

Homenaje a Alicia Seldes



Marta S. Maier*

Alicia M. Seldes nació en la ciudad de Buenos Aires el 31 de julio de 1945. Cursó sus estudios de la Licenciatura en Química en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) y a los 29 años obtuvo su título de Doctora en Ciencias Químicas luego de presentar su Tesis Doctoral en la síntesis de tetrazoles a partir de aldononitrilos acetilados. En el año 1978 participó junto con el Dr. Eduardo Gros en la creación de UMYMFOR (CONICET - FCEN, UBA), de la cual fue su subcoordinadora durante 25 años. Su contribución y dedicación permanente fue decisiva para el desarrollo de esta unidad de investigación y servicio. Alicia ocupó todas las categorías de cargos docentes en la Facultad de Ciencias Exactas, desde Ayudante de Segunda hasta Profesora Titular Plenaria y como Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET, desde Investigador Asistente hasta Principal.

Si bien realizó su tesis doctoral en hidratos de carbono, su campo de investigación se orientó inicialmente al de los esteroides en la síntesis de productos marcados para el estudio de rutas metabólicas de los mismos, estudios de reordenamientos y caracterización por resonancia magnética nuclear y por espectrometría de masa. En el año 1983 publicó por primera vez una serie de trabajos sobre esteroides de organismos marinos y organismos acuáticos de agua dulce y ésto

marcó un nuevo hito en su carrera científica al iniciar una línea de investigación original en nuestro país en el campo de los productos naturales de origen marino, lo cual fue reconocido en noviembre de 2002 por la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales con el otorgamiento del Premio "Dr. Eduardo G. Gros" en Química Orgánica de Productos Naturales. Anteriormente, había recibido el Premio KONEX. Diploma al Mérito en Química Orgánica en 1993 y el Trébol de Plata del Rotary Club Internacional en 1994.

Su interés y amplia experiencia en las técnicas de espectrometría de masa, la convirtieron en una referente indiscutida en nuestro país y en subcoordinadora del LANAIS de espectrometría de masa de nuestra facultad desde 1992 hasta 2002. Alumnos de doctorado y de grado de la Universidad de Buenos Aires y de otras Universidades de nuestro país (Bahía Blanca, Córdoba, Salta, Comodoro Rivadavia, Santa Fe) y del exterior (Chile y Costa Rica) se beneficiaron con sus excelentes clases, permanentemente actualizadas con los resultados más novedosos en el tema.

En el año 1992, su sensibilidad y gusto por el arte la motivaron a iniciar un nuevo desafío: aplicar la química al estudio de muestras arqueológicas y obras de arte de nuestro país. Desarrolló en este campo, nunca antes abordado en Argentina, un intenso trabajo interdisciplinario junto a restauradores, arqueólogos e historiadores de arte con el

apoyo de subsidios de la Universidad de Buenos Aires, Fundación Antorchas, ANPCyT y de la Fundación J. Paul Getty de EEUU.

Alicia publicó más de 100 trabajos de investigación originales, presentó cerca de 150 trabajos en congresos nacionales e internacionales, dictó muchísimas conferencias en el país y en el exterior y participó activamente en comisiones asesoras en CONICET y en la UBA. Su destacada carrera científica la llevó a ocupar la vicepresidencia de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Química Orgánica (SAIQO) (período 1997 - 1999) y posteriormente su presidencia (período 1999 - 2001).

El destino nos la arrebató el 23 de enero de 2003. Quienes fuimos sus discípulos y compartimos muchas horas a diario en el laboratorio durante tantos años, aprendimos a través de su ejemplo, sentimos su apoyo permanente para nuestros nuevos emprendimientos y disfrutamos de su cariño y calidez humana. También fuimos partícipes de los logros de sus hijos, Mariana y Gonzalo, y de la llegada de sus nietos. Lectora voraz, entusiasta por los nuevos desafíos, valiente y trabajadora hasta último momento, nos dejó un recuerdo imborrable de honestidad, empuje y de un profundo compromiso con todo lo que emprendía. Alicia fue una excelente investigadora y docente, pero fue por sobre todo una mujer excepcional que brilló con luz propia. Por todo ello, este número de Industria y Química está dedicado a su recuerdo.

* Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Homenaje a Alicia Seldes

Metabolitos secundarios bioactivos de organismos marinos pertenecientes al phylum Echinodermata

Marta S. Maier*

Los organismos marinos constituyen una fuente de metabolitos secundarios de una enorme diversidad química ya que sus estructuras son muy distintas a las encontradas en el ámbito terrestre. La investigación sistemática de especies marinas y el interés en el rol biológico y ecológico de sus metabolitos secundarios han conducido al descubrimiento de moléculas novedosas y con actividades biológicas promisorias [1]. En nuestro país son muy pocas las especies marinas que han sido estudiadas desde el

* Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR (CONICET - FCEN), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, (1428) Pabellón 2, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina
E-mail: maier@qo.fcen.uba.ar

punto de vista químico y por lo tanto el Mar Argentino constituye una fuente poco explorada y explotada al día de hoy de nuevos compuestos bioactivos.

En los últimos 10 años hemos estudiado los metabolitos secundarios de una serie de organismos marinos pertenecientes al phylum Echinodermata (del griego echinos, espino y derma, piel), el cual comprende alrededor de 7.000 especies vivientes ampliamente distribuidas en todos los océanos y a distintas profundidades. El phylum se divide en 5 clases: Holoturoidea (pepinos de mar u holoturios), Asteroidea (estrellas de mar), Ophiuroidea (ofiueros), Crinoidea (lirios y plumas de mar) y Echinoidea (erizos de mar).

Los organismos de las clases Asteroidea y Holoturoidea se caracterizan por producir mezclas complejas de glicósidos esteroidales y triterpenoidales, respectivamente, los cuales son responsables de su toxicidad general, pudiendo cumplir un rol defensivo debido a sus propiedades membranotrópicas. Estos metabolitos secundarios (saponinas) son muy comunes en el reino vegetal pero en el reino animal se han encontrado sólo en estos equinodermos y en algunas esponjas, alcionarias, algas verdes y en peces del género *Pardachirus*. Varias características estructurales de las agliconas y de las cadenas de oligosacárido diferencian a las saponinas de estrellas de mar (asterosaponinas) de las de holotureos (holoturinas) (Fig. 1).

Editorial

(viene de pág. 1)

La Asociación Química Argentina fundada hace 95 años por pioneros y desarrollada por muchos miles de químicos a lo largo de ese tiempo –quienes claramente comprendieron que ninguna carrera puede subsistir y progresar sin una institución representativa– constituye el enorme legado que recibimos y es un ejemplo de entidad prestigiosa, de trayectoria impecable y reconocida presencia en la comunidad, Asociación que reúne y a la que deben pertenecer quienes se vinculan con esa ciencia desde el estudio, la investigación básica, el desarrollo aplicado, la actividad empresarial, la enseñanza y el interés cultural.

Es que entre otros servicios y funciones para los socios, la AQA facilita su importante sede social, el contacto con colegas, la canalización de inquietudes profesionales,

la defensa de su campo de actuación, la asistencia a los asociados con cursos, libros de texto, bibliografía y documentación en química, sus publicaciones periódicas *Industria y Química*, *Journal of the Argentine Chemical Society* y el *Boletín Electrónico*, la organización de congresos, reuniones y conferencias especializadas, la vinculación con entidades extranjeras, además de actividades de cultura general.

Al comenzar mi labor como presidente, reitero a todos los químicos y estudiantes aún no socios la invitación cordial a asociarse, para que la sinergia que deriva de la actuación mancomunada de muchos incrementa los beneficios que les brinda nuestra Asociación.

Carlos A. Azize

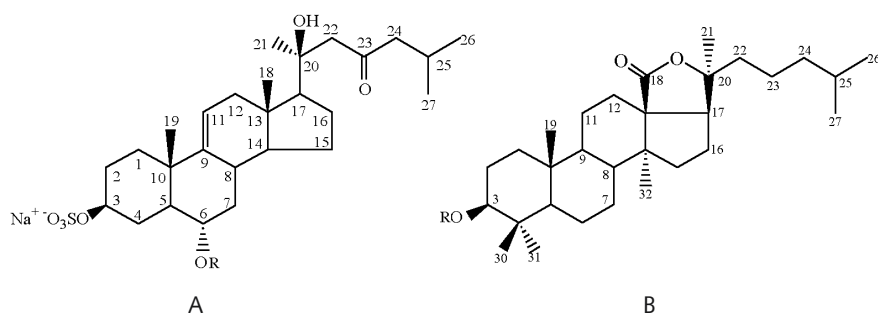


Figura 1. Saponinas de estrellas de mar (estructura A) y de holotureos (estructura B)

Las asterosaponinas (estructura A) contienen un núcleo esteroidal con un grupo sulfato unido al C-3 y una cadena de oligosacárido unida al C-6 de la aglicona. Las holoturinas (estructura B) presentan una cadena de oligosacárido unida al C-3 del esqueleto triterpenoidal con grupos sulfato unidos a las unidades de monosacárido en un 60 % de las holoturinas aisladas hasta el momento [2]. Las saponinas de estrellas de mar y holotureos presentan un amplio espectro de actividades biológicas: antifúngica, citotóxica, hemolítica, antiviral, antitumoral e inmunomoduladora, las cuales son una consecuencia de su acción membranotrópica frente a Δ^5 -esteroles en membranas celulares. Las saponinas forman complejos con estos esteroides desarrollando canales iónicos y poros de mayor tamaño lo que produce una alteración de las propiedades físico-químicas de las membranas. Las estrellas y pepinos de mar son resistentes a sus propias saponinas debido a la presencia de Δ^7 - y $\Delta^{9,11}$ -esteroides, Δ^5 -

esteroides sulfatados y β -xilósidos de esteroides en lugar de los Δ^5 -esteroides libres.

Los primeros trabajos de evaluación de actividades biológicas de saponinas aisladas de equinodermos se realizaron con extractos purificados de estos organismos marinos. Esta tendencia ha cambiado en los últimos años y actualmente las estructuras novedosas publicadas en la literatura incluyen estudios de actividad biológica que permiten establecer correlaciones estructura-actividad y contribuyen a una mejor comprensión de la función que cumplen estos metabolitos secundarios en los organismos productores. Por ejemplo, la estrella de mar *Anasterias minuta*, endémica de las costas cercanas a Comodoro Rivadavia, produce tres saponinas mayoritarias (**1-3**) (Fig. 2), las cuales presentan la misma cadena de hexasacárido y se diferencian en la estructura de la cadena lateral del esqueleto esteroidal [3].

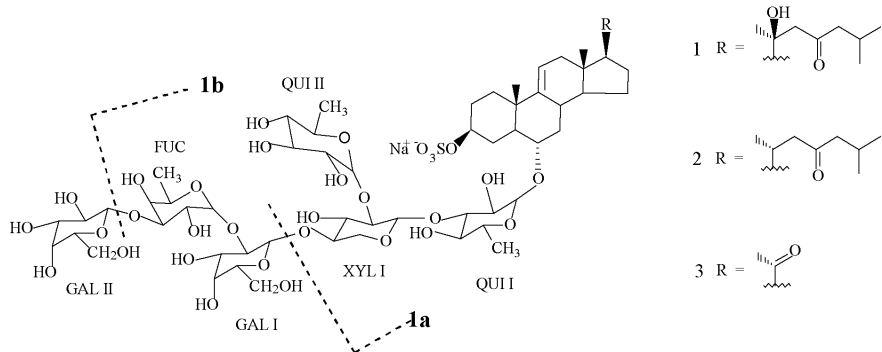


Figura 2. Saponinas aisladas de *Anasterias minuta*.

La evaluación de la actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* de los tres compuestos mostró que mientras Versicósido A (**1**) y Anasterósido A (**2**) resultaron activos, Anasterósido B (**3**) no mostró actividad antifúngica. También resultó inactivo el producto obtenido por desulfatación solvolítica de la saponina **1**. Por otra parte, la hidrólisis enzimática de **1** con una mezcla de glicosidasas de *Charonia lampas* rindió dos glicósidos, el triglicósido **1a** (Forbésido H) y el pentaglicósido **1b** (Thornasterósido A). Luego de su separación por HPLC, **1b** presentó una actividad antifúngica similar a la de las saponinas **1** y **2**, mientras que el triglicósido **1a** resultó inactivo. Estos resultados indicarían que la cadena de oligosacárido junto con la cadena lateral del esteroide y la presencia de un grupo sulfato en C-3 son características estructurales importantes en la actividad antifúngica de estas saponinas.

La toxicidad de las saponinas aisladas de *Anasterias minuta* y de una estrella de mar de Chile (*Heliaster helianthus*) ha sido demostrada *in situ* con especies de invertebrados intermareales en Mar del Plata, Comodoro Rivadavia y Península Valdés. Se observaron reacciones de escape, inmovilidad y muerte de los organismos al contacto con las fracciones enriquecidas en saponinas [4]. Un ejemplar del molusco *Siphonaria lessoni* liberó una mucosidad blanquecina al entrar en contacto con estas fracciones. Una reacción similar se produjo en ejemplares de *S. lessoni* bajo estímulo mecánico, mediante presión del manto del animal. El análisis por RMN ^1H y de ^{13}C del extracto de cloruro de metileno de la mucosidad mostró la presencia de dos compuestos polipropionados (**3** y **4**) (Fig. 3), los cuales habían sido aislados previamente de *S. lessoni* de Chile y *S. pectinata*. Algunos autores han sugerido que los compuestos polipropionados en moluscos de la especie *Siphonaria* cumplirían un rol defensivo. La

identificación de estos compuestos en alta concentración en la mucosidad liberada avalaría esta propuesta.

Además de saponinas, las estrellas de mar producen glicósidos de esteroides polihidroxilados, los cuales forman mezclas complejas de compuestos minoritarios. Las unidades de monosacárido (una o dos) están usualmente unidas al C-24 de la cadena lateral de la aglicona esteroidal, aunque en varios de estos metabolitos secundarios los sitios de glicosidación comprenden C-3, C-26, C-28 o C-29. Estos compuestos mues-

saponinas **1-3**, contiene los monoglicósidos sulfatados **5-7** (Fig. 4) [5], los cuales presentan una actividad antifúngica menor que las saponinas **1 y 2**.

Al igual que *A. minuta*, la mayoría de las estrellas de mar producen mezclas complejas de glicósidos esteroidales, lo cual requiere de la aplicación de varios pasos de purificación para obtener los compuestos puros. Al trabajar con extractos etanólicos de organismos marinos, el primer paso es la eliminación de sales, principalmente cloruro de sodio. Esto se logra percolando el extracto

polihidroxilados, los cuales pueden separarse en ambos grupos de metabolitos secundarios en función del peso molecular en una columna de Sephadex LH60 utilizando una mezcla de MeOH:H₂O (2:1) como solvente de elución. Las fracciones obtenidas se purifican por cromatografía en columna seca de sílica gel C-18 con mezclas de metanol y agua, con cantidades crecientes de metanol. La separación final de los glicósidos se realiza por HPLC en columna de fase reversa eluyendo en general con MeOH:H₂O (60:40).

Los compuestos se caracterizan luego por espectrometría de masa y RMN ¹H y de ¹³C en una y dos dimensiones. La espectrometría de masa es una técnica analítica muy sensible que posibilita el estudio de compuestos polares de alto peso molecular mediante la aplicación de técnicas de ionización suaves como el bombardeo con átomos rápidos (FAB, fase atom bombardment), electrospray (ESI) y MALDI (matriz assisted laser desorption ionization), ya sea en modo de iones negativos o positivos. Los glicósidos esteroidales sulfatados pueden ser caracterizados por estas técnicas sin derivatización previa, obteniéndose datos sobre su peso molecular y la secuencia de monosacáridos en la cadena de oligosacárido a partir del análisis de patrones de fragmentación. La aplicación de técnicas de espectrometría de masa tandem (EM/EM) permite obtener información sobre mecanismos de fragmentación de compuestos conocidos e información estructural sobre metabolitos nuevos.

A diferencia de las saponinas de estrellas de mar, las holoturinas son compuestos de mayor toxicidad, se encuentran en mayor proporción en los organismos productores y son específicos para diferentes grupos taxonómicos de holotureos. Las agliconas de estas saponinas presentan un anillo lactónico 18,20 y se clasifican en dos series: las que presentan un doble enlace Δ^{9,11} y aquellas con uno Δ⁷. Recientemente hemos estudiado tres especies de holotureos, dos

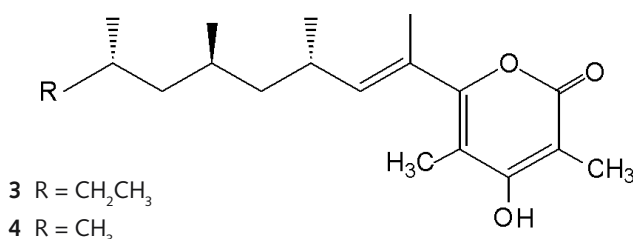


Figura 3. Norpectinatone (**3**) y Pectinatone (**4**) identificados en la mucosidad de *Siphonaria lessoni*.

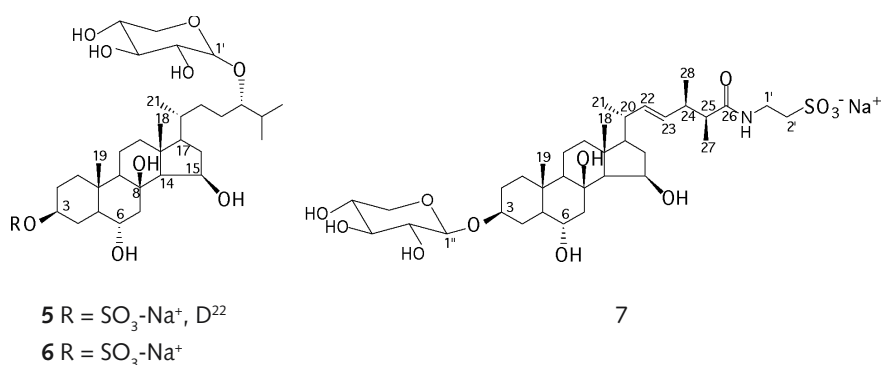


Figura 4. glicósidos polihidroxilados sulfatados de *A. minuta*.

tran una variabilidad estructural mucho mayor que la de las asterosaponinas debido a la posibilidad de hidroxilación en distintas posiciones del esqueleto esteroidal (3β, 6 (α o β), 8, 15 (α o β), 16 (α o β) y 24), a la identidad y posición de la unidad de monosacárido y a la presencia de grupos sulfato. La estrella *A. minuta*, además de las

acuoso remanente de la evaporación del etanol por la resina Amberlite XAD-2, lavando con agua destilada hasta reacción negativa de cloruro (con una solución acuosa de nitrato de plata) y eluyendo los glicósidos con metanol. El extracto metanólico contiene la mezcla de asterosaponinas y de glicósidos de esteroides

de ellos recolectados en el Mar Argentino: *Psolus patagonicus* y *Hemoiedema spectabilis* y un tercero en las cercanías de las Islas Georgias del Sur: *Staurocucumis liouvillei*. Los tres holotureos producen tetraglicósidos triterpenoidales sulfatados en las unidades de monosacárido.

Los Hemoiedemósidos A (**8**) y B (**9**) (Fig. 5) presentan la misma aglicona triterpenoidal y se diferencian en el grado de sulfatación de la cadena tetraglicósídica. Ambos glicósidos presentaron actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum*, siendo más activos que benomyl, un fungicida comercial [6]. La evaluación de las zootoxicidades de **8** y **9** en el bioensayo de mortalidad de larvas del crustáceo *Artemia salina* mostró una alta toxicidad del glicósido **8** (CL_{50} 18.7 ppm) en comparación con **9** (CL_{50} 47.5 ppm), mientras que el derivado semisintético desulfatado resultó mucho menos citotóxico (CL_{50} 424.5 ppm).

Patagonicósido A (**10**) aislado de *P. patagonicus* (Fig. 6) presenta la misma cadena glicosídica que **8** y se diferencia de éste en el doble enlace en Δ^7 y la presencia de dos grupos hidroxilo en C-12 (α) y C-16 (α)

[7]. Comparando las actividades antifúngicas de **8**, **9** y **10**, este último glicósido presenta una actividad menor. A diferencia de lo que se observa en asterosaponinas, los derivados semisintéticos desulfatados de **8-10** retienen la actividad antifúngica pero son mucho menos activos. Estos resultados sugieren que tanto la estructura de la aglicona como la presencia y el número de grupos sulfato en la cadena de oligosacárido juegan un papel importante en la actividad antifúngica de estas saponinas.

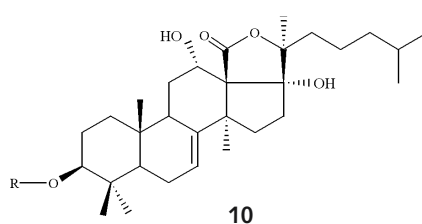
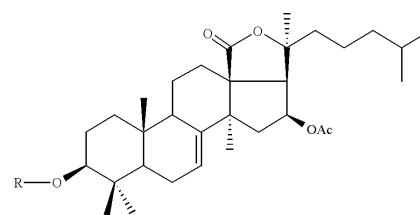


Figura 6. Patagonicósido A aislado de *Psolus patagonicus*.

Los Liouvillosidos A (**11**) y B (**12**) (Fig. 7) aislados de *Staurocucumis liouvillei* son glicósidos trisulfatados con la misma cadena glicosídica que **9**. Ambos compuestos se diferencian en un doble enlace en C-24 y presentan actividad virucida frente a herpes simplex, siendo el glicósido **12** el más activo [8]. Varias saponinas naturales aisladas



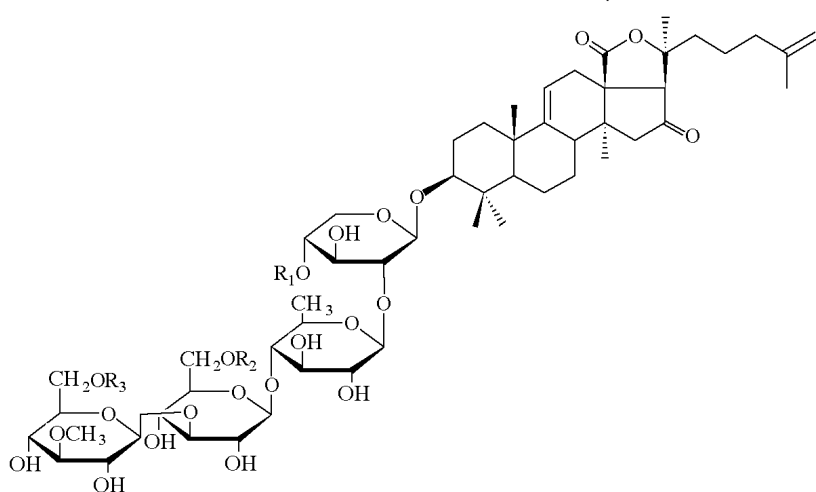
11 R = cadena de oligosacárido de **9**, D²⁴
12 R₁ = cadena de oligosacárido de **9**⁺

Figura 7. Holoturinas aisladas de *Staurocucumis liouvillei*.

de plantas presentan un comportamiento similar, ya sea ejerciendo un efecto virucida directo o por interferencia en un paso del ciclo de replicación del virus.

A diferencia de los organismos de las clases Asteroidea y Holoturoidea, los ofiuros se caracterizan por producir esteroides disulfatados en C-3 (α) y C-21 con grupos hidroxilo adicionales en los anillos A y B. Estos compuestos también han sido aislados de algunas especies de esponjas. En los últimos años hemos caracterizado varios esteroides sulfatados novedosos de ofiuros del Atlántico Sur como por ejemplo los compuestos **13-16** (Fig. 8) aislados de *Ophiocoma echinata* y *Ophioplocus januarii* [2]. Estos compuestos presentaron actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos como el virus herpes simplex, sincital respiratorio y virus Junin, responsable de la fiebre hemorrágica argentina. La evaluación de la actividad antiviral de otros esteroides disulfatados naturales aislados del ofiuro antártico *Astrotoma agassizii*, nos permitió identificar como característica estructural importante para la actividad antiviral la presencia de grupos hidroxilo sulfatados en C-2 y C-3 del núcleo esteroidal.

Dado que una limitación sería para la realización de estudios de actividad biológica de productos naturales marinos es su baja proporción en algunos organismos productores, la síntesis de análogos se presenta como la mejor alternativa en estos casos. Partien-



8 R₁ = R₂ = SO₃⁻Na⁺, R₃ = H

9 R₁ = R₂ = R₃ = SO₃⁻Na⁺

Figura 5. Holoturinas aisladas de *Hemoiedema spectabilis*.

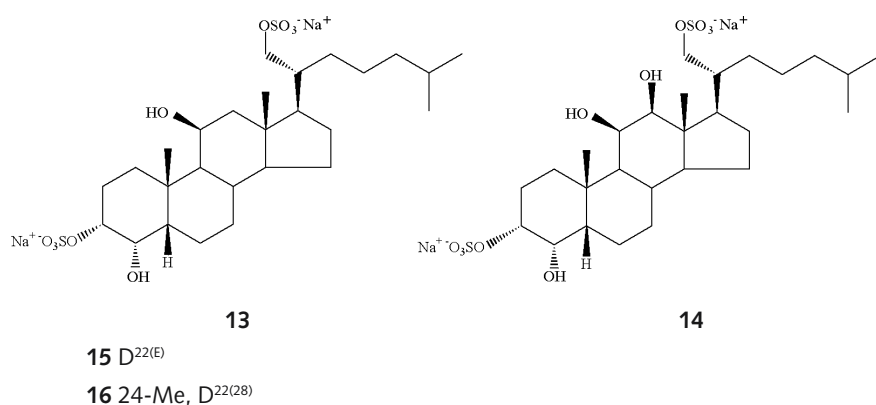
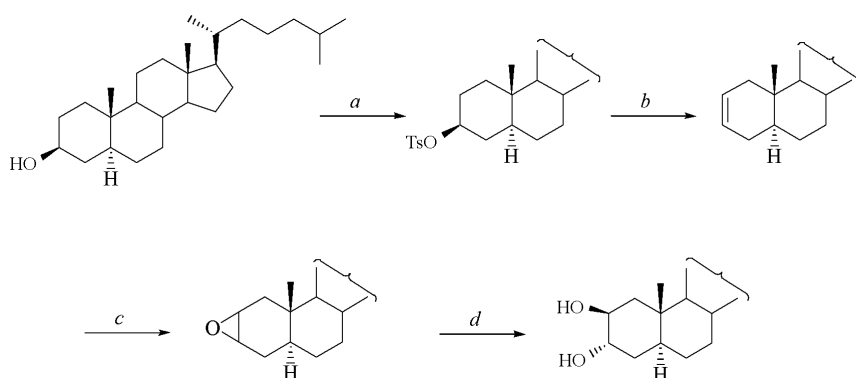


Figura 8. esteroides disulfatados aislados de *O. echinata* y *O. januarii*.



Esquema 1. a. TsCl, piridina, t.a., 24 h; b. LiBr, LiCO₃, DMF, reflujo, 1,5 h; c. ácido *m*-cloroperbenzoico, Na₂CO₃, Cl₂CH₂, t. a., 4 h; d. H₂SO₄ 1N, THF, t.a., 24 h

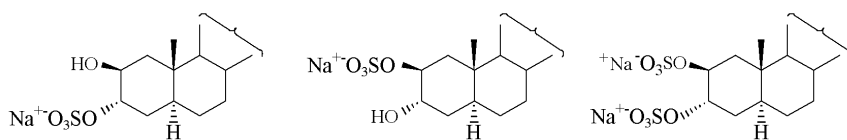


Figura 9. Análogos monosulfatados y disulfatado de 2β,3α-dihidroxi-5α-colestano.

do de 3β-hidroxi-5α-colestano, por tosiliación y eliminación, introdujimos un doble enlace en C-2-C-3, el cual por epoxidación y posterior apertura del epóxido en medio ácido rindió el análogo dihidroxilado en C-2 (β) y C-3 (α) (Esquema 1).

El 2β,3α-dihidroxi-5α-colestano fue sulfatado utilizando el complejo de trióxido de azufre-trietilamina obteniendo los compuestos monosulfatados en C-2 y C-3 y el disulfatado (Fig. 9).

Los compuestos monosulfatado en C-2 y disulfatado fueron los más activos frente al

virus herpes simplex (HSV-2), mientras que el dihidroxilado resultó inactivo. El esteroide disulfatado presentó el mejor índice de selectividad (relación entre la concentración de compuesto necesaria para reducir la viabilidad de las células en un 50% y la concentración que reduce el número de placas de virus en un 50%) y por eso se continuó con las pruebas de actividad frente al virus Junin y al virus del dengue. El esteroide disulfatado resultó inactivo frente al virus Junin pero presentó una marcada actividad inhibitoria frente al virus del dengue [9]. Estos resultados indican que el 2β,3α-dihidroxi-5α-colestano disulfatado es un

buen compuesto modelo para introducir grupos funcionales adicionales en el esqueleto esteroide y la cadena lateral para establecer correlaciones entre la estructura y la actividad inhibitoria frente a virus patógenos en humanos. Recientemente se han aislado de esponjas varios esteroides polihidroxilados sulfatados en C-2 (α), C-3 (β) y C-6 (α) que presentan actividad antiviral frente al virus de la leucemia y HIV. Estos resultados indican que los esteroides sulfatados en los anillos A y B se presentan como compuestos con potencial actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos.

En conclusión, los organismos marinos son una fuente poco investigada para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividades biológicas promisorias. El estudio de especies del Mar Argentino desde el punto de vista químico permitirá encontrar nuevos metabolitos bioactivos, entender relaciones entre especies y aumentar nuestros conocimientos sobre recursos muy poco explotados por nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] F. Pietra. *Biodiversity and Natural Products Diversity*. Pergamon, United Kingdom, 2002.
- [2] M. S. Maier, A. P. Murray, *Secondary Metabolites of Biological Significance from Echinoderms*. En: M. Fingerman, R. Nagabhushanam. (Ed), *Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms*; Science Publishers, New Hampshire, 2006.
- [3] H. D. Chludil, A. M. Seldes, M. S. Maier, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 153.
- [4] R. L. S. Centurión, *Evaluación del efecto de las saponinas aisladas de Heliaster helianthus (Lamarck, 1816) y Anasterias minuta Perrier 1875: ensayos in situ y bioactividad*. FCEyN, UBA, Buenos Aires, 2005.
- [5] H. D. Chludil, M. S. Maier, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1279.
- [6] H. D. Chludil, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 860.
- [7] A. P. Murray, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9563.
- [8] M. S. Maier, A. J. Roccatagliata, A. Kuriss, A. M. Seldes, C. A. Pujol, E. B. Damonte, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 732.
- [9] G.A. Garrido Santos, A.P. Murray, C.A. Pujol, E.B. Damonte, M.S. Maier, *Steroids* **2003**, *68*, 125.

Homenaje a Alicia Seldes

Aplicaciones cuantitativas de la resonancia magnética nuclear

Gerardo Burton*

INTRODUCCIÓN

Cuando la mayoría de los químicos piensa en resonancia magnética nuclear (RMN), la asocia a la elucidación estructural y caracterización de moléculas. Esto es razonable, ya que la RMN es hoy en día la técnica espectroscópica más completa en términos de proveer información estructural, no solo en pequeñas moléculas sino también en macromoléculas complejas como las proteínas. Desde el desarrollo del primer espectrómetro en 1950, la metodología y el equipamiento utilizado han sufrido cambios importantes, dos hitos que cabe destacar son el uso del método de pulsos y transformación de Fourier que reemplazó al método de barrido (o de "onda continua") y la introducción de imanes superconductores en reemplazo de los electroimanes e imanes permanentes en ambos casos a partir de la década del 70. El método de pulsos trajo una mejora importantísima en la sensibilidad dando acceso a la RMN multinu-

clear, especialmente de ^{13}C pero también de ^{15}N , ^{17}O , ^{29}Si , ^{31}P y muchos otros que hoy en día son rutina en cualquier espectrómetro moderno. Los imanes superconductores permitieron romper la barrera impuesta por la saturación de los núcleos de hierro y alcanzar campos magnéticos cada vez más altos ganando en sensibilidad y resolución. Finalmente los avances en la electrónica y un entendimiento detallado a nivel mecánico del fenómeno nos ha dado una miríada de experimentos de RMN que exceden largamente a los simples espectros que se obtenían en los orígenes del método, con 2, 3 y hasta 4 dimensiones de frecuencia para asistir en la elucidación estructural, análisis conformacional y estudio de sistemas dinámicos. Paralelamente el potencial de la RMN ha sido reconocido en otras áreas, como por ejemplo su uso en la generación de imágenes para diagnóstico clínico, hoy ampliamente difundido.

A lo largo de esta historia, la esencia de cualquier experimento de RMN ha sido medir frecuencias de resonancia de los núcleos de interés con la mayor precisión posible y poder diferenciar frecuencias cercanas. La precisión de la medición y estabilidad de los espectrómetros modernos es asombrosa, 1

en 10^9 o mejor en mediciones que pueden durar hasta varios días, pudiendo distinguir con facilidad diferencias menores de 0,5 Hz en frecuencias absolutas de más de 5×10^8 Hz. Esta información además tiene un alto grado de reproductibilidad entre instrumentos distintos permitiendo la comparación directa de datos espectroscópicos obtenidos en laboratorios alrededor del mundo. En paralelo a esta información, todo aquel que utiliza y analiza espectros de RMN hace uso de la información cuantitativa también presente en los espectros que permite, a partir del área de cada señal determinar la cantidad relativa de núcleos que le dan origen. A pesar que los aspectos cuantitativos de la técnica son bien conocidos y rutinariamente utilizados desde los comienzos, su uso como metodología analítica cuantitativa alternativa es bastante más reciente. A esto han contribuido varios factores, entre los cuales el elevado costo de los espectrómetros de RMN jugó un papel importante. No menor ha sido sin embargo el uso intensivo que los químicos, especialmente los químicos orgánicos, han hecho de la RMN con fines de caracterización de moléculas que al no requerir una precisión importante en los aspectos cuantitativos, llevó a pensar que la metodología no era adecuada para esos fines.

* UMYMFOR (CONICET – UBA) y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires – Pabellón 2, Ciudad Universitaria, C1428EHA Ciudad de Buenos Aires.
E-mail: burton@umy.fcen.uba.ar

PARTICULARIDADES DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Si bien una descripción detallada de los principios de la resonancia magnética nuclear escapa a los fines de este trabajo, existen ciertos aspectos de la RMN que merecen ser destacados en comparación con otras espectroscopías tradicionalmente usadas en química analítica cuantitativa (para una introducción a los principios de la RMN ver [1]). Como en otras espectroscopías (UV-visible, IR), en RMN hay absorción de energía de la radiación electromagnética y esa absorción ocurre a frecuencias características relacionadas a la estructura de la molécula. Sin embargo, a diferencia de otras espectroscopías de absorción, el fenómeno de RMN solo se manifiesta en presencia de un campo magnético que diferencia energéticamente las posibles orientaciones del momento magnético de los núcleos. Las cantidades de energía involucradas son muy pequeñas y solo pueden medirse cuando el campo magnético es muy intenso; aun así con los imanes más poderosos disponibles actualmente, la radiación electromagnética corresponde a las ondas de radio con frecuencias por debajo del GHz.

El único requisito para que un núcleo sea observable por RMN es que presente un momento magnético no nulo, característica que se da cuando el spin nuclear es distinto de cero. Todos los elementos de la tabla periódica tienen al menos un isótopo que cumple este requisito, si bien en muchos casos la sensibilidad es baja o las señales son muy anchas dificultando la medición y restándole utilidad. La tabla 1 muestra los núcleos más usados en RMN así como algunas características de los mismos.

El tener que utilizar ondas de radio como fuente de radiación electromagnética, trae aparejado algunas particularidades experimentales que diferencian a los espectrómetros de RMN de un espectrofotómetro UV-

Núcleo	Abundancia natural	Frecuencia de resonancia a 11,75 T	Información que brinda
¹³ C	1,07%	125,8 MHz	Permite "ver" el esqueleto de una molécula orgánica
¹ H	99,99%	500,1 MHz	Permite "ver" lo que rodea al esqueleto carbonado
³¹ P	100%	202,5 MHz	estructura de compuestos fosforados
¹⁹ F	100%	470,6 MHz	estructura de compuestos fluorados
²⁹ Si	4,69%	99,4 MHz	estructura de siliconas, etc.
¹⁵ N	0,36%	50,7 MHz	estructura de compuestos nitrogenados

visible o IR. En primer lugar debido a que la longitud de onda es en la escala de metros (habitualmente 0,5 a 5 m) no es posible enfocar o analizar las ondas de radio por métodos ópticos (lentes, redes de difracción, etc.); se deben usar antenas direccionales y circuitos electrónicos similares a los usados en transmisores y receptores de radio, televisión y telefonía celular. Por otra parte la eficiencia de la absorción por la muestra es muy baja y debe irradiarse con un exceso muy grande de energía de la cual se absorbe una fracción ínfima. Como consecuencia de estas características, no es posible medir un espectro de absorción "tradicional" y debe recurrirse a métodos más sofisticados para medir las frecuencias y la magnitud de la absorción. La RMN es considerablemente menos sensible que otras espectroscopías de absorción pero la sensibilidad aumenta al aumentar el campo magnético.

ASPECTOS CUANTITATIVOS

Continuando con la comparación con las espectroscopías de absorción, en éstas la intensidad de las bandas de absorción es proporcional a la cantidad de moléculas en el camino que atraviesa la radiación electromagnética. En UV-visible e IR ese número de moléculas está directamente relacionado con la concentración del analito (C) y la distancia recorrida por el haz de radiación al atravesar la muestra (d). En esas con-

diciones surge la conocida expresión para la absorbancia (A) dada por la ley de Beer-Lambert:

$$A = a \times d \times C$$

El coeficiente de proporcionalidad *a* (la absorptividad) es característico de cada banda pero no hay una relación sencilla ni fácilmente predecible entre las absorptividades de distintas bandas que deben ser determinadas experimentalmente. En RMN no es posible establecer el camino recorrido por la radiación electromagnética ya que ésta es enviada a la muestra desde distintas direcciones (generalmente hacia el interior de una antena de geometría cilíndrica). La intensidad de las bandas depende además de factores instrumentales (homogeneidad del campo magnético, sintonía), viscosidad, temperatura, solvente y presencia de impurezas paramagnéticas (incluido O₂). Es así que el coeficiente de proporcionalidad con la concentración tiene una pobre reproducibilidad y no tiene aplicación práctica.

Por otra parte, en RMN cada grupo de núcleos idénticos dará una señal de complejidad variable pero que puede ser asignada en forma inequívoca. El área de esa señal es directamente proporcional a la magnetización macroscópica de los núcleos que la producen, que no es más que la suma de los momentos magnéticos de los núcleos individuales. Como la magnitud del momento

magnético es una propiedad intrínseca del tipo de núcleo (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc.) en un espectro de RMN (por ejemplo de ^1H), las áreas de las señales dependerán solamente del número de núcleos que le dan origen. Existe entonces una relación sencilla y exacta entre las áreas de las distintas señales en un mismo espectro, dada por la cantidad relativa de núcleos que contribuyen a cada una de ellas. Un detalle muy importante a tener en cuenta es que estas áreas, al ser relativas, son independientes de la concentración y se corresponden exactamente con la *fracción molar* de cada grupo de núcleos idénticos en la muestra. La aplicación más simple de esto es la habitual integración a que se somete un espectro de RMN ^1H , donde la señal de un CH_3 tendrá un área 3 veces mayor que la de un CH y 1,5 veces la de un CH_2 . Sin embargo estas relaciones valen para todos los grupos de ^1H idénticos presentes en la muestra, independientemente de que pertenezcan o no a la misma molécula, lo cual nos lleva a una aplicación más general de la integración de un espectro RMN que, como se describe más abajo, permite mediante un cálculo sencillo obtener fracciones molares de los componentes de una mezcla.

ASPECTOS EXPERIMENTALES

Antes de pasar a los ejemplos de aplicación cabe dar algunas precisiones sobre los detalles experimentales a tener en cuenta al medir espectros para ser usados en determinaciones cuantitativas. Es común que en un espectro de RMN ^1H de un compuesto puro usado con fines estructurales, las áreas de las señales se desvíen hasta un 5-10% (o a veces más) del valor esperado. Como se sabe de antemano que las relaciones deben corresponder a números enteros (si una señal integra para 3,1 o 2,9 H sabemos que el valor correcto es 3) estos errores no afectan la interpretación y ésta es tal vez la causa principal que ha llevado a pensar que la

RMN es una técnica imprecisa desde el punto de vista cuantitativo. Esas desviaciones tienen varios orígenes:

Relajación incompleta de algunos núcleos:

En el método de pulsos suelen medirse varios espectros sucesivos (aplicando un pulso de radiofrecuencia y midiendo la señal resultante como amplitud en función del tiempo) que se suman para mejorar la relación señal/ruido del espectro y eliminar imperfecciones instrumentales. El espectro como una gráfica de amplitud vs frecuencia se obtiene por una transformación de Fourier de esa suma. Estrictamente, entre mediciones debe esperarse el tiempo suficiente para que el sistema vuelva al equilibrio, ese proceso sigue una recuperación asintótica exponencial caracterizada por el tiempo de relajación spin-red T_1 . Luego de aplicar un pulso de radiofrecuencia, se debe esperar 5 veces T_1 para recuperar el 99,5% de la magnetización original del sistema. Como el valor de T_1 es función del entorno de cada grupo de núcleos, puede ocurrir que para un determinado intervalo entre mediciones algunos núcleos recuperen su magnetización de equilibrio y otros lo hagan parcialmente, dando lugar a desviaciones en los valores de integración relativa (que es proporcional a la magnitud de la magnetización de cada tipo de núcleo). La solución a este problema es sencilla, deben medirse los tiempos de relajación de los núcleos involucrados (un experimento sencillo de realizar) y asegurarse que el intervalo entre mediciones sea mayor que 5 veces (o mejor 9 veces) el T_1 más largo. Como esto representa un incremento notable en los tiempos de medición, no es una práctica habitual en los espectros medidos con fines de elucidación de estructura.

Efecto Overhauser Nuclear: Este se da en núcleos distintos de ^1H cuando se miden espectros con irradiación simultánea de los ^1H . La irradiación simultánea o "desacoplamiento" de los ^1H es una práctica habitual

al medir espectros de otros núcleos ya que los simplifica. En RMN ^{13}C por ejemplo, se obtiene en estas condiciones una única señal por cada carbono de la molécula; sin embargo el área de esas señales puede tener variaciones de hasta un 200% por transferencia de polarización magnética desde los ^1H , un efecto muy útil para aumentar la sensibilidad pero desastroso si se busca información cuantitativa, que ha llevado a la presunción errónea que los espectros de RMN ^{13}C no pueden integrarse. Si se va a utilizar un espectro de RMN ^{13}C o ^{31}P en forma cuantitativa sólo debe eliminarse el efecto Overhauser nuclear (NOE), para lo cual existen secuencias de medición especiales que son estándar en cualquier espectrómetro moderno.

Relación señal/ruido pobre: Una línea de base con un alto nivel de ruido contribuye a imprecisiones en la integración de las señales, esto puede solucionarse fácilmente ya sea aumentando la cantidad de muestra (muestra más concentrada) y/o aumentando el número de espectros N sumados (la relación señal/ruido aumenta en forma proporcional a \sqrt{N}). Este factor es particularmente importante en núcleos poco abundantes y poco sensibles como ^{13}C .

Imperfecciones en la línea de base: Estas están asociadas a factores instrumentales como problemas de sintonía en la sonda del equipo, vibración mecánica de la sonda o tubos de muestra defectuosos. Imperfecciones en la forma de las líneas (que deberían ser Lorentzianas) suelen deberse a inhomogeneidad del campo magnético. Solucionados esos factores, las imperfecciones remanentes en general pueden corregirse con el software de procesamiento.

Baja resolución digital: Este es un factor a tener en cuenta en espectros de RMN de núcleos que tienen un ancho espectral grande como ^{13}C , ^{31}P y ^{15}N , donde luego de la digitalización las señales pueden quedar

definidas por muy pocos puntos. Esto produce alejamiento de la forma natural (Lorenziana) de las señales y desviaciones en el área. Nuevamente este problema puede solucionarse fácilmente, incrementando el tamaño de la tabla de datos de modo de tener una resolución digital adecuada.

Errores en la integración: La forma natural de las líneas de un espectro RMN corresponde a la función de Lorentz (líneas Lorenzianas), tienen el máximo en la frecuencia de resonancia y luego caen hacia los lados en forma asintótica. Este acercamiento asintótico a la línea de base, introduce un error en la integración que es tanto mayor cuanto mayor es el ancho a media altura de la línea. Este factor pasa a ser despreciable si se tienen líneas estrechas (preferentemente menos de 2-3 Hz de ancho a media altura)

Una descripción detallada de aspectos instrumentales y de operación a tener en cuenta y su efecto en los espectros, puede encontrarse en [2].

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR VS. CROMATOGRAFÍA DE GASES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Si cada componente de una mezcla diera una única señal en el espectro RMN, ese espectro se parecería a primera vista a un cromatograma obtenido por cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida (HPLC). Esto es bastante común por ejemplo, en el caso de espectros de RMN ^{31}P de pesticidas fosforados donde habitualmente cada componente contiene un único átomo de fósforo (o dos equivalentes) (Figura 1). Existen sin embargo varias diferencias a considerar que se resumen a continuación. En primer lugar la posición de las señales en el espectro está dada por el desplazamiento químico del núcleo directamente relacionado a la estructura de la molécula, es decir

que esa posición contiene información estructural precisa que puede ser comparada directamente con datos de literatura (por la elevada reproducibilidad que tiene el desplazamiento químico) y correlacionada con

En segundo lugar el factor de respuesta de los detectores usados en CG o HPLC varía de un analito a otro. Ese factor solo puede determinarse experimentalmente utilizando estándares certificados (de pureza conoci-

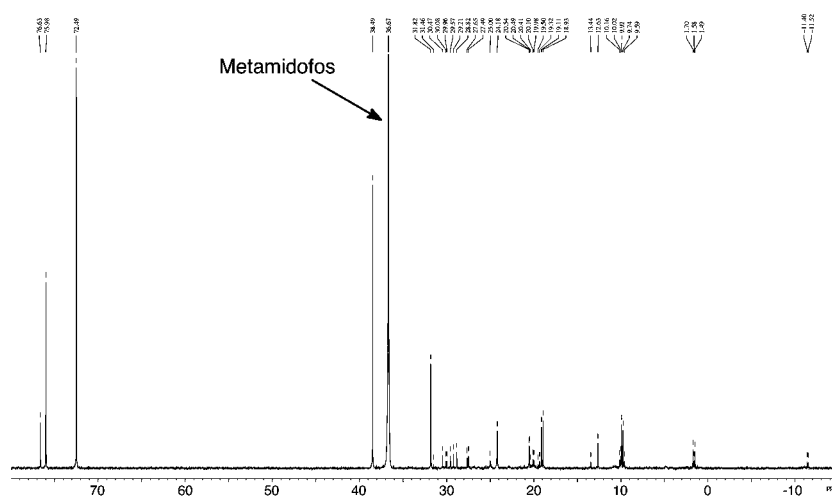


Figura 1. Espectro de RMN ^{31}P de metamidofos (O,S-dimetil fosforoamidotioato) técnico. La señal a 36,7 ppm corresponde a metamidofos (escala vertical multiplicada $\times 10$ para visualizar señales menores). Se observan resueltas, señales de más de 30 impurezas con fracciones molares que van de 0,05 a 0,002.

los espectros de RMN ^1H y ^{13}C . El dato equivalente en un cromatograma, el tiempo de retención, depende de numerosos factores (flujos, presiones, estado de la columna, etc) y no tiene una correlación directa con la estructura más allá de relaciones de polaridad o volatilidad; difícilmente alguien identificaría un compuesto por encontrar que tiene el mismo tiempo de retención que el descrito varios años atrás por un laboratorio a miles de kilómetros de distancia. La identificación inequívoca del analito que origina cada pico en CG o HPLC requiere utilizar como detector un espectrómetro de masa y cuando esto no es suficiente, hacer la cromatografía en escala preparativa de modo de aislar el componente responsable de cada pico e identificarlo luego mediante ... RMN. Debe tenerse siempre presente que la simple comparación de tiempos de retención con un estándar en idénticas condiciones no garantiza la identidad.

da) de los componentes en cuestión. En el espectro de RMN sabemos que el factor de respuesta depende sólo del número de núcleos, dato disponible una vez identificado el componente, con lo cual no se requiere un estándar de referencia.

Finalmente si se busca realizar una cuantificación absoluta, por ejemplo para determinar pureza o el contenido de un activo o una impureza en un producto técnico, en el caso de CG o HPLC nuevamente se requiere un estándar certificado de cada analito. En RMN también se necesita un estándar de referencia, pero en este caso la cuantificación se hace respecto a los núcleos sin importar en que molécula se encuentran, ya que la respuesta relativa (área de la señal) es independiente de ésta. En consecuencia en RMN la sustancia usada como referencia y el analito no tienen que ser la misma, sólo deben contener el mismo tipo

de núcleos (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc.). Esto permite usar un único estándar de referencia (diferente de los componentes de la muestra) que se agrega a la muestra previo a la medición del espectro. ¿Que requisitos debe cumplir este estándar de referencia? En primer lugar, como ya se mencionó, contener al menos un núcleo igual a uno de la muestra, ser soluble en el mismo solvente, no dar señales que se superpongan con las de la muestra o de las impurezas, preferentemente dar una única señal en el espectro RMN y obtenerse comercialmente con alto grado de pureza y título confiable. Otras características deseables son ser estable, no volátil y preferentemente sólida. La tabla 2 muestra algunos estándares de referencia que pueden utilizarse en RMN cuantitativo. De estos la dimetilsulfona es uno de los más utilizados y ha sido propuesta como estándar de referencia universal [7]. El procedimiento

mún en RMN ^1H o ^{13}C , cada analito da varias señales? En ese caso desde el punto de vista del análisis cuantitativo se debe seleccionar la señal más sencilla (idealmente un singulete) y mejor resuelta de cada analito. Además debe asegurarse por todos los medios posibles que la señal seleccionada no esté superpuesta a la de otro analito; usualmente esto puede hacerse por espectroscopía de correlación en 2 dimensiones donde los ^{13}C pueden correlacionarse con ^1H a 1, 2 o 3 enlaces, la posibilidad que simultáneamente el ^{13}C y esos ^1H se superpongan exactamente en dos compuestos diferentes es muy baja. Por último el disponer de varias señales del analito permite utilizar más de una en el cálculo y disminuir el error de la determinación. Por supuesto cuanto más complejo es el espectro de RMN más posibilidades de superposición existen y también más posibilidades que alguna impureza

bitualmente citado como QNMR por "Quantitative Nuclear Magnetic Resonance") [3-7], algunas ya se han incorporado a farmacopeas o han sido adoptados por la Organización Mundial de la Salud por ejemplo para el análisis de pesticidas. Se presentan a continuación tres ejemplos representativos todos ellos llevados a cabo en el laboratorio del autor.

Determinación de grado de etoxilación de alcohol láurico: Una de las aplicaciones más simples se refiere a determinar el contenido promedio de unidades oxietileno en un alcohol láurico polietoxilado, comúnmente usado como emulsionante en la industria cosmética y como base de tensoactivos (previa sulfatación) [8]. Debe tenerse en cuenta que habitualmente este tipo de compuestos son una mezcla obtenida por reacción del alcohol con óxido de etileno, y contiene una distribución de moléculas con distinto grado de etoxilación. El análisis por métodos cromatográficos (CG, HPLC) suele ser complejo ya que requiere disponer de los distintos patrones de referencia no siempre disponibles. La Figura 2 muestra el espectro RMN ^1H a 200 MHz y la asignación de las señales. En este caso no es necesario la resolución completa de todas las señales y alcanza con dividir las en dos grupos: las señales de metilenos unidos a oxígenos que se encuentran entre 3,4 y 3,8 ppm (área total A_{OX}) y las señales de los metilenos y el metilo de la cadena de hidrocarburo no unidos directamente a oxígeno entre 0,8 y 1,6 ppm (área total A_{HC}). El número de unidades de oxietileno (n) promedio puede obtenerse fácilmente a partir de la siguiente ecuación:

$$n = 5,75(A_{\text{OX}}/A_{\text{HC}}) - 0,5$$

De la misma forma puede obtenerse un peso molecular promedio. Si hubiera posibilidad que la porción del alcohol fuera en realidad una mezcla de alcoholes de distinto largo de cadena, aún es posible calcular tanto el

Tabla 2. Estándares de referencia aptos para RMN cuantitativo.

Estándar	Núcleos	Soluble en
dimetilsulfona	^1H , ^{13}C	agua, solventes orgánicos
acetato de sodio anhidro	^1H , ^{13}C	agua
fosfato de sodio dodecahidrato	^{31}P	agua
trifenilfosfato	^{31}P	solventes orgánicos
trifluoroacetato de etilo	^{19}F	solventes orgánicos
ortosilicato de etilo	^{29}Si	solventes orgánicos

to es extremadamente simple, se pesan cantidades de muestra y estándar calculadas para que den señales de área comparable en el espectro RMN, se mide el espectro y se determinan las áreas relativas. Conociendo el número de moles de estándar agregado puede calcularse en forma inmediata el número de moles del analito y a partir de éste la masa de analito presente en la muestra.

Al comienzo de esta sección se tomó como ejemplo una mezcla donde cada componente daba una única señal en el espectro RMN. ¿Que ocurriría sí, como es el caso más co-

za pase desapercibida, tal como ocurre en un cromatograma que presenta una zona con varios picos muy próximos. La solución aquí es usar un espectrómetro de campo magnético mayor para lograr más dispersión de las señales o cambiar de núcleo (^{13}C o ^{31}P tienen mayor dispersión de desplazamiento químico y menor posibilidad de superposición).

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

Existen en la literatura numerosos ejemplos de aplicaciones cuantitativas de la RMN (ha-

grado de oxietilación (n) como el número de carbonos promedio de los alcoholes (o el peso molecular medio) usando como referencia la integración de la señal a 3,44 ppm (el CH_2 vecino al OH) que corresponde exactamente a 2 H. En ese caso sería conveniente medir el espectro a un campo mayor (por ejemplo a 500 MHz) de modo de lograr una mejor resolución de esa señal y una integración más precisa.

en forma muy sencilla por RMN ^1H , el contenido de hidroquinona y otros aditivos relativo al cianoacrilato. En el caso de la hidroquinona y debido a la baja proporción en que se encuentra es conveniente para reducir el error, referir la integración relativa a uno de los satélites de ^{13}C de la señal del cianoacrilato cuya área corresponde al 0,535% (5350 ppm) de esta última. Cabe recordar que el 1,12% de las moléculas con-

Este método ha sido validado en el rango de 30 a 1000 ppm [4]. En el espectro de la Figura 3a pueden verse además las señales correspondientes a un poliácrlato-metacrilato de metilo que también puede cuantificarse en forma similar [8]. Surge aquí una de las grandes ventajas de la RMN frente a los métodos cromatográficos tradicionales, todos los componentes son visibles en el mismo espectro no siendo necesario buscar condiciones específicas para cada uno (como puede ocurrir en CG o HPLC para compuestos con propiedades físicas muy diferentes). Más aun, componentes desconocidos pueden en algunos casos ser identificados ya que el espectro provee información estructural.

Determinación de pureza y contenido de impurezas en muestras de glifosato: El glifosato (N -(fosfonometil)glicina) es un herbicida ampliamente utilizado en los cultivos de soja de todo el mundo. Tradicionalmente la pureza y el contenido de las principales impurezas conocidas, se determina por HPLC utilizando columnas de intercambio iónico. El método es costoso, requiere largos tiempos de estabilización de columnas y equipo y se debe disponer de un estándar certificado de glifosato para calibración. El análisis de las impurezas es más complejo aún, ya que no existe un método de detección "universal" para todas ellas (con lo cual algunas pueden pasar inadvertidas si no se las busca específicamente) y el perfil de impurezas puede variar dependiendo del origen ya que se utilizan al menos cuatro métodos de síntesis diferentes. También se debe disponer de estándares certificados de las impurezas, algunos de los cuales no están disponibles comercialmente o el título declarado es dudoso.

Siendo el glifosato una molécula sencilla que presenta solo dos señales en el espectro de RMN ^1H y una en el espectro RMN ^{31}P , resulta especialmente apta para su análisis cuantitativo por RMN [9]. La Figura 4a pre-

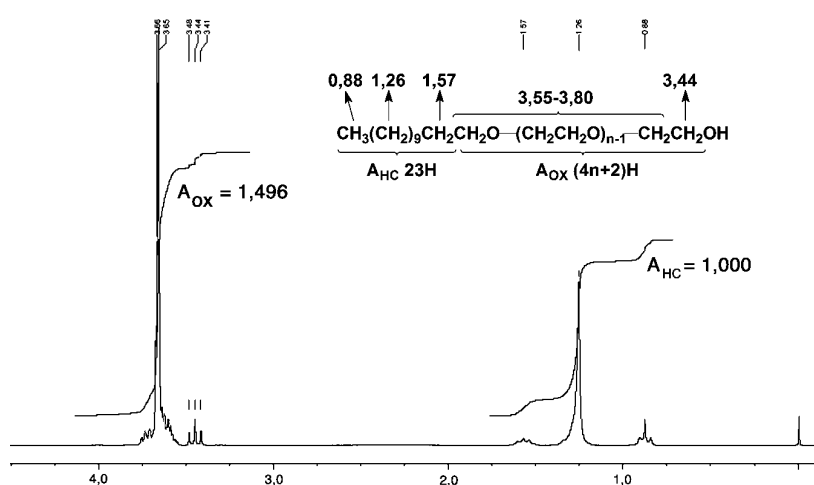


Figura 2. Espectro RMN ^1H 200 MHz de polioxietileno 8 lauril éter. La relación de áreas corresponde a 8,1 unidades de oxietileno ($n = 8,1$)

Contenido de aditivos en cianoacrilatos: Los adhesivos basados en cianoacrilato de etilo son muy utilizados no sólo para adherir objetos sino también para cerrar cortes y heridas. Normalmente estos adhesivos contienen entre 100 y 1000 ppm de hidroquinona como estabilizante y poliácrlatos de alquilo para mejorar las propiedades físicas (flexibilidad, adhesividad, etc.) luego de la polimerización. Debido a la facilidad con que polimerizan, resulta muy poco recomendable analizar estos productos por métodos cromatográficos como HPLC o CG. Aprovechando que los cianoacrilatos son estables por varias horas en solución de deuteriocloroformo seco, es posible analizar

tienen ^{13}C en vez de ^{12}C en una determinada posición y en ellas los ^1H unidos a ese ^{13}C aparecen acoplados; en el caso del cianoacrilato cada uno de los H olefinicos da un singlete correspondiente al 98,93% que contiene ^{12}C en esa posición y un pequeño doblete centrado al mismo desplazamiento químico ($J_{\text{HC}} \approx 160 \text{ Hz}$) que corresponde al 1,07% que contiene ^{13}C . En la Figura 3a se muestra el espectro RMN ^1H 500 MHz de un cianoacrilato comercial y en la Figura 3b se muestra la zona de H olefinicos usada para la determinación. En la expresión final debe tenerse en cuenta que la señal de la hidroquinona corresponde a 4 H mientras que cada satélite es 0,535% de 1 H:

$$\text{ppm_de_hidroquinona} = \frac{5350 \times \text{Area}_{\text{hidroq}} \times \text{PM}_{\text{hidroq}}}{2 \times (\text{Area}_{\text{sateliteH_1}} + \text{Area}_{\text{sateliteH_2}}) \times \text{PM}_{\text{cianoacrilato}}}$$

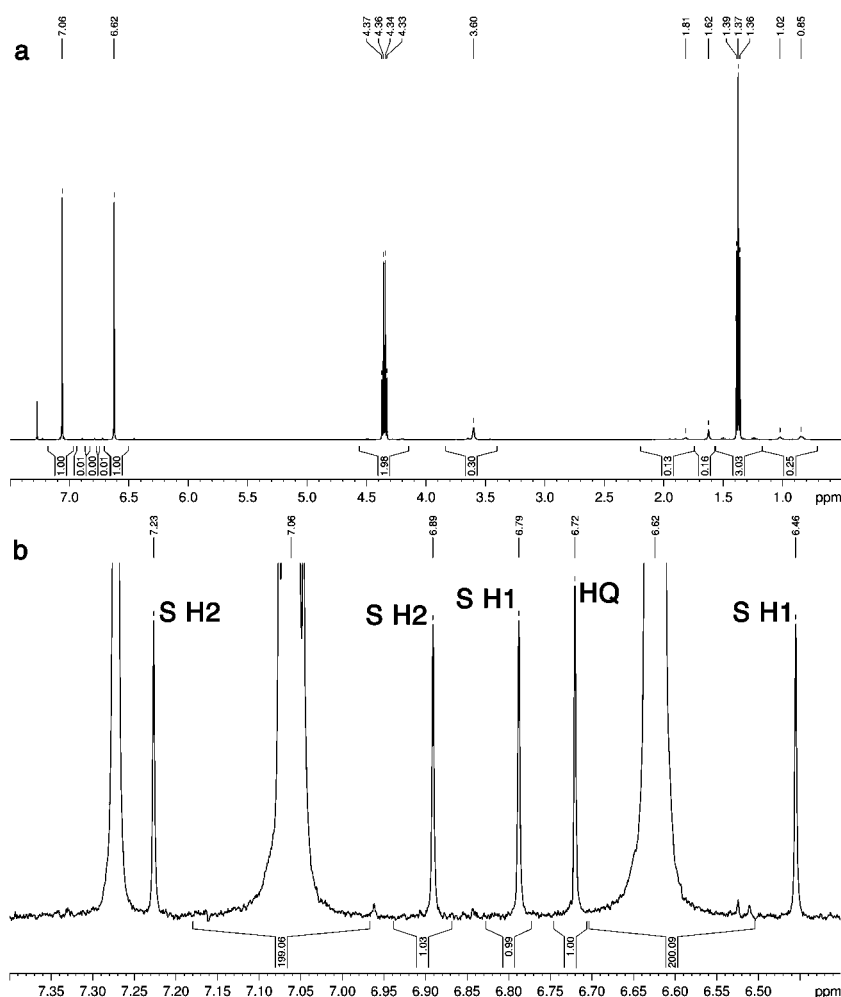


Figura 3. a. Espectro RMN ¹H 500 MHz de un adhesivo de cianoacrilato de etilo. b. Ampliación de la zona olefínica, S H1: satélite de H1, S H2: satélite de H2, HQ: hidroquinona

senta el espectro de un glifosato técnico en solución de óxido de deuterio/piridina-d₅ 7:1 con agregado de acetato de sodio como

que en una mezcla equimolar la relación de áreas sería 3:2):

$$\% \text{ de glifosato} = \frac{3 \times \text{Area}_{\text{glifosato}} \times PM_{\text{glifosato}} \times \text{masa}_{\text{acetato}}}{2 \times \text{Area}_{\text{acetato}} \times PM_{\text{acetato}} \times \text{masa}_{\text{muestra}}} \times 100$$

estándar de referencia. El contenido de glifosato puede obtenerse en forma sencilla de la integración relativa de las señales de acetato (singulete a 1,64 ppm) y del metileno α al carbonilo del analito (singulete a 3,5 ppm) teniendo en cuenta que corresponden a 3 y 2 H respectivamente (es decir

La Figura 4b, muestra una ampliación de una zona del espectro anterior con la identificación de algunas impurezas. El contenido de cualquiera de ellas surge en forma inmediata con la simple medición del área y aplicación de la ecuación anterior (cambiando el peso molecular y el número de H de la

señal considerada según corresponda). A partir del espectro de RMN ¹H y del espectro de RMN ³¹P (con fosfato trisódico como estándar de referencia) pueden identificarse y cuantificarse impurezas comunes como ácido iminodiacético (IDA), ácido fosfonometiliminodiacético (PMIDA) y su N-óxido, N-metilglifosato (NMG), glicina (GLI), glifosina, ácido hidroximetilfosfónico (HMPA), ácido aminometilfosfónico (AMPA), ácido metilaminometilfosfónico (MAMPA) y ácido iminodi(metilfosfónico) (IMPA) con límites de detección entre 0,01 y 0,05% según el caso [8]. Un detalle importante es que no existen impurezas “invisibles” o “transparentes” (salvo aquellas que no contengan ¹H ni ³¹P en este caso) ni de bajo o exagerado factor de respuesta como puede ocurrir en HPLC o CG, todas son detectables con la misma sensibilidad, bajo el mismo conjunto estándar de condiciones experimentales y todas pueden ser analizadas con precisión sin contar con estándares de referencia certificados de las mismas.

CONCLUSIONES

La resonancia magnética nuclear cuantitativa es una técnica poderosa y confiable que supera a los métodos cromatográficos tradicionales en muchos aspectos. Al igual que estos últimos, no es un método perfecto y no puede resolver todos los problemas, pero es una alternativa especialmente útil para el caso de impurezas inesperadas, cuando no se dispone de estándares de referencia o cuando se deben certificar estándares nuevos. La mayor desventaja de la RMN es la baja sensibilidad, que requiere trabajar con cantidades relativamente grandes de muestra (típicamente 50 a 100 mg por determinación) y por supuesto el costo elevado del equipamiento y de su mantenimiento.

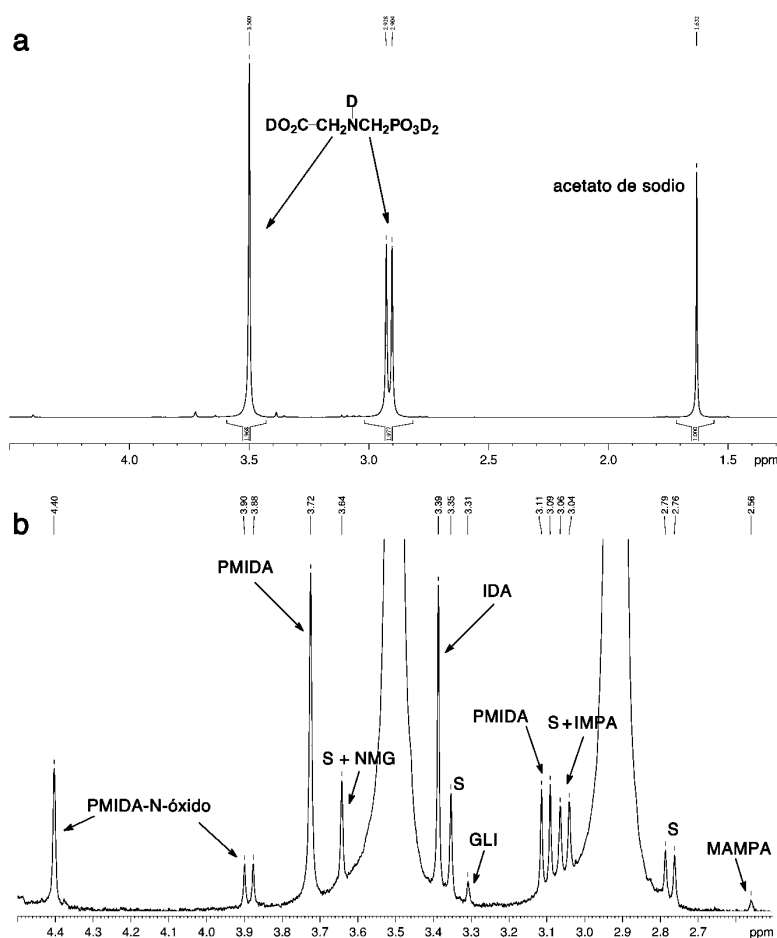


Figura 4. a. Espectro RMN ^1H 500 MHz de glifosato (en óxido de deuterio/piridina- d_5 7:1) con acetato de sodio como estándar de referencia; los H intercambiables se han reemplazado por deuterio del solvente (D). b. Ampliación de la zona 2.5-4.5 ppm y asignación de señales de impurezas; S: satélite de ^{13}C , otras abreviaturas ver texto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. J. Hore, *Resonancia magnética nuclear*, Colección: Manuales de Química - Eudeba, Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, 2000.
- [2] M. L. Martin, J. -J. Delpuech, G. J. Martin, *Practical NMR Spectroscopy*, Heyden & Son Ltd., Londres 1980
- [3] G. F. Pauli, *Phytochem. Anal.*, **2001**, *12*, 28-42.
- [4] U. Holzgrabe, B. W. K. Diehl, I. Wawer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, *17*, 557-616.
- [5] R. J. Wells, J. M. Hook, T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, *50*, 3366-3374.
- [6] R. J. Wells, J. Cheung, **2001**, *The Chemistry Preprint Server* CPS:analchem/0103002
- [7] R. J. Wells, J. Cheung, J. Hook, *Accred. Qual. Assur.*, **2004**, *9*, 450-456.
- [8] Método desarrollado en UMYMFOR (CONICET-UBA) no publicado previamente.
- [9] T. S. Al-Deen, D. B. Hibbert, J. M. Hook, R. J. Wells, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *474*, 125-135.

Homenaje a la Dra. Norma Nudelman

ESTIMADOS SOCIOS DE LA AQU Y COLEGAS

Nos es muy grato comunicarles que la Dra. Norma Nudelman, reconocida investigadora en el campo de la Química Orgánica y Miembro Titular de la Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina, ha sido homenajeada con una publicación conmemo-

rativa por el *Journal of Physical Organic Chemistry*, vol.19, issue 12 (2006), donde se publican los trabajos más relevantes de la CLAFCO-8.

Este tributo es un reconocimiento a su prolífica trayectoria y a sus importantes contribuciones al conocimiento en el campo de la Físicoquímica Orgánica.

Este reconocimiento internacional a la Dra. Nudelman distingue a la ciencia argentina y latinoamericana y enorgullece especialmente a los más 1000 socios con que cuenta la AQU en la actualidad, muchos de los cuales son jóvenes investigadores y profesionales activos, para los que la trayectoria de la Dra. Nudelman constituye un claro ejemplo a seguir.

Homenaje a Alicia Seldes

Agroquímicos naturales a partir del cultivo de hongos

Gabriela M. Cabrera*

NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL AGRO EN EL ÁREA DE LOS AGROQUÍMICOS

Los agroquímicos que se emplean en la actualidad son mayoritariamente de origen sintético y suelen ser moléculas sencillas, de poca especificidad, es decir, no discriminan entre la especie patógena que se desea eliminar u otra beneficiosa, y por lo tanto presentan considerable toxicidad y/o conllevan riesgos ambientales [1]. Factores técnicos, económicos y ambientales están forzando a adoptar nuevos métodos más sustentables [2] que permitan eficazmente controlar plagas y enfermedades en el sector agrícola. Estos métodos incluyen la utilización de nuevos agroquímicos de origen natural y el uso de agentes de biocontrol (ABC).

Existe una larga historia sobre la búsqueda de productos naturales para usos medicinales. Las penicilinas, ciclosporina A, vancomicina, tetraciclinas, bleomicina y compactina son sólo algunos ejemplos de

productos naturales aislados de microorganismos usados actualmente como medicamentos. Sin embargo, los esfuerzos dedicados a la búsqueda de productos naturales como agroquímicos es mucho menor [1]. Por un lado, la necesidad de obtener grandes cantidades de producto a bajo costo dificulta la búsqueda y restringe el tipo de organismos productores a evaluar. La búsqueda de agroquímicos producidos por plantas y organismos marinos queda limitada exclusivamente al área de los insecticidas o a la búsqueda de líderes para realizar luego sus respectivas síntesis o derivados sintéticos o semisintéticos. Pero lamentablemente debido a la complejidad de los productos naturales, sus síntesis resultan siempre extremadamente costosas para emplearse en el ámbito agropecuario.

Los microorganismos, en cambio, pueden ser cultivados en gran escala y pueden producir por fermentación las cantidades necesarias de los productos requeridos, aunque en algún caso aún este proceso ha resultado costoso [3]. Los microorganismos presentan ventajas adicionales debido a su extraordinaria biodiversidad; se sabe que se han descrito menos del 5% de las especies existentes. Pero además, pueden producir metabolitos con una gran diversidad de estructuras químicas. Esta

diversidad es necesaria para encarar seriamente cualquier programa de búsqueda de productos naturales, ya que es la que permite garantizar que puedan hallarse metabolitos que ejerzan su acción por diferentes y más específicos mecanismos.

Una vez hallados los metabolitos líderes a partir de la cepa adecuada, puede mejorarse su actividad-efectividad por medio de la síntesis de análogos. Un ejemplo reciente de la modificación estructural de un compuesto natural de origen fúngico para producir un nuevo fungicida es el desarrollo de azoxystrobin (Zeneca) y kresoxim-metilo (BASF), de uso en la actualidad como fungicidas de amplia aplicación en diversos vegetales. Estos fungicidas fueron sintetizados a partir de los productos naturales strobilurina A y oudemansina A (figura 1) aislados de los hongos *Strobilurus tenacellus* y *Oudemansiella mucida* respectivamente [3].

Las cepas productoras de los agentes activos pueden también emplearse en forma directa como agentes de biocontrol [4]. Este tipo de aplicación suele considerarse dentro de las prácticas de la agricultura orgánica. Es una práctica económica y sencilla, aunque tiene la desventaja del manejo de

* Departamento de Química Orgánica de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Ciudad Universitaria, Pab. II. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
E-mail: gabyc@qo.fcen.uba.ar

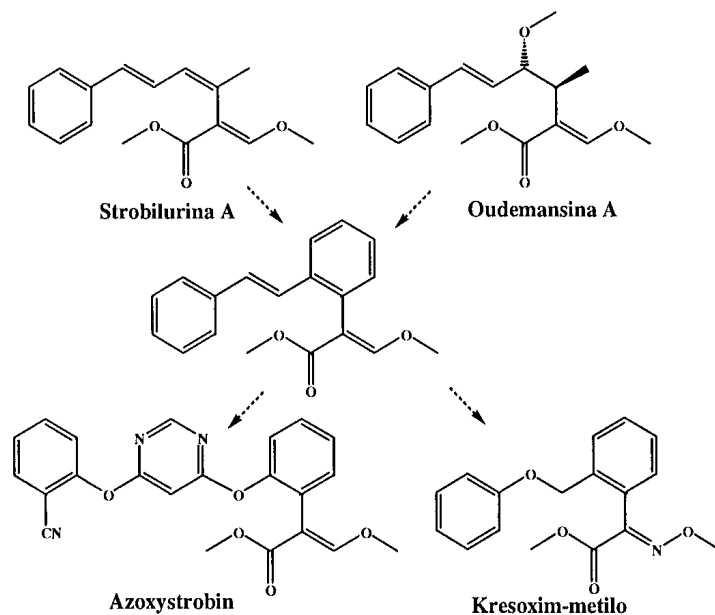


Figura 1. Desarrollo de azoxystrobin (Zeneca) y kresoxim-metilo (BASF) a partir de productos naturales (strobilurina A y oudemansina A).

una especie "viva" que tiene sus requerimientos de crecimiento, no generalizables a cualquier tipo de suelo, vegetal, etc. Numerosas especies (*Trichoderma* spp., *Bacillus* spp., etc) se comercializan en la actualidad aunque aún no tienen gran aceptación en Argentina.

BÚSQUEDA DE ANTIFÚNGICOS NATURALES EN ARGENTINA

En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo es hallar agroquímicos naturales que sean producidos por cultivos de hongos, y que puedan emplearse en forma directa o a través del agente fúngico que los produce [5]. En particular, nuestra búsqueda está orientada a hallar metabolitos antifúngicos que puedan combatir enfermedades que afectan a cultivos de importancia económica para nuestro país como soja, maíz, trigo y girasol. Los patógenos a inhibir son *Fusarium virguliforme* y *F. tucumaniae* (muerte repentina de soja), *Sclerotinia sclerotiorum* (podredumbre húmeda de tallo), *Rhizoctonia solani* (damping-off),

Macrophomina phaseolina (podredumbre carbonosa de tallo), entre otras. También realizamos una búsqueda de antibióticos naturales frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de la enfermedad loque americana y *Ascosphaera apis* (ascosferosis o cría yesificada) que afectan a las larvas de las abejas melíferas, y se está iniciando una nueva línea de búsqueda de bioinsecticidas.

Las cepas de hongos se seleccionan según su potencial uso y en general se testean y analizan toda clase de cepas de hongos con el fin de encontrar aquellas que produzcan metabolitos con la bioactividad buscada. Se trabaja con hongos aislados de suelo o de polen cuando específicamente se busca seleccionar agentes de biocontrol de uso en el suelo o en las colmenas respectivamente; de sedimentos marinos, para buscar diversidad de estructuras químicas, cepas patógenas de plantas o insectos, etc.

En una primera etapa se realiza un "screening", que consiste en el aislamiento de cepas de diverso origen, su cultivo en pequeña escala, la obtención de extractos

a partir de esos cultivos, análisis de los extractos por cromatografía, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y realización de bioensayos *in vitro*, para determinar actividad antifúngica y antibiótica. Como consecuencia de este screening quedan seleccionadas las cepas cuyos extractos resultaron de potencial interés, por su actividad y riqueza química. Normalmente suelen quedar seleccionadas 1 o 2 cepas por cada 10 analizadas.

La segunda etapa consiste en el cultivo en mayor escala (1 a 19 L) de las cepas seleccionadas. Sobre los extractos obtenidos en esta etapa, se realiza un fraccionamiento cromatográfico y purificación de los componentes bioactivos, siempre guiado por ensayos de bioactividad. Los metabolitos aislados son identificados por métodos espectroscópicos (RMN-1D y 2D, y Espectrometría de Masa (EM y EM/EM)).

Evidentemente durante la búsqueda se aíslan e identifican un gran número de compuestos con diferente grado de actividad y con estructuras químicas novedosas o ya conocidas, y estas últimas de actividad conocida o desconocida. Cuando la bioactividad de un metabolito es relevante, se procede a la tercera etapa, en la que se realizan estudios de actividad más profundos para evaluar la especificidad de la acción y para observar su comportamiento *in vivo*, generalmente en invernadero. Y cuando las estructuras químicas de los líderes son viables de ser sintetizadas por métodos relativamente sencillos y su actividad no es muy intensa, se procede a la síntesis de análogos con el fin de mejorar la actividad. También en esta última etapa suelen realizarse estudios de producción del metabolito en función del tiempo por métodos cromatográficos y Espectrometría de Masa, con el fin de encontrar las condiciones óptimas máximas de producción del compuesto de interés.

Algunos de los metabolitos aislados por nuestro grupo en los últimos años se encuentran en las figuras 2-5. Las estructuras de muchos de ellos resultaron novedosas [5-7]. En cuanto a su bioactividad, un gran porcentaje de los metabolitos identificados, exhibió actividad antibiótica inespecífica moderada a débil, salvo **5**, potente antibiótico, pero de conocida toxicidad y **17**, que resultó un antibiótico específico contra *P. larvae* [8]. La actividad de **17** resultó comparable a la del antibiótico comercial oxitetraciclina, que se usaba hasta hace poco tiempo para controlar loque americana y que ahora no se aplica por exigencias de calidad en la exportación de miel (tabla 1).

Se identificaron varios metabolitos que exhibieron actividad antifúngica.. El metabolito **1** y otros compuestos relacionados producidos por el hongo marino *Acremonium furcatum* presentaron leve a moderada actividad. Sin embargo luego de realizar la síntesis, para corroborar su identidad, se testearon todos los intermediarios sintéticos y dos de ellos, el ácido 2-metil-2,4-hexadienoico (**A**) y el correspondiente éster etílico (**B**) resultaron poseer una actividad *in vitro* comparable con el producto comercial benomyl (**C**) (tabla 2) [6]. El metabolito **16**, aislado de *T. harzianum*, ya había sido reivindicado como antifúngico en una aplicación de patente [9]. Otro ejemplo

destacable es el caso del compuesto indólico **7** y otros relacionados aislados a partir del hongo *Aporpium caryae* [10] de escasa o nula actividad antifúngica. Durante la elucidación estructural se prepararon derivados que resultaron poseer una mejor actividad, aunque aún baja. Se preparó entonces otra serie de derivados, de los cuales algunos presentaron una excelente actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, como antifúngicos curasemilla, en soja [11].

En cuanto a la búsqueda de agentes de biocontrol, los mejores resultados hasta el momento han sido los obtenidos con cepas de *Fusarium oxysporum* no fitopatógenas, cuya actividad antifúngica frente al fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* se correlacionó directa y exclusivamente con la producción del compuesto **21**, ciclosporina A, conocido inmunosupresor comercial y potente antifúngico. Estas cepas se testearon en ensayos en invernadero con excelentes resultados. Cuando plantas de soja fueron inoculadas con *F. oxysporum* junto con *S. sclerotiorum*, se produjo una supervivencia del 77.5% frente al 22.5% en presencia del patógeno solamente [12].

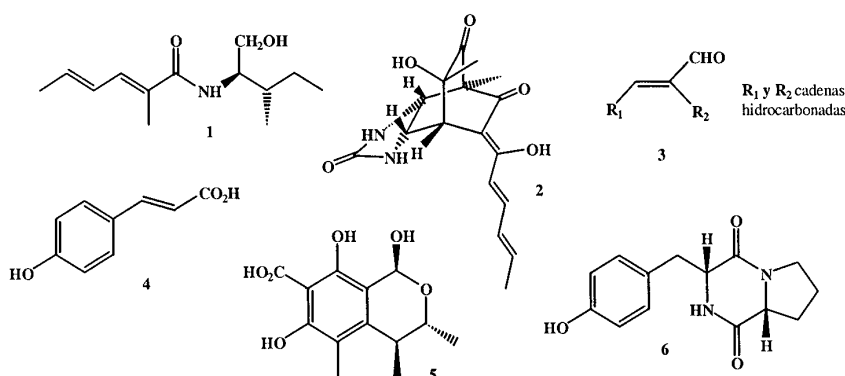


Figura 2. Metabolitos aislados a partir de cepas de hongos marinos.

Tabla 1. Valores de concentración de mínima inhibición (MIC) (mg ml⁻¹) de **17** y oxitetraciclina contra 5 cepas (A, C, I, II y III) de *Paenibacillus larvae* determinadas por el método de dilución.

Antibiótico/cepa	A	C	I	II	III
17	32	32	32	32	32
oxitetraciclina	64	32	32	32	16

Desafortunadamente, las cepas productoras de **17**, *Alternaria raphani* y *A. brassicicola*, producen también una altertoxina, que impediría su utilización como agentes de biocontrol.

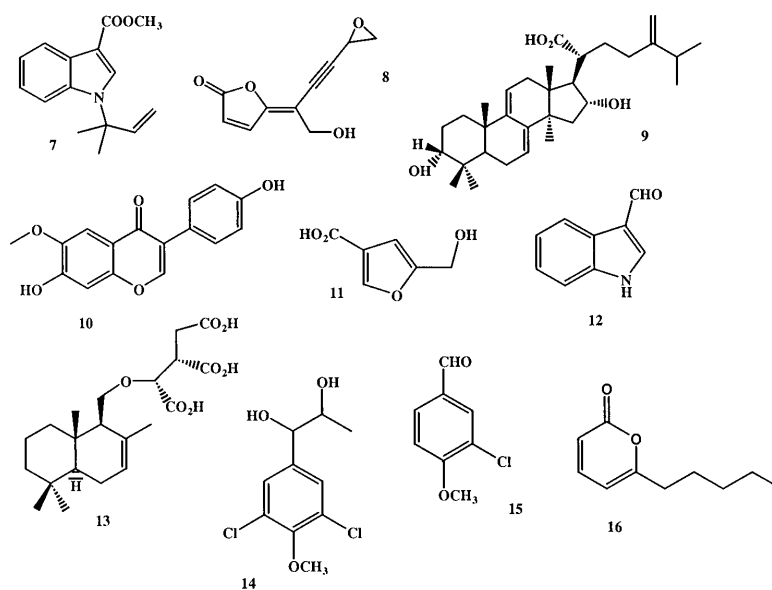


Figura 3. Metabolitos aislados a partir de cepas de hongos terrestres.

Tabla 2. Actividad antifúngica -halos de inhibición- del compuesto natural 1, dos intermediarios sintéticos A y B y benomyl C, determinados por bioautografía sobre sílicagel. Diámetros de inhibición en mm y concentración de mínima inhibición (MIC) en mg/pt.

Cepa/antifúngico	1	A	B	C
<i>Fusarium virguliforme</i>	15	25 (1µg)	15 (5µg)	20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15	29 (1µg)	24 (1µg)	20
<i>Botrytis cynerea</i>	15	15 (1µg)	12 (5µg)	28
<i>Colletotrichum truncatum</i>	10	12 (1µg)	10 (10µg)	25
<i>Macrophomina phaseolina</i>	nd	20 (1µg)	10 (25µg)	22

nd: no determinado.

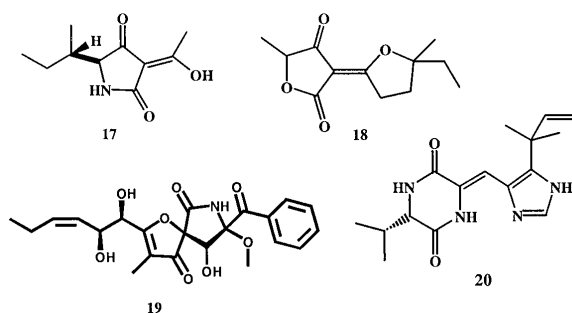


Figura 4. Metabolitos aislados a partir de cepas de hongos de polen.

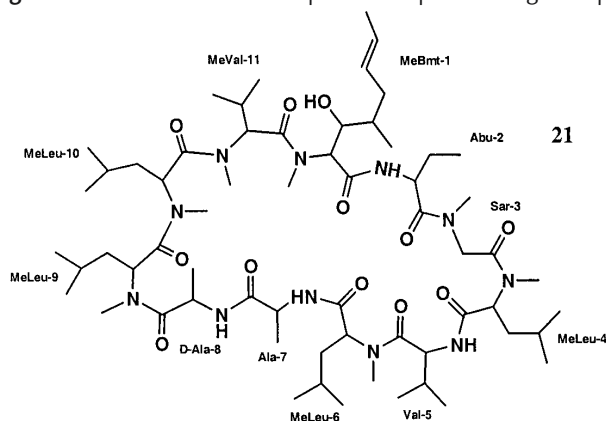


Figura 5. Ciclosporina A, aislada a partir de *Fusarium oxysporum* [12].

PERSPECTIVAS

Se han obtenido hasta el momento antifúngicos naturales con potencial aplicación para el control de enfermedades de los cultivos de soja, y algunas cepas con potencial aplicación como agentes de biocontrol. Se está trabajando en este momento con numerosas cepas, cuyos resul-

tados preliminares son muy promisorios, por ejemplo, cepas productoras de peptaiboles, péptidos de potente acción antifúngica, han presentado muy buenos resultados *in vivo* al emplearlas como ABCs. Algunos antifúngicos naturales han servido como líderes para el desarrollo de antifúngicos análogos con mejor actividad.

Estos resultados, junto con los de otros autores [1] reafirman que los microorganismos, y en particular los hongos, son una fuente de agroquímicos naturales que ofrecen nuevas oportunidades tanto para alcanzar una producción rentable como para obtener nuevos líderes para el desarrollo de nuevos y mejores productos para el agro.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a UMYMFOR (CONICET-FCEN, UBA), CONICET, ANPCYT y Universidad de Buenos Aires por el apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] H. G. Cutler, S. J. Cutler (Ed.), *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*, CRC Press, Boca Raton, USA, 1999.
- [2] D. Spadaro, M. L. Gullino, *Crop Protection* **2005**, *24*, 601-613.
- [3] H. L. Ypema, R. E. Gold, *Plant Disease* **1999**, *83*, 3-19.
- [4] T. M. Butt, C. Jackson, N. Magan (Ed.), *Fungi as biocontrol agents*, CAB International, 2001.
- [5] G. M. Cabrera, G. L. Gallardo, *Búsqueda de agroquímicos naturales a partir de cultivos de hongos*. En: P. Tundo, R. Hoyos de Rossi, (Ed.), *Química Verde en Latinoamérica*, Green Chemistry Series, N°11, IUPAC, 2004.
- [6] G. L. Gallardo, M. Butler, M. L. Gallo, M. A. Rodríguez, M. N. Eberlin, G. M. Cabrera, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2403-2410.
- [7] G. M. Cabrera, M. Butler, M. A. Rodríguez, A. Godeas, R. Haddad, M. Eberlin, *J. Nat. Prod.* **2006**, en prensa.
- [8] G. L. Gallardo, N. I. Peña, P. Chacana, H. R. Terzolo, G. M. Cabrera, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2004**, *20*, 609-612.
- [9] O. A. M. Merlier, M. J. Boirie, B. J. Pons, C. M. Renaud. European Patent Application EP 84-400545.
- [10] L. M. Levy, G. M. Cabrera, J. E. Wright, A. M. Seldes, *Phytochemistry* **2000**, *54*, 941-943.
- [11] G. M. Cabrera, B. V. Bertinetti, M. Scandiani. Aplicación de patente ante el INPI (P 06 0102909).
- [12] M. A. Rodríguez, G. M. Cabrera, A. Godeas, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 575-586.

Homenaje a Alicia Seldes

Biomoléculas de *Trypanosoma cruzi* como blanco para quimioterapia de la enfermedad de Chagas

Rosa M. de Lederkremer* y Rosalía Agustí

El parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el causante de la Enfermedad de Chagas, que afecta a más de 18 millones de personas en América Latina y se estima que se presentan 300.000 nuevos casos por año [1]. Pese a los esfuerzos realizados hasta el momento con el fin de controlar la enfermedad, sólo se disponen de agentes terapéuticos que son efectivos en la fase aguda de la infección. Nuevos blancos de acción de drogas son necesarios para lograr un control más adecuado de la Enfermedad de Chagas.

El parásito *T. cruzi* infecta dos hospedadores muy diferentes, uno invertebrado, insecto hematófago y vector de la enfermedad y otro vertebrado, mamífero en el cual se desarrolla la patología. Los insectos portadores pertenecen a la familia Reduviidae, cuya especie *Triatoma infestans* es la más común y en Argentina se conoce popularmente como vinchuca. Los hospedadores mamíferos abarcan desde el hombre hasta animales salvajes y domésticos. El *T. cruzi*

presenta tres estadios principales de diferenciación: epimastigote, trypomastigote y amastigote. Junto con la ingesta sanguínea de un mamífero infectado, el insecto vector adquiere formas trypomastigotes que se diferencian rápidamente al estadio epimastigote replicativo. Los epimastigotes proliferan gracias al ambiente nutritivo del intestino medio y cuando el número de parásitos aumenta y el ambiente se convierte nutritivamente pobre, se transforman en células más delgadas y largas, trypomastigotes metacíclicos, estadio no replicativo. Esta diferenciación puede lograrse también *in vitro* privando a los parásitos de determinados nutrientes o sometiéndolos a variaciones en el pH o en la temperatura. El insecto hematófago libera, junto con las heces, trypomastigotes metacíclicos, los cuales entran al torrente sanguíneo del mamífero por proximidad con la lastimadura que ocasiona la ingesta o por heridas en la piel. En cultivos de células epimastigotes, la metaciclogénesis ocurre espontáneamente durante la fase estacionaria del crecimiento.

Para lograr progreso en la infección, los trypomastigotes que circulan por el torrente sanguíneo del mamífero deben penetrar una célula rápidamente y diferenciarse a formas amastigote, aflageladas. Estas formas son capaces de invadir células

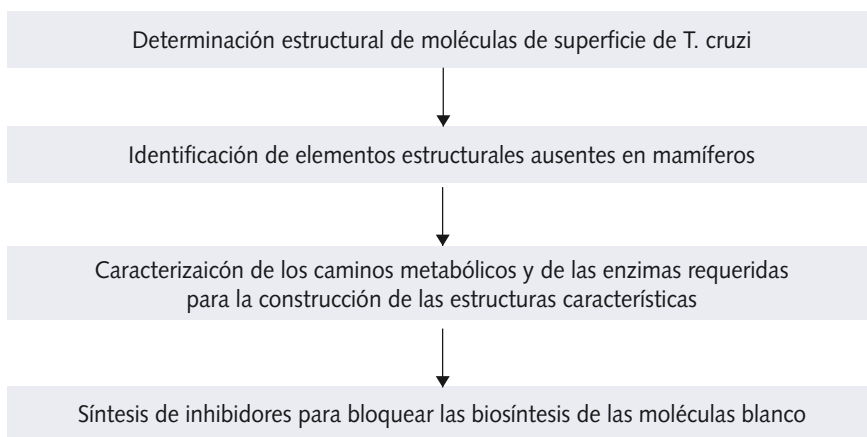
fagocíticas y no fagocíticas donde se multiplican intracelularmente por fisión binaria y se diferencian al estadio trypomastigote antes de romper la célula huésped y liberarse al torrente sanguíneo. Permanece en el torrente sanguíneo por un período indefinido antes de invadir otras células o ser ingerido por un insecto vector, lo cual completa el ciclo de vida.

Las moléculas de superficie del parásito caracterizan las diferentes formas.

Un enfoque racional para el descubrimiento de drogas se basa en los estudios biológicos y bioquímicos para la identificación de blancos moleculares que no están presentes en el huésped mamífero. Los pasos a seguir pueden verse en el Esquema 1.

La glicobiología que se ocupa del papel de los azúcares en los procesos biológicos ha contribuido significativamente a la identificación de blancos moleculares. Los parásitos, y en particular *T. cruzi*, son muy dependientes de los hidratos de carbono que incorporan a sus glicolípidos y glicoproteínas para su supervivencia e infectividad. Las biomoléculas más abundantes en las formas epimastigote y trypomastigote metacíclicas son los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) [2] y las mucinas (Fig. 1).

CIHIDECAR, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón II, 1428 Buenos Aires, Argentina
*Corresponding author. Tel.: 54-11-4576-3352; fax: 54-11-4576-3352;
e-mail: lederk@qo.fcen.uba.ar



Esquema 1. Pasos para la identificación de blancos para drogas.

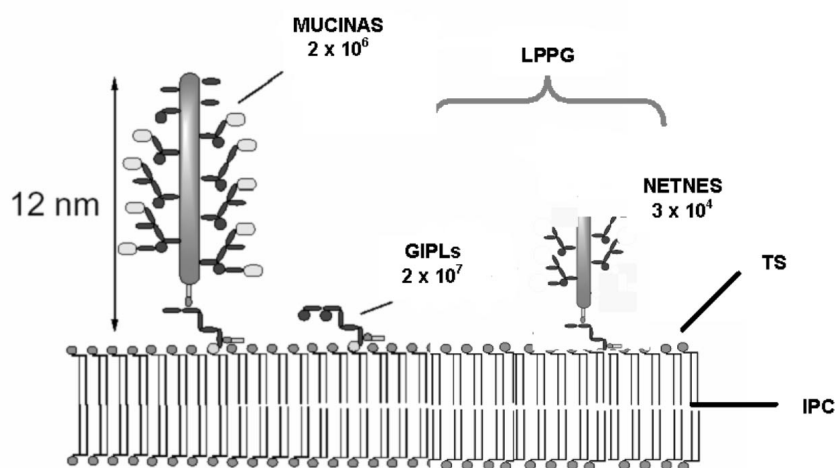


Figura 1. Moléculas de superficie de *Trypanosoma cruzi*. LPPG, lipopéptidofosfoglicano; GIPLs, glicoinositolfosfolípidos; TS, trans-sialidasa; IPC, inositolfosfoceramida; NETNES, indica una secuencia de aminoácidos del péptido central.

Los GIPLs se habían aislado como un complejo con un glicopéptido (NETNES) que se encuentra en mucha menor proporción y que tiene un GIPL como ancla de membrana. Ese complejo se llamó lipopéptidofosfoglicano (LPPG) y fue el primer glicoconjugado de *T. cruzi* sobre el que se publicaron estudios estructurales [2]. En el LPPG se reconocieron tres subestructuras no presentes en mamíferos: galactofuranosa (Gal f), inositolfosfoceramida (IPC) y aminoetilfosfónico (AEP).

La complejidad de los glicoconjugados de *T. cruzi* se ve representada en el glicopéptido pequeño NETNES que a pesar de tener sólo

13 aminoácidos tiene cinco modificaciones post-transcripcionales con azúcares, características [3].

La galactofuranosa es un componente de los GIPLs y de las mucinas [4]. Aunque la D-galactosa está extensamente distribuida en la naturaleza, en mamíferos se encuentra sólo en la forma piranósica (Gal p), por ejemplo en la lactosa, azúcar de la leche, y también en glicolípidos y glicoproteínas (Fig. 2).

El metabolismo de Gal f y las enzimas involucradas son también muy particulares (Fig. 3). Aunque el primer sustrato para la incorporación de Gal f es el nucleótido UDP- α -D-Gal p , son necesarias dos enzimas que no se encuentran en mamíferos, la UDP- α -D-Gal p mutasa y una galactofuranosiltransferasa (Fig. 3). En nuestro laboratorio hemos desarrollado la primera síntesis química del nucleótido radiactivo UDP [6- 3 H]- α -D-Gal f , útil para estudios de inhibición de la mutasa [5].

Es interesante que la Gal f se encuentre en mucinas de cepas del linaje 1 que son menos virulentas, mientras que en las del linaje 2, sólo hay Gal p . Hemos sintetizado químicamente los oligosacáridos que contienen galactofuranosa, los cuales se pueden diferenciar de los que tienen sólo Gal p por cromatografía aniónica de alta resolución con detección por pulso amperométrico

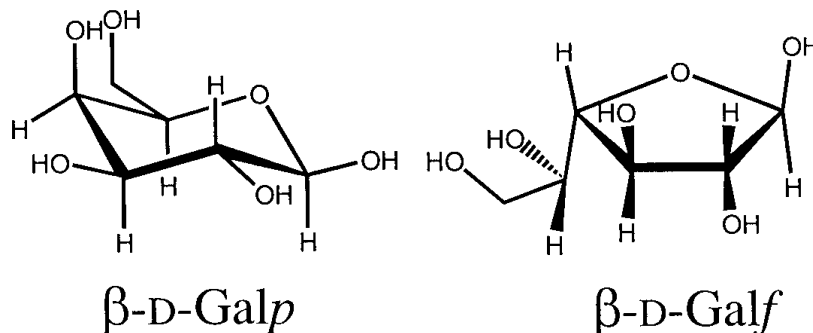


Figura 2. Fórmulas de los anómeros β de D-galactosa piranósica y furanósica.

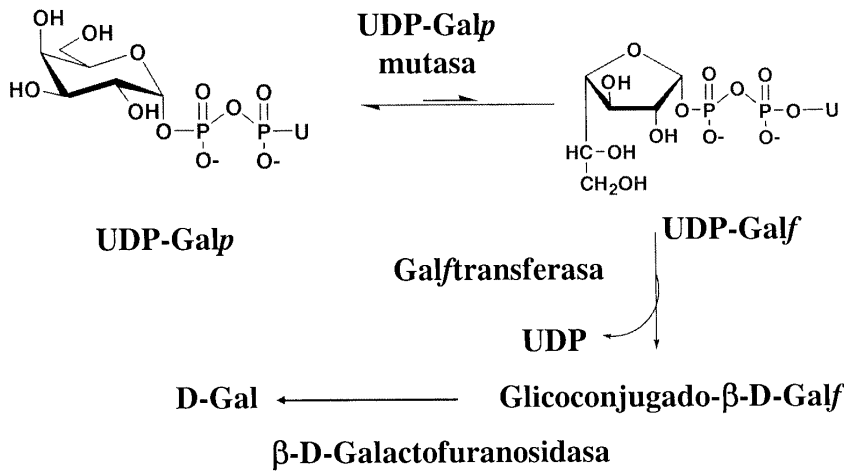


Figura 3. Enzimas involucradas en el metabolismo de Galactofuranosa.

(HPAEC-PAD) [6]. Por otra parte, las mucinas son lasceptoras de ácido siálico en una reacción de trans-sialidación catalizada por la trans-sialidasa de *T. cruzi* (TcTS), una enzima importante en el proceso de infección [7] y que no tiene su equivalente en mamíferos. La TcTS transfiere ácido siálico de los glicoconjugados del huésped a las Galp de las mucinas (Figura 4). Tie-

ne dos subsitios en el centro activo, uno que liga el ácido siálico donador y otro que une la galactosa del aceptor. Se ha descrito la inhibición de la actividad de trans-sialidasa por compuestos que se ligan al sitio activo de la galactosa y que indican un camino para el diseño de otros potenciales inhibidores [8].

Por otra parte, las enzimas involucradas en la

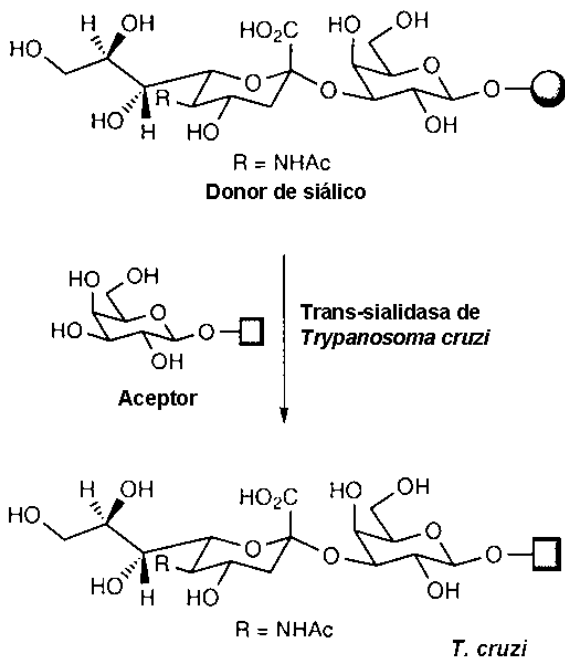


Figura 4. Reacción catalizada por la trans-sialidasa de *T. cruzi*.

construcción y remodelamiento de lípidos en *T. cruzi* son también buenos blancos para el desarrollo de drogas. La inositolfosfoceramida (IPC) es un componente importante de los inositolfosfolípidos en los tres estadios de *T. cruzi*. Es también constituyente de los GIPLs libres o que actúan como ancla de glicoproteínas de membrana [2].

La ceramida es incorporada a los GIPLs por un proceso de remodelamiento. Las células de mamífero no sintetizan IPC, sino que incorporan ceramida en esfingomielina (Fig. 5). Se encontró que la IPC en *T. cruzi* está involucrada en la diferenciación de trypomastigotes a amastigotes [9], forma replicativa en la célula de mamíferos y por lo tanto es otro buen blanco para la terapia antiparasitaria.

En la Figura 6 se resume la contribución de la glicobiología a la identificación de enzimas blanco para la terapia de la Enfermedad de Chagas.

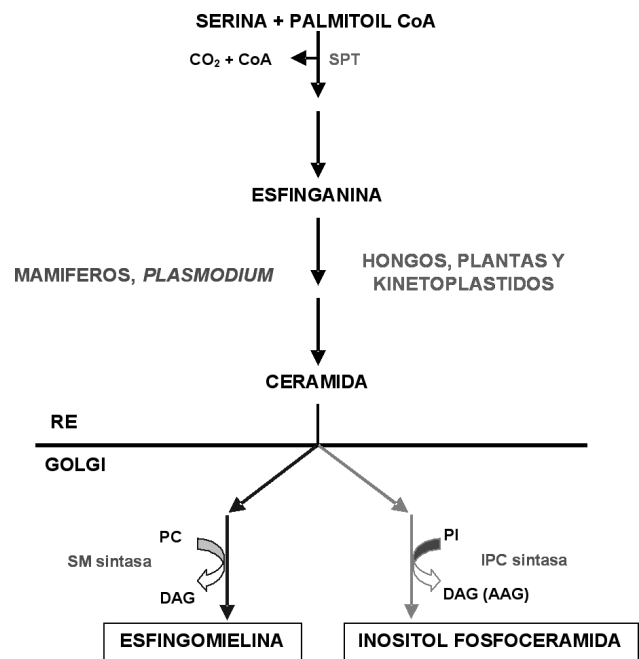


Figura 5. Biosíntesis de esfingolípidos. PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; DAG, diacilglicerol; AAG, alquililglicerol.

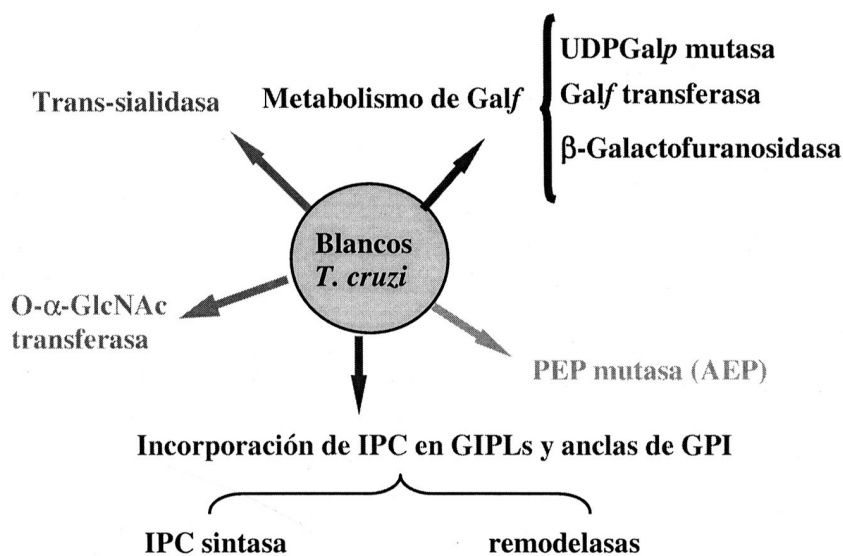


Figura 6. Contribución de la glicobiología a la identificación de enzimas blanco en *T. cruzi*. PEP, fosfoenol pirovato, IPC, inositolfosoceramida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Organización Mundial de la Salud, 2005.
- [2] R.M de Lederkremer, L. Bertello *Current Pharm. Design*, 2001, 7, 1165-1179.
- [3] J.I. McRae, A. Acosta-Serrano, N.A. Morrice, A. Mehlert, M.A.J. Ferguson *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 12201-12211
- [4] R.M. de Lederkremer, W. Colli *Glycobiology* 1995, 5, 547.
- [5] K. Mariño, C. Marino, C. Lima, L. Baldoni, R.M. de Lederkremer *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2958-2964.
- [6] M.L. Salto, C. Gallo-Rodriguez, C. Lima, R.M. de Lederkremer *Anal. Biochem.* 2000, 279, 79-84.
- [7] A.C.C. Frasch *Parasitol. Today* 2000, 16, 282-286.
- [8] R. Agusti, G. Paris, L. Ratier, A.C.C. Frasch, R.M. de Lederkremer *Glycobiology* 2004, 14, 659-670
- [9] M.L. Salto, L.E. Bertello, M. Vieira, R. Docampo, S.N.J. Moreno, R.M de Lederkremer *Eukaryot. Cell*, 2003, 2, 756-768.

Premios que se otorgarán en 2007



PREMIO CONSAGRACIÓN EN ÁREAS ESPECIALIZADAS:

“Premio Dr. Hans Schumacher 2007”: en el área investigación en fisicoquímica

PREMIO DE ESTÍMULO A LA INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN DE INVESTIGADORES:

“Premio Dr. Rafael Labriola 2007”: al investigador o investigadores que se encuentren realizando una labor destacada en la formación de discípulos y equipos de trabajo, en cualquiera de los campos de la química pura o aplicada y no haya cumplido aún 45 años en el año en que se otorgue el premio.

Para este premio se recibirán presentaciones en la sede hasta el 30.06.07

PREMIOS ESTÍMULO

Para las tesis aprobadas entre el 30.03.05 y el 30.03.07 con las siguientes distinciones:

“Premio Dr. Pedro N. Arata 2007”: En el área de Química Industrial

“Premio Dr. Enrique Herrero Ducloux 2007”: En el área de Química Biológica, Microbiológica y Biotecnología.

“Premio Dr. Luis Guglielmelli 2007”: En el área de la Química Orgánica y Bio-orgánica.

Los postulantes deberán presentar en la Sede de la AQA: a) un ejemplar de la tesis, b) resumen de la misma de hasta 5 páginas, c) CV abreviado y d) nota de presentación de las autoridades universitarias.

Para estos premios se recibirán presentaciones en la sede hasta el 31.05.07

PREMIOS INICIACIÓN PARA LOS MEJORES EGRESADOS

“Premio Asociación Química Argentina”: Galardona a los egresados de un mejor promedio (superior a 8 y sin ningún aplazo) en carreras de química de universidades de todo el país. Se otorgará a quienes satisfagan las condiciones y sean propuestos por las autoridades universitarias.

PREMIO ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA “Dr. Roberto Recoder”. PREMIO AL MEJOR TÉCNICO QUÍMICO egresado de cada escuela técnica de esta Capital. Se otorgará a quienes sean propuestos por las autoridades de las respectivas escuelas.

Para estos dos premios se recibirán presentaciones en la sede hasta el 31.05.07

Asociación Química Argentina: Sánchez de Bustamante 1749 – (C1425DUJ) Buenos Aires.
Tel. 4822-4886 E-mail: aqa@aqa.org.ar

Homenaje a Alicia Seldes

La búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos a partir de corales, tunicados y esponjas marinas

Jorge A. Palermo*

INTRODUCCIÓN

La naturaleza despliega ante nosotros un poderoso arsenal químico, el cual permanece mayormente inadvertido, pero que se manifiesta en las interacciones entre diferentes especies o entre individuos de una misma especie. Los organismos (plantas, insectos) necesitan defenderse de microorganismos y de otros organismos predadores o competidores, y en muchos casos recurren a compuestos químicos específicamente diseñados para tales fines: los "metabolitos secundarios" o "productos naturales", como más comúnmente se los conoce. Desde la antigüedad, el hombre ha venido utilizando los productos naturales principalmente de plantas terrestres, con fines terapéuticos (medicina tradicional) o de defensa (venenos y toxinas). Este conocimiento derivó en el estudio sistemático de los productos naturales de plantas y al nacimiento de las disciplinas conocidas como farmacognosia y fitoquímica.

A pesar de los grandes avances en el área de la química combinatoria, la mayor parte de las drogas medicinales actualmente en uso siguen siendo productos naturales o análogos basados en ellos. Esto es debido a

la enorme diversidad estructural de los productos naturales y a que son naturalmente biosintetizados en forma esteroespecífica, lo cual les confiere propiedades estructurales únicas. Esta diversidad estructural de sustancias es uno de los requerimientos principales para lo que se conoce como "drug discovery". El desarrollo de bioensayos automatizados agilizó el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos a partir de extractos crudos, y revitalizó la búsqueda de nuevas drogas terapéuticas en la naturaleza. La importancia de los productos naturales como compuestos "cabeza de serie" ha sido cabalmente comprendida por los laboratorios medicinales, lo cual ha promovido un renovado interés por la preservación de los recursos naturales especialmente en países en vías de desarrollo. Paralelamente, esto ha traído como consecuencia el desarrollo de nuevos institutos y programas de investigación tanto estatales como privados, con el fin de explorar la "biodiversidad química".

A lo largo de los años, la diversidad estructural en los productos naturales aislados de plantas terrestres ha comenzado a disminuir, principalmente debido a que esta disciplina ya acumula dos siglos de trabajo, y a que la quimiotaxonomía vuelve predecible en muchos casos el tipo estructural de compuestos que puedan ser aislados de una cierta especie. Esto trae como consecuencia que se sigan aislando compuestos "nuevos" pero no "novedosos", es decir, los compues-

tos nuevos que se aíslan suelen ser variantes de estructuras ya conocidas.

Frente a esto, el ámbito marino, y en especial los invertebrados bentónicos (del fondo marino) ofrecen una fuente aun poco explotada de biodiversidad química. Estos organismos compiten por el espacio (sustratos sólidos), la luz y los nutrientes. Además deben defenderse de microorganismos patógenos y de posibles predadores. Los invertebrados marinos, en particular las esponjas, tunicados y celenterados, carecen de sistema inmunológico, y por lo tanto deben biosintetizar o incorporar con la dieta sus propias armas químicas (compuestos con actividad antibiótica, antifúngica o antiviral) de defensa que les permitan sobrevivir en ecosistemas tan competitivos. Para poder competir por el sustrato deben producir compuestos tóxicos frente a un potencial competidor (que posee células que se reproducen rápidamente). Por este motivo no es sorprendente que muchos productos naturales marinos posean potente actividad antitumoral.

La característica más notable de los productos naturales marinos, y que los vuelve potencialmente interesantes para su estudio, es que son estructuralmente muy diferentes a los metabolitos secundarios aislados de fuentes terrestres. De hecho no es infrecuente el aislamiento de compuestos con esqueleto carbonado novedoso y/o con grupos funcionales poco frecuentes. Esta

Departamento de Química Orgánica y UMYMFOR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Ciudad Universitaria, Pabellón 2 (1428) Buenos Aires, Argentina
E-mail: palermo@qo.fcen.uba.ar

diversidad estructural les confiere un enorme potencial como compuestos cabeza de serie en programas de muestreo biomédico. De hecho, algunos productos naturales marinos, como la bryostatina 1 y la dehidrodidemina B, ya se encuentran en estudios de fase III como antitumorales en humanos, y próximos a llegar al mercado. Existen numerosos ejemplos de productos marinos en fase II, lo cual demuestra el inmenso potencial de este recurso.

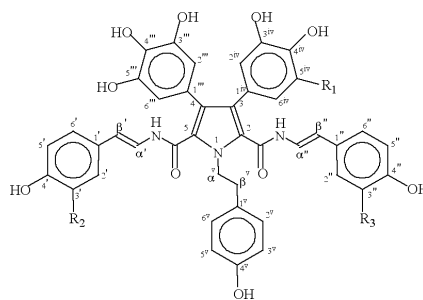
Nuestro país posee más de 3000 km de ecosistemas costeros (sin contar la Antártida), los cuales han sido poco estudiados tanto biológica como químicamente. La Dra. Alicia Seldes comenzó en la década del 80 con el estudio de los productos naturales marinos en nuestro país y su trabajo resultó fundamental para el desarrollo de esta disciplina en Argentina dando origen a tres grupos de investigación actualmente activos en esta área. En las páginas subsiguientes pasaré a relatar algunos descubrimientos que hemos realizado con mi grupo de investigación particularmente en el área de los productos naturales de esponjas, tunicados y corales.

En el área de productos naturales marinos, debido a las características de la disciplina, la metodología y la productividad son muy diferentes a las del área más tradicional de productos naturales de plantas. En general en los invertebrados marinos (particularmente en esponjas y tunicados) la mayor parte de las muestras no son bioactivas o no producen metabolitos secundarios. Esto es muy diferente en las plantas ya que prácticamente cualquier tipo de vegetal terrestre produce algún tipo de metabolito secundario (triterpenos, flavonoides, etc). En general se considera que en invertebrados marinos apenas el 5 % de las muestras suelen presentar bioactividad o riqueza química. Esta es la causa principal por la cual muchos grupos tradicionales en otros países latinoamericanos hicieron intentos de pasar "de la tierra al mar" y desistieron. Otro problema es que en general al ser moléculas en muchos casos totalmente novedosas y además no existir un conocimiento quimiotaxonómico previo (debido en muchos casos a que no se cuenta con una taxonomía certera en invertebrados marinos) uno se encuentra cada vez con proble-

mas totalmente diferentes. Esto trae aparejado que el proceso de elucidación estructural se vuelva mucho más lento. Afortunadamente estas dificultades mencionadas suelen estar compensadas por la novedad estructural o la bioactividad de las pocas muestras marinas que valen la pena.

ESPONJAS MARINAS

Nuestro primer éxito con esponjas marinas fue el aislamiento de las storniamidas una familia de alcaloides producidos por una esponja del género *Cliona* colectada en la zona intermareal en San Antonio Oeste, Río Negro [1]. El nombre de las storniamidas proviene del instituto de biología marina y pesquera "Almirante Storni" que sirvió de base para nuestros viajes de campaña en la localidad.

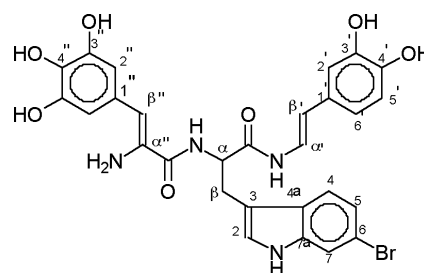


Storniamidas : R_1 , R_2 y R_3 : H u OH

Las storniamidas presentan un esqueleto formado por cinco unidades de tirosina, tres de las cuales se ensamblan para formar un anillo pirrólico central, y los diferentes compuestos se distinguen por el diferente grado de hidroxilación en los anillos aromáticos. Las storniamidas mostraron actividad frente a diferentes líneas celulares de tumores sólidos.

De otra especie de esponja perteneciente al mismo género, *Cliona chilensis*, colectada mediante buceo en Rada Tilly, Chubut, se aisló un nuevo alcaloide peptídico, la celenamida E [2]. Las esponjas del género *Cliona* se caracterizan por horadar sustratos calcáreos como rocas, valvas de moluscos, arrecifes de coral, etc. Esta habilidad es debida a la presencia de enzimas específicas capaces de disolver el carbonato de calcio de los sustratos. En las pesquerías de ostras

son consideradas una plaga porque producen fragilidad en las valvas de los moluscos, con las consiguiente pérdidas económicas, y en ciertas regiones del mundo, estas esponjas representan una amenaza para los arrecifes de coral. Casualmente, las esponjas del género *Cliona* suelen producir compuestos fenólicos, y se cree que estos metabolitos secundarios intervienen en el proceso de ataque a los sustratos calcáreos, ayudando a complejar el calcio.

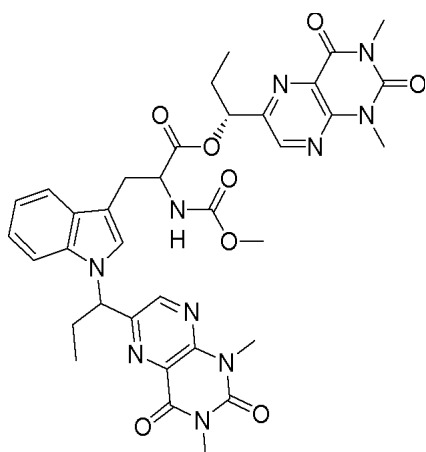


Celenamida E

Entre los distintos métodos para colectar este tipo de organismos, generalmente se emplea el buceo, el snorkel, o la colecta a mano durante la marea baja. Sin embargo estas técnicas sólo brindan acceso a las muestras que se encuentran a poca profundidad. Para acceder a la biodiversidad que se encuentra a profundidades mayores se hace necesario recurrir al uso de redes de profundidad o de rastras. Con la colaboración de personal del Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP, Mar del Plata) se logró acceder a colecciones de la llamada "fauna acompañante" de las operaciones de pesca de vieyras. Dicho material fue recolectado a más de 100 m de profundidad y por lo tanto se trata de especies a las que no se puede acceder por otros medios de colecta.

Una especie particularmente abundante fue una esponja *Clathria sp.* De la cual se pudo aislar las pseudoanchynazinas, una serie de alcaloides derivados de triptofano y pteridina de estructura novedosa [3]. Como característica estructural notable, en estos compuestos el grupo amino del triptofano se encuentra bloqueado con metil carbamato.

Es muy posible que estos compuestos constituyan algún medio de defensa para la esponja (probablemente impidiendo el asentamiento de larvas de otras especies) ya que esta los produce en gran cantidad,



Pseudoanchynazina B

sin embargo, sorprendentemente, las pseudoanchynazinas no presentaron actividad farmacológica de interés.

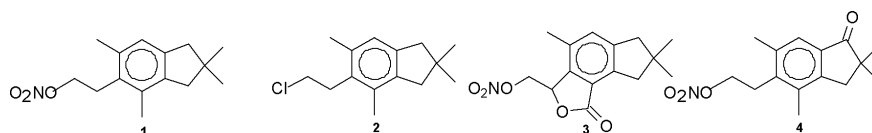
CORALES BLANDOS (OCTOCORALES)

La pesca en los mares antárticos se encuentra monitoreada por un organismo multinacional (CAMELAR) que periódicamente realiza campañas de muestreo para la evaluación del estado del recurso pesquero, en particular la merluza negra. Una de esas campañas, realizada por el navío *BIP Dr. E. Holmberg* del INIDEP nos permitió acceder a dos de las muestras más fascinantes en cuanto a la estructura y bioactividad de los metabolitos secundarios. El control del estado de las pesquerías se realiza, precisamente, pescando con redes de profundidad. Según la velocidad del buque, estas redes pueden arrastrarse por el fondo, llevando consigo también una gran cantidad de organismos bentónicos. Esta campaña, realizada alrededor de las islas Georgias del Sur, permitió la recolección de una buena cantidad de muestras de invertebrados.

Una de las muestras más importantes en cuanto a su cantidad, fue el octocoral *Alcyonium paessleri*, una de las especies de corales blandos más abundantes en los mares antárticos, colectado a 200m de profundidad. De dicha especie se pudieron aislar las alcyopterosinas, una familia de sesquiterpenoides novedosos (varios de ellos clorados) con el raro esqueleto de iludalano, pero lo más sorprendente fue la presencia

de un grupo nitrato como sustituyente en varios de estos compuestos [4]. Si bien los nitratos son nutrientes abundantes en el agua de mar, nunca se lo había detectado como sustituyente incorporado a un pro-

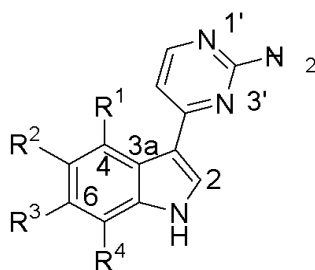
una buena actividad frente a distintas líneas celulares de tumores sólidos, y además se observó que producían apoptosis (muerte celular programada). Estos resultados nos llevaron a emprender distintos proyectos

Algunas alcyopterosinas aisladas del octocoral *Alcyonium paessleri*.

ducto natural. De hecho, estos compuestos resultaron ser los primeros nitratos naturales en ser completamente aislados y caracterizados. Varios de estos compuestos presentaron actividad antitumoral.

TUNICADOS

En la colección proveniente de las islas Georgias, la muestra más interesante desde el punto de vista de la bioactividad resultó el tunicado *Aplidium meridianum*. Dicho tunicado, de un color amarillo verdoso intenso, nos brindó una familia de alcaloides indólicos, las meridianinas, varias de las cuales presentaron promisoría actividad antitumoral [5].



- 1 $R^1 = OH; R^2 = R^3 = R^4 = H$
- 2 $R^1 = OH; R^2 = R^4 = H; R^3 = Br$
- 3 $R^1 = R^3 = R^4 = H; R^2 = Br$
- 4 $R^1 = R^2 = R^4 = H; R^3 = Br$
- 5 $R^1 = OH; R^2 = R^3 = H; R^4 = Br$

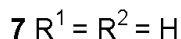
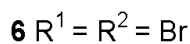
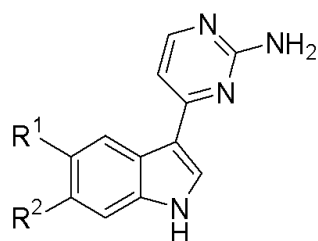
meridianinas A-E

Dichos compuestos poseían en común un anillo de 2-aminopirimidina unido al C-3 de un indol, y el anillo indólico podía encontrarse bromado y/o hidroxilado. Estudios preliminares de estos compuestos indicaron

relacionados con las meridianinas. Por un lado, se estableció un convenio con el laboratorio del Dr. Laurent Meijer (CNRS Roscoff-Francia) con el fin de evaluar la actividad de las meridianinas como inhibidoras de protein-quinasas. Por otro lado comenzamos un proyecto de síntesis de análogos de meridianinas con el fin de obtener derivados con mayor actividad y menor toxicidad. Además se comenzó a trabajar en el desarrollo de metodologías para el análisis y cuantificación de meridianinas en fluidos biológicos.

Fue precisamente esta última línea de trabajo la que condujo al descubrimiento de dos nuevas meridianinas. Al analizar los espectros de masa de las diferentes meridianinas se observó que todas presentaban una pérdida de 41 unidades de masa a partir del ion molecular. Dicha pérdida neutra (probablemente azirina) nos dio la idea de emplear espectrometría de masa tándem como método de análisis y cuantificación de este tipo de compuestos. Para probar la técnica utilizamos un nuevo batch de extracto crudo de *A. meridianum* colectado en las islas Georgias del Sur pero en una campaña posterior. Para nuestra sorpresa, detectamos, además de las meridianinas previamente aisladas, otros dos compuestos que no habíamos observado en el extracto del año anterior. Dichos compuestos fueron posteriormente aislados y caracterizados como meridianinas F y G [6].

Nuestro proyecto de síntesis de análogos nos llevó a preparar, mediante una síntesis de Fischer con uso de microondas, una serie de compuestos con el anillo de 2-aminopirimidina unido al C-2 del indol. Dichos derivados no resultaron bioactivos [7].



meridianinas F-G

Las pruebas de actividad realizadas en Francia mostraron que las meridianinas eran potentes inhibidores selectivos de varias protein-quinasas dependientes de ciclina (CDKs) [8]. Existe un gran número de CDKs y su función es promover la división celular en su forma fosforilada. La CDK se une al ATP y luego fosforila la proeína de retinoblastoma Rb. Esta proteína en su forma no fosforilada actúa como un freno a la división celular. Por lo tanto las diferentes CDKs son un objetivo para nuevas drogas antitumorales, donde el efecto buscado es inhibir la fosforilación de Rb. Esto conduce al proceso llamado apoptosis o muerte celular programada. Las CDKs son también importantes en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el mal de Alzheimer, lo cual las vuelve blancos aun más atractivos para la búsqueda y diseño de inhibidores específicos.

Estos resultados nos llevaron a presentar una patente provisional conjunta en EEUU entre el CNRS y la UBA, pero lamentablemente no se pudo obtener la patente definitiva debido a la existencia de otra patente anterior. En dicha patente se protegía todo tipo de pirimidinas 2,4 disustituídas como inhibidores de protein-quinasas, y lamentablemente las meridianinas quedaban automáticamente protegidas, por más que no eran el objetivo de la misma. La existencia de dicha patente nos llevó a cancelar el proyecto, pero por otro lado nos quedó la satisfacción de saber que estuvimos a punto (la patente llevaba menos de un año de publicada) de completar el ciclo de desarrollo de un producto natural: aislamiento, elucidación estructural, pruebas de actividad, patentamiento, síntesis de análogos.

CONCLUSIONES

Como queda demostrado con los resultados expuestos, nuestros mares son una fuente invaluable de potenciales descubrimientos en el área de productos naturales bioactivos y la farmacognosia. Su importancia es aun mayor si consideramos la vastedad del mismo, y que recién hemos comenzado a explorarlo químicamente, con lo cual es posible augurar un futuro promisorio a la disciplina, y el descubrimiento de nuevas sustancias que acaparen nuestro interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] J. A. Palermo, M. F. Rodríguez Brasco, A. Seldes, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2727-2734.

[2] J. Palermo, M. F. Rodríguez Brasco, A. Seldes, V. Balzaretto, E. Cabezas, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 488-490.

[3] I. A. Zuleta, M. L. Vitelli, R. Baggio, M. T. Garland, A. M. Seldes y J. A. Palermo, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4481-4486.

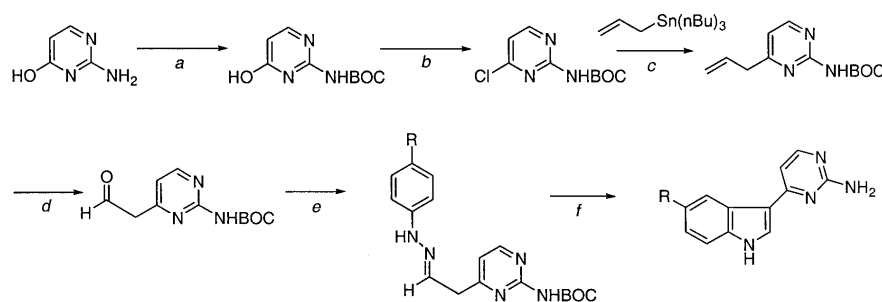
[4] J. A. Palermo, M. F. Rodríguez Brasco, C. Spagnuolo, E. Bal de Kier Joffé, L. Puricelli, A. M. Seldes, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4482-4486.

[5] L. Hernandez Franco, E. Bal de Kier Joffe, Lydia Puricelli, A. Seldes, J. Palermo, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1130-1132.

[6] A. M. Seldes, M. F. Rodríguez Brasco, L. Hernández Franco, J. A. Palermo *Nat. Prod. Res.* **2006**, em prensa.

[7] L. Hernandez Franco, J. A. Palermo, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 975-977.

[8] M. Gompel, M. Leost, E. Bal de Kier Joffé, L. Puricelli, L. Hernández Franco, J. Palermo, L. Meijer *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1703 - 1707.



a. $(t\text{-BuCO}_2)_2\text{O}$, py, 85 °C b. POCl_3 , N,N-dimethylaniline, CH_2Cl_2 , r.t. c. $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$, LiCl, THF, reflux d. KIO₄, KMnO₄, iprOH e. Phenylhydrazine hydrochloride, NaAcO, MeOH f. ZnCl_2 , DMF, microwave

Síntesis de Isomeridianinas

Tabla 1. Efecto de las meridianinas sobre CDK (DC_{50} , concentración micromolar)

quinasa	A	B	C	D	E
CDK1/ciclina B	2.50	1.50	3.00	13	0.18
CDK2/ciclina A	—	—	—	—	0.80
CDK5/p35	3.00	1.00	6.00	5.50	0.15
PK dependiente de AMP cíclico	—	0.08	0.70	1.00	0.09
PK dependiente de GMP cíclico	—	0.08	0.40	0.80	0.60
GSK3- β	1.30	0.50	2.00	2.50	2.50
Casein quinasa 1 (péptido)	—	1.00	30	100	0.40
Casein quinasa 1 (caseína)	—	2.00	>100	>100	1.00