

DERIVATIZACION DE LA CRÓMONA AISLADA DEL LIQUEN ALECTORIA SCROBICULATA

Patricia Morales B., Juana Robles C., Ana P. de Abram

RESUMEN

Uno de los compuestos aislados a partir del líquen *Alectoria scrobiculata* fue la 5, 7-dimetil-1-(metilen-metil-éter)-2-carboxicromona, a partir de la cual se obtuvieron tres derivados tipo amida, los cuales mostraron diferentes resultados al ser sometidos al bioensayo de la *Artemia salina*.

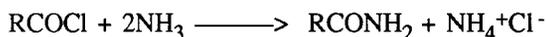
INTRODUCCION

Dentro de las investigaciones orientadas al estudio de líquenes peruanos, que se vienen desarrollando en la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, se realizó el estudio fitoquímico del líquen *Alectoria scrobiculata* [1].

Entre otros, se logró aislar el compuesto 5, 7-dimetil-1- (metilen-metil-éter)-2-carboxicromona, identificado por sus datos espectrales IR, $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$.

Este compuesto despertó nuestro interés para realizar reacciones de derivatización paralelamente a estudios de actividad biológica [2]. La reacción escogida fue la de formación de amidas, ya que es conocido que se trata de una reacción de relativa facilidad de ejecución, de buen rendimiento y además existen numerosos ejemplos de este tipo de compuestos que presentan una marcada actividad farmacológica, especialmente como hipnóticos y anestésicos, como por ejemplo el Paracetamol, el Diazepam o el Pentobarbital [3].

El método más común para la preparación de amidas consiste en la reacción de halogenuros de acilo con amoniaco o aminas. Se debe trabajar con un exceso de amina o de alguna otra base que capte el ácido producido en la reacción:



Los cloruros de acilo se preparan normalmente a partir de ácidos carboxílicos, mediante la sustitución del grupo hidroxilo por cloruro. Los reactivos utilizados para la reacción son, el cloruro de tionilo o los halogenuros de fósforo, PCl_3 o PCl_5 . Un método frecuente para la formación de cloruros de acilo, emplea cloruro de tionilo en presencia de dimetilformamida (DMF). Sus resultados parecen ser mejores que los de los procedimientos más antiguos.

Los derivados de tipo amida obtenidos a partir de la cromona, se prepararon a partir del cloruro de acilo correspondiente y amoniaco, n-propilamina y p-toluidina respectivamente, según el esquema que se muestra en la figura 1:

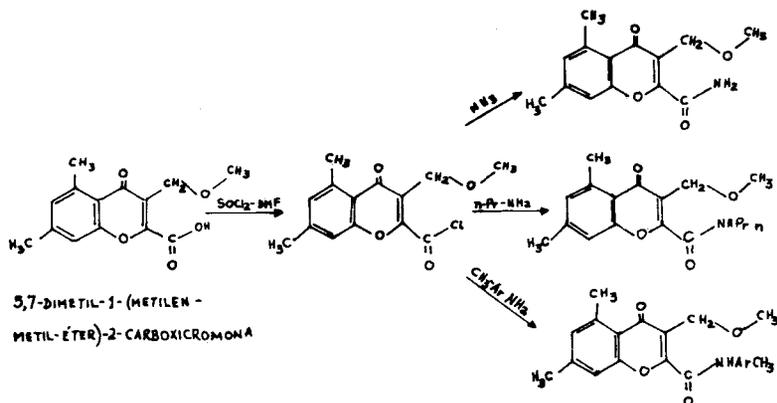


Figura 1. Esquema de reacciones de derivatización realizadas con la cromona aislada del líquen *Alectoria scrobiculata*

La actividad biológica de los derivados obtenidos y de la cromona fueron analizados utilizando el bioensayo de la *Artemia salina* Leach [4]. El método se basa en que los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos en dosis altas. Así, la letalidad "in vivo" en un organismo zoológicamente simple puede ser usada como una alternativa rápida y sencilla. Los huevos de la *Artemia salina* son fácilmente asequibles comercialmente a bajo costo y si se mantienen secos, pueden conservarse por mucho tiempo. Una vez colocados en una solución salina (agua de mar), los huevos se incuban por 48 horas, obteniéndose de esta manera una gran cantidad de larvas.

La muestra es sometida al bioensayo a concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000 ppm, en viales que contienen agua de mar y diez camaroncitos. Se trabaja por triplicado para cada concentración. Después de 24 horas se cuentan los sobrevivientes y se registran los porcentajes de muertos para cada dosis. Estos datos son luego procesados en un programa de computadora que estima valores de LC_{50} con intervalos de confianza del 95%. Para el caso de un compuesto puro, se le considera activo si presenta un valor de LC_{50} menor a 500.

PARTE EXPERIMENTAL

Purificación de la cromona: El esquema de separación aplicado al líquen *Alectoria scrobiculata* y el proceso de purificación de la cromona han sido reportados previamente [5].

Preparación del cloruro de acilo: En un balón de 5 mL se colocó 20 mg de la cromona, cuatro gotas de cloruro de tionilo y una gota de DMF. Se conectó a un condensador de reflujo y la mezcla se agitó con un magneto a temperatura ambiente, por 10 minutos. Luego se calentó en baño de arena a 80°C, por 15 minutos. Después de este tiempo, se esperó que enfrié a temperatura ambiente y se diluyó con 5 gotas de CH_2Cl_2 .

Preparación de la 5, 7-dimetil-1-(metilen-metil-éter)-2-amidocromona: En un vial cónico de 3 mL, equipado con un agitador magnético y un condensador de aire, se colocó 10 gotas de NH_3 concentrado. El vial se enfrió en un baño de hielo y se agregó gota a gota y con agitación, la solución de cloruro de acilo preparada anteriormente. Cuando se completó la adición, se removió el baño de hielo y la mezcla se agitó por cinco minutos más. Se agregó 10 gotas de CH_2Cl_2 para disolver el precipitado formado. Se separó la fase de

diclorometano de la fase acuosa y se pasó por una microcolumna que contenía 200 mg de Na_2SO_4 anhidro. La fase acuosa se extrajo con dos porciones de 0,5 mL de diclorometano adicionales, pasándose también estos extractos a través de la microcolumna.

Los eluatos se combinaron, se evaporó el solvente y el producto se recrystalizó en una mezcla de etanol-agua, recolectándose los cristales por filtración. Estos eran de color amarillo pálido y fundían con descomposición a 218-220°C. El peso del producto fue de 12,4 mg (Rdto. 62,6%).

Preparación de la 5, 7-dimetil-1-(metilen-metil-éter)-2-(n-propilamido)-cromona: En un vial cónico de 3 mL, equipado con un agitador magnético y un condensador de aire, se colocó 5 gotas de n-propilamina y 10 gotas de CH_2Cl_2 . La solución se enfrió en un baño de hielo y se agregó la solución de cloruro de acilo, de la misma manera que en la preparación anterior. Cuando se completó la adición, se removió el baño de hielo y la mezcla se agitó por 10 minutos más. La fase de diclorometano se lavó con 0,5 mL de agua, 0,5 mL de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 5%, 0,5 mL de $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 5% y 0,5 mL de agua sucesivamente. La solución húmeda de CH_2Cl_2 se pasó por una microcolumna que contenía 200 mg de Na_2SO_4 anhidro. Los eluatos se combinaron, se evaporó el solvente y el producto se recrystalizó de una mezcla de etanol-agua, de la misma manera que en la preparación anterior. Se obtuvieron cristales en forma de agujas finas de color amarillento, que fundían con descomposición a 235°C. El peso del producto fue de 10,9 mg (Rdto. 47,4%).

Preparación de la 5, 7-dimetil-1-(metilen-metil-éter)-2-(p-tolilamido)-cromona: Se siguió el mismo procedimiento aplicado en la preparación anterior, utilizando 0,294 g de p-toluidina. En este caso se obtuvieron cristales menudos de color amarillo ocre, que fundían con descomposición a 265°C. El peso del producto fue de 17,9 mg (Rdto. 67,0%).

Los tres derivados obtenidos fueron sometidos a análisis espectroscópico IR, utilizando un Espectrómetro Infrarrojo Perkin Elmer 882 (PUCP).

Bioensayo de la Artemia salina aplicado a la cromona y sus derivados: Se incubaron los huevos de la Artemia salina en agua de mar artificial por dos días, al cabo de los cuales las larvas estaban listas. Paralelamente, se prepararon tres juegos, de tres viales cada uno, conteniendo soluciones de la muestra a concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm respectivamente, utilizando como solvente etanol. Para cada muestra se preparó un vial de control que

contenía solamente el mismo volumen de solvente. Se dejó luego evaporar el solvente hasta sequedad en todos los viales. Se agregó agua de mar a cada vial y se colocaron diez camaroncitos en cada uno, es decir, treinta por dilución y se ajustó el volumen con agua de mar hasta tener 5 mL/vial. Veinticuatro horas después, se contó el número de sobrevivientes en cada vial. Los datos de número total de muertos por cada dosis se procesaron en un programa de computadora, obteniéndose así los valores correspondientes LC_{50} (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del bioensayo de la *Artemia salina* aplicado a la cromona y sus derivados

Muestra	% muertos			LC_{50}
	10' ppm	100 ppm	1000 ppm	
Cromona	33,33	43,33	53,33	435,32
Amida	26,67	43,33	60,00	233,87
n-Propilamida	13,33	46,67	80,00	120,64
p-Tolilamida	13,33	23,33	33,33	8022,45

RESULTADOS Y DISCUSION

Espectro IR de la cromona: El espectro IR de la 5, 7-dimetil-1-(metileno-metil-éter)-2-carboxicromona mostró las siguientes señales características:

- 3428 cm^{-1} (muy fuerte) : estiramiento OH para ácido carboxílico
- 1759 cm^{-1} (fuerte) : estiramiento C=O del grupo -COOH
- 1708 cm^{-1} (fuerte) : estiramiento C=O en anillo de seis miembros
- 1646 cm^{-1} (fuerte) : estiramiento C=C
- 1435 y 1290 cm^{-1} (fuertes) : estiramiento antisimétrico CO-O, combinado con flexión O-H
- 959 cm^{-1} (mediana) : flexión fuera del plano O-H

Espectro IR de la 5, 7-dimetil-1-(metileno-metil-éter)-2-amidocromona: El espectro IR del primer derivado de la cromona mostró las siguientes modificaciones:

- 3417 y 3239 cm^{-1} (fuertes) : aparición de dos señales correspondientes al estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo -NH_2
- 1736 cm^{-1} (muy fuerte y ancha) : señal modificada, correspondiente al estiramiento C=O , desplazada hacia frecuencias menores debido al cambio de grupo funcional
- 1642 y 1243 cm^{-1} (fuertes) : señales modificadas por efecto de la aparición de flexión N-H en el plano combinada con estiramiento C-N
- 748 cm^{-1} (mediana) : aparición de señal correspondiente a la flexión N-H fuera del plano

La señal a 959 cm^{-1} , correspondiente a la flexión fuera del plano para O-H , desaparece.

Espectro IR de la 5, 7-dimetil-1-(metilen-metil-éter)-2-(n-propilamido)-cromona: El espectro IR del segundo derivado de la cromona mostró las siguientes modificaciones:

- 3454 cm^{-1} (fuerte y ancha) : señal modificada, correspondiente al estiramiento N-H para amidas secundarias
- 2922 cm^{-1} (fuerte) : señal modificada, correspondiente al estiramiento C-H , incrementada por la introducción del grupo n-propilo
- 1735 cm^{-1} (muy fuerte y ancha) : señal modificada, correspondiente al estiramiento C=O amídico, desplazada hacia frecuencias menores debido al cambio de grupo funcional
- 1606 cm^{-1} (fuerte) : señal modificada, correspondiente a la flexión en el plano de N-H , combinada con estiramiento C-N y C=C

La señal a 959 cm^{-1} tampoco aparece en este caso.

Espectro IR de la 5,7-dimetil-1-(metilen-metil-éter)-2-(p-tolilamido)-cromona: El espectro IR del tercer derivado de la cromona mostró las siguientes modificaciones:

- 3338 cm^{-1} (fuerte) : señal modificada, correspondiente al estiramiento N-H para una amida secundaria
- 2957, 2917, 2852 cm^{-1} (fuertes) : señales características al estiramiento C-H
- 1699 cm^{-1} (muy fuerte) : señal modificada, correspondiente al estiramiento C=O amídico, desplazada hacia frecuencias menores debido al cambio de grupo funcional
- 1611 cm^{-1} (fuerte) : señal modificada, característica de la flexión en el plano N-H, combinada con estiramiento C-N y C=C
- 801 cm^{-1} (fuerte) : señal modificada por la introducción del grupo p-tolilo, correspondiente a la flexión fuera del plano del anillo aromático
- 733 cm^{-1} (mediana) : aparición de señal correspondiente a la flexión fuera del plano N-H

La señal a 959 cm^{-1} tampoco aparece en este caso.

En base a estos resultados, consideramos que hay evidencias suficientes para confirmar la identidad de cada uno de los derivados obtenidos.

Bioensayo de la Artemia salina aplicado a la cromona y sus derivados: A partir de los valores de LC_{50} podemos señalar que la cromona original es una sustancia débilmente activa; sin embargo, su actividad es incrementada al cambiar el grupo -COOH por el grupo -CONH₂. La introducción de un grupo alquilo, como el n-propilo, en el segundo derivado, modificó la actividad incrementándola considerablemente. En cambio, cuando el grupo sustituyente en la amida secundaria fue un anillo aromático, como el grupo p-tolilo, la actividad desapareció.

Una probable explicación de estos resultados podría estar relacionada con la variación observada en la actividad biológica de ciertos grupos, entre ellos las amidas, de carácter hipnótico-anestésico con algunas propiedades físicas tales como la lipofiliidad, la distribución electrónica y la naturaleza estérica, que debe ser complementaria al receptor [3].

En nuestro caso, la introducción de un grupo n-alquílico, como el n-propilo, aumenta en algún grado la lipofilicidad de la molécula, lo que repercute en el incremento de su actividad, lo que no ocurre cuando el sustituyente de la amida es un grupo arilo, como el p-tolilo.

REFERENCIAS

1. Robles J. (1990) *Estudio Fitoquímico del líquen Alectoria scrobiculata*. Tesis para optar el Grado de Bachiller en Ciencias con mención en Química, PUCP, Lima.
2. Morales E. (1992) *Aislamiento de Sustancias Liquénicas y su Estudio Químico*. Tesis para optar el Grado de Magister en Química, PUCP, Lima.
3. Albert A. (1987) *Xenobiosis*. Chapman and Hall, Gran Bretaña.
4. McLaughlin J. (1991) *Crown Gall Tumors on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation* en **Methods in Plant Biochemistry**. Ed. por K. Hostettman, Academic Press, Londres. p. 1-32.
5. Morales P., Robles J., Pastor de Abram A., Gallagher K., Valdez Gauthier C. (1993) *Revista de Química*. VII. Nº 2.