catalizan procesos radicalarios (Aruoma y Halliwell, 1987).

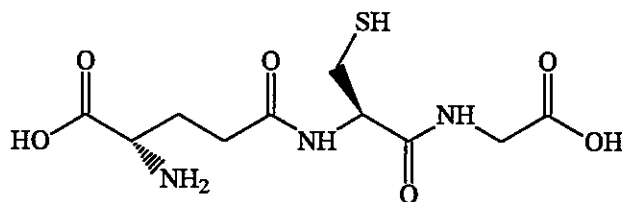
La ceruloplasmina, una proteína que contiene cobre en su sitio activo, tiene por su parte una activa función en el metabolismo de iones de hierro y despliega con ello una actividad antioxidante particular (Gutteridge y Stocks, 1981). Primero, la ceruloplasmina tiene una actividad ferroxidasa, es decir oxida Fe^{+2} a Fe^{+3} con la



concomitante reducción de O_2 a H_2O . Sin embargo, y a pesar de que se forman especies intermediarias reactivas del oxígeno (como el $O_2^{\cdot-}$) al oxidar el Fe^{+2} , éstas son mantenidas en el sitio activo de la enzima y no producen daños particulares en las biomoléculas vecinas. La actividad ferroxidásica de la ceruloplasmina permite que los iones de hierro se encuentren en su forma “inactiva” (como Fe^{+3}) y con ello inhiben la oxidación de lípidos dependiente de Fe^{+2} como también la generación de HO^{\cdot} a partir de H_2O_2 (Halliwell y Guttridge, 1990b).

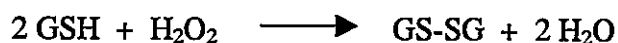
1.2.6 Glutación y análogos simplificados

El glutación (γ -glutamil-cisteinil-glicina) tiene múltiples funciones en el metabolismo humano entre las cuales se incluye la eliminación de xenobióticos, y en forma paralela es una importante defensa antioxidante ya que interviene, por ejemplo, en la protección del ADN contra los daños que produce la radiación ionizante y por otra parte actúa como sustrato de la glutación peroxidasa y transferasas en general (Ross, 1988).

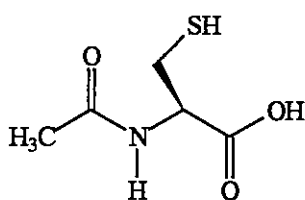


Glutación

La glutación peroxidasa que utiliza el glutación en el proceso de transformación del H_2O_2 en H_2O , es la única enzima humana que requiere el elemento selenio para su actividad: un residuo de seleno-cisteína (una cadena lateral conteniendo $-SeH$ en vez de $-SH$, como en la cisteína normal) que se encuentra presente en el sitio activo de la enzima (Levander, 1987). Como se había mencionado, la glutación peroxidasa remueve el H_2O_2 oxidando el glutación (GSH) a su forma dimérica, GSSG, de acuerdo a la siguiente reacción:

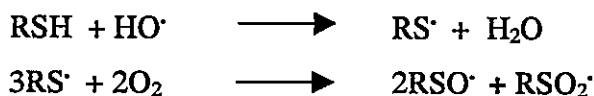


Existen datos que avalan el hecho que el glutatión en su forma reducida (GSH) puede ser de utilidad terapéutica como un antioxidante y como un agente citoprotector, en forma notable en los trasplantes de órganos, y contra la acción pro-oxidante de ciertos fármacos que inducen procesos oxidativos (Currin *et al.*, 1990). Sin embargo dada su alta polaridad, el GSH no es incorporado rápidamente a las células, por lo que se han desarrollado análogos estructurales que permiten mejorar su absorción. (metil- y etilésteres de glutatión) los cuales pueden atravesar bien las membranas celulares y ser hidrolizados por esterasas para producir GSH (Anderson y Meister, 1989). La *N*-acetilcisteína se ha utilizado como antioxidante en una amplia variedad de modelos experimentales (Moldéus *et al.*, 1986), y se ha determinado que al entrar en las células hepáticas se hidroliza, produciendo cisteína la que como precursor estimula la síntesis de GSH.



N-acetilcisteína

Sin embargo, mezclas de ciertos tioles con metales de transición pueden ser citotóxicas debido a que sus productos de reacción pueden generar especies reactivas de oxígeno ($O_2^{\cdot -}$ y HO^{\cdot}) (EROs) y radicales sulfurados del tipo RS^{\cdot} , RSO^{\cdot} y RSO_2^{\cdot} lo cual ha sido demostrado para cisteína, pero no para *N*-acetilcisteína y GSH, en modelos *in vitro* (Sevilla *et al.*, 1989).

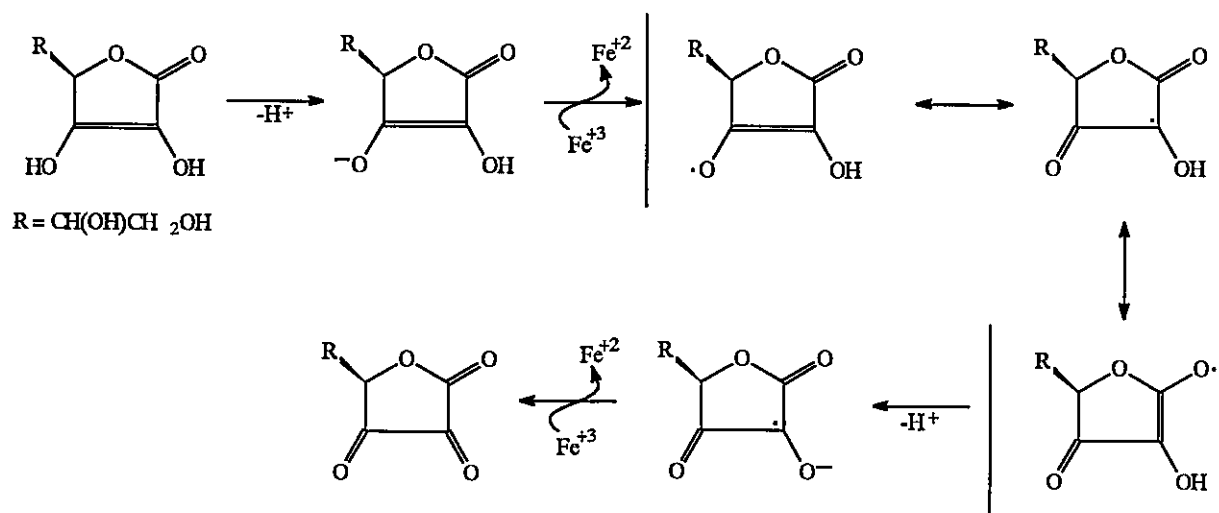


Del párrafo anterior se desprende que, cuando se propone utilizar un sustractor o un inhibidor de EROs, es necesario preguntarse qué sucede con los "nuevos" radicales libres que se forman a partir del antioxidante.

Tal como se mencionó en la sección 1.2.4, junto con el glutatión existen además al interior de las células otros antioxidantes inhibidores de procesos radicalarios como son el α -tocoferol localizado al interior de las membranas (Ingold *et al.*, 1989), y el ácido ascórbico (vitamina C) ubicado en el fluido acuoso que rodea dichas estructuras.

1.2.7 Vitamina C (ácido ascórbico), un antioxidante hidrosoluble.

La vitamina C se adquiere a través de la ingesta de frutas y verduras frescas (perejil, grosellas, tomate, coles, naranjas y pomelos), y la dosis diaria recomendada es de 50 a 60 mg. En humanos sanos, la concentración plasmática de esta vitamina es de 50 a 200 μ moles/l. La vitamina C tiene diferentes propiedades antioxidantes (Halliwell, 1990), siendo la más relevante la de regenerar la vitamina E mediante la reducción de los correspondientes radicales α -tocoferilos (α -tocoferol oxidado). En ausencia de iones de hierro (o de cobre), el ácido ascórbico es un poderoso antioxidante *in vitro*, pero la interacción del ácido ascórbico con los metales puede resultar peligroso, debido a la posibilidad de generar iones activos (Fe^{+2} o Cu^+) que pueden participar, junto al H_2O_2 en generación de radicales $\text{HO}\cdot$.

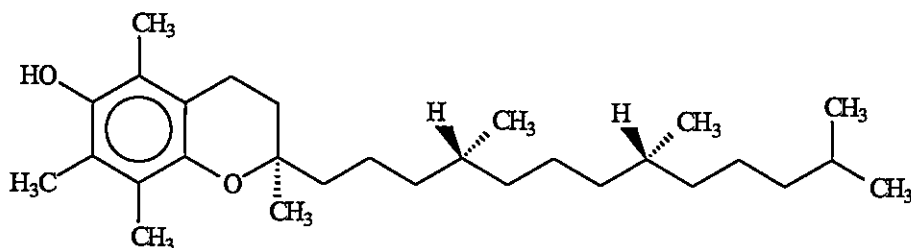


La administración aguda de altas dosis de vitamina C (hasta 20 g diarios) en humanos sanos, si bien injustificada, no trae consigo ningún tipo de daño significativo (Bendich *et al.*, 1986). La vitamina C es esencial en la dieta humana como co-factor para algunas

hidroxilasas (Levine, 1986), y una deficiencia de ésta podría predisponer al desarrollo de la aterosclerosis como sugieren algunos estudios epidemiológicos (Gey *et al.*, 1987).

1.2.8 Vitamina E (α -tocoferol), un antioxidante liposoluble.

Adicionalmente al glutatión y la vitamina C, las células contienen varios antioxidantes liposolubles denominados tocoferoles que inhiben las cadenas radicalarias: entre ellos el más eficaz es el α -tocoferol (vitamina E), que se localiza en el interior de las células (Ingold *et al.*, 1989). El término " α -tocoferol" y "vitamina E" son a menudo utilizados como sinónimos, sin embargo estrictamente la vitamina E se define desde un punto de vista nutricional, como un factor necesario en la dieta de las ratas para una reproducción normal (Diplock, 1985), y compuestos relacionados al α -tocoferol (como β -, γ -, δ -tocoferoles) muestran sólo cierta eficacia en este control. Por su parte el α -tocoferol es el más efectivo isómero antioxidante en los mamíferos.

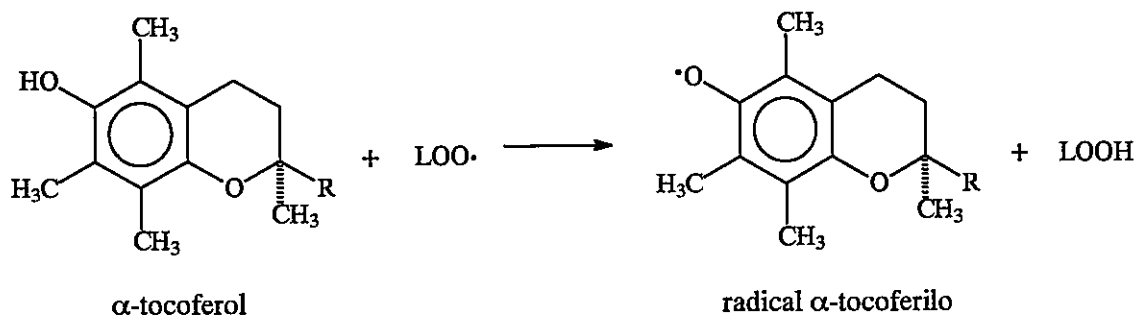


α -tocoferol

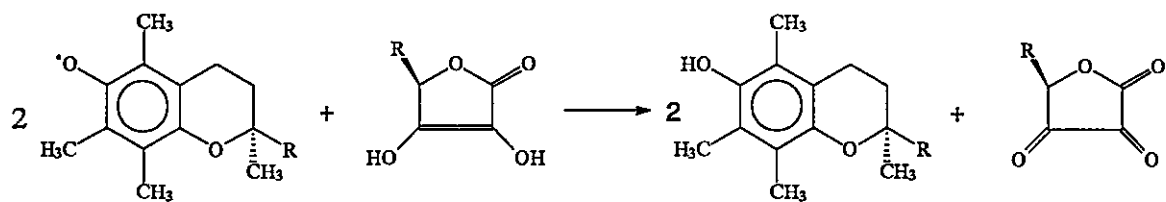
La vitamina E se incorpora al organismo a través del consumo de aceites vegetales (girasol, maíz, oliva y soya), germen de trigo, zanahorias, lechugas, huevos, mantequilla y leche entera. La ingesta diaria recomendada depende de la edad y el sexo y varía de 3 a 12 mg. Sin embargo, y aún cuando las manifestaciones de la deficiencia de vitamina E en animales de experimentación son proteicas, diversas acciones sobre los sistemas nervioso, reproductor, muscular y cardiovascular tienen más importancia porque se parecen más a los síndromes clínicos en los cuales se afirma que la terapéutica con vitamina E resulta beneficiosa. Sin embargo, los intentos de utilizar el α -tocoferol para el tratamiento de algunas enfermedades en las cuales los procesos oxidativos, se cree, son

importantes, tales como el daño cardíaco inducido por antraciclina (Powis, 1989), han sido desalentadores. Una razón para esto es que el tiempo necesario para elevar la concentración de este compuesto en algunos tejidos del cuerpo es relativamente largo, especialmente en el cerebro, mientras que el daño oxidativo se desarrolla muy rápido.

Las características estructurales que determinan la acción antioxidante del α -tocoferol son la presencia de un grupo hidroxilo fenólico cuyo átomo de hidrógeno puede ser fácilmente sustraído por una especie radicalaria, así como el carácter persistente del nuevo radical libre generado. Los radicales lipoperoxilo (L-O-O \cdot) y lipoalcoxilo (L-O \cdot) que provienen del daño radicalario de lípidos tienden a reaccionar preferencialmente con el antioxidante que genera a su vez un compuesto menos reactivo (el radical α -tocoferilo), y no con otro ácido graso poliinsaturado de las membranas. La escasa reactividad del radical α -tocoferilo se atribuye a su estabilidad termodinámica determinada por deslocalización del espín en el anillo aromático y por el efecto captodativo del oxígeno tetrahidropiránico y a su persistencia, que se atribuye a la presencia de grupos metilos en las posiciones de mayor deslocalización de espín.



El radical tocoferilo (R = C₁₆H₃₃) puede migrar hasta la interfase de las membranas y/o proteínas que se encuentran en contacto con el medio acuoso para ser reconvertido (regenerado) en α -tocoferol, a través de la reacción con glutatión (GSH) y/o con ácido ascórbico (R = CH(OH)CH₂OH) el cual se oxida a ácido dideshidroascórbico (ácido DA) (Esterbauer *et al.*, 1989; McCay 1985), como se ilustra para éste último compuesto a continuación:



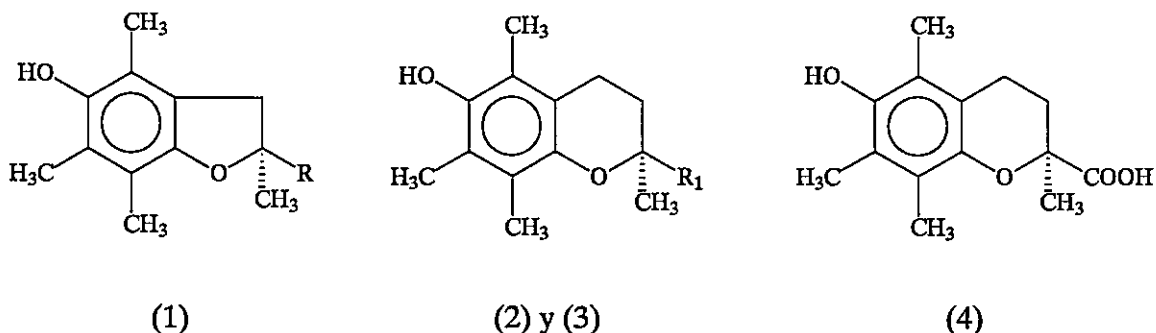
Radical α -tocoferilo

ácido ascórbico

α -tocoferol

ácido DA

Por otra parte, la estructura de la vitamina E ha servido como modelo para la preparación de un análogo benzofuránico (1, $R = C_{16}H_{33}$) (Scott *et al.*, 1974), más potente como antioxidante que el producto natural en fase lipídica, lo que se explica debido a las interacciones estereoelectrónicas más favorables entre el anillo bencénico y el heterociclo a través del solapamiento de la nube π del sistema aromático con los electrones no enlazantes del oxígeno (efecto captó-dativo), lo que es más eficiente que en el caso de que el ciclo unido al anillo aromático sea piránico.



(1)

(2) y (3)

(4)

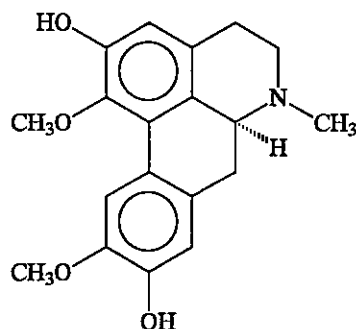
Modificaciones ulteriores de la estructura del α -tocoferol han conducido a la preparación de un compuesto que incorpora un grupo amino terciario en la cadena lateral del benzopirano (2, $R_1 = CH_2CH_2N(CH_3)_2$) (Grisar *et al.*, 1995), capaz de acumularse selectivamente en el cerebro debido posiblemente a una interacción de tipo electrostático entre los residuos fosfatos de los lípidos cerebrales y la función amina (Barclay, 1994), la que a pH fisiológico debe encontrarse en su forma protonada. Se han desarrollado también análogos hidrofílicos que incorporan funciones amina y como contraión tosílato (3, $R_1 = CH_2CH_2N^+(CH_3)_3OTs^-$) y un análogo en el cual se sustituye la cadena lateral hidrocarbonada por un grupo carboxílico: el Trolox® (4). Ambos compuestos presentan

cargas formales en su estructura (a pH fisiológico) y son capaces de acumularse en el tejido cardíaco previniendo procesos oxidativos asociados a infartos del miocardio. El Trolox® ha sido utilizado por su parte como antioxidante de referencia en distintos sistemas de evaluación de actividad antioxidante entre los cuales se cuentan los ensayos de descoloración de ABTS (ácido-(2,2-azo-*bis*(3-etilbenzotiazolín)sulfónico)).

1.3 Aporfinas como antioxidantes

1.3.1 La boldina

De entre todos los metabolitos que se han aislado a partir del boldo y determinado sus actividades farmacológicas, entre los que se cuentan flavonoides, aceites esenciales y alcaloides, sólo un par de éstos últimos han sido estudiados con mayor atención: la glaucina (1,2,9,10-trimetoxiaporfina) y la boldina (1,10-dimetoxi-2,9-dihidroxiaporfina) (Speisky y Cassels, 1995).



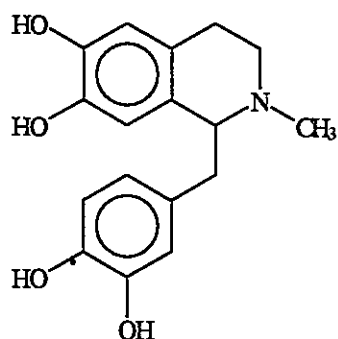
Los estudios farmacológicos sobre la boldina por ejemplo, han permitido demostrar que ejerce efectos colagogos y coleréticos en ciertos animales de experimentación (Kreitmair, 1952) y actúa como relajante de la musculatura lisa (Speisky *et al.*, 1991a) por mecanismos que se explicarían por su capacidad de actuar como antagonista en los receptores de tipo α_1 -adrenérgicos (Ivorra *et al.*, 1993).

Por otra parte, se ha podido determinar que la boldina es un potente agente antioxidante en sistemas bióticos y abióticos susceptibles de sufrir inactivación o daño peroxidativo a través de radicales libres (Speisky *et al.*, 1991b). La boldina es capaz de inhibir

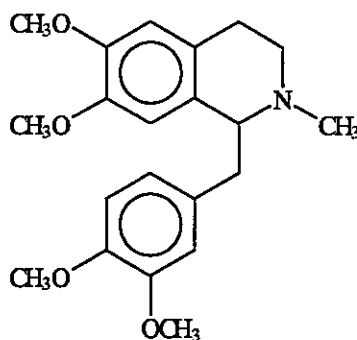
efectivamente, a concentraciones micromolares, la autoxidación (oxidación con oxígeno) *in vitro* de homogeneizado de cerebro de ratas, así como la peroxidación inducida químicamente (con alquilperóxidos generados por termólisis de 2,2'-azo-bis-amidinopropano, AAP) en membranas de eritrocitos, la inactivación de lisozima (Speisky *et al.*, 1991a) y el daño peroxidativo a membranas microsomales de hígado de ratas catalizado en forma enzimática y química (Fe^{+2} -ATP, Fe^{+2} -cisteína) (Martínez *et al.*, 1992; Cederbaum *et al.*, 1992). Estas acciones antioxidantes de la boldina están asociadas a su potente actividad captadora de radicales hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), los cuales son considerados como el metabolito oxigenado más reactivo generado en el medio biológico. La boldina también protege membranas microsomales contra el daño inducido *in vitro* por *ter*-butilhidroperóxido y tetracloruro de carbono, actuando como captador de radicales libres en la fase propagativa de las reacciones radicalarias (Cederbaum *et al.*, 1992).

1.3.2 Relaciones estructura-actividad antioxidante de aporfinas

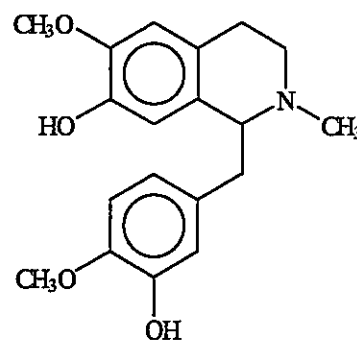
Entre las muchas estructuras químicas naturales y sintéticas que han sido sometidas a estudio para determinar sus propiedades antioxidantes se encuentran los alcaloides bencilisoquinolínicos (BIQ) en sentido amplio (Larson, 1988; Matsuno *et al.*, 1990). La BIQ no natural laudanosolina, que presenta dos grupos catecólicos en su estructura, es un potente antioxidante capaz de prevenir la lipoperoxidación inducida en forma química en células hepáticas.



laudanosolina

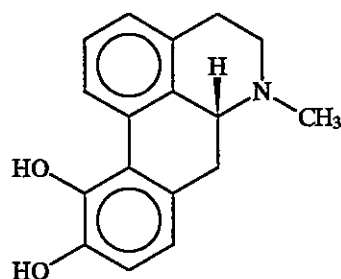


laudanosina

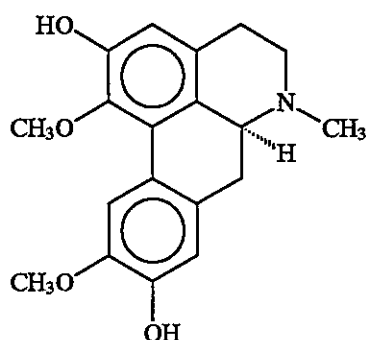


reticulina

Por el contrario, su análogo *O*-tetrametilado laudanosina, no fenólico, y la reticulina, difenólica pero no catecólica, muestran una actividad antioxidante mucho menor en las mismas condiciones. Dicho lo anterior no sorprende que la apomorfina, una aporfina catecólica hemisintética, se comporte también como un potente antioxidante. Sin embargo, el carácter catecólico muy necesario para que las BIQ muestren una actividad antioxidante interesante, no es un requerimiento estructural para las aporfinas fenólicas (Speisky *et al.*, 1991b; Martínez *et al.*, 1992).



(*R*)-apomorfina

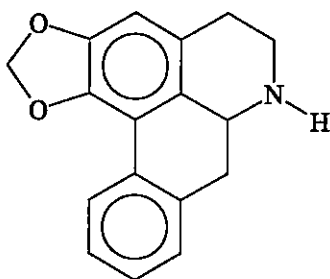


(*S*)-boldina

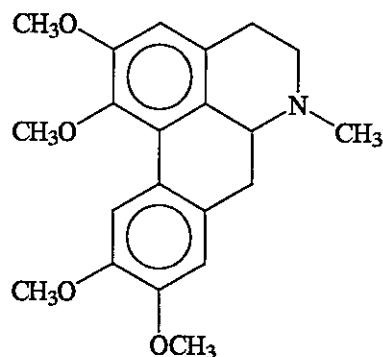
El examen estructural de la boldina, un alcaloide difenólico en el cual cada grupo hidroxilo lleva un sustituyente voluminoso (metoxilo) en una posición *orto* y tiene bloqueada la posición *para*, sirvió para racionalizar las observaciones experimentales, ya que este rasgo estructural se encuentra frecuentemente asociado a buenas actividades antioxidantes (Cassels *et al.* 1995), tal como se comenta en la sección 1.2.8. Además en su oportunidad se pensó que la estabilidad adicional que produciría la deslocalización del espín en el sistema bifenílico de la boldina se traduciría en la habilidad superior que presenta este tipo de compuestos para reaccionar con radicales libres y detener procesos radicalarios.

Sin embargo en aporfinas carentes de grupos hidroxilos como en el caso de la anonaína y la glaucina (Ríos *et al.*, 1990; Cassels *et al.*, 1995), también se observó en determinados modelos una actividad antioxidante comparable a la de la boldina. Producto de esta observación experimental se postuló que las aporfinas no fenólicas pueden formar un radical libre por sustracción de un átomo de hidrógeno desde una posición bencílica el

que, al igual que los radicales fenoxi, sería capaz de ser estabilizado por deslocalización a través del sistema bifenílico (Cassels *et al.*, 1995).

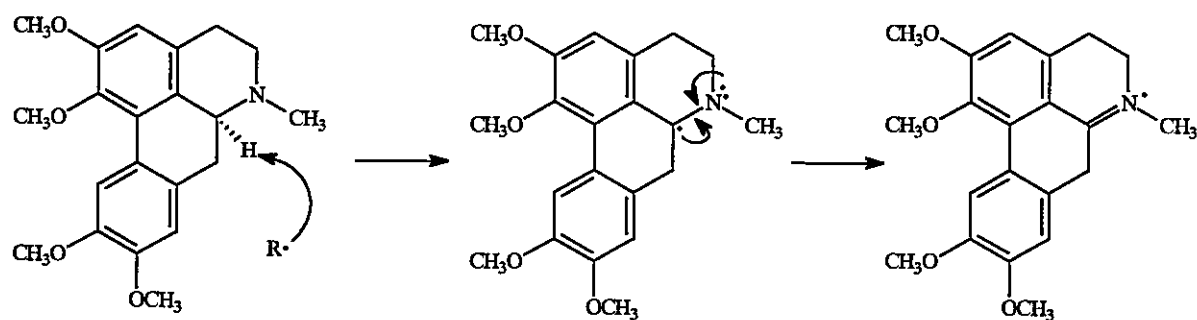


anonaína

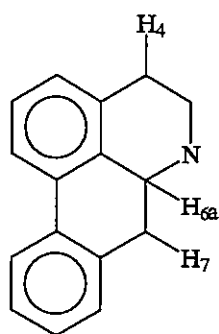


glaucina

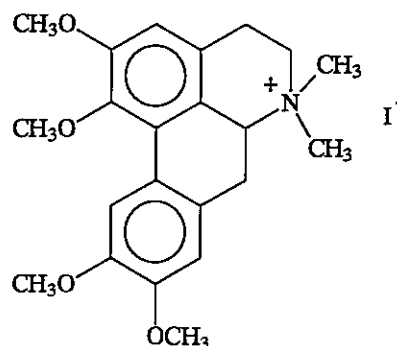
Por otra parte, un radical libre formado por sustracción del átomo de hidrógeno desde el C-6a sería más estable que aquellos formados en las otras dos posiciones benéflicas (C-4 y C-7) debido a la presencia de un átomo de nitrógeno vecino (por efecto captodativo). Este heteroátomo contribuiría con su par electrónico no enlazante a estabilizar el radical (Griller y Lossing, 1981) deslocalizándolo en el sistema bifenilo.



Esta hipótesis fue probada al comparar la capacidad antioxidante de la glaucina con la del yoduro de *N*-metilglaucinio, cuya eficacia en la protección de la lisozima fue nula (Cassels *et al.*, 1995).



Posiciones bencílicas



Yoduro de *N*-metilglaucinio

1.4 Objetivos generales

El propósito general de este trabajo fue estudiar relaciones estructura-actividad antioxidante de la boldina y algunos de sus derivados, como asimismo identificar los productos principales de oxidación de este alcaloide.

Partiendo de la hipótesis de que los grupos fenólicos de la boldina son determinantes de su actividad antioxidante, aunque probablemente en distinto grado, para determinar la contribución parcial que ejercen dichos grupos sobre la actividad antioxidante se prepararon los correspondientes derivados monometilados en las posiciones 2-*O*- y 9-*O*- de la boldina. Para evaluar el posible papel del par electrónico no enlazante del nitrógeno en la estabilización se prepararon sales cuaternarias de amonio (fenólicas y no fenólicas), lo que conduciría a suprimir la eventual formación del radical bencílico vecino al heteroátomo.

Para evaluar la actividad antioxidante de los análogos de la boldina como una función de la lipofilia, se planteó modificar la estructura del alcaloide aumentando el efecto hidrofóbico del sustituyente sobre el átomo de nitrógeno e introduciendo átomos de halógenos sobre los anillos aromáticos. Asimismo se consideró la preparación de análogos *O*-acilados con grupos acilo lipofílicos y otros tales como hemisuccinato y hemifitalato, que presentan grupos carboxilato libres, para disponer de una serie de derivados de menor o mayor carácter hidrofílico que la boldina.

Sobre la mayoría de estos compuestos se determinó sus capacidades antioxidantes en tres diferentes modelos: decoloración de soluciones de radicales libres derivados del ABTS, protección de una enzima (lisozima) frente al daño inducido por radicales libres producidos por la termólisis de AAP e inhibición de procesos oxidativos en membranas inducidos por radical hidroxilo generado *in situ*. El significado de estas siglas y la química pertinente se explican en las secciones de materiales y métodos.

Para identificar los productos de oxidación de la boldina y proponer una posible ruta de transformación de éstos se sometió el alcaloide a condiciones oxidativas similares a las que éste enfrenta en los ensayos de actividad antioxidante, y a otras que pudieran arrojar más evidencias empíricas sobre los posibles mecanismos de oxidación.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislamiento de precursores y preparación de derivados

2.1.1 Nomenclatura utilizada

En las secciones: Resultados y Discusión de Resultados se utilizan ya sea los nombres tradicionales de los alcaloides aislados y/o de sus respectivos derivados seguidos de los nombres semi-sistemáticos basados en el esqueleto aporfínico [dibenzo(*de,g*)quinolina]. Por ejemplo, la boldina también aparece como (*S*)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina. A los derivados estructuralmente relacionados con boldina adicionalmente se los nombra utilizando como base este alcaloide. Por ejemplo: predicentrina = 9-*O*-metilboldina = (*S*)-2-hidroxi-1,9,10-trimetoxiaporfina. Para designar el iniciador de radicales libres 2,2'-azo-*bis*-amidinopropano se utiliza la sigla AAP.

2.1.2 Caracterización de los compuestos obtenidos

Los puntos de fusión fueron determinados en una platina de Kofler Reichert-Jung Galen III y no están corregidos. Los poderes rotatorios fueron medidos en un aparato Schmidt-Haensch Polartronic E utilizando solventes de pureza analítica para preparar las soluciones cada vez. Los espectros de resonancia magnética de protones y de carbono 13 fueron registrados en un aparato Bruker AMX 300, utilizando tetrametilsilano como estándar interno y como solventes cloroformo deuterado (CDCl₃), óxido de deuterio (D₂O) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆). Los espectros de masas fueron registrados en un aparato Mass Spectrum 5973 (Hewlett Packard) bajo ionización por impacto de electrones (70 eV) con un filtro cuadrupolar y una sonda de introducción directa.

Para las cromatografías en columna de sílice, se utilizó gel de sílice de 40-63 μm de diámetro (Merck, Darmstadt, Alemania) y como solvente de elución acetato de etilo:metanol = 4:1 o cloroformo:metanol en idéntica proporción.

2.1.3 Aislamiento de precursores

Para el aislamiento de alcaloides desde sus fuentes vegetales, se utilizó un método desarrollado en nuestro laboratorio y que se describe a continuación en una obtención representativa de boldina (desde corteza de boldo, *Peumus boldus* Molina). Este procedimiento es similar al utilizado para obtener la fracción de alcaloides totales (*vide infra*) que permitió aislar laurolitina (*nor*-boldina) (desde madera de boldo) y laurotetanina (2-*O*-metil-*nor*-boldina) (desde corteza de tepa, *Laurelia philippiana* Looser)

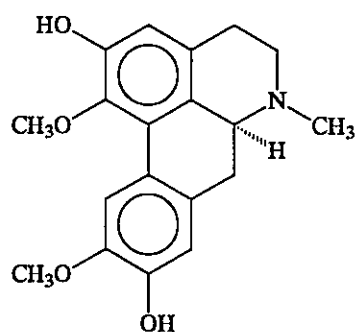
Método de extracción de boldina: La corteza de boldo (1 Kg), previamente seca y molida, se extrae con una solución acuosa ácida de HCOOH 1 M (10 porciones sucesivas de 3 L) a 80 °C y con agitación constante durante dos horas cada vez. Los extractos acuosos ácidos se separan del sólido por filtración a través de un paño de algodón y se reúnen. De esta última solución se toman fracciones de 500 mL y, previa basificación con NH₄OH (25 %) hasta pH 8-9, se extraen con CHCl₃ (6 porciones sucesivas de 300 mL). Los extractos orgánicos se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se concentran a sequedad en un evaporador rotatorio, dando de esta forma la fracción denominada de "alcaloides totales" (98,7 g, 9,87 %).

La fracción de alcaloides totales se divide en porciones de 20 g aproximadamente. Cada una de éstas, por separado, se disuelve en un volumen mínimo de CHCl₃ caliente (aproximadamente 2 mL/g de alcaloide), se agrega una punta de espátula de carbón activado (*ca.* 50 mg) y se hierve la mezcla por dos minutos, después de lo cual se filtra a través de Celite® y la solución que se obtiene se deja enfriar, observándose la aparición de cristales brillantes de color crema.

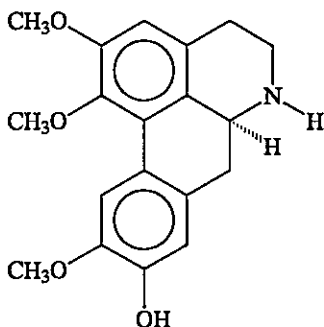
La boldina obtenida de todas las fracciones se recrystalizó por este método las veces necesarias hasta obtener por cromatografía en capa fina un producto que se alineaba correctamente con un patrón de boldina, con lo que se obtuvo 30 g del alcaloide puro (3 %) y 66 g de aguas madres de recrystalización clorofórmicas (AMR).

La boldina así obtenida (como complejo con un mol de CHCl₃, el cual se descuenta en cada una de las preparaciones), se utilizó para la preparación de los derivados de este alcaloide. La laurotetanina (2-*O*-metil-*nor*-boldina) que se obtuvo a partir de madera de

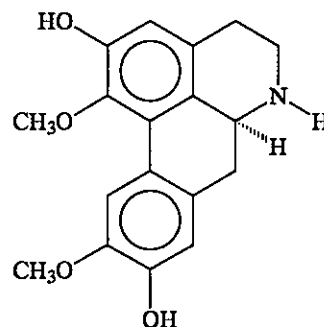
tepa se utilizó para preparar *N*-metillaurotetanina (2-*O*-metilboldina), y la laurolitsina (*nor*-boldina o *N*-desmetilboldina) para la preparación de *N*-etil-, *N*-*n*-propil y *N*-alil-derivados.



(*S*)-Boldina

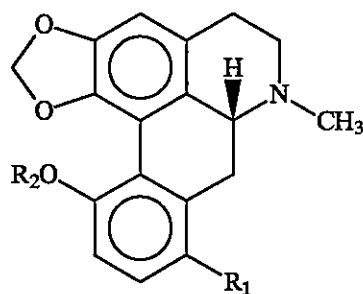


(*S*)-Laurotetanina



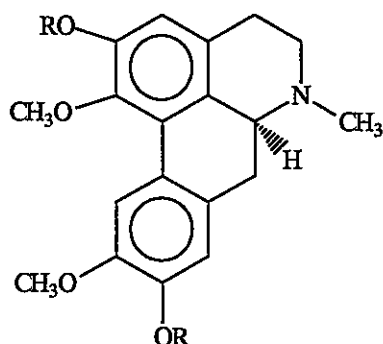
(*S*)-Laurolitsina

Se aisló a partir de un concentrado de extracto metanólico de pukatea (*Laurelia novae-zelandiae* A. Cunn.) pukateína [(*R*)-1,2-metilendioxi-11-hidroxiaporfina] ($R_1 = H$, $R_2 = H$), con la que se preparó los derivados 8-bromo- ($R_1 = Br$, $R_2 = H$) y 11-*O*-metilpukateínas ($R_1 = H$; $R_2 = CH_3$).

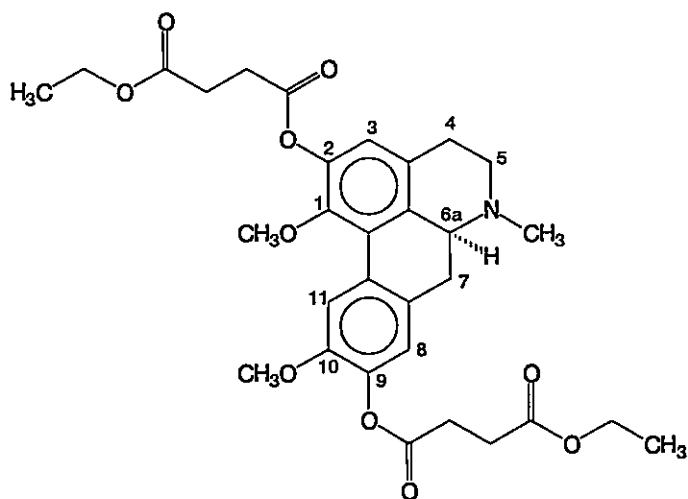


2.1.4 Métodos utilizados en la preparación de los derivados de aporfinas

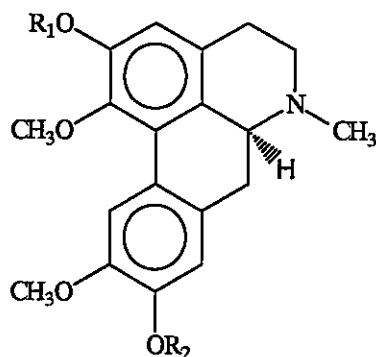
Derivados diesterificados de boldina: La preparación de 2,9-*O,O'*-diacetilboldina ($R = \text{CH}_3\text{CO}$) y 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina ($R = (\text{CH}_3)_3\text{CCO}$) se efectuó de acuerdo a procedimientos descritos para la acetilación de dopamina (Borgman *et al.*, 1975), sin ningún tipo de modificación.



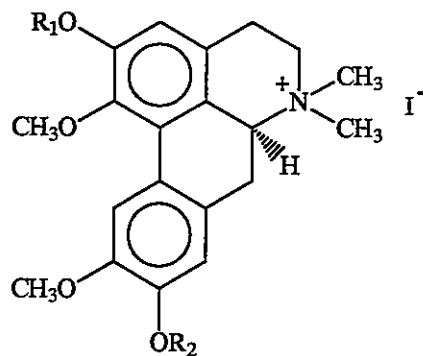
Para obtener el compuesto 2,9-*O,O'*-bis-(3-etoxicarbonilpropanoíl) boldina se utilizó una estrategia convergente preparando, por un lado, el ácido-3-etoxicarbonilpropanoico siguiendo un método ya descrito en la literatura (Robinson *et al.*, 1990) y luego condensando este producto con boldina, por un método similar al descrito en la preparación de un éster de rapamicina (Adamczyk *et al.*, 1994).



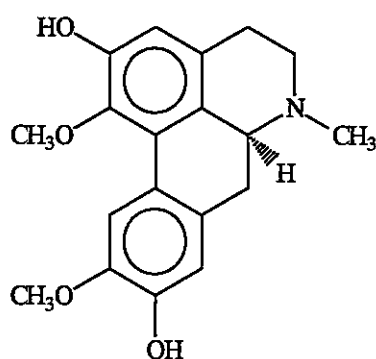
Derivados mono- y di-metilados de la boldina: En la preparación de glaucina (2,9-*O,O'*-dimetilboldina) ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$) y predicentrina (9-*O*-metilboldina) ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$) se utilizó una metódica descrita (Tschesche *et al.*, 1964 y 1965, Asencio *et al.*, 1993) que consiste en el tratamiento de una solución metanólica del alcaloide con una solución etérea de diazometano. Para la obtención de *N*-metillaurotetanina (2-*O*-metilboldina) ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$), el precursor laurotetanina fue *N*-metilado bajo condiciones modificadas de Eschweiler-Clarke.



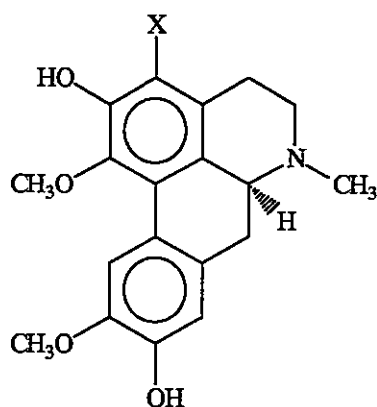
Derivados cuaternarios de amonio: se prepararon las sales cuaternarias de amonio, yoduros de *N*-metilboldinio ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$), *N*-metilglaucinio ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$), *N*-metilpredicentrinio ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$) y *N,N*-dimetillaurotetaninio ($R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$) por tratamiento de soluciones bencénicas de las bases correspondientes con yoduro de metilo mantenidas a reflujo por un espacio de dos horas de manera análoga a lo descrito para *N*-metilglaucinio (Yunusov y Progressov, 1952).



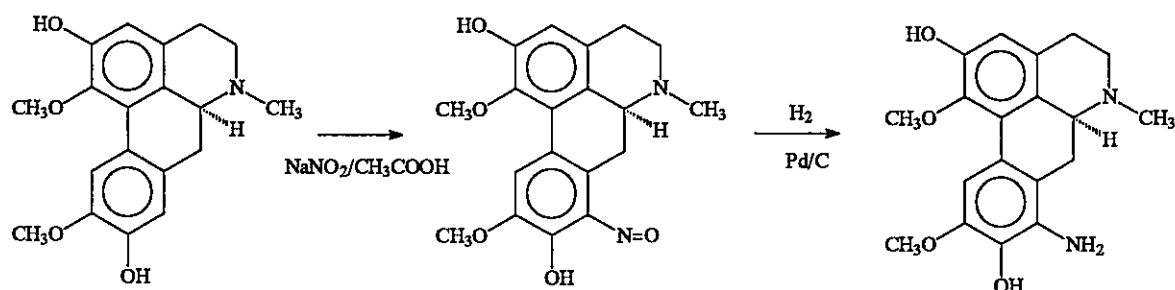
Derivados *N*-sustituídos de laurólitsina: a partir de laurólitsina ($R = H$) y mediante la amidificación con los respectivos anhídridos de ácidos, utilizando como solvente una mezcla de benceno en piridina, y reduciendo las amidas correspondientes con $LiAlH_4$ en éter (Vavrék *et al.*, 1970; Leboeuf *et al.*, 1980), se pudo preparar *N*-etil- ($R = CH_3CH_2$) y *N*-*n*-propil-*nor*-boldinas ($R = CH_3CH_2CH_2$). Para la preparación de *N*-alil-*nor*-boldina ($R = CH_2=CHCH_2$) la laurólitsina fue tratada con K_2CO_3 y cloruro de alilo (en acetonitrilo como solvente) a reflujo por un período de 2 horas.



Derivados halogenados de boldina: La halogenación de la boldina se llevó a cabo mediante un método ensayado previamente en nuestro laboratorio (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000), mediante el tratamiento con *N*-halógenosuccinimidas (NXS, con $X =$ halógeno = Cl-, Br- o I-) de soluciones de boldina en ácido trifluoroacético (TFA). Se obtuvo de esta manera: 3-cloro-, 3-bromo- y 3-yodoboldinas:



Preparación de otros compuestos de interés: A partir de pukateína se preparó el derivado 8-bromado siguiendo idéntico procedimiento que para los derivados halogenados de boldina descritos previamente (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000). Se preparó la 8-aminoboldina a través de la nitrosación de boldina con NaNO_2 en CH_3COOH a temperatura ambiente y posterior reducción con H_2 utilizando Pd/C al 10 %.



Ensayos de oxidación de la boldina: La oxidación de boldina diacetilada se efectuó con yodo en dioxano (Urzúa y Torres, 1982) con lo que se obtuvo 2,9-*O,O'*-diacetil-6a,7-dideshidrobaldina. Se estudió además la oxidación de la boldina sin protección de los hidroxilos siguiendo procedimientos descritos en la literatura científica para otros alcaloides aporfínicos (Cava *et al.*, 1972).

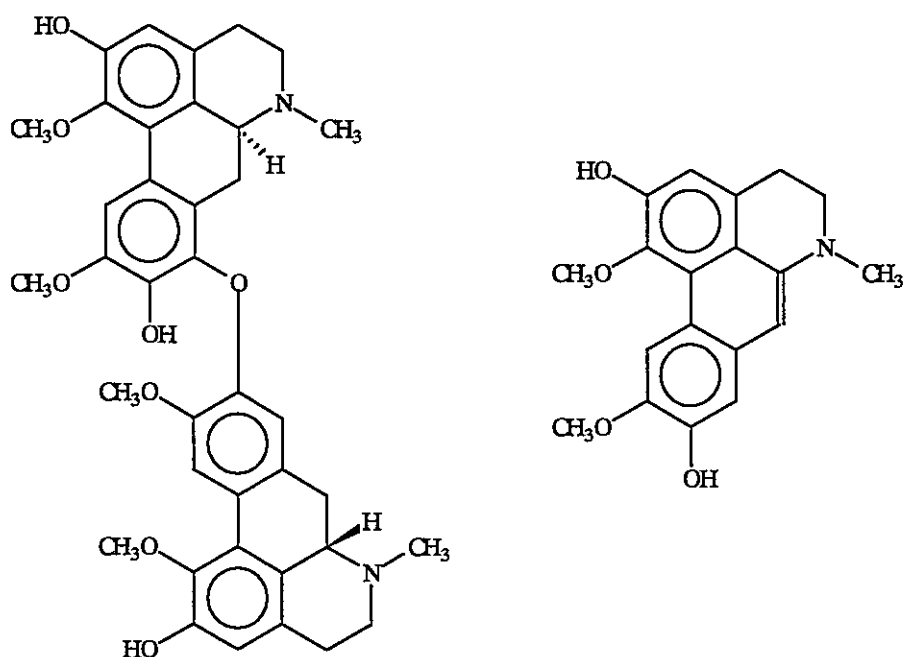
- Burbujeando aire (O_2) a través de una solución alcohólica de boldina a temperatura ambiente, y controlando el progreso de la reacción durante 5 días.
- Añadiendo sobre una solución de boldina en solución amortiguadora de pH de fosfato pH = 7,4 una solución al 6,5 % de HgCl_2 en la misma solución amortiguadora de pH a una temperatura de 37 °C.

Adicionalmente se realizaron oxidaciones de la boldina utilizando condiciones de pH, temperatura y tiempo de reacción similares a las utilizadas en las evaluaciones de actividad antioxidante de las aporfinas descritas más adelante (sección 2.2.2 y 2.2.3)

usando como sustrato oxidable membranas de hepatocitos (procedimiento c)) y lisozima (procedimiento d))

- c) Añadiendo sobre una solución de boldina en solución amortiguadora de pH de fosfato pH = 7,4, FeSO₄ y H₂O₂ a una temperatura de 37 °C.
- d) Co-incubando la boldina y 2,2'-azo-bis-amidinopropano (AAP) (concentraciones equimoleculares) a 37 °C.

Trabajando bajo las condiciones experimentales a), b) y c) se pudo aislar e identificar la 6a,7-dideshidrobaldina y en las condiciones tipo d) el bis-aporfinoide 8-(9-O-boldinoxiboldina).

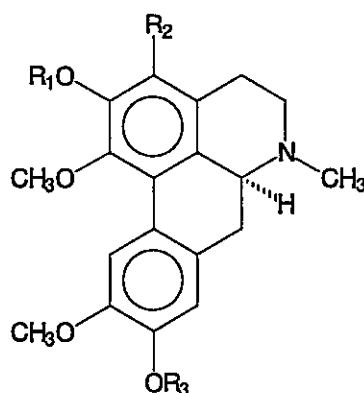


2.1.5 Evaluación del coeficiente de reparto.

Las lipofilias de los compuestos fueron medidas por el procedimiento clásico de reparto entre *n*-octanol y solución amortiguadora de pH de fosfato (pH 7,4; 20 mM). Para realizar estas mediciones se utilizó *n*-octanol de grado HPLC (Merck) y agua bidestilada

para preparar las soluciones amortiguadoras (SA) de pH 7,4, de similar concentración a la utilizada en los ensayos de protección de lisozima y de inhibición de la oxidación de microsomas hepáticos. Previamente se agitó la solución amortiguadora con un exceso de *n*-octanol (1:5 = SA:*n*-octanol) para presaturar ambas fases y se guardaron por una noche a temperatura ambiente (*ca.* 15 °C) en una caja de aislante (poliestireno expandido, Plumavit®) para evitar fluctuaciones de temperatura, para mantener constante la concentración del compuesto orgánico en la fase acuosa. El *n*-octanol, por su parte, que se utilizó fue de la pureza indicada (*cf.* Hansch y Leo, 1995) ya que no presentaba bandas de absorción sobre 220 nm (espectro UV-visible). La solución madre de *n*-octanol fue también presaturada con SA y mantenida en un recipiente de Plumavit® que impidiera las fluctuaciones de temperatura. Esta solución también se guardó por una noche previo a ser utilizada, tal como se hizo con la fase acuosa (SA) presaturada. Para realizar la partición se disolvió cada uno de los compuestos en la fase acuosa (100 µM) y se agitó durante 5 minutos (a temperatura ambiente, *ca.* 20 °C). Se recomienda a este punto, agitar de 2 a 3 minutos ya que pueden formarse emulsiones persistentes, lo que no se observó en el caso de las aporfinas. No se evaluó si la condición de equilibrio de fases se había logrado durante este período de agitación. Para asegurar la completa separación de fases luego del proceso de partición, la mezcla se centrifugó a 12000xg durante 20 minutos tal como se recomienda. Se utilizó el método espectrofotométrico para cuantificar la concentración en cada una de las fases, mediante la lectura de la absorbancia en la región de 300 nm (a longitudes de onda ligeramente diferentes para cada compuesto y cada solvente) e interpolación en las curvas de calibración obtenidas previamente para cada uno de los compuestos. A partir de estos datos se calculó el coeficiente de reparto (K_{rep} = concentración en la fase orgánica / concentración en la fase acuosa) y se expresó éstos resultados en su forma logarítmica ($\log K_{rep}$), o sea la lipofilia. El método seguido es similar al descrito por Hansch y Leo (1996). Las estructuras evaluadas se detallan a continuación:

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
boldina	H	H	H
predicentrina	H	H	CH ₃
glaucina	CH ₃	H	CH ₃
2,9- <i>O,O'</i> -dipivaloilboldin	(CH ₃) ₃ CO	H	(CH ₃) ₃ CO
8-aminoboldina	H	NH ₂	H
8-nitrosoboldina	H	NO	H
3-cloroboldina	H	Cl	H
3-bromoboldina	H	Br	H
3-yodoboldina	H	I	H



2.2 Evaluación de la actividad antioxidante

2.2.1 Descoloración de soluciones de radicales catiónicos generados a partir del ácido 2,2'-azo-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS).

Soluciones de ABTS (150 μ M) son mezcladas a volúmenes iguales con una solución de AAP (4 μ M) para alcanzar concentraciones finales 75 μ M y 2 μ M para ABTS y AAP respectivamente. En seguida, la mezcla se calienta en un baño a 45 °C durante 55 minutos. Después de este período, la solución de color azul-verdoso se deja en un baño de hielo-agua, hasta su utilización. Bajo estas condiciones (dilución y frío), la solución no cambia rápidamente de absorbancia, lo que permite guardarla durante períodos prolongados (Lissi y Campos, 1997). Para nuestras experiencias se utilizaron las soluciones preparadas con media hora de antelación. La solución que contiene los radicales libres se diluye a la mitad por la adición de solución amortiguadora de pH de fosfato (20 mM; pH = 7,4). Bajo las condiciones experimentales y utilizando las

concentraciones de ABTS y AAP antes mencionadas, la solución presentó absorbancias que se encuentran comprendidas entre 0,20 y 0,21, y que dependen de las manipulaciones que se efectuaron en su preparación. Por otra parte, se preparan soluciones madres a diferentes concentraciones de los derivados aporfínicos para efectuar los ensayos de decoloración. Para la determinación de la actividad descolorante 1 mL de la solución de los radicales coloreados se transfiere a una cubeta de cuarzo y se deja que alcance la temperatura ambiente (2-3 minutos) (aproximadamente 15 °C) y luego se mide su absorbancia inicial (A_i). Se añade 10 μ l de solución del compuesto a evaluar a una concentración determinada (concentraciones finales de 1-10 μ M) a la solución de radicales libres y después de 90 segundos se mide nuevamente la absorbancia (A_f). El antioxidante de referencia (Trolox®), al ser añadido sobre la solución de ABTS, produce una decoloración instantánea mientras que la adición de la boldina (y sus derivados) presenta un decaimiento progresivo de la absorbancia a lo largo de un minuto o más. Como no se puede estimar la velocidad de decoloración por Trolox® (en el rango de concentraciones utilizado en que se hicieron las evaluaciones) se optó por medir el efecto descolorante a un tiempo fijo que se eligió de la siguiente manera: con una concentración fija de boldina (5 μ M) se midió la disminución de la absorbancia durante 270 segundos. Después de los primeros 90 segundos la solución se había descolorado casi completamente, y a los 270 segundos la variación con respecto a los 90 segundos no superaba un 5 %. De acuerdo a esto se evaluó cada uno de los compuestos a una concentración fija (en intervalo de concentraciones de 1 a 10 μ M) midiendo el cambio de absorbancia que producían a 90 segundos). Se utilizó rangos de concentraciones que en su límite superior produjeran la decoloración total de la solución ($A_f = 0$). Los datos obtenidos se representaron como porcentajes de decoloración, es decir $\Delta A\% = (A_f / A_i) \times 100$ en función de concentraciones crecientes (μ M) de la sustancia utilizada. Este método fue utilizado para evaluar de manera preliminar si los derivados de aporfinas presentaban o no actividad antioxidante.

2.2.3 Determinación de la actividad residual de lisozima en presencia de radicales libres generados por la termólisis de AAP (2,2'-azo-bis-amidinopropano).

La actividad de la lisozima (grado I, Sigma, St. Louis, MO, USA) se determinó siguiendo la disminución de la turbidez a 436 nm después de la adición de una suspensión de liofilizado de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, MO, USA) (concentración final 0,27 mg enzima/mL), en ausencia y presencia de AAP (Polysciences, Warrington, PA, USA) (concentración final 100 μ M) y de las sustancias a evaluar.

Para la determinación de la actividad residual de la enzima, cada una de las soluciones siguientes se preparó en cinco ejemplares:

- *Solución control:* 900 μ l de solución de lisozima con concentración final 0,27 mg/mL (preparada en solución amortiguadora de pH de fosfato con cloruro de sodio ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 20 \text{ mM}$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 20 \text{ mM}$; $\text{NaCl} = 140 \text{ mM}$; $\text{pH} = 6,5$) completando con 100 μ l de solución amortiguadora.
- 900 μ l de solución de lisozima 0,27 mg/mL y 100 μ l de AAP.
- 800 μ l de solución de lisozima 0,27 mg/mL y 100 μ l de soluciones de las sustancias a evaluar (a diferentes concentraciones cada vez).

De acuerdo a las especificaciones que se encuentran en el catálogo de la empresa Sigma, la lisozima que se utilizó tiene la siguiente actividad: 1 unidad produce una variación de la absorbancia medida a 450 nm de 0,01 unidades de absorbancia (ua) por minuto (0,01/min) cuando se trabaja a pH 6,3 (al cual se trabajó) y a una temperatura de 25 °C (esto no fue controlado) cuando se utiliza una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato en una mezcla de 2,6 mL de reacción, considerando un paso óptico de 1 centímetro. La concentración de lisozima fue de 0,22 mg en una cubeta de 1 cc de volumen total, por lo que cada solución contenía aproximadamente 10800 unidades de la enzima lo que produce un decaimiento de la absorbancia de 108 ua/min.

Las soluciones preparadas se incubaron a 45 °C, y cada medición se realizó extrayendo una alícuota de muestra de la lisozima incubada (en presencia y ausencia de aporfinas o del antioxidante de referencia) cada 30 minutos (considerando un control a tiempo 0). En cada caso se midió la absorbancia inicial y la final para determinar el cambio total de la absorbancia (ΔA), cambio que a su vez fue comparado bajo condiciones experimentales idénticas en ausencia de AAP. A diferentes intervalos de tiempo (0, 30, 60 y 120 minutos) se extrajeron alícuotas de 500 μ l de cada solución y se conservaron en hielo. Las alícuotas de cada solución de la enzima preparada de esta forma, se mezclaron en una cubeta de cuarzo con 500 μ l de suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (1 mg/5 mL solución amortiguadora de pH de fosfato), y luego se agitaron manualmente antes de medir los cambios de la absorbancia durante 90 segundos a 20 °C. Los cambios debidos ya sea a la desnaturación o al efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática no fueron controlados.

En estas condiciones, se determinan las variaciones de absorbancia para la lisozima (ΔA_{lis}) en presencia de AAP ($\Delta A_{lis/ABAP}$) y diferentes concentraciones de las aporfinas evaluadas ($\Delta A_{lis/ABAP/antioxidante}$). A cada tiempo, la diferencia de actividad de la lisozima en la ausencia y presencia de AAP fue asignada arbitrariamente como 100 % es decir, ($\Delta A_{lis} - \Delta A_{lis/ABAP}$), lo que permitió calcular el porcentaje de actividad residual como:

$$(\Delta A_{lis/AAP/antioxidante} - \Delta A_{lis/AAP} / \Delta A_{lis} - \Delta A_{lis/AAP}) \times 100$$

2.2.4 Protección de membranas microsomales por aporfinas contra radicales hidroxilo generados a partir de una reacción de tipo Fenton.

La oxidación lipídica de microsomas hepáticos producida por radicales hidroxilo se determinó en términos de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico según el método descrito por Fee y Teitelbaum (1982), en presencia y ausencia de sustancias protectoras (la boldina, sus derivados y el antioxidante de referencia).

Ratas macho Sprague-Dawley de 200-250 g (Instituto de Salud Pública, Santiago, Chile) se mataron por dislocación cervical y fueron perfundidas por la vena porta con

una solución fría de KCl (140 mM), para eliminar la sangre. El hígado se retiró y fue cortado en pequeños trozos (ca. 3-4 g), los cuales fueron homogeneizados con 10 movimientos verticales de vaivén de un pistón de teflón girando a una velocidad de 1200 rpm dentro de un tubo de vidrio de tipo Potter-Elvehjem. Después de una primera centrifugación (10 minutos a 13500 g, 4 °C) que permite eliminar las partículas gruesas, el sobrenadante fue retirado y el precipitado (pellet) resuspendido, y se centrifugó nuevamente (40 minutos, 13500g, 4 °C). El sólido obtenido en esta centrifugación fue pesado y vuelto a suspender en un volumen igual de solución amortiguadora de pH de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 = 20 \text{ mM}$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 20 \text{ mM}$; $\text{NaCl} = 140 \text{ mM}$; $\text{pH} = 7,4$) y conservado a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando como estándares soluciones de concentraciones crecientes de albúmina de bovino.

Para efectuar los ensayos de oxidación, el preparado de membranas se diluyó convenientemente en solución amortiguadora para lograr una concentración final de 1 mg/mL. Esta suspensión (23 μl correspondiente a 1 mg/mL de membranas) se traspasó a tubos de hemólisis que contenía solución amortiguadora de pH de fosfato en los siguientes volúmenes: 1977 μl para el tubo de control y 1477 μl para el tubo de sustancias a evaluar, y luego se adicionó en cada uno de los tubos 500 μl de solución de las sustancias a evaluar (concentraciones finales 1, 3, 5, 10, 25 y 50 μM), y los antioxidantes de referencia (α -tocoferol y BHT), excepto en el de control. Finalmente, en un período no mayor a 15 segundos, se adicionó a cada tubo: 500 μl de solución de FeSO_4 (100 μM), 400 μl de solución de ácido ascórbico (50 μM) y 100 μl de H_2O_2 . De cada tubo se tomo una alícuota de 500 μl y se conservó en un tubo de Eppendorf, en frío (hielo) para medir la oxidación a 0 minutos. Las soluciones fueron incubadas a baño maria (37 °C) con agitación mecánica durante 20 minutos. Después de este período, 500 μl de cada tubo se retiraron y se guardaron en hielo (medida de la oxidación lipídica a los 20 minutos). Dentro de cada uno de los tubos (los incubados y los de referencia) se añadió 25 μl de Cl_3CCOOH (2mM), se mezclaron los contenidos en un agitador de vórtice, y luego fueron centrifugados (100 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente). Después 350 μl del sobrenadante obtenido se traspasaron a tubos de vidrio de 10 mL

que ya contenían 700 μl de ácido ascórbico (40 μM) (se utilizaron estos tubos para evitar pérdidas ya que se debía calentar en un baño de agua hirviendo). Los tubos así preparados se agitaron manualmente y se calentaron a 100 °C durante 10 minutos, y luego fueron enfriados a temperatura ambiente. Los productos reactivos al ácido tiobarbitúrico fueron determinados y de la misma manera se calculó del porcentaje de oxidación basal (debido solo a la mezcla de las sustancias) y que fue sustraído a lo medido a 0 minutos de aquello determinado a los 20 minutos, en cada una de las soluciones. Una oxidación de un 100 % fue considerada en el caso en que no se utilizó ningún tipo de sustancia antioxidante.

2.2.5 Tratamiento de datos.

En todas las condiciones experimentales se determinaron 4 valores (o más) para una determinada condición experimental, lo que se indica en las tablas respectivas, y se informan como el promedio \pm 1 desviación estándar. Las curvas obtenidas en los ensayos de actividad antioxidante, específicamente para obtener las concentraciones de semi-inhibición en microsomas hepáticos, fueron comparadas con un análisis *t*-student para datos finitos, informándose las diferencias sólo cuando estas son menores a 0,05 ($p < 0,05$). En los otros casos se utilizó el criterio de la desviación estandar para determinar si los datos eran o no significativos.

3.0 RESULTADOS

3.1 Aislamiento de precursores y preparación de derivados

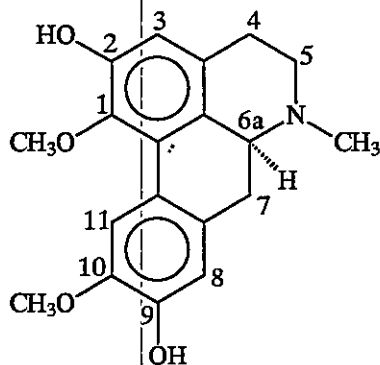
Boldina, [(S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina]

Rendimiento: 3% del producto puro (como boldina-CHCl₃) (respecto a la corteza de *Peumus boldus* Mol.)

Punto de fusión (base libre, cristalizada en CHCl₃ con un mol del solvente) = 161-162 °C (Lit. 161°C, Nakasato *et al.*, 1966)

$[\alpha]_D^{20} = +111^\circ$ (c = 1,0; MeOH) (Lit. $[\alpha]_D^{20} = +111^\circ$, c = 1,0; MeOH; Tewari *et al.*, 1961).

Espectro de masas de boldina (C₁₉H₂₃NO₄; PM = 327): *m/z* (abundancia relativa) 327 (100 %, M)⁺, 326 (M-H)⁺ (83%), 312 (M-CH₃)⁺ (34%), 296 (M-OCH₃)⁺ (37%), 284 (M-CH₃N=CH₂)⁺ (69%), 269 (M-CH₃N=CH₂, CH₃)⁺ (23%), resultados de acuerdo con lo publicado (Tewari *et al.*, 1972).



Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Tewari *et al.*, 1972).

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
2,53	3H	<i>s</i>	<i>N</i> -CH ₃
2,60	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,00-3,10	4H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,59	3H	<i>s</i>	1- <i>O</i> -CH ₃
3,90	3H	<i>s</i>	10- <i>O</i> -CH ₃
6,61	1H	<i>s</i>	H-3
6,81	1H	<i>s</i>	H-8
7,89	1H	<i>s</i>	H-11

Laurolicina, [(S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-nor-aporfina]

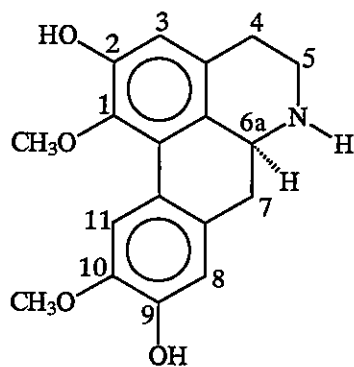
Rendimiento: 0,3 % (respecto a madera de *Peumus boldus* Mol.).

Punto de fusión (base libre) = 114-116 °C (Lit. 113-115°C; Lu *et al.*, 1969).

$[\alpha]_D^{20} = 91^\circ$ (c = 0,2; MeOH) (Lit. 101°, C = 0,69; EtOH; Tomita *et al.*, 1969)

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Tewari *et al.*, 1972).

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
2,68	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
2,95	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,35	1H	<i>m</i>	H-cicloalifático
3,58	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,81	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,52	1H	<i>s</i>	H-3
6,69	1H	<i>s</i>	H-8
8,00	1H	<i>s</i>	H-11



Laurotetanina, [(S)-1,2,10-trimetoxi-9-hidroxiaporfina]

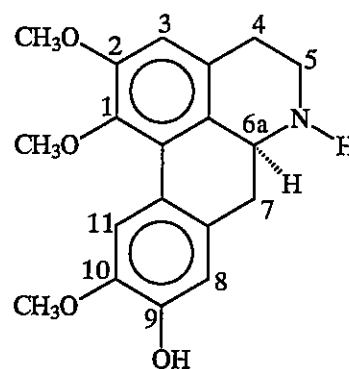
Rendimiento: 0,3 % (respecto a corteza de *Laurelia sempervirens*, AUTOR)

Punto de fusión (base libre) = 125-128 °C (Lit.125 °C, Nakasato *et al.*, 1966)*

$[\alpha]_D^{20} = +97^\circ$ (c = 0,5; MeOH) (Lit. + 95 °, Nakasato *et al.*, 1966)*

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Tewari *et al.*, 1972).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,68-2,95	6H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,35	1H	<i>m</i>	H-cicloalifático
3,58	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,80	3H	<i>s</i>	9-O- ó 10-O-CH ₃
3,81	3H	<i>s</i>	10-O- ó 9-O-CH ₃
6,52	1H	<i>s</i>	H-3
7,24	1H	<i>s</i>	H-8
8,00	1H	<i>s</i>	H-11



* La estructura del compuesto se confirma al comparar sus propiedades físicas y espectroscópicas con una muestra auténtica, obtenida anteriormente del mismo material, donada por el Dr. Alejandro Urzúa, Universidad de Santiago de Chile)

Pukateína, (*R*)-11-hidroxi-1,2-metilendioxiaporfina

Rendimiento = 20 % (con respecto a un extracto metanólico de *Laurelia novae-zelandiae* A. cunn.) *

Punto de fusión (base libre, EtOH) = 221-222 °C (Lit. 213-215 °C, Bernauer, 1967)

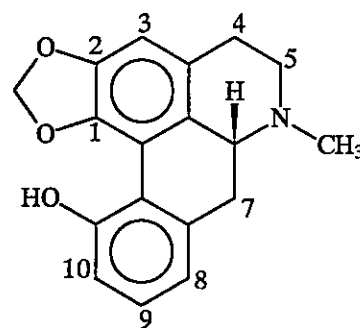
$[\alpha]_D^{16} = -215^\circ$ ($c = 1$; EtOH) (Lit. -240° ; Bernauer, 1967 y -261° Barger y Girardet; 1931, -257° Urzúa y Cassels, 1982).

Espectro de masas de pukateína ($C_{18}H_{17}NO_3$; PM = 295):

295 (M)⁺ (100 %), 294 (M-H)⁺ (99%), 278 (M-OH)⁺ (15%), 265 (M-OCH₂)⁺ (32%), 252 (M-CH₃N=CH₂)⁺ (42%). Resultados comparables con los informados en la literatura (Kametani, 1972).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Kametani, 1972).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	J (Hz)	Asignación
2,30-2,70	3H	<i>M</i>	-	H _{cicloalifáticos}
2,91-3,82	4H	<i>m</i>	-	H _{cicloalifáticos}
2,55	3H	<i>s</i>	-	N-CH ₃
5,92	1H	<i>d</i>	1,1 ^φ	-OCH ₂ O-
6,06	1H	<i>d</i>	1,1 ^φ	-OCH ₂ O-
6,68	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,81	2H	<i>d</i>	7,8	H-8/10
7,12	1H	<i>dd</i>	7,8	H-9



• Extracto de pukatea (*Laurelia novae-zelandiae* A. Cunn.), donado por el Dr. Graeme Russell del Horticultural Research Institute, Palmerston North, Nueva Zelandia.

• *J* aparentes: las señales aparecen como un sistema AB muy deformado

2,9-*O,O'*-Diacetilboldina, (S)-1,10-dimetoxi-2,9-diacetiloxiaporfina

Rendimiento= 76 % (con respecto a boldina)

Punto de fusión (base libre, MeOH) = 143 °C, (HBr) = 198-200 °C

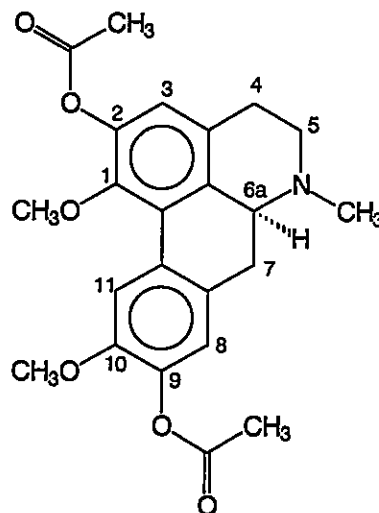
$[\alpha]_D^{23} = + 169^\circ$ (c = 0,1, MeOH).

Espectro de masas de *O,O'*-diacetilboldina (C₂₃H₂₅NO₆; PM = 411):

411 (M)⁺ (100%), 369 (M-CH₂=C=O)⁺ (63%), 354 (M-CH₂=C=O, CH₃)⁺ (33%), 327 (M-2x CH₂=C=O) (23%), 312 (M-2x CH₂=C=O, CH₃) (93%).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Hara, 1995).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,22	3H	s	CH ₃ CO
2,24	3H	s	CH ₃ CO
2,40	3H	s	N-CH ₃
2,40-2,69	3H	m	H-cicloalifáticos
2,87-3,07	4H	m	H-cicloalifáticos
3,49	3H	s	1-O-CH ₃
3,74	3H	s	10-O-CH ₃
6,71	1H	s	H-3
6,86	1H	s	H-8
7,97	1H	s	H-11



O,O'-Dipivaloílbaldina, (*S*)-1,10-dimetoxi-2,9-dipivaloiloxiaporfina

Rendimiento: 76 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (base libre, CHCl₃) = 174-176 °C

(Sal bromhídrica, EtOH) > 225 °C.

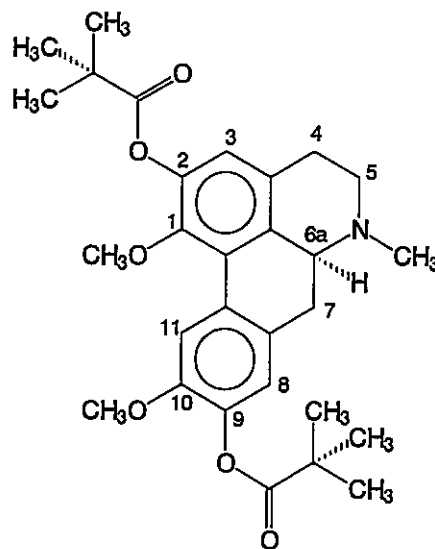
$[\alpha]_D^{20} = +65^\circ$ (c = 0,2; MeOH).

Espectro de masas de *O,O'*-dipivaloílbaldina (C₂₉H₃₇NO₆; PM = 495):

495 (M)⁺ (100 %), 480 (M-CH₃)⁺ (63%), 464 (M-CH₃)⁺ (22%), 452 (M-CH₃N=CH₂)⁺ (25%), 452 (M-O=CC(CH₃)₃)⁺ (67%), 367 (M-101)⁺ (27%), 57 (M-438)⁺ (32%).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en (TMS al 1 % v/v como referencia interna).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
1,38	9H	<i>s</i>	(CH ₃) ₃ CO
1,41	9H	<i>s</i>	(CH ₃) ₃ CO
2,50	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
2,53-2,66	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
2,97-3,19	4H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,56	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,83	3-H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,78	1H	<i>s</i>	H-3
6,86	1H	<i>s</i>	H-8
8,10	1H	<i>s</i>	H-11

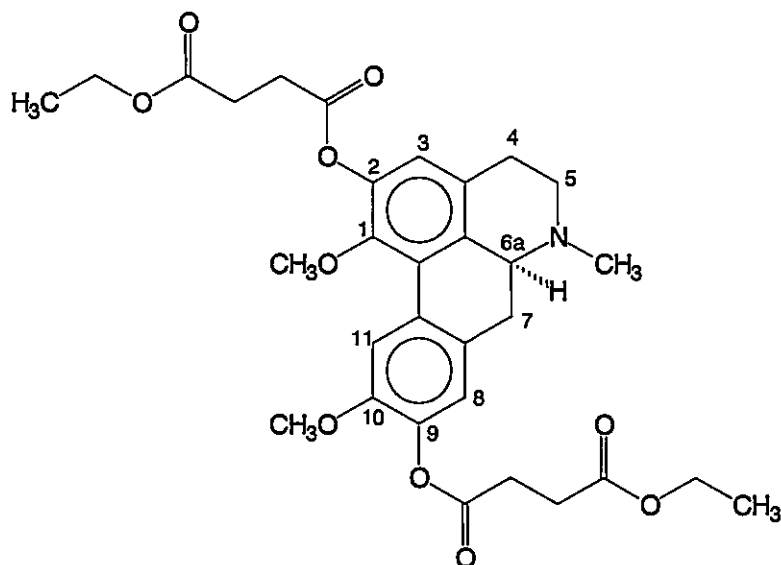


***O,O'*-Bis-(3-etoxicarbonilpropanoato) de boldina**

Rendimiento: 30 % (respecto a boldina).

Punto de fusión (base libre, CHCl₃) = 146-149 °C.

[α]_D²⁰ = + 123 ° (c = 0,3; EtOH).



Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna).

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	Asignación
1,26	6H	<i>t</i>	11,0	OCH ₂ CH ₃
2,52	3H	<i>s</i>	-	N-CH ₃
2,75-3,07	15H	<i>s</i>	-	CH ₂ boldina/succínico
3,57	3H	<i>s</i>	-	1-O-CH ₃
3,82	3H	<i>s</i>	-	10-O-CH ₃
4,15	4H	<i>q</i>	11,1	OCH ₂ CH ₃
6,81	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,97	1H	<i>s</i>	-	H-8
8,05	1H	<i>s</i>	-	H-11

Glaucina, (S)-2,9-O,O'-dimetilboldina, (S)-1,2,9,10-tetrametoxiaporfina.

Rendimiento : 36 %.

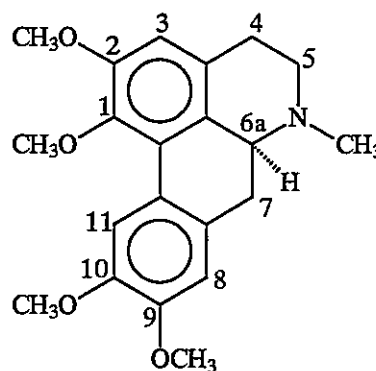
Punto de fusión (base libre, agujas incoloras, EtOAc) = 120-121 °C (Lit. 120-121 °C, Shamma y Dudock, 1968).

$[\alpha]_D^{20} = +114^\circ$ (c = 0,5 MeOH) (Lit. + 116 °, Johns *et al.*, 1969).

Espectro de masas de glaucina (C₂₁H₂₅NO₄; PM = 355) (Lit. Baarschers *et al.*, 1964)
 355 (M)⁺ (85 %), 354 (M-H)⁺ (100%), 340 (M-CH₃)⁺ (56%), 324 (M-OCH₃)⁺ (30%), 312 (M-CH₃N=CH₂)⁺ (16%), 281 (M-CH₃N=CH₂, CH₃)⁺ (10%).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Baarschers *et al.*, 1964).

δ (ppm)	Integr.	Multip.	Asignación
2,52	3H	s	N-CH ₃
2,80-3,30	7H	m	H-cicloalifáticos
3,63	3H	s	1-O-CH ₃
3,86	3H	s	O-CH ₃
3,88	6H	s	2 x O-CH ₃
6,61	1H	s	H-3
6,81	1H	s	H-8
7,89	1H	s	H-11



Predicentrina, (S)- 9-O-metilboldina, (S)-2-hidroxi-1, 9, 10-trimetoxiaporfina.

Rendimiento : 60 %.

Punto de fusión (Sal bromhídrica) = 198-200 °C (Lit. 200-205 °C; Johns *et al.*, 1969).

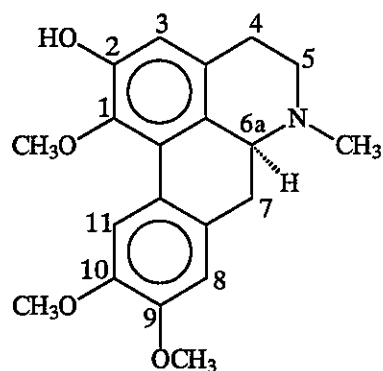
$[\alpha]_D^{20} = +107^\circ$ (c = 0,5 MeOH) (Lit. + 97 °; Johns *et al.*, 1969).

Espectro de masas de predicentrina (C₂₀H₂₃NO₄; PM = 341)

341 (M)⁺ (88%), 340 (M-H)⁺ (100%), 325 (M-CH₃)⁺ (59%), 310 (M-OCH₃)⁺ (33%), 298 (M-CH₃N=CH₂)⁺ (11 %), 283 (M-CH₃N=CH₂, CH₃)⁺ (18%), 267 (M-CH₃N=CH₂, OCH₃)⁺ (27%). Resultados de acuerdo a lo publicado (Lit. Johns *et al.*, 1969).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Johns *et al.*, 1969).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,54	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
2,60	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,00-3,10	4H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,58	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,90	3H	<i>s</i>	10- ó 9-O-CH ₃
3,93	3H	<i>s</i>	9- ó 10-O-CH ₃
6,58	1H	<i>s</i>	H-3
6,78	1H	<i>s</i>	H-8
7,93	1H	<i>s</i>	H-11



***N*-Metillaurotetanina, (S)-9-hidroxi-1,2,10-trimetoxiaporfina**

Rendimiento : 48 %.

Punto de fusión (base libre, agujas CHCl₃) = 219-220 °C (Lit. 229-230 °C, Tschesche *et al.*, 1964)

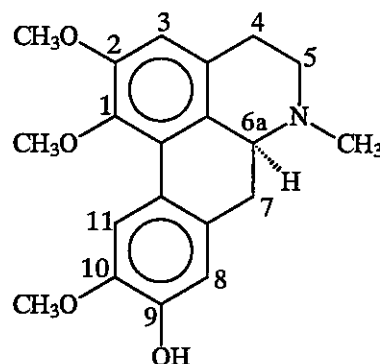
[α]¹⁷_D = + 85 ° (c = 0,9; EtOH) (Lit. + 88 °, Johns *et al.*, 1967).

Espectro de masas: *N*-metillaurotetanina (C₂₀H₂₃NO₄; M = 341):

341 (M)⁺ (86%), 340 (M-H)⁺ (100%), 326 (M-CH₃)⁺ (63%), 310 (M-OCH₃)⁺ (27%), 298 (M-CH₃N=CH₂)⁺ (15 %), 283 (M-CH₃N=CH₂, CH₃)⁺ (22%), 267 (M-CH₃N=CH₂, OCH₃)⁺ (31%). Resultados de acuerdo a lo publicado (Tewari *et al.*, 1972).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Tewari *et al.*, 1972).

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
2,54	3H	<i>s</i>	<i>N</i> -CH ₃
2,60-3,10	7H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,64	3H	<i>s</i>	1- <i>O</i> -CH ₃
3,86	3H	<i>s</i>	10- ó 2- <i>O</i> -CH ₃
3,87	3H	<i>s</i>	2- ó 10- <i>O</i> -CH ₃
6,56	1H	<i>s</i>	H-3
6,85	1H	<i>s</i>	H-8
8,10	1H	<i>s</i>	H-11



Yoduro de *N*-metilboldinio, yoduro de (*S*)-2,9-dihidroxi-1, 10-*O,O'*,*N*-trimetilaporfino

Rendimiento : 86 %.

Punto de fusión (MeOH) >225 °C.

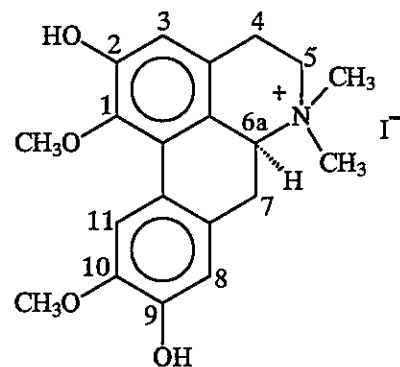
$[\alpha]_D^{20} = +70^\circ$ (c = 0,57, H₂O).

Espectro de masas del yoduro de *N*-metilboldinio (C₂₀H₂₂NO₄; PM = 342)

342 (M)⁺ (4%), 341 (M-H)⁺ (16%), 327 (M-CH₃)⁺ (7%), 299 (M-CH₂=N(CH₃)₃)⁺ (13 %), 127 (M-215)⁺ (5%), 58 (M-284) (100%).

Espectro de RMN-¹H del compuesto disuelto en D₂O (sin referencia interna).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,57-3,11	6H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,17	3H	<i>s</i>	<i>N</i> -CH ₃
3,28	3H	<i>s</i>	<i>N</i> -CH ₃
3,56	3H	<i>s</i>	1- <i>O</i> -CH ₃
3,76	3H	<i>s</i>	10- <i>O</i> -CH ₃
4,34	1H	<i>dd</i>	H-6 α
6,59	1H	<i>s</i>	H-3
6,79	1H	<i>s</i>	H-8
8,10	1H	<i>s</i>	H-11



Yoduro de *N*-metilglaucinio, yoduro de (*S*)-2, 9-*O*, *O'*,*N*-trimetilaporfino

Rendimiento : 96 %.

Punto de fusión (agujas, EtOH-éter) = 213-215 °C (Lit. 216 °C, Yunusov y Progressov, 1952).

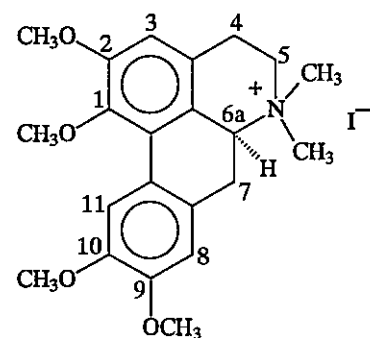
$[\alpha]_D^{15} = +73^\circ$ ($c = 0,25$; MeOH) (Lit. + 81 °, Dwuma-Badu *et al.*, 1980).

Espectro de masas de yoduro de *N*-metilglaucinio ($C_{22}H_{28}NO_4^+$; $M = 370$)

370 (M)⁺ (3%), 369 ($M-H$)⁺ (10%), 355 ($M-CH_3$)⁺ (3%), 312 ($M-CH_2=N(CH_3)_3$)⁺ (9%), 127 ($M-242$)⁺ (5%), 58 ($M-312$) (100%).

Espectro de RMN-¹H del compuesto disuelto en D₂O (sin referencia interna).

δ (ppm)	Integr.	Multip.	<i>J</i> Hz	Asignación
2,55-3,01	6H	<i>m</i>		H-cicloalifáticos
3,13	3H	<i>s</i>		<i>N</i> -CH ₃
3,25	3H	<i>s</i>		<i>N</i> -CH ₃
3,66	3H	<i>s</i>		1- <i>O</i> -CH ₃
3,78	3H	<i>s</i>		2- o 9- <i>O</i> -CH ₃
3,83	3H	<i>s</i>		9- o 2- <i>O</i> -CH ₃
3,86	3H	<i>s</i>		10- <i>O</i> -CH ₃
4,62	1H	<i>dd</i>	15; 3,1	H-6 α
6,95	1H	<i>s</i>		H-3
7,01	1H	<i>s</i>		H-8
7.92	1H	<i>s</i>		H-11



Yoduro de (S)-N-metilpredicentrinio, yoduro de (S)-2-hidroxi-1, 6a, 9, 10-O, O, O, N-tetrametilporfinio

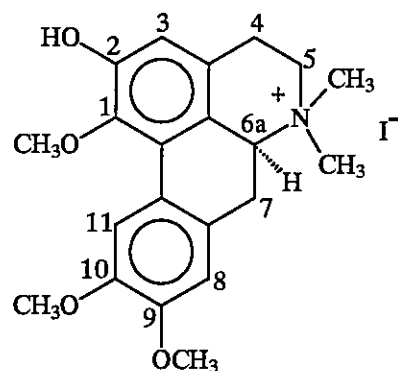
Rendimiento : 86 %

Punto de fusión (EtOH) > 225 °C.

$[\alpha]_D^{20} = + 52^\circ$ (c = 0,1; H₂O).

Espectro de RMN-¹H del compuesto disuelto en D₂O (sin referencia interna).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,55-3,16	6H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,22	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
3,33	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
3,63	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,79	3H	<i>s</i>	9-O-CH ₃
3,83	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
4,60	1H	<i>dd</i>	H-6 α
6,39	1H	<i>s</i>	H-3
6,89	1H	<i>s</i>	H-8
8,19	1H	<i>s</i>	H-11



Xantoplanina, yoduro de *N,N*-dimetillaurotetaninio, yoduro de (*S*)-9-hidroxi-1, 2, 6a, 10 -*O, O, O, N*-tetrametilaporfinio].

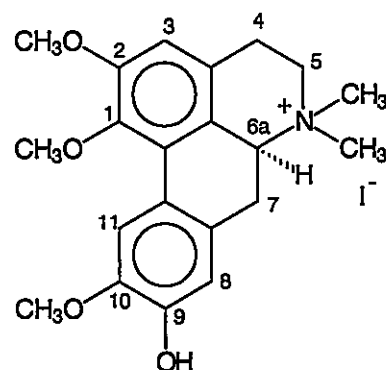
Rendimiento : 69 %.

Punto de fusión (MeOH) = 188-191 °C (218-220 °C; Kuck *et al.*, 1967).

$[\alpha]_D^{15} = +59^\circ$ (c = 0,13; H₂O) (lit. + 53 °, Chattopadhyay *et al.*, 1983).

Espectro de RMN-¹H del compuesto disuelto en D₂O (sin referencia interna).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,49-3,10	6H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,16	3H	<i>s</i>	<i>N</i> -CH ₃
3,27	3H	<i>s</i>	<i>N</i> -CH ₃
3,67	3H	<i>s</i>	1- <i>O</i> -CH ₃
3,83	3H	<i>s</i>	2- <i>O</i> -CH ₃
3,90	3H	<i>s</i>	10- <i>O</i> -CH ₃
4,60	1H	<i>dd</i>	H-6 α
6,54	1H	<i>s</i>	H-3
6,94	1H	<i>s</i>	H-8
8,19	1H	<i>s</i>	H-11



***N*-Etillaurolictsina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-*N*-etil-nor-aporfina**

Rendimiento : 29 % (con respecto a laurolictsina).

Punto de fusión (HCl, EtOH) = 175-176 °C (Lit. 175-177 °C, Chiou *et al.*, 1998).

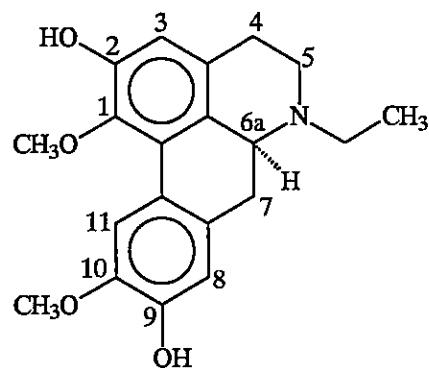
$[\alpha]_D^{15} = +111^\circ$ (c = 0,32; MeOH)

Espectro de masas de *N*-etillaurolictsina (C₂₀H₂₃NO₄; M = 341):

341 (M)⁺ (100%), 340 (M-H)⁺ (67%), 326 (M-CH₃)⁺ (70%), 310 (M-OCH₃)⁺ (25%), 284 (M- M- CH₂=NCH₂CH₃)⁺ (42%), 269 (M- CH₂=NCH₂CH₃, CH₃)⁺ (51%), idénticos a los publicados en la literatura (Chiou *et al.*, 1998)

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), de acuerdo a lo publicado en la literatura (Chiou *et al.*, 1998)

δ (ppm)	Integ.	Multip.	<i>J</i> (Hz)	Asignación
1,30	3H	<i>t</i>	7,5	<i>N</i> -CH ₂ CH ₃
2,3-2,5	3H	<i>m</i>	-	H _{cicloalifáticos}
2,65	2H	<i>q</i>	7,5	<i>N</i> -CH ₂ CH ₃
2,7-3,2	3H	<i>m</i>	-	H _{cicloalifáticos}
3,58	3H	<i>s</i>	-	1- <i>O</i> -CH ₃
3,84	3H	<i>s</i>	-	10- <i>O</i> -CH ₃
6,81	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,96	1H	<i>s</i>	-	H-8
8,07	1H	<i>s</i>	-	H-11



***N-n*-Propillaurolitsina, (*S*)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-*N-n*-propil-*nor*-aporfina**

Rendimiento : 32 % (con respecto a laurolitsina).

Punto de fusión (sal clorhídrica, EtOH) = 161-163 °C (Lit. 162-166 °C, Chiou *et al.*, 1998).

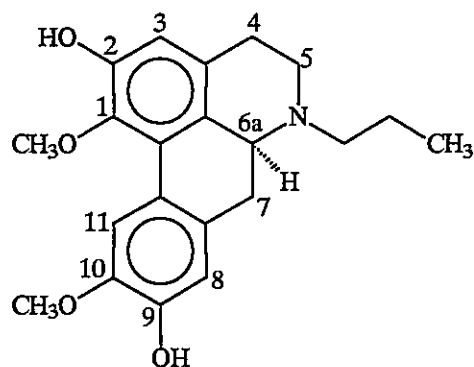
$[\alpha]_D^{15} = + 83^\circ$ (c = 0,50; EtOH)

Espectro de masas de *N,n*-propillaurolitsina (C₂₁H₂₅NO₄; M = 355)

355 (M)⁺ (100%), 354 (M-H)⁺ (91%), 340 (M-CH₃)⁺ (42%), 324 (M-OCH₃)⁺ (29%), 284 (M- M- CH₂=NCH₂CH₂CH₃)⁺ (42%), 269 (M- CH₂=NCH₂CH₂CH₃, CH₃)⁺ (51%). De acuerdo con lo publicado (Chiou *et al.*, 1998).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna) de acuerdo con lo publicado (Chiou *et al.*, 1998).

δ (ppm)	Integr.	Multip.	J (Hz)	Asignación
0,97	3H	<i>t</i>	7,4	<i>N</i> -CH ₂ CH ₂ CH ₃
1,62	2H	<i>m</i>	-	<i>N</i> -CH ₂ CH ₂ CH ₃
2,41	2H	<i>t</i>	7,6	<i>N</i> -CH ₂ CH ₂ CH ₃
2,5-2,7	3H	<i>m</i>	-	H-cicloalifáticos
2,7-3,0	4H	<i>m</i>	-	H-cicloalifáticos
3,56	3H	<i>s</i>	-	1- <i>O</i> -CH ₃
3,89	3H	<i>s</i>	-	10- <i>O</i> -CH ₃
6,66	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,80	1H	<i>s</i>	-	H-8
7,91	1H	<i>s</i>	-	H-11



***N*-Alillaurolitsina, (*S*)-*N*-alil-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-*nor*-aporfina**

Rendimiento : 47 % (con respecto a laurolitsina).

Punto de fusión (sal clorhídrica, EtOH-éter) = 174-176 °C (Lit. 175-180 °C, Chiou *et al.*, 1998).

$[\alpha]_D^{15} = +90^\circ$ (c = 0,10; EtOH)

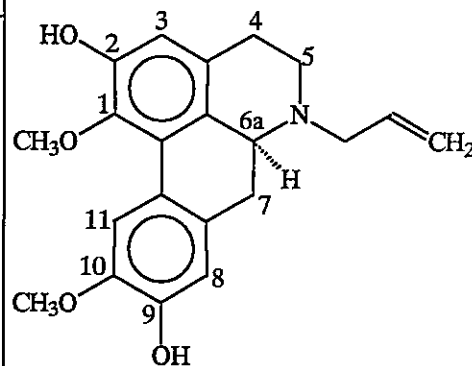
Espectro de masas de *N*-alillaurolitsina (C₂₁H₂₃NO₄; M = 353):

353 (M)⁺ (100%), 352 (M-H)⁺ (84%), 338 (M-CH₃)⁺ (75%), 322 (M-OCH₃)⁺ (27%), 284 (M-CH₂=NCH₂CH=CH₂)⁺ (31%), 296 (M-CH₂=NCH₂CH=CH₂, CH₃)⁺ (21%).

Resultados de acuerdo con lo publicado (Chiou *et al.*, 1998).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna). Resultados de acuerdo con lo publicado (Chiou *et al.*, 1998).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	J (Hz)	Asignación
2,47-3,02	7H	<i>m</i>	-	H-cicloalifáticos
2,98	2H	<i>t</i>	15	<i>N</i> -CH ₂ CH=CH ₂
3,59	3H	<i>s</i>	-	1-O-CH ₃
3,77	3H	<i>s</i>	-	10-O-CH ₃
5,50	1H	<i>d</i>	10	<i>N</i> -CH ₂ CH=CH ₂
5,60	1H	<i>d</i>	10	<i>N</i> -CH ₂ CH=CH ₂
6,09	1H	<i>m</i>	-	<i>N</i> -CH ₂ CH=CH ₂
6,64	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,77	1H	<i>s</i>	-	H-8
7,86	1H	<i>s</i>	-	H-11



3-Cloroboldina, (S)-3-cloro-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina

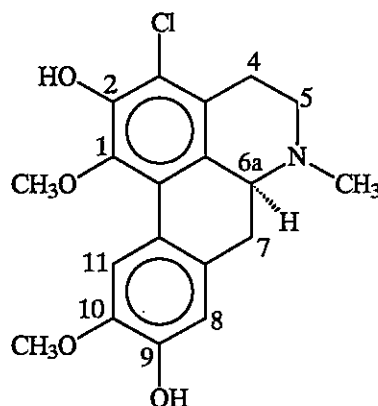
Rendimiento : 45 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (benceno) = 183-184 °C (Lit. 183-185 °C, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

$[\alpha]_D^{17} = +102^\circ$ (c = 0,1; MeOH) (Lit. + 103 °, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000) *

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,52	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
2,55	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
2,9-3,1	4H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,6	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,9	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,8	1H	<i>s</i>	H-8
7,9	1H	<i>s</i>	H-11



* Las propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados halogenados de boldina (3-Cl, 3-Br y 3-I) y la 8-nitroso y 8-aminoboldina preparados, fueron comparadas con muestras auténticas proporcionadas gentilmente por el Licenciado en Química, Sr. Eduardo Sobarzo del Laboratorio de Química Biodinámica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

3-Bromoboldina, (S)-3-bromo-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina

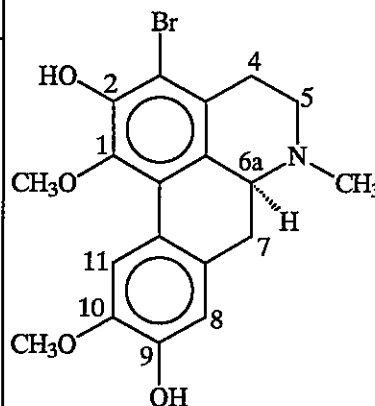
Rendimiento : 80 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (benceno) = 192-194 °C (Lit. 192-194 °C, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

$[\alpha]_D^{17} = +89^\circ$ (c = 0,1; MeOH) (Lit. + 88 °, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Bhakuni *et al.*, 1977; Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
2,37	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
2,48	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
2,83-3,04	4H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,63	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,90	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,82	1H	<i>s</i>	H-8
7,87	1H	<i>s</i>	H-11



3-Yodoboldina, (S)- 2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-3-yodoaporfina

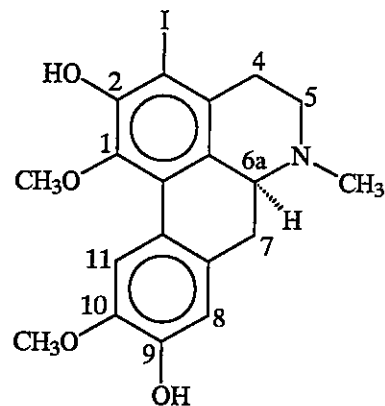
Rendimiento : 42 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (sal bromhídrica) > 220 °C (Lit. > 220 °C, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

$[\alpha]_D^{20} = +73^\circ$ (c = 0,2; MeOH) (Lit. 72,5 °; Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

Espectro de RMN-¹H de la sal bromhídrica disuelta en D₂O (sin referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000).

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
2,71-2,96	3H	<i>dd</i>	H-cicloalifáticos
3,09	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
3,33	3H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,51	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,78	1H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,80	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
4,25	1H	<i>m</i>	H-6 α
6,82	1H	<i>s</i>	H-8
7,87	1H	<i>s</i>	H-11



8-Bromopukateína, (*R*)-8-bromo-11-hidroxi-1,2-metilendioxiaporfina

Rendimiento : 67 % (con respecto a pukateína).

Punto de fusión (sal clorhídrica) = 193-195 °C .

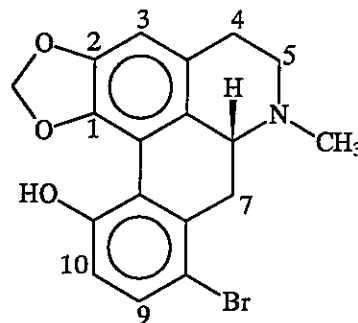
$[\alpha]_D^{20} = -153^\circ$ (c = 0,65; MeOH).

Espectro de masas de 8-Bromopukateína (C₁₈H₁₆NO₃Br M= 374):

375 (90%)-373 (82%) (M)⁺, 374 (100%)-372 (85%) (M-H)⁺, 360 (19%)-358 (13%) (M-CH₃)⁺, 345 (42%)-343 (42%) (M-OCH₂)⁺, 330 (58%)-332 (57%) (M-CH₃N=CH₂)⁺ (42%), 294 (M-Br)⁺.

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna).

δ (ppm)	Integr.	Multip.	J (Hz)	Asignación
2,51-2,63	3H	<i>m</i>	-	H _{cicloalifáticos}
2,58	3H	<i>s</i>	-	N-CH ₃
2,70-3,10	4H	<i>m</i>	-	H _{cicloalifáticos}
5,99	1H	<i>d</i>	1,2	-OCH ₂ O-
6,13	1H	<i>d</i>	1,2	-OCH ₂ O-
6,86	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,88	1H	<i>d</i>	8,8	H-10
6,98	1H	<i>d</i>	8,8	H-8



8-Nitrosoboldina, (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-8-nitrosoaporfina

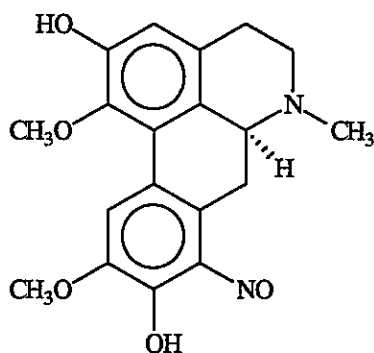
Rendimiento : 64 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (sal clorhídrica) = 128-130 °C (Lit. 128-130 °C, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 1993)

$[\alpha]_D^{25} = + 231^\circ$ (c = 0,1; MeOH) (Lit. 231 °, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 1993)

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en DMSO-*d*₆ (sin referencia interna)(Sobarzo-Sánchez *et al.*, 1993)

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
2,19-2,34	2H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
2,35	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
3,54-2,83	5H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,61	3H	<i>m</i>	1-O-CH ₃
3,90	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,60	1H	<i>s</i>	H-3
8,03	1H	<i>s</i>	H-11



8-Aminoboldina, (S)-8-amino-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina

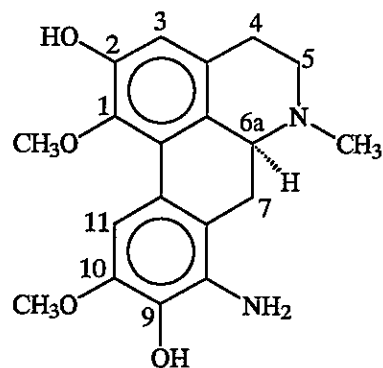
Rendimiento : 64 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (sal clorhídrica) = 177-179 °C (Lit. 177-179 °C, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 1993).

$[\alpha]_D^{25} = +189^\circ$ (c = 0,9; MeOH) (Lit. $+189^\circ$, Sobarzo-Sánchez *et al.*, 1993).

Espectro de RMN- ^1H de la base disuelta en DMSO- d_6 (sin referencia interna) (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 1993)

δ (ppm)	Integración	Multiplicidad	Asignación
1,84-2,29	2H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
2,44	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
2,49-3,13	5H	<i>m</i>	H-cicloalifáticos
3,49	1H	<i>m</i>	1-O-CH ₃
3,75	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,46	1H	<i>s</i>	H-3
7,34	1H	<i>s</i>	H-11



***O,O'*-Diacetil-6a,7-dideshidrobaldina, 2,9-diacetoxi-1,10-dimetoxi-6a,7-dideshidroaporfina**

Rendimiento : 39 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (base libre, MeOH) = 158-160 °C

(Lit. 159-160 °C, Urzúa y Torres, 1984).

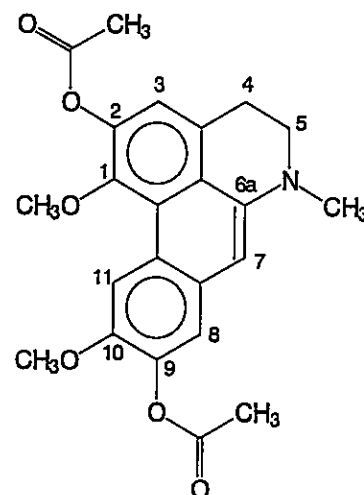
Espectro de masas de *O,O'*-diacetil-6a,7-dideshidrobaldina (C₂₃H₂₃NO₆; M = 409)

410, 409 (M)⁺ (100%), 367 (M-CH₂=C=O)⁺ (63%), 352 (M-CH₂=C=O, CH₃)⁺ (50%),

325 (M-2 x CH₂=C=O)⁺ (25%), 310 (M-2 x CH₂=C=O*, CH₃) (85%).

Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna), resultados de acuerdo con lo publicado (Urzúa y Torres, 1984).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,30	3H	<i>s</i>	CH ₃ C=O
2,35	3H	<i>s</i>	CH ₃ C=O
2,96	3H	<i>s</i>	N-CH ₃
3,17	2H	<i>d</i>	H-4β/5β
3,27	2H	<i>d</i>	H-4α/5α
3,79	3H	<i>s</i>	1-O-CH ₃
3,89	3H	<i>s</i>	10-O-CH ₃
6,60	1H	<i>s</i>	H-7
7,00	1H	<i>s</i>	H-3
7,31	1H	<i>s</i>	H-8
8,97	1H	<i>s</i>	H-11



6a,7-Dideshidrobaldina, 2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-6a,7-dideshidroaporfina

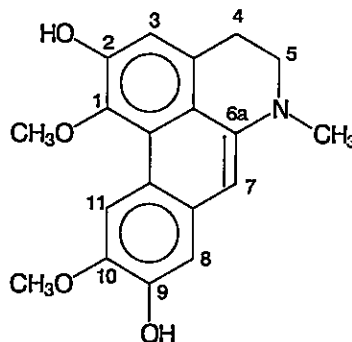
Este producto de oxidación se obtuvo de tres diferentes maneras:

- por oxidación de boldina con HgCl_2 (Rendimiento = 64 %)
- por oxidación de boldina con aire (O_2) (Rendimiento = 15 %)
- por oxidación con radicales hidroxilo (HO^\cdot) (Rendimiento = 60 %)

Punto de fusión (base libre, MeOH) = 178-180 °C (Lit. 179-180 °C, Urzúa y Torres, 1984)

Espectro de RMN- ^1H de la base disuelta en CDCl_3 (TMS al 1 % v/v como referencia interna).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	J (Hz)	Asignación
2,95	3H	<i>s</i>	-	N-CH ₃
3,10	2H	<i>dd</i>	5,4	H-4 β /5 β
3,24	2H	<i>dd</i>	5,4	H-4 α /5 α
3,80	3H	<i>s</i>	-	1-O-CH ₃
3,92	3H	<i>s</i>	-	10-O-CH ₃
6,40	1H	<i>s</i>	-	H-7
6,88	1H	<i>s</i>	-	H-3
6,99	1H	<i>s</i>	-	H-8
8,89	1H	<i>s</i>	-	H-11



8-(9-O-Boldinoxiboldina).

Este producto se obtuvo co-incubando boldina con ABAP (ver sección 3.1.4, oxidación de boldina; en Materiales y Métodos).

Rendimiento : 27 % (con respecto a boldina).

Punto de fusión (base, CHCl₃) = 177-179 °C

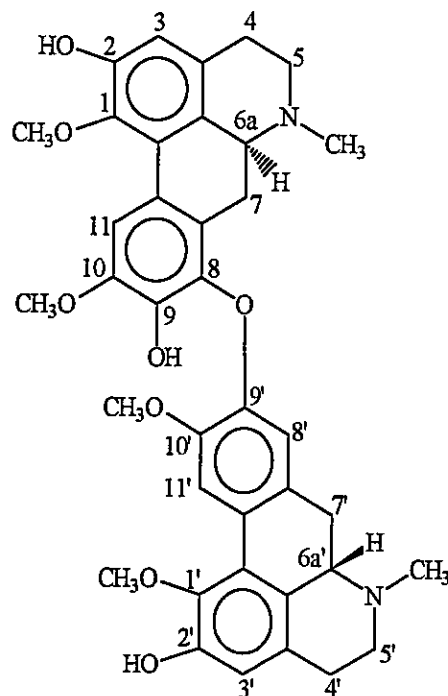
Análisis elemental: C₃₁H₃₃N (teórico) = 69,92; 6,17; 4,23

C₃₁H₃₃N (experimental) = 70,23; 5,99; 4,16

[α]_D²⁵ = +189 ° (c = 0,09; MeOH).

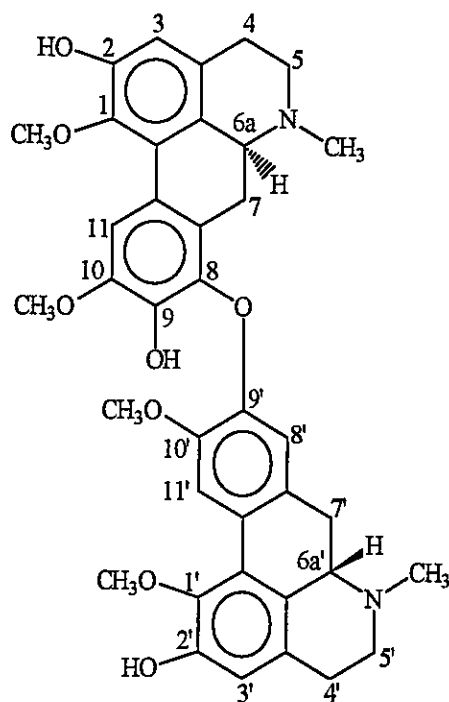
Espectro de RMN-¹H de la base disuelta en CDCl₃ (TMS al 1 % v/v como referencia interna).

δ (ppm)	Integ.	Multip.	Asignación
2,34	3H	s	N-CH ₃
2,45	3H	s	N-CH ₃ '
3,57	3H	s	1-O-CH ₃
3,61	3H	s	1'-O-CH ₃
3,92	3H	s	10-O-CH ₃
3,99	3H	s	10'-O-CH ₃
6,44	1H	s	H-3
6,49	1H	s	H'-3
6,62	1H	s	H'-8
7,91	1H	s	H-11
8,03	1H	s	H'-11



Espectro de RMN-¹³C δ (CDCl₃):

δ (ppm)	Asignación
26,8	C-7'
28,6	C-4 / C-4'
33,8	C-7
43,8	N-CH ₃ / N-CH ₃ '
53,2	C-5/ C-5'
56,2	10-O-CH ₃
56,3	10-O-CH ₃ '
60,2	1-O-CH ₃
60,4	1-O-CH ₃ '
62,2	C-6a
62,3	C-6a'
107,8	C-11
111,8	C-11'
113,9	C-3/C-3'
114,5	C-8'
123,1	C-11a
123,9	C-11a'
125,6	C-1a
125,7	C-1a'
126,0	C-7a
126,1	C-7a'
129,3	C-3a
129,4	C-3a'
129,7	C1b / C1b'
138,3	C-9'
139,3	C-8
142,5	C-1 / C-1'
146,4	C-9
146,4	C-10
147,7	C-10'
148,4	C-2
148,5	C-2'



3.2 Evaluación del coeficiente de reparto de algunos derivados.

3.2.1 Determinación de las absorptividades y las longitudes de onda de absorción máxima

Compuesto	$\lambda_{n\text{-octanol}}$ (nm)	$\epsilon_{n\text{-octanol}} \times 10^5$ (l/moles \cdot cm 2)	$\lambda_{\text{tampón fosfato}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{tampón fosfato}} \times 10^5$ (l/moles \cdot cm 2)
Boldina	304,5	0,0140	302,5	0,0108
2,9- <i>O,O'</i> -Dipivaloilboldina	300	0,0104	ND	ND
Glaucina	303	0,0135	281	0,0151
Predicentrina	303,5	0,0161	282	0,0164
3-Cloroboldina	318	0,0160	304,5	0,0170
3-Bromoboldina	286	0,0167	304,5	0,0172
3-Yodoboldina	322	0,0184	286,5	0,0188
8-Nitrosoboldina	283	0,0162	ND	ND
8-Aminoboldina	295	0,0132	304,2	0,0129

Tabla 1: Longitudes de onda de absorbancia máxima y absorptividades molares (ϵ) en n-octanol y en tampón de fosfato de boldina y algunos de sus derivados. Absorptividades molares, obtenidas por cálculo de la pendiente del gráfico absorbancia / concentración de cada uno de los compuestos evaluados.

ND : no determinado

3.2.3 Determinación de la constante de reparto (K_{rep}) y cálculo de la lipofilia aparente ($\log K_{rep}$).

Compuesto		$[X]_{oct}$ (μ M)	$[X]_{aq}$ (μ M)	K_{rep}	$\log K_{rep}$
3-Yodoboldina	(n = 8)	987 \pm 22	13	75,92	1,88
3-Nitrosoboldina	(n = 7)	973 \pm 25	27	36,03	1,56
3-Bromoboldina	(n = 7)	945 \pm 23	55	17,18	1,23
3-Cloroboldina	(n = 7)	940 \pm 15	60	15,66	1,19
2,9- <i>O,O'</i> -Dipivaloilboldina	(n = 7)	938 \pm 19	62	15,12	1,18
Glaucina	(n = 8)	899 \pm 16	101	8,90	0,95
Predicentrina	(n = 7)	860 \pm 23	140	6,14	0,79
Boldina	(n = 6)	858 \pm 19	142	6,04	0,78
8-Aminoboldina	(n = 7)	695 \pm 10	305	2,27	0,36

Tabla 2 : Concentraciones en octanol ($[X]_{oct}$) y concentraciones en la fase acuosa ($[X]_{aq}$) de boldina y algunos de sus derivados, constantes de reparto (K_{rep}) y lipofilias moleculares ($\log K_{rep}$) calculadas a partir de estos datos.

3.3 Evaluación de actividad antioxidante

3.3.1 Resultados: Descoloración de soluciones de ABTS.

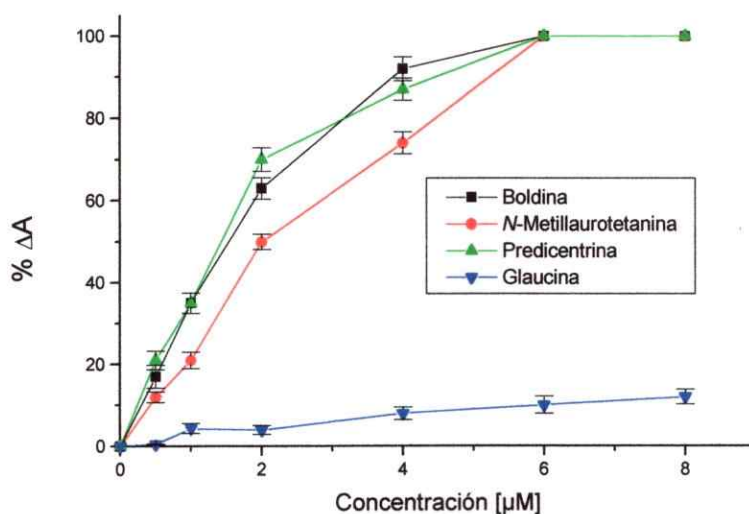


Gráfico 1 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de : boldina, *N*-metillaurotetanina, predicentrina y glaucina (n = 4).

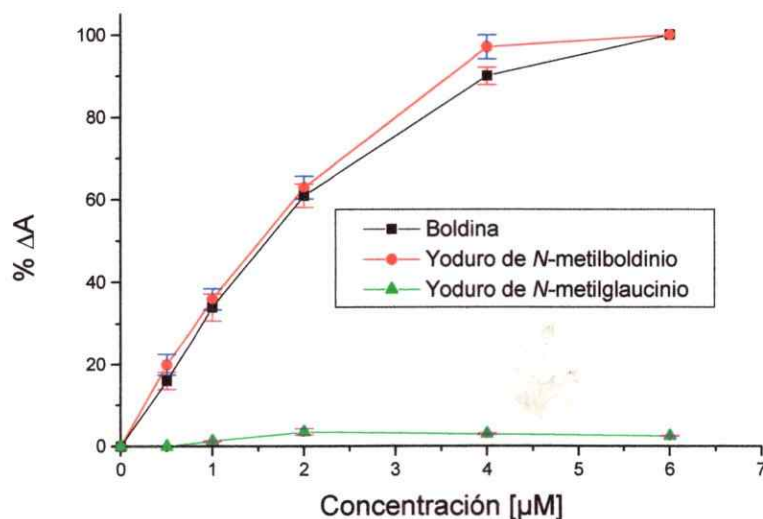


Gráfico 2 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: boldina, yoduro de *N*-metilboldinio y yoduro de *N*-metilglaucinio (n = 4).

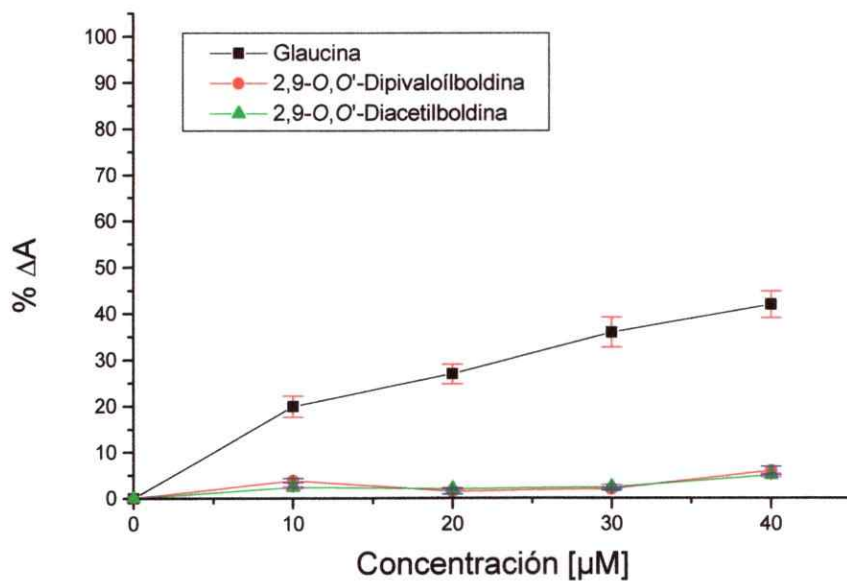


Gráfico 3 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: glaucina, 2,9-O,O'-dipivaloilboldina y 2,9-O,O'-diacetilboldina (n = 4).

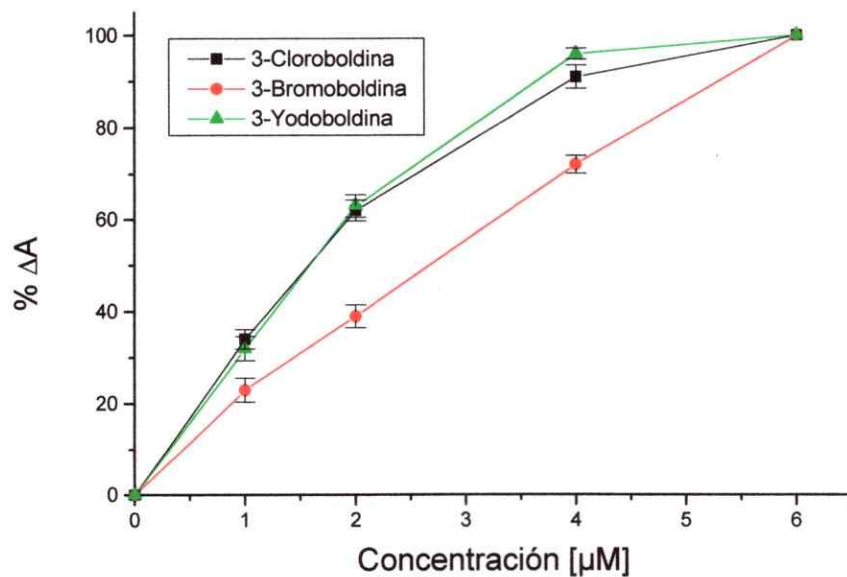


Gráfico 4 : Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: boldina, 3-cloro-, 3-bromo- y 3-yodoboldinas (n = 4).

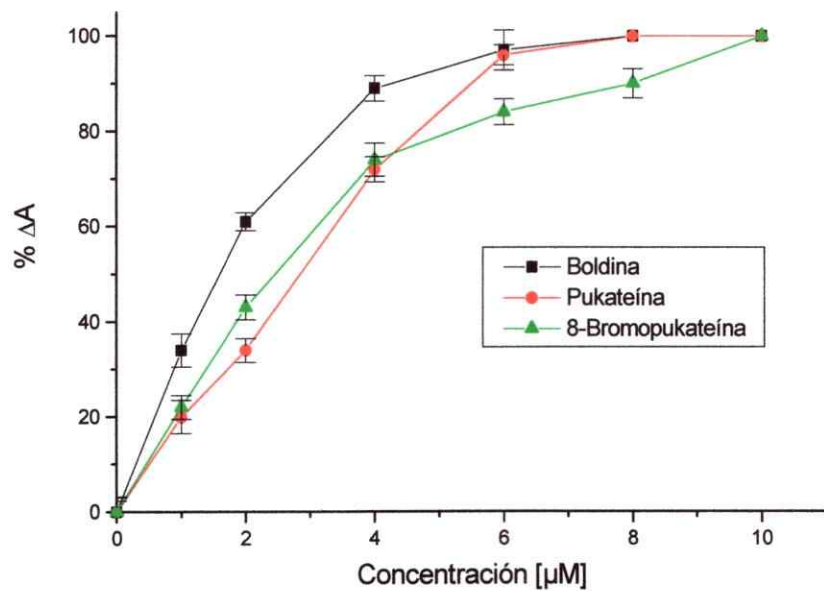


Gráfico 5: Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de: boldina, pukateína y 8-bromopukateína .

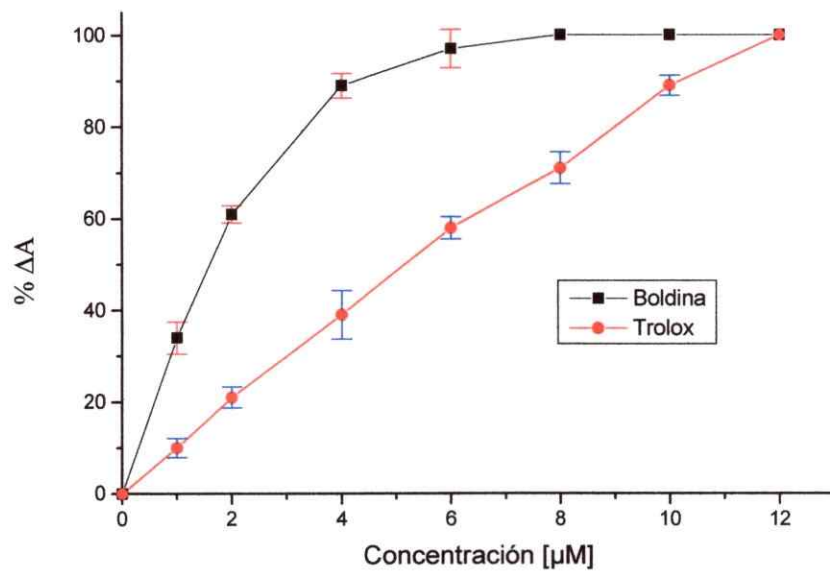


Gráfico 6: Modificaciones de la absorbancia (% ΔA) medida a los 90 segundos en función de concentraciones crecientes de : boldina y trolox® .

3.3.2 Comentario de los resultados obtenidos con ABTS.

La capacidad de descoloración de la boldina y de sus derivados metilados se evaluó a diferentes concentraciones (1-8 μM). Se observó que la descoloración total de la solución de ABTS (es decir % $\Delta A = 100$) se obtenía en presencia de boldina, predicentrina y de 2- *N*-metillaurotetanina a una concentración 6 μM (gráfico 1). Por otra parte la glaucina presenta una baja capacidad de descolorar la solución de radicales libres ya que a las mismas concentraciones reduce la coloración en aproximadamente 10 %. Se efectuó de la misma manera la evaluación de la capacidad descolorante de los derivados de amonio cuaternario de la boldina (yoduro de *N*-metilboldinio) y glaucina (yoduro de *N*-metilglaucinio), en el mismo intervalo de concentración (1-8 μM) (gráfico 2). La sal de amonio cuaternaria de boldina descolora la solución a una concentración 6 μM , mientras que el compuesto no fenólico no presenta poder descolorante a estas mismas concentraciones. La determinación de la actividad descolorante de los derivados diéster como la 2,9-*O,O'*-dipivaloilboldina y la 2,9-*O,O'*-diacetilboldina, se efectuó dentro del intervalo de 1-40 μM , en el cual no se observaron cambios superiores a un 10 % en la absorbancia (gráfico 3). Sin embargo, se determinó que una concentración 40 μM de glaucina es capaz de producir una descoloración de aproximadamente 25 %.

Un cuarto grupo de experiencias consistió en evaluar derivados modificados en el anillo aromático A del esqueleto aporfínico tales como 3-cloro-, 3-bromo- y 3-yodoboldina, utilizando concentraciones 1-8 μM (gráfico 4). Se determinó que los tres derivados halogenados de la boldina producen una descoloración total de la solución a una concentración mínima de 6 μM de manera similar al alcaloide precursor no modificado. Se incluyó además en la evaluación pukateína y 8-bromopukateína (gráfico 5), observándose que tanto la pukateína a una concentración 8 μM y su derivado bromado a una concentración 10 μM producen una descoloración máxima de la solución. Finalmente, se efectuó la comparación del poder descolorante de la boldina y el antioxidante de referencia, Trolox®, a concentraciones de 1-10 μM (gráfico 6). Esta experiencia permitió determinar que la concentración necesaria de Trolox® para producir una descoloración total de los radicales es 12 μM .

3.3.2 Resultados obtenidos en la protección de lisozima

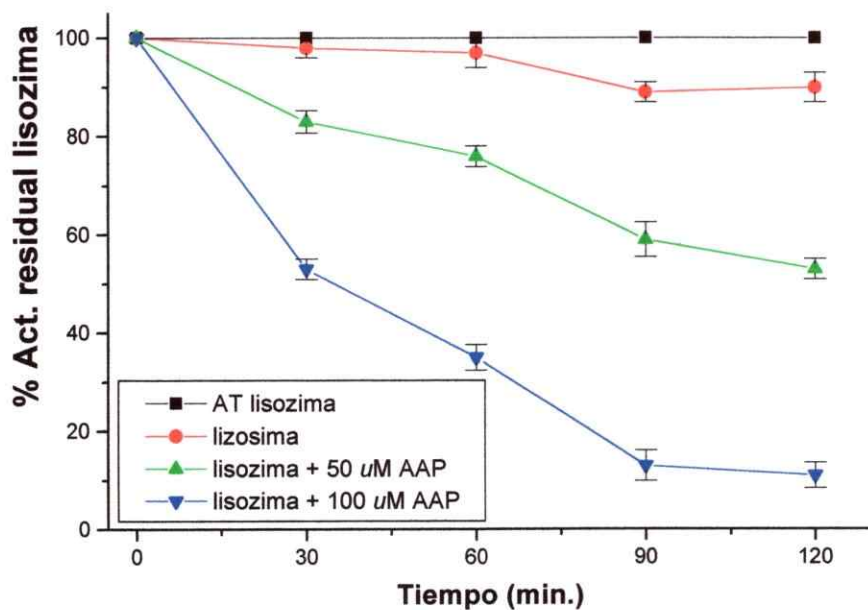


Grafico 7: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos con lisozima y al co-incubar la enzima con diferentes concentraciones AAP. Se incluye una línea teórica de 100 % de actividad (AT lisozima).

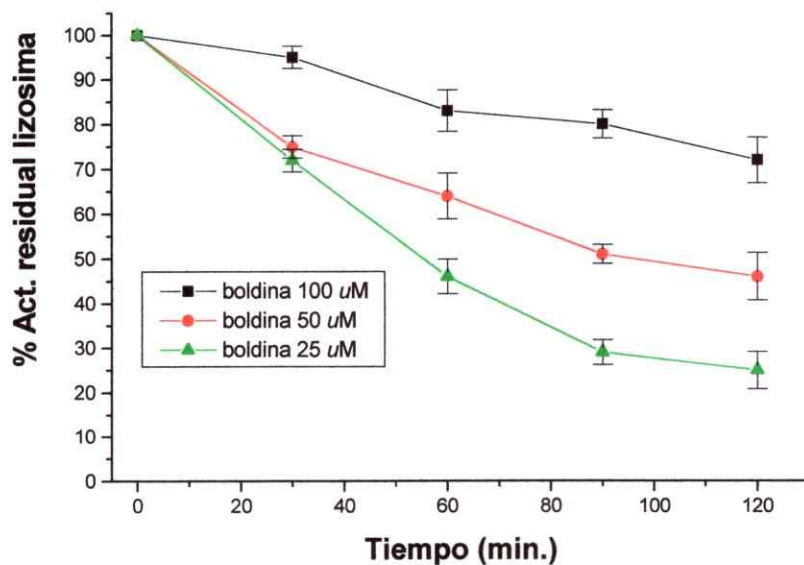


Grafico 8: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con diferentes concentraciones de boldina en presencia de AAP 100 μ M.

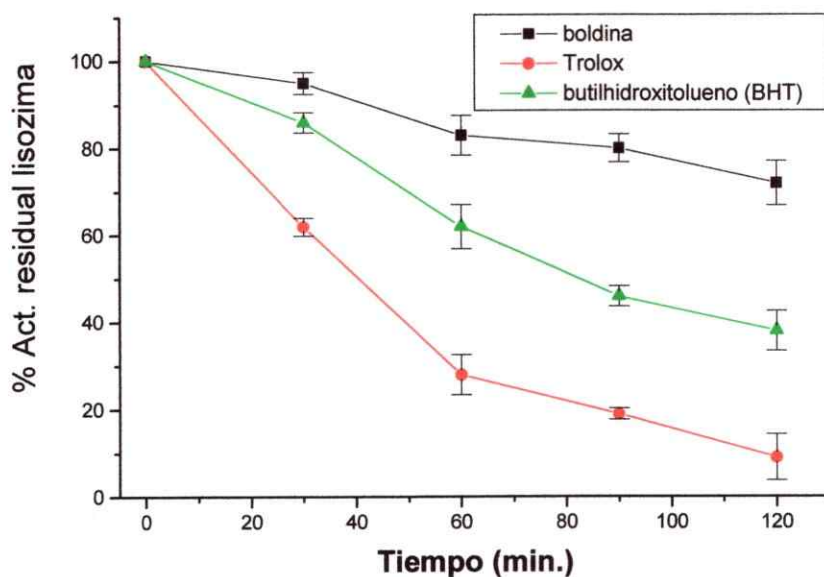


Grafico 9: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, trolox® o BHT 100 μM en presencia de AAP 100 μM .

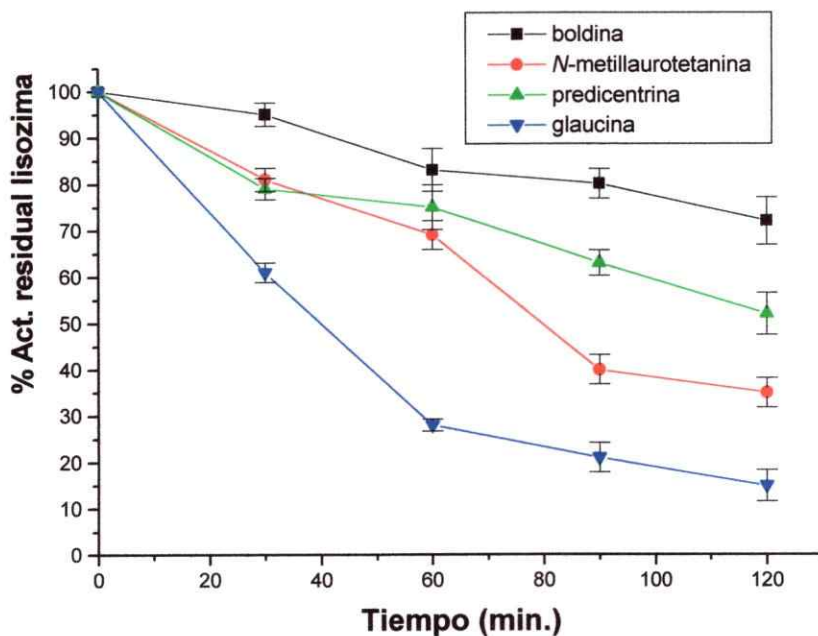


Grafico 10: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, N-metillaurotetanina, predicentrina o glaucina 100 μM en presencia de AAP 100 μM .

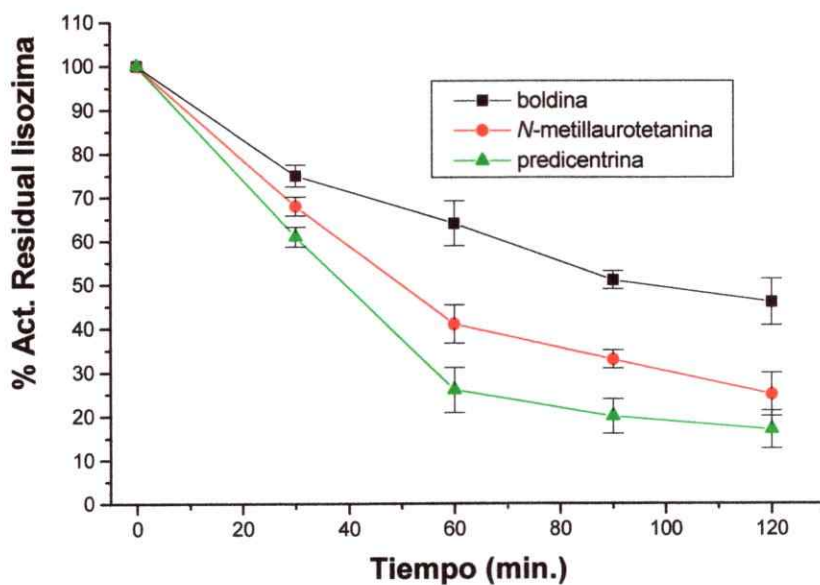


Grafico 11: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, *N*-metillaurotetanina y predicentrina en presencia de AAP 100 μ M.

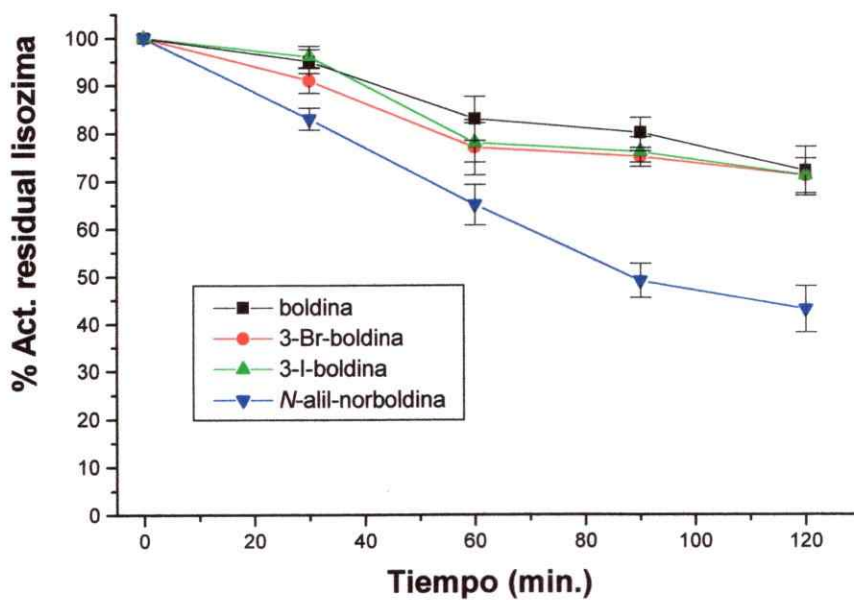


Grafico 12: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 3-bromoboldina, 3-yodoboldina o *N*-alil-norboldina 100 μ M en presencia de AAP 100 μ M.

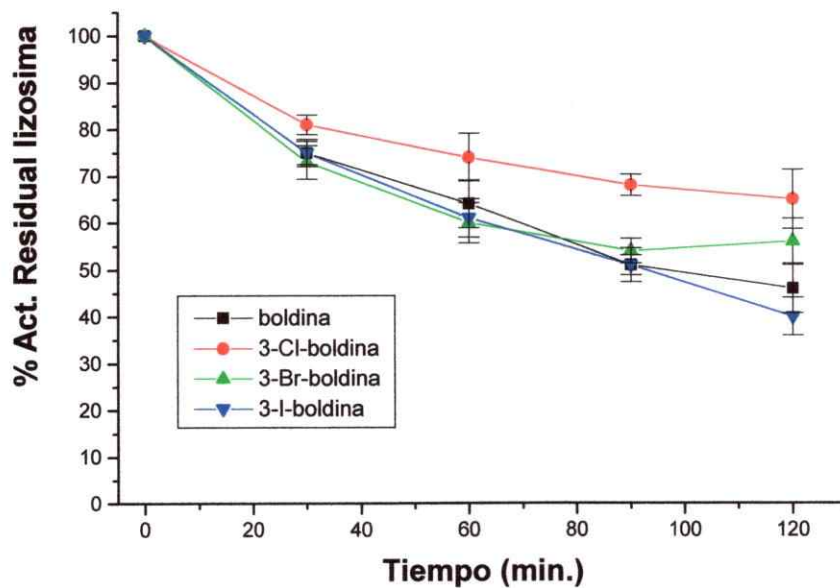


Grafico 13: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 3-cloroboldina, 3-bromoboldina o 3-yodoboldina 50 μM en presencia de AAP 100 μM .

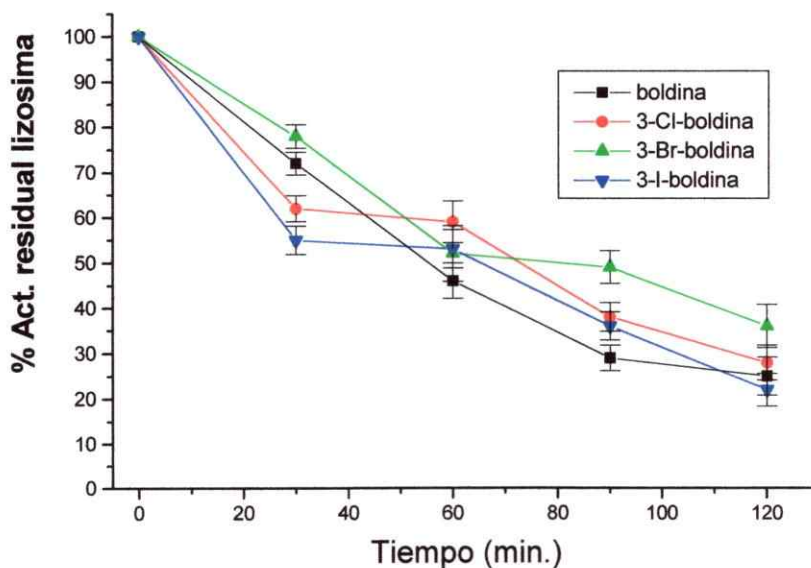


Grafico 14: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 3-cloroboldina, 3-bromoboldina o 3-yodoboldina 25 μM en presencia de AAP 100 μM .

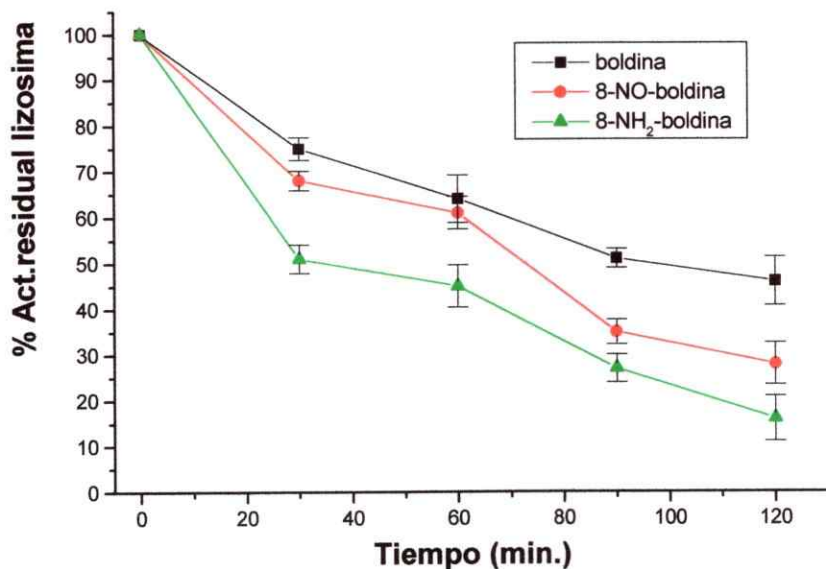


Grafico 15: Porcentaje de actividad residual de lisozima en función del tiempo. Resultados obtenidos al co-incubar lisozima con boldina, 8-nitrosoboldina u 8-aminoboldina 50 μM en presencia de AAP 100 μM .

A partir de las curvas de actividad residual versus el tiempo, se ajustaron por ajuste polinomial de segundo grado cuyos parámetros de muestran en la tabla 3. Utilizando éstas ecuaciones se obtuvieron los tiempos medios ($t_{1/2}$) a los cuales un antioxidante mantiene la actividad de la enzima en un 50 % y a partir de ellos se hizo una comparación entre los $t_{1/2}$ algunos de los antioxidante aporfinicos evaluados y el BHT, calculando un parámetro denominado $M_{1/2}$, para establecer la eficacia temporal de las aporfinas con respecto al antioxidante de referencia.

	A	B	C
boldina (100 uM)	100 ± 2,0	-0,25 ± 0,09	7.96 x 10 ⁻⁴ ± 0,8 x 10 ⁻⁴
boldina (50 uM)	98,8 ± 2,7	-0.78 ± 0.10	0,003 ± 8 x 10 ⁻⁴
boldina (25 uM)	101 ± 2,3	-1,13 ± 0,09	0,004 ± 7,3 x 10 ⁻⁴
Trolox (100 uM)	102 ± 4,2	-0,69 ± 0,16	0,001 ± 0,0013
BHT (100 uM)	99,8 ± 3,6	-1,48 ± 0,14	0,006 ± 0,0011
<i>N</i> -metilaurótetánina (100 uM)	99,2 ± 1,9	-0,58 ± 0,07	0,002 ± 6,2 x 10 ⁻⁴
predicentrina (100 uM)	99,2 ± 7,5	-0,57 ± 0,30	2,4 x 10 ⁻⁴ ± 0,0024
glaucina (100 uM)	100,3 ± 3,6	-1,51 ± 0,14	0,007 ± 0,0011
3-cloroboldina (100 uM)	100,6 ± 1,3	-1,41 ± 0,05	0,0014 ± 4,02 x 10 ⁻⁴
3-bromoboldina (100 uM)	100,7 ± 3,0	-0,26 ± 0,12	-4,76 x 10 ⁻⁴ ± 9,6 x 10 ⁻⁴
<i>N</i> -alil- <i>nor</i> -boldina (100 uM)	100,3 ± 0,6	-0,69 ± 0,03	0,0018 ± 2,01 x 10 ⁻⁴
3-cloroboldina (50 uM)	99,2 ± 1,6	-0,55 ± 0,006	0,0022 ± 4,96x 10 ⁻⁴
3-bromoboldina (50 uM)	99,3 ± 1,5	-0,85 ± 0,05	0,003 ± 4,71 x 10 ⁻⁴
3-yodoboldina (50 uM)	99,4 ± 1,53	-0,81 ± 0,06	0,0029 ± 4,81 x 10 ⁻⁴
3-cloroboldina (25 uM)	98,9 ± 1,3	-0,69 ± 0,007	0,0031 ± 2,7 x 10 ⁻⁴
3-bromoboldina (25 uM)	99,3 ± 3,1	-0,82 ± 0,023	0,069 ± 3,4 x 10 ⁻⁴
3-yodoboldina (25 uM)	97,6 ± 1,2	-0,97 ± 0,0021	0,0005 ± 4 x 10 ⁻⁴
8-nitrosoboldina (25 uM)	101,1 ± 2,7	-1,88 ± 0,034	0,006 ± 0,003
8-aminoboldina (25 uM)	99,7 ± 1,8	-1,65 ± 0,045	0,0056 ± 0,006

Tabla 3: Parámetros de las ecuaciones ($Y = A + BX + CX^2$) utilizados para el ajuste de las curvas obtenidas experimentalmente en los ensayos de inhibición de la lisozima ($p < 0,005$).

Compuesto	$t_{1/2}$ (100 μ M)	$M_{1/2}$
boldina	> 120	> 1,5
BHT	78	1
Trolox®	40	0,5

Tabla 4: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina, BHT y trolox. ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de los diferentes compuestos a 100 μ M. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina o trolox con respecto al $t_{1/2}$ del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando cada antioxidante 100 μ M).

Compuesto	$t_{1/2}$	$M_{1/2}$
boldina (100 μ M)	> 120	> 1,5
boldina (50 μ M)	90	-
boldina (25 μ M)	53	-

Tabla 5: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina. ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de boldina. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina con respecto al $t_{1/2}$ del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando cada antioxidante 100 μ M).

Compuesto	$t_{1/2}$ (100 μ M)	$t_{1/2}$ (50 μ M)	$t_{1/2}$ (25 μ M)	$M_{1/2}$ (100 μ M)
boldina	>120	90	53	> 1,54
<i>N</i> -metillaurotetanina	119	51	-	1,52
predicentrina	79	39	-	1,01
glaucina	43	-	-	0,55

Tabla 6: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina y sus derivados *O*-metilados ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos evaluados. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina o su derivados *O*-metilados con respecto al $t_{1/2}$ del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando cada antioxidante 100 μ M).

Compuesto	$t_{1/2}$ (100 μM)	$t_{1/2}$ (50 μM)	$t_{1/2}$ (25 μM)	$M_{1/2}$ (100 μM)
boldina	>120	90	53	> 1,54
3-cloroboldina	-	>120	75	-
3-bromoboldina	>120	91	63	> 1,54
3-yodoboldina	>120	87	62	> 1,54

Tabla 7: $t_{1/2}$ y $M_{1/2}$ para boldina y sus derivados halogenados ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos evaluados. $M_{1/2}$ = Razón de los $t_{1/2}$ de boldina o su derivados halogenados con respecto al $t_{1/2}$ del BHT ($t_{1/2 \text{ apo}} / t_{1/2 \text{ BHT}}$), determinados utilizando cada antioxidante 100 μM).

Compuesto	$t_{1/2}$ (100 μM)	$t_{1/2}$ (50 μM)	$t_{1/2}$ (25 μM)
boldina	>120	90	53
8-nitrosoboldina	-	73	-
8-aminoboldina	-	30	-
<i>N</i> -alil- <i>nor</i> -boldina	88	-	-

Tabla 8: $t_{1/2}$ para boldina y algunos de sus derivados. ($t_{1/2}$ = tiempo requerido para la pérdida del 50 % de la actividad enzimática (en minutos) en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos evaluados)

3.3.4 comentarios de los resultados obtenidos en la protección de la lisozima

La incubación de lisozima a 37 °C en presencia de AAP 100 μM conduce a la inactivación progresiva de la enzima como una función del tiempo. Este proceso se graficó como la actividad residual de la enzima (%AR), medida cada 30 minutos por espacio de 2 horas. En una primera etapa se evaluó el comportamiento de la lisozima incubada en ausencia de radicales libres y de antioxidantes (gráfico 7) para determinar el efecto de la temperatura y la agitación mecánica sobre la actividad de la proteína. La desnaturación (pérdida de capacidad enzimática) alcanza al cabo de dos horas aproximadamente un 10 % y se considera en los calculos ulteriores. En gráfico 7 también se muestra el efecto desnaturalante del generador de radicales libres a 50 y 100 μM , produciendo el máximo de pérdida de actividad enzimática a la mayor concentración. La actividad en ausencia de radicales libres fue entonces considerada como un 100 % de actividad enzimática y en presencia de 100 μM de la sustancia generadora de radicales libres como un 0 % de dicha actividad.

De acuerdo a los resultados obtenidos la boldina se comporta como un antioxidante de eficacia intermedia, es decir no produce tiempos de inducción definidos y su comportamiento cinético es difícil de calibrar a través curvas simuladas. En los gráficos de %AR-tiempo se observan estas características para todas las aporfinas ensayadas (gráficos 8-15). Debido a lo anterior, se compararon los tiempos necesarios para mantener la actividad de la lisozima en un 50 % ($t_{1/2}$) obtenidos a partir del ajuste de las curvas con una función polinomial (tabla 3). A partir de los $t_{1/2}$ y para obtener un parámetro de comparación con respecto a uno de los antioxidantes de referencia (BHT), se calculó la razón $M_{1/2}$ ($t_{1/2}$ aporfinas/ $t_{1/2}$ BHT); tablas 4-7. Un valor de $M_{1/2} = 1$ indica una potencia similar a la del BHT, medidos ambos a 100 μM . Finalmente, y donde se contaba con datos de actividad residual a diferentes concentraciones, se estimaron algunos IC_{50} (considerados de la manera tradicional).

Al ensayar boldina a diferentes concentraciones (tabla 5) se observa que a menores concentraciones del alcaloide los $t_{1/2}$ disminuyen progresivamente. Al comparar este parámetro con aquellos determinados para los antioxidantes de referencia (tabla 2) se observa que la boldina, así como la mayor parte de sus derivados, a excepción de la glaucina 100 μM , (tabla 4) protegen la enzima durante un tiempo más prolongado ($t_{1/2}$ mayores). Un comportamiento particular se observa para los derivados halogenados, que presentan actividades protectoras muy similares a la de la boldina (tabla 7), todas a 100 μM . En un intento de discriminar mejor entre las propiedades de estos compuestos, se evaluaron menores concentraciones de las haloaporfinas (50 y 25 μM) observándose el mismo comportamiento cinético. En todos los casos se observa un $t_{1/2}$ similar al de la boldina, aunque a 50 μM , la 3-cloroboldina presenta un $t_{1/2}$ mayor que los otros dos derivados.

Utilizando el parámetro $M_{1/2}$ la boldina, al igual que la mayor parte de sus derivados, presenta una mayor capacidad protectora que el BHT (y el trolox). La predicentrina (1,01) presenta la misma capacidad protectora que el BHT y la glaucina protege menos (0,55). Los derivados halogenados presentan, al igual que la boldina, un valor $> 1,5$ lo que indica que a concentración 100 μM mantienen una actividad superior al 50 % por períodos más prolongados que 2 horas (tabla 7).

Finalmente, se calcularon los IC_{50} graficando las concentraciones del antioxidante en función de los datos de actividad residual (%AR) de lisozima a diferentes tiempos en

que se efectuaron las mediciones ($t = 30, 60, 90$ y 120 minutos). No se consideraron las %AR a 30 min., debido a que no hay diferencias significativas del %AR a las distintas concentraciones. El IC_{50} aumenta sólo levemente con el tiempo de medición (*cf.* para la boldina: $46,4 \pm 7,9$ (60 min); $51,7 \pm 7,1$ (90 min.) y $53,6 \pm 6,2$ (120 min.)), pero se prefirió trabajar con los datos obtenidos a 120 minutos (tabla 9)

Aporfinas	IC_{50} (μM)
boldina	54 ± 6
<i>N</i> -metillaurotetanina	50 ± 3
predicentrina	65 ± 5
glaucina	>100
3-cloroboldina	37 ± 9
3-bromoboldina	42 ± 7
3-yodoboldina	63 ± 5

Tabla 9: IC_{50} de algunas aporfinas calculados en función de la concentración utilizada de aporfina versus la actividad residual a tiempo = 2 horas. Los IC_{50} se informan como el promedio \pm desviación estándar.

En comparación con sus derivados *O*-metilados, la boldina es más potente que la glaucina y la predicentrina. Tanto la *N*-metillaurotetanina como la 3-cloroboldina presentan una mayor eficacia protectora en este sistema; mientras que las 3-bromo- y 3-yodoboldinas despliegan una eficacia similar en proteger la lisozima que la boldina.

3.3.5 Resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación de microsomas hepáticos.

Aporfinas	50 μ M	25 μ M	10 μ M	5 μ M	3 μ M
boldina	96 \pm 3,5	95,5 \pm 4,5	52,7 \pm 4,5	18 \pm 2,4	4 \pm 1,0
predicentrina	91,5 \pm 4,5	75 \pm 1,0	19 \pm 4,9	10 \pm 3,6	2,7 \pm 2,0
<i>N</i> -metillaurotetanina	94,5 \pm 3,5	90 \pm 4,0	68 \pm 6,1	18 \pm 7,4	5,8 \pm 2,2
glaucina	97,5 \pm 0,5	95,5 \pm 2,5	42 \pm 8,2	20 \pm 3,9	4 \pm 1,4
3-cloroboldina	97,5 \pm 4,5	95,5 \pm 2,5	94,5 \pm 4,5	57 \pm 4,0	23 \pm 1,3
3-bromoboldina	99,5 \pm 0,5	97 \pm 3,0	96,7 \pm 4,0	85 \pm 2,5	38,7 \pm 5,4
3-yodoboldina	93 \pm 6,0	91 \pm 9,0	89 \pm 1,0	62 \pm 3,6	32 \pm 4,7
2,9- <i>O,O'</i> -dipivaloílbaldina	99,5 \pm 2,0	98,3 \pm 3,0	88 \pm 1,3	77 \pm 2,3	28 \pm 1,9
<i>N</i> -alilnorbaldina	92 \pm 7,0	85,5 \pm 1,5	83 \pm 5,3	53 \pm 1,9	21 \pm 2,3
α -tocoferol	72 \pm 2,5	49 \pm 4,0	2,33 \pm 1,7	1,2 \pm 0,5	-
Trolox®	63 \pm 5,5	54 \pm 4,5	11,1 \pm 2,1	1,0 \pm 0,4	-

- : no evaluado

Tabla 10 : Porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica en microsomas hepáticos por los diferentes compuestos evaluados a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (n = 4).

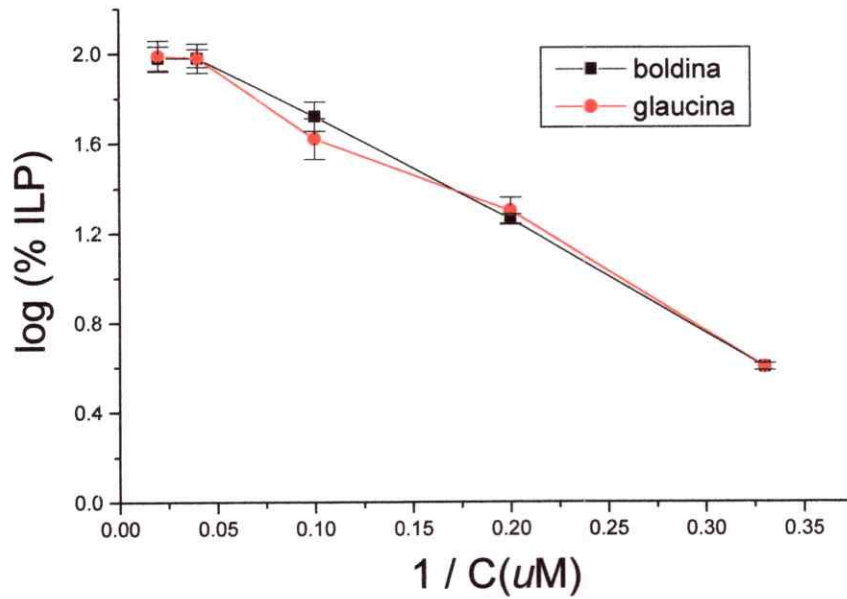


Grafico 16: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración de boldina o glaucina .

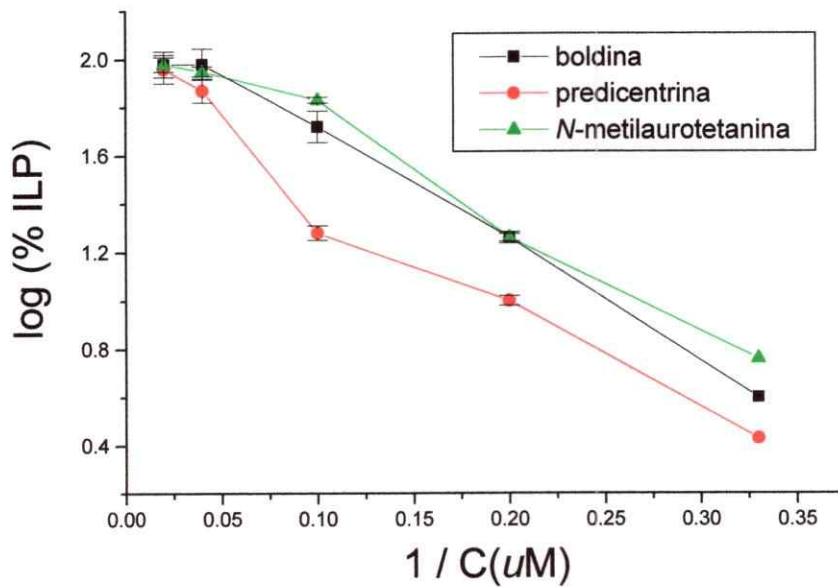


Grafico 17: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración boldina, predicentrina o N-metillaurotetanina .

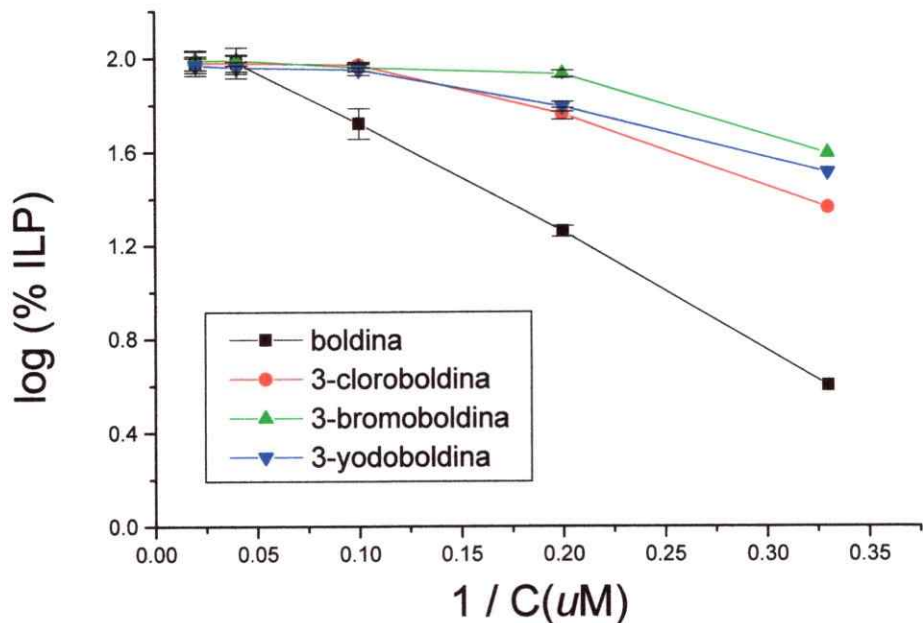


Grafico 18: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración boldina, 3-cloro-, 3-bromo- o 3-yodoboldinas.

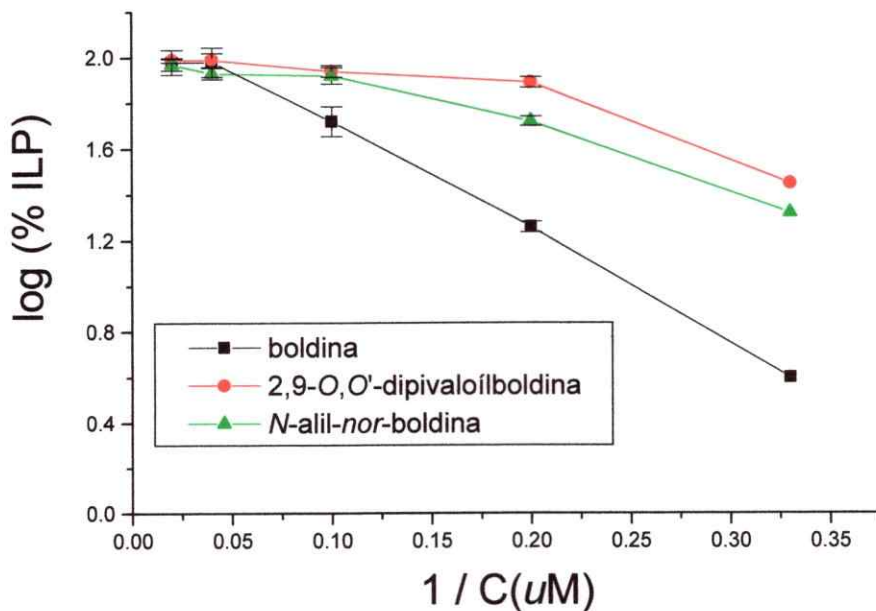


Grafico 19: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración boldina, 2,9-dipivaloilboldina o N-alilnorboldina.

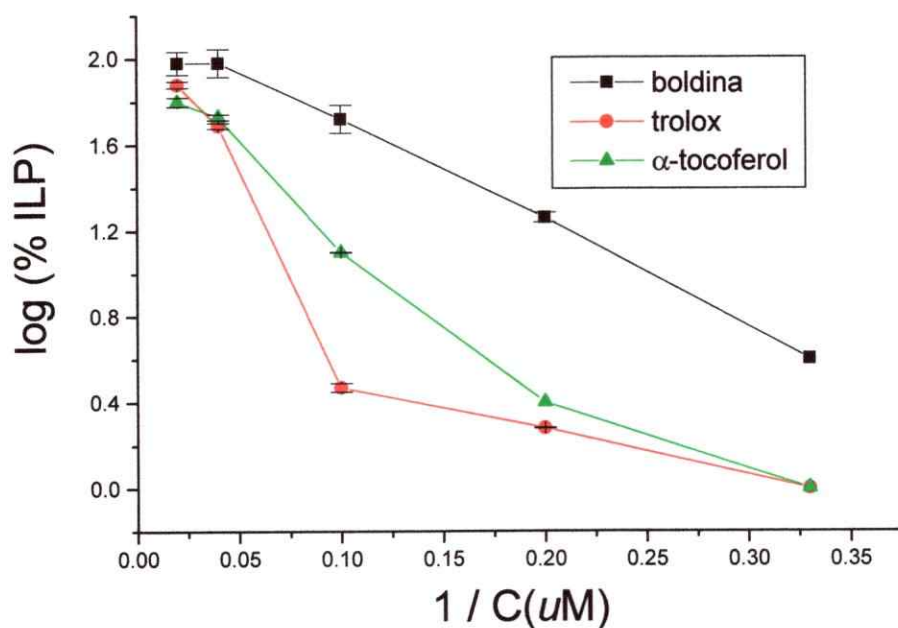


Gráfico 20: Logaritmo del porcentaje de inhibición de la oxidación de microsomas (log % ILP) en función del inverso de la concentración boldina, α -tocoferol o trolox®.

3.3.5 Cometarios de los resultados de inhibición de la oxidación lipídica

La inhibición de la oxidación lipídica (“lipoperoxidación”, ILP) producida por el radical hidroxilo (generado por una reacción de tipo Fenton) en microsomas hepáticos se evaluó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en presencia y ausencia de boldina, sus derivados y los antioxidantes de referencia en un rango de concentraciones comprendidas entre 1-50 μM , medidos durante 20 minutos. Bajo estas condiciones los alcaloides y los antioxidantes de referencia inhibieron el proceso de oxidación del sustrato biológico, aunque con diferente potencia. Los datos obtenidos indican que, de los compuestos bajo estudio, el grupo de las haloboldina (IC_{50} entre 4 y 5,6 μM) son los más eficientes antioxidantes en comparación a la boldina (13,3 μM) junto a la 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina y la *N*-alil-*nor*-boldina (4,4 y 6,3 μM , respectivamente). Los derivados monofenólicos de la boldina, *N*-metillaurotetanina y predicentrina poseen potencias antioxidantes diferentes (10 y 20 μM , respectivamente) mientras que la glaucina muestra una potencia semejante a la de la boldina. La boldina

bajo las condiciones de evaluación es más potente para inhibir el proceso de lipoperoxidación que los antioxidantes utilizados como referencia: trolox y α -tocoferol (43 y 38,4 μ M, respectivamente).

	IC ₅₀	N
boldina	13,3 \pm 0,5	5
predicentrina	20,0 \pm 1,2	5
<i>N</i> -metillaurotetanina	10,2 \pm 1,2	5
glaucina	13,5 \pm 0,8	5
3-cloroboldina	5,5 \pm 0,2	5
3-bromoboldina	4,0 \pm 0,3	5
3-yodoboldina	5,6 \pm 0,3	5
2,9-O,O'-dipivaloilboldina	4,4 \pm 1,3	5
<i>N</i> -alil- <i>nor</i> -boldina	6,3 \pm 0,4	5
α -tocoferol	38,4 \pm 2,6	3
trolox®	43 \pm 2,5	3

Tabla 11: Concentraciones de semi-inhibición (IC₅₀) para los diferentes compuestos evaluados en el proceso de lipoperoxidación. N = número de datos considerados.

4.0 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.0 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Hemisíntesis de derivados de la boldina y de la pukateína.

La extracción de la boldina y la laurolicina se llevó a cabo utilizando un método desarrollado en nuestro laboratorio, que consiste en el tratamiento del material vegetal (corteza o madera de boldo) finamente dividido y seco, con ácido fórmico acuoso a 80 °C. De esta manera se logra extraer los componentes susceptibles de ser ionizados en el material vegetal, particularmente la fracción alcaloidal protonada. La principal ventaja de este método es que se trabaja con un ácido de bajo costo y de características antioxidantes y se requiere un menor tiempo para aislar la fracción de interés que utilizando métodos alternativos. El posterior fraccionamiento y purificación de los alcaloides se lleva a cabo por extracción de la solución a diferentes pH, cristalizando o bien utilizando técnicas cromatográficas, lo que permitió obtener las moléculas precursoras en cantidades adecuadas para su posterior transformación.

Los primeros intentos de obtener derivados apuntaron a la conversión de boldina en sus respectivos ésteres, que podrían funcionar como prodrogas más fácilmente absorbibles o más susceptibles de atravesar membranas biológicas, intentándose dos vías independientes para obtener estos compuestos. En una de ellas, el proceso de acilación se realizó tratando una solución de boldina en diclorometano con anhídrido acético en piridina, en presencia de 4-dimetilaminopiridina, obteniéndose el compuesto diacetilado con rendimientos cercanos a un 45 %. El procedimiento alternativo consistió en el tratamiento de soluciones de boldina en ácido trifluoroacético con cloruro de acetilo (o pivaloilo - 2,2'-dimetilpropanoilo) alcanzándose rendimientos de hasta un 75 % en ambos casos. Aunque los rendimientos en forma comparativa al trabajar con los cloruros de ácido en medio de ácido trifluoroacético (Borgman *et al.*, 1975) son mayores que bajo condiciones básicas, la ventaja potencial de éstas, si se las lograra optimizar, consistiría en que el diclorometano es un reactivo menos tóxico y relativamente de bajo costo en comparación al ácido trifluoroacético, de lo cual se desprende la conveniencia de estas experiencias.. El mayor rendimiento de las acilaciones en medio ácido se puede explicar porque en estas condiciones, estando protonado el nitrógeno cicloalifático, los

agentes acilantes (electrófilos) reaccionaron preferentemente con los grupos fenólicos. En medio básico reacciones de eliminación de Hoffmann pueden formar derivados de 1-aminoetil- (o 1-acilamidoetil)-fenantreno, productos que se han descrito trabajando con boldina en condiciones análogas pero utilizando cloruro de benzoílo como agente acilante (Johns *et al.*, 1966). La formación de este tipo de compuestos, hipotéticamente, puede dar cuenta de los bajos rendimientos logrados al acilar boldina en solución piridínica.

Por otra parte, se logró preparar un hemiéster del ácido succínico: ácido-3-etoxicarbonilpropanoico, intermediario clave para la obtención de los hemiésteres de la boldina. A continuación se utilizó el procedimiento habitual para convertirlo en el cloruro de ácido 3-etoxicarbonilpropanoico (Robinson *et al.*, 1996). Finalmente, el etoxi-derivado fue sometido a reacción con la boldina para producir el éster mixto correspondiente, siguiendo un protocolo análogo al descrito en la preparación de un éster de la rapamicina (Adamczyk *et al.*, 1994). Este producto fue detectado en cromatografía de capa fina observándose la aparición de dos manchas principales, una de las cuales correspondía a la boldina sin modificar. La mezcla de reacción fue fraccionada utilizando cromatografía de columna separándose una cantidad importante del alcaloide sin modificación y un 30 % del compuesto diesterificado, que fue caracterizado por espectroscopía (RMN-¹H). El rendimiento global no fue alto, ni se detectaron los productos monosustituídos, los que podrían haberse hidrolizado en las etapas de aislamiento.

Intentos de hidrólisis para producir el hemiéster con un grupo carboxilato libre fueron infructuosos, ya que bajo condiciones básicas (EtOH/NaOH) la liberación de la función fenólica condujo nuevamente a la boldina. La formación de boldina en el proceso de hidrólisis del éster indica que el anión ariloxi (boldinox) es mejor nucleófilo que el alcoxi, por lo que la hidrólisis en medio básico conduce a la formación de la boldina nuevamente. Por consiguiente no se cuenta con ningún hemiéster de boldina con un residuo aniónico libre. Limitaciones de tiempo no permitieron explorar la preparación de otro éster mixto que incorporara un grupo bencilo (3-benciloxicarbonilpropanoílo) para formar el diéster correspondiente con la boldina. En este caso se podría haber esperado que la liberación del grupo bencilo a partir del 3-benciloxicarbonilpropanoato

de boldina se efectuara a través de una hidrogenólisis suave (con HCOOH 4,4% y Pd/C) (Adger *et al.*, 1987), sin afectar la función éster formada con el residuo de la boldina. Una segunda alternativa sería preparar un hemiéster utilizando el cloruro de ácido *ter*-butoxicarbonilpropanoico (preparado por reacción de *ter*-butanol y ácido succínico), el cual debería reaccionar de manera análoga al derivado etoxilado utilizado en nuestro primer intento. Efectuando la hidrólisis de este producto en medio ácido (por ejemplo HCOOH 10%) se esperaría la liberación del carbocatión terciario de manera predominante, produciendo *ter*-butanol y dejando intacto el hemisuccinato de boldina. Otra alternativa para salvar este escollo sería la utilización de enzimas comerciales que muestran preferencias por la liberación hidrolítica de residuos alcoxi sobre la de los fenoxi (Adamczyk *et al.*, 1994).

La preparación de uno de los derivados monometilados (predicentrina) y del derivado dimetilado (glaucina) de boldina, como aproximación al análisis del papel de cada uno de sus grupos hidroxilos en sus propiedades farmacológicas, se realizó de acuerdo a un procedimiento ya descrito (Tschesche *et al.*, 1964). El tratamiento de una solución metanólica de boldina con una solución etérea de diazometano condujo a la formación de glaucina (2,9-*O,O'*-dimetilboldina) como producto principal, observándose además por cromatografía en capa fina la presencia de los dos isómeros monometilados. Para la preparación del derivado monometilado en el átomo de oxígeno unido al C-9, la predicentrina (9-*O*-metilboldina), la reacción de eterificación se llevó a cabo bajo condiciones de control estequiométrico, mediante una adición lenta del agente metilante y manteniendo la temperatura de trabajo cercana a 0 °C. Para la preparación del derivado monometilado en el oxígeno de la posición 2, la *N*-metillaurotetanina (2-*O*-metilboldina), la cual no fue posible aislar de las mezclas de reacción de boldina con diazometano, se utilizó la alternativa de aislar laurotetanina (2-*O*-metil-lauroletsina o 2-*O*-metil-*nor*-boldina) a partir de corteza de *Laurelia sempervirens*, lo que se hizo siguiendo una metodología análoga a la utilizada para aislar boldina y lauroletsina. La laurotetanina fue sometida a una reacción de *N*-metilación en condiciones modificadas de Eschweiler-Clarke (formaldehído y borohidruro de sodio). De esta manera se obtuvo por vía indirecta la *N*-metillaurotetanina (Lebœuf *et al.* 1966).

La obtención exitosa de glaucina y predicentrina y los intentos infructuosos de aislar *N*-metillaurotetanina de la mezcla de metilación de boldina, utilizando como agente metilante diazometano, pueden racionalizarse sobre la base de estudios cinéticos. Así, sobre la base de la cuantificación por RMN de ^1H de los productos formados a diferentes tiempos en la mezcla de reacción (Asencio *et al.*, 1993), se ha postulado que la velocidad de metilación del grupo hidroxilo en el C-9, que conduce a predicentrina, es considerablemente mayor que la de aquél situado en el C-2, que conduce a *N*-metillaurotetanina. En consecuencia, la primera se forma mucho más rápidamente que la segunda. Además, al mantenerse la reactividad diferente de los hidroxilos en las monometilboldinas, la predicentrina formada en una primera etapa sólo es metilada lentamente a glaucina, permitiendo la acumulación de cantidades aislables del producto intermediario. Por el contrario, a medida que se forma *N*-metillaurotetanina, ésta se convierte rápidamente a glaucina y por lo tanto no se acumula en cantidades que permitan su aislamiento.

Los ambientes estéricos de los grupos hidroxilos en C-2 y C-9 son muy similares. Sin embargo, el grupo metoxilo en C-1 debe encontrarse, en promedio, fuera del plano (arriba o abajo) del anillo aromático A de la estructura de la boldina y la predicentrina, como se puede visualizar utilizando modelos moleculares, mediante cálculos de mecánica molecular o mecano-cuánticos y al interpretar los datos de RMN- ^1H y ^{13}C y de rayos X, de tal manera que podría dificultar estéricamente la metilación de la función fenólica en C-2 que conduciría a *N*-metillaurotetanina o glaucina, respectivamente. Al contrario, el carbono del grupo metoxilo en C-10 se encuentra preferentemente en el plano del anillo aromático D y orientado hacia el C-11 y por lo tanto este grupo tendría un débil efecto estérico sobre el entorno del grupo hidroxilo en C-9. En consecuencia, la metilación del grupo hidroxilo en C-9 se encontraría más favorecida que la del que está situado en el C-2. Un argumento estructural adicional que contribuye a explicar porqué sólo se detecta cantidades apreciables de predicentrina y no de *N*-metillaurotetanina es el hecho que, debido a la conjugación sobre el sistema bifenílico, la función hidroxilo en C-9 debería ser más ácida y por lo tanto más reactiva frente al diazometano. De hecho, una medición espectrofotométrica permitió determinar ambos pK_a encontrándose que el

hidroxilo en C-9 ($pK_a = 8,5$) es más ácido el de C-2 ($pK_a = 9,0$) lo que permite apoyar esta idea (Jara *et al.*, 1993).

En la preparación de las sales cuaternarias de amonio derivadas de boldina y de sus análogos mono- y dimetilados, que servirían para evaluar la hipótesis del papel del par electrónico del nitrógeno en la actividad antioxidante de aporfinas, se utilizaron procedimientos ya descritos para este tipo de sustancias desde la década de 1920. Cada una de las bases fue disuelta en benceno y se añadió una cantidad equivalente de yoduro de metilo, cristalizando la sal al cabo de un tiempo. Los espectros de RMN- 1H acusan la señal correspondiente a un segundo grupo $N-CH_3$, observándose el desplazamiento de ambas señales a bajo campo en comparación a la señal del único $N-CH_3$ en el producto no cuaternizado, lo que se debería a la carga positiva sobre el nitrógeno. La carga positiva además afecta a los protones vecinos: particularmente se observa la aparición a campo relativamente bajo de un doblete de dobletes correspondiente al protón metínico del C-6a y un desplazamiento de las señales metilénicas de C-5 hacia bajo campo. Las restantes señales mantienen sus desplazamientos químicos característicos y confirman la identidad de los productos aislados.

Para obtener una serie de N -alquil-*nor*-boldinas que se esperaba que fueran más lipofílicas que el alcaloide se había propuesto como primera alternativa una secuencia sintética de alquilación de boldina con los yoduros o bromuros de alquilo correspondientes sobre el nitrógeno (para formar las sales de amonio cuaternarias respectivas), seguida de una desmetilación con bencenotiolato de sodio en N,N -dimetilformamida. La formación de la sal cuaternaria de amonio sólo fue posible en el caso del yodometilato de boldina, ya que al aumentar el número de carbonos de los halogenuros de alquilo (yoduro de etilo y bromuro de propilo) sólo se detectaron los productos de eliminación de Hoffmann. Esto indicaría que la presencia de grupos más voluminosos que el metilo produce una compresión estérica importante y que la sal cuaternaria resultante reacciona fácilmente con nucleófilos mediocres como podrían ser moléculas de solvente o iones yoduro formando un producto estabilizado por resonancia, el derivado fenantrénico correspondiente. Sin embargo, fue posible obtener un par de las N -alquil-*nor*-boldinas propuestas utilizando una segunda ruta que evitara la apertura del anillo C de la boldina. Para esto se procedió a la amidificación de laurólitsina (*nor*-

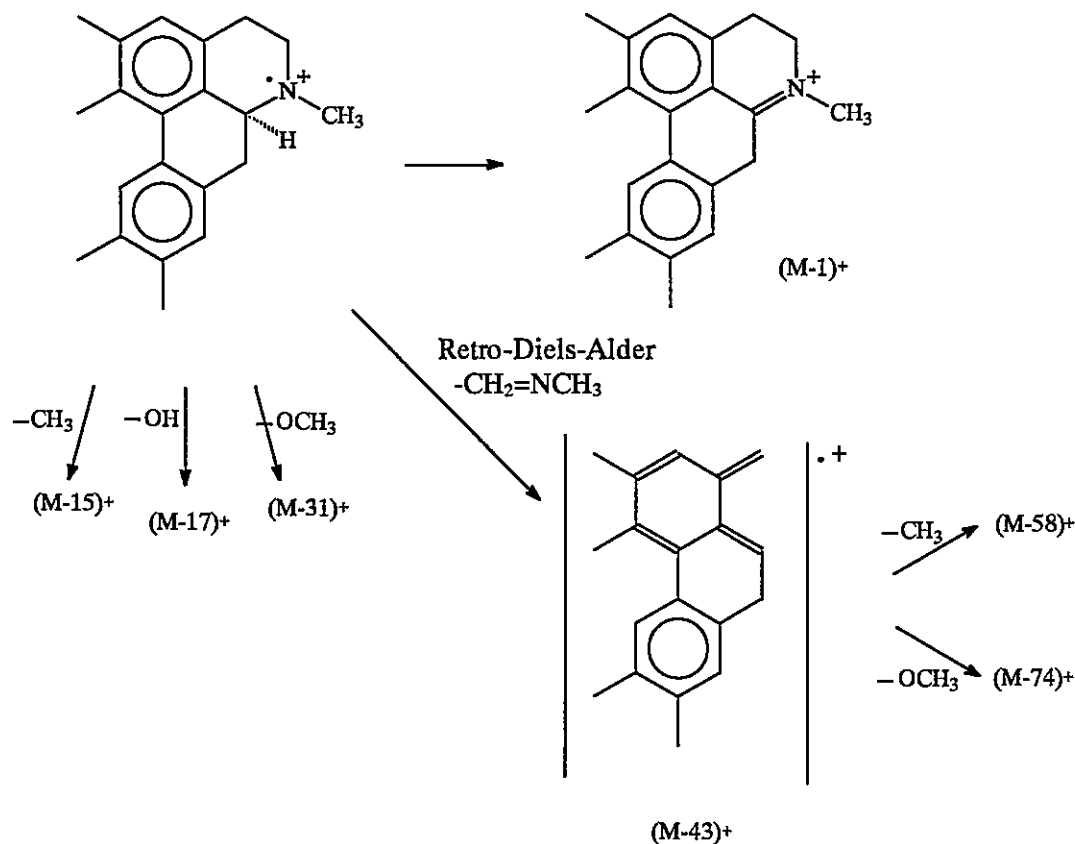
boldina) (Lebœuf *et al.*, 1980) con los anhídridos de ácidos acético y propiónico, utilizando como solvente una mezcla de benceno y piridina y reduciendo las amidas resultantes con hidruro de litio y aluminio en éter. De esta manera se pudo preparar *N*-etil- y *N*-propil-*nor*-boldinas. En adición, y utilizando cloruro de alilo y K_2CO_3 en acetonitrilo, se preparó *N*-alil-*nor*-boldina, pero se observó igualmente el producto de la eliminación de Hoffmann, que fue caracterizado sólo parcialmente por espectrometría de RMN- 1H cuyas señales características revelan la naturaleza fenantrénica del producto como la presencia de un doblete de dos nuevos protones unidos a un anillo aromático, H-9 y H-10 en el fenantreno ($\delta = 7,67$ y $7,40$ ppm, con $J = 9$ Hz), junto a las señales del grupo alilo unido al nitrógeno y los dos tripletes característicos de una cadena flexible de aminoetilo.

Con el fin de obtener otra serie de compuestos de mayor lipofilia que la boldina se repitieron preparaciones de derivados halogenados utilizando *N*-halogenosuccinimidas (con halógeno = Cl, Br o I) en ácido trifluoroacético (Sobarzo-Sánchez *et al.*, 2000). En estos casos, se utilizó una relación equimolecular entre la boldina y el agente halogenante con el objeto de obtener los derivados halogenados de boldina monosustituídos como productos principales, observándose además la formación en menor proporción de los productos disustituídos con cloro o bromo.

La identificación de la posición de la sustitución se realizó comparando el espectro de RMN- 1H de la boldina en la zona de los protones unidos a anillos aromáticos, es decir para los protones en C-3, C-8 y C-11 (con desplazamientos químicos de 6,61; 6,81 y 7,89 ppm, respectivamente para la boldina), con el de cada uno de los productos halogenados. En cada uno de los productos monohalogenados analizados se conservaron las señales presentes a más bajo campo (correspondientes a los protones en C-11 y C-8) y desapareció la señal del protón unido al C-3, aunque también se detectó la presencia en la mezcla de halogenación de productos disustituídos en C-3 y C-8. Sin embargo, no se detectó ningún producto sustituido exclusivamente en C-8 o C-11. Un análisis teórico simple permite predecir que la halogenación en la posición C-11 se encontraría favorecida electrónicamente (complejo σ estabilizado). Sin embargo, el entorno estérico de esta posición dificultaría la sustitución ya que el átomo C-11 se encuentra flanqueado por dos grupos voluminosos (metoxilos) presentes en C-1 y C-10.

A partir de un extracto enriquecido en pukateína [(*R*)-11-hidroxi-1,2-metilendioxi-aporfina], obtenido de corteza de pukatea (*Laurelia novae-zelandiae* A. Cunn, Monimiaceae) se aisló este alcaloide por recristalización en etanol absoluto, determinándose su espectro de RMN-¹H que coincide con los datos reportados en la literatura, mientras que el punto de fusión y poder rotatorio mostraron diferencias apreciables (este trabajo $pf = 221-222\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $[\alpha]_D = -215\text{ }^{\circ}$ ($c = 1$; EtOH); literatura $213-215\text{ }^{\circ}\text{C}$ y -240 a -260 ° , respectivamente, Bernauer, 1967). Esto podría ser atribuido a una menor pureza de este alcaloide obtenido en esta ocasión a partir del material vegetal. Para contar con una sal relativamente soluble en agua la pukateína fue transformada en su monotartrato, que cristalizó bien en isopropanol. Por otra parte, mediante halogenación con *N*-bromosuccinimida, se pudo aislar un producto monobromado. La deducción de la posición de bromación en C-8 se realizó sobre la base de la interpretación del espectro de RMN-¹H, a través de la aparición de dos dobletes ($J = 8$ Hz) asignables a los protones unidos a C-9 y C-10, y a la interpretación de los espectros HMQC y HMBC que permitieron confirmar la posición de sustitución. El espectro de masas produce los picos dobles característicos de las moléculas que incorporan un solo átomo de bromo (⁸¹Br y ⁷⁹Br en proporciones semejantes) en su estructura: 375 (90%)-373 (82%) (M)⁺, 374 (100%)-372 (85%) (M-H)⁺.

Los espectros de masas de las aporfina aisladas o preparadas en esta tesis presentan los típicos patrones de fragmentación de este tipo de alcaloides (Ohashi *et al.*, 1963) sustituidos en posiciones 1, 2, 9 y 10 del esqueleto aporfínico. En los derivados de la boldina el fragmento (M-1)⁺ origina el pico base. Las señales detectadas a (M-15), (M-17) y (M-31) representan los fragmentos correspondientes a las pérdidas de CH₃, OH y OCH₃. Una fragmentación característica es la pérdida de una *N*-alquilmetilenimina a través de una reacción de tipo retro-Diels-Alder. En el caso de que el grupo sobre el nitrógeno del anillo sea un metilo se pierde un fragmento de $m/z = 43$, cuyo relación masa/carga (m/z) se incrementa con la talla del sustituyente en las *N*-alquil-*nor*-laurolitsinas (57, 71 y 69 con alquilo = etilo, propilo y alilo respectivamente). Las fragmentaciones principales en la serie *N*-metilada se esquematizan a continuación:



Los patrones de fragmentación de las *O,O'*-diacetil- y *O,O'*-dipivaloílboldinas muestran eliminaciones complementarias que dan cuenta de los grupos acilo y alquilo presentes sobre los oxígenos fenólicos tales como: $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ (m/z 42) para el compuesto diacetilado (cuya contraparte $[(\text{CH}_3)_3\text{CCO}_2^+]$ no se detecta para el derivado sustituido con grupos pivaloílos), y $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (m/z 57) para la dipivaloílboldina.

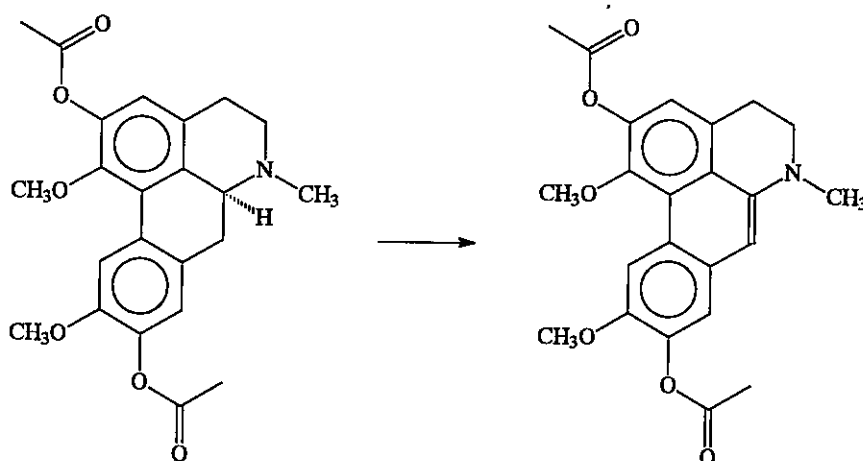
En los espectros de masas de un par de sales cuaternarias (yoduros de *N*-metilglaucinio y boldinio) se observó la presencia del ión molecular del catión cuaternario aporfínico, que da una señal de baja intensidad, al igual que las otras señales características de esta clase de compuestos (pérdida de metoxilo, metilos, etc.). Estos compuestos presentan similar pico base y que se atribuye al fragmento $\text{CH}_2=\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (m/z 58).

4.2 Estudios de oxidación de la boldina.

Ya en la primera mitad del siglo XX, era ampliamente reconocida la inestabilidad (oxidativa) de las aporfinas que se oscurecen en contacto con el aire, aunque no posean funciones fenólicas, y se sabía entonces que sus sales eran considerablemente más estables. La observación clásica de la mayor estabilidad de las sales se puede explicar con lo que se sabe ahora referente al tema, recurriendo a la hipótesis de la participación del par electrónico del nitrógeno en la estabilización del radical libre centrado en el C-6a de las aporfinas, ya que en las sales dicho par no estaría disponible y por lo tanto tales radicales libres no se formarían con la misma facilidad que en las bases libres y no seguiría adelante la cascada oxidativa. Por otra parte, desde los años 60 se empezaron a aislar y caracterizar estructuralmente dideshidro-, tetradeshidro- y oxoaporfinas (7-oxo-4,5,6,6a-tetradeshidroaporfinas) desde fuentes naturales. Es razonable postular que dichos "alcaloides" no son metabolitos en el sentido estricto de productos de la acción de enzimas en el tejido vivo, sino probablemente productos de autoxidación de aporfinas presentes en las mismas plantas.

A finales de los años sesenta, y durante la búsqueda de nuevos alcaloides utilizando la recientemente desarrollada cromatografía en capa fina (CCF), los investigadores nuevamente informan de efectos como el cambio de coloración que producía la exposición de los alcaloides a los vapores de yodo (que se utiliza para revelar la presencia de sustancias orgánicas en CCF), deduciendo que el yodo molecular podría eventualmente reaccionar de una manera específica con los compuestos aporfínicos (Cava *et al.*, 1968). Estos cambios igual fueron observados por la exposición de aporfinas a las condiciones ambientales: luz y aire (Preininger *et al.*, 1969), y con la utilización de otros agentes oxidantes o prooxidantes como cloruro mercúrico, luz ultravioleta, peróxidos y generadores de radicales libres. Al oxidar las aporfinas con alguno de estos agentes, el cambio más característico es la intensa coloración que en muchos casos se produce en las soluciones o en los cromatogramas y que tiene relación con el aumento de la conjugación en la estructura de las aporfinas, ya sea por la aromatización u oxigenación de los anillos B o C (o ambos a la vez) y/o la transformación de las funciones oxigenadas vecinas (grupos hidroxilo y metoxi) en orto-quinonas, como se discute más adelante (Cava *et al.*, 1972).

El primero de los intentos publicados de oxidar la estructura fundamental de la boldina, se realizó sobre la *O,O'*-diacetilboldina con yodo y acetato de sodio en dioxano (Urzúa y Torres, 1982) que condujo al compuesto caracterizado como la 2,9-*O,O'*-diacetil-6a,7-dideshidrobaldina.



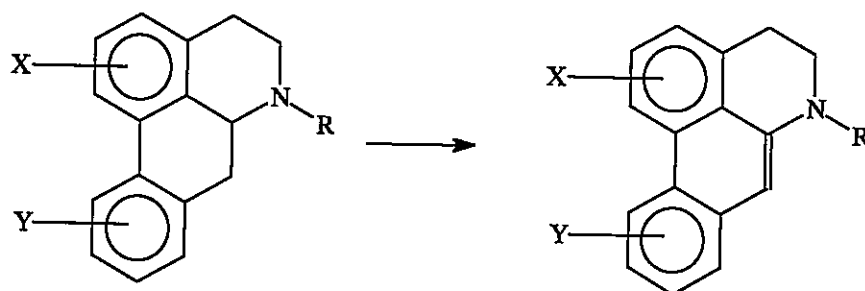
2,9-*O,O'*-diacetilboldina

2,9-*O,O'*-diacetil-6a,7-dideshidrobaldina

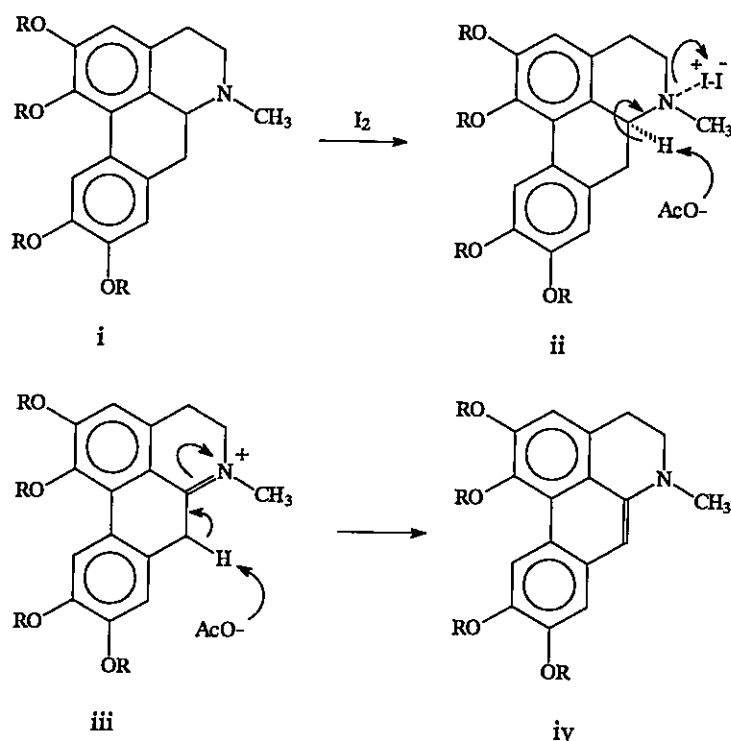
Por otra parte, utilizando la boldina sin protección de los grupos fenólicos, en el presente trabajo se efectuaron oxidaciones utilizando aire, HgCl_2 , radicales hidroxilo generados por una reacción de tipo Fenton o radicales alquilperoxilo generados por termólisis de AAP, controlando en los tres últimos casos el pH de las soluciones de trabajo para simular las condiciones experimentales bajo las cuales se realizaron las evaluaciones de las capacidades antioxidantes de boldina o de sus derivados. Bajo las tres primeras condiciones experimentales (aire, HgCl_2 y HO^\bullet) se logró aislar, aunque con distintos rendimientos, la 6a,7-dideshidrobaldina; mientras que trabajando con radicales libres alquilperoxilo se caracterizó un *bis*-aporfinoide no descrito con anterioridad.

Se ha publicado que una transformación característica que se observa en aporfinas (fenólicas y no fenólicas) cuando se oxidan con yodo, HgCl_2 o aire, es la deshidrogenación del anillo C, lo que produce 6a,7-dideshidroaporfina (Mollov y Dutchewska, 1966; Kupchan *et al.*, 1968; Cava *et al.*, 1972). Dicho proceso ocurriría de

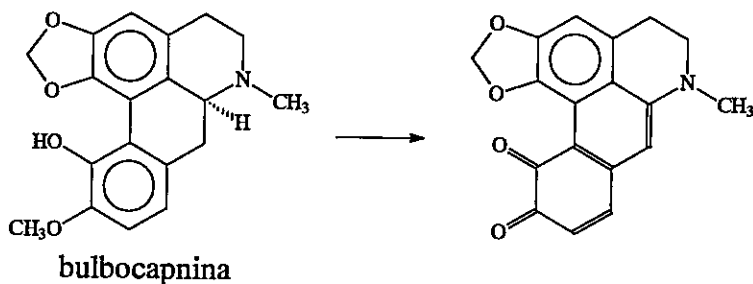
manera más eficiente cuando el oxidante es yodo molecular y el sustrato aporfínico no presenta grupos fenólicos.



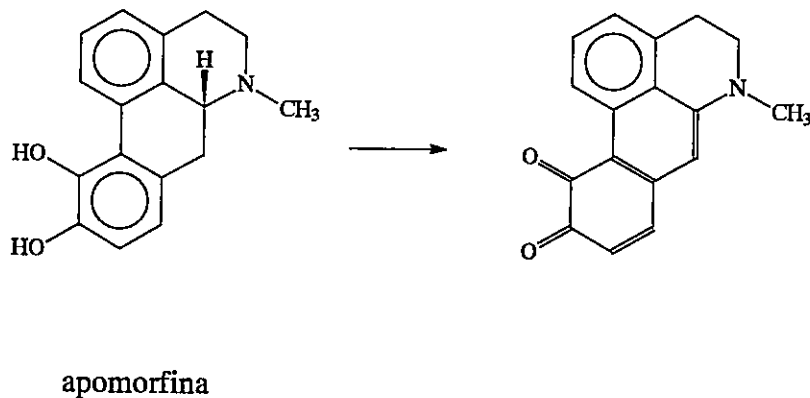
Un mecanismo que se propone para este tipo de transformaciones, cuando se realizan en aporfinas no fenólicas (ejemplificadas con la estructura i) con yodo y acetato de sodio, involucra la formación de un complejo de transferencia de carga entre el nitrógeno y el yodo con la formación de una estructura dipolar (ii). Se supone que el ión acetato sustrae el protón del C-6a, catalizando la formación de un ión iminio (iii). Posteriormente, por la acción de un segundo mol de acetato, se formaría la deshidroaporfina correspondiente (Cava *et al.*, 1972). Este mecanismo no demostrado sirve para explicar la formación de 2,9-*O,O'*-diacetil-6a,7-dideshidrobaldina en las condiciones utilizadas por Urzúa y Torres (1982).



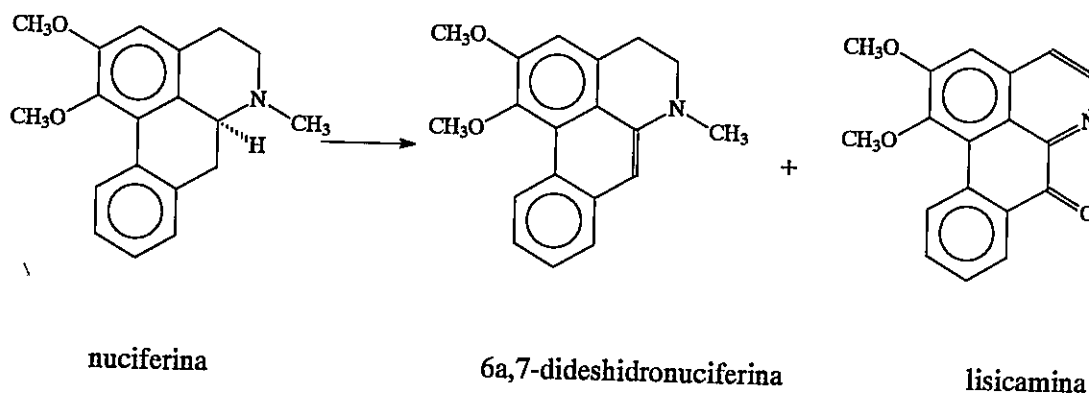
Cuando las aporfinas presentan grupos fenólicos libres, al ser oxidadas con yodo o HgCl_2 estas sustancias sufren dos transformaciones concomitantes: aromatización del anillo C (lo que conduce a las dideshidroaporfinas ya mencionadas) y formación de *orto*-quinonas a través de un proceso que involucra la *O*-desmetilación del grupo metoxilo contiguo al hidroxilo en los casos que no existe esta funcionalidad. Un ejemplo para este tipo de transformaciones lo constituye la bulbocapnina, la cual al ser oxidada con HgCl_2 (pH = 6; calentada a 80 °C, en presencia de aire, por 4 horas, 39 % de rendimiento) o con yodo en dioxano y acetato de sodio (1 hora de reflujo a 80 °C, 9 % de rendimiento) origina la *orto*-quinona correspondiente (1,2-metilendioxi-6a,7-dideshidroaporfina-10,11-quinona) (Cava *et al.*, 1972), tal como se ilustra en el siguiente esquema:



La apomorfina, una aporfina difenólica y catecólica, bajo la acción del HgCl_2 (pH = 6, calentamiento a 70 °C por 30 minutos, 53 % de rendimiento) o de oxígeno molecular (pH = 6, AcONa, 5 días de burbujeo, 11 % de rendimiento), conduce a la formación de la quinona deshidrogenada en el anillo C (Linde y Rabag, 1968).



Utilizando boldina y aire, HgCl_2 o HO^\cdot como agentes oxidantes, se obtuvieron mezclas de productos (junto con boldina no transformada), de las cuales no se pudo aislar ningún tipo de derivado *orto*-quinónico como los citados previamente. Sin embargo sí se aisló y caracterizó en los tres sistemas la 6a,7-dideshidrobaldina con distintos rendimientos (15, 60 y 30 % para aire, HgCl_2 y HO^\cdot , respectivamente), recuperándose boldina no transformada. La oxidación con aire de la boldina en etanol (efectuado sin control de la acidez del medio) se realizó por burbujeo del gas durante cinco días, luego de lo cual la mezcla de productos fue fraccionada permitiendo el aislamiento de la 6a,7-dideshidrobaldina como producto principal. Uno de los raros casos que se informa en la literatura científica (Cava *et al.*, 1972) respecto a la autoxidación de aporfina corresponde al de la nuciferina (no fenólica), la cual fue oxidada durante 15 días bajo corriente de oxígeno (con el alcaloide disuelto en *ter*-butanol y diluido con tampón MacIlvain de pH = 6, temperatura ambiente), produciendo dideshidronuciferina (33 %) y lisicamina (4%).

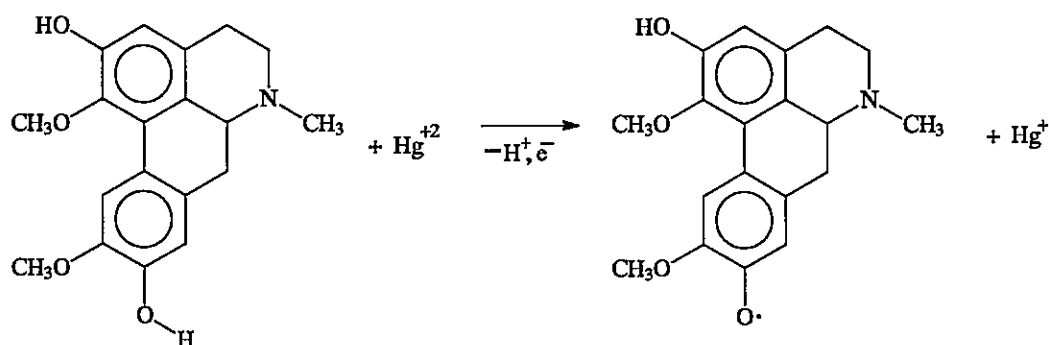


A pesar de que la nuciferina es una aporfina no fenólica, los resultados obtenidos con la boldina están de acuerdo al menos en lo que se refiere a uno de los tipos estructurales que se esperaba obtener. Sin embargo, factores como el pH de la solución y el tiempo de exposición a la corriente de aire pueden haber influido en el hecho que no se lograra aislar productos más oxidados a partir de la boldina. Un interesante trabajo que existe en la literatura con respecto a la capacidad desactivante de oxígeno singulete de la boldina y la glaucina (Zanocco *et al.*, 1997) señala que son dos los mecanismos por los cuales la boldina interacciona con el oxígeno singulete: por desactivación física

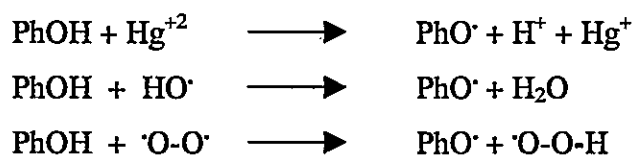
("quenching") y por reacción química, siendo esta última vía la que conduce a productos con un 5 % de rendimiento en las condiciones utilizadas, los cuales no fueron caracterizados. Las experiencias realizadas permiten proponer estructuras que podrían compararse con los resultados obtenidos utilizando oxígeno singulete, las que no necesariamente son semejantes pero sirven de punto de partida para futuros trabajos. A pesar de esto, nuestra experiencia con la boldina estaría de acuerdo con la hipótesis de que la primera etapa de oxidación de las aporfínas puede involucrar la aromatización del anillo C, a lo menos cuando no existe una estructura catecólica.

Por otra parte, la utilización de HgCl_2 (pH = 7,4; 37 °C), y de HO^\cdot (pH = 7,0; 37 °C) como agentes oxidantes, permitió aislar nuevamente la 6a,7-dideshidrobaldina desde mezclas de productos: boldina sin reaccionar y otras sustancias minoritarias de menor Rf que el producto deshidrogenado que no pudieron ser caracterizadas. Los mayores rendimientos obtenidos en estas experiencias se atribuyen a la mayor temperatura de trabajo y a la acidez del medio, que en otros casos análogos favorecería la formación del producto oxidado (Cava *et al.*, 1972), en comparación a las condiciones de trabajo utilizadas en la oxidación con aire. Por otra parte, los datos informados en la literatura muestran que los rendimientos en nuestras experiencias son menores que los que se registran con otros alcaloides aporfínicos, lo que se puede atribuir a las condiciones más energéticas con que se realizan las otras oxidaciones, comparadas con las realizadas aquí con la boldina. En los reportes de la literatura la mayor parte de las experiencias involucraron mayores temperaturas y tiempos de reacción (por ejemplo, 4 horas de calentamiento hasta 80 °C de una solución de bulbocapnina para oxidarla en sus productos respectivos), condiciones a las cuales no fue sometida la boldina, ya que se intentaba simular las condiciones experimentales (temperatura y tiempo de reacción) en las cuales ésta o sus derivados fueron evaluados como antioxidantes.

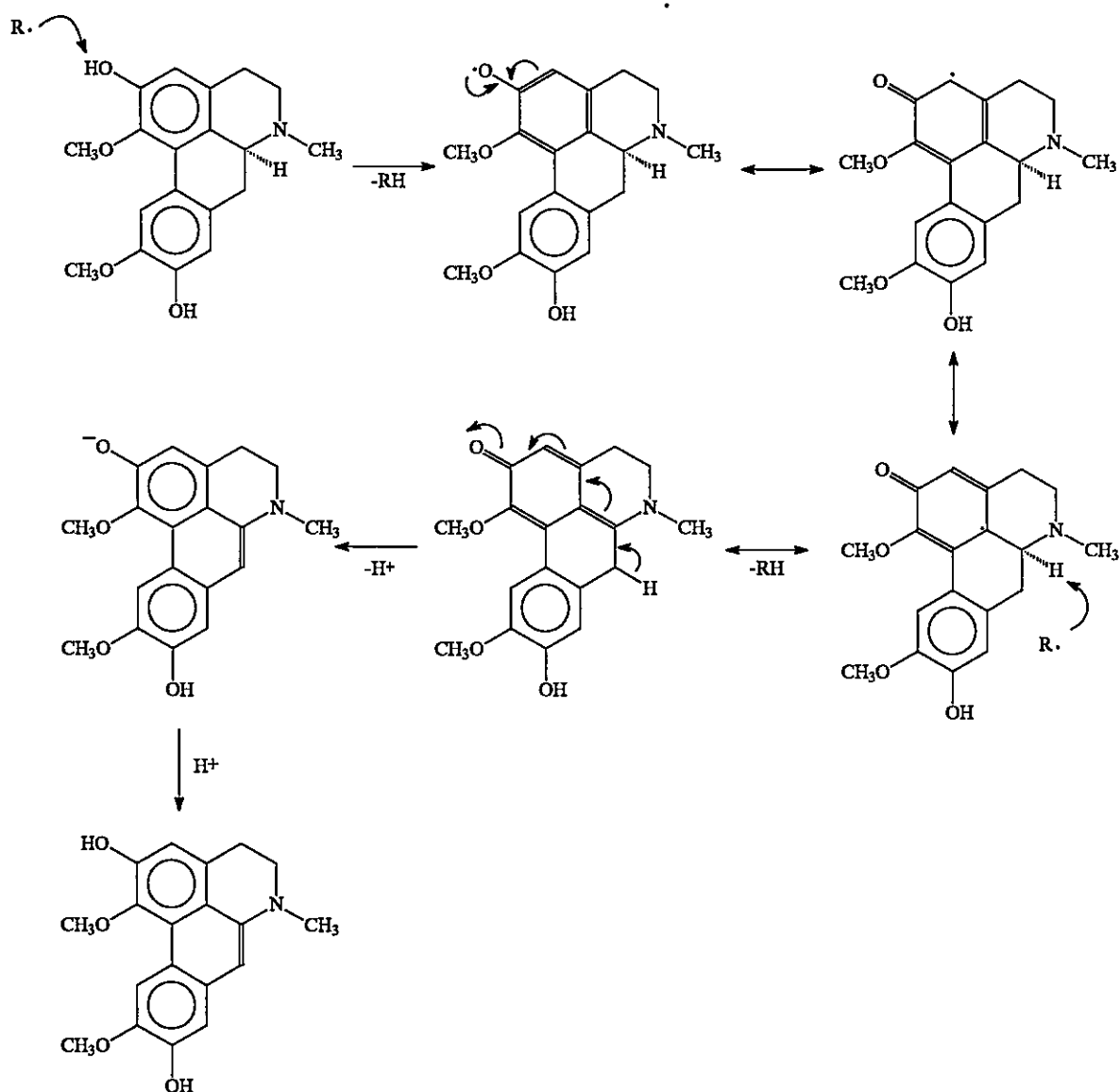
Para la oxidación con HgCl_2 se puede proponer un mecanismo de transferencia electrónica (reducción del Hg^{+2} a Hg^+ con la pérdida de un electrón y un protón desde una posición fenólica de la boldina y generación de un radical boldinoxilo, como se muestra en la siguiente figura para el C-9-OH), semejante al que se plantea a través de un mecanismo no radicalario para el yodo molecular (Cava *et al.*, 1972) pero actuando sobre el átomo de nitrógeno de las aporfínas.



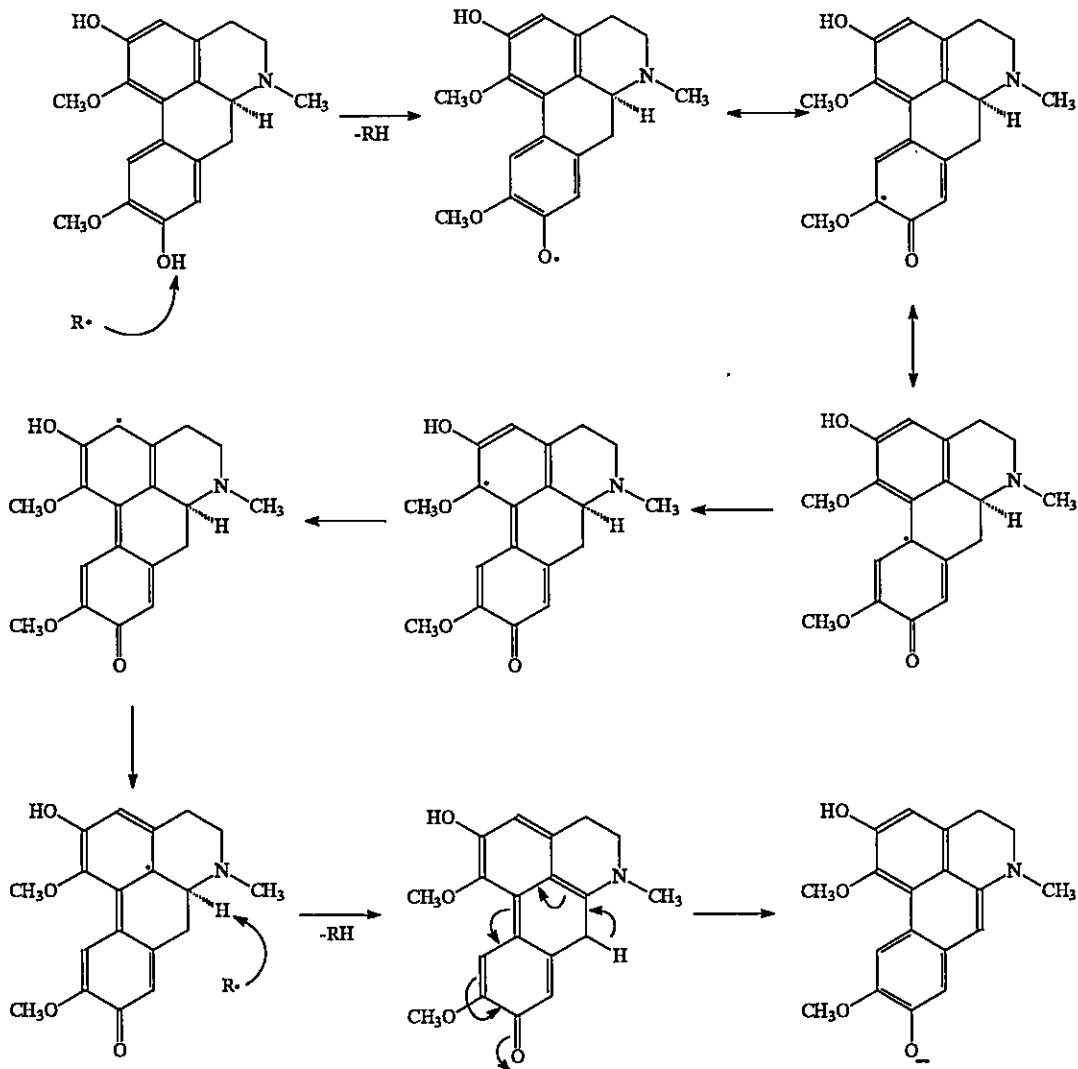
Para las oxidaciones con un sistema de Fenton o con aire, se puede proponer una sustracción directa de un átomo de hidrógeno fenólico por radicales HO[•] (con formación de agua y un radical boldinoxilo, PhO[•])



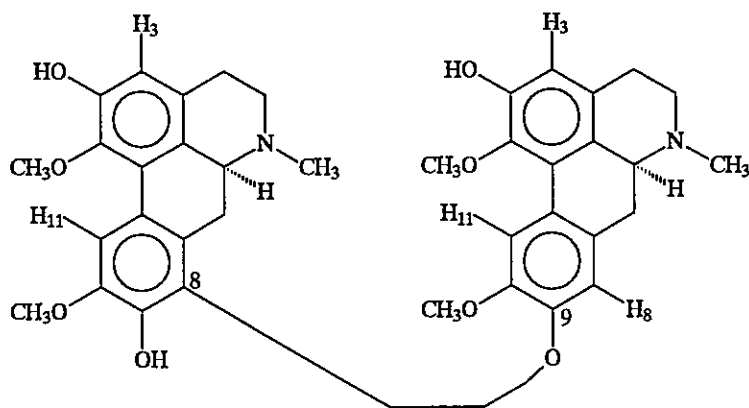
La formación de la 6a,7-dideshidrobaldina ocurriría a través de un proceso de sustracción sucesiva de dos átomos de hidrógeno de la estructura de la boldina: uno fenólico y otro desde la posición C-6a. La secuencia se iniciaría, como es habitual en los fenoles, con la sustracción de un átomo de hidrógeno fenólico produciendo un radical centrado sobre un átomo de oxígeno por ataque al 2-OH o 9-OH. Las estructuras canónicas de resonancia respectivas dan cuenta de la deslocalización de espín en el anillo A de la estructura aporfínica en el caso de la sustracción del hidrógeno del 2-OH y sobre todo el sistema bifenílico en el caso de la sustracción del hidrógeno del 9-OH. En una segunda etapa del proceso de oxidación se sustraería un segundo átomo de hidrógeno (de acuerdo a nuestra hipótesis, el sustentado por el C-6a) generando una estructura *para*-quinonoide conjugada (A). La generación de un sistema aromático más conjugado (fenantrénico), se explicaría mediante una tautomerización involucrando una desprotonación del carbono metilénico C-7 y la protonación del oxígeno carbonílico que produciría la 6a,7-dideshidrobaldina, como se muestra en el siguiente esquema.



Similares especulaciones mecanísticas podrían proponerse para la formación de la dideshidrobaldina si la sustracción del hidrógeno de la función fenólica sobre el C-9 fuese la reacción inicial. Aunque esta vía podría ser más probable, dada la mayor estabilidad esperada para el radical 9-O-boldinoxilo, más deslocalizado, el resultado final sería el mismo.



Por su parte, las oxidaciones realizadas con 2,2'-azo-bis-amidinopropano condujeron a la obtención de un par de productos separables cromatográficamente, uno de los cuales (el minoritario) no ha sido identificado, donde se descartó la 6a,7-dideshidroboldina ya que ninguna de las manchas de la mezcla de reacción total se alineó con esta sustancia al analizarla en CCF. Al compuesto mayoritario, sin embargo, en base de la interpretación de sus espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C de una y dos dimensiones (HMOC y HMBC), se le ha asignado la estructura de un *bis*-aporfinoide: 8-(9-*O*-boldinoxi)boldina, un compuesto no descrito hasta ahora en la literatura.

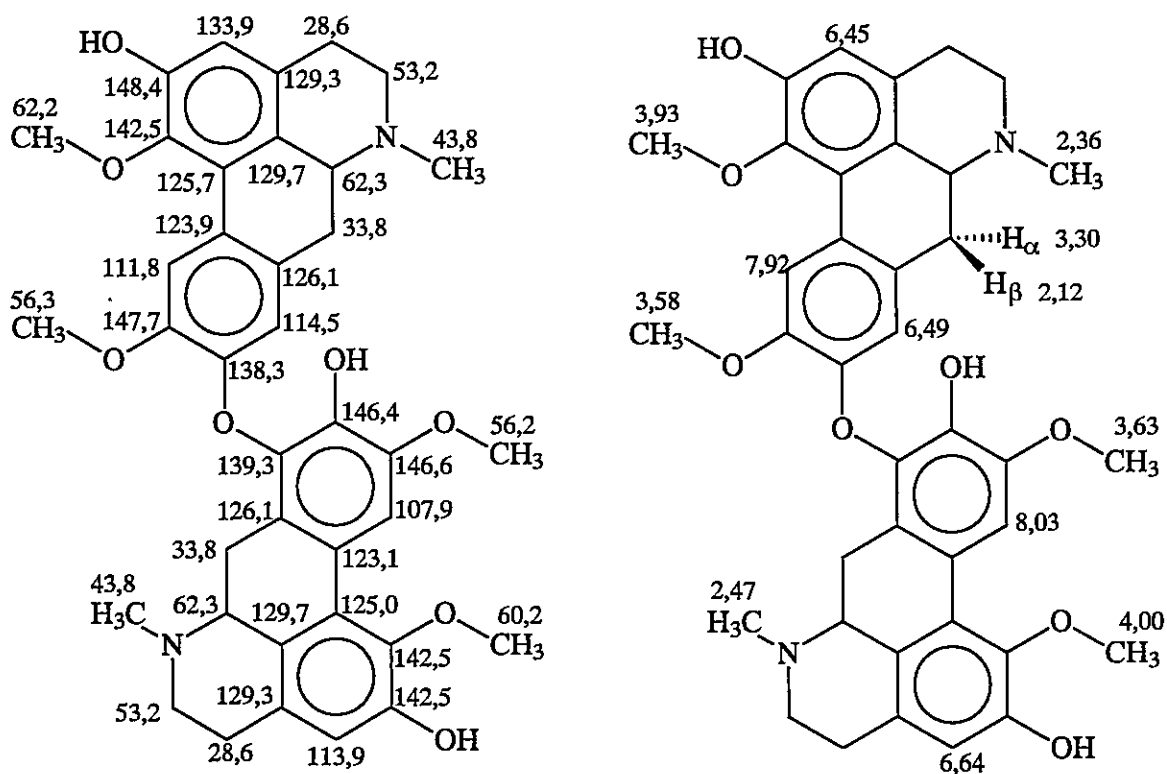


Uno de los primeros indicios que revelan la naturaleza dimérica del compuesto aislado, es la presencia de señales duplicadas en el espectro de RMN-¹H, correspondientes a los grupos *N*-metilos ($\delta = 2,34$ y $2,45$), dos pares de grupos metoxilos ($\delta = 3,6-3,61$ y $3,92-3,99$, los primeros unidos supuestamente a los C-1 y los restantes a los C-10), y los protones que resuenan a bajo campo, unidos supuestamente a los C-11 ($\delta = 7,91$ y $8,03$). Otras tres señales correspondientes a protones unidos a los anillos aromáticos ($\delta = 6,44$; $6,49$ y $6,62$) se pueden asignar a las posiciones C-3 y C-8, indicando la ausencia de una cuarta señal la posición del puente de unión del dímero (C-3 o C-8). El espectro de RMN-¹³C indica la presencia de 34 señales de las 38 esperadas para un dímero y tal como en el espectro de RMN-¹H se observa que la mayoría de las señales características (carbonos de anillos aromáticos y ciclo-alifáticos, *N*-metílicos y *O*-metílicos) se encuentran duplicadas y mantienen sus desplazamientos con variaciones que oscilan en el rango de 0,2-0,3 ppm con respecto al espectro de RMN-¹³C de la boldina. Una característica particular que se ha observado en el espectro de RMN-¹³C de la boldina y compuestos relacionados es que las resonancias metoxílicas (1-OCH₃ y 10-OCH₃) aparecen, - a pesar del entorno similar que tienen en estas estructuras -, con diferencias cercanas a 4 ppm. Aunque el desplazamiento observado se produce en el sentido opuesto al que se ve en el espectro de RMN-¹H, la resonancia del ¹³C del 1-OCH₃ a campo más bajo que lo habitual también se explicaría por el efecto anisotrópico del anillo A sobre dicho carbono, forzado a permanecer fuera del plano del anillo (a diferencia de la mayoría de los grupos metoxilo unidos a anillos aromáticos) por la

compresión estérica entre el sustituyente del C-2 y el del C-11. Efectos análogos son bien conocidos en las señales de RMN-¹H y RMN-¹³C de los grupos metoxilo centrales de los sistemas aromáticos 1,2,3-trimetoxilados, que no son infrecuentes en productos naturales. Esta explicación está avalada por un trabajo cristalográfico sobre el clorhidrato de boldina (Asencio *et al.*, 1993) que demuestra que en el cristal el 1-OCH₃ se desarrolla hacia "arriba" del plano del anillo A (en sentido opuesto al enlace estereogénico C-6a-H), mientras que el núcleo de carbono del 10-OCH₃ se encuentra casi exactamente en el plano del anillo D. Los grupos metoxilos que se detectan en el dímero presentan en la región característica del espectro de RMN-¹³C un par de señales gemelas atribuibles a los 1-OCH₃ ($\delta = 60,23$ y $60,43$) y otras dos a más alto campo correspondientes a los 10-OCH₃ ($\delta = 56,17$ y $56,34$).

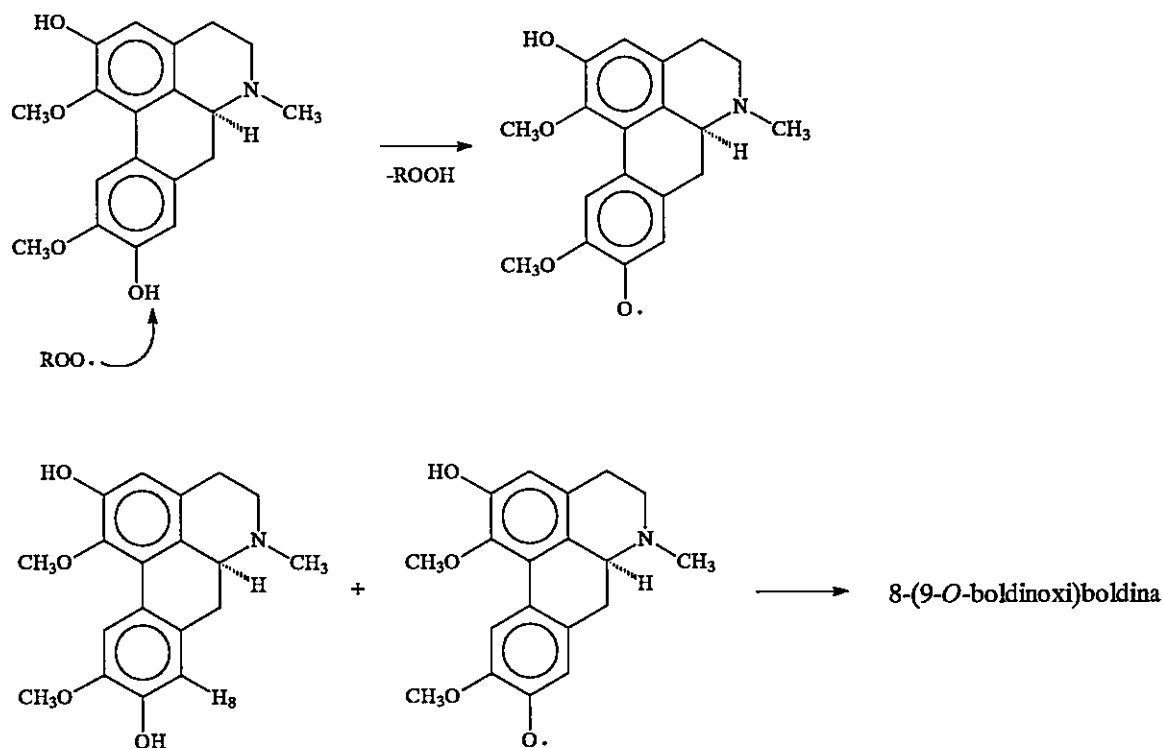
Los protones fácilmente identificables de los 1-OCH₃ ($\delta = 3,58$ y $3,63$) muestran una correlación a larga distancia (HMBC) con una única señal a $\delta = 142,7$ (y por lo tanto atribuible a ambos C-1), la que a su vez muestra dos claras interacciones (HMBC) con las resonancias de dos protones a $\delta = 6,49$ y $6,62$ (lo que permite asignarlas de manera inequívoca a los protones unidos a los C-3). De la misma forma las señales de los protones de los 10-OCH₃ ($\delta = 3,93$ y $4,00$) se correlacionan (HMBC) a su vez con un par de señales de ¹³C a $\delta = 146,6$ y $146,7$ respectivamente (atribuibles a ambos C-10). De estas últimas, la señal a más alto campo ($\delta = 146,6$) muestra una correlación a 3 enlaces con la del protón unido a un anillo aromático que resuena a $\delta = 6,45$ (y por lo tanto éste debe ser el único protón de la molécula unido a un C-8). Otra correlación, esta vez a dos enlaces, se establece entre la resonancia de este último protón y una que aparece a $\delta = 146,4$ (atribuible al único otro carbono del anillo D que puede resonar a este campo por estar oxigenado, el C-9), lo que se corrobora debido a que la señal del C-9 tiene una interacción (HMBC) con la del H-11 de más bajo campo ($\delta = 8,03$). Por su parte el otro H-11 ($\delta = 7,91$) muestra un par de interacciones a 3 y 2 enlaces con las resonancias ubicadas a $\delta = 138,3$ y $146,5$, respectivamente. La resonancia a $146,5$ se había asignado previamente a uno de los C-10, por lo que la segunda corresponde al C-9 de la segunda unidad monomérica, desplazada a alto campo producto, hipotéticamente, del cambio del tipo enlace que sustenta: de uno fenólico a uno de difeniléter (fragmento 9-boldinoxi),

que lo sujetaría al efecto anisotrópico del anillo D de la otra unidad monomérica. De las cuatro señales de ^{13}C que aparecen a más alto campo, dos apenas resueltas ($\delta = 28,60$ y $28,61$, atribuidas por consiguiente a los C-4) muestran correlaciones (HMBC) con las señales de los H-3 ($\delta = 6,49$ y $6,62$). Sólo una de las señales correspondientes a los C-7 ($\delta = 33,78$) tiene una interacción a largo alcance con el protón unido al C-8, indicando que corresponde a la porción monomérica que se une a través del oxígeno del C-9. Por lo tanto, la señal adicional ($\delta = 26,80$) corresponde al C-7 de la subunidad sustituida por el grupo 9-boldinoxi en el C-8. Este último núcleo de carbono presenta un par de interacciones de corto alcance (a un enlace; HMQC) con un par de resonancias de RMN- ^1H a $\delta = 2,12$ (tripleto, 1H) y $3,30$ (doblete de dobletes, 1H) que se deben atribuir entonces a los correspondientes hidrógenos metilénicos (las únicas señales con una resolución adecuada de la porción cicloalifática, con desplazamientos químicos muy diferentes atribuibles a la proximidad del sistema aromático de la otra mitad del dímero). Ambos protones unidos a este C-7 presentan a su vez una interacción con un núcleo que resuena a $\delta = 139,3$ ppm, señal que se atribuye al C-8, y que se encuentra desplazada de manera considerable debido al oxígeno de un puente éter que se formaría con el residuo 9-O-boldinoxi. La posición de la señal del C-8 no sustituido ($\delta = 114,5$) como también las de los C-11 ($\delta = 107,9$ y $111,8$) y C-3 (2 x $113,9$), se identifican directamente debido a sus interacciones a un enlace (HMQC) con los protones del sistema aromático que resuenan a más alto campo ($\delta = 6,44$; $6,49$, $6,62$; H-3, H-3' y H-8, respectivamente). En base a estos datos se asignó completamente el espectro a la estructura del bis-aporfinoide 8-(9-O-boldinoxi)boldina.



Se citan unos pocos compuestos diméricos de este tipo en la literatura, al igual que dímeros obtenidos de antioxidantes particularmente de flavonoides (Jorgensen *et al.*, 1999). Entre los derivados bencilisoquinolínicos se encuentra los 7,7'-bis-aporfinoïdes aislados desde la planta *Unonopsis pacifica* (Arango *et al.*, 1988), los cuales se postula se formarían a través de un proceso de acoplamiento oxidativo. Las uniones típicas entre ambos monómeros es C-C; aunque se reportado a los menos 15 estructuras diméricas que contienen, sin embargo, monómeros distintos (aporfina-bencilisoquinolina aislados de plantas del género *Berberis*, *Hernandia*, *Polialthia* y *Thalictrum* (Guinadeau *et al.*, 1984). Más recientemente se ha aislado de *Thalictrum wangii* (Al-Howirini *et al.*, 2001) un alcaloide dimérico constituido por una unidad protoberberínica y una aporfínica, la Talibealina, siendo el único compuesto de éste tipo de se encuentra unido a través de un puente difeniléter como el dímero de la boldina caracterizado en este trabajo. La obtención de este tipo de estructuras por medios no enzimáticos, como se hubiera esperado, pasa por la utilización de agentes oxidantes como el I₂, HgCl₂ y la *N*-clorosuccinimida (Jössang *et al.*, 1987). Sin embargo, estos productos naturales tienen

sus dos mitades aporfínicas unidas a través de un enlace C-C, mientras que el producto de oxidación de la boldina obtenido en el presente trabajo tiene una unión C-O-C. La racionalización de la formación de la 8-(9-O-boldinoxil)-boldina bajo las condiciones descritas en la parte experimental se postula bajo consideraciones similares a las propuestas para explicar la formación de la 6a,7-dideshidroaporfina. Los radicales libres generados por el proceso de termólisis aeróbica de AAP producirían radicales peroxilo, los que a su vez sustraerían un átomo de hidrógeno fenólico de la boldina generando un radical que se estabilizaría por deslocalización a través del sistema bifenílico. Las posiciones 3 y 8 son las únicas que, portadoras de altas densidades de espín, no presentan un impedimento estérico apreciable y en consecuencia son potencialmente las más reactivas para con un radical libre centrado en el oxígeno del C-2 o del C-9 derivado de una segunda molécula de boldina, produciéndose acoplamiento fenólicos oxidativos en el sentido postulado por Barton y Cohen (1957). Alternativamente, un radical boldinoxilo (centrado en el oxígeno del C-2 o del C-9) podría atacar una segunda molécula de boldina en el C-3 o el C-8 para dar un intermediario radicalario que debería perder un átomo de hidrógeno en una segunda etapa para generar el producto aromático final.



Bajo estas especulaciones se podrían formar eventualmente, aparte de la 8-(9-O-boldinoxi)boldina, la 8-(2-O-boldinoxi)boldina (A), la 3-(9-O-boldinoxi)boldina (B) y la 3-(2-O-boldinoxi)boldina (C). En consecuencia la formación preferencial de la 8-(9-O-boldinoxi)boldina puede atribuirse al ataque de un radical 9-O-boldinoxilo sobre una molécula de boldina o sobre un segundo radical 9-O-boldinoxilo, que tiene una alta densidad de espín en el C-8, descartando el ataque radicalario sobre C-3 (alternativas B y C) debido en parte al efecto estérico del grupo metoxilo sobre el C-1, el cual se encuentra fuera del plano del anillo y dificultaría el acercamiento del radical libre voluminoso derivado de la boldina. Como ya se ha señalado, se espera que el radical 9-O-boldinoxilo se forme preferencialmente debido a su mayor deslocalización de espín en todo el sistema bifenílico. El impedimento estérico mencionado sobre el C-3 no se da en el C-8 debido a que el grupo metoxilo unido al C-10 se encontraría la mayor parte del tiempo oscilando cerca del plano del anillo D y orientado hacia el C-11. El mismo razonamiento basado en la orientación del metoxilo unido al C-1 vale para justificar la

menor reactividad de un posible radical 2-*O*-boldinoxilo que podría originar los productos A y C.

4.3 Determinación del coeficiente de reparto.

Se sabe que la boldina es mal absorbida por vía oral y que se excreta rápidamente como glucurónido (Jiménez y Speisky, 2000). Dos aproximaciones a la superación de estos inconvenientes desde el punto de vista de una eventual administración de boldina o algún derivado suyo como fármaco se basan en la modificación estructural del alcaloide, esperando que los eventuales derivados de boldina tendrán una bio-disponibilidad más favorable, ya sea por una menor susceptibilidad a la transformación metabólica y/o una absorción más eficiente desde el tubo digestivo si se considerara una administración oral. Aunque las membranas biológicas no son todas iguales, en su mayoría tienen un carácter predominantemente lipídico; en consecuencia la velocidad de penetración de un fármaco en una membrana a través de un proceso pasivo (no facilitado ni mediado por transportadores) depende del coeficiente de reparto entre ésta y la fase acuosa vecina. El pasaje de xenobióticos a través de las membranas de la mucosa bucal o nasal, del epitelio gastrointestinal, de la vagina, del recto, de la piel, de los pulmones, la absorción de inyectables así como también el ingreso de fármacos al sistema nervioso central está relacionado en gran medida con sus lipofilias definidas, por conveniencia (ya que no existen modelos de utilidad práctica que simulen optimamente la complejidad de una membrana biológica), como el logaritmo decimal de su coeficiente de reparto entre una fase orgánica de baja polaridad y una fase acuosa:

$$K_{rep} = P = [S]_{org} / [S]_{ac}$$

$$\log P = \log [S]_{org} - \log [S]_{ac}$$

Donde

$[S]_{org}$ = concentración del compuesto en la fase orgánica (habitualmente *n*-octanol) y

$[S]_{ac}$ = concentración del compuesto en la fase acuosa (habitualmente tampón de fosfato, pH = 7,4).

Muchos fármacos son ácidos o bases más o menos débiles y por lo tanto en solución existen bajo formas iónicas y no iónicas. El grado de ionización depende del pH del medio y de la constante de disociación del xenobiótico (expresada generalmente como pK_a). En el caso de la boldina y los derivados ensayados, se trabajó a un $pH = 7,4$ (pH del plasma sanguíneo) por lo que la constante de reparto determinada corresponde a la fracción de los compuestos que no se encontraba ionizada y entrega, por lo tanto, una medida de la lipofilia aparente ($\log K_{rep}$). Los resultados obtenidos en esta etapa del trabajo en relación con las modificaciones efectuadas sobre la estructura de la boldina muestran cambios (aumento o disminución) en la lipofilia con respecto a aquella medida para la boldina ($\log K_{rep} = 0,78$).

aporfina	Log K_{rep}	π_{Fujita}
3-yodoboldina	1,88	1,12
8-nitrosoboldina	1,56	
3-bromoboldina	1,23	0,86
3-cloroboldina	1,19	0,71
<i>O,O'</i> -dipivaloílbaldina	1,18	
glaucina	0,95	0,56 (x2)
predicentrina	0,79	0,56
boldina	0,78	-
8-aminoboldina	0,36	-

En cada caso se calculó la contribución parcial (π) de cada átomo o grupo modificante a la lipofilia total y se comparó estos resultados con los informados en la literatura (π_{Fujita}) (Fujita, citado en Hansch y Leo, 1996) para derivados del benceno. Un par de cambios muy notorios de la lipofilia se producen por la incorporación de un grupo hidrofílico en la boldina, como en el caso de la 8-aminoboldina ($\log K_{rep} = 0,36$), o por el bloqueo de las funciones fenólicas del alcaloide, que en estos casos aumentan la lipofilia. Un ejemplo de este último comportamiento sirve para racionalizar los resultados obtenidos al medir las lipofilias de dos productos no fenólicos: la glaucina (2,9-*O,O'*-dimetilboldina; 0,95) y la 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina (1,18), atribuyéndose el mayor valor de lipofilia para el producto diesterificado al bloqueo de las funciones polares por

el grupo éster y a la interacción más favorable de ambos grupos *ter*-butilos con el solvente orgánico.

Sin bloquear las funciones fenólicas, la sustitución de uno de los hidrógenos unidos a anillos aromáticos por cualquier grupo menos el NH₂ produjo por su parte un aumento de la lipofilia, tanto al introducir un átomo del grupo VII en la estructura aporfínica para generar las 3-cloro-, 3-bromo- y 3-yodoboldinas (1,19; 1,23 y 1,88; respectivamente) o un grupo nitroso para dar 8-nitrosoboldina (log *D* = 1,56). Con respecto a los derivados halogenados, dos factores parecen influir en el aumento de la lipofilia al aumentar el número atómico del sustituyente: la disminución de la electronegatividad (que hace disminuir el carácter polar del enlace C-X) y la talla del átomo de halógeno; ambos factores contribuirían a una mayor interacción hidrofóbica con la fase orgánica y por lo tanto aumentarían el traspaso (lo que es más evidente en el compuesto yodado) hacia la fase orgánica.

Por otra parte y para establecer una correlación cuantitativa entre las modificaciones realizadas en la estructura de la boldina tal como se señaló más arriba, se calculó la contribución de grupo o átomo introducido (π) y se comparó este dato con aquellos informados en la literatura (π Fujita, Hansch y Leo, 1996). Las tendencias observadas en nuestras experiencias están de acuerdo con aquellas informadas en la literatura para sistemas aromáticos simples pero, salvo en el caso de la 3-yodoboldina, los valores de π calculadas en este trabajo son menores que las que se registran en la literatura científica. Esto obliga a considerar qué características estructurales propias de la boldina podrían incidir en la lipofilia medida para sus derivados. En la serie de los derivados halogenados de la boldina en el C-3 con Cl, Br o I (π = 0,41; 0,45 y 1,10 respectivamente) se observa un aumento de la lipofilia en función del número atómico, pero que no alcanza la magnitud que se informa en trabajos con sistemas aromáticos halogenados sencillos (π = 0,71; 0,86 y 1,12 respectivamente) (Hansch, 1996), especialmente para Cl y Br. A este punto es preciso señalar que la lipofilia de un compuesto no está dada solo por la suma de las contribuciones de los grupos introducidos, sino depende también de contribuciones estéricas y polares (El Tayar *et al.*, 1993), las que se resumen en la ecuación siguiente:

$$\text{Log } P = aV - \Lambda$$

donde V es el volumen molar (relacionado con la contribución estérica) que puede ser calculado teóricamente y Λ se obtiene indirectamente a partir de datos de $\log P$, siendo $\Lambda = 0$ para compuestos no polares. En el caso de la boldina, un factor dominante en las menores contribuciones de los grupos introducidos parece estar relacionado con el volumen molar (V) y la superficie activa que ofrece la molécula en su interacción con el solvente (particularmente el n -octanol). Las diferencias entre los datos para sistemas aromáticos simples y para los derivados halogenados de la boldina, se podría atribuir entonces al hecho que en estos compuestos el átomo de halógeno se encuentra casi sumergido (es decir estéricamente bloqueado) entre el grupo hidroxilo del C-2 y los átomos de hidrógeno del grupo metileno vecino en C-4, lo que dificulta su interacción con el solvente orgánico de manera muy marcada cuando la talla de este sustituyente es más pequeña; en el caso del yodo, el sustituyente sería lo suficientemente voluminoso para emerger de la cavidad que genera su entorno molecular, asemejándose su interacción con el solvente a la que se encuentra en derivados aromáticos yodados que no presentan las características particulares del C-3 de las aporfinas sustituidas en C-1 y C-2.

El sistema n -octanol-tampón es a menudo tomado como referencia para el cálculo de los coeficientes de reparto. Sin embargo otros sistemas de partición pueden ser modelos útiles para generar información acerca de los sistemas biológicos y las interacciones específicas que se espera lograr con un determinado compuesto. En este sentido se ha recomendado el uso de un "tetra-sistema" de solventes para simular el comportamiento de una membrana biológica a través de la utilización de diferentes solventes: alcanos (inertes), n -octanol (anfiprótico), cloroformo (dador de protones) y dipelargonato de propilenglicol (aceptor de protones) (Leahy *et al.*, 1991). También se ha propuesto que las diferencias de $\log P$ entre dos diferentes sistemas de solventes pueden ser útiles para obtener información relevante sobre la capacidad de un determinado sustrato para, por ejemplo, formar puentes de hidrógeno (van de Waterbeemd *et al.*, 1992). En la práctica, las lipofilias de series de compuestos son a menudo estimadas utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), debido a que esta

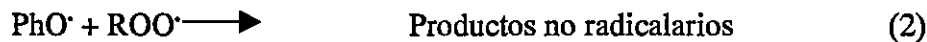
técnica es mucho más rápida que el tradicional método de medida del reparto entre *n*-octanol y una fase acuosa. Sin embargo, en la práctica aparecen problemas asociados a la técnica de RP-HPLC para la determinación de la constante de reparto utilizando mezclas isocráticas (Mimick et al., 1988). Primero los rangos de hidrofobicidad que presentan series de compuestos son más amplios que las capacidades dinámicas de las columnas utilizadas y/o las mezclas de solventes (con o sin modificador como el metanol o acetonitrilo). Adicionalmente los compuestos que son poco o demasiado retenidos bajo una determinada condición de análisis (largos de columna, mezclas de solvente), producen tiempos de retención demasiado cortos o largos para el análisis que no se correlacionan directamente con los coeficientes de reparto medidos por el método clásico. Los tiempos de retención de algunos compuestos hidrofóbicos son a menudo demasiado largos y adicionalmente aparecen un par de problemas característicos. El primero de ellos involucra la posibilidad de la inversión de las bandas cuando se añade al eluyente pequeñas cantidades de modificador (Valkó *et al.*, 1984) lo que modifica los tiempos de retención de los compuestos. Al cambiar las condiciones experimentales para medir tiempos de retención adecuados dentro de una misma serie de compuestos aparece el segundo problema que tiene relación con la imposibilidad de relacionar los tiempos de retención medidos bajo diferentes condiciones para compuestos de una misma serie. A la luz de estos problemas aún la técnica de RP-HPLC es limitada en lo que se refiere a la comparación de los tiempos de retención con los datos obtenidos utilizando los coeficientes en medios líquidos.

4.4 Discusión de la evaluación del comportamiento antioxidante de las aporfinas en diferentes sistemas.

4.4.1 Descoloración de ABTS

Los resultados obtenidos utilizando el método de decoloración de soluciones cromogénicas de ABTS (ácido 2,2'-azo-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) por los diferentes derivados de la boldina y por el antioxidante de referencia (Trolox®) están de acuerdo con los datos reportados en la literatura científica que señalan que compuestos

fenólicos (naturales o sintéticos) son capaces de descolorar estas soluciones (Campos y Lissi, 1997; Valcic *et al.*, 1999). Los fenoles son empleados ampliamente por los organismos vivos y en aplicaciones tecnológicas para proteger componentes celulares o materiales sintéticos susceptibles de la degradación oxidativa (Burton *et al.*, 1986). Esta actividad antioxidante es debida a la habilidad de los fenoles (PhOH) para reaccionar con los propagadores de reacciones en cadena como radicales peroxilos (ROO[•]), lo que produce hidroperóxidos (ROOH) y un radical ariloxilo (PhO[•]), ecuaciones a y b, aunque en algunos casos los radicales fenoxilo formados pueden actuar como propagadores de la cadena radicalaria (Foti *et al.*, 1994)



De acuerdo a los resultados obtenidos con las aporfinas, la presencia de uno o de dos grupos fenólicos en la estructura de estos compuestos implica una actividad descolorante de los radicales libres derivados del ABTS, supuestamente por cesión de un átomo de hidrógeno a éstos (ecuaciones 1 y 2). Modificaciones sobre los anillos aromáticos de aporfinas fenólicas como por ejemplo los derivados halogenados, nitrosados o aminados no alteran en un rango detectable este poder descolorante o "antioxidante", lo que permitiría concluir que este tipo de modificaciones no influyen en esta capacidad. De la misma forma, la cuaternización del átomo de nitrógeno de la boldina no conduce a una disminución de la actividad descolorante de este alcaloide. Como es de esperar, el yoduro de *N*-metilboldinio (con carga permanente) y el grupo amino de la boldina, que bajo las condiciones de pH al cual se realizaron los ensayos debe estar casi totalmente protonado, hacen que las capacidades descolorantes de ambas aporfinas sean de la misma magnitud.

El poder descolorante de las aporfinas fenólicas puede explicarse tentativamente mediante ecuaciones ya propuestas para este tipo de procesos (Campos y Lissi, 1997):





Primero las aporfina fenólicas reaccionan con los radicales libres coloreados del ABTS y descoloran la solución, proceso reversible (ecuación (1)) que no se observa al ensayar los derivados de la boldina, lo que permite decir que dichos compuestos en este ensayo no se comportan como sustancias prooxidantes ya que los nuevos radicales fenoxilo derivados de boldina no vuelven a producir radicales coloreados de ABTS. Los resultados indican que la descoloración permanente de estas soluciones resulta probablemente de la reacción de los nuevos radicales libres fenoxilo (formados a partir de la boldina) con una segunda molécula de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (ecuación (2)) y/o de una reacción entre los mismos radicales como se propone en la ecuación (3).

Recientemente se ha demostrado en similares experimentos de descoloración que por ejemplo el aminoácido tirosina presenta una capacidad descolorante similar a los fenoles simples y que dicha actividad se pierde al metilar el grupo fenólico (Aliaga y Lissi, 2000). En nuestras experiencias similares resultados fueron vistos, ya que los compuestos evaluados que no presentan grupos fenólicos (por ejemplo en el caso de 2,9-*O,O'*-dimetilboldina (glaucina) y 2,9-*O,O'*-dipivaloilboldina o el yoduro de *N*-metilglaucinio) no tienen un poder descolorante en un rango similar a las aporfina fenólicas (1-10 μM). Sin embargo a mayores concentraciones (10-40 μM) se determinó que la glaucina presenta una actividad descolorante significativa (40 % en el rango máximo de concentración), más que los diésteres de la boldina, los cuales son casi completamente inactivos. Una explicación tentativa para estos resultados nos permitió proponer en su oportunidad la participación de los hidrógenos bencílicos, especialmente aquél situado en C-6a (Cassels *et al.*, 1995), lo que permitiría deslocalizar el espín a través del sistema bifenilo. Las diferencias de capacidades descolorante, por su parte, entre los diésteres (diacetil y dipivaloilboldinas) y la glaucina (una dimetoxiboldina) se podría atribuir a la presencia de aceptores de electrones en las posiciones 2 y 9 (acetilo y dipivaloil), cambio que redundaría en una menor estabilidad del radical formado y que disminuiría notoriamente la capacidad descolorante de los ésteres.

El conjunto de los resultados nos permiten sugerir que, en este sistema particular, una débil actividad descolorante puede ser atribuida estructuralmente a la ausencia de grupos fenólicos libres manteniéndose grupos C-H bencílicos potencialmente reactivos, y que la ausencia de esta actividad es más notoria cuando se introduce una carga formal sobre el átomo de nitrógeno (yoduro de *N*-metilglaucinio) reduciendo así la estabilidad del posible radical libre centrado en el C-6a. Finalmente, la comparación entre la boldina y el antioxidante de referencia Trolox® permite afirmar que el poder descolorante es mayor en el producto natural y sus derivados fenólicos. Esta capacidad aumentada puede ser atribuida a la formación de especies derivadas de las aporfinas fenólicas que pueden igualmente reaccionar con otras moléculas de ABTS⁺, semejantes a las que se encontraron en los ensayos de oxidación controlada de la boldina. Así, por ejemplo, se esperaría que la 6a,7-dideshidrobaldina un producto de oxidación de la boldina, tenga igualmente capacidad descolorante y/o antioxidante en otros sistemas ya que mantiene los grupos activos (fenoles) intactos y cuenta con un sistema aromático más conjugado que la boldina (fenantrénico) y más capaz de estabilizar un radical libre formado a partir de cualquiera de los grupos hidroxilos.

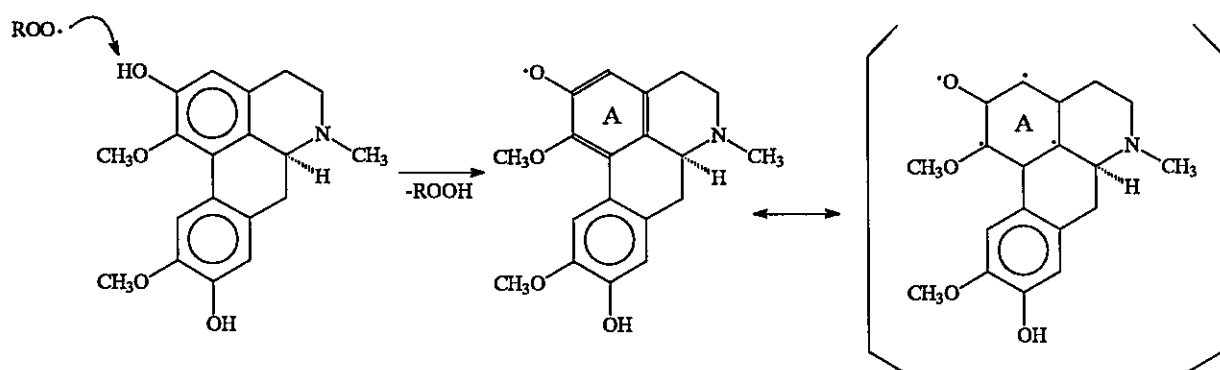
4.4.2 Protección de lisozima por aporfinas

El daño a proteínas es uno de los eventos asociados con el estrés oxidativo que es ampliamente reconocido (Lissi y Faure, 1993). Incluso algunos artículos señalan que la modificación de proteínas precede frecuentemente a la oxidación lipídica y es más difícil de inhibir que ésta, que constituye el clásico proceso asociado con la toxicidad de la acción de radicales libres en sistemas biológicos (Rice-Evans *et al.*, 1995). Se ha descrito (Lissi *et al.*, 1991) que la inactivación de lisozima causada por radicales producidos por la termólisis de 2,2'-azo-bis-amidinopropano (AAP) puede prevenirse por la adición de diferentes compuestos que pueden reaccionar con los radicales libres. Compuestos de alta reactividad (galato de propilo, trolox®, ácido ascórbico o cisteína) producen una protección total hasta el momento de su consumo resultando en tiempos de inducción bien definidos (es decir que mantienen la actividad enzimática cercana a un 100 %) en períodos cortos de tiempo. Sin embargo, productos de mediana reactividad o

que generan productos de oxidación que se sospecha pueden presentar actividad antioxidante, no presentan tiempos de inducción bien definidos y la caracterización a través de éste parámetro no es posible (Cassels *et al.*, 1995). En nuestras experiencias se evaluó la acción de algunas aporfinas derivadas de la boldina en períodos de tiempos mayores (hasta 120 minutos) para evaluar su efecto protector en función del tiempo.

La mayor parte de los derivados aporfínicos parecerían ser capaces de prevenir el proceso de inactivación de la lisozima bajo las condiciones de trabajo utilizadas. Al igual que en las experiencias de descoloración de soluciones de ABTS, el rasgo estructural dominante asociado a efectos protectores relevantes es la presencia de grupos fenólicos libres en las aporfinas, lo que está de acuerdo con los datos reportados en la literatura (Lissi *et al.*, 1991). En efecto, la mayor parte de estos compuestos son capaces de prevenir el proceso de inactivación de la lisozima, particularmente los derivados sustituidos con átomos de halógeno sobre C-3. Los derivados no fenólicos como la glaucina muestran una capacidad protectora inferior a aquellas determinadas para los derivados fenólicos. En estas experiencias se evaluó la acción protectora de antioxidantes de referencia como trolox y *ter*-butilhidroxitolueno (BHT) que resultó ser menos potente (medida por los correspondientes $t_{1/2}$) en comparación a un número importante de los derivados fenólicos de las aporfinas ensayadas, hecho que esta de acuerdo con los informado para boldina (Speisky *et al.*, 1991). El bloqueo selectivo de un grupo fenólico de la boldina produce una disminución de la acción protectora, lo que puede estar relacionado con la mayor estabilidad de un radical formado sobre el hidroxilo de C-9. El hecho que existan diferencias significativas entre los dos derivados monometilados se atribuye parcialmente a la diferente capacidad de estabilizar el radical fenoxilo generado por cada molécula, ya que un radical centrado sobre el átomo de oxígeno del C-9 (derivado de 2-*O*-metilboldina o *N*-metillaurotetanina) puede deslocalizar el espín sobre un sistema bifenilo, mientras que la sustracción del átomo de hidrógeno en C-2 (generando un radical libre derivado de la 9-*O*-metilboldina o predicentrina) puede solo ser estabilizado por el anillo aromático A de la estructura aporfínica, lo que se traduce en una menor capacidad antioxidante en este sistema, tal como se muestra en el siguiente esquema para la predicentrina, donde en la estructura A

se señalan con puntos los sitios donde se espera que se deslocalice el espín electrónico del radical libre.



Estructura A

En los comienzos de nuestros estudios de relaciones estructura-actividad antioxidante de aporfinas, se propuso un posible mecanismo que involucraba la participación de los hidrógenos bencílicos para explicar la capacidad antioxidante de aporfinas no fenólicas (Cassels *et al.*, 1995), implicando de manera particular el hidrógeno en el C-6a. Esta proposición se sostiene con más fuerza a la luz de los resultados encontrados en las experiencias con la lisozima (y con ABTS) y alcanza para explicar o justificar el hecho que aporfinas no fenólicas como la glaucina (2,9-*O,O'*-dimetilboldina) despliegan actividad antioxidante a través de la formación de un radical libre centrado en la posición C-6a y que puede ser estabilizado por el par de electrones no compartidos del átomo de nitrógeno (N-6) y el anillo aromático A de la estructura aporfínica.

Para explicar cómo el proceso de inactivación de la lisozima bajo la influencia de radicales libres se previene por los derivados de la boldina es necesario considerar los posibles sitios de acción de estas sustancias. Los radicales alquilperóxidos derivados del AAP son producidos por la termólisis en solución acuosa (ecuaciones 1 y 2), los cuales se supone reaccionan con algunos residuos de aminoácidos de la lisozima (por ejemplo, aquellos que son más susceptibles a la oxidación como la tirosina o el triptófano

presentes en el sitio catalítico hidrofóbico) o cisteína, produciendo la inactivación de la enzima (ecuación 3).



De acuerdo a las ecuaciones propuestas, un modo indirecto de mantener la actividad catalítica de la enzima sería a través de la inactivación de los radicales alquilperóxido en el medio acuoso (ecuación 4). Es igualmente posible que una parte de la acción antioxidante se ejerza directamente sobre la enzima reparando el sitio catalítico (u otro) (ecuación 5). Se sabe que los residuos que participan en la hidrólisis de las paredes bacterianas son el aspartato 52 y el glutamato 35, ambos susceptibles de ser oxidativamente modificados por radicales alquilperóxilos. Sin embargo, para mantener la actividad enzimática dependiente de la conformación global del sitio activo, de los residuos aminoacídicos que se encuentran cercanos o relativamente lejanos a él (y susceptibles de un ataque radicalario) como especialmente tirosina y triptofano, pueden de igual forma incidir en la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto la reparación y/o protección de los mismos por los antioxidantes debe ser un factor clave en conservar la actividad enzimática. Considerando que las aporfinas puedan ingresar al interior de la molécula de proteína, la acción protectora y/o reparadora de estas sustancias estaría modulada en parte por su lipofilia más el efecto puramente químico (antioxidante) (ecuación 5) que es común a casi todos estos compuestos. Bajo este razonamiento, los derivados monohalogenados de la boldina, la *N*-alil-*nor*-boldina y la 8-nitrosoboldina que presentan una lipofilia mayor que la boldina que podría explicar la mayor capacidad antioxidante observada para estos compuestos. Sin embargo, el factor lipofílico sólo alcanza para explicar parcialmente la mayor actividad observada cuando se comparan las potencias de los compuestos en función de su lipofilia (sección 4,5).

En estos compuestos se observa una mayor capacidad protectora (es decir conservan la actividad catalítica de la enzima por períodos mayores de tiempo) que los antioxidantes de referencia (Trolox® y BHT), lo que se atribuye a la formación de productos derivados de los antioxidantes que conservan rasgos estructurales que les permiten actuar como inhibidores de cadenas de radicales libres. Simulando las condiciones en los cuales se realizó la experiencia de la lisozima y utilizando el AAP y boldina fue posible aislar la 9-(8-boldinoxi)-boldina, que da cuenta en parte de este comportamiento.

4.4.3 Inhibición de la oxidación lipídica por derivados de la boldina.

En estas experiencias se determinó que todos los compuestos evaluados (fenólicos y no fenólicos) con distintas potencias, medidas en términos de sus IC_{50} , son capaces de disminuir la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) formados en los microsomas hepáticos por la acción de radicales libres generados por un reacción de tipo Fenton. Al igual que en las experiencias de descoloración y protección de lisozima, la presencia de grupos fenólicos en la estructura aporfínica está asociada a buenas actividades antioxidantes. Estos grupos funcionales actuarían mediante mecanismos similares a los descritos para las dos experiencias precedentes, por reacción de los átomos de hidrógenos fenólicos con el radical hidroxilo a través de mecanismos explicados previamente. Sin embargo, en los derivados fenólicos como las 3-halógenoboldinas, se observaron IC_{50} menores (es decir mayores potencias como antioxidantes) en comparación a la calculada para boldina. Estas diferencias de capacidades antioxidantes pueden ser atribuidas al menos a dos factores: uno de ellos es la estabilización adicional de los radicales libres debido a fenómenos capto-dativos (Kjorth *et al.*, 1993) debido a la presencia de grupos dadores π vecinos o conjugados con los grupos fenólicos de las aporfinas y a lipofilia tal como se explicará con mas detalle en la sección siguiente.

4.5 Relaciones entre la lipofilia y las potencias antioxidantes en los ensayos de oxidación de lisozima y microsomas hepáticos.

Para estudiar posibles relaciones entre los coeficientes de reparto (K_{rep}) y los valores de IC_{50} respectivos obtenidos en los ensayos de protección enzimática (lisozima) e inhibición de la lipoperoxidación (microsomas) se graficaron las potencias ($1/IC_{50}$) en función de las lipofilias ($\log K_{rep}$). El gráfico 18 muestra la variación de la potencia de boldina (1), predicentrina (2), 3-cloro- (3), 3-bromo- (4) y 3-yodo- (5) -boldinas en el ensayo de protección de lisozima en función de sus lipofilias.

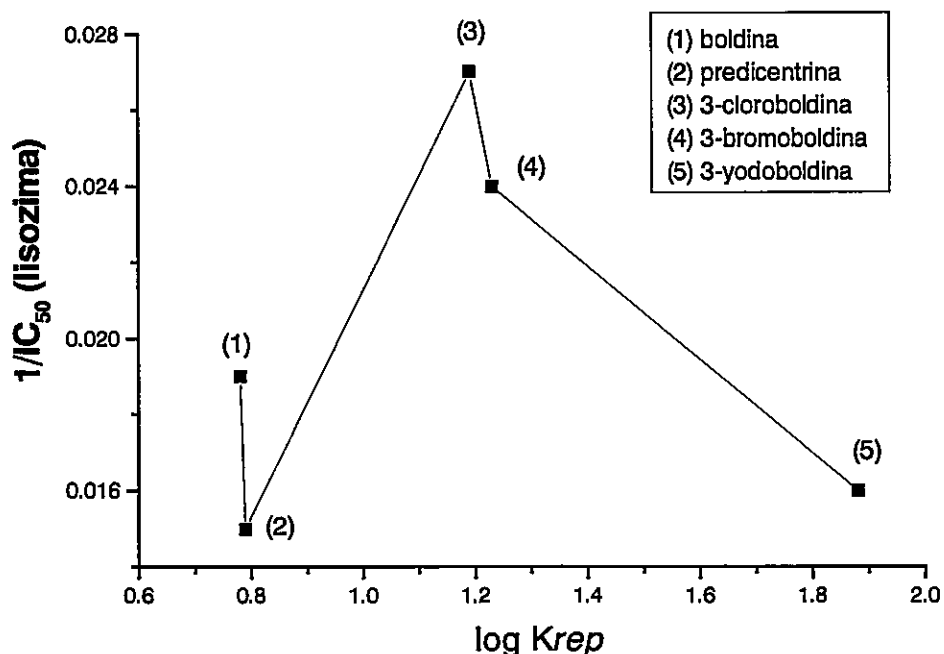


Gráfico 21: Relación entre la inversa de la concentración de semi-inhibición en la protección de lisozima en función del logaritmo de la constante de reparto (K_{rep}) de boldina y algunos de sus derivados.

Al comparar boldina y predicentrina, se observa que el bloqueo del grupo hidroxilo en C-9 (predicentrina, (2)) produce una disminución de la potencia antioxidante, lo que puede atribuirse a la menor estabilización de un radical libre deslocalizado en un único anillo aromático (anillo A del sistema bifénlico). Por otra parte, el aumento de la lipofilia molecular debida a la presencia de halógenos se traduce en una mayor potencia antioxidante para los derivados clorado (K_{rep} 15,1) y bromado (K_{rep} 16,9), potencia que,

sin embargo, disminuye al pasar de la 3-bromo- a la 3-yodoboldina (K_{rep} 76). Se puede concluir entonces que, para la protección de la enzima contra los radicales generados a partir de AAP, los derivados de boldina deberían presentar una lipofilia similar a la registrada para 3-cloroboldina (K_{rep} 15,1) y que a partir de ésta la potencia antioxidante tiende a disminuir. Esto último puede interpretarse – al margen de consideraciones sobre la eficacia intrínseca de los antioxidantes - en términos de que su acción se desarrollaría preferencialmente en la fase acuosa, ya que al aumentar la lipofilia dichos compuestos podrían encontrarse inmersos en las moléculas predominantemente lipofílicas de la lisozima y por lo tanto serían menos eficaces en prevenir la oxidación.

El gráfico 19 permite comparar de manera análoga la potencia de boldina (1), predicentrina (2), glaucina (3) y 2,9-*O,O'*-dipivaloilboldina (4) determinada en los ensayos de inhibición de la lipoperoxidación (microsomas hepáticos) en función de su lipofilia. Al igual que en los ensayos de protección de la lisozima, el bloqueo de una de las funciones fenólicas se traduce en una disminución de la potencia antioxidante. Sin embargo, y de manera inesperada, el bloqueo de ambos grupos (glaucina y 2,9-*O,O'*-dipivaloilboldina) produce un aumento en la potencia antioxidante de estos compuestos.

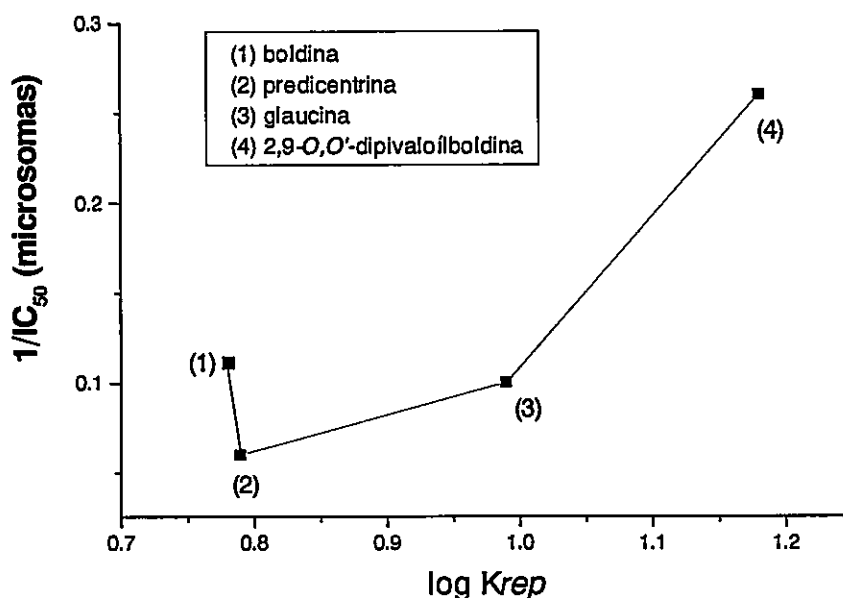


Gráfico 22: Relación entre la inversa de la concentración de semi-inhibición de la lipoperoxidación en función del logaritmo de la constante de reparto (K_{rep}) de boldina y algunos de sus derivados *O*-metilados.

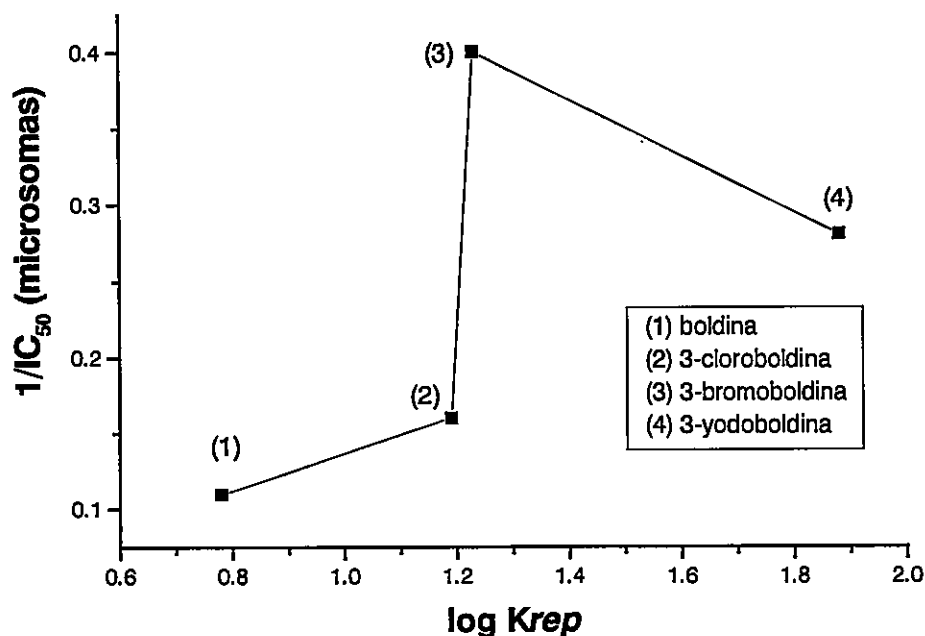
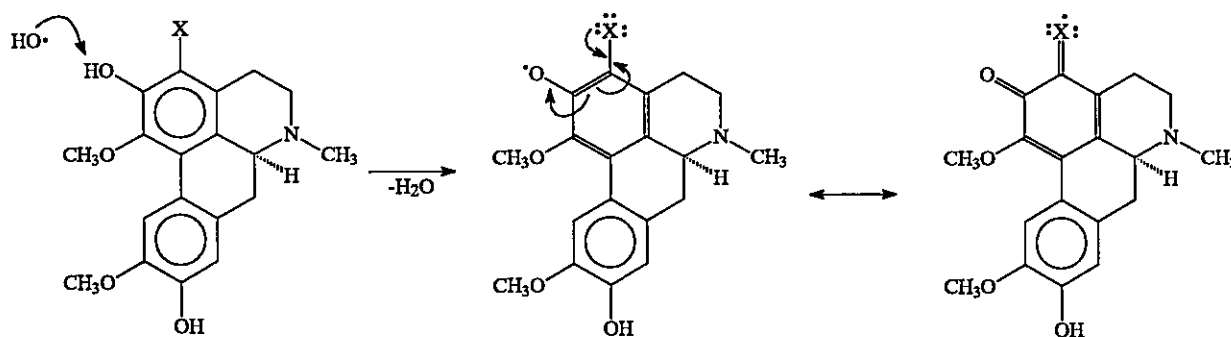


Gráfico 23: Relación entre la inversa de la concentración de semi-inhibición de la lipoperoxidación en función del logaritmo de la constante de reparto (K_{rep}) de boldina y algunos de sus derivados *O*-metilados.

Nuevamente la menor potencia antioxidante de predicentrina con respecto a boldina puede atribuirse a la formación de un radical libre que se estabiliza sobre un solo anillo aromático (formado por sustracción del átomo de hidrógeno del hidroxilo en C-2) que la haría menos reactiva frente a los radicales libres. Se ha descrito que compuestos no fenólicos como la glaucina o la anonaína pueden también desarrollar actividades protectoras sobre sistemas que contemplan la inhibición de procesos radicalarios (Cassels *et al.*, 1995) a través de la participación del átomo de hidrógeno del C-6a. Por lo mismo no sorprende encontrar similares comportamientos en la protección de microsomas hepáticos debidos a la glaucina o a la 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina. Sin embargo la clara mayor potencia de esta última molécula llama la atención y podría atribuirse a su mayor capacidad - con respecto a la glaucina - de solubilizarse en las membranas biológicas, que es donde se protegería con mayor efectividad dicho sustrato. Se puede plantear hipotéticamente que la 2,9-*O,O'*-dipivaloílbaldina podría, una vez

solubilizada en las membranas, sufrir desacilaciones que conducirían nuevamente a boldina o a uno o ambos de sus respectivos derivados monosustituídos. La acción de hidrolasas que podrían conducir a similares derivados puede proponerse, pero sin duda requiere de la verificación empírica.

Se sabe que la introducción de átomos de halógenos sobre anillos aromáticos como el del benceno, aumentan la lipofilia (es decir el $\log K_{rep}$) y se ha demostrado en el presente trabajo que similar efecto se observa en los derivados halogenados de la boldina. La mayor lipofilia de estos derivados aumentaría su capacidad de solubilizarse en las membranas microsomales y por ende de proteger dichas estructuras de una manera más eficaz. Este comportamiento es el que se observa en el gráfico 20. Los tres derivados halogenados presentan una mayor potencia antioxidante con respecto a la boldina, siendo ésta máxima para la 3-bromoboldina. La ausencia de una relación directa entre el aumento de la lipofilia y la potencia antioxidante parece reflejar la existencia de otro factor que interviene en la acción antioxidante de estas sustancias, como la estabilización de los radicales libres derivados de ellas a través de fenómenos electrónicos como el efecto captó dativo (Hjorth *et al.*, 1993). La presencia de grupos dadores π vecinos o conjugados con los grupos fenólicos, particularmente el de C-2, produce una deslocalización del espín adicional a la que permite el sistema bifenilo en las aporfínas. El diagrama siguiente muestra la estabilización adicional que produciría el átomo de halógeno (X) en la estructura aporfínica si el radical libre oxigenado atacara el grupo hidroxilo en C-2, tal como se muestra en el siguiente esquema



Las relaciones entre la potencia antioxidante y la lipofilia nos permiten concluir que cierto tipo de modificaciones operan positivamente en aumentar la capacidad antioxidante de estos compuestos, aunque esto depende del sistema de evaluación. En la protección de lisozima un aumento de la lipofilia más allá de 1,2 aproximadamente, no produce un aumento de la potencia antioxidante, lo que se podría atribuir a que la acción antioxidante se ejerce en fase acuosa de manera preferencial. En la inhibición de la lipoperoxidación los derivados que presentan una lipofilia mayor a 1 aumentan la potencia antioxidante independientemente de que posean o no funciones fenólicas.

5.0 COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

La (S)-boldina, el alcaloide principal de hojas y corteza de boldo (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae), ha sido caracterizado como un antioxidante efectivo en sistemas abióticos y bióticos que permite prevenir la oxidación lipídica y la inactivación de enzimas. Esta actividad presumiblemente da cuenta de los efectos hepato- y cito-protectores que han sido demostrados para este alcaloide y que pueden relacionarse con sus actividades antipiréticas y antiinflamatorias asociadas a la inhibición de la ciclooxigenasa y a su efecto protector en modelos experimentales de colitis. Sin embargo se ha demostrado que la boldina, una vez ingerida por vía oral, tiene una vida plasmática media corta (aproximadamente 15 minutos) y que es rápidamente glucoronidada en el hígado. Estas propiedades pueden explicar su relativamente corta vida media sistémica, y ciertamente limitan su potencial utilización terapéutica. Desde este punto de vista, pareció interesante modificar la estructura de la boldina con el objeto de obtener derivados con farmacocinéticas más favorables, los cuales pudieran mantener o mejorar algunas de sus actividades farmacológicas.

El propósito general de la presente tesis fue estudiar relaciones estructura-actividad antioxidante de la boldina y algunos de sus derivados, teniendo como eje central de trabajo la modificación selectiva de las funciones fenólicas, amino y de la estructura aromática del alcaloide (este último objetivo introducido durante el desarrollo del trabajo), con el concomitante cambio en la lipofilia de los derivados de la boldina.

El desarrollo del trabajo permite contar con los procedimientos de obtención y caracterización de una cantidad apreciable de sustancias derivadas de boldina, las cuales conforman series que son representativas de ciertas clases de compuestos tales como: ésteres, éteres y sus respectivas sales de amonio cuaternarias, halogenoderivados y un par de productos de oxidación del alcaloide. En adición se logró purificar y transformar en un par de derivados el alcaloide pukateína, el cual también fue estudiado en torno a sus propiedades antioxidantes y monoaminérgicas (estos últimos resultados no incluidos en esta tesis). Un segundo logro fue la caracterización de un par de productos de la

oxidación controlada de la boldina, bajo condiciones experimentales similares a las efectuadas en la evaluación antioxidante. Este objetivo se amplió, estudiando también la oxidación del alcaloide bajo condiciones "químicas" (oxidación con yodo, cloruro mercúrico y O₂).

Considerando los compuestos preparados en la primera etapa, se evaluó la hipótesis que las diferentes modificaciones estructurales de la boldina permitirían en algunos casos una más adecuada distribución entre medios hidrofílicos y lo que se traduciría en un aumento o mantención de la actividad antioxidante de dichos derivados con respecto a la base precursora.

Los resultados obtenidos en la parte farmacológica indican que la mayor parte de las sustancias preparadas desarrollan actividad antioxidante en los diferentes modelos, particularmente en modelos de membranas, y en algunos casos con mayor potencia que aquella determinada para sustancias que normalmente son utilizadas con estos fines en la conservación de alimentos o productos farmacéuticos, o con fines terapéuticos.

Estas acciones antioxidantes de las aporfinas derivadas de boldina, pueden explicarse en principio considerando que este alcaloide presenta dos grupos fenólicos, cada uno con dos grupos voluminosos (metoxilos) dadores de electrones en posiciones *orto* y *para*, lo que permite proponer que un radical formado por sustracción de un átomo de hidrógeno fenólico (por especies radicalarias como el radical hidroxilo), deberá ser estabilizado (cinética y termodinamicamente) por deslocalización del espín electrónico en los anillos aromáticos de la boldina. Estas características estructurales dan cuenta de la mayoría de los resultados en los sistemas que se utilizaron para medir la actividad antioxidante de nuestros compuestos. Por otra parte, los derivados no fenólicos de la boldina, como la glaucina, la diacetilboldina y la dipivaloilboldina no son antioxidantes eficaces en los ensayos de decoloración de soluciones de ABTS y en el modelo de protección enzimática (lisozima) en presencia de radicales libres provenientes del AAP. Sin embargo, en la inhibición de la oxidación lipídica (donde los radicales utilizados fueron hidroxilos), los compuestos no fenólicos (glaucina y 2,9-O,O'-dipivaloilboldina)

muestran una actividad comparable a aquella determinada para la boldina, y ya que estos compuestos carecen de grupos fenólicos libres, se atribuyó su actividad antioxidante a la participación del hidrógeno bencílico en C-6a (Cassels *et al.*, 1995). Adicionalmente, la actividad protectora de membranas hepáticas se encontraría relacionada con la lipofilia aumentada que presentan estos compuestos, aunque no se puede excluir la posibilidad de que en este modelo se produzca una activación metabólica de los derivados no fenólicos de boldina. El concepto de mayor lipofilia es también válido para los derivados halogenados de la boldina (fenólicos), donde la presencia de átomos de halógeno incrementa este parámetro fisicoquímico y se traduce en mayores potencias como inhibidores del proceso lipoperoxidativo. El conjunto de nuestros resultados muestra que la mayor parte de estas moléculas pueden actuar como efectivos antioxidantes en diferentes modelos, siendo el modelo de protección de membranas el que permite relacionar de mejor manera la acción antioxidante y la lipofilia de algunos compuestos.

Las modificaciones estructurales sobre este alcaloide hacen variar su lipofilia en relación a la de la boldina. Esta propiedad es un parámetro importante para fármacos que podrían eventualmente atravesar la barrera hematoencefálica (o no hacerlo como en el caso de los derivados de amonio cuaternario de boldina o de algunos de sus derivados *O*-metilados). Por otra parte, se puede prever que la modificación de las funciones fenólicas y/o la presencia de átomos de halógeno producirán cambios importantes en la biodisponibilidad de ciertos derivados (absorción más eficaz, menor velocidad de bioinactivación por los sistemas enzimáticos del organismo, excreción reducida, etc.)

Todos los puntos expresados en el párrafo anterior deberán ser estudiados si se considera la aplicación potencial de estas sustancias como herramientas farmacológicas o terapéuticas, información que dará sin duda, la base para el diseño de nuevas sustancias derivadas de boldina y que constituyen la materia de potenciales futuros trabajos a realizar.

6.0 BIBLIOGRAFIA

M. Adamczyk, J.G. Gebler y P.G. Mattingly.

Lipase mediated hydrolysis of rapamicin 42-hemisuccinate benzyl and methyl esters. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35 (7):1019

B.M. Adger, O'Farrell, N.J. Lewis, M.B. Mitchell. **1986**

Tetrahedron, 53 (citado en Adamczyk *et al.*, **1994**)

T.A. Al-Howiriny, M.A. Zemaitis, C. Gao, C.E. Hadden, G.A. Martin, F. Lin, Schiff Jr. P.L..

Thalibealine, a novel tetrahydroprotoberberine-aporphine dimeric alkaloid from *Thalictrum wangii*, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 819

M.E. Anderson, A. Meister.

Glutathione monoesters. *Analytical Biochemistry*, 1989, 183, 16

G.J. Arango, D. Cortés, A. Cavé y P. D'Ocon.

7,7'-bisdehydroaporphines from *Unonopsis pacifica*. *Anales de Química*, **1988**, 84C, 124

R.R. Arndt, W.H. Baarschers.

The alkaloids of *Phyllica rogersii* Pilians. *J. Chem. Soc.*, **1964**, 1964:2244.

O.I. Aruoma, P.J. Evans, H.Kaur, L.Sucliffe, B. Halliwell.

An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox, vitamin E and probucol. *Free Rad. Res. Comm.*, **1991**, 10, 143

O.I. Aruoma., B. Halliwell.

Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.*, **1987**, 241, 273

O.I. Aruoma, Halliwell B.

Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.*, **1990**, 241, 273

M. Asencio, B.K. Cassels, H. Speisky.

The methylation of boldine with diazomethane

Bol. Soc. Chil. Quím., **1993**, 38, 331

M. Asencio, B.K. Cassels, V. Manriquez, D. Boys.

(S)-1,10-dimethoxy-2,9-dihydroxyaporphinium chloride, $C_{19}H_{22}NO_4^+.Cl^-$. *Act. Cryst.* **1996**, C52, 1581.

W.H. Baarschers, R.R. Arndt, K. Pachler, J.A. Weisbach, B. Douglas.

Nuclear magnetic resonance. Study of aporphine alkaloids. *J. Chem. Soc.*, **1964**, 4478.

R.W. Baldock, P. Hudson, A.R. Katritzky, F. Soti.

Stable free radicals. Part I. A new principle governing the stable organic free radicals.

J. Chem. Soc. Trans. I, **1974**, 1422

G. Barger, A. Girardet.

Constitution de la pukatéine et de la lauréline. *Helv. Chim. Acta.*, **1931**, 14, 481

D.H.R. Barton, D.S. Bhakuni, G.H. Chapman, G.W. Kirby,

Phenol oxidation and biosynthesis. Part XV. The biosynthesis of roemerine, anonaine and mecambaine. *J. Chem. Soc.*, **1967**, 1973, 874.

L.R.C. Barclay, M.R. Vinsquist.

Membrane peroxidation: inhibiting effect of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. *Free Rad. Biol. Med.*, **1994**, 16, 779

D.S. Bhakuni, S. Tewari, R.S. Kapil.

J. Chem. Soc. Perkin Trans I, **1977**, 706.

K. Bendich, L.J. Machlin, O.Scandurra, G.W.Burton, D.D.M. Wayner.

The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radicals Biology and Medicine*, **1986**, 2, 419.

K. Bernauer,

Ueber alkaloides aus *Laurelia novae-zelandiae* (A. Cunn). *Helv. Chim. Acta.*, **1967**, 47, 2119.

R.J. Borgam, J.J. McPhillips, R.E. Stitzel, I.J. Goodman.

Synthesis and pharmacology of centrally acting dopamine derivatives and analogs in relation to parkinson's disease. *J. Med. Chem.*, **1973**, 16(6), 630

J.A. Buege S.D. Aust.

Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **1978**, 53, 302

G.W. Burton, K.U. Ingold.

Acc. Chem. Res., **1986**, 19, 194 (citado en Foti *et al.*, 1994)

G.W. Burton, L. Hughes, K.U. Ingold.

Antioxidant activity of phenols related to vitamin E. Are there chain breaking antioxidants better than α -tocopherol?. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5950

- B.K. Cassels, M. Asencio, P. Conget, H. Speisky, L.A. Videla, E.A. Lissi.
Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids,
Pharmacol. Res., **1995**, 31(2), 103
- A.M. Campos, E.A. Lissi.
Kinetics of the reaction between 2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
(ABTS) derived radical cations. *Int. J. Chem. Kinet*, **1997**, 29, 219
- M.P. Cava, P. Venkateswarlu, M. Srinivasan, D.L. Edie.
Oxidative transformations in the aporphine alkaloid series. *Tetrahedron*, **1972**, 28, 4299
- M.P. Cava, Y. Watanabe, K. Bessho, M.J. Mitchell, A. L. daRocha, B. Hwang, B.
Douglas, J.A. Weisbach.
Ocotea alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases.
Tetrahedron Lett., **1968**, 2437
- A.I. Cederbaum, E. Kukielka, H. Speisky.
Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. *Biochemical
Pharmacology*, **1992**, 41, 1765
- S.K. Chattopadhyay, A.B. Ray, D.J. Slatkin, P.L. Schiff Jr.
Phytochemistry. **1983**, 22, 2607. (Citado en: H. Guinadeau, M. Leboeuf, A. Cavé. 1979.
Aporphine alkaloids. IV. *J. Nat. Prod.*, 51(3), 469)
- C.M. Chiou, S.S. Lee, M.Z. Chen,
Litebamine *N*-homologues. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61(1), 46
- R.T. Currin, J.G. Toole, R.G. Thurman, J.J. Lemastes.
Evidence that Caroline rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against
reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver. *Transplantation*, **1990**, 50,
1076

M. Curzio.

Interaction between neutrophils and 4-hydroxyalkenals and consequences on neutrophils mobility. *Free Rad. Res. Commu.*, **1988**, 5, 1076

A.T. Diplock.

Fat soluble vitamins, their biochemistry and applications, **1985**, pags. 154-224, Heinemann Eds., London, U.K.

D. Dwuma-Badu, J.S.K Ayim, C.A. Mingle, A.N. Tackie, J.E. Knapp, P.L. Schiff Jr.
Phytochemistry, **1975**,14, 2524. (Citado en: H. Guinadeau, M. Leboeuf, A. Cavé. 1979.
Aporphine alkaloids. II. *J. Nat. Prod.*, 42(4):357)

N. El Tayar, A. Marston, A. Bechalany, K. Hostettmann, B. Testa.

Use of centrifugal partition chromatography for assessing partition coefficients in various solvent systems. *J. Chromatogr.*, **1989**, 469, 91.

H. Esterbauer, H. Zollner, R.J. Schaus.

Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation
ISI Atlas of Science, Biochemistry, **1987**, 1, 311

H. Esterbauer, G. Striegl, H. Puhl, M. Rotheneder.

Continous monitoring of *in vitro* oxydation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commu.*, **1989**, 6, 67

A.M. Félix, E.P. Heimer, T.J. Lambros, C.J. Tzougraki.

Hydrolysis of rapamicin benzyl ester by catalytic transfer hydrogenation. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 4194

M. Foti, K.U. Ingold, J. Luzstyk.

The surprinsingly high reactivity of phenoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 9440.

K.F. Gey, G.B. Brubacher, H.B. Stalehein.

Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischaemic heart disease and cancer.
Am. J. Clin. Nutr., **1987**, 45, 1368

D. Griller, F.P. Lossing,

On the thermochemistry of α -aminoalkyl radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 1586

M. Grisar, M. Petty, F.N. Bolkenius, J. Dow, J. Wagner, E.R. Wagner, K.D. Haegel,
W.A. De Jojng.

Cardioselective hydrophilic *N,N,N*-trimethylethaneminiium α -tocopherol analogue that
reduces myocardial infarctus size. *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 257

H. Guinadeau, M. Leboeuf, A. Cavé.

Dimeric aporphinoid alkaloids, II. *J. Nat. Prod.*, **1984**, 47(4), 565

J.C.M. Gutteridge.

Ceruloplasmine: physiological and pathological perspectives. CRC Critical Reviews in
Clinical Laboratory Sciences. **1981**, 14, 257

B. Halliwell, J.C.M. Gutteridge. **1989**

Free radicals in biology and medicine., 2nd., Ed., Clarendon Press, Oxford.

B. Halliwell.

How to characterize a biological antioxidant ?. *Free Rad. Res. Comm.*, **1989**, 9, 1

B. Halliwell.

Protection against tissue damage *in vivo* by desferioxamine: what is its mechanism of
action?. *Free Rad. Biol. Med.*, **1989**, 7, 645

B. Halliwell, and J.M.C. Gutteridge. **1990a**. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In Oxygen Radicals in Biological Systems. Part B. Oxygen Radicals and Antioxidants*, L. Packer and A.N. Glazer, Eds: 1-85. Academic Press. San Diego.

B. Halliwell, J.C.M. Gutteridge.

The antioxidants of extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990b**, 280, 1

C. Hansch, L. Leo. **1995**

Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol 3, Pergamon Press Ed., Oxford.H.

Hara, K. Kaneko, M. Endoh,

A novel ring cleavage and recyclization of *N*-cyanomethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinium methiodides: A biomimetic synthesis of litebamine. *Tetrahedron*, **1995**, 51(37), 10189.

K.U. Ingold, G.W. Burton, D.O. Foster, M. Zucker, M. Hughes.

A new vitamin E analogue more active than α -tocopherol in the rat curative myopathy bioassay. *FEBS Letters*, **1986**, 205, 117

D. Hughes, K. Genest, K. Skakum.

Alkaloids of *Peumus boldus*. Isolation of laurotetanine and lauroitsine. *J. Pharm. Sci.*, **1968**, 57,1619

D. Hughes, K. Genest, K. Skakum.

J. Pharm. Sci., **1965**, 27, 1023

M.D. Ivorra, S. Chulia, C.Lugnier, M.P. D'Ocon.

Selective action shown by two aporphines at α_1 -adrenergic receptors and in the potential-operated calcium channel. *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**, 231, 165

G.P. Jara, M. Asencio, B.K. Cassels, R.G.E. Morales. **1993**

Espectros y estructura molecular de boldina. Libro de Resúmenes, pág. 378, XX Jornadas Chilenas de Química, Punta de Tralca. Chile

S.R. Johns, J.A. Lambertson, A.A. Sioumis,

The alkaloids of *Neolitsea pubescens* (Lauraceae). *Aust. J. Chem.*, **1969**, 22, 1311.

S.R. Johns, J.A. Lambertson, A.A. Sioumis,

Laurotetanine and *N*-methyllaurotetanine from *Palmeria fengeriana*. *Aust. J. Chem.*, **1967**, 20, 1787.

S.R. Johns, J.A. Lambertson.

New aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Aust. J. Chem.*, **1966**, 19, 267

L. V.Jørgensen, H.L. Madsen, M.K. Thomsen, L. O. Dragsted, L. H. Skibsted.

Regeneration of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: An ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Rad. Res.*, **1999**, 30, 207

A. Jössang, M. Leboeuf, A. Cavé, T. Sevenet.

Alkaloids of Annonaceae. Part 65. Alkaloids of *Popowia pisocarpa*. Part 1. New bisbenzylisoquinolines. *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49(6), 1018

T. Kametani.

Studies on the synthesis of heterocyclic compounds. Part CDLXII. Total synthesis of aporphins: (+)-*N*-methyllaurotetanine, (+)-cassythicine and (+)-pukateine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1972**, 1435

H.G. Kjørtz, P. Lommès, P. Sutsmann.

Rotational barriers in 1-ciano-1-methoxyallyl radical: a contribution to the problem of captodative radical stabilization., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 663

H. Kreitmair.

Pharmacologische wirkung des alkaloids aus *Peumus boldus* Molina, *Pharmazie*, **1952**, 7, 507

A.M. Kuck, S.M. Albonico, V. Deulofeu, M.G. Escalante.

Alkaloids from Argentine *Fagara* species. *Phytochemistry*. **1967**, 6, 1541.

S.M. Kupchan, T.H. Yang, M.L. King, R.T. Borchardt.

Thalictrum alkaloids. VII. The isolation, structural elucidation and synthesis of dehydrothalicarpine. *J.Org. Chem.*, **1968**, 33, 1052.

R.A. Larson.

The antioxidants in higher plants. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 969

D.E. Leahy, J.J. Morris, P.J. Taylor, A.R. Wait. **1991**

Membranes and their models: towards a rational choice of partitioning system. En: *QSAR: Rational Approches to the design of Bioactive compounds*, pp 75-82, C. Silipo y A. Vittoria, Eds., Elsevier, Amsterdam.

M. Leboeuf, A. Cavé, J. Prévost, R. Tiberghien, P. Forgacs.

Ann. Pharm. Franç., **1980**, 38, 537.

M. Leboeuf, M. L. Abouchacra, H. Guinadeau, A. Cavé, J.

The bisbenzylisoquinoline alkaloids of *Pycnarrhena ozantha*. *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50(3), 375

O.A. Levander.

A global view of human selenium nutrition. *Annual Rev. Nutr.*. **1987**, 7, 227

M. Levine.

A new concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New Engl. J. Med.*, **1986**, 314, 892

H.H.A. Linde, M. S. Rabag.

Die Autoxydation des Apomorphins. *Helv. Chim. Acta*, **1968**, 51(4), 683.

E.A. Lissi, M. Faure, N. Clavero.

Effects of additives on the inactivation of lysozyme mediated by free radicals produced in the thermolysis of 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane). *Free Rad. Res. Commu.*, **1991**, 14(5-6):373.

H.O. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall.

Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265

S.T. Lu, S.J. Wang, F.S. Lin.

Studies on the alkaloids of Formosan Lauraceous plants. XIV. Alkaloids of *Actinodaphne acutivens* and *Litsea hayatae*. *J. Pharm. Soc. Jap.*, **1969**, 89, 1313.

L.A. Martínez, J.L. Ríos, M. Paya, M.J. Alcaráz.

Inhibition non enzymatic of lipid peroxidation by benzyloquinoline alkaloids, *Free Rad. Biol. Med.*, **1992**, 12, 287

P.B. MacCay.

Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.*, **1985**, 5, 323

T. Matsuno, K. Orita, K. Edashige, H. Kobuchi, E.P. Sato, B. Inouye, M. Inouye, K. Utsumi.

Inhibition of active oxygen generation in guinea pig neutrophils by biscochlorine alkaloids. *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, 39, 1325

P. Moldéus, I.A. Cotgreave, M. Bergreen.

Lung protection by a thiol-containing antioxidant: *N*-acetylcysteine. *Respiration*, **1986**, 50 (Suppl. I), 31

N.M. Mollov, H.B. Dutschewka.

Oxidation of the aporphine benzyloisoquinoline alkaloids, thalicarpine and thalcmelatine. *Chem. Ber.*, **1967**, 100(9), 3135.

T. Nakasato, S. Asada, Y. Kokzuka,

Alkaloids isolated from the trunk bark of *Neolitsea sericea*. *J. Pharm. Soc. Jap.*, **1966**, 86, 129.

E. Niki.

Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.*, **1990**, 186, 100.

M. Ohashi, J.M. Wilson, H. Budzikiewicz, M. Shamma, W.A. Sluzarchik, C. Djerassi.

Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXI. Aporphines and related alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2807

G.S. Omenn, G.E. Godmann, M.D. Thornquist, J. Balmes, M.R. Cullen, A. Glass, J.P. Keogh, F.L. Meinskens, B. Balanis, H.J. Williams, S. Barnhart, S. Hammart.

Effects of combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.*, **1996**, 334, 1145

N.A. Porter.

Chemistry of lipid peroxidation, *Meth. in Enzym.*, **1984**, 105, 273.

G. Powis.

Free radical formation by antitumoral quinones. *Free Rad. Biol. Med.*, **1989**, 6, 63

V. Preininger, A.D. Cross, D. Murphy, J.W. Šantavý.

Isolation and chemistry of alkaloids from plants of genus *Papaver*. *Collect. Czech. Chem. Comm.*, **1969**, 34(3), 875; (CA 70:108721 (1969))

A. Rice-Evans, J.N. Miller, P.G. Bolwell, J.B. Pridham.

The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, **1995**, 22(4), 375.

J.L. Ríos, R. Cholbi, A.I. Huget, A. Mora, S. Máñez, M. Payá, M.J. Alcaraz.

Effects of benzylisoquinolines on lipid peroxidation and superoxide scavenging. *Planta Med.*, **1990**, 56, 645

R. Robinson, L.A. Reitter, W.E. Barth, A.M. Campeta, K. Copper, B.J. Cronin, R.

Destito, K.M. Donahue, F.C. Falkner, E.P. Fiese, D.L. Jhonson, A.V. Kuperman, T.E.

Liston, D. Malloy, J.J. Martin, D.Y. Mitchell, F.W. Rusek, S.L. Shamblin, C:F: Wright.

Discovery of the hemifumarate and (α -L-alanyloxy)methyl ether as prodrugs of an antirheumatic oxindole: prodrugs for the enolic OH group. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 10

D. Ross.

Gluthathione free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacology and Therapeutics*. **1988**, 37, 231

N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell, G.P. Rice-Evans.

Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxydants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, 322, 339

M.D. Sevilla, M. Yan, D. Becker, S. Gillich.

ESR investigations of the reactions of radiation-produced thiyl and DNA peroxy radicals: formation of sulfoxyl radicals. *Free Rad. Res. Comm.*, **1989**, 6, 21

M. Shamma, B.S. Dudock.

Thalictrum alkaloids. V. Isolation. *J. Pharm. Sci.*, **1968**, *57*, 262.

J.W. Scott, W.M. Cort, H. Harley, D.R. Parrish, G. Saucy.

6-hydroxychroman-2-carboxylic acid: a novel antioxidant. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1974**, *51*, 200.

E. Sobarzo-Sánchez, J. Arbaoui, P. Protais, B.K. Cassels.

Halogenated boldine derivatives with enhanced monoamine receptor selectivity. *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*(4), 480

E. Sobarzo-Sánchez, B.K. Cassels, M. Asencio. **1997**

Síntesis de benzoxazol y benzoxazinona derivados de boldina. Libro de Resúmenes pág. 318, XXII Jornadas Chilenas de Química, Puyehue, Osorno, Chile.

H. Speisky, I. Jiménez,

Biological disposition of boldine: *In vitro* and *in vivo* studies, *Phytother. Res.*, **2000**, *14*(4), 254

H. Speisky, B.K. Cassels, E.A. Lissi, L.A. Videla.

Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, *41*, 1575

H. Speisky, B.K. Cassels.

Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacol. Res.*, **1994**, *29*, 1

S. Tewari, D.S. Bhakuni, M.M. Dhar,

The aporphine alkaloids of *Litsea glutinosa* (var. *Glabaria*). *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 1149.

R. Tschesche, P. Welzel, R. Moll, G. Legler.

Über 2 alkaloide aus der Rinde von *Symplococus celastrinea* Mart. *Tetrahedron*, **1964**, 20, 1435

R. Tschesche, P. Welzel, G. Legler.

Zur Struktur einiger tetrasubstituierter Aporphinalkaloide. *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 445.

A. Urzúa, P. Acuña.

Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*. *Fitoterapia*, **1983**, 54, 175.

A. Urzúa, B.K. Cassels.

Additional alkaloids from *Laurelia philippiana* and *L. novae-zelandiae*. *Phytochemistry*, **1982**, 21, 773.

A. Urzúa, R. Torres.

6a,7-Dehydroboldine from the bark of *Peumus boldus*. *J.Nat. Prod.* **1984**, 47, 525.

S. Valcic, A. Muders, N.E. Jacobsen, D.C. Lieber, B.N. Timmermann.

Antioxydant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radical. *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, 382

H. van de Waterbeemd.

The history of drug research: from Hansch to present. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1992**, 11, 200.

R.J. Vavrek, J.G. Cannon, R.V. Smith.

Centrally acting emetic agents IV. Synthesis and chromatographic methods for certain normuciferine derivatives. *J. Pharm. Sci.*, **1970**, 59(6), 823.

H. G. Viehe, R. Merényi, L. Stella, Z. Janousek.

Angew. Chem. **1979**, 91, 982. (citado en Baldock et al., 1974)

P. Wiriyaichitra, M.P. Cava.

Aromatic hydroxylation of some isoquinoline alkaloids. *J. Org. Chem.*, 1977, 42(13), 23

Y. Yamamoto, S. Haga, E. Niki, Y. Kamiya.

Oxidation of lipids. V. Oxydation of methyl linoleate in aqueous dispersion. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1984, 57, 1260

R. Yamauchi, T. Matsui, K. Kato, Y. Ueno.

Reaction products of α -tocopherol with methyl linoleate-peroxyl radicals. *Lipids*, 1990, 25, 15

S. Yunusov, N.N. Progressov,

Structure of thalicmine and thalicmidine., *Zh. Obshch. Khim.* 1952, 22, 1047; *Chem. Abstr.* 47:8084i.

A. L. Zanocco, E. Lemp, G. Gunther.

A kinetic study of the reaction between boldine and singlet oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$]. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1997, 2, 1299.