

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



**Semisíntesis de derivados de ácido oleanólico y ácido maslínico
en disolución y fase sólida. Estudio de sus propiedades
biológicas.**

TESIS DOCTORAL

Samuel Martín Fonseca

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Samuel Martín Fonseca
D.L.: GR 1912-2014
ISBN: 978-84-9083-088-8

**Semisíntesis de derivados de ácido oleanólico y ácido maslínico
en disolución y fase sólida. Estudio de sus propiedades
biológicas**

Por

Samuel Martín Fonseca

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor

Fdo. Samuel Martín Fonseca

El director de la Memoria,

Fdo. **Dr. Andrés Parra Sánchez**

Profesor Titular del Dpto. de

Química Orgánica de la

Universidad de Granada

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida asociada al proyecto de investigación:

“Semisíntesis de derivados del ácido maslínico y evaluación biológica de sus actividades frente serín proteasas Y BCL-2/BAX como moléculas reguladoras de apoptosis”
(Ref.: CTQ2009-13898, Ministerio de Ciencia e Innovación).

El doctorando Samuel Martín Fonseca y el director de Tesis D. Andrés Parra Sánchez garantizan, al firmar esta Tesis doctoral, que el trabajo que aquí se presenta ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la Tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a de Marzo de 2014

Director de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Andrés Parra Sánchez

Fdo.: Samuel Martín Fonseca

Α μι μαδρε, Ανα

Α μις ηερμανος, Φραν ε Ισαβελ

χον τοδο μι χαρι)ο

ÍNDICE

CAPITULO I OBJETIVOS E INTRODUCCIÓN	1
I.1 OBJETIVOS DE LA MEMORIA.....	3
I.2 ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO. GENERALIDADES.....	3
I.2.1 Biogénesis de triterpenos pentacíclicos.....	5
I.2.2 Fuentes naturales de ácido oleanólico y ácido maslínico	13
I.2.3. Biosíntesis de ácido oleanólico y ácido maslínico.....	15
I.3 REACTIVIDAD DE ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO.....	17
I.3.1 Reactividad del anillo A del esqueleto de oleaneno.....	19
I.3.2 Reactividad del doble enlace C-12/C-13 del esqueleto de oleaneno	23
I.3.3 Reactividad del carboxilo C-28 del esqueleto de oleaneno.....	26
I.4 QUÍMICA COMBINATORIA Y SÍNTESIS ORGÁNICA EN FASE SÓLIDA.....	27
I.4.1 Química Combinatoria.....	27
I.4.2 Síntesis Orgánica en Fase Sólida (SOFS).....	31
I.4.3 Librerías de productos naturales obtenidos por SOFS	32
I.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS	43
I.5.1 Productos naturales: concepto y utilidades.....	43
I.4.2. Importancia de la derivatización de productos naturales	45
I.4.3. Actividad citotóxica y apoptótica.....	48
a) El proceso de apoptosis y muerte celular	48
b) Actividad citotóxica y antitumoral de productos naturales.....	49
c) Actividad citotóxica y apoptótica de derivados de productos naturales	56
I.4.4. Actividad anti-Vih	69
a) El ciclo vital del VIH	69
b) Actividad anti-VIH de productos naturales.....	71
c) Actividad anti-VIH de derivados de productos naturales.....	75
I.4.5. Actividad anti-malárica	83
a) El ciclo vital de la malaria.....	83

b) Actividad antimalárica de productos naturales	84
c) Actividad antimalárica de derivados de productos naturales.....	85
CAPITULO II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
II.1. OBTENCIÓN DE MATERIAS PRIMAS.....	93
II.1.1. Aislamiento y caracterización de ácido oleanólico y ácido maslínico	93
II.1.2. Bencilación de ácido oleanólico y ácido maslínico	95
II.2. SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS FUNCIONALES SIMPLES DE AM Y AM-BN	97
II.2.1. Obtención de derivados nitrogenados de AM en el carboxilo C-28.....	97
II.2.2. Obtención de derivados de AM y bencil-AM en el anillo A.....	104
II.3. ESTUDIO DEL PROCESO DE APOPTOSIS DE LOS DERIVADOS FUNCIONALES DE AM	108
II.4. SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS ACILADOS EN EL ANILLO A DE AO Y AM	113
II.4.1. Ensayos de acetilaciones	113
II.4.2. Acilos utilizados en la obtención de derivados.....	116
II.4.3. Acilaciones en disolución de ácido oleanólico y ácido maslínico	117
II.4.4. Cuantificación de la incorporación de AO y AM a la resina de cloruro de 2-clorotritilo (CCT resina)	121
II.4.5. Acilaciones en fase sólida de AO y AM	124
II.4.6. Cuantificación de la acilación de AO y AM en fase sólida.....	127
II.5. ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS DERIVADOS ACILADOS	131
II.5.1. Citotoxicidad.....	131
II.5.2. Apoptosis	134
II.5.3. Producción de ROS.....	137
II.5.4. Actividad contra Anti-VIH-Proteasa	139
II.6. SEMISÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE DERIVADOS BIFUNCIONALES	143
II.6.1. Aminoácidos y acilos utilizados en la obtención de derivados	144
II.6.2. Semisíntesis de 28-monopeptidil derivados de AO y AM.....	145
II.6.3. Semisíntesis de 28-dipeptidil derivados de AO y AM.....	147
II.6.4. Semisíntesis de 3-acil-28-monopeptidil derivados de AO y 2,3-diacil-28- mono-peptidil derivados de AM	150

II.6.5. Semisíntesis de 3-acil-28-dipeptidil derivados de AO y 2,3-diacil-28-dipeptidil derivados de AM	152
II.6.6. Cuantificación de los procesos de aminoacilación y acilación en fase sólida de AO y AM.	154
II.7. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS DERIVADOS BIFUNCIONALES DE AO Y AM.....	159
II.7.1. Estudio de las propiedades citotóxicas en las líneas celulares B16-F10, HT29 y HepG2	160
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	169
III.1. INSTRUMENTACIÓN, GENERAL MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	171
III.1.1. Instrumentación general básica.....	171
III.1.2. Cromatografía.....	173
a) Cromatografía en capa fina	173
b) Cromatografía flash a media presión.....	173
c) Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)	173
III.1.3. Métodos de determinación estructural.....	175
a) Espectrometría de masas	175
b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	175
c) Espectroscopía de IR.....	176
d) Rotaciones específicas ($[\alpha]_D$).....	176
III.1.4. Procedimientos generales de síntesis en disolución.....	177
a) Aislamiento del ácido oleanólico y ácido maslínico	177
b) Reacción de bencilación.	177
c) Reacción de oxidación con PCC	177
d) Reducción con LiAlH_4	177
e) Reducción con NaBH_4	178
f) Reacción de acetonaación.....	178
g) Reacción de tosilación	178
h) Formación de azida a partir de tosilato.....	178
i) Apertura de acetónido.....	178
j) Reacción de acilación	178
k) Formación de cloruro de ácido	179
l) Formación de amida a partir de cloruro de ácido	179

m)	Formación de nitrilo a partir de amida.....	179
n)	Reacción de esterificación con un aminoácido protegido con grupo Fmoc.....	179
III.1.5.	Procedimientos generales en fase sólida.....	180
a)	Consideraciones generales.....	180
b)	Procedimiento general de cuantificación de la incorporación de AO y AM a la resina.	180
c)	Procedimiento general de acilación en fase sólida.....	181
d)	Procedimiento general de formación de derivados peptídicos de AO y AM.....	181
e)	Test de detección de grupo amino libre (Test de Kaiser o test de la ninhidrina).....	182
III.2.	INSTRUMENTACIÓN, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA ENSAYOS BIOLÓGICOS	183
III.2.1.	Consideraciones generales.....	183
a)	Productos	183
b)	Subcultivos celulares.....	183
c)	Almacenamiento celular y descongelación	184
III.2.2.	Estudio de necrosis y efecto apoptótico	185
III.2.2.1.	Líneas celulares	185
a)	Línea tumoral B16-F10.....	185
b)	Línea tumoral HT29.....	185
c)	Línea tumoral HEPG2.	185
III.2.3.	Ensayos de citotoxicidad	186
a)	Citometría de flujo	187
b)	Análisis de apoptosis.....	189
c)	Microscopia de fluorescencia.....	189
d)	Tinción con anexina V- FITC / yoduro de propidio.....	190
e)	Análisis por Citometría de flujo del potencial membrana mitocondrial ROS	190
III.2.4.	Ensayo de VIH	191
III.3.	RESULTADOS EXPERIMENTALES	193
III.3.1.	Aislamiento de los ácidos oleanólico y maslínico. Obtención de derivados inmediatos.....	193
III.3.2.	Obtención de productos de partida	195
III.3.2.1.	Bencilación del ácido oleanólico.....	195
III.3.2.2.	Bencilación de ácido maslínico.....	195
III.3.3.	Obtención de derivados funcionales en C-28	197
III.3.3.1.	Formación de la sal sódica de AM.....	197

III.3.3.2. Reducción de ácido maslínico con LiAlH_4	197
III.3.3.3. Formación del acetónido de 2 α -hidroxi-eritrodioI	198
III.3.3.4. Tosilación de acetónido de 2 α -hidroxi-eritrotriol	198
III.3.3.5. Formación de azida a partir de grupo tosilato	199
III.3.3.6. Acetilación de ácido maslínico	200
III.3.3.7. Obtención del cloruro de diacetil-AM	200
III.3.3.8. Formación de amida de AM a partir del cloruro de ácido	201
III.3.3.9. Saponificación de la amida de AM	202
III.3.3.10. Formación de diacetil-28-ciano-AM a partir de la correspondiente amida.....	202
III.3.3.11. Saponificación de diacetil-28-ciano-AM.	203
III.3.3.12. Formación de diacetil-28-amino-AM	204
III.3.4. Síntesis de derivados funcionales en el anillo A.....	205
III.3.4.1. Oxidación de AM con PCC.....	205
III.3.4.2. Oxidación de AM-Bn con PCC	206
III.3.4.3. Reducción de 3-oxo-AM con NaBH_4	207
III.3.4.4. Reducción de 3-oxo-AM con LiAlH_4	207
III.3.4.5. Reducción de 3-oxo-AM-Bn con LiAlH_4	208
III.3.5. Pruebas de acetilación en fase líquida.....	209
III.3.6. Método general de acilación	211
III.3.6.1. Derivados acilados de AO y AO-Bn	211
III.3.6.2. Derivados acilados de AM y AM-Bn.....	216
III.3.7. Síntesis Orgánica en Fase Sólida	227
III.3.7.1. Pruebas de cuantificación del acoplamiento del triterpeno a la resina	227
III.3.7.2. Síntesis en disolución de Fmoc-derivados de AO y AM	228
a) Reacción de AO con Fmoc-Gly	228
b) Reacción de AM con Fmoc-Gly	229
III.3.7.3. Pruebas de acilación en fase sólida.....	230
III.3.7.4. Cuantificación de la acilación de AO y AM en fase sólida. Formación de bencil-succinil derivados	231
a) Succinilización en fase sólida de AO y posterior bencilación en fase líquida	231
b) Succinilización en fase sólida de AM y posterior bencilación en fase líquida	232
III.3.8. Obtención de una librería de derivados peptídicos de los ácidos AO y AM .	234
III.3.8.1. Formación en fase sólida de C-28 mono-peptidil y di-peptidil derivados de AO y AM...	234
III.3.8.2. Acilación en fase- sólida de C-28 mono-peptidil y di-peptidil derivados de AO y AM	243

III.3.8.3. Cuantificación de la acilación de mono-peptidil- y di-peptidil derivados de AO y AM en fase sólida. Formación de bencil-succinil derivados.....	263
a) Formación y bencilación de succinil-AO-6AHA.....	263
b) Formación y bencilación de succinil-AO-6AHA-GLY-OH	264
c) Formación y bencilación de los succinil-AM-6AHA derivados	265
d) Formación y bencilación de los succinil-AM-6AHA-GLY-OH derivados.....	266
III.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS	268
III.4.1. Ensayos de apoptosis de los productos funcionales.....	268
III.4.2. Ensayo de citotoxicidad de los productos 1-4, 10 y 24-83	272
III.4.3. Ensayo de apoptosis para los productos 1-4, 10 y 24-83	273
III.4.4. Ensayo de producción de ROS	274
III.4.5. Ensayo anti-VIH	276
III.4.6. Ensayo de citotoxicidad de los productos de los peptidil derivados de AO y AM .	277
CAPITULO IV. CONCLUSIONES	279
ANEXO I. TABLAS.....	283
ANEXO II. ESPECTROS DE RMN.....	317
ANEXO III. TRABAJOS PUBLICADOS Y ENVIADOS.....	445

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[α]_D	Poder rotatorio	i-PrOH	Iso propanol
11AUA	Ácido 11-aminoundecanoico	IR	Infrarrojo
¹³C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono	IT	Inhibidores de la transcriptasa inversa
¹H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón	J	Constante de acoplamiento
6AHA	Ácido 6-aminohexanoico	Leu	Leucina
ADN	Ácido desoxiribonucleico	M	Molar
ALA	Alanina	m/z	Relación masa-carga
AMR	Ácido 25-hidroxi-3-oxoolean-12-en-28-oico	Me	Metilo
ARN	Ácido ribonucleico	mg	Miligramos
BOS	Biology Oriented Synthesis	min.	minutos
Calc.	Calculado	mL	mililitros
CAS	Cicloartenol Sintasa	mmol	milimoles
CCF	Cromatografía en Capa Fina	NBS	N-bromosuccinimida
CCT	2clorotritil cloruro	NOE	Nuclear Overhauser Effect
CDDO	Ácido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oico	NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
col.	colaboradores	° C	Grados centígrados
COSY	Correlation Spectroscopy	P. f.	Punto de fusión
d	Doblete	PCC	Clorocromato de piridinio
DCM	Diclorometano	pM	Picomolar
dd	Doble doblete	ppm	Parte por millón
ddd	Doble doblete	p-TsOH	Ácido para-toluensulfónico
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Py	Piridina
DIEA	N,N-Diisopropiletilamina	PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato
DIPCDI	N,N'-Diisopropilcarbodiimida	R. miehei	<i>Rhizomucor miehei</i>
DMAP	4-Dimetilaminopiridina	r.p.m.	revoluciones por minuto
DMF	Dimetilformamida	RMN	Resonancia Magnética Nuclear

DMSO	Dimetilsulfóxido	ROS	Reactive Oxygen Species
DOS	Diversity Oriented Synthesis	s	singlete
EC₅₀	Concentración efectiva a la cual la respuesta se situa en el 50% entre el máximo y el mínimo	SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
ED₅₀	Concentración a la cual el efecto biológico deseado es el 50%	SIV	Virus de inmunodeficiencia de los simios
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución	SOFS	Síntesis orgánica en fase sólida
ESI	Ionización por Electro spray	t. a.	temperatura ambiente
Fig.	Figura	TBS	Tert-Butildimetilsilil eter
FMOC	9-Fluorenilmetoxicarbonilo	TFA	Ácido trifluoracético
GABA	Ácido 4-aminobutanoico	THF	Tetrahidrofurano
GI₅₀	Concentración a la cual el efecto de proliferación celular se inhibe un 50%	TI	Índice terapéutico
GLY	Glicina	TIPS	Triisopropilsililo
h.	Horas	TNF	Factor de necrosis tumoral
HCl	Ácido clorhídrico	TsCl	Cloruro de tionilo
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity	u.m.a.	unidad de masa atómica
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence	UV	Ultravioleta
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol	VAL	Valina
HPLC	High-performance liquid chromatography	var.	variedad
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Coherence	VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HTS	High throughput screening	VIS	Virus de la Inmunodeficiencia de los simios
Hz	Hercio	v_{max}	Frecuencia máxima
IC₅₀	Concentración a la cual el efecto de inhibición es el 50%	δ	Desplazamiento químico
IP	Inhibidores de la proteasa		

ÍNDICE DE LÍNEAS CELULARES CITADAS

A2780	Cáncer de ovario	SW480	Cáncer de colon
HL-60	Leucemia	Panc-28	Cáncer de páncreas
T-47D	Cáncer de mama	HCT116	Cáncer de colon
P388	Leucemia	SF268	Cáncer de sistema nervioso
KB	Cáncer de cérvix	NC-H460	Cáncer de pulmón
LNCaP	Cáncer de próstata	PTX22	Cáncer de ovario
Col2	Cáncer de colon	LU-1	Cáncer de pulmón
A-549	Cáncer de pulmón	A8	Cáncer de ovario
NCI-ADR-RES	Cáncer de ovario	ASK	Cáncer de riñones
PANC-1	Cáncer de páncreas	SW1736	Cáncer de tiroides
HCC-2998	Cáncer de colon	K562	Leucemia
RXF 393	Cáncer de riñones	HepG2	Cáncer de hígado
UACC-62	Melanoma	H22	Cáncer de hígado
H460	Cáncer de pulmón	SMMC-7721	Cáncer de hígado
MCF-7	Cáncer de mama	Bel-7402	Cáncer de hígado
Jurkat	Leucemia	L-02	Cáncer de hígado
HeLa	Cáncer de cérvix uterino	AsPC-1	Cáncer de páncreas
K-562	Leucemia	PC-3	Cáncer de próstata
HT29	Cáncer de colon	MiaPaca-2	Cáncer de páncreas
B16F0	Melanoma en ratones	Capan2	Cáncer de páncreas
B16F10	Melanoma en ratones	Pana-1	Cáncer de páncreas
NB4	Leucemia	BxPC	Cáncer de páncreas
NCI-H187	Cáncer de pulmón	MT-2	Cáncer de Leucemia
IGROV-1	Cáncer de ovario		

CAPITULO I
OBJETIVOS E INTRODUCCIÓN

I.1 OBJETIVOS DE LA MEMORIA

El trabajo de investigación que se expone en esta Memoria se encuadra dentro del campo de los Productos Naturales en el área de Química Orgánica, por cuanto la materia prima utilizada procede de los desechos de molturación de la aceituna. En estos residuos sólidos de la industria oleica, se encuentran dos ácidos triterpénicos, los ácidos oleanólico (**AO**) y maslínico (**AM**), que se aíslan en abundancia y con relativa facilidad por métodos extractivos y cromatográficos y que constituyen el material de partida para el conjunto de reacciones semisintéticas que se desarrollan en la presente Memoria.

La relativa disponibilidad de la materia prima natural nos ha permitido manejar fácilmente un esqueleto carbonado pentacíclico con varios puntos de funcionalización sobre los que se puede actuar químicamente para lograr así una elevada diversidad en cuanto a los derivados obtenidos. Así, este esqueleto base puede ser derivatizado mediante el empleo de técnicas de síntesis orgánica en disolución y en fase sólida y reacciones orgánicas sencillas que conduzcan a la obtención de amplias librerías de compuestos que pueden ser testeados por sus potenciales actividades biológicas. Estas derivatizaciones del esqueleto triterpénico natural se fundamenta en una amplia revisión bibliográfica previa para compuestos terpénicos similares cuyos derivados han demostrado poseer actividades como agentes anticancerígenos, antivíricos, antimaláricos, etc.

Así pues el trabajo experimental proyectado en la presente Memoria tiene un objetivo global consistente en: “La derivatización de los productos naturales, ácido oleanólico y ácido maslínico, para la obtención de un amplio set de compuestos y el análisis experimental de algunas de sus potenciales actividades biológicas”.

Este objetivo global se puede desglosar en cuatro objetivos parciales de acuerdo con la labor experimental inicial que nos planteamos, a saber:

- Obtención de derivados sencillos de **AM** modificando la función presente en el anillo A y en el carboxilo de C-28 para obtener una gama de productos que nos permita verificar como influye esta funcionalidad en el potencial carácter apoptótico de los derivados obtenidos.
- Obtención de una amplia gama de derivados acilados en los hidroxilos del anillo A de **AO** y **AM**, mediante acilación en fase líquida y fase sólida que serán también evaluados por sus diferentes y potenciales actividades biológicas.

- Confirmación y puesta a punto del empleo de la técnica de Síntesis Orgánica en Fase Sólida (SOFS) para fijar los citados ácidos triterpénicos a un soporte sólido, bien directamente, o a través de un linker de aminoácido, y poder realizar sobre ellos reacciones orgánicas en condiciones poco tediosas, de buen rendimiento y fácil work-up.
- La obtención, mediante el empleo de SOFS, de una amplia librería de derivados bifuncionalizados en los dos puntos de diversidad del esqueleto triterpénico que permita realizar un testeo completo de potenciales actividades biológicas que conduzca a conclusiones interesantes sobre la relación estructura/actividad.

La presente memoria se ha estructurado de manera que abarque cada uno de los distintos bloques de objetivos por separado, sacrificando la linealidad del estudio para una mayor comprensión.

I.2 ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO. GENERALIDADES

Aunque en los últimos años ha existido un enorme progreso en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de ellos siguen presentando efectos secundarios¹, por lo que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros sigue siendo una parte importante de la investigación química y farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal continúa siendo una fuente interesante de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales (10.000 de las 300.000 especies de plantas superiores identificadas)² que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con variadas aplicaciones, de los que hasta el momento sólo ha sido investigada una pequeña parte.

De entre las distintas familias de productos naturales, los terpenos constituye la más extensa, con más de 25.000 compuestos perteneciente a esta clase³, que incluyen compuestos con actividades farmacológicas importantes, como son los esteroides, glucósidos cardíacos, saponinas y terpenos modificados. Debido a su extenso campo de aplicación, representan un grupo de suma importancia económica lo que permite que se sigan buscando e identificando nuevas estructuras.⁴

En plantas, los terpenoides intervienen en distintos procesos funcionales, como son reguladores de crecimiento vegetal (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos fotosintéticos (carotenoides y fitol), portadores de electrones (ubiquinona y plastoquinona) y componentes estructurales de membrana. Además de estas funciones metabólicas, funcionales y estructurales, muchos terpenoides intervienen en la comunicación y defensa de las plantas, como atrayentes de polinizadores o de dispersores de semillas, fitoalexinas competitivas, antibióticos y toxinas repelentes.⁵ Los terpenoides de origen vegetal representan un recurso natural renovable, y proporcionan un amplio rango de productos comerciales útiles, incluyendo, saborizantes, disolventes, fragancias, adhesivos, polímeros industriales (chicle), numerosos fármacos (artemisinina y taxol), compuestos agroalimentarios (piritrinas y

¹ Mazurek, J.; Jahnz-Rozyk, K. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. Family Med.* **2012**, 18, 34-39.

² McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. *Phytochemistry* **2007**, 68, 2015-2022.

³ Hill, R.A.; Connolly, J.D. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 780-818.

⁴ a) Devon T. K.; Scott, A. J. En *Handbook of naturally occurring compound. Terpenes*; Devon, T. K.; Scott, A. I., Eds.; Academic Press, New York, US, **1972**; Vol. 2, 125-128; b) Glasby, J. En *Encyclopedia of the terpenoids*; Glasby, J., Ed.; John Wiley & Sons, England, UK, **1982**; Vol. 3, 21-23.

⁵ Harbone, J. En *Recent advances in the ecological chemistry and biochemistry of plants terpenoids. Ecological Chemistry and biochemistry of plants terpenoids*; Harbone, J., Ed.; Oxford Clarendon Press, London, UK, **1991**; 399-426.

azaridactinas) e intermediarios sintéticos.⁶

Los terpenos se clasifican, atendiendo al número de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) que posee su esqueleto hidrocarbonado, en monoterpenos (10 carbonos, 2 unidades), sesquiterpenos (15 carbonos, 3 unidades), diterpenos (20 carbonos, 4 unidades), sesterterpenos (25 carbonos, 5 unidades), triterpenos (30 carbonos, 6 unidades) y tetraterpenos (40 carbonos, 8 unidades).

De esta forma, los triterpenos constituyen el grupo más extenso de terpenoides debido a su gran diversidad estructural y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en estado libre, como glicósidos o como ésteres, aunque también han sido hallados algunos importantes en el reino animal.⁷ Los triterpenos incluyen el escualeno, aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón y un gran número de compuestos con distinto número de anillos como el lanosterol, presente en la grasa de la lana.

⁶ a) Dawson, F. A. *J. of Naval Store Rev.* **1994**, *11*, 6-12; b) Zinkel, D. F.; Russell, J. En *Naval Stores. Production, Chemistry, Utilization*; Zinkel, D. F.; Russell, J., Eds.; Pulp Chemicals Association, New York, US, 1989; 123-142.

⁷ a) Phillips, D. R.; Rasbery, J. M.; Bartel, B.; Matsuda, S. P. T. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 305-314; b) Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-295.

I.2.1 Biogénesis de triterpenos pentacíclicos

Aunque el trabajo sobre los triterpenos comenzó en el siglo XIX, no fue hasta mediado el siglo pasado, cuando Ružička inició el estudio de su estructura. Todos los triterpenos, presentes en la naturaleza en gran variedad, tienen su origen en el escualeno, alcohol triterpénico formado por una condensación cola-cola del farnesol. Basándose en una amplia información estructural, Ružička fue capaz de racionalizar la biogénesis de terpenoides y desarrollarla (**regla biogenética del isopreno**).⁸

Los esquemas de correlación, que serán a continuación comentados, tienen su base esencialmente en esta ruta biogenética, que ha dado lugar a la publicación de un gran número de trabajos.⁹

En plantas, la biosíntesis de los compuestos terpénicos se inicia en el citosol con ácido mevalónico (ácido (*R*)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), que se forma por condensación de tres unidades de acetil-CoA.¹⁰ Posteriormente, ocurre una activación por fosforilación y descarboxilación de ácido mevalónico como indica la Figura 1.1. Se forma de esta manera pirofosfato de 3-isopentenilo, que puede isomerizar a pirofosfato de γ - γ -dimetilalilo (pirofosfato de 2-isopentenilo), y que presenta una gran reactividad en procesos de sustitución nucleofílica.

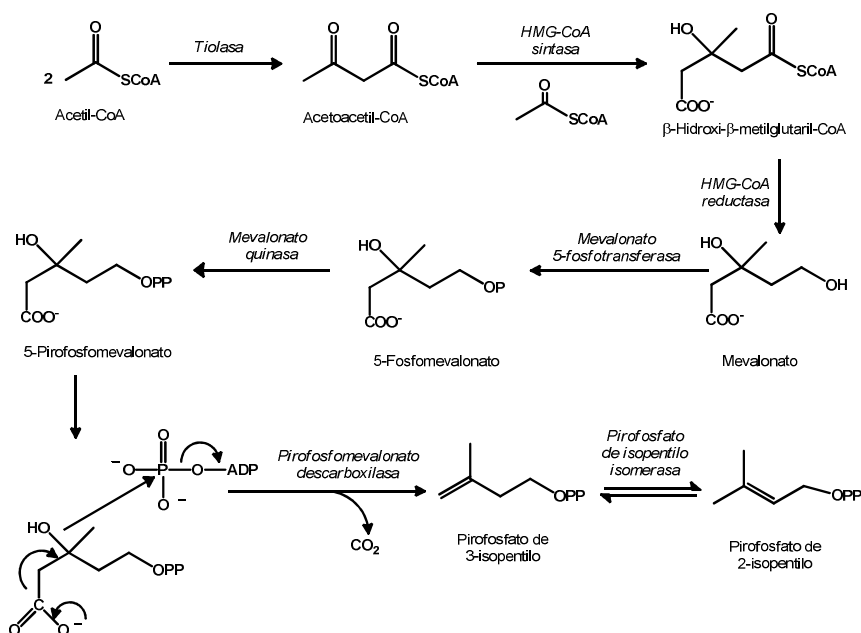


Figura 1.1. Biosíntesis de los precursores biológicos de los terpenos (pirofosfato de 3-isopentenilo y pirofosfato de 2-isopentenilo)

⁸ a) Ruzicka, L. *Experientia* **1959**, 9, 357-367; b) Eschenmoser, A.; Ruzicka, L.; Jeger, O.; Arigoni, D. *Helv. Chim. Acta* **1955**, 38, 1890-1904.

⁹ a) Simonsen, E. Q. J.; Ross, W. C. J. En *The Terpenes*; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1957**; Vol. 4-5; b) Devon, T. K.; Scott, A. I. En *Handbook of Naturally Occurring Compounds*; Academic Press, New York, US, **1972**; Vol. 2; c) Coffey, S. En *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, 2nd ed.; Coffey, S. Ed.; Elsevier, Amsterdam, NL, **1969**; Vol. 11, Part c, 406; **1971**; Vol. 11, Part e, 93; d) Overton, K. H. En *Terpenoids and Steroids. A Specialist Periodical Report*, Overton, K. H. Ed.; The Chemical Society, London, UK, **1971**, **1972**; Vol. 1-2; e) Revisiones periódicas en la revista *Natural Product Report*, Conolly, J. D.; Hill, R. A. **2003**, 20, 640-659; **2002**, 19, 494-514; **2001**, 18, 131-148; **2001**, 18, 560-579; **2000**, 17, 483-505; **1999**, 16, 221-241; **1997**, 14, 661-681; **1996**, 13, 151-171; **1995**, 12, 609-639.

¹⁰ Nakanishi, K.; Goto, T.; Ito, S.; Natori, S.; Nozoe, S. En *Natural Product Chemistry*; Nakanishi, K.; Goto, T.; Ito, S.; Natori, S.; Nozoe, S. Eds.; Kodansha Limited & Tokyo Academic Press Inc., New York, US, **1974**; Vol. 1, 411.

El doble enlace nucleófilo del pirofosfato de 3-isopentenilo, desplaza al grupo pirofosfato de 2-isopentenilo dando lugar, como se ve en la Figura 1.2., tras la pérdida de un protón, por parte del intermedio de reacción carbocatiónico, al monoterpene lineal fundamental, denominado pirofosfato de geranilo. Este monoterpene lineal, puede transformarse en los más diversos esqueletos de diez carbonos, denominados monoterpenos (geraniol, limoneno, mentol, etc.), según tenga lugar la acción de las enzimas apropiadas.

Si pirofosfato de geranilo reacciona con una nueva unidad isoprénica en forma de pirofosfato de 3-isopentenilo por la acción de geranil transferasa, se obtiene pirofosfato de farnesilo, que es la base de toda la gama de productos con quince átomos de carbono, sesquiterpenos, que presentan diferentes esqueletos carbonados (germacranos, eudesmanos, cariofilanos, etc.). Si farnesil pirofosfato reacciona de nuevo con pirofosfato de 3-isopentenilo, da lugar a pirofosfato de geranil-geraniol, intermedio que se supone precursor de los compuestos diterpénicos (kauranos, beyeranos, atisanos, etc.). El acoplamiento cabeza-cabeza de dos unidades de pirofosfato de farnesilo conduce a escualeno, con la ayuda de escualeno sintasa, a partir del que se forman los triterpenos (dammarano, lupano, oleanano, ursano, etc.) (Fig. 1.2.).

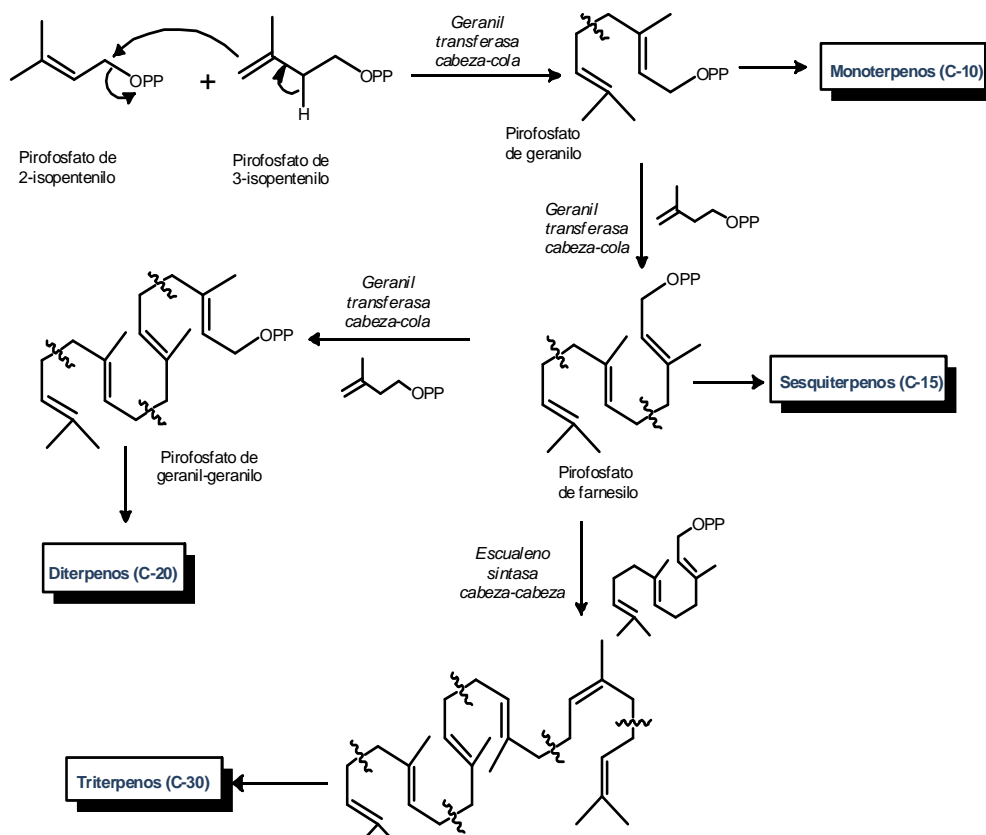


Figura 1.2. Rutas biogénicas hacia mono, sesqui, di y triterpenos a partir de sus precursores (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo)

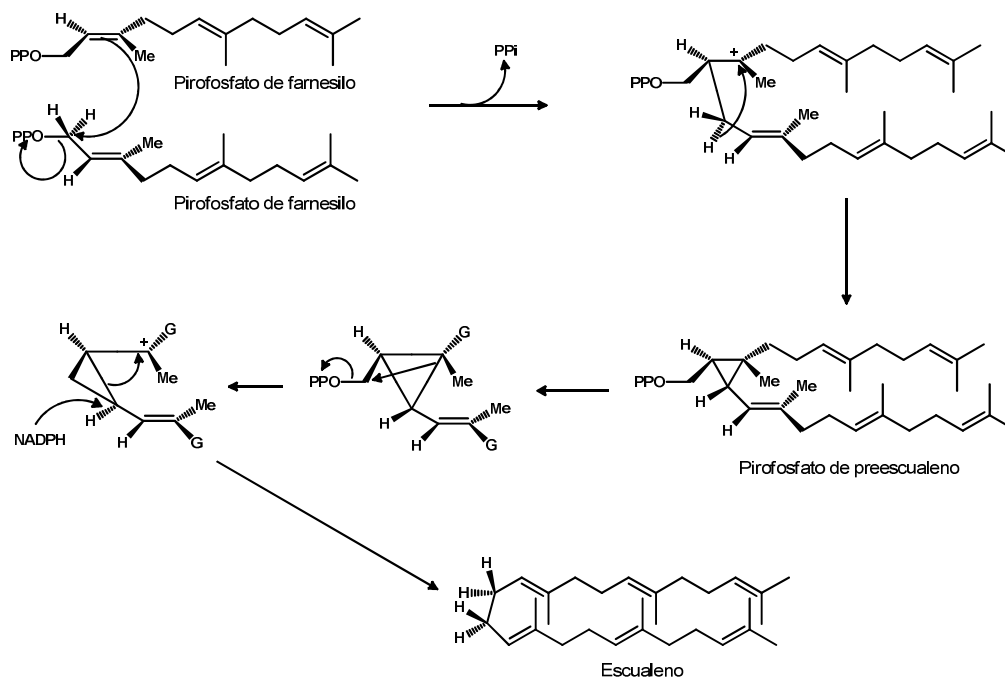


Figura 1.3. Biosíntesis del escualeno a partir de pirofosfato de farnesilo con formación intermedia de pirofosfato de preescualeno

De esta forma, y para entender el acoplamiento del pirofosfato de farnesilo, se puede ver en la Figura 1.3., como esta unión tiene lugar de forma reductora con otra molécula, formándose un pirofosfato de ciclopropilmetilo, el pirofosfato del alcohol de preescualeno, que por reordenación y reducción da lugar a escualeno.

La oxidación de uno de los dobles enlaces terminales de escualeno proporciona óxido de escualeno, que sufre una ciclación controlada por enzimas. En esta compleja reacción la cadena de escualeno debe plegarse de forma precisa como señala la Figura 1.4, (en conformación silla-silla-silla-bote) formándose un carbocatión tetracíclico con esqueleto de dammarano, que es la molécula de partida para la formación de otros triterpenos tetracíclicos. Además, mediante diferentes carbocationes generados por ciclaciones y migraciones de metilo o hidruro se obtienen también los triterpenos pentacíclicos con esqueleto de lupano, ursano, oleanano, transformaciones que pueden verse en las Figuras 1.4. y 1.5.

Existe un grupo de triterpenos pentacíclicos, donde se incluyen taraxerol, multiflorenol, glutinol y friedelina, que son sumamente interesantes debido a que estos compuestos son capaces de dar un considerable reagrupamiento esquelético en presencia de ácido, que conduce a los compuestos con esqueletos de oleanano (olean-11,13(18)-dieno, 18α -olean-12-eno y 18β -olean-12-eno, olean-13(18)-eno, β -amirina, etc.). En este sentido, se proponen en la Figura 1.6, desplazamientos de metilo y/o hidruro, protonaciones o desprotonaciones que dan lugar a la interconversión de los esqueletos triterpénicos

pentacíclicos mencionados.¹¹

Hace unos años se publicó una revisión¹² que recoge todos los mecanismos de formación del esqueleto triterpénico a través de la ciclación del escualeno, óxido de escualeno y bis-óxido de escualeno. De esta forma y ampliando lo anteriormente expuesto, puede considerarse que el óxido de escualeno es el precursor de la mayoría de los 3 β -hidroxi-triterpenoides, aunque también es plausible la ciclación del escualeno seguida de la oxidación de C-3. Por el contrario, la serie de 3-deoxi-triterpenos es generada por la ciclación en cascada catiónica del escualeno, que se diferencia del óxido de escualeno en que no intervienen ninguno de sus intermedios que causan la diversidad estructural de la serie.¹¹

Muchos triterpenoides en cambio, poseen estructuralmente un grado de oxidación mayor lo que concuerda con una posible derivación procedente de un escualeno doblemente oxidado. Consecuentemente, se ha demostrado experimentalmente que este sustrato, el bis-óxido de escualeno, puede ciclar y dar lugar a la serie de reagrupamientos conocidos en el óxido de escualeno, con la diferencia que se forma un epoxialcohol derivado que por un lado puede estabilizarse o continuar con una segunda ciclación que se inicia en el 22,23-epóxido distal al intentar estabilizar el carbocatión generado en la ciclación inicial.¹²

¹¹ a) Brownlie, G.; Spring, F. S.; Stevenson, R.; Strachan, W. S. *J. Chem. Soc.* **1956**, 2419-2427; b) Dutler, H.; Jeger, O.; Ruzicka, L. *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1268-1273; c) Corey, E. J.; Ursprung, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5041-5051; d) Lahey, F. N.; Leeding, M. V. *Proc. Chem. Soc.* **1958**, 342-343; e) Khastgir, H. N.; Sengupta, P. *Chem. Ind.* **1961**, 945, 1077; f) Beaton, J. M.; Spring, F. S.; Stevenson, R.; Stewart, J. L. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2131-2137.

¹² Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-265

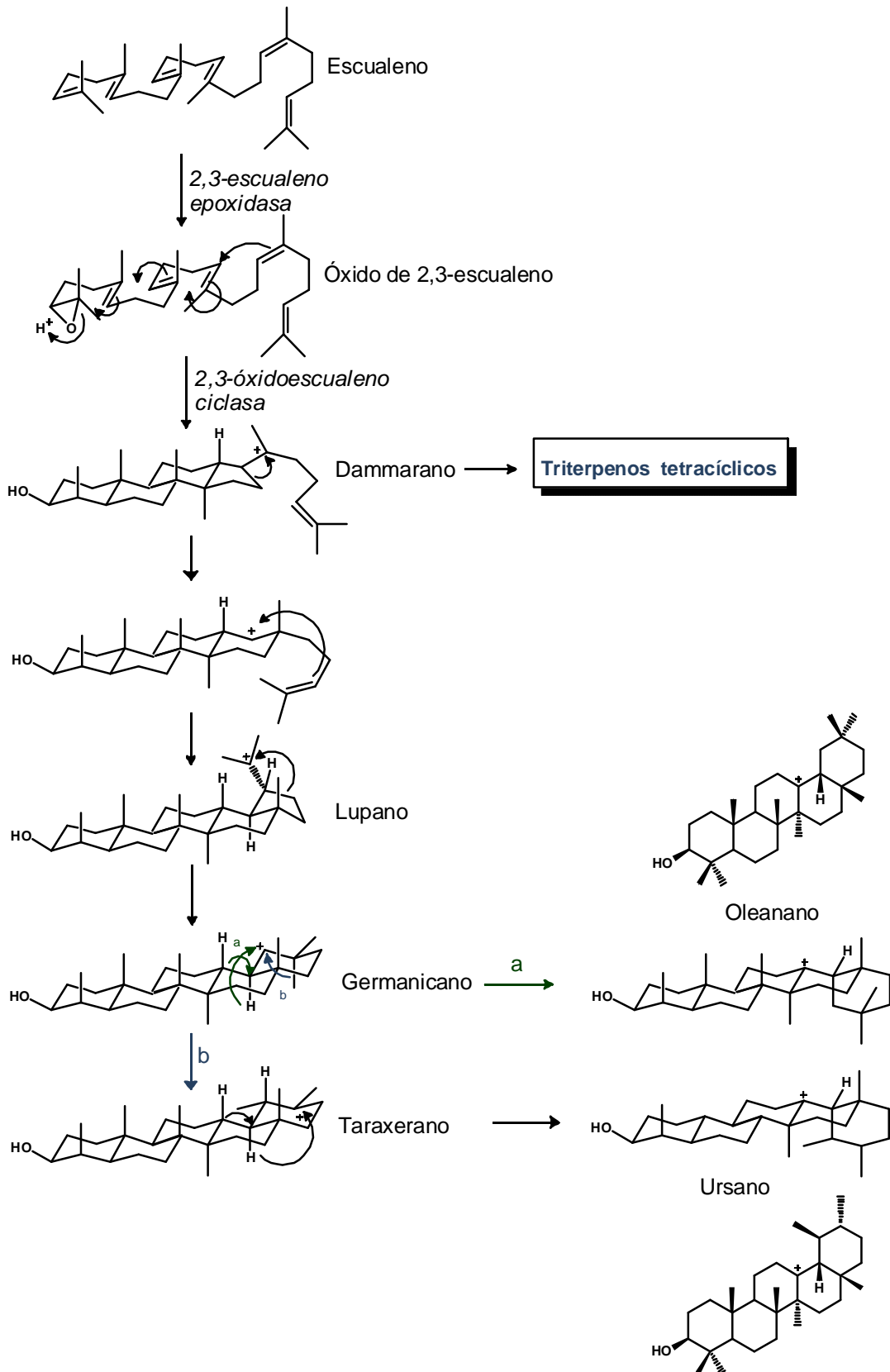


Figura 1.4. Biogénesis de triterpenos a partir de óxido de escualeno

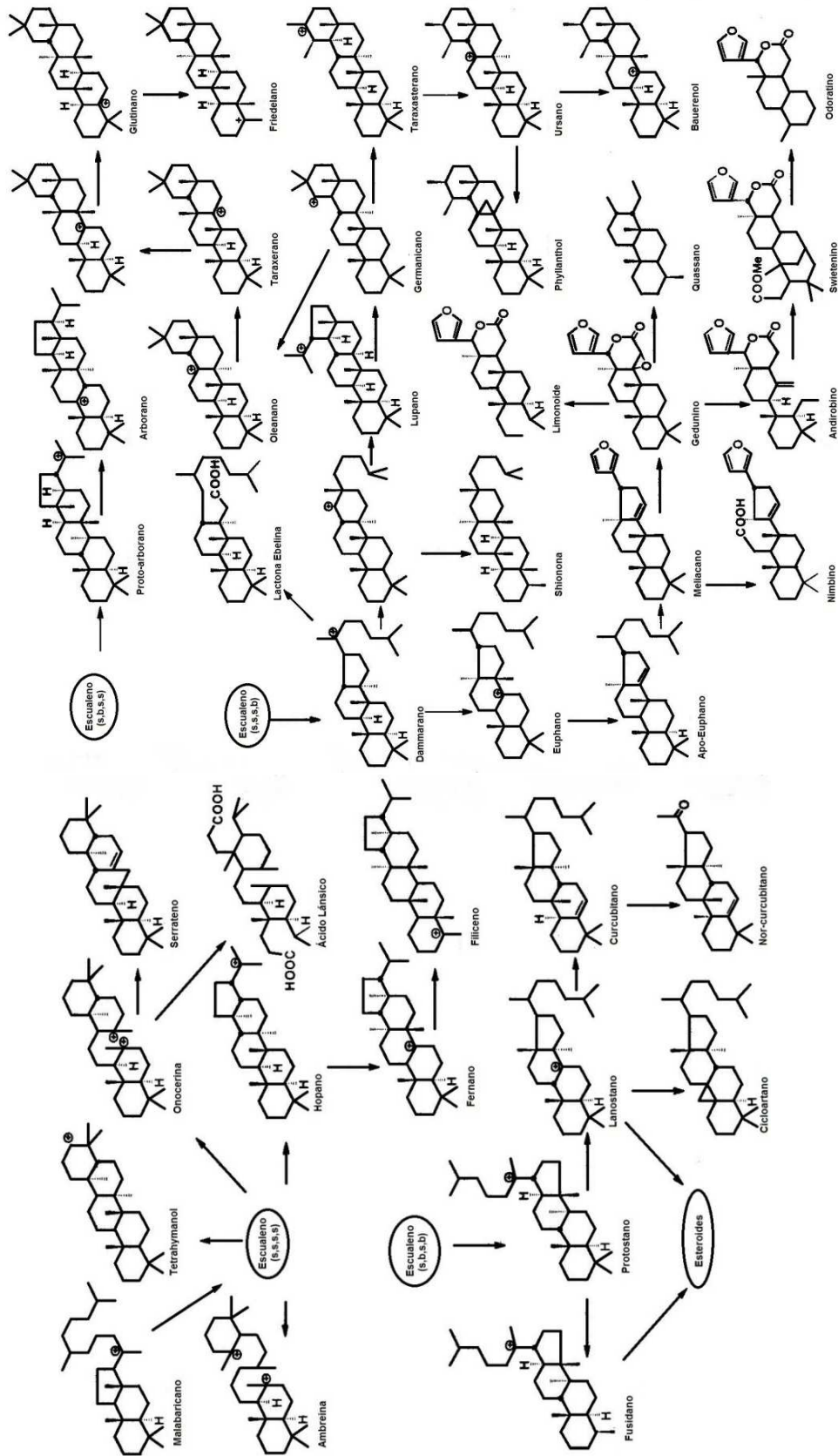


Figura 1.5. Esquema de correlación de esqueletos triterpénicos

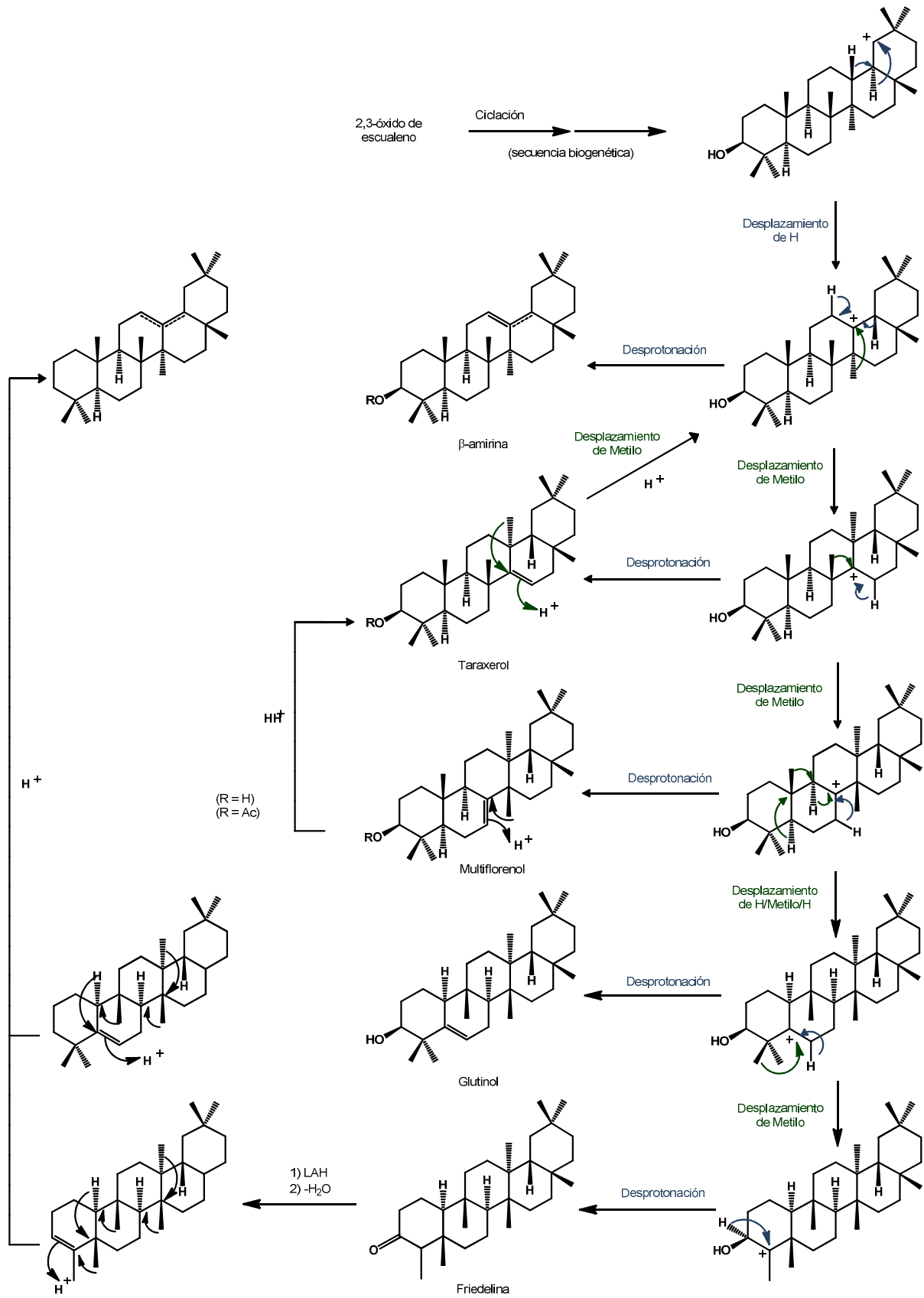


Figura 1.6. Interconversión de triterpenos pentacíclicos.

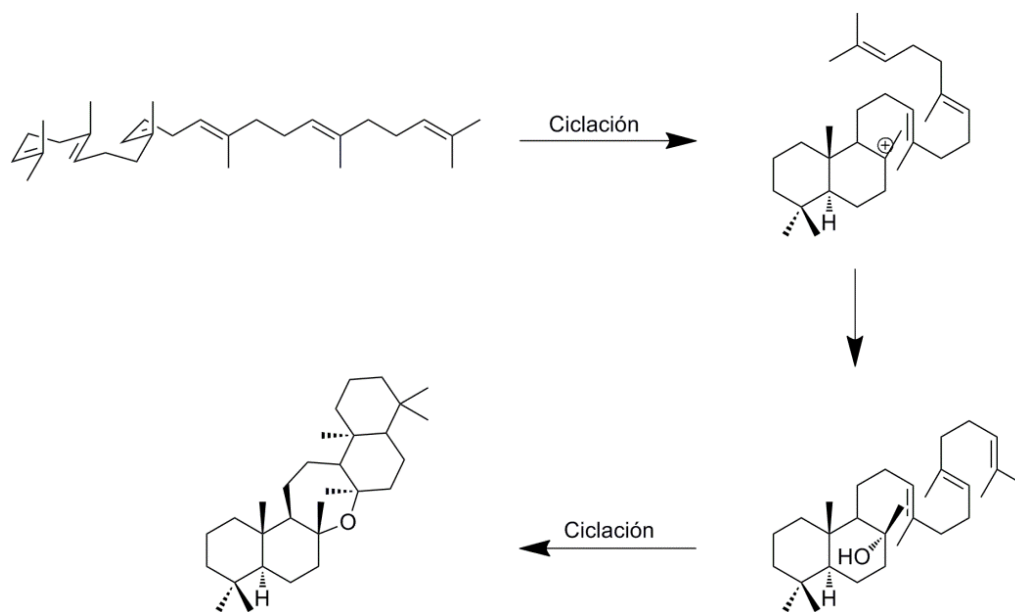


Figura 1.7. Ejemplo de ciclación directa de escualeno

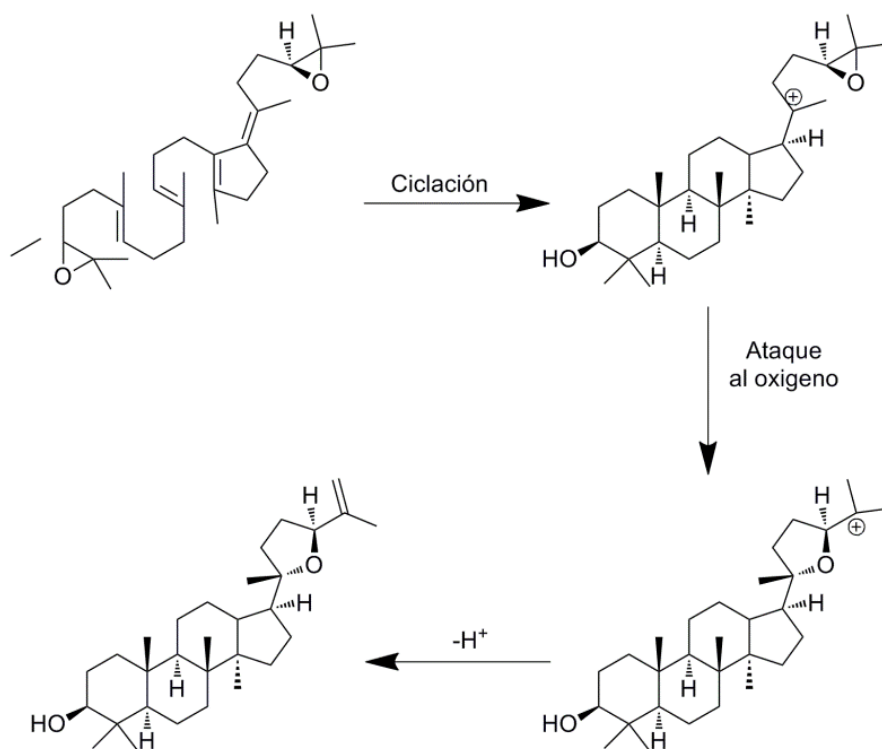


Figura 1.8. Ejemplo de ciclación a través de bis-óxido de escualeno

I.2.2 Fuentes naturales de ácido oleanólico y ácido maslínico

El trabajo que se expone en esta Memoria emplea como materia prima, ácido oleanólico y ácido maslínico, que son aislados de los residuos sólidos de la molturación de la aceituna por cualquiera de los tres procedimientos ahora empleados (prensas, continuo en dos fases y en tres fases). El método empleado para aislar y purificar estos productos a partir de la fuente natural se detallará en la Parte Experimental y se encuentra protegido por patentes nacional e internacional desarrolladas por nuestro Grupo de Investigación y titularizadas por la Universidad de Granada.¹³

Los ácidos oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-12-oleanen-28-oico, AO) y maslínico (ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-12-oleanen-28-oico, AM) (Fig. 1.9.) son dos productos naturales triterpénicos pentacíclicos con esqueleto de oleanano ampliamente repartidos en el reino vegetal^{14,15} y presentes en el orujo de la aceituna^{16,17} en cantidad considerable.

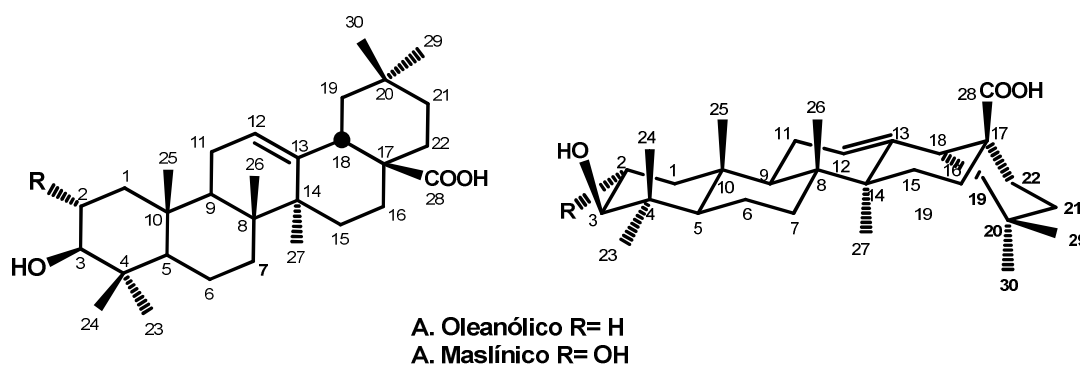


Figura 1.9. Representación plana y espacial de los ácidos oleanólico y maslínico

Aunque ácido oleanólico se comercializa principalmente procedente de los hidrolizados de ginseng, sin embargo no existen fuentes comerciales de ácido maslínico porque está mucho menos repartido. En nuestro laboratorio de investigación se obtienen en torno al 0.4% de ácido oleanólico y el 0.8% en peso de ácido maslínico a partir de los residuos sólidos secos de la industria olivarera, empleando los clásicos aparatos de extracción continua conocidos como *Soxhlet* y los procesos que más adelante se detallarán. Esto significa que por cada kilogramo de materia prima procesado se aíslan unos cuatro gramos de ácido oleanólico y unos ocho de ácido maslínico, lo que indica la inhabitual gran disponibilidad de materia prima con que contamos en este caso.

Ácido oleanólico fue aislado por primera vez en 1908 de las hojas de la aceituna por Frederick B. Power¹⁸, denominándolo oleanol. En 1924, van der Haar¹⁹ propone el cambio

¹³ Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico) y 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (ácido maslínico) contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna. Patente española P9601652. Patente internacional W098/04331.

¹⁴ Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Chapman & Hall, ISSN 0966-2146 ver.: 5.1. 1996; Oleanolic Acid, CAS (508-02-1); Maslinic Acid, CAS (4373-41-5).

¹⁵ a) Phytochemical and Ethnobotanical Database (<http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html>) Chemical: Oleanolic Acid; Chemical: Maslinic Acid;

b) Phytochemical & Ethnobotanical Search Page (<http://www.leffingwell.com/plants.htm#anchor9>)

¹⁶ Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 205-207.

¹⁷ Gil, M.; Haidour, A.; Ramos, J. L. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **1997**, *45*, 4490-4494.

¹⁸ Power, F. B.; Tutin, F. *J. Chem. Soc., Trans.* **1908**, *93*, 891-904.

de nombre a ácido oleanólico revisando su estructura. En 1931, Wedekind²⁰ aísla un triterpeno de la corteza del guaiac o guayaco (*Guaiacum officinale*), al que denomina guagenina y que Alfred Winterstein²¹ lo identifica como ácido oleanólico. De esta forma, ácido oleanólico tiene un gran número de sinónimos (oleanol, guagenina, taragenina, ácido víscico, ácido oleánico, etc.) y se encuentra libre en la naturaleza o bien formando distintos derivados (glicósidos mayoritariamente) y ha sido aislado en más de 1620 especies vegetales²², que incluyen alimentos o plantas medicinales, entre las que sobresalen el muérdago (*Viscum álbium*), el clavo (*Syzygium aromaticum*), la remolacha (*Beta vulgaris*), etc. Es especialmente predominante en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, como el olivo (*Olea europaea*) debido al cual lleva su nombre²³ y aún sigue siendo su principal fuente comercial.²⁴

En cambio, no es hasta 1960 cuando Luciano Caglioti²⁵ aisló un nuevo ácido triterpénico a partir de la pulpa de la aceituna al que denominó ácido maslínico, que resultó ser ácido cratególico, aislado anteriormente por Rudolf Tschesche²⁶, en 1951 a partir de un extracto de las hojas del espino (*Crataegus oxyacantha*). Aunque de forma menos extendida, se encuentra distribuido en la naturaleza como tal o bien en forma de éster metílico o formando distintos tipos de glicósidos. Puede aislarse además del lúpulo (*Humulus lupulus*), menta (*Mentha X rotundifolia*), el granado (*Punica granatum*), salvia (*Salvia officinalis*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y azufaifo (*Zyziphus jujuba*).

Algunos triterpenos en su forma libre, como es el caso del ácido oleanólico, suele encontrarse a menudo en la cera epicuticular de las plantas y ésta, no solo impermeabiliza la epidermis, sino que repele el agua y evita la adhesión de conidios y esporas de agentes patógenos, es decir que también constituye un medio de defensa.²⁷ De esta forma, en las hojas del olivo, el ácido oleanólico se encuentra formando casi cristales puros que forman una barrera física frente al ataque fúngico.²⁸ Sin embargo, no sólo se encuentra como ácido libre sino que también constituye el aglicón de ciertas saponinas triterpénicas uniéndose a una o a varias moléculas de azúcar.²⁹ En plantas, estas moléculas de ácido oleanólico glicoconjugadas pueden actuar como compuestos de defensa frente a herbívoros o patógenos, o como agentes alelopáticos.²¹

¹⁹ van der Haar, A. W. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1924**, *43*, 546–547.

²⁰ a) Wedekind, E.; Schicke, W. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1931**, *195*, 132-138; b) Wedekind, E.; Schicke, W. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1931**, *198*, 181-184.

²¹ Winterstein, A.; Stein, G. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1931**, *199*, 64-74.

²² a) Liu, J. *J. Ethnopharmacology* **1995**, *49*, 57-68; b) Fai, Y. M.; Tao, C. C. *Natura Proda Medica* **2009**, *2*, 77-290; c) Fukushima, E. O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muratana, T. *Plant Cell Physiology* **2011**, *52*, 2050-2061.

²³ Simonsen, J. L.; Ross, W. C. J. *The Terpenes: The Triterpenes and Their Derivatives. Hydroxy acids, Hidroxyl lactones, Hydroxyaldehído Acids, Hydroxyketo Acids and the stereochemistry of the Triterpenes*; Simonsen, J. L.; Ross, W. C. J. Eds.; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1957**; Vol. 5.

²⁴ Sporn, M. B.; Liby, K. T.; Yore, M. M.; Fu, L.; Lopchuk, J. M.; Gribble, G. W. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 537-545.

²⁵ a) Caglioti, L.; Cainelli, G.; Minutilli, F. *Classe Sci., Fis. Mat.* **1960**, *29*, 544-548; b) Caglioti, L.; Cainelli, G.; Minutilli, F. *Chimica e l'Industria* **1961**, *43*, 278.

²⁶ a) Tschesche, R.; Fugmann, R. *Chemische Berichte* **1951**, *84*, 810-26; b) Tschesche, R.; Heesch, A.; Fugmann, R. *Chemische Berichte* **1953**, *86*, 626-629.

²⁷ Heinzen, H.; de Vries, J. X.; Moyna, P.; Remberg, G.; Martínez, R.; Tietze, L. F. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 237-244.

²⁸ a) Kubo, I.; Matsumoto, A. *Cell. Mol. Life Sci.*, **1984**, *40*, 937-938; b) Kubo, I.; Matsumoto, A.; Takase, I. *J. Chem. Ecol.* **1985**, *11*, 251-263.

²⁹ a) Szakiel, A.; Grzelak, A.; Dudek, P.; Janiszowska, W. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 271-275; b) Szakiel, A.; Ruszhowski, D.; Janiszowska, W. *Phytochemistry Rev.* **2005**, *4*, 151-158.

I.2.3. Biosíntesis de ácido Oleanólico y ácido Maslínico

Como habíamos visto, la ciclación que conlleva el 2,3-óxido de escualeno forma el punto de ramificación entre la generación de los esteroides primarios y los triterpenos que conduce a la formación del ácido oleanólico. Como muestra la Figura 1.10., la biosíntesis de fitoesteroides se genera cuando el 2,3-óxido-escualeno es ciclado por la cicloartenol sintasa (CAS) y da lugar al precursor tetracíclico de todos los esteroides, el cicloartenol. Puede considerarse que la CAS, es la enzima ancestral de todas las óxido-escualeno ciclasas existentes hoy en día involucradas en el metabolismo secundario de las plantas. En la ruta biogenética del ácido oleanólico, el 2,3-óxido de escualeno se cicla al esqueleto pentacíclico de tipo oleanano, gracias a la actuación de la β -amirina sintasa (BAS), formando β -amirina.³⁰ En el paso final de la biosíntesis, β -amirina es oxidada en una secuencia de tres etapas oxidativas sobre C-28 llevadas a cabo por una enzima perteneciente al citocromo P450, identificada como CYP716A12,^{31,17} generando ácido oleanólico a través de un alcohol intermedio conocido como eritrodíol.

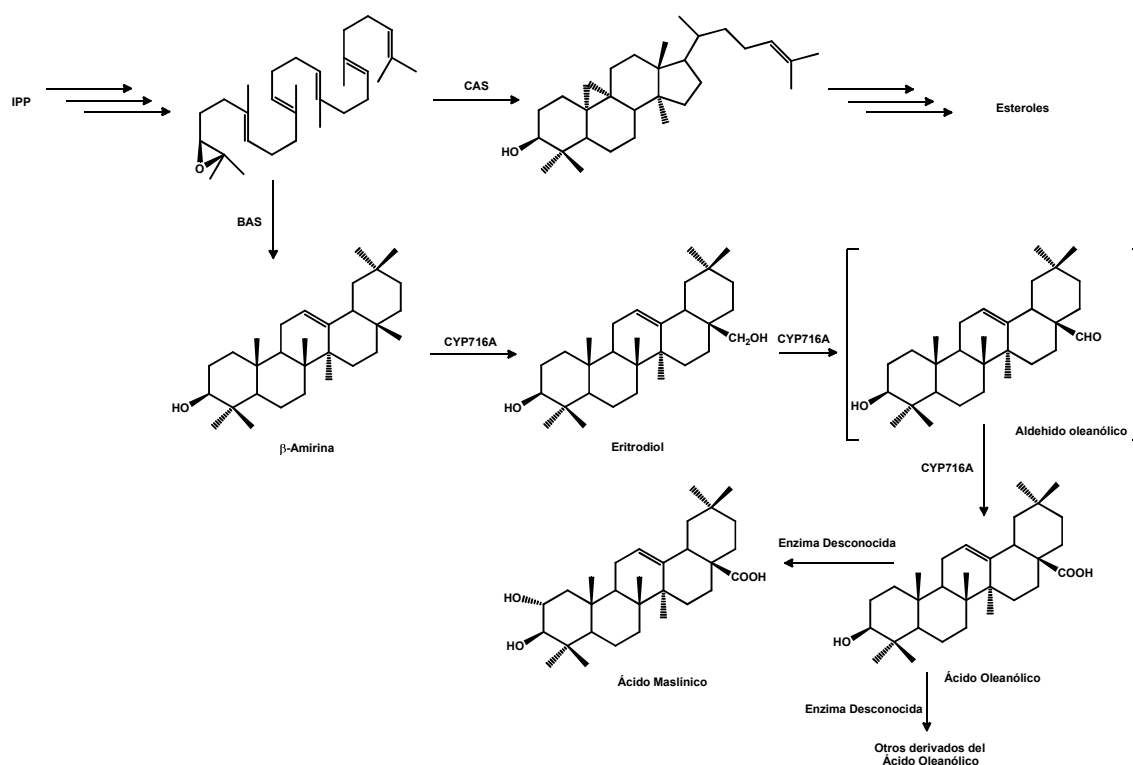


Figura 1.10. Ruta biogenética de ácido oleanólico y ácido maslínico

En cambio, la enzima o enzimas que pueden participar en la formación de otros

³⁰ a) Corey, E. J.; Matsuda, S. P. T.; Bartel, B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 11628-11632; b) Abe, I. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1311-1331; c) Kushiro, T.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 238-244.

³¹ a) Carelli, M.; Biazzi, E.; Panara, F.; Tava, A.; Scaramelli, L.; Porceddu, A.; Graham, N.; Odoardi, M.; Piano, E.; Arcioni, S.; May, S.; Scotti, C.; Calderini, O. *Plant Cell* **2011**, *23*, 3070-3081; b) d) Fukushima, E. O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muranaka, T. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 2050-2061.

derivados del propio ácido oleanólico, como es el caso del ácido maslínico, no se han discernido hoy en día.

Si se tiene en cuenta la ontogénesis del fruto, entre 12 y 18 semanas después de la floración, nos encontramos que la aceituna contiene cantidades significativas de α - y β -amirina, aproximadamente con un *ratio* de 3:2, así como varios compuestos más oxigenados con la adición de grupos hidroximetilenos o carboxílicos. Además, en el fruto inmaduro, existen únicamente cantidades muy pequeñas de triterpenos no esteroideos acilados, que representa menos del 2% de las formas libres correspondientes. Este resultado indica una metabolización casi total de las recién sintetizadas α - y β -amirina en dioles y ácidos triterpénicos, que podría tener lugar en el verde epicarpio de la aceituna que está directamente expuesto a la intensa luz del sol entre las 21 y 30 semanas de maduración. Es en este momento cuando tiene lugar la acumulación de ácido maslínico en el fruto (60% de triterpenoides totales), lo que ratifica que la hidroxilación en C-2 ocurre después de la oxidación del grupo metileno de C-28. Curiosamente, en conjunto, aunque α -amirina estaba presente en exceso en comparación con β -amirina, los compuestos de tipo oleanano se producen en mayores cantidades que los compuestos ursano. De esta forma, el eritrodioleol representa alrededor del 60% de los dialcoholes triterpénicos y los ácidos oleanólico y maslínico el 98-99% de los monohidroxi y dihidroxi-triterpenos pentacíclicos. Por lo tanto, el destino metabólico de la α -amirina en la aceituna aún no se ha dilucidado. A partir de las 30 semanas después de la floración, ocurre una disminución en la cantidad de todos los triterpenos pentacíclicos presentes en el fruto, que indica un metabolismo mayor de los mismos probablemente dirigidos a la formación de saponinas triterpénicas.³²

Además de todo esto, los avances en ingeniería genética están permitiendo la obtención de ácido oleanólico y derivados a través de la expresión de los genes biogénicos de plantas en diversas cepas como son *Escherichia coli* o levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*), lo que reduce bastante el inconveniente de la baja concentración *in planta* de estos compuestos.³³

³² Stiti, N.; Triki, S.; Hartmann, M. A. *Lipids* **2007**, *42*, 55-67.

³³ a) Pollier, J.; Moses, T.; Goossens, A. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1897-1916; b) Zhang, H.; Boghigian, B. A.; Armando, J.; Pfeifer, B. A. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 125-151.

I.3 REACTIVIDAD DE ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO

En química, la reactividad de una o más sustancias o de algún tipo de especie química en especial, es la capacidad de reacción química que presenta ante algunos reactivos o sustancias al momento de interactuar entre sí. Se puede distinguir entre la reactividad termodinámica y la reactividad cinética. La química orgánica y la química inorgánica estudian la reactividad de los distintos compuestos. En química orgánica el estudio de la reactividad de los compuestos se realiza a través de los puntos en los que se encuentran funcionalizados. Crear nuevos centros de funcionalización en las distintas moléculas es bastante complicado pero ello ayuda a aumentar la reactividad de las mismas.

Tanto en ácido oleanólico como ácido maslínico, sobre todo el primero, su reactividad química ha sido ampliamente estudiada. En el caso de ácido oleanólico se pueden distinguir tres grupos de derivados realizados. Los derivados del hidroxilo en C-3, el doble enlace entre C-12 y C-13 y el carboxilo que se encuentra en C-28. En el caso de ácido maslínico, el hidroxilo adicional en C-2 modifica considerablemente la reactividad y las propiedades químico-físicas de la molécula.

Ácido oleanólico ha sido más estudiado debido a su mayor abundancia en la naturaleza. Si se realiza un pequeño repaso de las primeras reacciones realizadas, se puede detectar la presencia de distintos acilados en C-3 interesantes³⁴, algunos de ellos por presentar actividad biológica. Su funcionalización en C-3 no sólo presenta ésteres sino que también presenta estudios de oxidaciones sobre este hidroxilo con la formación de una cetona así como derivados nitrogenados, como pueden ser amidas, oximas, nitrilos etc. Mientras que las transformaciones sufridas en C-28 se basan en la síntesis de distintos derivados glicosidados, lactonizados o reducidos del mismo ácido oleanólico.³⁵

Existen estudios recientes referidos a ambos compuestos que analizan las reactividades en los distintos anillos del esqueleto triterpénico. Uno de los puntos clave de los ácidos oleanólico y maslínico se encuentra en el anillo A, para ser más concretos, en el hidroxilo de C-3 en el caso de ácido oleanólico y los hidroxilos de C-2 y C-3 de ácido maslínico, los cuales constituyen puntos de derivatización muy importantes (Fig. 1.11.).

³⁴ Kashiwada, Y.; Nagao, T.; Hashimoto, A.; Ikeshiro, Y.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1619–1622.

³⁵ Sultana, N.; Ata, A. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, 23, 739–56.

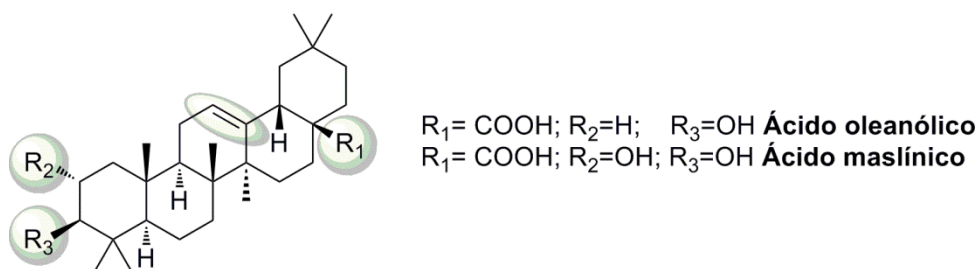


Figura 1.11. Zonas funcionalizadas de ácido oleanólico y ácido maslínico.

Nuestro grupo de investigación se ha dedicado en los últimos años a la semisíntesis de varios derivados tanto de ácido oleanólico como de ácido maslínico. Aunque existen muchos estudios y publicaciones acerca de la reactividad de triterpenos en general, nos centraremos, por razones obvias, en los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación sobre las tres regiones funcionales del esqueleto triterpénico antes citadas.

I.3.1 Reactividad del anillo A del esqueleto de oleaneno

La reactividad del anillo A de ácido oleanólico y ácido maslínico se centra en la funcionalización de los hidroxilos que se encuentran en este anillo. La mayoría de las publicaciones que se pueden encontrar acerca de las modificaciones realizadas en el anillo A se dirigen básicamente en la obtención de distintos ésteres o éteres de los triterpenos. Por tanto, se puede identificar como la reacción más comúnmente utilizada la acilación sobre estos hidroxilos, que resulta bastante interesante ya que en algunos casos es capaz de potenciar la actividad biológica respecto al triterpeno base, como ejemplo en el caso de la acetilación⁶ de ácido oleanólico. Hoy en día existen realmente una gran cantidad de derivados acilados semisintéticos a tener en cuenta que abarcan grupos halogenados, carboxilos terminales o funciones nitrogenadas (Fig. 1.12.).³⁶

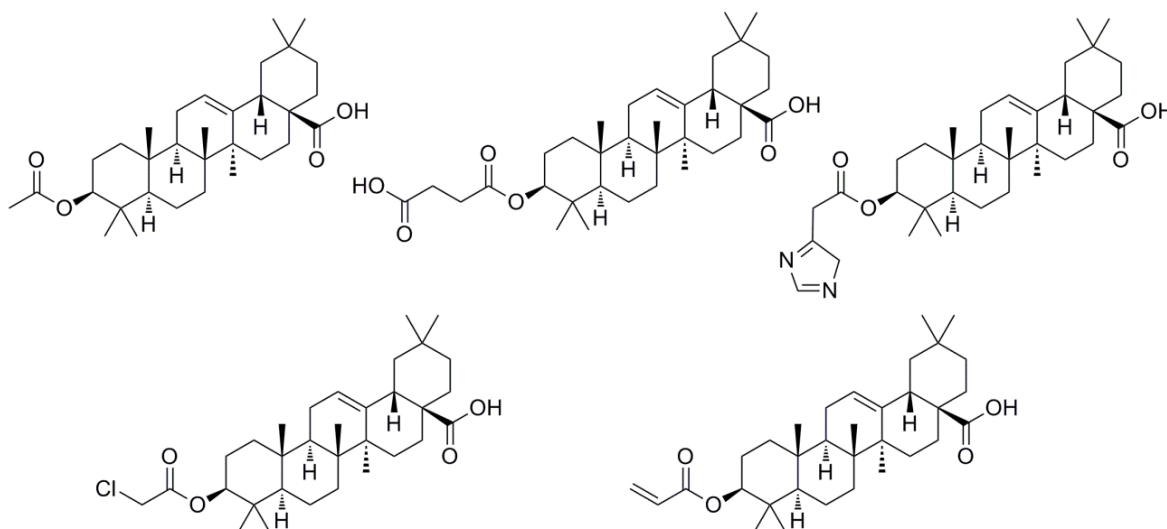


Figura 1.12. Ejemplo de derivados de ácido oleanólico en C-3.

La labor de nuestro grupo de investigación durante los últimos años respecto a la reactividad del anillo A ha llevado a por la formación de distintos derivados de ácido oleanólico y ácido maslínico. Así se puede destacar entre los más sencillos los que se encuentran formando derivados en el anillo A con grupos mesilos, tosilos así como sulfitos y sulfatos cíclicos (Fig. 1.13.), pudiendo encontrarse mono funcionalizados en el caso del ácido oleanólico como difuncionalizados en el caso de ácido maslínico.³⁷

³⁶ Hao, J.; Liu, J.; Wen, X.; Sun, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2074–7.

³⁷ García-Granados, A.; Dueñas, J.; Moliz, J. N.; Parra, A.; Pérez, F. L.; Dobado, J. A.; Molina, J. *J. Chem. Res.* **2000**, *2000*, 56–57.

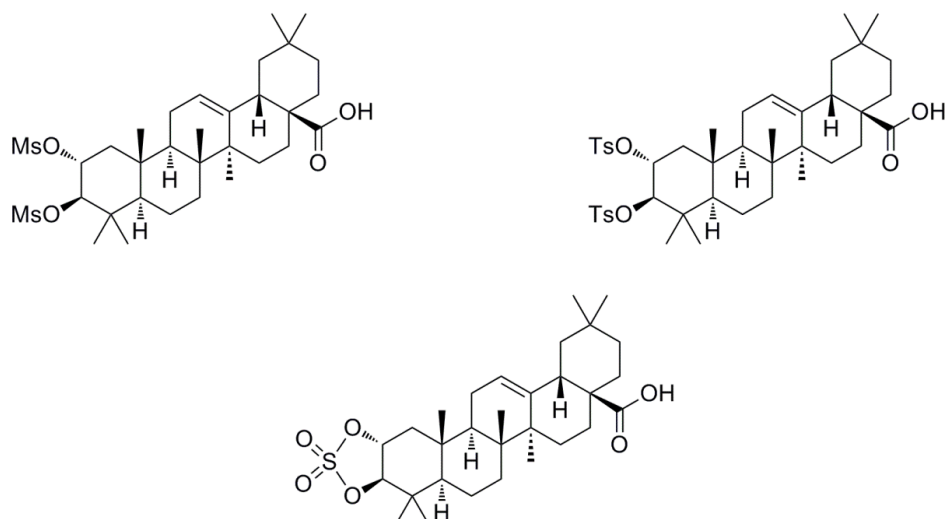


Figura 1.13. Ejemplo de derivados en C-2 y C-3 de ácido maslínico

Tras la obtención de estos derivados sencillos, los estudios realizados por nuestro grupo de investigación aumentaron en complejidad y las transformaciones en el anillo A se hicieron más importantes. El estudio de la eliminación de el/los hidroxilo/s de este anillo llevó la formación de compuestos que con diferentes tamaños de anillo y distintas insaturaciones (Fig. 1.14.).

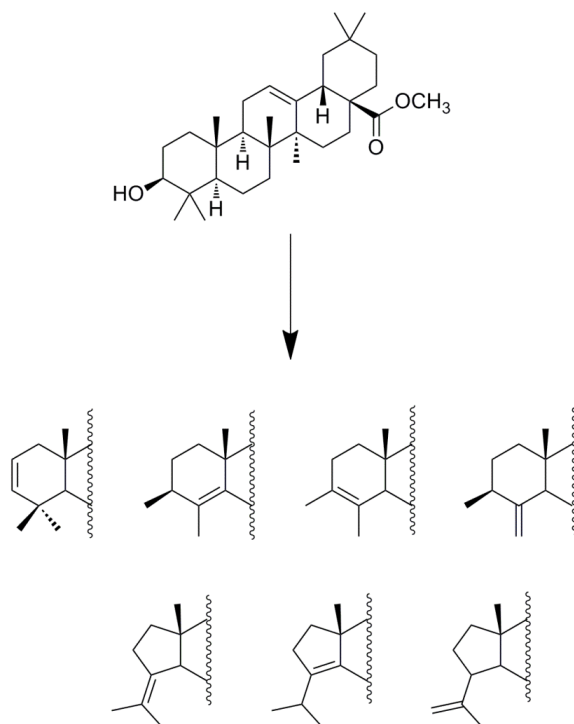


Figura 1.14. Reacciones de reagrupamiento de ácido oleanólico

Como se ha comentado anteriormente la presencia de una cetona en el C-3 también ha sido estudiada ampliamente. Existen varios triterpenos que contienen dicha función que

presentan propiedades biológicas muy interesantes³⁸. Entre estos productos oxidados en el anillo A se puede destacar CDDO³⁹ (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico), este derivado cetónico presenta dos cetonas en C-3 y C-12 y un grupo ciano en C-2 (Fig. 1.15.), aunque también se encuentran otros productos que están derivatizados con otras funciones como oximas⁴⁰, glicosidos⁴¹, etc.

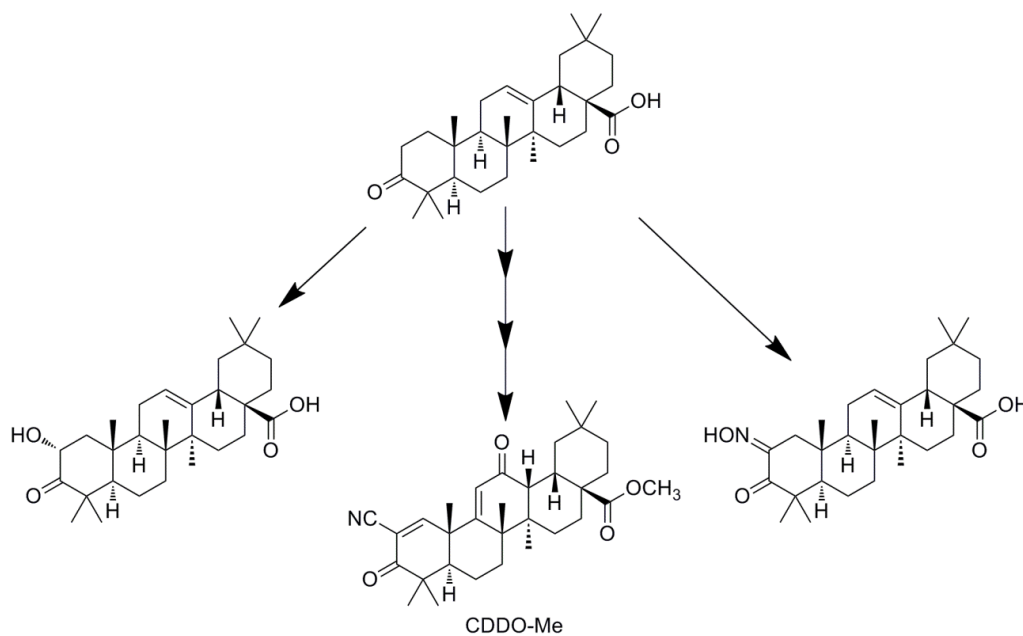


Figura 1.15. Obtención de derivados de interés biológico de AO

Aprovechando la modificación con una cetona en C-3 del anillo A nuestro grupo de investigación llevo a cabo diversos estudios con la intención de la hidroxilación remota del *gem*-dimetilo de C-4.⁴² Tras la obtención de un oxima derivado en C-3 a partir de la cetona se obtiene a través de una ciclopaladación regioselectiva la hidroxilación de este metilo, habiéndose realizado este proceso en ambos ácidos triterpénicos (Fig. 1.16.). Este producto permitió la obtención de distintos derivados acilados tanto en el hidroxilo recién formado como el que se encuentra en C-3 y/o C-2. Aprovechando los distintos intermedios que se utilizaron para llevar a cabo esta hidroxilación remota, también se obtuvieron diversos derivados del intermedio oxima que se usa en la ciclopaladación así como la síntesis de distintos derivados a través de la transformación del hidroxilo en C-4.⁴³

³⁸ Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Finlay, H. J.; Favaloro Jr., F. G.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W.; Favaloro, F. G. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4233–4246.

³⁹ Vannini, N.; Lorusso, G.; Cammarota, R.; Barberis, M.; Noonan, D. M.; Sporn, M. B.; Albin, A. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 3139–46.

⁴⁰ Zhao, H.; Zhou, M.; Duan, L.; Wang, W.; Zhang, J.; Wang, D.; Liang, X. *Molecules* **2013**, *18*, 3615–29.

⁴¹ Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 841–50.

⁴² García-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A.; Simeó, Y. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3500–9.

⁴³ Yu, F.; Wang, Q.; Zhang, Z.; Peng, Y.; Qiu, Y.; Shi, Y.; Zheng, Y.; Xiao, S.; Wang, H.; Huang, X.; Zhu, L.; Chen, K.; Zhao, C.; Zhang, C.; Yu, M.; Sun, D.; Zhang, L.; Zhou, D. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4300–19.

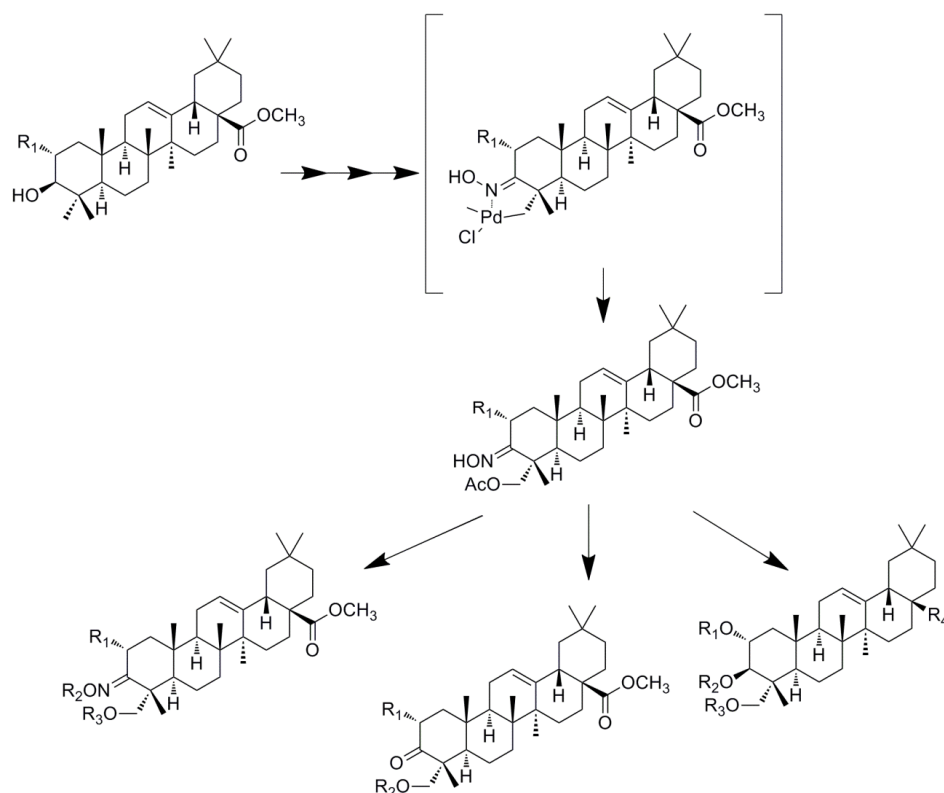


Figura 1.16. Hidroxilación remota en el metilo del C-4 de ácido oleanólico y ácido maslínico

Cabe destacar que siguiendo esta línea de hidroxilación remota, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación ha obtenido varios derivados con hidroxilaciones remotas casi imposibles vía química. Estas hidroxilaciones fueron realizadas a través de biotransformaciones del hongo *R. miehei* que sitúa la hidroxilación remota en varias posiciones del triterpeno⁴⁴, tanto de ácido oleanólico (Fig. 1.17.) como de ácido maslínico. En el caso de ácido oleanólico se ha sido capaz de hidroxilar tanto el anillo A como el anillo B, e incluso en C-30. En cambio en el caso de ácido maslínico la hidroxilación del esqueleto triterpénico no fue tan compleja.

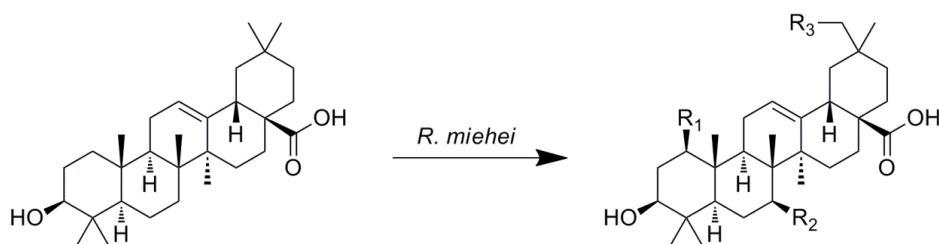


Figura 1.17. Hidroxilación remota de ácido oleanólico mediante el hongo *R. miehei*

⁴⁴ Martínez, A.; Rivas, F.; Perojil, A.; Parra, A.; García-Granados, A.; Fernández-Vivas, A. *Phytochemistry* **2013**, *94*, 229–37.

I.3.2 Reactividad del doble enlace C-12/C-13 del esqueleto de oleaneno

La reactividad del doble enlace C12/13 se encuentra poco estudiada, probablemente debido a su gran inercia química y su curiosa e inesperada respuesta a ciertos reactivos. Aunque existen estudios que muestran la reactividad de este doble enlace, la mayoría de ellos se centran en la halogenación, sobre todo con bromo, y la formación de la lactona con el ácido que se encuentra en C-28.⁴⁵ Nuestro grupo de investigación llevó a cabo varias reacciones con NBS, de ellas se obtienen varios dienos del triterpeno que puede ser funcionalizado con mayor facilidad (Fig.1.18.), pudiendo obtener incluso un cambio de tamaño de los anillos C y D pasando a anillos de 5 y 7 carbonos, respectivamente.

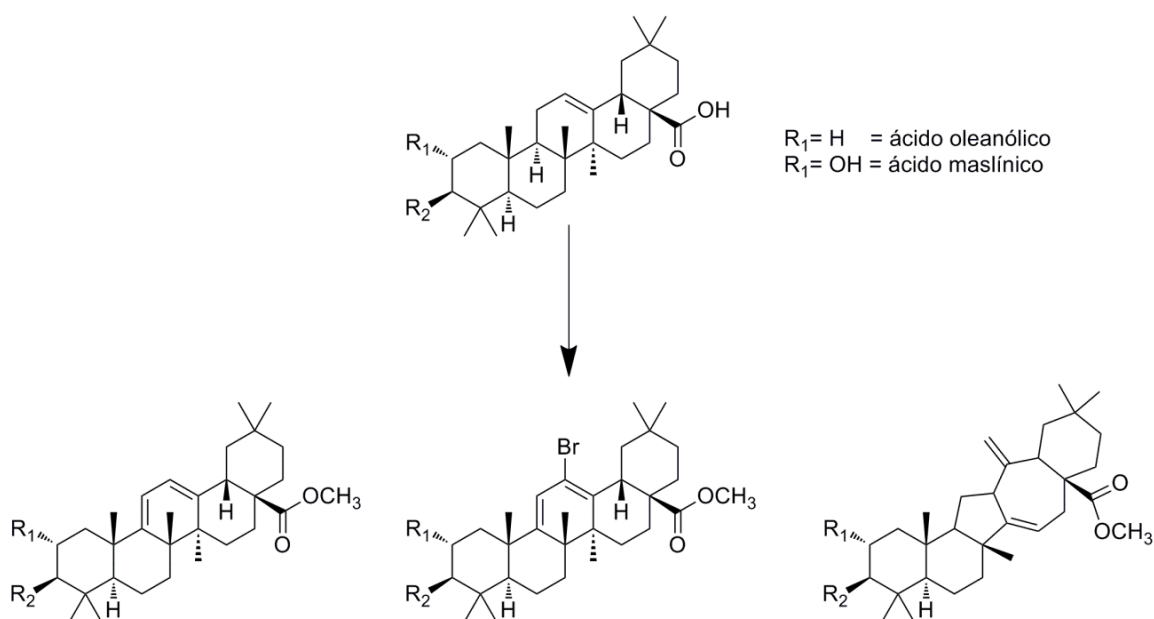


Figura 1.18. Formación de dienos de ácidos oleanólico y maslínico.

Además, diferentes procesos químicos y fotoquímicos condujeron a trienos cis y trans en los cuales el anillo C se ha roto por el enlace C-8/C-14 (Fig. 1.19.). De esta manera se formaron una serie de sistemas diénicos y triénicos intermedios con el objetivo final de fragmentar la molécula de triterpeno por el ciclo C central del esqueleto triterpénico.

⁴⁵ García-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A.; Simeó, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1491–1503.

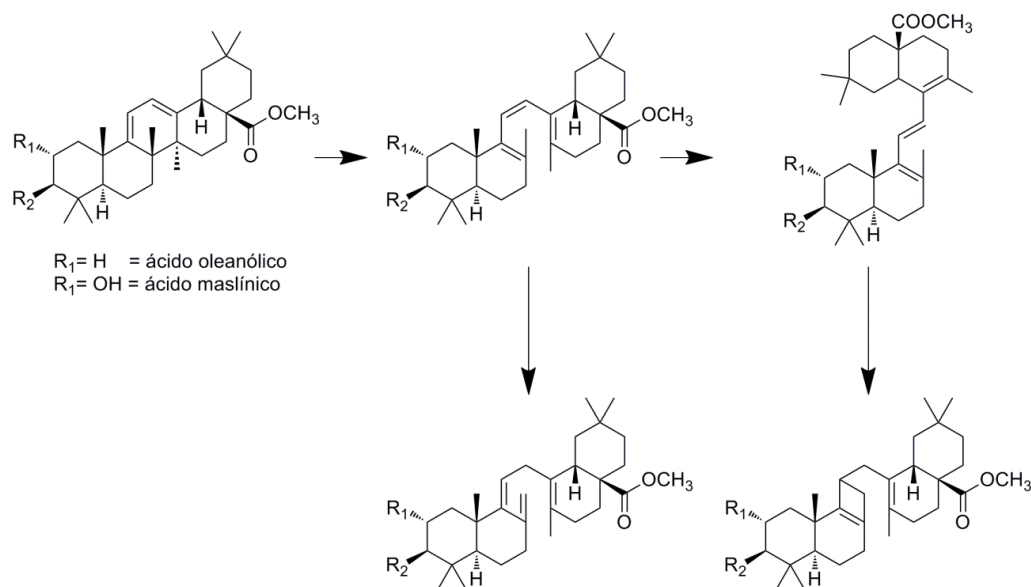


Figura 1.19. Formación de trienos de ácidos oleanólico y maslínico

Estudios posteriores de epoxidación, hidroxilación, ozonólisis, etc., condujeron a un exhaustivo estudio de la reactividad del anillo C de estos dienos y trienos⁴⁶. Posteriores procesos oxidativos del *cis*-trieno obtenido permitieron fragmentar la molécula en sintones sesquiterpénicos (Fig. 1.20.) con un gran interés en distintos campos científicos.

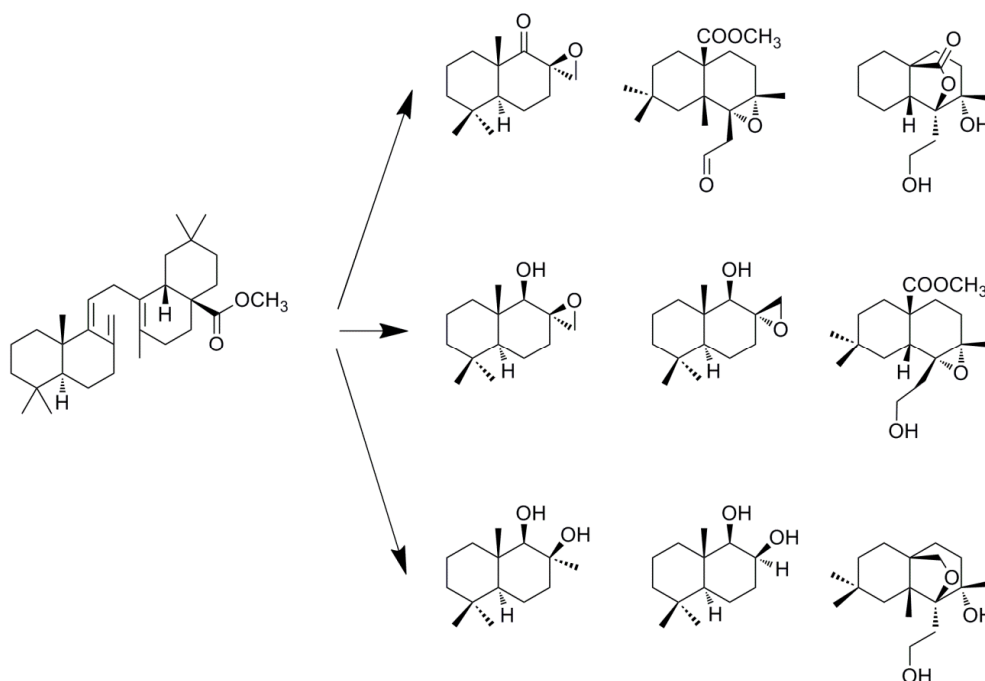


Figura 1.20. Formación de sintones sesquiterpénicos por ozonólisis de un *cis*-*exo*-trieno

⁴⁶ García-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A. A.; Simeó, Y.; Garcia-Granados, A.; Lopez, P. E.; Simeo, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3831–3845.

En cambio la oxidación de un *trans*-trieno permite la rotura de la molécula en dos fragmentos por el anillo C y obtener así una mezcla de dos sesquiterpenos (Fig. 1.21.)

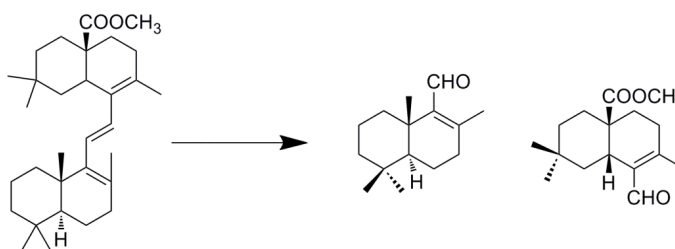


Figura 1.21. Formación de sintones sesquiterpénicos por ozonolisis de un *trans*-trieno

En este sentido, la síntesis de estos fragmentos a través de la rotura de los triterpenos por ozonolisis ha sido bastante bien estudiada⁴⁷ obteniéndose varios sesquiterpenos y algún nor-sesquiterpeno. Posteriores reacciones de estos sesquiterpenos conducen a la obtención de otros productos naturales de menor peso molecular como elengasidiol, achilleoles A y B y camelliol A. Pero más interesante resulta la obtención de sintones que están relacionadas con las estructuras de drimanos y ambra óxidos (Fig. 1.22).

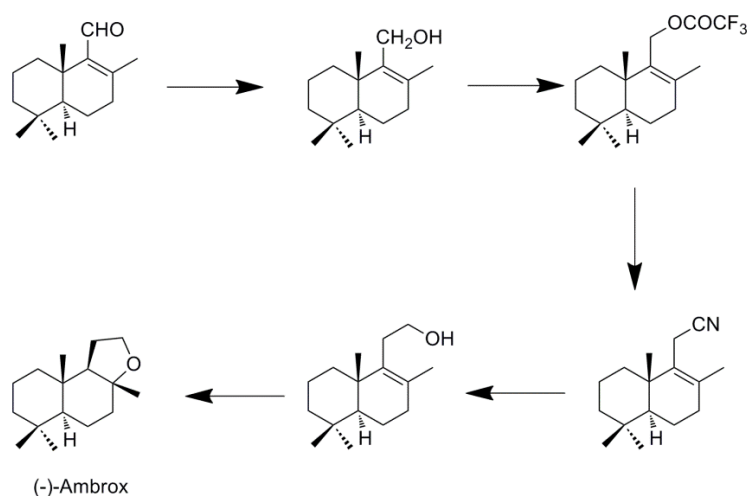


Figura 1.22. Obtención de (-)-ambrox a partir de sintones sesquiterpénicos

De todas las fragmentaciones realizadas por roturas oxidativas de los citados trienos triterpénicos se formó una gama de *cis* y *trans* decalinas, posibles precursores de otros sistemas drimánicos y fenantrénicos. Así mismo, se ha estudiado con detalle la reactividad de estos sistemas *cis* y *trans* decalínicos empleando diferentes tipos de reacciones como epoxidaciones, reducciones, deshidrataciones, etc, de las cuales se obtuvieron otros sesquiterpenos de interés.⁴⁸

⁴⁷ Parra, A.; Lopez, P. E.; Garcia-Granados, A. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 421–439.

⁴⁸ Garcia-Granados, A.; Lopez, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A. A.; Simeo, Y.; Garcia-Granados, A.; López, P. E.; Simeó, Y. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 3001–3018.

I.3.3 Reactividad del carboxilo C-28 del esqueleto de oleaneno

El grupo carboxilo en el C-28 es frecuente en la mayoría de los triterpenos, por tanto, es uno de los grupos funcionales más estudiados. Existen muchas investigaciones previas de derivatizaciones de varios triterpenos en el carboxilo de C-28, por eso no es de extrañar que en el caso de ácido oleanólico y ácido maslínico se observen derivados similares que ya han sido sintetizados para otros triterpenos. De entre todos los derivados que se encuentran en la literatura destacan diversos ésteres⁴⁹, amidas y derivados con aminoácidos⁵⁰ de estos triterpenos (Fig. 1.23.). Además, aparecen transformaciones en C-28 realizadas mediante otros procesos químicos como son reducciones a alcohol o aldehído y sucesivos derivados obtenidos a partir de estos, lo cual amplía la gama de productos que pueden ser derivatizados en el anillo A.

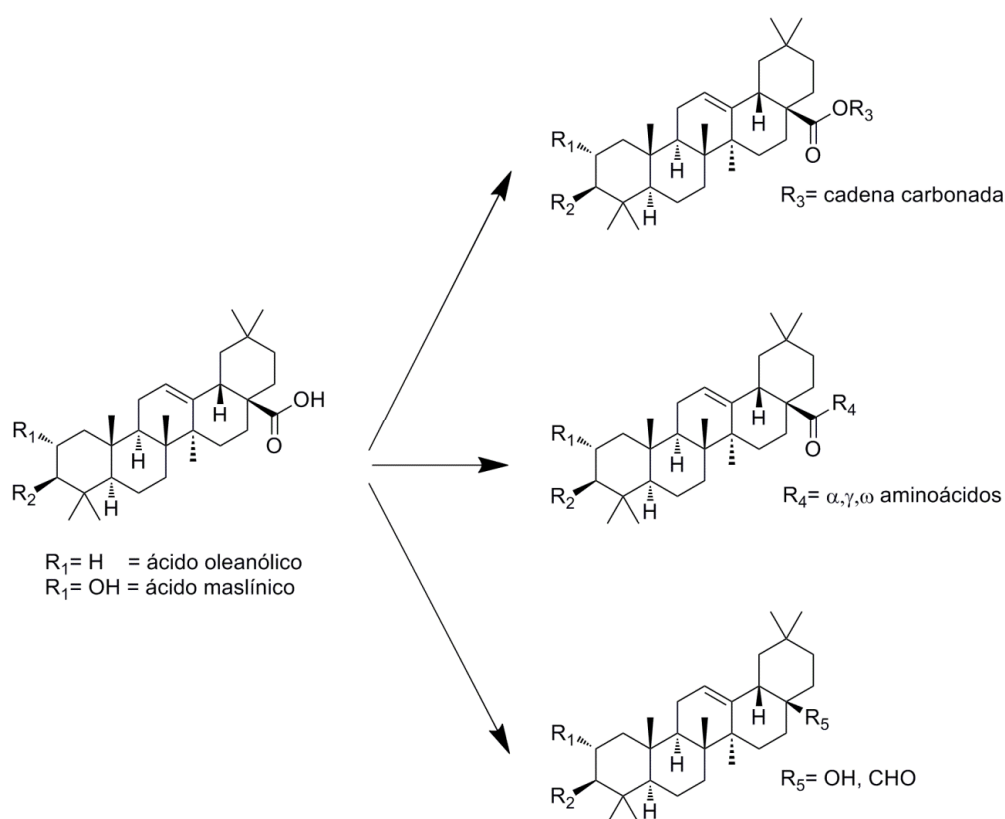


Figura 1.23. Obtención derivados en C-28 de ácidos oleanólico y maslínico.

⁴⁹ Siewert, B.; Pianowski, E.; Csuk, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70C*, 259–272.

⁵⁰ Parra, A.; Rivas, F.; Lopez, P. E.; Garcia-Granados, A.; Martinez, A.; Albericio, F.; Marquez, N.; Muñoz, E.; Munoz, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1139–45.

I.4 QUÍMICA COMBINATORIA Y SÍNTESIS ORGÁNICA EN FASE SÓLIDA

Hoy en día existe una creciente necesidad del uso de pequeñas moléculas para entender diversas funciones biológicas. Estas pequeñas moléculas ya han probado la habilidad de modular distintas macromoléculas como proteínas, ADN, ARN o carbohidratos que son los responsables de varias de las funciones biológicas más importantes en organismos vivos y son unos de los principales puntos de partida para la síntesis de fármacos bioactivos.⁵¹

Durante años se han utilizado productos de distintos esqueletos con el fin de probar su actividad biológica. En este punto cabe destacar la gran variedad de esqueletos, funciones y quiralidad que nos ofrecen los productos naturales. En los últimos años, gracias a los avances tanto en genómica como en proteómica, se están elucidando las distintas rutas e interacciones que tienen los productos naturales en el organismo. Estas nuevas técnicas combinadas con la química combinatoria y la modelización en 3D nos dirigen a lo que se llama “Diversity Oriented Synthesis, DOS” y “Biology Oriented Synthesis, BOS”. Estos procesos constituyen inestimables ayudas para la creación de bibliotecas de productos potencialmente más activos a partir de otros que ya lo eran.⁵²

I.4.1 Química Combinatoria

Los procesos químicos tradicionales son lentos, de modo que un químico suele darse por satisfecho si, al cabo de un año de trabajo, ha sido capaz de sintetizar unas pocas nuevas moléculas de interés potencial para la medicina, la industria o la agricultura. Es por esta razón que en los años 70 aparece una nueva filosofía química que es capaz de generar una gran cantidad de productos. Esta nueva forma de hacer química se denominó **QUÍMICA COMBINATORIA**. Fue el premio Nobel Bruce Merrifield quien, en 1963, desarrolló un sistema de síntesis de péptidos en condiciones coherentes y fiables de reacción mediante el empleo de una fase polimérica sólida que permitiera la separación simple entre productos y reactivos.

Se puede definir, por tanto, la **QUÍMICA COMBINATORIA** como el “conjunto de procedimientos que permiten sintetizar rápida, eficiente y simultáneamente una gran cantidad de compuestos orgánicos diferentes entre sí”, llamando a ese conjunto como

⁵¹ Mentel, M.; Breinbauer, R. In *Combinatorial Chemistry on Solid Supports*; 2007; pp. 209–241.

⁵² Nandy, J. P.; Prakesch, M.; Khadem, S.; Reddy, P. T.; Sharma, U.; Arya, P. *Chem. Rev.* **2009**.

coleccionas o biblioteca de compuestos⁵³. A diferencia de la química clásica, donde un compuesto A reacciona con un compuesto B para dar AB, la química combinatoria ofrece la posibilidad de crear una gran cantidad de combinaciones entre los compuestos A₁ al A_n con los compuestos B₁ al B_n, pudiendo obtenerse de manera individual un elevado número de compuestos en una forma paralela o en mezclas usando técnicas en fase sólida o disolución (Fig. 1.24).

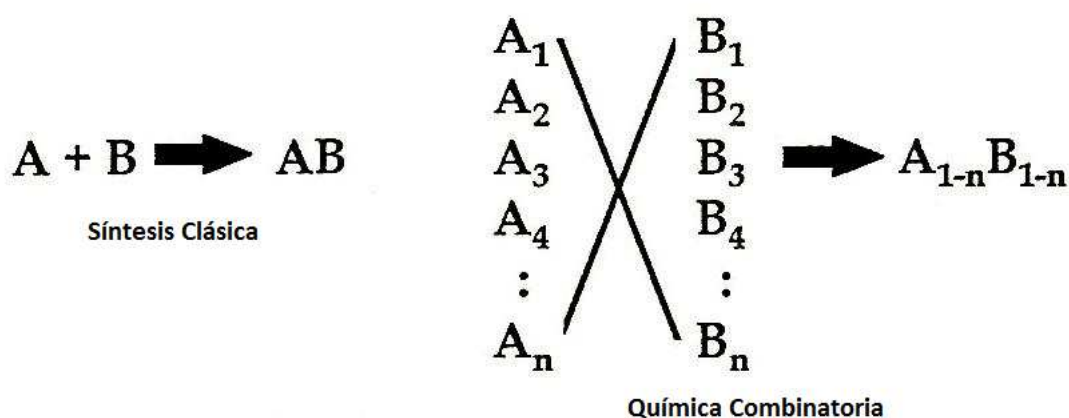


Figura 1.24. Diferencia entre química clásica y química combinatoria

La **QUÍMICA COMBINATORIA** tuvo una especial aplicación en el campo del descubrimiento de nuevos fármacos influyendo directamente en los procesos utilizados para la obtención de estos compuestos. Con esta nueva forma de operar, el primer paso integra la elección del objetivo terapéutico, una vez definido la dirección a seguir se necesita encontrar un compuesto guía con el que se consiga obtener una respuesta biológica favorable para atajar el problema y como paso final una vez obtenido e identificado el compuesto guía, se pasa por un proceso de optimización de sus propiedades a través de cambios estructurales y/o funcionales hasta obtener un candidato serio para su estudio y desarrollo.

La influencia de la **QUÍMICA COMBINATORIA** es tal que, el hecho de generar miles de productos de una forma sencilla, reduce el tiempo y el coste tanto de la búsqueda del compuesto guía como de la optimización posterior de éste. Este hecho produjo una verdadera revolución⁵⁴, denominada revolución combinatoria, que conllevaba una serie de aspectos que se discuten a continuación (Fig. 1.25.).

⁵³ a) Hughes, I. In *Drug Discovery and Development, Volume 1*; Chorghade, M. S., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 206; p. ch. 4. b) Schnur, D. M.; Beno, B. R.; Tebben, A. J.; Cavallaro, C. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *672*, 387–434. c) Abreu, P. M.; Branco, P. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 675–712. d) Baytas, S. N.; Linhardt, R. J. *ChemInform* **2004**, *35*, 27–39.

⁵⁴ Ruz, M.; Arrero, P.; Albericio. In *Combinatoria Molecular*; 2004; pp. 1–11.



Figura 1.25. Aspectos varios de la revolución combinatoria

Esta revolución combinatoria se popularizó pronto produciendo cambios muy rápidos, tanto en la forma de pensar, como en el tratamiento de varios campos de la ciencia:

- **Automatización:** El principal hecho de la revolución de la química combinatoria fue la aparición de una gran cantidad de aparatos de laboratorio que permitían la automatización total de todos los procesos de química combinatoria, pudiendo realizar síntesis con muchas etapas fácilmente.
- **Escala:** La escala de trabajo se vio radicalmente reducida ya que se sintetizaron únicamente la cantidad de productos precisa para su testeo biológico.
- **Fase sólida:** Con la aparición de la estrategia de usar un soporte polimérico sobre el cual realizar las reacciones desarrollada por Merrifield en los años 60 se potenció y ayudó a la revolución de la química combinatoria. Este proceso inicialmente pensado sólo para péptidos, se aplica hoy en día para la obtención de moléculas orgánicas en muchos laboratorios.
- **Métodos de laboratorio:** Cada vez existen técnicas más novedosas que se pueden combinar con la química combinatoria, claro ejemplo de ello son las técnicas en las que se utilizan microondas para acelerar reacciones químicas así como equipos de detección y purificación (HPLC), pudiendo llegar a adaptar técnicas como IR y RMN para la elucidación estructural.
- **Diversidad:** La posibilidad de realizar una gran variedad de reacciones en paralelo nos ayuda a obtener una gran cantidad de moléculas que difieren entre sí. La obtención de moléculas que poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas distintas

favorece directamente los procesos de obtención de fármacos. La diversidad molecular se puede dividir en una parte funcional y otra estructural.

- Interdisciplinariedad: La aparición de estas técnicas y las distintas bibliotecas de productos hizo necesaria la puesta en común entre científicos de diferentes áreas de la ciencia.
- Quimiinformática: Con el paso del tiempo y la mejora de la tecnología se ha pasado a poder realizar distintos análisis computacionales y crear bases de datos de compuestos químicos potencialmente activos y candidatos para posibles fármacos. Estas técnicas se conocen como QSAR y “*Docking*”.

Las técnicas de química combinatoria han ido perfeccionándose apareciendo dos metodologías diferentes:

1) La conocida como “Split-Mix” o “Split-Pool” síntesis, se basa en la división y reacción en sucesivas fases de varios productos. Tras sucesivas etapas de este proceso se multiplica exponencialmente la cantidad de productos obtenidos a través de este método. Al final se obtiene una mezcla compleja de productos que hay que separar y analizar (Fig. 1.26.).

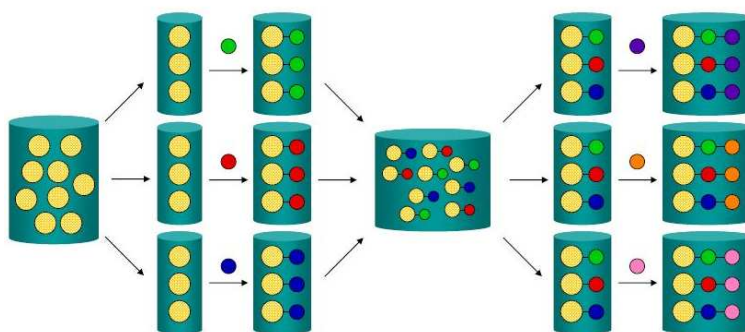


Figura 1.26. Ejemplo gráfico del método “Split-Mix”

2) La denominada “Parallel Synthesis”, este método se basa en la reacción individual de cada producto en paralelo con el fin de obtener productos cuasi puros y con una gran diversidad funcional (Fig. 1.27.).

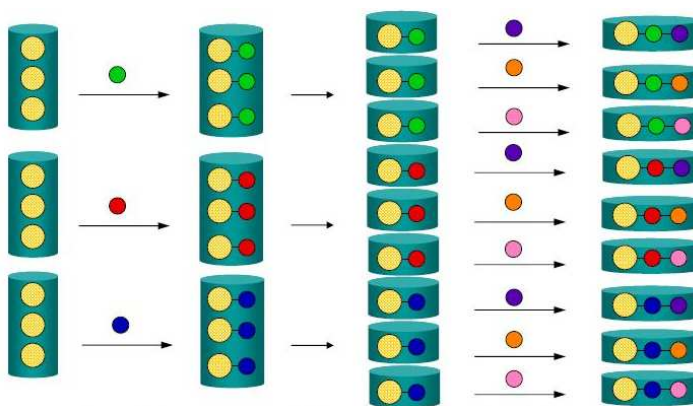


Figura 1.27. Ejemplo gráfico de síntesis en paralelo

Existen hoy en día muchos ejemplos de bibliotecas de productos sintetizados, tanto naturales como análogos que van desde unos cuantos productos a verdaderas librerías de miles de productos.

I.4.2 Síntesis Orgánica en Fase Sólida (SOFS)

Tradicionalmente la química orgánica estudia las reacciones entre sustancias disueltas en un medio líquido, en cambio en la química combinatoria lo más frecuente es que los productos estén unidos a un soporte sólido insolubles sobre el cual se realizarán las distintas reacciones. El nacimiento de la síntesis en fase sólida se debe a Robert Bruce Merrifield en el año 1963 y su principal aplicación se centraba en la síntesis de péptidos⁵⁵. Fue a partir de ahí cuando surgieron un sinnúmero de artículos con síntesis de diversos péptidos mediante SOFS. Desde entonces se llevan a cabo cientos de pruebas, tanto para comprobar que reacciones se podían dar sobre los distintos soportes sólidos⁵⁶ así como para identificar diversos linkers que se pudiesen unir a las distintas resinas⁵⁷. A medida que se avanzaba en la nueva forma de obtener péptidos de una forma efectiva iban apareciendo nuevos tipos de resinas que mejoraban los rendimientos y ayudaban a la síntesis.⁵⁸ Tras los ensayos realizados sobre la síntesis de péptidos se pasó a la síntesis de derivados de productos naturales, ya que estos productos mostraban un creciente interés por sus distintas propiedades biológicas. Dentro de este campo se investigaron todo tipo de compuestos como poliaminas, cumarinas o flavonas⁵⁹, así como distintos tipos de librerías de alcaloides⁶⁰ e incluso oligosacáridos.⁶¹

Son muchas las ventajas que nos ofrece la síntesis en fase sólida:

- Simplificación de las manipulaciones, ya que todo el proceso se puede realizar en un mismo reactor, con la consiguiente reducción de pérdidas.
- Work up simplificado, pues los excesos de reactivos y productos secundarios solubles se eliminan por simple filtración y lavado.
- La utilización de excesos de reactivo permite alcanzar excelentes rendimientos.
- Permite la utilización de disolventes difíciles.
- Permite la automatización.
- Permite la utilización de reactivos que sean incompatibles.
- Facilita algunos procesos químicos como las ciclaciones.
- Resulta muy útil para síntesis a pequeña escala.

⁵⁵ Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.

⁵⁶ Booth, S.; Hermkens, P. H. H.; Ottenheijm, H. C. J.; Rees, D. C.; Group, S. D.; Organon, N. V; Box, P. O.; Oss, B. H. **1998**, *54*, 15385–15443.

⁵⁷ James, I. W. *Tetrahedron report number 489 Linkers for Solid Phase Organic Synthesis*; 1999; Vol. 55, pp. 4855–4946.

⁵⁸ Yu, Z.; Bradley, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 347–352.

⁵⁹ a) Eifler-lima, V. L.; Graebin, C. S.; Uchoa, F. D. T. **2010**, *21*, 1401–1423. b) Dolle, R. E. **2011**, 685.

⁶⁰ a) Lee, S.; Lee, T.; Lee, Y. M.; Kim, D.; Kim, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 8422–5. b) Moura-Letts, G.; Diblasi, C. M.; Bauer, R. a; Tan, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6745–50.

⁶¹ Nicolaou, K. C.; Pfefferkorn, J. a. *Biopolymers* **2001**, *60*, 171–93.

Cabe señalar también que la SOFS no siempre es aplicable y no siempre funciona mejor que la síntesis en disolución. La principal desventaja que muestra se debe al uso de resinas. Estas resinas en muchos casos sólo funcionan a temperatura ambiente y además hay que controlar muy bien el pH del medio, siendo esta la principal razón por la cuales algunas reacciones funcionan peor en fase sólida que en disolución. Además también hay que señalar que los progresos en las reacciones químicas son más difíciles de controlar y las caracterizaciones de los intermedios no siempre es directa.

I.4.3 Librerías de productos naturales obtenidos por SOFS

Las técnicas manuales y automatizadas de síntesis en fase sólida son responsables de la rápida producción de grandes librerías de productos que pueden contener desde unas decenas de productos hasta millares de ellos. El único problema a la hora de producir un sinfín de candidatos a futuros fármacos reside en la capacidad de análisis posterior de la bioactividad de estos productos. Resulta por tanto fundamental el diseño de estas librerías. El principio básico de estas librerías es la accesibilidad y la disponibilidad de los bloques sintéticos utilizados, así como un estudio previo de la dirección o derivatización de los productos que se quieran obtener. Está claro que la cantidad de productos sintetizados no es el dato fundamental de una librería, sino más bien la diversidad de esos productos así como su semejanza a estructuras de fármacos ya conocidas. Una metodología muy útil para ello lo constituyen los procedimientos como el denominado High-Throughput Screening (HTS), es decir, el cribado farmacológico de alto rendimiento, que consiste en testear grandes colecciones de compuestos químicos o productos naturales para identificar moléculas biológicamente activas. Una librería ideal es aquella que presenta una gran diversidad estructural y tras identificar alguna estructura bioactiva será utilizado como nuevo bloque sintético, este bloque sufrirá nuevas aproximaciones a otros derivados a través de la química combinatoria.

Los productos naturales son un excelente punto de partida para la química combinatoria y tanto la construcción de moléculas complejas como el descubrimiento de nuevos análogos biológicamente activos se pueden llevar a cabo mediante esta técnica. Así, la SOFS ha sido usada para la preparación de librerías de péptidos, compuestos heterocíclicos, azúcares, ácidos nucleicos, etc. Recientemente se han iniciado métodos de trabajo para la síntesis de distintas clases de productos naturales usando métodos combinatorios ya que representan prometedoras piezas para la diversificación. En algunos de los casos, dichos compuestos son más potentes que el producto natural de partida, demostrándose que moléculas obtenidas a partir de librerías por simple modificaciones de grupos funcionales pueden incrementar alguna propiedad biológica del producto natural.

Dos estrategias son las que han aparecido en el uso de esta técnica para la síntesis de productos naturales y análogos. El primer método conlleva la construcción de todo el producto natural a partir de bloques estando unida siempre a la resina. Este proceso en la mayoría de los casos requiere la aplicación de varias reacciones por pasos que en muchos casos lleva el desarrollo de nuevos métodos sobre las distintas resinas. El segundo de los

casos se realiza uniendo a la resina un producto natural o un precursor. Esta molécula debe estar anclada a la resina a través de una función bien identificada para facilitar su posterior desanclaje. Mientras que la primera estrategia maximiza la diversidad del esqueleto del producto natural, la segunda aporta una gran diversificación a través de las funciones que ya posee el producto natural.

En el caso de la primera estrategia, se puede afirmar que el gran progreso en los métodos de SOFS ha posibilitado la síntesis de complejos esqueletos moleculares que en algunos casos no hubiesen sido posibles a través de los métodos tradicionales. Hoy en día existen ya muchos ejemplos de productos naturales o análogos de estos que han sido sintetizados mediante la síntesis orgánica en fase sólida.^{51,52}

Por tanto, se puede decir que una de las principales aplicaciones de la síntesis en fase sólida es la obtención de productos naturales que son difíciles de sintetizar⁵² y que pueden ir desde sencillos alcanos hasta complicadas moléculas orgánicas.

Como ejemplo de producto natural obtenido a través de fase sólida se puede indicar tentoxina⁶², sintetizado por uno de los laboratorios pioneros de fase sólida en España, el grupo del Dr. Albericio en el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona. Tentoxina es un tetrapéptido cíclico natural que se usa como herbicida natural. La síntesis de este péptido se realizó sobre una resina de Barlos a través de varias etapas y la consiguiente ciclación tras el desanclaje de la molécula (Fig. 1.28.).

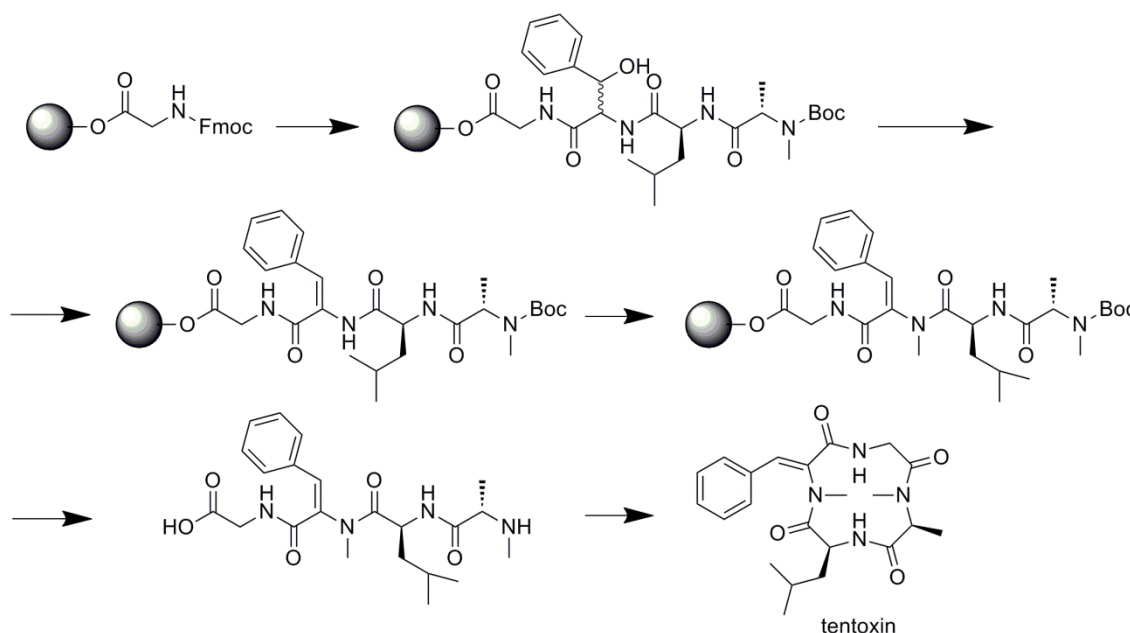


Figura 1.28. Síntesis en fase sólida de la molécula de tentoxina

⁶² Jiménez, J. C.; Chavarría, B.; López-Macià, A.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2115–8.

También existen otros casos de gran interés como es la síntesis de epothilonas⁶³ (Fig. 1.29.), una nueva clase de fármacos contra el cáncer, presentando una gran citotoxicidad en varias líneas celulares incluidas las resistentes a Taxol. Al igual que los taxanos tienen su punto de acción interfiriendo con la tubulina y se presentan mayores eficacias y menores efectos adversos que los taxanos.

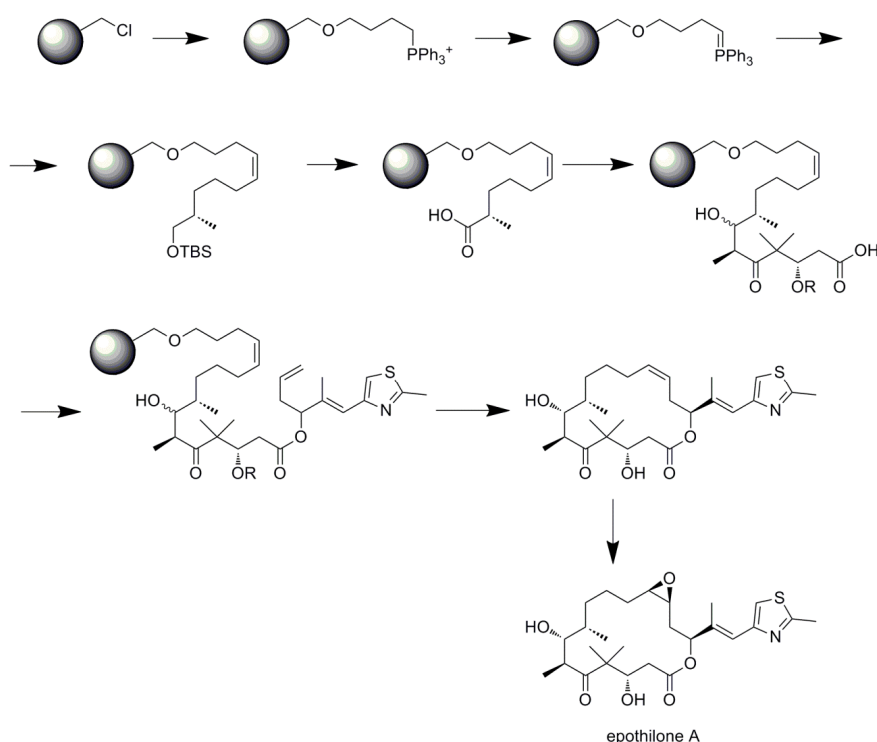


Figura 1.29. Síntesis en fase sólida de epothilona A

Pero para lo que está diseñada la SOFS es para facilitar procesos que de otra manera fuesen engorrosos y difíciles o imposibles de llevar a cabo. Se puede decir que en química orgánica una de las síntesis más complejas de productos naturales son aquellas en las que están envueltos los poliolinos, moléculas de difícil síntesis a través de métodos convencionales pues contienen varios grupos de triples enlaces conjugados. Estas moléculas presentan muchas actividades biológicas distintas. Gracias a la SOFS se consiguió desarrollar un método fácil para la obtención de poliolinos.⁶⁴ Las reacciones se realizaron sobre una resina de cloruro de 2-clorotritilo y se obtuvieron 56 productos con cadenas de distinto tamaño (Fig. 1.30) que posteriormente fueron analizados comprobándose su citotoxicidad, y obteniendo en algunos casos actividades muy prometedoras.

⁶³ Nicolaou, K. C.; Winssinger, N.; Pastor, J.; Ninkovic, S.; Sarabia, F.; He, Y.; Vourloumis, D.; Yang, Z.; Li, T.; Giannakakou, P.; Hamel, E. *Nature* **1997**, *387*, 268–72.

⁶⁴ Jonke, S.; Liu, K.-G.; Schmidt, R. R. *Chemistry* **2006**, *12*, 1274–90.

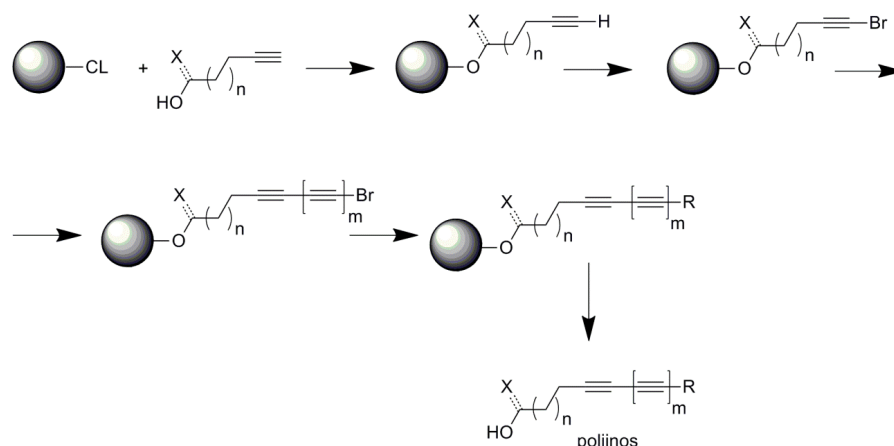


Figura 1.30. Síntesis en fase sólida de poliinos

La SOFS se utilizó también en la creación de una librería de 190 miembros de alcaloides/terpenos⁶⁵ y en este caso se realizan sobre la resina reacciones de ciclo adiciones y ciclaciones mediadas a través de un metal de transición. Se utilizaron como sustratos productos que contenían una mayor diversidad y complejidad estereoquímica que los productos naturales análogos. Otra de las aplicaciones de la fase sólida puede ser la creación de oligosacáridos de una forma sencilla.⁶⁶ La creación de distintos oligosacáridos de distintos tamaños se facilita con el uso de una resina Merrifield y distintos grupos protectores que ayudaran a sintetizar la cadena que se desee (Fig. 1.31.).

Dentro de la estrategia que usa la derivatización de un producto natural para mejorar sus propiedades biológicas, existen también varios casos muy significativos como es el caso del uso del isoprenoide farnesil difosfato en fase sólida⁶⁷. Se utilizó para obtener 80 derivados utilizando una resina Merrifield llevando a cabo sobre ella tres reacciones diferentes, aminación reductiva, bromación y fosforilación (Fig. 1.32.).

Pero a medida que la técnica se iba perfeccionando se han utilizado moléculas cada vez más complejas como es squalamina⁶⁸, que ha demostrado ser un antibiótico soluble en agua y con un poder antibacteriano contra Gram positivo y Gram negativo. Para la síntesis de cerca de 20 derivados de este compuesto, se usó un linker en forma de amina (Fig 1.33.) y se estudiaron sus propiedades para compararlas con las del producto de partida.

⁶⁵ Moura-Letts, G.; Diblasi, C. M.; Bauer, R. a; Tan, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6745–50.

⁶⁶ Weishaupt, M.; Eller, S.; Seeberger, P. H. *Methods Enzymol.* **2010**, *478*, 463–84.

⁶⁷ Subramanian, T.; Wang, Z.; Troutman, J. M.; Andres, D. A.; Spielmann, H. P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2109–12.

⁶⁸ Chitkul, B.; Atrash, B.; Bradley, M. *Tetrahedron Letters*, **2001**, *42*, 6211–6214.

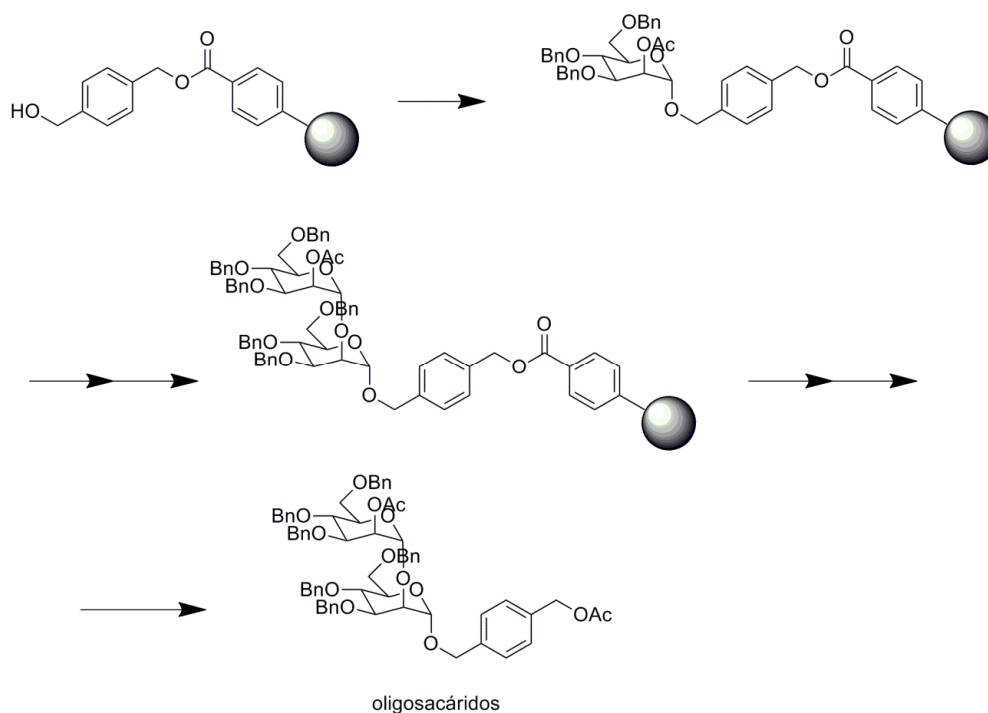


Figura 1.31. Síntesis en fase sólida de oligosacáridos

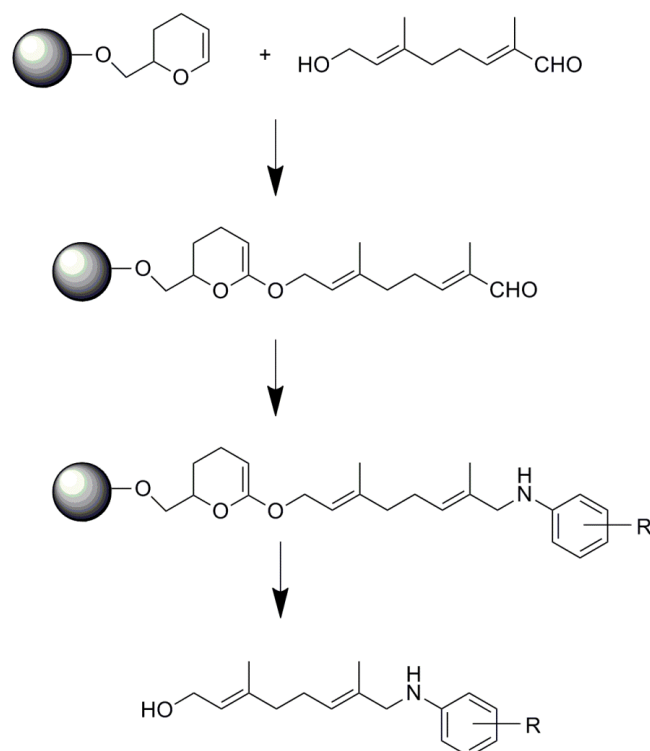


Figura 1.32. Síntesis en fase sólida de derivados del isoprenoide farnesil difosfato

Se puede señalar como claro ejemplo del uso de la SOFS la derivatización de productos de reconocida actividad biológica como el taxol, que ha sido estudiado en fase sólida para la formación de varios 10-acil- y 7,10-diacilderivados⁶⁹ obteniéndose 24 derivados acilados del mismo (Fig. 1.34.). Tras la obtención de estos derivados se usaron en ensayos de citotoxicidad con la línea celular A2780, cáncer de ovario y en algunos casos se consiguió aumentar la citotoxicidad respecto del taxol, demostrando esta técnica una forma sencilla y eficaz de obtener productos mejorados de precursores de alto interés.

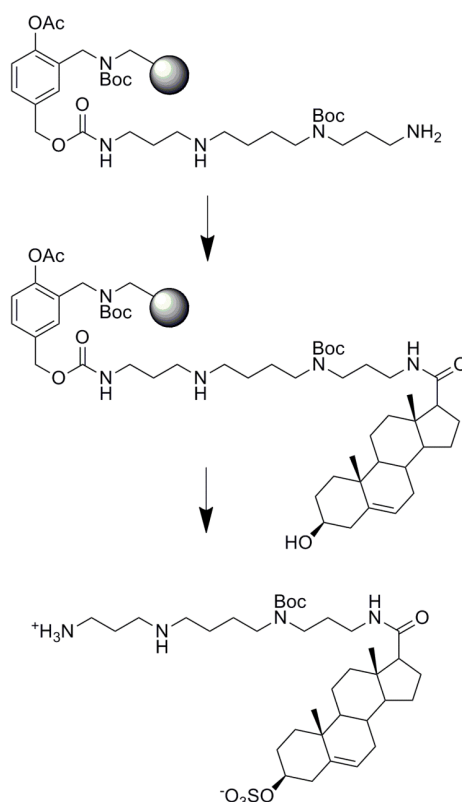


Figura 1.33. Formación de derivados de squalamina mediante SOFS.

En el campo de los esteroides⁷⁰ se han realizado varios intentos de formación de librerías mediante SOFS. Uno de los últimos estudios presentados nos muestra una biblioteca de productos de más de 200 compuestos con diversos puntos de diversificación (Fig. 1.35.). Tras la síntesis de estos amino-derivados de los esteroides, se analizaron sus propiedades citotóxicas en la línea celular HL-60, observando que seis de estos productos resultaron mostrar una actividad bastante interesante.

⁶⁹ Jagtap, P. G.; Baloglu, E.; Barron, D. M.; Bane, S.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1136–1142.

⁷⁰ Roy, J.; Maltais, R.; Jegham, H.; Poirier, D. *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 317–39.

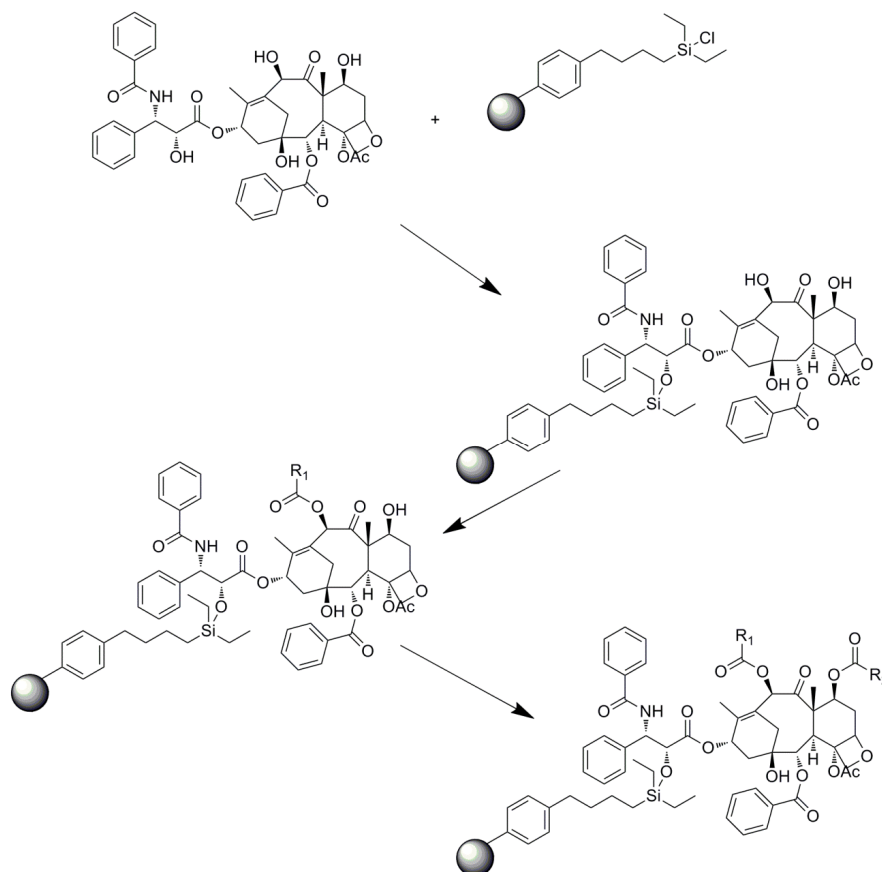


Figura 1.34. Síntesis de derivados de taxol mediante SOFS

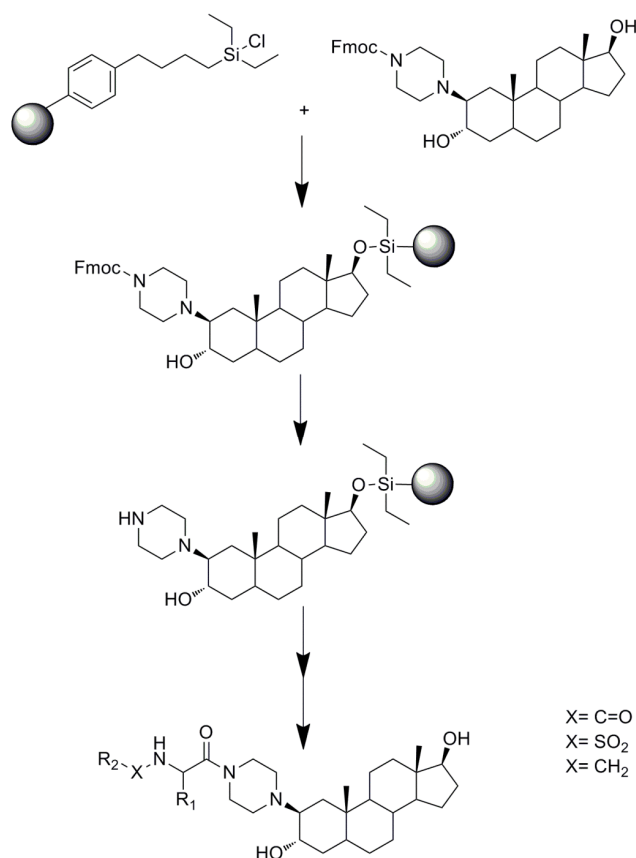


Figura 1.35. Síntesis en fase sólida de derivados de esteroides

Gracias al camino abierto por Merrifield, demostrando la facilidad de formar oligopéptidos (mono-, di-, tri-, etc. péptidos), estos se usaron en síntesis mixtas con otras moléculas, por ejemplo con el estradiol⁷¹, que es un diterpeno que forma parte del abanico de las hormonas femeninas. En el proceso se usó una resina aminometil unida con un linker o-nitrobenzilo sobre el que se acopló el estradiol y se hicieron posteriores reacciones con distintos aminoácidos, acil cloruros y anhídridos (Fig. 1.36.). Los derivados sintetizados han sido usados posteriormente para comprobar la citotoxicidad en la línea celular T-47D.

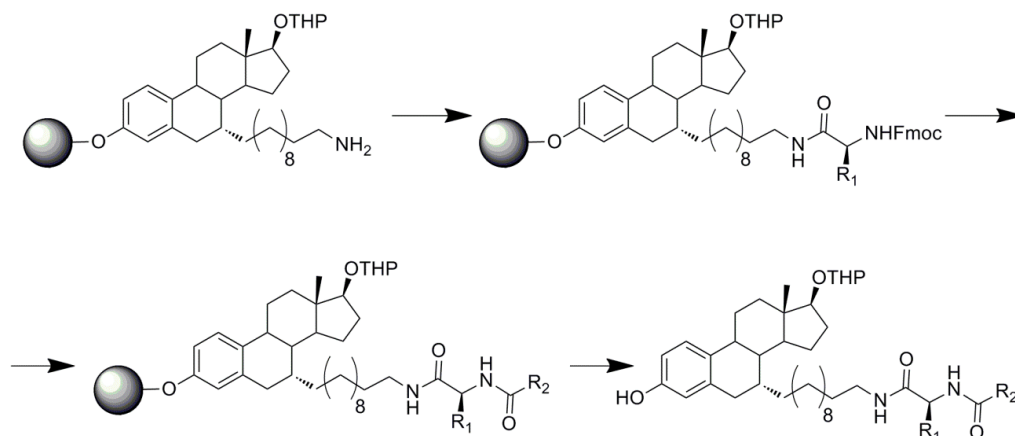


Figura 1.36. Síntesis en fase sólida de derivados peptídicos de estradiol

Aunque existen pocos estudios utilizando la SOFS con triterpenos, dos de estos triterpenos son ácido oleanólico y ácido maslínico. Uno de los primeros usos en fase sólida de este triterpeno se remonta a la formación de un derivado de la molécula kahalalide F⁷², depsipeptido cíclico que presenta una potente actividad anticancerígena. La síntesis de este péptido fue realizado completamente en fase sólida añadiendo en cada paso un aminoácido y realizando la ciclación una vez desanclado de la resina, pero previamente se realizó la derivatización con los dos triterpenos ácido oleanólico y ácido maslínico (Fig. 1.37.).

En los últimos años AM esta demostrando tener un gran potencial y fue usado para aumentar su actividad anti-VIH³⁷ mediante la derivatización en C-28. En este sentido, se semisintetizaron diversos derivados peptídicos sobre una resina Barlos, concretamente se realizaron 12 derivados mono-peptídicos, 10 dipeptídicos y un tripéptido (Fig. 1.38.). Una vez obtenido estos derivados se realizaron ensayos anti-VIH para cada uno de ellos sobre células MT-2 infectadas resultando que algunos de los derivados presentaron actividad anti-VIH contra VIH-1. Los derivados que presentaron actividad son los que habían sido derivatizados con un ω -aminoácido, concretamente el ácido 11-aminoundecanoico en uno de los casos y en el otro el 11-aminoundecanoico unido a la valina.

⁷¹ Tremblay, M. R.; Simard, J.; Poirier, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2827–2832.

⁷² Lopez, P. E.; Isidro-Llobet, A.; Gracia, C.; Cruz, L. J.; Garcia-Granados, A.; Parra, A. A.; Alvarez, M.; Albericio, F.; López, P. E.; García-Granados, A.; Álvarez, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7737–7741.

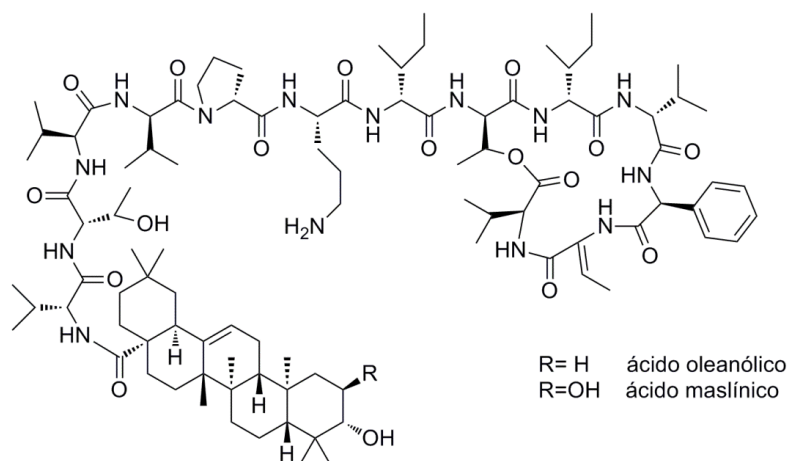


Figura 1.37. Derivados de kahalalide F con ácido oleanólico y ácido maslínico

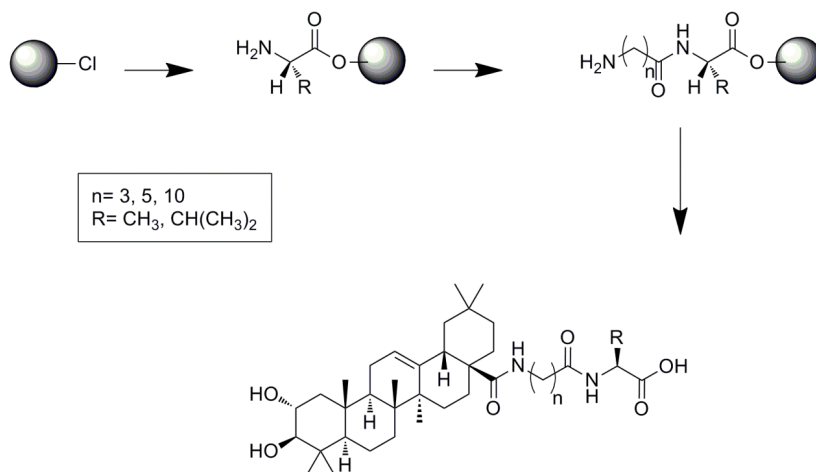


Figura 1.38. SOFS de derivados peptídicos de ácido maslínico

Pero el uso de SOFS en triterpenos comenzó mucho antes, uno de los primeros estudios se llevó a cabo sobre lupeol, este triterpeno ya había demostrado tener un poder antiinflamatorio, urolítico y anti-malárico, permitió la automatización del proceso y condujo a derivados con actividad anti-malárica⁷³ mejorada. El lupeol fue fijado a una resina Rink con un grupo amina como grupo anclador y tras varias reacciones los productos obtenidos (Fig. 1.39.), en torno a 50, eran básicamente amido-derivados del lupeol realizándose sobre ellos ensayos de actividad anti-malárica *in vitro* e *in vivo* llegando, en algunos casos, a mejorar la actividad 9 ó 10 veces.

⁷³ Srinivasan, T.; Srivastava, G. .; Pathak, A.; Batra, S.; Raj, K.; Singh, K.; Puri, S. .; Kundu, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**, 12, 2803–2806.

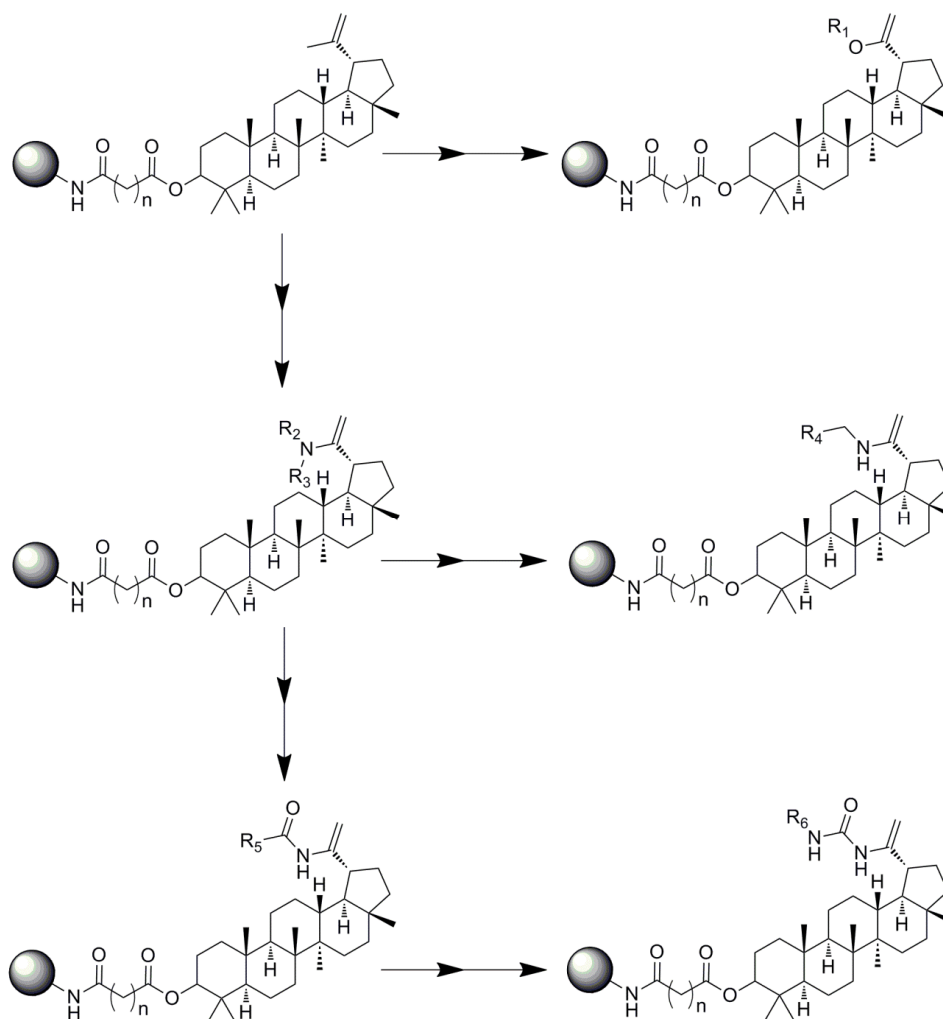


Figura 1.39. Formación de una librería de derivados de lupeol

Es lógico pensar que el triterpeno más común, ácido betulínico, haya sido también estudiado en SOFS. Por tanto, se encuentra algún trabajo protagonizado por este triterpeno y el ácido ursólico.⁷⁴ En este caso se semisintetizaron 18 derivados de cada uno de los ácidos triterpénicos usando la resina Barlos, obteniéndose productos derivados tanto en el C-3 como en el C-28 con aminoácidos pequeños y ácidos carboxílicos. A los derivados formados se le realizaron ensayos contra *P. falciparum in vitro*, encontrando que cuatro de estos derivados resultaron ser 5 veces más potentes que los ácidos precursores con una IC_{50} de 10 μ M.

Uno de los últimos estudios de SOFS realizados es sobre otro triterpeno de gran interés biológico, ácido oleanólico.⁷⁵ En él se describe la utilización de un polietilenglicol con un amino terminal como linker unido a la resina de cloruro de 2-clorotritilo (Fig. 1.40.). Con la ayuda del linker se formaron cerca de 20 derivados en C-3 y otros en C-3 y C-28, gracias, a

⁷⁴ Pathak, a; Singh, S. K.; Biabani, M. a F.; Kulshreshtha, D. K.; Puri, S. K.; Srivastava, S.; Kundu, B. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2002**, 5, 241–8.

⁷⁵ Wang, S.; Fang, W.; Street, N. T. *Molecules* **2011**.

la habilidad del linker de romper el enlace a la resina de forma selectiva, dejando el ácido carboxílico en C-28 libre o el derivado polietilenglicol unido a ácido oleanólico.

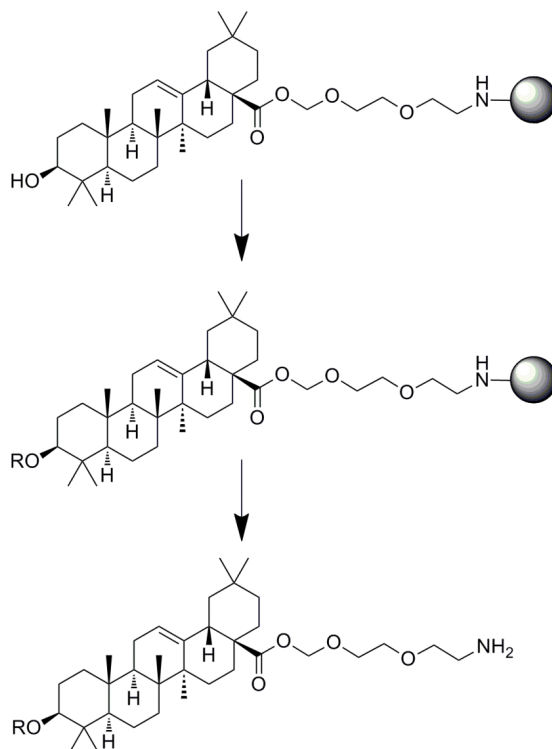


Figura 1.40. Síntesis de derivados de ácido oleanólico a través de un linker de polietilenglicol

I.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS

I.5.1 PRODUCTOS NATURALES: CONCEPTO Y UTILIDADES

A través de los tiempos y de las distintas civilizaciones, las plantas han proporcionado a los seres humanos remedios para distintos males. Aún a día de hoy muchas culturas mantienen sus viejas tradiciones y remedios caseros derivados de lo que se han llamado plantas medicinales. No es de extrañar que muchos de los medicamentos puestos en el mercado provengan de esos denominados productos naturales.

Los productos naturales son pequeñas moléculas que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal pero que también se pueden encontrar en distintos organismos tanto terrestres como marinos.⁷⁶ En sentido amplio un producto natural está formado por todos los compuestos de la Naturaleza. En sentido más restrictivo un producto natural sólo es un metabolito secundario. Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular. Los principales esqueletos de productos naturales comprenden los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, furanos, etc.

En la actualidad los productos naturales representan cerca del 30% de los fármacos descubiertos. Pero además, se puede decir que casi el 50% de los fármacos descubiertos recientemente son productos naturales, derivados potenciados de los mismos o sustancias que imitan a otro producto natural (lo que se suele llamar productos mímicos o análogos).⁷⁷

Gracias a la evolución de los distintos medios de extracción, aislamiento e identificación los productos naturales fueron identificados, en muchos casos, como estructuras orgánicas complejas de estudiar. No fue hasta 1806 cuando Friedrich Sertürner aisló morfina⁷⁸ de *Papaver somniferum*. A partir de ahí hasta nuestros días a medida que iban apareciendo nuevos métodos de extracción, aislamiento e identificación se podían identificar cada vez más moléculas. A día de hoy se han estudiado un sinnúmero de moléculas que tienen actividad biológica. Existen muchos ejemplos de productos naturales, derivados de las plantas como taxol (paclitaxel) o artemisinina productos con actividad antitumoral y anti-malárica, respectivamente, provenientes de microorganismos como penicilinas⁷⁹ y

⁷⁶ Chin, Y.-W.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D. *AAPS J.* **2006**, *8*, E239–53.

⁷⁷ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–35.

⁷⁸ Croteau, R. ... *Mol. Biol. ...* **2000**, 1250–1318.

⁷⁹ Kardos, N.; Demain, A. L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 6613–22.

cefalosporinas⁸⁰ que son utilizados como antibióticos y en el caso de origen marino se puede incluir, por ejemplo, (+)-discodermolida⁷⁶ cuya actividad es inmunosupresora, antifúngica y antitumoral (Fig. 1.41.).

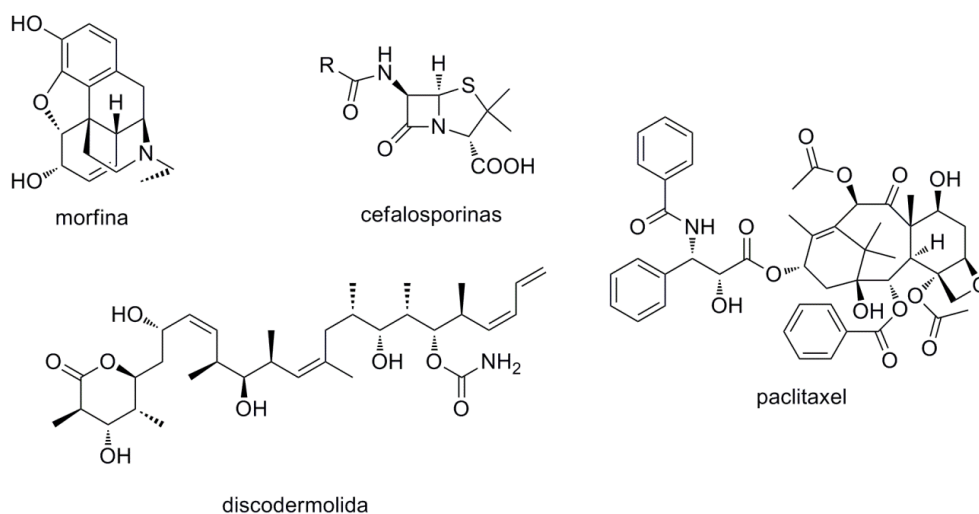


Figura 1.41. Ejemplos de productos naturales

No obstante, la baja disponibilidad de los productos naturales supone una gran desventaja. La mayoría de los productos naturales tienen una baja disponibilidad en la naturaleza y se suelen aislar de la fuente natural en pequeñas cantidades o impuros. Sólo en algunos casos se puede considerar la síntesis total como una solución, pero la mayoría de los productos naturales tienen estructuras muy complejas y su síntesis total es difícil o imposible y muy poco rentable. Por tanto, una vez encontrado un producto natural activo biológicamente se suele desarrollar una síntesis a través de un precursor del mismo o a través de la síntesis de productos que imitan la actuación o la estructura del producto en cuestión. Uno de los casos más relevantes y estudiados es taxol⁸¹ que se aísla de la corteza del *Taxus brevifolia*, cuya principal desventaja reside en su baja disponibilidad, siendo uno de los productos más estudiados tanto para llevar a cabo su síntesis total como para su semisíntesis a través de precursores.⁸²

Una de las grandes ventajas del uso de los productos naturales es la novedad de sus estructuras. Estructuras que están comprobadas por la misma naturaleza y que ofrecen configuraciones únicas que tienen comprobada actividad biológica por sí misma. Los productos naturales han servido para abrir nuevos campos de investigación y han contribuido a la identificación de nuevas vías biológicas de las distintas enfermedades, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto hace que estos compuestos adquieran cada vez más importancia

⁸⁰ Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L. H. *J. Invest. Surg.* 2012, 25, 67–77.

⁸¹ Guenard, D.; Gueritte-Voegelein, F.; Potier, P. *Acc. Chem. Res.* 1993, 26, 160–167.

⁸² Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K. *Nature* 1994, 367, 630–4.

en el estudio de las distintas actividades biológicas haciendo que no sólo sean nuevos fármacos sino también herramientas bioquímicas⁸³.

I.4.2. IMPORTANCIA DE LA DERIVATIZACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES

La derivatización química consiste la obtención de moléculas que difieren de su precursor en algún punto de su estructura, puede ser por un cambio de función en la misma o por extender la molécula acoplándole distintos bloques a través de reacciones con otras moléculas. La importancia de la derivatización de los productos naturales reside en la obtención de derivados que aporten algo diferente al producto de partida. Esta derivatización puede mejorar las actividades biológicas ya presentes o incluso puede ofrecer otras nuevas. La gran complejidad de las estructuras de los productos naturales difícilmente hubiese podido ser imaginado por la mente humana. Esta complejidad aportada por la naturaleza es utilizada a favor del ser humano desde hace mucho tiempo. Aunque es verdad que existen casos en los que el producto natural sigue siendo mejor que los derivados que se han propuesto hasta la fecha. El tamaño y la compleja estructura de los productos naturales facilitan que éstos puedan interactuar con procesos biológicos complejos, pasando de interacciones sencillas hasta las más complejas como pueden ser las interacciones proteína-proteína.

En torno a los 90 hubo un auge de la derivatización de productos naturales gracias al desarrollo de los métodos de extracción e identificación y a la aparición de la filosofía sintética previamente comentada denominada química combinatoria.^{77,84} Esta metodología química que se basa en la creación de librerías de cientos de productos para su posterior estudio de actividad ayudó enormemente a la derivatización química. Pero pronto la comunidad científica observó que tampoco en muchos casos la química combinatoria era la panacea porque bastante de los productos sintetizados eran inactivos, suponía invertir mucho tiempo y un gran esfuerzo para una pobre recompensa. En muchos casos se sintetizaban cientos y miles de productos que muchas veces se era incapaz de analizar quedando olvidados o sin estudiar su actividad. Fueron de hecho estos problemas los que provocaron una nueva vertiente en la química combinatoria denominada “Diversity Oriented Synthesis” (DOS). Esta técnica se basa en la creación de librerías a partir de un producto al que se le realizan distintas modificaciones químicas con el fin de obtener o mejorar una actividad biológica, siendo en muchos casos los productos de partida productos naturales de reconocida actividad biológica y en otros casos productos que imitan esas estructuras. En la actualidad ambas vertientes se siguen usando, pero donde mejores resultados se obtienen es cuando se enfoca a la creación de librerías con el fin de amplificar una actividad específica⁸⁵.

Hoy en día existen muchos derivados de productos naturales que interesan por distintos motivos, unos están ya comercializados, otros se encuentran en fase preclínica o clínica y otros en plena fase de desarrollo. Así cabe destacar amrubicina, un derivado de

⁸³ Grabley, S.; Thiericke, R. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1999**, *64*, 101–54.

⁸⁴ a) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–77. b) Ganesan, a. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 306–17.

⁸⁵ Newman, D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589–99.

doxorubicina aislada de *Streptomyces peucetius* que ha demostrado actividad anticancerígena sobre todo en tumores de mama, pulmón y gástrico (Fig. 1.42.).⁷⁶ Otro ejemplo es un análogo de tienamicina aislada del *Streptomyces catleya* que presenta una gran efectividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y que por ello está indicado como antibiótico (Fig. 1.42.). Cabe citar aquí también casos de productos como el docetaxel⁷⁹, que es un derivado del taxol y es más activo que éste en los tratamientos del cáncer de mama, ovario, pulmón, próstata y gástrico.

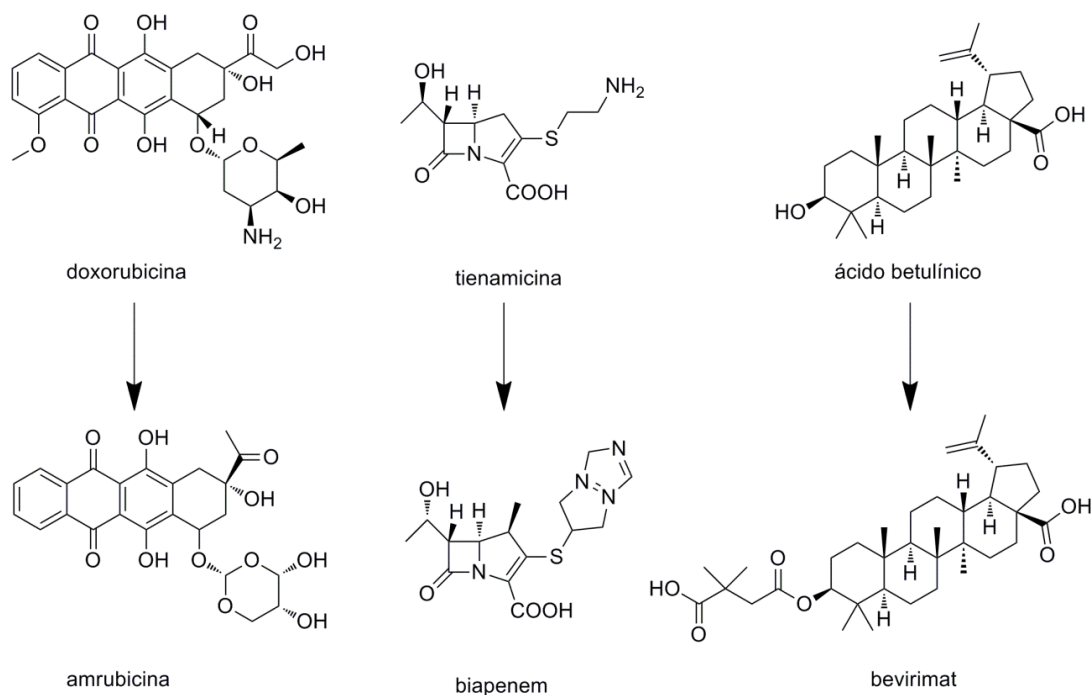


Figura 1.42. Ejemplos de derivados de productos naturales con mejor actividad que sus precursores

Los derivados obtenidos a partir de semisíntesis de productos naturales se denominan derivados de primera generación. Como indica la DOS, se observa que tras obtener productos activos biológicamente se puede seguir mejorando los productos mediante sucesivas reacciones. Los derivados así obtenidos se denominan derivados de segunda generación y son muchos los que parten de fármacos conocidos y que se encuentran en pleno estudio de derivatización. Como productos de segunda generación aparece como ejemplo derivados de andrografolida, quinina o incluso de ácido betulínico, del cual se puede comentar uno de ellos que destaca contra el VIH llamado bevirimat (Fig. 1.43.).⁸⁶ El caso del bevirimat, un producto que presenta una importante actividad anti-VIH y que se ha consolidado como un fármaco antimaduración del virus (Fig. 1.42.). Los derivados de segunda generación del bevirimat se encuentran bajo estudio y ofrecen una actividad

⁸⁶ Martin, D. E.; Salzwedel, K.; Allaway, G. P. *Antivir. Chem. Chemother.* **2008**, *19*, 107–113.

anti-VIH potenciada ya que la nueva derivatización aporta una nueva actividad como inhibidor de entrada del virus.⁸⁷

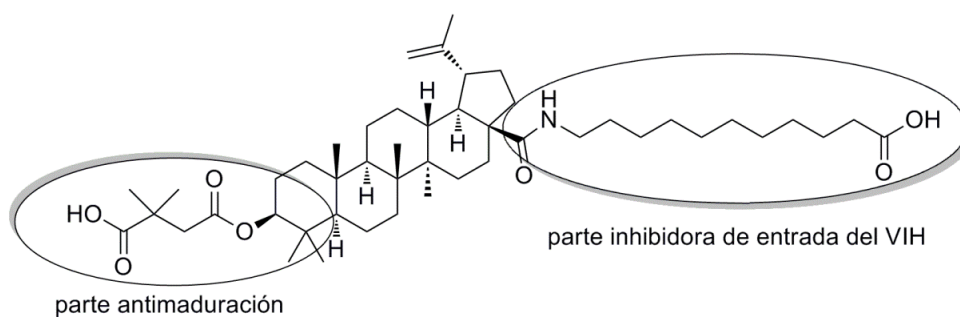


Figura 1.43. Derivado de segunda generación de ácido betulínico con mayor actividad que su precursor

⁸⁷ Aiken, C.; Chen, C. H. *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 31–6.

I.4.3. ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y APOPTÓTICA

a) El proceso de apoptosis y muerte celular

La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular que juega un importante papel en múltiples procesos biológicos de los organismos multicelulares. Estos organismos requieren una homeostasis celular que afecta tanto al número como al tipo de células y está involucrada en procesos tales como el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, la homeostasis celular de tejidos, la regeneración celular, etc.⁸⁸ Además de estos procesos existen otros en los que una célula normal activa los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis en respuesta a una posible patología o de acuerdo a la fisiología normal del tejido que pertenece.

La desregulación de los mecanismos de apoptosis está implicada en la progresión de los procesos cancerosos, en los que la célula potencialmente tumoral puede poseer mutaciones en varios genes permisiblemente cancerígenos denominados por este motivo proto-oncogenes.⁸⁹ Algunos de los cambios en la fisiología celular ocurridos durante el proceso de apoptosis, que lo diferencian del proceso de necrosis, son entre otros: la disminución del volumen celular; adquisición de un aspecto vesiculado o *blebbing* de la membrana citoplasmática, distorsionándose sin llegar a romperse; condensación de la cromatina formando cúmulos cerca de la membrana nuclear, fenómenos denominado *picnosis*; y fragmentación del ADN en fragmentos cuyo tamaño es múltiplo del número de pares bases que se encuentran entre dos nucleosomas. Las células entonces pueden desintegrarse formando los denominados cuerpos apoptóticos, los cuales en principio mantienen la integridad de la membrana plasmática.

La iniciación y ejecución de la apoptosis, a nivel molecular, depende la activación de las rutas extrínsecas y/o intrínsecas de muerte celular.⁹⁰ El proceso apoptótico está regulado por una gran cantidad de señales intracelulares. Hay dos importantes rutas de señalización en la inducción de la apoptosis, la ruta dependiente de receptores de muerte celular y la ruta mitocondrial. Denominadas clásicamente como ruta extrínseca y ruta intrínseca de inducción de apoptosis. Algunos estímulos extracelulares que inducen apoptosis pueden ser: citoquinas⁹¹ como el TNF,⁹² radiaciones, falta de señales hormonales o de factores tróficos⁹³. Mientras que los estímulos intracelulares suelen ser: mitosis incompleta,⁹⁴ aumento de las especies reactivas de oxígeno,⁹⁵ aumento del calcio citoplasmático⁹⁶ o daños irreparables del ADN⁹⁷ mediados por la molécula p53.⁹⁸

⁸⁸ a) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br. J. Cancer* **1972**, 26, 239–57. b) Wong, R. S. Y. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, 30, 87.

⁸⁹ Zhang, J.; Chen, Y.-H.; Lu, Q. **2010**.

⁹⁰ Hongmei, Z. *Apoptosis and Medicine*; Ntuli, T., Ed.; InTech, 2012.

⁹¹ Dranoff, G. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 11–22.

⁹² Varfolomeev, E. E.; Ashkenazi, A. *Cell* **2004**, 116, 491–7.

⁹³ Kennedy, B. C.; Showers, C. R.; Anderson, D. E.; Anderson, L.; Canoll, P.; Bruce, J. N.; Anderson, R. C. E. *J. Oncol.* **2013**, 2013, 486912.

⁹⁴ Castedo, M.; Perfettini, J.-L.; Roumier, T.; Andreau, K.; Medema, R.; Kroemer, G. *Oncogene* **2004**, 23, 2825–37.

⁹⁵ Matés, J. M.; Segura, J. a; Alonso, F. J.; Márquez, J. *Arch. Toxicol.* **2012**, 86, 1649–65.

⁹⁶ Rasola, A.; Bernardi, P. *Cell Calcium* **2011**, 50, 222–33.

⁹⁷ Li, C.; Hashimi, S. M.; Good, D. a; Cao, S.; Duan, W.; Plummer, P. N.; Mellick, A. S.; Wei, M. Q. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2012**, 39, 739–46.

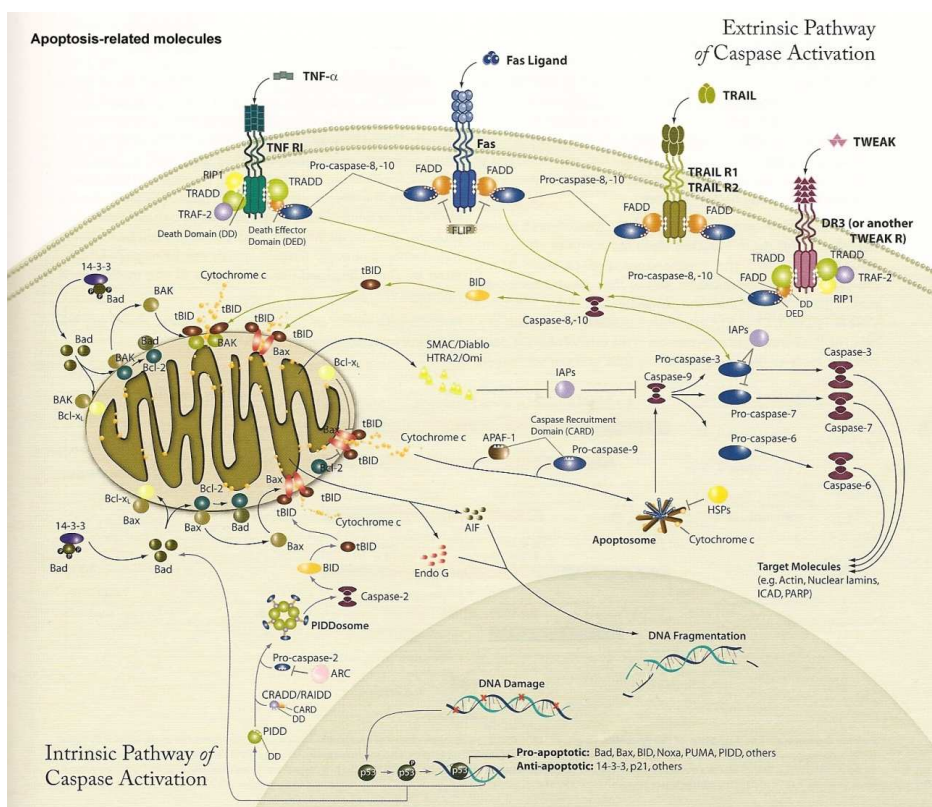


Figura 1.44. Distintas rutas metabólicas de apoptosis

La apoptosis en ambas rutas, está mediada por la activación de una serie de aspartato proteasas, denominadas caspasas. Estas proteasas activan de forma proteolítica a gran variedad de substratos citoplasmáticos y nucleares, induciendo los fenómenos típicos y propios de la muerte celular por apoptosis. Por estos motivos, fallos en los procesos mediados por caspasas son algunos de los principales responsables del desarrollo de tumores y enfermedades autoinmunes, así como una excesiva activación se cree vinculada con enfermedades como el Alzheimer.

b) Actividad citotóxica y antitumoral de productos naturales

Existen muchos productos naturales que ofrecen una buena o muy buena actividad antitumoral. Algunos de ellos ya están siendo comercializados como fármacos contra las distintas enfermedades existentes, otros en cambio aún se encuentran en pleno estudio estando algunos en fases preclínicas y clínicas. Esta variedad de compuestos abarca desde alcaloides a grandes moléculas pasando por péptidos de gran actividad, siendo la procedencia de estos productos naturales de origen animal, vegetal así como de origen microbiano, de los cuales algunos obtenidos de la fauna marina resultan muy interesantes.

⁹⁸ Pietsch, E. C.; Sykes, S. M.; McMahon, S. B.; Murphy, M. E. *Oncogene* **2008**, 27, 6507–21.

Cuando se observa el sinfín de estructuras que nos brinda la naturaleza, se detecta que las estructuras más sencillas de muy pocos carbonos no suelen dar actividad biológica muy buena, probablemente es debido a la dificultad de conservación y su alta volatilidad. Aunque existen casos en los que se puede encontrar moléculas que pueden tener bastante actividad, en este caso presentan actividad anticancerígena. Destacamos como ejemplo la molécula de pericosina A (Fig. 1.45.), una molécula con apenas 7 carbonos obtenida del hongo *Periconia byssoides*, encontrado en el interior de un organismo marino. Los ensayos efectuados *in vitro* mostraron una actividad anti-leucémica, comprobada sobre la línea celular P388, y una actividad *in vivo* sobre ratones prologando la vida de los mismos.⁹⁹

A medida que aumentamos la complejidad de las moléculas existen más estructuras que presentan actividad biológica. Alvaradoina E (Fig. 1.45.), hallado en la República Dominicana, es otro de estos productos con apenas 20 carbonos que presenta varios estudios interesantes sobre su actividad. En el primero de ellos se evaluó su actividad sobre la línea celular KB, comprobando que no mostraba una gran actividad. Varios estudios posteriores *in vitro* sobre las líneas celulares LNCaP y Col2 pusieron de manifiesto una significativa inhibición al crecimiento de las mismas. Al observar estos efectos se confirmó que la citotoxicidad del producto era debido a la apoptosis, viendo los efectos más espectaculares sobre la línea celular LNCaP de cáncer de próstata, en menos de 24 h se obtuvieron signos de apoptosis con concentraciones para la IC₅₀ que van a una decena de nM a μ M.¹⁰⁰

El incremento del número de carbonos aporta nuevos esqueletos y, por tanto, una mayor variedad de moléculas que presentan actividad, entre ellas se puede encontrar con macrociclos como neopeltolida o palmerolida A (Fig. 1.46.) que demuestran tener una gran actividad biológica frente a varias líneas celulares. En el caso de neopeltolida ha demostrado tener actividad citotóxica frente a la línea celular A-549, NCI-ADR-RES, y P388 con IC₅₀ cercanas al nM. Estudios posteriores confirmaron esta actividad demostrando tener una gran capacidad inhibidora sobre células PANC-1.¹⁰¹ En el caso de palmerolida A, ha presentando una buena actividad frente a las líneas celulares HCC-2998, RXF 393 y mejor aún frente a células de melanoma UACC-62 con una alta selectividad.¹⁰²

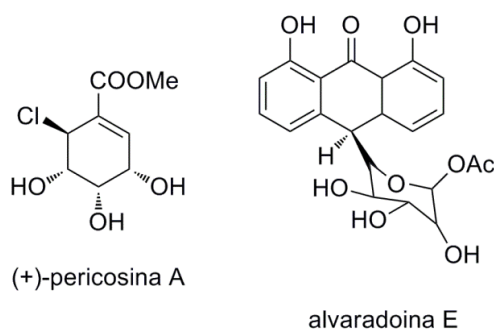


Figura 1.45. Moléculas de bajo peso molecular con actividad antitumoral

⁹⁹ Yamada, T.; Iritani, M.; Ohishi, H.; Tanaka, K.; Minoura, K.; Doi, M.; Numata, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3979–86.

¹⁰⁰ Mi, Q.; Lantvit, D.; Reyes-Lim, E.; Chai, H.; Phifer, S. S.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Tan, G. T.; Cordell, G. a; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, a D.; Pezzuto, J. M. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 779–87.

¹⁰¹ Cossy, J.; Gallon, J.; Reymond, S. *Comptes Rendus Chim.* **2008**, *11*, 1463–1476.

¹⁰² Kinghorn, A. D.; Chin, Y.-W.; Swanson, S. M. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, *12*, 189–96.

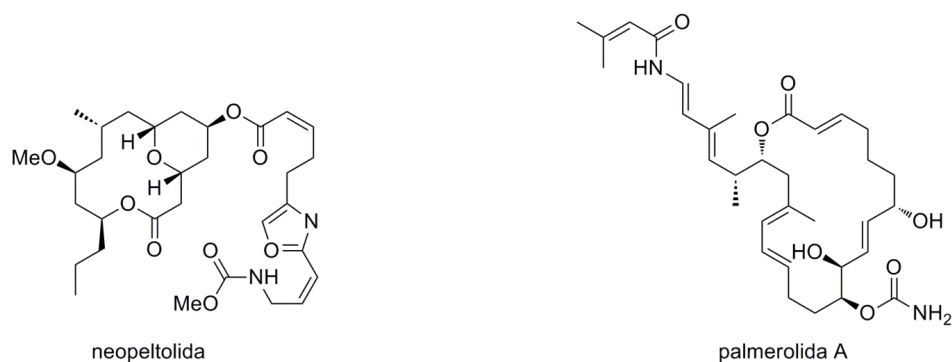


Figura 1.46. Macrociclos naturales con actividad antitumoral

Se puede señalar, como último ejemplo, la molécula de silvestrol (Fig. 1.47.), un ciclopentabenzofurano que tiene una potente actividad antitumoral. Los ensayos se han centrado en medir la citotoxicidad sobre varias líneas celulares donde destacaban los cánceres de mama, próstata y pulmón. La potencia del silvestrol se puede comparar con la del paclitaxel, observándose unas ED_{50} muy similares y del rango de los nM para esas líneas celulares.^{102,103}

En los terpenos, cabe destacar que desde los más sencillos, los monoterpenos, hasta los triterpenos, hay compuestos que presentan actividades antitumorales muy interesantes. Por esta razón se empieza el repaso con el terpeno más abundante en la naturaleza, D-limoneno (Fig. 1.48.), principal componente de la piel de los cítricos. Este monoterpeno ha demostrado tener propiedades antitumorales¹⁰⁴ en diversas líneas celulares así como propiedades anti-inflamatorias.¹⁰⁵ Las propiedades antitumorales de D-limoneno han sido ampliamente estudiadas, pero es contra el cáncer de mama¹⁰⁶ donde está dando realmente buenos resultados este compuesto.

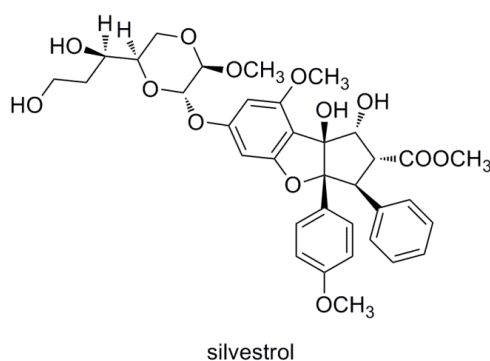


Figura 1.47. Molécula de silvestrol con alta actividad antitumoral

¹⁰³ Hwang, B. Y.; Su, B.-N.; Chai, H.; Mi, Q.; Kardono, L. B. S.; Afriastini, J. J.; Riswan, S.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Wild, R.; Fairchild, C. R.; Vite, G. D.; Rose, W. C.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Kinghorn, A. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3350–8.

¹⁰⁴ Paduch, R.; Kandefer-Szerszeń, M.; Trytek, M.; Fiedurek, J. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **2007**, *55*, 315–327.

¹⁰⁵ Hirota, R.; Roger, N. N.; Nakamura, H.; Song, H.-S.; Sawamura, M.; Sugauma, N. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H87–92.

¹⁰⁶ a) Crowell, P. L. *Breast Cancer Res. Treat.* **1997**, *46*, 191–197. b) Miller, J. a; Lang, J. E.; Ley, M.; Nagle, R.; Hsu, C.-H.; Thompson, P. a; Cordova, C.; Waer, A.; Chow, H.-H. S. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **2013**, *6*, 577–84.

Al pasar de monoterpenos a sesquiterpenos se observa un aumento de los productos naturales con actividad citotóxica y antitumoral, debido a que el aumento del número de carbonos favorece la aparición de estructuras más complejas y menor volatilidad de los productos. Muchos han sido los sesquiterpenos que se han estudiado para comprobar su citotoxicidad, pudiendo destacar en los últimos años la molécula de armillaridina¹⁰⁷ como el más prometedor (Fig. 1.48.). El estudio comprende líneas celulares MCF-7, Jurkat, HeLa, K-562. Melampomagnolida B¹⁰⁸ (Fig. 1.48.) es otro de los productos que presenta una gran actividad frente a líneas celulares de leucemia, su mecanismo inhibe los factores de transcripción NF- κ B con concentraciones de 7.5 μ M, mostrando como característica una gran selectividad para distinguir entre las células dañadas y las normales.

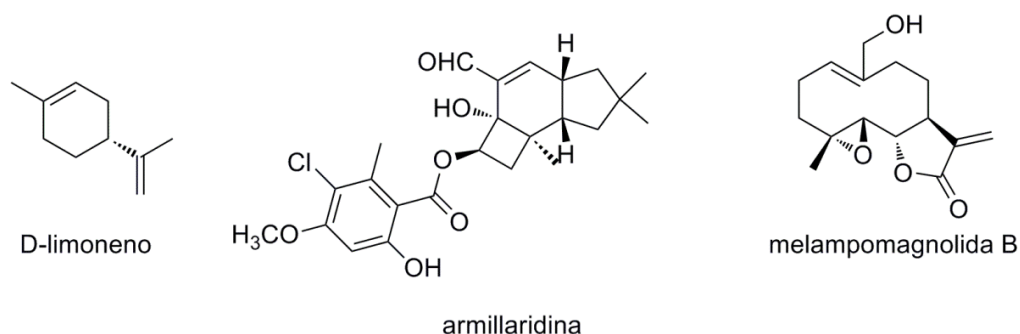


Figura 1.48. Algunos monoterpenos y sesquiterpenos naturales con actividad antitumoral

En el campo de los Diterpenos, nos encontramos con el máximo exponente de terpenos anticancerígenos, e irremediablemente se debe hablar aquí de taxol o paclitaxel.¹⁰⁹ Este compuesto es un derivado de un diterpeno cíclico de la familia de los taxanos. Fue descubierto en 1968 en la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*. Su estructura fue elucidada poco después y es entonces cuando empezó a usarse para tratamientos químicos en varias líneas de cáncer. La investigación y las aplicaciones de este compuesto crecen a medida que pasa el tiempo, siendo hoy uno de los principales medicamentos frente al cáncer, sobre todo de pulmón, ovario, mama y formas avanzadas del sarcoma de Kaposi. Hoy en día se han realizados incontables pruebas *in vitro* e *in vivo*, encontrándose ya fuera de las pruebas clínicas para varios tipos de cáncer.¹¹⁰

No obstante, existen otros diterpenos con actividad antitumoral y entre ellos se puede destacar la molécula de andrografolida¹¹¹ (Fig. 1.49.), perteneciente a los labdanos, cuyos estudios manifiestan una gran citotoxicidad *in vitro* frente a varias líneas celulares como KB, P388, HL-60 y NB4 mediadas por diferenciación celular y apoptosis. Además, existen varios estudios de su efecto *in vivo* contra MCF-7, HT29 y B16F0, observándose una inhibición de la angiogénesis muy interesante a través de vías de producción de factores anti-angiogénicos así como de factores anti-inflamatorios. Otras estructuras menos comunes

¹⁰⁷ Bohnert, M.; Miethbauer, S.; Dahse, H.-M.; Ziemer, J.; Nett, M.; Hoffmeister, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2003–6.

¹⁰⁸ Nasim, S.; Pei, S.; Hagen, F. K.; Jordan, C. T.; Crooks, P. a. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 1515–9.

¹⁰⁹ Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2325–2327.

¹¹⁰ Nilufer Jasmine Selimah Fauzee, et al. *Asian Pacific J Cancer Prev*, **2011**, 12, , 837-851.

¹¹¹ Lim, J. C. W.; Chan, T. K.; Ng, D. S.; Sagineedu, S. R.; Stanslas, J.; Wong, W.S. **2012** ,39: 300–310.

como caseamembrina T¹¹² (Fig. 1.49.) también tienen cierta relevancia ya que también presenta actividad antitumoral y los estudios previos de citotoxicidad son comparables con los de un medicamento de referencia. El estudio fue realizado sobre varias líneas celulares y han mostrado resultados muy alentadores. De la misma familia con una estructura similar, esqueleto de clerodano se puede encontrar caseargrewiina H (Fig. 1.49.) que muestra una potente citotoxicidad frente a las líneas celulares de KB, BC1 y NC1-H187 con IC₅₀ menores de 1 µg/mL.

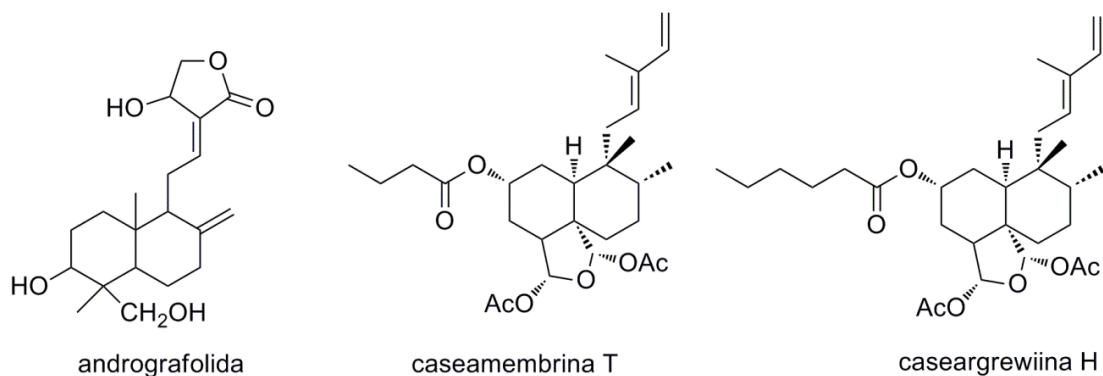


Figura 1.49. Algunos diterpenos naturales con actividad antitumoral

Por otra parte, la fauna marina ha sido poco estudiada hasta la fecha, pero en ella se presentan moléculas muy interesantes con actividades muy significativas. Entre estas sustancias de origen marino se puede destacar los sesterterpenos que a día de hoy están poco estudiados y de los cuales apenas se conocen unos 1000 ejemplos. Sus principales propiedades biológicas están siendo estudiadas, pero ya se han podido observar efectos anti-inflamatorio, citotóxico, anti-tumoral, antibiótico y anti-tuberculosis. Las esponjas marinas son las que están proporcionando las moléculas más interesantes respecto a su actividad biológica. Un claro ejemplo de sustancia aislada de una esponja, *Hyrtios* sp., es heteronemina (Fig. 1.50.) que tiene una gran cantidad de aplicaciones, habiéndose demostrado que tiene actividad antiinflamatoria¹¹³ *in vitro* además de una potente citotoxicidad¹¹⁴ frente a varias líneas celulares. Además, un reciente estudio aclara que heteronemina¹¹⁵ modula a nivel de transcripción varias rutas metabólicas y procesos relacionados con la proliferación celular, supervivencia, apoptosis, autofagocitosis, la ruta MAPK y la inhibición de la cascada NF-κB.

Otro ejemplo de molécula extraída de una esponja es furospinusolina-1¹¹⁶ (Fig. 1.50.), un sesterterpeno que presenta una potente actividad antitumoral y que actúa fuertemente en condiciones de hipoxia tumoral. Estas condiciones sin oxígeno obligan al cáncer a crear nuevos vasos sanguíneos para alimentarse, denominado angiogénesis. Es

¹¹² Chen, C.; Cheng, Y.; Chen, S.; Chien, C.; Kuo, Y. **2008**, *5*, 162–167.

¹¹³ Schumacher, M.; Juncker, T.; Schnekenburger, M.; Gaascht, F.; Diederich, M. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 89–92.

¹¹⁴ Chang, Y.-C.; Tseng, S.-W.; Liu, L.-L.; Chou, Y.; Ho, Y.-S.; Lu, M.-C.; Su, J.-H. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 987–97.

¹¹⁵ Schumacher, M.; Cerella, C.; Eifes, S.; Chateauvieux, S.; Morceau, F.; Jaspars, M.; Dicato, M.; Diederich, M. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 610–22.

¹¹⁶ Arai, M.; Kawachi, T.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1919–26.

precisamente la angiogénesis uno de los procesos que inhibe para evitar la proliferación. Actúa selectivamente en estas condiciones de hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo*.

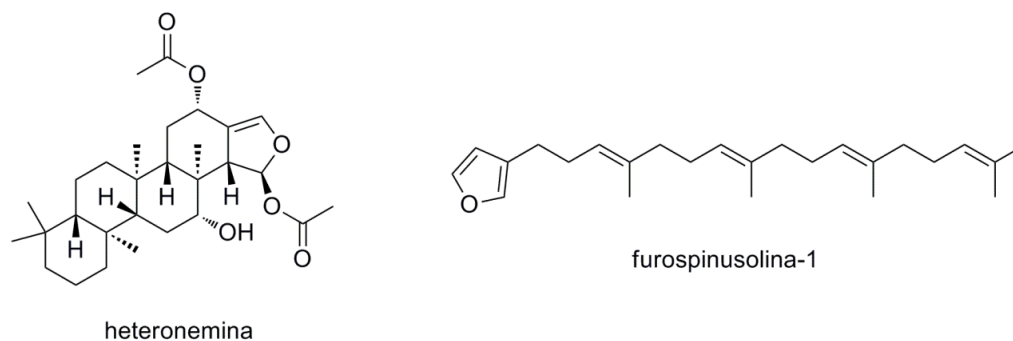


Figura 1.50. Algunos sesterterpenos naturales con actividad antitumoral

En el campo de los triterpenos se pueden destacar tres esqueletos que son los más estudiados y que son los que más actividad han presentado, a saber, lupanos, ursanos y oleananos (Fig. 1.51.). La comunidad científica se ha volcado en el estudio de estos triterpenos y uno de los más estudiados es el ácido betulínico, probablemente por su gran presencia en la naturaleza y su fácil aislamiento y purificación.

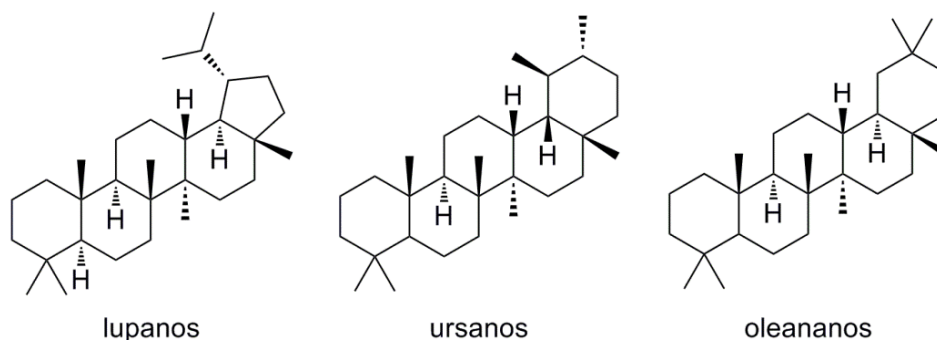


Figura 1.51. Principales esqueletos de triterpenos con actividad antitumoral

Como principal representante de los triterpenos nos encontramos con la molécula de ácido betulínico (Fig. 1.52.). Este compuesto está identificado como altamente selectivo e inhibidor del melanoma humano y produce apoptosis en ese tipo de células. Los estudios sobre ácido betulínico muestran como tiene varias vías de actuación para provocar la apoptosis en células cancerígenas y en combinación con radiación mejora notablemente sus efectos en células de melanoma humano. Además, ha sido comparado *in vitro* con la doxorubicina y los correspondientes estudios fueron realizados sobre distintas líneas celulares que seguían distintas vías.¹¹⁷ En uno de los experimentos se estudió la citotoxicidad de las líneas celulares neoplásicas como melanomas, carcinomas de pulmón,

¹¹⁷a) Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17–25. b) Kessler, J. H.; Mullauer, F. B.; De Guido M., R.; Medema, J. P. *Cancer Lett. (Amsterdam, Netherlands)* **2007**, *251*, 132–145.

ovario y cérvix y se observó que en todas las líneas testeadas tenía un efecto inhibitor con IC_{50} entre 1.5-4.5 $\mu\text{g/ml}$. También se pudo comprobar su efectividad sobre líneas celulares mutantes de las anteriormente mencionadas. El estudio *in vivo* con ratones mostró que aumentaba la supervivencia de los mismos cuando se le administraba ácido betulínico a los que se había inducido cáncer de ovario, IGROV-1 como línea celular. Estudios posteriores ofrecieron más datos sobre muchas más líneas celulares incluyendo varias líneas celulares de próstata, mama y colon y en la mayoría de ellas se observaron actividades con EC_{50} muy prometedoras.

De forma similar, ácido ursólico (Fig. 1.52.), representante de los ursanos, tiene actividad antitumoral en algunas líneas celulares, existiendo varios estudios que demuestran la actividad citotóxica y apoptótica de ácido ursólico.¹¹⁸ De entre ellos se observan estudios *in vitro* sobre el mieloma, el cáncer de próstata, mama, colon, ovario, páncreas, pulmones y otros carcinomas. Mientras que los estudios *in vivo* se centran en cáncer de próstata, hígado, colon, mama, piel y estómago, principalmente realizado en ratones y ratas. Los estudios incluyen la vía a través de la que actúa ácido ursólico y se comprobó que ocurre a través de la vía p53, realizado sobre la línea celular SW480¹¹⁹ pasando por la activación de la vía p53 y los factores NF- κ B y llevando el sistema a la activación de las caspasas 9 y 3 para llegar finalmente a la apoptosis de la célula.

Ácido oleanólico (Fig. 1.52.), como representante más común en la naturaleza de los oleananos, ha sido utilizado en una gran cantidad de experimentos y ensayos para determinar su actividad antitumoral, pero han sido pocos los estudios que han dado resultados prometedores. Un ejemplo de ellos es el estudio *in vitro* e *in vivo* que se realiza para el cáncer de pulmón¹²⁰ en el que se describe el efecto de ácido oleanólico sobre dos líneas celulares A549 y H460 obteniendo actividad citotóxica y apoptótica. El ensayo *in vivo* con ratones se estudia a través de la línea celular B16F10 y se observa una inhibición de la metástasis producida por el cáncer. Mientras que otro estudio nos muestra la actividad de ácido oleanólico sobre la línea celular HeLa.¹²¹ De estos estudios se pueden obtener dos conclusiones, la primera que no ofrece toxicidad para células normales y la segunda que el ácido oleanólico debe afectar a varias de las vías por las que crece el cáncer de pulmón, explicándose así su efecto sobre el mismo.

Mientras que la actividad de ácido oleanólico ha sido bastante bien estudiada otro triterpeno de la familia de los oleananos está demostrando tener un gran potencial en los últimos años, ácido maslínico (Fig. 1.52.). Su principal diferencia estructural con ácido oleanólico es que cuenta con un hidroxilo más en el anillo A, resultando crucial para el aumento de la actividad antitumoral observada. Ácido maslínico presenta una buena actividad citotóxica y apoptótica en varias líneas celulares estudiadas y una de las líneas

¹¹⁸a) Feng, J.-H.; Chen, W.; Zhao, Y.; Ju, X.-L. *Open Nat. Prod. J.* **2009**, 2, 48–52. b) Shanmugam, M. K.; Dai, X.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H. H.; Sethi, G.; Bishayee, A. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, 85, 1579–87.

¹¹⁹ Nam, H.; Kim, M.-M. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 62, 579–583.

¹²⁰ Lúcio, K. A.; Rocha, G. D. G.; Monção-Ribeiro, L. C.; Fernandes, J.; Takiya, C. M.; Gattass, C. R. *PLoS One* **2011**, 6, e28596.

¹²¹ Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 394–411.

mejor estudiadas es la del cáncer de colon, la línea celular HT29¹²², de este estudio se pueden sacar varias conclusiones que nos permiten decir que ácido maslínico actúa a través de una vía caspasa dependiente, concretamente de la vía JNK-p53.

Ácido maslínico además de haber sido estudiado en la línea celular HT29, también ha sido estudiado en otras líneas como la línea Panc-28 correspondiente al cáncer de páncreas.¹²³ Este estudio demuestra que ácido maslínico tiene una IC₅₀ de 56 μ M, que actúa a través de una vía caspasa dependiente y de forma que suprime la actividad de los factores NF- κ B. Estos resultados muestran que la actividad antitumoral de ácido maslínico puede incrementarse a través de la derivatización mostrándose como un precursor muy prometedor para este tipo de enfermedad.

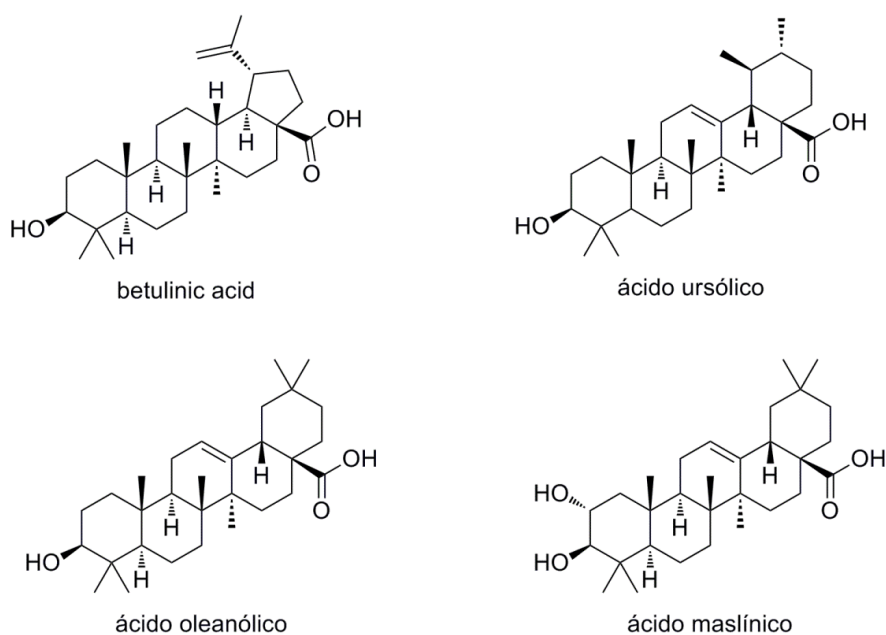


Figura 1.48. Algunos triterpenos con actividad antitumoral

c) Actividad citotóxica y apoptótica de derivados de productos naturales

El cáncer actúa a través de complicadas vías de transducción de señales y conlleva complejos mecanismos de acción. La lucha contra cada tipo de cáncer se realiza de forma distinta para cada línea celular. Los fármacos sintetizados actúan en algún punto del proceso apoptótico del cáncer inhibiendo algún proceso específico de desarrollo del mismo. Mientras que alguno de los compuestos puede actuar en una línea celular en concreto, en otras puede que presente actividad, ya que cada línea celular presenta procesos propios y mecanismos de acción específicos para ella.

¹²² a) Reyes, F. J.; Centelles, J. J.; Lupiáñez, J. a; Cascante, M.; Lupianez, J. A. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6302–10. b) Reyes-Zurita, F. J.; Pachón-Peña, G.; Lizárraga, D.; Rufino-Palomares, E. E.; Cascante, M.; Lupiáñez, J. a.

c) Rufino-Palomares, E. E.; Reyes-Zurita, F. J.; García-Salguero, L.; Mokhtari, K.; Medina, P. P.; Lupiáñez, J. a; Peragón, J. J. *Proteomics* **2013**, *83*, 15–25.

¹²³ Li, C.; Yang, Z.; Zhai, C.; Qiu, W.; Li, D.; Yi, Z.; Wang, L.; Tang, J.; Qian, M.; Luo, J.; Liu, M. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 73.

El fundamento de toda derivatización es la obtención de productos más activos que los productos de partida y como se ha comentado previamente, las distintas técnicas de derivatización de productos naturales aportan grandes librerías de productos que van a diferir tanto en propiedades químicas como físicas. Por tanto, se encuentra con un sinfín de ejemplos de derivados de productos naturales en la literatura. Así, a partir de productos naturales que ya han mostrado actividad biológica como las macrolidas neopeltolida¹²⁴ y palmerolida A¹²⁵, ya comentadas con anterioridad, se sintetizan análogos y derivados semisintéticos cuyas actividades biológicas están potenciadas.

Los derivados de la macrolida neopeltolida sintetizados, han sufrido cambios en los grupos funcionales ya existentes y/o introducción de nuevos grupos funcionales, variando la cadena lateral con sustituyentes y conformaciones similares a las que poseía la molécula inicial. En este sentido, se observa como para la línea celular MCF-7 el producto derivado 9-epi-neopeltolida (Fig. 1.53.) es 5 veces más potente, aunque estos resultados todavía se alejan mucho del paclitaxel, que está a varios órdenes de magnitud por debajo de esos valores. En el caso de la línea celular HCT116, ninguno de los derivados, excepto dos de ellos, con valores cercanos al producto precursor, pudieron mejorar al producto natural neopeltolida que incluso muestra valores mejores que el paclitaxel.

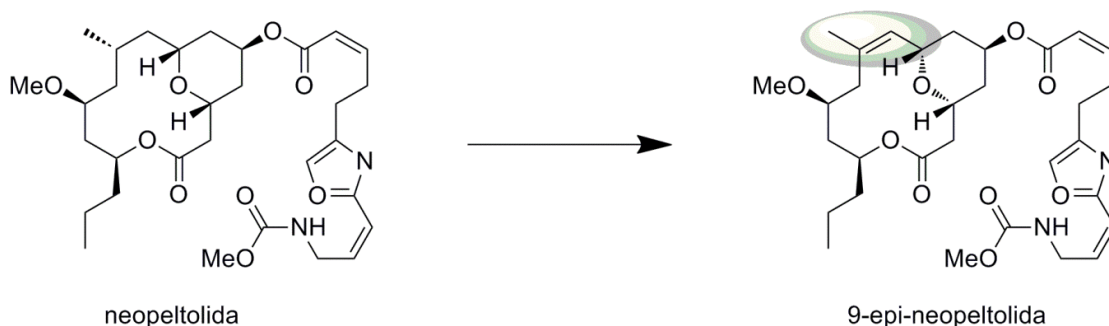


Figura 1.53. Formación de un derivado de neopeltolida con mayor actividad antitumoral

En el caso de palmerolida A se demuestra, aun siendo este producto muy bueno en muchas de las líneas celulares estudiadas como UACC-62, MCF-7, SF268, NC-H460, IA9, PTX22, A8 y HM-2, que existen otros derivados y análogos que son capaces de mejorar estas actividades. Se obtuvieron distintos derivados tanto funcionales como de cadena¹²⁵ y se observó que el producto deshidratado en la posición 7 (Fig. 1.54.) era capaz de igualar los valores de actividad para dos de las líneas celulares, en concreto para la UACC-62 y la PTX22 con valores de concentración cercanas a las decenas de nM. Uno de los derivados en los que se había cambiado la cadena lateral llegaba a ser en torno de 2 a 10 veces mejor que el producto natural. El derivado que consiguió el mayor aumento de actividad fue el que se obtuvo de sustituir el carboxilato en el extremo de la cadena por un benzilamino (Fig.

¹²⁴ Cui, Y.; Balachandran, R.; Day, B. W.; Floreancig, P. E. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2225–35.

¹²⁵ a) Nicolaou, K. C.; Leung, G. Y. C.; Dethle, D. H.; Guduru, R.; Sun, Y.-P.; Lim, C. S.; Chen, D. Y.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10019–23. b) Lisboa, M. P.; Dudley, G. B. *Chemistry* **2013**, *19*, 16146–68.

1.54.), obteniéndose resultados espectaculares con concentraciones que oscilaban en torno a los nM para las distintas líneas celulares, exceptuando una de las líneas celulares, HM-2 donde se obtuvieron valores ligeramente peores pero que aún así mejoraban la actividad del producto natural de partida 2 veces.

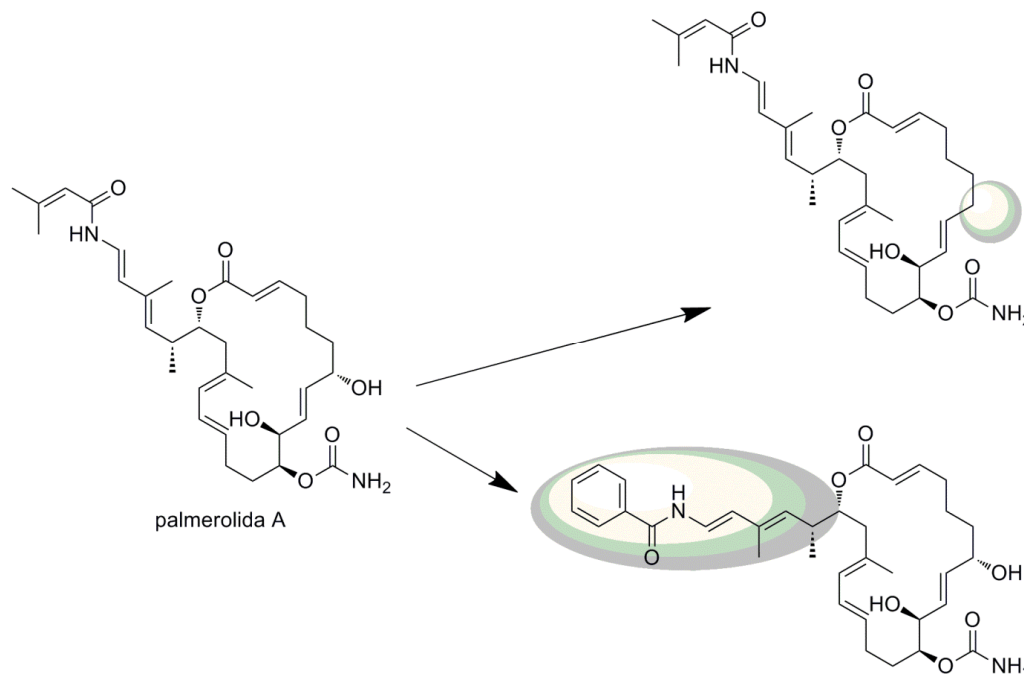


Figura 1.54. Formación de derivados de palmerolida A con mayor actividad antitumoral

Entre los terpenoides destacan varios diterpenos y triterpenos que resultan ser interesantes por sus capacidades antitumorales. Dos de estos diterpenos con clara actividad anticancerígena también han sido derivatizados, andrografolida y taxol y constituyen claros ejemplos de productos naturales que mediante, la derivatización, mejoran aún más sus actividades biológicas.

La estructura de andrografolida con sus 3 hidroxilos libres permite la semisíntesis de diferentes derivados funcionales. El caso más sencillo que se puede estudiar es aquel en el que una sencilla derivatización del hidroxilo de C-3 o de C-19 produce una sensible mejora en la actividad.¹¹¹ El bloqueo de estos hidroxilos a través de varias vías es capaz de mejorar la actividad antitumoral. Así, la acetilación en C-19 (Fig. 1.55.) es capaz de mejorar ligeramente la GI_{50} del producto natural estando en el orden de μM para las líneas celulares de MCF-7 y HCT116 y el bloqueo de los hidroxilos mediante acetona en C-3 y C-19 (Fig. 1.55.) consigue un aumento de la actividad para la línea celular HCT-116. Al comprobar que la derivatización es eficaz para aumentar la actividad citotóxica, se estudiaron otras modificaciones como son los cambios en los hidroxilos en C-14 y C-19, encontrándose estudios para el caso de los derivados del hidroxilo en el C-19 sobre varias líneas celulares

como P388, KB, COL2, MCF-7, LU-1 y ASK. Comparado con el producto natural que presenta una ED_{50} entre 2.25 y 27,37 μM para las distintas líneas celulares¹²⁶, tres de estos derivados mostraron una mejora de la actividad en casi todas las líneas celulares anteriormente citadas. Los derivados más espectaculares presentaban o bien un grupo TIPS, CPH_3 o TBS en el hidroxilo de C-19 (Fig. 1.55.) y mejoraban la actividad respecto del producto natural en casi todas las líneas celulares.

De los derivados funcionales de andrografolida, destacan varios compuestos epoxidados en uno de los dobles enlaces y esterificados en el hidroxilo del C-14 (Fig. 1.56.), para los cuales se observan resultados bastante prometedores y mejorados con respecto al producto natural de partida¹²⁷. El derivado de primera generación epoxidado no mejora significativamente la actividad mientras que la aparición de un grupo éster unido al hidroxilo del C-14 en cuyo extremo tiene un grupo bencilo sustituido es capaz de bajar su actividad hasta las decenas de nM para las distintas líneas celulares estudiadas.

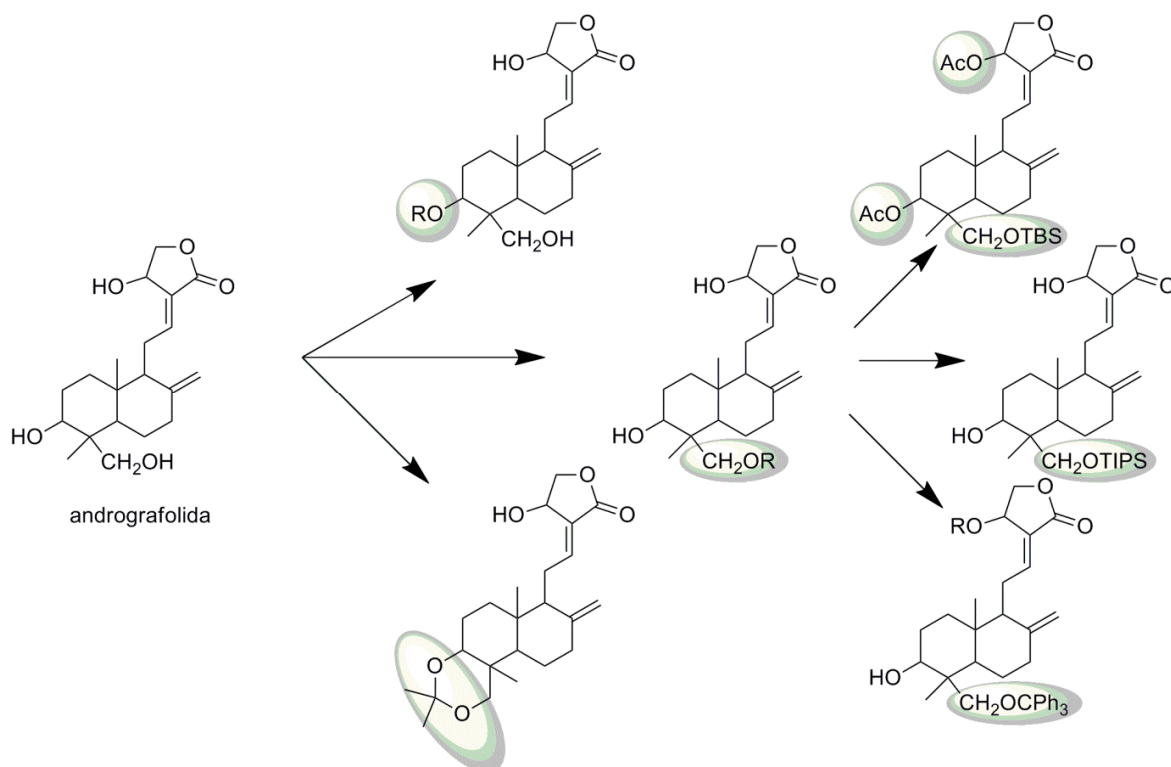


Figura 1.55. Formación de varios derivados con mayor actividad antitumoral que andrografolida

¹²⁶ Sirion, U.; Kasemsook, S.; Suksen, K.; Piyachaturawat, P.; Suksamram, A.; Saeeng, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22, 49–52.

¹²⁷ Nanduri, S.; Nyavanandi, V. K.; Sanjeeva Rao Thunuguntla, S.; Kasu, S.; Pallerla, M. K.; Sai Ram, P.; Rajagopal, S.; Ajaya Kumar, R.; Ramanujam, R.; Moses Babu, J.; Vyas, K.; Sivalakshmi Devi, A.; Om Reddy, G.; Akella, V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14, 4711–4717.

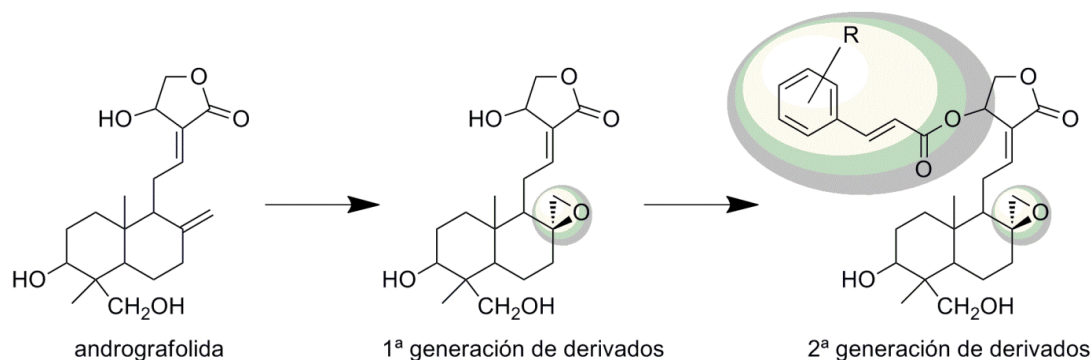


Figura 1.56. Formación de derivados de primera y segunda generación de andrografolida

Para el caso de los triterpenos, los derivados citotóxicos más estudiados han sido los de ácido betulínico, ácido glicirrético y ácido oleanólico, aunque también son de tener en cuenta los derivados de ácido maslínico, ácido ursólico y ácido torméntico. Los triterpenos son moléculas que, en la mayoría de los casos, están poco funcionalizadas, y a menudo, presentan dos o tres funciones responsables de la actividad biológica en cuestión y que, por tanto, constituyen las zonas estructurales sobre las que actuar. Los primeros estudios estaban dirigidos a obtener la información necesaria para saber si los triterpenos podían ser productos de interés respecto de su actuación como agentes antitumorales. Estos estudios sencillos fueron realizados derivatizando distintos tipos de esqueletos de triterpenos¹²⁸, siendo ácido betulínico uno de esos compuestos más utilizados para el estudio, comprobándose que era crucial tener la molécula difuncionalizada en C-3 y C-28 para que presentase una buena actividad. Se demostró, asimismo, que el grupo carboxilo en C-28 aporta actividad biológica y que al esterificar el ácido no se restaba actividad a la molécula sino que era incluso capaz de aumentarla llegando a obtener una IC_{50} de pocos μM . La acetilación del compuesto anterior bloqueó el OH en C-3 obteniéndose una actividad muy similar al caso anterior. La formación de una cetona en C-3 y C-28 también dio valores similares (Fig. 1.57.), pudiendo por tanto extraer de los datos obtenidos las conclusiones de que la modificación en C-3 a través de la acetilación o la oxidación aportan una mejora en la actividad biológica de los derivados y que el ácido en C-28 es necesario aunque esté esterificado.

De ahí en adelante las posibilidades de modificación estructural o funcional para la obtención de los correspondientes derivados son cuasi infinitas. Ejemplo de ello es la formación de derivados en el hidroxilo del C-3 y en el grupo carboxilo del C-28 y C-30 en el caso de ácido glicirrético. Entre los derivados sintetizados en los últimos años se encuentra la formación de etinil derivados en C-28 de ácido betulínico.¹²⁹ Estos estudios sugieren que es necesaria la derivatización del C-3 con un grupo acetilo, metilo o cetona ya que los etinil derivados sin esa derivatización en C-3 no presentan una mejora en la actividad mientras que los que sí lo están mejoran su actividad en las líneas celulares analizadas. El derivado

¹²⁸ Hata, K.; Hori, K.; Takahashi, S. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 645–8.

¹²⁹ Csuk, R.; Barthel, A.; Sczepek, R.; Siewert, B.; Schwarz, S. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2011**, *344*, 37–49.

que tiene en C-28 un metilpropionato (Fig. 1.58.) muestra muy buenas citotoxicidades en las distintas líneas celulares investigadas con una IC_{50} de 4 μ M de media¹³⁰.

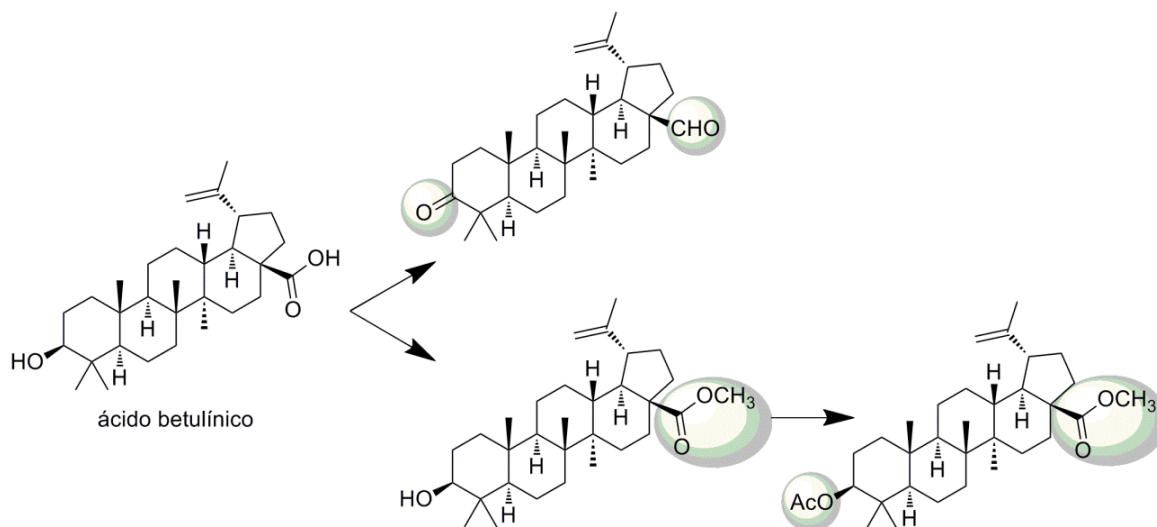


Figura 1.57. Primeras pruebas de derivatización de ácido betulínico

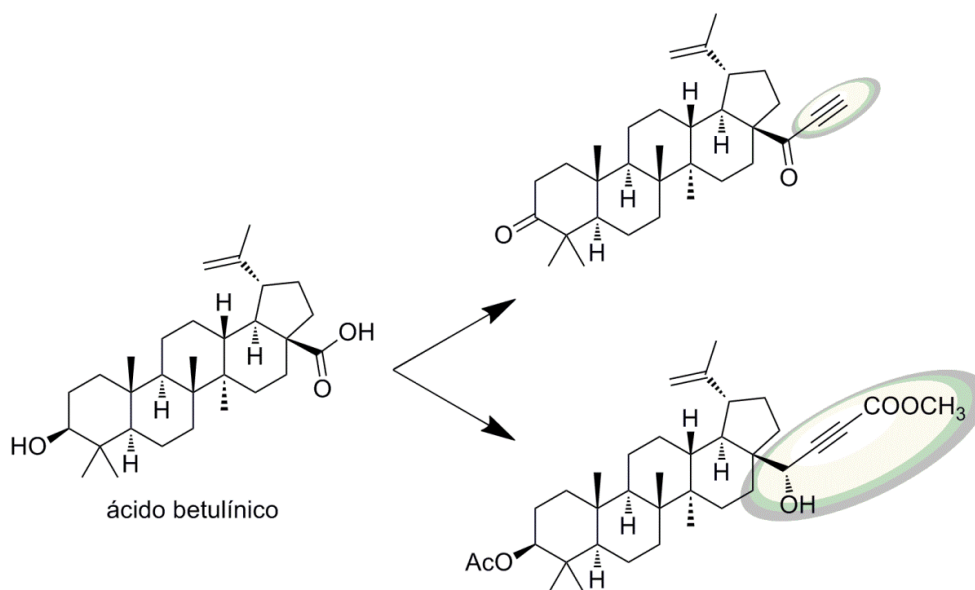


Figura 1.58. Formación de etinil-derivados de ácido betulínico

Siendo el grupo carboxilo del triterpeno uno de los grupos más estudiados, se realizaron otras transformaciones sobre el mismo. En este sentido, se llevaron a cabo otros ensayos como la formación de derivados nitrogenados en C-28 de ácido betulínico. Algunos de estos derivados nitrogenados presentaban una actividad muy prometedora en varias

¹³⁰ Csuk, R.; Barthel, A.; Schwarz, S.; Kommera, H.; Paschke, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2549–58.

líneas celulares como el derivado con el sustituyente $-N(CH_3)_2$ (Fig. 1.59.) con IC_{50} cercanas al μM y otras aminas disustituidas también muy activas¹³¹.

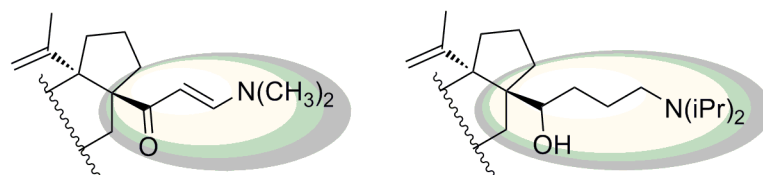


Figura 1.59. Derivados en C-28 de ácido betulínico

A diferencia de otros triterpenos con esqueleto de oleanano y lupano, ácido glicirrético presenta, un esqueleto que tiene el grupo carboxilo en C-30. El primer hecho comprobable es el que la sustitución en C-30 en forma de éster es totalmente necesaria para mejorar la actividad del derivado¹³², ya que el ácido por si solo apenas tiene actividad citotóxica. La esterificación del grupo carboxílico mejora entre 4 y 5 veces la actividad citotóxica de los productos. Las pruebas se hicieron en varias líneas celulares entre las que destaca un producto con un sustituyente en C-30, el (2E) 4-bromobut-2-enilo (Fig. 1.60.), con una IC_{50} en el rango μM para la línea celular SW1736.

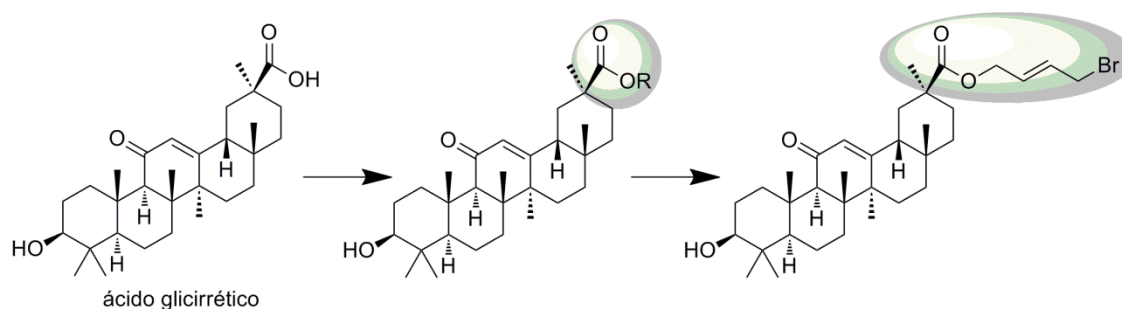


Figura 1.60. Derivados en C-30 de ácido glicirrético

Los estudios posteriores sobre ácido glicirrético, tras comprobar la necesidad de tener el C-30 esterificado, indicaban que para mejorar la actividad es necesario actuar sobre el OH en C-3. Así aparecen estudios donde se utilizaron sustituyentes aminoalquilo¹³³ de distinto tamaño de cadena donde se pudo comprobar que todos derivados que presentaban un grupo aminoalquilo aumentaban considerablemente la actividad citotóxica. También se encontró que los derivados con cadena en torno a 6 carbonos daban los mejores resultados, llegando a tener alguno de ellos una IC_{50} menor que $1 \mu M$ en algunas de las líneas celulares estudiadas. Al observar el incremento de estos derivados con un grupo nitrogenado también se probó en ácido glicirrético la síntesis de derivados que contuviesen distintos tipos de aminoácidos libres o en forma de sal hidroclicórica.¹³⁴ De los ésteres metílicos, etílicos,

¹³¹ Csuk, R.; Sczepek, R.; Siewert, B.; Nitsche, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 425–35.

¹³² Csuk, R.; Schwarz, S.; Siewert, B.; Kluge, R.; Ströhl, D. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2012**, *345*, 223–30.

¹³³ Csuk, R.; Schwarz, S.; Kluge, R.; Ströhl, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5718–23.

¹³⁴ Schwarz, S.; Csuk, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7458–74.

isopropílicos y bencílicos ensayados (Fig. 1.61.), los que resultaron más activos frente las líneas tumorales estudiadas, fueron los isopropílicos, además de tres derivados que contenían aminoácidos en el C-3 de manera que todos ellos, mejoraban la actividad del producto de partida.

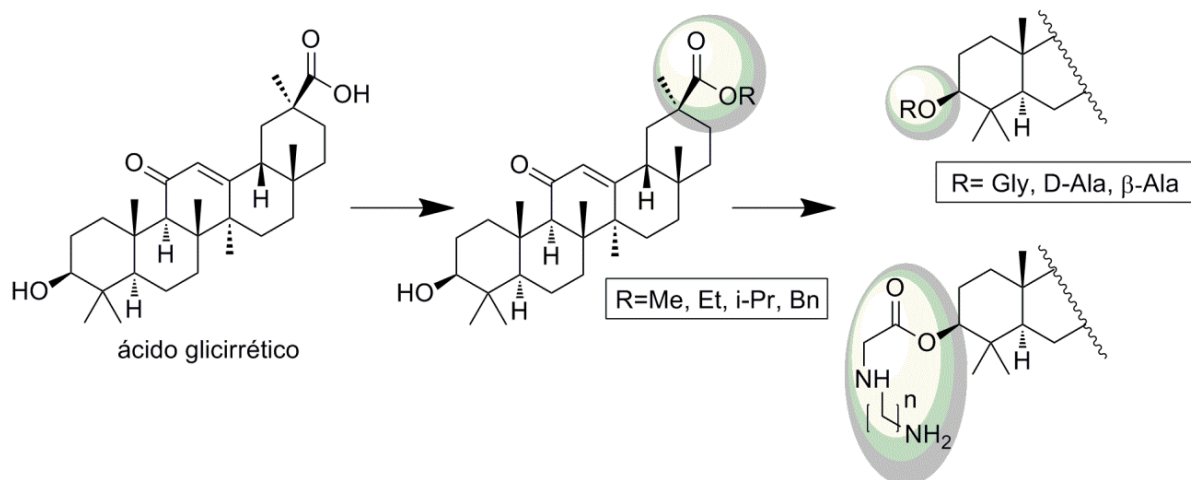


Figura 1.61. Derivados difuncionalizados de ácido glicirrético

En el caso de ácido oleanólico se considerarán dos tipos de derivados, los derivados de ácido oleanólico en sí y los derivados de CDDO (ácido 2-ciano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oico). Estos estudios comenzaron con transformaciones bastante sencillas de ácido oleanólico que demuestran que el 3-acetil derivado de ácido oleanólico y eritrodíol (Fig. 1.62.), tienen actividad anticancerígena en la línea celular HT29. Así, 3-O-acetiloleanólico¹³⁵, resultó ser muy activo como anticancerígeno sobre la línea celular HT-116, cáncer de colon humano, y que su actuación se lleva a cabo por una vía extrínseca a través de la cascada de activación caspasa 8.

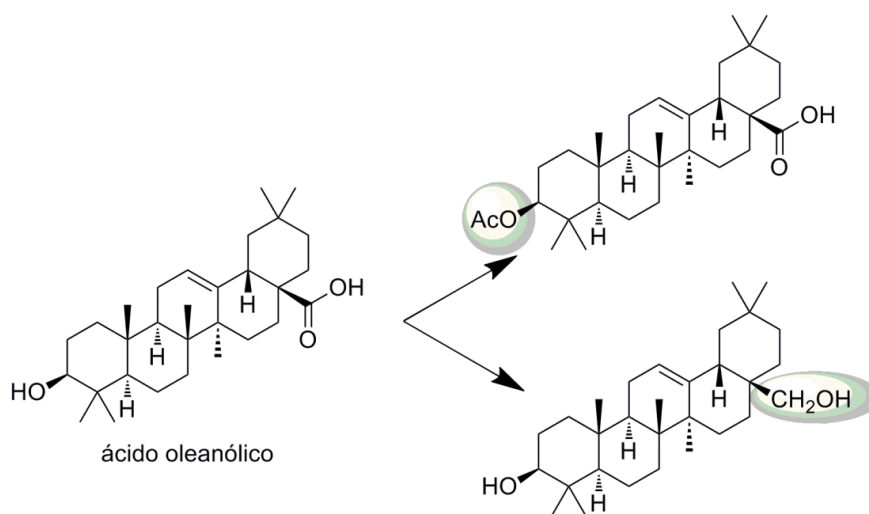


Figura 1.62. Derivados inmediatos de ácido oleanólico

¹³⁵Yoo, K. H.; Park, J.-H.; Cui, E. J.; Kim, K. Il; Kim, J. Y.; Kim, J.; Hong, S. G.; Baek, N. I.; Chung, I. S. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1541–6.

A partir de aquí el abanico de posibilidades de derivatización aumenta exponencialmente como consecuencia de la posibilidad de formar derivados tanto en C-3 como en C-28 o en ambos a la vez. Un claro y reciente ejemplo es la formación de derivados en C-3 con un grupo vinilboronato¹³⁶ y una amida o aminoácido en C-28. Se observa que los derivados de mayor actividad son los que tienen un boronato en C-3 y una amida o los aminoácidos glicina o alanina (Fig. 1.63.). El estudio se realizó para distintas líneas celulares dando como mejor resultado la línea celular K562 con una IC₅₀ casi 10 veces mejores que el producto natural de partida.

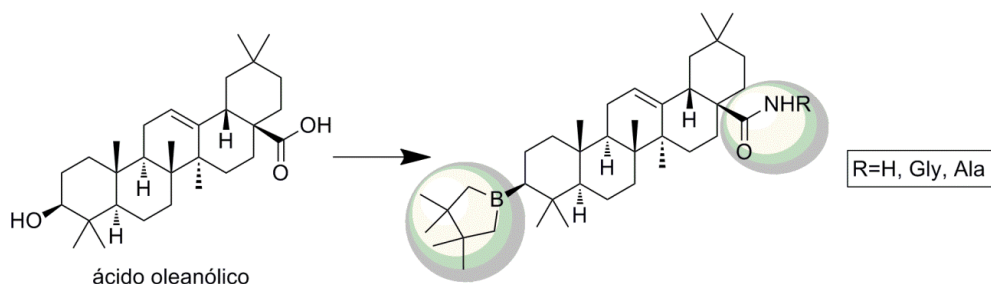


Figura 1.63. Formación de vinilboronato-derivados de ácido oleanólico

Otro derivado que se encuentra difuncionalizado, denominado NG, ha mostrado reducir el peso del tumor producido por la línea celular H22 en ratones y es capaz de inhibir el crecimiento en células HepG2 *in vitro*.¹³⁷ Este derivado tiene en C-3 un anillo bencénico con varios sustituyentes nitrogenados y en C-28 un éster glucósido (Fig. 1.64.). El estudio *in vitro* fue realizado sobre 4 líneas celulares: HepG2, SMMC-7721, Bel-7402 y L-02 poniendo de manifiesto que actúa de una forma dosis dependiente produciendo apoptosis y teniendo una IC₅₀ de 3.15 μ M a las 48 horas para la línea HepG2.

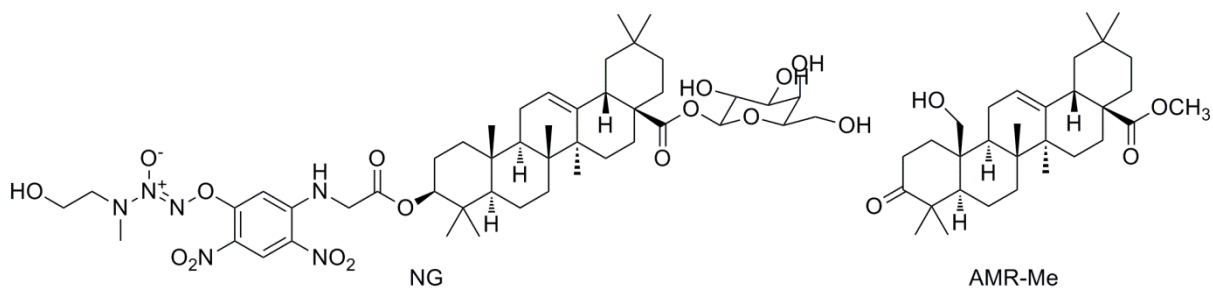


Figura 1.64. Derivados de ácido oleanólico difuncionalizados

Otro derivado de ácido oleanólico, con distintas variaciones funcionales con respecto de su precursor, es amooranina (AMR) que tiene grupo cetónico sobre C-3 e hidroxilo sobre el metilo angular de C-25 y presenta cierta actividad antitumoral. El éster metílico en C-28 de este compuesto (AMR-Me) presenta una buena actividad anticancerígena y es capaz de

¹³⁶ Moreira, V. M.; Salvador, J. a R.; Simões, S.; Destro, F.; Gavioli, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 46–56.

¹³⁷ Liu, L.; Fu, J.; Li, T.; Cui, R.; Ling, J.; Yu, X.; Ji, H.; Zhang, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, 691, 61–8.

crear una inhibición del crecimiento tumoral y un efecto apoptótico en cáncer de pecho en roedores.¹³⁸

Estudios más complejos muestran una serie de derivados en los que se le han incorporado grupos imidazol carbamatos, acilimidazoles o N-alquilimidazoles (Fig. 1.65).¹³⁹ El estudio realizado *in vitro* sobre células AsPC-1, células tumorales pancreáticas, revela que los productos más potentes de estos derivados son aquellos que tienen C-28 bloqueado como metil éster, lactonizado o formando una amida con imidazol. Este estudio también revela la necesidad de tener sustituido C-3 en la mayoría de los casos con un acilimidazol dando actividades entre 10 y 30 veces más potentes que el ácido oleanólico. Entre estos derivados sintetizados se descubrió uno que presentaba una actividad 111 veces más potente que el ácido precursor, que contiene un imidazolcarbamato en C-2, una cetona en C-3 y metil éster en C-28 y cuya IC₅₀ para la línea celular estudiada AsPC-1 es de 0.9 μM. Además, se realizaron estudios en otras líneas celulares similares como MIA PaCa2, PANC-1, MCF-7, HepG2, PC-3 y A549, obteniéndose resultados muy similares y mostrando ser este derivado muy prometedor para el tratamiento del cáncer pancreático.

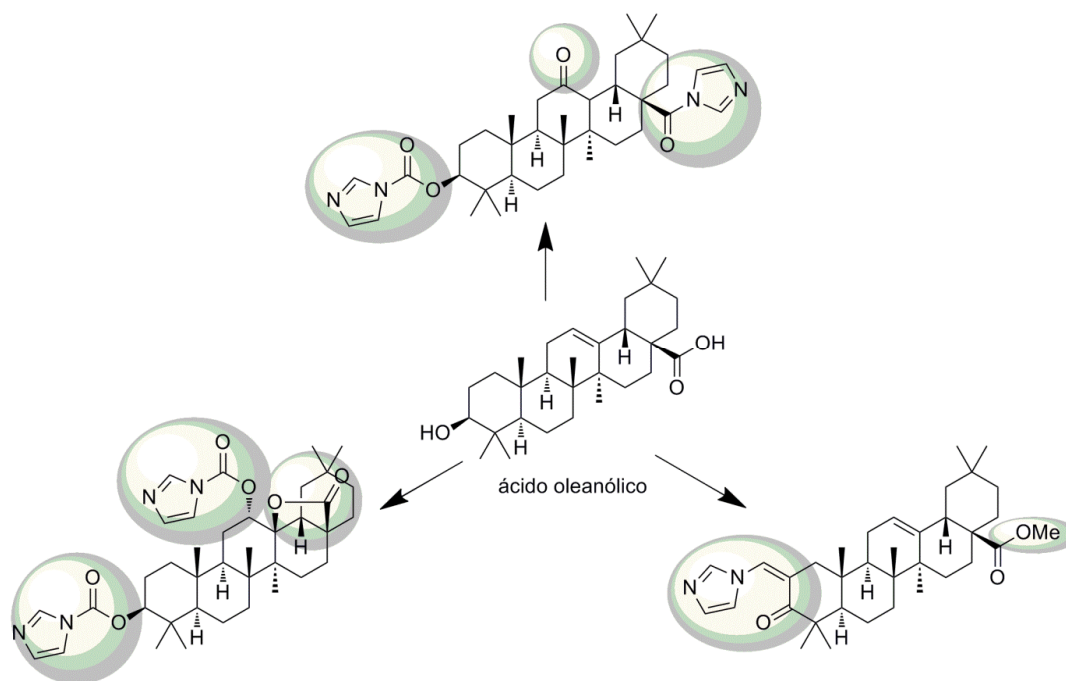


Figura 1.65. Derivados de ácido oleanólico con grupos imidazoles

Como ya se ha señalado la mayoría de los estudios van dirigidos a la síntesis de derivados en el C-3 y/o C-28, pero existen otros que nos presentan derivados de ácido oleanólico en el anillo C.¹⁴⁰ De estos derivados algunos muestran una actividad anticancerígena bastante prometedora, destacando los derivados que incluyen un grupo cetona en C-12 que ven aumentada su actividad anticancerígena respecto a ácido

¹³⁸ Bishayee, A.; Mandal, A.; Thoppil, R. J.; Darvesh, A. S.; Bhatia, D. *Int. J. Cancer* **2013**, *1064*, 1054–1063.

¹³⁹ Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. a R.; Jing, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1726–38.

¹⁴⁰ Bednarczyk-Cwynar, B.; Zaprutko, L.; Ruszkowski, P.; Hladoń, B. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2201–5.

oleanólico si a su vez se tiene bloqueado el C-28 como metil éster. La derivatización del C-3 con un grupo hidroximinio mejora sustancialmente la actividad, al igual que si se sustituye en C-12 con la misma función mientras se tiene el C-3 acetilado (Fig. 1.66.). Los ensayos fueron realizados sobre tres líneas celulares humanas KB, MCF-7, HeLa y en el caso de la línea celular KB se llegó a obtener una IC_{50} por debajo de 1 μ M. Además, en varios de los productos con el derivado hidroximinio se obtuvieron IC_{50} entre 1-2 μ M.

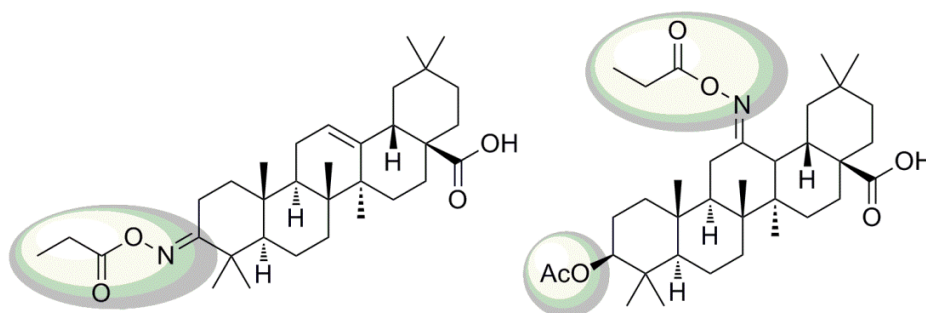


Figura 1.66. Derivados de ácido oleanólico con un grupo hidroximinio

El derivado más prometedor de ácido oleanólico es CDDO¹⁴¹, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico) que merece, por tanto, una mención aparte. CDDO es un derivado de ácido oleanólico con un grupo ciano en C-2 y dos cetonas en los carbonos C-3 y C-12 (Fig. 1.67.). Su actividad biológica es clara, actuando como anticancerígeno induciendo apoptosis, diferenciación e inhibición de la respuesta inflamatoria en varias líneas celulares. Los derivados obtenidos a partir de CDDO también están mostrando una fuerte actividad anticancerígena, los estudios se han desarrollado tanto a nivel de laboratorio como *in vivo*. El principal derivado de CDDO es su metil éster en C-28, realizando sobre él la mayoría de ensayos y estudios anticancerígenos. Uno de los más prometedores es aquel que se dirige a su actividad anticancerígena frente a osteosarcoma¹⁴² Este estudio proporciona además información sobre la vía de actuación de la molécula, observándose que ocurre por la vía de activación de las caspasas y con una actividad dosis dependiente. Este estudio también aporta datos sobre la sinergia que se produce con la doxorubicina, uno de los principales fármacos utilizados en la quimioterapia, siendo capaz de mejorar la actividad y disminuir la resistencia química que se crea sobre el fármaco. El CDDO-Me también se ha revelado como un buen agente contra el cáncer de páncreas¹⁴³, comprobándose su actuación frente a las líneas celulares MiaPaca2, Capan2, Pana-1 y BxPC y encontrándose en todos los casos su IC_{50} entre 0.6-1 μ M. Posteriores estudios confirmaron que al igual que en el caso anterior su actuación era dosis dependiente y podía seguir una vía tanto dependiente caspasa o como independiente de ella.¹⁴⁴ Los estudios *in vivo* se realizaron con ratones y ayudaron a comprobar la actividad frente a otros tipos de cáncer, siendo el ejemplo más claro el que

¹⁴¹ Petronelli, A.; Pannitteri, G.; Testa, U. *Anticancer. Drugs* **2009**, *20*, 880–892.

¹⁴² Ryu, K.; Susa, M.; Choy, E.; Yang, C.; Hornicek, F. J.; Mankin, H. J.; Duan, Z. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 187.

¹⁴³ Deeb, D.; Gao, X.; Arbab, A. S.; Barton, K.; Dulchavsky, S. A.; Gautam, S. C. *Cancers (Basel)*. **2010**, *2*, 1779–1793.

¹⁴⁴ Dorrah Deeb, Xiaohua Gao, Yong Bo Liu, and S. C. G.; D, D.; X, G.; YB, L.; SC, G. *J Exp Ther Oncol*. **2013**, *10*, 51–64.

muestra un estudio sobre el cáncer de próstata en ratones¹⁴⁵, comprobándose que inhibe tanto el cáncer de páncreas como su metástasis. Otra de las pruebas *in vivo* que ha dado resultados bastante alentadores es aquella en la que se utiliza el metil éster y la etil amida del CDDO para prevenir y tratar el cáncer de pulmón en ratones.¹⁴⁶ El estudio incluye la administración a ratones de los triterpenos junto con otros dos retinoides con actividad biológica ya demostrada. Los resultados presentados fueron bastante prometedores y, aunque los componentes ya eran anticancerígenos, la unión de ellos dos mejoraba bastante la actividad contra el cáncer de pulmón, además de ofrecer unos efectos antiinflamatorios aumentados.

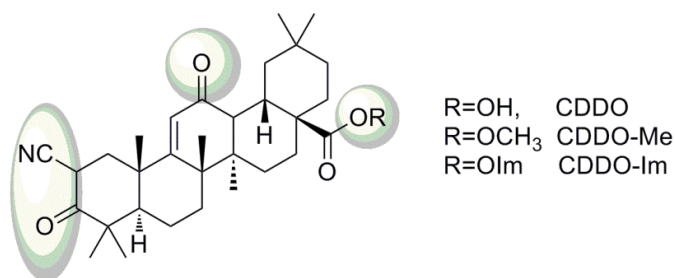


Figura 1.67. Derivados de ácido oleanólico de alto interés biológico

Otro derivado del CDDO es aquel que tiene unido un grupo imidazol en el C-28. No sólo ha demostrado actividad anticancerígena¹⁴¹, sino que existen estudios recientes que demuestran que inhibe el crecimiento de la metástasis en cáncer de hígado.¹⁴⁷ Además de actuar contra el cáncer, resulta muy útil en pacientes que tienen problemas de plaquetas ya que mejora su producción.¹⁴⁸ Por otra parte, al igual que en el caso anterior la combinación con ciertos tipos de retinoides mejora el efecto.

Entre los triterpenos menos estudiados cabe destacar ácido maslínico, otro triterpeno de la familia de los oleananos cuyos derivados con gran potencial antitumoral. Los estudios previos realizados sobre este triterpeno fueron realizados modificando el C-28 (Fig. 1.68.) y uniendo a él α y ω aminoácidos capaces de generar una respuesta apoptótica en células MT-2⁵⁰. Estudios posteriores mostraron que la esterificación en el C-28 con cadenas carbonadas de distintos tamaños y con diferentes grupos funcionales eran capaces de mejorar su actividad antitumoral. El estudio se centra en 7 líneas celulares muy distintas, dando lugar a resultados mejores que los derivados análogos similares de ácido betulínico, observándose en la mayoría de los derivados una IC₅₀ en torno a 5-20 μM ⁴⁹ y poniendo de manifiesto ser estos derivados del AM un buen punto de partida para iniciar la formación de derivados que mejorasen su actividad antitumoral.

¹⁴⁵ Gao, X.; Deeb, D.; Liu, Y.; Arbab, A. S.; Divine, G. W.; Dulchavsky, S. a; Gautam, S. C. *Cancers (Basel)*. **2011**, 3, 3353–3369.

¹⁴⁶ a) Liby, K.; Risingsong, R.; Royce, D. B.; Williams, C. R.; Ma, T.; Yore, M. M.; Sporn, M. B. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **2009**, 2, 1050–8. b) Kulkarni, A. A.; Thatcher, T. H.; Hsiao, H.-M.; Olsen, K. C.; Kottmann, R. M.; Morrissette, J.; Wright, T. W.; Phipps, R. P.; Sime, P. J. *PLoS One* **2013**, 8, e63798.

¹⁴⁷ Townson, J. L.; Macdonald, I. C.; Liby, K. T.; Mackenzie, L.; Dales, D. W.; Hedley, B. D.; Foster, P. J.; Sporn, M. B.; Chambers, A. F. *Clin. Exp. Metastasis* **2011**, 28, 309–17.

¹⁴⁸ Sardina, J. L.; López-Ruano, G.; Sánchez-Sánchez, B.; Hernández-Hernández, A. CDDO-Im, an antitumor molecule that also improves platelet production. *Leukemia Research*, 2011, 35, 427–428.

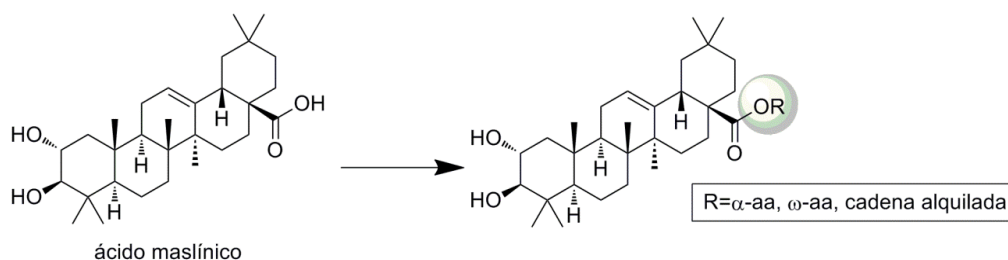


Figura 1.68. Formación de derivados en el C-28 de ácido maslínico

Al igual que la molécula de ácido maslínico otros ácidos triterpénicos han sido objeto de estudios menos exhaustivos, ejemplo de ello son ácido torméntico y ácido ursólico. Los derivados de ácido torméntico muestran cierta actividad anticancerígena en las distintas líneas celulares estudiadas¹⁴⁹, pudiendo llegar en algunos casos a IC₅₀ inferiores a 1 μ M. Los mejores resultados fueron obtenidos por productos esterificados en C-28 y mono o di sustituidos con ácido cloracético en los hidroxilos del anillo A (Fig. 1.69.). Mientras que en el caso de ácido ursólico hay que destacar unos triazol derivados en C-28 (Fig. 1.69.) que muestran actividades muy prometedoras¹⁵⁰, teniendo en algunos casos IC₅₀ menores de 0.1 μ M en alguna de las líneas celulares estudiadas y mostrando así que la sustitución en C-28 con un derivado bencílico del triazol es capaz de incrementar la actividad anticancerígena de una forma muy considerable.

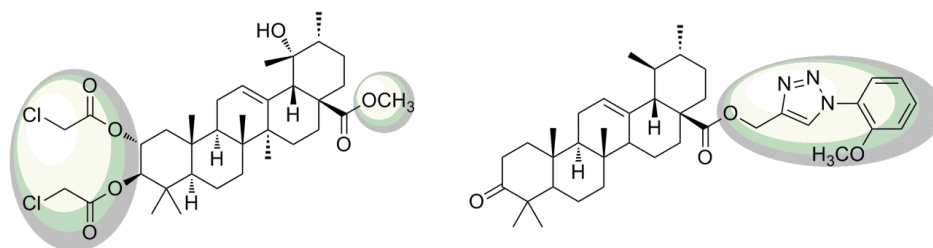


Figura 1.69. Derivados de otros ácidos triterpénicos que presentan actividad antitumoral

¹⁴⁹ Csuk, R.; Siewert, B.; Dressel, C.; Schäfer, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *56*, 237–45.

¹⁵⁰ Rashid, S.; Dar, B. A.; Majeed, R.; Hamid, A.; Bhat, B. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66C*, 238–245.

I.4.4. ACTIVIDAD ANTI-VIH

a) El ciclo vital del VIH

Un virus es un agente infeccioso microscópico acelular. Para que los virus se reproduzcan, deben infectar una célula. Para formar virus nuevos, deben introducirse en una célula y usarla para reproducirse. Los virus introducen su propio ADN en el ADN de la célula, cuando la célula intenta producir proteínas nuevas, también crea nuevos virus. El VIH infecta mayormente a las células del sistema inmunitario.

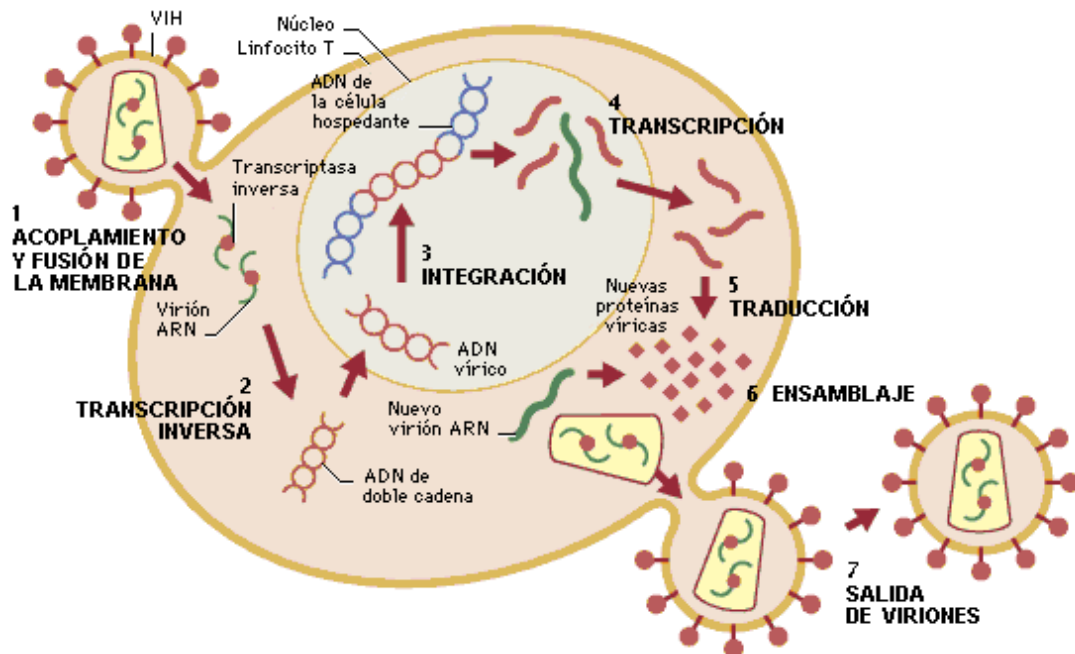


Figura 1.70. Ciclo vital del VIH

Existen dos tipos de VIH¹⁵¹, se han identificado como agentes etiológicos del SIDA y que se han denominado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); estos dos tipos de virus son genética y antigénicamente diferentes y se han llamado VIH-1 y VIH-2. El primero es el considerado responsable de la epidemia mundial mientras que en el caso del segundo, se trata de un virus endémico del África Oriental y es sumamente raro fuera de esta región. El VIH-2 se diferencia del VIH-1 porque produce una enfermedad menos agresiva, parece evolucionar más lentamente hacia la destrucción del sistema inmunitario, su transmisión vertical (madre-hijo) parece ser más difícil y existe variación en la regulación del virus a nivel genético; los genomas del VIH-1 y VIH-2 tienen una similitud de sólo el 40-50% y el VIH-2 presenta una homología del 75% con el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV).

¹⁵¹ a) Barré-Sinoussi, F.; Ross, A. L.; Delfraissy, J.-F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 877–83. b) Nyamweya, S.; Hegedus, A.; Jaye, A.; Rowland-Jones, S.; Flanagan, K. L.; Macallan, D. C. *Rev. Med. Virol.* **2013**, *23*, 221–40

El ciclo vital del VIH consta de varias etapas y en cada una de ellas existe un potencial de bloqueo del mismo:

- Etapa 1: Unión

El virus está compuesto por una cubierta externa formada por proteínas, lípidos y azúcares, que envuelve a un grupo de genes (en el caso del VIH, la información genética se transporta como ARN en lugar de ADN) y enzimas especiales. En la cubierta, el VIH tiene proteínas que son atraídas con fuerza hacia el receptor de superficie CD4⁺ que se encuentra en la superficie exterior de la célula T4. Cuando el VIH se une al receptor de superficie CD4⁺, activa otras proteínas en la superficie celular, permitiendo que la cubierta del VIH se fusione con la superficie exterior de la célula. Los inhibidores de la entrada pueden bloquear esta etapa.

- Etapa 2: Transcripción inversa

Los genes del VIH son transportados en dos cadenas de ARN, en tanto que el material genético de las células humanas se encuentra en el ADN. Para que el virus pueda infectar a la célula, es necesario que ocurra un proceso llamado "transcripción inversa", en el cual se genera una copia de ADN a partir del ARN viral. Después del proceso de unión, se libera la cápside viral (la parte interna del virus que contiene el ARN y las enzimas importantes) dentro de la célula anfitriona. Una enzima viral conocida como transcriptasa inversa hace una copia de ADN a partir del ARN. Este nuevo ADN se llama "ADN proviral". Los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa, y los inhibidores no-nucleósidos de la transcriptasa inversa son los que pueden afectar a esta etapa.

- Etapa 3: Integración

A continuación, el ADN del VIH es llevado al núcleo de la célula, donde ésta guarda su ADN. Luego, otra enzima viral denominada integrasa oculta el ADN proviral dentro del ADN de la célula. Entonces, cuando la célula trata de producir nuevas proteínas, puede producir nuevos VIH. Los inhibidores de la integrasa pueden bloquear la integración.

- Etapa 4: Transcripción

Una vez que el material genético del VIH se encuentra dentro del núcleo celular, dirige a la célula para producir nuevos VIH. Dentro del núcleo, las cadenas de ADN viral se separan, y enzimas especiales crean una hebra complementaria de material genético que se conoce como ARN mensajero o ARNm (las instrucciones para producir un nuevo VIH). Los inhibidores de la transcripción (IT), nuevas clases de medicamentos que se encuentran en las primeras etapas de investigación, pueden bloquear la transcripción.

- Etapa 5: Traducción

El ARNm transporta instrucciones para crear nuevas proteínas virales desde el núcleo hasta la mitocondria. Cada sección del ARNm corresponde a un eslabón de la cadena de proteínas para construir una parte del VIH. A medida que se procesa cada cadena de ARNm, se forma una cadena de proteínas. Este proceso continúa hasta que la

cadena de ARNm se ha transformado o "traducido" en las nuevas proteínas virales necesarias para formar nuevos virus.

- Etapa 6: Ensamble viral

El paso final comienza con el ensamblado de un virus nuevo. Una enzima viral denominada proteasa, corta las largas cadenas de proteínas formando otras proteínas más pequeñas. Estas proteínas cumplen muchas funciones; algunas se convierten en elementos estructurales de un nuevo VIH, mientras que otras se transforman en enzimas, tales como la transcriptasa inversa. Una vez que las nuevas partículas virales se ensamblan, se desprenden de la célula anfitriona, y crean un virus nuevo. Entonces el virus entra al paso de maduración, el cual comprende el procesamiento de proteínas virales. La maduración es el paso final en el proceso y es un requisito necesario para que el virus pase a ser infeccioso. Una vez que se completa el ensamblado y la maduración del virus, el mismo es capaz de infectar otras células. Cada célula infectada puede producir muchos virus nuevos.

Los inhibidores de la proteasa (IP) pueden bloquear el ensamble viral. La maduración, un nuevo blanco de ataque para el desarrollo de medicamentos anti-VIH, puede ser bloqueada por los inhibidores de la maduración. Se observa por tanto que existe la posibilidad de frenar e incluso impedir que el VIH se desarrolle o que infecte a la célula. Las nuevas técnicas farmacológicas van encaminadas a esas vías y gracias a la aparición de varios productos naturales se tiene la esperanza de poder tratar el VIH.

b) Actividad anti-VIH de productos naturales

La actividad anti-VIH como se ha señalado anteriormente se basa en interferir en uno de los pasos del ciclo vital del VIH. Para ello nos encontramos en el mercado un sinnúmero de fármacos que interrumpen o interfieren de alguna forma en los procesos del VIH. En el estudio de los agentes anti-VIH destacan desde alcaloides sencillos de unos pocos carbonos hasta triterpenos complejos con varias funciones, todo esto gracias a la aparición de nuevas técnicas de separación y purificación.

Se pueden encontrar compuestos con actividad anti-VIH desde los compuestos más simples, como son los alcaloides, pudiendo identificar varios productos con bastante actividad. Entre ellos destacan los productos (+)-1(R)-coclaurina y (-)-1(S)-norcoclaurina presentando ambos una EC_{50} baja¹⁵², harmina, otro alcaloide que presenta actividad anti-VIH con una EC_{50} del orden de μM ¹⁵³ y moléculas un poco más complejas con grupos funcionales menos comunes como (\pm)-6-acetonildihidrocheleritrina que a pesar de tener una EC_{50} no muy baja tiene un TI muy interesante y que hace a esta una sustancia muy prometedora para estudios posteriores (Fig. 1.71.).¹⁵⁴

¹⁵² Kashiwada, Y.; Aoshima, A.; Ikeshiro, Y.; Chen, Y.-P.; Furukawa, H.; Itoigawa, M.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Cosentino, L. M.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 443–448.

¹⁵³ Ishida, J.; Wang, H.-K.; Oyama, M.; Cosentino, M. L.; Hu, C.-Q.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 958–960.

¹⁵⁴ Chang, Y.-C.; Hsieh, P.-W.; Chang, F.-R.; Wu, R.-R.; Liaw, C.-C.; Lee, K.-H.; Wu, Y.-C. *Planta Med.* **2003**, *69*, 148–52.

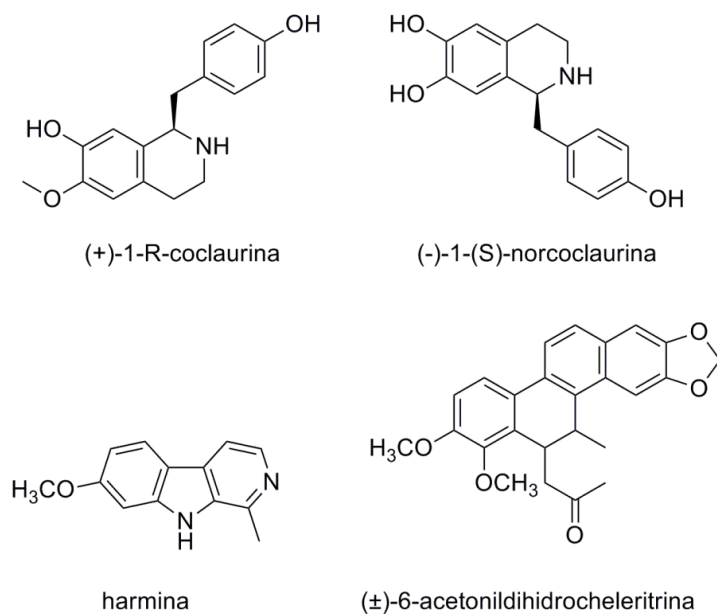


Figura 1.71. Ejemplos de productos naturales con actividad anti-VIH

En el campo de las flavonas también se han encontrado una serie de productos con actividad anti-VIH como son acacetin-7-O-b-D-galactopiranosida obtenido del extracto de las flores del *Chrysanthemum morifolium*¹⁵⁵ y el lawinal¹⁵⁶ extraído del *Desmos* spp. (Fig. 1.72.). Ambos compuestos tienen una EC_{50} en torno a las unidades μM , pero cabe destacar que su TI ronda los 50 lo cual les convierte en productos muy interesantes.

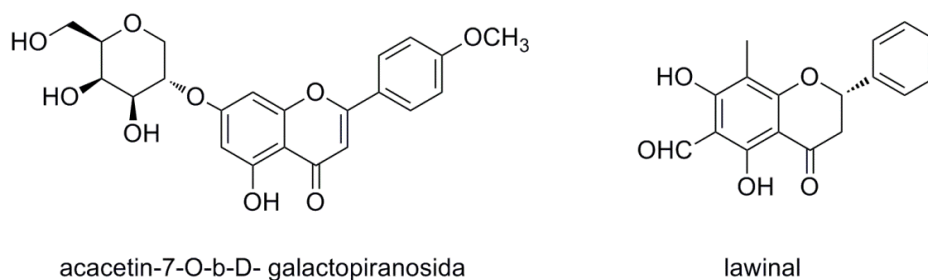


Figura 1.72 Algunas flavonas con actividad anti-VIH

Sustancias más complejas como los lignanos también han resultado muy activos y cabe destacar el fármaco etoposida, que ha demostrado tener altas propiedades anticancerígenas y cuya IC_{50} es de $1.27 \mu\text{M}$ y su TI mayor de 40.¹⁵⁷

¹⁵⁵ Hu, C.-Q.; Chen, K.; Shi, Q.; Kilkuskie, R. E.; Cheng, Y.-C.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 42–51.

¹⁵⁶ Wu, J.-H.; Wang, X.-H.; Yi, Y.-H.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, *13*, 1813–1815.

¹⁵⁷ Zhu, X.-K.; Guan, J.; Xiao, Z.; Mark Cosentino, L.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4267–4273.

En algunos casos, incluso, encontramos moléculas de las cuales ya se están realizando actualmente estudios preclínicos y clínicos siendo su máximo exponente (+)-calanolida A¹⁵⁸ (Fig. 1.73.) que resulta ser un potente inhibidor de la transcriptasa inversa con una EC₅₀ *in vitro* en torno a 0.1 μM. Los estudios previos *in vivo* se realizaron sobre ratones dando muy buenos resultados¹⁵⁹ y esto supuso que se comenzaran a realizar estudios preclínicos con este producto los cuales se encuentran en la actualidad en la Fase IB de los ensayos (fase para pacientes con cáncer extenso que puede ser palpado u observado en un examen).

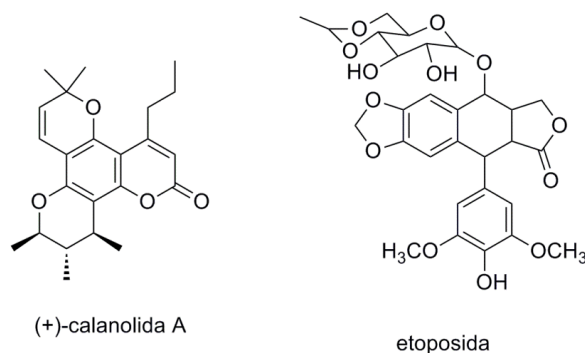


Figura 1.73. Ejemplos de moléculas con actividad anti-VIH

En el campo de los terpenos también se puede destacar bastantes ejemplos de compuestos naturales como tales o de sus derivados que muestran actividad anti-VIH. De todos ellos, la mayoría de los terpenos que presentan actividad anti-VIH son triterpenos tetracíclicos o pentacíclicos, aunque cabe destacar también una serie de diterpenos y sesquiterpenos muy prometedores. Entre los sesquiterpenos¹⁶⁰ recientemente descubiertos cabe subrayar oxyfillendiol B y 1,2,3,4-tetrahidro-2,5-dimetil-8-(1-metiletil)-1,2-naftalenediol (Fig. 1.74.) que han resultado tener una actividad contra de la replicación del VIH-1 gracias al experimento realizado con células HOG.R5.

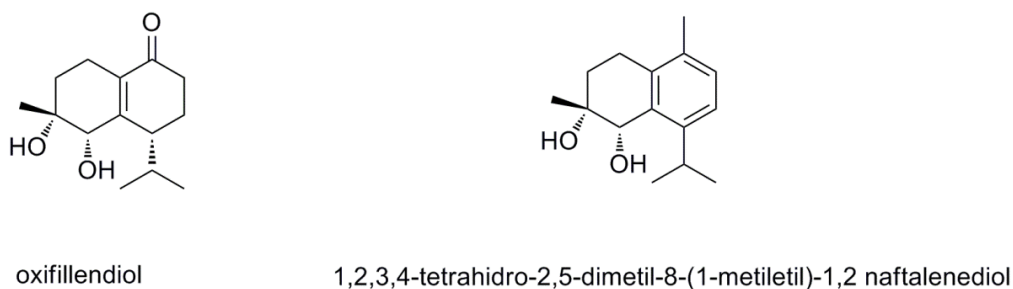


Figura 1.74. Algunos sesquiterpenos con actividad anti-VIH

¹⁵⁸ Kashman, Y.; Gustafson, K. R.; Fuller, R. W.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Currens, M. J.; Buckheit, R. W.; Hughes, S. H.; Cragg, G. M.; Boyd, M. R. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2735–2743.

¹⁵⁹ Xu, Z.-Q.; Hollingshead, M. G.; Borgel, S.; Elder, C.; Khilevich, A.; Flavin, M. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 133–138.

¹⁶⁰ Singh, I. P.; Bodiwala, H. S. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1781–800.

Como ejemplos de diterpenos con actividad anti-VIH se pueden resaltar varios obtenidos del extracto de *Tripterygium wilfordii*. Los tres diterpenos encontrados con actividad anti-VIH son neutripterrifordina¹⁶¹, tripterifordina¹⁶² y ácido 16 β ,17-dihidroxi-ent-kauran-19-oico (Fig. 1.75).¹⁶³

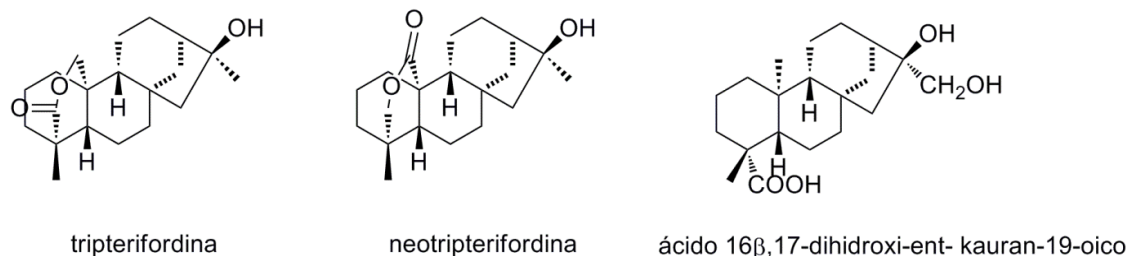


Figura 1.75. Algunos diterpenos con actividad anti-VIH

En los últimos años los triterpenos han sido muy estudiados para comprobar su actividad anti-VIH y de ellos sobresalen fundamentalmente los triterpenos tetracíclicos y los pentacíclicos (Fig. 1.76.). Casi como único representante de los triterpenos tetracíclicos destaca la molécula curcurbitacina F, con una actividad anti-VIH bastante elevada ya que presenta una IC₅₀ menores a 1 μ M.

De los ácidos triterpénicos pentacíclicos hay que subrayar uno sobre los demás, ácido betulínico. Sobre este ácido, tan abundante en la naturaleza, se realizaron los primeros estudios anti-VIH y por esta razón el ácido betulínico es uno de los compuestos que más se ha derivatizado.¹⁶⁴ Cabe destacar que el producto de partida tiene bastante buena actividad anti-VIH presentando una EC₅₀ de 1.4 μ M para el VIH-1 sobre células H9 linfocíticas, mostrando actividad contra la entrada del virus y como inhibidor de la transcriptasa inversa y la proteasa del mismo.

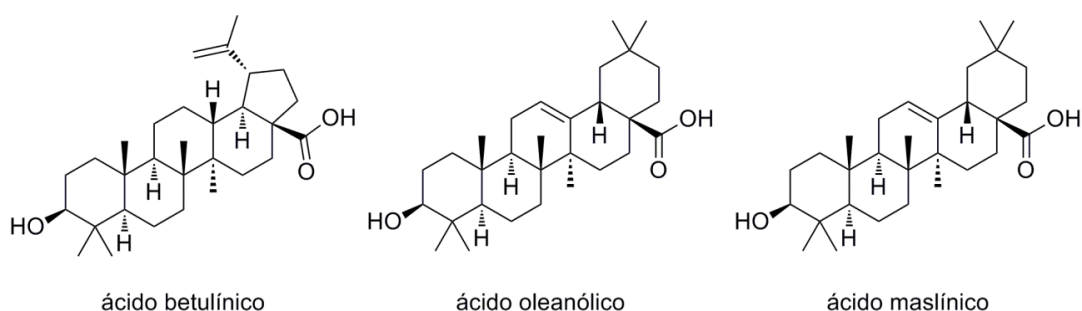


Figura 1.76. Principales estructuras de ácidos triterpénicos con actividad anti-VIH

¹⁶¹ Chen, K.; Shi, Q.; Fujioka, T.; Nakano, T.; Hu, C.-Q.; Jin, J.-Q.; Kilkuskie, R. E.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1345–1348.

¹⁶² Chen, K.; Shi, Q.; Fujioka, T.; Zhang, D.-C.; Hu, C.-Q.; Jin, J.-Q.; Kilkuskie, R. E.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 88–92.

¹⁶³ Wu, Y. C.; Hung, Y. C.; Chang, F. R.; Cosentino, M.; Wang, H. K.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 635–7.

¹⁶⁴ Yogeeswari, P.; Sriram, D. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657–66.

Otros triterpenos destacados son algunos de la familia de los oleananos y entre ellos el ácido oleanólico que presenta una actividad con una IC_{50} de 21.8 $\mu\text{g/mL}$.¹⁶⁵ Otro triterpeno pentacíclico estudiado es ácido maslínico, que posee una potente actividad inhibitora *in vitro* de la proteasa del virus del SIDA¹⁶⁶ y actividad antiviral (anti-HSV).¹⁶⁷ Se ha comprobado, además, que esta actividad es más potente en este ácido que en otros triterpenos como ácido ursólico, ácido epipomólico, ácido euscáfico y ácido torméntico. Se han realizado ensayos para su utilización como inhibidor de proteasas en el tratamiento del SIDA y se ha demostrado que estos productos no sólo actúan *in vitro* a nivel de enzima, sino que son capaces de penetrar en la célula, impidiendo la acción que el virus del SIDA utiliza para su salida de la célula infectada en su camino hacia el ataque de nuevas células. En consecuencia se ha llegado a comprobar que a la concentración de 17.9 $\mu\text{g/mL}$ la actuación de ácido maslínico consiste en ralentizar de forma muy significativa la propagación del SIDA.

c) Actividad anti-VIH de derivados de productos naturales

La obtención de fármacos dirigidos contra el VIH se rige hoy día en su mayoría por dos factores fundamentales, a saber, el abaratamiento de costes de producción y la consecución de una futura vacuna contra el mismo. Es sabido que, como el VIH muta rápidamente y se vuelve resistente a todos los medicamentos administrados en forma aislada, los pacientes deben tomar una combinación de fármacos para lograr la máxima supresión del VIH.

Como se ha señalado con anterioridad, actualmente, los productos naturales son un buen recurso para obtener fármacos prometedores contra el sida. La mayoría de los fármacos se dividen en cuatro grandes familias: inhibidores de la proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido/nucleótido, inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido e inhibidores de la entrada o fusión. En la actualidad existe un sinnúmero de compuestos químicos con los que se están experimentando. A modo de ejemplo se puede subrayar un producto natural denominado andrografolida¹⁶⁸ con apenas actividad anti-VIH y que la ve mejorada sensiblemente, pasando de un TI de 1.31 a un TI de 23.74, cuando se forma un derivado de ella que tiene con una cadena lateral esterificada con 10 carbonos, llegando a obtener una TI de 34 para el derivado que presenta un grupo naftalina como cadena lateral (Fig. 1.77.).

Productos como peyssonol y calanolida A llevan más tiempo bajo estudio y se consideran inhibidores de la transcriptasa inversa. En el caso de peyssonol se observa que partiendo de un producto natural que ya muestra actividad con una EC_{50} de 1 μM y TI de 4 se obtienen derivados más activos a través de reacciones muy sencillas (Fig. 1.78.). Se demuestra que los dos derivados más activos de peyssonol¹⁶⁹ son dos productos que han

¹⁶⁵ Kashiwada, Y.; Wang, H.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, O. L. M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; Ikeshiro, Y.; Hu, C.; Yeh, O. E.; Lee, K. **1998**, *3864*, 1090–1095.

¹⁶⁶ Xu, H.; Zeng, F.; Wan, M.; Sim, K. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 12–14.

¹⁶⁷ Serra, C.; Lampis, G.; Pompei, R.; Pinza, M. *Pharmacol. Res.* **1994**, *29*, 359–366.

¹⁶⁸ Tang, C.; Liu, Y.; Wang, B.; Gu, G.; Yang, L.; Zheng, Y.; Qian, H.; Huang, W. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2012**, *345*, 647–56.

¹⁶⁹ Treitler, D. S.; Li, Z.; Krystal, M.; Meanwell, N. A.; Snyder, S. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, *23*, 2192–2196.

perdido el grupo bencilo y tienen dos hidroxilos, uno de los derivados con los hidroxilos protegidos vía carbonatación y otro con los hidroxilos libres.

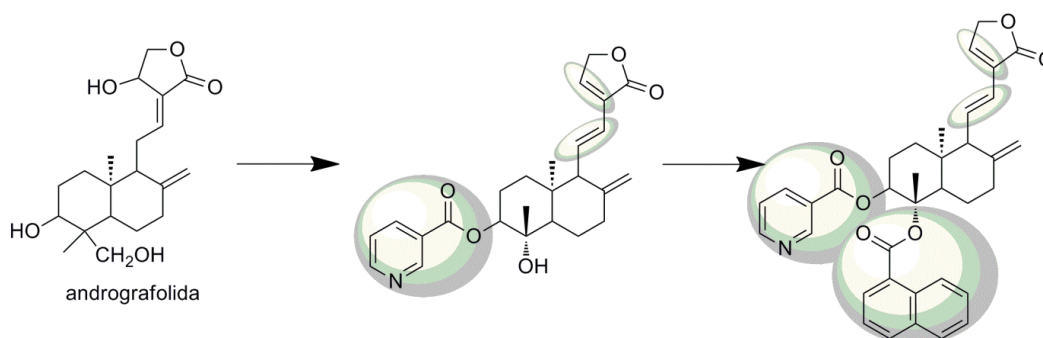


Figura 1.77. Derivados de andrografolida con actividad anti-VIH

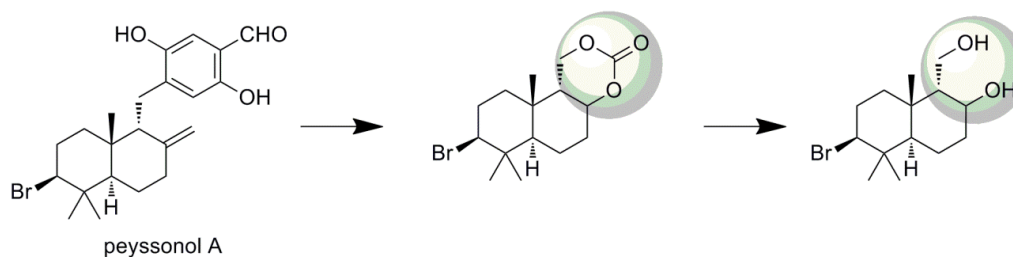


Figura 1.78. Derivados de peyssonol con actividad anti-VIH

Por otra parte, calanolida A, proveniente de la planta *Calophyllum lanigerum*, como ya se ha indicado anteriormente ya se encuentra en estudios clínicos tiene una actividad con una TI de 85. Los derivados obtenidos a partir de este producto mejoran considerablemente la actividad mostrada pudiendo llegar a obtener un TI > 1000 (Fig. 1.79.).

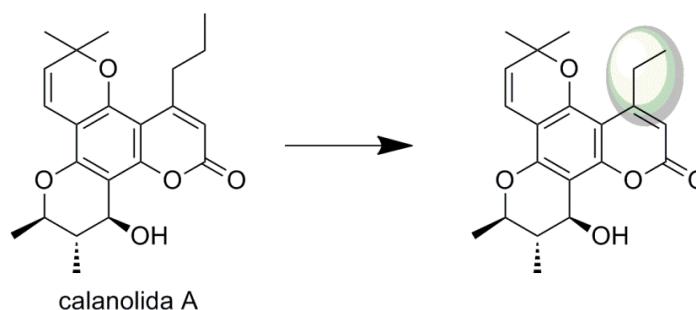


Figura 1.79. Derivado de calanolida A con alta actividad anti-VIH

Como se ha comentado anteriormente, ácido betulínico es el más utilizado y derivatizado de los triterpenos debido a su sobresaliente actividad biológica como agente anti-VIH.¹⁷⁰ Las últimas investigaciones aparecidas van encaminadas a una serie de fármacos que han abierto otra vía de ataque frente al VIH, los fármacos anti-maduración. El máximo exponente de este tipo de fármacos es el llamado bevirimat (Fig. 1.80.).¹¹⁷ Este fármaco derivado¹⁷¹ del producto natural ácido betulínico presenta una IC_{50} de $0.087 \mu M$ y un TI de 171 mientras que ácido betulínico¹⁷² tiene una IC_{50} de $13 \mu M$ y un TI de 9.3. El derivado es casi 20 veces más efectivo que el producto de partida y trabaja con una concentración mucho menor, encontrándose actualmente en estudios preclínicos. La principal característica funcional de bevirimat es la formación de un éster con un 3,3-dimetilsuccinilo en el hidroxilo de C-3 y ello conlleva una potenciación de varios órdenes de magnitud en su IC_{50} .¹⁷² Se estudió, además, con detalle el efecto de la posición de los metilos en el acilo, analizando la respuesta de los monometilsuccinilderivados y concluyendo que el que más aportaba a la actividad anti-VIH, era el 3S-metil-succinil-derivado obteniendo.¹⁷³

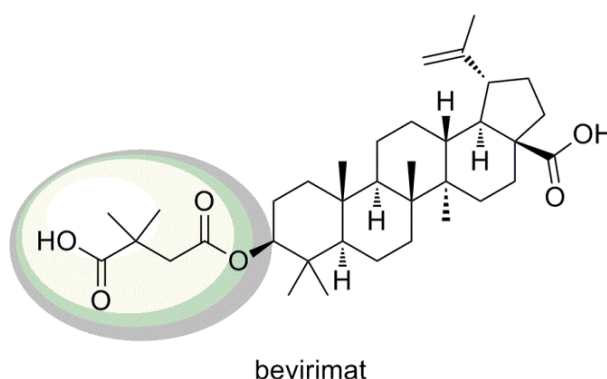


Figura 1.80. Principal derivado de ácido betulínico con actividad anti-VIH

Dada la buena actividad mostrada por estos últimos derivados en ácido betulínico, se escogieron otras moléculas de ácidos triterpénicos similares y se estudiaron exactamente los mismos derivados. Una de las primeras sustancias utilizadas fue el ácido dihidrobetulínico¹⁷² por ser casi idéntico al ácido betulínico deduciéndose que también en esta caso el derivado 3,3-dimetilsuccinilado es más potente (IC_{50} de $4.9 \mu M$ para el derivado de ácido dihidrobetulínico) que el 2,2-dimetilsuccinilo (IC_{50} de $7.7 \mu M$ para el derivado del dihidrobetulínico).

Tras observar que el gem-dimetilo en posición 3 del succinil derivado era tan importante, se probó con otros derivados que tuvieran esa misma disposición estructural,

¹⁷⁰ Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243–247.

¹⁷¹ Qian, K.; Bori, I. D.; Chen, C.-H.; Huang, L.; Lee, K.-H. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8128–36.

¹⁷² Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H. H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016–

7.

¹⁷³ Qian, K.; Nakagawa-Goto, K.; Yu, D.; Morris-Natschke, S. L.; Nitz, T. J.; Kilgore, N.; Allaway, G. P.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6553–6557.

entre ellos el más usado fue el 3,3-dimetil-glutarilo (Fig. 1.81.). Al igual que antes se comenzó con derivados de ácido betulínico y dihidrobetulínico observándose una IC_{50} bastante bajas¹⁷² y actividades similares a los derivados succinilados.

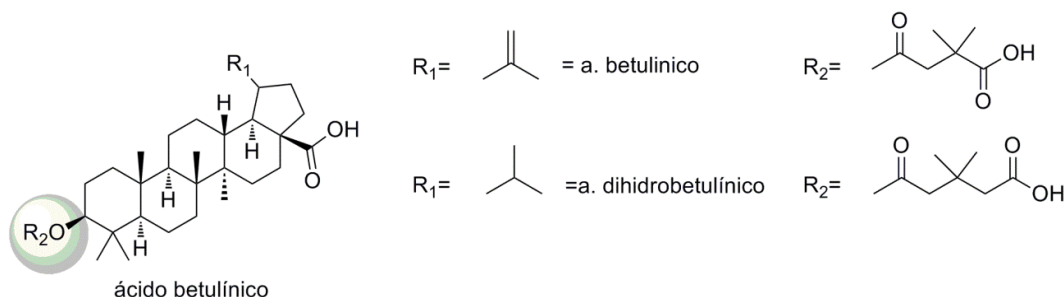


Figura 1.81. Derivados de ácido betulínico y de ácido dihidrobetulínico con alta actividad anti-VIH

Los compuestos más usuales con esta actividad biológica tenían en el anillo E como función principal es un ácido carboxílico y en algunos casos se transformó esta función en un grupo hidroximetilénico por reducción del grupo carboxilo del ácido betulínico.¹⁷⁴ En algunos casos, además, se procedió a la funcionalización del grupo hidroximetilénico obtenido. Así, cuando betulinol es acilado en C-28¹⁷⁵ con 2,2-dimetilsuccinilo y 3,3-dimetilsuccinilo, la modificación funcional mejoró ligeramente la actividad frente al compuesto de origen quedándose su IC_{50} en torno a 30-40 μ M, bastante lejos del producto de partida, comprobándose también que la posición del gem-dimetilo no influía en la actividad. De igual manera fueron ensayados otros grupos unidos al hidroxilo de C-3 de estos ácidos triterpénicos, pero ninguno de ellos supuso una mejoría de la actividad biológica estudiada tomando como referencia el derivado 3,3-dimetilsuccinilado. Un ejemplo de estos ensayos fue la oxidación del OH en C-3 a cetona¹⁷⁶, lo cual reduce drásticamente la actividad anti-VIH. Así mismo, si el grupo éster de C-3 se cambia por una función amida¹⁷⁷ también se reduce su actividad varios órdenes de magnitud quedando su IC_{50} en torno a 30-40 μ M. Pero incluso se ha demostrado que la epimerización¹⁷⁸, pasando de 3β a 3α del mismo sustituyente 3,3-dimetilsuccinil, produce una pérdida de actividad de 10 veces su valor uno respecto del otro.

Por tanto, una vez puesto de manifiesto que el sustituyente que mayor actividad anti-VIH origina en estos derivados de los ácidos triterpénicos es el 3β -3,3-dimetilsuccilo, se tiene constancia de varios intentos de mejorar la actividad buscando variar el sustituyente en

¹⁷⁴ Sun, I. C.; Wang, H. K.; Kashiwada, Y.; Shen, J. K.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Yang, L. M.; Lee, K. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648–4657.

¹⁷⁵ Kashiwada, Y.; Chiyo, J.; Ikeshiro, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Fowke, K.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 183–185.

¹⁷⁶ Yu, D.; Sakurai, Y.; Chen, C.-H.; Chang, F.-R.; Huang, L.; Kashiwada, Y.; Lee, K.-H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5462–5469.

¹⁷⁷ Qian, K.; Yu, D.; Chen, C.-H.; Huang, L.; Morris-Natschke, S. L.; Nitz, T. J.; Salzwedel, K.; Reddick, M.; Allaway, G. P.; Lee, K.-H. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3248–58.

¹⁷⁸ Soler, F.; Poujade, C.; Evers, M.; Carry, J. C.; Hénin, Y.; Bousseau, a; Huet, T.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Mayaux, J. F.; Le Pecq, J. B.; Dereu, N. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1069–83.

C-28 para maximizar esta actividad biológica obteniendo así derivados bifuncionalizados. Esta modificación en C-28 se llevó a cabo variando la funcionalización en este carbono y uniendo distintos tipos de α , γ , ω -aminoácidos, formando derivados mono o dipeptídicos. De estos derivados monofuncionalizados en C-28 la mayoría de ellos apenas mejoran la actividad de su precursor, ácido betulínico. Así en el caso de ácido betulínico se confirma que variar la función carboxilo de C-28 por un aldehído¹⁷⁹ o un nitrilo reducía ligeramente la actividad de los distintos derivados realizados teniendo una IC_{50} elevadas. El estudio de la unión de C-28 a ω -aminoácidos se inició principalmente con ácido betulínico y se realizaron pruebas con cadenas de distinto tamaño en el aminoácido que va desde 3 hasta 12 carbonos (Fig. 1.82.).¹⁷³ Así, se comprobó que las cadenas a partir de ocho carbonos hasta 12 presentaban una buena actividad anti-VIH y que concretamente el ácido 11-aminoundecanoico mostraba una muy buena actividad anti-VIH.¹⁸⁰ En cambio las cadenas más cortas concretamente las de 5 carbonos mostraban buena actividad frente al VIH-2¹⁸¹, llegando a IC_{50} menores de 1 μ M. Estos estudios también incluyen la formación de varios dipéptidos realizados mediante la combinación de una serie de ω -aminoácidos y α -aminoácidos, analizando los efectos de estos producidos sobre la actividad y mostrando que el grupo amida formado debe ser un factor importante a la hora de presentar actividad.

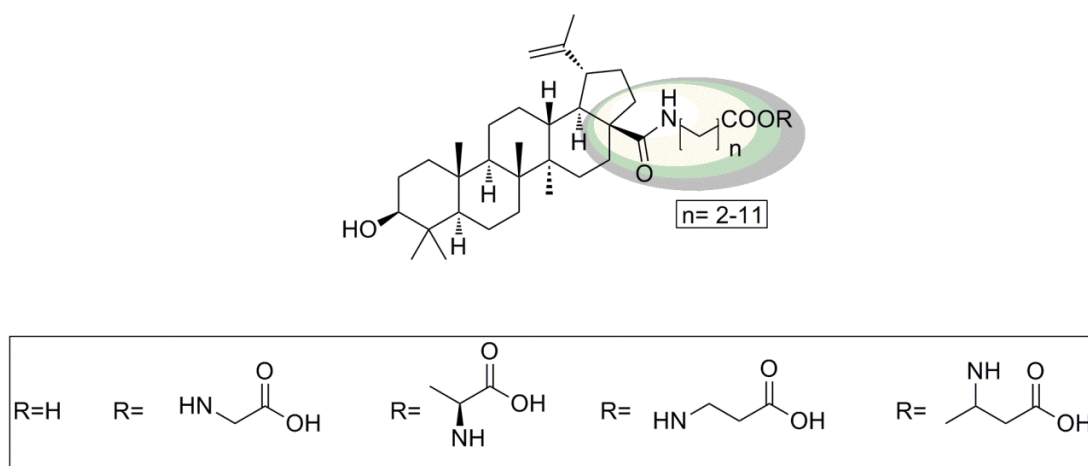


Figura 1.82. Derivados de ácido betulínico en el C-28 con actividad anti-VIH

En caso de bevirimat, se observa que hay varias combinaciones de distintos tipos de aminoácidos que presentaban actividad similar o incluso mejor que él.¹⁸² Pero donde los resultados fueron realmente excelentes fue en la unión de un ω -aminoácido con un α -aminoácido, concretamente el caso de la unión de un ω -aminoácido de 8 carbonos con un α -aminoácido¹⁸² como la Leu (Fig. 1.83.) dando valores de IC_{50} muy bajos. Por otra parte, los derivados con una unión de un grupo aminobenzoico tienen actividades similares a los

¹⁷⁹ Dorr, C. R.; Yemets, S.; Kolomitsyna, O.; Krasutsky, P.; Mansky, L. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 542–5.

¹⁸⁰ Mayaux, J. F.; Bousseau, A.; Pauwels, R.; Huet, T.; Henin, Y.; Dereu, N.; Evers, M.; Soler, F.; Poujade, C.; De, C. E.; et, al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 3564–3568.

¹⁸¹ Dang, Z.; Lai, W.; Qian, K.; Ho, P.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H.; Huang, L. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7887–91.

¹⁸² a) Huang, L.; Ho, P.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2279–2289. b) Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelievre, Y.; Gueguen, J. C.; Reisdorf, D.; Morize, I.; Pauwels, R.; De, C. E.; Henin, Y.; Bousseau, A.; Mayaux, J. F.; Le, P. J. B.; Dereu, N. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1056–1068. c) Sun, I.; Chen, C.; Kashiwada, Y.; Wu, J.; Wang, H.; Lee, K. **2002**, 4271–4275.

mencionados anteriormente, incluso se observa una actividad potenciada si a ese grupo aminobenzoico se le introducen distintos tipos de sustituyentes.¹⁸³ Los últimos estudios también han mostrado que otro grupo interesante a la hora de sustituir en el C-28 puede ser una piperidina sustituida¹⁸⁴ obteniéndose resultados muy prometedores.

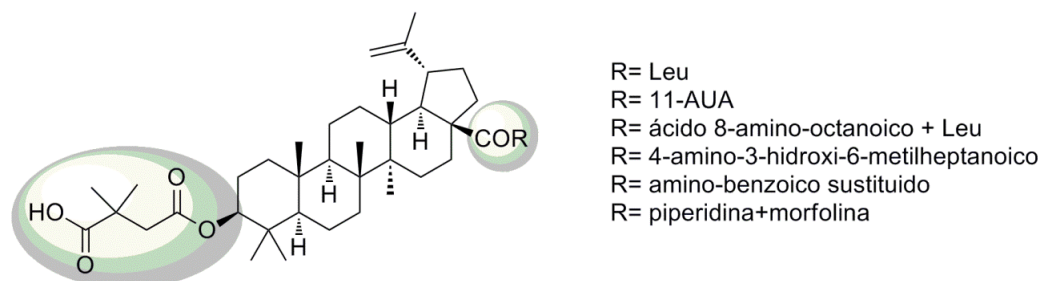


Figura 1.83. Derivados difuncionalizados de ácido betulínico

Ácido oleanólico en cambio es uno de estos triterpenos que, aunque tiene una actividad anti-VIH menos potente, también resulta interesante. El derivado con el mismo sustituyente que el bevirimat, el 3,3-dimetilsuccinil- de ácido oleanólico (Fig. 1.84.), fue utilizado en células infectadas H9³⁴ obteniéndose una IC₅₀ mejor que la del producto natural pero muy lejos del bevirimat. En otros triterpenos cabe destacar que no en todos los casos se ha mejorado la actividad anti-VIH de ese mismo derivado, como se demuestra en el caso de ácido ursólico y ácido pomólico comprobándose que el 3,3-dimetilsuccinil-derivado no solo empeoraba su IC₅₀ sino que además aumentaba su toxicidad frente a células normales. En el caso de ácido oleanólico, también se estudiaron de otros ésteres que en ácido betulínico presentaban una buena actividad. En cambio en éste se observó que los glutaril derivados 3,3-dimetil, 3-etil-3-metil y espiro [4,5]-1,5 pentadioico- mostraban actividades inferiores incluso a las del 2,2-dimetilsuccinil-³⁵ con EC₅₀ en torno a 1.1-1.5 µg/ mL. Ácido oleanólico ha mostrado mejorar la actividad en algunos casos con derivados muy sencillos, como el caso de su sal potásica que es un derivado más activo (Fig. 1.84.) cuya IC₅₀ pasa de 47.8 µM a 1.8 µM.

Por otra parte, el ácido morónico que tiene una cetona en el C-3¹⁸⁵ que confiere una estructura plana a esta zona de la molécula, presenta una citotoxicidad con una IC₅₀ relativamente baja. La síntesis directa de derivados de este ácido morónico pasa por la lactonización y/o por la formación de una amida cíclica, estos cambios indujeron una pérdida de la propiedad de inhibir la replicación del VIH¹⁷⁹. Además, la formación de derivados con aminoácidos en esta estructura mejora ligeramente la actividad de ácido morónico pero se obtienen resultados bastante pobres.

¹⁸³ Gerrish, D.; Kim, I. C.; Kumar, D. V.; Austin, H.; Garrus, J. E.; Baichwal, V.; Saunders, M.; McKinnon, R. S.; Anderson, M. B.; Carlson, R.; Arranz-Plaza, E.; Yager, K. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6377–80.

¹⁸⁴ Qian, K.; Bori, I. D.; Chen, C.-H.; Huang, L.; Lee, K.-H. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8128–36.

¹⁸⁵ Ito, J.; Chang, F. R.; Wang, H. K.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1278–81.

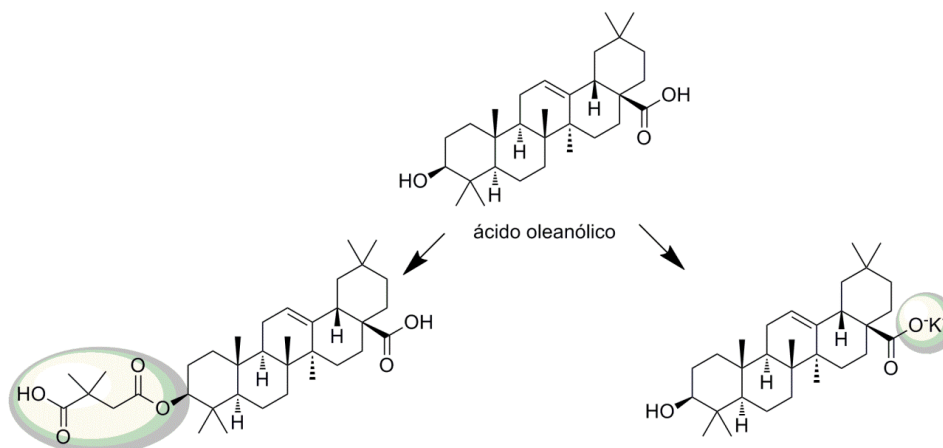


Figura 1.84. Derivados de ácido oleanólico con actividades anti-VIH mejoradas

Otras funciones a tener en cuenta son los derivados amino azúcares que han conseguido aumentar tanto la actividad como la selectividad de ácido glicirrético en células MT-4 infectadas con el VIH-1¹⁸⁶. Aunque estos últimos no demuestran una actividad anti-VIH considerable, también son grupos interesantes ya que amplían el abanico de derivados y cambian considerablemente las propiedades de las moléculas. Mientras otros ácidos como ácido maslínico⁵⁰ muestra resultados prometedores en cuanto actividad anti-VIH dando buenos resultados sobre todo los derivados de ω -aminoácidos ácido 4-aminobutírico y 11-aminoundecanoico que resultan muy similares a los realizados con ácido betulínico y demostrando tener bastante potencial.

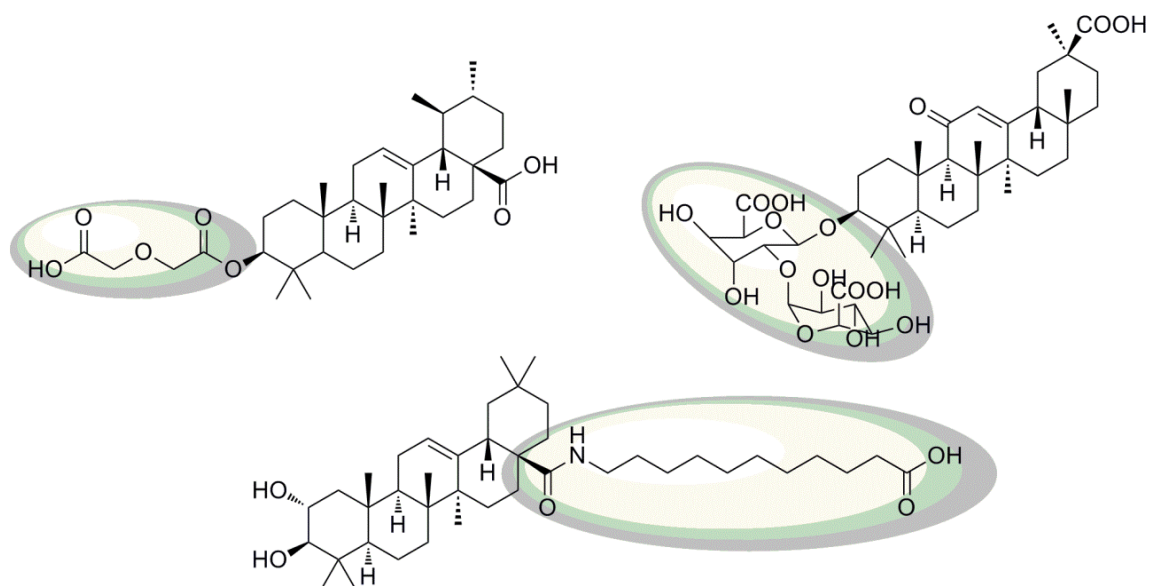


Figura 1.85. Derivados de los ácidos triterpénicos ursólico, glicirrético y maslínico con actividades anti-VIH mejoradas

¹⁸⁶ Hirabayashi, K.; Matsumoto, H.; Mori, T.; Shibata, S.; Baba, M.; Ito, M.; Shigeta, S.; Nakashima, H.; Yamamoto, N. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, 39, 112–115.

Por último, mencionar varios seco-terpenos obtenidos por la rotura del anillo A para dejar dos grupos carboxilos libres (Fig. 1.86.), de los cuales los que mayor actividad han presentado han sido los de los ácidos glicirrético y oleanólico.

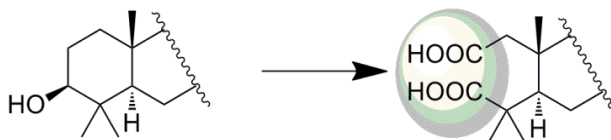


Figura 1.86. Ejemplo de secoterpenos con actividad anti-VIH

I.4.5. ACTIVIDAD ANTI-MALÁRICA

a) El ciclo vital de la malaria

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*, y es probable que se haya transmitido al ser humano a través de los gorilas occidentales. Es la primera enfermedad de importancia entre las enfermedades debilitantes. Entre 700.000 y 2,7 millones de personas mueren al año por causa de la malaria, de los cuales más del 75 % son niños en zonas endémicas de África. Asimismo, causa unos 400–900 millones de casos de fiebre aguda al año en la población infantil (menores de 5 años) en dichas zonas.

La enfermedad puede ser causada por una o por varias de las diferentes especies de *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* o *Plasmodium knowlesi*, las tres primeras de las cuales son las reportadas en el continente americano. Los vectores de esta enfermedad son diversas especies del mosquito de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*. Sólo las hembras de este mosquito son las que se alimentan de sangre para poder madurar los huevos; los machos no pican.

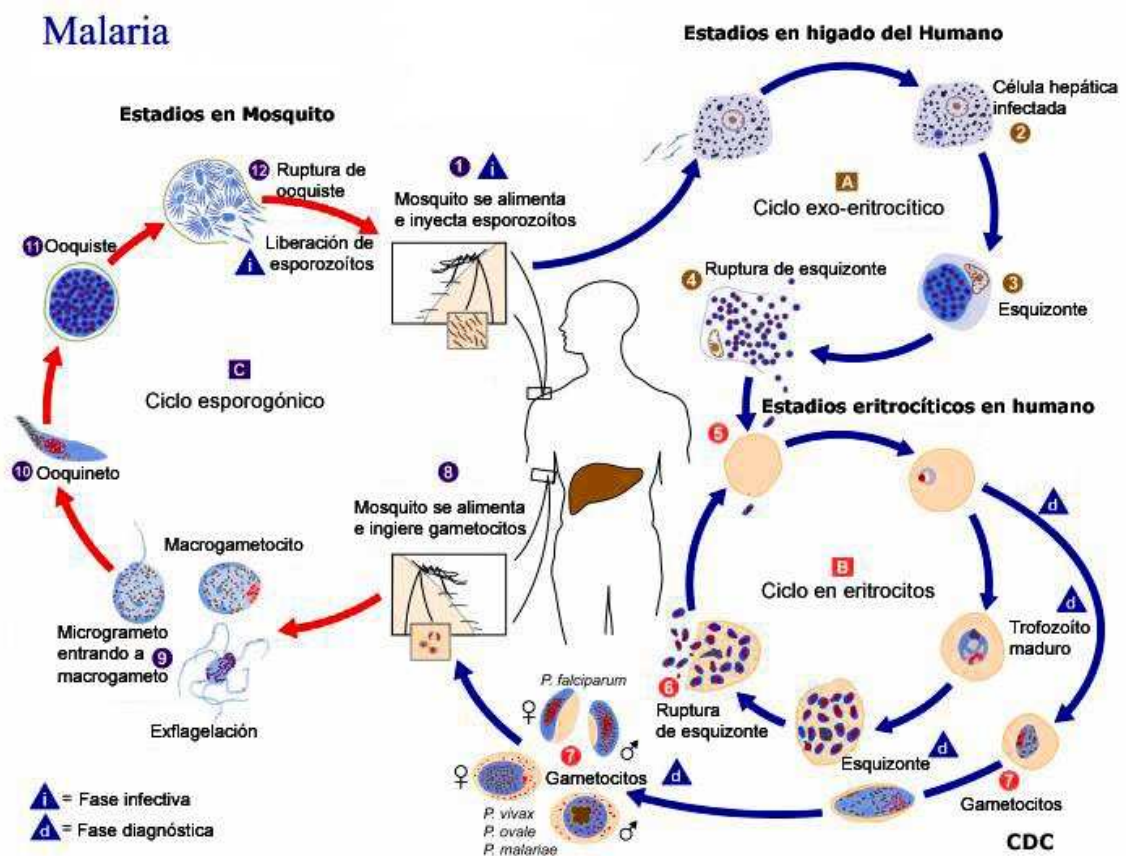


Figura 1.87. Ciclo vital del parásito de la malaria

El ciclo vital del parásito comienza con la inoculación del mosquito infectado de esporozoítos del *Plasmodium* en sus glándulas salivales. Cuando una persona es infectada, los esporozoítos entran a través de la saliva del mosquito y migran al hígado, donde se multiplican rápidamente dentro de las células hepáticas mediante una división asexual

múltiple, y se transforman en merozoítos que entran en el torrente sanguíneo. Allí infectan los eritrocitos y siguen multiplicándose, dando lugar a unas formas iniciales típicamente anulares (trofozoítos), formas en división asexual múltiple (merontes) y finalmente un número variable de merozoítos según la especie de *Plasmodium*, que provoca la ruptura del eritrocito. Algunos merozoítos se transforman en unas células circulares relativamente grandes que son gametocitos femeninos y masculinos y dejan de multiplicarse, aunque en *P. falciparum* son más grandes que el propio eritrocito y tienen forma de boomerang, lo que ocasiona su ruptura. Una hembra de mosquito no infectada pica a un enfermo y adquiere los gametocitos, y así se inicia el ciclo sexual del *Plasmodium*. Con la unión de los gametos en su intestino, la formación de un huevo, que es móvil, y que dará origen a un ooquiste que volverá a dividirse y dar esporozoítos listos para infectar nuevamente, al llegar a las glándulas salivales del mosquito.

b) Actividad antimalárica de productos naturales

Desde hace tiempo se vienen buscando fármacos contra la malaria pero actualmente sigue sin haber una vacuna efectiva contra la misma. Los primeros fármacos que surgieron fueron de forma sintética entre los que se encuentran cloroquina, mepacrina, mefloquina, halofantrina, azitromicina y atovaquona. La mayoría de los mismos presentan efectos secundarios no deseados o al poco uso el parásito se vuelve resistente a los mismos.¹⁸⁷

Cuando la cepa se hizo resistente a los fármacos utilizados habitualmente fue cuando empezaron a surgir varios productos naturales aislados de plantas, calificadas en algunas culturas como medicinales. De los extractos de las plantas se aislaron pequeñas moléculas que mostraban una muy buena actividad biológica contra la malaria. El primero de los productos que mostraba una buena actividad fue la quinina (Fig. 1.88.) y poco a poco fueron apareciendo otros productos naturales capaces de combatir la malaria como yingzhausu A, febrifungine, sergeolide, etc.

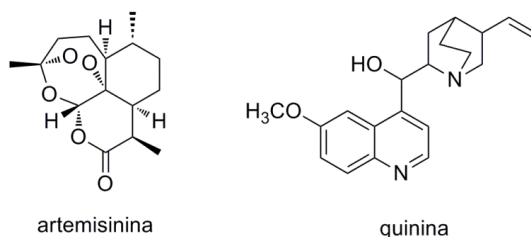


Figura 1.88. Principales productos naturales con actividad anti-malárica

Pero no fue hasta 1972 cuando un grupo de investigadores chinos aislaron a partir de la planta *Artemisia annua* un producto que denominaron artemisinina (Fig. 1.88.).¹⁸⁸ Este producto pertenece a la familia de los sesquiterpenos y contiene una lactona con un puente

¹⁸⁷ Chaturvedi, D.; Goswami, A.; Saikia, P. P.; Barua, N. C.; Rao, P. G. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 435–54.

¹⁸⁸ Pawluk, S. A.; Wilby, K. J.; Ensom, M. H. H. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, *52*, 153–167.

peróxido. Hoy en día es el principal fármaco contra la malaria (*malaria falciparum*). Artemisinina muestra una buena actividad incluso a concentraciones nM, además apenas produce resistencia en los tratamientos.

En el campo de los triterpenos también existen casos de compuestos con actividad anti-malárica. Uno de los primeros en ser estudiados fue ácido betulínico cuya actividad ha sido ensayada varias veces observándose que frente a distintas cepas las IC₅₀ del mismo son muy similares.¹⁸⁹ Ácido ursólico también ha sido estudiado dando resultados muchos peores que el ácido betulínico.

El ácido triterpénico más ampliamente estudiado y que presenta varias pruebas con bastante éxito es ácido maslínico. Gracias a exhaustivas pruebas, se ha comprobado que ácido maslínico impide la reproducción de parásitos protozoarios de la familia *Phyllum apicomplexa* y se ha trabajado in vitro con cuatro géneros diferentes que son; *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Toxoplasma* y *Plasmodium*. Los recientes estudios en torno al *Plasmodium*, concretamente la cepa *P. falciparum*, están dando resultados muy prometedores contra esta cepa que es la más virulenta que provoca la malaria.¹⁹⁰ En experimentos sobre ratones se observa que los tratados con ácido maslínico aumentan sus posibilidades de supervivencia de un 20% a un 80% comprobándose, además, que actúa por una vía distinta a la de los actuales medicamentos y abre otras posibilidades de actuación frente a esta enfermedad.

c) Actividad antimalárica de derivados de productos naturales

La principal problemática de la malaria es su capacidad de mutar y volverse resistente a los fármacos que se utilizan. Los primeros productos antimaláricos fueron la quinina y sustancias análogas.¹⁹¹ La quinina fue aislada por primera vez en 1920, pero fue en los años siguientes cuando se popularizó su uso, siendo en la segunda guerra mundial cuando surgió la verdadera necesidad del uso de fármacos como éste en contra la malaria. El principal fármaco que se conocía era un derivado de la quinina, concretamente la cloroquina (Fig. 1.89.), compuesto que presenta un cloro como particularidad funcional más sobresaliente.

La primera revolución de productos anti-maláricos empezó con los derivados de la quinina y entre ellos destaca mefloquina¹⁹² (Fig. 1.90.) y primaquina que hoy en día se usan en el tratamiento y en la prevención de la malaria. Mefloquina se consideran un análogo de quinina y es efectivo contra de las cepas cloroquina-susceptible y resistentes del *Plasmodium falciparum*. Mientras que primaquina consiste en un derivado de la familia de

¹⁸⁹ a) De Sá, M. S.; Costa, J. F. O.; Krettl, A. U.; Zalis, M. G.; Maia, G. L. de A.; Sette, I. M. F.; Câmara, C. de A.; Filho, J. M. B.; Giulietti-Harley, A. M.; Ribeiro Dos Santos, R.; Soares, M. B. P. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 275–9. b) Innocente, A. M.; Silva, G. N. S.; Cruz, L. N.; Moraes, M. S.; Nakabashi, M.; Sonnet, P.; Gosmann, G.; Garcia, C. R. S.; Gnoatto, S. C. B. *Molecules* **2012**, *17*, 12003–14. c) Da Silva, G. N. S.; Maria, N. R. G.; Schuck, D. C.; Cruz, L. N.; de Moraes, M. S.; Nakabashi, M.; Graebin, C.; Gosmann, G.; Garcia, C. R. S.; Gnoatto, S. C. B. *Malar. J.* **2013**, *12*, 89.

¹⁹⁰ a) Moneriz, C.; Mestres, J.; Bautista, J. M.; Diez, A.; Puyet, A. *FEBS J.* **2011**, *278*, 2951–61. b) Moneriz, C.; Marín-García, P.; García-Granados, A.; Bautista, J. M.; Diez, A.; Puyet, A. *Malar. J.* **2011**, *10*, 82. c) Moneriz, C.; Marín-García, P.; Bautista, J. M.; Diez, A.; Puyet, A. *Malar. J.* **2011**, *10*, 103.

¹⁹¹ Renslo, A. R. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1126–1128.

¹⁹² Schlagenhauf, P.; Adamcova, M.; Regep, L.; Schaerer, M. T.; Rhein, H.-G. *Malar. J.* **2010**, *9*, 357.

las 8-aminoquinolinas, está indicada para el tratamiento de *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax* y, al igual que otros fármacos derivados de quinina, pueden producir serios efectos secundarios.

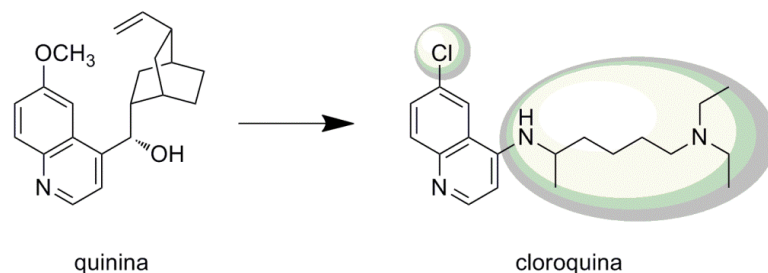


Figura 1.89. Formación del principal derivado de la quinina con actividad anti-malárica

Otro de los productos que a destacar y que ya se encuentran en el mercado es la amodiaquina¹⁹³ (Fig. 1.90.), un derivado directo de la cloroquina, que es más efectivo que ella y que ya se usa contra de cepas cloroquina-resistentes del *Plasmodium falciparum*. Sin embargo, otro derivado de la cloroquina, la piperaquina¹⁹⁴ (Fig. 1.90.) ya no se usa tanto debido a que surgieron cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes al fármaco. Este hecho es uno de los principales problemas de la lucha contra la malaria, los primeros productos en aparecer fueron los derivados de quinina pero indujeron a la mutación de las distintas especies resultando resistentes a ellas.

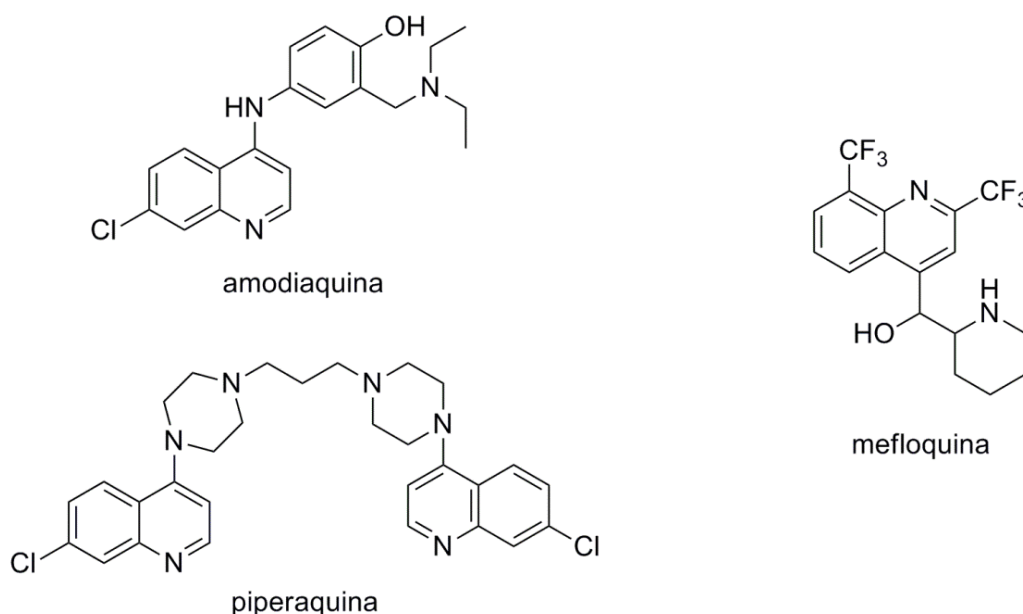


Figura 1.90. Derivados de la quinina con actividad anti-malárica

¹⁹³ Kerb, R.; Fux, R.; Mörike, K.; Kremsner, P. G.; Gil, J. P.; Gleiter, C. H.; Schwab, M. *Lancet Infect. Dis.* **2009**, *9*, 760–74.

¹⁹⁴ Davis, T. M. E. ; Hung, T.-Y.; Sim, I.-K.; Karunajeewa, H. A. ; *Drugs.* **2005**, *65*, 75-87.

Aun así, hoy en día se sigue la investigación de derivados de quinina y entre ellos destaca una serie de derivados peptídicos que han sido probados contra la cepa de *Plasmodium falciparum* cloroquina-susceptible, llegando a igualar las actividades de quinina y en algún caso incluso a superarla¹⁹⁵ con rango de concentraciones del orden nM. En el caso de los derivados de la cloroquina, se puede también destacar algunos que imitan a primaquina y forman dímeros.¹⁹⁶ Con el problema de la aparición de cepas resistentes y la aparición de graves efectos secundarios en la mayoría de los derivados de quinina, surge la necesidad de buscar otros fármacos que mejoren esos resultados.

Artemisinina surgió en el momento en que existían graves problemas con la aparición de cepas resistentes y este hecho supuso la aparición de una segunda revolución de derivados suyos que hoy en día están en pleno uso. Destacan tres derivados principales de la artemisinina: artesunato, dihidroartemisinina y artemether (Fig. 1.91.) aunque existen otros muchos. En este sentido se ha puesto de manifiesto, mediante varios estudios en seres humanos, por ejemplo, que artesunato se ha presentado como claramente superior a quinina y que conlleva menos efectos secundarios.¹⁹⁷ Los otros dos derivados dihidroartemisinina y artemether también han sido usados en ensayos y suelen utilizarse en combinación con otros fármacos contra la malaria.

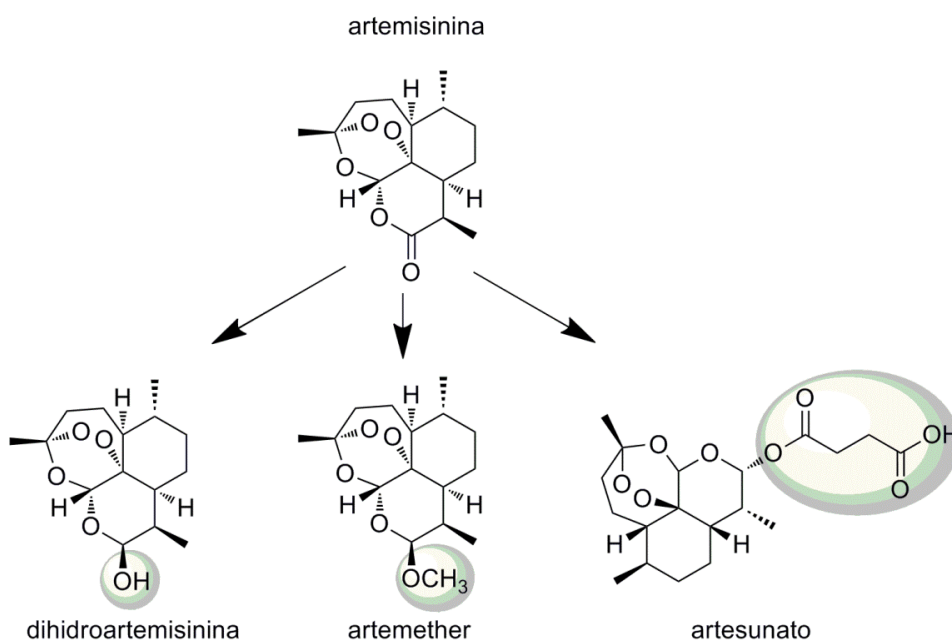


Figura 1.91. Derivados de la artemisinina con actividad anti-malárica

La aparición de un sinnúmero de derivados de los compuestos anteriormente citados puso de manifiesto que la derivatización de los mismos permite acceder a compuestos que mejoran muchas veces la capacidad anti-malárica del producto de partida. Así, destacan como derivados más significativos de la artemisinina, los que han sufrido un cambio en C-12

¹⁹⁵ Panda, S. S.; Ibrahim, M. a; Küçükbay, H.; Meyers, M. J.; Sverdrup, F. M.; El-Feky, S. a; Katritzky, A. R. *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *82*, 361–6.

¹⁹⁶ Kaur, K.; Jain, M.; Reddy, R. P.; Jain, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3245–3264.

¹⁹⁷ Sinclair, D.; Donegan, S.; Isba, R.; Lalloo, D. G. *Cochrane database Syst. Rev.* **2012**, *6*, CD005967.

añadiendo un grupo p-trifluorometilo y que demuestran una actividad *in vitro* para el *Plasmodium falciparum* que mejora la de artemether.¹⁸⁷ Otra de las posiciones más estudiadas es C-10, donde se incluyen diferentes sustituyentes nitrogenados (Fig. 1.92.) y acilados que conlleva una sensible mejoría de la actividad anti-malárica.¹⁹⁸

Además, diversos derivados de artemisinina, obtenidos a través de una reacción con una base de Mannich¹⁹⁹, presentaban muy buenos resultados *in vitro* frente a cepas de *Plasmodium bergeri* y *P. falciparum* siendo su característica principal la unión en un hidroxilo de un grupo bencilo que se encuentra sustituido con hidroxilos o cadenas alquiladas nitrogenadas. Otros derivados sintetizados presentaban una gran cantidad de distintos tipos de ésteres unidos al hidroxilo del C-10 de la artemisinina (Fig. 1.92.).²⁰⁰ No sólo se ha propuesto la derivatización directa de artemisinina sino que, al igual que en la quinina, existen dímeros y trímeros de éstos que tienen también una buena actividad anti-malárica. En este sentido, se observa como los dímeros que tienen como linker una cadena alquilada con un grupo hidroxilo, diol o cetona muestran *in vitro* actividades 10 veces más potentes que las de la artemisinina frente a una cepa de *P. falciparum* cloroquina-resistente.²⁰¹ Mientras que otro dímero que posee un linker con un grupo fosfato fue probado frente a cepas K1 y HB3 de *P. falciparum* y mostraba actividades de casi 50 veces más potentes que artemisinina y 15 veces más potentes que el acetal artemether²⁰².

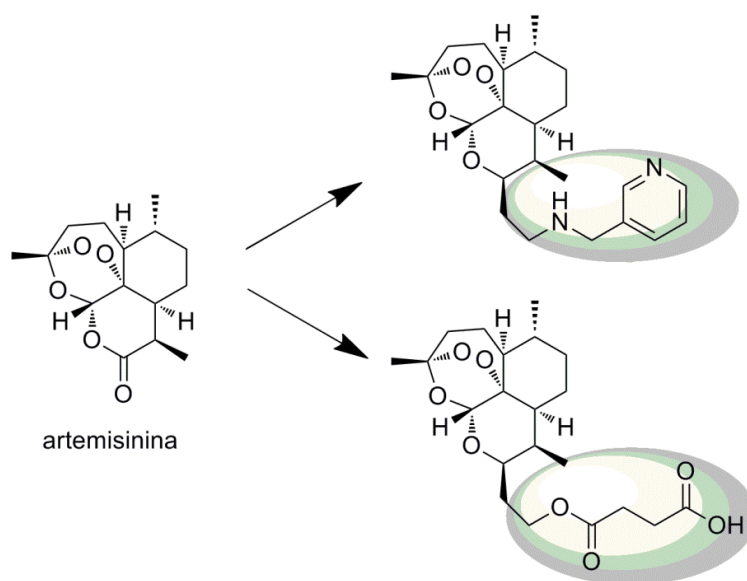


Figura 1.92. Derivados de la artemisinina en C-10 con actividad anti-malárica

¹⁹⁸ Khac, V. T.; Van, T. N.; Van, S. T. Synthesis of novel 10-deoxoartemisinins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15, 2629–2631.

¹⁹⁹ Li, Y.; Yang, Z.-S.; Zhang, H.; Cao, B.-J.; Wang, F.-D.; Zhang, Y.; Shi, Y.-L.; Yang, J.-D.; Wu, B.-A. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 4363–4368.

²⁰⁰ Singh, C.; Chaudhary, S.; Puri, S. K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18, 1436–1441.

²⁰¹ Posner, G. H.; Paik, I.-H.; Sur, S.; McRiner, A. J.; Borstnik, K.; Xie, S.; Shapiro, T. A. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 1060–5.

²⁰² Jeyadevan, J. P.; Bray, P. G.; Chadwick, J.; Mercer, A. E.; Byrne, A.; Ward, S. A.; Park, B. K.; Williams, D. P.; Cosstick, R.; Davies, J.; Higson, A. P.; Irving, E.; Posner, G. H.; O'Neill, P. M. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1290–8.

Por último, hay que comentar que gracias a la familia de los triterpenos se abre una nueva vía de acción contra la malaria aportando esqueletos totalmente distintos a los existentes hoy en día y que la mayoría de estos triterpenos estudiados presentan unas toxicidades muy bajas o nulas con efectos adversos muy leves. Así, en el año 2002 apareció una librería de distintos derivados de lupeol⁷³ con distintas funciones en C-3 y C-30. De esta librería se obtienen 15 productos que muestran actividad anti-malárica *in vitro* siendo 10 veces más potentes que el mismo lupeol.

De nuevo se demostró que la derivatización de los ácidos triterpénicos (como la acetilación en C-3) suponía una mejora sustancial en la actividad anti-malárica. Además se hicieron ensayos modificando el otro extremo de la molécula, y, por ejemplo, se semisintetizaron 20 derivados de ácido ursólico en los que se unió un grupo bisaminopropilpiperazina en el extremo de C-28 de la molécula (Fig. 1.93.).²⁰³ De los derivados sintetizados tres de ellos mostraron actividades en el rango de las concentraciones nM contra una cepa cloroquina-resistente del *Plasmodium falciparum* (FcB1). Estos derivados también se obtuvieron a partir de ácido betulínico, observándose resultados igual de prometedores que sobre ácido ursólico, destacando un derivado con tan sólo un grupo bisaminopropilpiperazina en C-28 (Fig. 1.93.) que mostraba una IC₅₀ de 0.22 μM .¹⁸⁶

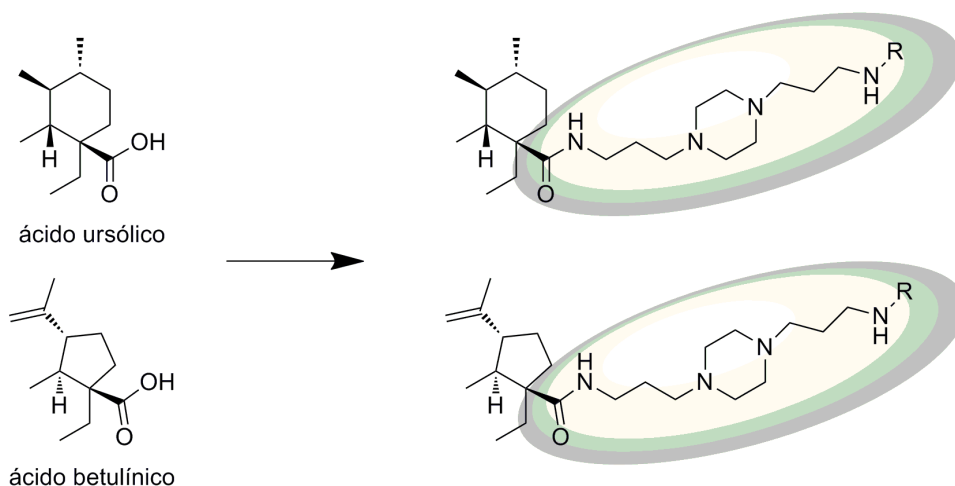


Figura 1.93. Derivados de ácido ursólico y ácido betulínico con actividad anti-malárica

Dada la importancia observada de la acetilación en C-3 en los triterpenos, se probaron distintos acilos tanto en ácido betulínico como en ácido ursólico¹⁸⁷ deduciéndose que los ésteres de cadena corta mostraban una mejor actividad. Así, para ácido betulínico los ésteres butanoicos e isobutanoicos obtenidos presentaban una IC₅₀ de 5 y 8 μM , lo cual supone que son 3 veces más potentes que el triterpeno de partida, mientras que en los derivados de ácido ursólico sólo éster butanoico es capaz de mejorar la actividad del triterpeno de partida.

²⁰³ Gnoatto, S. C. B.; Susplugas, S.; Vechia, L. D.; Ferreira, T. B.; Dassonville-Klimpt, A.; Zimmer, K. R.; Demailly, C.; Nascimento, S. Da; Guillon, J.; Grellier, P.; Verli, H.; Gosmann, G.; Sonnet, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 771–782.

CAPITULO II.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.1. OBTENCIÓN DE MATERIAS PRIMAS

II.1.1. Aislamiento y caracterización de ácido oleanólico y ácido maslínico

Ácido oleanólico (1) y ácido maslínico (2) son dos ácidos triterpénicos que se aíslan en cantidades apreciables a partir de los desechos de molturación de la aceituna según el procedimiento que ha sido desarrollado por el Grupo de investigación “Biotransformación y Química de Productos Naturales”, encontrándose perfectamente detallado en sendas patentes nacional (P96061652) e internacional (W098/04331) titularizadas por la Universidad de Granada. En la Figura 3.1 se resume el procedimiento de aislamiento de estos ácidos. Los ácidos se obtienen a partir de los desechos de molturación de la aceituna por extracción en soxhlet con hexano, obteniéndose una fracción líquida, que tras ser concentrada, contiene mayoritariamente ácido oleanólico y otra fracción sólida donde, después de ser extraída con acetato de etilo y concentrada, se encuentra la mayor parte de ácido maslínico. Ambos ácidos triterpénicos poseen esqueleto de olean-12-eno con un grupo carboxilo β en C-17.

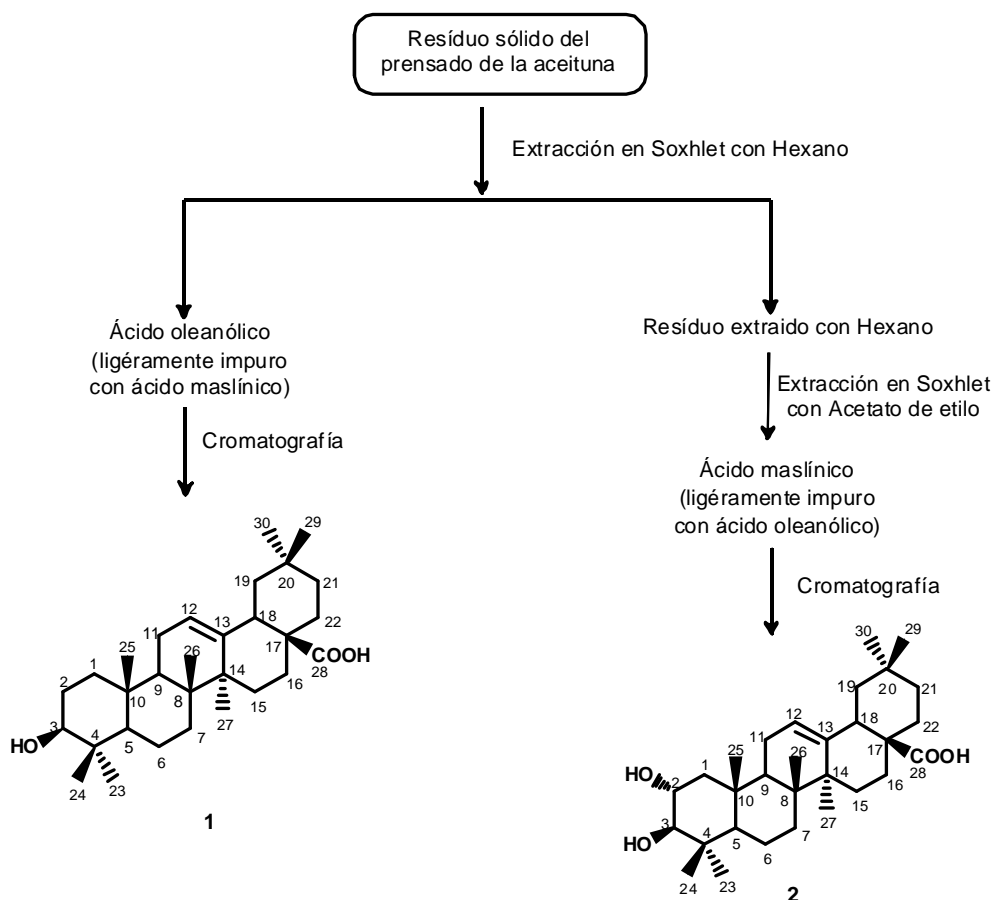


Figura 2.1. Obtención de ácido oleanólico y ácido maslínico

Ácido oleanólico (**1**) presenta un espectro de masas que indica una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ siendo, por tanto, su peso molecular de 456 u.m.a. En su espectro de 1H RMN se observa a δ_H 5.25 ppm un doble doblete ($J_1= J_2= 3.6$ Hz) que, por desplazamiento y tipo de señal, debe corresponder al protón olefínico de C-12 acoplado con los dos hidrógenos de C-11. A δ_H 3.16 ppm se localiza un doble doblete ($J_1= 11.2$ Hz y $J_2= 4.8$ Hz), que se atribuye al protón axial geminal al hidroxilo 3β ecuatorial y a 2.84 ppm se sitúa el protón alílico de C-18 como doble doblete por su acoplamiento con los dos protones de C-19 ($J_1= 13.6$ Hz y $J_2= 3.7$ Hz). Por último, se observan las señales de siete metilos singletes a δ_H 1.15 (3H-27), 0.97 (3H-23), 0.93 (3H-25 y 3H-30), 0.90 (3H-29), 0.80 (3H-26) y 0.77 (3H-24). La estructura de ácido 3β -hidroxiolean-12-en-28-oico para el ácido oleanólico **1** queda completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.²⁰⁴

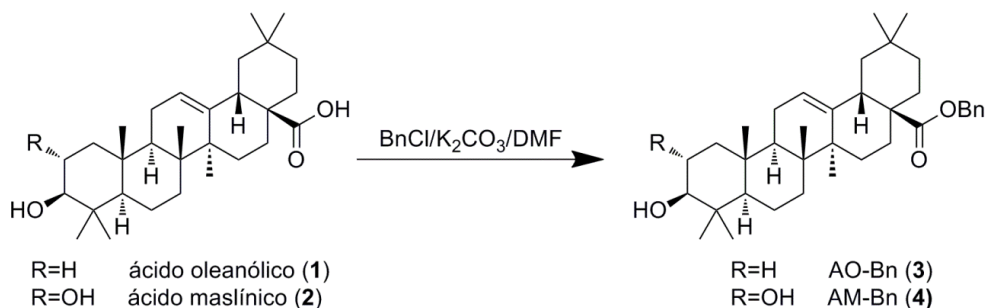
Ácido maslínico (**2**) presenta características físicas y espectroscópicas similares a las de ácido oleanólico (**1**), pero posee mayor polaridad como consecuencia de la presencia de otro hidroxilo en C-2. Su peso molecular es de 472 u.m.a. y su fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$. El espectro de 1H RMN de ácido maslínico muestra similitudes con el de ácido oleanólico, pero aparece una nueva señal a δ_H 3.62 (1H, ddd, $J_1= 11.3$ Hz, $J_2= 9.6$ Hz, $J_3= 4.5$ Hz) atribuible a un protón axial geminal al grupo hidroxilo en C-2, que se acopla con el protón axial sobre C-3 (δ_H 2.91, 1H, d, $J= 9.6$ Hz). En cuanto al espectro de ^{13}C RMN, se comprueba con respecto al ácido oleanólico (**1**) la desaparición de un carbono metilénico (C-2) y la aparición de un nuevo carbono metínico oxigenado a δ_C 69.5 ppm. La estructura de ácido $2\alpha,3\beta$ -dihidroxiolean-12-en-28-oico para el ácido maslínico **2** queda completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados.²⁰⁵

²⁰⁴ a) Ines Khlif, I.; Hamden, K.; Damak, M.; Allouche, N. *Chem. Nat. Compd.* **2012**, *48*, 799-802; b) Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 636-638.

²⁰⁵ Yamagishi, T.; Zhang, D. C.; Chang, J. J.; Mcphail, J. D.; Mcphail, A. T.; Lees, K. H. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3213- 3216.

II.1.2. Bencilación de ácido oleanólico y ácido maslínico

En el Esquema 2.2 se muestran la reacción que conduce a la obtención de los derivados bencilados de ácido oleanólico y maslínico que serán empleados posteriormente en el presente trabajo para la realización de diferentes reacciones.



Esquema 2.2. Bencilación de ácido oleanólico y ácido maslínico

La formación de estos compuestos se realiza con el fin de obtener derivados de AO y AM bloqueados en el carboxilo de C-28 mediante la introducción de un grupo bencilo, lo cual ayuda a su manipulación cromatográfica y, además, a estudiar los cambios en su actividad biológica frente a los ácidos triterpénicos de partida. En ambos casos se disuelve ácido oleanólico (1) o ácido maslínico (2) en una disolución de DMF a la que se agrega K_2CO_3 como base para neutralizar el HCl que se forma. Una vez disueltos se añade BnCl y se deja en agitación durante 4 h a 55°C . Tras purificación por cromatografía de columna, se obtiene un 81% de **AO-Bn (3)** y un 83 % de **AM-Bn (4)**.

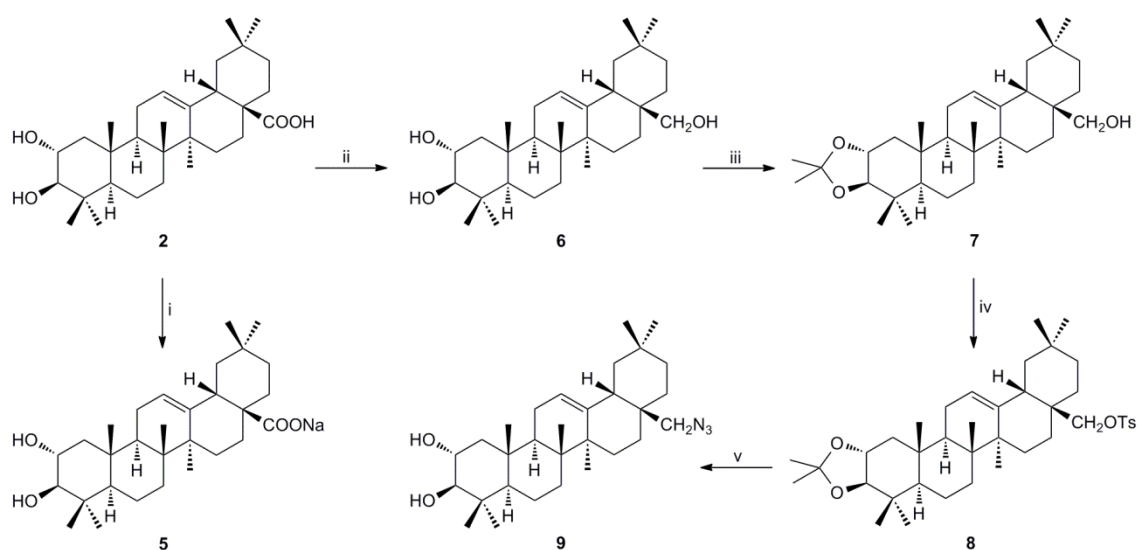
En el caso del producto (3) se observa un HR-LSIMS de 561.3937 u.m.a. que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{O}_4$. En su ^1H RMN se aprecia la aparición de un multiplete a un δ_{H} 7.48 que integra por 5 H que corresponden a los protones aromáticos del grupo bencilo y a δ_{H} 5.00 aparece el sistema AB característico del grupo metilénico del bencilo que integra por 2H ($J=12.0$ Hz). En el ^{13}C RMN aparecen varias señales en torno a δ_{C} 128 que corresponden a los 5 carbonos metínicos del bencilo. También aparece una señal a δ_{C} 136.7 que se atribuye al carbono cuaternario del bencilo así como una señal a δ_{C} 66.1 perteneciente al grupo metileno del mismo. Excepto el C-28 que ha sido desplazado a δ_{C} 177.6, el resto de las señales del espectro de ^1H RMN y ^{13}C RMN son básicamente iguales a las del producto de partida **AO (1)**.

De forma similar, el producto (4) presenta un HR-LSIMS de 585.3910 u.m.a. que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{Na}$. En su ^1H RMN presenta, igual que en el caso anterior, dos señales nuevas, la señal a δ_{H} 7.48 que se presenta como un multiplete que integra por 5H y a δ_{H} 4.97 el sistema AB característico del metileno del bencilo. En el espectro de ^{13}C RMN se observan los distintos carbonos del bencilo en torno a δ_{C} 128, el carbono cuaternario a δ_{C} 136.5 y el metilénico a δ_{C} 66.3 mientras que el C-28 es desplazado a un δ_{C} de 177.0. El resto de las señales del espectro de ^1H RMN y ^{13}C RMN son esencialmente iguales a las del producto de partida **AM (2)**.

II.2. SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS FUNCIONALES SIMPLES DE AM Y AM-BN

II.2.1. Obtención de derivados nitrogenados de AM en el carboxilo C-28

En la literatura científica existen precedentes de triterpenos que han sido modificados en C-28 con una función nitrogenada para potenciar sus actividades biológicas.²⁰⁶ Con este fin se han realizados varios derivados del **AM** con modificaciones en C-28 para comprobar su influencia en sus propiedades biológicas. En este sentido se empieza por la semisíntesis de la sal sódica de **AM** y varios derivados nitrogenados en esta posición del esqueleto carbonado del triterpeno (Esq. 2.3. y Esq. 2.4.).



(i) 1) NaOH, 2) NaCl 4%. (ii) LiAlH₄/THF. (iii) 2,2-dimetoxipropano. (iv) TsCl/Py. (v) 1) NaN₃/DCM, 2) Ácido p-toluensulfónico.

Esquema 2.3. Esquema de reacción para la obtención de azido-derivado en C-28.

²⁰⁶ a) Zhu, P.; Bi, Y.; Xu, J.; Li, Z.; Liu, J.; Zhang, L.; Ye, W.; Wu, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 6966–9. b) Dorr, C. R.; Yemets, S.; Kolomitsyna, O.; Krasutsky, P.; Mansky, L. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 542–5.

La formación de la sal sódica de **2** (Esq. 2.3., vía i) se lleva a cabo para obtener un derivado más soluble en medios acuosos que ácido maslínico y poder observar así como influyen las diferentes solubilidades en la actividad biológica de este derivado con respecto al compuesto que tiene el grupo carboxilo libre. Para la formación de la sal sódica se disuelve ácido maslínico en una disolución de NaOH acuosa 0.3 N y se mantiene en agitación hasta su completa disolución, para facilitar el proceso se añade una disolución de NaCl. Se deja enfriar la disolución y se lava el sólido que aparece con una disolución saturada de NaCl y posteriormente con agua, obteniendo el producto **5** con un rendimiento de casi el 100%. El producto **5** presenta un HR-LSIMS de 481.3655 u.m.a. que concuerda con la fórmula molecular de $C_{30}H_{50}O_3Na$. El espectro de 1H RMN apenas se observan cambios en sus desplazamientos químicos mientras que en su espectro de ^{13}C RMN sólo se aprecia un ligero desplazamiento de C-28, que pasa a un δ_C 181.6 manteniéndose los demás desplazamientos químicos casi inalterados respecto de **AM (2)**.

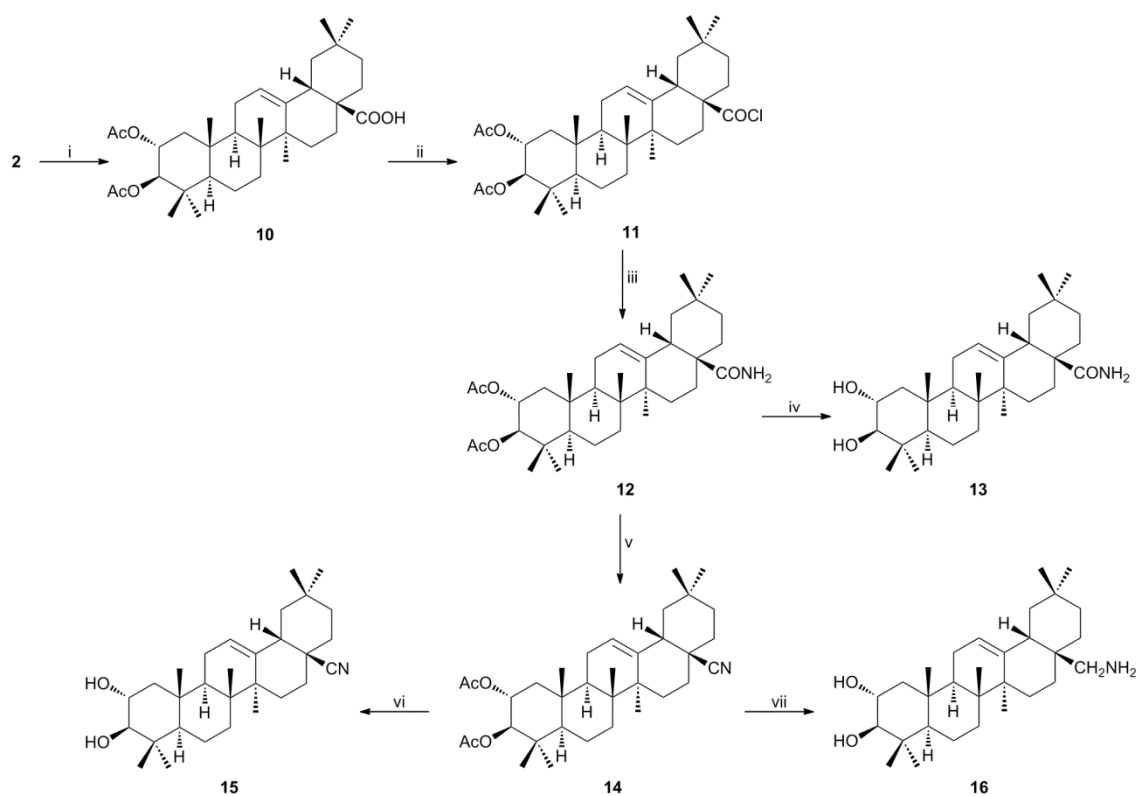
Por otra parte, con el fin de introducir un grupo azido en C-28, se siguen las etapas ii-v indicadas en el Esquema 2.3. Se empieza por modificar C-28 transformándolo en un alcohol sobre el que introducir un buen grupo saliente, y para ello se realiza la reducción del grupo carboxilo con hidruro de aluminio y litio (Esq. 2.3., vía ii). El compuesto con un grupo hidroximetilénico en C-28 (**6**) será utilizado como intermedio para continuar con la semisíntesis de otros derivados y, además, se testarán sus propiedades biológicas, ya que alcoholes análogos han sido estudiados previamente y han demostrado tener actividad biológica. Para reducir AM, se disuelve en THF seco y se añade una disolución de $LiAlH_4$ en THF, manteniendo la reacción a reflujo dos 2 horas y dejándola evolucionar otras 12 horas a temperatura ambiente. Para destruir el exceso de reactivo se añade metanol y se obtiene el producto (**6**) con una pureza del 93%. El producto presenta un HR-LSIMS de 459.3842 u.m.a. que resulta compatible con la fórmula molecular $C_{30}H_{51}O_3$. En su espectro de 1H RMN se observa la aparición de los dos protones del metileno de C-28 a δ_H 3.19 y 3.53 que están acoplados formando un doblete con una constante de acoplamiento característica $J=10.9$ Hz. Además, su espectro de ^{13}C RMN pone de manifiesto que ha desaparecido la señal del grupo carboxilo y ha aparecido otra a un δ_C 69.8 perteneciente al metileno de C-28, encontrándonos con que el resto de los espectros de 1H RMN y ^{13}C RMN son bastante similares a los de ácido maslínico (**2**).

Una vez obtenido el alcohol en C-28, se hace necesario el bloqueo de los hidroxilos del anillo A, para ello aprovechando la presencia del diol vecinal, se lleva cabo una reacción de acetonación del mismo (Esq. 2.3., vía iii). Así, 2 α -hidroxieritrodio (**6**) se disuelve en 2,2-dimetoxipropano con una cantidad catalítica de p-TsOH y, tras mantenerlo a 12 h a temperatura ambiente, se obtiene el producto **7**, que tiene los hidroxilos del anillo A en forma de acetónido, casi al 100%. La primera evidencia de la formación del producto **7** es su HR-LSIMS con un valor de 497.4077 u.m.a. que concuerda con su fórmula molecular $C_{33}H_{54}O_3$. En su espectro de 1H RMN se observa que los protones de C-2 y C-3 se encuentran ligeramente desapantallados debido a la presencia del acetónido, encontrándose a δ_H 3.66 (ddd, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$ y $J_3=10.9$ Hz)

y δ 3.01 (d, $J= 10.9$ Hz), respectivamente. Además, aparecen los hidrógenos de los dos metilos del grupo acetónido a δ_H 1.40 y 1.38, quedando los demás valores inalterados respecto al producto (**6**). En lo que respecta al espectro de ^{13}C RMN se aprecia la aparición de tres carbonos pertenecientes al acetónido a δ_C 108.4 para el carbono cuaternario, δ_C 27.4 y δ_C 27.1 para los correspondientes metilos.

Con el fin de formar un buen grupo saliente en C-28, se lleva a cabo la tosilación del hidroximetileno de esta posición mediante la adición de cloruro de tosilo a una disolución de Py donde se ha disuelto previamente el producto **7** (Esq. 2.3., vía iv). Tras mantenerlo en agitación durante 12 horas, se extrae y se purifica para obtener **8**. Aunque este producto resulta bastante inestable, es posible purificarlo y aislarlo para, posteriormente, determinar así sus características físico-químicas y espectroscópicas. Para el HR-LSIMS de este producto se obtiene un valor de 651.4157 que es aplicable con la fórmula molecular de $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_5\text{S}$. Respecto del producto anterior **7**, en su espectro de ^1H RMN, se observan únicamente las señales características del grupo tosilo, es decir, protones aromáticos a δ_H 7.74 y 7.30 y una señal de metilo singlete a δ_H 2.42. En cambio en el ^{13}C RMN aparecen más señales debido a todos los nuevos carbonos característicos del tosilo, a δ_C 128.2 y 129.9 para los metinos del grupo bencilo, a δ_C 143.3 la señal del carbono cuaternario unido al azufre, a δ_C 133.3 el otro carbono cuaternario y a δ_C 28.7 el grupo metilo. El desplazamiento de C-28 del esqueleto triterpénico también se ve afectado por la unión del grupo tosilo situándose ahora a δ_C 76.9.

El siguiente paso es intercambiar el tosilo, por un grupo azido (Esq. 2.3., vía v). Por ello y, con el fin de evitar la descomposición del producto **8**, el siguiente paso de la reacción se realiza acto seguido redisolviendo el producto en DCM y añadiendo NaN_3 . La reacción se mantiene en agitación durante 3 h y una vez finalizada, tras eliminar el exceso de reactivo, se procede directamente a la desprotección del grupo acetónido. Así, para realizar este proceso de desprotección se redisuelve la mezcla obtenida anteriormente en DCM y se añade una pequeña cantidad de ácido p-toluensulfónico durante 1 h. La mezcla obtenida se extrae y se purifica por cromatografía en capa fina para obtener un 93% de **9**. El producto así obtenido presenta un HR-LSIMS de 482.3820 u.m.a. correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_2\text{N}_3$. Se puede observar perfectamente en el espectro de ^1H RMN como se han perdido las señales de los grupos acetónido y tosilo, pero se pueden encontrar las dos señales características del C-28 como carbono metilénico unido a un nitrógeno a δ_H 3.68 y 3.34 ($J=9$ Hz). En el espectro de ^{13}C RMN también se observa la desaparición de los carbonos característicos de tosilo y acetónido, y en δ_C 69.9 aparece la señal del C-28 propio de un carbono unido al nitrógeno de la azida. Las demás señales son las propias de ácido maslínico en sus espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN.



(i) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$. (ii) SOCl_2/DCM . (iii) MeOH/NH_3 (1:1). (iv) KOH/MeOH (1:10). (v) SOCl_2/DCM . (vi) KOH/MeOH (1:10). (vii) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$.

Esquema 2.4. Esquema de reacción para la obtención de amino-, amido- y ciano-derivados en C-28 de AM

Otra secuencia de reacciones, que permite la introducción en C-28 de los grupos amido, amino y ciano, se lleva a cabo mediante el bloqueo de los hidroxilos del anillo A con grupos acetilo (Esq. 2.4.). Para ello, la acetilación se realiza disolviendo **AM** en Py, añadiendo anhídrido acético y manteniendo la reacción a reflujo durante una hora (Esq. 2.4., vía i). Tras el oportuno procesado de la mezcla de reacción y su purificación en cromatografía de columna, se obtiene el producto diacetilado (**10**) con un rendimiento del 70%. El HR-LSIMS de **10** es fácilmente reconocible ya que el valor obtenido es de 579.3649 u.m.a. que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{Na}$. En sus espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN aparecen las señales características de los acetilos, así en el ^1H RMN se aprecian los dos metilos del acetilo a un δ_{H} 1.96 y 2.03, mientras que las señales de los protones geminales a los hidroxilos en C-2 y C-3 se desplazan a δ_{H} 5.08 para el protón axial en C-2 y a δ_{H} 4.72 para el protón axial de C-3. En el espectro de ^{13}C RMN se observan los metilos de los dos grupos acetilo a δ_{C} 21.1 y 21.3 y sus respectivos carbonilos a δ_{C} 170.8 y 171.0, mientras que los carbonos de C-2 y C-3 son desplazados a δ_{C} 70.2 y 80.8, respectivamente.

Una vez obtenido el producto diacetilado (**10**) se pasa a obtener el cloruro de ácido mediante del tratamiento con cloruro de tionilo en DCM (Esq. 2.4., vía ii). Tras la

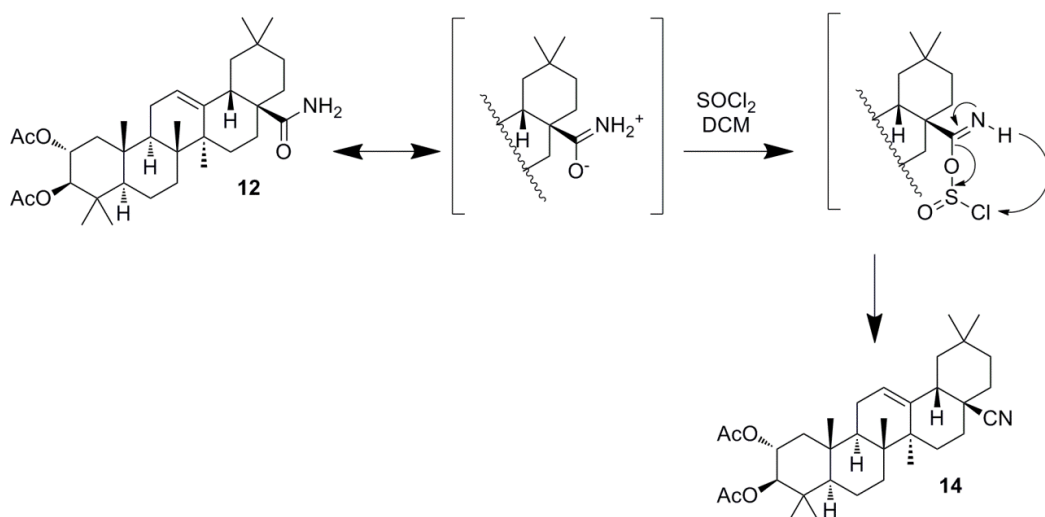
oportuna purificación, se debe tener mucho cuidado con el fin de no revertir la reacción, evitando la humedad ambiental y conservando el producto en un ambiente inerte. La formación y pureza de este intermedio clorado se controla por su espectro de HR-LSIMS que concuerda con la fórmula $C_{34}H_{51}O_5ClNa$ con un valor de 597.3316 u.m.a. y su espectro de 1H RMN que no presenta cambios respecto al producto **10** mientras que en el espectro de ^{13}C RMN se observa el cambio del carbonilo que ha sido clorado que se desplaza a δ_C 179.8.

Por otra parte, uno de los productos de interés que se pretende semisintetizar amida en C-28, ya que se usará para comprobar si la formación de la misma ayuda al incremento de actividad antitumoral frente al ácido carboxílico libre del producto de partida **AM**. De hecho, en bibliografía se pueden encontrar muchos ejemplos de triterpenos que contienen dicha función en C-28, varios de ellos con actividad biológica. Así una vez formado el derivado clorado (**11**) se añade una disolución de NH_3 :metanol y se deja evolucionar la reacción durante 12 h (Esq. 2.4., vía iii). Después de los adecuados procesos de extracción y purificación, se obtiene **12** con un 55% de rendimiento. Como primera prueba de la formación de la amida se determinó su HR-LSIMS que proporcionó un valor de 556.3998 u.m.a. compatible con la fórmula $C_{34}H_{54}O_5N$. También aquí sólo se observa un leve cambio en el desplazamiento químico de C-28 en el espectro de ^{13}C RMN, que aparece ahora a un δ_C 182.2 mientras que el correspondiente espectro de 1H RMN resulta inalterado.

Una vez obtenido el producto **12**, se divide la cantidad del mismo obtenida, utilizando una parte para obtener el producto desacetilado (**13**) y otra para la formación del derivado que presenta un nitrilo en C-28 (**14**). Para poder testear la influencia de los hidroxilos del anillo A libres o bloqueados sobre la amida de AM en cuanto a su posible actividad biológica, se procede al desbloqueo de los hidroxilos del compuesto **12** mediante saponificación (Esq. 2.4., vía iv). Así pues, para obtener la amida desacetilada de ácido maslínico se disuelve el producto **12** en THF y se añade una disolución de KOH/MeOH, manteniendo la reacción en agitación durante 30 min. Tras los oportunos tratamientos de neutralización y purificación se obtiene el producto **13** con un 90% de rendimiento. Por su HR-LSIMS de valor 494.3592 u.m.a. se deduce en una fórmula molecular $C_{30}H_{49}O_3Na$. A su vez en el espectro de 1H RMN se observa que los metilos de los acetilos han desaparecido y que los protones geminales a los hidroxilos sobre C-2 y C-3 vuelven a estar a valores similares a los de los **AM** con un δ_H 3.71 ($J_1 = 4.4$, $J_2 = 9.1$ y $J_3 = 11.2$) y 3.03 ($J = 9.1$), respectivamente, habiéndose apantallado debido a la pérdida de los grupos acetilos. En el espectro de ^{13}C RMN se observa como C-2 y C-3 vuelven a los valores previos a la acetilación de δ_C 84.2 y 69.1.

De forma similar a lo que ocurre en el caso de la amida, el grupo nitrilo también ha sido bastante estudiado, siendo responsable en algunos casos de productos con una actividad biológica bastante interesante. Así con la porción restante de **12** se comienza la síntesis del derivado que presenta un grupo nitrilo en C-28 (Esq. 2.4., vía v), para ello se disuelve **12** en DCM y se añade cloruro de tionilo, manteniendo la reacción en agitación durante 2.5 h. La formación del nitrilo-derivado con cloruro de

tionilo transcurre a través de la formación de un intermedio sulfurado y con posterior desprendimiento de SO_2 (Esq. 2.5.). Una vez que se da por finalizada la reacción, y tras los tratamientos de extracción y purificación, se obtiene el producto **14** con un 43% de rendimiento. El valor encontrado para su HR-LSIMS es 560.3716 u.m.a. que es compatible con la fórmula $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{O}_4\text{NNa}$. En los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN sólo podemos observar cambios en este último respecto del producto precursor **12**. En este sentido, sólo se aprecia un cambio en C-28 que es desplazado a δ_{C} 125.7, que corresponde con desplazamiento químico característico de grupo ciano.



Esquema 2.5. Mecanismo de formación de un ciano-derivado en C-28

De nuevo aquí se subdivide en dos mitades el producto **14** obtenido y se procede a la desacetilación con potasa metanólica de una de ellas para formar el ciano-derivado con los hidroxilo del anillo A libres (**15**) (Esq. 2.4., vía vi). Este producto tiene un HR-LSIMS de 476.3513 u.m.a que concuerda con la fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_2\text{NNa}$. En sus espectros de RMN sólo se observan cambios, respecto del producto **14**, en los carbonos que son afectados por la desacetilación, C-2 y C-3, recuperando los protones geminales a los hidroxilos ahora libres los valores de δ_{H} 3.69 y 2.99 y en el espectro de ^{13}C RMN se aprecia como recuperan los desplazamientos δ_{C} 84.1 y 69.1 característicos del estado desacetilado de los hidroxilos.

Como última etapa del proceso se procede a la formación de un amino-derivado en C-28, este producto al igual que los anteriores derivados nitrogenados sintetizados, resulta muy interesante para su posterior estudio biológico. Para llevar a cabo este último paso sólo queda la reducción del producto **14** anteriormente descrito con LiAlH_4 obteniéndose un 80% del producto **16** (Esq. 2.4., vía vii) que presenta un HR-LSIMS de 456.3913 que indica una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_2\text{N}$. Los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN resultan muy similares a los del producto **6**, donde cabe destacar la pérdida de los dos acetilos en C-2 y C-3 que se corrobora por los desplazamientos en δ_{H} 3.71 y 3.03 de los correspondientes protones geminales a las funciones oxigenadas de estas posiciones. En el caso de C-28 observamos la aparición de los

dos protones metilénicos a δ_H 3.23 y 3.57. Además, en el espectro de ^{13}C RMN a valores de δ_C 69.8 y 84.1 aparecen de nuevo los C-2 y C-3 y además, se puede comprobar cómo se ha apantallado C-28 en su espectro de ^{13}C RMN a valores de δ_C 69.9, característico de la presencia de una amina sobre ese carbono.

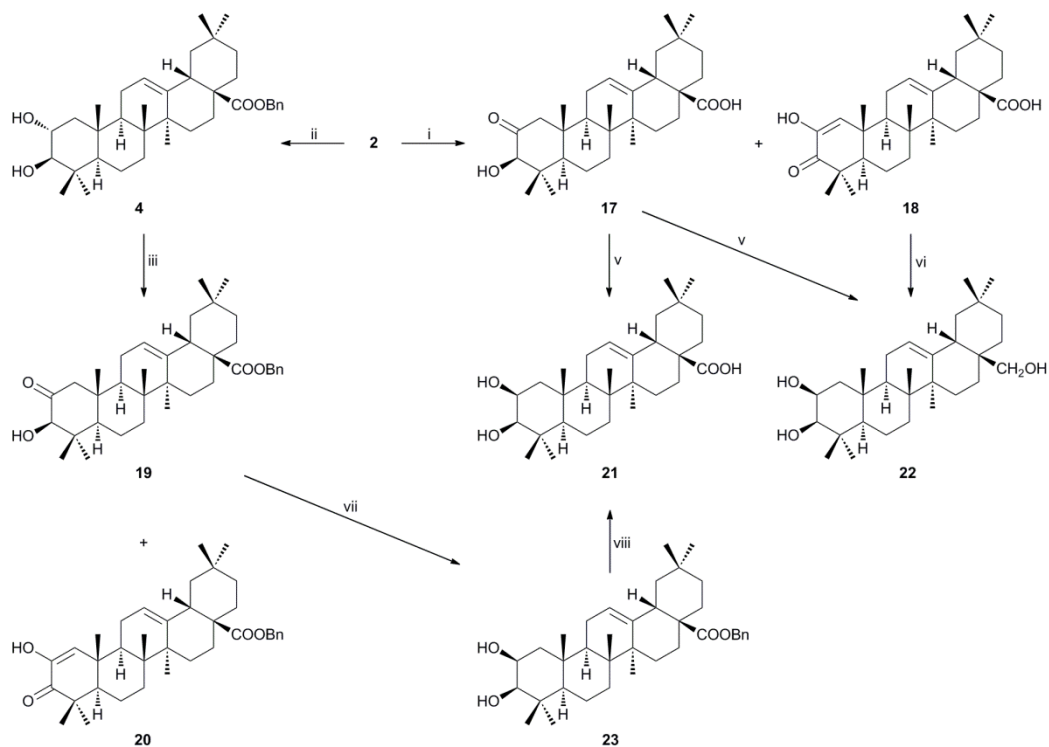
Carbono	2	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
15	27.4	27.6	25.6	25.8	25.7	25.8	27.8	27.4	27.4	27.6	28.2	28.2	25.8
16	22.7	23.1	22.0	22.2	22.9	22.2	23.0	23.5	23.9	23.8	23.8	23.8	22.2
17	46.1	45.6	37.0	42.0	41.7	42.0	46.7	47.5	46.5	46.7	46.8	42.1	42.0
18	41.0	41.7	42.4	42.5	42.2	42.6	41.1	42.6	42.6	42.8	42.6	44.1	42.6
21	33.6	33.8	34.2	34.3	34.0	34.3	34.0	33.8	34.2	34.4	34.2	33.2	34.3
22	32.4	32.5	31.1	31.3	31.8	31.3	32.6	31.2	32.4	32.6	32.4	32.6	31.3
28	180.6	181.6	69.8	69.9	76.9	69.9	184.3	179.8	182.2	181.5	125.7	125.8	69.9

Tabla 2.6. Desplazamientos químicos de los derivados de **AM** en C-28

El efecto de la sustitución de C-28, sobre este carbono y los adyacentes, se aprecia claramente en los desplazamientos químicos de ^{13}C RMN (Tab. 2.6.). Los efectos más notables se dan en C-28 que se sitúa en torno a 180 ppm cuando se trata de un carbonilo que pertenece a diferentes grupos funcionales, entre 70-80 ppm, cuando es un grupo metileno y, sobre 125 ppm cuando es un grupo ciano. También podemos apreciar como C-22 se encuentra ligeramente apantallado en los productos **6-9** y **16**, en los cuales hay grupo metileno en C-28, encontrándose su desplazamiento en torno a δ 31.5. Además, estos mismos productos tienen C-15 y C-16 ligeramente apantallados respecto a **AM**. Para C-17 nos encontramos como los productos **6-9**, **11**, **15** y **16** presentan un leve apantallamiento mientras que para C-21 y C-22 los cambios en los desplazamientos químicos son poco notables, quedando su desplazamiento a ± 1 respecto a **AM**.

II.2.2. Obtención de derivados de AM y AM-Bn en el anillo A

A la vista de las múltiples, interesantes y prometedoras actividades biológicas de distintos triterpenos pentacíclicos (naturales y sintetizados) ya comentados en la Introducción de esta Memoria^{128,207}, se pretende aquí obtener nuevas estructuras a partir del ácido maslínico con potenciales actividades farmacológicas. Así se llevarán a cabo oxidaciones en el anillo A de ácido maslínico, y de este mismo protegido en el C-28 con un bencilo, para obtener sistemas oxidados o epimerizados en los carbonos hidroxilados C-2 y C-3.



(i) PCC/DCM. (ii) BnCl/K₂CO₃/DMF. (iii) PCC/DCM. (iv) NaBH₄/i-PrOH. (v) LiAlH₄/THF. (vi) LiAlH₄/THF. (vii) LiAlH₄/THF. (viii) H₂/Pd/DCM.

Esquema 2.7. Esquema de reacciones para la obtención de derivados en el anillo A de AM y AM-Bn

En primer lugar, y con el fin de obtener derivados oxidados en el anillo A del ácido maslínico, se disuelve **AM** en DCM, a esta disolución se le añade PCC y se mantiene la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Tras el oportuno work-up de la reacción, se obtienen dos productos, el mono oxidado en C-2 más accesible (producto **17**, 40%) y el compuesto doblemente oxidado (producto **18**,

²⁰⁷ a) Wei, Y.; Ma, C.-M.; Hattori, M. Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 4112–20. b) Deeb, D.; Gao, X.; Arbab, A. S.; Barton, K.; Dulchavsky, S. A.; Gautam, S. C. Cancers (Basel). 2010, 2, 1779–1793.

40%) (Esq. 2.7., vía i). Los HR-LSIMS de **17** y **18** que aparecen muestran unos valores de 471.3470 y 469.3390 u.m.a., respectivamente, y por tanto, concuerdan con las fórmulas moleculares $C_{30}H_{44}O_4$ y $C_{30}H_{45}O_4$. Los cambios funcionales son fácilmente reconocibles en el espectro de 1H RMN ya que en el caso del producto **17** aparece una cetona en el C-2 y por tanto desaparece la señal del H sobre ese carbono y aparece un singlete a δ_H 3.92 debido al protón sobre C-3 que no tiene ahora ningún otro protón en carbono contiguo. En el espectro de ^{13}C RMN de **17** se observa un carbono carbonílico en C-2 a δ_C 211.2 mientras que C-1 sufre un ligero desplazamiento quedando su δ_C a 53.3.

El proceso que sigue el compuesto **17** tras la primera la oxidación sobre el carbono C-2 más accesible, es una segunda oxidación sobre el hidroxilo de C-3 formando una dicetona vecinal que evoluciona rápidamente a un producto cetona-enólico a través de los protones de C-1 (aciloina **18**) (Fig. 2.8.). Así en este producto **18**, que se encuentra doblemente oxidado, se observa en su 1H RMN la ausencia de los protones correspondientes a C-2 y C-3, situándose el protón de C-1 desplazado a δ_H 6.31 en forma de singlete debido al doble enlace formado por tautomería cetona-enólica. Además, en el espectro de ^{13}C RMN se aprecia como los carbonos C-1 y C-2 son desplazados a δ_C 128.4 y δ_C 144.0, respectivamente, mientras que C-3 se presenta como un carbono carbonílico a δ_C 201.3, apareciendo la mayoría de los demás carbonos en valores bastantes similares a **AM**.

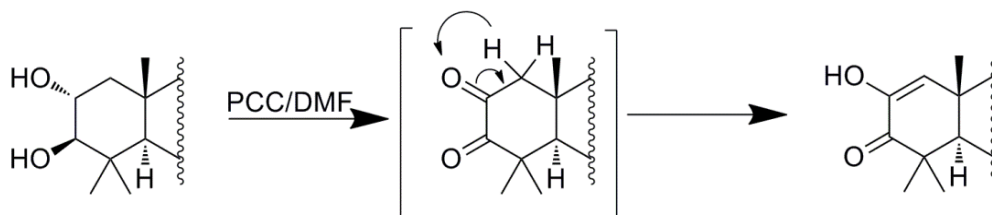


Figura 2.8. Formación de enol por tautomerización de la dicetona

Como ya se ha detallado con anterioridad en esta Memoria, para bloquear el grupo carboxilo de **AM** se lleva a cabo la bencilación de **2** para dar **4** (Esq. 2.7., vía ii). De nuevo por oxidación de **4** con PCC/DCM se forman los compuestos oxidados similares **19** y **20** (Esq. 2.7., vía iii). Los valores de HR-LSIMS para **19** y **20** son 561.3943 y 559.3765 u.m.a., respectivamente, que concuerdan con las fórmulas moleculares $C_{37}H_{53}O_4$ y $C_{37}H_{51}O_4$. En el espectro de 1H RMN igual que en el caso anterior se observan fácilmente los cambios que han tenido lugar en la molécula. En el producto **19** aparece la cetona en C-2 y, por tanto, desaparece la señal del protón sobre este carbono, mientras que en C-3 la señal se desplaza a δ_H 4.04 pasando la multiplicidad de un doblete a un singlete. En el espectro de ^{13}C RMN se aprecia la aparición de un carbono carbonílico en C-2 a δ_C 211.2 y C-1 sufre un ligero desapantallamiento quedando su desplazamiento químico a δ_C 53.3. En el producto **20**, desaparecen en su 1H RMN los protones correspondientes a C-2 y C-3 y el protón de

C-1 se encuentra desplazado en forma de singlete a δ_H 6.24. Por otra parte, en el espectro de ^{13}C RMN de **20** se detectan los carbonos C-1 y C-2 a un desplazamiento de δ_C 128.5 y δ_C 143.9, respectivamente, mientras que C-3 aparece como carbonilo a δ_C 201.3.

Con el fin de realizar un estudio más pormenorizado del efecto de la situación de los hidroxilos del anillo A, se lleva a cabo la semisíntesis de una serie de productos en los que hidroxilo de C-2, pasa de posición ecuatorial a axial. La epimerización en C-2 de **AM** se lleva a cabo mediante disolución del producto **17** en isopropanol y reducción con NaBH_4 , durante 2 h en agitación a temperatura ambiente (Esq. 2.7., vía iv). Después del procesado de la reacción, se obtiene **21** con un rendimiento del 95%. El HR-LSIMS que presenta el producto **21** es de 495.3455 u.m.a. y concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}$. En su espectro de ^1H RMN se observa que la nueva disposición de los hidroxilos produce un ligero desplazamiento de los protones de C-2 y C-3, pasando a situarse a δ_H 4.08 y 3.11, respectivamente. En este sentido, se aprecia un notable desapantallamiento para H-2 en el compuesto **21** con respecto de este mismo protón en **AM** como consecuencia del cambio de configuración al pasar de ser axial (en **AM**) a ecuatorial (en **21**). En el espectro de ^{13}C RMN ocurre exactamente lo mismo, los carbonos afectados por este cambio son los mismos, pasando a tener δ_C 71.9 para C-2 y δ_C 78.8 para C-3. Para C-1, que se encuentra contiguo al carbono que ha sufrido el cambio en la molécula, también se aprecia una diferencia de desplazamiento, quedando ahora a δ_C 45.0

Además, cuando el 3-ceto derivado de **AM** (**17**) se reduce totalmente con LiAlH_4 se obtiene compuesto **22**, (Esq. 2.7., vía v), en el cual se ha reducido el grupo carboxilo a grupo hidroximetilénico y, además, se ha epimerizado la posición C-2 obteniéndose un triol que nos permitirá el estudio de la influencia en las propiedades biológicas de estos dos cambios en C-2 y C-28 simultáneamente. Este mismo compuesto **22** puede ser también obtenido por tratamiento con el mismo reductor de la aciloina **18** (Esq. 2.7., vía vi). En el espectro de masas HR-LSIMS de **22** se encuentra un valor de 459.3842 compatible con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_3$ y en su espectro de ^1H RMN vuelven a aparecer los dos protones de C-28 con δ_H 3.20 y 4.08 acoplados entre sí como doblete y con un $J=9.1\text{Hz}$. Por otra parte, los protones de H-2 y H-3 aparecen ahora a δ_H 4.08 y δ_H 3.20, respectivamente, con constantes de acoplamiento muy diferentes de las presentes en **AM** por el cambio de orientación de H-2. Así se observa como H-3 pasa de tener $J=9.1\text{Hz}$ para **AM** a $J=3.1\text{Hz}$ en **22**; de forma similar H-2 pasa de tener $J_1=4.4\text{Hz}$, $J_2=9.1\text{Hz}$ y $J_3=11.2\text{Hz}$ a tener valores de $J_1=J_2=3.1$ y $J_3=4.4\text{Hz}$. En el espectro de ^{13}C RMN de **22**, C-2 se sitúa a δ_C 71.6 y C-3 a δ_C 78.7.

Finalmente, para obtener otro producto con el hidroxilo en C-2 en posición ecuatorial, se trata el ceto-derivado de **AM-Bn**, **19**, con LiAlH_4 por el procedimiento descrito previamente, para obtener un 91% de **23** que mantiene el bencilo en C-28 y tiene epimerizada la posición C-2 (Esq. 2.7., vía vii). Tras los adecuados procesos de purificación, se identifica el citado derivado por su HR-LSIMS de valor 561.3937 u.m.a. que indica una fórmula de $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{O}_4$. En el espectro de ^1H RMN se observa desplazamiento de H-2 y H-3 respecto de **AM-Bn** con δ_H 3.98 y 3.10, respectivamente,

y, de forma similar a todos los productos que tienen el hidroxilo en posición axial, este hidrógeno de C-2 se encuentra ligeramente más desapantallado respecto de los que tienen el hidroxilo en ecuatorial. En el espectro de ^{13}C RMN se observan desplazamientos para esos mismos carbonos con δ_{C} 71.3 para C-2, δ_{C} 78.7 para C-3 y δ_{C} 44.3 para C-1. Por último, comentar que se correlaciona este producto **23** epímero en C-2 y bencilado en C-28 con el compuesto **21** por desbencilación mediante hidrogenación catalítica (Esq. 2.7., vía viii).

Carbono	2	4	6	17	18	19	20	21	22	23
1	46.1	46.2	46.5	53.3	128.5	53.3	128.5	45.0	44.7	44.3
2	68.2	69.2	69.0	211.2	144.0	211.2	143.9	71.9	71.6	71.3
3	83.2	89.0	83.9	83.1	201.3	83.1	201.3	78.8	78.7	78.7
4	39.0	38.4	38.2	46.0	44.1	45.9	44.1	39.2	38.3	38.3
5	55.1	55.6	55.3	54.7	54.1	54.7	54.1	56.4	55.6	55.4
6	18.1	18.7	18.4	18.7	18.9	18.7	18.9	18.8	18.6	18.3

Tabla 2.9. Desplazamientos químicos de los carbonos del anillo A de derivados de **AM**

Como se puede observar en la Tabla 2.9, donde se dan los desplazamientos químicos para los carbonos del anillo A de los derivados de **AM**, el efecto de la oxidación de los hidroxilos del anillo A conlleva un claro cambio en los desplazamientos químicos de los carbonos cercanos. En este sentido, los carbonos más afectados, aparte de los que sufren directamente el cambio de función (C-2 y C-3), son los directamente contiguos a ellos, o sea, C-1 y C-4. En primer lugar la oxidación en C-2 conlleva un desapantallamiento lógico de C-1, que pasa de 46.1 ppm a 53.3 ppm y de C-4, que de estar a δ_{C} 39.0, se sitúa a δ_{C} 46.0 (productos **17** y **19**). La doble oxidación de la molécula presente en **18** y **20** afecta principalmente a C-1, que por tener carácter etilénico, se sitúa a δ_{C} 128.5, C-4 es desapantallado a valores de δ_{C} 44.1. Se comprueba, además que los cambios sufridos por la oxidación no afectan más allá de C-1 y C-4, ya que tanto C-5 como C-6, apenas sufren cambios en sus desplazamientos químicos.

Para los productos que presentan la epimerización del hidroxilo en C-2 (**21**, **22** y **23**) se puede generalizar como C-2 sufre un desapantallamiento (pasando de 68 ppm a 71-72 ppm), mientras que C-3 sufre un apantallamiento considerable (de estar a 83.2 ppm se sitúa ahora a 78.7 ppm). Además, a excepción de C-1, que sufre un ligero apantallamiento, el resto de los carbonos del anillo A queda inalterado para estos productos.

II.3. ESTUDIO DEL PROCESO DE APOPTOSIS DE LOS DERIVADOS FUNCIONALES DE AM

La apoptosis, es una forma de muerte celular programada que está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. La apoptosis tiene una función muy importante en los organismos, pues hace posible la destrucción de las células dañadas genéticamente, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer. La anexina V marcada con FITC puede identificar y cuantificar las células vivas, apoptóticas y necróticas. La tinción de las células mediante yoduro de propidio y Anexina V-FITC permite la distinción de las células mediante citometría de flujo.

El primer paso para comprobar si los productos son biológicamente activos es el estudio de su citotoxicidad. Esta prueba se realiza con el fin de detectar cuáles de los productos es capaz de producir citotoxicidad frente a la línea celular en estudio. En este caso la línea celular estudiada es la B16F10, que corresponde al cáncer de piel de roedores tipo ratones y rata.

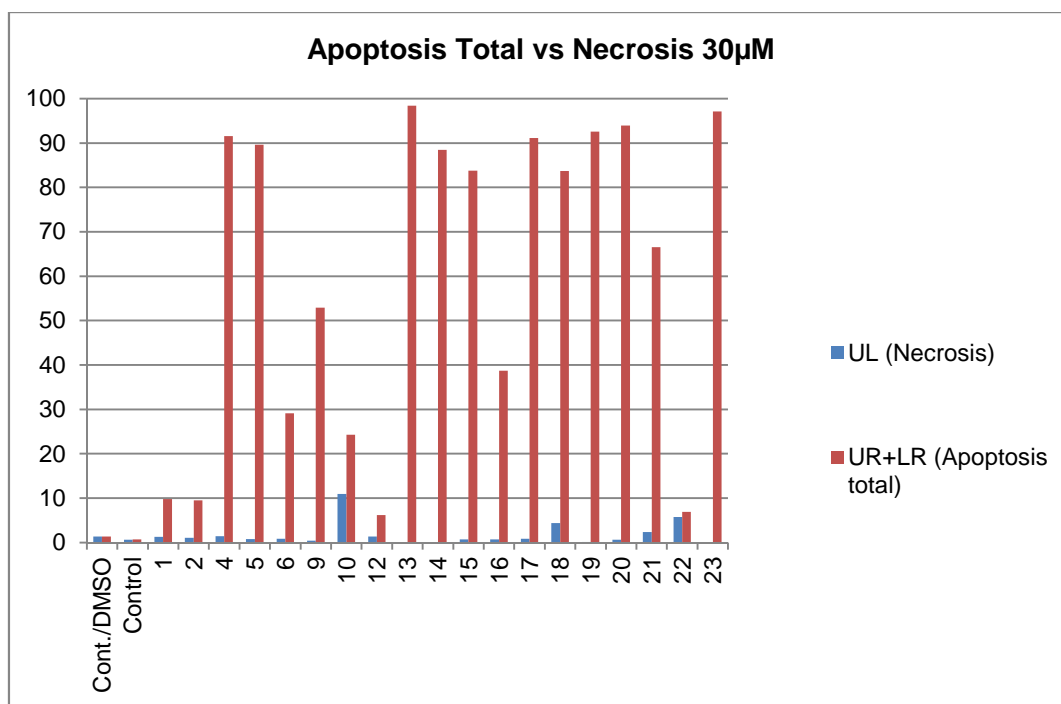


Figura 2.10. Apoptosis total frente necrosis de los derivados en el anillo A y los derivados nitrogenados en C-28 del ácido maslínico.

Las células de la línea B16-F10 se cultivan en un medio de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contiene L-glutamina, NaHCO_3 , piruvato sódico, glucosa y suero bovino fetal. Una vez obtenido las suficientes células son repartidas en placas de 6 pocillos. Tras el cultivo se tratan las células con los productos **4-23** disueltos en DMSO, salvo el compuesto **11** que es demasiado inestable, introduciendo en los pocillos con una concentración de $30 \mu\text{M}$ los citados compuestos durante 24 h. La mayoría de los productos analizados presentan un valor de necrosis menor del 10%, a excepción del producto **10** que presenta una necrosis ligeramente mayor del 10%. De los 19 productos analizados, 10 de ellos presentaban una apoptosis total (apoptosis temprana y tardía) mayor del 80% (Fig. 2.10.). Los productos que presentaban esta apoptosis son **4, 5, 13-15, 17-20** y **23**, siendo en la mayoría de ellos, la apoptosis temprana más del 90% de la apoptosis total.

De los resultados encontrados, se comprueba que los productos **7** y **8** no muestran actividad alguna, los demás productos se encuentran en la Figura 2.10 y se puede observar como la presencia de un grupo que modifique C-28 aumenta la actividad citotóxica en todos los casos, excepto para el producto **12**. Así, la presencia de la sal sódica o un grupo bencilo aumenta la actividad hasta cerca de un 90%. Por otra parte, de los derivados que han sido modificados con funciones nitrogenadas en C-28, podemos destacar, con más del 95% de apoptosis, el amido derivado **13** que además tiene los hidroxilos libres. Los otros dos productos derivados con una función nitrogenada que también dieron buenos resultados (por encima del 80%) fueron los productos **14** y **15**, los cuales presentan en ambos casos un nitrilo en C-28 pero estando el producto **15** desacetilado. En cambio los productos cuya función es una azida (**9**) o una amina (**16**) dieron resultados peores encontrándose por debajo del 60%.

Respecto de los derivados oxidados (**17-20**) semisintetizados, o sea aquellos que contienen en su estructura una cetona en C-2 o C-3, nos encontramos que todos ellos han mostrado una apoptosis por encima del 90%, a excepción del producto **18**, que sigue estando por encima del 80%. En el caso de **AM** este hecho resulta bastante significativo ya que los productos **17** y **18** que mejoran mucho la actividad con respecto del precursor, que se encuentra en torno al 10%. En cambio en el caso del **AM-Bn** resulta menos llamativo ya que este producto ya es muy activo y, por ello, la mejora de sus productos derivados **19** y **20** es más leve.

Cuando analizamos los productos que han cambiado la configuración del hidroxilo en C-2 pasando de ecuatorial a axial, se encuentra como el producto **21** incrementa su actividad respecto a su epímero en C-2, **AM**, llegando hasta un 65% de apoptosis. En el caso del producto **23** ocurre algo parecido ya que presenta una actividad del 96% lo cual supone una ligera mejoría de la misma ya que su epímero en C-2, **AM-Bn**, ya mostraba una fuerte actividad apoptótica (en torno al 90%). Por otra parte, en el caso de los trioles **6** y **22** es de destacar que muestran una mayor actividad el compuesto natural con el $2\beta\text{-OH}$ (**6**) que se sitúa en torno al 30 % de apoptosis, mientras que el epímero **22**, con el $2\alpha\text{-OH}$ presenta una actividad menor del 10%.

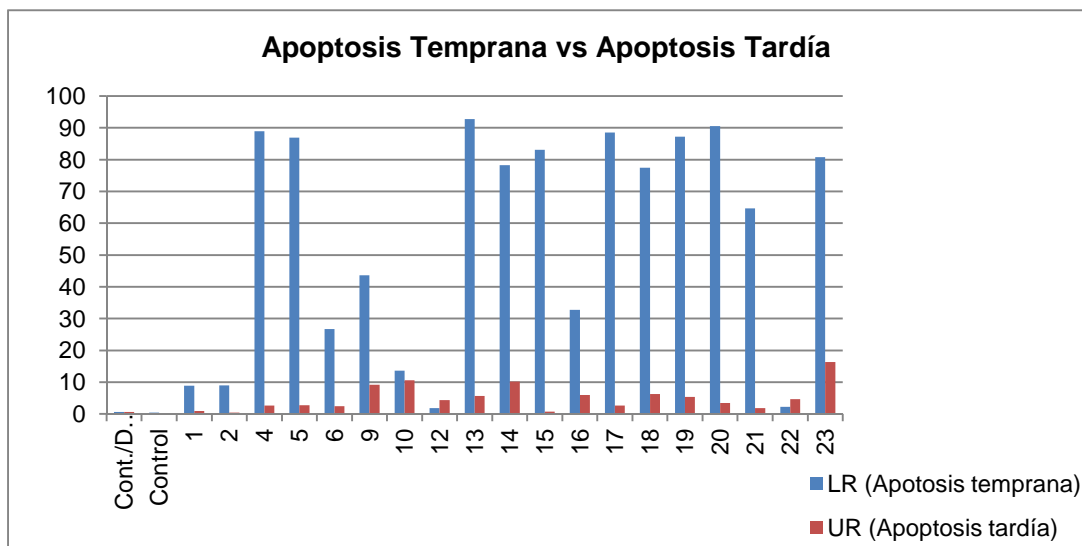


Figura 2.11. Apoptosis temprana frente a apoptosis tardía en los compuestos **1-23**.

En la Figura 2.11 se representa la apoptosis temprana frente a la tardía y en ella se puede observar como la contribución a la apoptosis total de los productos activos se debe, sobre todo, a la apoptosis temprana. A excepción de los productos **9**, **10**, **14** y **23** todos los demás productos presentan una apoptosis tardía menor de 10%.

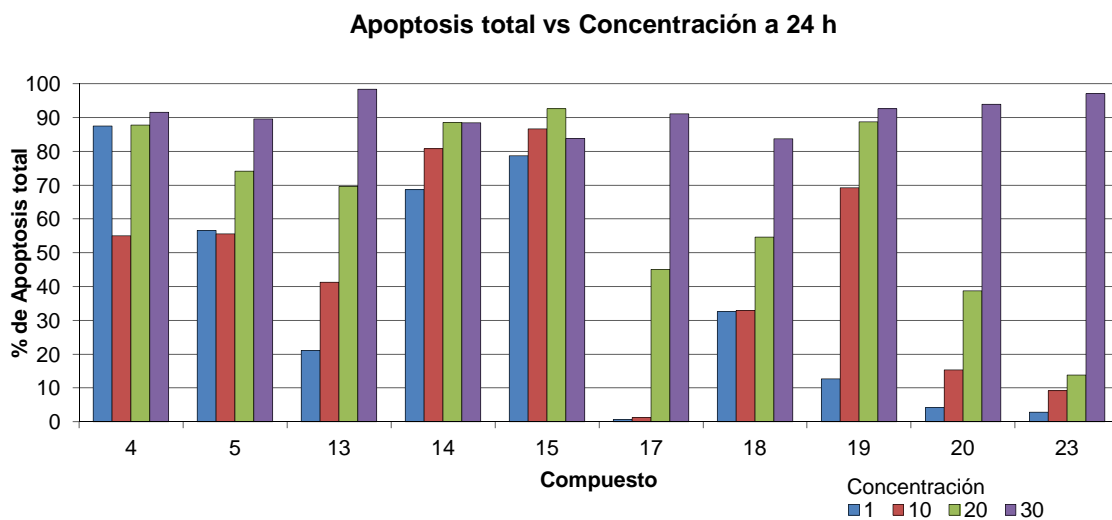
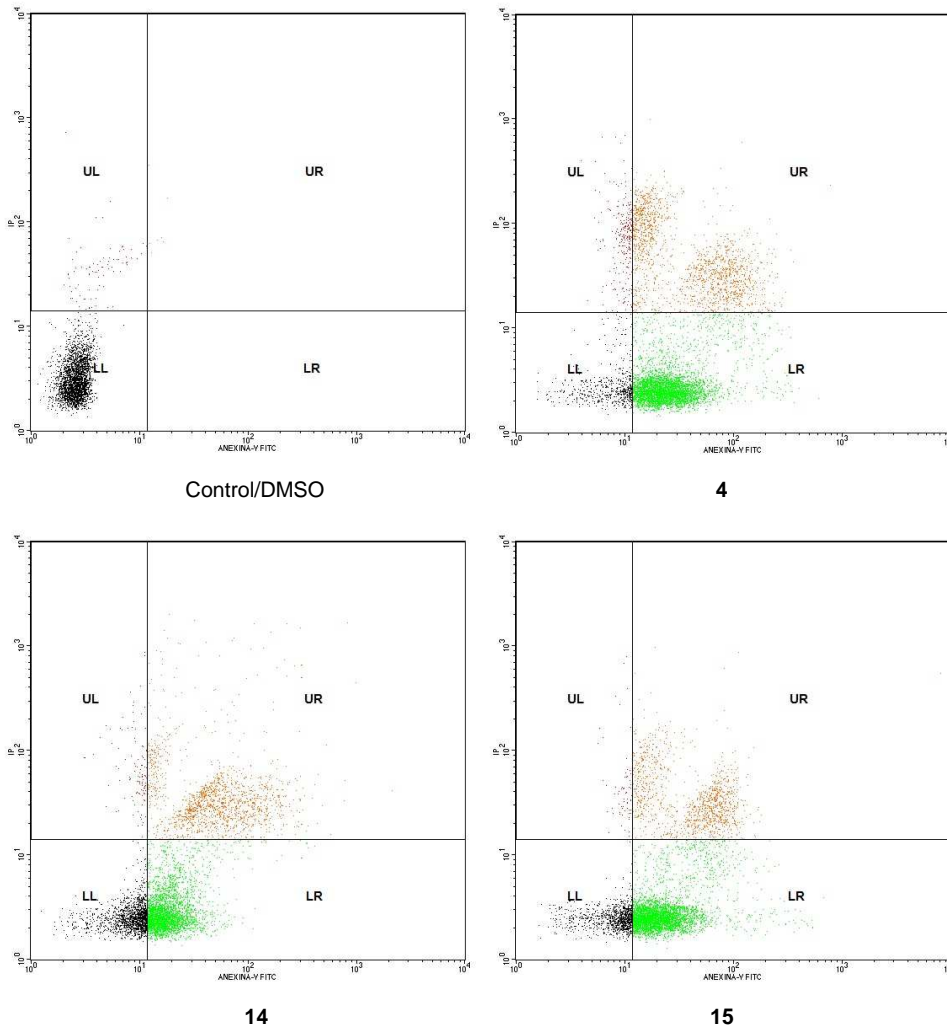


Figura 2.12. Apoptosis a 24 h de los derivados más activos en función de la concentración

Una vez estudiados los productos más activos a la concentración inicial de 30 μM (**4**, **5**, **13-15**, **17-20** y **23**), se procedió al análisis de la influencia de la concentración sobre la apoptosis de estos compuestos. Para ello se realizaron nuevos análisis a distintas concentraciones más bajas (1, 10, 20 μM) y a dos tiempos distintos 24 h y 48

h. Así, a la concentración de 20 μM se observa que los compuestos **4**, **5**, **13-15**, **17-20** y **23** muestran una apoptosis total por encima del 70% a las 24 h (Fig. 2.12), y esta actividad baja sensiblemente a las 48 h (Fig. 2.14). Sin embargo, a la concentración 1 μM , hay productos que pierden prácticamente toda su actividad apoptótica, son los productos **17**, **19**, **20** y **23**. No obstante, para otros productos se mantiene la actividad apoptótica bastante alta a esta concentración tan baja, observándose esta circunstancia para los derivados **4** (87.5%), **5** (56.7%), **14** (68.6%) y **15** (78.7%), estos porcentajes se ponen de manifiesto en la Figura 2.13, observándose como para los productos **4**, **14** y **15**, la mayoría de las células del ensayo de citometría se encuentran en el cuadrante inferior derecho perteneciente a la apoptosis temprana y como hay una mínima cantidad de células en el cuadrante superior izquierdo perteneciente a la necrosis.

De forma similar, se observa que para las pruebas a 48 horas (Fig. 2.14), todos los derivados tienen una buena o muy buena actividad apoptótica a la concentración de 20 μM . Cuando la concentración se hace 10 μM sólo los productos **5**, **13** y **20** superan el 50% de apoptosis total destacando los productos **5** y **13** que tienen valores superiores al 80%. Sin embargo, si se reduce la concentración a 1 μM , la actividad apoptótica decrece sensiblemente por debajo del 50%, salvo para el producto **5**, la sal sódica del ácido maslínico, que presenta, aun a esta concentración, un valor superior al 80% de apoptosis total.



Citometría de flujo para control/DMSO y los productos 4,14 y 15 a la concentración de 1 μ M. Interpretación de las figuras LL: células vivas, LR: apoptosis temprana, UR: apoptosis tardía y UL: necrosis

Figura 2.13. Análisis de los gráficos de citometría de flujo para los derivados de AM de mayor actividad apoptótica a concentración de 1 μ M

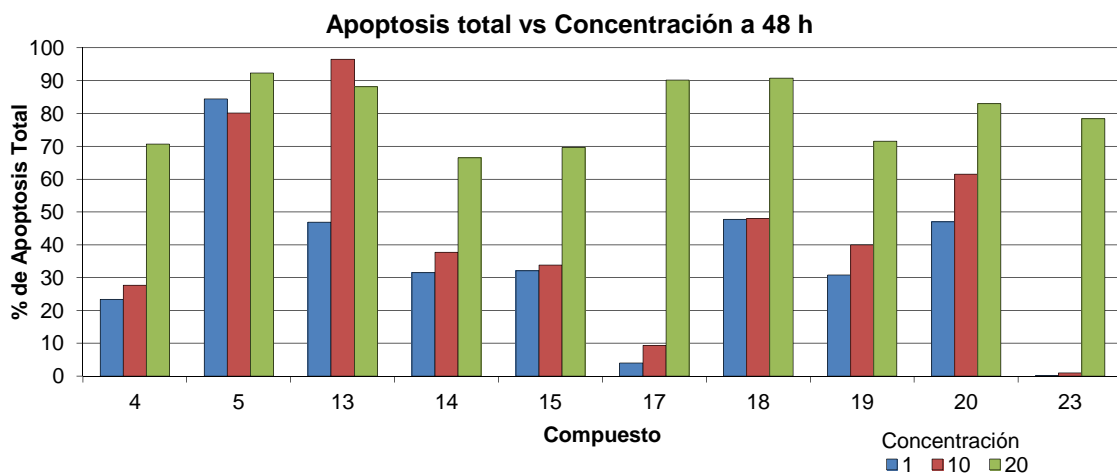


Figura 2.14. Porcentaje de apoptosis total frente a concentración a 48 h

II.4. SEMISÍNTESIS DE DERIVADOS ACILADOS EN EL ANILLO A DE AO Y AM

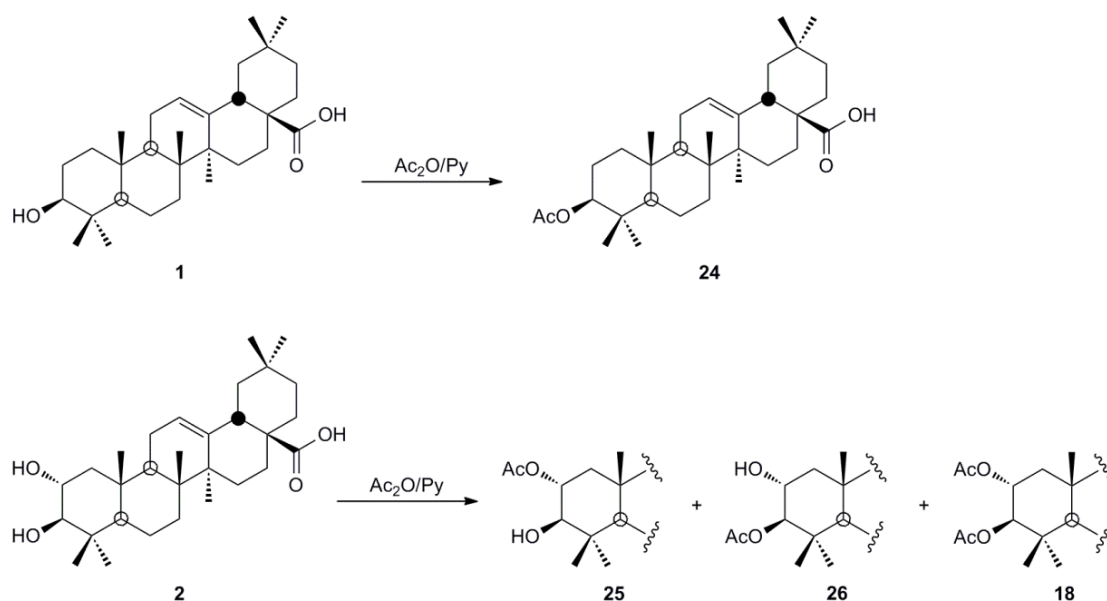
El objetivo de esta sección consiste en la obtención de una serie de derivados acilados en los hidroxilos del anillo A de ácido oleanólico y de ácido maslínico. El proceso de acilación se ha realizado en disolución y se ha comparado posteriormente con el mismo procedimiento en fase sólida. Para ello hemos realizado en primer lugar varias pruebas de acilación en disolución de ambos ácidos triterpénicos, después se ha llevado a cabo un estudio de la incorporación de los ácidos triterpénicos a la resina utilizada en fase sólida y, por último, se han llevado a cabo ensayos de acilación en fase sólida sobre los productos anclados en la resina. Posteriormente, en el apartado siguiente, estos distintos derivados acilados obtenidos serán testeados para comprobar sus distintas actividades biológicas.

II.4.1. Ensayos de acetilaciones

Con el fin de obtener un método estándar para las acilaciones en disolución de los hidroxilos del anillo A de **AO** y **AM**, se procede, en primer lugar, a realizar distintos ensayos de acetilación en las diferentes condiciones reflejadas en las Tablas 2.16 y 2.17. Para ello se mantiene la reacción en Py y se usa una proporción de 4:1 de anhídrido acético respecto a los grupos hidroxilos del triterpeno (Esq. 2.15.). La reacción se lleva a cabo a diferentes temperaturas y distintos tiempos de reacción y las mezclas de productos obtenidos han sido estudiadas mediante HPLC.

Tiempo (h)	Temperatura	Compuesto			
		OA (1)		3-acetil-OA (24)	
		(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)
0.5	reflujo	8.9		91.1	
1	reflujo	5.6	9.72	94.4	13.89
12	t.a.	18.4		81.6	
24	t.a.	5.3		94.7	

Tabla 2.16. Tabla de pruebas de acetilación de ácido oleanólico



Esquema 2.15. Esquema de reacciones de los ensayos de acetilación de AO y AM

Como se puede apreciar en la Tabla 2.16, el proceso de acetilación en fase disolución de ácido oleanólico conduce al esperado 3-acetil-derivado **24** con rendimientos de entre el 80-95 % para la reacción realizada a temperatura ambiente y para tiempos de reacción elevados. Sin embargo, a tiempos más cortos, entre 30-60 minutos, se obtiene un rendimiento similar del 95%, si la reacción se lleva a cabo a reflujo. El estudio de HPLC pone de manifiesto que el derivado acetilado **24** es más apolar y, por ello, aparece a un mayor tiempo de retención que el **AO**, concretamente a 13.9 min.

Tiempo (h)	Temp.	Compuesto							
		MA (2)		2-acetil-MA (25)		3-acetil-MA (26)		2,3-diacetil-MA (10)	
		(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)
0.5	reflujo	10.3		20.7		9.2		59.8	
1	reflujo	6.2		2.2		1.7		89.9	
12	t.a.	9.7	4.69	30.8	6.93	19.0	8.56	40.5	10.12
24	t.a.	4.3		14.1		0.8		80.8	
12	0 °C	45.3		30.8		20.1		3.8	
24	0 °C	10.5		44.6		30.2		14.7	

Tabla 2.17. Tabla de pruebas de acetilación de ácido maslínico

Ácido maslínico, al tener dos hidroxilos, da lugar a una mezcla más compleja de productos formada por ácido 3-acetilmaslínico, **25**, ácido 2-acetilmaslínico, **26** y ácido 2,3-

diacetilmaslínico, **10**. Con el fin de estudiar como ocurre la acilación en los hidroxilos de C-2 y C-3, se realiza la reacción en disolución a distintas temperaturas y tiempos. Es necesario destacar aquí que, aunque el hidroxilo de C-2 es α y el de C-3 es β y ambos hidroxilos son ecuatoriales, siempre se obtiene una mayor proporción del derivado 2α -acetilado ya que la posición C-3 del esqueleto triterpénico está parcialmente impedida por la presencia del gem-dimetilo de C-4. Este hecho se puede comprobar en la Tabla 2.17, a cualquier tiempo de reacción y temperatura. Por otra parte, y como es lógico, se observa, que al aumentar la temperatura y el tiempo de reacción aumenta la proporción del derivado diacetilado **10**, obteniéndose un rendimiento del 80% a 24 horas y temperatura ambiente y 90% para cuando la reacción se lleva a cabo durante 1 hora a reflujo. Con el fin último tener un método para conseguir el mayor rendimiento del producto diacetilado, se elige como método general aquél en el que se mantiene la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente.

II.4.2. Acilos utilizados en la obtención de derivados

Con el fin de diversificar en la mayor medida posible la derivatización de los esqueletos triterpénicos de AO y AM, se escogen 10 agentes acilantes que presenten diversas estructuras en forma de los correspondientes anhídridos de ácido. En la elección de estos agentes acilantes ha influido, además, de su propiedades físico-químicas, la bibliografía existente al respecto, utilizando según ella, acilos que ya han demostrado actividades en triterpenos como los ácidos betulínico y ursólico, aunque se introducirán aquí algunos acilos menos estudiados. En la Figura 2.18 aparecen las estructuras de los acilos finalmente seleccionados.

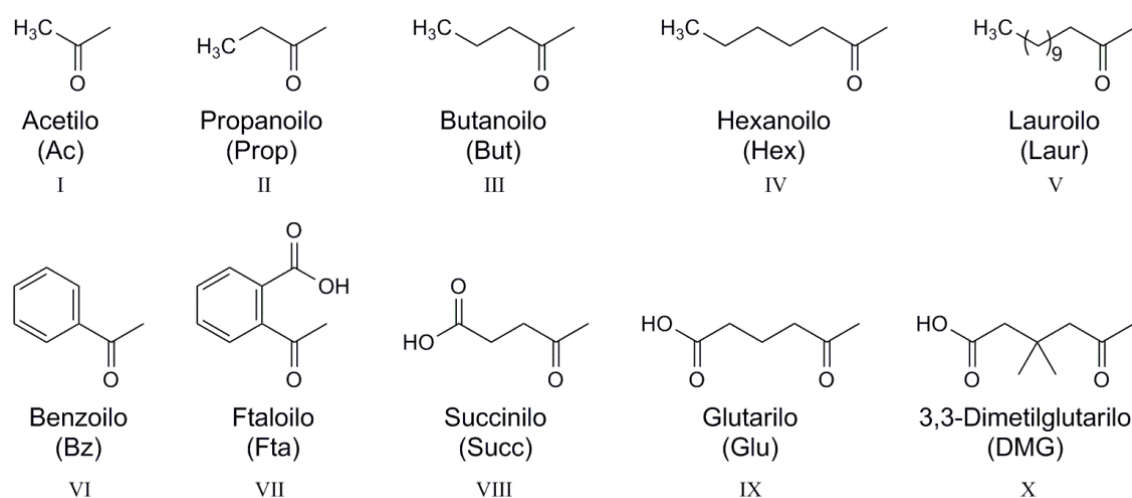


Figura 2.18. Estructuras de los acilos utilizados

Entre los agentes acilantes escogidos, el grupo **I-V**, son derivados de ácidos carboxílicos de cadena alifática variable (2-12 carbonos), cuya polaridad lógicamente va disminuyendo a medida que aumenta la cadena de carbonos. Los acilos **VI** y **VII** incorporan anillos aromáticos, siendo el acilo **VI** apolar mientras que el acilo **VII** presenta un carboxilo adicional libre que le confiere una mayor polaridad. Por último decir que, el grupo de acilos **VII-X** provienen de anhídridos de ácidos cíclicos y presentan todos ellos un carboxílico adicional al final de la cadena lo que les proporciona un aumento de la polaridad y la solubilidad (Fig. 2.18.).

II.4.3. Acilaciones en disolución de ácido oleanólico y ácido maslínico

Una vez escogido las condiciones óptimas de reacción, se empieza con la síntesis de los distintos derivados acilados de ácido oleanólico y ácido maslínico. La acilación de los grupos hidroxilos del anillo A se lleva a cabo en fase disolución a partir de los compuestos **1-4**. La acilación se realiza con diez anhídridos de ácido que nos proporcionan los diez acilos antes mencionados para poder posteriormente comprobar sus propiedades biológicas. Como ya se ha comentado, los grupos acilantes seleccionados difieren tanto en el número de carbonos como en su grupo funcional, lo que conlleva la obtención de derivados con características físico-químicas distintas.

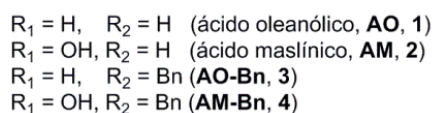
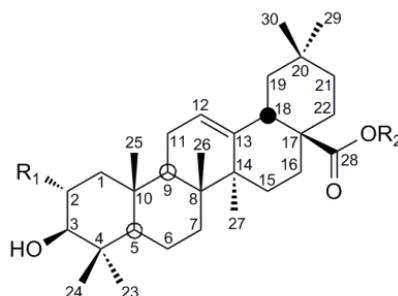
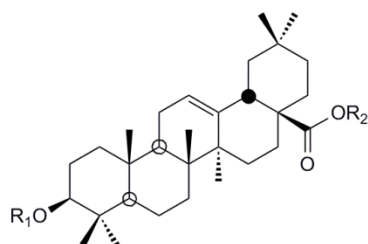


Figura 2.19. Ácidos triterpénicos y derivados usados en las reacciones de acilación

El método general de acilación en fase líquida, consiste en llevar a cabo la reacción a partir de los compuestos **1-4**, disolviendo estos productos en piridina y añadiendo el correspondiente anhídrido **I-X** en una proporción 4:1 respecto del grupo hidroxilo. De estas reacciones se obtienen 57 nuevos derivados (**27-83**) con rendimientos variables.

La principal, y casi única, diferencia que se aprecia en los espectros de ¹H RMN de los derivados de **AO** y **AO-Bn** (compuestos **27-45**) (Fig. 2.20.) y los correspondientes sustratos, estriba en el desapantallamiento observado para las señales de los protones geminales al grupo hidroxilo en C-3 cuando éste se encuentra acilado. Así se puede observar que la señal del protón geminal H-3 que se sitúa a δ_H 3.19 y 3.18 para **AO** y **AO-Bn**, respectivamente, aparece a δ_H 4.40-4.50 para los derivados de los acilos **I-V** y **VIII-X**, y a δ_H 4.70-4.80 para los acilos **VI** y **VI**. Por otra parte, la acilación en C-3 de **AO** y **AO-Bn** se pone de manifiesto ligeramente en los espectros de ¹³C RMN de los derivados acilados con respecto del producto de partida (Tab. 2.21. y Tab. 2.22.). En este sentido, se observa que C-3 para **AO** y **AO-Bn** tiene valores de δ_C 81.0 y 79.2, respectivamente, mientras que este carbono se encuentra a δ_C 80-83 para los derivados **27-45**.



Compuesto	R ₁	R ₂	Rendimiento (%)	Compuesto	R ₁	R ₂	Rendimiento (%)
27	Propanoilo	H	83	36	Acetilo	Bn	89
28	Butanoilo	H	87	37	Propanoilo	Bn	85
29	Hexanoilo	H	90	38	Butanoilo	Bn	93
30	Lauroilo	H	73	39	Hexanoilo	Bn	90
31	Benzoilo	H	69	40	Lauroilo	Bn	91
32	Ftaloilo	H	93	41	Benzoilo	Bn	73
33	Succinilo	H	47	42	Ftaloilo	Bn	82
34	Glutarilo	H	59	43	Succinilo	Bn	51
35	3,3-Dimetilglutarilo	H	62	44	Glutaril	Bn	67
				45	3,3-Dimetilglutarilo	Bn	65

Figura 2.20. Derivados acilados de **AO (1)** y de **AO-Bn (3)** y rendimientos alcanzados

C/Nº	AO (1)	24	27	28	29	30	31	32	33	34	35
C-1	38.1	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.4	38.2	38.2	38.2	38.0
C-2	29.8	29.9	29.9	29.9	29.9	29.8	29.9	29.7	29.6	29.7	29.9
C-3	81.0	81.2	80.8	80.8	80.8	80.8	81.8	83.4	81.7	81.3	81.2
C-4	37.0	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.3	38.1	37.2	37.2	37.3
C-5	55.3	55.5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.6	55.6	55.5	55.5	55.4
C-6	18.2	18.4	18.4	18.4	184.3	18.4	18.5	18.4	18.5	18.4	18.5

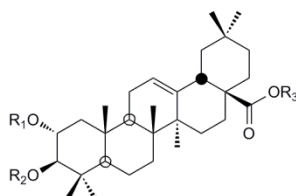
Tabla 2.21. Desplazamientos químicos de los carbonos del anillo A de derivados de **AO**

C/N	AO-Bn (3)	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
C-1	38.7	38.3	38.4	38.3	38.3	38.3	38.3	38.4	38.3	38.1	38.3
C-2	27.9	27.8	28.3	27.8	25.1	25.4	23.8	27.9	29.3	27.8	27.8
C-3	79.2	81.1	80.8	80.7	80.8	80.7	81.8	83.1	81.7	81.6	81.6
C-4	37.3	37.1	37.2	36.9	37.1	37.1	37.2	37.2	37.1	37.1	37.1
C-5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.6	55.7	55.5	55.5	55.5
C-6	18.6	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4	18.4	18.4

Tabla 2.22. Desplazamientos químicos de los carbonos del anillo A de derivados de **AO-Bn**

Como ya se ha comentado, la acilación en disolución de **AM** y **AM-Bn** origina los derivados acilados **46-83** y cuando se aplica el método optimizado para la obtención de los distintos derivados acilados obtenemos en mayor proporción el producto diacilado y en menor cantidad el 2-acil-derivado, mientras que el 3-acil-derivado se obtiene en

rendimientos muy bajos debido probablemente al impedimento estérico del gem-dimetilo que se encuentra sobre C-4 (Fig. 2.23). Por ello estos 3-acil-derivados no han sido considerados para los extensos estudios que se realizan en esta Memoria aunque serán tenidos en cuenta y cuantificados en algún caso más adelante.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimiento (%)	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimiento (%)
46	Propanoilo	H	H	20	64	Acetilo	H	Bn	15
47	Propanoilo	Propanoilo	H	73	65	Acetilo	Acetilo	Bn	75
48	Butanoilo	H	H	15	66	Propanoilo	H	Bn	22
49	Butanoilo	Butanoilo	H	80	67	Propanoilo	Propanoilo	Bn	67
50	Hexanoilo	H	H	19	68	Butanoilo	H	Bn	10
51	Hexanoilo	Hexanoilo	H	70	69	Butanoilo	Butanoilo	Bn	79
52	Lauroilo	H	H	27	70	Hexanoilo	H	Bn	15
53	Lauroilo	Lauroilo	H	57	71	Hexanoilo	Hexanoilo	Bn	76
54	Benzoilo	H	H	37	72	Lauroilo	H	Bn	33
55	Benzoilo	Benzoilo	H	45	73	Lauroilo	Lauroilo	Bn	61
56	Ftaloilo	H	H	25	74	Benzoilo	H	Bn	35
57	Ftaloilo	Ftaloilo	H	40	75	Benzoilo	Benzoilo	Bn	51
58	Succinilo	H	H	30	76	Ftaloilo	H	Bn	27
59	Succinilo	Succinilo	H	33	77	Ftaloilo	Phthaloilo	Bn	55
60	Glutarilo	H	H	31	78	Succinilo	H	Bn	27
61	Glutarilo	Glutarilo	H	35	79	Succinilo	Succinilo	Bn	43
62	3,3-Dimetilglutarilo	H	H	33	80	Glutarilo	H	Bn	21
63	3,3-Dimetilglutarilo	3,3-Dimetilglutarilo	H	36	81	Glutarilo	Glutarilo	Bn	51
					82	3,3-Dimetilglutarilo	H	Bn	25
					83	3,3-Dimetilglutarilo	3,3-Dimetilglutarilo	Bn	47

Figura 2.23. Derivados acilados de AM (2) y AM-Bn (3) y rendimientos alcanzados

C/N	AM	10	25	26	46	47	48	49	50	51	52	53
C-1	46.1	44.1	43.9	48.0	43.8	44.1	43.8	44.1	43.8	44.1	43.9	44.1
C-2	68.2	70.2	73.5	67.1	73.2	70.1	73.1	70.1	73.1	70.1	73.1	70.1
C-3	83.2	80.8	81.1	85.1	81.0	80.5	81.1	80.3	81.0	80.3	81.1	80.3
C-4	39.0	39.6	38.6	39.6	38.6	38.4	38.5	38.4	38.4	38.4	38.4	38.4
C-5	55.1	55.1	55.4	55.4	55.3	55.1	55.3	55.1	55.3	55.1	55.4	55.1
C-6	18.1	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4

C/N	AM	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
C-1	46.1	44.0	44.2	43.9	43.9	44.8	44.6	44.5	44.4	45.2	44.6
C-2	68.2	74.2	71.3	74.8	72.2	74.2	70.7	73.8	70.8	73.9	70.7
C-3	83.2	81.2	81.2	82.4	82.4	80.2	81.2	81.1	81.2	81.1	80.7
C-4	39.0	38.6	38.7	38.6	38.6	39.1	39.2	39.6	39.1	39.6	39.0
C-5	55.1	55.4	55.4	55.5	55.5	56.1	55.5	56.2	55.6	56.6	55.6
C-6	18.1	18.5	18.5	18.6	18.6	19.3	18.9	19.7	18.7	19.7	19.1

Tabla 2.24. Desplazamientos químicos de los carbonos del anillo A de derivados de AM

C/N	AM-Bn (4)	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
C-1	46.2	43.9	44.1	43.9	44.2	43.9	44.1	43.9	44.1	43.9	44.2
C-2	69.2	73.5	70.2	73.3	70.1	73.3	69.9	73.2	69.4	73.3	70.1
C-3	89.0	81.1	80.8	81.1	80.5	81.1	80.2	81.1	80.2	80.2	80.4
C-4	38.4	38.5	39.5	38.5	38.4	38.5	38.2	38.5	38.3	38.3	38.3
C-5	55.6	55.4	55.1	55.4	55.1	55.4	55.0	55.4	55.1	55.1	55.1
C-6	18.7	18.5	18.4	18.5	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4	18.4	18.5

C/N	AM-Bn (4)	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
C-1	46.2	43.9	44.2	43.8	43.9	43.8	44.1	43.9	44.0	43.8	44.2
C-2	69.2	74.3	71.3	74.9	72.1	73.7	70.7	73.5	70.2	73.5	70.5
C-3	89.0	81.1	81.3	82.3	82.4	80.9	81.1	81.0	80.4	80.9	80.4
C-4	38.4	38.6	38.6	38.6	38.6	38.5	38.4	38.5	38.4	38.5	38.4
C-5	55.6	55.4	55.4	55.5	55.5	55.3	55.1	55.3	55.1	55.3	55.1
C-6	18.7	18.5	18.6	18.6	18.6	18.4	18.5	18.5	18.4	18.5	18.5

Tabla 2.25. Desplazamientos químicos de los carbonos del anillo A de derivados de **AM-Bn**

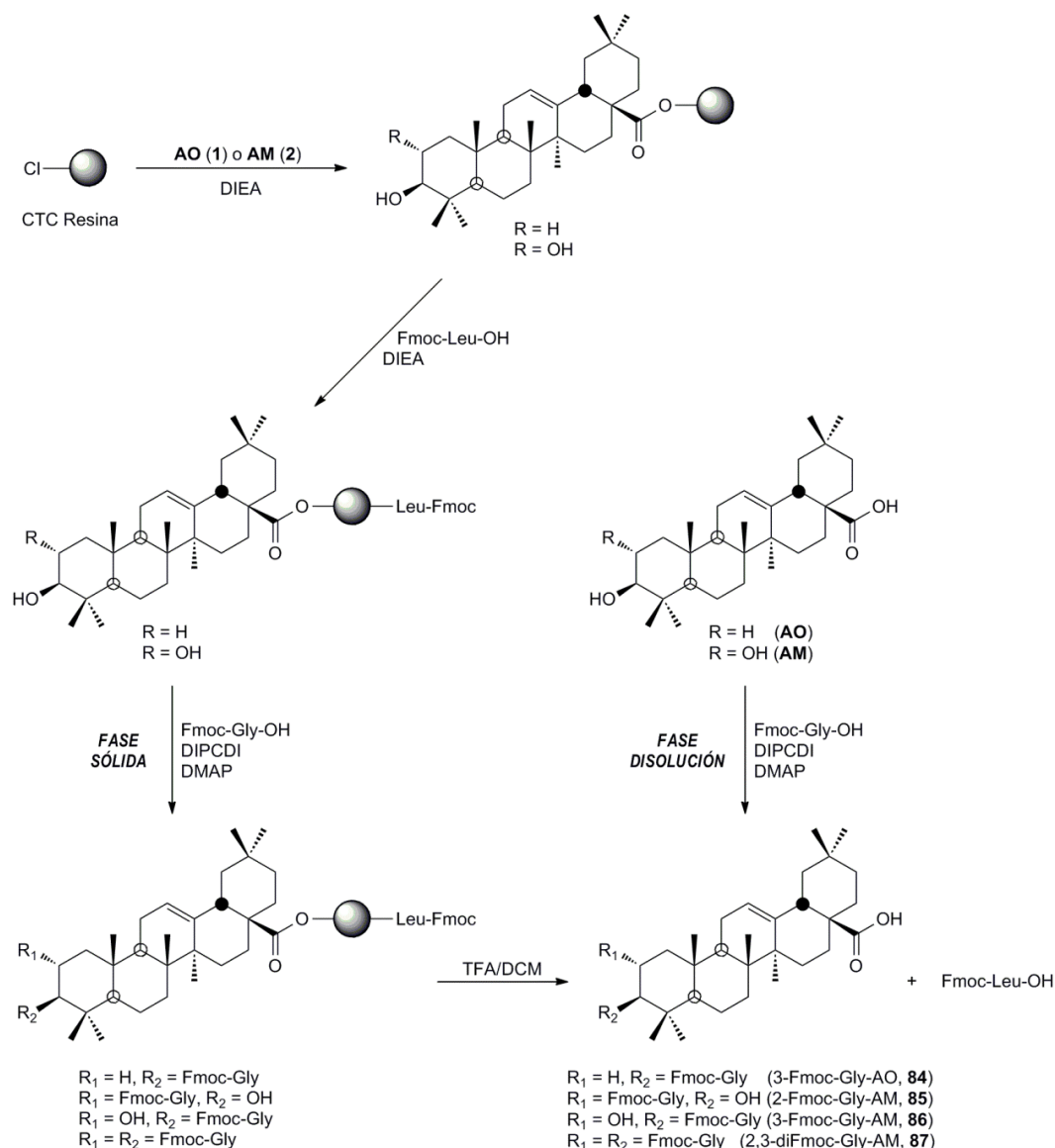
Una vez más las principales y casi únicas diferencias espectroscópicas se encuentran en los δ_H de los hidrógenos geminales a los hidroxilos (1H RMN) y en los δ_C de los carbonos (^{13}C RMN) que se encuentran acilados, o sea, los pertenecientes a C-2 y C-3. Para realizar la comparativa del espectro de 1H RMN partimos de H-2 y H-3 de **AM** y **AM-Bn** situados a δ_H 3.45 y 2.84 para **AM** y δ_H 3.59 y 2.89 para **AM-Bn**, respectivamente. En el caso de los 2-acil-derivados las señales de H-2 se desapantallan a valores de δ_H entre 4.90-5.20, quedando H-3 prácticamente inalterado. Para el caso de los 2,3-diacil-derivados se observa como la señal de H-3 se desapantalla a δ_H entre 4.70-4.80 para los acilos **I-V** y **VIII-X**, hasta δ_H 5.50-5.80 para los acilos **VI-VII**. En el espectro de ^{13}C RMN se realiza la misma comparativa encontrando las señales de C-2 y C-3 de **AM** a δ_C 68.2 y 83.2 y para **AM-Bn** a δ_C 69.0 y 83.9, respectivamente. Sin embargo, cuando estos sustratos están monoacilados en C-2 la señal de este carbono se desapantalla a valores de δ_C 73-74 y a δ_C 69-71 para los 2,3-diacil-derivados (Tab. 2.24. y Tab. 2.25.). Por otra parte, la señal del C-3 se apantalla ligeramente tanto en los monoacilados como en los diacilados a valores de δ_C 80-82.

II.4.4. Cuantificación de la incorporación de AO y AM a la resina de cloruro de 2-clorotritilo (CCT resina)

En la forma anteriormente expuesta se han semisintetizado en fase líquida todos los derivados acilados en los hidroxilos del anillo A de los sustratos **1-4**, o sea, los compuestos **27-83**. Sin embargo, se ha de reconocer que la semisíntesis en fase líquida y la purificación cromatográfica de los derivados obtenidos con los acilos **VII-X**, han resultado muy laboriosas debido a que la presencia de un grupo carboxilo libre en el otro extremo de la estructura dificulta enormemente el manejo de estos derivados. Así ha ocurrido sobre todo con los productos **32-35** en el caso de los derivados de **AO** y **56-63** en el caso de **AM**. Estos compuestos contienen dos o tres grupos carboxilos lo cual dificulta seriamente todos los procesos y, en este punto de la investigación, se hacía realmente necesario disponer de un método que facilitara su purificación y manejo. Por otra parte, la síntesis orgánica en fase sólida (SOFS) se ha consolidado en los últimos años como un método que permite realizar las ciertas reacciones orgánicas con relativa facilidad, que logra obtener productos de reacción en altos rendimientos y que conlleva un “work-up” sencillo. Por esta razón se realizará un estudio comparativo de las acilaciones anteriormente comentadas en fase sólida frente a las llevadas a cabo en fase disolución. Para ello se escoge como soporte sólido y, entre todas las resinas que hay en el mercado, la resina Barlos (resina de cloruro de 2-clorotritilo, CCT resina) que tiene como característica que el anclaje se realiza a través de un grupo carboxilo (en este caso del triterpeno) y que el desanclaje se lleva a cabo en condiciones ligeramente ácidas de ácido trifluoracético, adecuado para no afectar al esqueleto triterpeno y provocar en el reacciones secundarias no deseadas.

Para poder usar la citada resina adecuadamente, y ajustar las cantidades de los reactivos, se debe de estudiar previamente el grado de incorporación del triterpeno a la resina (Esq. 2.26.). Ello el primer paso es el tratamiento de la resina con los dos triterpenos **AO** y **AM**, que se añaden para este estudio en 3 proporciones distintas (0.5, 1 y 3 equivalentes respecto de un equivalente de centros activos de la resina). Tras este tratamiento, la resina con el triterpeno que ha incorporado, se hace reaccionar con un aminoácido protegido en el grupo amino con un grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Este grupo Fmoc tiene como característica principal que absorbe a λ 301 nm, muy lejos de las señales características de los triterpenos. Así, como segundo paso, una vez anclado el triterpeno a la resina, ésta es tratada con Fmoc-Leu-OH para ocupar aquellos centros activos donde no ha entrado el triterpeno. Tras este proceso, el siguiente tratamiento consiste en el capado de la resina con MeOH, para anular cualquier centro activo que no hubiese reaccionado ni con el triterpeno ni con la Fmoc-Leu-OH. Seguidamente, se procede a la esterificación de los hidroxilos del anillo A del triterpeno con Fmoc-Gly-OH y, por último, se desanclan las dos partes que están unidas a la resina con TFA en DCM. De estas pruebas se obtiene, en el caso de **AO**, la proporción de Fmoc-Leu-OH que ocupó los centros activos de la resina que no fueron ocupados por el citado ácido triterpénico y el compuesto **84** (3-Fmoc-Gly-AO), es decir, el ácido oleanólico que ha sido esterificado en C-3 con Fmoc-Gly-OH. De la misma manera, cuando la prueba se realiza con **AM**, tras el clivado de la resina, se obtiene la correspondiente proporción de Fmoc-Leu-OH y los tres productos

posibles de la esterificación total o parcial de ácido maslínico con Fmoc-Gly-OH, o sea, **85** (2-Fmoc-Gly-AM), **86** (3-Fmoc-Gly-AM) y **87** (2,3-di-Fmoc-Gly-AM).



Esquema 3.26. Cuantificación de la incorporación de AO y AM a la CCT-resina

La cuantificación de la incorporación a la resina se realizó a través de HPLC a midiendo a λ 301 nm de absorbancia, longitud de onda a la que absorbe el grupo protector Fmoc. En el caso de **AO** se deduce que la incorporación a la resina es prácticamente cuantitativa al usar 3 equivalentes de este triterpeno (Tab. 2.27.). En cambio la máxima incorporación de **AM** encontrada está en torno al 92% para 3 equivalentes del compuesto. Ese porcentaje de incorporación se distribuye entre un 68.1% del C-2 derivado, un 6.8% del C-3 derivado y un 17.2% del derivado esterificado en C-2 y C-3 (Tab. 2.27.). Esta distribución en cuanto a las proporciones en C-2 y C-3 de **AM**, concuerda con la obtenida en los casos de acilaciones en fase disolución y, tal y como se comentó allí, la menor

proporción obtenida del C-3 derivado se debe al impedimento estérico que sobre esta posición ejercen los metilos angulares que presenta C-4.

Test de incorporación de AO a la resina		Equivalentes de AO respecto de la resina		
		0.5 equiv	1 equiv	3 equiv
Fmoc-Leu-OH	($t_R = 11.59$ min)	32.2%	13.9%	1.1%
Fmoc-Gly-OA (84)	($t_R = 34.74$ min)	67.8%	86.1%	98.9%
Test de incorporación de AM a la resina		Equivalentes de AM respecto de la resina		
		0.5 equiv	1 equiv	3 equiv
Fmoc-Leu-OH	($t_R = 11.61$ min)	39.4%	17.8%	7.9%
2-(Fmoc-Gly)-AM (85)	($t_R = 31.84$ min)	55.8%	67.3%	68.1%
3-(Fmoc-Gly)-AM (86)	($t_R = 33.42$ min)	1.9%	3.8%	6.8%
2,3-di(Fmoc-Gly)-AM (87)	($t_R = 35.82$ min)	2.9%	11.1%	17.2%

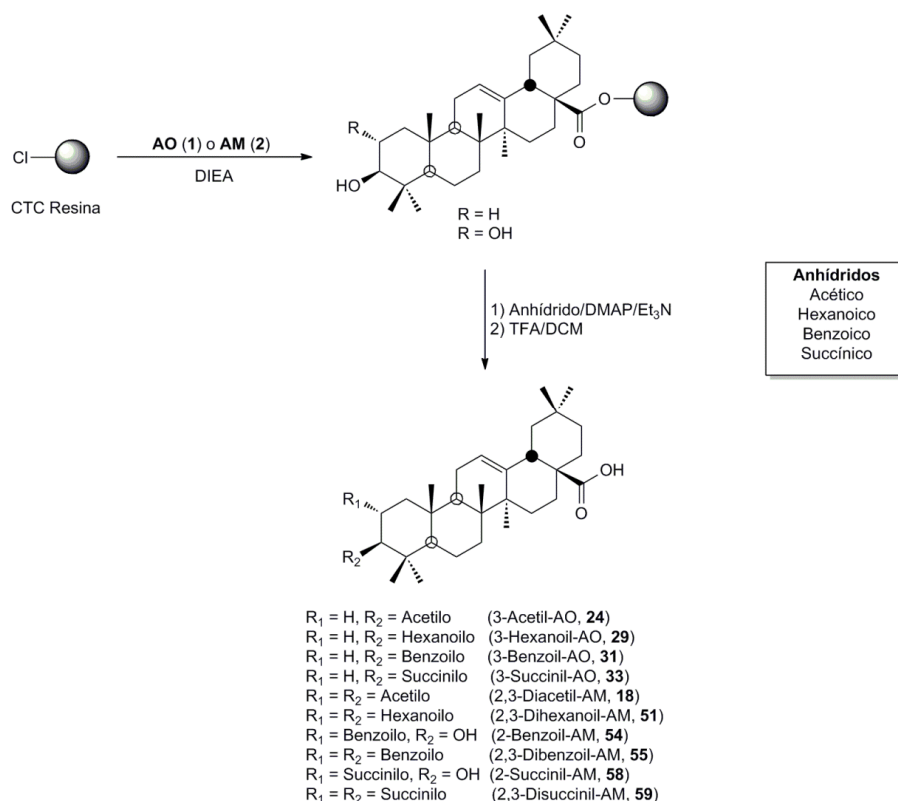
Tabla 2.27. Condiciones y productos obtenidos en el test de cuantificación de **AO** y **AM** incorporación a la CCT-resina

Para este estudio de cuantificación mediante HPLC fue necesaria la síntesis en fase disolución de los derivados de **AO** y **AM** con Fmoc-Gly-OH, como patrones (Esq. 2.26.). Con este fin se hizo reaccionar el **AO** y **AM** con Fmoc-Gly-OH en DCM en presencia de DIPCDI y DMAP, manteniendo esta reacción 12 h a reflujo. En el caso de **AO** se obtiene tan sólo un derivado, 3-Fmoc-Gly-AO (**84**) en cuyo espectro de ^1H RMN se observa el desapantallamiento de H-3 a δ_H 4.62 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 7.5$ Hz) que confirma la esterificación ocurrida. También se aprecia la aparición de varios protones pertenecientes al grupo Fmoc, y así, a δ_H 4.26 (1H, t, $J_1 = 6.8$ Hz) se sitúa la señal del protón del ciclopentano del grupo Fmoc y a δ_H 4.43 (3H, d, $J_1 = 6.8$ Hz) los protones de su metileno. Por último, a δ_H 4.01 (2H, d, $J_1 = 3.5$ Hz) aparecen los protones característicos del metileno de glicina. En el caso del ^{13}C RMN se reconocen fácilmente las señales nuevas que aparecen, a saber, δ_C 170.1 y 43.2 las señales características del carbonilo y del metileno de la glicina, δ_C 156.5 y 67.4 señales del grupo carbonilo y del metileno del grupo Fmoc y en torno a δ_C 144-120 las señales de los carbonos aromáticos del grupo Fmoc. La señal que se ve afectada del triterpeno es básicamente la perteneciente a C-3 que es desplazada a δ_C 82.8.

La reacción en las mismas condiciones anteriormente descritas con **AM** da lugar a los tres derivados esperados, 2-Fmoc-Gly-AM (**85**), 3-Fmoc-Gly-AM (**86**) y 2,3-diFmoc-Gly-AM (**87**). El espectro de RMN los productos **85** y **86** sólo difieren en la señal de H-2/C-2 y H-3/C-3. En el espectro de ^1H RMN del producto **85** aparece la señal de H-2 desapantallada a δ_H 5.06 y la de H-3 a δ_H 3.19, en cambio las señales de esos mismos protones en el producto **86** aparecen a δ_H 3.80 y 4.60, respectivamente. En el espectro de ^{13}C RMN del producto **85** encontramos la señal para C-2 a un δ_C 74.9 y la de C-3 a δ_C 80.7, en cambio el producto **86** tiene la señal característica de C-2 en δ_C 67.3 y la de C-3 en δ_C 86.6. En cambio cuando se analiza el espectro de ^1H RMN del producto diacetilado (**87**) podemos encontrar las señales a δ_H 5.34 para H-2 y δ_H 4.80 para H-3. El espectro de ^{13}C RMN nos indica que las señales de C-2 están a un δ_C 71.0 y la de C-3 a δ_C 82.1. Las demás señales que aparecen tanto en el espectro de ^1H RMN como en el ^{13}C RMN corresponden a las señales del grupo Fmoc-Gly anteriormente descrito.

II.4.5. Acilaciones en fase sólida de AO y AM

Una vez comprobada la incorporación del ácido triterpénico a la resina, se pasa a la obtención de derivados acilados de estos triterpenos en fase sólida. Para ello se seleccionan 4 agentes acilantes distintos, los anhídridos acético, hexanoico, benzoico y succínico, para estudiar la evolución de la reacción de acilación en fase sólida en función del grupo acilo que se une al hidroxilo. Así, el acetilo y el hexanoilo han sido elegidos como grupos apolares con diferente tamaño, el benzoilo por tener un anillo aromático y el succinilo como representante de los agentes acilantes cíclicos que, tras la reacción, dejan un grupo carboxilo libre. Se comienza la síntesis por la incorporación a la resina de los triterpenos **AO** y **AM**, según los procedimientos anteriormente descrito con las cantidades optimizadas (3 equivalentes de triterpeno por equivalente de centro activo de resina). Para cada triterpeno se separa la resina en cuatro nuevas jeringas, a cada de las cuales se le añaden los distintos anhídridos anteriormente seleccionados en relación molar de 4:1 (anhídrido: grupo hidroxilo). La reacción se lleva a cabo en DCM/DMF en presencia de DMAP y Et₃N, manteniéndose 24 h en agitación orbital a temperatura ambiente. Una vez que se da por finalizada la reacción de acilación, el correspondiente derivado acilado se obtiene por clivado de la resina con TFA/DCM, recogiendo los oportunos residuos líquidos que son concentrados a vacío y comparados y cuantificados mediante HPLC con los correspondientes patrones anteriormente sintetizados en fase líquida (Esq. 2.28.).



Esquema 2.28. Test de acilación en fase sólida de **AO** y **AM**

La acilación en fase sólida de **AO** con los anhídridos acético y hexanoico se completa en un tiempo de 30 min. La acilación con anhídrido benzoico en cambio sólo llega al 94.8% tras 4 horas de reacción. Pero fue la acilación con anhídrido succínico la que se desarrolló más lentamente llegando sólo al 36.9% tras 24 h. Habida cuenta del bajo rendimiento obtenido en la succinilación de **AO** en fase sólida, se aumentó el tiempo de reacción para comprobar si la reacción puede evolucionar más. Así, tras 48 horas sólo se llegó a un rendimiento del 53.7% (Tab. 2.29.).

Tiempo (h)	Acilo	Compuesto			
		AO		3-acil-AO	
		Rendimiento (%)	t _R (min)	Rendimiento (%)	t _R (min)
0.5	Acetilo	1.5		98.3	14.1
0.5	Hexanoilo	1.1		96.4	22.4
2	Benzoilo	23.5	9.5	75.1	25.0
4		3.2		94.8	
2	Succinilo	94.4		2.5	
4		90.1		6.8	
8		79.6		18.2	9.0
24		59.8		36.9	
48		43.6		53.7	

Tabla 2.29. Test de acilación en fase sólida de **AO**

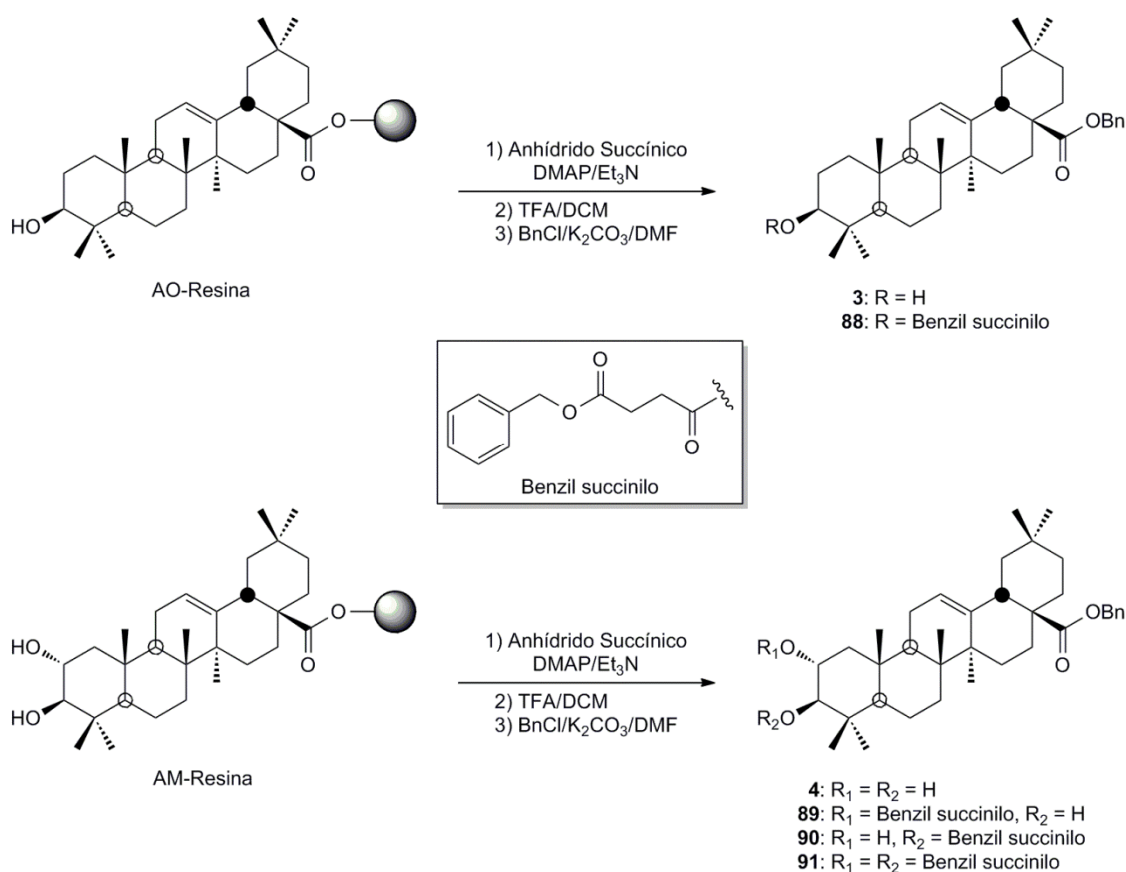
La acilación en fase sólida de **AM** con los mismos cuatro anhídridos antes citados produjo mezclas más complejas, debido a la presencia de los dos grupos hidroxilos en el anillo A. Los resultados para los anhídridos más apolares (acético y hexanoico) son similares al caso del **AO** y se observa que tras 2 h se obtienen completamente los derivados diacilados (Tab. 2.30.). En cambio la benzoilación se desarrolla más lentamente y no fue hasta las 24 h que se obtuvo el 94.9% del doblemente benzoilado (**55**). También se pudo aislar una pequeña proporción del 2-benzoil-derivado (**54**), no detectándose la presencia del 3-benzoil-derivado. Para la reacción con anhídrido succínico se observa que tras 48 horas de reacción se obtiene un 81.1% del derivado diacilado (**59**) (Tab. 2.30.). Esto claramente difiere con los resultados obtenidos con **AO**. Dado el poco porcentaje de 3-acil-derivado, siempre inferior al 5%, obtenido durante succinilación, podemos suponer que la reacción de acilación transcurre por un proceso en el que el primer hidroxilo en acilarse es el que se encuentra en C-2, esta situación probablemente favorezca la entrada de un segundo grupo acilo en la posición más impedida de C-3, obteniéndose, por tanto, un mayor porcentaje del derivado doblemente acilado que en el caso de la acilación sobre el C-3 de **AO**.

Tiempo (h)	Acilo	Compuesto							
		MA		2-acil- AM		3-acil- AM		2,3-diacil-AM	
		(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)	(%)	t _R (min)
2	Acetilo	1.2		0.0	–	0.0	–	96.4	10.0
2	Hexanoilo	0.8		0.0	–	0.0	–	97.1	24.9
2	Benzoilo	2.2		47.3		0.0		49.4	
4		1.8		32.9	10.1	0.0	–	64.3	19.8
8		1.1		23.7		0.0		73.9	
24		0.6	4.7	3.4		0.0		94.9	
2	Succinilo	32.5		41.2		1.7		23.4	
4		27.6		31.5		2.4		37.1	
8		18.4		20.1	3.7	3.8	1.3	56.3	1.5
24		10.2		14.5		4.2		69.2	
48		6.3		7.1		4.8		81.1	

Tabla 2.30. Test de acilación en fase sólida del **AM**

II.4.6. Cuantificación de la acilación de AO y AM en fase sólida

Tal y como se ha comentado previamente, los derivados de los anhídridos cíclicos utilizados como agentes acilantes, es decir, los anhídridos ftálico, succínico, glutárico y 3,3-dimetilglutárico, presentan dificultades para su manejo, purificación y caracterización, debido a la presencia de dos o tres grupos carboxilos libres en la molécula. Así pues, con el fin de obtener una mayor precisión en las distintas reacciones de acilación y evaluar más correctamente los porcentajes de reacción, se ha realizado un estudio detallado de la reacción de acilación de los triterpenos **AO** y **AM** con anhídrido succínico. Para ello, tras realizar las adecuadas reacciones de acilación en fase sólida y el desanclado del/los derivado/s succinilado/s de la resina con TFA/DCM, se obtiene una mezcla de compuestos que es tratada con cloruro de bencilo en DMF en presencia de K_2CO_3 con el fin de bloquear los carboxilos libres (Esq. 2.31.).



Esquema 2.31. Síntesis en fase sólida y posterior bencilación en fase líquida de los succinil-derivados de **AO** y **AM**.

En este sentido, tras la reacción de succinilación de ácido oleanólico en fase sólida, la mezcla de compuestos obtenidos, se cliva de la resina y se procede al tratamiento con cloruro de bencilo, se obtienen dos productos, **AO-Bn** (**3**) con un 40% de rendimiento y 3-bencilsuccinil-AO-Bn (**88**) con un rendimiento del 55%. En el espectro de 1H RMN del producto **88** se observan las señales características del producto doblemente bencilado en

los dos restos carboxílicos de la molécula, 10 protones aromáticos a δ_H 7.36-7.35 y dos sistemas AB a δ_H 5.13 y 5.07. Como ocurre en los demás acilados de **AO**, H-3 se desplaza a δ_H 4.53. En el espectro de ^{13}C RMN se aprecian las señales de 12 carbonos aromáticos entre δ_C 136-128 y dos grupos metilenos a δ_C 66.5 y 65.9 pertenecientes a los dos grupos bencilos presentes en la molécula. Además, aparecen los dos metilenos del resto succinilado a δ_C 29.3 y 29.6 y sus respectivos carboxilos a δ_C 172.1 y 171.8. El resto de los carbonos del triterpeno se ven casi inalterados a excepción de C-3 que se sitúa a un δ_C 81.3 y C-28 a δ_C 174.8 como consecuencia de la bencilación que sufrió el grupo carboxilo de C-28.

De la acilación de **AM** en fase sólida con anhídrido succínico y su posterior bencilación se obtienen cuatro compuestos. El primero es **AM-Bn** (**4**) con un rendimiento del 6%, 2-bencilsuccinil-AM-Bn (**89**) con un rendimiento del 8%, 3-bencilsuccinil-AM-Bn (**90**) con un rendimiento del 6% y 2,3-dibencilsuccinil-AM-Bn (**91**) como producto mayoritario con un 74%. En el espectro de ^1H RMN de los productos **89** y **90** aparecen las señales de los dos grupos bencilos a δ_H 7.36-7.34 para los 10 protones aromáticos y en torno a δ_H 5.14-5.07 para los sistemas AB. En el espectro de ^1H RMN del producto **89** se aprecia un desapantallamiento de H-2 a δ_H 5.00 y H-3 a δ_H 3.14, mientras que en el producto **90** aparece la señal de H-3 a δ_H 4.57 y H-2 a δ_H 3.75. En lo que respecta al espectro de ^{13}C RMN en el caso del producto los dos productos **89** y **90** aparecen los 12 carbonos aromáticos entre δ_C 136-128 y los grupos metilenos en δ_C 67.2-66.1. También se aprecian los carbonos correspondientes al grupo succinilo encontrándose a δ_C 173.0-172.5 los carboxilos y δ_C 29.7-29.4 para sus metilenos. El resto de los carbonos del esqueleto triterpénico se encuentran inalterados a excepción de C-28 que se encuentra a δ_C 177.5, C-2 a δ_C 73.9 para el caso del producto **89** y C-3 a δ_C 85.6 para el producto **90**. En el caso del producto diacilado **91** se observan desplazamientos similares en los RMN a los productos anteriores, con la diferencia que en este caso se observan 3 grupos de bencilados y por tanto las señales aparecen por triplicado. En el ^1H RMN hay 15 protones aromáticos en torno a δ_H 7.38-7.31 y los sistemas AB a δ_H 5.12-5.04. Por otro lado, H-2 y H-3 se encuentran en torno a δ_H 5.14 y 4.79, respectivamente. En el espectro de ^{13}C RMN los carbonos aromáticos se sitúan en torno a δ_C 128-136.5 y los 3 metilenos a δ_C 66.5, 66.4 y 66.0. Los cuatro metilenos de los dos restos succinilos están a δ_C 29.0-29.3 y los carboxilos a δ_C 171.9-172.2. C-2 y C-3 del triterpeno aparecen a δ_C 70.3 y 80.7, mientras que C-28 aparece a δ_C 177.4.

Como conclusiones de estos tests de cuantificación de succinilación en fase sólida de **AO** y **AM**, llevada a cabo mediante bencilación final en fase disolución de la mezcla resultante, se puede indicar que:

- **AO** se succinila en fase sólida, en las condiciones de reacción dadas, en una proporción ligeramente superior a la mitad de la muestra inicial (55%) dando el 3-succinil-AO y quedando un 45% del producto inicial inalterado.
- **AM** se succinila en fase sólida, en las condiciones de reacción dadas, en una proporción más elevada que **AO** y que ronda el 90%.
- La mayor proporción de derivados succinilados de **AM** se debe al derivado 2,3-disuccinil-AM (~75%), seguidamente el 2-succinil-AM (~10%), a

continuación el 3-succinil-AM (~5%) y en torno a un 5% del producto de partida inalterado.

- Dada la diferencia de proporciones finales entre la succinilación de **AO** y la de **AM**, es de suponer que la presencia del hidroxilo en C-2 en **AM** ayuda a la entrada del acilo en los hidroxilos de este último obteniéndose una mayor proporción final del derivado doblemente succinilado.

II.5. ESTUDIO DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS DERIVADOS ACILADOS

La citotoxicidad es la cualidad de un compuesto orgánico natural o sintético de ser tóxico para determinadas células y debería que ser selectiva para células anómalas, en el caso de fármacos. Como se ha comentado en la Introducción de la presente Memoria, podemos encontrar un sinfín de productos que presentan citotoxicidad frente a una anomalía en el organismo como puede ser el cáncer, una infección o la presencia de un parásito. En el presente apartado de esta Memoria, se estudia la influencia en la citotoxicidad de los distintos acil derivados semi-sintetizados a partir de **AO** y **AM** sobre la línea celular B16F10. En los casos que aparecen citotoxicidad se llevan a cabo las pruebas con ensayos de apoptosis, producción de ROS y actividad contra anti-VIH-proteasa. Existen en bibliografía casos precedentes de triterpenos análogos funcionalizadas en C-3 que han demostrado actividad citotóxica, apoptosis y actividad contra la anti-VIH-proteasa.^{34,182}

II.5.1. Citotoxicidad

Se examinaron los efectos citotóxicos de los derivados acilados semisintéticos de **AO** y **AM** en la línea celular de B16F10 usando el ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Este ensayo consiste en tratar las células de melanoma murino B16F10 con dosis crecientes (rango 0-80 µg/mL) de cada derivado sintetizado, su viabilidad se determinó por tinción con formazano y es expresado como un porcentaje de células control sin tratar. Tras terminar el ensayo, se observa que sólo el 24% de los compuestos analizados (**1-4**, **10** y **24-83**) presentan citotoxicidad sobre esta línea celular (Tab. 2.32.).

El primer paso es comparar las IC_{50} obtenidas para los productos precursores **AO**, **AO-Bn**, **AM** y **AM-Bn**. Los resultados observados muestran como **AM** (36.2 µM) necesita una concentración tres veces menor que la de **OA** (106.4 µM) para llegar a la IC_{50} . En cambio cuando comparamos los productos con sus derivados bencilados la IC_{50} se reduce a la mitad, siendo para **AO-Bn** 52.2 µM y para **AM-Bn** 19.0 µM.

Sólo tres de los derivados del **AO** presentan actividad citotóxica, estos productos son el **24** (64.7 µM), **27** (161.1 µM) y **31** (162.1 µM). De estos sólo **24** supera la actividad citotóxica de su precursor **AO** (**1**). En el caso de los bencil-derivados de **AO**, cuatro productos son los que muestran actividad citotóxica (**42-45**). Los productos **42** (26.8 µM), **43** (23.2 µM), **44** (29.9 µM) y **45** (14.2 µM) mejoran sensiblemente la actividad respecto a su precursor **AO-Bn**. De todo ello se deduce que los acilados cuyo sustituyente en C-3 muestra

un carboxilo libre son los que presentan mayor actividad, o sea los acilados con grupo ftaloilo, succinilo, glutarilo y 3,3-dimetilglutarilo.

Comp. #	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ concentración (μM) ^a	$\frac{IC_{50} \text{ de precursor}}{IC_{50} \text{ de compuesto \#}^b}$
OA (1)	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0
24	–	Acetilo	H	64.7 ± 2.8	1.6
27	–	Propanoilo	H	161.1 ± 9.8	0.7
31	–	Benzoilo	H	162.1 ± 18.4	0.7
OA-Bn (3)	–	H	Bn	52.2 ± 0.9	1.0
42	–	Ftaloilo	Bn	26.8 ± 0.9	1.9
43	–	Succinilo	Bn	23.2 ± 0.3	2.3
44	–	Glutarilo	Bn	29.9 ± 0.9	1.7
45	–	3,3-Dimetil-glutarilo	Bn	14.2 ± 1.0	3.7
MA (2)	H	H	H	36.2 ± 3.8	1.0
10	Acetilo	Acetilo	H	44.1 ± 3.8	0.8
48	Butanoilo	H	H	106.6 ± 11.3	0.3
50	Hexanoilo	H	H	34.6 ± 2.1	1.0
MA-Bn (4)	H	H	Bn	19.0 ± 0.2	1.0
64	Acetilo	H	Bn	39.6 ± 0.8	0.5
76	Ftaloilo	H	Bn	73.2 ± 2.4	0.3
80	Glutarilo	H	Bn	63.2 ± 2.1	0.3
82	3,3-Dimetil-glutarilo	H	Bn	28.3 ± 1.1	0.7

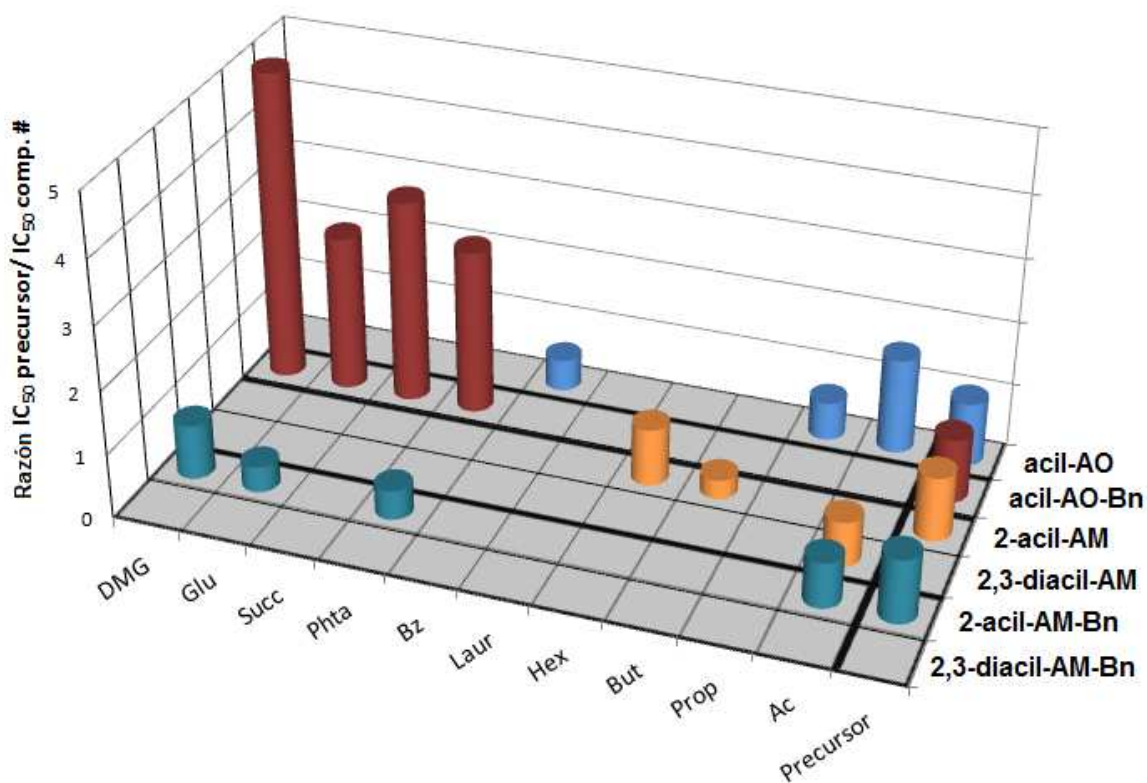
^a Se calcularon los valores de IC₅₀ teniendo en cuenta las células de control no tratadas como 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Los valores, media ± S.E.M.

^b La última columna representa la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO, AO-Bn, AM o AM-Bn) y el IC₅₀ de los derivados acilados relacionados.

Tabla 2.32. Inhibición del crecimiento sobre células B16F10 de los derivados acilados

En el caso de los derivados de AM, se aprecia que sólo tres de los derivados muestran actividad citotóxica (**10**, **48** y **50**). La actividad mostrada por los productos **10** (44.1 μM), **48** (106.6 μM) y **50** (34.6 μM) resulta similar o menor, comparada con la de su precursor **AM** (36.2 μM). Al igual que sucedía con el **AO-Bn**, los derivados de **AM-Bn** que muestran actividad son los que incluyen un acilo cuyo sustituyente contiene un carboxilo, exceptuando el derivado con el grupo succinilo. Pero en este caso el sustituyente se encuentra en C-2. Así los derivados **64** (39.6 μM), **76** (73.2 μM), **80** (63.2 μM) y **82** (28.3 μM) son los que muestran actividad citotóxica pero en todos los casos la actividad es menor a la de su precursor **AM-Bn** (19 μM). También es de destacar que hay varios de los derivados

que presentan citotoxicidad, en el caso del **AO** presentan grupos acetilos en los carbonos C-3 (**24**), en el caso del **AM** en C-2 y C-3 (**10**) y en el caso del **AM-Bn** en el C-2 (**64**). Por tanto podemos ver que sólo seis de los derivados son más activos que sus precursores (**24**, **42-45** y **50**). El siguiente paso tras analizar la actividad citotóxica es el estudio de las propiedades apoptóticas de estos compuestos derivados acilados de **AO** y **AM**.



DMG =3,3-dimetilglutarilo, Glu =glutarilo, Succ =succinilo, Phta =ftaloilo, Bz =benzoilo, Laur =lauroilo, Hex =hexanoilo, But =butanoilo, Prop =propanoilo, Ac =acetilo, Precursores =AO (1), AM (2), AO-Bn (3), y AM-Bn (4).

Figura 2.33. Representación tridimensional comparativa de la inhibición de crecimiento IC_{50} de los derivados acilados de **AO** y **AM** con respecto de su precursor

En la Figura 2.33 se observa claramente como los productos que mayor citotoxicidad presentan respecto a su precursor son los derivados monoacilados, es decir, los 3-acil-derivados de **AO-Bn** y los 2-acil-derivados de **AM-Bn**. Por tanto, se puede concluir que la presencia del grupo bencilo es necesaria para obtener una buena citotoxicidad, también se puede observar como la presencia de los agentes acilantes cíclicos, ftálico, succínico, glutárico y 3,3-dimetilglutárico mejoran considerablemente esa actividad.

II.5.2. Apoptosis

Las propiedades anticancerígenas de los triterpenos pentacíclicos están ampliamente estudiadas y se identifican como inhibidores de la proliferación de células tumorales, supresores de angiogénesis, metástasis e inductores de apoptosis (véase la Introducción de la presente Memoria). Una de las principales razones por las que estos triterpenos tienen un gran potencial en la quimioprevención y en la terapia de varios tipos de cáncer, es que tienen la habilidad de suprimir varios pasos clave en la iniciación, progresión y desarrollo del tumor. Existen muchos 3-O-acilderivados de triterpenos pentacíclicos que muestran actividad apoptótica.

Los ensayos de determinación de la actividad apoptótica fueron realizados a través de una doble tinción con annexin V (An-V) conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y yoduro de propidio (PI). Los procesos de apoptosis implican la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática acompañado por la translocación de la fosfatidilserina (PS) del interior de la membrana al exterior, exponiendo de este modo la PS al ambiente externo. Este hecho es el que se aprovecha para controlar y observar los efectos apoptóticos. Al tener la An-V una alta afinidad por las PS es capaz de unirse a ella en las células que se encuentran marcadas con FITC. Los porcentajes de apoptosis se determinaron con un análisis de citometría de flujo (annexin V-FITC/PI). Los ensayos de apoptosis en las células B16F10 fueron realizadas tras 72 h de tratamiento con los diferentes derivados que mostraban citotoxicidad a las concentraciones de IC_{50} y $IC_{50} \times 2$. Para diferenciar entre apoptosis temprana o tardía, necrosis o células normales se utiliza un ensayo FACS (técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia) usando como marcadores annexina V y yoduro de propidio.

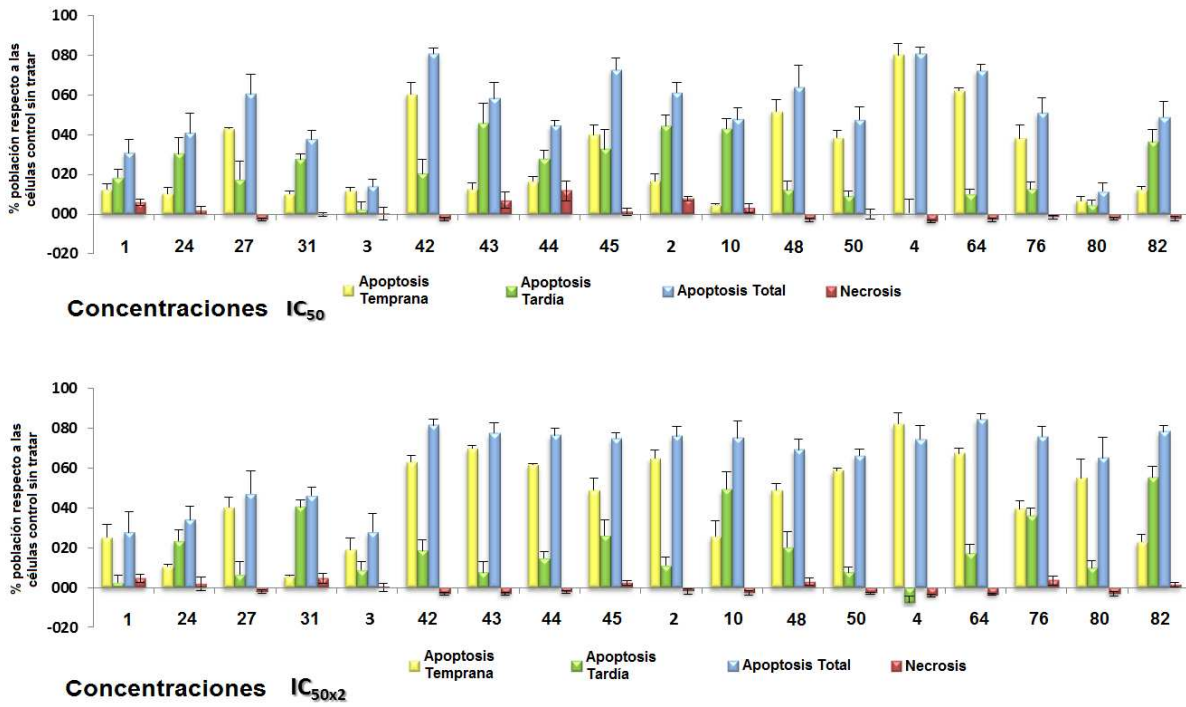
Como se desprende de la información dada en las Tablas 2.34. y 2.35., todos los compuestos citotóxicos muestran actividad apoptótica bastante alta y una necrosis casi despreciable. A la concentración de IC_{50} la mayoría de los compuestos muestran una actividad de apoptosis total entre el 51 y 95% a excepción del producto **80** que sólo muestra una apoptosis total del 25.2%. A la concentración de $IC_{50} \times 2$ la apoptosis total de los productos estudiados se encuentra entre el 60 y 98%. Los productos **27, 42, 43, 45, 48 y 64** muestran una apoptosis total por encima del 70% a la concentración IC_{50} . Tres de estos productos son los que muestran mayor actividad citotóxica (**42, 43 y 45**), estos productos derivados del **AO-Bn** son los que presentan en el C-3 un acilo con un grupo carboxilo libre. Cuando se analiza la concentración $IC_{50} \times 2$ se observa que diez compuestos (**10, 42-45, 48, 50, 64, 76 y 82**) son los que presentan una apoptosis total superior al 80%, donde hay que destacar que los que presentan el grupo carboxilo en C-28 bloqueado con el bencilo y con acilos dicarboxílicos sustituidos en C-2 o C-3 son los productos que presentaban mejores resultados. Al analizar la apoptosis temprana se aprecia que siete compuestos (**27, 42, 45, 48, 50, 64 y 76**) presentan una apoptosis temprana (entre 42 y 66% de la población total de células) mayor que la apoptosis tardía a la concentración de IC_{50} , respecto la concentración $IC_{50} \times 2$ podemos ver que son nueve (**27, 42-45, 48, 50, 64 y 80**) los compuestos que presentan esta característica quedando la apoptosis temprana entre un 44 y 74% de las células totales.

Comp. #	Conc. ^a	Población ^b				
		Normal	Apoptosis Temprana	Apoptosis Tardía	Apoptosis Total	Necrosis
Control	0	77.9 ± 1.5	3.9 ± 0.4	9.8 ± 2.2	13.7 ± 2.7	4.0 ± 0.6
AO (1)	IC ₅₀	44.9 ± 5.1	16.4 ± 2.3	28.2 ± 2.0	44.6 ± 4.3	10.1 ± 1.0
	IC ₅₀ X2	49.8 ± 6.4	29.1 ± 6.0	12.4 ± 1.6	41.5 ± 7.5	8.7 ± 1.4
24	IC ₅₀	39.5 ± 6.5	14.4 ± 2.4	40.3 ± 5.8	54.7 ± 7.2	5.8 ± 1.4
	IC ₅₀ X2	46.3 ± 6.8	14.6 ± 0.6	33.4 ± 3.5	48.0 ± 4.1	5.7 ± 2.8
27	IC ₅₀	24.3 ± 6.8	47.0 ± 0.0	27.4 ± 7.0	74.4 ± 7.0	1.3 ± 0.1
	IC ₅₀ X2	37.2 ± 8.9	44.3 ± 4.7	16.5 ± 4.3	60.8 ± 9.1	2.0 ± 0.1
31	IC ₅₀	44.6 ± 1.9	14.0 ± 1.1	37.6 ± 0.5	51.6 ± 1.6	3.8 ± 0.4
	IC ₅₀ X2	31.6 ± 0.2	9.5 ± 0.4	50.5 ± 1.2	60.0 ± 1.6	8.5 ± 1.8
AO-Bn (3)	IC ₅₀	67.9 ± 3.5	15.6 ± 1.2	12.2 ± 1.7	27.8 ± 0.8	4.3 ± 2.6
	IC ₅₀ X2	54.3 ± 5.4	23.0 ± 5.1	18.6 ± 2.1	41.6 ± 6.5	4.1 ± 1.5
42	IC ₅₀	3.9 ± 0.3	64.3 ± 5.6	30.3 ± 5.2	94.6 ± 0.5	1.5 ± 0.2
	IC ₅₀ X2	3.7 ± 0.5	66.9 ± 2.8	28.5 ± 3.3	95.4 ± 0.5	1.0 ± 0.0
43	IC ₅₀	16.9 ± 2.1	16.6 ± 2.8	55.5 ± 8.2	72.1 ± 5.5	11.1 ± 3.4
	IC ₅₀ X2	7.7 ± 2.5	74.0 ± 0.8	17.6 ± 3.3	91.6 ± 2.4	0.7 ± 0.0
44	IC ₅₀	25.8 ± 4.5	20.6 ± 1.9	37.9 ± 1.9	58.4 ± 0.1	15.9 ± 4.4
	IC ₅₀ X2	8.1 ± 0.8	65.8 ± 0.1	24.6 ± 1.1	90.4 ± 1.0	1.6 ± 0.1
45	IC ₅₀	8.3 ± 2.0	44.0 ± 4.4	42.6 ± 7.7	86.5 ± 3.3	5.3 ± 1.3
	IC ₅₀ X2	4.9 ± 0.6	52.8 ± 5.7	36.1 ± 5.6	88.8 ± 0.1	6.4 ± 0.7
AM (2)	IC ₅₀	10.9 ± 1.7	20.8 ± 2.8	54.2 ± 3.5	74.9 ± 2.5	11.7 ± 0.5
	IC ₅₀ X2	8.3 ± 1.8	68.8 ± 3.9	21.0 ± 1.9	89.8 ± 2.5	2.0 ± 0.7
10	IC ₅₀	31.4 ± 1.3	8.7 ± 0.0	52.9 ± 3.0	61.6 ± 3.0	7.1 ± 1.7
	IC ₅₀ X2	9.7 ± 5.6	29.6 ± 7.6	59.3 ± 6.5	88.9 ± 6.0	1.5 ± 0.5
48	IC ₅₀	21.0 ± 8.2	55.6 ± 5.5	22.1 ± 2.0	77.7 ± 8.5	1.2 ± 0.3
	IC ₅₀ X2	10.2 ± 1.6	53.0 ± 2.9	30.0 ± 5.7	83.0 ± 2.8	6.8 ± 1.2
50	IC ₅₀	34.8 ± 1.7	42.4 ± 3.3	19.0 ± 0.4	61.4 ± 3.6	3.9 ± 1.9
	IC ₅₀ X2	18.9 ± 0.5	62.7 ± 0.9	17.5 ± 0.5	80.2 ± 0.5	1.1 ± 0.0
AM-Bn (4)	IC ₅₀	5.0 ± 0.6	84.2 ± 5.4	10.6 ± 4.7	94.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1
	IC ₅₀ X2	11.3 ± 4.2	86.2 ± 5.0	2.2 ± 1.0	88.4 ± 4.1	0.1 ± 0.1
64	IC ₅₀	12.9 ± 0.9	66.0 ± 0.9	20.0 ± 0.3	86.0 ± 0.6	1.2 ± 0.3
	IC ₅₀ X2	1.1 ± 0.1	71.3 ± 2.2	27.1 ± 2.1	98.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0
76	IC ₅₀	32.8 ± 4.7	42.2 ± 6.3	22.5 ± 1.4	64.7 ± 4.9	2.5 ± 0.2
	IC ₅₀ X2	2.9 ± 0.7	43.6 ± 3.7	46.2 ± 1.4	89.7 ± 2.3	7.5 ± 1.7
80	IC ₅₀	73.3 ± 1.7	10.6 ± 1.7	14.6 ± 0.1	25.2 ± 1.6	1.6 ± 0.1
	IC ₅₀ X2	20.2 ± 4.3	59.1 ± 9.1	19.8 ± 1.2	78.9 ± 7.8	0.9 ± 0.6
82	IC ₅₀	35.4 ± 4.5	16.5 ± 0.8	46.3 ± 4.2	62.8 ± 5.0	1.8 ± 0.5
	IC ₅₀ X2	2.2 ± 0.3	26.9 ± 3.5	65.3 ± 3.3	92.2 ± 0.2	5.6 ± 0.5

^a La línea de células fueron tratadas con concentraciones iguales a sus valores de IC₅₀ o IC₅₀X2. Los valores se expresan como medias ± S.E.M. de tres experimentos por duplicado.

^b Las células normales son anexina V⁺ PI⁻, las células de apoptosis temprana son anexina V⁺ PI⁺, mientras que las células apoptóticas tardías son anexina V⁺ PI⁺, la apoptosis total (apoptosis temprana más apoptosis tardía) son anexina V⁺, y las células necróticas son anexina V⁺PI⁺.

Tabla 2.34. Apoptosis para las concentraciones IC_{50} y $IC_{50} \times 2$



Las líneas celulares fueron tratadas en concentraciones iguales a su IC_{50} e $IC_{50 \times 2}$.

Figura 2.35. Análisis por citometría de flujo por tinción de anexina VeFITC y acumulación de PI después de la exposición durante 72 h de las células de melanoma B16F10 con los derivados acilados de **AO** y **AM**.

II.5.3. Producción de ROS

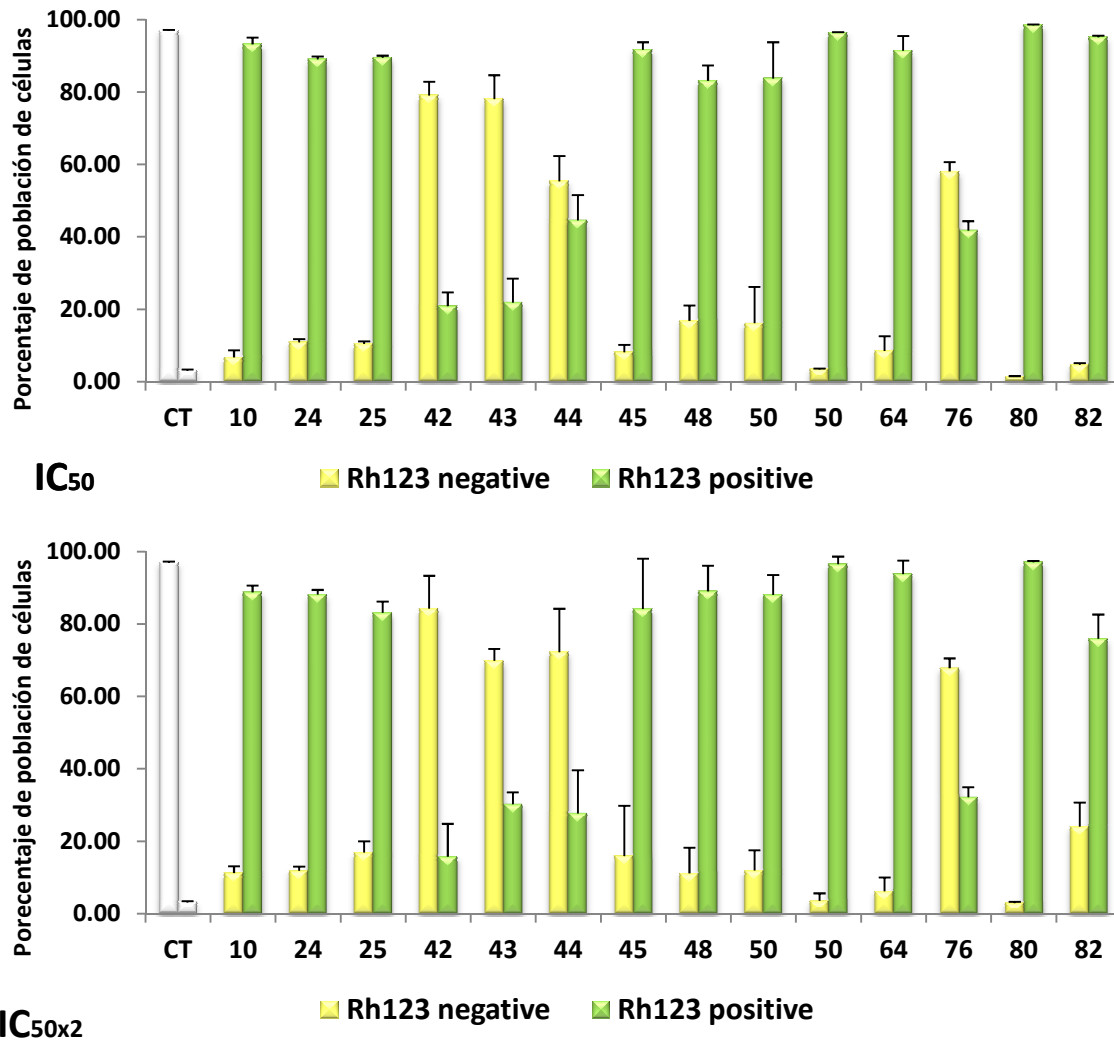
El estudio de la producción de ROS sirve esencialmente para la elucidación de la vía metabólica que siguen los distintos compuestos para inducir la apoptosis, pudiendo ser extrínseca o intrínseca. Varios triterpenos pentacíclicos ya han demostrado activar la vía intrínseca, mediada por alteraciones en la mitocondria²⁰⁸, y a través de la vía extrínseca mediada por un receptor. El estudio de la producción de ROS de los compuestos **AO (1)** y **AM (2)** también ha sido estudiado en otras líneas celulares.²⁰⁹ Las alteraciones de potencial en la membrana mitocondrial pueden ser examinadas por monitorización de la fluorescencia de células tintadas con rodamina 123 (Rh123) y PI. Rh123 es un colorante catiónico fluorescente que es absorbido selectivamente por la mitocondria, de forma directamente proporcional a la MMP (permeabilización de la membrana de la mitocondria). La mayoría de los estudios de mecanismos moleculares de apoptosis nos proponen que cuando el mecanismo de apoptosis se activa por una vía intrínseca se genera una rápida producción de ROS producido por las alteraciones de la mitocondria, aunque esto también puede ocurrir en los pasos finales de la activación extrínseca si transcurren por la activación de las caspasas 8 o 10.

Para elucidar el mecanismo de apoptosis envuelto en la respuesta a la línea celular B16F10 de los distintos acil-derivados del **AO** y **AM** se pasa al estudio de su ROS con las mismas concentraciones en las que mostraban actividad citotóxica y apoptótica, la concentración IC_{50} e $IC_{50} \times 2$. El estudio se realizó con el fin de determinar si la producción de ROS se genera de forma simultánea o no con la apoptosis. Si es así la alteración mitocondrial podría ser provocada por una respuesta intrínseca, pero si no es así la apoptosis transcurre por una vía extrínseca. Los cambios en el MMP se analizaron por citometría de flujo después de la tinción con Rh123 (Fig. 2.36).

A la concentración de IC_{50} se observan una alta intensidad en la fluorescencia de la Rh123 en la mayoría de los compuestos a excepción de los compuestos **42-44** y **76**. De estos resultados se puede interpretar que los compuestos **10, 24, 27, 31, 45, 50, 64, 80** y **82** producen una alteración mitocondrial en la activación de la apoptosis, en cambio los productos **42-44** y **76** no generaron una respuesta ROS en la inducción de la apoptosis. A la concentración de la $IC_{50} \times 2$ los resultados fueron bastante similares y siguieron el mismo patrón que a la concentración de IC_{50} . De estos resultados se puede desprender que los productos **42-44** y **76** transcurren por una ruta apoptótica de activación extrínseca, mientras que los demás productos analizados (**10, 24, 27, 31, 45, 50, 64, 80** y **82**) lo hacen por una activación intrínseca. Aunque estos resultados no son definitivos los productos se encuentran en la actualidad en estudios moleculares para confirmar esta teoría.

²⁰⁸ Matés, J. M.; Segura, J. a; Alonso, F. J.; Márquez, J. Arch. Toxicol. 2012, 86, 1649–65.

²⁰⁹ Wei, J.; Liu, M.; Liu, H.; Wang, H.; Wang, F.; Zhang, Y.; Han, L.; Lin, X. J. Appl. Toxicol. 2013, 33, 756–65.



Las líneas celulares fueron tratadas en concentraciones iguales a su IC₅₀ e IC_{50x2}. Los valores se expresan como media de tres experimentos por duplicado.

Figura 2.36. Análisis por citometría de flujo con rodamina 123 y tinción de PI después de la exposición de las células de melanoma B16F10 con derivados acilados de AO y AM durante 72 h.

II.5.4. Actividad contra Anti-VIH-Proteasa

La actividad de los triterpenos pentacíclicos está suficientemente probada. Los mecanismos por los que estos triterpenos actúan frente al VIH están asociados a evitar la entrada del virus, inhibidor de la transcriptasa inversa, acoplamiento el virus y antimaduración.¹⁷³ Muchos de los triterpenos que muestran una actividad anti-VIH antimaduración están asociados con la presencia de un grupo acilado en C-3 del esqueleto triterpénico⁸⁶, mientras que los inhibidores de entrada del virus están relacionados con la derivatización del C-28 de los triterpenos.

La determinación de la concentración de los productos para los que se observa una inhibición del 50% de la actividad de la proteasa del VIH-1 (IC_{50}) se realizó con la técnica FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Cuando los productos estudiados tienen una IC_{50} en el rango de 0-1200 $\mu\text{g/mL}$ se consideran inhibidores de la proteasa del VIH-1.

Los resultados de este ensayo fueron muy prometedores observándose una gran capacidad de inhibición de la proteasa del VIH-1 por muchos de los derivados estudiados. De los 65 derivados estudiados (**1-4**, **18** y **24-83**) un 38% mostró actividad inhibidora. La primera diferencia que observamos es que en el caso de los derivados **AO** hubo menos productos que mostraban actividad inhibidora en comparación con los derivados del **AM**. Sólo 5 de los derivados del acilados del **AO** (**5**, **32**, **34**, **35** y **42**) presentaban actividad. A excepción del derivado **5** los demás derivados del **AO** con actividad citotóxica mostraban un sustituyente dicarboxílico en C-3. Los valores de IC_{50} para estos derivados se encuentran entre 0.31 y 0.70 μM siendo la IC_{50} 57.7 para su precursor **AO**, o sea los 5 derivados son entre el 82 y 186 veces más potentes.

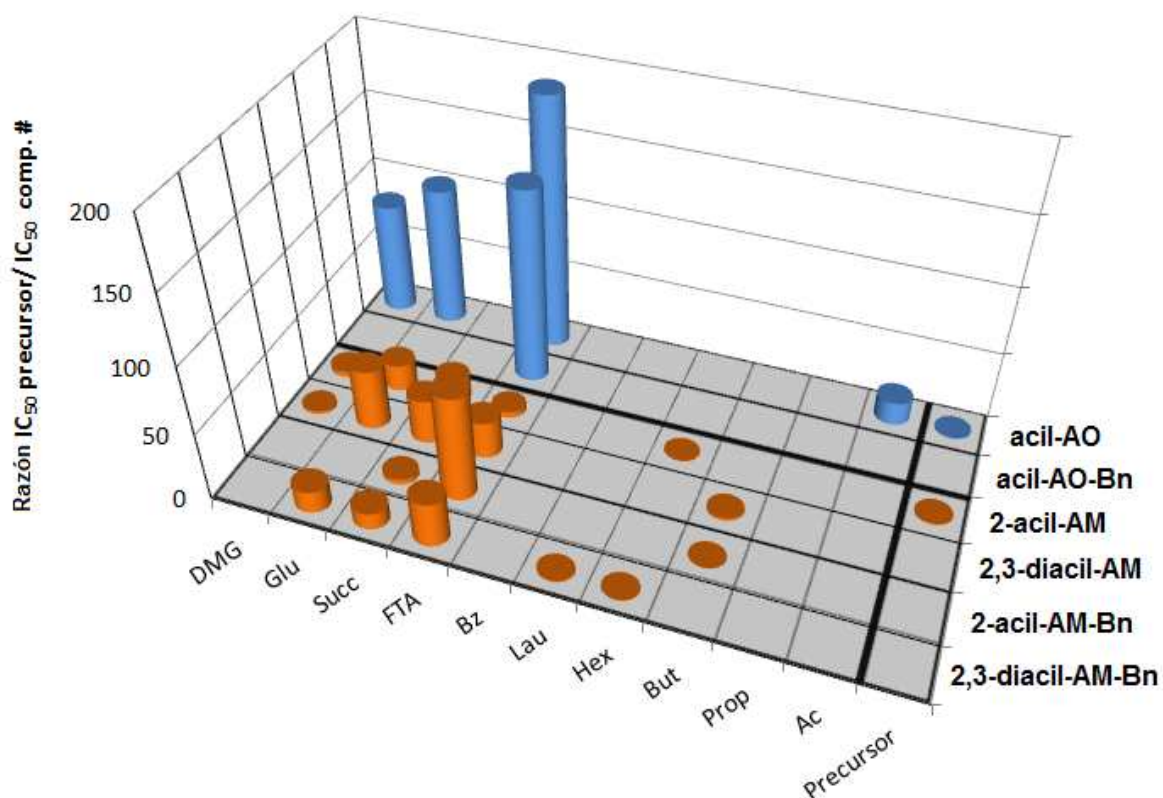
En el caso de los derivados de **AM** podemos observar 18 de ellos (**49**, **50**, **56-63**, **68**, **71**, **73**, **76-79** y **81**) con actividad anti-VIH. De los productos que mostraban actividad anti-VIH sólo 4 daban actividades menores que su precursor **50** (124.4 μM), **68** (226 μM), **71** (150 μM) y **73** (73 μM). El producto **50** posee un grupo hexanoilo en el C-2 y el **71** tanto en el C-2 como en el C-3, el producto **68** se encuentra bencilado en el C-28 y posee un grupo butanoilo en el C-2 y el producto **73** se encuentra diacilado con dos grupos lauroilo en los carbonos C-2 y C-3. Los derivados de **AM** con mayor actividad anti-VIH son los que presentan un grupo dicarboxílico como sustituyente en uno o dos de los hidroxilos del anillo A. Los productos que presentan un grupo ftaloilo (**38**, **39**, **58** y **59**) presentan una IC_{50} entre 0.8 y 14.2 μM , siendo los productos que se encuentran bencilados más activos que los que se encuentran con el carboxilo libre. En el caso de los derivados con el succinilo (**40**, **41**, **60** y **61**) ocurre lo contrario y los que se encuentran con el carboxilo libre presenta más actividad encontrando su IC_{50} 3.5 y 1.9 μM para los productos **40** y **41** y una IC_{50} 15.6 y 5.2 para los respectivos productos bencilados en C-28, **60** y **61**. Para los derivados que incorporan grupo glutarilo **42**, **43** y **63**, se encuentra una IC_{50} de 1.4 a 3.9 μM . Los derivados con 3,3-dimetilglutarilo, solo aquellos con grupo carboxilo libre en C-28, (**44** y **45**) presentan una IC_{50} de 14.3 y 27.5 respectivamente. Podemos señalar que los derivados que presentan actividad anti-VIH son entre 4 y 78 veces más potentes.

Comp. #	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) (% de inhibición de la proteasa del VIH-1) ^a	$\frac{IC_{50_AO}}{IC_{50_comp. \#^b}}$
OA (1)	–	H	H	57.7 ± 3.9	1.0
24	–	Acetilo	H	3.4 ± 0.4	17.0
32	–	Ftaloilo	H	0.31 ± 0.03	186.1
34	–	Glutarilo	H	0.56 ± 0.16	103.0
35	–	3,3-Dimetilglutarilo	H	0.70 ± 0.07	82.4
42	–	Ftaloilo	Bn	0.4 ± 0.1	144.3
					$\frac{IC_{50_AM}}{IC_{50_comp. \#^b}}$
MA (2)	H	H	H	62.7 ± 4.9	1.0
49	Butanoilo	Butanoilo	H	31.2 ± 5.9	2.0
50	Hexanoilo	H	H	124.4 ± 5.8	0.5
56	Ftaloilo	H	H	14.2 ± 2.1	4.4
57	Ftaloilo	Ftaloilo	H	2.3 ± 0.3	27.3
58	Succinilo	H	H	3.5 ± 0.5	17.9
59	Succinilo	Succinilo	H	1.9 ± 0.4	33.0
60	Glutarilo	H	H	3.2 ± 0.3	19.6
61	Glutarilo	Glutarilo	H	1.4 ± 0.3	44.8
62	3,3-Dimetilglutarilo	H	H	14.3 ± 1.8	4.4
63	3,3-Dimetilglutarilo	3,3-Dimethylglutarilo	H	27.5 ± 3.3	2.3
68	Butanoilo	H	Bn	226 ± 24	0.3
71	Hexanoil	Hexanoilo	Bn	150 ± 8	0.4
73	Lauroilo	Lauroilo	Bn	73 ± 4	0.9
76	Ftaloilo	H	Bn	0.8 ± 0.1	78.4
77	Ftaloilo	Ftaloilo	Bn	1.9 ± 0.5	33.0
78	Succinilo	H	Bn	15.6 ± 2.9	4.0
79	Succinilo	Succinilo	Bn	5.2 ± 0.7	12.1
81	Glutarilo	Glutarilo	Bn	3.9 ± 0.3	16.1

^a Los valores de IC₅₀ se calcularon basádonos en la fórmula: $V_{inh} = V_0 \cdot IC_{50}/([I] + IC_{50})$. El porcentaje de inhibición de la proteasa se calculó con la fórmula: % inhibición = $[1 - (V_{inh}/V_0)] \cdot 100$. Todos los ensayos se realizaron tres veces por triplicado.

^b La última columna representa la relación entre la IC₅₀ de cada precursor AO y AM y la IC₅₀ de los derivados relacionados.

Tabla 2.37. Inhibición de la proteasa del VIH-1 de los derivados de **AO** y **AM**



DMG =3,3-dimetilglutarilo, Glu =glutarilo, Succ =succinilo, Phta =ftaloilo, Bz =benzoilo, Laur =lauroilo, Hex =hexanoilo, But =butanoilo, Prop =propanoilo, Ac =acetilo, Precursores =AO (1), AM (2), AO-Bn (3), y AM-Bn (4).

Figura 2.38. Representación tridimensional de los efectos de inhibición frente a la proteasa del VIH-1 de los derivados acilados de **AO** y **AM**. Relación entre los valores de IC_{50} de los derivados y sus precursores **1-4**.

De la Figura 2.38 se puede observar como la mayoría de los derivados acilados apolares tanto de **AO**, **AO-Bn**, **AM** y **AM-Bn** apenas muestran actividad anti-VIH. En cambio los acilos polares en su mayoría presentan mayor actividad anti-VIH que su precursor, pudiendo destacar entre ellos aquellos que presentan un grupo ftaloilo como agente acilante.

II.6. SEMISÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE DERIVADOS BIFUNCIONALES

Como ya se ha demostrado con anterioridad, el esqueleto triterpénico, es un prometedor punto de partida para semisintetizar un elevado número de derivados con distinta funcionalización que sean compuestos interesantes por sus potenciales actividades biológicas. Así, nuestras materias primas naturales, los ácidos oleanólico y maslínico, poseen dos puntos de funcionalización fácilmente accesibles para reacciones sencillas, el carboxilo de C-28 y el/los hidroxilos que se encuentra/n en las posiciones C-2/C-3 del anillo A. Para llevar a cabo la semisíntesis de estos derivados de **AO** y **AM** se utilizará en esta parte, casi exclusivamente, la técnica comentada en la Introducción y en los apartados anteriores de la presente Memoria, conocida como “Síntesis Orgánica en Fase sólida” (SOFS). Esta metodología de trabajo permite obtener de forma más sencilla y menos tediosa un elevado número de compuestos tomando como base un esqueleto carbonado con varios puntos de diversidad. Como ya se ha comentado, la SOFS permite que el esqueleto base sea anclado directa o indirectamente a un soporte sólido y se realicen sobre él las reacciones orgánicas necesarias hasta llegar al derivado deseado el cual es separado finalmente del soporte por un tratamiento químico adecuado. En nuestro caso usaremos aquí, de nuevo como soporte sólido, la resina de cloro-2-clorotritilo (resina Cl-Trt-Cl o resina Barlos, CCT-resina) ya utilizada en la obtención de compuestos acilados de **AO** y **AM** en los trabajos anteriores expuestos en esta Memoria. Nuestro Grupo de Investigación ya empleó con éxito esta resina para la formación de derivados de **AO** y **AM** con un largo polipéptido obteniendo derivados de Kahalide⁷². En un trabajo posterior⁵⁰ se empleó de nuevo la CCT-resina para obtener derivados monofuncionales de **AO** y **AM** uniendo al carboxilo de C-28 varios aminoácidos de cadena corta (α -aminoácidos) y cadena larga (ω -aminoácidos). Como ya se ha comentado, en los apartados anteriores se ha empleado también esta resina para obtener derivados monofuncionalizados de **AO** y **AM** por acilación en el/los hidroxilos del anillo A. Con estos precedentes, la intención de este último apartado de la presente Memoria es semisintetizar por SOFS una librería de derivados bifuncionalizados en los hidroxilos del anillo A (donde se unirán 10 acilos diferentes) y en el carboxilo de C-28 (donde se anclarán 6 aminoácidos distintos). La técnica combinatoria desarrollada con los 10 acilos y los 6 aminoácidos conducirá a la obtención de un total de 264 productos que serán sometidos posteriormente a estudios de citotoxicidad en varias líneas celulares con el fin de realizar un análisis detallado de la relación estructura/actividad.

II.6.1. Aminoácidos y acilos utilizados en la obtención de derivados

Para la obtención de los distintos derivados, se escogieron 6 aminoácidos que han sido utilizados previamente en otros estudios con triterpenos similares y que han demostrado su eficacia al potenciar la actividad biológica de los mismos. Se escogieron tres α -aminoácidos y tres ω -aminoácidos de distinta cadena. De entre los α -aminoácidos se eligieron dos aminoácidos no esenciales glicina y alanina (GLY y ALA) y otro esencial valina (VAL). Se eligió glicina por ser el aminoácido más pequeño, alanina por presentar quiralidad (concretamente se utiliza S-Glicina) y por ser uno de los aminoácidos más abundantes en biosíntesis y valina (concretamente S-Valina) por ser el aminoácido esencial de menor tamaño, además de estar todos ellos bien estudiados y haber demostrado su efectividad como potenciadores de la actividad biológica de algunos triterpenos. Los ω -aminoácidos usados varían principalmente en el tamaño de su cadena y se escogieron por los precedentes bibliográficos conocidos para estudiar cómo influye la estructura del aminoácido en la actividad del derivado. Así se eligieron los ω -aminoácidos que presentaban el tamaño de cadena de cuatro carbonos, ácido γ -aminobutírico o ácido 4-aminobutanoico (GABA), de seis carbonos, ácido 6-aminohexanoico (6AHA) y de once carbonos, ácido 11-aminoundecanoico (11AUA) (Fig. 2.39).

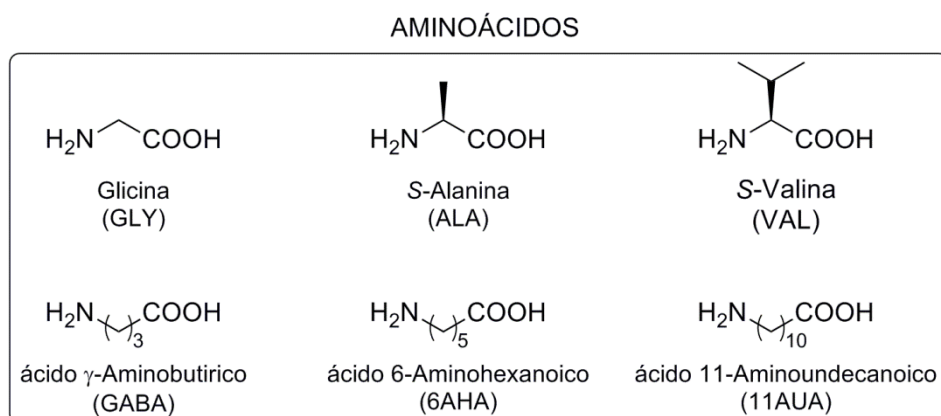
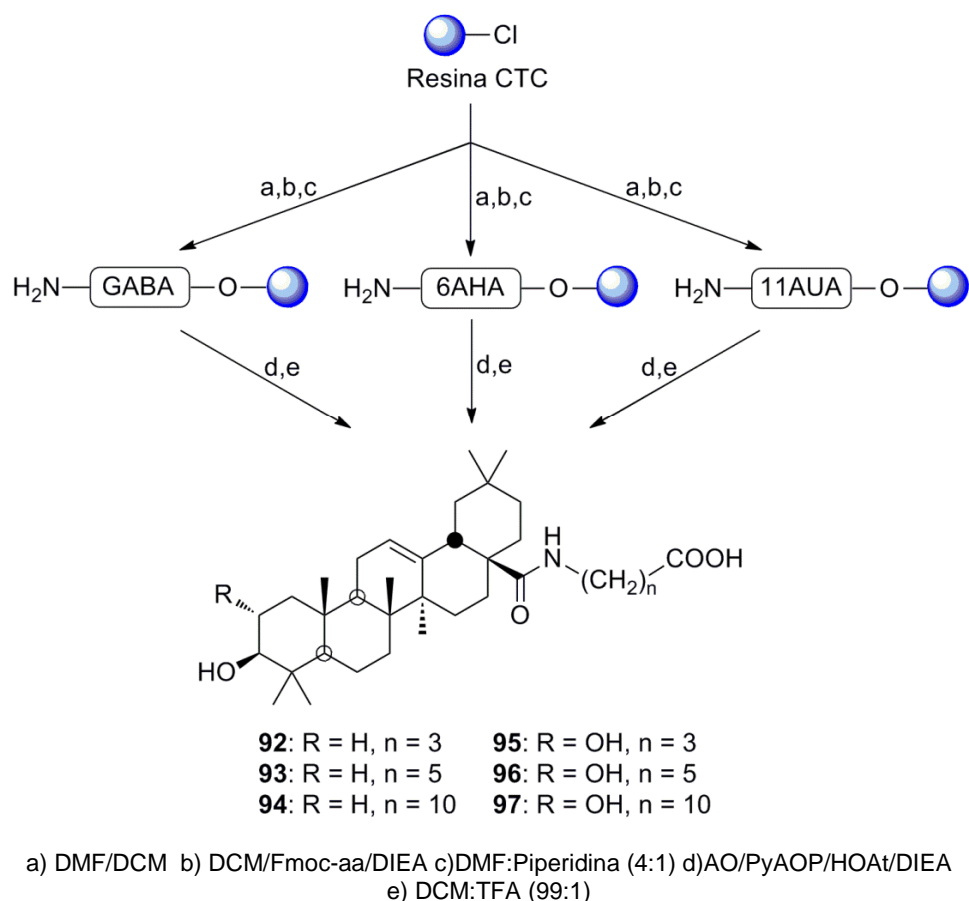


Figura 2.39. Aminoácidos usados en la semisíntesis de derivados bifuncionales de **AO** y **AM**

Para la funcionalización en el/los hidroxilos del anillo A mediante acilación, se escogieron los mismos agentes acilantes que los empleados en capítulos anteriores (Ver Fig. 2.17.), a saber, los anhídridos acético, propanoico, butanoico, hexanoico, láurico, benzoico, ftálico, succínico, glutárico y 3,3-dimetilglutárico. Por tanto, se eligió una muestra representativa de acilos lineales, aromáticos y cíclicos con el fin de obtener derivados con diferentes propiedades físico-químicas que puedan influir en sus propiedades biológicas. De esta manera, una vez escogidos el esqueleto base y todos los diferentes bloques sintéticos, con la filosofía de la Química Combinatoria y la técnica de la Síntesis Orgánica en Fase Sólida, se obtuvieron 264 derivados: 6 monopéptidos de **AO** y **AM** (92-97), 18 dipéptidos de **AO** y **AM** (98-115) y 240 mono y dipéptidos de **AO** y **AM** acilados (92-115 a-j).

II.6.2. Semisíntesis de 28-monopeptidil derivados de AO y AM

El primer paso del proceso consiste en la obtención de los 28-monopeptidil derivados en C-28 de **AO (92-94)** y de **AM (95-97)** que nos puedan servir de patrones para diversificar posteriormente, mediante acilación de los hidroxilos del anillo A, formando así una librería de compuestos bifuncionales. Se comienza el proceso sintético preparando seis jeringas de 2 mL con 100 mg de resina CTC cada una. Tras los tratamientos previos de lavado de la resina con DMF y DCM se procede a la adecuación (hinchado) de la misma con DCM durante 30 min. Una vez preparada la resina, se elimina el disolvente por filtración a vacío y se añaden los tres ω -Fmoc-aminoácidos antes seleccionados: GABA a las jeringas 1 y 2, 6AHA a las jeringas 3 y 4, 11AUA a las jeringas 5 y 6. Estos Fmoc-aminoácidos se acoplan a la resina a través de su grupo carboxilo en DCM como disolvente y DIEA como agente acoplante (Esq. 3.40.). Tras 90 min de agitación orbital, la resina es tratada con MeOH con el fin de captar todos los centros activos de la resina que no hayan sido ocupados por el correspondiente aminoácido. El siguiente paso en el proceso, es la desprotección del grupo Fmoc, que se lleva a cabo por tratamiento con piperidina:DMF (1:4), repitiéndose 3 veces y acabando con varios lavados con DMF y DCM con el fin de evitar cualquier rastro de piperidina. Una vez que se tiene la resina limpia y con el aminoácido con el grupo amino desprotegido, se procede al acoplamiento del triterpeno a la misma mediante la formación de un enlace peptídico entre el grupo amino libre del aminoácido y el grupo carboxilo del triterpeno. Así, se agrega **AO** a las jeringas 1, 3 y 5, y **AM** a las jeringas 2, 4 y 6 usando además, PyAOP, HOAt y DIEA como agentes acoplantes y la mezcla DMF/DCM como disolvente. Se mantiene la reacción en agitación orbital durante 24 h y, a continuación se lleva cabo un seguimiento del proceso mediante la realización del test de la ninhidrina (test de Kaiser). Este test permite, mediante el empleo de los reactivos adecuados, determinar la presencia o no de grupos amino libres, de forma que si un resultado es negativo, se da la reacción por terminada, pudiendo por tanto proseguir el proceso. Por el contrario, un test de Kaiser positivo indica que quedan grupos amino libres y que, por tanto, no se ha formado por completo el enlace peptídico requerido, y habría que dejar la reacción más tiempo o bien hacer un reacoplamiento con los ácidos triterpénicos. En este caso el test a las 24 horas de reacción, fue negativo y, por ello, los distintos derivados obtenidos fueron clivados del soporte sólido por tratamiento con TFA:DCM (1:99). Una vez evaporado el disolvente se obtienen los productos **92-97** que son liofilizados, pesados y analizados por HPLC, determinando sus tiempos de reacción, rendimientos y sus purezas, que resultan ser siempre superiores al 90% (Esq. 2.40).



Esquema 2.40. Obtención de 28-monopeptidil derivados de **AO** y **AM**

Las estructuras de los compuestos **92-97** son fácilmente corroboradas por sus espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN, ya que la única transformación que ha tenido lugar se encuentra en el carboxilo de C-28, donde se han unido los diferentes ω-aminoácidos. Así en el espectro de ¹H RMN podemos encontrar en todos los casos la señal del enlace amida formado entre el carboxilo de C-28 del triterpeno y el grupo amino del correspondiente aminoácido. Esas señales aparecen en todos los casos como doble doblete a δ_H 6.10-6.20 para los compuestos **92-94** y a δ_H 7.20-7.30 para los compuestos **95-97**, observándose un mayor desapantallamiento debido probablemente a la necesidad de usar DMSO-d₆ como disolvente para realizar los espectros de RMN de los monopeptidil derivados de **AM**. Las demás señales que se observan en el espectro, tanto las pertenecientes al anillo A como aquellas que se deben al doble enlace son similares en todos los productos respecto a sus precursores. En el espectro de ¹³C RMN se observa como la señal de C-28 se apantalla ligeramente debido a la formación del enlace peptídico quedando su δ_C 179.9-178.7 para **92-94** y δ_C 176.2-176.0 (DMSO-d₆) para los compuestos **95-97**, además siempre aparece otra señal ligeramente más apantallada y que se encuentra en torno a δ_C 178.9-174.2 que corresponde a cada uno de los carboxilos libres de los aminoácidos. Las demás señales pertenecientes a los aminoácidos se encuentran en sus desplazamientos químicos típicos, así los metilenos típicos de los distintos aminoácidos aparecen desde δ_C 34.2-24.0 hasta δ_C 39.9-38.2 para el más cercano al grupo carboxilo.

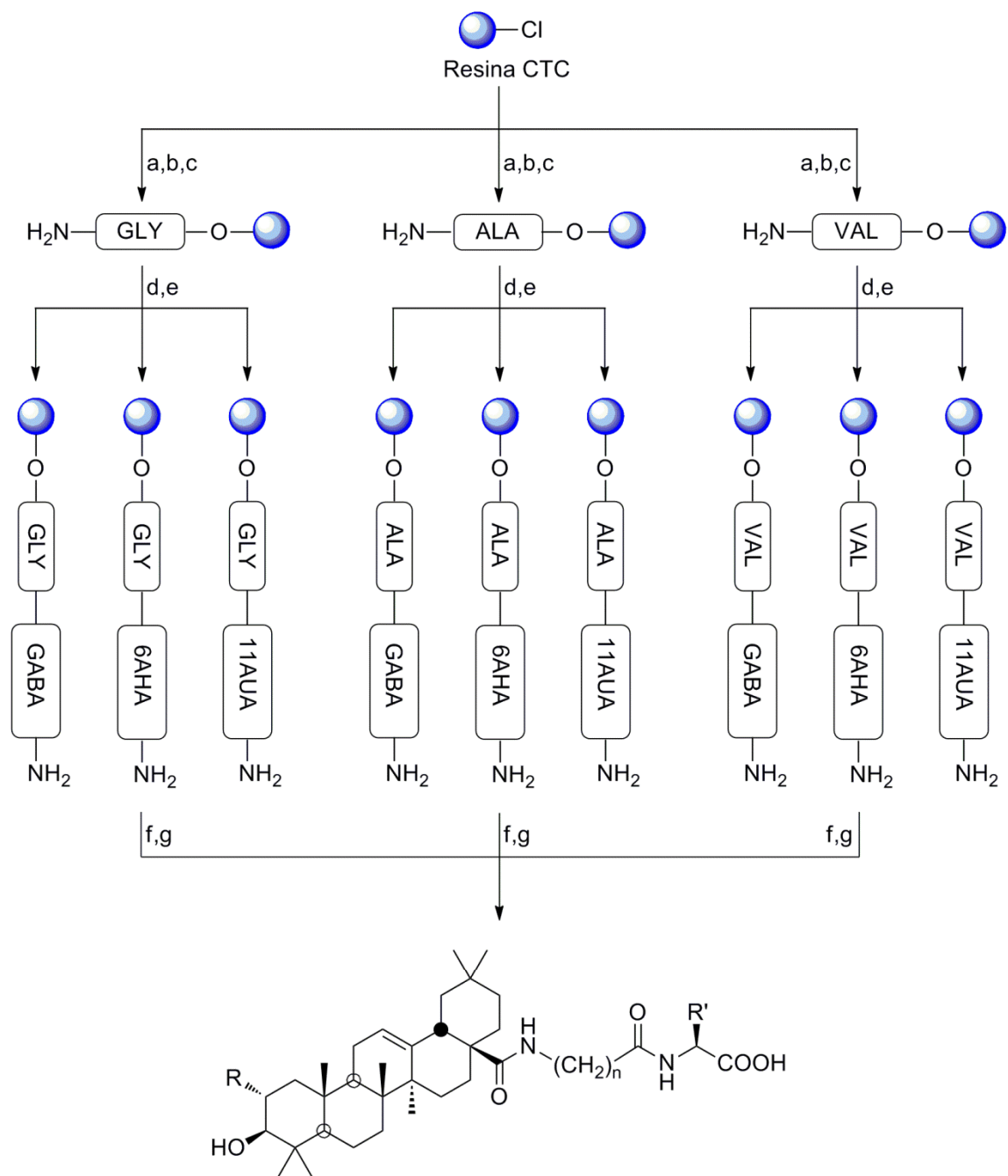
II.6.3. Semisíntesis de 28-dipeptidil derivados de AO y AM

Una vez obtenido los 28-monopeptidil derivados de **AO** y **AM**, se procede a través de un proceso similar, a la semisíntesis de los distintos 28-dipeptidil derivados (compuestos **98-115**) (Esq. 2.41.). En este caso el procedimiento varía puesto que ahora en C-28 se acopla primero un aminoácido de cadena larga (ω -aminoácido) y después otro de cadena corta (α -aminoácido), formando los derivados dipeptídicos de **AO** (**98-106**) y **AM** (**107-115**). La síntesis comienza colocando tres porciones de resina CCT en jeringas que serán marcadas como A, B y C. Tras los tratamientos previos de adecuación de la resina indicados en el caso anterior, se añade a cada jeringa un α -aminoácido, en este caso los que hemos seleccionado anteriormente Fmoc-Gly-OH (jeringa A), Fmoc-Ala-OH (jeringa B) y Fmoc-Val-OH (jeringa C). Las jeringas se ponen en agitación orbital durante 90 min a temperatura ambiente y, como antes, se procede al capado y lavado de la resina y a la desprotección del grupo Fmoc. Seguidamente la resina se seca totalmente y se subdivide en tres porciones exactamente iguales. Las nueve fracciones de monopeptidil-CCT-resina así obtenidas, son tratadas ahora con los ω -aminoácidos correspondientes de la siguiente manera: A-1, B-1 y C-1 con Fmoc-GABA-OH; A-2, B-2 y C-2 con Fmoc-6AHA-OH; y A-3, B-3 y C-3 con Fmoc-11AUA-OH. Para completar esta reacción de formación de enlace peptídico entre los dos aminoácidos, se usaron como agentes acoplantes HOAt y DIPCDI y DMF como disolvente. Tras dejar la reacción 90 min en agitación orbital a temperatura ambiente, se realiza el test de Kaiser, obteniendo un resultado negativo y pudiendo pasar, por tanto, al lavado y la desprotección del grupo Fmoc. El proceso prosigue ahora subdividiendo cada una de las jeringas en dos porciones exactamente iguales, añadiendo **AO** a una de ellas y **AM** a la otra, empleando además, para ello una disolución de DMF que contiene PyAOP, HOAt y DIEA como agentes acoplantes. Después de dejar la reacción 24 h en agitación magnética se realiza el test de ninhidrina, obteniendo sendos negativos para todas las jeringas y se obtienen los compuestos **98-115** son soltados del soporte sólido por tratamiento con DCM:TFA (99:1). Los derivados obtenidos son liofilizados, pesados y analizados por HPLC, anotando los correspondientes tiempos de retención, rendimientos y pureza de cada uno de ellos, la cual en todos los casos es superior al 90% (Esq. 2.41.).

Las estructuras de los diferentes dipeptidil-derivados de **AO** (**98-106**) y **AM** (**107-115**) fueron determinados a partir de sus espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN. Los espectros de los derivados de **AO** se realizaron en Cl_3CD mientras que los derivados de **AM** se llevaron a cabo en DMSO-d_6 debido a su mayor polaridad. En todos los compuestos se observa la aparición de dos tipos de protones de los grupo NH pertenecientes a los dos enlaces peptídicos existentes, uno entre el grupo carboxilo de C-28 y el grupo amino de cada uno de los ω -aminoácidos (GABA, 6AHA y 11AUA) y otro correspondiente al enlace peptídico entre este aminoácido y los distintos α -aminoácidos (GLY, ALA y VAL). La señal de NH más desapantallada pertenece a los α -aminoácidos, apareciendo con una multiplicidad de doble doblete a δ_{H} 7.50-6.30 para los derivados de **AO** (**98-106**) y δ_{H} 8.00 para los derivados de **AM** (**107-115**). La segunda señal se encuentra para todos los casos como un doble doblete debido a que el grupo NH de los ω -aminoácidos siempre tiene dos protones en el carbono adyacente apareciendo en el rango de δ_{H} 6.50-6.10 para los derivados de **AO** y alrededor de

δ_H 7.20 para los derivados de **AM**. Por otra parte, la señal de H-12 se sitúa a δ_H 5.40 para todos los derivados sintetizados, la señal de H-3 en torno a δ_H 3.20 para los derivados de **AO** y H-2 y H-3 en torno a δ_H 3.40 y 2.70 para los distintos derivados de **AM**. En el espectro de ^{13}C RMN se observan hasta 3 grupos carbonilos en cada uno de los compuestos, pertenecientes uno al C-28 del triterpeno, otro al enlace peptídico entre el ω - y α -aminoácidos y el último al grupo carboxilo que queda libre del α -aminoácidos. El carbonilo más desapantallado es aquel que corresponde al enlace peptídico entre el carboxilo de C-28 del triterpeno y el grupo amino del ω -aminoácido situándose alrededor de δ_C 180 para los derivados de **AO (98-106)** y alrededor de δ_C 176 para los derivados de **AM (107-115)**. La siguiente señal que aparece en el espectro corresponde al carbonilo de la unión entre el ω -aminoácido y el α -aminoácido, situándose esta señal alrededor de δ_C 175 para los derivados de **AO** y a δ_C 174-172 para los derivados de **AM**.

Las señales del triterpeno se ven ligeramente afectadas por el acoplamiento de los aminoácidos al C-28, sobre todo las señales que corresponden al doble enlace entre C-12/C-13 y las correspondientes a los hidroxilos del anillo A. En este sentido, podemos observar que, en el ^1H RMN, las señales del protón de H-3 se encuentran en torno a δ_H 3.22 para los derivados de **AO (98-106)** y a δ_H 3.41 para H-2 y δ_H 2.73 para H-3 en el caso de los derivados de **AM (107-115)**. En el caso del espectro de ^{13}C RMN podemos encontrar los carbonos del doble enlace C-12/C-13 en torno a δ_C 123.6-123.2 para C-12 y δ_C 144.9 para el C-13 para los derivados correspondientes a **AO** y en torno al δ_C 121.2 para C-12 y δ_C 144.2 para los derivados de **AM**. Los carbonos C-3 se sitúan en torno a δ_C 79.4 y 82.2 respectivamente para **AO** y **AM** y C-2 a δ_C 67.1 para el caso de los derivados de **AM**.



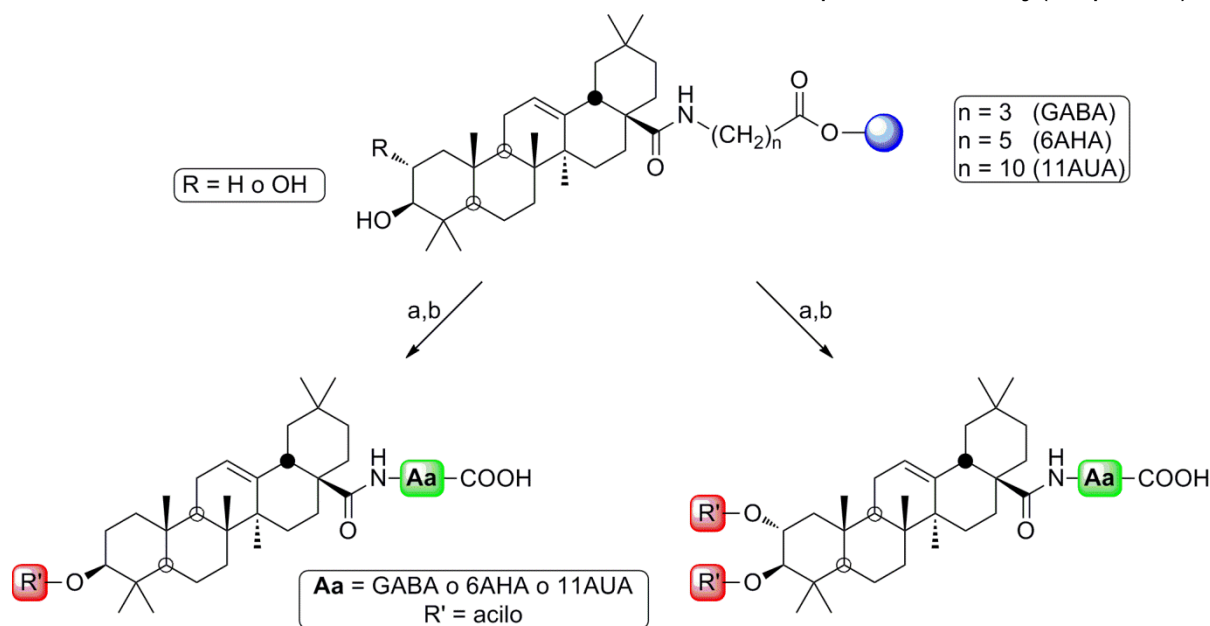
- | | |
|--|---|
| 98: R = H, R' = H, n = 3 | 107: R = OH, R' = H, n = 3 |
| 99: R = H, R' = H, n = 5 | 108: R = OH, R' = H, n = 5 |
| 100: R = H, R' = H, n = 10 | 109: R = OH, R' = H, n = 10 |
| 101: R = H, R' = CH ₃ , n = 3 | 110: R = OH, R' = CH ₃ , n = 3 |
| 102: R = H, R' = CH ₃ , n = 5 | 111: R = OH, R' = CH ₃ , n = 5 |
| 103: R = H, R' = CH ₃ , n = 10 | 112: R = OH, R' = CH ₃ , n = 10 |
| 104: R = H, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 3 | 113: R = OH, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 3 |
| 105: R = H, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 5 | 114: R = OH, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 5 |
| 106: R = H, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 10 | 115: R = OH, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 10 |

a) DMF/DCM b) DCM/Fmoc-aa-1/DIEA c) DMF:Piperidina (4:1) d) Fmoc-aa-2/HOAt/DIPCDI e) DMF:Piperidina (4:1) f) AO/PyAOP/HOAt/DIEA g) DCM:TFA (99:1)

Esquema 2.41. Obtención de 28-dipeptidil derivados de **AO** y **AM**

II.6.4. Semisíntesis de 3-acil-28-monopeptidil derivados de AO y 2,3-diacil-28-monopeptidil derivados de AM

Una vez sintetizados e identificados los diferentes patrones que incorporan un solo aminoácido en C-28 del triterpeno (compuestos **92-97**), y con el fin de incrementar la diversidad en el proceso y obtener una más amplia librería de derivados, se procede a su acilación también en fase sólida en el/los hidroxilo/s del anillo A del esqueleto triterpénico. Así, el tratamiento de estos mono-peptidil derivados de **AO** y **AM** con los 10 acilos anteriormente seleccionados en presencia de Et₃N, DMAP y DMF/DCM como disolvente, conduce a la colección de 60 derivados bifuncionalizados, compuestos **92a-97j** (Esq. 2.42.).



	Acil mono-peptidil derivados de AO			Acil mono-peptidil derivados de AM		
	GABA	6AHA	11AUA	GABA	6AHA	11AUA
Ac	92a	93a	94a	95a	96a	97a
Prop	92b	93b	94b	95b	96b	97b
But	92c	93c	94c	95c	96c	97c
Hex	92d	93d	94d	95d	96d	97d
Laur	92e	93e	94e	95e	96e	97e
Bz	92f	93f	94f	95f	96f	97f
Fta	92g	93g	94g	95g	96g	97g
Succ	92h	93h	94h	95h	96h	97h
Glu	92i	93i	94i	95i	96i	97i
DMG	92j	93j	94j	95j	96j	97j

a) Anhídrido/Et₃N/DMAP/DMF b) DCM:TFA (99:1)

Esquema 2.42. Obtención de 3-acil-28-mono-peptidil derivados de AO y 2,3-diacil-28-mono-peptidil derivados de AM

De acuerdo con la técnica de SOFS antes expuesta, se obtienen de nuevo 6 mono-peptidil compuestos, los derivados de **AO** (**92-94**) y de **AM** (**95-97**) y antes de ser clivados de la resina, se procede a la acilación de los mismos empleando para ello los 10

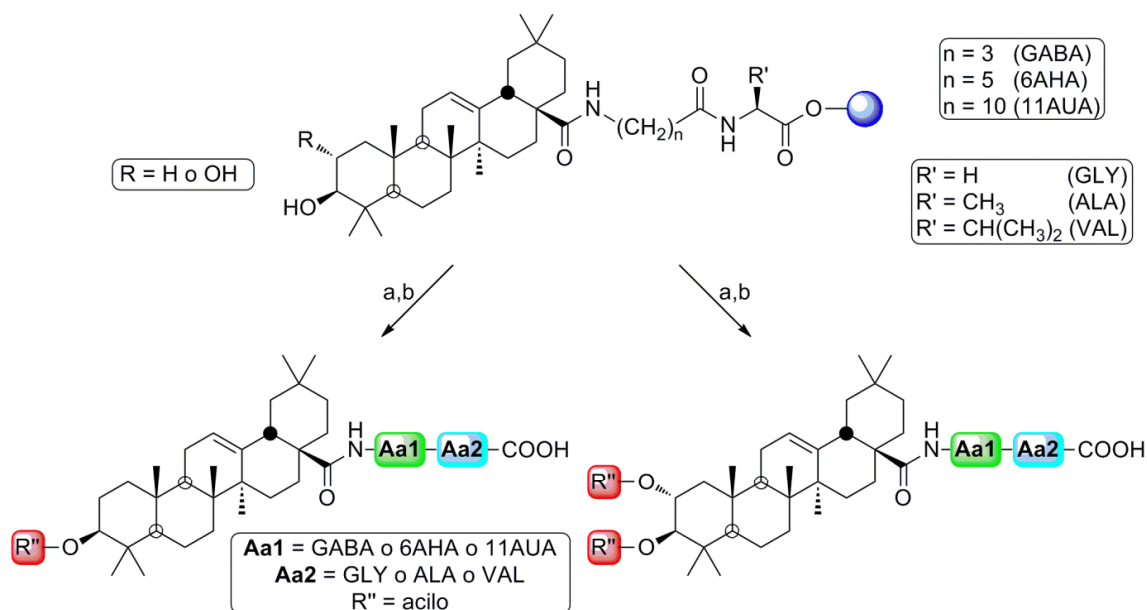
acilos mencionados. Estos acilos son añadidos en forma de anhídridos de ácido en presencia de Et_3N y DMAP como catalizadores en DMF y son colocados en agitación orbital durante 48 h a 40-45°C. Tras este proceso, realizado sobre los mono-peptidil derivados de **AO**, se separan del soporte sólido por tratamiento con TFA:DCM, son liofilizados y estudiados por HPLC y HRMS, obteniéndose una colección de compuestos bifuncionales **(92-94)a** hasta **(92-94)j** (Esq. 3.42.), identificados como 30 nuevos 3-acil-28-mono-peptidil derivados de **AO**. El análisis de HPLC y HRMS de estos compuestos nos proporcionó sus tiempos de retención, sus masas moleculares y sus purezas encontrándose que, en la mayoría de los casos estas últimas son superiores al 90%. De forma similar, cuando los derivados **95-97**, obtenidos a partir de **AM**, se acilan en fase sólida se obtienen 30 derivados semisintéticos bifuncionales (2,3-diacil-28-mono-peptidil derivados de **AM**), los compuestos **(95-97)a** a **(95-97)j** (Esq. 2.42.). Dado que en este caso, surge la posibilidad de que puedan aparecer los monoacil-derivados debido a la presencia de los dos grupos hidroxilos en el anillo A de **AM**, se opta por realizar siempre el proceso de acilación en fase sólida a una temperatura ligeramente superior (40-45°C) en lugar de a temperatura ambiente. De esta forma se asegura el mayor rendimiento de derivado doblemente acilado, aunque como se verá posteriormente en un ejemplo de cuantificación, también se obtienen cantidades bajas de los derivados monoacilados. De nuevo estos productos se analizaron mediante técnicas de HPLC y HRMS, obteniendo purezas bastante altas (alrededor de 90-100%), exceptuando los derivados sintetizados con los anhídridos cíclicos **VII-X** (ftálico, succínico, glutárico y 3,3-dimetilglutárico), para los cuales el rendimiento se encuentra en el rango de 75-100%. De este análisis se obtuvieron también los tiempos de retención característicos de cada derivado y sus masas moleculares que se aportan en la Sección Experimental de esta Memoria.

II.6.5. Semisíntesis de 3-acil-28-dipeptidil derivados de AO y 2,3-diacil-28-dipeptidil derivados de AM

De la misma manera que en los casos anteriores, los dipeptidil derivados de **AO** y **AM** antes obtenidos (**92-115**), fueron acilados en fase sólida antes de ser clivados de la resina por tratamiento con los diez anhídridos de ácido ya mencionados disueltos en DMF, en presencia de Et₃N y DMAP y en agitación orbital durante 24 h a temperatura de 40-45°C.

Tras el proceso de acilación de los dipeptidil derivados de **AO** (**98-106**), se obtuvieron un total de 90 nuevos 2-acil-28-dipeptidil derivados de **AO**, los productos de (**98-106**)a a (**98-106**)j (Esq. 2.43.). Estos productos fueron identificados por analizando sus masas moleculares por HRMS y, además, se realizaron estudios por HPLC para determinar sus tiempos de retención y sus purezas, encontrándose éstas entre 90-100%. Tras el mismo proceso para el caso de los derivados de **AM** (**107-115**) se obtienen otros 90 productos nuevos, los 2,3-diacil-28-dipeptidil derivados (**107-115**)a a (**107-115**)j (Esq. 2.43.).

De los estudios de HPLC y HRMS se obtienen las purezas de estos productos y se comprueba que los productos de de (**107-115**)a a (**107-115**)f presentan purezas muy altas, en cambio los productos (**107-115**)g a (**107-115**)j tuvieron que mantenerse en condiciones de reacción distintas para obtener grados de pureza elevados, de esta forma estas reacciones se mantuvieron a mayor tiempo en agitación orbital y a una mayor temperatura obteniendo tras el proceso de clivado grados de pureza entre 75-100%.



Acil dipeptidil derivado de AO									
	GABA GLY	6AHA GLY	11AUA GLY	GABA ALA	6AHA ALA	11AUA ALA	GABA VAL	6AHA VAL	11AUA VAL
Ac	98a	99a	100a	101a	102a	103a	104a	105a	106a
Prop	98b	99b	100b	101b	102b	103b	104b	105b	106b
But	98c	99c	100c	101c	102c	103c	104c	105c	106c
Hex	98d	99d	100d	101d	102d	103d	104d	105d	106d
Laur	98e	99e	100e	101e	102e	103e	104e	105e	106e
Bz	98f	99f	100f	101f	102f	103f	104f	105f	106f
Fta	98g	99g	100g	101g	102g	103g	104g	105g	106g
Succ	98h	99h	100h	101h	102h	103h	104h	105h	106h
Glu	98i	99i	100i	101i	102i	103i	104i	105i	106i
DMG	98j	99j	100j	101j	102j	103j	104j	105j	106j

Acil dipeptidil derivados de AM									
	107a	108a	109a	110a	111a	112a	113a	114a	115a
Ac	107a	108a	109a	110a	111a	112a	113a	114a	115a
Prop	107b	108b	109b	110b	111b	112b	113b	114b	115b
But	107c	108c	109c	110c	111c	112c	113c	114c	115c
Hex	107d	108d	109d	110d	111d	112d	113d	114d	115d
Laur	107e	108e	109e	110e	111e	112e	113e	114e	115e
Bz	107f	108f	109f	110f	111f	112f	113f	114f	115f
Fta	107g	108g	109g	110g	111g	112g	113g	114g	115g
Succ	107h	108h	109h	110h	111h	112h	113h	114h	115h
Glu	107i	108i	109i	110i	111i	112i	113i	114i	115i
DMG	107j	108j	109j	110j	111j	112j	113j	114j	115j

a) Anhídrido/Et₃N/DMAP/DMF b) DCM:TFA (99:1)

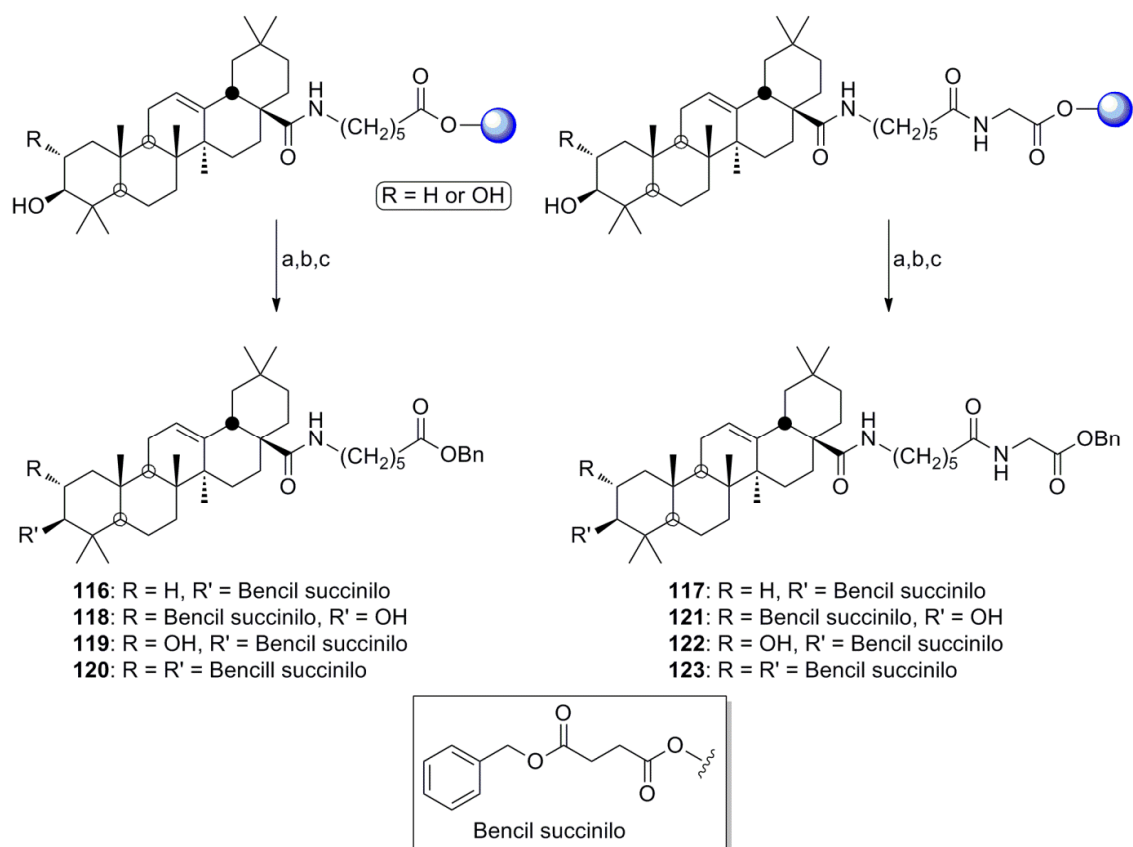
Esquema 2.43. Obtención de 3-acil-28-dipeptidil derivados de AO y 2,3-diacil-28-dipeptidil derivados de AM

II.6.6. Cuantificación de los procesos de aminoacilación y acilación en fase sólida de **AO** y **AM**.

Tras la obtención de los distintos derivados acilados de los mono-peptidil- y dipeptidil-derivados de **AO** y **AM** se observa que los derivados sintetizados con un acilo polar, como son los acilos ftaloil, succinil, glutaril y 3,3-dimetilglutaril, se obtienen con mayores dificultades de reacción, son más difíciles de manejar y, además, son obtenidos con purezas más bajas. Además de las dificultades que se presentaban en su síntesis, la identificación de los mismos resulta bastante complicada a través de los métodos espectroscópicos usuales, debido a la presencia de varios grupos carboxilos en la molécula. Dada esta problemática para estos derivados polares, se realiza a continuación, un estudio más detallado de la acilación en fase sólida de distintos derivados mono- y dipeptídicos de **AO** y **AM** con anhídrido succínico, como ejemplo, con el fin de elucidar las proporciones exactas de los compuestos obtenidos en estas reacciones (Esq. 2.44.). El proceso seguido consiste en la protección, mediante bencilación, de los distintos carboxilos que queden libres en la molécula una vez haya sido liberada de la resina, con el fin de obtener productos menos polares y por tanto más manejables para su estudio.

De acuerdo con la metodología de fase sólida anteriormente comentada, se procede a la obtención de un monopeptido y un dipéptido acilado con un grupo succinilo. En ambos casos se escogieron como monopeptidos los obtenidos a través de la unión con 6AHA y, como dipéptidos, los derivados que presentan GLY y 6AHA en el carboxilo de C-28. Además, esta secuencia de reacciones de aminoacilación en C-28, posterior succinilación en los hidroxilos en fase sólida y una final bencilación en fase disolución, se lleva a cabo tanto para **AO** como para **AM**.

Así pues, para el caso de **AO** se procedió a la formación de los derivados según la metodología de síntesis orgánica en fase sólida, acoplado como primer paso Fmoc-6AHA-OH a la resina. Tras la desprotección y lavados de este aminoácido se acopló **AO** a la misma, según el procedimiento indicado. Tras comprobar, a través del test de la ninhidrina, el total acoplamiento de **AO**, se aciló el hidroxilo del anillo A con anhídrido succínico manteniendo la reacción durante 48 h en agitación orbital y a una temperatura de 40-45°C. Después de este proceso se cliva la resina obteniendo el producto, antes sintetizado, **93h** y tras retirar el disolvente que queda en exceso, se procede a la bencilación, en las condiciones anteriormente descritas de este producto formando así el producto **116** (6-aminohexanoato de N-(3β-bencilsuccinilolean-12-en-28-oilo)) con un rendimiento del 95%. De una forma similar se procedió a la formación del dipéptido a través de la unión en primera instancia de Fmoc-GLY-OH para, posteriormente desproteger, lavar y unir el segundo aminoácido Fmoc-6AHA-OH con el procedimiento descrito anteriormente. Una vez obtenido el dipéptido se desprotege, se agrega **AO** y se acila con anhídrido succínico. Este producto es clivado de la resina e identificado como el ya conocido compuesto **99h**, que es ahora bencilado, para obtener el producto **117** (glicinato de N'-[N-(3β-bencilsuccinilolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoilo] con un rendimiento del 98%.



a) Anhídrido succínico/Et₃N/DMAP/DMF b) DCM:TFA (99:1) c) BnCl/DCM

Esquema 2.44. Cuantificación de la succinilación en fase sólida y posterior bencilación en fase líquida de mono y dipeptidil derivados de **AO** y **AM**

Similarmente, se procede a la formación de los bencil-mono-peptidil y dipeptidil succinilados de **AM**. Así, el anclaje del aminoácido Fmoc-6AHA-OH a la resina, su posterior desprotección y reacción con **AM**, la acilación con anhídrido succínico y el clivado conduce a una mezcla de reacción en la que se encuentra el producto **96h**, que ya había sido obtenido con anterioridad. Esta mezcla de reacción es tratada con BnCl en disolución y de esta reacción, tras purificación, se aíslan tres derivados bencilados nuevos (**118** un 4%, **119** un 2% y **120** un 80%) (Esq. 2.44.). Los dos derivados bencilados minoritarios obtenidos **118** y **119** se identifican como los mono-succinil-bencilados de **AM** en las posiciones C-2 y C-3, respectivamente, que poseen en su molécula dos grupos bencilo, mientras que el compuesto mayoritario **120**, corresponde con el derivado doblemente succinilado y que incorpora, por tanto, tres grupos bencilo.

Para concluir este estudio se procede a la síntesis del dipéptido de **AM** con GLY y 6AHA, el cual es posteriormente succinilado y, tras ser soltado de la resina es bencilado en todos los grupos carboxilos que presenta. Antes de la bencilación se detecta en la mezcla de reacción obtenida del proceso de SOFS, como producto mayoritario, el derivado ya conocido **108h**. Tras el clivado de la resina y la bencilación en fase disolución se obtiene una mezcla de reacción, se aíslan tres productos nuevos (**121** (5%), **122** (2%) y **123** (85%)). Después del estudio espectroscópico de estos derivados se comprueba que el producto **121**

corresponde al bencil-succinil-monoderivado en posición de C-2, el producto **122** corresponde al otro derivado en C-3 y el producto **123** corresponde al dibencil-disuccinil-derivado tanto en C-2 como en C-3.

Estas afirmaciones vienen corroboradas por los desplazamientos químicos que se observan tanto en el espectro de ^1H RMN como en el de ^{13}C RMN. Los compuestos **116** y **117** pertenecientes a **AO** tienen un grupo bencilsuccinilo en C-3 y un bencilo sobre el aminoácido que hay en C-28, diferenciándose únicamente en el/los aminoácido/s unidos directamente al carboxilo de C-28. Los productos **118**, **119**, **121** y **122**, derivados de **AM**, poseen también un bencilsuccinilo sobre C-2 o C-3 y otro bencilo sobre el aminoácido que hay en C-28, y se diferencian precisamente en el/los aminoácidos unidos a esta posición. Por tanto, la característica común de los productos en el espectro de ^1H RMN radica en la presencia de un grupo bencil-succinilo en C-3, C-2 o C-3 así como un bencilo en C-28. Así se puede encontrar en el espectro de ^1H RMN la presencia de los hidrógenos aromáticos a δ_{H} 7.35, los dos grupos AB de los bencilos en torno a δ_{H} 5.18-5.09 y los metilenos de los succinilos en el rango δ_{H} 2.75-2.50. Para los productos **120** y **123** se pueden encontrar señales similares con la diferencia de poseer dos grupos bencilsuccinilo sobre C-2 y C-3 y un grupo bencilo en C-28 del **AM** y, por tanto, las señales en el espectro de ^1H RMN integran por un mayor número de protones.

Además, en los productos **116** y **118-120** donde hay un sólo aminoácido (6AHA) y, por tanto, se puede encontrar en común la presencia de una señal a δ_{H} 5.90 en forma de doble doblete perteneciente al grupo amino del enlace peptídico entre el triterpeno y el aminoácido. En cambio los productos **117** y **121-123** cuentan con la presencia de dos aminoácidos y, por tanto, se encuentra una señal a δ_{H} 6.05 perteneciente al grupo amino de GLY y otra en torno a δ_{H} 5.92 perteneciente al grupo amino de 6AHA. En torno a δ_{H} 4.00 nos encontramos la señal perteneciente al metileno perteneciente a GLY. Por último, se comprueba en los espectros como se afectan los protones en C-3 para **AO** y C-2/C-3 para **AM**. En este sentido, en los espectros de ^1H RMN se puede encontrar H-3 a δ_{H} 4.51 para los derivados **116** y **117**. De forma similar, H-2 y H-3 para **118** y **121** se sitúan a δ_{H} 5.00 y 3.16, respectivamente, para **119** y **122** estos protones resuenan a δ_{H} 4.75 y 3.78 y, por último, para los productos **120** y **123** a δ_{H} 5.11 y 4.78.

De forma análoga en el espectro de ^{13}C RMN se pueden encontrar señales pertenecientes a los grupos bencilsuccinilos y bencilos de los distintos derivados (Tab. 2.44.). Así aparecen señales a δ_{C} 136.2-128.2 pertenecientes a los 2 ó 3 anillos aromáticos de los derivados, así como δ_{C} 67.3-66.3 los dos metilenos correspondientes a los bencilos, encontrando los metilenos de los succinilos a δ_{C} 29.7-29.5 y sus respectivos carbonilos en torno a δ_{C} 173-170. El espectro de ^{13}C RMN revela las señales pertenecientes a estos aminoácidos, para los monopéptidos (**116** y **118-120**) se encuentran señales de carbonilos una perteneciente a C-28 del triterpeno a δ_{C} 178.2 y otra a δ_{C} 173.5. En cambio para los dipéptidos (**117** y **121-123**) nos encontramos con tres carbonilos, perteneciente a C-28 en torno δ_{C} 178.1, a 6AHA a δ_{C} 173.4 y GLY a δ_{C} 173.0.

C/N	AO	AM	116	117	118	119	120	121	122	123
2	29.8	68.2	29.2	29.4	73.9	67.2	70.3	73.9	67.4	70.3
3	81.0	83.2	81.5	81.4	80.7	85.5	80.8	80.7	85.5	80.8
28	178.2	178.3	173.5	173.1	178.1	178.2	178.1	178.2	180.2	178.1
CH ₂ bencilo			66.7	67.3	66.9	66.9	66.9	67.3	67.0	66.6
CH ₂ bencilo			66.3	66.6	66.3	66.3	66.5	66.9	66.4	66.5
CH ₂ bencilo							66.2			66.5
COOH succinilo			172.3	172.0	172.7	173.0	172.5	172.5	173.1	172.2
COOH succinilo			172.4	171.1	172.6	172.9	170.1	170.1	173.0	172.2
COOH succinilo							172.0			172.0
COOH succinilo							172.3			172.0
COOH 6AHA			173.5	173.1	173.4	173.4	173.4	173.0	173.5	173.0
COOH GLY				172.2				172.7	172.4	172.2

Tabla 2.45. Desplazamientos químicos de ¹³C RMN de los mono-peptidil y dipeptidil bencil succinil derivados de **AO** y **AM**

En la Tabla 2.45 se dan los desplazamientos químicos de estos derivados succinilados y bencilados de **AO** y **AM**. Por el número de metilenos se conoce el número de bencilos presentes en la molécula y por el número de carboxilos o carbonilo de enlace amida, el número de succinilos y de aminoácidos existentes en la misma. Además los valores de los desplazamientos químicos de C-2 y C-3 indica la acilación que ha tenido lugar. Así podemos observar como por el caso de los derivados de **AO** C-3 es desapantallado ligeramente a δ_c 81.5. En los derivados de **AM** nos encontramos como los 2-bencil-succinil-derivados y 2,3-dibencil-succinil-derivados, C-2 es desapantallado a δ_c 73.9 y 70.3 y C-3 se apantalla a δ_c 80.7. y 80.8, respectivamente. Mientras que los 3-bencil-succinil-derivados apantallan C-2 a δ_c 67.3 y desapantallan C-3 a δ_c 85.5.

II.7. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS DERIVADOS BIFUNCIONALES

Como ya se ha comentado previamente, la citotoxicidad de los derivados de ácidos triterpénicos se ha estudiado para una gran variedad de esqueletos. En la mayoría de los casos su mecanismo de actuación transcurre a través del denominado MAPK (mitogen-activated protein kinases), receptores de muerte celular y ruptura mitocondrial. Para el estudio de citotoxicidad se han escogido tres líneas celulares (B16-F10, HT29 y HepG2). Estas tres líneas celulares han sido escogidas debido a su uso generalizado para el estudio de citotoxicidad. Particularmente tanto ácido oleanólico como ácido maslínico han sido estudiados en estas líneas celulares demostrando en algunos casos actividades relativamente buenas.

En los estudios previos realizados con ácido oleanólico sobre líneas celulares como B16-F10 se comprueba que demuestra una buena actividad anti-metastásis, frenando el cáncer inducido en células pulmonares¹²⁰ y puede ser considerado por ello un buen precursor para obtener derivados. En cambio en la línea celular HT29, ácido oleanólico comparado con ácido maslínico presenta una actividad moderada.²¹⁰ Por otra parte, la actividad que ácido oleanólico presenta en la línea celular HepG2 viene respaldada por un estudio donde se han analizado ampliamente sus efectos, encontrándose como en esta línea celular la actividad de ácido oleanólico es dosis dependiente y como aumenta la fragmentación de ADN así como la actividad de las caspasas 3 y 8.²¹¹

Los efectos de ácido maslínico sobre la línea celular B16-F10 han sido descritos previamente en esta Memoria (apartado 2.3.) quedando su actuación bien clara en la Figura 2.5. El efecto de **AM** sobre la línea celular HT29 ha sido particularmente objeto de estudio en una Tesis Doctoral realizada en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada.²¹² De estos primeros estudios se puede extraer que ácido maslínico induce apoptosis de una forma caspasa-dependiente en la línea celular HT29 y a través de una vía intrínseca mitocondrial.²¹³ Estudios posteriores confirmaron estos efectos y demostraron como el mecanismo concreto de actuación es a través de una ruta JNK-p53 dependiente²¹⁴ así como sus efectos en la expresión de proteínas del citoesqueleto en las células tumorales.¹²² En cambio en la línea celular HepG2, ácido maslínico ha sido menos estudiado, aunque existe alguna referencia bibliográfica que analiza sus efectos sobre esta

²¹⁰ Juan, M. E. E.; Planas, J. M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Wenzel, U. *Br. J. Nutr.* 2008, 100, 36–43.

²¹¹ Yan, S.; Huang, C.; Wu, S.; Yin, M. *Toxicol. In Vitro* 2010, 24, 842–8.

²¹² Reyes-Zurita, F. J. Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural, 2007, pp. 1–375.

²¹³ Reyes-Zurita, F. J.; Rufino-Palomares, E. E.; Lupianez, J. A.; Cascante, M. *Cancer Lett. (Shannon, Ireland)* 2009, 273, 44–54.

²¹⁴ Reyes-Zurita, F. J.; Pachón-Peña, G.; Lizárraga, D.; Rufino-Palomares, E. E.; Cascante, M.; Lupiáñez, J. a. *BMC Cancer* 2011, 11, 154.

línea celular, demostrando como ácido maslínico induce la expresión de enzimas citoprotectoras a través de la activación del factor de transcripción Nrf2.²¹⁵

II.7.1. Estudio de las propiedades citotóxicas en las líneas celulares B16-F10, HT29 y HepG2

Este estudio comenzará por determinar la capacidad citotóxica de los precursores AO y AM y, posteriormente, se llevará a cabo el análisis de los efectos citotóxicos de los distintos derivados difuncionalizados semi-sintetizados previamente sobre las distintas líneas celulares de forma que se puedan sacar conclusiones acerca de la relación estructura-actividad (estudio SAR). Para ello se ha testado la citotoxicidad de 90 de los 264 derivados semisintetizados sobre tres líneas celulares, B16F10 (melanoma de ratón murino), HT29 (adenocarcinoma de colon humano) y Hep G2 (carcinoma de hígado humano). Estos compuestos han sido seleccionados para obtener conclusiones coherentes respecto de la relación estructura/reactividad de este tipo de derivados de triterpenos.

En general, se puede observar que en las condiciones puestas (de 0 a 300 $\mu\text{g/mL}$), cerca del 90% de los productos ensayados presentan citotoxicidad sobre las líneas celulares B16F10 y HT29 mientras que para la línea celular Hep G2 este porcentaje baja hasta el 67%. Algunos de estos compuestos citotóxicos, la mayoría de ellos derivados de **AO**, son más efectivos que el correspondiente precursor (**AO** o **AM**), con porcentajes que van desde el 31% (B16F10), 58% (HT29) y por encima del 67% (Hep G2).

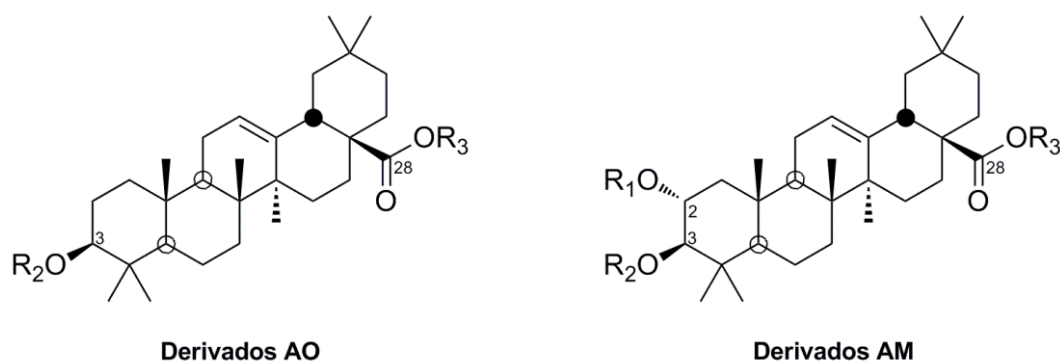


Figura 2.46. Esqueletos generales de los derivados bifuncionales de **AO** y **AM**

Comparando los datos de IC₅₀ de los dos ácidos triterpénicos (**AO** y **AM**) en las tres líneas celulares seleccionadas, se deduce que el hidroxilo de C-2 mejora sensiblemente la citotoxicidad de este último (Tab. 2.47.), destacando sobre todo en la línea HT29 donde ácido maslínico llega a ser más de 10 veces más potente que ácido oleanólico.

²¹⁵ Yap, W. H.; Khoo, K. S.; Ho, A. S. H.; Lim, Y. M. *Biomed. Prev. Nutr.* **2012**, 2, 51–58.

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16F10	$\frac{IC_{50_prec.}}{IC_{50\#}}$	HT29	$\frac{IC_{50_prec.}}{IC_{50\#}}$	HEPG2	$\frac{IC_{50_prec.}}{IC_{50\#}}$
OA	-	OH	H	48.5 ± 1.7	1.0	196.0 ± 0.3	1.0	96.6 ± 0.2	1.0
MA	OH	OH	H	17.1 ± 1.2	1.0	15.2 ± 1.8	1.0	46.8 ± 7.3	1.0

Tabla 2.47. Actividad citotóxica de **AO** y **AM** en las tres líneas celulares estudiadas

En el caso de los valores de IC_{50} de los mono-peptidil derivados de **AO** (92-94), se observa que son en general más bajos que el valor de citotoxicidad de su precursor **AO**, particularmente cuando el aminoácido tiene una cadena larga (6AHA o 11AUA). La línea celular que presenta peores resultados es B16-F10, en cambio en las otras líneas celulares aunque sus valores de IC_{50} sean altos, se alcanzan actividades entre 2 a 5 veces más mayores (Fig. 2.48 y Tab. 2.49). Sin embargo, para los mono-peptidil-derivados de **AM** (95-97), todos muestran una actividad citotóxica menor que la de su precursor en todas las líneas celulares, a excepción del producto **97** (11AUA-AM) en la línea celular Hep G2 (Tab. 2.48. y Fig. 2.49.). En lo que respecta a los dipeptidil derivados de **AO**, se pueden establecer dos conclusiones dependiendo del tipo de aminoácido presente en el derivado. Por una parte, que los derivados cuyo esqueleto presenta los aminoácidos GLY o ALA tienen menor actividad que aquellos que presentan el aminoácido VAL y, por otra que, la actividad es mayor cuando se usan ω -aminoácidos de longitud de cadena larga (tipo 6AHA o mejor 11AUA) (Fig. 2.48 y Tab. 2.49).

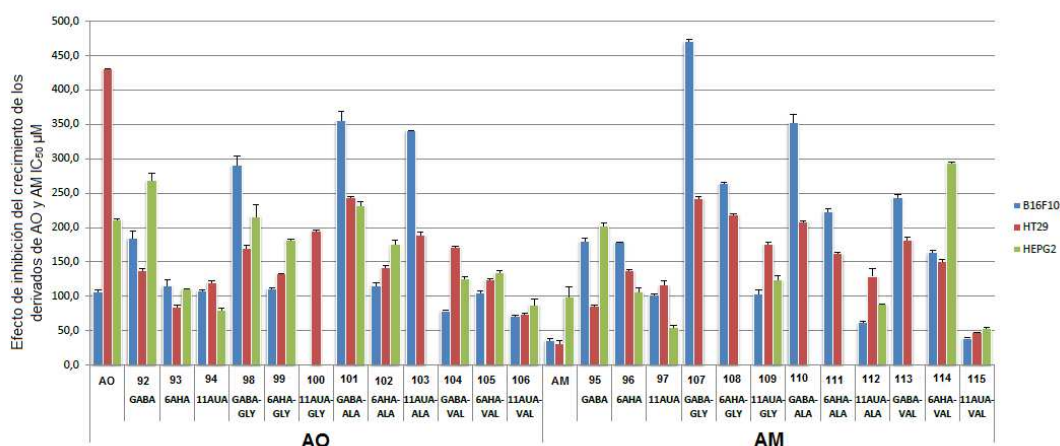


Figura 2.48. IC_{50} de los mono- (92-97) y dipeptidil- (98-115) derivados de **AO** y **AM**

De forma similar, cuando se analizan los datos para los dipeptidil-derivados de **AM** se obtiene como conclusión que todos ellos muestran una IC_{50} mayor que el propio ácido maslínico, a excepción de los productos **112** y **115**, cuya IC_{50} es inferior para la línea celular Hep G2. No obstante, en todos estos valores (y en el monopeptido **97**) se aprecia que, siempre el producto que ofrece una menor IC_{50} es, de nuevo, aquél que presenta un resto

11AUA. También se comprueba que los derivados que presentan el α -aminoácido VAL en su estructura presentan la mayor actividad citotóxica (Fig. 2.48 y Tab. 2.49). Por tanto, en general, podemos concluir, para los mono- y dipéptidos derivados, que aquellos que presentan una longitud de cadena más grande del ω -aminoácido (11AUA) y un volumen mayor del α -aminoácido (VAL) exhiben mejores actividades que sus análogos con otros aminoácidos.

También se ha estudiado la citotoxicidad de los mono-peptidil- (**92g-94g**) y los dipeptidil-3-ftaloil-AO (**98g-106g**), y los mono-peptidil- (**95g-97g**) y dipeptidil-2,3-diftaloil- AM (**107g-115g**) derivados. Estos productos se han seleccionados de acuerdo con los buenos resultados alcanzados con este grupo acilo con los mismos compuestos triterpénicos en los trabajos expuestos en apartados anteriores de la presente Memoria. En este caso se analiza la influencia de la presencia de uno o dos aminoácidos unidos al grupo carboxilo de la molécula sobre la citotoxicidad de estos compuestos. Los mejores resultados de citotoxicidad con los ftaloil derivados se logran cuando hay un aminoácido de cadena larga presente en la molécula. (**94g, 100g, 103g, y 106g**). Sin embargo, los diftaloil-AM derivados presentan resultados peores que **AM** (Tab. 2.50 y Fig. 2.53).

Finalmente, considerando los buenos resultados obtenidos con los 11AUA-mono-peptidil derivados de **AO** y **AM** con grupos acetilo y grupo butanoilo en C-2 o C-2/C-3, también se ha analizado la influencia de otros aminoácidos de cadena más corta (GABA o 6AHA) sobre los derivados que tienen los citados acilos. Así, estos derivados exhiben en general una más alta citotoxicidad que los correspondientes precursores (**AO** o **AM**), pero más bajos que cuando está presente el aminoácido 11AUA (Tab. 2.51 y Fig. 2.53). Así pues, tanto en el caso de **AO** como **AM** los derivados exhiben en general una citotoxicidad mejor que la de su precursores **AO** y **AM**, pero peor que los derivados que contienen el aminoácido 11AUA. De los datos obtenidos se extrae que en la mayoría de los casos el derivado que presenta el aminoácido 6AHA tiene una IC_{50} inferior que los que presentan GABA como aminoácido. En ambos casos, tanto para los derivados de **AO** como de **AM** se observa que los butanoil-derivados presentan una IC_{50} menor que los acetil derivados y que los valores de IC_{50} son muy similares para cada producto en las tres líneas celulares (Tab. 2.52 y Fig. 2.53).

Como conclusión global de este análisis de citotoxicidad de derivados bifuncionales de **AO** y **AM**, se puede afirmar que, varios derivados de **AO** son muy citotóxicos y tienen por ello valor muy bajos de IC_{50} ($<6 \mu M$) siendo alrededor de 300 veces más efectivos que su precursor. Además, algunos derivados de **AM** tienen también valores bajos de IC_{50} ($<6 \mu M$) lo cual indica una eficacia entre 6 y 24 veces mayor que su precursor porque ya de por sí el **AM** presenta un valor de IC_{50} bastante más bajo que el **AO**. Analizando la relación estructura-actividad de estos derivados bifuncionales de **AO** y **AM**, se puede concluir que los grupos funcionales que mejoran clara y sustancialmente los efectos citotóxicos de estos compuestos son un ω -aminoácido de cadena larga sobre el carboxilo de C-28, y un grupo acilo pequeño (acetil o butanoil) sobre los hidroxilos del anillo A del esqueleto triterpénico. Por todo ello, estos acetil o butanoil derivados de **AO** y **AM** con 11AUA como aminoácido pueden ser considerados prometedores agentes para la quimiopreención y la quimioterapia del cáncer.

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	IC ₅₀ de precursor ^b IC ₅₀ de producto#	HT29 ^a	IC ₅₀ de precursor ^b IC ₅₀ de producto#	Hep G2 ^a	IC ₅₀ de precursor ^b IC ₅₀ de producto#
OA	-	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
92	-	H	GABA	185.0 ± 9.4	0.6	137.2 ± 3.5	3.1	268.4 ± 10.6	0.8
93	-	H	6AHA	115.5 ± 8.2	0.9	84.8 ± 3.0	5.1	110.9 ± 0.2	1.9
94	-	H	11AUA	108.2 ± 1.6	1.0	120.4 ± 3.1	3.6	80.5 ± 2.9	2.6
98	-	H	GABA-GLY	290.2 ± 14.1	0.4	170.3 ± 4.2	2.5	216.0 ± 17.4	1.0
99	-	H	6AHA-GLY	111.3 ± 1.4	1.0	132.9 ± 0.6	3.2	182.4 ± 1.4	1.2
100	-	H	11AUA-GLY	> 500		194.8 ± 1.6	2.2	> 500	
101	-	H	GABA-ALA	356.1 ± 12.7	0.3	243.1 ± 2.4	1.8	232.3 ± 5.9	0.9
102	-	H	6AHA-ALA	115.5 ± 4.9	0.9	142.1 ± 2.8	3.0	175.4 ± 5.6	1.2
103	-	H	11AUA-ALA	340.5 ± 0.1	0.3	189.6 ± 3.5	2.3	> 500	
104	-	H	GABA-VAL	79.4 ± 0.4	1.3	170.9 ± 2.7	2.5	125.9 ± 2.8	1.7
105	-	H	6AHA-VAL	105.3 ± 2.4	1.0	124.0 ± 1.3	3.5	134.1 ± 2.8	1.6
106	-	H	11AUA-VAL	71.9 ± 1.0	1.5	73.6 ± 2.1	5.8	88.2 ± 7.6	2.4
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
95	H	H	GABA	180.3 ± 3.9	0.2	86.4 ± 1.4	0.4	202.4 ± 4.1	0.5
96	H	H	6AHA	178.4 ± 0.9	0.2	137.9 ± 0.7	0.2	107.0 ± 5.4	0.9
97	H	H	11AUA	102.7 ± 1.0	0.4	116.3 ± 5.8	0.3	54.7 ± 3.2	1.8
107	H	H	GABA-GLY	469.6 ± 3.8	0.1	242.6 ± 3.1	0.1	> 500	
108	H	H	6AHA-GLY	263.5 ± 1.8	0.1	218.7 ± 0.7	0.1	> 500	
109	H	H	11AUA-GLY	103.0 ± 5.9	0.4	175.5 ± 3.5	0.2	124.0 ± 6.3	0.8
110	H	H	GABA-ALA	351.9 ± 12.2	0.1	208.5 ± 1.2	0.2	> 500	
111	H	H	6AHA-ALA	223.4 ± 4.0	0.2	162.6 ± 1.1	0.2	> 500	
112	H	H	11AUA-ALA	62.2 ± 1.4	0.6	129.4 ± 10.3	0.2	88.5 ± 0.4	1.1
113	H	H	GABA-VAL	243.3 ± 3.9	0.1	181.9 ± 3.5	0.2	> 500	
114	H	H	6AHA-VAL	164.0 ± 2.9	0.2	150.4 ± 3.6	0.2	292.9 ± 2.6	0.3
115	H	H	11AUA-VAL	39.6 ± 1.0	0.9	47.4 ± 1.0	0.7	53.2 ± 1.1	1.9

^aSe calcularon los valores de IC₅₀ (μM) teniendo en cuenta las células control sin tratar como el 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Valores, medias ± S.E.M.

^bEstas columnas representan la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO o AM) y el IC₅₀ de los derivados relacionados.

Tabla 2.49. Actividad citotóxica de mono- (92-97) y dipeptidil (98-115) derivados de **AO** y **AM**

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of producto\#}}$	HT29 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of producto\#}}$	Hep G2 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of producto\#}}$
OA	-	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
92g	-	Fta	GABA	211.7 ± 1.1	0.5	314.5 ± 1.5	1.4	326.8 ± 4.4	0.6
93g	-	Fta	6AHA	140.0 ± 21.2	0.8	213.7 ± 3.1	2.0	211.3 ± 2.5	1.0
94g	-	Fta	11AUA	68.6 ± 0.7	1.6	113.5 ± 0.4	3.8	79.3 ± 1.0	2.7
98g	-	Fta	GABA-GLY	> 500		> 500		> 500	
99g	-	Fta	6AHA-GLY	> 500		399.8 ± 1.7	1.1	> 500	
100g	-	Fta	11AUA-GLY	76.8 ± 2.4	1.4	167.0 ± 2.4	2.6	125.9 ± 2.9	1.7
101g	-	Fta	GABA-ALA	> 500		398.2 ± 1.1	1.1	> 500	
102g	-	Fta	6AHA-ALA	314.5 ± 2.0	0.3	> 500		> 500	
103g	-	Fta	11AUA-ALA	122.0 ± 2.8	0.9	160.5 ± 3.5	2.7	129.6 ± 2.4	1.6
104g	-	Fta	GABA-VAL	211.4 ± 3.7	0.5	275.9 ± 0.2	1.6	327.9 ± 3.0	0.6
105g	-	Fta	6AHA-VAL	134.2 ± 1.1	0.8	364.4 ± 3.2	1.2	> 500	
106g	-	Fta	11AUA-VAL	82.3 ± 2.1	1.3	143.8 ± 3.3	3.0	153.8 ± 2.7	1.4
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
95g	Fta	Fta	GABA	348.3 ± 3.9	0.1	357.0 ± 0.6	0.1	> 500	
96g	Fta	Fta	6AHA	215.4 ± 1.0	0.2	336.5 ± 0.7	0.1	243.0 ± 1.3	0.4
97g	Fta	Fta	11AUA	129.7 ± 3.6	0.3	280.2 ± 3.4	0.1	213.7 ± 2.1	0.5
107g	Fta	Fta	GABA-GLY	> 500		> 500		> 500	
108g	Fta	Fta	6AHA-GLY	> 500		> 500		> 500	
109g	Fta	Fta	11AUA-GLY	59.1 ± 5.1	0.6	228.1 ± 0.9	0.1	> 500	
110g	Fta	Fta	GABA-ALA	> 500		> 500		> 500	
111g	Fta	Fta	6AHA-ALA	> 500		> 500		> 500	
112g	Fta	Fta	11AUA-ALA	202.8 ± 1.6	0.2	> 500		268.1 ± 2.7	0.4
113g	Fta	Fta	GABA-VAL	> 500		> 500		> 500	
114g	Fta	Fta	6AHA-VAL	> 500		> 500		> 500	
115g	Fta	Fta	11AUA-VAL	> 500		> 500		> 500	

^aSe calcularon los valores de IC₅₀ (μM) teniendo en cuenta las células control sin tratar como el 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Valores, medias ± S.E.M.

^bEstas columnas representan la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO o AM) y el IC₅₀ de los derivados relacionados.

Tabla 2.50. Actividad citotóxica de ftaloil-mono- y dipeptidil-derivados de AO y AM

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	IC ₅₀ of precursor ^b IC ₅₀ of producto#	HT29 ^a	IC ₅₀ of precursor ^b IC ₅₀ of producto#	Hep G2 ^a	IC ₅₀ of precursor ^b IC ₅₀ of producto#
OA	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
94a	–	Ac	11AUA	10.9 ± 0.1	9.8	1.63 ± 0.01	263.7	17.5 ± 0.1	12.1
100a	–	Ac	11AUA-GLY	13.8 ± 0.4	7.7	1.41 ± 0.03	304.9	34.1 ± 0.1	6.2
103a	–	Ac	11AUA-ALA	11.6 ± 0.9	9.2	2.71 ± 0.04	158.6	30.8 ± 1.0	6.9
106a	–	Ac	11AUA-VAL	13.2 ± 0.2	8.1	5.4 ± 0.1	79.6	28.3 ± 0.6	7.5
94c	–	But	11AUA	12.74 ± 0.03	8.4	1.59 ± 0.01	270.4	35.4 ± 0.6	6.0
100c	–	But	11AUA-GLY	13.6 ± 0.4	7.8	1.40 ± 0.04	307.1	24 ± 0.8	8.8
103c	–	But	11AUA-ALA	11.2 ± 0.1	9.5	1.33 ± 0.01	323.2	27.1 ± 0.2	7.8
106c	–	But	11AUA-VAL	13.4 ± 0.6	7.9	1.44 ± 0.01	298.5	18.9 ± 0.5	11.2
94f	–	Bz	11AUA	51.6 ± 0.9	2.1	129.9 ± 2.8	3.3	83.1 ± 1.7	2.5
100f	–	Bz	11AUA-GLY	58.7 ± 1.6	1.8	146.4 ± 5.9	2.9	93.1 ± 0.2	2.3
103f	–	Bz	11AUA-ALA	20.0 ± 0.3	5.3	1.55 ± 0.01	277.4	23.5 ± 0.3	9.0
106f	–	Bz	11AUA-VAL	29.9 ± 1.2	3.6	2.80 ± 0.02	153.5	27.7 ± 0.1	7.6
94h	–	Succ	11AUA	110.8 ± 10.1	1.0	113 ± 3.5	3.8	> 500	
100h	–	Succ	11AUA-GLY	283.5 ± 9.1	0.4	357.9 ± 1.1	1.2	> 500	
103h	–	Succ	11AUA-ALA	278.3 ± 0.6	0.4	354.1 ± 0.6	1.2	> 500	
106h	–	Succ	11AUA-VAL	38.7 ± 2.0	2.7	143.5 ± 8.0	3.0	125.9 ± 7.4	1.7
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
97a	Ac	Ac	11AUA	2.4 ± 0.1	15.1	3.1 ± 0.1	10.3	14.2 ± 0.1	7.0
109a	Ac	Ac	11AUA-GLY	60.2 ± 2.6	0.6	105.6 ± 3.9	0.3	66.5 ± 1.1	1.5
112a	Ac	Ac	11AUA-ALA	26.8 ± 0.3	1.4	64.5 ± 3.5	0.5	105.0 ± 3.8	0.9
115a	Ac	Ac	11AUA-VAL	68.1 ± 0.7	0.5	97.8 ± 4.9	0.3	105.6 ± 6.6	0.9
97c	But	But	11AUA	5.7 ± 0.2	6.3	1.37 ± 0.01	23.5	27.6 ± 0.4	3.6
109c	But	But	11AUA-GLY	82.8 ± 1.4	0.4	159.2 ± 4.0	0.2	70.9 ± 2.4	1.4
112c	But	But	11AUA-ALA	39.5 ± 1.0	0.9	109.1 ± 2.7	0.3	100.8 ± 6.9	1.0
115c	But	But	11AUA-VAL	243.1 ± 4.1	0.1	301.0 ± 1.5	0.1	> 500	
97f	Bz	Bz	11AUA	145.0 ± 2.3	0.2	126.3 ± 4.9	0.3	> 500	
109f	Bz	Bz	11AUA-GLY	159.4 ± 2.5	0.2	227.4 ± 4.0	0.1	> 500	
112f	Bz	Bz	11AUA-ALA	130.8 ± 2.5	0.3	293.4 ± 0.8	0.1	> 500	
115f	Bz	Bz	11AUA-VAL	104.8 ± 5.6	0.3	184.1 ± 3.0	0.2	72.1 ± 3.7	1.4
97h	Succ	Succ	11AUA	38.1 ± 1.1	1.0	153.7 ± 0.3	0.2	111.3 ± 3.1	0.9
109h	Succ	Succ	11AUA-GLY	221.1 ± 3.0	0.2	218.4 ± 5.1	0.1	344.3 ± 4.8	0.3
112h	Succ	Succ	11AUA-ALA	164.5 ± 2.6	0.2	211.6 ± 2.5	0.2	> 500	
115h	Succ	Succ	11AUA-VAL	250.4 ± 1.3	0.1	212.2 ± 4.3	0.2	> 500	

Tabla 2.51. Actividad citotóxica de mono- y dipeptidil-derivados acilados de AO y AM

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of product \#}}$	HT29 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of product \#}}$	Hep G2 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of product \#}}$
OA	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
92a	–	Ac	GABA	81.7 ± 0.2	1.3	81.9 ± 0.3	5.3	79.9 ± 3.8	2.6
93a	–	Ac	6AHA	61.4 ± 0.7	1.7	72.8 ± 1.4	5.9	75.29 ± 0.05	2.8
92c	–	But	GABA	29.7 ± 1.2	3.6	45.6 ± 1.0	9.4	24.0 ± 0.9	8.8
93c	–	But	6AHA	19.2 ± 0.2	5.5	20.3 ± 0.3	21.2	17.5 ± 0.1	12.1
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
95a	Ac	Ac	GABA	104.6 ± 1.7	0.3	95.8 ± 1.7	0.3	109.2 ± 1.5	0.9
96a	Ac	Ac	6AHA	50.2 ± 2.4	0.7	89.8 ± 0.6	0.4	87.0 ± 1.5	1.1
95c	But	But	GABA	52.3 ± 0.6	0.7	31.3 ± 0.1	1.0	18.0 ± 0.6	5.5
96c	But	But	6AHA	46.0 ± 1.5	0.8	32.1 ± 1.3	1.0	19.8 ± 0.8	5.0

^aSe calcularon los valores de IC₅₀ (μM) teniendo en cuenta las células control sin tratar como el 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Valores, medias ± S.E.M.

^bEstas columnas representan la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO o AM) y el IC₅₀ de los derivados relacionados.

Tabla 2.52. Actividad de los acetil- y butanoil- mono-peptidil derivados (GABA y 6AHA) de **AO y AM**

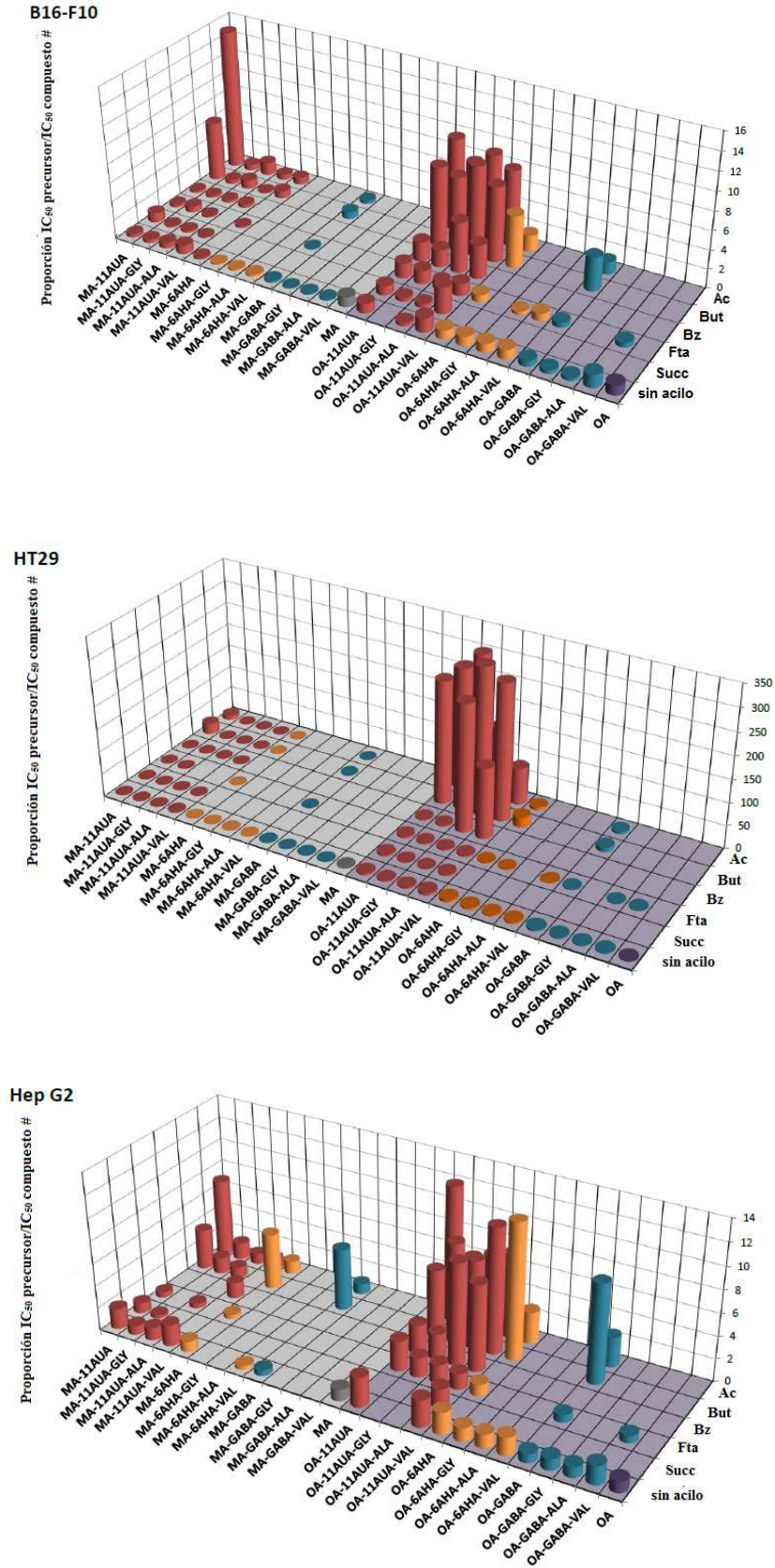


Figura 2.53. Representaciones tridimensionales de la relación de IC_{50} de cada producto respecto a su precursor (AO y AM) para las líneas celulares B16-F10, HT29, Hep G2

CAPITULO III.
PARTE EXPERIMENTAL

III.1. INSTRUMENTACIÓN, GENERAL MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

III.1.1. Instrumentación general básica

Los puntos de fusión microscópicos han sido determinados en un aparato tipo Stuart, de la casa Reichert.

Para la evaporación a vacío se ha utilizado un rotavapor de la casa Büchi, el modelo 210.

Para la agitación orbital se utilizó un agitador Unimax 1010, de la casa Heidolph.

La liofilización de productos se realizó en un Freezemobile 12L, de la casa Virtis.

Para la realización de reacciones simultáneas se utilizó un Carousel 12 Plus Reaction Station de la casa Radleys.



Figura 3.1. Aparato de punto de fusión tipo Stuart



Figura 3.2. Rotavapor Büchi 210



Figura 3.3. Agitador orbital Unimax 1010



Figura 3.4. Liofilizador Freezemobile



Figura 3.5. Reactor Carousel Radleys

III.1.2. Cromatografía

a) Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se ha llevado a cabo con gel de sílice Merck 7747, en capas de 0.25 mm de espesor. La visualización de los productos se realizó con la mezcla usualmente denominada "óleum" ($H_2O-H_2SO_4-AcOH$, 4:1:20) y calefacción a 120 °C hasta aparición de manchas. Para la cromatografía en capa fina se han empleado como eluyentes los siguientes disolventes: *n*-hexano, $CHCl_3$, DCM, éter dietílico, isopropanol, metanol, acetona y acetato de etilo, bien solos o mezclados.



Figura 3.6. Placas de gel de sílice utilizadas

b) Cromatografía flash a media presión

Difiere de la cromatografía tradicional en columna básicamente por el tamaño de las partículas del soporte, que es menor, y en la mayor contrapresión causada por las mismas que obliga al uso de una fuente de presión para generar el caudal de fase móvil necesario en columna.



Figura 3.7. Cromatografía en columna flash

Las cromatografías en columna se han realizado con gel de sílice como adsorbente (gel de sílice Scharlau 60, 40-60 μm) soportadas en columnas de vidrio de diámetro variable en función de la cantidad de muestra a separar, trabajando con una presión de entre 0.2 y 1 atmósfera. Se ha utilizado un gradiente de polaridad creciente con disolventes o mezclas de disolventes, generalmente, *n*-hexano-AcOEt, DCM-acetona, $CHCl_3$ -MeOH y se sigue la composición de las fracciones eluidas por CCF.

c) Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

Los análisis por HPLC-MS se realizaron en un sistema que consta de la instrumentación siguiente:

- Inyector-sistema de bombeo Waters 2795 Separations Mode Alliance HT

- Detector UV-VIS de doble canal Waters 2487
- Detector de masas con ionización en modelo electrospray modelo Waters Micromass ZQ
- Ordenador de control del equipo con sistema operativo *Windows 2000 professional* y Masslynk™ 4.0. como software de control.

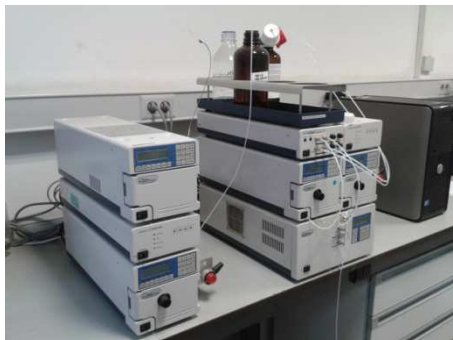


Figura 3.8. Aparato de HPLC

Se utilizó una columna *Symmetry™ C₁₈* (150 x 3.9 mm). Las muestras se fluyeron a un flujo de 1mL/min utilizando como eluyentes H₂O con 0.1% ácido fórmico y ACN con 0.1% de ácido fórmico. Ambos eluyentes fueron filtrados previamente mediante un sistema de Millipore con un filtro de 0.45 μm. Las muestras también fueron filtradas con filtros de 0.45 μm.

III.1.3. Métodos de determinación estructural

a) Espectrometría de masas

Los espectros de masas se han llevado a cabo por ionización a presión atmosférica por electro spray (ESI) en un sistema con analizador de tiempo de vuelo (TOF) WATERS modelo LCT Premier XE, con jeringa de infusión para muestras líquidas y con UPLC Acquity Binary Solvent manager como cromatógrafo. El volumen inoculado de muestra fue de 2 μL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ y se empleó una columna en fase reversa Acquity UPLC BECH C18 130 \AA 1.7 μm 2.1 mm x 50 mm. Los datos se expresan en unidades de masa (m/z).



Figura 3.9. Espectrómetro de masas WATERS LCT Premier XE

b) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de ^1H RMN y de ^{13}C RMN se registraron en un espectrómetro BRUKER AM-300 y BRUKER ARX-400, con cabeza dual, empleando CDCl_3 , CD_3OD o $\text{C}_3\text{D}_6\text{SO}$ como disolventes, que al mismo tiempo proporcionan la señal del lock. Las asignaciones en ^{13}C RMN monodimensional se han realizado con la ayuda de experiencias DEPT (135°). Las experiencias bidimensionales realizadas de correlación C/H (HMBC y HMQC), se han realizado utilizando programas de la casa Bruker, en las condiciones estándar del servicio de Resonancia Magnética Nuclear del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.



Figura 3.10. Espectrómetro de RMN BRUKER

c) Espectroscopía de IR

Los espectros de infrarrojo se han realizado en forma de películas sobre cristales de NaCl o con pastillas de KBr en un espectrómetro MATTSON SATELLITE FTIR. Las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} .



Figura 3.11. Espectrómetro de infrarrojos

d) Rotaciones específicas ($[\alpha]_D$)

Las rotaciones específicas, $[\alpha]_D$, se midieron en CHCl_3 o MeOH a la temperatura del laboratorio en dos polarímetros automáticos PERKIN-ELMER 141 y 341, en una célula de 1 dm de longitud y a las concentraciones que se indican en cada caso.



Figura 3.12. Polarímetro PERKIN-ELMER

III.1.4. Procedimientos generales de síntesis en disolución

a) Aislamiento del ácido oleanólico y ácido maslínico

Ácido oleanólico (**1**) y ácido maslínico (**2**) se aíslan de los desechos de molturación de la aceituna según el procedimiento que será expuesto a continuación y que ha sido desarrollado por nuestro Grupo de Investigación, encontrándose perfectamente detallado en sendas patentes nacional (P96061652) e internacional (W098/04331) titularizadas por la Universidad de Granada. Estos desechos secos, obtenidos por diferentes tratamientos, son finamente triturados y extraídos en aparato Soxhlet con hexano y cuando se considera agotada la extracción con este disolvente (por análisis del residuo), se hace una nueva extracción de los diferentes cartuchos con acetato de etilo hasta nuevo agotamiento de los mismos. Los residuos tanto hexánicos, como de acetato de etilo, son concentrados y analizados mediante cromatografía en capa fina. De esta forma se comprueba que el extracto de hexano posee una mezcla de ácido oleanólico-ácido maslínico 80:20, mientras que esta proporción es aproximadamente inversa en el extracto de acetato de etilo. Ambos compuestos se separan a partir de estas mezclas mediante cromatografía en columna, llevándose a cabo la identificación de los mismos por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en bibliografía, siendo totalmente concordantes.

b) Reacción de bencilación.

Se disuelven 0.2 mol de producto de partida en DMF (8 mL) se añade K_2CO_3 (4,5 mmol) y $BnCl$ (0.4 mol). La reacción se deja en agitación durante 4 h a 55 °C. La mezcla es diluida con agua y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

c) Reacción de oxidación con PCC

Se disuelven 0.1 mmol de producto de partida en 5 mL de DCM y se añaden 65 mg (0.3 mmol) de clorocromato de piridinio (PCC). La reacción se mantiene en agitación 1 h a temperatura ambiente, tras la cual se filtra en una placa de vidrio molido a la que se le ha agregado previamente una pequeña cantidad de gel de sílice de grano grueso, se concentra a vacío y por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

d) Reducción con $LiAlH_4$

Se disuelven 0.3 mmol del sustrato a reducir en 3 mL de THF seco y se añade 1 mL de disolución 1 M de $LiAlH_4$ en THF, manteniéndose la reacción a la temperatura y el tiempo indicados en cada caso, transcurrido el cual se agrega metanol para destruir el exceso de reactivo, la mezcla es diluida con agua y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

e) Reducción con NaBH₄

0.2 mmol de sustrato se disuelven en 5 mL de isopropanol y se añaden 0.3 mmol de NaBH₄, manteniéndose la reacción a la temperatura y el tiempo indicados en cada caso, se concentra a presión reducida, posteriormente es diluida con agua y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

f) Reacción de acetonación

Se disuelven 0.2 de diol en 10 mL de 2,2-dimetoxipropano, se le agrega 1 mg de PPTS y se pone a reflujo el tiempo indica en cada caso. Después se lava con una disolución acuosa de NaHCO₃, se extrae con DCM y se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro. Posteriormente se concentra a vacío y por último se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

g) Reacción de tosiliación

Se disuelven 0.21 mmol del alcohol a tosilar en 2 mL de piridina y se agrega una cantidad equimolecular de cloruro de tosilo, manteniéndose la reacción con agitación magnética a la temperatura y el tiempo indicados en cada caso. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. A continuación se lava la fase orgánica con una disolución diluida de HCl y posteriormente con una disolución de NaHCO₃ hasta pH neutro, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Finalmente, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

h) Formación de azida a partir de tosilato.

Se añade a una disolución de DCM con 0.21 mmol de sustrato 0.7 mmol de NaN₃ y se deja en agitación magnética el tiempo indicado en cada caso a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

i) Apertura de acetónido

Se disuelven 0.2 mmol del acetónido en DCM y se le añaden 10 mg de *p*-TsOH. Se deja en agitación magnética el tiempo indicado a 60 °C en cada caso y una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. Se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

j) Reacción de acilación

Se disuelven 0.2 mmol de producto en 4 mL de piridina y se añaden 1 mmol del anhídrido, llevándose a cabo la reacción en las condiciones particulares que se indican en cada caso. Una vez finalizada, se añade agua fría y se extrae varias veces con DCM. A continuación se

lava la fase orgánica con una disolución de HCl y posteriormente con una disolución de NaHCO₃ hasta pH neutro, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

k) Formación de cloruro de ácido

Se disuelven 0.1 mmol de sustrato y se disuelven en 20 mL de DCM, se le añade 2 mL de Cl₂SO, manteniéndose la reacción a la temperatura y el tiempo indicado en cada caso. Se concentra a vacío y por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

l) Formación de amida a partir de cloruro de ácido

Añadir a una disolución de cloruro de ácido una disolución 1:1 NH₃: metanol poco a poco hasta observar que cesa el burbujeo, manteniéndose la reacción a la temperatura y el tiempo indicado en cada caso. Se extrae varias veces con DCM, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

m) Formación de nitrilo a partir de amida

Se disuelven 0.21 mmol de sustrato en 10 mL de DCM y se añade lentamente 0,63 mmol de Cl₂SO, manteniéndose la reacción con agitación magnética a la temperatura y el tiempo indicado en cada caso. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. Se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

n) Reacción de esterificación con un aminoácido protegido con grupo Fmoc.

Se disuelven 0.21 mmol del alcohol a esterificar en DCM (5mL). Se le añade una disolución de Fmoc-aa-OH (3 equivalentes por grupo OH), DIPCDI (3 equivalentes por grupo OH) y DMAP (0.3 equivalentes por grupo OH) en DCM/DMF (5 mL/5 mL). La reacción se mantiene en agitación magnética a reflujo durante 2 h. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de gel de sílice empleando una mezcla de *n*-hexano-AcOEt o DCM-acetona con un gradiente de polaridad adecuado.

III.1.5. Procedimientos generales en fase sólida.

a) Consideraciones generales

Las síntesis sobre fase sólida se llevan a cabo en jeringas de polipropileno provistas de un filtro de polietileno poroso, de volumen adecuado en función de la cantidad de resina utilizada. Los disolventes y mezclas de reacción se eliminan mediante succión. Previamente al inicio de una síntesis, las resinas se someten a un proceso de acondicionamiento que consta de una serie de lavados que tienen como principal función solvatar adecuadamente la resina para que las reacciones sobre ésta y la transferencia de reactivos sean eficientes. Para la agitación se emplean varillas de teflón en agitadores orbitales. Los lavados entre las diferentes reacciones se realizan con DMF y DCM (5 x 30", 10 mL/g resina) lavando primero con el disolvente en el que se ha realizado la última reacción y por último en el disolvente en el que se hará la siguiente. Los aminoácidos se incorporan disueltos en DMF (4 mL/g resina) junto con los agentes acoplantes correspondientes, se añaden a la resina y se deja reaccionar durante una hora con agitación orbital. Se filtran los reactivos, se lava la resina y se realiza el ensayo correspondiente para comprobar si el acoplamiento ha finalizado.

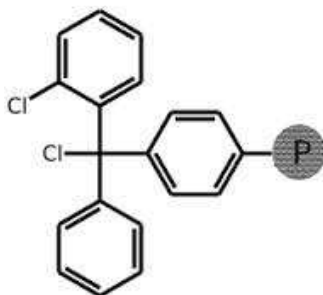


Figura 3.13. Estructura de la resina de cloruro de 2-clorotritilo (CCT-resina) utilizada para las reacciones en fase sólida

El soporte polimérico empleado, para la síntesis de los distintos compuestos con el extremo C en forma de ácido, ha sido la resina de cloruro de 2-clorotritilo (CCT-resina) o también llamada resina de Barlos. Esta resina es muy lábil al medio ácido. Por ello, el DCM utilizado se pasa previamente por una columna de alúmina básica con la intención de eliminar posibles trazas de ácido clorhídrico. En primer lugar se solvata adecuadamente la resina con DCM durante 20 min, para que todos los centros activos sean accesibles.

b) Procedimiento general de cuantificación de la incorporación de AO y AM a la resina.

Paso 1: Se colocan porciones de resina CCT (1.27 mmol/g) en jeringas de polipropileno (10 mL) equipado con un disco de polietileno. La resina se lava con DMF (2 mL x3 veces) y DMC (2 mL x 3 veces), se solvata la resina con DCM (2 mL durante 20 min) para posteriormente eliminar el disolvente por succión. La jeringa es tratada con una disolución de los productos **AM** o **AO** con DIEA y DCM y colocada en agitación orbital durante 48 h. Posteriormente se filtra la resina y se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3). Finalmente se seca la resina.

Paso 2: La jeringa con la resina es tratada con la correspondiente disolución de Fmoc-Leu-OH con DIEA en DCM y puesto en agitación orbital durante 2 h.

Paso 3: Para saturar los centros activos de la resina se añade 0.5 mL de MeOH a la jeringa con la resina y se coloca en agitación orbital durante 30 min. Posteriormente se filtra la resina y se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3). Finalmente se seca la resina.

Paso 4: Se añade una disolución de Fmoc-Gly, DIPCDI, DMAP en DCM/DMF a la jeringa y se coloca en agitación orbital durante 1 h. La jeringa es filtrada y lavada con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3) y después secada.

Paso 5: La escisión de los derivados de **AO** y **AM** de la resina se realizó mediante la adición a la jeringa de una disolución de TFA (1%) en DCM (2 min x3).

c) Procedimiento general de acilación en fase sólida.

Paso 1: Porciones de resina de CCT se colocan en jeringas de polipropileno (20 mL) equipadas con filtros de polietileno. La resina se lava con DMF (2 mL x3) y DCM (2 mLx3), se solvata la resina con DCM (2 mL, 20 min) para posteriormente eliminar el disolvente. Se incorpora **AO** y **AM** a la resina por el método general descrito anteriormente y se coloca en agitación orbital durante 24h. Posteriormente se reacopla con una disolución de **AO** y **AM** con las mismas concentraciones que la anterior, se coloca de nuevo en agitación orbital durante 24 h.

Paso 2: Tras este periodo se saturan los centros activos de la resina añadiendo 0.5 mL de MeOH y se coloca en agitación orbital durante 20 min. Después de los tratamientos, la resina es filtrada y lavada con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3) y después secada.

Paso 3: Cada jeringa es dividida en las porciones necesarias para realizar las reacciones de acilación correspondientes. Cada una de las jeringas es acilada con un anhídrido en una relación molar de 4:1 (anhídrido: grupo OH) y puesta en agitación orbital durante 24 h a temperatura ambiente. La reacción de acilación se produce en presencia de DMAP (0.5 equiv.), Et₃N (0.5 equiv.) y DCM/DMF (1 mL/ 1 mL) como disolvente. La resina es filtrada y lavada con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x3) y después secada.

Paso 4: La escisión de los acil-derivados de la resina se realiza añadiendo a cada jeringa una disolución de DCM con TFA (1%) (2 min x3).

d) Procedimiento general de formación de derivados peptídicos de AO y AM.

Paso1: Se colocan porciones de 100 mg de resina CCT (1.27 mmol/g) en jeringas de polipropileno (10 mL) equipado con un disco de polietileno. La resina se lava con DMF (2 mL x3 veces) y DMC (2 mL x 3 veces), se solvata la resina con DCM (2 mL durante 20 min) para posteriormente eliminar el disolvente. La jeringa es tratada con una disolución de los productos con el primer aa (2 equivalentes respecto a la resina) con DIEA en DMF y colocada en agitación orbital durante 2 h. Posteriormente se filtra la resina y se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM. Finalmente se seca la resina.

Paso 2: para saturar los centros activos de la resina se añade 0.5 mL de MeOH a la jeringa con la resina y se coloca en agitación orbital durante 30 min. Posteriormente se filtra la resina y se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3). Finalmente se seca la resina.

Paso 3: Para eliminar el grupo protector Fmoc y liberar el grupo carboxilo se lava la resina primeramente con DCM (2 mL x 3 veces) y DMF (2 mL x 3 veces). Posteriormente se filtra

la resina y se le añade una disolución de DMF: piperidina (4:1) (2 mL x 3, 10 minutos cada vez). Tras este proceso se lava la resina con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3). Finalmente se seca la resina.

Paso 4: Si se quiere obtener derivados con solo un aa pasamos al paso 5. En el caso que queramos derivados con más de un aminoácido añadimos a la resina obtenida en el paso anterior una disolución del siguiente aminoácido (4 equivalentes respecto a la resina) con DIPCDI-HOAt (4 equivalentes de cada uno respecto a la resina) en DMF. Tras añadir la disolución se mantiene en agitación orbital a temperatura ambiente durante 2 h. Se coge una pequeña porción de resina y se le realiza el test de Kaiser. Si sale positivo se reacopla el aminoácido utilizado. En caso que salga negativo seguiremos repitiendo el paso 3 para eliminar el grupo protector Fmoc.

Paso 5: A la resina con el/los aminoácido acoplado/s se le añade una disolución de **AO** o **AM**, (3 equivalentes respecto a la resina) PyAOP, HOAT, DIEA (3 equivalentes respecto a la resina) disueltos en DMF. La mezcla se mantiene en agitación orbital durante 24 h a temperatura ambiente. Tras este proceso la resina es filtrada y lavada con DMF (2 mL x 3) y se le vuelve a añadir la misma disolución anterior para el reacoplamiento del **AO** o **AM**. La resina resultante es filtrada y lavada con DMF, piperidina 20% en DMF, DMSO y DCM (2 mL x3 veces con cada disolución).

Paso 6: En el caso que queramos obtener sólo derivados peptídicos pasamos al paso 7. En caso que queramos obtener derivados acilados de los productos anclados a la resina se le añade una disolución del anhídrido (4 equivalentes respecto a la resina) y DMAP en DMF. Se deja en agitación orbital un tiempo determinado para cada anhídrido a temperatura ambiente. Tras este proceso la resina resultante es filtrada y lavada con DMF (2 mL x3) y DCM (2 mL x3).

Paso 7: La escisión de los derivados de **AO** y **AM** de la resina se realizó mediante la adición a la jeringa de una disolución de TFA (1%) en DCM (2 min x3).

e) Test de detección de grupo amino libre (Test de Kaiser o test de la ninhidrina)

Test de Kaiser (Sigma Aldrich Quimica, S.L.)

El test colorimétrico de la ninhidrina se ha utilizado como control de las etapas de acoplamiento realizados sobre aminas primarias, ya que permite detectar la presencia de grupos aminos primarios libres.²¹⁶

Para ello se toman una pequeña alícuota de la peptidilresina (1 mg aprox) previamente lavada con DCM y secada al aire, se le añade 6 gotas de reactivo A y dos gotas de reactivo B y se deja en un baño de arena a 110 °C durante 3 min. La presencia de aminas primarias libres (acoplamiento < 99%) se indica por la aparición de coloración azul en la resina o en el sobrenadante, siendo el ensayo positivo. Si la coloración final es amarilla y las bolas de resina permanecen incoloras el test es negativo, es decir la reacción es cuantitativa (acoplamiento > 99%).

²¹⁶ Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I., *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595.

III.2. INSTRUMENTACIÓN, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos.

III.2.1. Consideraciones generales

a) Productos

Los diferentes compuestos utilizados para realizar los diferentes ensayos se disuelven antes de su uso de forma 10 mg/mL en 50-50% DMSO/PBS. Las disoluciones fueron congeladas y guardadas a -20 °C; esta disolución es la que se diluye en los diferentes medios de cultivo celulares para los distintos ensayos. Se mide la IC₅₀ y IC_{50x2} de la apoptosis y el potencial de membrana mitocondrial, así como la actividad anti VIH.

b) Subcultivos celulares

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en flascos de 74 cm² y en placas de 100cm o 180 cm de diámetro. Crecidas en DEMEM conteniendo glucosa (25 mM) (Sigma, St.Louis, MO (USA)), suplementado con suero bovino fetal (FCS, fetal calf serum, PAA Laboratories GmbH, Pasching, (Austria)) y 0.1 % de los antibióticos penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, GibcoBRL), siendo incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad.

En todas las líneas celulares se realizaron un máximo de 12-subcultivos, en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar. Cuando las células se encontraron próximas a la confluencia, en torno a un 90-95%, fueron subcultivadas. Para lo cual se les retiró el medio, siendo lavadas 2 veces con PBS. Inmediatamente después, la células fueron despegadas del soporte por incubación con tripsina-EDTA durante 5-10min (0.25% tripsina, 1mM EDTA, GibcoBRL) en un incubador humidificado al 5% de CO₂. La tripsina fue inactivada añadiendo medio de cultivo suplementado con FCS. A continuación las células fueron recogidas por centrifugación y subcultivadas o sembradas para la realización de los distintos ensayos.

c) Almacenamiento celular y descongelación

Todas las líneas celulares fueron congeladas en suero con un 10% de DMSO. En primer lugar se congelaron a -80°C utilizando un crió-contenedor de congelación gradual y a continuación fueron almacenadas a -192°C en nitrógeno líquido. Para una descongelación rápida, los criotubos fueron inmersos en un baño a 37°C . A continuación, las líneas celulares fueron diluidas en 10 mL de medio de cultivo al 10% de FCS, e incubadas a 37°C en un incubador humidificado con un 5% de CO_2 .

III.2.2. Estudio de necrosis y efecto apoptótico

III.2.2.1. Líneas celulares

a) Línea tumoral B16-F10

Originalmente aislada de ratones, derivada del melanoma de piel de un cepa de ratón C57BL/6. Muestra característica de fibroblasto, que produce melanina. Presenta un alto índice de metástasis, resistentes a ciertas concentraciones de quimioterapia.

b) Línea tumoral HT29

Originalmente aislada a partir del cáncer de colon de una mujer caucásica de 44 años de edad. Estas células son comúnmente utilizadas en estudios de cáncer de colon. Su capacidad tumorigénica ha sido mostrada en ratón formando adenocarcinomas bien diferenciados consistentes con colon primario (grado I). Además son capaces de formar tumores en hámsteres tratados con esteroides. Esta línea celular es positiva para la expresión de los siguientes oncogenes: myc^+ , ras^+ , myb^+ , fos^+ , $p53^+$, abl^- , ros^- , src^- . El tiempo que estas células tardan en doblar su población es de aproximadamente 48h en condiciones normales de cultivo.

c) Línea tumoral HEPG2.

Originalmente aislada de un hombre caucásico americano de 15 años. Línea celular tumoral del cáncer de hígado. Las células han sido ampliamente estudiadas en modelos *in vitro*.

III.2.3. Ensayos de citotoxicidad

Para establecer el número óptimo de células necesario para llevar a cabo los estudios de viabilidad celular, se realiza previamente un screening para determinar el número de células sembradas que tras ser crecidas proporcionan una absorbancia óptima entre valores de 1 a 1.5, obtenida por el ensayo con MTT en el que la absorbancia es proporcional con la cantidad de células presentes.

Tras determinar el número óptimo de células a sembrar en cada línea celular, se procede a la realización de los distintos ensayos de citotoxicidad en orden a establecer el efecto antitumoral de cada uno de los productos. Para ello se realizan diferentes curvas de citotoxicidad sobre las líneas celulares anteriormente descritas, determinando, en cada línea celular, la concentración de compuesto a la que se produce una inhibición del crecimiento del cultivo de un 50% o IC₅₀.

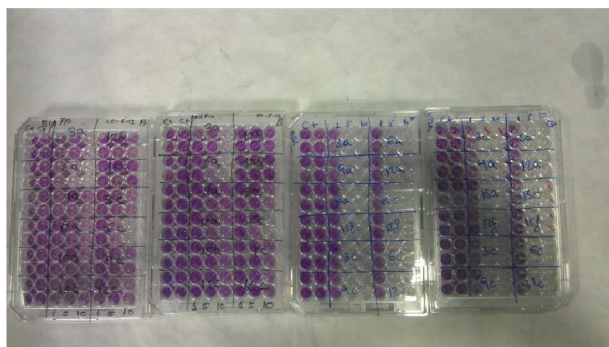


Figura 4.14. Placas con pocillos para el estudio de la citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad las células son sembradas en placas de 96 pocillos con 0.31 cm²/pozo. Se siembran por pocillo 6×10^3 células de cada uno de las líneas celulares. Todos los tipos celulares se crecen en 200 μ L de DMEM suplementado con glutamina 2mM, 10% en FBS y 0.1% de estreptomicina/penicilina (S/P), a 37°C y bajo una atmósfera del 5% CO₂. Se utiliza DMSO como agente vehiculizante de los productos, ya que esta es una sustancia parcialmente soluble en medio acuoso. Tras 24h de la siembra se retira el medio, añadiendo medio nuevo junto con las distintas concentraciones de los distintos productos hasta un volumen final de 200 μ L.

La puesta a punto del método así como el rango efectivo de citotoxicidad del compuesto se determina para cada una de las líneas celulares. En primer lugar, para encontrar el rango de efectividad de los distintos productos se utilizaron concentraciones de

0, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300. Tras una incubación de 72h se examina el aspecto presentado por las células a las distintas concentraciones.

Finalmente, se obtienen las correspondientes curvas de citotoxicidad mediante el ensayo de viabilidad con MTT, método derivado del ensayo colorimétrico descrito por Mosmann en 1983.



Figura 3.15. Lector de placas ELISA

El procedimiento seguido, para la determinación de las curvas de citotoxicidad, fue el siguiente: tras 24h de la siembra, se les retiró el medio añadiendo medio fresco, en el que se incubaron las células con las siguientes concentraciones de los productos: 0, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300. Las células fueron incubadas con las distintas concentraciones de los productos durante 72h. A continuación se les retiró el medio de cultivo añadiendo medio fresco con un 50% PBS y MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL, incubándose durante 1 h en condiciones de esterilidad en un incubador humidificado y bajo una atmósfera del 5% en CO₂, por último, se retiró el medio y se solubilizó el formazán incorporado por las células en 100 µL de DMSO. Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas tipo ELISA (Merck ELISA System MIOS versión 3.2).

Los resultados se muestran como porcentaje de células vivas respecto al control. Estos valores se determinan como porcentaje de absorbancia respecto al valor de absorbancia control para cada concentración de compuesto en cada una de las líneas celulares, ya que los valores de absorbancia se encuentran en proporción directa con el número de células viables. Para todas las concentraciones se realizaron 4 réplicas.

a) Citometría de flujo

La citometría de flujo es uno de los métodos más específicos en el estudio integrado de los eventos morfológicos y moleculares ocurridos durante la muerte y proliferación celular. En teoría estos métodos muestran de forma simultánea información sobre la morfología, fenotipo, estatus de la cromatina y del DNA e incluso la expresión intracelular de proteínas, habiendo sido marcadas previamente con un fluoróforo, lo que hace posible determinar el mecanismo de muerte celular y la posición del ciclo celular en las que las

células se encuentran. Todo ello hace posible determinar la aparición de distintas poblaciones celulares, ya que la presencia de aneuploidía es frecuente en células cancerígenas.



Figura 3.16. Citómetro de flujo

La citometría de flujo es una herramienta de análisis que permite discriminar partículas de diferente tamaño y color. Esta técnica de análisis es utilizada de forma rutinaria en muchos laboratorios clínicos y de investigación para medir y cuantificar propiedades fenotípicas, bioquímicas y/o moleculares de células individualizadas mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas de uno o varios parámetros celulares.

La principal característica de la citometría es que puede ofrecer de forma muy rápida (entre 30 y 60 segundos por muestra) información simultánea de varios parámetros de cada una de las partículas adquiridas de forma aleatoria en la suspensión, con una muestra significativa (10000 partículas adquiridas por muestra analizada) y sin la posibilidad de que se produzca subjetividad introducida por el operador, como ocurría con la microscopía de fluorescencia, siendo analizadas, y mostrando la relación entre dichos parámetros. Los parámetros analizables por citometría de flujo son: i) los relacionados con las características físicas de la partícula: el tamaño y la complejidad y ii) las distintas fluorescencias asociadas a la partícula. El análisis se realiza a velocidades de miles de células/segundo, lo que permite obtener datos de elevada fiabilidad estadística, así como identificar poblaciones representadas en baja frecuencia dentro de la población global. Otra importante característica de la citometría de flujo es que el análisis se realiza en una suspensión de partículas individualizadas, por lo que las partículas o células objeto de análisis deben encontrarse en suspensión y en forma de partícula (célula) única. Mediante citometría se pueden resolver minúsculas diferencias en el tamaño celular, así como la detección de células apoptóticas basada en la aparición de hipodiploidía, que se traduce en la aparición de irregularidades en el número de eventos que se encuentran en fases sub G_0/G_1 del ciclo celular. Estas irregularidades también pueden suceder por la presencia de fragmentos nucleares, cromosomas simples, grupos de cromosomas, fragmentos celulares, contaminación bacteriana, etc. Por este motivo es preferible combinar simultáneamente este análisis con otros como el marcaje con anexina V-FICT, que se une específicamente a la fosfatidil-serina de la monocapa externa de la membrana plasmática. Finalmente, es

importante destacar que existe una restricción respecto al tamaño de las partículas objeto de análisis, ya que estas deben tener tamaños comprendidos entre las 0.5-100µm.

b) Análisis de apoptosis

Durante el proceso de apoptosis se producen una serie de cambios morfológicos que pueden ser detectados mediante citometría de flujo: Disminución del volumen celular como consecuencia de la pérdida de agua; plegamiento de la membrana plasmática “blebbing” o zeiosis, colapso del núcleo en una esfera densa, picnosis, fragmentación del núcleo, y por último fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos rodeados de membrana plasmática. Los cuerpos apoptóticos mantienen el gradiente osmótico y no vierten el contenido celular al medio, por tanto no provocan inflamación.

Aparte de los procesos anteriormente mencionados, durante el proceso de apoptosis ocurren cambios específicos en la superficie de la célula apoptótica como por ejemplo la exposición de proteínas con carbohidratos que mantienen el ácido siálico terminal (proteínas inmaduras), así como la alteración en la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática. La fosfatidilserina es expuesta en esta fase de la apoptosis en una proporción mayor a lo habitual en la monocapa externa de la membrana plasmática de célula apoptótica. La interacción de la fosfatidilserina en la superficie de estas células con los receptores de fosfatidilserina que se encuentran en los macrófagos, indican a estos últimos el inicio de la fagocitosis de la célula apoptótica. Esta exposición de fosfatidilserina es utilizada para la cuantificación, por citometría de flujo, del número de células apoptóticas, así como del grado de apoptosis que estas presentan. La fosfatidilserina interacciona de forma específica con la anexina, pudiendo cuantificarse el grado de apoptosis determinando la extensión del marcaje con anexina, pudiendo cuantificarse el grado de apoptosis determinando la extensión del marcaje con anexina, para ello se utilizó anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína, FITC. La apoptosis se detectó por citometría de flujo (FACS) mediante el ensayo de unión específica de la anexina V-FITC a la fosfatidilserina (Anexina V- FITC kit, Bender MedSystems, Vienna, Austria), combinado junto con el marcaje con IP. Utilizando este método puede distinguirse entre células con apoptosis temprana (anexina V positivas, IP negativas), apoptosis tardía (anexina V positivas, IP positivas) y necrosis (anexina V negativas, IP positivas).

c) Microscopia de fluorescencia

Durante el proceso de apoptosis tienen lugar una serie de cambios morfológicos que son englobados en las etapas finales de los procesos de apoptosis. Estos cambios incluyen la disminución del volumen celular como consecuencia de la pérdida de agua, agrupación de los orgánulos y de la cromatina nuclear, así como el plegamiento de la membrana plasmática que pasa a tener un aspecto vesiculado, fenómeno denominado *blebbing*. Por último, el núcleo se colapsa en una esfera densa (picnosis) que es fragmentada. A continuación, la célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos, rodeados de membrana

plasmática. La mayoría de estos cambios pueden ser visualizados mediante el uso de técnicas de microscopía.

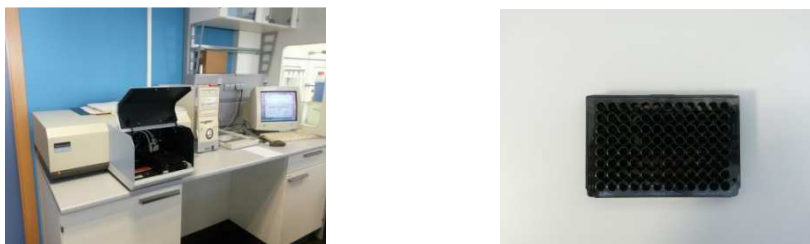


Figura 3.17. Fluorímetro

d) Tinción con anexina V- FITC / yoduro de propidio

La microscopía de fluorescencia permite visualizar como tienen lugar los cambios morfológicos a nivel de membrana y del núcleo celular durante el proceso de apoptosis. Se realizó un análisis de este proceso mediante la tinción con yoduro de propidio (IP) y anexina V- FITC. Tras incubar con anexina una alícuota de 2.500 células de cada línea celular, siendo fijadas con paraformaldéhidro al 4% en PBS durante unos 15 min. El ADN fue teñido con IP durante 3 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, las células fueron contabilizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

e) Análisis por Citometría de flujo del potencial membrana mitocondrial ROS

El estrés oxidativo fue estudiado por citometría de flujo de los niveles ROS, usando 123-dihidrorodamina oxidada al producto altamente fluorescente rodamina. La formación de rodamina se puede monitorizar por espectroscopía de fluorescencia usando ondas de excitación y emisión de 500 y 536 nm, respectivamente. Las medidas de especies reactivas oxigenadas fue realizado por determinación de la 123-rodamina por citometria. Al igual que en los ensayos de apoptosis, se colocan $11 \cdot 10^4$ de cada línea celular en placas de 12 pocillos y son tratadas con los productos que han presentado citotoxicidad tras 72 h, en las mismas concentraciones de IC_{50} y $IC_{50} \times 2$. Después del tratamiento, se retira el medio antiguo y se añade otro con DHR, con una concentración final de 5 $\mu\text{g/mL}$. Después de 30 min de incubación, se retira el medio y se lavan las células, resuspendiéndolas en PBS a 5 $\mu\text{g/mL}$. La intensidad de la fluorescencia de Rh123 y PI fue determinada usando un FACScanflow cytometer (fluorescence-activated cell sorter) (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

III.2.4. Ensayo de VIH

La actividad anti-VIH fue determinada usando VIH-proteasa de *E. coli* (PQITLWQRPL VTIKIGGQLK EALLDTGADD TVLEEMNLPG RWKPKMIGGI GGFIVRQYD QILIEICGHK AIGTVLVGPT PVNIIGRNLL TQIGCTLNF) de BioVendor GmbH (Heidelberg, Germany). La actividad proteolítica de la proteasa VIH-1 fue medida usando el FRET (fluorescence resonance energy transfer). Se utilizó como sustrato el péptido (Abz-Ala-Arg-Val-Nle-Tyr(NO₂)-Glu-Ala-Nle-NH₂) de Sigma (St. Louis, MO, USA) correspondiente al centro activo p-24-p17, que fue usado como sustrato. En el sustrato FRET HIV-1 PR, la fluorescencia es controlada por la rotura en dos fragmentos producida por la proteasa VIH-1, cuando se rompe el péptido y se separa de la enzima se produce la fluorescencia que es la que se mide.

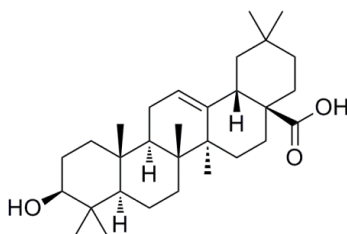
Para medir el porcentaje de inhibición se observó la disminución del porcentaje de la actividad fluorescente, y fue calculada según la siguiente fórmula:

% de inhibición = $[1 - (V_{inh}/V_0)] \cdot 100$ (V_{inh} = actividad enzimática en presencia de inhibidor; V_0 = actividad enzimática de control).

III.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

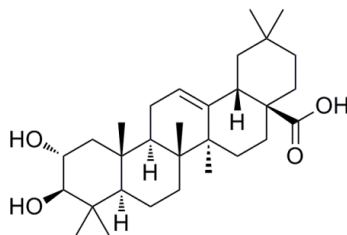
III.3.1. Aislamiento de los ácidos oleanólico y maslínico. Obtención de derivados inmediatos.

Los ácidos oleanólico (1) y maslínico (2) se aíslan de los desechos de molturación de la aceituna según el procedimiento que ha sido desarrollado por el Grupo de investigación de Biotransformaciones y Química Productos Naturales, encontrándose perfectamente detallado en sendas patentes nacional (P96061652) e internacional (W098/04331) titularizada por la Universidad de Granada. El alpeorujo industrial se introduce en cartuchos de papel de filtro y es extraído en un Soxhlet con hexano. Cuando se considera agotada la extracción con este disolvente, se hace una nueva extracción con acetato de etilo. Estos extractos se concentran hasta evaporación del disolvente, obteniéndose un residuo (120 g) con el que se prepara una mezcla con gel de sílice (50 g) que se coloca en cabeza de una columna de cromatografía y se procede a su separación cromatográfica con mezclas de DCM/acetona de polaridad creciente (40/1 hasta 2/1 en fracciones de 300 ml) recogiendo fracciones de 100 mL. El control de la separación cromatográfica se realiza mediante cromatografía en capa fina agrupando aquellas fracciones que presentan una composición similar, que se concentran y posteriormente se lleva a cabo la identificación de los productos de las mismas mediante el estudio de sus propiedades espectroscópicas. De forma que por cada 170 g de la mezcla (extracto + gel de sílice) se obtiene un 68.7% de ambos ácidos, 23.67 g de ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico, 19.7%) y 80.04 g de ácido 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (ácido maslínico, 66.7%).



Ácido oleanólico (1): Sólido blanco; pf 306-308 °C. $[\alpha]_D = 80$ (c 1, CHCl₃). IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹: 3438, 2930, 2869 y 1690; ¹H RMN (CDCl₃ o CD₃OD) δ 5.15 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 3.07 (dd, 1H, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, H-3), 2.71 (dd, 1H, $J_1 = 4.7$ Hz, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 1.01 (s, 3H, Me), 0.85 (s, 3H, Me), 0.80 (s, 3H, Me), 0.78 (s, 3H, Me), 0.78 (s, 3H, Me), 0.65 (s, 3H,

Me), 0.64 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 o CD_3OD) δ 184.5, 143.7, 122.6, 81.0, 55.3, 47.6, 46.6, 45.9, 41.6, 40.9, 39.3, 38.1, 37.7, 37.0, 33.8, 33.3, 32.5, 32.5, 30.7, 29.8, 28.3, 27.7, 25.9, 23.6, 23.4, 22.9, 18.2, 17.2, 16.7, 15.4; **HR-LSIMS** (m/z): 479.3504, ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 479.3501).

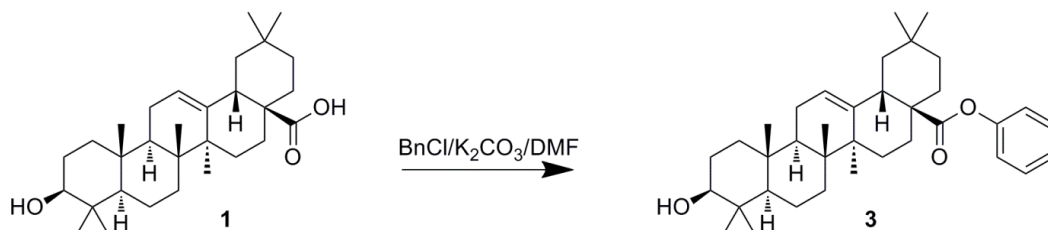


Ácido maslínico (2): Sólido blanco; **pf** 267-269 °C; $[\alpha]_D = 54$ (c 1, CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$: 3386, 2936, 2867, 1690; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 o CD_3OD) δ 5.16 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.45 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 9.1$ Hz, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 2.84 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-3), 2.71 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 0.93 (s, 3H, Me), 0.82 (s, 3H, Me), 0.77 (s, 3H, Me), 0.72 (s, 3H, Me), 0.69 (s, 3H, Me), 0.59 (s, 3H, Me), 0.58 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 o CD_3OD) δ 180.6, 143.7, 121.9, 83.2, 68.2, 55.1, 47.4, 46.1, 46.1, 45.7, 41.5, 41.0, 39.1, 39.0, 37.9, 33.6, 32.7, 32.4, 32.3, 30.4, 28.2, 27.4, 25.5, 23.2, 23.1, 22.7, 18.1, 16.5, 16.4, 16.1; **HR-LSIMS** (m/z): 495.3458, ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 495.3450).

III.3.2. Obtención de productos de partida

III.3.2.1. Bencilación del ácido oleanólico

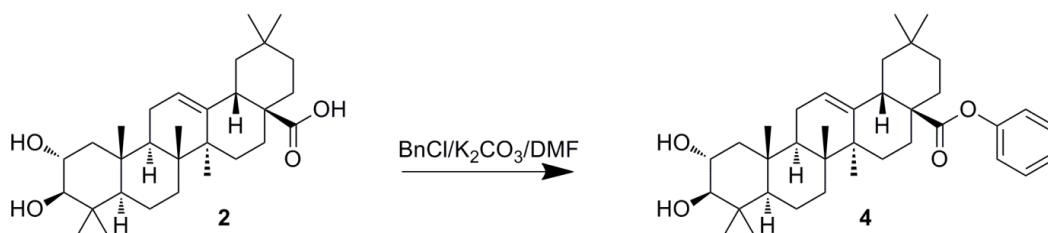
Se disuelven 912 mg (0.2 mol) de **AO** en 8 mL de DMF con 0.61 g de K_2CO_3 y se añaden 0.5 mL de BnCl. La reacción se deja en agitación durante 4 h a $55^\circ C$. se añade agua fría y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (**3**), (680 mg, 81%).



Bencil oleanato(3): Sólido blanco; pf 221-223 $^\circ$; $[\alpha]_D^{25}$ +64 (c 1, $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3371, 2940, 2891, 1668; 1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.48 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.00 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 3.98 (ddd, 1H, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 4.4$ y $J_3 = 4.4$ Hz, H-2), 3.10 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 3.1$ y $J_2 = 12.0$ Hz, H-18), 1.18 (s, 3H, Me), 1.10 (s, 3H, Me), 0.98 (s, 3H, Me), 0.98 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.60 (3 H, s, Me); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 177.6, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2, 128.1, 122.7, 79.2, 66.1, 55.5, 47.9, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 39.0, 38.7, 37.3, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.3, 27.9, 27.9, 26.1, 23.9, 23.6, 23.3, 18.6, 17.1, 15.8, 15.5; HR-LSIMS (m/z) 561.3937 ($C_{37}H_{53}O_4^+$ [M+1] calculado 561.3937).

III.3.2.2. Bencilación de ácido maslínico

Se disuelven 944 mg (0.2 mol) de **AM** en 8 mL de DMF con 0.61 g de K_2CO_3 y se añaden 0.5 mL de BnCl. La reacción se deja en agitación durante 4 h a $55^\circ C$. Se añade agua fría y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (**4**), (710 mg, 83%).

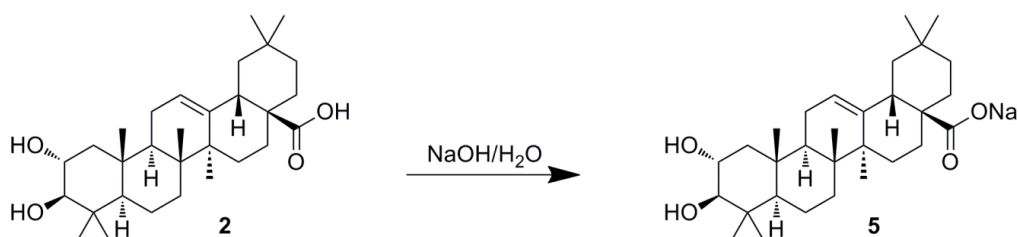


Bencil maslinato (4): Sólido blanco; *pf* 226-228°; $[\alpha]_D^{25} = 12$ (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3396, 2925, 2843, 1704; **¹H RMN** (CDCl₃) δ 7.48 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.21 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.97 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 3.59 (ddd, 1H, $J_1 = 9.1$ y $J_2 = 12.1$ Hz, H-2), 2.89 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-3), 2.82 (dd, 1H, $J_1 = 3.55$ y $J_2 = 12.2$ Hz, H-18), 1.03 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.85 (s, 3H, Me), 0.82 (s, 3H, Me), 0.80 (s, 3H, Me), 0.72 (s, 3H, Me), 0.50 (3 H, s, Me); **¹³C RMN** (CDCl₃) δ 177.0, 143.9, 136.5, 128.5, 128.1, 128.0, 122.5, 89.0, 69.2, 66.3, 55.6, 47.9, 46.8, 46.2, 46.0, 41.9, 41.5, 39.5, 39.2, 38.4, 34.0, 33.5, 32.9, 32.7, 30.9, 29.0, 28.7, 27.9, 24.0, 23.8, 23.3, 18.7, 17.3, 17.2, 16.9; **HR-LSIMS** (*m/z*) 585.3910, (C₃₇H₅₄O₄Na⁺ [M+Na] calculado 585.3920).

III.3.3. Obtención de derivados funcionales en C-28

III.3.3.1. Formación de la sódica de AM

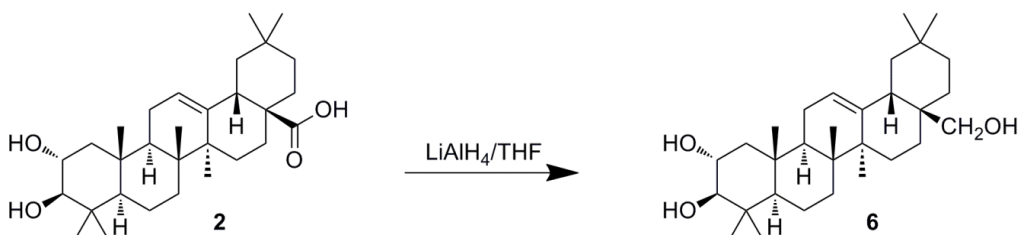
Se prepara una disolución de NaOH (263 mg, 6.5 mmol) en agua caliente (20 mL). Posteriormente se añade el **AM** (200 mg, 0.42 mmol) dejándolo en agitación magnética hasta su completa disolución. Para facilitar el proceso se añade una porción de una disolución saturada de NaCl al 4%. La mezcla obtenida es enfriada observándose la aparición de un precipitado, una vez obtenido el precipitado es filtrado y lavado con una disolución de NaCl y agua. Posteriormente se seca y se purifica en columna flash de silicagel usando como eluyentes DCM/acetona obteniéndose (**5**) (210 mg, 99%);



Maslinato sódico (5): Sólido blanco; pf 267-269°; $[\alpha]_D^{25}$ +54 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3396, 3001, 2843, 1710; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.03 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 3.59 (ddd, 1H, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$ y $J_3=11.2$ Hz, H-2), 2.87 (d, 1H, $J=9.1$ Hz, H-3), 2.73 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$ Hz, H-18), 1.04 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.88 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.83 (s, 3H, Me), 0.72 (s, 3H, Me), 0.69 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 181.6, 146.1, 119.6, 82.2, 67.1, 54.9, 47.4, 46.9, 46.9, 45.6, 41.7, 41.5, 38.9, 38.8, 37.7, 33.8, 33.1, 32.5, 32.5, 30.7, 28.8, 27.6, 25.7, 23.7, 23.4, 23.1, 18.2, 17.5, 17.2, 16.3; **HR-LSIMS (m/z)** 481.3655 (C₃₀H₅₀O₃Na⁺ [M+Na] calculado 481.3658).

III.3.3.2. Reducción de ácido maslínico con LiAlH₄

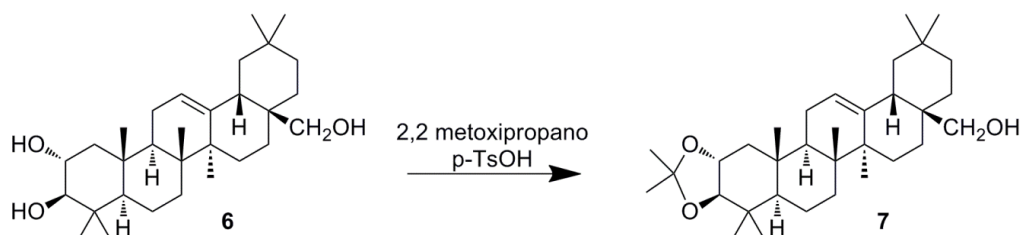
Se disuelve **AM** (1 g, 2,1mmol) en 30 mL de THF seco y se añade una disolución de LiAlH₄ (10 mL, 1M) en THF, manteniéndose la reacción a reflujo durante 2 horas y se deja evolucionar a temperatura ambiente durante 12 h, transcurrido el tiempo se agrega metanol para destruir el exceso de reactivo, se lava con agua, se extrae varias veces con DCM, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (**6**), (932mg, 93%).



2 α ,3 β ,28-Trihidroxiolean-12-eno (6): Sólido blanco; pf 142-144 °C. $[\alpha]_D = 16$ (c 1, CHCl₃). IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3389, 2946, 1461 y 1046 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃): δ 5.18 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 3.67 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz y $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.53 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, H-28a), 3.19 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, H-28b), 2.99 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$, H-18), 2.98 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3), 1.15 (s, 3H, Me), 1.02 (s, 3H, Me), 0.98 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.81 (s, 3H, Me); ¹³C RMN (CD₃OD) δ 144.3, 122.2, 83.9, 69.8, 69.0, 55.3, 47.6, 46.6, 46.5, 42.4, 41.8, 39.9, 39.3, 38.2, 37.0, 34.2, 33.3, 32.5, 31.1, 31.0, 28.7, 26.0, 25.6, 23.6, 23.6, 22.0, 18.4, 16.9, 16.9, 16.8; **HR-LSIMS (m/z)** 459.3842 (C₃₀H₅₁O₃⁺ [M+1] calculado 459.3838).

III.3.3.3. Formación del acetónido de 2 α -hidroxi-eritrodio

Se disuelve el producto (6) (250 mg, 0.55 mmol) en 2,2-dimetoxipropano (10 mL), se añade p-TsOH y se mantiene en agitación magnética a temperatura ambiente durante 12 h, transcurrido el tiempo se concentra a vacío y se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (7), (273 mg, 99%).

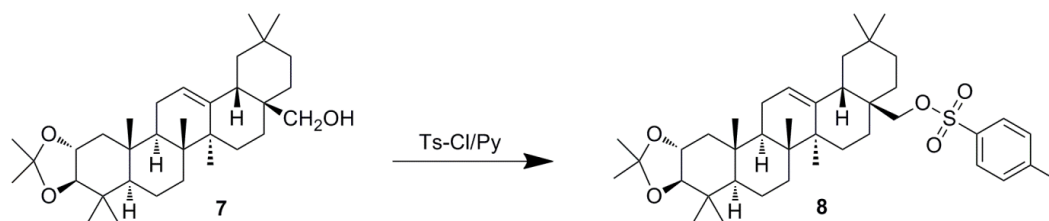


2,3-Acetónido de 2 α ,3 β ,28-trihidroxiolean-12-eno (7): Sólido blanco; pf 52-54°; $[\alpha]_D + 23$ (c 1, CHCl₃); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3359, 2967, 2899, 1680; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.17 (dd, 1H, $J_1=J_2= 3.5$ Hz, H-12), 3.66 (ddd, 1H, $J_1= 4.4$, $J_2= 9.1$ y $J_3= 11.2$ Hz, H-2), 3.52 (d, 1H, $J= 12.5$ Hz, H_A-28), 3.19 (d, 1H, $J= 12.5$ Hz, H_B-28), 3.01 (d, 1H, $J= 10.9$ Hz, H-3), 2.71 (dd, 1H, $J_1= 4.3$ y $J_2= 13.9$ Hz, 18-H), 1.40 (s, 3H, Me-acetonido), 1.38 (s, 3H, Me-acetonido), 1.14 (s, 3H, Me), 1.03 (s, 3H, Me), 1.01 (s, 3H, Me), 0.93 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.85 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 144.6, 122.3, 108.4, 88.9, 72.7, 69.9, 56.3, 48.1, 46.6, 42.5, 42.2, 42.0, 40.4, 40.2, 37.6, 37.2, 34.3, 33.4, 32.9, 31.3, 28.8, 27.4, 27.4, 27.1, 26.2, 25.8, 24.0, 23.8, 22.2, 18.0, 17.5, 17.3, 16.4; **HR-LSIMS (m/z)** 497.4077 (C₃₃H₅₄O₃⁺ [M+1] calculado 497.4073).

III.3.3.4. Tosilación de acetónido de 2 α -hidroxi-eritrodio

Se disuelve el producto (7) (500 mg, 0.8 mmol) en Py (5 mL) y se agrega cloruro de tosilo (300 mg), manteniéndose la reacción con agitación magnética a temperatura ambiente durante 12 h. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. A continuación se lava la fase orgánica con una disolución diluida de HCl y

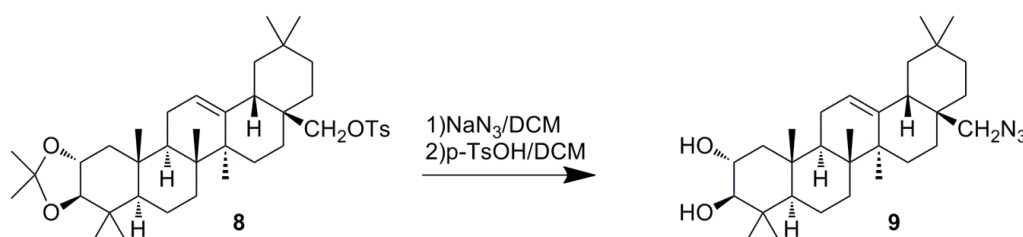
posteriormente con una disolución de NaHCO_3 hasta pH neutro, se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío y se obtiene (**8**), (653 mg, 98%);



2,3-Acetónido de 2 α ,3 β -dihidroxi-28-tosilolean-12-eno (8**):** Sólido blanco; pf 101-103°; $[\alpha]_D^{25} +27$ (c 1, CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3379, 2895, 2845, 1700; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.74 (d, 2H, $J=9.0$, H-grupo tosilo), 7.30 (d, 2H, $J=9.0$, H-grupo tosilo), 5.05 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, H-12), 3.87 (d, 1H, $J=12.5$ Hz, H_B-28), 3.66 (ddd, 1H, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$ y $J_3=11.2$ Hz, H-2), 3.50 (d, 1H, $J=12.5$ Hz, H_A-28), 3.00 (d, 1H, $J=10.9$ Hz, H-3), 2.71 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$ Hz, 18-H), 2.42 (s, 3H, Me-grupo tosilo), 1.39 (s, 3H, Me-acetonido), 1.38 (s, 3H, Me-acetonido), 1.08 (s, 3H, Me), 1.02 (3H, s, M), 0.97 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.84 (s, 3H, Me), 0.81 (3 H, s, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 144.7, 143.3, 133.3, 129.9, 128.2, 123.1, 108.4, 88.8, 76.9, 72.6, 56.2, 47.9, 46.3, 42.2, 42.2, 41.7, 40.2, 40.0, 37.5, 35.5, 34.0, 33.2, 32.7, 31.8, 31.0, 28.7, 27.4, 27.1, 26.2, 25.7, 23.9, 23.8, 22.9, 21.8, 17.9, 17.4, 16.8, 16.4; **HR-LSIMS** (m/z) 651.4157 ($\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_5\text{S}^+$ [M+1] calculado 651.4161).

III.3.3.5. Formación de azida a partir de grupo tosilato

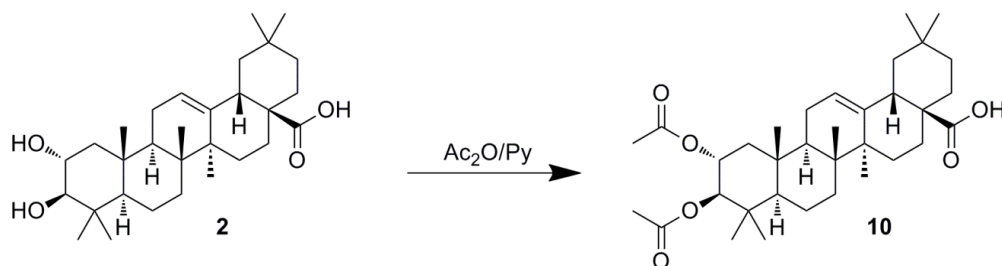
Se disuelve (**8**) (300 mg, 0.48 mmol) en DCM (10 mL) y se le añade NaN_3 (90 mg), manteniéndose la reacción con agitación magnética a temperatura ambiente durante 3 horas. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. A continuación se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Se redisuelve en DCM y se añaden 10 mg de p-TsOH. Se deja en agitación magnética durante 30 min y una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna de silicagel y se obtiene (**9**), (215 mg, 93%).



2 α ,3 β -Dihidroxi-28-azidoolean-12-eno (9): Sólido blanco; *pf* 89-91 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25}$ +62 (*c* 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); *IR* ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3392, 2950, 2883, 1664; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.19 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.80 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 9.0$ y $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 3.68 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H_B-28), 3.34 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H_A-28), 3.13 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H-3), 2.71 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ y $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 1.16 (s, 3H, Me), 1.03 (s, 3H, Me), 0.99 (s, 3H, Me), 0.95 (s, 3H, Me), 0.93 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.85 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 144.5, 122.4, 84.1, 69.9, 69.2, 55.5, 47.8, 46.8, 46.7, 42.6, 42.0, 40.1, 39.5, 38.4, 37.2, 34.3, 33.4, 32.7, 31.3, 29.5, 28.9, 26.2, 25.8, 25.8, 22.2, 22.2, 18.6, 17.8, 17.1, 17.0; **HR-LSIMS (*m/z*)** 482.3820 (C₃₀H₄₉O₂N₃⁺ [M+1] calculado 482.3825).

III.3.3.6. Acetilación de ácido maslínico

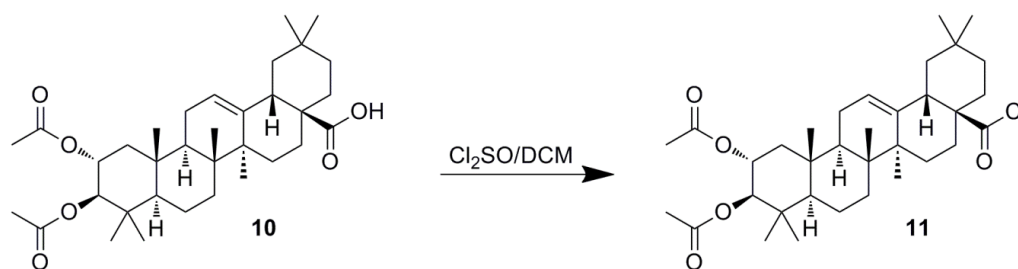
Se disuelve **AM** (1.2 g, 2.5 mmol) en 13 mL de Ac₂O-Py (1:2) y se mantuvo 1 h a reflujo, tras agitar durante 12 h a temperatura ambiente, cuando se considera finalizada la reacción, se añade agua fría y se extrae varias veces con DCM. A continuación se lava la fase orgánica con HCl y posteriormente con una disolución de NaHCO₃ hasta pH neutro, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (**10**), (924 mg, 70%).



Ácido 2 α ,3 β -diacetoxi-olean-12-en-28-oico (10): Sólido blanco; *pf* 220-222 $^{\circ}$ C; $[\alpha]_D^{25}$ 25 (*c* 1, CHCl₃); *IR* ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2945, 1741, 1695; ¹H RMN (CDCl₃) δ 5.24 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.08 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 4.72 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.03 (s, 3H, COCH₃) y 1.96 (s, 3H, COCH₃), 1.10 (s, 3H, Me), , 1.04 (s, 3H, Me), , 0.91 (s, 3H, Me), , 0.89 (s, 3H, Me), , 0.88 (s, 3H, Me), , 0.88 (s, 3H, Me), y 0.73 (s, 3H, Me); ; ¹³C RMN (CDCl₃) δ 184.3, 171.0, 170.8, 143.9, 122.4, 80.8, 70.2, 55.1, 51.1, 47.7, 46.7, 46.0, 44.1, 41.8, 39.6, 39.5, 38.4, 34.0, 33.1, 32.6, 32.6, 30.9, 28.5, 27.8, 25.9, 23.7, 23.6, 23.0, 21.3, 21.1, 18.4, 17.7, 17.2, 16.5; **HR-LSIMS (*m/z*)** 579.3649 (C₃₄H₅₂O₆Na⁺ [M+Na] calculado 579.3661).

III.3.3.7. Obtención del cloruro de diacetil-AM

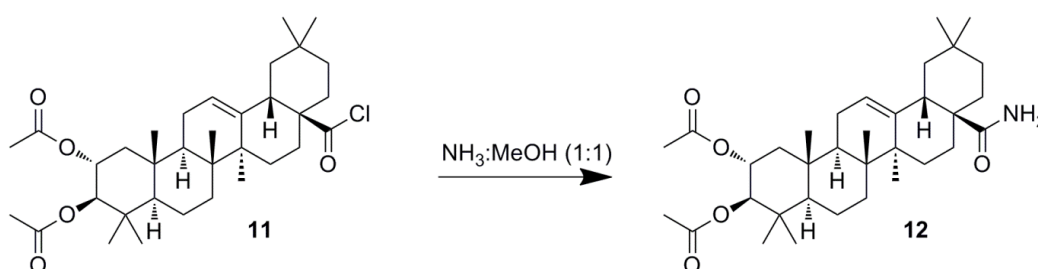
Se disuelven 500mg de (**10**) en 20 mL de DCM, se le añade 2 mL de Cl₂SO y se mantiene la reacción a reflujo durante 2 horas. Se extrae varias veces con DCM, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (**11**) (430 mg, 83%).



Cloruro de 2 α ,3 β -diacetoxiolean-12-en-28-oilo (11): Sólido marrón; pf 190–192 °C; $[\alpha]_D^{25} = 18$ (c 1, CHCl₃); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2945, 1740, 1250; ¹H RMN (CDCl₃) δ 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.08 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 10.7$ Hz, $J_3 = 10.7$ Hz, H-2), 4.72 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, H-3), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 1.95 (s, 3H, COCH₃), 1.12 (s, 3H, Me), 1.04 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.89 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.76 (s, 3H, Me); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 179.8, 170.9, 170.6, 142.2, 123.4, 80.6, 70.0, 57.5, 54.9, 47.5, 46.3, 43.9, 42.6, 41.7, 39.4, 39.4, 38.1, 33.8, 32.8, 32.4, 31.2, 30.6, 28.4, 27.4, 25.8, 24.0, 23.5, 23.5, 21.2, 21.0, 18.2, 17.7, 16.8, 16.5; HR-LSIMS (m/z) 597.3316 (C₃₄H₅₁O₅ClNa⁺ [M+Na] calculado 597.3323).

III.3.3.8. Formación de amida de AM a partir del cloruro de ácido

A una disolución de (11) (200 mg, 0,36 mmol) se añade una disolución NH₃:metanol (1:1) poco a poco hasta observar el cese del burbujeo. Se deja en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Se extrae varias veces con DCM, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose (12), (109 mg, 55%).

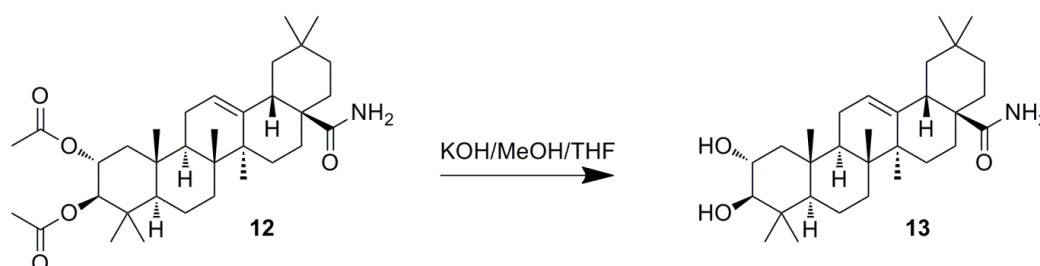


2 α ,3 β -Diacetoxi-28-carbamoilolean-12-eno (12): Sólido blanco; pf 267-269 °C; $[\alpha]_D^{25} = 54$ (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2929, 2360, 1741 y 1250; ¹H RMN (CDCl₃ o CD₃OD) δ 5.35 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 9.1$ Hz, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 4.76(d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-3), 2.53 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ Hz, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.07 (3H, s, CH₃-COO-), 1.99 (3H, s, CH₃-COO-), 1.18 (s, 3H, Me), 1.10 (s, 3H, Me), 1.07 (s, 3H, Me), 0.93 (s, 3H, Me), 0.91 (s, 3H, Me), 0.85 (s, 3H, Me), 0.84 (s, 3H, Me); ¹³C RMN (CDCl₃) δ 182.2, 171.0, 170.7, 145.0, 122.7, 80.2, 70.2, 55.0, 47.6, 46.8, 46.5, 44.1, 42.6, 42.2, 39.5, 39.5, 38.3,

34.2, 33.2, 32.6, 32.4, 30.9, 28.6, 27.4, 25.9, 23.9, 23.9, 23.5, 21.3, 21.1, 18.4, 17.8, 17.7, 17.1; **HR-LSIMS** (m/z) 556.3998 ($C_{34}H_{54}O_5N^+$ [M+1] calculado 556.4002).

III.3.3.9. Saponificación de la amida de AM

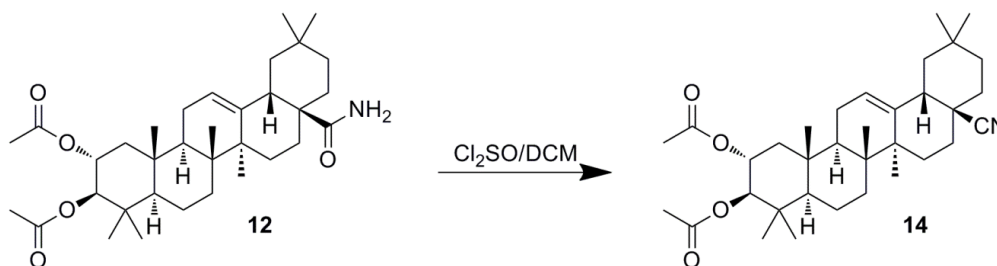
Se prepara una disolución de **12** (100 mg, 0.18 mmol) en THF anhidro (5 mL). Se le añade KOH/MeOH (1:10, 5 mL). La reacción se mantiene en agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. Tras este proceso se añade gota a gota una disolución diluida de HCl en agua hasta observar el cese del burbujeo. La mezcla se extrae varias veces con DCM. Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **13**, (76 mg, 90%).



2 α ,3 β -Dihidroxi-28-carbamoilolean-12-eno (13): Sólido blanco; pf 160-162°C; $[\alpha]_D = 60$ (c 1, $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3401, 2940, 2890, 1698; 1H RMN ($CDCl_3$ o CD_3OD) δ 5.90 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 3.71 (ddd, 1H, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$ y $J_3=11.2$, H-2), 3.03 (d, 1H, $J=9.1$, H-3), 2.56 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$, H-18), 1.20 (s, 3H, Me), 1.06 (s, 3H, Me), 1.02 (s, 3H, Me), 0.95 (s, 3H, Me), 0.95 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.86 (3 H, s, Me); ^{13}C RMN ($CDCl_3$) δ 181.5, 145.2, 122.9, 84.2, 69.1, 55.5, 47.8, 46.9, 46.7, 46.6, 42.8, 42.4, 39.5, 39.4, 38.5, 34.4, 33.2, 32.7, 32.6, 31.0, 28.8, 27.6, 26.0, 24.1, 23.8, 23.8, 18.6, 17.3, 17.0, 16.9; **HR-LSIMS** (m/z) 494.3592 ($C_{30}H_{49}O_3Na^+$ [M+Na] calculado 494.3610).

III.3.3.10. Formación de diacetil-28-ciano-AM a partir de la correspondiente amida

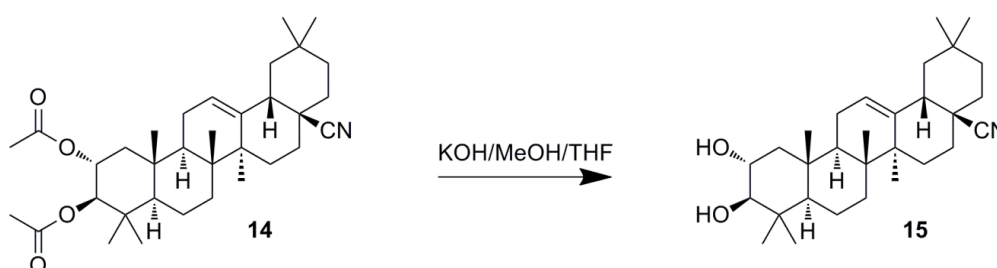
Se disuelve **12** (200 mg, 0,36 mmol) en 10 mL de DCM y se añade lentamente Cl_2SO (1,08 mmol), manteniéndose la reacción con agitación magnética a la temperatura ambiente durante 2,5 horas. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua fría y se extrae varias veces con DCM. Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **14**, (83 mg, 43%).



2 α ,3 β -Diacetoxi-28-cianoolean-12-eno (14): Sólido blanco; **pf** 144-146 $^{\circ}$; **[α]_D** +34 (*c* 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); **IR** ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2929, 2360, 1741, 1250; **¹H NMR** (CDCl₃) δ 5.34 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 5.07 (ddd, 1H, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$ y $J_3=11.2$, H-2), 4.73 (d, 1H, $J=9.1$, H-3), 2.56 (dd, 1H, $J_1=4.3$, $J_2=13.9$, H-18), 2.03 (s, 3H, CH₃-COO-), 1.95 (s, 3H, CH₃-COO-), 1.23 (s, 3H, Me), 1.11 (s, 3H, Me), 1.07 (s, 3H, Me), 1.01 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.89 (3 H, s, Me); **¹³C NMR** (CDCl₃) δ 171.1, 170.7, 141.9, 125.7, 124.5, 80.8, 70.2, 55.1, 47.7, 46.8, 44.2, 44.1, 42.6, 39.7, 39.6, 38.4, 38.2, 34.2, 33.2, 32.6, 32.4, 30.8, 28.7, 28.2, 25.7, 24.2, 23.8, 23.6, 21.3, 21.1, 18.4, 17.9, 17.4, 16.7; **HR-LSIMS** (*m/z*) 560.3710 (C₃₄H₅₁O₄NNa⁺ [M+Na] calculado 560.3716).

III.3.3.11. Saponificación de diacetil-28-ciano-AM.

Se prepara una disolución de **14** (100 mg, 0.18 mmol) en THF anhidro (5 mL). Se le añade KOH/MeOH (1:10, 5 mL). La reacción se mantiene en agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente. Tras este proceso se añade gota a gota una disolución diluida de HCl en agua hasta observar el cese del burbujeo. La mezcla se extrae varias veces con DCM. Se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **15**, (77 mg, 90%).

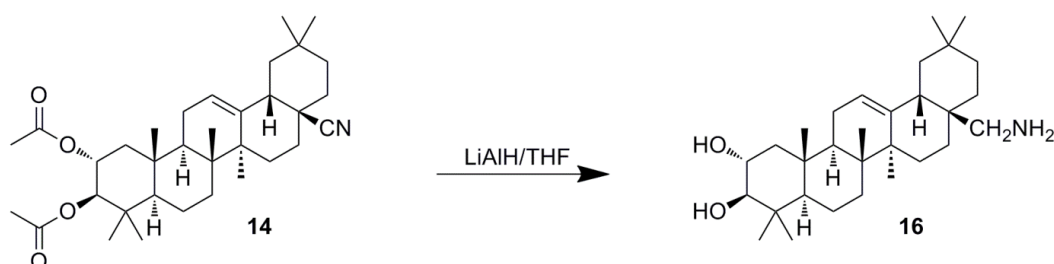


2 α ,3 β -Dihidroxi-28-cianoolean-12-eno (15): Sólido blanco; **pf** 105-107 $^{\circ}$; **[α]_D** +40 (*c* 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); **IR** ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2955, 2383, 1755, 1270; **¹H NMR** (CDCl₃) δ 5.35 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 3.69 (ddd, 1H, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$, $J_3=11.2$, H-2), 2.99 (d, 1H, $J=9.1$, H-3), 2.56 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$, H-18), 1.12 (s, 3H, Me), 1.02 (s, 3H, Me), 1.01 (s, 3H, Me), 1.00 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.89 (s, 3H, Me), 0.82 (s, 3H, Me); **¹³C NMR** (CDCl₃) δ 141.9, 125.8, 124.68, 84.1, 69.1, 55.5, 47.8, 46.7, 45.0, 44.1, 42.1, 39.8, 39.4, 38.5, 38.2,

33.2, 33.1, 33.1, 32.6, 30.8, 28.9, 28.2, 25.8, 24.3, 23.8, 23.7, 18.6, 17.5, 17.0, 16.9, **HR-LSIMS** (m/z) 476.3513 ($C_{30}H_{47}O_2NNa^+$ [$M+Na$] calculado 476.3504).

III.3.3.12. Formación de diacetil-28-amino-AM

Se disuelve **14** (100 mg, 0.18 mmol) en 5 mL de THF seco y se añade una disolución de $LiAlH_4$ (1 mL, 1M) en THF, manteniéndose la reacción a reflujo durante 2 h y se deja evolucionar a temperatura ambiente durante 12 h, transcurrido el tiempo se agrega metanol para destruir el exceso de reactivo, se lava con agua, se extrae varias veces con DCM, se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel, obteniéndose (**16**), (66 mg, 80%).

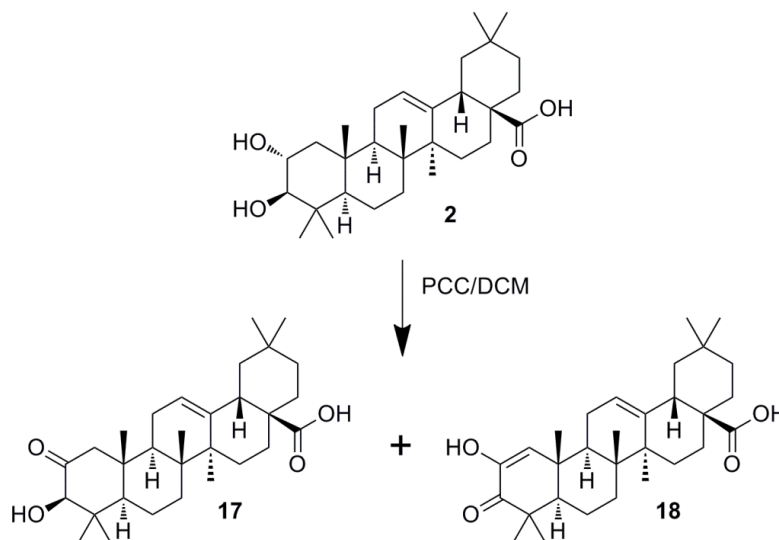


2 α ,3 β -Dihidroxi-28-aminoolean-12-eno (16): Sólido blanco; pf 135-137 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25} +63$ (c 1, $CHCl_3:MeOH$, 2:1); **IR** $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 2933, 2342, 1761, 1245; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 5.22 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, H-12), 3.71 (ddd, 1H, $J_1=4.4$, $J_2=9.1$ y $J_3=11.2$ Hz, H-2), 3.57 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, H_B-28), 3.23 (d, 1H, $J=12.0$ Hz, H_A-28), 3.03 (d, 1H, $J=9.1$ Hz, H-3), 2.58 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$ Hz, H-18), 1.19 (s, 3H, Me), 1.06 (s, 3H, Me), 1.03 (s, 3H, Me), 0.96 (s, 3H, Me), 0.91 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.85 (3 H, s, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 144.5, 122.4, 84.1, 69.9, 69.8, 55.5, 47.8, 46.7, 46.7, 42.6, 42.0, 40.1, 39.4, 38.4, 37.2, 34.3, 33.4, 32.7, 31.3, 29.5, 28.8, 25.7, 23.8, 23.8, 23.8, 22.2, 18.6, 17.1, 17.0, 17.0; **HR-LSIMS** (m/z) 456.3913 ($C_{30}H_{51}O_2N^+$ [$M+1$] calculado 456.3920).

III.3.4. Síntesis de derivados funcionales en el anillo A

III.3.4.1. Oxidación de AM con PCC

Se prepara una disolución de **AM** (200 mg, 0.42 mmol) en DCM (10 mL). A esta disolución se le añade PCC (90 mg, 5.4 mmol) y se mantiene en agitación magnética durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se lava con una disolución de hexano/dietileter (1:1) con Na₂SO₄. El disolvente se concentra a vacío y, por último, se purifica en columna flash de silicagel, obteniéndose **17** (67 mg, 40%) y **18** (67 mg, 40%).

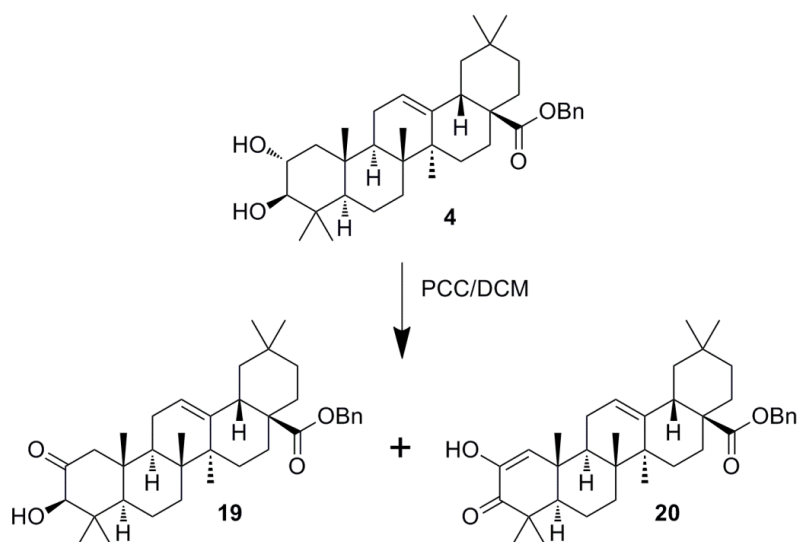


Ácido 3β-hidroxi-2-oxoolean-12-en-28-oico (17): Sólido blanco; pf 164-166°; [α]_D +85 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3400, 2953, 2868, 1639; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.32 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$, H-12), 3.92 (s, 1H, H-3), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ y $J_2 = 13.9$, H-18), 1.22 (s, 3H, Me), 1.22 (s, 3H, Me), 0.96 (s, 3H, Me), 0.94 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.78 (s, 3H, Me), 0.71 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 211.2, 183.3, 144.1, 122.1, 83.1, 54.7, 53.3, 47.9, 46.7, 46.1, 46.0, 44.0, 42.0, 41.2, 40.0, 34.0, 33.3, 32.6, 32.6, 30.9, 29.6, 27.6, 26.1, 23.8, 23.6, 23.1, 18.7, 16.9, 16.8, 16.4; **HR-LSIMS (m/z)** 469.3390 (C₃₀H₄₆O₄⁺ [M+1] calculado 469.3396).

Ácido 2-hidroxi-3-oxoolean-1,12-dien-28-oico (18): Sólido blanco; pf 173-175°; [α]_D +85 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3359, 2971, 2829, 1698; ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.31 (s, 1H, H-1), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$, H-12), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$ y $J_2 = 13.9$, H-18), 1.19 (s, 3H, Me), 1.18 (s, 3H, Me), 1.10 (s, 3H, Me), 1.05 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.79 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 201.3, 184.4, 144.1, 144.0, 128.5, 122.3, 54.1, 46.8, 45.9, 44.1, 43.3, 42.2, 41.3, 40.2, 38.7, 34.0, 33.3, 32.6, 32.6, 30.9, 27.8, 27.4, 26.1, 23.8, 23.6, 23.0, 22.0, 19.9, 18.9, 17.7; **HR-LSIMS (m/z)** 469.3307 (C₃₀H₄₅O₄⁺ [M+1] calculado 469.3318).

III.3.4.2. Oxidación de AM-Bn con PCC

Se prepara una disolución de **AM-Bn** (200 mg, 0.34 mmol) en DCM (10 mL). A esta disolución se le añade PCC (90 mg, 5.4 mmol) y se mantiene en agitación magnética durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se lava con una disolución de hexano/dietileter (1:1) con Na₂SO₄. El disolvente se concentra a vacío y, por último, se purifica en columna flash de silicagel, obteniéndose **19** (77 mg, 40%), **20** (77 mg, 40%).

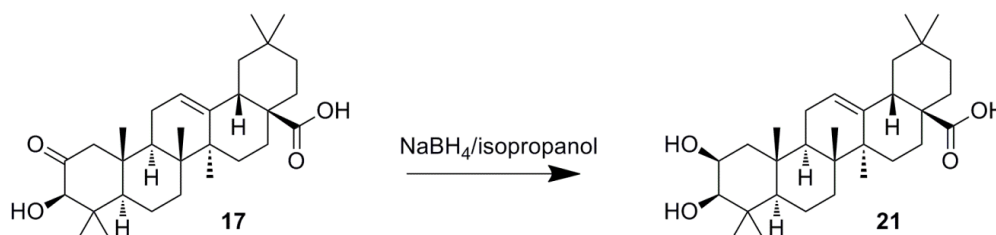


Bencil 3β-hidroxi-2-oxoolean-12-en-28-oato (19): Sólido blanco; pf 107-109°; [α]_D +52 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3366, 2963, 2832, 1720; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.48 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.21 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 5.21 (sistema AB, 2H, $J=12.0$, metileno bencilo), 4.04 (s, 1H, 3-H), 3.09 (dd, 1H, $J_1=3.1$, $J_2=12.2$, 18-H), 1.10 (s, 3H, Me), 1.09 (s, 3H, Me), 0.84 (s, 3H, Me), 0.82 (s, 3H, Me), 0.76 (s, 3H, Me), 0.61 (s, 3H, Me), 0.50 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 211.2, 177.5, 144.1, 136.6, 128.6, 128.2, 128.2, 121.9, 83.1, 66.2, 54.7, 53.3, 47.8, 46.9, 46.1, 45.9, 43.9, 42.0, 41.6, 39.9, 34.1, 33.3, 32.6, 32.5, 30.9, 29.6, 27.8, 26.0, 23.8, 23.6, 23.2, 18.7, 16.8, 16.7, 16.4; HR-LSIMS (m/z) 561.3943 (C₃₇H₅₃O₄⁺ [M+1] calculado 561.3944).

Bencil 2-hidroxi-3-oxoolean-1,12-dien-28-oato (20): Sólido blanco; pf 199-201°; [α]_D +47 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR v_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3391, 2925, 2897, 1700; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.38 (m, 5H, aromáticos bencilo), 6.24 (s, 1H, H-1), 5.25 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 5.10 (sistema AB, 2H, $J=12.0$, metileno bencilo), 2.94 (dd, 1H, $J_1=3.1$ y $J_2=15.0$, H-18), 1.12 (s, 3H, Me), 1.10 (s, 3H, Me), 1.03 (s, 3H, Me), 1.02 (s, 3H, Me), 0.84 (s, 3H, Me), 0.81 (s, 3H, Me), 0.57 (3H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 201.3, 177.6, 144.3, 143.9, 136.6, 128.6, 128.5, 128.2, 128.2, 122.3, 66.3, 54.1, 47.0, 46.0, 44.1, 43.3, 42.3, 41.7, 40.2, 34.2, 33.6, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 27.9, 27.8, 26.0, 23.8, 23.7, 23.3, 22.0, 19.8, 18.9, 17.5; HR-LSIMS (m/z) 559.3765 (C₃₇H₅₁O₄⁺ [M+1] calculado 559.3787).

III.3.4.3. Reducción de 3-oxo-AM con NaBH₄

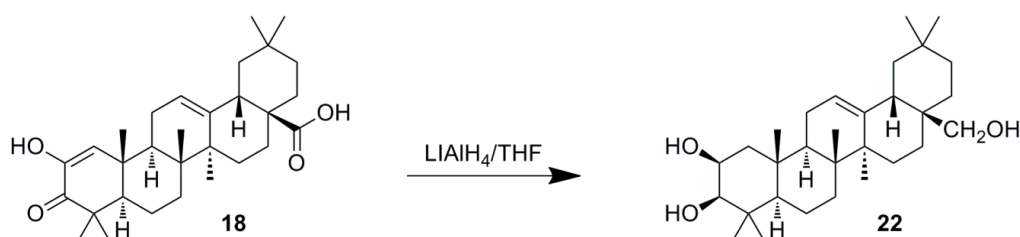
Se disuelven 100 mg de **17** (0.21 mmol) en 5 mL de isopropanol y se añaden NaBH₄ (40 mg, 0.1 mmol), manteniéndose la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras este proceso se añade metanol para eliminar el exceso de reactivo y se concentra a presión reducida, se lava con agua, se extrae con DCM. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **21**, (95mg, 95%).



Ácido 2 β ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (21): Sólido blanco; *pf* 265-267^o; [α]_D +83 (*c* 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3380, 2912, 2890, 1676; ¹H NMR (CD₃OD) δ 5.19 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$, H-12), 4.08 (ddd, 1H, $J_1=J_2=3.1$ y $J_3=4.4$, H-2), 3.11 (d, 1H, $J=3.1$, H-3), 2.99 (dd, 1H, $J_1=4.3$ y $J_2=13.9$, H-18), 1.19 (s, 3H, Me), 1.04 (s, 3H, Me), 0.99 (s, 3H, Me), 0.94 (s, 3H, Me), 0.76 (s, 3H, Me), 0.69 (s, 3H, Me), 0.62 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 180.6, 145.3, 123.1, 78.8, 71.9, 56.4, 48.7, 46.6, 46.5, 45.0, 42.8, 42.2, 40.4, 39.2, 37.8, 34.4, 33.7, 33.5, 33.4, 30.7, 30.4, 28.7, 26.4, 24.1, 23.9, 23.2, 18.8, 18.3, 17.6, 16.8; HR-LSIMS (*m/z*) 495.3455 (C₃₀H₄₈O₄Na⁺ [M+Na] calculado 495.3450).

III.3.4.4. Reducción de 18 con LiAlH₄

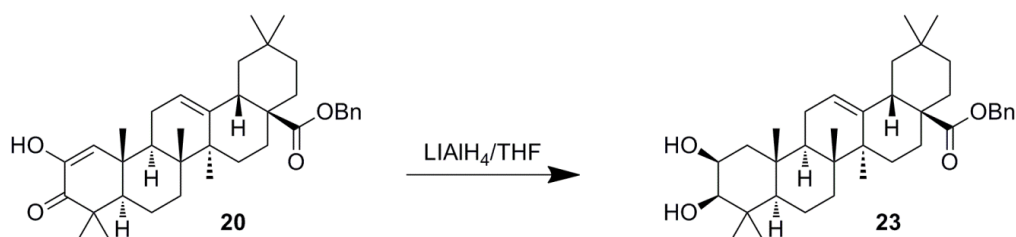
Se disuelve el producto **18** (100 mg, 0.21 mmol) en THF seco (10 mL) y se añade 1 mL de disolución 1 M de LiAlH₄ (1 mL, 1M) en THF, manteniéndose la reacción a reflujo durante 2 horas y se deja evolucionar durante 12 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agrega metanol para destruir el exceso de reactivo, se lava con agua y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **22**, (93mg, 93%).



2 β ,3 β ,28-Trihidroxiolean-12-eno (22): Sólido blanco; pf 158-160 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25}$ +84 (*c* 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3374, 2940, 1459, 1039; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.19 (dd, 1H, *J* 3.5, 3.5, 12-H), 4.08 (ddd, 1H, *J*₁=4.4, *J*₂=*J*₃= 6.0, H-2), 3.53 (d, 1H, *J*= 9.1, H_B-28), 3.20 (d, 1H, *J*= 9.1, H_A-28), 3.20 (d, 1H, *J*= 6.0, H-3), 2.99 (dd, 1H, *J*₁=4.3 y *J*₂=13.9, H-18), 1.23 (s, 3H, Me), 1.14 (s, 3H, Me), 1.00 (s, 3H, Me), 0.99 (s, 3H, Me), 0.94 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.85 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 144.4, 122.6, 78.7, 71.6, 70.2, 55.6, 48.5, 46.9, 44.7, 42.8, 42.1, 40.1, 38.3, 37.2, 36.9, 34.6, 33.0, 32.8, 31.2, 30.2, 29.9, 26.5, 26.0, 24.1, 24.1, 22.5, 18.6, 17.8, 17.2, 17.0; HR-LSIMS (*m/z*) 459.3842 (C₃₀H₅₁O₃⁺ [M+1] calculado 459.3838).

III.3.4.5. Reducción de 20 con LiAlH₄

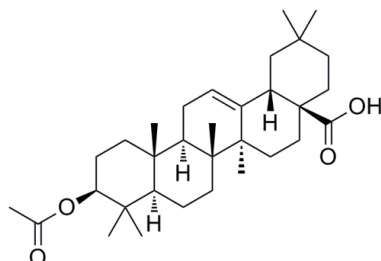
Se disuelven **20** (100 mg, 0.18 mmol) en THF seco (10 mL) y se añade una disolución de LiAlH₄ (1 mL, 1M) en THF, manteniéndose la reacción a reflujo durante 2 horas y se deja evolucionar durante 12 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agrega metanol para destruir el exceso de reactivo, se lava con agua y se extrae varias veces con DCM. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **23**, (90mg, 91%).



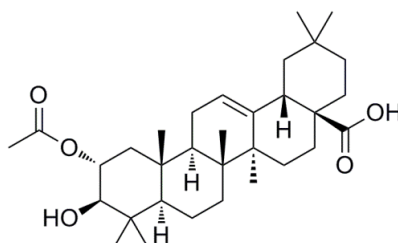
Bencil 2 β ,3 β ,dihidroxiolean-12-en-28-oato (23): Sólido blanco; pf 221-223 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25}$ +64 (*c* 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3371, 2940, 2891, 1668; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.48 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.28 (dd, 1H, *J*₁=*J*₂= 3.5, 12-H), 5.00 (sistema AB, 2H, *J* =12.0, metileno bencilo), 3.98 (ddd, 1H, *J*₁=3.0, *J*₂=*J*₃= 4.4, H-2), 3.10 (d, 1H, *J*= 3.0, H-3), 2.83 (dd, 1H, *J*₁=3.1 y *J*₂=12.0, H-18), 1.18 (s, 3H, Me), 1.10 (s, 3H, Me), 0.98 (s, 3H, Me), 0.98 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.87 (s, 3H, Me), 0.60 (3 H, s, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.7, 143.9, 136.6, 128.6, 128.2, 128.1, 122.8, 78.7, 71.3, 66.2, 55.4, 48.3, 47.0, 46.1, 44.3, 42.1, 41.6, 39.6, 38.3, 36.9, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 29.9, 27.7, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.3, 17.5, 17.1, 16.5; HR-LSIMS (*m/z*) 561.3937 (C₃₇H₅₃O₄⁺ [M+1] calculado 561.3937).

III.3.5. Pruebas de acetilación en fase líquida

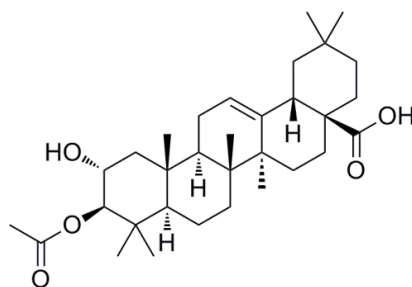
Para comprobar la acetilación en fase disolución se prepara la reacción bajo distintas condiciones, variando el tiempo y la temperatura (Tab. 2.16 y Tab. 2.17). Para la acetilación se utiliza anhídrido acético en piridina según el método general de acilación. Las distintas mezclas obtenidas son estudiadas por HPLC (Tab. 2.16 y Tab. 2.17), utilizando el método general.



Ácido 3β-acetoxiolean-12-en-28-oico (24): Sólido blanco; pf 260-262 °C; $[\alpha]_D^{25}$ 74 (c 1, CHCl₃); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2940, 2857, 1735 y 1694; $^1\text{H RMN}$ (CDCl₃) δ 5.25 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 8.2$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.03 (s, 3H, COCH₃), 1.10 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.90 (s, 3H, Me), 0.88 (s, 3H, Me), 0.86 (s, 3H, Me), 0.83 (s, 3H, Me), 0.72 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl₃) δ 184.5, 143.7, 122.6, 81.0, 55.3, 47.6, 46.6, 45.9, 41.6, 40.9, 39.3, 38.1, 37.7, 37.0, 33.8, 33.3, 32.5, 32.5, 30.7, 29.8, 28.3, 27.7, 25.9, 23.6, 23.4, 22.9, 18.2, 17.2, 16.7, 15.4; **HR-LSIMS** (m/z) 521.3609 (C₃₂H₅₀O₄Na⁺ [M+Na] calculado 521.3607).



Ácido 2α-acetoxi-3β-hidroxiolean-12-en-28-oico (25): Sólido blanco; pf 190-192 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +1.4° (CHCl₃, c 1); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 2940, 1724, 1695; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ 5.25 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 9.1$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 3.18 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H-3), 2.82 (dd, 1H, $J_1 = 13.3$, $J_2 = 3.4$, H-18), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 1.11 (s, 3H, Me), 1.03 (s, 3H, Me), 1.01 (s, 3H, Me), 0.91 (s, 3H, Me), 0.89 (s, 3H, Me), 0.83 (s, 3H, Me), 0.72 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃) δ 183.8, 171.9, 143.9, 122.5, 81.1, 73.5, 55.4, 47.8, 46.7, 46.1, 43.9, 41.8, 41.1, 40.0, 39.5, 38.6, 34.0, 33.5, 32.7, 32.6, 30.9, 28.9, 27.8, 26.3, 24.0, 23.7, 23.1, 21.6, 18.4, 17.4, 17.0, 16.0; **HR-LSIMS** (m/z) 537.3580 (C₃₂H₅₀O₅Na⁺ [M + Na] calculado 537.3556).

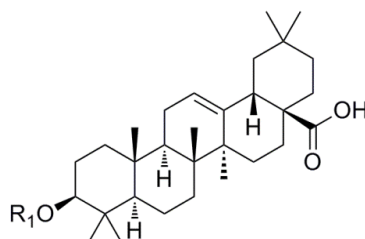


Ácido 3β-acetoxi-2α-hidroxiolean-12-en-28-oico (26): Sólido blanco; pf 190-192 °C; $[\alpha]_D^{25} +1.4^\circ$ (CHCl₃, c 1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2940, 1724, 1695; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.25 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 4.72 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 3.45 (1H, ddd, $J_1 = 4.4$ Hz, $J_2 = 9.1$ Hz, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 2.82 (dd, 1H, $J=13.3$, $J_2=3.4$, H-18), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 1.11 (s, 3H, Me), 1.03 (s, 3H, Me), 1.01 (s, 3H, Me), 0.91 (s, 3H, Me), 0.89 (s, 3H, Me), 0.83 (s, 3H, Me), 0.72 (s, 3H, Me); ¹³C NMR δ 182.9, 172.6, 143.9, 122.5, 85.1, 67.1, 55.4, 48.0, 47.8, 46.7, 46.0, 41.9, 41.1, 39.6, 39.6, 38.5, 34.1, 33.4, 32.6, 32.6, 30.9, 29.7, 28.7, 27.8, 26.2, 23.6, 23.1, 21.3, 18.4, 17.1, 17.0, 16.2; HR-LSIMS (m/z) 537.35800 (C₃₂H₅₀O₅Na⁺ [M + Na] calculado 537.35559).

III.3.6. Método general de acilación

Se prepara una disolución de los productos a acilar (100 mg) en piridina (2 mL). Se añaden los distintos anhídridos (Fig. 3.18-3.21) en una relación molar 4:1 (anhídrido:grupo hidroxilo). La reacción se mantiene en agitación magnética durante 24 h a temperatura ambiente. Se añade agua fría a la mezcla y se extrae varias veces con DCM, se seca la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose los distintos productos acilados de **AO** y **AO-Bn** (Fig. 3.18 y 3.19), así como aquellos pertenecientes a **AM** y **AM-Bn** (Fig. 3.20 y 3.21)

III.3.6.1. Derivados acilados de AO y AO-Bn



Sustrato	Anhídrido (R ₁)	mg/mL	Producto obtenido	%	mg obtenidos
AO	Propanoico	0.2 mL	27	83	89
	Butanoico	0.2 mL	28	87	96
	Hexanoico	0.25 mL	29	90	104
	Laurico	325 mg	30	73	97
	Benzoico	0.25 mL	31	69	81
	Ftálico	125 mg	32	93	123
	Succínico	90 mg	33	47	57
	Glutárico	100 mg	34	59	73
	3,3-dimetilglutárico	100 mg	35	62	81

Figura 3.18. Reactivos y productos acilados obtenidos de **AO**

Ácido 3β-propanoiolean-12-en-28-oico (27): Sólido blanco; pf 245–247 °C; [α]_D + 71 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ 3388, 3015, 2829, 1720; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.26 (dd, 1H, J₁ = J₂ = 3.5 Hz, H-12), 4.48 (dd, 1H, J₁ = 5.5, J₂ = 10.5 Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, J₁ = 4.3, J₂ = 13.9 Hz, H-18), 2.30 (q, 2H, J = 6.5 Hz, grupo propanoilo), 1.11, 0.92, 0.91, 0.88, 0.84, 0.83, 0.73 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 183.8, 174.5, 143.8, 122.8, 80.9, 55.5, 47.8, 46.8, 46.1, 41.8, 41.2, 39.5, 38.3 (2C), 37.2, 34.0, 33.3, 32.8, 32.7, 30.9, 29.9, 28.8, 28.3, 27.9, 26.1, 23.8 (2C), 23.1, 18.4, 17.3, 16.9, 15.6, 9.6; ESI-HRMS (m/z) 513.3948 (C₃₃H₅₃O₄⁺ [M+1] calculado 513.3944).

Ácido 3β-butanoiolean-12-en-28-oico (28): Sólido blanco; pf 215–217 °C; [α]_D + 79 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max}(KBr)/cm⁻¹ 3379, 2989, 2815, 1699; ¹H NMR (CDCl₃) δ

5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.30 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, grupo butanoilo), 1.11, 0.92, 0.91, 0.88, 0.84, 0.83, 0.73 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.0, 173.7, 143.8, 122.8, 80.8, 55.5, 47.8, 46.8, 46.1, 41.8, 41.2, 39.5, 38.3 (2C), 37.2, 37.0, 34.0, 33.3, 32.8, 32.7, 30.9, 29.9, 28.3, 27.9, 26.1, 23.8, 23.6, 23.1, 18.9, 18.4, 17.3, 16.9, 16.5, 13.9; **ESI-HRMS** (m/z) 527.4101 ($\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{O}_4^+$ [M+1] calculado 527.4100).

Ácido 3 β -hexanoiloxiolean-12-en-28-oico (29): Sólido blanco; **pf** 159–161; $[\alpha]_{\text{D}}$ + 69 (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3383, 2979, 2832, 1679; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.27 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, grupo hexanoilo), 1.11, 0.92, 0.91, 0.89, 0.84, 0.83, 0.74 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 183.8, 173.9, 143.8, 122.8, 80.8, 55.6, 47.8, 46.8, 46.1, 41.9, 41.3, 39.6, 38.3, 37.9, 37.2, 35.1, 34.1, 33.3, 32.8, 32.7, 31.6, 30.9, 29.9, 28.3, 27.9, 26.1, 25.1, 23.8, 23.7, 23.2, 22.5, 18.4, 17.3, 17.0, 15.6, 14.1; **ESI-HRMS** (m/z) 555.4421 ($\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_4^+$ [M+1] calculado 555.4413).

Ácido 3 β -lauroiloxiolean-12-en-28-oico (30): Sólido blanco; $[\alpha]_{\text{D}}$ + 37 (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3379, 2963, 2840, 1681; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.80 (dd, 1H, $J_1 = 5.4$, $J_2 = 10.4$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, grupo lauroilo), 1.11, 0.92, 0.91, 0.89, 0.86, 0.84, 0.83 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 183.2, 174.0, 143.8, 122.8, 80.8, 55.6, 47.8, 46.8, 46.1, 41.9, 41.3, 39.6, 38.3, 38.0, 37.9, 35.1, 34.0, 33.3, 32.8, 32.7, 32.2, 30.9, 29.8 (4C), 29.7, 29.5, 28.3, 27.9, 26.2, 25.4, 23.7 (2C), 23.6, 23.2, 22.9, 18.4, 17.3, 17.0, 15.6, 14.3; **ESI-HRMS** (m/z) 639.5352 ($\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{O}_4^+$ [M+1] calculado 639.5361).

Ácido 3 β -benzoiloxiolean-12-en-28-oico (31): Sólido blanco; **pf** 153–155 °C; $[\alpha]_{\text{D}}$ + 36 (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3390, 3001, 2840, 1689; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.42 (m, 5H, grupo benzoilo), 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.70 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 1.14, 1.00, 0.98, 0.93, 0.90, 0.83, 0.77 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 183.1, 166.5, 143.8, 132.9 (2C), 131.2 (2C), 129.8, 128.5, 122.8, 81.8, 55.6, 47.8, 46.8, 46.1, 41.9, 41.3, 39.6, 38.4 (2C), 37.3, 34.1, 32.9, 32.7 (2C), 30.9, 29.9, 28.5, 27.9, 26.2, 23.8, 23.7, 23.2, 18.5, 17.3, 17.2, 15.7; **ESI-HRMS** (m/z) 561.3944 ($\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{O}_4^+$ [M+1] calculado 561.3937).

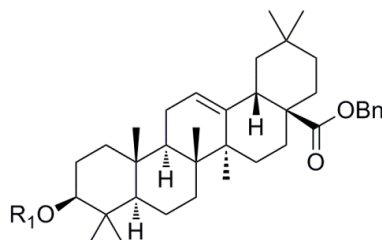
Ácido 3 β -ftaloiloxiolean-12-en-28-oico (32): Sólido blanco; **pf** 166–168 °C; $[\alpha]_{\text{D}}$ + 26 (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3380, 3053, 2855, 1699; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.80–7.50 (m, 4H, grupo ftaloilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 4.71 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.3$ Hz, H-3), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 1.12, 0.91, 0.91, 0.89, 0.89, 0.83, 0.73 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 185.0, 172.8, 168.0, 143.8, 133.8, 132.2, 130.9, 130.3, 130.0, 129.2, 122.8, 83.4, 55.6, 47.7, 46.7, 46.1, 41.8, 41.1, 39.5, 38.2 (2C), 38.1, 34.0, 32.8, 33.3, 32.7, 30.9, 29.7, 28.4, 27.9, 26.2, 23.8, 23.6, 23.0, 18.4, 17.5, 17.0, 15.7; **ESI-HRMS** (m/z) 605.3842 ($\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 605.3850).

Ácido 3 β -succiniloxi-12-oleanen-28-oico (33): Sólido blanco; **pf** 190–192 °C; $[\alpha]_{\text{D}}$ + 49 (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3394, 3018, 2854, 1712; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.51 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.70–2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 1.10, 0.92, 0.90, 0.88, 0.83,

0.81, 0.72 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.9, 178.6, 171.8, 143.8, 122.8, 81.7, 55.7, 47.7, 46.8, 46.0, 41.7, 41.1, 39.5, 38.3, 38.2, 37.2, 34.0, 33.3, 32.7, 32.6, 30.9, 29.7, 29.6, 29.4, 28.3, 27.9, 26.2, 23.8, 23.6, 23.0, 18.5, 17.2, 17.0, 15.7; **ESI-HRMS** (m/z) 557.3842 ($\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 557.3844).

Ácido 3 β -glutariloxiolean-12-en-28-oico (34): Sólido blanco; pf 190–192 °C; $[\alpha]_D + 49$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3379, 3018, 2847, 1700; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.49 (dd, 1H, $J_1 = 5.6$, $J_2 = 10.6$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.45–2.35 (m, 6H, grupo glutarilo), 1.10, 0.92, 0.91, 0.88, 0.85, 0.82, 0.71 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 185.0, 179.6, 172.7, 143.8, 122.8, 81.3, 55.5, 47.7, 46.8, 46.0, 41.7, 41.1, 39.5, 38.2, 38.0, 37.2, 34.0, 33.3 (2C), 33.0, 32.7, 32.6, 30.9, 29.7, 28.4, 27.9, 26.2, 23.8, 23.6, 23.1, 20.4, 18.4, 17.2, 17.1, 15.6; **ESI-HRMS** (m/z) 571.4005 ($\text{C}_{35}\text{H}_{55}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 571.3999).

Ácido 3 β -(3,3-dimetilglutariloxi)olean-12-en-28-oico (35): Sólido blanco; pf 220–222 °C; $[\alpha]_D + 9$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3399, 3022, 2845, 1704; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.50 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 2.70–2.25 (m, 4H, grupo 3,3-dimetilglutarilo), 1.13, 1.10, 1.07, 0.93, 0.91, 0.88, 0.85, 0.80, 0.70 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.9, 178.0, 172.1, 143.7, 122.9, 81.2, 55.4, 47.5, 46.8, 46.1, 45.4, 44.4, 41.6, 41.0, 39.5, 38.0 (2C), 37.3, 34.0, 34.0, 32.7 (2C), 32.6, 30.9, 29.9, 28.8, 28.6 (2C), 28.0, 26.2, 23.8, 23.6, 22.9, 18.5, 17.6, 17.3, 15.8; **ESI-HRMS** (m/z) 599.4301 ($\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 599.4312).



Sustrato	Anhídrido (R ₁)	mg/mL	Producto obtenido	%	mg obtenidos
AO-Bn	Acético	0.1 mL	36	89	95
	Propanoico	0.2 mL	37	85	97
	Butanoico	0.2 mL	38	93	108
	Hexanoico	0.25 mL	39	90	111
	Laurico	325 mg	40	91	126
	Benzoico	0.25 mL	41	73	90
	Ftálico	125 mg	42	82	107
	Succínico	90 mg	43	51	62
	Glutárico	100 mg	44	67	84
	3,3-dimetilglutárico	100 mg	45	65	84

Figura 3.19. Reactivos y productos acilados obtenidos de AO-Bn

Bencil 3 β -acetoxiolean-12-en-28-oato (36): Sólido blanco; pf 173–175 °C; $[\alpha]_D + 47$ (*c* 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3376, 3001, 2865, 1710; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.46 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 10.4$ Hz, H-3), 2.98 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.02 (s, 3H), 1.10, 0.91, 0.90, 0.88, 0.84, 0.83, 0.59 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 183.8, 171.2, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.1, 66.1, 55.5, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 38.4, 37.9, 37.1, 34.1, 33.3, 32.9 (2C), 30.9, 28.3, 27.8 (2C), 26.0, 23.9, 23.6, 23.3, 21.5, 18.4, 17.1, 16.9, 15.6; **ESI-HRMS (*m/z*)** 589.4252 (C₃₉H₅₇O₄⁺ [M+1] calculado 589.4257).

Bencil 3 β -propanoiloiolean-12-en-28-oato (37): Sólido blanco; pf 153–155 °C; $[\alpha]_D + 47$ (*c* 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3391, 2989, 2855, 1690; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz metileno bencilo), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 2.30 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz, grupo propanilo), 0.11, 0.92, 0.91, 0.89, 0.88, 0.83, 0.59 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.7, 174.5, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.7, 80.8, 66.1, 55.5, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 40.0, 38.4, 38.0, 37.2, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.3 (2C), 27.9, 26.1, 23.9, 23.6, 23.3, 18.8, 18.4, 17.1, 16.9, 15.5, 13.9; **ESI-HRMS (*m/z*)** 603.4439 (C₄₀H₅₉O₄⁺ [M+1] calculado 603.4413).

Bencil 3 β -butanoiloiolean-12-en-28-oato (38): Sólido blanco; pf 108–110 °C; $[\alpha]_D + 40$ (*c* 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3387, 2982, 2843, 1699; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, grupo butanoilo), 1.11, 0.90, 0.89, 0.88, 0.84, 0.83, 0.59 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.6, 173.6, 143.9, 136.6, 128.5, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 80.7, 66.1, 55.5, 47.7, 46.9, 46.0, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3 (2C), 36.9, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.8, 28.2, 27.8, 26.0, 23.8 (2C), 23.6, 23.3, 18.8, 18.4, 17.1, 16.9, 15.5, 13.9; **ESI-HRMS (*m/z*)** 617.4570 (C₄₁H₆₁O₄⁺ [M+1] calculado 617.4584).

Bencil 3 β -hexanoiloiolean-12-en-28-oato (39): Sólido blanco; pf 73–75 °C; $[\alpha]_D + 49$ (*c* 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3360, 2989, 2845, 1708; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.32 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.6$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, grupo hexanoilo), 1.11, 0.90, 0.89, 0.88, 0.87, 0.83, 0.59 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.6, 173.9, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.7, 80.8, 66.1, 55.5, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.6, 38.4, 38.0, 37.1, 35.0, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 31.6, 30.9, 28.3, 28.1, 27.9, 26.1, 23.9, 23.8, 23.6, 23.3, 22.5, 18.4, 17.1, 17.0, 15.5, 14.1; **ESI-HRMS (*m/z*)** 645.4861 (C₄₃H₆₅O₄⁺ [M+1] calculado 645.4883).

Bencil 3 β -lauroiloiolean-12-en-28-oato (40): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 24$ (*c* 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3368, 2978, 2861, 1712; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.33 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.27 (dd, 1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 5.06 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 5.6$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.90 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.30 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, grupo lauroilo), 1.11, 0.90, 0.89, 0.88, 0.86, 0.84, 0.59 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.6, 173.8, 143.9, 136.6, 128.6, 128.2 (2C), 128.1

(2C), 122.6, 80.7, 66.1, 55.5, 47.7, 46.9, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 35.0, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 32.1, 30.9, 29.8 (3C), 29.5 (2C), 29.4, 28.3 (2C), 27.8, 26.0, 23.8 (2C), 23.6, 23.3, 22.9, 18.4, 17.1, 17.0, 15.5, 14.1; **ESI-HRMS (*m/z*)** 729.5826 ($C_{49}H_{77}O_4^+$ [M+1] calculado 729.5822).

Bencil 3 β -benzoiloxiolean-12-en-28-oato (41): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 31$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3380, 3015, 2849, 1699; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 7.98–7.33 (m, 5H, aromáticos bencilo), 7.15 (m, 5H, grupo benzoilo), 5.12 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.06 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.55 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.73 (dd, 1H, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 0.96, 0.83, 0.83, 0.87, 0.93, 0.72, 0.45, (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 177.6, 166.5, 143.8, 134.7, 132.9 (2C), 130.7 (2C), 129.7, 129.1, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.8, 66.1, 55.6, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 40.0, 38.3, 37.2 (2C), 34.1, 32.9, 33.3, 32.6, 30.9, 28.4, 27.8, 26.1, 23.8 (2C), 23.6, 23.3, 18.4, 17.2, 17.1, 15.6; **ESI-HRMS (*m/z*)** 651.4404 ($C_{44}H_{59}O_4^+$ [M+1] calculado 651.4413).

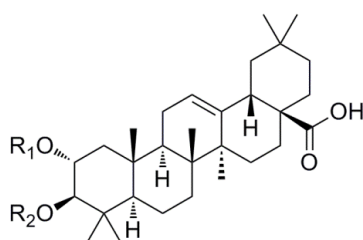
Bencil 3 β -ftaloiloxiolean-12-en-28-oato (42): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 48$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3376, 3060, 2842, 1711; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 8.02–7.56 (m, 4H, grupo ftaloilo), 7.33 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.77 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 1.12, 0.94, 0.90, 0.89, 0.89, 0.85, 0.59 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 177.7, 171.0, 168.1, 143.8, 136.7, 133.3, 132.1, 131.9, 131.1, 130.4, 129.4, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 83.1, 66.1, 55.7, 47.8, 47.0, 46.1, 42.0, 41.6, 39.6, 38.4, 38.2, 37.2, 34.1, 32.9, 33.3, 32.6, 30.9, 28.4, 27.9, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.2, 18.4, 17.1, 17.0, 15.2; **ESI-HRMS (*m/z*)** 695.4312 ($C_{45}H_{59}O_6^+$ [M+1] calculado 695.4331).

Bencil 3 β -succiniloxiolean-12-en-28-oato (43): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 38$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3377, 3020, 2859, 1720; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.4$, $J_2 = 10.6$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.70–2.40 (m, 4H, grupo succinilo), 1.10, 0.90, 0.88, 0.88, 0.83, 0.83, 0.59 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 178.4, 177.7, 172.9, 143.8, 136.6, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.7, 66.1, 55.5, 47.7, 46.9, 46.0, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 34.0, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 29.6, 29.5, 29.3, 28.2, 27.8, 26.0, 23.9, 23.6, 23.2, 18.4, 17.1, 16.9, 15.5; **ESI-HRMS (*m/z*)** 647.4312 ($C_{41}H_{59}O_6^+$ [M+1] calculado 647.4332).

Bencil 3 β -glutariloxiolean-12-en-28-oato (44): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 26$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3378, 3033, 2867, 1715; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.42–2.34 (m, 6H, grupo glutarilo), 1.10, 0.90, 0.88, 0.88, 0.83, 0.83, 0.59 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 178.4, 177.7, 172.9, 143.9, 136.6, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.3, 66.1, 55.5, 47.7, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 34.1, 33.9 (2C), 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.3, 27.8, 27.8, 26.0, 23.9, 23.6, 23.3, 20.3, 18.4, 17.1, 17.0, 15.6; **ESI-HRMS (*m/z*)** 661.4468 ($C_{42}H_{61}O_6^+$ [M+1] calculado 661.4486).

Bencil 3 β -(3,3-dimetil-glutariloxy)olean-12-en-28-oato (45): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D^{20}$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3390, 3021, 2865, 1698; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.50 (dd, 1H, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, H-3), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.70–2.25 (m, 4H, grupo 3,3-dimetil-glutarilo), 1.13, 1.10, 0.93, 0.91, 0.88, 0.85, 0.80, 0.70, 0.59 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.7, 176.4, 172.5, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.6, 66.1, 55.6, 47.8, 47.0, 46.1, 45.8, 45.4, 41.9, 41.6, 39.5, 38.4, 37.8, 37.1, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6 (2C), 30.9, 28.3, 28.2, 28.1, 27.8, 27.8, 26.1, 23.9, 23.6, 23.3, 18.4, 17.1, 17.0, 15.5; ESI-HRMS (m/z) 689.4781 (C₄₄H₆₅O₆⁺ [M+1] calculado 689.4767).

III.3.6.2. Derivados acilados de AM y AM-Bn



Sustrato	Anhídrido	mg/mL	Obtenido	Nº	%	mg obtenidos
AM	Propanoico	0.4 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	46	20	22
			R ₁ =acil R ₂ = acil	47	73	89
	Butanoico	0.4 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	48	15	18
			R ₁ =acil R ₂ = acil	49	80	109
	Hexanoico	0.5 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	50	19	22
			R ₁ =acil R ₂ = acil	51	70	101
	Laurico	650 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	52	27	37
			R ₁ =acil R ₂ = acil	53	57	100
	Benzoico	0.5 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	54	37	46
			R ₁ =acil R ₂ = acil	55	45	64
	Ftálico	250 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	56	25	33
			R ₁ =acil R ₂ = acil	57	40	65
	Succínico	180 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	58	30	40
			R ₁ =acil R ₂ = acil	59	33	45
Glutárico	200 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	60	31	38	
		R ₁ =acil R ₂ = acil	61	35	53	
3,3-dimetilglutárico	200 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	62	33	45	
		R ₁ =acil R ₂ = acil	63	36	59	

Figura 3.20. Reactivos y productos acilados obtenidos de AM

Ácido 3 β -hidroxi-2 α -propanoiloxiolean-12-en-28-oico (46): Sólido blanco; pf 155–157 °C; $[\alpha]_D^{20}$ + 49 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3376, 3015, 2855, 1711; ¹H NMR (CDCl₃) δ 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.92 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 3.17 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.30 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz, grupo propanoilo), 1.10, 1.08, 1.01, 0.99, 0.88, 0.81, 0.70 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 184.2, 175.3, 143.9, 122.4, 81.0, 73.2, 55.3, 47.7, 46.7, 46.0, 43.8, 41.8, 41.0, 40.0, 39.5, 38.6, 34.0, 33.2, 32.6, 32.6, 30.8, 28.7, 28.1, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0,

18.4, 17.3, 16.8, 16.5, 9.3; **ESI-HRMS (m/z)** 529.3886 ($C_{33}H_{53}O_5^+$ [M+1] calculado 529.3893).

Ácido 2 α ,3 β -dipropioniloxiolean-12-en-28-oico (47): Sólido blanco; pf 224–226 °C; $[\alpha]_D + 32$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3299, 3017, 2796, 1699; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.14 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.1$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 4.80 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-3), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 12.0$ Hz, H-18), 2.32, 2.26 (q, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, gupo propanoilo), 1.08, 1.01, 0.99, 0.92, 0.91, 0.91, 0.76 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 184.6, 173.5 (2C), 143.9, 122.5, 80.5, 70.1, 55.1, 47.8, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.1, 39.7, 39.6, 38.4, 34.0, 33.3, 32.6 (2C), 30.9, 28.7, 28.1 (2C), 27.9, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.4, 17.9, 17.4, 16.6, 9.6, 9.4; **ESI-HRMS (m/z)** 585.4144 ($C_{36}H_{57}O_6^+$ [M+1] calculado 585.4155).

Ácido 2 α -butanoiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (48): Sólido blanco; pf 138–140 °C; $[\alpha]_D + 52$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3353, 2980, 2839, 1719; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.92 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.0$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 3.17 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-3), 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.28 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, gupo butanoilo), 1.08, 1.01, 0.92, 0.89, 0.86, 0.81, 0.70 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 184.3, 174.5, 143.9, 122.5, 81.1, 73.2, 55.3, 47.8, 46.7, 46.1, 43.9, 41.8, 41.1, 40.0, 39.5, 38.5, 36.7, 34.0, 33.3, 32.6 (2C), 30.9, 28.7, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.7, 18.4, 17.3, 16.8, 16.5, 13.8; **ESI-HRMS (m/z)** 565.3862 ($C_{34}H_{54}O_5Na^+$ [M+Na] calculado 565.3869).

Ácido 2 α ,3 β -dibutanoiloxiolean-12-en-28-oico (49): Sólido blanco; pf 142–144 °C; $[\alpha]_D + 42$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3365, 3000, 2848, 1780; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.12 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 4.80 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.30, 2.22 (t, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, gupo butanoilo), 1.14, 1.08, 0.94, 0.93, 0.91, 0.91, 0.70 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 184.6, 173.5 (2C), 143.9, 122.5, 80.3, 70.1, 55.1, 47.8, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.1, 39.7, 39.6, 38.4, 36.7 (2C), 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 30.9, 28.7, 27.9, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.8, 18.6, 18.4, 17.9, 17.4, 16.6, 14.0, 13.9; **ESI-HRMS (m/z)** 611.4305 ($C_{38}H_{59}O_6^-$ [M–1] calculado 611.4312).

Ácido 2 α -hexanoiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (50): Sólido blanco; pf 124–126 °C; $[\alpha]_D + 40$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3405, 3053, 2849, 1690; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz, H-12), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.16 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.28 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, gupo hexanoilo), 1.09, 1.01, 0.99, 0.88, 0.86, 0.82, 0.71 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 184.5, 174.7, 143.8, 122.5, 81.0, 73.1, 55.3, 47.7, 46.7, 46.0, 43.9, 41.8, 41.1, 39.9, 39.5, 38.4, 34.7, 34.0, 33.2, 32.6 (2C), 31.4, 30.8, 28.7, 27.8, 26.1, 24.6, 23.7 (2C), 23.0, 22.5, 18.4, 17.2, 16.8, 16.5, 14.1; **ESI-HRMS (m/z)** 569.4209 ($C_{36}H_{57}O_5^-$ [M–1] calculado 569.4206).

Ácido 2 α ,3 β -dihexanoiloxiolean-12-en-28-oico (51): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D - 21$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** $\nu_{max}(\text{film})/cm^{-1}$ 3340, 3013, 2839, 1701; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 5.19 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.02 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 4.69 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.75 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.5$ Hz, H-18), 2.22, 2.13 (t, 2H, Me, $J = 6.5$

Hz, gupo hexanoilo), 1.13, 1.11, 1.05, 0.98, 0.83, 0.81, 0.67 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 183.0, 173.7, 173.6, 143.9, 122.5, 80.3, 70.1, 55.1, 47.8, 46.7, 46.1, 44.1, 41.9, 41.2, 39.7, 39.6, 38.4, 34.8 (2C), 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 31.7, 31.5, 30.9, 28.7, 27.9, 26.1, 25.1, 24.9, 23.8, 23.1, 22.9, 22.6 (2C), 18.4, 17.9, 17.4, 16.6, 14.1, 14.1; **ESI-HRMS** (m/z) 691.4913 ($\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_6\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] calculado 691.4914).

Ácido 3 β -hidroxi-2 α -lauroiloxiolean-12-en-28-oico (52): Sólido blanco; pf 30–32 °C; $[\alpha]_D + 20$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3384, 2956, 2827, 1689; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 4.94 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.18 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.79 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.31 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, gupo lauroilo), 1.10, 1.03, 1.01, 0.90, 0.88, 0.83, 0.73 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.8, 174.8, 143.8, 122.5, 81.1, 73.1, 55.4, 47.8, 46.8, 46.1, 43.9, 41.9, 41.1, 40.0, 39.6, 38.4, 34.8, 34.3, 33.3, 32.6 (2C), 32.1, 30.9, 29.7 (3C), 29.3 (2C), 29.1, 28.7, 27.8, 26.1, 24.8, 23.8, 23.7, 23.1, 22.8, 18.5, 16.9, 16.8, 16.5, 14.2; **ESI-HRMS** (m/z) 655.5316 ($\text{C}_{42}\text{H}_{71}\text{O}_5^+$ [$\text{M}+1$] calculado 655.5302).

Ácido 2 α ,3 β -dilauroiloxiolean-12-en-28-oico (53): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 45$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3390, 3000, 2880, 1770; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.18 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz, H-12), 5.01 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 4.68 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.73 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.21, 2.13 (t, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, gupo lauroilo), 1.13, 1.04, 1.05, 0.97, 0.80, 0.77, 0.65 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.5, 173.7, 173.6, 143.9, 122.5, 80.3, 70.0, 55.1, 47.8, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.1, 39.7, 39.6, 38.4, 34.9, 34.8, 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 32.2 (2C), 30.9, 30.0 (4C), 29.9 (4C), 29.8, 29.6 (2C), 29.3, 28.7, 27.9, 26.1, 25.4, 25.2, 23.8, 23.7, 23.1, 22.9 (2C), 18.4, 17.9, 17.3, 16.6, 14.4, 14.1; **ESI-HRMS** (m/z) 837.6967 ($\text{C}_{54}\text{H}_{93}\text{O}_6^+$ [$\text{M}+1$] calculado 837.6972).

Ácido 2 α -benzoiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (54): Sólido blanco; pf 95–97 °C; $[\alpha]_D + 28$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3420, 3030, 2822, 1717; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.10–7.45 (m, 5H, grupo benzoilo), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.20 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.39 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 1.13, 1.07, 1.07, 0.92, 0.90, 0.89, 0.77 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.8, 172.2, 143.8, 133.9 (2C), 130.4 (2C), 129.8, 128.7, 122.6, 81.2, 74.2, 55.4, 47.8, 46.8, 46.1, 44.0, 41.9, 41.2, 40.1, 39.6, 38.7, 34.0, 33.3, 32.7, 32.6, 30.9, 28.8, 27.9, 26.2, 23.8, 23.7, 23.1, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 575.3745 ($\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{O}_5^-$ [$\text{M}-1$] calculado 575.3737).

Ácido 2 α ,3 β -dibenzoiloxiolean-12-en-28-oico (55): Sólido blanco; pf 70–72 °C; $[\alpha]_D + 28$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3402, 2983, 2842, 1700; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.95–7.35 (m, 10 H, grupo benzoilo), 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.23 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 5.20 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 1.20, 1.16, 1.11, 1.03, 0.93, 0.91, 0.80 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.0, 166.7, 166.5, 143.9, 133.9 (4C), 129.8 (4C), 129.8 (2C), 128.5 (2C), 122.5, 81.2, 71.3, 55.4, 47.9, 46.8, 46.0, 44.2, 41.9, 41.2, 40.1, 39.7, 38.7, 34.1, 33.3, 32.7 (2C), 30.9, 28.8, 27.9, 26.2, 23.8, 23.7, 23.1, 18.5, 18.1, 17.4, 16.8; **ESI-HRMS** (m/z) 681.4155 ($\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{O}_6^+$ [$\text{M}+1$] calculado 681.4155).

Ácido 2 α -ftaloiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (56): Sólido blanco; pf 190–192 °C; $[\alpha]_D + 11$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3375, 3015, 2822, 1722; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.30–7,30 (m, 4H, gupo ftaloilo), 5.74 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.6$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.40 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.33 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, H-3), 2.70 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 1.29, 1.25, 1.11, 1.07, 1.06, 1.02, 0.97 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 180.2, 169.9, 168.3, 145.1, 133.8, 132.9, 132.3 (2C), 128.4, 128.1, 122.1, 82.3, 74.8, 55.5, 47.9, 46.8 (2C), 43.9, 42.1, 41.4, 40.4, 39.9, 38.6, 34.4, 33.5, 33.3, 33.1, 31.2, 28.9, 27.4, 26.4, 24.1, 23.9 (2C), 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; ESI-HRMS (m/z) 619.3649 (C₃₈H₅₁O₇⁻ [M-1] calculado 619.3635).

Ácido 2 α ,3 β -diftaloiloxiolean-12-en-28-oico (57): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 38$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3391, 2999, 2843, 1740; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.30–7,30 (m, 8H, gupo ftaloilo), 5.80 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.60 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 5.42 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 2.69 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 1.30, 1.28, 1.10, 1.08, 1.06, 1.03, 0.98 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 180.3, 170.7, 169.9, 168.7, 168.3, 145.2, 133.8 (2C), 132.9 (2C), 132.3 (4C), 128.4 (2C), 128.1 (2C), 122.2, 82.4, 72.2, 55.5, 48.0, 46.8 (2C), 43.9, 42.1, 41.4, 40.3, 39.9, 38.6, 34.4, 33.5, 33.3, 33.1, 31.2, 28.9, 27.4, 26.4, 24.1, 23.9 (2C), 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; ESI-HRMS (m/z) 769.3954 (C₄₆H₅₇O₁₀⁺ [M+1] calculado 769.3952).

Ácido 3 β -hidroxi-2 α -succiniloxiolean-12-en-28-oico (58): Sólido blanco; pf 121–123 °C; $[\alpha]_D + 11$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3365, 3022, 2839, 1711; ¹H NMR (Py-d5) δ 5.53 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.8$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.47 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 3.55 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz, H-3), 3.30 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.80–2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 1.30, 1.26, 1.08, 1.05, 1.03, 1.00, 0.98 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (Py-d5) δ 180.6, 175.6, 173.4, 145.4, 122.8, 80.2, 74.3, 56.1, 48.5, 47.2, 47.1, 44.9, 42.8, 42.5, 40.9, 40.3, 39.1, 34.8, 33.8, 33.7, 33.6, 31.5, 30.9, 30.6, 29.7, 28.8, 26.7, 24.4, 24.3, 24.2, 19.3, 18.1, 17.9, 17.0; ESI-HRMS (m/z) 595.3612 (C₃₄H₅₂O₇Na⁺ [M+Na] calculado 595.3611).

Ácido 2 α ,3 β -disucciniloxiolean-12-en-28-oico (59): Sólido blanco; pf 113–115 °C; $[\alpha]_D - 6$ (c 1 in MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3346, 3021, 2803, 1688; ¹H NMR (Py-d5) δ 5.50 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.9$, $J_3 = 11.4$ Hz, H-2), 5.44 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.15 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz, H-3), 3.30 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.80–2.55 (m, 8H, grupo succinilo), 1.29, 1.25, 1.04, 1.01, 0.98, 0.96, 0.95 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (Py-d5) δ 180.9, 176.0, 175.7, 173.5, 173.4, 145.7, 122.5, 81.2, 70.7, 55.5, 48.2, 47.2, 47.0, 44.6, 42.7, 42.4, 40.5 (2C), 39.2, 34.7, 33.8, 33.6, 33.3, 31.8, 31.0, 30.9, 30.6, 30.5, 29.0, 28.7, 26.7, 24.3, 24.2, 24.1, 18.9, 18.4, 17.7, 16.9; ESI-HRMS (m/z) 673.3952 (C₃₈H₅₇O₁₀⁺ [M+1] calculado 673.3947).

Ácido 2 α -glutariloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (60): Sólido blanco; $[\alpha]_D + 17$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3395, 2979, 2833, 1725; ¹H NMR (DMSO-d6) δ 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.00 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.7$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.20 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, H-3), 2.90 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.35–2.15 (m, 4H, grupo glutarilo), 1.20, 1.17, 1.09, 1.07, 0.97, 0.89, 0.85 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (DMSO-d6) δ 181.9, 175.7, 173.7, 145.5, 122.5, 81.1, 73.8, 56.2, 49.1, 47.7, 47.4, 44.6, 43.1, 42.9, 41.1,

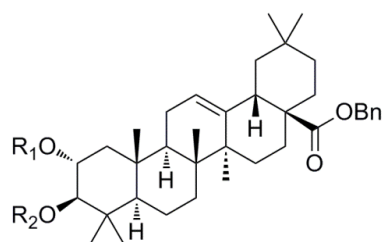
40.7, 39.6, 35.1, 34.0 (2C), 33.7, 32.2, 31.8, 30.9, 29.7, 28.8, 26.6, 24.7, 24.2 (2C), 21.6, 19.7, 18.4, 17.8, 17.1; **ESI-HRMS (m/z)** 587.3957 ($C_{35}H_{55}O_7^+$ [M+1] calculado 587.3948).

Ácido 2 α ,3 β -diglutariloxiolean-12-en-28-oico (61): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D - 14$ (c 1 in MeOH); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3396, 3001, 2843, 1710; **1H NMR** (Py-d5) δ 5.49 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.45 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.7$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.14 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, H-3), 3.20 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.35–2.10 (m, 8H), 1.32, 1.09, 1.03, 1.01, 0.98, 0.98, 0.95 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** (Py-d5) δ 180.7, 176.3, 176.2, 173.7, 173.5, 145.6, 122.7, 81.2, 70.8, 55.6, 48.0, 47.3, 46.7, 44.4, 42.9, 42.2, 41.4, 40.3, 39.1, 34.5, 34.4 (2C), 34.2, 34.1, 33.6, 33.5, 33.1, 31.6, 28.9, 28.5, 26.5, 24.1, 24.0, 23.9, 21.5, 21.4, 18.8, 18.2, 17.6, 16.7; **ESI-HRMS (m/z)** 723.4073 ($C_{40}H_{60}O_{10}Na^+$ [M+Na] calculado 723.4084).

Ácido 2 α -(3,3-dimetil-glutariloxi)-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (62): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 44$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3299, 2987, 2801, 1740; **1H NMR** (DMSO-d6) δ 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 4.97 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 3.19 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.45–2.35 (m, 4H, grupo 3,3-dimetil-glutarilo), 1.19, 1.17, 1.16, 1.14, 1.01, 0.96, 0.93, 0.88, 0.84 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** (DMSO-d6) δ 181.8, 177.0, 174.9, 145.4, 122.5, 81.1, 73.9, 56.7, 49.1, 47.7, 47.4, 45.4, 45.2, 45.1, 43.1, 42.8, 41.1, 40.7, 39.6, 35.1, 34.7, 34.0, 33.9, 33.8, 31.8, 30.8, 29.7, 29.4, 29.0, 26.6, 24.7, 24.2 (2C), 19.7, 17.8, 17.6, 17.1; **ESI-HRMS (m/z)** 615.4252 ($C_{37}H_{59}O_7^+$ [M+1] calculado 615.4261).

Ácido 2 α ,3 β -di(3,3-dimetil-glutariloxi)olean-12-en-28-oico (63): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D - 13$ (c 1 in MeOH); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3380, 3024, 2841, 1724; **1H NMR** (Py-d5) δ 5.49 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.6$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.46 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.21 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, H-3), 3.60 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.90–2.65 (m, 8H, grupo 3,3-dimetil-glutarilo), 1.43, 1.41, 1.39, 1.37, 1.07, 1.05, 1.04, 1.03, 0.99, 0.99, 0.98 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** (Py-d5) δ 180.7, 175.3 (2C), 172.5, 172.4, 145.5, 122.6, 80.7, 70.8, 55.6, 48.0, 47.7, 46.7, 46.2 (2C), 45.2 (2C), 44.6, 42.8, 42.1, 40.4, 40.3, 39.0, 34.7 (2C), 34.5, 33.5, 33.4, 33.1, 31.6, 29.0, 28.6 (2C), 28.2 (2C), 28.1, 26.4, 24.4, 23.9, 23.4, 19.1, 18.3, 17.5, 16.7; **ESI-HRMS (m/z)** 779.4712 ($C_{44}H_{68}O_{10}Na^+$ [M+Na] calculado 779.4710).

Bencil 3 β -hidroxi-2 α -acetoxiolean-12-en-28-oato(64): Sólido blanco; **pf** 85–87 °C; $[\alpha]_D + 14$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); **IR** v_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3396, 3015, 2845, 1701; **1H NMR** ($CDCl_3$) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.16 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.04, 1.09, 1.03, 0.97, 0.90, 0.88, 0.84, 0.57 (s, 3H, Me); **^{13}C NMR** ($CDCl_3$) δ 177.6, 171.8, 144.0, 136.3, 128.6 (5C), 122.4, 81.1, 73.5, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 41.9, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.1, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.2, 21.6, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6; **ESI-HRMS (m/z)** 627.4017 ($C_{39}H_{56}O_5Na^+$ [M+Na] calculado 627.4025).



	Anhidrido	mg/mL	Obtenido	Nº	%	mg obtenidos
AAM-Bn	Acético	0.2 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	64	15	17
			R ₁ =acil R ₂ = acil	65	75	94
	Propanoico	0.4 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	66	22	24
			R ₁ =acil R ₂ = acil	67	67	81
	Butanoico	0.4 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	68	10	12
			R ₁ =acil R ₂ = acil	69	79	100
	Hexanoico	0.5 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	70	15	18
			R ₁ =acil R ₂ = acil	71	76	100
	Laurico	650 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	72	33	44
			R ₁ =acil R ₂ = acil	73	61	102
	Benzoico	0.5 mL	R ₁ =H R ₂ = acil	74	35	44
			R ₁ =acil R ₂ = acil	75	51	70
	Ftálico	250 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	76	27	36
			R ₁ =acil R ₂ = acil	77	55	89
	Succínico	180 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	78	27	34
			R ₁ =acil R ₂ = acil	79	43	65
	Glutárico	200 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	80	21	27
			R ₁ =acil R ₂ = acil	81	51	75
3,3-dimetilglutárico	200 mg	R ₁ =H R ₂ = acil	82	25	33	
		R ₁ =acil R ₂ = acil	83	47	71	

Figura 3.21. Reactivos y productos acilados obtenidos de AM-Bn

Bencil 2 α ,3 β -diacetoxiolean-12-en-28-oato (65): Sólido blanco; pf 78–80 °C; [α]_D + 54 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3353, 2995, 2808, 1685; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.30 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.08 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.03 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.70 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.01, 1.94, 1.08, 0.99, 0.89, 0.87, 0.87, 0.86, 0.55 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.5, 170.9, 170.6, 143.9, 136.6, 128.5 (2C), 128.2, 128.0 (2C), 122.3, 80.8, 70.2, 66.1, 55.1, 47.7, 46.9, 46.0, 44.1, 41.9, 41.5, 39.5 (2C), 38.3, 34.0, 33.3, 32.7, 32.5, 30.9, 28.6, 27.7, 26.0, 23.8, 23.6, 23.2, 21.3, 21.0, 18.4, 17.9, 17.8, 16.6; **ESI-HRMS (m/z)** 647.4320 (C₄₁H₅₉O₆⁺ [M+1] calculado 647.4312).

Bencil 3 β -hidroxi-2 α -propioniloxiolean-12-en-28-oato (66): Sólido blanco; pf 46–48 °C; [α]_D + 24 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3401, 2989, 2823, 1745; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.18 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.33 (2H, q, $J = 6.5$ Hz, grupo propanoilo), 1.12, 1.09, 1.03, 0.98, 0.90, 0.87, 0.84 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.6, 175.3, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 81.1, 73.3, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 42.0, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.1, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 28.1, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.5, 17.1, 16.9, 16.5, 9.4; **ESI-HRMS (m/z)** 619.4368 (C₄₀H₅₉O₅⁺ [M+1] calculado 619.4363).

Bencil 2 α ,3 β -dipropioniloxiolean-12-en-28-oato(67): Sólido blanco; pf 34–36 °C; $[\alpha]_D + 7$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3400, 3042, 2835, 1704; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.30 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.32 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 9.5$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.74 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 2.28, 2.22 (t, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, grupo propanoilo), 1.09, 1.03, 1.01, 0.92, 0.90, 0.88, 0.86 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.6, 174.3, 173.2, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 80.5, 70.1, 66.2, 55.1, 47.7, 47.0, 46.1, 44.2, 42.0, 41.6, 39.7, 39.6, 38.4, 34.0, 33.3, 32.6 (2C), 30.9, 28.7, 28.1 (2C), 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.5, 17.9, 17.1, 16.6, 9.6, 9.4; **ESI-HRMS (m/z)** 675.4626 (C₄₃H₆₃O₆⁺ [M+1] calculado 675.4625).

Bencil 2 α -butanoiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (68): Sólido blanco; pf 33–35 °C; $[\alpha]_D + 53$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3376, 3015, 2842, 1710; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.92 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 9.8$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.16 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, grupo butanoilo), 1.10, 1.03, 0.93, 0.89, 0.89, 0.87, 0.84 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.5, 174.5, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 81.1, 73.3, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 44.0, 41.6, 41.5, 40.0, 39.5, 38.5, 36.8, 34.1, 33.4, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.9, 23.8, 23.3, 18.8, 18.4, 17.1, 16.9, 16.6, 13.9; **ESI-HRMS (m/z)** 633.4523 (C₄₁H₆₁O₅⁺ [M+1] calculado 633.4519).

Bencil 2 α ,3 β -dibutanoiloxiolean-12-en-28-oato (69): Sólido blanco; pf 47–49 °C; $[\alpha]_D + 5$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3412, 3020, 2862, 1730; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.30 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 5.03 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.74 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.24, 2.15 (t, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, grupo butanoilo), 1.08, 0.99, 0.94, 0.91, 0.90, 0.86, 0.85 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.4, 173.3, 173.2, 143.9, 136.5, 128.5 (2C), 128.1, 128.0 (2C), 122.3, 80.2, 69.9, 66.1, 55.0, 47.6, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.5, 39.6, 39.5, 38.3, 36.6 (2C), 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 30.8, 28.6, 27.7, 26.0, 23.8, 23.6, 23.2, 18.7, 18.5, 18.4, 17.8, 17.0, 16.5, 13.9, 13.8; **ESI-HRMS (m/z)** 703.4946 (C₄₅H₆₇O₆⁺ [M+1] calculado 703.4938).

Bencil 2 α -hexanoiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (70): Sólido blanco; pf 40–42 °C; $[\alpha]_D - 6$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3375, 3012, 2841, 1753; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.02 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 9.9$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 3.16 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-3), 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 2.31 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, grupo hexanoilo), 1.09, 1.02, 0.98, 0.90, 0.87, 0.87, 0.84 (s, 3H, Me); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.5, 174.6, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 81.1, 73.2, 66.1, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 41.9, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.8, 34.1, 33.3, 32.7, 32.6, 31.5, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 24.9, 23.8, 23.7 (2C), 22.5, 18.5, 17.1, 16.9, 16.5, 14.1; **ESI-HRMS (m/z)** 661.4844 (C₄₃H₆₅O₅⁺ [M+1] calculado 661.4832).

Bencil 2 α ,3 β -dihexanoiloxiolean-12-en-28-oato (71): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D - 24$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR $\nu_{\max}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3432, 3022, 2849, 1740; ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.29 (m,

5H, aromáticos bencilo), 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.04 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.02 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.74 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.6$ Hz, H-18), 2.26, 2.16 (t, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, grupo hexanoilo), 1.13, 1.08, 0.99, 0.89, 0.87, 0.87, 0.85 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.4, 173.5, 173.4, 143.9, 136.5, 128.5 (2C), 128.2, 128.0 (2C), 122.3, 80.2, 69.4, 66.1, 55.1, 47.7, 46.8, 46.0, 44.1, 41.9, 41.5, 39.6, 39.5, 38.3, 34.7, 34.6, 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 31.5, 31.4, 30.8, 28.6, 27.7, 26.0, 24.9, 24.7, 23.8, 23.6, 23.2, 22.4 (2C), 18.4, 17.8, 17.0, 16.5, 14.0 (2C); **ESI-HRMS** (m/z) 759.5560 ($\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 759.5564).

Bencil 3 β -hidroxi-2 α -lauroiloxiolean-12-en-28-oato (72): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 25$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3388, 3012, 2815, 1700; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.02 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.6$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 3.16 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.6$ Hz, H-18), 2.29 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, grupo lauroilo), 1.10, 1.03, 0.98, 0.90, 0.88, 0.86, 0.84 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6, 174.7, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 81.1, 73.3, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 42.0, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.9, 34.1, 33.3, 32.7, 32.6, 32.1, 30.9, 29.8 (3C), 29.7 (2C), 29.4, 28.8, 27.8, 26.1, 25.3, 23.9, 23.7, 23.3, 22.9, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6, 14.3; **ESI-HRMS** (m/z) 745.5758 ($\text{C}_{49}\text{H}_{77}\text{O}_5^+$ [M+1] calculado 745.5771).

Bencil 2 α ,3 β -dilauroiloxiolean-12-en-28-oato (73): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 1$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3419, 2999, 2850, 1708; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz, H-12), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.75 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 2.21, 2.12 (q, 2H, Me, $J = 6.5$ Hz, grupo lauroilo), 1.09, 1.00, 0.90, 0.87, 0.87, 0.86, 0.83 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6, 173.7, 173.6, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 80.4, 70.1, 66.2, 55.1, 47.7, 46.9, 46.1, 44.2, 41.9, 41.6, 39.6 (2C), 38.3, 34.9, 34.8, 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 32.2 (2C), 30.0, 29.9 (4C), 29.8 (4C), 29.6 (3C), 30.9, 28.7, 27.8, 26.1, 24.9 (2C), 23.9, 23.7, 23.3, 22.9, 22.2, 18.5, 17.9, 17.1, 16.6, 14.3 (2C); **ESI-HRMS** (m/z) 927.7434 ($\text{C}_{61}\text{H}_{99}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 927.7442).

Bencil 2 α -benzoiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (74): Sólido blanco; **pf** 120–122 °C; $[\alpha]_D + 14$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3401, 3022, 2848, 1712; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.45–8.10 (m, 5H, grupo benzoilo), 7.32 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.20 (ddd, 1H, $J_1 = 4.7$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 11.1$ Hz, H-2), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 3.35 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 1.11, 1.08, 1.05, 0.92, 0.90, 0.89, 0.88 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6, 167.2, 143.9, 136.6, 133.9, 130.4, 129.8 (2C), 128.7 (2C), 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 81.1, 74.3, 66.1, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 44.0, 41.9, 41.6, 40.1, 39.5, 38.6, 34.1, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.2, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 689.4175 ($\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 689.4182).

Bencil 2 α ,3 β -dibenzoiloxiolean-12-en-28-oato (75): Sólido blanco; **pf** 75–77 °C; $[\alpha]_D - 18$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3379, 2991, 2845, 1729; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.95–7.35 (m, 10 H, grupo benzoilo), 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.53 (ddd, 1H, $J_1 =$

4.6, $J_2 = 10.4$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.30 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.27 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, H-3), 5.13 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 2.97 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 1.21, 1.20, 1.14, 1.06, 0.96, 0.94, 0.68 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6, 166.7, 166.5, 144.0, 136.7, 133.1, 133.0, 130.8, 129.8 (2C), 129.8 (2C), 129.1 (2C), 128.5 (4C), 128.3 (2C), 128.2 (2C), 122.4, 81.3, 71.3, 66.2, 55.4, 47.9, 47.0, 46.1, 44.2, 42.0, 41.7, 40.1, 39.7, 38.6, 34.2, 33.4, 32.8, 32.6, 31.0, 28.8, 27.9, 26.2, 23.9, 23.8, 23.3, 18.6, 18.1, 17.2, 16.8; **ESI-HRMS** (m/z) 771.4601 ($\text{C}_{51}\text{H}_{63}\text{O}_6^+$ [M+1] calculado 771.4625).

Bencil 2 α -ftaloiloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (76): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 45$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3427, 3030, 2862, 1731; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.30–7.30 (m, 4H, grupo ftaloilo), 7.32 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.64 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.38 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.08 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 3.33 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.72 (dd, 1H, $J_1 = 4.7$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 1.28, 1.26, 1.10, 1.08, 1.05, 1.01, 0.94 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 180.7, 169.4, 168.3, 145.1, 136.7, 133.8, 132.9, 132.3, 129.9, 128.5 (2C), 128.4, 128.2 (4C), 122.2, 82.3, 74.9, 66.2, 55.5, 47.8, 46.9, 46.8, 43.8, 42.2, 41.4, 40.4, 39.9, 38.6, 34.4, 33.4, 33.2, 33.1, 31.2, 28.9, 27.4, 26.3, 24.2, 24.0, 23.9, 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; **ESI-HRMS** (m/z) 733.4068 ($\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{O}_7\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 733.4080).

Bencil 2 α ,3 β -diftaloiloxiolean-12-en-28-oato (77): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 1$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3366, 3019, 2868, 1701; $^1\text{H NMR}$ (Py-d_5) δ 8.30–7.30 (m, 8H, grupo ftaloilo), 7.32 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.78 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 5.62 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 5.40 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.05 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 2.70 (dd, 1H, $J_1 = 4.7$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 1.20, 1.16, 1.11, 1.09, 1.07, 1.04, 0.98 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 180.1, 170.6, 169.9, 168.6, 168.2, 145.1, 136.7, 133.8 (2C), 132.9 (2C), 132.3 (2C), 129.8 (2C), 128.5 (2C), 128.4 (2C), 128.2 (2C), 128.1 (2C), 128.0, 122.2, 82.4, 72.1, 66.3, 55.5, 48.0, 46.9, 46.8, 43.9, 42.2, 41.4, 40.2, 39.9, 38.6, 34.4, 33.5, 33.4, 33.2, 31.1, 28.9, 27.5, 26.4, 24.1, 23.9 (2C), 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; **ESI-HRMS** (m/z) 859.4420 ($\text{C}_{53}\text{H}_{63}\text{O}_{10}^+$ [M+1] calculado 859.4421).

Bencil 3 β -hidroxi-2 α -succiniloxiolean-12-en-28-oato (78): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 13$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3421, 2983, 2845, 1722; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.30 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.05 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 9.9$, $J_3 = 11.2$ Hz, H-2), 5.04 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 3.20 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.9$ Hz, H-18), 2.70–.50 (m, 4H, grupo succinilo), 1.14, 1.09, 1.01, 0.95, 0.89, 0.87, 0.78 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6 (2C), 172.8, 143.9, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 80.9, 73.7, 66.2, 55.3, 47.7, 46.9, 46.1, 43.8, 41.9, 41.6, 39.8, 39.5, 38.5, 34.1, 33.3, 32.7, 32.5, 30.9, 29.9, 29.8, 28.8, 27.8, 26.1, 23.8, 23.4, 23.3, 18.4, 17.0, 16.9, 16.5; **ESI-HRMS** (m/z) 663.4272 ($\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{O}_7^+$ [M+1] calculado 663.4261).

Bencil 2 α ,3 β -disucciniloxiolean-12-en-28-oato (79): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 10$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** v_{max} (film)/ cm^{-1} 3379, 2984, 2855, 1700; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.30 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.04 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.75 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 2.70–2.55 (m, 8H, grupo

succinilo), 1.09, 0.99, 0.90, 0.88, 0.88, 0.86, 0.56 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 178.6 (2C), 177.6, 172.1, 171.9, 144.0, 136.6, 128.7 (2C), 128.3 (2C), 128.2, 122.3, 81.2, 70.7, 66.2, 55.1, 47.8, 46.9, 46.1, 44.2, 41.9, 41.6, 39.7, 39.6, 38.4, 34.1, 33.4, 32.7, 32.6, 30.9, 29.3 (2C), 29.1 (2C), 28.7, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.5, 18.0, 17.1, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 785.4246 ($\text{C}_{45}\text{H}_{62}\text{O}_{10}\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 785.4241).

Bencil 2 α -glutariloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (80): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 19$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3401, 3015, 2871, 1699; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.98 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.96 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 11.5$ Hz, H-2), 3.18 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz, H-3), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.45–2.30 (m, 4H, grupo), 1.09, 1.02, 0.97, 0.89, 0.83, 0.78, 0.57 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.9, 177.6, 173.7, 144.0, 136.6, 128.7 (2C), 128.3 (2C), 128.2, 122.3, 81.2, 70.7, 66.2, 55.1, 47.8, 46.9, 46.1, 44.2, 41.9, 41.6, 39.7, 39.6, 38.4, 34.1, 33.4, 32.7, 32.6, 30.9, 29.3, 29.1, 28.7, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 20.2, 18.5, 18.0, 17.1, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 699.4261 ($\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_7\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 699.4237).

Bencil 2 α ,3 β -diglutariloxiolean-12-en-28-oato (81): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 1$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3378, 3021, 2861, 1725; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.32 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.04 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.75 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.50–2.10 (m, 8H, grupo glutarilo), 1.09, 1.02, 0.99, 0.88, 0.87, 0.87, 0.56 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 178.6 (2C), 177.5, 172.9 (2C), 143.9, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.3, 80.4, 70.2, 66.1, 55.1, 47.7, 46.9, 46.1, 44.0, 41.9, 41.5, 39.6, 39.5, 38.4, 34.1, 33.4 (2C), 33.3, 33.1 (2C), 32.7, 32.5, 30.9, 28.6, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.2, 20.3, 20.2, 18.4, 17.9, 17.0, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 813.4523 ($\text{C}_{47}\text{H}_{66}\text{O}_{10}\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 813.4554).

Bencil 2 α -(3,3-dimetil-glutariloxi)-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oato (82): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 25$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3383, 3010, 2829, 1715; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.04 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.94 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 3.19 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H-3), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.7$ Hz, H-18), 2.45–2.35 (m, 4H, grupo 3,3-dimetil-glutarilo), 1.14, 1.12, 1.10, 1.02, 0.98, 0.89, 0.87, 0.84, 0.56 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6 (2C) 172.8, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 80.9, 73.5, 66.2, 55.3, 47.8, 46.9, 46.1, 45.4, 45.1, 43.9, 42.0, 41.6, 39.9, 39.6, 38.5, 34.1, 33.3, 33.0, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 28.6, 28.5, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.2, 18.5, 17.1, 16.9, 16.5; **ESI-HRMS** (m/z) 727.4552 ($\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_7\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 727.4550).

Bencil 2 α ,3 β -di(3,3-dimetil-glutariloxi)olean-12-en-28-oato (83): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D + 10$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); **IR** ν_{max} (film)/ cm^{-1} 3401, 3027, 2839, 1732; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.31 (m, 5H, aromáticos bencilo), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz, H-2), 5.04 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.77 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz, H-18), 2.55–2.25 (m, 8H, grupo 3,3-dimetil-glutarilo), 1.12, 1.12, 1.09, 1.00, 0.89, 0.87, 0.87, 0.84, 0.56 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 177.6, 177.1 (2C), 172.1, 171.9, 144.1, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (3C),

122.3, 80.4, 70.5, 66.2, 55.1, 47.7, 46.9, 46.1, 45.5 (2C), 45.1 (2C), 44.2, 42.0, 41.6, 39.6 (2C), 38.4, 34.1, 33.3, 32.6, 32.5, 31.1 (2C), 30.9, 28.8, 28.2 (2C), 28.0 (2C), 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.5, 18.5, 18.0, 17.1, 16.6; **ESI-HRMS (*m/z*)** 845.5194 ($C_{51}H_{73}O_{10}^-$ [M-1] calculado 845.5204).

III.3.7. Síntesis Orgánica en Fase Sólida

III.3.7.1. Pruebas de cuantificación del acoplamiento del triterpeno a la resina

Paso 1: Se colocan 6 porciones de 50 mg de resina CCT (1.27 mmol/g) en jeringas de polipropileno (10 mL) equipado con un disco de polietileno. La resina se lava con DMF (2 mL x3 veces) y DMC (2 mL x 3 veces), se solvata con DCM (2 mL durante 20 min) para, posteriormente, eliminar el disolvente por succión. Tres jeringas son tratadas con una disolución de **AO** y otras tres con una disolución de **AM**, según se muestra en la Tabla 3.22, con DIEA y DCM y colocada en agitación orbital durante 48 h. Posteriormente, se filtra la resina, se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM y finalmente se seca la resina.

	OA (1)	DIEA	DCM
Test A (jeringa 1)	14.82 mg, 0.5 equiv	10 μ L, 10 equiv	1 mL
Test B (jeringa 2)	29.64 mg, 1.0 equiv	20 μ L, 20 equiv	1 mL
Test C (jeringa 3)	88.92 mg, 3.0 equiv	60 μ L, 60 equiv	1 mL
	MA (2)	DIEA	DCM
Test A (jeringa 4)	15.34 mg, 0.5 equiv	10 μ L, 10 equiv	1 mL
Test B (jeringa 5)	60.68 mg, 1.0 equiv	20 μ L, 20 equiv	1 mL
Test C (jeringa 6)	92.04 mg, 3.0 equiv	60 μ L, 60 equiv	1 mL

Tabla 3.22. Estequiometría de los ensayos de acoplamiento del triterpeno a la resina

Paso 2: Las jeringas con la resina son tratadas con una disolución de Fmoc-Leu-OH (115 mg, 5 equiv cada una) con DIEA (102 μ L, 10 equiv cada una) en DCM y puesto en agitación orbital durante 2 h.

Paso 3: Para saturar los centros activos de la resina se añade 0.5 mL de MeOH a la jeringa con la resina y se coloca en agitación orbital durante 30 min. Posteriormente, se filtra la resina, se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3) y finalmente se seca.

Paso 4: Se añade una disolución de Fmoc-Gly, DIPCDI, DMAP en DCM/DMF (1 mL/1 mL) según se muestra en la Tabla 3.23. Se colocan las jeringas en agitación orbital durante 1 h. La resina es filtrada, lavada con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3) y después secada.

	Fmoc-Gly-OH	DIPCDI	DMAP
Jeringas 1, 2 y 3	188 mg, 10 equiv	93 μ L, 10 equiv	7 mg, 1 equiv
Jeringas 4, 5 y 6	376 mg, 20 equiv	186 μ L, 20 equiv	14 mg, 2 equiv

Tabla 3.23. Estequiometría de la esterificación de **AO** y **AM** con Fmoc-Gly-OH en fase sólida

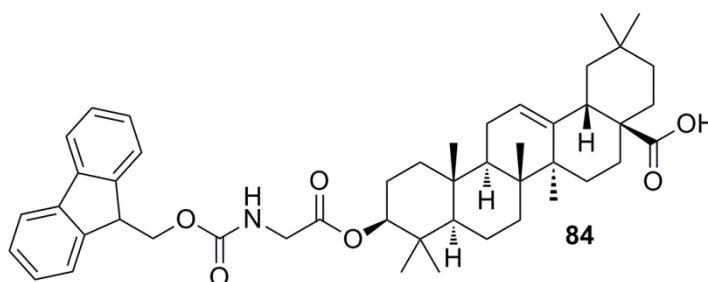
Paso 5: La escisión de los derivados de **AO** y **AM** de la resina se realizó mediante la adición a la jeringa de una disolución de TFA (1%) en DCM (2 min x3).

Una vez obtenido las distintas mezclas de Fmoc-Gly-AO o Fmoc-Gly-AM y Fmoc-Leu-OH se analizan por HPLC (Esq. 2.26 y Tab. 2.27). El análisis por RP-HPLC se lleva a cabo con una columna C18 fase-reversa WATERS (0.4 μm diámetro de partícula, 150 mm x 3.9 mm) con un flujo de 1 mL/min. La longitud de onda seleccionada para el análisis es de 301 nm y se utiliza un gradiente lineal $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ con 1% de TFA, desde 30% de agua a 0% en 30 min, posteriormente, se mantiene durante 5 min un flujo de 100 % CH_3CN .

III.3.7.2. Síntesis en disolución de Fmoc- derivados de AO y AM

a) Reacción de AO con Fmoc-Gly

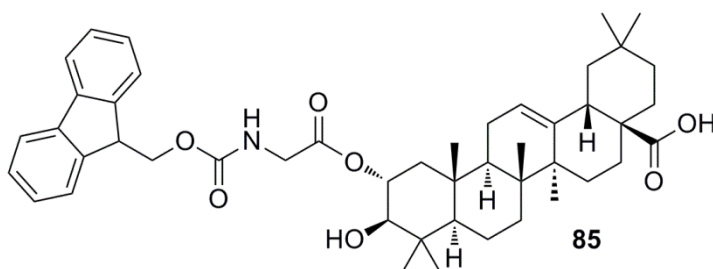
Se prepara una disolución de **AO** (100 mg, 0.22 mmol) en DCM (5 mL). Se le añade una disolución de Fmoc-Gly-OH (188 mg, 10 mmol), DIPCDI (93 μL , 10 mmol) y DMAP (7 mg, 1 mmol) en DCM/DMF (5 mL/5 mL). La reacción se mantiene en agitación magnética durante 2 h a reflujo. Se añade agua fría a la mezcla y se extrae varias veces con DCM, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **84** en los distintos porcentajes que se muestran en la Tabla 2.27.



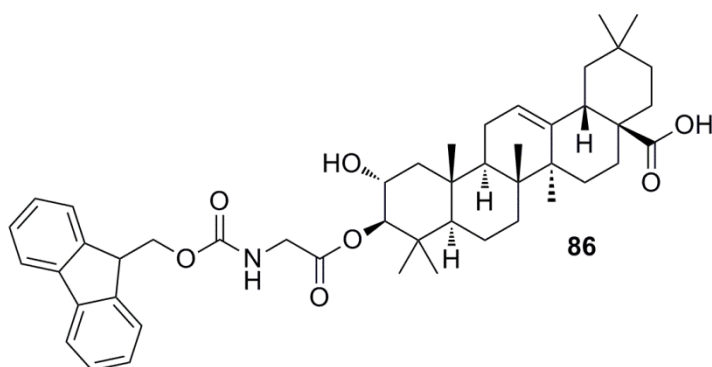
Fmoc-Gly-AO (84): Sólido blanco; pf 115–117 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 27$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3620, 2941, 2395, 1699; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.79 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.63 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.45–7.29 (m, 4H), 5.31 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 4.62 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 7.5$ Hz), 4.43 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.26 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.01 (d, 2H, $J = 3.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$, $J_2 = 10.5$ Hz), 1.07, 1.01, 0.89, 0.87, 0.85, 0.84, 0.59 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 184.0, 170.1, 156.5, 144.0 (2C), 143.8, 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.3 (2C), 125.3 (2C), 122.6, 120.2 (2C), 82.8, 67.4, 55.5, 47.8, 47.3, 46.7, 46.1, 43.2, 41.8, 41.1, 39.6, 38.2, 38.1, 37.2, 34.0, 33.3, 32.7, 32.6, 30.9, 28.3, 27.9, 26.1, 23.8 (2C), 23.7, 23.1, 18.4, 17.3, 16.8, 15.6; **HR-LSIMS** (m/z) 736.4570 ($\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{NO}_6^+$ [M+1] calculado 736.4577).

b) Reacción de AM con Fmoc-Gly

Se prepara una disolución de **AM** (100 mg, 0.21 mmol) en DCM (5 mL). Se le añade una disolución de Fmoc-Gly-OH (376 mg, 20 mmol), DIPCDI (186 μ L, 20 mmol) y DMAP (14 mg, 2 mmol) en DCM/DMF (5 mL/5 mL). La reacción se mantiene en agitación magnética durante 2 h a reflujo. Se añade agua fría a la mezcla y se extrae varias veces con DCM, la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Por último, se purifica en columna flash de silicagel obteniéndose **85**, **86** y **87** según los porcentajes de la Tabla 2.27.

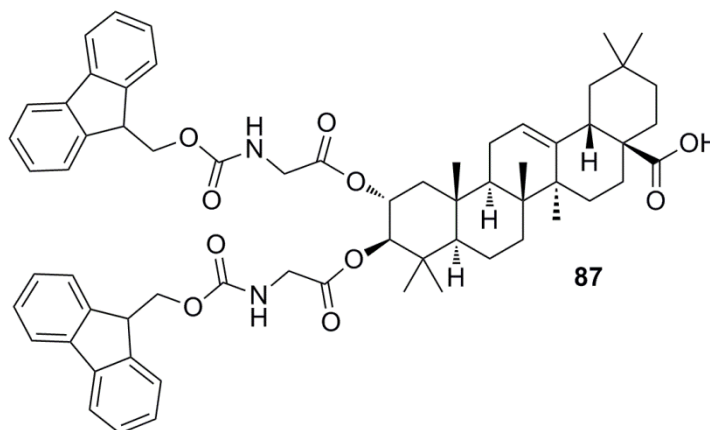


2-Fmoc-Gly-AM (85): Sólido blanco; pf 170–172 °C; $[\alpha]_D + 6$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3636, 2930, 2389, 1700; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.76 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 7.43–7.29 (m, 4H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz), 4.42 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 4.24 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 4.02–3.92 (m, 4H), 3.19 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$, $J_2 = 10.5$ Hz), 1.12, 1.04, 1.03, 0.93, 0.92, 0.86 0.75 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 182.5, 170.3, 157.3, 143.8, 143.8 (2C), 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.3 (2C), 125.7 (2C), 122.4, 120.2 (2C), 80.7, 74.9, 67.5, 55.3, 47.7, 47.2, 46.7, 46.0, 43.7, 43.3, 41.2, 39.9, 39.5, 38.6, 34.0, 33.2, 32.6 (2C), 30.8, 29.9, 28.7, 27.8, 26.1, 23.7, 23.6, 23.1 18.4, 17.2, 16.8, 16.5; **ESI-HRMS** (m/z) 752.4529 ($\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{NO}_7^+$ [M+1] calculado 752.4526).



3-Fmoc-Gly-AM (86): Sólido blanco; pf 143–145 °C; $[\alpha]_D + 3$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3619, 2922, 2388, 1705; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.76 (d, 2H, 6.5 Hz), 7.59 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.42–7.28 (m, 4H), 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.60 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 4.42 (d, 2H, $J = 12.5$ Hz), 4.24 (t, 1H, $J = 6.5$), 4.05–4.00 (m, 4H) 3.80 (ddd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 =$

10.5, $J_3 = 12.5$ Hz), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 1.14, 0.98, 0.93, 0.91, 0.90, 0.85, 0.76 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 185.32, 170.8, 157.3, 143.9, 143.8 (2C), 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.2 (2C), 125.2 (2C), 122.5, 120.2 (2C), 86.6, 67.5, 67.3, 55.3, 47.7, 47.3, 46.6, 46.0, 43.4, 41.9, 41.3, 39.5, 39.4, 38.4, 34.0, 33.2, 32.7, 32.6, 30.8, 29.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.7, 23.6, 23.1 18.4, 17.8, 17.3, 16.7; **ESI-HRMS** (m/z) 752.4525 ($\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{NO}_7^+$ [M+1] calculado 752.4526).



2,3-diFmoc-Gly-AM (87): Sólido blanco; pf 121–123 °C; $[\alpha]_D - 1$ (c 1 in CHCl_3); **IR** $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3615, 2927, 2390, 1710; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.79 (d, 4H, $J = 6.5$ Hz), 7.63 (d, 4H, $J = 6.5$ Hz), 7.45–7.29 (m, 8H), 5.34 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz), 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.80 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 4.18 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.95–3.87 (m, 8H), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.4$ Hz), 1.11, 1.04, 0.85, 0.81, 0.81, 0.75 0.53 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 183.7, 170.3, 169.9, 157.0 (2C), 143.9 (4C), 143.8, 141.4 (4C), 127.9 (4C), 127.3 (4C), 125.7 (4C), 122.2, 120.1 (4C), 82.1, 71.0, 67.5 (2C), 55.0, 47.7, 47.2 (2C), 46.7, 46.0, 43.9, 43.1, 42.9, 41.8, 41.1, 39.6, 39.5, 38.5, 34.0 (2C), 32.6, 32.5, 30.9, 28.6, 27.8, 26.1, 23.8, 23.6, 23.0 18.3, 17.8, 17.3, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 1031.5428 ($\text{C}_{64}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{10}^+$ [M+1] calculado 1031.5422).

III.3.7.3. Pruebas de acilación en fase sólida

Paso 1: Dos porciones de resina de CCT (200 mg, 1,27 mmol/g) se colocan en dos jeringas de polipropileno (20 mL) equipadas con filtros de polietileno. La resina se lava con DMF (2 mL x3) y DCM (2 mLx3), se solvata con DCM (2 mL, 20 min) para, posteriormente, eliminar el disolvente. Se incorpora **AO** y **AM** a la resina por el método general descrito anteriormente y se coloca en agitación orbital durante 24 h. Posteriormente se reacopla con una disolución de **AO** y **AM** con las mismas concentraciones que la anterior y se coloca de nuevo en agitación orbital durante 24 h.

Paso 2: Tras este periodo de tiempo, se saturan los centros activos de la resina añadiendo 0.5 mL de MeOH y se coloca en agitación orbital durante 20 min. Después de este proceso, la resina es filtrada, lavada con DMF (2 mLx 3) y DCM (2 mL x 3) y después secada.

Paso 3: Cada jeringa es dividida en cuatro porciones (1/4 cada una) para obtener cuatro jeringas de resina-**AO** y otras cuatro jeringas de resina-**AM**. Cada una de las jeringas es acilada con los anhídridos acético, hexanoico, benzoico y succínico (Tab. 3.24), en una relación molar de 4:1 (anhídrido: grupo OH) y puesta en agitación orbital a temperatura ambiente. La resina es filtrada, lavada con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x3) y después secada.

		Anhídrido	Cantidad de Anhídrido	DMAP (mg)	ET ₃ N (mL)	DCM/DMF (mL)
AO	Jeringa 1	Acético	0.075 mL	5	0.05	1/1
	Jeringa 2	Hexanoico	0.18 mL	5	0.05	1/1
	Jeringa 3	Benzoico	180 mg	5	0.05	1/1
	Jeringa 4	Succínico	80 mg	5	0.05	1/1
AM	Jeringa 5	Acético	0.15 mL	5	0.05	1/1
	Jeringa 6	Hexanoico	0.36 mL	5	0.05	1/1
	Jeringa 7	Benzoico	360 mg	5	0.05	1/1
	Jeringa 8	Succínico	160 mg	5	0.05	1/1

Tabla 3.24. Proporciones estequiométricas para las pruebas de acilación en fase sólida

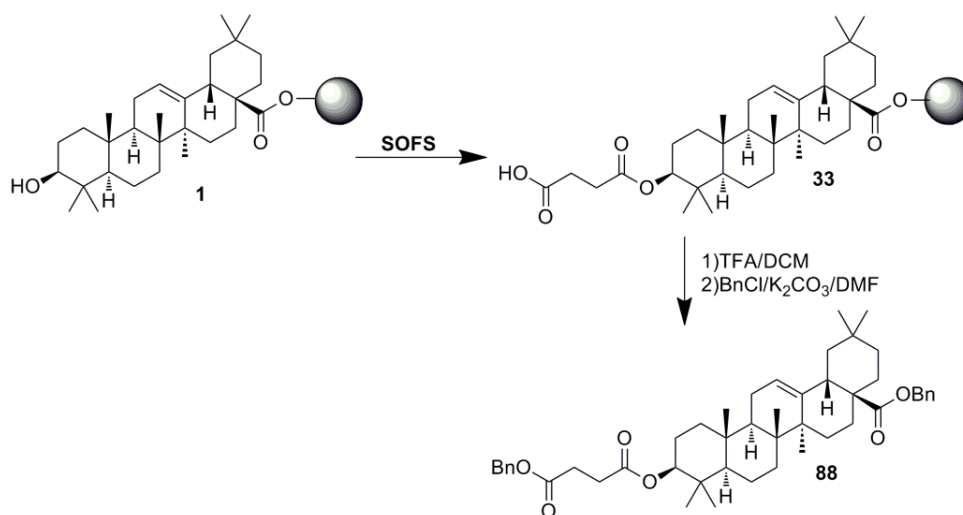
Paso 4: La escisión de los acil-derivados de la resina se realiza añadiendo a cada jeringa una disolución de DCM con TFA (1%) (2 min x3).

Una vez obtenido las distintas mezclas de las reacciones de acilación se analizan por HPLC (Tab. 3.29 y Tab. 3.30). El análisis por RP-HPLC se lleva a cabo con una columna C18 fase-reversa WATERS (0.4 μ m diámetro de partícula, 150 mm x 3.9 mm) con un flujo de 1 mL/min. La longitud de onda seleccionada para el análisis es de 210 nm y se utiliza un gradiente lineal H₂O-CH₃CN que contiene un 0.1% de TFA, desde 30% de agua a 0% en 30 min, posteriormente se mantiene durante 5 min un flujo de 100 % CH₃CN. Ambos disolventes contienen un 0.1% de TFA.

III.3.7.4. Cuantificación de la acilación de **AO** y **AM** en fase sólida. Formación de bencil-succinil derivados

a) Succinilización en fase sólida de **AO** y posterior bencilación en fase líquida

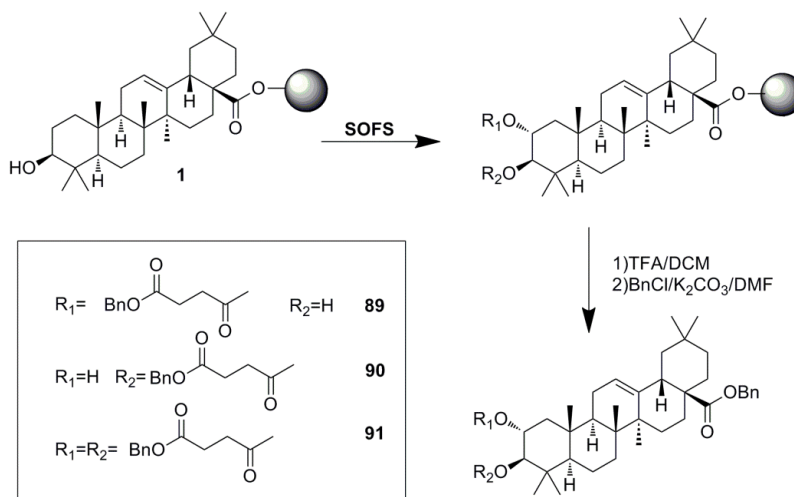
AO (1, 150 mg, 0.33 mmol) se succinila en fase sólida según el procedimiento general anteriormente descrito. Una vez clivado de la resina se evapora el exceso de disolvente obteniéndose 110 mg de residuo sólido. La mezcla de reacción es disuelta en DMF (5 mL) con K₂CO₃ (0.2 g) y se le añade BnCl (0.05 mL). La reacción se mantiene 4 horas en agitación magnética a 55 °C. Una vez finalizada se diluye en agua y extrae con DCM, para secar, posteriormente, la parte orgánica con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se retira por evaporación en rotavapor y el residuo obtenido es purificado en cromatografía en columna usando un gradiente DCM/Acetona para obtener bencil oleanato (**3**, 60 mg, 40%, descrito anteriormente) y bencil 3-(bencilsuccinil) oleanato (**88**, 133 mg, 55%).



Bencil 3-(bencilsuccinil) oleanato (88): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D^{25} +77$ (*c* 1 en CHCl₃); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3293, 2985, 2815 y 1699; ¹H RMN (CDCl₃): δ 7.36-7.35 (m, 10H, aromáticos bencilo), 5.31 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.13, 5.07 (sistema AB, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 4.53 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.6$ Hz, H-3), 2.93 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz, H-18), 2.75-2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 1.15, 0.94, 0.92, 0.91, 0.87, 0.85, 0.63 (s, 3H, Me); ¹³C RMN (CDCl₃): δ 178.4, 172.1, 171.8, 143.7, 136.5, 135.8, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 122.4, 81.3, 66.5, 65.9, 55.3, 47.6, 46.8, 45.9, 41.7, 41.4, 39.3, 37.7, 36.9, 38.1, 33.9, 33.1, 32.9, 32.4, 30.7, 29.6, 29.3, 29.2, 28.1, 27.7, 25.9, 23.7, 23.5, 23.1, 18.2, 16.9, 16.8, 15.4; **ESI-HRMS** (*m/z*) 735,4623 (C₄₈H₆₃O₆ [M-1] calculado 735,4625).

b) Succinilización en fase sólida de AM y posterior bencilación en fase líquida

AM (**2**, 472 mg, 1 mmol) es succinilado en fase sólida utilizando el método anteriormente descrito. Una vez clivado de la resina se obtienen 390 mg de residuo que son posteriormente tratados, al igual que se ha descrito para **AO**, obteniéndose cuatro productos, (**4**, 28 mg, 6%, descrito anteriormente), bencil 2-(bencilsuccinil) maslinato (**89**, 60 mg, 8%), bencil 3-(bencilsuccinil) maslinato (**90**, 45 mg, 6%), bencil 2,3-di(bencilsuccinil) maslinato (**91**, 754 mg, 80%).



Bencil 2-(bencilsuccinil) maslinato (89): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D +6$ (c 1 en CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3301, 3012, 2915 y 1783; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7.36-7.34 (m, 10H, aromáticos bencilo), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz, H-12), 5.14, 5.08 (sistema AB, 2H, $J = 12.0$ Hz, metileno bencilo), 5.00 (ddd, 1H, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 6.0$ Hz, $J_3 = 10.5$ Hz, H-2), 3.14 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-3), 2.91 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz, H-18), 2.75-2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 1.12, 1.05, 0.99, 0.92, 0.90, 0.86, 0.59 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 177.5, 172.7, 172.5, 143.9, 136.5, 135.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 122.3, 80.7, 73.9, 66.8, 66.1, 55.2, 47.6, 46.8, 46.0, 43.6, 41.8, 41.5, 39.7, 39.4, 38.4, 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 30.8, 29.7, 29.6, 28.7, 27.7, 26.0, 23.8, 23.6, 23.1, 18.3, 17.0, 16.8, 16.4; **ESI-HRMS** (m/z) 753.4714 ($\text{C}_{48}\text{H}_{65}\text{O}_7$ [M+1] calculado 753.4730).

Bencil 3-(bencilsuccinil) maslinato (90): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D +3$ (c 1 en CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3343, 3076, 2915 y 1783; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7.35-7.34 (m, 10H, aromáticos bencilo), 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.13, 5.07 (sistema AB, 2H each, $J = 12.5$ Hz, metileno bencilo), 4.57 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz, H-3), 3.75 (ddd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 6.5$ Hz, $J_3 = 10.5$ Hz, H-2), 2.91 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz, H-18), 2.80-2.65 (m, 4H, grupo succinilo), 1.13, 0.95, 0.92, 0.90, 0.87, 0.84, 0.60 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 177.5, 173.0, 172.9, 143.8, 136.5, 135.7, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 122.4, 85.6, 67.2, 66.9, 66.0, 55.2, 47.5, 46.9, 46.8, 45.8, 41.8, 41.5, 39.5, 39.3, 38.2, 34.0, 33.2, 32.5, 32.4, 30.8, 29.5, 29.4, 28.5, 27.6, 25.9, 23.6, 23.4, 23.0, 18.3, 17.7, 16.9, 16.6; **ESI-HRMS** (m/z) 753.4722 ($\text{C}_{48}\text{H}_{65}\text{O}_7$ [M+1] calculado 753.4730).

Bencil 2,3-di(bencilsuccinil) maslinato (91): Sirupo incoloro; $[\alpha]_D +57$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3343, 3076, 2915 and 1783; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7.38-7.31 (m, 15H, aromáticos bencilo), 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 5.14 (ddd, 1H, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 6.0$ Hz, $J_3 = 10.5$ Hz, H-2), 5.12, 5.04 (sistema AB, 6H each, metileno bencilo), 4.79 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-3), 2.93 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz, H-18), 2.67-2.57 (m, 8H, grupo succinilo), 1.14, 1.03, 1.02, 0.94, 0.92, 0.89, 0.60 (s, 3H each, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3): δ 177.4, 172.2, 172.1, 172.0, 171.9, 143.7, 136.5, 135.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 122.1, 80.7, 70.3, 66.5, 66.4, 66.0, 54.9, 47.5, 46.7, 45.8, 43., 41.7, 41.4, 39.5, 39.3, 38.1, 33.9, 33.2, 32.5, 32.4, 30.8, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.4, 27.6, 25.9, 23.7, 23.5, 23.1, 18.2, 17.7, 16.8, 16.4; **ESI-HRMS** (m/z) 943.5335 ($\text{C}_{59}\text{H}_{75}\text{O}_{10}$ [M+1] calculado 943.5360).

III.3.8. Obtención de una librería de derivados peptídicos de los ácidos AO y AM

III.3.8.1. Formación en fase sólida de C-28 mono-peptidil y di-peptidil derivados de AO y AM

Paso 1: Se colocan porciones de 300 mg de resina CCT (1.27 mmol/g) en 6 jeringas de polipropileno (20 mL) equipado con un disco de polietileno. La resina se lava con DMF (2 mL x3 veces) y DMC (2 mL x 3 veces), se solvata con DCM (2 mL durante 20 min) para, posteriormente, eliminar el disolvente. La resina es tratada con una disolución de los productos con el primer aminoácido (según se indica en la Tabla 3.25) y se coloca en agitación orbital durante 2 h. Posteriormente, se filtra la resina, se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM y finalmente se seca la resina.

Jeringa	AA	mg	DIEA	DCM
1	Fmoc-Gaba	260	0.90 mL	1.1 mL
2	Fmoc-6-AHA	280	0.90 mL	1.1 mL
3	Fmoc-11-AUA	330	0.90 mL	1.1 mL
4	Fmoc-Gly	230	0.90 mL	1.1 mL
5	Fmoc-Ala	245	0.90 mL	1.1 mL
6	Fmoc-Val	265	0.90 mL	1.1 mL

Tabla 3.25. Proporciones estequiométricas para el acoplamiento del primer aminoácido a la resina

Paso 2: Para saturar los centros activos de la resina se añade 0.5 mL de MeOH a la jeringa con la resina y se coloca en agitación orbital durante 30 min. Posteriormente se filtra la resina, se lava con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3) y finalmente se seca.

Paso 3: Para eliminar el grupo Fmoc y liberar el grupo carboxilo se lava la resina primeramente con DCM (2 mL x 3 veces) y DMF (2 mL x 3 veces). Posteriormente se filtra la resina y se le añade una disolución de DMF: piperidina (4:1) (2 mL x 3, 10 minutos cada vez). Tras este proceso se lava la resina con DMF (2 mL x 3) y DCM (2 mL x 3). Finalmente se seca la resina.

Paso 4: La resina de las jeringas 1,2 y 3 se divide cada una en 2 porciones y el proceso pasa por la etapa 5 mientras que las jeringas 4, 5 y 6 son divididas en 3 porciones, cada porción es tratada con una disolución con el siguiente aminoácido (según la Tab. 3.26.) en DMF. Tras añadir la disolución se mantiene en agitación orbital a temperatura ambiente durante 2 horas. Se toma una pequeña porción de resina y se realiza el test de Kaiser que resulta ser negativo continuando con el proceso. Se repite el paso 3 para eliminar el grupo Fmoc del aminoácido y por último, se dividen las porciones en 2 cada una, Obteniéndose un total de 24 porciones.

	AA	mg	HAOT	DIPCDI	DMF
Porción 1	Fmoc-Gaba	170	0.25 mL	0.322	4 mL
Porción 2	Fmoc-6-AHA	184	0.25 mL	0.322	4 mL
Porción 3	Fmoc-11-AUA	220	0.25 mL	0.322	4 mL

Tabla 3.26. Proporciones estequiométricas para el acoplamiento del segundo aminoácido a la resina

Paso 5: A cada porción de resina (50 mg) se le añade una disolución de **AO** (89 mg) o **AM** (92 mg), PyAOP (101.67 mg), HOAt (0.075 mL), DIEA (0.31 mL) disueltos en DMF (1 mL). La mezcla se mantiene en agitación orbital durante 24 h a temperatura ambiente. Tras este proceso la resina es filtrada y lavada con DMF (2 mL x 3) y se le vuelve a añadir la misma disolución anterior para el reacoplamiento del **AO** o **AM**. La resina resultante es filtrada y lavada con DMF, piperidina 20% en DMF, DMSO y DCM (2 mL x 3 veces con cada disolución).

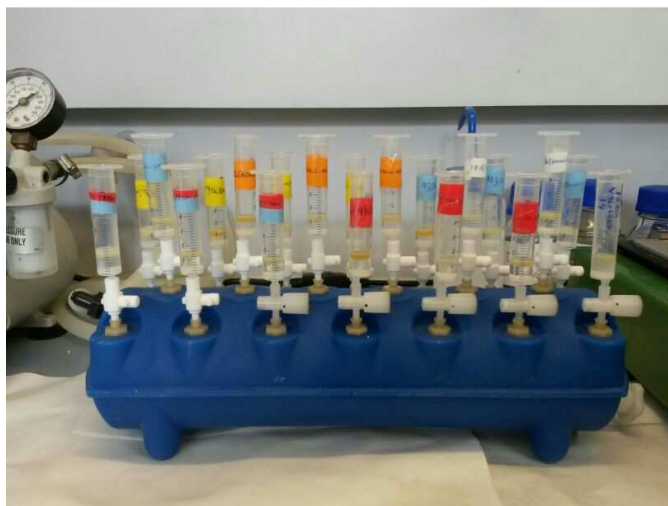
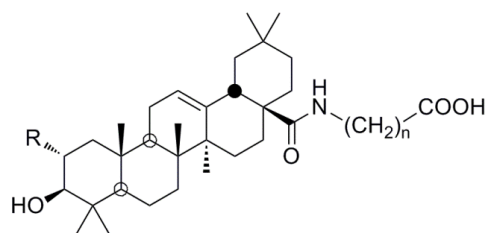


Figura 4.27. Equipamiento para realizar el work-up de SOFS

Paso 6: La escisión de los derivados de **AO** y **AM** de la resina se realiza mediante la adición a la jeringa de una disolución de TFA (1%) en DCM (2 min x3).

Una vez obtenido las distintas mezclas de los derivados peptídicos, se analizan por HPLC y por los métodos de determinación estructural. El análisis por RP-HPLC se lleva a cabo con una columna C18 fase-reversa WATERS (0.4 μ m diámetro de partícula, 150 mm x 3.9 mm) con un flujo de 1 mL/min. La longitud de onda seleccionada para el análisis es de 210 nm y se utiliza un gradiente lineal H₂O-CH₃CN que contienen un 0.1% de TFA, desde 30% de agua a 0% en 30 min, posteriormente se mantiene durante 5 min un flujo de 100 % CH₃CN.



92: R = H, n = 3 **95:** R = OH, n = 3
93: R = H, n = 5 **96:** R = OH, n = 5
94: R = H, n = 10 **97:** R = OH, n = 10

Monopeptidil derivados de AO y AM

Ácido N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (OA-GABA-OH) (92): HPLC tiempo de retención 4.08 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 121-123 °C; $[\alpha]_{D+} +42$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 6.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.1$ Hz, NH), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 3.40 (dt, 2H, $J_1=5.1$ Hz, $J_2=7.0$ Hz, 2H C-4 GABA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.52 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.35 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, H-2 GABA), 1.14, 0.96, 0.88, 0.88, 0.88, 0.76, 0.73 (s, 3H, Me); ^{13}C NMR (Cl_3CD) δ 179.7, 176.7, 144.9, 123.3, 79.2, 47.7, 47.7, 47.0, 46.6, 42.4, 42.4, 39.6, 39.1, 38.9, 37.2, 36.7, 34.3, 33.1, 32.7, 32.5, 31.9, 30.9, 28.3, 27.5, 27.5, 26.0, 25.0, 23.8, 23.8, 23.7, 18.5, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS (m/z)** 564.4193 ($C_{34}H_{55}NO_4Na^+$ [M+Na] calculado 564.4209).

Ácido N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (OA-6AHA-OH) (93): HPLC tiempo de retención 4.65 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 117-119 °C; $[\alpha]_{D+} +88$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 6.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.4$ Hz, NH), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 3.36 (m, 2H, 2H C-6 6AHA), 3.26 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.44 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.34 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, 2H C-2 6AHA), 1.14, 0.97, 0.89, 0.89, 0.87, 0.77, 0.73 (s, 3H, Me); ^{13}C NMR (Cl_3CD) δ 179.9, 178.9, 145.0, 123.4, 79.6, 55.3, 47.7, 46.9, 46.6, 42.6, 42.4, 39.9, 39.6, 38.4, 38.2, 37.2, 34.2, 33.9, 33.1, 32.4, 32.3, 30.9, 29.0, 29.0, 28.3, 27.4, 26.6, 25.9, 24.4, 23.9, 23.8, 23.7, 18.4, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS (m/z)** 592.4353 ($C_{36}H_{59}NO_4Na^+$ [M+Na] calculado 592.4342).

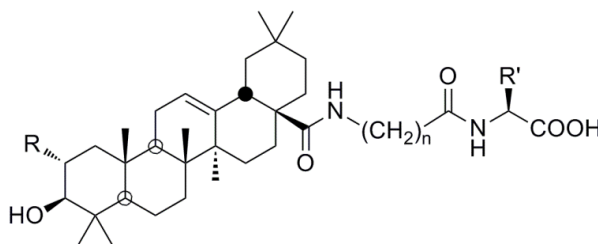
Ácido N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (OA-11AUA-OH) (94): HPLC tiempo de retención 11.68 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 97-99 °C; $[\alpha]_{D+} +56$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 6.10 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.1$ Hz, NH), 5.35 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 3.34 (m, 2H, 2H C-11 11AUA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.45 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.31 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, 2H C-2 11AUA), 1.14, 0.97, 0.89, 0.88, 0.86, 0.76, 0.74 (s, 3H, Me); ^{13}C NMR (Cl_3CD) δ 178.7, 178.5, 145.3, 123.0, 79.2, 54.3, 47.8, 47.1, 46.5, 42.7, 42.4, 39.9, 39.6, 39.0, 38.7, 37.2, 34.4, 34.2, 33.2, 32.6, 32.1, 30.9, 29.5, 29.5, 29.3, 29.3, 29.3, 29.3, 28.3, 27.5, 27.4, 26.0, 24.9, 24.0, 24.0, 23.8, 23.8, 18.5, 17.2, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS (m/z)** 662.5308 $C_{41}H_{69}NO_4Na^+$ [M+Na] calculado 662.5305).

Ácido N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (MA-GABA-OH) (95): HPLC tiempo de retención 2.75 min; HPLC pureza 99 %; **Sólido blanco**; pf 181-183 °C;

$[\alpha]_D + 17$ (c 1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3432, 2947, 2899, 1711; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 7.27 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.1$ Hz, NH), 5.21 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 3.39 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=9.3$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 3.00 (dt, 2H, $J_1=5.1$ Hz, $J_2=7.0$ Hz, 2H C-4 GABA), 2.78 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.72 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, H-3), 2.16 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, H-2 GABA), 1.06, 0.90, 0.87, 0.87, 0.85, 0.68, 0.63 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ 176.2, 174.2, 144.1, 121.3, 82.2, 67.1, 54.7, 47.1, 46.7, 45.9, 45.2, 41.2, 40.4, 38.8, 38.6, 38.2, 37.6, 33.6, 32.9, 32.7, 32.3, 31.2, 30.4, 28.7, 26.9, 25.7, 24.4, 23.5, 23.0, 22.1, 18.0, 17.1, 16.8, 16.2; HR-LSIMS (m/z) 580.3971 ($\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{NO}_5\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 580.3977).

Ácido N-(2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-ol)-6-aminohexanoico (MA-6AHA-OH) (96): HPLC tiempo de retención 3.23 min; HPLC pureza 93 %; **Sólido blanco**; pf 142-144 °C; $[\alpha]_D + 19$ (c 1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3422, 2940, 2870, 1688; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 7.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.4$ Hz, NH), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=9.3$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.97 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 2.78 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.72 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, H-3), 2.16 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, 2H C-2 6AHA), 1.06, 0.90, 0.87, 0.86, 0.85, 0.68, 0.64 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ 176.0, 174.3, 144.1, 121.2, 82.2, 67.1, 54.7, 47.0, 46.7, 45.7, 45.1, 41.2, 40.4, 38.8, 38.6, 38.6, 37.5, 33.6, 33.6, 32.7, 32.7, 32.3, 30.3, 28.8, 28.7, 26.8, 25.6, 24.2, 23.5, 22.9, 22.2, 18.0, 17.0, 16.8, 16.2; HR-LSIMS (m/z) 608.4295 ($\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{NO}_5\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 608.4290).

Ácido N-(2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-ol)-11-aminoundecanoico (MA-11AUA-OH) (97): HPLC tiempo de retención 6.78 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 126-128 °C; $[\alpha]_D + 2$ (c 1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3401, 2910, 2869; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 7.19 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.1$ Hz, NH), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 3.40 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=9.3$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.99 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 2.78 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.72 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, H-3), 2.6 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, 2H C-2 11AUA), 1.07, 0.90, 0.88, 0.87, 0.86, 0.68, 0.65 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ 176.0, 174.3, 144.1, 121.1, 82.1, 67.0, 54.7, 47.0, 46.7, 46.0, 45.1, 41.2, 40.2, 38.8, 38.8, 38.6, 37.5, 33.6, 33.6, 32.9, 32.6, 32.3, 30.3, 29.1, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 26.6, 25.6, 24.5, 23.5, 22.9, 22.2, 18.0, 17.0, 16.8, 16.2; HR-LSIMS (m/z) 678.5076 ($\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{NO}_5\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 678.5073).



- | | |
|---|--|
| 98: R = H, R' = H, n = 3 | 107: R = OH, R' = H, n = 3 |
| 99: R = H, R' = H, n = 5 | 108: R = OH, R' = H, n = 5 |
| 100: R = H, R' = H, n = 10 | 109: R = OH, R' = H, n = 10 |
| 101: R = H, R' = CH ₃ , n = 3 | 110: R = OH, R' = CH ₃ , n = 3 |
| 102: R = H, R' = CH ₃ , n = 5 | 111: R = OH, R' = CH ₃ , n = 5 |
| 103: R = H, R' = CH ₃ , n = 10 | 112: R = OH, R' = CH ₃ , n = 10 |
| 104: R = H, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 3 | 113: R = OH, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 3 |
| 105: R = H, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 5 | 114: R = OH, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 5 |
| 106: R = H, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 10 | 115: R = OH, R' = CH(CH ₃) ₂ , n = 10 |

Dipeptidil derivados de AO y AM

N'-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (OA-GABA-GLY-OH) (98):

HPLC tiempo de retención 3.44 min; **HPLC** pureza of 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 148-150 °C; **[α]_D⁺** 61 (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3423, 2948, 2850, 1654; **¹H NMR** (Cl₃CD) δ 7.41 (dd, 1H, $J_1=J_2=4.5$ Hz, NH Gly); 6.43 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.6$ Hz, NH GABA); 5.38 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.03 (dd, 2H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=18.2$ Hz, 2H C-2 Gly), 3.41 (m, 2H 2H C-4 GABA), 3.21 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.47 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.33 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, 2H C-2 GABA), 1.14, 0.96, 0.88, 0.88, 0.87, 0.76, 0.71 (s, 3H, Me); **¹³C NMR** (Cl₃CD) δ 180.1, 175.1, 172.3, 144.5, 123.6, 79.4, 55.3, 47.7, 46.9, 46.7, 42.5, 42.3, 41.9, 39.6, 39.4, 38.9, 37.2, 36.7, 34.2, 33.5, 33.1, 32.6, 32.5, 30.9, 29.4, 28.3, 27.4, 26.0, 26.0, 23.9, 23.7, 22.3, 18.5, 17.1, 15.8, 15.5; **HR-LSIMS** (*m/z*) 621.4253 (C₃₆H₅₆N₂O₅Na⁺ [M+Na] calculado 621.4243).

N'-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (OA-6AHA-GLY-OH) (99):

HPLC tiempo de retención 3.99 min; **HPLC** pureza 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 112-114 °C; **[α]_D⁺** 55 (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3423, 2948, 2850, 1654; **¹H NMR** (Cl₃CD) δ 6.86 (dd, 1H, $J_1=J_2=4.5$ Hz, NH Gly), 6.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 6AHA), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.02 (dd, 2H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=18.2$ Hz, 2H C-2 Gly), 3.34 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.46 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.30 (t, 2H, $J=5.5$ Hz, 2H C-2 6AHA), 1.14, 0.96, 0.89, 0.89, 0.87, 0.76, 0.72 (s, 3H, Me); **¹³C NMR** (Cl₃CD) δ 179.8, 174.9, 172.4, 144.9, 123.4, 79.4, 55.3, 47.7, 46.9, 46.6, 42.5, 42.3, 41.8, 39.7, 39.6, 38.9, 38.7, 37.2, 36.0, 34.3, 33.1, 32.5, 32.5, 30.9, 29.9, 29.0, 28.3, 27.4, 26.4, 26.1, 25.9, 23.7, 23.7, 23.3, 18.5, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS** (*m/z*) 649.4553 (C₃₈H₆₂N₂O₅Na⁺ [M+Na] calculado 649.4556).

N'-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (OA-11AUA-GLY-OH) (100):

HPLC tiempo de retención 8.07 min; **HPLC** pureza 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 110-112 °C; **[α]_D⁺** 57 (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3423, 2948, 2850, 1654; **¹H NMR** (Cl₃CD) δ 6.44 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH Gly), 6.13 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 11AUA), 5.36 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 4.02 (dd, 2H, $J_1=3.9$ Hz, $J_2=18.2$ Hz, 2H C-2 Gly), 3.34 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.45 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.25 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, 2H C-2 11AUA), 1.14, 0.96, 0.89, 0.89, 0.88, 0.76, 0.73 (s, 3H, Me); **¹³C NMR** (Cl₃CD) δ 179.5, 175.0, 172.3, 145.1, 123.3, 79.4, 55.3, 47.7, 47.0, 46.5, 42.7, 42.3, 41.7, 40.1, 39.6, 39.0, 38.7, 37.2, 36.4, 34.3, 33.1, 32.4, 32.4, 30.9, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.2, 28.9, 28.3, 27.4, 25.9, 25.8, 25.1, 23.7, 23.3, 22.9, 18.5, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS** (*m/z*) 719.5336 (C₄₃H₇₂N₂O₅Na⁺ [M+Na] calculado 719.5339).

N'-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (OA-GABA-ALA-OH) (101):

HPLC tiempo de retención 3.39 min; **HPLC** pureza 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 140-142 °C; **[α]_D⁺** 54 (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3423, 2948, 2850, 1654; **¹H NMR** (Cl₃CD) δ 7.35 (dd, 1H, $J=5.4$ Hz, NH Ala), 6.41 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.8$ Hz, NH GABA), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.53 (dq, 1H, $J_1=J_2=5.4$ Hz, 1H C-2 Ala), 3.37 (m, 2H 2H C-4 GABA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.48 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.31 (t, 2H, $J=5.1$ Hz, 2H C-2 GABA), 1.43 (d, 3H, $J=5.4$ Hz, 3H C-3 Ala), 1.13, 0.96, 0.88, 0.88, 0.87, 0.75, 0.71 (s, 3H, Me); **¹³C NMR** (Cl₃CD) δ 180.3, 175.1, 174.0, 144.6, 123.4, 79.3, 55.3, 48.7, 47.7, 46.9, 46.6, 42.5, 42.2, 39.6, 39.3, 38.9, 38.7, 37.1, 34.2, 33.7, 33.1, 32.6, 32.5,

30.8, 29.4, 28.3, 27.4, 26.0, 25.8, 23.9, 23.7, 23.7, 18.5, 18.3, 17.1, 15.8, 15.5; **HR-LSIMS** (*m/z*) 635.4416 ($C_{37}H_{60}N_2O_5Na^+$ [M+Na] calculado 635.4400).

N¹-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (OA-6AHA-ALA-OH) (102): HPLC tiempo de retención 3.92 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 120-122 °C; $[\alpha]_D^{25} + 49$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 6.98 (dd, 1H, $J=5.1$ Hz, NH Ala), 6.24 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 6AHA), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.56 (dq, 1H, $J_1=J_2=5.1$ Hz, 1H C-2 Ala), 3.34 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 3.23 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.44 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.26 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, 2H C-2 6AHA), 1.41 (d, 3H, $J=5.1$ Hz, 3H C-3 Ala), 1.13, 0.96, 0.88, 0.88, 0.87, 0.76, 0.72 (s, 3H, Me); ^{13}C NMR (Cl_3CD) δ 179.9, 175.2, 174.6, 144.8, 123.4, 79.5, 55.3, 48.6, 47.7, 46.9, 46.6, 42.3, 42.3, 39.8, 39.6, 38.9, 38.7, 37.1, 36.0, 34.2, 33.1, 32.4, 32.4, 30.8, 29.9, 29.8, 28.2, 27.4, 27.1, 26.4, 25.9, 23.9, 23.7, 23.7, 18.4, 18.2, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS** (*m/z*) 663.4720 ($C_{39}H_{64}N_2O_5Na^+$ [M+Na] calculado 663.4713).

N¹-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (OA-11AUA-ALA-OH) (103): HPLC tiempo de retención 8.67 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 115-117 °C; $[\alpha]_D^{25} + 40$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 6.49 (dd, 1H, $J=5.7$ Hz, NH Ala), 6.14 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.6$ Hz, NH 11AUA), 5.36 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 4.55 (dq, 1H, $J_1=J_2=5.7$ Hz, 1H C-2 Ala), 3.30 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 3.23 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.45 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.23 (t, 2H, $J=5.7$ Hz, 2H C-2 11AUA), 1.42 (d, 3H, $J=5.1$ Hz, 3H C-3 Ala), 1.13, 0.96, 0.89, 0.89, 0.87, 0.76, 0.73 (s, 3H, Me); ^{13}C NMR (Cl_3CD) δ 179.6, 175.1, 174.5, 145.1, 123.3, 79.4, 55.3, 48.5, 47.7, 46.9, 46.5, 42.6, 42.3, 40.1, 39.6, 38.9, 38.7, 37.1, 36.5, 34.3, 33.1, 32.5, 32.4, 30.9, 29.9, 29.5, 29.4, 29.2, 29.2, 29.2, 29.1, 28.3, 27.4, 25.9, 25.8, 25.7, 23.9, 23.8, 23.7, 18.5, 18.2, 17.1, 15.6, 15.5; **HR-LSIMS** (*m/z*) 733.5495 ($C_{44}H_{74}N_2O_5Na^+$ [M+Na] calculado 733.5495).

N¹-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (OA-GABA-VAL-OH) (104): HPLC tiempo de retención 4.71 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 105-107 °C; $[\alpha]_D^{25} + 60$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 7.35 (dd, 1H, $J=6.3$ Hz, NH Val), 6.43 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH GABA), 5.38 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.54 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.3$ Hz, 1H C-2 Val), 3.34 (m, 2H 2H C-4 GABA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.45 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.10-2.40 (m, 2H 1H C-3 Val, 1H C-2 GABA), 0.93 (d, 6H, $J=4.5$ Hz, 6H C-4, C-5 Val), 1.13, 0.96, 0.88, 0.88, 0.87, 0.76, 0.71 (s, 3H, Me); ^{13}C NMR (Cl_3CD) δ 180.3, 174.7, 174.1, 144.4, 123.5, 79.4, 57.6, 55.3, 47.7, 46.9, 46.7, 42.3, 42.2, 39.6, 39.5, 38.9, 38.7, 37.1, 34.2, 34.0, 33.1, 32.6, 32.5, 31.4, 30.9, 29.9, 28.3, 27.4, 26.2, 26.0, 23.8, 23.7, 23.7, 19.1, 18.4, 18.0, 17.2, 15.8, 15.5; **HR-LSIMS** (*m/z*) 663.4725 ($C_{39}H_{64}N_2O_5Na^+$ [M+Na] calculado 663.4713).

N¹-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-valina (OA-6AHA-VAL-OH) (105): HPLC tiempo de retención 5.27 min; HPLC pureza 100 %. **Sólido blanco**; pf 90-92 °C; $[\alpha]_D^{25} + 51$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3423, 2948, 2850, 1654; 1H NMR (Cl_3CD) δ 6.84 (dd, 1H, $J=6.3$ Hz, NH Val), 6.21 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 6AHA), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.57 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.3$ Hz, 1H C-2 Val), 3.34 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.45 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.10-2.40

(m, 2H 1H C-3 Val, 1H C-2 6AHA), 0.94 (d, 6H, $J=4.5$ Hz, 6H C-4, C-5 Val), 1.14, 0.96, 0.89, 0.89, 0.87, 0.76, 0.72 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (Cl_3CD) δ 179.8, 174.8, 174.1, 144.9, 123.4, 79.4, 57.5, 55.3, 47.7, 46.9, 46.6, 42.5, 42.3, 39.7, 39.6, 38.9, 38.7, 37.2, 36.1, 34.2, 33.1, 32.5, 32.4, 31.2, 30.9, 29.9, 28.9, 28.8, 27.4, 26.3, 26.1, 25.9, 23.7, 23.7, 23.7, 19.3, 18.5, 18.0, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS** (m/z) 691.5815 ($\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] calculado 691.5026).

N'-[N-(3 α -hidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminoundecanoil]-L-valina (OA-11AUA-VAL-OH) (106): HPLC tiempo de retención 9.48 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 93-95 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +48 (c 1, MeOH); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3423, 2948, 2850, 1654; $^1\text{H NMR}$ (Cl_3CD) δ 6.29 (dd, 1H, $J=6.0$ Hz, NH Val), 6.11 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 11AUA), 5.34 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.55 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.0$ Hz, 1H C-2 Val), 3.32 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 3.22 (dd, 1H, $J_1=5.0$ Hz, $J_2=10.0$ Hz, H-3), 2.46 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.10-2.40 (m, 2H 1H C-3 Val, 1H C-2 11AUA), 0.93 (d, 6H, $J=4.5$ Hz, 6H C-4, C-5 Val), 1.13, 0.95, 0.90, 0.89, 0.85, 0.76, 0.73 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C NMR}$ (Cl_3CD) δ 179.4, 174.5, 174.2, 145.1, 123.2, 79.4, 57.3, 55.3, 47.7, 47.0, 46.5, 42.6, 42.3, 40.0, 39.3, 38.9, 38.7, 37.1, 36.7, 34.3, 33.1, 32.5, 32.4, 31.3, 30.9, 29.9, 29.5, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 28.3, 27.4, 25.9, 25.9, 25.9, 23.9, 23.7, 23.2, 19.2, 18.5, 17.9, 17.1, 15.8, 15.6; **HR-LSIMS** (m/z) 761.5815 ($\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] calculado 761.5808).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (MA-GABA-GLY-OH) (107): HPLC tiempo de retención 2.35 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; pf 157-159 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +8 (c 1, MeOH); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3389, 2930, 2891, 1700; $^1\text{H RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.01 (dd, 1H, $J_1=J_2=4.5$ Hz, NH Gly); 7.23 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.6$ Hz, NH GABA); 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 3.71 (dd, 2H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=18.2$ Hz, 2H C-2 Gly), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.98 (m, 2H 2H C-4 GABA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.08 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, 2H C-2 GABA), 1.07, 0.90, 0.88, 0.87, 0.85, 0.68, 0.63 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 176.2, 172.3, 171.3, 144.1, 121.3, 82.3, 54.8, 47.1, 47.1, 46.8, 46.0, 45.2, 41.2, 40.5, 40.4, 38.9, 38.9, 38.6, 37.6, 33.6, 32.9, 32.8, 32.7, 32.3, 30.4, 28.8, 26.9, 25.7, 25.1, 23.6, 23.0, 22.2, 18.0, 17.1, 16.8, 16.3; **HR-LSIMS** (m/z) 637.4197 ($\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] calculado 637.4192).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (AM-6AHA-GLY-OH) (108): HPLC tiempo de retención 4.71 min; HPLC pureza of 100 %; **Sólido blanco**; pf 145-147 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +2 (c 1, MeOH); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3423, 2942, 2890, 1678; $^1\text{H RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.04 (dd, 1H, $J_1=J_2=4.5$ Hz, NH Gly), 7.15 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 6AHA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 3.70 (dd, 2H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=18.2$ Hz, 2H C-2 Gly), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.96 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.10 (t, 2H, $J=5.5$ Hz, 2H C-2 6AHA), 1.07, 0.90, 0.87, 0.86, 0.85, 0.69, 0.64 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 176.0, 172.6, 171.3, 144.2, 121.3, 82.2, 67.1, 54.8, 47.1, 46.8, 46.0, 45.2, 41.3, 41.3, 39.1, 38.9, 38.9, 38.7, 37.6, 35.0, 33.6, 32.9, 32.7, 32.3, 30.4, 28.9, 28.8, 26.6, 26.2, 25.7, 24.9, 23.5, 23.0, 22.2, 18.0, 17.1, 16.8, 16.2; **HR-LSIMS** (m/z) 665.4496 ($\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] calculado 665.4506).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (MA-11AUA-GLY-OH) (109): HPLC tiempo de retención 4.80 min; HPLC pureza 100%; Sólido blanco; pf 134-136 °C; $[\alpha]_D +26$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3399, 2968, 2901, 1699; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 8.03 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH Gly), 7.15 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 11AUA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 3.69 (dd, 2H, $J_1=3.9$ Hz, $J_2=18.2$ Hz, 2H C-2 Gly), 3.40 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=9.3$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.97 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 2.78 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.72 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, H-3), 2.06 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, 2H C-2 11AUA), 1.07, 0.90, 0.87, 0.86, 0.84, 0.68, 0.64 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ 176.0, 172.5, 171.4, 144.2, 121.2, 82.2, 67.1, 55.7, 47.1, 46.8, 46.0, 45.2, 41.3, 40.9, 39.1, 38.9, 38.7, 38.7, 37.6, 35.0, 33.7, 32.9, 32.7, 32.3, 30.4, 29.1, 28.9, 28.9, 28.6, 28.5, 26.5, 25.9, 25.2, 23.6, 23.0, 22.3, 18.0, 17.0, 16.9, 16.2; **HR-LSIMS (m/z)** 735.5284 ($\text{C}_{43}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 735.5280).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (MA-GABA-ALA-OH) (110): HPLC tiempo de retención 2.59 min; HPLC pureza 100 %; Sólido blanco; pf 148-150 °C; $[\alpha]_D +3$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3411, 2935, 2887, 1715; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 8.06 (dd, 1H, $J=5.4$ Hz, NH Ala), 7.23 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.8$ Hz, NH GABA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.17 (dq, 1H, $J_1=J_2=5.4$ Hz, 1H C-2 Ala), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.97 (m, 2H 2H C-4 GABA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.06 (t, 2H, $J=5.1$ Hz, 2H C-2 GABA), 1.23 (d, 3H, $J=5.4$ Hz, 3H C-3 Ala), 1.06, 0.90, 0.87, 0.86, 0.84, 0.68, 0.63 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ 176.2, 174.2, 171.8, 144.1, 121.3, 82.2, 67.1, 54.8, 47.3, 47.1, 46.8, 46.0, 45.2, 41.2, 40.6, 38.9, 38.7, 38.6, 37.6, 32.9, 32.8, 32.7, 32.6, 32.3, 30.4, 28.8, 26.9, 25.7, 25.1, 23.5, 23.0, 22.2, 18.0, 17.1, 17.0, 16.8, 16.2; **HR-LSIMS (m/z)** 651.4350 ($\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 651.4349).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (MA-6AHA-ALA-OH) (111): HPLC tiempo de retención 3.25 min; HPLC pureza 100 %; Sólido blanco; pf 146-148 °C; $[\alpha]_D +5$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3412, 2943, 2888, 1720; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 8.00 (dd, 1H, $J=5.1$ Hz, NH Ala), 7.16 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 6AHA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.18 (dq, 1H, $J_1=J_2=5.1$ Hz, 1H C-2 Ala), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.97 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.06 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, 2H C-2 6AHA), 1.22 (d, 3H, $J=5.1$ Hz, 3H C-3 Ala), 1.06, 0.90, 0.87, 0.86, 0.84, 0.69, 0.64 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (DMSO- d_6) δ 176.0, 174.2, 171.9, 144.2, 121.3, 82.2, 67.1, 54.8, 47.3, 47.1, 46.8, 46.1, 45.1, 41.2, 41.1, 39.1, 38.9, 38.7, 37.6, 35.0, 33.7, 32.9, 32.7, 32.4, 30.4, 28.9, 28.8, 26.9, 26.2, 25.7, 24.9, 23.6, 23.0, 22.2, 18.0, 17.2, 17.1, 16.8, 16.3; **HR-LSIMS (m/z)** 679.4671 ($\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 679.4662).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (MA-11AUA-ALA-OH) (112): HPLC tiempo de retención 5.79 min; HPLC pureza 100 %; Sólido blanco; pf 140-142 °C; $[\alpha]_D +17$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{\max}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3423, 2911, 2869, 1728; $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ 7.99 (dd, 1H, $J=5.7$ Hz, NH Ala), 7.15 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.6$ Hz, NH 11AUA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, H-12), 4.19 (dq, 1H, $J_1=J_2=5.7$ Hz, 1H C-2 Ala), 3.40 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=9.3$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.97 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 2.78 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.7$ Hz, H-18), 2.72 (d, 1H, $J=9.3$ Hz, H-3), 2.06 (t, 2H, $J=5.7$ Hz, 2H C-2 11AUA), 1.22

(d, 3H, $J=5.1$ Hz, 3H C-3 Ala), 1.07, 0.90, 0.88, 0.87, 0.85, 0.68, 0.65 (s, 3H, Me); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 176.0, 174.2, 171.9, 144.2, 121.2, 82.2, 67.1, 54.7, 47.4, 47.3, 46.9, 46.1, 45.2, 41.2, 40.9, 39.2, 39.1, 38.9, 37.6, 35.1, 33.7, 33.0, 32.7, 32.4, 30.4, 29.1, 29.0, 29.0, 28.9, 28.9, 28.8, 28.7, 26.9, 26.9, 26.7, 25.7, 23.6, 23.1, 22.3, 18.1, 17.2, 17.1, 16.9, 16.3; **HR-LSIMS** (m/z) 749.5440 ($\text{C}_{44}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 749.5444).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanodl]-L-valina (MA-GABA-VAL-OH) (113): HPLC tiempo de retención 3.00 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 171-173 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +29$ (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3400, 2939, 2880, 1678; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7.92 (dd, 1H, $J=6.3$ Hz, NH Val), 7.24 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH GABA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.14 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.3$ Hz, 1H C-2 Val), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 3.00 (m, 2H 2H C-4 GABA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 1.98-2.10 (m, 2H 1H C-3 Val, 1H C-2 GABA), 0.86 (d, 6H, $J=4.5$ Hz, 6H C-4, C-5 Val), 1.07, 0.90, 0.88, 0.86, 0.85, 0.68, 0.63 (s, 3H, Me); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 176.2, 173.1, 172.3, 144.1, 121.3, 82.2, 74.3, 57.0, 54.7, 47.1, 47.1, 46.2, 45.1, 41.2, 40.9, 39.3, 38.9, 38.9, 37.6, 33.6, 32.9, 32.8, 32.7, 32.3, 30.4, 29.8, 28.8, 26.9, 25.7, 25.5, 23.5, 23.0, 22.2, 19.2, 19.2, 18.0, 17.1, 16.8, 16.2; **HR-LSIMS** (m/z) 679.4666 ($\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 679.4662).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-valina (MA-6AHA-VAL-OH) (114) HPLC tiempo de retención 4.46 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 160-162 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +27$ (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3403, 2943, 2877, 1687; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7.86 (dd, 1H, $J=6.3$ Hz, NH Val), 7.17 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH GABA), 5.21 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.14 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.3$ Hz, 1H C-2 Val), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.96 (m, 2H 2H C-6 6AHA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.00-2.20 (m, 2H 1H C-3 Val, 1H C-2 6AHA), 0.86 (d, 6H, $J=4.5$ Hz, 6H C-4, C-5 Val), 1.08, 0.91, 0.88, 0.86, 0.86, 0.69, 0.65 (s, 3H, Me); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 176.1, 173.1, 172.4, 144.2, 121.2, 82.2, 56.9, 54.7, 47.1, 47.1, 46.8, 46.0, 45.1, 41.2, 40.4, 39.1, 38.9, 38.7, 37.6, 34.9, 33.6, 32.9, 32.7, 32.3, 30.4, 29.8, 28.9, 28.8, 26.9, 26.2, 25.7, 25.1, 23.5, 23.0, 22.2, 19.1, 19.1, 18.0, 17.1, 16.8, 16.3; **HR-LSIMS** (m/z) 707.4977 ($\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 707.4975).

N'-[N-(2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (MA-11AUA-VAL-OH) (115): HPLC tiempo de retención 6.52 min; HPLC pureza 100 %; **Sólido blanco**; **pf** 138-140 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +24$ (c 1, MeOH); **IR** ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3411, 2953, 2899, 1699; ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 7.84 (dd, 1H, $J=6.0$ Hz, NH Val), 7.15 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.9$ Hz, NH 11AUA), 5.20 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.2$ Hz, H-12), 4.12 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.0$ Hz, 1H C-2 Val), 3.41 (ddd, 1H, $J_1=4.3$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, $J_3=12.2$ Hz, H-2), 2.92 (m, 2H 2H C-11 11AUA), 2.77 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.5$ Hz, H-18), 2.73 (d, 1H, $J=10.5$ Hz, H-3), 2.13 (dq, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=6.0$ Hz, H-3 Val), 2.06 (t, 2H, $J=4.8$ Hz, 2H C-2 11AUA), 0.87 (d, 6H, $J=4.5$ Hz, 6H C-4, C-5 Val), 1.06, 0.90, 0.87, 0.86, 0.84, 0.68, 0.63 (s, 3H, Me); ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ 176.0, 173.2, 172.5, 144.3, 121.2, 82.2, 67.1, 57.0, 54.7, 47.1, 46.8, 46.1, 45.2, 41.3, 41.0, 39.2, 39.1, 38.8, 37.6, 35.0, 33.7, 32.9, 32.7, 32.4, 30.4, 30.0, 30.0, 29.1, 29.0, 29.0, 28.9, 28.8, 28.8, 26.9, 26.6, 26.4, 25.7, 23.6, 23.0, 22.3, 19.2, 19.2, 18.0, 17.1, 16.9, 16.3; **HR-LSIMS** (m/z) 777.5764 ($\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}^+$ [M+Na] calculado 777.5757).

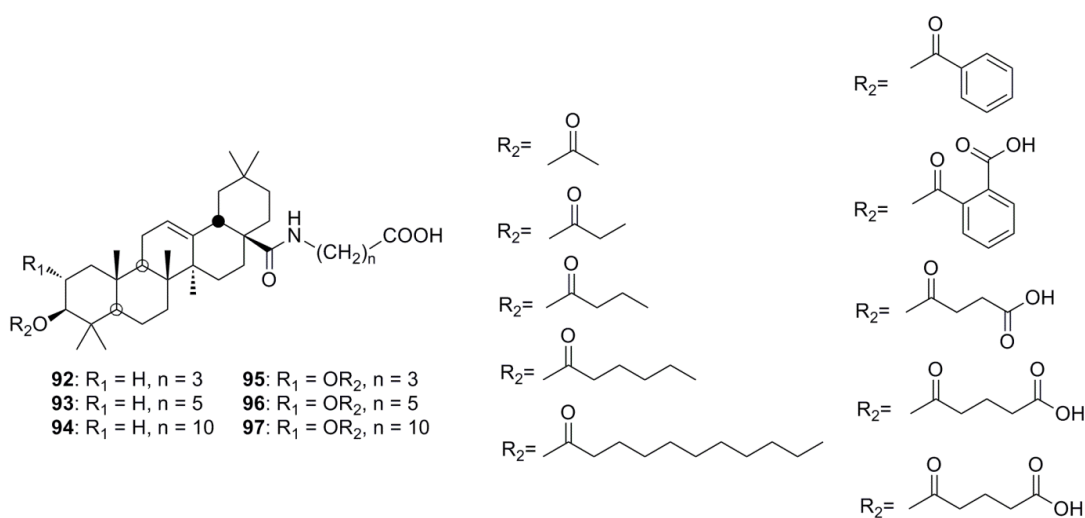
III.3.8.2. Acilación en fase sólida de C-28 mono-peptidil y di-peptidil derivados de AO y AM

Se preparan 500 mg de resina con cada derivado peptídico **92-115** con el método anteriormente descrito para, posteriormente, (Esq. 2.42 y Esq. 2.43) dividirlos en 10 jeringas de 10 mL con 50 mg de resina cada una. Cada jeringa es tratada con la disolución del correspondiente anhídrido (Tab. 3.28).

Jeringa	Anhídrido	Volumen o peso	DCM/DMF (mL)	DMAP	Et ₃ N
1	Acético	0.055 mL	1/1	5 mg	0.05 mL
2	Propanoico	0.075 mL	1/1	5 mg	0.05 mL
3	Butírico	0.096 mL	1/1	5 mg	0.05 mL
4	Hexanoico	0.135 mL	1/1	5 mg	0.05 mL
5	Láurico	224 mg	1/1	5 mg	0.05 mL
6	Benzoico	132.3 mg	1/1	5 mg	0.05 mL
7	Ftálico	87 mg	1/1	5 mg	0.05 mL
8	Succínico	59 mg	1/1	5 mg	0.05 mL
9	Glutárico	67 mg	1/1	5 mg	0.05 mL
10	3,3-Dimetilglutárico	84 mg	1/1	5 mg	0.05 mL

Tabla 3.28. Estequiometría para la acilación de los derivados peptídicos de **AO** y **AM**

Una vez obtenido las distintas mezclas de los derivados peptídicos acilados se analizan por HPLC y por espectrometría de masas. El análisis por RP-HPLC se lleva a cabo con una columna C18 fase-reversa WATERS (0.4 μ m diámetro de partícula, 150 mm x 3.9 mm) con un flujo de 1 mL/min. La longitud de onda seleccionada para el análisis es de 210 nm y se utiliza un gradiente lineal H₂O-CH₃CN que contienen un 0.1% de TFA, desde 30% de agua a 0% en 30 min, posteriormente se mantiene durante 5 min un flujo de 100 % CH₃CN.



a=acetilo, b=propilo, c=butilo, d=hexanoilo, e=lauroilo, f=benzoilo, g=ftaloilo, h=succinilo, i=glutarilo y j=3,3-dimetil glutarilo

Mono-peptidil derivados de AO y AM acilados

Ácido N-(3 α -acetiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92a). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₃₆H₅₇NO₅Na 606.4143, encontrado 606.4132, RT 7.87 min, HPLC pureza 95%.

Ácido N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93a). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₃₈H₆₁NO₅Na 634.4447, encontrado 634.4445, RT 8.61 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₇₂NO₅ 682.5411, encontrado 682.5387, RT 16.27 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₃₈H₆₀NO₇ 642.4292, encontrado 642.4370, RT 3.51 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₄NO₇ 670.4638, encontrado 670.4683, RT 5.43 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₄NO₇ 740.5465, encontrado 740.5474, RT 9.04 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₃₈H₆₁N₂O₆ 641.4530, encontrado 641.4520, RT 5.08 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₅N₂O₆ 669.4843, encontrado 669.4836, RT 6.17 min, HPLC pureza 97%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₅N₂O₆ 739.5625, encontrado 739.5593, RT 13.15 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₃₉H₆₃N₂O₆ 655.4686, encontrado 655.4679, RT 6.31 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₇N₂O₆ 683.4999, encontrado 683.5027, RT 6.91 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₇N₂O₆ 753.5782, encontrado 753.5769, RT 13.87 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-4-aminobutanoil]-L-valina (104a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₇N₂O₆ 683.4999, encontrado 683.4966, RT 7.36 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-6-aminohexanoil]-L-valina (105a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₇₁N₂O₆ 711.5312, encontrado 711.5299, RT 8.65 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Acetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₈₁N₂O₆ 781.6095, encontrado 781.6129, RT 16.31 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-4-aminobutanoil]-glicina (107a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₃N₂O₈ 699.9369, encontrado 699.9376, RT 3.71 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-6-aminohexanoil]-glicina (108a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₇N₂O₈ 727.4897, encontrado 727.4906, RT 4.71 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-11-aminoundecanoil]-glicina (109a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₇N₂O₈ 797.5680, encontrado 797.5691, RT 9.60 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₅N₂O₈ 713.4741, encontrado 713.4711, RT 4.43 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5050, RT 2.44 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₉N₂O₈ 811.5836, encontrado 811.5906, RT 14.65 min, HPLC pureza 90%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-4-aminobutanoil]-L-valina (113a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5059, RT 10.12 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-6-aminohexanoil]-L-valina (114a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₃N₂O₈ 769.5367, encontrado 769.5384, RT 19.38 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diacetiloxiolean-12-en-28-*o*il)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115a). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₃N₂O₈ 839.6149, encontrado 839.6187, RT 17.03 min, HPLC pureza 98%.

Ácido N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-*o*il)-4-aminobutanoico (92b). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₃₇H₅₉NO₅Na 620.4291, encontrado 620.4293, RT 9.48 min, HPLC pureza 89%.

Ácido N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93b). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₃₉H₆₃NO₅Na 648.4604, encontrado 648.4602, RT 10.95 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₄NO₅ 696.5567, encontrado 696.5554, RT 18.85 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₄NO₇ 670.4683, encontrado 670.4688, RT 5.36 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₈NO₇ 698.4996, encontrado 698.4995, RT 5.43 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₈NO₇ 768.5778, encontrado 768.5800, RT 12.09 min, HPLC pureza 95%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₃₉H₆₃N₂O₆ 655.4686, encontrado 655.4674, RT 6.85 min, HPLC pureza 87%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₇N₂O₆ 683.4999, encontrado 683.4984, RT 8.09 min, HPLC pureza 80%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoililoxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₇N₂O₆ 753.5782, encontrado 753.5799, RT 14.53 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₅N₂O₆ 669.4843, encontrado 669.4855, RT 8.25 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₉N₂O₆ 697.5156, encontrado 697.5166, RT 9.04 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₉N₂O₆ 767.5938, encontrado 767.5927, RT 14.80 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₉N₂O₆ 697.5156, encontrado 697.5168, RT 9.49 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₃N₂O₆ 725.5469, encontrado 725.5466, RT 10.87 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Propanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₃N₂O₆ 795.6251, encontrado 795.6255, RT 18.73 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₇N₂O₈ 727.9901, encontrado 727.9891, RT 5.59 min, HPLC pureza 97%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₁N₂O₈ 755.5210, encontrado 755.5208, RT 7.69 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoililoxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₁N₂O₈ 825.5993, encontrado 825.5980, RT 12.63 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5027, RT 5.81 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₃N₂O₈ 769.5367, encontrado 769.5339, RT 3.45 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₃N₂O₈ 839.6149, encontrado 839.6116, RT 15.84 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₃N₂O₈ 769.5367, encontrado 769.5339, RT 11.28 min, HPLC pureza 75%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₇N₂O₈ 797.5680, encontrado 797.5690, RT 21.86 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dipropanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115b). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₂H₈₇N₂O₈ 867.6462, encontrado 867.6473, RT 18.63 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N-(3 α -Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92c). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₃₈H₆₁NO₅Na 634.4447, encontrado 634.4451, RT 11.61 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93c). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₄₀H₆₅NO₅Na 662.4760, encontrado 662.4756, RT 13.20 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₆NO₅ 710.5724, encontrado 710.5702, RT 21.77 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₈NO₇ 698.4996, encontrado 698.4997, RT 8.04 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₂NO₇ 726.5309, encontrado 726.5308, RT 9.81 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₂NO₇ 796.6091, encontrado 796.6075, RT 15.49 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₅N₂O₆ 669.4843, encontrado 669.4847, RT 8.68 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₉N₂O₆ 697.5156, encontrado 697.5186, RT 10.00 min, HPLC pureza 83%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₉N₂O₆ 767.5938, encontrado 767.5953, RT 14.53 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₇N₂O₆ 683.4999, encontrado 683.5004, RT 10.15 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₇₁N₂O₆ 711.5312, encontrado 711.5311, RT 11.17 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₈₁N₂O₆ 781.6095, encontrado 781.6103, RT 17.17 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₇₁N₂O₆ 711.5312, encontrado 711.5321, RT 11.52 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₅N₂O₆ 739.5625, encontrado 739.5628, RT 12.95min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Butanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₅N₂O₆ 809.6408, encontrado 809.6416, RT 20.61 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₁N₂O₈ 755.5210, encontrado 755.5216, RT 9.00 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₅N₂O₈ 783.5523, encontrado 783.5525, RT 10.72 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₅N₂O₈ 853.6306, encontrado 853.6313, RT 16.25 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₃N₂O₈ 769.5367, encontrado 769.5341, RT 10.76 min, HPLC pureza 98%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₇N₂O₈ 797.5680, encontrado 797.5645, RT 5.15 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₂H₈₇N₂O₈ 867.6462, encontrado 867.6452, RT 16.51 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₇N₂O₈ 797.5680, encontrado 797.5645, RT 12.03 min, HPLC pureza 84%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₁N₂O₈ 825.5993, encontrado 825.6014, RT 24.25 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibutanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115c). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₄H₉₁N₂O₈ 895.6775, encontrado 895.6768, RT 20.6120.93 min, HPLC pureza 96%.

Ácido N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92d). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₄₀H₆₅NO₅Na 662.4760, encontrado 662.4761, RT 16.32 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₇₀NO₅ 668.5254, encontrado 668.5272, RT 18.03 min, HPLC pureza 87%.

Ácido N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₈₀NO₅ 738.6037, encontrado 738.6037, RT 25.92 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N-(2β,3α-Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₆NO₇ 754.5622, encontrado 754.5618, RT 15.05 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2β,3α-Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₈₀NO₇ 782.5935, encontrado 782.5931, RT 16.77 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N-(2β,3α-Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₉₀NO₇ 852.6717, encontrado 852.6717, RT 21.53 min, HPLC pureza 95%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₉N₂O₆ 697.5156, encontrado 697.5168, RT 12.91 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₃N₂O₆ 725.5469, encontrado 725.5476, RT 14.63 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₃N₂O₆ 795.6251, encontrado 795.6273, RT 21.43 min, HPLC pureza 85%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₇₁N₂O₆ 711.5312, encontrado 711.5328, RT 14.48 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₅N₂O₆ 739.5625, encontrado 739.5634, RT 15.73 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₅N₂O₆ 809.6408, encontrado 809.6411, RT 21.51 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₅N₂O₆ 739.5625, encontrado 739.5632, RT 15.99 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₉N₂O₆ 767.5938, encontrado 767.5949, RT 17.39 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Hexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₂H₈₉N₂O₆ 837.6721, encontrado 837.6722, RT 24.59 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₉N₂O₈ 811.5836, encontrado 811.5840, RT 15.49 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₃N₂O₈ 839.6149, encontrado 839.6158, RT 18.61 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₅H₉₃N₂O₈ 909.6932, encontrado 909.6930, RT 22.41 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₁N₂O₈ 825.5993, encontrado 825.5952, RT 14.16 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminoheptanoil]-L-alanina (111d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₅N₂O₈ 853.6312, encontrado 853.6306, RT 10.59 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₆H₉₅N₂O₈ 923.7088, encontrado 923.7057, RT 16.75 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₅N₂O₈ 853.6306, encontrado 853.6271, RT 14.47 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₈₉N₂O₈ 881.6619, encontrado 881.6650, RT 29.15 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dihexanoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115d). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₈H₉₉N₂O₈ 951.7401, encontrado 951.7415, RT 22.32 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92e). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₄₆H₇₇NO₅Na 746.5699, encontrado 746.5698, RT 31.35 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminoheptanoico (93e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₈₂NO₅ 752.6193, encontrado 752.6198, RT 31.73 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₉₂NO₅ 822.6976, encontrado 822.6975, RT 43.24 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₈H₁₀₀NO₇ 922.7500, encontrado 922.7509, RT 25.31 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminoheptanoico (96e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₀H₁₀₄NO₇ 950.7813, encontrado 950.7809, RT 24.92 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₅H₁₁₄NO₇ 1020.8595, encontrado 1020.8595, RT 30.69 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₈₁N₂O₆ 781.6095, encontrado 781.6108, RT 29.00 min, HPLC pureza 89%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohecanoil]-glicina (99e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₅N₂O₆ 809.6408, encontrado 809.6422, RT 29.25 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₅H₉₅N₂O₆ 879.7190, encontrado 879.7180, RT 45.03 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₃N₂O₆ 795.6251, encontrado 795.6258, RT 28.36 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohecanoil]-L-alanina (102e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₇N₂O₆ 823.6564, encontrado 823.6570, RT 31.73 min, HPLC pureza 88%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₆H₉₇N₂O₆ 893.7347, encontrado 893.7361, RT 42.01 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₇N₂O₆ 823.6564, encontrado 823.6577, RT 31.85 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₉₁N₂O₆ 851.6877, encontrado 851.6891, RT 34.52 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(3 α -Lauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₈H₁₀₁N₂O₆ 921.7660, encontrado 921.7679, RT 46.21 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₀H₁₀₃N₂O₈ 979.7714, encontrado 979.7722, RT 24.36 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohecanoil]-glicina (108e). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₆₀H₁₀₆N₂O₈Na 1029.7847, encontrado 1029.7842, RT 25.33 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109e). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₆₇H₁₁₂N₂O₈Na 1077.8810, encontrado 1077.8809, RT 34.04 min, HPLC pureza 96%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110e). HR-LSIMS (m/z) [M+Na]⁺ calculado para C₆₁H₁₀₅N₂O₈Na 993.7847, encontrado 993.7878, RT 30.16 min, HPLC pureza 100%.

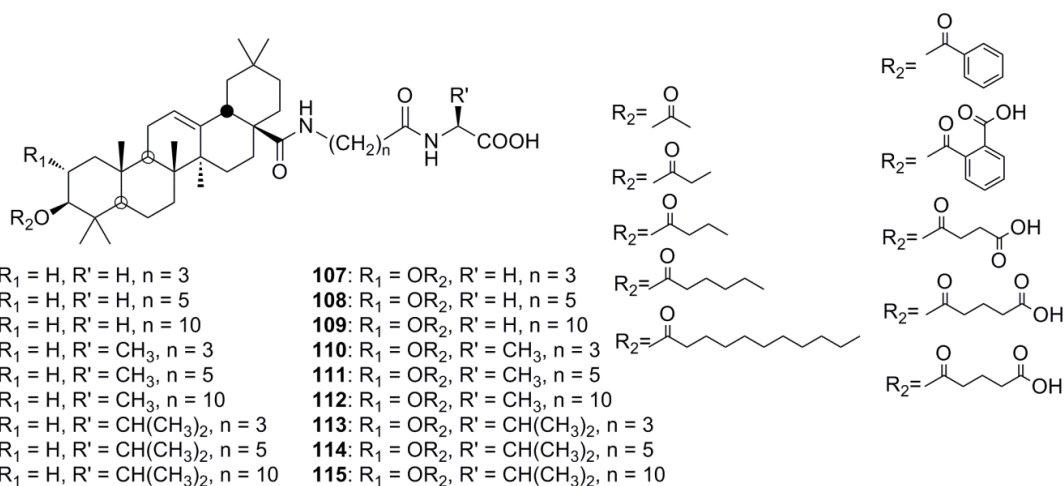
Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohecanoil]-L-alanina (111e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₃H₁₀₉N₂O₈ 1021.8184, encontrado 1021.8180, RT 12.96 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₈H₁₁₉N₂O₈ 1091.8966, encontrado 1091.8971, RT 19.05 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₃H₁₀₉N₂O₈ 1021.8184, encontrado 1021.8182, RT 20.68 min, HPLC pureza 99%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₅H₁₁₃N₂O₈ 1049.8497, encontrado 1049.8503, RT 31.36 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dilauroiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115e). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₇₀H₁₂₃N₂O₈ 1119.9279, encontrado 1119.9283, RT 27.89 min, HPLC pureza 100%.



a=acetilo, b=propilo, c=butilo, d=hexanoilo, e=lauroilo, f=benzoilo, g=ftaloilo, h=succinilo, i=glutarilo y j=3,3-dimetil glutarilo

Dipeptidil derivados de AO y AM acilados

Ácido N-(3α-Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₀NO₅ 646.4471, encontrado 646.4456, RT 13.71 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3α-Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminoheptanoico (93f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₄NO₅ 674.4784, encontrado 674.4777, RT 15.12 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3α-Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₄NO₅ 744.5567, encontrado 744.5579, RT 23.20 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₆₄NO₇ 766.4683, encontrado 766.4697, RT 12.80 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₆₈NO₇ 794.4996, encontrado 794.5008, RT 13.71 min, HPLC pureza 97%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₅H₇₈NO₇ 864.5778, encontrado 864.5773, RT 19.39 min, HPLC pureza 97%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₃N₂O₆ 703.4686, encontrado 703.4662, RT 10.49 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₆₇N₂O₆ 731.4999, encontrado 731.4971, RT 11.67 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₇₇N₂O₆ 801.5782, encontrado 801.5790, RT 11.73 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₆₅N₂O₆ 717.4843, encontrado 717.4850, RT 11.01 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₆₉N₂O₆ 745.5156, encontrado 745.5163, RT 13.25 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₇₉N₂O₆ 815.5938, encontrado 815.5951, RT 18.65 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₆₉N₂O₆ 745.5156, encontrado 745.5158, RT 13.63 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₃N₂O₆ 773.5469, encontrado 773.5458, RT 15.01 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N'-[N-(3 α -Benzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₈₃N₂O₆ 843.6251, encontrado 843.6254, RT 22.23 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₆₇N₂O₈ 823.4897, encontrado 823.4899, RT 10.49 min, HPLC pureza 90%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₂H₇₁N₂O₈ 851.5210, encontrado 851.5215, RT 13.51 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₇H₈₁N₂O₈ 921.2538, encontrado 921.2530, RT 19.55 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₆₉N₂O₈ 837.5054, encontrado 837.5031, RT 10.65 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₇₃N₂O₈ 865.5367, encontrado 865.5331, RT 6.85 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₈H₈₃N₂O₈ 935.6149, encontrado 935.6109, RT 14.35 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₇₃N₂O₈ 865.5367, encontrado 865.5379, RT 13.84 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₅H₇₇N₂O₈ 893.5680, encontrado 893.5673, RT 25.94 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Dibenzoiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115f). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₆₀H₈₇N₂O₈ 963.6462, encontrado 963.6479, RT 22.25 min, HPLC pureza 95%.

Ácido N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₀NO₇ 690.4370, encontrado 690.4379, RT 4.69 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₆₄NO₇ 718.4683, encontrado 718.4691, RT 5.43 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₇₄NO₇ 788.5465, encontrado 788.5431, RT 11.27 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₀H₆₂NO₁₁ 852.4323, encontrado 852.4312, RT 19.57 min, HPLC pureza 83%.

Ácido N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₂H₆₆NO₁₁ 880.4636, encontrado 880.4639, RT 20.45 min, HPLC pureza 90%.

Ácido N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₇H₇₆NO₁₁ 950.5418, encontrado 950.5432, RT 23.11 min, HPLC pureza 85%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₆₃N₂O₈ 747.4584, encontrado 747.4572, RT 3.69 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₆₇N₂O₈ 775.4819, encontrado 775.4827, RT 4.23 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₇₇N₂O₈ 845.5602, encontrado 845.5608, RT 10.39 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₆₅N₂O₈ 761.4741, encontrado 761.4753, RT 5.79 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₆₉N₂O₈ 789.5054, encontrado 789.5079, RT 6.56 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₂H₇₉N₂O₈ 859.5836, encontrado 859.5862, RT 11.73 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₆₉N₂O₈ 789.5054, encontrado 789.5072, RT 4.97 min, HPLC pureza 84%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₇₃N₂O₈ 817.5367, encontrado 817.5355, RT 5.99 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(3α-Phthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106g). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₄H₈₃N₂O₈ 887.6149, encontrado 887.6163, RT 12.41 min, HPLC pureza 84%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₂H₆₅N₂O₁₂ 909.4538, encontrado 909.4519, RT 19.00 min, HPLC pureza 82%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₄H₆₉N₂O₁₂ 937.4851, encontrado 937.4872, RT 16.48 min, HPLC pureza 85%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₉H₇₉N₂O₁₂ 1007.5633, encontrado 1007.5623, RT 22.86 min, HPLC pureza 80%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₃H₆₇N₂O₁₂ 923.4694, encontrado 923.4651, RT 17.89 min, HPLC pureza 87%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₅H₇₁N₂O₁₂ 951.5007, encontrado 951.5001, RT 20.02 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₆₀H₈₁N₂O₁₂ 1021.5790, encontrado 1021.5818, RT 23.48 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₅H₇₁N₂O₁₂ 951.5007, encontrado 951.5029, RT 19.49 min, HPLC pureza 78%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₇H₇₅N₂O₁₂ 979.5320, encontrado 979.5322, RT 19.37 min, HPLC pureza 96%.

Ácido N'-[N-(2β,3α-Diphthaloiloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115g). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₆₂H₈₅N₂O₁₂ 1049.6103, encontrado 1049.6071, RT 25.36 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N-(3α-Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₃₈H₆₀NO₇ 642.4383, encontrado 642.4373, RT 4.22 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N-(3α-Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₄NO₇ 670.4683, encontrado 670.4687, RT 4.58 min, HPLC pureza 94%.

Ácido N-(3α-Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₄NO₇ 740.5465, encontrado 740.5464, RT 11.09 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N-(2β,3α-Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₂H₆₂NO₁₁ 756.4323, encontrado 756.4314, RT 15.37 min, HPLC pureza 77%.

Ácido N-(2β,3α-Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₄H₆₆NO₁₁ 784.4636, encontrado 784.4603, RT 15.96 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N-(2β,3α-Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₉H₇₆NO₁₁ 854.5418, encontrado 854.5410, RT 20.57 min, HPLC pureza 80%.

Ácido N'-[N-(3α-Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₀H₆₃N₂O₈ 699.4584, encontrado 699.4583, RT 4.29 min, HPLC pureza 97%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₇N₂O₈ 727.4897, encontrado 717.4893, RT 4.77 min, HPLC pureza 96%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₇H₇₇N₂O₈ 797.5693, encontrado 797.5688, RT 9.17 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₅N₂O₈ 713.4741, encontrado 713.4727, RT 5.79 min, HPLC pureza 95%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5060, RT 5.25 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₉N₂O₈ 811.5836, encontrado 811.5822, RT 9.84 min, HPLC pureza 96%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5090, RT 4.29 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₃N₂O₈ 769.5367, encontrado 769.5345, RT 5.13 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Succiniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106h). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₃N₂O₈ 839.6149, encontrado 839.6179, RT 11.44 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₄H₆₅N₂O₁₂ 813.4538, encontrado 813.4514, RT 17.00 min, HPLC pureza 84%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₆H₆₉N₂O₁₂ 841.4851, encontrado 841.4827, RT 16.48 min, HPLC pureza 85%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₁H₇₉N₂O₁₂ 911.5633, encontrado 911.5598, RT 19.53 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₅H₆₇N₂O₁₂ 827.4694, encontrado 827.4676, RT 13.59 min, HPLC pureza 82%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₇H₇₁N₂O₁₂ 855.5007, encontrado 855.4976, RT 16.36 min, HPLC pureza 80%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₂H₈₁N₂O₁₂ 925.5790, encontrado 925.5754, RT 19.11 min, HPLC pureza 87%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₇H₇₁N₂O₁₂ 843.5007, encontrado 843.5010, RT 16.05 min, HPLC pureza 76%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₉H₇₅N₂O₁₂ 883.5320, encontrado 883.5331, RT 17.00 min, HPLC pureza 93%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Disucciniloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115h). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₄H₈₅N₂O₁₂ 953.6103, encontrado 953.6064, RT 18.66 min, HPLC pureza 90%.

N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₃₉H₆₂NO₇ 656.4526, encontrado 656.4523, RT 4.39 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₆NO₇ 684.4839, encontrado 684.4836, RT 4.73 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₆NO₇ 754.5622, encontrado 754.5620, RT 11.60 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₄H₆₆NO₁₁ 784.4594, encontrado 784.4599, RT 16.48 min, HPLC pureza 78%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₆H₇₀NO₁₁ 812.5017, encontrado 812.5009, RT 17.47 min, HPLC pureza 79%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₁H₈₀NO₁₁ 882.5610, encontrado 882.5621, RT 21.31 min, HPLC pureza 83%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₅N₂O₈ 713.4741, encontrado 713.4739, RT 3.09 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5060, RT 3.57 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₉N₂O₈ 811.5836, encontrado 811.5844, RT 8.67 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₂H₆₇N₂O₈ 727.4897, encontrado 727.4896, RT 4.32 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₁N₂O₈ 755.5210, encontrado 755.5227, RT 5.33 min, HPLC pureza 84%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₉H₈₁N₂O₈ 825.5993, encontrado 825.5986, RT 9.85 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₁N₂O₈ 755.5210, encontrado 755.5243, RT 4.32 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₅N₂O₈ 783.5523, encontrado 783.5518, RT 5.16 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106i). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₅N₂O₈ 853.6306, encontrado 853.6302, RT 11.48 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₆H₆₉N₂O₁₂ 841.4851, encontrado 841.4851, RT 17.50 min, HPLC pureza 82%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₈H₇₃N₂O₁₂ 869.5164, encontrado 869.5153, RT 17.53 min, HPLC pureza 80%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₃H₈₃N₂O₁₂ 939.5946, encontrado 939.5927, RT 19.53 min, HPLC pureza 77%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₇H₇₁N₂O₁₂ 855.5007, encontrado 855.4977, RT 15.76 min, HPLC pureza 78%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₉H₇₅N₂O₁₂ 883.5320, encontrado 883.5316, RT 16.53 min, HPLC pureza 84%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₄H₈₅N₂O₁₂ 953.6103, encontrado 953.6082, RT 19.89 min, HPLC pureza 87%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₉H₇₅N₂O₁₂ 883.5320, encontrado 883.5292, RT 16.69 min, HPLC pureza 76%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₁H₇₉N₂O₁₂ 911.5633, encontrado 911.5613, RT 17.49 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Diglutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115i). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₆H₈₉N₂O₁₂ 981.6416, encontrado 981.6390, RT 20.85 min, HPLC pureza 78%.

Ácido N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (92j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₁H₆₆NO₇ 684.4839, encontrado 684.4847, RT 4.00 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (93j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₇₀NO₇ 712.5152, encontrado 712.5135, RT 4.75 min, HPLC pureza 92%.

Ácido N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (94j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₈₀NO₇ 782.5935, encontrado 782.5945, RT 3.44 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoico (95j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₄₈H₇₄NO₁₁ 840.5262, encontrado 840.5289, RT 18.16 min, HPLC pureza 79%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoico (96j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₀H₇₈NO₁₁ 868.5575, encontrado 868.5566, RT 18.97 min, HPLC pureza 77%.

Ácido N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoico (97j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₅H₈₈NO₁₁ 938.6357, encontrado 938.6341, RT 22.93 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (98j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₃H₆₉N₂O₈ 741.5054, encontrado 741.5044, RT 3.09 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (99j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₅H₇₃N₂O₈ 769.5367, encontrado 769.5389, RT 3.56 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (100j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₀H₈₃N₂O₈ 839.6149, encontrado 839.6143, RT 8.97 min, HPLC pureza 89%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (101j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₄H₇₁N₂O₈ 755.5210, encontrado 755.5240, RT 4.71 min, HPLC pureza 91%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (102j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₅N₂O₈ 783.5523, encontrado 783.5544, RT 5.35 min, HPLC pureza 85%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (103j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₁H₈₅N₂O₈ 853.6306, encontrado 853.6309, RT 9.91 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (104j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₆H₇₅N₂O₈ 783.5445, encontrado 783.5434, RT 4.33 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (105j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₄₈H₇₉N₂O₈ 811.5758, encontrado 811.5746, RT 5.20 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(3 α -(3,3-dimethyl)Glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (106j). HR-LSIMS (m/z) [M+1]⁺ calculado para C₅₃H₈₉N₂O₈ 881.6541, encontrado 881.6536, RT 11.36 min, HPLC pureza 100%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-glicina (107j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₀H₇₇N₂O₁₂ 897.5477, encontrado 897.5453, RT 17.47 min, HPLC pureza 82%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicina (108j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₂H₈₁N₂O₁₂ 925.5790, encontrado 925.5765, RT 17.84 min, HPLC pureza 83%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-glicina (109j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₇H₉₁N₂O₁₂ 995.6572, encontrado 995.6543, RT 21.03 min, HPLC pureza 76%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-alanina (110j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₁H₇₉N₂O₁₂ 911.5633, encontrado 911.5636, RT 17.20 min, HPLC pureza 79%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-L-alanina (111j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₃H₈₃N₂O₁₂ 939.5946, encontrado 939.5945, RT 18.07 min, HPLC pureza 81%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-alanina (112j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₈H₉₃N₂O₁₂ 1009.6729, encontrado 1009.6708, RT 21.48 min, HPLC pureza 82%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (113j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₁H₈₃N₂O₁₂ 939.5946, encontrado 939.5934, RT 17.96 min, HPLC pureza 79%.

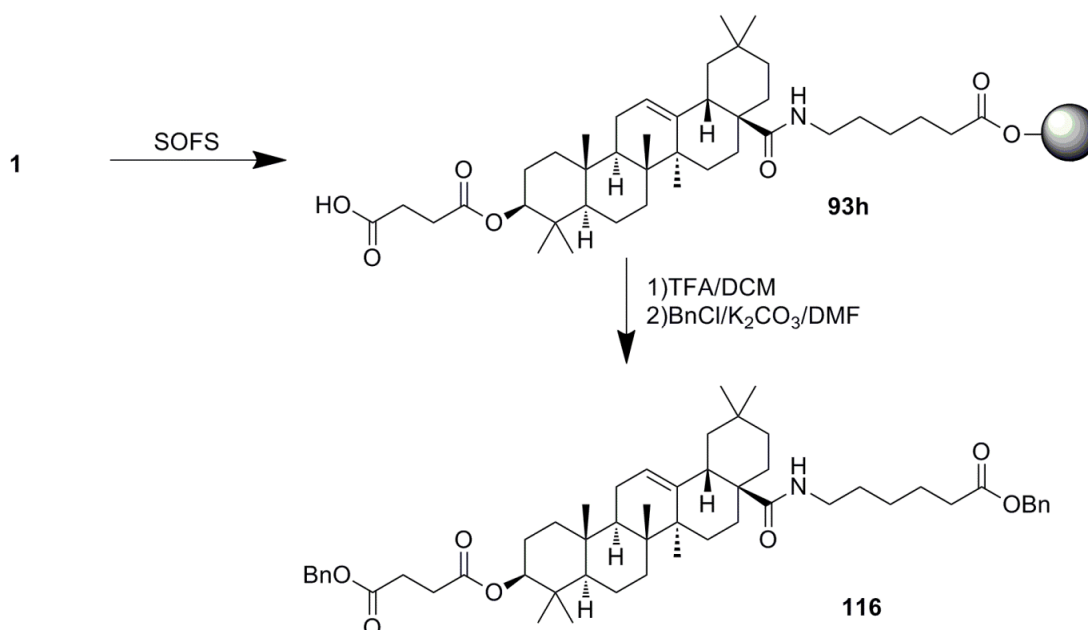
Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-4-aminobutanoil]-L-valina (114j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₅₃H₈₇N₂O₁₂ 967.6259, encontrado 967.6242, RT 19.04 min, HPLC pureza 83%.

Ácido N'-[N-(2 β ,3 α -Di(3,3-dimethyl)glutariloxiolean-12-en-28-oil)-11-aminoundecanoil]-L-valina (115j). HR-LSIMS (m/z) [M-1]⁺ calculado para C₆₀H₉₇N₂O₁₂ 1037.7042, encontrado 1037.7030, RT 22.49 min, HPLC pureza 79%.

III.3.8.3. Cuantificación de la acilación de mono-peptidil- y di-peptidil derivados de AO y AM en fase sólida. Formación de bencil-succinil derivados

a) Formación y bencilación de succinil-AO-6AHA

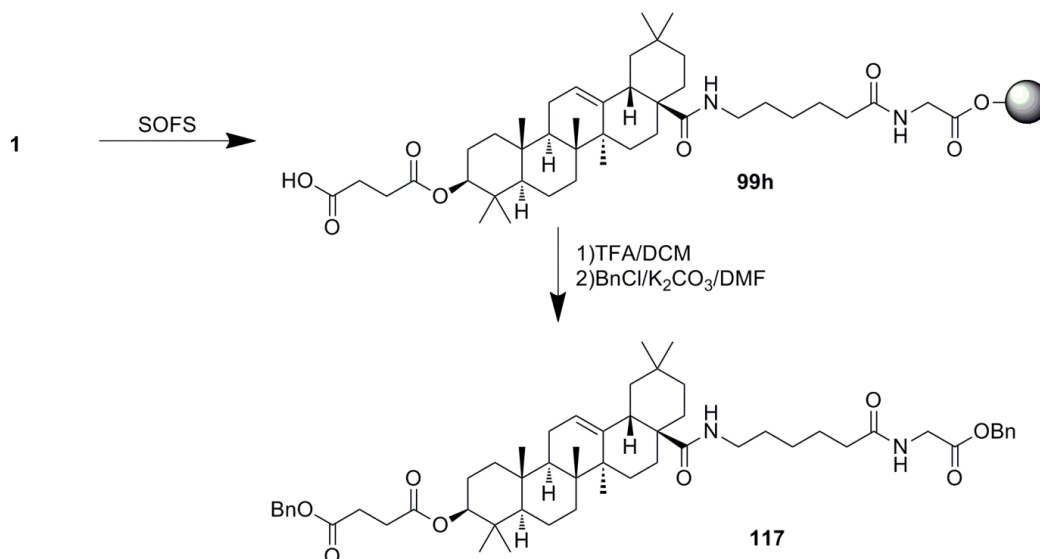
Se procede a la síntesis del producto **93h** a través del método anteriormente descrito para él en fase sólida. Una vez clivado de la resina se retira el disolvente, se añade DMF (5 mL) con K_2CO_3 0.2 g y se trata con BnCl (0.05 mL). La reacción se mantiene en agitación magnética durante 4h a 55°C y posteriormente es extraída con DCM, secada con Na_2SO_4 y purificada en cromatografía en columna con un gradiente DCM/Acetona hasta obtener **116** (95%).



Benzil N-(3 β -benzilsucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoato (116): HPLC tiempo de retención 10.41 min; HPLC pureza 95 %; Sirupo incoloro; $[\alpha]_D^{20} + 44.2^\circ$ (*c* 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3363, 2953, 2877, 1715 ; 1H RMN (Cl_3CD) δ 7.35 (m, 10H, aromáticos bencilo), 5.90 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.3$ Hz, NH), 5.36 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.4$ Hz, H-12), 5.16-5.10 (m, 4H, metileno bencilo), 4.51 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, H-3), 3.35 (m, 1H, C-6 6AHA), 3.00 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.75-2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 2.50 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=12.7$ Hz, H-18), 2.36 (t, 2H, $J=7.0$ Hz, C-2 6AHA), 1.14, 0.92, 0.91, 0.91, 0.85, 0.84, 0.76 (s, 3H, Me); ^{13}C RMN (Cl_3CD) δ 178.2, 173.5, 172.3 and 172.4, 145.3, 136.2, 136.0, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 122.7, 81.5, 66.7, 66.3, 55.4, 47.6, 46.9, 46.4, 42.5, 42.3, 39.5, 39.4, 38.3, 37.9, 37.0, 34.3, 34.3, 33.1, 32.7, 32.5, 30.9, 29.7, 29.5, 29.2, 29.2, 28.2, 27.5, 26.7, 25.9, 24.7, 23.8, 23.6, 23.8, 18.3, 17.1, 16.8, 15.6; HR-LSIMS (*m/z*) 850.5628 ($C_{54}H_{76}NO_7$ $[M+1]^+$ calculado 850.5622).

b) Formación y bencilación de succinil-AO-6AHA-GLY-OH

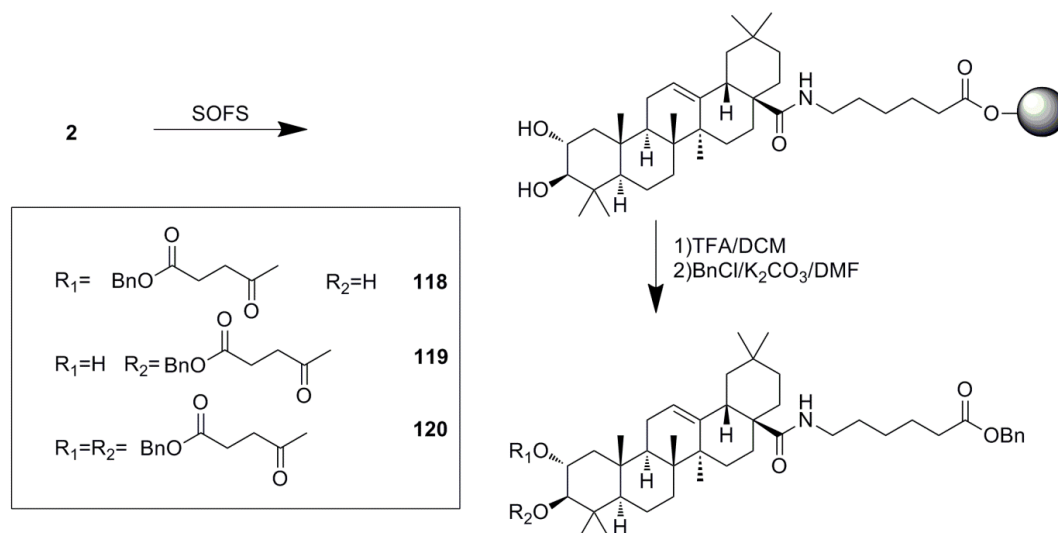
De la misma forma se procede a la síntesis en fase sólida del producto **99h** para su posterior bencilación. El residuo obtenido es tratado para su bencilación como se ha descrito anteriormente y se purifica obteniendo el producto **117** (98%).



Benzil N'-[N-(3β-benzilsucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoil]-glicinato (117): HPLC tiempo de retención 26.92 min; HPLC pureza 98%; Sirupo incoloro; $[\alpha]_D^{20} + 37.8^\circ$ (*c* 1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3352, 2963, 2887, 1699; ¹H RMN (Cl₃CD) δ 7.35-7.35 (m, 10H, aromáticos bencilo), 6.06 (dd, 1H, $J_1=J_2=5.0$ Hz, NH GLY), 5.94 (dd, 1H, $J_1=J_2=6.0$ Hz, NH 6AHA), 5.36 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, H-12), 5.18-5.09 (m, 4H, metileno bencilo), 4.51 (dd, 1H, $J_1=4.5$ Hz, $J_2=10.5$ Hz, H-3), 4.06 (d, 2H, $J=3.5$ Hz, C-2 GLY), 3.35 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.99 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.70-2.50 (m, 4H, grupo succinilo), 2.51 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=12.7$ Hz, H-18), 2.24 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, C-2 6AHA), 1.15, 0.92, 0.90, 0.90, 0.85, 0.83, 0.76 (s, 3H, Me). ¹³C RMN (Cl₃CD): δ 178.3, 173.1, 172.2, 172.0, 171.1, 145.2, 135.9, 135.3, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 122.7, 81.4, 67.3, 66.6, 55.4, 47.6, 46.9, 46.4, 42.4, 42.2, 41.5, 39.5, 39.3, 38.3, 37.9, 37.0, 36.2, 34.3, 33.1, 32.7, 32.5, 30.9, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 28.1, 27.4, 26.7, 25.8, 24.7, 23.9, 23.6, 23.7, 18.3, 17.1, 16.8, 15.6; HR-LSIMS (*m/z*) 907.5844 (C₅₆H₇₉N₂O₈ [M+1]⁺ calculado 907.5835).

c) Formación y bencilación de los succinil-AM-6AHA derivados

El tratamiento en fase sólida de **2** con 6AHA y posteriormente, con anhídrido succínico conduce a una mezcla de reacción, que tras ser clivada de la resina, es bencilada. Tras el tratamiento de los 238 mg de la mezcla se obtienen los productos **118** (4%), **119** (2%) y **120** (80%).



Benzil N-(3β-hidroxi-2α-benzilsucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoato (118): HPLC tiempo de retención 25.48 min; HPLC pureza 4%; Sirupo incoloro; [α]^D + 3.5 ° (c 1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3384, 2933, 2891, 1695; ¹H RMN (Cl₃CD) δ 7.36-7.33 (m, 10H, aromáticos bencilo), 5.90 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH), 5.35 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.4$ Hz, H-12), 5.14-5.11 (m, 4H, metileno bencilo), 5.00 (ddd, 1H, $J_1=3.0$ Hz, $J_2=6.5$ Hz, $J_3=10.5$ Hz, H-2), 3.34 (m, 1H, C-6 6AHA), 3.16 (d, 1H, $J=6.5$ Hz, H-3), 2.98 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.75-2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 2.52 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, H-18), 2.36 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, C-2 6AHA), 1.16, 1.06, 1.02, 0.91, 0.88, 0.86, 0.75 (s, 3H, Me); ¹³C RMN (Cl₃CD) δ 178.1, 173.4, 172.7 and 172.6, 145.4, 136.2, 135.8, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, , 122.5, 80.7, 73.9, 66.9, 66.3, 55.2, 47.6, 47.0 , 46.4, 43.7, 42.4, 42.3, 39.8, 39.6, 39.4, 38.5, 34.3, 34.3, 33.1, 32.7, 32.4, 30.9, 29.8 and 29.6, 29.3, 28.7, 27.4, 26.7, 25.9, 24.7, 23.9, 23.6, 23.8, 18.3, 17.1, 16.8, 16.5; HR-LSIMS (*m/z*) 866.5533 (C₅₄H₇₆NO₈ [M+1]⁺ calculado 866.5571).

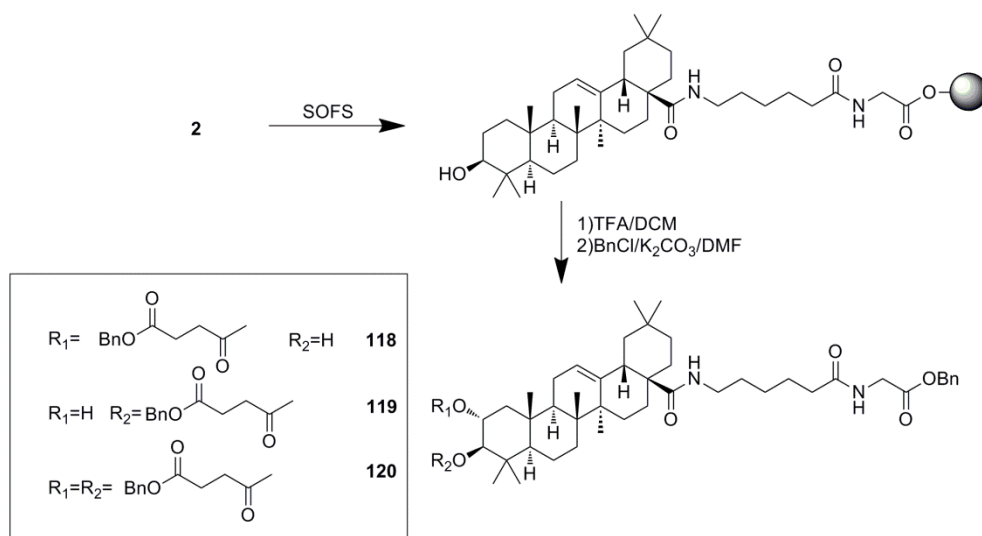
Benzil N-(2α-hidroxi-3β-benzilsucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoato (119): HPLC tiempo de retención 24.06 min; HPLC pureza 2%; Sirupo incoloro; [α]^D + 16.2 ° (c 1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3377, 2964, 2899, 1700; ¹H RMN (Cl₃CD) δ 7.35-7.34 (m, 10H, aromáticos bencilo), 5.89 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH), 5.37 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.4$ Hz, H-12), 5.17-5.08 (m, 4H, metileno bencilo), 4.57 (d, 1H, $J=6.0$ Hz, H-3), 3.78 (ddd, 1H, $J_1=3.0$ Hz, $J_2=6.0$ Hz, $J_3=10.5$ Hz, H-2), 3.35 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.98 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.75-2.50 (m, 4H, grupo succinilo), 2.50 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, H-18), 2.36 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, C-2 6AHA), 1.16, 0.98, 0.91, 0.91, 0.87, 0.84, 0.76 (s, 3H, Me); ¹³C RMN (Cl₃CD): δ 178.2, 173.4, 173.0, 172.9, 145.3, 136.2, 135.7, 128.8, 128.7, 128.5, 128.3, , 122.6, 85.5, 67.2, 66.9, 66.3, 55.1, 47.6, 47.0 , 46.9, 46.4, 42.5, 42.3, 39.6, 39.4, 39.4, 38.1, 34.3, 34.3, 33.1,

32.7, 32.4, 30.8, 29.7, 29.6, 29.2, 28.6, 27.4, 26.7, 25.9, 24.7, 23.8, 23.7, 23.7, 18.4, 17.8, 17.1, 16.8; **HR-LSIMS** (m/z) 866.5539 ($C_{54}H_{76}NO_8$ $[M+1]^+$ calculado 866.5571).

Benzil N-(2 α ,3 β -dibenzilsucciniloxiolean-12-en-28-oil)-6-aminohexanoato (120): HPLC tiempo de retención 27.40 min; HPLC pureza 80%; **Sirupo incoloro**; $[\alpha]^D +12.1^\circ$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3390, 2969, 2895, 1712; 1H RMN (Cl_3CD) δ 7.35-7.30 (m, 15H, aromáticos bencilo), 5.88 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH), 5.35 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, H-12), 5.15-5.05 (m, 6H, metileno bencilo), 5.11 (ddd, 1H, $J_1=3.0$ Hz, $J_2=6.5$ Hz, H-2), 4.78 (d, 1H, $J=6.5$ Hz, H-3), 3.36 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.99 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.75-2.60 (m, 8H, grupo succinilo), 2.50 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, H-18), 2.36 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, C-2 6AHA), 1.16, 1.04, 0.91, 0.91, 0.88, 0.88, 0.75 (s, 3H, Me); ^{13}C RMN (Cl_3CD) δ 178.1, 173.4, 172.2, 172.2, 172.0, 172.0, 145.3, 136.2, 136.0, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 122.4, 80.8, 70.3, 66.9, 66.5, 66.2, 54.9, 47.5, 46.9, 46.4, 44.0, 42.4, 42.2, 39.6, 39.5, 39.3, 38.2, 34.2, 34.2, 33.1, 32.7, 32.3, 30.8, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.3, 28.5, 27.4, 26.7, 25.8, 24.6, 23.8, 23.7, 23.7, 18.3, 17.7, 17.0, 16.5; **HR-LSIMS** (m/z) 1056.6215 ($C_{65}H_{86}NO_{11}$ $[M+1]^+$ calculado 1056.6201).

d) Formación y bencilación de los succinil-AM-6AHA-GLY-OH derivados

Se realiza el mismo procedimiento que para los productos anteriores para obtener los distintos bencil succinil derivados con dos aminoácidos en C-28. Tras el tratamiento de los 238 mg de la mezcla de reacción con BnCl se obtienen los productos **121** (5%), **122** (2%) y **123** (85%).



Benzil N'-[N-(2 α -benzilsucciniloxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oil)-6-aminoheptanoil]-glicinato (121): HPLC tiempo de retención 27.78 min; HPLC pureza 5%; **Sirupo incoloro**; $[\alpha]^D + 8.0^\circ$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3399, 2952, 2883, 1710; 1H RMN (Cl_3CD) δ 7.36-7.35 (m, 10H, aromáticos bencilo), 6.03 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH GLY), 5.92 (dd, 1H, $J_1=J_2=4.0$ Hz, NH 6AHA), 5.36 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, H-12), 5.20-5.10 (m, 4H, metileno

bencilo), 5.00 (ddd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=6.0$ Hz, $J_3=10.5$ Hz, H-2), 4.07 (d, 2H, $J=3.5$ Hz, C-2 GLY), 3.35 (m, 1H, C-6 6AHA), 3.16 (d, 1H, $J=6.0$ Hz, H-3), 3.00 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.75-2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 2.51 (dd, 1H, $J_1=3.4$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, H-18), 2.25 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, C-2 6AHA), 1.16, 1.06, 1.03, 0.91, 0.91, 0.87, 0.76 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (Cl_3CD): δ 178.2, 173.0, 172.7, 172.5, 170.1, 145.3, 135.8, 135.3, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 122.5, 80.7, 73.9, 67.3, 66.9, 55.2, 47.6, 47.0, 46.4, 43.7, 42.4, 42.3, 41.5, 39.8, 39.6, 39.3, 38.5, 36.3, 34.3, 33.1, 32.8, 32.4, 30.9, 29.8, 29.6, 29.3, 28.7, 27.4, 26.7, 25.9, 25.1, 23.9, 23.8, 23.7, 18.4, 17.1, 16.8, 16.5; **HR-LSIMS** (m/z) 923.5615 ($\text{C}_{56}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_9$ [M-1] calculado 921.56.29).

Benzil N'-[N-(2 α -hidroxi-3 β -benzilsucciniloxiolean-12-en-28-ol)-6-aminohexanoil]-glicinato (122): HPLC tiempo de retención 27.15 min; HPLC pureza 2%; **Sirupo incoloro;** $[\alpha]^D + 11.4^\circ$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3379, 2953, 2902, 1690; $^1\text{H RMN}$ (Cl_3CD) δ 7.35-7.30 (m, 10H, aromáticos bencilo), 6.05 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH GLY), 5.99 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH 6AHA), 5.47 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.4$ Hz, H-12), 5.20-5.10 (m, 4H, metileno bencilo), 4.57 (d, 1H, $J=6.0$ Hz, H-3), 3.95 (d, 2H, $J=3.0$ Hz, C-2 GLY), 3.78 (ddd, 1H, $J_1=3.0$ Hz, $J_2=6.0$ Hz, $J_3=10.5$ Hz, H-2), 3.24 (m, 2H, C-6 6AHA), 2.75-2.60 (m, 4H, grupo succinilo), 2.58 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, H-18), 2.35 (t, 2H, $J=6.5$ Hz, C-2 6AHA), 1.17, 0.96, 0.91, 0.91, 0.87, 0.83, 0.69 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (Cl_3CD) δ 180.2, 173.5, 173.1, 173.0, 172.4, 143.8, 136.2, 135.7, 128.8, 128.6, 128.5, 128.2, 123.8, 85.5, 67.4, 67.0, 66.4, 55.1, 47.6, 46.8, 46.6, 46.4, 42.1, 42.3, 41.5, 39.7, 39.6, 39.4, 38.1, 34.2, 34.2, 33.1, 32.5, 32.3, 30.8, 29.7, 29.6, 29.2, 28.6, 27.4, 26.4, 25.9, 24.7, 23.8, 23.7, 23.7, 18.4, 17.8, 16.7, 16.8; **HR-LSIMS** (m/z) 923.5613 ($\text{C}_{56}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_9$ [M-1] calculado 921.56.29).

Benzyl N'-[N-(2 α , 3 β -dibenzilsucciniloxiolean-12-en-28-oyl)-6-aminohexanoil]-glycinate (123): HPLC tiempo de retención 29.75 min; HPLC pureza 85%; **Sirupo incoloro;** $[\alpha]^D + 12.1^\circ$ (c 1, MeOH); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3383, 2939, 2897, 1719; $^1\text{H RMN}$ (Cl_3CD) δ 7.36-7.25 (m, 15H, aromáticos bencilo), 6.05 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.5$ Hz, NH GLY), 5.91 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.0$ Hz, NH 6AHA), 5.35 (dd, 1H, $J_1=J_2=3.4$ Hz, H-12), 5.20-5.05 (m, 6H, metileno bencilo), 5.10 (m, 1H, H-2), 4.77 (d, 1H, $J=6.5$ Hz, H-3), 4.07 (d, 2H, $J=3.0$ Hz, C-2 GLY), 3.35 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.99 (m, 1H, C-6 6AHA), 2.70-2.55 (m, 8H, grupo succinilo), 2.52 (dd, 1H, $J_1=3.5$ Hz, $J_2=12.0$ Hz, H-18), 2.24 (t, 2H, $J=6.0$ Hz, C-2 6AHA), 1.15, 1.04, 0.91, 0.91, 0.88, 0.88, 0.75 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C RMN}$ (Cl_3CD) δ 178.1, 173.0, 172.2, 172.2, 172.2, 172.0, 172.0, 145.2 (C, C-13), 136.0, 135.9, 128.8, 128.6, 128.4, 128.2, 122.4, 80.8, 70.3, 66.7, 66.6, 66.5, 54.9, 47.5, 46.9, 46.4, 44.0, 42.3, 42.2, 41.5, 39.6, 39.5, 39.3, 38.2, 36.2, 34.3, 33.1, 32.8, 32.3, 30.9, 29.4, 29.3, 29.1, 29.1, 29.3, 28.5, 27.4, 26.7, 25.8, 25.1, 23.8, 23.7, 23.7, 18.3, 17.1, 16.6, 16.5; **HR-LSIMS** (m/z) 113.6410 ($\text{C}_{67}\text{H}_{89}\text{N}_2\text{O}_{12}$ [M-1] calculado 1113.6416).

III.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

III.4.1. Ensayos de apoptosis de los productos funcionales

Las células B16-F10 se hacen crecer en DMEM como medio de cultivo, que contiene L-glutamina (4nM), glucosa (4,5 g/L) y suero fetal bovino (10%). Una vez alcanzado el n° de células deseado, las células confluentes en DMEM se tripsinan y se traspasan a placas de 6 pocillos (300.000 células por pocillos). Después de 24 h, las células se tratan con los diferentes compuestos **1-23** en DMSO a diferentes concentraciones (1, 10, 20 y 30 μ M) y por duplicado para los compuestos **4, 5, 13-21** y **23**. Las células se mantienen durante 24 y 48 horas con los productos. Como control se utiliza células B16-F10 incubado en presencia del disolvente con el que se agregan los productos, o sea DMSO, o sólo con el medio de cultivo.

Tras el tratamiento de las células con los diferentes productos, se desprenden de los pocillos por tratamiento con EDTA-Tripsina (0.5 mg/mL y 0.2 mg/mL respectivamente), se lava dos veces con una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspenden en una disolución tampón con una concentración de 10^6 células/mL. Para cada 100 μ L de disolución se añade 5 μ L de Annexin V-FITC y 5 μ L de yoduro de propidio. Tras este proceso se incuban las células en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Una vez pasado el periodo de incubación se añaden 400 μ L de disolución tampón y se analizan por citometría de flujo, en un periodo menor de 1 hora.

Los productos se analizan en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSVantage con un filtro BP530 \pm 30 nm en FL1 y un filtro BP585 \pm 70 nm en FL2 para recoger las señales que preceden de fluoresceína y de yoduro de propidio, respectivamente. La adquisición durante el proceso se realiza a 500 células/s hasta completar 10.000 células con CELLQuest Software (Becton Dickinson). Tras la recogida y tratamiento de las señales se obtienen los distintos valores para células normales (LL), apoptosis temprana (UL), apoptosis tardía (UR) y necrosis (LR) que vienen recogidas en la Tabla 3.28 y Tabla 3.29.

Concentración		30 μ M				
Nº	LL	UL	UR	LR	UR+LR	UR+LR/UL
C	98.65	0.65	0.29	0.41	0.70	1.08
C DMSO	97.31	1.35	0.64	0.69	1.33	0.99
1	89.11	1.27	0.93	8.86	9.79	7.71
2	89.43	1.08	0.48	9.01	9.49	8.79
4	6.96	1.46	2.64	88.94	91.58	62.73
5	9.56	0.79	2.78	86.87	89.65	113.48
6	70.00	0.88	2.45	26.67	29.12	33.09
9	46.67	0.41	9.24	43.67	52.91	129.05
10	64.76	10.95	10.66	13.63	24.29	2.22
12	89.44	1.35	4.33	1.87	6.20	4.59
13	1.52	0.02	5.71	92.75	98.46	4923.00
14	11.52	0.04	10.21	78.23	88.44	2211.00
15	15.52	0.67	0.70	83.11	83.81	125.09
16	60.57	0.68	5.94	32.80	38.74	56.97
17	8.05	0.83	2.61	88.52	91.13	109.80
18	11.89	4.36	6.33	77.41	83.74	19.21
19	7.30	0.10	5.38	87.22	92.60	926.01
20	5.39	0.62	3.47	90.51	93.98	151.58
21	31.09	2.38	1.87	64.66	66.53	27.95
22	87.38	5.75	4.63	2.25	6.88	1.20
23	2.83	0.08	16.37	80.73	97.10	1213.75

Tabla 3.28. Apoptosis de los productos **1-23** para concentración 30 μ M

Compuesto	Tiempo	Concentración	LL	UL	UR	LR	UR+LR	(UR+LR)/UL
4	24	1	10.82	1.68	17.79	69.71	87.5	52.1
		10	42.09	2.87	12.17	42.87	55.04	19.2
		20	11.27	0.88	12.33	75.51	87.84	99.8
	48h	1	75.79	0.83	0.43	22.95	23.38	28.2
		10	72.08	0.24	0.27	27.41	27.68	115.3
		20	29.19	0.18	0.46	70.17	70.63	392.4
5	24	1	40.33	2.99	0.33	56.34	56.67	19.0
		10	33.49	3.94	0.62	54.96	55.58	14.1
		20	24.29	1.55	2.08	72.08	74.16	47.8
	48h	1	11.82	3.73	0.33	84.12	84.45	22.6
		10	14.4	5.5	0.37	79.74	80.11	14.6
		20	5.34	2.36	2.8	89.49	92.29	39.1
9	24	1	83.32	15.72	0.96	0	0.96	0.1
		10	80.02	12.09	7.5	0.39	7.89	0.7
		20	11.44	1.11	12.64	74.81	87.45	78.8
	48h	1	77.52	2.38	0.29	19.81	20.1	8.4
		10	67.1	2.28	0.29	30.33	30.62	13.4

		20	55.62	0.64	0.89	42.85	43.74	68.3
13	24	1	72.37	6.57	10.07	11	21.07	3.2
		10	52.61	6.09	12.74	28.56	41.3	6.8
		20	16.81	13.63	6.62	62.95	69.57	5.1
	48h	1	52.41	0.7	2.28	44.6	46.88	67.0
		10	3.24	0.29	7.25	89.22	96.47	332.7
		20	11.75	0.11	2.96	85.19	88.15	801.4
14	24	1	30	1.38	17.43	51.19	68.62	49.7
		10	18.4	0.77	14.36	66.47	80.83	105.0
		20	10.25	1.15	12.77	75.83	88.6	77.0
	48h	1	65.5	3.06	2.74	28.7	31.44	10.3
		10	60.9	1.41	1.89	35.79	37.68	26.7
		20	32.33	1.19	2.58	63.9	66.48	55.9
15	24	1	20.67	0.58	11.53	67.22	78.75	135.8
		10	12.92	0.45	16.97	69.66	86.63	192.5
		20	7.22	0.15	13.84	78.8	92.64	617.6
	48h	1	67.11	0.79	0.62	31.47	32.09	40.6
		10	65.42	0.71	0.57	33.3	33.87	47.7
		20	30.17	0.21	1.82	67.8	69.62	331.5
16	24	1	83.25	2.68	0.45	13.63	14.08	5.3
		10	56.89	3.88	1.79	37.44	39.23	10.1
		20	12.62	1.65	4.82	80.91	85.73	52.0
	48h	1	60.25	2.25	1.46	36.04	37.5	16.7
		10	70.5	0.44	0.52	28.54	29.06	66.0
		20	22.81	1.02	4.96	71.21	76.17	74.7
17	24	1	97.23	2.14	0.28	0.34	0.62	0.3
		10	97.46	1.35	0.59	0.59	1.18	0.9
		20	54.52	0.4	1.61	43.47	45.08	112.7
	48h	1	84.39	11.66	0.46	3.49	3.95	0.3
		10	83.04	7.65	0.68	8.64	9.32	1.2
		20	9	0.86	6.04	84.1	90.14	104.8
18	24	1	66.64	0.83	1.34	31.18	32.52	39.2
		10	66.7	0.38	2.35	30.56	32.91	86.6
		20	44.88	0.46	2.85	51.8	54.65	118.8
	48h	1	41.62	10.65	3.8	43.92	47.72	4.5
		10	51.36	0.65	1.85	46.15	48	73.8
		20	8.53	0.67	5.26	85.54	90.8	135.5
19	24	1	85.11	2.2	1.66	11.03	12.69	5.8
		10	30.39	0.35	4.5	64.76	69.26	197.9
		20	11.11	0.15	2.25	86.49	88.74	591.6
	48h	1	66.88	2.3	0.21	30.6	30.81	13.4
		10	55.89	4.16	0.64	39.31	39.95	9.6
		20	28.2	0.29	1.15	70.36	71.51	246.6
20	24	1	94.28	1.59	0.98	3.15	4.13	2.6
		10	84.03	0.66	1.28	14.03	15.31	23.2
		20	60.76	0.55	1.55	37.14	38.69	70.3

21	48h	1	49.82	3.2	4.17	42.82	46.99	14.7
		10	37.09	1.43	4.98	56.51	61.49	43.0
		20	16.14	0.9	4.15	78.8	82.95	92.2
	24	1	84.2	3.66	1.14	11.01	12.15	3.3
		10	90.21	2.56	0.68	6.55	7.23	2.8
		20	23.17	2.16	2.5	72.16	74.66	34.6
	48h	1	98.56	0.65	0.02	0.76	0.78	1.2
		10	92.66	4.23	0.08	3.02	3.1	0.7
		20	29.19	1.68	1.27	67.87	69.14	41.2
23	24	1	93.82	3.41	0.65	2.12	2.77	0.8
		10	88.16	2.7	1.3	7.84	9.14	3.4
		20	84.55	1.66	2.18	11.61	13.79	8.3
	48h	1	98.15	1.72	0.03	0.09	0.12	0.1
		10	96.33	2.73	0.04	0.9	0.94	0.3
		20	6.62	15.01	73.78	4.59	78.37	5.2

Tabla 3.29. Apoptosis de productos **4, 5, 9, 13-21** y **23**

III.4.2. Ensayo de citotoxicidad de los productos 1-4, 10 y 24-83

El efecto anti-proliferación de cada producto para la línea celular B16-F10 se mide mediante el ensayo MTT, que se basa en la habilidad de las células viva de acoplarse al anillo de tetrazolio, produciendo formazano que absorbe a 570 nm.

La viabilidad se determina por la medida de la absorbancia de las células tintadas por MTT. Para este ensayo se necesitan 11×10^3 células de B16-F10 por pocillos. Una vez que se consigue ese número de células se tratan con los diferentes productos **1-4**, **10** y **24-83** con concentraciones de 0-80 $\mu\text{g/mL}$. Tras 72 horas se añade a cada pocillo 100 μL de una disolución 0.5 mg/mL de MTT. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las células se lavan dos veces con PBS para posteriormente ser resuspendidas con formazano en 200 μL de DMSO. La viabilidad celular se mida a una absorbancia de 550 nm en un lector de placas ELISA (Tecan Sunrise MR20-301, Tecan, Austria). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.32.

III.4.3. Ensayo de apoptosis para los productos 1-4, 10 y 24-83

La apoptosis se analiza por citometría de flujo usando un FACScan (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Se cultivan 11×10^4 células B16-F10 por pocillo en placas de 12 pocillos con 2 mL de medio y posteriormente se tratan con los productos **1-4, 10, 24, 27, 31, 42-45, 48, 50, 64, 76, 80, 82**, manteniéndose durante 72 horas en incubación a las concentraciones de IC_{50} e $IC_{50 \times 2}$ calculadas en el ensayo anterior. Tras pasar el tiempo requerido las células son recogidas y resuspendidas en una disolución tampón (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$), posteriormente se añade Annexin V-FitC (1 μ g/mL) y se incuba durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Justo antes del ensayo de citometría las células son teñidas con 20 μ L de una disolución de ioduro de propidio (1 mg/mL). En cada experimento se analizan aproximadamente 20×10^3 células, realizando el experimento por duplicado tres veces. Los resultados se muestran en la Tabla 2.34.

III.4.4. Ensayo de producción de ROS

El daño producido por agentes oxidantes se estudia mediante el análisis de los niveles de ROS por citometría de flujo usando dihidrorodamina 123 (DHR), que es oxidada a un producto altamente fluorescente, rodamina. La formación de la rodamina se monitoriza a través espectroscopía de fluorescencia usando longitudes de onda de excitación y emisión de 500 y 536 nm, respectivamente. Las medidas intracelulares de especies oxidantes reactivas se realiza mediante la determinación de rodamina 123 por citometría de flujo. De la misma forma que los ensayos de apoptosis se cultivan 11×10^4 células B16-F10 por pocillo en placas de 12 pocillos. Posteriormente son tratados con los productos **1-4, 10, 24, 27, 31, 42-45, 48, 50, 64, 76, 80, 82** a las concentraciones de IC_{50} e $IC_{50 \times 2}$ durante 72 h. Tras el tratamiento se cambia el medio por otro que contenga DHR (5 $\mu\text{g/mL}$) y se incuba durante 30 min. Después de este proceso se elimina el medio, se lavan las células y se resuspenden en PBS 5 $\mu\text{g/mL}$. La intensidad de la fluorescencia de Rh123 y PI se determina usando un citómetro de flujo FACScan (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.30, Tabla 3.31 y Tabla 3.32.

	Conc.	Q1	Q2	Q3	Q4	Rdh-	Rdh+
OA	9	48.8	8	10.3	33	59.1	41
OA	9	57.4	11.5	11.3	19.6	68.7	31.1
MA	9	4.9	5	76.1	14	81	19
MA	9	1.6	5.4	72.1	20.8	73.7	26.2
OA-Bz	9	1.7	0.8	3.1	94.4	4.8	95.2
OA-Bz	9	1	1.1	2.6	95.3	3.6	96.4
AM-Bz	9	0.7	1.7	1.7	95.9	2.4	97.6
AM-Bz	9	1.4	1.8	1.7	95.1	3.1	96.9
OA	42	2.9	1.9	2.2	93	5.1	94.9
OA	42	1.7	2.1	3	93.2	4.7	95.3
MA	42	8.4	1.2	79.6	10.8	88	12
MA	42	4.8	0.4	93.3	1.5	98.1	1.9
OA-Bz	42	1	1.4	4.4	93.2	5.4	94.6
OA-BZz	42	0.8	1.4	3.6	94.2	4.4	95.6

Tabla 3.30. Producción de ROS de los productos de partida

IC ₅₀	Rh123 negative		Rh123 positive	
	CT	96.93	0.30	3.12
10	6.8	1.9	93.2	1.9
24	10.95	0.85	89.05	0.85
25	10.5	0.7	89.5	0.6
42	79.1	3.8	20.9	3.8
43	78.1	6.6	21.9	6.6
44	55.4	7	44.6	7
45	8.2	2	91.75	2.05
48	16.85	4.25	83.15	4.25
50	16.2	10	83.8	10
50	3.55	0.15	96.45	0.15
64	8.55	4.05	91.5	4
76	58.1	2.6	41.8	2.6
80	1.4	0.2	98.55	0.15
82	4.75	0.45	95.15	0.45

Tabla 3.31. Producción de ROS de los productos acilados a la concentración de IC₅₀

IC _{50x2}	Rh123 negative		Rh123 positive	
	CT	96.93	0.30	3.12
10	11.25	1.85	88.75	1.85
24	11.85	1.15	88.15	1.25
25	16.85	3.15	83.1	3.1
42	84.2	9.1	15.75	9.05
43	69.8	3.3	30.2	3.3
44	72.25	11.95	27.7	11.9
45	15.95	13.85	84.15	13.85
48	11.1	7.1	89	7.1
50	11.95	5.55	88.05	5.45
50	3.55	2.05	96.55	2.05
64	6.2	3.8	93.75	3.75
76	67.8	2.7	32.2	2.7
80	2.95	0.35	97.05	0.35
82	24.05	6.65	75.95	6.65

Tabla 3.32. Producción de ROS de los productos acilados a la concentración de IC_{50x2}

III.4.5. Ensayo anti-VIH

La actividad anti-VIH se determina usando la proteasa recombinante HIV de *E. coli* (PQITLWQRPL VTIKIGGQLK EALLDTGADD TVLEEMNLPG RWKPKMIGGI GGFIVRQYD QILIEICGHK AIGTVLVGPT PVNIIGRNLL TQIGCTLNF) obtenida del fabricante BioVendor GmbH (Heidelberg, Alemania). La actividad proteolítica de la proteasa de VIH-1 se mide usando FRET (Transferencia de energía de resonancia de Förster). Como sustrato se utiliza el péptido sintético (Abz-Ala-Arg-Val-Nle-Tyr(NO₂)-Glu-Ala-Nle-NH₂) de Sigma (St. Louis, MO, USA) correspondiente al sitio de anclaje p-24-p17. Cuando se usa FRET, la fluorescencia esta atenuada en el péptido y cuando es dividido en dos partes en el sitio de anclaje de la proteasa aparece señal fluorescencia. El porcentaje de inhibición de la actividad fluorescente se usa para determinar el porcentaje de inhibición de la actividad de los productos. Este porcentaje se calcula según la fórmula:

$$\% \text{ inhibition} = [1 - (V_{inh}/V_0)] \times 100$$

(V_{inh} = actividad enzimática en presencia de inhibidor)

(V_0 = actividad enzimática de la disolución control)

Los ensayos se realizan con una disolución que contenga la proteasa VIH-1 (10 η M)

El ensayo se realiza con una disolución tampón (50 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, 0.5 nM DTT, 1 M NaCl, 2.5% glicerol) que contiene la proteasa VIH-1 (10 η M), el sustrato fluorogénico (10 η M) y el inhibidor en concentración crecientes 0.17 μ g/mL a 1.7 mg/mL, en un volumen total de μ L. La fluorescencia se analiza usando un espectrómetro de fluorescencia LS 50B con $\lambda = 320$ nm y 420 nm de excitación y emisión respectivamente. Los productos que fueron analizados por esta técnica son **1-4**, **10** y **24-83** y los resultados se muestran en la Tabla 2.37.

III.4.6. Ensayo de citotoxicidad de los productos de los peptidil derivados de AO y AM

El efecto anti-proliferativo de cada producto para cada una de las líneas celulares (B16-F10, HT29, Hep G2) se mide mediante el ensayo MTT, que se basa en la habilidad de las células vivas para acoplarse al anillo de tetrazolio, produciendo formazano que absorbe a 570 nm.

La viabilidad se determina por la medida de la absorbancia de las células tintadas por MTT. Para este ensayo se necesitan 11×10^3 células de cada línea celular por pocillos. Una vez que se consigue ese número de células se tratan con los diferentes productos **1, 2, 92-115, (92-115)g, (92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115)a, (92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115)c, (94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115)f y (94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115)h** con concentraciones de 0-80 $\mu\text{g/mL}$. Tras 72 horas se añade a cada pocillo 100 μL de una disolución 0.5 mg/mL de MTT. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las células se lavan dos veces con PBS para posteriormente ser resuspendidas con formazano en 200 μL de DMSO. La viabilidad celular se mide a una absorbancia de 550 nm en un lector de placas ELISA (Tecan Sunrise MR20-301, Tecan, Austria). Los resultados obtenidos se muestran en la Tablas 2.49-2.52 y Figura 2.53.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Partiendo del producto natural, ácido maslínico, aislado de los restos sólidos de molturación de la aceituna, y mediante el empleo de reacciones orgánicas sencillas, se han semisintetizado varios derivados nitrogenados en C-28 del esqueleto triterpénicos, a saber, los grupos azido, carbamoil, ciano, amino, entre otros. Similarmente, actuando químicamente sobre los hidroxilos del anillo A de ácido maslínico o de su derivado bencilado en C-28, usando también transformaciones orgánicas simples, se han semisintetizado derivados de este compuesto natural, que se diferencian en el estado redox de los carbonos de este ciclo y en la configuración absoluta de sus sustituyentes.

2. Algunos derivados sencillos de ácido maslínico han resultado ser importantes agentes proapoptóticos para la línea celular B16F10 de melanoma murino con porcentajes de necrosis celular insignificantes. Particularmente maslinato sódico, maslinato de bencilo y ácido 28-ciano maslínico presentan potente actividad anticancerígena a concentración micromolar muy baja y pueden ser considerados moléculas evaluables como prometedores agentes antiproliferativos.

3. Tomando como esqueleto base, los ácidos triterpénicos naturales, ácido oleanólico y ácido maslínico y sus derivados bencilados en C-28, se han semisintetizado una librería de 65 derivados acilados en los hidroxilos del anillo A de estos compuestos. El proceso de acilación se ha llevado a cabo en fase líquida mediante el empleo de diez anhídridos de ácido diferentes como agentes acilantes.

4. Para poder llevar a cabo reacciones orgánicas más limpias, de mejor rendimiento y menos tediosas sobre los ácidos triterpénicos AO y AM, se ha realizado un estudio de su incorporación a un soporte sólido a través de su carboxilo de C-28. Como soporte sólido se ha elegido la resina de cloruro de 2-clorotritilo (resina de Barlos), comprobándose que si se emplea un relación estequiométrica de 3 equivalentes de triterpeno frente a un equivalente de centro activo de resina, la incorporación de AO y AM se sitúa entre 90-100%.

5. Profundizando en el empleo de la Síntesis Orgánica en Fase Sólida (SOFS), se han llevado a cabo varias acilaciones de AO y AM comparativamente con las mismas reacciones de acilación llevadas a cabo en disolución. Se comprueba que el proceso de acilación mediante técnicas de SOFS se lleva a cabo más fácilmente, con

work-up más sencillo y se obtienen derivados con mayor rendimiento para condiciones más suaves y menores tiempos de reacción.

6. La librería de derivados acilados de AO y AM obtenidos han sido estudiados por sus efectos antiproliferativos contra la línea celular B16F10 de melanoma murino y antivirales como inhibidores de la proteasa del VIH-1. Se ha puesto de manifiesto que varios de los compuestos analizados presentan niveles de apoptosis temprana y total que superan el 90%, sobre todo aquellos que tienen en el carboxilo de C-28 un grupo bencilo y en los hidroxilos del anillo A un fragmento polar dicarboxílico. También se ha comprobado que un considerable número de estos derivados acilados se comportan como potentes inhibidores de la proteasa del VIH-1 llegando a ser hasta 200 veces más activos que sus precursores.

7. Dadas las potentes actividades exhibidas en los procesos de activación apoptótica en la línea celular citada y de inhibición de la proteasa del VIH-1, algunos de los derivados acilados de AO y AM, podrían ser usados en el futuro como agentes anticancerígenos y antivirales nuevos, más seguros y efectivos.

8. Se ha empleado con total validez, enorme sencillez y muy alta eficacia, la técnica de Síntesis Orgánica en Fase Sólida para obtener una más amplia librería de más de 250 miembros, de compuestos bifuncionalizados en los hidroxilos del anillo A y el carboxilo de C-28 de AO y AM. Esta librería se consigue empleando la filosofía de la Química Combinatoria y la técnica de la SOFS, escogiendo para ello seis aminoácidos a acoplar en el grupo carboxilo de C-28 y diez acilos a unir en los hidroxilos del anillo A de AO y AM.

9. Se ha determinado la actividad citotóxica de un grupo seleccionado de los anteriores derivados bifuncionalizados sobre tres líneas celulares, a saber, B16F10 (melanoma de ratón murino), HT29 (adenocarcinoma de colon humano) y Hep G2 (carcinoma de hígado humano). Un elevado porcentaje de los derivados testeados presentan alta citotoxicidad en las tres líneas celulares con valores que superan en algunos casos hasta 300 veces la actividad del correspondiente precursor a concentraciones realmente bajas. Los derivados que mejores resultados han son aquellos que tienen un α -aminoácido sobre C-28 y un grupo acilo pequeño sobre C-2 o C-3.

10. La amplia librería obtenida de derivados bifuncionales de AO y AM tiene un gran potencial en sí misma y garantiza la continuidad de más pruebas bioquímicas sobre todo ellos, como la que actualmente se realiza, para determinar el posible y muy esperanzador uso como agentes inhibidores del VIH-1. Además, se empiezan a desarrollar también con los derivados más prometedores, estudios bioquímicos moleculares más profundos para comprobar los mecanismos de actuación en las actividades biológicas citadas y otras que están por fijar.

ANEXO I. TABLAS

Tablas ¹³C RMN

C/Nº	AO (1)	AM (2)	AO-Bn (3)	AM-Bn (4)
C-1	38.1	46.1	38.7	46.2
C-2	29.8	68.2	27.9	69.2
C-3	81.0	83.2	79.2	89.0
C-4	37.0	39.0	37.3	38.4
C-5	55.3	55.1	55.5	55.6
C-6	18.2	18.1	18.6	18.7
C-7	32.5	32.3	32.6	33.0
C-8	39.3	39.1	39.5	39.5
C-9	47.6	47.4	47.9	47.9
C-10	37.7	37.9	39.0	39.2
C-11	23.4	23.2	23.6	23.8
C-12	122.6	121.9	122.7	122.5
C-13	143.7	143.7	143.9	143.9
C-14	41.6	41.5	41.9	41.5
C-15	27.7	27.4	27.9	27.9
C-16	22.9	22.7	23.3	23.4
C-17	46.6	46.1	47.0	46.0
C-18	40.9	41.0	41.6	41.9
C-19	45.9	45.7	46.1	46.8
C-20	30.7	30.4	30.9	30.9
C-21	33.8	33.6	34.1	34.0
C-22	32.5	32.4	32.9	32.7
Me	15.4	28.2	15.5	29.0
Me	16.7	16.1	15.8	17.3
Me	17.2	16.4	17.1	17.2
Me	23.6	16.5	23.9	17.0
Me	25.9	25.5	26.1	26.3
C-28	184.5	180.6	177.6	177.2
Me	28.3	32.7	28.3	33.5
Me	33.3	23.1	33.3	24.0
Bencilo			136.7	136.6
			128.6	128.6
			128.2	128.1
			128.1	128.1
CH ₂		66.1	66.3	

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los productos de partida usados

C/Nº	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C-1	46.9	46.5	42.2	42.2	46.7	44.1	43.9	46.8	46.9	44.2	46.7	46.7
C-2	67.1	69.0	72.7	72.6	69.2	70.2	70.0	70.2	69.1	70.2	69.1	69.8
C-3	82.2	83.9	88.9	88.8	84.1	80.8	80.6	80.2	84.2	80.8	84.1	84.1
C-4	38.8	38.2	37.6	37.5	38.4	39.6	38.1	39.5	39.4	38.4	39.4	39.4
C-5	54.9	55.3	56.3	56.2	55.5	55.1	54.9	55.0	55.5	55.1	55.5	55.5
C-6	18.2	18.4	18.0	17.9	18.6	18.4	18.2	18.4	18.6	18.4	18.6	18.6
C-7	32.5	32.5	32.9	32.7	32.7	32.6	32.4	32.6	32.7	32.6	33.1	32.7
C-8	38.9	39.9	40.2	40.0	39.5	38.4	39.4	39.5	39.5	39.6	38.5	38.4
C-9	47.4	47.6	48.1	47.9	47.8	47.7	47.5	47.6	47.8	47.7	47.8	47.8
C-10	37.7	39.3	37.2	35.5	37.2	39.5	39.4	38.3	38.5	38.2	38.2	37.2
C-11	23.4	23.6	24.0	23.9	22.2	23.7	24.0	23.9	24.1	24.2	24.3	23.8
C-12	119.6	122.2	122.3	123.1	122.4	122.4	123.4	122.7	122.9	124.5	124.7	122.4
C-13	146.1	144.3	144.6	144.7	144.5	143.9	142.2	145.0	145.2	141.9	141.9	144.5
C-14	41.5	41.8	40.4	40.2	40.1	41.8	41.7	42.2	42.4	39.7	39.8	40.1
C-15	27.6	25.6	25.8	25.7	25.8	27.8	27.4	27.4	27.6	28.2	28.2	25.8
C-16	23.1	22.0	22.2	22.9	22.2	23.0	23.5	23.9	23.8	23.8	23.8	22.2
C-17	45.6	37.0	42.0	41.7	42.0	46.7	47.5	46.5	46.7	46.8	42.1	42.0
C-18	41.7	42.4	42.5	42.2	42.6	41.1	42.6	42.6	42.8	42.6	44.1	42.6
C-19	46.9	46.6	46.6	46.3	46.8	46.0	46.3	44.1	46.6	44.1	45.0	46.7
C-20	30.7	31.0	28.8	31.0	29.5	30.9	30.6	30.9	31.0	30.8	30.8	29.5
C-21	33.8	34.2	34.3	34.0	34.3	34.0	33.8	34.2	34.4	34.2	33.2	34.3
C-22	32.5	31.1	31.3	31.8	31.3	32.6	31.2	32.4	32.6	32.4	32.6	31.3
Me	28.8	33.3	26.2	26.2	28.9	33.1	32.8	28.6	28.8	28.7	28.9	28.8
Me	16.3	28.7	16.4	16.4	17.1	28.5	28.4	17.8	17.3	17.9	17.5	17.0
Me	17.2	26.0	17.3	16.8	17.0	25.9	25.8	17.1	17.0	17.4	17.0	17.1
Me	17.5	23.6	17.5	17.4	17.8	23.6	23.5	17.7	16.9	16.7	16.9	17.0
Me	25.7	16.9	27.4	21.8	25.8	17.7	17.7	25.9	26.0	25.7	25.8	25.7
C-28	181.6	69.8	69.9	76.9	69.9	184.3	179.8	182.2	181.5	125.7	125.8	69.9
Me	33.1	16.9	33.4	33.2	33.4	17.2	16.8	33.2	33.2	33.2	33.1	33.4
Me	23.7	16.8	23.8	23.8	26.2	16.5	16.5	23.5	23.8	23.6	23.7	23.8
			108.4	143.3		170.8	170.6	171.0		171.1		
			27.4	133.3		171.0	170.9	170.7		170.7		
			27.1	129.9		21.1	21.0	21.3		21.3		
				128.2		21.3	21.2	21.1		21.1		
				28.7								

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados nitrogenados en C-28

C/Nº	17	18	19	20	21	22	23
C-1	53.3	128.5	53.3	128.5	45.0	44.7	44.3
C-2	211.2	144.0	211.2	143.9	71.9	71.6	71.3
C-3	83.1	201.3	83.1	201.3	78.8	78.7	78.7
C-4	46.0	44.1	45.9	44.1	39.2	38.3	38.3
C-5	54.7	54.1	54.7	54.1	56.4	55.6	55.4
C-6	18.7	18.9	18.7	18.9	18.8	18.6	18.3
C-7	32.6	32.6	32.6	32.8	33.7	32.8	32.9
C-8	40.0	38.7	39.9	33.6	37.8	37.2	36.9
C-9	47.9	43.3	47.8	43.3	48.7	48.5	48.3
C-10	44.0	42.2	43.9	42.3	40.4	36.9	39.6
C-11	23.6	23.6	23.6	23.7	24.1	24.1	23.7
C-12	122.1	122.3	121.9	122.3	123.1	122.6	122.8
C-13	144.1	144.1	144.1	144.3	145.3	144.4	143.9
C-14	42.0	40.2	42.0	40.2	42.8	40.1	42.1
C-15	27.6	27.8	27.8	27.8	28.7	26.0	27.7
C-16	23.1	23.0	23.2	23.3	23.2	22.5	23.3
C-17	46.7	46.8	46.9	47.0	46.5	42.1	47.0
C-18	41.2	41.3	41.6	41.7	42.2	42.8	41.6
C-19	46.1	45.9	46.1	46.0	46.6	46.9	46.1
C-20	30.9	30.9	30.9	30.9	30.7	29.9	30.9
C-21	34.0	34.0	34.1	34.2	34.4	34.6	34.1
C-22	32.6	32.6	32.5	32.6	33.5	31.2	32.6
Me	29.6	27.4	29.6	27.9	30.4	30.2	29.9
Me	16.9	22.0	16.8	22.0	18.3	17.8	17.5
Me	16.8	19.9	16.7	19.8	17.6	17.2	17.1
Me	16.4	17.7	16.4	17.5	16.8	17.0	16.5
Me	26.1	26.1	26.0	26.0	26.4	26.5	26.1
C-28	183.3	184.4	177.5	177.6	180.6	70.2	177.7
Me	33.3	33.3	33.3	33.3	33.4	33.0	33.3
Me	23.8	23.8	23.8	23.8	23.9	24.1	23.9
Bencilo			136.6	136.6			136.6
			128.6	128.6			128.6
			128.2	128.2			128.2
			128.2	128.2			128.1
CH ₂		66.2	66.3			66.2	

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados oxidados en el anillo A

C/Nº	AO (1)	24	27	28	29	30	31	32	33	34	35
C-1	38.1	38.3	38.3	38.3	38.3	38.3	38.4	38.2	38.2	38.2	38.0
C-2	29.8	29.9	29.9	29.9	29.9	29.8	29.9	29.7	29.6	29.7	29.9
C-3	81.0	81.2	80.8	80.8	80.8	80.8	81.8	83.4	81.7	81.3	81.2
C-4	37.0	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.3	38.1	37.2	37.2	37.3
C-5	55.3	55.5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.6	55.6	55.5	55.5	55.4
C-6	18.2	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4	18.5	18.4	18.5
C-7	32.5	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.6	32.6
C-8	39.3	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5	39.6	39.5	39.5	39.5	39.5
C-9	47.6	47.8	47.8	47.8	47.8	47.8	47.8	47.7	47.7	47.7	47.5
C-10	37.7	38.3	38.3	38.3	38.0	38.0	38.4	38.2	38.3	38.0	38.0
C-11	23.4	23.8	23.6	23.6	23.6	23.7	23.7	23.6	23.6	23.6	23.6
C-12	122.6	122.8	122.8	122.8	122.8	122.8	122.8	122.8	122.8	122.8	122.9
C-13	143.7	143.8	143.8	143.8	143.8	143.8	143.8	143.8	143.8	143.8	143.7
C-14	41.6	41.8	41.8	41.8	41.9	41.9	41.9	41.8	41.7	41.7	41.6
C-15	27.7	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9	27.9	28.0
C-16	22.9	23.1	23.1	23.1	23.2	23.2	23.2	22.9	23.0	23.0	22.9
C-17	46.6	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8	46.7	46.8	46.8	46.8
C-18	40.9	41.2	41.2	41.2	41.3	41.3	41.3	41.0	41.1	41.1	41.0
C-19	45.9	46.1	46.1	46.1	46.1	46.1	46.1	46.1	46.0	46.0	46.1
C-20	30.7	30.1	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9
C-21	33.8	34.0	34.0	34.0	34.1	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0
C-22	32.5	32.8	32.8	32.8	32.8	32.8	32.8	32.8	32.7	32.7	32.8
Me	15.4	15.6	15.6	16.5	15.6	15.6	15.6	15.7	15.7	15.6	15.7
Me	16.7	16.9	16.9	16.9	16.9	17.0	17.2	17.0	17.0	17.0	17.3
Me	17.2	17.3	17.3	17.3	17.3	17.3	17.3	17.5	17.2	17.2	17.6
Me	23.6	23.8	23.8	23.8	23.8	23.7	23.8	23.8	23.8	23.8	23.8
Me	25.9	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.2	26.1	26.1	26.2	26.2
C-28	184.5	183.8	183.8	183.9	183.8	183.2	183.1	184.9	184.9	185.0	184.9
Me	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.4	28.4	28.3	28.4	28.6
Me	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	32.7	32.3	33.3	33.3	33.9
COOH		171.3	174.5	173.7	173.9	173.9	166.5	172.8	171.8	179.6	178.0
COOH								168.1	178.6	172.7	172.1
CH3		21.5	9.6	13.9	14.1	14.3					28.8
CH3											28.6
CH2			28.3	18.9	35.1	35.1			29.6	33.3	45.4
CH2				37.0	31.6	32.1			29.4	33.0	44.3
CH2					25.1	29.8				20.4	
CH2					22.5	29.7					
CH2						29.6					
CH2						29.5					
CH2						25.4					
CH2						22.9					
CH							132.9	130.9			
CH							131.2	130.3			
CH							129.8	130.0			
CH							128.5	129.2			
C								133.8			32.7
C								132.2			

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados acilados de AO (1)

C/Nº	AO-Bn (3)	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
C-1	38.7	38.3	38.4	38.3	38.3	38.3	38.3	38.4	38.3	38.1	38.3
C-2	27.9	27.8	28.3	27.8	25.1	25.4	23.8	27.9	29.3	27.8	27.8
C-3	79.2	81.1	80.8	80.7	80.8	80.7	81.8	83.1	81.7	81.6	81.6
C-4	37.3	37.1	37.2	36.9	37.1	37.1	37.2	37.2	37.1	37.1	37.1
C-5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.5	55.6	55.7	55.5	55.5	55.5
C-6	18.6	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4	18.4	18.4
C-7	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.5	32.6	32.6
C-8	39.5	39.5	39.9	39.5	39.5	39.5	39.9	39.6	39.5	39.5	39.5
C-9	47.9	47.8	47.8	47.7	47.8	47.7	47.8	47.8	47.7	47.7	47.7
C-10	39.0	37.9	38.0	38.3	37.9	37.9	37.2	38.2	37.9	37.8	37.8
C-11	23.6	23.6	23.6	23.6	23.6	23.6	23.6	23.7	23.6	23.6	23.6
C-12	122.7	122.6	122.7	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6
C-13	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.8	143.9	143.9
C-14	41.9	41.9	41.9	41.8	41.9	41.9	41.9	41.9	41.9	41.9	41.9
C-15	27.9	27.8	27.9	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
C-16	23.3	23.3	23.3	23.2	23.3	23.3	23.3	23.2	23.2	23.3	23.3
C-17	47.0	47.0	47.0	46.9	46.9	46.9	46.9	47.0	46.9	47.0	46.9
C-18	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6	41.6
C-19	46.1	46.1	46.1	46.0	46.1	46.1	46.1	46.1	46.0	46.1	46.1
C-20	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9
C-21	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	34.0	34.4	34.1	34.0	34.1	34.1
C-22	32.9	32.9	32.9	32.9	32.9	32.9	32.9	32.9	32.8	32.8	32.9
Me	15.5	15.6	15.6	15.5	15.6	15.5	15.6	15.2	15.5	15.5	15.5
Me	15.8	16.9	16.7	16.9	16.9	16.9	17.1	17.1	16.9	16.9	17.0
Me	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1	17.9	17.1	17.0	17.1	17.1
Me	23.9	23.9	23.9	23.8	23.9	23.8	23.8	23.9	23.8	23.8	23.9
Me	26.1	26.0	26.1	26.0	26.1	26.0	26.1	26.1	26.0	26.1	26.1
C-28	177.6	177.6	177.7	177.6	177.6	177.6	177.6	177.7	177.7	177.7	177.7
Me	28.3	28.2	28.3	28.2	28.3	28.3	28.4	28.4	28.2	28.3	28.3
Me	33.3	33.3	33.3	33.2	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
Bencilo	136.7	136.7	136.7	136.6	136.7	136.6	136.6	136.7	136.6	136.6	136.6
	128.6	128.6	128.6	128.6	128.6	128.6	128.6	128.6	122.5	128.6	128.6
	128.2	128.2	128.2	128.1	128.2	128.2	128.2	128.2	128.1	128.2	128.2
	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1	128.1
	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1	66.1
COOH	171.1	174.5	173.6	173.8	173.8	166.4	171.0	178.1	172.9	172.5	
COOH							168.1	172.0	178.4	176.3	
CH3	21.5	9.6	13.9	14.1	14.3					28.2	
CH3										28.1	
CH2			23.8	23.8	35.0	35.0		29.5	33.9	45.8	
CH2				18.8	31.5	32.1		29.6	33.9	45.4	
CH2					23.8	29.8			20.3		
CH2					22.5	29.8					
CH2						29.6					
CH2						29.5					
CH2						29.4					
CH2						29.4					
CH2						23.8					
CH2						22.9					
CH							134.7	133.3			
CH							132.9	132.1			
CH							130.8	130.4			
CH							129.7	129.6			
C							129.1	131.1		32.6	
C								131.9			

Desplazamientos químicos ^{13}C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados acilados de AO-Bn (3)

C/Nº	AM	25	26	10	46	47	48	49	50	51	52	53
C-1	46.1	43.9	48.0	44.1	43.8	44.1	43.8	44.1	43.8	44.1	43.9	44.1
C-2	68.2	73.5	67.1	70.2	73.2	70.1	73.1	70.1	73.1	70.1	73.1	70.1
C-3	83.2	81.1	85.1	80.8	81.0	80.5	81.1	80.3	81.0	80.3	81.1	80.3
C-4	39.0	38.6	39.6	39.6	38.6	38.4	38.5	38.4	38.4	38.4	38.4	38.4
C-5	55.1	55.4	55.4	55.1	55.3	55.1	55.3	55.1	55.3	55.1	55.4	55.1
C-6	18.1	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4
C-7	32.3	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.7	32.6	32.7	32.6	32.6
C-8	39.1	39.5	38.5	38.4	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5	39.6	39.6	39.6
C-9	47.4	47.8	47.8	47.7	47.7	47.8	47.8	47.7	47.8	47.7	47.8	47.8
C-10	37.9	40.0	39.6	39.5	40.0	39.7	39.9	39.7	39.9	39.7	39.9	39.7
C-11	23.2	23.7	23.6	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.1	23.7	23.7
C-12	121.9	122.5	122.5	122.4	122.4	122.5	122.5	122.5	122.4	122.5	122.5	122.5
C-13	143.7	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.9	143.8	143.9	143.8	143.9
C-14	41.5	41.8	41.9	41.8	41.7	41.8	41.8	41.8	41.8	41.9	41.9	41.8
C-15	27.4	27.8	27.8	27.8	27.8	27.9	27.8	27.9	27.8	27.9	27.8	27.8
C-16	22.7	23.1	23.1	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	28.9	23.1	23.1
C-17	46.1	46.7	46.7	46.7	46.7	46.8	46.7	46.8	46.7	46.7	46.7	46.8
C-18	41.0	41.1	41.1	41.1	41.0	41.1	41.1	41.1	41.1	41.2	41.1	41.1
C-19	45.7	46.1	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.1	46.0
C-20	30.4	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.8	30.9	30.8	30.9	30.9	30.9
C-21	33.6	34.0	34.1	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.8	34.0
C-22	32.4	32.7	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6	32.7	32.6	32.7	32.6	32.6
Me	28.2	33.5	33.4	33.1	16.5	16.6	16.5	16.6	16.5	16.6	16.5	16.6
Me	16.1	28.9	28.7	28.5	16.8	17.4	16.8	17.4	16.8	17.4	16.8	17.3
Me	16.4	26.3	26.2	25.9	17.3	17.9	17.3	17.9	17.2	17.9	16.9	17.9
Me	16.5	24.0	29.7	23.6	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1	26.1
Me	25.5	17.4	17.1	17.7	28.1	28.1	27.8	27.9	27.8	27.9	27.8	27.9
C-28	180.6	183.8	182.9	184.3	184.2	184.6	184.3	184.6	184.5	183.0	184.8	184.5
Me	32.7	17.0	17.0	17.2	32.6	32.6	32.6	32.7	32.6	32.7	32.6	32.7
Me	23.1	16.0	16.2	16.5	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	22.9	22.8	23.1
COOH		171.9	172.6	170.8	175.3	175.5	174.5	173.4	174.7	173.6	174.8	173.7
COOH				171.0		173.4		173.5		173.7		173.6
CH3		21.6	21.3	21.1	9.3	9.6	13.8	14.0	14.1	14.1	14.2	14.2
CH3				21.3		9.4		13.9		14.1		14.4
CH2					28.1	28.1	36.7	36.7	34.7	34.7	22.8	22.9x 2
CH2						28.1	18.7	36.7	31.4	34.8	24.8	25.2/2 5.4
CH2								18.6	24.5	31.6	29.1	29.3/2 9.5
CH2								18.6	22.5	31.5	29.3	29.6/2 9.7
CH2										24.8	29.3	29.9 x8
CH2										25.1	29.7	32.2 x2
CH2										22.6	29.7	34.8 x2
CH2										22.6	34.3	
CH2											32.1	

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados acilados de AM (2)

C/Nº	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
C-1	44.0	44.2	43.9	43.9	44.8	44.6	44.5	44.4	45.2	44.6
C-2	74.2	71.3	74.8	72.2	74.2	70.7	73.8	70.8	73.9	70.7
C-3	81.2	81.2	82.4	82.4	80.2	81.2	81.1	81.2	81.1	80.7
C-4	38.6	38.7	38.6	38.6	39.1	39.2	39.6	39.1	39.6	39.0
C-5	55.4	55.4	55.5	55.5	56.1	55.5	56.2	55.6	56.6	55.6
C-6	18.5	18.5	18.6	18.6	19.3	18.9	19.7	18.7	19.7	19.1
C-7	32.6	32.7	33.1	33.1	33.6	33.3	34.0	33.1	33.9	33.1
C-8	39.6	39.6	39.9	39.9	40.3	40.5	40.7	40.3	40.7	40.3
C-9	47.8	47.9	47.9	47.9	48.5	48.2	49.1	48.0	49.1	48.0
C-10	40.1	40.1	40.3	40.3	40.8	40.5	41.1	41.3	41.1	40.4
C-11	23.7	23.6	23.9	23.9	24.4	24.3	24.7	24.1	24.7	23.9
C-12	122.5	122.5	122.1	122.2	122.8	122.5	122.5	122.7	122.5	122.6
C-13	143.8	143.9	145.1	145.2	145.4	145.7	145.5	145.6	145.4	145.5
C-14	41.9	41.9	41.4	41.4	42.8	42.7	43.1	42.8	43.1	42.8
C-15	27.8	27.9	27.4	27.4	28.8	28.7	28.8	28.5	28.9	28.1
C-16	23.1	23.1	23.9	23.9	24.2	24.1	24.2	23.9	24.2	23.4
C-17	46.8	46.8	46.8	46.8	47.2	47.2	47.7	47.3	47.7	47.7
C-18	41.1	41.2	42.1	42.1	42.5	42.3	42.8	42.2	42.8	42.1
C-19	46.1	46.1	46.8	46.8	47.1	46.9	47.4	46.7	47.4	46.7
C-20	30.9	30.9	31.2	31.2	31.5	31.8	31.8	31.6	30.7	31.5
C-21	34.0	34.1	34.4	34.4	34.8	34.7	33.1	34.5	35.1	31.5
C-22	32.7	32.7	33.3	33.3	33.7	33.6	33.9	33.5	34.0	33.4
Me	16.6	16.8	16.5	16.5	17.0	16.9	17.1	16.7	17.1	16.7
Me	16.9	17.4	17.4	17.4	17.9	17.7	17.8	17.6	17.6	17.5
Me	17.1	18.1	18.3	18.3	18.1	18.4	18.4	18.2	17.8	18.3
Me	26.2	26.2	26.4	26.4	26.7	26.7	26.6	26.5	26.6	26.4
Me	27.9	27.9	28.9	28.9	28.8	28.7	28.8	28.9	29.0	29.0
C-28	184.8	183.9	180.2	180.2	180.6	180.9	181.9	180.7	181.8	180.7
Me	32.7	32.7	33.1	33.1	33.8	33.8	33.7	33.6	33.8	33.5
Me	23.1	23.1	23.9	23.9	24.3	24.3	24.2	24.0	24.2	23.9
COOH	172.2	166.5	168.3	168.3/ 168.7	173.4	173.4/173 .5	173.7	173.5/173. 7	174.9	172.4/172.5
COOH		166.7	169.9	169.9/ 170.7	175.6	175.7/176 .0	175.7	176.2/176. 3	177.0	175.3 x2
CH3									29.7	28.2 x2
CH3									31.8	28.6 x2
CH2					30.6	30.5	21.6	21.4	45.1	45.1
CH2					30.9	30.6	30.9	21.5	45.5	45.1
CH2						30.9	32.2	32.1		46.2
CH2						31.0		34.2		46.2
CH2								34.4 x2		
CH2										
CH2										
CH2										
CH	128.6	128.5 x2	128.1	128.1 x2					34.7	
CH	129.8 x2	129.8 x4	128.4	128.4 x2						
CH	130.4 x2	129.8 x4	129.9	129.8 x2						
CH			132.3	132.3 x2						
C	133.9	133.9 x2	132.9	132.9 x2						
C			133.8	133.6 x2						

Desplazamientos químicos ^{13}C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados acilados de de AM (2)

C/Nº	AM-Bn (4)	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73
C-1	46.2	43.9	44.1	43.9	44.2	43.9	44.1	43.9	44.1	43.9	44.2
C-2	69.2	73.5	70.2	73.3	70.1	73.3	69.9	73.2	69.4	73.3	70.1
C-3	89.0	81.1	80.8	81.1	80.5	81.1	80.2	81.1	80.2	80.2	80.4
C-4	38.4	38.5	39.5	38.5	38.4	38.5	38.2	38.5	38.3	38.3	38.3
C-5	55.6	55.4	55.1	55.4	55.1	55.4	55.0	55.4	55.1	55.1	55.1
C-6	18.7	18.5	18.4	18.5	18.4	18.4	18.4	18.5	18.4	18.4	18.5
C-7	32.9	32.6	32.5	32.6	32.6	32.6	32.5	32.6	32.5	32.5	32.6
C-8	39.5	39.6	38.3	39.6	39.6	39.5	39.5	39.5	39.5	39.5	39.6
C-9	47.9	47.8	47.7	47.8	47.7	47.8	47.6	47.8	47.6	47.6	74.7
C-10	39.2	40.0	39.5	40.0	39.6	40.0	39.6	39.4	39.6	39.6	39.6
C-11	23.8	23.7	23.6	23.7	23.7	23.7	23.6	23.7	23.6	23.7	23.7
C-12	122.5	122.4	122.3	122.4	122.4	122.4	122.2	122.4	122.3	122.3	122.4
C-13	143.9	144.0	143.9	144.0	144.0	144.0	143.9	144.0	143.9	143.9	143.9
C-14	41.5	41.9	41.9	41.9	41.9	41.5	41.8	41.9	41.9	41.9	41.9
C-15	27.9	27.8	27.7	28.0	27.8	27.8	27.7	27.8	27.7	27.7	27.8
C-16	23.3	23.2	23.2	23.3	23.2	23.2	23.2	23.7	23.2	23.2	23.3
C-17	46.0	46.9	46.8	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9	46.8	46.8	46.9
C-18	41.9	41.6	41.5	41.6	41.6	41.6	41.5	41.6	41.5	41.5	41.6
C-19	46.8	46.1	46.0	46.1	46.1	46.1	46.0	46.1	46.0	46.0	46.1
C-20	30.9	30.9	30.8	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.8	30.8	30.9
C-21	34.0	34.1	34.0	34.1	34.0	34.1	34.1	34.1	34.0	34.0	34.0
C-22	32.7	32.8	32.6	32.8	32.6	32.8	32.6	32.6	32.7	32.7	32.6
Me	33.5	33.3	33.3	33.3	33.3	33.4	33.2	33.3	33.2	33.3	33.3
Me	29.0	29.0	28.6	28.8	28.7	28.8	28.6	28.8	28.6	28.8	28.7
Me	28.7	28.8	28.6	28.1	28.7	28.8	28.6	28.8	28.6	28.8	28.7
Me	24.0	23.9	23.8	23.7	23.7	23.9	23.8	23.8	23.8	23.9	23.9
Me	17.3	17.1	17.9	17.1	17.9	17.1	17.8	17.1	17.8	17.1	17.9
C-28	177.0	177.6	177.5	177.6	177.6	177.5	177.4	177.5	177.4	177.6	177.6
Me	17.2	16.9	17.8	16.9	17.1	16.9	17.0	16.9	17.0	16.9	17.1
Me	16.9	16.6	16.6	16.5	16.6	16.6	16.5	16.5	16.5	16.6	16.6
	66.3	66.1	66.1	66.2	66.2	66.2	66.1	66.1	66.1	66.2	66.2
Bencilo	128.0	128.6	128.1	128.1	128.1	128.2	128.0	128.1	128.0	128.1	128.1
	128.1	128.6	128.2	128.2	128.2	128.3	128.2	128.2	128.2	128.2	128.2
	128.5	128.6	128.5	128.6	128.6	128.6	128.5	128.6	128.5	128.6	128.6
	136.5	136.3	136.5	132.6	136.6	136.6	136.5	136.6	136.5	136.6	136.6
COOH		171.8	170.6	175.3	173.1	174.5	173.2	174.6	173.4	174.7	173.6
COOH			170.9		174.3		173.3		173.5		173.7
CH3		21.6	21.6	9.4	9.4	13.9	13.8	14.1	14.0	14.3	14.3
CH3			21.8		9.6		13.9	22.5	14.0	22.9	14.3
CH2				28.1	28.1	18.8	18.5	24.9	22.4 x2	25.2	22.2
CH2					28.1	36.8	18.7	31.5	1.4	29.4	22.9
CH2							36.5	34.8	24.9	29.6	24.9 x2
CH2							36.6		31.4 x2	29.7	29.6 x3
CH2									34.6 x2	29.8	29.7
CH2										32.1	29.9 x8
CH2										34.1	32.2
CH2											34.8
CH2											34.8

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados acilados de AM-Bn (4)

C/Nº	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
C-1	43.9	44.2	43.8	43.9	43.8	44.1	43.9	44.0	43.8	44.2
C-2	74.3	71.3	74.9	72.1	73.7	70.7	73.5	70.2	73.5	70.5
C-3	81.1	81.3	82.3	82.4	80.9	81.1	81.0	80.4	80.9	80.4
C-4	38.6	38.6	38.6	38.6	38.5	38.4	38.5	38.4	38.5	38.4
C-5	55.4	55.4	55.5	55.5	55.3	55.1	55.3	55.1	55.3	55.1
C-6	18.5	18.6	18.6	18.6	18.4	18.5	18.5	18.4	18.5	18.5
C-7	32.5	32.6	33.1	33.2	32.5	32.7	32.5	32.5	32.6	32.5
C-8	39.5	39.7	39.9	39.9	39.5	39.6	39.5	39.5	39.6	39.6
C-9	47.8	47.9	47.8	48.0	47.7	47.8	47.7	47.7	47.7	47.7
C-10	40.1	40.1	40.4	40.2	39.8	39.7	40.0	39.6	39.9	39.6
C-11	23.7	23.8	24.0	23.9	23.4	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7
C-12	122.4	122.4	122.2	122.2	122.4	122.3	122.4	122.3	122.4	122.3
C-13	143.9	144.1	145.1	145.1	143.9	144.0	143.9	143.9	144.0	144.1
C-14	41.9	42.0	41.4	41.4	41.9	41.9	41.9	41.9	41.9	42.0
C-15	27.8	27.9	27.4	27.5	27.7	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
C-16	23.2	23.3	23.9	23.9	23.3	23.2	23.2	23.2	23.2	23.5
C-17	46.9	47.0	46.8	46.8	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9
C-18	41.6	41.6	42.2	42.2	41.5	41.6	41.6	47.5	41.6	41.6
C-19	46.0	46.1	46.9	46.9	46.1	46.1	46.0	46.1	46.1	46.1
C-20	30.9	31.0	31.2	31.1	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9
C-21	34.1	34.1	34.4	34.4	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1	34.1
C-22	32.8	32.8	33.1	33.4	32.7	32.7	32.8	32.8	32.8	32.6
Me	33.3	33.4	33.2	33.5	33.3	33.4	33.4	33.3	33.3	33.3
Me	28.8	28.8	28.9	28.9	28.8	29.1	29.1	28.6	28.8	28.8
Me	28.8	28.8	28.9	28.9	28.8	28.7	28.7	28.6	28.8	28.8
Me	23.8	23.8	23.9	23.9	23.8	23.7	23.9	23.8	23.9	23.9
Me	17.1	18.1	18.3	18.3	17.0	18.0	18.0	17.9	17.1	18.0
C-28	177.6	177.6	180.7	180.1	177.6	177.6	177.9	177.5	177.6	177.6
Me	16.9	17.2	17.4	17.4	16.9	17.1	17.1	17.0	16.9	17.1
Me	16.6	16.8	16.5	16.5	16.5	16.6	16.6	16.6	16.5	16.6
Bencilo	66.1	66.2	66.2	66.2	66.1	66.2	66.2	66.1	66.2	66.2
	128.1	128.2	128.2	128.2	128.1	128.2	128.1	128.1	128.1	128.2
	128.2	128.3	128.3	128.3	128.2	128.3	128.2	128.2	128.2	128.2
	128.6	128.5	128.5	128.2	128.6	128.7	128.6	128.6	128.6	128.6
	136.6	136.7	136.7	136.7	136.5	136.6	136.6	136.6	136.6	136.6
COOH	167.2	166.5	168.3	168.2/168.6	172.8	171.9/172.1	173.9	172.9 x2	172.8	171.9/172
COOH		166.7	169.4	169.9/170.6	177.6	178.5/178.6	177.6	178.5/178.6	177.6	177.1 x2
CH3									28.5	28.2 x2
CH3									28.6	28.0 x2
CH2					29.8	29.1 x2	20.2	20.2	45.1	45.1 x2
CH2					29.9	29.2 x2	33.1	20.3	45.4	45.4 x2
CH2							33.7	33.1 x2		
CH2								33.4 x2		
CH2										
CH2										
CH2										
CH2										
CH	128.6	129.1 x2	128.4	128.1x 2					33.0	31.1 x2
CH	129.8 x2	129.8 x4	129.9	128.4 x2						
CH	130.4 x2	129.8 x2	132.3	129.8 x2						
CH		130.8 x2	132.9	132.3 x2						
C	133.9	133.0	133.8 x2	132.9 x2						
C		133.1		133.8 x2						

Desplazamientos químicos ^{13}C RMN del esqueleto triterpénico de los derivados acilados de AM-Bn (4)

C/N	84	85	86	C/N	87
1	38.2	43.7	38.4	1	43.9
2	23.8	74.9	67.3	2	71.0
3	82.8	80.7	86.6	3	82.1
4	37.2	39.9	39.5	4	39.6
5	55.5	55.3	55.3	5	55.0
6	18.4	18.4	18.4	6	18.3
7	32.6	32.6	32.6	7	32.5
8	39.6	39.5	39.4	8	39.5
9	47.8	47.7	47.7	9	47.7
10	38.1	38.6	38.4	10	38.5
11	23.7	23.6	23.6	11	23.6
12	122.6	122.4	122.5	12	122.2
13	143.8	143.8	143.9	13	143.8
14	41.8	41.8	41.9	14	41.8
15	27.9	27.8	27.8	15	27.8
16	23.1	23.1	23.1	16	23.0
17	46.7	46.7	46.6	17	46.7
18	41.1	41.2	41.3	18	41.1
19	46.1	46.0	46.0	19	46.0
20	30.9	30.8	30.8	20	30.9
21	34.0	34.0	34.0	21	34.0
22	32.7	32.6	32.7	22	32.6
Me	15.6	33.2	16.7	Me	16.6
Me	16.8	28.7	17.2	Me	17.3
Me	17.3	26.1	17.8	Me	17.8
Me	23.8	23.7	23.7	Me	23.8
Me	26.1	16.8	26.1	Me	26.1
28	184.0	182.5	185.3	28	183.7
Me	28.3	16.5	28.8	Me	28.3
Me	33.3	17.2	33.2	Me	34.0
1'	170.1	170.3	170.8	1'	170.3
2'	43.2	43.3	43.4	1'	169.9
1''	156.5	157.3	157.3	2'	42.9
2''	67.4	67.5	67.5	2'	43.1
3''	47.3	47.2	47.3	1'' x2	157.0
4'' x2	144.0	143.8	143.8	2'' x2	67.5
5'' x2	120.2	120.2	120.2	3'' x2	47.2
6'' x2	127.3	127.3	127.2	4'' x4	143.9
7'' x2	127.9	127.9	127.9	5'' x4	120.1
8'' x2	125.3	125.7	128.2	6'' x4	127.3
9'' x2	141.5	141.5	141.5	7'' x4	127.9
				8'' x4	125.3
				9'' x4	141.4

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los Fmoc-GLY derivados de AO y AM

C/Nº	88	C/Nº	89	90	91
C-1	38.1	C-1	43.6	45.8	43.8
C-2	29.2	C-2	73.9	67.2	70.3
C-3	81.3	C-3	80.7	85.6	80.7
C-4	36.9	C-4	38.4	38.2	38.1
C-5	55.3	C-5	55.2	55.2	54.9
C-6	18.2	C-6	18.3	18.3	18.2
C-7	32.9	C-7	32.7	32.5	32.5
C-8	39.3	C-8	39.7	39.5	39.5
C-9	47.6	C-9	47.9	47.5	47.5
C-10	37.7	C-10	39.4	39.3	39.3
C-11	23.5	C-11	23.6	23.4	23.5
C-12	122.4	C-12	122.3	122.4	122.1
C-13	143.7	C-13	143.9	143.8	143.7
C-14	41.7	C-14	41.8	41.8	41.7
C-15	27.7	C-15	27.7	27.6	27.6
C-16	23.1	C-16	23.1	23.0	23.1
C-17	46.8	C-17	46.8	46.8	46.7
C-18	41.4	C-18	41.5	41.5	41.4
C-19	45.9	C-19	46.0	46.9	45.8
C-20	30.7	C-20	30.8	30.8	30.8
C-21	33.9	C-21	34.0	34.0	33.9
C-22	32.4	C-22	32.5	32.4	32.4
Me	15.4	Me	33.2	33.2	33.2
Me	16.8	Me	28.7	28.5	28.4
Me	16.9	Me	26.0	25.9	25.9
Me	23.7	Me	23.8	23.6	23.7
Me	25.9	Me	17.0	17.7	17.7
C-28	174.8	C-28	177.5	177.5	177.4
Me	28.1	Me	16.8	16.9	16.8
Me	33.1	Me	16.4	16.6	16.4
C	136.5	C	136.5	136.5	136.5
C	135.8	C	135.8	135.7	135.8
CH	128.6	C			135.8
CH	128.4	CH	128.7	128.7	128.7
CH	128.3	CH	128.5	128.6	128.5
CH	128.2	CH	128.4	128.5	128.5
CH	128.0	CH	128.3	128.3	128.4
CH	127.9	CH	128.1	128.1	128.3
CH2	66.5	CH	128.0	128.0	128.3
CH2	65.9	CH			128.1
CH2	29.3	CH			128.0
CH2	29.6	CH			128.0
COOH	172.1	CH2	66.8	66.9	66.5
COOH	171.8	CH2	66.1	66.0	66.4
		CH2			66.0
		CH2	29.7	29.5	29.3
		CH2	29.6	29.4	29.2
		CH2			29.1
		CH2			29.0
		COOH	172.7	173.0	172.2
		COOH	172.5	172.9	172.1
		COOH			172.0
		COOH			171.9

Desplazamientos químicos ^{13}C RMN del esqueleto triterpénico de los bencil-succinil derivados de AO y AM

C/Nº	92	93	94	98	99	100	101	102	103	104	105	106
C-1	36.7	38.4	38.7	36.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7	38.7
C-2	27.5	29.0	27.4	29.4	29.0	29.4	29.4	29.9	29.5	29.9	28.9	29.4
C-3	79.2	79.6	79.2	79.4	79.4	79.4	79.3	79.5	79.4	79.4	79.4	79.4
C-4	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.2	37.1	37.1	37.1	37.1	37.2	37.1
C-5	55.3	55.3	54.3	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3
C-6	18.5	18.4	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.4	18.5	18.4	18.5	18.5
C-7	32.7	32.4	32.6	32.6	32.5	32.4	32.6	32.4	32.5	32.6	32.5	32.5
C-8	38.9	38.2	39.0	38.9	38.9	39.0	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9
C-9	47.7	47.7	47.8	47.7	47.7	47.7	47.7	47.7	47.7	47.7	47.7	47.7
C-10	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.6	39.3
C-11	23.7	23.9	23.8	22.3	23.7	23.3	23.7	23.7	23.8	23.7	23.7	23.7
C-12	123.3	123.4	123.0	123.6	123.4	123.3	123.4	123.4	123.3	123.5	123.4	123.2
C-13	144.9	145.0	145.3	144.5	144.9	145.1	144.6	144.8	145.1	144.4	144.9	145.1
C-14	42.4	42.4	42.4	42.3	42.3	42.3	42.2	42.3	42.3	42.3	42.3	42.3
C-15	27.5	27.4	27.5	27.4	27.4	27.4	27.4	27.4	27.4	27.4	27.4	27.4
C-16	23.8	23.8	24.0	23.9	23.3	22.9	23.9	23.9	23.9	23.8	23.7	23.9
C-17	46.6	46.6	46.5	46.7	46.6	46.5	46.6	46.6	46.5	46.7	46.6	46.5
C-18	42.4	42.6	42.7	42.5	42.5	42.7	42.5	42.3	42.6	42.2	42.5	42.6
C-19	47.0	46.9	47.1	46.9	46.9	47.0	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9	47.0
C-20	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	30.8	30.8	30.9	30.9	30.9	30.9
C-21	34.3	34.2	34.4	34.2	34.3	34.3	34.2	34.2	34.3	34.2	34.2	34.3
C-22	32.5	32.3	32.1	32.5	32.5	32.4	32.5	32.4	32.4	32.5	32.4	32.4
Me	33.1	33.1	33.2	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1	33.1
Me	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.2	28.3	28.3	28.8	28.3
Me	26.0	25.9	26.0	26.0	25.9	25.9	26.0	25.9	25.9	26.0	25.9	25.9
Me	23.8	23.7	23.8	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.7	23.2
Me	17.1	17.1	17.2	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1	17.2	17.1	17.1
C-28	179.7	179.9	178.7	180.1	179.8	179.5	180.3	179.9	179.6	180.3	179.8	179.4
Me	15.8	15.8	15.8	15.8	15.8	15.8	15.8	15.8	15.6	15.8	15.8	15.8
Me	15.6	15.6	15.6	15.5	15.6	15.6	15.5	15.6	15.5	15.5	15.6	15.6

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los mono- y dipeptídicos de AM

C/Nº		92	93	94	98	99	100	101	102	103	104	105	106
GABA	C-1	176.7			175.1			175.1			174.7		
	C-4	39.1			39.4			39.3			39.5		
	C-2	31.9			33.5			33.7			34.0		
	C-3	25.0			26.0			25.8			26.2		
6AHA	C-1		178.9			174.9			175.2			174.8	
	C-6		39.9			39.7			39.8			39.7	
	C-2		33.9			36.0			36.0			36.1	
	C-5		29.0			29.9			29.8			29.9	
	C-4		26.6			26.4			27.1			26.3	
C-3		24.4			26.1			26.4			26.1		
11AUA	C-1			178.5			175.0			175.1			174.5
	C-11			39.9			40.1			40.1			40.0
	C-2			34.2			36.4			36.5			36.7
	C-4			29.5			29.4			29.9			29.9
	C-5			29.5			29.3			29.4			29.5
	C-6			29.3			29.3			29.2			29.4
	C-7			29.3			29.2			29.2			29.3
	C-8			29.3			29.2			29.2			29.3
	C-10			29.3			28.9			29.1			29.2
	C-3			24.9			25.8			25.8			25.9
C-9			24.0			25.1			25.7			25.9	
GLY	C-1				172.3	172.4	172.3						
	C-2				41.9	41.8	41.7						
	C-1							174.0	174.6	174.5			
ALA	C-2							48.7	48.6	48.5			
	C-3							18.3	18.2	18.2			
	C-1										174.1	174.1	174.2
VAL	C-2										57.6	57.5	57.3
	C-3										31.4	31.2	31.3
	C-4										19.1	19.3	19.2
	C-5										18.0	18.0	17.9
	C-1												

Desplazamientos químicos ^{13}C RMN del fragmento de aminoácido de los derivados mono- y dipeptídicos de AO

C/Nº	95	96	97	107	108	109	110	111	112	113	114	115
C-1	46.7	46.7	46.7	46.8	46.8	46.8	46.8	46.8	46.9	47.1	46.8	46.8
C-2	67.1	67.1	67.0	67.1	67.1	67.1	67.1	67.1	67.1	67.1	67.1	67.1
C-3	82.2	82.2	82.1	82.3	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2	82.2
C-4	38.6	38.6	38.6	38.6	38.9	38.9	38.7	38.9	39.1	38.9	38.9	39.1
C-5	54.7	54.7	54.7	54.8	54.8	55.7	54.8	54.8	54.7	54.7	54.7	54.7
C-6	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.1	18.0	18.0	18.0
C-7	32.7	32.7	32.6	32.8	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.8	32.7	32.7
C-8	37.6	37.5	37.5	37.6	37.6	37.6	37.6	37.6	37.6	37.6	37.6	37.6
C-9	47.1	47.0	47.0	47.1	47.1	47.1	47.1	47.1	47.3	74.3	47.1	47.1
C-10	38.8	38.8	38.8	38.9	39.1	39.1	38.9	39.1	39.2	39.3	39.1	39.2
C-11	22.1	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.3
C-12	121.3	121.2	121.1	121.3	121.3	121.2	121.3	121.3	121.2	121.3	121.2	121.2
C-13	144.1	144.1	144.1	144.1	144.2	144.2	144.1	144.2	144.2	144.1	144.2	144.3
C-14	41.2	41.2	41.2	41.2	41.3	41.3	41.2	41.2	41.2	41.2	41.2	41.3
C-15	26.9	26.8	26.6	26.9	26.6	26.5	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9	26.9
C-16	23.0	22.9	22.9	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.1	23.0	23.0	23.0
C-17	45.2	45.1	45.1	45.2	45.2	45.2	45.2	45.1	45.2	45.1	45.1	45.2
C-18	40.4	40.4	40.2	40.4	41.3	40.9	40.6	41.1	40.9	40.9	40.4	41.0
C-19	45.9	45.7	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0	46.1	46.1	46.2	46.0	46.1
C-20	30.4	30.3	30.3	30.4	30.4	30.4	30.4	30.4	30.4	30.4	30.4	30.4
C-21	33.6	33.6	33.6	33.6	33.6	33.7	32.9	33.7	33.7	33.6	33.6	33.7
C-22	32.3	32.3	32.3	32.3	32.3	32.3	32.6	32.4	32.4	32.7	32.3	32.4
Me	32.9	32.7	32.9	32.9	32.9	32.9	32.8	32.9	33.0	32.9	32.9	32.9
Me	28.7	28.7	28.7	28.8	28.8	28.5	28.8	28.8	28.8	28.8	28.8	28.8
Me	25.7	25.6	25.6	25.7	25.7	25.9	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7
Me	23.5	23.5	23.5	23.6	23.5	23.6	23.5	23.6	23.6	23.5	23.5	23.6
Me	17.1	17.0	17.0	17.1	17.1	17.0	17.0	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1
C-28	176.2	176.0	176.0	176.2	176.0	176.0	176.2	176.0	176.0	176.2	176.1	176.0
Me	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8	16.9	16.8	16.8	16.9	16.8	16.8	16.9
Me	16.2	16.2	16.2	16.3	16.2	16.2	16.2	16.3	16.3	16.2	16.3	16.3

Desplazamientos químicos ¹³C RMN del esqueleto triterpénico de los mono- y dipeptídicos de AM

C/Nº	95	96	97	107	108	109	110	111	112	113	114	115
GABA	C-1	174.2			172.3		174.2			173.1		
	C-4	38.2			38.9		38.6			38.9		
	C-2	31.2			32.7		32.3			32.3		
	C-3	24.4			25.1		25.1			25.5		
6AHA	C-1		174.3		172.6			174.2			173.1	
	C-6		38.6		38.7			38.7			38.7	
	C-2		33.6		35.0			35.0			34.9	
	C-5		28.8		28.9			28.9			28.9	
	C-4		24.2		26.2			26.2			26.2	
11AUA	C-3				24.9			24.9			25.1	
	C-1			174.3		172.5			174.2			173.2
	C-11			38.8		38.7			38.9			38.8
	C-2			33.6		35.0			35.1			35.0
	C-4			29.1		29.1			29.1			30.0
	C-5			28.9		28.9			29.0			29.1
	C-6			28.8		28.9			29.0			29.0
	C-7			28.6		28.6			28.9			29.0
	C-8			24.5		25.2			28.9			28.9
	C-10								28.7			28.8
GLY	C-3								26.9			26.6
	C-9								26.7			26.4
	C-1			171.3	171.3	171.4						
ALA	C-2			40.5	38.9	38.7						
	C-1						171.8	171.9	171.9			
	C-2						47.3	47.3	47.4			
VAL	C-3						17.1	17.2	17.2			
	C-1									172.3	172.4	172.5
	C-2									57.0	56.9	57.0
	C-3									29.8	29.8	30.0
	C-4									19.2	19.1	19.2
C-5									19.2	19.1	19.2	

Desplazamientos químicos ^{13}C RMN del fragmento de aminoácido de los derivados mono- y dipeptídicos de AM

C/Nº	116	C/N	118	119	120
C-1	38.3	1	43.7	46.9	44.0
C-2	29.2	2	73.9	67.2	70.3
C-3	81.5	3	80.7	85.5	80.8
C-4	37.0	4	39.6	39.4	39.5
C-5	55.4	5	55.2	55.1	54.9
C-6	18.3	6	18.3	18.4	18.3
C-7	32.7	7	32.7	32.7	32.7
C-8	37.9	8	38.5	38.1	38.2
C-9	47.6	9	47.6	47.6	47.5
C-10	39.5	10	39.8	39.6	39.6
C-11	23.8	11	23.9	23.8	23.8
C-12	122.7	12	122.5	122.6	122.4
C-13	145.3	13	145.4	145.3	145.3
C-14	42.3	14	42.3	42.3	42.2
C-15	27.5	15	27.4	27.4	27.4
C-16	23.6	16	23.6	23.7	23.7
C-17	46.4	17	46.4	46.4	46.4
C-18	42.5	18	42.4	42.5	42.4
C-19	46.9	19	47.0	47.0	46.9
C-20	30.9	20	30.9	30.8	30.8
C-21	34.3	21	34.3	34.3	34.2
C-22	32.5	22	32.4	32.4	32.3
Me	15.6	Me	33.1	33.1	33.1
Me	16.8	Me	28.7	28.6	28.5
Me	17.1	Me	25.9	25.9	25.8
Me	23.8	Me	23.8	23.7	23.7
Me	25.9	Me	17.1	17.8	17.7
C-28	178.2	28	178.1	178.2	178.1
Me	28.2	Me	16.8	17.1	17.0
Me	33.1	Me	16.5	16.8	16.5
C	136.2	C	136.2	136.2	136.2
C	136.0	C	135.8	135.7	136.0
CH	128.7	CH	128.8	128.8	128.7
CH	128.4	CH	128.7	128.7	128.6
CH	128.3	CH	128.5	128.5	128.3
CH	128.2	CH	128.4	128.3	128.2
CH	128.1	CH	128.0	128.0	128.0
CH	128.0	CH	128.1	128.1	128.1
CH2	66.7	CH2	66.9	66.9	66.9
CH2	66.3	CH2	66.3	66.3	66.5
CH2	29.7	CH2			66.2
CH2	29.5	CH2	29.8	29.7	29.4
COOH	172.3	CH2	29.6	29.6	29.3
COOH	172.4	CH2			29.2
COOH	173.5	CH2			29.1
CH2	39.4	COOH	172.7	173.0	172.5
CH2	34.3	COOH	172.6	172.9	170.1
CH2	29.2	COOH			172.0
CH2	26.7	COOH			172.3
CH2	24.7	COOH	173.4	173.4	173.4
		CH2	39.4	39.4	39.3
		CH2	34.3	34.3	34.2
		CH2	29.3	29.2	29.3
		CH2	26.7	26.7	26.7
		CH2	24.7	24.7	24.6

Desplazamientos químicos ¹³C RMN de los derivados bencil succinil mono-peptídicos de AO y AM

C/Nº	117	C/N	121	122	123
C-1	38.3	1	43.7	46.6	44.0
C-2	29.4	2	73.9	67.4	70.3
C-3	81.4	3	80.7	85.5	80.8
C-4	37.0	4	39.6	39.4	39.5
C-5	55.4	5	55.2	55.1	54.9
C-6	18.3	6	18.4	18.4	18.3
C-7	32.7	7	32.8	32.5	32.8
C-8	37.9	8	38.5	38.1	38.2
C-9	47.6	9	47.6	47.6	47.5
C-10	39.5	10	39.8	39.6	39.6
C-11	23.9	11	23.9	23.8	23.8
C-12	122.7	12	122.5	123.8	122.4
C-13	145.2	13	145.3	143.8	145.2
C-14	42.2	14	42.3	42.3	42.2
C-15	27.4	15	27.4	27.4	27.4
C-16	23.6	16	23.8	23.7	23.7
C-17	46.4	17	46.4	46.4	46.4
C-18	42.4	18	42.4	42.1	42.3
C-19	46.9	19	47.0	46.8	46.9
C-20	30.9	20	30.9	30.8	30.9
C-21	34.3	21	34.3	34.2	34.3
C-22	32.5	22	32.4	32.3	32.3
Me	15.6	Me	33.1	33.1	33.1
Me	16.8	Me	28.7	28.6	28.5
Me	17.1	Me	25.9	25.9	25.8
Me	23.7	Me	23.7	23.7	23.7
Me	25.8	Me	17.1	17.8	17.1
C-28	178.3	28	178.2	180.2	178.1
Me	28.1	Me	16.8	16.8	16.6
Me	33.1	Me	16.5	16.7	16.5
C	135.9	C	135.8	136.2	136.0
C	135.3	C	135.3	135.7	135.9
CH	128.9	CH			135.9
CH	128.7	CH	128.8	128.8	128.8
CH	128.5	CH	128.7	128.6	128.6
CH	128.4	CH	128.5	128.5	128.4
CH	128.1	CH	128.4	128.2	128.2
CH	128.0	CH2	67.3	67.0	66.6
CH2	67.3	CH2	66.9	66.4	66.5
CH2	66.6	CH2			66.5
CH2	29.5	CH2	29.8	29.7	29.4
CH2	29.7	CH2	29.6	29.6	29.3
COOH	172.0	CH2			29.1
COOH	171.1	CH2			29.1
COOH	173.1	COOH	172.5	173.1	172.2
CH2	39.3	COOH	170.1	173.0	172.2
CH2	36.2	COOH			172.0
CH2	29.3	COOH			172.0
CH2	26.7	COOH	173.0	173.5	173.0
CH2	24.7	CH2	39.6	39.7	39.3
COOH	172.2	CH2	36.3	34.2	36.2
C	41.5	CH2	29.3	29.2	29.3
		CH2	26.7	26.4	26.7
		CH2	25.1	24.7	25.1
		COOH	172.7	172.4	172.2
		C	41.5	41.5	41.5

Tablas de desplazamientos químicos ^{13}C RMN de los derivados bencil succinil dipeptídicos de AO y AM

Tablas de actividad biológica

Concentración 30 μM						
Nº	LL	UL	UR	LR	UR+LR	UR+LR/UL
C	98.65	0.65	0.29	0.41	0.70	1.08
C DMSO	97.31	1.35	0.64	0.69	1.33	0.99
1	89.11	1.27	0.93	8.86	9.79	7.71
2	89.43	1.08	0.48	9.01	9.49	8.79
4	6.96	1.46	2.64	88.94	91.58	62.73
5	9.56	0.79	2.78	86.87	89.65	113.48
6	70.00	0.88	2.45	26.67	29.12	33.09
9	46.67	0.41	9.24	43.67	52.91	129.05
10	64.76	10.95	10.66	13.63	24.29	2.22
12	89.44	1.35	4.33	1.87	6.20	4.59
13	1.52	0.02	5.71	92.75	98.46	4923.00
14	11.52	0.04	10.21	78.23	88.44	2211.00
15	15.52	0.67	0.70	83.11	83.81	125.09
16	60.57	0.68	5.94	32.80	38.74	56.97
17	8.05	0.83	2.61	88.52	91.13	109.80
18	11.89	4.36	6.33	77.41	83.74	19.21
19	7.30	0.10	5.38	87.22	92.60	926.01
20	5.39	0.62	3.47	90.51	93.98	151.58
21	31.09	2.38	1.87	64.66	66.53	27.95
22	87.38	5.75	4.63	2.25	6.88	1.20
23	2.83	0.08	16.37	80.73	97.10	1213.75

Apoptosis de los productos 1-23 para concentración 30 μ M

Compuesto	Tiempo	Concentración	LL	UL	UR	LR	UR+LR	(UR+LR)/UL
4	24	1	10.82	1.68	17.79	69.71	87.5	52.1
		10	42.09	2.87	12.17	42.87	55.04	19.2
		20	11.27	0.88	12.33	75.51	87.84	99.8
	48h	1	75.79	0.83	0.43	22.95	23.38	28.2
		10	72.08	0.24	0.27	27.41	27.68	115.3
		20	29.19	0.18	0.46	70.17	70.63	392.4
5	24	1	40.33	2.99	0.33	56.34	56.67	19.0
		10	33.49	3.94	0.62	54.96	55.58	14.1
		20	24.29	1.55	2.08	72.08	74.16	47.8
	48h	1	11.82	3.73	0.33	84.12	84.45	22.6
		10	14.4	5.5	0.37	79.74	80.11	14.6
		20	5.34	2.36	2.8	89.49	92.29	39.1
9	24	1	83.32	15.72	0.96	0	0.96	0.1
		10	80.02	12.09	7.5	0.39	7.89	0.7
		20	11.44	1.11	12.64	74.81	87.45	78.8
	48h	1	77.52	2.38	0.29	19.81	20.1	8.4
		10	67.1	2.28	0.29	30.33	30.62	13.4
		20	55.62	0.64	0.89	42.85	43.74	68.3
13	24	1	72.37	6.57	10.07	11	21.07	3.2
		10	52.61	6.09	12.74	28.56	41.3	6.8
		20	16.81	13.63	6.62	62.95	69.57	5.1
	48h	1	52.41	0.7	2.28	44.6	46.88	67.0
		10	3.24	0.29	7.25	89.22	96.47	332.7
		20	11.75	0.11	2.96	85.19	88.15	801.4
14	24	1	30	1.38	17.43	51.19	68.62	49.7
		10	18.4	0.77	14.36	66.47	80.83	105.0
		20	10.25	1.15	12.77	75.83	88.6	77.0
	48h	1	65.5	3.06	2.74	28.7	31.44	10.3
		10	60.9	1.41	1.89	35.79	37.68	26.7
		20	32.33	1.19	2.58	63.9	66.48	55.9
15	24	1	20.67	0.58	11.53	67.22	78.75	135.8
		10	12.92	0.45	16.97	69.66	86.63	192.5
		20	7.22	0.15	13.84	78.8	92.64	617.6
	48h	1	67.11	0.79	0.62	31.47	32.09	40.6
		10	65.42	0.71	0.57	33.3	33.87	47.7
		20	30.17	0.21	1.82	67.8	69.62	331.5
16	24	1	83.25	2.68	0.45	13.63	14.08	5.3
		10	56.89	3.88	1.79	37.44	39.23	10.1
		20	12.62	1.65	4.82	80.91	85.73	52.0
	48h	1	60.25	2.25	1.46	36.04	37.5	16.7
		10	70.5	0.44	0.52	28.54	29.06	66.0
		20	22.81	1.02	4.96	71.21	76.17	74.7
17	24	1	97.23	2.14	0.28	0.34	0.62	0.3
		10	97.46	1.35	0.59	0.59	1.18	0.9
		20	54.52	0.4	1.61	43.47	45.08	112.7

	48h	1	84.39	11.66	0.46	3.49	3.95	0.3
		10	83.04	7.65	0.68	8.64	9.32	1.2
		20	9	0.86	6.04	84.1	90.14	104.8
18	24	1	66.64	0.83	1.34	31.18	32.52	39.2
		10	66.7	0.38	2.35	30.56	32.91	86.6
		20	44.88	0.46	2.85	51.8	54.65	118.8
	48h	1	41.62	10.65	3.8	43.92	47.72	4.5
		10	51.36	0.65	1.85	46.15	48	73.8
		20	8.53	0.67	5.26	85.54	90.8	135.5
19	24	1	85.11	2.2	1.66	11.03	12.69	5.8
		10	30.39	0.35	4.5	64.76	69.26	197.9
		20	11.11	0.15	2.25	86.49	88.74	591.6
	48h	1	66.88	2.3	0.21	30.6	30.81	13.4
		10	55.89	4.16	0.64	39.31	39.95	9.6
		20	28.2	0.29	1.15	70.36	71.51	246.6
20	24	1	94.28	1.59	0.98	3.15	4.13	2.6
		10	84.03	0.66	1.28	14.03	15.31	23.2
		20	60.76	0.55	1.55	37.14	38.69	70.3
	48h	1	49.82	3.2	4.17	42.82	46.99	14.7
		10	37.09	1.43	4.98	56.51	61.49	43.0
		20	16.14	0.9	4.15	78.8	82.95	92.2
21	24	1	84.2	3.66	1.14	11.01	12.15	3.3
		10	90.21	2.56	0.68	6.55	7.23	2.8
		20	23.17	2.16	2.5	72.16	74.66	34.6
	48h	1	98.56	0.65	0.02	0.76	0.78	1.2
		10	92.66	4.23	0.08	3.02	3.1	0.7
		20	29.19	1.68	1.27	67.87	69.14	41.2
23	24	1	93.82	3.41	0.65	2.12	2.77	0.8
		10	88.16	2.7	1.3	7.84	9.14	3.4
		20	84.55	1.66	2.18	11.61	13.79	8.3
	48h	1	98.15	1.72	0.03	0.09	0.12	0.1
		10	96.33	2.73	0.04	0.9	0.94	0.3
		20	6.62	15.01	73.78	4.59	78.37	5.2

Apoptosis de productos 4, 5, 9, 13-21 y 23 a 24 h y 48 h a distintas concentraciones

Comp. #	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ concentración (µM) ^a	$\frac{IC_{50} \text{ de precursor}}{IC_{50} \text{ de compuesto \#}^b}$
OA (1)	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0
24	–	Acetilo	H	64.7 ± 2.8	1.6
27	–	Propanoilo	H	161.1 ± 9.8	0.7
31	–	Benzoilo	H	162.1 ± 18.4	0.7
OA-Bn (3)	–	H	Bn	52.2 ± 0.9	1.0
42	–	Ftaloilo	Bn	26.8 ± 0.9	1.9
43	–	Succinilo	Bn	23.2 ± 0.3	2.3
44	–	Glutarilo	Bn	29.9 ± 0.9	1.7
45	–	3,3-Dimetil-glutarilo	Bn	14.2 ± 1.0	3.7
MA (2)	H	H	H	36.2 ± 3.8	1.0
10	Acetilo	Acetilo	H	44.1 ± 3.8	0.8
48	Butanoilo	H	H	106.6 ± 11.3	0.3
50	Hexanoilo	H	H	34.6 ± 2.1	1.0
MA-Bn (4)	H	H	Bn	19.0 ± 0.2	1.0
64	Acetilo	H	Bn	39.6 ± 0.8	0.5
76	Ftaloilo	H	Bn	73.2 ± 2.4	0.3
80	Glutarilo	H	Bn	63.2 ± 2.1	0.3
82	3,3-Dimetil-glutarilo	H	Bn	28.3 ± 1.1	0.7

^a Se calcularon los valores de IC₅₀ teniendo en cuenta las células de control no tratadas como 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Los valores, media ± S.E.M.

^b La última columna representa la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO, AO-Bn, AM o AM-Bn) y el IC₅₀ de los derivados acilados relacionados.

Inhibición del crecimiento sobre células B16F10 de los derivados acilados 1-4, 10 y 24-83

Comp. #	Conc. ^a	Población ^b				
		Normal	Apoptosis Temprana	Apoptosis Tardía	Apoptosis Total	Necrosis
Control	0	77.9 ± 1.5	3.9 ± 0.4	9.8 ± 2.2	13.7 ± 2.7	4.0 ± 0.6
AO (1)	IC ₅₀	44.9 ± 5.1	16.4 ± 2.3	28.2 ± 2.0	44.6 ± 4.3	10.1 ± 1.0
	IC ₅₀ x2	49.8 ± 6.4	29.1 ± 6.0	12.4 ± 1.6	41.5 ± 7.5	8.7 ± 1.4
24	IC ₅₀	39.5 ± 6.5	14.4 ± 2.4	40.3 ± 5.8	54.7 ± 7.2	5.8 ± 1.4
	IC ₅₀ x2	46.3 ± 6.8	14.6 ± 0.6	33.4 ± 3.5	48.0 ± 4.1	5.7 ± 2.8
27	IC ₅₀	24.3 ± 6.8	47.0 ± 0.0	27.4 ± 7.0	74.4 ± 7.0	1.3 ± 0.1
	IC ₅₀ x2	37.2 ± 8.9	44.3 ± 4.7	16.5 ± 4.3	60.8 ± 9.1	2.0 ± 0.1
31	IC ₅₀	44.6 ± 1.9	14.0 ± 1.1	37.6 ± 0.5	51.6 ± 1.6	3.8 ± 0.4
	IC ₅₀ x2	31.6 ± 0.2	9.5 ± 0.4	50.5 ± 1.2	60.0 ± 1.6	8.5 ± 1.8
AO-Bn (3)	IC ₅₀	67.9 ± 3.5	15.6 ± 1.2	12.2 ± 1.7	27.8 ± 0.8	4.3 ± 2.6
	IC ₅₀ x2	54.3 ± 5.4	23.0 ± 5.1	18.6 ± 2.1	41.6 ± 6.5	4.1 ± 1.5
42	IC ₅₀	3.9 ± 0.3	64.3 ± 5.6	30.3 ± 5.2	94.6 ± 0.5	1.5 ± 0.2
	IC ₅₀ x2	3.7 ± 0.5	66.9 ± 2.8	28.5 ± 3.3	95.4 ± 0.5	1.0 ± 0.0
43	IC ₅₀	16.9 ± 2.1	16.6 ± 2.8	55.5 ± 8.2	72.1 ± 5.5	11.1 ± 3.4
	IC ₅₀ x2	7.7 ± 2.5	74.0 ± 0.8	17.6 ± 3.3	91.6 ± 2.4	0.7 ± 0.0
44	IC ₅₀	25.8 ± 4.5	20.6 ± 1.9	37.9 ± 1.9	58.4 ± 0.1	15.9 ± 4.4
	IC ₅₀ x2	8.1 ± 0.8	65.8 ± 0.1	24.6 ± 1.1	90.4 ± 1.0	1.6 ± 0.1
45	IC ₅₀	8.3 ± 2.0	44.0 ± 4.4	42.6 ± 7.7	86.5 ± 3.3	5.3 ± 1.3
	IC ₅₀ x2	4.9 ± 0.6	52.8 ± 5.7	36.1 ± 5.6	88.8 ± 0.1	6.4 ± 0.7
AM (2)	IC ₅₀	10.9 ± 1.7	20.8 ± 2.8	54.2 ± 3.5	74.9 ± 2.5	11.7 ± 0.5
	IC ₅₀ x2	8.3 ± 1.8	68.8 ± 3.9	21.0 ± 1.9	89.8 ± 2.5	2.0 ± 0.7
10	IC ₅₀	31.4 ± 1.3	8.7 ± 0.0	52.9 ± 3.0	61.6 ± 3.0	7.1 ± 1.7
	IC ₅₀ x2	9.7 ± 5.6	29.6 ± 7.6	59.3 ± 6.5	88.9 ± 6.0	1.5 ± 0.5
48	IC ₅₀	21.0 ± 8.2	55.6 ± 5.5	22.1 ± 2.0	77.7 ± 8.5	1.2 ± 0.3
	IC ₅₀ x2	10.2 ± 1.6	53.0 ± 2.9	30.0 ± 5.7	83.0 ± 2.8	6.8 ± 1.2
50	IC ₅₀	34.8 ± 1.7	42.4 ± 3.3	19.0 ± 0.4	61.4 ± 3.6	3.9 ± 1.9
	IC ₅₀ x2	18.9 ± 0.5	62.7 ± 0.9	17.5 ± 0.5	80.2 ± 0.5	1.1 ± 0.0
AM-Bn (4)	IC ₅₀	5.0 ± 0.6	84.2 ± 5.4	10.6 ± 4.7	94.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1
	IC ₅₀ x2	11.3 ± 4.2	86.2 ± 5.0	2.2 ± 1.0	88.4 ± 4.1	0.1 ± 0.1
64	IC ₅₀	12.9 ± 0.9	66.0 ± 0.9	20.0 ± 0.3	86.0 ± 0.6	1.2 ± 0.3
	IC ₅₀ x2	1.1 ± 0.1	71.3 ± 2.2	27.1 ± 2.1	98.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0
76	IC ₅₀	32.8 ± 4.7	42.2 ± 6.3	22.5 ± 1.4	64.7 ± 4.9	2.5 ± 0.2
	IC ₅₀ x2	2.9 ± 0.7	43.6 ± 3.7	46.2 ± 1.4	89.7 ± 2.3	7.5 ± 1.7
80	IC ₅₀	73.3 ± 1.7	10.6 ± 1.7	14.6 ± 0.1	25.2 ± 1.6	1.6 ± 0.1
	IC ₅₀ x2	20.2 ± 4.3	59.1 ± 9.1	19.8 ± 1.2	78.9 ± 7.8	0.9 ± 0.6
82	IC ₅₀	35.4 ± 4.5	16.5 ± 0.8	46.3 ± 4.2	62.8 ± 5.0	1.8 ± 0.5
	IC ₅₀ x2	2.2 ± 0.3	26.9 ± 3.5	65.3 ± 3.3	92.2 ± 0.2	5.6 ± 0.5

^a La línea de células fueron tratadas con concentraciones iguales a sus valores de IC₅₀ o IC₅₀x2. Los valores se expresan como medias ± S.E.M. de tres experimentos por duplicado.

^b Las células normales son anexina V-PI-, las células de apoptosis temprana son anexina V⁺ PI-, mientras que las células apoptóticas tardías son anexina V⁺ PI+, la apoptosis total (apoptosis temprana más apoptosis tardía) son anexina V⁺, y las células necróticas son anexina V⁺PI+.

Apoptosis para las concentraciones IC₅₀ y IC₅₀ x 2 de los productos 1-4, 10, 24, 27, 31, 42-45, 48, 50, 64, 76, 80 y

	Conc.	Q1	Q2	Q3	Q4	Rdh-	Rdh+
OA	9	48.8	8	10.3	33	59.1	41
OA	9	57.4	11.5	11.3	19.6	68.7	31.1
MA	9	4.9	5	76.1	14	81	19
MA	9	1.6	5.4	72.1	20.8	73.7	26.2
OA-Bz	9	1.7	0.8	3.1	94.4	4.8	95.2
OA-Bz	9	1	1.1	2.6	95.3	3.6	96.4
AM-Bz	9	0.7	1.7	1.7	95.9	2.4	97.6
AM-Bz	9	1.4	1.8	1.7	95.1	3.1	96.9
OA	42	2.9	1.9	2.2	93	5.1	94.9
OA	42	1.7	2.1	3	93.2	4.7	95.3
MA	42	8.4	1.2	79.6	10.8	88	12
MA	42	4.8	0.4	93.3	1.5	98.1	1.9
OA-Bz	42	1	1.4	4.4	93.2	5.4	94.6
OA-Bz	42	0.8	1.4	3.6	94.2	4.4	95.6

Producción de ROS de los productos de partida 1-4

IC ₅₀	Rh123 negative		Rh123 positive	
CT	96.93	0.30	3.12	0.31
10	6.8	1.9	93.2	1.9
24	10.95	0.85	89.05	0.85
25	10.5	0.7	89.5	0.6
42	79.1	3.8	20.9	3.8
43	78.1	6.6	21.9	6.6
44	55.4	7	44.6	7
45	8.2	2	91.75	2.05
48	16.85	4.25	83.15	4.25
50	16.2	10	83.8	10
50	3.55	0.15	96.45	0.15
64	8.55	4.05	91.5	4
76	58.1	2.6	41.8	2.6
80	1.4	0.2	98.55	0.15
82	4.75	0.45	95.15	0.45

Producción de ROS de los productos 1-4, 10, 24, 27, 31, 42-45, 48, 50, 64, 76, 80 y 82 a la concentración de IC₅₀

IC _{50x2}	Rh123 negative		Rh123 positive	
CT	96.93	0.30	3.12	0.31
10	11.25	1.85	88.75	1.85
24	11.85	1.15	88.15	1.25
25	16.85	3.15	83.1	3.1
42	84.2	9.1	15.75	9.05
43	69.8	3.3	30.2	3.3
44	72.25	11.95	27.7	11.9
45	15.95	13.85	84.15	13.85
48	11.1	7.1	89	7.1
50	11.95	5.55	88.05	5.45
50	3.55	2.05	96.55	2.05
64	6.2	3.8	93.75	3.75
76	67.8	2.7	32.2	2.7
80	2.95	0.35	97.05	0.35
82	24.05	6.65	75.95	6.65

Producción de ROS de los productos 1-4, 10, 24, 27, 31, 42-45, 48, 50, 64, 76, 80 y 82 a la concentración de IC_{50x2}

Comp. #	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (µM) (% de inhibición de la proteasa del VIH- 1) ^a	$\frac{IC_{50} AO}{IC_{50} comp. \#^b}$
OA (1)	–	H	H	57.7 ± 3.9	1.0
24	–	Acetilo	H	3.4 ± 0.4	17.0
32	–	Ftaloilo	H	0.31 ± 0.03	186.1
34	–	Glutarilo	H	0.56 ± 0.16	103.0
35	–	3,3-Dimetilglutarilo	H	0.70 ± 0.07	82.4
42	–	Ftaloilo	Bn	0.4 ± 0.1	144.3
					$\frac{IC_{50} AM}{IC_{50} comp. \#^b}$
MA (2)	H	H	H	62.7 ± 4.9	1.0
49	Butanoilo	Butanoilo	H	31.2 ± 5.9	2.0
50	Hexanoilo	H	H	124.4 ± 5.8	0.5
56	Ftaloilo	H	H	14.2 ± 2.1	4.4
57	Ftaloilo	Ftaloilo	H	2.3 ± 0.3	27.3
58	Succinilo	H	H	3.5 ± 0.5	17.9
59	Succinilo	Succinilo	H	1.9 ± 0.4	33.0
60	Glutarilo	H	H	3.2 ± 0.3	19.6
61	Glutarilo	Glutarilo	H	1.4 ± 0.3	44.8
62	3,3-Dimetilglutarilo	H	H	14.3 ± 1.8	4.4
63	3,3-Dimetilglutarilo	3,3-Dimethylglutarilo	H	27.5 ± 3.3	2.3
68	Butanoilo	H	Bn	226 ± 24	0.3
71	Hexanoil	Hexanoilo	Bn	150 ± 8	0.4
73	Lauroilo	Lauroilo	Bn	73 ± 4	0.9
76	Ftaloilo	H	Bn	0.8 ± 0.1	78.4
77	Ftaloilo	Ftaloilo	Bn	1.9 ± 0.5	33.0
78	Succinilo	H	Bn	15.6 ± 2.9	4.0
79	Succinilo	Succinilo	Bn	5.2 ± 0.7	12.1
81	Glutarilo	Glutarilo	Bn	3.9 ± 0.3	16.1

^a Los valores de IC₅₀ se calcularon basándonos en la fórmula: $V_{inh} = V_0 \cdot IC_{50}/([I] + IC_{50})$. El porcentaje de inhibición de la proteasa se calculó con la fórmula: % inhibición = $[1 - (V_{inh}/V_0)] \cdot 100$. Todos los ensayos se realizaron tres veces por triplicado.

^b La última columna representa la relación entre la IC₅₀ de cada precursor AO y AM y la IC₅₀ de los derivados relacionados.

Inhibición de la proteasa del VIH-1 de los productos 24, 32, 34, 35, 42, 49, 50, 56-63, 68, 71, 73, 76-79, 81.

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ de precursor}^b}{IC_{50} \text{ de producto\#}}$	HT29 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ de precursor}^b}{IC_{50} \text{ de producto\#}}$	Hep G2 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ de precursor}^b}{IC_{50} \text{ de producto\#}}$
OA	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
92	–	H	GABA	185.0 ± 9.4	0.6	137.2 ± 3.5	3.1	268.4 ± 10.6	0.8
93	–	H	6AHA	115.5 ± 8.2	0.9	84.8 ± 3.0	5.1	110.9 ± 0.2	1.9
94	–	H	11AUA	108.2 ± 1.6	1.0	120.4 ± 3.1	3.6	80.5 ± 2.9	2.6
98	–	H	GABA-GLY	290.2 ± 14.1	0.4	170.3 ± 4.2	2.5	216.0 ± 17.4	1.0
99	–	H	6AHA-GLY	111.3 ± 1.4	1.0	132.9 ± 0.6	3.2	182.4 ± 1.4	1.2
100	–	H	11AUA-GLY	> 500		194.8 ± 1.6	2.2	> 500	
101	–	H	GABA-ALA	356.1 ± 12.7	0.3	243.1 ± 2.4	1.8	232.3 ± 5.9	0.9
102	–	H	6AHA-ALA	115.5 ± 4.9	0.9	142.1 ± 2.8	3.0	175.4 ± 5.6	1.2
103	–	H	11AUA-ALA	340.5 ± 0.1	0.3	189.6 ± 3.5	2.3	> 500	
104	–	H	GABA-VAL	79.4 ± 0.4	1.3	170.9 ± 2.7	2.5	125.9 ± 2.8	1.7
105	–	H	6AHA-VAL	105.3 ± 2.4	1.0	124.0 ± 1.3	3.5	134.1 ± 2.8	1.6
106	–	H	11AUA-VAL	71.9 ± 1.0	1.5	73.6 ± 2.1	5.8	88.2 ± 7.6	2.4
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
95	H	H	GABA	180.3 ± 3.9	0.2	86.4 ± 1.4	0.4	202.4 ± 4.1	0.5
96	H	H	6AHA	178.4 ± 0.9	0.2	137.9 ± 0.7	0.2	107.0 ± 5.4	0.9
97	H	H	11AUA	102.7 ± 1.0	0.4	116.3 ± 5.8	0.3	54.7 ± 3.2	1.8
107	H	H	GABA-GLY	469.6 ± 3.8	0.1	242.6 ± 3.1	0.1	> 500	
108	H	H	6AHA-GLY	263.5 ± 1.8	0.1	218.7 ± 0.7	0.1	> 500	
109	H	H	11AUA-GLY	103.0 ± 5.9	0.4	175.5 ± 3.5	0.2	124.0 ± 6.3	0.8
110	H	H	GABA-ALA	351.9 ± 12.2	0.1	208.5 ± 1.2	0.2	> 500	
111	H	H	6AHA-ALA	223.4 ± 4.0	0.2	162.6 ± 1.1	0.2	> 500	
112	H	H	11AUA-ALA	62.2 ± 1.4	0.6	129.4 ± 10.3	0.2	88.5 ± 0.4	1.1
113	H	H	GABA-VAL	243.3 ± 3.9	0.1	181.9 ± 3.5	0.2	> 500	
114	H	H	6AHA-VAL	164.0 ± 2.9	0.2	150.4 ± 3.6	0.2	292.9 ± 2.6	0.3
115	H	H	11AUA-VAL	39.6 ± 1.0	0.9	47.4 ± 1.0	0.7	53.2 ± 1.1	1.9

^aSe calcularon los valores de IC₅₀ (µM) teniendo en cuenta las células control sin tratar como el 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Valores, medias ± S.E.M.

^bEstas columnas representan la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO o AM) y el IC₅₀ de los derivados relacionados.

Actividad citotóxica de mono- (92-97) y dipeptidil (98-115) derivados de AO y AM

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of producto\#}}$	HT29 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of producto\#}}$	Hep G2 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}^b}{IC_{50} \text{ of producto\#}}$
OA	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
92g	–	Fta	GABA	211.7 ± 1.1	0.5	314.5 ± 1.5	1.4	326.8 ± 4.4	0.6
93g	–	Fta	6AHA	140.0 ± 21.2	0.8	213.7 ± 3.1	2.0	211.3 ± 2.5	1.0
94g	–	Fta	11AUA	68.6 ± 0.7	1.6	113.5 ± 0.4	3.8	79.3 ± 1.0	2.7
98g	–	Fta	GABA-GLY	> 500		> 500		> 500	
99g	–	Fta	6AHA-GLY	> 500		399.8 ± 1.7	1.1	> 500	
100g	–	Fta	11AUA-GLY	76.8 ± 2.4	1.4	167.0 ± 2.4	2.6	125.9 ± 2.9	1.7
101g	–	Fta	GABA-ALA	> 500		398.2 ± 1.1	1.1	> 500	
102g	–	Fta	6AHA-ALA	314.5 ± 2.0	0.3	> 500		> 500	
103g	–	Fta	11AUA-ALA	122.0 ± 2.8	0.9	160.5 ± 3.5	2.7	129.6 ± 2.4	1.6
104g	–	Fta	GABA-VAL	211.4 ± 3.7	0.5	275.9 ± 0.2	1.6	327.9 ± 3.0	0.6
105g	–	Fta	6AHA-VAL	134.2 ± 1.1	0.8	364.4 ± 3.2	1.2	> 500	
106g	–	Fta	11AUA-VAL	82.3 ± 2.1	1.3	143.8 ± 3.3	3.0	153.8 ± 2.7	1.4
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
95g	Fta	Fta	GABA	348.3 ± 3.9	0.1	357.0 ± 0.6	0.1	> 500	
96g	Fta	Fta	6AHA	215.4 ± 1.0	0.2	336.5 ± 0.7	0.1	243.0 ± 1.3	0.4
97g	Fta	Fta	11AUA	129.7 ± 3.6	0.3	280.2 ± 3.4	0.1	213.7 ± 2.1	0.5
107g	Fta	Fta	GABA-GLY	> 500		> 500		> 500	
108g	Fta	Fta	6AHA-GLY	> 500		> 500		> 500	
109g	Fta	Fta	11AUA-GLY	59.1 ± 5.1	0.6	228.1 ± 0.9	0.1	> 500	
110g	Fta	Fta	GABA-ALA	> 500		> 500		> 500	
111g	Fta	Fta	6AHA-ALA	> 500		> 500		> 500	
112g	Fta	Fta	11AUA-ALA	202.8 ± 1.6	0.2	> 500		268.1 ± 2.7	0.4
113g	Fta	Fta	GABA-VAL	> 500		> 500		> 500	
114g	Fta	Fta	6AHA-VAL	> 500		> 500		> 500	
115g	Fta	Fta	11AUA-VAL	> 500		> 500		> 500	

^aSe calcularon los valores de IC₅₀ (µM) teniendo en cuenta las células control sin tratar como el 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Valores, medias ± S.E.M.

^bEstas columnas representan la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO o AM) y el IC₅₀ de los derivados relacionados.

Actividad citotóxica de ftaloil-mono- y dipeptidil-derivados de AO y AM (92-115)g

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^o	IC ₅₀ of precursor ^b IC ₅₀ of producto#	HT29 ^o	IC ₅₀ of precursor ^b IC ₅₀ of producto#	Hep G2 ^o	IC ₅₀ of precursor ^b IC ₅₀ of producto#
OA	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
94a	–	Ac	11AUA	10.9 ± 0.1	9.8	1.63 ± 0.01	263.7	17.5 ± 0.1	12.1
100a	–	Ac	11AUA-GLY	13.8 ± 0.4	7.7	1.41 ± 0.03	304.9	34.1 ± 0.1	6.2
103a	–	Ac	11AUA-ALA	11.6 ± 0.9	9.2	2.71 ± 0.04	158.6	30.8 ± 1.0	6.9
106a	–	Ac	11AUA-VAL	13.2 ± 0.2	8.1	5.4 ± 0.1	79.6	28.3 ± 0.6	7.5
94c	–	But	11AUA	12.74 ± 0.03	8.4	1.59 ± 0.01	270.4	35.4 ± 0.6	6.0
100c	–	But	11AUA-GLY	13.6 ± 0.4	7.8	1.40 ± 0.04	307.1	24 ± 0.8	8.8
103c	–	But	11AUA-ALA	11.2 ± 0.1	9.5	1.33 ± 0.01	323.2	27.1 ± 0.2	7.8
106c	–	But	11AUA-VAL	13.4 ± 0.6	7.9	1.44 ± 0.01	298.5	18.9 ± 0.5	11.2
94f	–	Bz	11AUA	51.6 ± 0.9	2.1	129.9 ± 2.8	3.3	83.1 ± 1.7	2.5
100f	–	Bz	11AUA-GLY	58.7 ± 1.6	1.8	146.4 ± 5.9	2.9	93.1 ± 0.2	2.3
103f	–	Bz	11AUA-ALA	20.0 ± 0.3	5.3	1.55 ± 0.01	277.4	23.5 ± 0.3	9.0
106f	–	Bz	11AUA-VAL	29.9 ± 1.2	3.6	2.80 ± 0.02	153.5	27.7 ± 0.1	7.6
94h	–	Succ	11AUA	110.8 ± 10.1	1.0	113 ± 3.5	3.8	> 500	
100h	–	Succ	11AUA-GLY	283.5 ± 9.1	0.4	357.9 ± 1.1	1.2	> 500	
103h	–	Succ	11AUA-ALA	278.3 ± 0.6	0.4	354.1 ± 0.6	1.2	> 500	
106h	–	Succ	11AUA-VAL	38.7 ± 2.0	2.7	143.5 ± 8.0	3.0	125.9 ± 7.4	1.7
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
97a	Ac	Ac	11AUA	2.4 ± 0.1	15.1	3.1 ± 0.1	10.3	14.2 ± 0.1	7.0
109a	Ac	Ac	11AUA-GLY	60.2 ± 2.6	0.6	105.6 ± 3.9	0.3	66.5 ± 1.1	1.5
112a	Ac	Ac	11AUA-ALA	26.8 ± 0.3	1.4	64.5 ± 3.5	0.5	105.0 ± 3.8	0.9
115a	Ac	Ac	11AUA-VAL	68.1 ± 0.7	0.5	97.8 ± 4.9	0.3	105.6 ± 6.6	0.9
97c	But	But	11AUA	5.7 ± 0.2	6.3	1.37 ± 0.01	23.5	27.6 ± 0.4	3.6
109c	But	But	11AUA-GLY	82.8 ± 1.4	0.4	159.2 ± 4.0	0.2	70.9 ± 2.4	1.4
112c	But	But	11AUA-ALA	39.5 ± 1.0	0.9	109.1 ± 2.7	0.3	100.8 ± 6.9	1.0
115c	But	But	11AUA-VAL	243.1 ± 4.1	0.1	301.0 ± 1.5	0.1	> 500	
97f	Bz	Bz	11AUA	145.0 ± 2.3	0.2	126.3 ± 4.9	0.3	> 500	
109f	Bz	Bz	11AUA-GLY	159.4 ± 2.5	0.2	227.4 ± 4.0	0.1	> 500	
112f	Bz	Bz	11AUA-ALA	130.8 ± 2.5	0.3	293.4 ± 0.8	0.1	> 500	
115f	Bz	Bz	11AUA-VAL	104.8 ± 5.6	0.3	184.1 ± 3.0	0.2	72.1 ± 3.7	1.4
97h	Succ	Succ	11AUA	38.1 ± 1.1	1.0	153.7 ± 0.3	0.2	111.3 ± 3.1	0.9
109h	Succ	Succ	11AUA-GLY	221.1 ± 3.0	0.2	218.4 ± 5.1	0.1	344.3 ± 4.8	0.3
112h	Succ	Succ	11AUA-ALA	164.5 ± 2.6	0.2	211.6 ± 2.5	0.2	> 500	
115h	Succ	Succ	11AUA-VAL	250.4 ± 1.3	0.1	212.2 ± 4.3	0.2	> 500	

Actividad citotóxica de mono- y dipeptidil-derivados acilados de AO y AM (94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115)(a, c, f, h)

#	R ₁	R ₂	R ₃	B16-F10 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}}{IC_{50} \text{ of product \#}}$ ^b	HT29 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}}{IC_{50} \text{ of product \#}}$ ^b	Hep G2 ^a	$\frac{IC_{50} \text{ of precursor}}{IC_{50} \text{ of product \#}}$ ^b
OA	—	H	H	106.4 ± 3.7	1.0	429.9 ± 0.7	1.0	211.8 ± 0.5	1.0
92a	—	Ac	GABA	81.7 ± 0.2	1.3	81.9 ± 0.3	5.3	79.9 ± 3.8	2.6
93a	—	Ac	6AHA	61.4 ± 0.7	1.7	72.8 ± 1.4	5.9	75.29 ± 0.05	2.8
92c	—	But	GABA	29.7 ± 1.2	3.6	45.6 ± 1.0	9.4	24.0 ± 0.9	8.8
93c	—	But	6AHA	19.2 ± 0.2	5.5	20.3 ± 0.3	21.2	17.5 ± 0.1	12.1
MA	H	H	H	36.2 ± 2.5	1.0	32.2 ± 3.8	1.0	99.2 ± 15.5	1.0
95a	Ac	Ac	GABA	104.6 ± 1.7	0.3	95.8 ± 1.7	0.3	109.2 ± 1.5	0.9
96a	Ac	Ac	6AHA	50.2 ± 2.4	0.7	89.8 ± 0.6	0.4	87.0 ± 1.5	1.1
95c	But	But	GABA	52.3 ± 0.6	0.7	31.3 ± 0.1	1.0	18.0 ± 0.6	5.5
96c	But	But	6AHA	46.0 ± 1.5	0.8	32.1 ± 1.3	1.0	19.8 ± 0.8	5.0

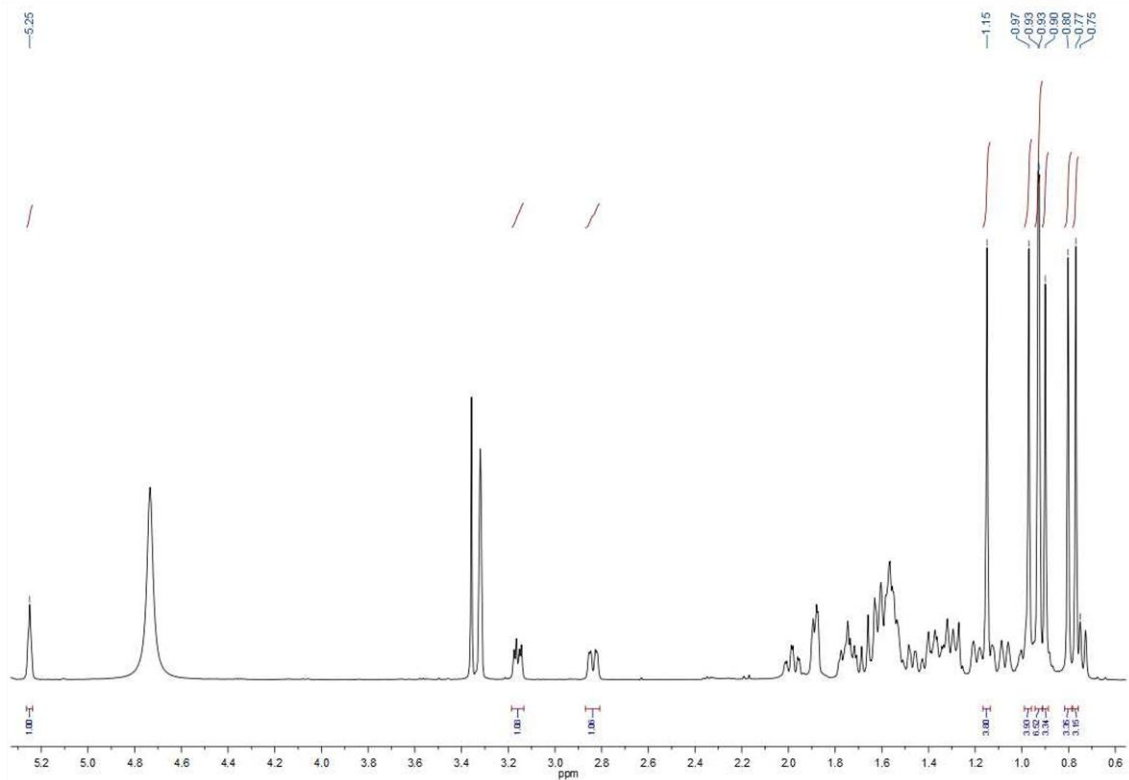
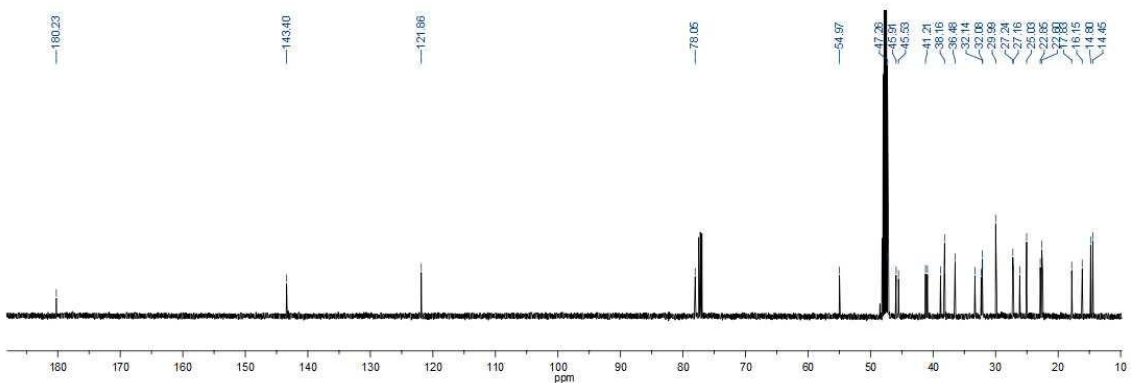
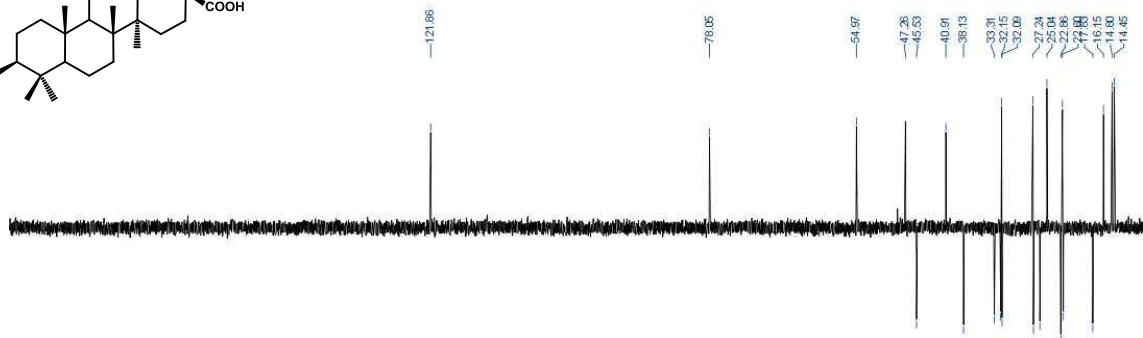
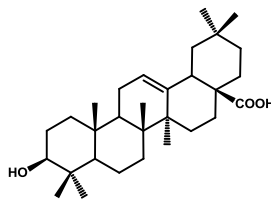
^aSe calcularon los valores de IC₅₀ (μM) teniendo en cuenta las células control sin tratar como el 100% de viabilidad. La inhibición del crecimiento celular se analizó mediante el ensayo MTT, tal como se describe en la sección experimental. Todos los ensayos se hicieron cuatro veces usando seis repeticiones. Valores, medias ± S.E.M.

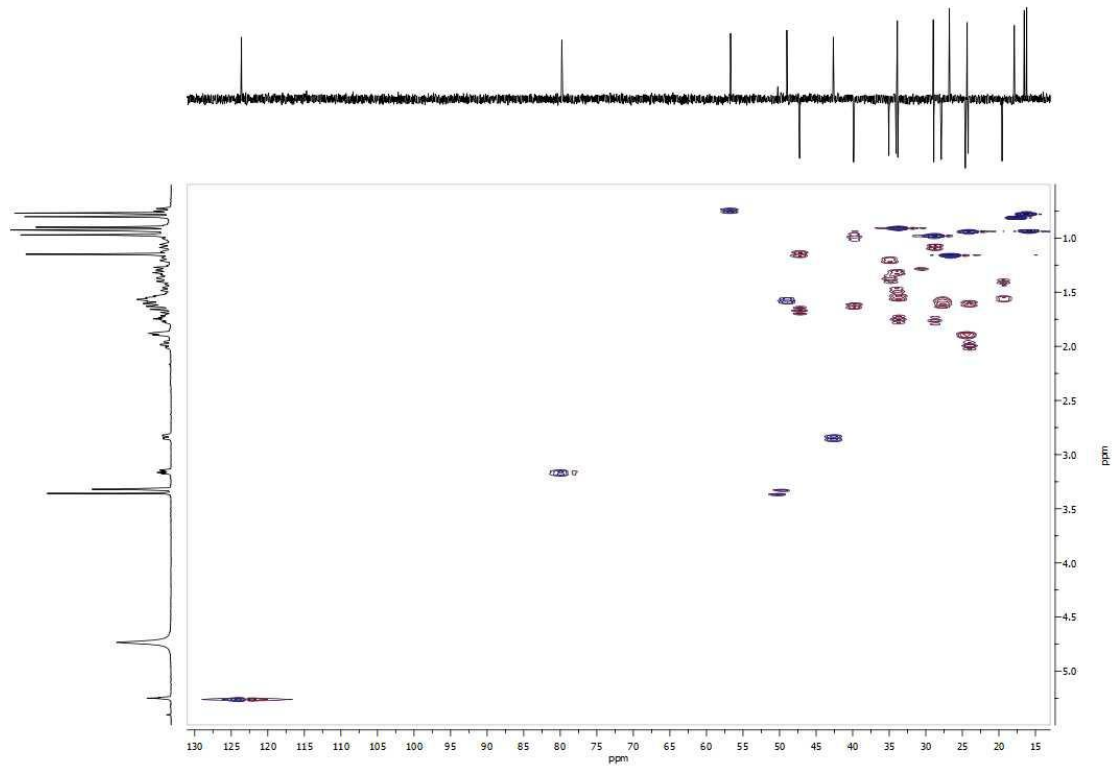
^bEstas columnas representan la relación entre la IC₅₀ de cada precursor (AO o AM) y el IC₅₀ de los derivados relacionados.

Actividad de los acetil- y butanoil- mono-peptidil derivados (92, 93, 95 y 96)a y (92, 93, 95 y 96)c

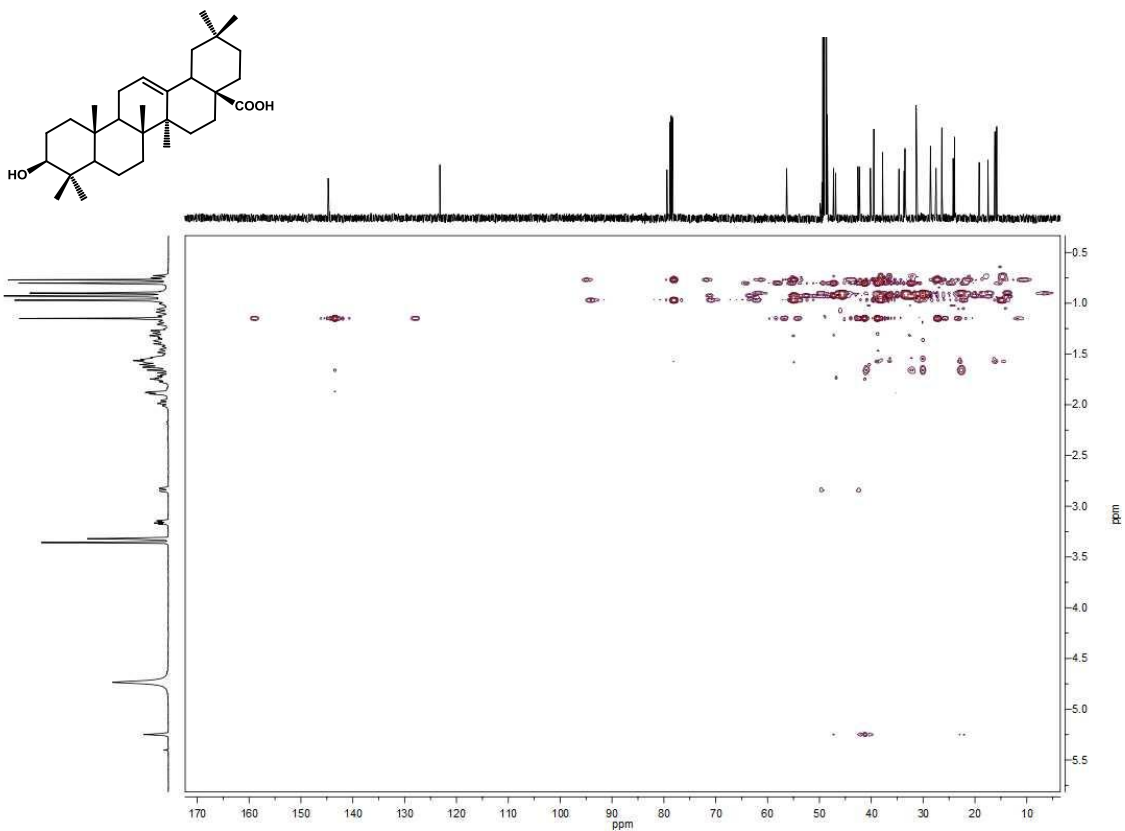
ANEXO II. ESPECTROS DE RMN

Producto 1

Espectro de ^1H RMN del producto 1Espectro de ^{13}C RMN del producto 1

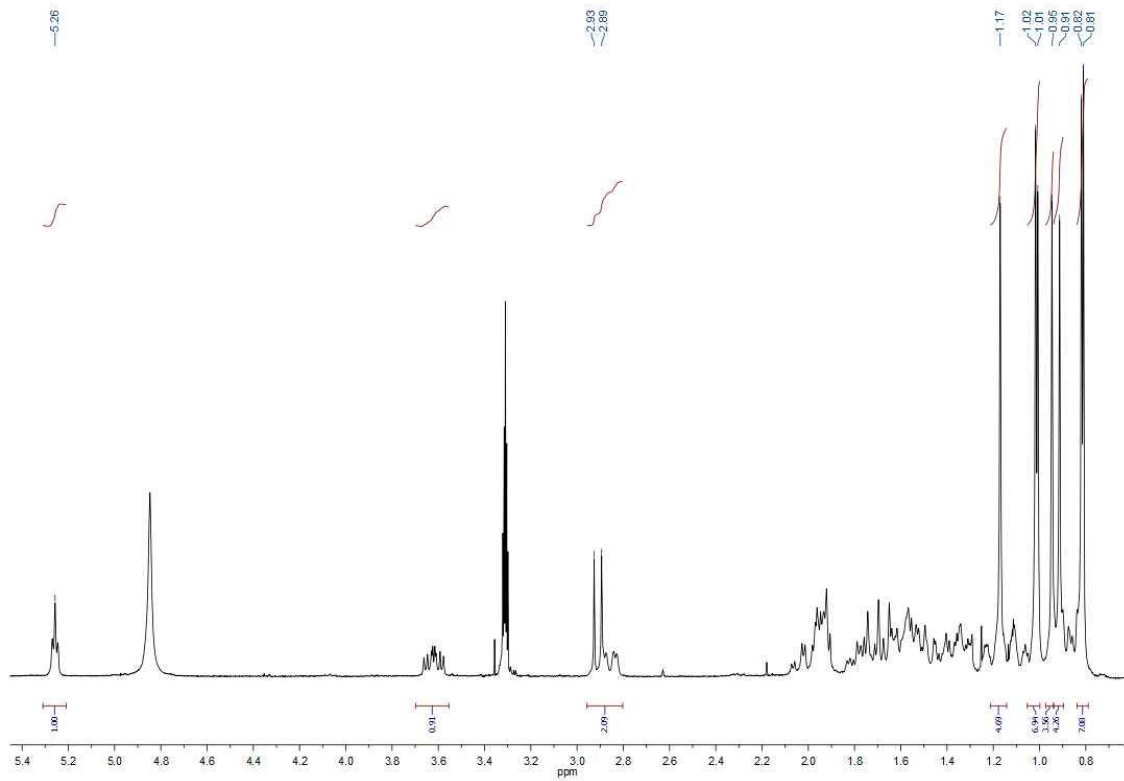
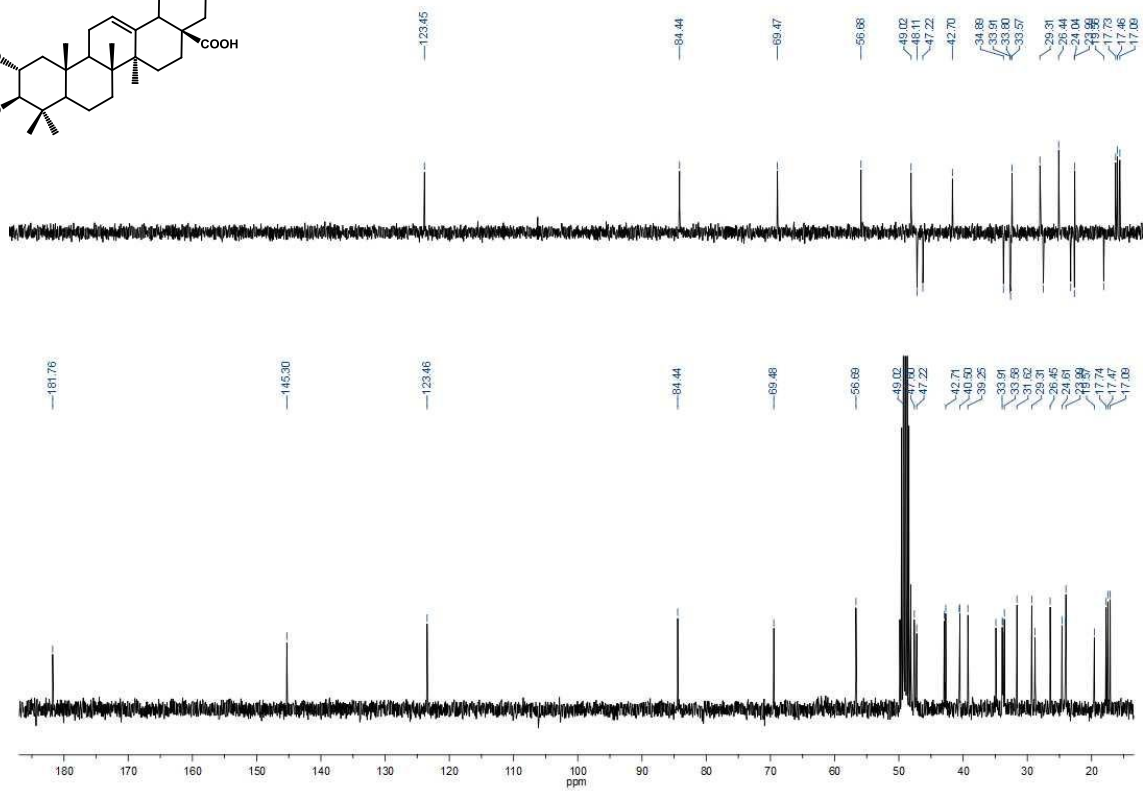
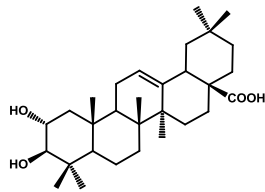


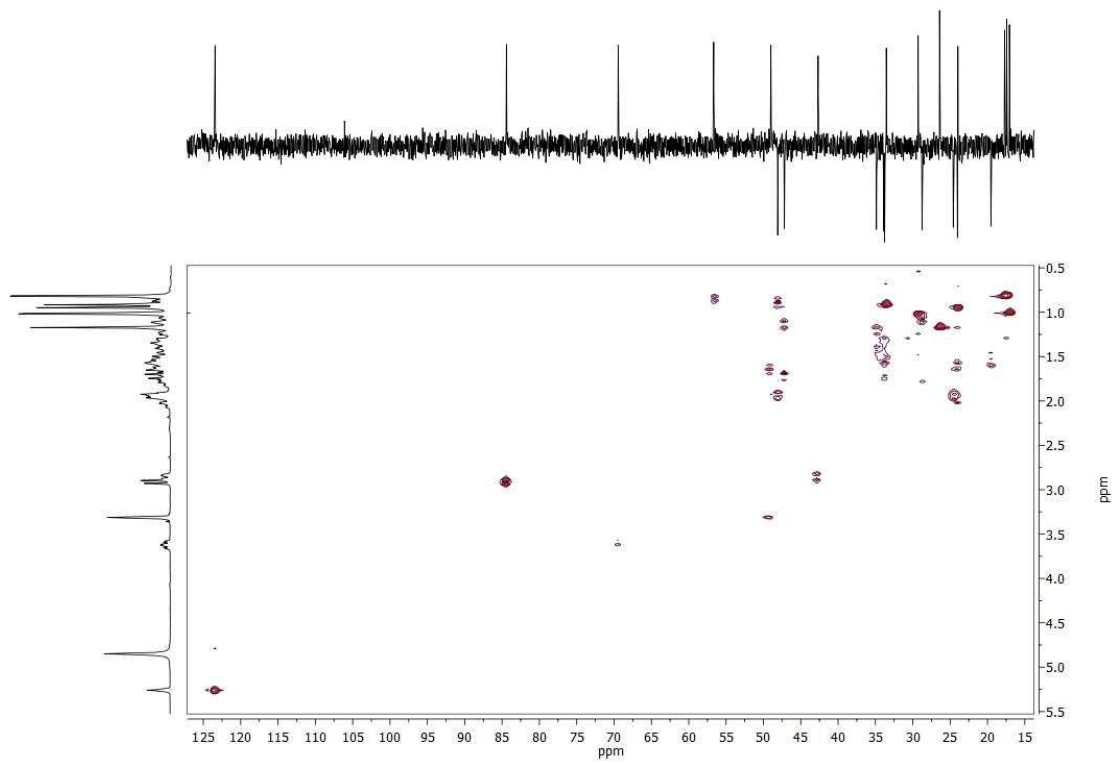
Espectro HSQC del producto 1



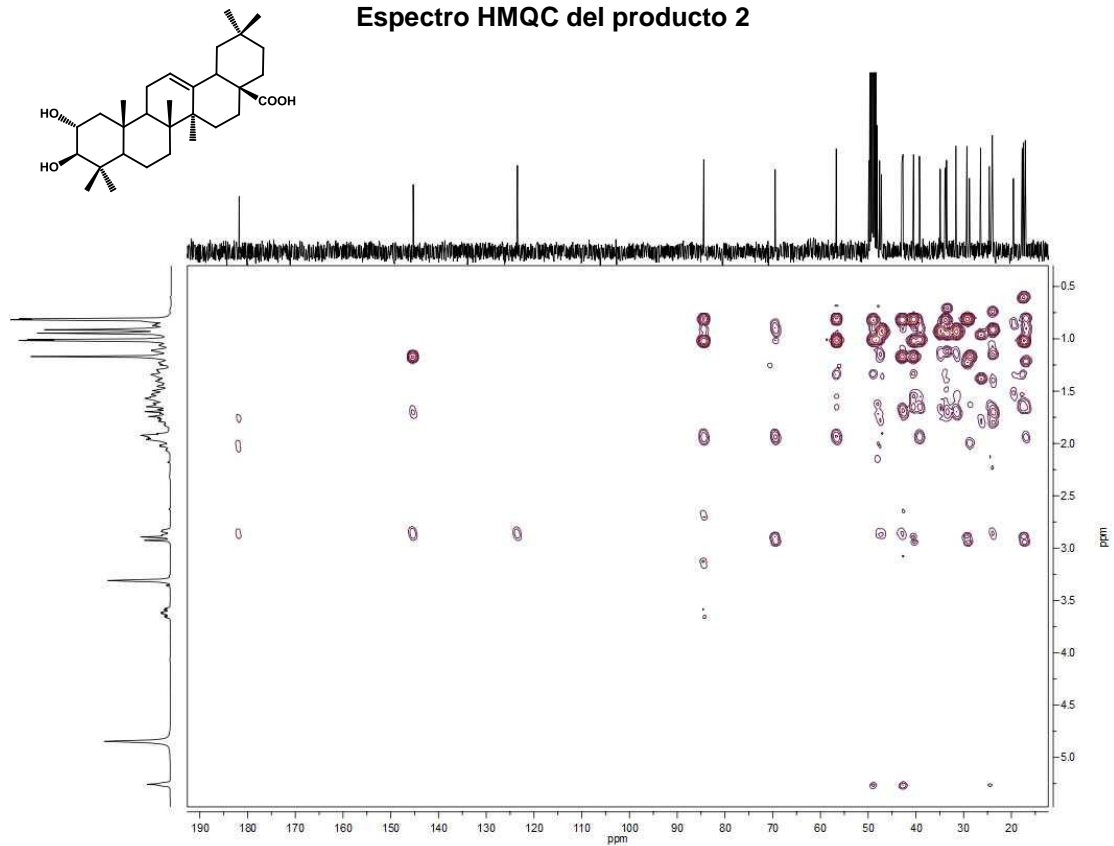
Espectro HMBC del producto 1

Producto 2

Espectro de ^1H RMN del producto 2Espectro de ^{13}C RMN del producto 2

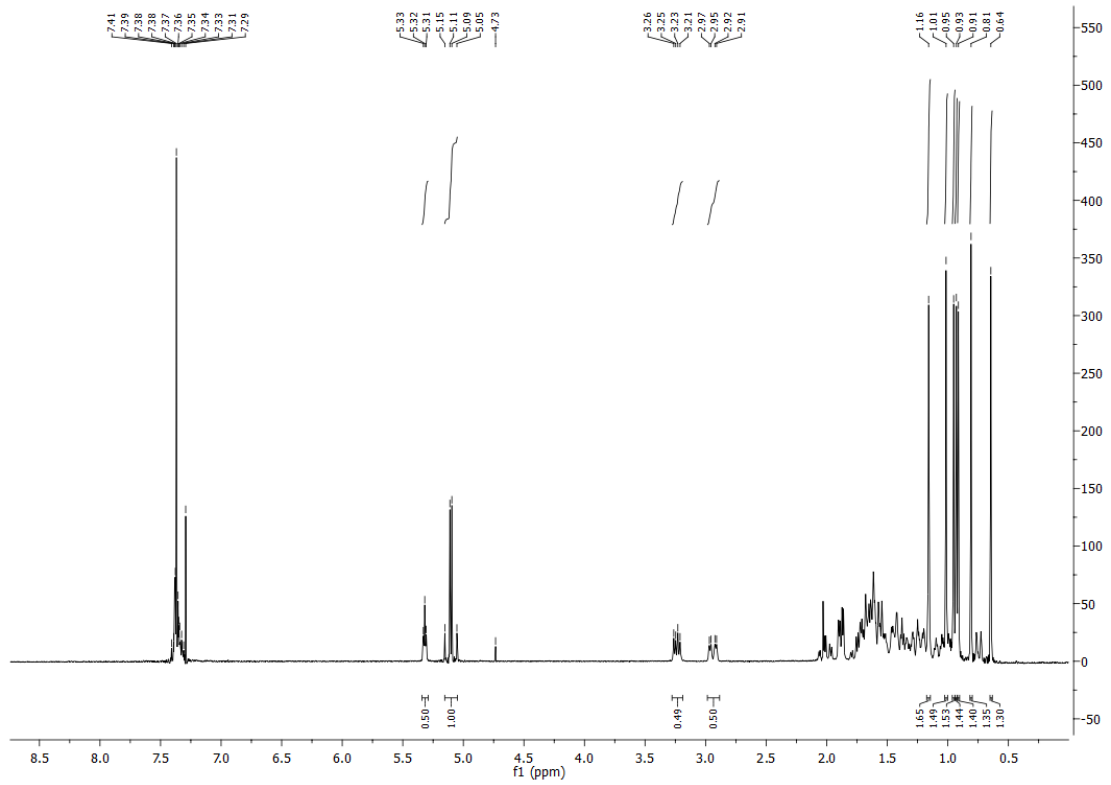


Espectro HMQC del producto 2

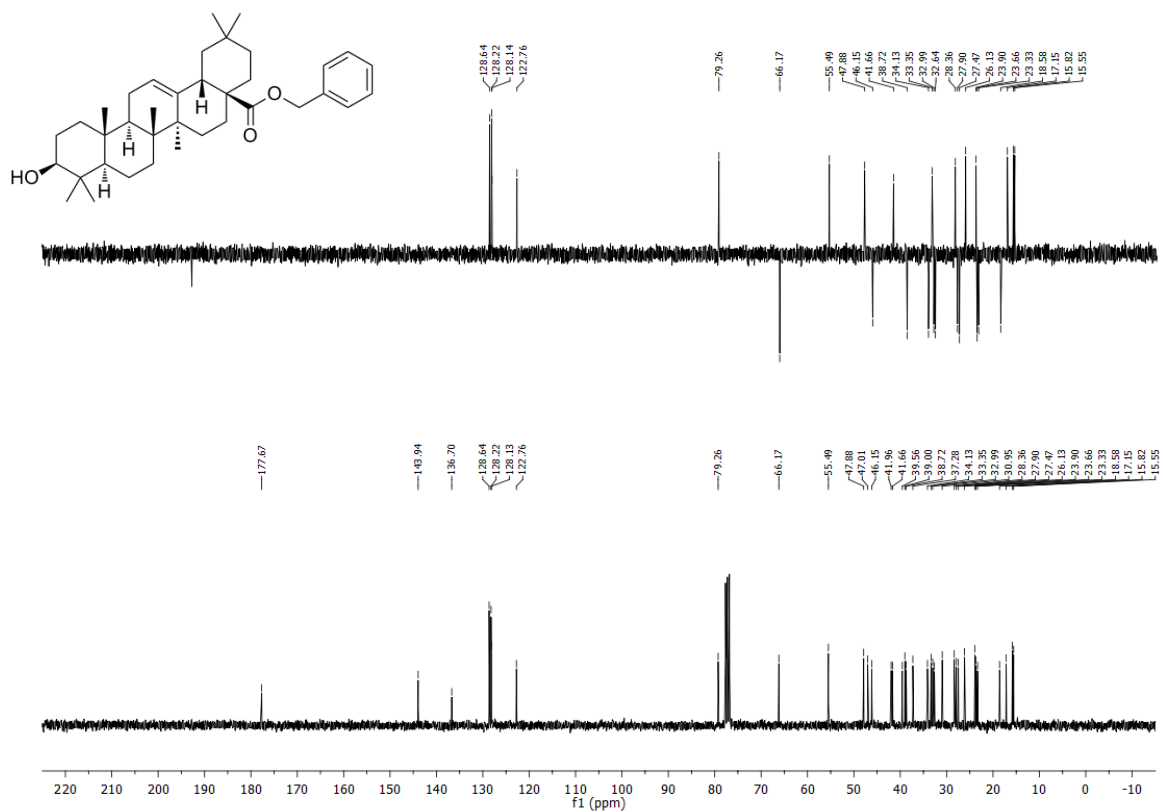


Espectro HMBC del producto 2

Producto 3

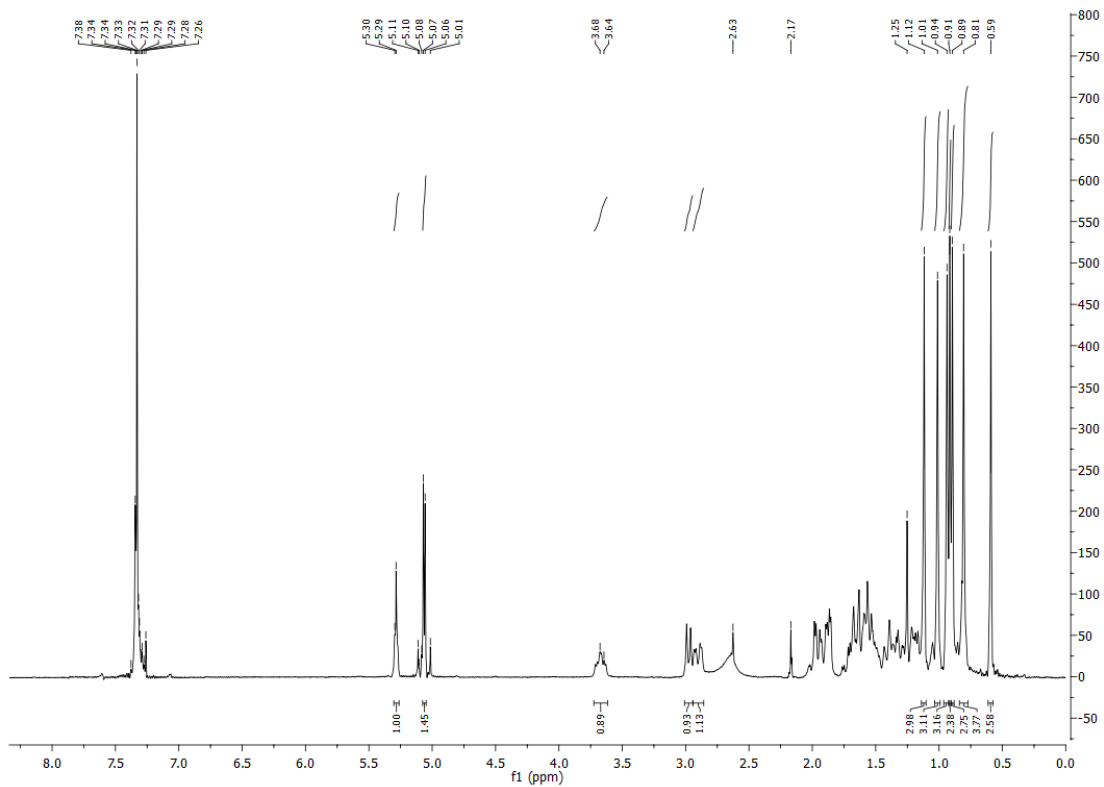
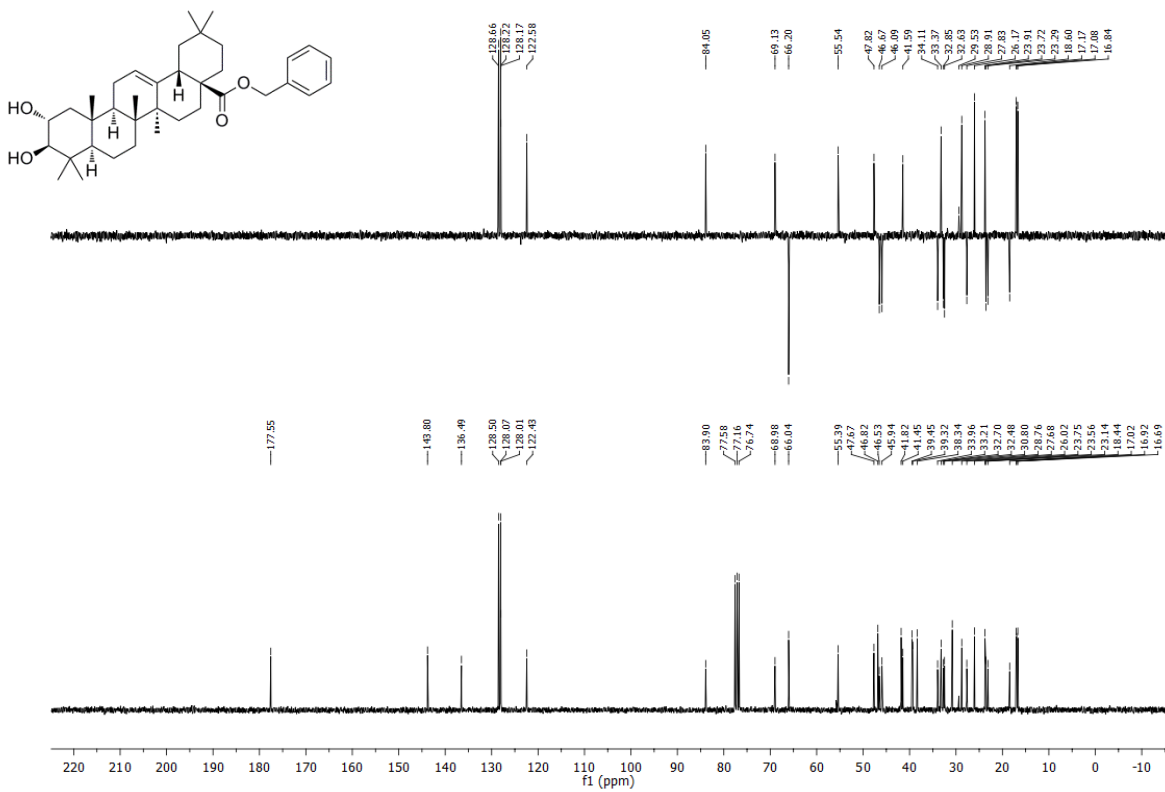


Espectro de ¹H RMN del producto 3

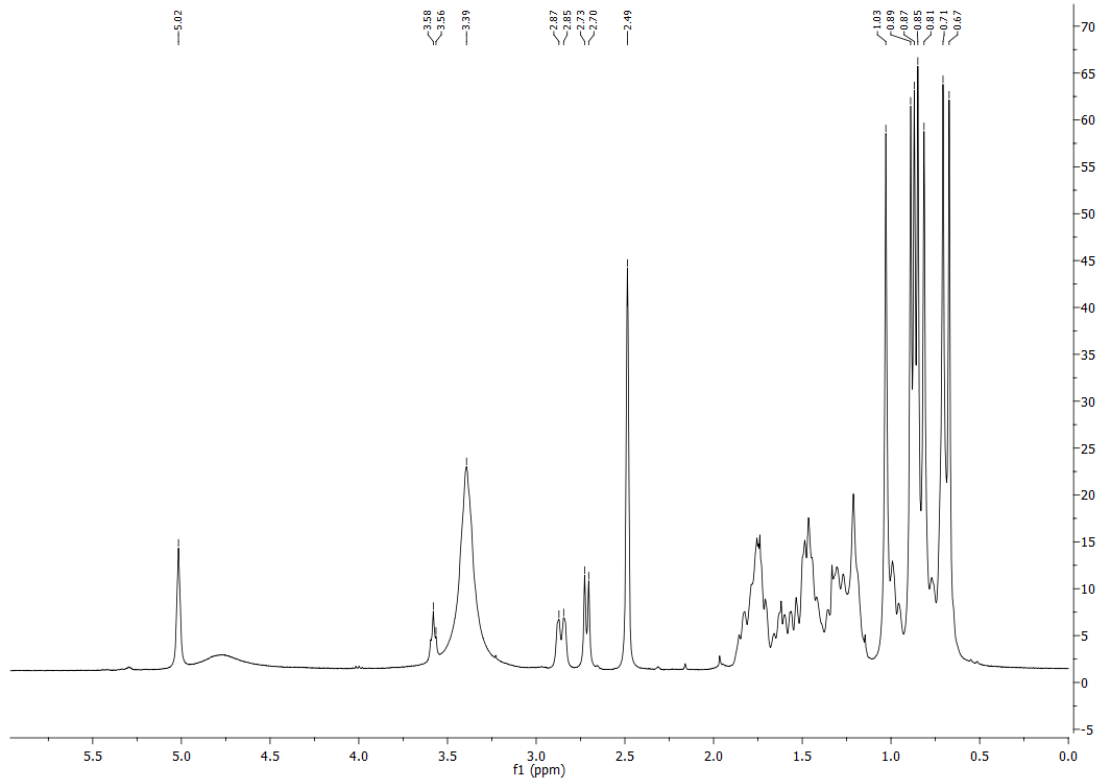


Espectro de ¹³C RMN del producto 3

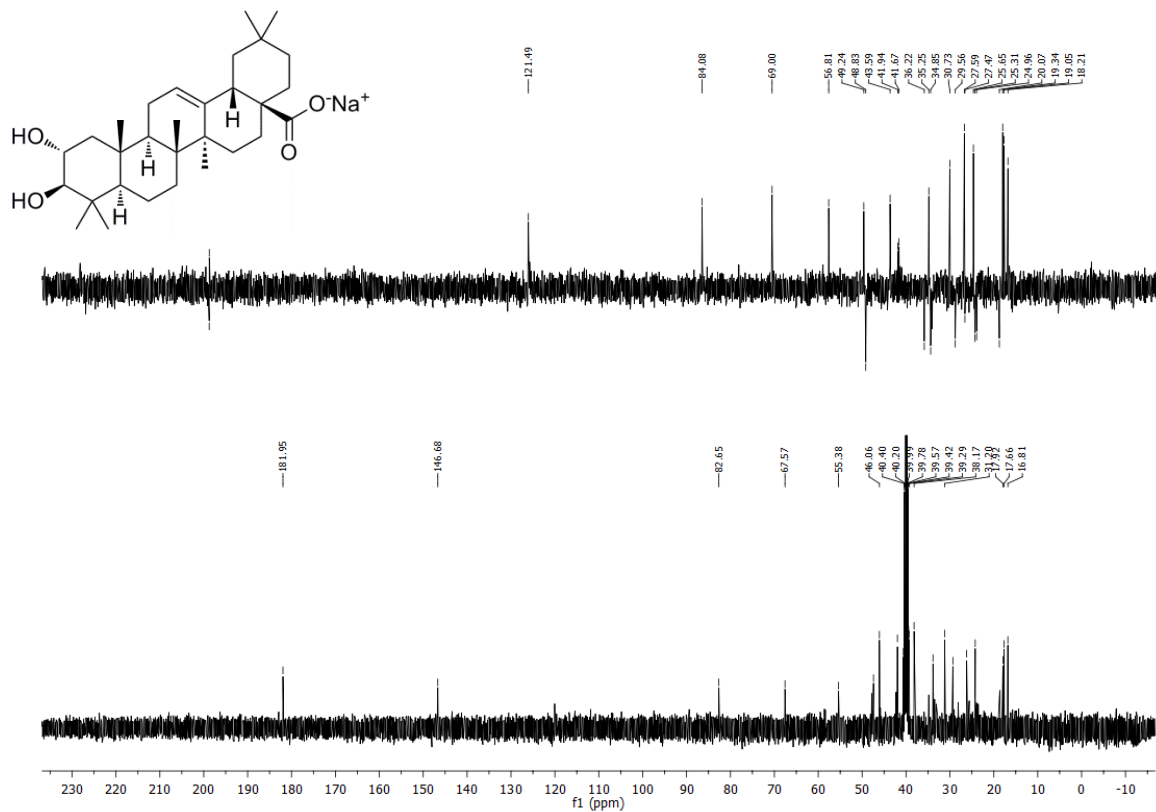
Producto 4

Espectro de ¹H RMN del producto 4Espectro de ¹³C RMN del producto 4

Producto 5

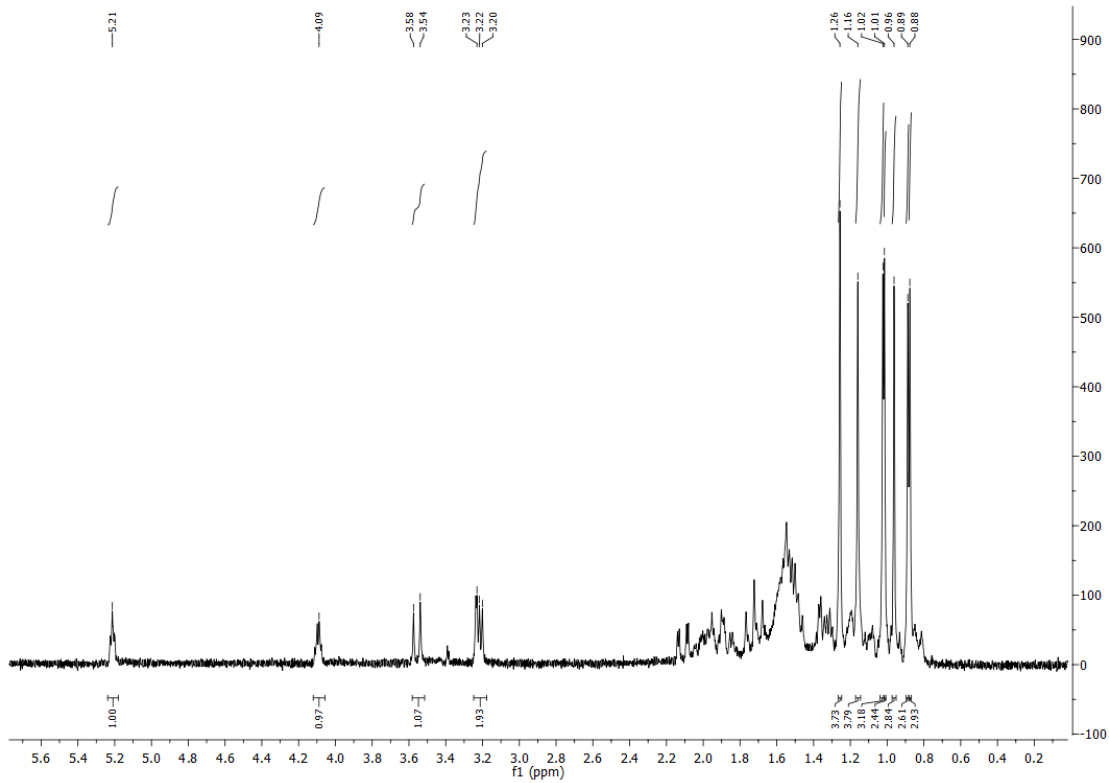
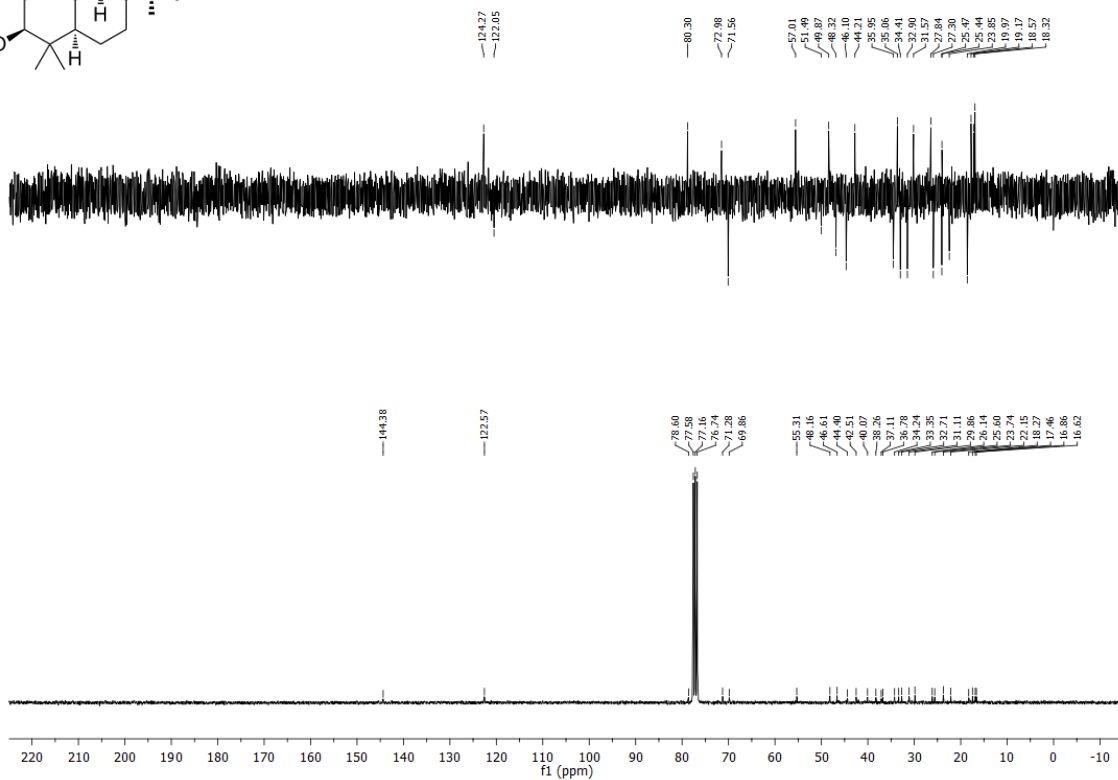
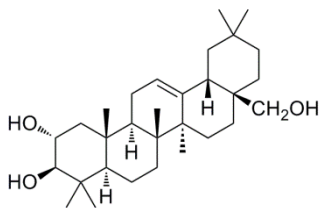


Espectro de ^1H RMN del producto 5

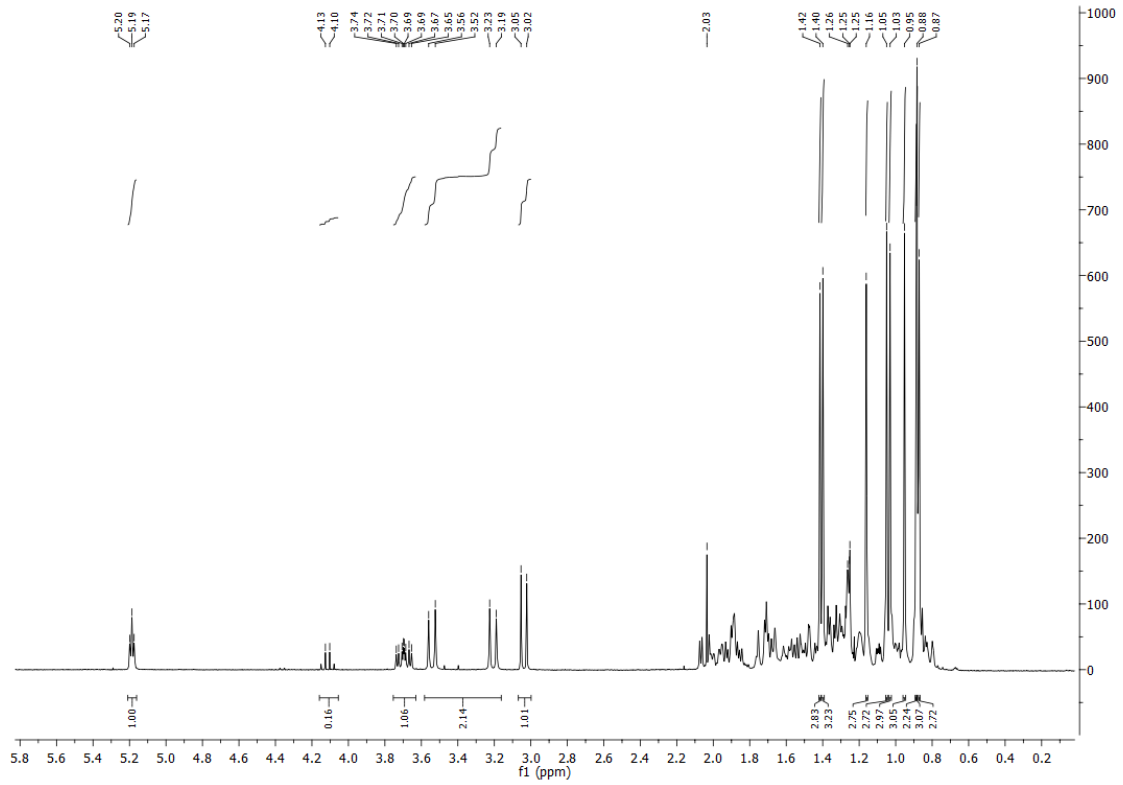


Espectro de ^{13}C RMN del producto 5

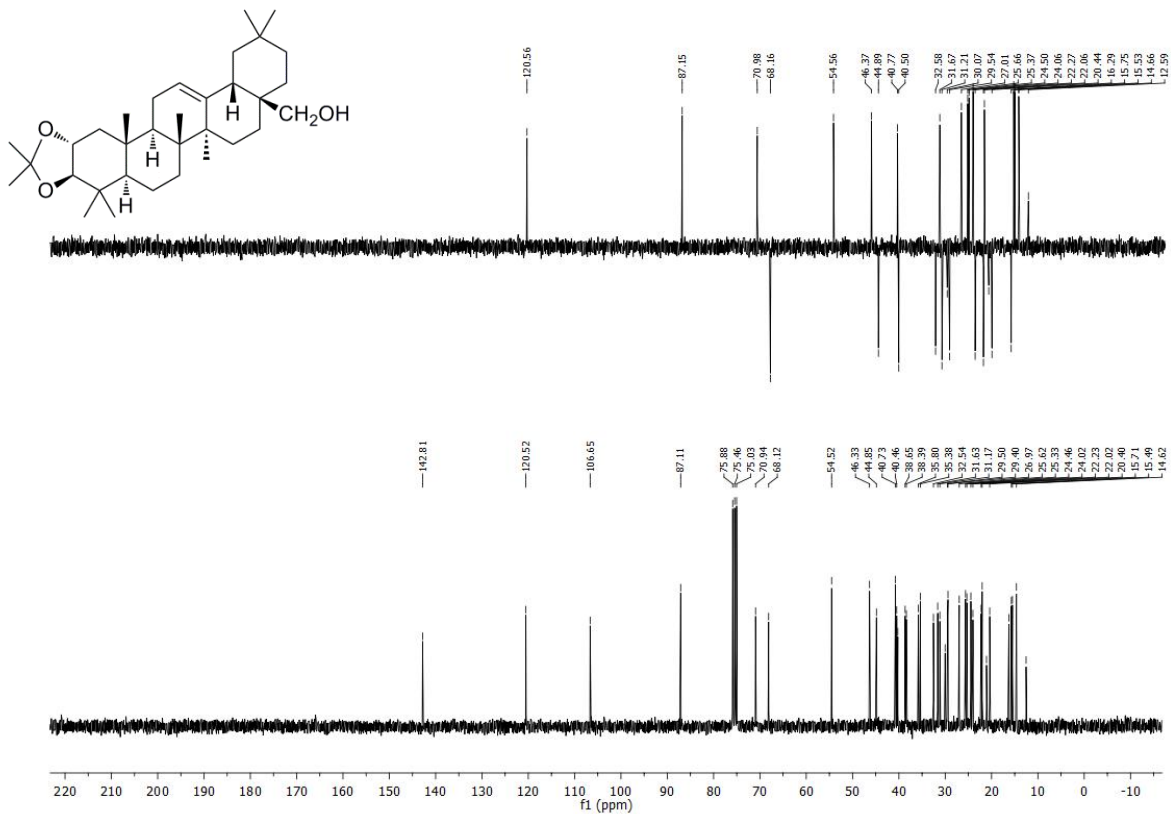
Producto 6

Espectro de ^1H RMN del producto 6Espectro de ^{13}C RMN del producto 6

Producto 7

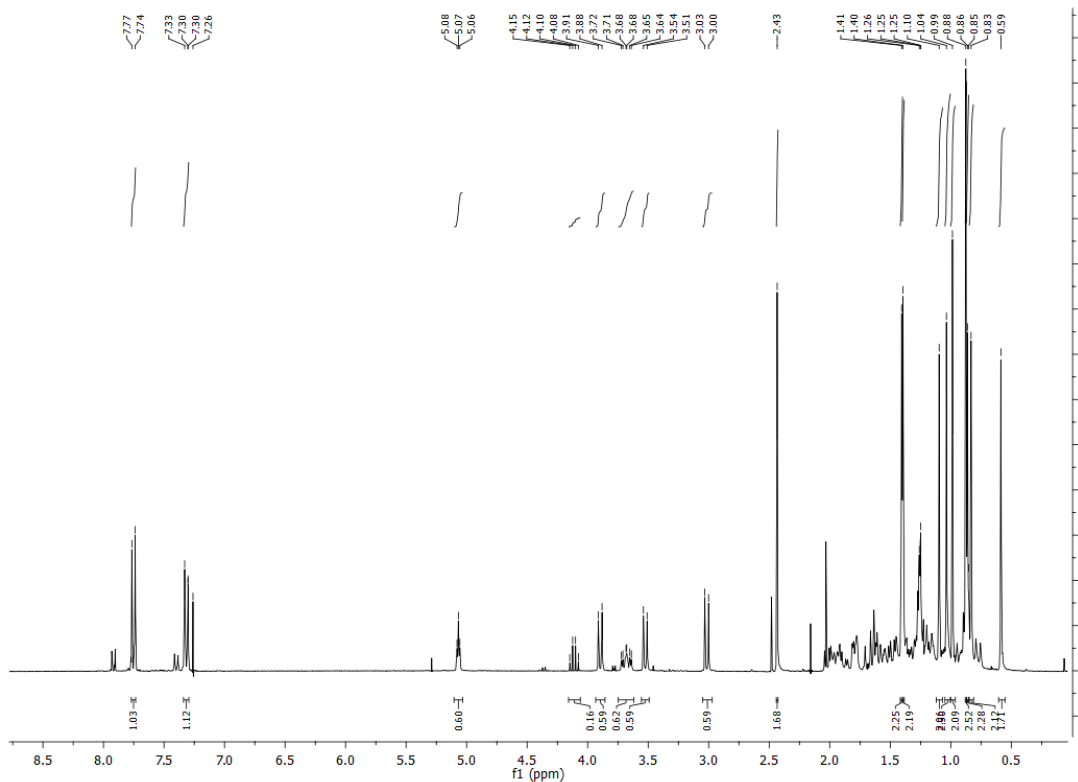
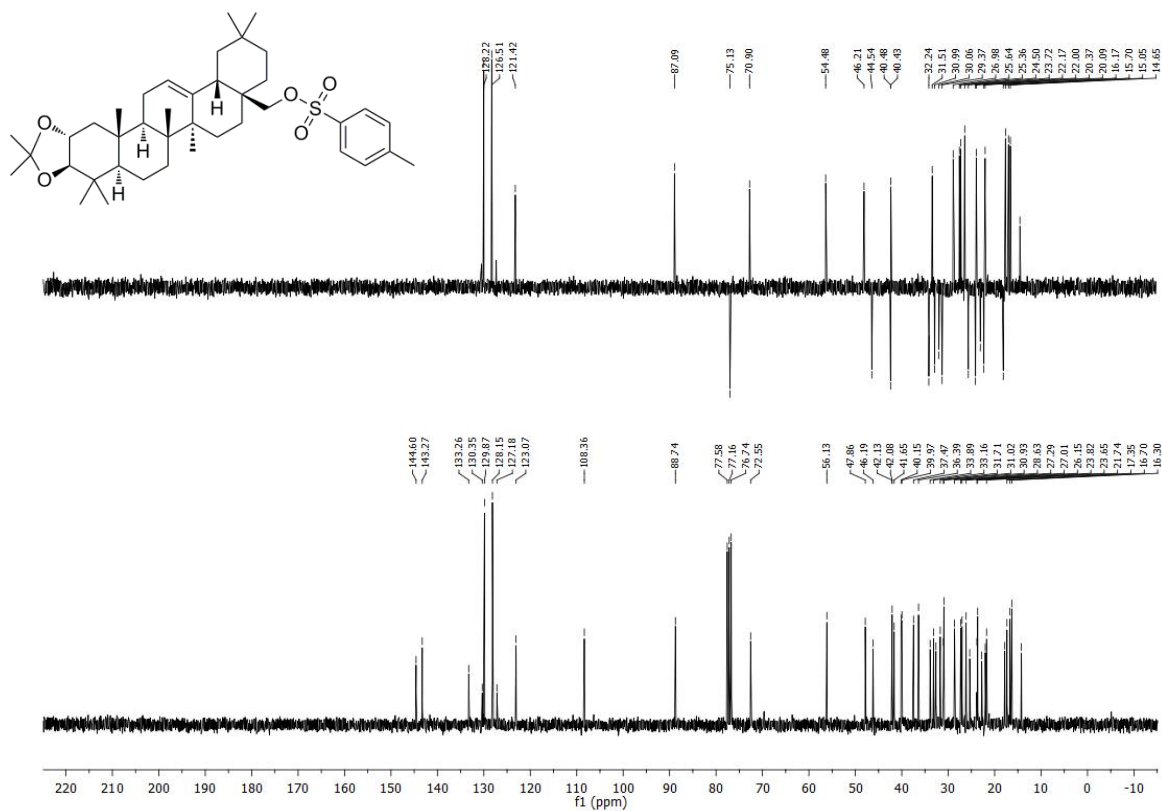


Espectro de ¹H RMN del producto 7

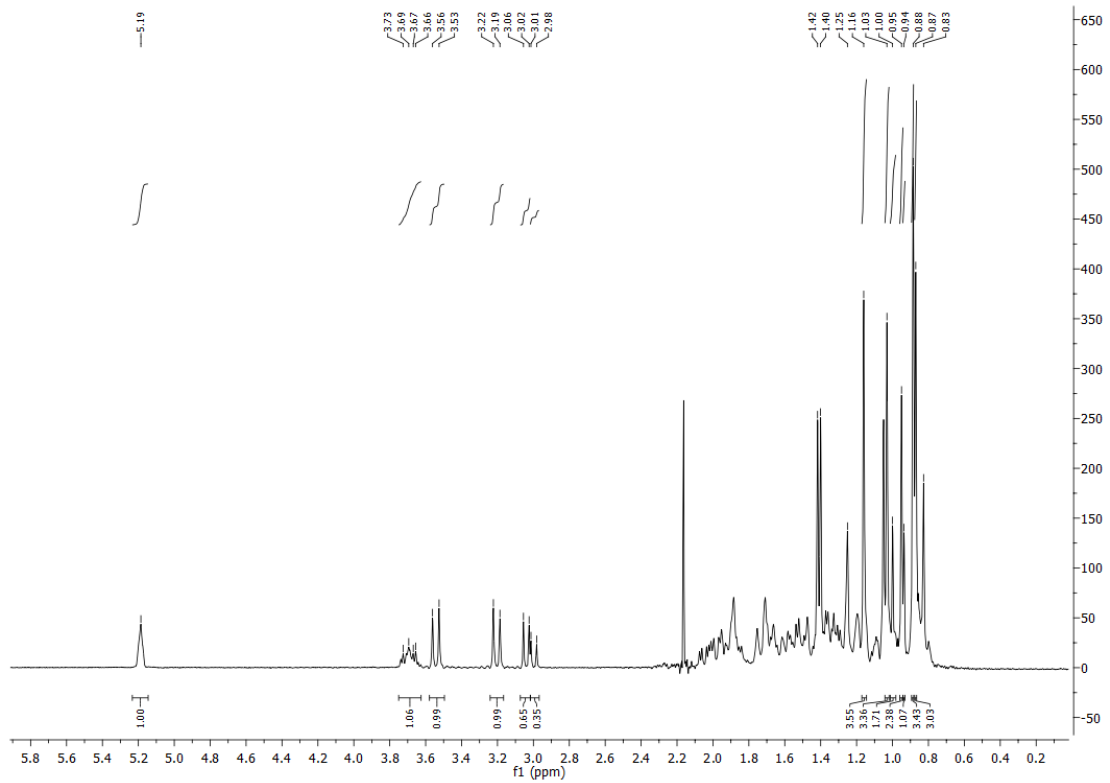
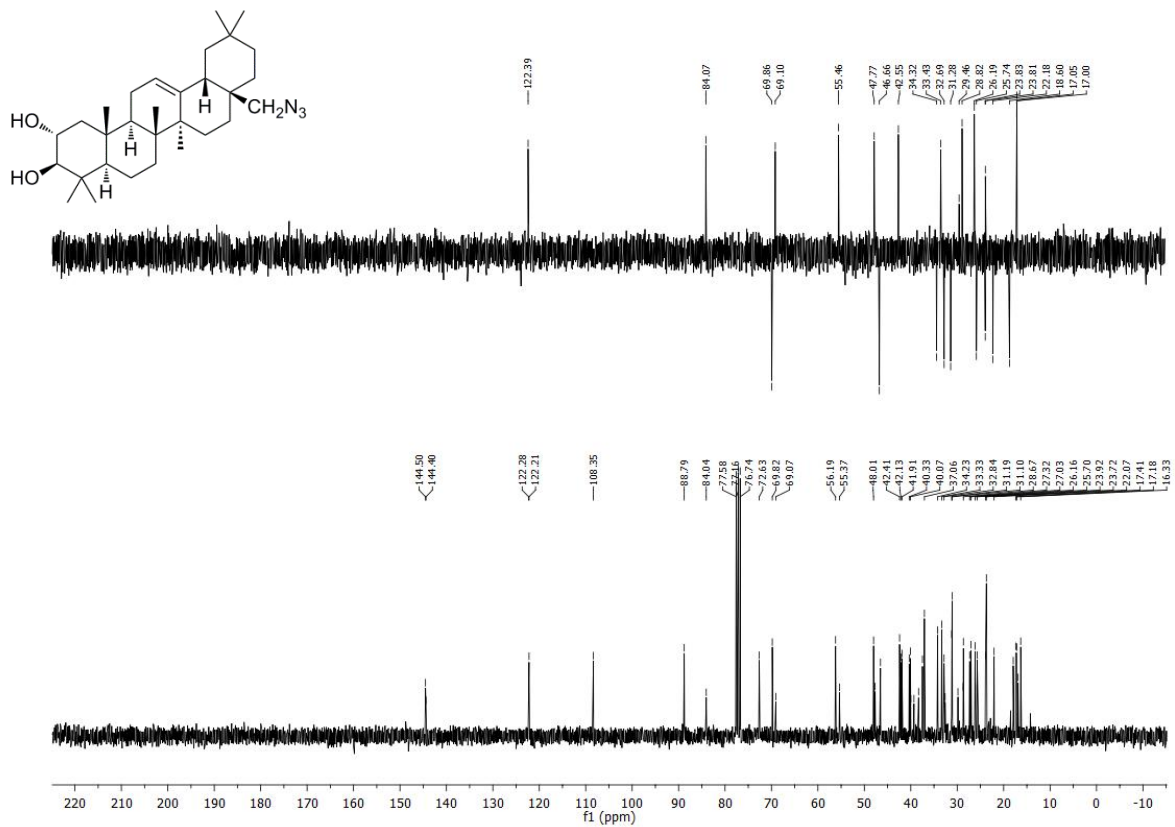


Espectro de ¹³C RMN del producto 7

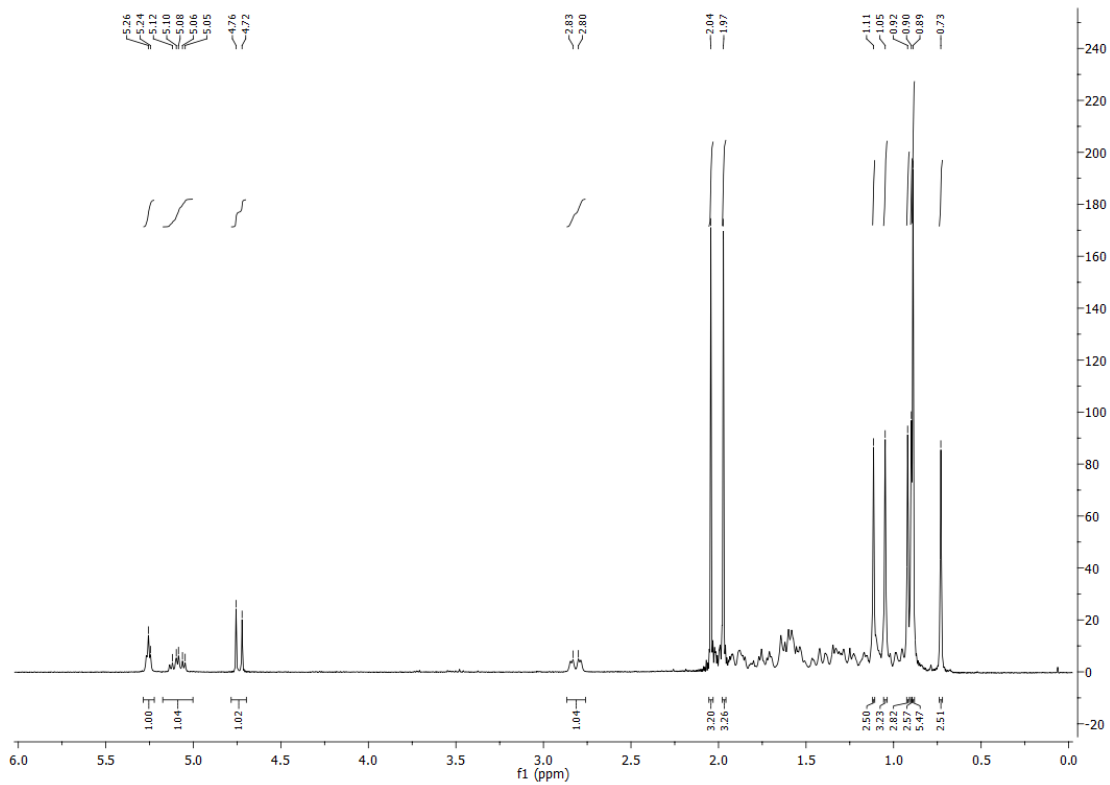
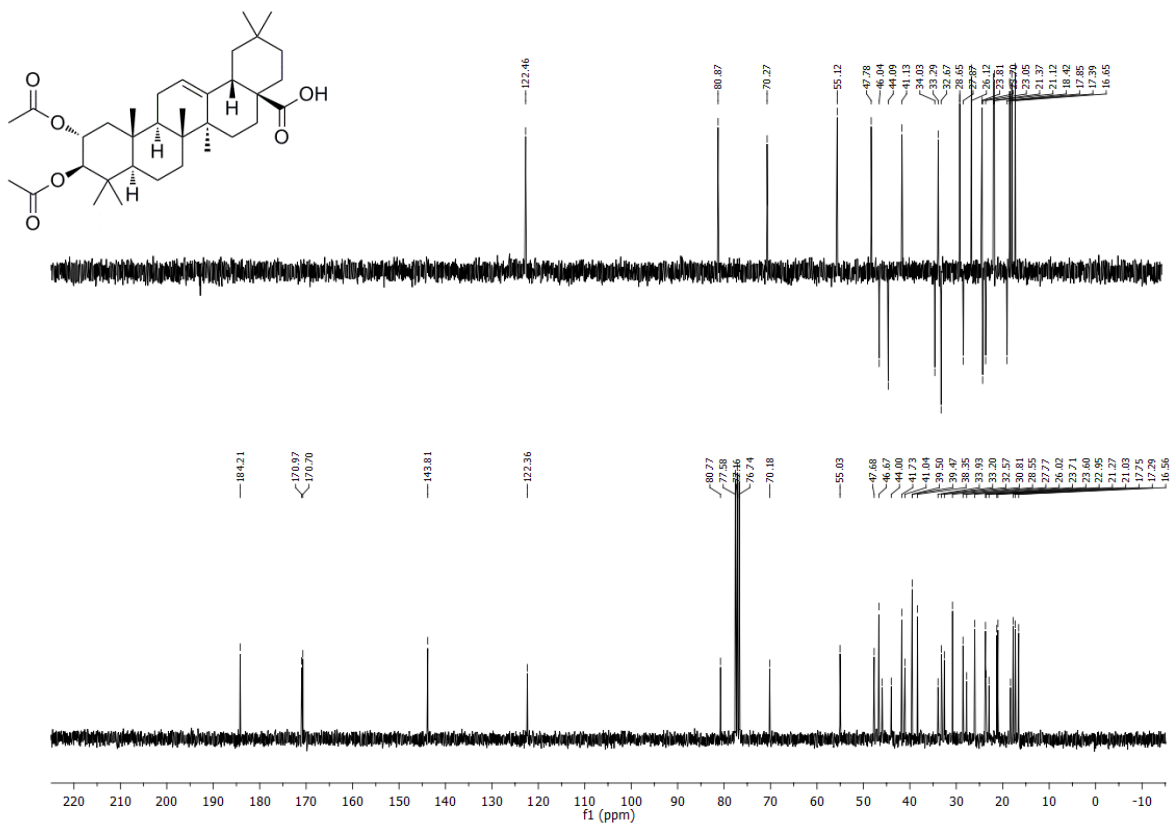
Producto 8

Espectro de ¹H RMN del producto 8Espectro de ¹³C RMN del producto 8

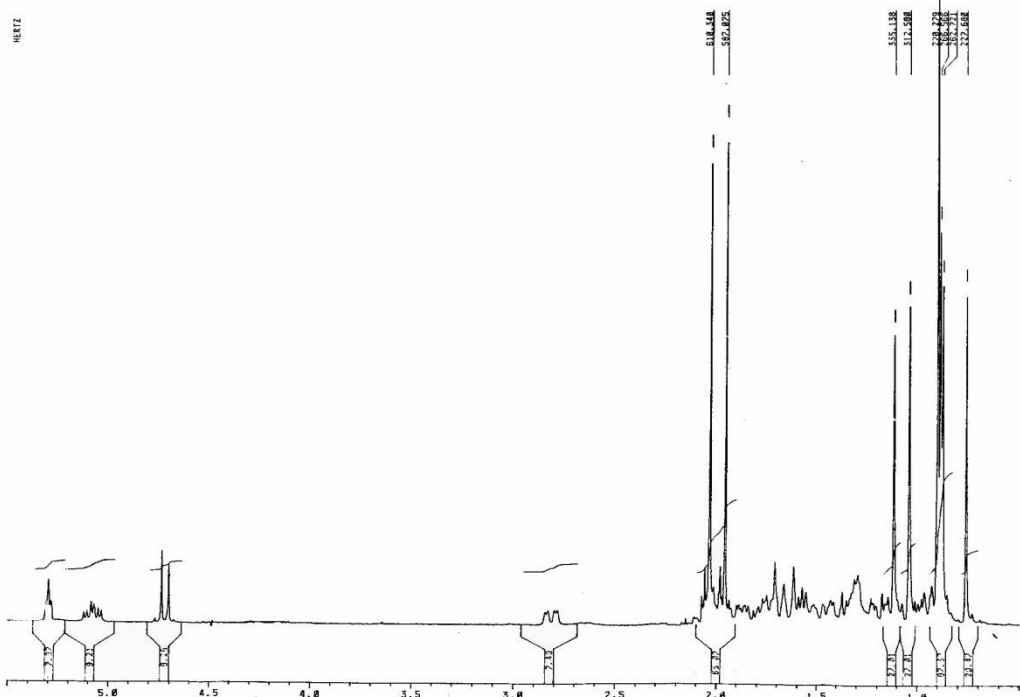
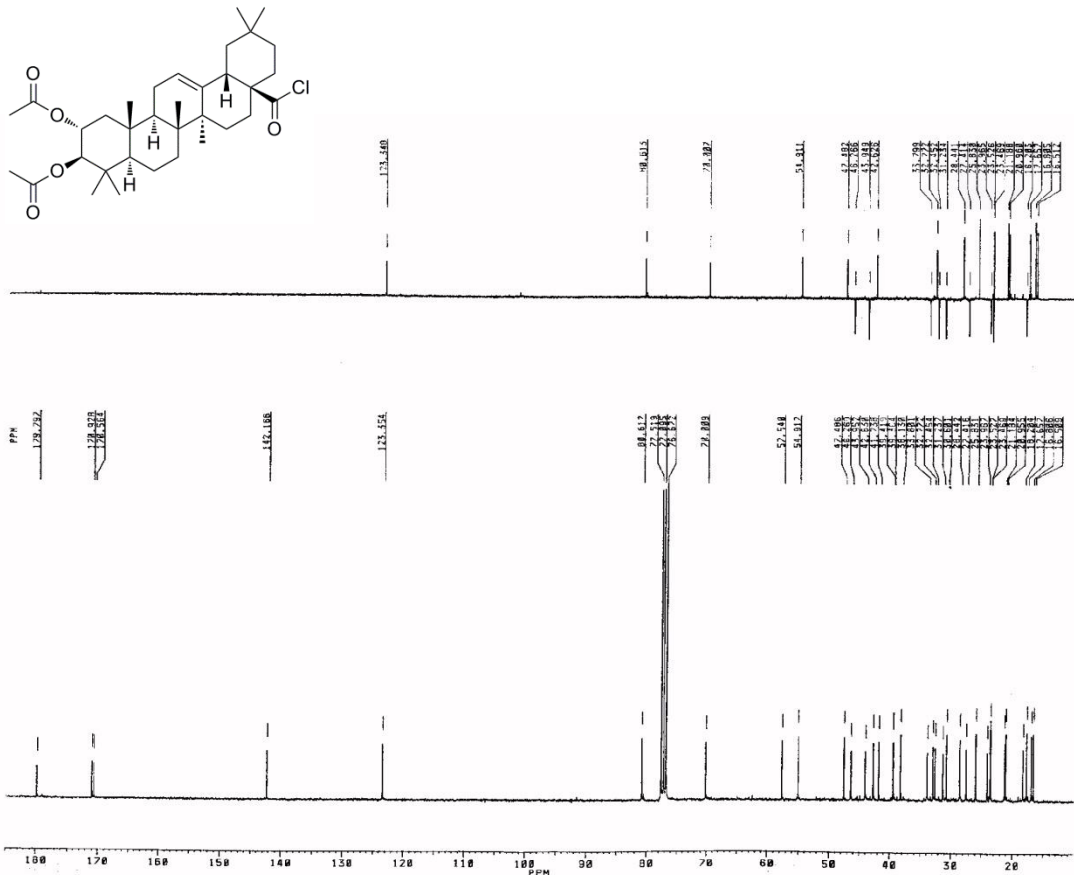
Producto 9

Espectro de ^1H RMN del producto 9Espectro de ^{13}C RMN del producto 9

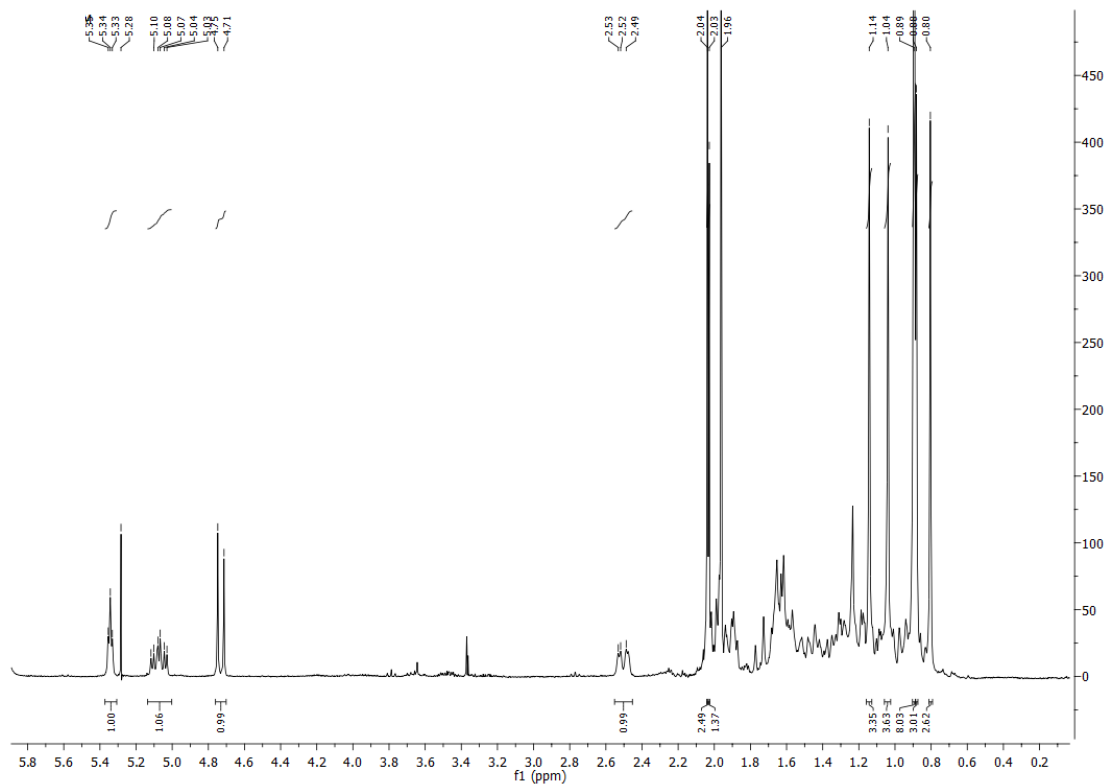
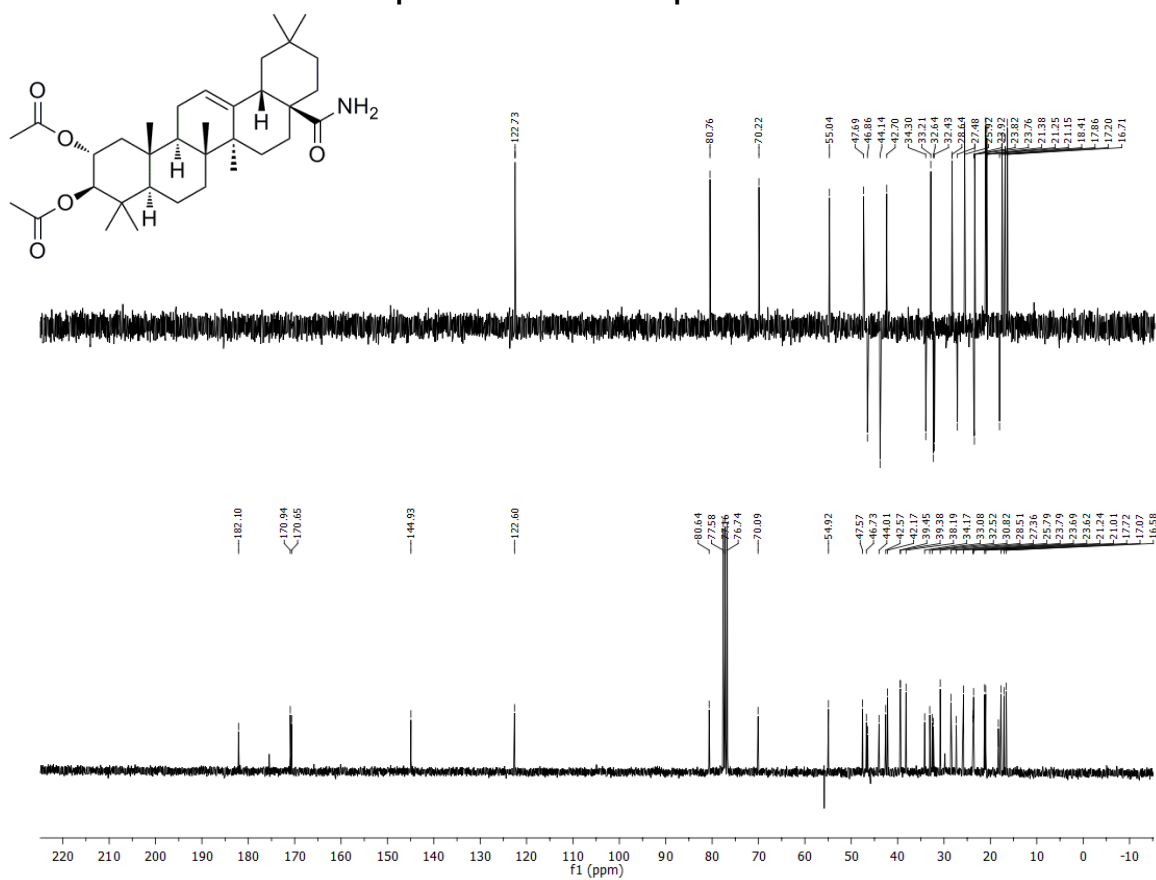
Producto 10

Espectro de ^1H RMN del producto 10Espectro de ^{13}C RMN del producto 10

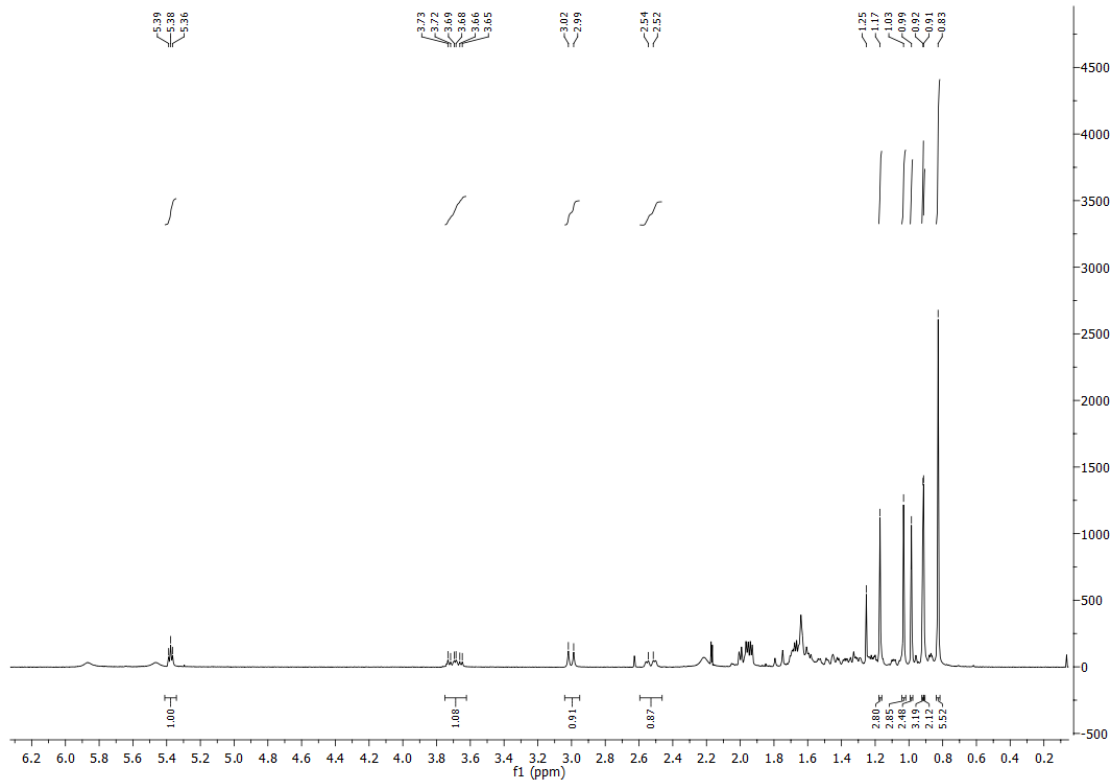
Producto 11

Espectro de ¹H RMN del producto 11Espectro de ¹³C RMN del producto 11

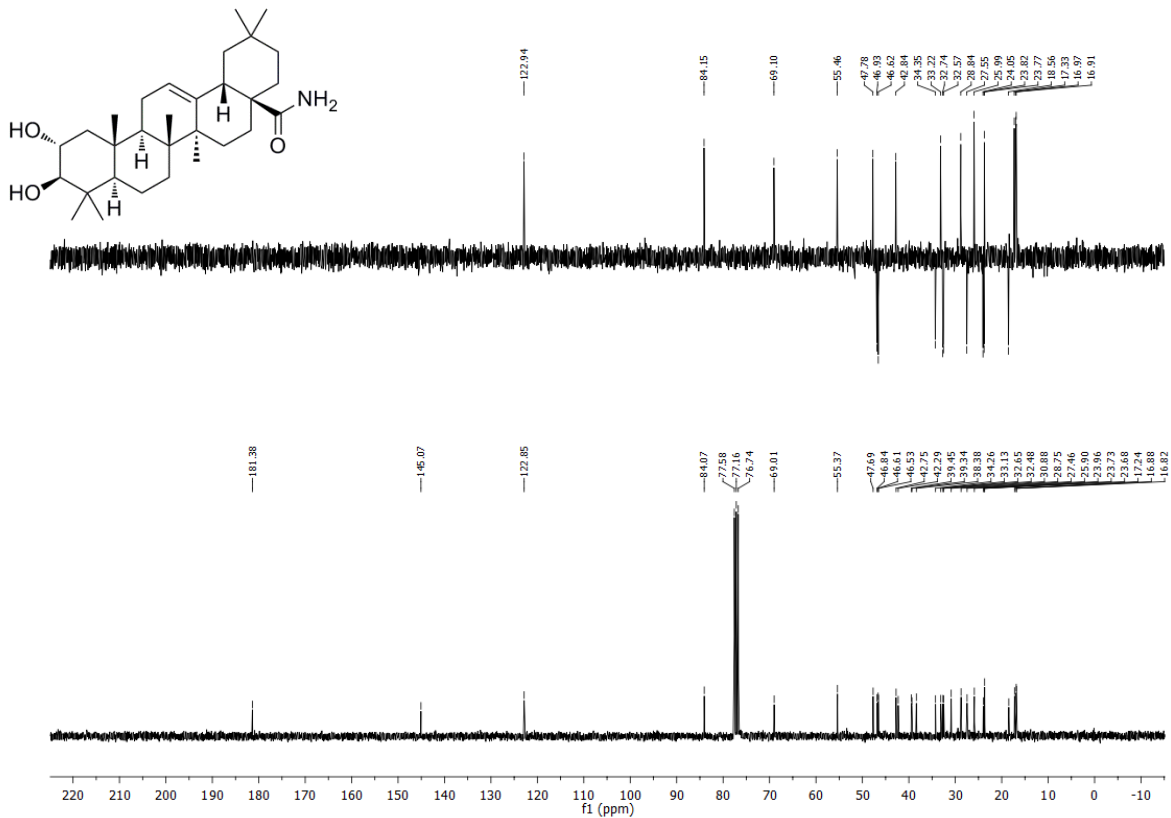
Producto 12

Espectro de ^1H RMN del producto 12Espectro de ^{13}C RMN del producto 12

Producto 13

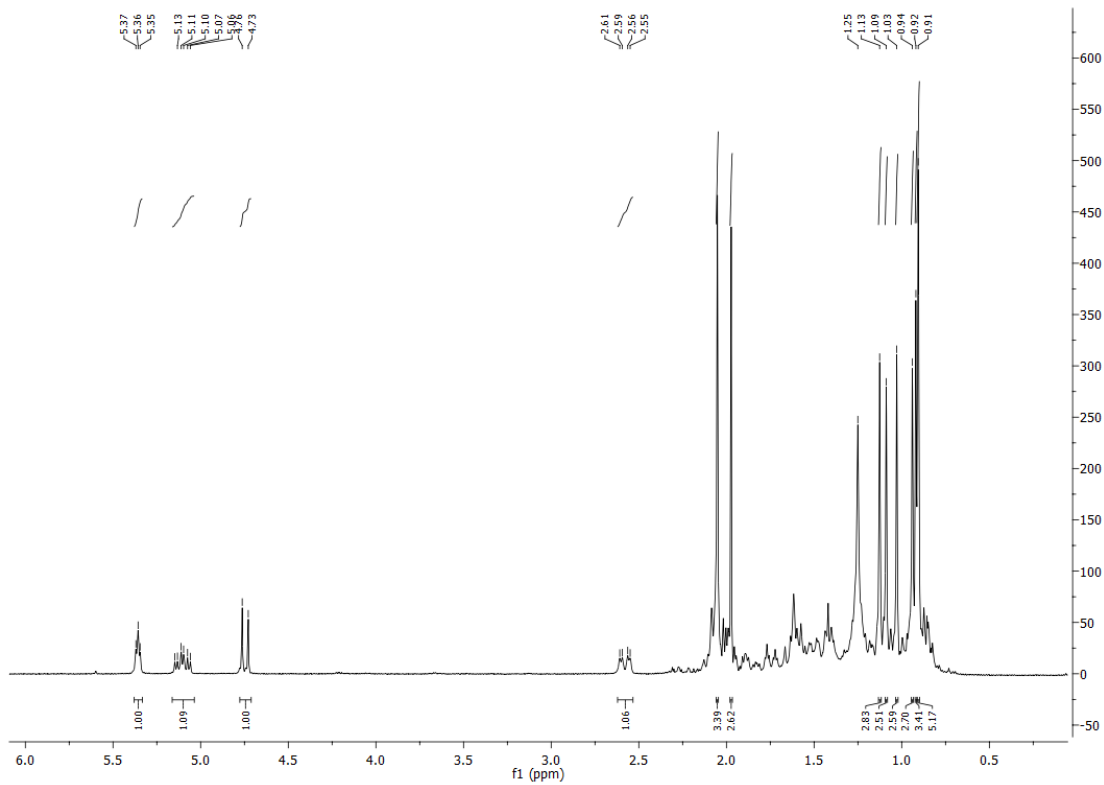
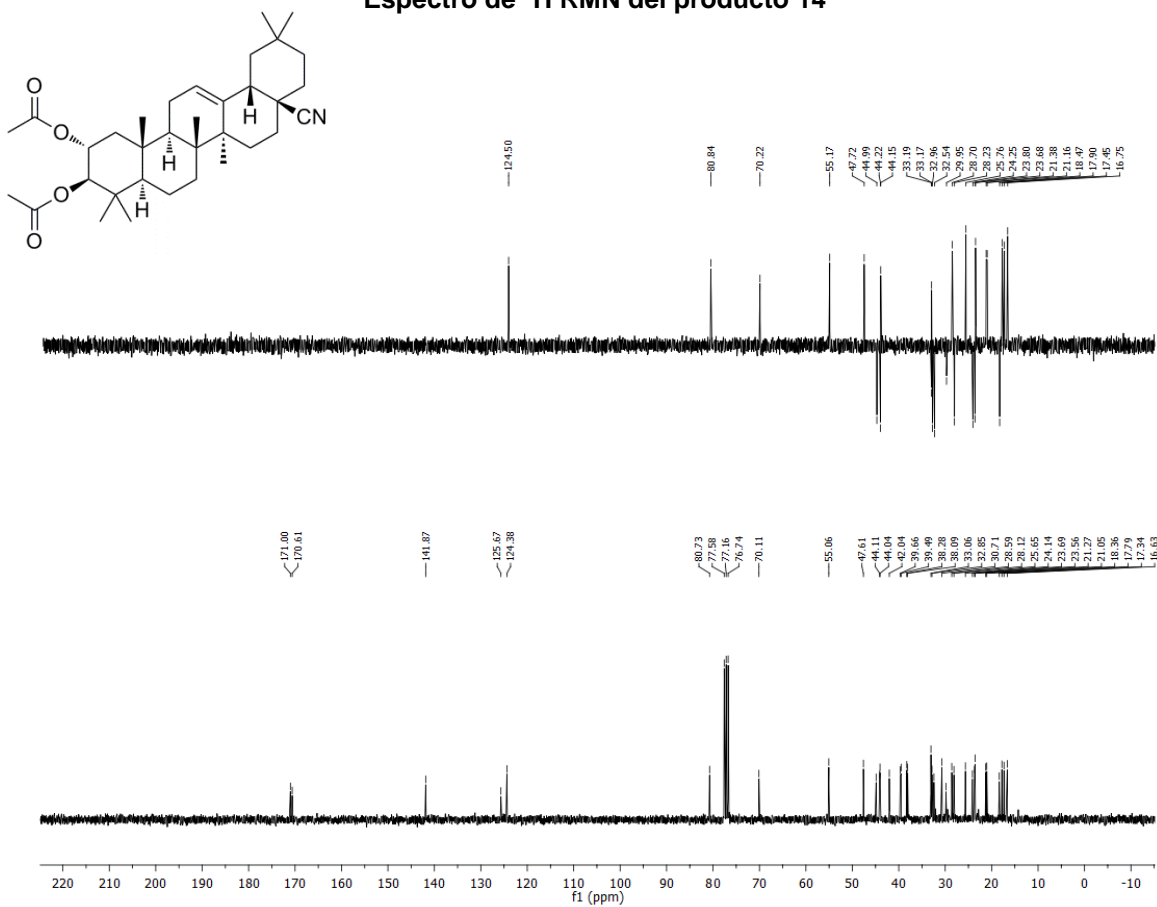


Espectro de ¹H RMN del producto 13

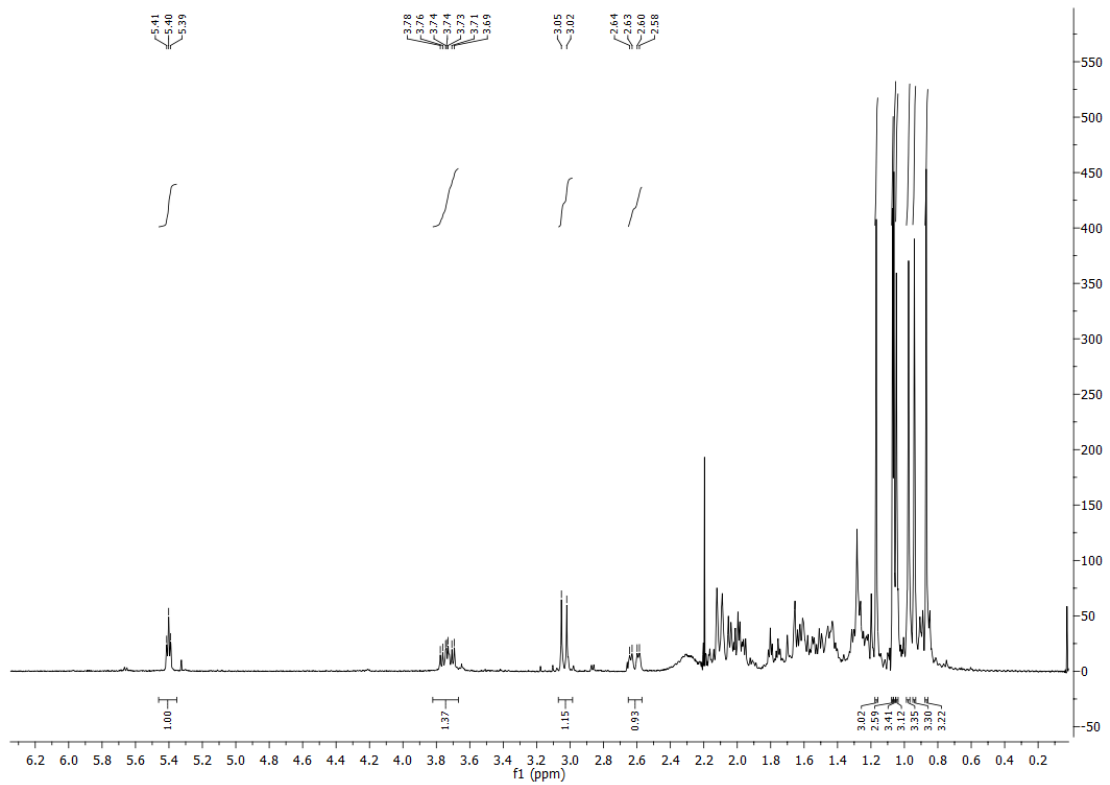
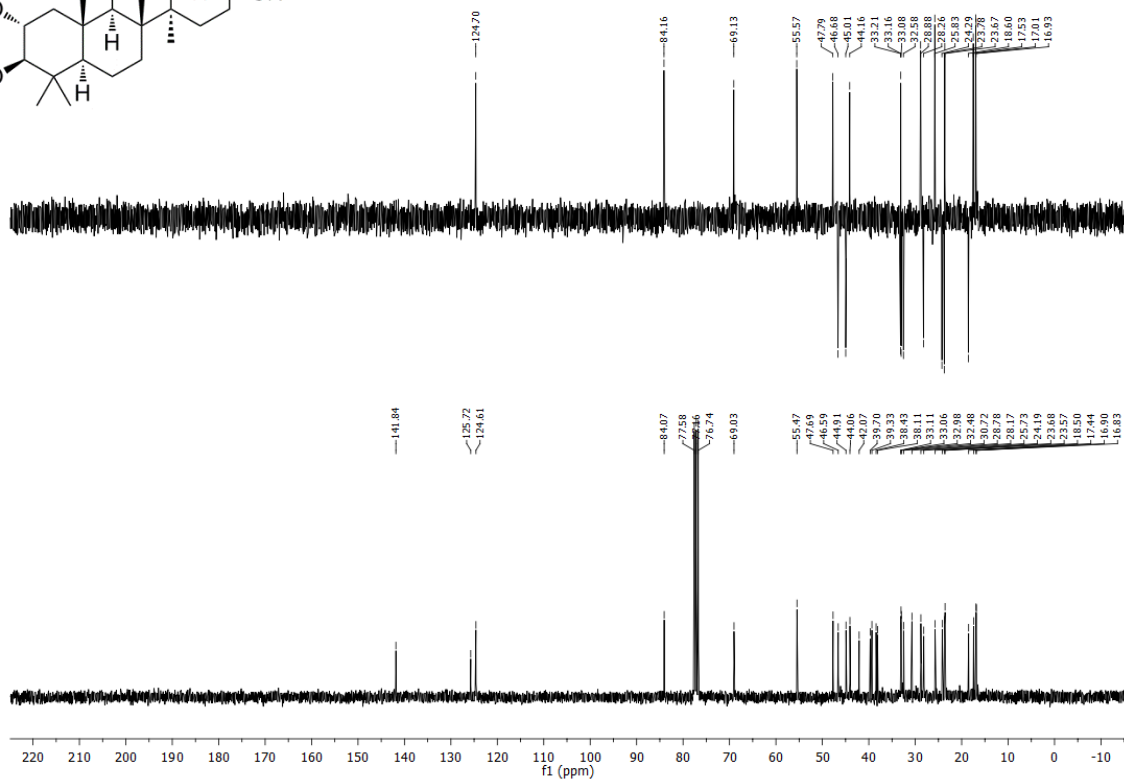
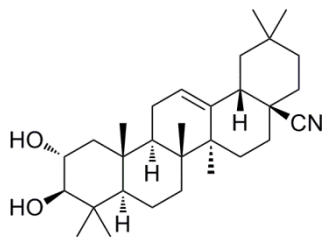


Espectro de ¹³C RMN del producto 13

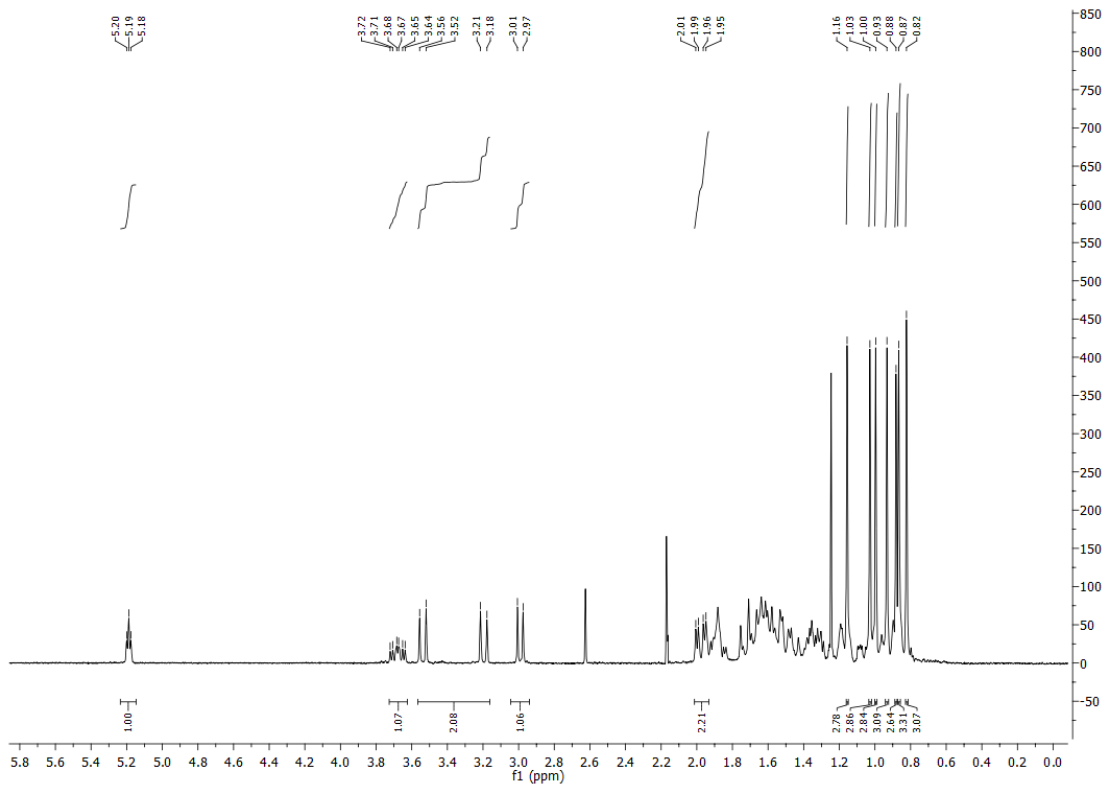
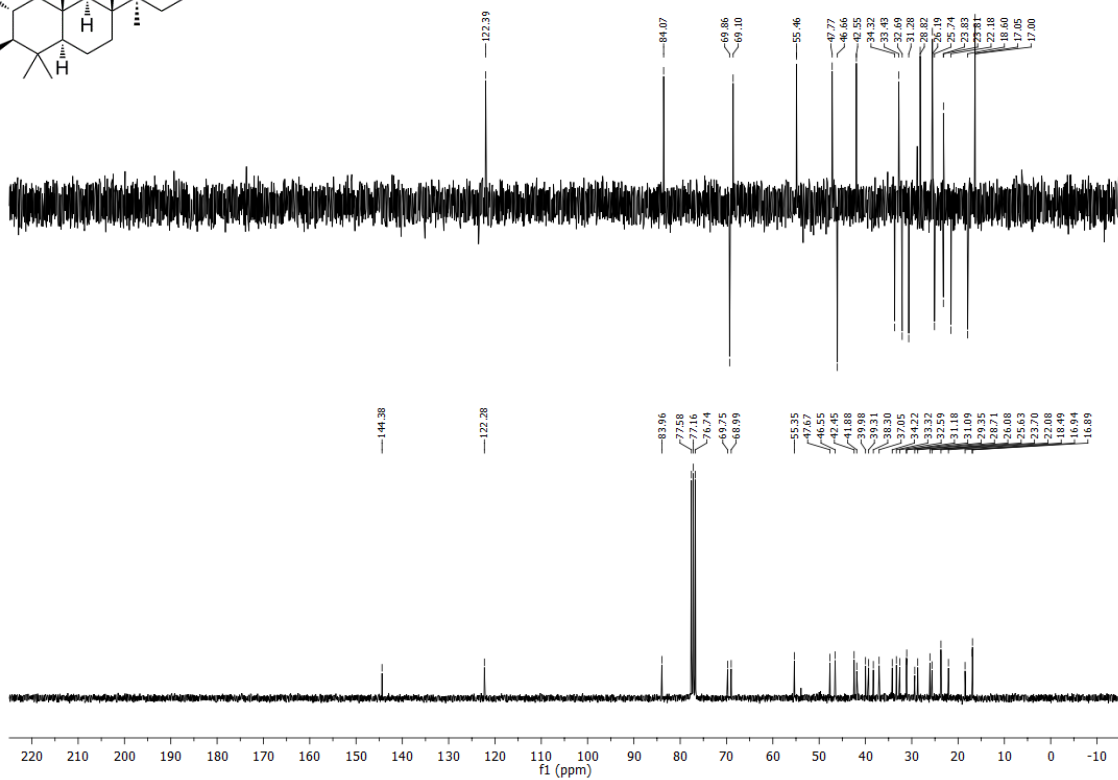
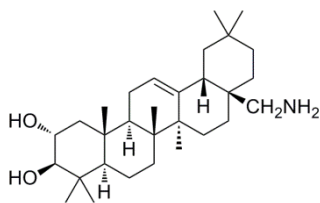
Producto 14

Espectro de ^1H RMN del producto 14Espectro de ^{13}C RMN del producto 14

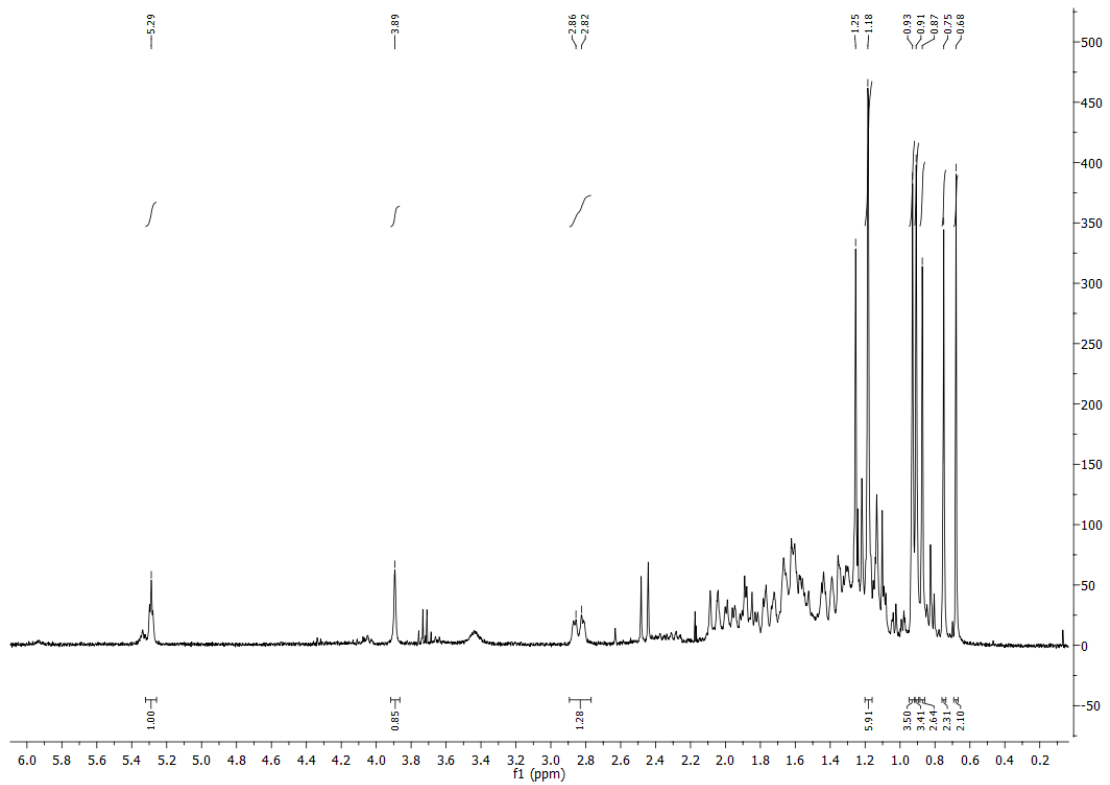
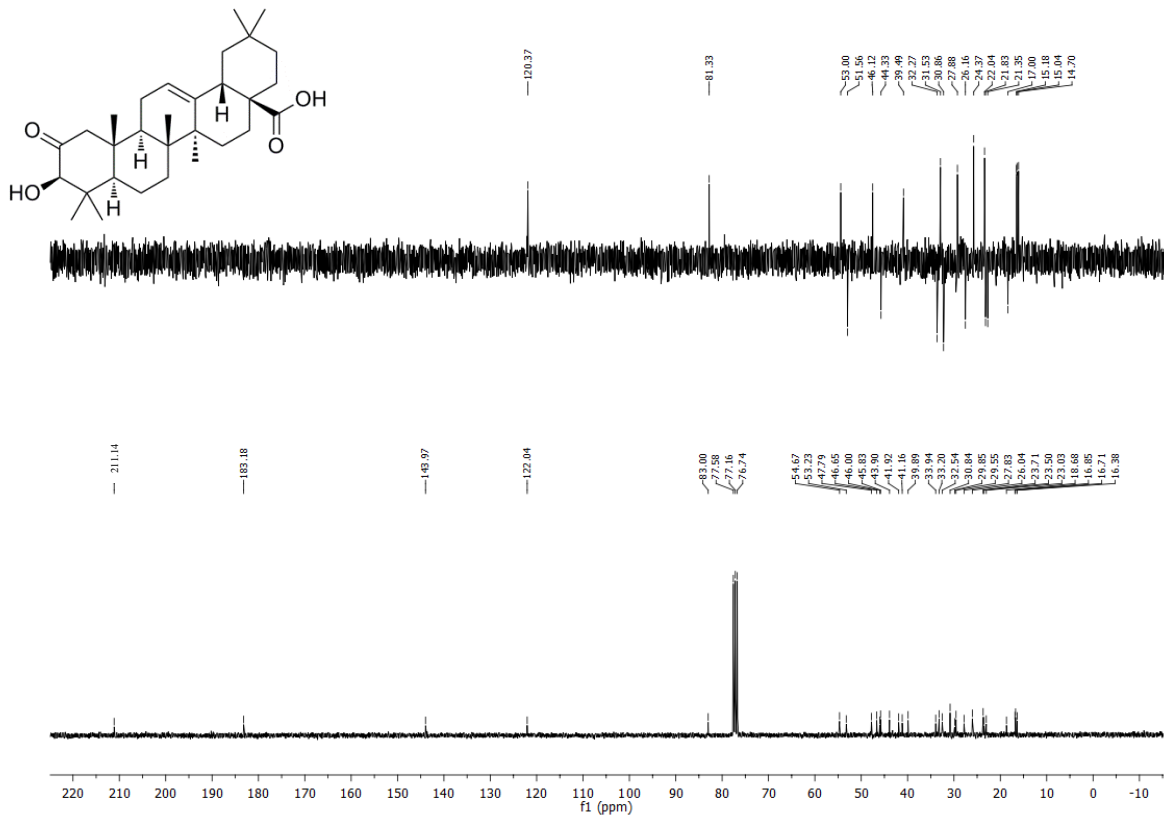
Producto 15

Espectro de ^1H RMN del producto 15Espectro de ^{13}C RMN del producto 15

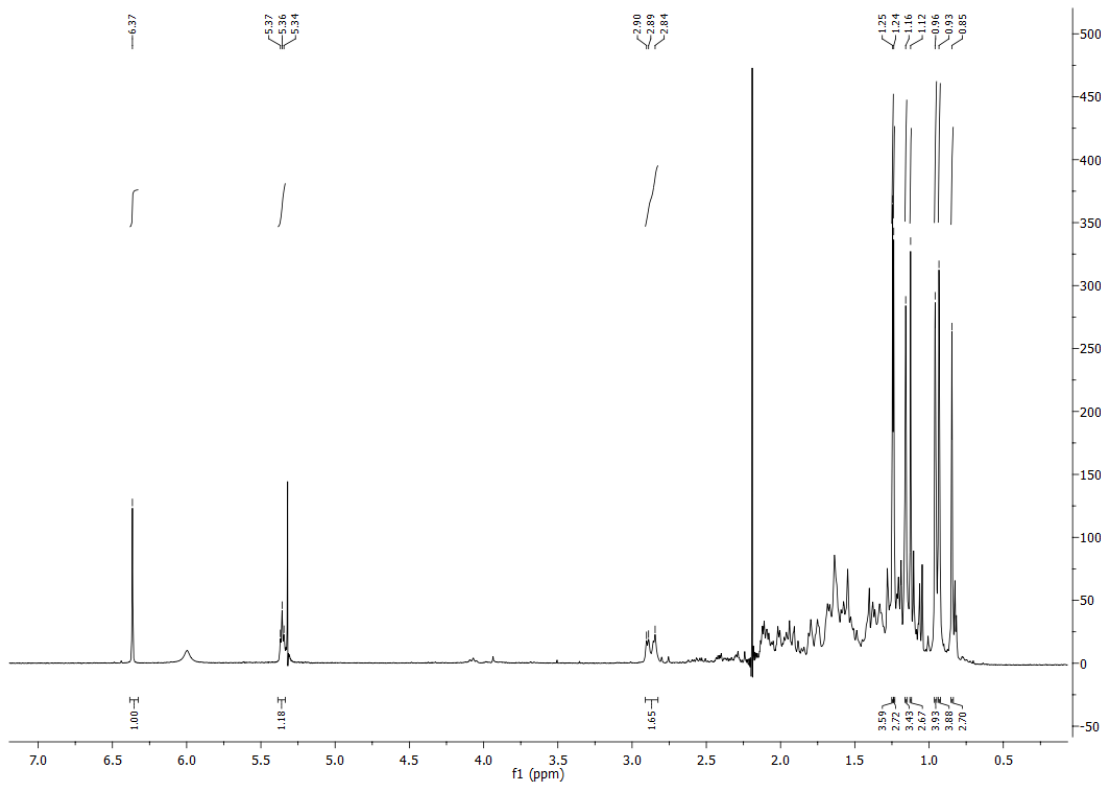
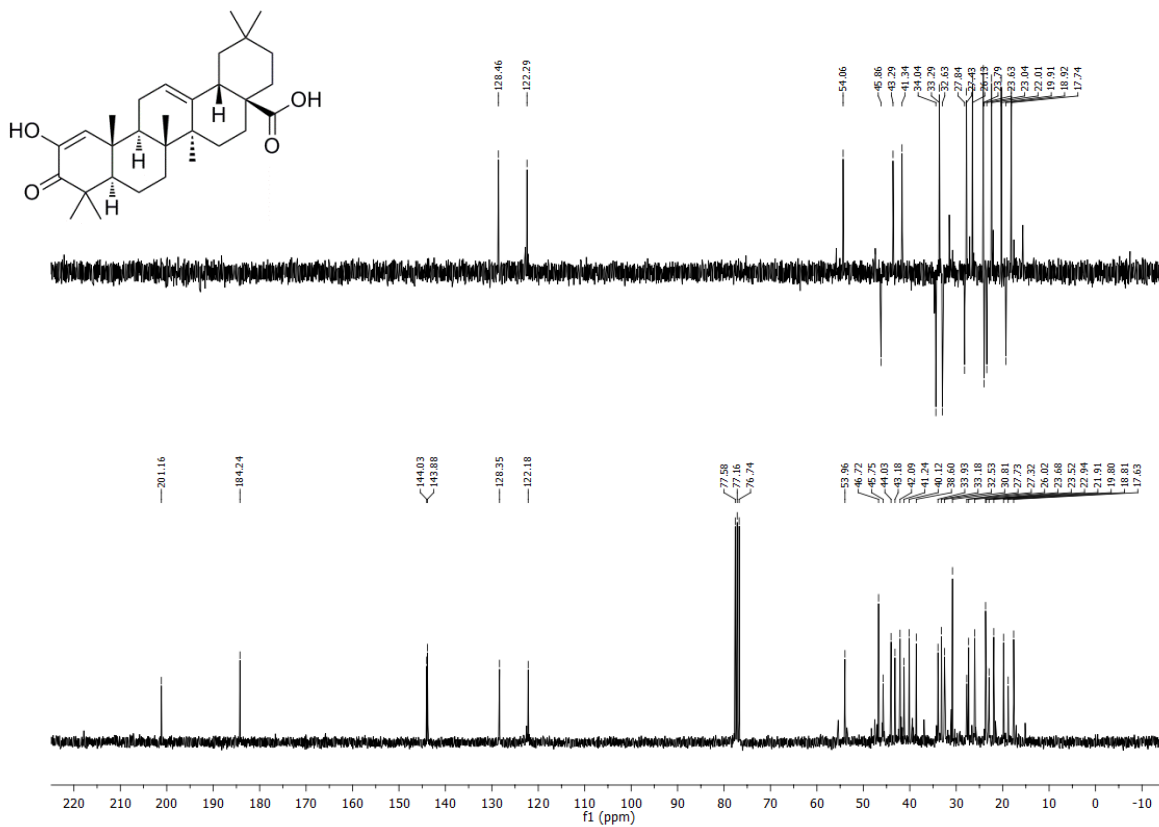
Producto 16

Espectro de ^1H RMN del producto 16Espectro de ^{13}C RMN del producto 16

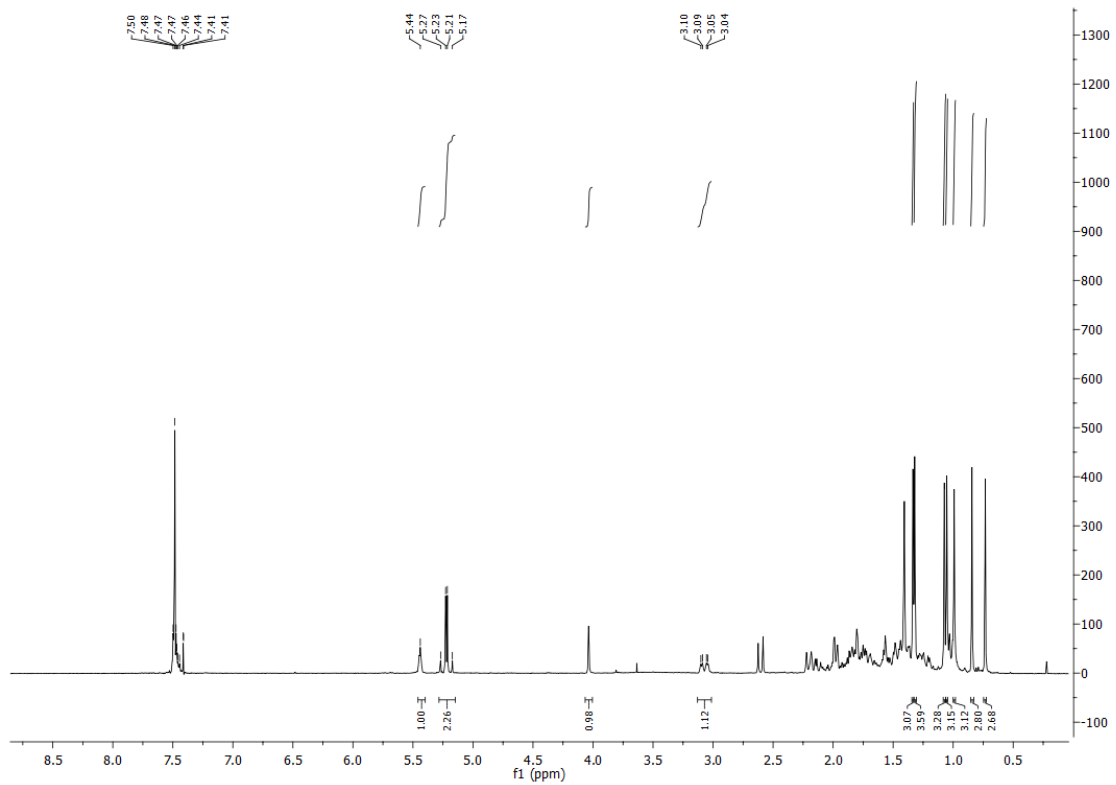
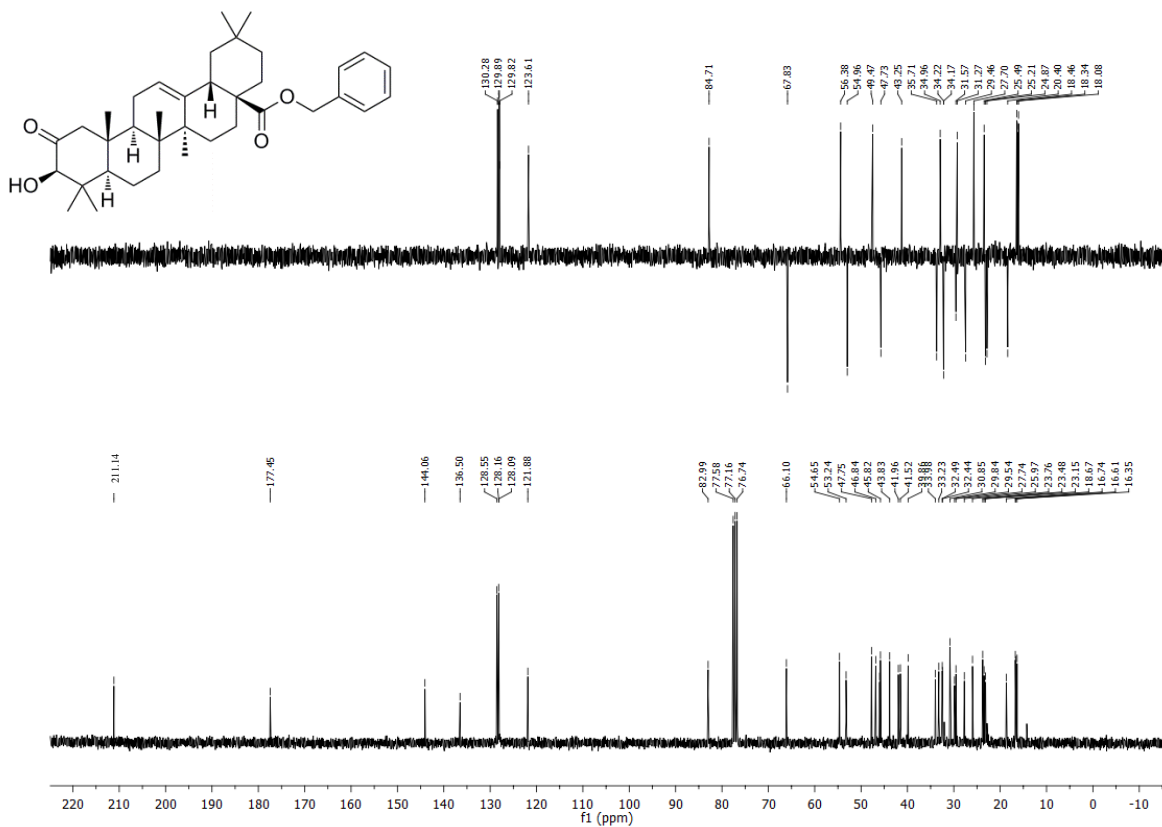
Producto 17

Espectro de ^1H RMN del producto 17Espectro de ^{13}C RMN del producto 17

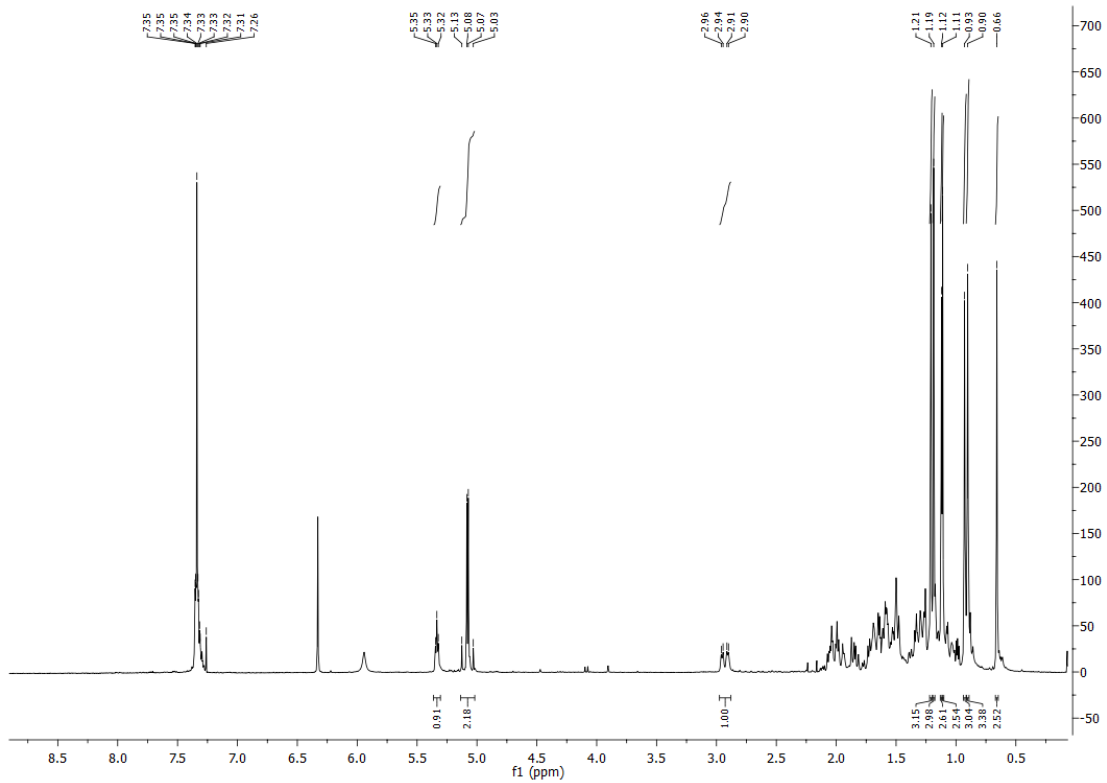
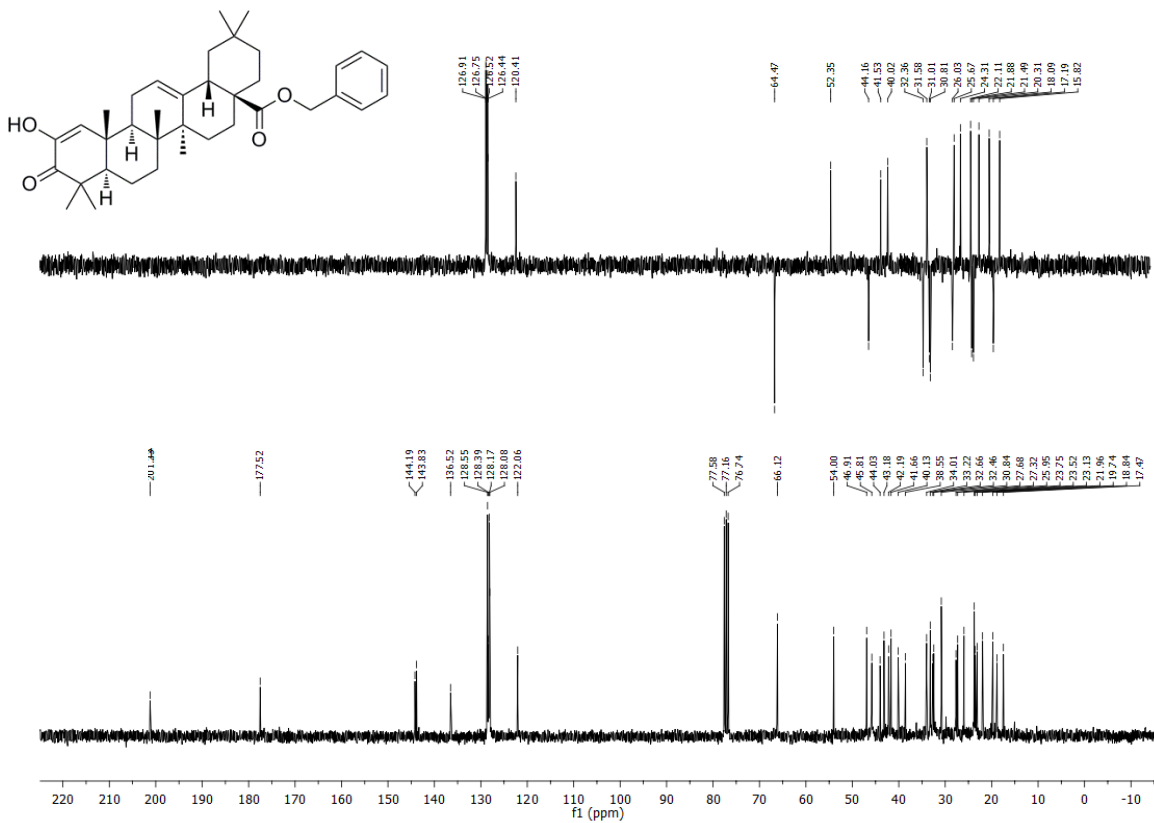
Producto 18

Espectro de ¹H RMN del producto 18Espectro de ¹³C RMN del producto 18

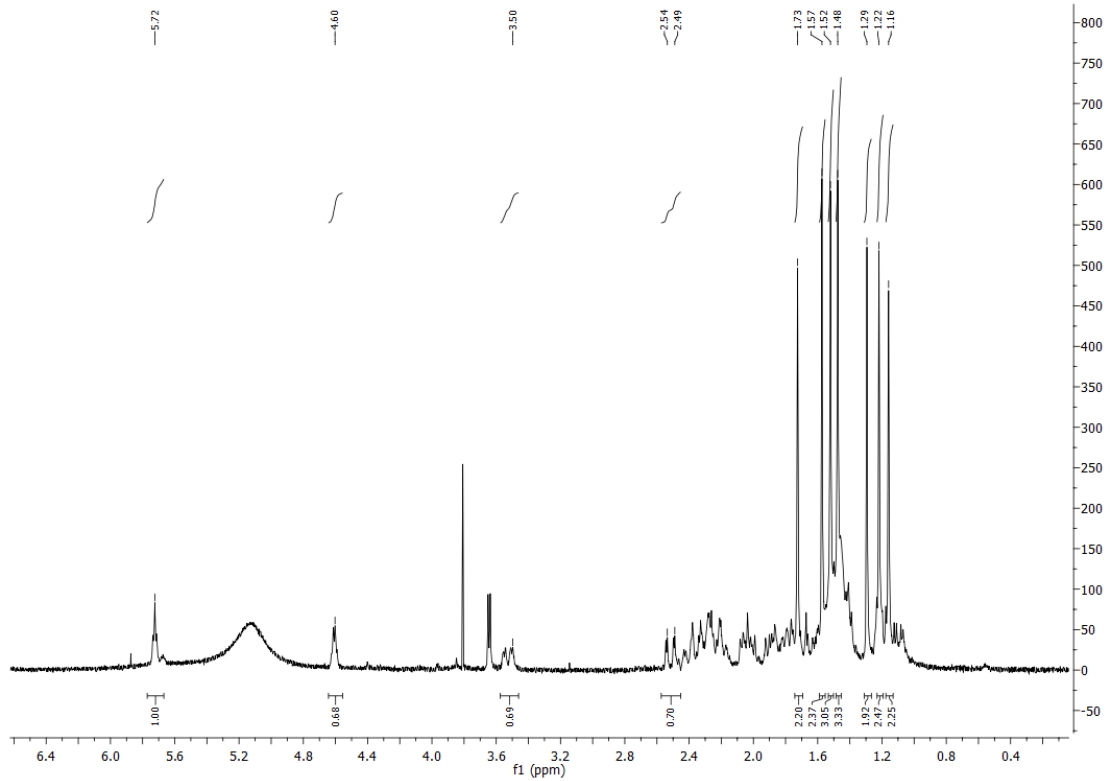
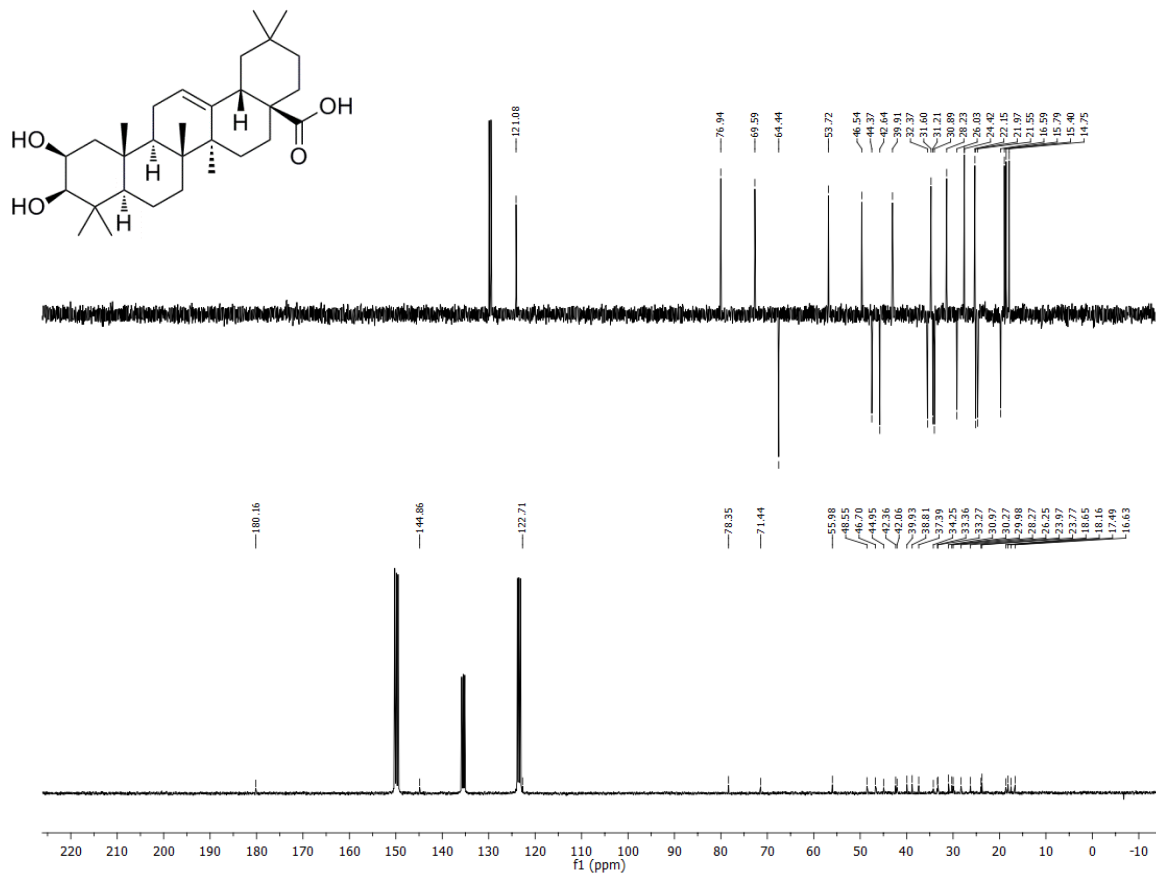
Producto 19

Espectro de ^1H RMN del producto 19Espectro de ^{13}C RMN del producto 19

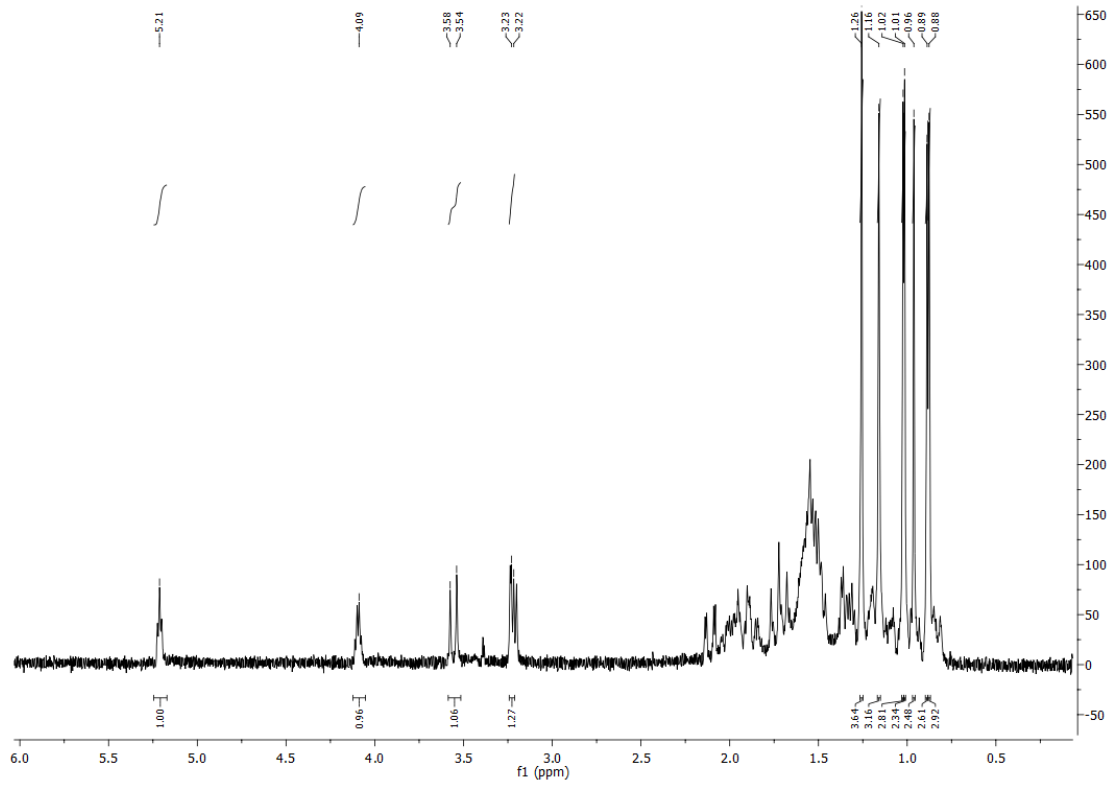
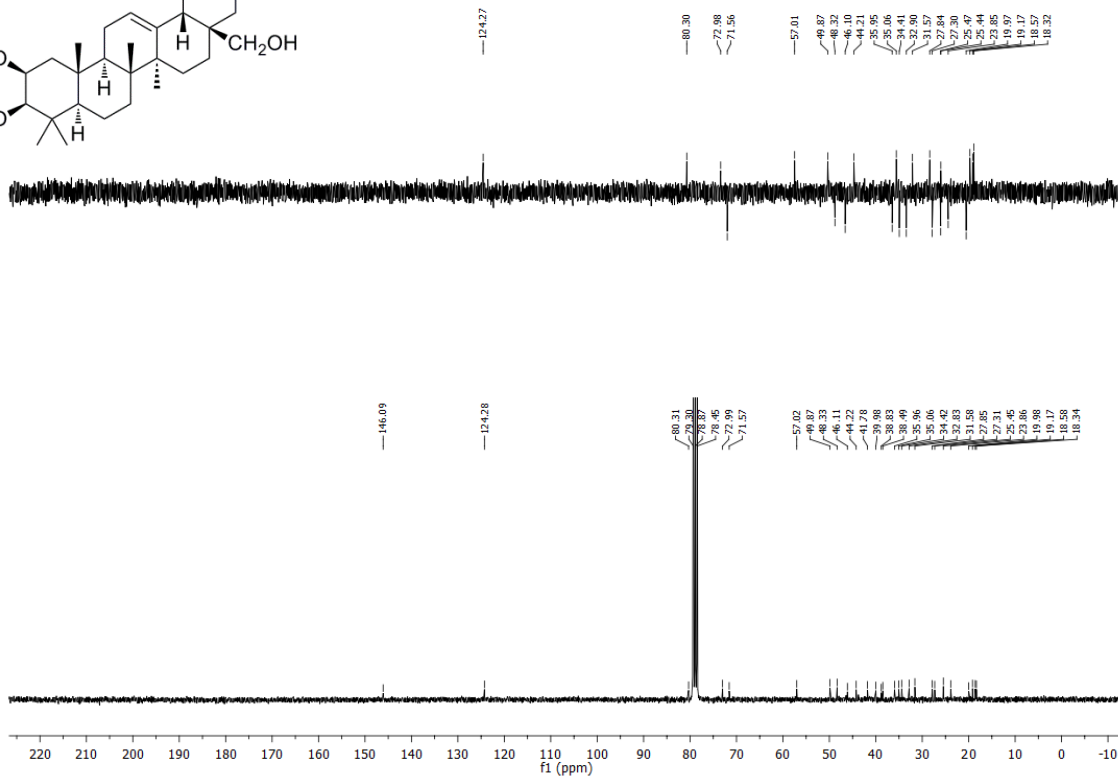
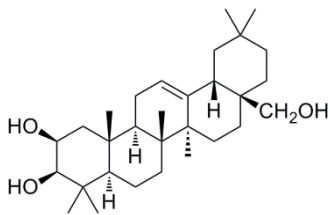
Producto 20

Espectro de ^1H RMN del producto 20Espectro de ^{13}C RMN del producto 20

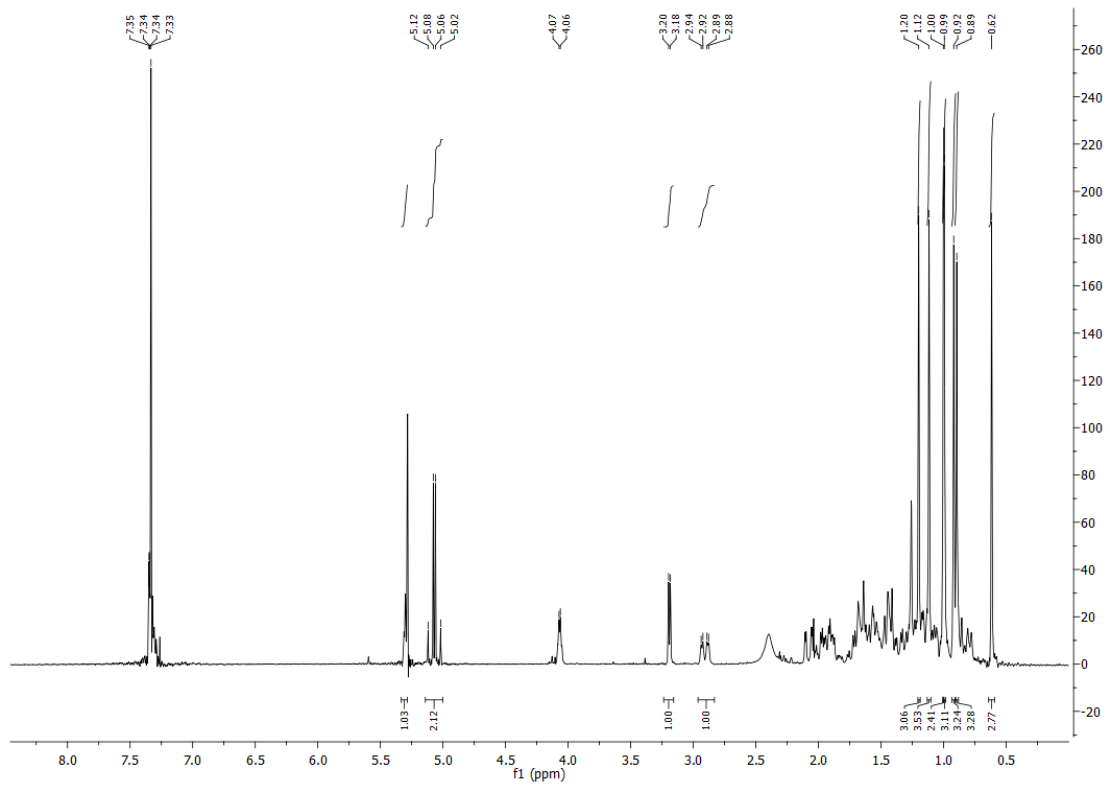
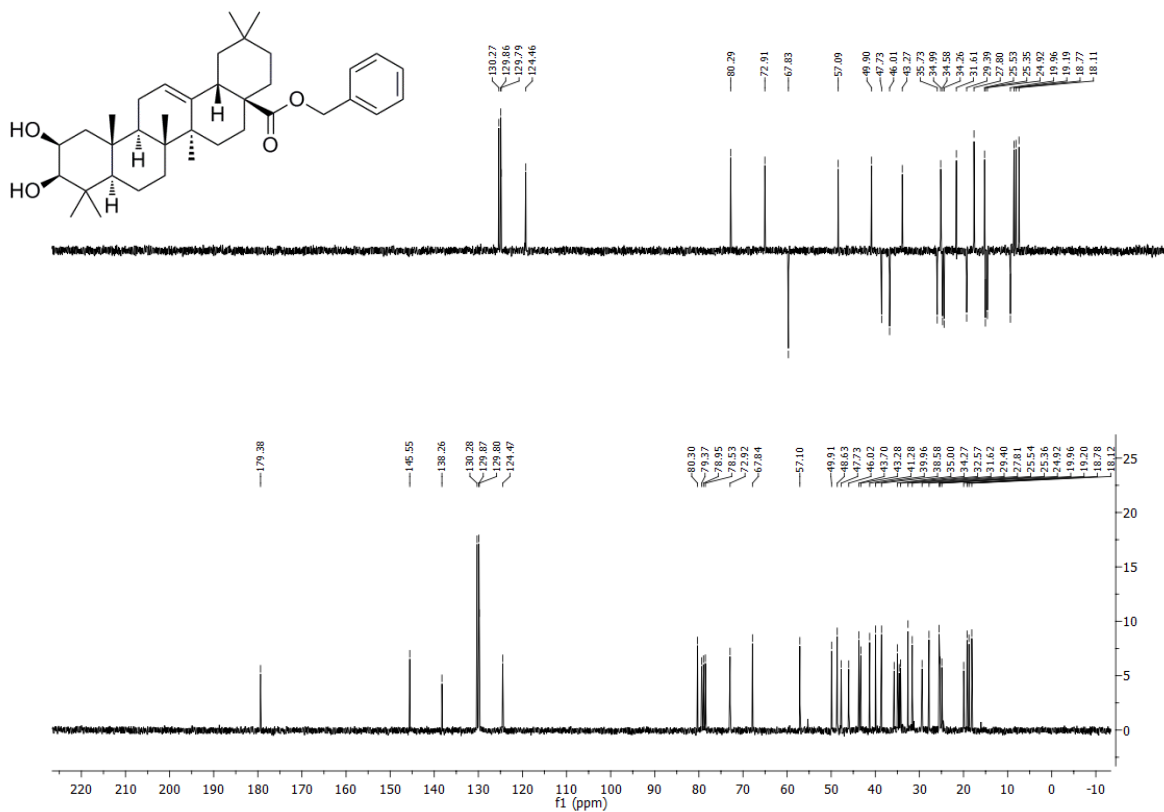
Producto 21

Espectro de ^1H RMN del producto 21Espectro de ^{13}C RMN del producto 21

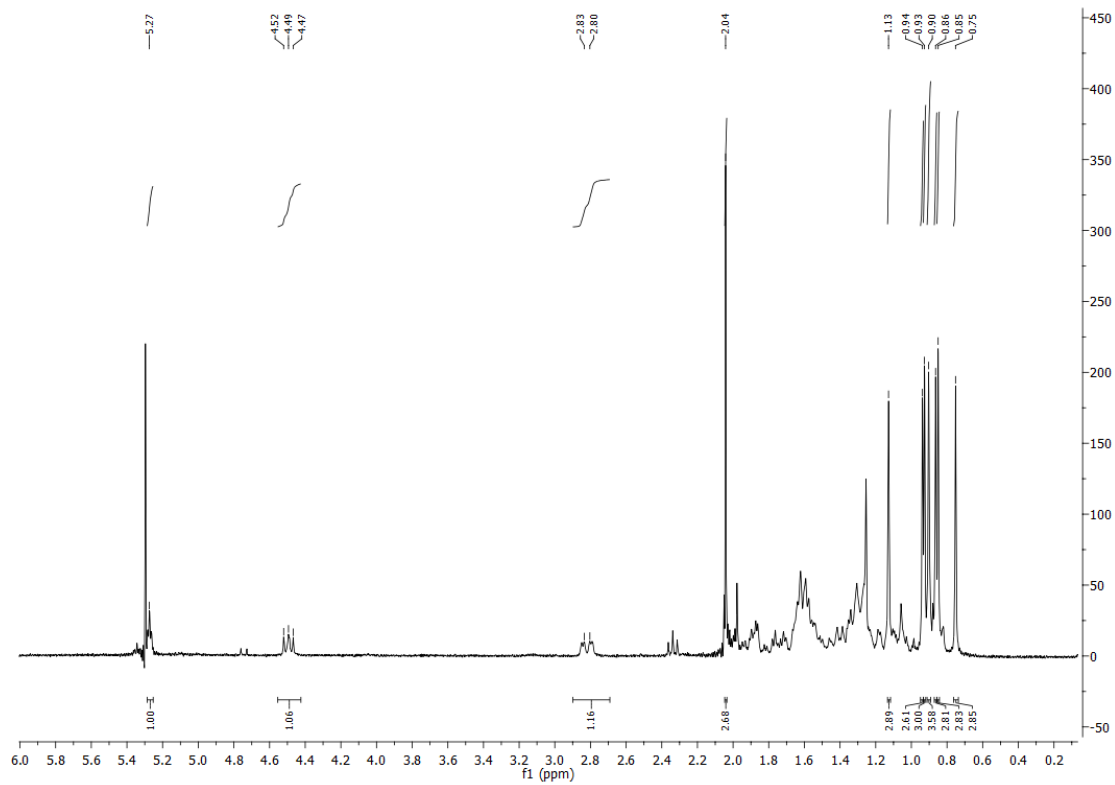
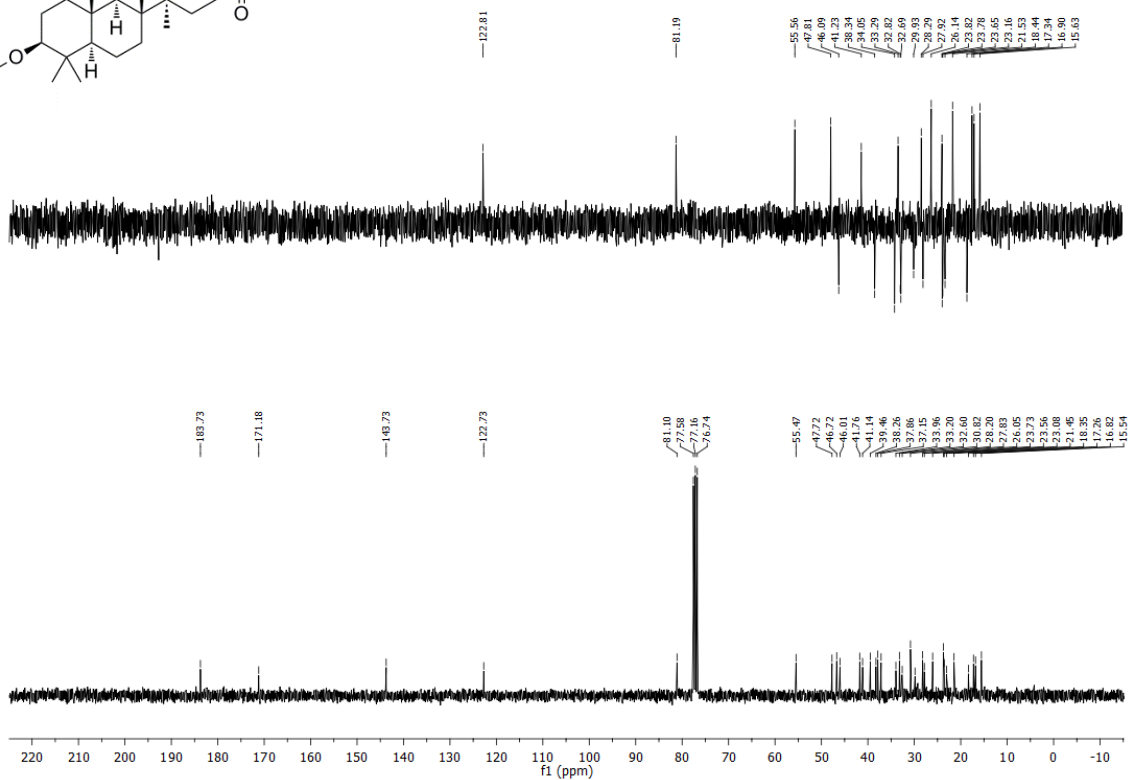
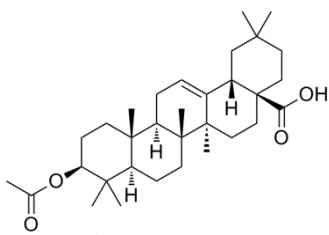
Producto 22

Espectro de ^1H RMN del producto 22Espectro de ^{13}C RMN del producto 22

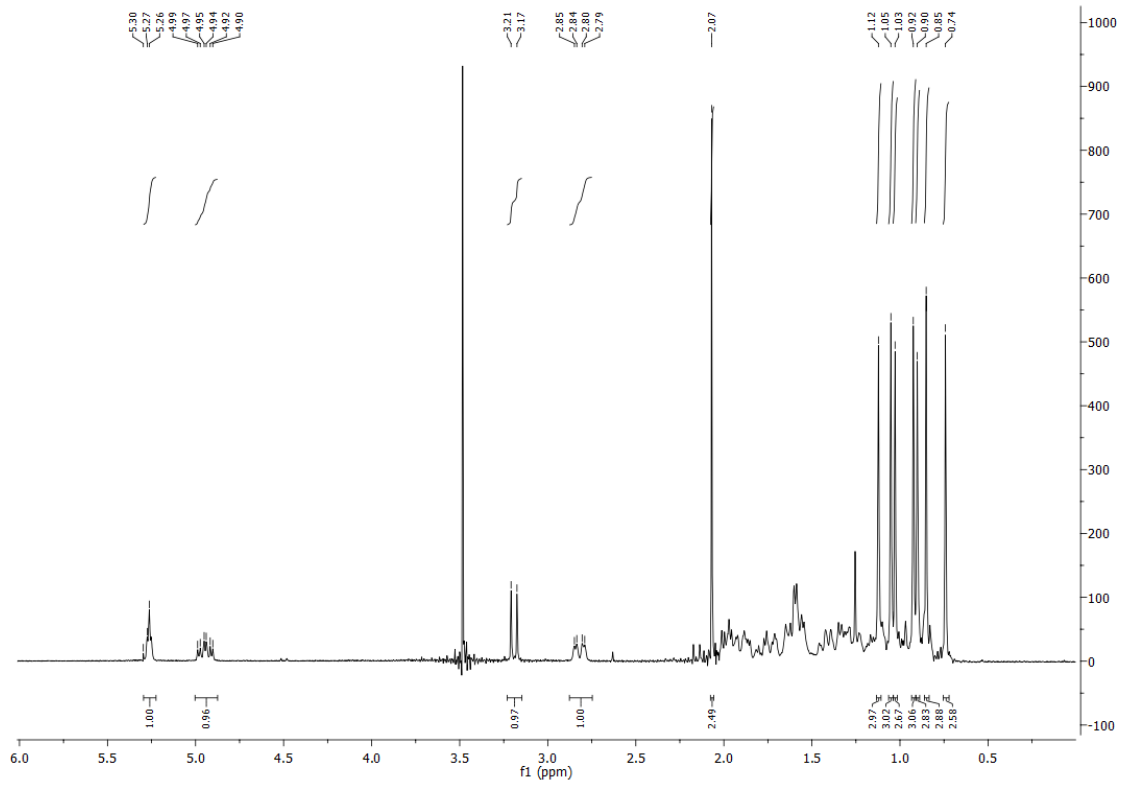
Producto 23

Espectro de ^1H RMN del producto 23Espectro de ^{13}C RMN del producto 23

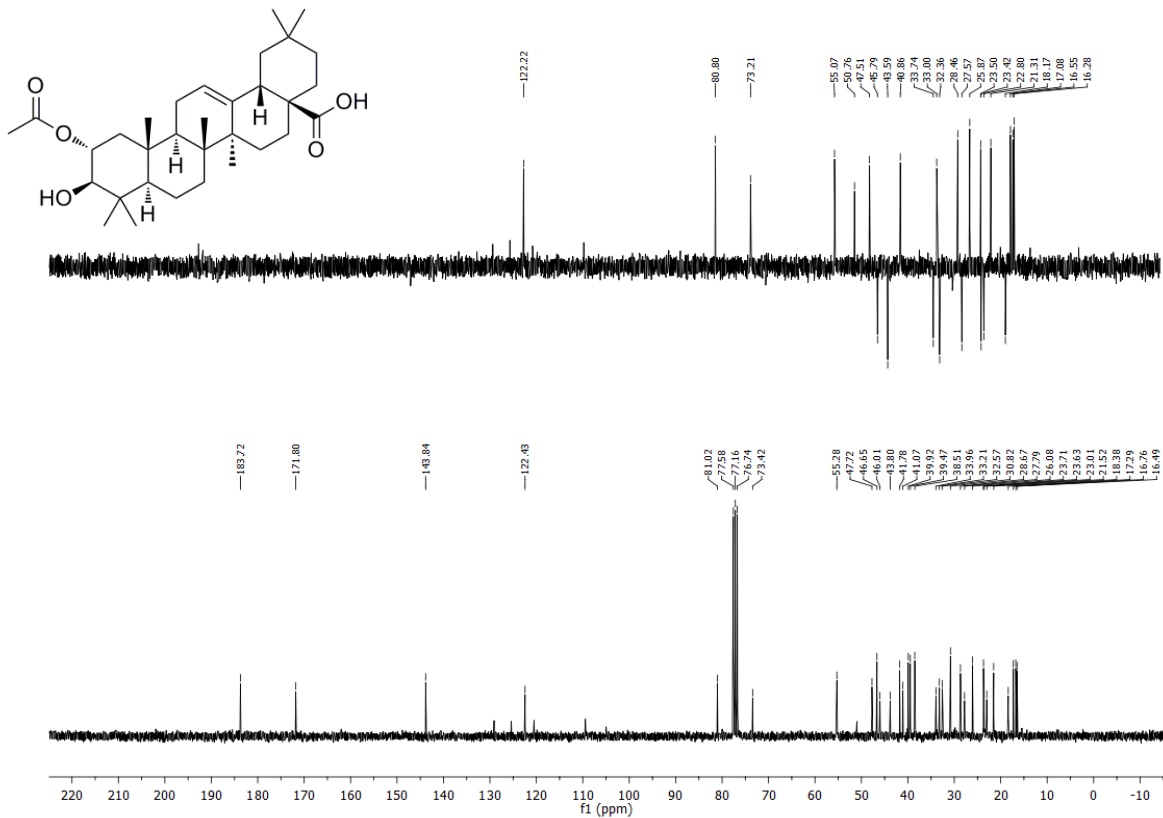
Producto 24

Espectro de ^1H RMN del producto 24Espectro de ^{13}C RMN del producto 24

Producto 25

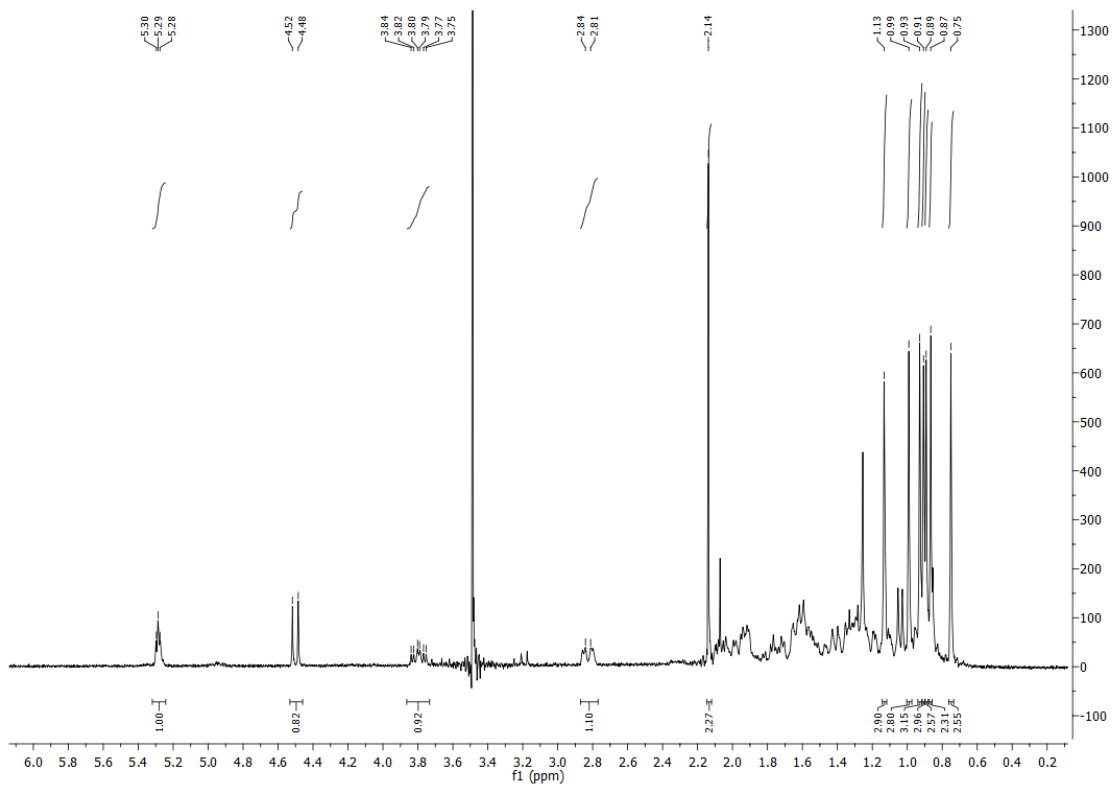
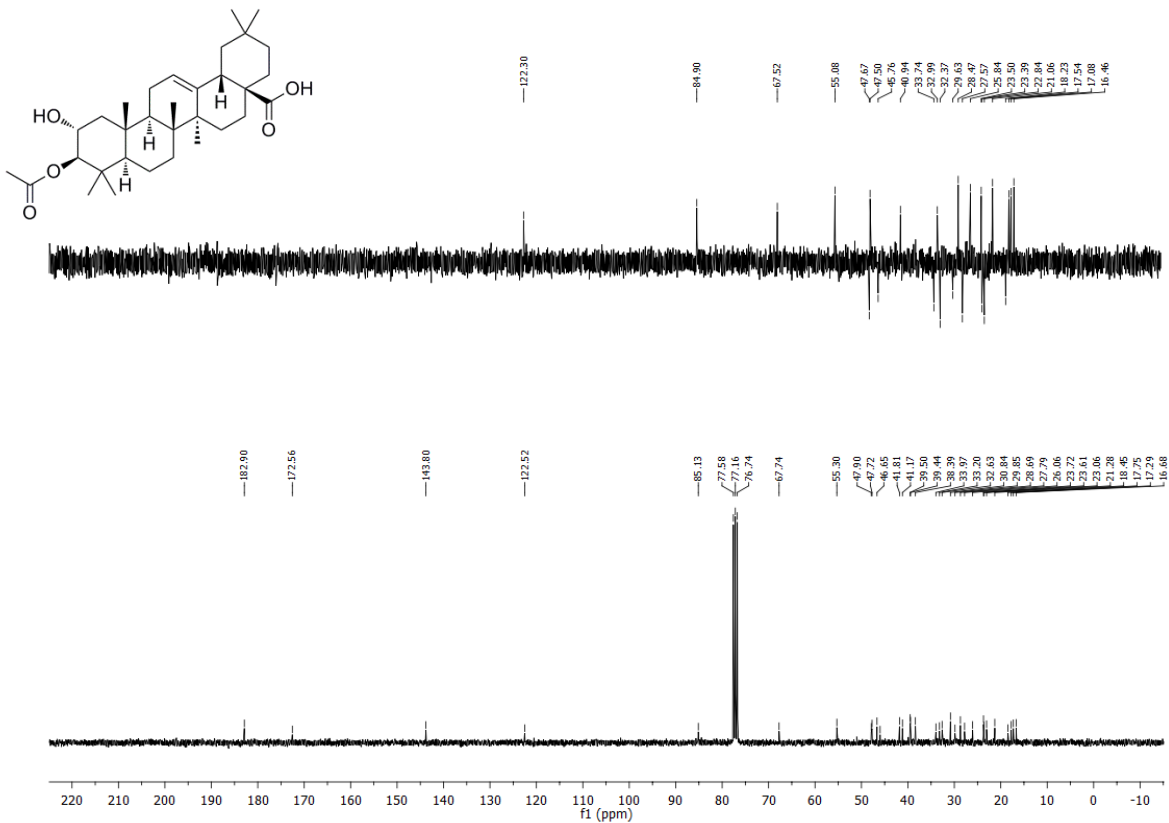


Espectro de ^1H RMN del producto 25

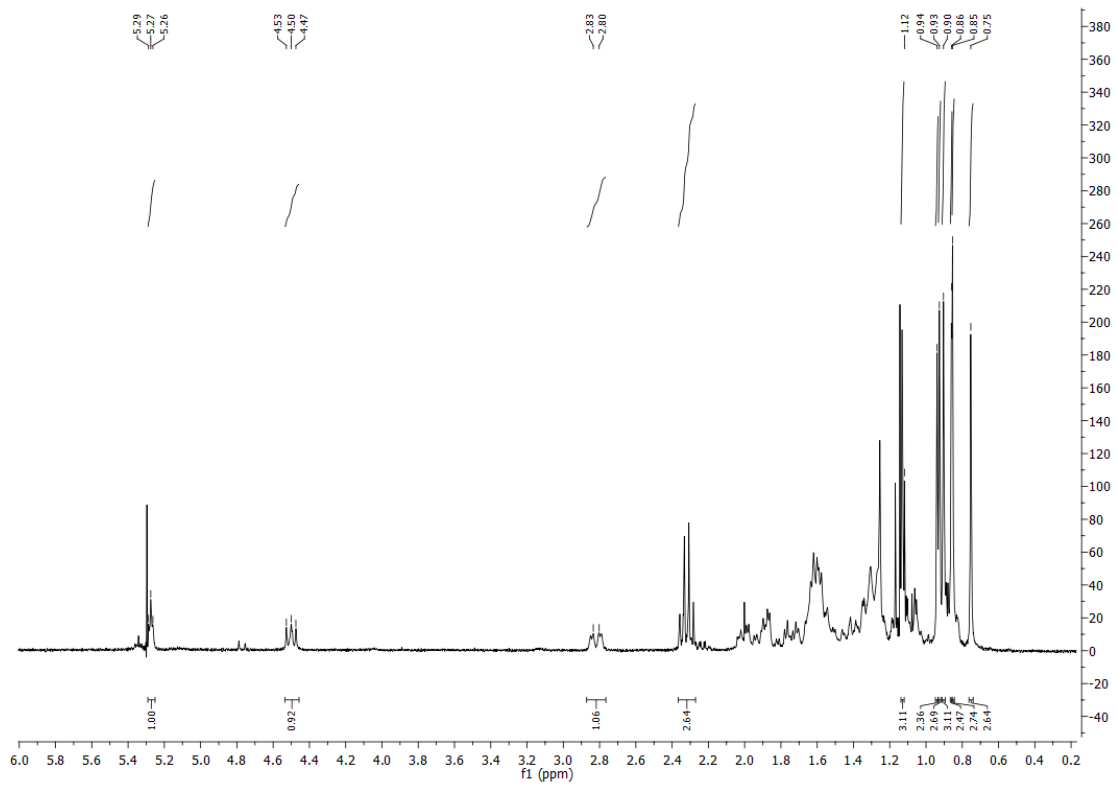
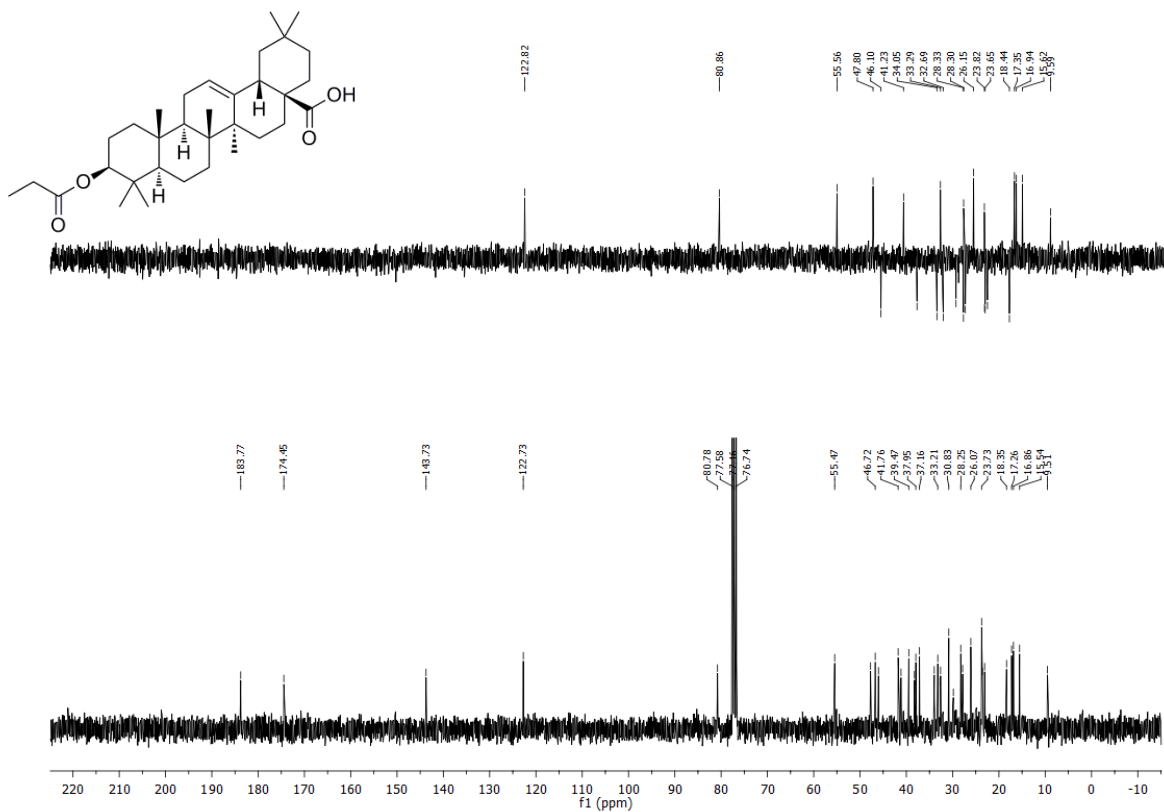


Espectro de ^{13}C RMN del producto 25

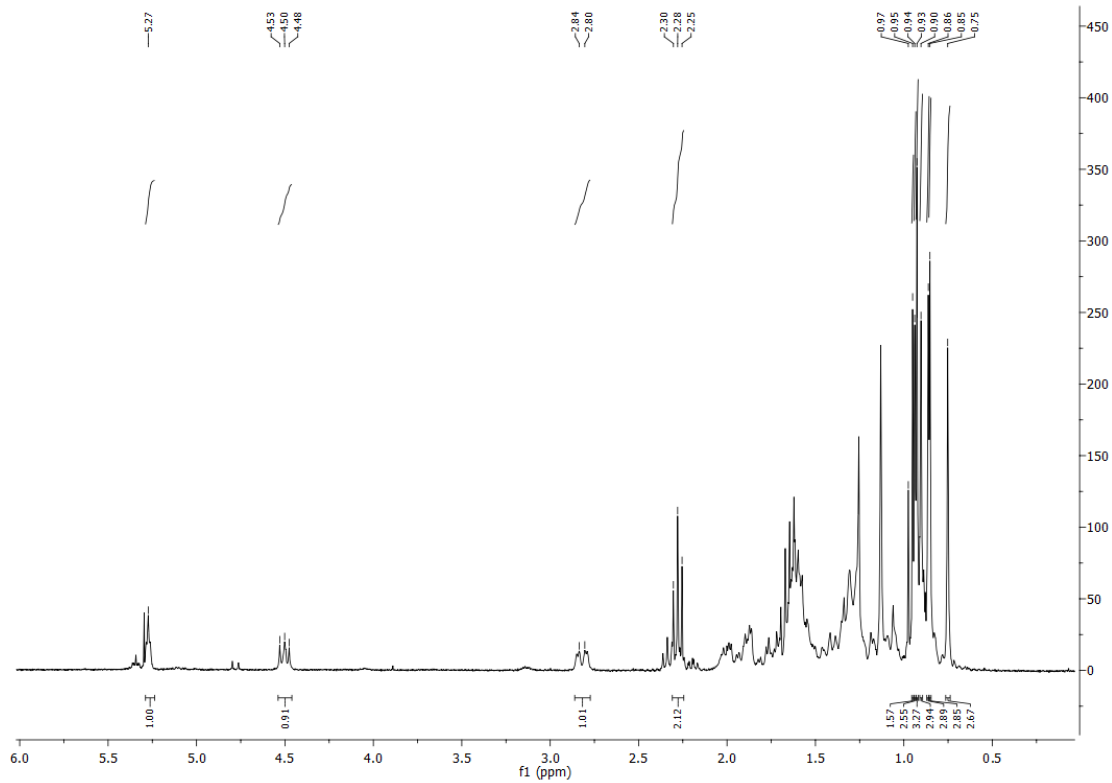
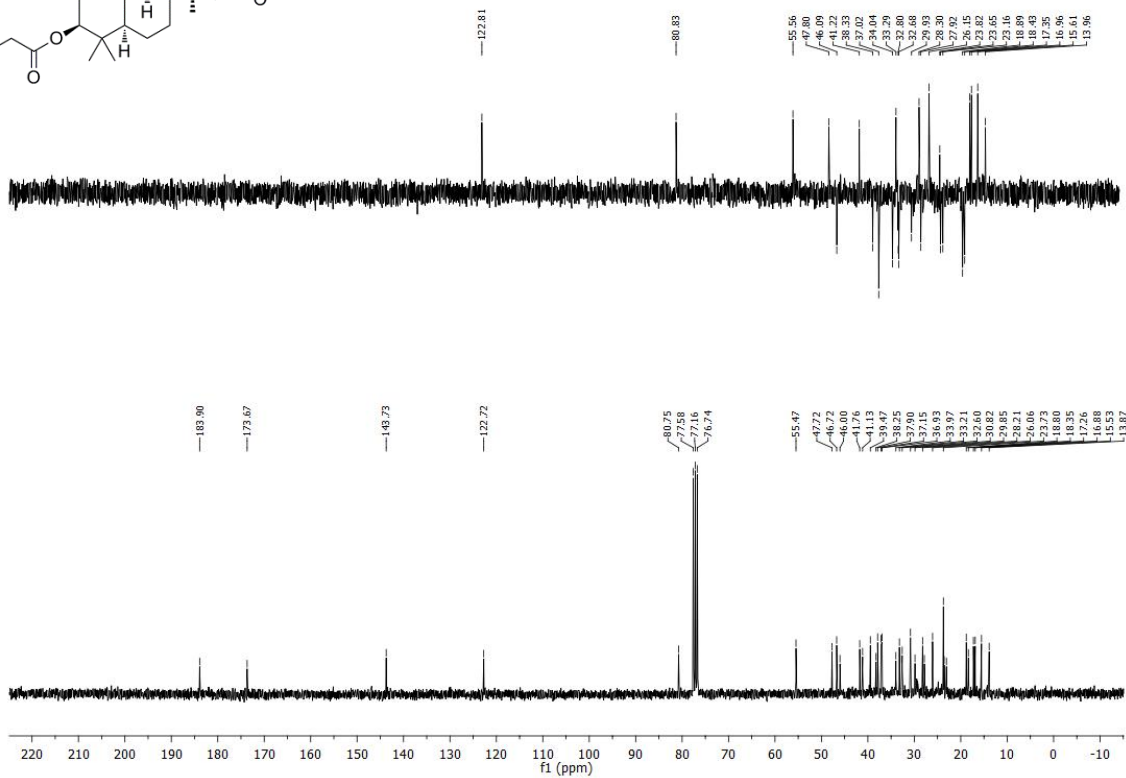
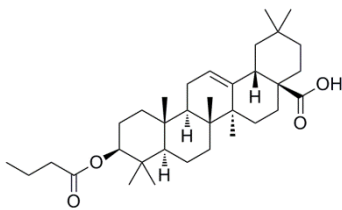
Producto 26

Espectro de ^1H RMN del producto 26Espectro de ^{13}C RMN del producto 26

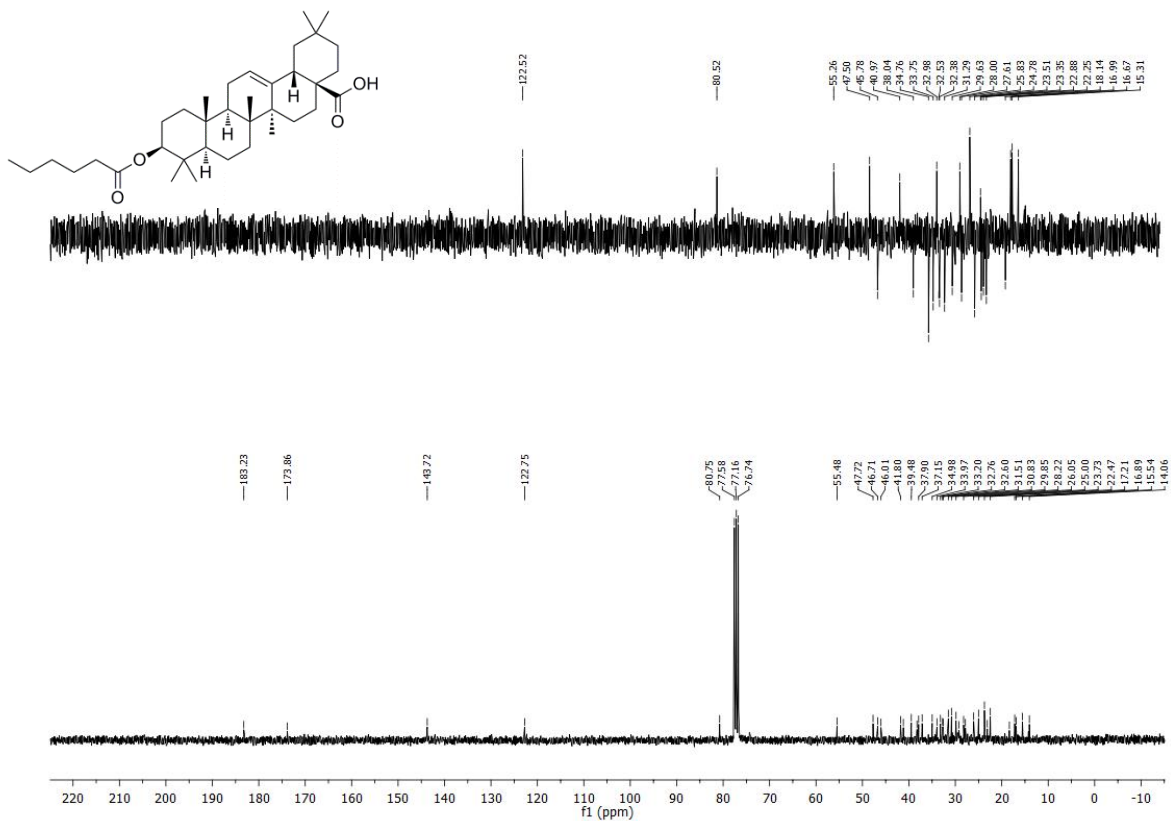
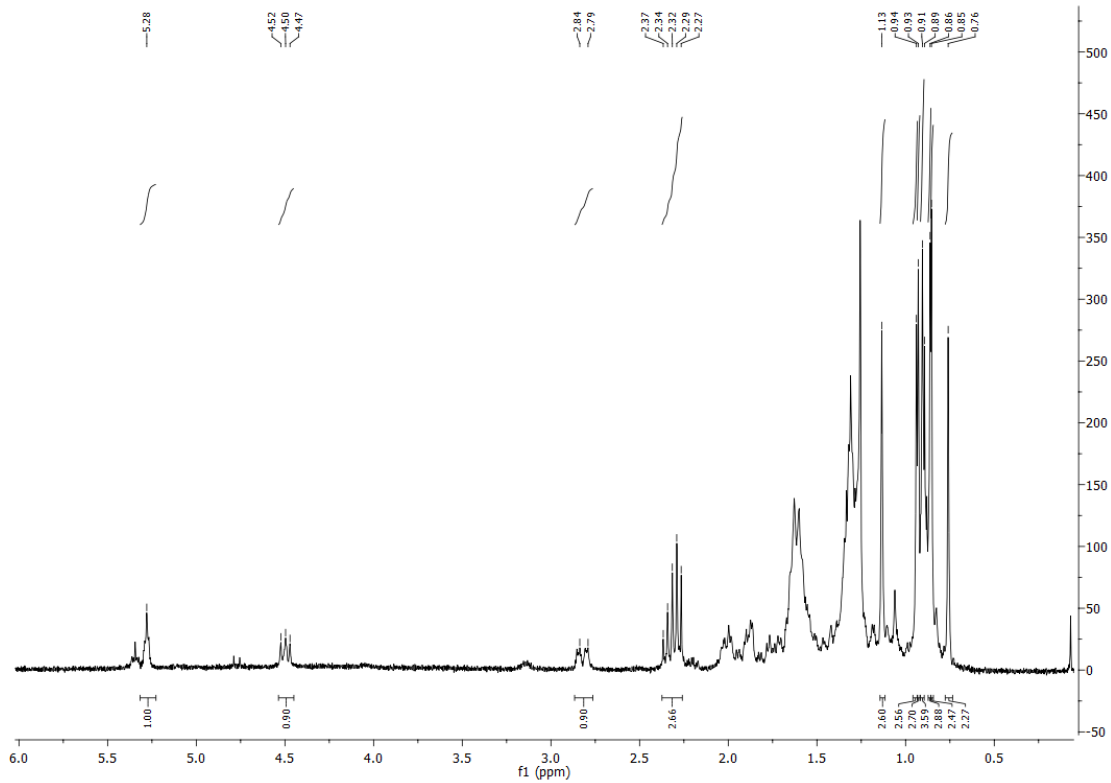
Producto 27

Espectro de ^1H RMN del producto 27Espectro de ^{13}C RMN del producto 27

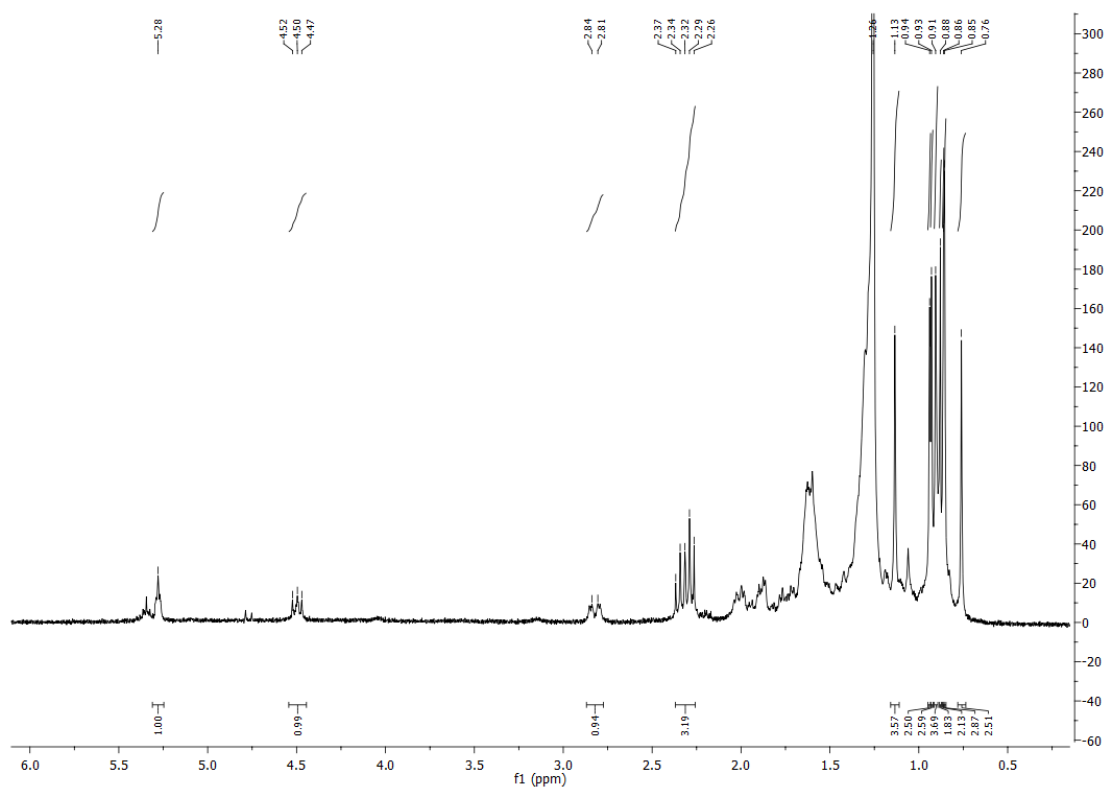
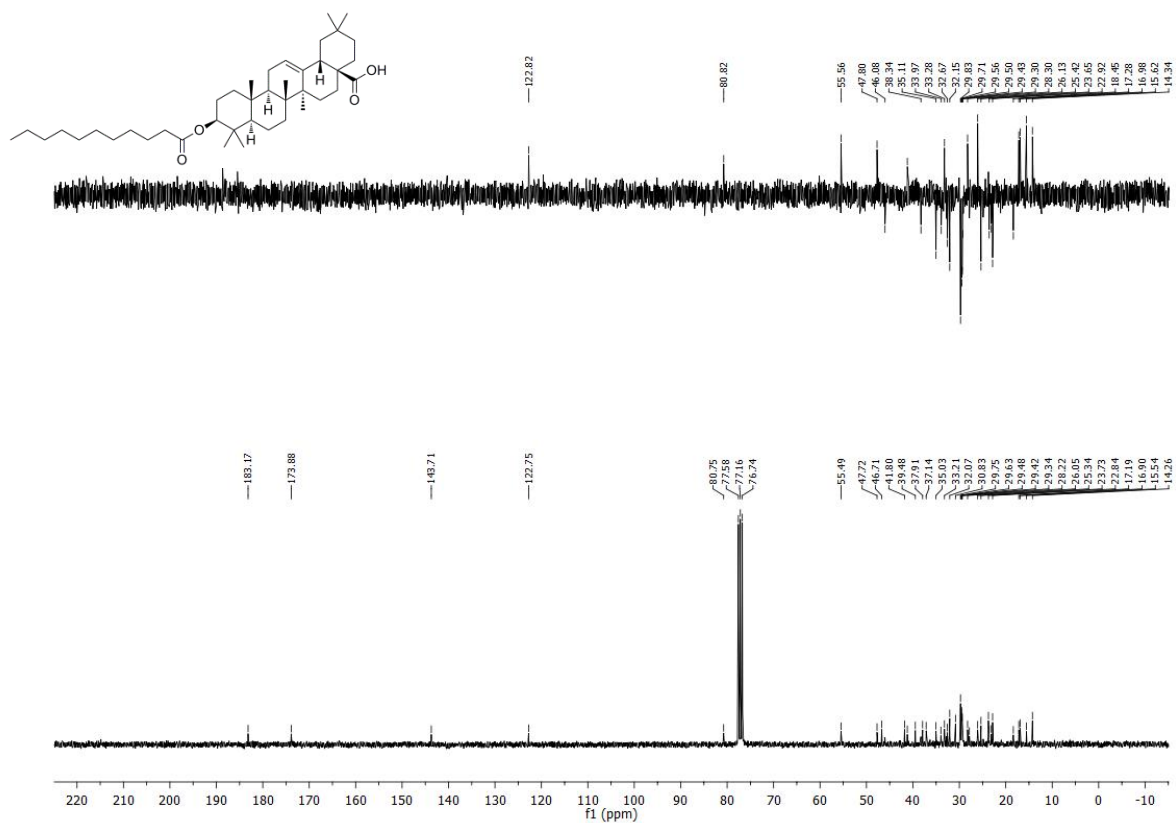
Producto 28

Espectro de ^1H RMN del producto 28Espectro de ^{13}C RMN del producto 28

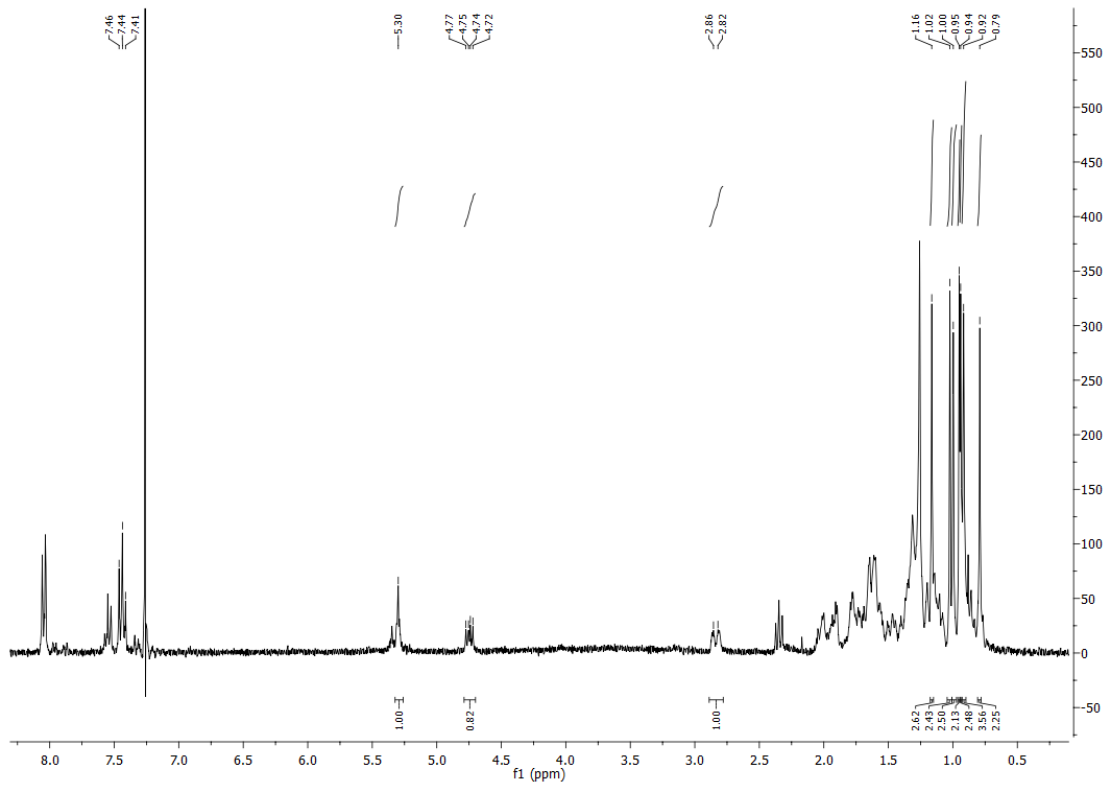
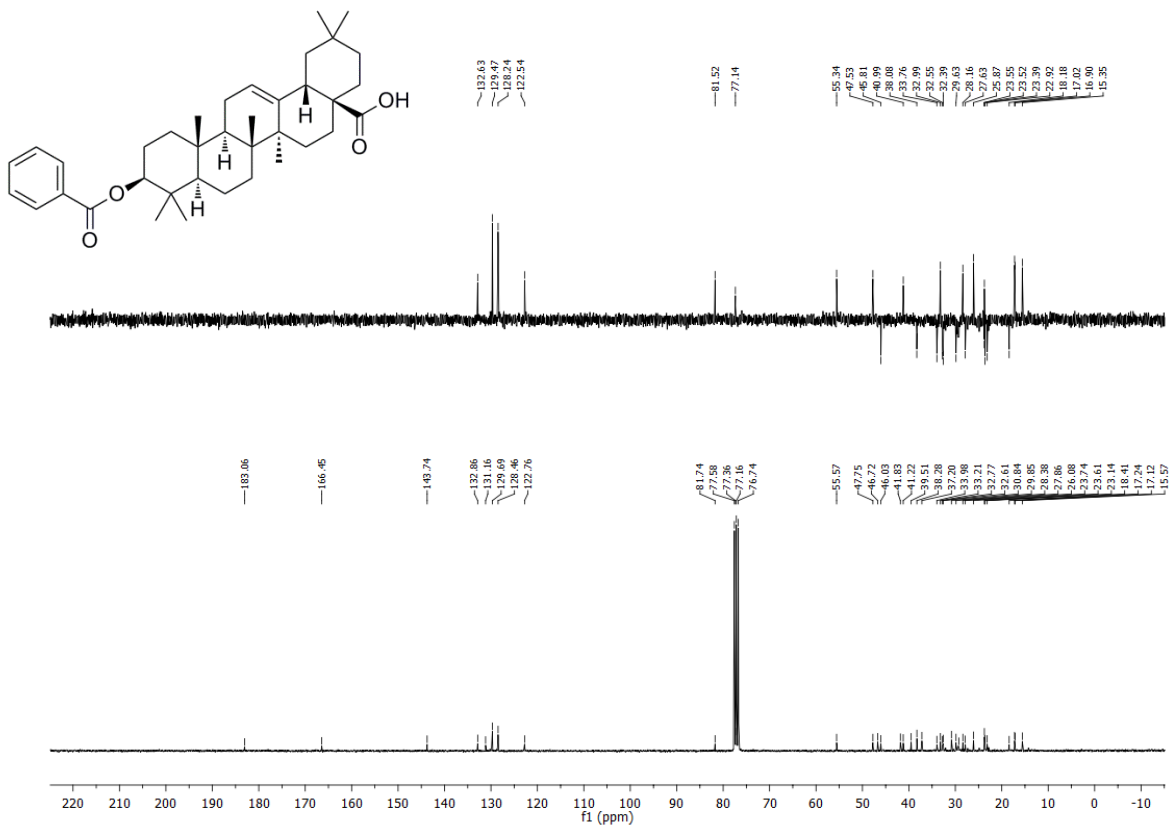
Producto 29



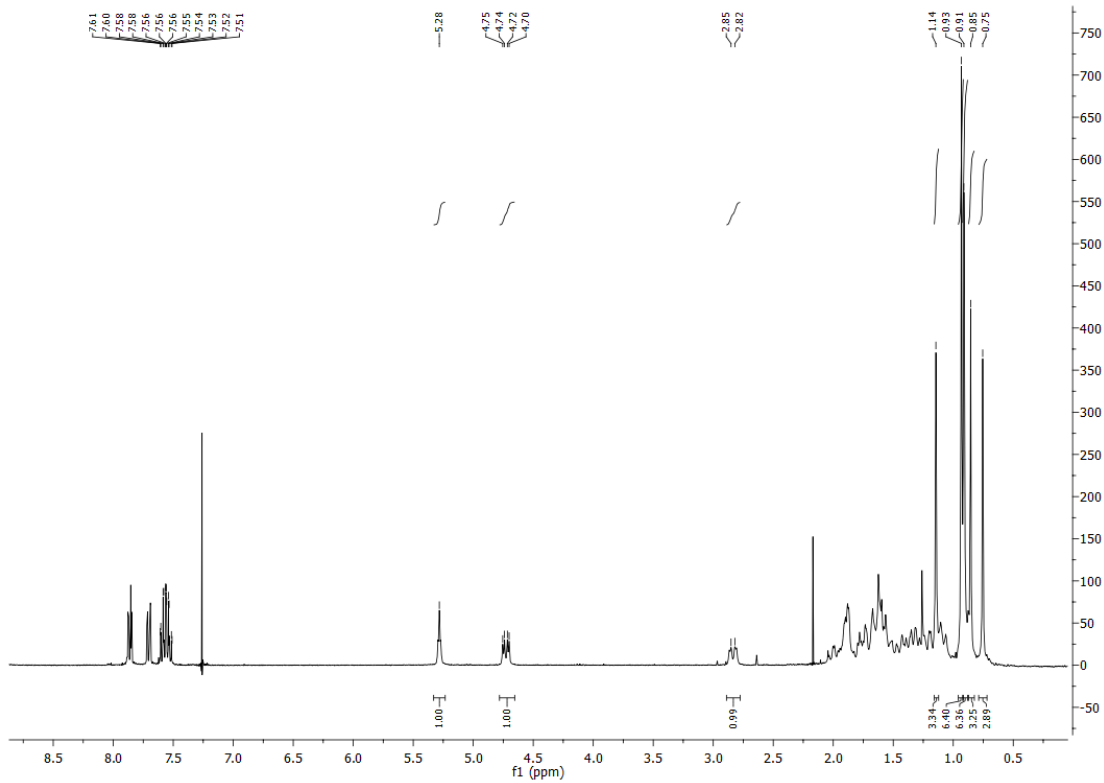
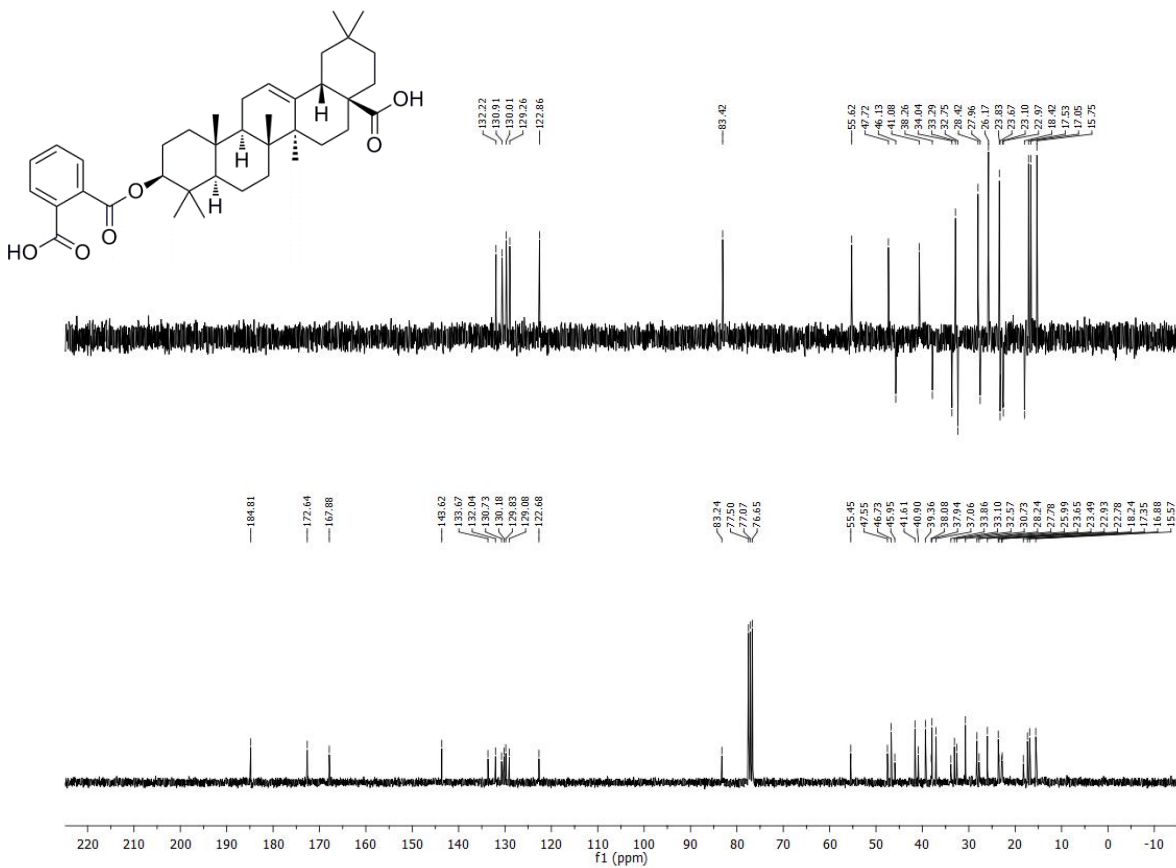
Producto 30

Espectro de ^1H RMN del producto 30Espectro de ^{13}C RMN del producto 30

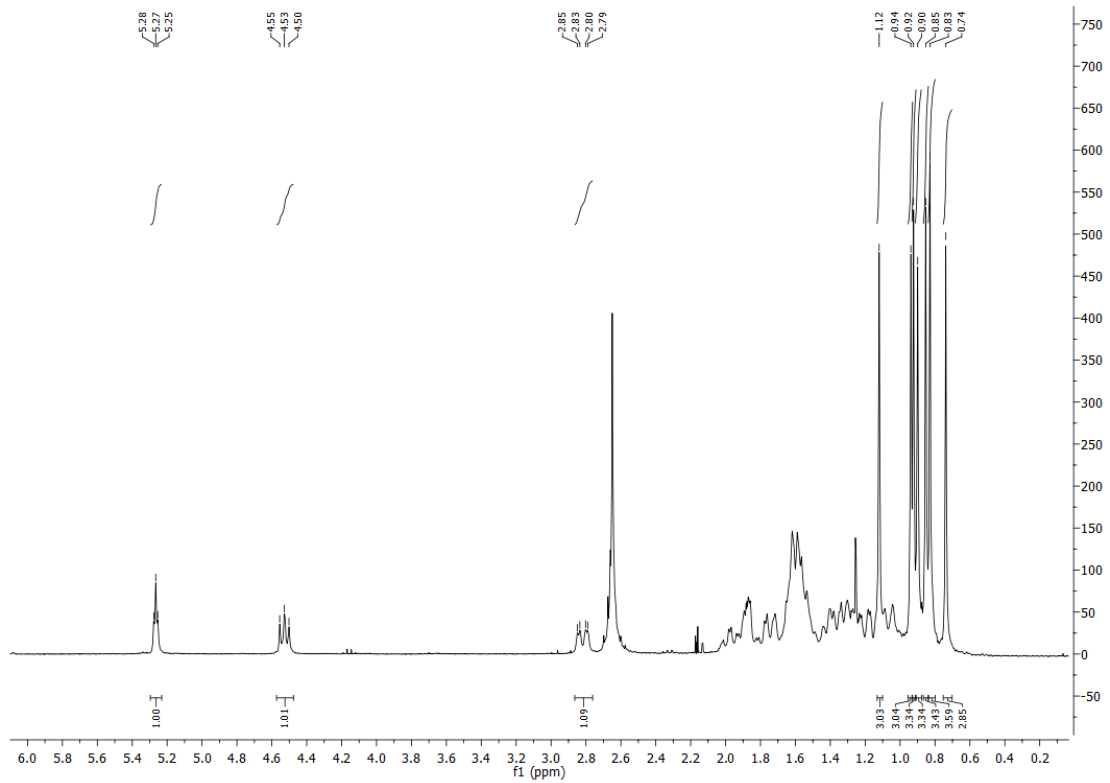
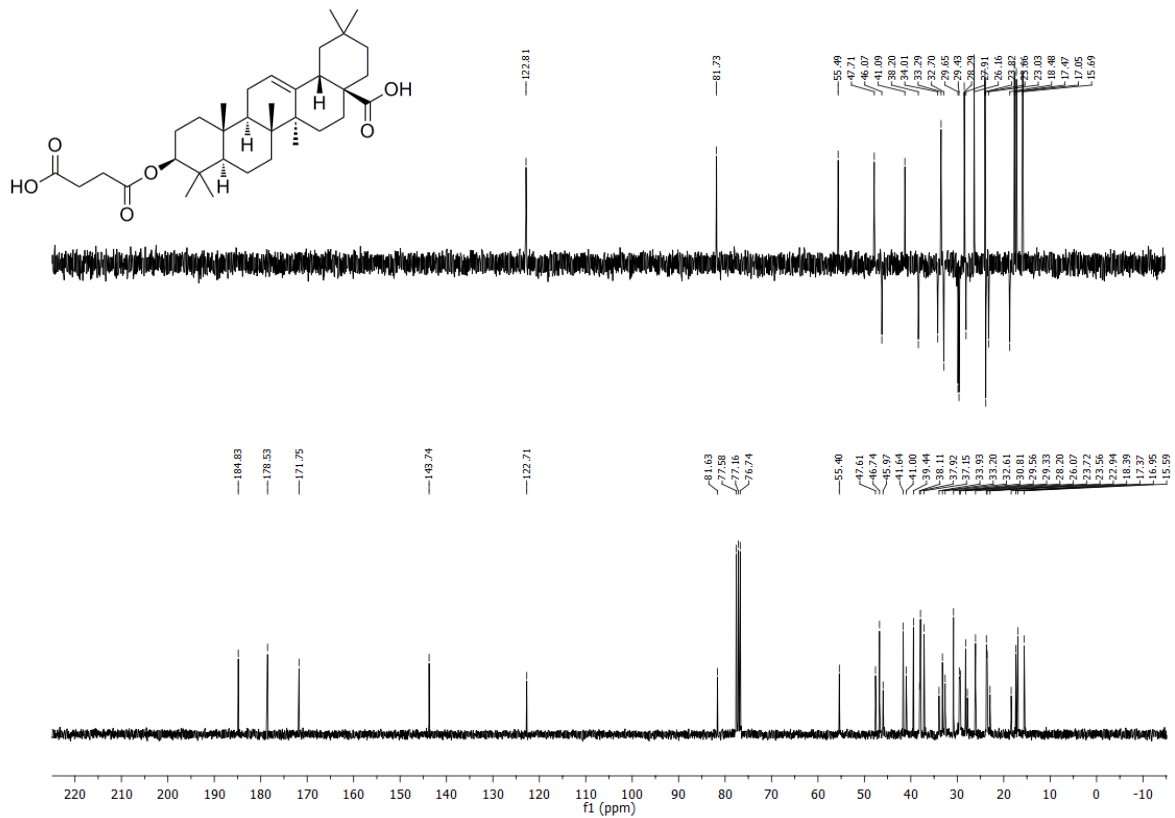
Producto 31

Espectro de ^1H RMN del producto 31Espectro de ^{13}C RMN del producto 31

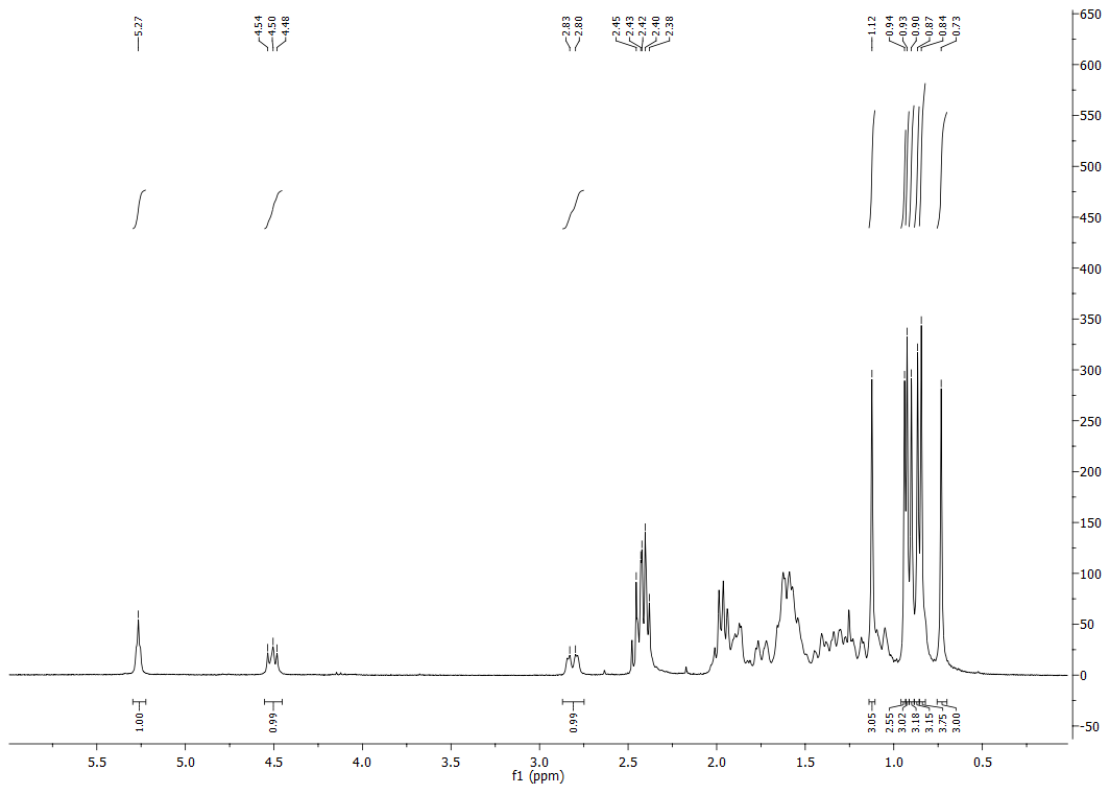
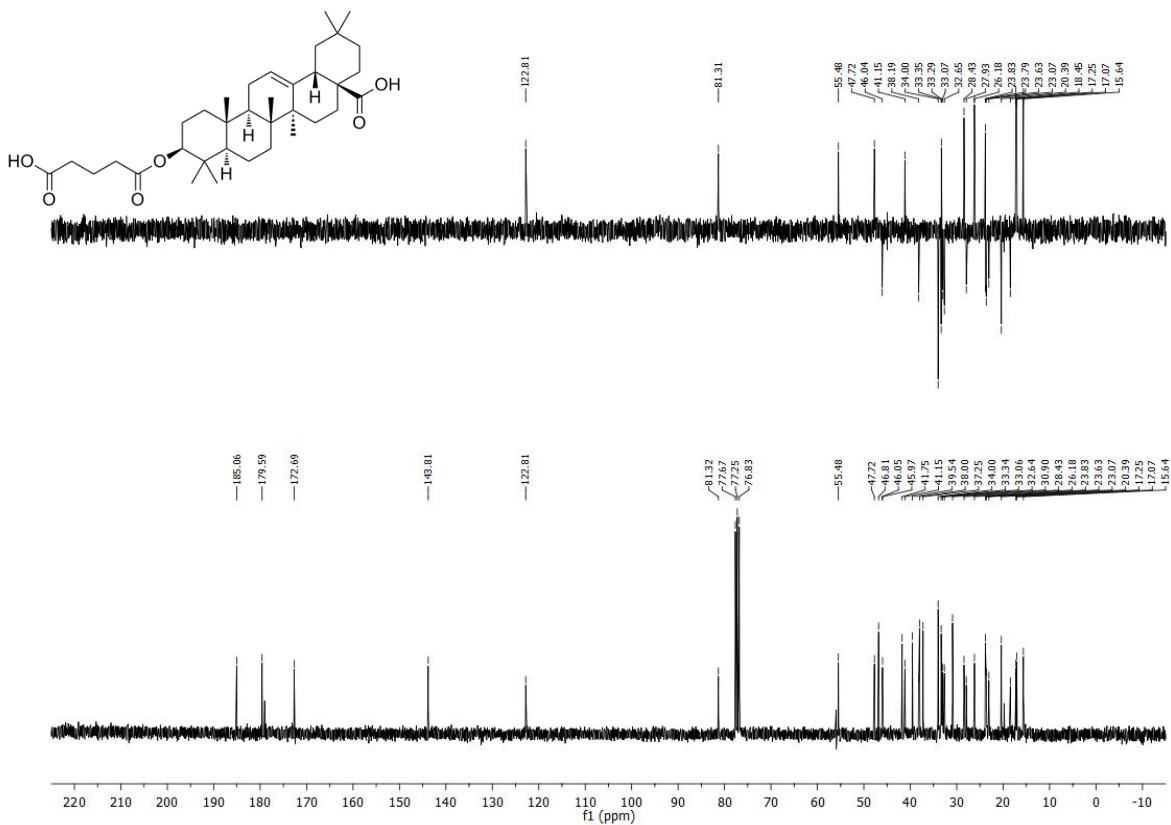
Producto 32

Espectro de ^1H RMN del producto 32Espectro de ^{13}C RMN del producto 32

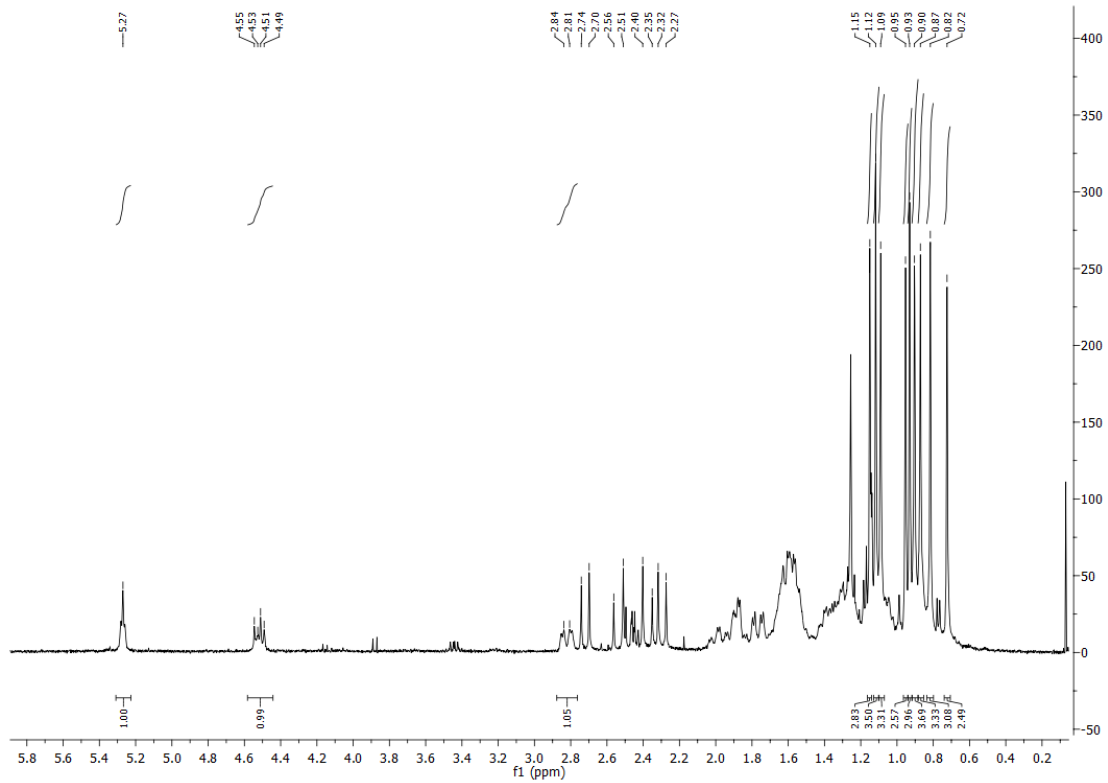
Producto 33

Espectro de ^1H RMN del producto 33Espectro de ^{13}C RMN del producto 33

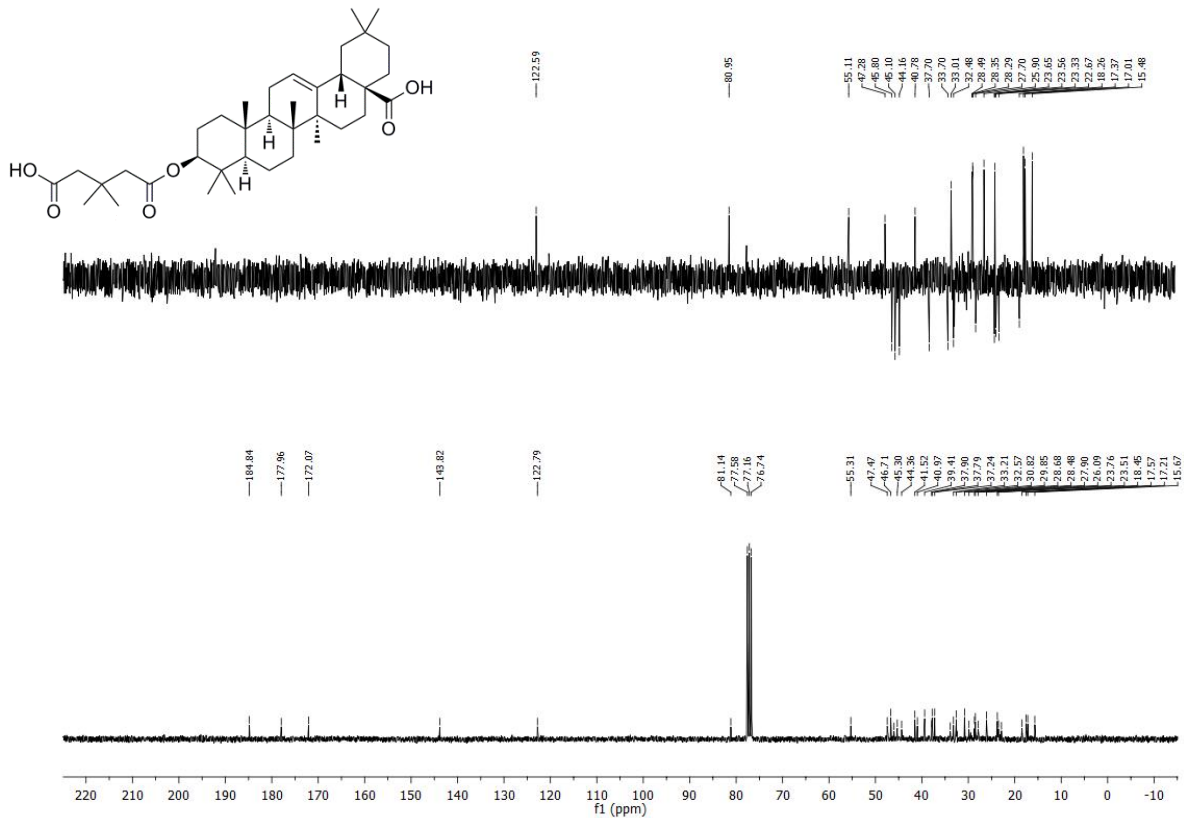
Producto 34

Espectro de ^1H RMN del producto 34Espectro de ^{13}C RMN del producto 34

Producto 35

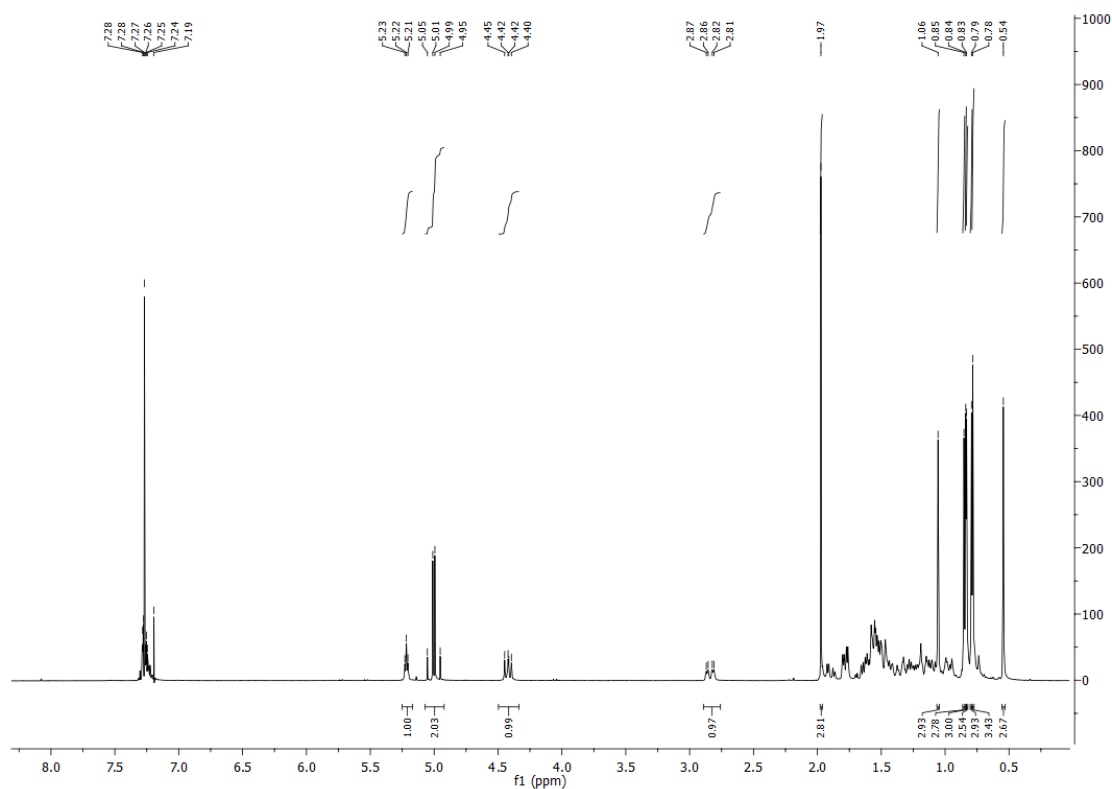
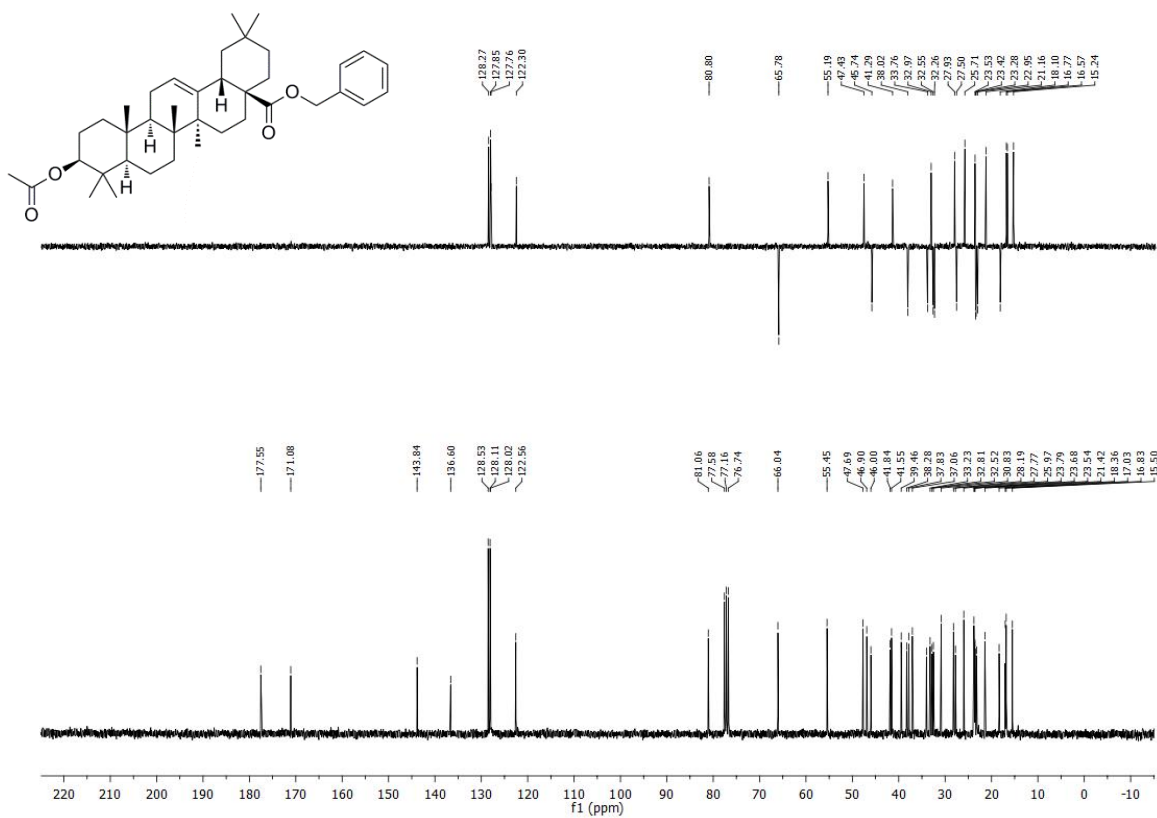


Espectro de ^1H RMN del producto 35

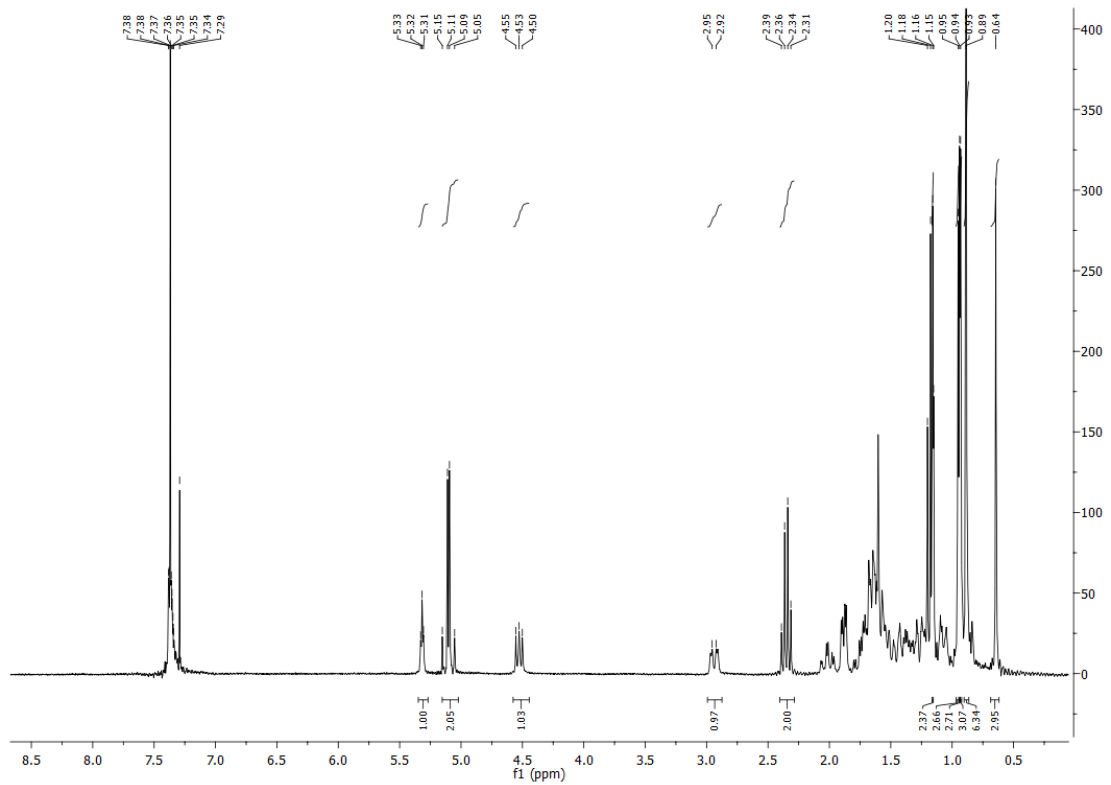
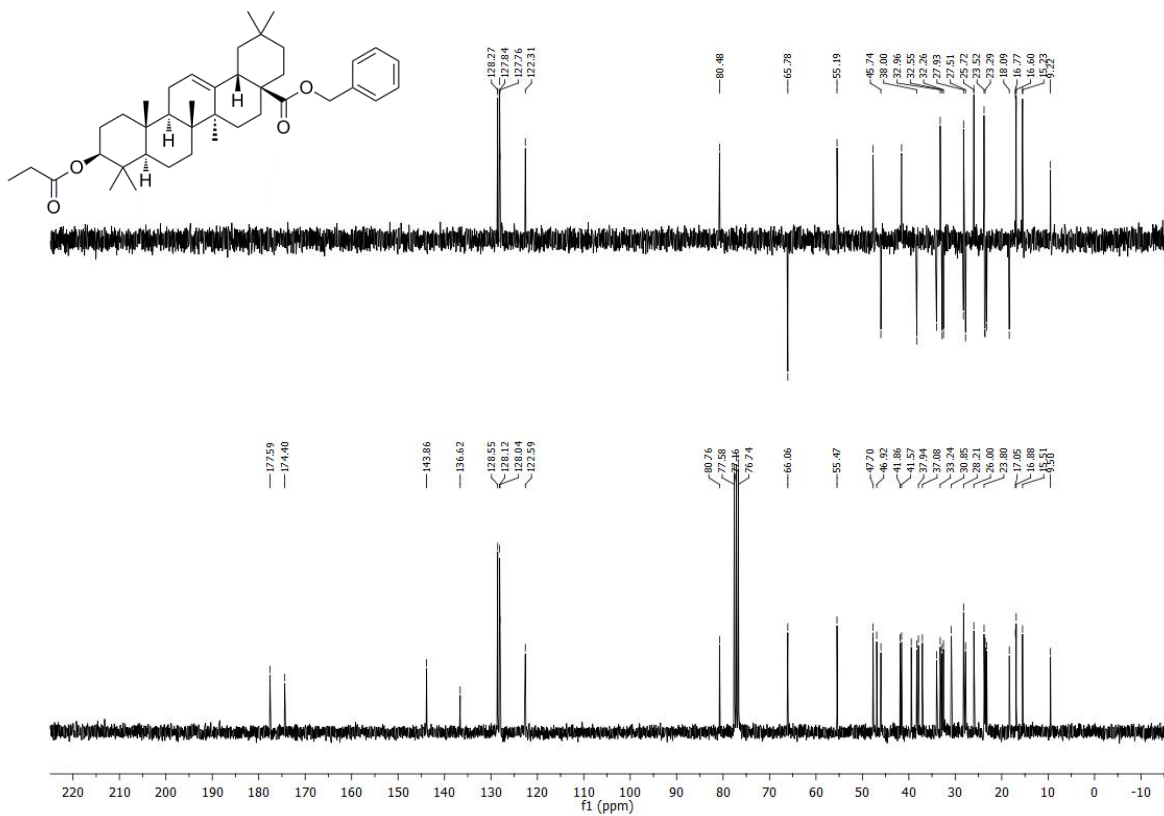


Espectro de ^{13}C RMN del producto 35

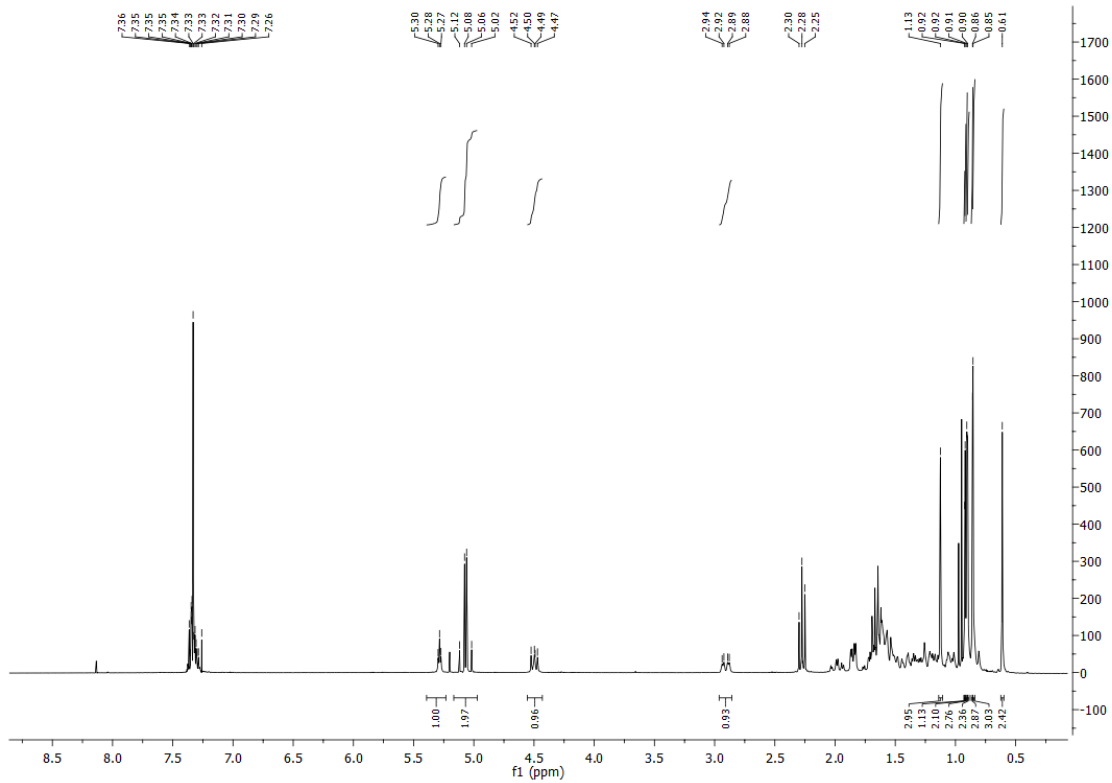
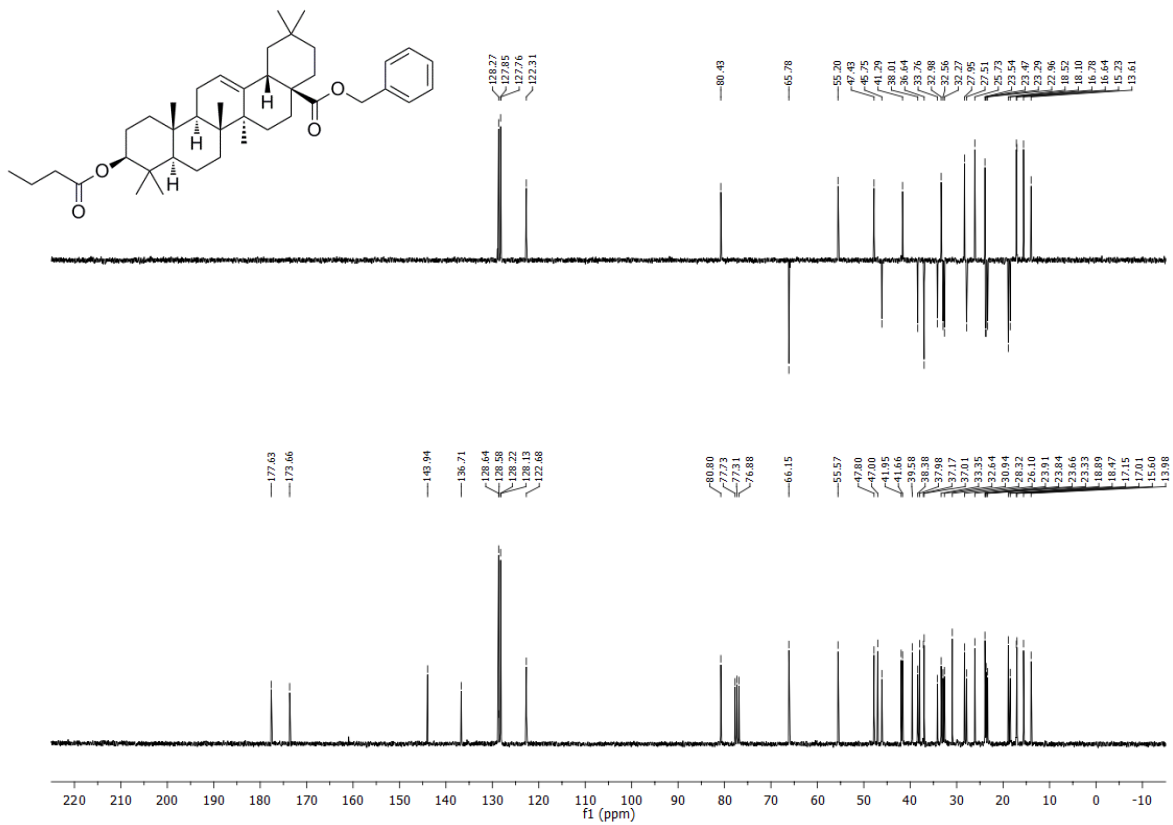
Producto 36

Espectro de ^1H RMN del producto 36Espectro de ^{13}C RMN del producto 36

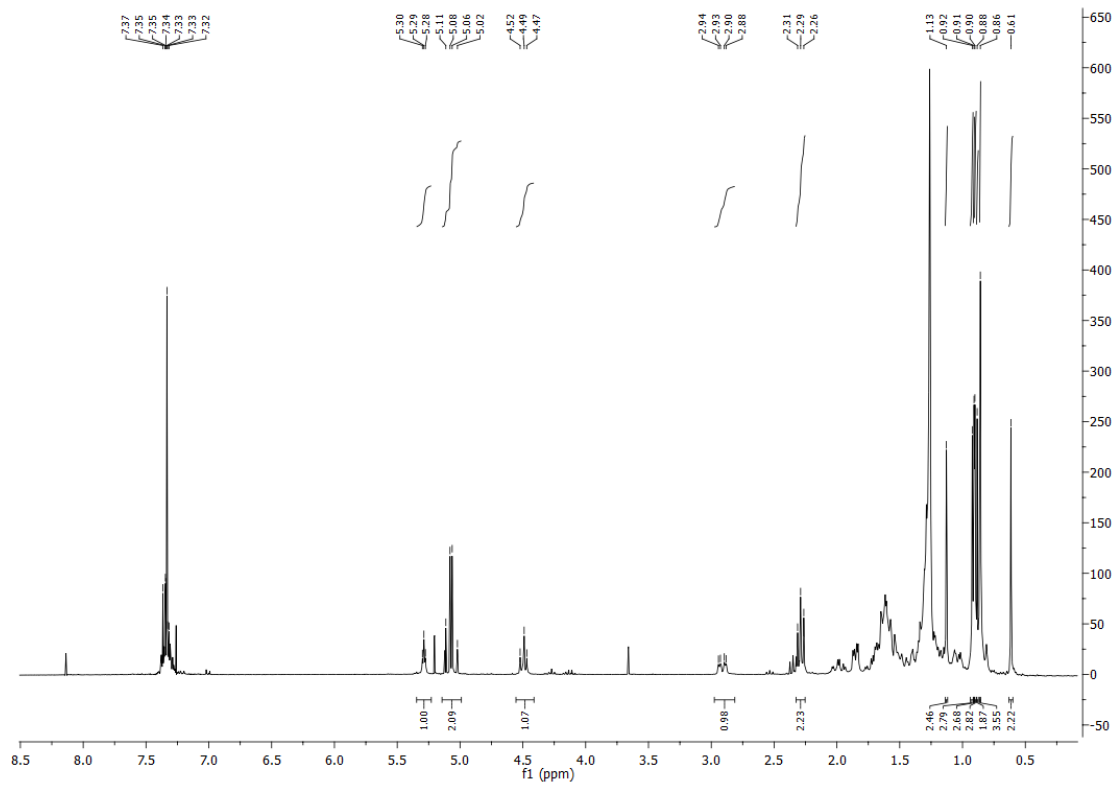
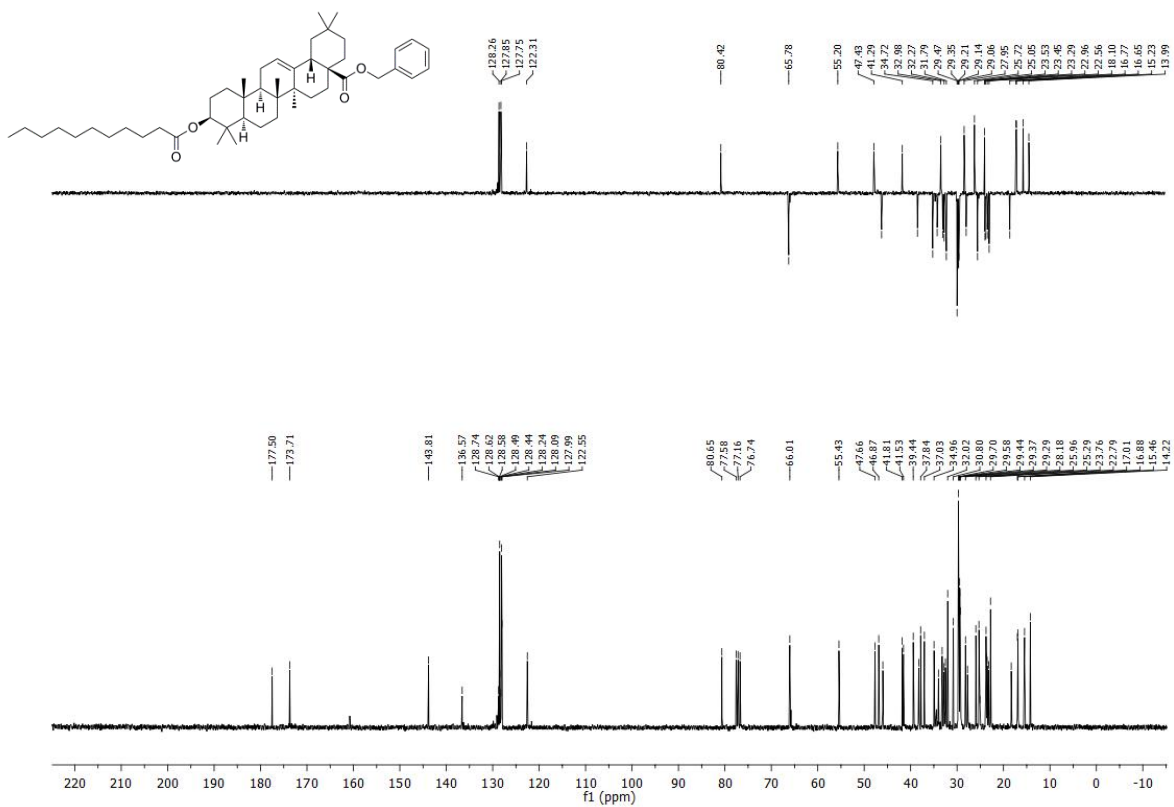
Producto 37

Espectro de ^1H RMN del producto 37Espectro de ^{13}C RMN del producto 37

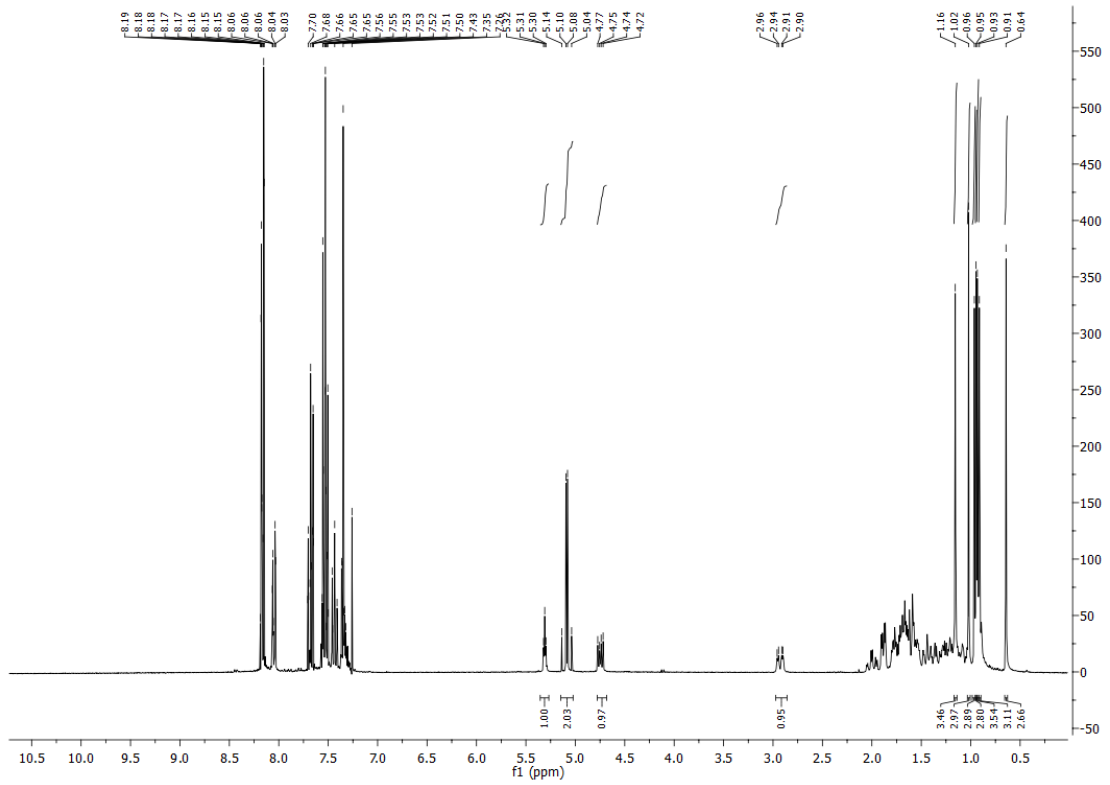
Producto 38

Espectro de ^1H RMN del producto 38Espectro de ^{13}C RMN del producto 38

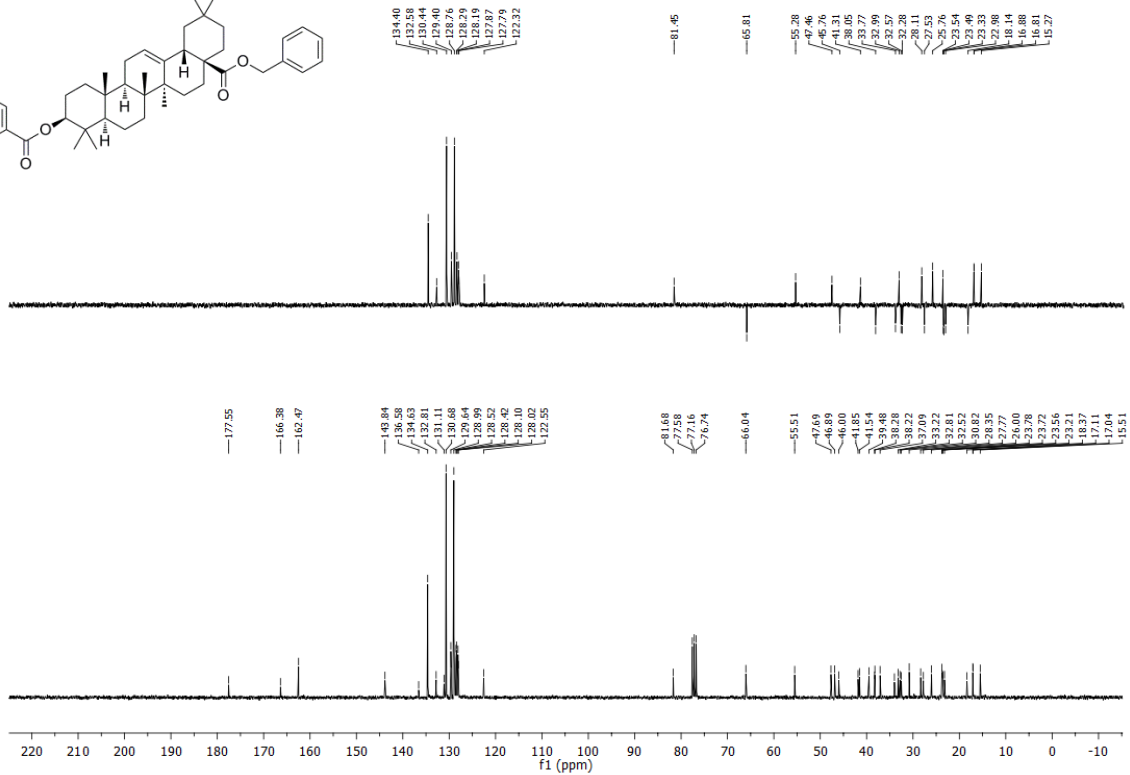
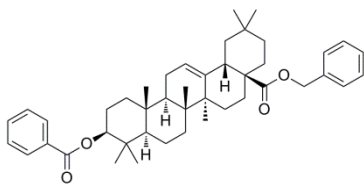
Producto 40

Espectro de ^1H RMN del producto 40Espectro de ^{13}C RMN del producto 40

Producto 41

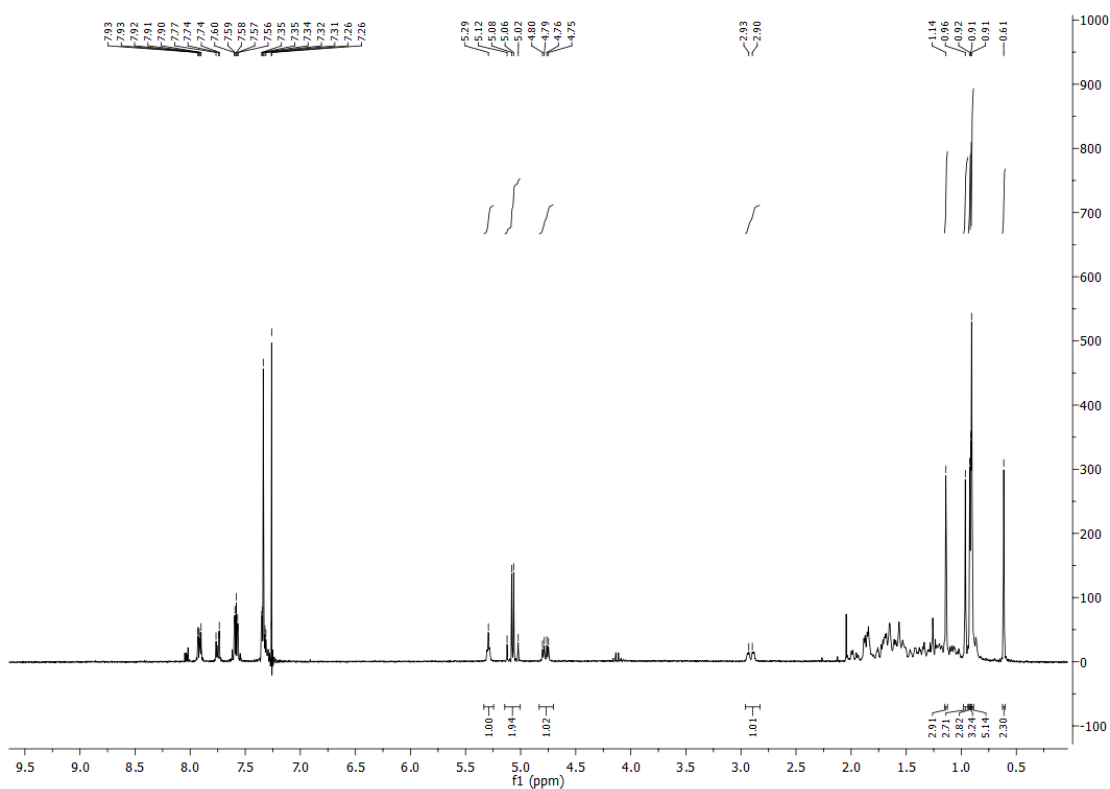
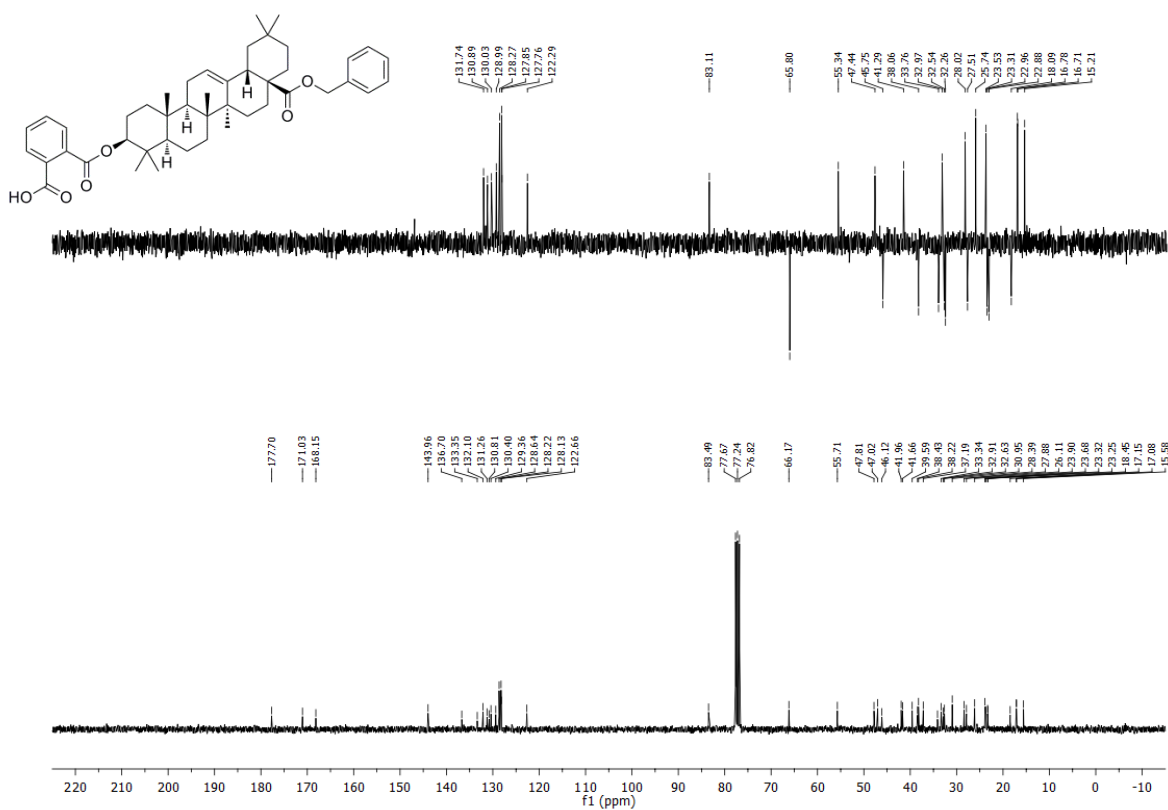


Espectro de ¹H RMN del producto 41

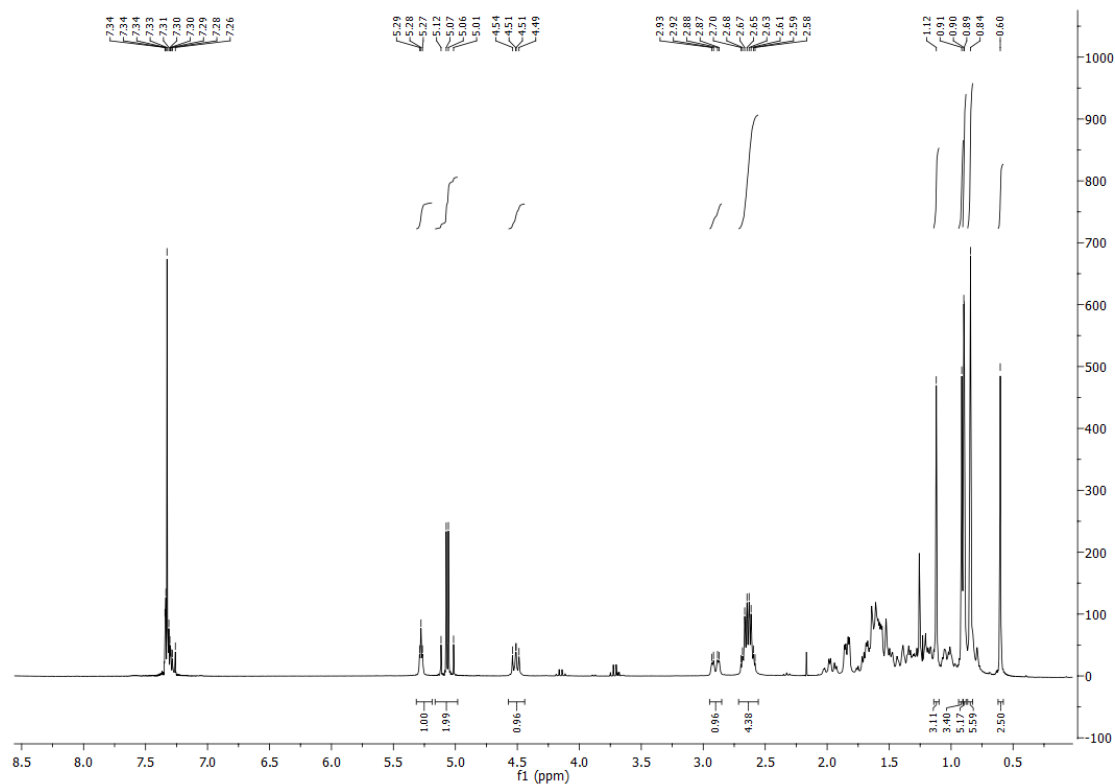


Espectro de ¹³C RMN del producto 41

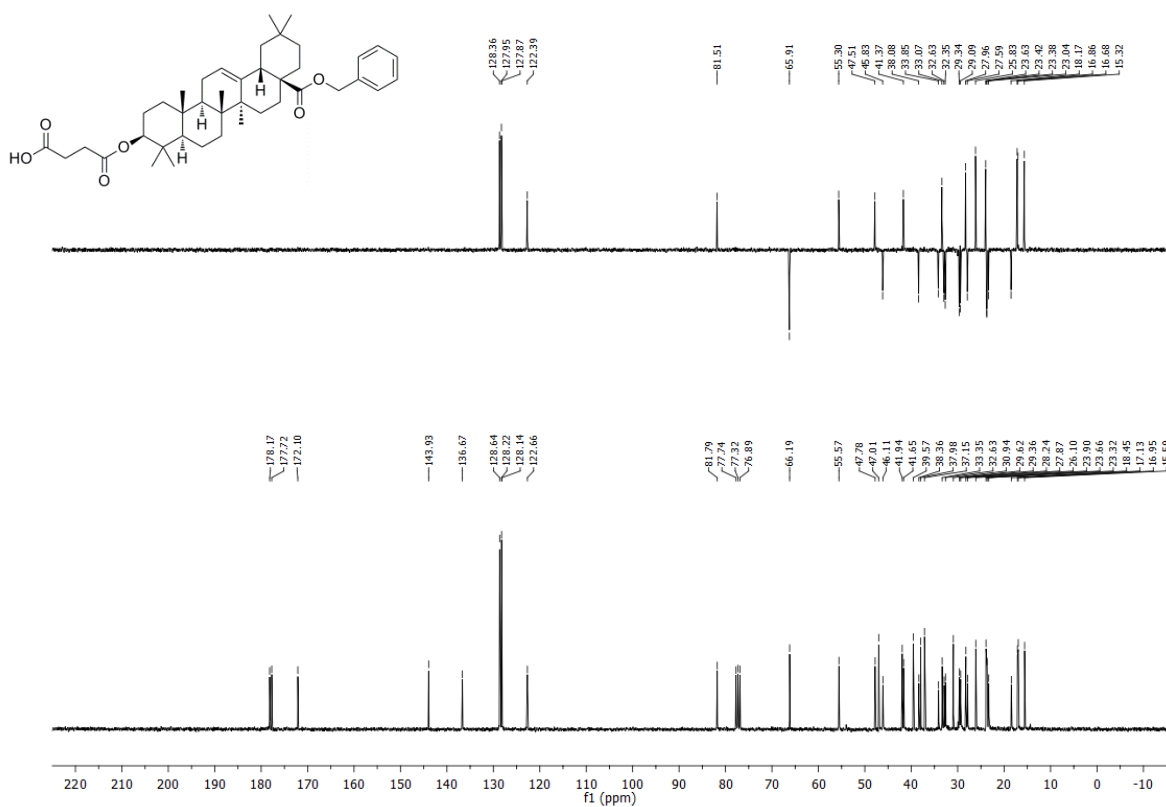
Producto 42

Espectro de ^1H RMN del producto 42Espectro de ^{13}C RMN del producto 42

Producto 43

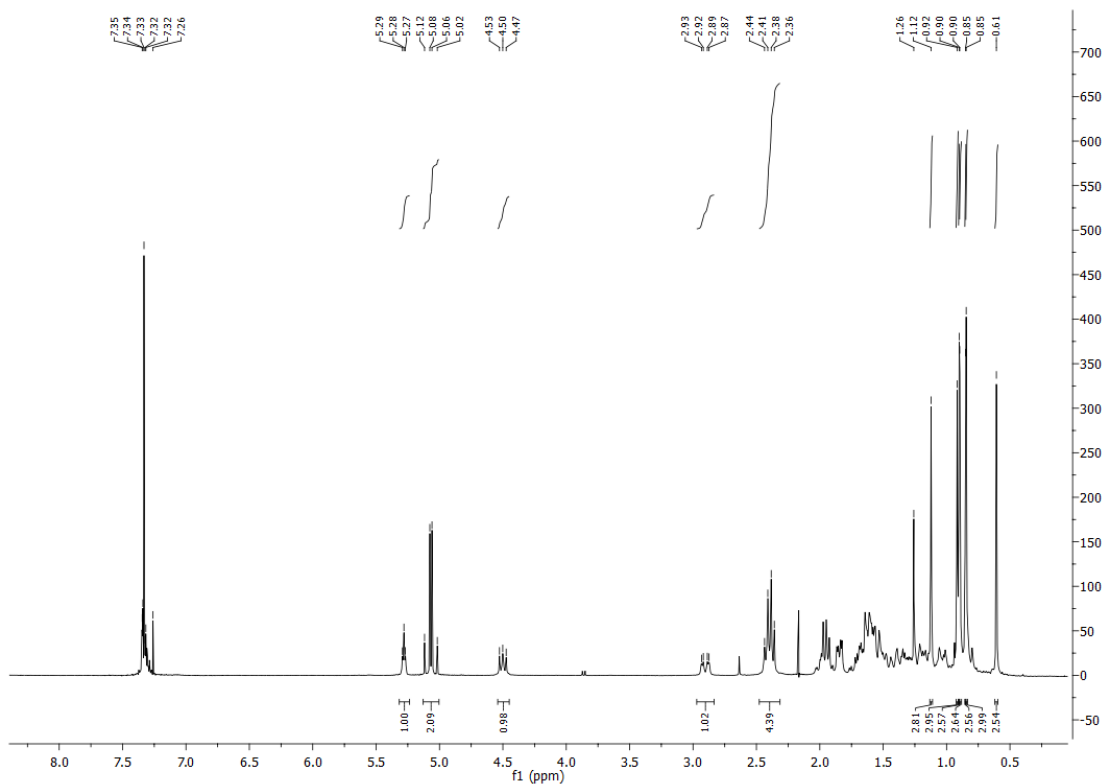
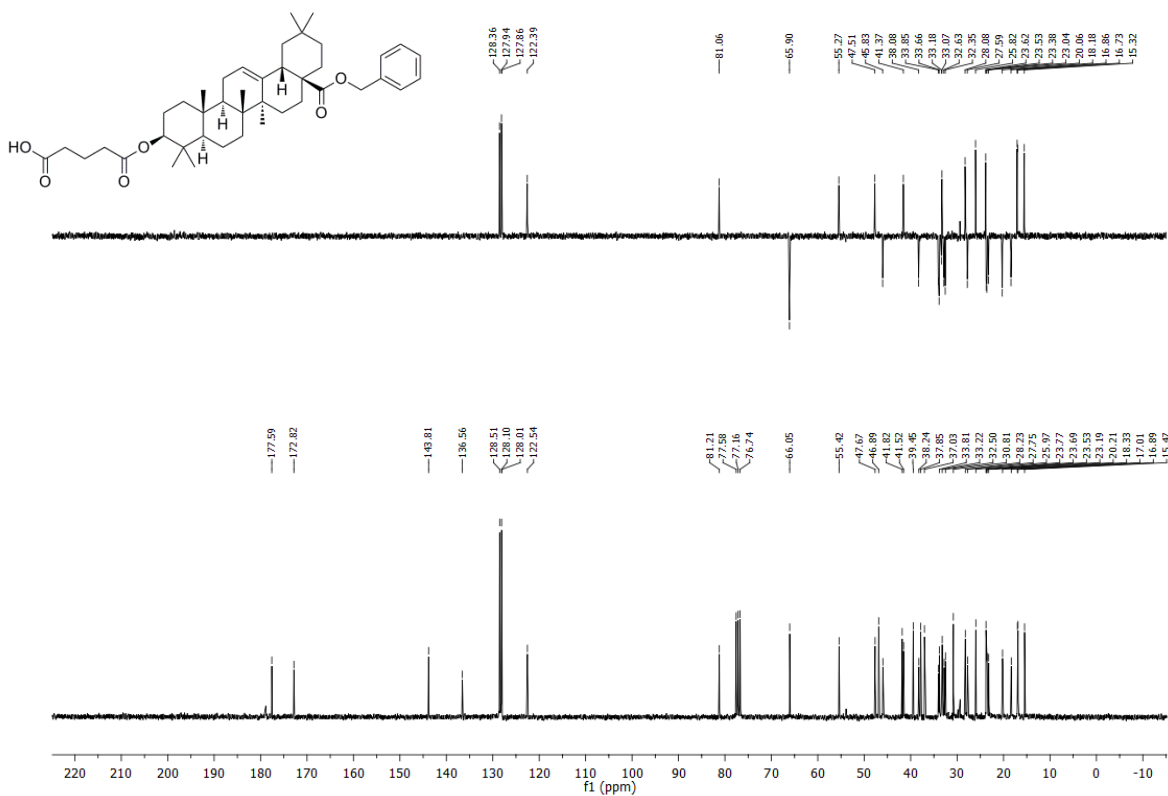


Espectro de ¹H RMN del producto 43

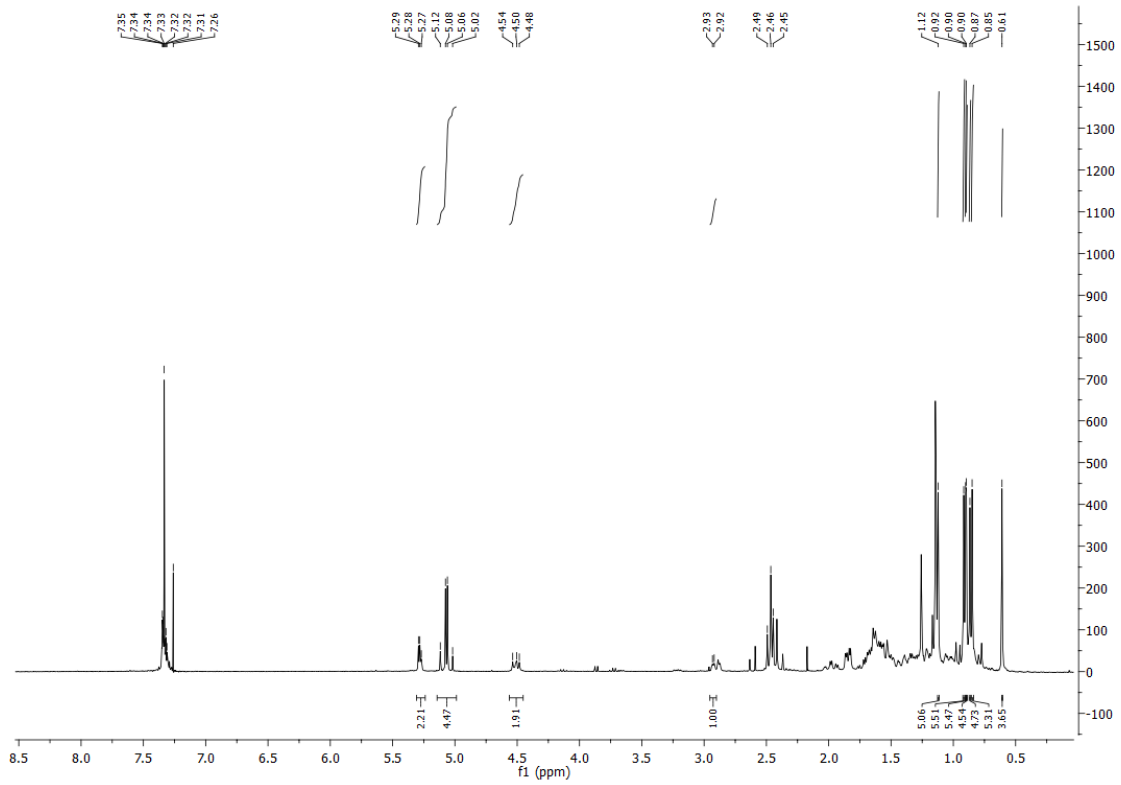


Espectro de ¹³C RMN del producto 43

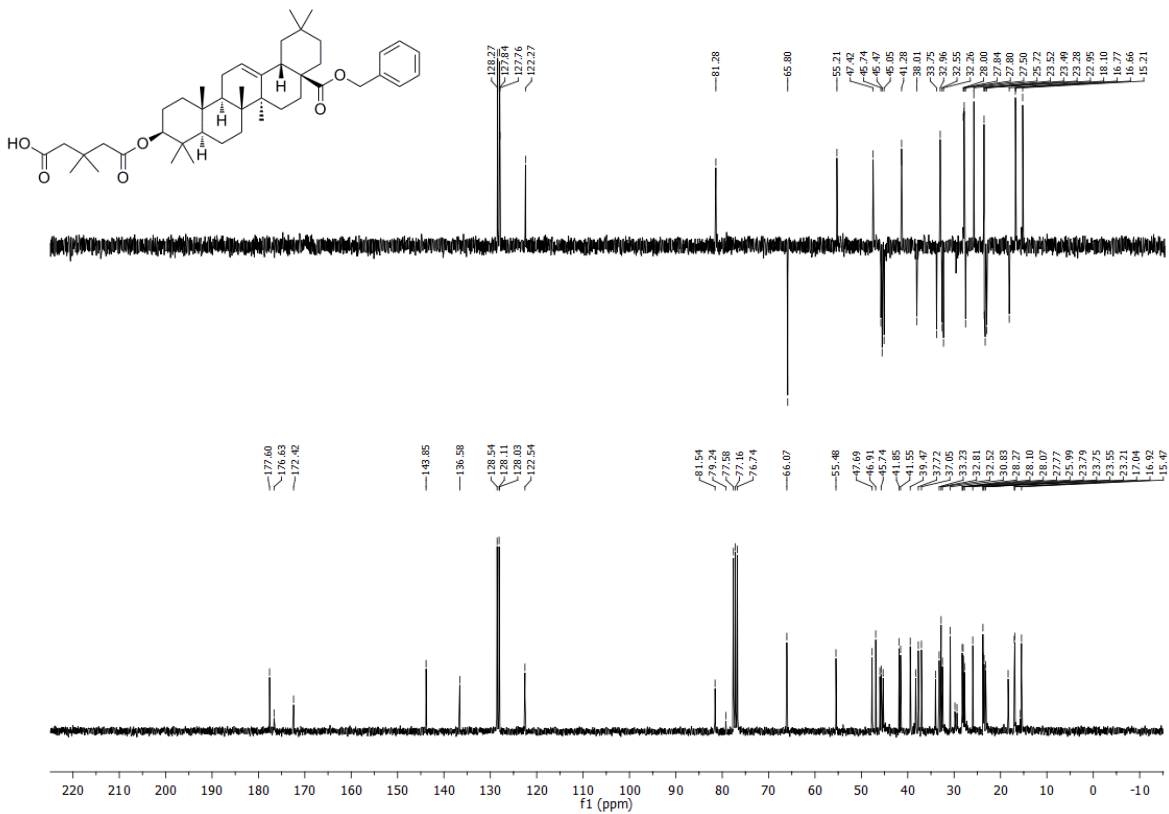
Producto 44

Espectro de ^1H RMN del producto 44Espectro de ^{13}C RMN del producto 44

Producto 45

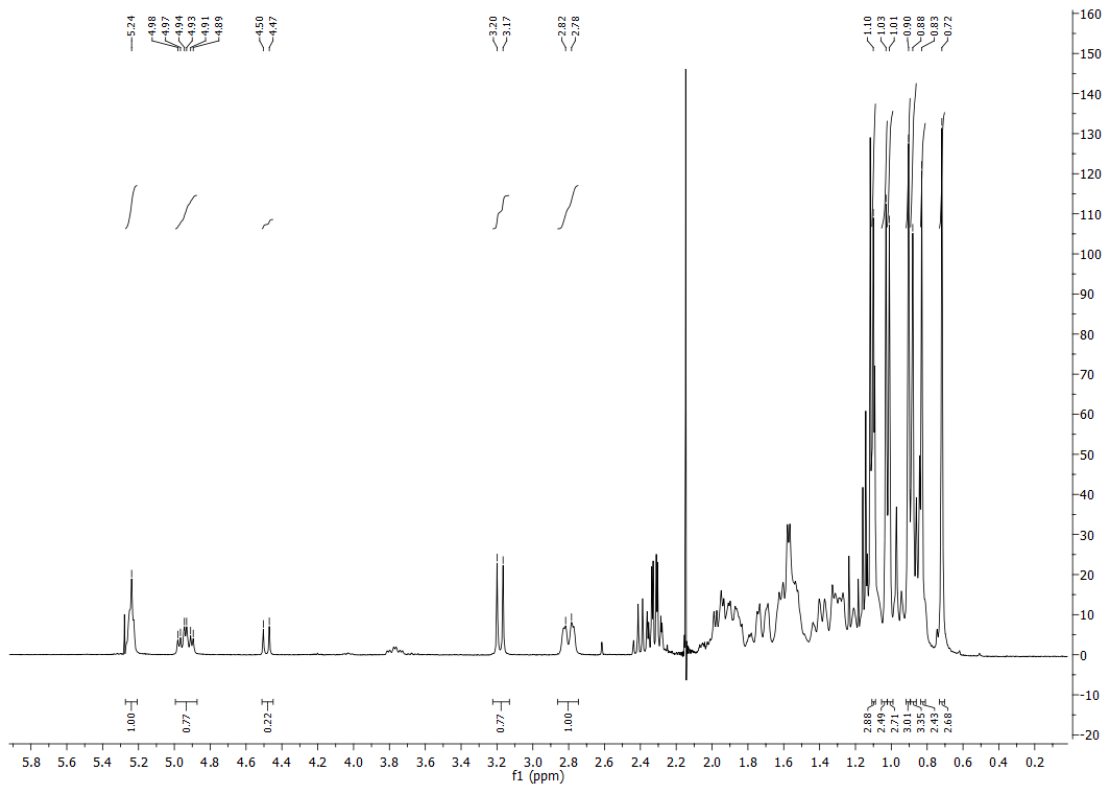
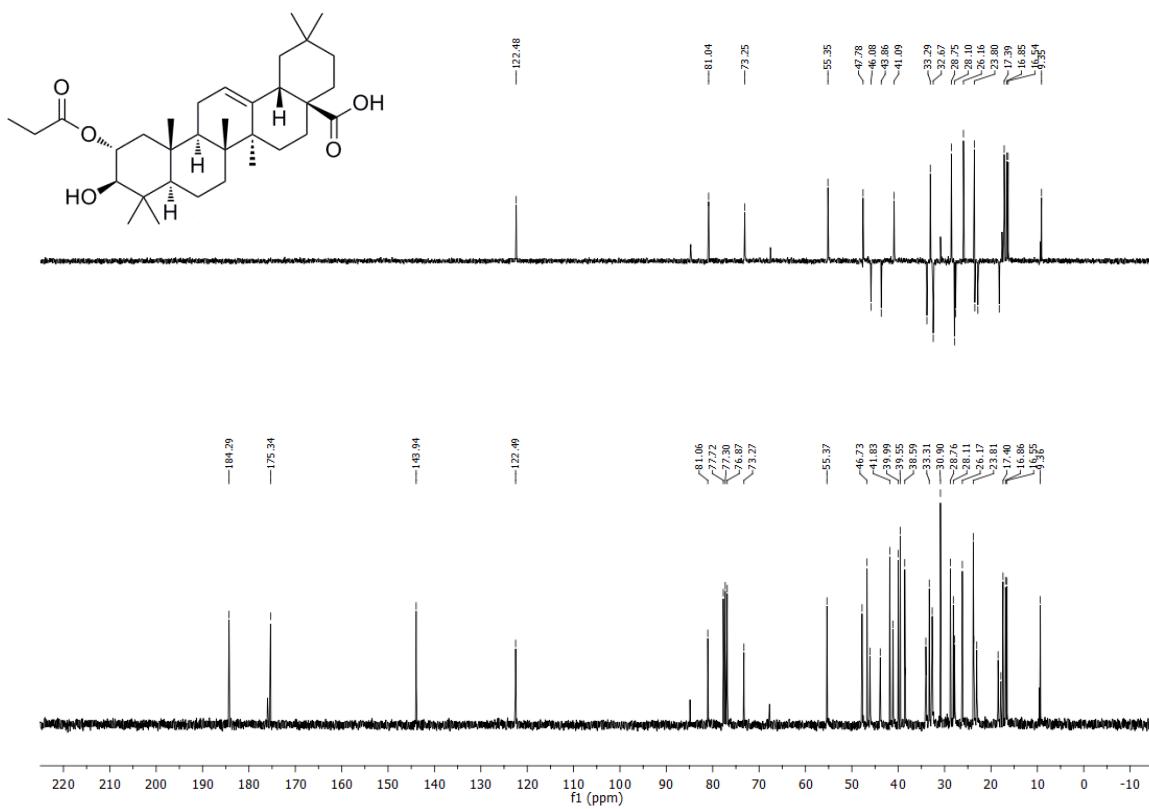


Espectro de ¹H RMN del producto 45

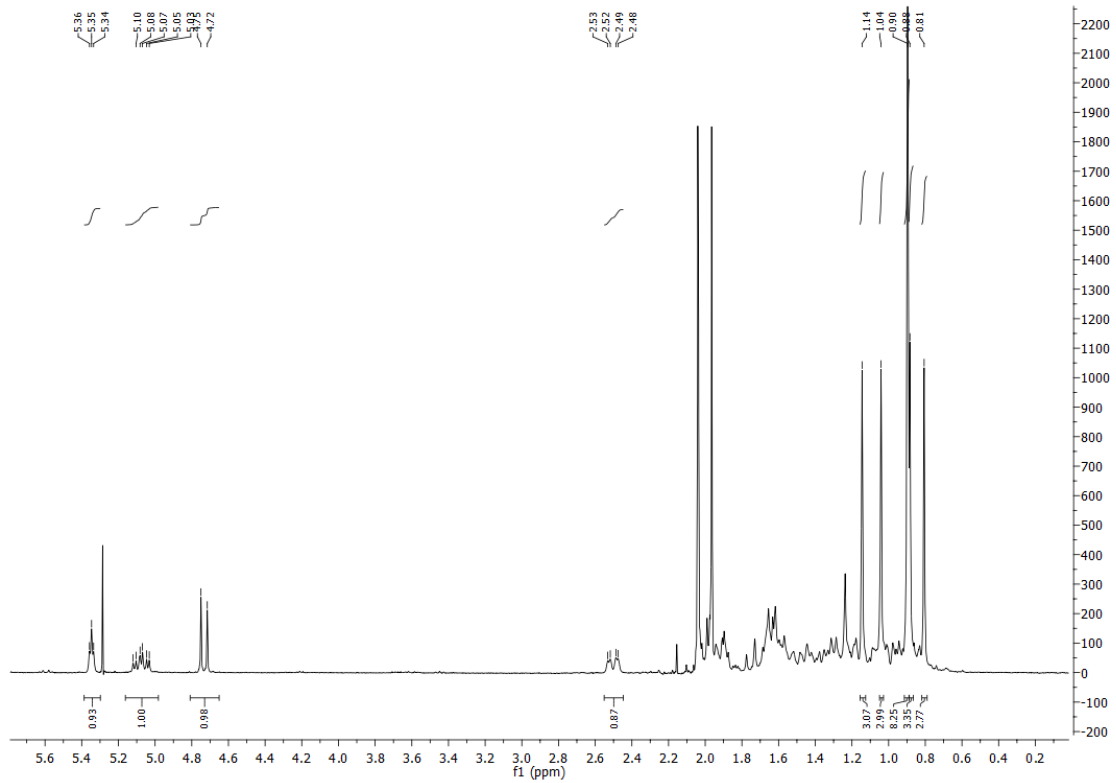
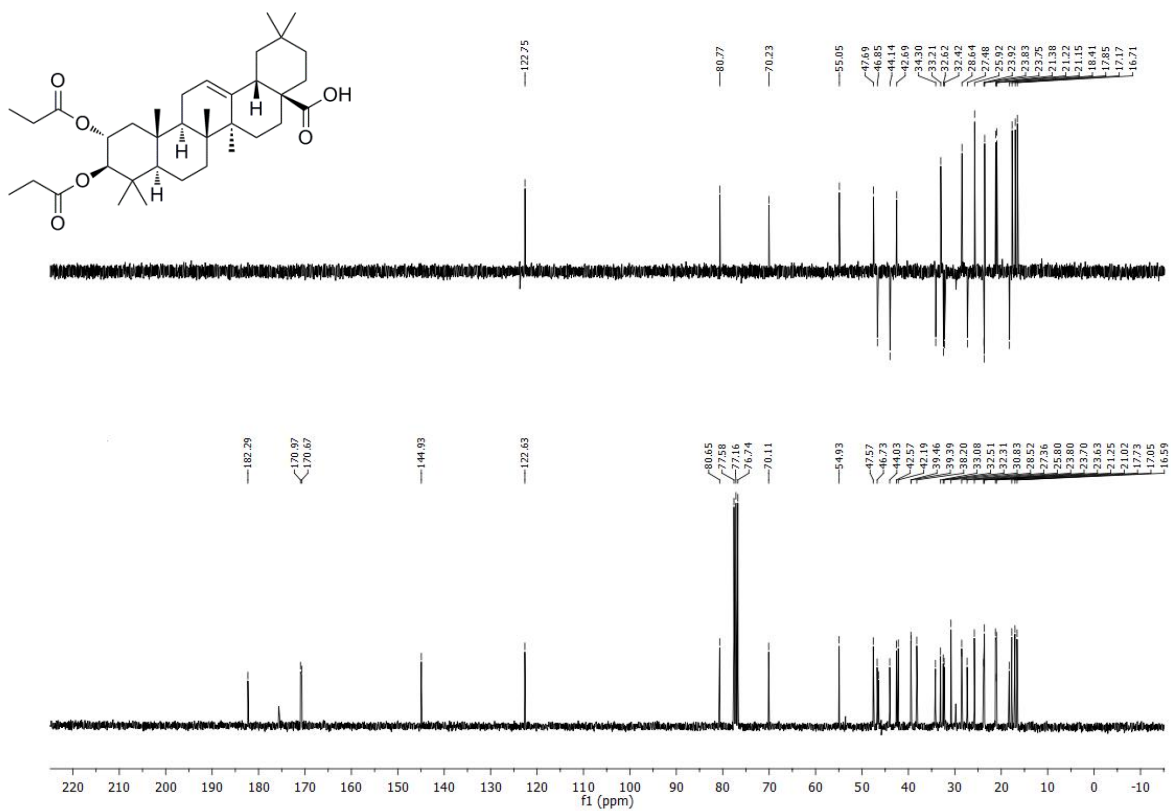


Espectro de ¹³C RMN del producto 45

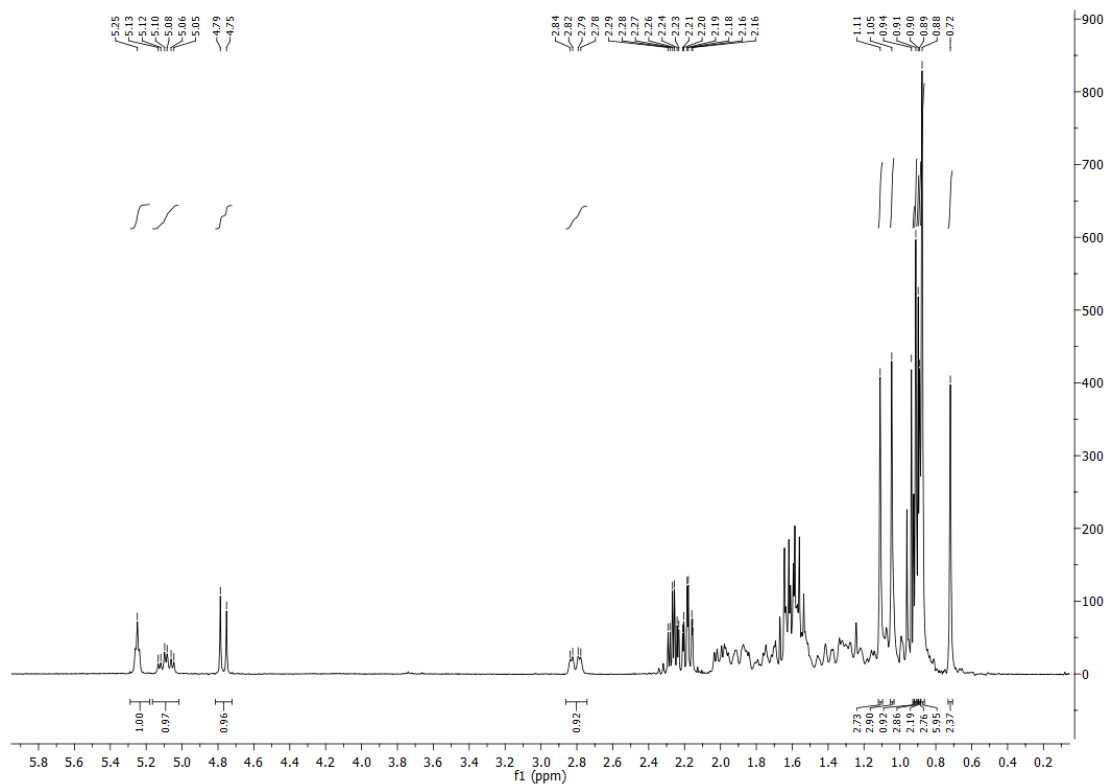
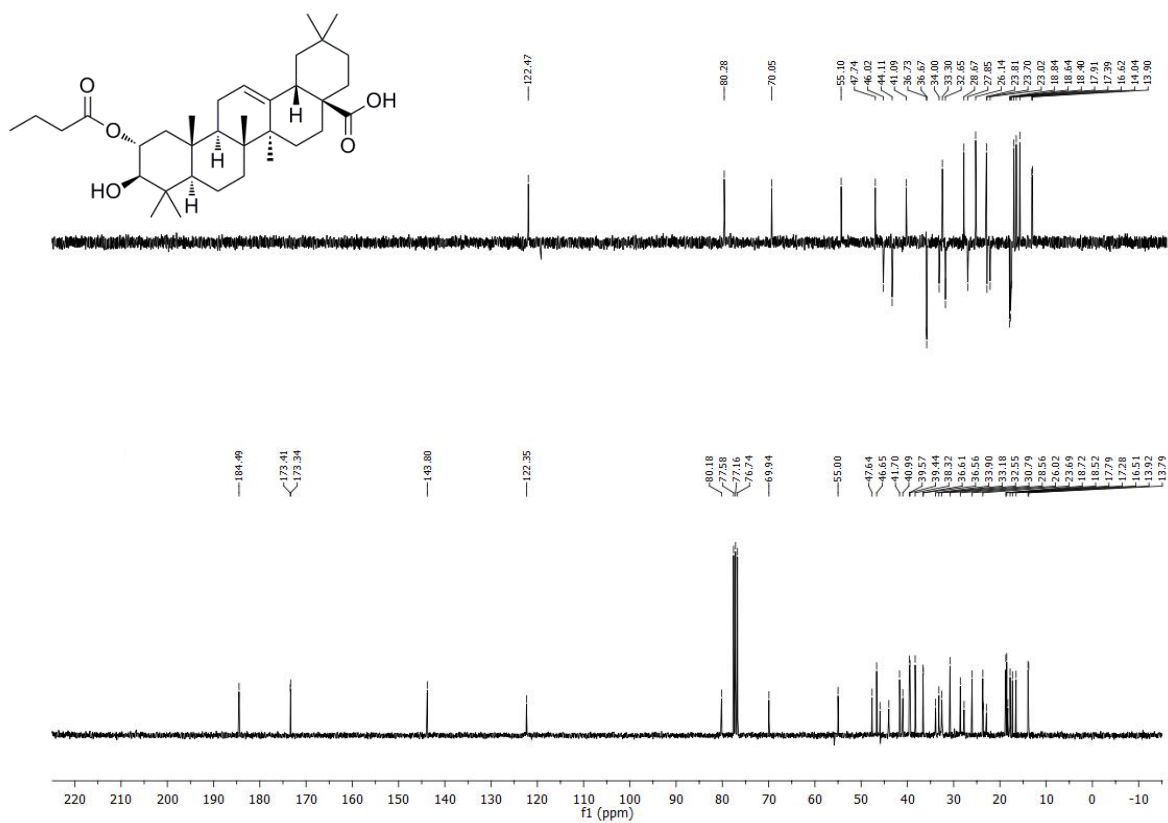
Producto 46

Espectro de ^1H RMN del producto 46Espectro de ^{13}C RMN del producto 46

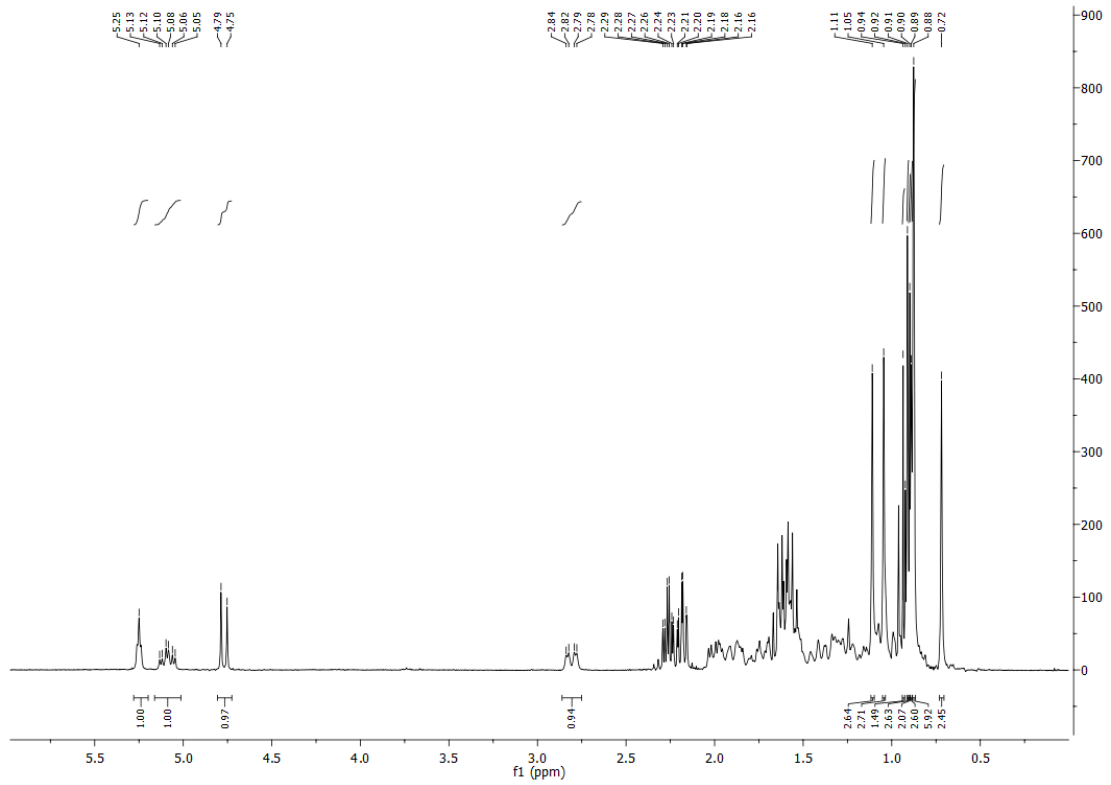
Producto 47

Espectro de ^1H RMN del producto 47Espectro de ^{13}C RMN del producto 47

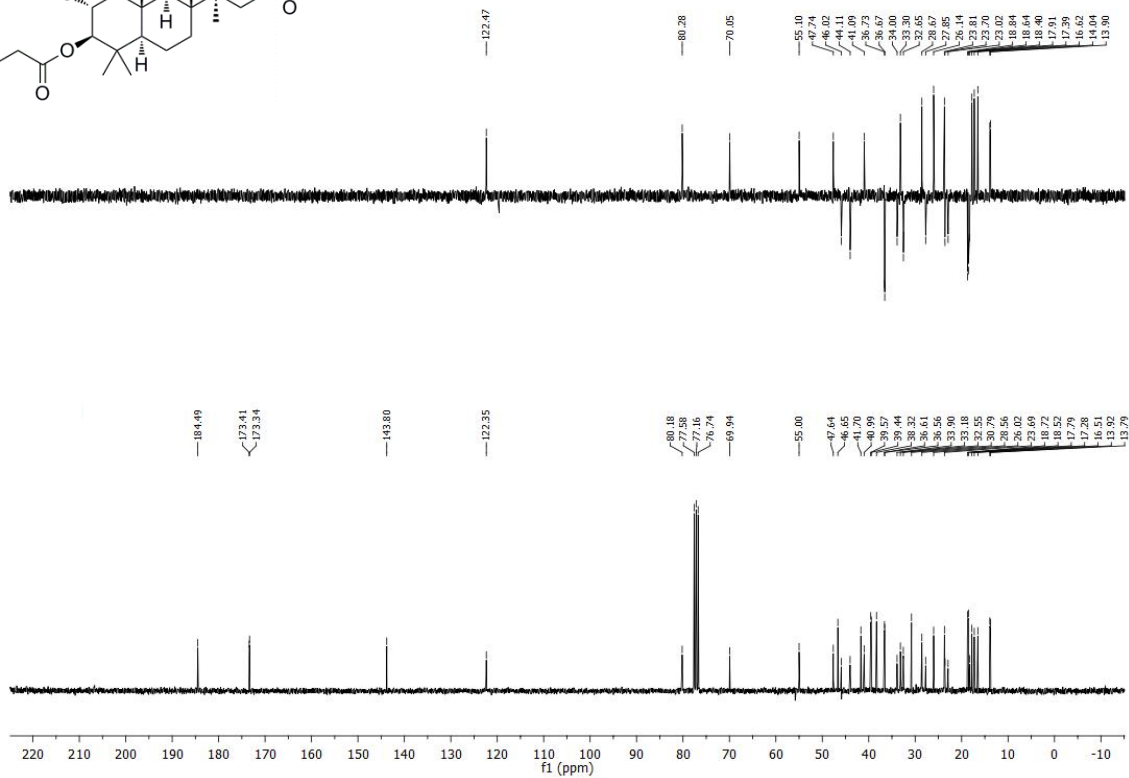
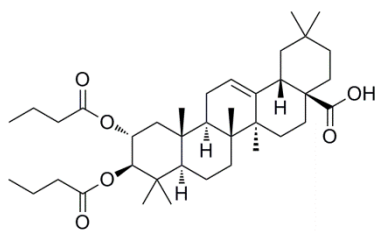
Producto 48

Espectro de ^1H RMN del producto 48Espectro de ^{13}C RMN del producto 48

Producto 49

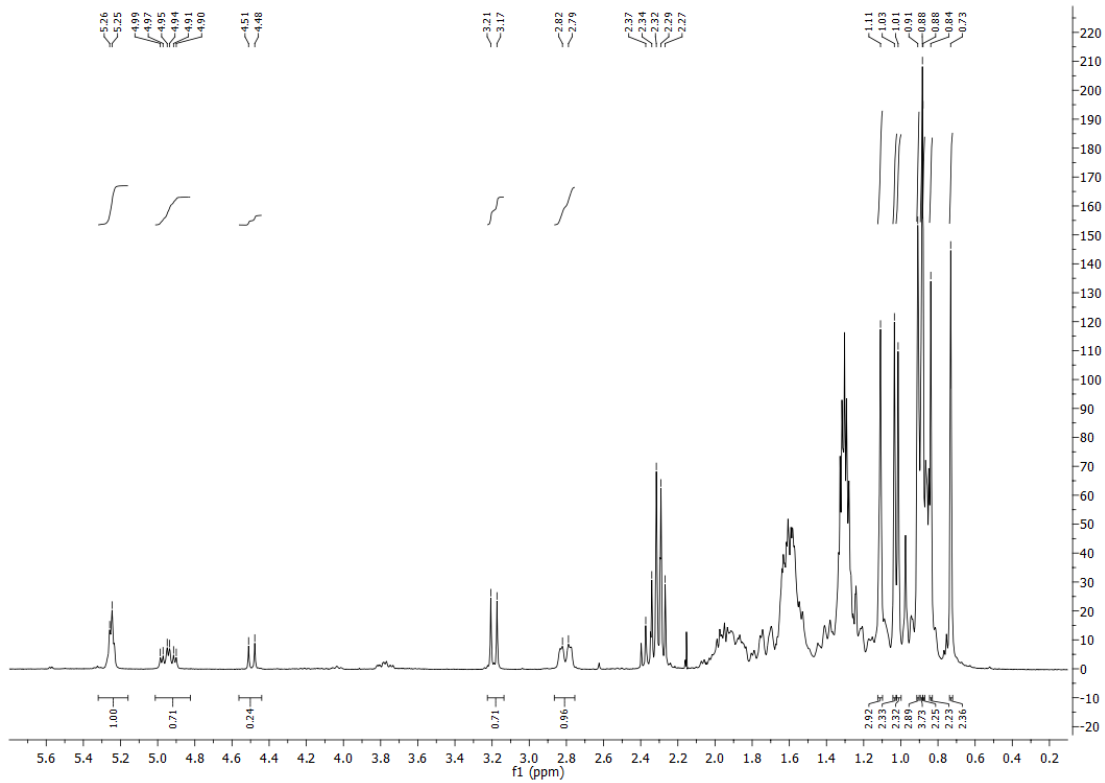
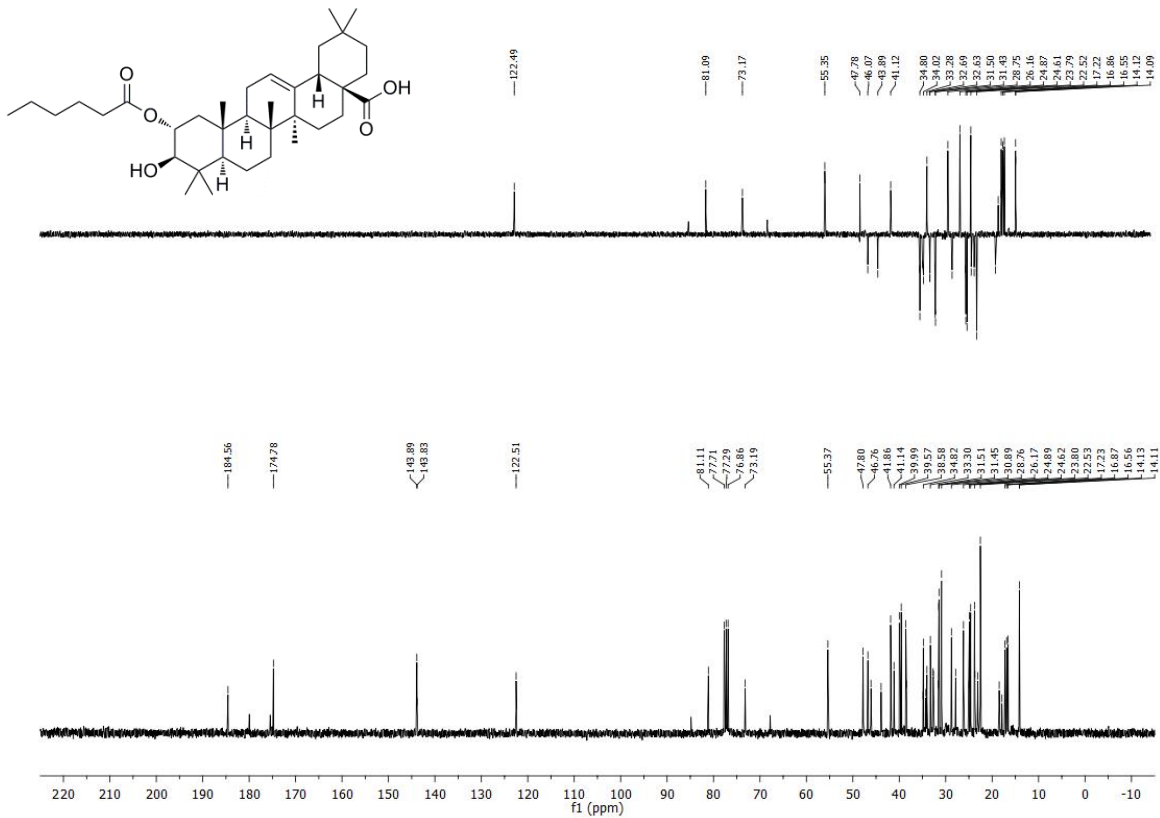


Espectro de ¹H RMN del producto 49

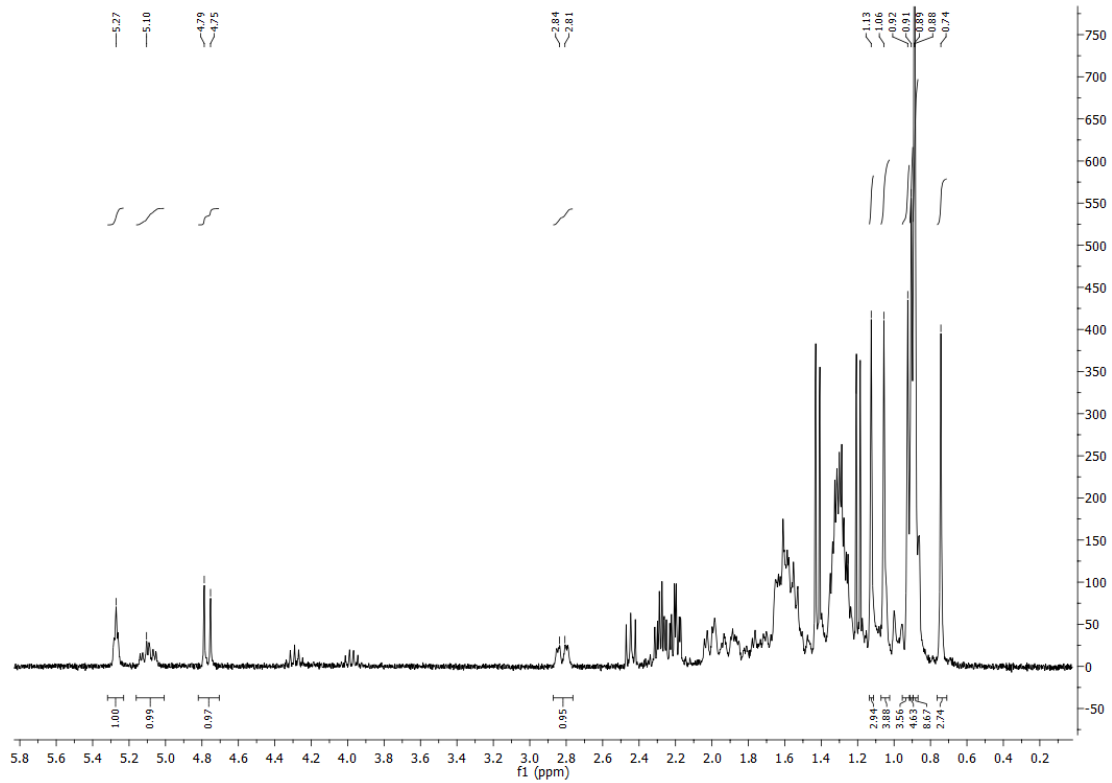


Espectro de ¹³C RMN del producto 49

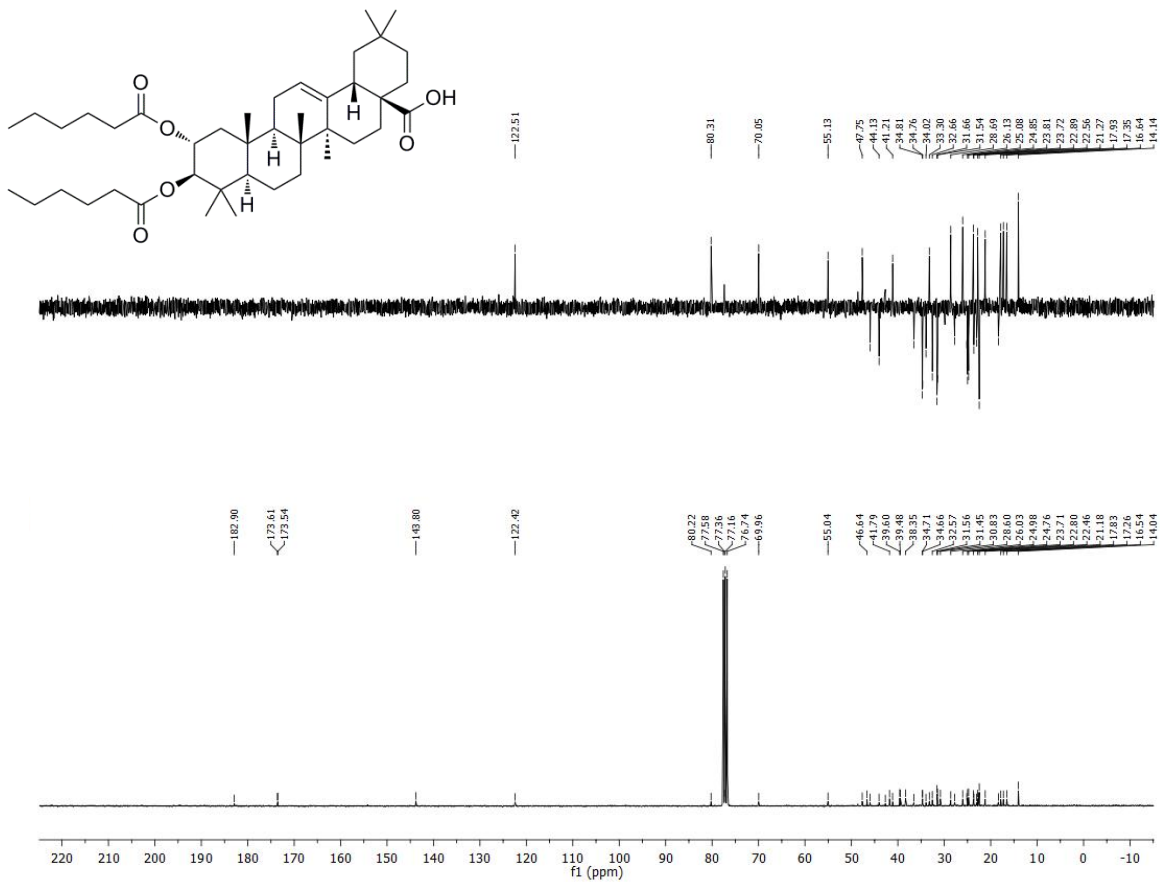
Producto 50

Espectro de ^1H RMN del producto 50Espectro de ^{13}C RMN del producto 50

Producto 51

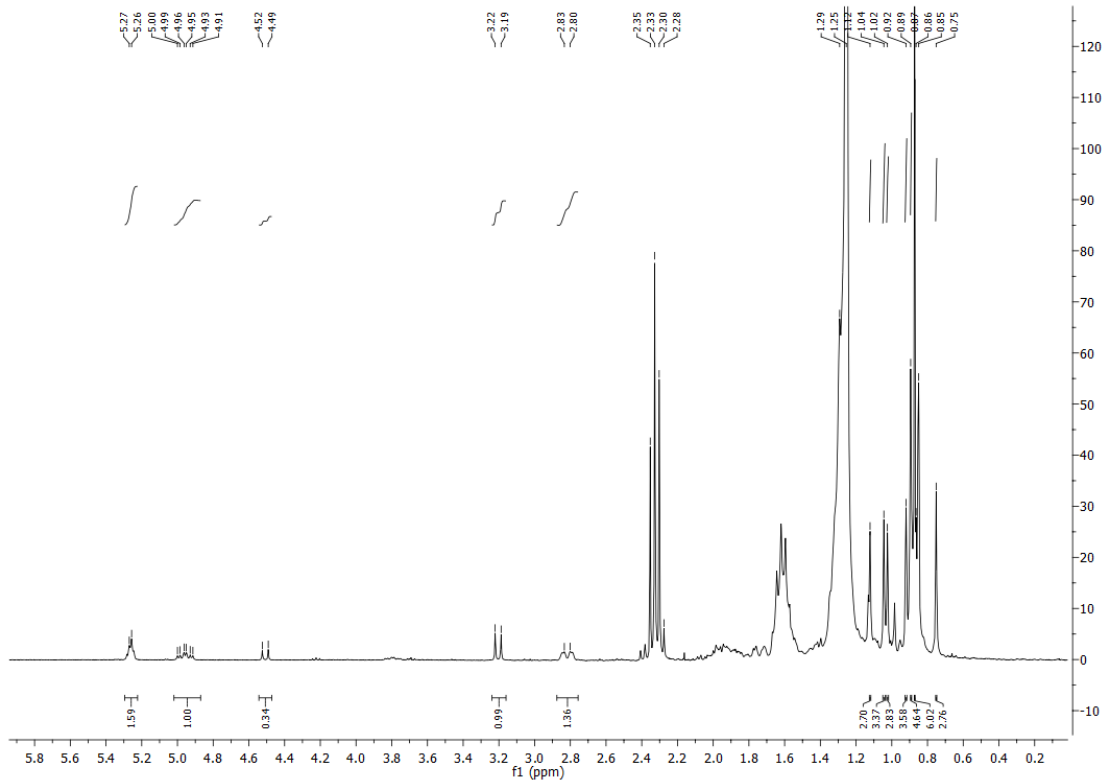
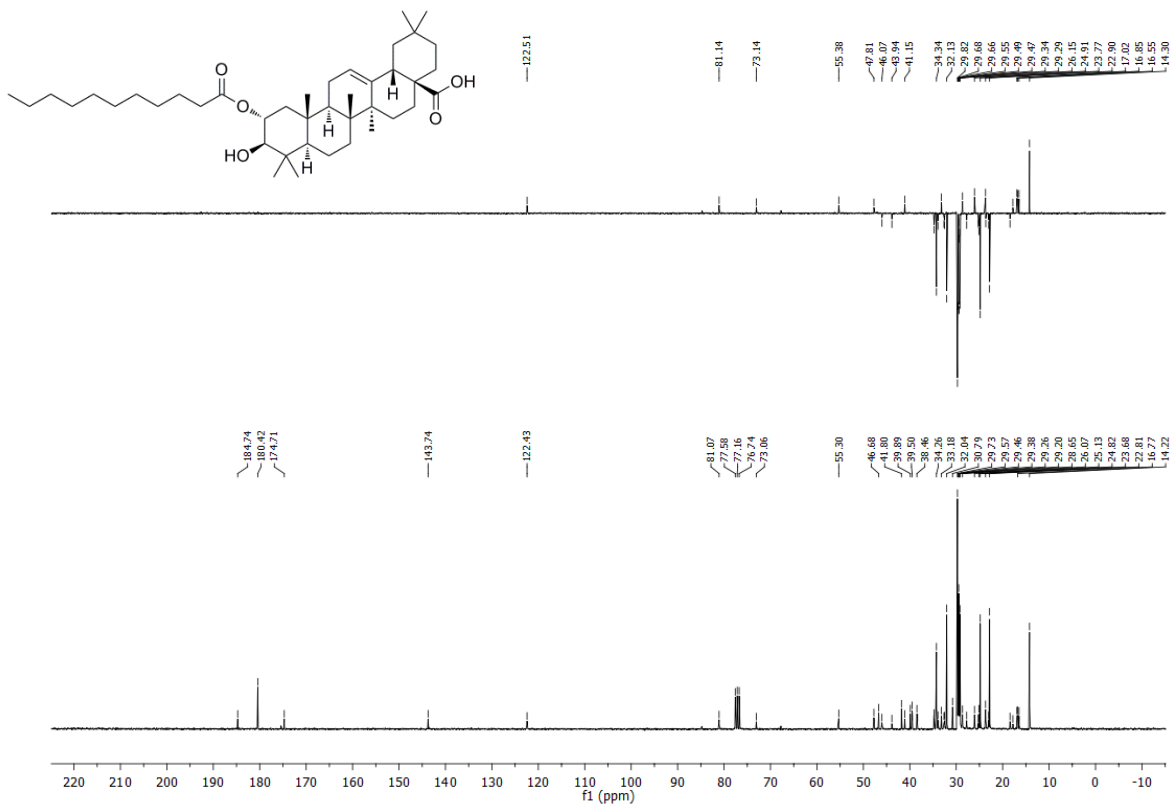


Espectro de ¹H RMN del producto 51

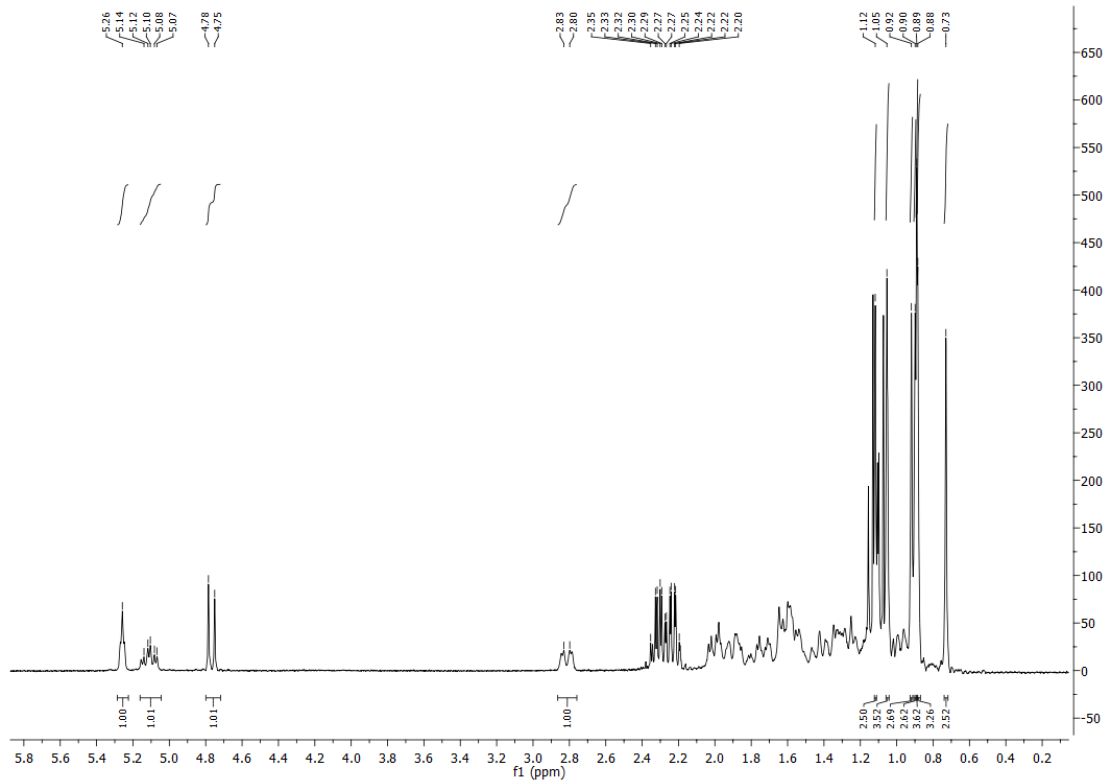
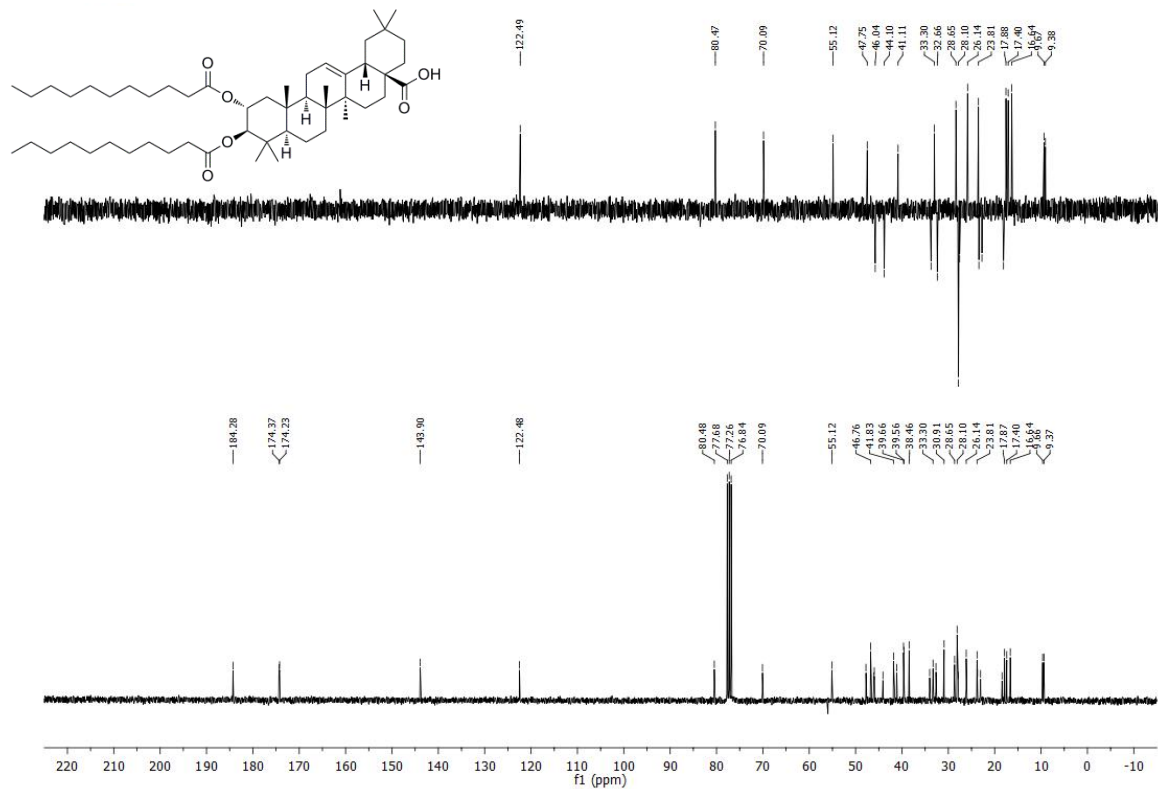


Espectro de ¹³C RMN del producto 51

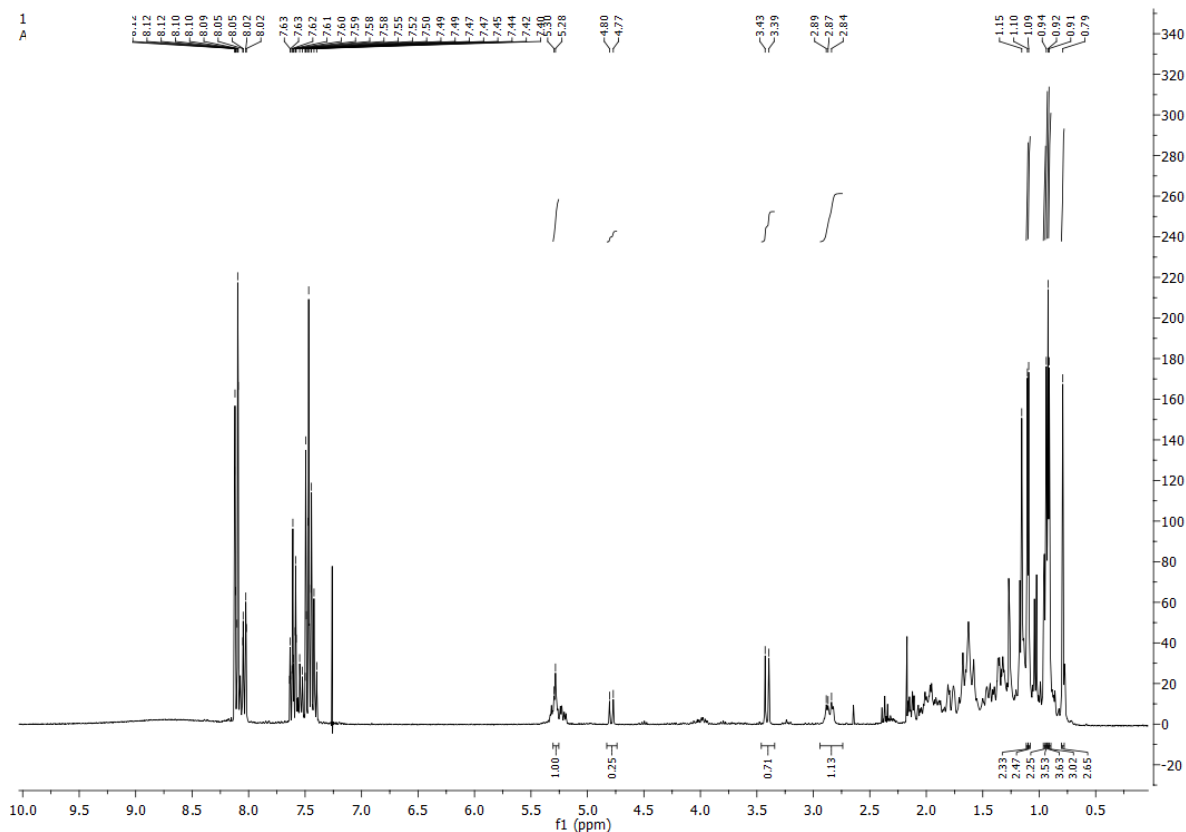
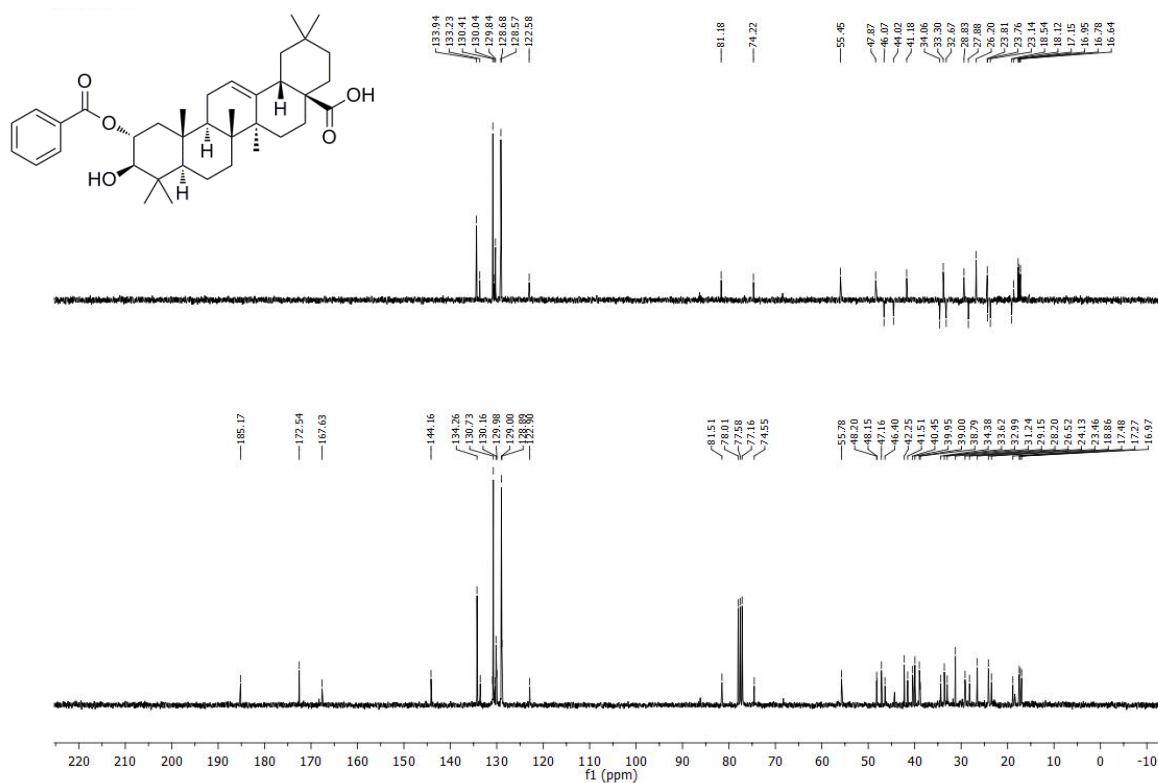
Producto 52

Espectro de ^1H RMN del producto 52Espectro de ^{13}C RMN del producto 52

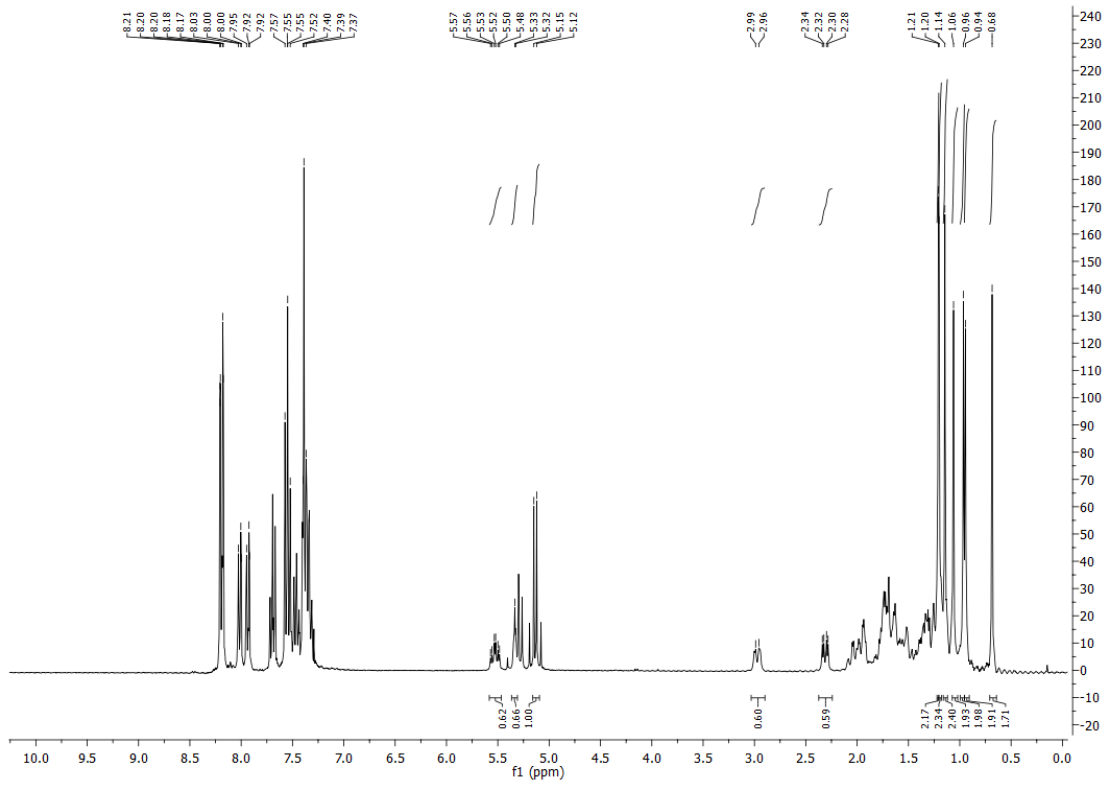
Producto 53

Espectro de ^1H RMN del producto 53Espectro de ^{13}C RMN del producto 53

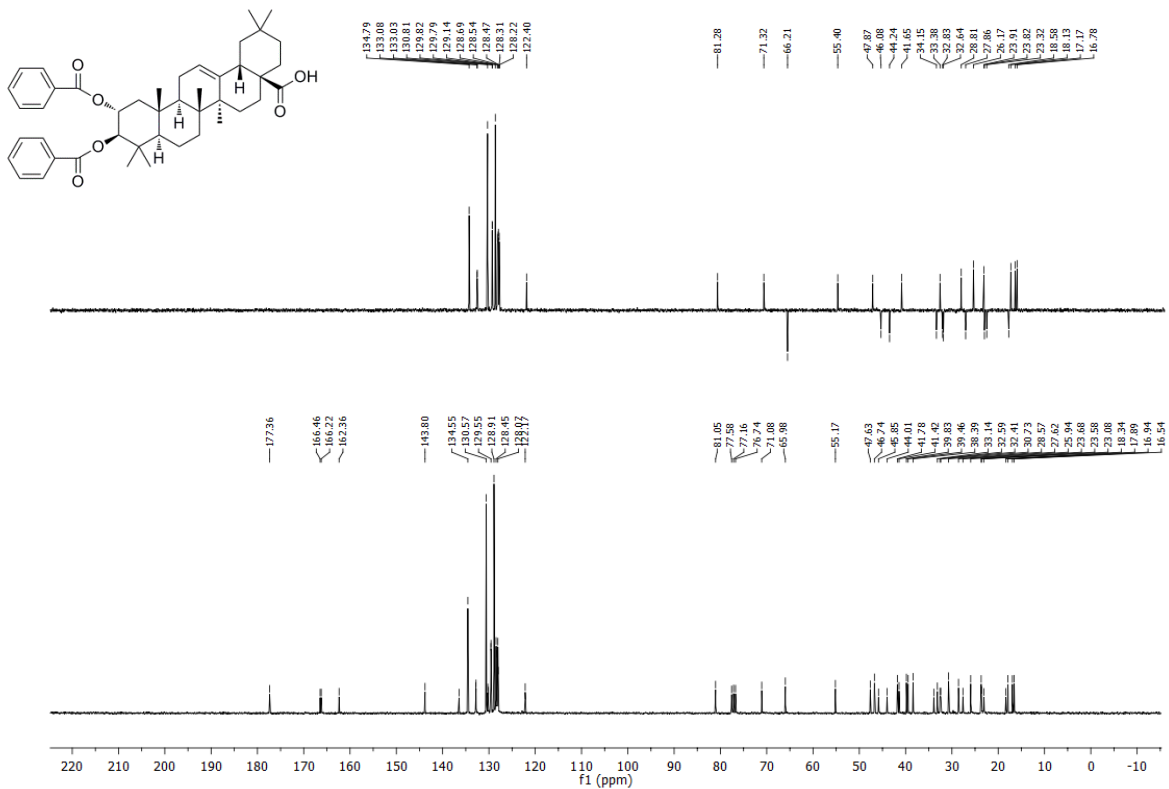
Producto 54

Espectro de ^1H RMN del producto 54Espectro de ^{13}C RMN del producto 54

Producto 55

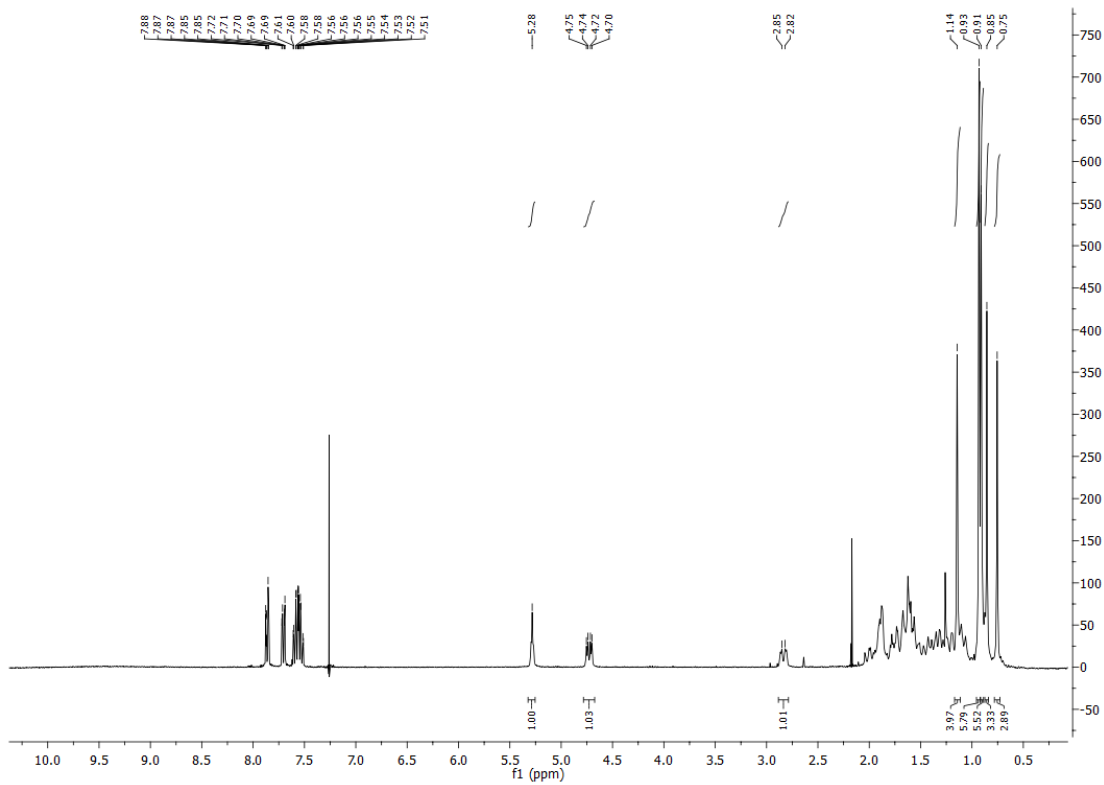
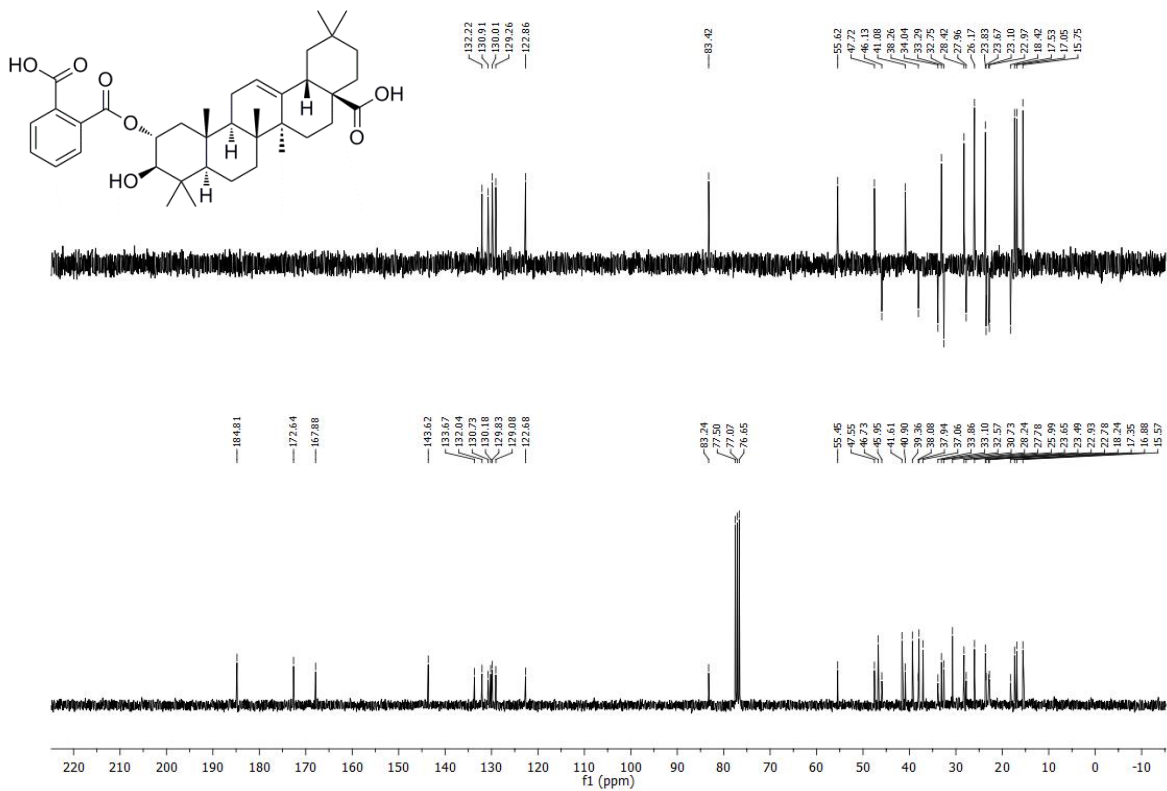


Espectro de ¹H RMN del producto 55

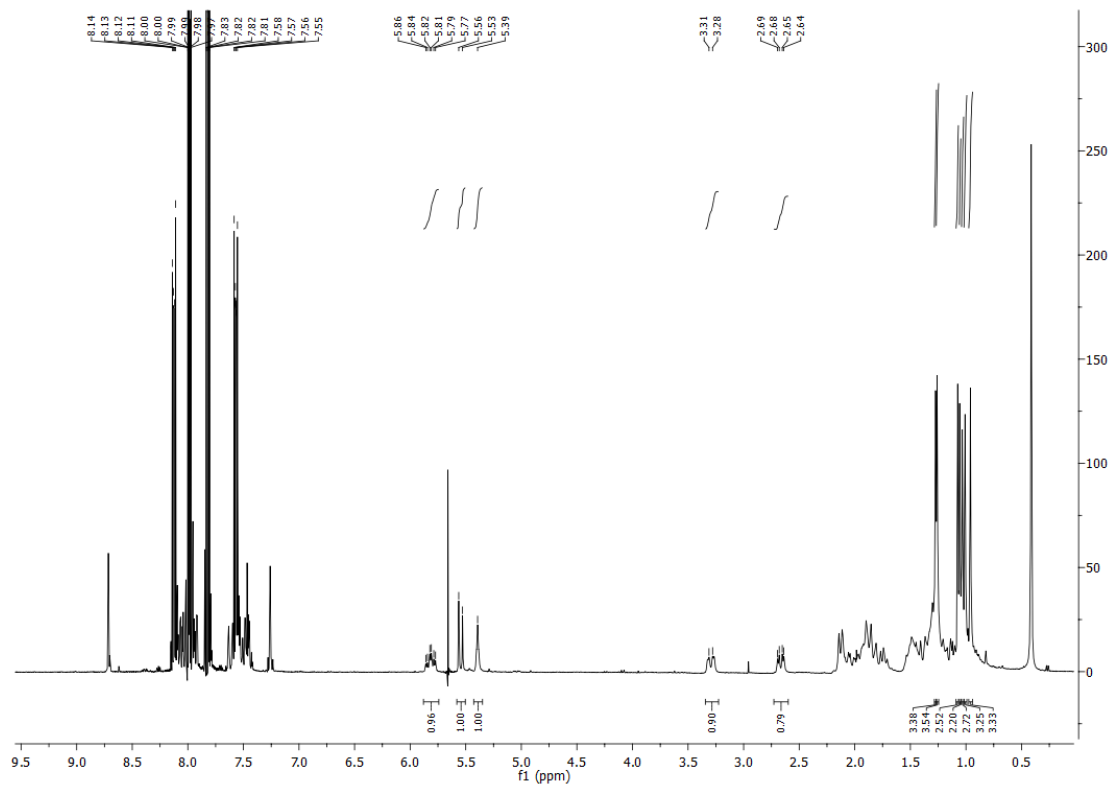
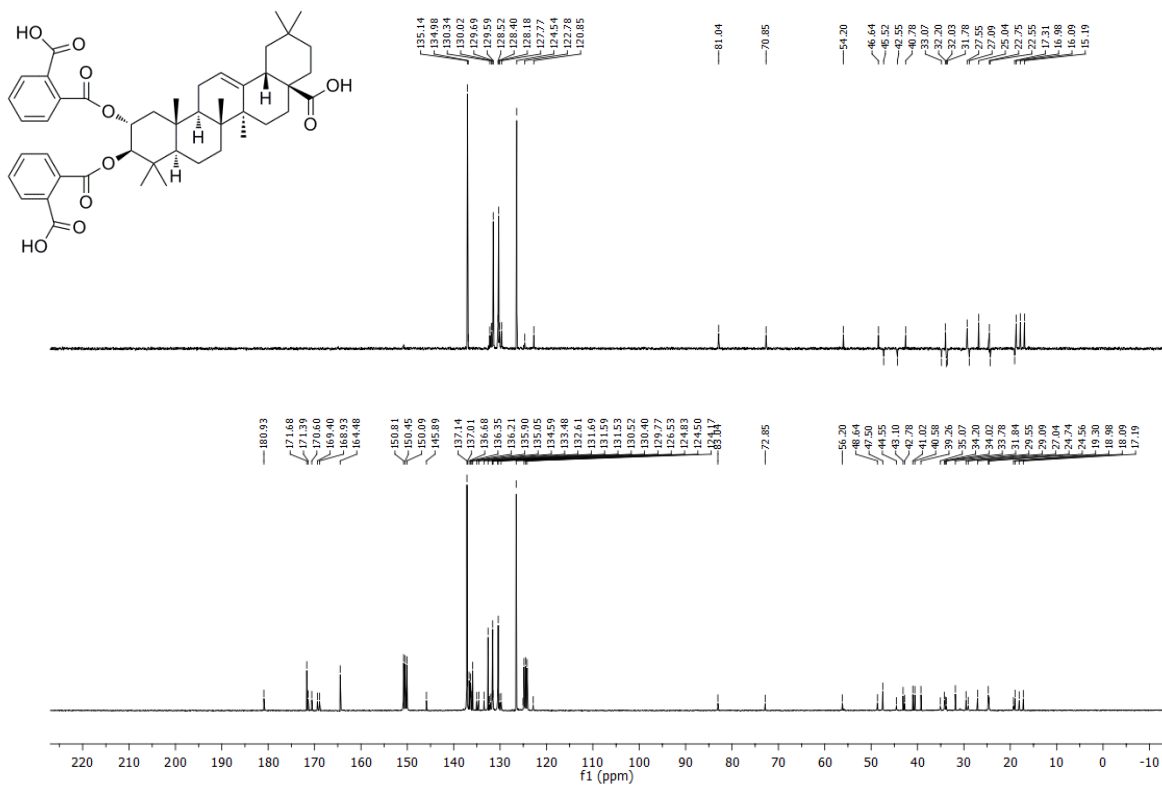


Espectro de ¹³C RMN del producto 55

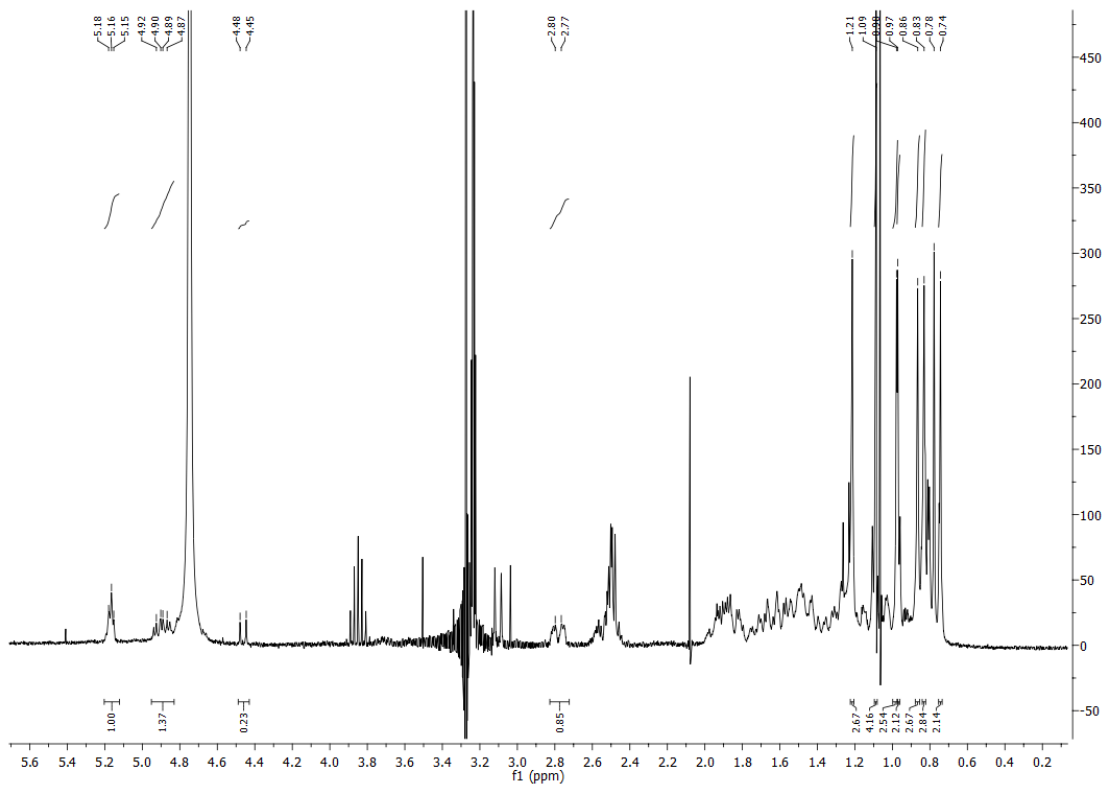
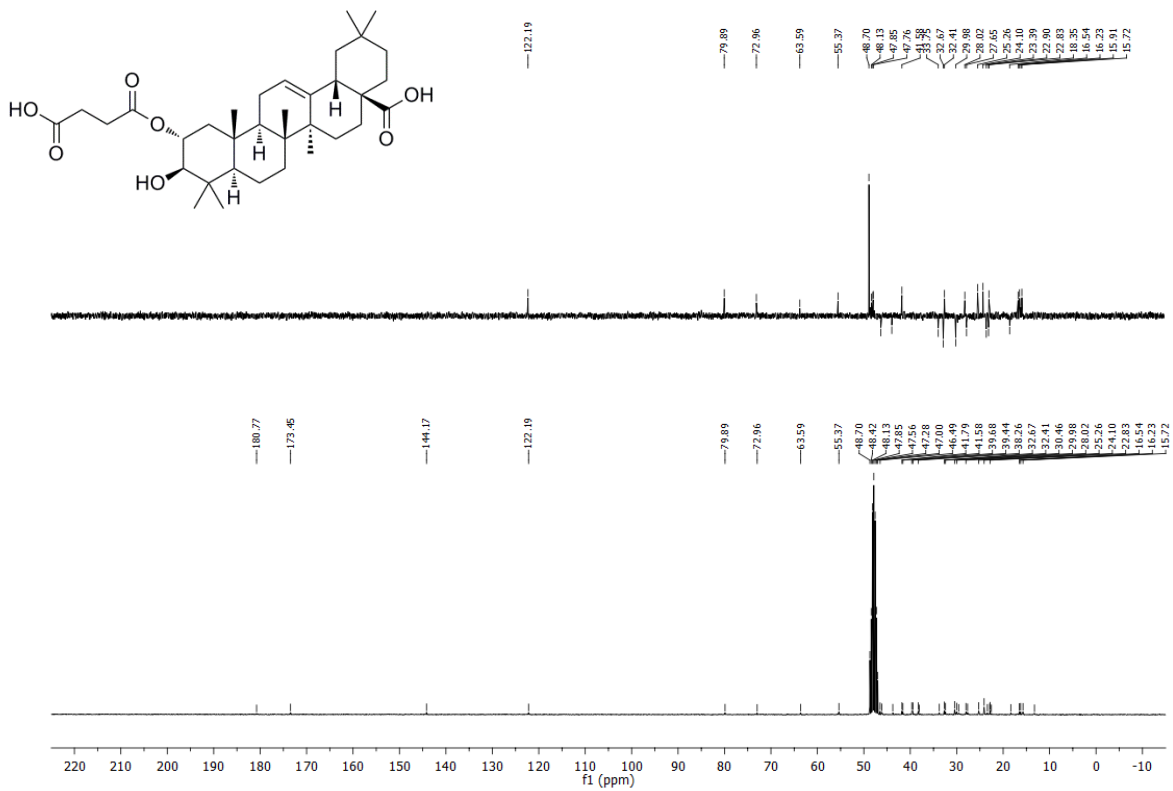
Producto 56

Espectro de ^1H RMN del producto 56Espectro de ^{13}C RMN del producto 56

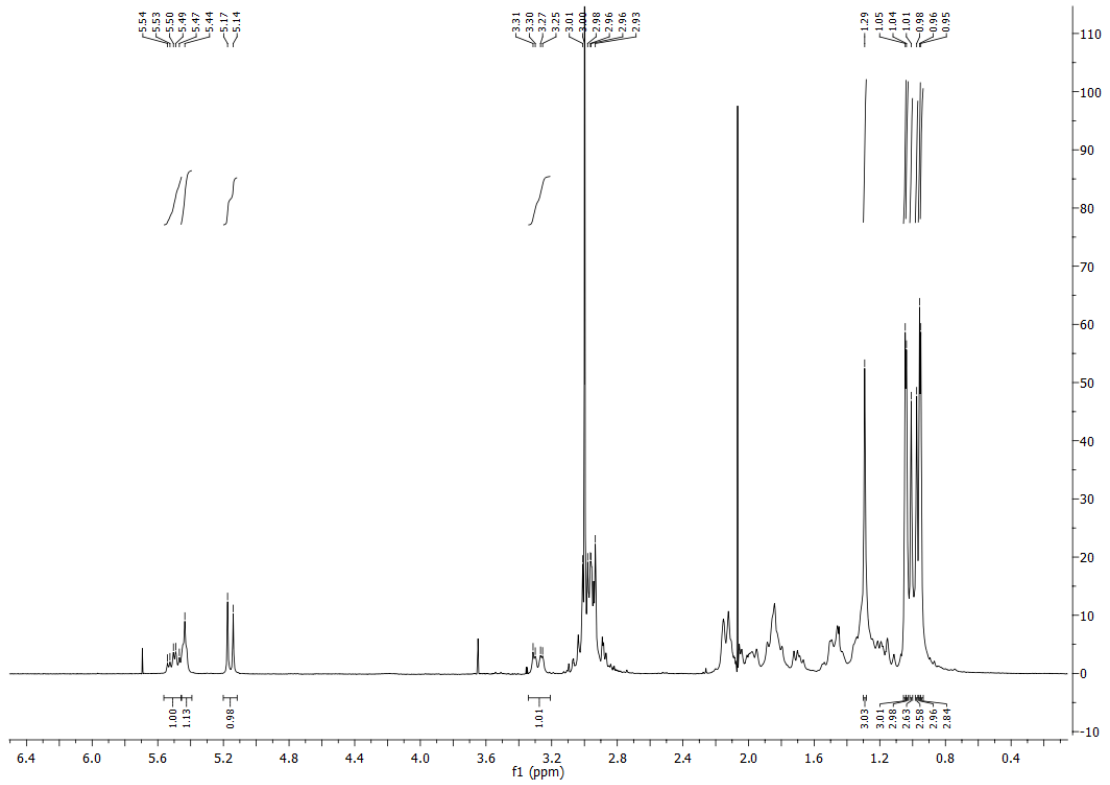
Producto 57

Espectro de ^1H RMN del producto 57Espectro de ^{13}C RMN del producto 57

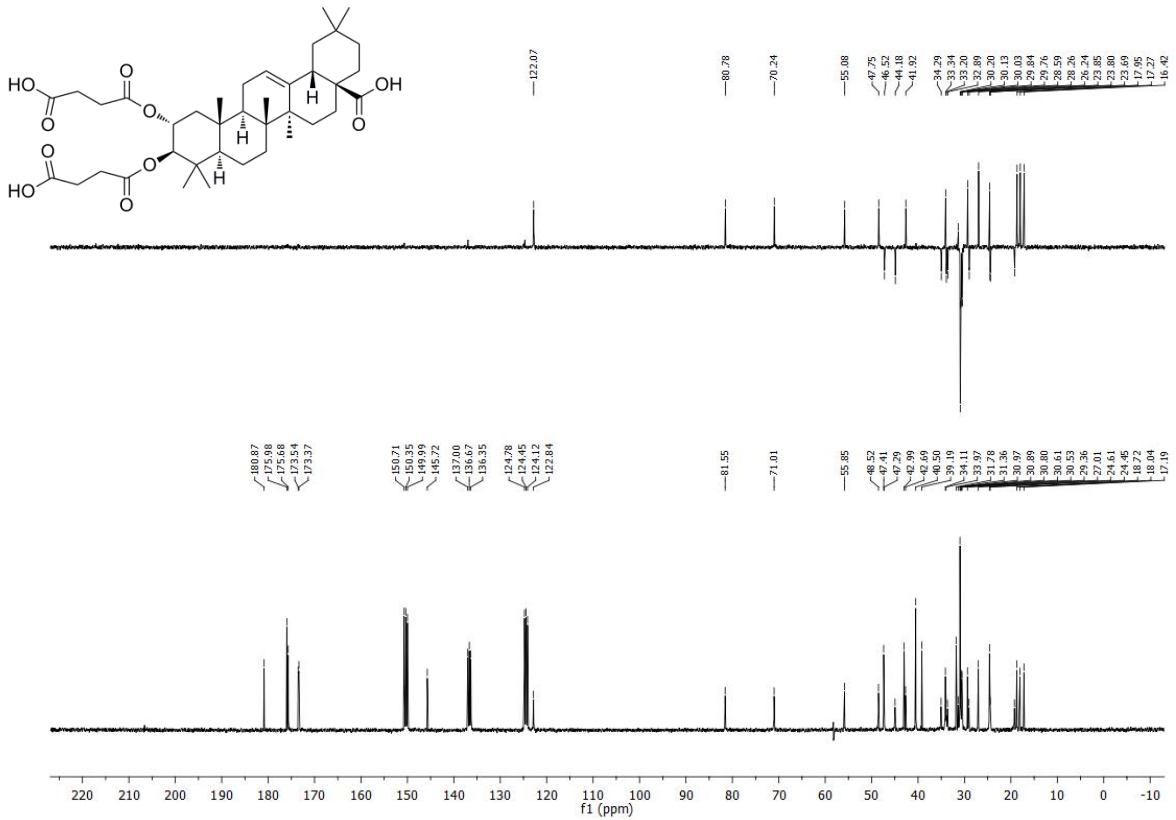
Producto 58

Espectro de ^1H RMN del producto 58Espectro de ^{13}C RMN del producto 58

Producto 59

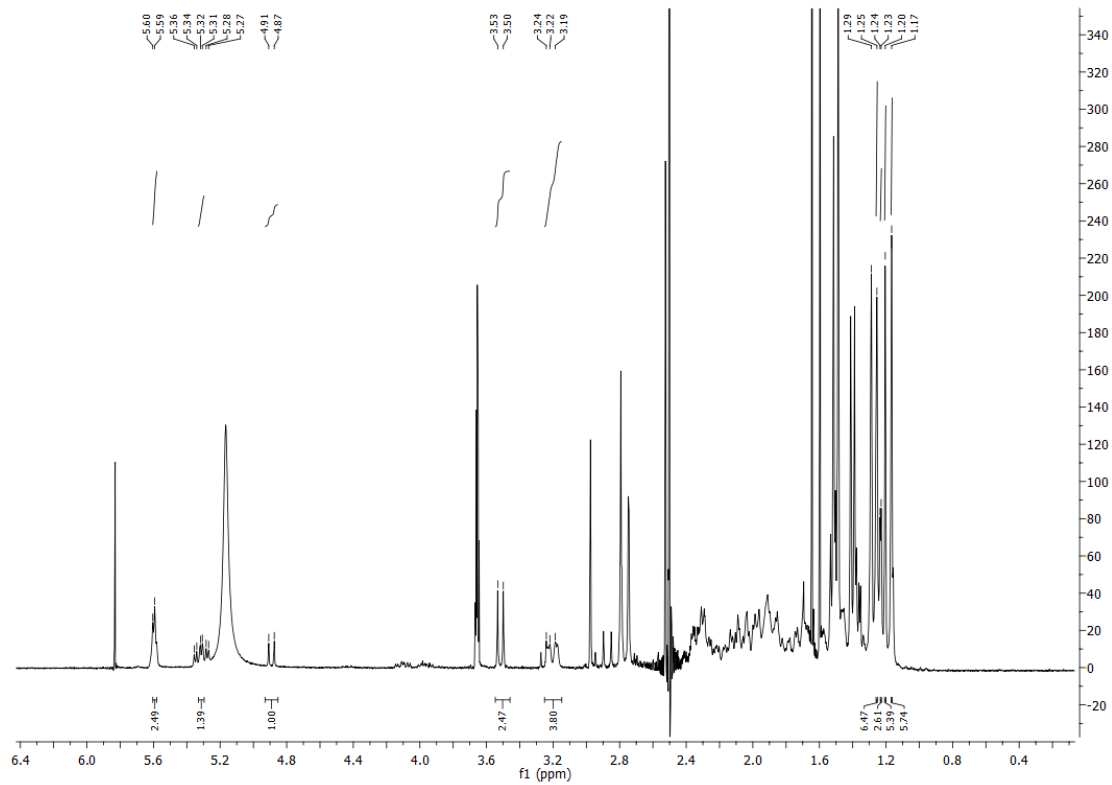
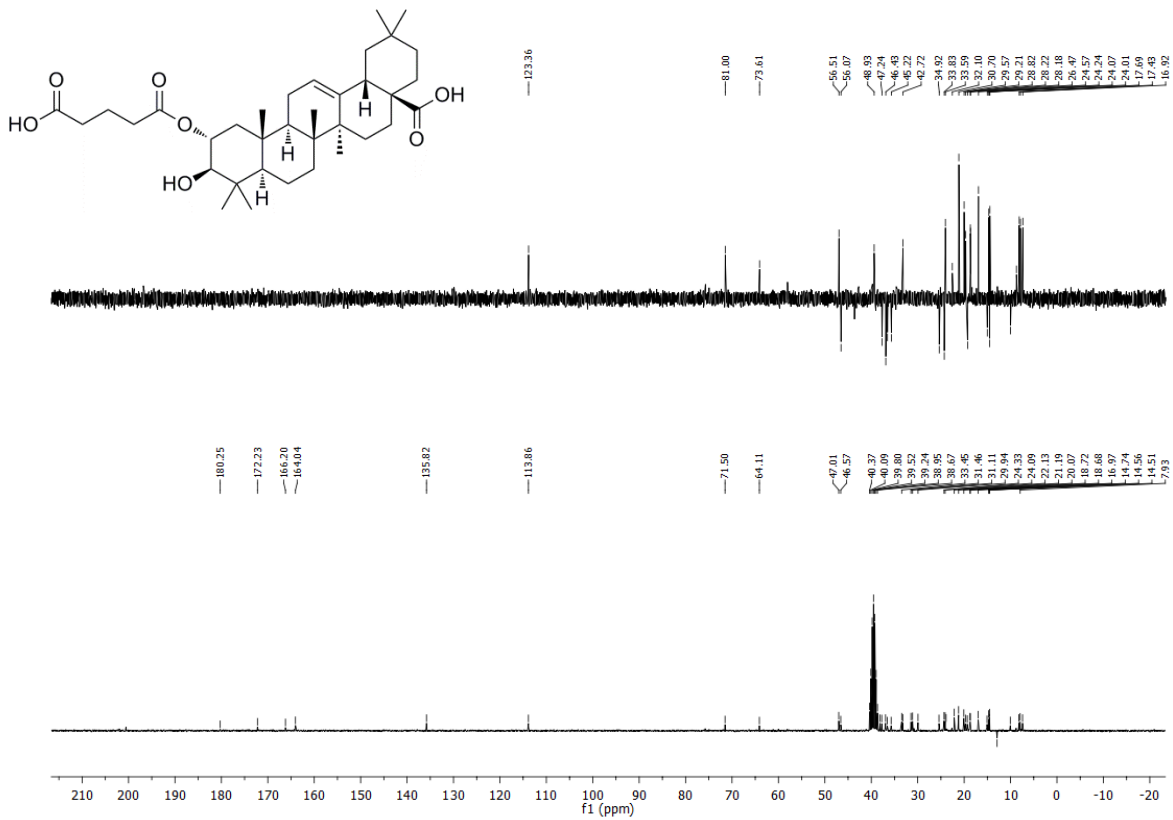


Espectro de ¹H RMN del producto 59

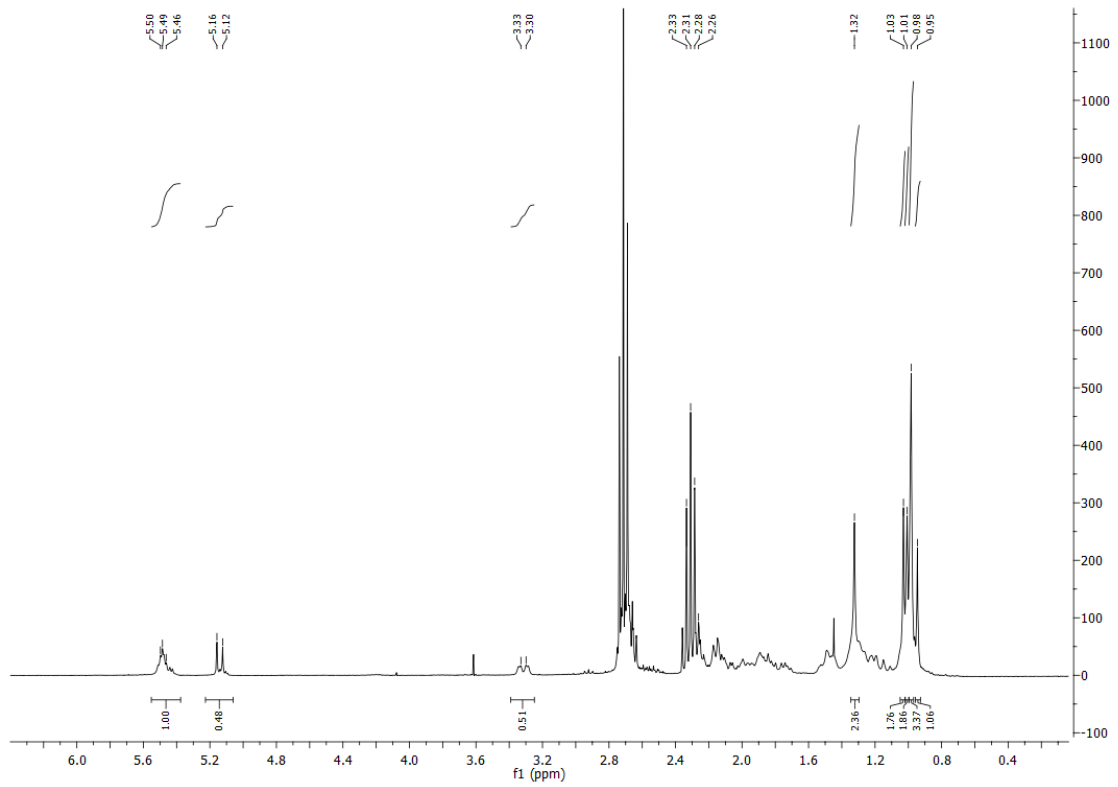
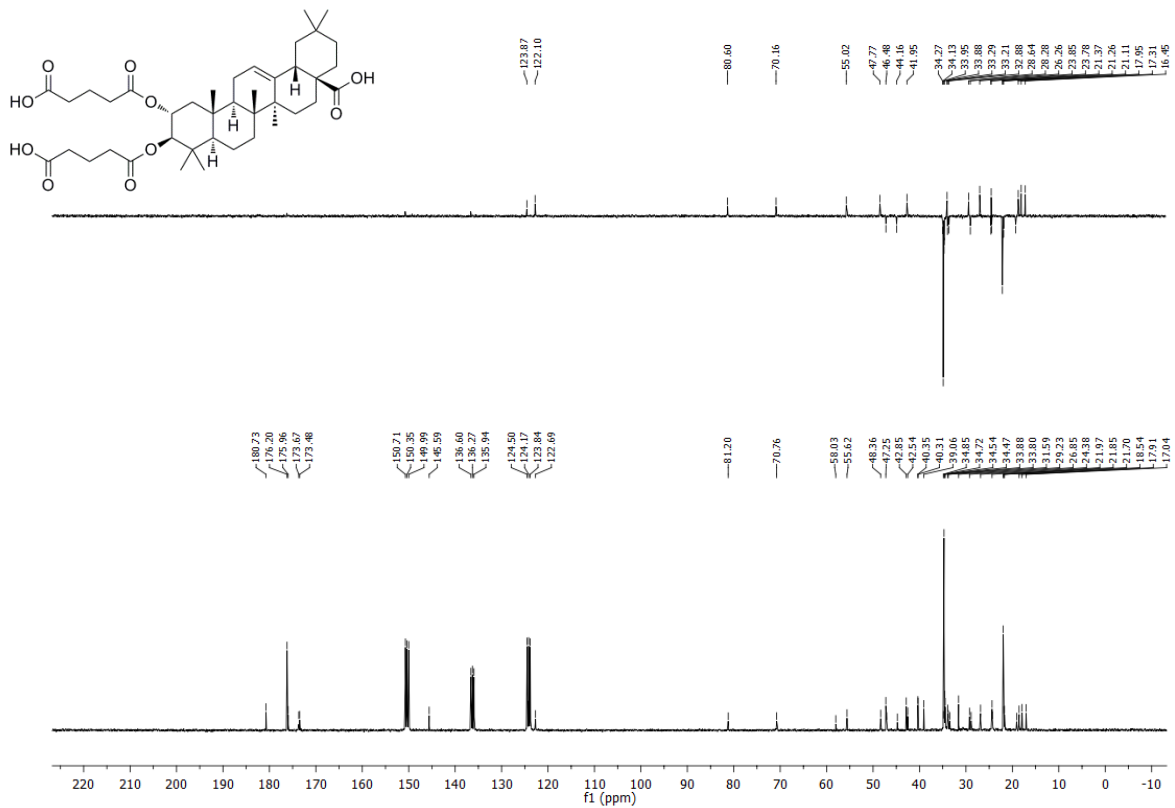


Espectro de ¹³C RMN del producto 59

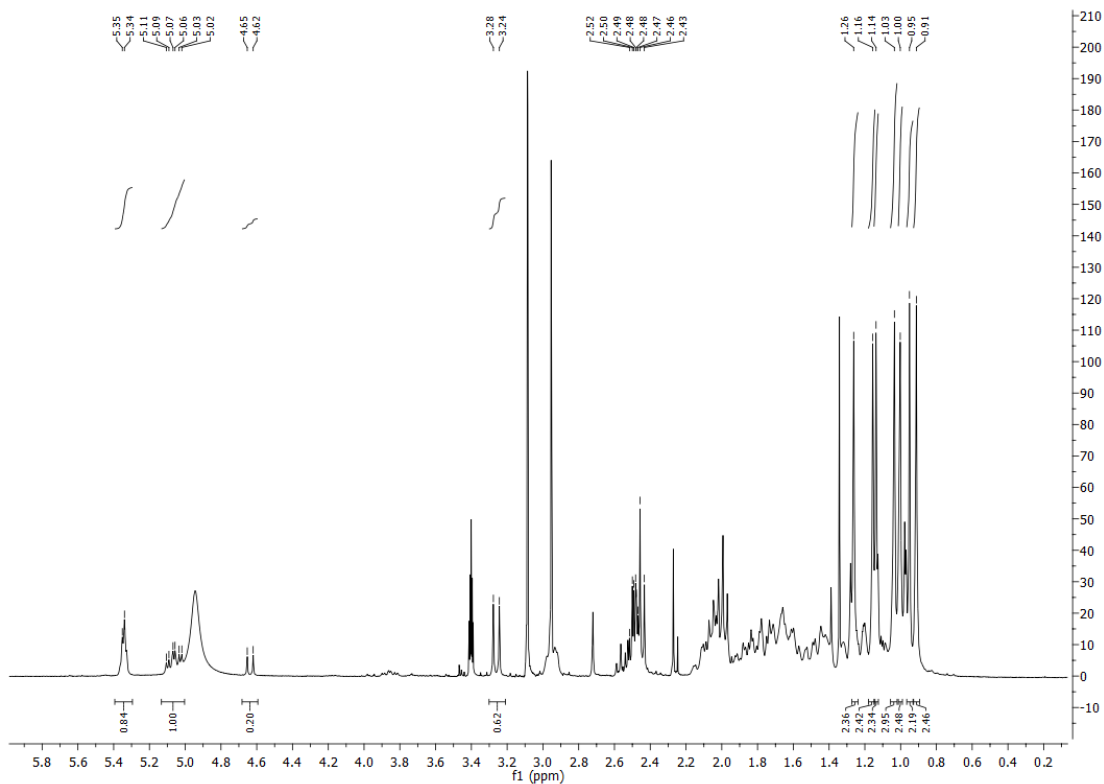
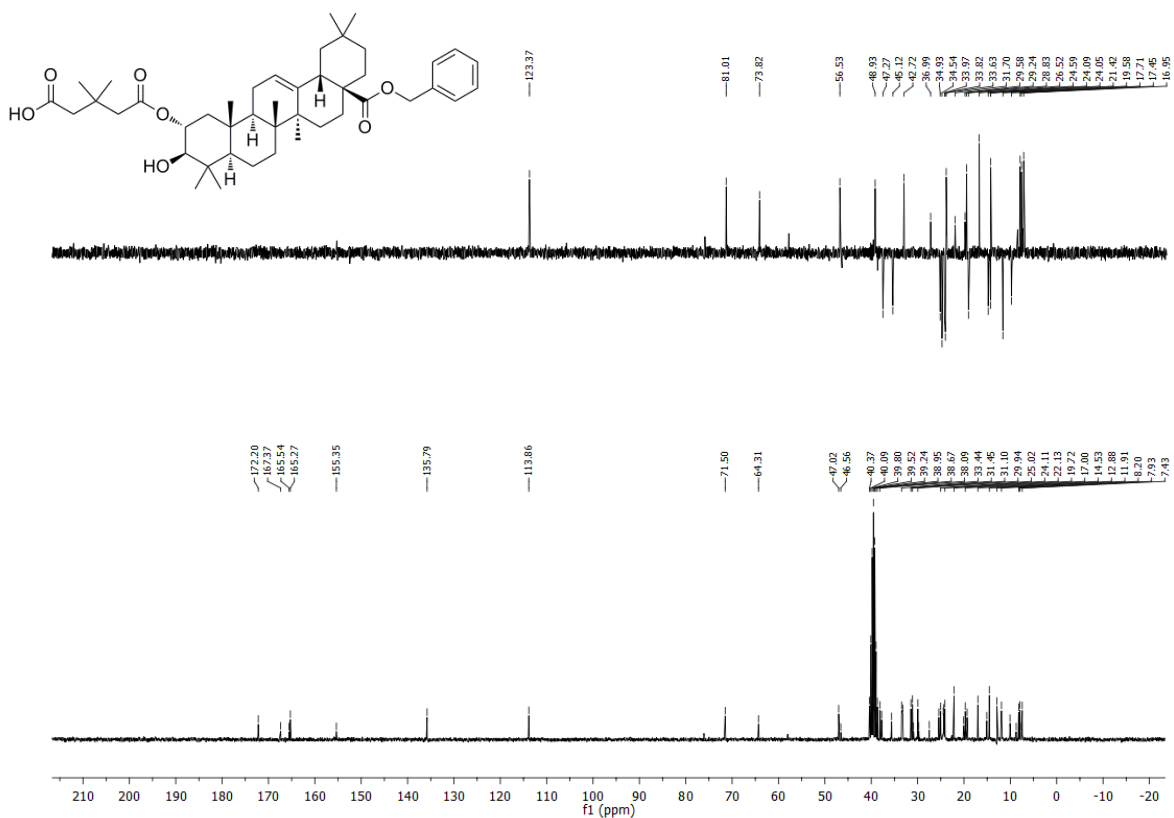
Producto 60

Espectro de ^1H RMN del producto 60Espectro de ^{13}C RMN del producto 60

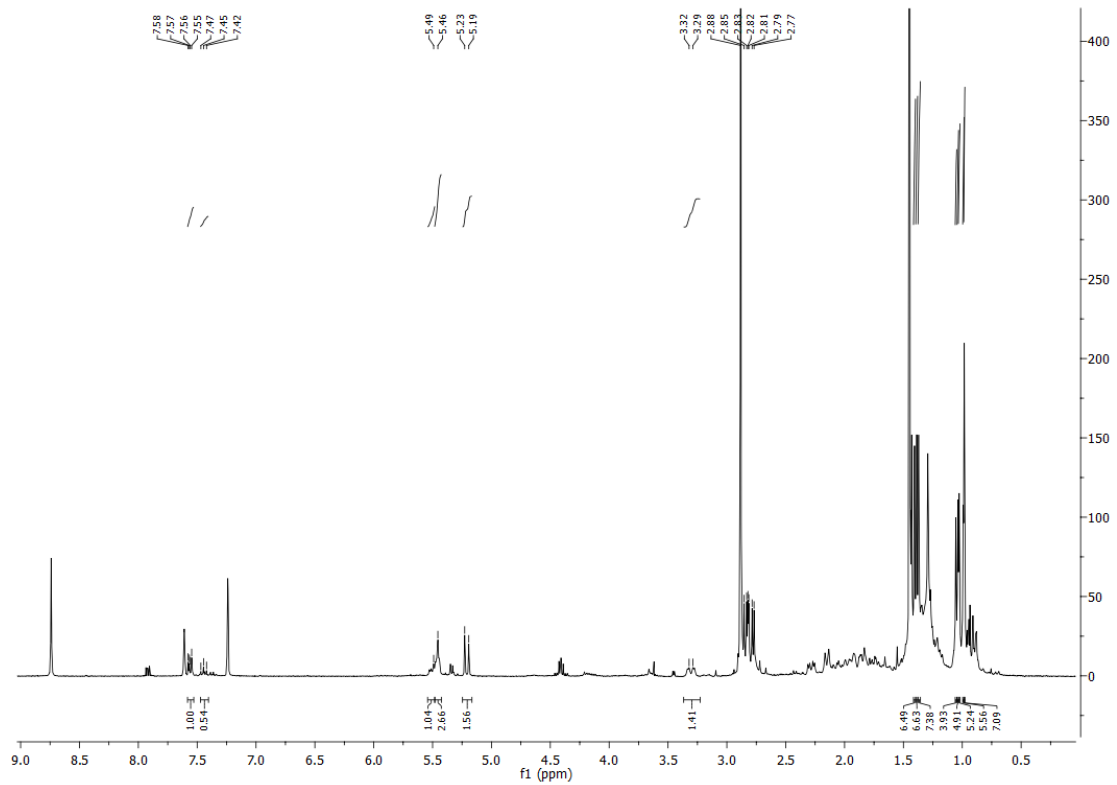
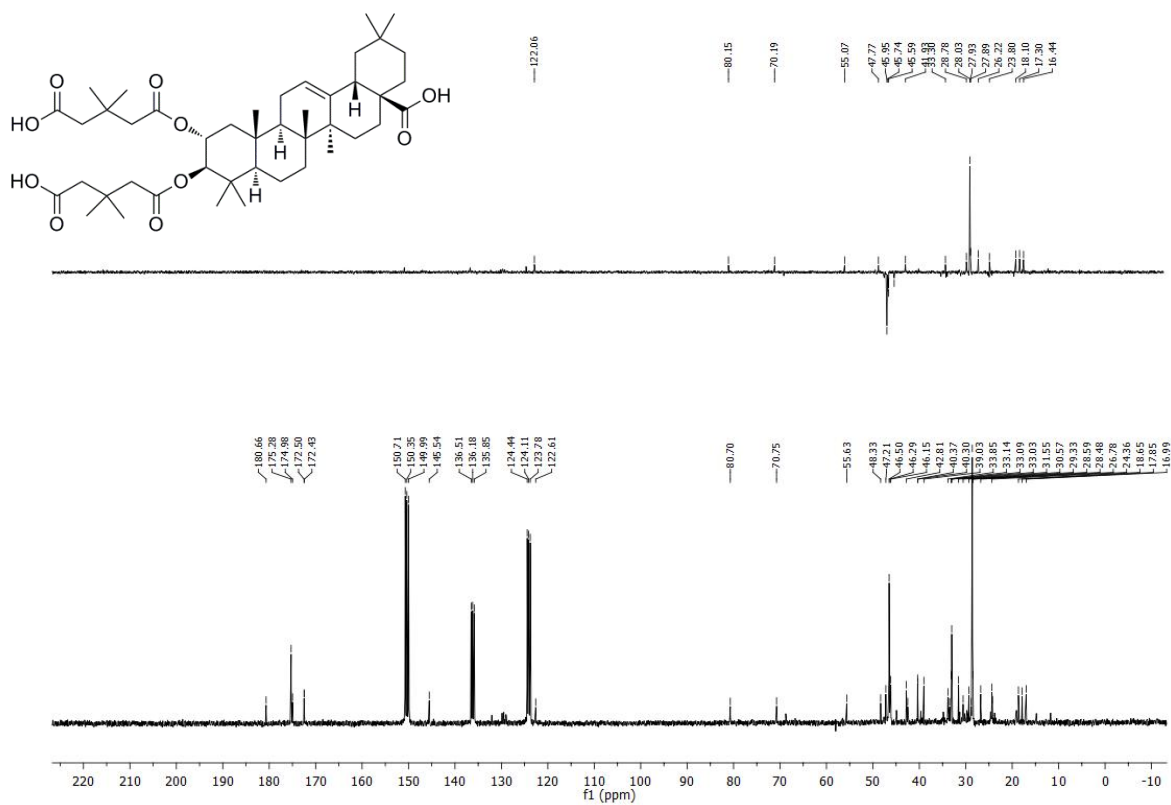
Producto 61

Espectro de ^1H RMN del producto 61Espectro de ^{13}C RMN del producto 61

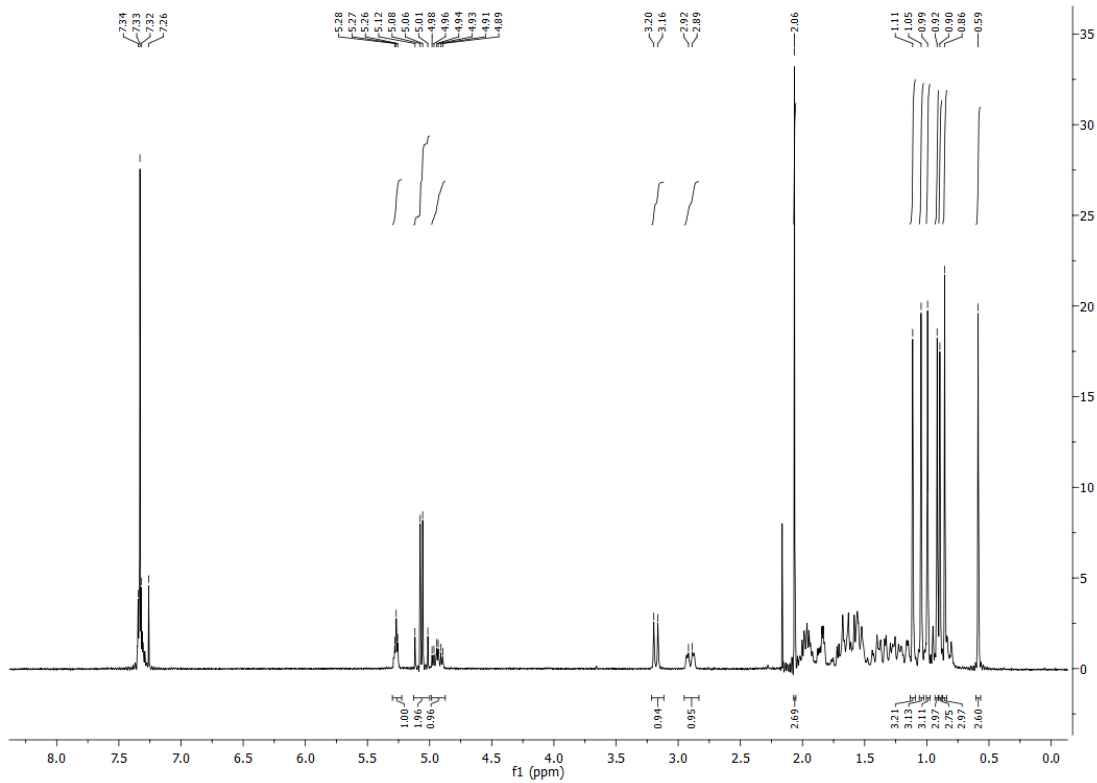
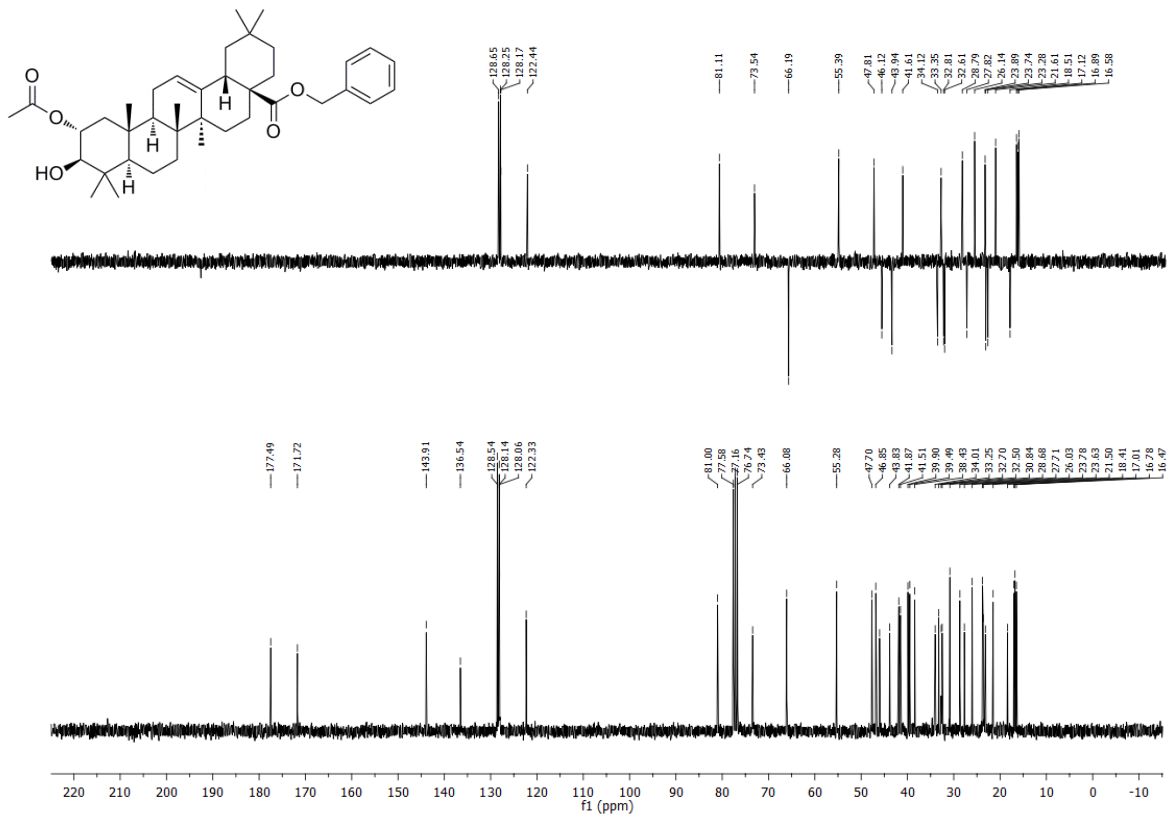
Producto 62

Espectro de ^1H RMN del producto 62Espectro de ^{13}C RMN del producto 62

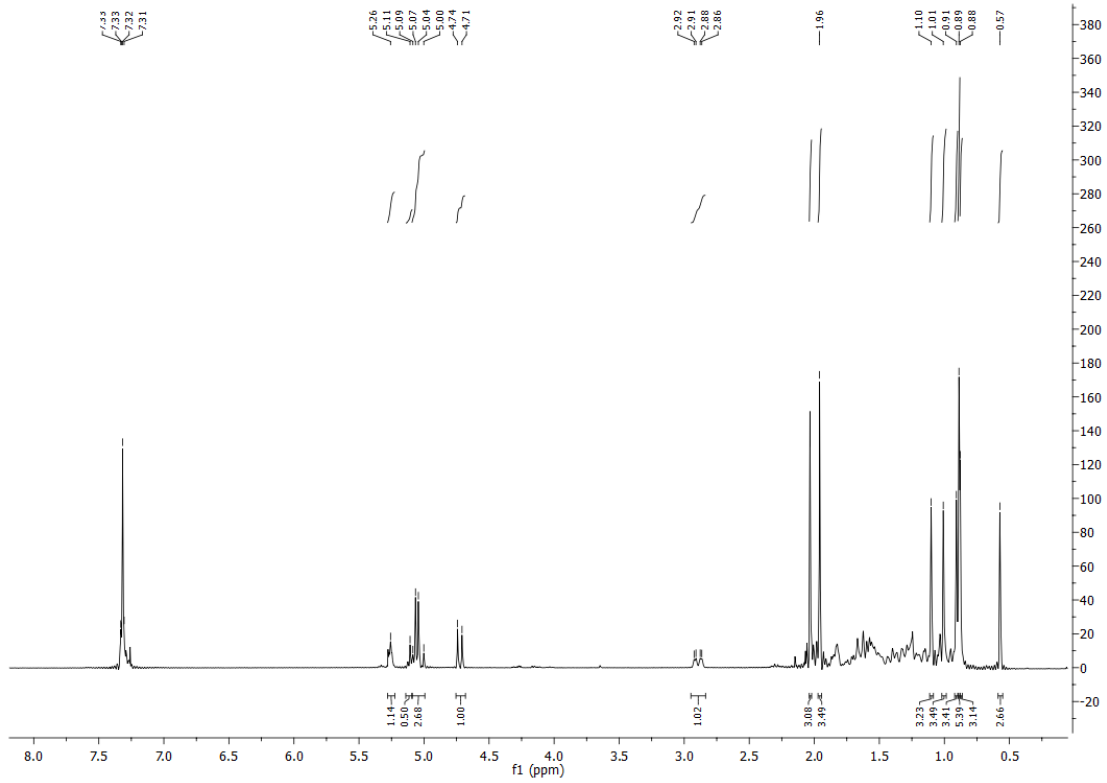
Producto 63

Espectro de ^1H RMN del producto 63Espectro de ^{13}C RMN del producto 63

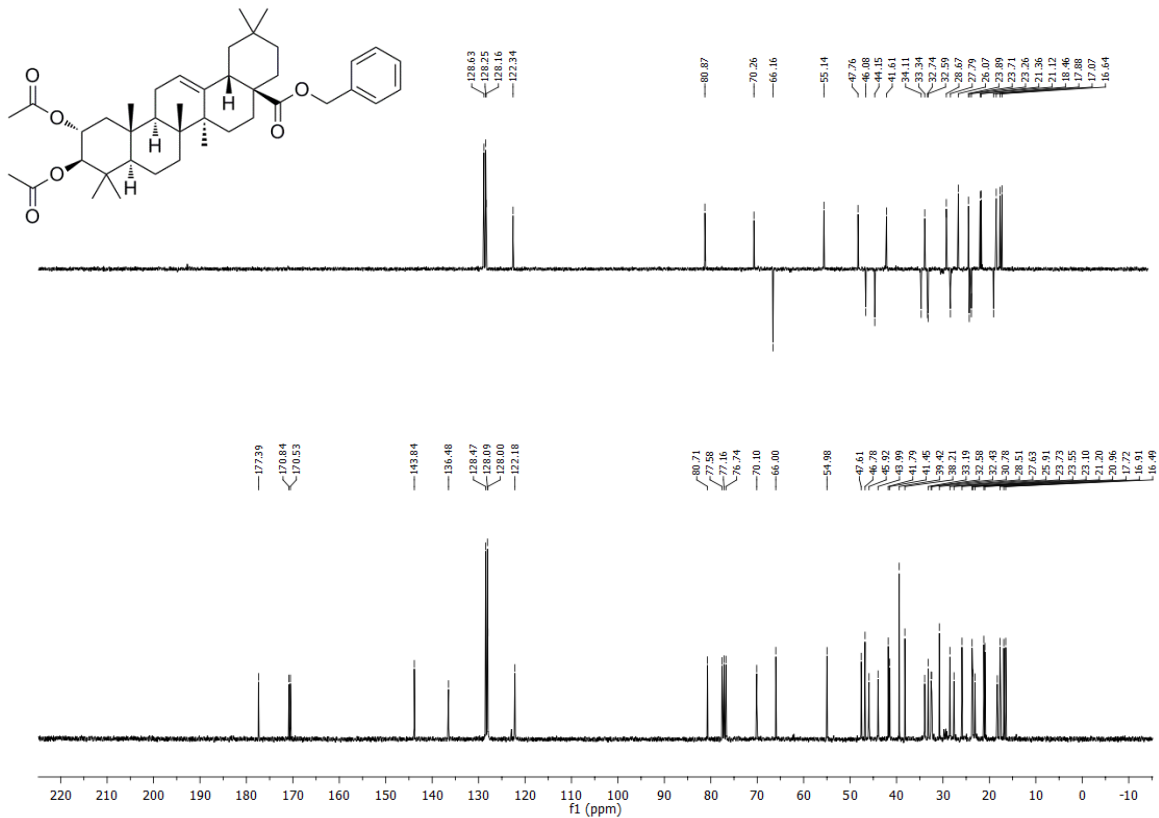
Producto 64

Espectro de ^1H RMN del producto 64Espectro de ^{13}C RMN del producto 64

Producto 65

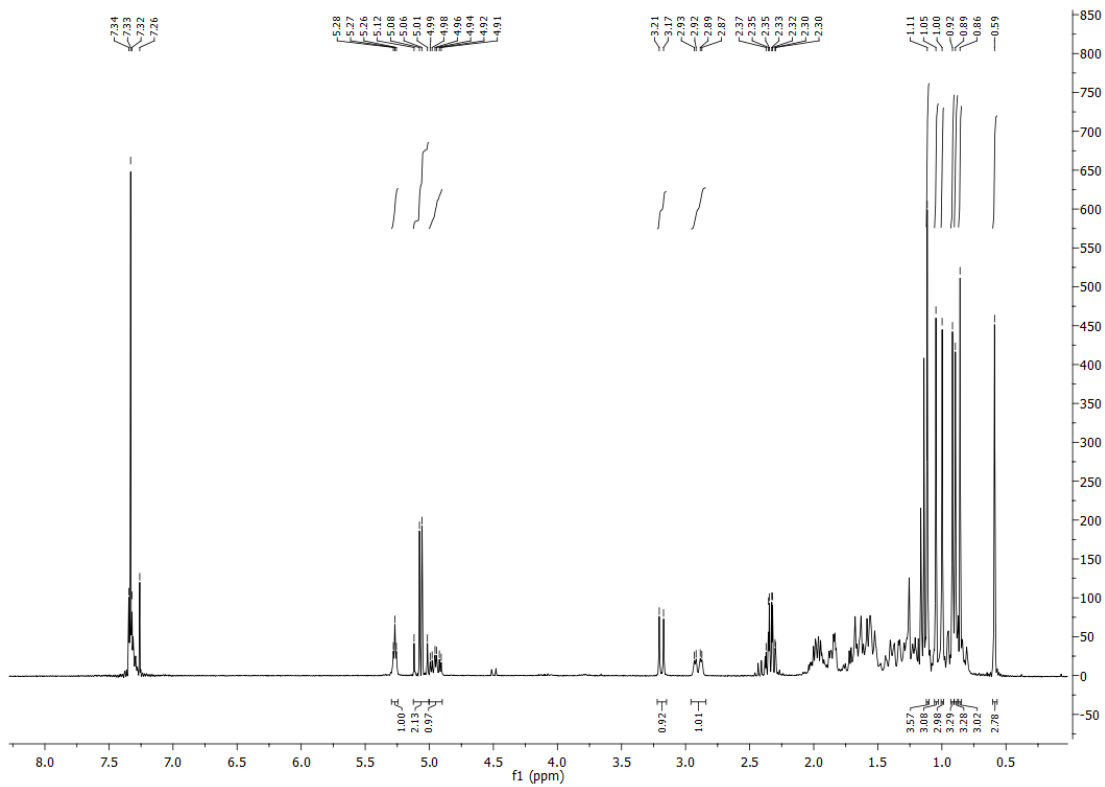
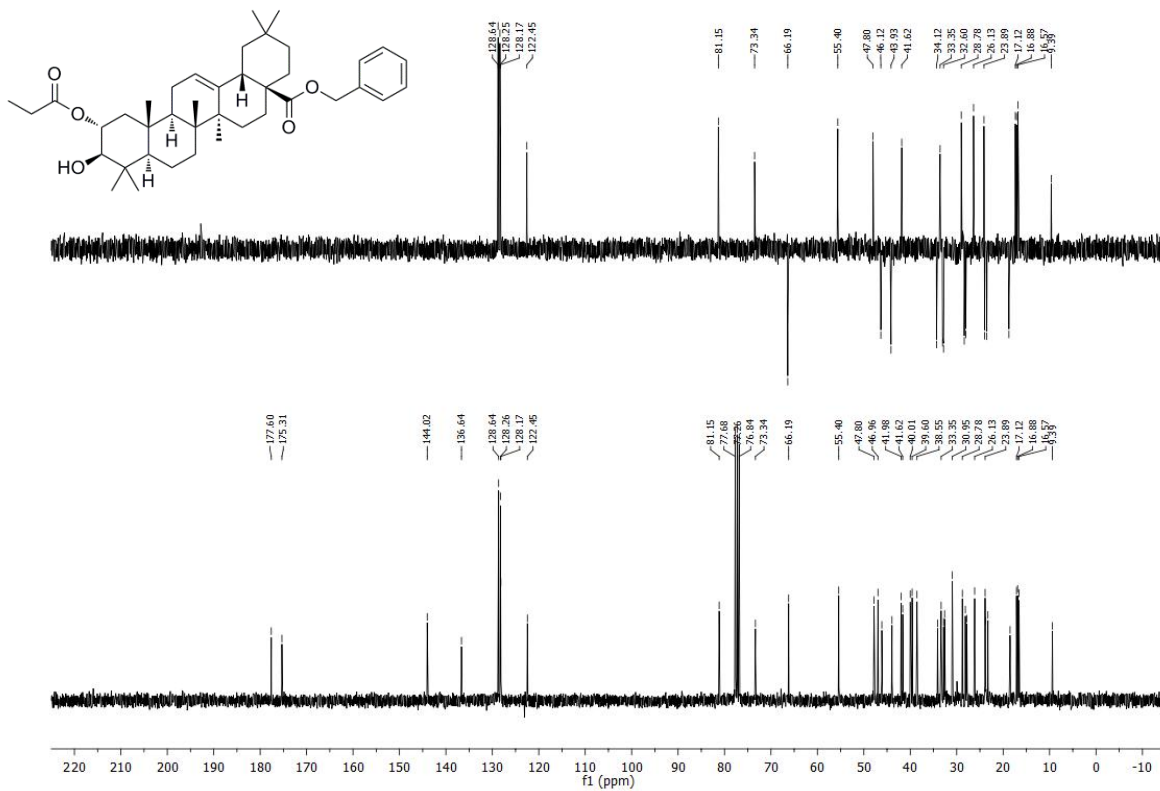


Espectro de ¹H RMN del producto 65

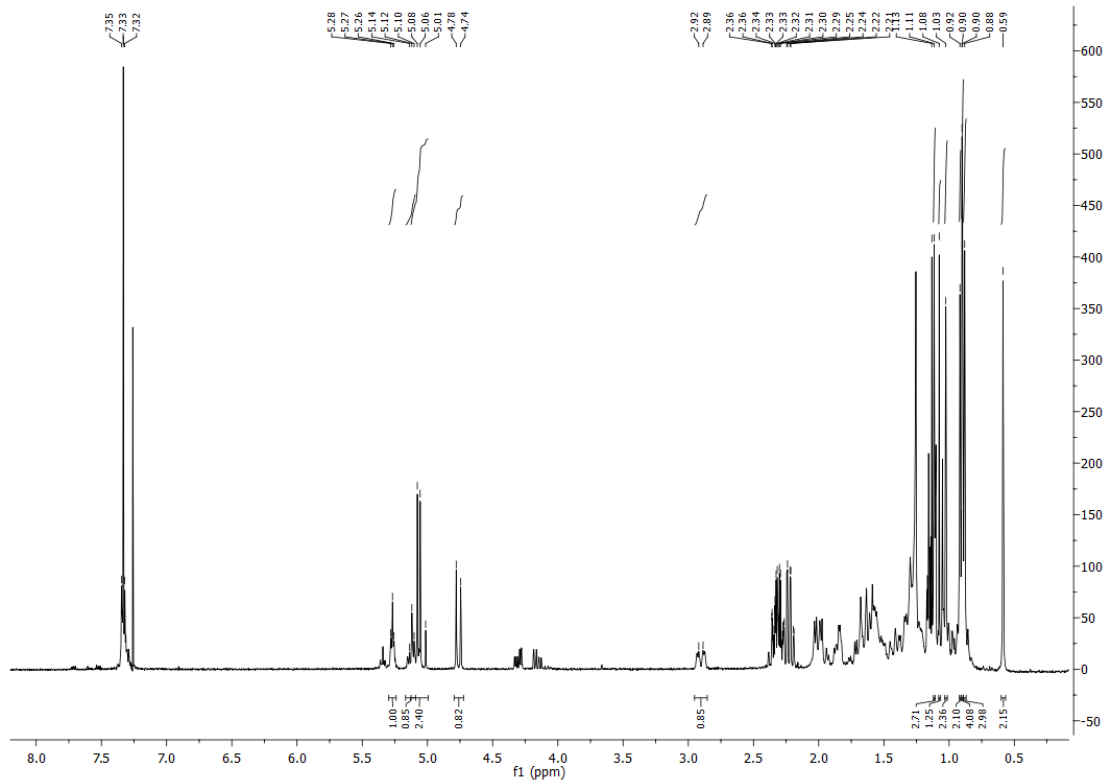
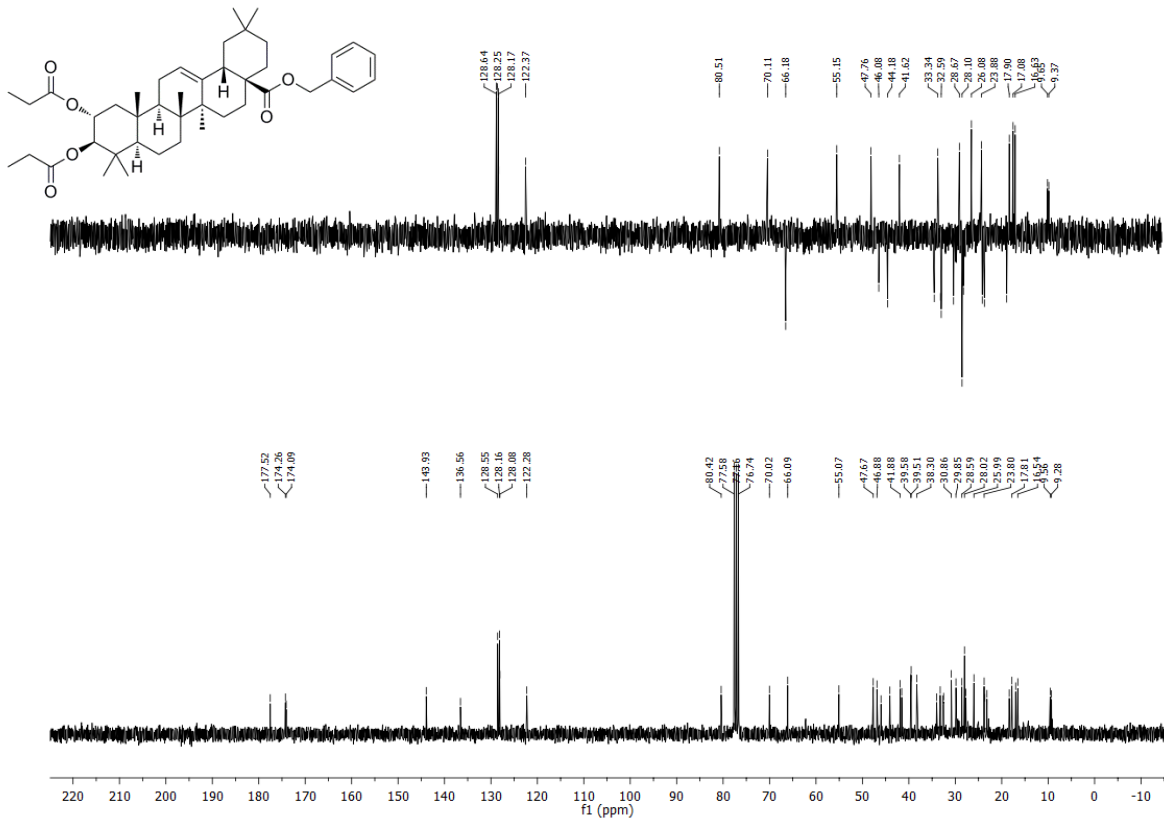


Espectro de ¹³C RMN del producto 65

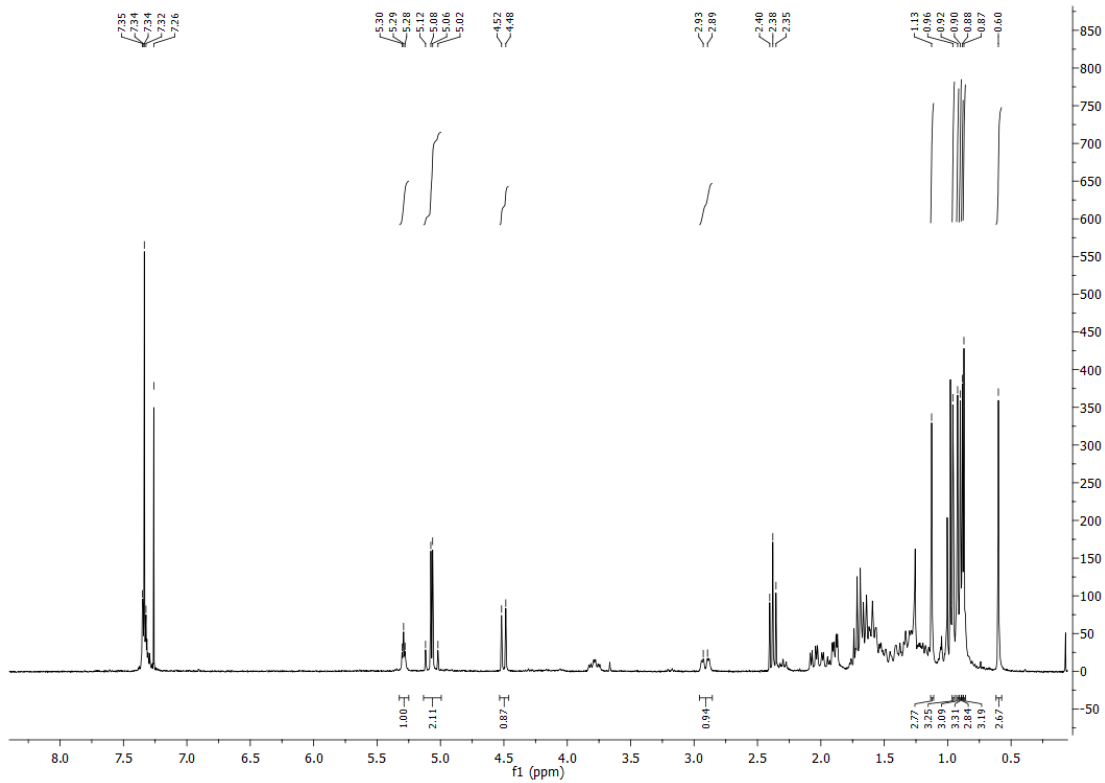
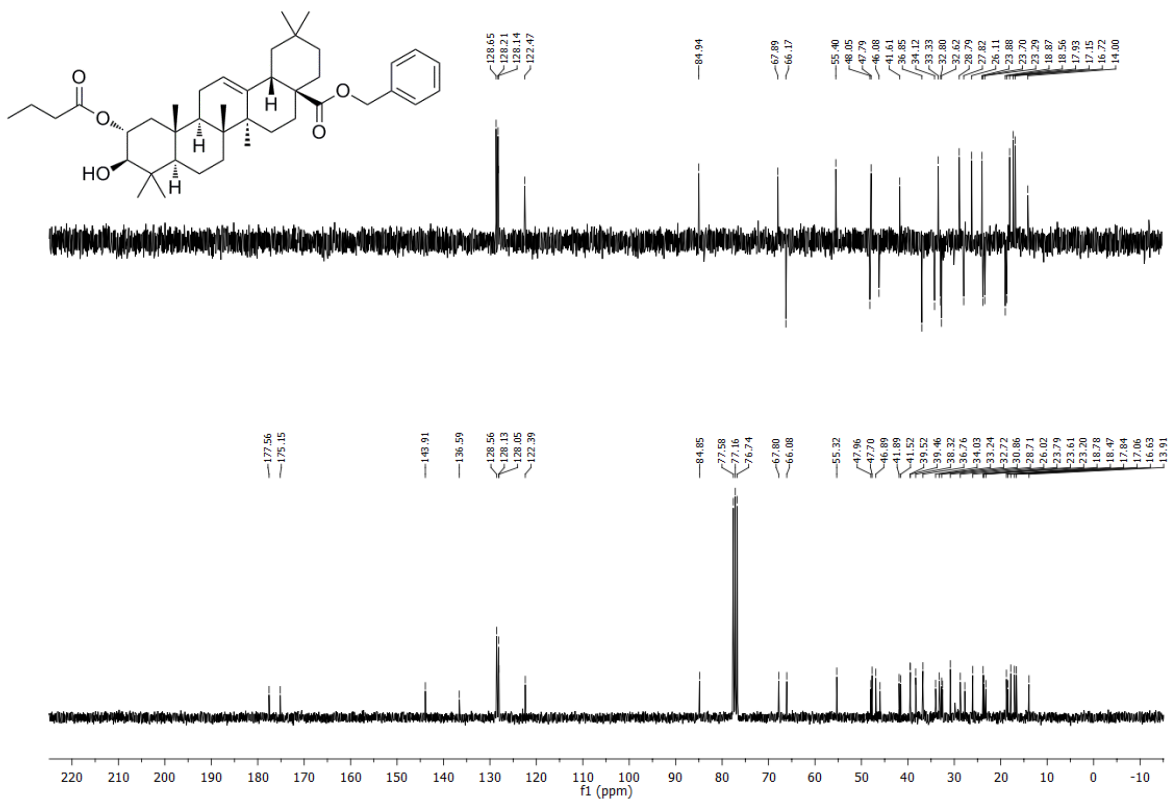
Producto 66

Espectro de ^1H RMN del producto 66Espectro de ^{13}C RMN del producto 66

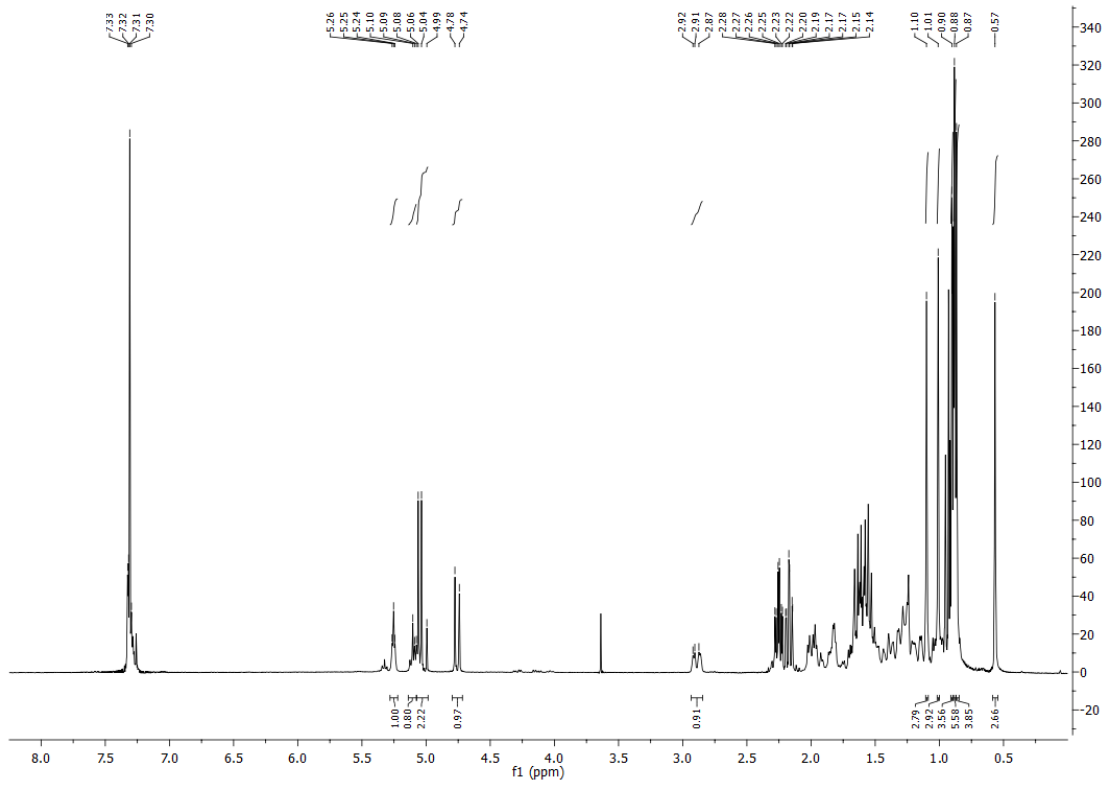
Producto 67

Espectro de ^1H RMN del producto 67Espectro de ^{13}C RMN del producto 67

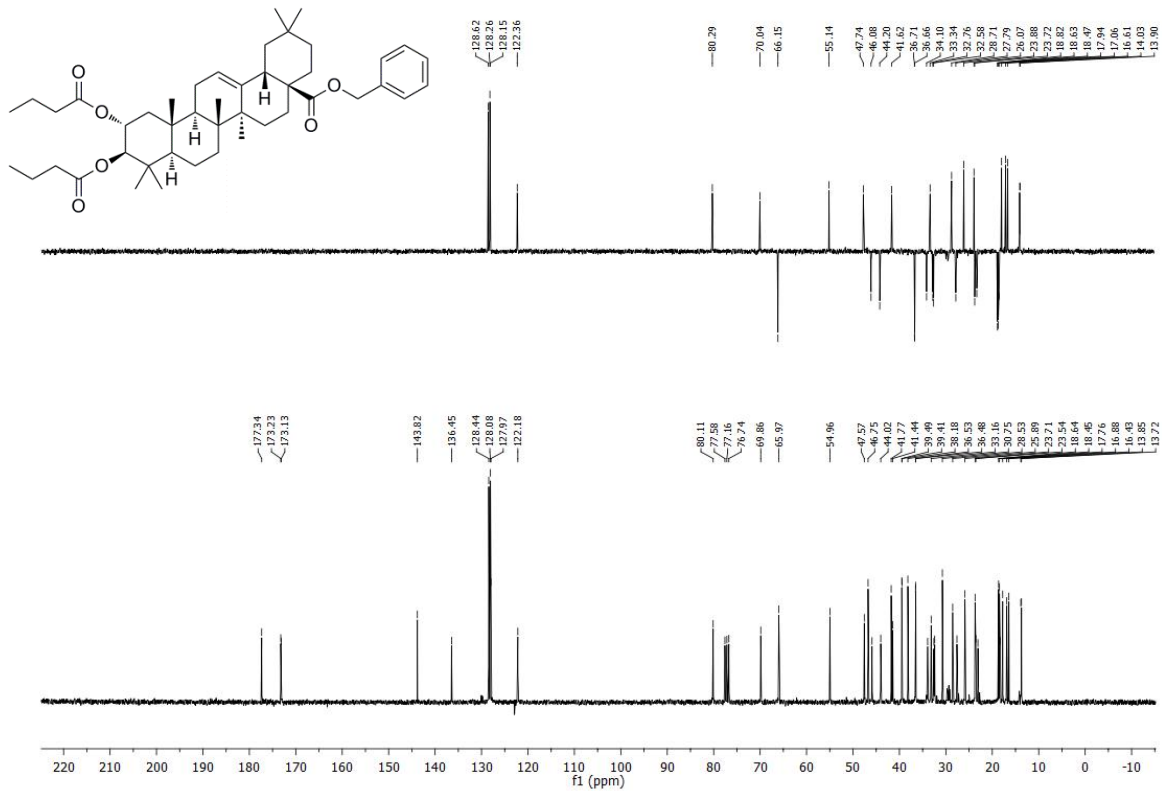
Producto 68

Espectro de ^1H RMN del producto 68Espectro de ^{13}C RMN del producto 68

Producto 69

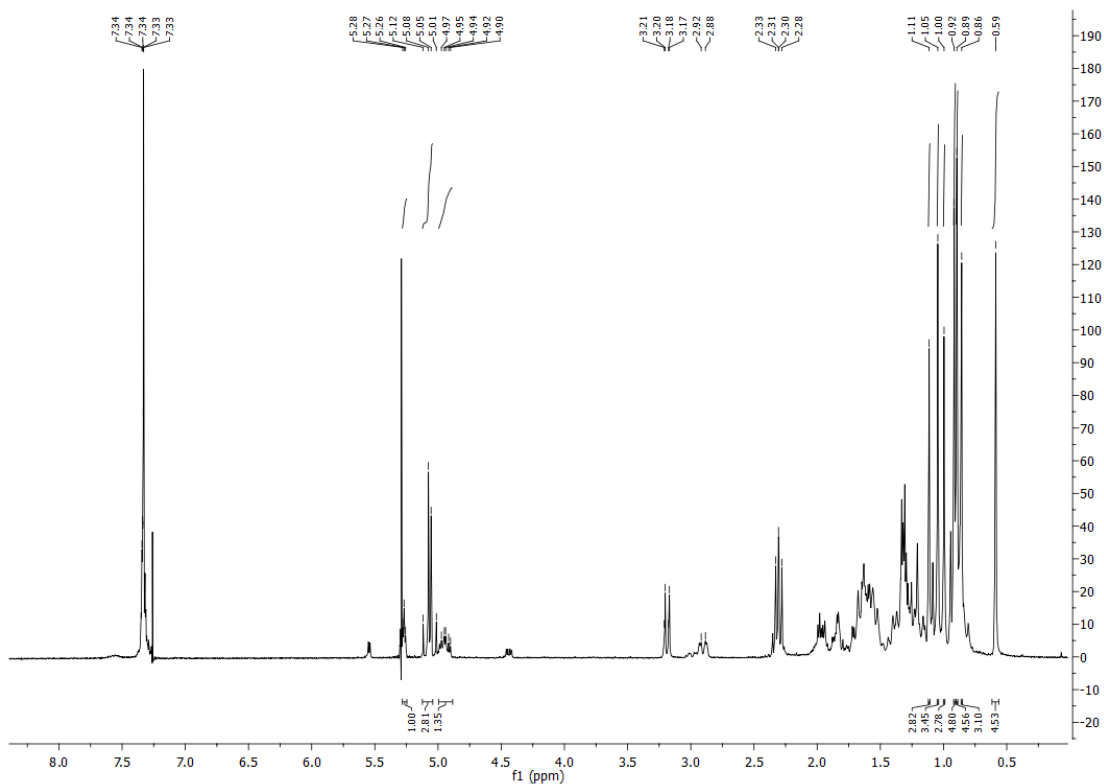
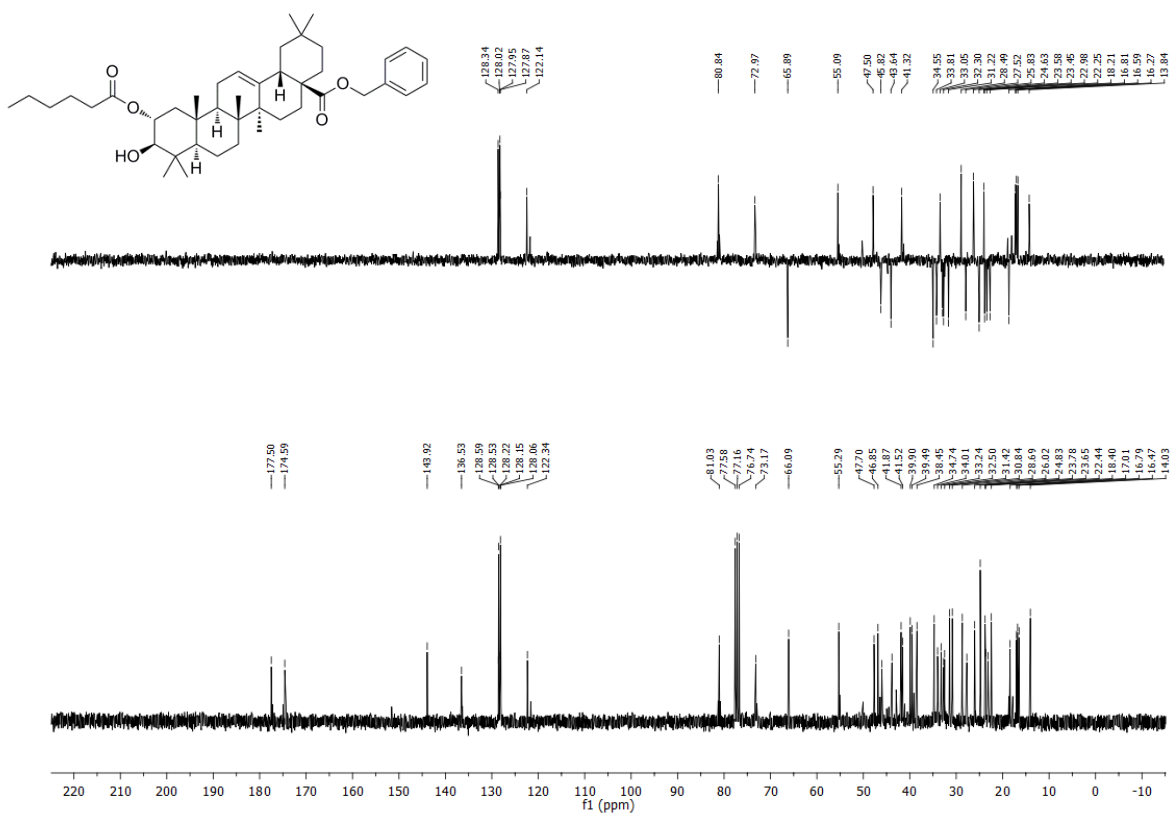


Espectro de ¹H RMN del producto 69

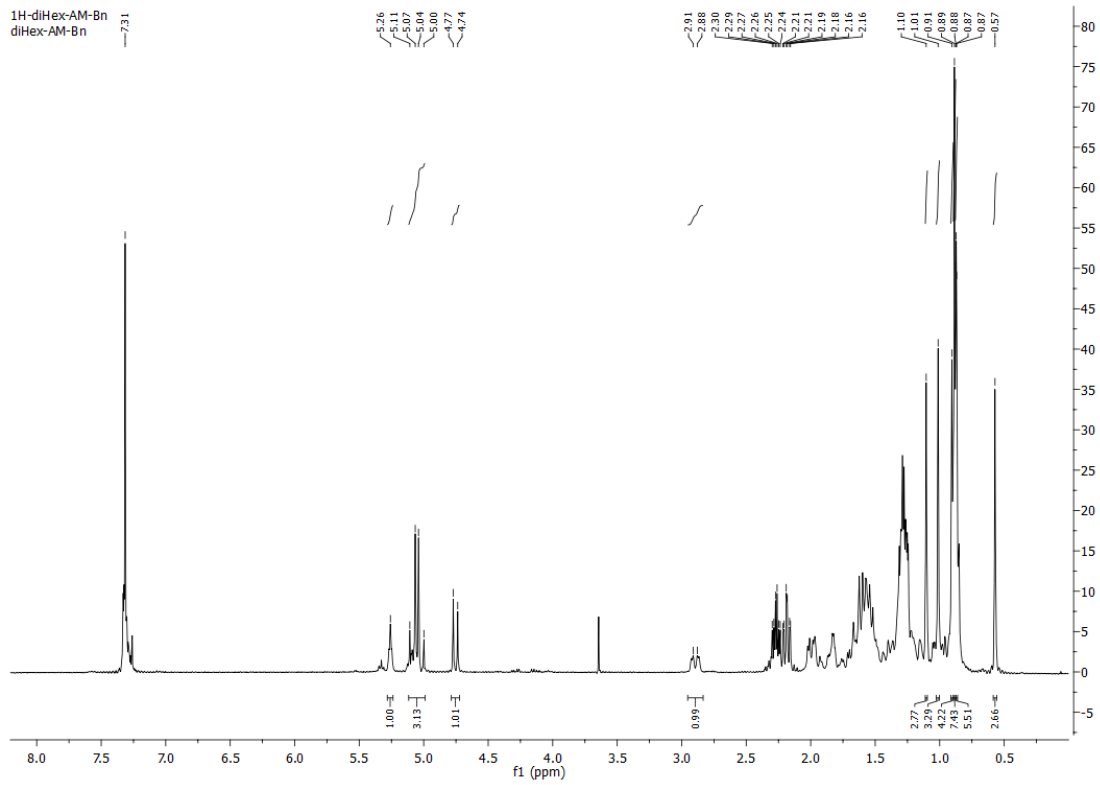


Espectro de ¹³C RMN del producto 69

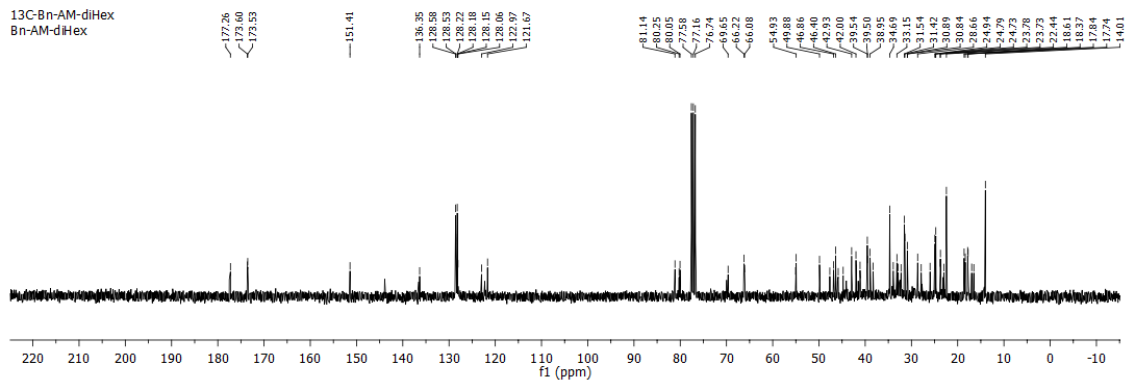
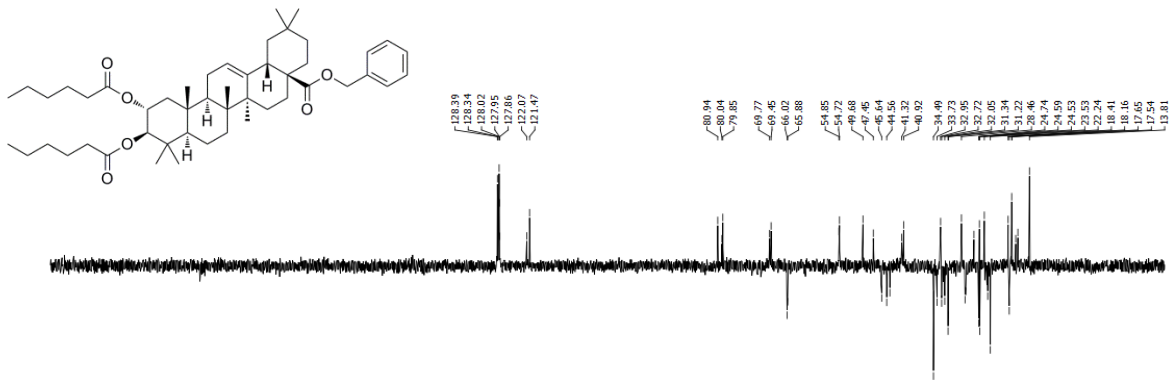
Producto 70

Espectro de ^1H RMN del producto 70Espectro de ^{13}C RMN del producto 70

Producto 71

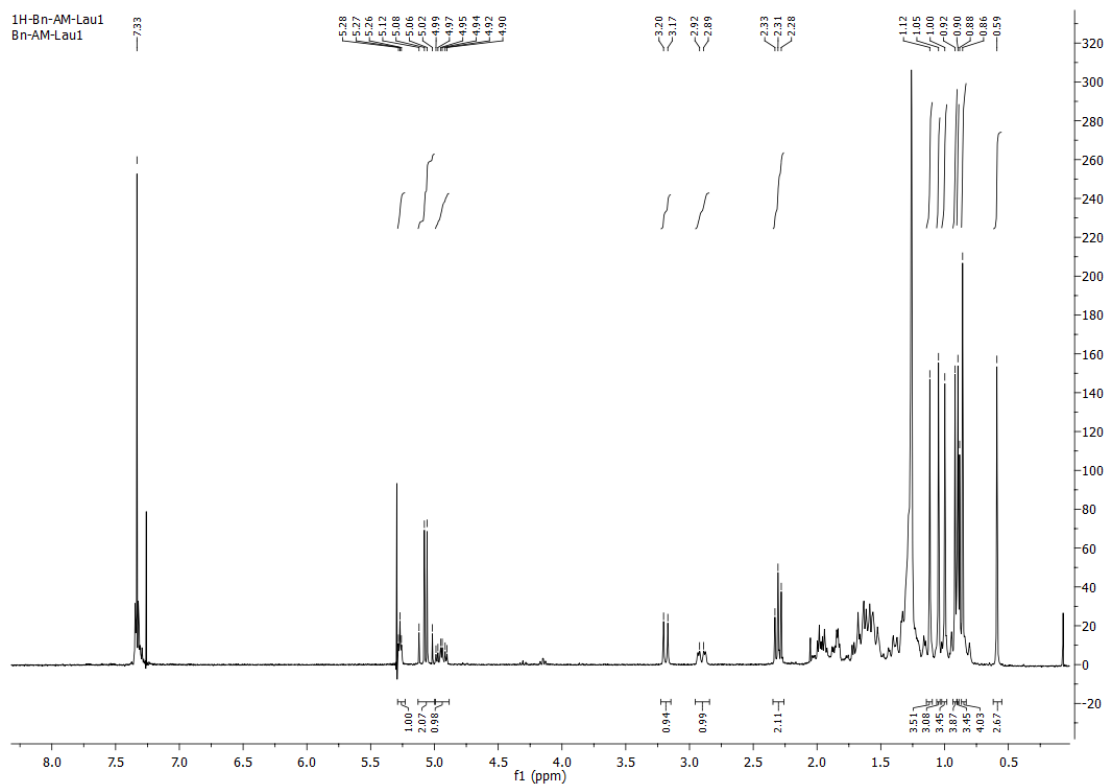
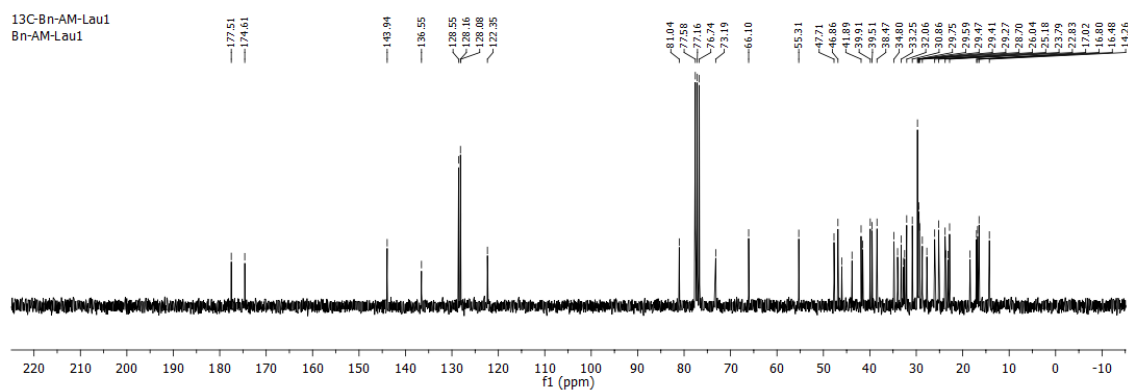
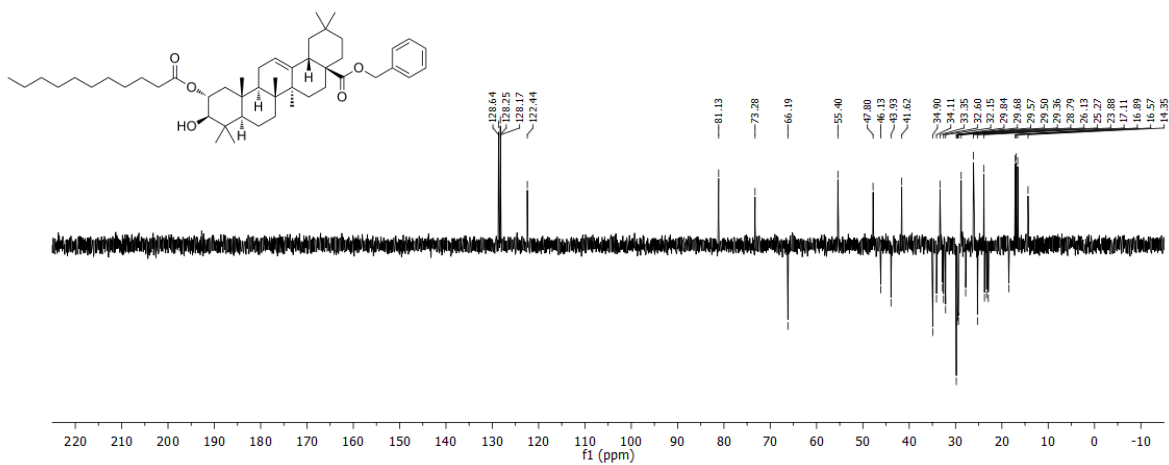


Espectro de ¹H RMN del producto 71

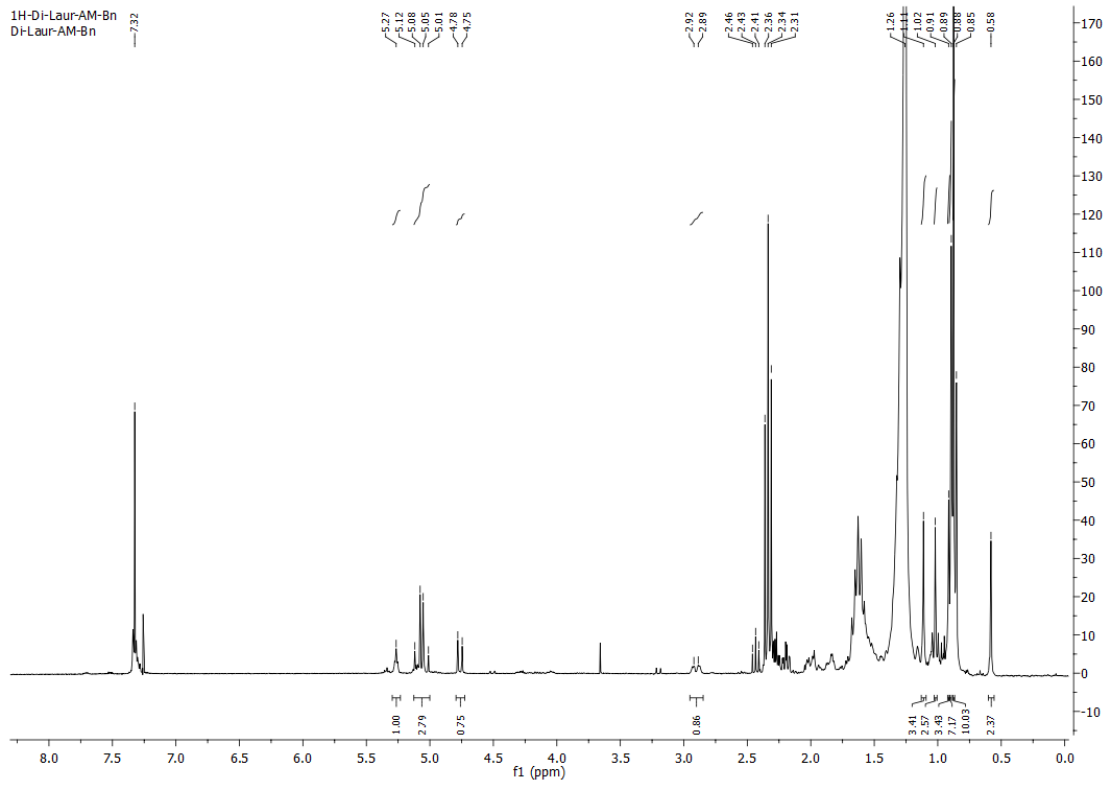


Espectro de ¹³C RMN del producto 71

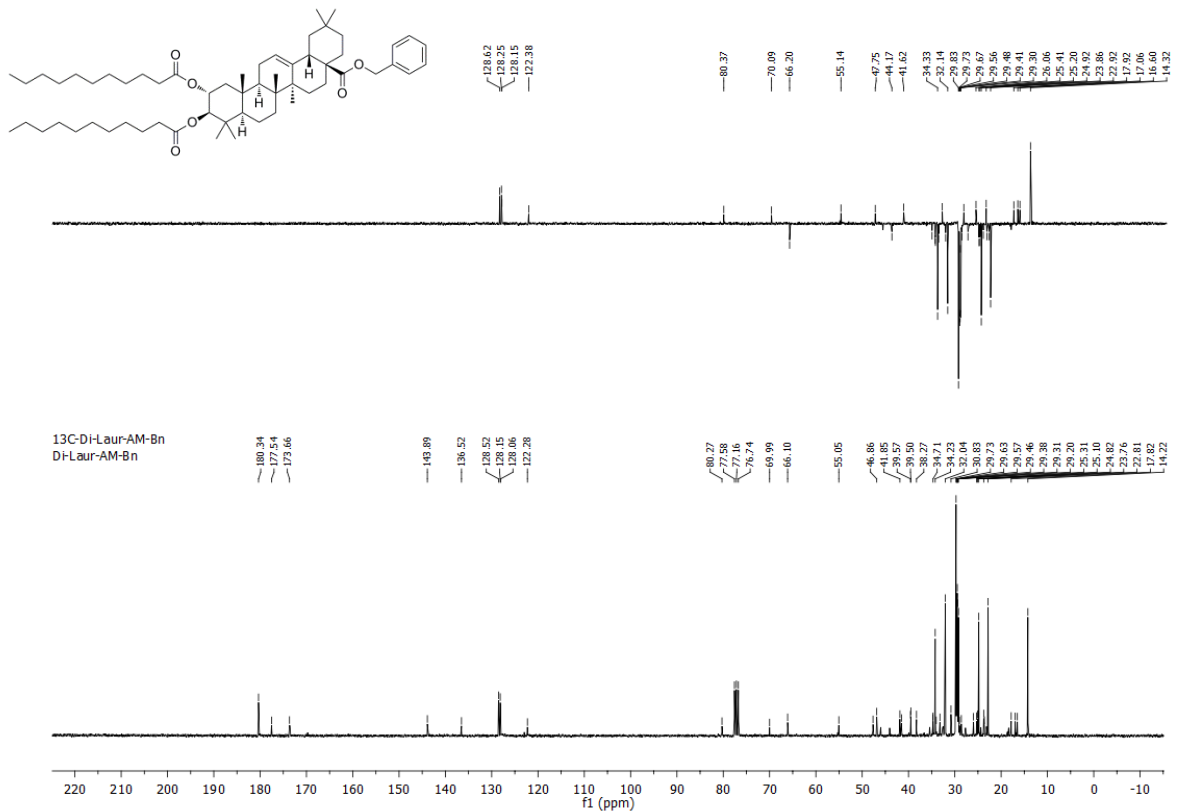
Producto 72

Espectro de ^1H RMN del producto 72Espectro de ^{13}C RMN del producto 72

Producto 73

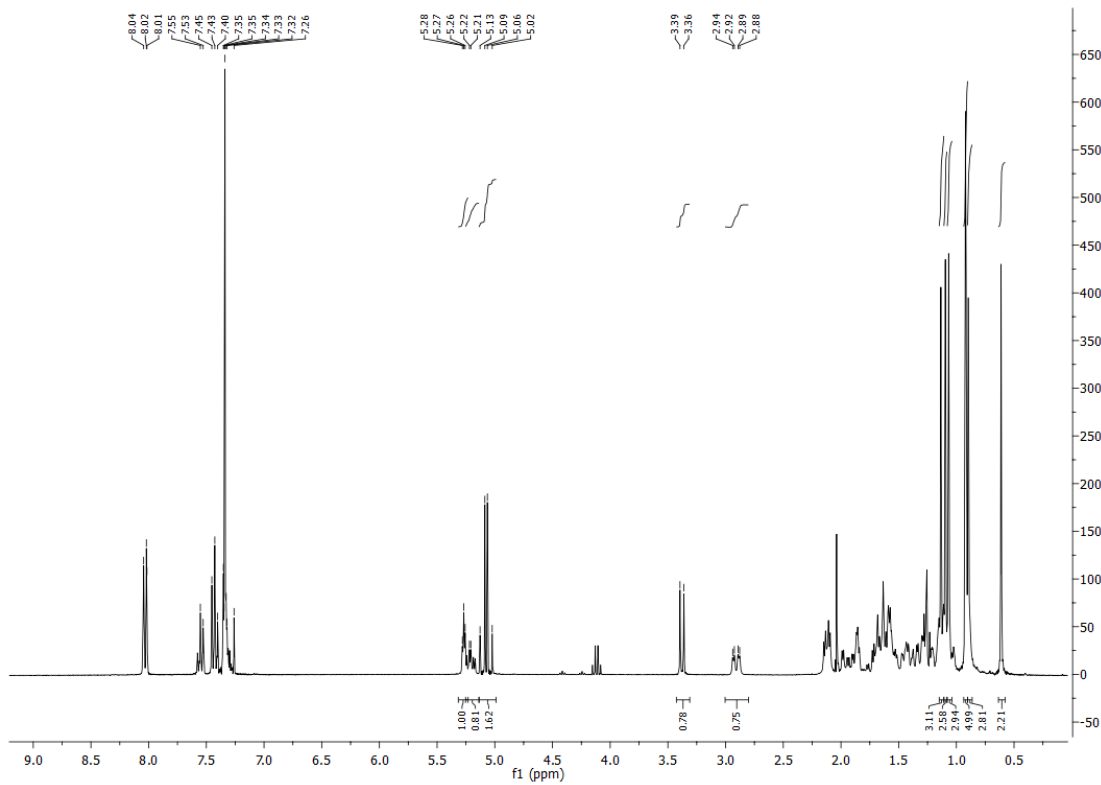
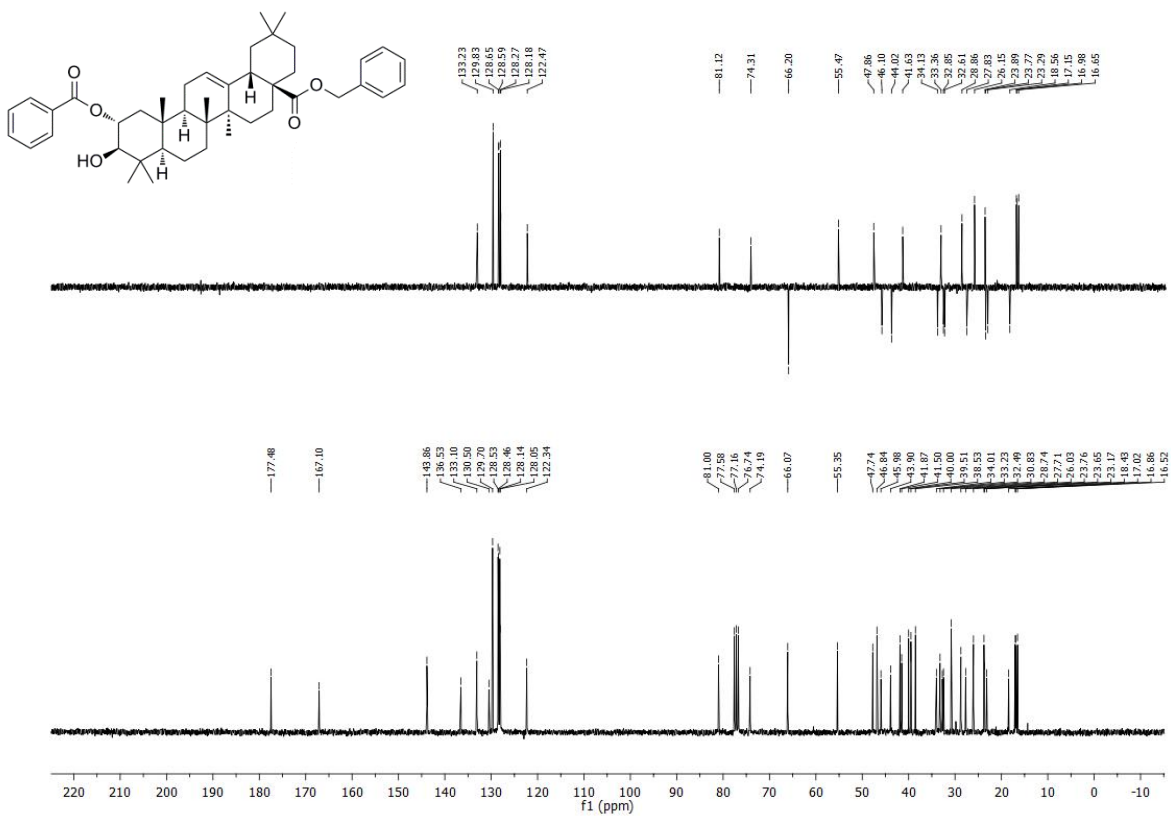


Espectro de ¹H RMN del producto 73

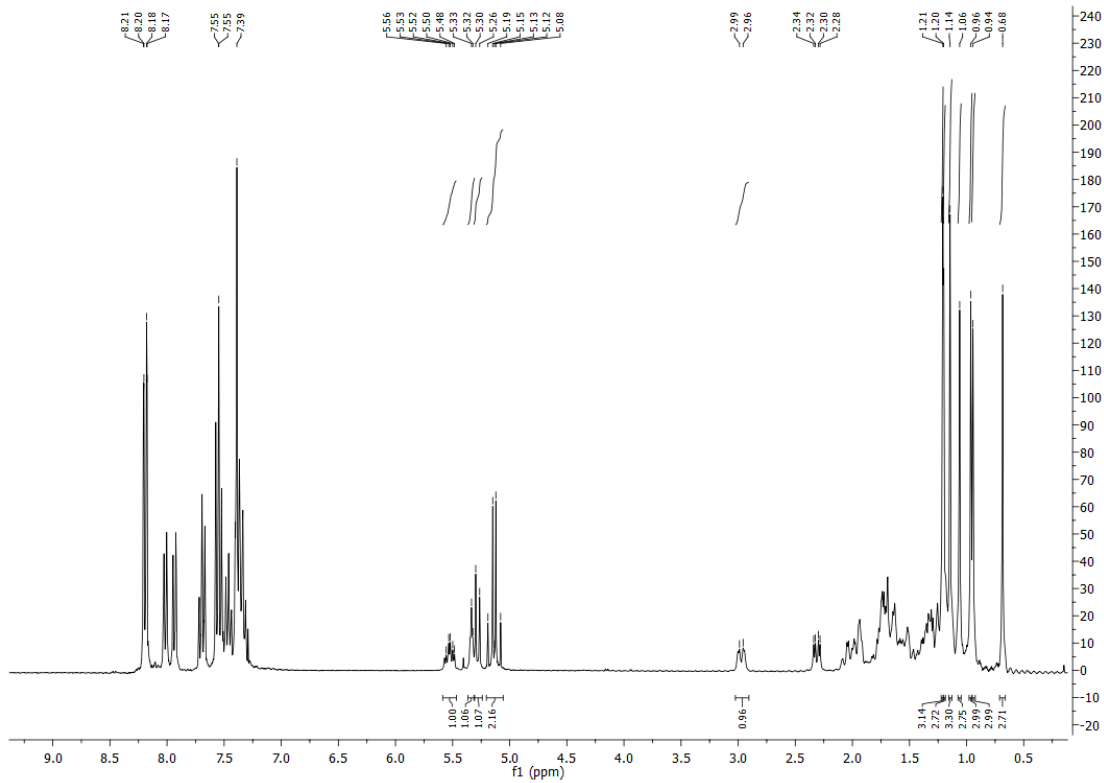


Espectro de ¹³C RMN del producto 73

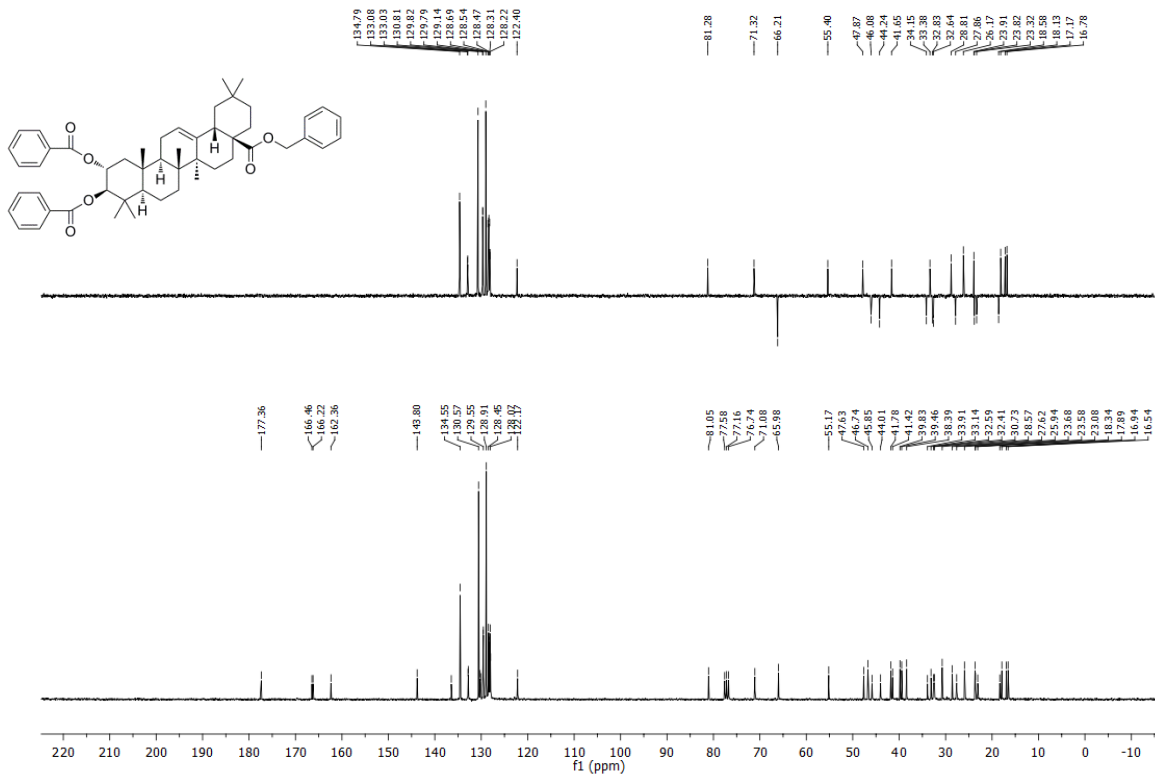
Producto 74

Espectro de ^1H RMN del producto 74Espectro de ^{13}C RMN del producto 74

Producto 75

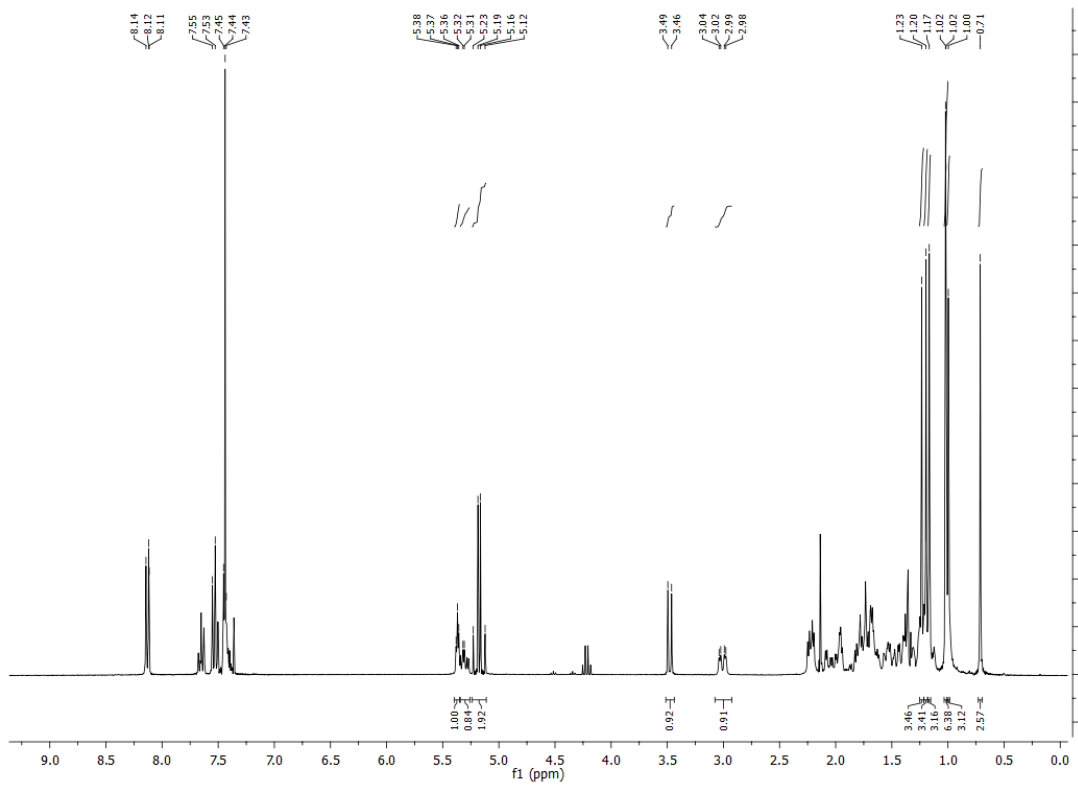
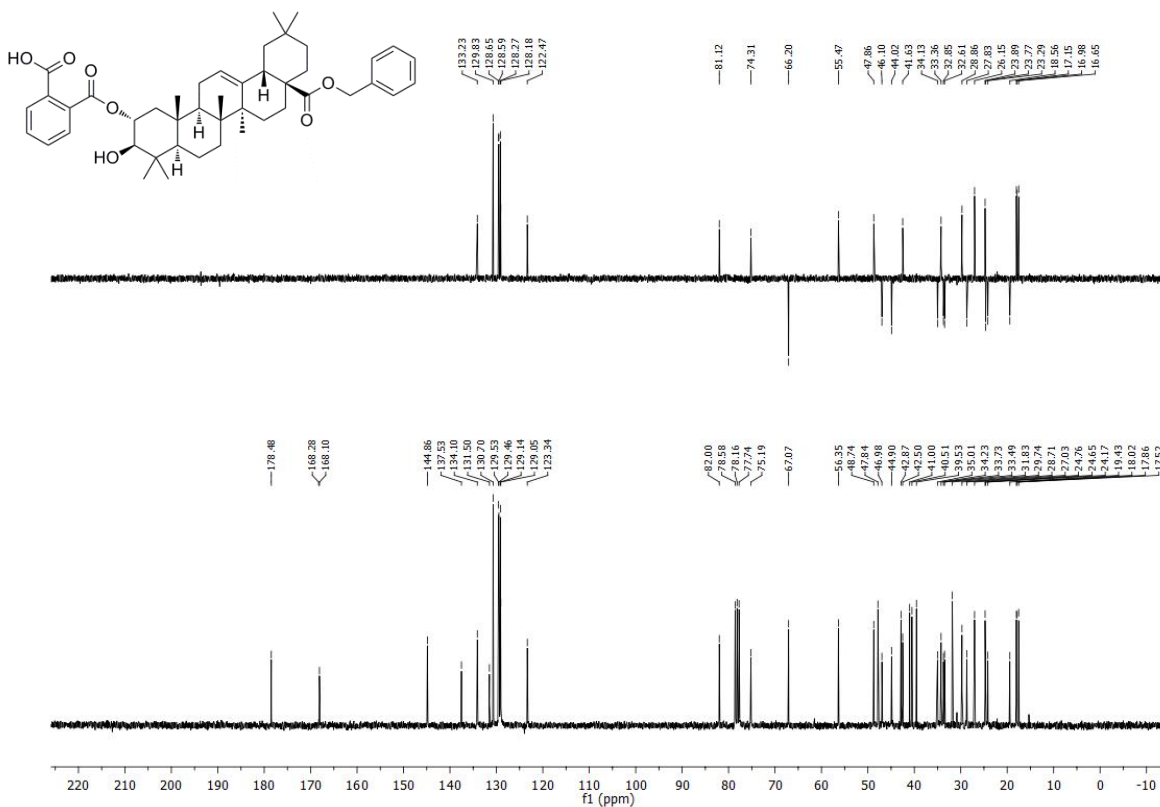


Espectro de ¹H RMN del producto 75

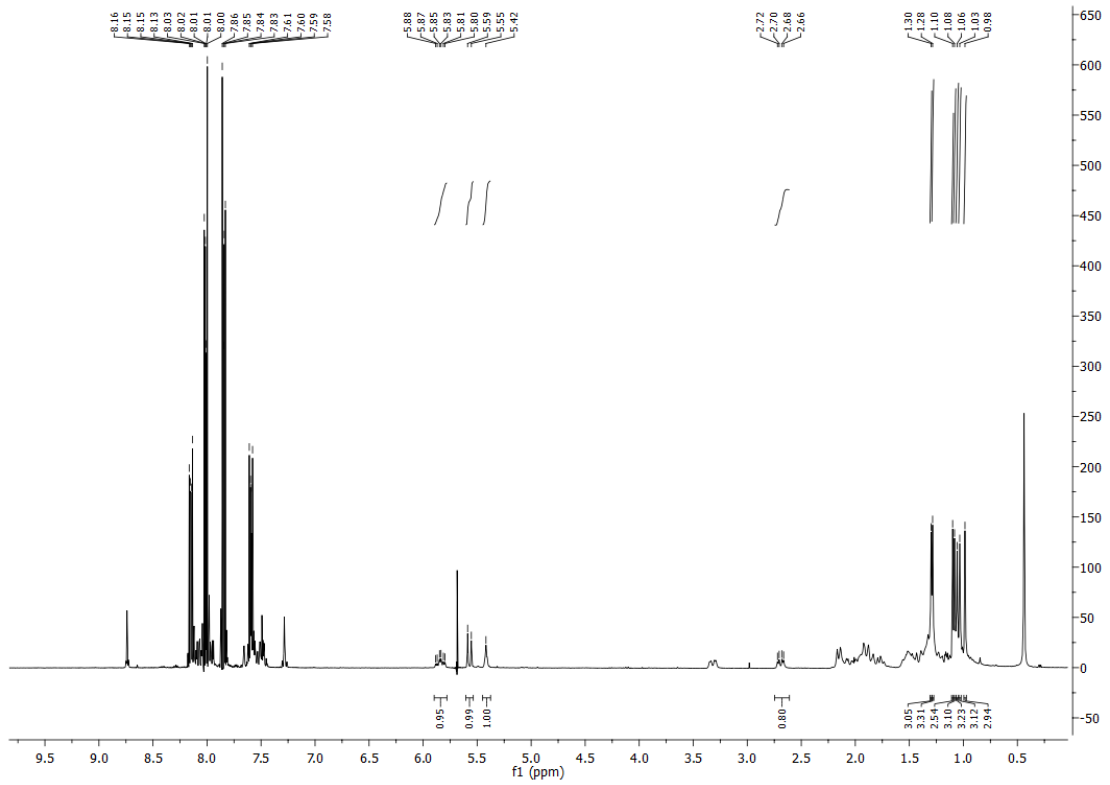


Espectro de ¹³C RMN del producto 75

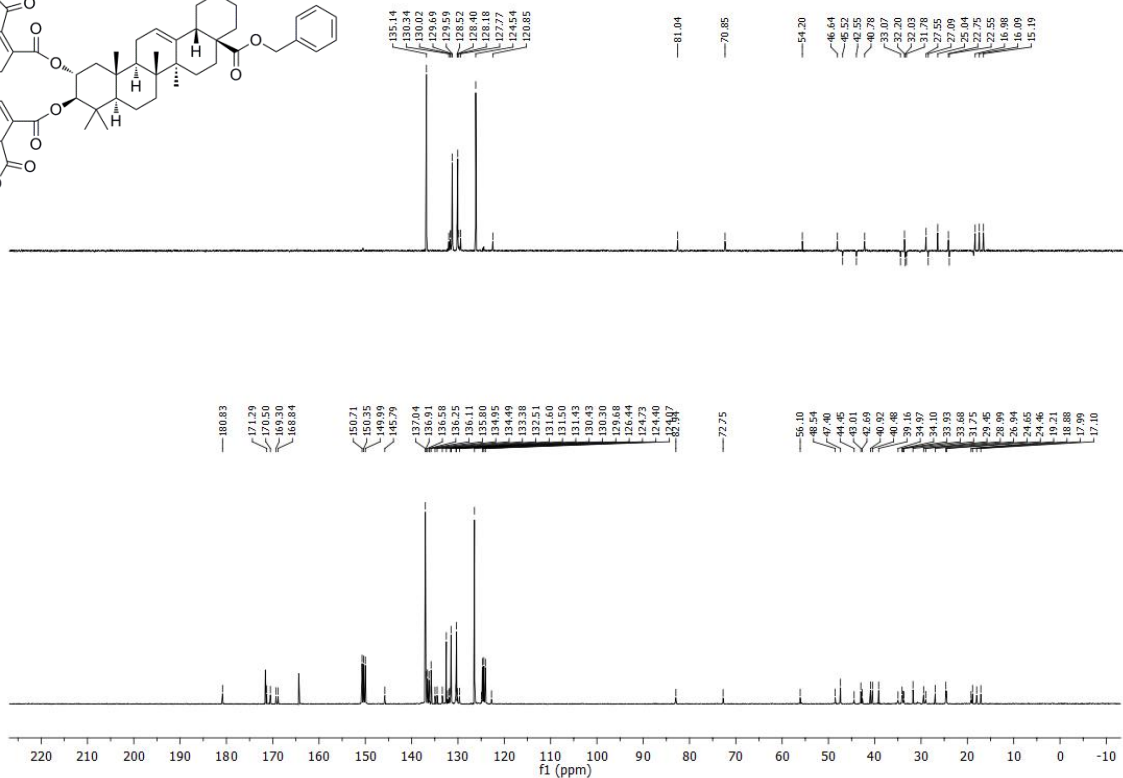
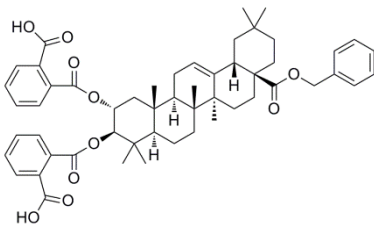
Producto 76

Espectro de ^1H RMN del producto 76Espectro de ^{13}C RMN del producto 76

Producto 77

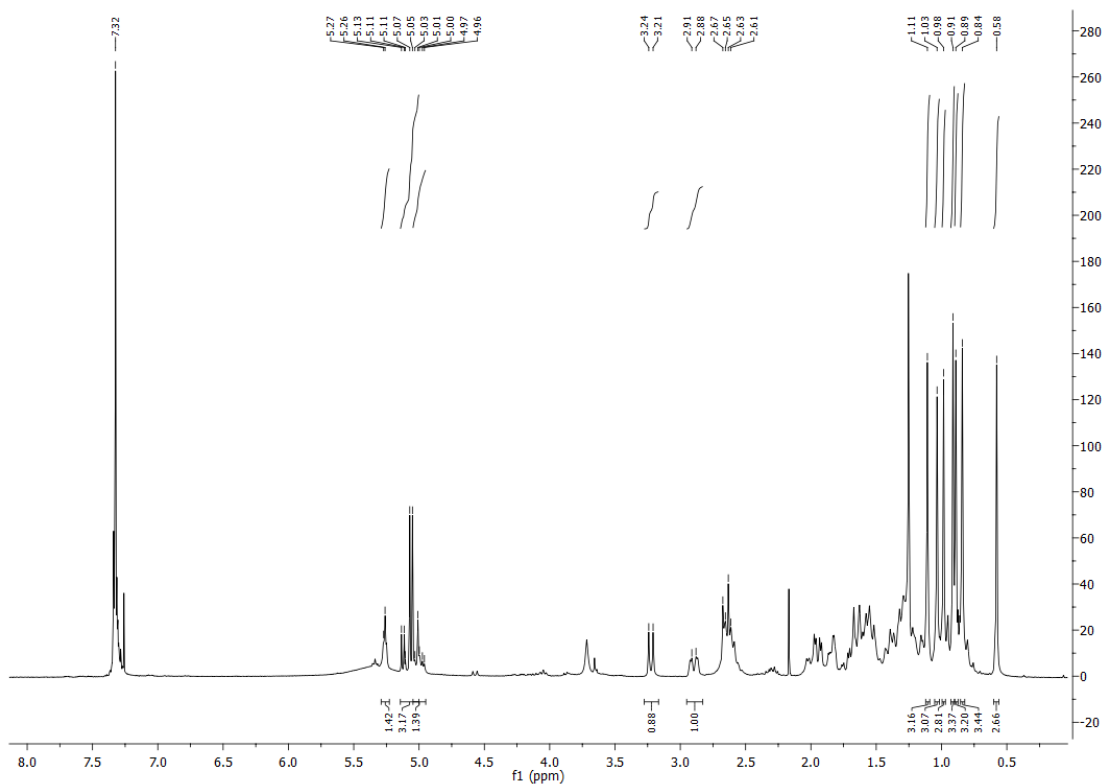
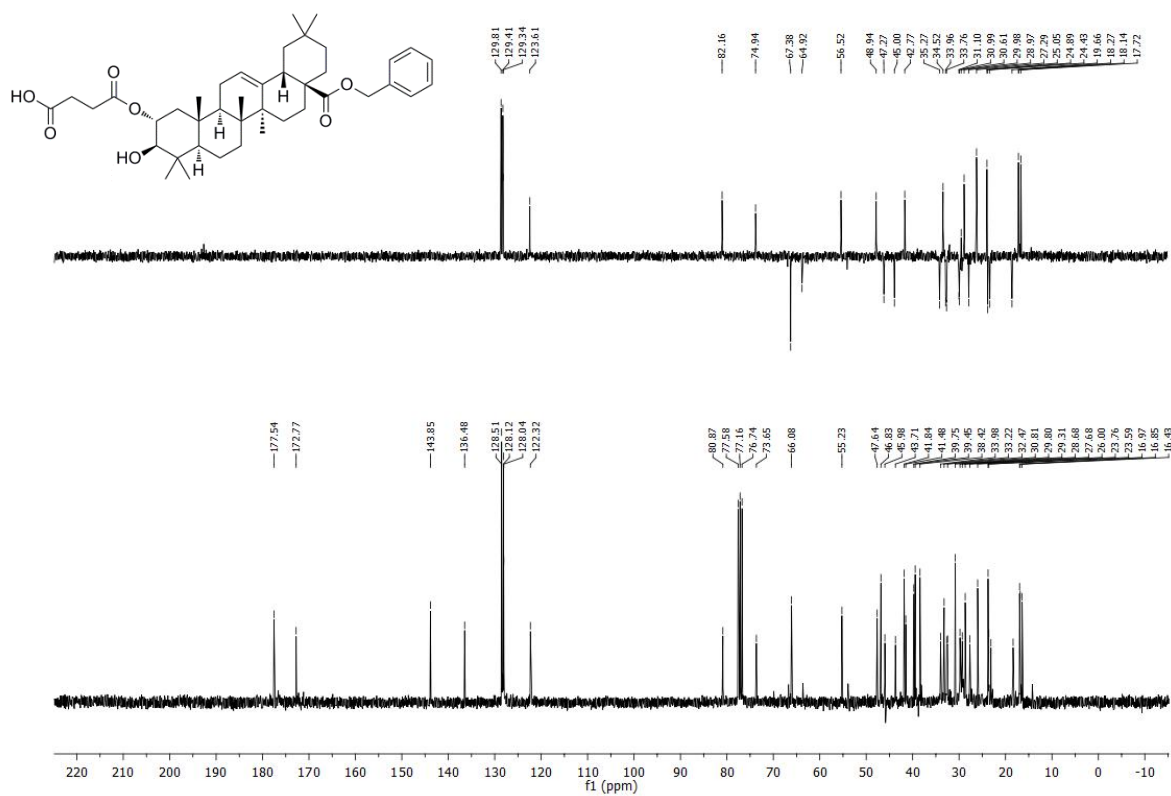


Espectro de ¹H RMN del producto 77

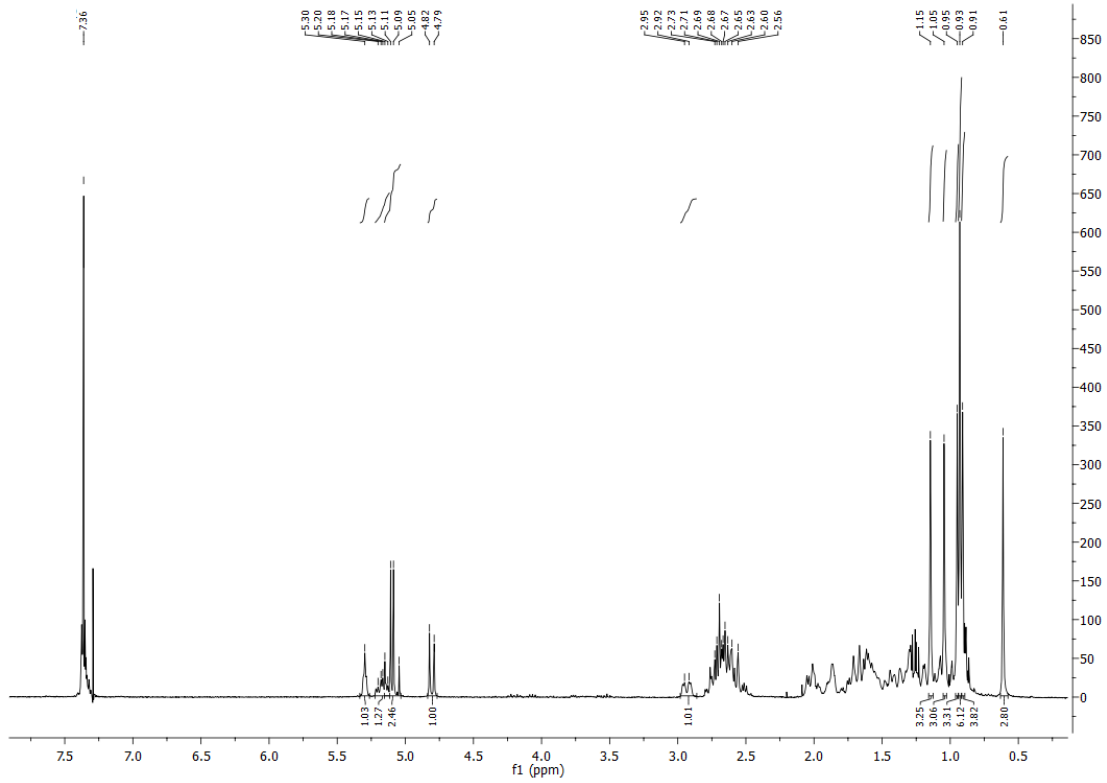


Espectro de ¹³C RMN del producto 77

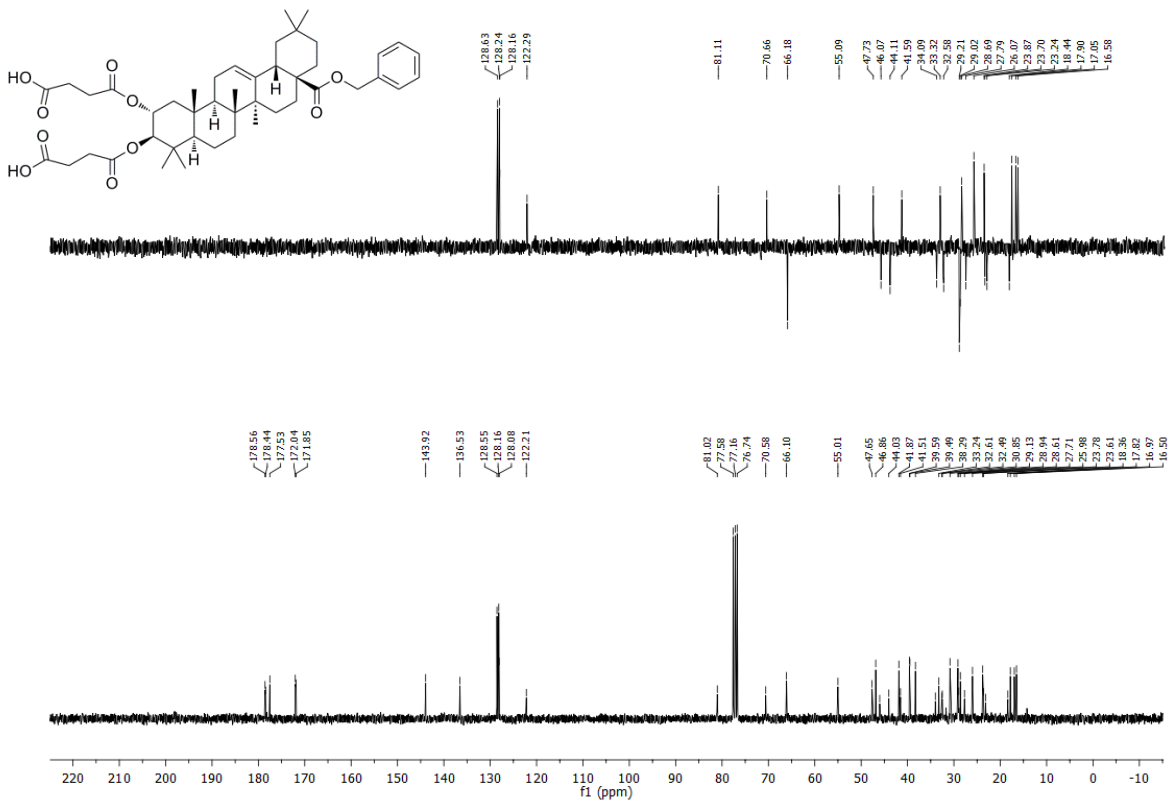
Producto 78

Espectro de ^1H RMN del producto 78Espectro de ^{13}C RMN del producto 78

Producto 79

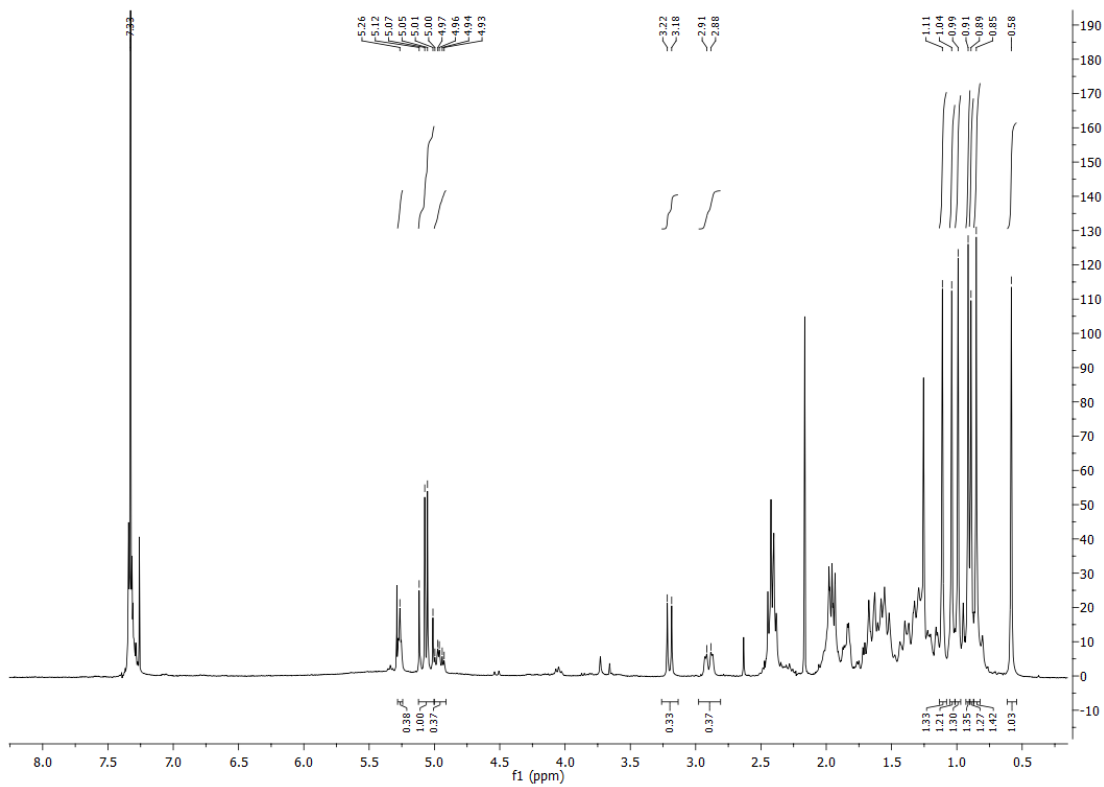
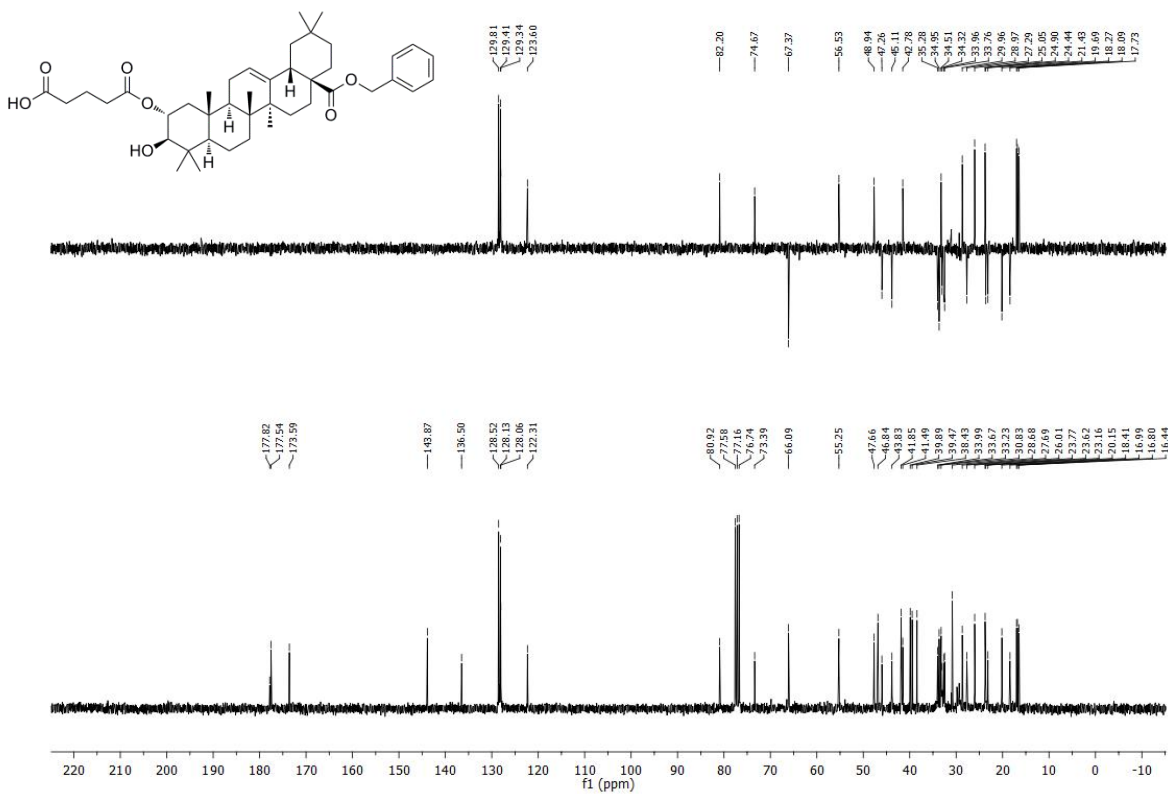


Espectro de ¹H RMN del producto 79

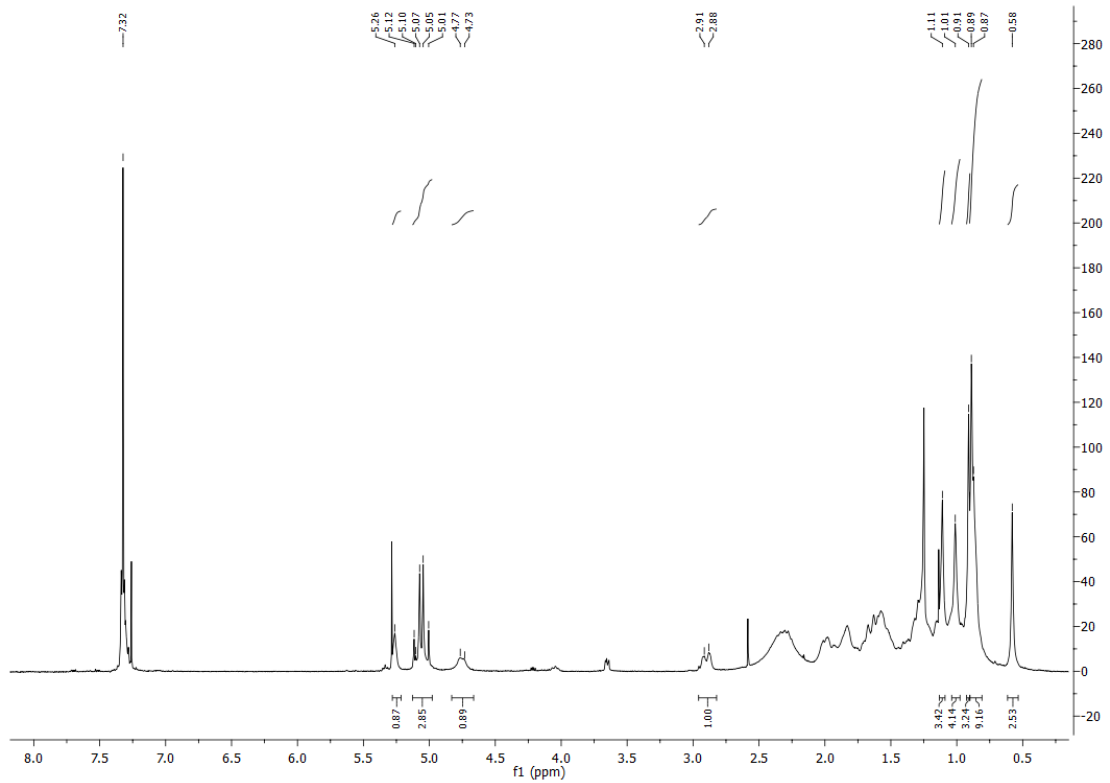
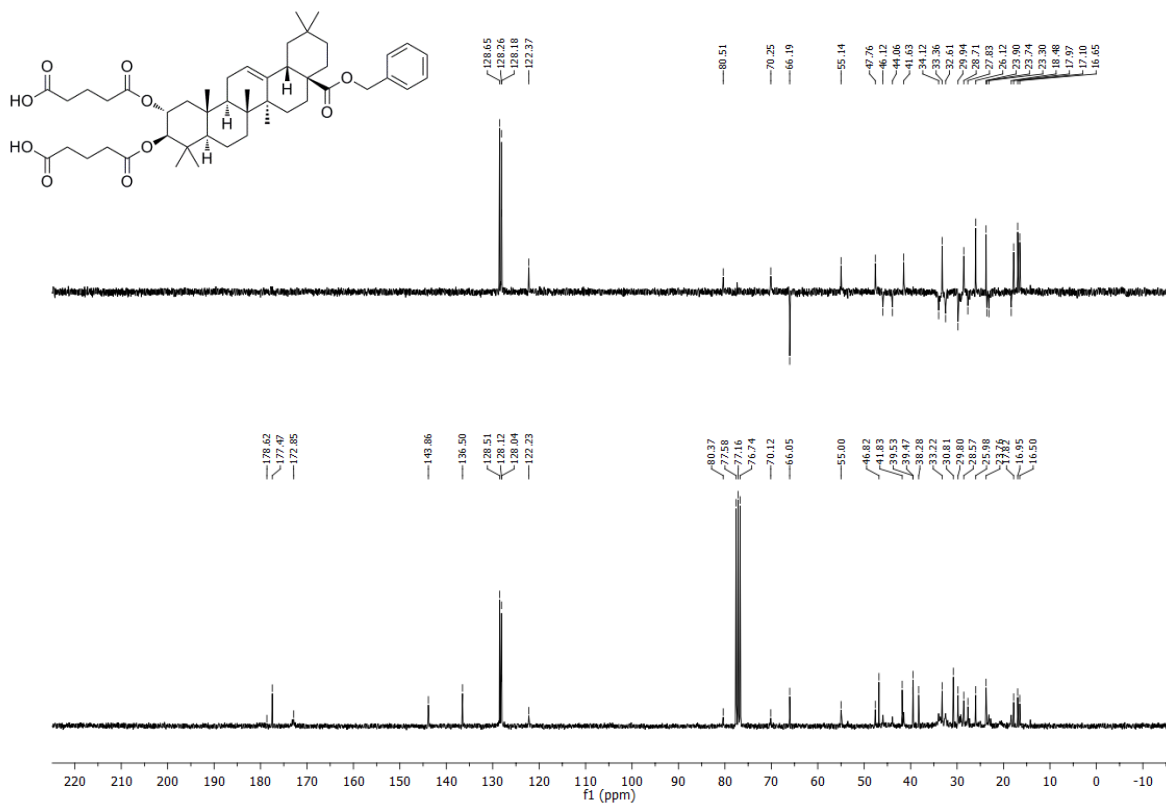


Espectro de ¹³C RMN del producto 79

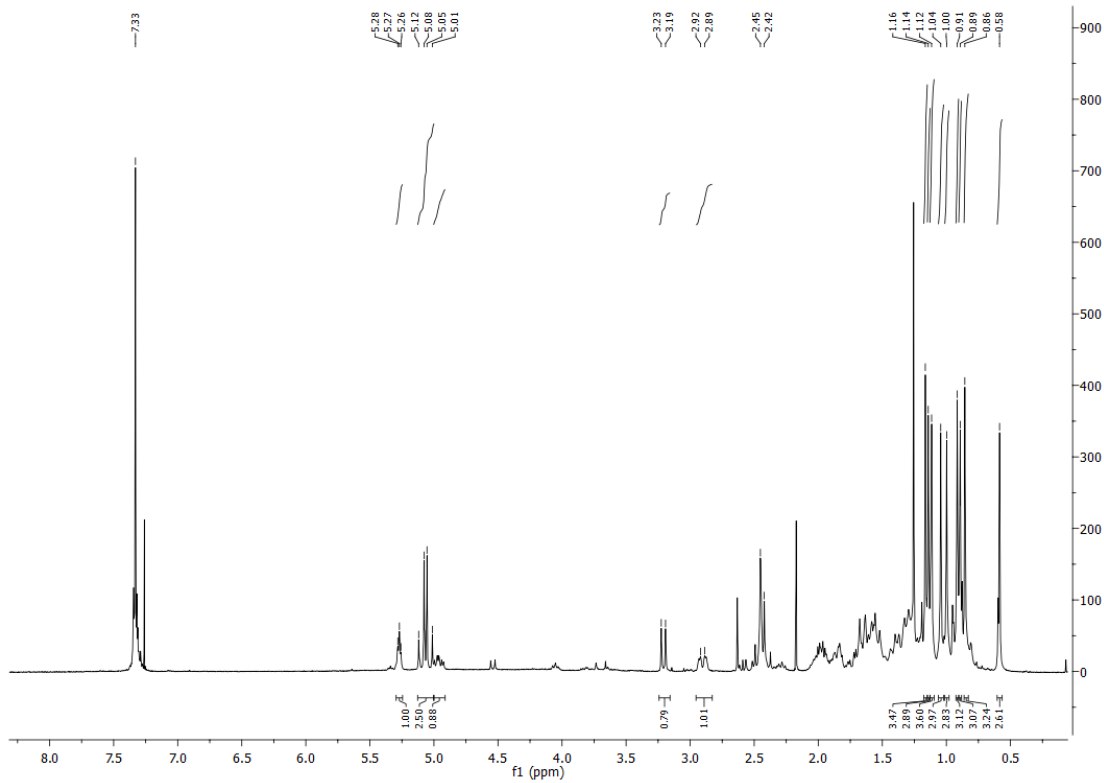
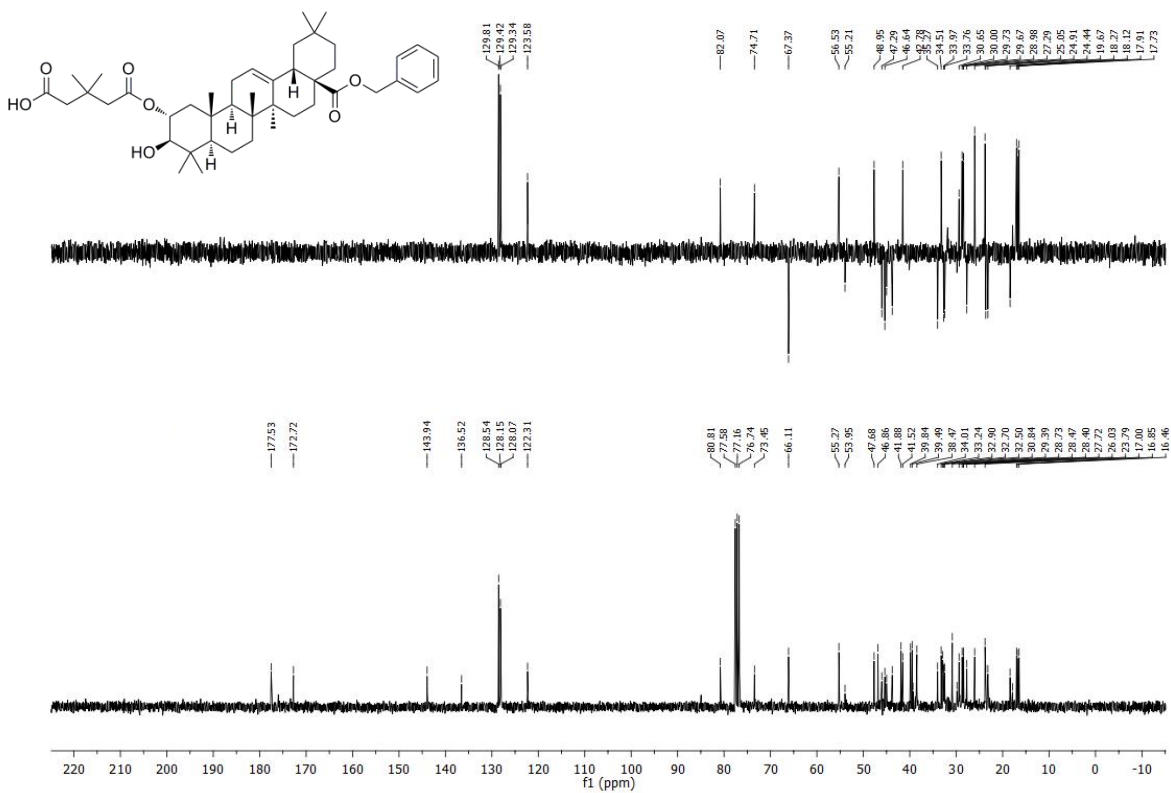
Producto 80

Espectro de ^1H RMN del producto 80Espectro de ^{13}C RMN del producto 80

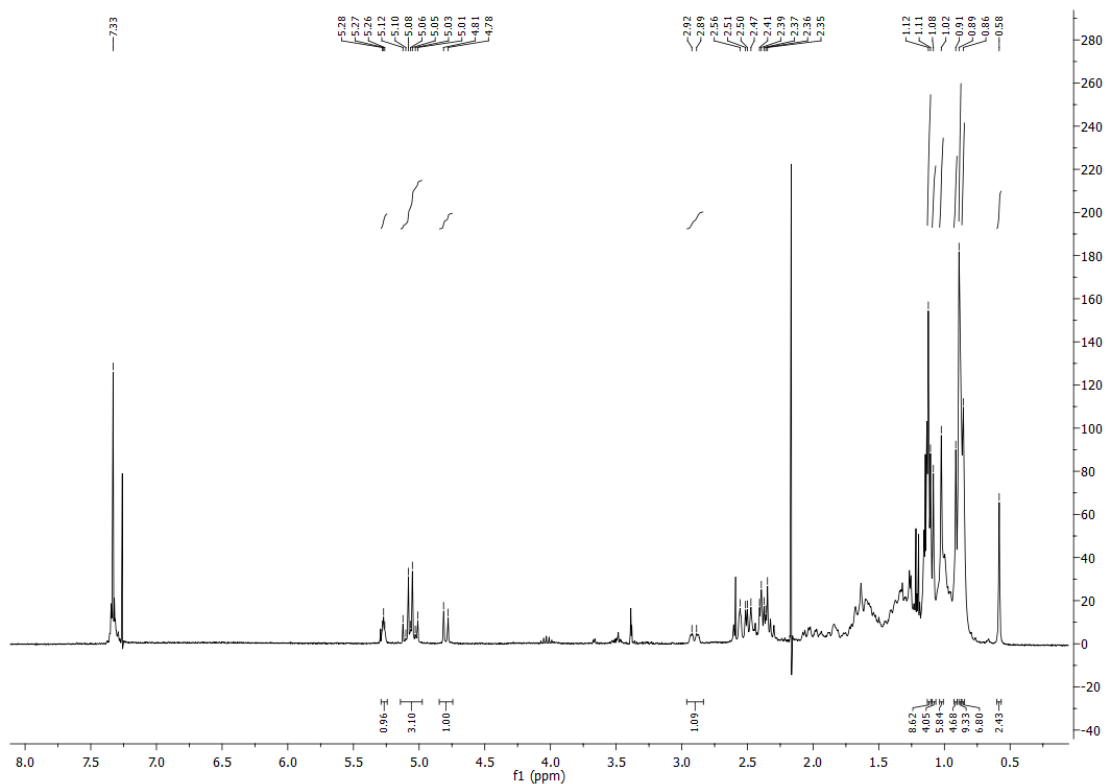
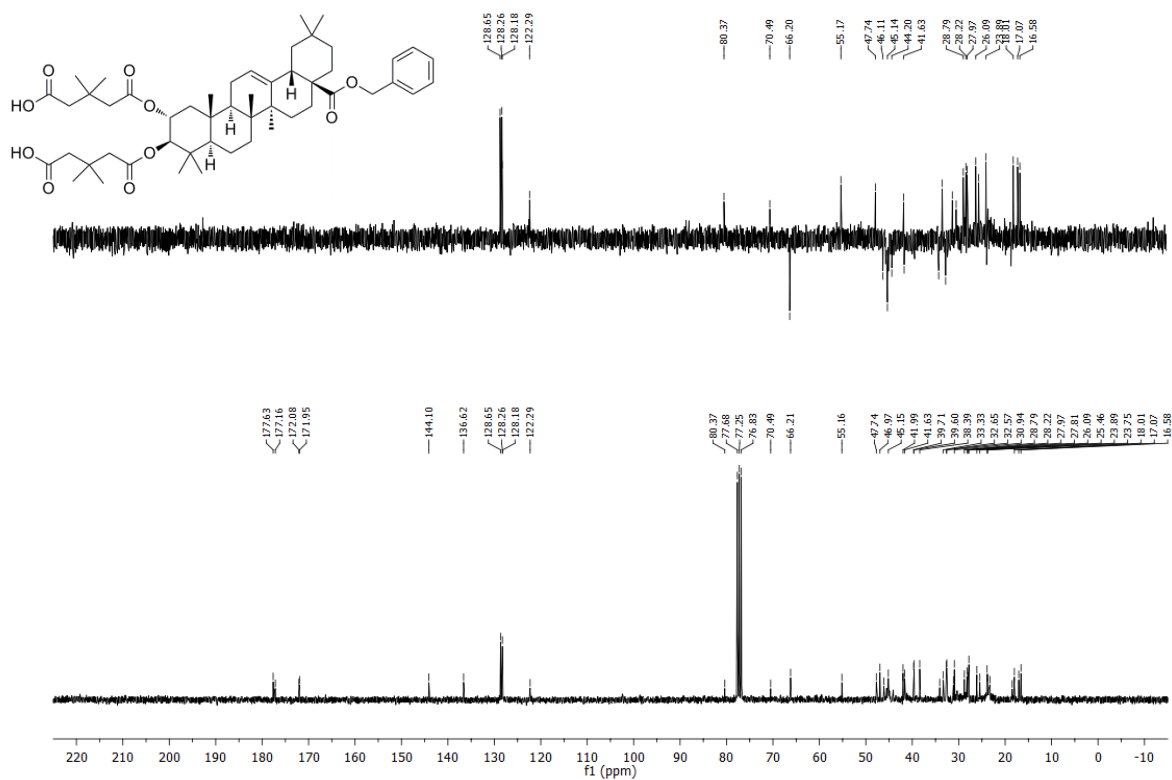
Producto 81

Espectro de ^1H RMN del producto 81Espectro de ^{13}C RMN del producto 81

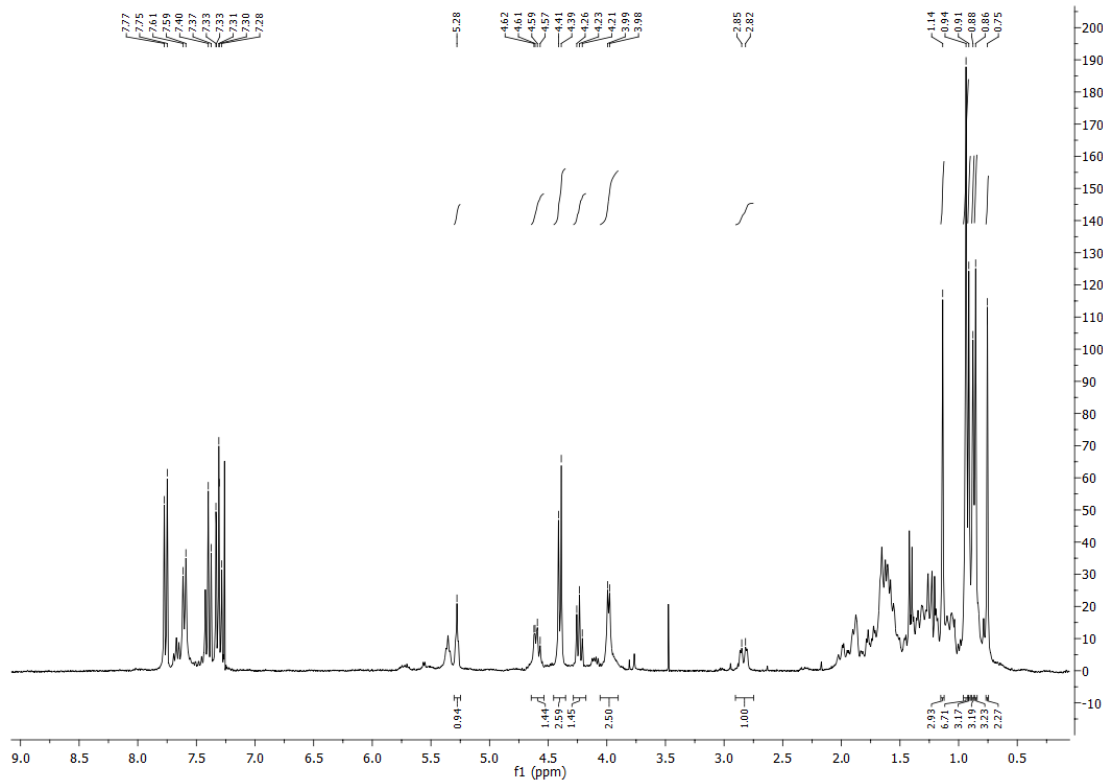
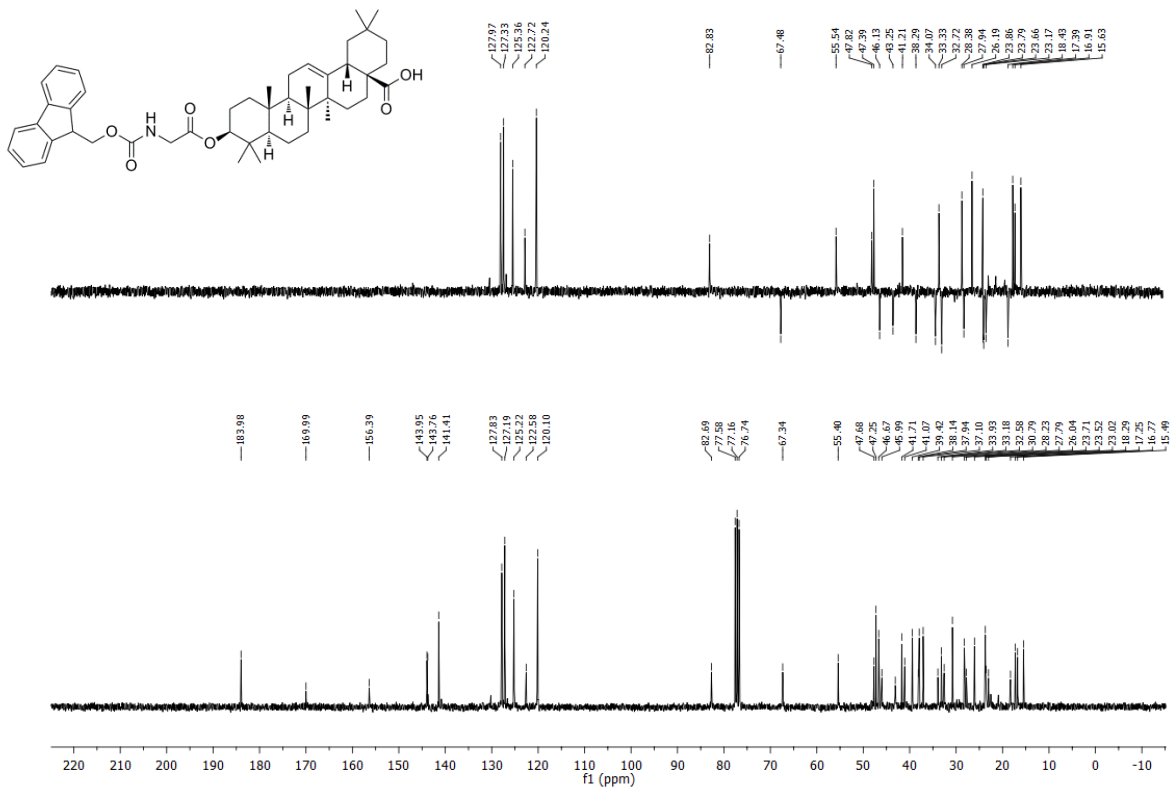
Producto 82

Espectro de ^1H RMN del producto 82Espectro de ^{13}C RMN del producto 82

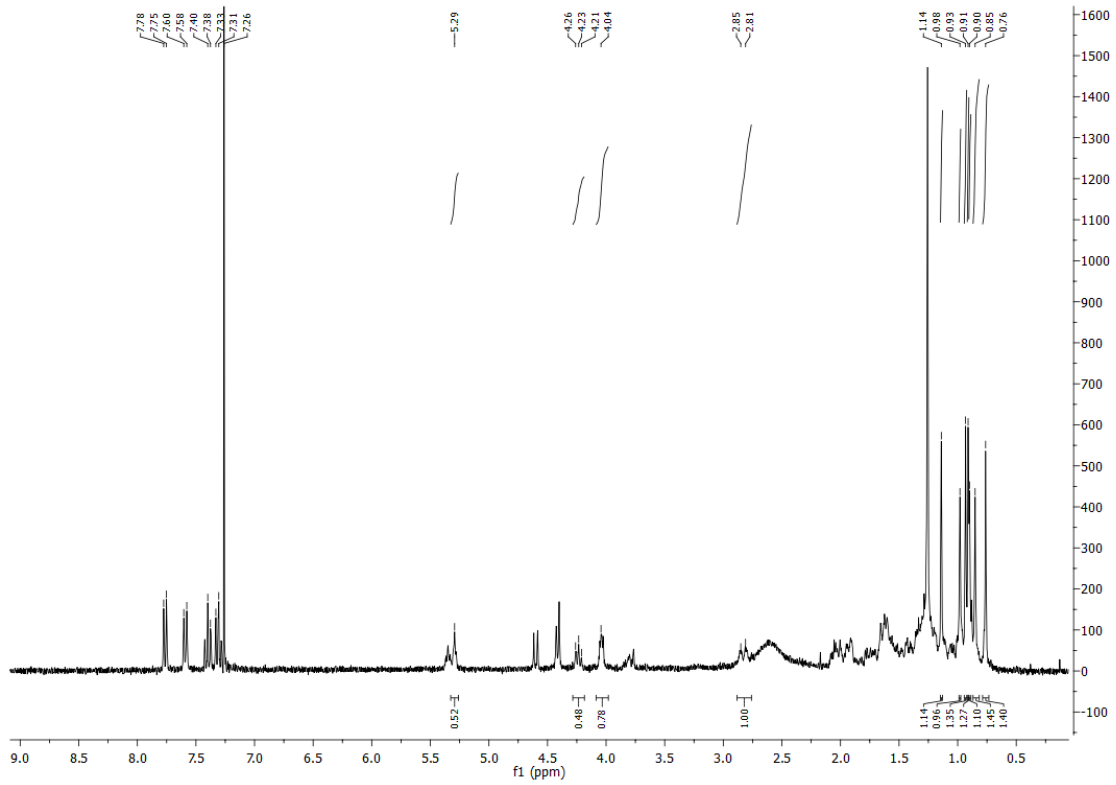
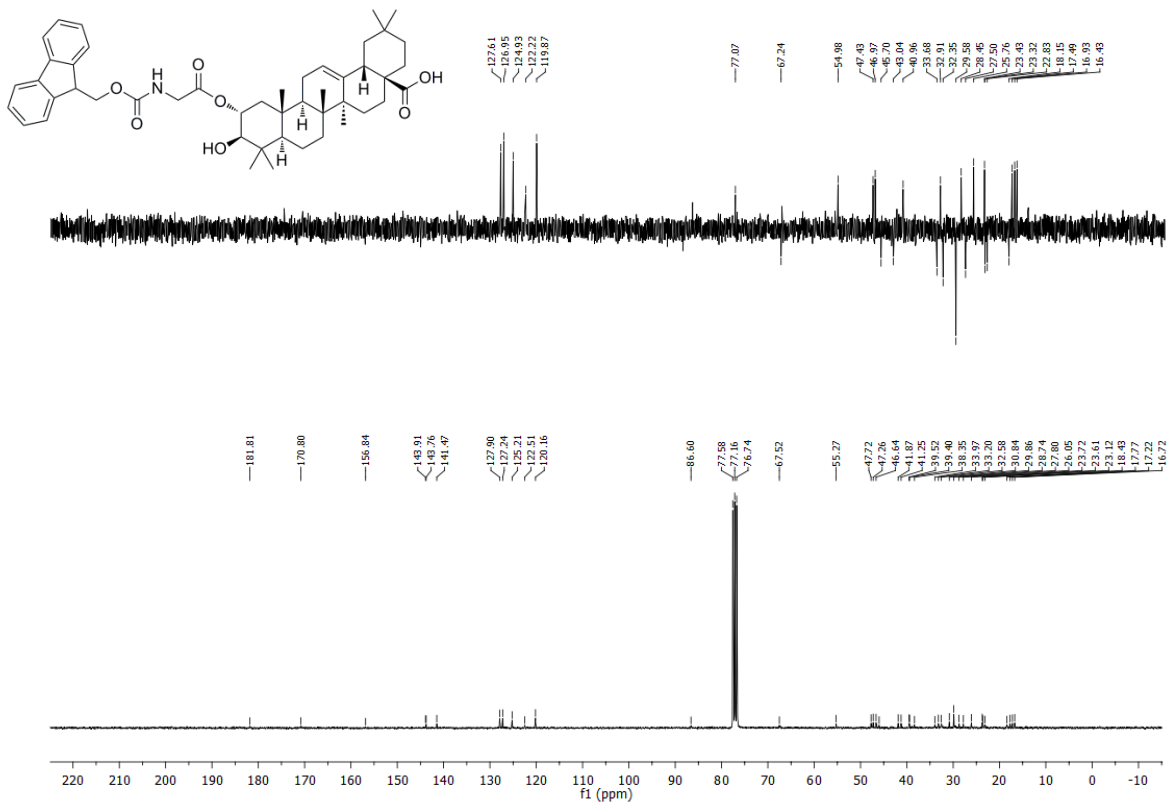
Producto 83

Espectro de ¹H RMN del producto 83Espectro de ¹³C RMN del producto 83

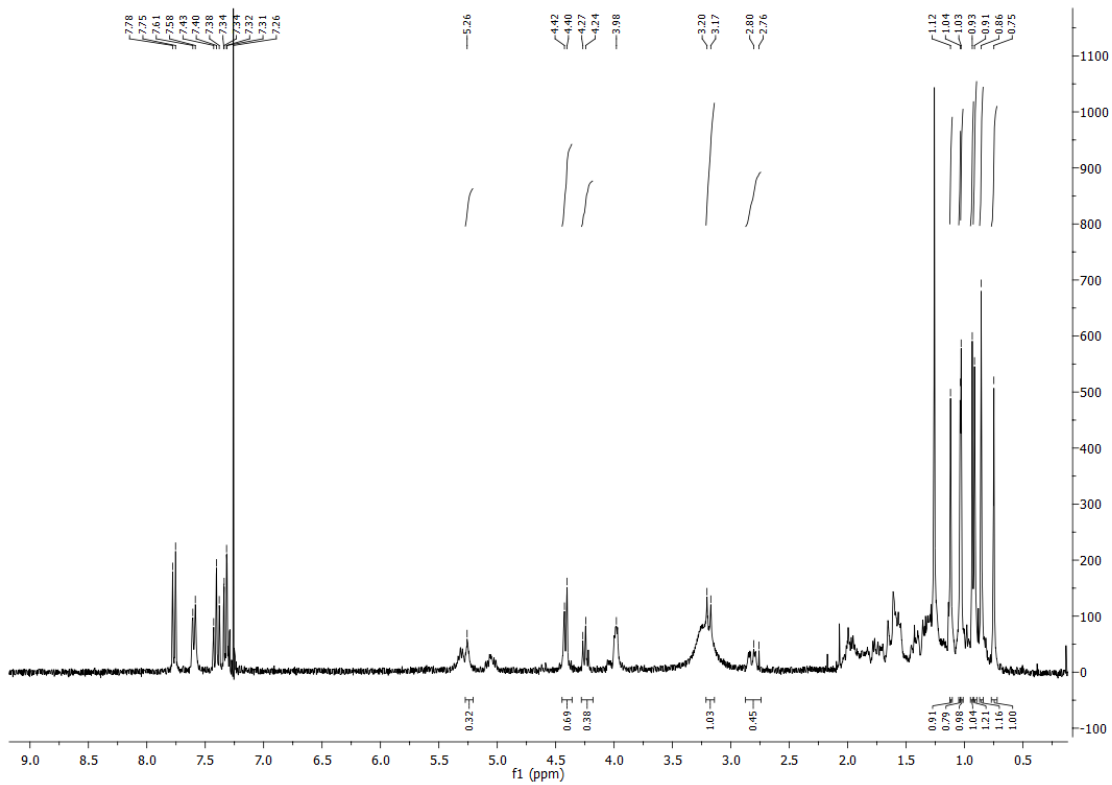
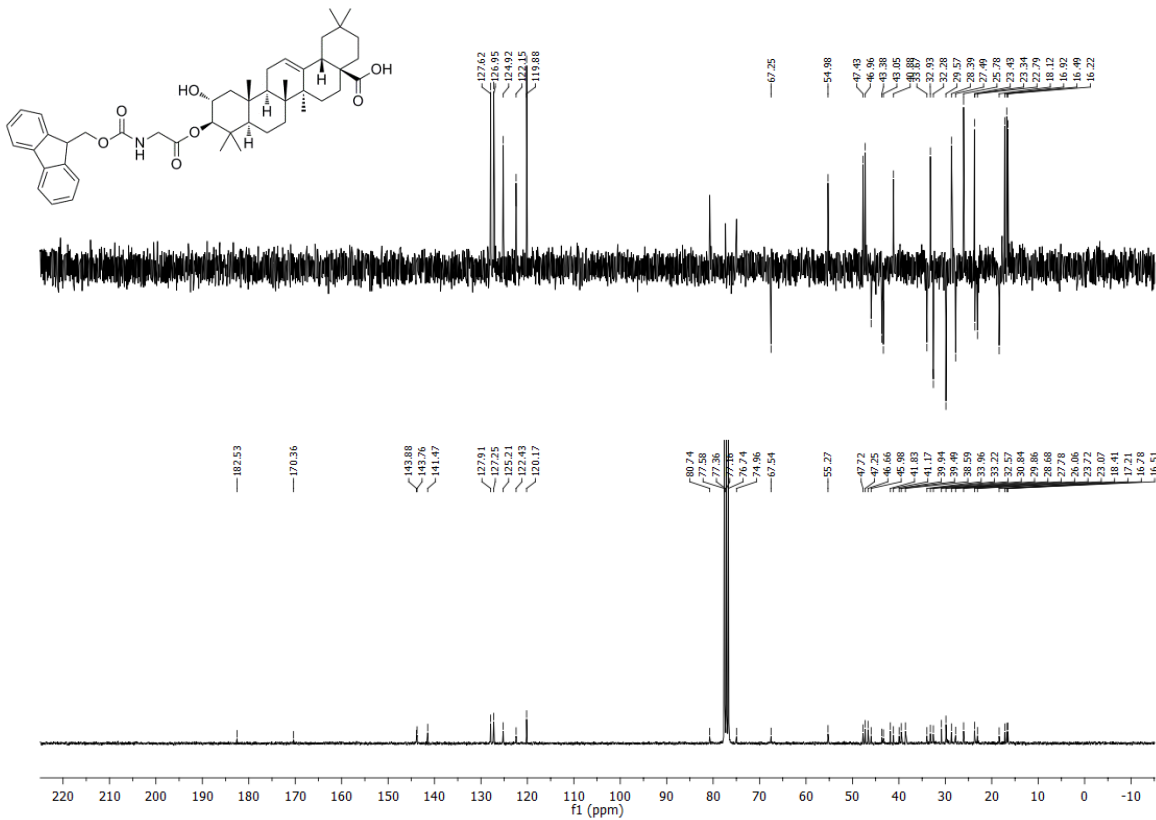
Producto 84

Espectro de ^1H RMN del producto 84Espectro de ^{13}C RMN del producto 84

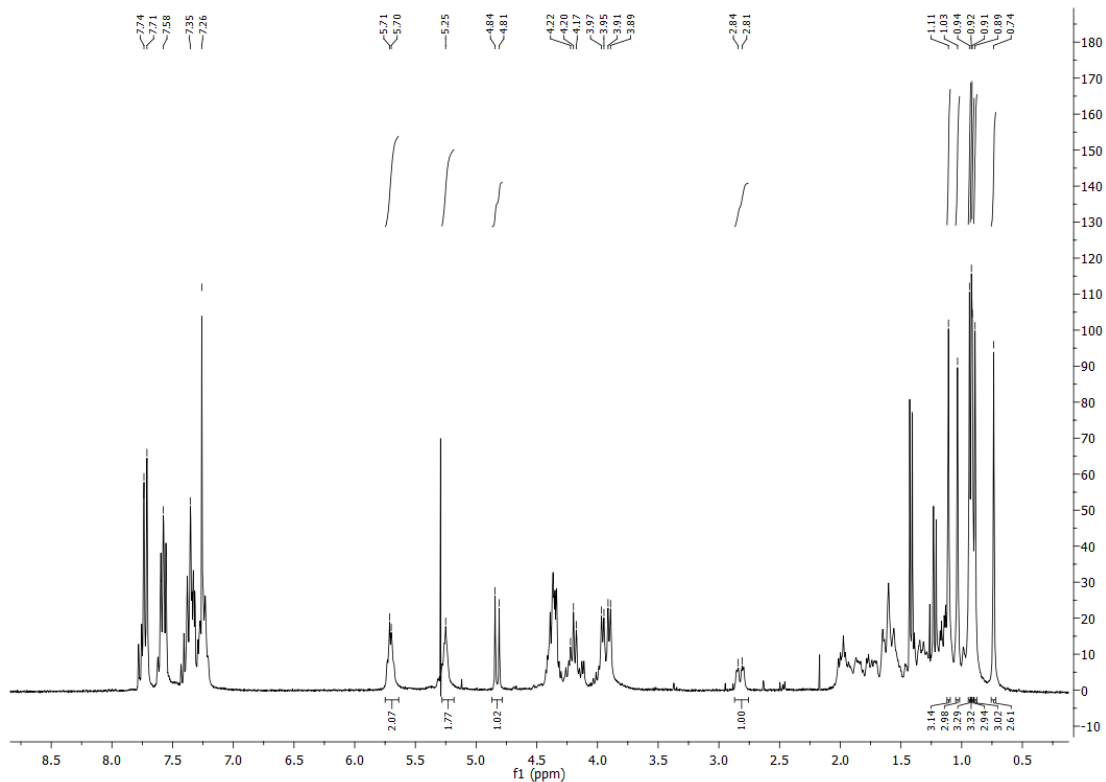
Producto 85

Espectro de ^1H RMN del producto 85Espectro de ^{13}C RMN del producto 85

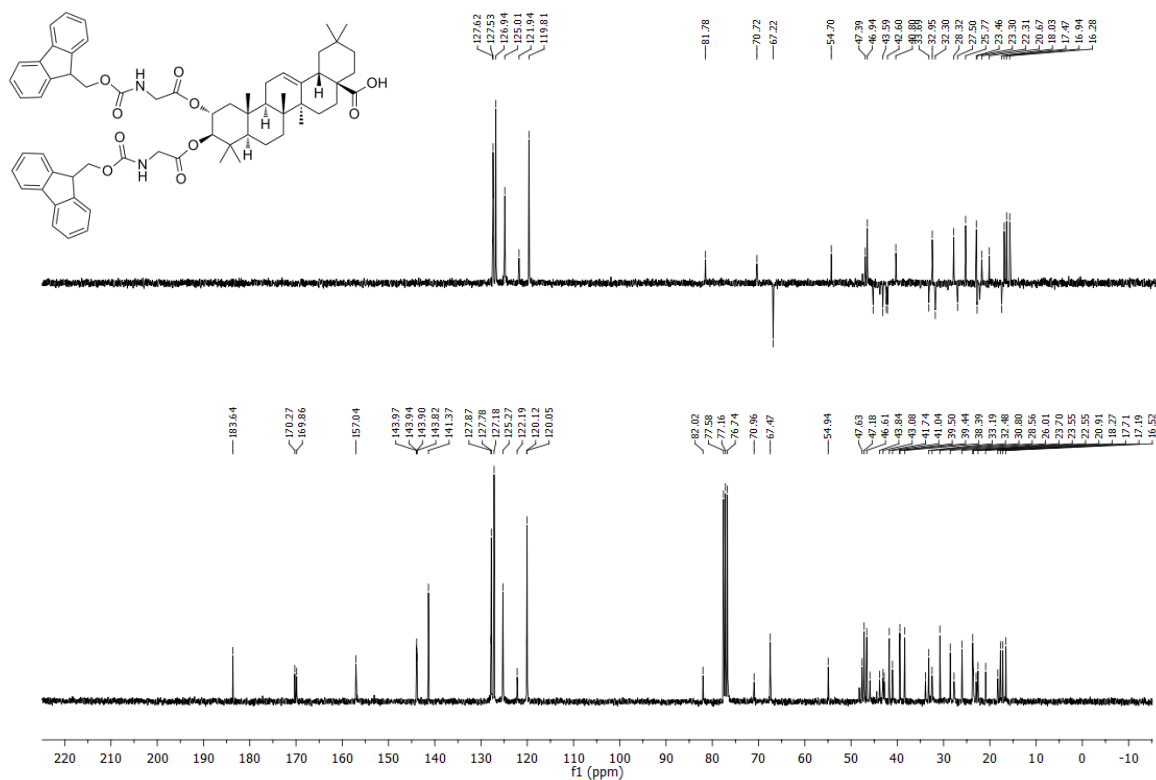
Producto 86

Espectro de ^1H RMN del producto 86Espectro de ^{13}C RMN del producto 86

Producto 87

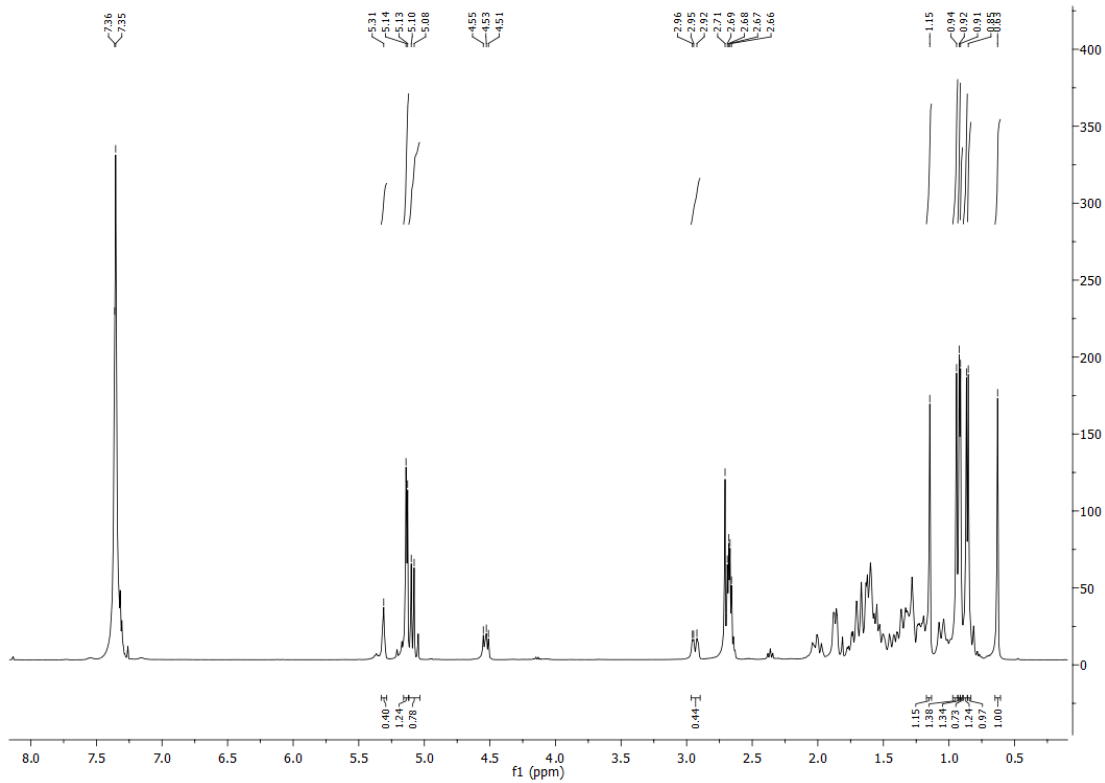
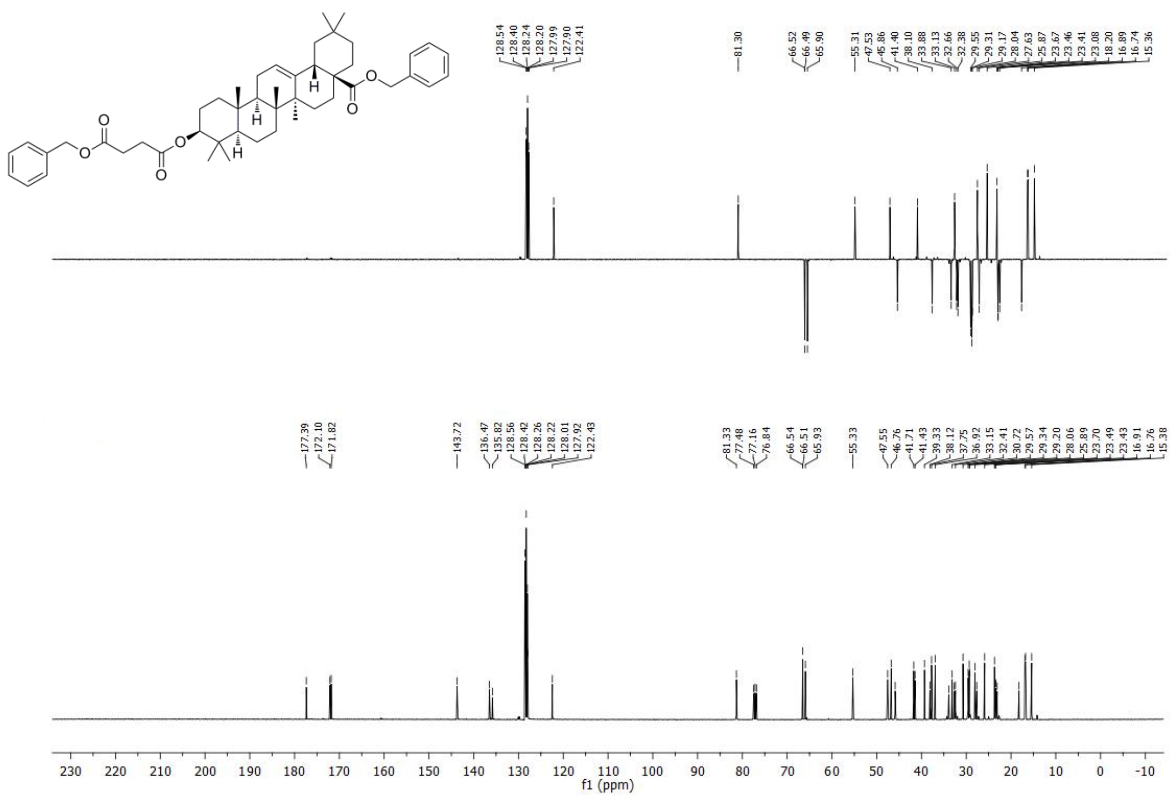


Espectro de ¹H RMN del producto 87

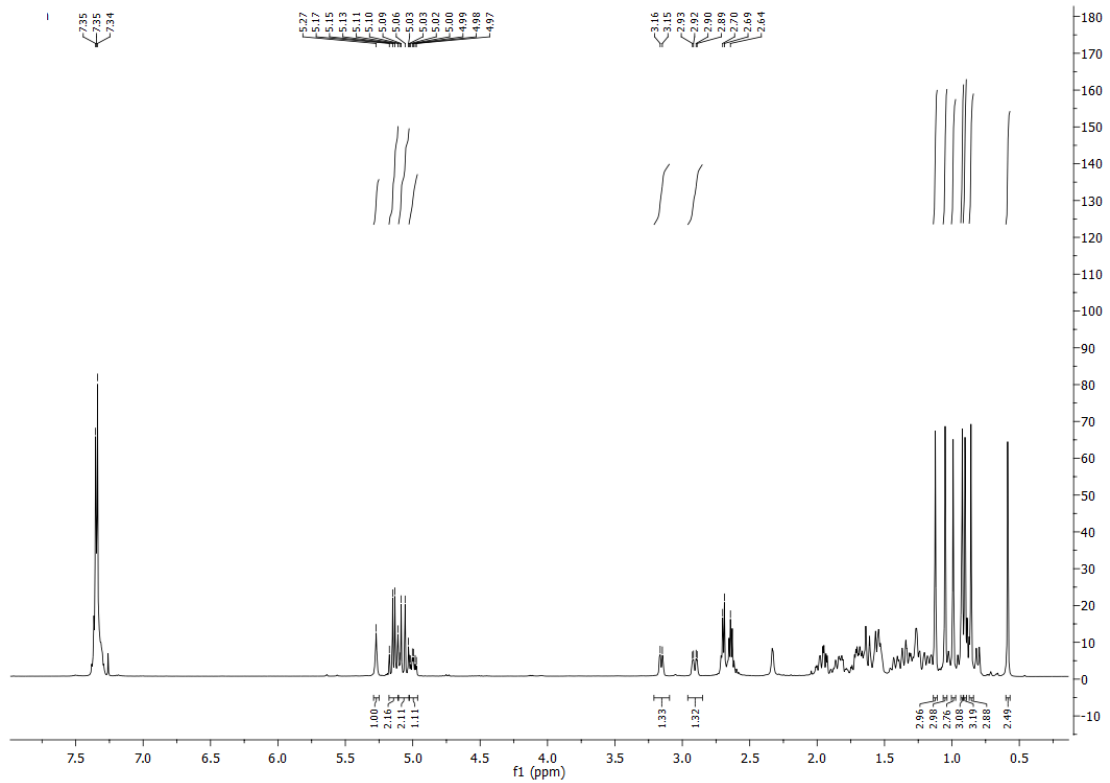
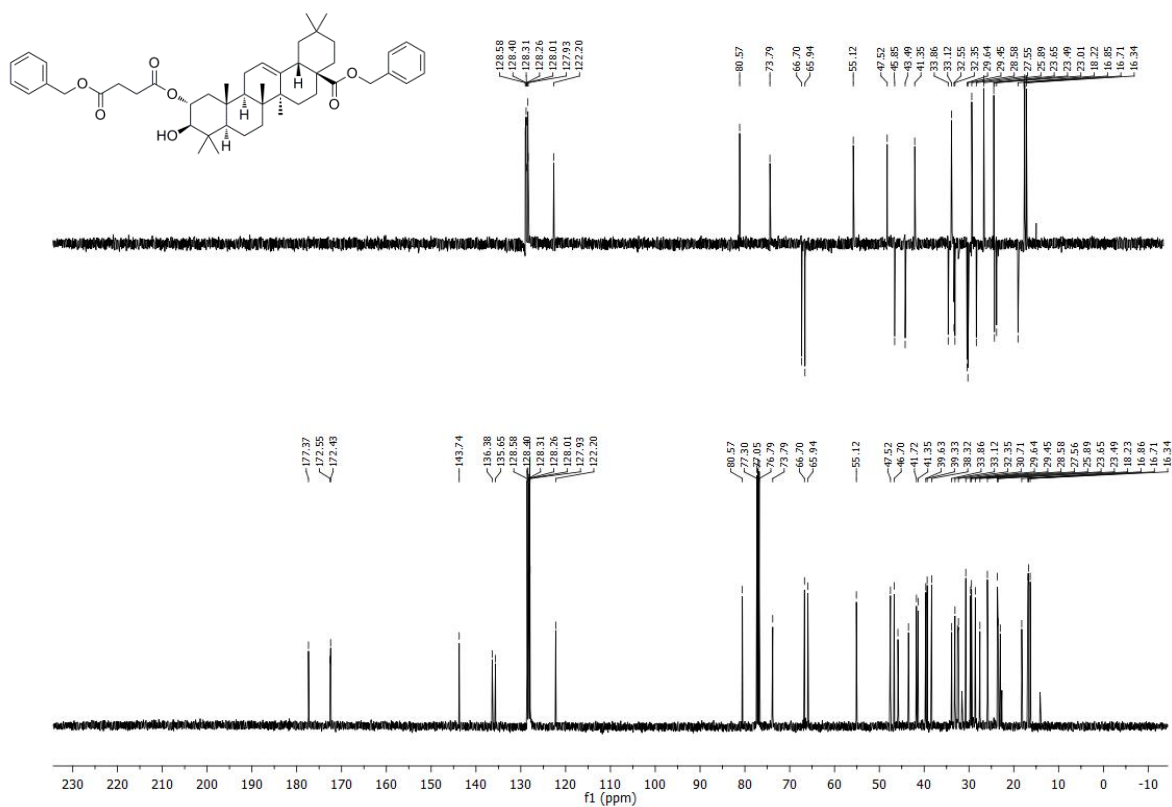


Espectro de ¹³C RMN del producto 87

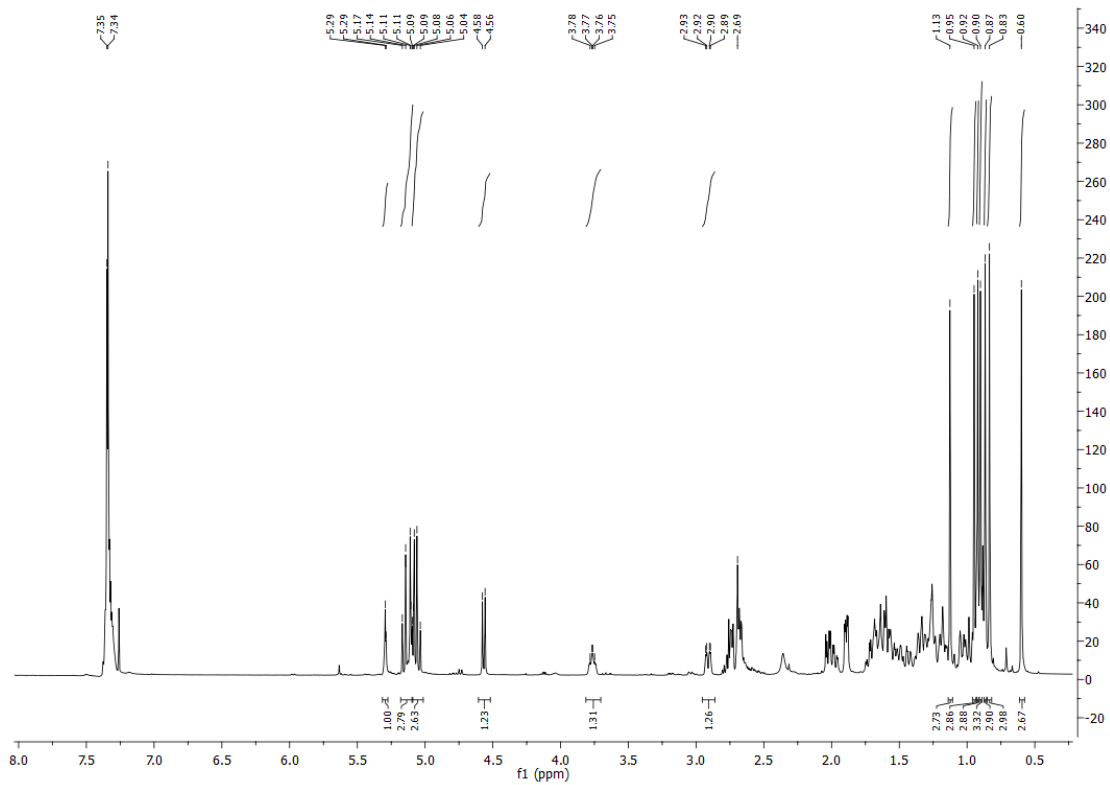
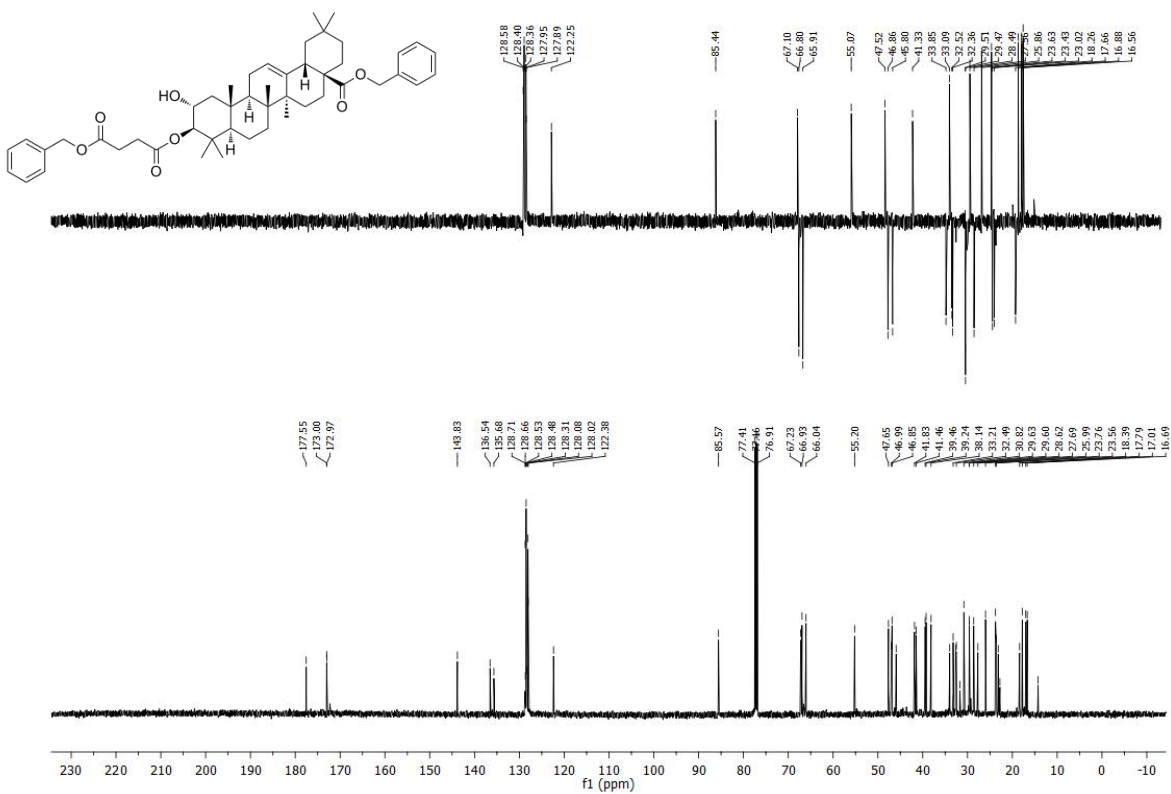
Producto 88

Espectro de ^1H RMN del producto 88Espectro de ^{13}C RMN del producto 88

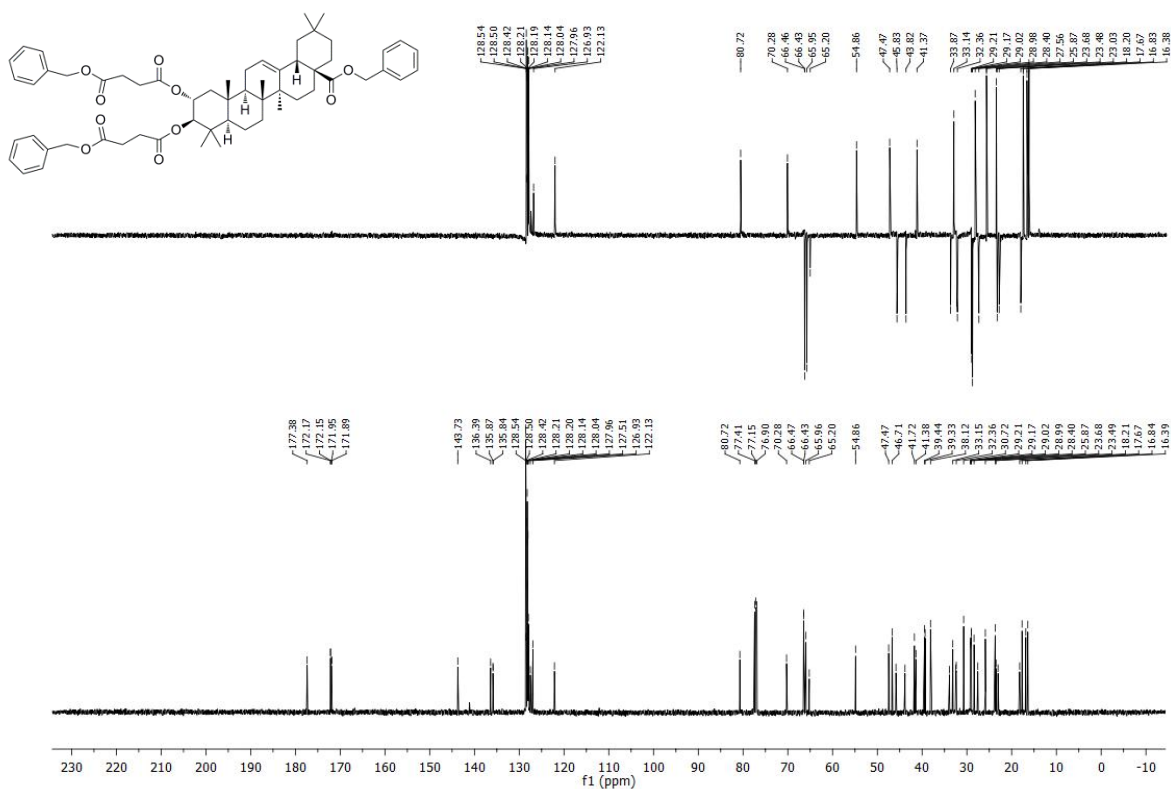
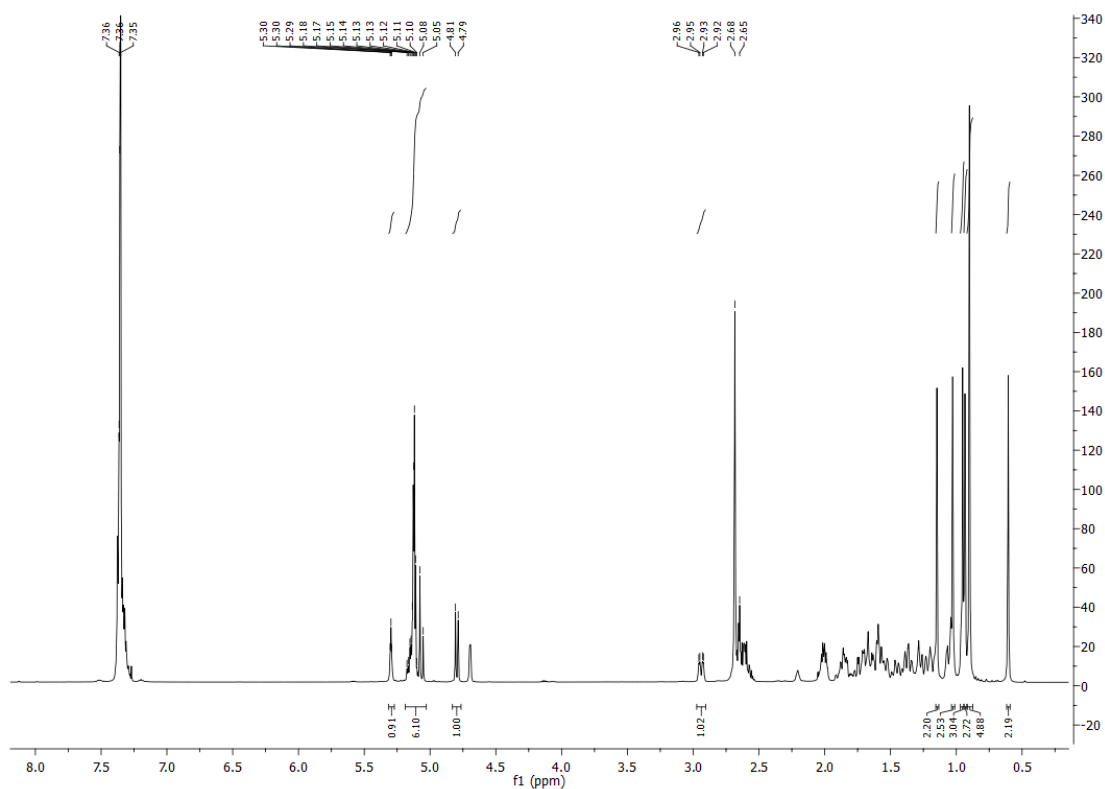
Producto 89

Espectro de ^1H RMN del producto 89Espectro de ^{13}C RMN del producto 89

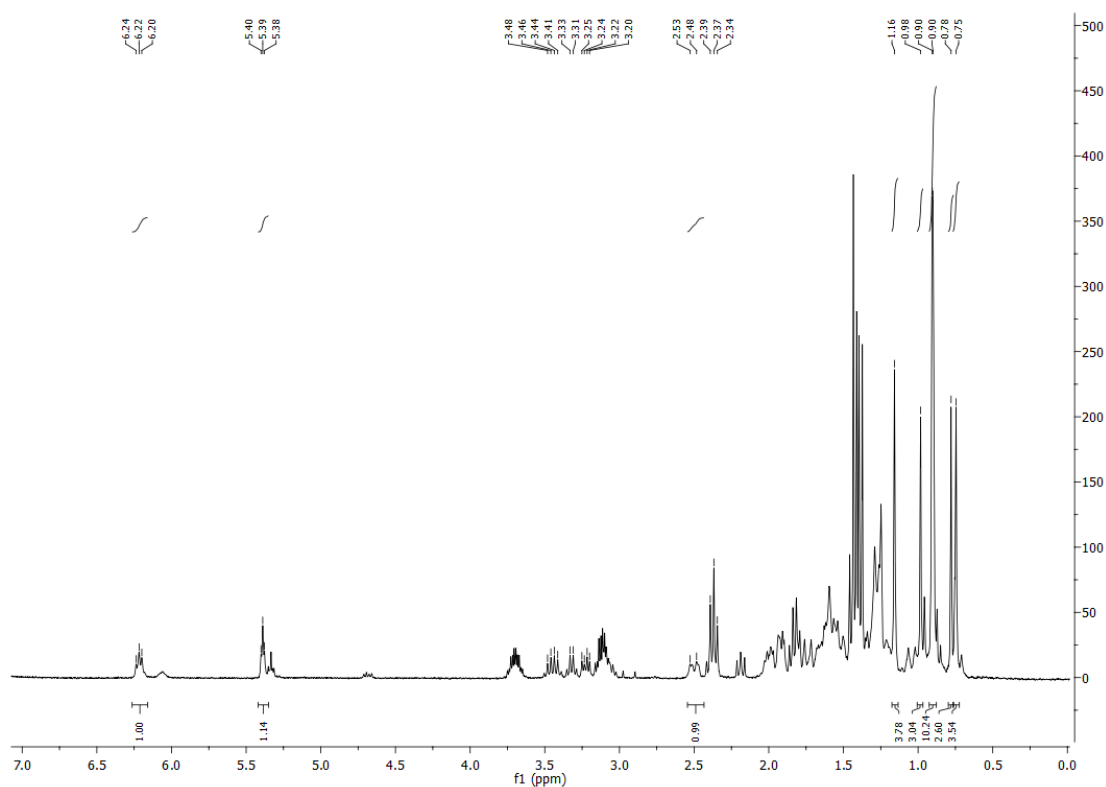
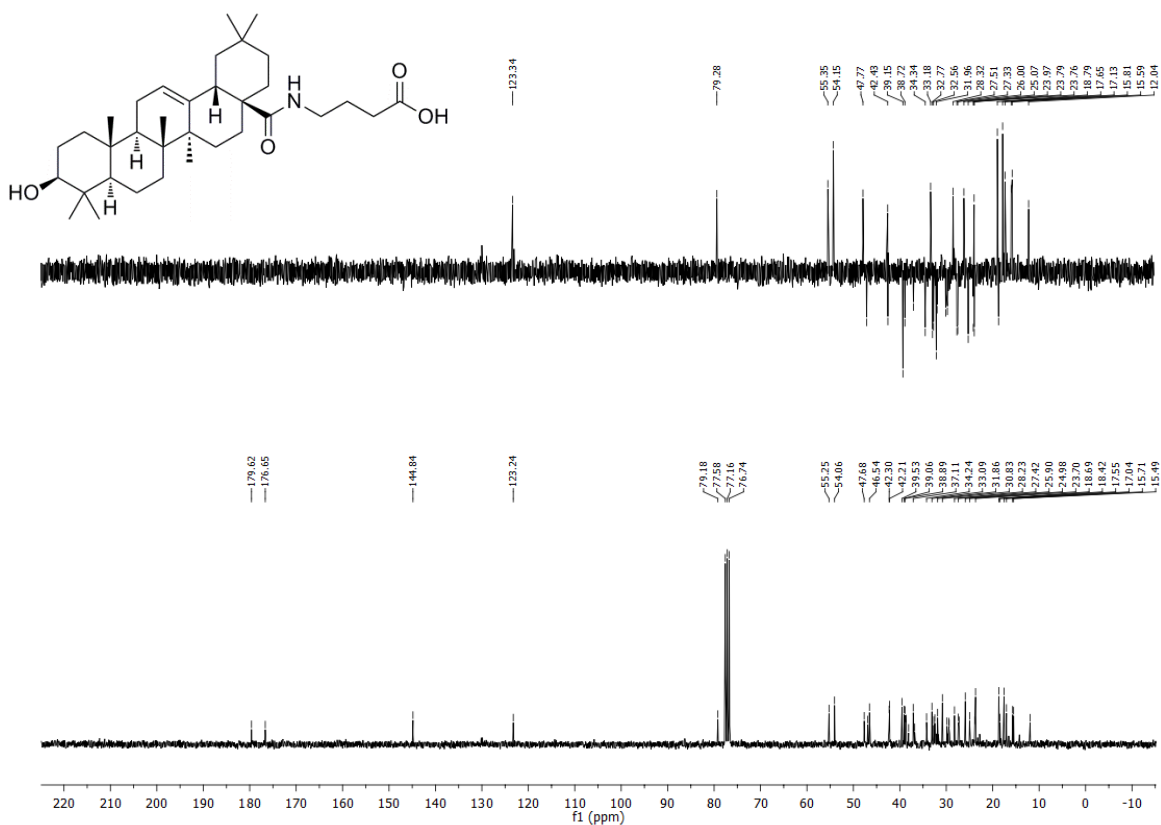
Producto 90

Espectro de ^1H RMN del producto 90Espectro de ^{13}C RMN del producto 90

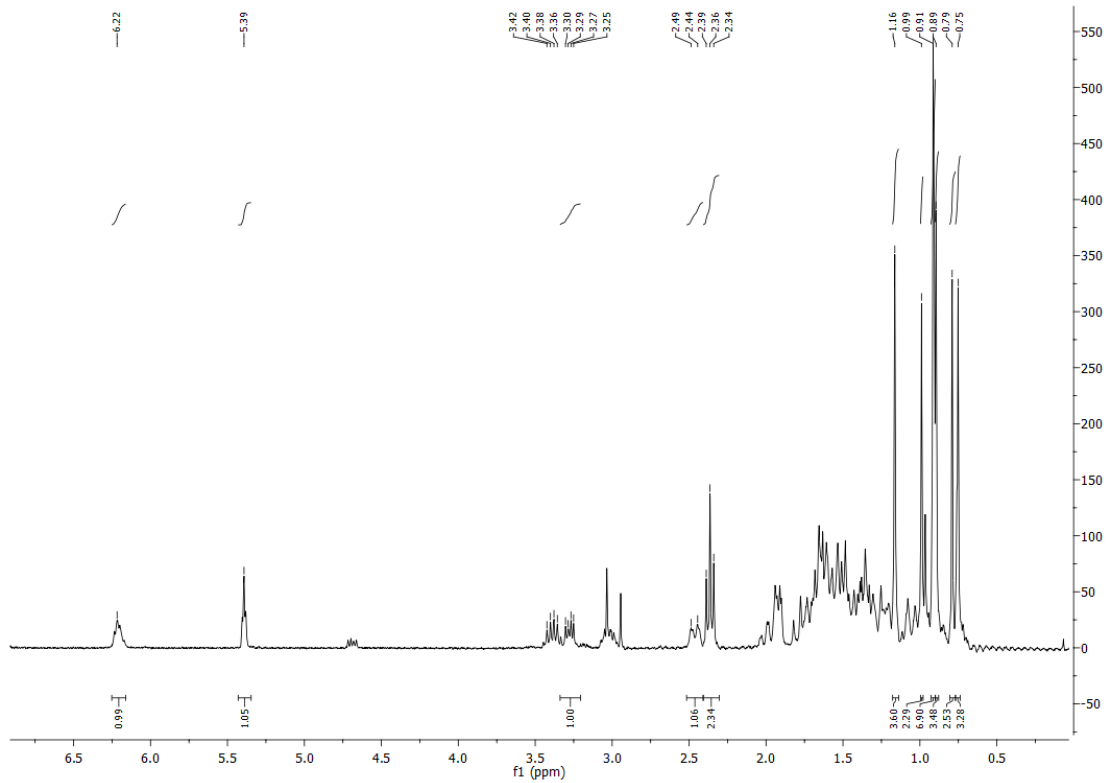
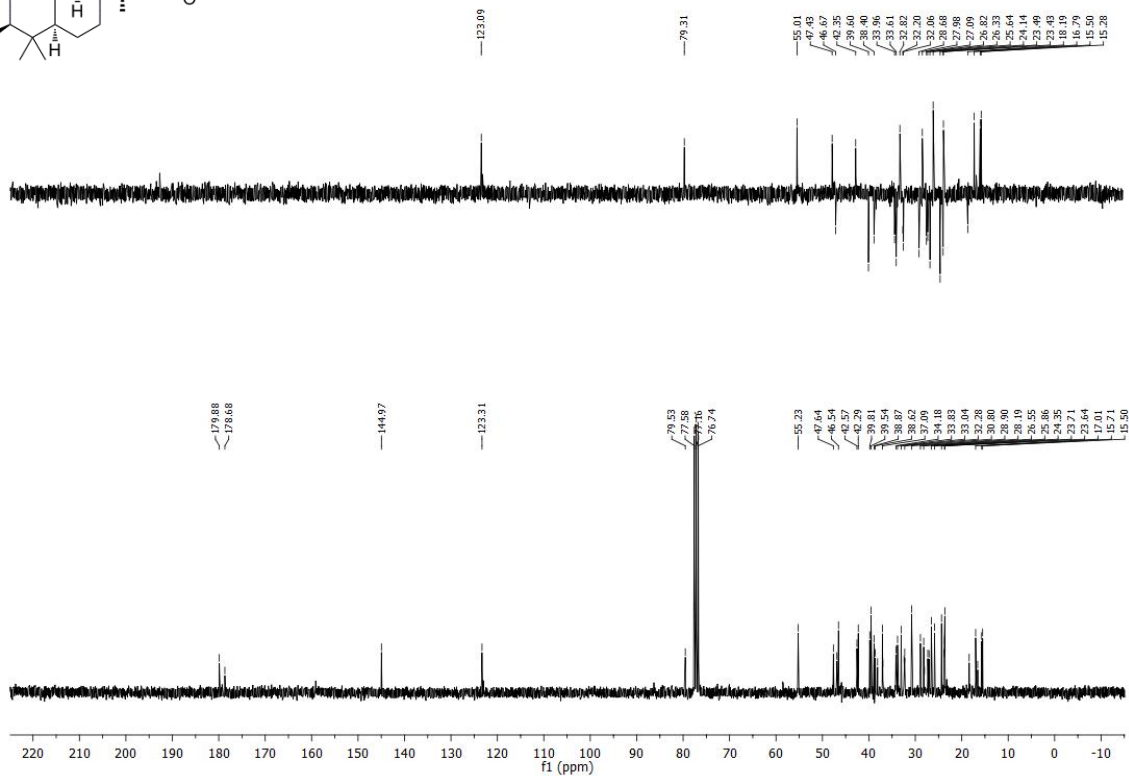
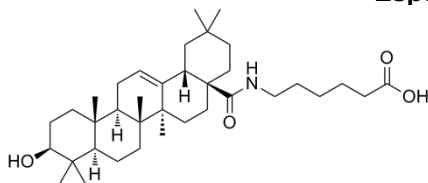
Producto 91



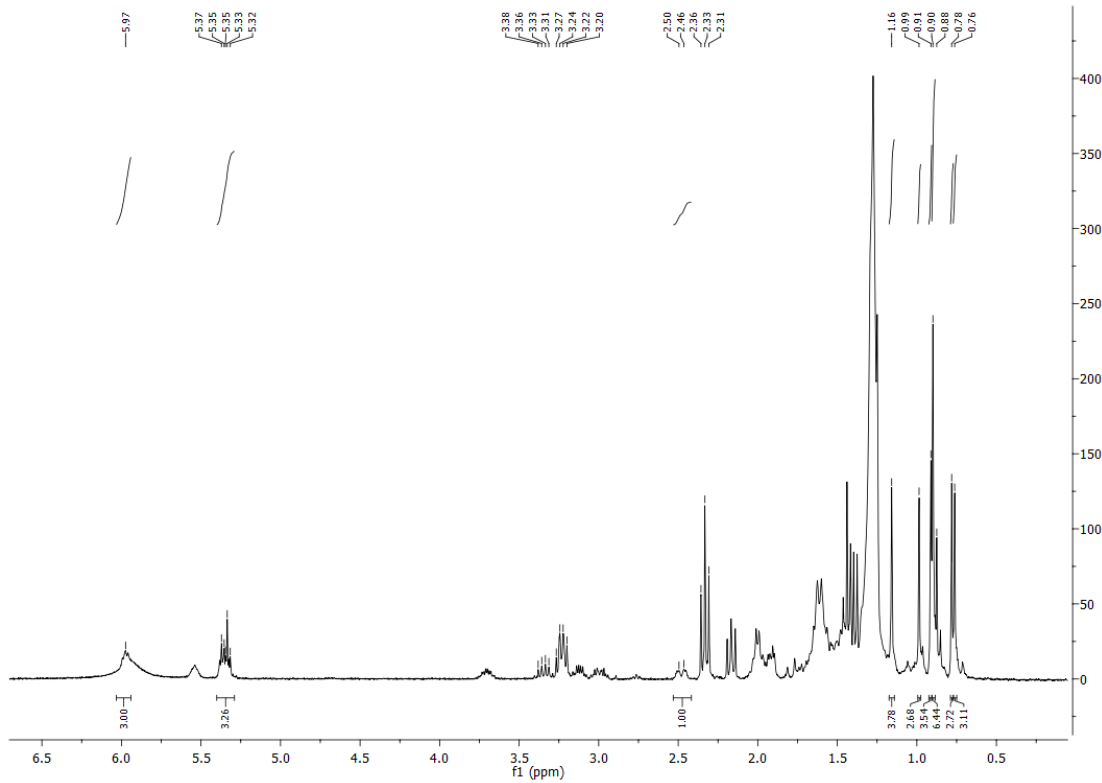
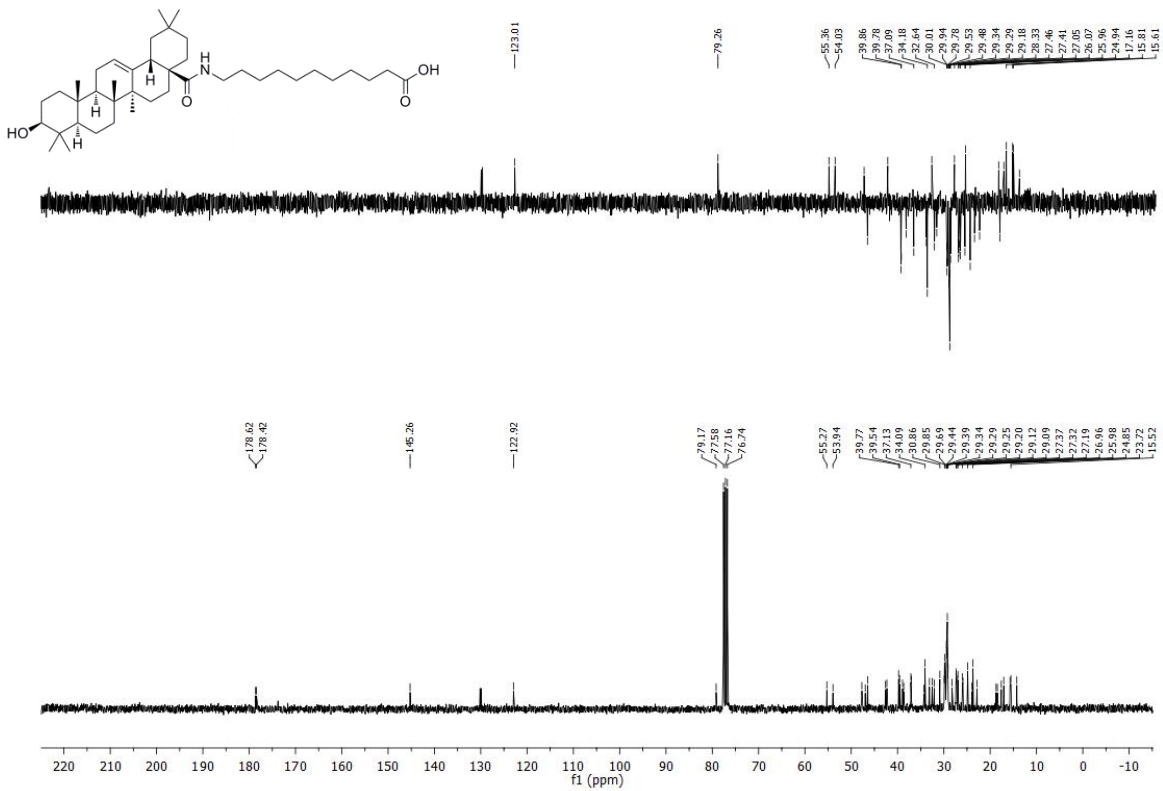
Producto 92

Espectro de ^1H RMN del producto 92Espectro de ^{13}C RMN del producto 92

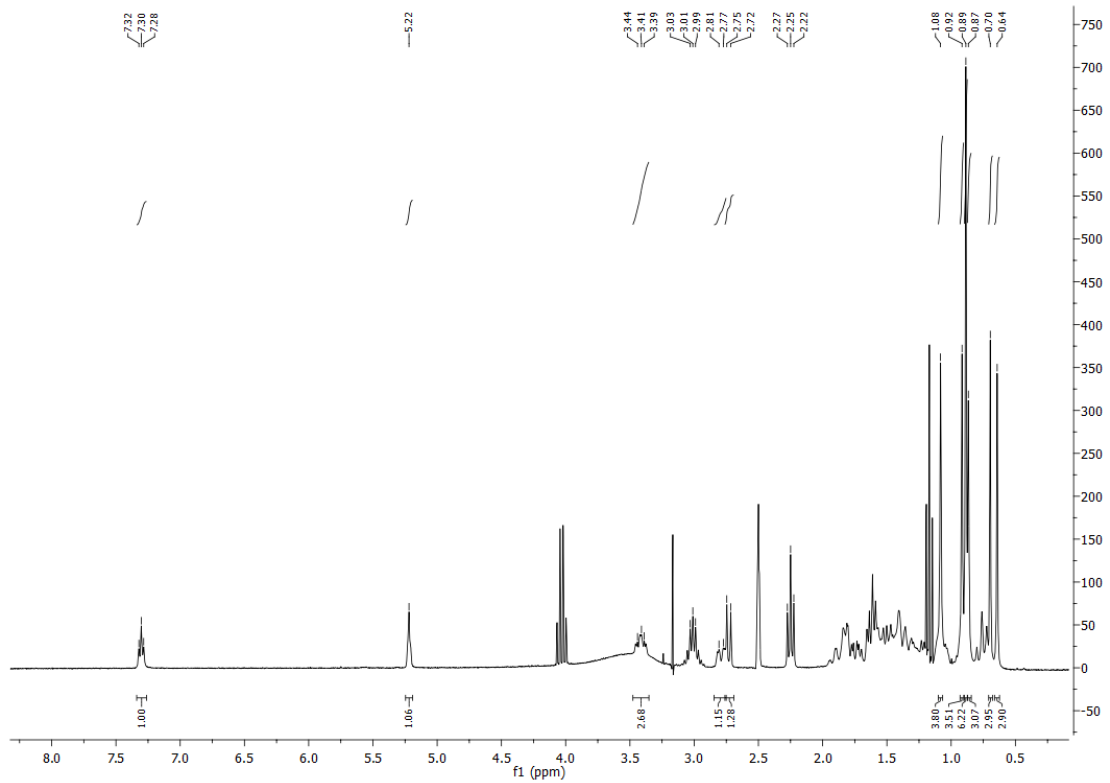
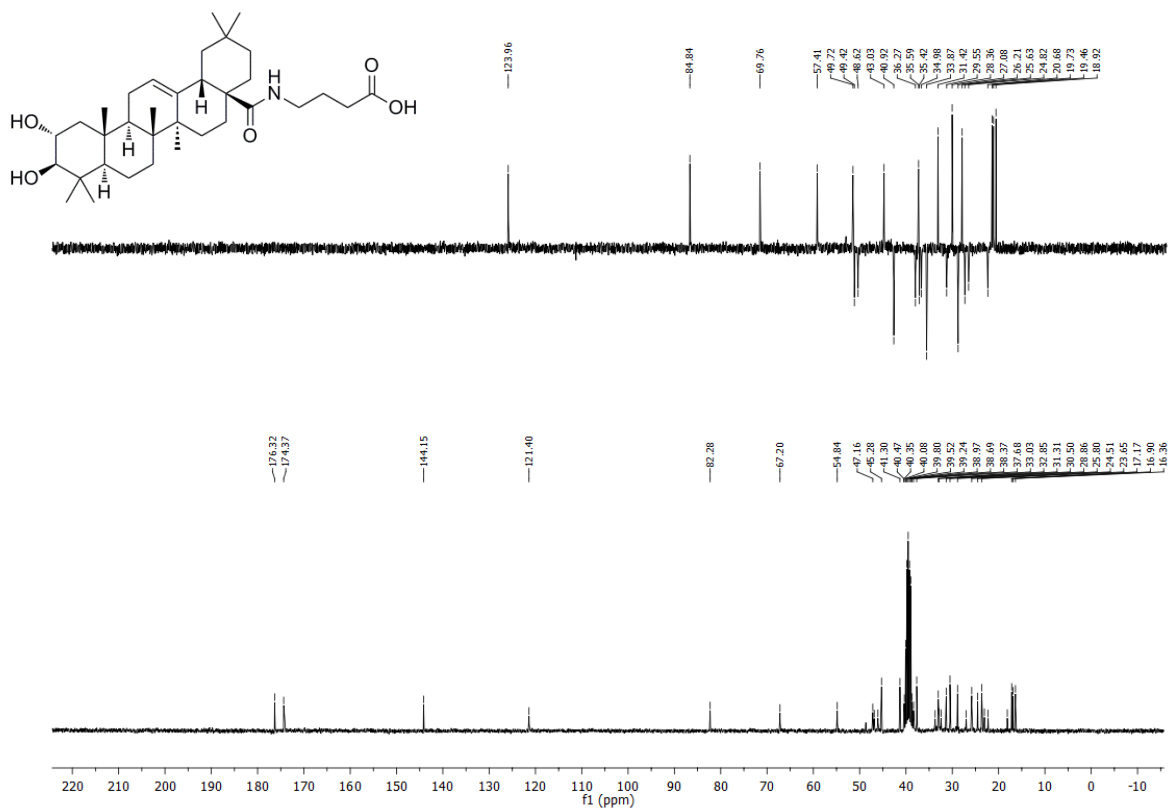
Producto 93

Espectro de ^1H RMN del producto 93Espectro de ^{13}C RMN del producto 93

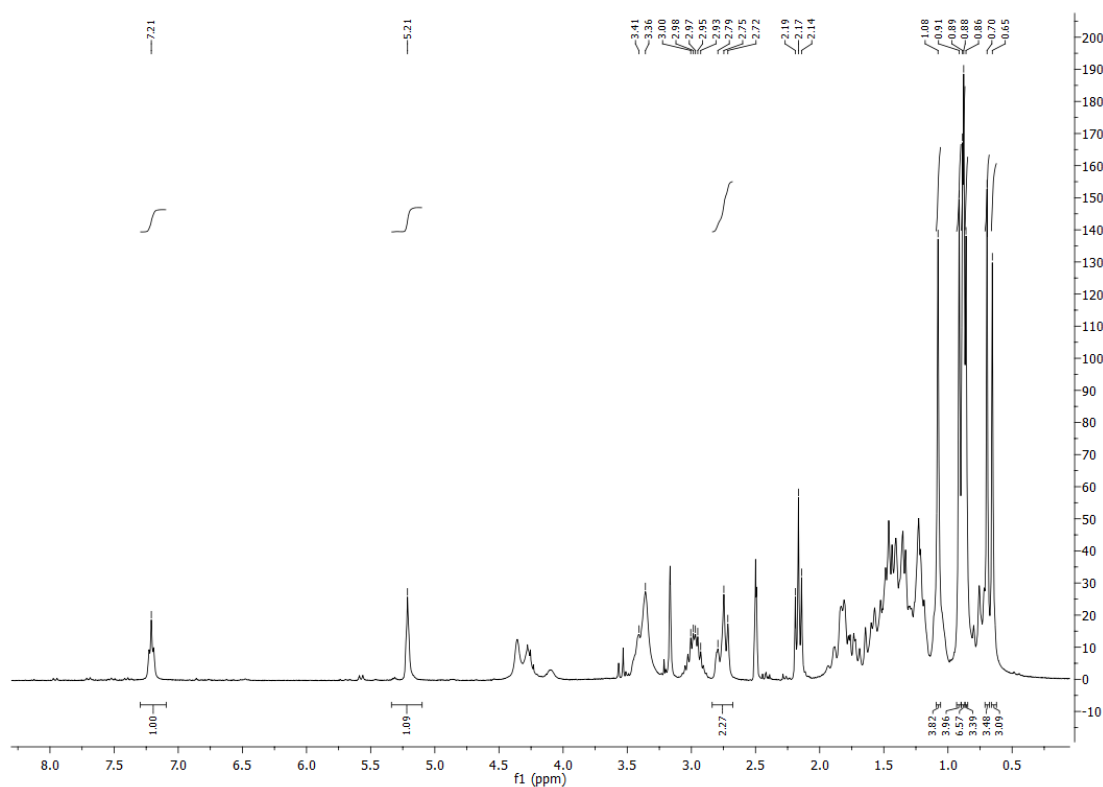
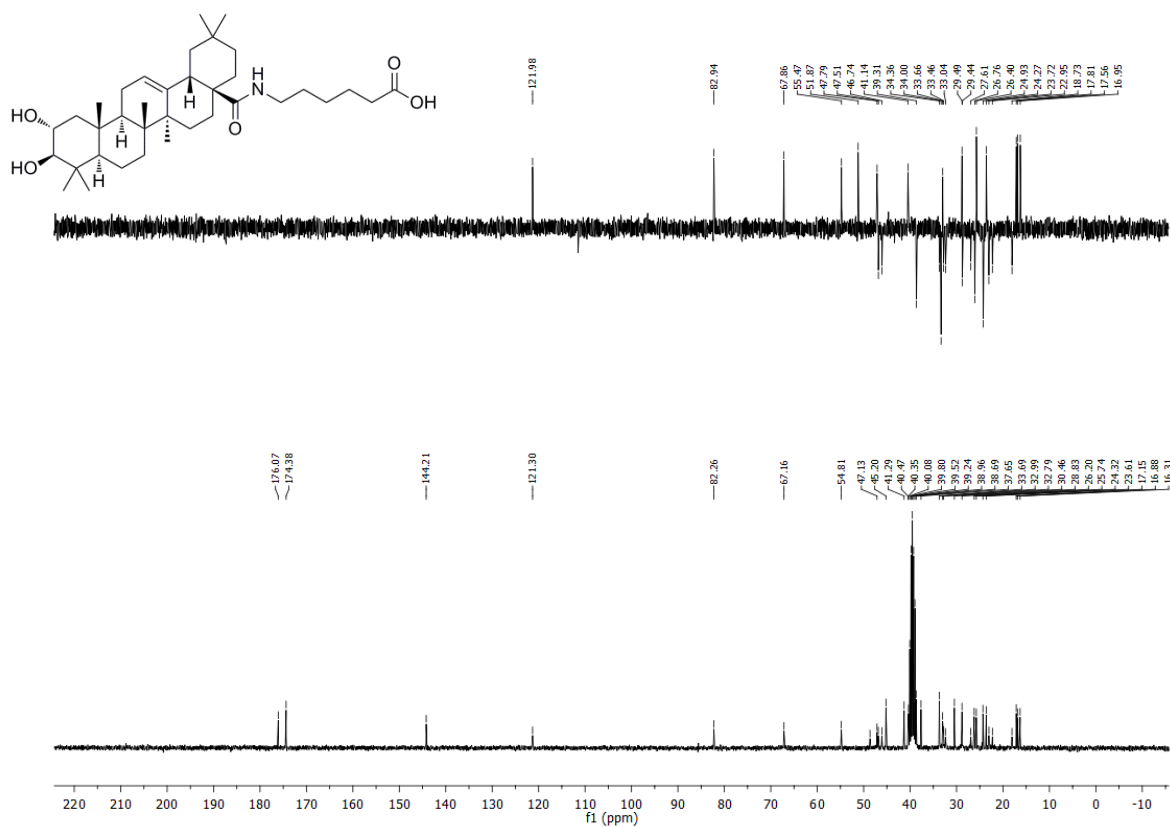
Producto 94

Espectro de ^1H RMN del producto 94Espectro de ^{13}C RMN del producto 94

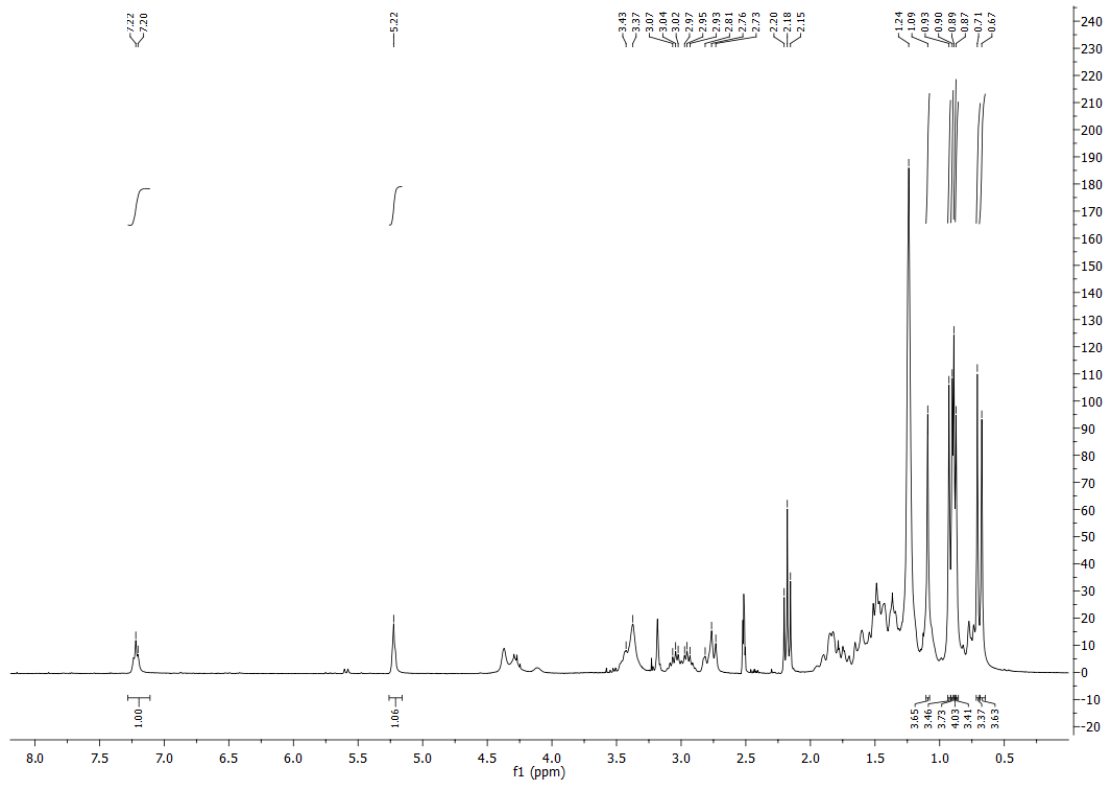
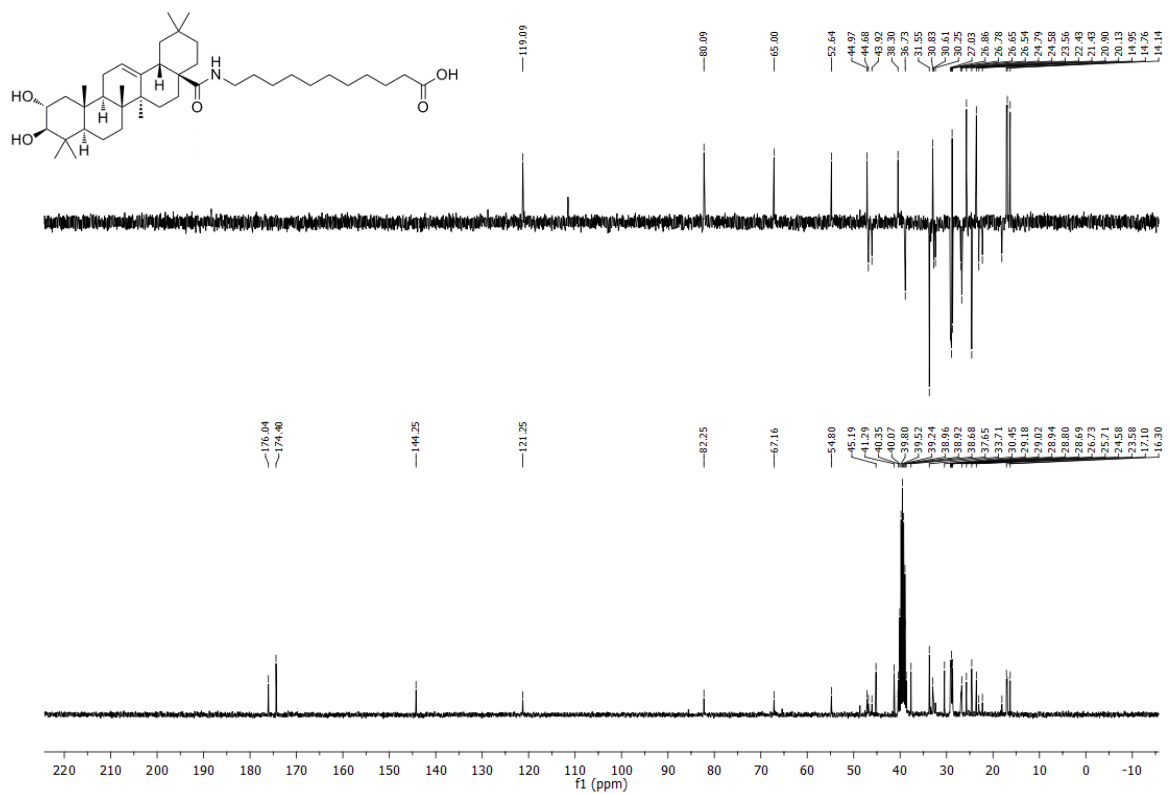
Producto 95

Espectro de ^1H RMN del producto 95Espectro de ^{13}C RMN del producto 95

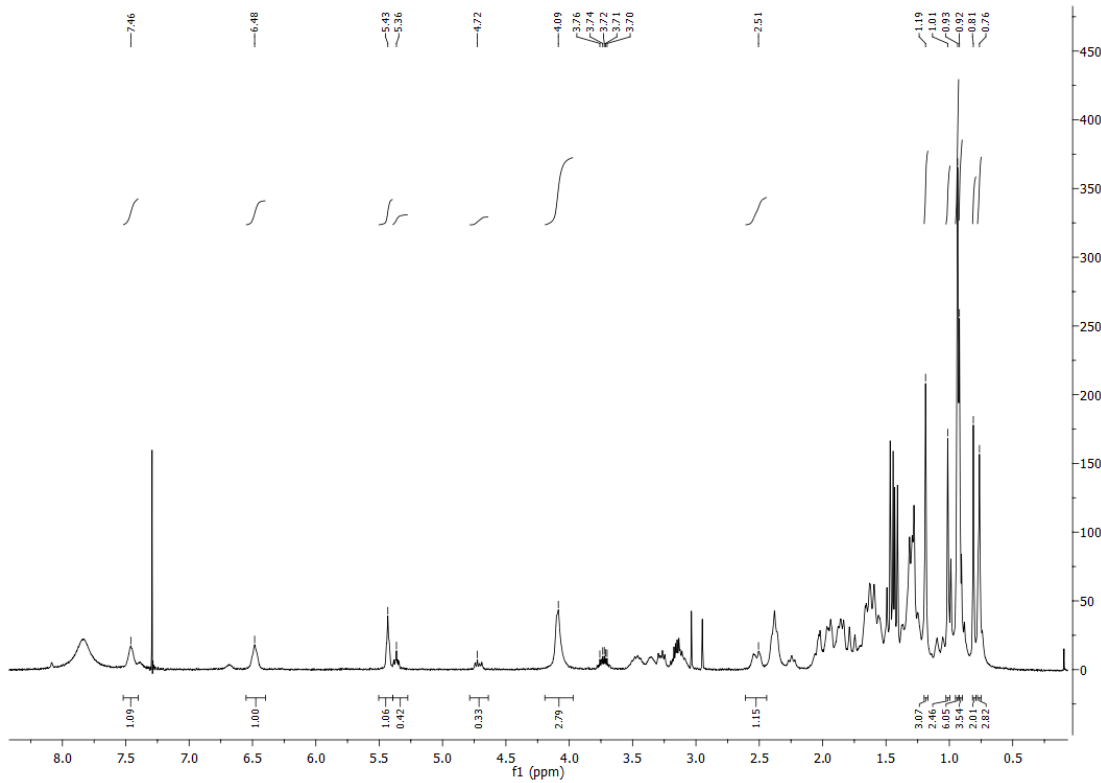
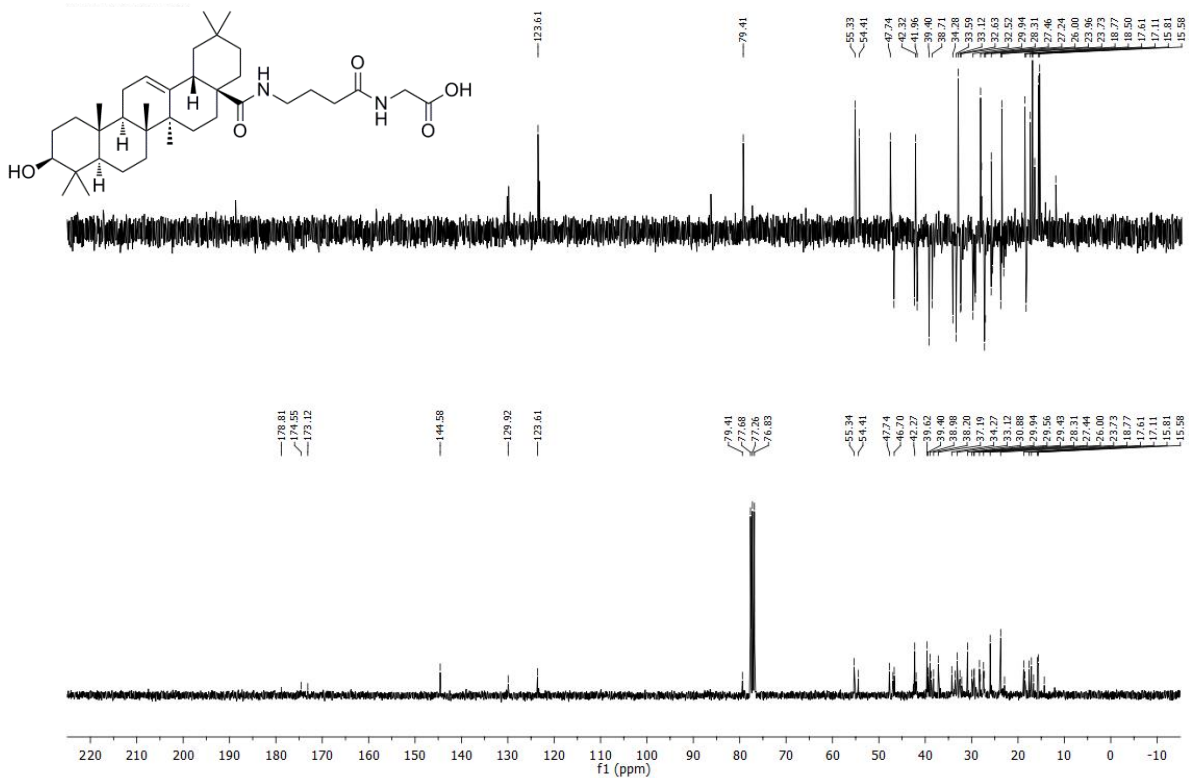
Producto 96

Espectro de ^1H RMN del producto 96Espectro de ^{13}C RMN del producto 96

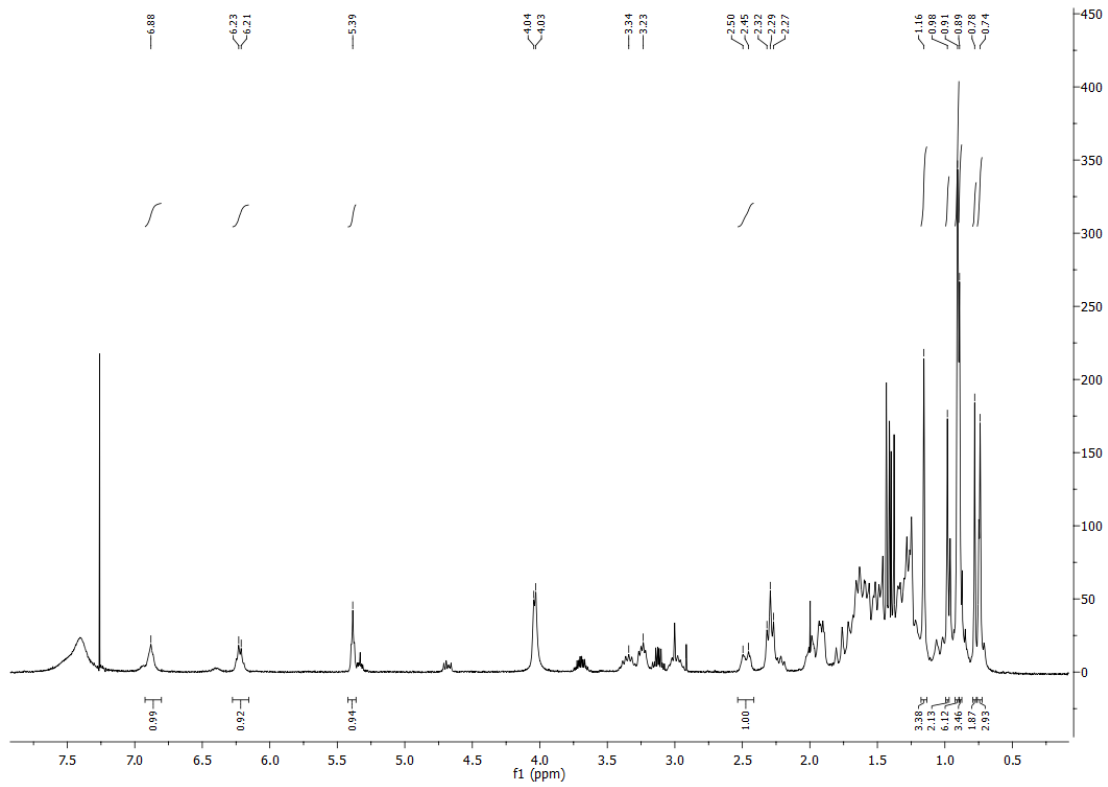
Producto 97

Espectro de ^1H RMN del producto 97Espectro de ^{13}C RMN del producto 97

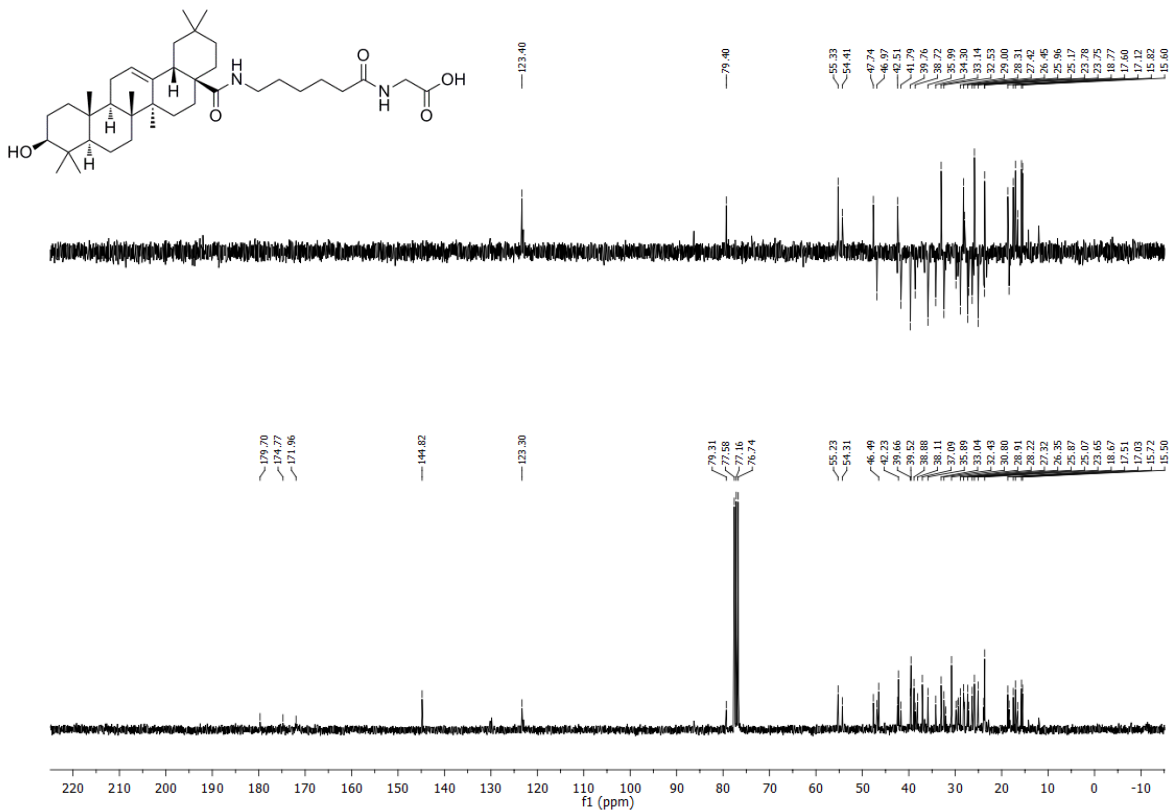
Producto 98

Espectro de ^1H RMN del producto 98Espectro de ^{13}C RMN del producto 98

Producto 99

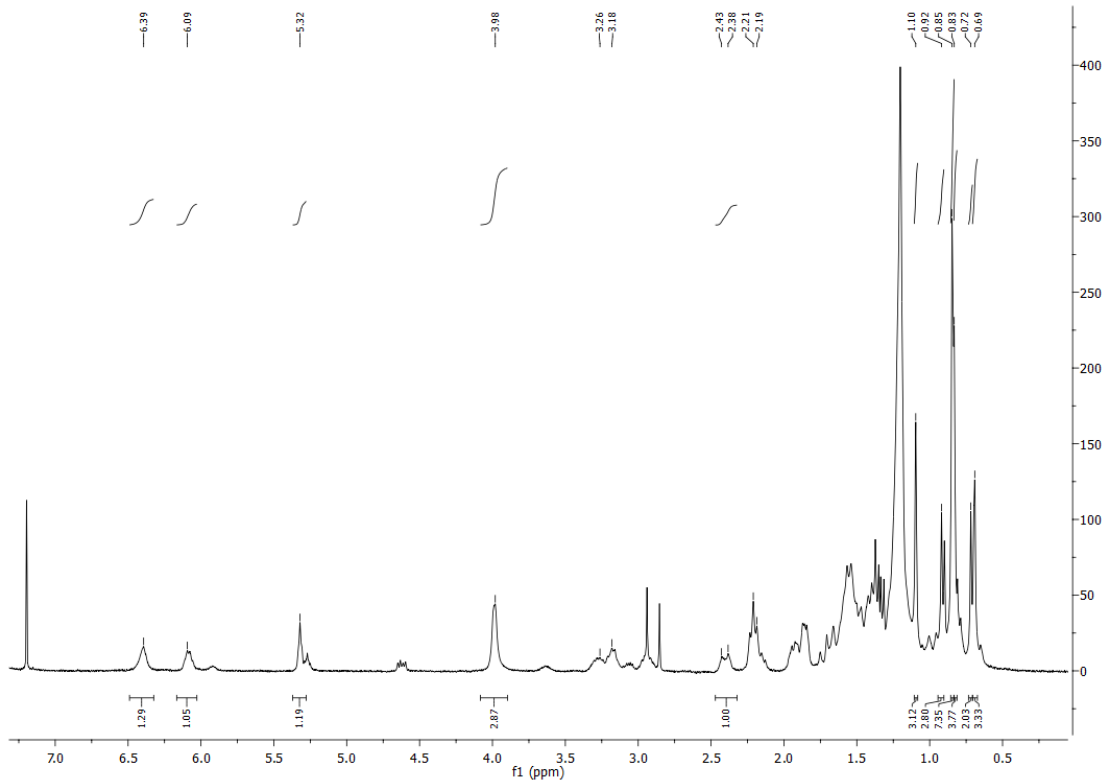
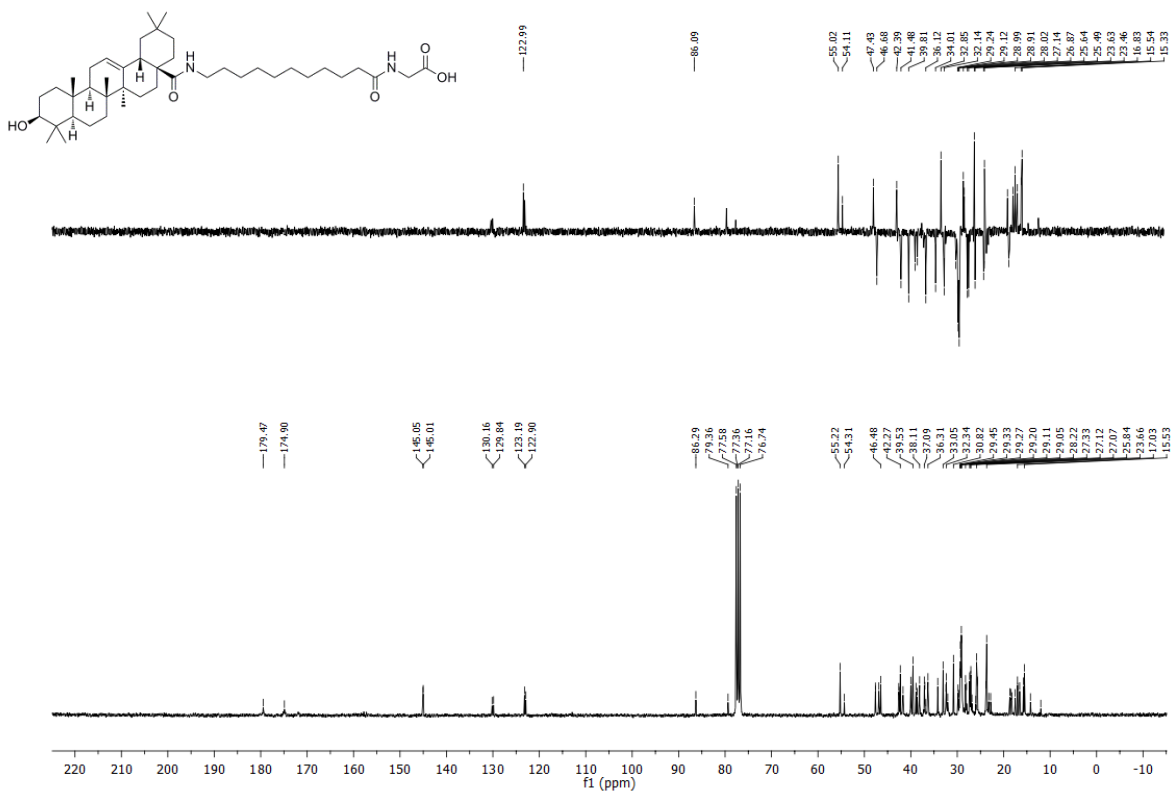


Espectro de ¹H RMN del producto 99

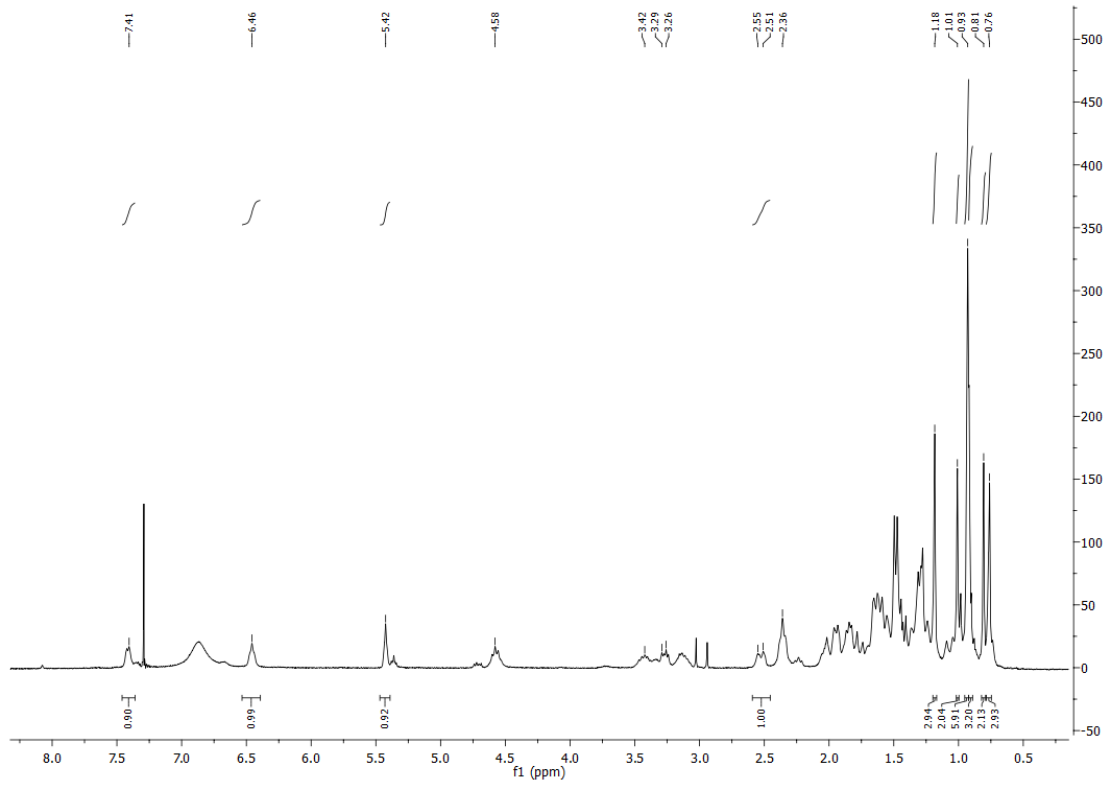


Espectro de ¹³C RMN del producto 99

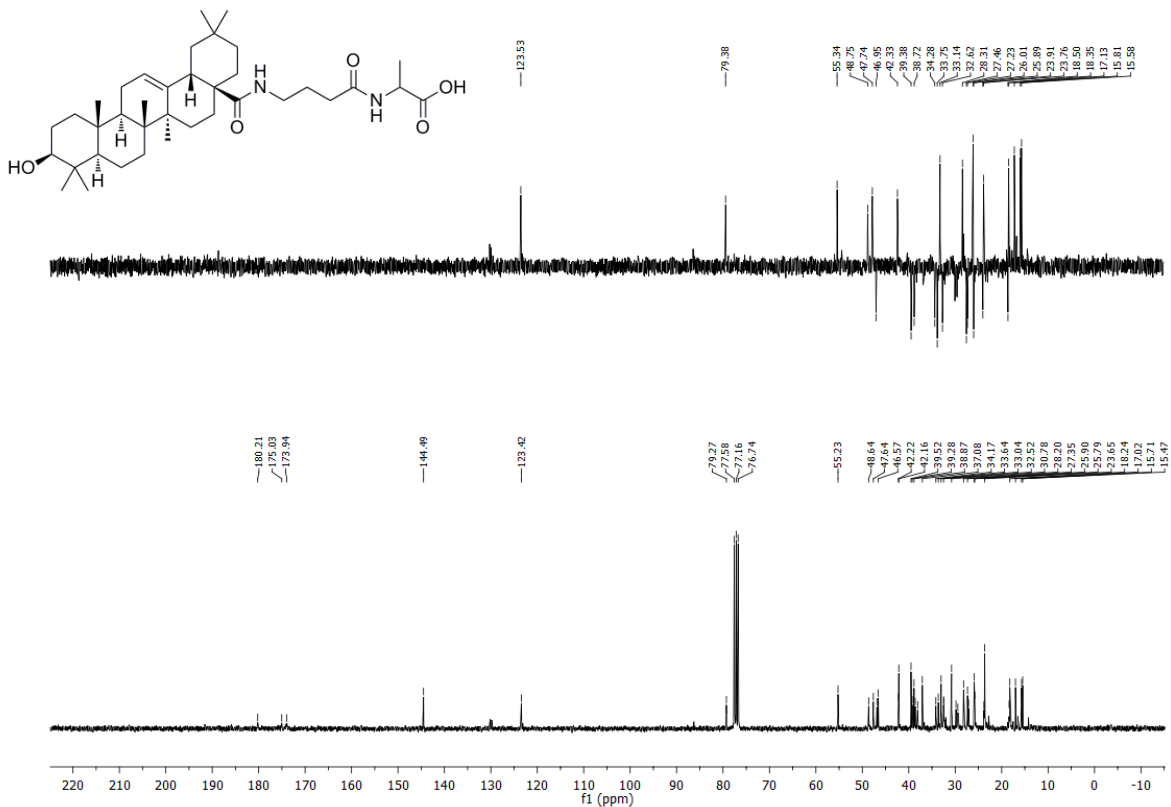
Producto 100

Espectro de ^1H RMN del producto 100Espectro de ^{13}C RMN del producto 100

Producto 101

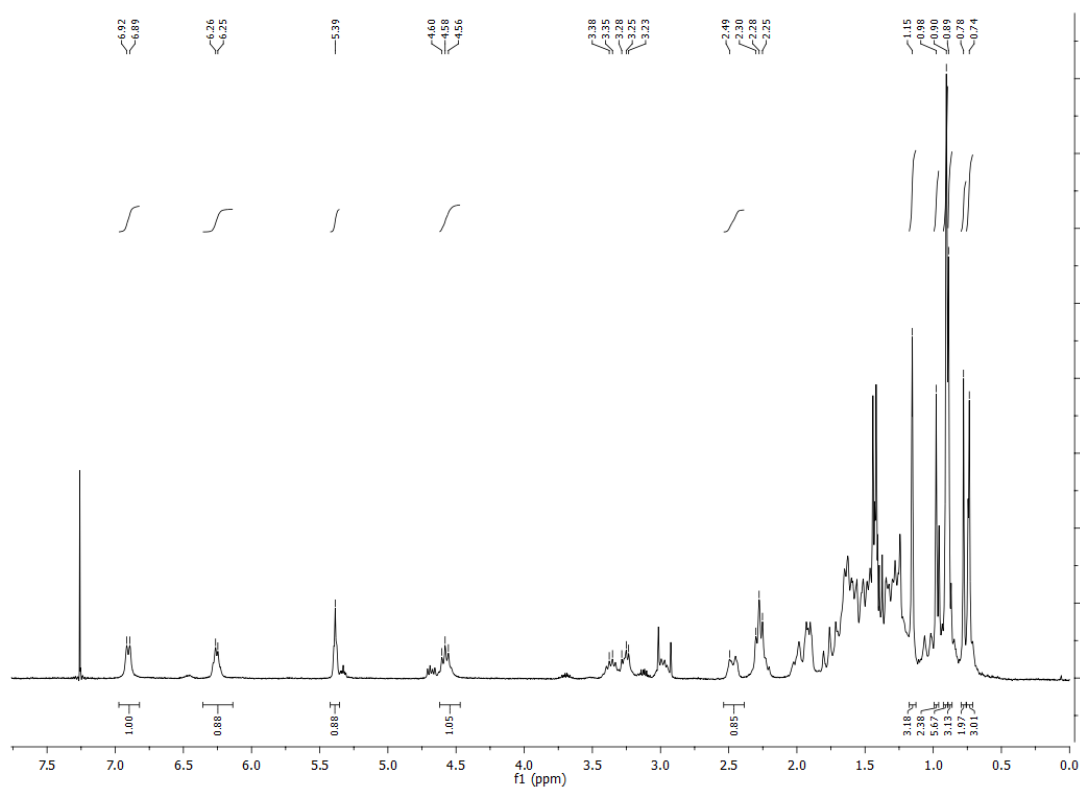
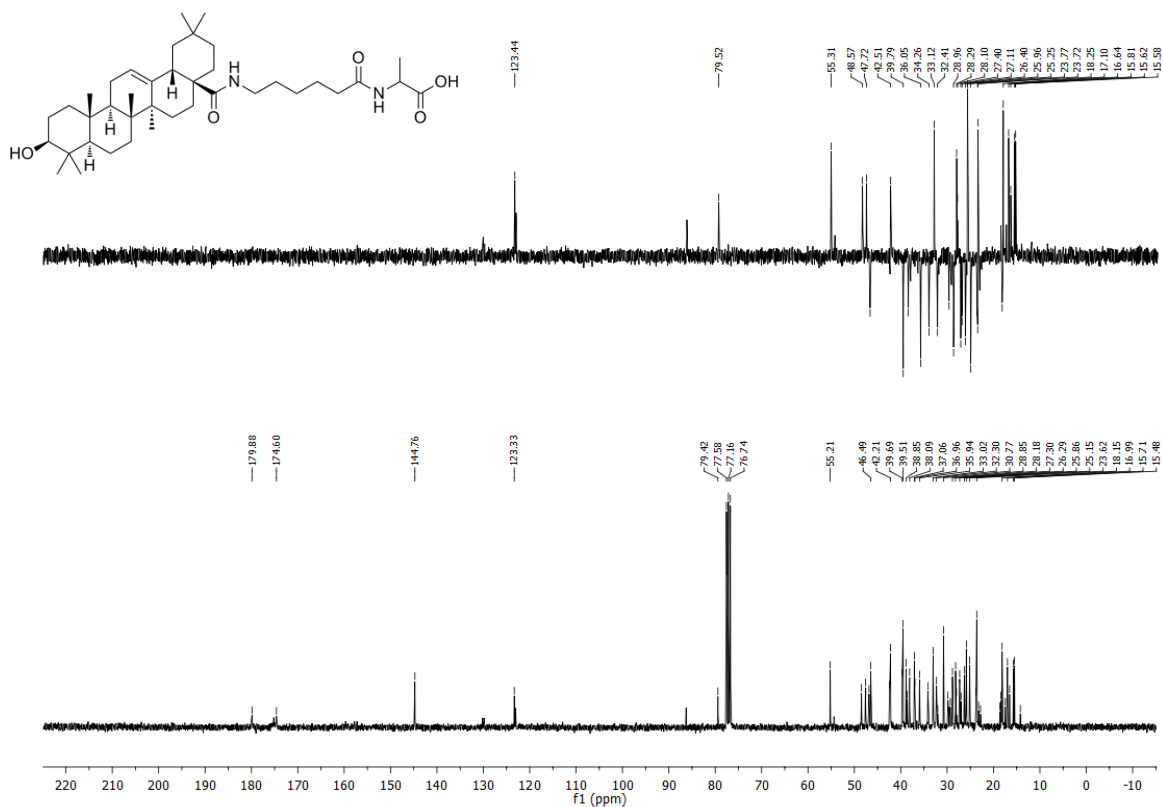


Espectro de ¹H RMN del producto 101

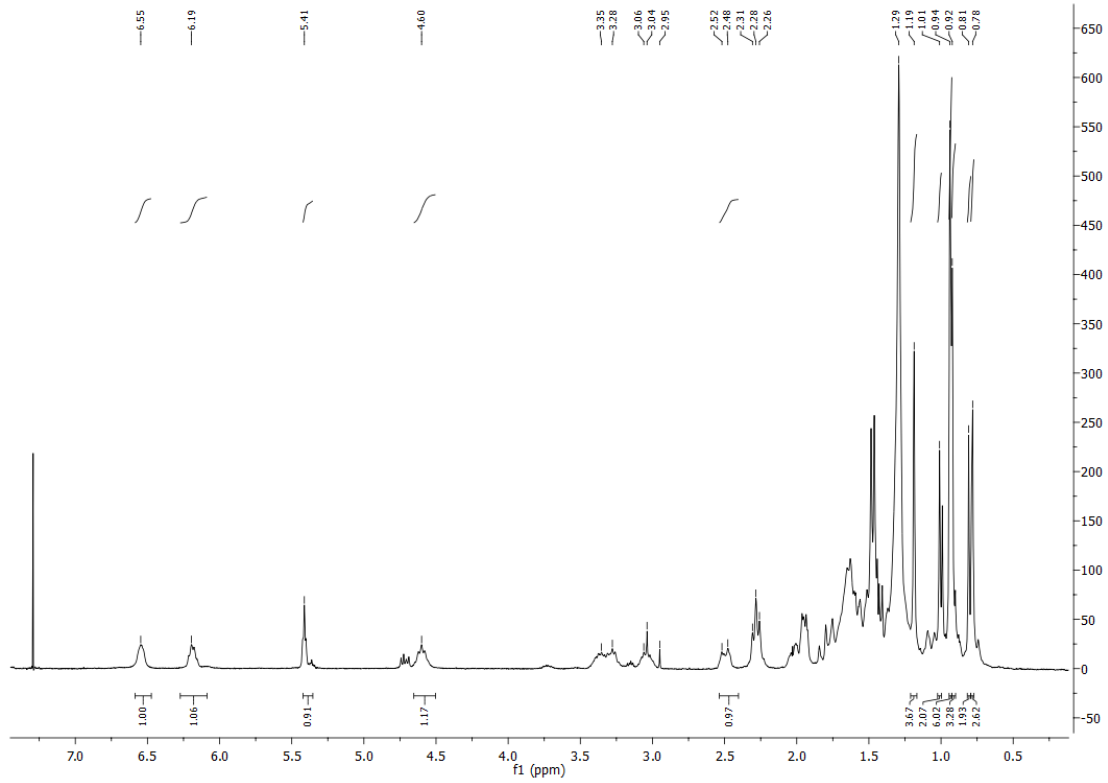


Espectro de ¹³C RMN del producto 101

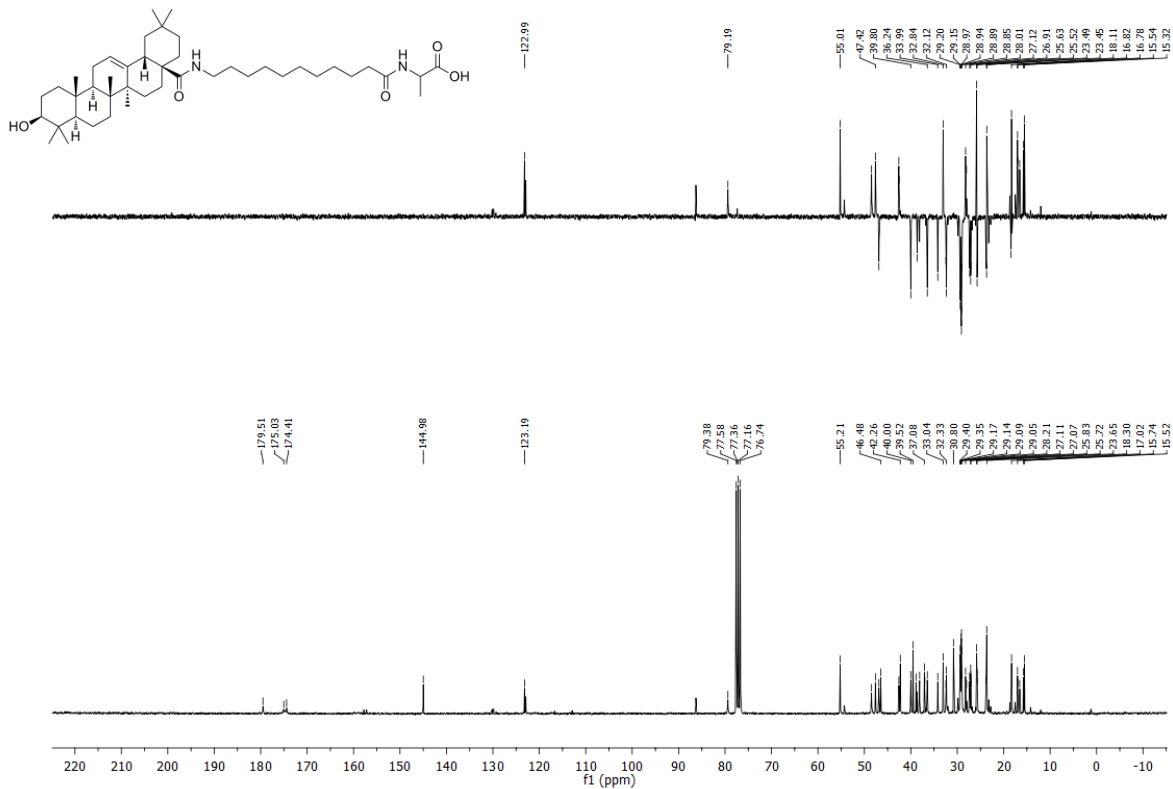
Producto 102

Espectro de ^1H RMN del producto 102Espectro de ^{13}C RMN del producto 102

Producto 103

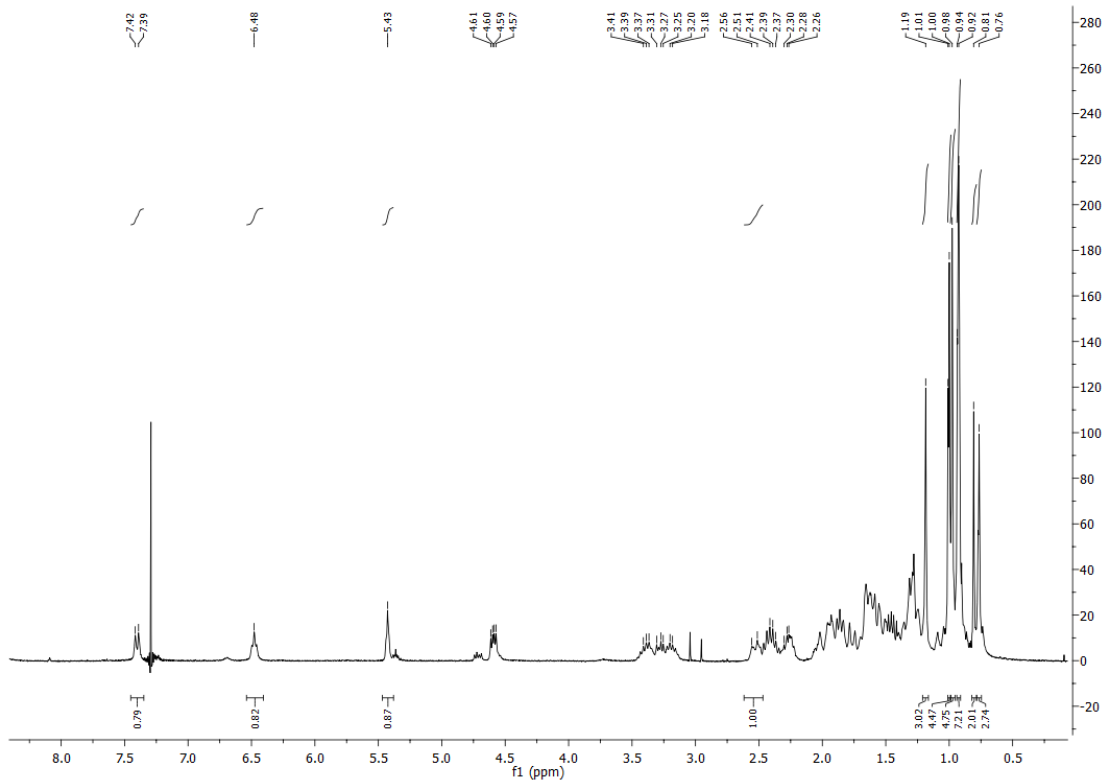
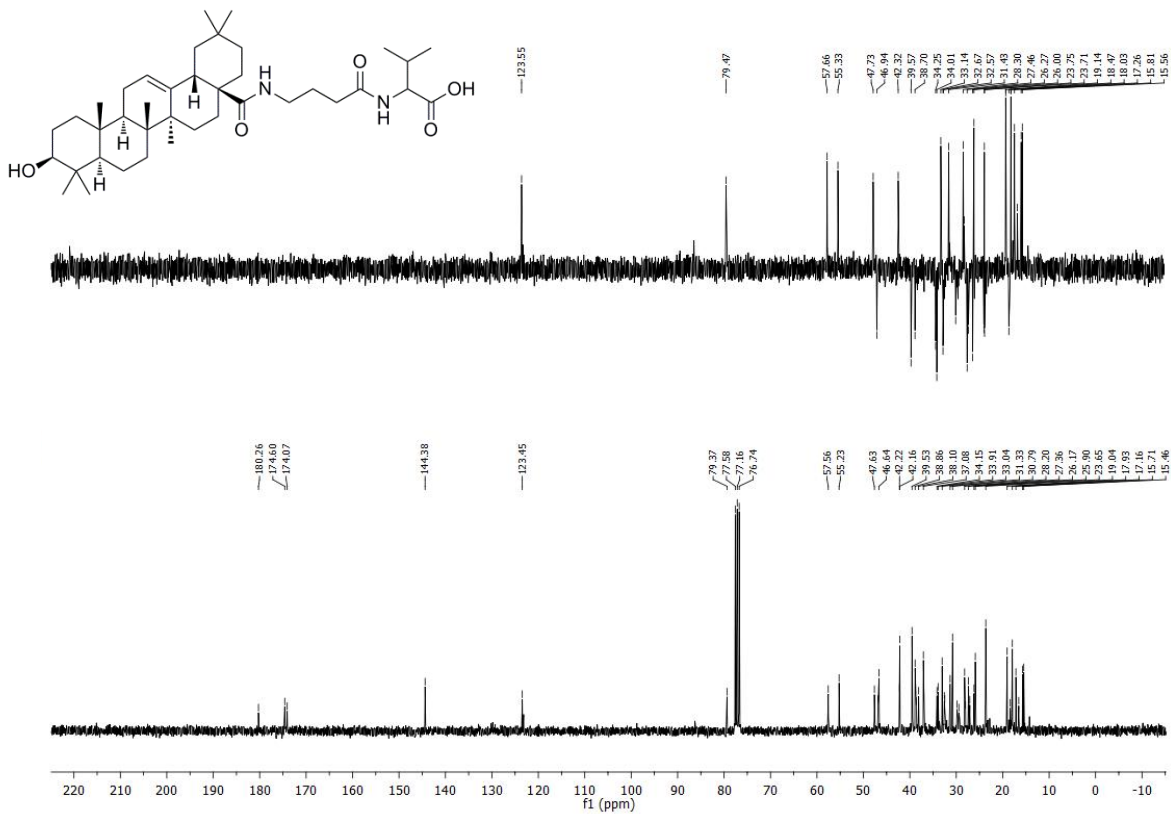


Espectro de ¹H RMN del producto 103

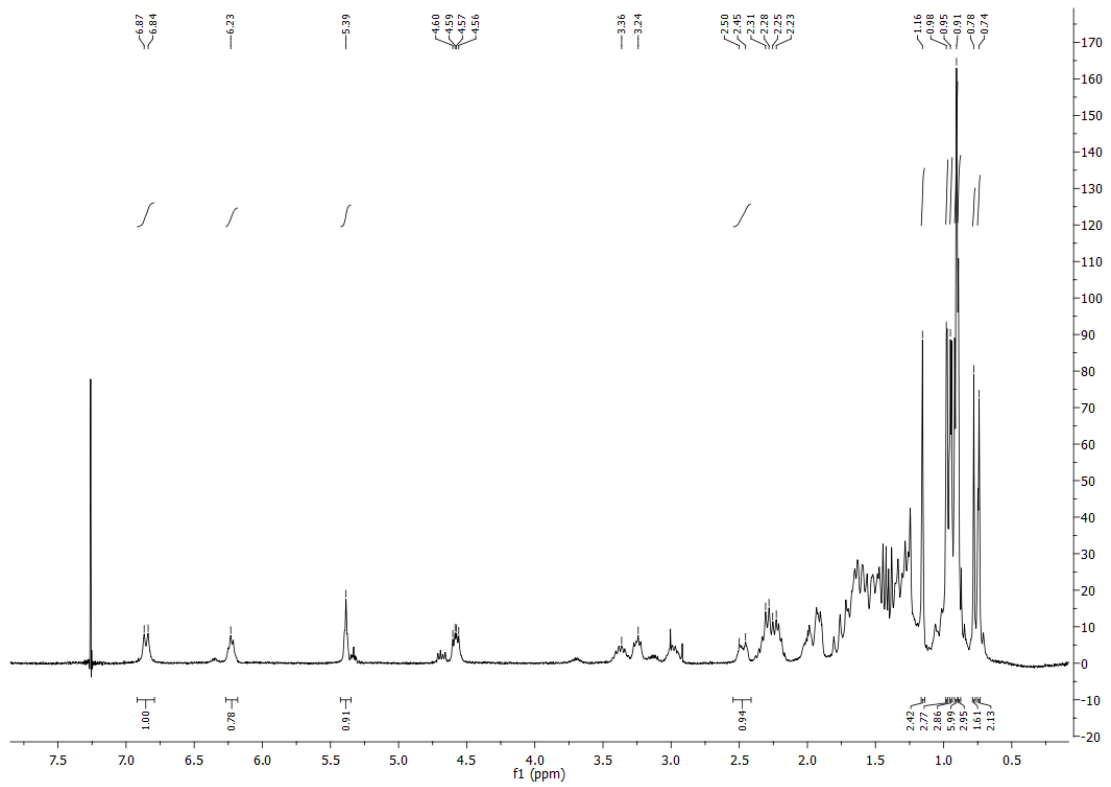


Espectro de ¹³C RMN del producto 103

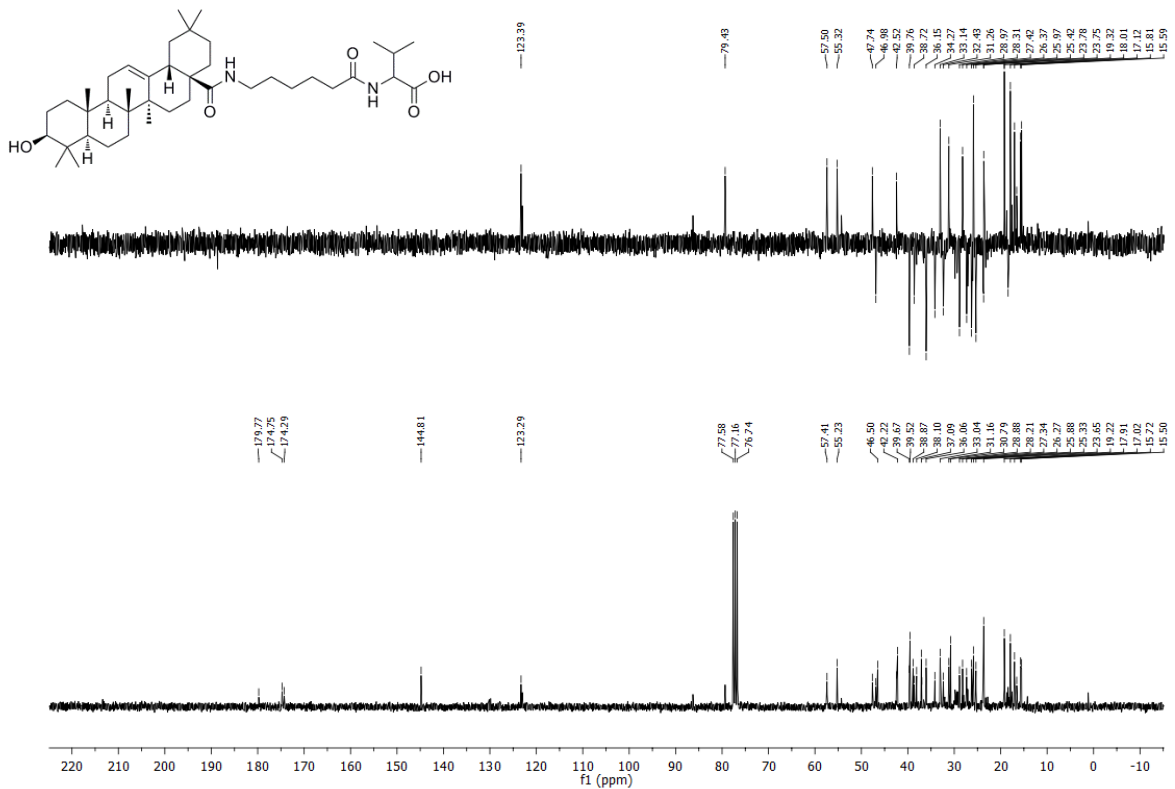
Producto 104

Espectro de ^1H RMN del producto 104Espectro de ^{13}C RMN del producto 104

Producto 105

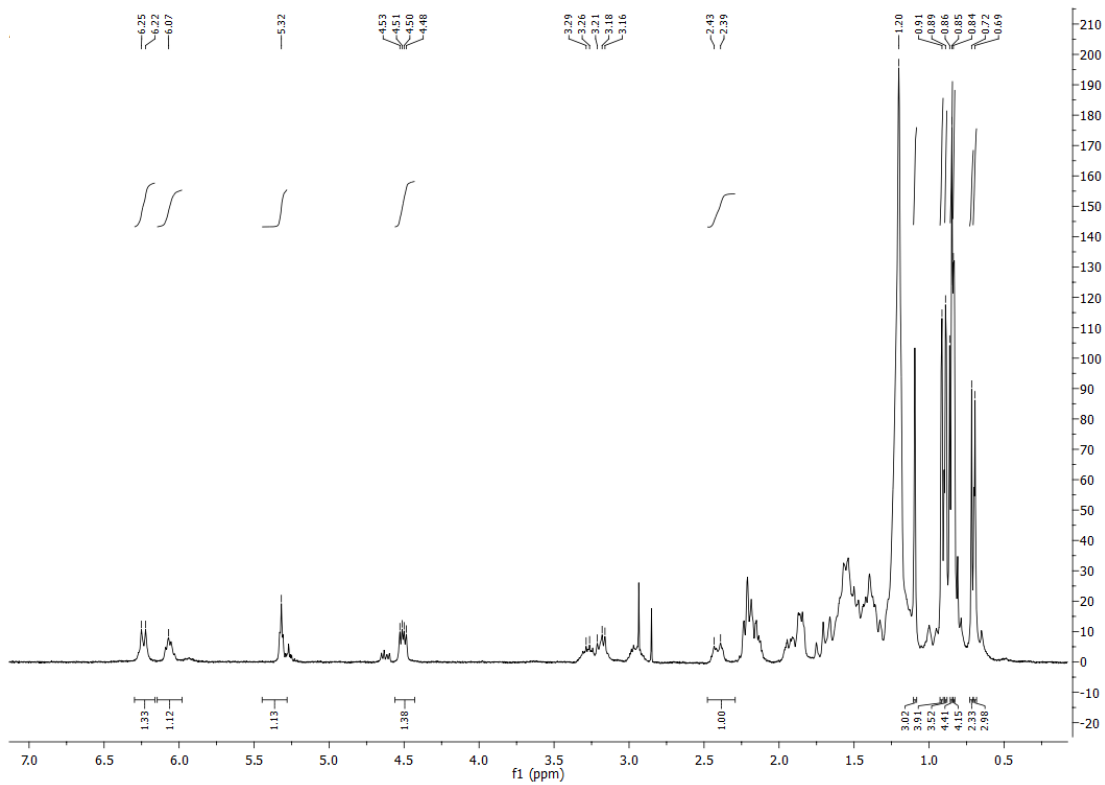
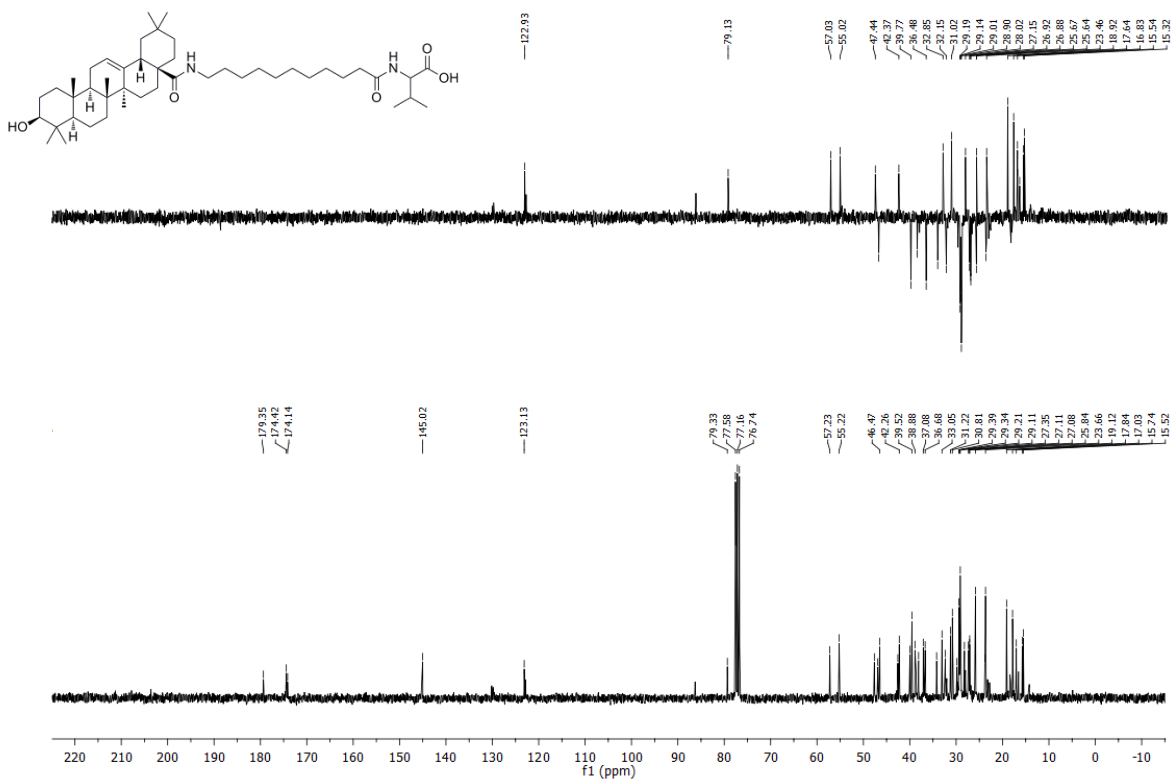


Espectro de ¹H RMN del producto 105

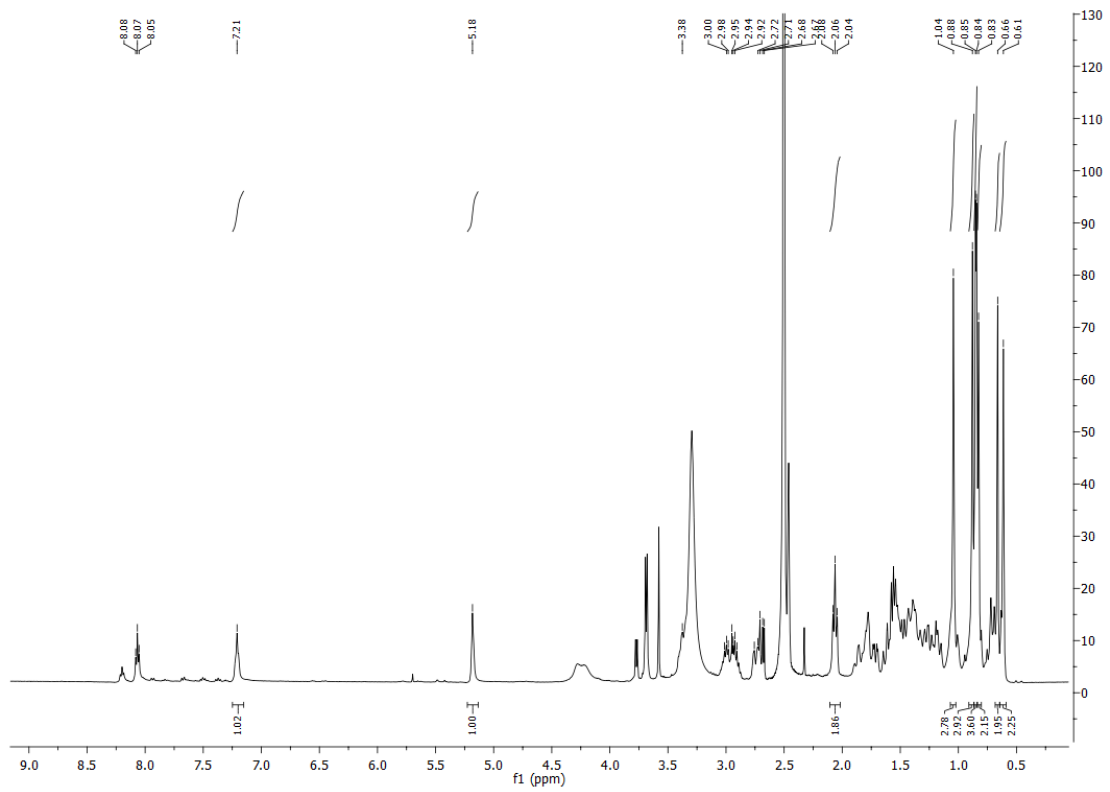
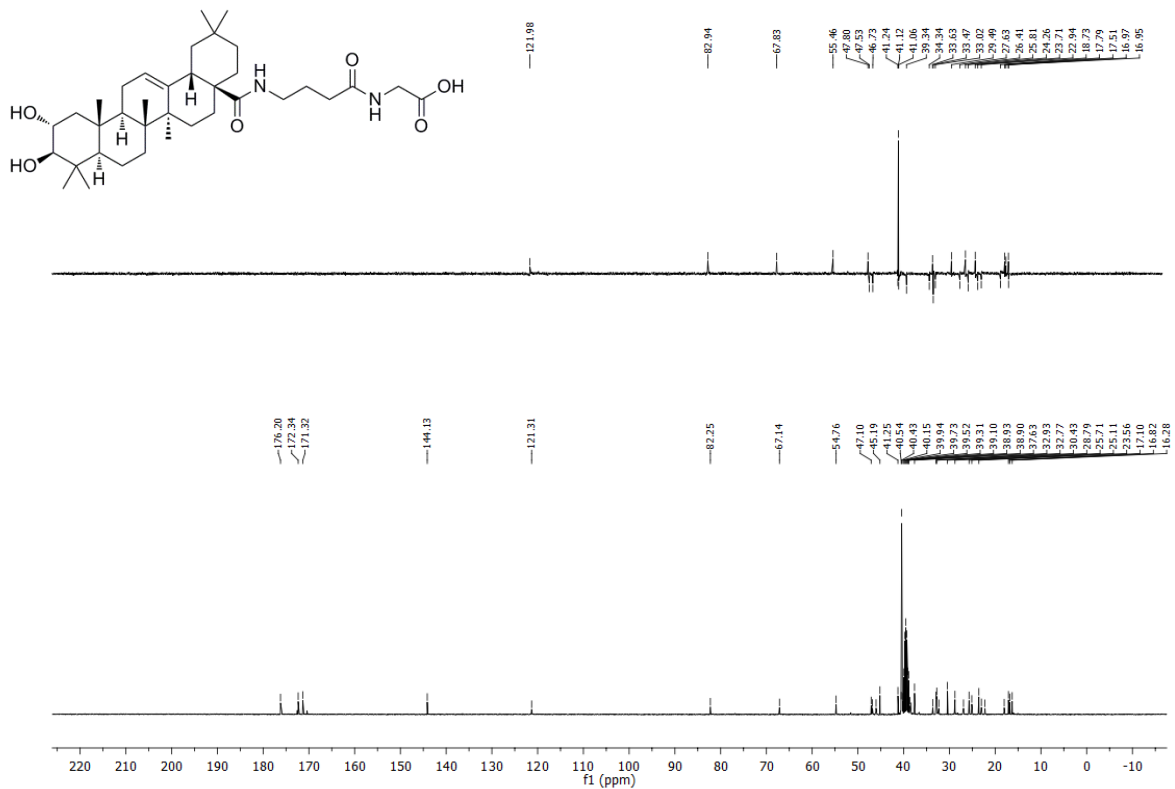


Espectro de ¹³C RMN del producto 105

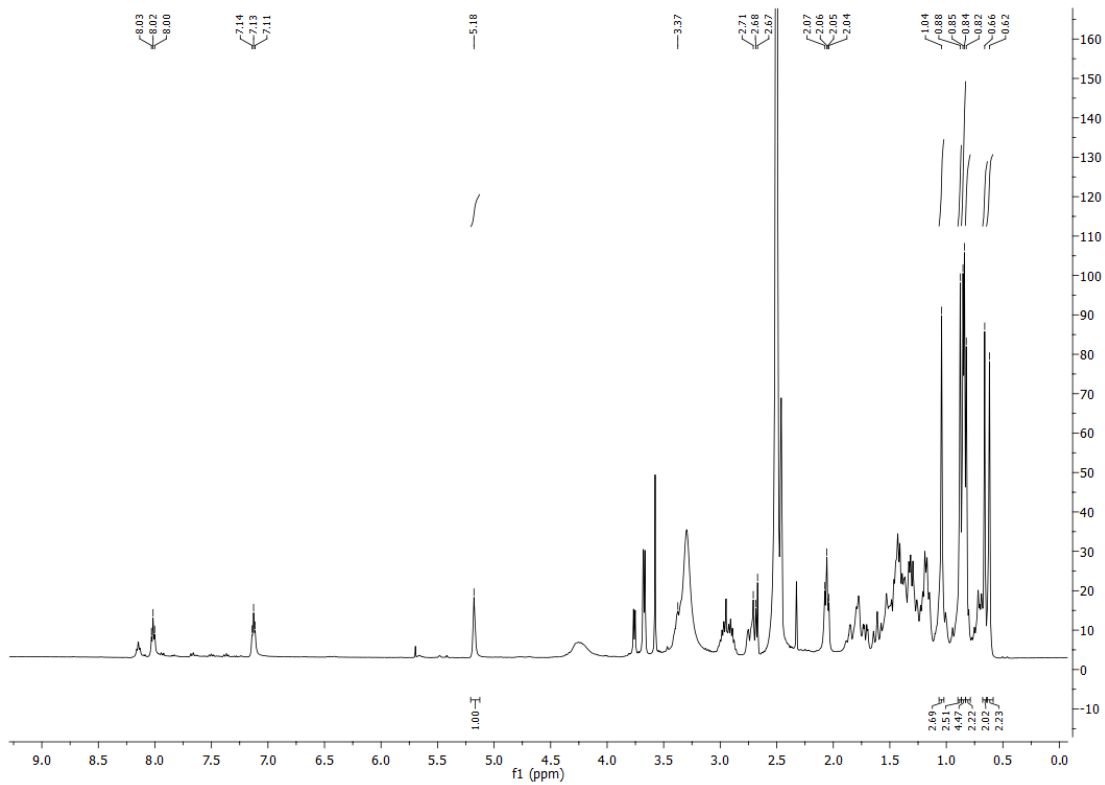
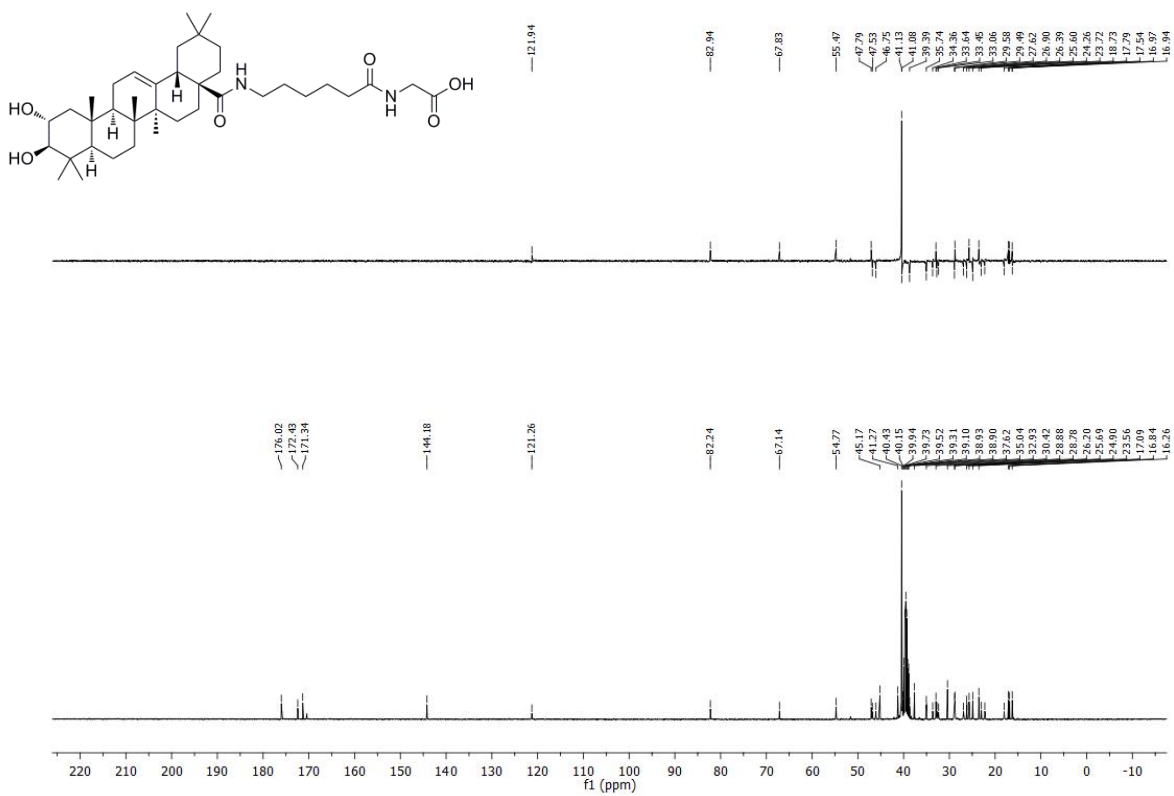
Producto 106

Espectro de ^1H RMN del producto 106Espectro de ^{13}C RMN del producto 106

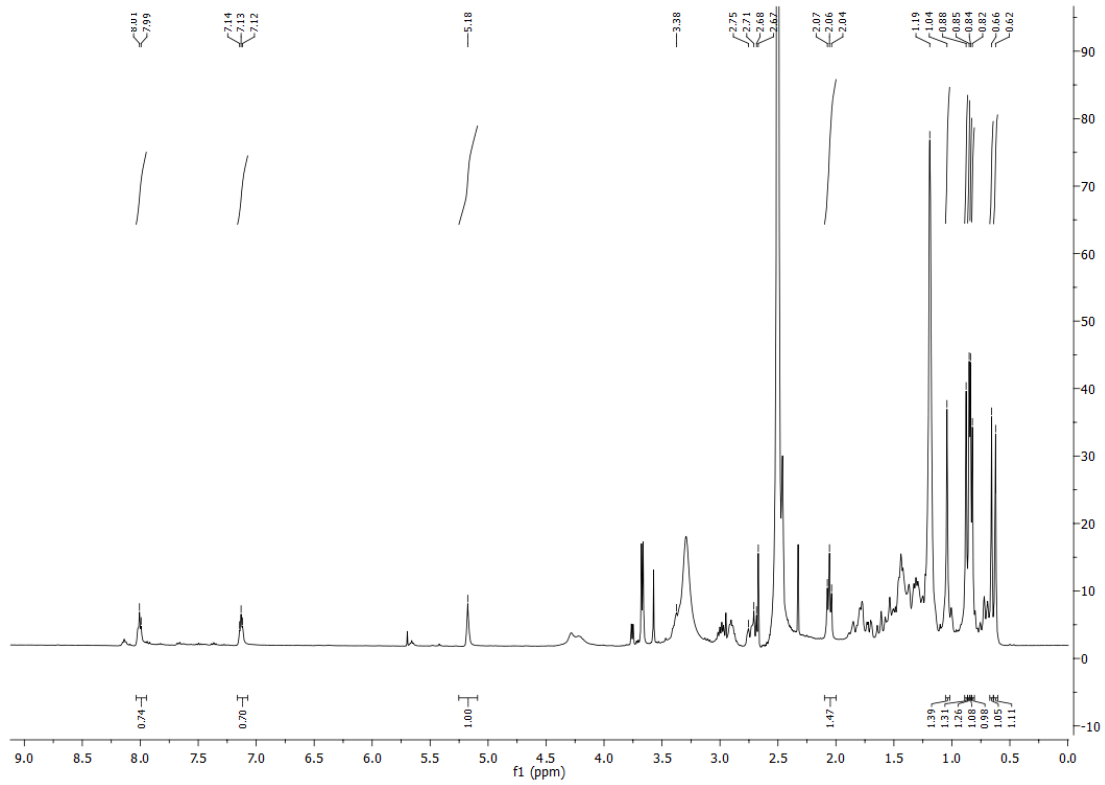
Producto 107

Espectro de ¹H RMN del producto 107Espectro de ¹³C RMN del producto 107

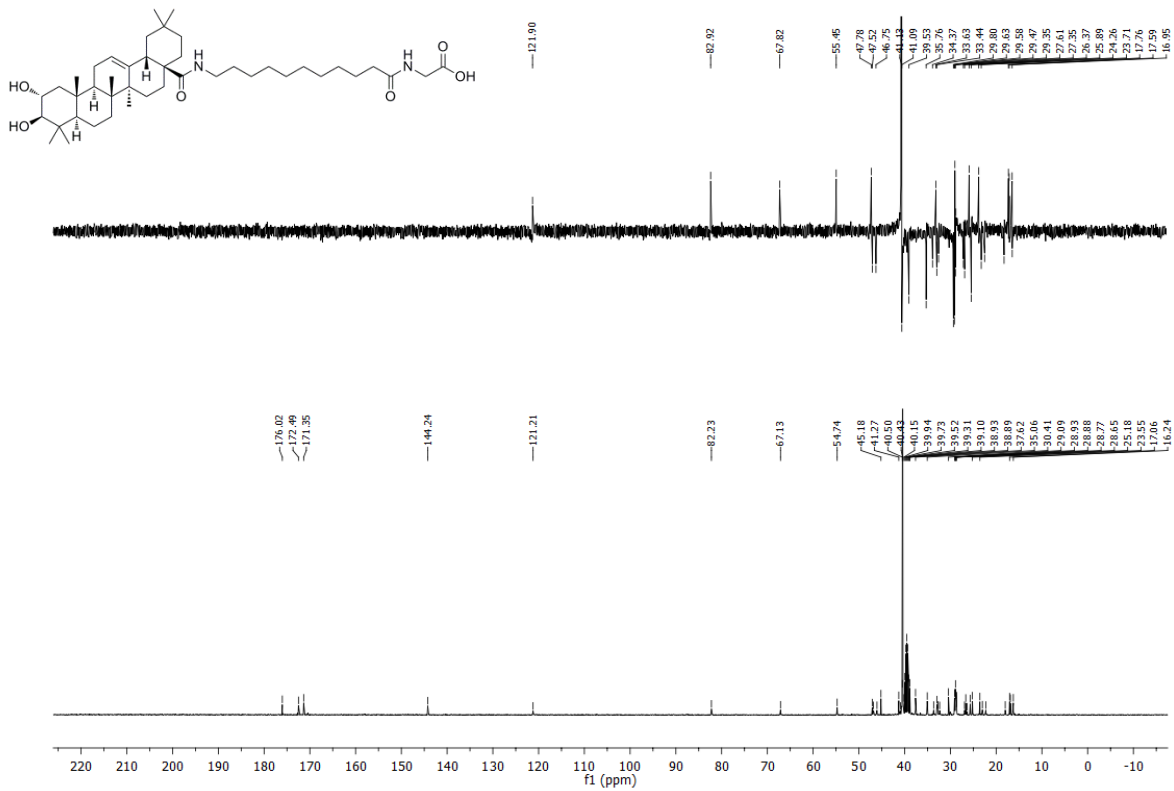
Producto 108

Espectro de ^1H RMN del producto 108Espectro de ^{13}C RMN del producto 108

Producto 109

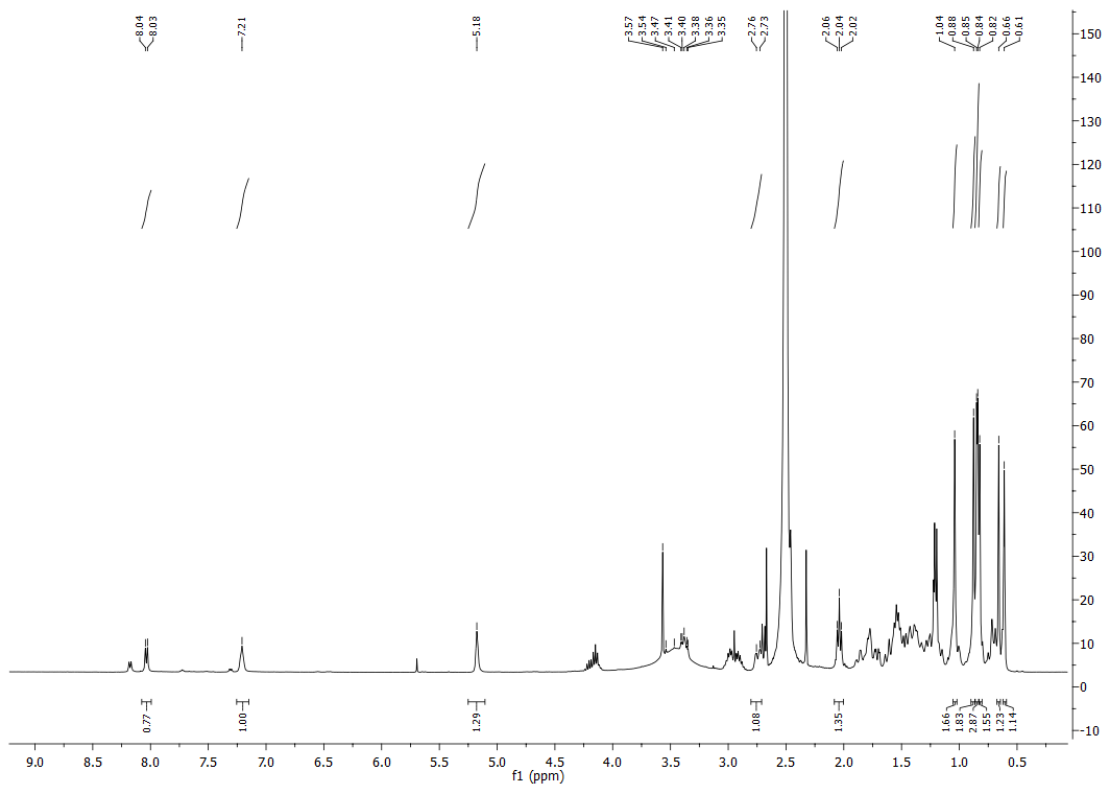
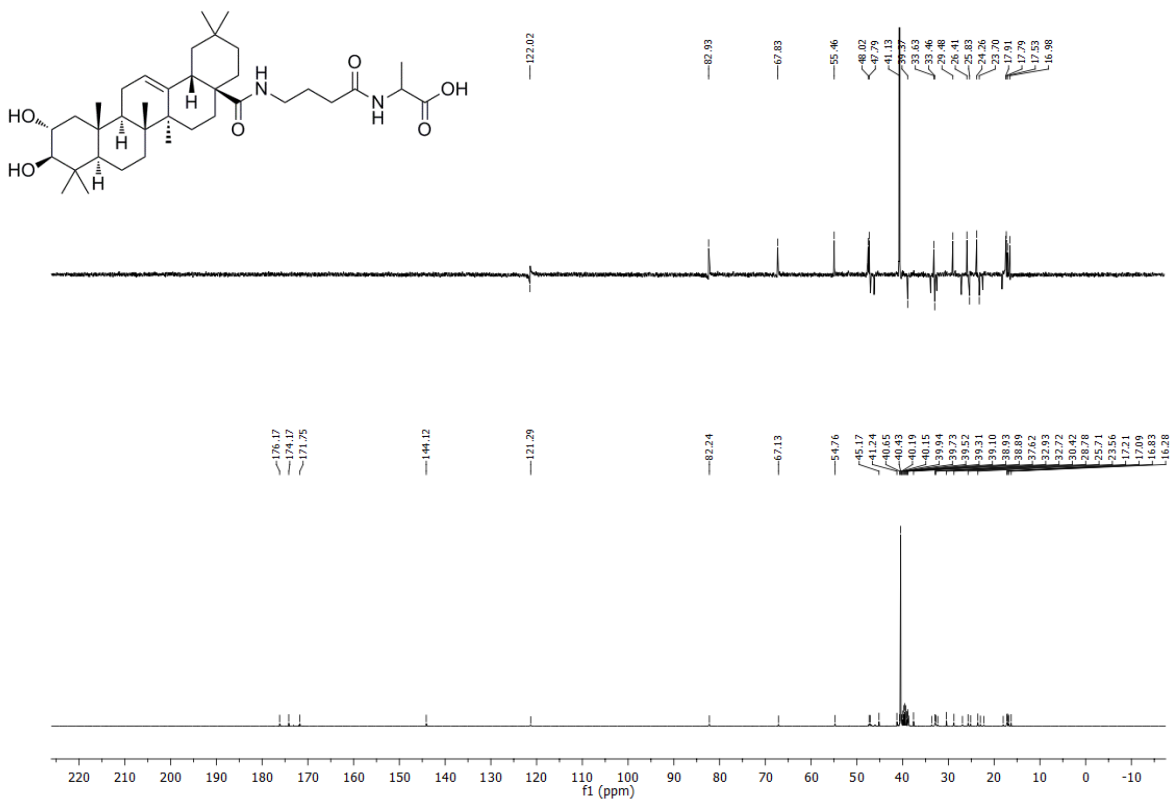


Espectro de ¹H RMN del producto 109

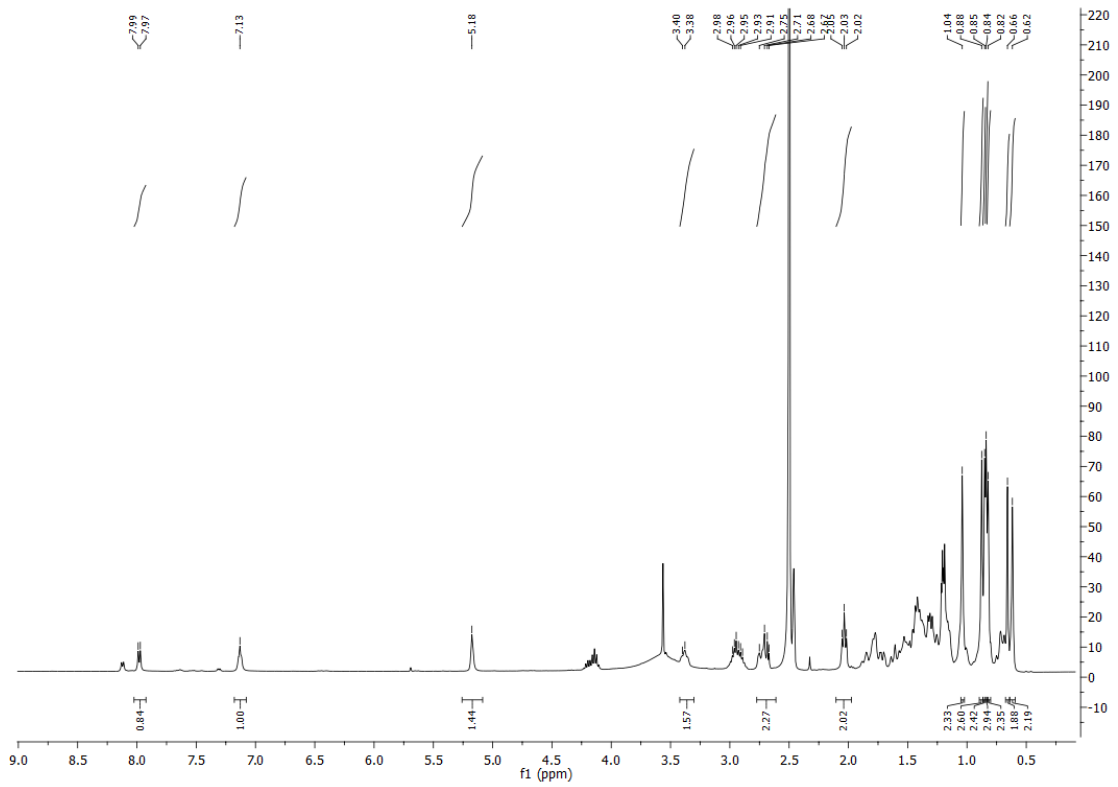


Espectro de ¹³C RMN del producto 109

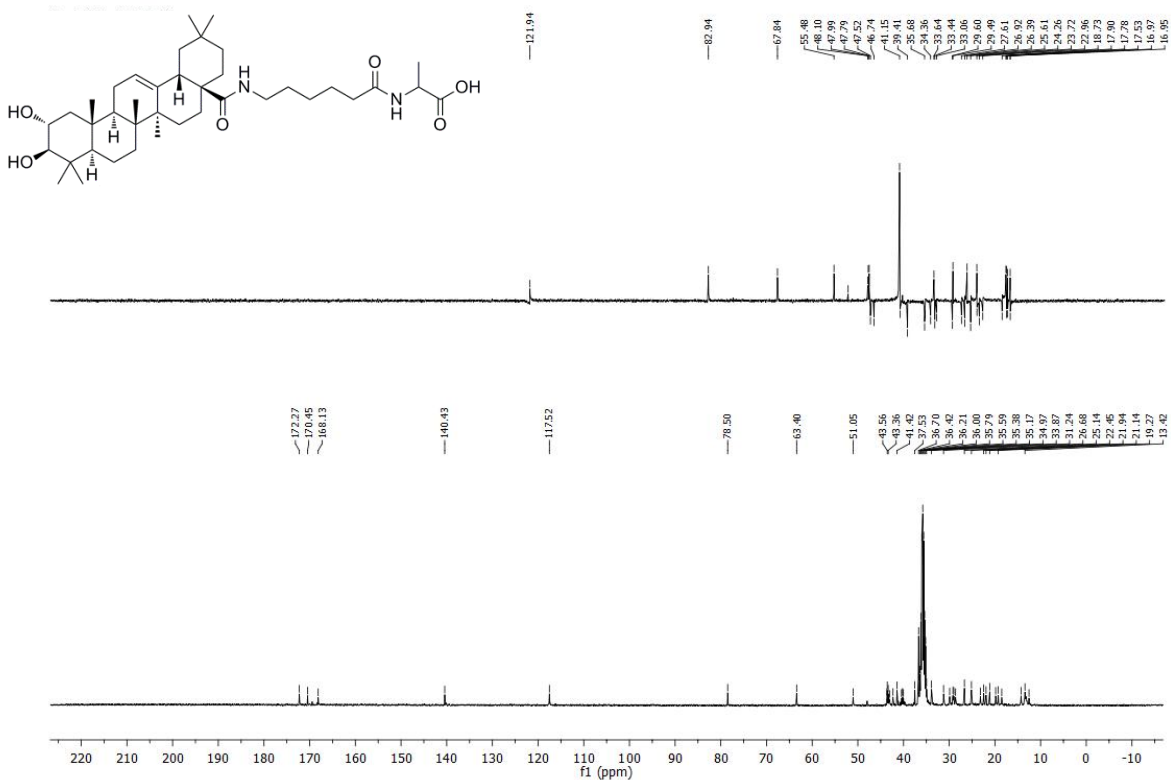
Producto 110

Espectro de ¹H RMN del producto 110Espectro de ¹³C RMN del producto 110

Producto 111

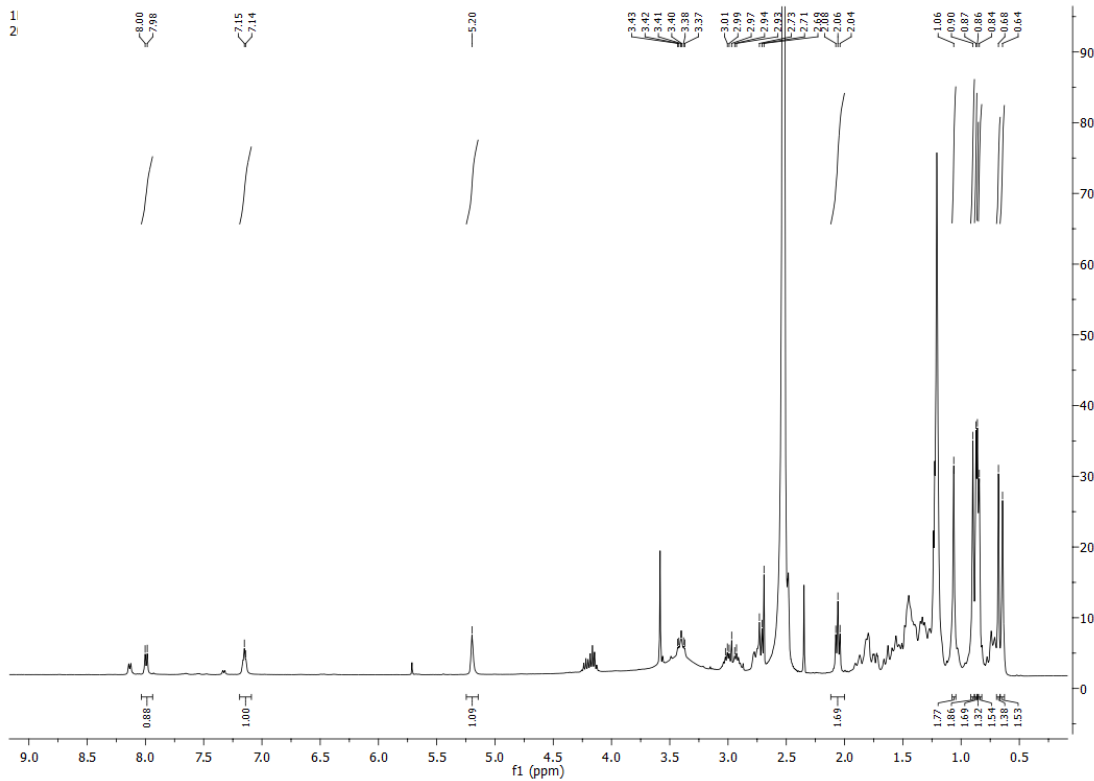


Espectro de ¹H RMN del producto 111

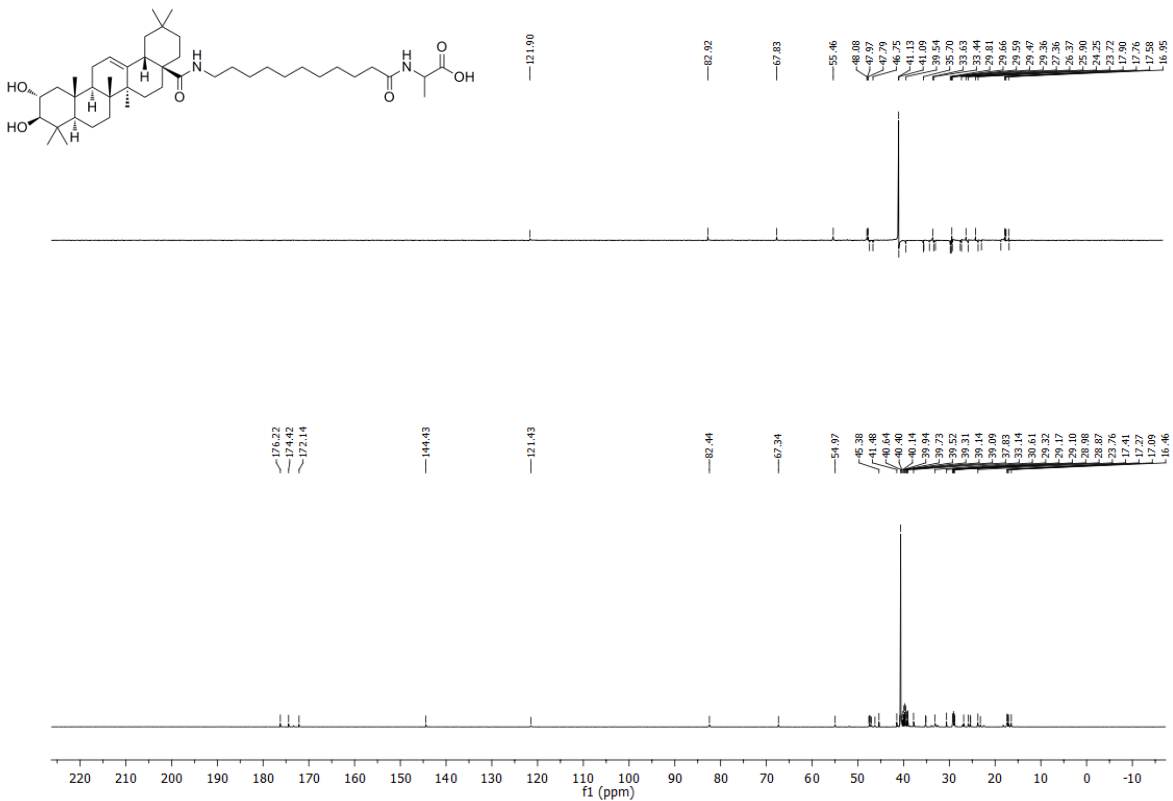


Espectro de ¹³C RMN del producto 111

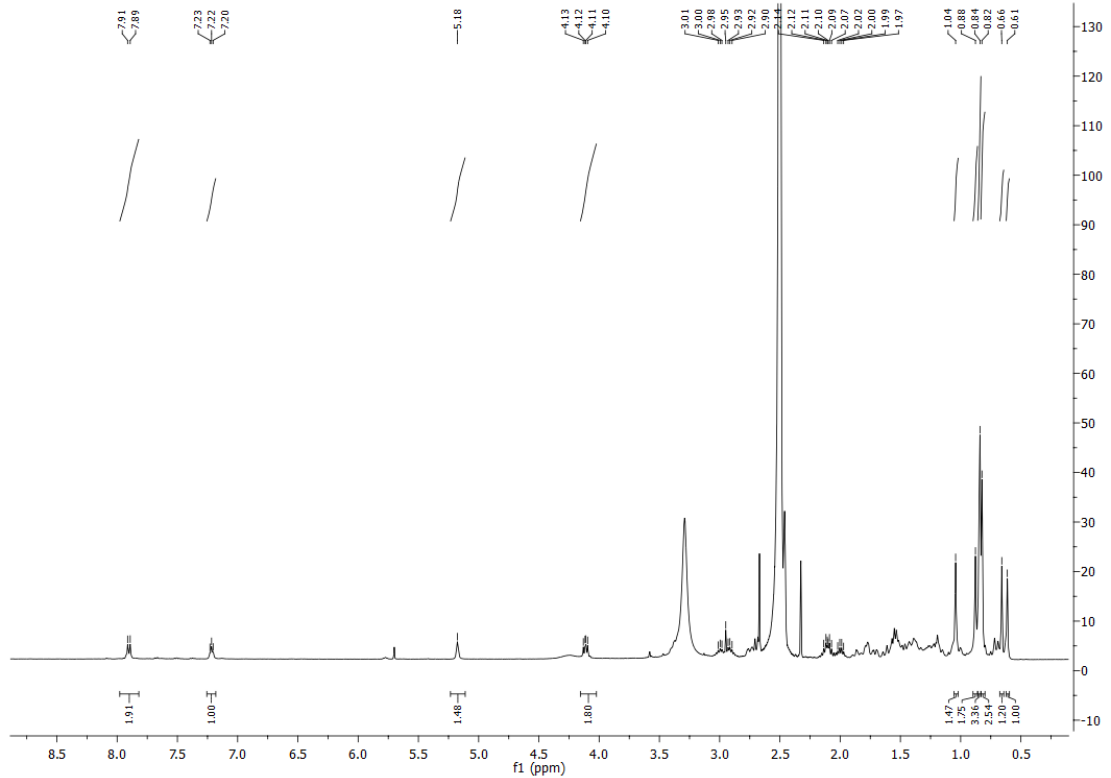
Producto 112



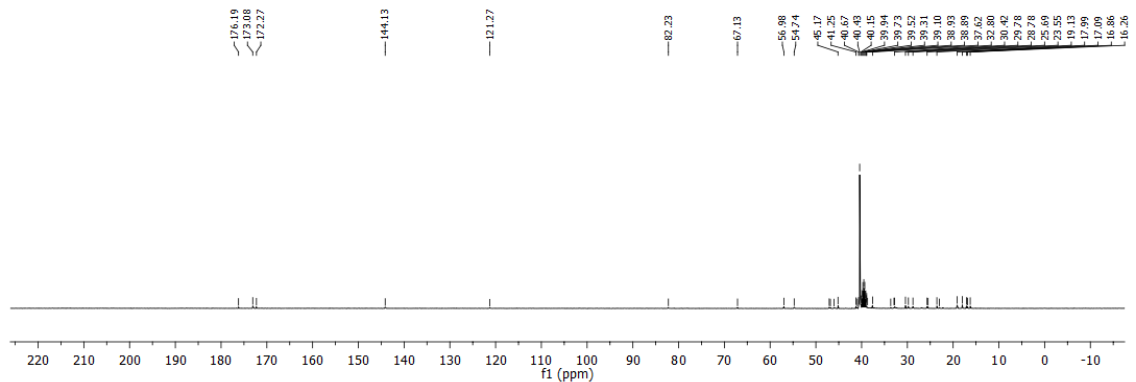
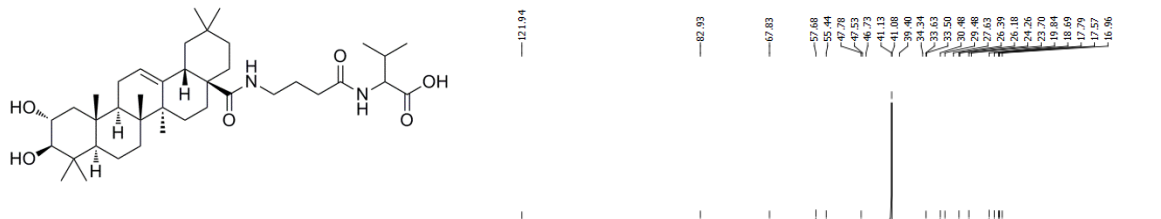
Espectro de ¹H RMN del producto 112



Espectro de ^{13}C RMN del producto 112
Producto 113

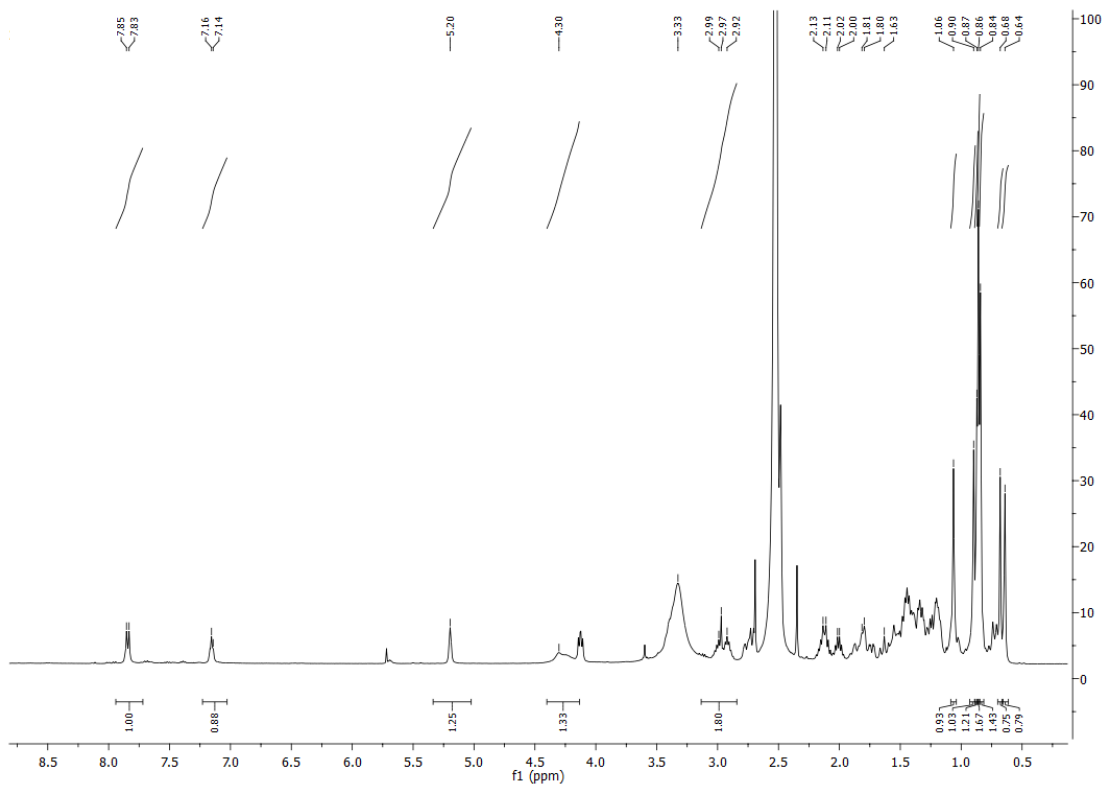
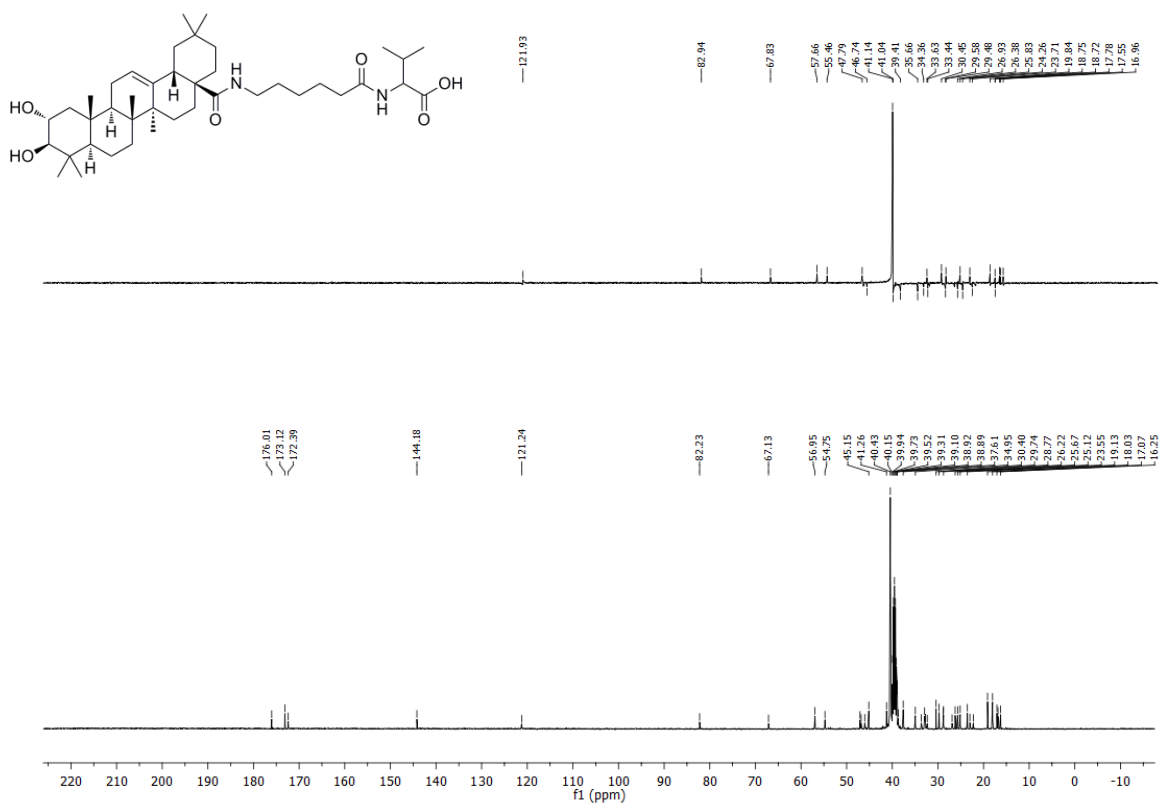


Espectro de ^1H RMN del producto 113

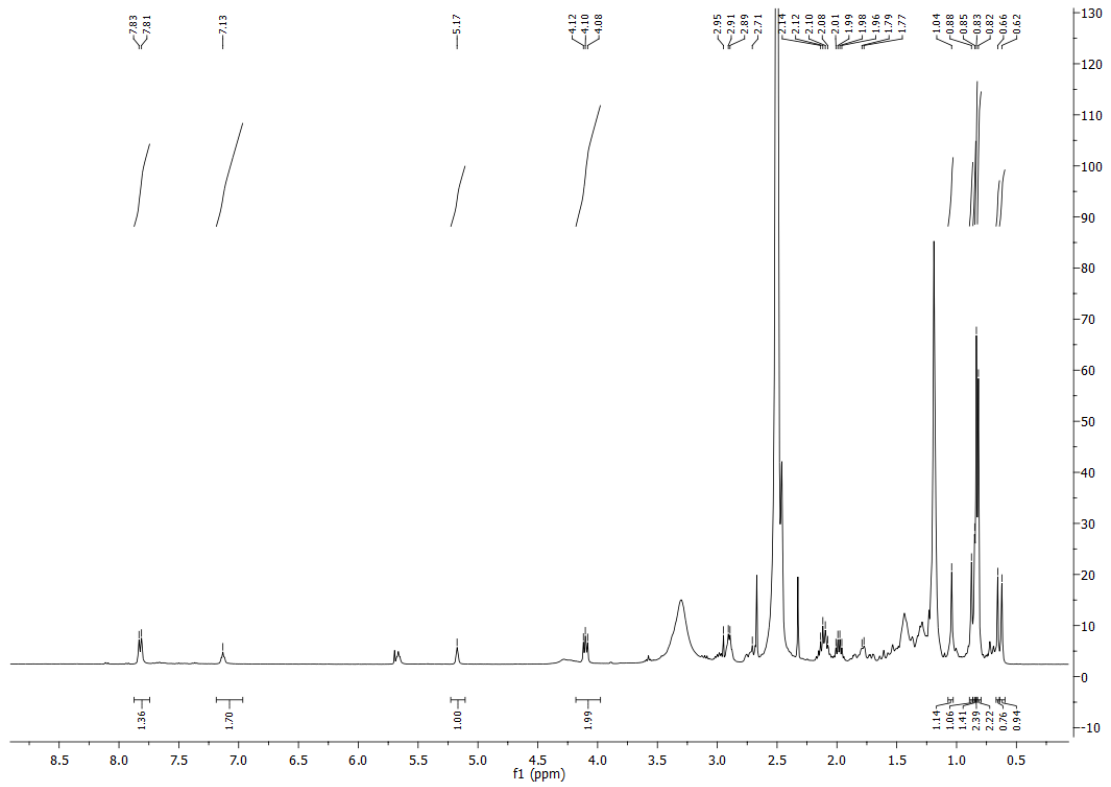


Espectro de ^{13}C RMN del producto 113

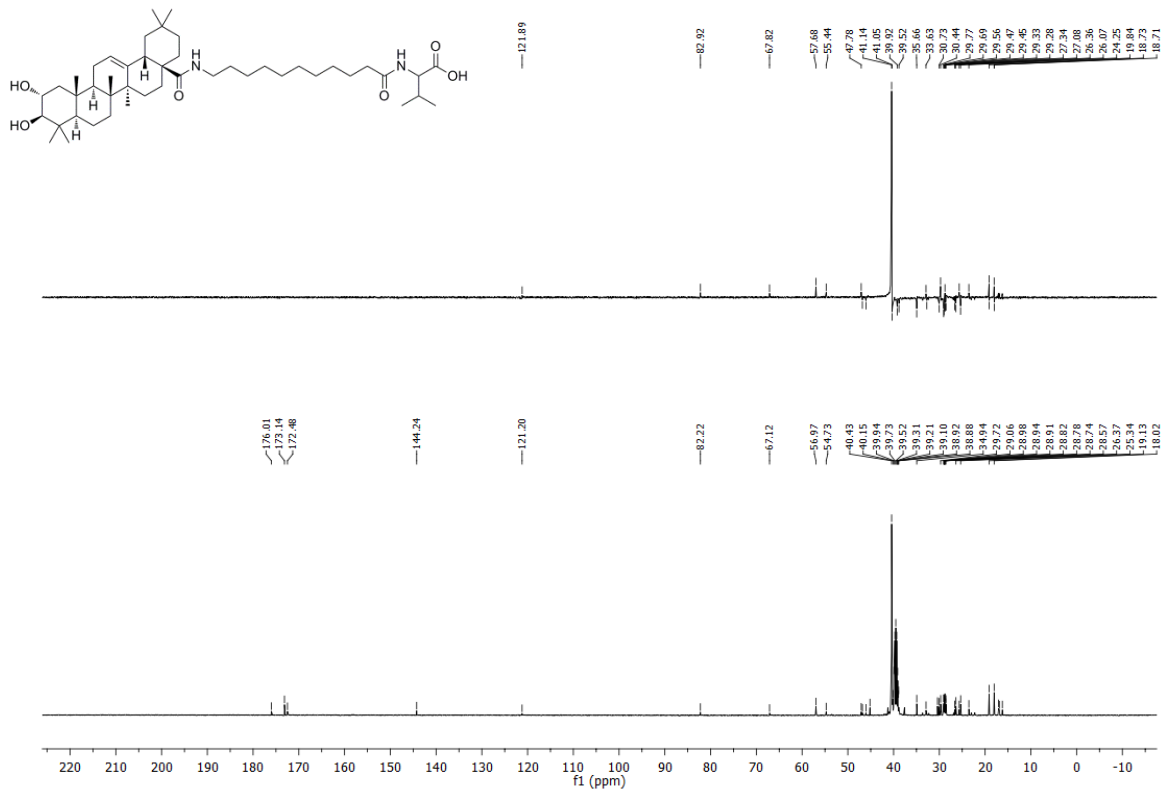
Producto 114

Espectro de ^1H RMN del producto 114Espectro de ^{13}C RMN del producto 114

Producto 115

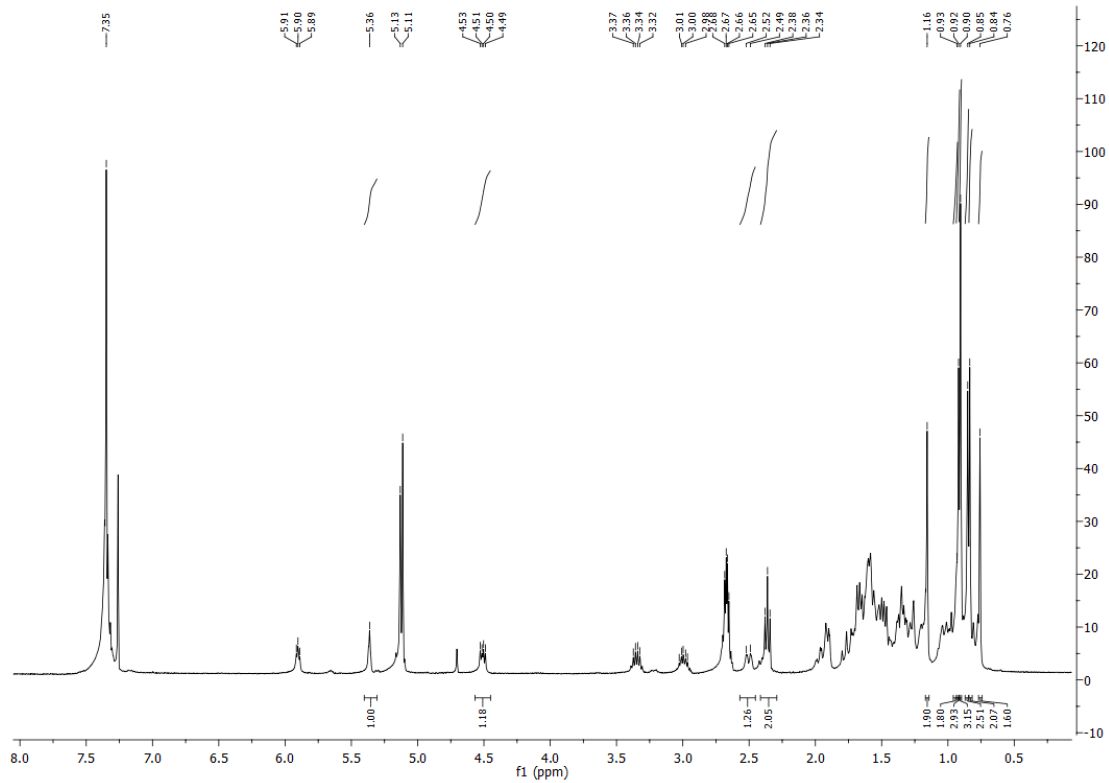
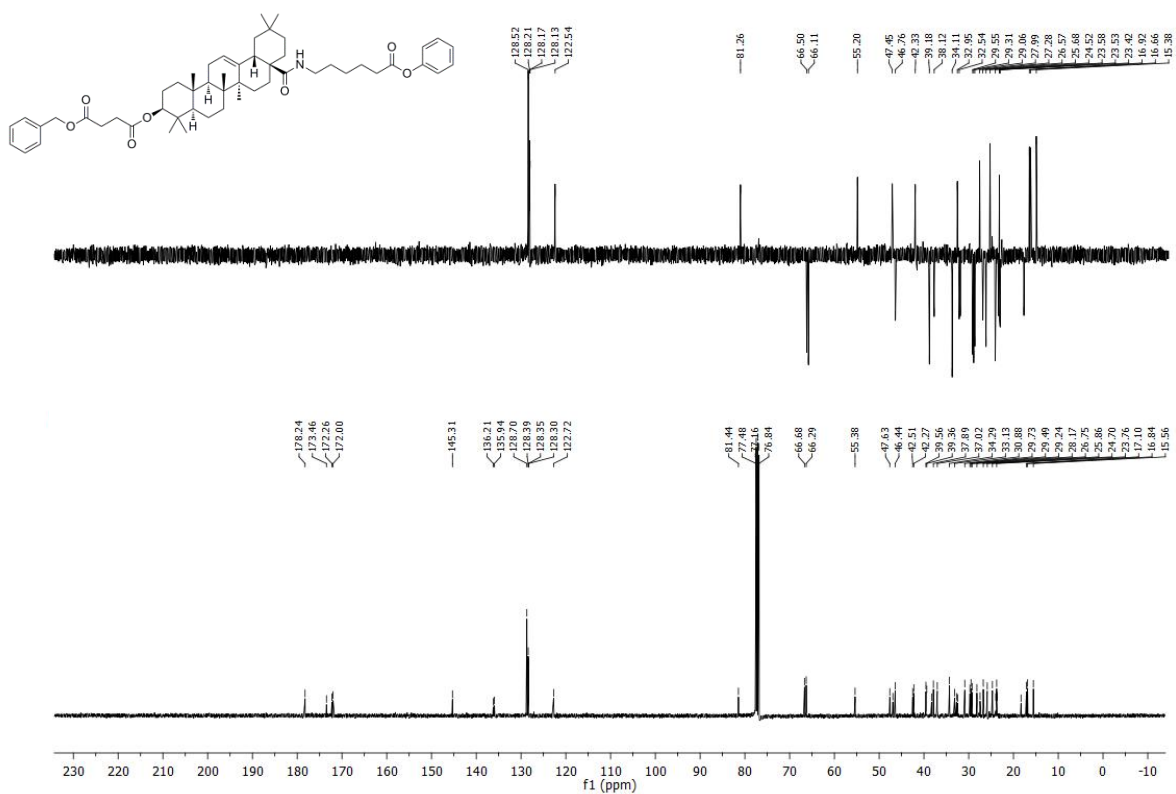


Espectro de ¹H RMN del producto 115

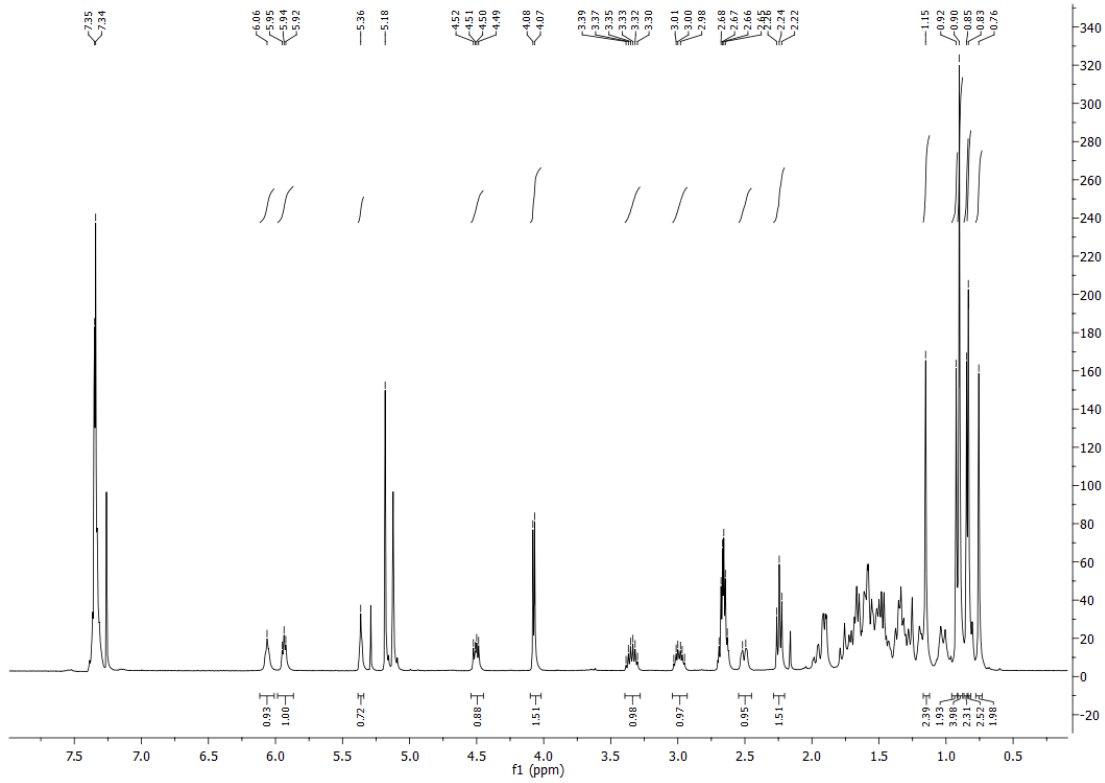


Espectro de ¹³C RMN del producto 115

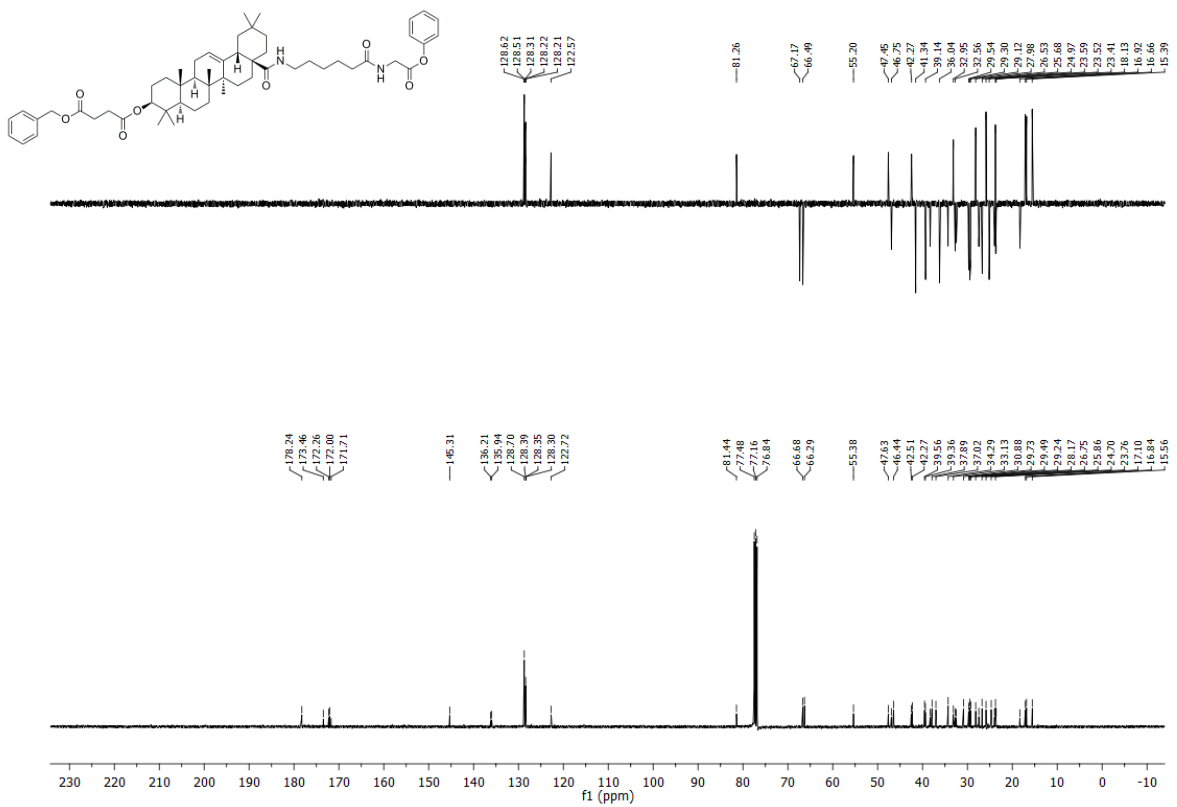
Producto 116

Espectro de ^1H RMN del producto 116Espectro de ^{13}C RMN del producto 116

Producto 117

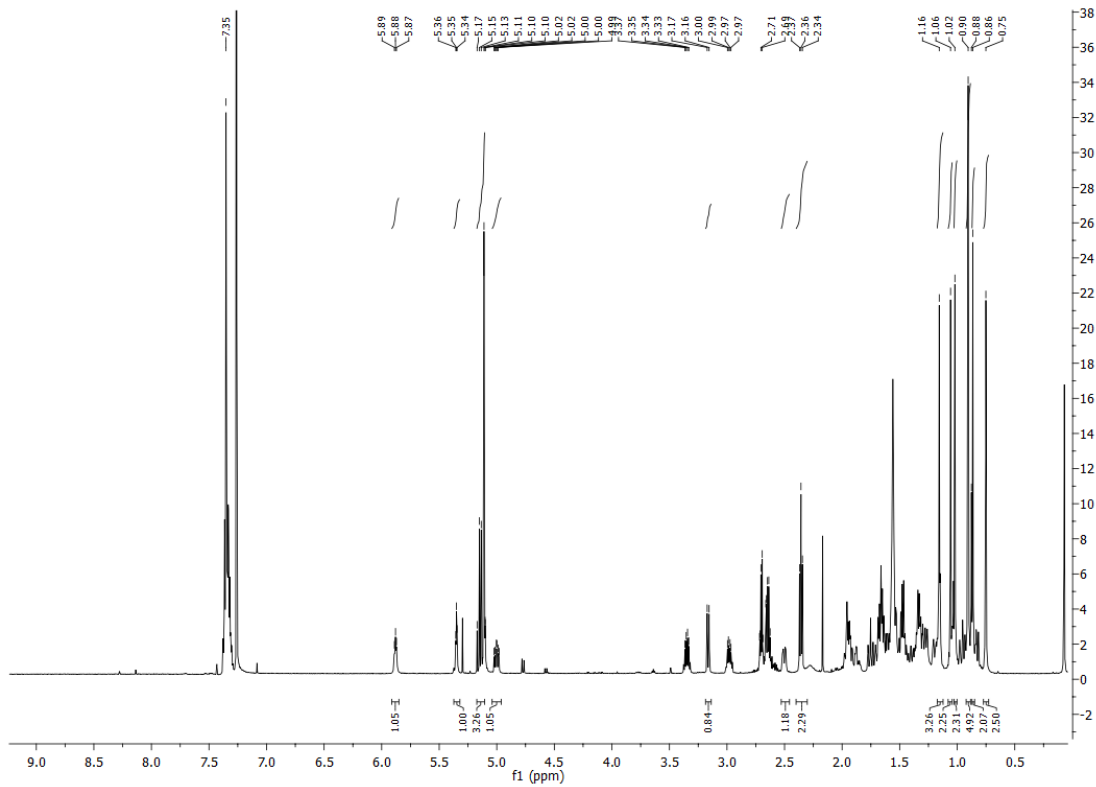
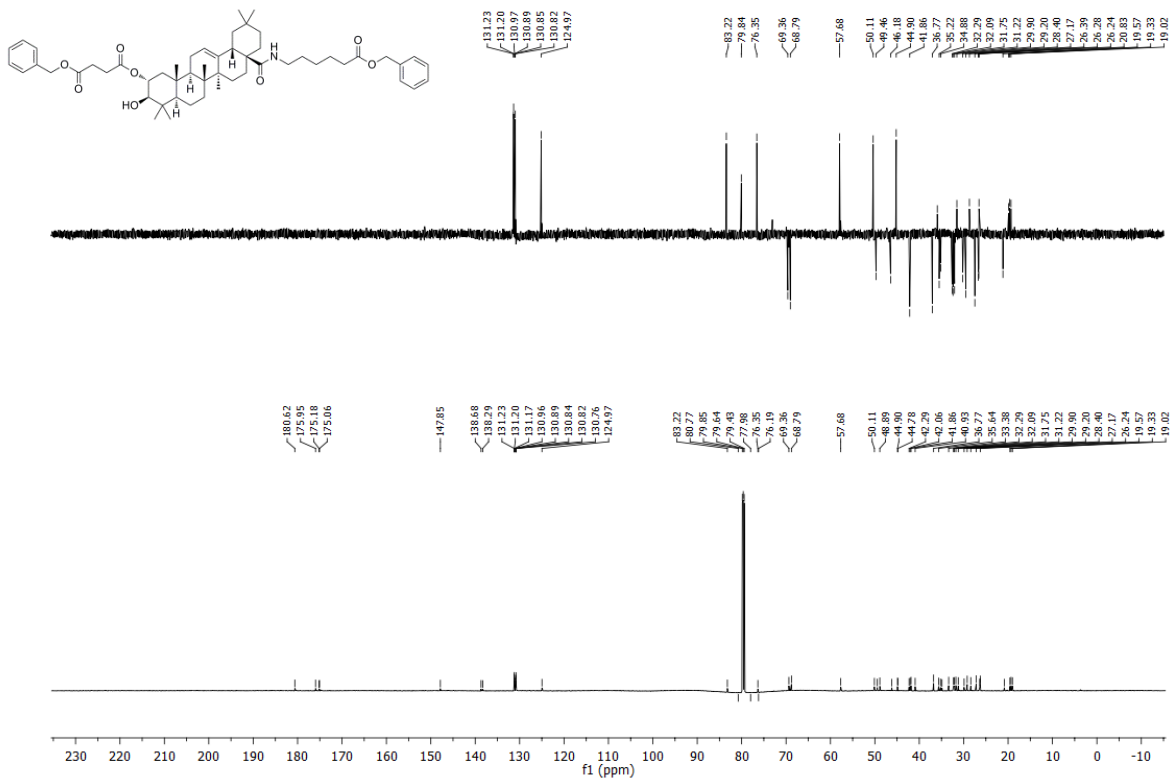


Espectro de ¹H RMN del producto 117

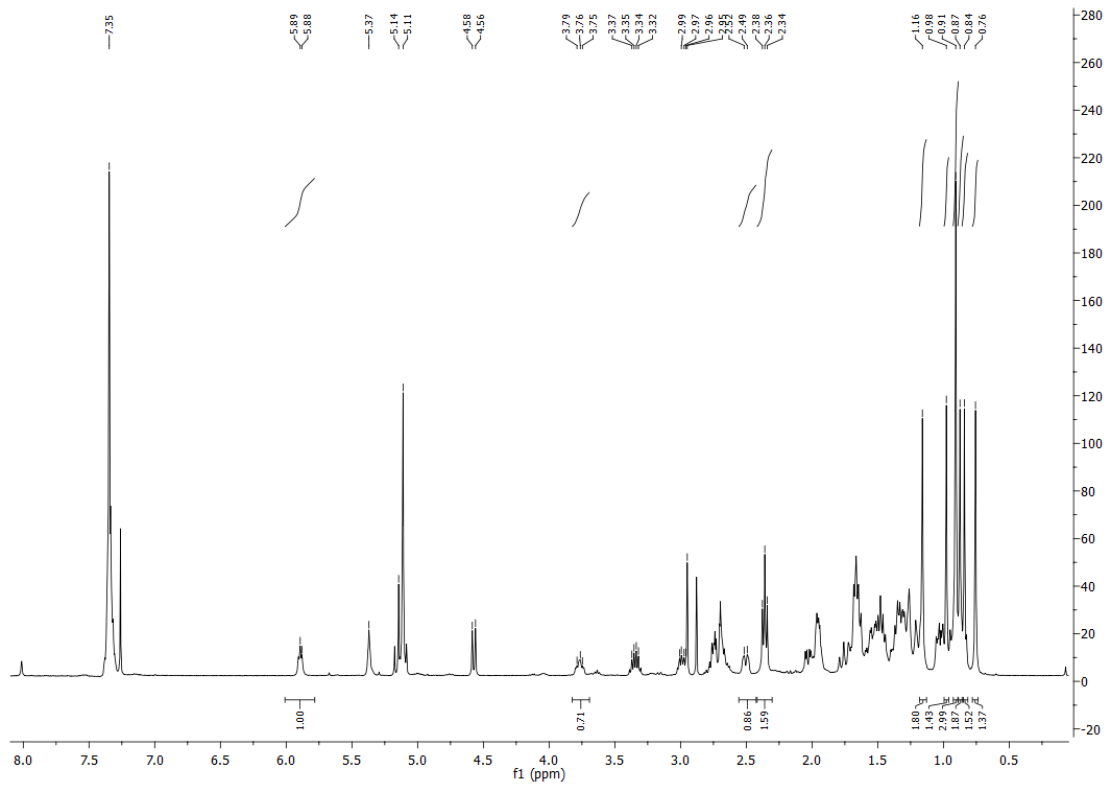
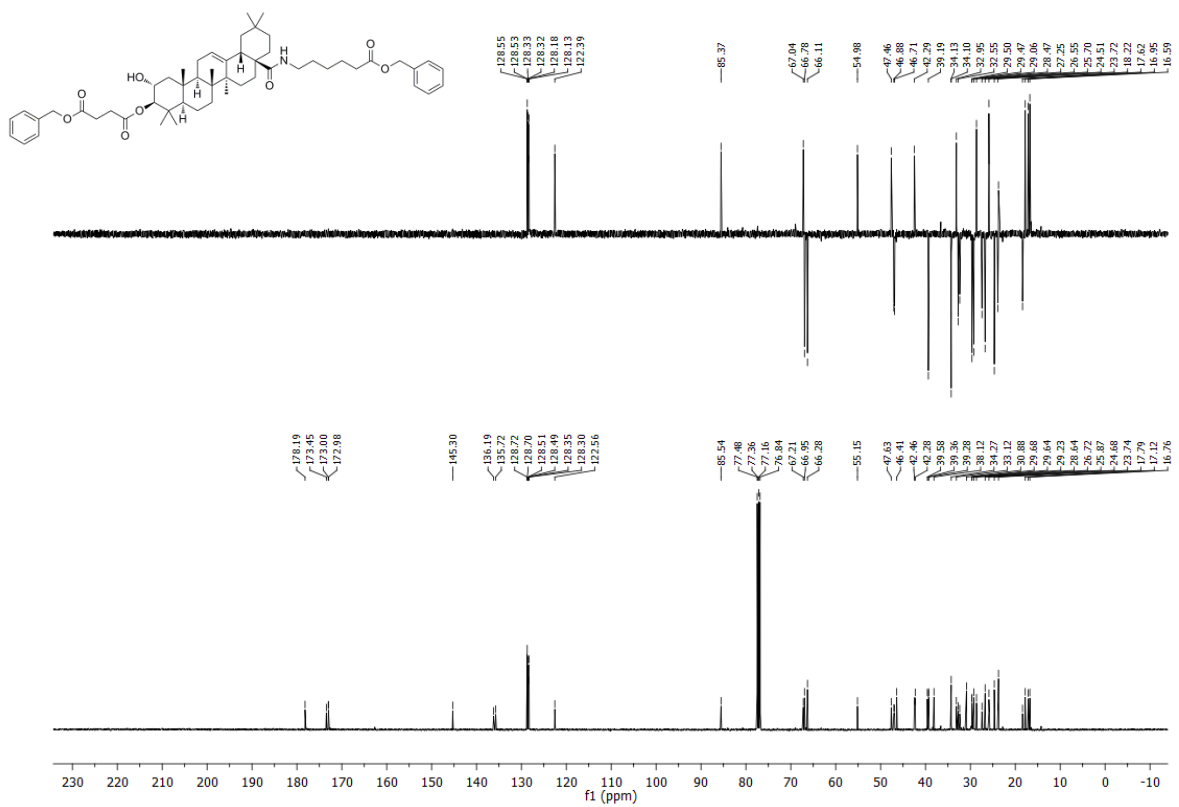


Espectro de ¹³C RMN del producto 117

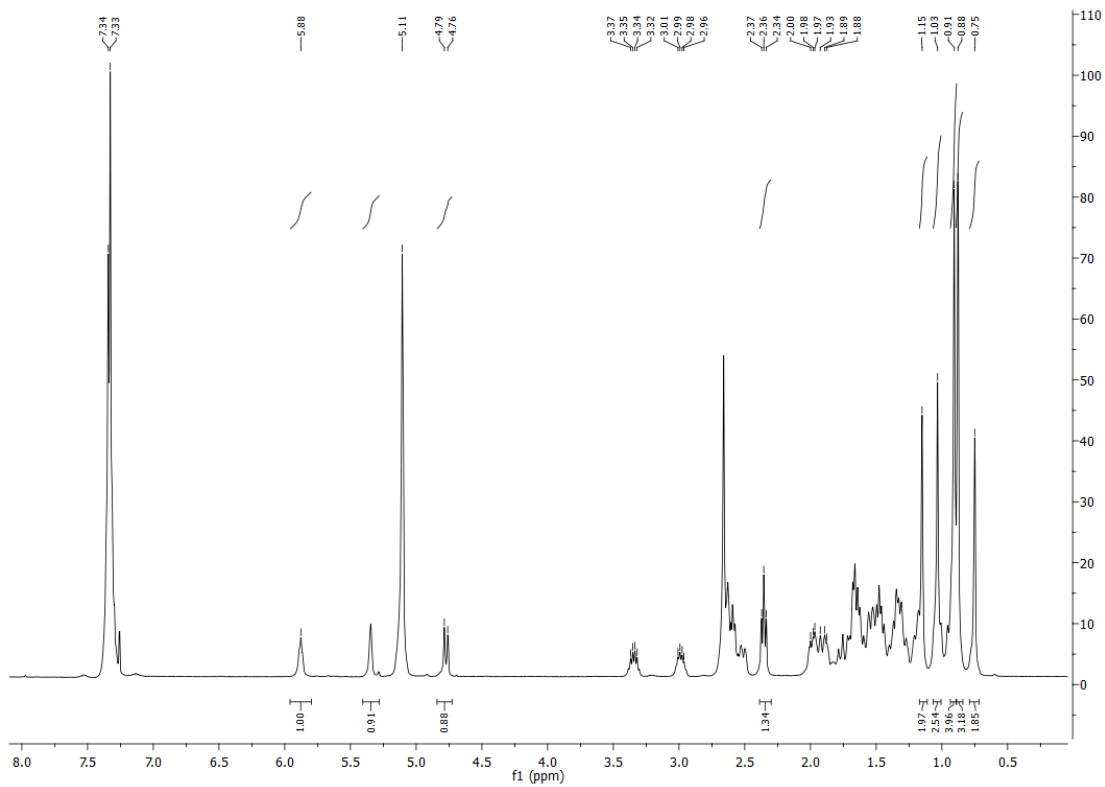
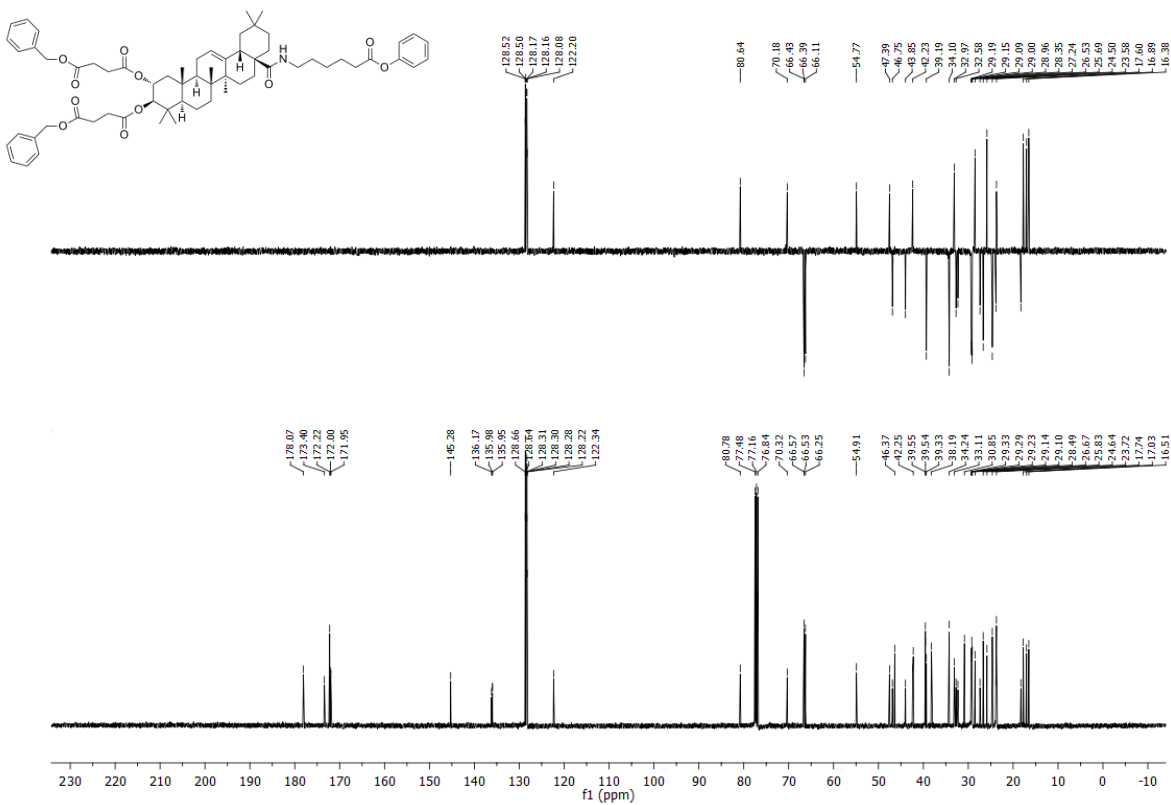
Producto 118

Espectro de ^1H RMN del producto 118Espectro de ^{13}C RMN del producto 118

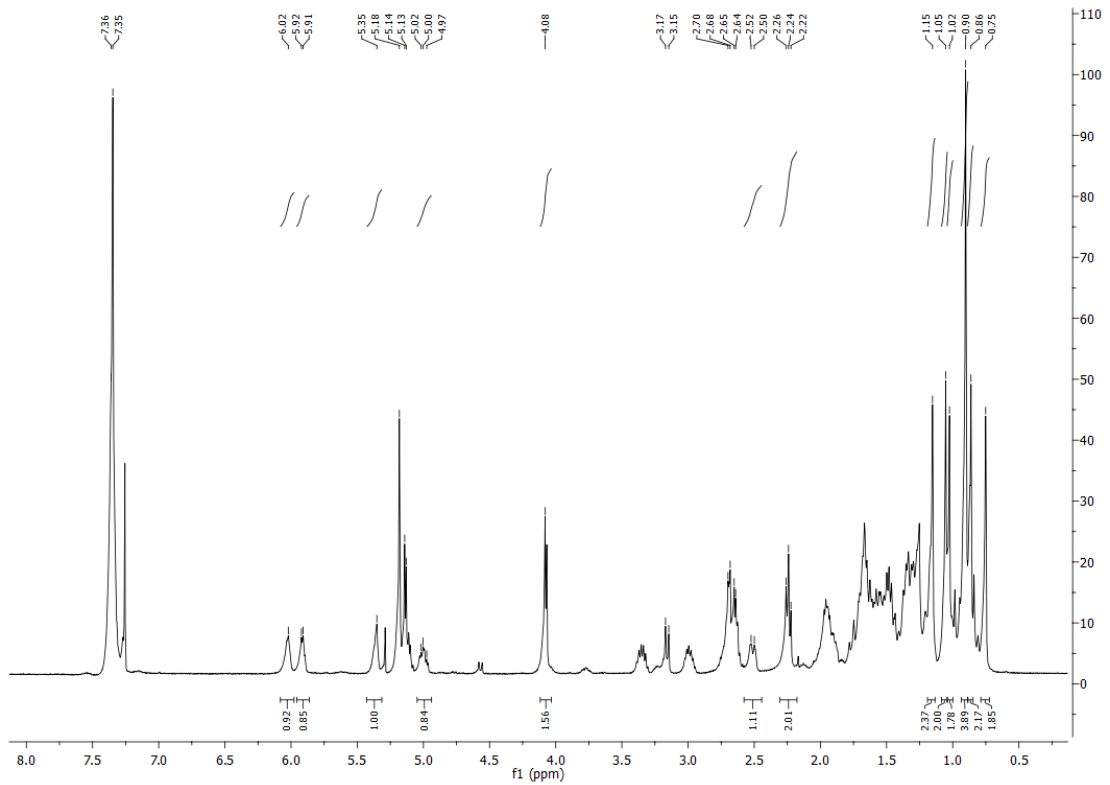
Producto 119

Espectro de ^1H RMN del producto 119Espectro de ^{13}C RMN del producto 119

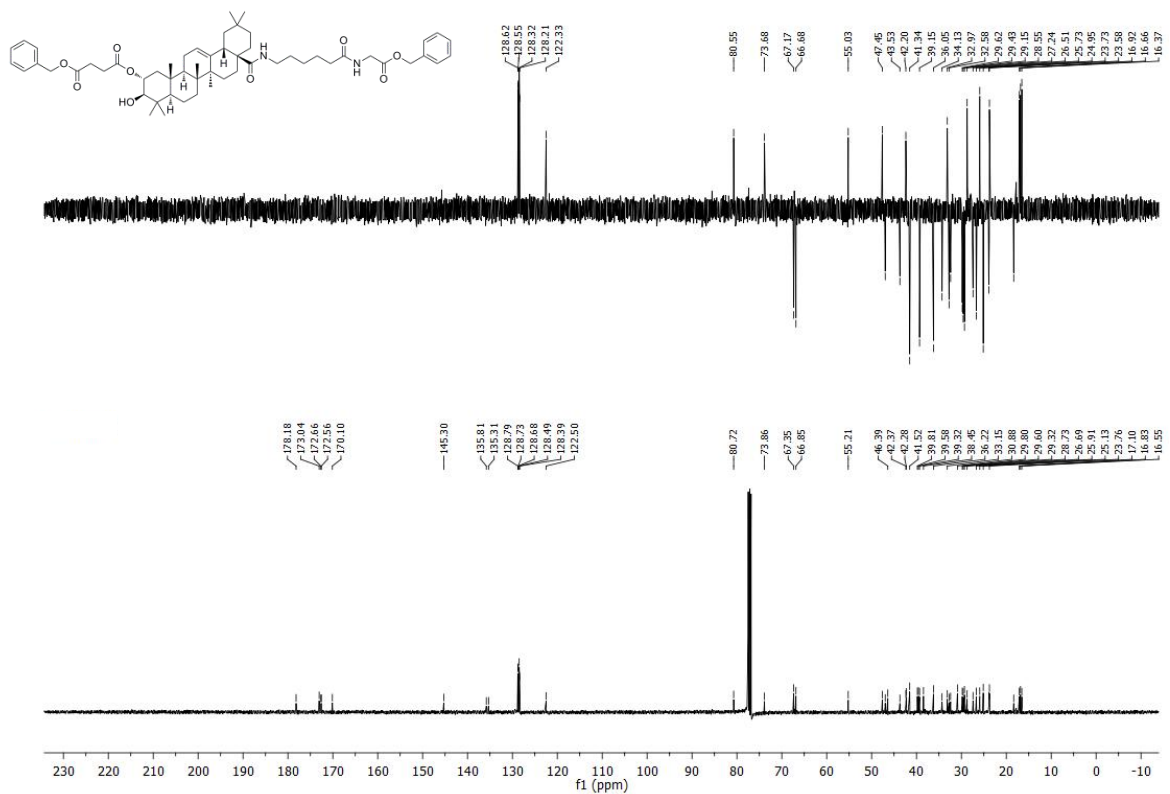
Producto 120

Espectro de ^1H RMN del producto 120Espectro de ^{13}C RMN del producto 120

Producto 121

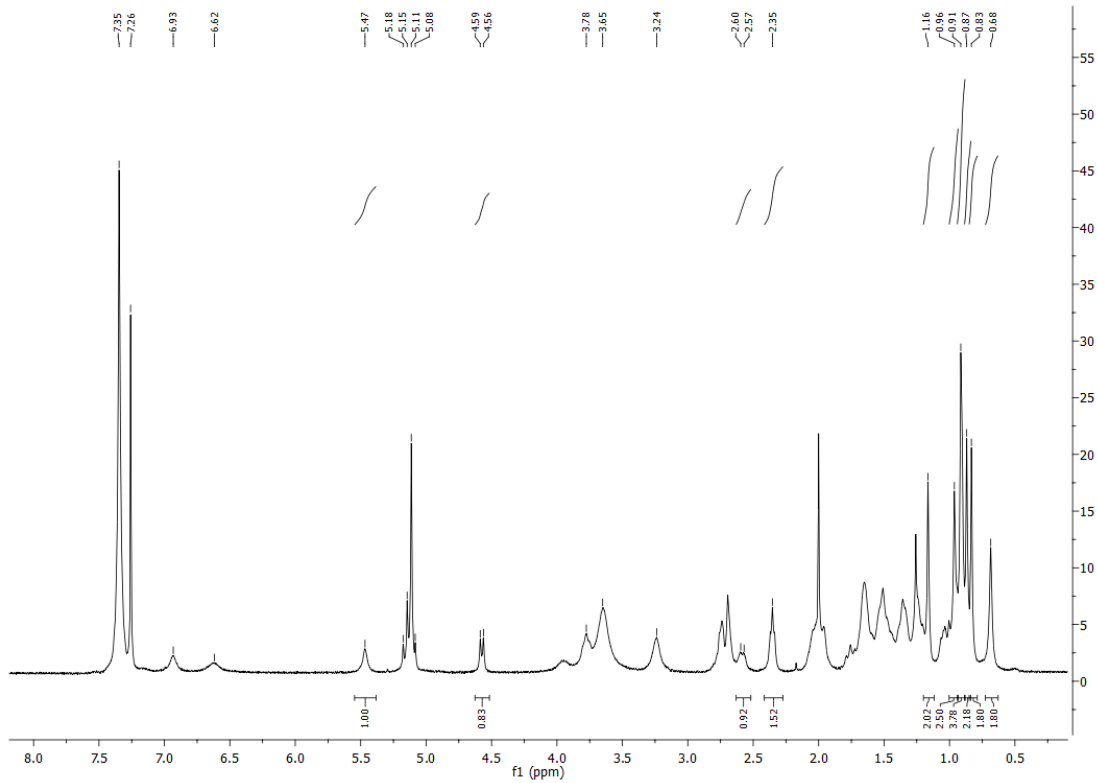
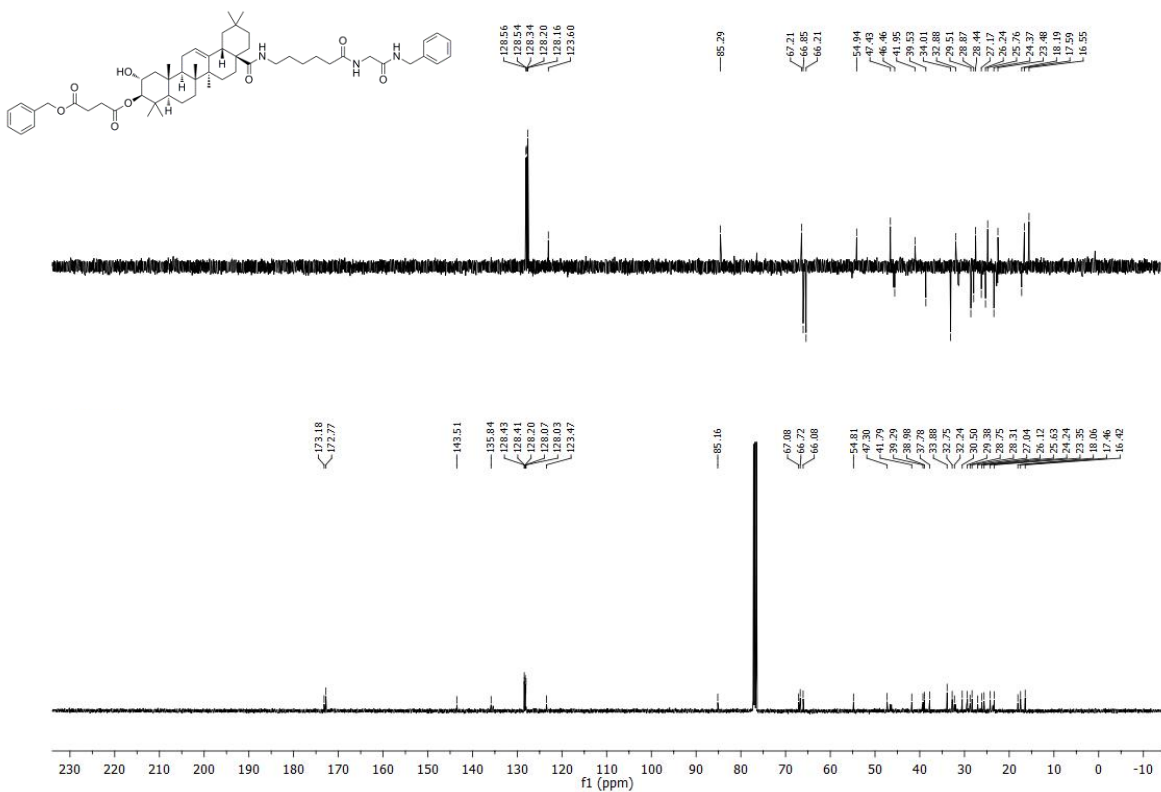


Espectro de ¹H RMN del producto 121

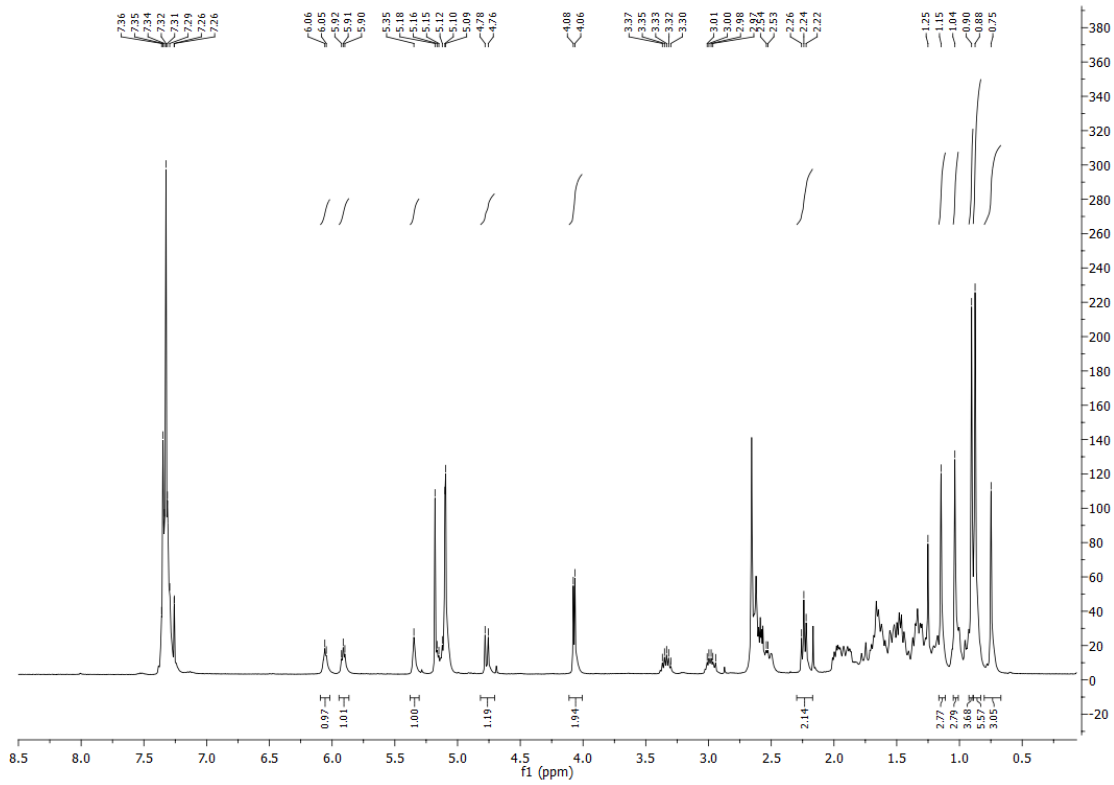


Espectro de ¹³C RMN del producto 121

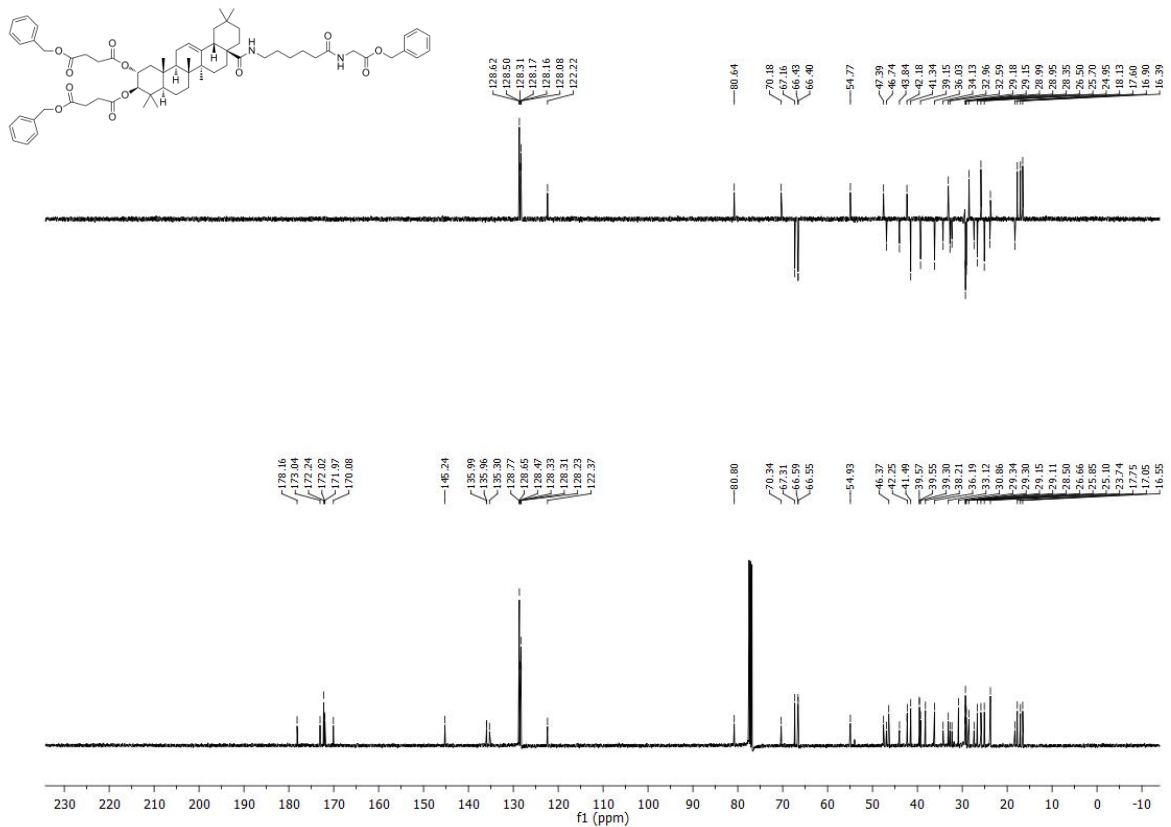
Producto 122

Espectro de ^1H RMN del producto 122Espectro de ^{13}C RMN del producto 122

Producto 123



Espectro de ¹H RMN del producto 123



Espectro de ¹³C RMN del producto 123

**ANEXO III. TRABAJOS PUBLICADOS Y
ENVIADOS**



Original article

Maslinic acid derivatives induce significant apoptosis in b16f10 murine melanoma cells

Andres Parra*, Francisco Rivas*, Samuel Martin-Fonseca, Andres Garcia-Granados, Antonio Martinez

Departamento de Quimica Organica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva, s/n, 18071-Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2011

Received in revised form

29 September 2011

Accepted 4 October 2011

Available online 12 October 2011

Keywords:

Maslinic acid derivatives

Synthesis

Cytotoxicity

Anticancer activity

Apoptosis

ABSTRACT

Maslinic acid ($2\alpha,3\beta$ -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid), a natural dihydroxylated pentacyclic triterpene acid isolated from olive-pressing residues, has been investigated together with some of its derivatives regarding the induction of apoptosis in B16F10 melanoma cells. Some of the compounds tested are described in this work, but others come from previous studies. Ten of these derivatives induce over 80% of apoptosis, clearly promoting cell death in B16F10 melanoma. By contrast, the induction cell death through necrosis was very slightly significant with these compounds. These results indicate that maslinic acid derivatives are promising chemopreventive and chemotherapeutic agents.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Natural products have a noteworthy role in drug discovery, as almost half of all new drugs are natural compounds or directly derived therefrom [1–4]. Triterpenoids are compounds derived from squalene and widely present in plants used in traditional medicine [5–9]. Tetra- and pentacyclic triterpenoids display anti-inflammatory, anti-microbial, anti-HIV, anti-oxidant, hepatoprotective, and analgesic effects [10–13]. However, the disadvantage of using many of these triterpenoids is the toxicity due to their haemolytic and cytostatic properties. In addition, several natural triterpene compounds and some derivatives induce apoptosis in a wide variety of cancer cells, such as breast carcinoma, melanoma, hepatoma, prostate carcinoma and leukaemia [14–17]. Apoptosis is a programmed process of cell death, and inappropriately regulated apoptosis is involved in diverse disease states, such as neurodegenerative disease and cancer. Agents that suppress the proliferation of malignant cells, and even cause apoptosis, have the potential to both prevent and treat cancer. The identification of new cytotoxic agents that enhance or restore the capability of malignant cancer cells to undergo apoptosis may be crucial for more effective anticancer therapies.

Oleanolic acid (OA, **1**, 3β -hydroxyolean-12-en-28-oic acid) and maslinic acid (MA, **2**, $2\alpha,3\beta$ -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) (Fig. 1) are two pentacyclic triterpenes present in high concentrations in olive-pomace oil, being the main components of the protective wax-like coating of the olive skin [18,19]. A method to obtain large amounts of both compounds from the olive-pressing residues has been reported by our group [20]. Maslinic acid (MA, **2**) has been found to reduce cell proliferation and promote cell apoptosis in various types of human cancer [21–28]. Moreover, in the last decade, our research group has published several papers on the reactivity and some biological activities of OA and MA [29–35].

In the present paper, we have semi-synthesized a series of MA derivatives (**3–21**), which have been tested for their apoptosis-inducing abilities on B16F10 melanoma cells. This apoptotic effect was also investigated for a set of triterpene compounds previously developed in our laboratory (**22–40**). Some of these MA derivatives exhibit strongly apoptotic effects without any cytotoxic consequence.

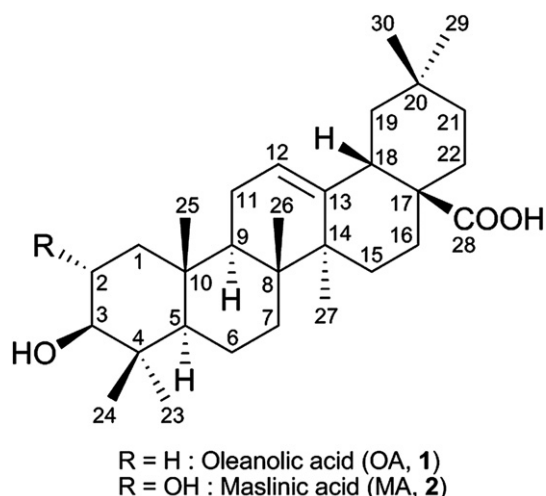
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Starting with natural maslinic acid (MA, **2**), we prepared several derivatives to be tested as potential apoptotic agents. Thus, compound **2** was transformed into its corresponding sodium salt

* Corresponding authors.

E-mail addresses: aparra@ugr.es (A. Parra), frivas@ugr.es (F. Rivas).

Fig. 1. Compounds **1** and **2**.

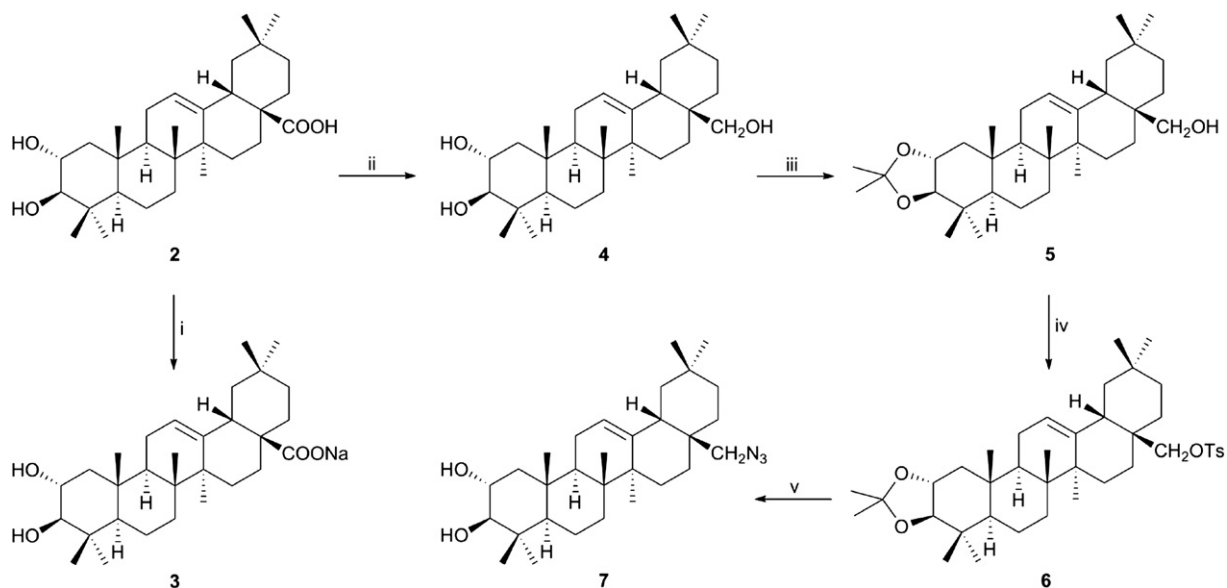
(**3**) by several procedures (see Experimental). This derivative **3** presented NMR data very similar to that of MA (**2**), differing only in its water solubility. Moreover, MA (**2**) was treated with LiAlH_4 in THF to form 2 α -hydroxyerythrodiol (**4**) [36]. The subsequent reaction of this triol (**4**) with 2,2-dimethoxypropane produced the ketal derivative **5**, in which both hydroxyl groups of the A-ring were blocked. The tosyl derivative **6** was formed by treatment with tosyl chloride in pyridine, and converted into the desired compound **7**, which has a $-\text{N}_3$ group on C-28, through an azidation reaction (Scheme 1).

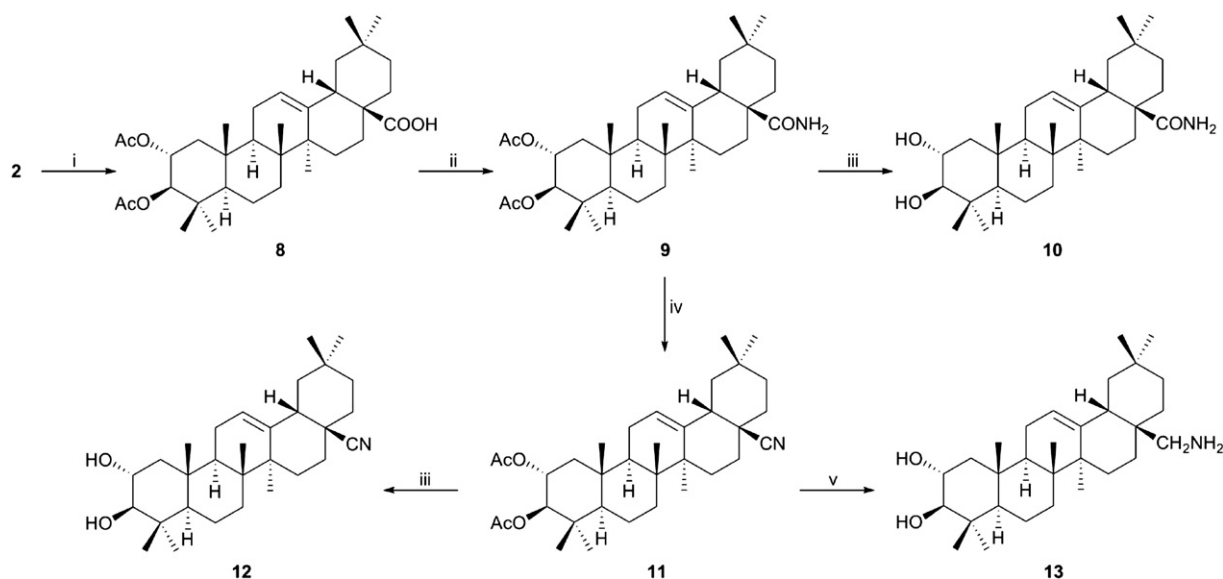
Structures of these compounds **5**–**7** can be easily deduced from their ^1H and ^{13}C NMR data. The NMR signals for compound **5** are compatible with the presence of an acetonide group between C-2 and C-3 (δ 1.38 and 1.40 in its ^1H NMR spectrum and δ 27.1, 27.4 and 108.4 in its ^{13}C NMR spectrum). Compound **6** had the same NMR signals as compound **5** had, except for the corresponding signals of the tosyl group on C-28 (δ 2.42, 7.30 and 7.74 in its ^1H NMR spectrum). Finally, the ^1H and ^{13}C NMR spectra of **7** revealed the absence of acetonide and tosyl groups as well as the presence of a $-\text{N}_3$ group on C-28 (δ 69.9).

Several triterpenoids containing a nitrogen atom on C-28 have shown significant biological activities [37,38]. On this basis, we prepared a new series of MA derivatives with a nitrogen atom on C-28, starting from this natural product (Scheme 2). Thus, MA (**2**) was acetylated to obtain the diacetyl derivative **8** [39], which was transformed into the corresponding amide derivative **9** by treatment, firstly with thionyl chloride/DCM and then with MeOH/NH_3 . The diacetyl amide **9** was deacetylated to form compound **10**. The ^{13}C NMR spectra of these amide derivatives (**9** and **10**) differed mainly from that of **8** in the signal of C-28, because it is more shielded in a carboxylic acid group (δ 184.5 for **8**) than in an amide group (δ 182.2 for **9** and 181.5 for **10**). The amide derivative **9** was also converted into the nitrile derivative **11** by a treatment with thionyl chloride in DCM, which was then deacetylated to form compound **12**. In the ^{13}C NMR spectra of both nitrile derivatives (**11** and **12**), the C-28 signals are the most relevant (δ 125.7 for **11** and 125.8 for **12**). Finally, the amine derivative **13** was prepared by the treatment of **11** with LiAlH_4 in THF. The NMR signals, for **13**, of the methylene group at C-28 (δ 3.23 and 3.57) and the signal of this carbon atom (δ 69.9) confirmed the presence of an amine group.

Scheme 3 shows the third set of MA (**2**) derivatives that were also tested against B16F10 melanoma cells. Thus, we treated MA (**2**) with PCC/DCM to obtain a partially oxidized product (**14**, 40%), and a previously described conjugated dicarbonyl product (**15**, 40%) [39], which appeared in its ketoenolic form. Triterpenoids with the same conjugated dicarbonylic system on the A-ring have proved to be cytotoxic against several cancer-cell lines [40]. The NMR data of **14** (a singlet signal of 3-H at δ 3.92 and a signal of a carbonyl group on C-2 at δ 211.2) confirmed the presence of a carbonyl group on C-2, as a result of the oxidation of the hydroxyl group on this carbon of MA (**2**). In addition, to test the influence that the configuration of the hydroxyl group at C-2 exerted on the apoptotic activity, compound **14** was reduced with NaBH_4 to form the 2-*epi*-maslinic acid (augustic acid, **16**). The narrow ^1H NMR signal of the geminal proton of the hydroxyl group at C-2 (δ 4.08, ddd, J 3.1, 3.1 and 4.4), for **16**, confirmed the configuration in this carbon atom. Also, **14** and **15** were reduced with LiAlH_4 in THF and, in both reactions, triol **17** was achieved, with a hydroxymethylene group placed at C-28 [41].

To test the influence, on the induction of apoptosis in cancer cells, of a free carboxyl group at C-28 or its benzyl ester, a series of derivatives (**18**–**21**) were synthesised. Several benzyl derivatives of

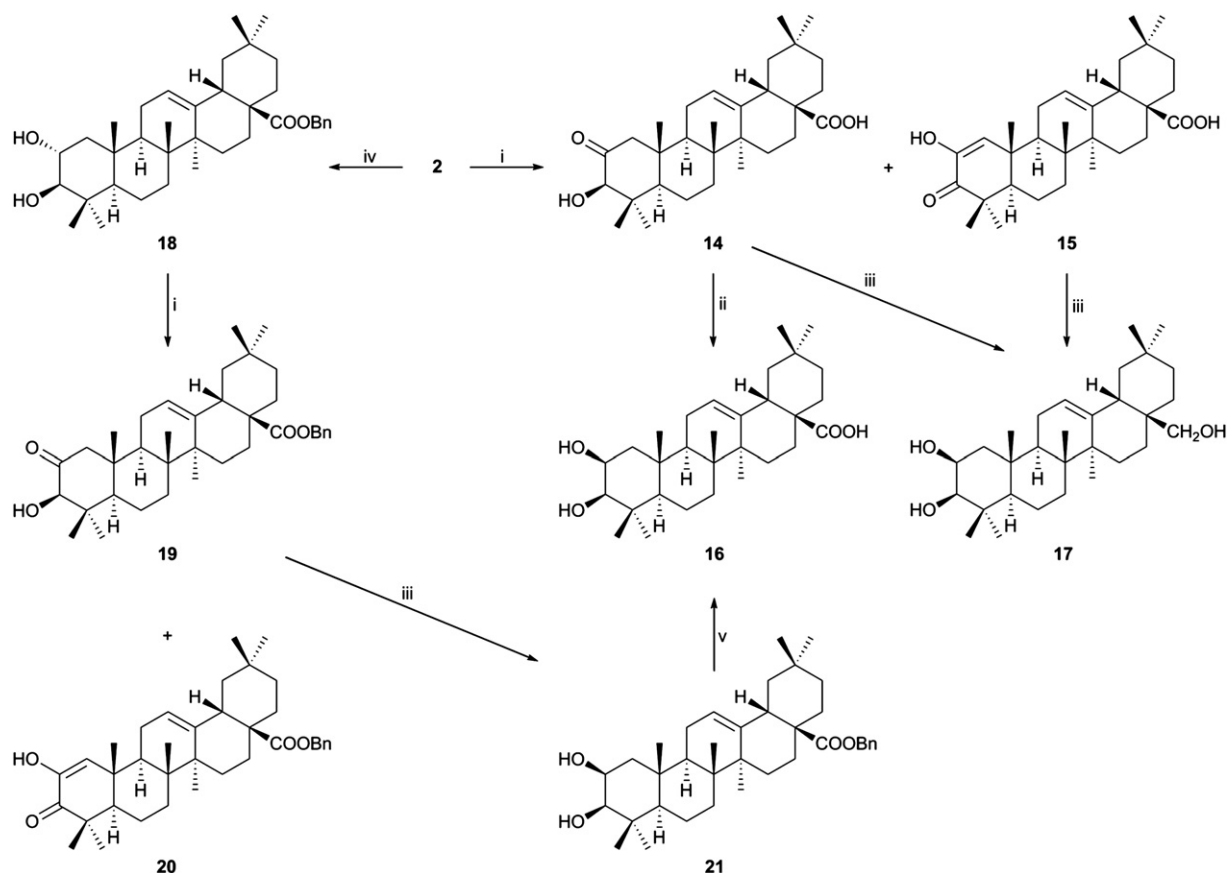
Scheme 1. (i) 1) NaOH , 2) NaCl 4%. (ii) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$. (iii) 2,2-dimethoxypropane. (iv) TsCl/Py . (v) 1) NaN_3/DCM , 2) *p*-toluenesulfonic acid.



Scheme 2. (i) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$. (ii) 1) SOCl_2/DCM , 2) MeOH/NH_3 (1:1). (iii) KOH/MeOH (1:10). (iv) SOCl_2/DCM . (v) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$.

triterpenoids, previously described, exhibit more potent activity than did their parent compounds [42]. Therefore, MA (**2**) was treated with benzyl chloride and DMF to form 28-benzyl maslinic acid (**18**). Oxidation of **18** with PCC/DCM led to two oxidized compounds **19** and **20**, 28-benzyl derivatives of **14** and **15**, respectively. The reduction of **19** with LiAlH_4 in THF gave

compound **21** (28-benzyl augustinic acid). Finally, deprotection of the benzyl group at C-28 of **21**, was carried out by hydrogenation with $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{DCM}$ to get **16**. We easily identified all the compounds of this series (**18–21**) by comparing their corresponding ^1H and ^{13}C NMR spectra with those of the analogues with a free carboxyl group at C-28 (**2**, **14–16**) (Scheme 3).



Scheme 3. (i) PCC/DCM . (ii) $\text{NaBH}_4/i\text{-PrOH}$. (iii) $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$. (iv) $\text{BnCl}/\text{K}_2\text{CO}_3/\text{DMF}$. (v) $\text{H}_2/\text{Pd}/\text{DCM}$.

Several compounds (**22–40**) [43–47], previously developed by our research group, have also been tested as apoptotic agents. Their structures are shown in Fig. 2.

2.2. Investigation of apoptosis

Apoptosis is a regulated process of cell death that occurs during embryonic development as well as maintenance of tissue homeostasis. Annexin V labelled with FITC can identify and quantify apoptotic cells on a single-cell basis by flow cytometry. Staining cells with propidium iodide and Annexin V-FITC enables the distinction of live, apoptotic, dead and late apoptotic, or necrotic cells [48]. The percentages detected in this test for each cell type, at different concentrations and periods of time, provide information on the mechanism involved in the cell death.

B16-F10 murine melanoma cell lines have been treated with several MA or OA derivatives (**1–40**) to test their cytotoxic or apoptotic effects. The results of the flow cytometry for these melanoma cells, which have been treated with a 30 μM solution of these compounds (**1–40**) in DMSO for 24 h, are shown in Fig. 3. All the compounds tested, presented very low necrosis (less than 10%

in most cases), and there were 10 compounds that exhibited total apoptosis (early and late apoptosis) over 80% (**3, 10–12, 14, 15, 18–21**). In most of these compounds, the early apoptosis represented over 90% of total apoptosis. Moreover, the compounds described in previous articles (**22–40**), with a great structural variation between them, showed smaller apoptotic effects, and only **25, 27, 29**, and **35** had a significant biological activity between 30 and 50% (see Fig. 3).

The compounds with the best results of total apoptosis of the above test, at 30 μM of concentration for 24 h (**3, 10–12, 14, 15, 18–21**), were selected to carry out new analyses for 24 h and 48 h at lower concentrations (1, 10, and 20 μM ; Figs. 4 and 5). At a concentration of 20 μM for 24 h, compounds **3, 10–12, 18–19** showed a total apoptosis over 70%, whereas for 48 h, almost all the compounds showed this percentage of apoptosis at least. At the lowest concentration (1 μM), the apoptotic activities of certain compounds, for 24 h, were strongly significant: sodium maslinate (**3**, 56.67%), 2,3-diacetoxy-28-cyanide MA (**11**, 68.62%), 28-cyanide MA (**12**, 78.75%), and 28-benzoyl MA (**18**, 87.50%) (Fig. 6). In the compounds with the highest apoptosis activity (**11, 12** and **18**), at lower concentrations (1 and 10 μM), this apoptosis percentage

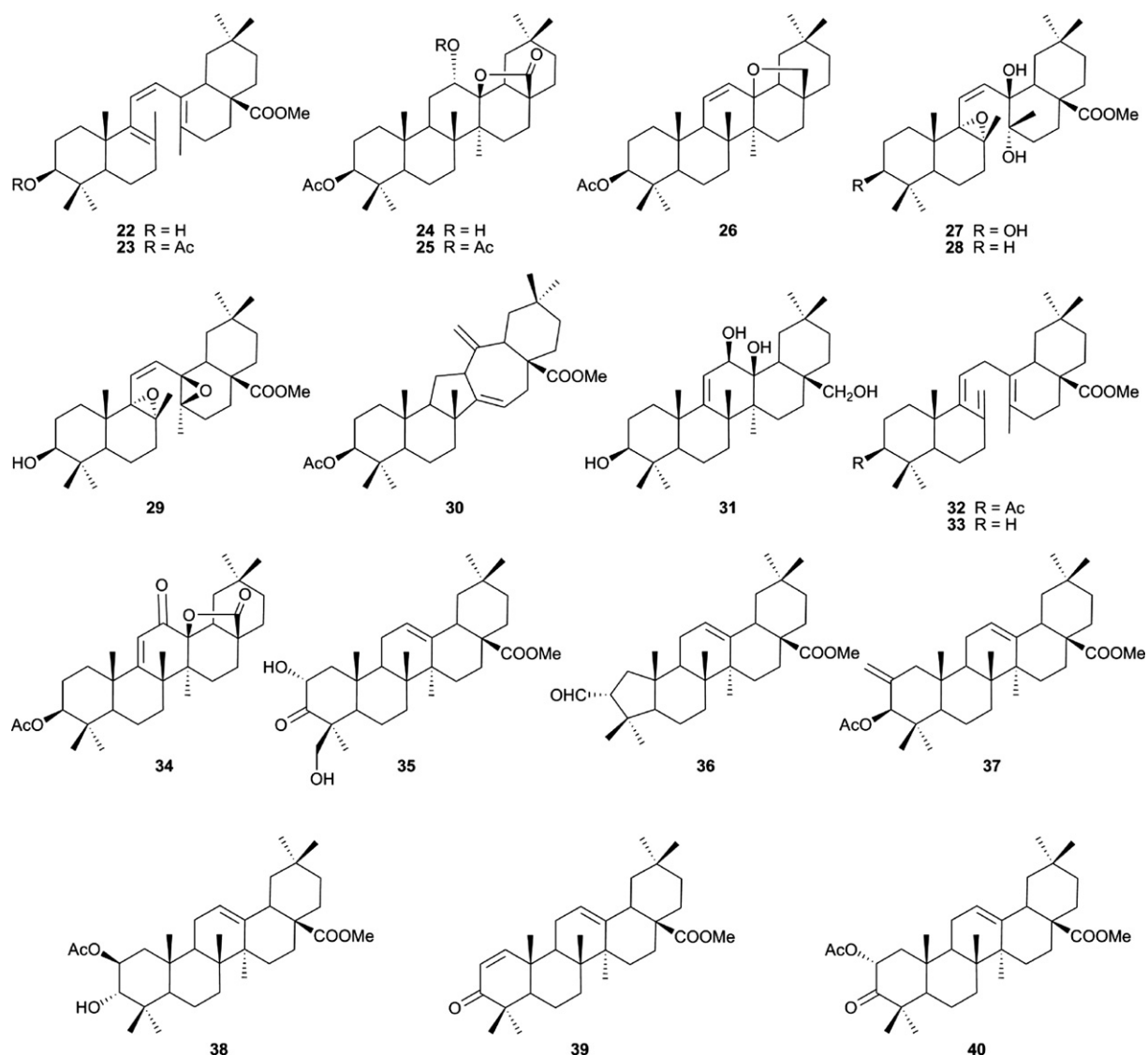


Fig. 2. Compounds **22–40**.

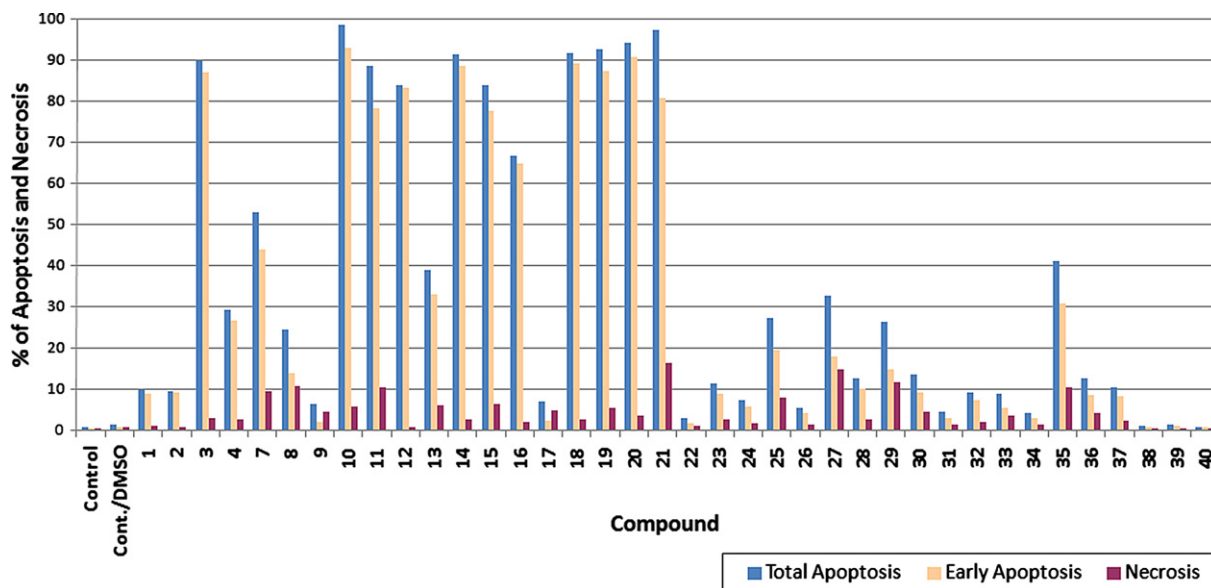


Fig. 3. % of apoptosis (total and early apoptosis) and necrosis at 30 μM of concentration for 24 h.

greatly decreased for 48 h compared to 24 h, possibly due to the fact that the cells that were in apoptosis at 24 h were not present at 48 h, as a consequence of the very process of cell death. Although the structure and activity relationships of these pentacyclic triterpene derivatives are far from clear, it seems that the $-\text{COONa}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CN}$, and $-\text{COOBn}$ groups at C-28 enhanced the apoptotic ability of these derivatives as compared to triterpenic acids ($-\text{COOH}$ at C-28). Moreover, the necrosis percentage detected with these MA derivatives was insignificant.

3. Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that a number of maslinic acid derivatives provide new insight into the anti-carcinogenic action to inhibit B16F10 melanoma. Given that apoptosis induction is arguably the most important process to remove cells that have lost growth control, these maslinic acid derivatives may be considered valuable molecules for use as antiproliferative agents.

4. Experimental

4.1. General

Measurements of NMR spectra (300.13 MHz ^1H and 75.47 MHz ^{13}C) were made in CDCl_3 or CD_3OD (which also provided the lock signal) using a BRUKER AM-300 spectrometer. The assignments of ^{13}C chemical shifts were made with the aid of distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) using a flip angle of 135° . Bruker's programs were used for COSY (45°) and C/H and C/C correlation. IR spectra were recorded on a MATTSON SATELLITE FTIR spectrometer. High-resolution mass spectra were made in a MICROMASS AUTOSPEC-Q spectrometer (EBE geometry). Mps were determined using a Kofler (Reichter) apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on a Perkin–Elmer 241 polarimeter at 25°C . All reaction solvents and chromatography solvents were distilled prior to use. Commercially available reagents were used without further purification. TLC was carried

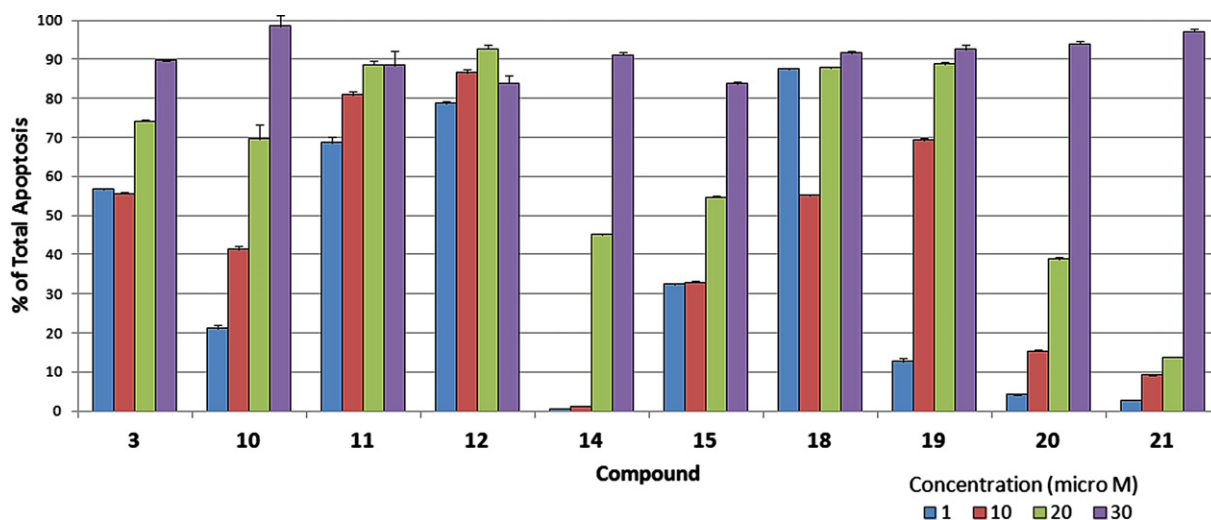


Fig. 4. Total apoptosis vs. concentration at 24 h. Data are presented as mean \pm SD from two independent experiments.

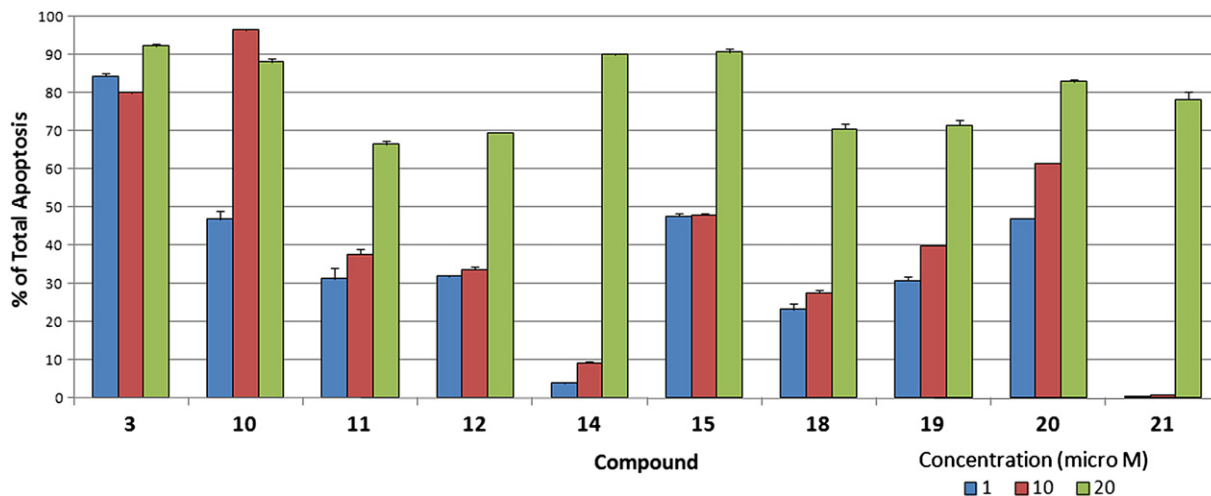


Fig. 5. Total apoptosis vs. concentration at 48 h. Data are presented as mean \pm SD from two independent experiments.

out on commercially available TLC aluminium sheets, and spots were rendered visible by spraying with H_2SO_4 -AcOH, followed by heating to 120°C , and also visualized under UV at 254 nm. Silica gel (40–60 μm) was used for flash chromatography.

4.2. Synthesis

4.2.1. Sodium maslinate (**3**)

MA (**2**, 200 mg, 0.42 mmol) was added slowly to a stirred solution of NaOH (263 mg) in hot water (20 mL) until its complete dissolution. To facilitate this process, a solution of NaCl (4%) was added. Then, the mixture was cooled and the solid was filtered, washed with a saturated NaCl solution, and with water, to give **3** as a white solid (210 mg, 99%); mp 267 – 269° ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+54}$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3396, 3001, 2843 and 1710; δ_{H} (CDCl_3) 0.69 (3 H, s, Me), 0.72 (3 H, s, Me), 0.83 (3 H, s, Me), 0.86 (3 H, s, Me), 0.88 (3 H, s, Me), 0.90 (3 H, s, Me), 1.04 (3 H, s, Me), 2.73 (1 H, dd, $J = 4.3$ and 13.9 , H-18), 2.87 (1 H, d, $J = 9.1$, H-3), 3.59 (1 H, ddd, $J = 4.4$, 9.1 and 11.2 , H-2) and 5.03 (1 H, dd, $J = 3.5$ and 3.5 , H-12); δ_{C} (CDCl_3) 16.3 (Me), 17.2 (Me), 17.5 (Me), 18.2 (C-6), 23.0 (C-16), 23.4 (C-11), 23.7 (Me), 25.7 (Me), 27.6 (C-15), 28.8 (Me), 30.7 (C-20), 32.4 (C-7), 32.5 (C-22), 33.1 (Me), 33.8 (C-21), 37.7 (C-10), 38.8 (C-4), 38.9 (C-8), 41.5 (C-14), 41.7 (C-18), 45.6 (C-17), 46.9 (C-19), 46.9 (C-1), 47.4 (C-9), 54.9 (C-5), 67.1 (C-2), 82.2 (C-3), 119.6 (C-12), 146.1 (C-13) and 181.6 (C-28); HR-LSIMS (m/z) 481.3655 ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{Na}^+$ requires 481.3658).

4.2.2. Reduction of MA (**2**) with LiAlH_4

LiAlH_4 (10 mL, 1 M) was added to a solution of MA (**2**, 1 g, 2.1 mmol) in anhydrous THF (30 mL). The reaction was stirred for 2 h at reflux. MeOH was added to destroy the excess reagent, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (4:1) to give **4** as a white solid (0.932 g, 93%) [36].

4.2.3. 2,3-Acetonide-2 α ,3 β ,28-trihydroxyolean-12-ene (**5**)

A solution of **4** (250 mg, 0.55 mmol) in anhydrous 2,2-dimethoxypropane (10 mL) was stirred for 12 h at room temp. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **5** as a white solid (273 mg, 99%); mp 52 – 54° ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+23}$ (c 1, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3359, 2967, 2899 and 1680; δ_{H} (CDCl_3) 0.85 (3 H, s, Me), 0.86 (3 H, s, Me), 0.86 (3 H, s, Me), 0.93 (3 H, s, Me), 1.01 (3 H, s, Me), 1.03 (3 H, s, Me), 1.14 (3 H, s, Me), 1.38 (3 H, s, Me)

acetone group), 1.40 (3 H, s, Me acetone group), 2.71 (1 H, dd, $J = 4.3$ and 13.9 , H-18), 3.01 (1 H, d, $J = 9.1$, H-3), 3.19 (1 H, d, $J = 12.5$, H_B-28), 3.52 (1 H, d, $J = 12.5$, H_A-28), 3.66 (1 H, ddd, $J = 4.4$, 9.1 and 11.2 , H-2) and 5.17 (1 H, dd, $J = 3.5$ and 3.5 , H-12); δ_{C} (CDCl_3) 16.4 (Me), 17.3 (Me), 17.5 (Me), 18.0 (C-6), 22.2 (C-16), 23.8 (Me), 24.0 (C-11), 25.8 (C-15), 26.2 (Me), 27.1 (Me acetone group), 27.4 (Me), 27.4 (Me acetone group), 28.7 (C-20), 31.3 (C-22), 32.9 (C-7), 33.4 (Me), 34.3 (C-21), 37.2 (C-10), 37.6 (C-4), 40.2 (C-8), 40.4 (C-14), 42.0 (C-17), 42.2 (C-1), 42.5 (C-18), 46.6 (C-19), 48.1 (C-9), 56.3 (C-5), 69.9 (C-28), 72.7 (C-2), 88.8 (C-3), 108.4 (C acetone group), 122.3 (C-12) and 144.6 (C-13); HR-LSIMS (m/z) 497.4077 ($\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_3^+$ requires 497.4073).

4.2.4. 2,3-Acetonide-2 α ,3 β -dihydroxy-28-tosylolean-12-ene (**6**)

Tosyl chloride (300 mg, 0.46 mmol) was added to a solution of **5** (500 mg, 0.8 mmol) in anhydrous pyridine (10 mL). The reaction was stirred for 24 h at room temp. The mixture was extracted with DCM and the organic layer dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (8:1) to give **6** as a white solid in quantitative yield (663 mg); mp 101 – 103° ; $[\alpha]_{\text{D}}^{+27}$ (c 1, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3379, 2895, 2845 and 1700; δ_{H} (CDCl_3) 0.81 (3 H, s, Me), 0.84 (3 H, s, Me), 0.86 (3 H, s, Me), 0.86 (3 H, s, Me), 0.97 (3 H, s, Me), 1.02 (3 H, s, Me), 1.08 (3 H, s, Me), 1.38 (3 H, s, Me acetone group), 1.39 (3 H, s, Me acetone group), 2.42 (3 H, s, Me acetone group), 2.71 (1 H, dd, $J = 4.3$ and 13.9 , H-18), 3.00 (1 H, d, $J = 9.1$, H-3), 3.50 (1 H, d, $J = 12.5$, H_A-28), 3.66 (1 H, ddd, $J = 4.4$, 9.1 and 11.2 , H-2), 3.87 (1 H, d, $J = 12.5$, H_B-28), 5.05 (1 H, dd, $J = 3.5$ and 3.5 , H-12), 7.30 (2 H, d, $J = 9.0$, H tosyl group) and 7.74 (2 H, d, $J = 9.0$, H tosyl group); δ_{C} (CDCl_3) 16.4 (Me), 16.7 (Me), 17.4 (Me), 17.9 (C-6), 20.6 (Me tosyl group), 21.8 (Me), 22.8 (C-16), 23.8 (Me), 23.9 (C-11), 25.7 (C-15), 26.2 (Me), 27.3 (Me acetone group), 28.7 (Me acetone group), 31.0 (C-20), 31.8 (C-22), 32.7 (C-7), 33.2 (Me), 33.9 (C-21), 35.5 (C-10), 37.5 (C-4), 40.0 (C-8), 40.2 (C-14), 41.7 (C-17), 42.1 (C-18), 42.2 (C-1), 46.3 (C-19), 47.9 (C-9), 56.2 (C-5), 72.6 (C-2), 76.8 (C-28), 88.8 (C-3), 108.4 (C acetone group), 123.1 (C-12), 128.2 (C tosyl group), 129.9 (C tosyl group), 133.3 (C tosyl group), 143.3 (C tosyl group) and 144.6 (C-13); HR-LSIMS (m/z) 651.4157 ($\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_5\text{S}^+$ requires 651.4161).

4.2.5. 2 α ,3 β -Dihydroxyolean-12-en-28-azide (**7**)

NaN_3 (90 mg) was added to a solution of **6** (300 mg, 0.48 mmol) in DCM (25 mL). The reaction was stirred for 4 h at room temp. The

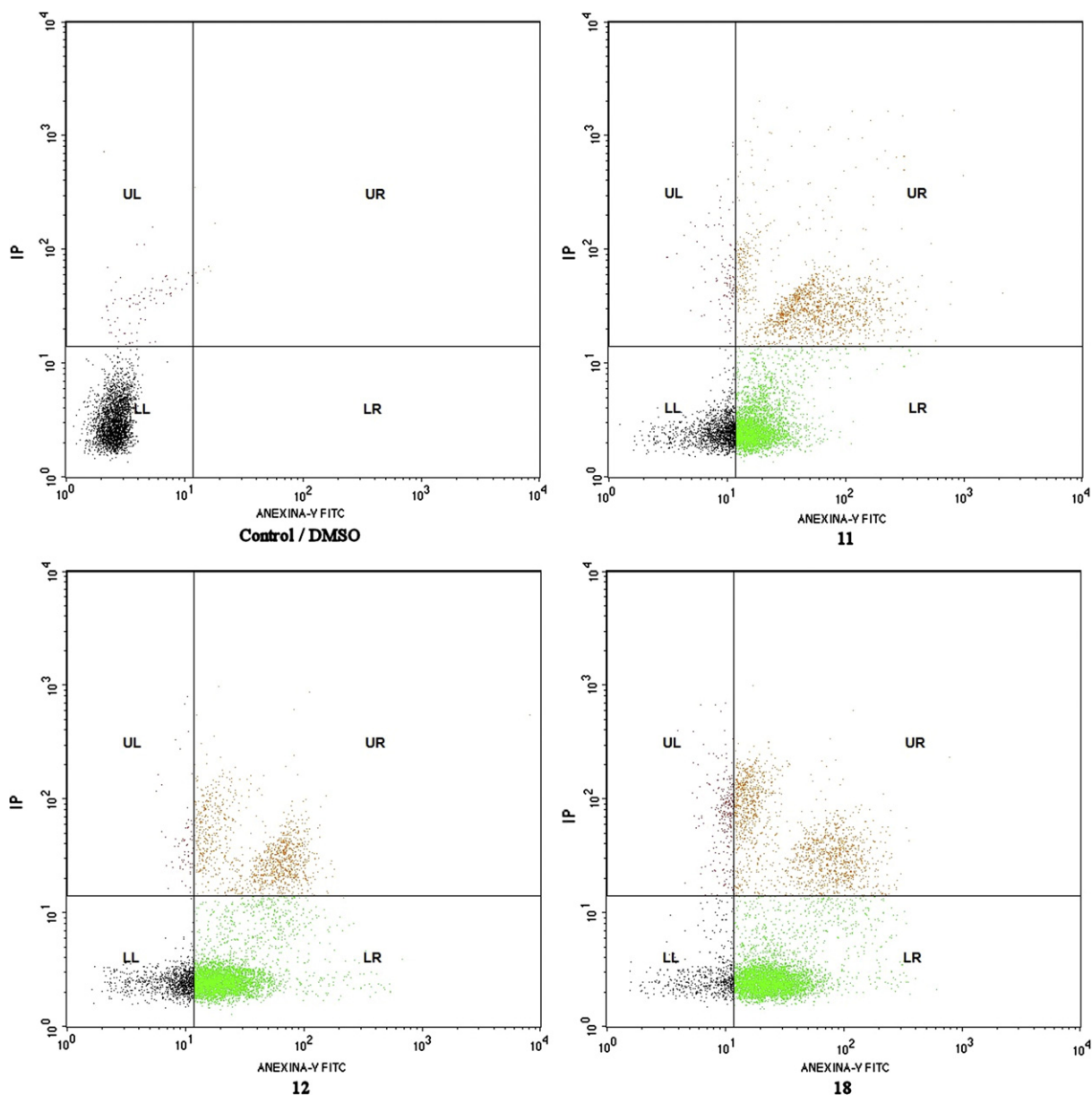


Fig. 6. Flow cytometry for control/DMSO and compounds **11**, **12**, and **18** at a concentration of 1 μ M for 24 h. Low left quadrant (LL, black): live cells. Low right quadrant (LR, green): early apoptotic cells. Upper right quadrant (UR, orange): late apoptotic and dead cells. Upper left quadrant (UL, fuchsia): necrotic cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mixture was extracted with DCM, *p*-toluenesulfonic acid (20 mg) was added, and the reaction was stirred for 30 min at room temp. The mixture was extracted with DCM, and the organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by column chromatography using DCM/acetone (2:1) to give **7** as a white solid (77 mg, 93%); mp 89–91 $^\circ$; $[\alpha]_D^{+62}$ (c 1, CHCl_3 :MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3392, 2950, 2883 and 1664; δ_{H} (CDCl_3) 0.85 (3 H, s, Me), 0.87 (3 H, s, Me), 0.93 (3 H, s, Me), 0.95 (3 H, s, Me), 0.99 (3 H, s, Me), 1.03 (3 H, s, Me), 1.16 (3 H, s, Me), 2.71 (1 H, dd, $J = 4.3$ and 13.9, H-18), 3.13 (1H, d, $J = 9.0$, H-3), 3.34 (1 H, d, $J = 9.0$, H_A-28), 3.68 (1 H, d, $J = 9.0$, H_B-28), 3.80 (1 H, ddd, $J = 4.4$, 9.0 and 11.2, H-2) and 5.19 (1 H, dd, $J = 3.5$ and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl_3) 17.0 (Me), 17.1 (Me), 17.8 (Me), 18.6 (C-6), 22.2 (C-16), 22.2 (C-11), 25.7 (Me), 25.8 (C-15), 26.2 (Me), 28.8 (Me), 29.5 (C-20), 31.3 (C-22), 32.7 (C-7), 33.4 (Me), 34.3 (C-21), 37.2 (C-10), 38.4 (C-4), 39.4 (C-8), 40.1 (C-14), 42.0 (C-17),

42.6 (C-18), 46.7 (C-1), 46.8 (C-19), 47.7 (C-9), 55.5 (C-5), 69.2 (C-2), 69.9 (C-28), 84.1 (C-3), 122.4 (C-12) and 144.5 (C-13); HR-LSIMS (m/z) 482.3820 ($\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_2\text{N}_3^+$ requires 482.3825).

4.2.6. Acetylation of MA (**2**) with Ac_2O

Ac_2O (2 mL) was added slowly to a solution of MA (**2**, 1.4 g, 0.294 mol) in pyridine (10 mL). The reaction was stirred for 2 h at reflux. Cold water was added to the mixture and, after this was extracted with DCM, the organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **8** as a white solid (924 mg, 70%) [39].

4.2.7. $2\alpha,3\beta$ -Diacetoxyolean-12-en-28-amide (**9**)

SOCl_2 (2 mL) was added to a solution of **8** (500 mg, 0.87 mmol) in anhydrous DCM (20 mL). The reaction was stirred for 2 h at

reflux. The solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in MeOH. Then, a solution of MeOH/NH₃ (1:1) was added dropwise up to the cessation of the bubbling. The mixture was stirred overnight at room temp. The mixture was extracted with DCM and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (2:1) to give **9** as a white solid (109 mg, 55%); mp 267–269°; [α]_D +54 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3399, 2912, 2855 and 1708; δ_{H} (CDCl₃) 0.84 (3 H, s, Me), 0.85 (3 H, s, Me), 0.91 (3 H, s, Me), 0.93 (3 H, s, Me), 1.07 (3 H, s, Me), 1.10 (3 H, s, Me), 1.18 (3 H, s, Me), 1.94 (3 H, s, Me acetyl group), 2.02 (3 H, s, Me acetyl group), 2.49 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 4.71 (1H, d, *J* = 9.1, H-3), 5.04 (1 H, ddd, *J* = 4.4, 9.1 and 11.2, H-2) and 5.90 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl₃) 17.8 (Me), 17.1 (Me), 17.6 (Me), 18.3 (C-6), 21.1 (Me acetyl group), 21.3 (Me acetyl group), 23.5 (Me), 23.9 (C-11), 23.9 (C-16), 25.9 (Me), 27.4 (C-15), 28.6 (Me), 30.9 (C-20), 32.4 (C-22), 32.6 (C-7), 33.2 (Me), 34.2 (C-21), 38.3 (C-10), 39.4 (C-4), 39.5 (C-8), 42.2 (C-14), 42.6 (C-18), 44.1 (C-19), 46.5 (C-17), 46.8 (C-1), 47.64 (C-9), 55.0 (C-5), 70.2 (C-2), 80.2 (C-3), 122.7 (C-12), 145.0 (C-13), 170.7 (C=O acetyl group), 171.0 (C=O acetyl group) and 182.2 (C-28); HR-LSIMS (*m/z*) 556.3998 (C₃₄H₅₄O₅N⁺ requires 556.4002).

4.2.8. 2 α ,3 β -Dihydroxyolean-12-en-28-amide (**10**)

A solution of KOH/MeOH (1:10, 5 mL) was added to a solution of **9** (100 mg, 0.18 mmol) in anhydrous THF (5 mL). The reaction was stirred for 30 min at room temp. Then, cold water was added dropwise up to the cessation of the bubbling. The mixture was extracted with DCM. The organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (2:1) to give **10** as a white solid (76 mg, 90%); mp 160–162°; [α]_D +60 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3401, 2940, 2890 and 1698; δ_{H} (CDCl₃) 0.86 (3 H, s, Me), 0.86 (3 H, s, Me), 0.95 (3 H, s, Me), 0.95 (3 H, s, Me), 1.02 (3 H, s, Me), 1.06 (3 H, s, Me), 1.20 (3 H, s, Me), 2.56 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 3.03 (1H, d, *J* = 9.1, H-3), 3.71 (1 H, ddd, *J* = 4.4, 9.1 and 11.2, H-2) and 5.90 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl₃) 16.9 (Me), 17.0 (Me), 17.3 (Me), 18.5 (C-6), 23.8 (Me), 23.8 (C-16), 24.0 (C-11), 26.0 (Me), 27.5 (C-15), 27.8 (Me), 30.9 (C-20), 32.6 (C-22), 32.7 (C-7), 33.2 (Me), 34.3 (C-21), 38.5 (C-10), 39.4 (C-4), 39.5 (C-8), 42.4 (C-14), 42.8 (C-18), 46.6 (C-19), 46.7 (C-17), 46.9 (C-1), 47.8 (C-9), 55.5 (C-5), 69.1 (C-2), 84.1 (C-3), 122.9 (C-12), 145.2 (C-13) and 181.5 (C-28); HR-LSIMS (*m/z*) 494.3592 (C₃₀H₄₉O₃Na⁺ requires 494.3610).

4.2.9. 2 α ,3 β -Diacetoxyolean-12-en-28-nitrile (**11**)

SOCl₂ (2 mL) was added to a solution of **9** (200 mg, 0.36 mmol) in anhydrous DCM (10 mL). The reaction was stirred for 3 h at room temp. Then, cold water was added and the mixture was extracted with DCM. The organic layer was dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **11** as a white solid (83 mg, 43%); mp 144–146°; [α]_D +34 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2929, 2360, 1741 and 1250; δ_{H} (CDCl₃) 0.89 (3 H, s, Me), 0.90 (3 H, s, Me), 0.92 (3 H, s, Me), 1.01 (3 H, s, Me), 1.07 (3 H, s, Me), 1.11 (3 H, s, Me), 1.23 (3 H, s, Me), 1.95 (3 H, s, Me acetyl group), 2.03 (3 H, s, Me acetyl group), 2.56 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 4.73 (1H, d, *J* = 9.1, H-3), 5.07 (1 H, ddd, *J* = 4.4, 9.1 and 11.2, H-2) and 5.34 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl₃) 16.7 (Me), 17.4 (Me), 17.9 (Me), 18.4 (C-6), 21.1 (Me acetyl group), 21.3 (Me acetyl group), 23.6 (Me), 23.7 (C-16), 24.2 (C-11), 25.7 (Me), 28.2 (C-15), 28.7 (Me), 30.8 (C-20), 32.4 (C-22), 32.6 (C-7), 33.2 (Me), 34.2 (C-21), 38.2 (C-10), 38.3 (C-4), 39.6 (C-8), 39.7 (C-14), 42.6 (C-18), 44.1 (C-19), 44.2

(C-1), 46.8 (C-17), 47.7 (C-9), 55.1 (C-5), 70.2 (C-2), 80.8 (C-3), 124.4 (C-12), 125.7 (C-28), 141.9 (C-13), 170.7 (C=O acetyl group) and 171.0 (C=O acetyl group); HR-LSIMS (*m/z*) 560.3710 (C₃₄H₅₁O₄N-Na⁺ requires 560.3716).

4.2.10. 2 α ,3 β -Dihydroxyolean-12-en-28-nitrile (**12**)

A solution of KOH/MeOH (1:10, 5 mL) was added to a solution of **11** (100 mg, 0.18 mmol) in anhydrous THF (5 mL). Proceeding as described above for compound **10**, compound **12** was obtained as a white solid (77 mg, 90%); mp 105–107°; [α]_D +40 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2955, 2383, 1755 and 1270; δ_{H} (CDCl₃) 0.82 (3 H, s, Me), 0.89 (3 H, s, Me), 0.92 (3 H, s, Me), 1.00 (3 H, s, Me), 1.01 (3 H, s, Me), 1.02 (3 H, s, Me), 1.12 (3 H, s, Me), 2.56 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 2.99 (1H, d, *J* = 9.1, H-3), 3.69 (1 H, ddd, *J* = 4.4, 9.1 and 11.2, H-2) and 5.35 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl₃) 16.9 (Me), 17.0 (Me), 17.5 (Me), 18.6 (C-6), 23.6 (Me), 23.7 (C-16), 24.3 (C-11), 25.8 (Me), 28.2 (C-15), 28.9 (Me), 30.8 (C-20), 32.5 (C-22), 33.1 (C-7), 33.2 (Me), 33.2 (C-21), 38.2 (C-10), 38.5 (C-8), 39.4 (C-4), 39.8 (C-14), 42.1 (C-17), 44.1 (C-18), 45.0 (C-19), 46.7 (C-1), 47.8 (C-9), 55.5 (C-5), 69.1 (C-2), 84.1 (C-3), 124.7 (C-12), 125.8 (C-28) and 141.9 (C-13); HR-LSIMS (*m/z*) 476.3513 (C₃₀H₄₇O₂NNa⁺ requires 476.3504).

4.2.11. 2 α ,3 β -Dihydroxyolean-12-en-28-amine (**13**)

LiAlH₄ (1 mL, 1 M) was added to a solution of **11** (100 mg, 0.2 mmol) in anhydrous THF (3 mL). The reaction was stirred for 2 h at reflux. The mixture was extracted with DCM and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by column chromatography using DCM/acetone (2:1) to give **13** as a white solid (75 mg, 80%); mp 135–137°; [α]_D +63 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2933, 2342, 1761 and 1245; δ_{H} (CDCl₃) 0.85 (3 H, s, Me), 0.90 (3 H, s, Me), 0.91 (3 H, s, Me), 0.96 (3 H, s, Me), 1.03 (3 H, s, Me), 1.06 (3 H, s, Me), 1.19 (3 H, s, Me), 2.58 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 3.03 (1H, d, *J* = 9.1, H-3), 3.23 (1 H, d, *J* = 12.0, H_A-28), 3.57 (1 H, d, *J* = 12.0, H_B-28), 3.71 (1 H, ddd, *J* = 4.4, 9.1 and 11.2, H-2) and 5.22 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl₃) 17.0 (Me), 17.0 (Me), 17.1 (Me), 18.6 (C-6), 22.2 (C-16), 23.8 (C-11), 23.9 (C-15), 23.9 (Me), 25.7 (Me), 28.8 (Me), 29.5 (C-20), 31.3 (C-22), 32.7 (C-7), 33.4 (Me), 34.3 (C-21), 37.2 (C-10), 38.4 (C-8), 39.4 (C-4), 40.1 (C-14), 42.0 (C-17), 42.6 (C-18), 46.7 (C-1), 46.7 (C-19), 47.8 (C-9), 55.5 (C-5), 69.8 (C-2), 69.9 (C-28), 84.1 (C-3), 122.4 (C-12) and 144.5 (C-13); HR-LSIMS (*m/z*) 456.3913 (C₃₀H₅₁O₂N⁺ requires 456.3920).

4.2.12. Oxidation of MA (**2**) with PCC

PCC (90 mg, 5.4 mmol) was added to a solution of **2** (200 mg, 0.36 mmol) in dry DCM (10 mL). The mixture was stirred for 2 h at room temp. The mixture was extracted with a solution of hexane/diethyl ether (1:1) and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using hexane/ethyl acetate (2:1) to give **14** as a white solid (67 mg, 40%); mp 164–166°; [α]_D +85 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3400, 2953, 2868 and 1639; δ_{H} (CDCl₃) 0.71 (3 H, s, Me), 0.78 (3 H, s, Me), 0.90 (3 H, s, Me), 0.94 (3 H, s, Me), 0.96 (3 H, s, Me), 1.22 (3 H, s, Me), 1.22 (3 H, s, Me), 2.87 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 3.92 (1 H, s, H-3) and 5.32 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CDCl₃) 16.4 (Me), 16.8 (Me), 16.9 (Me), 18.7 (C-6), 23.1 (C-16), 23.6 (C-11), 23.8 (Me), 26.1 (Me), 27.6 (C-15), 29.6 (Me), 30.9 (C-20), 32.6 (C-7), 32.6 (C-22), 33.2 (Me), 34.0 (C-21), 39.9 (C-8), 41.2 (C-18), 42.0 (C-14), 43.9 (C-10), 46.0 (C-4), 46.1 (C-19), 46.7 (C-17), 47.9 (C-9), 53.3 (C-1), 54.7 (C-5), 83.1 (C-3), 122.1 (C-12), 144.0 (C-13), 183.2 (C-28) and 211.2 (C-2); HR-LSIMS (*m/z*) 469.3390 (C₃₀H₄₆O₄⁺ requires 469.3396); and **15**, also as a white solid (67 mg, 40%) [39].

4.2.13. Augustic acid (2 β ,3 β -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) (**16**)

NaBH₄ (40 mg) was added to a solution of **14** (100 mg, 0.21 mmol) in *i*-PrOH (5 mL). The reaction was stirred for 2 h at room temp. MeOH was added to destroy the excess reagent, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (4:1) to give **16** as a white solid (95.2 mg, 95%); mp 265–267°; [α]_D +83 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3380, 2912, 2890 and 1676; δ_{H} (CD₃OD) 0.62 (3 H, s, Me), 0.69 (3 H, s, Me), 0.76 (3 H, s, Me), 0.94 (3 H, s, Me), 0.99 (3 H, s, Me), 1.04 (3 H, s, Me), 1.19 (3 H, s, Me), 2.99 (1 H, dd, *J* = 4.3 and 13.9, H-18), 3.11 (1 H, d, *J* = 3.1, H-3), 4.08 (1 H, ddd, *J* = 3.1, 3.1 and 4.4, H-2) and 5.19 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12); δ_{C} (CD₃OD) 16.7 (Me), 17.6 (Me), 18.3 (Me), 18.8 (C-6), 23.2 (C-16), 23.9 (Me), 24.1 (C-11), 26.4 (Me), 28.7 (C-15), 30.4 (Me), 30.7 (C-20), 33.4 (Me), 33.5 (C-22), 33.7 (C-7), 34.4 (C-21), 37.8 (C-8), 39.2 (C-4), 40.3 (C-10), 42.2 (C-18), 42.8 (C-14), 45.0 (C-1), 46.5 (C-17), 46.6 (C-19), 48.7 (C-9), 56.4 (C-5), 71.9 (C-2), 78.8 (C-3), 123.1 (C-12), 145.3 (C-13) and 180.6 (C-28); HR-LSIMS (*m/z*) 495.3455 (C₃₀H₄₈O₄Na⁺ requires 495.3450).

4.2.14. 2 β ,3 β ,28-Trihydroxyolean-12-ene (**17**)

LiAlH₄ (1 mL, 1 M) was added to a solution of **14** (100 mg, 0.21 mmol) in anhydrous THF (5 mL). Proceeding as described above for the reduction of MA (**2**), compound **17** was obtained as a white solid (93.2 mg, 93%). The compound **17** also was synthesised from **15** under the same reaction conditions (92.1 mg, 91%) [41].

4.2.15. Benzyl maslinate (**18**)

BnCl was added to a solution of MA (**2**, 1 g, 2 mmol) in DMF (8 mL) with K₂CO₃ (0.61 g). The reaction was stirred for 4 h at 55 °C. The mixture was washed with water and extracted with DCM, and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure, the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **18** as a white solid (690 mg, 81%); mp 226–228°; [α]_D +12 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3396, 2925, 2843 and 1704; δ_{H} (CDCl₃) 0.50 (3 H, s, Me), 0.72 (3 H, s, Me), 0.80 (3 H, s, Me), 0.82 (3 H, s, Me), 0.85 (3 H, s, Me), 0.92 (3 H, s, Me), 1.03 (3 H, s, Me), 2.82 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 12.2, H-18), 2.89 (1 H, d, *J* = 9.1, H-3), 3.59 (1 H, ddd, *J* = 9.1 and 12.1, H-2), 4.97 (2 H, AB system, *J* = 12.0, H benzyl group), 5.21 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12) and 7.48 (5 H, m, H benzyl group); δ_{C} (CDCl₃) 16.9 (Me), 17.2 (Me), 17.3 (Me), 18.7 (C-6), 23.3 (C-16), 23.8 (C-11), 24.0 (Me), 27.9 (C-15), 29.02 (Me), 30.9 (C-20), 32.7 (C-22), 32.9 (C-7), 33.5 (Me), 34.0 (C-21), 38.4 (C-4), 39.2 (C-10), 39.5 (C-8), 41.5 (C-14), 41.9 (C-18), 46.0 (C-17), 46.2 (C-1), 46.8 (C-19), 47.9 (C-9), 55.6 (C-5), 66.3 (benzyl-C), 69.2 (C-2), 89.0 (C-3), 122.5 (C-12), 128.0 (C benzyl group), 128.1 (C benzyl group), 128.5 (C benzyl group), 136.5 (C benzyl group), 143.9 (C-13) and 177.2 (C-28); HR-LSIMS (*m/z*) 585.3910 (C₃₇H₅₄O₄Na⁺ requires 585.3920).

4.2.16. Oxidation of **18** with PCC

PCC (90 mg, 5.4 mmol) was added to a solution of **18** (200 mg, 0.36 mmol) in DCM (10 mL). Proceeding as described above for the oxidation of MA (**2**), compound **19** was obtained as a white solid (77 mg, 40%); mp 107–109°; [α]_D +52 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3366, 2963, 2832 and 1720; δ_{H} (CDCl₃) 0.50 (3 H, s, Me), 0.61 (3 H, s, Me), 0.76 (3 H, s, Me), 0.82 (3 H, s, Me), 0.84 (3 H, s, Me), 1.09 (3 H, s, Me), 1.10 (3 H, s, Me), 3.09 (1 H, dd, *J* = 3.1 and 12.2, H-18), 4.04 (1 H, s, H-3), 5.21 (2 H, AB system, *J* = 12.0, H benzyl group), 5.21 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12) and 7.48 (5 H, m, H benzyl group); δ_{C} (CDCl₃) 16.4 (Me), 16.7 (Me), 16.8 (Me), 18.7 (C-6), 23.2 (C-16), 23.5 (C-11), 23.8 (Me), 26.0 (Me), 27.8 (C-15), 29.6 (Me), 30.9 (C-20), 32.5 (C-22), 32.5 (C-7), 33.3 (Me), 34.1 (C-21), 39.9 (C-

8), 41.6 (C-18), 42.0 (C-14), 43.9 (C-10), 45.9 (C-4), 46.1 (C-19), 46.9 (C-17), 46.8 (C-9), 53.3 (C-1), 54.7 (C-5), 66.17 (C benzyl group), 83.2 (C-3), 121.9 (C-12), 128.1 (C benzyl group), 128.2 (C benzyl group), 128.6 (C benzyl group), 136.6 (C benzyl group), 144.1 (C-13), 177.5 (C-28) and 211.2 (C-2); HR-LSIMS (*m/z*) 561.3943 (C₃₇H₅₃O₄⁺ requires 561.3944); and also **20** as a white solid (77 mg, 40%); mp 199–201°; [α]_D +47 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3391, 2925, 2897 and 1700; δ_{H} (CDCl₃) 0.57 (3 H, s, Me), 0.81 (3 H, s, Me), 0.84 (3 H, s, Me), 1.02 (3 H, s, Me), 1.03 (3 H, s, Me), 1.10 (3 H, s, Me), 1.12 (3 H, s, Me), 2.94 (1 H, dd, *J* = 3.1 and 15.0, H-18), 5.10 (2 H, AB system, *J* = 12.0, H benzyl group), 5.25 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12), 6.24 (1 H s, H-1) and 7.38 (5 H, m, H benzyl group); δ_{C} (CDCl₃) 17.5 (Me), 18.9 (C-6), 19.8 (Me), 22.0 (Me), 23.3 (C-16), 23.7 (11), 23.8 (Me), 26.0 (Me), 27.7 (C-15), 27.9 (Me), 30.9 (C-20), 32.6 (C-22), 32.8 (C-7), 33.3 (Me), 33.6 (C-8), 34.2 (C-21), 40.2 (C-14), 41.7 (C-18), 42.3 (C-10), 43.2 (C-9), 44.1 (C-4), 46.0 (C-19), 47.0 (C-17), 54.1 (C-5), 66.3 (C benzyl group), 122.3 (C-12), 128.2 (C benzyl group), 128.2 (C benzyl group), 128.5 (C-1), 128.6 (C benzyl group), 136.5 (C benzyl group), 143.9 (C-2), 144.3 (C-13), 177.6 (C-28) and 201.3 (C-3); HR-LSIMS (*m/z*) 559.3765 (C₃₇H₅₁O₄⁺ requires 559.3787).

4.2.17. Benzyl augustate (**21**)

LiAlH₄ (1 mL, 1 M) was added to a solution of **19** (100 mg, 0.18 mmol) in anhydrous THF (10 mL). Proceeding as described above for the reduction of MA (**2**), compound **21** was obtained as a white solid (90.1 mg, 91%); mp 221–223°; [α]_D +64 (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3371, 2940, 2891 and 1668; δ_{H} (CDCl₃) 0.60 (3 H, s, Me), 0.87 (3 H, s, Me), 0.90 (3 H, s, Me), 0.98 (3 H, s, Me), 0.98 (3 H, s, Me), 1.10 (3 H, s, Me), 1.18 (3 H, s, Me), 2.83 (1 H, dd, *J* = 3.1 and 12.0, H-18), 3.10 (1 H, d, *J* = 3.0, H-3), 3.98 (1 H, ddd, *J* = 3.0, 4.4 and 4.4, H-2), 5.00 (2 H, AB system, *J* = 12.0, H benzyl group), 5.28 (1 H, dd, *J* = 3.5 and 3.5, H-12) and 7.48 (5 H, m, H benzyl group); δ_{C} (CDCl₃) 16.5 (Me), 17.1 (Me), 17.5 (Me), 18.3 (C-6), 23.3 (C-16), 23.7 (C-11), 23.8 (Me), 26.1 (Me), 27.7 (C-15), 29.9 (Me), 30.9 (C-20), 32.6 (C-22), 32.9 (C-7), 33.3 (Me), 34.08 (C-21), 36.9 (C-8), 38.3 (C-4), 39.6 (C-10), 41.6 (C-18), 42.0 (C-14), 44.3 (C-1), 46.1 (C-19), 47.0 (C-17), 48.3 (C-9), 55.43 (C-5), 66.1 (C benzyl group), 71.3 (C-2), 78.7 (C-3), 122.8 (C-12), 128.1 (C benzyl group), 128.2 (C benzyl group), 128.6 (C benzyl group), 136.6 (C benzyl group), 143.9 (C-13) and 177.6 (C-28); HR-LSIMS (*m/z*) 561.3937 (C₃₇H₅₃O₄⁺ requires 561.3937).

4.2.18. Hydrogenation of **21**

Palladium was added in catalytic amount to a solution of **21** (200 mg, 0.39 mmol) in anhydrous DCM (20 mL). The reaction was stirred for 2 h at 4 atm hydrogen pressure. Then, the mixture was filtered and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (2:1) to give **16** as a white solid (165 mg, 90%).

4.3. Apoptosis tests

B16-F10 murine melanoma cell lines (ATCC N°: CRL-6475) were provided by the Scientific Instrumentation Centre of University of Granada. B16-F10 murine melanoma cells were grown in DMEM medium containing L-glutamine (4 mM), sodium bicarbonate (1.5 g/L), sodium pyruvate (1 mM), glucose (4.5 g/L), and foetal bovine serum (10%). Confluent B16-F10 melanoma cells in DMEM medium with foetal bovine serum, 10%, were trypsinised and put on 6-well culture dishes (300,000 cells per well). After 24 h, the cells were treated with the compounds **1–40** (by duplicate with compounds **3**, **10–12**, **14**, **15**, **18–21**) in DMSO at different concentrations for 24 or 48 h. As a control, B16F10 cells were incubated in the presence of the vehicle (DMSO) or in medium alone.

Afterwards, the cells were detached with EDTA-Trypsin (0.5 mg/mL and 0.2 mg/mL, respectively), washed twice with temperate phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in $1 \times$ Annexin-binding buffer at a concentration 1×10^6 cells/mL. 5 μ L of the Annexin V-FITC and 5 μ L of propidium iodide were added to 100 μ L of each sample. The cells were incubated at room temperature for 15 min in darkness. After this incubation period, 400 μ L of $1 \times$ Annexin-binding buffer were added and the samples analysed by flow cytometry within 1 h.

Samples were analysed on a Becton Dickinson FACS Vantage flow cytometer with a filter BP530 \pm 30 nm in FL1 and a filter BP585 \pm 70 nm in FL2 to collect the fluorescein and propidium iodide signals, respectively. The acquisition process was at 500 cells/sec up to completing 10,000 cells with CELLQuest Software (Becton Dickinson).

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Dirección General de Programas y Transferencia de Conocimiento and by a project from Ministerio de Ciencia e Innovación. We thank David Nesbitt for reviewing the English of the manuscript.

References

- [1] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 461–477.
- [2] K.S. Lam, New aspects of natural products in drug discovery, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 279–289.
- [3] A.L. Demain, L. Zhang, Natural products and drug discovery. in: A.L. Demain, L. Zhang (Eds.), *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005, pp. 3–29.
- [4] T. Henkel, R.M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 643–647.
- [5] V.R. Yadav, S. Prasad, B. Sung, R. Kannappan, B.B. Aggarwal, Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer, *Toxins* 2 (2010) 2428–2466.
- [6] P. Dzubak, M. Hajdych, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban, J. Sarek, Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, *Nat. Prod. Rep.* 23 (2006) 394–411.
- [7] Z. Ovesna, A. Vachalkova, K. Horvathova, D. Tothova, Pentacyclic triterpenic acids: new chemoprotective compounds, *Neoplasma* 51 (2004) 327–333.
- [8] J.D. Park, D.K. Rhee, Y.H. Lee, Biological activities and chemistry of saponins from Panax ginseng C. A. Meyer, *Phytochem. Rev.* 4 (2005) 159–175.
- [9] W.N. Setzer, M.C. Setzer, Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents, *Mini Rev. Med. Chem.* 3 (2003) 540–556.
- [10] M.B. Sporn, K. Liby, M.M. Yore, N. Suh, A. Albini, T. Honda, C. Sundararajan, G. Gribble, Platforms and networks in triterpenoid pharmacology, *Drug Dev. Res.* 68 (2007) 174–182.
- [11] K.I. Wolska, A.M. Grudniak, B. Fiecek, A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. Kurek, Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives, *Cent. Eur. J. Biol.* 5 (2010) 543–553.
- [12] L. Huang, C.H. Chen, The molecular targets of anti-HIV-1 triterpenes, an update, *Med. Chem. Rev. Online* 2 (2005) 423–427.
- [13] J. Patocka, Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicinal significance, *J. Appl. Biomed.* 1 (2003) 7–12.
- [14] S. Safe, G. Chadalapaka, I. Jutooru, S. Chintharlapalli, S. Papineni, Highlights of pentacyclic triterpenes in the cancer setting. in: J.A.R. Salvador (Ed.), *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*. Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, New York, 2010, pp. 277–306.
- [15] M.N. Laszczyk, Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Med.* 75 (2009) 1549–1560.
- [16] A. Petronelli, G. Pannitteri, U. Testa, Triterpenoids as new promising anti-cancer drugs, *Anti-Cancer Drugs* 20 (2009) 880–892.
- [17] S.R. Wang, W.S. Fang, Pentacyclic triterpenoids and their saponins with apoptosis-inducing activity, *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (2009) 1581–1596.
- [18] A. García-Granados, A. Martínez, J.N. Moliz, A. Parra, F. Rivas, 3 β -hydroxyolean-12-en-28-oic acid (oleanolic acid), *Molecules* 3 (1998) M87.
- [19] A. García-Granados, A. Martínez, J.N. Moliz, A. Parra, F. Rivas, 2 α ,3 β -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (maslinic acid), *Molecules* 3 (1998) M88.
- [20] A. García-Granados, Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling byproducts, PCT, *Int. Appl. WO* 9804331 (1998).
- [21] D.M. Wu, D. Zhao, D.Z. Li, D.Y. Xu, W.F. Chu, X.F. Wang, Maslinic acid induces apoptosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells by Ca²⁺-evoked p38 signaling pathway, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 383 (2011) 321–330.
- [22] Y. Allouche, F. Warleta, M. Campos, C. Sanchez-Quesada, M. Uceda, G. Beltran, J.J. Gaforio, Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 121–130.
- [23] Y.W. Hsum, W.T. Yew, P.L.V. Hong, K.K. Soo, L.S. Hoon, Y.C. Chieng, L.Y. Mooi, Cancer chemopreventive activity of maslinic acid: suppression of COX-2 expression and inhibition of NF- κ B and AP-1 activation in Raji cells, *Planta Med.* 77 (2011) 152–157.
- [24] C. Li, Z. Yang, C. Zhai, W. Qiu, D. Li, Z. Yi, L. Wang, J. Tang, M. Qian, J. Luo, M. Liu, Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor α by inhibiting NF- κ B signaling pathway, *Mol. Cancer* 9 (2010) 73.
- [25] F.J. Reyes-Zurita, E.E. Rufino-Palomares, J.A. Lupianez, M. Cascante, Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, *Cancer Lett.* 273 (2009) 44–54.
- [26] M.E. Juan, J.M. Planas, V. Ruiz-Gutierrez, H. Daniel, U. Wenzel, Anti-proliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells, *Br. J. Nutr.* 100 (2008) 36–43.
- [27] R. Martin, J. Carvalho, E. Ibeas, M. Hernandez, V. Ruiz-Gutierrez, M.L. Nieto, Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation, *Cancer Res.* 67 (2007) 3741–3751.
- [28] F.J. Reyes, J.J. Centelles, J.A. Lupianez, M. Cascante, (2 α ,3 β)-2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells, *FEBS Lett.* 580 (2006) 6302–6310.
- [29] A. Parra, F. Rivas, P.E. Lopez, A. García-Granados, A. Martínez, F. Albericio, N. Marquez, E. Munoz, Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 1139–1145.
- [30] A. García-Granados, P.E. Lopez, E. Melguizo, A. Parra, Y. Simeo, Reactivity of chiral sesquiterpene synthons obtained by the degradation of maslinic acid from olive-pressing residues, *Synth. Comm.* 36 (2006) 3001–3018.
- [31] P.E. Lopez, A. Isidro-Llobet, C. Gracia, L.J. Cruz, A. García-Granados, A. Parra, M. Alvarez, F. Albericio, Use of p-nitrobenzyloxycarbonyl (pNZ) as a permanent protecting group in the synthesis of kahalalide F analogs, *Tet. Lett.* 46 (2005) 7737–7741.
- [32] A. García-Granados, P.E. Lopez, E. Melguizo, A. Parra, Y. Simeo, Degradation of triterpenic compounds from olive-pressing residues. Synthesis of trans-decalin type chiral synthons, *Tet. Lett.* 44 (2003) 6673–6677.
- [33] L.M. De Pablos, M.F.B. dos Santos, E. Montero, A. García-Granados, A. Parra, A. Osuna, Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens, *Parasitol. Res.* 107 (2010) 601–604.
- [34] L.M. De Pablos, G. Gonzalez, R. Rodrigues, A. García-Granados, A. Parra, A. Osuna, Action of a pentacyclic triterpenoid, maslinic acid, against *Toxoplasma gondii*, *J. Nat. Prod.* 73 (2010) 831–834.
- [35] M.P. Montilla, A. Agil, C. Navarro, M.I. Jimenez, A. García-Granados, A. Parra, M.M. Cabo, Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*, *Planta Med.* 69 (2003) 472–474.
- [36] A. García-Granados, P.E. Lopez, E. Melguizo, J.N. Moliz, A. Parra, Y. Simeo, J.A. Dobado, Epoxides, cyclic sulfites, and sulfate from natural pentacyclic triterpenoids: theoretical calculations and chemical transformations, *J. Org. Chem.* 68 (2003) 4833–4844.
- [37] C.R. Dorr, S. Yemets, O. Kolomitsyna, P. Krasutsky, L.M. Mansky, Triterpene derivatives that inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 542–545.
- [38] R.Y. Kuo, K. Qian, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 1321–1344.
- [39] A. García-Granados, J. Duenas, J.N. Moliz, A. Parra, F.L. Perez, J.A. Dobado, J. Molina, Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Theoretical and experimental ¹³C chemical shifts, *J. Chem. Res. Synop.* 2 (2000) 326–339.
- [40] M. Urban, J. Sarek, I. Tislerova, P. Dzubak, M. Hajdych, Influence of esterification and modification of A-ring in a group of lupane acids on their cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 5527–5535.
- [41] A. Parra, P.E. Lopez, A. García-Granados, Different pathways for the deoxygenation of the A-ring of natural triterpene compounds, *Nat. Prod. Res.* 24 (2010) 177–196.
- [42] L. Zhang, J. Chen, Y. Gong, J. Liu, L. Zhang, W. Hua, H. Sun, Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 864–874.
- [43] A. Parra, P.E. Lopez, A. García-Granados, Bioactive compounds with added value prepared from terpenes contained in solid wastes from the olive oil industry, *Chem. Biodivers.* 7 (2010) 421–439.
- [44] A. García-Granados, P.E. Lopez, E. Melguizo, A. Parra, Y. Simeo, Remote hydroxylation of methyl groups by regioselective cyclopalladation. partial synthesis of hyptatic acid-A, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 3500–3509.

- [45] A. Garcia-Granados, P.E. Lopez, E. Melguizo, A. Parra, Y. Simeo, Oxidation of several triterpenic diene and triene systems. Oxidative cleavage to obtain chiral intermediates for drimane and phenanthrene semi-synthesis, *Tetrahedron* 60 (2004) 3831–3845.
- [46] A. Garcia-Granados, P.E. Lopez, E. Melguizo, A. Parra, Y. Simeo, Partial synthesis of C-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Formation of several triene systems by chemical and photochemical isomerization processes, *Tetrahedron* 60 (2004) 1491–1503.
- [47] A. Garcia-Granados, J. Duenas, E. Melguizo, J.N. Moliz, A. Parra, F.L. Perez, J.A. Dobado, J. Molina, Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Part II. Theoretical and experimental ^{13}C chemical shifts, *J. Chem. Res. Synop.* 5 (2000) 653–670.
- [48] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V, *J. Immunol. Meth.* 184 (1995) 39–51.



Original article

Semi-synthesis of acylated triterpenes from olive-oil industry wastes for the development of anticancer and anti-HIV agents



Andres Parra^{a,*}, Samuel Martin-Fonseca^a, Francisco Rivas^{a,**}, Fernando J. Reyes-Zurita^b, Marta Medina-O'Donnell^a, Antonio Martinez^a, Andres Garcia-Granados^a, Jose A. Lupiañez^{b,***}, Fernando Albericio^{c,d}

^a Departamento de Química Organica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain

^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain

^c Institute for Research in Biomedicine and CIBER BBN, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

^d School of Chemistry and Physics, University of KwaZulu-Natal, 4001 Durban, South Africa

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2013

Received in revised form

20 December 2013

Accepted 23 December 2013

Available online 8 January 2014

Keywords:

Triterpene

Oleanolic acid

Maslinic acid

Apoptosis

Anti-HIV

Green chemistry

ABSTRACT

A broad set of potential bioactive conjugate compounds has been semi-synthesized through solution- and solid-phase organic procedures, coupling two natural pentacyclic triterpene acids, oleanolic (OA) and maslinic acids (MA), at the hydroxyl groups of the A-ring of the triterpene skeleton, with 10 different acyl groups. These acyl OA and MA derivatives have been tested for their anti-proliferative (against the b16f10 murine melanoma cancer cells) and antiviral (as inhibitors of the HIV-1-protease) effects. Several derivatives have shown high levels of early and total apoptosis (up to 90%). Most of the compounds that exhibited anti-proliferative effects also generated ROS, probably involving the activation of an intrinsic apoptotic route. The only four compounds that did not cause the release of ROS could be related to the participation of a probable extrinsic activation of the apoptosis mechanism. A great number of these acyl OA and MA derivatives have proved to be potent inhibitors of the HIV-1-protease, the most active inhibitors having IC₅₀ values between 0.31 and 15.6 μM, these values being between 4 and 186 times lower than their non-acylated precursors. The potent activities exhibited in the apoptosis-activation processes and in the inhibition of the HIV-1-protease by some OA and MA acylated derivatives imply that these compounds could be used as new, safe, and effective anticancer and/or antiviral drugs.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The olive-oil industry produces a large volume of solid and liquid wastes, which require complex disposal problems and potential environmental pollution. In fact, olive-oil waste has historically been one of the biggest problems associated with this industry. Nevertheless, these residues are promising sources of diverse substrates, such as, phenolic compounds, oligosaccharides, manitol and two triterpenic acids (oleanolic and maslinic acids), which can be converted into value-added products. Thus, our starting vegetal material was the residue of both liquid and solid wastes from the two-phase industrial olive-oil extraction. The isolated triterpene compounds were oleanolic acid (3β-

hydroxyolean-12-en-28-oic acid, **OA**, **1**) and maslinic acid (2α,3β-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, **MA**, **2**) (Fig. 1), two natural pentacyclic triterpenoids widely found in nature [1–3]. A method to obtain large quantities of these triterpene acids from olive-mill wastes has been reported by our research group [4]. Both acids, and several closely related triterpene compounds, exhibit a wide range of biological activities, and some may be used in medicine [5–9]. These compounds could be useful to semi-synthesize other biologically or chemically valuable products [10,11]. Moreover, there is firm evidence supporting the beneficial effects of consuming olive oil, and **OA** and **MA** are two bioactive compounds contained in its residual waste [12].

Triterpenoids are natural products widely distributed among diverse organisms, including bacteria, fungi, yeasts, plants, and mammals. Nevertheless, the majority of triterpenes are found in plants, especially as glycoside derivatives (saponins). Pentacyclic triterpenes are a group of compounds which are broadly distributed throughout the plant kingdom and which can be classified into three major types based on their structural skeleton: oleanane,

* Corresponding author. Tel.: +34 958 240480; fax: +34 958 248437.

** Corresponding author. Tel./fax: +34 958 240479.

*** Corresponding author. Tel.: +34 958 243089.

E-mail addresses: aparra@ugr.es (A. Parra), frivas@ugr.es (F. Rivas), jlcara@ugr.es (J.A. Lupiañez).

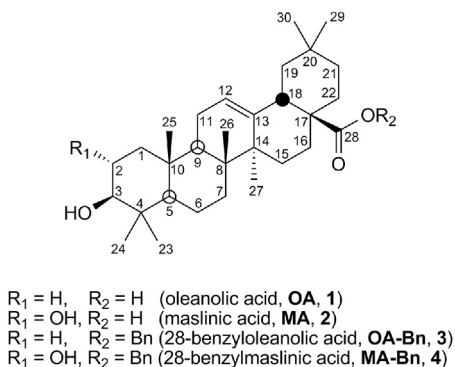


Fig. 1. Structures of compounds 1–4.

ursane, and lupine [13,14]. Biologically, these are the most important triterpenoid structures for their anti-inflammatory, anti-HIV, hepatoprotective, analgesic, antimicrobial, and virostatic properties [15–23]. Although some natural compounds of the terpenoid family have emerged as promising anti-HIV substances, importantly, their chemical modification may allow improvement of both their potency and selectivity in this assay [24–26]. The potential anti-HIV properties of diverse compounds can be tested using an FRET (fluorescence resonance energy transfer) HIV protease-inhibitor assay. This assay is considered an effective means for drug screening [27,28]. The continuous quantification of HIV-protease activity uses an FRET peptide, in which the fluorescence is quenched by a quencher group until the peptide is cleaved into two separate fragments.

Apoptosis or programmed cell death is a well-ordered and tightly regulated physiological process of cell self-destruction, with specific morphological and biochemical changes in the nucleus and cytoplasm, which plays a crucial role in the development of cancer. Apoptotic death is known to involve a cascade of proteolytic events driven mainly by a family of cysteine proteases, called caspases. Defects in apoptotic pathways contribute fundamentally to a range of disease states. Agents that suppress the proliferation of malignant cells, by inducing apoptosis, may represent a useful mechanistic approach to both chemoprevention and chemotherapy of cancer. The discovery of small-molecule drugs capable of inducing apoptosis in cancer cells is a fundamental and a highly attractive goal. Pro-apoptotic agents would be expected to have beneficial effects compared to existing cancer therapeutics [29–31]. Recently, our research group has demonstrated that some MA derivatives induce noteworthy apoptosis in b16f10 murine melanoma cells, and therefore they may be considered valuable molecules for their use as anti-proliferative agents [32]. MA also shows anti-tumour effects in Caco-2 and HT29 colon-cancer cell lines [33,34], and in the astrocytoma cell line [35], via mitochondrial or intrinsic apoptotic pathway [36,37]. In addition, our group has demonstrated for the first time, that the MA can modify certain cytoskeleton proteins of HT29, which is one of the bases of their anti-proliferative activity against colon-cancer cells [38], as well as the effectiveness of MA as a potential chemopreventive against colorectal cancer when used against the development of intestinal tumours in the $Apc^{Min/+}$ mice model [39]. MA also displays cytotoxic effects in different tumour-cell lines: non-small lung cells, ovary, melanoma, central nervous system, and colon [40].

During apoptotic activation, two major pathways have been described: the mitochondrial or intrinsic pathway, and the death-receptor or extrinsic pathway. The intrinsic pathway involves mitochondrial disruption, changing the mitochondrial-membrane

potential and the release of ROS (reactive oxygen species) [41,42]. This apoptotic route involves the mitochondria-dependent activation of initiator caspases, which in turn activates downstream executive caspases, such as caspase-3. The extrinsic death-receptor pathway is triggered by death ligands through the formation of the death-inducing signalling complex that results in caspase-8 and caspase-10 activation, triggering downstream apoptotic signalling [43,44]. An initial release of ROS accompanied by apoptosis induction could indicate the activation of the intrinsic apoptotic pathway, whereas that apoptotic induction without the release of ROS would suggest the activation of the extrinsic apoptotic pathway. The evaluation of the levels of ROS, at the cytotoxic and apoptotic concentrations, can help to determine the possible molecular mechanism involved in the apoptotic response found against the different compounds tested.

A major aim in the field of diversity-oriented synthesis is the effective production of small-molecule libraries to undertake new biological probes and to discover new therapeutic leader compounds [45]. Terpenoids have long served as important small-molecule drugs, leading to drug discoveries [46,47]. In fact, terpenoid cores are prevalent among privileged scaffolds able to bind multiple biological targets, and a variety of terpenoid-based libraries have been reported [48,49]. Combinatorial chemistry represents the possibility of synthesizing and testing a large number of compounds for their bioactivity simultaneously, instead of one by one [50,51]. On the other hand, the SPOS (solid-phase organic synthesis) is a powerful tool in the synthesis of small molecules to discover new remarkable pharmacological compounds. In this synthetic technique, the derivatives are synthesized by using an excess of reagents to drive reactions to completion, being isolated easily by simple filtration and removed from the support material [49]. The SPOS has a principal advantage during synthesis in solution, which facilitates the purification process, allowing automation of the whole synthesis. However, SPOS also presents some major disadvantages; for example, it can be problematic to adapt some conventional solution reactions to a solid-phase process. There are only few articles related to the solid-phase of triterpenoids by attaching a solid support to the C-28 position [52–54]. This methodology would not only serve to protect the carboxyl group, but also could simplify the entire synthesis procedure.

In the present paper, we have carried out the semi-synthesis of a number of oleanolic and maslinic acid derivatives, starting from these natural compounds isolated from olive-oil wastes. This preparation has been made using solution-phase organic synthesis processes, which have been compared with the corresponding solid-phase organic synthesis ones. Previously, we have also tested the degree of incorporation of OA and MA to the solid support employed. Finally, these acyl OA and MA derivatives were also tested in a screening mode, for different potential bioactivities such as anticancer and anti-HIV properties. The main purpose of this study is to determine the bioactive potential of these acyl OA and MA derivatives as anti-proliferative and pro-apoptotic compounds as well as anti-virals on HIV-serine protease. With respect to the anticancer properties, we firstly determined the cytotoxic potential of the different derivatives against the murine melanoma cell line b16f10, and we secondly investigated whether the cytotoxicity of the most effective compounds was caused by the induction of apoptosis. We also determined the levels of ROS, proposing a plausible molecular mechanism for its apoptotic effects. Finally, we have performed HIV-protease inhibition assays, being the action of the acyl derivatives of the triterpene acids, much more potent than that of the natural precursor compounds. Hence, these derivatives may represent an effective therapeutic strategy for treating cancer or HIV infection.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

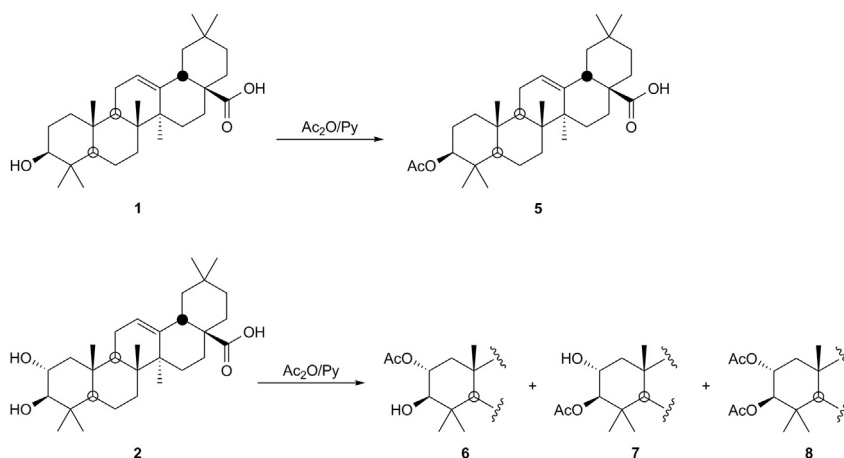
Oleanolic acid (**1**, 3 β -hydroxyolean-12-en-28-oic acid, **OA**) [1] and maslinic acid (**2**, 2 α ,3 β -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, **MA**) [2] are natural compounds belonging to the pentacyclic triterpene family and are widely distributed in the plant kingdom. In our case, these compounds were isolated from the olive-pressing residues by extraction processes with different solvents [4]. These triterpenoid acids were benzylated by treatment with benzyl chloride to obtain the corresponding derivatives **3** (28-benzyleoleanolic acid, **OA-Bn**) and **4** (28-benzylmaslinic acid, **MA-Bn**) (Fig. 1). Both compounds were easily recognizable from their spectroscopic properties, since in their ^1H and ^{13}C NMR spectra appeared the signals of the benzyl methylene group (δ_{H} 5.05, 2H, AB system, $J = 12.0$ Hz, and δ_{C} 66.15, respectively in both compounds), which matched those found in the literature [32,55].

2.1.1. Solution-phase acylations of triterpenes 1–4

To compare the acylation process, in different phases and conditions, of **OA** (**1**) and **MA** (**2**), we proceeded to test their acetylation in solution-phase at diverse times and under different temperature conditions. The acetylation reactions of **OA** and **MA** were carried out with acetic anhydride in pyridine, consistently using an excess of 4:1 of the acylating agent with respect to the hydroxyl group (Scheme 1). The composition of the different acetylation mixtures was studied using HPLC (Tables 1 and 2).

In this acetylation process in the solution-phase, **OA** was acetylated to form the 3-acetyl derivative **5** [56] in good yields (80–95%), even at rt (Table 1). In the acetylation reaction of **MA** (**2**), three derivatives were formed: 2-acetyl-MA (**6**), 3-acetyl-MA (**7**), and 2,3-diacetyl-MA (**8**) [57]. This acylation process was conducted at several reaction times and temperatures, improving the yield of the double acetylated derivative (**8**) with the increase in the temperature and reaction time (80% at 24 h at rt, and 90% at 1 h and reflux) (Table 2).

Once the reaction conditions (24 h at rt) for the acetylations of **OA** and **MA** were optimized, we carried out the semi-syntheses in solution-phase of several derivatives of compounds **1–4**, by acylation of the hydroxyl groups of the A-ring with 10 acid anhydrides (Fig. 2), to later check their biological properties. The acyl groups were selected with a wide structural variety in order to obtain acylated derivatives of **OA** and **MA** with diverse physical and chemical characteristics. Thus, acyl groups I–V have an increasing number of carbon atoms, and therefore the polarity decreases



Scheme 1. Acetylation tests of **OA** and **MA** in the solution-phase.

Table 1
Solution-phase acetylation of **OA**.

Time (h)	Temperature	Compound			
		OA (1)		3-Acetyl- OA (5)	
		Yield (%)	R_t (min)	Yield (%)	R_t (min)
0.5	Reflux	8.9	9.72	91.1	13.89
1	Reflux	5.6		94.4	
12	rt	18.4		81.6	
24	rt	5.3		94.7	

Table 2
Solution-phase acetylation of **MA**.

Time (h)	Temp. (h)	Compound							
		MA (2)		2-Acetyl- MA (6)		3-Acetyl- MA (7)		2,3-Diacetyl- MA (8)	
		Yield (%)	R_t (min)	Yield (%)	R_t (min)	Yield (%)	R_t (min)	Yield (%)	R_t (min)
0.5	Reflux	10.3	4.69	20.7	6.93	9.2	8.56	59.8	10.12
1	Reflux	6.2		2.2		1.7		89.9	
12	rt	9.7		30.8		19.0		40.5	
24	rt	4.3		14.1		0.8		80.8	
12	0 °C	45.3		30.8		20.1		3.8	
24	0 °C	10.5		44.6		30.2		14.7	

progressively from the acetyl to the lauroyl group. On the other hand, acyl groups VI and VII have aromatic rings, and phthaloyl group (VII) also another carboxylic group at the end of the carbon chain. Finally, acyl groups VIII–X, derived from succinic and glutaric anhydrides, also have an additional carboxylic group that conferred them with singular polarity and solubility properties.

The above-mentioned acylated derivatives were formed by treating the compounds **1–4** with the corresponding acid anhydride in pyridine for 24 h at rt, in a relationship of 4:1 (anhydride:hydroxyl group). Thus, we obtained 57 acylated derivatives (**9–65**), given in Figs. 3 and 4.

The main spectroscopic differences between the acylated compounds (**9–27**) and the corresponding substrates (**OA** (**1**), and **OA-Bn** (**3**)) were the important deshieldings of the signals of the geminal protons to the hydroxyl group at C-3 (^1H spectra), and the notable variations in the chemical shifts of C-3 (^{13}C spectra). Thus, the signal of the geminal proton of H-3 for **OA** and **OA-Bn** was situated at δ_{H} 3.19 and 3.18, respectively, whereas the same signal was deshielded up to δ_{H} 4.40–4.50 for the derivatives with the acyl group I–V and VIII–X, and up to δ_{H} 4.70–4.80 for the acyl groups VI and VII (aromatic ring). In the same way, the chemical shift of C-3

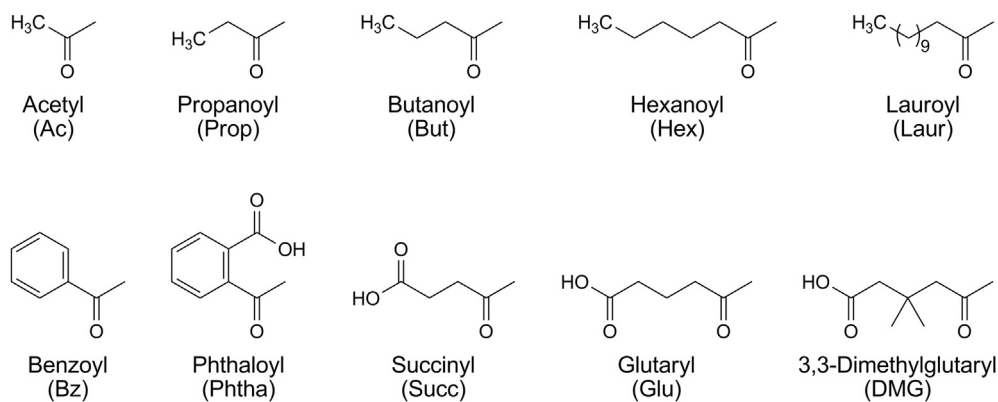
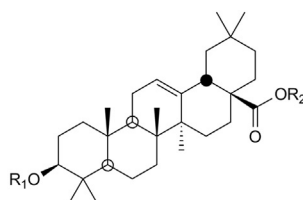


Fig. 2. Structures of the acyl groups used for the acylations of **OA** and **MA**.



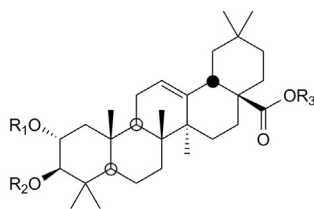
Compound	R ₁	R ₂	Yield (%)	Compound	R ₁	R ₂	Yield (%)
9	Propanoyl	H	83	18	Acetyl	Bn	89
10	Butanoyl	H	87	19	Propanoyl	Bn	85
11	Hexanoyl	H	90	20	Butanoyl	Bn	93
12	Lauroyl	H	73	21	Hexanoyl	Bn	90
13	Benzoyl	H	69	22	Lauroyl	Bn	91
14	Phthaloyl	H	93	23	Benzoyl	Bn	73
15	Succinyl	H	47	24	Phthaloyl	Bn	82
16	Glutaryl	H	59	25	Succinyl	Bn	51
17	3,3-Dimethylglutaryl	H	62	26	Glutaryl	Bn	67
				27	3,3-Dimethylglutaryl	Bn	65

Fig. 3. Structures of compounds **9–27** from the acylation of **OA**.

was situated at δ_C 78.69 for **OA** and δ_C 79.23 for **OA-Bn**, moving to δ_C 80–83 when this carbon was acylated.

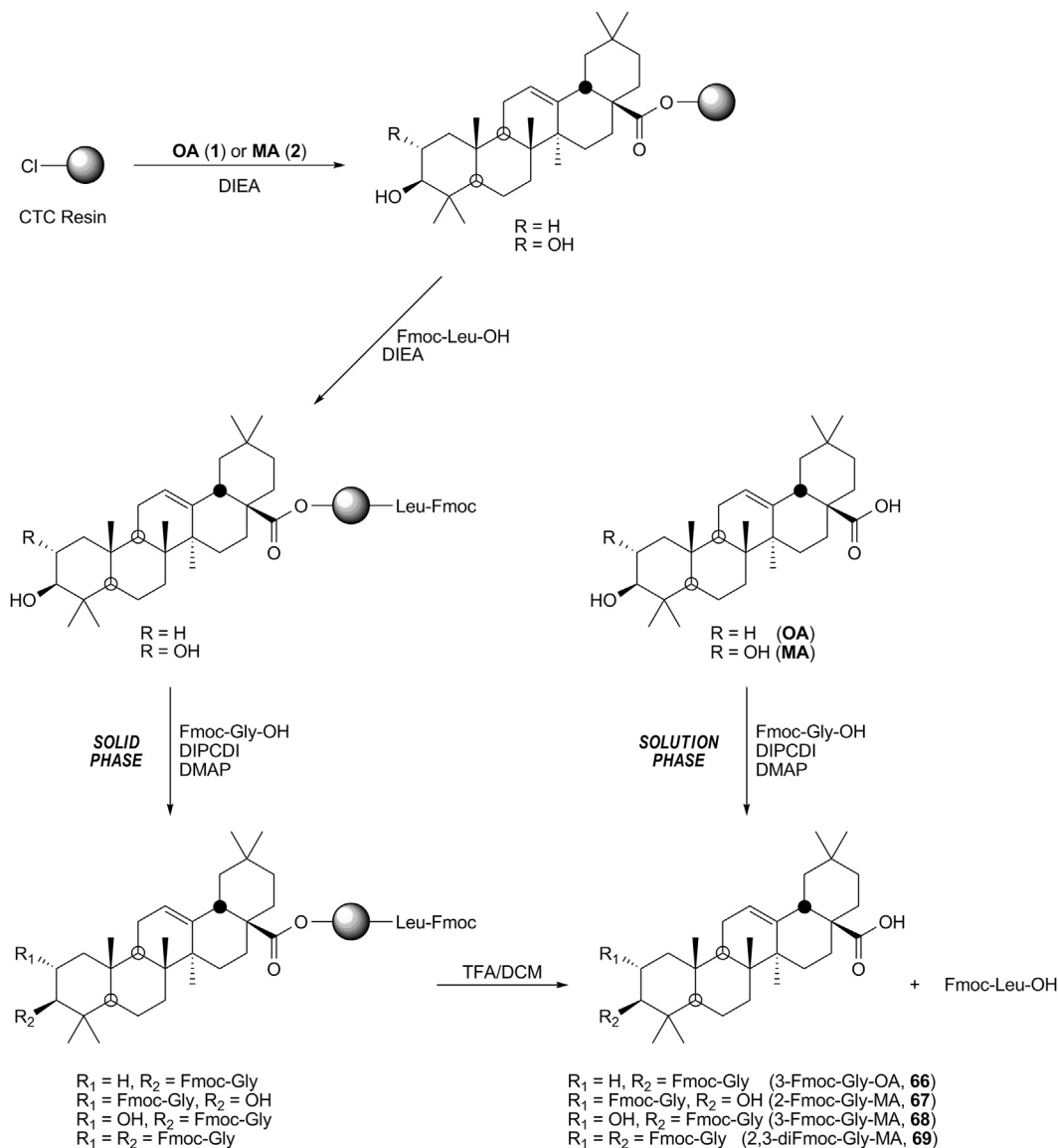
In the acylation processes of **MA** (**2**) and **MA-Bn** (**4**), using the optimized reaction conditions of 24 h at rt, the major 2-acyl

derivatives and 2,3-diacyl derivatives were formed, probably due to the increased steric hindrance of the hydroxyl group at C-3 by the presence of the geminal methyl groups on C-4. For this reason, the minor 3-acyl derivatives were not considered for this study. The



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	Yield (%)	Compound	R ₁	R ₂	R ₃	Yield (%)
28	Propanoyl	H	H	20	46	Acetyl	H	Bn	15
29	Propanoyl	Propanoyl	H	73	47	Acetyl	Acetyl	Bn	75
30	Butanoyl	H	H	15	48	Propanoyl	H	Bn	22
31	Butanoyl	Butanoyl	H	80	49	Propanoyl	Propanoyl	Bn	67
32	Hexanoyl	H	H	19	50	Butanoyl	H	Bn	10
33	Hexanoyl	Hexanoyl	H	70	51	Butanoyl	Butanoyl	Bn	79
34	Lauroyl	H	H	27	52	Hexanoyl	H	Bn	15
35	Lauroyl	Lauroyl	H	57	53	Hexanoyl	Hexanoyl	Bn	76
36	Benzoyl	H	H	37	54	Lauroyl	H	Bn	33
37	Benzoyl	Benzoyl	H	45	55	Lauroyl	Lauroyl	Bn	61
38	Phthaloyl	H	H	25	56	Benzoyl	H	Bn	35
39	Phthaloyl	Phthaloyl	H	40	57	Benzoyl	Benzoyl	Bn	51
40	Succinyl	H	H	30	58	Phthaloyl	H	Bn	27
41	Succinyl	Succinyl	H	33	59	Phthaloyl	Phthaloyl	Bn	55
42	Glutaryl	H	H	31	60	Succinyl	H	Bn	27
43	Glutaryl	Glutaryl	H	35	61	Succinyl	Succinyl	Bn	43
44	3,3-Dimethylglutaryl	H	H	33	62	Glutaryl	H	Bn	21
45	3,3-Dimethylglutaryl	3,3-Dimethylglutaryl	H	36	63	Glutaryl	Glutaryl	Bn	51
					64	3,3-Dimethylglutaryl	H	Bn	25
					65	3,3-Dimethylglutaryl	3,3-Dimethylglutaryl	Bn	47

Fig. 4. Structures of compounds **28–65** from the acylation of **MA**.



Scheme 2. Control and quantification of load of OA and MA to the CTC resin.

main ^1H NMR chemical shift differences between the acylated compounds (**28–65**) and the corresponding substrates (**MA (2)**, and **MA-Bn (4)**) were the position of the signals of H-2 and H-3, situated at δ_{H} 3.45 and 2.84 for **MA**, and at δ_{H} 3.59 and 2.89 for **MA-Bn**, respectively. However, in the corresponding 2-acyl derivatives, the H-2 signals were situated between δ_{H} 4.90–5.20, and for the 2,3-diacyl derivatives, the H-3 signals were deshielded up to δ_{H} 4.70–4.80 for the derivatives with the acyl group I–V and VIII–X, and up to δ_{H} 5.50–5.80 for the acyl groups VI and VII (aromatic ring). Additionally, the ^{13}C NMR chemical shifts of the signals of C-2 and C-3 were situated at δ_{C} 68.24 and 83.17 for **MA** and δ_{C} 68.98 and 83.90 for **MA-Bn**, respectively, whereas the C-2 signals were deshielded up to δ_{C} 73–74 for the 2-acyl derivatives, and up to δ_{C} 69–71 for the 2,3-diacyl derivatives. The C-3 signals were shielded down to δ_{C} 80–82 for both monoacylated and diacylated derivatives.

2.1.2. Solid-phase acylations of OA and MA

Several of these acylated derivatives (acetic, hexanoic, benzoic, and succinic) of **OA** and **MA**, were also semi-synthesized by solid-

phase processes. The 2-chlorotriptyl chloride polymer resin (Barlos resin, PL Cl-Trt-Cl resin, CTC resin) was chosen as the solid support, since this resin allows the release of the compounds by treatment under mild acidic conditions that do not affect the triterpene skeleton. First, it became necessary to study and to quantify the incorporation of **OA** and **MA** into this resin. Therefore, a sequence of chemical reactions was carried out using amino acids with an Fmoc (fluorenylmethoxycarbonyl) group incorporated, since this group absorbs at a wavelength (301 nm) that does not interfere with that of the other compounds. In this way, the above-mentioned triterpene acids were attached to the resin through its 28-carboxyl group, and later, a treatment was made with Fmoc-Leu-OH and MeOH to cap the resin. Afterwards, Fmoc-Gly-OH was attached to the hydroxyl groups of the A-ring, and finally, the resin was cleaved with TFA in DCM, producing free Fmoc-Leu-OH, and **OA** and **MA**, which incorporated Fmoc-Gly-OH in their hydroxyl groups (**66–69**). Additionally, to determine the better yield of triterpene acid loaded to the solid support, we made three tests with different proportions of **OA** and **MA** (0.5, 1.0, and 3.0 equiv with respect to the resin) (Scheme 2).

The incorporation of **OA** to the CTC resin was almost quantitative with 3 equiv of this triterpene acid. The maximum incorporation of **MA** into the resin was about a 92%, also with 3 equiv of this compound. This percentage was distributed between the C-2 derivative (68.1%), the C-2/C-3 derivative (17.2%), and the C-3 derivative (6.8%) (Table 3). This distribution of derivatives was reasonable, given that the C-3 hydroxyl group has more steric hindrance due to the presence of the angular methyl groups on C-4. This quantification was achieved by HPLC at 301 nm of absorbance, and the Fmoc-Gly-derivatives of **OA** and **MA**, used as reference compounds, were prepared via the solution-phase. Thus, the reaction of **OA** (**1**) with Fmoc-Gly-OH in DCM with DIPCDI and DMAP at reflux for 12 h, gave 3-Fmoc-Gly-OA (**66**) (Table 3 and Scheme 2). The ¹H NMR spectrum of this compound (**66**) presented the following deshielded signals: δ_{H} 4.01 (2H, d, $J = 3.5$ Hz, 2H-2' glycine methylene), 4.26 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-3'' proton of the cyclopentane ring of the Fmoc group), 4.43 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-2'' methylene of the Fmoc group), 4.62 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 7.5$ Hz, H-3), and 5.31 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz, H-12). In its ¹³C NMR spectrum the signals of the carbonyl and methylene groups of the glycine (δ_{C} 170.1 and 43.2), those of the carbonyl and methylene groups of the Fmoc group (δ_{C} 156.5 and 67.4), and those of C-3 and C-28 (δ_{C} 82.8 and 184.0), were detected.

The reaction of **MA** (**2**) with Fmoc-Gly-OH in DCM with DIPCDI and DMAP at rt for 24 h, gave 2-Fmoc-Gly-MA (**67**), 3-Fmoc-Gly-MA (**68**), and 2,3-diFmoc-Gly-MA (**69**) (Table 3 and Scheme 2). The NMR spectra of compounds **67** and **68** differed only in the signals of H-2/C-2 and H-3/C-3. In the ¹H NMR spectrum of **67**, the signal of H-2 appeared at δ_{H} 5.06 and that of H-3 at δ_{H} 3.19, whereas for **68**, the signals of these protons were detected at δ_{H} 3.80 and 4.60, respectively. In the ¹³C NMR spectrum of **67**, the signal of C-2 appeared at δ_{C} 74.9 and that of C-3 at δ_{C} 80.7, whereas for **68**, the signals of these carbons were detected at δ_{C} 67.3 and 86.6, respectively. The doubly substituted derivative 2,3-diFmoc-Gly-MA (**69**) had a ¹H NMR spectrum in which the signal of H-2 appeared at δ_{H} 5.34, and that of H-3 at δ_{H} 4.80. In the ¹³C NMR spectrum of **69**, the signal of C-2 was placed at δ_{C} 71.0 and that of C-3 at δ_{C} 82.1.

The acid anhydrides selected to carry out the acylation reactions in solid-phase were: acetic, hexanoic, benzoic and succinic. First, **OA** and **MA** were incorporated into the resin under the above-described optimized conditions (3 equiv of the triterpene acid). After this, the four selected acid anhydrides were added to the corresponding syringe in a molar relationship of 4:1 (anhydride:hydroxyl group), in the presence of DMAP and Et₃N. Finally, after 24 h of orbital stirring at rt, the resin was cleaved with TFA/DCM, and the residue was analyzed by HPLC (Scheme 3).

The solid-phase acylation reactions of **OA** (**1**) with the acetic and hexanoic anhydrides were almost completed in 30 min. However,

the nearly complete benzoylation process of **OA** (94.8%) required 4 h of reaction time, and the acylation with succinic anhydride was much more difficult and slow, reaching a yield of only 53.7% after 48 h of reaction (Table 4).

The solid-phase acylations of **MA** (**2**) with the same four acid anhydrides provided more complex mixtures of compounds because of the presence of the two hydroxyl groups in the A-ring of the substrate (**2**). Nevertheless, the acylation reactions with the more apolar and aliphatic acid anhydrides (acetic and hexanoic) only gave the doubly acylated compounds (**8** and **33**, respectively) in 2 h. The benzoylation process took place more slowly, requiring 24 h for a yield of 94.9% of the doubly benzoyl derivative (**37**). In this acylation reaction, we identified the 2-benzoyl derivative (**36**) but did not detect the possible 3-benzoyl derivative. Finally, the solid-phase succinylation of **MA** yielded 81.1% of the diacylated derivative (**41**) after 48 h of reaction. This yield was higher than the one reached in the formation of the succinyl derivative of **OA** (**15**). The succinylation reaction of **MA** probably first formed the 2-succinyl derivative (**40**), which seems to help the entry at the more hindered C-3 hydroxyl group, and therefore the doubly acylated compound (**41**) gave very high yield. In this case, we also detected very low proportions of what may be a possible 3-succinyl derivative of **MA** (Table 5).

In these acylation studies, we found that the acylated derivatives of **OA** and **MA** that were achieved from a cyclic acid anhydride (phthalic, succinic, glutaric, and 3,3-dimethylglutaric) were compounds of very difficult chromatographic isolation and also of complicated spectroscopic identification, due to the presence of two or three free carboxylic groups in the molecule. Therefore, to avoid these experimental problems, we selected the succinyl derivatives to study the protection of the free carboxylic groups, through a benzoylation reaction. Accordingly, when **OA** (incorporated to the resin) was succinylated in solid-phase, cleaved from the resin, and benzylated with benzyl chloride, the corresponding benzyl oleanolate (**3**, 40%), and benzyl 3-(benzylsuccinyl) oleanolate (**70**, 55%) were formed (Scheme 4). The NMR spectra of **70** presented the characteristic signals of a doubly benzylated compound, 10 aromatic protons at δ_{H} 7.36–7.35, two AB systems at δ_{H} 5.13 and 5.07, 12 aromatic carbons between 136 and 128 ppm, and two methylene groups at δ_{C} 66.5 and 65.9 (see the Experimental Section). In a similar process, **MA** was also succinylated and benzylated to give: benzyl maslinate (**4**, 6%), benzyl 2-(benzylsuccinyl) maslinate (**71**, 8%), benzyl 3-(benzylsuccinyl) maslinate (**72**, 6%), and benzyl 2,3-di(benzylsuccinyl) maslinate (**73**, 74%) (Scheme 4). The benzylsuccinyl derivatives of **MA** (**71–73**) were also easily chromatographically separated, and identified from their NMR properties. Hence, with these benzoylation reactions the proportions of succinylated derivatives achieved from the solid-phase succinylation of **OA** and **MA** could be determined more accurately.

2.2. Cytotoxicity

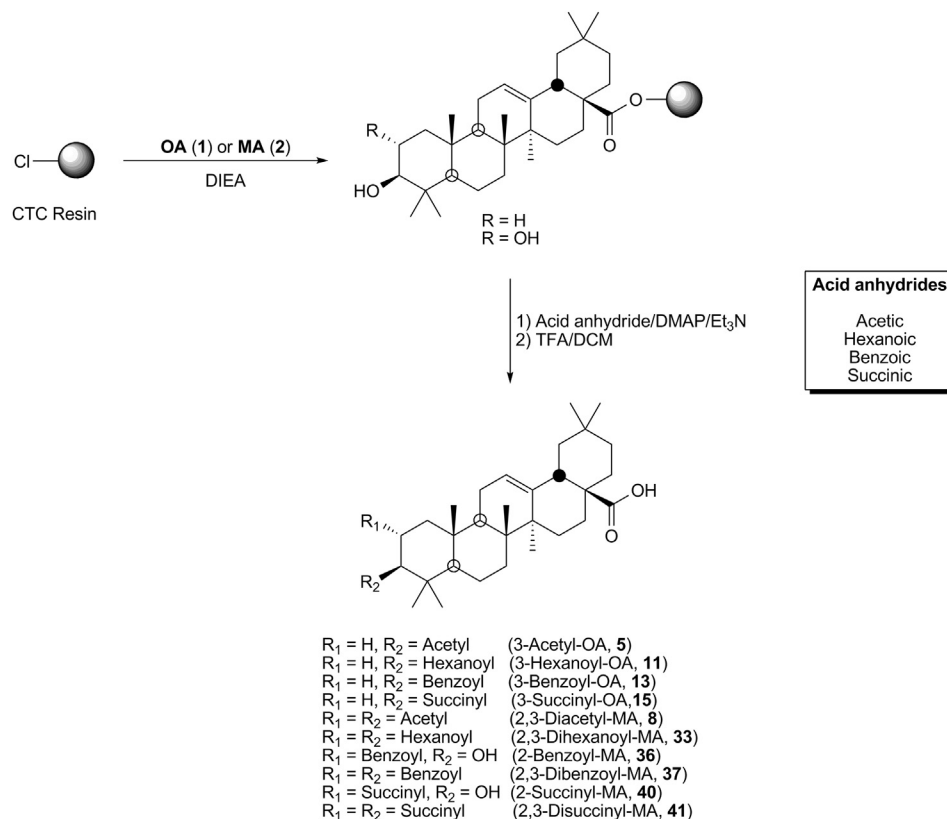
We determined the bioactive potential of these semi-synthesized oleanolic and maslinic acid derivatives (**1–65**), as anti-proliferative and pro-apoptotic compounds, and as anti-virals on HIV-serine protease (Fig. 5).

Cytotoxicity effects have been previously described in a wide variety of pentacyclic triterpenes, involving a mechanism that implied MAPK (mitogen-activated protein kinases), death receptor, and mitochondrial disruption [19,33]. Also, the cytotoxic effects of 3-O-acyl derivatives of several pentacyclic triterpenes have been described [58,59].

We examined the effects of the semi-synthesized acylated **MA** and **OA** derivatives on the proliferation of b16f10 cell line using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

Table 3
Tests of incorporation of the triterpenic acids to the CTC resin.

Test incorporation OA to the resin	Equivalents of OA respect to the resin		
	0.5 equiv	1 equiv	3 equiv
Fmoc-Leu-OH ($R_t = 11.59$ min)	32.2%	13.9%	1.1%
Fmoc-Gly-OA (66) ($R_t = 34.74$ min)	67.8%	86.1%	98.9%
Test incorporation MA to the resin	Equivalents of MA respect to the resin		
	0.5 equiv	1 equiv	3 equiv
Fmoc-Leu-OH ($R_t = 11.61$ min)	39.4%	17.8%	7.9%
2-(Fmoc-Gly)-MA (67) ($R_t = 31.84$ min)	55.8%	67.3%	68.1%
3-(Fmoc-Gly)-MA (68) ($R_t = 33.42$ min)	1.9%	3.8%	6.8%
2,3-di(Fmoc-Gly)-MA (69) ($R_t = 35.82$ min)	2.9%	11.1%	17.2%



Scheme 3. Solid-phase acylation reactions of **OA** and **MA**.

bromide) assay. Thus, these murine melanoma cells were treated with increasing doses (range 0–80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of each derivative, and their viability was determined by formazan dye uptake, and expressed as a percentage of untreated control cells. The results of these assays showed that only some 24% of the compounds tested (**1–65**) displayed cytotoxic effects on this cell line. The numbers and structures of these cytotoxic compounds and their IC_{50} values are given in Table 6. Comparing the IC_{50} data for **OA** (106.4 μM) and **MA** (36.2 μM), we deduce that the hydroxyl group at C-2 enhances the cytotoxicity of this compound (**2**). Furthermore, considering the IC_{50} data for **OA** and **MA**, and those of their corresponding 28-benzyl derivatives (**3** and **4**), we find that benzylation reduces the IC_{50} concentrations by about 50% (Table 6).

The acyl OA derivatives with cytotoxic effects were only compounds **5**, **9**, and **13**, and only the acetyl derivative (**5**, $\text{IC}_{50} = 64.7 \mu\text{M}$) showed a lower IC_{50} concentration than its precursor (**1**). Nevertheless, the acyl 28-benzyl OA derivatives (**24–27**) with cytotoxic effects (IC_{50} from 14.2 to 29.9 μM), showed an IC_{50} underneath its precursor (**3**). In terms of structure–activity relationship (SAR), the better cytotoxic results for the acyl OA derivatives were achieved when the acyl group at C-3 (R_2) was a polar dicarboxylic fragment, such as phthaloyl, succinyl, glutaryl, or 3,3-dimethylglutaryl (compounds **24–27**), and a benzyl group was placed at the carboxylic group (R_3) (Table 6 and Chart 1).

The acyl MA derivatives (**8**, **30**, and **32**) exhibited relatively low cytotoxicity (IC_{50} from 34.6 to 106.6 μM), although in the same range as found in its precursor (**2**). Similarly, several acyl 28-benzyl MA derivatives (**46**, **58**, **62**, and **64**) showed low IC_{50} (from 28.3 to 73.2 μM), but above of its precursor (**4**). The acyl MA derivatives that showed cytotoxicity had only one acyl group at C-2 (R_1), whereas the hydroxyl group at C-3 (R_2) was free, except the diacetyl derivative **8**. The presence of double acyl groups at C-2 (R_1) and at

C-3 (R_2) in the acyl MA derivatives appears to inhibit the cytotoxicity of these compounds. The exception observed with the diacetyl derivative **8** may be due to the small size of this acyl group (Table 6 and Chart 1). Chart 1 shows a comparison of the growth-inhibitory effects of the acyl OA and MA derivatives on b16f10 murine melanoma cells, describing the ratio between the IC_{50} values of the triterpene precursors (**OA**, **MA**, **OA-Bn** and **MA-Bn**) and the IC_{50} values of their cytotoxic acyl derivatives (last column of Table 6).

Several cytometry studies, described below, were made to determine the apoptotic properties of the compounds tested (**1–65**). The *in vitro* IC_{50} growth-inhibitory concentrations of the new semi-synthesized compounds were, in many cases, similar of those of their precursors (**1–4**), but sufficiently low to investigate their apoptotic properties.

2.3. Apoptosis

Different types of pentacyclic triterpenoids have shown anti-cancer properties ranging from inhibition of tumour-cell proliferation, induction of apoptosis, suppression of angiogenesis, and metastasis. These triterpenoids have the ability to suppress various key steps of initiation, progression, and promotion of tumours, and therefore have the potential for use in both chemoprevention and therapy of various cancers with several common molecular targets [33,60]. Recently, the anticancer properties of a 3-O-acyl derivative of a pentacyclic triterpene have been reported [61].

The apoptotic determination assays were conducted through double staining with An-V (annexin V) conjugated FITC (fluorescein isothiocyanate) and PI (propidium iodide). Early events in the apoptotic processes are loss of plasma-membrane asymmetry accompanied by translocation of PS (phosphatidylserine) from the inner to the outer membrane leaflet, thereby exposing PS to the

Table 4
Solid-phase acylation of OA.

Time (h)	Acyl group	Compound			
		OA		3-Acyl-OA	
		Yield (%)	R _t (min)	Yield (%)	R _t (min)
0.5	Acetyl	1.5	9.5	98.3	14.1
0.5	Hexanoyl	1.1		96.4	22.4
2	Benzoyl	23.5		75.1	25.0
4		3.2		94.8	
2	Succinyl	94.4		2.5	9.0
4		90.1		6.8	
8		79.6		18.2	
24		59.8		36.9	
48		43.6		53.7	

external environment. The phospholipid-binding protein annexin V has a high affinity for PS and binds to cells fluorescently labelled with FITC. The percentages of apoptosis were determined with annexin V–FITC/PI flow-cytometric analysis. Apoptosis in b16f10 cells was assessed 72 h after treatment with the different previously cytotoxic OA and MA derivatives at the IC₅₀ concentrations before administered (Table 6), and at the IC₅₀ × 2 concentrations (twice IC₅₀ concentrations. ×2 values corresponding to 50% viability). FACS (flow-activated cell sorter) analysis using annexin V–FITC staining and PI accumulation was used to differentiate early apoptotic cells (An-V⁺ and PI⁻) from late apoptotic (An-V⁺ and PI⁺), necrotic (An-V⁻ and PI⁺) or normal cells (An-V⁻ and PI⁻).

All the cytotoxic compounds showed apoptotic effects on the treated cells with a high percentage of total apoptosis between 51 and 95% at IC₅₀ concentration, except product **62** (25.2% of total apoptosis), and between 60 and 98% at IC₅₀ × 2 concentrations (Table 7). In addition, the percentages of the necrotic population for all these acyl OA and MA derivatives were irrelevant. Several compounds (**9**, **24**, **25**, **27**, **30**, and **46**) showed a total apoptosis above 70%, at its IC₅₀ concentrations; three of these were the acyl 28-benzyl OA derivatives (**24**, **25**, and **27**) with a polar dicarboxylic substituent at C-3 (R₂), which displayed the most cytotoxic properties. Ten compounds (**8**, **24**–**27**, **30**, **32**, **46**, **58**, and **64**) showed a percentage of total apoptosis above 80%, at its IC₅₀ × 2 concentrations, higher percentages corresponding to compounds with a benzyl group blocking the carboxylic group of the triterpene skeleton, and a polar dicarboxylic acyl substituent at C-2 (R₁) or C-3 (R₂). In addition, seven of the compounds tested (**9**, **24**, **27**, **30**, **32**, **46**, and **58**) showed a higher percentage of early apoptosis than late apoptosis, at its IC₅₀ concentrations (between 42 and 66% of total cell population), whereas nine compounds (**9**, **24**–**27**, **30**, **32**, **46**, and **62**) did (between 44 and 74% of total cells) at its IC₅₀ × 2 concentrations (Table 7 and Chart 2). Fig. 6 presents the diagrams of

annexin V/propidium iodide flow-cytometry for three of the compounds that display higher apoptotic cell populations (**24**, **25**, and **46**).

Though the structure–activity relationship of these OA and MA derivatives was not absolutely well defined, it seems that the presence of a benzyl group blocking the carboxylic group at C-28 and a polar dicarboxylic acyl substituent at C-2 (R₁) or C-3 (R₂), enhanced the apoptotic properties of these derivatives, compared with the corresponding precursors. The potent activities on the apoptosis-activation process reached by these derivatives suggest that they could be used as anticancer drugs.

2.4. ROS production

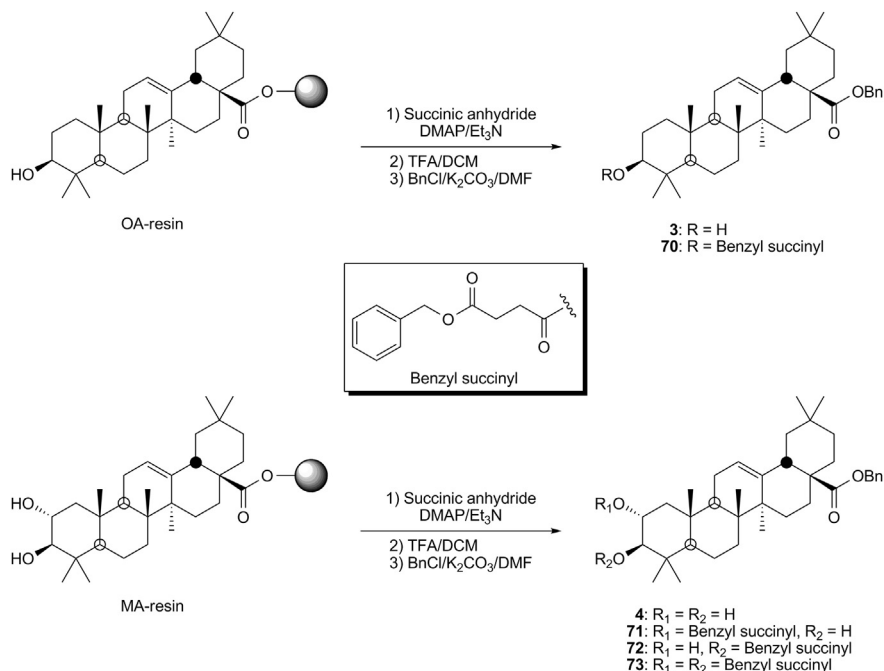
Mitochondria constitute a key target in synthetic and natural triterpenoids [7]. Pentacyclic triterpene compounds have proved to be able to activate the intrinsic apoptotic pathway, mediated with mitochondrial disruption [36,37], and the extrinsic apoptotic pathway [33], mediated by an enhanced receptor [62]. The over production of ROS in OA and MA treatment on several cancer cell lines has also been reported [34,35,63]. Changes in the mitochondrial-membrane potential can be examined by monitoring the cell fluorescence after double staining with Rh123 (rhodamine 123) and PI (propidium iodide). Rh123 is a membrane-permeable fluorescent cationic dye that is selectively taken up by mitochondria directly proportional to the MMP (mitochondrial-membrane permeabilization) [64]. Most studies on the apoptotic molecular mechanism show that when the intrinsic apoptotic mechanism is activated, a rapid production of the ROS is generated by the mitochondrial disruption, although this also can be triggered in the final steps of extrinsic apoptotic activation if the initiator caspases 8 or 10 [65,66].

We analyzed the ROS production to elucidate the possible mechanism involved in the apoptotic responses in the b16f10 mouse melanoma cells to the acyl OA and MA derivatives, at the same times and concentrations of the cytotoxic and apoptosis responses. These studies were performed to determine whether ROS generation occurs simultaneously or not with apoptosis. If so, the mitochondrial disruption would be implicated in the apoptotic response, but if not the apoptosis could be caused by the extrinsic apoptotic-route activation. Changes in the MMP were analyzed by flow-cytometry after staining with Rh123.

The results at the IC₅₀ concentration, showed strong Rh123 fluorescence intensity in the response in many of the compounds tested, except for compounds **24**, **25**, **26**, and **58** (Chart 3). From these results, it can be interpreted that compounds **5**, **8**, **9**, **13**, **27**, **30**, **32**, **46**, **62**, and **64** caused mitochondrial disruption in the activation of apoptosis, whereas in the compounds **24**, **25**, **26**, and **58**, the

Table 5
Solid-phase acylation of MA.

Time (h)	Acyl group	Compound							
		MA		2-Acyl-MA		3-Acyl-MA		2,3-Diacyl-MA	
		Yield (%)	R _t (min)	Yield (%)	R _t (min)	Yield (%)	R _t (min)	Yield (%)	R _t (min)
2	Acetyl	1.2	4.7	0.0	–	0.0	–	96.4	10.0
2	Hexanoyl	0.8		0.0	–	0.0	–	97.1	24.9
2	Benzoyl	2.2		47.3	10.1	0.0	–	49.4	19.8
4		1.8		32.9		0.0		64.3	
8		1.1		23.7		0.0		73.9	
24		0.6		3.4		0.0		94.9	
2	Succinyl	32.5		41.2	3.7	1.7	1.3	23.4	1.5
4		27.6		31.5		2.4		37.1	
8		18.4		20.1		3.8		56.3	
24		10.2		14.5		4.2		69.2	
48		6.3		7.1		4.8		81.1	



Scheme 4. Solid-phase succinylation reactions and consecutive solution-phase benzoylation reactions of **OA** and **MA**.

induction of apoptosis was not concomitant with the ROS generation. The results found at the IC₅₀ × 2 concentration were very similar to those found at the IC₅₀ concentration, and showed the generation or not of ROS for the same compounds. These results could be related with an extrinsic activation of the apoptosis mechanism for compounds **24**, **25**, **26**, and **58**, and the others by the intrinsic apoptotic-route activation. In any case, further molecular studies in this sense will be necessary to confirm this assertion.

Fig. 7 shows the diagram of Rh123/PI flow-cytometry, for the compounds with minor (**24** and **25**) and with major (**32** and **62**) Rh123 staining. The Rh123/PI labelling of b16f10 cells was carried out as described in the experimental section. This diagram indicates that, for compounds **24** and **25** (negative ROS production), the major cell population was distributed into the Q₁ and Q₃ left quadrants, whereas for compounds **32** and **62** it was contained into the Q₂ and Q₄ right quadrants.

Finally, we can conclude that, although the ROS production structure–activity relationship was not absolutely clear, the compounds in which the ROS production was totally or partially negative had a polar dicarboxylic substituent at C-2 (R₁), and a benzyl group blocked the carboxyl group at C-28 of the triterpene skeleton.

2.5. Anti-HIV-1-protease activity

Pentacyclic triterpenes have been found to exhibit anti-HIV activities. The modes of action of the anti-HIV triterpenes have been reported to be associated with virus entry, reverse transcription, virus assembly, and maturation [67]. In many cases, the anti-HIV maturation activity has been associated with the presence of an acyl group at C-3 of the pentacyclic triterpene skeleton [24,26,68–70], whereas a side chain at C-28 has been related with the anti-HIV-1 entry activity [53,71].

The determination of the concentration of the products that account for the inhibition of 50% activity of HIV-1-protease or the IC₅₀ concentration using the FRET (fluorescence resonance energy transfer) technique with a fluorescence resonance energy transfer peptide. The different compounds were considered to be inhibitors of the HIV-1-protease when their IC₅₀ values were within the concentration range (0–1200 μg/mL). The results from this test for all the acyl OA and MA derivatives (**1–65**) showed strong inhibitory capacity of the HIV-1-protease by the 38% of the compounds (Table 8 and Chart 4). From the set of the acyl OA derivatives assayed, only five compounds (**5**, **14**, **16**, **17**, and **24**) presented anti-HIV activity. Most of the active acyl OA derivatives had a polar

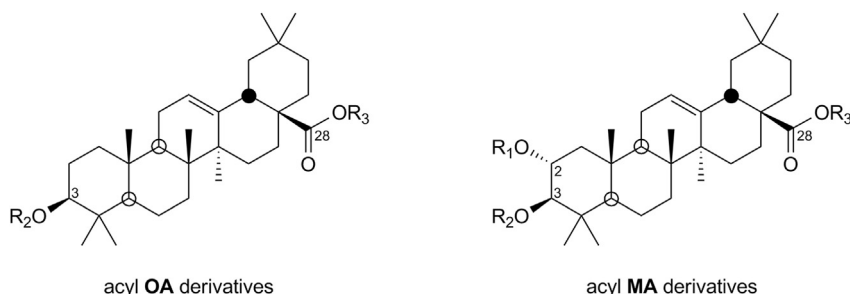


Fig. 5. General structures of the tested acyl OA and MA derivatives.

Table 6
Growth-inhibitory effects of acyl OA and MA derivatives on b16f10 murine melanoma cells.

Comp. #	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ concentration (μM) ^a	IC ₅₀ of precursor/IC ₅₀ of compound # ^b
OA (1)	–	H	H	106.4 ± 3.7	1.0
5	–	Acetyl	H	64.7 ± 2.8	1.6
9	–	Propanoyl	H	161.1 ± 9.8	0.7
13	–	Benzoyl	H	162.1 ± 18.4	0.7
OA-Bn (3)	–	H	Bn	52.2 ± 0.9	1.0
24	–	Phthaloyl	Bn	26.8 ± 0.9	1.9
25	–	Succinyl	Bn	23.2 ± 0.3	2.3
26	–	Glutaryl	Bn	29.9 ± 0.9	1.7
27	–	3,3-Dimethylglutaryl	Bn	14.2 ± 1.0	3.7
MA (2)	H	H	H	36.2 ± 3.8	1.0
8	Acetyl	Acetyl	H	44.1 ± 3.8	0.8
30	Butanoyl	H	H	106.6 ± 11.3	0.3
32	Hexanoyl	H	H	34.6 ± 2.1	1.0
MA-Bn (4)	H	H	Bn	19.0 ± 0.2	1.0
46	Acetyl	H	Bn	39.6 ± 0.8	0.5
58	Phthaloyl	H	Bn	73.2 ± 2.4	0.3
62	Glutaryl	H	Bn	63.2 ± 2.1	0.3
64	3,3-Dimethylglutaryl	H	Bn	28.3 ± 1.1	0.7

^a The IC₅₀ values were calculated considering control untreated cells as 100% of viability. Cell-growth inhibition was analyzed by the MTT assay, as described in the Experimental section. All assays were made four times using six replicates. Values, means ± S.E.M.

^b The last column represents the ratio between the IC₅₀ of each precursor (**OA**, **OA-Bn**, **MA** or **MA-Bn**) and the IC₅₀ of the related acyl derivatives.

dicarboxylic substituent at C-3 (R₂), and exhibited an excellent inhibitory capacity, with IC₅₀ values between 0.31 and 0.70 μM, which are between 82 and 186 times lower than its precursor (**OA**) (see Table 8 and Chart 4).

There were 18 acyl MA derivatives that inhibited the HIV-1-protease (Table 8). Only compounds **32**, **50**, **53**, and **55**, showed lower activities than their precursors, and all of them had an aliphatic substituent at C-2 (R₁) or at C-2 and C-3 (R₂), such as butanoyl, hexanoyl or lauroyl group. The most active acyl MA derivatives had polar dicarboxylic substituents, such as phthaloyl, succinyl or glutaryl group, and exhibited a good inhibitory capacity, with IC₅₀ values between 0.8 and 15.6 μM, which were between 4 and 78 times lower than its precursor (**MA**) (see Table 8 and Chart 4). Chart 4 shows a comparative of the inhibitory effects of the acyl OA and MA derivatives on the HIV-1-protease, describing the ratio between the IC₅₀ values of the triterpene precursors (**OA** and **MA**) and the IC₅₀ values of their acyl derivatives (last column of Table 8).

3. Conclusions

The comparative study of the solution- and solid-phase semi-synthesis of the OA and MA derivatives showed that the solid-phase procedures were shorter, easier, cleaner, and with better yields than the corresponding solution processes, when using an aliphatic or an aromatic acyl group. In this solid-phase process, we determined a high degree of incorporation (above 90%) of **OA** and **MA** to the CTC resin, when coupling with 3 equiv of these acids.

The acyl OA and MA derivatives were tested for their anti-proliferative effects. Some of these derivatives (24%) displayed cytotoxic effects (low IC₅₀) as growth inhibitors against the b16f10 murine melanoma cells. These cytotoxic compounds showed apoptotic effects on the treated cells, with high levels of early and total apoptosis, reaching in several cases, values of apoptosis population up to 90% of the total cells. The study of the structure–activity relationship indicated that the more cytotoxic and pro-

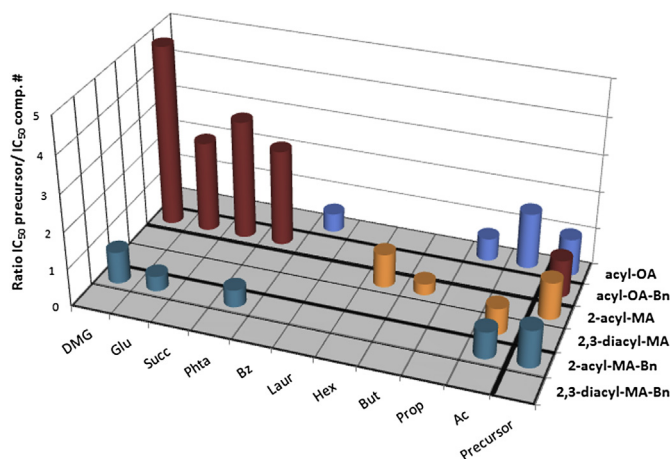


Chart 1. Comparison of the growth-inhibitory effects of the acyl OA and MA derivatives on b16f10 murine melanoma cells, describing the ratio between the IC₅₀ values of the triterpene precursors (1–4) and the IC₅₀ values of their cytotoxic acyl derivatives. DMG = 3,3-dimethylglutaryl, Glu = glutaryl, Succ = succinyl, Phtha = phthaloyl, Bz = benzoyl, Laur = lauroyl, Hex = hexanoyl, But = butanoyl, Prop = propanoyl, Ac = acetyl, Precursors = **OA** (1), **MA** (2), **OA-Bn** (3), and **MA-Bn** (4).

Table 7
Flow-cytometry analysis of annexin V–FITC staining and PI accumulation after exposure of b16f10 murine melanoma cells to acyl OA and MA derivatives.

Comp. #	Conc. ^a	Population ^b				
		Normal	Early apoptosis	Late apoptosis	Total apoptosis	Necrosis
Control	0	77.9 ± 1.5	3.9 ± 0.4	9.8 ± 2.2	13.7 ± 2.7	4.0 ± 0.6
OA (1)	IC ₅₀	44.9 ± 5.1	16.4 ± 2.3	28.2 ± 2.0	44.6 ± 4.3	10.1 ± 1.0
	IC ₅₀ × 2	49.8 ± 6.4	29.1 ± 6.0	12.4 ± 1.6	41.5 ± 7.5	8.7 ± 1.4
5	IC ₅₀	39.5 ± 6.5	14.4 ± 2.4	40.3 ± 5.8	54.7 ± 7.2	5.8 ± 1.4
	IC ₅₀ × 2	46.3 ± 6.8	14.6 ± 0.6	33.4 ± 3.5	48.0 ± 4.1	5.7 ± 2.8
9	IC ₅₀	24.3 ± 6.8	47.0 ± 0.0	27.4 ± 7.0	74.4 ± 7.0	1.3 ± 0.1
	IC ₅₀ × 2	37.2 ± 8.9	44.3 ± 4.7	16.5 ± 4.3	60.8 ± 9.1	2.0 ± 0.1
13	IC ₅₀	44.6 ± 1.9	14.0 ± 1.1	37.6 ± 0.5	51.6 ± 1.6	3.8 ± 0.4
	IC ₅₀ × 2	31.6 ± 0.2	9.5 ± 0.4	50.5 ± 1.2	60.0 ± 1.6	8.5 ± 1.8
OA-Bn (3)	IC ₅₀	67.9 ± 3.5	15.6 ± 1.2	12.2 ± 1.7	27.8 ± 0.8	4.3 ± 2.6
	IC ₅₀ × 2	54.3 ± 5.4	23.0 ± 5.1	18.6 ± 2.1	41.6 ± 6.5	4.1 ± 1.5
24	IC ₅₀	3.9 ± 0.3	64.3 ± 5.6	30.3 ± 5.2	94.6 ± 0.5	1.5 ± 0.2
	IC ₅₀ × 2	3.7 ± 0.5	66.9 ± 2.8	28.5 ± 3.3	95.4 ± 0.5	1.0 ± 0.0
25	IC ₅₀	16.9 ± 2.1	16.6 ± 2.8	55.5 ± 8.2	72.1 ± 5.5	11.1 ± 3.4
	IC ₅₀ × 2	7.7 ± 2.5	74.0 ± 0.8	17.6 ± 3.3	91.6 ± 2.4	0.7 ± 0.0
26	IC ₅₀	25.8 ± 4.5	20.6 ± 1.9	37.9 ± 1.9	58.4 ± 0.1	15.9 ± 4.4
	IC ₅₀ × 2	8.1 ± 0.8	65.8 ± 0.1	24.6 ± 1.1	90.4 ± 1.0	1.6 ± 0.1
27	IC ₅₀	8.3 ± 2.0	44.0 ± 4.4	42.6 ± 7.7	86.5 ± 3.3	5.3 ± 1.3
	IC ₅₀ × 2	4.9 ± 0.6	52.8 ± 5.7	36.1 ± 5.6	88.8 ± 0.1	6.4 ± 0.7
MA (2)	IC ₅₀	10.9 ± 1.7	20.8 ± 2.8	54.2 ± 3.5	74.9 ± 2.5	11.7 ± 0.5
	IC ₅₀ × 2	8.3 ± 1.8	68.8 ± 3.9	21.0 ± 1.9	89.8 ± 2.5	2.0 ± 0.7
8	IC ₅₀	31.4 ± 1.3	8.7 ± 0.0	52.9 ± 3.0	61.6 ± 3.0	7.1 ± 1.7
	IC ₅₀ × 2	9.7 ± 5.6	29.6 ± 7.6	59.3 ± 6.5	88.9 ± 6.0	1.5 ± 0.5
30	IC ₅₀	21.0 ± 8.2	55.6 ± 5.5	22.1 ± 2.0	77.7 ± 8.5	1.2 ± 0.3
	IC ₅₀ × 2	10.2 ± 1.6	53.0 ± 2.9	30.0 ± 5.7	83.0 ± 2.8	6.8 ± 1.2
32	IC ₅₀	34.8 ± 1.7	42.4 ± 3.3	19.0 ± 0.4	61.4 ± 3.6	3.9 ± 1.9
	IC ₅₀ × 2	18.9 ± 0.5	62.7 ± 0.9	17.5 ± 0.5	80.2 ± 0.5	1.1 ± 0.0
MA-Bn (4)	IC ₅₀	5.0 ± 0.6	84.2 ± 5.4	10.6 ± 4.7	94.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1
	IC ₅₀ × 2	11.3 ± 4.2	86.2 ± 5.0	2.2 ± 1.0	88.4 ± 4.1	0.1 ± 0.1
46	IC ₅₀	12.9 ± 0.9	66.0 ± 0.9	20.0 ± 0.3	86.0 ± 0.6	1.2 ± 0.3
	IC ₅₀ × 2	1.1 ± 0.1	71.3 ± 2.2	27.1 ± 2.1	98.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0
58	IC ₅₀	32.8 ± 4.7	42.2 ± 6.3	22.5 ± 1.4	64.7 ± 4.9	2.5 ± 0.2
	IC ₅₀ × 2	2.9 ± 0.7	43.6 ± 3.7	46.2 ± 1.4	89.7 ± 2.3	7.5 ± 1.7
62	IC ₅₀	73.3 ± 1.7	10.6 ± 1.7	14.6 ± 0.1	25.2 ± 1.6	1.6 ± 0.1
	IC ₅₀ × 2	20.2 ± 4.3	59.1 ± 9.1	19.8 ± 1.2	78.9 ± 7.8	0.9 ± 0.6
64	IC ₅₀	35.4 ± 4.5	16.5 ± 0.8	46.3 ± 4.2	62.8 ± 5.0	1.8 ± 0.5
	IC ₅₀ × 2	2.2 ± 0.3	26.9 ± 3.5	65.3 ± 3.3	92.2 ± 0.2	5.6 ± 0.5

^a Cell lines were treated at concentrations equal to its IC₅₀ or IC₅₀ × 2 values. Values are expressed as means ± S.E.M. of three experiments in duplicate.

^b Normal cells were annexin V⁻ PI⁻ early apoptotic cells were annexin V⁺ PI⁻ whereas late apoptotic cells were annexin V⁺ PI⁺ total apoptosis (early apoptosis plus late apoptosis) were annexin V⁺ and necrotic cells were annexin V⁻ PI⁺.

apoptotic compounds had a benzyl group on the carboxylic group at C-28, and polar dicarboxylic fragments on the hydroxyl groups of the A-ring of the triterpene skeleton.

Most of the compounds that exhibited anti-proliferative effects also triggered ROS generation. Therefore, the apoptosis would probably be caused by the participation of an intrinsic apoptotic-route activation, and the mitochondrial disruption would be involved in the apoptotic response. Only four compounds (**24**, **25**, **26**, and **58**) did not release ROS, and these results could be related with the participation of a plausible extrinsic activation of the apoptosis mechanism. Further molecular studies are necessary to test these conclusions, but both mechanisms on the apoptosis induction by triterpenes compounds have been described in the literature.

A great number of acyl OA and MA derivatives (38%) were demonstrated to be outstanding inhibitors of the anti-HIV-1-protease, with IC₅₀ values between 4 and 186 times lower than their non-acylated precursors. The most active acyl OA and MA

derivatives had a polar dicarboxylic substituent at C-2 or at C-2 and C-3 of the triterpene skeleton.

The potent activities on the apoptosis-activation process and on the inhibition of the HIV-1-protease reached by some of the tested OA and MA acylated derivatives suggest that they could be used in the future as new, safe, and effective anticancer and/or antiviral drugs.

4. Experimental

4.1. General experimental chemical procedures

Measurements of NMR spectra (300.13 MHz ¹H and 75.47 MHz ¹³C) were made in CDCl₃, CD₃OD, DMSO-d₆ or Pyridine-d₅ (which also provided the lock signal) using a VARIAN Inova unity (300 MHz ¹H NMR). The ¹³C chemical shifts were assigned with the aid of distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) using a flip angle of 135°. IR spectra were recorded on a MATTSON SATELLITE FTIR spectrometer. Optical rotations were measured on a Perkin–Elmer 241 polarimeter at 25 °C. Purity of new compounds was determined by a WATERS ACQUITY UPLC system (ultra-performance liquid chromatography) coupled with a WATERS SYNAPT G2 HRMS spectrometer (high-resolution mass spectra) with ESI (electrospray ionization). Melting points (mp) were determined using a Kofler (Reichter) apparatus and were uncorrected. All reaction solvents and chromatography solvents were distilled prior to use. Commercially available reagents were used without further purification. Merck silica-gel 60 aluminium sheets (ref. 1.16835) were used for TLC, and spots were rendered visible by spraying with H₂SO₄–AcOH, followed by heating to 120 °C, and also visualized under UV at 254 nm. Merck silica-gel 60 (0.040–0.063 mm, ref. 1.09385) was used for flash chromatography. CH₂Cl₂ (Fisher, ref. D/1852/17), CHCl₃ (Fisher, ref. C/4960/17), or *n*-hexane (Merck, ref. 1.04374), with increasing amounts of Me₂CO (Fisher, ref. A/0600/17), MeOH (Fisher, ref. M/4000/17), or AcOEt (Fisher, ref. E/0900/17), were used as eluents (all the solvents had an analytical reagent-grade purity). RP-HPLC analyses were made with a WATERS C18 reverse-phase column (0.4 μm diameter of particle; 150 mm × 3.9 mm) with a flow rate of 1 mL/min, on a WATERS Liquid Chromatograph (HPLC, model ALLIANCE 2690 (Waters, USA). Wavelengths of 210 and 301 nm were selected for the purity analyses. The analyses were performed using a linear gradient of 30–0% of B in 30 min and maintained for 5 min without B, where A was CH₃CN containing 0.1% TFA and B was H₂O containing 0.1% TFA. CTC resin (1.27 mmol/g), Fmoc-amino acid derivatives, DIEA, DIPCDI, and DMF were purchased from different sources.

4.2. Isolation of OA (1) and MA (2)

OA and **MA** were isolated from solid olive-oil-production wastes, which were extracted successively in a Soxhlet with hexane and EtOAc. Hexane extracts were a mixture of **OA** and **MA** (80:20), whereas this relationship was (20:80) for the EtOAc extracts. Both products were purified from these mixtures by column chromatography over silica gel, eluting with a CHCl₃/MeOH or CH₂Cl₂/acetone mixtures of increasing polarity [1,2,72].

4.3. Synthesis of benzyl OA and MA derivatives

4.3.1. Benzyl oleanolate (3)

BnCl (418 μL) was added in a relationship of 2:1 to a solution of **OA** (1, 912 mg, 2 mmol) in DMF (8 mL) with K₂CO₃ (0.61 g). The reaction was stirred for 4 h at 55 °C. The mixture was diluted with water and extracted with DCM, and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced

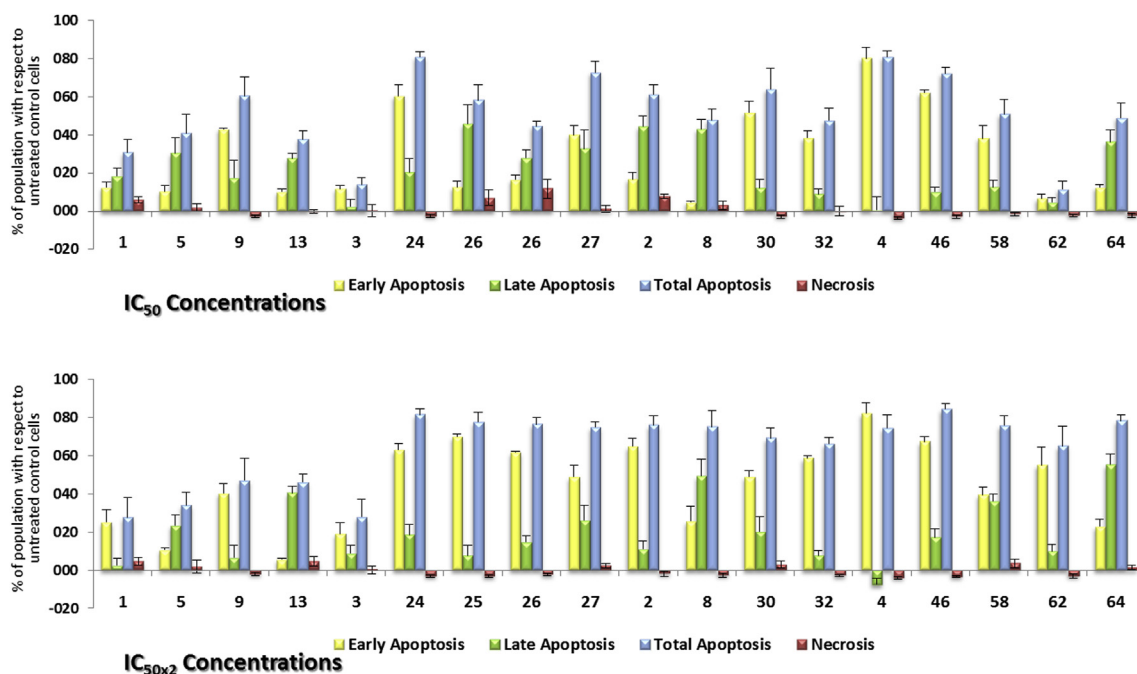


Chart 2. Flow-cytometry analysis of annexin V–FITC staining and PI accumulation after exposure of b16f10 murine melanoma cells to acyl OA and MA derivatives for 72 h with respect to untreated control cells. Cell lines were treated at concentrations equal to its IC_{50} or $IC_{50} \times 2$ values. Early apoptotic cells (yellow bars) were annexin V^+ PI^- , whereas late apoptotic cells (green bars) were annexin V^+ PI^+ , total apoptosis (blue bars) were annexin V^+ , and necrotic cells (red bars) were annexin V^- PI^+ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pressure, and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **3** as a white solid (710 mg, 83%) [55].

4.3.2. Benzyl maslinatate (**4**)

$BnCl$ (418 μ L) was added in a relationship of 2:1 to a solution of **MA** (**2**, 944 mg, 2 mmol) in DMF (8 mL) with K_2CO_3 (0.61 g). The reaction was stirred for 4 h at 55 °C. The mixture was diluted with water and extracted with DCM, and the organic layer dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **4** as a white solid (690 mg, 81%) [32].

4.4. Acetylations of **OA** and **MA**

4.4.1. Acetylations of **OA** with Ac_2O

Ac_2O (1 mL) was added slowly to a solution of **OA** (**1**, 1368 mg, 3 mmol) in pyridine (10 mL). The reaction was performed under different conditions (see Table 1). Cold water was added to the different mixtures, and afterwards these were extracted with DCM, and the organic layers were dried with anhydrous Na_2SO_4 . In all cases, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **5** as a white solid (percentages in Table 1) [56].

4.4.2. Acetylations of **MA** with Ac_2O

Ac_2O (2 mL) was added slowly to a solution of **MA** (**2**, 1416 mg, 3 mmol) in pyridine (10 mL). The reaction was performed under different conditions (see Table 2). Cold water was added to the different mixtures, and afterwards these were extracted with DCM, and the organic layers were dried with anhydrous Na_2SO_4 . In all cases, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/

acetone (10:1) to give **6**, **7**, and **8** as white solids (percentages in Table 2) [57].

4.5. General method for acylation of **1–4** in solution-phase

The corresponding acid anhydrides (**I–X**) were added respectively, in a relationship of 4:1 (anhydride:hydroxyl group), to a solution of compounds (**1–4**) in pyridine. The reactions were stirred for 24 h at rt. In all cases, cold water was added to the mixture and afterwards was extracted with DCM; the organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone or hexane/ethyl acetate.

4.5.1. Acylation of **OA** with propanoic anhydride

Propanoic anhydride (113 μ L) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **9** as a white solid (89 mg, 83%), mp 245–247 °C; $[\alpha]_D + 71$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3388, 3015, 2829 and 1720; δ_H ($CDCl_3$) 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.30 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.11, 0.92, 0.91, 0.88, 0.84, 0.83, 0.73 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 183.8, 174.5, 143.8, 122.8, 80.9, 55.5, 47.8, 46.8, 46.1, 41.8, 41.2, 39.5, 38.3 (2C), 37.2, 34.0, 33.3, 32.8, 32.7, 30.9, 29.9, 28.8, 28.3, 27.9, 26.1, 23.8 (2C), 23.1, 18.4, 17.3, 16.9, 15.6, 9.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{33}H_{53}O_4$ [$M + 1$] 513.3944, found 513.3948.

4.5.2. Acylation of **OA** with butanoic anhydride

Butanoic anhydride (143 μ L) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method to give **10** as a white solid (96 mg, 87%), mp 215–217 °C; $[\alpha]_D + 79$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3379, 2989, 2815 and 1699; δ_H ($CDCl_3$) 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.80

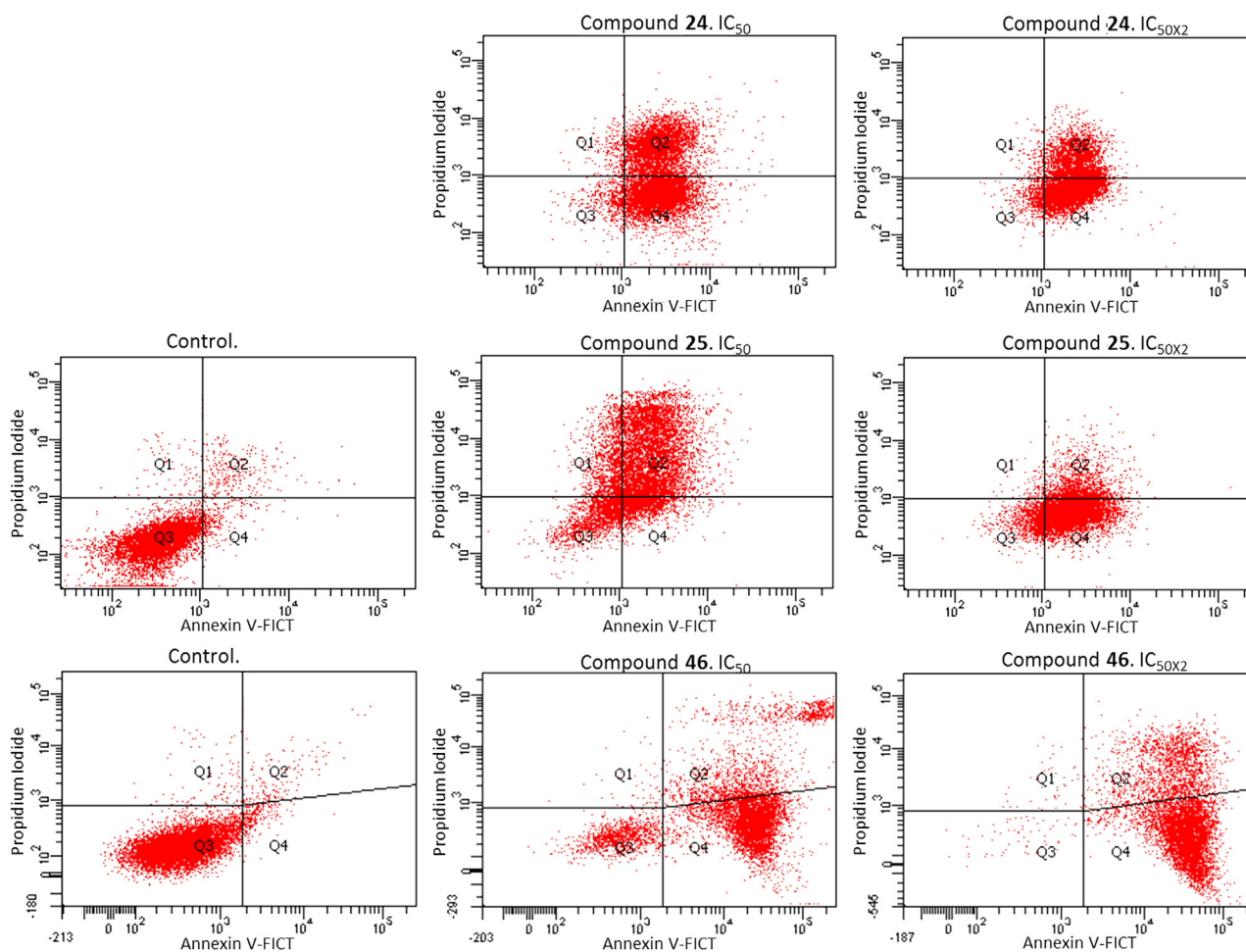


Fig. 6. Diagrams of annexin V/propidium iodide flow-cytometry for **24**, **25**, and **46**. Q1 quadrant (necrotic cells). Q2 quadrant (late apoptotic cells). Q3 quadrant (normal cells). Q4 quadrant (early apoptotic cells). Left diagrams IC_{50} concentrations. Right diagrams $IC_{50} \times 2$ concentrations.

(dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.11, 0.92, 0.91, 0.88, 0.84, 0.83, 0.73 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 184.0, 173.7, 143.8, 122.8, 80.8, 55.5, 47.8, 46.8, 46.1, 41.8, 41.2, 39.5, 38.3 (2C), 37.2, 37.0, 34.0, 33.3, 32.8, 32.7, 30.9, 29.9, 28.3, 27.9, 26.1, 23.8, 23.6, 23.1, 18.9, 18.4, 17.3, 16.9, 16.5, 13.9; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₄H₅₅O₄ [M + 1] 527.4100, found 527.4101.

4.5.3. Acylation of **OA** with hexanoic anhydride

Hexanoic anhydride (203 μ L) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method to give **11** as a white solid (104 mg, 90%), mp 159–161; $[\alpha]_D + 69$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3383, 2979, 2832 and 1679; δ_H (CDCl₃) 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.27 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.11, 0.92, 0.91, 0.89, 0.84, 0.83, 0.74 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 183.8, 173.9, 143.8, 122.8, 80.8, 55.6, 47.8, 46.8, 46.1, 41.9, 41.3, 39.6, 38.3, 37.9, 37.2, 35.1, 34.1, 33.3, 32.8, 32.7, 31.6, 30.9, 29.9, 28.3, 27.9, 26.1, 25.1, 23.8, 23.7, 23.2, 22.5, 18.4, 17.3, 17.0, 15.6, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₆H₅₉O₄ [M + 1] 555.4413, found 555.4421.

4.5.4. Acylation of **OA** with lauric anhydride

Lauric anhydride (336 mg, 0.876 mmol) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **12** as a colourless oil (97 mg, 73%), $[\alpha]_D + 37$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (film)/cm⁻¹ 3379, 2963, 2840 and 1681;

δ_H (CDCl₃) 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.80 (dd, 1H, $J_1 = 5.4$, $J_2 = 10.4$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.11, 0.92, 0.91, 0.89, 0.86, 0.84, 0.83 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 183.2, 174.0, 143.8, 122.8, 80.8, 55.6, 47.8, 46.8, 46.1, 41.9, 41.3, 39.6, 38.3, 38.0, 37.9, 35.1, 34.0, 33.3, 32.8, 32.7, 32.2, 30.9, 29.8 (4C), 29.7, 29.5, 28.3, 27.9, 26.2, 25.4, 23.7 (2C), 23.6, 23.2, 22.9, 18.4, 17.3, 17.0, 15.6, 14.3; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₂H₇₁O₄ [M + 1] 639.5361, found 639.5352.

4.5.5. Acylation of **OA** with benzoic anhydride

Benzoic anhydride (166 μ L) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **13** as a white solid (81 mg, 69%), mp 153–155 °C; $[\alpha]_D + 36$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3390, 3001, 2840 and 1689; δ_H (CDCl₃) 7.42 (m, 5H), 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.70 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz), 1.14, 1.00, 0.98, 0.93, 0.90, 0.83, 0.77 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 183.1, 166.5, 143.8, 132.9 (2C), 131.2 (2C), 129.8, 128.5, 122.8, 81.8, 55.6, 47.8, 46.8, 46.1, 41.9, 41.3, 39.6, 38.4 (2C), 37.3, 34.1, 32.9, 32.7 (2C), 30.9, 29.9, 28.5, 27.9, 26.2, 23.8, 23.7, 23.2, 18.5, 17.3, 17.2, 15.7; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₇H₅₃O₄ [M + 1] 561.3937, found 561.3944.

4.5.6. Acylation of **OA** with phthalic anhydride

Phthalic anhydride (130 mg, 0.876 mmol) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for

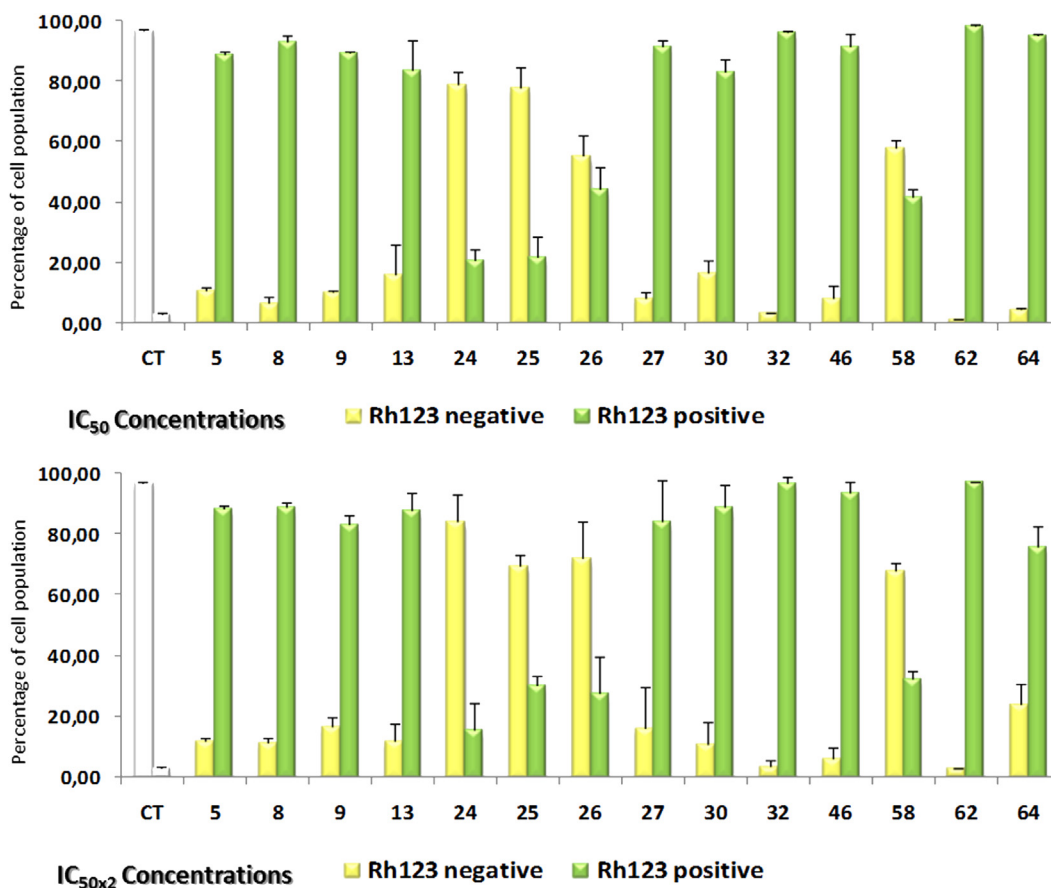


Chart 3. Flow-cytometry analysis of rhodamine 123 and PI staining after exposure of b16f10 murine melanoma cells to acyl OA and MA derivatives for 72 h with respect to the control untreated cells. Cell lines were treated at concentrations equal to its IC₅₀ or IC₅₀ × 2 values. ROS-negative cells (yellow bars) were rhodamine 123⁻ with PI⁺ or PI⁻. ROS-positive cells (green bars) were rhodamine 123⁺ with PI⁺ or PI⁻. Values are expressed as means ± S.E.M. of three experiments in duplicate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

acylation to give **14** as a white solid (123 mg, 93%), mp 166–168 °C; [α]_D + 26 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3380, 3053, 2855 and 1699; δ_{H} (CDCl₃) 7.80–7.50 (m, 4H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz), 4.71 (dd, 1H, $J_1 = 5.5, J_2 = 10.3$ Hz), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.9$ Hz), 1.12, 0.91, 0.91, 0.89, 0.89, 0.83, 0.73 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 185.0, 172.8, 168.0, 143.8, 133.8, 132.2, 130.9, 130.3, 130.0, 129.2, 122.8, 83.4, 55.6, 47.7, 46.7, 46.1, 41.8, 41.1, 39.5, 38.2 (2C), 38.1, 34.0, 32.8, 33.3, 32.7, 30.9, 29.7, 28.4, 27.9, 26.2, 23.8, 23.6, 23.0, 18.4, 17.5, 17.0, 15.7; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₃H₅₃O₆ [M + 1] 605.3850, found 605.3842.

4.5.7. Acylation of **OA** with succinic anhydride

Succinic anhydride (88 mg, 0.876 mmol) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **15** as a white solid (57 mg, 47%), mp 190–192 °C; [α]_D + 49 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3394, 3018, 2854 and 1712; δ_{H} (CDCl₃) 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.51 (dd, 1H, $J_1 = 5.5, J_2 = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 13.8$ Hz), 2.70–2.60 (m, 4H), 1.10, 0.92, 0.90, 0.88, 0.83, 0.81, 0.72 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.9, 178.6, 171.8, 143.8, 122.8, 81.7, 55.7, 47.7, 46.8, 46.0, 41.7, 41.1, 39.5, 38.3, 38.2, 37.2, 34.0, 33.3, 32.7, 32.6, 30.9, 29.7, 29.6, 29.4, 28.3, 27.9, 26.2, 23.8, 23.6, 23.0, 18.5, 17.2, 17.0, 15.7; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₄H₅₃O₆ [M + 1] 557.3844, found 557.3842.

4.5.8. Acylation of **OA** with glutaric anhydride

Glutaric anhydride (100 mg, 0.876 mmol) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The

mixture was treated as described in the general method for acylation to give **16** as a white solid (73 mg, 59%), mp 190–192 °C; [α]_D + 49 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3379, 3018, 2847 and 1700; δ_{H} (CDCl₃) 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.49 (dd, 1H, $J_1 = 5.6, J_2 = 10.6$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.9$ Hz), 2.45–2.35 (m, 6H), 1.10, 0.92, 0.91, 0.88, 0.85, 0.82, 0.71 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 185.0, 179.6, 172.7, 143.8, 122.8, 81.3, 55.5, 47.7, 46.8, 46.0, 41.7, 41.1, 39.5, 38.2, 38.0, 37.2, 34.0, 33.3 (2C), 33.0, 32.7, 32.6, 30.9, 29.7, 28.4, 27.9, 26.2, 23.8, 23.6, 23.1, 20.4, 18.4, 17.2, 17.1, 15.6; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₅H₅₅O₆ [M + 1] 571.3999, found 571.4005.

4.5.9. Acylation of **OA** with 3,3-dimethylglutaric anhydride

3,3-Dimethylglutaric anhydride (124 mg, 0.876 mmol) was added slowly to a solution of **OA** (100 mg, 0.219 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **17** as a white solid (81 mg, 62%), mp 220–222 °C; [α]_D + 9 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3399, 3022, 2845 and 1704; δ_{H} (CDCl₃) 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.50 (dd, 1H, $J_1 = 5.5, J_2 = 10.5$ Hz), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.7$ Hz), 2.70–2.25 (m, 4H), 1.13, 1.10, 1.07, 0.93, 0.91, 0.88, 0.85, 0.80, 0.70 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.9, 178.0, 172.1, 143.7, 122.9, 81.2, 55.4, 47.5, 46.8, 46.1, 45.4, 44.4, 41.6, 41.0, 39.5, 38.0 (2C), 37.3, 34.0, 34.0, 32.7 (2C), 32.6, 30.9, 29.9, 28.8, 28.6 (2C), 28.0, 26.2, 23.8, 23.6, 22.9, 18.5, 17.6, 17.3, 15.8; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₇H₅₉O₆ [M + 1] 599.4312, found 599.4301.

4.5.10. Acylation of **OA-Bn** with Ac₂O

Ac₂O (69 μ L) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as in the

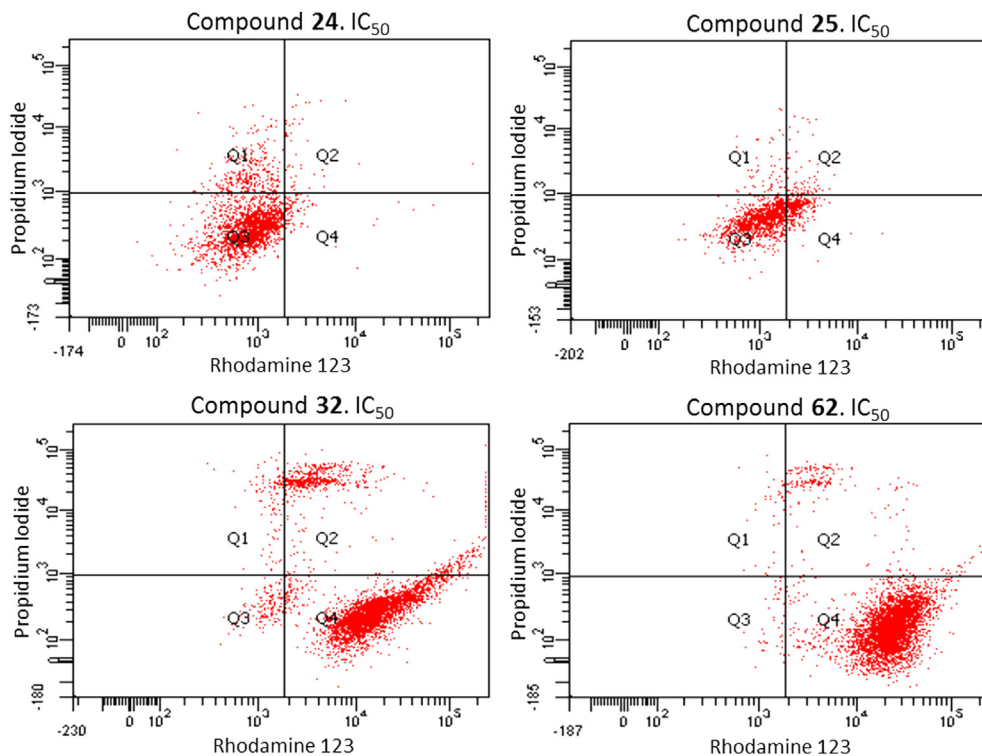


Fig. 7. Diagram of rhodamine 123/propidium iodide flow-cytometry, for the compounds with minor (**24** and **25**) and major (**32** and **62**) Rh123 staining. The right quadrants of each diagram (Q2 and Q4) represent cells positive stained with Rh123.

general method for acylation above to give **18** as a white solid (95 mg, 89%), mp 173–175 °C; [α]_D + 47 (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3376, 3001, 2865 and 1710; δ_{H} (CDCl₃) 7.31 (m, 5H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz),

4.46 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 10.4$ Hz), 2.98 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.02 (s, 3H), 1.10, 0.91, 0.90, 0.88, 0.84, 0.83, 0.59 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 183.8, 171.2, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.1, 66.1, 55.5, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 38.4, 37.9,

Table 8

HIV-1-protease inhibition effects of OA and MA derivatives.

Comp. #	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) (% HIV-1-protease activity inhibition) ^a	IC ₅₀ OA/IC ₅₀ comp. # ^b
OA (1)	–	H	H	57.7 ± 3.9	1.0
5	–	Acetyl	H	3.4 ± 0.4	17.0
14	–	Phthaloyl	H	0.31 ± 0.03	186.1
16	–	Glutaryl	H	0.56 ± 0.16	103.0
17	–	3,3-Dimethylglutaryl	H	0.70 ± 0.07	82.4
24	–	Phthaloyl	Bn	0.4 ± 0.1	144.3
					IC₅₀ MA/IC₅₀ comp. #^b
MA (2)	H	H	H	62.7 ± 4.9	1.0
31	Butanoyl	Butanoyl	H	31.2 ± 5.9	2.0
32	Hexanoyl	H	H	124.4 ± 5.8	0.5
38	Phthaloyl	H	H	14.2 ± 2.1	4.4
39	Phthaloyl	Phthaloyl	H	2.3 ± 0.3	27.3
40	Succinyl	H	H	3.5 ± 0.5	17.9
41	Succinyl	Succinyl	H	1.9 ± 0.4	33.0
42	Glutaryl	H	H	3.2 ± 0.3	19.6
43	Glutaryl	Glutaryl	H	1.4 ± 0.3	44.8
44	3,3-Dimethylglutaryl	H	H	14.3 ± 1.8	4.4
45	3,3-Dimethylglutaryl	3,3-Dimethylglutaryl	H	27.5 ± 3.3	2.3
50	Butanoyl	H	Bn	226 ± 24	0.3
53	Hexanoyl	Hexanoyl	Bn	150 ± 8	0.4
55	Lauroyl	Lauroyl	Bn	73 ± 4	0.9
58	Phthaloyl	H	Bn	0.8 ± 0.1	78.4
59	Phthaloyl	Phthaloyl	Bn	1.9 ± 0.5	33.0
60	Succinyl	H	Bn	15.6 ± 2.9	4.0
61	Succinyl	Succinyl	Bn	5.2 ± 0.7	12.1
63	Glutaryl	Glutaryl	Bn	3.9 ± 0.3	16.1

^a The IC₅₀ values were calculated based on: $V_{\text{inh}} = V_0 \cdot \text{IC}_{50} / ([I] + \text{IC}_{50})$. The percentage of protease-activity inhibition was calculated according to: % inhibition = $[1 - (V_{\text{inh}}/V_0)] \cdot 100$. All assays were performed three times in triplicates.

^b The last column represents the ratio between the IC₅₀ of each precursor (**OA** or **MA**) and the IC₅₀ of the related acyl derivatives.

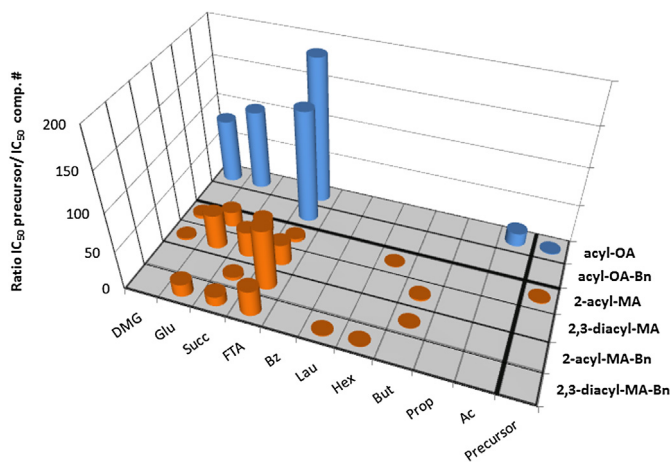


Chart 4. Comparative of the inhibitory effects of the acyl OA and MA derivatives on the HIV-1-protease, describing the ratio between the IC_{50} values of the triterpene precursors (**OA** and **MA**) and the IC_{50} values of their acyl derivatives. DMG = 3,3-dimethylglutaryl, Glu = glutaryl, Succ = succinyl, Phtha = phthaloyl, Bz = benzoyl, Laur = lauroyl, Hex = hexanoyl, But = butanoyl, Prop = propanoyl, Ac = acetyl, precursors = **OA** (**1**) and **MA** (**4**).

37.1, 34.1, 33.3, 32.9 (2C), 30.9, 28.3, 27.8 (2C), 26.0, 23.9, 23.6, 23.3, 21.5, 18.4, 17.1, 16.9, 15.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{39}H_{57}O_4$ [$M + 1$] 589.4257, found 589.4252.

4.5.11. Acylation of **OA-Bn** with propanoic anhydride

Propanoic anhydride (94 μ L) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **19** as a white solid (97 mg, 85%), mp 153–155 °C; $[\alpha]_D + 47$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3391, 2989, 2855 and 1690; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 13.7$ Hz), 2.30 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz), 0.11, 0.92, 0.91, 0.89, 0.88, 0.83, 0.59 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.7, 174.5, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.7, 80.8, 66.1, 55.5, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 40.0, 38.4, 38.0, 37.2, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.3 (2C), 27.9, 26.1, 23.9, 23.6, 23.3, 18.8, 18.4, 17.1, 16.9, 15.5, 13.9; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{40}H_{59}O_4$ [$M + 1$] 603.4413, found 603.4439.

4.5.12. Acylation of **OA-Bn** with butanoic anhydride

Butanoic anhydride (119 μ L) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **20** as a white solid (108 mg, 93%), mp 108–110 °C; $[\alpha]_D + 40$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3387, 2982, 2843 and 1699; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz), 2.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 1.11, 0.90, 0.89, 0.88, 0.84, 0.83, 0.59 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 173.6, 143.9, 136.6, 128.5, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 80.7, 66.1, 55.5, 47.7, 46.9, 46.0, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3 (2C), 36.9, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.8, 28.2, 27.8, 26.0, 23.8 (2C), 23.6, 23.3, 18.8, 18.4, 17.1, 16.9, 15.5, 13.9; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{41}H_{61}O_4$ [$M + 1$] 617.4584, found 617.4570.

4.5.13. Acylation of **OA-Bn** with hexanoic anhydride

Hexanoic anhydride (169 μ L) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **21** as a white solid (111 mg, 90%), mp 73–75 °C; $[\alpha]_D + 49$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3360, 2989, 2845 and 1708; δ_H ($CDCl_3$) 7.32 (m, 5H), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB

system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.6$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.11, 0.90, 0.89, 0.88, 0.87, 0.83, 0.59 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 173.9, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.7, 80.8, 66.1, 55.5, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.6, 38.4, 38.0, 37.1, 35.0, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 31.6, 30.9, 28.3, 28.1, 27.9, 26.1, 23.9, 23.8, 23.6, 23.3, 22.5, 18.4, 17.1, 17.0, 15.5, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{43}H_{65}O_4$ [$M + 1$] 645.4883, found 645.4861.

4.5.14. Acylation of **OA-Bn** with lauric anhydride

Lauric anhydride (280 mg, 0.732 mmol) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **22** as a colourless oil (126 mg, 91%), $[\alpha]_D + 24$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3368, 2978, 2861 and 1712; δ_H ($CDCl_3$) 7.33 (m, 5H), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz), 5.06 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.47 (dd, 1H, $J_1 = 5.6$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.90 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.11, 0.90, 0.89, 0.88, 0.86, 0.84, 0.59 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 173.8, 143.9, 136.6, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 80.7, 66.1, 55.5, 47.7, 46.9, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 35.0, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6, 32.1, 30.9, 29.8 (3C), 29.5 (2C), 29.4, 28.3 (2C), 27.8, 26.0, 23.8 (2C), 23.6, 23.3, 22.9, 18.4, 17.1, 17.0, 15.5, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{49}H_{77}O_4$ [$M + 1$] 729.5822, found 729.5826.

4.5.15. Acylation of **OA-Bn** with benzoic anhydride

Benzoic anhydride (138 μ L) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **23** as a colourless oil (90 mg, 73%), $[\alpha]_D + 31$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3380, 3015, 2849 and 1699; δ_H ($CDCl_3$) 7.98–7.33 (m, 5H), 7.15 (m, 5H), 5.12 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.06 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.55 (dd, 1H, $J_1 = 5.3$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.73 (dd, 1H, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 13.7$ Hz), 0.96, 0.83, 0.83, 0.87, 0.93, 0.72, 0.45 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 166.5, 143.8, 134.7, 132.9 (2C), 130.7 (2C), 129.7, 129.1, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.8, 66.1, 55.6, 47.8, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 40.0, 38.3, 37.2 (2C), 34.1, 32.9, 33.3, 32.6, 30.9, 28.4, 27.8, 26.1, 23.8 (2C), 23.6, 23.3, 18.4, 17.2, 17.1, 15.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{44}H_{59}O_4$ [$M + 1$] 651.4413, found 651.4404.

4.5.16. Acylation of **OA-Bn** with phthalic anhydride

Phthalic anhydride (108 mg, 0.732 mmol) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **24** as a colourless oil (107 mg, 82%), $[\alpha]_D + 48$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3376, 3060, 2842 and 1711; δ_H ($CDCl_3$) 8.02–7.56 (m, 4H), 7.33 (m, 5H), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.77 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.9$ Hz), 1.12, 0.94, 0.90, 0.89, 0.89, 0.85, 0.59 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.7, 171.0, 168.1, 143.8, 136.7, 133.3, 132.1, 131.9, 131.1, 130.4, 129.4, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 83.1, 66.1, 55.7, 47.8, 47.0, 46.1, 42.0, 41.6, 39.6, 38.4, 38.2, 37.2, 34.1, 32.9, 33.3, 32.6, 30.9, 28.4, 27.9, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.2, 18.4, 17.1, 17.0, 15.2; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{45}H_{59}O_6$ [$M + 1$] 695.4331 found 695.4312.

4.5.17. Acylation of **OA-Bn** with succinic anhydride

Succinic anhydride (73 mg, 0.732 mmol) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **25** as a colourless oil (62 mg, 51%), $[\alpha]_D + 38$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3377, 3020, 2859 and 1720; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.4$, $J_2 = 10.6$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz), 2.70–2.40 (m, 4H), 1.10, 0.90, 0.88, 0.88,

0.83, 0.83, 0.59 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 178.4, 177.7, 172.9, 143.8, 136.6, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.7, 66.1, 55.5, 47.7, 46.9, 46.0, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 34.0, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 29.6, 29.5, 29.3, 28.2, 27.8, 26.0, 23.9, 23.6, 23.2, 18.4, 17.1, 16.9, 15.5; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₁H₅₉O₆ [M + 1] 647.4332, found 647.4312.

4.5.18. Acylation of **OA-Bn** with glutaric anhydride

Glutaric anhydride (84 mg, 0.732 mmol) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **26** as a colourless oil (84 mg, 67%), $[\alpha]_{\text{D}} + 26$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (film)/cm⁻¹ 3378, 3033, 2867 and 1715; δ_{H} (CDCl₃) 7.31 (m, 5H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.48 (dd, 1H, $J_1 = 5.5, J_2 = 10.5$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.9$ Hz), 2.42–2.34 (m, 6H), 1.10, 0.90, 0.88, 0.88, 0.83, 0.83, 0.59 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 178.4, 177.7, 172.9, 143.9, 136.6, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.3, 66.1, 55.5, 47.7, 47.0, 46.1, 41.9, 41.6, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 34.1, 33.9 (2C), 33.3, 32.9, 32.6, 30.9, 28.3, 27.8, 27.8, 26.0, 23.9, 23.6, 23.3, 20.3, 18.4, 17.1, 17.0, 15.6; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₂H₆₁O₆ [M + 1] 661.4486, found 661.4468.

4.5.19. Acylation of **OA-Bn** with 3,3-dimethylglutaric anhydride

3,3-Dimethylglutaric anhydride (105 mg, 0.732 mmol) was added slowly to a solution of **OA-Bn** (100 mg, 0.183 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **27** as a colourless oil (84 mg, 65%); $[\alpha]_{\text{D}} + 20$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (film)/cm⁻¹ 3390, 3021, 2865 and 1698; δ_{H} (CDCl₃) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.50 (dd, 1H, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 13.8$ Hz), 2.70–2.25 (m, 4H), 1.13, 1.10, 0.93, 0.91, 0.88, 0.85, 0.80, 0.70, 0.59 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 177.7, 176.4, 172.5, 143.9, 136.7, 128.6, 128.2 (2C), 128.1 (2C), 122.6, 81.6, 66.1, 55.6, 47.8, 47.0, 46.1, 45.8, 45.4, 41.9, 41.6, 39.5, 38.4, 37.8, 37.1, 34.1, 33.3, 32.9, 32.6 (2C), 30.9, 28.3, 28.2, 28.1, 27.8, 27.8, 26.1, 23.9, 23.6, 23.3, 18.4, 17.1, 17.0, 15.5; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₄H₆₅O₆ [M + 1] 689.4767, found 689.4781.

4.5.20. Acylation of **MA** with propanoic anhydride

Propanoic anhydride (217 μ L) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **28** as a white solid (22 mg, 20%), mp 155–157 °C; $[\alpha]_{\text{D}} + 49$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3376, 3015, 2855 and 1711; δ_{H} (CDCl₃) 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.92 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8, J_2 = 10.5, J_3 = 11.2$ Hz), 3.17 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.9$ Hz), 2.30 (q, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.10, 1.08, 1.01, 0.99, 0.88, 0.81, 0.70 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.2, 175.3, 143.9, 122.4, 81.0, 73.2, 55.3, 47.7, 46.7, 46.0, 43.8, 41.8, 41.0, 40.0, 39.5, 38.6, 34.0, 33.2, 32.6, 32.6, 30.8, 28.7, 28.1, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.4, 17.3, 16.8, 16.5, 9.3; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₃H₅₃O₅ [M + 1] 529.3893, found 529.3886; and **29** as a white solid (89 mg, 73%), mp 224–226 °C; $[\alpha]_{\text{D}} + 32$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3299, 3017, 2796 and 1699; δ_{H} (CDCl₃) 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.14 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 10.1, J_3 = 11.2$ Hz), 4.80 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 12.0$ Hz), 2.32 and 2.26 (q, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.08, 1.01, 0.99, 0.92, 0.91, 0.91, 0.76 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.6, 173.5 (2C), 143.9, 122.5, 80.5, 70.1, 55.1, 47.8, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.1, 39.7, 39.6, 38.4, 34.0, 33.3, 32.6 (2C), 30.9, 28.7, 28.1 (2C), 27.9, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.4, 17.9, 17.4, 16.6, 9.6, 9.4; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₆H₅₇O₆ [M + 1] 585.4155, found 585.4144.

4.5.21. Acylation of **MA** with butanoic anhydride

Butanoic anhydride (276 μ L) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was

treated as described in the general method for acylation to give **30** as a white solid (18 mg, 15%), mp 138–140 °C; $[\alpha]_{\text{D}} + 52$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3353, 2980, 2839 and 1719; δ_{H} (CDCl₃) 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.92 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 10.0, J_3 = 11.5$ Hz), 3.17 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 3.5, J_2 = 14.0$ Hz), 2.28 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.08, 1.01, 0.92, 0.89, 0.86, 0.81, 0.70 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.3, 174.5, 143.9, 122.5, 81.1, 73.2, 55.3, 47.8, 46.7, 46.1, 43.9, 41.8, 41.1, 40.0, 39.5, 38.5, 36.7, 34.0, 33.3, 32.6 (2C), 30.9, 28.7, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.7, 18.4, 17.3, 16.8, 16.5, 13.8; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₄H₅₄O₅Na [M + Na] 565.3869, found 565.3862; and **31** as a white solid (109 mg, 80%), mp 142–144 °C; $[\alpha]_{\text{D}} + 42$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3365, 3000, 2848 and 1780; δ_{H} (CDCl₃) 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.12 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 10.5, J_3 = 11.5$ Hz), 4.80 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 13.8$ Hz), 2.30 and 2.22 (t, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.14, 1.08, 0.94, 0.93, 0.91, 0.91, 0.70 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.6, 173.5 (2C), 143.9, 122.5, 80.3, 70.1, 55.1, 47.8, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.1, 39.7, 39.6, 38.4, 36.7 (2C), 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 30.9, 28.7, 27.9, 26.1, 23.8, 23.7, 23.0, 18.8, 18.6, 18.4, 17.9, 17.4, 16.6, 14.0, 13.9; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₈H₅₉O₆ [M – 1] 611.4312, found 611.4305.

4.5.22. Acylation of **MA** with hexanoic anhydride

Hexanoic anhydride (389 μ L) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **32** as a white solid (22 mg, 19%), mp 124–126 °C; $[\alpha]_{\text{D}} + 40$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3405, 3053, 2849 and 1690; δ_{H} (CDCl₃) 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 10.3, J_3 = 11.3$ Hz), 3.16 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 14.0$ Hz), 2.28 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.09, 1.01, 0.99, 0.88, 0.86, 0.82, 0.71 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.5, 174.7, 143.8, 122.5, 81.0, 73.1, 55.3, 47.7, 46.7, 46.0, 43.9, 41.8, 41.1, 39.9, 39.5, 38.4, 34.7, 34.0, 33.2, 32.6 (2C), 31.4, 30.8, 28.7, 27.8, 26.1, 24.6, 23.7 (2C), 23.0, 22.5, 18.4, 17.2, 16.8, 16.5, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₆H₅₇O₅ [M⁺ – 1] 569.4206, found 569.4209; and **33** as a colourless oil (101 mg, 70%), $[\alpha]_{\text{D}} - 21$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (film)/cm⁻¹ 3340, 3013, 2839 and 1701; δ_{H} (CDCl₃) 5.19 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.02 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 10.5, J_3 = 11.2$ Hz), 4.69 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.75 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.5$ Hz), 2.22 and 2.13 (t, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.13, 1.11, 1.05, 0.98, 0.83, 0.81, 0.67 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 183.0, 173.7, 173.6, 143.9, 122.5, 80.3, 70.1, 55.1, 47.8, 46.7, 46.1, 44.1, 41.9, 41.2, 39.7, 39.6, 38.4, 34.8 (2C), 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 31.7, 31.5, 30.9, 28.7, 27.9, 26.1, 25.1, 24.9, 23.8, 23.1, 22.9, 22.6 (2C), 18.4, 17.9, 17.4, 16.6, 14.1, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₂H₆₈O₆Na [M + Na] 691.4914, found 691.4913.

4.5.23. Acylation of **MA** with lauric anhydride

Lauric anhydride (645 mg, 1.680 mmol) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **34** as a white solid (37 mg, 27%), mp 30–32 °C; $[\alpha]_{\text{D}} + 20$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3384, 2956, 2827 and 1689; δ_{H} (CDCl₃) 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 4.94 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 10.3, J_3 = 11.3$ Hz), 3.18 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.79 (dd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 13.8$ Hz), 2.31 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.10, 1.03, 1.01, 0.90, 0.88, 0.83, 0.73 (s, 3H each); δ_{C} (CDCl₃) 184.8, 174.8, 143.8, 122.5, 81.1, 73.1, 55.4, 47.8, 46.8, 46.1, 43.9, 41.9, 41.1, 40.0, 39.6, 38.4, 34.8, 34.3, 33.3, 32.6 (2C), 32.1, 30.9, 29.7 (3C), 29.3 (2C), 29.1, 28.7, 27.8, 26.1, 24.8, 23.8, 23.7, 23.1, 22.8, 18.5, 16.9, 16.8, 16.5, 14.2; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₂H₇₁O₅ [M + 1] 655.5302, found 655.5316; and **35** as a colourless oil (100 mg, 57%), $[\alpha]_{\text{D}} + 45$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{max} (film)/cm⁻¹ 3390, 3000, 2880 and 1770; δ_{H} (CDCl₃) 5.18 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 5.01 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 10.5, J_3 = 11.3$ Hz), 4.68 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.73 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.8$ Hz), 2.21 and 2.13

(t, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.13, 1.04, 1.05, 0.97, 0.80, 0.77, 0.65 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 184.5, 173.7, 173.6, 143.9, 122.5, 80.3, 70.0, 55.1, 47.8, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.1, 39.7, 39.6, 38.4, 34.9, 34.8, 34.0, 33.3, 32.7 (2C), 32.2 (2C), 30.9, 30.0 (4C), 29.9 (4C), 29.8, 29.6 (2C), 29.3, 28.7, 27.9, 26.1, 25.4, 25.2, 23.8, 23.7, 23.1, 22.9 (2C), 18.4, 17.9, 17.3, 16.6, 14.4, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for C₅₄H₉₃O₆ [M + 1] 837.6972, found 837.6967.

4.5.24. Acylation of **MA** with benzoic anhydride

Benzoic anhydride (318 μ L) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **36** as a white solid (46 mg, 37%), mp 95–97 °C; $[\alpha]_D + 28$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3420, 3030, 2822 and 1717; δ_H (CDCl₃) 8.10–7.45 (m, 5H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.20 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 11.3$ Hz), 3.39 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.7$ Hz), 1.13, 1.07, 1.07, 0.92, 0.90, 0.89, 0.77 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 184.8, 172.2, 143.8, 133.9 (2C), 130.4 (2C), 129.8, 128.7, 122.6, 81.2, 74.2, 55.4, 47.8, 46.8, 46.1, 44.0, 41.9, 41.2, 40.1, 39.6, 38.7, 34.0, 33.3, 32.7, 32.6, 30.9, 28.8, 27.9, 26.2, 23.8, 23.7, 23.1, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₇H₅₁O₅ [M – 1] 575.3737, found 575.3745; and **37** as a white solid (64 mg, 45%), mp 70–72 °C; $[\alpha]_D + 28$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3402, 2983, 2842 and 1700; δ_H (CDCl₃) 7.95–7.35 (m, 10 H), 5.28 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.20 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.5$ Hz), 5.23 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz), 1.20, 1.16, 1.11, 1.03, 0.93, 0.91, 0.80 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 184.0, 166.7, 166.5, 143.9, 133.9 (4C), 129.8 (4C), 129.8 (2C), 128.5 (2C), 122.5, 81.2, 71.3, 55.4, 47.9, 46.8, 46.0, 44.2, 41.9, 41.2, 40.1, 39.7, 38.7, 34.1, 33.3, 32.7 (2C), 30.9, 28.8, 27.9, 26.2, 23.8, 23.7, 23.1, 18.5, 18.1, 17.4, 16.8; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₄H₅₇O₆ [M + 1] 681.4155, found 681.4155.

4.5.25. Acylation of **MA** with phthalic anhydride

Phthalic anhydride (250 mg, 1.680 mmol) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **38** as a white solid (33 mg, 25%), mp 190–192 °C; $[\alpha]_D + 11$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3375, 3015, 2822 and 1722; δ_H (CDCl₃) 8.30–7.30 (m, 4H), 5.74 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.6$, $J_3 = 11.5$ Hz), 5.40 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 3.33 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz), 2.70 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.8$ Hz), 1.29, 1.25, 1.11, 1.07, 1.06, 1.02, 0.97 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 180.2, 169.9, 168.3, 145.1, 133.8, 132.9, 132.3 (2C), 128.4, 128.1, 122.1, 82.3, 74.8, 55.5, 47.9, 46.8 (2C), 43.9, 42.1, 41.4, 40.4, 39.9, 38.6, 34.4, 33.5, 33.3, 33.1, 31.2, 28.9, 27.4, 26.4, 24.1, 23.9 (2C), 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₈H₅₁O₇ [M – 1] 619.3635, found 619.3649; and to give **39** as a colourless oil (65 mg, 40%), $[\alpha]_D + 38$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3391, 2999, 2843 and 1740; δ_H (CDCl₃) 8.30–7.30 (m, 8H), 5.80 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz), 5.60 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 5.42 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 2.69 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 13.9$ Hz), 1.30, 1.28, 1.10, 1.08, 1.06, 1.03, 0.98 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 180.3, 170.7, 169.9, 168.7, 168.3, 145.2, 133.8 (2C), 132.9 (2C), 132.3 (4C), 128.4 (2C), 128.1 (2C), 122.2, 82.4, 72.2, 55.5, 48.0, 46.8 (2C), 43.9, 42.1, 41.4, 40.3, 39.9, 38.6, 34.4, 33.5, 33.3, 33.1, 31.2, 28.9, 27.4, 26.4, 24.1, 23.9 (2C), 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₆H₅₇O₁₀ [M + 1] 769.3952, found 769.3954.

4.5.26. Acylation of **MA** with succinic anhydride

Succinic anhydride (169 mg, 1.680 mmol) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **40** as a white solid (40 mg, 30%), mp 121–123 °C; $[\alpha]_D + 11$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3365, 3022, 2839 and 1711; δ_H (Py-d5) 5.53 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.8$,

$J_3 = 11.5$ Hz), 5.47 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz), 3.55 (d, 1H, $J = 10.8$ Hz), 3.30 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.80–2.60 (m, 4H), 1.30, 1.26, 1.08, 1.05, 1.03, 1.00, 0.98 (s, 3H each); δ_C (Py-d5) 180.6, 175.6, 173.4, 145.4, 122.8, 80.2, 74.3, 56.1, 48.5, 47.2, 47.1, 44.9, 42.8, 42.5, 40.9, 40.3, 39.1, 34.8, 33.8, 33.7, 33.6, 31.5, 30.9, 30.6, 29.7, 28.8, 26.7, 24.4, 24.3, 24.2, 19.3, 18.1, 17.9, 17.0; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₄H₅₂O₇Na [M + Na] 595.3611, found 595.3612; and **41** as a white solid (45 mg, 33%), mp 113–115 °C; $[\alpha]_D - 6$ (c 1 in MeOH); IR ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3346, 3021, 2803 and 1688; δ_H (Py-d5) 5.50 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.9$, $J_3 = 11.4$ Hz), 5.44 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.15 (d, 1H, $J = 10.9$ Hz), 3.30 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.80–2.55 (m, 8H), 1.29, 1.25, 1.04, 1.01, 0.98, 0.96, 0.95 (s, 3H each); δ_C (Py-d5) 180.9, 176.0, 175.7, 173.5, 173.4, 145.7, 122.5, 81.2, 70.7, 55.5, 48.2, 47.2, 47.0, 44.6, 42.7, 42.4, 40.5 (2C), 39.2, 34.7, 33.8, 33.6, 33.3, 31.8, 31.0, 30.9, 30.6, 30.5, 29.0, 28.7, 26.7, 24.3, 24.2, 24.1, 18.9, 18.4, 17.7, 16.9; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₈H₅₇O₁₀ [M + 1] 673.3947, found 673.3952.

4.5.27. Acylation of **MA** with glutaric anhydride

Glutaric anhydride (193 mg, 1.680 mmol) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **42** as a colourless oil (38 mg, 31%), $[\alpha]_D + 17$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3395, 2979, 2833 and 1725; δ_H (DMSO-d₆) 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.00 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.7$, $J_3 = 11.3$ Hz), 3.20 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz), 2.90 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz), 2.35–2.15 (m, 4H), 1.20, 1.17, 1.09, 1.07, 0.97, 0.89, 0.85 (s, 3H each); δ_C (DMSO-d₆) 181.9, 175.7, 173.7, 145.5, 122.5, 81.1, 73.8, 56.2, 49.1, 47.7, 47.4, 44.6, 43.1, 42.9, 41.1, 40.7, 39.6, 35.1, 34.0 (2C), 33.7, 32.2, 31.8, 30.9, 29.7, 28.8, 26.6, 24.7, 24.2 (2C), 21.6, 19.7, 18.4, 17.8, 17.1; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₅H₅₅O₇ [M + 1] 587.3948, found 587.3957; and **43** as a colourless oil (53 mg, 35%), $[\alpha]_D - 14$ (c 1 in MeOH); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3396, 3001, 2843 and 1710; δ_H (Py-d5) 5.49 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.45 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.7$, $J_3 = 11.5$ Hz), 5.14 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz), 3.20 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.35–2.10 (m, 8H), 1.32, 1.09, 1.03, 1.01, 0.98, 0.98, 0.95 (s, 3H each); δ_C (Py-d5) 180.7, 176.3, 176.2, 173.7, 173.5, 145.6, 122.7, 81.2, 70.8, 55.6, 48.0, 47.3, 46.7, 44.4, 42.9, 42.2, 41.4, 40.3, 39.1, 34.5, 34.4 (2C), 34.2, 34.1, 33.6, 33.5, 33.1, 31.6, 28.9, 28.5, 26.5, 24.1, 24.0, 23.9, 21.5, 21.4, 18.8, 18.2, 17.6, 16.7; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₀H₆₀O₁₀Na [M + Na] 723.4084, found 723.4073.

4.5.28. Acylation of **MA** with 3,3-dimethylglutaric anhydride

3,3-Dimethylglutaric anhydride (239 mg, 1.680 mmol) was added slowly to a solution of **MA** (100 mg, 0.211 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **44** as a colourless oil (45 mg, 33%), $[\alpha]_D + 44$ (c 1 in CHCl₃:MeOH, 2:1); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3299, 2987, 2801 and 1740; δ_H (DMSO-d₆) 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 4.97 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.5$ Hz), 3.19 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.45–2.35 (m, 4H), 1.19, 1.17, 1.16, 1.14, 1.01, 0.96, 0.93, 0.88, 0.84 (s, 3H each); δ_C (DMSO-d₆) 181.8, 177.0, 174.9, 145.4, 122.5, 81.1, 73.9, 56.7, 49.1, 47.7, 47.4, 45.4, 45.2, 45.1, 43.1, 42.8, 41.1, 40.7, 39.6, 35.1, 34.7, 34.0, 33.9, 33.8, 31.8, 30.8, 29.7, 29.4, 29.0, 26.6, 24.7, 24.2 (2C), 19.7, 17.8, 17.6, 17.1; ESI-HRMS m/z calcd for C₃₇H₅₉O₇ [M + 1] 615.4261, found 615.4252; and **45** as a colourless oil (59 mg, 36%), $[\alpha]_D - 13$ (c 1 in MeOH); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3380, 3024, 2841 and 1724; δ_H (Py-d5) 5.49 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.6$, $J_3 = 11.3$ Hz), 5.46 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.21 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz), 3.60 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.90–2.65 (m, 8H), 1.43, 1.41, 1.39 and 1.37 (s, 3H), 1.07, 1.05, 1.04, 1.03, 0.99, 0.99, 0.98 (s, 3H each); δ_C (Py-d5) 180.7, 175.3 (2C), 172.5, 172.4, 145.5, 122.6, 80.7, 70.8, 55.6, 48.0, 47.7, 46.7, 46.2 (2C), 45.2 (2C), 44.6, 42.8, 42.1, 40.4, 40.3, 39.0, 34.7 (2C), 34.5, 33.5, 33.4, 33.1, 31.6, 29.0, 28.6 (2C), 28.2 (2C), 28.1, 26.4, 24.4, 23.9, 23.4, 19.1, 18.3, 17.5, 16.7; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₄H₆₈O₁₀Na [M + Na] 779.4710, found 779.4712.

4.5.29. Acylation of **MA-Bn** with Ac_2O

Ac_2O (134 μ L) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **46** as a white solid (17 mg, 15%), mp 85–87 °C; $[\alpha]_D + 14$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3396, 3015, 2845 and 1701; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz), 3.16 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 13.8$ Hz), 2.04, 1.09, 1.03, 0.97, 0.90, 0.88, 0.84, 0.57 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 171.8, 144.0, 136.3, 128.6 (5C), 122.4, 81.1, 73.5, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 41.9, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.1, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.2, 21.6, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{39}H_{56}O_5Na$ [$M + Na$] 627.4025, found 627.4017; and **47** as a white solid (94 mg, 75%), mp 78–80 °C; $[\alpha]_D + 54$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3353, 2995, 2808 and 1685; δ_H ($CDCl_3$) 7.30 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.08 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.5$ Hz), 5.03 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.70 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz), 2.01, 1.94, 1.08, 0.99, 0.89, 0.87, 0.87, 0.86, 0.55 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.5, 170.9, 170.6, 143.9, 136.6, 128.5 (2C), 128.2, 128.0 (2C), 122.3, 80.8, 70.2, 66.1, 55.1, 47.7, 46.9, 46.0, 44.1, 41.9, 41.5, 39.5 (2C), 38.3, 34.0, 33.3, 32.7, 32.5, 30.9, 28.6, 27.7, 26.0, 23.8, 23.6, 23.2, 21.3, 21.0, 18.4, 17.9, 17.8, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{41}H_{59}O_6$ [$M + 1$] 647.4312, found 647.4320.

4.5.30. Acylation of **MA-Bn** with propanoic anhydride

Propanoic anhydride (182 μ L) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **48** as a white solid (24 mg, 22%), mp 46–48 °C; $[\alpha]_D + 24$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3401, 2989, 2823 and 1745; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.2$, $J_3 = 11.3$ Hz), 3.18 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.33 (2H, q, $J = 6.5$ Hz), 1.12, 1.09, 1.03, 0.98, 0.90, 0.87, 0.84 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 175.3, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 81.1, 73.3, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 42.0, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.1, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 28.1, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.5, 17.1, 16.9, 16.5, 9.4; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{40}H_{59}O_5$ [$M + 1$] 619.4363, found 619.4368; and **49** as a white solid (81 mg, 67%), mp 34–36 °C; $[\alpha]_D + 7$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3400, 3042, 2835 and 1704; δ_H ($CDCl_3$) 7.30 (m, 5H), 5.32 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 9.5$, $J_3 = 11.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.74 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.7$ Hz), 2.28 and 2.22 (t, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.09, 1.03, 1.01, 0.92, 0.90, 0.88, 0.86 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 174.3, 173.2, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 80.5, 70.1, 66.2, 55.1, 47.7, 47.0, 46.1, 44.2, 42.0, 41.6, 39.7, 39.6, 38.4, 34.0, 33.3, 32.6 (2C), 30.9, 28.7, 28.1 (2C), 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.5, 17.9, 17.1, 16.6, 9.6, 9.4; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{43}H_{63}O_6$ [$M + 1$] 675.4625, found 675.4626.

4.5.31. Acylation of **MA-Bn** with butanoic anhydride

Butanoic anhydride (232 μ L) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as in the general method for acylation above to give **50** as a white solid (12 mg, 10%), mp 33–35 °C; $[\alpha]_D + 53$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3376, 3015, 2842 and 1710; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.92 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 9.8$, $J_3 = 11.3$ Hz), 3.16 (d, 1H, $J = 9.8$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.27 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.10, 1.03, 0.93, 0.89, 0.89, 0.87, 0.84 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.5, 174.5, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 81.1, 73.3, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 44.0, 41.6, 41.5, 40.0, 39.5, 38.5, 36.8, 34.1, 33.4, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.9, 23.8, 23.3, 18.8,

18.4, 17.1, 16.9, 16.6, 13.9; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{41}H_{61}O_5$ [$M + 1$] 633.4519, found 633.4523; and **51** as a white solid (100 mg, 79%), mp 47–49 °C; $[\alpha]_D + 5$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3412, 3020, 2862 and 1730; δ_H ($CDCl_3$) 7.30 (m, 5H), 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.2$ Hz), 5.03 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.74 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.9$ Hz), 2.24 and 2.15 (t, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.08, 0.99, 0.94, 0.91, 0.90, 0.86, 0.85 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.4, 173.3, 173.2, 143.9, 136.5, 128.5 (2C), 128.1, 128.0 (2C), 122.3, 80.2, 69.9, 66.1, 55.0, 47.6, 46.8, 46.0, 44.1, 41.8, 41.5, 39.6, 39.5, 38.3, 36.6 (2C), 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 30.8, 28.6, 27.7, 26.0, 23.8, 23.6, 23.2, 18.7, 18.5, 18.4, 17.8, 17.0, 16.5, 13.9, 13.8; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{45}H_{67}O_6$ [$M + 1$] 703.4938, found 703.4946.

4.5.32. Acylation of **MA-Bn** with hexanoic anhydride

Hexanoic anhydride (328 μ L) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **52** as a white solid (18 mg, 15%), mp 40–42 °C; $[\alpha]_D - 6$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3375, 3012, 2841 and 1753; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.02 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 9.9$, $J_3 = 11.5$ Hz), 3.16 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz), 2.78 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 14.0$ Hz), 2.31 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.09, 1.02, 0.98, 0.90, 0.87, 0.87, 0.84 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.5, 174.6, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 81.1, 73.2, 66.1, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 41.9, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.8, 34.1, 33.3, 32.7, 32.6, 31.5, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 24.9, 23.8, 23.7 (2C), 22.5, 18.5, 17.1, 16.9, 16.5, 14.1; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{43}H_{65}O_5$ [$M + 1$] 661.4832, found 661.4844; and **53** as a colourless oil (100 mg, 76%), $[\alpha]_D - 24$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3432, 3022, 2849 and 1740; δ_H ($CDCl_3$) 7.29 (m, 5H), 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.04 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz), 5.02 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.74 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.6$ Hz), 2.26 and 2.16 (t, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.13, 1.08, 0.99, 0.89, 0.87, 0.87, 0.85 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.4, 173.5, 173.4, 143.9, 136.5, 128.5 (2C), 128.2, 128.0 (2C), 122.3, 80.2, 69.4, 66.1, 55.1, 47.7, 46.8, 46.0, 44.1, 41.9, 41.5, 39.6, 39.5, 38.3, 34.7, 34.6, 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 31.5, 31.4, 30.8, 28.6, 27.7, 26.0, 24.9, 24.7, 23.8, 23.6, 23.2, 22.4 (2C), 18.4, 17.8, 17.0, 16.5, 14.0 (2C); ESI-HRMS m/z calcd for $C_{49}H_{75}O_6$ [$M + 1$] 759.5564, found 759.5560.

4.5.33. Acylation of **MA-Bn** with lauric anhydride

Lauric anhydride (544 mg, 1.422 mmol) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **54** as a colourless oil (44 mg, 33%), $[\alpha]_D + 25$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3388, 3012, 2815 and 1700; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.02 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.93 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.6$, $J_3 = 11.5$ Hz), 3.16 (d, 1H, $J = 10.6$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 13.6$ Hz), 2.29 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 1.10, 1.03, 0.98, 0.90, 0.88, 0.86, 0.84 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 174.7, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 81.1, 73.3, 66.2, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 43.9, 42.0, 41.6, 40.0, 39.6, 38.5, 34.9, 34.1, 33.3, 32.7, 32.6, 32.1, 30.9, 29.8 (3C), 29.7 (2C), 29.4, 28.8, 27.8, 26.1, 25.3, 23.9, 23.7, 23.3, 22.9, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6, 14.3; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{49}H_{77}O_5$ [$M + 1$] 745.5771, found 745.5758; and **55** as a colourless oil (102 mg, 61%), $[\alpha]_D + 1$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3419, 2999, 2850 and 1708; δ_H ($CDCl_3$) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.2$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.75 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.7$ Hz), 2.21 and 2.12 (q, 2H each, $J = 6.5$ Hz), 1.09, 1.00, 0.90, 0.87, 0.87, 0.86, 0.83 (s, 3H each); δ_C ($CDCl_3$) 177.6, 173.7, 173.6, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2, 128.1 (2C), 122.4, 80.4, 70.1, 66.2, 55.1, 47.7, 46.9, 46.1, 44.2, 41.9, 41.6, 39.6 (2C), 38.3, 34.9, 34.8,

34.0, 33.3, 32.7 (2C), 32.2 (2C), 30.0, 29.9 (4C), 29.8 (4C), 29.6 (3C), 30.9, 28.7, 27.8, 26.1, 24.9 (2C), 23.9, 23.7, 23.3, 22.9, 22.2, 18.5, 17.9, 17.1, 16.6, 14.3 (2C); ESI-HRMS m/z calcd for $C_{61}H_{99}O_6$ [$M + 1$] 927.7442, found 927.7434.

4.5.34. Acylation of **MA-Bn** with benzoic anhydride

Benzoic anhydride (268 μ L) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **56** as a white solid (44 mg, 35%), mp 120–122 °C; $[\alpha]_D + 14$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3401, 3022, 2848 and 1712; δ_H (CDCl₃) 7.45–8.10 (m, 5H), 7.32 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.20 (ddd, 1H, $J_1 = 4.7, J_2 = 10.2, J_3 = 11.1$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 3.35 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 13.8$ Hz), 1.11, 1.08, 1.05, 0.92, 0.90, 0.89, 0.88 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.6, 167.2, 143.9, 136.6, 133.9, 130.4, 129.8 (2C), 128.7 (2C), 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 81.1, 74.3, 66.1, 55.4, 47.8, 46.9, 46.1, 44.0, 41.9, 41.6, 40.1, 39.5, 38.6, 34.1, 33.3, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.2, 18.5, 17.1, 16.9, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{44}H_{58}O_5Na$ [$M + Na$] 689.4182, found 689.4175; and **57** as a white solid (70 mg, 51%), mp 75–77 °C; $[\alpha]_D - 18$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(KBr)/cm^{-1}$ 3379, 2991, 2845 and 1729; δ_H (CDCl₃) 7.95–7.35 (m, 10H), 7.31 (m, 5H), 5.53 (ddd, 1H, $J_1 = 4.6, J_2 = 10.4, J_3 = 11.5$ Hz), 5.30 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.27 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 5.13 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 2.97 (dd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 13.7$ Hz), 1.21, 1.20, 1.14, 1.06, 0.96, 0.94, 0.68 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.6, 166.7, 166.5, 144.0, 136.7, 133.1, 133.0, 130.8, 129.8 (2C), 129.8 (2C), 129.1 (2C), 128.5 (4C), 128.3 (2C), 128.2 (2C), 122.4, 81.3, 71.3, 66.2, 55.4, 47.9, 47.0, 46.1, 44.2, 42.0, 41.7, 40.1, 39.7, 38.6, 34.2, 33.4, 32.8, 32.6, 31.0, 28.8, 27.9, 26.2, 23.9, 23.8, 23.3, 18.6, 18.1, 17.2, 16.8; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{51}H_{63}O_6$ [$M + 1$] 771.4625, found 771.4601.

4.5.35. Acylation of **MA-Bn** with phthalic anhydride

Phthalic anhydride (210 mg, 1.422 mmol) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **58** as a colourless oil (36 mg, 27%), $[\alpha]_D + 45$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3427, 3030, 2862 and 1731; δ_H (CDCl₃) 8.30–7.30 (m, 4H), 7.32 (m, 5H), 5.64 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 10.5, J_3 = 11.3$ Hz), 5.38 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.08 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 3.33 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.72 (dd, 1H, $J_1 = 4.7, J_2 = 14.0$ Hz), 1.28, 1.26, 1.10, 1.08, 1.05, 1.01, 0.94 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 180.7, 169.4, 168.3, 145.1, 136.7, 133.8, 132.9, 132.3, 129.9, 128.5 (2C), 128.4, 128.2 (4C), 122.2, 82.3, 74.9, 66.2, 55.5, 47.8, 46.9, 46.8, 43.8, 42.2, 41.4, 40.4, 39.9, 38.6, 34.4, 33.4, 33.2, 33.1, 31.2, 28.9, 27.4, 26.3, 24.2, 24.0, 23.9, 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{45}H_{58}O_7Na$ [$M + Na$] 733.4080, found 733.4068; and **59** as a colourless oil (89 mg, 55%), $[\alpha]_D + 1$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3366, 3019, 2868 and 1701; δ_H (CDCl₃) 8.30–7.30 (m, 8H), 7.32 (m, 5H), 5.78 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 10.3, J_3 = 11.5$ Hz), 5.62 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 5.40 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.05 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 2.70 (dd, 1H, $J_1 = 4.7, J_2 = 13.7$ Hz), 1.20, 1.16, 1.11, 1.09, 1.07, 1.04, 0.98 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 180.1, 170.6, 169.9, 168.6, 168.2, 145.1, 136.7, 133.8 (2C), 132.9 (2C), 132.3 (2C), 129.8 (2C), 128.5 (2C), 128.4 (2C), 128.2 (2C), 128.1 (2C), 128.0, 122.2, 82.4, 72.1, 66.3, 55.5, 48.0, 46.9, 46.8, 43.9, 42.2, 41.4, 40.2, 39.9, 38.6, 34.4, 33.5, 33.4, 33.2, 31.1, 28.9, 27.5, 26.4, 24.1, 23.9 (2C), 18.6, 18.3, 17.4, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{53}H_{63}O_{10}$ [$M + 1$] 859.4421, found 859.4420.

4.5.36. Acylation of **MA-Bn** with succinic anhydride

Succinic anhydride (142 mg, 1.422 mmol) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for

acylation to give **60** as a colourless oil (34 mg, 27%), $[\alpha]_D + 13$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3421, 2983, 2845 and 1722; δ_H (CDCl₃) 7.30 (m, 5H), 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.05 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 9.9, J_3 = 11.2$ Hz), 5.04 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 3.20 (d, 1H, $J = 9.9$ Hz), 2.70–0.50 (m, 4H), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 13.9$ Hz), 1.14, 1.09, 1.01, 0.95, 0.89, 0.87, 0.78 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.6 (2C), 172.8, 143.9, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 80.9, 73.7, 66.2, 55.3, 47.7, 46.9, 46.1, 43.8, 41.9, 41.6, 39.8, 39.5, 38.5, 34.1, 33.3, 32.7, 32.5, 30.9, 29.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.8, 23.4, 23.3, 18.4, 17.0, 16.9, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{41}H_{59}O_7$ [$M + 1$] 663.4261, found 663.4272; and **61** as a colourless oil (65 mg, 43%), $[\alpha]_D + 10$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3379, 2984, 2855 and 1700; δ_H (CDCl₃) 7.30 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 10.3, J_3 = 11.3$ Hz), 5.04 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.75 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 4.6, J_2 = 13.7$ Hz), 2.70–2.55 (m, 8H), 1.09, 0.99, 0.90, 0.88, 0.88, 0.86, 0.56 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 178.6 (2C), 177.6, 172.1, 171.9, 144.0, 136.6, 128.7 (2C), 128.3 (2C), 128.2, 122.3, 81.2, 70.7, 66.2, 55.1, 47.8, 46.9, 46.1, 44.2, 41.9, 41.6, 39.7, 39.6, 38.4, 34.1, 33.4, 32.7, 32.6, 30.9, 29.3 (2C), 29.1 (2C), 28.7, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 18.5, 18.0, 17.1, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{45}H_{62}O_{10}Na$ [$M + Na$] 785.4241, found 785.4246.

4.5.37. Acylation of **MA-Bn** with glutaric anhydride

Glutaric anhydride (162 mg, 1.422 mmol) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **62** as a colourless oil (27 mg, 21%), $[\alpha]_D + 19$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3401, 3015, 2871 and 1699; δ_H (CDCl₃) 7.31 (m, 5H), 5.24 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.98 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.96 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 10.2, J_3 = 11.5$ Hz), 3.18 (d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.8, J_2 = 13.8$ Hz), 2.45–2.30 (m, 4H), 1.09, 1.02, 0.97, 0.89, 0.83, 0.78, 0.57 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.9, 177.6, 173.7, 144.0, 136.6, 128.7 (2C), 128.3 (2C), 128.2, 122.3, 81.2, 70.7, 66.2, 55.1, 47.8, 46.9, 46.1, 44.2, 41.9, 41.6, 39.7, 39.6, 38.4, 34.1, 33.4, 32.7, 32.6, 30.9, 29.3, 29.1, 28.7, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.3, 20.2, 18.5, 18.0, 17.1, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{42}H_{60}O_7Na$ [$M + Na$] 699.4237, found 699.4261; and **63** as a colourless oil (75 mg, 51%), $[\alpha]_D + 1$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3378, 3021, 2861 and 1725; δ_H (CDCl₃) 7.32 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.10 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 10.5, J_3 = 11.3$ Hz), 5.04 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.75 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.8$ Hz), 2.50–2.10 (m, 8H), 1.09, 1.02, 0.99, 0.88, 0.87, 0.87, 0.56 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 178.6 (2C), 177.5, 172.9 (2C), 143.9, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.3, 80.4, 70.2, 66.1, 55.1, 47.7, 46.9, 46.1, 44.0, 41.9, 41.5, 39.6, 39.5, 38.4, 34.1, 33.4 (2C), 33.3, 33.1 (2C), 32.7, 32.5, 30.9, 28.6, 27.8, 26.1, 23.8, 23.7, 23.2, 20.3, 20.2, 18.4, 17.9, 17.0, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{47}H_{66}O_{10}Na$ [$M + Na$] 813.4554, found 813.4523.

4.5.38. Acylation of **MA-Bn** with 3,3-dimethylglutaric anhydride

3,3-Dimethylglutaric anhydride (202 mg, 1.422 mmol) was added slowly to a solution of **MA-Bn** (100 mg, 0.177 mmol) in pyridine (2 mL). The mixture was treated as described in the general method for acylation to give **64** as a colourless oil (33 mg, 25%), $[\alpha]_D + 25$ (c 1 in $CHCl_3$:MeOH, 2:1); IR $\nu_{max}(film)/cm^{-1}$ 3383, 3010, 2829 and 1715; δ_H (CDCl₃) 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.04 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.94 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5, J_2 = 10.5, J_3 = 11.3$ Hz), 3.19 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.3, J_2 = 13.7$ Hz), 2.45–2.35 (m, 4H), 1.14, 1.12, 1.10, 1.02, 0.98, 0.89, 0.87, 0.84, 0.56 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.6 (2C) 172.8, 144.0, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (2C), 128.1, 122.4, 80.9, 73.5, 66.2, 55.3, 47.8, 46.9, 46.1, 45.4, 45.1, 43.9, 42.0, 41.6, 39.9, 39.6, 38.5, 34.1, 33.3, 33.0, 32.8, 32.6, 30.9, 28.8, 28.6, 28.5, 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.2, 18.5, 17.1, 16.9, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for $C_{44}H_{64}O_7Na$ [$M + Na$] 727.4550,

found 727.4552; and **65** as a colourless oil (71 mg, 47%), $[\alpha]_D + 10$ (c 1 in CHCl_3 :MeOH, 2:1); IR $\nu_{\text{max}}(\text{film})/\text{cm}^{-1}$ 3401, 3027, 2839 and 1732; $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$ 7.31 (m, 5H), 5.25 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.3$, $J_3 = 11.3$ Hz), 5.04 (AB system, 2H, $J = 12.0$ Hz), 4.77 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 2.88 (dd, 1H, $J_1 = 4.3$, $J_2 = 13.8$ Hz), 2.55–2.25 (m, 8H), 1.12, 1.12, 1.09, 1.00, 0.89, 0.87, 0.87, 0.84, 0.56 (s, 3H each); $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$ 177.6, 177.1 (2C), 172.1, 171.9, 144.1, 136.6, 128.6 (2C), 128.2 (3C), 122.3, 80.4, 70.5, 66.2, 55.1, 47.7, 46.9, 46.1, 45.5 (2C), 45.1 (2C), 44.2, 42.0, 41.6, 39.6 (2C), 38.4, 34.1, 33.3, 32.6, 32.5, 31.1 (2C), 30.9, 28.8, 28.2 (2C), 28.0 (2C), 27.8, 26.1, 23.9, 23.7, 23.5, 18.5, 18.0, 17.1, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{73}\text{O}_{10}$ $[M - 1]$ 845.5204, found 845.5194.

4.6. General procedure for the quantization of the incorporation of OA and MA to the CTC resin

Step 1. Portions of 50 mg of CTC resin (loading 1.27 mmol/g) were placed in six polypropylene syringes (10 mL) fitted with polyethylene filter disks. The resin was washed with DMF (2 mL \times 3) and DCM (2 mL \times 3), swelled with DCM (2 mL, 20 min) and drained. Each syringe was treated with the corresponding solution of OA (**1**) or MA (**2**) and DIEA indicated below and placed in orbital agitation for 48 h. Afterwards, the resin was filtered, washed with DMF (2 mL \times 3) and DCM (2 mL \times 3), and then drained.

	OA (1)	DIEA	DCM
Test A (syringe 1)	14.5 mg, 0.5 equiv	110 μL , 10 equiv	1 mL
Test B (syringe 2)	29.0 mg, 1.0 equiv	220 μL , 20 equiv	1 mL
Test C (syringe 3)	87.0 mg, 3.0 equiv	660 μL , 60 equiv	1 mL
	MA (2)	DIEA	DCM
Test A (syringe 4)	15.0 mg, 0.5 equiv	110 μL , 10 equiv	1 mL
Test B (syringe 5)	29.9 mg, 1.0 equiv	220 μL , 20 equiv	1 mL
Test C (syringe 6)	89.9 mg, 3.0 equiv	660 μL , 60 equiv	1 mL

Step 2. The six syringes with the resin were now treated with the corresponding six solutions of Fmoc-Leu-OH (112 mg, 5 equiv each) and DIEA (110 μL , 10 equiv each) in DCM, and placed in orbital stirring for 2 h.

Step 3. For the capping of the resin, 0.5 mL of MeOH were added to each syringe and maintained with orbital stirring for 30 min. The resin was filtered, washed with DMF (2 mL \times 3) and DCM (2 mL \times 3) and then drained.

Step 4. The solutions of Fmoc-Gly, DIPCDI, DMAP in DCM/DMF specified below were added to the different syringes and placed in orbital stirring for 1 h. The syringes were filtered, rinsed with DCM and treated twice more with the same solutions. After the three treatments, the resin was filtered, washed with DMF (2 mL \times 3) and DCM (2 mL \times 3), and then drained.

	Fmoc-Gly-OH	DIPCDI	DMAP
Syringes 1, 2 and 3	188 mg, 10 equiv	98 μL , 10 equiv	7 mg, 1 equiv
Syringes 4, 5 and 6	377 mg, 20 equiv	196 μL , 20 equiv	15 mg, 2 equiv

Step 5. The cleavage of the OA or MA derivatives from the resin was performed by adding to each syringe a solution of TFA (1%) in DCM (2 min \times 3).

The resulting mixtures of Fmoc-Gly-OA or Fmoc-Gly-MA and Fmoc-Leu-OH were then analyzed by HPLC. RP-HPLC analyses were carried out with a WATERS C18 reverse-phase column (0.4 μm diameter of particle; 150 mm \times 3.9 mm) with a flow rate of 1 mL/

min. A wavelength of 301 nm was selected for the purity analysis, using a linear gradient of 30–0% of B in 30 min and maintained for 5 min without B, where A was CH_3CN containing 0.1% TFA and B was H_2O containing 0.1% TFA.

4.6.1. Reaction of OA with Fmoc-Gly

A solution of Fmoc-Gly with DIPCDI and DMAP in DCM/DMF was added to a solution of **1** in DCM, as described in the above step 4 of the general procedure for the quantization of the incorporation of OA to the CTC resin. The reaction was stirred for 2 h at reflux. Then, cold water was added to the mixture and afterwards was extracted with DCM. The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give **66** as a white solid, with the percentages given in Table 3, mp 115–117 °C; $[\alpha]_D + 27$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3620, 2941, 2395 and 1699; $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$ 7.79 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.63 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.45–7.29 (m, 4H), 5.31 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 4.62 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 7.5$ Hz), 4.43 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.26 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.01 (d, 2H, $J = 3.5$ Hz), 1.07, 1.01, 0.89, 0.87, 0.85, 0.84, 0.59 (s, 3H each); $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$ 184.0, 170.1, 156.5, 144.0 (2C), 143.8, 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.3 (2C), 125.3 (2C), 122.6, 120.2 (2C), 82.8, 67.4, 55.5, 47.8, 47.3, 46.7, 46.1, 43.2, 41.8, 41.1, 39.6, 38.2, 38.1, 37.2, 34.0, 33.3, 32.7, 32.6, 30.9, 28.3, 27.9, 26.1, 23.8 (2C), 23.7, 23.1, 18.4, 17.3, 16.8, 15.6; ESI-HRMS m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{NO}_6$ $[M + 1]$ 736.4577, found 736.4570.

4.6.2. Reaction of MA with Fmoc-Gly

A solution of Fmoc-Gly with DIPCDI and DMAP in DCM/DMF was added to a solution of **2** in DCM, as described in the above step 4 of the general procedure for the quantization of the incorporation of MA to the CTC resin. The reaction was stirred for 12 h at rt. Then, cold water was added to the mixture and afterwards was extracted with DCM. The organic layer was dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (20:1) to give as white solids, with the percentages given in Table 3: **67**, mp 170–172 °C; $[\alpha]_D + 6$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3636, 2930, 2389 and 1700; $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$ 7.76 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 7.43–7.29 (m, 4H), 5.26 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.3$ Hz), 5.06 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz), 4.42 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 4.24 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 4.02–3.92 (m, 4H) 3.19 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$, $J_2 = 10.5$ Hz), 1.12, 1.04, 1.03, 0.93, 0.92, 0.86 0.75 (s, 3H each); $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$ 182.5, 170.3, 157.3, 143.8, 143.8 (2C), 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.3 (2C), 125.7 (2C), 122.4, 120.2 (2C), 80.7, 74.9, 67.5, 55.3, 47.7, 47.2, 46.7, 46.0, 43.7, 43.3, 41.2, 39.9, 39.5, 38.6, 34.0, 33.2, 32.6 (2C), 30.8, 29.9, 28.7, 27.8, 26.1, 23.7, 23.6, 23.1 18.4, 17.2, 16.8, 16.5; ESI-HRMS m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{NO}_7$ $[M + 1]$ 752.4526, found 752.4529; **68**, mp 143–145 °C; $[\alpha]_D + 3$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3619, 2922, 2388 and 1705; $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$ 7.76 (d, 2H, 6.5 Hz), 7.59 (d, 2H, $J = 6.5$ Hz), 7.42–7.28 (m, 4H), 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.60 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 4.42 (d, 2H, $J = 12.5$ Hz), 4.24 (t, 1H, $J = 6.5$), 4.05–4.00 (m, 4H) 3.80 (ddd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 12.5$ Hz), 2.83 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 10.5$ Hz), 1.14, 0.98, 0.93, 0.91, 0.90, 0.85, 0.76 (s, 3H each); $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$ 185.32, 170.8, 157.3, 143.9, 143.8 (2C), 141.5 (2C), 127.9 (2C), 127.2 (2C), 125.2 (2C), 122.5, 120.2 (2C), 86.6, 67.5, 67.3, 55.3, 47.7, 47.3, 46.6, 46.0, 43.4, 41.9, 41.3, 39.5, 39.4, 38.4, 34.0, 33.2, 32.7, 32.6, 30.8, 29.9, 28.8, 27.8, 26.1, 23.7, 23.6, 23.1 18.4, 17.8, 17.3, 16.7; ESI-HRMS m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{62}\text{NO}_7$ $[M + 1]$ 752.4526, found 752.4525; and **69**, mp 121–123 °C; $[\alpha]_D - 1$ (c 1 in CHCl_3); IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})/\text{cm}^{-1}$ 3615, 2927, 2390 and 1710; $\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$ 7.79 (d, 4H, $J = 6.5$ Hz), 7.63 (d, 4H, $J = 6.5$ Hz), 7.45–7.29 (m, 8H), 5.34 (ddd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 11.3$ Hz), 5.23 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 4.80 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz), 4.18 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.95–3.87 (m, 8H) 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.4$ Hz),

1.11, 1.04, 0.85, 0.81, 0.81, 0.75 0.53 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 183.7, 170.3, 169.9, 157.0 (2C), 143.9 (4C), 143.8, 141.4 (4C), 127.9 (4C), 127.3 (4C), 125.7 (4C), 122.2, 120.1 (4C), 82.1, 71.0, 67.5 (2C), 55.0, 47.7, 47.2 (2C), 46.7, 46.0, 43.9, 43.1, 42.9, 41.8, 41.1, 39.6, 39.5, 38.5, 34.0 (2C), 32.6, 32.5, 30.9, 28.6, 27.8, 26.1, 23.8, 23.6, 23.0 18.3, 17.8, 17.3, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for C₆₄H₇₅N₂O₁₀ [M + 1] 1031.5422, found 1031.5428.

4.7. General method for solid-phase acylation

Two portions of CTC resin (250 mg, 1.27 mmol/g) were placed in two polypropylene syringes (20 mL) fitted with polyethylene filter disks. The resin was washed with DMF (2 mL × 3) and DCM (2 mL × 3), swelled with DCM (2 mL, 20 min) and drained. **OA** (**1**) and **MA** (**2**) were incorporated into the resin as described in the above general procedure, and placed in orbital stirring for 24 h. Afterwards the resin was recoupled with the same solutions for another 24 h. For the capping of the resin, 0.5 mL of MeOH were added to each syringe and maintained with orbital stirring for 30 min. The resin was filtered, washed with DMF (2 mL × 3) and DCM (2 mL × 3), and then drained.

These two syringes were each split into four portions (1/4 each one) to obtain four syringes of resin-OA and other four syringes of resin-MA, which were now respectively acylated with acetic, hexanoic, benzoic, and succinic anhydrides at a molar relationship of 4:1 (anhydride:OH group), and placed in orbital agitation for 24 h at rt. These acylation reactions were conducted in the presence of DMAP (0.5 equiv), Et₃N (0.5 equiv) and DCM/DMF (1 mL/1 mL) as solvent. The resin was filtered, washed with DMF (2 mL × 3) and DCM (2 mL × 3), and then drained. The cleavage of the acylated derivatives from the resin was carried out by addition of each syringe of a solution of DCM with TFA (1%) (2 min × 3).

4.7.1. Solid-phase succinylation and consecutive solution-phase benzylation of **OA**

OA (150 mg, 0.33 mmol) was succinylated in solid-phase according with the general procedure described above. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure and 110 mg of residue were obtained. BnCl (83 μ L) was added in a relationship 2:1 to a solution of this residue in DMF (5 mL) with K₂CO₃ (0.12 g). The reaction was stirred for 4 h at 55 °C. Then, the reaction mixture was diluted with water and extracted with DCM, and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give benzyl oleanolate (**3**, 72 mg, 40.1%), and benzyl 3-(benzylsuccinyl) oleanolate (**70**, 133 mg, 54.9%) as a colourless oil; $[\alpha]_D + 77$ (c 1 in CHCl₃); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3293, 2985, 2815 and 1699; δ_H (CDCl₃) 7.36–7.35 (m, 10H), 5.31 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.13 and 5.07 (2 AB systems, 2H each, $J = 12.0$ Hz), 4.53 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$, $J_2 = 10.6$ Hz), 2.93 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz), 2.75–2.60 (m, 4H), 1.15, 0.94, 0.92, 0.91, 0.87, 0.85, 0.63 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 178.4, 172.1, 171.8, 143.7, 136.5, 135.8, 128.6, 128.4 (2C), 128.3 (2C), 128.2 (2C), 128.0 (2C), 127.9, 122.4, 81.3, 66.5, 65.9, 55.3, 47.6, 46.8, 45.9, 41.7, 41.4, 39.3, 37.7, 36.9, 38.1, 33.9, 33.1, 32.9, 32.4, 30.7, 29.6, 29.3, 29.2, 28.1, 27.7, 25.9, 23.7, 23.5, 23.1, 18.2, 16.9, 16.8, 15.4; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₈H₆₃O₆ [M – 1] 735.4625, found 735.4623.

4.7.2. Solid-phase succinylation and consecutive solution-phase benzylation of **MA**

MA (472 mg, 1 mmol) was succinylated in solid-phase according with the general procedure described above. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure and 390 mg of residue were obtained. BnCl (364 μ L) was added in a relationship 2:1 to a solution of this residue in DMF (8 mL) with K₂CO₃ (0.53 g). The reaction

was stirred for 4 h at 55 °C. Then, the reaction mixture was diluted with water and extracted with DCM, and the organic layer dried with anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography using DCM/acetone (10:1) to give benzyl maslinate (**4**, 32 mg, 5.7%); benzyl 2-(benzylsuccinyl) maslinate (**71**, 57 mg, 7.6%) as a colourless oil; $[\alpha]_D + 6$ (c 1 in CHCl₃); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3301, 3012, 2915 and 1783; δ_H (CDCl₃) 7.36–7.34 (m, 10H), 5.27 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz), 5.14 and 5.08 (2 AB systems, 2H each, $J = 12.0$ Hz), 5.00 (ddd, 1H, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 6.0$, $J_3 = 10.5$ Hz), 3.14 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 2.91 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz), 2.75–2.60 (m, 4H), 1.12, 1.05, 0.99, 0.92, 0.90, 0.86, 0.59 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.5, 172.7, 172.5, 143.9, 136.5, 135.8, 128.7, 128.5 (2C), 128.4 (2C), 128.3 (2C), 128.1 (2C), 128.0, 122.3, 80.7, 73.9, 66.8, 66.1, 55.2, 47.6, 46.8, 46.0, 43.6, 41.8, 41.5, 39.7, 39.4, 38.4, 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 30.8, 29.7, 29.6, 28.7, 27.7, 26.0, 23.8, 23.6, 23.1, 18.3, 17.0, 16.8, 16.4; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₈H₆₅O₇ [M + 1] 753.4730, found 753.4714; benzyl 3-(benzylsuccinyl) maslinate (**72**, 43 mg, 5.5%) as a colourless oil; $[\alpha]_D + 3$ (c 1 in CHCl₃); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3343, 3076, 2915 and 1783; δ_H (CDCl₃) 7.35–7.34 (m, 10H), 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.13 and 5.07 (2 AB systems, 2H each, $J = 12.5$ Hz), 4.57 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz), 3.75 (ddd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 6.5$, $J_3 = 10.5$ Hz), 2.91 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz), 2.80–2.65 (m, 4H), 1.13, 0.95, 0.92, 0.90, 0.87, 0.84, 0.60 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.5, 173.0, 172.9, 143.8, 136.5, 135.7, 128.7, 128.6 (2C), 128.5 (2C), 128.3 (2C), 128.1 (2C), 128.0, 122.4, 85.6, 67.2, 66.9, 66.0, 55.2, 47.5, 46.9, 46.8, 45.8, 41.8, 41.5, 39.5, 39.3, 38.2, 34.0, 33.2, 32.5, 32.4, 30.8, 29.5, 29.4, 28.5, 27.6, 25.9, 23.6, 23.4, 23.0, 18.3, 17.7, 16.9, 16.6; ESI-HRMS m/z calcd for C₄₈H₆₅O₇ [M + 1] 753.4730, found 753.4722; and benzyl 2,3-di(benzylsuccinyl) maslinate (**73**, 721 mg, 76.5%) as a colourless oil; $[\alpha]_D + 57$ (c 1 in CHCl₃); IR ν_{\max} (film)/cm⁻¹ 3343, 3076, 2915 and 1783; δ_H (CDCl₃) 7.38–7.31 (m, 15H), 5.29 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz), 5.14 (ddd, 1H, $J_1 = 3.0$, $J_2 = 6.0$, $J_3 = 10.5$ Hz), 5.12 and 5.04 (m, 6H each), 4.79 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 2.93 (dd, 1H, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 12.0$ Hz), 2.67–2.57 (m, 8H), 1.14, 1.03, 1.02, 0.94, 0.92, 0.89, 0.60 (s, 3H each); δ_C (CDCl₃) 177.4, 172.2, 172.1, 172.0, 171.9, 143.7, 136.5, 135.8 (2C), 128.7, 128.5 (4C), 128.4 (4C), 128.3 (4C), 128.1, 128.0, 122.1, 80.7, 70.3, 66.5, 66.4, 66.0, 54.9, 47.5, 46.7, 45.8, 43.8, 41.7, 41.4, 39.5, 39.3, 38.1, 33.9, 33.2, 32.5, 32.4, 30.8, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.4, 27.6, 25.9, 23.7, 23.5, 23.1, 18.2, 17.7, 16.8, 16.4; ESI-HRMS m/z calcd for C₅₉H₇₅O₁₀ [M + 1] 943.5360, found 943.5335.

4.8. Biological experimental procedures

4.8.1. Drugs

The different compounds used in cell treatment were dissolved before use at 10 mg/mL in 50% DMSO and 50% PBS. A stock solution was frozen and stored at – 20 °C. Prior to the experiments, this solution was diluted in cell-culture medium. Apoptosis and mitochondrial-membrane potential were measured at the IC₅₀ (concentration causing 50% reduction in growth compared to the control after 72 h of treatment) and the IC₅₀ × 2 (twice IC₅₀ concentration. ×2 value corresponding to 50% viability) concentrations.

4.8.2. Cell culture

Murine melanoma cell line b16f10 (ECACC CRL-6475, provided by the cell bank of the University of Granada, Spain) was cultured in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated FCS, 10,000 units/mL of penicillin and 10 mg/mL of streptomycin. Subconfluent monolayer cells were used in all experiments.

4.8.3. Cell-proliferation activity assay

The effect of treating each product upon proliferation in b16f10 murine melanoma cells was measured using the MTT assay (Sigma,

MO, USA), which is based on the ability of live cells to cleave the tetrazolium ring, thus producing formazan, which absorbs at 570 nm.

Cell viability was determined by measuring the absorbance of MTT dye staining of living cells [33]. For this assay, $11 \cdot 10^3$ b16f10 cells were grown on a 96-well plate and incubated with the different products (0–80 $\mu\text{g/mL}$). After 72 h, 100 μL of MTT solution (0.5 mg/mL) was added to each well. After 2 h of incubation the cells were washed twice with PBS and the formazan was resuspended in 200 μL DMSO. Relative cell viability was measured by absorbance at 550 nm on an ELISA plate reader (Tecan Sunrise MR20-301, TECAN, Austria).

4.8.4. Annexin V–FICT/propidium iodide flow-cytometric analysis

The extension apoptosis was analyzed with flow-cytometry by using a FACScan flow-cytometer (fluorescence-activated cell sorter) (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). In brief, $11 \cdot 10^4$ b16f10 cells were plated in 12-well plates with 2 mL of medium following treatment with the compounds for 72 h, at the IC_{50} concentrations, calculated previously, and at twice the IC_{50} concentrations ($\text{IC}_{50} \times 2$). The cells were collected and resuspended in binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2). Annexin V–FITC conjugate (1 $\mu\text{g/mL}$) was added and incubated for 30 min at rt in darkness. Just before FACS analysis, cells were stained with 20 μL of 1 mg/mL PI solution. In each experiment, approximately $20 \cdot 10^3$ cells were analyzed and the experiment was duplicated three times.

4.8.5. Flow-cytometry analysis of the mitochondrial-membrane potential

Oxidative damage was studied by flow-cytometry analysis of the ROS levels, using dihydrorhodamine 123 oxidized to the highly fluorescent product rhodamine. The formation of rhodamine can be monitored by fluorescence spectroscopy using excitation and emission wavelengths of 500 and 536 nm, respectively. The intracellular measurement of the reactive oxygen species was made by cytometry determination of rhodamine 123. In the same way as in the apoptosis assays, $11 \cdot 10^4$ b16f10 cells were plated in 12-well plates, and treated with the compounds that exhibited cytotoxic activity for 72 h, at the IC_{50} and $\text{IC}_{50} \times 2$ concentrations. After treatment, the medium was removed and a fresh medium with DHR, at a final concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$, was added. After 30 min of incubation, the medium was removed and the cells were washed and resuspended in PBS with 5 $\mu\text{g/mL}$. The intensity of fluorescence from Rh123 and PI was determined using a FACScan flow-cytometer (fluorescence-activated cell sorter) (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA).

4.8.6. Anti-HIV protease activity

The HIV activity was determined using recombinant HIV protease from *E. coli* source (PQITLWQRPLVTIKIGGQLK EALLDTGADD TVLEEMNLPG RWKPKMIGGI GGFIVRQYD QILIEICGHK AIGTVLVGPT PVNIIGRNL TQIGCTLNF) from BioVendor GmbH (Heidelberg, Germany). The proteolytic activity of HIV-1-protease was measured using the FRET (fluorescence resonance energy transfer). The synthetic peptide (Abz-Ala-Arg-Val-Nle-Tyr(NO_2)-Glu-Ala-Nle- NH_2) from Sigma (St. Louis, MO, USA) corresponding to the p-24-p17 cleavage site in the natural gag precursor was used as substrate. In the FRET HIV-1 PR substrate, the fluorescence was quenched by an appropriate fluorescence quencher until this peptide was cleaved into two separate fragments by HIV-1-protease at the cleavage site; when the peptide was cleaved, the fluorescence was monitored.

The decrease in the percentage of the fluorescence activity was used to determine the percentage of the activity inhibition, and was

calculated according to: % inhibition = $[1 - (V_{\text{inh}}/V_0)] \cdot 100$ (V_{inh} = enzymatic activity in the presence of the inhibitor; V_0 = enzymatic activity of the control). The assays were performed with a solution containing HIV-1-protease (10 ηM), the fluorogenic substrate (10 μM) in an assay buffer (50 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 M NaCl, 2.5% glycerol), and an increasing concentrations of inhibitor from 0.17 $\mu\text{g/mL}$ to 1.7 mg/mL, in a total volume of 140 μL . The fluorescence was analyzed using an LS 50B fluorescence spectrometer at excitation/emission = 320 nm/420 nm.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (CTQ2009–13898) and the *Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa* of the *Junta de Andalucía* (FQM–0139). We thank David Nesbitt for reviewing the English in the manuscript.

References

- [1] A. Garcia-Granados, A. Martinez, J.N. Moliz, A. Parra, F. Rivas, 3 β -hydroxyolean-12-en-28-oic acid (oleanolic acid), *Molecules* 3 (1998) M87.
- [2] A. Garcia-Granados, A. Martinez, J.N. Moliz, A. Parra, F. Rivas, 2 α ,3 β -dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (maslinic acid), *Molecules* 3 (1998) M88.
- [3] J. Pollier, A. Goossens, Oleanolic acid, *Phytochemistry* 77 (2012) 10–15.
- [4] A. Garcia-Granados, Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling byproducts, *PCT. Int. Appl. WO* 9804331, 1998.
- [5] J.M. Lou-Bonafonte, C. Arnal, M.A. Navarro, J. Osada, Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 1043–1057.
- [6] I. Sogno, N. Vannini, G. Lorusso, R. Cammarota, D.M. Noonan, L. Generoso, M.B. Sporn, A. Albini, Anti-angiogenic activity of a novel class of chemopreventive compounds: oleanic acid terpenoids, *Recent Results Cancer Res.* 181 (2009) 209–212.
- [7] A. Petronelli, G. Pannitteri, U. Testa, Triterpenoids as new promising anti-cancer drugs, *Anti-Cancer Drugs* 20 (2009) 880–892.
- [8] N. Sultana, A. Ata, Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 23 (2008) 739–756.
- [9] F. Mengoni, M. Lichtner, L. Battinelli, M. Marzi, C.M. Mastroianni, V. Vullo, G. Mazzanti, In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells, *Planta Med.* 68 (2002) 111–114.
- [10] M.B. Sporn, K.T. Liby, M.M. Yore, L. Fu, J.M. Lopchuk, G.W. Gribble, New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 537–545.
- [11] K.I. Wolska, A.M. Grudniak, B. Fiecek, A. Kraczkiewicz-Dowjat, A. Kurek, Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives, *Cent. Eur. J. Biol.* 5 (2010) 543–553.
- [12] V.R. Preedy, R.R. Watson, *Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Elsevier, London, 2010.
- [13] R.A. Hill, J.D. Connolly, Triterpenoids, *Nat. Prod. Rep.* 29 (2012) 780–818 and references therein.
- [14] H. Sheng, H. Sun, Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases, *Nat. Prod. Rep.* 28 (2011) 543–593 and references therein.
- [15] N. Sultana, Z.S. Saify, Naturally occurring and synthetic agents as potential anti-inflammatory and immunomodulators, *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem.* 11 (2012) 3–19.
- [16] A. Bishayee, S. Ahmed, N. Brankov, M. Perloff, Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer, *Front. Biosci.* 16 (2011) 980–996.
- [17] G. Kuttan, P. Pratheeshkumar, K.A. Manu, R. Kuttan, Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids, *Pharm. Biol.* 49 (2011) 995–1007.
- [18] V.R. Yadav, S. Prasad, B. Sung, R. Kannappan, B.B. Aggarwal, Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer, *Toxins* 2 (2010) 2428–2466.
- [19] J.A.R. Salvador, *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*, Nova Science Publishers, New York, 2010.
- [20] J. Rios, Effects of triterpenes on the immune system, *J. Ethnopharmacol.* 128 (2010) 1–14.
- [21] J. Feng, W. Chen, Y. Zhao, X. Ju, Anti-tumor activity of oleanolic, ursolic and glycyrrhetic acid, *Open Nat. Prod. J.* 2 (2009) 48–52.
- [22] M.N. Laszczyk, Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Med.* 75 (2009) 1549–1560.
- [23] P. Dzubak, M. Hajduch, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban, J. Sarek, Pharmacological activities of natural

- triterpenoids and their therapeutic implications, *Nat. Prod. Rep.* 23 (2006) 394–411 and references therein.
- [24] B.K. Cassels, M. Asencio, Anti-HIV activity of natural triterpenoids and hemisynthetic derivatives 2004–2009, *Phytochem. Rev.* 10 (2011) 545–564.
- [25] C.R. Dorr, S. Yemets, O. Kolomitsyna, P. Krasutsky, L.M. Mansky, Triterpene derivatives that inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 542–545.
- [26] R.Y. Kuo, K. Qian, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 1321–1344.
- [27] H. Gehringer, K. Von der Helm, S. Seelmeir, B. Weissbrich, J. Eberle, H. Nitschko, Development and evaluation of a phenotypic assay monitoring resistance formation to protease inhibitors in HIV-1-infected patients, *J. Virol. Methods* 109 (2003) 143–152.
- [28] S.M. Rodems, B.D. Hamman, C. Lin, J. Zhao, S. Shah, D. Heidary, L. Makings, J.H. Stack, B.A. Pollok, A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases, *Assay Drug Dev. Technol.* 1 (2002) 9–19.
- [29] N.I. Ziedan, H. Kadri, A.D. Westwell, The development of pro-apoptotic cancer therapeutics, *Mini Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 711–718.
- [30] L. Cipak, L. Grausova, E. Miadokova, L. Novotny, P. Rauko, Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects, *Arch. Toxicol.* 80 (2006) 429–435.
- [31] J.M.R. Patlolla, C.V. Rao, Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13 (2012) 147–155.
- [32] A. Parra, F. Rivas, S. Martin-Fonseca, A. Garcia-Granados, A. Martinez, Maslinic acid derivatives induce significant apoptosis in b16f10 murine melanoma cells, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5991–6001.
- [33] F.J. Reyes, J.J. Centelles, J.A. Lupiañez, M. Cascante, ($2\alpha,3\beta$)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europaea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells, *FEBS Lett.* 580 (2006) 6302–6310.
- [34] M.E. Juan, J.M. Planas, V. Ruiz-Gutierrez, H. Daniel, U. Wenzel, Anti-proliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells, *Br. J. Nutr.* 100 (2008) 36–43.
- [35] R. Martin, J. Carvalho-Tavares, E. Ibeas, M. Hernandez, V. Ruiz-Gutierrez, M.L. Nieto, Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation, *Cancer Res.* 67 (2007) 3741–3751.
- [36] F.J. Reyes-Zurita, E.E. Rufino-Palomares, J.A. Lupiañez, M. Cascante, Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, *Cancer Lett.* 273 (2009) 44–54.
- [37] F.J. Reyes-Zurita, G. Pachon-Pena, D. Lizarraga, E.E. Rufino-Palomares, M. Cascante, J.A. Lupiañez, The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism, *BMC Cancer* 11 (2011) 154.
- [38] E.E. Rufino-Palomares, F.J. Reyes-Zurita, L. Garcia-Salguero, K. Mokhtari, P.P. Medina, J.A. Lupiañez, J. Peragon, Maslinic acid, a triterpene antitumour agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells, *J. Proteomics* 83 (2013) 15–25.
- [39] S. Sanchez-Tena, F.J. Reyes-Zurita, S. Diaz-Moralli, M.P. Vinardell, M. Reed, F. Garcia-Garcia, J. Dopazo, J.A. Lupiañez, U. Günther, M. Cascante, Maslinic acid-enriched diet decreases intestinal tumorigenesis in ApcMin/+ mice through transcriptomic and metabolomic reprogramming, *PLoS One* 8 (2013) e59392.
- [40] Y.K. Kim, S.K. Yoon, S.Y. Ryu, Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedium*, *Planta Med.* 66 (2000) 485–486.
- [41] X. Wang, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.* 15 (2001) 2922–2933.
- [42] S.Y. Sun, N. Hail Jr., R. Lotan, Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention, *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (2004) 662–672.
- [43] O. Micheau, J. Tschopp, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes, *Cell* 114 (2003) 181–190.
- [44] A. Ashkenazi, Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (2008) 325–331.
- [45] S.T. Derek, Diversity-oriented synthesis: exploring the intersections between chemistry and biology, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 74–84.
- [46] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 311–335.
- [47] A. Ganesan, The impact of natural products upon modern drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 306–317.
- [48] M.E. Welsch, S.A. Snyder, B.R. Stockwell, Privileged scaffolds for library design and drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 347–361.
- [49] V.L. Eifer-Lima, C.S. Graebin, F.D.T. Uchoa, P.D. Duarte, A.G. Corrêa, Highlights in the solid-phase organic synthesis of natural products and analogues, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1401–1423.
- [50] T. Kodadek, The rise, fall and reinvention of combinatorial chemistry, *Chem. Commun.* 47 (2011) 9757–9763.
- [51] A. Ganesan, Natural products as a hunting ground for combinatorial chemistry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 584–590.
- [52] P.E. Lopez, A. Isidro-Llobet, C. Gracia, L.J. Cruz, A. Garcia-Granados, A. Parra, M. Alvarez, Use of p-nitrobenzyloxycarbonyl (pNB) as a permanent protecting group in the synthesis of Kahalalide F analogs, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 7737–7741.
- [53] A. Parra, F. Rivas, P.E. Lopez, A. Garcia-Granados, A. Martinez, F. Albericio, N. Marquez, Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 1139–1145.
- [54] S. Wang, W. Fang, Design and synthesis of a dual linker for solid phase synthesis of oleanolic acid derivatives, *Molecules* 16 (2011) 4748–4763.
- [55] R. Weis, W. Seebacher, Complete assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of new pentacyclic triterpene acid benzyl esters, *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) 455–457.
- [56] A. Garcia-Granados, J. Dueñas, J.N. Moliz, A. Parra, F.L. Perez, J.A. Dobado, J. Molina, Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Theoretical and experimental ¹³C chemical shifts, *J. Chem. Res. (M)* (2000) 326–339.
- [57] A. Garcia-Granados, J. Dueñas, E. Melguizo, J.N. Moliz, A. Parra, F.L. Perez, J.A. Dobado, J. Molina, Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Part II. Theoretical and experimental ¹³C chemical shifts, *J. Chem. Res. (M)* (2000) 653–670.
- [58] J. Hao, J. Liu, X. Wen, H. Sun, Synthesis and cytotoxicity evaluation of oleanolic acid derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 2074–2077.
- [59] F.B.H. Ahmad, M.G. Moghaddam, M. Basri, M.B. Abdul Rahman, Anticancer activity of 3-O-acylated betulinic acid derivatives obtained by enzymatic synthesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 1025–1029.
- [60] M.K. Shanmugam, A.H. Nguyen, A.P. Kumar, B.K.H. Tan, G. Sethi, Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: potential role in prevention and therapy of cancer, *Cancer Lett.* 320 (2012) 158–170.
- [61] Y. Qurishi, A. Hamid, P.R. Sharma, S.A. Wani, D.M. Mondhe, S.K. Singh, M.A. Zargar, S.S. Andotra, B.A. Shah, S.C. Taneja, A.K. Saxena, PARP cleavage and perturbation in mitochondrial membrane potential by 3- α -propionylxylo- β -boswellic acid results in cancer cell death and tumor regression in murine models, *Future Oncol.* 8 (2012) 867–881.
- [62] I. Murtaza, M. Saleem, V.M. Adhami, B.B. Hafeez, H. Mukhtar, Suppression of cFLIP by luteol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 1156–1165.
- [63] J. Wei, M. Liu, H. Liu, H. Wang, F. Wang, Y. Zhang, L. Hana, X. Lina, Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 756–765.
- [64] R.K. Emaus, R. Grunwald, J.J. Lemasters, Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties, *Biochim. Biophys. Acta* 850 (1986) 436–448.
- [65] H. Li, H. Zhu, C.J. Xu, J. Yuan, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94 (1998) 491–501.
- [66] X. Luo, I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, X. Wang, Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* 94 (1998) 481–490.
- [67] L. Huang, C.H. Chen, The molecular targets of anti-HIV-1 triterpenes, an update, *Med. Chem. Rev. Online* 2 (2005) 423–427.
- [68] K. Qian, R.Y. Kuo, C.H. Chen, L. Huang, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, Anti-AIDS agents 81. Design, synthesis, and structure–activity relationship study of betulinic acid and moronic acid derivatives as potent HIV maturation inhibitors, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 3133–3141.
- [69] Y.M. Zhu, J.K. Shen, H.K. Wang, L.M. Cosentino, K.H. Lee, Synthesis and anti-HIV activity of oleanolic acid derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 3115–3118.
- [70] K. Qian, K. Nakagawa-Goto, D. Yu, S.L. Morris-Natschke, T.J. Nitz, N. Kilgore, G.P. Allaway, K.H. Lee, Anti-AIDS agents 73: structure–activity relationship study and asymmetric synthesis of 3-O-monomethylsuccinyl-betulinic acid derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 6553–6557.
- [71] K. Qian, D. Yu, C.H. Chen, L. Huang, S.L. Morris-Natschke, T.J. Nitz, K. Salzwedel, M. Reddick, G.P. Allaway, K.H. Lee, Anti-AIDS agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 3248–3258.
- [72] A. Martinez, F. Rivas, A. Perojil, A. Parra, A. Garcia-Granados, A. Fernandez-Vivas, Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*, *Phytochemistry* 94 (2013) 229–237.

Asunto: Bioconjugate Chemistry - Manuscript ID bc-2014-001142

De: support@services.acs.org

Fecha: 17/03/2014 15:14

Para: aparra@ugr.es

CC: aparra@ugr.es, samu@correo.ugr.es, frivas@ugr.es, ferjes@ugr.es, odonnel@correo.ugr.es, evaevae@ugr.es, aramon@ugr.es, agarcia@ugr.es, jlcara@ugr.es, fernando.albericio@irbbarcelona.org

17-Mar-2014

Dear Dr. Parra:

Your manuscript has been successfully submitted to Bioconjugate Chemistry.
Title: "Solid-Phase Library Synthesis of Bi-Functional Derivatives of Oleanolic and Maslinic Acids and Their Cytotoxicity on Three Cancer Cell Lines"
Authors: Parra, Andrés; Martin-Fonseca, Samuel; Rivas, Francisco; Reyes-Zurita, Fernando; Medina-O'Donnell, Marta; Rufino-Palomares, Eva; Martinez, Antonio; Garcia-Granados, Andros; Lupiañez, Jose; Albericio, Fernando
Manuscript ID: bc-2014-001142.

Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus at <https://acs.manuscriptcentral.com/acs> and select "Edit Your Account" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <https://acs.manuscriptcentral.com/acs>.

Thank you for submitting your manuscript to Bioconjugate Chemistry.

Sincerely,

Bioconjugate Chemistry Editorial Office

Asunto: Manuscript bc-2014-001142 assigned to Editor

De: eic@bioconj.acs.org

Fecha: 17/03/2014 16:22

Para: aparra@ugr.es

CC: aparra@ugr.es, samu@correo.ugr.es, frivas@ugr.es, ferjes@ugr.es, odonnel@correo.ugr.es, evaevae@ugr.es, aramon@ugr.es, agarcia@ugr.es, jlcara@ugr.es, fernando.albericio@irbbarcelona.org

17-Mar-2014

Manuscript ID: bc-2014-001142

Dear Dr. Parra:

Your manuscript entitled "Solid-Phase Library Synthesis of Bi-Functional Derivatives of Oleanolic and Maslinic Acids and Their Cytotoxicity on Three Cancer Cell Lines" has been assigned to the following editor:

Prof. Jan C. M. Van Hest
Associate Editor
Bioconjugate Chemistry
Phone: +31 (0)24 36 53204
Fax: 202-354-4617
Email: vanhest-office@bioconj.acs.org

Please address all future correspondence regarding this manuscript to the above editor.

Submission of a manuscript to Bioconjugate Chemistry implies that the work reported therein has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere in any medium, including electronic journals and computer databases of a public nature. This manuscript is being considered with the understanding that it is submitted on an exclusive basis. If otherwise, please advise.

Also please note that according to ACS Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research, all authors must have reviewed and approved the submission of their manuscript. If you are a coauthor and approve its submission, no action is necessary. If you do not approve its submission to Bioconjugate Chemistry, please let us know as soon as possible. Refer to the manuscript number listed above in any correspondence, or you may simply reply to this message leaving the subject line intact. For more information on ethical responsibilities of authors, see the Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research at <http://pubs.acs.org/page/policy/ethics/index.html>.

ACS Publications uses CrossCheck's iThenticate software to detect instances of similarity in submitted manuscripts. In publishing only original research, ACS is committed to deterring plagiarism, including self-plagiarism. Your manuscript may be screened for similarity to published material.

Sincerely,

Bioconjugate Chemistry Editorial Office

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

**Solid-Phase Library Synthesis of Bi-Functional Derivatives
of Oleanolic and Maslinic Acids and Their Cytotoxicity on
Three Cancer Cell Lines**

Journal:	<i>Bioconjugate Chemistry</i>
Manuscript ID:	bc-2014-001142
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	17-Mar-2014
Complete List of Authors:	Parra, Andrés; Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica Martin-Fonseca, Samuel; Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica Rivas, Francisco; Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica Reyes-Zurita, Fernando; University of Granada, Department of Biochemistry and Molecular Biology Medina-O'Donnell, Marta; Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica Rufino-Palomares, Eva; University of Granada, Department of Biochemistry and Molecular Biology Martinez, Antonio; Universidad de Granada, Departamento de Química Orgánica García-Granados, Andros; Universidad de Granada, Depto de Química Orgánica Lupiañez, Jose; University of Granada, Dept. Biochem. Molecular Biology Albericio, Fernando; Institut for Research in Biomedicine, Química Combinatoria

ONE

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Solid-Phase Library Synthesis of Bi-Functional Derivatives of Oleanolic and Maslinic Acids and Their Cytotoxicity on Three Cancer Cell Lines

Andres Parra,^{*,†} Samuel Martin-Fonseca,[†] Francisco Rivas,^{*,†} Fernando J. Reyes-Zurita,[‡] Marta
Medina-O'Donnell,[†] Eva E. Rufino-Palomares,[‡] Antonio Martinez,[†] Andres Garcia-Granados,[†]
Jose A. Lupiañez,^{*,‡} and Fernando Albericio^{§,⊥}

[†] Departamento de Quimica Organica. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071
Granada, Spain

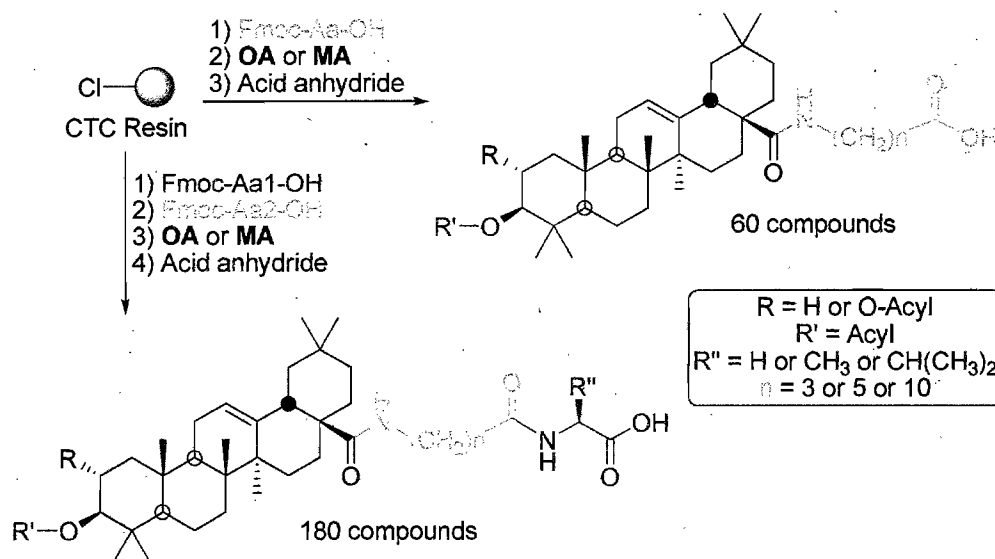
[‡] Departamento de Bioquimica y Biologia Molecular I. Facultad de Ciencias, Universidad de
Granada, E-18071 Granada, Spain

[§] Institut for Research in Biomedicine and CIBER BBN, Baldiri Reixac 10, 08028-Barcelona,
Spain

[⊥] School of Chemistry and Physics, University of KwaZulu-Natal, 4001-Durban, South Africa

Keywords

Combinatorial chemistry; Solid-phase synthesis; Triterpene; Acylation; Oleanolic; Maslinic.



ABSTRACT: A wide set of 264 compounds has been semi-synthesized with high yields and purities. These compounds have been obtained through easy synthetic processes based on a solid-phase combinatorial methodology. All the members of this library have one central core of a natural pentacyclic triterpene (oleanolic or maslinic acid) and differ by 6 amino acids, coupled with the carboxyl group at C-28 of the triterpenoid skeleton, and by 10 different acyl groups attached to the hydroxyl groups of the A-ring of these molecules. According to the literature on the outstanding and promising pharmacological activities of other similar terpene derivatives, some of these compounds have been tested for their cytotoxic effects on the proliferation of three cancer cell lines: B16-F10, HT29, and Hep G2. In general, we have found that: around 70% of the compounds tested show cytotoxicity in all three of the cell lines selected; around 60% of the cytotoxic compounds are more effective than their corresponding precursors, i.e. oleanolic (OA) or maslinic (MA) acids; and nearly 50% of the cytotoxic derivatives have IC₅₀ values between 2- to 320-fold lower than their corresponding precursor (OA or MA).