

Trabajo Fin de Grado

Diseño de nuevos agentes terapéuticos frente a *Leishmania* spp: Síntesis de análogos de withanolidas de origen natural

Raúl Lorenzo Romero

Tutores: Dra. Isabel López Bazzocchi

Dr. Ignacio A. Jiménez Díaz

Curso 2021-2022

La Dra. Dña. ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI y el Dr. D. IGNACIO ANTONIO JIMÉNEZ DÍAZ, como tutores de la presente memoria:

AUTORIZAN: Al alumno Raúl Lorenzo Romero, a la presentación y defensa del Trabajo Fin de Grado titulado "Diseño de nuevos agentes terapéuticos frente a *Leishmania* spp: Síntesis de análogos de withanolidas de origen natural", para optar el Grado en Química por la Universidad de La Laguna.

Fdo.: Dra. Dña. Isabel López Bazzocchi Fdo.: Dr. D. Ignacio A. Jiménez Díaz

La Laguna, 17 de junio de 2022

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Enfermedades parasitarias. Leishmaniasis y tripanosomiasis	5
1.2. Estrategias en el diseño de fármacos.....	10
1.2.1. Compuestos heterocíclicos de nitrógeno.....	12
1.3. Productos naturales como fuente de agentes terapéuticos	14
1.4. Estado actual del tema. Withanolidas.....	16
2. OBJETIVOS	20
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1. Withanolidas aisladas de las hojas de <i>Withania aristata</i>	21
3.2. Preparación de derivados de withaferina A	24
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	39
4.1. Técnicas experimentales.....	39
4.1.1. Técnica de extracción. Extracción Soxhlet.....	39
4.1.2. Técnicas cromatográficas.....	40
4.1.3. Técnicas espectroscópicas	41
4.1.4. Técnicas espectrométricas.....	41
4.1.5. Programas informáticos.....	41

4.2.	Recolección, secado y molienda del material vegetal.....	42
4.3.	Extracción y aislamiento.....	42
4.3.1.	Preparación de los extractos.....	42
4.3.2.	Fraccionamiento cromatográfico.....	43
4.3.3.	Purificación de withaferina A.....	43
4.4.	Modificación estructural: Preparación de análogos de withaferina A .	45
4.4.1.	Datos espectroscópicos de withaferina A.....	45
4.4.2.	Análogo 1: 3 β -metoxi-withaferina A	46
4.4.3.	Análogo 2: 3 β -propargilamino-withaferina A.....	47
4.4.4.	Análogo 3: 3 β -imidazolin-withaferina A.....	48
4.4.5.	Análogos 4 y 5: 27-O-acetil-3 β -imidazolin-withaferina A y 4,27-di-O-acetil-withaferina A.....	49
4.4.6.	Análogo 6: 27-O-butanoil-3 β -imidazolin-withaferina A	51
4.4.7.	Análogo 7: 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin- withaferina A	53
5.	CONCLUSIONES	55
6.	BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias, al igual que el conjunto de las enfermedades infecciosas, son un problema de salud global que afecta principalmente a las regiones tropicales y subtropicales. Entre las parasitosis más relevantes destacan la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, que afectan anualmente a millones de personas en todo el mundo, siendo los principales focos de estas enfermedades África, Asia y Latinoamérica.

Este Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo principal la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios mediante el desarrollo de una quimioteca basada en un esteroide natural, withaferina A, aislado de *Withania aristata*, especie endémica de Canarias. Se pretende, así, optimizar el potencial antiparasitario que presenta este metabolito, así como profundizar en la relación estructura-actividad de productos naturales con esqueleto de withanolida.

Para ello, se llevó a cabo el aislamiento de withaferina A de las hojas de *Withania aristata* mediante el uso de técnicas cromatográficas. Siete análogos fueron preparados a partir del compuesto cabeza de serie, siguiendo diversas estrategias: la introducción de motivos estructurales activos (grupos aminos o compuestos heterocíclicos de nitrógeno) y la esterificación de los grupos hidroxilo presentes en la molécula, con el fin de validar la importancia del sistema α,β -insaturado y de los alcoholes, respectivamente, en la actividad antiparasitaria de withaferina A.

La elucidación estructural de los análogos se llevó a cabo usando técnicas espectroscópicas, que incluyen experimentos de RMN monodimensionales (^1H y ^{13}C) y bidimensionales, tanto heteronucleares (HSQC y HMBC) como homonucleares (ROESY), y técnicas espectrométricas (espectrometría de masas)

SUMMARY

Parasitic diseases, like all infectious diseases, are a global health problem that mainly affects tropical and subtropical areas. Among them highlight Chagas disease and Leishmaniasis, parasitic diseases which annually affect millions of people around the world, mainly in Africa, Asia, and Latin America.

This Final Degree Project has as its main goal the search for new antiparasitic agents, through the development of a chemolibrary based on a natural steroid, withaferin A, isolated from *Withania aristata*, endemic specie of the Canary Islands. In this way, the antiparasitic potential presented by this metabolite is optimized, as well as the structure-activity relationship of natural products with withanolide skeleton is deepened.

To this task, withaferin A was isolated from the leaves of *Withania aristata* using chromatographic techniques. Seven analogues were prepared from the leader compound, withaferin A, following two strategies: the introduction of active motives (amino groups or heterocyclic nitrogen compounds) and the esterification of the hydroxyl groups present in the molecule, to validate the relevance of the α,β -unsaturated system and alcohols, respectively, in the antiparasitic activity of withaferin A.

Structural elucidation of the analogues was carried out using spectroscopic techniques, including one-dimensional (^1H y ^{13}C) and two-dimensional heteronuclear (HSQC and HMBC) and homonuclear (ROESY) NMR experiments and spectrometric techniques (mass spectrometry).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades parasitarias. Leishmaniasis y tripanosomiasis

Las enfermedades tropicales desatendidas son un grupo de enfermedades infecciosas que prevalecen en países tropicales y subtropicales en vía de desarrollo. Según ha estimado la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de mil millones de personas sufren de una o más de estas enfermedades conocidas como “desatendidas u olvidadas” debido a su asociación directa con la pobreza de dichos países y la poca inversión de las empresas farmacéuticas en la investigación de soluciones a su tratamiento¹.

Por otra parte, las condiciones climáticas de los países tropicales, África, Asia y América favorecen la proliferación, persistencia y permanencia de estas enfermedades debido al clima cálido y húmedo del trópico que permite la multiplicación de los vectores reservorios².

Entre las principales enfermedades causadas por parásitos cabe destacar la leishmaniasis, ocasionada por un protozoo parásito del género *Leishmania* (**Figura 1**), encontrándose dentro del top 10 de enfermedades tropicales desatendidas.

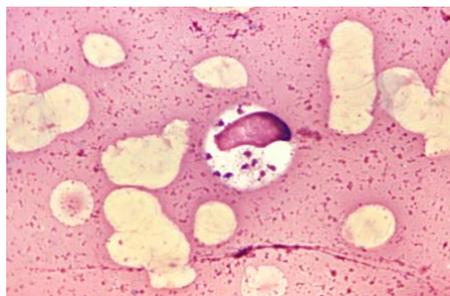


Figura 1. *Leishmania donovani*.³

La leishmaniasis puede clasificarse en 3 tipos dependiendo de las manifestaciones clínicas que presente:

1. Leishmaniasis visceral: Es una enfermedad crónica que produce episodios de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. Además, es mortal en más del 95% de los casos.

2. Leishmaniasis cutánea: Es la forma más común de esta infección y suele producir lesiones ulcerosas que dejan cicatriz en la piel de por vida.
3. Leishmaniasis mucocutánea: Surge como una complicación de la leishmaniasis cutánea y provoca una destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz y boca, pudiendo causar discapacidades⁴.



Figura 2. L. Visceral ⁵



Figura 3. L. Cutánea ⁶



Figura 4. L. Mucocutánea ⁶

La repercusión de dicha enfermedad en los últimos años se debe al aumento de la depresión del sistema inmunológico resultante de enfermedades crónicas como neoplasmas, tratamientos inmunosupresores e infección por VIH (Virus de la inmunodeficiencia humana). Además, se estima que cada año se dan aproximadamente entre 700.000 y 1 millón de casos nuevos⁴.

Asimismo, la coinfección con VIH produce un aumento de más de 100 veces la posibilidad de desarrollar una leishmaniasis visceral activa, incrementa la mortalidad y facilita el estado del portador crónico y las recaídas⁷. A medida que el SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida) se propaga en zonas rurales, la leishmaniasis visceral lo hace en zonas suburbanas, generando así un mayor grado de superposición entre las distribuciones geográficas de las dos enfermedades y, por tanto, una incidencia creciente de coinfección por Leishmaniasis/VIH⁸.

En 2021 esta coinfección se notificó en 45 países⁴. A parte de ello, los datos más recientes encontrados pertenecen a 2010 (**Figura 5**), donde treinta y tres países habían notificado hasta dicha fecha casos de coinfección de manera que el número de países ha aumentado desde aquel entonces.

Se calcula que en el sureste europeo entre el 25 y el 70% de los casos de leishmaniasis visceral correspondían a enfermos infectados con el VIH. Además, por ese entonces España contaba con un 58% de los casos declarados por la OMS de dicha coinfección⁹.



Figura 5. Distribución geográfica mundial de la coinfección VIH-Leishmaniasis visceral hasta 2010⁹

Por otra parte, la tripanosomiasis o enfermedad de Chagas es causada por infección con el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (**Figura 6**). En humanos se transmite mediante la orina y las heces de los insectos triatominos (también conocidos como chinches) pudiendo causar graves problemas en el corazón y aparato digestivo del hospedador.



Figura 6. *Trypanosoma cruzi*¹⁰

La transmisión de la enfermedad es vectorial, es decir, a través de la picadura y posterior deposición de la chinche que actúa como vector y una vez se produce la infección las fases de la enfermedad pueden ser:

1. Fase aguda: Esta fase se prolonga hasta varios meses después de contraerse la infección. Durante ella circulan por la sangre una gran

cantidad de parásitos, pero en la mayoría de los casos no hay síntomas o son leves.

2. Fase crónica: Se puede dar entre 10 y 30 años después de la infección inicial y afecta principalmente al corazón y aparato digestivo¹¹.

En torno al 75% de los pacientes son asintomáticos, mientras que el 25% de las infecciones evolucionan a la fase crónica, causando problemas en el corazón, sistema digestivo y/o daños en el sistema nervioso. Se cuenta con 28.000 casos en la región de América que afectan entre 6 y 8 millones de personas, llegando a causar 12.000 muertes por año¹².

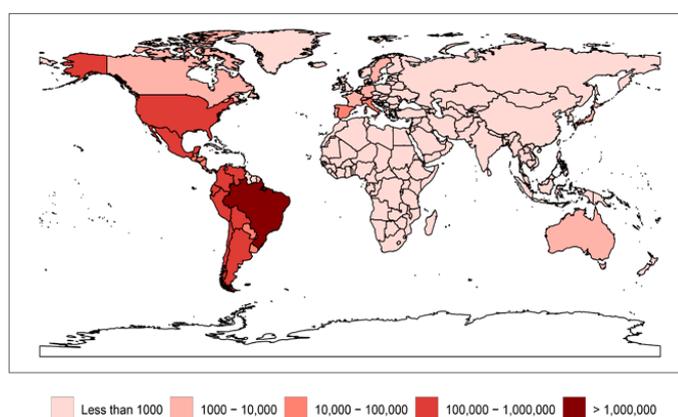


Figura 7. Balance global de la enfermedad de Chagas en 2020 ¹³

Hoy en día, como consecuencia de la variación de la eficacia de los diferentes fármacos frente a la leishmaniasis, dependiendo de la forma clínica de esta, las diferentes especies de *Leishmania* y la región geográfica, se usan los antimoniales pentavalentes como primera línea de tratamiento. En cuanto a los tratamientos de segunda línea, llama la atención la anfotericina B, miltefosina y paromomicina¹⁴. A modo resumen, las principales características de cada uno de estos fármacos se pueden ver en la tabla adjunta (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características de los fármacos usados en el tratamiento de la Leishmaniasis ¹⁵

Tratamiento	Eficacia	Inconvenientes	Resistencias
Antimonio pentavalente	35-95% dependiendo del área	Cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad.	Aumento de resistencia

Anfotericina B (Figura 8)	>90%	Nefrotoxicidad y efectos secundarios como escalofríos.	Resistencia en cepas de laboratorio
Miltefosina	94-97%	Toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, teratogenicidad.	Resistencia en cepas de laboratorio
Paromomicina	94% (India) 46-85% (África dependiendo de la dosis)	Nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, ototoxicidad.	Resistencia en cepas de laboratorio

Tanto en el caso de leishmaniasis cutánea como mucocutánea, el diagnóstico se basa en métodos clínicos y directos como pueden ser biopsias o aspirados de lesiones. Por el contrario, en el caso de leishmaniasis visceral se utilizan métodos indirectos como inmunofluorescencia (IFI) o inmunoensayo enzimático (ELISA)¹⁶.

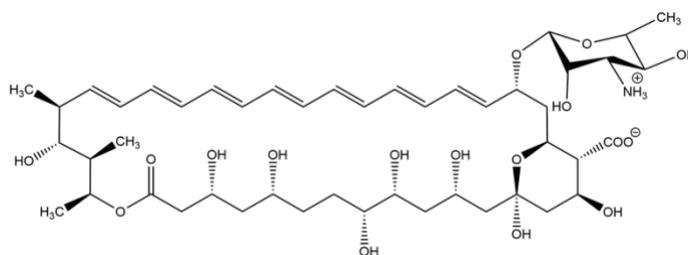


Figura 8. Estructura de la anfotericina B

Por otra parte, para la enfermedad de Chagas como tratamiento se usan dos fármacos, el benznidazol **(Figura 9)** y el nifurtimox **(Figura 10)**, contando ambos con una eficacia cerca del 100% en caso de ser inyectados al comienzo de la infección en la etapa aguda, así como en los casos de transmisión congénita¹¹. Sin embargo, después de la infección con el parásito, la efectividad del tratamiento disminuye a lo largo de los años¹⁷.

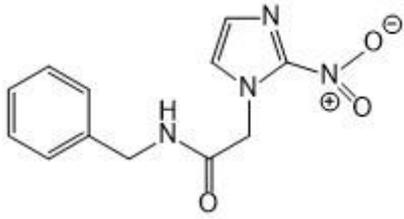


Figura 9. Estructura del benznidazol

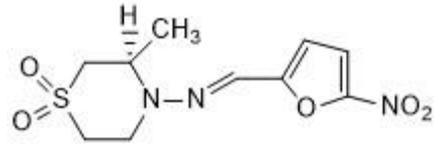


Figura 10. Estructura del nifurtimox

Además, durante la fase aguda se puede llevar a cabo un diagnóstico parasitológico, en el que se detecte *T. cruzi* mediante microscopía a partir de muestras de sangre, mientras que durante la fase crónica se puede realizar un diagnóstico molecular mediante PCR¹⁸.

La quimioterapia actual ante estas enfermedades incluye resistencia generalizada a los medicamentos, toxicidad, largos ciclos de administración y un elevado costo. Además, a estos inconvenientes se le suma la falta de una vacuna efectiva, hecho que hace imprescindible la investigación de nuevas alternativas a los tratamientos actuales¹⁹.

1.2. Estrategias en el diseño de fármacos

El diseño de fármacos suele considerarse como un proceso largo que implica la identificación de los candidatos, síntesis, caracterización, detección y ensayos para determinar la eficacia terapéutica.

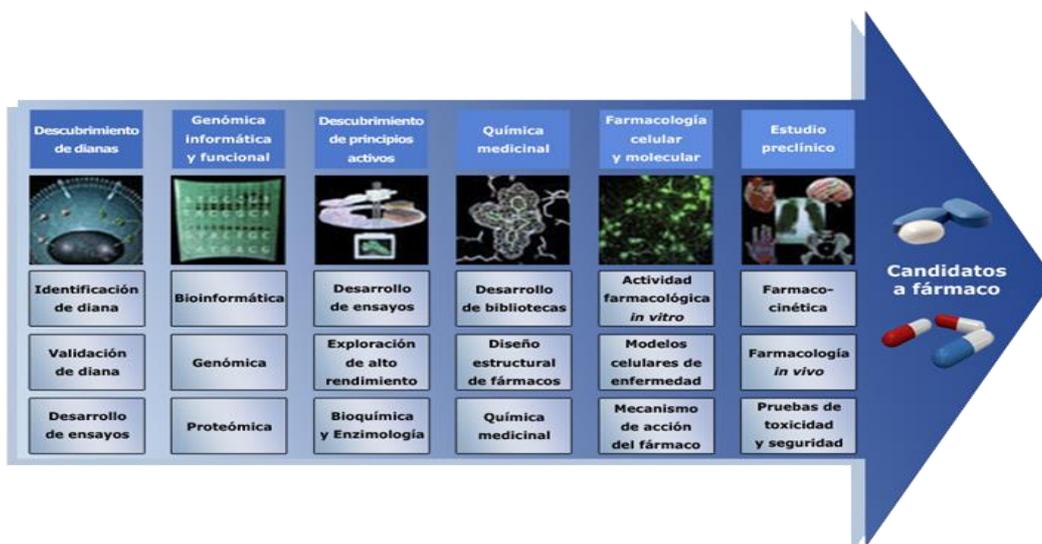


Figura 11. Etapas del descubrimiento, diseño y desarrollo de fármacos²⁰

En el diseño de un fármaco caben destacar dos fases: una primera fase donde se produce su descubrimiento (fase preclínica) y una segunda donde se desarrolla (fase clínica). Las estrategias seguidas durante la fase preclínica son²¹:

1. Selección de una diana terapéutica: Puede ser una proteína transportadora, una enzima o un receptor.
2. Identificación, descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias bioactivas: Se basa en la obtención de un *compuesto líder* a partir de ensayos *in vitro* con la diana seleccionada.
3. Optimización: Una vez obtenido el compuesto *cabeza de serie (líder)* se prepara una quimioteca de compuestos para aumentar la potencia y selectividad, así como para disminuir la toxicidad de la sustancia bioactiva.
4. Estudios farmacológicos: Se llevan a cabo para seleccionar el candidato a fármaco idóneo en función de su eficacia y seguridad.

La optimización de un *compuesto líder* se realiza mediante la síntesis de análogos de un *cabeza de serie* que tiene como objetivos:

- Aumentar la potencia del líder.
- Reducir los efectos secundarios.
- Potenciar acciones secundarias deseadas.
- Separar actividades en compuestos multi-acción.
- Combinar actividades.
- Modificar la biodisponibilidad.
- Identificar el farmacóforo.
- Estudiar relación estructura-actividad.

Para descubrir nuevos agentes terapéuticos más potentes y selectivos mediante la modificación estructural del *cabeza de serie* y mejorando sus propiedades farmacológicas se siguen varias estrategias establecidas en Química Médica destacando las siguientes ²²:

- a) Simplificación estructural: Se realizan simplificaciones progresivas de una molécula hasta hacerla más asequible desde el punto de vista sintético.
- b) Aumento de la rigidez y/o complejidad: La introducción de anillos o insaturaciones en una cadena carbonada produce un aumento de la rigidez del producto, provocando la disminución de la libertad conformacional y de los efectos secundarios, haciendo que tengan lugar menos interacciones fármaco-receptor.
- c) Variación de sustituyentes: Mediante el intercambio de grupos funcionales se pueden modificar propiedades como la solubilidad, la basicidad, la densidad electrónica, la conformación o sus propiedades farmacológicas²³. De este modo, la introducción de elementos bioactivos en la molécula constituye una atractiva alternativa para modificar estructuralmente el compuesto líder.

1.2.1. *Compuestos heterocíclicos de nitrógeno*

Los compuestos heterocíclicos desempeñan un papel vital en el metabolismo de todas las células vivas. La mayoría de ellos son compuestos heterocíclicos de cinco y seis miembros. Algunos de los más utilizados en medicamentos son aminoácidos como la prolina, la histidina y el triptófano, las vitaminas y coenzimas precursoras como la tiamina, riboflavina, piridoxina o ácido fólico²⁴.

En la naturaleza se pueden encontrar compuestos heterocíclicos de nitrógeno formando parte de muchas moléculas farmacológicamente activas. Estos ofrecen un alto grado de diversidad estructural que ha demostrado ser útil para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con mejoras en sus propiedades farmacológicas.

Asimismo, los pares de bases que constituyen el ADN y ARN (guanina, citosina, adenina y timina) contienen también compuestos *N*-heterocíclicos, purinas y pirimidinas (**Figura 12**). Debido a sus características y aplicaciones han ganado importancia en los campos de la Química Orgánica y la industria farmacéutica. Por ello, cerca de un 75% de los fármacos cuentan con heterociclos de nitrógeno.

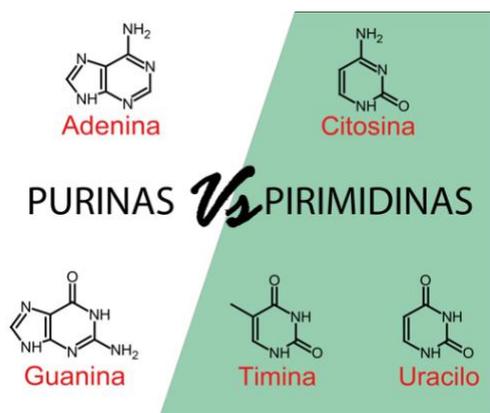


Figura 12. Purinas y pirimidinas como ejemplos de compuestos *N*-heterocíclicos ²⁵

Además, los compuestos heterocíclicos de nitrógeno presentan diversas aplicaciones terapéuticas, siendo usados como bloques de construcción de nuevos fármacos debido a la capacidad con la que cuenta el átomo de nitrógeno para formar fácilmente enlaces de hidrógeno con dianas biológicas.

A diferencia de los fármacos que se encuentran actualmente en la práctica clínica, los compuestos que contienen nitrógeno presentan grandes ventajas como son su fácil preparación, baja toxicidad, alta biodisponibilidad, menor resistencia a otros medicamentos, buena biocompatibilidad, etc²⁶.

Entre ellos destacan aquellos fármacos que contienen una molécula de imidazol. Este es un compuesto heterocíclico de cinco miembros conocido también como 1,3-diazol. Debido a la presencia de una carga positiva en cualquiera de los dos átomos de nitrógeno, el 1,3-diazol presenta dos formas tautoméricas equivalentes (**Figura 13**). Además, cuenta con 6 electrones π (4 de los dobles enlace y 2 del nitrógeno) que hacen del imidazol un compuesto aromático teniendo en cuenta la regla de Hückel.

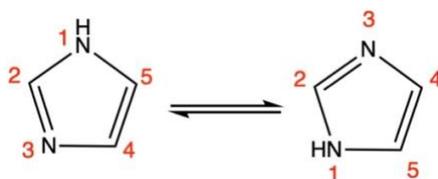


Figura 13. Formas tautoméricas del imidazol.

En la naturaleza, es un anfótero que cuenta con propiedades tanto ácidas como básicas. Además, es el esqueleto de algunos productos naturales como, por ejemplo, histidina (**Figura 14**), purina e histamina.

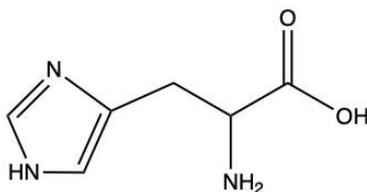


Figura 14. Estructura de la histidina.

Asimismo, el 1,3-diazol cuenta con una amplia variedad de propiedades químicas y biológicas, que hacen que se haya convertido en un síntón de gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos. Así, sus derivados poseen diferentes actividades biológicas tales como antibacterianos, antiinflamatorios, antivirales y antifúngicos entre otras, aunque destaca su actividad antitumoral²⁷.

1.3. Productos naturales como fuente de agentes terapéuticos

A pesar de que las plantas medicinales siempre han sido utilizadas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, en los últimos años, se ha incrementado el interés por formulaciones basadas en productos naturales ya sea por su baja o nula toxicidad, su biodegradabilidad, disponibilidad de fuentes naturales o por su bajo costo en comparación con la mayoría de los compuestos obtenidos por síntesis química.

Este tipo de medicina denominada como “tradicional” en países en vía de desarrollo cubre las necesidades sanitarias primarias de más de un billón de personas que no pueden costearse otras alternativas. Debido a ello, la OMS incentiva el estudio de plantas medicinales como una fuente eficaz para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos²⁸.

Por su parte, los productos naturales, en particular los de origen microbiano y vegetal, han desempeñado un papel esencial como nuevas entidades químicas para el descubrimiento de fármacos útiles y difíciles de obtener mediante una vía

sintética. Sobre todo, lo que destaca de ellos es su enorme diversidad estructural y biológica²⁹.

Algunos de los ejemplos más llamativos de fármacos obtenidos a partir de productos naturales no modificados son el antitumoral **vincristina (Figura 15)**, obtenido del arbusto *Catharanthus roseus* de Madagascar, responsable del aumento de la supervivencia de niños con leucemia y el inmunosupresor **rapamicina (Figura 16)**, aislado del *Streptomyces hygroscopicus* (bacteria que se encuentra en el suelo de la Isla de Pascua), usado en el trasplante de riñón³⁰.

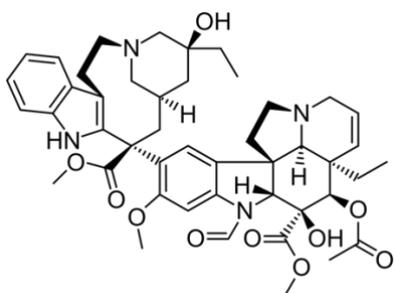


Figura 15. Estructura de la vincristina³¹

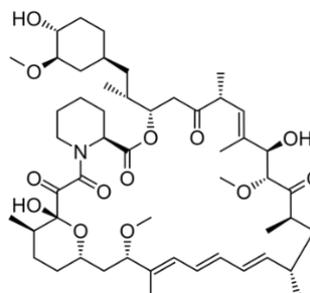


Figura 16. Estructura de la rapamicina³²

El incremento del uso de productos naturales como fuente de fármacos se puede apreciar en los artículos publicados por Newman y Cragg que muestran la evolución del peso de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos abarcando, en uno de sus artículos publicado en 2020, el periodo comprendido entre 1981 y 2019³³ (**Figura 17**).

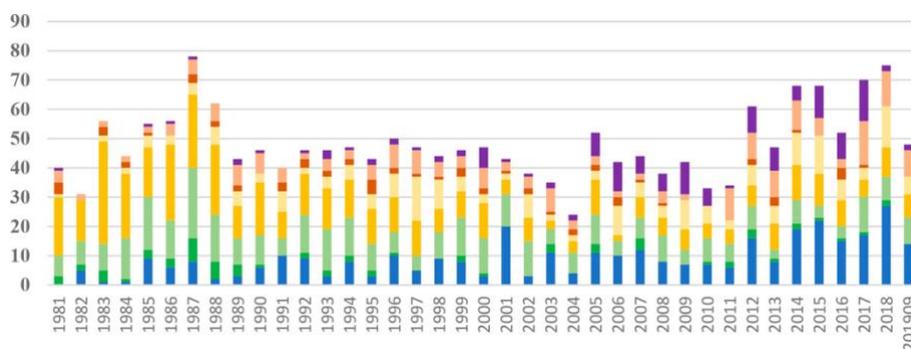


Figura 17. Distribución de los nuevos fármacos aprobados por año³³

Por otra parte, muchos de los fármacos sintéticos causan efectos secundarios que no son aceptables excepto como tratamientos de último recurso para

enfermedades terminales como el cáncer. Sin embargo, los metabolitos descubiertos en plantas medicinales y otros productos naturales carecen de estos efectos secundarios ocasionados por los fármacos sintéticos²⁹.

Actualmente, alrededor de un 50% de los medicamentos de uso clínico derivan o se sintetizan a partir de productos naturales, cuyas únicas fuentes disponibles son plantas y microorganismos. Por ello, dada la diversidad estructural y biológica de los constituyentes de las plantas, estas se consideran un recurso único y renovable para el descubrimiento de nuevos fármacos^{34,35}.

1.4. Estado actual del tema. Withanolidas

Las withanolidas son un grupo de lactonas esteroides polioxigenadas que gozan de una distribución limitada en el reino vegetal y se encuentran principalmente en géneros de la familia botánica Solanaceae³⁶. Están basadas en un esqueleto de ergostano tipo C₂₈ y caracterizadas por la presencia de un anillo de δ - o γ -lactona, formado por un grupo carboxílico en C-26. Además, presentan una cadena carbonada de 9 átomos de carbono sobre la posición C-17 y dos metilos en C-10 y C-13³⁷ (**Figura 18**).

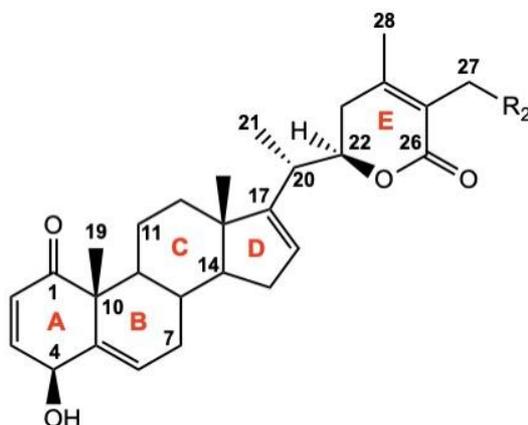


Figura 18. Estructura base de una withanolida.

El género *Withania* se encuentra distribuido en la región macaronésica, que comprende el este del área mediterránea y el sur de Asia, y algunas de sus especies cuentan con gran renombre en la medicina popular en la actualidad. Entre las especies del género *Withania*, la especie *Withania aristata* (**Figura 19**) es una planta endémica de Canarias que ha sido utilizada en la medicina

tradicional como agente cicatrizante, así como para el reumatismo, enfermedades oculares y otitis, insomnio, estreñimiento y para combatir patologías urinarias y el cáncer³⁸.



Figura 19. *Withania aristata*³⁹.

Debido a sus únicos y diversos esqueletos estructurales, las withanolidas presentan una gran variedad de actividades farmacológicas tales como antiinflamatoria, inmunomoduladora, y antitumoral⁴⁰. Se encuentran descritas en torno a 580 withanolidas no modificadas aisladas únicamente de especies de la familia Solanaceae y aquellas con estructuras más complejas ya sea por modificación del núcleo o de la cadena lateral del esteroide pueden ser originadas mediante transformaciones genéticas de las withanolidas no modificadas⁴¹.

Por su parte, withaferina A (WA) es uno de los productos naturales más representativos de los esteroides con esqueleto de withanolida y es considerada como el compuesto “líder” o cabeza de serie entre los metabolitos que se encuentran en el género *Withania*.

Fue la primera withanolida en ser aislada y caracterizada por David Lavie y Asher Yarden en 1962. En 1965, Lavie aisló withaferina A de las hojas de *Withania somnifera* y le asignó la fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_6$ determinando, finalmente, todos sus grupos funcionales. Por último, Lavie en el año 1968 estableció su estructura⁴²⁻⁴⁴ (**Figura 16**).

Previamente, withaferina A se investigó en 1967 como agente anticancerígeno y desde entonces se ha ido describiendo en diferentes artículos un amplio abanico de líneas celulares cancerígenas y dianas sobre las que actúa⁴⁵.

Se considera un agente terapéutico prometedor contra diferentes cánceres como el de mama, cuello uterino, próstata, pulmón y páncreas. Además, se ha demostrado que mediante la administración de extracto de *Withania somnifera* se produce un alivio de la toxicidad y la fatiga inducidas por la quimioterapia.

Por otra parte, withaferina A (**Figura 20**) ha sido estudiada por sus propiedades antiinflamatorias, antineurodegenerativas, antivirales, antiangiogénicas y anticancerígenas⁴⁶. Esto ha quedado claramente reflejado en los numerosos estudios que se han llevado a cabo sobre el potencial de withaferina A y sus análogos por el grupo de investigación QUIMIOPLAN, Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, que ponen de manifiesto que withaferina A es el metabolito mayoritario de *Withania aristata*, siendo esta una fuente excepcional de withanolidas⁴⁷⁻⁵⁰.

Desde el punto de vista estructural, withaferina A posee una lactona polifuncional con 28 átomos de carbono basado en un esqueleto de ergostano, en el que los carbonos 22 y 26 se oxidan para formar una δ -lactona con 5 funcionalidades principales: un grupo cetona α,β -insaturado en el anillo A, un grupo alcohol secundario en el carbono 4, un anillo de epóxido lábil entre los carbonos 5 y 6, un grupo hidroxilo primario en el carbono 27 y un anillo lactónico de 6 miembros con un grupo carbonilo α,β -insaturado⁵¹.

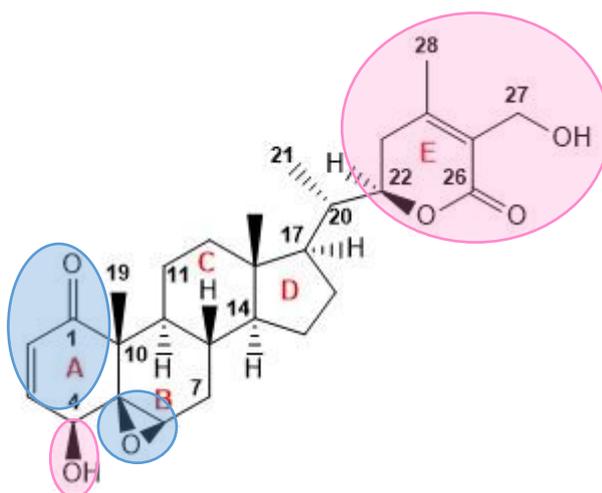


Figura 20. Estructura de withaferina A, destacando sus centros activos.

Según estudios previos de SAR⁴⁹ (Relación estructura-actividad) las zonas sombreadas de azul en la figura anterior representan aquellas regiones de la molécula que son esenciales para la actividad biológica, mientras que las sombreadas en rosado representan aquellas que no son esenciales pero cuya modificación puede modularla (quimiomodulación).

Así, tanto el carbonilo α,β -insaturado como el epóxido sombreados en azul son partes esenciales de la molécula ya que una modificación estructural del primero o una apertura del segundo pueden reducir gravemente su actividad. Mientras tanto, el alcohol primario en C-27, el alcohol secundario en C-4 y el anillo lactónico no son motivos estructurales esenciales para la actividad de la molécula por lo que se prestan a modificación en caso de llevar a cabo una optimización del perfil farmacológico de este prometedor cabeza de serie⁴⁸.

Por otra parte, los grupos hidroxilos son de gran importancia en la molécula ya que le confieren cierto grado de polaridad puesto que pueden llevar a cabo interacciones mediante enlaces de hidrógeno y el átomo de oxígeno también puede actuar como nucleófilo. De esta forma, se convierten en grupos funcionales clave para llevar a cabo transformaciones con el fin de investigar cuál es su papel en la actividad biológica. Un ejemplo de ello es la oxidación del grupo hidroxilo a carbonilo, que conlleva un cambio del carácter de este que pasa de ser dador y aceptor de enlaces de hidrógeno a únicamente aceptor.

En el caso de que sean grupos hidroxilos los que formen enlaces con la molécula diana, al acilar, la interacción se pierde y la actividad debe disminuir o desaparecer. Sin embargo, la actividad puede aumentar en el caso de que se introduzcan ésteres de distinta naturaleza como ésteres aromáticos que puedan interactuar con la molécula diana mediante enlaces π - π hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno^{52,53}.

Asimismo, a pesar de los numerosos trabajos que se han llevado a cabo sobre el potencial anticancerígeno de withaferina A y sus análogos, tanto por nuestro grupo de investigación como por otros investigadores, no existe ningún estudio en relación con su potencial antiparasitario salvo un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo de investigación⁴⁷.

Teniendo en cuenta los antecedentes comentados anteriormente y siguiendo la línea de investigación desarrollada en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González por el grupo de investigación QUIMIOPLAN, cuyo objetivo es la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad biológica y la optimización de compuestos líderes, se plantean en este Trabajo Fin de Grado (TFG) los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS

Este TFG tiene como objetivo principal la preparación de una quimioteca de análogos con potencial antiparasitario (quimiomodulación), a partir de un compuesto líder, withaferina A. El desglose de los objetivos específicos sería el siguiente:

1. Búsqueda bibliográfica de withanolidas de origen natural, así como de sus actividades biológicas y farmacológicas.
2. Optimización del método de extracción de withaferina A de las hojas de *Withania aristata*, especie endémica de Canarias.
3. Aislamiento, mediante técnicas cromatográficas, de withaferina A, siendo el metabolito mayoritario de la especie objeto de estudio.
4. Preparación de análogos de withaferina A, haciendo uso de dos estrategias: introducción de motivos estructurales que contienen nitrógeno en el esqueleto de withaferina A (reacción de Michael) y esterificaciones.
5. Elucidación estructural de los análogos preparados mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
6. Evaluación de la actividad antiparasitaria con la colaboración del grupo de investigación del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Withanolidas aisladas de las hojas de *Withania aristata*

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en este Trabajo Fin de Grado, el primer paso a llevar a cabo fue el aislamiento de withaferina A, metabolito usado como plataforma para la preparación de análogos, a partir de las hojas de *Withania aristata*, especie endémica de Canarias.

Para ello, a fin de desarrollar un método rápido para la obtención de withaferina A, se llevó a cabo la preparación de extractos partiendo de hojas de *Withania aristata* finamente divididas, usando el Soxhlet como técnica de extracción y empleando, separadamente, hexanos y acetona como disolventes.

Los extractos así obtenidos, fueron concentrados a presión reducida en el rotavapor para eliminar el disolvente y posteriormente, analizados mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando una muestra de withaferina A como referencia. Este análisis mostró la presencia de dicho metabolito únicamente en el extracto acetónico, siendo este seleccionado para un posterior estudio y, por tanto, descartando el extracto hexánico.

A continuación, el extracto acetónico, se cromatografió en columna, a fin de aislar y purificar el compuesto de interés, withaferina A. Para ello, se utilizó como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexanos/acetato de etilo y, posteriormente, acetato de etilo/etanol de polaridad creciente. Se obtuvieron, así, 29 fracciones que, a su vez, se combinaron en base a su similitud en CCF en 3 fracciones.

Los posteriores análisis mediante cromatografía en capa fina permitieron seleccionar la fracción enriquecida en withaferina A (F-2). Además, durante dicho proceso también se aisló otra withanolida, 16,17-didehidro-withaferina A (W-16), junto con withaferina A en el extracto acetónico.

Por último, se realizó la purificación de withaferina A mediante cromatografía, utilizando dos técnicas cromatográficas: cromatografía en columna con gel de sílice, usando como fase móvil diclorometano/acetona en polaridad creciente y

cromatografía en capa fina circular preparativa (Chromatotron), usando como disolvente una mezcla de diclorometano/acetona (6.5 : 3.5).

Siguiendo este procedimiento se aíslan dos withanolidas mayoritarias, withaferina A (WA) y W-16, ya aisladas en estudios previos⁴⁹. Las estructuras de ambos metabolitos se establecieron mediante el análisis de sus datos espectroscópicos, de RMN de ¹H y ¹³C y espectrométricos y comparación con los datos existentes en la bibliografía química. Así, los compuestos fueron identificados como (4 β ,5 β ,6 β ,22R)-4,27-Dihidroxi-5,6:22,26-diepoxi ergosta-2,24-dieno-1,26-diona (withaferina A, WA) y 16,17-didehidro-withaferina A (W-16), cuyas estructuras se muestran a continuación (**Figura 21**).

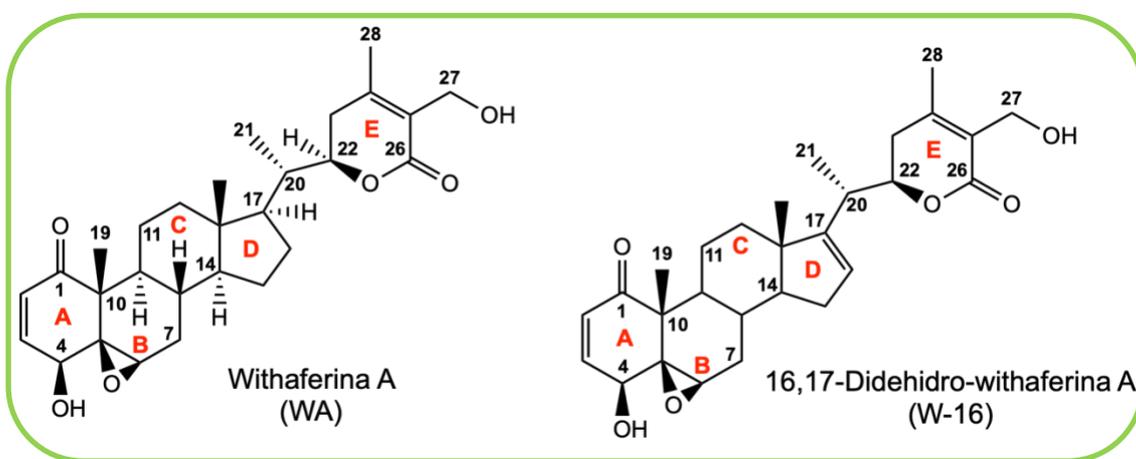


Figura 21. Withanolidas aisladas de *Withania aristata*.

Teniendo en cuenta la estructura de ambas moléculas, como diferencia más significativa destaca la presencia de un doble enlace entre los carbonos 16 y 17 en el caso de 16,17-Didehidro-withaferina A con respecto a withaferina A.

Por su parte, un cuidadoso estudio de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (**Figuras 22 y 23**), permitieron la asignación de las señales correspondientes a los protones y los carbonos de la molécula de withaferina A, usada como compuesto de partida en la preparación de análogos.

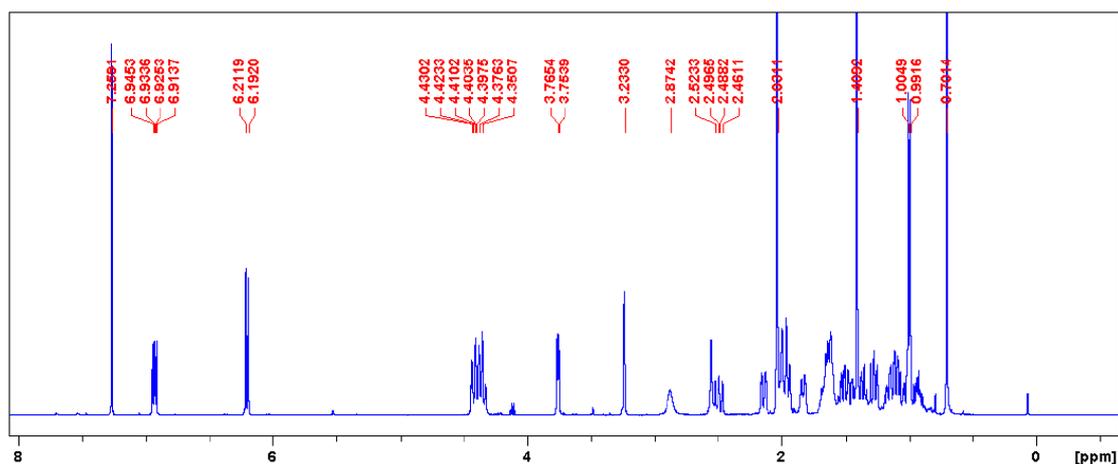


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de withaferina A

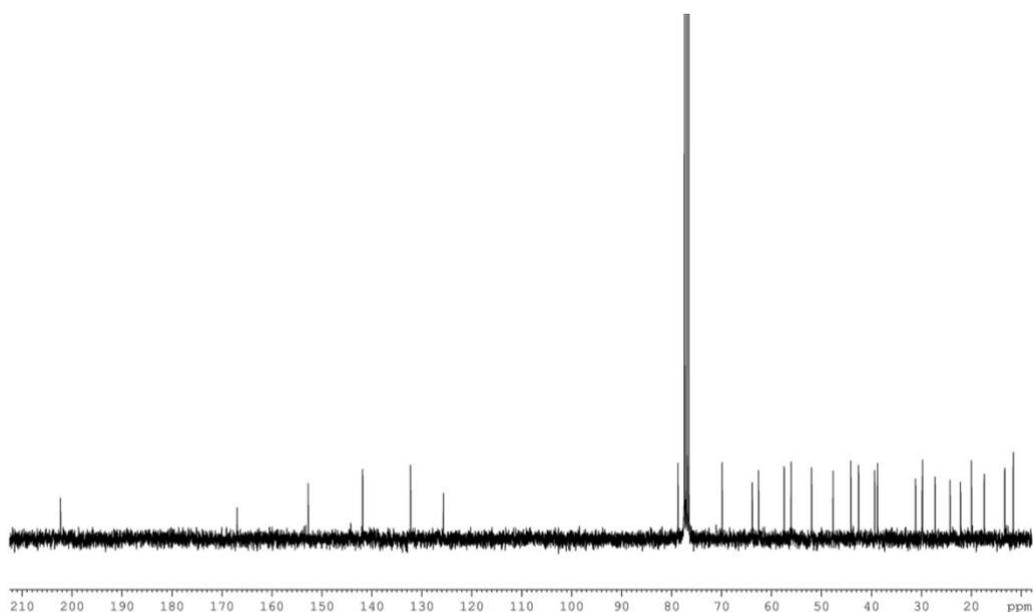


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) de withaferina A

Así, como señales más significativas, su espectro de RMN de ^1H (**Figura 22**) indicó la presencia de 4 metilos cuyos desplazamientos químicos corresponden a δ_{H} 0.70 (3H, s, Me-18), 0.99 (3H, d, $J= 6.7$ Hz, Me-21), 1.40 (3H, s, Me-19) y 2.03 (3H, s, Me-28), un epóxido a δ_{H} 3.23 (1H, s, H-6), dos grupos hidroxilos, uno primario a δ_{H} 4.32, 4.48 (2H, d_{AB} , $J= 12.5$ Hz, H-27) y otro secundario a δ_{H} 3.76 (1H, d, $J= 6.0$ Hz, H-4), una C-22/C-26 δ -lactona a δ_{H} 4.42 (1H, dt, $J= 13.3, 3.4$ Hz, H-22) y una cetona α,β -insaturada con señales a δ_{H} 6.20 (1H, d, $J= 10.0$ Hz, H-2) y δ_{H} 6.93 (1H, dd, $J= 5.9, 10.0$ Hz, H-3). Estos datos son característicos de

un esqueleto de withanolida y superponibles con los datos de una muestra auténtica de withaferina A.

En su espectro de RMN ^{13}C (**Figura 23**), se observaron señales correspondientes a 28 carbonos, distribuidos de la siguiente manera: cuatro carbonos metílicos, seis carbonos metilénicos, diez carbonos metínicos y ocho carbonos cuaternarios. Las señales más características en dicho espectro de RMN ^{13}C son las de la cetona α,β -insaturada a δ_{C} 201.5 (C-1), 132.3 (CH-2) y 141.2 (CH-3), alcohol primario a δ_{C} 57.5 (CH₂-27) y alcohol secundario a δ_{C} 69.8 (CH-4). Asimismo, se observan señales correspondientes al epóxido situado entre los carbonos 5 y 6 a δ_{C} 62.6 (CH-6) y 63.9 (C-5), a la δ -lactona a δ_{C} 29.9 (CH₂-23), 78.7 (CH-22), 125.7 (C-25), 152.6 (C-24) y 167.1 (C-26), así como las correspondientes a los cuatro metilos a δ_{C} 11.6 (CH₃-18), 13.4 (CH₃-21), 17.5 (CH₃-19) y 20.1 (CH₃-28).

Estos datos están de acuerdo con los de una estructura de withanolida y la comparación de los mismos con los existentes en la literatura química confirmaron la estructura propuesta como la de withaferina A.

3.2. Preparación de derivados de withaferina A

Debido a las características estructurales y el amplio rango de actividades biológicas que presentan las withanolidas, se ha generado un gran interés en compuestos que presenten este tipo de esqueleto, haciendo de este grupo de productos naturales "estructuras privilegiadas".

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación⁴⁷ (QUIMIOPLAN) en colaboración con el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, muestran que withaferina A presenta una prometedora actividad leishmanicida. Por ello, con el objetivo de modular la actividad antiparasitaria y llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad (SAR), se prepararon una serie de análogos, a partir del compuesto líder withaferina A, con el objetivo de optimizar y mejorar su perfil farmacológico.

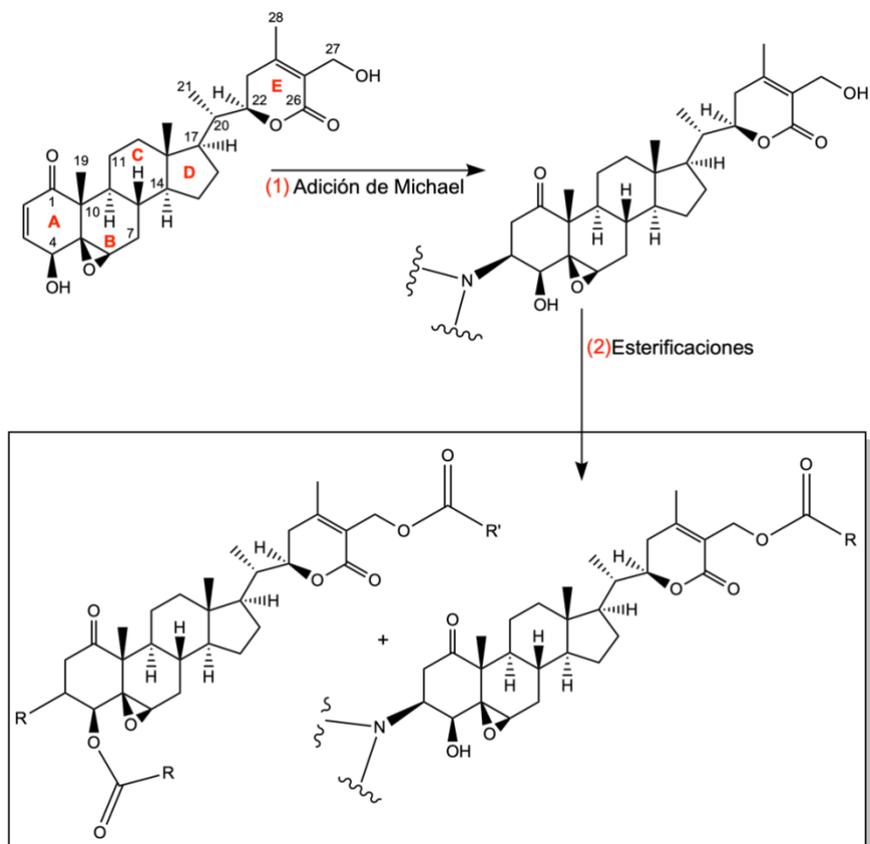
Teniendo en cuenta que los centros reactivos de la molécula de withaferina A son la enona, el epóxido, los dioles y la lactona⁴⁹, para la preparación de sus derivados se siguieron dos estrategias:

Una estrategia conjuntiva, llevando a cabo una reacción de Michael sobre la enona del anillo A, con la finalidad de combinar dos motivos estructurales, el esteroide y un heterociclo de nitrógeno tipo imidazol, a fin de optimizar el perfil biológico de withaferina A y validar la importancia que tiene la enona en la actividad biológica de dicho compuesto⁴⁸.

Por otra parte, la introducción de funciones básicas tales como grupos aminos protonables, mediante la preparación de azoesteroides, permite aumentar la solubilidad de un compuesto, mejorando su biodisponibilidad y favoreciendo, así, aspectos farmacocinéticos de dicho compuesto.

Modificación estructural del alcohol primario en C-27 y del alcohol secundario en C-4 mediante reacciones de esterificación, teniendo presente trabajos previos en los cuales destaca el importante papel que juegan los grupos hidroxilos en la actividad biológica de los withaesteroides^{48,49}.

Así, siguiendo estas estrategias y usando withaferina A como producto de partida, se llevó a cabo la reacción de adición de Michael con nucleófilos de nitrógeno y oxígeno, obteniéndose, de esta forma, los correspondientes aza/oxa-esteroides. Asimismo, se llevaron a cabo reacciones de esterificación, usando anhídridos o cloruros de ácido con distintas características estructurales como se indica en el siguiente esquema (**Esquema 1**).



Esquema 1. Esquema de síntesis de análogos de la withaferina A.

Las estructuras de los análogos sintetizados fueron determinadas haciendo uso de técnicas espectrométricas y espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos heteronucleares, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) y homonucleares, ROESY (Heteronuclear Single Quantum Coherence). A continuación, se procede a describir la preparación de los análogos objeto de este Trabajo Fin de Grado, así como su elucidación estructural.

a. Preparación de 3 β -metoxi-withaferina A: Reacción con azida sódica

A una disolución de withaferina A en diclorometano a temperatura ambiente, se le añadió azida sódica y un exceso de Al_2O_3 . La reacción se agitó durante dos horas, siguiendo su evolución mediante análisis de cromatografía en capa fina (CCF). Sin embargo, se observó que el material de partida permanecía inalterado, por lo que se repitió la reacción usando metanol como disolvente para mejorar la solubilidad de la azida sódica, produciéndose la reacción de forma

inmediata y dando lugar al 3 β -metoxi-withaferina A, cuya estructura fue determinada mediante sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

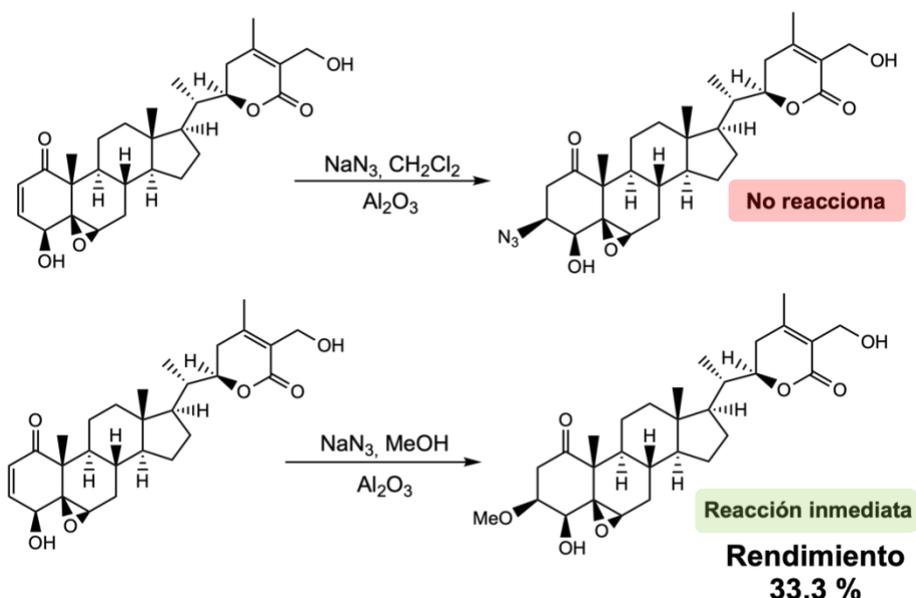


Figura 24. Esquema de síntesis de 3 β -metoxi-withaferina A a partir de withaferina A

El derivado mostró en su espectro de RMN de ^1H como diferencias más significativas con el de withaferina A, la presencia de señales correspondientes a un grupo metoxilo a δ_{H} 3.34 (3H, s, OMe), un protón oximetínico a δ_{H} 3.69 (1H, ddd, $J= 4.1, 6.5, 9.8$ Hz, H-3), un metileno a δ_{H} 2.61 (1H, dd, $J= 15.1, 4.1$ Hz, H-2 α) y 2.99 (1H, dd, $J= 15.1, 6.5$ Hz, H-2 β), así como la desaparición de las señales de los protones vinílicos a δ_{H} 6.20 (1H, d, $J= 10.0$ Hz, H-2) y a δ_{H} 6.93 (1H, dd, $J= 5.9, 10.0$ Hz, H-3) presentes en withaferina A.

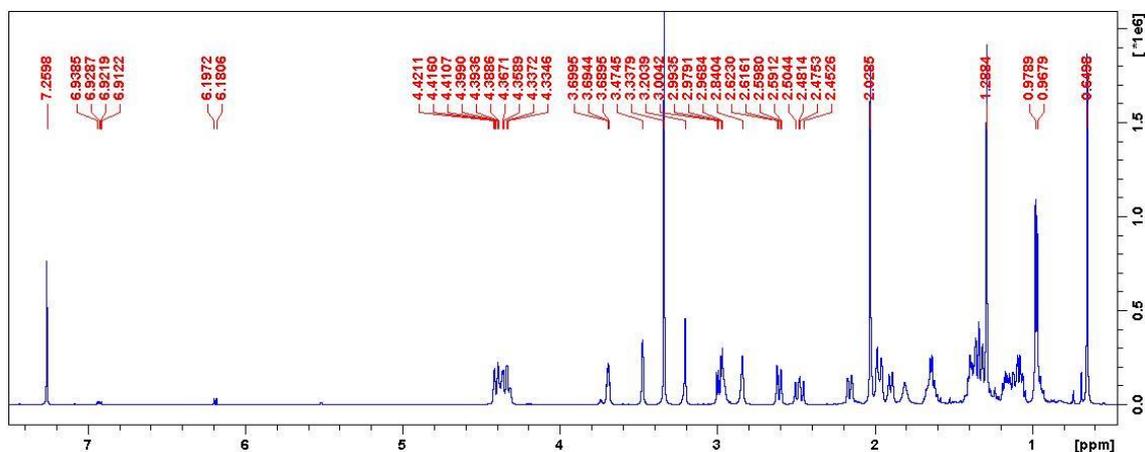


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del 3 β -metoxi-withaferina A

Estos datos fueron confirmados mediante RMN de ^{13}C , en cuyo espectro se observó la presencia de señales correspondientes a un carbono metilénico a δ_{C} 39.6 (t, C-2), un carbono metínico unido a oxígeno a δ_{C} 77.5 (d, C-3) y un grupo metoxilo a δ_{C} 56.8 (c, OMe).

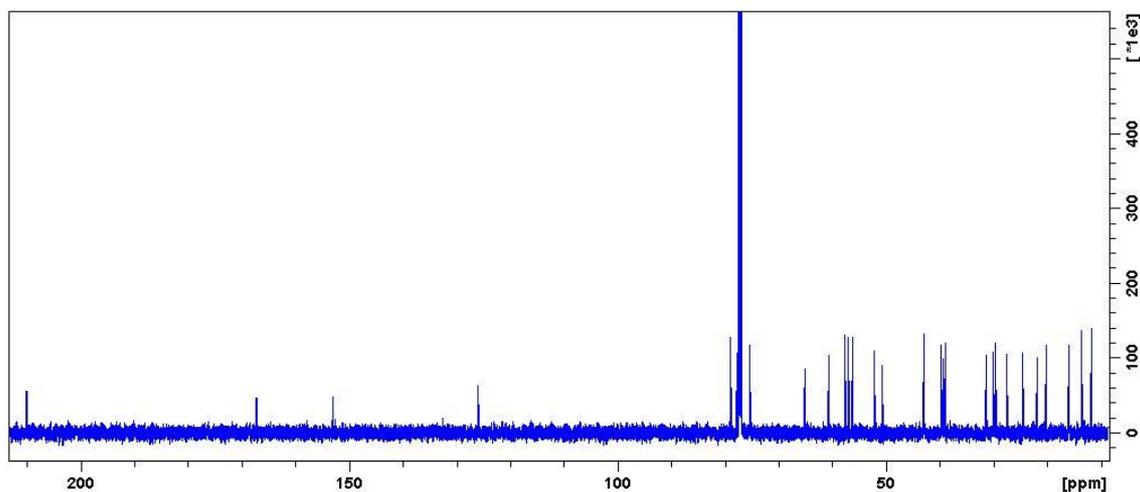


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) del 3 β -metoxi-withaferina A

b. Preparación de 3 β -propargilamino-withaferina A: Reacción con propargilamina

La reacción de withaferina A con propargilamina y un exceso de Al_2O_3 en CH_2Cl_2 , rindió el análogo 3 β -propargilamino-withaferina A. Esta reacción se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación durante 3 días, siguiendo su desarrollo a través de CCF.

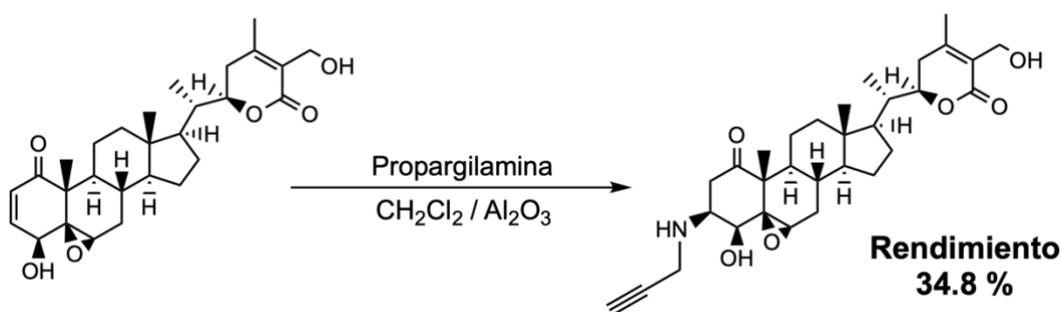


Figura 27. Esquema de síntesis de 3 β -propargilamino-withaferina A a partir de withaferina A.

En el estudio y comparación del espectro de RMN de ^1H del análogo con el del producto de partida, withaferina A, destaca la presencia de tres nuevas señales

a δ_H 3.41, 3.47 (2H, d_{AB} , $J = 17.4$ Hz, H-1') asignadas al metileno (CH_2) de la propargilamina y a δ_H 3.41 (1H, s) correspondiente al protón acetilénico.

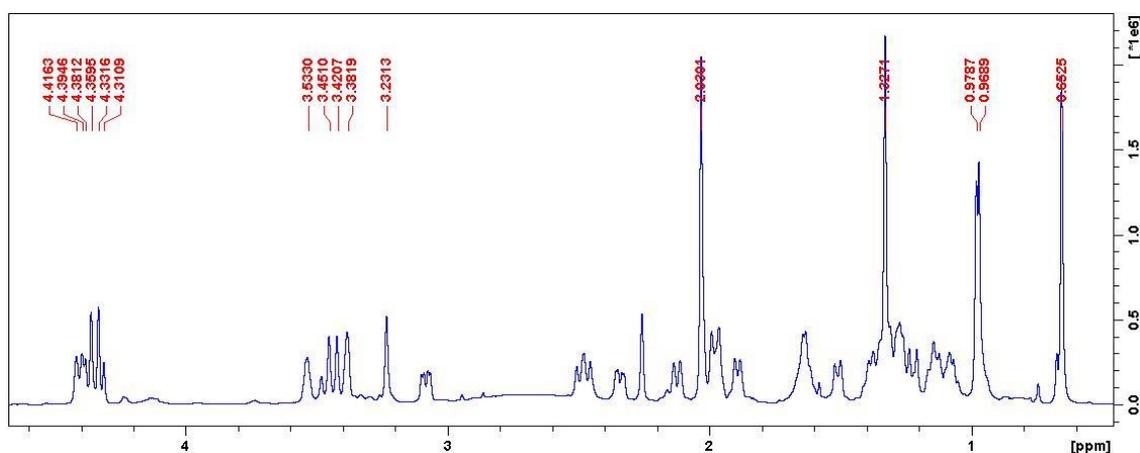


Figura 28. Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) del 3 β -propargilamino-withaferina A.

En el espectro de RMN de ^{13}C destaca, en comparación con el de withaferina A, la presencia de tres nuevas señales a δ_C 35.3 (t), 72.7 (d) y 80.6 (s), asignadas a los carbonos correspondientes a la propargilamina.

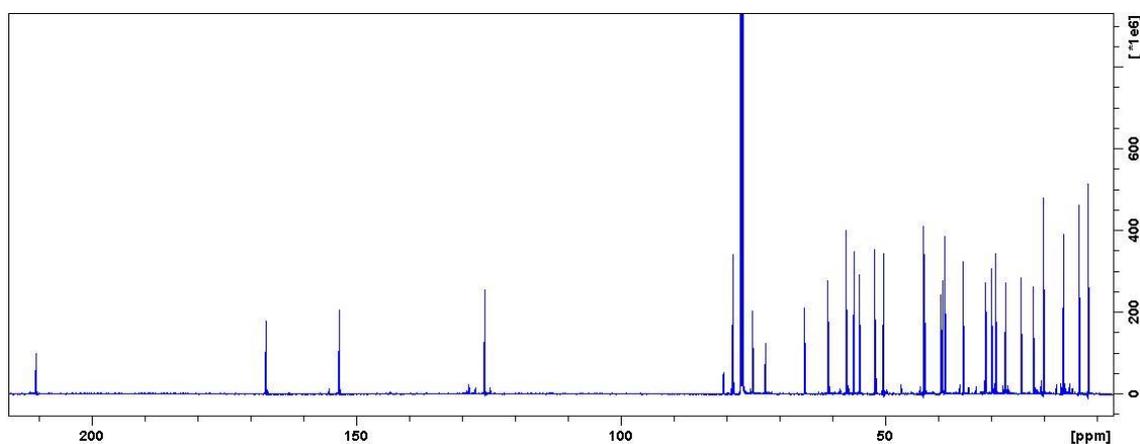


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) del 3 β -propargilamino-withaferina A.

También, cabe destacar que, al igual que ocurrió en la reacción anterior, se observa la desaparición de las señales correspondientes a los protones vinílicos a δ_H 6.20 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2) y a δ_H 6.93 (1H, dd, $J = 5.9, 10.0$ Hz, H-3), presentes en withaferina A.

c. Preparación de 3β-imidazolin-withaferina A: Reacción con imidazol

Con el objetivo de combinar dos motivos estructurales como son el esteroide y un heterociclo de nitrógeno tipo imidazol, se hizo reaccionar withaferina A con imidazol en diclorometano, usando como catalizador Al_2O_3 . La reacción se agitó durante 6 días y su evolución se siguió mediante análisis de cromatografía en capa fina.

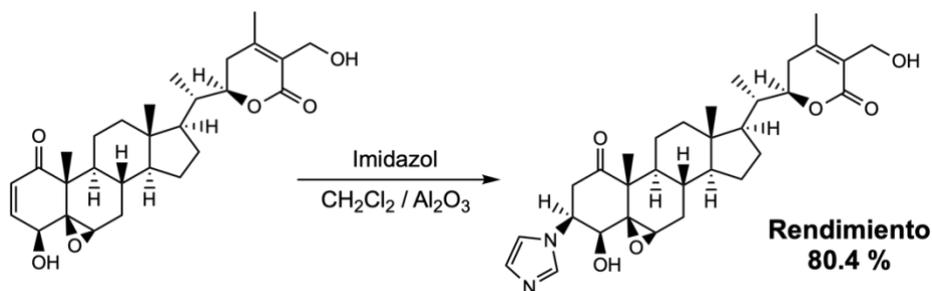


Figura 30. Esquema de síntesis de 3β-imidazolin-withaferina A a partir de withaferina A.

La estructura de este derivado fue establecida mediante espectrometría de masas, así como mediante sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos homo (ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC).

En el análisis de los datos de RMN de ^1H del 3β-imidazolin-withaferina A se observó como principal diferencia, con respecto al producto de partida, la desaparición de las señales correspondientes al doble enlace situado en los carbonos C-2 a δ_{C} 132.3 (CH-2) y δ_{H} 6.20 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), y C-3 a δ_{C} 141.2 (CH-3) y δ_{H} 6.93 (1H, dd, $J = 5.9, 10.0$ Hz, H-3), del anillo A. Por otro lado, se observó la presencia de señales en RMN de ^1H a δ_{H} 6.92 (1H, s, H-2'), 7.05 (1H, s, H-4') y 7.57 (1H, s, H-5') y en RMN de ^{13}C a δ_{C} 117,5 (d, C-2'), 129.9 (d, C-4') y 136,3 (d, C-5'), correspondientes al anillo heterocíclico del imidazol, así como la presencia de señales en RMN asignables a un carbono metilénico en C-2 a δ_{H} 2.97 (1H, dd, $J = 15.9, 6.7$ Hz, H-2 α) y 3.22 (1H, dd, $J = 15.9, 2.7$ Hz, H-2 β) y δ_{C} 39.6 (t, C-2) y un carbono metínico unido a nitrógeno en C-3 a δ_{H} 4.70 (1H, ddd, $J = 2.7, 3.9, 6.7$ Hz, H-3) y δ_{C} 56.3 (d, C-3).

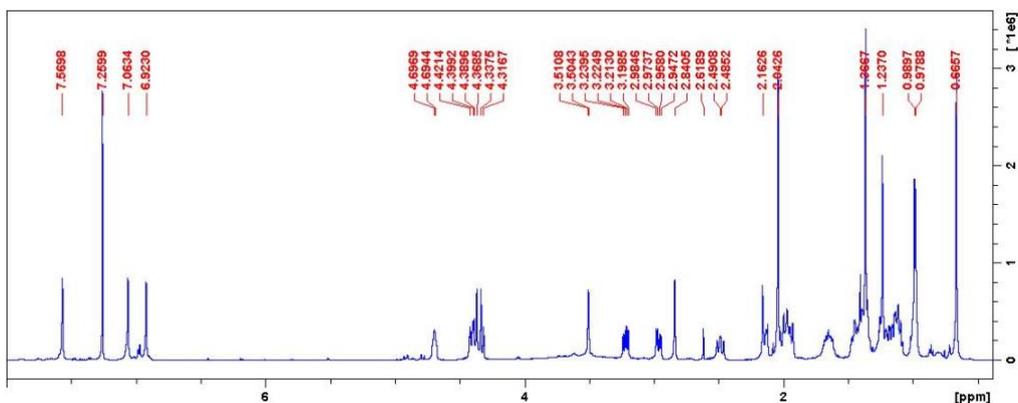


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del 3 β -imidazolin-withaferina A

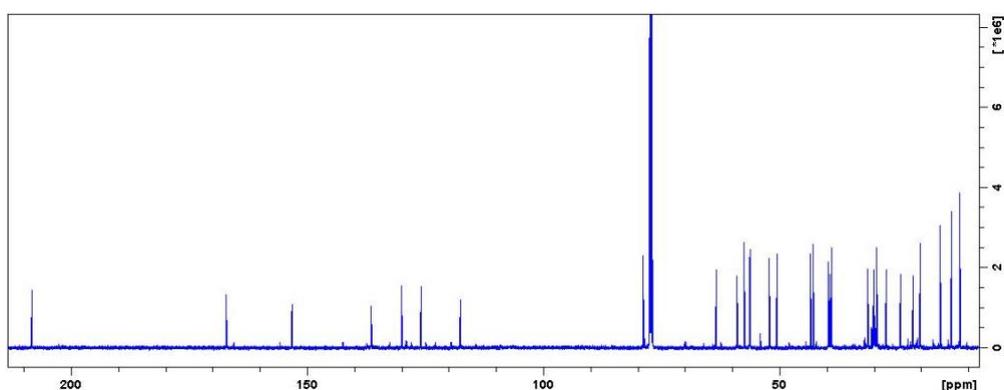


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) del 3 β -imidazolin-withaferina A

Con la finalidad de confirmar la estructura propuesta para este análogo, se llevó a cabo un estudio de experimentos de RMN bidimensionales. Así, la regiosustitución del compuesto se determinó mediante un experimento HMBC, en el que se observaron como correlaciones más remarcables las correspondientes a la señal de H-3 a δ_{H} 4.70 (1H, ddd, $J = 2.7, 3.9, 6.7$ Hz, H-3) con los carbonos C-2' y C-5' del grupo imidazol a δ_{C} 117,5 (d, C-2') y 129.9 (d, C-4') respectivamente, localizando el grupo imidazol en C-3 (**Figura 33**).

La configuración relativa fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento de H-2 a δ_{H} 2.97 (1H, dd, $J = 15.9, 6.7$ Hz, H-2 α) y 3.22 (1H, dd, $J = 15.9, 2.7$ Hz, H-2 β) y H-3 a δ_{H} 4.70 (1H, ddd, $J = 2.7, 3.9, 6.7$ Hz, H-3), que indicaron una disposición *beta* del grupo imidazol, hecho que fue confirmado mediante un experimento ROESY, en el cual se observó correlación espacial de la señal correspondiente a H-3 con las de H-4 y H-2 α , quedando establecida la disposición espacial del grupo imidazol como 3 β . El conjunto de estos datos

permitió determinar la estructura del compuesto como **3 β -imidazolin-withaferina A**.

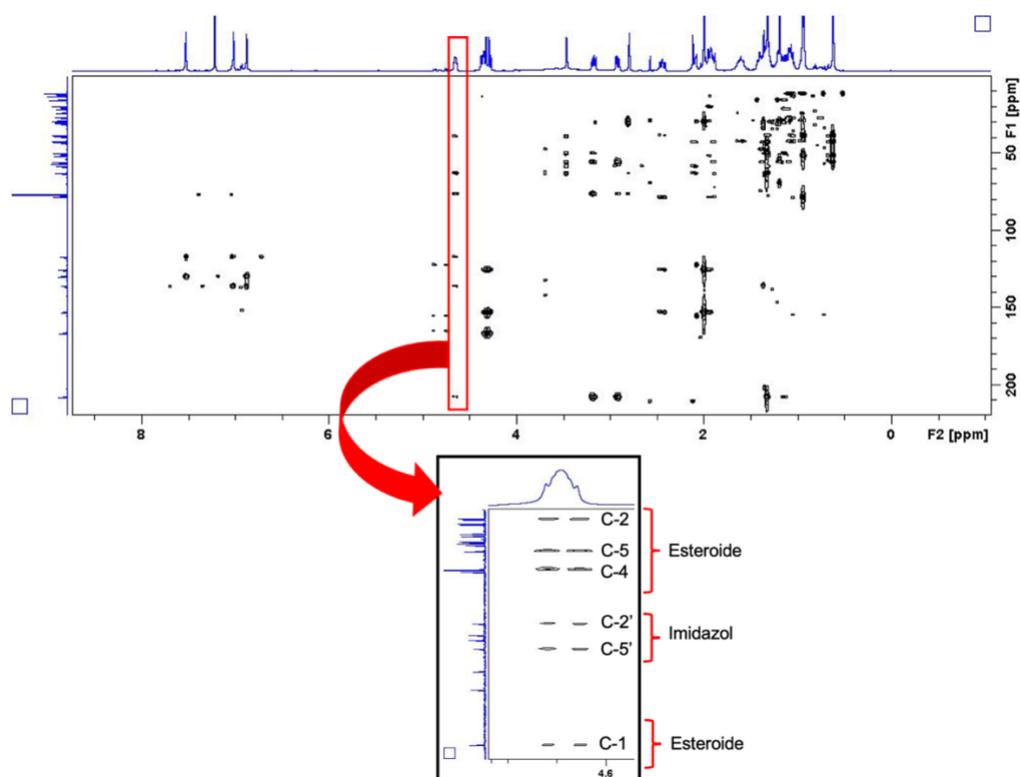


Figura 33. Experimento de RMN bidimensional HMBC (CDCl₃, 600 MHz) del 3 β -imidazolin-withaferina A

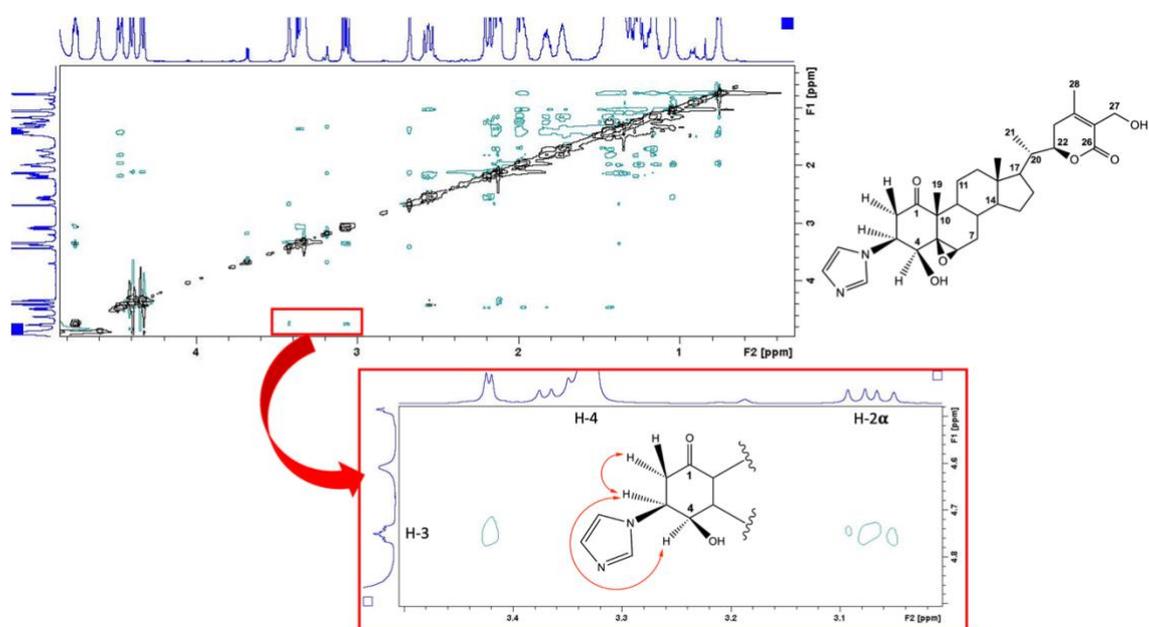


Figura 34. Experimento de RMN bidimensional ¹H-¹H ROESY (CD₃OD, 600 MHz) del 3 β -imidazolin-withaferina A

**d. Preparación de 27-O-butanoil-3 β -imidazolin-withaferina A, 27-O-acetil-3 β -imidazolin-withaferina A y 4,27-di-O-acetil-withaferina A:
Reacciones de esterificación**

Con el objetivo de ampliar el conocimiento de la implicación de los grupos hidroxilos en la actividad biológica de withaferina A, se transformaron los grupos hidroxilos en ésteres, capaces de actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno a pesar de que sus interacciones sean más débiles debido a los efectos estéricos del grupo acilo.

Preparación de 27-O-butanoil-3 β -imidazolin-withaferina A

Se hizo reaccionar 3 β -imidazolin-withaferina A con anhídrido butírico y trietilamina en diclorometano, usando Al₂O₃ como catalizador. La reacción se agitó durante 2 horas y su evolución se siguió mediante análisis de cromatografía en capa fina.

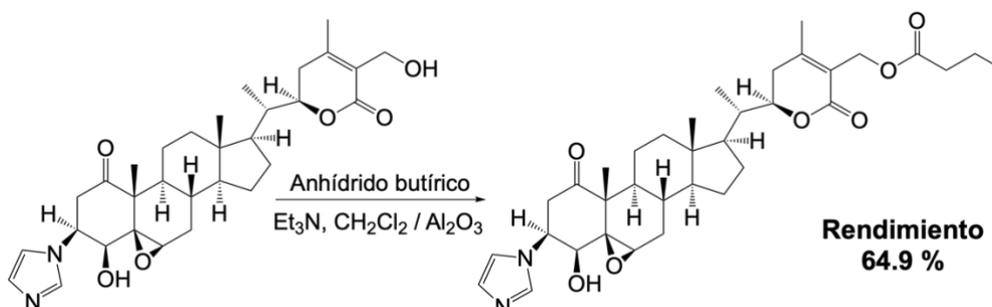


Figura 35. Esquema de síntesis de 27-O-butanoil-3 β -imidazolin-withaferina A a partir de 3 β -imidazolin-withaferina A

En el análisis de los datos de RMN de ¹H de este análogo se observó, como diferencia más significativa con respecto al correspondiente al 3 β -imidazolin-withaferina A, el desplazamiento de la señal del protón H-27 de δ_H 4.32, 4.38 (2H, d_{AB}, J = 12.5 Hz, H-27) a δ_H 4.87, 4.90 (2H, d_{AB}, J = 11.7 Hz, H-27). Además, también se observa la presencia de señales para un éster butirato a δ_H [0.93 (3H, t, J = 7,4 Hz, H-4''), 1.64 (2H, sextuplete, J = 7,4 Hz, H-3'') y 2.29 (2H, t, J = 7,4 Hz, H-2'') asignadas al grupo butirato introducido en este análogo.

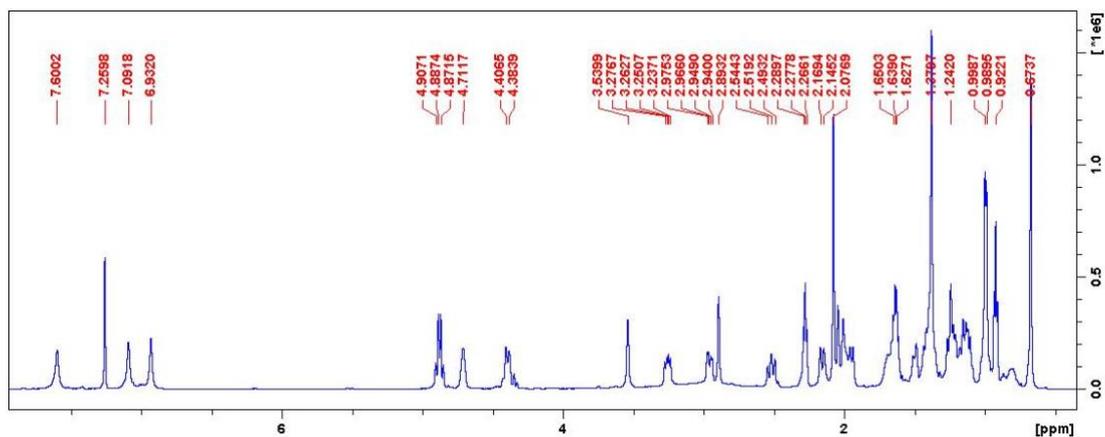


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del 27-O-butanoil- 3β -imidazolin-withaferina A

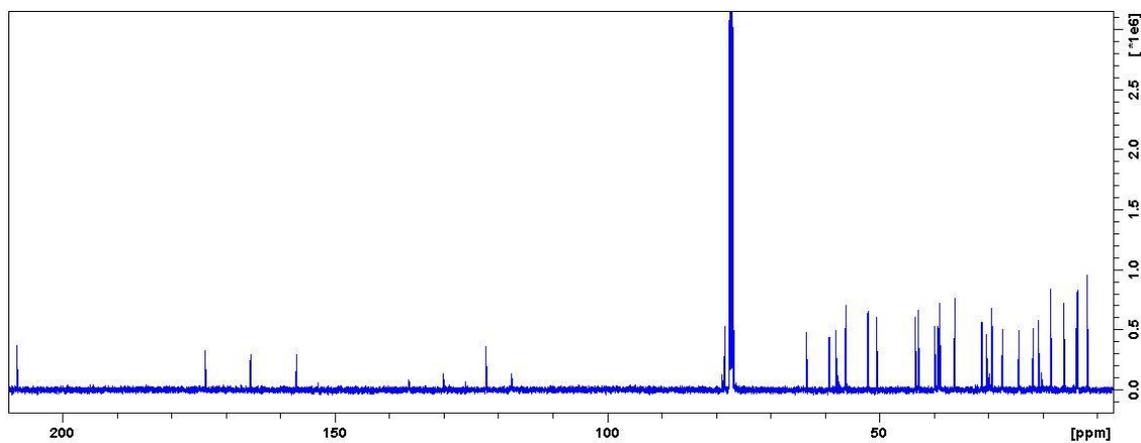


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) del 27-O-butanoil- 3β -imidazolin-withaferina A

Preparación de 27-O-acetil- 3β -imidazolin-withaferina A

Por otra parte, la reacción de 3β -imidazolin-withaferina A con anhídrido acético y trietilamina en CH_2Cl_2 , usando Al_2O_3 como catalizador, rindió el análogo 27-O-acetil- 3β -imidazolin-withaferina A. Esta reacción se mantuvo a temperatura ambiente y se agitó durante 45 minutos, siguiendo su desarrollo a través de CCF.

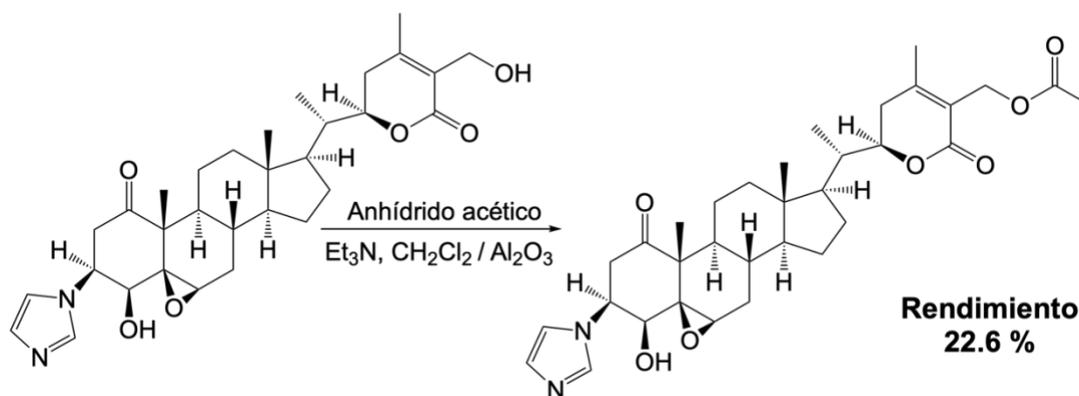


Figura 38. Esquema de síntesis de 27-O-acetil-3β-imidazolin-withaferina A a partir de 3β-imidazolin-withaferina A

En el análisis de los datos de RMN de ^1H de este análogo de withaferina A se observó, como principal diferencia con el producto de partida, el desplazamiento de la señal del protón H-27 de δ_{H} 4.32, 4.38 (2H, d_{AB} , $J= 12.5$ Hz, H-27) a δ_{H} 4.86, 4.91 (2H, d_{AB} , $J= 11.9$ Hz, H-27). Además, también se observó la presencia de señales a δ_{H} 2.05 (3H, s, H-2'') asignadas al éster acetato introducido en este análogo.

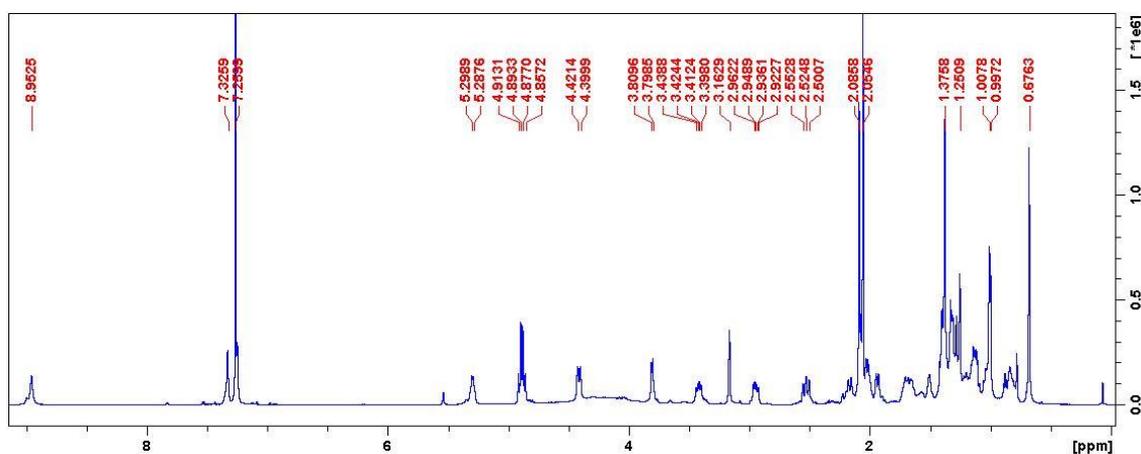


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del 27-O-acetil-3β-imidazolin-withaferina A

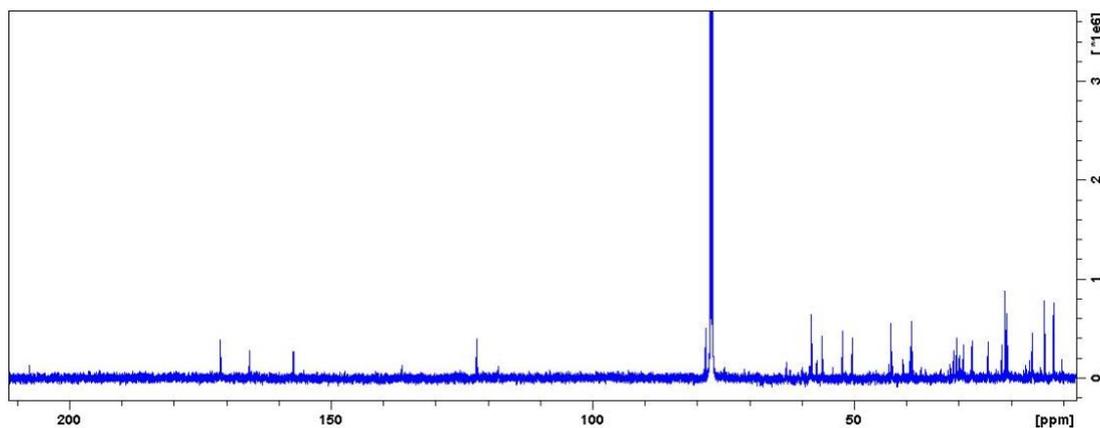


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) del 27-O-acetil-3 β -imidazolin-withaferina A

Cabe destacar que junto con el 27-O-acetil-3 β -imidazolin-withaferina A, se obtuvo el análogo diacetato de withaferina A.

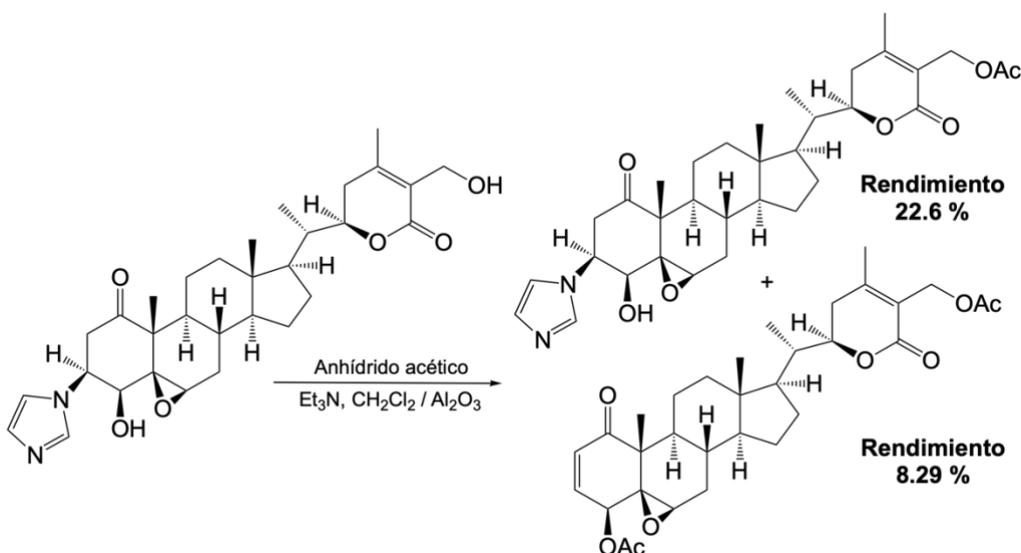


Figura 41. Esquema de síntesis de 4,27-di-O-acetil-withaferina A a partir de 3 β -imidazolin-withaferina A

El conjunto de los datos físicos y espectroscópicos del producto 4,27-di-O-acetil-withaferina A mostró como diferencia más notable con respecto a los datos asignados al 3 β -imidazolin-withaferina A, las señales correspondientes a los grupos acetatos a δ_{H} OAc-27, OAc-4 2.05, 6H, (s) y δ_{C} OAc-4 20.6 (c) y 169.9 (s) y el desplazamiento de la señal asignada a H-4 a δ_{H} 4.65 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-4) y H-27 a δ_{H} 4.85, 4.90 (2H, d_{AB} , $J=12.1$ Hz, H-27) a campos más bajos.

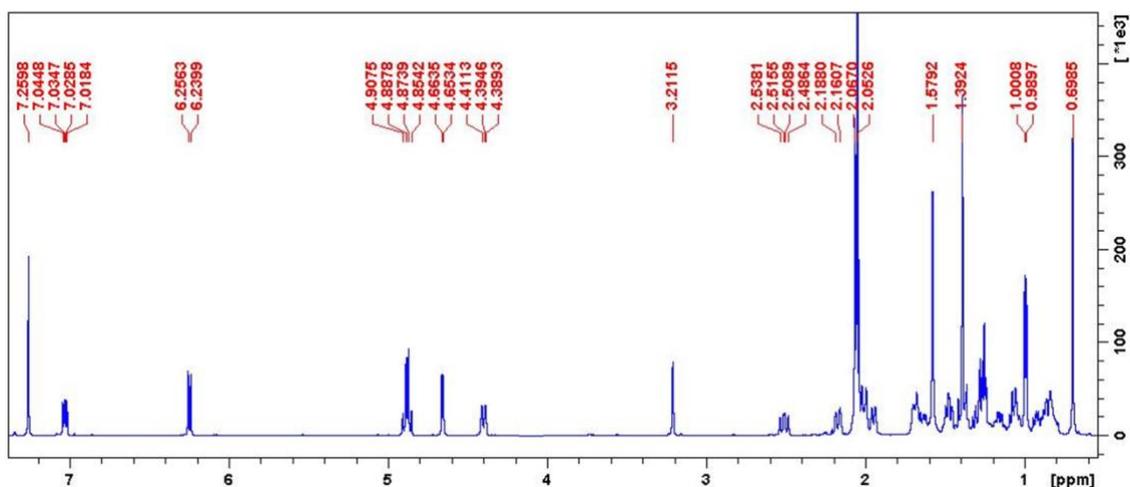


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del 4,27-di-O-acetil-withaferina A

e. Preparación de 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A: Reacción de benzoilación

A una disolución de 3 β -imidazolin-withaferina A y cloruro de benzoilo disueltos en CH_2Cl_2 , se le añadieron 2 gotas de piridina y un exceso de Al_2O_3 usado como catalizador. La reacción fue agitada durante 90 minutos a temperatura ambiente y su evolución se siguió mediante CCF.

La purificación del crudo de reacción rindió la formación del 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A, análogo esterificado en el alcohol primario del C-27 y con apertura del epóxido C5-C6. La estructura, al igual que el resto de los derivados, fue determinada mediante el estudio de sus datos espectroscópicos.

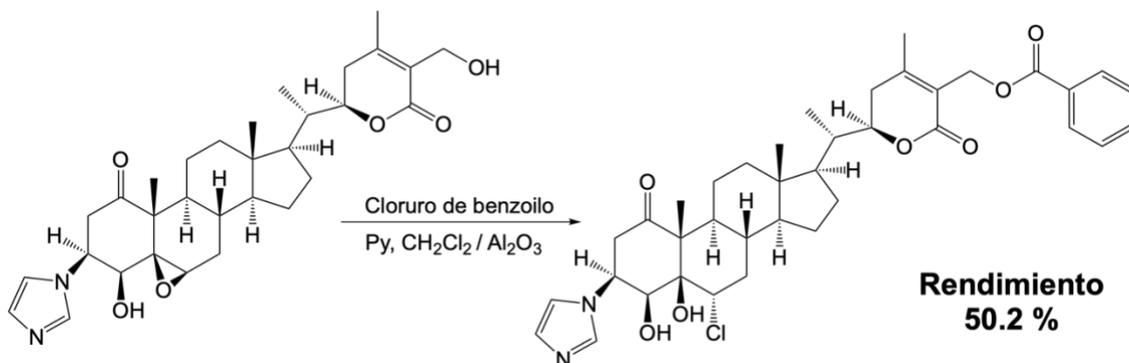


Figura 43. Esquema de síntesis de 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A a partir de 3 β -imidazolin-withaferina A

En su espectro de RMN de ^1H se observaron señales asignables a 5 protones aromáticos, correspondientes al grupo benzoato a δ_{H} 7.41 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 7.54 (1H, t, $J = 7.4$ Hz) y (2H, d, $J = 7.4$ Hz), así como el desplazamiento a campos más bajos de H-27 a δ_{H} 5.14 (2H, t, $J = 12.5$ Hz, H-27). También presentó como principal diferencia con respecto al producto de partida, 3 β -imidazolin-withaferina A, el desplazamiento a campos bajos de H-4 a δ_{H} 4.96 (1H, s, H-4) y H-6 a δ_{H} 4.45 (1H, dd, $J = 13.2, 3.7$ Hz, H-6).

El mismo efecto se observó en su espectro de RMN de ^{13}C , en el que los carbonos C-5 y C-6 se desplazan más de 12 ppm y el C-4, en torno a 5 ppm con respecto al derivado 3 β -imidazolin-withaferina A, debido a la apertura del epóxido y la formación de la cloridrina.

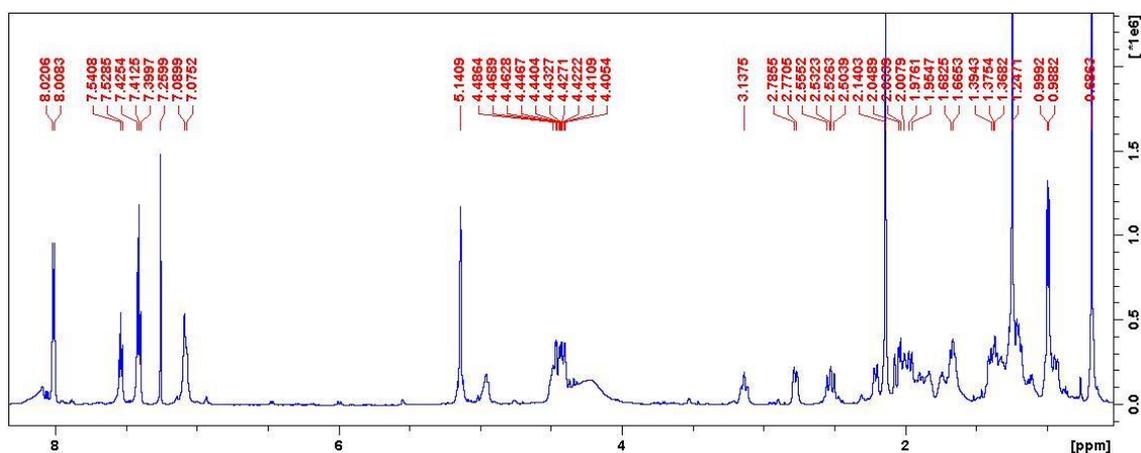


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A

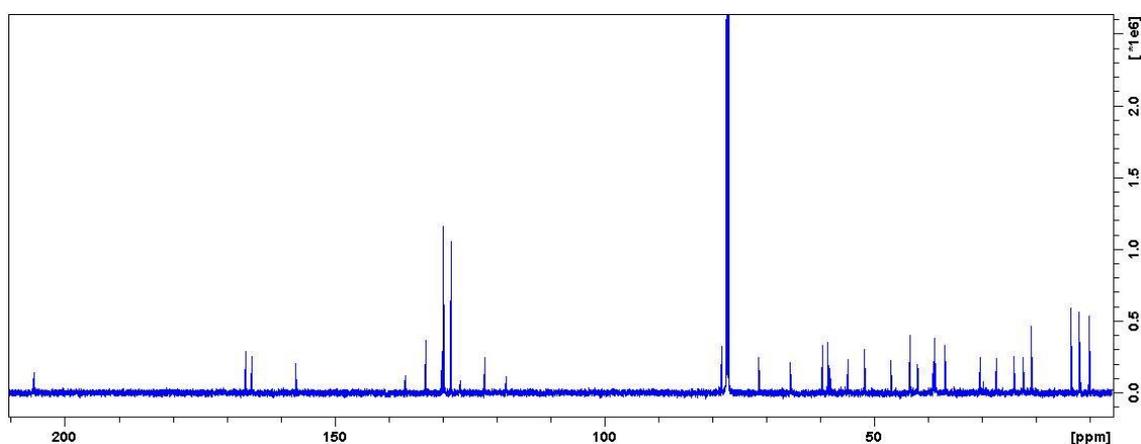


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) del 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Técnicas experimentales

4.1.1. Técnica de extracción. Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet es una técnica de separación sólido-líquido, usada para extraer sustancias con el disolvente de extracción. La muestra finamente molida se coloca en un cartucho de papel de filtro, el cual se introduce en la cámara de extracción del equipo Soxhlet (**Figura 46**).

A continuación, se procede a calentar el disolvente añadido en el balón, generando un sistema de reflujo, en el que el disolvente condensado se recoge en la cámara de extracción. Una vez que la cámara se llena se produce el vaciado de esta hacia el balón del equipo extractor.

Tras varios ciclos, el material deseado se concentra en el matraz de destilación⁵⁴. Por tanto, el disolvente se recircula continuamente a través de la muestra, haciendo de este tipo de extracción un sistema continuo.

La extracción Soxhlet cuenta con varias ventajas entre las que se encuentran las siguientes:

- La muestra está en constante contacto con porciones frescas de disolvente, facilitando el desplazamiento del equilibrio de transferencia.
- El sistema permanece a una temperatura elevada debido al calor aplicado al matraz de destilación, llegando a la cavidad de extracción.
- No se requiere filtración.
- El rendimiento de la muestra se puede aumentar, llevando a cabo varias extracciones simultáneas en paralelo.

Por otra parte, los principales inconvenientes que presenta en comparación con otras técnicas de extracción son:

- Elevada cantidad de disolvente usado que, a parte de su dificultad para ser desechado, puede causar problemas ambientales.



Figura 46.
Extracción de hojas
de *W. aristata*
mediante Soxhlet.

- Al extraer muestras en torno al punto de ebullición del disolvente durante largos periodos de tiempo se corre el riesgo de que se puedan descomponer térmicamente sustancias termolábiles⁵⁵.

4.1.2. Técnicas cromatográficas

Entre las técnicas cromatográficas utilizadas a lo largo del desarrollo del TFG se encuentran:

a) Cromatografía en columna (CC): Para la preparación de columnas cromatográficas, tanto húmedas como secas, se utilizó gel de sílice fina de 0,063 – 0,200 nm de diámetro de la empresa Macherey – Nagel. Se realizaron columnas tanto con muestras disueltas como con muestras absorbidas en el gel de sílice.



Figura 47. Columna cromatográfica

b) Cromatografía en capa fina (CCF o TLC): La realización de este tipo de cromatografía se hizo recortando cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice 60 de la empresa Merck a la medida de 5 x 7 cm. Para detectar la presencia de los diferentes productos sobre las placas recortadas se exponen a fluorescencia con luz UV a 254 o 360 nm o mediante un revelado, pulverizando óleum sobre la placa ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$, 80:16:4) con un posterior calentamiento en placa calefactora.

c) Cromatografía preparativa en capa fina (PTLC): En este caso, las placas utilizadas (20 x 20 cm) eran de gel de sílice de 1 mm de espesor y de la empresa Merck. En cada placa se sembró una cantidad aproximada de 10 mg de muestra y para la elución se usó la mezcla más adecuada de disolventes para cada caso. Al igual que en el caso anterior, la detección se llevó a cabo exponiendo la placa a fluorescencia con luz UV a 254 o 360 nm. Finalmente, se recuperó el producto mediante filtración por gravedad con acetato de etilo y se elimina el disolvente en el rotavapor.

d) Cromatografía en capa fina circular preparativa (CCRP): Se utilizó un equipo Chromatotron, modelo 7924T, 24VDC, 0.5 A y placas de gel de sílice

Merck 60 PF 254 con yeso. Para muestras de entre 50-150 mg se usaron placas circulares de 1 mm de espesor y, para muestras de entre 150-300 mg placas de 2 mm de espesor.

4.1.3. Técnicas espectroscópicas

Resonancia magnética nuclear (RMN): Se realizaron espectros de RMN de ^{13}C , ^1H y bidimensionales (HSQC, HMBC y ROESY). Los espectros de RMN de ^1H se llevaron a cabo con el espectrofotómetro Bruker Avance 600 (600 MHz) disolviendo siempre los productos en cloroformo deuterado (CDCl_3) o metanol (MeOH). En los espectros, los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Actividad óptica: Se determinó el valor de la actividad óptica usando un polarímetro Perkin Elmer, modelo 241, utilizando la línea D de sodio a 20 °C. Para la obtención de la medida, el producto se disolvió en metanol y se utilizó una cubeta de 1 mL de volumen y 1 cm de camino óptico. La concentración (C) se expresa en gramos por 100 mL de disolución.

4.1.4. Técnicas espectrométricas

La técnica de espectrometría de masas se utilizó para la obtención de los espectros de masa de baja y alta resolución, llevándose a cabo mediante el espectrómetro Vion IMS QTof, Instrument driver version: 3.1.0, método polarity: positive.

4.1.5. Programas informáticos

Entre los programas informáticos utilizados, el WinSCP se usó para poder guardar los archivos de los espectros de RMN en el ordenador y el TopSpin 3.6.1 de Bruker, para el procesado.

Las estructuras de los diferentes compuestos han sido realizadas en el programa ChemDraw, versión 19.1 de PerkinElmer, CambridgeSoft.

La búsqueda bibliográfica se ha realizado a través de Punto Q, Google Scholar y SciFinder, encontrándose este último disponible a través de la Universidad de la Laguna.

4.2. Recolección, secado y molienda del material vegetal

El material vegetal objeto de estudio *Withania aristata*, fue recolectado en noviembre de 2021, en el municipio de Icod de los Vinos (Tenerife, Islas Canarias, España), a unos 300 metros sobre el nivel del mar, en la pista que conduce hacia la punta de Juan Centellas. La recolección fue realizada en colaboración con la técnica del herbario TFC (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, Dra. Cristina González Montelongo. Un espécimen se encuentra depositado en el herbario cuyo Voucher de referencia es el siguiente: TFC 53219.

Las hojas fueron secadas durante dos semanas, en una habitación oscura y a una temperatura de entre 20 y 23°C. Una vez seco, el material vegetal fue molido en una máquina de la marca Mateu & Sole, S.L. tipo B-2, hasta obtener una homogenización de la muestra.

4.3. Extracción y aislamiento

4.3.1. Preparación de los extractos

El procedimiento de extracción en Soxhlet comenzó preparando un cartucho de papel de filtro en el que se colocó el material vegetal (421 gramos de hojas de *Withania aristata*), realizando una extracción con 4 litros de *n*-hexano durante 24 horas. Seguidamente, después de realizar un seguimiento por capa fina, el extracto hexánico se descartó, el residuo vegetal se secó a temperatura ambiente, y se volvió a extraer con 4 litros de acetona durante otras 24 horas. El extracto acetónico se filtró por gravedad y el disolvente se eliminó a presión reducida en el rotavapor, obteniéndose 9,7 gramos de extracto acetónico (rendimiento: 2.3%).

4.3.2. Fraccionamiento cromatográfico

El extracto obtenido fue fraccionado mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil 1 L de una mezcla de hexanos/acetato de etilo de polaridad creciente (50:50, 30:70, 10:90, 0:100) y, finalmente, una mezcla de acetato de etilo/etanol (5:95 y 10:90). Se obtuvieron, así, 29 fracciones, que se reunieron en 3 fracciones después de realizar un análisis por cromatografía comparativa en capa fina con una muestra auténtica de withaferina A. Este análisis también sirvió para confirmar la presencia del compuesto de interés como metabolito mayoritario en una de estas fracciones, la fracción 2 (F-2).

4.3.3. Purificación de withaferina A

La purificación de withaferina A, producto de partida para la preparación de análogos, se llevó a cabo mediante dos técnicas cromatográficas diferentes:

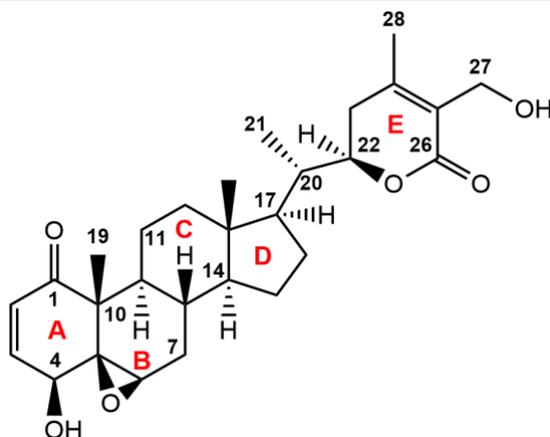
- a. Cromatografía en columna con gel de sílice: Parte de la fracción que contenía withaferina A (F-2) se purificó usando cromatografía en columna con gel de sílice. Para ello, se empleó como fase móvil 200 mL de una mezcla de diclorometano/acetona de polaridad creciente (9:1, 8:2, 7:3 y 5:5) y se finalizó la cromatografía con acetato de etilo, obteniéndose withaferina A pura (0,104 gramos).
- b. Cromatografía en capa fina circular preparativa: La parte restante de la fracción que contenía withaferina A (F-2), se purificó utilizando un Chromatotron. Para ello, la muestra se colocó disuelta en una mezcla de diclorometano/acetona (6.5:3.5) y se eluyó utilizando la misma proporción de disolventes, finalizando con 100 mL de metanol y 100 mL de diclorometano. Se obtuvo, así, withaferina A pura (0,217 gramos).



Esquema 2. Obtención de withaferina A a partir de las hojas de *Withania aristata*

4.4. Modificación estructural: Preparación de análogos de withaferina A

4.4.1. Datos espectroscópicos de withaferina A

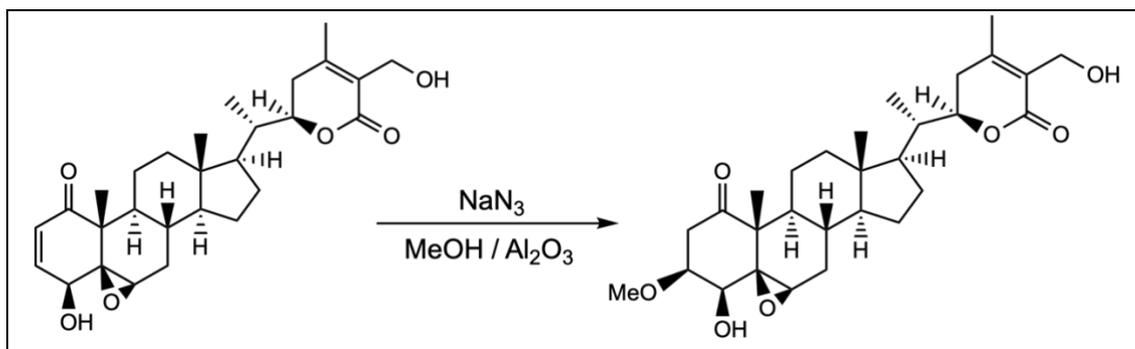


$[\alpha]_D^{20}$: + 45.2 (c 0.52, MeOH)

RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 0.70 (3H, s, Me-18); 0.93 (1H, m, H-14); 0.97 (1H, m, H-9); 0.99 (3H, d, J = 6.7 Hz, Me-21); 1.08 (1H, m, H-17); 1.14 (1H, m, H-12); 1.23 (1H, m, H-15); 1.27 (1H, m, H-7); 1.34 (1H, m, H-16); 1.40 (3H, s, Me-19); 1.43 (1H, m, H-11); 1.50 (1H, m, H-8); 1.61 (1H, m, H-15); 1.66 (1H, m, H-16); 1.80 (1H, ddd, J = 3.5, 7.2, 14.0 Hz, H-11); 1.93 (1H, m, H-20); 1.97 (1H, dd, J = 3.3, 17.8 Hz, H-23 α); 1.98 (1H, m, H-12); 2.03 (3H, s, Me-28) 2.14 (1H, ddd, J = 2.5, 3.9, 14.8 Hz, H-7 β); 2.48 (1H, dd, J = 13.2, 17.5 Hz, H-23 β); 2.87 (1H, s, OH); 3.23 (1H, s, H-6); 3.76 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-4); 4.32, 4.38 (2H, dAB, J = 12.5 Hz, H-27); 4.42 (1H, dt, J = 13.3, 3.4 Hz, H-22); 6.20 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-2); 6.93 (1H, dd, J = 5.9, 10.0 Hz, H-3).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 11.6 (CH_3 -18); 13.4 (CH_3 -21); 17.5 (CH_3 -19); 20.1 (CH_3 -28); 22.2 (CH_2 -11); 24.3 (CH_2 -15); 27.3 (CH_2 -16); 29.7 (CH-8); 29.9 (CH_2 -23); 31.1 (CH_2 -7); 38.8 (CH-20); 39.2 (CH_2 -12); 42.6 (C-13); 44.1 (CH-9); 47.7 (C-10); 52.1 (CH-17); 56.1 (CH-14); 57.5 (CH_2 -27); 62.6 (CH-6); 63.9 (C-5); 69.8 (CH-4); 78.7 (CH-22); 125.7 (C-25); 132.3 (CH-2); 141.2 (CH-3); 152.6 (C-24); 167.1 (C-26); 201.5 (C-1).

4.4.2. Análogo 1: 3β-metoxi-withaferina A



A una disolución de withaferina A (60.3 mg, 0.128 mmoles) en 1,5 mL de metanol (MeOH) se le adicionó azida sódica (9.2 mg, 0.141 mmoles) y un exceso de Al_2O_3 (103.8 mg, 1.33 mmoles). El tiempo de agitación de la reacción fue mínimo (35 minutos) ya que ésta tuvo lugar de manera inmediata, siguiéndose su avance mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se llevó el producto a sequedad para, posteriormente, realizar una cromatografía preparativa en capa fina (PTLC), obteniéndose el 3β-metoxi-withaferina A (21.4 mg, 0.0426 mmoles, rendimiento: 33.3%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: + 3.7 (c 0.24, MeOH)

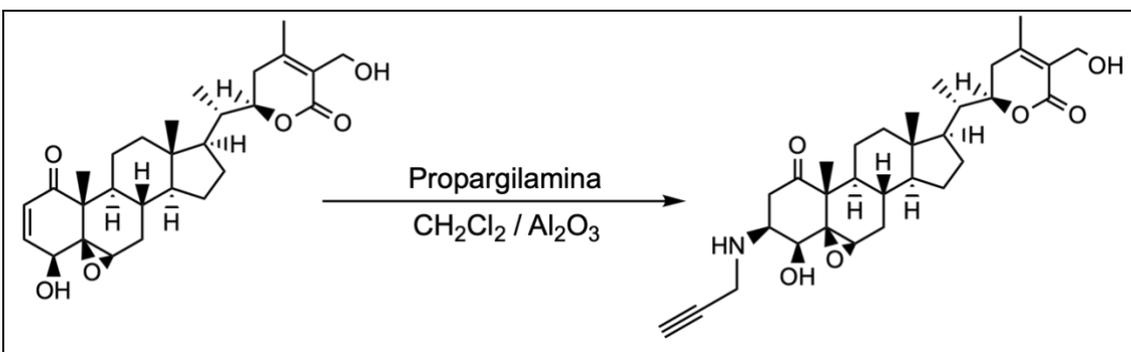
RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 0.65 (3H, s, Me-18); 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21); 0.98 (1H, m, H-14); 1.10 (1H, m, H-17); 1.14 (1H, m, H-12); 1.19 (1H, m, H-15); 1.20 (1H, m, H-9); 1.29 (3H, s, Me-19); 1.34 (1H, m, H-7 α); 1.37 (1H, m, H-11); 1.39 (1H, m, H-16); 1.41 (1H, m, H-11); 1.43 (1H, m, H-8); 1.66 (1H, m, H-15); 1.67 (1H, m, H-16); 1.91 (1H, m, H-12); 2.00 (1H, m, H-23 α); 2.01 (1H, m, H-20); 2.03 (3H, s, Me-28); 2.16 (1H, d, J = 15.2 Hz, H-7 β); 2.48 (1H, dd, J = 13.8, 17.5 Hz, H-23 β); 2.61 (1H, dd, J = 15.1, 4.1 Hz, H-2 α); 2.84 (1H, s, OH); 2.97 (1H, s, OH); 2.99 (1H, dd, J = 15.1, 6.5 Hz, H-2 β); 3.20 (1H, s, H-6); 3.48 (1H, s, H-4); 3.69 (1H, ddd, J = 4.1, 6.5, 9.8 Hz, H-3); 4.32, 4.38 (2H, d_{AB}, J = 12.5 Hz, H-27); 4.40 (1H, dt, J = 13.1, 3.2 Hz, H-22); OMe [3.34 (3H, s)].

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 11.5 (c, C-18); 13.3 (c, C-21); 15.6 (c, C-19); 20.0 (c, C-28); 21.6 (t, C-11); 24.3 (t, C-15); 27.3 (t, C-16); 29.4 (d, C-8); 29.8 (t, C-23); 31.2 (t, C-7); 38.8 (d, C-20); 39.1 (t, C-12); 39.6 (t, C-2); 42.7 (s, C-13); 42.8 (d, C-9); 50.4 (d, C-10); 51.9 (d, C-17); 56.0 (s, C-14); 57.4 (7, C-27); 60.2 (d, C-6); 65.0 (s, C-5); 75.1 (d, C-4); 77.5 (d, C-3); 78.7 (d, C-22); 125.7 (s, C-25); 153.0 (s, C-24); 167.0 (s, C-26); 209.9 (s, C-1); OMe [56.8 (c)].

ESIMS m/z (%): 525 $[M + Na]^+$ (100)

ESI/MS-AR m/z : Observado, 525.2826 (Calculado para $C_{29}H_{42}O_7Na$ $[M + Na]^+$ 525.2823).

4.4.3. Análogo 2: 3 β -propargilamino-withaferina A



A una disolución de withaferina A (21.6 mg, 0.0459 mmoles) en 2 mL de CH_2Cl_2 se le añadió 1 gota de propargilamina y un exceso de Al_2O_3 (48.6 mg, 0.477 mmoles). La reacción se agitó durante 3 días a temperatura ambiente, siguiéndose su evolución a través de cromatografía en capa fina (CCF). El crudo de la reacción se filtró y lavó con acetato de etilo y metanol, obteniéndose, una vez seco, 8.40 mg de 3 β -propargilamino-withaferina A (0.0160 mmoles, rendimiento: 34.8%)

$[\alpha]_D^{20}$: + 0.9 (c 0.65, MeOH)

RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 0.65 (3H, s, Me-18); 0.92 (1H, m, H-14); 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, Me-21); 1.03 (1H, m, H-17); 1.08 (1H, m, H-15); 1.10 (1H, m, H-12); 1.22 (1H, m, H-9); 1.23 (1H, m, H-11); 1.29 (1H, m, H-7 α); 1.30 (3H, s, Me-19); 1.31 (1H, m, H-16); 1.45 (1H, m, H-11); 1.59 (1H, m, H-15); 1.60 (1H, m, H-16); 1.85 (1H, m, H-12); 1.93 (1H, m, H-20); 1.94 (1H, m, H-23 α); 2.03 (3H, s, Me-28); 2.05 (1H, d, J = 15.2 Hz, H-7 β); 2.34 (1H, dd, J = 14.5, 4.7 Hz, H-2 α); 2.48 (1H, t, J = 16.2 Hz, H-23 β); 3.08 (1H, dd, J = 14.5, 5.4 Hz, H-2 β); 3.23 (1H, s, H-6); 3.53 (1H, s, H-3); 3.81 (1H, s, H-4); 4.31, 4.37 (2H, d_{AB}, J = 12.3 Hz, H-27); 4.41 (1H, d, J = 13.0 Hz, H-22); Propargilamina [3.41 (1H, s); 3.41, 3.47 (2H, d_{AB}, J = 17.4 Hz, H-1')].

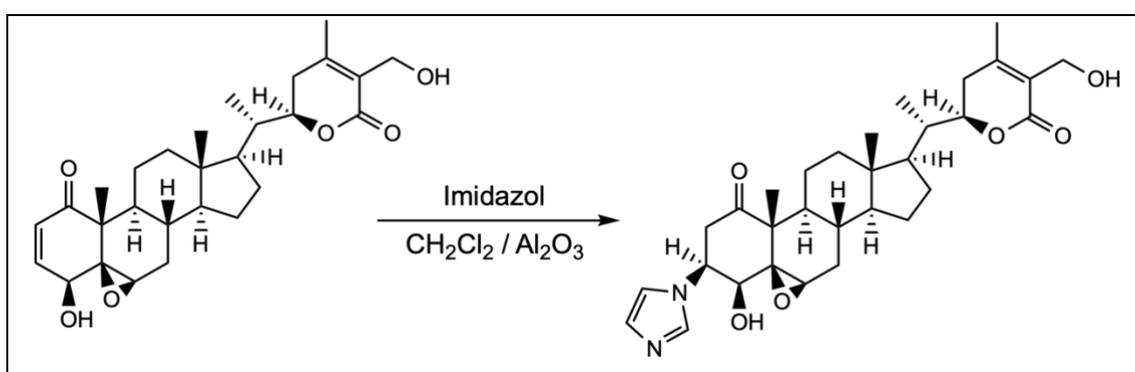
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 11.7 (c, C-18); 13.5 (c, C-21); 16.4 (c, C-19); 20.2 (c, C-28); 22.0 (t, C-11); 24.4 (t, C-15); 27.3 (t, C-16); 29.2 (d, C-8); 29.9 (t, C-23); 31.0 (t, C-7); 38.9 (d, C-20); 39.3 (t, C-12); 39.6 (t, C-2); 42.7 (d, C-

9); 42.8 (s, C-13); 50.3 (d, C-10); 52.1 (d, C-17); 55.0 (d, C-3); 56.0 (s, C-14); 57.4 (7, C-27); 60.9 (d, C-6); 65.3 (s, C-5); 75.2 (d, C-4); 78.9 (d, C-22); 125.7 (s, C-25); 153.3 (s, C-24); 167.2 (s, C-26); 210.6 (s, C-1); Propargilamina [35.3 (t); 72.7 (d); 80.6 (s)].

ESIMS m/z (%): 548 [M + Na]⁺ (100)

ESI/MS-AR m/z : Observado, 548.2978 (Calculado para C₃₁H₄₃NO₆Na [M + Na]⁺ 548.2983).

4.4.4. Análogo 3: 3β-imidazolin-withaferina A



A una disolución de withaferina A, (62.4 mg, 0.133 mmoles) en 5 mL de cloroformo, se le añadió imidazol (18,8 mg, 0,2762 mmoles) y un exceso de Al₂O₃ (144.7 mg, 1.42 mmoles). La reacción se agitó durante 6 días y se siguió mediante CCF. Una vez finalizada, se filtró a gravedad lavando con una mezcla 9:1 CH₂Cl₂:Metanol. Seguidamente, se concentró en el rotavapor para, posteriormente, purificar el producto mediante una columna cromatográfica de gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂/acetona de polaridad creciente (0% a 100%). Las fracciones que contenían el producto se reunieron y llevaron a sequedad en el rotavapor y la bomba de alto vacío, obteniéndose 57.7 mg de 3β-imidazolin-withaferina A (0.107 mmoles, rendimiento: 80.4%).

[α]_D²⁰: + 5.6 (c 1.01, MeOH)

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 0.67 (3H, s, Me-18); 0.98 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-21); 1.02 (1H, m, H-14); 1.13 (1H, m, H-17); 1.16 (1H, m, H-15); 1.17 (1H, m, H-12); 1.24 (1H, m, H-9); 1.26 (1H, m, H-7α); 1.37 (3H, s, Me-19); 1.38 (1H, m, H-16); 1.41 (1H, m, H-11); 1.44 (1H, m, H-8); 1.53 (1H, m, H-11); 1.65 (1H, m, H-15); 1.69 (1H, m, H-16); 1.97 (1H, m, H-12); 2.01 (1H, m, H-20); 2.02 (1H,

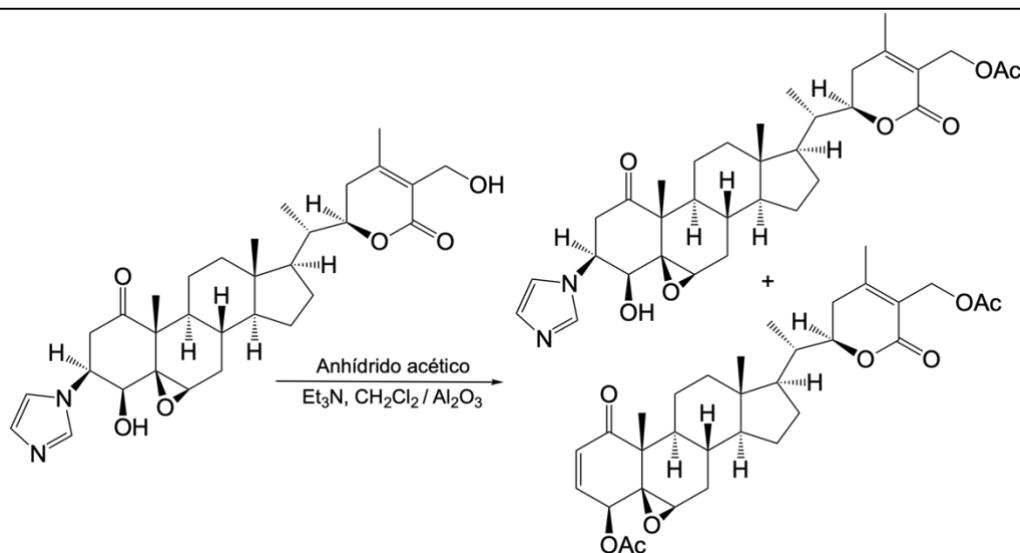
m, H-23 α); 2.04 (3H, s, Me-28); 2.18 (1H, m, H-7 β); 2.49 (1H, dd, J = 17.4, 14.0 Hz, H-23 β); 2.84 (1H, s, H-6); 2.97 (1H, dd, J = 15.9, 6.7 Hz, H-2 α); 3.22 (1H, dd, J = 15.9, 2.7 Hz, H-2 β); 3.51 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-4); 4.32, 4.38 (2H, d_{AB}, J = 12.6 Hz, H-27); 4.41 (1H, dt, J = 13.5, 3.3 Hz, H-22); 4.70 (1H, ddd, J = 2.7, 3.9, 6.7 Hz, H-3); Imidazol [6.92 (1H, s, H-2'); 7.05 (1H, s, H-4'); 7.57 (1H, s, H-5')].

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ : 11.7 (c, C-18); 13.5 (c, C-21); 15.9 (c, C-19); 20.2 (c, C-28); 21.6 (t, C-11); 24.3 (t, C-15); 27.3 (t, C-16); 29.3 (d, C-8); 30.0 (t, C-23); 31.2 (t, C-7); 38.9 (d, C-20); 39.2 (t, C-12); 39.6 (t, C-2); 42.8 (s, C-13); 43.4 (d, C-9); 50.5 (d, C-10); 52.0 (d, C-17); 56.2 (s, C-14); 56.3 (d, C-3); 57.4 (t, C-27); 58.9 (d, C-6); 63.3 (s, C-5); 76.9 (d, C-4); 78.8 (d, C-22); 125.9 (s, C-25); 153.1 (s, C-24); 167.1 (s, C-26); 208.2 (s, C-1); Imidazol [117,5 (d, C-2'); 129.9 (d, C-4'); 136,3 (d, C-5')].

ESIMS m/z (%): 561 [M + Na]⁺ (100)

ESI/MS-AR m/z : Observado, 561.2928 (Calculado para C₃₁H₄₂N₂O₆Na [M + Na]⁺ 561.2935).

4.4.5. Análogos 4 y 5: 27-O-acetil-3 β -imidazolin-withaferina A y 4,27-di-O-acetil-withaferina A



A una disolución de 3 β -imidazolin-withaferina A (23.4 mg, 0.0435 mmoles) en 1 mL de CH₂Cl₂, se le añadió 1 gota de anhídrido acético, 3 gotas de trietilamina y un exceso de Al₂O₃ (36.2 mg, 0.464 mmoles). La reacción se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente, siguiendo su evolución mediante CCF.

Una vez terminada, el crudo de la reacción fue fraccionado mediante una columna cromatográfica de gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂/acetona de polaridad creciente (100:0 a 70:30). Las fracciones donde se encontraba el producto de interés se reunieron y llevaron a sequedad en el rotavapor y la bomba de alto vacío. Se realizó una cromatografía preparativa en capa fina (PTLC), obteniéndose el 27-O-acetil-3β-imidazolin-withaferina A (5.7 mg, 0.00982 mmoles, rendimiento: 22.6%) y el 4,27-di-O-acetil-withaferina A (2 mg, 0.00361 mmoles, rendimiento: 8.29%)

27-O-acetil-3β-imidazolin-withaferina A

[α]_D²⁰: + 10.9 (c 0.57, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 0.68 (3H, s, Me-18); 1.01 (3H, d, *J*= 6.4 Hz, Me-21); 1.03 (1H, m, H-14); 1.13 (1H, m, H-17); 1.15 (1H, m, H-15); 1.20 (1H, m, H-12); 1.30 (1H, m, H-7α); 1.31 (1H, m, H-9); 1.32 (1H, m, H-11); 1.37 (3H, s, Me-19); 1.39 (1H, m, H-16); 1.40 (1H, m, H-8); 1.51 (1H, m, H-11); 1.65 (1H, m, H-15); 1.71 (1H, m, H-16); 1.94 (1H, m, H-12); 1.94 (1H, m, H-7β); 2.00 (1H, m, H-20); 2.04 (1H, m, H-23α); 2.09 (3H, s, Me-28); 2.53 (1H, dd, *J*= 17.0, 14.3 Hz, H-23β); 2.94 (1H, dd, *J*= 16.0, 8.2 Hz, H-2α); 3.15 (1H, s, H-6); 3.41 (1H, dd, *J*= 16.0, 8.7 Hz, H-2β); 3.78 (1H, d, *J*= 6.9 Hz, H-4); 4.41 (1H, dt, *J*= 13.0, 3.1 Hz, H-22); 4.86, 4.91 (2H, d_{AB}, *J*= 11.9 Hz, H-27); 5.25 (1H, dd, *J*= 7.5, 6.8 Hz, H-3); Imidazol [7.22 (1H, s, H-2'); 7.31 (1H, s, H-4'); 8.85 (1H, s, H-5')]; Ac-27 [2.05 (3H, s, H-2'')].

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 11.8 (c, C-18); 13.5 (c, C-21); 15.8 (c, C-19); 20.8 (c, C-28); 21.7 (t, C-11); 24.4 (t, C-15); 27.4 (t, C-16); 29.0 (d, C-8); 29.8 (t, C-23); 30.3 (t, C-7); 38.9 (d, C-20); 39.2 (t, C-12); 40.7 (t, C-2); 42.5 (d, C-9); 42.8 (s, C-13); 50.3 (s, C-10); 52.1 (d, C-17); 56.0 (d, C-14); 57.1 (2 x d, C-3, C-6); 58.2 (t, C-27); 62.7 (s, C-5); 73.3 (d, C-4); 78.3 (d, C-22); 122.1 (s, C-25); 157.1 (s, C-24); 165.4 (s, C-26); 207.4 (s, C-1); Imidazol [118.1 (d, C-2'); 126.7 (d, C-4'); 136.3 (d, C-5')]; Ac-27 [21.1 (c, CH₃); 171.0 (s, COO-)].

ESIMS *m/z* (%): 603 [M + Na]⁺ (100)

ESI/MS-AR *m/z*: Observado, 603.3032 (Calculado para C₃₃H₄₄N₂O₇Na [M + Na]⁺ 603.3041).

4,27-di-O-acetil-withaferina A

[α]_D²⁰: + 100.6 (c 0.48, CHCl₃)

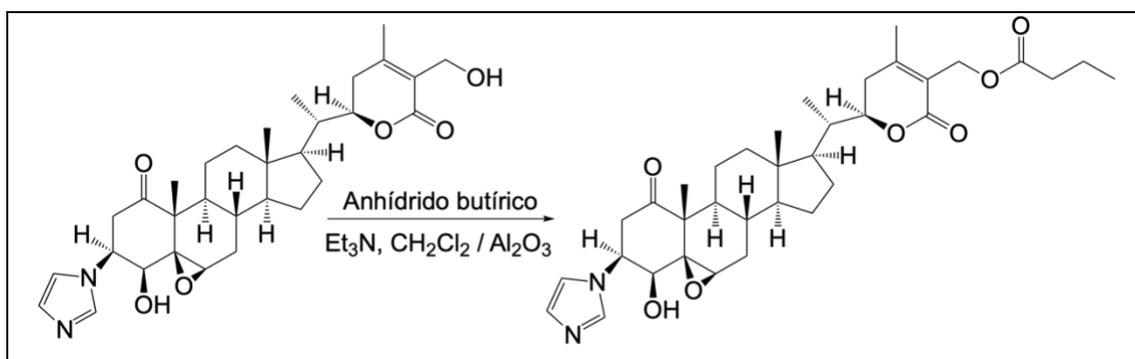
RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 0.69 (3H, s, Me-18); 0.95 (1H, m, H-14); 0.99 (3H, d, *J*= 6.7 Hz, Me-21); 1.00 (1H, m, H-9); 1.09 (1H, m, H-17); 1.10 (1H, m, H-12); 1.15 (1H, m, H-15); 1.31 (1H, m, H-7_α); 1.38 (1H, m, H-16); 1.39 (3H, s, Me-19); 1.45 (1H, m, H-11); 1.55 (1H, m, H-8); 1.65 (1H, m, H-15); 1.70 (1H, m, H-16); 1.83 (1H, m, H-11); 1.97 (1H, m, H-12); 1.98 (1H, m, H-23_α); 2.00 (1H, m, H-20); 2.13 (3H, s, Me-28); 2.17 (1H, m, H-7_β); 2.50 (1H, dd, *J*= 17.7, 13.4 Hz, H-23_β); 3.21 (1H, s, H-6); 4.40 (1H, dt, *J*= 13.1, 3.3 Hz, H-22); 4.65 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-4); 4.85, 4.90 (2H, d_{AB}, *J*= 12.1 Hz, H-27); 6.25 (1H, d, *J*= 9.8 Hz, H-2); 7.03 (1H, dd, *J*= 6.0, 9.8 Hz, H-3); Ac-27 [2.09 (3H, s)]; Ac-4 [2.06 (3H, s)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 11.3 (c, C-18); 13.1 (c, C-21); 15.5 (c, C-19); 20.4 (c, C-28); 21.1 (t, C-11); 24.0 (t, C-15); 27.1 (t, C-16); 29.3 (d, C-8); 29.9 (t, C-23); 30.8 (t, C-7); 38.5 (d, C-20); 38.9 (t, C-12); 42.3 (s, C-13); 43.9 (d, C-9); 51.7 (d, C-17); 55.8 (d, C-14); 57.8 (t, C-27); 57.9 (s, C-10); 60.0 (d, C-6); 60.8 (s, C-5); 71.9 (d, C-4); 77.9 (d, C-22); 121.7 (s, C-25); 133.7 (d, C-2); 139.6 (d, C-3); 156.7 (s, C-24); 165.1 (s, C-26); 201.0 (s, C-1); Ac-27 [20.7 (c); 170.7 (s)]; Ac-4 [20.6 (c); 169.9 (s)].

ESIMS *m/z* (%): 577 [M + Na]⁺ (100)

ESI/MS-AR *m/z*: Observado, 557.2779 (Calculado para C₃₂H₄₂O₈Na [M + Na]⁺ 557.2777).

4.4.6. Análogo 6: 27-O-butanoil-3β-imidazolin-withaferina A



A una disolución de 3β-imidazolin-withaferina A (18.5 mg, 0.0344 mmoles) en 1 mL de CH₂Cl₂, se le añadió 1 gota de anhídrido butírico, 3 gotas de trietilamina y un exceso de Al₂O₃ (28.6 mg, 0.367 mmoles). La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, siguiendo su evolución

mediante CCF. Una vez terminada, el crudo de la reacción fue fraccionado mediante una columna cromatográfica de gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂/acetona de polaridad creciente (100:0 a 70:30). Las fracciones donde se encontraba el producto de interés se reunieron y llevaron a sequedad en el rotavapor y la bomba de alto vacío. Se le realizó una cromatografía preparativa en capa fina (PTLC) de la que se obtuvo el 27-O-butanoil-3β-imidazolin-withaferina A (13.6 mg, 0.0223 mmoles, rendimiento: 64.9%).

[α]_D²⁰ : + 4.0 (c 0.48, MeOH)

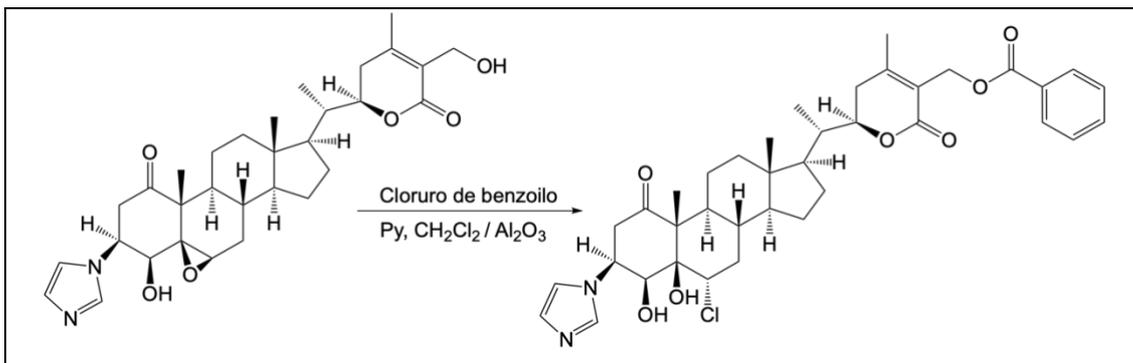
RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ: 0.68 (3H, s, Me-18); 0.95 (1H, m, H-14); 1.00 (3H, d, *J*= 6.6 Hz, Me-21); 1.06 (1H, m, H-17); 1.08 (1H, m, H-15); 1.11 (1H, m, H-12); 1.16 (1H, m, H-9); 1.18 (1H, m, H-7α); 1.32 (1H, m, H-16); 1.33 (1H, m, H-11); 1.37 (1H, m, H-8); 1.39 (3H, s, Me-19); 1.47 (1H, m, H-11); 1.58 (1H, m, H-15); 1.63 (1H, m, H-16); 1.90 (1H, m, H-12); 1.94 (1H, m, H-20); 1.96 (1H, m, H-23α); 2.08 (3H, s, Me-28); 2.09 (1H, m, H-7β); 2.53 (1H, dd, *J*= 17.5, 13.4 Hz, H-23β); 2.94 (1H, dd, *J*= 15.9, 6.7 Hz, H-2α); 2.95 (1H, s, H-6); 3.29 (1H, dd, *J*= 15.9, 8.2 Hz, H-2β); 3.56 (1H, d, *J*=4,5 Hz, H-4); 4.40 (1H, dt, *J*= 13.4, 3.3 Hz, H-22); 4.70 (1H, ddd, *J*= 8.2, 6.8, 4.5 Hz, H-3); 4.87, 4.90 (2H, d_{AB}, *J*= 11.7 Hz, H-27); Imidazol [6.92 (1H, s, H-2'); 7.11 (1H, s, H-4'); 7.57 (1H, s, H-5')]; But-27 [0.93 (3H, t, *J*=7,4 Hz, H-4''); 1.64 (2H, sextuplete, *J*= 7,4 Hz, H-3''); 2.29 (2H, t, *J*= 7,4 Hz, H-2'')].

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 11.7 (c, C-18); 13.5 (c, C-21); 16.0 (c, C-19); 20.7 (c, C-28); 21.7 (t, C-11); 24.3 (t, C-15); 27.4 (t, C-16); 29.3 (d, C-8); 30.2 (t, C-23); 31.1 (t, C-7); 38.9 (d, C-20); 39.2 (t, C-12); 39.8 (t, C-2); 42.8 (s, C-13); 43.3 (d, C-9); 50.4 (s, C-10); 52.0 (d, C-17); 56.1 (d, C-14); 56.2 (d, C-3); 57.9 (t, C-27); 59.1 (d, C-6); 63.3 (s, C-5); 76.6 (d, C-4); 78.3 (d, C-22); 122.2 (s, C-25); 157.0 (s, C-24); 165.4 (s, C-26); 208.2 (s, C-1); Imidazol [117.5 (d, C-2'); 129.9 (d, C-4'); 136.3 (d, C-5')]; But-27 [13.7 (c, C-4''); 18.6 (t, C-3''); 36.2 (t, C-2''); 173.7 (s, C-1'', COO-)].

ESIMS *m/z* (%): 631 [M + Na]⁺ (100)

ESI/MS-AR *m/z*: Observado, 631.3350 (Calculado para C₃₅H₄₈N₂O₇Na [M + Na]⁺ 631.3354).

4.4.7. Análogo 7: 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A



A una disolución de 3 β -imidazolin-withaferina A (27.1 mg, 0.0503 mmoles) en 1 mL de CH₂Cl₂, se le añadió 1 gota de cloruro de benzoilo, 2 gotas de piridina y un exceso de Al₂O₃ (41.9 mg, 0.537 mmoles). La reacción se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente, siguiendo su evolución mediante CCF. Una vez finalizada, el crudo de la reacción fue fraccionado mediante una columna cromatográfica usando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂/acetona de polaridad creciente (100:0 a 0:100). Las fracciones que contenían el producto de interés se reunieron y secaron en el rotavapor y en la bomba de alto vacío, obteniéndose 16,7 mg de 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A (0.0253 mmoles, rendimiento: 50.2%)

$[\alpha]_D^{20}$: + 14.5 (*c* 1.67, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ : 0.69 (3H, s, Me-18); 0.96 (1H, m, H-11); 0.99 (3H, d, *J*= 6.6 Hz, Me-21); 1.22 (1H, m, H-15); 1.23 (1H, m, H-17); 1.25 (3H, s, Me-19); 1.28 (1H, m, H-12); 1.34 (1H, m, H-14); 1.34 (1H, m, H-11); 1.42 (1H, m, H-16); 1.68 (1H, m, H-15); 1.70 (1H, m, H-8); 1.77 (1H, m, H-16); 1.87 (1H, m, H-9); 1.93 (1H, m, H-7 α); 1.98 (1H, m, H-12); 2.03 (1H, m, H-20); 2.08 (1H, m, H-23 α); 2.14 (3H, s, Me-28); 2.23 (1H, dt, *J*= 15.2, 3.3 Hz, H-7 β); 2.53 (1H, dd, *J*= 13.7, 17.4 Hz, H-23 β); 2.78 (1H, dd, *J*= 4.7, 13.2 Hz, H-2 α); 3.13 (1H, t, *J*= 13.2 Hz, H-2 β); 4.42 (1H, dt, *J*= 12.9, 2.9 Hz, H-22); 4.45 (1H, dd, *J*= 13.2, 3.7 Hz, H-6); 4.49 (1H, dd, *J*= 13.2, 3.7 Hz, H-3); 4.96 (1H, s, H-4); 5.14 (2H, t, *J*= 12.5 Hz, H-27); Imidazol [7.10 (1H, s, H-2'); 7.09 (1H, s, H-4'); 8.17 (1H, s, H-5')]; Bz-27 [7.41 (2H, t, *J*= 7.4 Hz); 7.54 (1H, t, *J*= 7.4 Hz); (2H, d, *J*= 7.4 Hz)].

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) δ: 10.1 (c, C-19); 11.9 (c, C-18); 13.5 (c, C-21); 20.9 (c, C-28); 22.4 (t, C-11); 24.1 (t, C-15); 27.4 (t, C-16); 30.4 (t, C-23); 36.8 (d, C-8); 38.6 (t, C-7); 38.8 (d, C-20); 39.1 (t, C-12); 41.9 (t, C-2); 43.4 (s, C-13); 46.9 (d, C-9); 51.8 (d, C-17); 54.9 (d, C-14); 58.2 (s, C-10); 58.6 (d, C-6); 59.5 (t, C-27); 65.5 (d, C-3); 71.4 (d, C-4); 76.9 (s, C-5); 78.3 (d, C-22); 122.2 (s, C-25); 157.2 (s, C-24); 165.3 (s, C-26); 205.8 (s, C-1); Imidazol [118,2 (d, C-2'); 126.7 (d, C-4'); 136,9 (d, C-5')]; Bz-27 [128.4 (2 x d, C-2'', C-6''); 129.8 (2 x d; C- 3'', C-5''); 130.1 (s, C-1''); 133.2 (d, C-4''); 166.6 (s, COO-)].

ESIMS *m/z* (%): 701 [M + Na]⁺ (100)

ESI/MS-AR *m/z*: Observado, 701.2964 (Calculado para C₃₈H₄₇N₂O₇ClNa [M + Na]⁺ 701.2946).

5. CONCLUSIONES

Teniendo presentes los objetivos planteados para el desarrollo de la investigación realizada en este Trabajo Fin de Grado, se extraen las siguientes conclusiones:

- Las hojas de *Withania aristata* se extraen selectivamente, usando como técnica de extracción el Soxhlet y como disolventes hexanos y acetona. En base a los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) realizados, el extracto acetónico presentó un alto contenido en withaferina A.
- A partir del extracto acetónico y haciendo uso de técnicas cromatográficas, se aisló withaferina A, así como otra withanolida mayoritaria, 16,17-didehidro-withaferina A (W-16).
- Se prepararon tres derivados de withaferina A: 3 β -metoxi-withaferina A, 3 β -propargilamino-withaferina A y 3 β -imidazolin-withaferina A, mediante reacción de Michael, usando como nucleófilos metanol, propargilamina e imidazol, y obteniéndose rendimientos de 33.3%, 34.8% y 80.4%, respectivamente.
- A partir del análogo 3 β -imidazolin-withaferina A, se prepararon 4 derivados: 27-O-acetil-3 β -imidazolin-withaferina A, 4,27-di-O-acetil-withaferina A, 27-O-butanoil-3 β -imidazolin-withaferina A y 6 α -cloro-5 β -hidroxi-27-O-benzoil-3 β -imidazolin-withaferina A, mediante reacción de esterificación con rendimientos de 22.6%, 8.29%, 64.9% y 50.2%, respectivamente.
- La determinación de la estructura de withaferina A y sus análogos se llevó a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas, que incluyeron experimentos de resonancia magnética nuclear monodimensional (^1H y ^{13}C) y bidimensional (HSQC, HMBC y ROESY), así como técnicas espectrométricas (espectrometría de masas).
- Cinco de los análogos preparados son nuevos en la literatura química lo que supone un aporte importante en el descubrimiento de nuevas moléculas.
- Se pretende, en un futuro, la evaluación antiparasitaria de estos análogos en colaboración con el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales

y Salud Pública de Canarias, con el fin de llevar a cabo estudios SAR y evaluar la eficacia de la optimización del compuesto líder.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) *Enfermedades tropicales desatendidas*. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases> (accessed 2022-05-15).
- (2) LaBonte, J.; Lebbos, J.; Kirkpatrick, P. Enfuvirtide. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2 (5), 345–346. <https://doi.org/10.1038/nrd1091>.
- (3) *File: Leishmania donovani 01.png - Wikimedia Commons*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmania_donovani_01.png (accessed 2022-05-15).
- (4) *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed 2022-05-08).
- (5) *OPS/OMS | Leishmaniasis visceral*. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=es (accessed 2022-05-15).
- (6) *OPS/OMS | Leishmaniasis cutánea y mucosa*. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es (accessed 2022-05-15).
- (7) Rojo Marcos, G.; Herrera Ávila, J. P.; Ramírez Peña-Herrera, J.; Novella Mena, M.; Miguel Benito, Á.; Trasobares Marugán, L.; Cuadros González, J. A. Evolución de La Incidencia de Leishmaniasis Visceral y Leishmaniasis Cutánea Durante 30 Años En Un Área Sanitaria de La Comunidad de Madrid. *Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud (RIECS)* **1970**, 2 (2), 7–19. <https://doi.org/10.37536/RIECS.2017.2.2.35>.

- (8) Desjeux, P.; Alvar, J. *Leishmania* /HIV Co-Infections: Epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **2003**, *97* (sup1), 3–15. <https://doi.org/10.1179/000349803225002499>.
- (9) Fernández Rubio, C. Potencial Terapéutico y Toxicidad de Inhibidores de Topoisomerasas Como Antiparasitarios = Structural Characterization of the Dna Topoisomerase from “Leishmania Donovanii,” Universidad de León, **2010**. <https://doi.org/10.18002/10612/1030>.
- (10) *File: Trypanosoma cruzi crithidia.jpeg - Wikimedia Commons*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_cruzi_crithidia.jpeg (accessed 2022-05-15).
- (11) *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 2022-05-15).
- (12) *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 2022-05-08).
- (13) Hotez, P.; Bottazzi, M. E.; Strub-Wourgaft, N.; Sosa-Estani, S.; Torrico, F.; Pajín, L.; Abril, M.; Sancho, J. A New Patient Registry for Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2020**, *14* (10), e0008418. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008418>.
- (14) Sundar, S.; Chakravarty, J.; Meena, L. P. Leishmaniasis: Treatment, Drug Resistance and Emerging Therapies. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **2019**, *7* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/21678707.2019.1552853>.
- (15) Freitas-Junior, L. H.; Chatelain, E.; Kim, H. A.; Siqueira-Neto, J. L. Visceral Leishmaniasis Treatment: What Do We Have, What Do We Need and How to Deliver It? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2012**, *2*, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>.

- (16) Sundar, S.; Singh, O. P. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Molecular Diagnosis & Therapy* **2018**, 22 (4), 443–457. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0343-y>.
- (17) Vermelho, A. B.; Rodrigues, G. C.; Supuran, C. T. Why Hasn't There Been More Progress in New Chagas Disease Drug Discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery* **2020**, 15 (2), 145–158. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1681394>.
- (18) Murcia, L.; Carrilero, B.; Saura, D.; Iborra, M. A.; Segovia, M. Diagnóstico y Tratamiento de La Enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2013**, 31 (SUPPL.1), 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3).
- (19) Cheuka, P.; Mayoka, G.; Mutai, P.; Chibale, K. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules* **2016**, 22 (1), 58. <https://doi.org/10.3390/molecules22010058>.
- (20) *Investigación Médica | Celgene España*. <https://www.celgene.es/investigacion-y-desarrollo/investigacion-medica/> (accessed 2022-05-21).
- (21) Pauli, G. F.; Chen, S.-N.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Jaki, B. U. Analysis and Purification of Bioactive Natural Products: The AnaPurNa Study. *Journal of Natural Products* **2012**, 75 (6), 1243–1255. <https://doi.org/10.1021/np300066q>.
- (22) McKinney, J. D. The Practice of Structure Activity Relationships (SAR) in Toxicology. *Toxicological Sciences* **2000**, 56 (1), 8–17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/56.1.8>.
- (23) KOCH, M.; WALDMANN, H. Protein Structure Similarity Clustering and Natural Product Structure as Guiding Principles in Drug Discovery☆. *Drug Discovery Today* **2005**, 10 (7), 471–483. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03419-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03419-7).

- (24) Mukhtyar, S. Saini, A. K. J. D. R. S. A Review: Biological Significances of Heterocyclic Compounds. *Internacional Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* **2013**, 4, 66–77.
- (25) *Diferencias entre purinas y pirimidinas - Bases nitrogenadas - YuBrain*. <https://www.yubrain.com/ciencia/biologia/diferencias-entre-purinas-y-pirimidinas/> (accessed 2022-05-17).
- (26) Kerru, N.; Gummidi, L.; Maddila, S.; Gangu, K. K.; Jonnalagadda, S. B. A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications. *Molecules* **2020**, 25 (8), 1909. <https://doi.org/10.3390/molecules25081909>.
- (27) Siwach, A.; Verma, P. K. Synthesis and Therapeutic Potential of Imidazole Containing Compounds. *BMC Chemistry* **2021**, 15 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00730-1>.
- (28) Tuta-Quintero, E. A.; Suárez-Ramírez, V.; Pimentel, J. Eficacia y Seguridad de La Medicina Tradicional China En COVID-19: Una Revisión Exploratoria. *Revista Internacional de Acupuntura* **2020**, 14 (4), 132–150. <https://doi.org/10.1016/j.acu.2020.09.001>.
- (29) Lahlou, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy* **2013**, 04 (03), 17–31. <https://doi.org/10.4236/pp.2013.43A003>.
- (30) Carlos Jiménez. El Papel de Los Productos Naturales En El Mercado Farmacéutico Actual. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. May 30, **2013**, pp 134–141.
- (31) *File: Vincristine.svg - Wikimedia Commons*. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vincristine.svg> (accessed 2022-05-17).

- (32) *File: Sirolimus.svg - Wikimedia Commons.*
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sirolimus.svg> (accessed 2022-05-17).
- (33) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **2020**, *83* (3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- (34) Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Prawat, H.; Pisutjaroenpong, S.; Engprasert, S.; Chumsri, P.; Tengchaisri, T.; Sirisinha, S.; Picha, P. Biodiversity and Natural Product Drug Discovery. *Pure and Applied Chemistry* **1998**, *70* (11), 2065–2072. <https://doi.org/10.1351/pac199870112065>.
- (35) Lahlou, M. Screening of Natural Products for Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2007**, *2* (5), 697–705. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.5.697>.
- (36) Huang, M.; He, J.-X.; Hu, H.-X.; Zhang, K.; Wang, X.-N.; Zhao, B.-B.; Lou, H.-X.; Ren, D.-M.; Shen, T. Withanolides from the Genus *Physalis*: A Review on Their Phytochemical and Pharmacological Aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2020**, *72* (5), 649–669. <https://doi.org/10.1111/jphp.13209>.
- (37) Chen, L.-X.; He, H.; Qiu, F. Natural Withanolides: An Overview. *Natural Product Reports* **2011**, *28* (4), 705. <https://doi.org/10.1039/c0np00045k>.
- (38) López-Arencibia; San Nicolás-Hernández; Bethencourt-Estrella; Sifaoui; Reyes-Batlle; Rodríguez-Expósito; Rizo-Liendo; Lorenzo-Morales; Bazzocchi; Piñero; Jiménez. Withanolides from *Withania Aristata* as Antikinetoplastid Agents through Induction of Programmed Cell Death. *Pathogens* **2019**, *8* (4), 172. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040172>.
- (39) *Withania aristata.*
<https://endemicascanarias.com/index.php/es/allcategories-es-es/67-nativas/1476-withania-aristata> (accessed 2022-05-08).

- (40) Fournet, A.; Munoz, V. Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**, *2* (11), 1215–1237. <https://doi.org/10.2174/1568026023393011>.
- (41) Cassels, B. K.; Asencio, M. Anti-HIV Activity of Natural Triterpenoids and Hemisynthetic Derivatives 2004–2009. *Phytochemistry Reviews* **2011**, *10* (4), 545–564. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9172-2>.
- (42) Yarden, A.; Lavie, D. 567. Constituents of *Withania Somnifera*. Part I. The Functional Groups of Withaferin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1962**, 2925. <https://doi.org/10.1039/jr9620002925>.
- (43) Kupchan, S. M.; Doskotch, R. W.; Bollinger, P.; McPhail, A. T.; Sim, G. A.; Renauld, J. A. S. The Isolation and Structural Elucidation of a Novel Steroidal Tumor Inhibitor from *Acnistus Arborescens*^{1,2}. *J Am Chem Soc* **1965**, *87* (24), 5805–5806. <https://doi.org/10.1021/ja00952a061>.
- (44) Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. 1371. Constituents of *Withania Somnifera* Dun. Part IV. The Structure of Withaferin A. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1965**, 7517. <https://doi.org/10.1039/jr9650007517>.
- (45) Moujir, L. M.; Llanos, G. G.; Araujo, L.; Amesty, A.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A. Withanolide-Type Steroids from *Withania Aristata* as Potential Anti-Leukemic Agents. *Molecules* **2020**, *25* (23), 5744. <https://doi.org/10.3390/molecules25235744>.
- (46) Jeyabalan, J.; Aqil, F.; Munagala, R.; Annamalai, L.; Vadhanam, M. v.; Gupta, R. C. Chemopreventive and Therapeutic Activity of Dietary Blueberry against Estrogen-Mediated Breast Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62* (18), 3963–3971. <https://doi.org/10.1021/jf403734j>.
- (47) López-Arencibia; San Nicolás-Hernández; Bethencourt-Estrella; Sifaoui; Reyes-Batlle; Rodríguez-Expósito; Rizo-Liendo; Lorenzo-Morales; Bazzocchi; Piñero; Jiménez. Withanolides from *Withania Aristata* as

- Antikinetoplastid Agents through Induction of Programmed Cell Death. *Pathogens* **2019**, 8 (4), 172. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040172>.
- (48) Perestelo, N. R.; Llanos, G. G.; Reyes, C. P.; Amesty, A.; Sooda, K.; Afshinjavid, S.; Jiménez, I. A.; Javid, F.; Bazzocchi, I. L. Expanding the Chemical Space of Withaferin A by Incorporating Silicon To Improve Its Clinical Potential on Human Ovarian Carcinoma Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, 62 (9), 4571–4585. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00146>.
- (49) Llanos, G. G.; Araujo, L. M.; Jiménez, I. A.; Moujir, L. M.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Bazzocchi, I. L. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Withaferin A-Analogues as Potent Apoptotic Inducers. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 140, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.004>.
- (50) Llanos, G. G.; Araujo, L. M.; Jiménez, I. A.; Moujir, L. M.; Bazzocchi, I. L. Withaferin A-Related Steroids from *Withania Aristata* Exhibit Potent Antiproliferative Activity by Inducing Apoptosis in Human Tumor Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 54, 499–511. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.05.032>.
- (51) Yousuf, S. K.; Majeed, R.; Ahmad, M.; Sangwan, P. I.; Purnima, B.; Saxsena, A. K.; Suri, K. A.; Mukherjee, D.; Taneja, S. C. Ring A Structural Modified Derivatives of Withaferin A and the Evaluation of Their Cytotoxic Potential. *Steroids* **2011**, 76 (10–11), 1213–1222. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.05.012>.
- (52) Gambhir, L.; Checker, R.; Sharma, D.; Thoh, M.; Patil, A.; Degani, M.; Gota, V.; Sandur, S. K. Thiol Dependent NF-KB Suppression and Inhibition of T-Cell Mediated Adaptive Immune Responses by a Naturally Occurring Steroidal Lactone Withaferin A. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2015**, 289 (2), 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.014>.
- (53) Antony, M. L.; Lee, J.; Hahm, E.-R.; Kim, S.-H.; Marcus, A. I.; Kumari, V.; Ji, X.; Yang, Z.; Vowell, C. L.; Wipf, P.; Uechi, G. T.; Yates, N. A.; Romero,

G.; Sarkar, S. N.; Singh, S. v. Growth Arrest by the Antitumor Steroidal Lactone Withaferin A in Human Breast Cancer Cells Is Associated with Down-Regulation and Covalent Binding at Cysteine 303 of β -Tubulin. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (3), 1852–1865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.496844>.

- (54) *Funcionalidades y Ventajas del Extractor Soxhlet | TECNILAB*.
<https://www.tecnilab.es/soxhlet-automatico/> (accessed 2022-05-09).
- (55) Luque de Castro, M. D.; Priego-Capote, F. Soxhlet Extraction: Past and Present Panacea. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (16), 2383–2389. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>.