

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



TESIS DOCTORAL

**FUNCIONALIZACIÓN DE DERIVADOS TERPÉNICOS
(ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO) CON
APLICACIONES**

DULCE KARINA VEGA GRANADOS

GRANADA 19 DE NOVIEMBRE DE 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Dulce Karina Vega Granados

ISBN: 978-84-1306-757-5

URI: <http://hdl.handle.net/10481/66416>

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al programa de Becas al Extranjero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-Gobierno del Estado de Baja California México 2015. Así como los proyectos de Excelencia de la Junta de Andalucía, convocatoria 2012: Geles supramoleculares para su empleo en ingeniería tisular, en medicina, en catálisis y en cristalización, con referencia: FQM2012-2721 e investigador principal: Luis Álvarez de Cienfuegos Rodríguez. Y convocatoria 2013: Incremento de la Biodisponibilidad y la Actividad Biológica de Ácido Maslínico e Hidroxitirosol, dos Compuestos Procedentes de los Residuos de Molturación de la Aceituna, por Acilación y Pegilación mediante Técnicas de Síntesis Orgánica en Fase Sólida, con referencia: FQM07372 e investigador principal: Andrés Parra Sánchez.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1.INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Productos Naturales | 1 |
| 1.1.1 Fuente de nuevos fármacos | 6 |
| 1.1.2 Procedencia de los productos naturales | 8 |
| 1.2 Los metabolitos | 11 |
| 1.2.1 Tipos de metabolitos secundarios | 12 |
| 1.3 Triterpenos pentacíclicos | 22 |
| 1.4 <i>Olea Europaea</i> | 23 |
| 1.4.1 Ácido oleanólico y ácido maslínico | 26 |
| 1.4.2 Biogénesis del ácido oleanólico y ácido maslínico | 28 |
| 1.4.3 Reactividad del ácido oleanólico y ácido maslínico | 30 |
| 1.5 Bibliografía | 32 |
| 2. OBJETIVOS | 40 |
| I. CAPÍTULO I. Derivados de AO y AM con aplicación antimicrobiana. | 43 |
| I.1 Resumen | 44 |
| I.2 Introducción | 45 |
| I.3 Resultados y discusión | 50 |
| I.3.1 Actividad antibacteriana y toxicidad <i>in vitro</i> | 50 |
| I.3.2 Toxicidad y eficacia <i>in vivo</i> en <i>Galleria mellonella</i> | 53 |

| | |
|--|-----|
| I.3.3 Efecto sobre la membrana celular bacteriana y posible mecanismo de acción | 57 |
| I.3.4 Actividad antibiopelícula contra <i>Staphylococcus aureus</i> estática y continua | 63 |
| I.4 Conclusiones | 68 |
| I.5 Sección experimental | 69 |
| I.5.1 Química | 69 |
| I.5.2 Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano | 71 |
| I.5.3 Pruebas de susceptibilidad antibacteriana (actividad <i>in vitro</i>) | 72 |
| I.5.4 Determinación de la citotoxicidad en mamíferos (toxicidad <i>in vitro</i>) | 72 |
| I.5.5 Determinación de la toxicidad animal (toxicidad <i>in vivo</i>) | 73 |
| I.5.6 Ensayo de supervivencia en modelo animal con <i>Galleria mellonella</i> (eficacia <i>in vivo</i>) | 74 |
| I.5.7 Viabilidad por microscopía fluorescente y análisis membranas | 75 |
| I.5.8 Análisis bacteriano por microscopía electrónica de barrido (SEM) | 76 |
| I.5.9 Efecto antibacteriano de los compuestos sobre las biopelículas que crecen en los catéteres | 77 |
| I.5.10 Efecto antibacteriano de los compuestos en las biopelículas en flujo continuo | 77 |
| I.6 Espectros de RMN y valores HRMS | 79 |
| I.7 Bibliografía | 95 |
| II. CAPÍTULO II. Derivados de AO y AM para el desarrollo de geles. | 101 |
| II.1 Resumen | 102 |
| II.2 Introducción | 103 |
| II.3 Resultados y discusión | 109 |
| II.3.1 Gelificación de compuestos | 109 |
| II.3.2 Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) | 112 |
| II.3.3 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 114 |
| II.3.4 Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) VT- ¹ H | 116 |

| | |
|--|-----|
| II.3.5 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) | 118 |
| II.3.6 Dicroísmo circular vibracional (VCD) | 122 |
| II.3.7 Estudios de difracción de rayos X (XRD) | 126 |
| II.3.8 Estudios reológicos | 130 |
| II.4 Conclusiones | 135 |
| II.5 Sección experimental | 137 |
| II.5.1 Reactivos y materiales | 137 |
| II.5.2 Síntesis de los geladores | 138 |
| II.5.3 Protocolo de gelificación | 140 |
| II.5.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 141 |
| II.5.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 142 |
| II.5.6 Resonancia magnética nuclear ^1H (^1H -RMN) | 143 |
| II.5.7 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) | 144 |
| II.5.8 Dicroísmo circular vibracional (VCD) | 144 |
| II.5.9 Cálculos DFT | 145 |
| II.5.10 Difracción de rayos X (XRD) | 145 |
| II.5.11 Caracterización reológica | 146 |
| II.6 Espectros de RMN y valores HRMS | 148 |
| II.7 Bibliografía | 150 |
| III. CAPÍTULO III. Derivados de AO y AM con aplicación como sondas fluorescentes | 156 |
| III.1 Resumen | 156 |
| III.2 Introducción | 157 |
| III.3 Resultados y discusión | 164 |

| | |
|--|-----|
| III.3.1 Síntesis y propiedades espectroscópicas | 164 |
| III.3.2 Propiedades ópticas | 170 |
| III.3.3 Actividad biológica: efecto sobre la proliferación celular | 176 |
| III.4 Conclusiones | 181 |
| III.5 Sección experimental | 182 |
| III.5.1 Metodología y técnicas espectroscópicas generales | 182 |
| III.5.2 Procedimiento químico general de semisíntesis de NBD-derivados | 182 |
| III.5.3 Metodología general de espectroscopía de fluorescencia | 184 |
| III.5.4 Metodología general de pruebas biológicas | 186 |
| III.6 Espectros de RMN y valores HRMS | 188 |
| III.7 Bibliografía | 118 |
| IV. CAPÍTULO IV. Derivados de AO y AM con aplicación anticancerígena. | 223 |
| IV.1 Resumen | 224 |
| IV.2 Introducción | 225 |
| IV.3 Resultados y discusión | 235 |
| IV.3.1 Síntesis y caracterización | 235 |
| IV.3.2 Citotoxicidad | 241 |
| IV.3.3 Apoptosis | 243 |
| IV.3.4 Ciclo celular | 248 |
| IV.4 Conclusiones | 250 |
| IV.5 Sección experimental | 252 |
| IV.5.1 Generales | 252 |
| IV.5.2 Aislamiento de AM | 253 |
| IV.5.3 Síntesis de AM-diamina II, III y IV | 253 |

| | |
|--|-----|
| IV.5.4 Acoplamiento de los intermedios II, III y IV al grupo carboxilo de AM | 254 |
| IV.6 Espectros de RMN y valores HRMS | 257 |
| IV.7 Bibliografía | 288 |

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRODUCTOS NATURALES

A lo largo de la historia, la naturaleza ha proporcionado una gran cantidad de productos para el tratamiento de enfermedades, desde infecciones, trastornos gástricos hasta el manejo del dolor. Los primeros medicamentos conocidos en diversas culturas y civilizaciones, fueron elaborados con extractos de plantas que se consumían o aplicaban directamente. Algunos de ellos se procesaban mediante la extracción de los ingredientes activos con agua (tés), alcohol (tinturas) o incluso fermentados.



Figura 1. Papiro de Ebers, imagen del museo de Egipto.

Estos medicamentos tradicionales se transmitían de generación en generación a menudo a través de curanderos seleccionados por la comunidad. Algunas de estas enseñanzas fueron transmitidas de forma escrita, uno de los primeros registros en la historia, de la elaboración y uso de estos extractos medicinales, se plasmó en Egipto en el año 1500 a. C., en el papiro de Ebers (Fig. 1), con la descripción de más de 700 remedios herbales.

Este documento en la escritura egipcia hierática representa el registro más extenso y mejor conservado de la medicina egipcia antigua que se conoce. Actualmente se encuentra en la Biblioteca de la Universidad de Leipzig en Alemania.

Más adelante aproximadamente en el año 1100 a.C., en China, se registraron una serie de tratados farmacológicos que recopilaba 365 remedios, principalmente herbales, aunque también incluía minerales y animales. Este documento se registró con el nombre de Běn Cǎo, por el emperador Shén Nóng, conocido como el legendario creador de la medicina herbal china. Es la Materia Médica China más antigua, aunque desapareció hace mucho tiempo, Tao Hongjing utilizó una versión de cuatro capítulos para producir el “Shén Nóng Běn Cǎo Jīng” (Fig. 2) este texto tiene el doble de hierbas que el original. Las secciones copiadas del original estaban en tinta roja, mientras que las nuevas se escribieron en tinta negra, conservando así una versión del original.

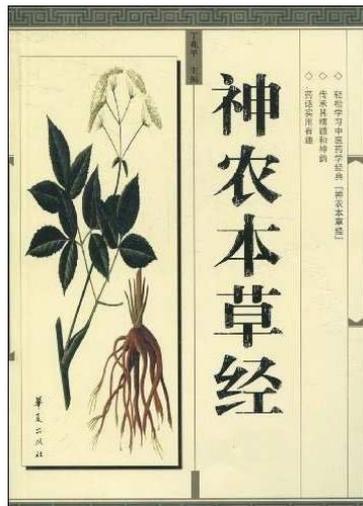


Figura 2. Página de la versión Shén Nóng Běn Cǎo Jīng

Después en el año 1000 a.C. los sistemas ayurvédicos describieron más de 300 extractos medicinales. De igual forma las culturas del medio y lejano oriente, los antiguos griegos y romanos utilizaban productos naturales como medicamento. El considerado padre de la medicina moderna, Hipócrates desarrolló las bases del sistema de medicación occidental y realizó curaciones con hierbas o fitoterapia. Estos preparados medicinales descritos, formaron la base del conocimiento farmacológico durante milenios.^{1,2}

Estas civilizaciones antiguas utilizaban los remedios herbales de formas relativamente sencillas, como se menciona anteriormente (I.1 Productos Naturales) en forma de infusiones, decocciones y maceraciones. Sin embargo, en la Edad Media y en particular entre los siglos XVI y XVIII, la demanda de fármacos compuestos estaba aumentando. Estas drogas contenían plantas medicinales mezcladas con drogas de origen animal y vegetal. De esta forma se produjo la droga altamente valorada, Teriaca, mezclando varias plantas medicinales, animales raros y minerales (Fig. 3). Estos componentes se fermentaban por largos periodos, lo cual hacía que su costo se elevara, y solo fuera asequible para las personas adineradas.³



Figura 3. Escrito sobre el uso y dosificación de teriaca de Venecia, en el siglo XVIII.

Como podemos observar en la Figura 3, las indicaciones de uso y dosificación comenzaron a ser una parte esencial para el empleo de extractos medicinales. El consumo inadecuado de estos extractos, más allá de curar afecciones, las generaban. Cada vez se hizo más evidente, cuan errónea era la idea de que, por ser productos de procedencia natural no podían ser tóxicos y generar efectos adversos en el ser humano. Era frecuente observar que, con el uso inadecuado y la ingesta desenfrenada de estos productos, resultaban intoxicaciones graves y problemas de salud agudos.

Con estos antecedentes a principios del siglo XIX, el uso y conocimiento de las plantas medicinales, evolucionaron de forma remarcable. Se comenzó con el descubrimiento, fundamentación y aislamiento de compuestos a partir de los extractos. En 1806 el aislamiento de alcaloides de la amapola, en 1817 de ipecacuana y strychnos, en 1820 de cinchona, en 1878 de la granada (Fig. 4) y otras plantas. Posteriormente el aislamiento de los glucósidos, marcó el comienzo de la farmacia científica. Con la mejora de los métodos químicos, también se descubrieron otras sustancias activas de las plantas medicinales como los taninos, saponósidos, aceites etéricos, vitaminas, hormonas, etc.

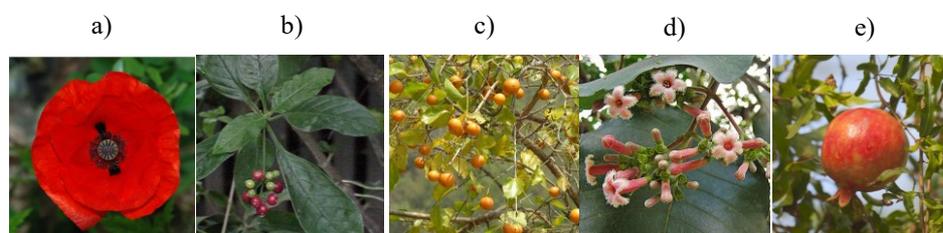


Figura 4. Imágenes de las plantas fuente de alcaloides. a) Amapola, b) Ipecacuana, c) Strychnos, d) Cinchona, e) Granada.

Estos alcaloides y glucósidos aislados en forma pura, reemplazaban cada vez más, a los extractos medicinales de los que habían sido aislados. Enseguida se comprobó que, aunque la acción de los alcaloides puros era más rápida que con los extractos medicinales, el efecto era completo y duradero. A principios del siglo XX, se propusieron métodos de estabilización para plantas medicinales frescas, especialmente aquellas con componentes medicinales lábiles. Además, del estudio de las condiciones de fabricación y cultivo de plantas medicinales.^{3,4}

En la actualidad el aislamiento y purificación de compuestos activos de productos naturales, sigue siendo una metodología efectiva en la búsqueda de nuevos fármacos. Ya sea empleando directamente los compuestos aislados, los derivados, o los sintetizados basados en estructuras naturales, son un gran porcentaje de todos los agentes terapéuticos aprobados anualmente.

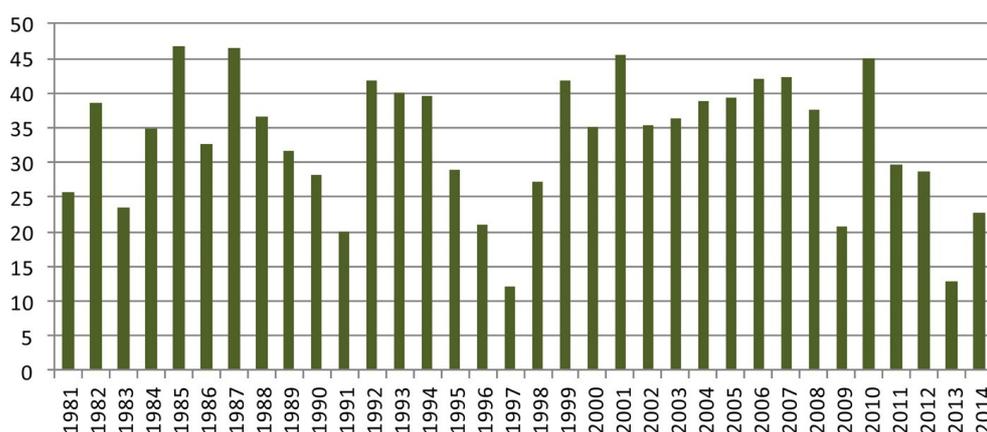


Figura 5. Gráfica del porcentaje de productos naturales empleados en fármacos aprobados por año.⁵

En la Figura 5. se presenta la gráfica de Newman y Cragg en 2016, con los porcentajes anuales de fármacos aprobados, basados o provenientes de productos naturales, desde 1981 a 2014.

En algunos años se observan porcentajes superiores al 45%, con estos datos podemos apreciar el gran impacto que han y continúan representando los productos naturales en la producción de nuevos compuestos activos.⁵

1.1.1. FUENTE DE NUEVOS FÁRMACOS

Con el punto de inflexión del siglo XIX, en las metodologías para el descubrimiento de medicamentos derivados de productos naturales, se concretó la importancia de esta fuente aparentemente inagotable, de la cual se obtenían compuestos altamente efectivos para combatir enfermedades. Algunos ejemplos bien conocidos procedentes de esta fuente son: la aspirina del árbol *Salix alba*, la digoxina de *Digitalis purpurea* y la penicilina de *Penicillium notatum* (Fig. 6).^{6,7}

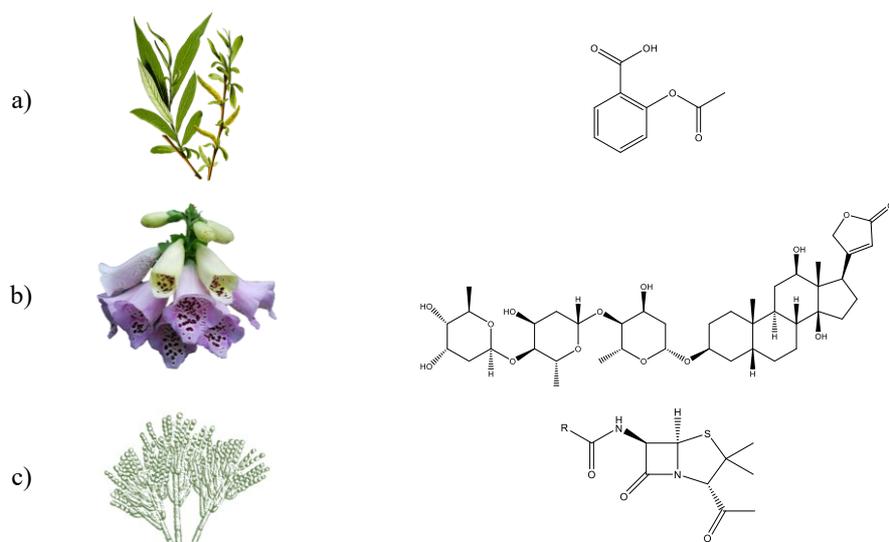


Figura 6. Ejemplos de productos naturales y los medicamentos que se obtienen de ellos. a) Árbol *Salix alba* y estructura de la aspirina, b) *Digitalis purpurea* y estructura de digoxina, c) *Penicillium notatum* y estructura de penicilina

Su importancia es tan ampliamente aceptada, como cierta, sobre todo si tomamos en cuenta las estadísticas de su empleo, que en la era postgenómica más del 80% de las sustancias farmacológicas eran productos naturales o inspirados en algún compuesto natural.⁸

Más recientemente como observamos en la Figura 5, casi la mitad de los medicamentos aprobados se basan en productos naturales.^{5,9,10} Cinco de ellos aprobados entre 2005 y 2007, representan los primeros miembros de nuevas clases de fármacos: los péptidos exenatida y ziconotida, y las moléculas pequeñas ixabepilona, trabectedina y retapamulina (Fig. 7).

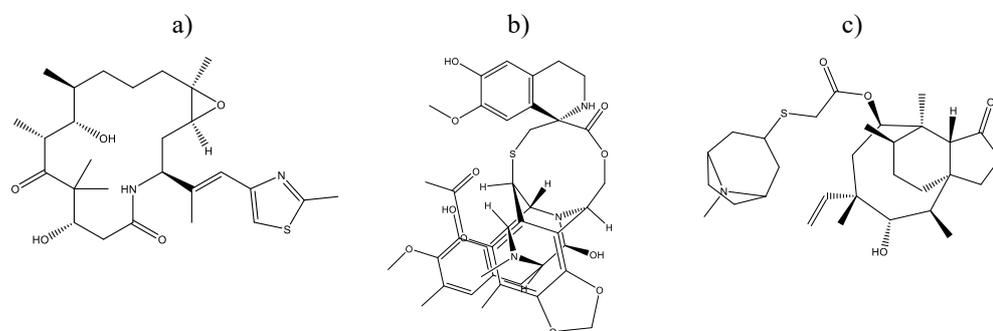


Figura 7. Ejemplos de nuevas clases de fármacos derivados de productos naturales. a) Estructura de ixabepilona, b) Estructura de trabectedina, c) Estructura de retapamulina.

Todos ellos provenientes de diversos organismos, como ejemplos provenientes de plantas están: elliptinium, galantamina y huperzina, de microbios: daptomicina, y de animales: exenatida y ziconotida.¹¹

1.1.2. PROCEDENCIA DE LOS PRODUCTOS NATURALES

Como se comenta anteriormente, la procedencia de los productos naturales es bastante diversa, a continuación, se describen detalladamente algunas de estas fuentes y ejemplos de compuestos de cada una de ellas.

Los microorganismos tienen una amplia variedad de sustancias activas, pero no fue hasta el descubrimiento de la penicilina (Fig. 6c)) que se observaron como fuente de potenciales compuestos activos. Algunos ejemplos de compuestos antibacterianos derivados de estos organismos son: cefalosporinas, acarbosa y espirubicina.^{12,13}

Ya que la mayoría de la superficie de nuestro planeta está cubierta por océanos, casi en un 70 %, los organismos de este hábitat desarrollan mecanismos de defensa altamente efectivos sintetizando potentes sustancias para utilizarlas contra sus depredadores. Es de esperarse que estos organismos marinos sean otra fuente principal de productos naturales activos. Los primeros compuestos aislados de este grupo fueron espongouridina y espongotimidina en 1950 desde *Cryptothecia crypta* (Fig. 8 a)), estos representaban potenciales antivirales y anticancerígenos.^{14, 15}

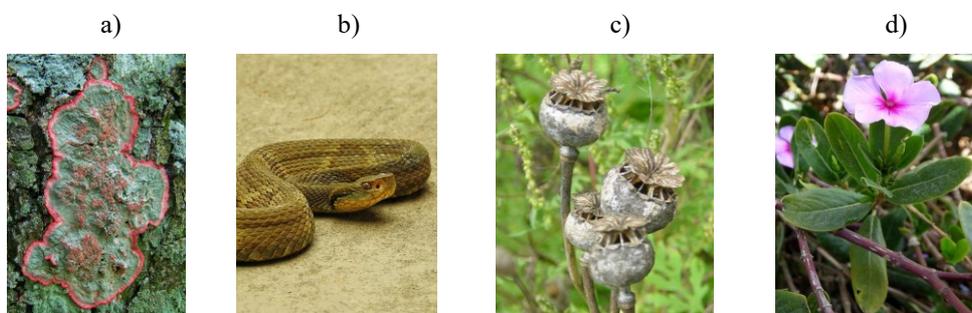


Figura 8. Ejemplos de distintas especies como fuente de productos naturales activos. a) *Cryptothecia crypta*, b) *Bothrops jararaca*, c) *Papaver somniferum* y d) *Catharanthus roseus*.

Otra fuente importante de productos naturales son los animales, algunos de sus compuestos se usaron como drogas, como la secreción venenosa de la piel de rana ecuatoriana. De esta fuente se pudo obtener la epibatidina, siendo 10 veces más efectiva como analgésico que la morfina. Otro ejemplo es teprotide, extraído de *Bothrops jararaca* (Fig. 8 b)), el cual condujo al desarrollo de captopril y cilazapril, efectivos fármacos contra la hipertensión.^{16,17}

Las bacterias son otra fuente de compuestos activos, principalmente de antibióticos, unos ejemplos con bacterias proveniente de suelo del género *Streptomyces*, son: Estreptomicina aminoglucósida, aislada de *Streptomyces griseus*, efectiva contra *M. tuberculosis* también fue activa contra una amplia variadas de patógenos. Otros ejemplos son los grupos de antibióticos actinomicinas, tetraciclinas y eritromicinas.^{18, 19, 20}

Pero sin duda la fuente más importante, con una larga historia de uso clínico, mejor tolerancia y aceptación del paciente son las plantas. Hasta la fecha se conoce un estimado entre 35000 a 70000 especies de plantas para uso medicinal. El primer producto natural comercial puro fue la morfina, comercializada por Merck en 1826, utilizando como fuente la planta *Papaver somniferum* (Fig. 8 c)). Hoy en día las plantas y sus importantes compuestos sirven como medicina, alimento, para curaciones y recreación. Algunos reconocidos centros de investigación se dedican a examinar plantas con potenciales compuestos activos contra enfermedades como cáncer y VIH, un ejemplo es el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) en Estados Unidos.

Como resultado de estas investigaciones, se han aprobado una serie de medicamentos anticancerígenos para su venta comercial por la administración de alimentos y medicamentos (FDA).

Por ejemplo, el fármaco de primera elección contra varios tipos de cáncer entre ellos el de mama, es el taxol o paclitaxel (Fig. 9) que proviene de *Taxus brevifolia*.

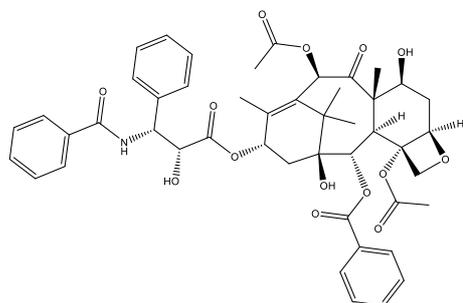


Figura 9. Estructura de taxol.

El fármaco de primera elección ante la leucemia es vinblastina proveniente de *Catharanthus roseus* (Fig. 8 d)), de esta planta también se obtuvo otro antileucémico, la vincristina. De *Camptotheca acuminata* se ha podido obtener, topotecán e irinotecán (Fig. 10), principalmente para el tratamiento de cáncer de ovario y cáncer colorrectal, respectivamente.^{21, 22}

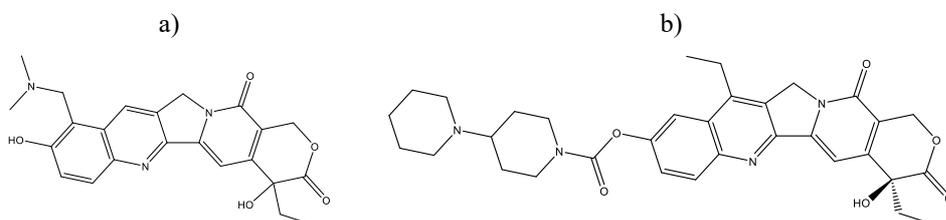


Figura 10. Estructuras de compuestos activos aislados de *Camptotheca acuminata*. a) Topotecán e b) Irinotecán

La producción de estos compuestos activos por las plantas, ha sido el resultado de muchos de años de evolución biosintética.

Las primeras formas de plantas, estaban preparadas para llevar a cabo procesos fundamentales, como la fotosíntesis, glucólisis y el ciclo de Krebs, para la producción de compuestos involucrados en las funciones primarias de las mismas.²³

Sin embargo, hace 450 millones de años, cuando las primeras plantas terrestres aparecieron según lo evidenciado por sus esporas. La transición del ambiente acuático que tenían las primeras plantas, a la vida terrestre, representó tres principales desafíos: cambios drásticos de temperatura, desecación y luz ultravioleta directa. Aquí es donde la producción de compuestos no esenciales para el funcionamiento de la planta, desempeña un papel único y significativo para superar desafíos bióticos y abióticos.²⁴

1.2. LOS METABOLITOS

Como se menciona anteriormente, las plantas son capaces de biosintetizar diferentes tipos de compuestos, los nutricionales como los carbohidratos, lípidos y aminoácidos son producidos por plantas verdes fotosintéticas que forman la base de casi todas las cadenas alimentarias de la tierra, estos compuestos que se ven involucrados en las funciones primarias de la planta se les denominan, metabolitos primarios.

Además de estos metabolitos esenciales, existen compuestos que en el pasado eran considerados productos de desecho, sin embargo, ha surgido evidencia que los muestra como una ventaja evolutiva. Estos compuestos distintos de las moléculas principales en las plantas, se conocen como

metabolitos secundarios por Kossel en 1891, fue el primero en definirlos en oposición a los primarios.

Treinta años más tarde, Czapek dio un importante paso adelante, dedicando un volumen completo de su serie de "bioquímica vegetal" a lo que llamó "producto final". Según él, estos productos bien podrían derivar del metabolismo del nitrógeno mediante lo que llamó "modificaciones secundarias", como la desaminación.²⁵

Actualmente se sabe que estos compuestos son productos naturales sintetizados principalmente por bacterias, hongos y plantas. Presentan moléculas de bajo peso molecular con diversas estructuras químicas y actividades biológicas. Ahora es aceptado que los metabolitos secundarios desempeñan un papel clave en la supervivencia del organismos que los produce, estos determinan interacciones dentro de su entorno.²⁶

Se estima que las plantas pueden biosintetizar al menos un millón de diversos metabolitos secundarios, de hecho, la expresión selectiva de estos compuestos ha ayudado a clasificar plantas en diferentes grupos quimiotaxonómicos.^{24, 27}

1.2.1. TIPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Naturalmente al tener esta gran diversidad de metabolitos secundarios, como se menciona anteriormente, existe la necesidad de agrupar o clasificar para su mejor estudio y entendimiento. La clasificación de los metabolitos secundarios se suele hacer en tres grupos principales: alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos. Dentro de los cuales se encuentran tres subgrupos

importantes según su estructura específica: glucósidos, taninos y saponinas.^{28,29}

Los alcaloides son un grupo de compuestos que químicamente contienen nitrógeno, ya sea uno o más átomos, dentro del anillo heterocíclico. Este grupo también puede contener oxígeno, azufre y rara vez otros elementos como cloro, bromo y fósforo.

Desafortunadamente no existe un límite bien establecido entre los alcaloides y las aminas complejas naturales. En su mayoría son de carácter básico, y son biosintetizados por una gran variedad de organismos, pero principalmente por plantas. En comparación con otros grupos de metabolitos secundarios, se caracterizan por una gran diversidad estructural y debido a esto no hay una clasificación uniforme entre ellos. La biosíntesis es a partir de aminoácidos como tirosina. Un alcaloide representativo que se obtiene a partir de la biosíntesis a partir de tirosina es la morfina. La clasificación más reciente de los alcaloides está basada en la similitud del esqueleto de carbono.^{29,30}

Algunos ejemplos de clasificación estructural de los alcaloides son por presencia de grupos como piridina, tropano, quinolina, isoquinolina, fenantreno, feniletilamina, indol, purina, imidazol, entre otros. En la Figura 11 se muestran algunos de estos grupos y ejemplos de alcaloides.³⁰

Por lo general los precursores de algunos neurotransmisores como: acetilcolina, noradrenalina, dopamina, ácido gamma-aminobutírico, ácido glutámico, histamina y serotonina, son los mismos precursores de algunos alcaloides.

Debido a esta similitud estructural con frecuencia se superponen a los neurotransmisores. Los alcaloides pueden actuar como agonistas, antagonistas,

canales iónicos, modular pasos en la transducción de señales neuronales, captar o degradar neurotransmisores y segundos mensajeros.³¹

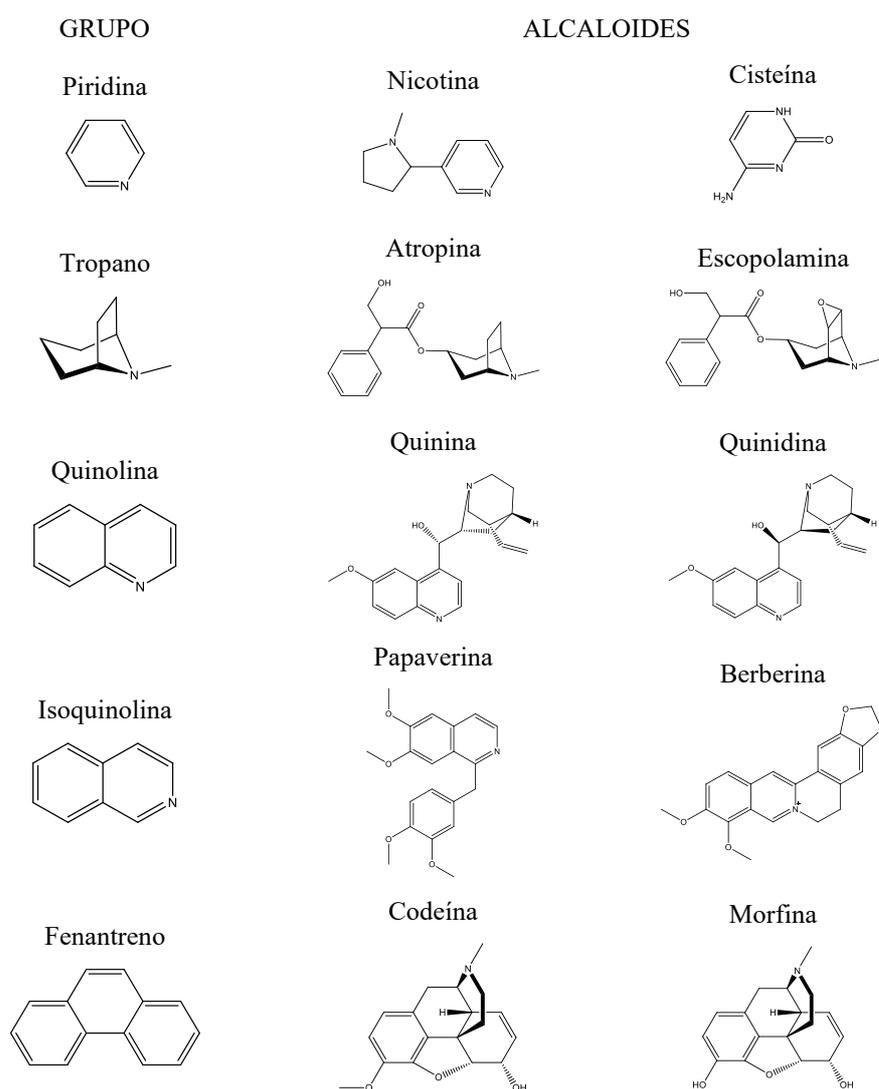


Figura 11. Ejemplos de clasificación estructural de alcaloides.

Otro grupo importante de metabolitos secundarios son los compuestos fenólicos, estos se caracterizan por contener al menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo en su estructura, según Quideau et al. 2011, cuando el

compuesto presenta al menos dos anillos fenólicos y está desprovisto de algún grupo funcional a base de nitrógeno en su expresión estructural más básica, se le puede denominar polifenol.

Existe una gran variedad de compuestos que se encuentran en esta clasificación (Fig. 12.), desde fenilpropanoides, flavonoides, catequinas, taninos, lignanos, quinonas, antraquinonas y varios alcaloides.^{31,32}

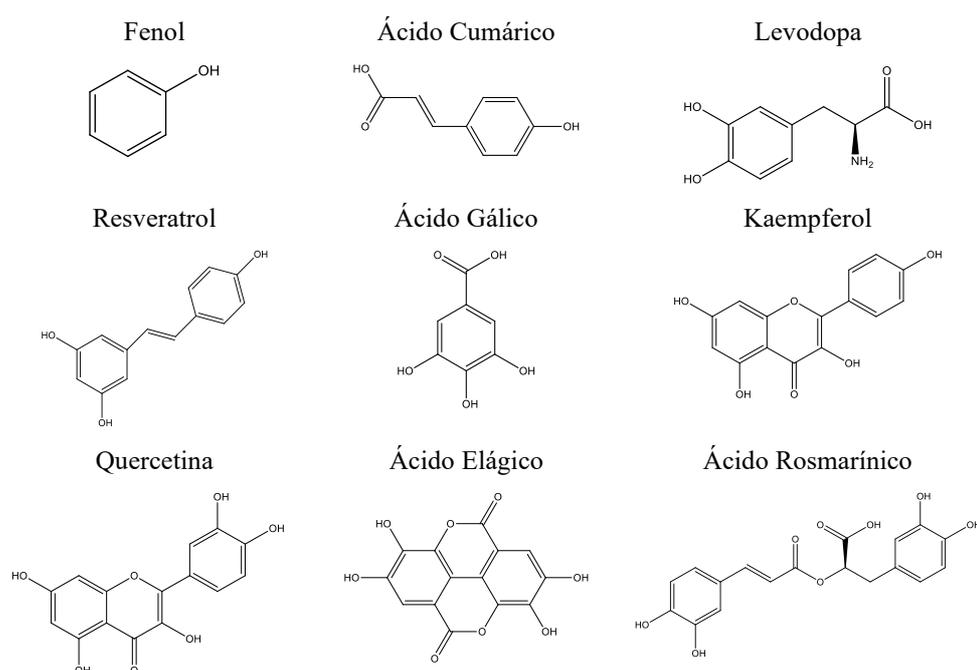


Figura 12. Ejemplos de compuestos fenólicos.

Las propiedades de estos compuestos son tan variadas como sus mismas estructuras, algunos aportan pigmentaciones en flores y frutos maduros, desde rojos a azules para atraer a los involucrados en la polinización y la diseminación de semillas. Otros aportan protección contra la radiación UV, defensa contra herbívoros, hongos y virus. Los polifenoles tienen en común

que pueden interactuar con las proteínas formando enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos con átomos electronegativos del enlace peptídico o las cadenas laterales cargadas positivamente de aminoácidos básicos (lisina, histidina, arginina), respectivamente.³³

Entre los grupos químicamente más diversos, representando más de 30.000 metabolitos secundarios, se encuentran los terpenos. El origen biosintético común de sus estructuras es el pirofosfato de isopentilo (IPP) (Fig. 13), la unidad funcional de isopreno en los organismos vivos. Debido a esto, es útil clasificar a los terpenos en base a la cantidad de unidades de isopreno que presentan en su estructura.^{34,35}

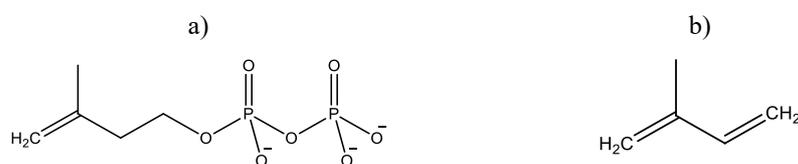


Figura 13. Estructuras bases para la biosíntesis de los terpenos. a) Estructura de pirofosfato de isopentilo (IPP) y b) Estructura de isopreno.

Se clasifican en los siguientes grupos: hemiterpenos los que presentan una unidad de isopreno; C₅, monoterpenos con dos unidades de isopreno; C₁₀, sesquiterpenos con tres unidades de isopreno; C₁₅, diterpenos con 4 unidades de isopreno; C₂₀, sesterterpenos con 5 unidades de isopreno; C₂₅, triterpenos con 6 unidades de isopreno; C₃₀, tetraterpenos con 8 unidades de isopreno; C₄₀ y politerpenos con más de 8 unidades de isopreno.³⁵

El grupo más simple de los terpenos son los hemiterpenos C₅, el más prominente es el isopreno que se encuentra en muchos árboles y hierbas como *Hamamelis japónica*. Otros ejemplos de hemiterpenos son el alcohol isoamílico (Fig. 14 a)) y los ácidos tíglico (Fig. 14 b)), angélico, isovalérico (Fig. 14 c)) y senecioico.³⁶

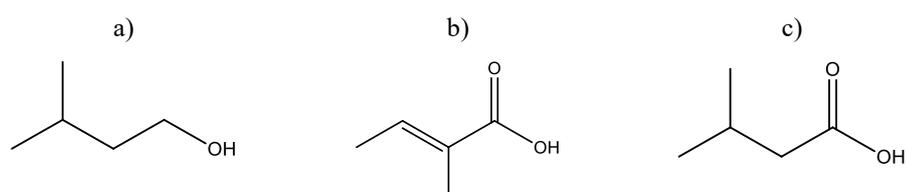


Figura 14. Ejemplos de hemiterpenos. a) Estructura de alcohol isoamílico b) Estructura de ácido tíglico c) Estructura de ácido isovalérico

En el grupo de los monoterpenos C₁₀ (Fig. 15), se pueden encontrar en aceites fragantes de muchas plantas, también se han encontrado en organismos marinos, donde generalmente están halogenados, como feromonas de insectos y secreciones de defensa.

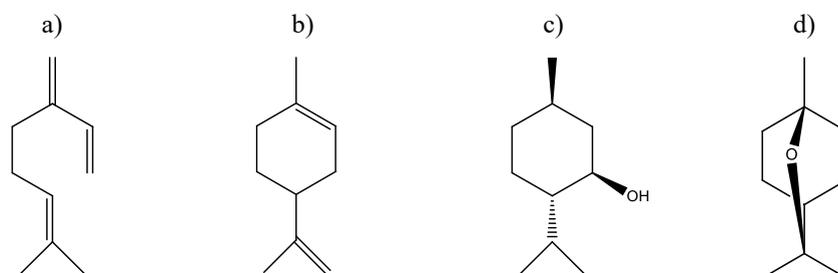


Figura 15. Ejemplos de monoterpenos. a) Estructura de mircenno, b) Estructura de limoneno, c) Estructura de mentol, d) Estructura de eucaliptol.

Los sesquiterpenos C₁₅ (Fig. 16), se encuentran particularmente en plantas superiores, surgen del precursor común pirofosfato de farnesilo (FPP), por varios modos de ciclación seguidos, y en muchos casos, por reordenamiento de esqueleto.

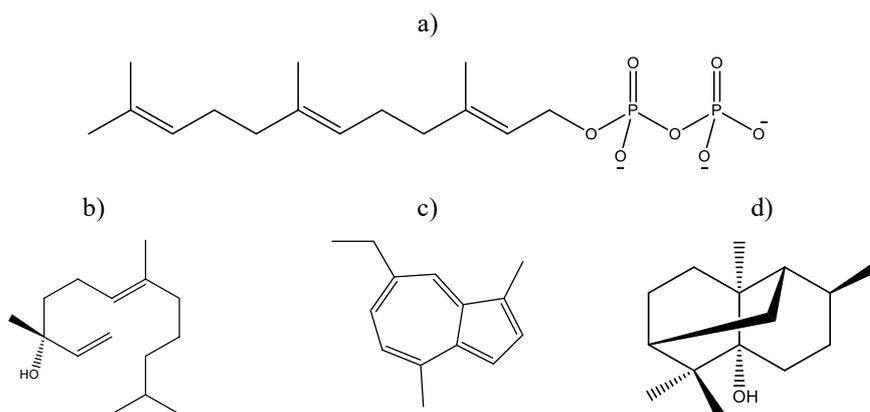


Figura 16. Ejemplos de sesquiterpenos y su precursor. a) Pirofosfato de farnesilo (FPP), b) Estructura de β -nerolidol, c) Estructura de camazuleno, d) Estructura de alcohol de pachulí.

Los diterpenos C₂₀, constituyen un gran grupo de compuestos derivados del pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), se encuentran en plantas, hongos, insectos y organismos marinos.

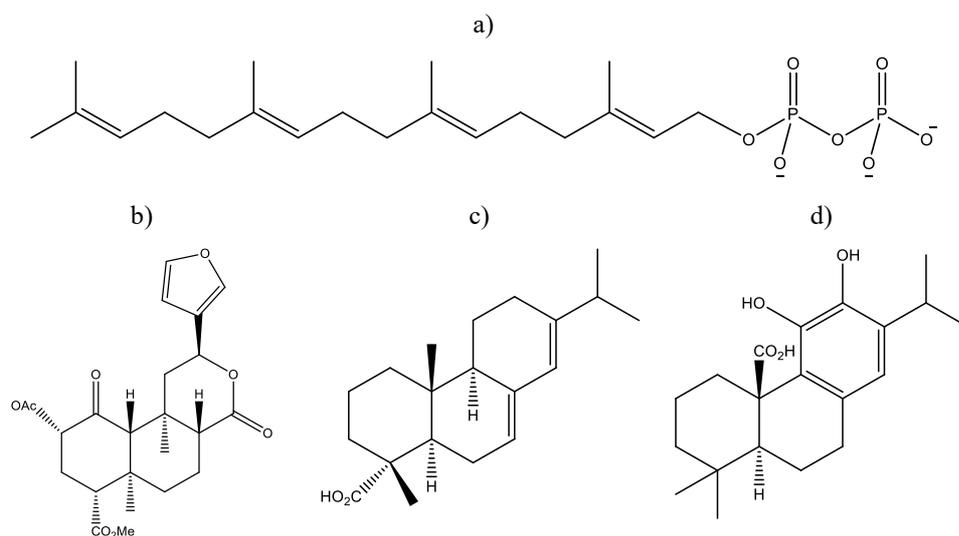


Figura 17. Ejemplos de diterpenos y su precursor. a) Estructura de pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), b) Estructura de salvinorina A, c) Estructura de ácido abiótico y d) Estructura de ácido carnósico.

Los sesterterpenos C₂₅ (Fig. 18), se encuentran principalmente en hongos, organismos marinos y plantas. Su origen biosintético proviene del pirofosfato geranilfarnesilo (GFPP).³⁷

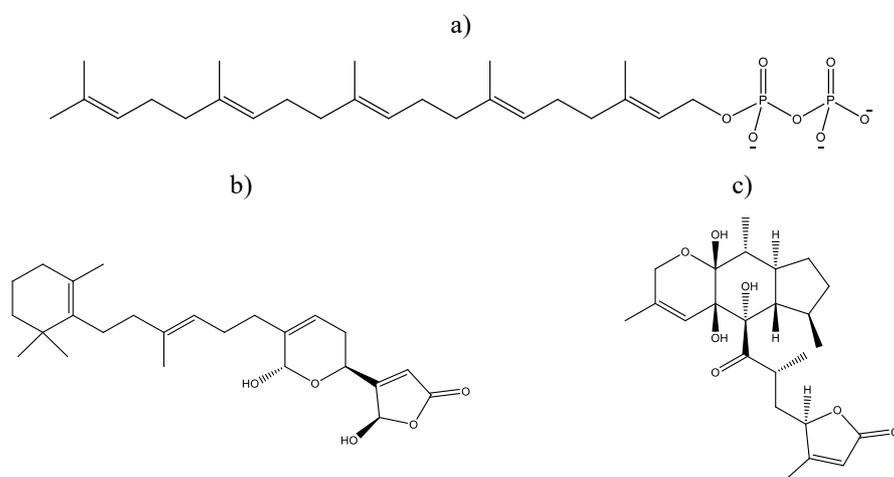


Figura 18. Ejemplos de sesterterpenos y su precursor. a) Estructura de pirofosfato de geranilfarnesilo (GFPP), b) Estructura de manoalida y c) Estructura de leucosceptrina.

Los triterpenos C₃₀ (Fig. 19), constituyen un gran grupo de productos naturales derivados del escualeno o, en el caso de los 3 β -hidroxitriterpenos, el isómero del escualeno, 2,3-oxidoescualeno. La mayoría de los triterpenos que se encuentran en la naturaleza son triterpenos cíclicos con sistemas de 1 a 5 anillos.

Esto compuestos son abundantes en algunas bacterias, protozoos, animales, plantas y hongos. Se conocen casi cien tipos distintos de esqueletos de triterpenos cíclicos en la naturaleza, lo que muestra la capacidad para producir una gran diversidad estructural a partir de un solo precursor.³⁸

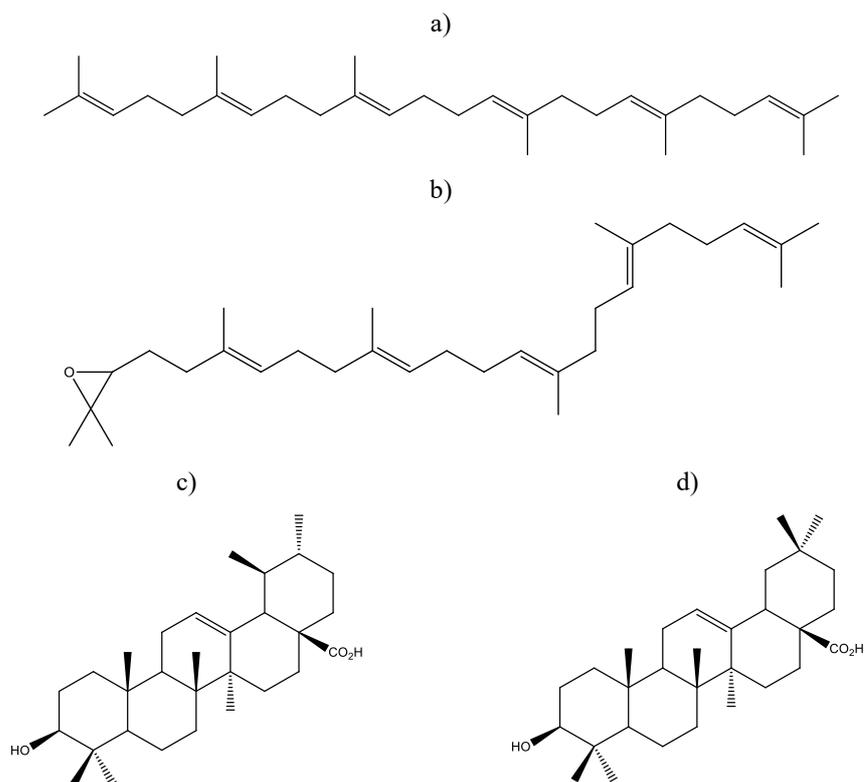


Figura 19. Ejemplos de triterpenos y su precursor. a) Estructura de escualeno b) Estructura de 2,3-oxidosqualeno, c) Estructura de ácido ursólico y d) Estructura de ácido oleanólico.

Los tetraterpenos C₄₀ (Fig. 20), surgen por el acoplamiento cabeza a cabeza de dos moléculas de pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) (Fig. 17 a)).

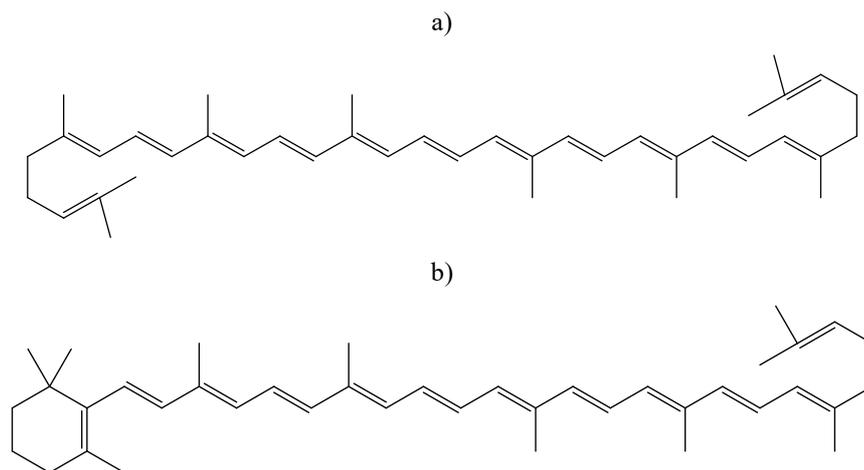


Figura 20. Ejemplos de tetraterpenos. a) Estructura de licopeno y b) Estructura de β -caroteno.

Los politerpenos $>C_{40}$ (Fig. 21), constituyen un grupo donde se encuentran algunos carotenoides y poliprenoles superiores con más de 40 carbonos.³⁹

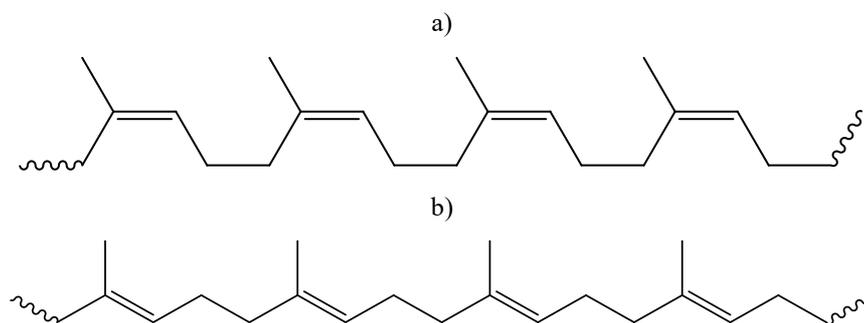


Figura 21. Ejemplos de politerpenos. a) Estructura de caucho y b) Estructura de gutapercha.

1.3. TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

Uno de los grupos de terpenos más destacados en los últimos años por su valor medicinal, son los triterpenos pentacíclicos, algunas de sus actividades más reconocidas son la antiinflamatoria, hepatoprotectora, antihipertensiva, antiulcerogénica, antitumoral, anti-VIH, antioxidante y antiartrítica. Estructuralmente están formados por un esqueleto principal que generalmente es ursano, oleanano y lupano. Presentan grupos funcionales como ésteres, glucósidos y ácidos libres, es común encontrarlos en plantas superiores, corteza de árboles y resinas.⁴⁰

Las investigaciones de última década sobre triterpenos pentacíclicos han arrojado una variedad de actividades biológicas, como la actividad antidiabética que presenta el ácido corosólico y el ácido euscáfico provenientes de *Potentilla discolor*, la actividad antiinflamatoria del ácido 3-O-acetiloleanólico proveniente de *Vigna sinensis* (Fig. 22 a)), la actividad antiartrítica de los ácidos boswélicos proveniente de *Boswellia serrata* (Fig. 22 b)), la actividad antiproliferativa de los ácidos ursólico y etulínico provenientes de *Syzygium campanulatum* y la actividad anticancerígena de los ácidos maslínico y oleanólico provenientes de *Olea europaea* (Fig. 22 c)).⁴¹

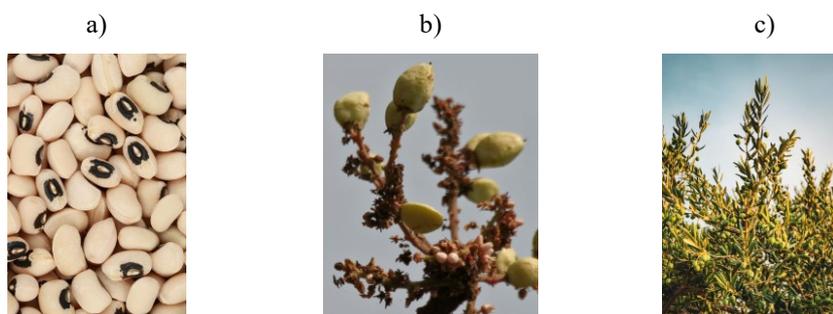


Figura 22. Ejemplos de distintas especies de productos naturales como fuente de triterpenos pentacíclicos. a) *Vigna sinensis*, b) *Boswellia serrata*, y c) *Olea europaea*.

1.4. *Olea Europaea*

El olivo (*Olea Europaea* L.) (Fig. 22 c)), desde tiempos ancestrales se utiliza con fines nutricionales, medicinales y ceremoniales. Pertenece a un género de aproximadamente 25 especies de la familia *Oleaceae* y es una de las primeras plantas cultivadas.

Para darnos una idea de su antigüedad, hay ejemplares de sus hojas fosilizadas que datan de hace 50.000 a 60.000 años en el archipiélago del mar Egeo. El cultivo del olivo se originó en un valle del río Jordán (Fig. 23) en la zona del Mediterráneo oriental y este hallazgo fue de la mano con la expansión de las civilizaciones. Desde entonces el cultivo se ha expandido por Egipto, Francia Iberia, Israel, Italia, Líbano, Marruecos, Túnez, Chile, el Caribe, Perú, Argentina, Brasil, México y finalmente en el siglo XVII, a California. También se ha introducido en la agricultura china y crece vigorosamente en Australia del Sur y algunas partes de Sudáfrica.



Figura 23. Mapa del Río Jordán basado en un mapa de las Naciones Unidas.

Se conoce su empleo como remedio tradicional en islas y países mediterráneos europeos como España, Italia, Francia, Grecia, Israel, Marruecos, Túnez y Turquía. Actualmente es un cultivo importante en el mediterráneo, ya que produce el 98% del total mundial (aproximadamente 11 millones de toneladas) por lo cual representa importantes beneficios económicos y dietéticos para las personas de esa región.^{42,43}

Según Sarakomenos en 1930, el aceite de oliva fue descubierto por el hombre primitivo, cuando aplastaba accidentalmente estos frutos caídos, y se percató que el líquido segregado de este, suavizaba la piel áspera de sus plantas. La humanidad desde entonces no ha dejado de perfeccionar la extracción de este líquido preciado, desde el año 5.000 a.C. se empleaban morteros de piedra para machacar las aceitunas y extraer aceite. Mas adelante se aumentó la producción mediante una pasta de aceituna y la adición agua caliente para recoger el aceite que quedaba en la superficie (Fig. 24).



Figura 24. Diagrama de la producción de aceite de oliva en la Edad de Bronce.

El invento que marcó un antes y después en la extracción del aceite de oliva, fue la prensa hidráulica por Joseph Bramah en 1795, la producción fue aumentada exponencialmente (Fig. 25).

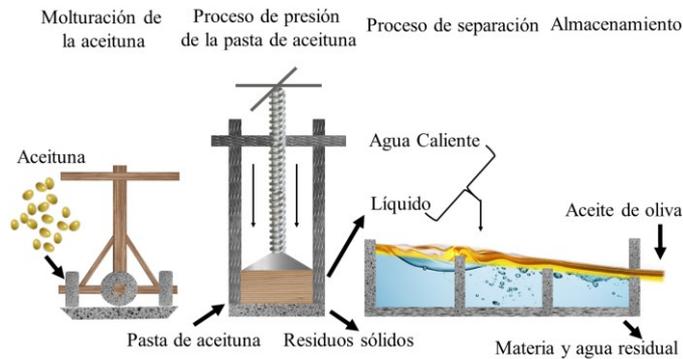


Figura 25. Diagrama de la producción de aceite de oliva con prensa hidráulica.

Sin embargo, la productividad no fue suficiente para el hombre, y el proceso de extracción continuó evolucionando hasta llegar al método más empleado en la actualidad, la centrifugación (Fig. 26), dando como resultado un aceite de mayor calidad y mejor rendimiento.⁴⁴

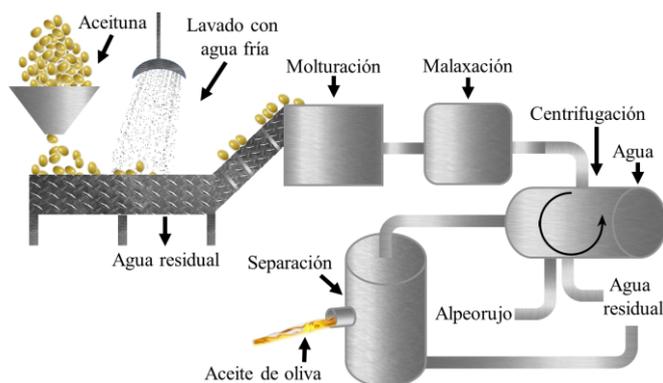


Figura 26. Diagrama de la producción de aceite de oliva con centrifugación.

Como se aprecia en la Figura 26, en este proceso se obtiene el subproducto alpeorajo, y representa un alto porcentaje de los residuos de extracción. Por cada tonelada de aceituna procesada se obtienen aproximadamente 800 kg de alpeorajo.⁴⁵

Este subproducto es una fuente prometedora de compuestos útiles tales como compuestos fenólicos, oligosacáridos, manitol, y compuestos triterpénicos.⁴⁶

Con los antecedentes del trabajo de Bianchi *et al.*, que confirma la presencia de los ácidos oleanólico y maslínico, en cantidades considerables en la piel de la aceituna, y siendo esta un componente de los residuos sólidos del proceso de extracción, era predecible que ambos triterpenos se encuentren en cantidades explotables en estos residuos.⁴⁷

En nuestro grupo de investigación de Biotransformación y Química de Productos Naturales, se han aprovechado estos residuos industriales perfeccionando el proceso de recuperación de los ácidos oleanólico y maslínico. Este procedimiento tiene patente nacional (P96061652) e internacionalmente (W098/04331) titularizada por la Universidad de Granada, más adelante en el apartado experimental se describe en detalle el proceso.⁴⁸

1.4.1. ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-12-oleanen-28-oico) (Fig. 27 a)) y maslínico (ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-12-oleanen-28-oico) (Fig. 27 b)), son dos triterpénicos pentacíclicos con esqueleto de oleanano provenientes principalmente de *Olea europaea* (Fig. 22 c)).

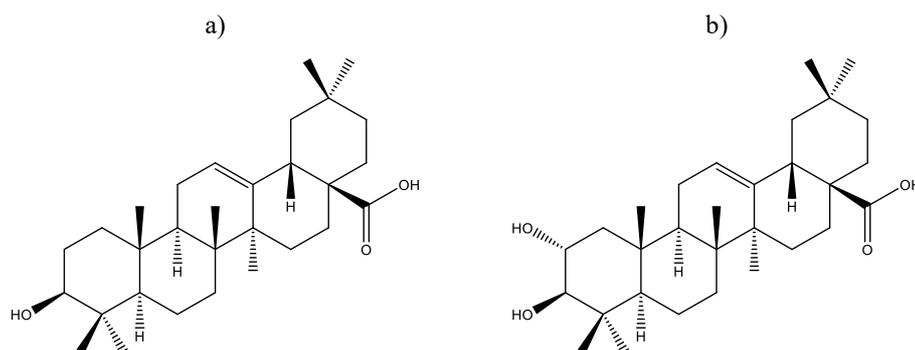


Figura 27. Estructura de los ácidos a) Oleanólico y b) Maslínico.

En 1908 en el trabajo titulado “Los constituyentes de las hojas de olivo” por Frederick Belding Power y Frank Tutin, se reporta el aislamiento del ácido oleanólico con el nombre de oleanol.⁴⁹ Desde entonces se ha aislado en más de 1620 especies incluidas plantas medicinales y alimenticias, sin embargo, *Olea europaea* todavía sirve como la fuente comercial principal.⁵⁰

Por otra parte, en 1951 en el trabajo titulado “Ácido crataególico, un nuevo triterpenoide de *Crataegus oxyacantha*” por Rudolf Tschesche y Robert Fugmann, se reporta el aislamiento del ácido maslínico, con el nombre de ácido crataególico, haciendo alusión al nombre de la especie de procedencia *Crataegus oxyacantha*. No fue hasta el año 1960 que en el trabajo titulado “Aislamiento de un nuevo ácido triterpénico del orujo de *Olea europaea*” por Luciano Caglioti *et. al.*, que se le reconoció con el nombre de ácido maslínico.^{51,52,53}

Como hemos mencionado, la fuente principal de estos ácidos es el olivo, pero no fue hasta 1994 con el trabajo de Bianchi *et al.*, en el que logra esclarecer la información conocida hasta entonces sobre el contenido y relación de estos compuestos.

Los resultados anteriores de Parisi y De Vito reportaron el aislamiento del ácido oleanólico casi puro a partir del extracto etéreo de la pulpa de aceituna tratada con gasolina. Sin embargo, Caglioti *et al.* encontraron que el ácido maslínico era el compuesto dominante de la piel de aceitunas lavadas con gasolina extraídas con éter etílico.

Luego, Caputo *et al.* informaron que las cáscaras de aceituna frescas contenían solo ácido oleanólico, mientras que la extracción de la piel envejecida dio mezclas de ácidos maslínico y oleanólico en diferentes proporciones y consideraron que el ácido maslínico podría ser el producto de una hidroxilación microbiana.

Finalmente, el estudio de Bianchi *et al.* mostró la presencia de ambos ácidos hasta en un 95% de la composición en la piel de la aceituna, en relaciones variables según la polaridad de los solventes empleados. El ácido oleanólico se extrajo en cantidades mayores a polaridades bajas y el ácido maslínico fue mayoritario a polaridades altas.^{51,54}

1.4.2. BIOGÉNESIS DEL ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO

Como se menciona anteriormente en el apartado de triterpenos pentacíclicos (I.3), estos cuentan con un esqueleto base o principal, que en el caso de los ácidos oleanólico y maslínico, es el oleanano. En la biogénesis del ácido oleanólico (Fig. 28), para obtener este esqueleto pentacíclico de tipo oleanano, se parte de la ciclación del 2,3-oxidosqualeno (Fig. 19 B)) por la acción de la enzima β -amirina sintasa (BAS), formando β -amirina.

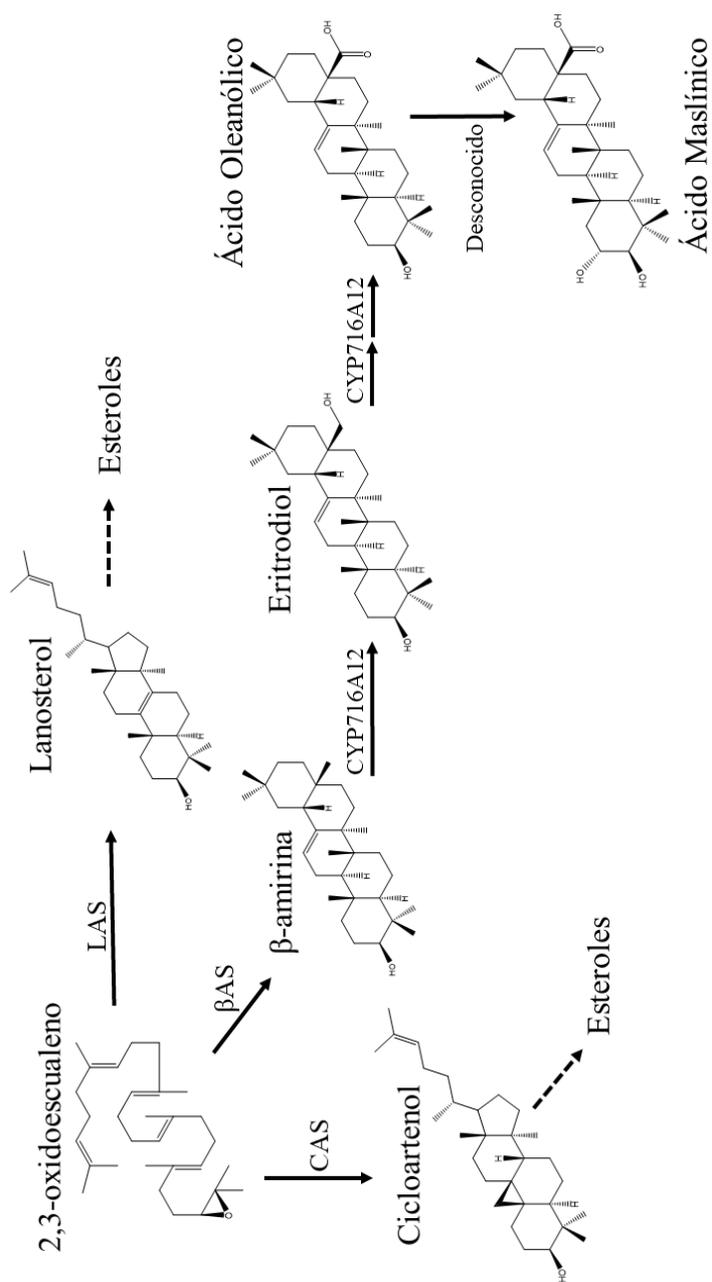


Figura 28. Ruta biogénica del ácido oleanólico y posible del ácido maslínico.

Finalmente, la β -amirina sufre una oxidación secuencial en tres pasos sobre la posición C-28 por la enzima del citocromo P450, para obtener la estructura del ácido oleanólico a través del eritrodiol. Esta enzima del citocromo P450 involucrada en la oxidación secuencial, se identifica como CYP716A12, y se descubrió por primera vez en un medicamento de *Medicago truncatula* (Fig. 24) por Carelli *et. al.* Y Fukushima *et al.* en 2011.⁵⁰



Figura 29. Fotografía de *Medicago truncatula*

Por otra parte, la ruta biosintética del ácido maslínico se desconoce hasta el día de hoy. Probablemente, el compuesto se deriva del ácido oleanólico (Fig. 23) generando el hidroxilo en C-2 por un proceso enzimático, al igual que ocurre con la enzima CYP716A para la producción del ácido oleanólico. Actualmente se investiga más sobre el papel que desempeñan las enzimas en la síntesis de los triterpenos y así poder elucidar las rutas biosintéticas de triterpenos como el ácido maslínico.^{50, 55, 56, 57}

1.4.3. REACTIVIDAD DEL ÁCIDO OLENÓLICO Y MASLÍNICO

La reactividad de una especie química, es la capacidad de reaccionar ante la presencia de otras sustancias, interactuando entre sí. En química orgánica el estudio de la reactividad de las moléculas se realiza a través de las partes en las que se encuentran funcionalizadas.

Las moléculas principales de este estudio, presentan diversos puntos reactivos o funcionalizados, los cuales vamos a emplear para modificar estructuralmente estos ácidos.

En el ácido oleanólico se encuentra un hidroxilo β en C-3, un doble enlace en el anillo C entre C-12 y C-13, y un carboxilo en C-28. El ácido maslínico presenta los mismos puntos reactivos que en el ácido oleanólico y, además, hay un hidroxilo en C-2 (Figura. 30). La diferencia que aporta este grupo hidroxilo adicional, es considerable en las propiedades fisicoquímicas que diferencian a ambos ácidos, siendo de mayor polaridad el ácido maslínico.

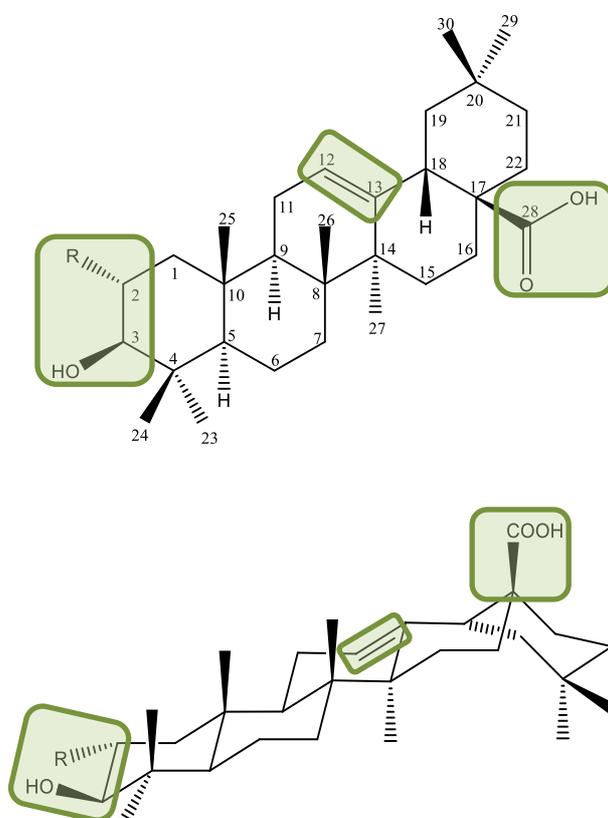


Figura 30. Partes más reactivas de las moléculas de ácido oleanólico (R=H) y ácido maslínico (R=OH).

1.5. BIBLIOGRAFÍA

1. P., L. E. *Historia de la Medicina*. (Salvat Editores, S.A., 1978).
2. Zhao, Z. The Original Source of Modern Research on Chinese Medicinal Materials: Bencao Texts. *Altern. Complement. Integr. Med.* **3**, 1–9 (2017).
3. Petrovska, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* **6**, 1–5 (2012).
4. Ekor, M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Neurol.* **4 JAN**, 1–10 (2014).
5. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).
6. Otvos, R. A., Still, K. B. M., Somsen, G. W., Smit, A. B. & Kool, J. Drug Discovery on Natural Products: From Ion Channels to nAChRs, from Nature to Libraries, from Analytics to Assays. *SLAS Discov.* **24**, 362–385 (2019).
7. Wright, G. D. Unlocking the potential of natural products in drug discovery. *Microb. Biotechnol.* **12**, 55–57 (2019).
8. Arrays, P., State, S., Lackstock, C. B., Oehling, K. A. P. & Reer, M. E. L. G. *Drug Prototypes and Their Exploitation By Walter Sneader* (University of Strathclyde). John Wiley: Chichester, U.K. 1996. xii + 788 pp. ISBN 0-471-94847-0. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1500–1500 (1997).

9. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461–477 (2007).
10. Butler, M. S. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 475–516 (2008).
11. Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* **13**, 894–901 (2008).
12. Woodruff, H. B. Natural Products From Microorganisms An Odyssey Revisited. *Actinomycetologica* **13**, 58–67 (1999).
13. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257–268 (2004).
14. Bernan, V. S., Greenstein, M. & Maiese, W. M. Marine microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.* **43**, 57–90 (1997).
15. König, G. M., Kehraus, S., Seibert, S. F., Abdel-Lateff, A. & Müller, D. Natural products from marine organisms and their associated microbes. *ChemBioChem* **7**, 229–238 (2006).
16. Clark, A. M. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research* vol. 13 1133–1141 (1996).
17. Cragg, G. M., Newman, D. J. & Snader, K. M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52–60 (1997).
18. Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden & Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 290–302 (2006).

19. Raja, A. & Prabakarana, P. Actinomycetes and Drug-An Overview. *American Journal of Drug Discovery and Development* 1: 75-84 (2011) doi:10.3923/ajdd.2011.75.84.
20. Jabeen, S., Hanif, M. A., Khan, M. M., Waseem, R. & Qadri, K. Natural products sources and their active compounds on disease prevention: A Review. *Int. J. Chem. Biochem. Sci.* **6**, 76–83 (2014).
21. Veeresham, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **3**, 200–201 (2012).
22. Inoue, M., Hayashi, S. & E. Craker, L. Role of Medicinal and Aromatic Plants: Past, Present, and Future. *Pharmacogn. - Med. Plants* (2019) doi:10.5772/intechopen.82497.
23. Weng, J. K. The evolutionary paths towards complexity: A metabolic perspective. *New Phytol.* **201**, 1141–1149 (2014).
24. Delgoda, R. & Murray, J. E. *Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00007-X.
25. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* (2001) doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
26. Mosunova, O., Navarro-Muñoz, J. C. & Collemare, J. The Biosynthesis of Fungal Secondary Metabolites: From Fundamentals to Biotechnological Applications. *Ref. Modul. Life Sci.* 1–19 (2020) doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.21072-8.

27. Stone, M. J. & Williams, D. H. On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol. Microbiol.* **6**, 29–34 (1992).
28. Verpoorte, R. Exploration of nature's chemodiversity: The role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov. Today* **3**, 232–238 (1998).
29. Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R. & He, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **2**, 377–392 (2014).
30. Debnath, B. *et al.* Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Mater. Today Chem.* **9**, 56–72 (2018).
31. Wink, M. & Schimmer, O. *Molecular Modes of Action of Defensive Secondary Metabolites. Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites: Second Edition* vol. 39 (2010).
32. Cooper, R. & Nicola, G. *Phenolic Compounds. Natural Products Chemistry* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1201/b17244-10.
33. Cheynier, V. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochem. Rev.* **11**, 153–177 (2012).
34. Tiwari, R. & Rana, C. S. Plant secondary metabolites: a review. *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.* **3**, 661–670 (2015).
35. González-Burgos, E. & Gómez-Serranillos, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5319–5341 (2012).

36. Ludwiczuk, A., Skalicka-Wó Zniak, K. & Georgiev, M. I. *Chapter 11 - Terpenoids. Pharmacognosy* (2016). doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1.
37. Evidente, A. *et al.* Sesterterpenoids with Anticancer Activity. *Curr. Med. Chem.* **22**, 3502–3522 (2015).
38. Kushiro, T. & Ebizuka, Y. Comprehensive Natural Products II, 1.18 - Triterpenes. *Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.* **1**, 673–708 (2010).
39. John Buckingham. Dictionary of Natural Products on CD-ROM. in *Dictionary of Natural Products* 210 (Chapman and Hall/CRC, 1998). doi:10.1016/0169-7439(93)80050-r.
40. Ghante, M. H. & Jamkhande, P. G. Role of pentacyclic triterpenoids in chemoprevention and anticancer treatment: An overview on targets and underling mechanisms. *J. Pharmacopuncture* **22**, 55–67 (2019).
41. Xu, C., Wang, B., Pu, Y., Tao, J. & Zhang, T. Techniques for the analysis of pentacyclic triterpenoids in medicinal plants. *J. Sep. Sci.* **41**, 6–19 (2018).
42. El, S. N. & Karakaya, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.* **67**, 632–638 (2009).
43. Rhizopoulou, S. *Olea europaea* L. A Botanical Contribution to Culture. *Am-Euras. J. Agnc. & Environ. Sci.* **2**, 382–387 (2007).
44. Kapellakis, I. E., Tsagarakis, K. P. & Crowther, J. C. Olive oil history, production and by-product management. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **7**, 1–26 (2008).

-
45. Albuquerque, J. A., González, J., García, D. & Cegarra, J. Agrochemical characterisation of ‘alperujo’, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.* **91**, 195–200 (2004).
 46. Fernández-Hernández, A., Martínez, A., Rivas, F., García-Mesa, J. A. & Parra, A. Effect of the solvent and the sample preparation on the determination of triterpene compounds in two-phase olive-mill-waste samples. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4269–4275 (2015).
 47. Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R. & Jiménez, A. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas y Aceites* **57**, 95–106 (2006).
 48. García-Granados, A. *Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling subproducts.* (1998).
 49. Power, F. B. & Tutin, F. The constituents of olive leaves. *J. Chem. Soc., Trans.* **93**, 891–904 (1908).
 50. Pollier, J. & Goossens, A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* **77**, 10–15 (2012).
 51. Lozano-Mena, G., Sánchez-González, M., Juan, M. E. & Planas, J. M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - A promising nutraceutical? *Molecules* **19**, 11538–11559 (2014).
 52. Tschesche, R. & Fugmann, R. Crataegolsäure, ein neues Triterpenoid aus *Crataegus oxyacantha*. Ein Beitrag zur Konstitution der α -Amyrine. **84**, 810–826 (1951).

53. Del Noce, I. *Angelo Mangini (1905-1988) Inventario analitico dell'Archivio*. (Alma Mater Studiorum – Università di Bologna – Alma DL, 2017).
54. Bianchi, G., Pozzi, N. & Vlahov, G. Pentacyclic triterpene acids in olives. *Phytochemistry* **37**, 205–207 (1994).
55. Wang, D. *et al.* Elucidation of the complete biosynthetic pathway of the main triterpene glycosylation products of *Panax notoginseng* using a synthetic biology platform. *Metab. Eng.* **61**, 131–140 (2020).
56. Han Suk Choi, Jung Yeon Han, Y. E. C. Plant Science Identification of triterpenes and functional characterization of oxidosqualene cyclases involved in triterpene biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Sci.* **301**, 110656 (2020).
57. Li, J. *et al.* Efficient O-Glycosylation of Triterpenes Enabled by Protein Engineering of Plant Glycosyltransferase UGT74AC1. *ACS Catal.* **10**, 3629–3639 (2020).

2. OBJETIVOS



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, con lo cual, además de evitar su contaminación del medio ambiente, se consigue un óptimo aprovechamiento y un valor añadido de los mismos. Los ácidos oleanólico (AO) y maslínico (AM), principales componentes de los residuos de molturación de la aceituna han sido aislados a partir de ellos mediante un procedimiento de extracción recogido en una patente titularizada por la Universidad de Granada. Además, los propios ácidos triterpénicos y algunos derivados de ellos, han manifestado numerosas y variadas actividades biológicas, ampliamente descritas en bibliografía como agentes anticancerígenos, antimicrobianos, antivirales, etc.

En primer lugar, los esfuerzos del presente trabajo se centraron en el aislamiento, purificación y caracterización de los ácidos oleanólico y maslínico a partir de los mencionados residuos sólidos o líquidos de la industria oleica mediante procedimientos de extracción con disolventes de diferente polaridad y las distintas técnicas cromatográficas.

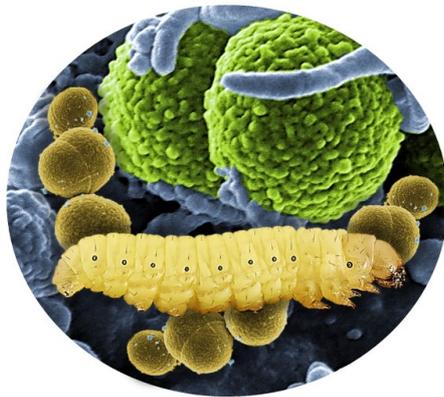
La derivatización de productos naturales es un procedimiento ampliamente empleado en disciplinas como la Biología, la Farmacia, la Bioquímica, La Medicina, etc., para obtener compuestos con actividad biológica mejorada respecto a sus precursores, pero aprovechando el esqueleto carbonado de la sustancia natural. Una vez que se dispone de la materia prima adecuada en pureza y cantidad se han preparados diferentes derivados del esqueleto triterpénico que han sido estudiado por sus propiedades biológicas o posibles aplicaciones en otros ámbitos de la Ciencia y Tecnología Químicas.

- El primer objetivo estriba en la preparación de un conjunto de derivado de AO y AM acoplando 4 dialquilaminas de distinta longitud en el carboxilo de C-28 del esqueleto triterpénico mediante un enlace amida. Estos derivados aminados de AO y AM fueron testeados por sus actividades antimicrobianas resultando que dos de ellos presentan una actividad antimicrobiana importante en la mayoría de las bacterias Gram-positivas testeadas.
- El segundo objetivo consiste en la semisíntesis de derivados de AO y AM que presentaran propiedades gelificantes por formación de geles de bajo peso molecular. Así prepararon un derivado de AO y otro de AM por tratamiento de estos productos naturales con una sal de uronio (TBTU) que presentan las propiedades gelificantes deseadas por captación lenta de agua desde sus disoluciones de DMSO y DMF.
- El tercer objetivo de este trabajo es la preparación de sondas fluorescentes por derivatización de AO y AM con una etiqueta fluorescente que permita su seguimiento en tejidos biológicos mediante su propiedad de fluorescencia. Se obtiene así un conjunto de 15 derivados por una reacción entre un hidroxilo del anillo A de AO y AM con una etiqueta fluorescente como el NBD-Cl empleando como linker entre ambos un w-aminoácido de distinta longitud. Dichos compuestos son estudiados por sus propiedades ópticas y su actuación sobre tres líneas celulares cancerígenas con resultados prometedores.

- En cuarto y último lugar, el objetivo se logra al preparar derivados de los triterpenos naturales antes citados con cumarina a través de los dos puntos de funcionalización del esqueleto triterpénico, a saber, los hidroxilos del anillo A y el carboxilo de C-28. De nuevo se obtienen 12 derivados triterpeno-cumarina mediante enlaces de tipo éster o enlace tipo amida. Estos compuestos también son estudiados por su actuación sobre las mismas tres líneas celulares y se obtuvieron resultados en algunos de estos ensayos que se acercan a la escala nanomolar lo cual les atribuye potenciales utilidades como agentes anticancerígenos.

CAPÍTULO I

DERIVADOS DE AO Y AM
CON APLICACIÓN ANTIMICROBIANA



I.1 RESUMEN

Los ácidos oleanólico (OA) y maslínico (MA) son compuestos triterpénicos pentacíclicos que abundan en los residuos industriales de la extracción de aceite de oliva. Estos compuestos tienen importantes propiedades antimicrobianas y carecen de citotoxicidad en células eucariotas, así como de mecanismos de resistencia en bacterias. A pesar de estas ventajas, su actividad antimicrobiana solo ha sido probado *in vitro*, y no se han reportado derivados mejorando esta actividad. En este trabajo, se sintetizaron 14 derivados de OA y MA modificando la posición C-28 con amidas. Dos de estos derivados, OA-HDA y MA-HDA, aumentan la actividad antimicrobiana *in vitro* de los compuestos originales, al mismo tiempo reducen su toxicidad en la mayoría de las bacterias gram positivas analizadas, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). También se incrementa la eficacia *in vivo* del derivado MA-HDA en un modelo de infección de animal invertebrado con *Galleria mellonella*. En un intento de elucidar preliminarmente su mecanismo de acción, se demostró que estos compuestos son capaces de penetrar y dañar la membrana celular bacteriana. Mas importante aún, se ha demostrado su capacidad para reducir la formación de biopelículas en catéteres en dos condiciones: una estática y una, más desafiante, de flujo continuo con biopelícula de *S. aureus*.

I.2. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Staphylococcus aureus* (Fig. I.2 a)) es un gran problema sanitario en todo el mundo, es una de las principales causas de infecciones en hospitales, la principal causa de formación de biopelículas en catéteres y otros dispositivos médicos como las prótesis.¹ Las bacterias incrustadas en biopelículas pueden ser de 100 a 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las bacterias en crecimiento planctónico (Fig. I.1).²

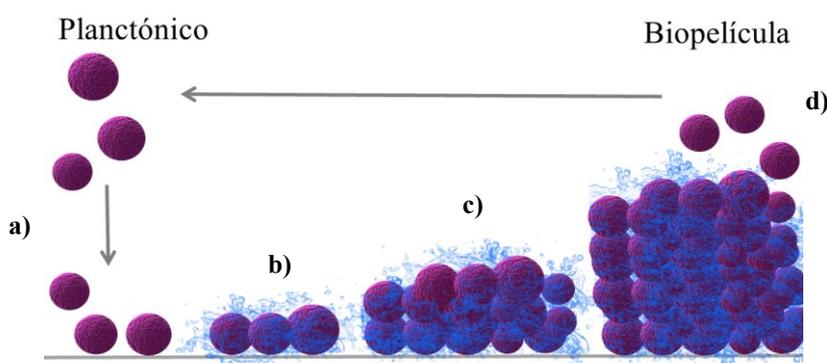


Figura I.1 Representación de la formación de biopelículas. a) Adhesión reversible de las células planctónicas (círculos morados), seguida de la adhesión a la superficie (línea gris). b) Formación de monocapa y adherencia irreversible produciendo una matriz extracelular. c) Formación de una microcolonia donde aparecen multicapas. d) Maduración de la biopelícula adoptando forma de "hongo" debido a los polisacáridos, finalmente algunas células comienzan a desprenderse y la biopelícula se dispersa.³

Debido a esto las biopelículas de *S. aureus* pueden generar peligrosas infecciones como endocarditis, infección de prótesis articular e incluso sepsis. El único tratamiento eficaz contra estas biopelículas es la eliminación del dispositivo médico y la terapia con antibióticos por largos periodos,⁴ lo que puede desarrollar bacterias resistentes a los antibióticos como *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y un incremento considerable en el costo del tratamiento.^{5,6,7} Las infecciones por MRSA están relacionadas con casos de bacteriemia y tienen malos resultados clínicos.⁵

Como resultado del uso inadecuado de los antibióticos, las bacterias multirresistentes son un problema de salud preocupante en todo el mundo y causa de una importante morbilidad y mortalidad. Por lo tanto, existe una necesidad crítica de encontrar alternativas a los antibióticos comunes y que presenten un menor riesgo de desarrollo de resistencia.

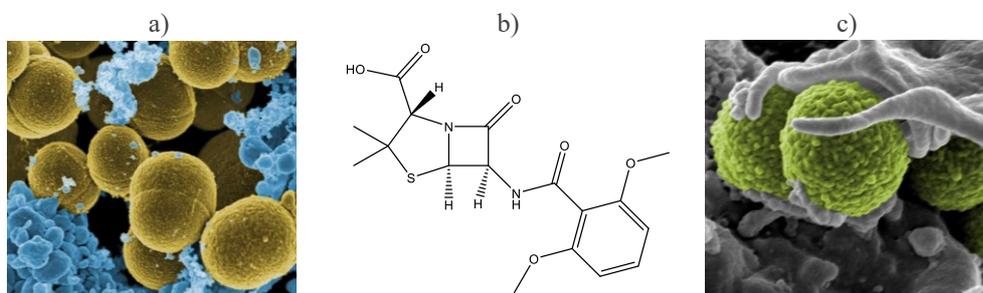


Figura I.2 Bacterias *Staphylococcus aureus* a) Bacterias *Staphylococcus aureus* (color verde), b) Estructura del antibiótico meticilina, c) Bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (color verde).

Como se menciona en la introducción del trabajo (1.3) de la introducción de este trabajo, el ácido oleanólico (OA) y el ácido maslínico (MA) son compuestos triterpénicos pentacíclicos que pueden aislarse ampliamente de las plantas. La función de estos triterpenos parece ser de protección contra la deshidratación y los microbios, al comprobarse un aumento de las infecciones de las plantas cuando la síntesis de estos compuestos disminuye.^{8,9} Están muy presentes en los frutos de *Olea europaea* y, en consecuencia, abundan en los residuos de la industria del aceite de olivo.^{9,10}

En la medicina ancestral OA y MA se han utilizado ampliamente por sus propiedades antiinflamatorias, antihiperlipidémicas, antitumorales, hepatoprotectoras y sus conocidas propiedades antimicrobianas, todas estas reconocidas desde hace mucho tiempo.^{8,9,11,12,13,14,15,16,17,18} Por otra parte, estos triterpenos no tienen citotoxicidad en las células eucariotas, ni se han encontrado mecanismos de resistencia en bacterias.^{13,19}

A pesar de que el mecanismo antimicrobiano de estos compuestos aún se desconoce, hay algunos trabajos que indican la síntesis de peptidoglicano como el objetivo principal,¹¹ lo cual puede explicar por qué estas actividades antimicrobianas se han observado principalmente en especies Gram-positivas, careciendo de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas.^{8,11,12,13,17,18}

A pesar de la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas la actividad de OA y MA solo se ha probado *in vitro*, y hasta donde sabemos, se desconocen derivados de OA y MA con mejoras en la actividad antimicrobiana.

Al respecto, en este trabajo se han sintetizado 14 derivados amida de OA y MA en la posición C-28 (Figura I.3), a los cuales se les ha medido su eficacia antimicrobiana y propiedades citotóxicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, se ha llevado a cabo una evaluación de la actividad antibiopelícula, estática y en flujo, en catéteres, a los compuestos más eficientes.

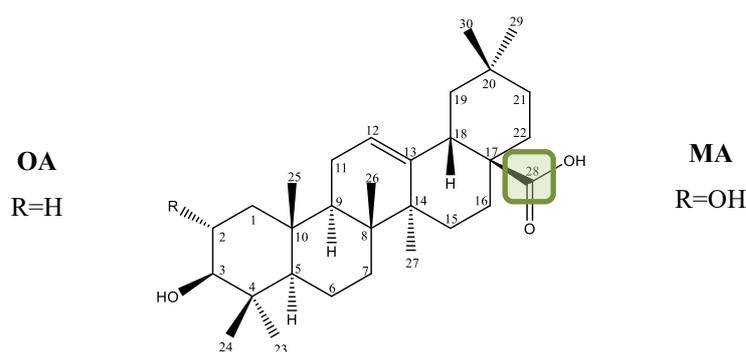


Figura I.3 Posición C-28 de OA y MA

La elección de estos derivados se propuso con el objetivo de cumplir simultáneamente dos criterios esenciales. El primero fue obtener dos grupos de moléculas con polaridades y pesos moleculares muy diferentes para estudiar qué factor podría influir más en la actividad antibacteriana.

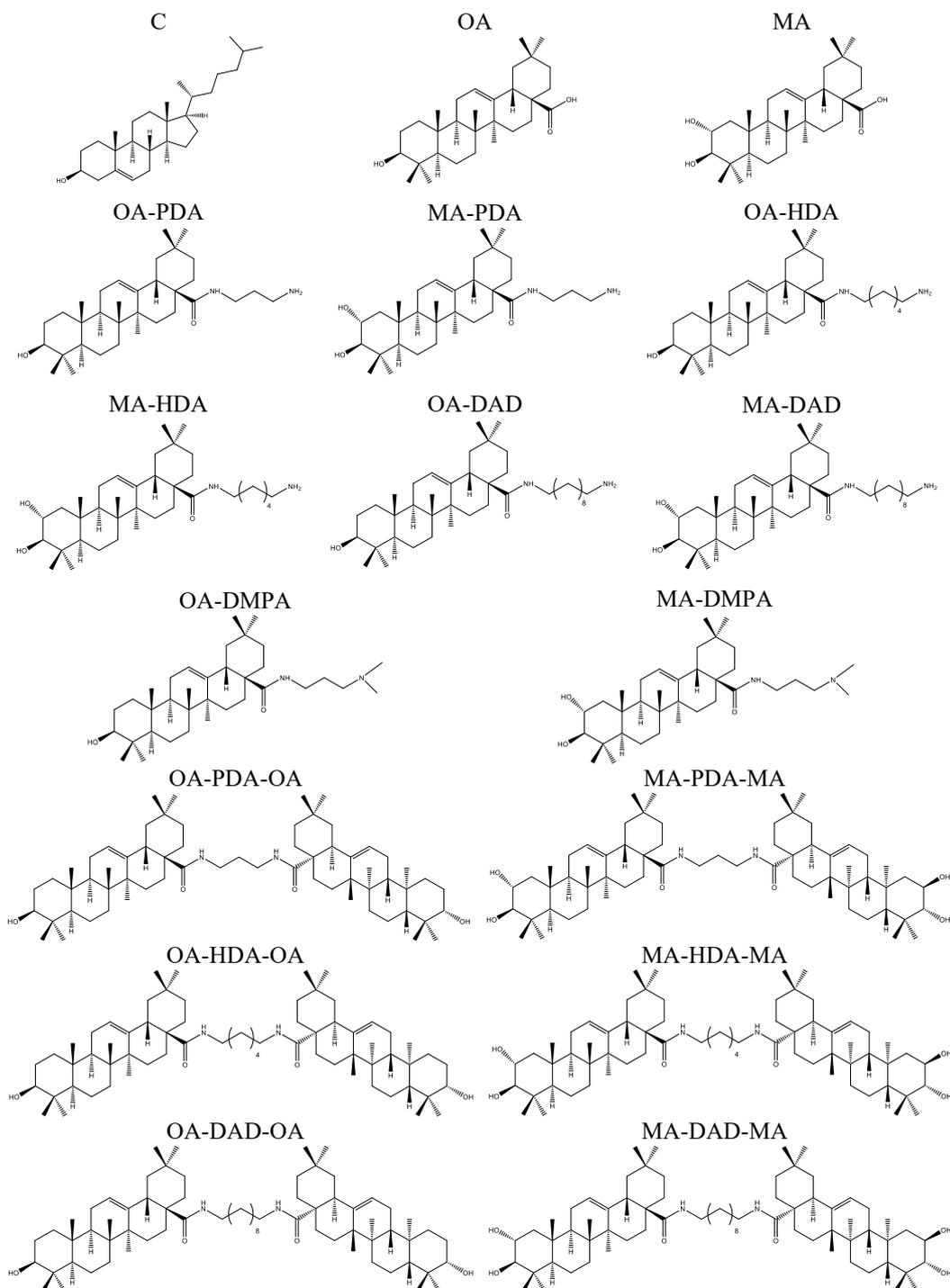


Figura I.4 Estructuras de compuestos evaluados.

El segundo fue obtener estos derivados mediante una estrategia sintética simple y directa, lo que nos permitiría obtener, por un lado, derivados con mínimas modificaciones para mantener la baja toxicidad del OA y MA naturales y, por otro lado, la posibilidad de sintetizar grandes cantidades. Además, recientemente se ha demostrado que algunos derivados amida de OA y MA en C-28 presentan una actividad anticancerígena mejorada con respecto a los triterpenos naturales.¹⁴

Por primera vez, dos de estos nuevos derivados (OA-HDA y MA-HDA) aumentan la actividad antimicrobiana *in vitro* y disminuyen la toxicidad de los compuestos originales al reducir la concentración inhibitoria mínima (MIC) en la mayoría de las bacterias Gram-positivas probadas, destacando la eficacia contra *S. aureus* y MRSA. Sorprendentemente el compuesto MA-HDA también muestra actividad mejorada *in vivo* en el modelo de infección animal con *Galleria mellonella*. En un intento preliminar de investigar su mecanismo de acción se demuestra que estos compuestos son capaces de dañar la membrana celular bacteriana.

Además, estos dos derivados son más efectivos que sus compuestos precursores en la reducción de biopelículas de *S. aureus* tanto de forma estática, como de flujo continuo. Estos dos derivados pueden servir como guía para el desarrollo de efectivos antimicrobianos y agentes antibiopelícula basados en compuestos naturales de fácil acceso que pueden usarse solos o en combinación con otros antimicrobianos para promover una actividad sinérgica.¹⁸

I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.3.1. Actividad antibacteriana y toxicidad *in vitro*

Los derivados amida del ácido oleanólico (OA) y ácido maslínico (MA) se sintetizaron en el Departamento de Química Orgánica, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y se analizaron en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña en colaboración con el grupo de Infecciones Bacterianas: Terapias Antimicrobianas. A estos derivados se les realizaron análisis para conocer su actividad antibacteriana con bacterias en crecimiento planctónico. La actividad antibacteriana que se puede ver en la Tabla X está representada según la concentración mínima inhibitoria 50% (MIC₅₀) y definida como la concentración del compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano en un 50%.

Como se describió anteriormente,^{8,11,12,13,17,18,20} OA y MA inhibieron el crecimiento de bacterias Gram-positivas, mientras que no se detectó efecto contra patógenos Gram-negativos. Del mismo modo, los derivados de amida probados en este trabajo no mostraron actividad antibacteriana contra ningún patógeno Gram-negativo analizado (Tabla X). Se utilizó colesterol (C) como control negativo. No se detectó actividad antimicrobiana cuando se probaron OA-PDA, OA-DMPA, MA-PDA-MA, OA-PDA-OA y OA-DAD-OA. Además, los precursores químicos diamina HDA y DAD no mostraron ninguna actividad antimicrobiana por sí solos a la concentración más alta probada (120 µg/mL). Entre los 14 derivados probados en este trabajo, OA-HDA y MA-HDA mostraron la mayor eficacia al mantener o mejorar la actividad antimicrobiana de OA y MA en la mayoría de las cepas probadas con especial relevancia contra *S. aureus* y MRSA.

Tabla I.1 Actividad antibacteriana MIC₅₀ (µg/mL)

| Compuestos | Gram-Positivo | | | | | Gram-Negativo | |
|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus-MRSA</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. mutans</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| C | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| OA | 30 | 75 | 200 | 30 | 30 | NA | NA |
| MA | 15 | 75 | 25 | 15 | 15 | NA | NA |
| OA-PDA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| MA-PDA | 200 | 200 | NA | NA | NA | NA | 200 |
| OA-HDA | 4 | 10 | 5 | 5 | 15 | NA | NA |
| MA-HDA | 15 | 25 | 20 | 50 | 75 | NA | NA |
| OA-DAD | 30 | 30 | 7.5 | 25 | 25 | NA | NA |
| MA-DAD | 20 | 25 | 10 | 25 | 25 | NA | NA |
| OA-DMPA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| MA-DMPA | 75 | 85 | 75 | 85 | 75 | NA | NA |
| OA-PDA-OA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 200 |
| MA-PDA-MA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| OA-HDA-OA | NA | NA | 75 | 100 | 100 | NA | NA |
| MA-HDA-MA | NA | NA | 100 | 100 | NA | NA | NA |
| OA-DAD-OA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| MA-DAD-MA | NA | NA | 50 | NA | NA | NA | NA |

La MIC₅₀ se evaluó en: *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *S. aureus-MRSA*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; *S. epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*; *S. mutans*, *Streptococcus mutans*; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *E. coli*, *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; C, colesterol. Marcado como NA, a los compuestos sin actividad o que presentan una MIC₅₀ > 250 µg/mL.

Es de destacar que los compuestos derivados de HDA (MA-HDA y OA-HDA) aumentaron su actividad antimicrobiana y redujeron la MIC₅₀ contra MRSA en 66% y 87% respectivamente (MIC₅₀ de 25 y 10 µg/mL) en comparación con sus compuestos originales (OA y MA, MIC₅₀ 75 µg/mL).

El mismo comportamiento se observó con los compuestos derivados de DAD (MA-DAD y OA-DAD), que redujeron la MIC₅₀ contra MRSA en un 66% y 60%, respectivamente.

Ya que las bacterias resistentes a los antibióticos como MRSA son hoy en día un problema de salud público, es crucial encontrar nuevos antimicrobianos que no produzcan mecanismos de resistencia en estas bacterias.

Por lo tanto, la actividad mejorada de los compuestos derivados de HDA y DAD, y el hecho de que aún no se han encontrado mecanismos de resistencia en los compuestos precursores OA y MA^{13,17} establecen estas moléculas como una posible alternativa para el tratamiento de MRSA.

Se realizaron estudios adicionales para determinar su toxicidad *in vitro*, utilizando la línea celular epitelial pulmonar humana A549.

La toxicidad *in vitro* en células, se expresa en la Tabla I.1 como concentración que mata el 50% de las células (CC₅₀), demuestra que los derivados HDA y DAD de OA y MA no fueron más tóxicos que sus precursores, aunque mostraron mejor actividad antimicrobiana en algunas cepas bacterianas.

Tabla I.2. Toxicidad *in vitro*

| Compuestos | CC ₅₀ (µg/mL) | Compuestos | CC ₅₀ (µg/mL) | Compuestos | CC ₅₀ (µg/mL) |
|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|
| C | NT | MA-HDA | 268 ± 5.3 | MA-PDA-MA | 120 ± 19.5 |
| OA | 314 ± 9.8 | OA-DAD | 313 ± 5.3 | OA-HDA-OA | 314 ± 12.8 |
| MA | 314 ± 6 | MA-DAD | 250 ± 10.9 | MA-HDA-MA | 312 ± 9.4 |
| OA-PDA | 312 ± 8.6 | OA-DMPA | NT | OA-DAD-OA | 912 ± 3.3 |
| MA-PDA | 310 ± 5.4 | MA-DMPA | NT | MA-DAD-MA | 317.5 ± 2.9 |
| OA-HDA | 249 ± 10.1 | OA-PDA-OA | NT | | |

Resultados de citotoxicidad (CC₅₀) *in vitro*, en células epiteliales pulmonares humanas A549. Marcado como NT, a los compuestos no tóxicos o que presentan una CC₅₀ > 1000 µg/mL.

I.3.2. Toxicidad y eficacia *in vivo* en *Galleria mellonella*

Para evaluar la toxicidad (dosis letal) de los nuevos compuestos antimicrobianos probados, se utilizó *Galleria mellonella*.²¹ Se evaluó la dosis de compuesto por kilogramo de larvas de polilla de la cera que mata al 50% de la población animal (dosis letal 50, LD₅₀). Usando la MIC₅₀, los índices de toxicidad CC₅₀ y LD₅₀, se calcularon los índices de selectividad (SI).

Tabla I.3 Dosis letal media

| Compuestos | LD ₅₀ (mg/kg) | Compuestos | LD ₅₀ (mg/kg) |
|------------|-----------------------------|------------|-----------------------------|
| C | >400 | OA-HDA | 210.08 ± 69.9 |
| OA | 361.8 ± 70 | MA-HDA | 396.56 ± 81.2 |
| MA | 302.44 ± 67 | | |

LD₅₀ *in vivo* con larvas de *Galleria mellonella*.

Tabla I.4 Índice de selectividad

| Compuestos | <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus-MRSA</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. mutans</i> | <i>E. faecalis</i> |
|---------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
| OA | (10.5/302) | | | (10.5/302) | (10.5/302) |
| MA | (20.9/504) | | (12.5/302) | (20.9/504) | (20.9/504) |
| OA-HDA | (62.2/1313) | (24.9/525) | (49.8/1050) | (49.8/105) | (16.6/350) |
| MA-HDA | (17.9/661) | (10.7/397) | (13.4/496) | (5.4/198) | |
| OA-DAD | (10.4) | (10.4) | (41.7) | (12.5) | (12.52) |
| MA-DAD | (10.5) | (8.4) | (21) | (8.4) | (8.4) |

Índice de selectividad (SI), calculado como CC_{50}/MIC_{50} y LD_{50}/MIC_{50} , indicados dentro del paréntesis.

Los índices de selectividad (en células o *Galleria mellonella*) enfatizan la mejora de la actividad de los derivados de HDA (OA-HDA, SI = 62.2 o 1313; MA-HDA, SI = 17.9 o 661) contra el crecimiento de *S. aureus* en relación con su toxicidad, como se ve con un aumento de 5 veces en el SI de OA-HDA en comparación con OA.

El uso de *Galleria mellonella* como animal invertebrado modelo para probar la toxicidad *in vivo* y calcular el SI es crucial, porque el índice de selectividad (SI) aumenta considerablemente cuando se calcula con la LD_{50} en lugar de la CC_{50} (Tabla I.4). En algunos casos, la toxicidad *in vivo* puede ser significativamente diferente; por ejemplo, la toxicidad del compuesto MA-HDA aumentó *in vitro* mientras que la toxicidad *in vivo* disminuyó en comparación con el predecesor MA.

Los resultados destacan el uso de un modelo animal para la evaluación de la toxicidad, y tener una mejor selección de los compuestos para los siguientes pasos de la investigación, o desarrollo de fármaco.

El uso de *G. mellonella* es una alternativa económica para la detección de toxicidad *in vivo* y eficacia, antes del análisis en roedores o incluso opciones más caras.



Figura I.5 Larva de *Galleria mellonella*

Además, las larvas de *Galleria mellonella* se emplearon como modelo de infección de *S. aureus*, para evaluar la eficacia antibacteriana *in vivo* de los derivados amida más activos (AO-HDA y AM-HDA). Se infectó *G. mellonella* con *S. aureus* a 1.5×10^9 ufc/mL (ufc, unidades formadoras de colonias) en el celoma (Fig. I.5) y se trató dos veces con los compuestos a 240 mg/kg (1 y 6 h después de la infección).

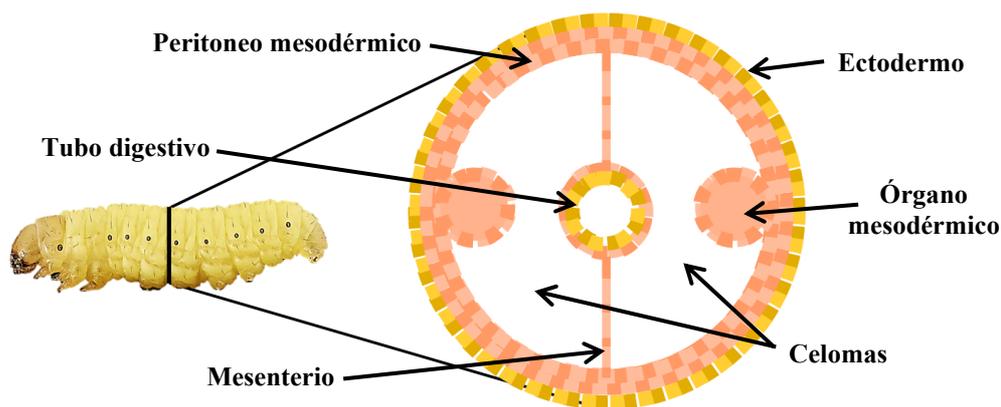


Figura I.6 Larva segmentada mostrando celomas: cavidades corporales llenas de fluido, completamente envueltas por el mesodermo. Se encuentra entre la cavidad digestiva y la pared corporal.

Como se muestra en la Figura I.7, el tratamiento con los compuestos MA-HDA y MA dio como resultado que el 50% de las larvas sobrevivieran, mientras que sólo el 20% sobrevivió a la infección por *S. aureus* después del tratamiento con OA.

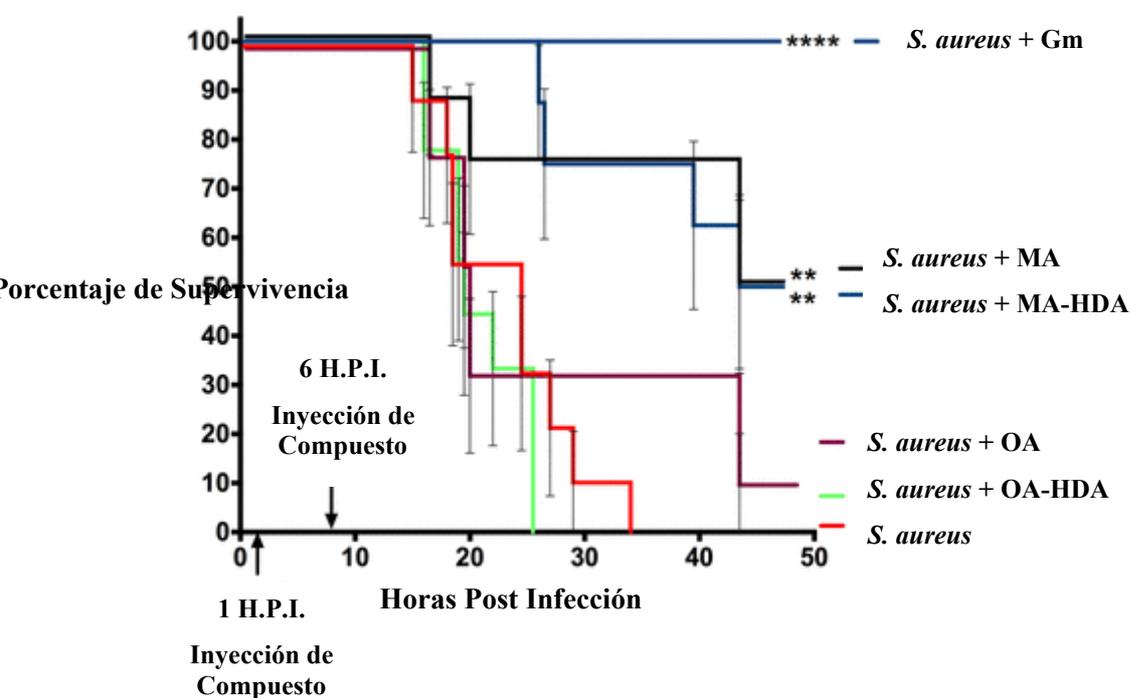


Figura I.7 Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *S. aureus*. Fueron tratadas con los diferentes compuestos a 1 y 6 h post-infección a una concentración final de 240 mg por kg de peso corporal. Se utilizó gentamicina (Gm) a 20 mg/kg como control. Asteriscos: diferencia estadísticamente significativa frente a *S. aureus* sin tratamiento en una prueba de rango logarítmico, GraphPad 6.0 (**: valor $p < 0,005$; ****: valor $p < 0,0001$).

Sin embargo, no se observaron diferencias entre los insectos no tratados y los tratados con OA-HDA, mostrando una inactividad *in vivo* de este compuesto. Debido a que la toxicidad *in vivo* disminuyó en el derivado MA-HDA, estos resultados mejoraron la eficacia antibacteriana de MA-HDA aumentando la supervivencia de *Galleria mellonella* infectada con *S. aureus* en un 50%.

Dado que estos dos nuevos compuestos (OA-HDA y MA-HDA) tienen un alto índice de actividad y selectividad, podrían ser considerados buenos agentes antibacterianos en un contexto de terapia moderna, especialmente útiles en el tratamiento de bacterias multirresistentes. Debido a que los antibióticos utilizados en la quimioterapia ya no parecen ser tan eficaces como cuando se crearon, existe una necesidad urgente de descubrir nuevos fármacos antibacterianos con diferentes mecanismos de acción para hacer frente a la creciente resistencia a los fármacos.

I.3.3. Efecto sobre la membrana celular bacteriana y posible mecanismo de acción.

Para identificar el mecanismo de acción preliminar de los diferentes compuestos usados en este trabajo, se llevaron a cabo en primer lugar análisis de tinción Vivo/Muerto y de daño de membrana. El análisis Vivo/Muerto (Figura I.8) se realizó mediante tinción de células *de S. aureus* después de 4 h de tratamiento con los distintos compuestos.

Esta tinción diferencial permitió la discriminación de bacterias viables (teñidas con colorante SYTO9, verde) de las bacterias muertas (teñidas con colorante PI, rojo), además de ver el deterioro del crecimiento que el tratamiento podría causar. Después de 4 h de tratamiento, se pudo detectar un decremento notable de células viables cuando se usaron los compuestos OA, MA, OA-HDA, MA-HDA, OA-DAD y MA-DAD, como se muestra en la Figura I.8 con el recuento promedio en la Tabla I.5 mientras que se observó una persistencia de estas células cuando se utilizaron compuestos sin actividad (MA-HDA-MA y MA-DMPA).

Tabla I.5 Análisis Vivo/Muerto

| | CONTROL | OA | MA | OA-HDA | MA-HDA | OA-DAD | MA-DAD | MA-DMPA | MA-HDA-MA |
|---------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| CELULAS VERDES | 4450 ± 296.6 | 15.17 ± 7.3 | 4 ± 2.8 | 0.8 ± 1.09 | 5 ± 2.55 | 6.67 ± 4 | 2.67 ± 3.05 | 1241 ± 153.9 | 1570.7 ± 20.8 |
| CELULAS ROJAS | 76 ± 8.485 | 68.8 ± 32.16 | 44.5 ± 14.1 | 34.2 ± 7.12 | 68.7 ± 18.7 | 31.67 ± 22.85 | 98 ± 13 | 96.25 ± 19.2 | 144.33 ± 24.5 |
| RATIO VERDES/ROJAS | 58.55 | 0.22 | 0.09 | 0.02 | 0.07 | 0.21 | 0.03 | 12.89 | 10.88 |

Promedio ± desviación estándar y proporción de células verdes y rojas en el análisis Vivo/Muerto.

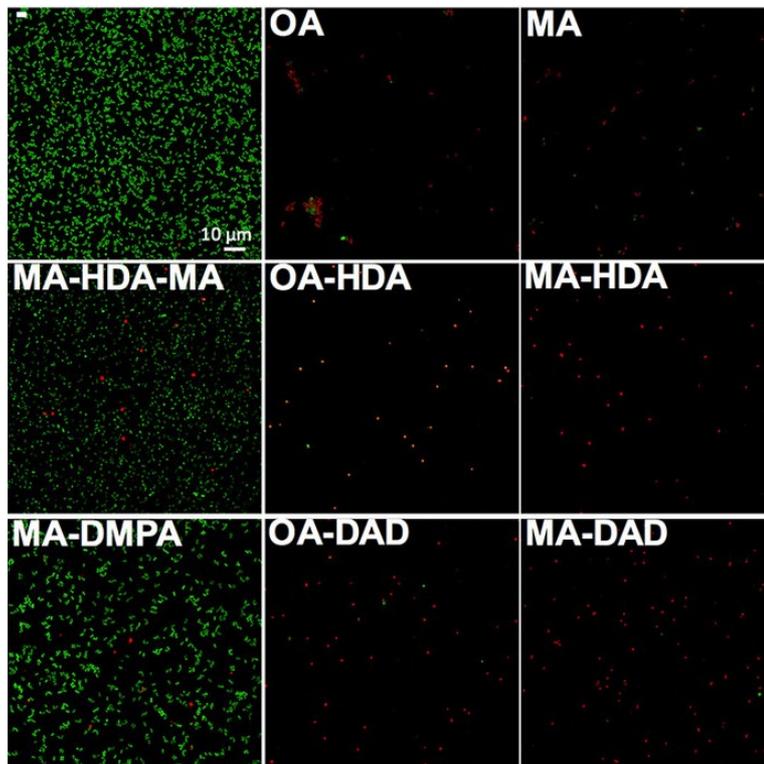


Figura I.8 Análisis Vivo/Muerto en *S. aureus*. La fluorescencia verde indica células vivas y la fluorescencia roja indica células metabólicamente inactivas (muertas).

Además, se realizó una tinción de la membrana celular bacteriana de *S. aureus*, con colorante lipofílico: N-(3trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) dibromuro de hexatrienil) piridinio (FM 4-64) (Fig. I.9).

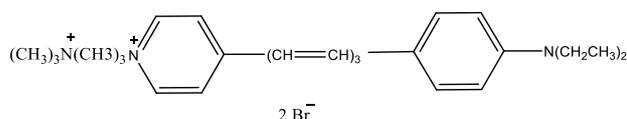


Figura I.9 Estructura de FM 4-64

Después de teñir durante 10 min, se pudo observar el deterioro de la membrana al emplear los compuestos activos. Se pudieron apreciar algunas acumulaciones de colorante en la membrana (Fig. I.10) (puntos rojos indicados por una flecha) cuando se trató con los compuestos antimicrobianos activos (OA, MA, OA-HDA, MA-HDA, OA-DAD y MA-DAD).

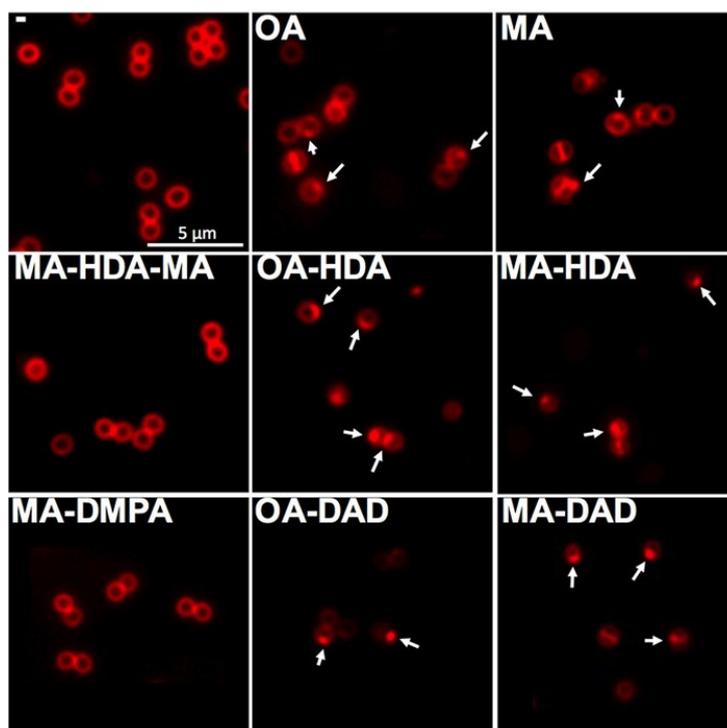


Figura I.10 Análisis de daño de membrana mediante tinción FM 4-64 de *S. aureus*. Las flechas muestran acumulaciones de tinción no uniformes en la membrana que indican daño celular.

Estas acumulaciones reafirmaron los resultados de Vivo/Muerto y sugirieron un modo de acción bacteriolítico. Finalmente, se llevó a cabo la caracterización con microscopio electrónico de barrido (SEM) de las células de *S. aureus* tratadas para validar los experimentos de tinción anteriores. La Figura I.11 muestra imágenes SEM de células de *S. aureus* después de la exposición a los compuestos.

Se observa que la superficie de la bacteria se volvió rugosa apareciendo pequeñas burbujas en muchas células *S. aureus* tratadas, mientras que la membrana de las células no tratadas permaneció lisa, lo que sugiere daño de la membrana y corrobora aún más los resultados observados en el análisis del microscopio fluorescente.

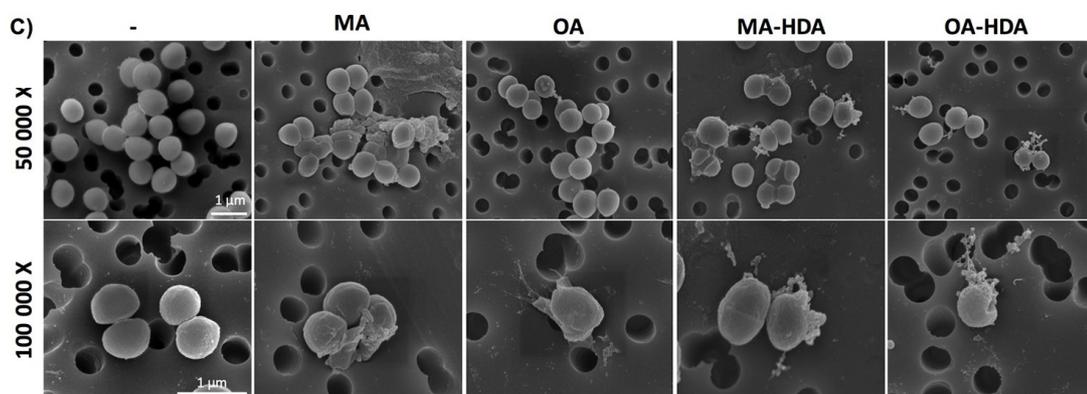


Figura I.11. Imágenes SEM de células de *S. aureus* después del tratamiento con los compuestos.

Los resultados anteriores muestran que OA y MA inducen la desestabilización y destrucción^{13,22} de la membrana celular. Se han propuesto proteasas, proteína quinasas y factores de transcripción como objetivos para estos compuestos,^{11,23,24,25,26} pero el mecanismo exacto sigue siendo desconocido.

El mecanismo de acción del MA no ha sido descrito en bacterias, solo contra protozoos, nematodos, virus y células cancerígenas como inhibidor de la glucógeno fosforilasa,²⁷ regulador de factores de transcripción y las proteína quinasa²⁵ e inhibidor de proteasas.^{28,29} También se ha sugerido un mecanismo de unión no estándar de MA a estas proteínas.³⁰

En cuanto al mecanismo de acción del OA contra las bacterias, es bien sabido que inhibe el metabolismo de los peptidoglicanos y previene la división celular en *Listeria monocytogenes* (Fig. I.12 a)).¹⁹

Otros estudios demuestran un efecto similar de OA en los *Streptococcus mutans* (Fig. I.12 a)) Gram-positivos, tanto en el metabolismo del peptidoglicano a nivel transcripcional¹¹ como en la adherencia a la superficie del diente para formar la biopelícula cariogénica.³¹ A pesar de no tener actividad antimicrobiana en *Escherichia coli* (Fig. I.12 c)), se ha demostrado que OA afecta el flujo de bombas en esta bacteria²⁴ y actúa como un agente inductor de estrés.²³

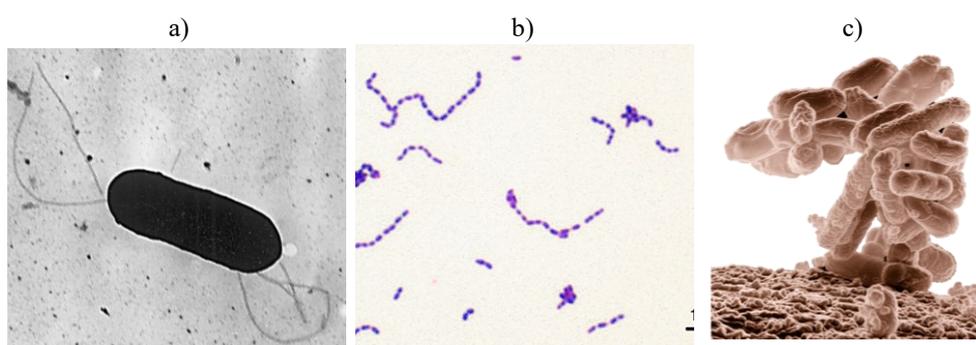


Figura I.12 Imágenes de bacterias a) *Listeria monocytogenes*, b) *Streptococcus mutans*, c) *Escherichia coli*.

Sin embargo, las diferentes actividades entre los derivados de OA y MA y la relativa a los compuestos originales, sugiere que el mecanismo de acción de estos derivados podría ser diferente de los ácidos triterpénicos naturales.

La única diferencia estructural entre todos los derivados es la longitud del residuo de diamina. Parece que estos compuestos requieren una cierta longitud de cadena para ser activos y, por esta razón, solo los derivados de cadena más larga (HDA y DAD) son activos. Esto podría tener alguna justificación si el mecanismo de acción se debe a la interacción de la membrana celular bacteriana y la desestabilización posterior, como lo sugieren los análisis de tinción de daño de membrana, vivo /muerto y la caracterización SEM.

Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas tienen una envoltura cargada negativamente debido a la carga negativa de los ácidos teicoicos y lipopolisacáridos, respectivamente, pero con respecto a la membrana plasmática, las bacterias Gram-positivas contienen una mayor porción de fosfolípidos cargados negativamente que las bacterias Gram-negativas (Fig. 1.13).³²

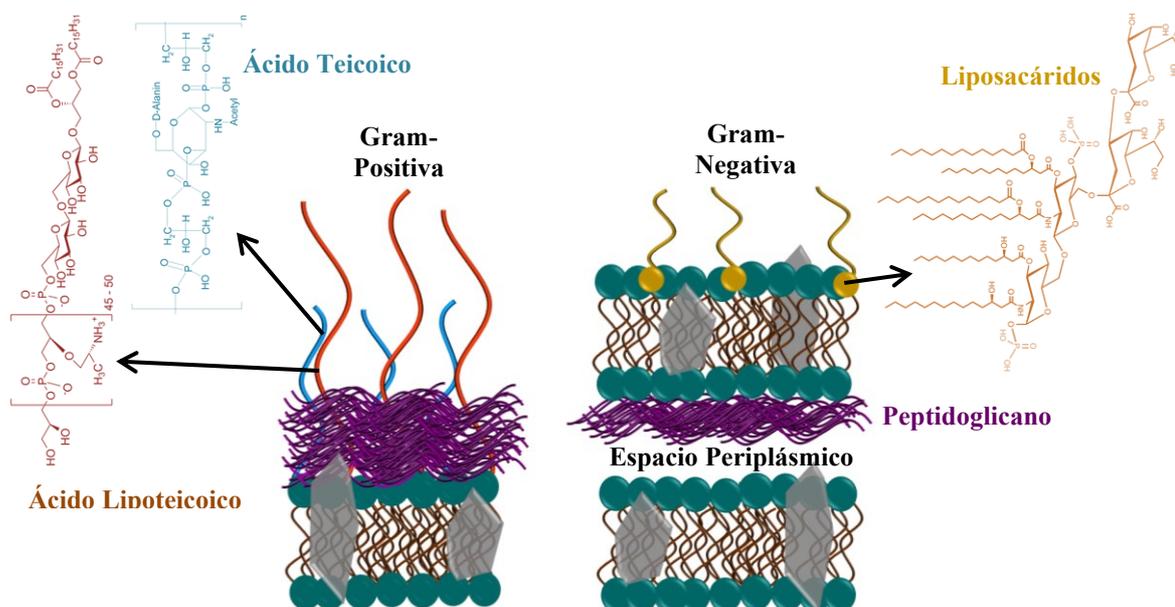


Figura I.13. Diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

A pH fisiológico, el grupo amina terminal está cargado positivamente y puede promover la interacción de los derivados con la membrana plasmática por interacciones electrostáticas que se van a potenciar en la membrana Gram-positiva.

Una vez que los derivados están en contacto con la membrana, deben insertarse de manera eficiente para producir la desestabilización de la membrana. Este segundo paso es donde la longitud de la cadena alquílica puede tener una importancia relevante. Si la cadena alquílica es corta, la interacción es principalmente superficial y los derivados no tienen la posibilidad de insertarse en la membrana celular.

Por otro lado, si la longitud de la cadena es lo suficientemente larga, los derivados pueden insertarse en la membrana celular, provocando rotura. Se sabe que la longitud de la cadena alquílica en compuestos orgánicos pequeños que atacan las membranas celulares bacterianas, tiene un impacto importante en la actividad de los compuestos.^{33,34,35} En nuestro caso, los derivados de HDA, que tienen una cadena diamina de 6 carbonos, presentan la combinación más eficaz.

I.3.4. Actividad antibiopelícula contra *Staphylococcus aureus* estática y continua.

Dado que las bacterias dentro de las biopelículas pueden ser más resistentes a los antimicrobianos que en el estado planctónico, se probó la capacidad de eliminación de las biopelículas preformadas de *S. aureus* cultivadas estáticamente y en flujo continuo.

Primero, se cultivó una biopelícula de *S. aureus* en tubos de catéter (Fig. I.14) durante 72 h. Luego, se trataron con los diferentes compuestos a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante las siguientes 24 h.

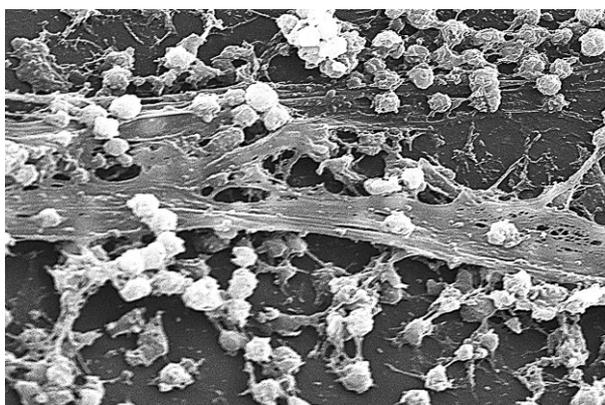


Figura I.14 Biopelícula de *S. aureus* en la superficie de un catéter.

Como podemos ver en la Figura I.15, los compuestos más activos (MA, MA-HDA y OA-HDA) pudieron eliminar más del 99% de la biopelícula preformada en comparación con la biopelícula sin tratar.

Sin embargo, la concentración probada para OA y MA-HDA-MA fue insuficiente para presentar inhibición, no tuvieron capacidad para eliminar la biopelícula, al contrario, mejoraron la formación de la biopelícula,³⁶ lo que podría explicar el aumento del crecimiento de la biopelícula producida.

Nótese que la actividad antibacteriana fue mayor para los compuestos MA-HDA y OA-HDA en contraste con el conocido antibiótico ciprofloxacina.

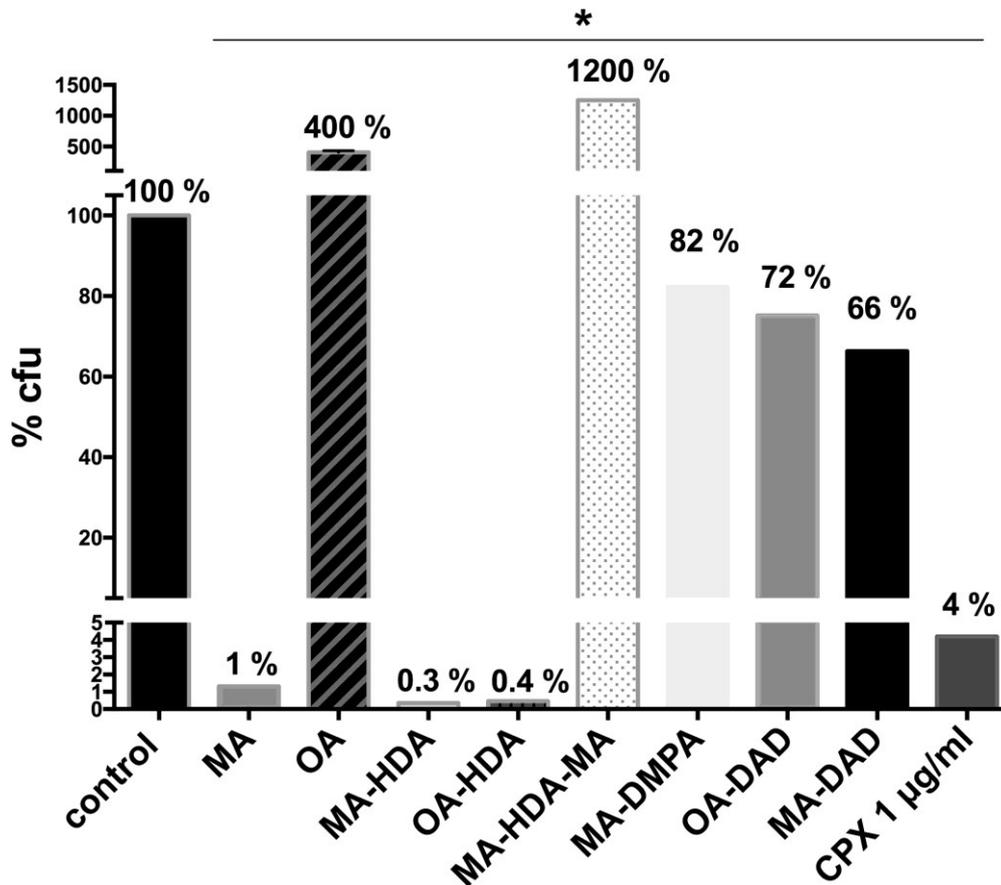


Figura I.15 Eficacia antibacteriana de compuestos en biopelículas de *S. aureus* ATCC 12600 en catéter. Las barras indican el porcentaje (%) de células de biopelícula viables (ufc) que quedan en el catéter después de 24 h de tratamiento con los compuestos. CPX, ciprofloxacina. Asterisco (*): diferencia estadísticamente significativa frente al control sin tratamiento (valor de $p < 0,05$ en una prueba t no apareada, GraphPad 6.0).

En segundo lugar, se creó una biopelícula de flujo continuo de *S. aureus* para imitar las condiciones en las que esta bacteria establece una infección crónica.

La biopelícula de *S. aureus* se formó durante 4 días consecutivos y luego se trató con los diferentes compuestos a una concentración de 50 µg/mL durante las siguientes 24 h.

Las imágenes de la Figura I.16 son proyecciones confocales en Z con las correspondientes vistas ortogonales de la biopelícula después del tratamiento.

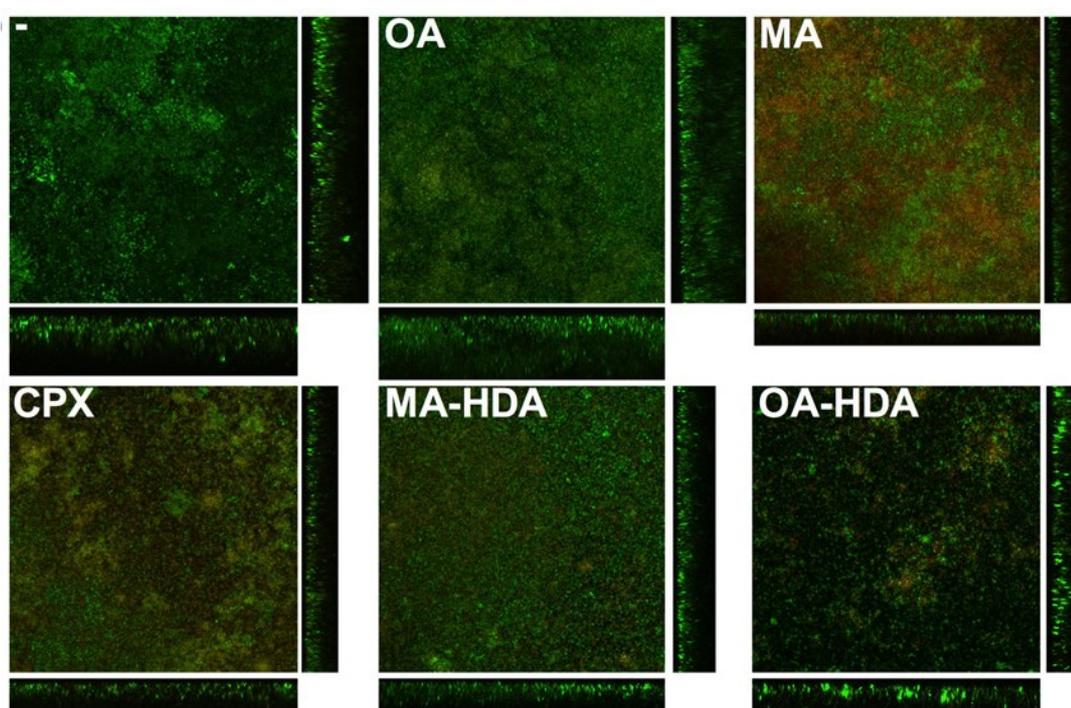


Figura I.16 Imágenes de microscopio de barrido láser confocal (CLSM) (suma de imágenes de pila y vistas ortogonales) teñidas con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead BacLight.

El gráfico de la Figura I.17 muestra la biomasa promedio de la biopelícula. Claramente, la mejor actividad antibiopelícula se detectó con los compuestos MA-HDA y OA-HDA (reducción del 30% y 45% en la biomasa de la biopelícula, respectivamente).

Presentando una disminución correspondiente en el espesor (alrededor de 10 μm) como se ve en las vistas ortogonales. Es importante señalar que estos compuestos tienen una mejor eficacia antimicrobiana en comparación con los compuestos originales AO y MA.

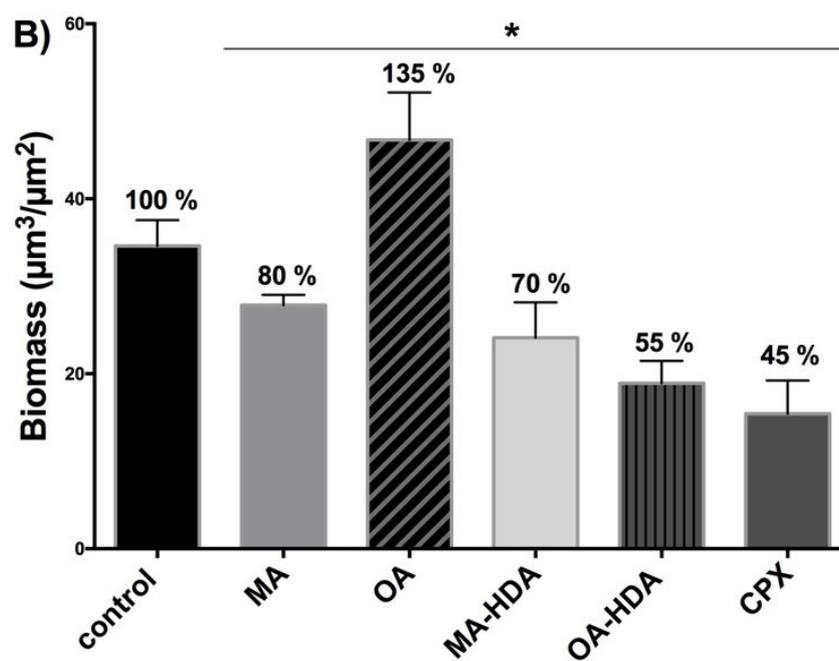


Figura I.17 Biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) de las biopelículas analizadas con COMSTAT2. CPX, ciprofloxacina. Asterisco (*): diferencia estadísticamente significativa frente al control sin tratamiento (valor de $p < 0,05$ en una prueba t no apareada, GraphPad 6.0).

I.4. CONCLUSIONES

Por primera vez, los nuevos derivados de OA y MA superan la actividad antimicrobiana conocida de sus compuestos originales. De los 14 derivados amida de OA y MA C-28 analizados, MA-HDA y OA-HDA, han mostrado una mejor actividad antimicrobiana *in vitro* en todas las cepas bacterianas Gram-positivas probadas al reducir significativamente la MIC₅₀ contra MRSA en 66% y 87%, respectivamente, en comparación con los compuestos MA y OA.

Los estudios de toxicidad *in vitro* también mostraron que estos nuevos derivados no aumentaron la toxicidad con respecto a sus precursores. Los estudios preliminares realizados para arrojar luz sobre su mecanismo de acción revelaron que estos compuestos podían penetrar y dañar la membrana celular bacteriana.

Estos excelentes resultados *in vitro* también se han validado *in vivo* en un modelo animal de *Galleria mellonella*. En particular, MA-HDA mostró los mejores resultados en términos de eficacia y toxicidad, aumentando en un 50% la supervivencia de *G. mellonella* infectada con *S. aureus*. Tomados en conjunto, estos resultados señalan la relevancia que tiene la materia prima natural para proporcionar compuestos bioactivos con fines terapéuticos.

En este caso, OA y MA son productos naturales obtenidos en grandes cantidades a partir de residuos de aceite de oliva, y, por tanto, son de fácil acceso y económicos. A través de pocos pasos sintéticos, hemos obtenido nuevos derivados que son altamente activos *in vitro* e *in vivo* contra peligrosas cepas bacterianas Gram-positivas, incluido MRSA. Su mecanismo de acción sugiere que estos compuestos podrían usarse en combinación con otros antibióticos para promover un efecto sinérgico.

I.5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

I.5.1. Química

Se aislaron los ácidos oleanólico (ácido 3 β -hidroxioleano-12-en-28-oico, OA) y maslínico (ácido 2 α , 3 β -dihidroxioleano-12-en-28-oico) de los residuos sólidos resultantes de la producción de aceite de oliva, que fueron extraídos en un sistema soxhlet con hexano y acetato de etilo sucesivamente.³⁷ Ambos ácidos se purificaron a partir de estas mezclas mediante cromatografía flash sobre gel de sílice, eluyendo con diclorometano/acetona en polaridad creciente.³⁸

Los derivados amida en C-28 se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la figura I.18.¹⁴ El grupo carboxilo de OA y MA se activó con tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU). Los derivados OA-TBTU y MA-TBTU se obtuvieron mediante la adición de TBTU en presencia de diisopropiletilamina (DIEA) en THF anhidro a temperatura ambiente. En segundo lugar, estos derivados se disolvieron en diclorometano y se hicieron reaccionar con los correspondientes reactivos de diamina: [propano-1,3diamina (PDA), hexano-1,6-diamina (HDA) y decano-1,10diamina (DAD)] en presencia de K₂CO₃.

En todos los casos se originaron dos productos: monómeros con un rendimiento superior al 60% (MA-PAD 63%, MA-HDA 64%, MA-DAD 62%, OA-PAD 65%, OA-HDA 62% y OA-DAD 63%) y dímeros cercanos al 30% de rendimiento (MA-PAD-MA 27%, MA-HDA-MA 28%, MA-DAD-MA 30%, OA-PAD-OA 28%, OA-HDA-OA 29% y OA-DAD-OA 29%).

La reacción de los derivados de OA-TBTU y MA-TBTU con N,N-dimetil-1,3-propanodiamina dio lugar a un solo compuesto (MA-DMPA y OA-DMPA) con un 90% rendimiento en ambos casos.

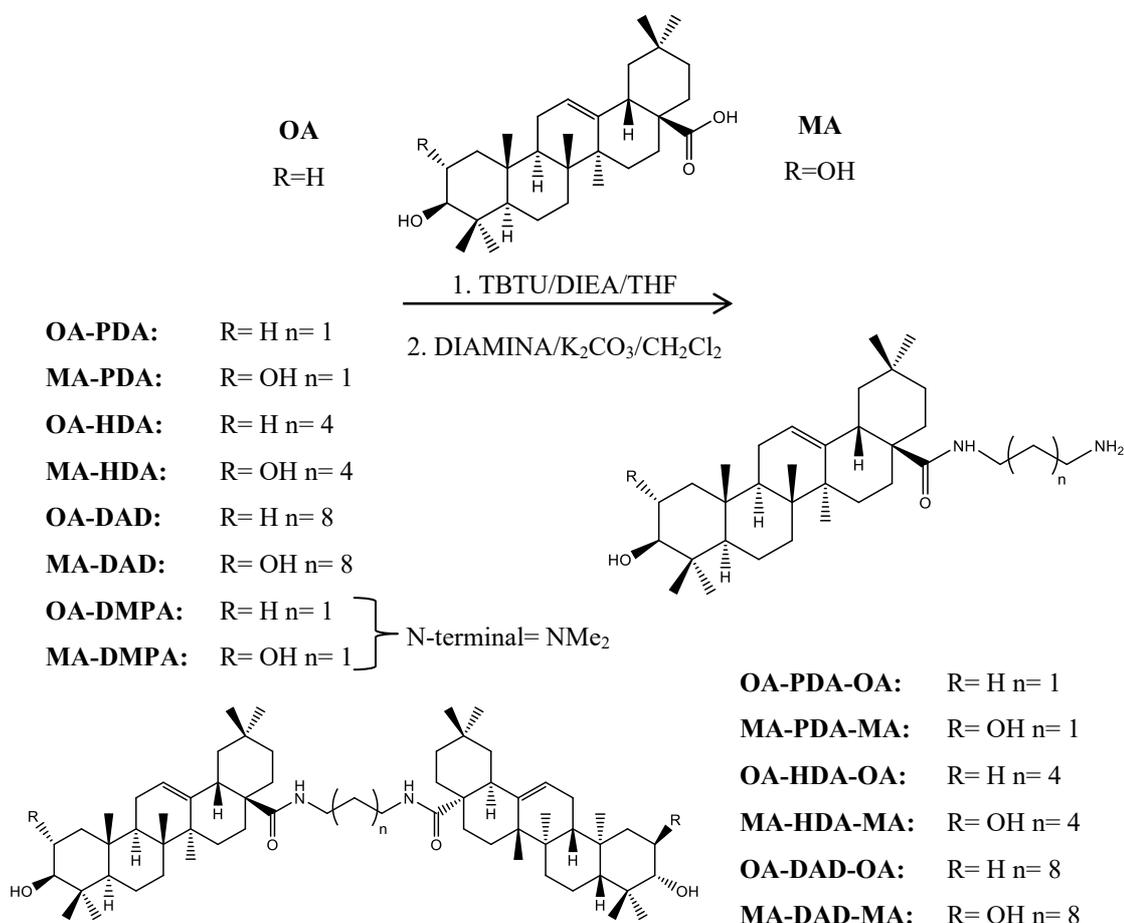


Figura I.18 Síntesis de derivados amida de OA y MA en la posición C-28

En todos los casos, los compuestos se purificaron mediante cromatografía en columna. La pureza de los compuestos se determinó mediante un sistema Waters Acquity UPLC (cromatografía líquida de ultra rendimiento) acoplado con un espectrómetro Waters Synapt G2 HRMS (espectrómetro de masas de alta resolución) con ESI (ionización por electropulverización) $\geq 95\%$.

Los compuestos aislados se caracterizaron por ^1H RMN y HRMS, coincidiendo con los datos ya publicados.¹⁴ MA-DMPA y OA-DMPA se caracterizaron por ^1H y ^{13}C RMN y HRMS. Las copias de los espectros de RMN y los valores de HRMS se incluyen en el apartado I.5 de este capítulo.

I.5.2. Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano

Staphylococcus aureus de tipo salvaje CECT 86 (ATCC 12600), *Staphylococcus epidermidis* CECT 231 (ATCC 1798), *Streptococcus mutans* CECT 479 (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* CECT 481 (ATCC 19433), *Escherichia coli* K12 MG1655 CECT 433 (ATCC 700926) y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CECT 4122 (ATCC 15692) se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina del Instituto de Bioingeniería de Cataluña.³⁹

Los perfiles de actividad antimicrobiana de *S. aureus* se enumeran en la Tabla I.6 Todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en el medio de cultivo Triptona-Soja (Tryptic Soy Broth, TSB) o Luria-Bertani (LB) (Scharlab) a 37 ° C.

Tabla I.6 Perfil de actividad antimicrobiana (MIC₅₀ µg/mL)

| Antibiótico | <i>S. aureus</i> CECT 86 (ATCC 12600) | <i>S. aureus</i> MRSA |
|----------------|--|-----------------------|
| Linezonid | 2 | 4 |
| Oxacilina | 1 | >250 |
| Vancomicina | 1 | 1 |
| Daptomicina | 0.25 | 0.5 |
| Ciprofloxacina | 0.25 | |

I.5.3. Pruebas de susceptibilidad antibacteriana (actividad *in vitro*)

Los compuestos se probaron en diferentes cepas bacterianas como se describió anteriormente.³⁹ Las bacterias se cultivaron en medio TSB o LB hasta una $D.O_{550} \approx 0.1$ ($\approx (4.3 \times 10^7) \pm (1.4 \times 10^6)$ ufc/mL)(ufc, unidades formadoras de colonias) y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning 3596 Polystyrene Flat Bottom 96 Well, Corning NY) conteniendo varias concentraciones de los compuestos de acuerdo con las directrices del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).⁴⁰

Las placas se incubaron a 37 ° C con agitación a 120 rpm durante 8 h y se leyó la absorbancia a 550 nm cada 15 min en un lector de microplacas multimodo SPARK (Tecan). La concentración mínima inhibitoria del 50% (MIC₅₀) se definió como la concentración del compuesto que inhibía el crecimiento bacteriano en un 50%.

I.5.4. Determinación de la citotoxicidad en mamíferos (toxicidad *in vitro*)

Se colocaron células epiteliales alveolares humanas A549 (ATCC CCL-185) y se dejaron sedimentar en una placa de microtitulación (Corning 3596 Polystyrene Flat Bottom 96 Well, Corning NY) a 2×10^4 células/pocillo y se añadieron los compuestos a varias concentraciones. Después de 24 h, se añadió una solución al 10% de MTT (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich) y el formazán ((E, Z)-5-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-1,3-difenilformazan) que precipitó 3 horas después se disolvió con isopropanol ácido (solución 1.5 % v/v de ácido clorhídrico en isopropanol) (Fig. 1.19).

La absorbancia se midió a 550 nm en un lector de microplacas multimodo SPARK (Tecan) para determinar la viabilidad celular.

Se calculó CC_{50} con Prism 6.00 (GraphPad Software) como la concentración del compuesto que disminuyó la población celular en un 50%. Se muestran los valores \pm desviación estándar para 3 experimentos independientes.

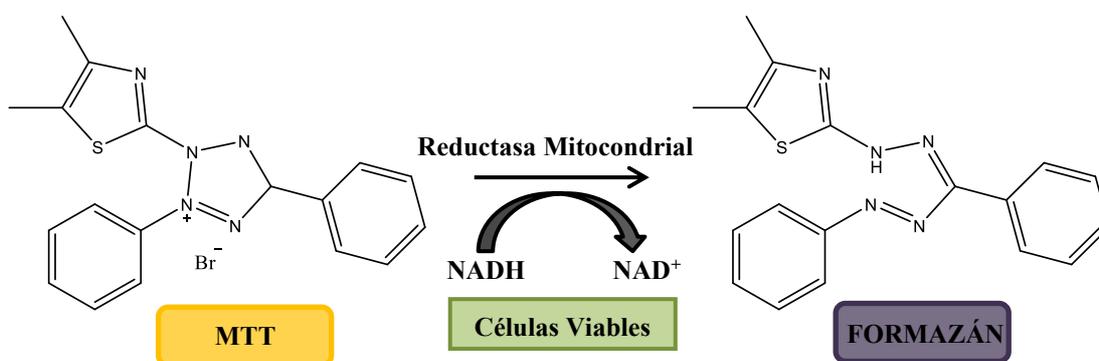


Figura I.19 Conversión del MTT en cristales de formazán por acción de la enzima reductasa mitocondrial en células viables.

I.5.5. Determinación de la toxicidad animal (toxicidad *in vivo*)

Las larvas de *Galleria mellonella* se criaron con una dieta artificial (15% de harina de maíz, 15% de harina de trigo, 15% de cereal para bebés, 11% de leche en polvo, 6% de levadura de cerveza, 25% de miel y 13% de glicerol) a 34 ° C en la oscuridad antes de su uso.

Las larvas *G. mellonella* se inyectaron con 10 μ l de cada compuesto a 300 y 400 mg/kg con una microjeringa (Hamilton) en el hemocele a través del proleg superior izquierdo (Fig. I.20).



Figura I.20 Inyección en la larva de *Galleria mellonella* por el proleg inferior izquierdo.⁴¹

Se inyectaron a cinco larvas (200-250 mg cada una) por compuesto y se registró diariamente la concentración y la mortalidad de las larvas. Los grupos de control se inyectaron con 10 μ l de 1 \times PBS (tampón fosfato salino) o el vehículo (DMSO) en la concentración más alta utilizada.

La LD₅₀ (dosis letal media) se calculó con Prism 6.00 (GraphPad Software) como la concentración del compuesto que mató al 50% de las larvas en 24 h. Se muestran los valores \pm desviación estándar para 3 experimentos independientes.

I.5.6. Ensayo de supervivencia en modelo animal con *Galleria mellonella* (eficacia *in vivo*)

Se inyectaron las larvas de *Galleria mellonella* con una dosis infecciosa de *S. aureus* (1,5 x 10⁹ ufc/mL) en el hemocele a través del proleg superior izquierdo (Fig. I.20).

Una vez infectadas las larvas se inyectaron 10 μ L del compuesto a 240 mg/kg a través de un proleg diferente, la primera vez transcurrida una hora de la infección y por segunda ocasión transcurridas seis horas. Cada compuesto se inyectó en un grupo de cinco larvas (200 a 250 mg cada una).

Los grupos de control se inyectaron con 10 μ l de 1 \times PBS (tampón fosfato salino), el vehículo (DMSO) o gentamicina a 20 mg/kg. Las larvas de *G. mellonella* se incubaron a 37 °C y se registró diariamente la mortalidad. Las curvas de supervivencia se trazaron mediante el análisis de Kaplan-Meier y las diferencias en las tasas de supervivencia se analizaron mediante la prueba de rango logarítmico (GraphPad Prism 6,00). Las diferencias con valores de $P < 0,005$ se consideraron estadísticamente significativas.

I.5.7. Viabilidad por Microscopía Fluorescente y Análisis membranas

S. aureus se desarrolló en el medio de cultivo TSB hasta una D.O.₅₅₀ \approx 0.3 ($\approx (1.3 \times 10^8) \pm (3 \times 10^7)$ ufc/mL) y los compuestos se agregaron a una concentración de 50 μ g/mL durante 4 h en el análisis Vivo/Muerto y por 10 min en el análisis de membrana. Las células bacterianas se recolectaron y tiñeron con el kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Thermo Fisher Scientific) para la prueba de viabilidad.

Para el análisis de membranas, se tiñeron con 10 μ g/mL de N-(3trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenilo) dibromuro de hexatrienil) piridinio (FM 4-64, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. A continuación, se visualizaron las bacterias con un microscopio fluorescente invertido Nikon ECLIPSE Ti-S / L100 (Nikon) acoplado con una cámara Nikon DS-Qi2 (Nikon).

I.5.8. Análisis bacteriano por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis morfológico de *S. aureus* después de la exposición a los compuestos antimicrobianos se realizó mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (Nova Nano SEM FEISEM).

S. aureus se cultivó en el medio TSB hasta una D.O.₅₅₀ $\approx 0,6$ ($\approx (2 \times 10^8) \pm (4 \times 10^7)$ ufc/mL) y se expuso a los compuestos a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 min. Se utilizaron bacterias no expuestas como referencia. Inmediatamente después de la exposición, las bacterias se fijaron en glutaraldehído. Para ello, se centrifugaron 100 μL de cultivo tratado durante 5 minutos a 6000 rpm y se reemplazó el medio TSB por 50 μL de solución de glutaraldehído (3% en peso).

Después de 3 horas a temperatura ambiente, el fijador se reemplazó con el mismo volumen de fijador nuevo y se dejó a 4 °C durante la noche. Las bacterias fijadas se depositaron en la parte superior de las membranas porosas mediante filtración en vacío suave. Para eliminar el fijador, las bacterias depositadas se lavaron tres veces con 1 \times PBS (durante 15 min para cada reposición) y se deshidrataron en etanol diluido en serie (30, 50, 70, 90 y 100% en peso, 30 min en cada concentración). Las células en etanol se secaron finalmente utilizando la técnica del punto crítico (CPD Baltec 030). Antes del examen en SEM, las bacterias depositadas en las membranas se pulverizaron con una capa fina de oro para una mejor conductividad.

I.5.9. Efecto antibacteriano de los compuestos sobre las biopelículas que crecen en los catéteres

Se colocaron piezas de catéter de silicona estéril (2 mm de diámetro y 1 cm de ancho) (SILT-002, SUDELAB) en un tubo de 10 mL y se cubrieron con un cultivo de *S. aureus* de D.O.₅₅₀ ≈ 0.1 ($\approx (4.3 \times 10^7) \pm (1.43 \times 10^6)$ ufc/ mL) en medio TSB + glucosa al 0,2%. Los tubos se incubaron a 37 °C sin agitar. Después de 72 h, las piezas del catéter se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS) (Fisher BioReagents) para descartar el crecimiento planctónico (bacterias no formadoras de biopelícula).

Se trataron con los diferentes compuestos a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Después de 24 h, se volvieron a lavar los catéteres y se añadió una solución de 1 x PBS + TWEEN al 0,05%. Luego, los tubos se colocaron en un baño ultrasónico (USC100T, VWR) durante 5 min y se agitaron en vórtex durante 30 s para eliminar las bacterias que crecían en una biopelícula. Se colocaron diluciones en serie en placas de agar TSB para determinar las células viables en la biopelícula. Los recuentos viables en el experimento de control sin tratamiento fueron $(4,4 \times 10^5) \pm (1,7 \times 10^5)$ ufc/mL.

I.5.10. Efecto antibacteriano de los compuestos en las biopelículas en flujo continuo

Se formaron biopelículas de flujo continuo de *S. aureus* como se describió previamente^{42,43} con algunas modificaciones y con un inóculo bacteriano inicial de D.O.₅₅₀ $\approx 0,1$ ($\approx (4,3 \times 10^7) \pm (1,43 \times 10^6)$ ufc/mL). Las biopelículas se cultivaron en TSB al 2% (v/v) + glucosa al 0,2% bombeada a través de las cámaras de las células de flujo usando una bomba peristáltica ISM (Ismatec) a 42 $\mu\text{L} / \text{min}$.

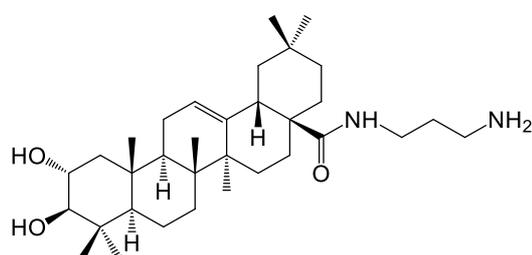
Estas células de flujo (DTU) se recubrieron previamente con plasma bovino al 20% (Biowest) durante la noche antes de la inoculación de la bacteria.

Después de 4 días de crecimiento, se detuvo el flujo y se inyectaron en las biopelículas formadas los diferentes compuestos diluidos en medio, incluyendo ciprofloxacina como control. Después de 24 h de tratamiento, las biopelículas se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead BacLight (Thermo Fisher Scientific) y se visualizaron bajo un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM 800 (CLSM) con el objetivo de aire de 20 ×/0,8.

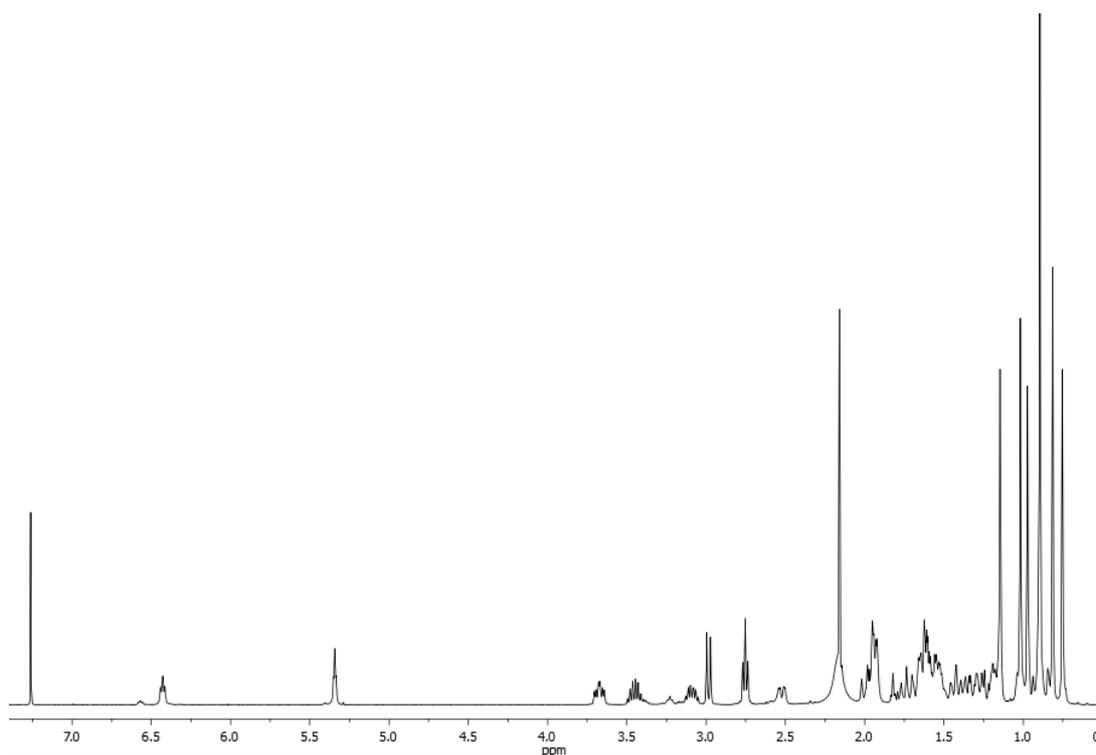
Se realizó un análisis de las imágenes obtenidas para cuantificar la biomasa y el espesor de las biopelículas utilizando el software ImageJ FIJI y COMSTAT242.⁴⁴

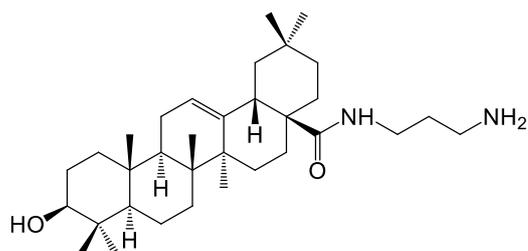
I.6. ESPECTROS DE RMN Y VALORES HRMS

MA-PDA

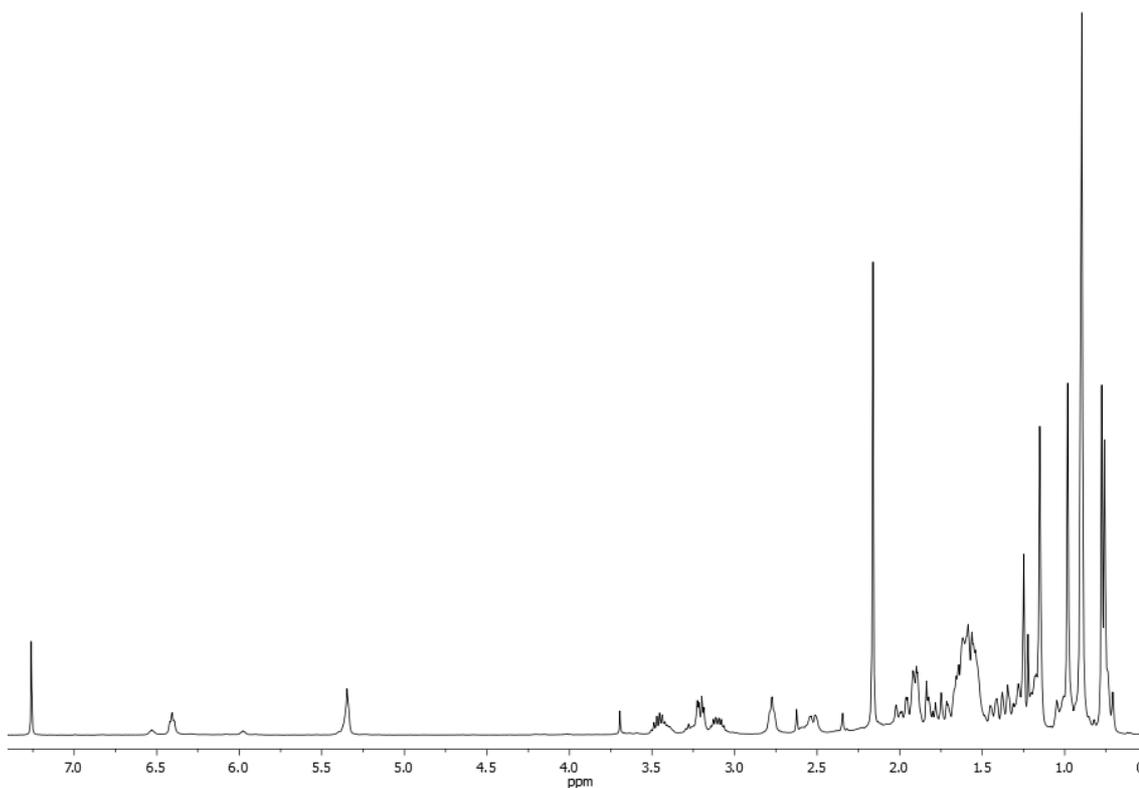


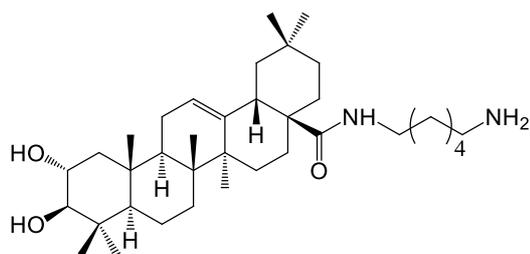
¹HRMN(CDCl₃, 400 MHz): δ 6.43 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 5.4$ Hz), 5.35 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.2$ Hz), 3.70 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 9.6$, $J_3 = 14.0$ Hz), 3.50–3.41 (m, 1H), 3.13–3.10 (m, 1H), 2.98 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 2.75 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 2.52 (dd, 1H, $J_1 = 3.6$, $J_2 = 12.8$ Hz), 1.15, 1.02, 0.97, 0.90, 0.90, 0.81, 0.75 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para C₃₃H₅₇N₂O₃ [M+1]⁺ 529.4369, encontrado 529.4336.



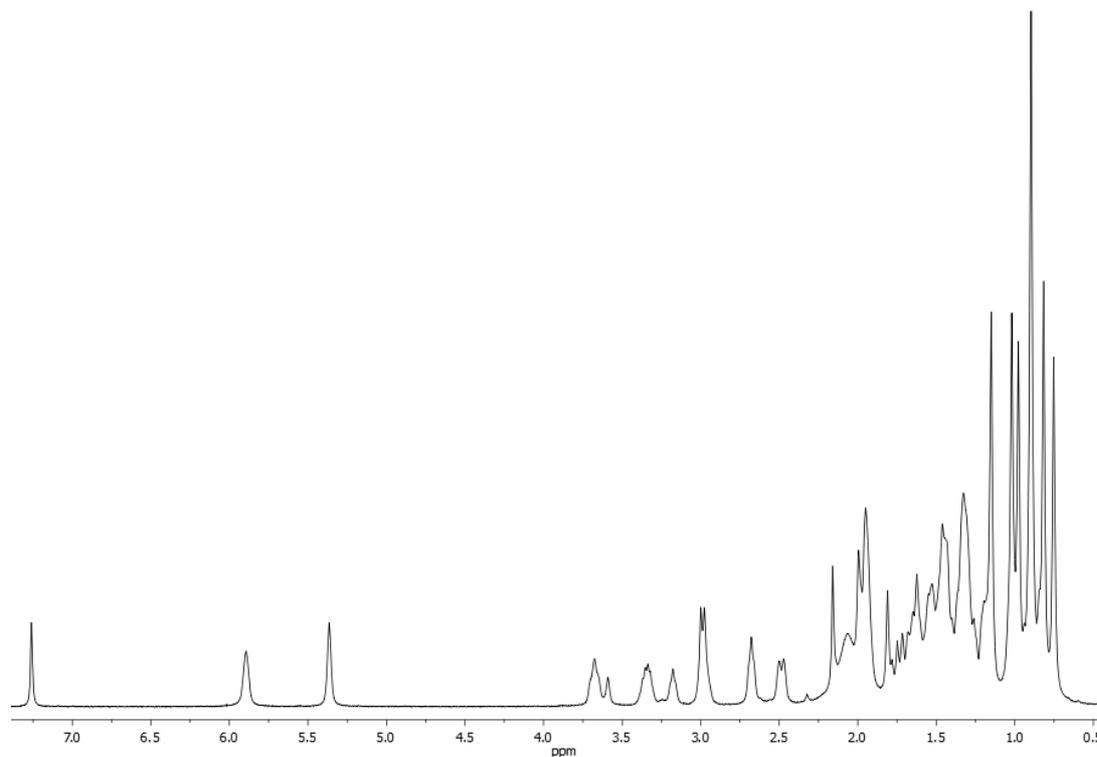
AO-PDA

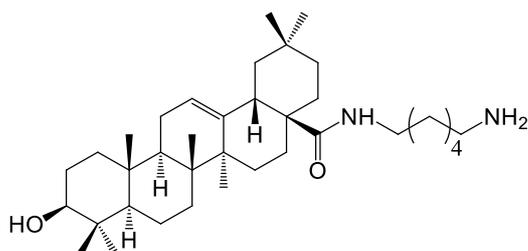
$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$: δ 6.41 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 5.0 \text{ Hz}$), 5.35 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.2 \text{ Hz}$), 3.49–3.44 (m, 1H), 3.21 (dd, 1H, $J_1 = 4.6, J_2 = 8.8 \text{ Hz}$), 3.13–3.10 (m, 1H), 2.77 (t, 2H, $J = 6.0 \text{ Hz}$), 2.52 (dd, 1H, $J_1 = 3.4, J_2 = 13.0 \text{ Hz}$), 1.25, 1.15, 0.98, 0.90, 0.90, 0.78, 0.76 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 513.4420, encontrado 513.4426.



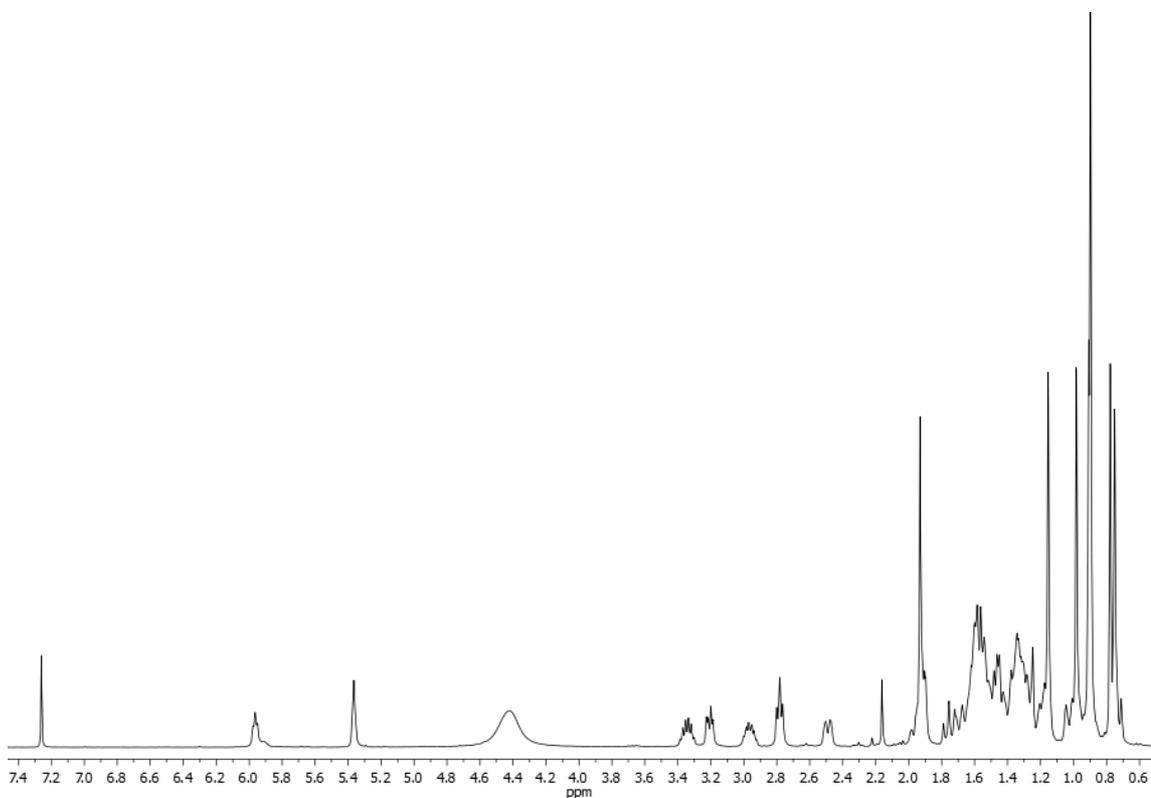
MA-HDA

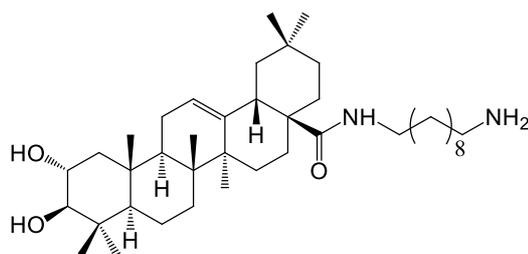
¹HRMN(CDCI₃, 400 MHz): δ 5.90 (dd, 1H, *J*₁ = *J*₂ = 5.4 Hz), 5.36 (dd, 1H, *J*₁ = *J*₂ = 3.2 Hz), 3.68 (ddd, 1H, *J*₁ = 4.8, *J*₂ = 9.2, *J*₃ = 14.0 Hz), 3.35–3.32 (m, 1H), 3.19–3.15 (m, 1H), 2.98 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 2.69 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 2.49 (dd, 1H, *J*₁ = 3.6, *J*₂ = 12.8 Hz), 1.15, 1.02, 0.98, 0.90, 0.90, 0.82, 0.75 (s, 3H); ESI-HRMS *m/z* calculado para C₃₆H₆₃N₂O₃ [M+1]⁺ 571.4839, encontrado 571.4842.



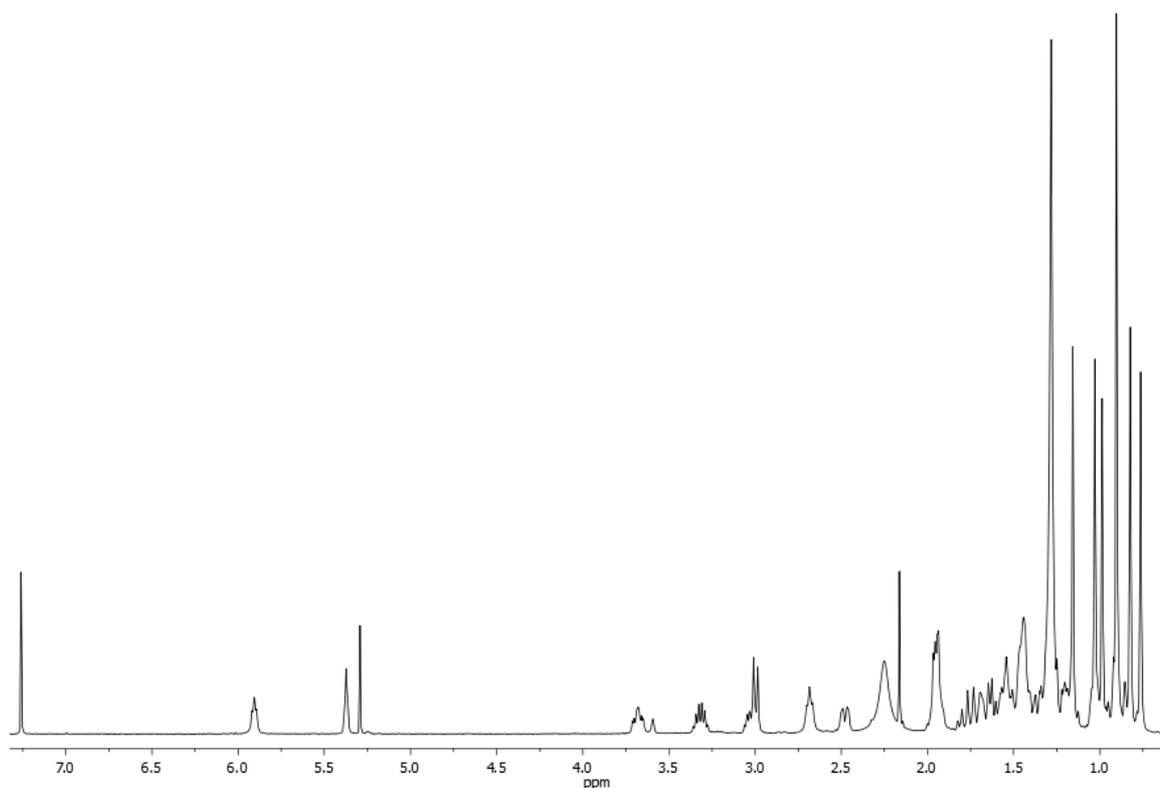
OA-HDA

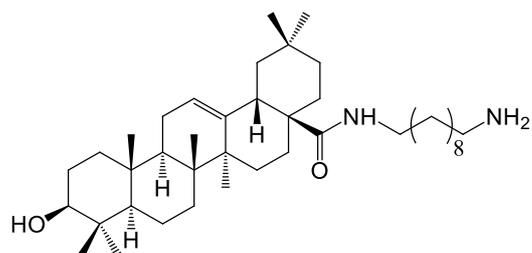
¹HRMN(CDCl₃, 400 MHz): δ 5.96 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 6.0$ Hz), 5.37 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz), 3.37–3.32 (m, 1H), 3.21 (dd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.8$ Hz), 2.98–2.94 (m, 1H), 2.78 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.50 (dd, 1H, $J_1 = 2.8$, $J_2 = 13.2$ Hz), 1.15, 0.98, 0.91, 0.90, 0.90, 0.78, 0.75 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para C₃₆H₆₃N₂O₂ [M+1]⁺ 555.4890, encontrado 555.4874.



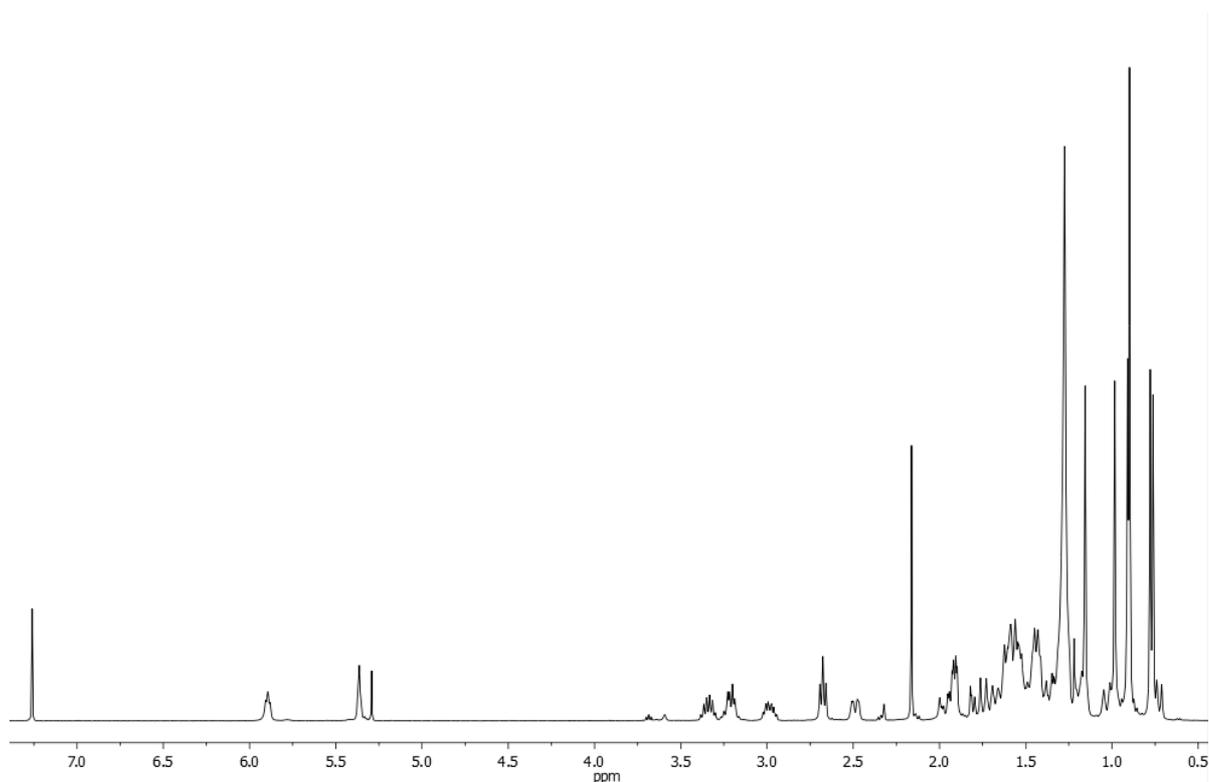
MA-DAD

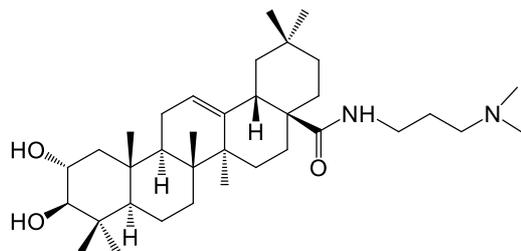
¹HRMN(CDCl₃, 400 MHz): δ 5.91 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 4.8$ Hz), 5.36 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz), 3.68 (ddd, 1H, $J_1 = 4.0$, $J_2 = 9.6$, $J_3 = 14.0$ Hz), 3.36–3.28 (m, 1H), 3.06–2.99 (m, 1H), 3.00 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 2.68 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 2.50 (dd, 1H, $J_1 = 2.4$, $J_2 = 12.4$ Hz), 1.28, 1.16, 1.03, 0.99, 0.90, 0.82, 0.76 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para C₄₀H₇₁N₂O₃ [M+1]⁺ 627.5386, encontrado 627.5478.



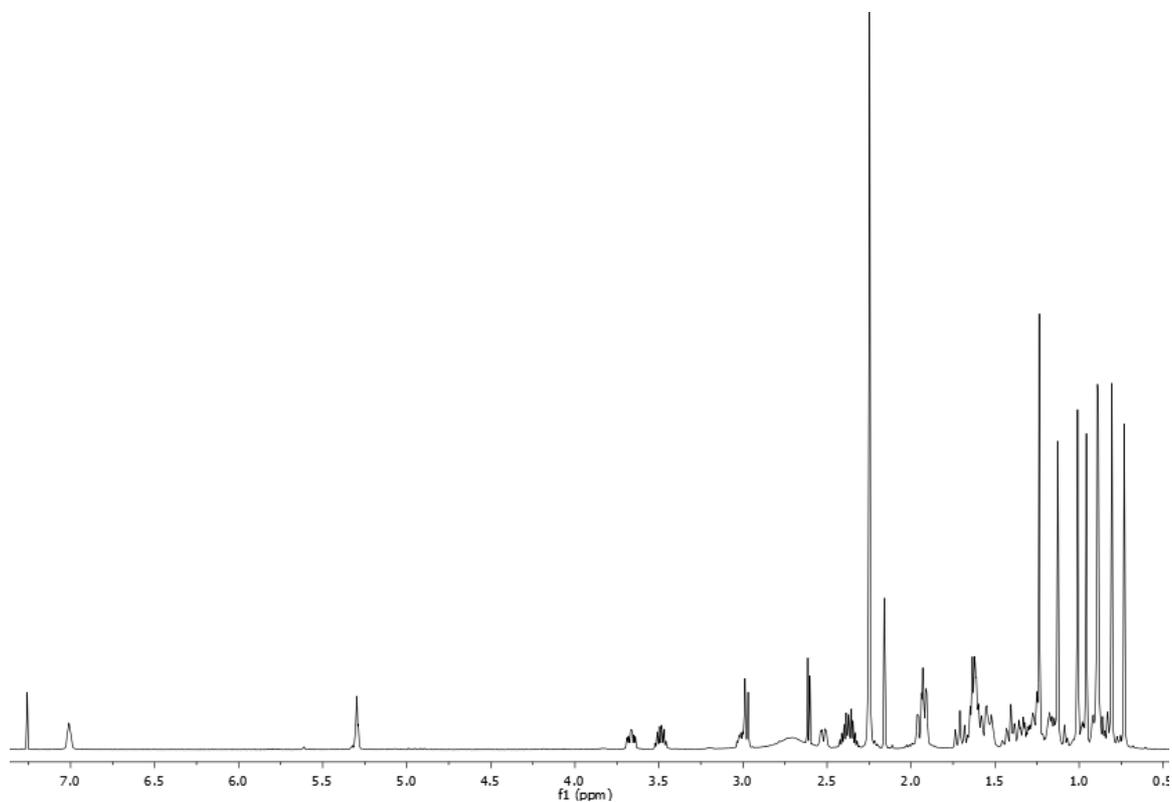
OA-DAD

¹HRMN(CDCl₃, 400 MHz): δ 6.41 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 5.2$ Hz), 5.35 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.2$ Hz), 3.49–3.39 (m, 1H), 3.21 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 11.1$ Hz), 3.14–3.07 (m, 1H), 2.77 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 2.52 (dd, 1H, $J_1 = 3.6$, $J_2 = 13.2$ Hz), 1.25, 1.15, 0.98, 0.91, 0.90, 0.78, 0.76 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para C₄₀H₇₁N₂O₂ [M+1]⁺ 611.5516, encontrado 611.5534.

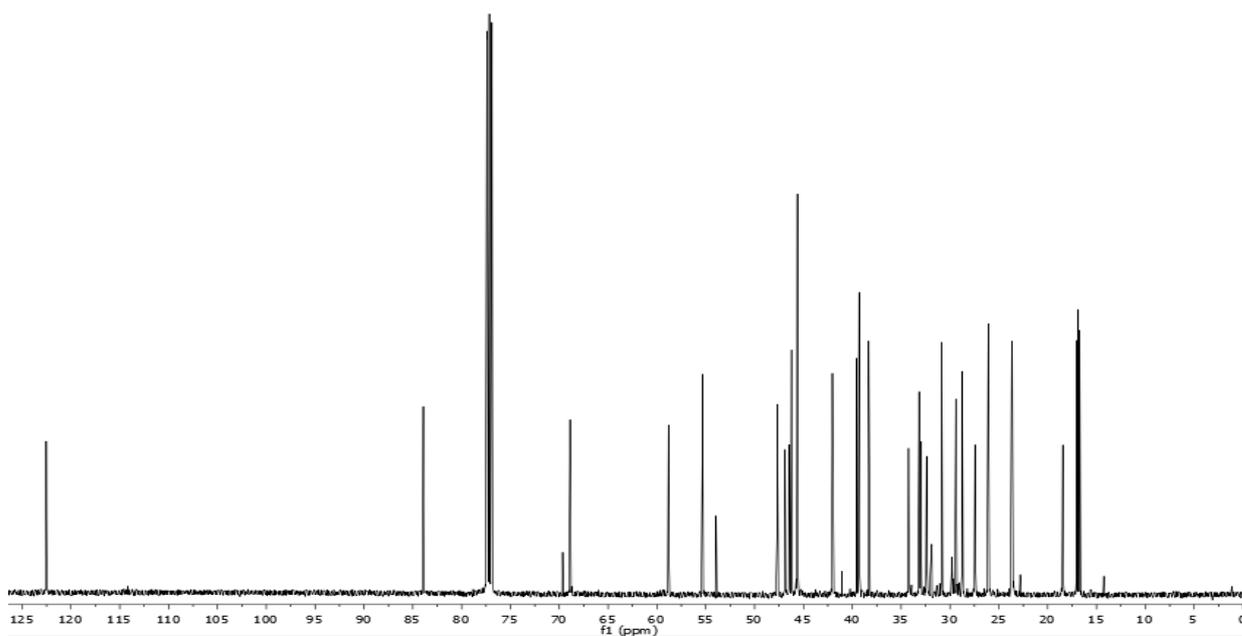


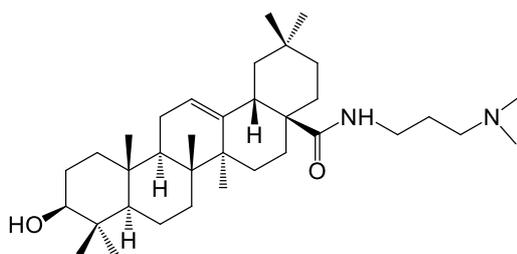
MA-DMPA

¹HMRN(CDCl₃, 500 MHz): δ 7.01 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 5.4$ Hz), 5.30 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz), 3.66 (ddd, 1H, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 9.6$, $J_3 = 14.0$ Hz), 3.53–3.45 (m, 1H), 3.00–2.98 (m, 1H), 2.97 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz), 2.51 (dd, 1H, $J_1 = 3.6$, $J_2 = 12.8$ Hz), 2.25, 2.25, 1.12, 1.01, 0.95, 0.89, 0.88, 0.80 0.73 (s, 3H).

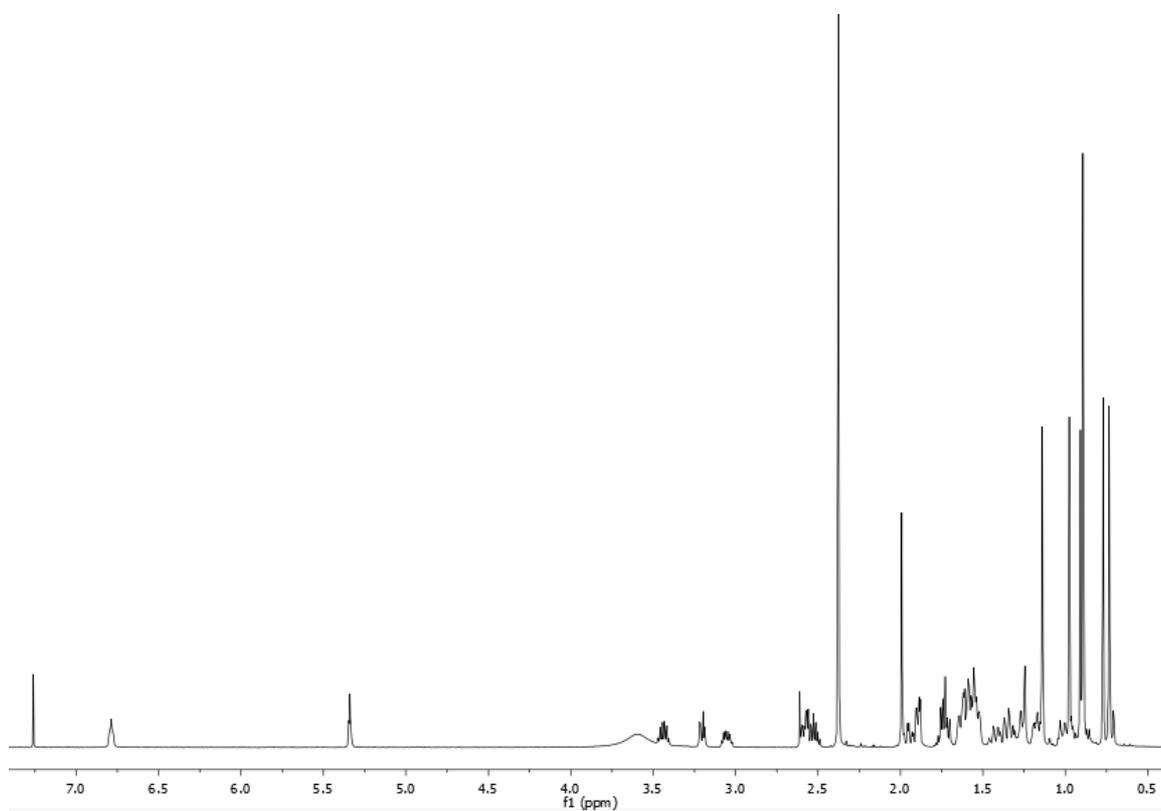


$^{13}\text{CRMN}$ (CDCl_3 , 126 MHz): δ 178.10 (C), 144.80 (C), 122.53 (CH), 83.92 (CH), 68.90 (CH), 58.81(CH₂), 55.34(CH), 53.95(CH₂), 47.68(CH), 46.88 (CH₂), 46.44 (CH₂), 46.22 (C), 45.62 (CH), 42.04 (C), 41.99 (CH₃), 39.54 (C), 39.30 (CH₂), 38.32 (C), 34.24 (CH₂), 33.16 (CH₃), 32.99 (CH₂), 32.39 (CH₂), 31.86 (C), 30.84 (C), 29.39 (CH₃), 28.75 (CH₃), 27.44 (CH₂), 26.07 (CH₃), 26.05 (CH₂), 23.67 (CH₃), 23.63(CH₂), 18.44 (CH₂), 17.04 (CH₃), 16.90 (CH₃), 16.73 (CH₃). ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+1]^+$ 557.4604, encontrado 557.4682.

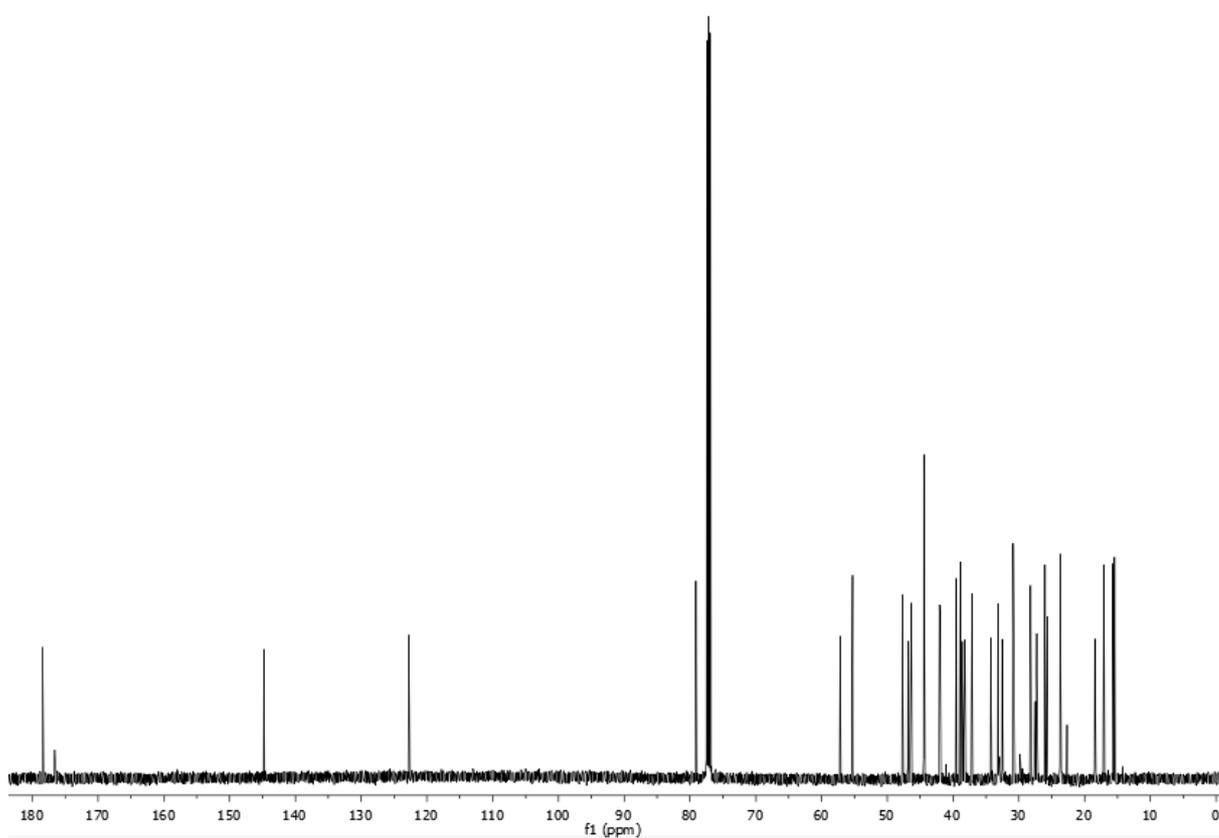


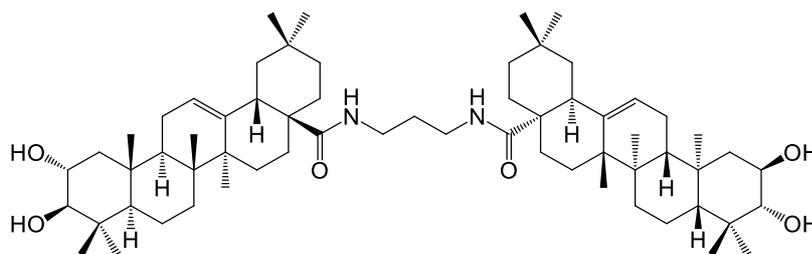
OA-DMPA

¹HMRN(CDCl₃, 500 MHz): δ 6.78 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 5.3$ Hz), 5.34 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.7$ Hz), 3.47–3.40 (m, 1H), 3.18 (dd, 1H, $J_1 = 4.6$, $J_2 = 11$ Hz), 3.09–3.02 (m, 1H), 2.58 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$, $J_2 = 13.0$ Hz), 2.37, 2.37, 1.13, 0.97, 0.90, 0.89, 0.89, 0.77, 0.73 (s, 3H).

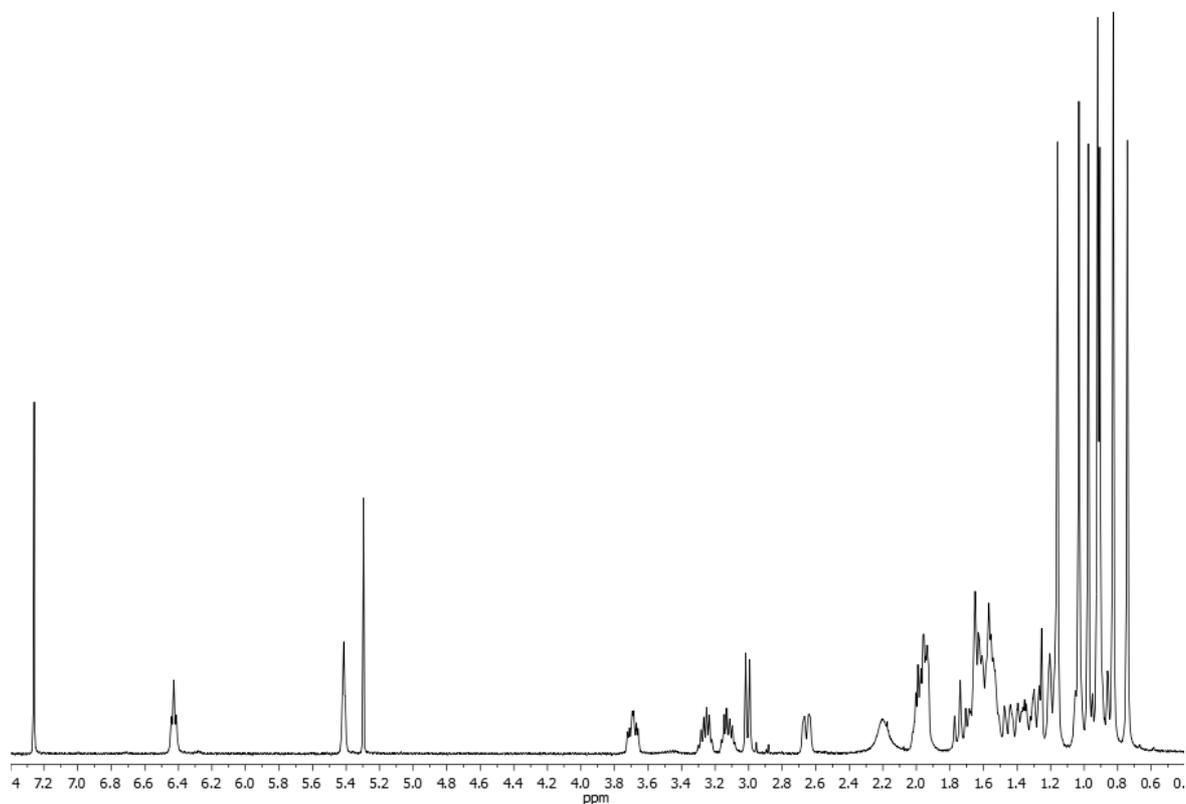


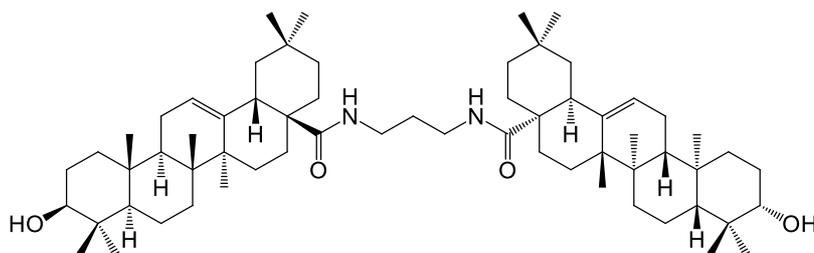
^{13}C RMN (CDCl_3 , 126 MHz): δ 178.44 (C), 144.80 (C), 122.75 (CH), 79.09 (CH), 57.17 (CH_2), 55.28 (CH), 47.71 (CH), 46.85(CH_2), 46.34 (C), 44.43 (CH), 42.04 (C), 41.95 (CH_3), 39.51(C), 38.89 (C), 38.57 (CH_2), 38.17 (CH_2), 37.13 (C), 34.28 (CH_2), 33.18 (CH_3), 33.03 (CH_2), 32.54 (CH_2), 30.86 (C), 28.23(CH_3), 27.50 (CH_2), 27.29 (CH_2), 26.03 (CH_3), 25.69 (CH_2), 23.73 (CH_3), 23.64 (CH_2), 23.60 (CH_2), 22.68 (CH_3), 18.44 (CH_2), 17.07 (CH_3), 15.71 (CH_3), 15.46 (CH_3).ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+1]^+$ 541.4655, encontrado 541.4733.



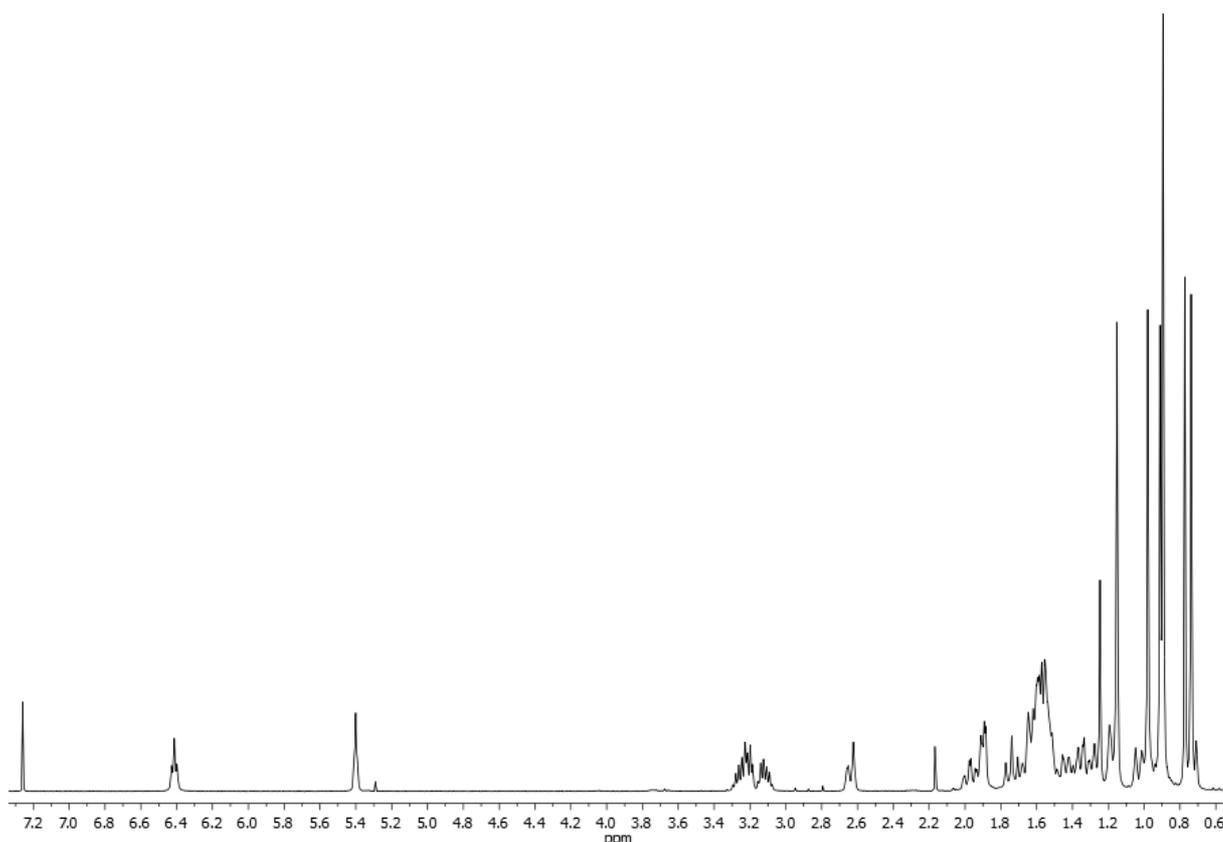
MA-PDA-MA

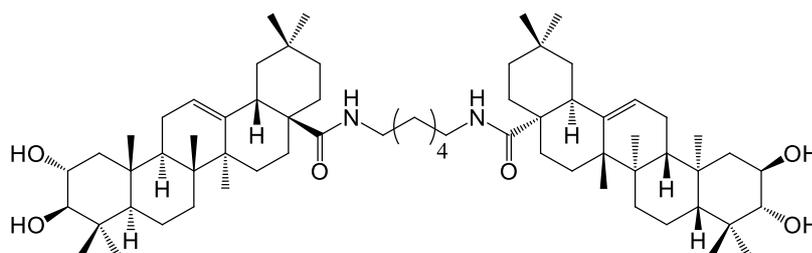
$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz}): \delta$ 6.43 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 6.0 \text{ Hz}$), 5.35 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.2 \text{ Hz}$), 3.70 (ddd, 1H, $J_1 = 4.0, J_2 = 9.2, J_3 = 14.0 \text{ Hz}$), 3.28–3.23 (m, 1H), 3.15–3.10 (m, 1H), 3.01 (d, 1H, $J = 9.2 \text{ Hz}$), 2.65 (dd, 1H, $J_1 = 3.6, J_2 = 13.2 \text{ Hz}$), 1.16, 1.03, 0.98, 0.92, 0.91, 0.83, 0.74 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{63}\text{H}_{103}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$ 983.7816, encontrado 983.7781.



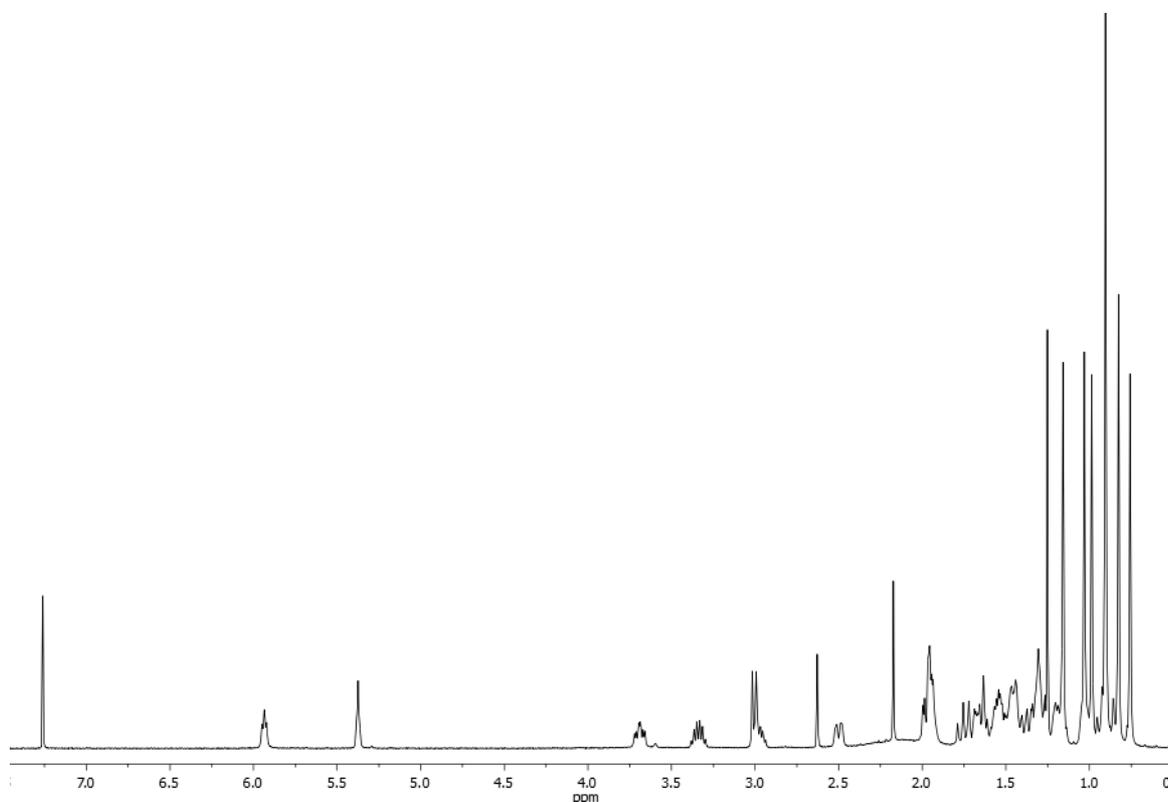
OA-PDA-OA

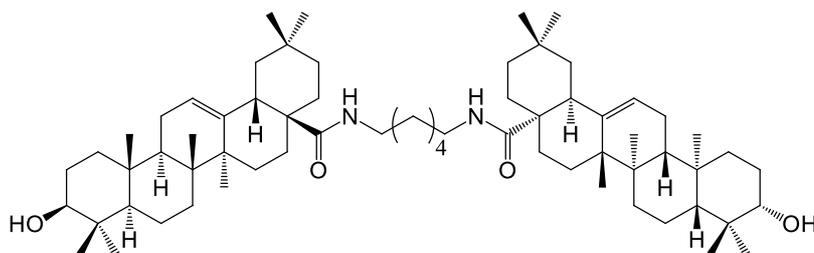
$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$: δ 6.41 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 6.0 \text{ Hz}$), 5.40 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.2 \text{ Hz}$), 3.28–3.24 (m, 1H), 3.21 (dd, 1H, $J_1 = 4.8, J_2 = 11.21 \text{ Hz}$), 3.14–3.10 (m, 1H), 2.64 (dd, 1H, $J_1 = 3.2, J_2 = 14.4 \text{ Hz}$), 1.25, 1.15, 0.98, 0.91, 0.90, 0.77, 0.74 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{63}\text{H}_{101}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+1]^+$ 949.7761, encontrado 949.7772.



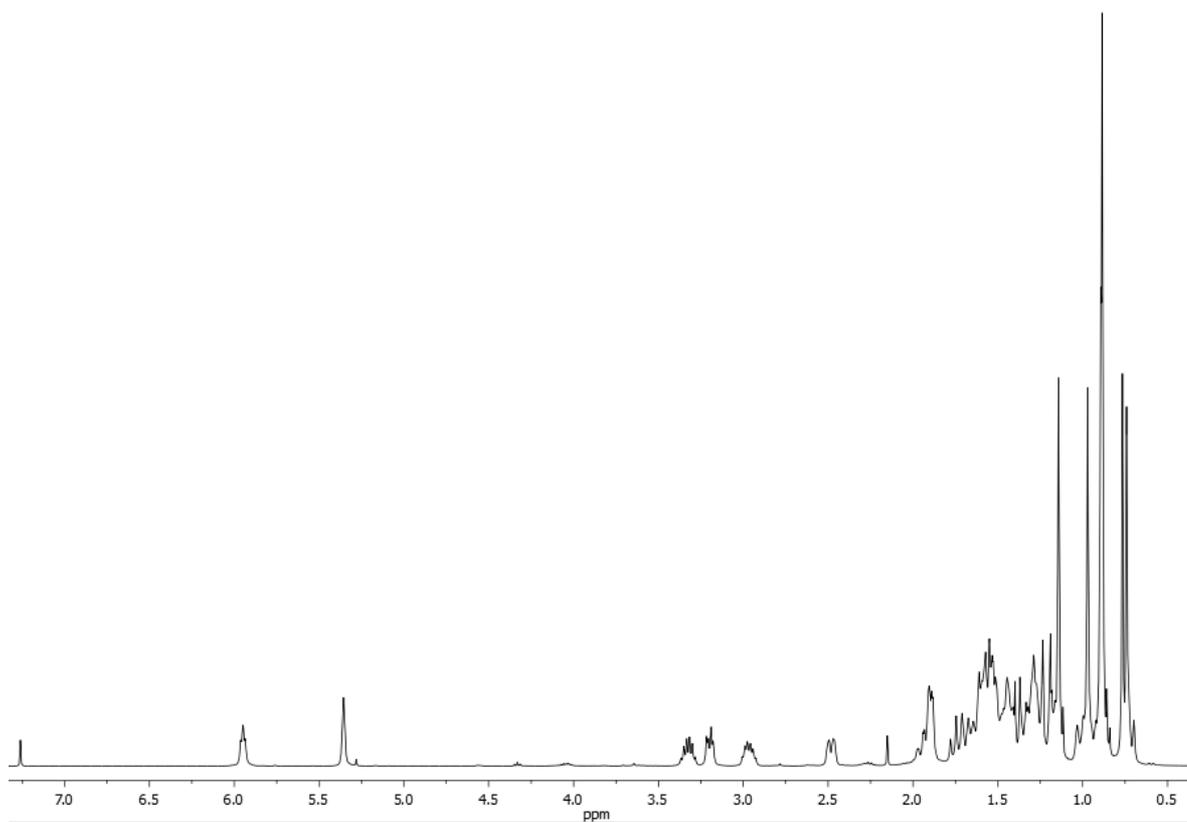
MA-HDA-MA

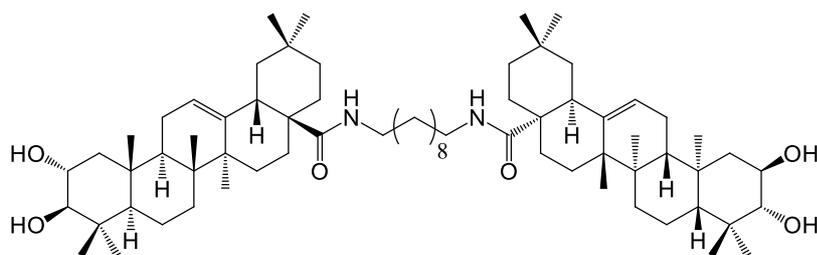
$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz}): \delta 5.94 \text{ (dd, 1H, } J_1 = J_2 = 5.4 \text{ Hz)}, 5.38 \text{ (dd, 1H, } J_1 = J_2 = 3.2 \text{ Hz)}, 3.70 \text{ (ddd, 1H, } J_1 = 4.4, J_2 = 9.2, J_3 = 13.6 \text{ Hz)}, 3.38\text{--}3.30 \text{ (m, 1H)}, 3.01\text{--}2.94 \text{ (m, 1H)}, 3.00 \text{ (d, 1H, } J = 9.2 \text{ Hz)}, 2.50 \text{ (dd, 1H, } J_1 = 3.2, J_2 = 12.8 \text{ Hz)}, 1.25, 1.16, 1.03, 0.99, 0.90, 0.83, 0.76 \text{ (s, 3H)}; \text{ESI-HRMS } m/z \text{ calculado para } \text{C}_{66}\text{H}_{109}\text{N}_2\text{O}_6 \text{ [M+1]}^+ 1025.8286, \text{ encontrado } 1025.8268.$



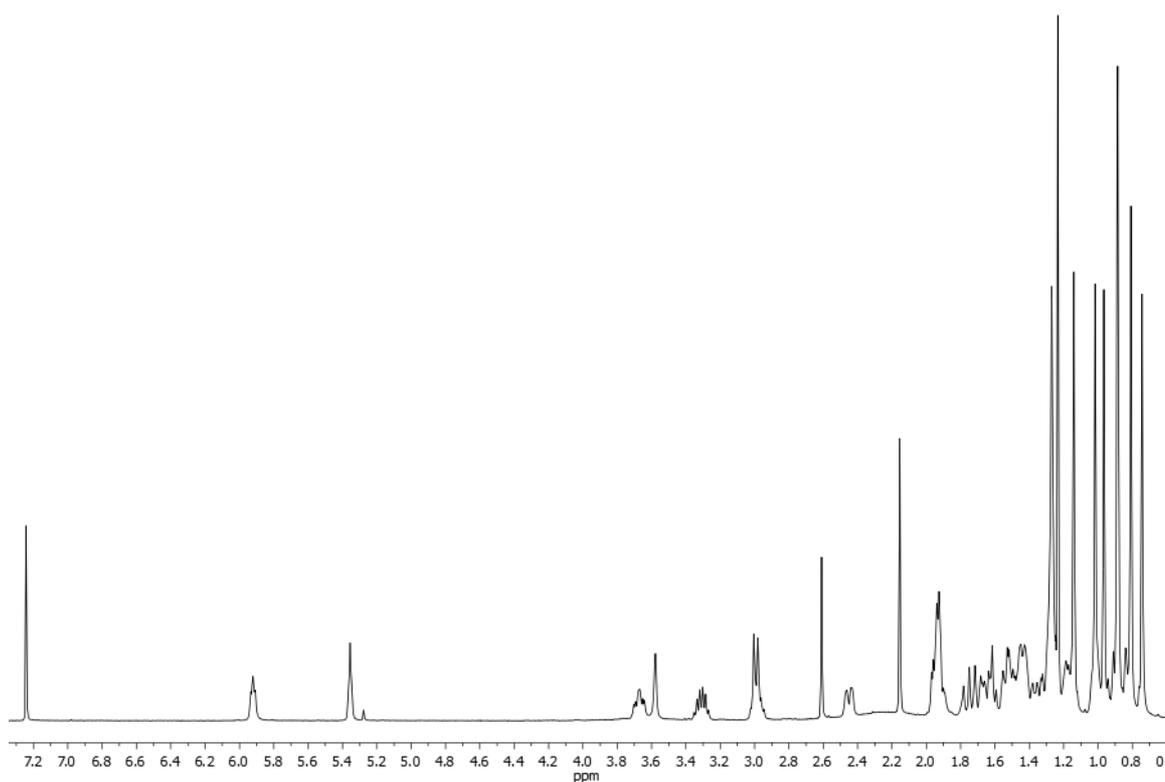
OA-HDA-OA

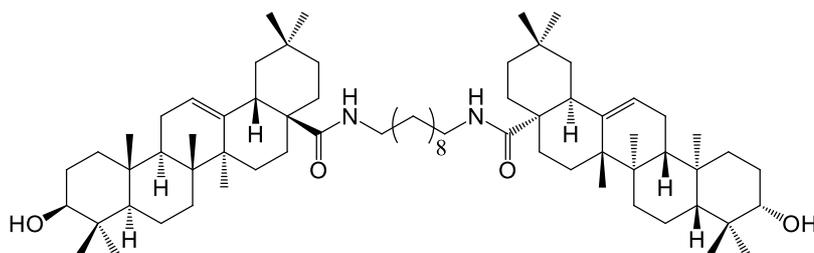
¹HRMN(CDCl₃, 400 MHz): δ 5.95 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 5.2$ Hz), 5.36 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.0$ Hz), 3.35–3.30 (m, 1H), 3.20 (dd, 1H, $J_1 = 4.2$, $J_2 = 11.0$ Hz), 3.00–2.93 (m, 1H), 2.48 (dd, 1H, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 13.2$ Hz), 1.14, 0.97, 0.89, 0.89, 0.88, 0.77, 0.74 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para C₆₆H₁₀₇N₂O₄ [M+1]⁺ 991.8231, encontrado 991.8235.



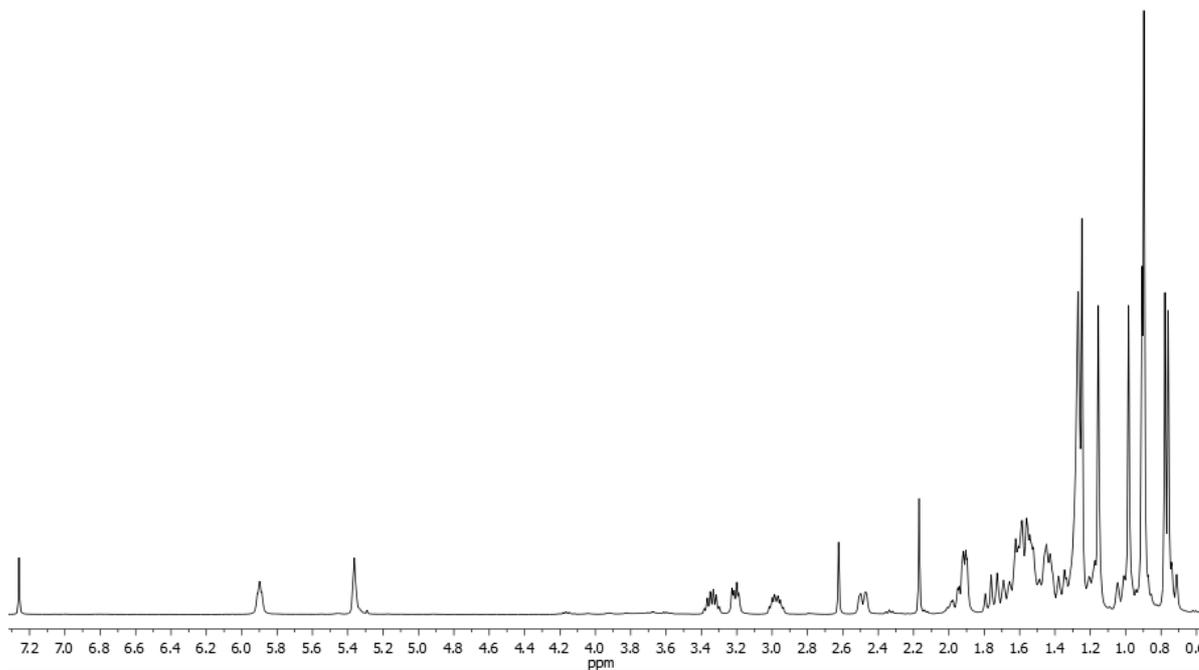
MA-DAD-MA

$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz}): \delta 5.94 \text{ (dd, 1H, } J_1 = J_2 = 5.2 \text{ Hz)}, 5.37 \text{ (dd, 1H, } J_1 = J_2 = 3.2 \text{ Hz)}, 3.69 \text{ (ddd, 1H, } J_1 = 4.4, J_2 = 9.6, J_3 = 14 \text{ Hz)}, 3.35\text{--}3.29 \text{ (m, 1H)}, 3.02\text{--}2.96 \text{ (m, 1H)}, 3.51 \text{ (d, 1H, } J = 9.6 \text{ Hz)}, 2.47 \text{ (dd, 1H, } J_1 = 3.2, J_2 = 12.4 \text{ Hz)}, 1.25, 1.16, 1.03, 0.98, 0.90, 0.83, 0.76 \text{ (s, 3H)}; \text{ESI-HRMS } m/z \text{ calculado para } \text{C}_{70}\text{H}_{117}\text{N}_2\text{O}_6 \text{ [M+1]}^+ 1081.8912, \text{ encontrado } 1081.8900.$



OA-DAD-OA

$^1\text{HRMN}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$: δ 5.90 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 4.8 \text{ Hz}$), 5.36 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 2.8 \text{ Hz}$), 3.37–3.32 (m, 1H), 3.21 (dd, 1H, $J_1 = 4.4, J_2 = 10.8 \text{ Hz}$), 3.00–2.93 (m, 1H), 2.49 (dd, 1H, $J_1 = 2.6, J_2 = 12.6 \text{ Hz}$), 1.25, 1.15, 0.98, 0.91, 0.90, 0.78, 0.76 (s, 3H); ESI-HRMS m/z calculado para $\text{C}_{70}\text{H}_{117}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+1]^+$ 1049.9013, encontrado 1049.8990.



I.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol Spectr.* **6**, 1–17 (2018).
2. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135–138 (2001).
3. Trafny, E. A. Biofilms and their role in infection pathogenesis. *Postep. Mikrobiol.* **47**, (2008).
4. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science (80-.)*. **284**, 1318–1322 (1999).
5. Hassoun, A., Linden, P. K. & Friedman, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care* **21**, 211 (2017).
6. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 603–661 (2015).
7. Suresh, M. K., Biswas, R. & Biswas, L. An update on recent developments in the prevention and treatment of Staphylococcus aureus biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* **309**, 1–12 (2019).
8. J.A., J., J.H.G., L., M.D., L., E.S., Y. & L.F.D., P. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, 1–14 (2015).

9. Rufino-Palomares, E. E. *et al.* Anti-cancer and Anti-angiogenic Properties of Various Natural Pentacyclic Tri-terpenoids and Some of their Chemical Derivatives. *Curr. Org. Chem.* (2015) doi:10.2174/1385272819666150119225952.
10. Fernández-Hernández, A., Martínez, A., Rivas, F., García-Mesa, J. A. & Parra, A. Effect of the solvent and the sample preparation on the determination of triterpene compounds in two-phase olive-mill-waste samples. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4269–4275 (2015).
11. Park, S. N., Ahn, S. J. & Kook, J. K. Oleanolic acid and ursolic acid inhibit peptidoglycan biosynthesis in *Streptococcus mutans* UA159. *Brazilian J. Microbiol.* **46**, 613–617 (2015).
12. Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C. & Duval, R. E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 272–276 (2008).
13. Kim, S., Lee, H., Lee, S., Yoon, Y. & Choi, K. H. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
14. Medina-O'Donnell, M. *et al.* Diamine and PEGylated-diamine conjugates of triterpenic acids as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **148**, 325–336 (2018).
15. Jie, L. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* **49**, 57–68 (1995).
16. Lozano-Mena, G., Sánchez-González, M., Juan, M. E. & Planas, J. M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - A promising nutraceutical? *Molecules* **19**, 11538–11559 (2014).

17. García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G. & Irusta, S. Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules* **23**, 1–18 (2018).
18. Abreu, A. C. *et al.* Antibiotic adjuvants from: *Buxus sempervirens* to promote effective treatment of drug-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *RSC Adv.* **6**, 95000–95009 (2016).
19. Kurek, A. *et al.* Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **97**, 61–68 (2010).
20. Pavel, I. Z. *et al.* In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Ability and Cytotoxicity on Two Melanoma Cell Lines of a Benzylamide Derivative of Maslinic Acid. *Anal. Cell. Pathol.* **2016**, 1–6 (2016).
21. Ignasiak, K. & Maxwell, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res. Notes* **10**, 1–8 (2017).
22. C.M., M.-N. *et al.* Amoebicidal Activity of Caffeine and Maslinic Acid by the Induction of Programmed Cell Death in *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, 1–10 (2017).
23. Grudniak, A. M., Kurek, A., Szarlak, J. & Wolska, K. I. Oleanolic and ursolic acids influence affect the expression of the cysteine regulon and the stress response in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **62**, 1331–1336 (2011).
24. Martins, A. *et al.* Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **37**, 438–444 (2011).

25. Sharma, H., Kumar, P., Deshmukh, R. R., Bishayee, A. & Kumar, S. Pentacyclic triterpenes: New tools to fight metabolic syndrome. *Phytomedicine* **50**, 166–177 (2018).
26. Liang, Z. *et al.* Identification of pentacyclic triterpenes derivatives as potent inhibitors against glycogen phosphorylase based on 3D-QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 2011–2021 (2011).
27. Mukaratirwa, S., Gcanga, L. & Kamau, J. Efficacy of maslinic acid and fenbendazole on muscle larvae of *Trichinella zimbabwensis* in laboratory rats. *J. Helminthol.* **90**, 86–90 (2016).
28. Moneriz, C. *et al.* Parasitostatic effect of maslinic acid. I. Growth arrest of *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages. *Malar. J.* **10**, 1–10 (2011).
29. De Pablos, L. M. *et al.* Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasitol. Res.* **107**, 601–604 (2010).
30. Moneriz, C., Mestres, J., Bautista, J. M., Diez, A. & Puyet, A. Multi-targeted activity of maslinic acid as an antimalarial natural compound. *FEBS J.* **278**, 2951–2961 (2011).
31. Kozai K *et al.* Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and ursolic acid. *Caries Res.* **21**, 104–108 (1987).
32. Malanovic, N. & Lohner, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 936–946 (2016).

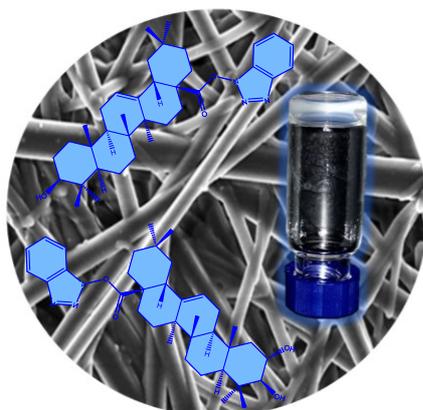
33. Ghosh, C. *et al.* Small molecular antibacterial peptoid mimics: The simpler the better! *J. Med. Chem.* **57**, 1428–1436 (2014).
34. Hoque, J., Konai, M. M., Sequeira, S. S., Samaddar, S. & Haldar, J. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Cationic Small Molecules with Spatial Positioning of Hydrophobicity: An in Vitro and in Vivo Evaluation. *J. Med. Chem.* **59**, 10750–10762 (2016).
35. Konai, M. M. & Haldar, J. Fatty Acid Comprising Lysine Conjugates: Anti-MRSA Agents That Display in Vivo Efficacy by Disrupting Biofilms with No Resistance Development. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1194–1204 (2017).
36. Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 737–751 (2011).
37. García-Granados, A. *Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling subproducts.* (1998).
38. Martinez, A. *et al.* Biotransformation of oleanolic and maslinic methyl esters by *Rhizomucor miehei* CECT 2749. *Phytochemistry* **117**, 500–508 (2015).
39. Barniol-Xicotà, M. *et al.* Antibacterial activity of novel benzopolycyclic amines. *Bioorganic Med. Chem.* **23**, 290–296 (2015).
40. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically : Approved Standard, 7th ed.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006. *Clinical Laboratory Standards Institute* (2006). doi:10.1093/cid/ciw353.

41. Megaw, J., Thompson, T. P., Lafferty, R. A. & Gilmore, B. F. *Galleria mellonella* as a novel in vivo model for assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Chemosphere* **139**, 197–201 (2015).
42. Baelo, A. *et al.* Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J. Control. Release* **209**, 150–158 (2015).
43. Crespo, A., Blanco-Cabra, N. & Torrents, E. Aerobic vitamin B12 biosynthesis is essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II ribonucleotide reductase activity during planktonic and biofilm growth. *Front. Microbiol.* **9**, 1–10 (2018).
44. Heydorn, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**, 2395–2407 (2000).

CAPÍTULO II

DERIVADOS DE AO Y AM

PARA EL DESARROLLO DE GELES



II.1 RESUMEN

Los triterpenos pentacíclicos tienen un esqueleto lipofílico rígido complementado con grupos funcionales polares como hidroxilo, carbonilo y carboxilo, que les aportan atractivas propiedades anfífilas. La capacidad de este tipo de compuestos para autoensamblarse en nanoestructuras complejas, ha generado interés recientemente debido en parte, a la abundante existencia de materias primas renovables. A continuación, presentamos dos nuevos derivados triterpénicos pentacíclicos de los ácidos maslínico y oleanólico, que presentan la capacidad de autoensamblarse en fibras largas dando lugar a geles homogéneos. Sorprendentemente, estas moléculas pueden formar geles capturando lentamente el agua atmosférica de sus soluciones con DMSO (dimetilsulfóxido) y DMF (dimetilformamida). Hasta donde sabemos, este mecanismo de formación de gel no se ha reportado previamente para otros geladores de bajo peso molecular (LMWG, por sus siglas en inglés) y destaca la versatilidad de estos compuestos para formar geles como respuesta a diferentes estímulos externos. Las propiedades micro y macroscópicas de los geles resultantes han sido estudiadas en detalle por TEM (microscopio electrónico de transmisión), SEM (microscopía electrónica de barrido), RMN (resonancia magnética nuclear), VCD (dicroísmo circular vibracional), FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier), XRD (difracción de rayos X) y reología. Se ha demostrado que los geles preparados mediante la captura de agua atmosférica en DMSO son más homogéneos y más rígidos que los obtenidos mediante la adición directa de agua a la solución orgánica.

II.2. INTRODUCCIÓN

Los geladores de bajo peso molecular (LMWG) son una clase particular de compuestos que tienen la capacidad de autoensamblarse de manera eficiente en estructuras supramoleculares capaces de retener las moléculas del disolvente, dando lugar a geles (Fig. II.1).^{1,2,3} Dado que la naturaleza de autoensamblaje de estas moléculas es promovida por enlaces no covalentes, principalmente fuerzas de van der Waals, los geles resultantes, en la mayoría de los casos, son reversibles, siendo capaces de responder a estímulos externos, como temperatura, pH, sonicación, aditivos químicos, etc.^{4,5,6} Así, se han anticipado aplicaciones prometedoras para este tipo de materiales como plantillas para el crecimiento de partículas inorgánicas, biomateriales, catalizadores, sensores y dispositivos optoelectrónicos.^{7,8,9,10}

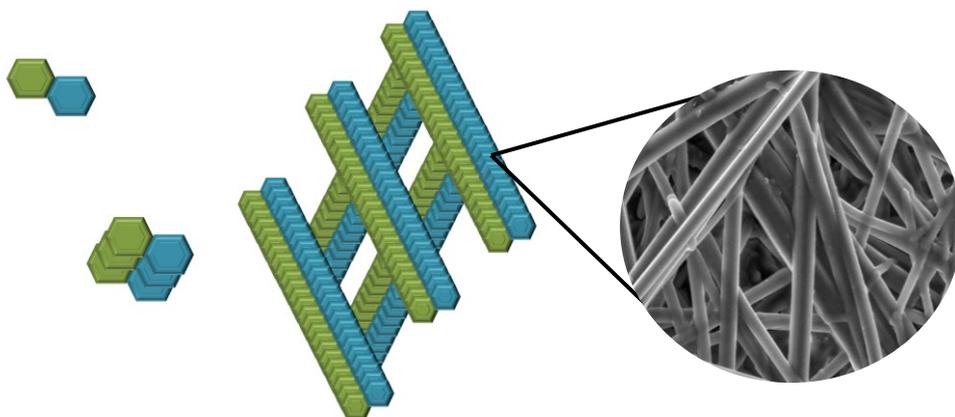


Figura II.1 Representación del proceso de autoensamblaje supramolecular en geles.

Hasta la fecha, no es posible anticipar los requisitos estructurales para que una molécula determinada se comporte como un LMWG o predecir en qué disolvente o disolventes formará un gel.

Se han empleado grandes esfuerzos en descubrir nuevos LMWG y tratar de relacionar su composición química con su capacidad de autoensamblaje.^{11,12}

Entre los tipos de estructuras estudiadas, los LMWG basados en esteroides han sido particularmente exitosos.¹³ Los trabajos pioneros de Weiss y colaboradores en geladores orgánicos a base de colesterol, mostraron que las estructuras que comprenden una fracción aromática (A) conectada a un grupo esteroideal (S) a través de un espaciador (L) muestran una capacidad de gelificación eficaz (Fig. II.2).¹ Los derivados basados en las estructuras de tipo A(LS)2- o LS2 también han mostrado la capacidad de gelificación.^{14,15,16}

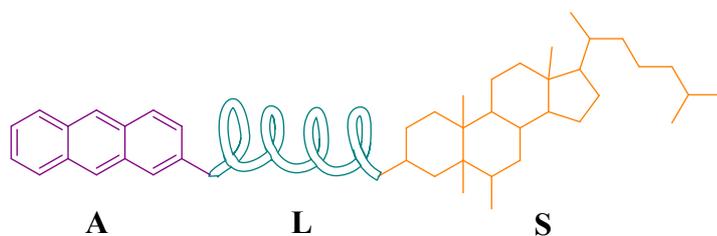


Figura II.2 Modelo de gelador eficaz de Weiss

Los derivados de ácidos biliares son otro grupo de derivados esteroidales que se han estudiado en profundidad, mostrando la capacidad de formar tanto organogeles como hidrogeles.¹³ En ambos casos, las interacciones de van der Waals entre los esqueletos rígidos de los esteroides policíclicos, favorecen la autoasociación de las moléculas y promueven el crecimiento anisotrópico de fibras largas, necesarias para formar geles.

En la última década, los esfuerzos se han centrado en estudiar las propiedades de autoensamblaje que presenta otra familia de compuestos naturales con estructura relacionada, los triterpenos.¹⁷ Como se menciona en el apartado de la introducción (1.2.1) los triterpenos están muy presentes en las plantas y, al igual que los esteroides, contienen un esqueleto rígido policíclico. El interés de estos compuestos radica en su amplia diversidad de propiedades terapéuticas, como antitumorales, antivirales, antiinflamatorias y antimicrobianas.^{18,19,20} Además, algunos de estos compuestos pueden aislarse fácilmente en grandes cantidades de su fuente natural, lo que los convierte en

una alternativa muy atractiva, no solo en la búsqueda de nuevos fármacos, sino también en el campo de la ciencia de los materiales, ya que pueden evolucionar hacia nuevos nanomateriales obtenidos de recursos renovables.

En este sentido, la capacidad de autoensamblaje de estos triterpenos ha sido reportada en compuestos naturales aislados^{21,22,23,24} y también en derivados.^{25,26,27} Estos compuestos han sido capaces de formar fibras helicoidales quirales,²⁸ nanovarillas²⁷ y vesículas^{22,24,25} en disolventes orgánicos y mezclas de orgánicos y acuosos (Fig. II.3).¹⁷ La mayoría de estos compuestos pueden formar agregados supramoleculares mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento o mediante cambios en la proporción de la mezcla de disolventes. La versatilidad de estos agregados supramoleculares se ha aprovechado en la generación de materiales avanzados,^{29,30} en catálisis³¹ y como transportadores de fármacos.³²

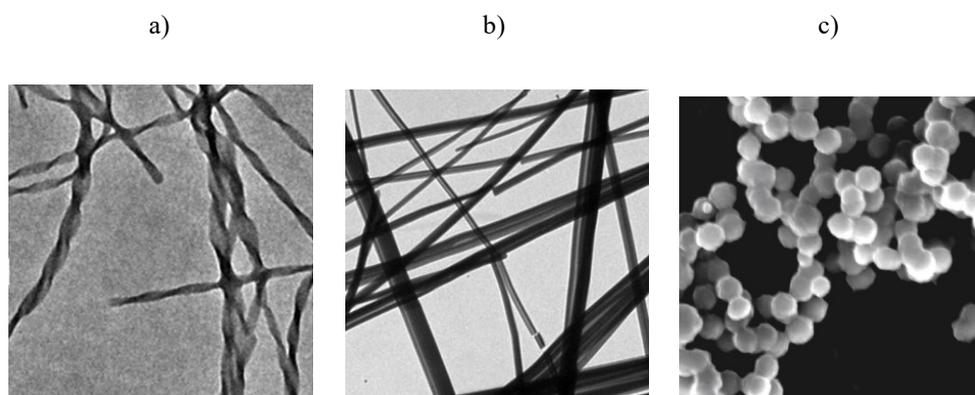


Figura II.3 Estructuras supramoleculares de autoensamblaje con triterpenos. a) Fibras helicoidales quirales.²⁸ b) Nanovarillas.²⁷ c) Vesículas.²⁴

Teniendo esto en cuenta, se propuso estudiar la capacidad de autoasociación de derivados de los compuestos objeto de estudio: los ácidos triterpénicos pentacíclicos maslínico (MA) y oleanólico (OA) (Fig. II.4).

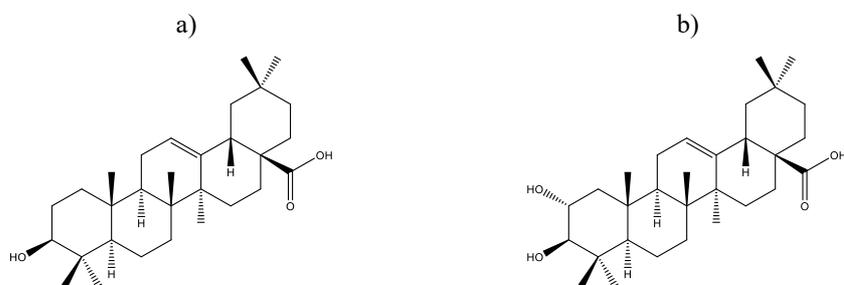


Figura II.4 Estructura de los ácidos a) Oleanólico y b) Maslínico.

Ya que, como se menciona en el apartado de la introducción (I.4.1), se encuentran abundantemente en los frutos de *Olea europaea*. Y como se describe en el apartado de materiales y métodos (X), se aíslan y purifican fácilmente a partir de residuos industriales de aceite de oliva, y poseen un grupo carboxílico que puede modificarse convenientemente para obtener derivados.

Conociendo estas ventajas que presentan MA y OA (Fig. II.4), se razonó la introducción de un grupo aromático a través del grupo carboxílico, de esta forma se generaría una estructura similar a los geladores de tipo ALS (Fig. II.2). En el intento de sintetizar los derivados propuestos, se activó el grupo carboxílico de MA y OA con N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il) uranio tetrafluoroborato (TBTU) (Fig. II.5).

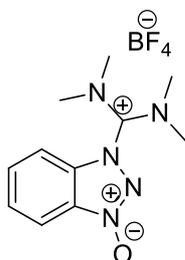
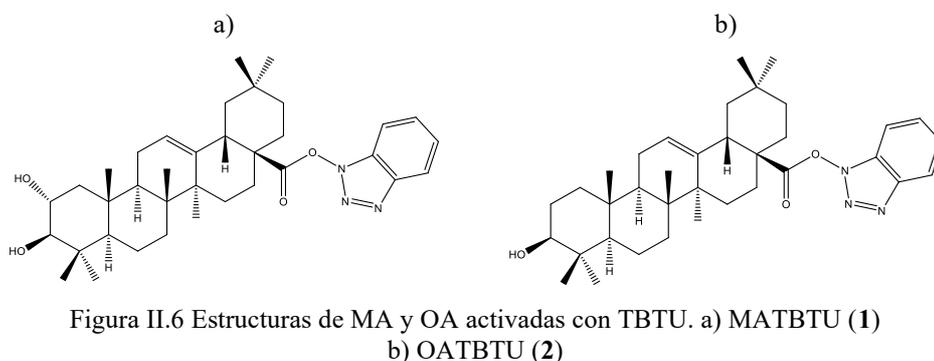


Figura II.5 Estructura de TBTU.

Obteniendo los correspondientes ácidos activados con TBTU (compuesto MATBTU **1** y OATBTU compuesto **2**) (Fig.II.6) que, inesperadamente, no solo formaron compuestos estables, sino que también pudieron formar geles homogéneos en DMSO-H₂O, DMF-H₂O y el compuesto **1** también en tolueno.



Más interesante aún, estos compuestos fueron capaces de formar geles homogéneos mediante dos estrategias diferentes. Una con la adición directa de agua a sus soluciones de DMSO y DMF, y otra capturando lentamente el agua atmosférica de sus respectivas soluciones (Fig. II.7).



Figura II.7 Estrategias de formación de geles. a) Adición directa de agua a solución de gelador b) Captación de agua atmosférica de la solución de gelador.

La cinética de formación del gel con adición directa y la captación lenta de agua, difieren significativamente. Cuando se agrega agua inmediatamente a la solución de DMSO, el gel se forma en 5 minutos. Mientras que la formación de gel requiere mucho más tiempo cuando captura el agua atmosférica. El tiempo de gelificación de este último proceso depende de la concentración del gelador. Los geles formados de esta manera son más homogéneos y son mucho más rígidos que los geles formados por adición directa de agua. Además, este proceso es capaz de formar geles a mayor concentración de gelador, dando lugar a geles auto-soportables más estables.

Hay que indicar que un compuesto pequeño debe de cumplir varios requisitos para poder gelificar mediante la captación atmosférica de un disolvente. Primero, el gelador debe poder formar un gel a temperatura ambiente; en segundo lugar, debe poder formar un gel en la mezcla de la combinación resultante de disolventes, es decir, DMSO-H₂O o DMF-H₂O; en tercer lugar, debe poder formar un gel en la proporción adecuada de disolventes, que, en este caso, también depende del carácter higroscópico del disolvente orgánico. Y cuarto, para generar geles homogéneos, la cinética de la autoasociación de las moléculas del gelador debe ser compatible con la velocidad de disolución del agua atmosférica en el disolvente orgánico.

En este trabajo, se ha estudiado en detalle la capacidad de gelificación de los compuestos **1** (MATBTU) y **2** (OATBTU) en diferentes disolventes, así como las propiedades micro y macroscópicas de los geles resultantes mediante TEM, SEM, ¹H-RMN, FTIR, VCD, XRD y reología. Curiosamente, el compuesto **1** puede formar geles no solo en DMSO-H₂O y DMF-H₂O, sino también en tolueno neto. En este disolvente, el compuesto **1** forma agregados supramoleculares diferentes a los obtenidos en DMSO-H₂O y DMF-H₂O. Se ha propuesto un modelo del empaquetamiento supramolecular del compuesto **1** en tolueno utilizando datos de XRD y cálculos teóricos.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Gelificación de los compuestos

Se analizó el comportamiento de gelificación de los compuestos **1** (MATBTU) y **2** (OATBTU) en 37 disolventes a una concentración del 1% (p/v), los resultados se muestran en la Tabla II.1

Tabla II.1 Propiedades de gelificación de **1** y **2** en disolventes orgánicos

| Solvent | 1 | 2 | Solvent | 1 | 2 |
|------------------------------|----|----|------------------------|----|----|
| Acetone | PG | S | DMSO-H2O | G | G |
| Ethyl acetate | S | S | Ethanol | PG | PG |
| Acetonitrile | S | S | Diethyl ether | I | S |
| Acetophenone | S | S | n-Hexane | I | PG |
| Benzene | PG | S | n-Heptane | I | PG |
| n-Butanol | S | S | Isooctane | I | S |
| Butanone | S | S | Isopropanol | PG | S |
| Butyl glycolate | S | S | Methanol | PG | I |
| Chlorobenzene | P | S | Methyl acetate | S | S |
| Chloroform | S | S | 2-Methylfuran | PG | S |
| Cyclohexane | P | PG | 1-Methyl-2-pyrrolidone | S | S |
| Cyclopentane | P | PG | Nitromethane | S | S |
| Cyclopentanone | S | S | Octane | I | PG |
| 1,2-Dichloroethane | S | S | Pentane | I | P |
| Diisopropyl ether | I | S | 1-Propanol | S | S |
| Dichloromethane | S | S | Tetrahydrofuran | S | S |
| DMA | S | S | Tetrahydropyran | S | S |
| Methylformamide | S | S | Toluene | TG | S |
| DMF (75%) H2O (25%) 1 | G | G | | | |
| DMF (86%) H2O (14%) 2 | | | | | |

Concentration of gelator: 1% w/v; G: gels forming at room temperature; S: solution; PG: partial gel; I: insoluble; TG: turbid gel; P: precipitate.

Las pruebas de gelificación se realizaron siguiendo diferentes estrategias. En primer lugar, se intentaron disolver los compuestos a temperatura ambiente mediante la aplicación de sonicación. En segundo lugar, se intentaron disolver los compuestos mediante cambio de temperatura, se elevó la temperatura hasta completar la disolución del gelador y, en tercer lugar, se intentaron disolver los compuestos por cambio de solvente, mezclando la solución de gelador con un solvente en el que no es soluble.

De todos los disolventes probados, los compuestos **1** y **2** pudieron formar geles homogéneos a temperatura ambiente mediante el cambio de disolvente en DMSO-H₂O y DMF-H₂O, y el compuesto **1** en tolueno mediante cambio de temperatura.

En DMSO-H₂O, los compuestos **1** y **2** pudieron formar geles a concentraciones que iban del 1% al 10% (p/v) dando lugar a geles homogéneos de opacidad creciente (Fig. II.8). En todas las concentraciones de gelificante analizadas, la cantidad de agua absorbida fue siempre la misma. Pesando los viales que contenían la solución de gelador con DMSO y los geles resultantes, se cuantificó que la cantidad de agua absorbida era del 15% (v/v). Esta cantidad de agua concuerda con el agua que el solvente DMSO es capaz de absorber a temperatura ambiente.³³



Figura II.8 Geles de **1** y **2** en DMSO-H₂O a concentraciones crecientes de gelador. De izquierda a derecha: los geles 1 a 3 están al 1% (p/v) (10 mg/1 mL), de 4 a 6 están al 4% (p/v) (40 mg/1 mL) y de 7 a 9 son al 8% (p/v) (80 mg/1 mL).

De manera similar, ambos compuestos también pudieron formar geles homogéneos en DMF-H₂O, aunque el rango de concentraciones estuvo restringido de 4% a 10% (p/v). A la concentración de 10% (p/v), el gel era opaco y ocurría la precipitación del gelador.



Figura II.9 Geles de **1** en DMF-H₂O a concentraciones crecientes de gelador. De izquierda a derecha: vial 1 a 4% (p/v) (40 mg/1 mL), vial 2 a 8% (p/v) (80 mg/1 mL), vial 3 a 10% (p/v) (100 mg/1 mL).

En este caso, la cantidad de agua absorbida no fue la misma para ambos geladores, los valores se muestran en la Tabla II.2. El compuesto **1** absorbió mucha más agua que el compuesto **2**, como se indica en la Tabla II.1 y la Tabla II.2.

Tabla II.2. Proporciones de DMF y H₂O necesarias para formar geles en función de la concentración de gelador.

| % (w/v) | 1 | | 2 | |
|---------|----------|----------------------|----------|----------------------|
| | DMF (v) | H ₂ O (v) | DMF (v) | H ₂ O (v) |
| 1% | 75 | 25 | 86 | 14 |
| 4% | 82 | 18 | 90 | 10 |
| 8% | 83 | 17 | 94 | 6 |

El compuesto **1** también pudo gelificar en tolueno, aunque, en este caso, la gelificación sólo se produjo a una concentración única del 1.6% (p/v) dando un gel opaco blanquecino. Es interesante notar que, aunque estos compuestos son bastante hidrófobos (**1** $c \log P = 5.62$ y **2** $c \log P = 6.86$) pueden gelificar mezclas de solventes orgánicos muy polares, como DMSO-H₂O y DMF-H₂O.

Sorprendentemente, el tolueno, aunque está clasificado como disolvente no polar, tiene un gran momento cuadrupolar permanente y es capaz de formar no sólo interacciones aromáticas π - π sino también interacciones polares- π con donantes de enlaces de hidrógeno. Aunque el compuesto **1** difiere del compuesto **2** sólo en la presencia de un grupo hidroxilo adicional (Fig. II.6), este pequeño cambio es suficiente para influir en la capacidad de estos compuestos para formar agregados supramoleculares en una variedad de disolventes orgánicos. Mientras que el compuesto **1** fue capaz de gelificar parcialmente disolventes altamente polares y aromáticos, el compuesto **2**, por el contrario, pudo gelificar parcialmente disolventes no polares tales como hidrocarburos lineales (Tabla II.1).

II.3.2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para estudiar el impacto del disolvente en la estructura de la red resultante, se tomaron las imágenes SEM de xerogeles. Los xerogeles se prepararon liofilizando o secando al aire los geles de **1** y **2** al 1,6% (p/v) en DMSO-H₂O (85%/15%) y DMF-H₂O (75%/25% para **1** y 86%/14 % para **2**).

Los geles se prepararon capturando agua atmosférica. Además, se obtuvieron xerogeles de **1** preparado en tolueno a la misma concentración mediante secado por punto crítico (CPD) y secado al aire.

Las imágenes SEM de los xerogeles de ambos compuestos a partir de geles de DMSO-H₂O (Fig. II.10 A y B) y DMF-H₂O (Fig. II.10 C y D) presentaron una morfología similar. Ambas muestras mostraron una malla congestionada de fibras helicoidales entrelazadas con diámetros que iban, principalmente, de 50 a 100 nm, aunque también se observaron fibras con diámetros mayores. Estos resultados indicaron que los geladores **1** y **2** dieron lugar a agregados similares en estos dos disolventes.

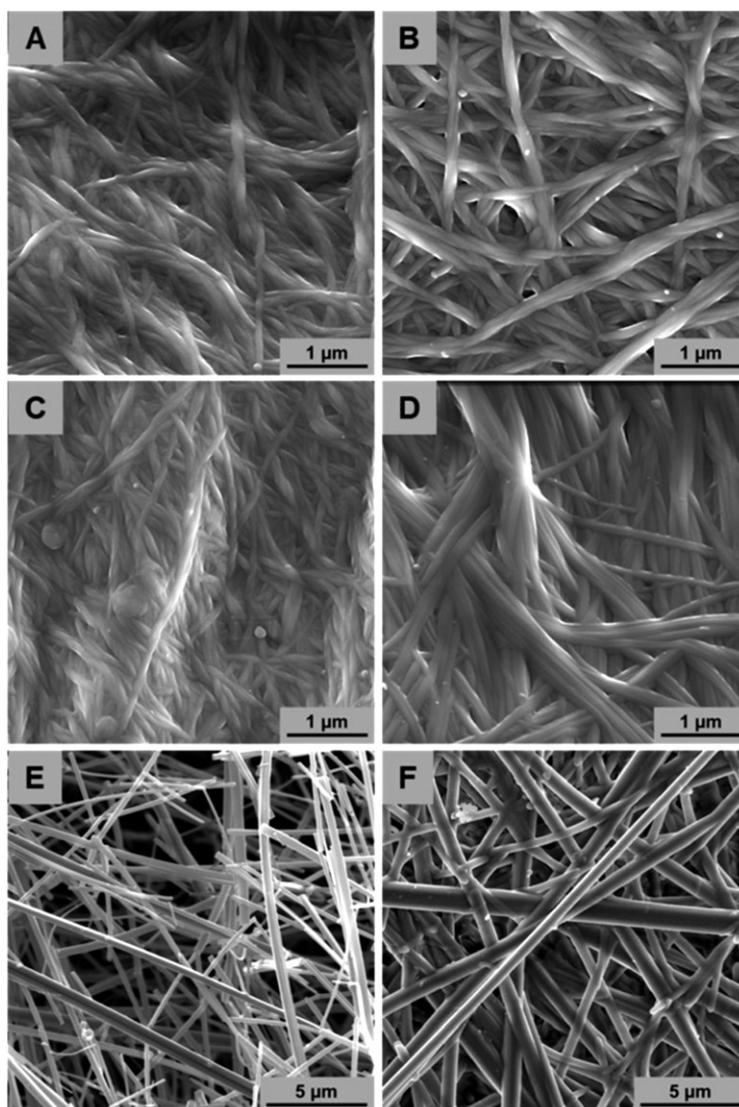


Figura II.10 Imágenes SEM de los xerogeles de 1 y 2 en DMSO-H₂O (A y B, respectivamente) y DMF-H₂O (C y D, respectivamente). SEM del xerogel de 1 en tolueno con secado supercrítico (E) y secado al aire (F).

En este caso, la ligera diferencia estructural de los geladores, prácticamente no tiene influencia en las estructuras supramoleculares formadas. Esto podría explicarse por el carácter similar entre DMSO y DMF, ya que ambos son disolventes apróticos polares de constante dieléctrica

similar. La alta polaridad de estos disolventes pudo favorecer la agregación hidrofóbica de estos geladores a través del esqueleto triterpénico.

Por otro lado, se obtuvieron agregados muy diferentes de los xerogeles de **1** en tolueno. Las imágenes SEM del xerogel por CPD (Fig. II.10 E) mostraron varillas gruesas bien definidas, de diámetros mayores que iban desde los 100 a 400 nm. Para comprobar si los diferentes protocolos de preparación de muestras influyeron en la morfología final, se prepararon muestras por secado al aire, de manera similar que los geles con DMSO-H₂O y DMF-H₂O, y también se analizaron (Figura II.10 F). En este caso, las morfologías eran idénticas a las muestras preparadas por CPD, siendo muy diferente a las morfologías obtenidas en los otros disolventes. No es inusual que este tipo de geladores presenten diferentes morfologías en diferentes disolventes. Se han obtenido resultados similares con colesterol y derivados triterpénicos,^{14,27} destacando la naturaleza dinámica no covalente del proceso de autoagregación. La distinta polaridad de tolueno con respecto a las mezclas de DMSO-H₂O y DMF-H₂O, justifica la diferente morfología de los agregados supramoleculares resultantes.

II.3.3. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

También se observó una tendencia similar en las imágenes TEM (Fig. II.11). En este caso, solo se observaron nanovarillas para ambos compuestos. Las longitudes y diámetros de estas nanovarillas fueron significativamente influenciadas por el disolvente, de tal forma que, las nanovarillas que se formaron con DMSO-H₂O mostraron un tamaño más pequeño, con diámetros de 10 a 60 nm (Fig. II.11 A y B), mientras que las nanovarillas formadas en DMF-H₂O mostraron mayores dimensiones con diámetros de 20 a 80 nm (Fig. II.11 C y D).

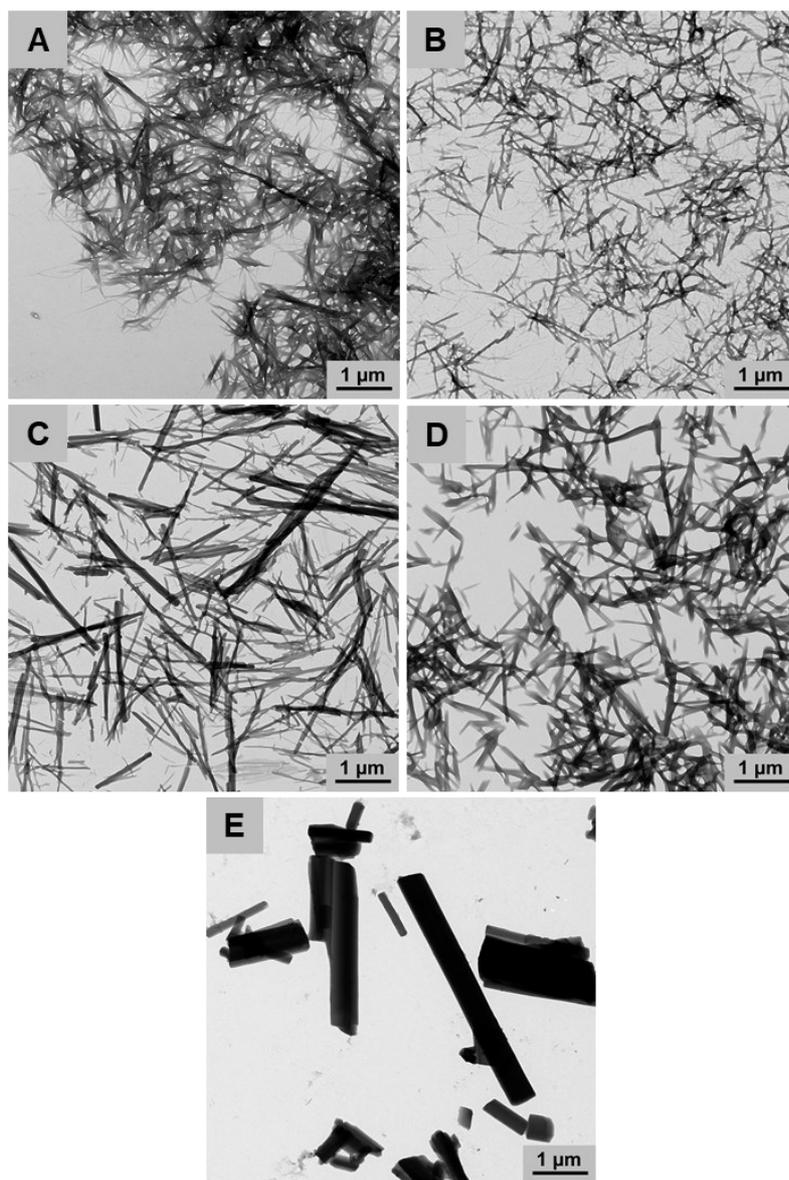


Figura II.11 Imágenes TEM de xerogeles de **1** y **2** en DMSO-H₂O (A y B, respectivamente) y DMF-H₂O (C y D, respectivamente). Xerogel de **1** en tolueno después de secado al aire (E).

No es sorprendente que las nanovarillas más distintas se observaran en el gelador **1** en tolueno (Fig. II.11 E). En este caso, las nanovarillas presentaron un tamaño mucho mayor, alcanzando diámetros superiores a 500 nm.

Resultados similares se han observado en un derivado oleanolato-piridinio, en el que el efecto solvofóbico entre los disolventes y el gelificante es el responsable principal de la agregación y crecimiento del gelador.²⁷ En este caso, el tolueno, al ser un disolvente no polar, promueve una agregación más fuerte de **1** dando lugar a nanovarillas de relación más grande.

II.3.4. Estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) VT-¹H

Los espectros de ¹H-RMN dependientes de la temperatura de los geladores **1** y **2** en DMSO-d⁶ que contienen 15% de D₂O se muestran en la Figura II.12. A temperatura ambiente (25°C) el gel mostró picos anchos de la molécula con acoplamientos *J* sin resolver.

La intensidad de las señales sugiere que solo una fracción de las moléculas del gelador es observada por RMN, ya que las fibras en estado gel no se observan por RMN debido al gran tiempo de correlación de los agregados.

A medida que aumentaba la temperatura de 25 °C a 100 °C los espectros aparecían mejor resueltos asemejándose al monómero lo cual sugiere que la T_{gel} fue sobrepasada.

Se puede observar que prácticamente no hubo variación en los desplazamientos químicos de las señales en los estados gel y sol, aunque hubo modificaciones en los tiempos de relajación T_2 , tras la formación del gel (Tabla II.3). Esta variación en los valores de T_2 , no se puede atribuir a posibles cambios en la viscosidad del medio, ya que se sabe que los geladores supramoleculares no afectan a los valores de T_2 ³⁴ y la viscosidad del solvente.³⁵

Este fenómeno ya ha sido observado por otros autores en estructuras de geladores estrechamente relacionadas, como los derivados de colesterol estilbena³⁶ y sugiere que hay regiones móviles del gel que pueden ser observadas por RMN.

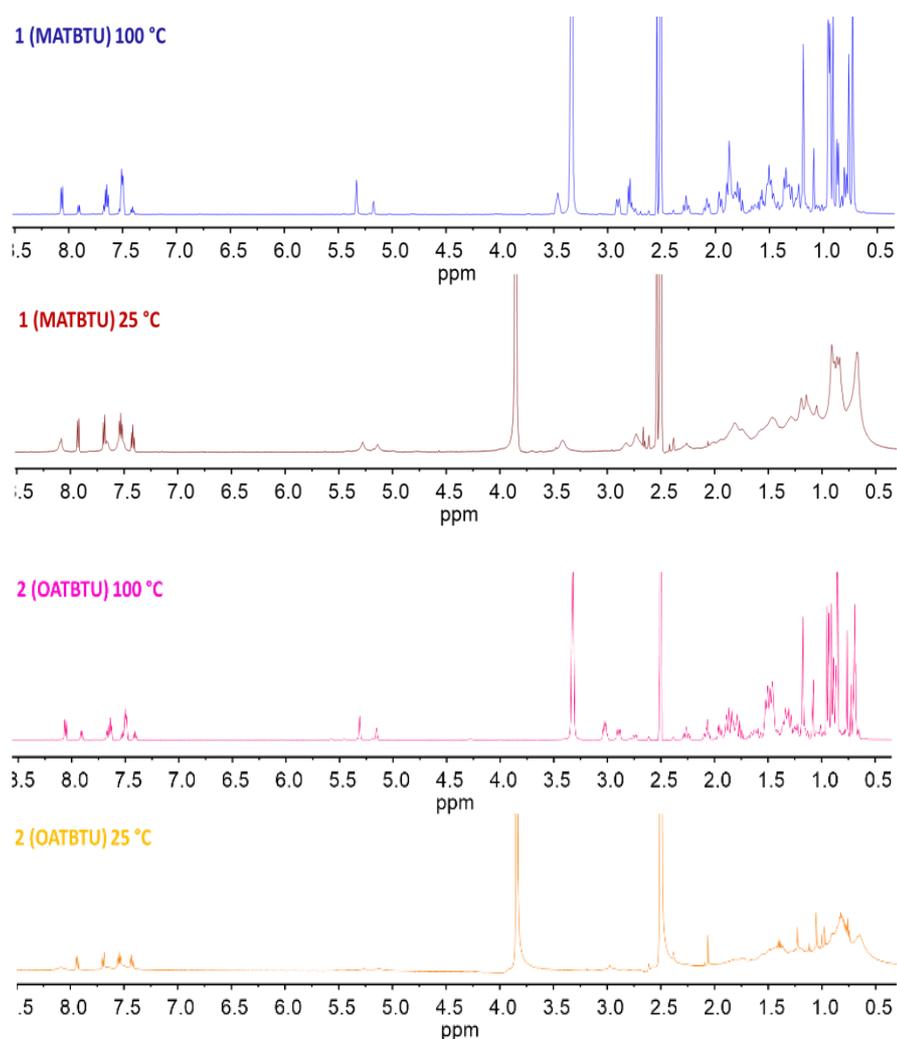


Figura II.12 Espectros ¹H-RMN dependientes de temperatura de los compuestos **1** y **2** en DMSO-*d*⁶/D₂O.

Tabla II.3 Tiempos de relajación T_2 ^1H -RMN para los geladores **1** y **2** en $\text{DMSO-}d^6/\text{D}_2\text{O}$.

| Gelator | Temperature ($^{\circ}\text{C}$) | Integration Peaks (ppm) | T2(s) |
|---------|------------------------------------|-------------------------|--------|
| 1 | 100 (sol) | 7.43-7.38 | 1.0045 |
| 1 | 100 (sol) | 5.34-5.31 | 0.3989 |
| 1 | 25 (gel) | 7.44-7.39 | 0.2376 |
| 1 | 25 (gel) | 5.31-5.23 | 0.1231 |
| 2 | 100 (sol) | 7.43-7.39 | 1.9865 |
| 2 | 100 (sol) | 1.19-1.16 | 0.4276 |
| 2 | 25 (gel) | 7.45-7.40 | 0.6059 |
| 2 | 25 (gel) | 1.24-1.21 | 0.2638 |

Una explicación alternativa de este efecto ha sido propuesto por Escuder y Miravet.³⁴ Estos autores sugieren que en estos sistemas hay un intercambio de las moléculas de gelador, del gel a la solución, rápido en los tiempos de relajación de RMN (segundos) y lento en la escala de tiempo de RMN (milisegundos). De esta forma, los desplazamientos químicos de las moléculas permanecerían sin cambios al pasar de sol a gel, ya que solo las moléculas libres serían observadas, mientras que los agregados no.

II.3.5. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de los geles de **1** en $\text{DMSO-H}_2\text{O}$ a concentración creciente de MATBTU, junto con los espectros de MATBTU y DMSO puros, se muestran en la Fig. II.13 a.

Los espectros de los geles están dominados principalmente por las características del disolvente orgánico. La presencia de moléculas de agua en los geles se confirma aún más por los movimientos de estiramiento ($3300\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$) y flexión (*ca.* 1650 cm^{-1}) de las moléculas de agua.

Además, el pico a 1041 cm^{-1} , asignado al movimiento de estiramiento S=O de moléculas de DMSO autoasociadas,³⁷ es desplazado hacia el rojo, a *ca.* 1020 cm^{-1} en los geles (Fig. II.13 c).

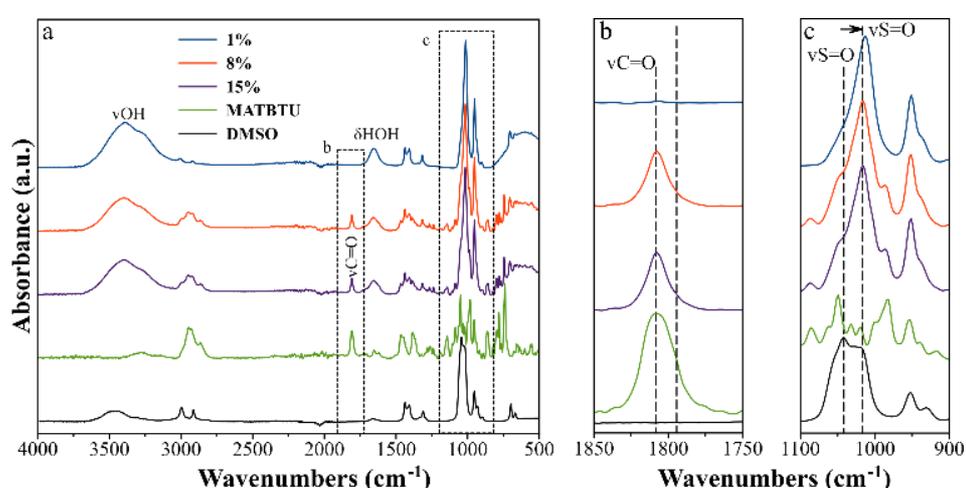


Figura II.13 Espectros FTIR de MATBTU (**1**). a) Geles de **1** en DMSO–H₂O a diferentes concentraciones de gelador. Espectro FTIR del compuesto **1** puro (curva color verde) y DMSO (curva negra). b) Regiones espectrales que contienen $\nu\text{C}=\text{O}$ de MATBTU, y c) $\nu\text{S}=\text{O}$ de DMSO.

Las moléculas de DMSO se autoasocian a través de interacciones dipolo-dipolo resultando en estructuras cíclicas y en cadena.³⁷ El agua induce la formación de dímeros de DMSO–H₂O con enlaces de hidrógeno, lo que da como resultado un desplazamiento hacia el rojo del estiramiento de SO.³⁷ De hecho, en soluciones acuosas de DMSO, la frecuencia del estiramiento SO coincide con el balanceo del metilo (*ca.* 1020 cm^{-1}). Por esta razón, la intensidad global de la región alrededor de 1020 cm^{-1} se incrementa en presencia de agua,³⁷ como se observa en los espectros FTIR (Fig. II.13 c). De hecho, la variación más alta se encontró en el gel 1% (p/v), que contiene la relación agua/gelador más alta (Fig. II.13 a y c).

Por lo tanto, la formación de los dímeros de DMSO-H₂O, que también ocurre en el compuesto **2** en DMSO, (Fig. II.14) podría ser el desencadenante de la gelificación, cambiando el efecto solvofóbico entre el medio y el gelador.

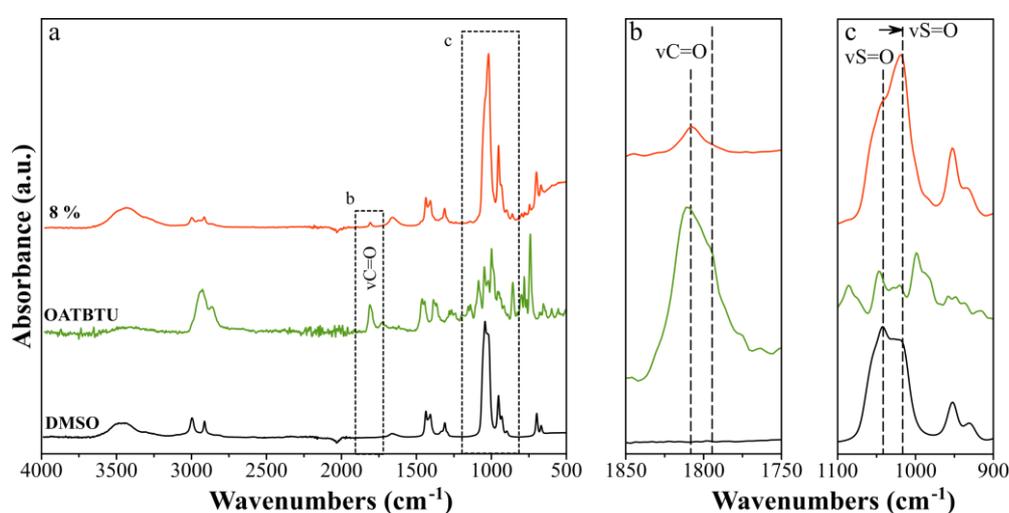
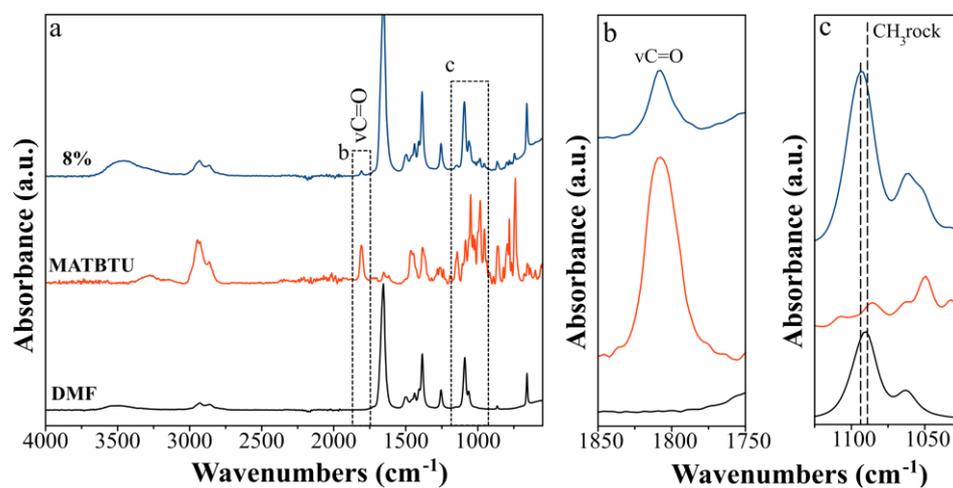
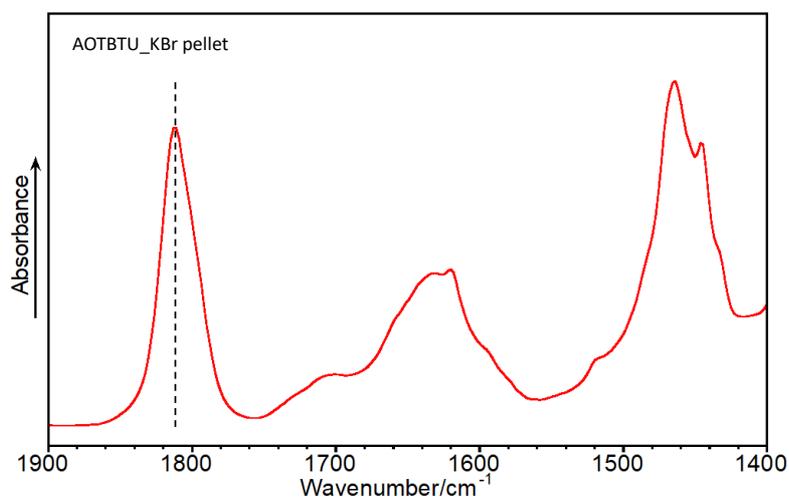


Figura II.14. Espectros FTIR del compuesto **2** en DMSO-H₂O.

Resultados similares se encontraron en mezclas de DMF-H₂O (Fig. II.14). Las bandas de vibración asignables al gelador fueron visibles a las concentraciones más altas de 8 y 15% (p/v) (Fig. II.14 a). Los compuestos **1** y **2**, como geles con DMSO-H₂O, mostraron una banda intensa a 1808 cm⁻¹, que se pudo asignar a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo, ν (C=O), de acuerdo con los cálculos DFT.

Figura II.15 Espectros FT-IR del compuesto **1** en DMF-H₂O.

En el espectro del compuesto **2** como un sólido puro (Fig. II.16) esta banda tenía un máximo a 1812 cm^{-1} presentado un ligero ensanchamiento a números de onda más bajos, también visible en el gel. Esto podría sugerir la existencia de diferentes ambientes alrededor del grupo carbonilo.

Figura II.16 Espectro FTIR de **2** en pastilla de BrK.

Los movimientos de flexión de las moléculas de agua entre 1750 y 1600 cm^{-1} impidieron observar dos absorciones débiles (que estaban bien predichas por los cálculos de DFT), las vibraciones de estiramiento de C=C y las fracciones de benzotriazol. No se predijeron diferencias para ellas al comparar **1** y **2**. La mayoría de las bandas medidas entre 1500 y 1100 cm^{-1} se asignaron a la vibración de flexión de enlaces alifáticos C-H, principalmente grupos metilo y metileno. Sobre la base de los cálculos de DFT, la banda a 1382 cm^{-1} en **1** también se pudo asignar al estiramiento del benzotriazol. La misma banda se midió a 1384 cm^{-1} para el gel **2**.

II.3.6. Dicroísmo circular vibracional (VCD)

Los espectros VCD de los geles de **1** y **2** en DMSO-H₂O se muestran en la Figura II.18, que también incluye los espectros infrarrojos y VCD calculados. Los espectros VCD de los geles elaborados en DMF-H₂O y tolueno no se pudieron medir debido a la superposición de la señal del disolvente. Se eliminaron los picos de 1750 y 1600 cm^{-1} de los espectros, ya que la señal quiróptica de las moléculas de agua no es significativa.

El resultado sobresaliente fue la señal negativa observada para el estiramiento de carbonilo. Además, la banda $\nu(\text{C}=\text{O})$ de **2** aparece como un doblete, mientras que una sola banda se observa en el espectro VCD de **1**.

Este hecho está en conformidad con el hombro a *ca.* 1798 cm^{-1} medido en la correspondiente banda FTIR de **2** que no se observó en **1**.

La señal negativa en el espectro VCD para el modo de estiramiento (tensión) del carbonilo se predijo correctamente mediante cálculos DFT. Sin embargo, los cálculos también indicaron que el signo de esta banda dependía fuertemente del ángulo diedro entre el grupo éster y la fracción policíclica alifática.

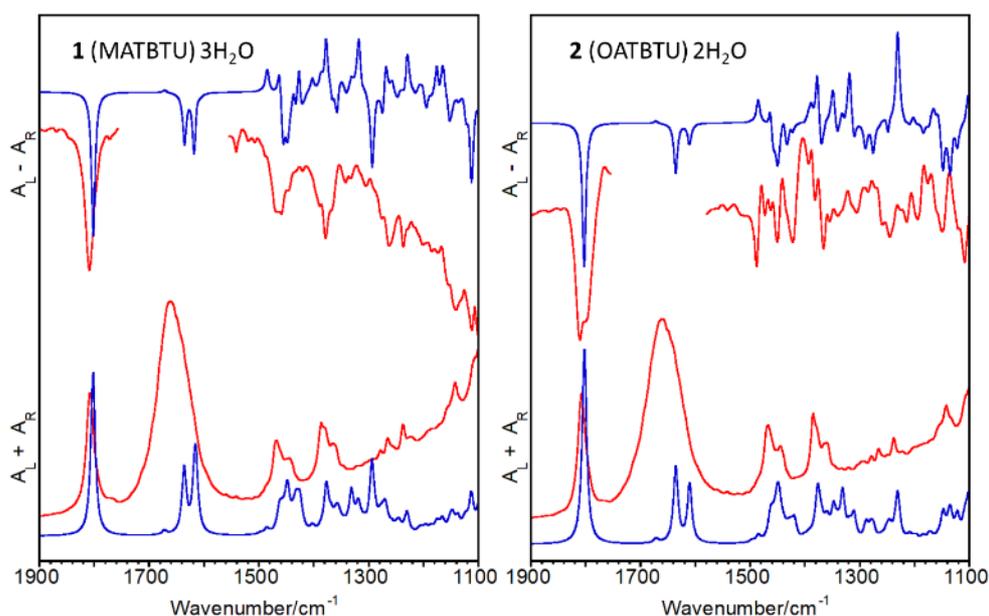


Figura II.17. Espectros VCD (arriba) e infrarrojo (abajo) de **1** (recuadro izquierdo) y de **2** (recuadro derecho) en DMSO-H₂O. Líneas rojas: espectros FTIR experimentales de los geles en DMSO-H₂O. Líneas azules: espectros b3lyp/cc-pvdz calculados de **1**-3H₂O y **2**-2H₂O complejos enlaces de hidrogeno.

En consecuencia, y para alcanzar la configuración absoluta de estas moléculas, dos conformaciones diferentes de **1** y **2** se optimizaron con éxito y sus espectros VCD fueron calculados (Fig. II.17). Aunque se permitió que todos los parámetros geométricos variaran de forma independiente, solo dos conformeros se estabilizaron con éxito, los cuales diferían en la orientación del grupo éster con respecto a la fracción policíclica.

Mirando sus espectros VCD, la única diferencia sólida entre los dos conformeros era el signo de la banda de estiramiento del carbonilo, que fue positiva para los conformeros A y negativa para los B. Los parámetros optimizados fueron bastante similares para **1** y **2** (Fig. II.18). Los conformeros con señal de estiramiento del carbonilo negativo, **1A** y **2A**, fueron siempre los más estables.

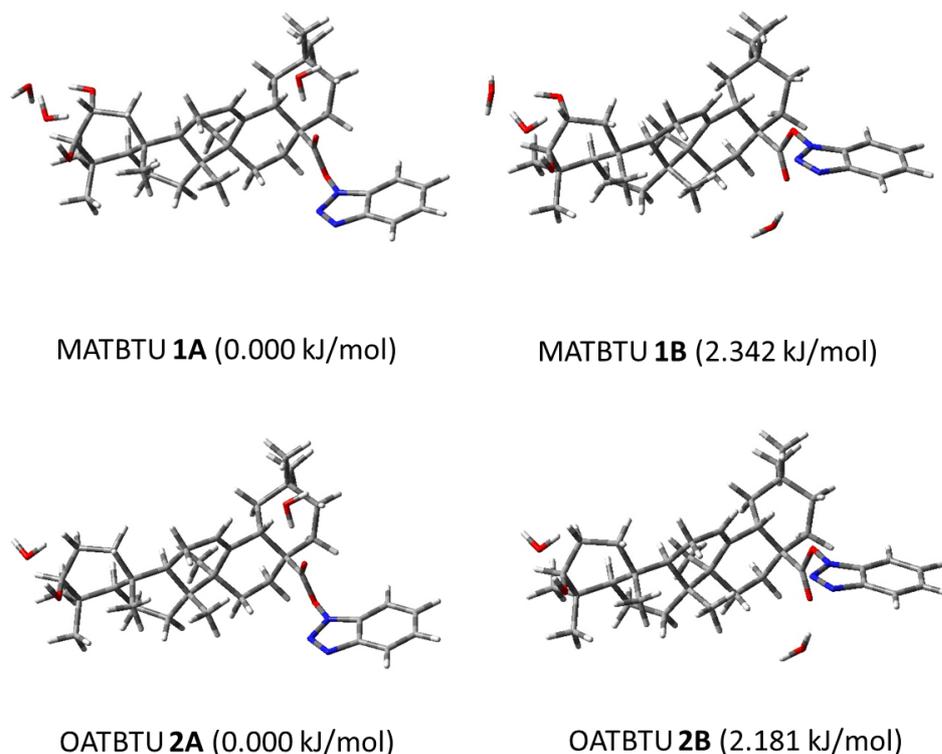


Figura II.18 Estructuras optimizadas y energías de las dos conformaciones estudiadas para **1** y **2**.

Mirando sus espectros VCD, la única diferencia sólida entre los dos conformeros era el signo de la banda de estiramiento del carbonilo, que fue positiva para los conformeros A y negativa para los B. Los parámetros optimizados fueron bastante similares para **1** y **2** (Fig. II.18). Los conformeros con señal de estiramiento del carbonilo negativo, **1A** y **2A**, fueron siempre los más estables.

Las diferencias de energía calculadas fueron $2.342 \text{ kJ mol}^{-1}$ para **1** y $2.181 \text{ kJ mol}^{-1}$ para **2**. Los ángulos diedros calculados O=CO–C–CH, que definen la posición relativa del grupo éster, fueron 25.2 y 25.7 grados para **1A** y **2A**, respectivamente, y 136.3 y 138.0 grados para los conformeros menos estables, **1B** y **2B**, respectivamente.

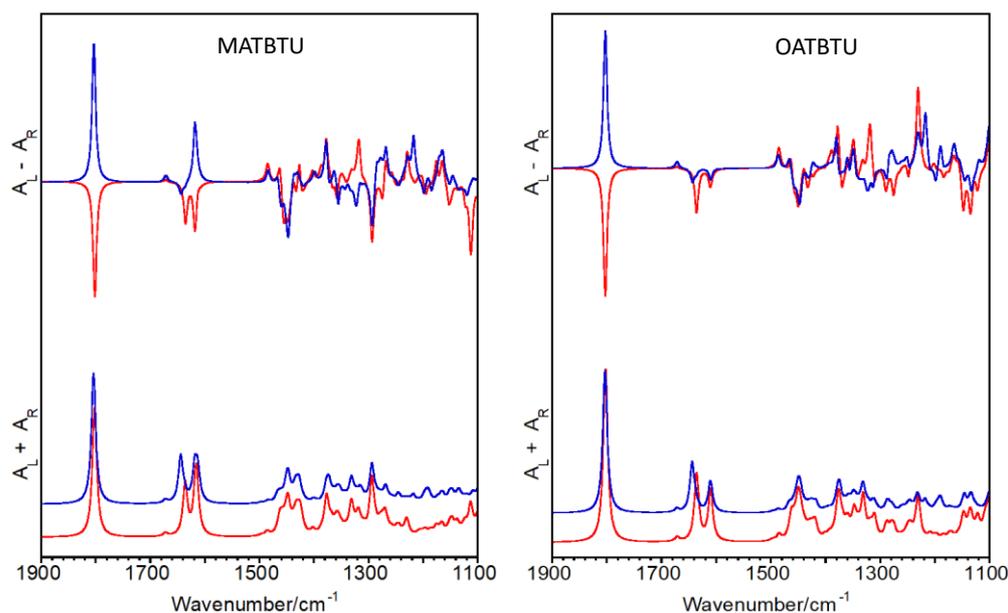


Figura II.19 Espectros de infrarrojos y VCD calculados (b3lyp-pvdz) de las dos conformaciones estudiadas para **1** y **2**. Líneas rojas: conformaciones **1A** y **2A**. Líneas azules: conformaciones **1B** y **2B**.

Teniendo en cuenta el signo negativo de las bandas experimentales $\nu(\text{C}=\text{O})$, estos datos indican que la señal quiróptica proviene principalmente del conformero A, que puede proponerse como la configuración absoluta para los geles de **1** y **2**. En el caso de **2**, el doblete negativo se evidencia en al menos dos ambientes diferentes en el gel.

A pesar de la buena correlación entre los espectros FTIR calculados y experimentales, los espectros VCD de **1** y **2** apenas se reproducen en la región $1500\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$. Esto es causado en gran parte por la libertad conformacional de los grupos hidroxilo y metilo, que tienen varias vibraciones de flexión en esta región, y por el efecto de las fuerzas intermoleculares en el gel, las cuales no pueden ser simuladas por nuestros cálculos de fase gaseosa.

II.3.7. Estudios de difracción de rayos X (XRD)

El patrón de difracción de rayos X del gel **1** (MATBTU) en DMSO-H₂O se representa en la Figura II.20. Muestra una intensa dispersión difusa (líneas punteadas) del disolvente y material no cristalino.

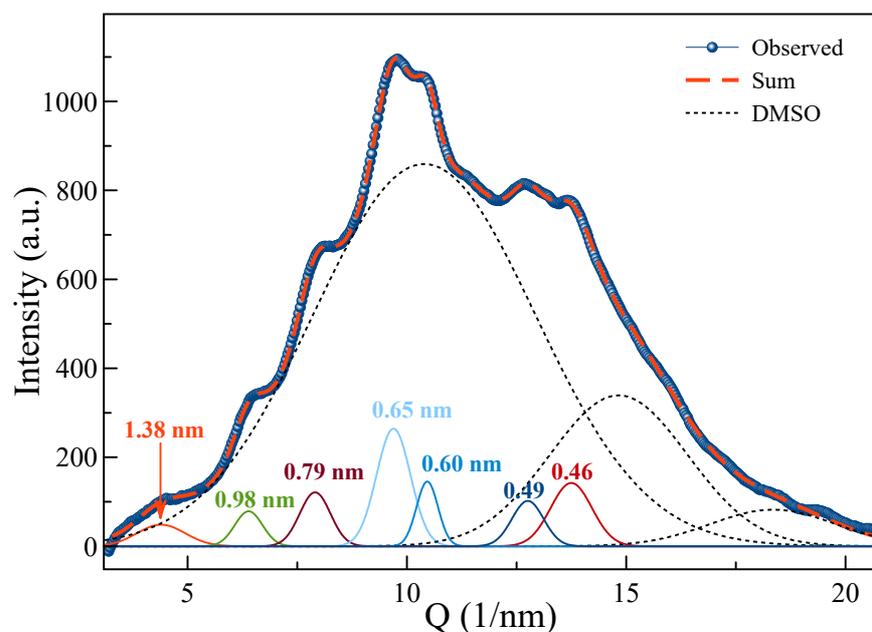


Figura II.20 Patrón XRD de gel de **1** en DMSO-H₂O. Se ha utilizado un ajuste no lineal para determinar la posición de los picos de difracción. Las líneas punteadas representan la dispersión del disolvente DMSO-H₂O.

Algunas reflexiones correspondientes al espaciamiento d ($d=2\pi/Q$) de 1.38, 0.97, 0.78, 0.64, 0.61 y 0.50 nm se observan verificando las estructuras laminares de las fibras. Esta estructura prácticamente se mantiene después de secar los geles, según lo confirmado por XRD (Fig. II.21). Además, los patrones de difracción de los xerogeles de los compuestos **1** y **2** en DMSO y DMF fueron muy similares.

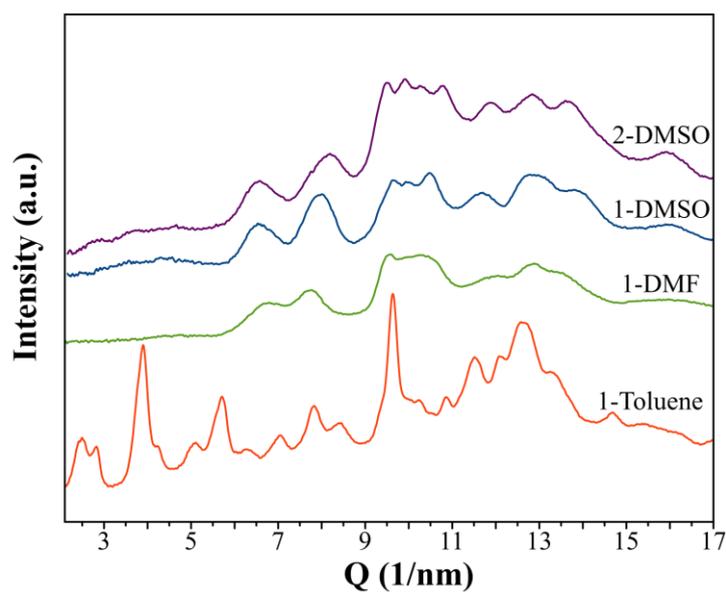


Figura II.21 Difracción de rayos X (XRD) de xerogeles de **1** en tolueno, DMF y DMSO. Xerogel de **2** en DMSO.

Por otro lado, el patrón XRD del xerogel de **1** en tolueno fue completamente diferente. Mostró picos de difracción de Bragg mejor definidos, indicando que las fibras contienen un orden de rango más largo en comparación con las fibras obtenidas en DMSO y/o DMF (Tabla II.4). Se emplearon cálculos DFT para asignar reflexiones a las distancias intramoleculares correspondientes (Tabla II.4 y Fig. II.22).

Tabla II.4 Asignaciones propuestas para los espaciamientos d medidos por XRD (nm), en fibras formadas en tolueno, y dimensiones moleculares medidas en la estructura optimizada (b3lyp/cc-pvdz) en **1**.

| XRD Spacings | Dimensions (Isolated molecule) |
|--------------|-----------------------------------|
| 0.50 | |
| 0.54 | 0.54 |
| 0.65 | 0.65 |
| 0.75 | 0.75 |
| 0.80 | |
| 0.89 | 0.89 |
| 1.10 | 1.10 |
| 1.48 | 1.48 |
| 1.61 | |
| 2.22 | |

Las dimensiones preferenciales del compuesto **1** (MATBTU) optimizado se muestran en la Fig. II.2.

Los valores de 0.54 a 0.75 nm corresponden a la longitud vertical del esqueleto triterpénico y los valores de 0.89 a 1.61 nm corresponden a la longitud horizontal de la derivada desde diferentes vistas. Los patrones de XRD del xerogel de **1** en tolueno mostraron picos similares a los calculados por DFT, correspondientes a espaciamientos d de 2.20, 1.61, 1.48, 1.10, 0.89, 0.75, 0.65 y 0.54 nm.

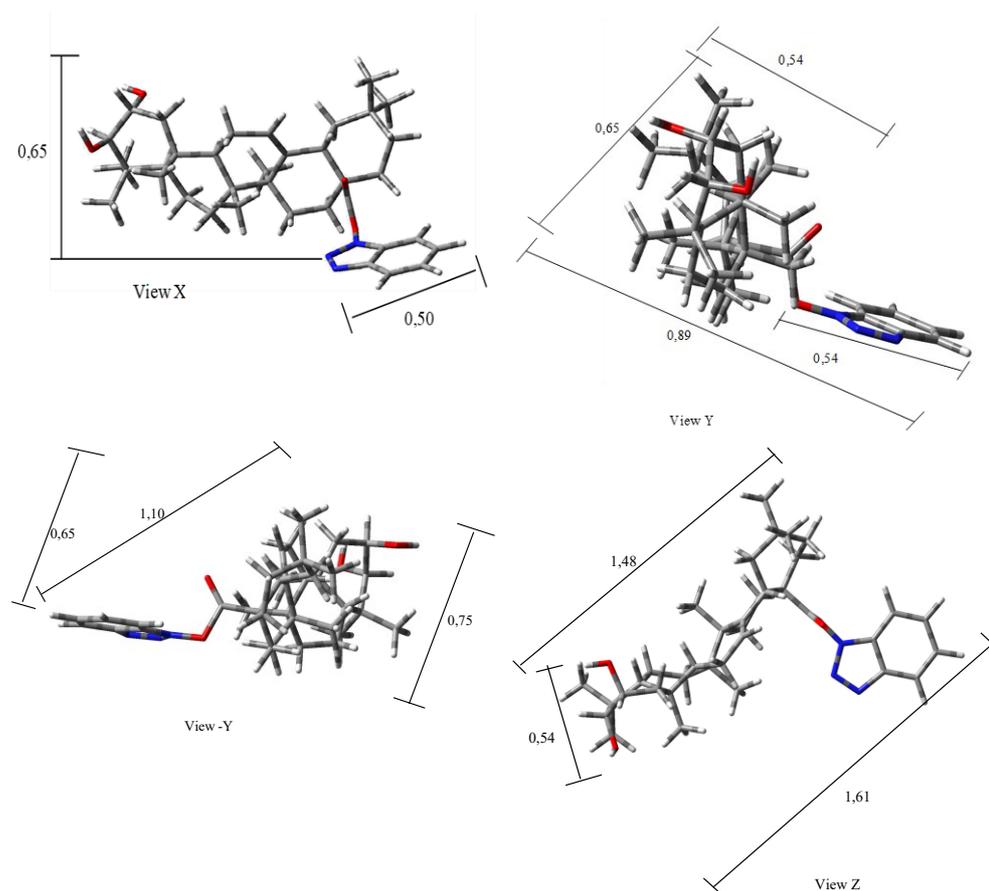


Figura II.22 Dimensiones moleculares medidas en la estructura optimizada (b3lyp/cc-pvdz) en **1**.

El valor medido a 2.20 nm puede corresponder a la duplicación de la longitud molecular que sugiere la formación de un dímero como se muestra en la Fig. II.23, en la que los anillos aromáticos se tuercen e interactúan mediante apilamiento π . Este dímero dispone los esqueletos triterpénicos expuestos al exterior favoreciendo el crecimiento de la estructura por interacciones intermoleculares de van der Waals entre los esqueletos triterpénicos.

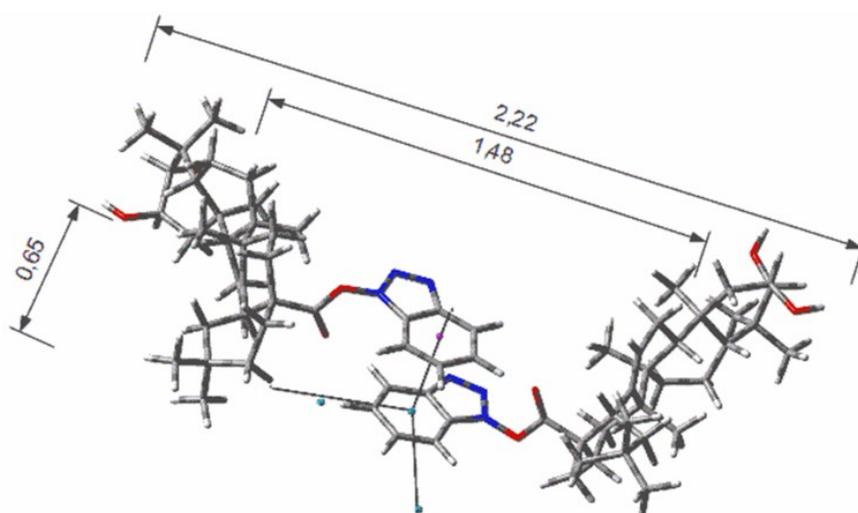


Figura II.23 Modo de empaquetado simulado de un dímero de **1** en tolueno.

II.3.8. Estudios reológicos

Los barridos de amplitud (Fig. II.24) demostraron para todas las muestras un comportamiento típico similar a un gel, caracterizado por valores del módulo de almacenamiento (G') mucho mayores que los valores del módulo de pérdida (G'') dentro de la región de amplitud de deformación por cizallamiento suficientemente baja, para lo cual tanto G' como G'' eran aproximadamente independientes de la amplitud de deformación por cizallamiento.

Esta región de independencia de los módulos viscoelásticos con el valor de la amplitud de la deformación por cizallamiento se conoce como región viscoelástica lineal (LVR). A valores más altos de la amplitud de deformación por cizallamiento se observa una caída inicialmente suave de G' , acompañada de un aumento suave de G'' , que refleja el inicio del régimen viscoelástico no lineal en el cual tiene lugar la ruptura de la estructura del gel. Luego, se obtiene un máximo en G'' , que representa la máxima disipación de energía asociada a la rotura de la estructura del gel.

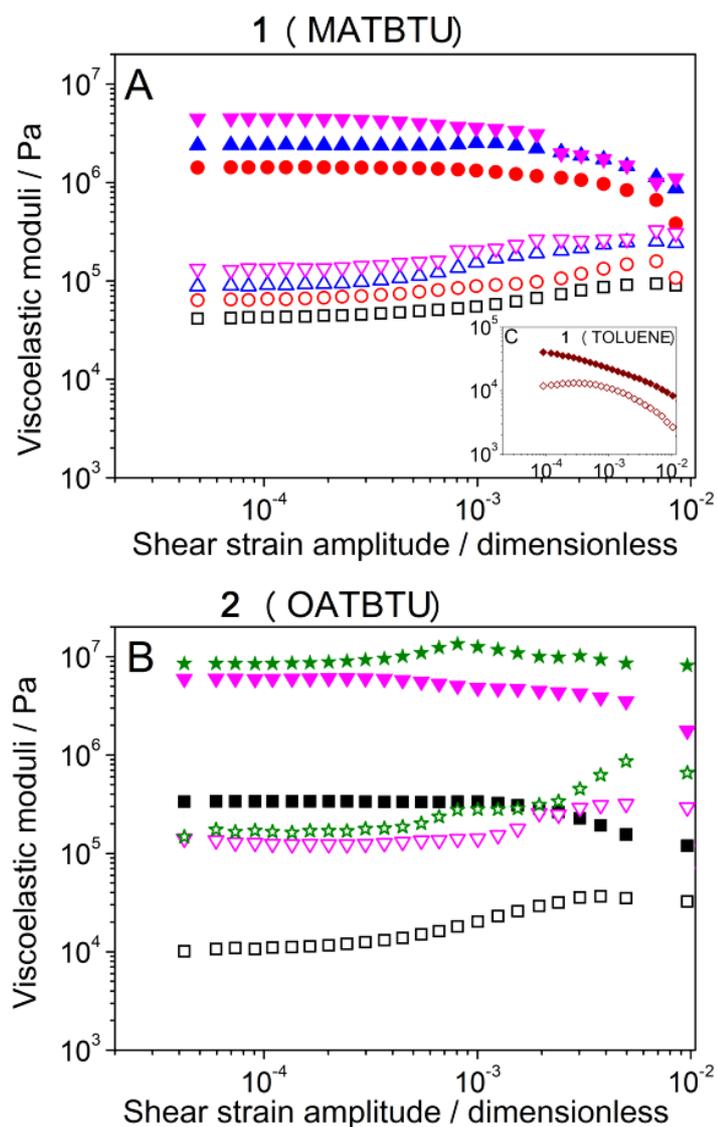


Figura II.24 Barridos de amplitud: módulos viscoelásticos en función de la amplitud del esfuerzo cortante, para experimentos oscilatorios de frecuencia constante (1 Hz) y amplitud creciente. (A y B) Gel 1; (C) gel 1; (D y E) gel 2; los símbolos llenos representan valores del módulo de almacenamiento; valores de símbolos vacíos del módulo de pérdida. Concentración de gelificante (solo geles formados al capturar agua atmosférica): ■□: 1%; ◆◇: 1,6%; ●○: 2%; ▲△: 3%; ▼▽: 4%; ★★: 8%. Concentración de gelificante (solo geles formados por adición directa de agua): ►▷: 1%.

Los resultados de los barridos de frecuencia también demostraron un comportamiento típico de un gel, con G' casi independiente de la frecuencia y G'' aumentando ligeramente con esta magnitud (Fig. II.25).

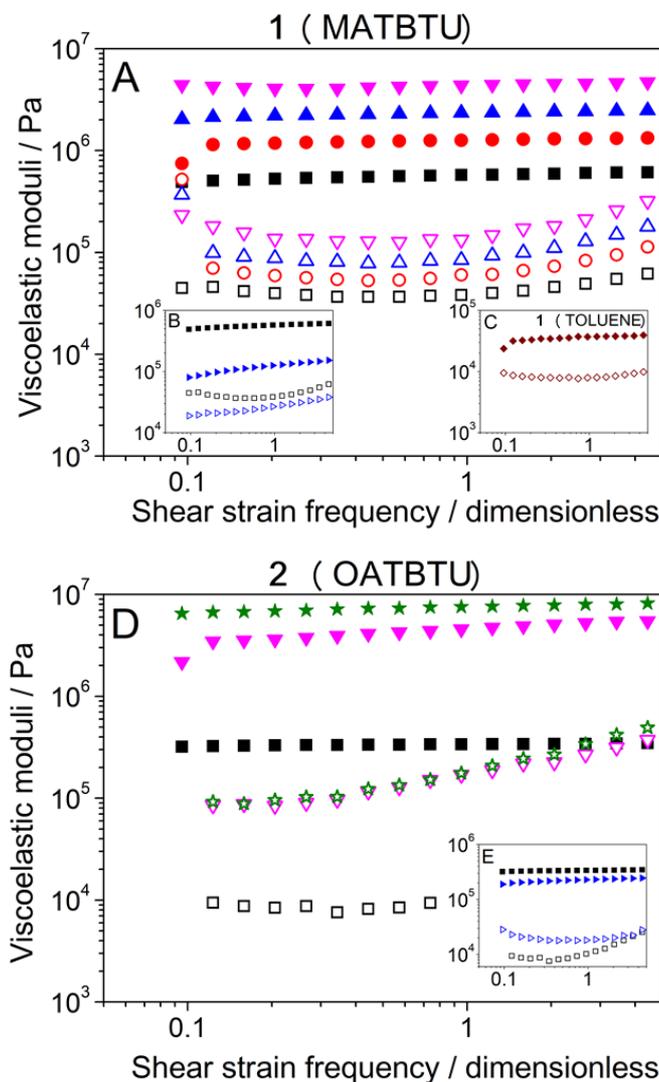


Figura II.25. Barridos de frecuencia: módulos viscoelásticos en función de la frecuencia de deformación por cizallamiento, para experimentos oscilatorios de amplitud constante dentro de la región viscoelástica lineal y frecuencia creciente. A y B: gel 1 en DMSO; C: gel 1 en tolueno; D y E: gel 2 en DMSO; Los símbolos completos representan valores del módulo de almacenamiento; valores de símbolos abiertos del módulo de pérdida. Concentración de gelificante (solo geles formados por captura de agua atmosférica): ■□: 1%; ◆◇: 1,6%; ●○: 2%; ▲△: 3%; ▼▽: 4%; ★★: 8%. Concentración de gelificante (solo geles formados por adición directa de agua): ►►: 1%.

Cuando se formaron los geles mediante la captura de agua atmosférica en DMSO, fue posible obtener geles homogéneos que contenían concentraciones más altas de gelificante. Con respecto al gelador **1**, las mediciones realizadas a una concentración de gelificante creciente mostraron un aumento monótono de los valores de G' y G'' y, por tanto, de la robustez de las muestras. Incluso a la concentración más baja de gelificante (1% p/v), los geles eran muy rígidos mostrando valores de G' superiores a 10^5 .

Por otro lado, cuando se utilizó tolueno como disolvente, se obtuvieron valores mucho más bajos de G' y G'' (aproximadamente dos órdenes de magnitud). Para el gel **2** también se observó una tendencia similar de dependencia de la concentración-rigidez. En este caso, este gelador logró formar geles más rígidos que el compuesto **1**, alcanzando valores de G' cercanos a 10^7 al 8% (p/v). Estos altos valores de G' no son habituales para este tipo de LMWG que tienden a ser 4 órdenes de magnitud más bajos.¹⁶

Por otro lado, cuando los geles se formaron mediante adición directa de agua, los datos demostraron una naturaleza más débil que para los geles formados capturando agua atmosférica. Este resultado se puede apreciar al comparar en la Figura X los gráficos B y E, ambos geles se midieron al 1% (p/v). Este resultado resalta la influencia que tiene la cinética de formación del gel en las propiedades macroscópicas finales de los geles.

Con respecto a los experimentos dirigidos a la determinación de T_{gel} , también se observaron diferencias basadas en el protocolo de gelificación. Para los geles formados por captura de agua atmosférica en DMSO, se muestra la tendencia típica (ejemplo para el gelador **2** a una concentración de gelador del 1% (p/v)), los valores de G' y G'' no cambian apreciablemente a baja temperatura (aproximadamente por debajo de 35 °C). En este rango de baja temperatura, G' fue mucho más alto que G'' , como se espera para un gel.

Por otro lado, a mayor temperatura, tanto G' como G'' , pero especialmente el primero, disminuyeron fuertemente, hasta que finalmente se estabilizaron a temperaturas superiores, a aproximadamente $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este rango de alta temperatura, G' no fue apreciablemente mayor que G'' , lo que definitivamente indica que las muestras no eran un gel a estas temperaturas.

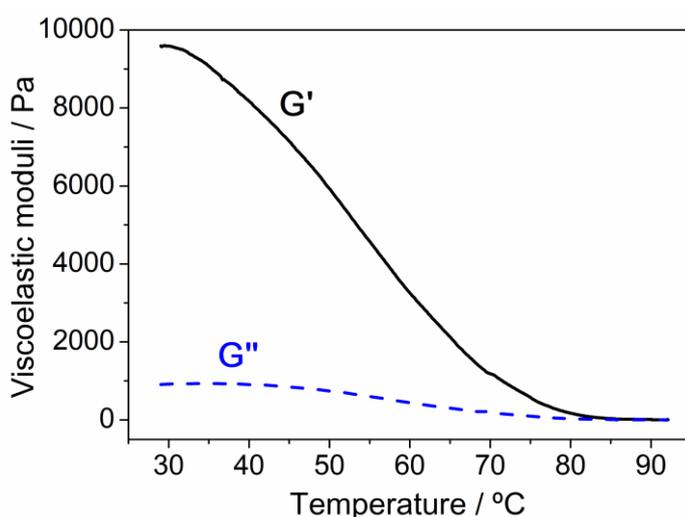


Figura II.26 Módulos viscoelásticos en función de la temperatura para el gel **2** a una concentración de gelificante del 1% (p/v) en DMSO- H_2O . G' : módulo de almacenamiento; G'' : módulo de pérdida.

Como temperatura de transición de una muestra en estado gel a una muestra líquida (T_{gel}), en este trabajo se tomó la temperatura mínima a la que G' y G'' alcanzaron valores solo un 10% superiores a los valores correspondientes al promedio de las mesetas de alta temperatura. Los valores obtenidos para el gel **1** y el gel **2** al 1% (p/v) de concentración de gelificante fueron respectivamente $75.1 \pm 2.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $86 \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando se formaron mediante captura de agua atmosférica, y $59.2 \pm 2.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $63.1 \pm 0.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando se formaron mediante adición directa de agua. Como era de esperar, se obtuvo una T_{gel} más baja para los geles formados por adición directa de agua, en relación con su naturaleza más débil.

II.4. CONCLUSIONES

En resumen, en este trabajo se ha estudiado la capacidad de dos nuevos derivados triterpénicos (MATBTU y OATBTU) para formar geles supramoleculares. Estos dos nuevos compuestos tienen algunas particularidades no descritas anteriormente en geladores estructuralmente relacionados, lo que los hace especialmente relevantes en el campo de los LMWG. En primer lugar, tienen la capacidad de formar geles capturando lentamente agua atmosférica dando lugar a geles homogéneos que muestran valores extremadamente altos de G' hasta 10^7 Pa. Que un compuesto pequeño de lugar a un gel tras la interacción lenta con un agente externo, no es trivial. Como ha sido descrito por la mayoría de los LMWG, la gelificación implica la nucleación y el subsecuente crecimiento en 1D.³⁸

En este caso, el proceso de gelificación lento sujeto a la captura de agua atmosférica sugiere que estos dos gelificantes deben tener una gran tendencia a crecer en fibras 1D necesarias para formar los geles. Esta suposición se ve confirmada por las largas fibras y nanovarillas observadas en las imágenes SEM y TEM. También es muy notable la capacidad de estos geladores para formar geles homogéneos incluso a concentraciones altas, hasta un 10% (p/v), lo cual también puede justificarse por la gran tendencia de estas moléculas a autoensamblarse en fibras y por el lento proceso de gelificación.

No obstante, los estudios de RMN sugieren que parte de estas moléculas de gelador pueden estar libres en solución intercambiándose con la red de gel a temperatura ambiente. También es notable la combinación de mezclas de disolventes en las que estas moléculas pueden formar un gel. Como muestran los resultados de FTIR, el agua puede interrumpir las interacciones DMSO-DMSO dando lugar a dímeros DMSO-H₂O que pueden ser responsables de desencadenar la formación de gel.

Esta particular interacción entre agua y DMSO favorece la formación de un entorno más homogéneo en el que se promueve el autoensamblaje del gelador. Aunque los geladores **1** y **2** solo difieren en un grupo hidroxilo adicional, los resultados han demostrado que estas dos estructuras interactúan de manera diferente. Significativamente, solo el compuesto **1** es capaz de gelificar en tolueno y los resultados mostraron que probablemente lo hace siguiendo un patrón de agregación diferente, como se observa en la difracción XRD y las imágenes TEM y SEM. Sin embargo, las mediciones de VCD respaldadas por cálculos de DFT sugieren que ambos compuestos tienen un conformero preferido y similar en solución.

Las mediciones reológicas han revelado que estos geles en DMSO, cuando se forman mediante captura de agua atmosférica, son muy rígidos, incluso en concentraciones bajas, con valores altos de T_{gel} . Cuando se agrega agua directamente a la solución se obtienen valores más bajos de G' , G'' y T_{gel} . Se obtienen geles más débiles a partir de **1** en tolueno. Los datos reológicos parecen estar de acuerdo con las conclusiones extraídas con las otras técnicas y apuntan a la capacidad de estos dos geladores para formar geles muy homogéneos a la hora de captar agua atmosférica.

II.5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

II.5.1. Reactivos y materiales

Se aislaron los ácidos oleanólico (ácido 3b-hidroxiolean-12-en-28-oico, OA) y maslínico (ácido 2a, 3b-dihidroxiolean-12-en-28-oico, MA) de los desechos sólidos resultantes de la producción de aceite de oliva (Fig. II.27). Se extrajeron en un sistema soxhlet con hexano (Merck, ref. 1.04374) y acetato de etilo (Fisher Scientific, ref. E/0900/17) sucesivamente.¹⁹ Ambos ácidos se purificaron a partir de estas mezclas mediante cromatografía flash sobre gel de sílice 60 (Merck, ref. 1.09385), eluyendo con diclorometano (Fisher Scientific, ref. D/1852/17), con cantidades crecientes de acetona (Fisher Scientific, ref. A/0600/17).³⁹ Para el seguimiento de la cromatografía flash y las reacciones, se utilizaron láminas de gel de sílice 60 sobre aluminio (Merk. ref. 1.16835), los compuestos se hicieron visibles pulverizando una mezcla de ácido sulfúrico y ácido acético, seguido de calentamiento a 120 °C y finalmente observado con luz UV a 254 nm.



Figura II.27 Residuos sólidos de la producción del aceite de oliva.

II.5.2. Síntesis de los geladores

Se agregaron 0.3 mmol de *N,N*-Diisopropiletilamina (DIEA) (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$, ref. D125806) y 0.66 mmol de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrafluoroborato de tetrametiluronio (TBTU) (Apollo Scientific, ref. PC0921), a cada solución de triterpeno MA y OA, la solución se preparó con 0.44 mmol en tetrahidrofurano (20 mL). Las reacciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 horas y luego se extrajeron varias veces con agua y diclorometano. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó a presión reducida.

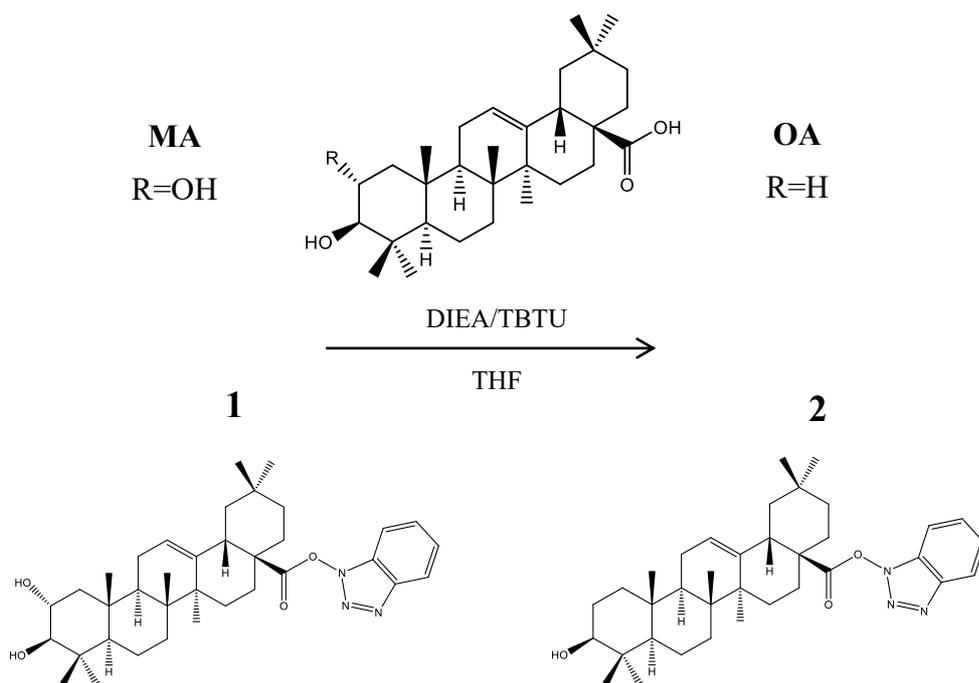


Figura II.28 Síntesis de los geladores **1** y **2**.

Finalmente, cada residuo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando hexano y acetato de etilo como eluyentes, obteniendo los compuestos **1** (92% de rendimiento) y **2** (90% de rendimiento).⁴⁰

Para el compuesto **1** ^1H -RMN: (CDCl_3 500 MHz): 8.05 (m, 1H, grupo TBTU), 7.52 (m, 1H, grupo TBTU), 7.38 (m, 2H, grupo TBTU), 5.38 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 3.69 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.0$, $J_3 = 14.4$ Hz, H-2), 3.01 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-3), 2.98 (dd, 1H, $J_1 = 4.0$, $J_2 = 13.5$ Hz, H-18), 1.22, 1.05, 1.00, 0.98, 0.97, 0.85, 0.84 (s, 3H cada grupo metilo); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz): 16.8 (CH_3), 16.9 (CH_3), 17.5 (CH_3), 18.5 (CH_2), 23.3 (CH_2), 23.7 (CH), 23.7 (CH_3), 25.9 (CH_3), 28.2 (CH_2), 28.8 (CH_3), 30.8 (C), 32.6 (CH_2), 32.9 (CH_2), 33.1 (CH_3), 33.8 (CH_2), 38.4 (C), 39.3 (C), 39.7 (C), 41.7 (CH), 42.1 (C), 45.6 (CH_2), 46.6 (CH_2), 47.7 (CH), 47.8 (C), 55.5 (CH), 69.0 (CH), 84.1 (CH), 108.3 (CH TBTU), 120.7 (CH TBTU), 123.9 (CH), 124.8 (CH TBTU), 128.6 (CH TBTU), 128.9 (C TBTU), 142.3 (C), 143.7 (C TBTU), 173.7 (COOH); ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M} + 1]^+$ 590.3958, encontrada 590.3954.

Para el compuesto **2** ^1H -RMN: (CDCl_3 , 500 MHz): 8.03 (m, 1H, grupo TBTU), 7.50 (m, 1H, grupo TBTU), 7.37 (m, 2H, grupo TBTU), 5.36 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.20 (dd, 1H, $J_1 = 4.0$, $J_2 = 11.0$ Hz, H-3), 2.97 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 1.21, 0.99, 0.98, 0.96, 0.89, 0.84, 0.78 (s, 3H cada grupo metilo); ^{13}C -RMN: (CDCl_3 , 125 MHz): 15.5 (CH_3), 15.7 (CH_3), 17.4 (CH_3), 18.4 (CH_2), 23.2 (CH_2), 23.6 (CH), 23.6 (CH_3), 25.8 (CH_3), 27.3 (CH_2), 28.2 (CH_2), 28.2 (CH_3), 30.7 (C), 32.5 (CH_2), 32.9 (CH_2), 33.0 (CH_3), 33.8 (CH_2), 37.1 (C), 38.7 (CH_2), 38.9 (C), 41.7 (CH), 42.0 (C), 45.6 (CH_2), 47.7 (CH), 47.7 (C), 55.3 (CH), 79.0 (CH), 108.3 (CH TBTU), 120.6 (CH TBTU), 124.0 (CH), 124.7 (CH TBTU), 128.6 (CH TBTU), 128.9 (CH TBTU), 142.2 (C), 143.6 (CH TBTU), 173.7 (COOH); ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M} + 1]^+$ 574.4009, encontrada 574.4020.

II.5.3. Protocolo de gelificación

Para preparar geles en mezclas de DMSO-H₂O o DMF-H₂O, se pesó la cantidad deseada de polvo de **1** o **2** en un tubo de muestra (Fig. II.29) y luego se añadió DMSO o DMF para alcanzar la concentración final.



Figura II.29 Compuesto **1** y **2** en polvo para la preparación de geles.

La mezcla se calentó suavemente hasta que se obtuvo una solución transparente y se dejó hasta que alcanzara la temperatura ambiente. Para preparar geles mediante la captura de agua, la solución de gelador en viales abiertos se dejó expuesta al ambiente del laboratorio durante diferentes momentos dependiendo de la concentración del gel (Tablas II.5 y II.6).

Tabla II.5 Tiempo de gelificación en DMSO

| Percent/Percentage (w/v) | Time (h) |
|--------------------------|----------|
| 1 % | 20 |
| 2 % | 20 |
| 3 % | 20 |
| 4 % | 6 |
| 6 % | 5 |
| 8 % | 5 |
| 10 % | 5 |
| 15 % | 5 |

Tabla II.6 Tiempo de gelificación en DMF

| Percent/Percentage (w/v) | Time (h) |
|--------------------------|----------|
| 4 % | 48 |
| 8 % | 48 |
| 10 % | 30 |

Para los geles preparados por adición directa de agua, se agregó agua a la solución y la gelificación se completó en 5 minutos en el caso de DMSO-H₂O y 90 minutos en el caso de DMF-H₂O.

Se prepararon geles de **1** que contenían tolueno añadiendo tolueno para alcanzar una concentración de gelador del 1,6% (p/v). La mezcla se calentó suavemente para disolver el gelador y los geles se obtuvieron cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente, aproximadamente 5 minutos.

II.5.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras que contenían DMSO-H₂O o DMF-H₂O se liofilizaron. Las muestras que contenían tolueno se secaron al aire (Fig. II.30), exponiendo una porción de gel al entorno del laboratorio durante la noche y mediante "secado de punto crítico" (CPD).



Figura II.30 Gel de **1** con tolueno secado al aire.

Para el CPD, se empapó secuencialmente una porción de gel en diferentes mezclas de tolueno y etanol, aumentando la proporción de etanol hasta que todo el tolueno fue reemplazado por etanol. Luego, la muestra se colocó en la cámara del equipo Polaron CPD 7501 CPD.

La cámara se selló, se enfrió y el disolvente se eliminó con CO₂ supercrítico. La muestra se cubrió con carbón con el evaporador térmico de alto vacío EMITECH K975X (Fig. II.31). Todas las muestras secas, se estudiaron usando un microscopio electrónico FEI Quanta 400 ESEM.



Figura II.31 Muestras de xerogeles cubiertas de carbón para SEM.

II.5.5. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes TEM se registraron utilizando un microscopio electrónico LIBRA 120 PLUS (Carl Zeiss). Para todas las muestras, se dispersó una pequeña porción de gel en agua usando un baño ultrasónico y se colocó una gota de la suspensión acuosa sobre una rejilla de cobre recubierta de carbón (300-mesh) (Fig. II.32). Las muestras se secaron a temperatura ambiente durante la noche.

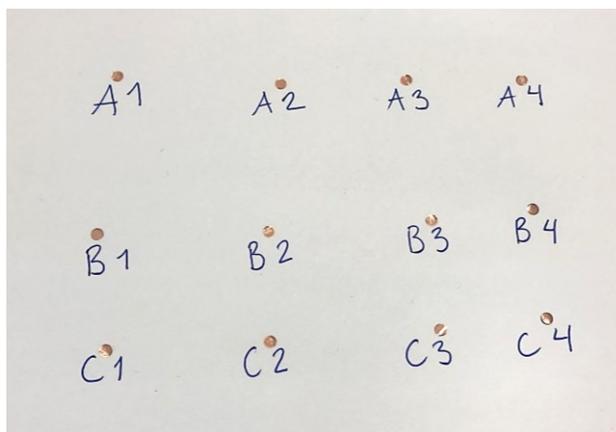


Figura II.32. Muestras de geles **1** y **2** en rejillas de cobre para TEM.

II.5.6. Resonancia magnética nuclear ^1H (^1H -RMN)

Las muestras de gel para RMN se prepararon al 1% (p/v) a temperatura ambiente añadiendo D_2O (15%, 0.15 mL) a una solución de **1** o **2** en $\text{DMSO-}d^6$ (0.85 mL) contenida en un tubo de RMN de 5 mm. Los espectros de RMN correspondientes a los experimentos de relajación se registraron en un instrumento de 600 MHz (Agilent VNMRS software VnmrJ-4.2A) a 25 °C (estado de gel) y a 100 °C (estado de solución). Las medidas de T_2 se realizaron utilizando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG2) con tiempos de desfase de 0.4 ms. Se obtuvo un mínimo de nueve puntos para cada uno de los experimentos de relajación y se obtuvo un buen ajuste de los datos a una disminución exponencial en todos los datos reportados.

II.5.7. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se registraron en un espectrómetro Tensor 27 (Bruker) equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR) (diamond, 1 reflection, 451). Los geles se presionaron contra el cristal de diamante. Los espectros son el resultado de un promedio de 25 exploraciones recogidas en el rango entre 4000 y 500 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} . Se utilizó un espectro de aire como fondo.

II.5.8. Dicroísmo circular vibracional (VCD)

Los espectros VCD se midieron mediante un banco óptico Bruker PMA50 acoplado al espectrómetro Vertex 70. En el instrumento PMA50, la radiación infrarroja es enfocada por una lente BaF_2 , pasando un filtro óptico (rango de 3800-600 cm^{-1}) y un modulador fotoelástico de ZnSe (PM, frecuencia de 50 kHz). El haz de luz es finalmente recogido por un detector D313/QMTC con ventanas de BaF_2 no dicroicas. Se requiere la calibración previa del PM en un número de onda fijo antes de grabar un espectro de VCD. Entonces se dispone de una región espectral de 600 cm^{-1} centrada en cada número de onda de calibración. Normalmente, las calibraciones a 1300 cm^{-1} permitieron obtener señales VCD sobre la región infrarroja de interés. Cada espectro de VCD fue el resultado de promediar un mínimo de 28 000 exploraciones (tiempos de adquisición de 12 h) con una resolución espectral mejor que 4 cm^{-1} . Los espectros VCD se registraron a partir de geles formados en $\text{DMSO-H}_2\text{O}$ a una concentración de 3×10^{-3} M. Los geles se colocaron en una celda de 0.015 mm de longitud y ventanas de KBr con paso de luz variable. Las mediciones y los tratamientos espectrales se realizaron utilizando el software espectroscópico OPUS 6.5.

II.5.9. Cálculos DFT

El conjunto de programas de Gaussian'16⁴¹ se utilizó para realizar los cálculos químicos cuánticos de la teoría funcional de la densidad (DFT). En todos los cálculos se utilizó la función híbrida de intercambio-correlación b3lyp. Combina la función de intercambio con corrección de gradiente de tres parámetros de Becke (*b3*) y las correlaciones no locales de Lee-Yang-Parr (LYP).^{42, 43, 44} Las estructuras de estado fundamental se calcularon utilizando conjuntos de bases consistentes de correlación de Dunning's cc-pvdz doble-zeta,⁴⁵ que incluye funciones de polarización por definición. Los espectros teóricos de infrarrojos y VCD se obtuvieron a partir de las intensidades de DFT en combinación con los números de onda vibracionales calculados uniformemente escalados en 0.98. Cada banda estaba representada por una función gaussiana de 10 cm⁻¹ de ancho de media altura.

II.5.10. Difracción de rayos X (XRD)

Los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de las muestras se obtuvieron en un difractómetro Bruker D8 Discover μ MR (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipado con un detector 2D DECTRIS PILATUS3 R 100K-A de recuento de fotones híbrido (HPC) 2D. Las mediciones se llevaron a cabo usando radiación Cu K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) generada a 50 kV y 1 mA. Los patrones se registraron en el rango 2θ de 3 a 45° con un tamaño de paso (2θ) de 0.02. Se prepararon los geles y se depositaron en una placa de silicio de difracción cero.



Figura II.33 Muestras de los compuestos 1 y 2 en polvo para XRD.

II.5.11. Caracterización reológica

Para la caracterización de las propiedades reológicas dinámicas de los geles, se utilizó un reómetro Haake Mars III de tensión controlada, provisto de dos conjuntos de geometrías diferentes (placas paralelas de 35 mm de diámetro y cilindros coaxiales de 16 mm y 17 mm de diámetro interno y externo, respectivamente) (Fig. II.34). Todas las muestras se sometieron a esfuerzos cortantes oscilatorios y se midieron a una temperatura de 25 °C.



Figura II.34 Geles de 1 con DMSO en placas paralelas para mediciones reológicas.

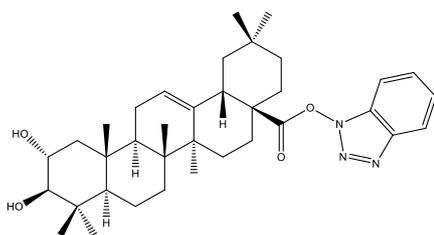
A partir de estas medidas se obtuvieron los módulos viscoelásticos de las muestras: módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdidas (G'').

Para obtener una caracterización completa de las propiedades reológicas en el régimen de deformación por cizallamiento oscilatorio, realizamos dos experimentos separados. En primer lugar, los barridos de amplitud, de la frecuencia fija de oscilaciones y la amplitud de deformación por cizallamiento creciente escalonada, que permitieron determinar la extensión del régimen viscoelástico lineal (LVR). Luego, se realizaron barridos de frecuencia de amplitud fija de deformación por cizallamiento dentro del LVR y frecuencia creciente escalonada.

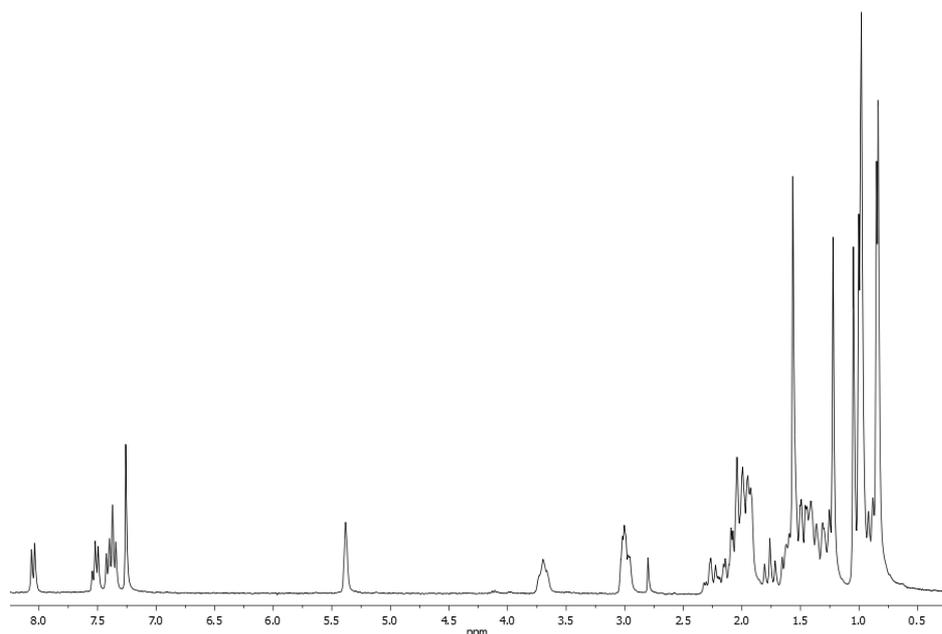
Además, se determinaron por métodos reológicos la temperatura a la que tuvo lugar la transición gel-sol de los geles (T_{gel}). Para ello, se colocaron los geles en el sistema de medición del reómetro a temperatura ambiente y aumentamos la temperatura $2.5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1} \pm 0.97$, hasta $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras se sometieron a deformaciones por cizallamiento oscilatorio de frecuencia fija (1 Hz) y amplitud fija dentro del LVR y se controló la evolución de temperatura de los módulos viscoelásticos de los geles. Para cada muestra y condición experimental, se realizaron al menos 3 mediciones separadas. Los resultados que se muestran representan el promedio de cada conjunto de medidas separadas.

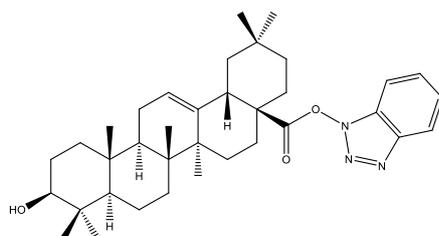
II.6. ESPECTROS DE RMN Y VALORES HRMS

MATBTU

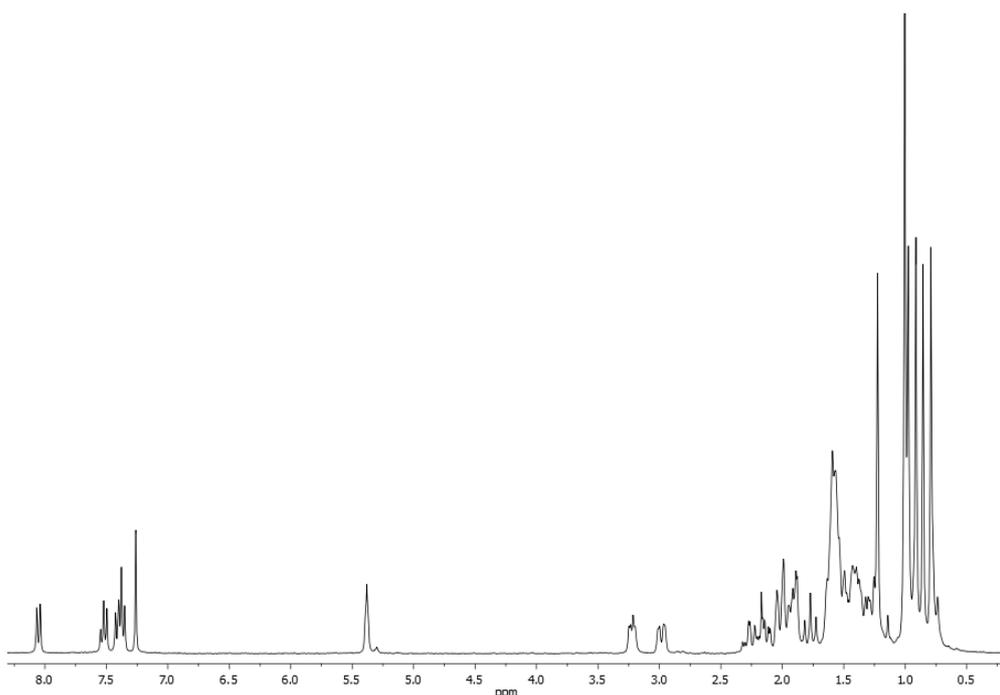


^1H -RMN: (CDCl_3 500 MHz): 8.05 (m, 1H, grupo TBTU), 7.52 (m, 1H, grupo TBTU), 7.38 (m, 2H, grupo TBTU), 5.38 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 3.69 (ddd, 1H, $J_1 = 4.4$, $J_2 = 10.0$, $J_3 = 14.4$ Hz, H-2), 3.01 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-3), 2.98 (dd, 1H, $J_1 = 4.0$, $J_2 = 13.5$ Hz, H-18), 1.22, 1.05, 1.00, 0.98, 0.97, 0.85, 0.84 (s, 3H cada grupo metilo); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz): 16.8 (CH_3), 16.9 (CH_3), 17.5 (CH_3), 18.5 (CH_2), 23.3 (CH_2), 23.7 (CH), 23.7 (CH_3), 25.9 (CH_3), 28.2 (CH_2), 28.8 (CH_3), 30.8 (C), 32.6 (CH_2), 32.9 (CH_2), 33.1 (CH_3), 33.8 (CH_2), 38.4 (C), 39.3 (C), 39.7 (C), 41.7 (CH), 42.1 (C), 45.6 (CH_2), 46.6 (CH_2), 47.7 (CH), 47.8 (C), 55.5 (CH), 69 (CH), 84.1 (CH), 108.3 (CH TBTU), 120.7 (CH TBTU), 123.9 (CH), 124.8 (CH TBTU), 128.6 (CH TBTU), 128.9 (C TBTU), 142.3 (C), 143.7 (C TBTU), 173.7 (COOH); ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+1]^+$ 590.3958, encontrada 590.3954.



OATBTU

^1H -RMN: (CDCl_3 , 500 MHz): 8.03 (m, 1H, grupo TBTU), 7.50 (m, 1H, grupo TBTU), 7.37 (m, 2H, grupo TBTU), 5.36 (dd, 1H, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.20 (dd, 1H, $J_1 = 4.0$, $J_2 = 11.0$ Hz, H-3), 2.97 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, H-18), 1.21, 0.99, 0.98, 0.96, 0.89, 0.84, 0.78 (s, 3H cada grupo metilo); ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz): 15.5 (CH_3), 15.7 (CH_3), 17.4 (CH_3), 18.4 (CH_2), 23.2 (CH_2), 23.6 (CH), 23.6 (CH_3), 25.8 (CH_3), 27.3 (CH_2), 28.2 (CH_2), 28.2 (CH_3), 30.7 (C), 32.5 (CH_2), 32.9 (CH_2), 33 (CH_3), 33.8 (CH_2), 37.1 (C), 38.7 (CH_2), 38.9 (C), 41.7 (CH), 42 (C), 45.6 (CH_2), 47.7 (CH), 47.7 (C), 55.3 (CH), 79 (CH), 108.3 (CH TBTU), 120.6 (CH TBTU), 124 (CH), 124.7 (CH TBTU), 128.6 (CH TBTU), 128.9 (CH TBTU), 142.2 (C), 143.6 (CH TBTU), 173.7 (COOH); ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+1]^+$ 574.4009, encontrada 574.4020.



II.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Terech, P. & Weiss, R. G. Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels. *Chem. Rev.* **97**, 3133-3159 (1997).
2. Sangeetha, N. M. & Maitra, U. Supramolecular gels: Functions and uses. *Chem. Soc. Rev.* **34**, 821-836 (2005).
3. Weiss, R. G. The past, present, and future of molecular gels. What is the status of the field, and where is it going? *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 7519-7530 (2014).
4. Draper, E. R. & Adams, D. J. Low-Molecular-Weight Gels: The State of the Art. *Chem* **3**, 390-410 (2017).
5. Contreras-Montoya, R. *et al.* Iron nanoparticles-based supramolecular hydrogels to originate anisotropic hybrid materials with enhanced mechanical strength. *Mater. Chem. Front.* **2**, 686-699 (2018).
6. Wang, H. & Cheng, Y. All-small-molecule dynamic covalent hydrogels with multistimuli responsiveness. *Mater. Chem. Front.* **3**, 472-475 (2019).
7. Hirst, A. R., Escuder, B., Miravet, J. F. & Smith, D. K. High-tech applications of self-assembling supramolecular nanostructured gel-phase materials: From regenerative medicine to electronic devices. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 8002-8018 (2008).
8. Escuder, B., Rodríguez-Llansola, F. & Miravet, J. F. Supramolecular gels as active media for organic reactions and catalysis. *New J. Chem.* **34**, 1044-1054 (2010).
9. Conejero-Muriel, M. *et al.* Influence of the chirality of short peptide supramolecular hydrogels in protein crystallogenesis. *Chem. Commun.* **51**, 3862-3865 (2015).

10. Contreras-Montoya, R. *et al.* Catalytic and Electron Conducting Carbon Nanotube–Reinforced Lysozyme Crystals. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1-10 (2019).
11. Frederix, P. W. J. M. *et al.* Exploring the sequence space for (tri-)peptide self-assembly to design and discover new hydrogels. *Nat. Chem.* **7**, 30-37 (2015).
12. Argudo, P. G. *et al.* Unravelling the 2D self-assembly of Fmoc-dipeptides at fluid interfaces. *Soft Matter* **14**, 9343-9350 (2018).
13. Svobodová, H., Noponen, V., Kolehmainen, E. & Sievänen, E. Recent advances in steroidal supramolecular gels. *RSC Adv.* **2**, 4985-5007 (2012).
14. Xue, M., Liu, K., Peng, J., Zhang, Q. & Fang, Y. Novel dimeric cholesteryl-based A(LS)₂ low-molecular-mass gelators with a benzene ring in the linker. *J. Colloid Interface Sci.* **327**, 94-101 (2008).
15. Peng, J. *et al.* New dicholesteryl-based gelators: Gelling ability and selective gelation of organic solvents from their mixtures with water at room temperature. *New J. Chem.* **32**, 2218-2224 (2008).
16. Xue, M., Gao, D., Chen, X., Liu, K. & Fang, Y. New dimeric cholesteryl-based A(LS)₂ gelators with remarkable gelling abilities: Organogel formation at room temperature. *J. Colloid Interface Sci.* **361**, 556-564 (2011).
17. Bag, B. G. & Majumdar, R. Self-assembly of Renewable Nano-sized Triterpenoids. *Chem. Rec.* **17**, 841-873 (2017).
18. Rufino, E. *et al.* Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic triterpenoids and some of their chemical derivatives. *Curr. Org. Chem.* **19**, 919-947 (2015).

19. Medina-O'Donnell, M. *et al.* Diamine and PEGylated-diamine conjugates of triterpenic acids as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **148**, 325-336 (2018).
20. Blanco-Cabra, N. *et al.* Novel Oleanolic and Maslinic Acid Derivatives as a Promising Treatment against Bacterial Biofilm in Nosocomial Infections: An in Vitro and in Vivo Study. *ACS Infect. Dis.* **5**, 1581-1589 (2019).
21. Bag, B. G. & Dash, S. S. First self-assembly study of betulinic acid, a renewable nano-sized, 6-6-6-6-5 pentacyclic monohydroxy triterpenic acid. *Nanoscale* **3**, 4564-4566 (2011).
22. Bag, B. G. & Paul, K. Vesicular and Fibrillar Gels by Self-Assembly of Nanosized Oleanolic Acid. *Asian J. Org. Chem.* **1**, 150-154 (2012).
23. Bag, B. G. & Dash, S. S. Hierarchical Self-Assembly of a Renewable Nanosized Pentacyclic Dihydroxy-triterpenoid Betulin Yielding Flower-Like Architectures. *Langmuir* **31**, 13664-13672 (2015).
24. Bag, B. G., Hasan, S. N., Ghorai, S. & Panja, S. K. First Self-Assembly of Dihydroxy Triterpenoid Maslinic Acid Yielding Vesicles. *ACS Omega* **4**, 7684-7690 (2019).
25. Bag, B. G. *et al.* Self-assembly of ketals of arjunolic acid into vesicles and fibers yielding gel-like dispersions. *Langmuir* **29**, 1766-1778 (2013).
26. Bag, B. G., Maity, G. C. & Dinda, S. K. Donor-acceptor interaction promoted gelation: Visual observation of color change. *Org. Lett.* **8**, 5457-5460 (2006).
27. Gao, Y. *et al.* Solvent-Directed Assembly of a Pyridinium-Tailored Methyl Oleanolate Amphiphile: Stepwise Growth of Microrods and Nanofibers. *Langmuir* **32**, 1685-1692 (2016).

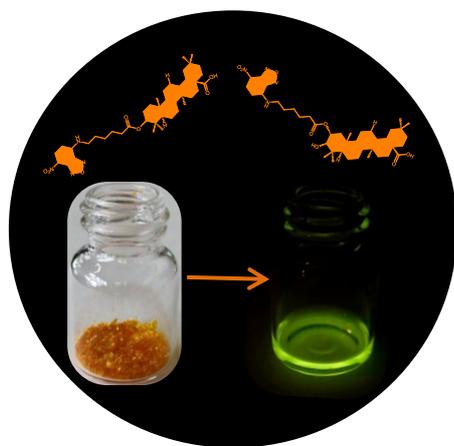
28. Gao, Y. *et al.* Supramolecular helical nanofibers assembled from a pyridinium-functionalized methyl glycyrrhetate amphiphile. *Nanoscale* **7**, 13568-13575 (2015).
29. Lu, J., Hu, J., Song, Y. & Ju, Y. A new dual-responsive organogel based on uracil-appended glycyrrhetic acid. *Org. Lett.* **13**, 3372-3375 (2011).
30. Gao, Y. *et al.* Imprinting supramolecular chirality on silica from natural triterpenoid-regulated helical ribbons. *Mater. Chem. Front.* **3**, 308-313 (2019).
31. Majumdar, R., Tantayanon, S. & Gopal Bag, B. A Novel Trihybrid Material Based on Renewables: An Efficient Recyclable Heterogeneous Catalyst for C–C Coupling and Reduction Reactions. *Chem. - An Asian J.* **11**, 2406-2414 (2016).
32. Bag, B. G., Das, S., Hasan, S. N. & Chandan Barai, A. Nanoarchitectures by hierarchical self-assembly of ursolic acid: entrapment and release of fluorophores including anticancer drug doxorubicin. *RSC Adv.* **7**, 18136-18143 (2017).
33. Waybright, T. J., Britt, J. R. & McCloud, T. G. Overcoming problems of compound storage in DMSO: Solvent and process alternatives. *J. Biomol. Screen.* **14**, 708-715 (2009).
34. Escuder, B., LLusar, M. & Miravet, J. F. Insight on the NMR study of supramolecular gels and its application to monitor molecular recognition on self-assembled fibers. *J. Org. Chem.* **71**, 7747-7752 (2006).
35. Miguel, D. *et al.* Development of a new dual polarity and viscosity probe based on the foldamer concept. *Org. Lett.* **17**, 2844-2847 (2015).

36. Duncan, D. C. & Whitten, D. G. ¹H NMR investigation of the composition, structure, and dynamics of cholesterol-stilbene tethered dyad organogels. *Langmuir* **16**, 6445-6452 (2000).
37. Wallace, V. M., Dhupal, N. R., Zehentbauer, F. M., Kim, H. J. & Kiefer, J. Revisiting the Aqueous Solutions of Dimethyl Sulfoxide by Spectroscopy in the Mid- and Near-Infrared: Experiments and Car-Parrinello Simulations. *J. Phys. Chem. B* **119**, 14780-14789 (2015).
38. Huang, X., Terech, P., Raghavan, S. R. & Weiss, R. G. Kinetics of 5 α -cholestan-3 β -yl N-(2-naphthyl)carbamate/n-alkane organogel formation and its influence on the fibrillar networks. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4336-4344 (2005).
39. Martinez, A. *et al.* Biotransformation of oleanolic and maslinic methyl esters by *Rhizomucor miehei* CECT 2749. *Phytochemistry* **117**, 500-508 (2015).
40. Medina-O'Donnell, M. *et al.* Semi-synthesis and antiproliferative evaluation of PEGylated pentacyclic triterpenes. *Eur. J. Med. Chem.* **118**, 64-78 (2016).
41. Frisch G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratch, D. J., M. J. . T. Gaussian 16, Rev. B.01. *Gaussian, Inc., Wallingford, CT* (2016).
42. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648-5652 (1993).
43. Lee, C., Yang, W. & Parr, and R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785-789 (1988).
44. Tawada, Y., Tsuneda, T., Yanagisawa, S., Yanai, T. & Hirao, K. A long-range-corrected time-dependent density functional theory. *J. Chem. Phys.* **120**, 8425-8433 (2004).

-
45. Dunning, T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* **90**, 1007-1023 (1989).

CAPÍTULO III

DERIVADOS DE AO Y AM CON APLICACIÓN COMO SONDAS FLUORESCENTES



III.1 RESUMEN

Empleando un protocolo general de etiquetado fluorescente para productos naturales hidroxilados, se han semisintetizado, con buen rendimiento, quince derivados con notables propiedades de fluorescencia y actividad biológica. Para esta semisíntesis se ha empleado como etiqueta fluorescente el reactivo cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl). Los conectores usados para unir este reactivo fluorescente al compuesto natural han sido ω -aminoácidos de diferente longitud de cadena. Los productos naturales utilizados, con grupos hidroxilo, han sido los ácidos triterpénicos oleanólico y maslínico, sus correspondientes 28-bencil derivados y el colesterol. Se han obtenido así 15 NBD-aminoácido-triterpeno derivados que han sido estudiados en base a sus propiedades ópticas de fluorescencia y sus actividades biológicas frente a la proliferación celular en tres líneas celulares cancerígenas. Los resultados del estudio de fluorescencia han puesto de manifiesto que las mejores etiquetas fluorescentes son aquellas en las que la cadena del ω -aminoácido es corta (6 átomos de carbono) y el grupo carboxilo se encuentra libre, sin bencilar. Por otra parte, la acción inhibidora de estos NBD-derivados sobre las líneas celulares cancerígenas ensayadas, nos indica que se obtienen los mejores valores de IC_{50} , de nuevo con los compuestos conjugados en los que la cadena del ω -aminoácido es corta y el grupo carboxilo libre.

III.2. INTRODUCCIÓN

El término “producto natural” se refiere a cualquier sustancia procedente de una fuente natural y que, generalmente, es un metabolito secundario. Es decir, es una pequeña molécula no implicada en el metabolismo primario de la célula, sino que interviene en otros aspectos de la misma como la defensa, la protección la competencia, la interacción entre especies, etc.^{1,2,3}

Históricamente, el descubrimiento de productos naturales ha sido un campo de investigación de un enorme interés científico, comercial y médico. Centrándonos en el aspecto medicinal, hay que señalar que, antes del siglo XVIII, los principios activos de la mayoría de las medicinas se obtenían de plantas, pero el contenido de los extractos de productos naturales, los aceites, las mezclas, etc. eran desconocidos. Fue con el incremento del conocimiento científico sobre los procesos de aislamiento, de extracción y de identificación estructural de los compuestos químicos presentes en los extractos naturales, lo que impulsó racionalmente la medicina basada en compuestos presentes en la naturaleza.^{4,5}

En este sentido los productos naturales representan una gran fuente de compuestos farmacológicamente activos y que a menudo se usan como punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos.^{6,7,8} Así, más de la mitad de los fármacos formados por pequeñas moléculas que se ha aprobado por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) desde 1981 hasta 2014, provienen de productos naturales y otros no naturales que son derivados de los mismos obtenidos químicamente.⁹ Por ejemplo, en el área del cáncer, en el periodo desde 1940 hasta finales de 2014, de las 175 pequeñas moléculas aprobadas,

131 (75%) son sintéticas, con 85 de ellas (49%), que provienen bien de productos naturales, o de derivados de ellos.

Los triterpenos se clasifican en dos grandes grupos: triterpenoides tetra- y pentacíclicos. Los triterpenos más interesantes, desde un punto de vista biológico, son los pentacíclicos que presentan esqueletos carbonados muy variados, como son: friedelano, lupano, ursano, oleanano, serratano y taraxano, fundamentalmente.¹⁰ Estos productos naturales están ampliamente distribuidos en plantas y otros organismos vivos, y representan el grupo más grande de metabolitos secundarios, por su amplio espectro de actividades biológicas, como agentes anti-inflamatorios, anti-oxidantes, anti-bacterianos, anti-cancerígenos, anti-virales, etc.^{11,12,13}

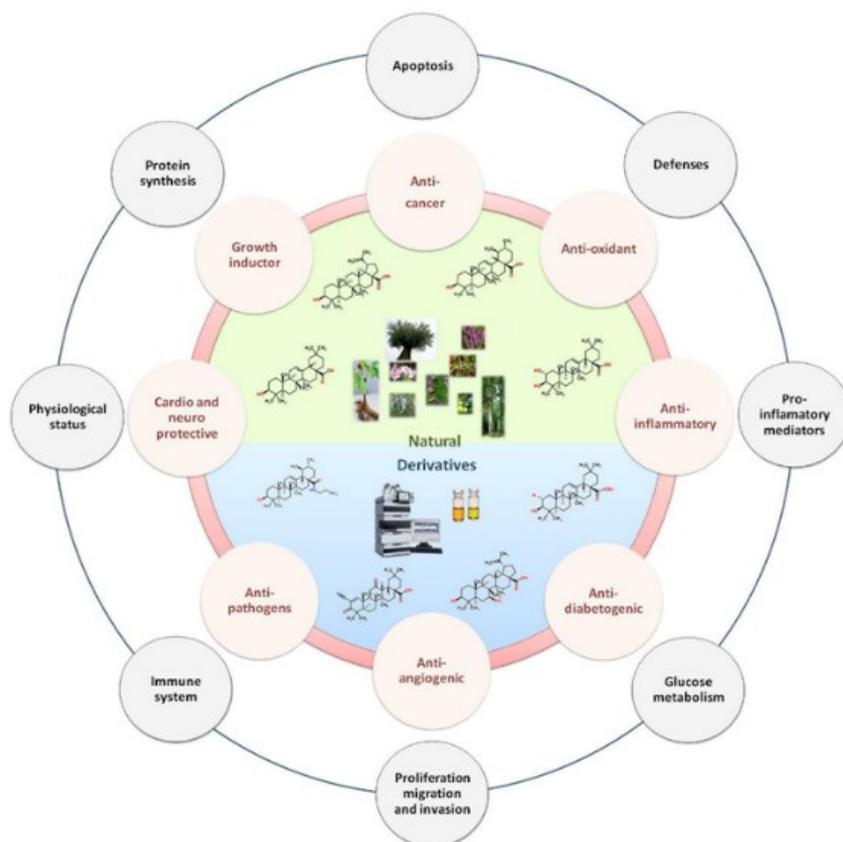


Figura III.1. Estructuras y actividades biológicas más usuales de triterpenos y derivados.¹¹

Dentro de los triterpenos pentacíclicos con esqueleto de oleanano, los ácidos oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico, AO)¹⁴ y maslínico (ácido 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico, AM)^{15,16} son los más interesantes biológicamente. El AO se encuentra en muchas fuentes naturales, sobre todo plantas, pero el AM está bastante menos extendido en la naturaleza.

Ambos ácidos triterpénicos se encuentran en cantidades ingentes en los residuos de molturación de la aceituna, de donde se extraen eficientemente y ello permite disponer de abundantes cantidades para ser usados como materia prima para su estudio y derivatización.^{17,18,19,20,21,22,23,24.}

La fluorescencia es un fenómeno de luminiscencia (emisión de luz cuyo origen no son las altas temperaturas) que consiste en un proceso de emisión de luz, en el cual las moléculas son excitadas por absorción de radiación electromagnética. La energía emitida en forma de luz es siempre menor que la absorbida y la diferencia entre ambas se disipa en forma de calor. Las sustancias fluorescentes absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta (rayos g, rayos X, UV, etc.) y luego la emiten de nuevo a una longitud de onda más larga (menor energía) dentro del espectro UV/visible. Las sustancias que poseen un grupo funcional fluoróforo (o fluorocromo) son capaces de emitir luz al ser excitadas por distintos tipos de radiación.

El fluoróforo suele ser un grupo funcional de la molécula capaz de emitir luz al ser excitado. La microscopía de fluorescencia es una técnica particularmente importante, en el campo de la bioquímica, para visualizar la célula, estudiar la interacción entre moléculas in vivo, localizar moléculas específicas, estudiar procesos celulares, etc.

La microscopía de fluorescencia es una herramienta que permite estudiar materiales fluorescentes al irradiar al objetivo fluorescente con la luz de excitación y separar la luz fluorescente emitida, de forma que las partes fluorescentes del objetivo brillan sobre un fondo oscuro.^{25,26,27}

La fluorescencia es, pues, una técnica de alta sensibilidad que permite monitorizar, a tiempo real, los fenómenos celulares a través de la información cuantitativa y cualitativa obtenida a partir de instrumentos capaces de detectarla. Así, se utilizan productos naturales unidos covalentemente a compuestos orgánicos fluorescentes, con objeto de desvelar procesos celulares relacionados con su actividad biológica. Por lo tanto, la exploración de un protocolo de marcado o etiquetado rápido, efectivo y económico de productos naturales bioactivos y la implementación exitosa del procedimiento, facilitan la obtención de imágenes de fluorescencia y la investigación de eventos celulares.

Los protocolos de etiquetado fluorescente de productos naturales implican varios pasos de reacción y procedimientos de reacción que, a veces, son tediosos. Además, los etiquetados con fluoróforos usuales como fluoresceína, rodamina, cumarina, y otras etiquetas fluorescentes disponibles comercialmente, son bastante caros y pueden requerir condiciones de reacción extremas para el etiquetado, lo cual puede conducir a la pérdida parcial o total de la actividad biológica. En los últimos años, se ha progresado mucho en el establecimiento de métodos para la identificación de objetivos celulares o el modo de acción de pequeñas moléculas, con la ayuda de sondas etiquetadas fluorescentemente.^{28,29,30}

Se han referenciado diferentes estrategias centrales o protocolos para el etiquetado de productos naturales empleando como etiquetas fluorescentes, por ejemplo, una cumarina³¹ o un oxadiazol.³²

La cumarina usada en el primer ejemplo es la etil 7-dimetilaminocumarina-4-acetato (Figura III.1), la cual es convertida en un conjunto de 9 intermedios fluorescente con diferente funcionalización, que son a continuación utilizados para etiquetas, para obtener una colección de 13 productos naturales, mediante diversas reacciones de síntesis orgánica. Estos productos naturales etiquetados con derivados de cumarina, como fluoróforo, han sido estudiados por su bioactividad en distintos ensayos celulares.

Por otra parte, el etiquetado con oxadiazol se ha llevado cabo con cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), que es una molécula no fluorescente, pero que es capaz de sufrir una sustitución nucleofílica a través de un grupo amino y convertirse así en una entidad fluorescente altamente sensible. En este protocolo se llevó a cabo la unión del reactivo NBD-Cl, a través de un conector, ω -aminoácido de diferente longitud de cadena, a diferentes productos naturales hidroxilados (Figura III.2).

Los productos naturales hidroxilados así etiquetados se han evaluado por su toxicidad frente a diferentes líneas celulares cancerígenas. También se han estudiado otros ejemplos de etiquetados de productos naturales y compuestos bioorgánicos empleando NBD-Cl como reactivo para obtener fluorescencia.^{33,34,35,36,37}

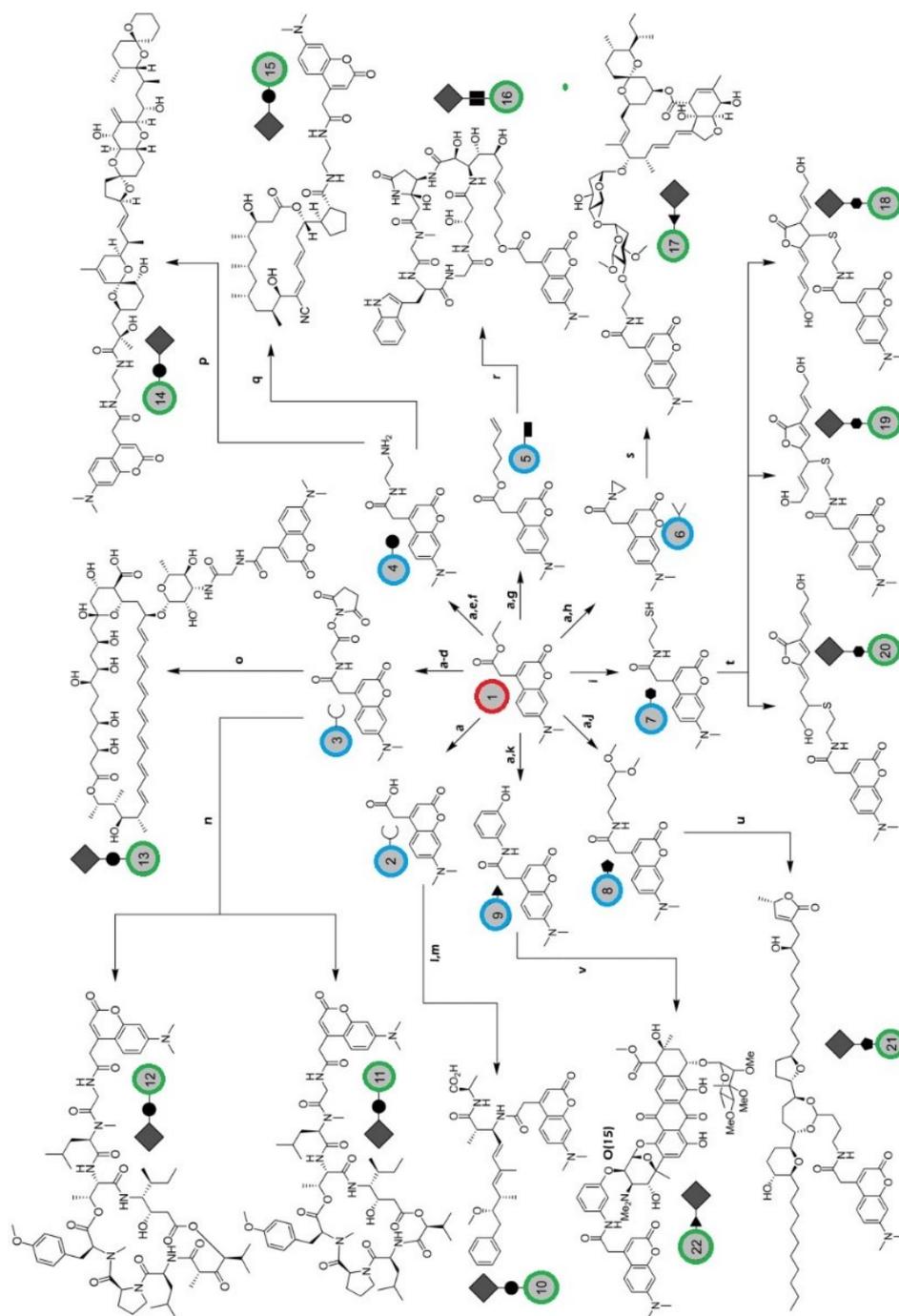


Figura III.2. Ejemplo de etiquetado fluorescente de productos naturales con derivados de cumarina.³¹

Por último, se ha estudiado también la actividad biológica de dos triterpenos naturales, el ácido oleanólico^{38,39} y el ácido 23-hidroxibetulínico⁴⁰, mediante la preparación de sondas fluorescentes, empleando diferentes derivados cumarínicos (Figura III.3) y 3-hidroflavónicos, respectivamente.

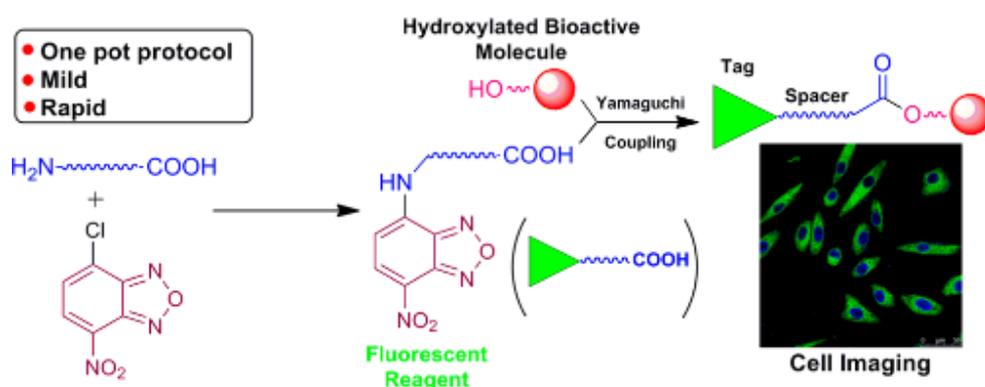


Figura III.3. Protocolo general de etiquetado fluorescente de productos naturales hidroxilados con NBD-Cl.³²

En este estudio, se ha empleado el protocolo general de etiquetado fluorescente de productos naturales hidroxilados empleando como reactivo el NBD-Cl. Los conectores utilizados han sido los ω -aminoácidos de cadena variable, como el ácido 6-aminohexanoico (A6AH), el ácido 8-aminooctanoico (A8AO) y el ácido 11-aminoundecanoico (A11AU).

Finalmente, como productos naturales hidroxilados, se han usado los ácidos oleanólico (AO) y maslínico (AM), sus correspondientes 28-bencil derivados (ácido 28-benciloleanólico: ABO y ácido 28-bencil maslínico: ABM) y el colesterol (COL). Una adecuada reacción de conjugación de estos tres grupos químicos condujo a la semisíntesis de 15 NBD-derivados, que han sido estudiados por sus características químicas, espectroscópicas, de fluorescencia y su actividad biológica.

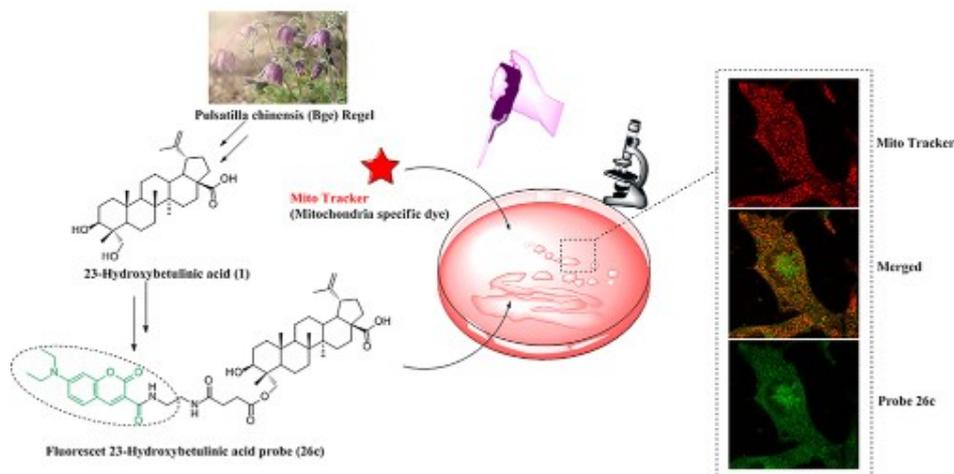


Figura III.4. Ejemplo de etiquetado fluorescente de un triterpeno con cumarina.⁴⁰

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. SÍNTESIS Y PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

Los distintos derivados fluorescentes han sido obtenidos de acuerdo con un protocolo, según el cual, se puede hacer etiquetado fluorescente de complejos productos naturales bioactivos en un único matraz (one-pot).³² Se ha usado como reactivo para el etiquetado fluorescente 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, NBD-Cl, CAS: 101-99-89-0).

Los conectores empleados para unir este reactivo fluorescente con el producto natural hidroxilado (PNH), han sido ω -aminoácidos de distinta longitud de cadena, como el ácido 6-aminohexanoico (A6AH, CAS: 60-32-2), ácido 8-aminooctanoico (A8AO, CAS: 1002-57-9) y el ácido 11-aminooctanoico (A11AU, CAS: 2432-99-7) (Figura III.4).

Como productos naturales hidroxilados (PNHs) se han utilizado los ácidos triterpénicos presentes en los residuos de la industria del aceite, como son el ácido oleanólico (AO, I, ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico), el ácido maslínico (AM, II, 2 α , 3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico).

Sus correspondientes 28-bencil derivados, ácido 28-bencil oleanólico (ABO, III) y ácido 28-bencil maslínico (ABM, IV) y, por último, un compuesto esteroidal como es el colesterol (COL, V) (Figura III.5).

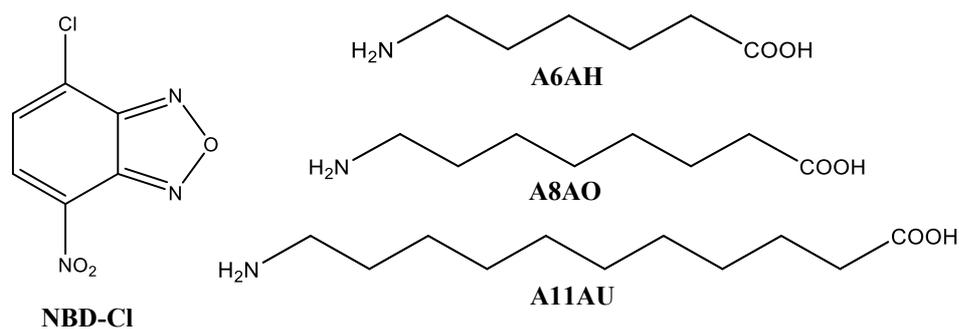


Figura III.5. Estructuras de reactivos utilizados.

Así, la adecuada reacción de conjugación de esta etiqueta fluorescente (NBD-Cl), tres ω -aminoácidos (A6AH, A8AO y A11AU) y cinco productos naturales (AO, AM, ABO, ABM y COL), dieron lugar a 15 derivados conjugados, numerados del **1-15** (Figura III.6 y III.7).

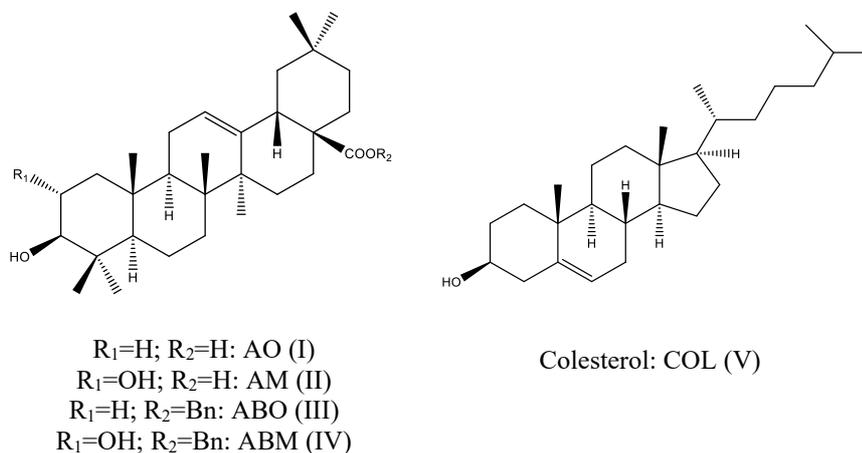


Figura III.6. Estructuras de los productos naturales hidroxilados utilizados.

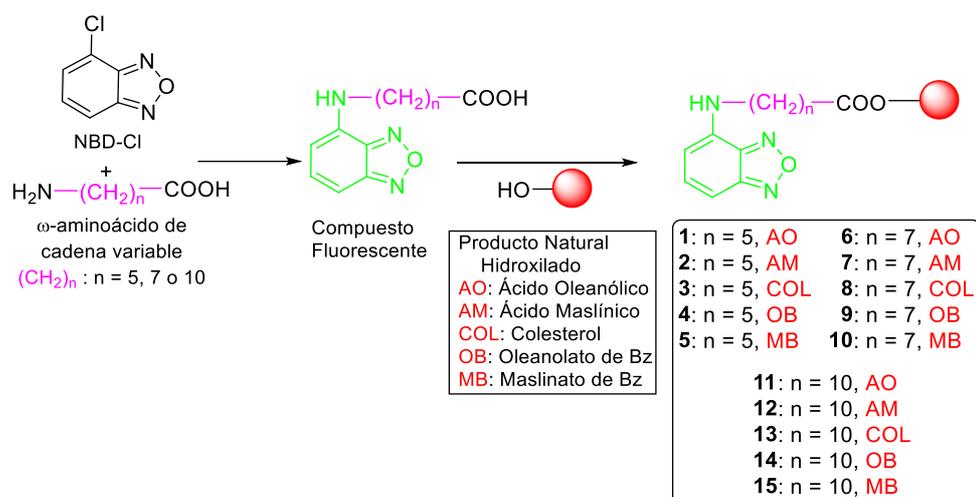


Figura III.7. Método general de etiquetado fluorescente de los productos naturales hidroxilados.

El reactivo usado como etiqueta fluorescente, cloruro de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), presenta espectros de ^1H y ^{13}C RMN muy sencillos, en los que se aprecian sólo dos señales de grupos metilos aromáticos. En el espectro de ^1H RMN se observa un sistema AB con

dobletes centrados a 7.68 y 8.48 ppm ($J = 7.6$ Hz). Estas señales se correlacionan con las señales a δ_C 130.7 y 128.7, respectivamente.

Además, se aprecian, en el espectro de ^{13}C RMN, las señales de otros cuatro carbonos cuaternarios a δ_C 149.6, 143.0, 135.7 y 131.4. Antes de empezar con la síntesis de derivados de NBD- con los productos naturales elegidos, se realizó una prueba, uniendo el reactivo NBD-Cl con el conector ácido 6-aminoundecanoico (NBD-A11AU). Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN de este intermedio presentan las señales características del sistema AB característico del grupo NBD- a 8.49 ppm (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-6') y 6.17 ppm (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-5').

Que correlacionan con las señales de los correspondientes carbonos metílicos δ_C 136.7 (C-6') y δ_C 98.7 (C-5'). Se aprecia también la señal del protón del NH del grupo amida que se ha formado, a δ_H 6.32 (1H, m). Por otra parte, los protones y carbonos más desapantallados de la cadena del aminoácido aparecen a δ_H 3.67 (H-11) y 2.35 (H-2) y a δ_C 44.1 (C-11) y 34.9 (C-2). En el espectro de ^{13}C RMN, también se observa la señal del grupo carboxilo libre del aminoácido a 179.0 ppm (C-1).

Una vez realizada esta prueba, y de acuerdo con el protocolo antes comentado, se hacen reaccionar sucesivamente NBD-Cl, A6AH y AO, sin purificar los intermedios, obteniéndose el derivado **1**, (NBD-A6AH-AO). Este derivado **1** presenta una fórmula molecular $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_7$ que corresponde con una masa molar de 732 Dalton y que justifica la unión del NBD- al grupo amino del A6AH y la esterificación de éste por el grupo carboxilo del aminoácido con el grupo hidroxilo de C-3 de AO. Los datos espectroscópicos de RMN de este derivado **1**, confirman esta estructura.

Por una parte, en el espectro de ^1H RMN, se observa el sistema AB de los protones aromáticos del grupo NBD, a 8.49 y 6.18 ppm (2H, d, $J =$

8.5 Hz, H-5 y H-6). Estos protones muestran correlación con las señales a δ_C 98.7 y 136.6, respectivamente, en el espectro de HSQC.

En el espectro de ^{13}C RMN, además de los metinos (C-5 y C-6), aparecen cuatro carbonos cuaternarios. Es de destacar en este espectro que, el metino de C-5, que en el reactivo NBD-Cl se sitúa a 130.7 ppm, se apantalla hasta 98.7 ppm en el derivado **1**. Este valor de C-5 se repite siempre en todos los NBD-derivados que se han sintetizado. Respecto a la cadena del A6AH, aparecen como señales más significativas las más desapantalladas y que corresponden a los extremos de la cadena, posiciones C-2 y C-6.

Así, a δ_H 3.52 (2H-6) y δ_H 2.35 (2H-2) se observan dos señales que aparecen como multipletes y que correlacionan con los carbonos metilénicos a δ_C 43.8 (C-6) y δ_C 34.5 (C-2). La parte del triterpeno se manifiesta con sus señales típicas de ^1H y ^{13}C RMN, destacando el desplazamiento del protón geminal al grupo hidroxilo de C-3 que se sitúa a 4.52 ppm (1H, dd, $J_1 = 6.0$ y $J_2 = 8.0$ Hz) muy desapantallada con respecto a la correspondiente de AO (δ_H 3.23), donde el hidroxilo no está esterificado. Finalmente, comentar que el desplazamiento químico de C-3 (δ_C 81.2), también indica que el grupo hidroxilo de esta posición se ha unido al grupo carboxilo de NBD-A6AH formando un enlace éster.

El derivado **2**, NBD-A6AH-AM, obtenido por reacción de NBD-Cl con A6AH y AM, presenta una masa molar de 748 Dalton, acorde con la fórmula molecular $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8$. Las señales de ^1H y ^{13}C RMN de este derivado **2** son similares a las del derivado **1**. La única diferencia estriba en que el ácido maslínico, tiene ahora dos grupos hidroxilo en C-2 y C-3, y es necesario determinar qué grupo hidroxilo se ha esterificado con el intermedio NBD-A6AH. Así, en el derivado **2**, se observa que la señal de H-2 se sitúa a δ_H 5.02 (ddd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 14.4$ Hz), mientras que en

AM se encuentra a 3.45 ppm, lo que indica que la esterificación ha tenido lugar en el grupo hidroxilo de C-2, lo que también se confirma por los valores de δ_C para C-2 (73.2 ppm en **2** y 68.2 ppm en AM).

El grupo hidroxilo de C-3 no se ha esterificado ya que la señal de su protón geminal aparece a 3.20 ppm (2.84 ppm en AM) y la señal de C-3 aparece a δ_C 83.2 (81.4 en AM). Esta esterificación en uno solo de los grupos hidroxilo se debe a un adecuado manejo de las cantidades estequiométricas utilizadas para todas las reacciones en las que se ha empleado el ácido maslínico.

Además, esto se facilita por el hecho de que el grupo hidroxilo esté bastante más impedido y menos accesible que el de C-2 para la reacción de esterificación, debido a la presencia del *gem*-dimetilo situado en la posición contigua de C-4.

El derivado **3** se obtuvo por reacción de NBD-Cl, A6AH y colesterol, y presentaba masa molar de 662 Dalton, concordante con la fórmula molecular $C_{39}H_{58}N_4O_5$. Las señales de 1H y ^{13}C RMN del derivado **3**, son acordes con lo previsto para las tres regiones de la molécula y, sólo cabe analizar los desplazamientos químicos de C-3 y del protón geminal al grupo hidroxilo de esta posición. Así, mientras en el colesterol H-3 está a 3.74 ppm, en el derivado **3** se sitúa a δ_H 4.65. Además, mientras que C-3 está a δ_C 72.1 en el colesterol, en este derivado aparece a 74.3 ppm. Estos desapantallamientos sufridos por H-3 y C-3 indican que, como era de esperar, el grupo hidroxilo de esta posición se ha unido al grupo al grupo carboxilo del aminoácido A6AH mediante un enlace éster.

Los derivados conjugados **4** y **5**, presentan señales de 1H y ^{13}C RMN muy similares a las de los espectros de los derivados **1** y **2**, respectivamente. La única diferencia entre ambas parejas de compuestos son las señales del

grupo bencilo presentes en **4** y **5**, ya que estos derivados fueron obtenidos por reacción de NBD-Cl, A6AH y el ácido 28-bencil oleanólico (ABO) o el ácido 28-bencil maslínico (ABM).

En este sentido, además de las señales características de un anillo aromático, aparecen las señales de un grupo metileno en torno a δ_H 5.00 y δ_C 66.1. Por último, los desplazamientos químicos de C-28 en los derivados triterpénicos bencilados presentan valores en torno a 177.5 ppm, mientras que, en los derivados con grupo carboxilo libre, dicho carbono aparece alrededor de 183-184 ppm.

Los derivados conjugados **6-10** se obtuvieron de forma similar a los derivados **1-5**, pero empleando ahora como linker un ω -aminoácido de cadena más larga, el ácido 8-aminooctanoico (A8AO). Todas las señales de los espectros de 1H y ^{13}C RMN de estos compuestos, **6-10**, son acordes con las estructuras propuestas. Caben destacar los grupos metilenos de los extremos de la cadena del A8AO (C-8 y C-2), cuyos hidrógenos se sitúan alrededor de 3.50 y 2.30 ppm, respectivamente, y sus correspondientes carbonos en torno a δ_C 44.0 y 34.5.

Finalmente, los derivados **11-15** se formaron del mismo modo, pero empleando como linker un aminoácido de cadena aún mayor, el ácido 11-aminoundecanoico (A11AU). De nuevo, en este las únicas señales que son diferentes son las de los dos grupos metilenos de los extremos de la cadena de A11AU (C-11 y C-2), que están situados alrededor de δ_H 3.4 y 2.30 y δ_C 44.0 y 34.5, respectivamente.

III.3.2. PROPIEDADES ÓPTICAS

Se han estudiado mediante espectroscopía de absorción y fluorescencia las propiedades ópticas de las sondas de los AO-, AM- y colesterol-NBDs derivados semisintetizados.

Los valores de longitud de onda de los máximos de absorción (λ_{abs}), la longitud de onda la emisión de fluorescencia (λ_{em}), el coeficiente de extinción (ϵ), el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_{F}) y el tiempo de vida media de fluorescencia (τ) se indican en la Tabla III.1 (con el patrón NBD-Cl y los 15 derivados).

Las tablas de compuestos seleccionados, Tabla III.2 (con los tres derivados del esteroide colesterol), Tabla III.3 (con los 6 derivados de AO y AM) y Tabla III.4 (con los derivados bencilados de AO y AM).

Si analizamos los resultados de la Tabla III.1 con los resultados para los tres NBD-derivados de colesterol, podemos observar que la longitud de la cadena hidrocarbonada del aminoácido, situada entre el grupo NBD y el triterpeno, tiene cierta influencia sobre la longitud de onda de absorción y la longitud de onda de emisión, de forma que mientras λ_{abs} va disminuyendo conforme aumenta dicha longitud, λ_{em} aumenta con ella. Se aprecia también que el coeficiente de extinción molar aumenta, pero el rendimiento cuántico y el tiempo de vida media disminuyen conforme la cadena se hace más larga.

El efecto de la longitud de la cadena del aminoácido influye también sobre las propiedades ópticas de los NBD-derivados de AO y AM (Tabla III.1). En ambos casos, se observa que los máximos de absorción y de emisión no se ven afectados por la longitud de la cadena del aminoácido, sin embargo, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida disminuyen con dicha longitud.

La variación de las propiedades ópticas de los NBD-derivados de bencil-AO y bencil-AM vienen indicadas en la Tabla III.1. También en este caso, en general se observa que mientras los máximos de absorción y de emisión no varían, el rendimiento cuántico y el tiempo de vida media disminuyen.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que, desde el punto de vista de la fluorescencia, tanto en los derivados bencilados como en no bencilados de AO y AM, no resulta interesante aumentar la cadena del aminoácido puesto que se reducen tanto el rendimiento cuántico como el tiempo de vida media del derivado en cuestión.

Tabla III.1. Propiedades ópticas de absorción y fluorescencia de NBD-derivados 1-15

| Tipo de Compuesto | Compuesto | (λ abs) max (nm) | (λ em) max (nm) | ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) | Φ | τ (ns) |
|--------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------|-------------|
| Reactivo | NBD-Cl | 471 | 557 | 369 | --- | --- |
| Derivados de AO | NBD6AO (1) | 480 | 546 | 2539 | 0.76 | 7.712 |
| | NBD8AO (6) | 480 | 545 | 1144 | 0.73 | 7.654 |
| | NBD11AO (11) | 481 | 546 | 1015 | 0.71 | 7.635 |
| Derivados de AM | NBD6AM (2) | 480 | 546 | 3166 | 0.71 | 7.681 |
| | NBD8AM (7) | 481 | 546 | 1986 | 0.55 | 7.621 |
| | NBD11AM (12) | 481 | 546 | 1199 | 0.45 | 7.153 |
| Derivados del colesterol | NBD6C (3) | 482 | 544 | 1111 | 0.72 | 7.831 |
| | NBD8C (8) | 480 | 546 | 1345 | 0.98 | 7.684 |
| Derivados del AOBn | NBD11C (13) | 478 | 544 | 1762 | 0.43 | 7.659 |
| | NBD6AOBn (4) | 480 | 545 | 4035 | 0.67 | 7.761 |
| | NBD8AOBn (9) | 480 | 547 | 2645 | 0.71 | 7.724 |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------|-----|-----|------|------|-------|
| Derivados del AMBn | NBD11AOBn (14) | 480 | 546 | 2718 | 0.49 | 7.645 |
| | NBD6AMBn (5) | 480 | 545 | 1338 | 0.72 | 7.650 |
| | NBD8AMBn (10) | 481 | 548 | 3358 | 0.59 | 7.639 |
| | NBD11AMBn (15) | 480 | 546 | 2710 | 0.46 | 7.633 |

Para analizar el efecto de la bencilación del triterpeno sobre las propiedades ópticas se ha agrupado los derivados bencilados y no bencilados de AO y AM en la Tabla III.2. Si comparamos los tres derivados de AO con el carboxilo libre con los tres que tienen el carboxilo bencilado, se puede observar que los máximos de absorción no se ven afectados, mientras que, rendimiento cuántico disminuye y el tiempo de vida media y el coeficiente de extinción molar aumentan. Este último resultado era de esperar teniendo en cuenta la absorción del anillo aromático del bencilo.

TABLA III.2. Propiedades ópticas de absorción y fluorescencia comparativas de NBD-derivados con y sin bencilación.

| Tipo de Compuesto | Compuesto | (λ abs) max (nm) | (λ em) max (nm) | ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) | Φ | τ (ns) |
|-------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------|-------------|
| AO | NBD6AO (1) | 480 | 546 | 2539 | 0.76 | 7.712 |
| | NBD6AOBn (4) | 480 | 545 | 4035 | 0.67 | 7.761 |
| | NBD8AO (6) | 480 | 545 | 1144 | 0.73 | 7.654 |
| | NBD8AOBn (9) | 480 | 547 | 2645 | 0.71 | 7.724 |
| | NBD11AO (11) | 481 | 546 | 1015 | 0.71 | 7.635 |
| | NBD11AOBn (14) | 480 | 546 | 2718 | 0.49 | 7.645 |

| | | | | | | |
|----|----------------|-----|-----|------|------|-------|
| AM | NBD6AM (2) | 480 | 546 | 3166 | 0.71 | 7.681 |
| | NBD6AMBn (5) | 480 | 545 | 1338 | 0.72 | 7.650 |
| | NBD8AM (7) | 481 | 546 | 1986 | 0.55 | 7.621 |
| | NBD8AMBn (10) | 481 | 548 | 3358 | 0.59 | 7.639 |
| | NBD11AM (12) | 481 | 546 | 1199 | 0.45 | 7.153 |
| | NBD11AMBn (15) | 480 | 546 | 2710 | 0.46 | 7.633 |

Para las parejas de derivados bencilados y no bencilados de AM (Tabla III.6), se aprecia de nuevo que los máximos de absorción y emisión no se ven afectados, pero el rendimiento varía muy poco, y el tiempo de vida media y el coeficiente de extinción molar aumentan al bencilar los triterpenos naturales AO y AM.

En la Figura III.7 se pueden observar los espectros normalizados de absorción del NBD-Cl y de NBD6AO (1) en solución de DMSO. En esta figura se puede apreciar la diferencia en la longitud de onda de absorción mucho menor del reactivo NBD-Cl con respecto al derivado en el cual el grupo NBD se ha unido al aminoácido A6AH y al AO.

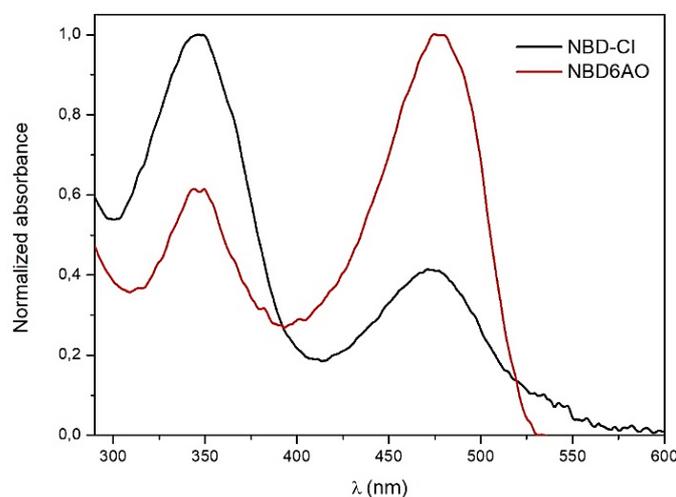


Figura III.7. Espectro normalizado de absorción de NBD-Cl y NBD6AO (1)

La Figura III.8 muestra el espectro de fluorescencia de los derivados NBD8AOBn (**9**) y NBD11AOBn (**14**) a 50 μM en solución de DMSO. Es de destacar que el compuesto donde la cadena del aminoácido es más corta es más fluorescente.

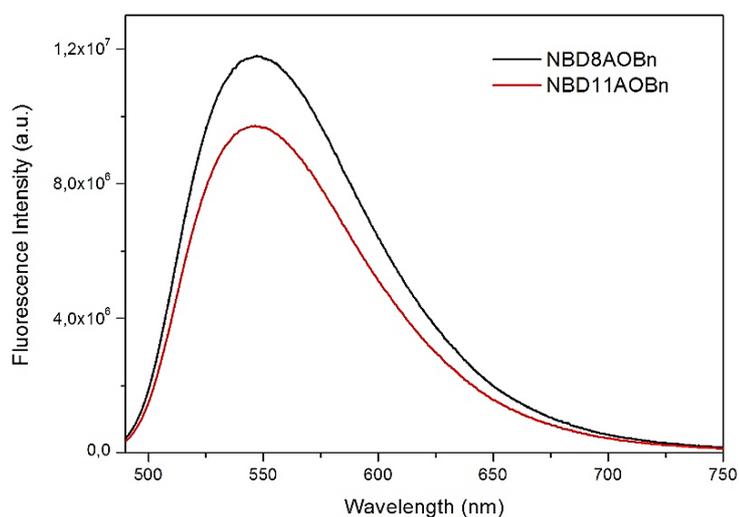


Figura III.8. Espectro de fluorescencia NBD8AOBn (**9**) y NBD11AOBn (**14**) a 50 μM en DMSO.

La figura III.9 presenta el espectro de los derivados NBD6AO (**1**) y NBD6AM (**2**) donde se aprecia que el derivado del ácido oleanólico es más fluorescente que el del ácido maslínico. La misma tendencia fue observada para el resto de los derivados.

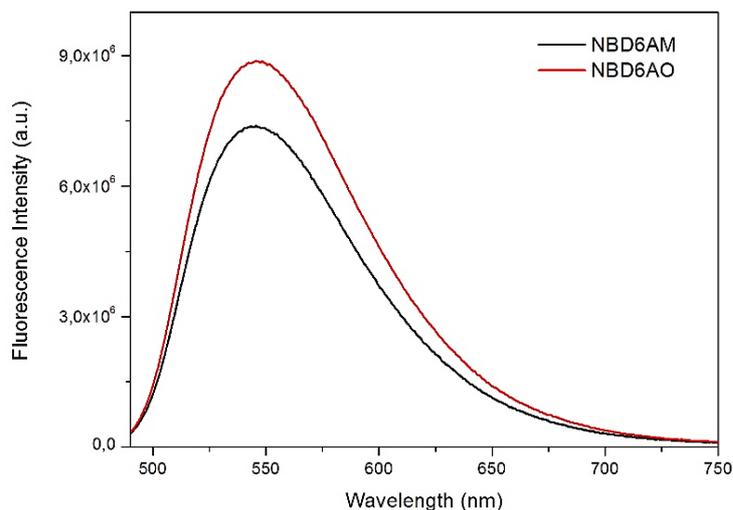


Figure III.9. Espectro de fluorescencia de NBD6AO (1) y NBD6AM (2) a 55 μ M en DMSO.

Los NBD-derivados sintetizados poseen una banda de longitud de onda máxima en un rango de 400-520 nm, con máximo bien pronunciado alrededor de 480 nm. Este máximo es menos importante para el NBD-Cl, aparece a 471 nm y presenta una banda de absorción máxima en un rango 300-400 nm. Como se puede observar en la Tabla 1, las longitudes de onda de los máximos de absorción y de emisión difieren muy poco para todos los derivados.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que, desde el punto de vista de la fluorescencia, tanto en los derivados de AO y AM bencilados, como en los derivados de ellos no bencilados de AO y AM, y los derivados del colesterol, resulta contraproducente el alargamiento de la cadena del aminoácido.

Ello se debe a que este aumento de longitud conlleva una disminución del rendimiento cuántico, con lo cual baja la eficacia de la fluorescencia y una reducción generalizada del tiempo de vida media del derivado en cuestión, que supone un decaimiento más brusco de la fluorescencia. De igual manera, analizando los resultados de los compuestos NBD-derivados de AO y AM con

los dos correspondientes derivados bencilados, se puede deducir que la bencilación de AO y AM no es aconsejable, puesto que, sobre todo en los derivados de AO, disminuye de nuevo el rendimiento cuántico.

III.3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA: EFECTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Se han examinado los efectos de los 15 NBD-derivados de AO, AM, AOBn, AMBn y colesterol sobre la proliferación de tres líneas celulares cancerígenas, a saber, B16-F10 (células de melanoma de ratón murino), HT29 (células de carcinoma humano de colon) y Hep G2, (células de carcinoma humano de hígado).

La viabilidad celular fue determinada por absorción del tinte formazan y se expresó como un porcentaje de células de control no tratadas. En estas tres líneas se determinó la concentración de compuestos requerida para que inhibición de crecimiento fuera la mitad (IC_{50}).

En primer lugar, y para poder hacer una comparativa de la efectividad de la derivatización del producto natural precursor, en la Tabla 3 se indican los valores de las IC_{50} s de los cinco compuestos de partida en su actuación sobre las tres líneas celulares cancerígenas ensayadas.

Como se puede observar el compuesto más citotóxico sobre las tres líneas es el reactivo usado como etiqueta fluorescente NBD-Cl, con IC_{50} en torno a 9 μ M, le sigue el AM-Bn con una IC_{50} comprendida entre 15 y 20 μ M, y a continuación el propio AM en torno a 30-40 μ M para B16-F10 y HT29 y alrededor de 100 μ M para Hep G2.

El precursor AO-Bn presenta también una IC_{50} entre 40-70 μM y los otros productos de partida, AO y colesterol tienen valores de IC_{50} más altos, considerablemente superiores a 100 μM .

Tabla III.3. Efectos inhibidores del crecimiento (IC_{50}) de los compuestos precursores sobre las células cancerígenas B16F10, HT29 y Hep G2.

| Precusores | B16-F10 | HT29 | Hep G2 |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| AO | 106.4 \pm 3.7 | 429.9 \pm 0.7 | 211.8 \pm 0.5 |
| AM | 36.2 \pm 2.5 | 32.2 \pm 3.8 | 99.2 \pm 5.5 |
| AO-Bn | 52.2 \pm 0.9 | 67.1 \pm 3.2 | 38.7 \pm 1.7 |
| AM-Bn | 19.0 \pm 0.2 | 15.3 \pm 0.5 | 17.0 \pm 0.1 |
| NBD-Cl | 8.3 \pm 0.1 | 9.0 \pm 1.1 | 8.4 \pm 0.2 |
| Colesterol | 136.1 \pm 3.6 | 169.8 \pm 2.7 | 195.1 \pm 2.3 |

Los resultados de la inhibición de la proliferación celular de los NBD-derivados de los cinco precursores antes citados se dan en la Tabla III.4 y en la Figura III.9. Se hace a continuación un estudio pormenorizado de los efectos de estos NBD-derivados, comparando sus valores de IC_{50} con los de sus correspondientes precursores (Figura III.10). Así, en el caso de los derivados de AO, prácticamente todos mejoran la IC_{50} del precursor (salvo en la línea B16-F10).

Es de destacar el efecto inhibitor del derivado **1**, que presenta un valor de IC_{50} muy bajo (2.4 μM) en la línea B16-F10 y valores bajos en HT29 (IC_{50} = 19.5) y en Hep G2 (IC_{50} = 13.9 μM), con respecto del precursor ácido oleanólico. El efecto de los derivados de AM es menos pronunciado ya que este ácido triterpénico tiene una IC_{50} más baja en las tres líneas celulares. No obstante, de nuevo el derivado **2**, de cadena de aminoácido más corta, presenta valores de IC_{50} bajos en las tres líneas celulares.

TABLA III.4. Efectos inhibidores del crecimiento de los NBD-derivados **1-15** sobre las células cancerígenas B16-F10, HT29 y Hep G2.

| Compuestos | B16-F10 | HT29 | Hep G2 |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 2.4 ± 0.1 | 19.5 ± 0.1 | 13.9 ± 0.5 |
| 2 | 4.9 ± 0.4 | 6.6 ± 0.1 | 12.5 ± 0.1 |
| 3 | 73.5 ± 2.2 | 116.7 ± 1.3 | 40.3 ± 1.5 |
| 4 | 76.6 ± 3.7 | 63.3 ± 2.4 | 74.2 ± 0.7 |
| 5 | 96.4 ± 0.9 | 120.7 ± 4.0 | 91.2 ± 2.3 |
| 6 | 136.8 ± 2.0 | 105.4 ± 1.2 | 95.7 ± 3.4 |
| 7 | 39.4 ± 0.7 | 45.1 ± 0.9 | 98.4 ± 0.8 |
| 8 | 111.6 ± 1.2 | 78.0 ± 1.9 | 72.1 ± 2.5 |
| 9 | 74.2 ± 2.1 | 95.9 ± 2.2 | 71.6 ± 1.7 |
| 10 | 96.8 ± 1.8 | 122.8 ± 1.7 | 95.3 ± 0.7 |
| 11 | 101.1 ± 0.9 | 101.1 ± 0.9 | 84.5 ± 0.4 |
| 12 | 107.6 ± 0.4 | 109.8 ± 5.2 | 122.7 ± 0.9 |
| 13 | 142.3 ± 1.6 | 107.1 ± 0.4 | 97.6 ± 0.9 |
| 14 | 92.3 ± 1.5 | 100.9 ± 1.0 | 82.7 ± 2.5 |
| 15 | 80.8 ± 0.9 | 108.3 ± 3.8 | 80.9 ± 1.1 |

Sin embargo, todos los NBD-derivados de AOBn y AMBn, (**4**, **5**, **9**, **10**, **14** y **15**) tienen actividades inhibitoras peores que sus precursores, con IC₅₀ en el rango 80-120 μM, bastante superiores a los productos naturales de partida.

Por último, los derivados del colesterol, **3**, **8** y **13**, presentan valores de IC₅₀ bastante altos en las tres líneas celulares cancerígenas, aunque siempre inferiores a los de su precursor, colesterol, que es muy tóxico en las mismas.

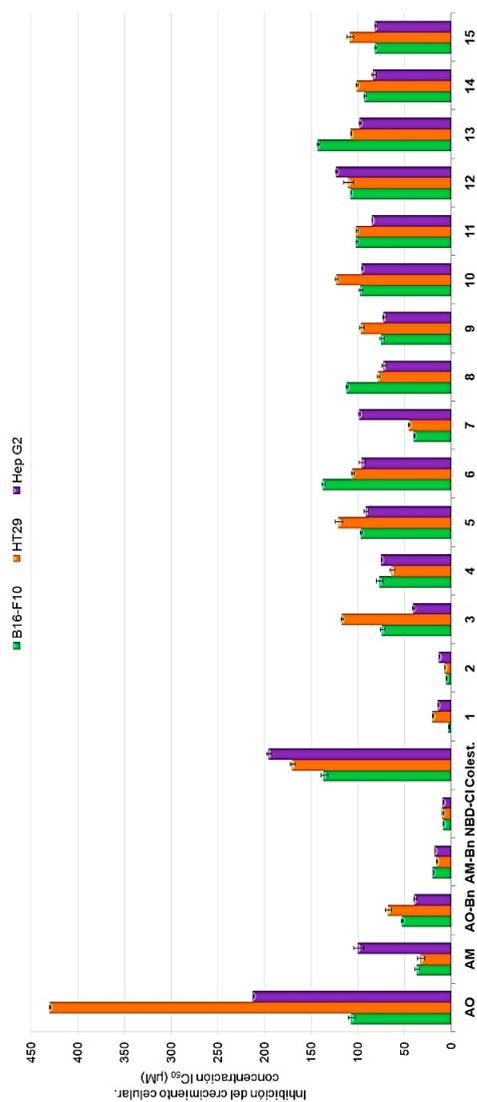


Figura III.10. Representación gráfica de los valores de IC_{50} de los NBD-derivados y de los correspondientes precursores.

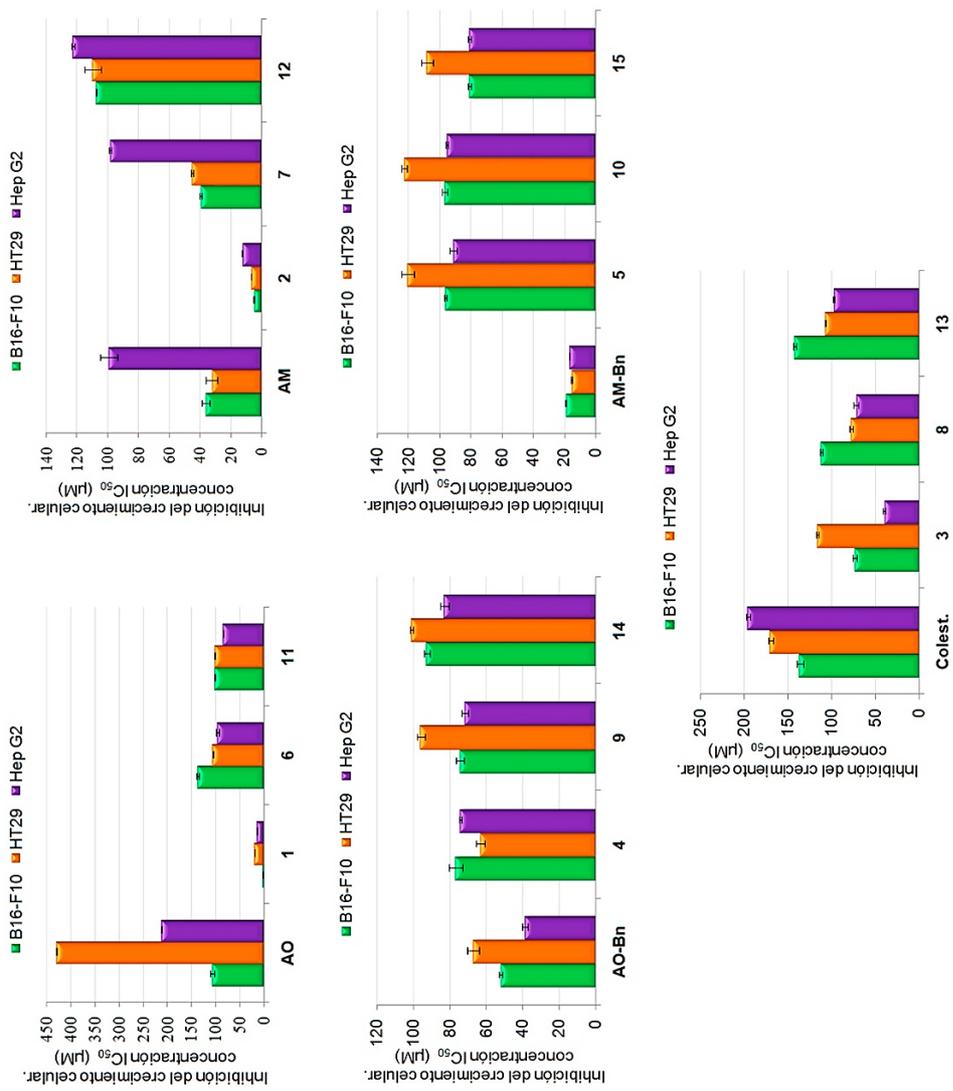


Figura III.11. Estudio comparativo de los valores de IC_{50} de los derivados con sus precursores.

III.4. CONCLUSIONES

Se han obtenido 15 NBD-derivados (**1-15**) de los ácidos oleanólico y maslínico, sus 28-bencil derivados y el colesterol, mediante un protocolo general que permite poner una etiqueta fluorescente en la posición 2 o 3 del compuesto natural hidroxilado. Las síntesis se han llevado a cabo, con buen rendimiento, uniendo al grupo hidroxilo del compuesto natural el grupo NBD, mediante un linker de tipo ω -aminoácido con distinta longitud de cadena. Las propiedades físico-químicas y espectroscópicas de los derivados **1-15** formados confirman las estructuras químicas antes comentadas para los mismos.

Los NBD-derivados así obtenidos se han estudiado por sus propiedades ópticas y su acción inhibidora sobre la proliferación de tres líneas celulares cancerígenas.

Según los resultados de fluorescencia, los mejores valores de las variables de esta propiedad, rendimiento cuántico y tiempo de vida media, se obtienen cuando el ω -aminoácido que hace de linker entre el grupo NBD- y el producto natural hidroxilado, tiene la cadena más corta de 6 carbonos y el grupo carboxilo de C-28 del triterpeno se encuentra libre en lugar de bencilado.

En lo referente a la actividad biológica de los compuestos conjugados **1-15**, se puede decir que el etiquetado fluorescente de los productos naturales, afecta sensiblemente a su acción inhibidora sobre la proliferación de las líneas celulares cancerígenas B16-F10, HT29 y Hep G2. Dicho efecto es relevante casi exclusivamente cuando, de nuevo, el ω -aminoácido es de cadena corta y el PNH es el ácido oleanólico o el ácido maslínico, presentando IC_{50} muy bajas y próximas a la escala nanomolar.

Posteriormente, el acetonitrilo se evaporó a presión reducida, el pH de la mezcla de reacción acuosa se ajustó aproximadamente 2.0 (usando HCl 1 N) y luego se concentró hasta sequedad. El crudo sólido, de color naranja intenso, se disolvió nuevamente en una cantidad mínima de acetonitrilo y se secó nuevamente. Después de eso, en el mismo matraz, se llevó a cabo el acoplamiento de Yamaguchi añadiendo, al sólido bruto seco, el triterpeno hidroxilado (AO, AM, AOBn, AMBn) o el colesterol (0.75 mmol), disuelto en THF anhidro bajo una atmósfera inerte y con agitación. Luego, se añadieron, sucesivamente, gota a gota a la mezcla de reacción cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (1.0 mmol) y trietilamina anhidra (1.0 mmol). Después de 5 minutos, se añadió 4-dimetilaminopiridina (1.0 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó durante 12 h. La reacción se detuvo agregando unas gotas de agua. Finalmente, la mezcla de reacción se concentró a vacío hasta sequedad, y los diferentes derivados de NBD se purificaron en una columna flash de gel de sílice, utilizando mezclas de Cl_2CH_2 y acetona de polaridad creciente.

Compuesto 1, 81% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +11$ (c 1, CHCl_3); IR(film) ν_{max} 3317, 2924, 1727, 1531, 1506, 1462, 1261, 1163, 1017, 736 cm^{-1} . Compuesto 2, 76% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +26$ (c 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3314, 2925, 1697, 1531, 1498, 1453, 1275, 1162, 1031, 739 cm^{-1} . Compuesto 3, de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +8$ (c 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3330, 3074, 2922, 1732, 1530, 1497, 1457, 1276, 1189, 1028, 720 cm^{-1} . Compuesto 4, 82% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +22$ (c 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3349, 3066, 2925, 1723, 1581, 1455, 1255, 1158, 1029, 750 cm^{-1} . Compuesto 5, 77% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +29$ (c 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3322, 3065, 2944, 1718, 1581, 1448, 1259, 1159, 1015, 736 cm^{-1} .

Compuesto 6, 83% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +28$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3316, 2925, 1723, 1531, 1499, 1447, 1275, 1186, 1010, 739 cm^{-1} . Compuesto 7, 74% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +20$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3315, 2925, 1695, 1530, 1498, 1448, 1260, 1158, 1030, 738 cm^{-1} . Compuesto 8, 92% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D -14$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3327, 3076, 2930, 1731, 1530, 1497, 1456, 1274, 1170, 1028, 739 cm^{-1} . Compuesto 9, 85% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +40$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3321, 3063, 2929, 1721, 1580, 1447, 1262, 1158, 1030, 737 cm^{-1} . Compuesto 10, 81% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +11$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3321, 3063, 2929, 1717, 1581, 1448, 1261, 1157, 1030, 735 cm^{-1} . Compuesto 11, 83% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +40$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3319, 2926, 1727, 1581, 1506, 1447, 1275, 1147, 1034, 749 cm^{-1} . Compuesto 12, 72% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +14$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3329, 2927, 1725, 1582, 1500, 1447, 1274, 1152, 1014, 735 cm^{-1} . Compuesto 13, 89% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D -14$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3320, 3075, 2928, 1730, 1530, 1501, 1446, 1276, 1174, 1029, 741 cm^{-1} . Compuesto 14, 86% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +34$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3322, 2927, 1721, 1580, 1447, 1275, 1158, 1011, 738 cm^{-1} . Compuesto 15, 84% de rendimiento, sirupo naranja; $[\alpha]^{20}_D +13$ (*c* 1, CHCl_3); IR (film) ν_{max} 3321, 2927, 1717, 1580, 1448, 1275, 1158, 1014, 738 cm^{-1} .

III.5.3. METODOLOGÍA GENERAL DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Los espectros UV-visible se obtuvieron con un espectrofotómetro BioSpectronic Kinetic (Eppendorf, Germany). Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un fluorímetro FluoroMax-4 (Horiba, Jobin Yvon). Este dispositivo está equipado con una lámpara de Xenon de 150-W y dispone de una célula peltier para el control de la temperatura. Los espectros de fluorescencia de los diferentes compuestos se obtuvieron a la longitud de onda de excitación de 480 nm, que corresponde al máximo de absorción.

El tiempo de vida media del estado excitado de las muestras, se obtuvo a partir de medidas de fluorescencia en tiempo resuelto, utilizando para ello un fluorímetro LifeSpec II (Edinburgh Instruments, Ltd). Este dispositivo dispone de un láser pulsado de 485 nm, con un periodo de 100 ns. La emisión se recogió a la longitud de onda máxima. Los resultados fueron analizados con el software que dispone el dispositivo. Para todas las muestras, la respuesta del dispositivo fue recogida midiendo la dispersión de luz de una muestra de suspensión Ludox. Las curvas de decaimiento fueron ajustadas a una exponencial del tipo:

$$I(t) = \sum_i A_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

donde A_i es el factor pre-exponencial para el término i cuyo tiempo de vida media es τ_i . Para todas las muestras estudiadas, el mejor ajuste se llevó a cabo con una exponencial simple, siendo en todos los casos $\chi^2 \leq 1.05$.

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) se determinó mediante el método comparativo, utilizando Cumarina 6 como estándar in solución etanólica ($\Phi_F = 0.78$). La siguiente expresión se utilizó para tal fin.⁴¹

$$\Phi_f = \Phi_r \frac{F_f A_r n_f^2}{F_r A_f n_r^2}$$

siendo F el área encerrada bajo la curva del espectro de fluorescencia corregido, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación y n es el índice de refracción del disolvente. Los subíndices r y f corresponden a la Cumarina 6 y a la muestra, respectivamente. Todos los estudios se realizaron a 25°C y usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. El disolvente utilizado fue DMSO.

III.5.4. METODOLOGÍA GENERAL DE PRUEBAS BIOLÓGICAS.

Los diferentes compuestos y derivados empleados en los tratamientos celulares fueron disueltos antes de su uso en DMSO a una concentración de 5 mg/mL, constituyendo las soluciones Stock, almacenadas a -20°C. Antes de cada experimento, estas soluciones se diluyeron en medio de cultivo celular a las concentraciones adecuadas para la realización de cada ensayo celular.

Se utilizaron tres líneas celulares tumorales para la realización de los ensayos. Células de melanoma de ratón B16-F10 (ATCC No. CRL-6475), línea tumoral de adenocarcinoma de colon humano HT29 (ECACC: 91072201) y línea tumoral de hepatocarcinoma humano Hep G2 (ECACC: 85011430). Fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor y gentamicina, siendo incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95 % de humedad.

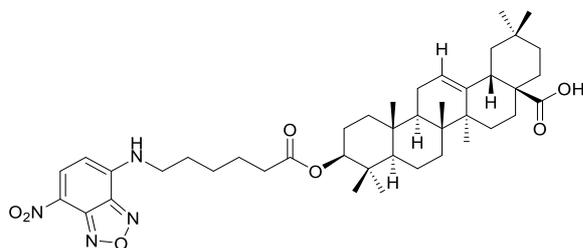
El efecto de los compuestos sintetizados sobre la viabilidad de las células tumorales se realizó mediante el ensayo MTT, basado en la capacidad que tienen las células vivas en reducir metabólicamente el bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazol dando formazan, compuesto coloreado con un máximo de absorbancia de 570 nm. Para estudiar los efectos citotóxicos de los compuestos sobre las tres líneas celulares tumorales, se sembraron las distintas líneas en placas de 96 pocillos con una densidad celular por pocillo de $5 \cdot 10^3$ para B16-F10, $6 \cdot 10^3$ para HT29 y $15 \cdot 10^3$ para Hep G2. Una vez sembradas las placas, se dejaron crecer durante 24 horas y posteriormente fueron tratadas por triplicado con los distintos compuestos a diferentes concentraciones (0-200 $\mu\text{g/mL}$) durante 72 horas.

Pasado el tiempo, las células se tiñeron agregando 100 μL de MTT (0,5 mg/mL) por pocillo y se incubaron durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron con una solución salina con fosfato (PBS) y el formazan fue resuspendido en 100 μL de DMSO por pocillo. La viabilidad celular se midió por absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA (Tecan Sunrise MR20-301, TECAN, Austria).

Los resultados se obtuvieron por análisis de regresión estadística y no lineal para la determinación de la concentración a la cual los distintos compuestos reducen la población celular a la mitad (IC_{50}). Se utilizó el software Sigmaplot 12.5. Todos los datos cuantitativos se expresaron como las medias \pm desviación estándar (DE). Todos los datos mostrados fueron representativos de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado.

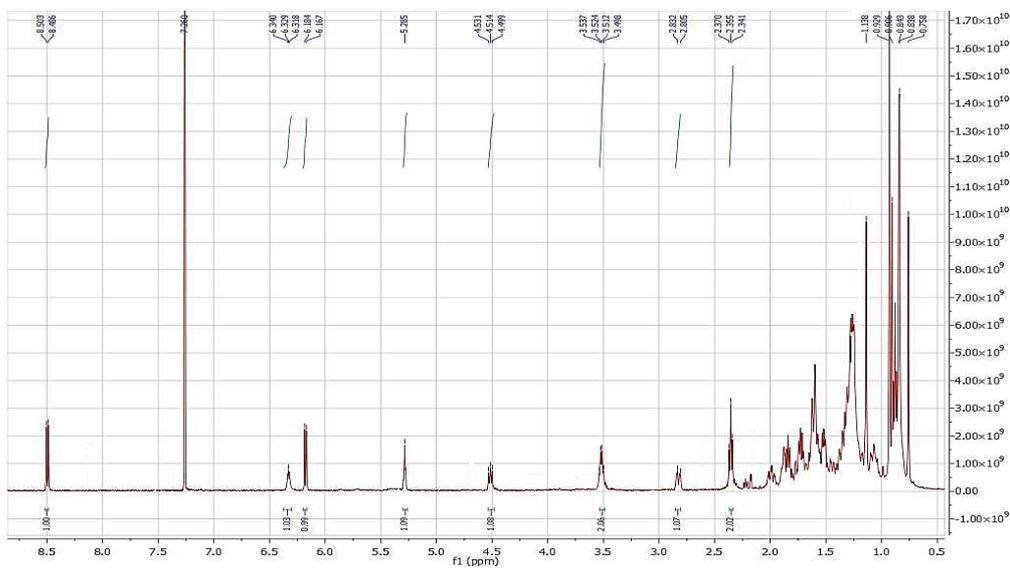
III.6. ESPECTROS DE RMN Y VALORES HRMS

Compuesto 1: NBD6AO

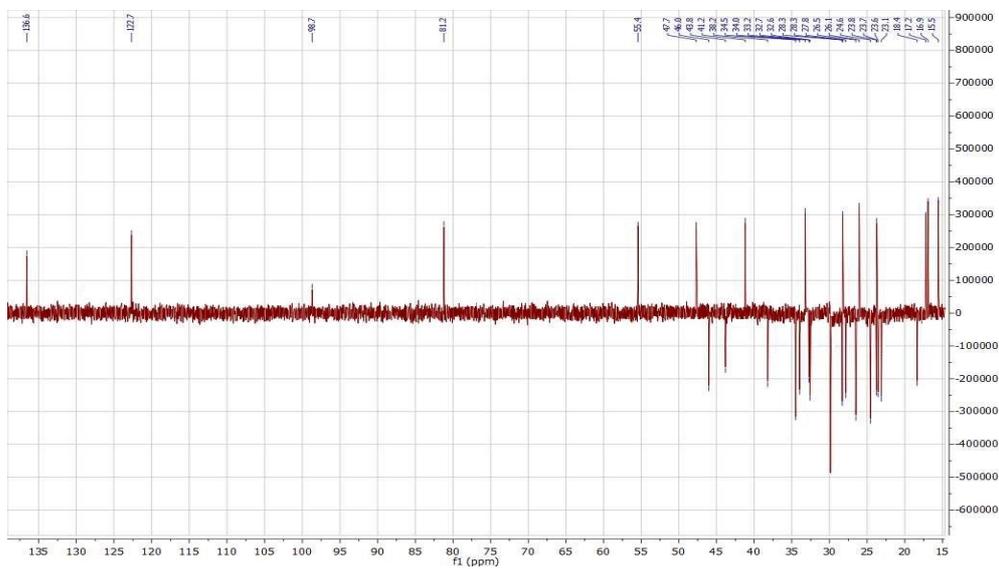


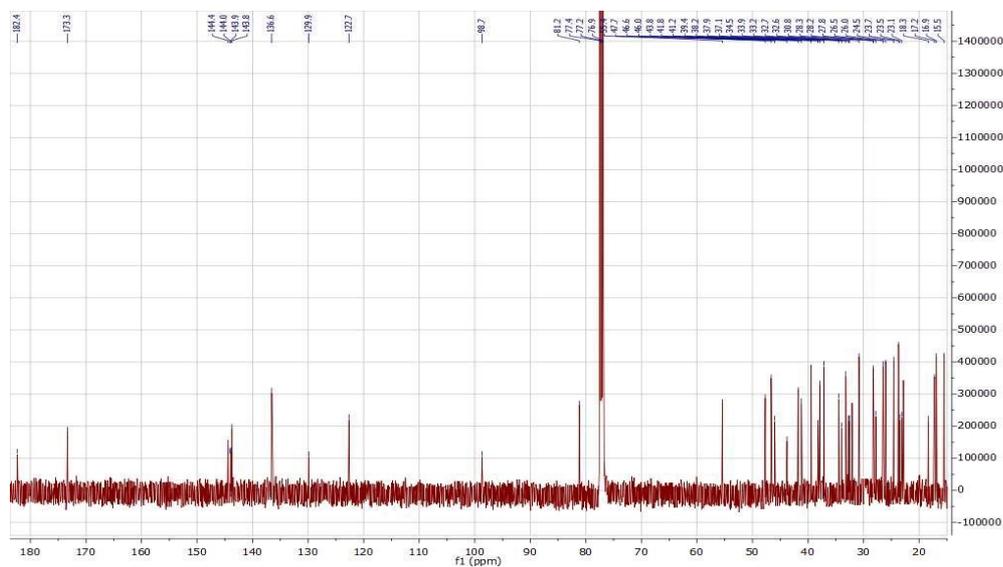
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.33 (m, 1H), 6.18 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.28 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 4.52 (dd, $J_1 = 6.0$, $J_2 = 8.5$ Hz, 1H), 3.52 (m, 2H), 2.81 (dd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 9.5$ Hz, 1H), 2.35 (m, 2H), 1.14, 0.93, 0.91, 0.88, 0.84, 0.83, 0.76 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 182.4, 173.3, 144.4, 144.0, 143.9, 143.8, 136.6, 129.9, 122.7, 98.7, 81.2, 55.4, 47.7, 46.6, 46.0, 43.8, 41.8, 41.2, 39.4, 38.2, 37.9, 37.1, 34.5, 33.9, 33.2, 32.7, 32.6, 30.8, 28.3, 28.2, 27.8, 26.5, 26.0, 24.5, 23.7, 23.7, 23.5, 23.1, 18.3, 17.2, 16.9, 15.5; HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$, 755.4360; encontrada, 755.4351.

^1H RMN

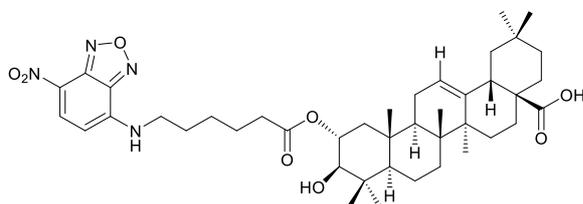


¹³C RMN





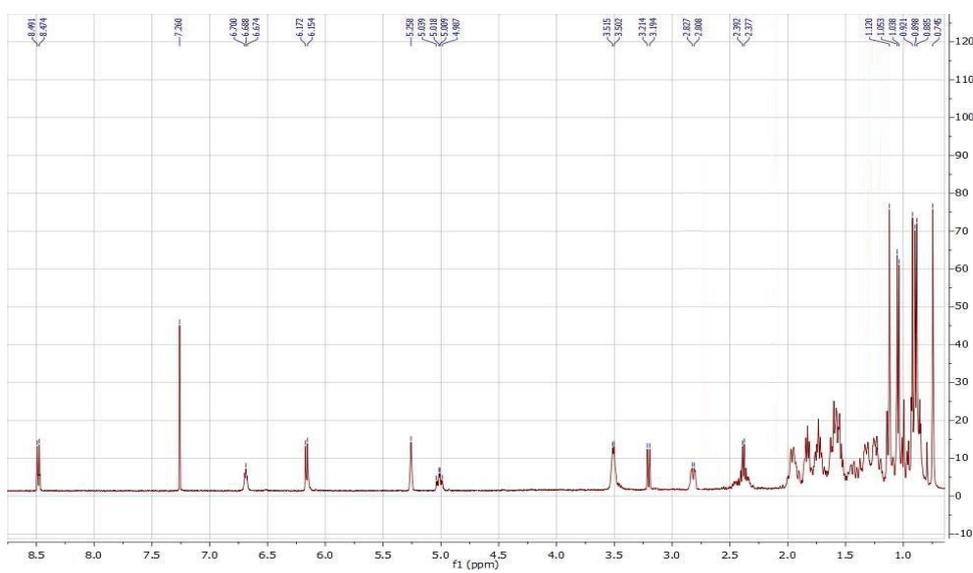
Compuesto 2: NBD6A



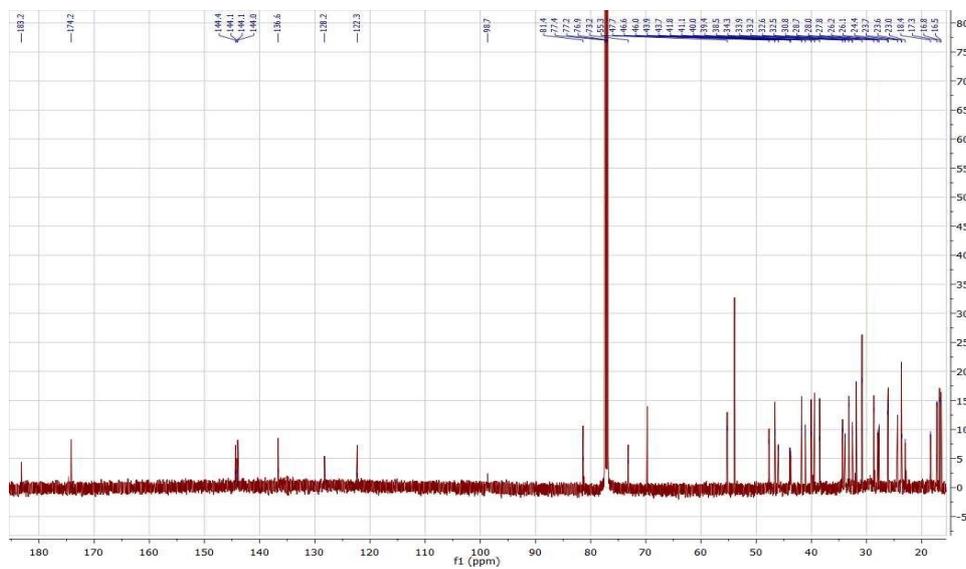
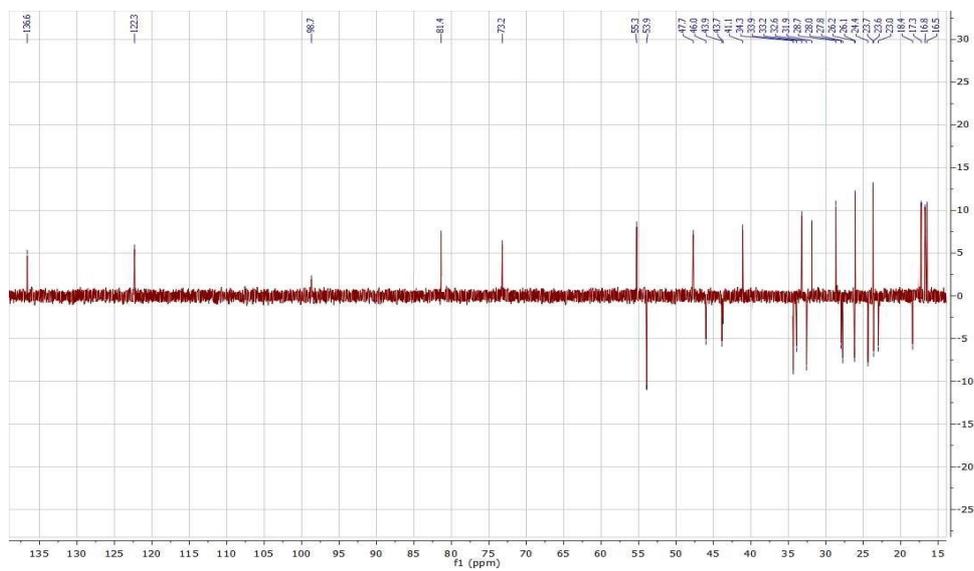
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.69 (m, 1H), 6.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.26 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 5.02 (ddd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 10.5$, $J_3 = 14.5$ Hz, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.20 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 10.0$ Hz, 1H), 2.38 (m, 2H), 1.12, 1.05, 1.04, 0.92, 0.90, 0.88, 0.75 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 183.2, 174.2, 144.4, 144.1, 141.1, 144.0, 136.6, 128.2, 122.3, 98.7, 81.4, 73.2, 55.3, 47.7, 46.6, 46.0, 43.9, 43.7,

41.8, 41.1, 40.0, 39.4, 38.5, 34.3, 33.9, 33.2, 32.6, 32.5, 30.8, 28.7, 28.0, 27.8, 26.2, 26.1, 24.4, 23.7, 23.6, 23.0, 18.4, 17.3, 16.8, 16.5; HRMS m/z : $[M + Na]^+$
 Calculada para $C_{42}H_{60}N_4O_8Na$, 771.4309, encontrada, 771.4307.

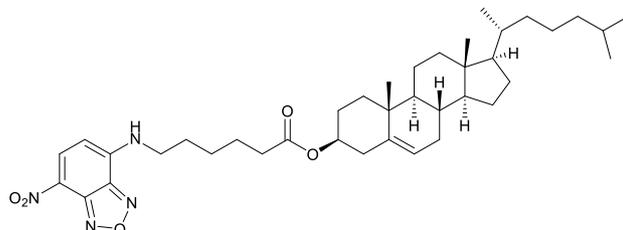
1H RMN



^{13}C RMN

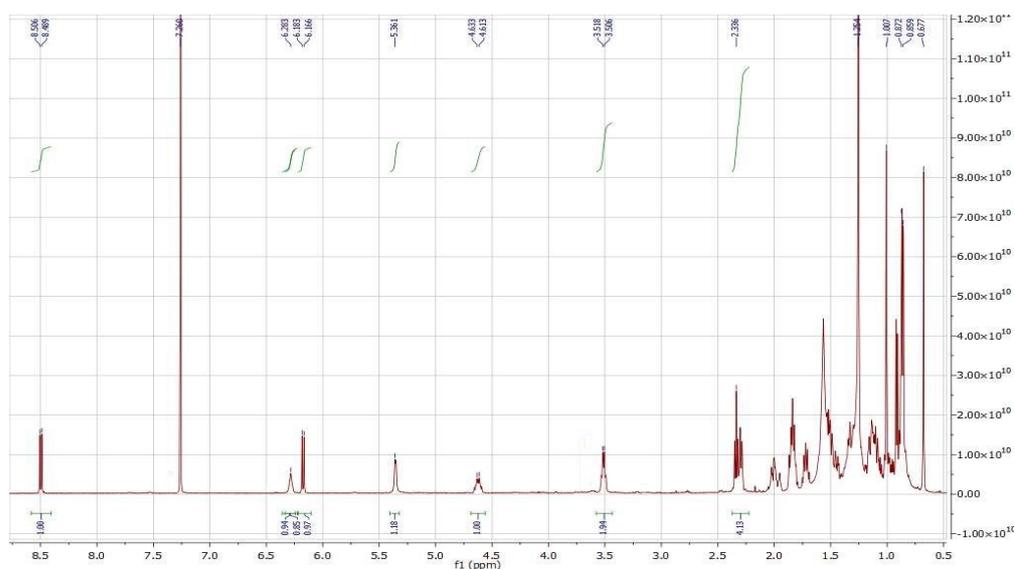


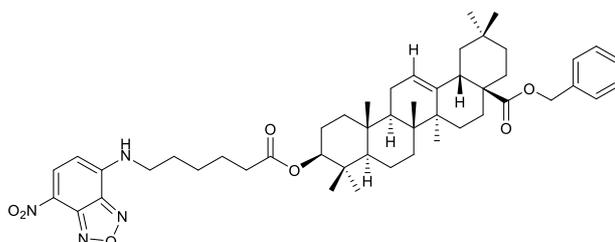
Compuesto 3: NBD6C



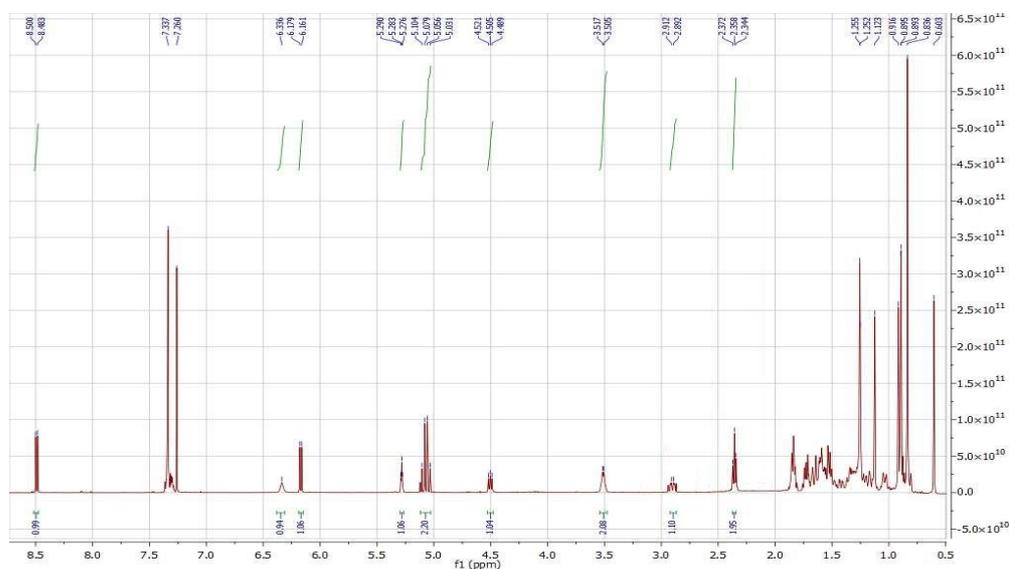
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.52 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.32 (m, 1H), 6.20 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.38 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 3.52 (m, 2H), 2.37 (m, 2H), 1.03 (s, 3H), 0.90 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 0.70 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 173.0, 144.5, 144.1, 143.9, 139.7, 136.5, 124.4, 123.0, 98.7, 74.3, 56.9, 56.3, 50.2, 43.8, 42.5, 39.9, 39.7, 38.3, 37.1, 36.8, 36.4, 36.0, 34.4, 32.1, 32.0, 28.4, 28.3, 28.2, 28.0, 26.5, 24.5, 24.5, 24.0, 23.0, 22.7, 21.2, 19.5, 18.9, 12.0. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$, 685.4305; encontrada, 685.4314.

^1H RMN

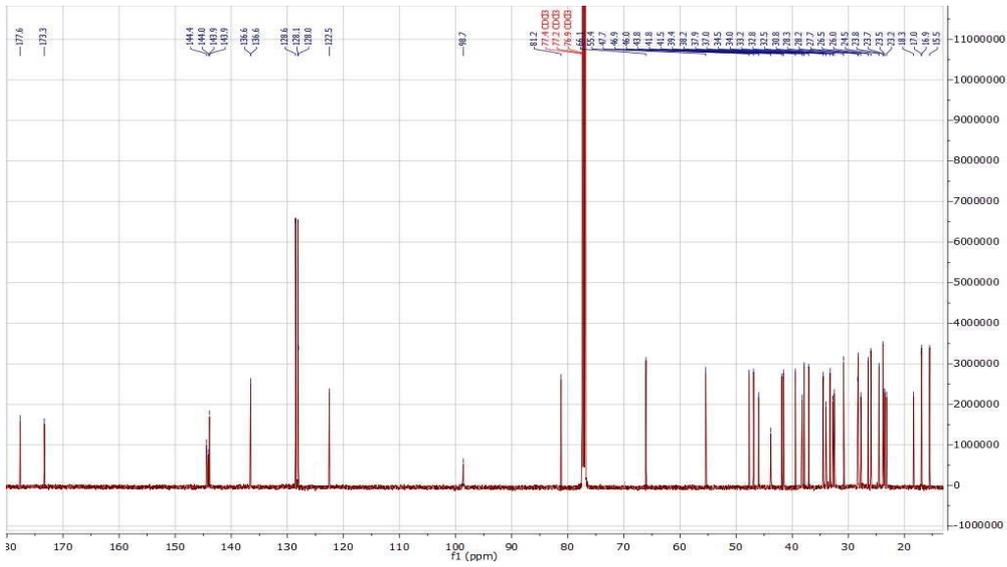
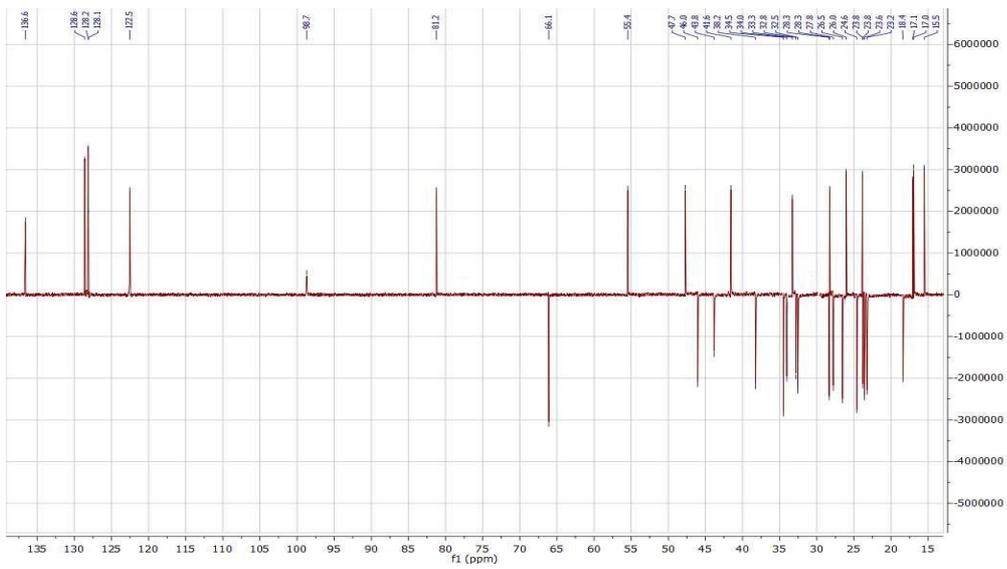


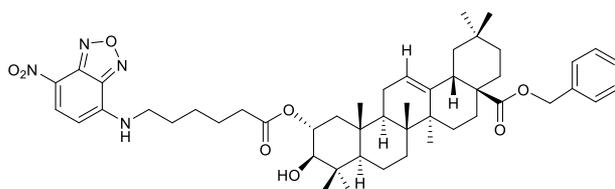
Compuesto 4: NBD6AOBn

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.49 (d, 1H), $J = 8.5$ Hz, 7.34 (m, 1H), 6.34 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.28 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 5.07 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 2H), 4.51 (dd, $J_1 = J_2 = 8.0$ Hz, 1H), 3.51 (m, 2H), 2.89 (dd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, 1H), 2.36 (m, 2H), 1.12, 0.92, 0.89, 0.84, 0.84, 0.84, 0.60 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.6, 173.3, 144.4, 144.0, 143.9, 143.9, 136.6, 136.5, 128.5, 128.5, 128.5, 128.1, 128.1, 128.0, 122.5, 98.7, 81.2, 66.1, 55.4, 47.7, 46.6, 46.0, 43.8, 41.8, 41.5, 39.4, 38.2, 37.9, 37.0, 34.5, 34.0, 33.2, 32.8, 32.5, 30.8, 28.3, 28.2, 27.7, 26.5, 26.0, 24.6, 23.8, 23.7, 23.5, 23.2, 18.3, 17.0, 16.9, 15.5. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{49}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$, 845.4829; encontrada, 845.4825.

 ^1H RMN

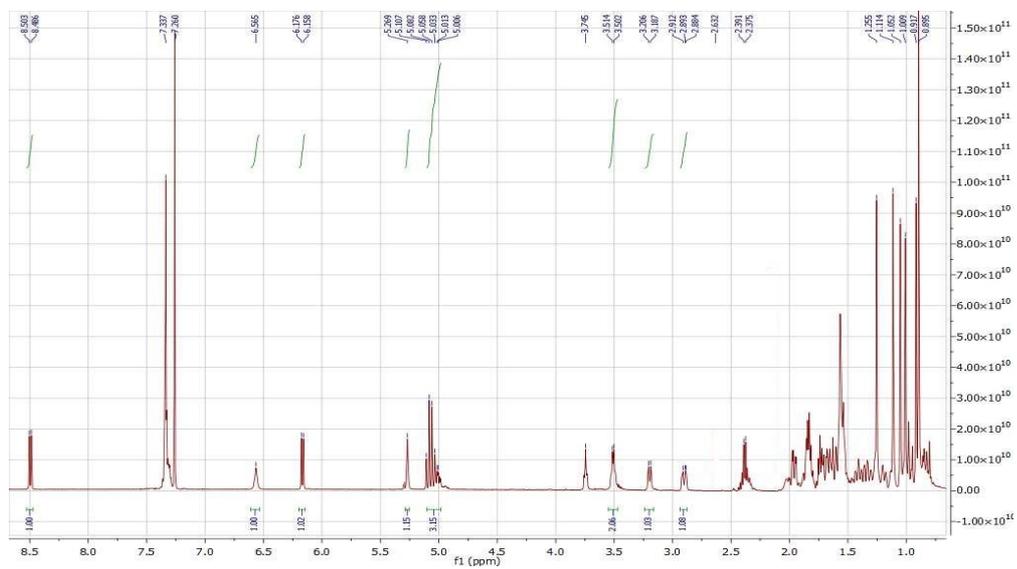
¹³C RMN



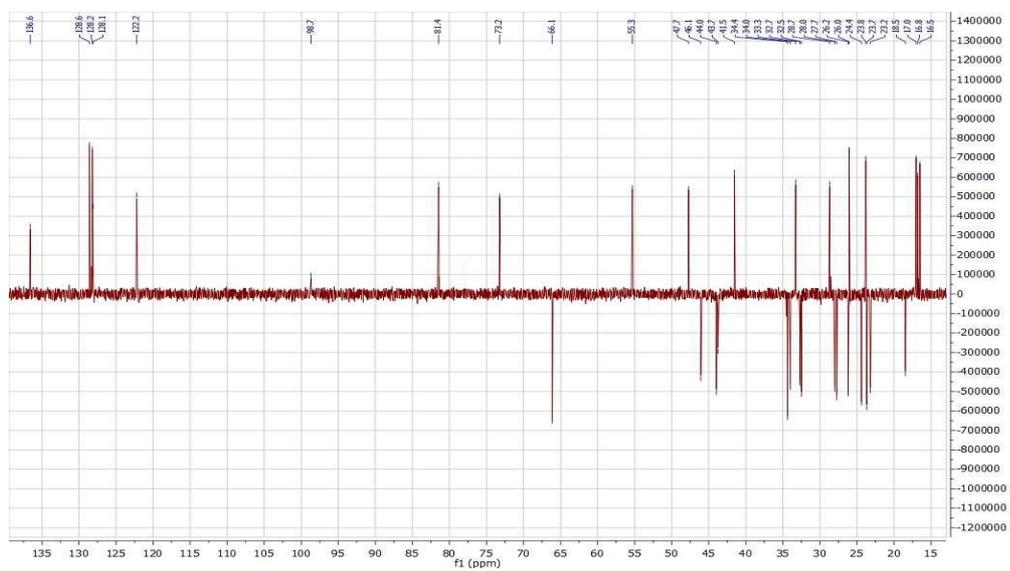
Compuesto 5: NBD6AMBn

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.50 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.32 (m, 5H), 6.56 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 5.07 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 2H), 5.01 (ddd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 11.0$, $J_3 = 14.5$ Hz, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.20 (d, $J = 11.0$ Hz), 2.90 (dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.5$ Hz, 1H), 2.38 (m, 2H), 1.11, 1.05, 1.01, 0.92, 0.89, 0.89, 0.59 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.5, 174.1, 144.4, 144.1, 144.1, 144.0, 136.6, 136.5, 128.6, 128.6, 128.6, 128.3, 128.3, 128.2, 122.2, 98.7, 81.4, 73.2, 66.1, 55.3, 47.7, 46.8, 46.1, 43.9, 43.7, 41.9, 41.5, 40.1, 39.5, 38.5, 34.3, 34.0, 33.3, 32.7, 32.5, 30.9, 28.7, 28.0, 27.7, 26.2, 26.0, 24.4, 23.8, 23.7, 23.2, 18.5, 17.0, 16.8, 16.5. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{49}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$, 861.4778; encontrada, 861.4769.

 ^1H RMN

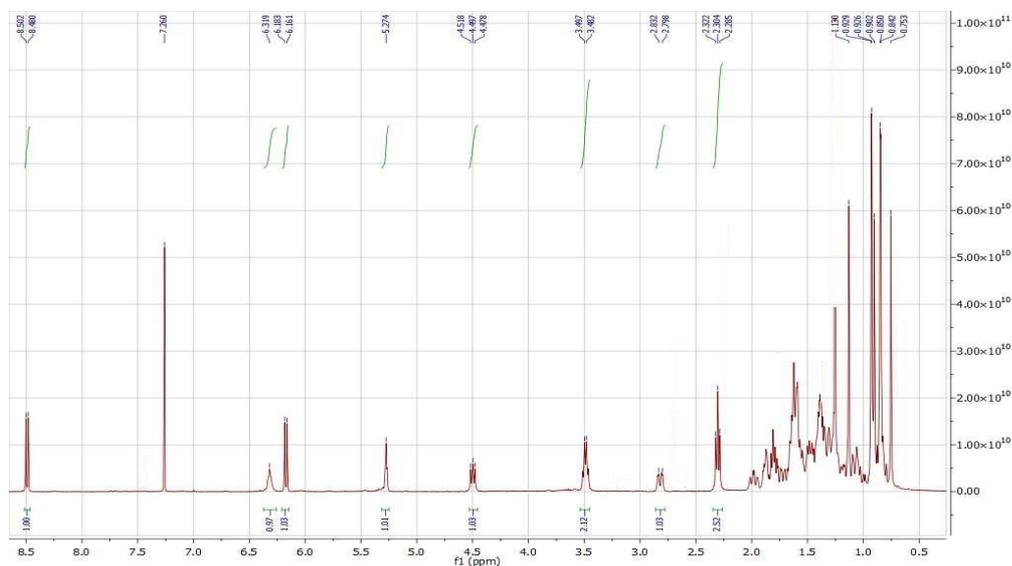


¹³C RMN

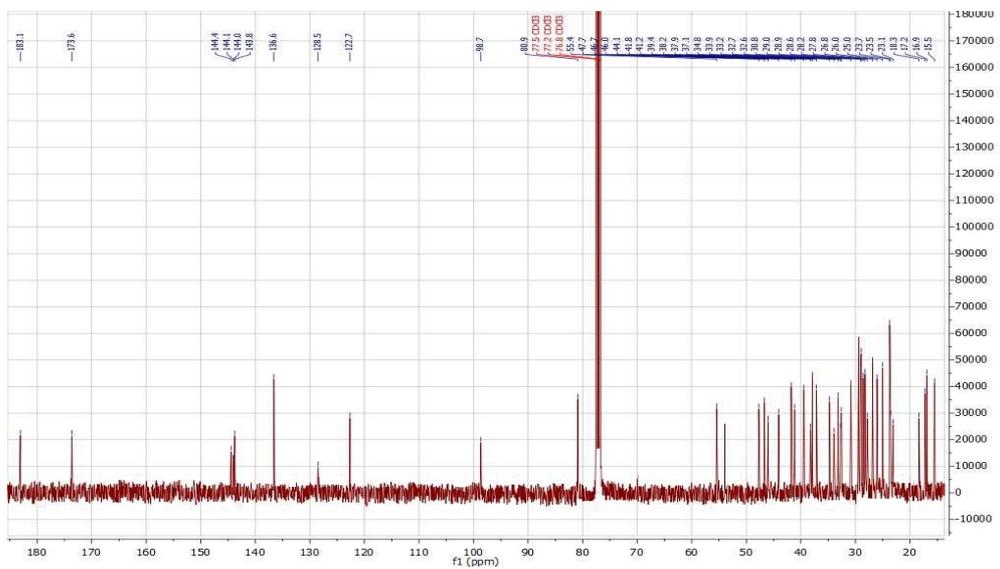
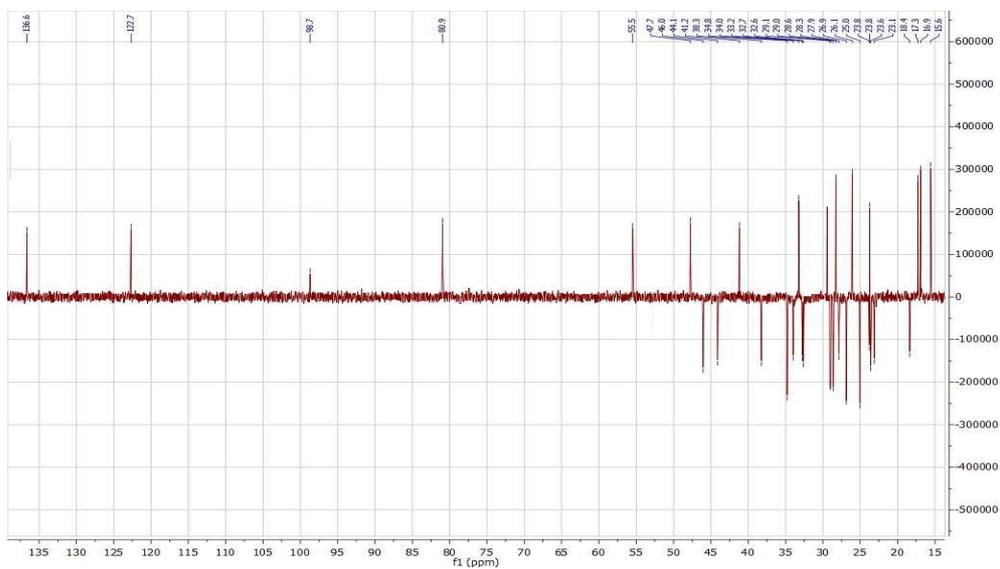


98.7, 80.9, 55.4, 47.7, 46.7, 46.0, 44.1, 41.8, 41.2, 39.4, 38.2, 37.9, 37.1, 34.8, 33.9, 33.2, 32.7, 32.6, 30.8, 29.0, 28.9, 28.6, 28.2, 27.8, 26.8, 26.0, 25.0, 23.7, 23.7, 23.6, 23.1, 18.3, 17.2, 16.9, 15.5. HRMS m/z : $[M + Na]^+$ Calculada para $C_{44}H_{63}N_4O_8Na$, 799.4622; encontrada, 799.4611.

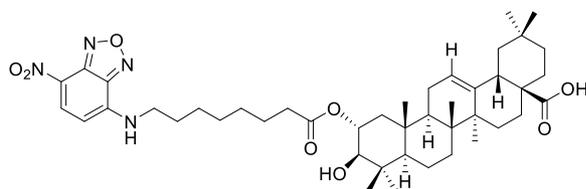
1H RMN



^{13}C RMN

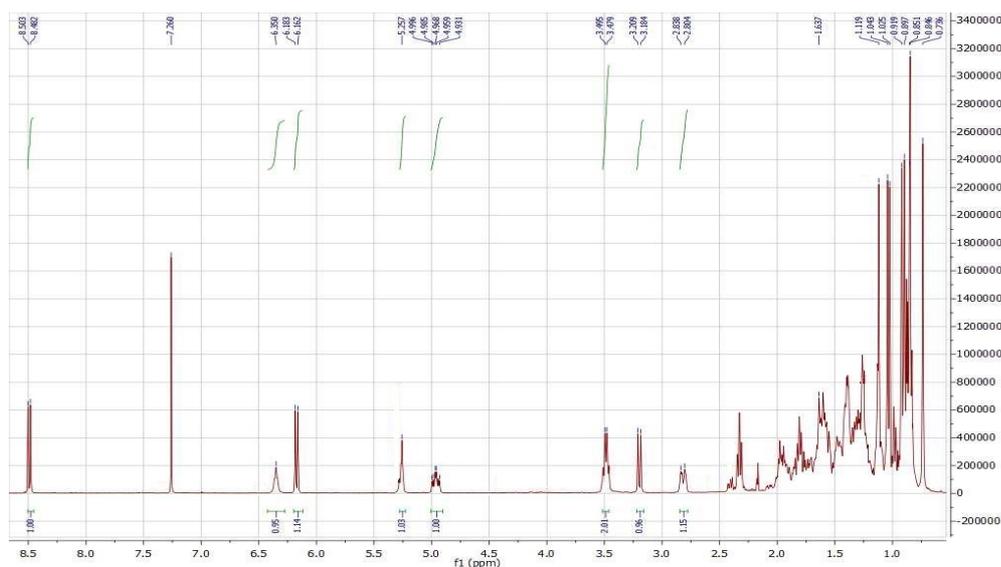


Compuesto 7: NBD8AM

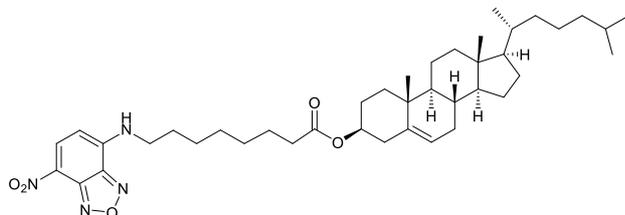


^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.35 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 4.96 (ddd, $J_1 = 4.8$, $J_2 = 11.0$, $J_3 = 14.8$ Hz, 1H), 3.49 (m, 2H), 3.20 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.81 (dd, $J_1 = 3.6$, $J_2 = 13.2$ Hz, 1H), 2.33 (m, 2H), 1.12, 1.04, 1.02, 0.92, 0.90, 0.85, 0.74 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 183.5, 174.5, 144.4, 144.1, 140.0, 140.0, 136.6, 124.1, 122.3, 98.7, 81.1, 73.2, 55.3, 47.7, 46.6, 46.0, 44.1, 43.8, 41.8, 41.1, 39.9, 39.5, 38.5, 34.6, 33.9, 33.2, 32.6, 32.5, 30.8, 28.9, 28.9, 28.7, 28.5, 27.8, 26.8, 26.1, 24.9, 23.7, 23.6, 23.0, 18.4, 17.3, 16.8, 16.5; HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$, 771.4309; encontrada, 771.4307.

^1H RMN

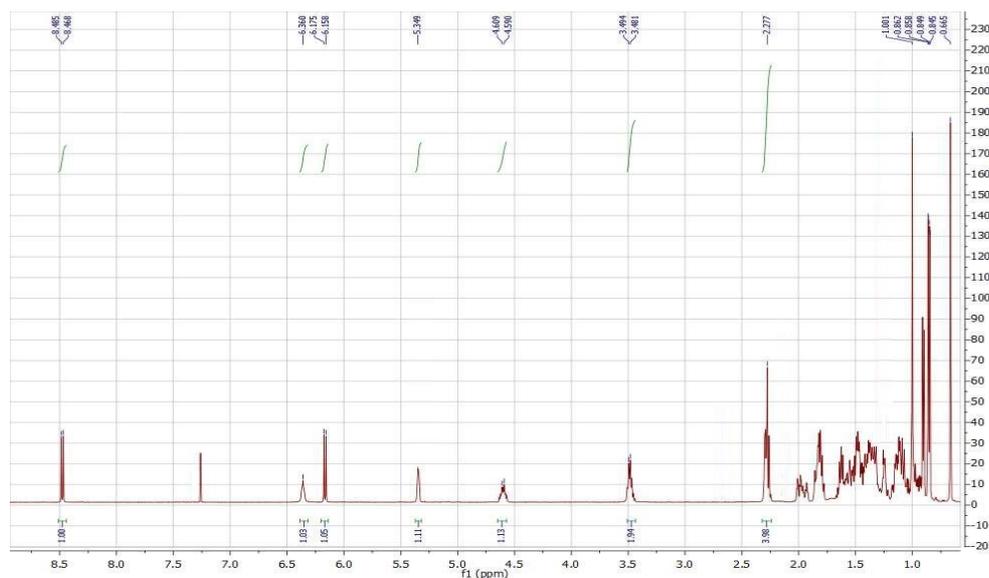


^{13}C RMN

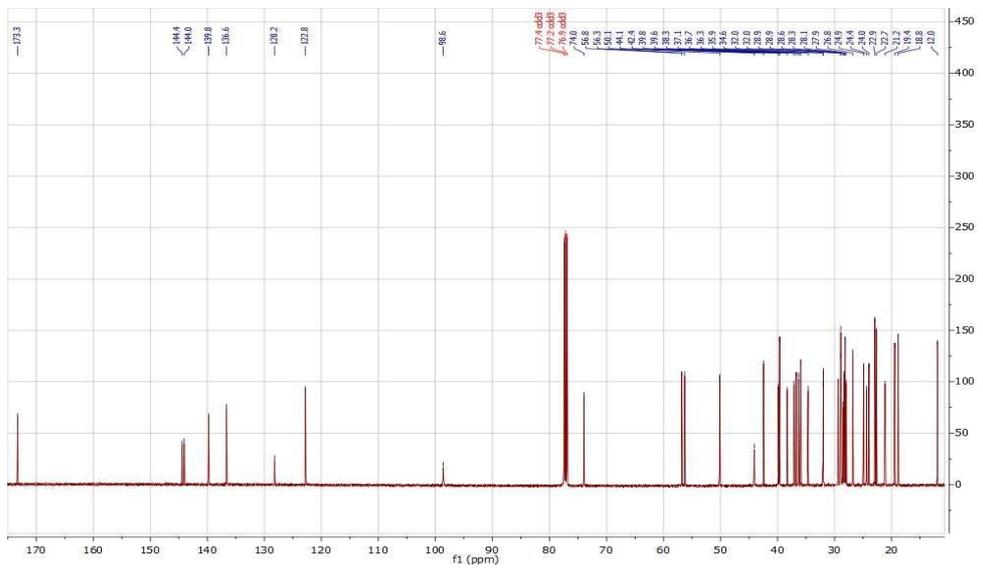
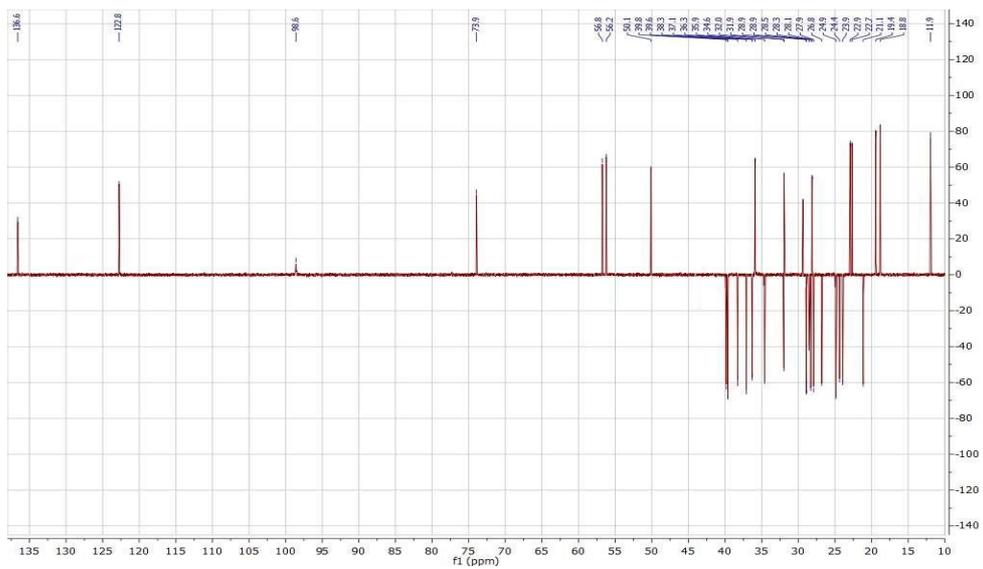


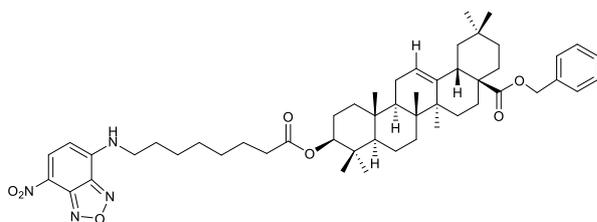
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.36 (dd, $J = 4.5$ Hz, 1H), 6.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.34 (dd, $J_1 = J_2 = 4.0$ Hz, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.49 (m, 2H), 2.44 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 0.66 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 173.3, 144.4, 144.0, 143.8, 139.8, 136.6, 128.2, 122.8, 98.6, 74.0, 56.8, 56.3, 50.1, 44.1, 42.4, 39.8, 39.6, 38.3, 37.1, 36.7, 36.3, 35.9, 34.6, 32.0, 32.0, 28.9, 28.9, 28.6, 28.3, 28.1, 27.9, 26.8, 24.9, 24.4, 24.0, 22.9, 22.7, 21.2, 19.4, 18.8, 12.0. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$, 713.4618; encontrada, 713.4621.

^1H RMN

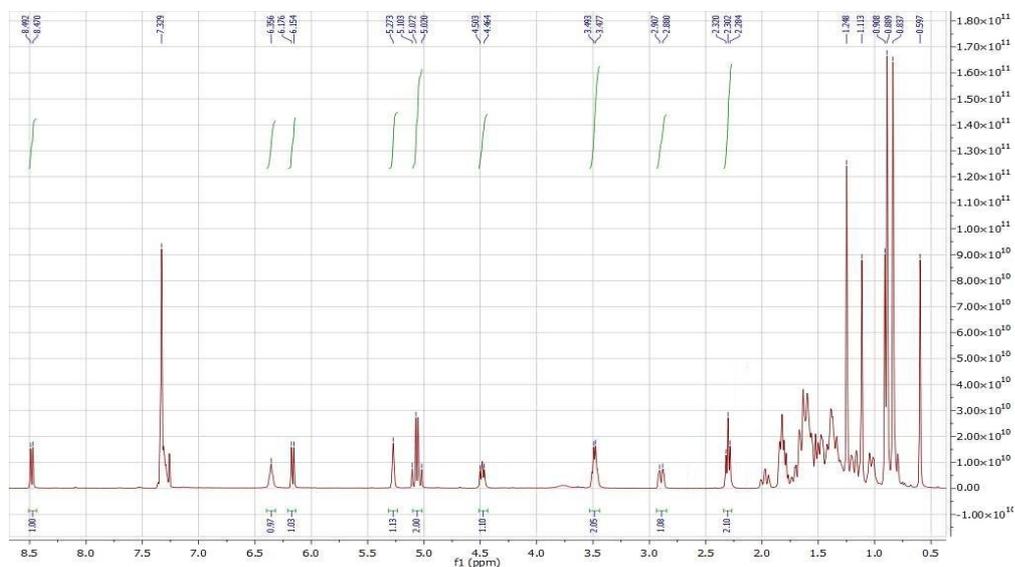


¹³C RMN

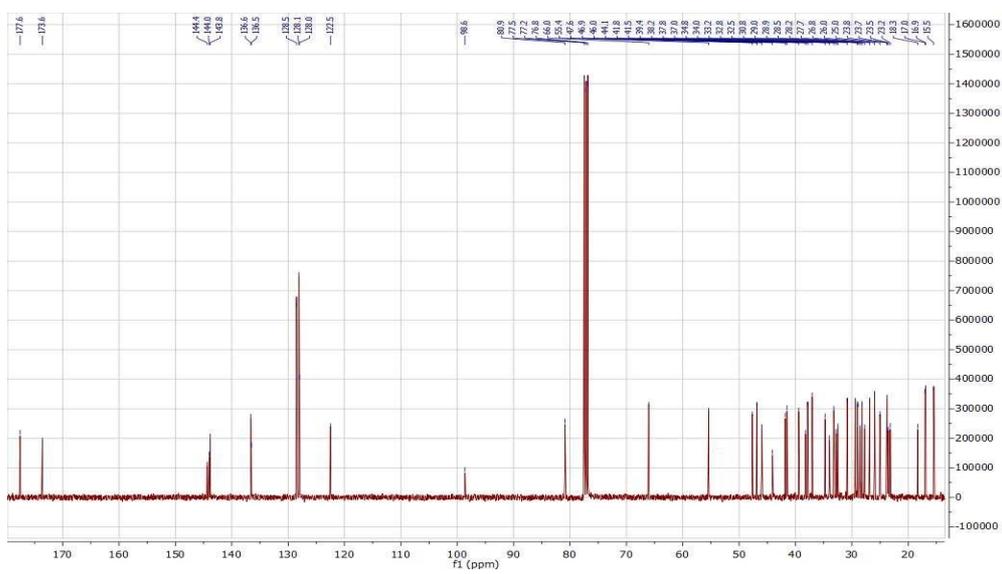
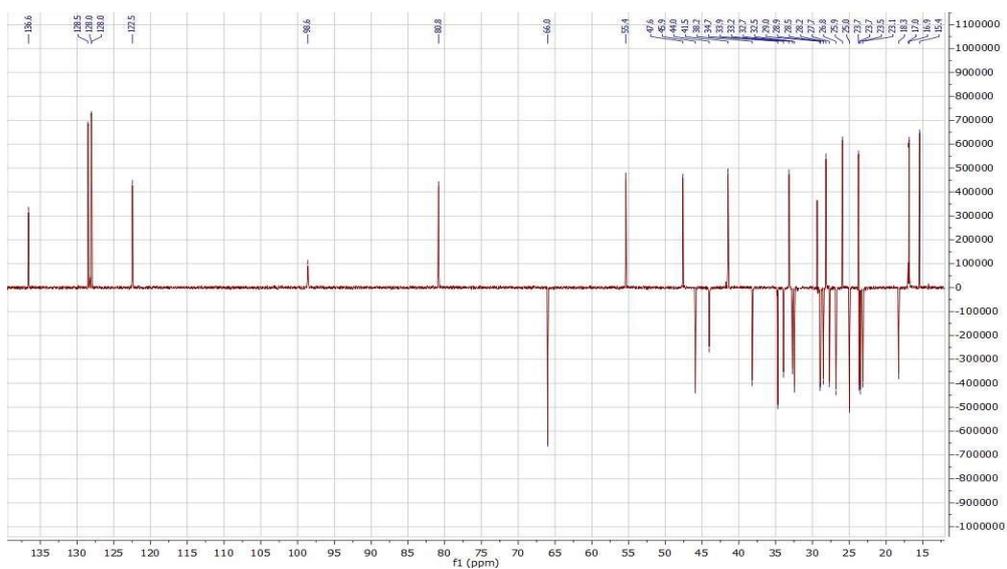


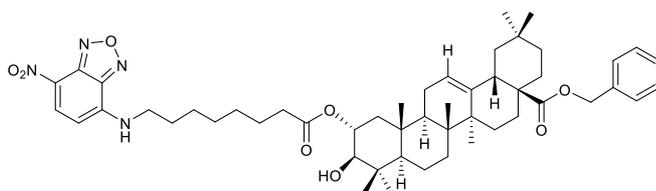
Compuesto 9: NBD8AOBn

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.33 (m, 5H), 6.36 (m, 1H), 6.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 5.06 (AB system, $J = 12.4$ Hz, 2H), 4.48 (dd, $J_1 = J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 3.49 (m, 2H), 2.89 (dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.6$ Hz, 1H), 2.30 (m, 2H), 1.11, 0.91, 0.89, 0.89, 0.84, 0.84, 0.60 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.6, 173.6, 144.4, 144.0, 143.8, 143.8, 136.6, 136.5, 128.5, 128.5, 128.5, 128.1, 128.1, 128.0, 122.5, 98.6, 80.9, 66.0, 55.4, 47.6, 46.9, 46.0, 44.1, 41.8, 41.5, 39.4, 38.2, 37.8, 37.0, 34.8, 34.0, 33.2, 32.8, 32.5, 30.8, 29.0, 28.9, 28.5, 28.2, 27.7, 26.8, 26.0, 25.0, 23.8, 23.7, 23.5, 23.2, 18.3, 17.0, 16.9, 15.5. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{51}\text{H}_{70}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$, 873.5142; encontrada, 873.5142.

 ^1H RMN

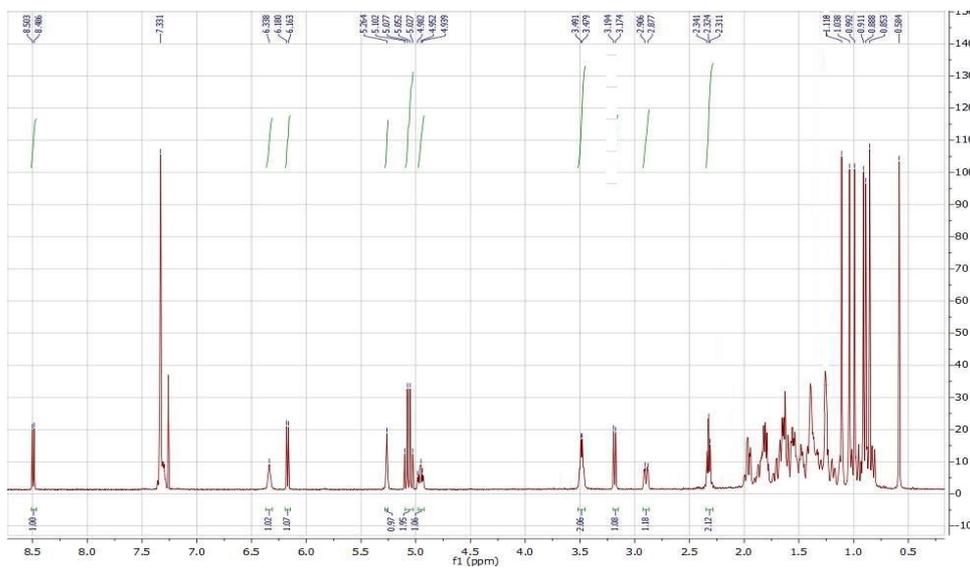
¹³C RMN



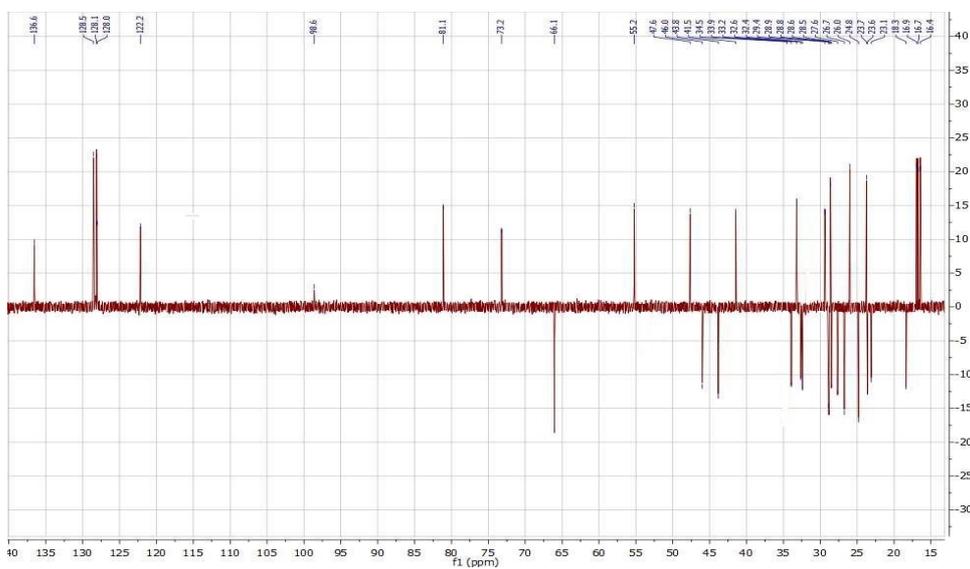
Compuesto 10: NBD8AMBn

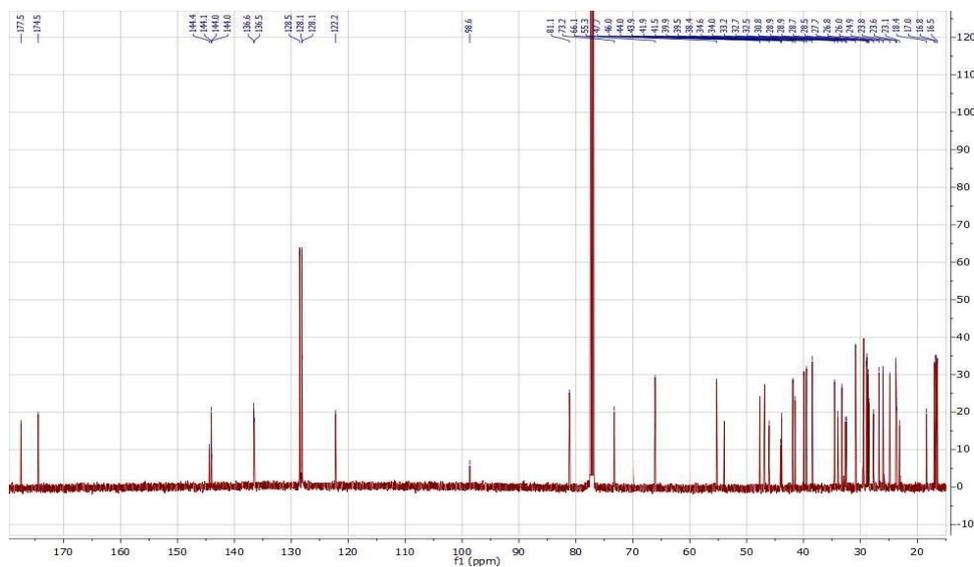
¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ: 8.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.33 (m, 5H), 6.34 (m, 1H), 6.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.26 (dd, *J*₁ = *J*₂ = 3.5 Hz, 1H), 5.06 (AB system, *J* = 12.5 Hz, 2H), 5.00 (ddd, *J*₁ = 4.0, *J*₂ = 10.5, *J*₃ = 14.5 Hz, 1H), 3.49 (m, 2H), 3.18 (d, *J* = 10.5 Hz), 2.90 (dd, *J*₁ = 3.5, *J*₂ = 13.0 Hz, 1H), 2.33 (m, 2H), 1.11, 1.04, 0.99, 0.91, 0.89, 0.85, 0.58 (s, 3H cada uno). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ: 177.5, 174.5, 144.4, 144.1, 144.0, 140.0, 136.6, 136.5, 128.5, 128.5, 128.5, 128.1, 128.1, 128.0, 122.2, 98.6, 81.1, 73.2, 66.1, 55.3, 47.7, 46.8, 46.0, 44.0, 43.9, 41.9, 41.5, 39.9, 39.5, 38.4, 34.6, 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 30.8, 28.9, 28.9, 28.7, 28.5, 27.7, 26.8, 26.0, 24.9, 23.8, 23.6, 23.1, 18.4, 17.0, 16.8, 16.5. HRMS *m/z*: [M + Na]⁺ Calculada para C₅₁H₇₀N₄O₈Na, 889.5091; encontrada, 889.5081.

¹H RMN

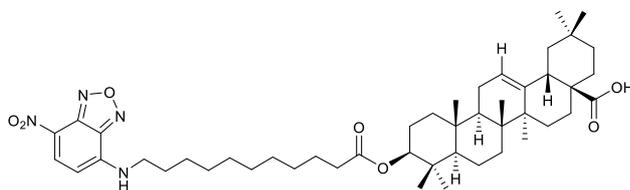


¹³C RMN





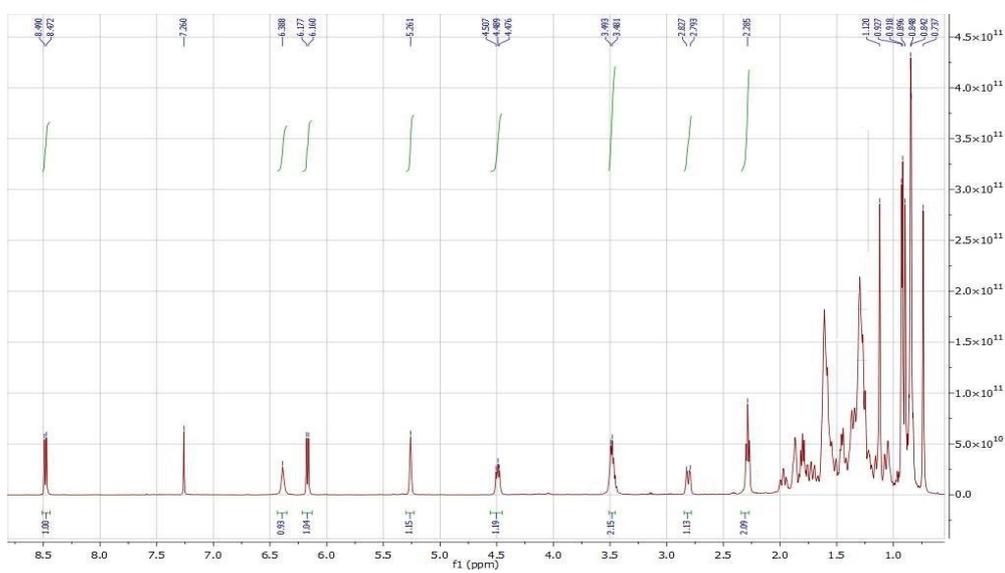
Compuesto 11: NBD11AO



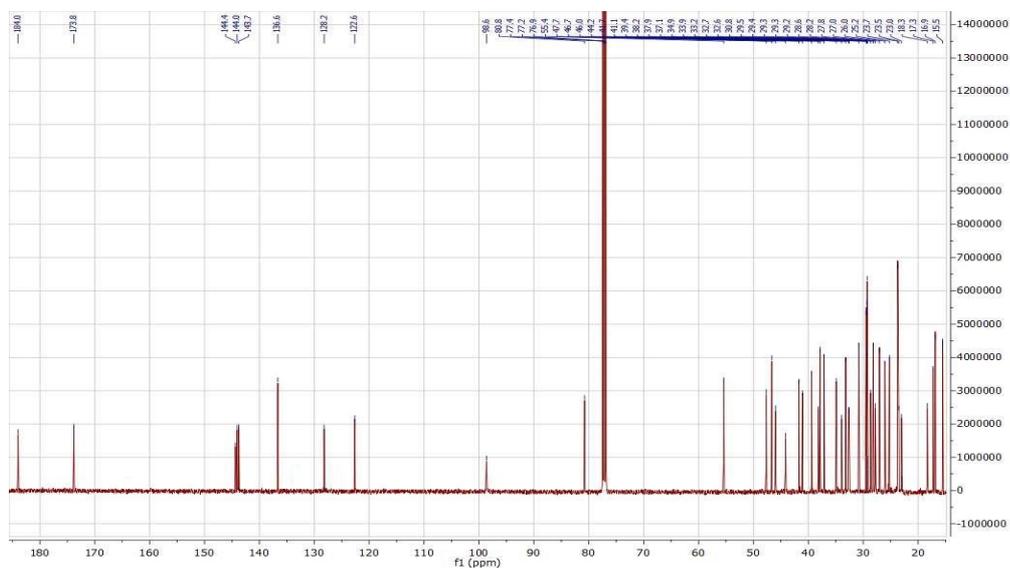
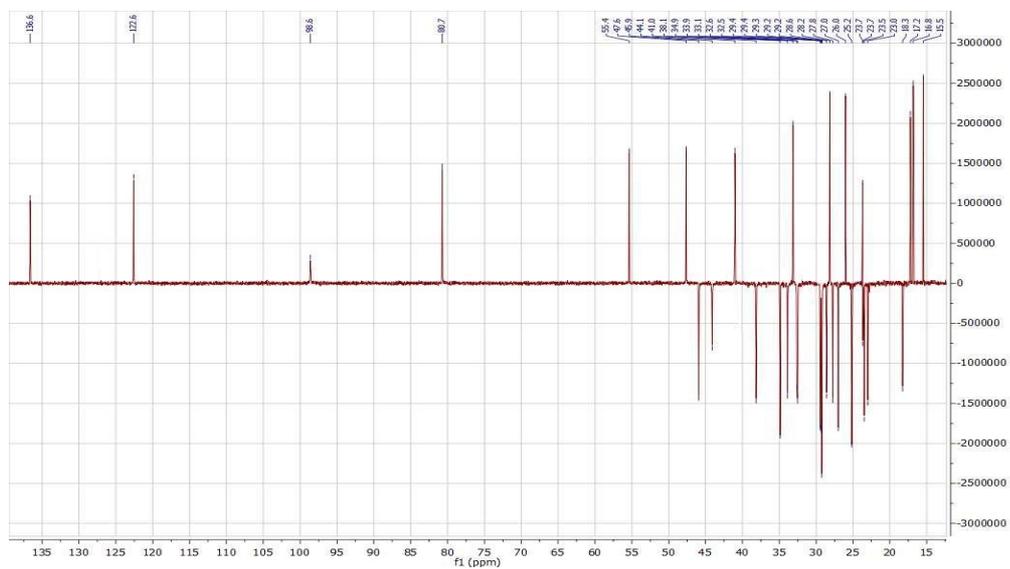
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.39 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.26 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 4.49 (dd, $J_1 = J_2 = 9.0$ Hz, 1H), 3.48 (m, 2H), 2.81 (dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.5$ Hz, 1H), 2.28 (m, 2H), 1.12, 0.93, 0.92, 0.90, 0.85, 0.84, 0.74 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 184.0, 173.8, 144.4, 144.0, 144.0, 143.7, 136.6, 128.2, 122.6, 98.6, 80.8, 55.4, 47.7, 46.7, 46.0, 44.2, 41.7, 41.1, 39.4, 38.2, 37.9, 37.1, 34.9, 33.9,

33.2, 32.7, 32.6, 30.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 28.6, 28.2, 27.8, 27.0, 26.0, 25.2, 23.7, 23.7, 23.5, 23.0, 18.3, 17.3, 16.9, 15.5; HRMS m/z : $[M + Na]^+$
 Calculada para $C_{42}H_{60}N_4O_7Na$, 755.4360; encontrada, 755.4351.

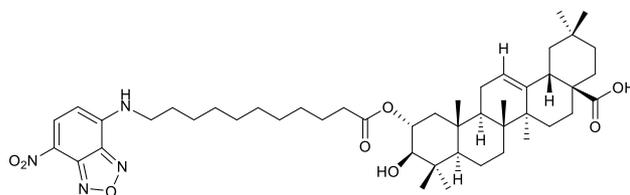
1H RMN



^{13}C RMN

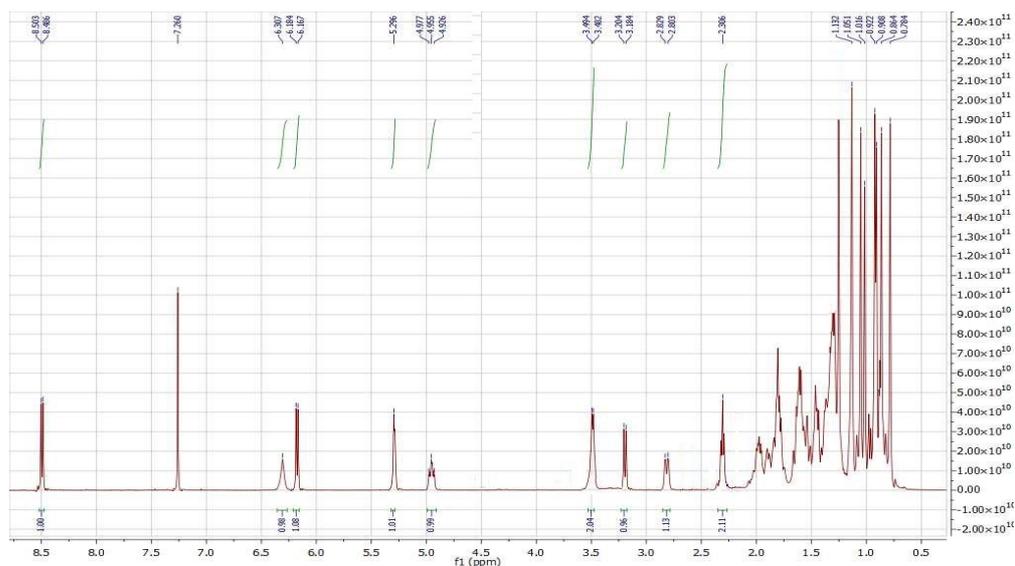


Compuesto 12: NBD11AM

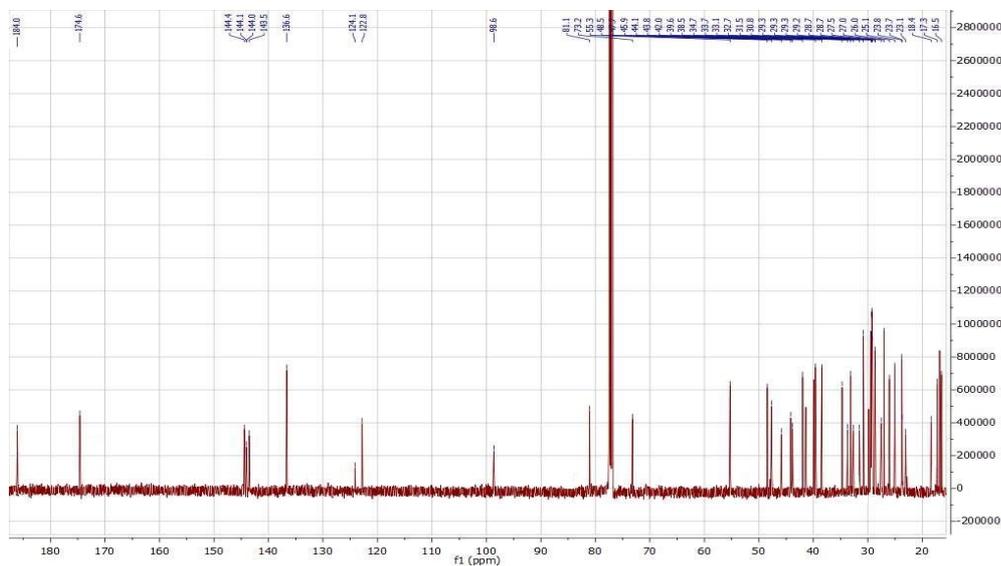
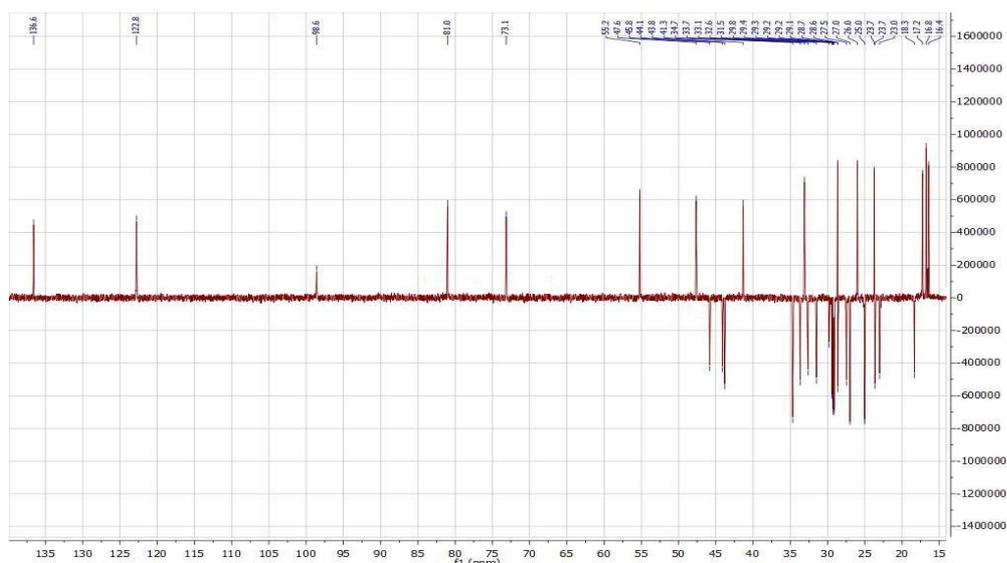


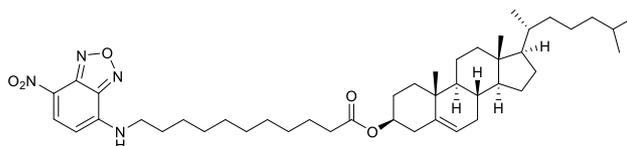
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.31 (m, 1H), 6.18 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.29 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 4.95 (ddd, $J_1 = 4.0$, $J_2 = 11.0$, $J_3 = 14.5$ Hz, 1H), 3.49 (m, 2H), 3.19 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.82 (dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.0$ Hz, 1H), 2.31 (m, 2H), 1.13, 1.05, 1.02, 0.92, 0.91, 0.86, 0.78 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 184.0, 174.6, 144.4, 144.1, 140.0, 143.5, 136.6, 124.1, 122.8, 98.6, 81.1, 73.2, 55.3, 47.7, 46.9, 45.9, 44.1, 43.8, 42.0, 39.6, 38.5, 34.7, 33.1, 32.7, 31.5, 30.8, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.1, 28.7, 27.5, 27.0, 25.1, 23.8, 23.7, 23.1, 18.4, 17.2, 16.8, 16.4. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$, 771.4309; encontrada, 771.4307.

^1H RMN

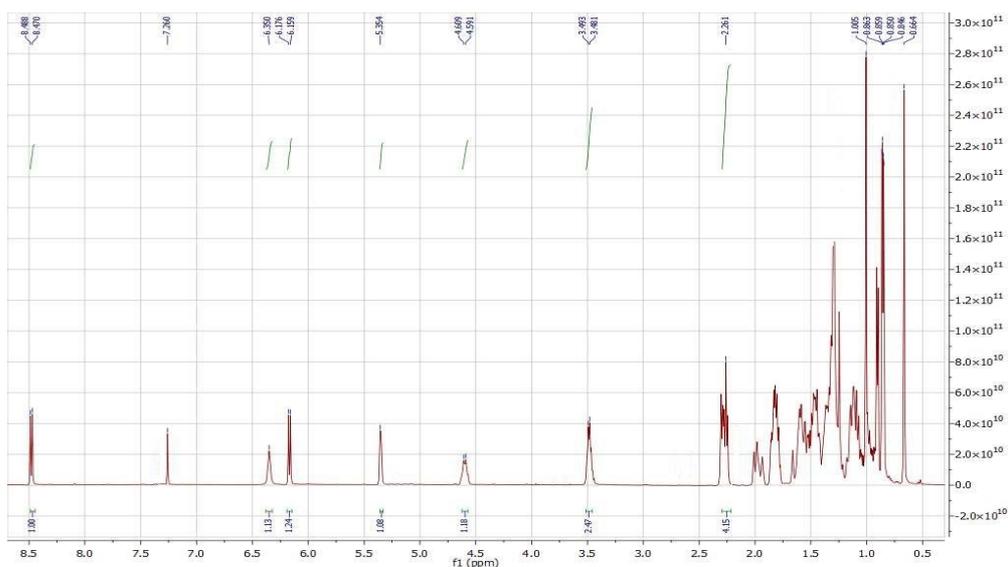


¹³C RMN

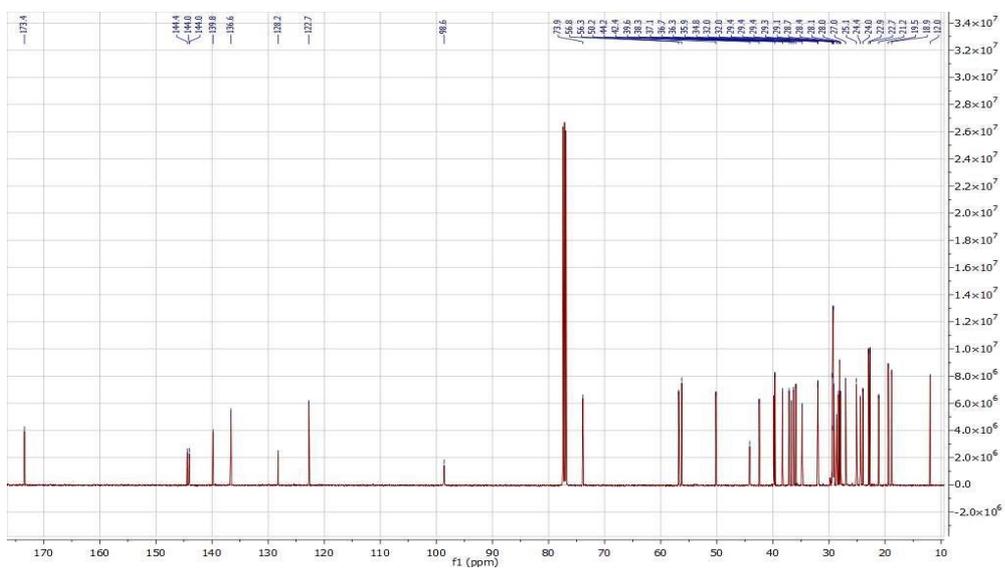
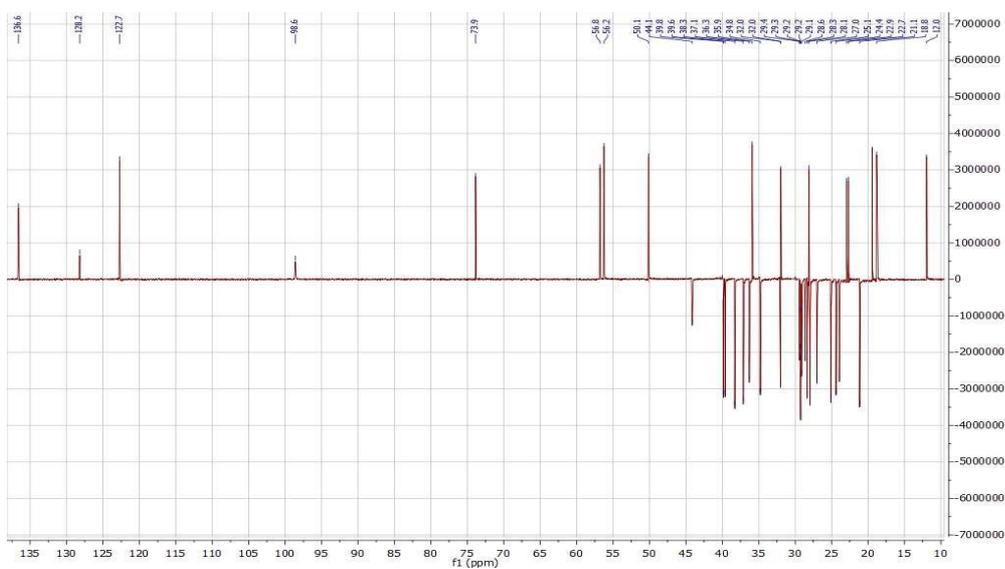


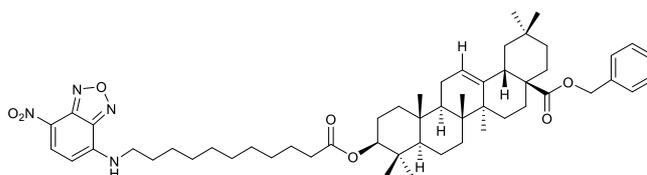
Compuesto 13: NBD11C

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.35 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.35 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 3.49 (m, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.00 (s, 3H), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 2.0$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 2.0$ Hz, 3H), 0.66 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 173.4, 144.4, 144.0, 144.0, 139.8, 136.6, 128.2, 127.7, 98.6, 73.9, 56.8, 56.3, 50.2, 44.2, 42.4, 39.8, 39.6, 38.3, 37.1, 36.7, 36.3, 35.9, 34.8, 32.0, 32.0, 29.4, 29.4, 29.4, 29.3, 29.1, 28.7, 28.4, 28.1, 28.0, 27.0, 25.1, 24.4, 24.0, 22.9, 22.7, 21.2, 19.5, 18.9, 12.0. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$, 755.5087; encontrada, 755.5085.

 ^1H RMN

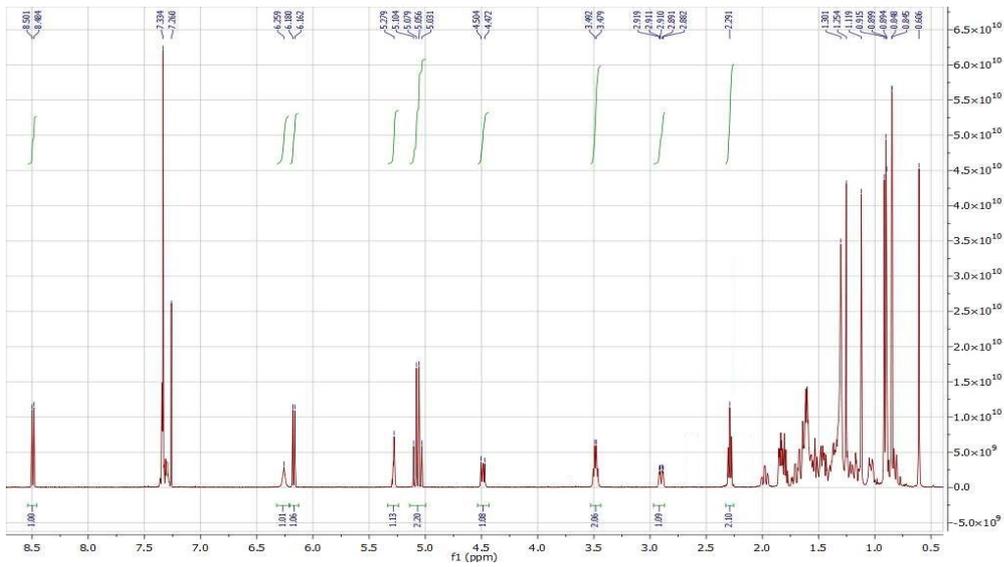
¹³C RMN



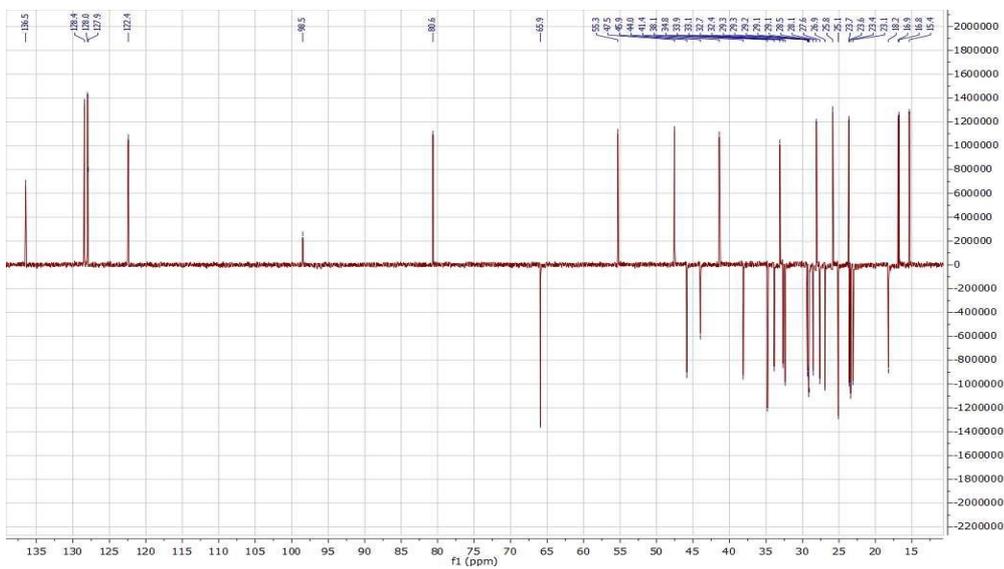
Compuesto 14: NBD11AOBn

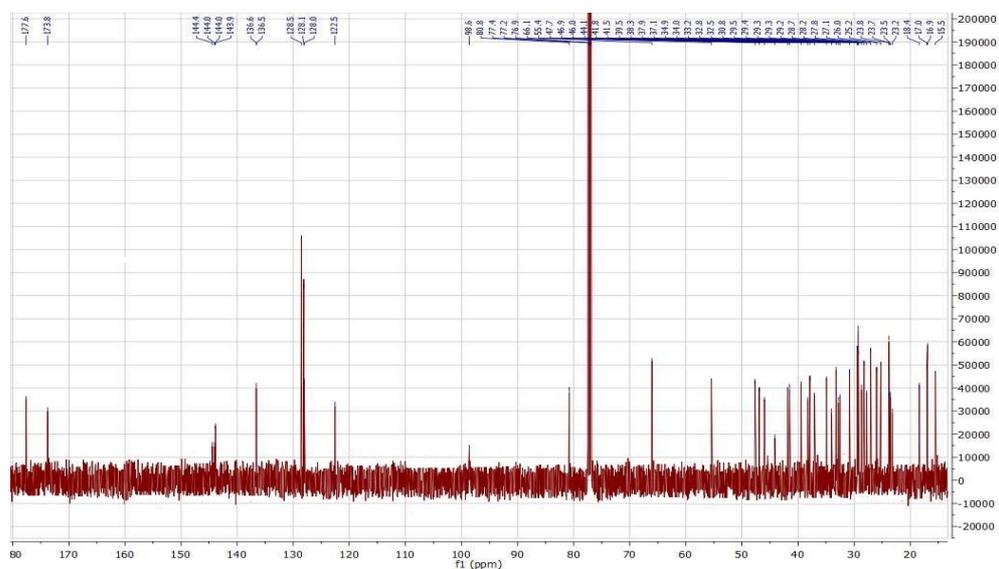
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.33 (m, 5H), 6.26 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.28 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 5.07 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 2H), 4.49 (dd, $J_1 = 6.0$, $J_2 = 8.5$ Hz, 1H), 3.48 (m, 2H), 2.90 (dd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 14.0$ Hz, 1H), 2.29 (m, 2H), 1.12, 0.91, 0.90, 0.89, 0.85, 0.85, 0.61 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.6, 173.8, 144.4, 144.0, 140.0, 143.9, 136.6, 136.5, 128.5, 128.5, 128.5, 128.1, 128.1, 128.0, 122.5, 98.6, 80.8, 66.1, 55.4, 47.7, 46.9, 46.0, 44.1, 41.8, 41.5, 39.5, 38.3, 37.9, 37.1, 34.9, 34.0, 33.2, 32.8, 32.5, 30.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 28.7, 28.2, 27.8, 27.1, 26.0, 25.2, 23.8, 23.7, 23.5, 23.2, 18.4, 17.0, 16.9, 15.5. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ Calculada para $\text{C}_{54}\text{H}_{76}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$, 915.5612; encontrada, 915.5605.

 ^1H RMN

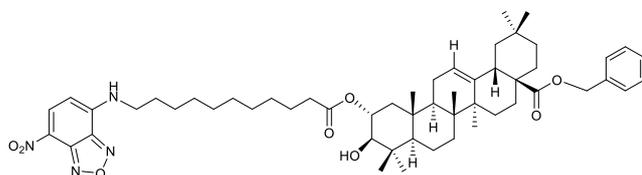


¹³C RMN





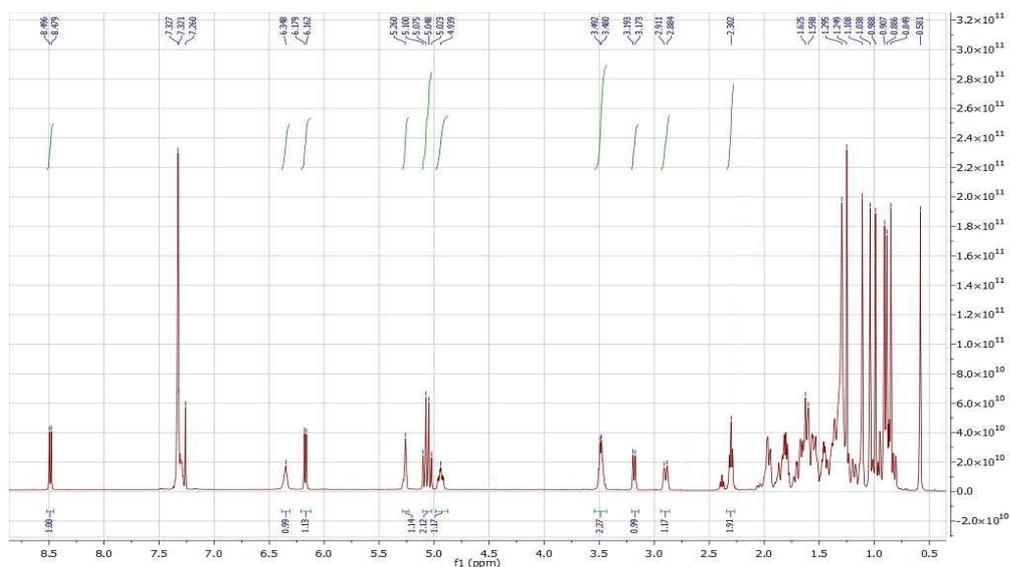
Compuesto 15: NBD11AMBn



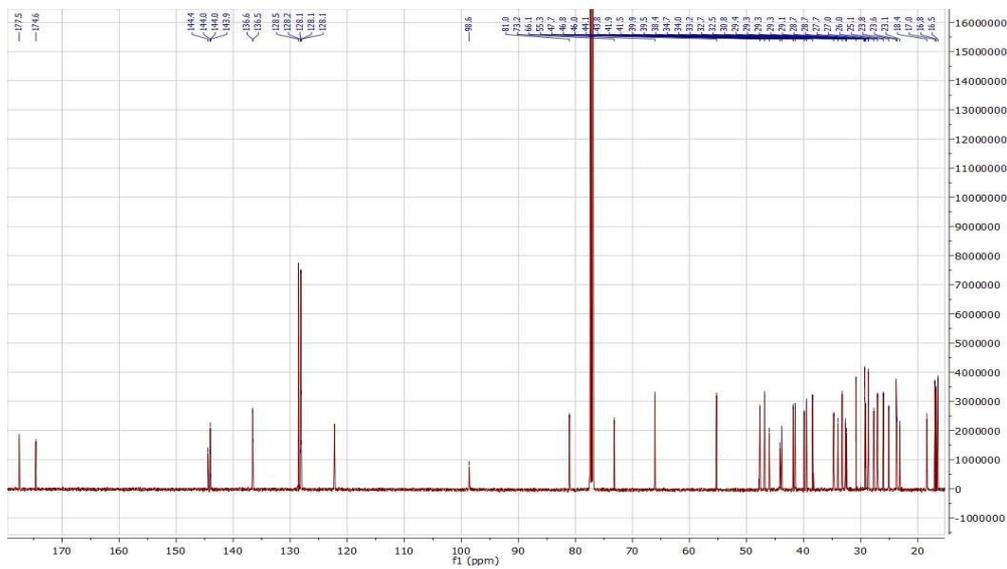
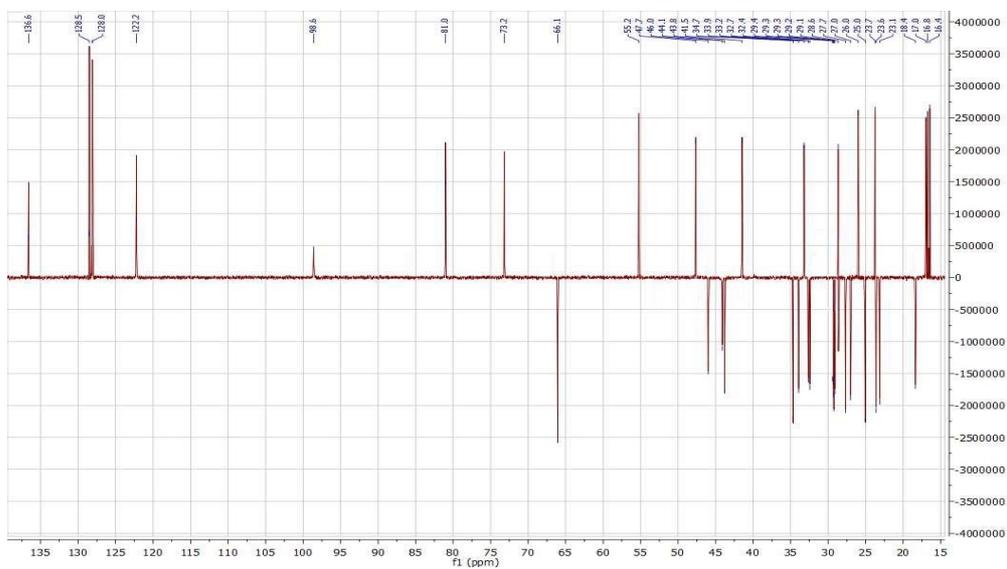
^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.33 (m, 5H), 6.35 (m, 1H), 6.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.26 (dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, 1H), 5.06 (AB system, $J = 12.5$ Hz, 2H), 4.94 (ddd, $J_1 = 4.5$, $J_2 = 11.0$, $J_3 = 14.5$ Hz, 1H), 3.48 (m, 2H), 3.18 (d, $J = 11.0$ Hz), 2.89 (dd, $J_1 = 3.5$, $J_2 = 13.5$ Hz, 1H), 2.30 (m, 2H), 1.11, 1.04, 0.99, 0.91, 0.89, 0.85, 0.58 (s, 3H cada uno). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 177.5, 174.6, 144.4, 144.0, 144.0, 143.9, 136.6, 136.5,

128.5, 128.2, 128.1, 128.1, 128.1, 128.1, 128.0, 122.2, 98.6, 81.0, 73.2, 66.1, 55.3, 47.7, 46.8, 46.0, 44.1, 43.8, 41.9, 41.5, 39.9, 39.5, 38.4, 34.7, 34.0, 33.2, 32.7, 32.5, 30.8, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.7, 28.6, 27.7, 27.0, 26.0, 25.1, 23.8, 23.6, 23.1, 18.4, 17.0, 16.8, 16.5; HRMS m/z : $[M + Na]^+$ Calculada para $C_{54}H_{76}N_4O_8Na$, 931.5561; encontrada, 931.5561.

1H RMN



^{13}C RMN



III.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanson, J. R., Abel, E. W., Davies, A. G., Phillips, D. & Woollins, J. D. *Natural Products: The Secondary Metabolites. Chapter 1: The classes of natural products and their isolation. Natural Products* (The Royal Society of Chemistry, 2003). doi:10.1039/9781847551535-00001.
2. Springob, K. & Kutchan, T. M. Plant-derived natural products. Chapter 1. Introduction to the different classes of natural products. in *Plant-derived natural products*. (2009). doi:10.1007/978-0-387-85498-4_1.
3. Pascolutti, M. & Quinn, R. J. Natural products as lead structures: Chemical transformations to create lead-like libraries. *Drug Discov. Today* **19**, 215–221 (2014).
4. Li, G. & Lou, H. X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med. Res. Rev.* **38**, 1255–1294 (2018).
5. Amirikia, V. & Heinrich, M. Natural products and drug discovery: A survey of stakeholders in industry and academia. *Front. Pharmacol.* **6**, 1–8 (2015).
6. Gurnani, N., Mehta, D., Gupta, M. & Mehta, B. K. Natural Products : Source of Potential Drugs Natural Products Lab , School of Studies in Chemistry & Bio-Chemistry ,. **6**, 171–186 (2014).
7. Siddiqui, A. A., Iram, F., Siddiqui, S. & Sahu, K. Role of natural products in drug discovery process. *Int. J. Drug Dev. Res.* **6**, 172–204 (2014).
8. Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 111–129 (2015).
9. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).
10. Connolly, J. D. & Hill, R. A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 221–240 (1999) doi:<https://doi.org/10.1039/A703937I>.

11. Rufino, E. *et al.* Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic triterpenoids and some of their chemical derivatives. *Curr. Org. Chem.* **19**, 919–947 (2015).
12. Rascón, L. . V., Torres, H. M., Velázquez, C. C., Garibay, A. E. & Robles, R. . *Z. Triterpenoids : Synthesis , Uses in Cancer Treatment and other Biological Activities Complimentary Contributor Copy.* (2016).
13. Sk, P. *et al.* Neuropharmacological effects of triterpenoids. **4**, 354–372 (2013).
14. Ayeleso, T. B., Matumba, M. G. & Mukwevho, E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules* **22**, (2017).
15. Fernández-Navarro, M. *et al.* Chapter 157. Maslinic Acid: A Component of Olive Oil on Growth and Protein-turnover Rates. in *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* 1415–1421 (Elsevier Inc., 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00157-1.
16. Lozano-Mena, G., Sánchez-González, M., Juan, M. E. & Planas, J. M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives - A promising nutraceutical? *Molecules* **19**, 11538–11559 (2014).
17. García-Granados, A. *Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling subproducts.* (1998).
18. Reyes-Zurita, F. J. *et al.* Maslinic acid, a natural triterpene, induces a death receptor-mediated apoptotic mechanism in caco-2 p53-deficient colon adenocarcinoma cells. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
19. Medina-O'Donnell, M. *et al.* Synthesis and in vitro antiproliferative evaluation of PEGylated triterpene acids. *Fitoterapia* **120**, 25–40 (2017).
20. Medina-O'Donnell, M. *et al.* Diamine and PEGylated-diamine conjugates of triterpenic acids as potential anticancer agents. *Eur. J.*

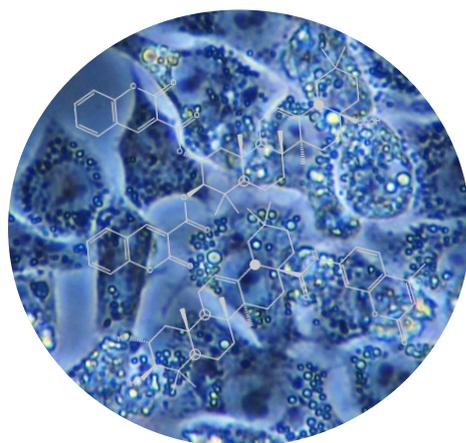
- Med. Chem.* **148**, 325–336 (2018).
21. Molina-Bolívar, J. A. *et al.* Maslinic acid conjugate with 7-amino-4-methylcoumarin as probe to monitor the temperature dependent conformational changes of human serum albumin by FRET. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **214**, 161–169 (2019).
 22. Blanco-Cabra, N. *et al.* Novel Oleanolic and Maslinic Acid Derivatives as a Promising Treatment against Bacterial Biofilm in Nosocomial Infections: An in Vitro and in Vivo Study. *ACS Infect. Dis.* **5**, 1581–1589 (2019).
 23. Vega-Granados, K. *et al.* Atmospheric water triggers supramolecular gel formation of novel low molecular weight maslinic and oleanolic triterpenic derivatives. *Mater. Chem. Front.* **3**, 2637–2646 (2019).
 24. Medina-O'donnell, M. *et al.* Oleanolic Acid Derivatives as Potential Inhibitors of HIV-1 Protease. *J. Nat. Prod.* **82**, 2886–2896 (2019).
 25. Sezgin, E. *et al.* A comparative study on fluorescent cholesterol analogs as versatile cellular reporters. *J. Lipid Res.* **57**, 299–309 (2016).
 26. Yu, W. L., Guizzunti, G., Foley, T. L., Burkart, M. D. & La Clair, J. J. An optimized immunoaffinity fluorescent method for natural product target elucidation. *J. Nat. Prod.* **73**, 1659–1666 (2010).
 27. Sandler, J. S., Fenical, W., Gulledge, B. M., Chamberlin, A. R. & La Clair, J. J. Fluorescent profiling of natural product producers. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9320–9321 (2005).
 28. Fu, Y. & Finney, N. S. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv.* **8**, 29051–29061 (2018).
 29. Duval, R. & Duplais, C. Fluorescent natural products as probes and tracers in biology. *Nat. Prod. Rep.* **34**, 161–193 (2017).
 30. Oliveira, E. *et al.* Green and Red Fluorescent Dyes for Translational

- Applications in Imaging and Sensing Analytes: A Dual-Color Flag. *ChemistryOpen* **7**, 9–52 (2018).
31. Alexander, M. D. *et al.* A central strategy for converting natural products into fluorescent probes. *ChemBioChem* **7**, 409–416 (2006).
 32. Haldar, S. *et al.* One-pot fluorescent labeling protocol for complex hydroxylated bioactive natural products. *J. Org. Chem.* **78**, 10192–10202 (2013).
 33. Kand, D., Saha, T. & Talukdar, P. Off-on type fluorescent NBD-probe for selective sensing of cysteine and homocysteine over glutathione. *Sensors Actuators, B Chem.* **196**, 440–449 (2014).
 34. Rohacova, J., Marín, M. L. & Romero, A. M. Fluorescent Benzofurazan–Cholic Acid Conjugates for in vitro Assessment of Bile Acid Uptake and Its Modulation by Drugs - Rohacova - 2009 - ChemMedChem - Wiley Online Library. *ChemMedChem* **4**, 466–472 (2009).
 35. Faletrov, Y. V. *et al.* 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **134**, 59–66 (2013).
 36. Omar, M. A., Hammad, M. A. & Awad, M. Utility of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole for development of a highly sensitive stability indicating spectrofluorimetric method for determination of salmeterol xinafoate; Application to human plasma. *RSC Adv.* **7**, 44773–44779 (2017).
 37. Rageh, A. H., El-Shaboury, S. R., Saleh, G. A. & Mohamed, F. A. Spectrophotometric method for determination of certain cephalosporins using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl). *Nat. Sci.* **02**, 828–840 (2010).
 38. Mao, M., Xiao, S., He, H., Cao, Q. & Zou, K. Fluorescent labeling of

- oleanolic acid using ‘click’ chemistry. *Heterocycl. Commun.* **19**, 239–243 (2013).
39. Turkmen, Z. *et al.* A triterpene oleanolic acid conjugate with 3-hydroxyflavone derivative as a new membrane probe with two-color ratiometric response. *J. Biochem. Biophys. Methods* **64**, 1–18 (2005).
40. Yao, H. *et al.* Synthesis, Biological Evaluation of Fluorescent 23-Hydroxybetulinic Acid Probes, and Their Cellular Localization Studies. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**, 1030–1034 (2018).
41. Ruiz, C. C., Hierrezuelo, J. M. & Molina-Bolivar, J. A. Analysis of the photophysical behavior and rotational-relaxation dynamics of coumarin 6 in nonionic micellar environments: The effect of temperature. *Molecules* **20**, 19343–19360 (2015).

CAPÍTULO IV

DERIVADOS DE AO Y AM CON APLICACIÓN ANTICANCERÍGENA



IV.1 RESUMEN

Partiendo de ácido maslínico (AM), producto natural contenido en los residuos de molturación de la aceituna, se han preparado 12 cumarina-triterpeno derivados por acoplamiento de este ácido triterpénico con varias cumarinas comerciales con un grupo carboxilo o amino en su molécula. Los acoplamientos de estos dos compuestos orgánicos se han llevado a cabo, por un lado, a través de los grupos hidroxilo del anillo A del triterpeno y del grupo carboxilo de la cumarina que forman un enlace éster. Otra forma de unión entre el triterpeno y las cumarinas ha sido el acoplamiento de los grupos carboxilo del triterpeno y de las cumarinas, a través de diversos conectores alquildiamina con diferente longitud de cadena, para formar enlaces amida. De forma similar, y empleando una cumarina con grupo amina en su molécula, se ha semisintetizado un derivado triterpénico con hasta tres moléculas de cumarina unidas sobre los grupos hidroxilo del anillo A y/o el grupo carboxilo de C-28. Estos 12 cumarina-triterpeno derivados han sido estudiados por sus propiedades citotóxicas sobre tres líneas celulares cancerígenas (B16-F10, HT29 y Hep G2). Los valores de concentración de IC₅₀ de estos derivados en las tres líneas celulares cancerígenas, son relativamente bajos para cuatro compuestos, mejorando sensiblemente los resultados de su precursor, el ácido maslínico. Sobresale entre ellos el derivado del ácido maslínico **10**, con dos cumarinas acopladas en los grupos hidroxilo del anillo A, con una IC₅₀ cercana a la escala nano-molar (IC₅₀ = 0.58 mM). Se ha estudiado también el efecto inductor de la apoptosis y el efecto sobre el ciclo celular de estos cuatro derivados más citotóxicos. Estos cuatro derivados elegidos se pueden considerar como buenos compuestos proapoptóticos, con porcentajes de apoptosis superiores al 50%.

IV.2. INTRODUCCIÓN

Los triterpenoides son productos naturales presentes en plantas y muchos otros organismos, que tienen diversas actividades biológicas como agentes anticancerígenos, antivirales, antimicrobianos y antiinflamatorios.^{1,2,3,4,5} Más específicamente, los triterpenos pentacíclicos que se encuentran en la naturaleza, especialmente en plantas y hongos, son metabolitos secundarios que realizan funciones muy variadas en los organismos vivos y pueden presentar diferentes esqueletos carbonados como ursano, oleanano, lupano, etc.² Dentro de este grupo de los triterpenos pentacíclicos, el ácido oleanólico (AO, ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-óico) y el ácido maslínico (AM, ácido 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-óico) han demostrado ser muy abundantes en algunas fuentes naturales.

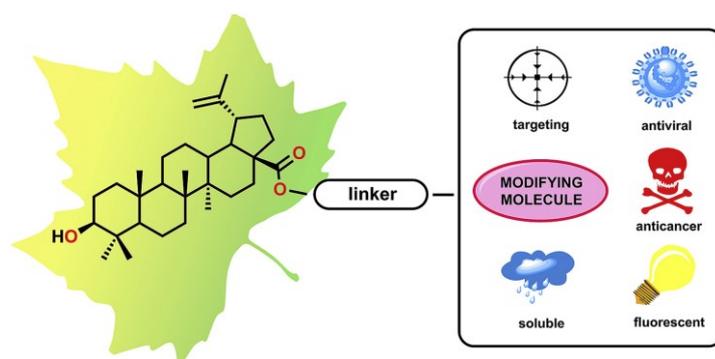


Figura IV.1. Ejemplo de protocolo de diseño y semi-síntesis de conjugados de triterpenos pentacíclicos y su uso en investigación médica.¹

Se ha demostrado que estos ácidos triterpénicos poseen una gran cantidad de actividades biológicas interesantes, para ser utilizados especialmente como potenciales agentes antivirales, anticancerígenos y antiinflamatorios.^{6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17}

AO y AM son productos naturales que se encuentran en cantidades apreciables en los desechos líquidos y sólidos de la industria oleica, lo cual representa una fuente natural muy importante, a partir de la cual, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un procedimiento simple y barato para extraerlos con una excelente pureza.¹⁸ En este sentido, la comunidad científica ha llevado a cabo múltiples reacciones de formación de derivados con estos y otros ácidos triterpénicos, introduciendo varios heterociclos en la molécula, conectando otras moléculas o fragmentos moleculares del esqueleto de triterpeno, a través de los dos puntos de funcionalización más comunes, el grupo hidroxilo del anillo A y/o el grupo carboxilo presente en la posición C-28. De esta manera, en los últimos años, se ha sintetizado una gran cantidad de compuestos conjugados con Triterpenos, que manifiestan una amplia gama de actividades biológicas y que les han permitido ser utilizados en investigaciones médicas recientes, como una alternativa a los medicamentos habituales en ciertas enfermedades como el cáncer, el SIDA, la diabetes, etc.^{19,20,21,22,23}

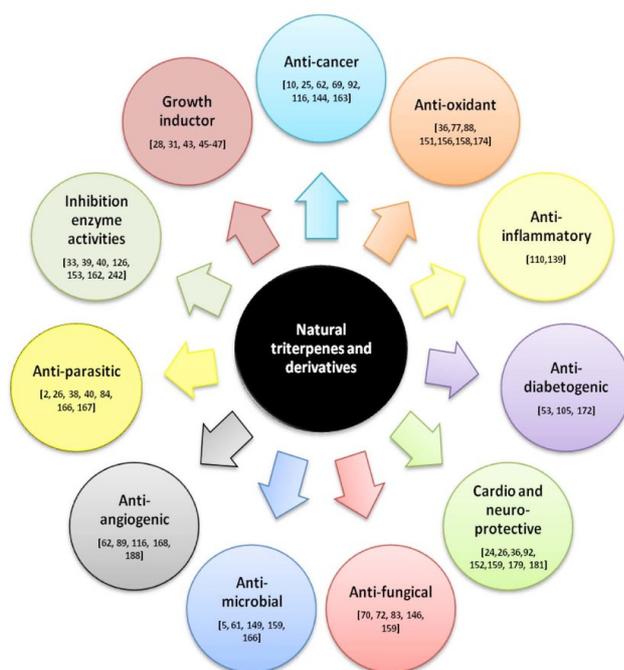


Figura IV.2. Principales actividades biológicas de los triterpenos y sus derivados.³

Los derivados conjugados más conocidos de los triterpenos pentacíclicos con actividad antiviral son los derivados del ácido betulínico, un ácido triterpénico pentacíclico natural con esqueleto de lupano. Siendo el ácido 3 β -(2,2'-dimetil)hemisuccinil betulínico (CDDO), comúnmente conocido como bevirimat, el candidato más prometedor.^{24,25} Además, se han utilizado otros triterpenos, con esqueleto de lupano, para obtener diferentes derivados unidos directamente o a través de varios conectores, a las posiciones funcionalizadas del esqueleto de carbonado de la molécula AZT (azidotimidina), un medicamento utilizado contra el cáncer,^{26,27,28,29,30,31} obteniéndose así una amplia gama de derivados conjugados con actividades similares al bevirimat.

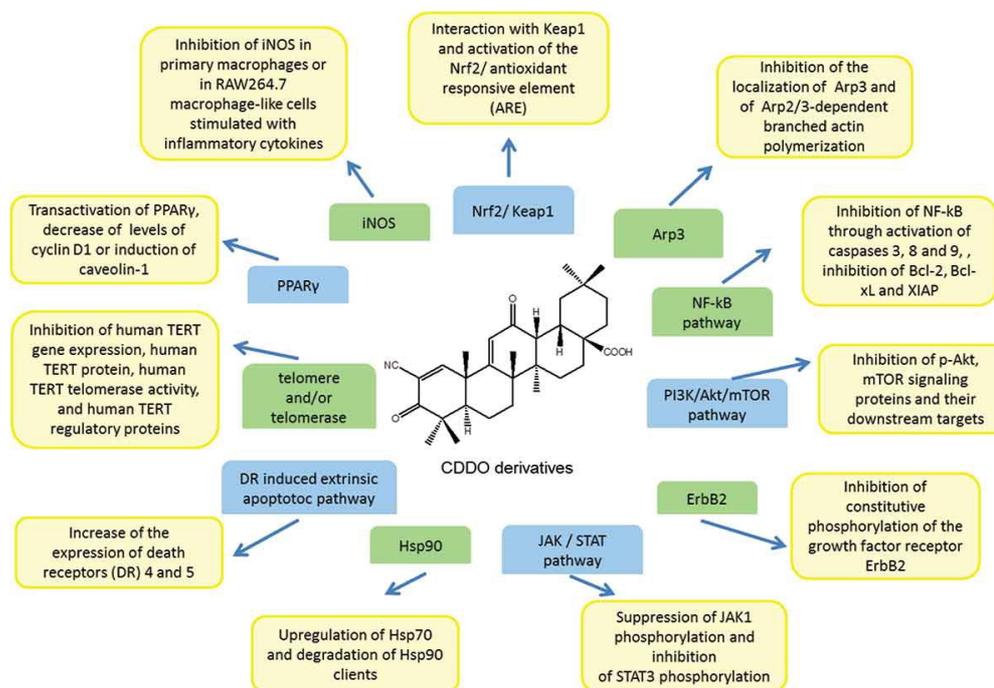


Figura IV.3. Principales objetivos biológicos de los derivados de CDDO.³²

Por otro lado, a partir de triterpenos con estructura de oleaneno, los ácidos oleanólico y maslínico, se han preparado y ensayado diversos derivados que muestran actividades antivirales interesantes.^{33,8,34,35} Estos derivados conjugados de AO y AM se obtuvieron mediante el acoplamiento de diferentes acilos en los grupos hidroxilo del anillo A del triterpeno y/o varios aminoácidos al grupo carboxilo C-28 del mismo. Asimismo, nuestro grupo de investigación realizó la obtención, en fase sólida, de una amplia gama de derivados de AO bifuncionalizados, mediante la unión de 10 anhídridos de ácido al grupo hidroxilo de C-3 y 3 aminoácidos diferentes al grupo carboxilo de C-28.³⁶ Algunos de estos conjugados bifuncionales de AO, sobre todos aquellos a los que les queda un grupo carboxilo libre, como los conjugados con anhídrido ftálico, han demostrado ser potentes agentes antivirales que actúan sobre la proteasa del VIH-1.

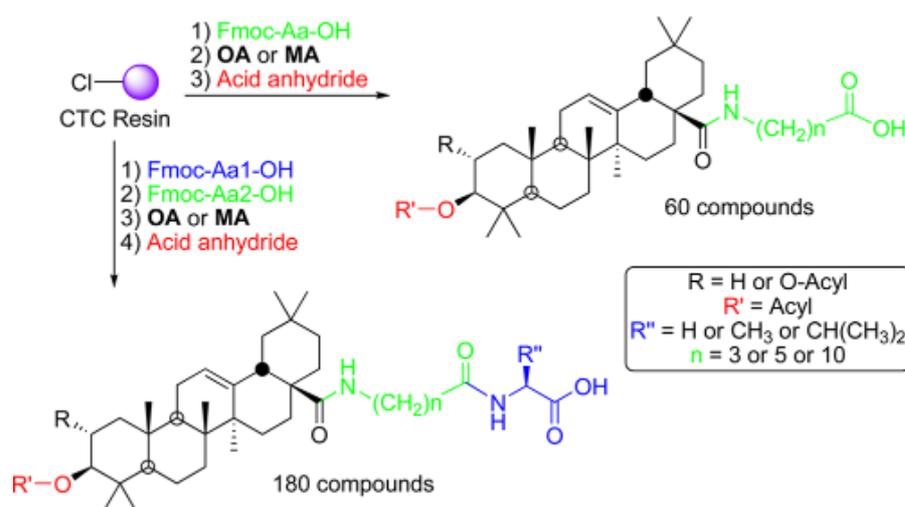


Figura IV.4. Semi-síntesis de derivados bifuncionalizados de AO y AM con propiedades anticancerígenas y antivirales.³⁶

Muchos de los conjugados de los triterpenos pentacíclicos semi-sintetizados en los últimos años, se han ensayado también como agentes antiproliferativos, ya que son capaces de causar disrupción mitocondrial en las células cancerosas y conducir las a la apoptosis. Así, diferentes derivados de estos productos naturales, principalmente de lupano, ursano y oleanano, unidos a la rodamina, han presentado actividades apoptóticas con bajas concentraciones IC_{50} , considerándose agentes antiproliferativos efectivos en algunas líneas celulares cancerígenas.^{37,38,39} En este sentido, y dado que los complejos de platino son fármacos de uso prolongado contra el cáncer, últimamente también se han preparado diferentes conjugados de estos complejos con triterpenos pentacíclicos para verificar su eficacia en el tratamiento del cáncer.^{40,41,42} Sin embargo, se ha encontrado en casi todos los casos, que estos conjugados de triterpenos pentacíclicos con complejos de platino tienen una IC_{50} moderada alrededor de 6-15 μM , similar a la del bevirimat.

Asimismo, se han preparado otros derivados conjugados de triterpenos pentacíclicos que tienen una amplia gama de actividades biológicas, por ejemplo, triterpenos con esqueleto de lupano conjugados con urea o tiourea con actividad antiinflamatoria,⁴³ con residuos de amino-heterociclos como agentes antioxidantes,⁴⁴ con imidazol con actividades antifúngicas y antiplasmodiales.^{45,46} De igual manera, recientemente se han publicado derivados de triterpenos, de tipo oleanano, unidos a diaminas con propiedades bactericidas,⁴⁷ antioxidantes⁴⁸ y, para formar geles supramoleculares.⁴⁹ Finalmente, se han formado conjugados de los triterpenos pentacíclicos con compuestos fluoróforos, para ser utilizados como sondas fluorescentes en estudios biológicos en moléculas en células y tejidos.^{50,51,52,53,54}

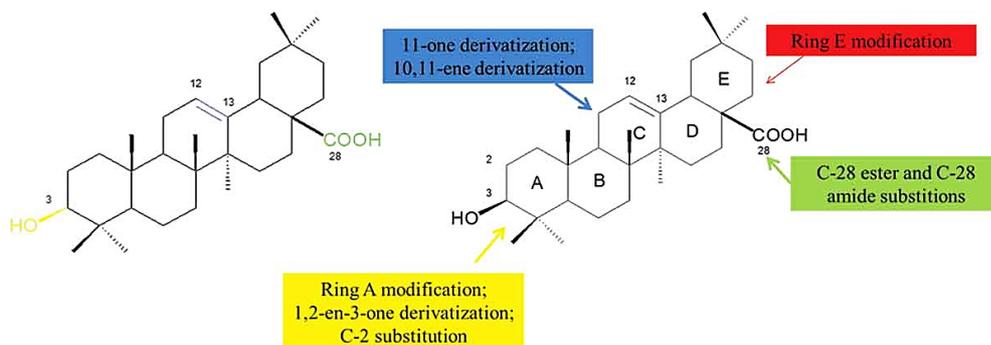


Figura IV.5. Posibles modificaciones en el ácido oleanólico para obtener derivados bioactivos.³²

En este trabajo, se han unido diferentes cumarinas comerciales a través de los grupos hidroxilo del anillo A y/o del grupo carboxilo C-28 del ácido maslínico. Las cumarinas son productos naturales presentes en muchas plantas, que las utilizan para la defensa química contra sus depredadores. Las cumarinas son compuestos químicos orgánicos que tienen un esqueleto aromático llamado 2H-chromen-2-ona, que consiste en un benceno que tiene dos hidrógenos adyacentes del anillo reemplazados por una cadena de lactona y, por lo tanto, forma un segundo heterociclo de seis miembros. Las cumarinas comerciales utilizadas para este estudio han sido: 7-amino-4-metilcumarina (AMC, número CAS: 26093-31-2), ácido cumarin-3-carboxílico (C3CA, número CAS: 531-81-7), 7-hidroxicumarinil-4-ácido acético (HCAA, Número CAS: 6950-82-9) y ácido p-cumárico (PCA, Número CAS: 501-98-4). La 7-amino-4-metilcumarina, es un reactivo utilizado para obtener sustratos fluorogénicos con el fin de detectar la actividad proteolítica de las enzimas.^{55,56,57} El ácido cumarina-3-carboxílico, es un compuesto utilizado como detector de radicales libres en soluciones acuosas.⁵⁸ El 7-hidroxicumarinil-4-ácido acético se usa, por ejemplo, unido al BSA, como una sonda espectrofluorométrica para la determinación de la concentración de ácidos grasos en soluciones acuosas.^{59,60}

Finalmente, el ácido p-cumárico, es un producto natural que se encuentra en una amplia variedad de plantas comestibles y se ha utilizado como sustrato quimioluminiscente para la detección de proteínas.^{61,62}

Las cumarinas representan un esqueleto carbonado privilegiado para obtener medicamentos, por sus propiedades físico-químicas y porque son capaces de formar una gran variedad de cumarinas con distinta funcionalización.⁶³ Los productos naturales que tienen el esqueleto de carbonado de las cumarinas han demostrado tener un amplio espectro de actividades farmacológicas contra el cáncer, el SIDA, el Alzheimer, la diabetes, la tuberculosis, la hepatitis, etc.^{64,65,66}

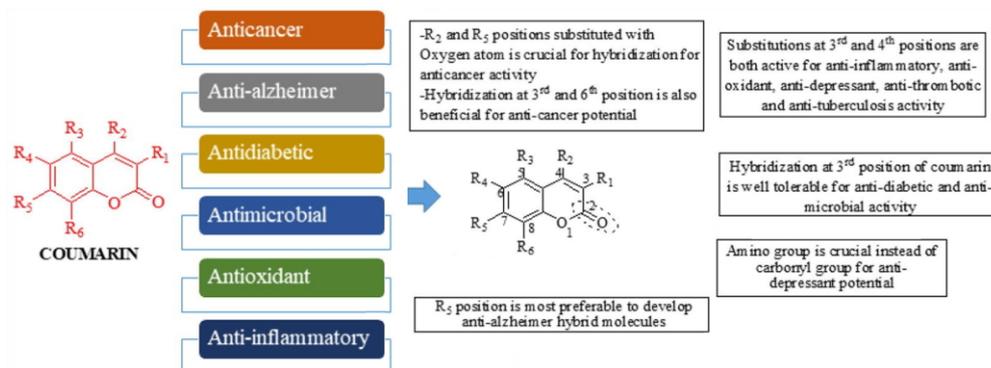


Figura IV.6. Derivados de cumarina con diferentes propiedades biológicas.⁶⁷

En base a esta premisa, en los últimos años, se ha estudiado un gran conjunto de moléculas híbridas basadas en cumarinas y obtenidas por conjugación con otros farmacóforos. Así, se han obtenido derivados de cumarinas con indol, triazol, pirimidina, imidazol, calcona, etc., como agentes anticancerígenos. Por otro lado, otros conjugados de cumarina se han sintetizado con apigenina, triazol, glioxal, péptidos, etc. con propiedades antidiabéticas y antimicrobianas.⁶⁸

De manera similar, otros derivados de cumarina con bencimidazol, polifenoles, teofilina, pirazol, etc. Tienen varias actividades como como antiinflamatorios, antioxidantes, antidepresivos, antitrombóticos, antituberculosos.⁶⁷

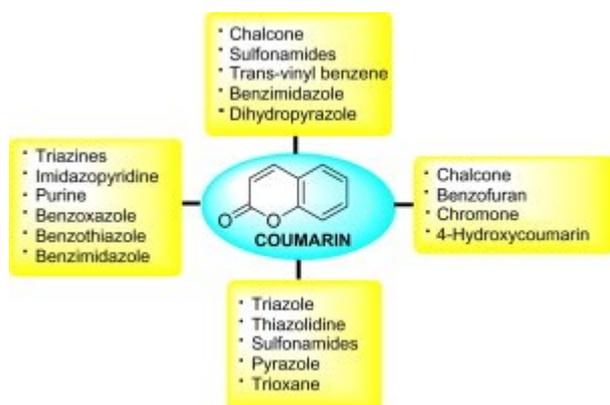


Figura IV.7. Derivatización de cumarinas naturales activas para obtener moléculas híbridas como nuevos agentes terapéuticos.⁶⁹

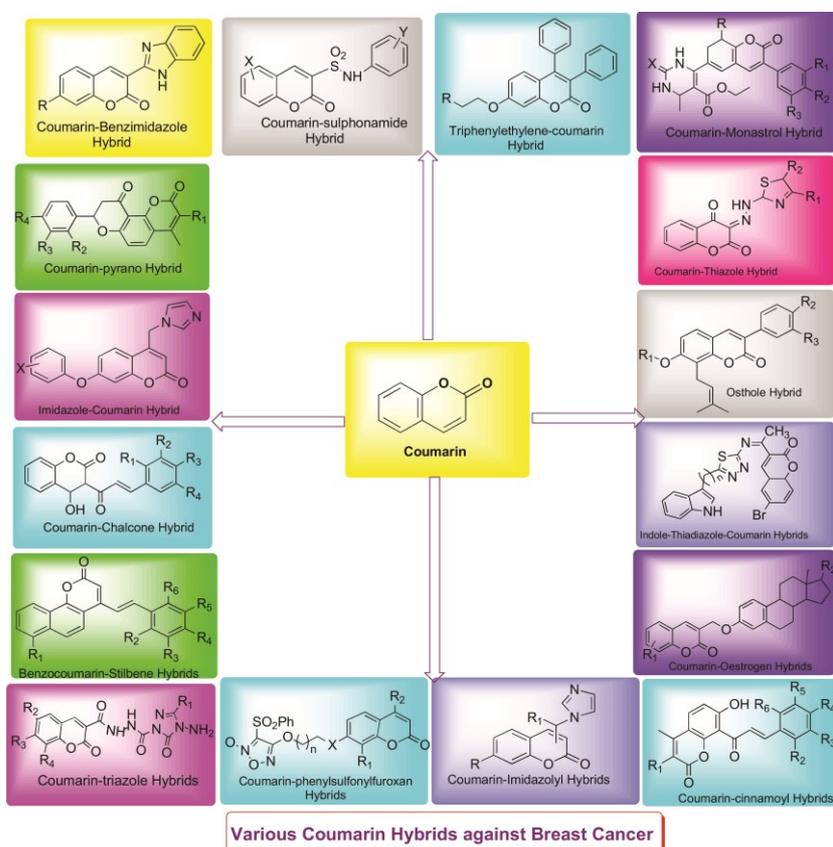


Figura IV.8. Algunos derivados de cumarinas usados como agentes anticancerígenos.⁷⁰

En los últimos años, utilizando cumarinas y otras moléculas orgánicas, se han preparado diferentes conjugados que representan sondas teranósticas, es decir, moléculas que sirven tanto, para un buen diagnóstico, como para el tratamiento de enfermedades cancerígenas y virales.^{71,72} De manera similar, para el desarrollo de nuevos productos para el cáncer de mama, se han acoplado diferentes cumarinas al grupo fenólico del anillo A de varios estrógenos. Los conjugados de estrógeno-cumarina presentaron actividades anticancerígenas similares al fármaco, 4-hidroxitamoxifeno, utilizado clínicamente.⁷³

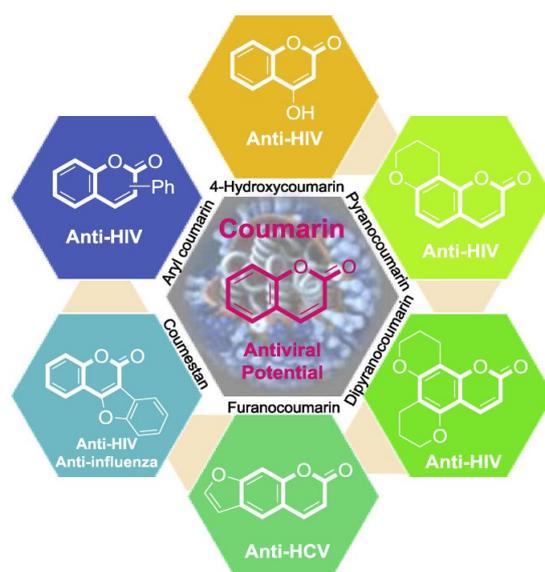


Figura IV.9. Algunos derivados de cumarinas usados como agentes antivirales.

Finalmente, diversos conjugados del ácido betulínico, un triterpeno natural con propiedades anticancerígenas, se han preparado recientemente uniendo varios restos de cumarina en el anillo A y en el grupo hidroximetileno del esqueleto triterpénico.⁵³ Estos conjugados de cumarina-triterpeno constituyen sondas fluorescentes interesantes que han permitido estudios subcelulares sobre la ingesta y la ubicación del fármaco.

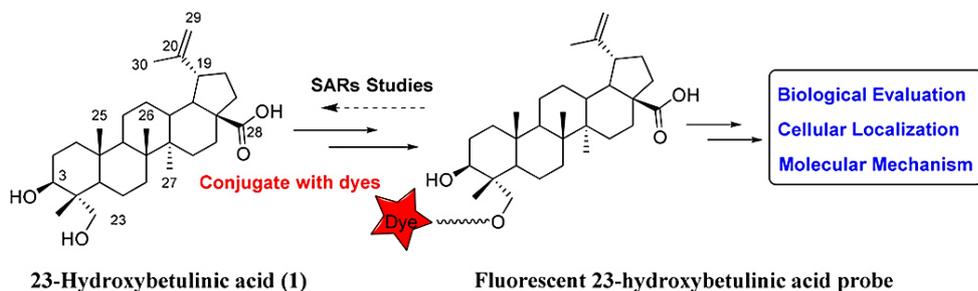


Figura IV.10. Estrategia global de etiquetado fluorescente del ácido 23-hidroxibetulinico.⁵³

En este trabajo, se ha partido del ácido maslínico (AM). Sobre el grupo carboxilo de C-28 de este triterpeno natural, se unieron las cumarinas **II**, **III** y **IV**, utilizando varios conectores de alquildimamina con diferente longitud de cadena. Por otro lado, también se ha preparado un derivado triplemente conjugado de AM, acoplando, a los grupos hidroxilo del anillo A, dos moléculas de cumarina **II** (C3CA) mediante enlaces éster, y, al grupo carboxilo C-28 de triterpeno, la cumarina **I** (AMC), a través de un enlace amida. Estos 12 cumarina-triterpeno conjugados han sido estudiados por sus propiedades anticancerígenas frente las líneas celulares cancerígenas B16-F10, HT29 y Hep G2. Los resultados obtenidos de estos estudios de actividad biológica demuestran que, 4 de estos cumarina-triterpeno derivados (**1**, **4**, **7** y **10**), presentan bajos valores de IC₅₀ como agentes antiproliferativos y alto porcentajes de apoptosis total, por lo que pueden ser considerados como potenciales agentes anticancerígenos de futuro.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

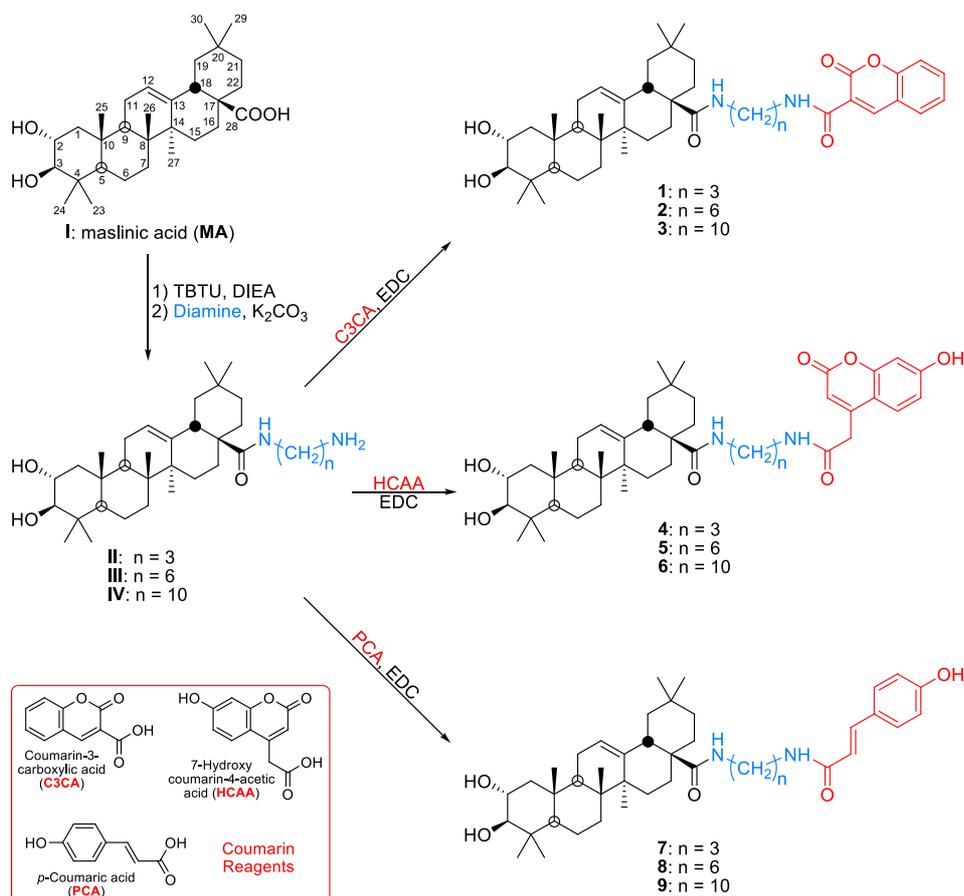
IV.3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

En el presente trabajo se ha utilizado el ácido maslínico (AM, I, ácido $2\alpha,3\beta$ -dihidroxi-12-oleanen-28-oico), aislado de los desechos de la industria del aceite de oliva, como material de partida para obtener varios derivados conjugados de triterpeno-cumarina (Esquemas IV.1 y IV.2). El AM fue aislado de la fuente natural mediante un procedimiento de extracción en un sistema Soxhlet, usando acetato de etilo como disolvente y, después, fue purificado en una columna de cromatografía flash, empleando mezclas de acetona y diclorometano, como eluyente.

En primer lugar, se semisintetizaron nueve derivados conjugados, por unión de tres cumarinas diferentes al grupo carboxilo de C-28 del esqueleto de triterpeno (Esquema 1). Para este acoplamiento, se usaron tres conectores de alquildiamina, con diferente longitud de cadena (con 3, 6 o 10 átomos de carbono).

De este modo, en primer lugar, se prepararon los derivados intermedios de diamina-AM (II, III y IV), de acuerdo con lo realizado con anterioridad,⁷³ uniéndose al grupo carboxílico C-28 a las dialquilaminas propano-1,3-diamina, hexano-1,6-diamina o decano-1,10-diamina (Esquema IV.1).

A partir de estos conjugados intermedios de AM, se formaron nueve de los derivados de cumarina-triterpeno, acoplando al grupo amino terminal libre, tres cumarinas que tienen un grupo carboxilo, formando con el grupo amino mencionado un puente amida. Todas estas reacciones se llevaron a cabo con EDC como reactivo de acoplamiento y DMF como disolvente, a reflujo durante 2 horas.



Esquema IV.1. Semisíntesis de los conjugados 1-9 por unión de AM y tres cumarinas diferentes

Como se puede observar en el Esquema IV.1, se unieron los intermedios de diamina-AM (**II**, **III** y **IV**), con C3CA (ácido cumarina-3-carboxílico) para obtener los derivados conjugados **1**, **2** y **3**, respectivamente, con buen rendimiento. Estos compuestos (**1**, **2** y **3**) mostraron las siguientes masas molares: 701.4533, 743.5015 y 799.5612 Da, que están de acuerdo con las fórmulas moleculares $C_{43}H_{60}N_2O_6$, $C_{46}H_{66}N_2O_6$ y $C_{50}H_{74}N_2O_6$, respectivamente. Los espectros de 1H RMN de los compuestos **1**, **2** y **3** son muy similares entre sí, con señales más desapantalladas del triterpeno, situadas alrededor de 5.4 ppm (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz) debido a H-12, señales a δ_H 3.60-3.70 y 3.00, (1H, cada uno) de los protones geminales a los grupos hidroxilo en C-2 y C-3, respectivamente, del anillo A del triterpeno.

La cadena de diamina aparece alrededor de δ_H 3.00-3.30 (señales de dos protones de C-1' unidos al grupo amida de AM) y cerca de 3.45 ppm (tripleto de los protones de C-3' en **1**, C-6' en **2** y C-10' en **3**, unidos al grupo amida de cumarina). Por otro lado, los dos protones NH de los grupos amida, están situados a δ_H 8.80 (t, 1H, para el NH del enlace amida formado con el resto de cumarina) y a δ_H 6.50-6.00 (t, 1H, para el NH del grupo amida del fragmento triterpénico). Finalmente, los tres derivados de AM y C3CA, **1**, **2** y **3**, mostraron las señales aromáticas adecuadas, tanto en multiplicidad, como en desplazamiento químico, correspondientes a los cinco protones aromáticos del esqueleto de cumarina.

Por otra parte, los espectros de ^{13}C RMN de estos conjugados AM-cumarina presentan las señales típicas de 30 carbonos del esqueleto de oleaneno y diez carbonos de la parte de cumarina, destacando las señales de carbono carboxílico de los dos grupos amida, que estaban situados en torno a δ_C 178, para el grupo amida del AM y 161-162 ppm, para el grupo amida de la cumarina. Además, en las señales de los carbonos de la cadena de alquildiamina aparecen como más desapantallados los carbonos de los extremos de la cadena, por lo tanto, C-3' (36.19 ppm), C-6' (39.57 ppm), C-10' (39.55 ppm), mientras que C-1' en los tres derivados se sitúa entre 37-40 ppm.

Como podemos apreciar en el Esquema IV.1, también se formaron los conjugados **4**, **5** y **6**, por reacción de los intermedios **II**, **III** y **IV** con la cumarina HCAA (ácido hidroxycumarinil-4-acético). Las masas molares para los compuestos **4**, **5** y **6** fueron: 731.4640, 773.5108 y 829.5714 Da, coincidentes con las fórmulas moleculares $C_{44}H_{62}N_2O_7$, $C_{47}H_{68}N_2O_7$ y $C_{51}H_{78}N_2O_7$, respectivamente. Los espectros de 1H RMN de estos derivados mostraron las señales características del esqueleto de oleaneno del AM, junto con las señales adecuadas para de los 11 protones aromáticos de la parte cumarínica.

Estos derivados **4**, **5** y **6** no son solubles en Cl_3CD , y al realizar sus espectros de ^1H RMN en CD_3OD , se observó que en ellos no aparecían las señales de los protones de los dos grupos NH presentes en la molécula. Para poder ver estas señales, estos espectros tuvieron que realizarse en piridina- d_5 y $\text{DMSO-}d_6$, disolventes con los que, si aparecían estas señales, como tripletes ($J = 5.5$ Hz), a los desplazamientos químicos (ppm) indicados en la Tabla IV.1.

Tabla VI.1. Desplazamientos químicos de ^1H RMN de los protones de los grupos amida de los derivados **4**, **5** y **6** en diferentes disolventes.

| Grupo Amida | Disolvente | 4 | 5 | 6 |
|-------------|----------------------|------|------|------|
| AM-CONH- | CD ₃ OD | --- | --- | --- |
| -HNCO-Cum | | --- | --- | --- |
| AM-CONH- | Pirina- d_5 | 7.65 | 7.40 | 7.36 |
| -HNCO-Cum | | 9.03 | 8.83 | 8.83 |
| AM-CONH- | DMSO- d_6 | 7.22 | 7.21 | 7.20 |
| -HNCO-Cum | | 9.19 | 8.17 | 8.15 |

Además, en los espectros de ^1H RMN en CD_3OD de **4**, **5** y **6** se observó otro comportamiento irregular, ya que la señal del grupo metileno bencílico (2H-2'') de la estructura cumarínica (HCAA) sólo aparecía para el compuesto **5**, como un singlete a 3,73 ppm. Estas señales si eran visibles para todos los compuestos, cuando éstos se realizaron en piridina- d_5 y $\text{DMSO-}d_6$, tal y como se indica en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Desplazamientos químicos de ^1H RMN de los protones del grupo metileno benílico (2H-2'') en los derivados **4**, **5** y **6** en diferentes disolventes.

| Disolvente | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------|------|------|------|
| CD ₃ OD | --- | 3.73 | --- |
| Piridina-d ₅ | 3.95 | 3.96 | 3.97 |
| DMSO-d ₆ | 3.33 | 3.34 | 3.34 |

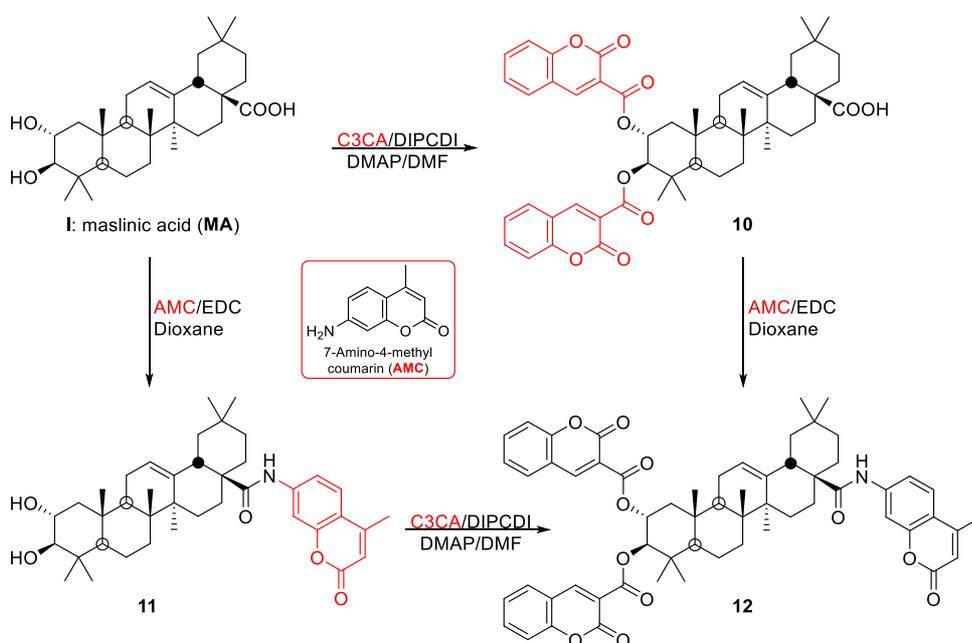
Sin embargo, los espectros de ^{13}C RMN de los conjugados **4**, **5** y **6** se llevaron a cabo sin dificultad en CD₃OD, observándose las señales características del ácido maslínico, con una señal a 180 ppm, correspondiente a un grupo amida (AM-CONH-); junto con otra señal entre 170-171 ppm, correspondiente al otro grupo amida (-HNCO-Cum), además de la del grupo metileno, entre 37-40 ppm.

Por último, en el Esquema IV.1, se puede ver la semisíntesis de los conjugados AM-cumarina **7**, **8** y **9**, a partir de los intermedios **I**, **II** y **III**, acoplándose con PCA (ácido *p*-cumárico), de acuerdo con las condiciones indicadas anteriormente. Estos derivados conjugados mostraron masas molares de 675.4734, 717.5211 y 773.5844 Da, correspondientes a las fórmulas moleculares de C₄₂H₆₂N₂O₅, C₄₅H₆₈N₂O₅ y C₄₉H₇₆N₂O₅, respectivamente.

Los espectros de ^1H RMN de **7**, **8** y **9** presentaron las señales características de los protones del ácido maslínico junto con las del ácido *p*-cumárico, los cuatro protones aromáticos y los dos protones de doble enlace, que aparecían a 7.45 ppm (d, $J=15.7$ Hz, H-2'') y 6.40 ppm (d, $J=15.7$ Hz, H-3''). Los espectros de ^{13}C RMN de **7**, **8** y **9** mostraron las señales de carbono características tanto del triterpeno como de la cumarina. Entre estas últimas, destacan las de los carbonos del doble enlace de la cumarina con C-2'' y C-3'' situadas a δ_{C} 118 y 141.

Finalmente, dentro de esta secuencia de preparación de derivados conjugados de AM con cumarinas, nuestro objetivo fue formar un derivado triterpénico triplemente sustituido por dos restos de cumarina diferentes (Esquema IV.2).

Este conjugado AM-cumarina (**12**), se obtuvo por la unión de dos unidades de la cumarina C3CA (ácido cumarina-3-carboxílico) a los grupos hidroxilo del anillo A, a través de un enlace éster y, por otro lado, se unió la cumarina AMC (7-amino-4-metilcumarina) al grupo carboxilo de C-28, a través de un enlace amida. El conjugado (**12**) puede obtenerse siguiendo dos rutas alternativas dependiendo del orden en el que se unen los dos tipos de cumarinas (Esquema IV.2).



Esquema IV.2. Semisíntesis de los conjugados **1-9** por unión de AM y dos cumarinas diferentes.

El conjugado AM-cumarina (**10**), se formó a partir de dos unidades de C3CA que fueron añadidas al ácido maslínico, en DMF y en presencia de DIPC DI y DMAP. En esta reacción se produjo el acoplamiento del grupo carboxilo de la cumarina a los grupos hidroxilo en C-2 y C-3 de AM (Esquema 2). Este conjugado **10** presenta una masa molar de 817.3943 Da, correspondiente a una fórmula molecular adecuada de $C_{50}H_{56}O_{10}$. Este derivado **10** muestra las señales típicas de 1H RMN del triterpeno y cumarina usados.

En este espectro destaca el desapantallamiento que se ha producido en las señales de los protones geminales a los grupos hidroxilo de C-2 y C-3, debido a la formación de los enlaces éster correspondientes con el grupo carboxilo de la cumarina (δ_H 5.47, 1H, ddd, $J_1=J_2=10.3$ Hz, $J_3=4.6$ Hz, H-2; δ_H 5.21, 1H, d, $J=10.3$ Hz, H-1). Por otro lado, en el espectro de ^{13}C RMN de este compuesto se encuentran las señales características de los carbonos tanto del AM como de la cumarina, junto con las señales de dos grupos carboxilo (alrededor de 162 ppm), debidas a los nuevos enlaces éster.

Por otro lado, cuando AM se trató con la cumarina AMC en dioxano y en presencia de EDC (Esquema IV.2), se formó un enlace amida entre el grupo carboxilo de C-28 de AM y el grupo amino de AMC, obteniéndose la AM-Cumarina **11** previamente sintetizada.⁵⁰

El conjugado AM-cumarina **12**, se obtuvo de dos formas. La primera fue a partir del derivado **10** por reacción con la cumarina AMC en dioxano y presencia de EDC. En la segunda, se partió del derivado **11**, por tratamiento con la cumarina C3CA en DMF y en presencia de DIPCDI y DMAP (Esquema IV.2). Éste derivado **12** tiene una masa molar de 974.4480 Da, de acuerdo con la fórmula molecular $C_{60}H_{64}NO_{11}$, y muestra también unos datos espectroscópicos de RMN similares tanto a los de los compuestos **10** y **11**.

IV.3.2. CITOTOXICIDAD

Se han examinado los efectos de los 12 derivados de AM con las tres cumarinas antes citadas (productos **1-12**) sobre la proliferación de tres líneas celulares cancerígenas, a saber, B16F10 (células de melanoma de ratón murino), HT29 (células de carcinoma humano de colon) y Hep G2, (células de carcinoma humano de hígado) mediante el ensayo de MTT con dosis crecientes de cada compuesto (0-100 mg/mL).

La viabilidad celular fue determinada a las 72 horas del tratamiento, por absorción del tinte formazan. Los datos obtenidos se midieron a 550 nm y fueron expresados como porcentaje de células de control no tratadas. En estas tres líneas se determinó la concentración de compuestos requerida para que inhibición de crecimiento fuera la mitad (IC_{50}). Los resultados de estos ensayos son representados en la Tabla IV.3 y expresados como la concentración a la que cada compuesto es capaz de inhibir el 50 % del crecimiento de las diferentes células tumorales expresado en μM (IC_{50}). Así pues, en la Tabla IV.3 se indican los valores de IC_{50} de la actuación de los derivados AM-Cumarina (1-12) sobre la proliferación celular en las tres líneas celulares cancerígenas antes mencionadas.

Tabla IV.3. Efectos inhibidores del crecimiento celular de los derivados AM-Cumarina (1-12) sobre las células cancerígenas de las líneas B16F10, HT29 y Hep G2.

| Compuesto/Línea celular | B16F10 (μM) | HT29 (μM) | HEPG2 (μM) |
|-------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| AM | 36.2 \pm 2.5 | 32.2 \pm 3.8 | 99.2 \pm 5.5 |
| AMC | >100 | >100 | >100 |
| C3CA | >100 | >100 | >100 |
| HCAA | >100 | >100 | >100 |
| PCA | >100 | >100 | >100 |
| 1 | 18,49 \pm 0,12 | 20,96 \pm 0,49 | 13,97 \pm 1,13 |
| 2 | >100 | >100 | 90,52 \pm 3,39 |
| 3 | >100 | >100 | 71,07 \pm 4,03 |
| 4 | 46,96 \pm 3,73 | >100 | 49,40 \pm 3,30 |
| 5 | >100 | >100 | 83,30 \pm 1,54 |
| 6 | >100 | >100 | 91,95 \pm 2,08 |
| 7 | 10,42 \pm 0,21 | 10,85 \pm 0,46 | 8,82 \pm 0,38 |
| 8 | >100 | >100 | 86,56 \pm 1,85 |
| 9 | >100 | >100 | >100 |
| 10 | 0,58 \pm 0,03 | 1,10 \pm 0,05 | 0,89 \pm 0,03 |
| 11 | >100 | 55,82 \pm 1,66 | 55,91 \pm 2,99 |
| 12 | >100 | 93,12 \pm 3,44 | 78,92 \pm 1,76 |

Se dan en primer lugar, en esta tabla, los valores de IC_{50} para los dos fragmentos que constituyen los distintos derivados obtenidos, el triterpeno AM y las cumarinas AMC, C3CA, HCAA y PCA. Como se puede apreciar el AM tiene una IC_{50} bastante baja en las líneas celulares B16F10 y HT29 (alrededor de 35 mM) mientras que en Hep G2 presenta un valor bastante más elevado que se acerca a 100 IC_{50} . Sin embargo, las cuatro cumarinas tomadas como reactivos son muy poco tóxicas con valores de IC_{50} superiores a 100 mM.

IV.3.3. APOPTOSIS

A la vista de estos resultados, es de destacar que el compuesto con mayor actividad inhibitoria sobre la proliferación de las tres líneas celulares cancerígenas ensayadas, es el derivado **10**, el cual consiste en el AM que tiene unidos en los hidroxilos de C-2 y C-3 un fragmento de la cumarina C3CA mediante un enlace éster. Como se puede apreciar la IC_{50} de este derivado **10** toma valores sobresalientes, muy cercanos a la escala nanomolar, (entre 0.58 y 1.10 mM) para las tres líneas celulares. Como se observa, parece ser que es imprescindible que el grupo carboxilo de C-28 del AM esté libre, puesto que cuando se le une la cumarina AMC en este lugar, por enlace amida, la IC_{50} del correspondiente derivado, producto **12**, aumenta sensiblemente. Señalar también que el derivado **11**, en el cual sólo hay unido la cumarina AMC al carboxilo del C-28 del AM, también se perjudica el efecto tóxico con respecto del AM como tal, tomando valores significativamente superiores a la IC_{50} de este producto natural prácticamente en todas las líneas celulares estudiadas.

Por último, en los casos de los otros derivados **1-9**, en los cuales la cumarina se une al carboxilo de C-28 del triterpeno a través de un conector de diamina de longitud variable, es de señalar que los mejores valores de IC_{50} se obtienen cuando el linker es lo más corto posible, la 1,3-diaminopropano.

Así en la gran mayoría de los casos, para los derivados **1**, **4** y **7**, estos valores de IC₅₀ son notables, se situándose entre 10 y 20 mM, mientras que cuando la cadena del conector aumenta en el número de carbono (6 ó 10 C) los valores de IC₅₀ aumentan de forma importante y prácticamente todos ellos, por encima de 100 mM. A la vista de los resultados antes comentados, referida a la inhibición sobre el crecimiento celular causada por estos derivados de AM-cumarina, se han elegido los derivados **1**, **4**, **7** y **10**, que tienen mayor efecto citotóxico sobre las tres líneas celulares cancerígenas antes citadas, para llevar a cabo los siguientes estudios citométricos. Así, los ensayos de determinación de los efectos apoptóticos de estos derivados sobre las tres líneas celulares cancerígenas se llevan a cabo por tinción con Annexina V (An-V), conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (PI).

Tabla IV.4. Análisis citométrico indicativo de los porcentajes de la situación celular tras la aplicación de los derivados **1**, **4**, **7** y **10** sobre las tres líneas celulares cancerígenas y la tinción con An-V-FICT/PI.

| Línea celular | Compuestos | Vivas | Ap. Temp. | Ap. Tard. | Ap. Total | Necrosis |
|----------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| B16-F10 | Control | 90.95 ± 1.13 | 0.15 ± 0.07 | 4.15 ± 1.62 | 4.30 ± 0.90 | 4.75 ± 2.75 |
| | 1 | 30.45 ± 1.91 | 48.45 ± 2.75 | 19.40 ± 4.24 | 67.85 ± 1.48 | 1.70 ± 0.42 |
| | 4 | 13.95 ± 3.89 | 74.85 ± 2.62 | 10.50 ± 1.41 | 85.35 ± 3.03 | 0.70 ± 0.04 |
| | 7 | 39.30 ± 3.53 | 39.00 ± 4.10 | 18.60 ± 0.07 | 57.60 ± 3.17 | 3.10 ± 0.57 |
| | 10 | 53.35 ± 2.90 | 18.10 ± 2.97 | 22.85 ± 3.75 | 40.95 ± 1.72 | 5.70 ± 0.82 |
| HT29 | Control | 89.50 ± 4.31 | 1.15 ± 2.40 | 7.65 ± 2.26 | 8.80 ± 1.40 | 1.70 ± 0.28 |
| | 1 | 56.30 ± 1.27 | 10.80 ± 0.57 | 29.20 ± 0.49 | 40.00 ± 0.49 | 3.70 ± 0.85 |
| | 4 | 41.40 ± 3.82 | 31.95 ± 2.33 | 20.45 ± 2.97 | 52.40 ± 2.97 | 6.20 ± 0.85 |
| | 7 | 52.90 ± 1.97 | 16.20 ± 3.61 | 29.40 ± 1.63 | 45.60 ± 1.98 | 1.50 ± 0.42 |
| | 10 | 35.65 ± 2.33 | 23.80 ± 4.24 | 34.05 ± 4.86 | 57.85 ± 1.62 | 6.50 ± 0.01 |
| Hep G2 | Control | 93.00 ± 0.77 | 2.40 ± 0.51 | 1.30 ± 2.32 | 5.70 ± 0.19 | 1.30 ± 0.34 |
| | 1 | 28.75 ± 2.76 | 50.10 ± 4.49 | 19.35 ± 4.82 | 69.45 ± 2.33 | 1.80 ± 0.35 |
| | 4 | 29.65 ± 1.34 | 48.45 ± 3.75 | 20.05 ± 5.30 | 68.50 ± 1.55 | 1.85 ± 0.21 |
| | 7 | 21.90 ± 1.27 | 57.35 ± 4.30 | 18.55 ± 3.23 | 75.90 ± 1.98 | 2.20 ± 0.63 |
| | 10 | 55.00 ± 1.41 | 19.20 ± 4.94 | 21.60 ± 3.16 | 40.80 ± 3.16 | 4.20 ± 1.13 |

Los valores de apoptosis se hicieron sobre las tres líneas celulares cancerígenas mencionadas a 72 horas después del tratamiento con los cuatros derivados triterpeno-cumarina seleccionados, **1**, **4**, **7** y **10**, a sus correspondientes concentraciones IC50. Los porcentajes de apoptosis se han determinado con la tinción celular con An-V-FICT/PI por análisis de citometría de flujo empleando la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia, diferenciando así entre células normales, células con apoptosis temprana, células con apoptosis tardía y células necróticas. Los porcentajes de apoptosis se dan en la Tabla IV.4 y en la Figura IV.11.

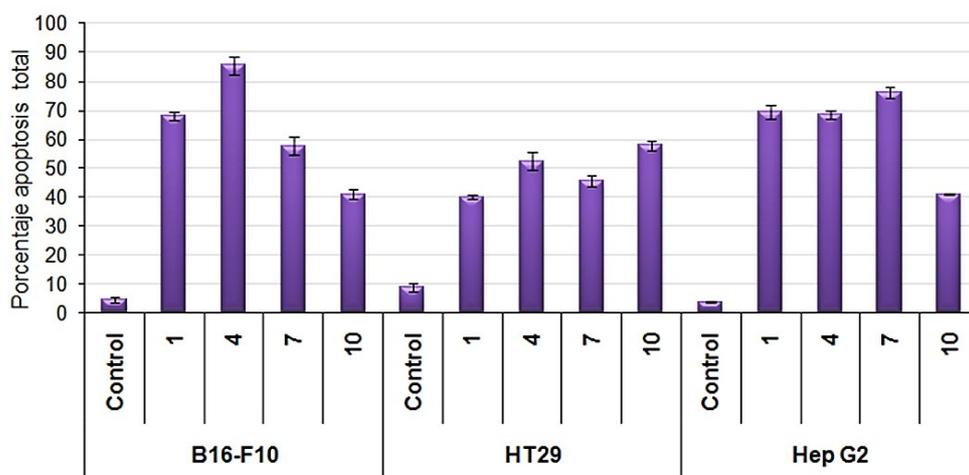


Figura IV.11. Resultados porcentuales del análisis por citometría de flujo de la apoptosis celular al aplicar los derivados **1**, **4**, **7** y **10** sobre las tres líneas celulares cancerígenas.

Estos resultados del análisis de citometría de flujo ponen de manifiesto que todos los derivados ensayados son apoptóticos con valores porcentuales de apoptosis iguales o superiores al 40-50% en las tres líneas celulares cancerígenas, alcanzándose valores máximos, que rondan entre 70-90% en algunos casos, como el derivado **4** en la línea celular B16-F10 o el derivado **7** en Hep G2.

Es de destacar, además, que no necesariamente el producto que presenta mayor inhibición de la proliferación celular, el derivado 10, es el más apoptótico, pues su apoptosis total, ronda siempre un valor alto pero discreto entre 40-50%. Esto parecía indicar que el proceso de alta citotoxicidad celular de este derivado ocurra por otras vías que no sean la apoptosis, o bien, que al ser tan elevada esa citotoxicidad haya muchas células muertas y en el análisis de citometría de flujo se haya perdido información. Además, cabe señalar que en todos los casos se aprecia un escaso valor del proceso de necrosis celular, que no supera el 5-6%. Por otra parte, los porcentajes de apoptosis temprana y tardía son variables según el compuesto y la línea celular cancerígena de que se trate. Esta distribución de las diferentes poblaciones del estado celular se estudia a continuación en las Figuras IV.12, IV.13 y IV.14.

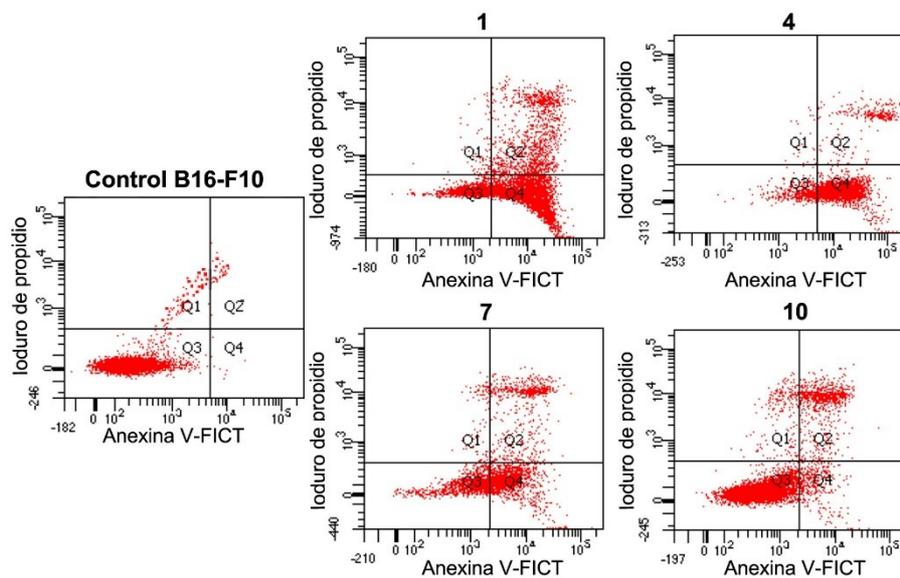


Figura IV.12. Análisis de citometría de flujo de la apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de las tres líneas celulares cancerígenas tras el tratamiento con los derivados **1**, **4**, **7** y **10**. Cuadrante Q1: Necrosis; Cuadrante Q2: Apoptosis tardía; Cuadrante Q3: Células vivas; Cuadrante Q4: Apoptosis temprana.

La distribución de poblaciones celulares en la apoptosis de las células cancerígenas B16-F10 tras ser tratadas con los derivados de triterpeno-cumarina **1**, **4**, **7** y **10** se dan en la Figura IV.12. Como se puede observar el producto más apoptótico en esta línea es el derivado **4**, con una apoptosis total del 85%, que se reparte entre un 75% de apoptosis temprana (Q4) y un 10% de apoptosis tardía (Q2) y casi sin necrosis (Q1, 0.7%). Cabe también mencionar el alto porcentaje de apoptosis total de derivado **1** con 70%.

En la línea celular HT29 (Figura IV.13) estos cuatro triterpeno-cumarina derivados **1**, **4**, **7** y **10**, son algo menos inductores de la apoptosis con valores situados entre 40-50% y siendo el derivado **10** el más apoptótico con 58% de apoptosis (23.8% apoptosis temprana y 34.05% apoptosis tardía).

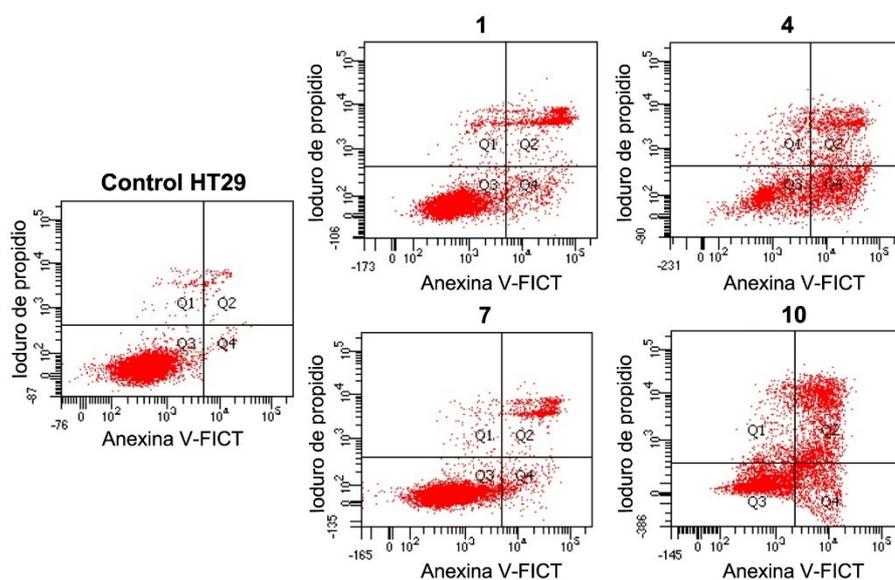


Figura IV.13. Análisis de citometría de flujo de la apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de las tres líneas celulares cancerígenas tras el tratamiento con los derivados **1**, **4**, **7** y **10**. Cuadrante Q1: Necrosis; Cuadrante Q2: Apoptosis tardía; Cuadrante Q3: Células vivas; Cuadrante Q4: Apoptosis temprana.

Por último, en la línea celular Hep G2 (Figura IV.14) destacan los derivados **1**, **4** y **7** con porcentajes de apoptosis cercanos al 70-75%. Mencionar también que en los casos de los tres derivados citados el porcentaje de apoptosis temprana se sitúa alrededor del 50% y el de tardía está en torno al 20%.

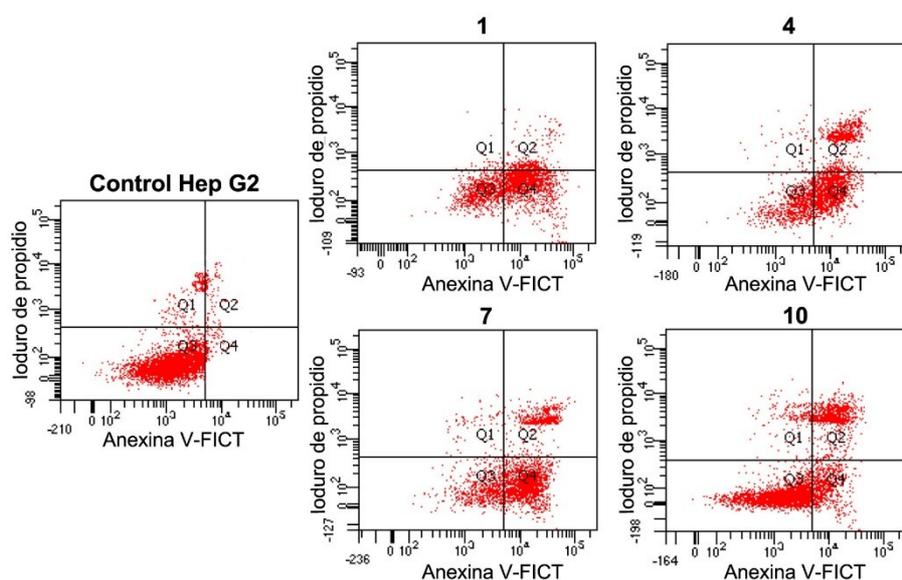


Figura IV.14. Análisis de citometría de flujo de la apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de las tres líneas celulares cancerígenas tras el tratamiento con los derivados **1**, **4**, **7** y **10**. Cuadrante Q1: Necrosis; Cuadrante Q2: Apoptosis tardía; Cuadrante Q3: Células vivas; Cuadrante Q4: Apoptosis temprana.

IV.3.4. CICLO CELULAR

En base a la citotoxicidad mostrada por los derivados **1**, **4**, **7** y **10**, es decir, la inhibición en el crecimiento celular causada por estos compuestos semisintéticos, también se estudiaron sus efectos sobre la distribución del ciclo celular, con el fin de determinar posibles efectos citostáticos causados por la respuesta citotóxica. Los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular fue analizado a las 72 h, mediante incorporación de ioduro de propidio.

Así, las tres líneas celulares B16-F10, HT29 y Hep G2, fueron tratadas con los coumarin-triterpeno derivados elegidos **1**, **4**, **7** y **10**, a sus respectivas IC_{50} en cada línea celular. También se usó la citometría de flujo para la medida de la ploidía del DNA y las alteraciones en los perfiles de ciclo celular. Se ha de tener en cuenta que el contenido de DNA es proporcional a la fluorescencia del yoduro de propidio, lo cual nos permite determinar el porcentaje de células en cada fase de ciclo celular, y también visualizar las subpoblaciones celulares con diferente contenido de DNA.

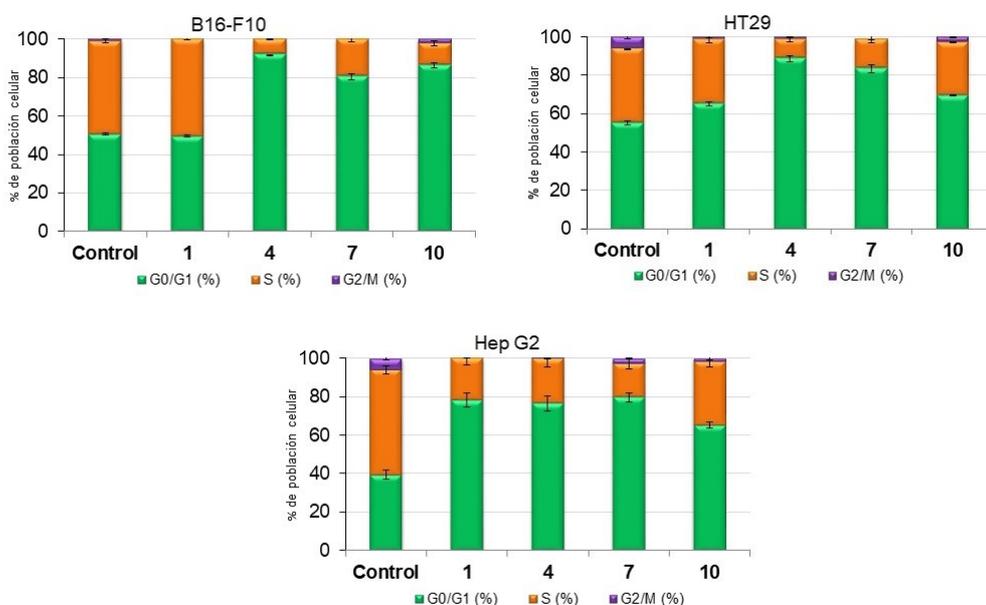


Figura IV.15. Cambios en el porcentaje celular, en cada fase del ciclo celular referido al control de células no tratadas. Se representan los valores para las tres líneas celulares B16-F10, HT29 y Hep G2, después de ser tratadas con los derivados **1**, **4**, **7** y **10**.

El análisis del histograma de DNA pone de manifiesto que los cuatro derivados escogidos **1**, **4**, **7** y **10**, producen arresto de ciclo celular en las tres líneas celulares ensayadas, aumentando el número de células en la fase G0/G1 con porcentajes superiores al 70%, salvo el derivado **1** en las líneas celulares B16-F10 y HT29.

Estos aumentos de población celular en G₀/G₁ van acompañados por disminuciones importantes del porcentaje del número de células proliferativas en la fase celular S, con porcentajes entre 10-30%. Señalar, finalmente que en todos los casos las poblaciones celulares en la fase G₂/M son prácticamente insignificantes.

IV.4. CONCLUSIONES

En este trabajo, partiendo del ácido triterpénico natural, ácido maslínico, se han semisintetizado 12 derivados triterpeno-cumarina mediante el acoplamiento de tres tipos de cuamrina a los dos puntos de funcionalidad más asequibles del ácido maslínico. Así partiendo de ácido maslínico, se ha conectado en primer lugar una dialquilamina de diferente longitud al carboxilo de C-18 de AM, a través de un enlace amida. Las dialquilaminas empleadas son de 3, 6 y 10 átomos de carbono que nos proporcionan 3 intermedios de AM con un grupo amino terminal libre. Posteriormente, al amino terminal de cada intermedio, se acoplaron tres cumarinas comerciales con grupo carboxilo mediante un nuevo enlace amida, y ello nos proporcionó los primeros 9 derivados de triterpeno y cumarina.

Posteriormente, se obtuvieron otros derivados de triterpeno y cumarina por reacción con los hidroxilos del anillo A del triterpeno con una de las cumarinas a través de un enlace éster y la formación de otro derivado por el carboxilo de C-28 por reacción con una cumarina con grupo amino. Por último, partiendo de estos derivados, y por una doble vía se llega a formar un derivado triterpeno cumarina que incorpora tres unidades de cumarina sobre el esqueleto del triterpeno. Se semisintetizan, por tanto, de esta forma tres nuevos derivados triterpeno-cumarina.

Tras la semisíntesis de estos 12 derivados triterpeno-cumarina, se estudió la actividad biológica de estos compuestos sobre tres líneas celulares cancerígenas B16-F10, HT-29 y Hep G2. Se observa en primer lugar que el producto con mayor actividad inhibitoria sobre la proliferación celular es el derivado **10**, compuesto que consiste en el ácido maslínico que incorpora dos moléculas de cumarina en los dos hidroxilos del anillo A. Esta inhibición ocurre en las tres líneas celulares ensayadas con valores que se aproximan a la escala nanomolar. También se determinaron los efectos apoptóticos en las tres líneas celulares cancerígenas antes citadas de los derivados con mayor toxicidad. Se obtuvieron así resultados discretos de porcentajes de apoptosis que oscilan entre el 40-75%, que sugieren buenas actuaciones de estos compuestos como potenciales agentes anticancerígenos. En base a la citotoxicidad manifestada por algunos derivados se llevó a cabo, finalmente, el estudio del ciclo celular para profundizar en la actuación de estos compuestos como posibles agentes anticancerígenos.

IV.5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

IV.5.1. GENERALES

Las medidas de los espectros de ^1H NMR y ^{13}C NMR se realizaron en los espectrómetros VARIAN Inova Unity y VARIAN Direct Drive. Los desplazamientos químicos de ^{13}C RMN se asignaron con la ayuda de experiencias DEPT, utilizando un ángulo de giro de 135° . Los espectros IR se registraron en un espectrómetro MATTSON SATELLITE FTIR. Las rotaciones ópticas se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer 241 a 25°C . La pureza de los nuevos compuestos se determinó mediante un sistema WATERS ACQUITY UPLC junto con un espectrómetro WATERS SYNAPT G2 HRMS (espectro de masas de alta resolución) con ESI (ionización por electropulverización).

Los puntos de fusión (pf) se determinaron usando un aparato Kofler (Reichter) y no se corrigieron. Todos los disolventes de reacción y los disolventes de cromatografía se destilaron antes de su uso. Los reactivos disponibles comercialmente se usaron sin purificación adicional. Se utilizaron 60 láminas de aluminio de gel de sílice Merck (ref. 1.16835) para TLC, y las manchas se hicieron visibles mediante pulverización con H_2SO_4 -AcOH- H_2O , seguido de calentamiento a 120°C .

Se usó gel de sílice Merck 60 (0.040-0.063 mm, ref. 1.09385) para la cromatografía instantánea. Como eluyentes se usaron CH_2Cl_2 (Fisher, ref. D/1852/17), CHCl_3 (Fisher, ref. C/4960/17), o n-hexano (Merck, ref. 1.04374), con cantidades crecientes de Me_2CO (Fisher, ref. A/0600/17), MeOH (Fisher, ref. M/4000/17) o AcOEt (Fisher, ref. E/0900/17).

Las cumarinas comerciales utilizadas en este trabajo fueron: 7-amino-4-metilcumarina (AMC, número CAS: 26093-31-2), ácido cumarina-3-carboxílico (C3CA, número CAS: 531-81-7), ácido 7-hidroxicumarinil-4-acético (HCAA, número CAS: 6950-82-9) y el ácido p-cumárico (PCA, número CAS: 501-98-4) y fueron adquiridas desde Sigma-Aldrich.

IV.5.2. AISLAMIENTO DE AM

El ácido maslínico (AM, I) se aisló a partir de desechos sólidos de producción de aceite de oliva, que se extrajeron sucesivamente en un Soxhlet con EtOAc y se purificaron mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, eluyendo con mezclas de CH_2Cl_2 /acetona CHCl_3 /MeOH de polaridad creciente.

IV.5.3. SINTESIS DE AM-DIAMINA II, III Y IV.

Estos intermedios de AM-diamina se prepararon de acuerdo con lo establecido en un trabajo previo.⁵⁰ Así, el AM en THF seco, se trató previamente con DIEA y TBTU para activar el grupo carboxilo, y ahora con el derivado de AM-TBTU en DCM, se agregó carbonato potásico y el reactivo de diamina apropiado: (DDA, 1,3-propanodiamina; HDA, 1,6-hexanodiamina; DDA, 1,10-decanodiamina).

Los intermedios de AM-diamina **II** (AM-PDA), **III** (AM-HDA) y **IV** (AM-DDA), así obtenidos, se purificaron para ser acoplados con las cumarinas indicadas anteriormente.

IV.5.4. ACOPLAMIENTO DE LOS INTERMEDIOS II, III Y IV AL GRUPO CARBOXILO DE AM.

Obtención de conjugados de AM-diamina-cumarina **1-9**. Los tres intermedios diamino-cumarina, mencionados anteriormente, se colocaron en tres tubos de reacción (0,75 mmol cada uno) de una estación-carrusel de reacción, se disolvieron en dioxano (8 ml cada uno) y se añadió EDC (0,75 mmol a cada uno). Cada mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación.

Después, el primer tubo se dividió en los tubos 1, 2 y 3 y se le añadió a cada uno de ellos, el intermedio AM-diamina II (0,5 mmol); el segundo tubo de reacción se dividió en los tubos 5, 6 y 7 y se le añadió a cada uno de ellos el intermedio AM-diamina III (0,5 mmol a cada uno); el tercer tubo de reacción se dividió en los tubos 7,8 y 9, a los cuales se agregó conjugado AM-diamina IV (0,5 mmol a cada uno). Las mezclas de reacción se agitaron durante 2h reflujo. Las mezclas se diluyeron con agua y se extrajeron con DCM, y la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y los residuos se purificaron por cromatografía en columna usando DCM/acetona (10:1) como eluyente, obteniéndose los derivados **1-9** con muy buenos rendimientos (80-90%).

Semisíntesis de los conjugados de AM-diamina-cumarina **1, 2 y 3**. De acuerdo con el procedimiento general, la cumarina-3-ácido carboxílico (C3CA), en presencia de EDC y los intermedios de AM-diamina **I, II o III**, dan los derivados **1** (83 %), **2** (85%) y **3** (86%).

Semisíntesis de los conjugados de AM-diamina-cumarina **4, 5 y 6**. De acuerdo con el procedimiento general, el ácido 7-hidroxycumarinil-4-ácido acético (HCAA), en presencia de EDC y los intermedios de AM-diamina **I, II o III**, dan los derivados **4** (87%), **5** (84%) y **6** (86%).

Semisíntesis de los conjugados de AM-diamina-cumarina **7**, **8** y **9**. De acuerdo con el procedimiento general, el ácido *p*-cumárico (PCA), en presencia de EDC y los intermedios de AM-diamina **I**, **II** o **III**, dan los derivados **7** (83%), **8** (88%) y **9** (84%).

Semisíntesis de 2 α ,3 β -bis((2'-oxo-2'H-chromene-3''-carbonyl)oxy)-olean-12-en-28-amide (**10**). El AM (**I**) (0.5 mmol) en DMF (5 mL) se trató con la cumarina-3-ácido carboxílico (C3CA) (3 mmol) en presencia de DIPCDI (3 mmol) y DMAP (3 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a 60 °C durante una noche, se diluyó con agua, se extrajo con DCM, y, la capa orgánica, se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se eliminó el disolvente a vacío, y, el residuo fue purificado en cromatografía de columna usando DCM/acetone (10:1) como eluyente para dar el derivado **10**.

Semisíntesis de 2 α ,3 β -Dihydroxy-N-(4'-methyl-2'-oxo-2'H-chromen-7'-yl)-olean-12-en-28-amide (**11**). El derivado (**11**) se preparó de acuerdo con el método ya establecido,⁵⁰ disolviendo AM en DCM seco, en presencia de 7-amino-4-metilcumarina y EDC.

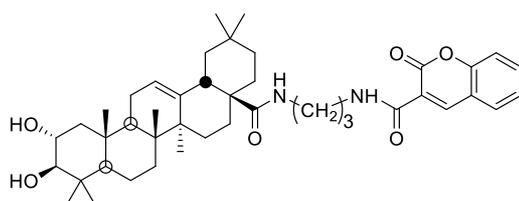
Semisíntesis de N-(4'''-methyl-2'''-oxo-2'''H-chromen-7'''-yl)-2 α ,3 β -bis((2'-oxo-2'H-chromene-3'-carbonyl)oxy)-olean-12-en-28-amide (**12**). El derivado conjugado **12** se puede obtener por dos caminos diferentes. A partir del conjugado di-C3CA-AM (**10**, 0.5 mmol) que es disuelto en dioxano (10 mL), y que se trata con 7-amino-4-metilcumarina (AMC, 0.75 mmol) y EDC (0.75 mmol) manteniendo la reacción 2h a reflujo. Tras el procesado normal de la mezcla de reacción, y la oportuna purificación en columna de cromatografía, se obtiene el derivado **12** (85%). Este derivado **12** también fue obtenido a partir de AM-AMC (**11**, 0.5 mmol), el cual se trató con la cumarina-3-ácido carboxílico (C3CA, 3 mmol) en presencia de DIPCDI (3 mmol) y DMAP (3 mmol) a 60 °C durante una noche.

Después del procesado normal de la mezcla de reacción y la correspondiente usual purificación, se aisló el derivado **12**.

Compuesto 1: Sólido blanco, pf: 69-71 °C; $[\alpha]^{25}_D +38^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2940, 1609, 1531, 1051, 1033. Compuesto 2: Sólido blanco, pf: 73-75 °C; $[\alpha]^{25}_D +12^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2967, 1614, 1567, 1168, 1033. Compuesto 3: Sólido blanco, pf: 86-88 °C; $[\alpha]^{25}_D +18^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2923, 1708, 1455, 1053, 1033. Compuesto 4: Sólido blanco, pf: 143-145 °C; $[\alpha]^{25}_D +16^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2938, 1607, 1455, 1052, 1033. Compuesto 5: Sólido blanco, pf: 139-141 °C; $[\alpha]^{25}_D +5^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2937, 1607, 1466, 1053, 1033. Compuesto 6: Sólido blanco, pf: 120-122 °C; $[\alpha]^{25}_D +27^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2923, 1709, 1607, 1053, 1033. Compuesto 7: Sólido blanco, pf: 123-125 °C; $[\alpha]^{25}_D +33^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2938, 1604, 1514, 1053, 1033. Compuesto 8: Sólido blanco, pf: 76-78 °C; $[\alpha]^{25}_D +17^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2927, 1602, 1513, 1168, 1033. Compuesto 9: Sólido blanco, pf: 104-106 °C; $[\alpha]^{25}_D +22^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2923, 1604, 1513, 1053, 1033. Compuesto 10: Sólido blanco, pf: 200-202 °C; $[\alpha]^{25}_D -64^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2939, 1609, 1455, 1055, 1033. Compuesto 12: Sólido blanco, pf: 206-208 °C; $[\alpha]^{25}_D -20^\circ$ (c 1 en MeOH); IR ν_{\max} (película)/cm⁻¹: 2967, 1713, 1608, 1055, 1033.

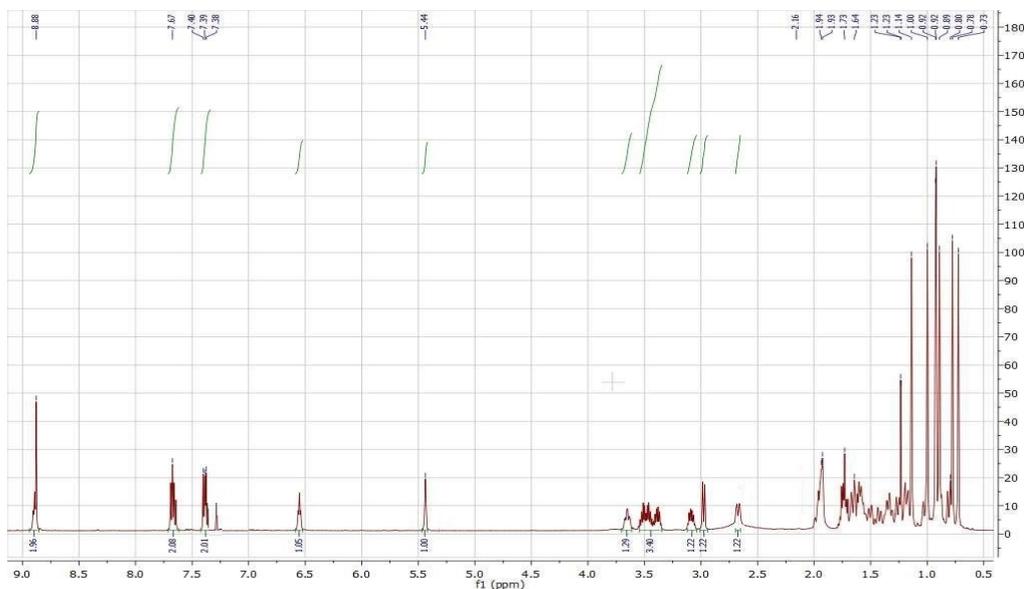
IV.6. ESPECTROS DE RMN Y VALORES HRMS

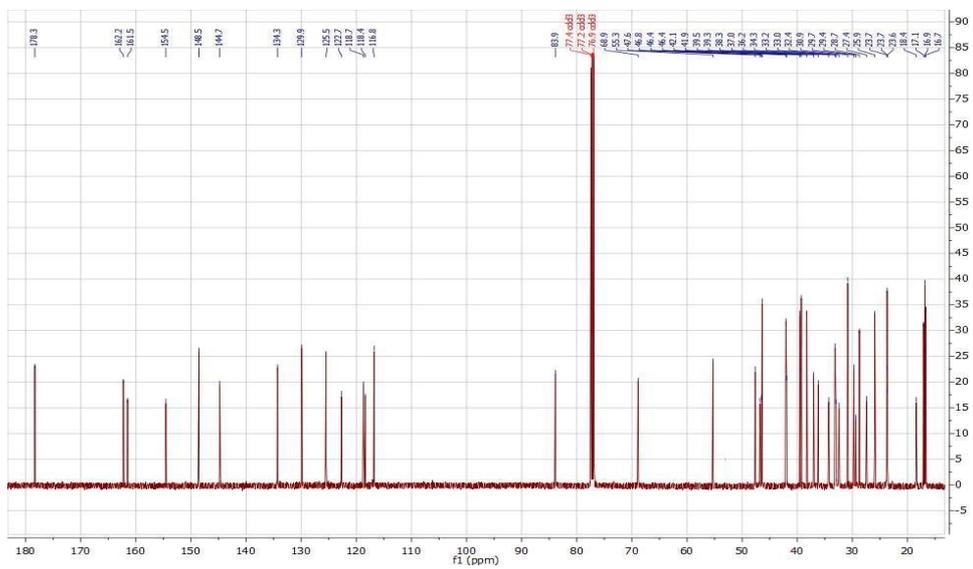
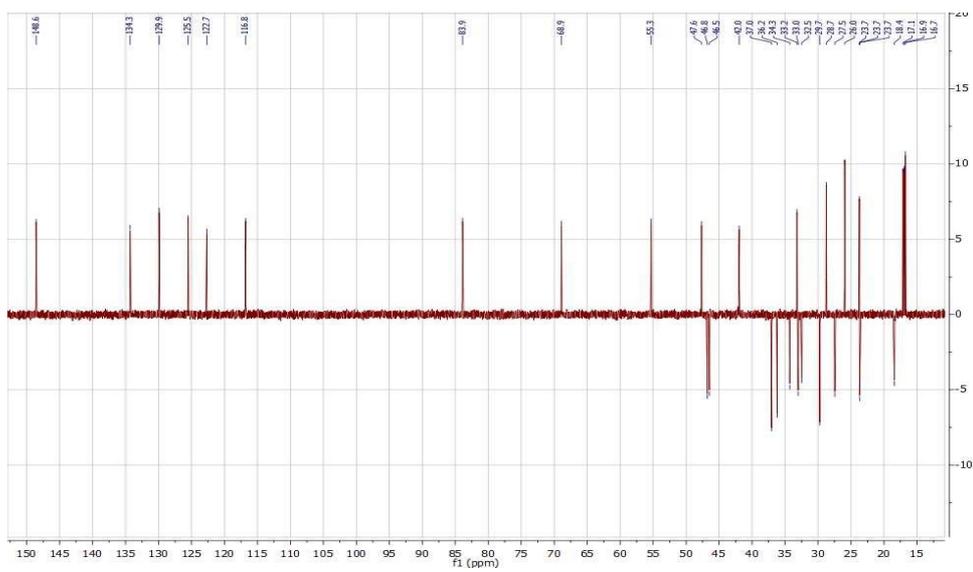
Compuesto 1



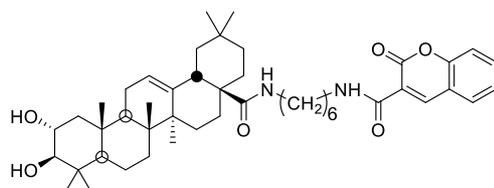
¹H RMN δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 8.89 (1H, t, 5.9, -NHCO-cumarina), 8.88 (1H, s, H-4''), 7.69-7.65 (2H, m, H-5'' y H-7''), 7.40-7.36, 2H, m (H-8'' y H-6''), 6.55 (1H, t, 6.0, AM-CONH-), 5.44 (1H, dd, 3.6, H-12), 3.65 (1H, ddd, 9.4, 9.4, 4.3, H-2), 3.51 y 3.47 (1H cada uno, m, 2H-3'), 3.39 y 3.09 (1H cada uno, m, 2H-1'), 2.98 (1H, d, 9.4, H-3), 2.67 (1H, dd, 13.2, 4.2, H-18), 1.14 (3H, s), 1.00 (3H, s), 0.93 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.78 (3H, s) y 0.73 (3H, s) (grupos metilo); ¹³C RMN δ_C (CDCl₃, 100 MHz): ver Tabla C1; ESI-HRMS m/z calculada para C₄₃H₆₁N₂O₆ [M+1]⁺ 701.4530, encontrada 701.4533.

¹H RMN



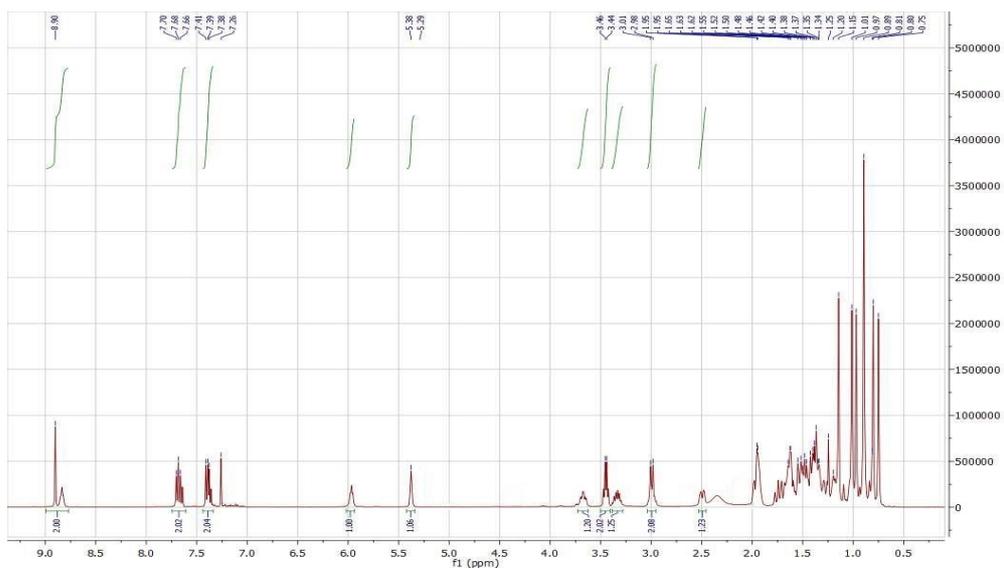
^{13}C RMN

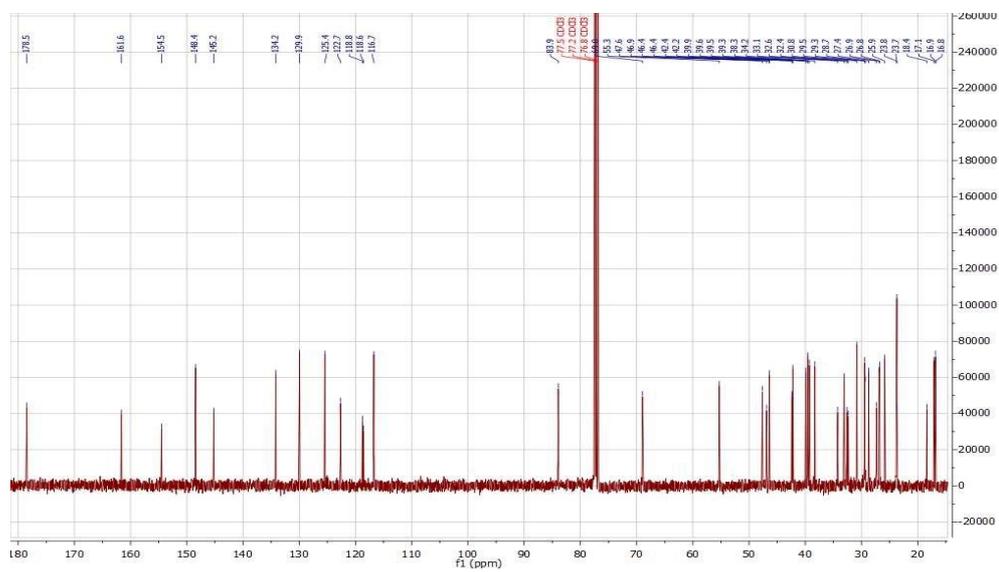
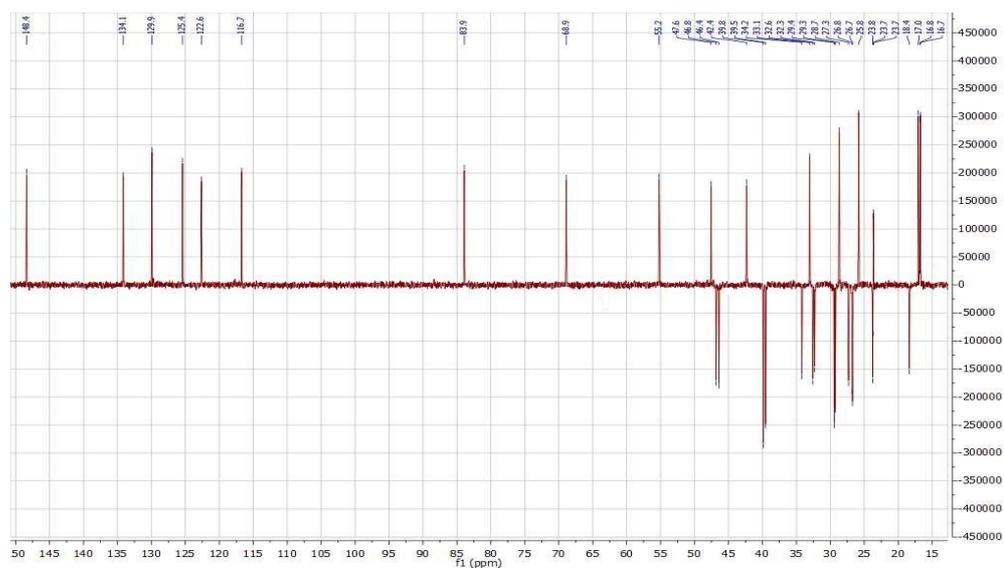
Compuesto 2



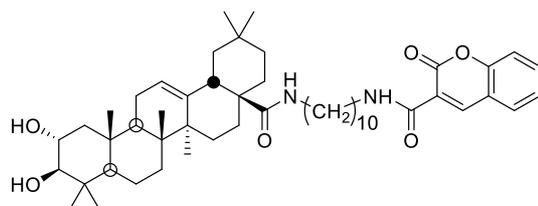
^1H RMN δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 8.90 (1H, s, H-4''), 8.83 (1H, t, 5.9, -NHCO-cumarina), 7.70-7.64 (2H, m, H-5'' y H-7''), 7.41-7.36, (2H, m (H-8'' y H-6''), 5.97 (1H, t, 6.7, AM-CONH-), 5.38 (1H, dd, 3.6, H-12), 3.67 (1H, ddd, 9.4, 9.4, 4.3, H-2), 3.45 (2H, c, 6.7, 2H-6'), 3.34 y 2.99 (1H cada uno, m, 2H-1'), 2.99 (1H, d, 9.4, H-3), 2.49 (1H, dd, 13.2, 4.2, H-18), 1.14, (3H, s), 1.01 (3H, s), 0.97 (3H, s), 0.89 (6H, s), 0.80 (3H, s) y 0.75 (3H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz): ver Tabla C1; ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$ 743.4999, encontrada 743.5015.

^1H RMN



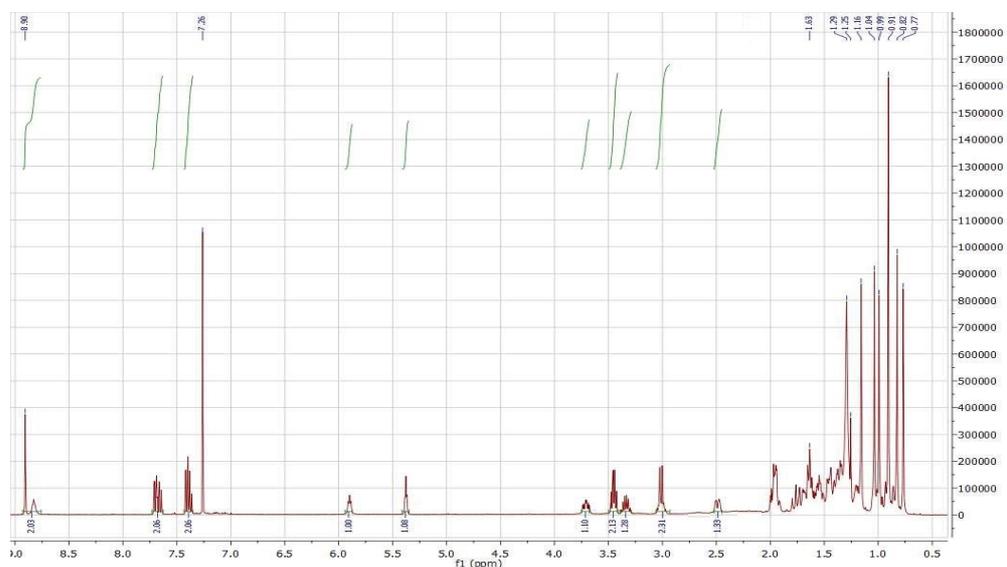
^{13}C RMN

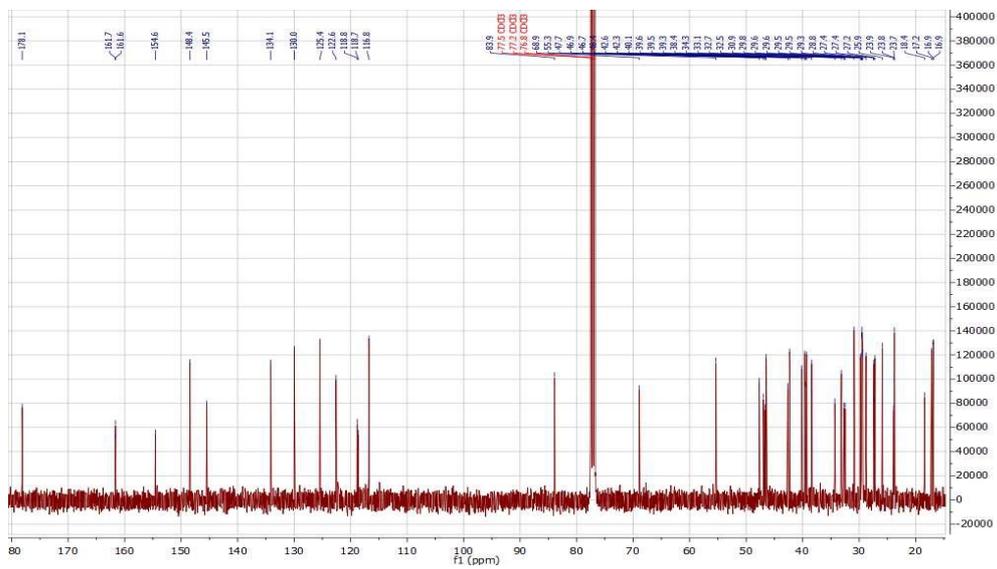
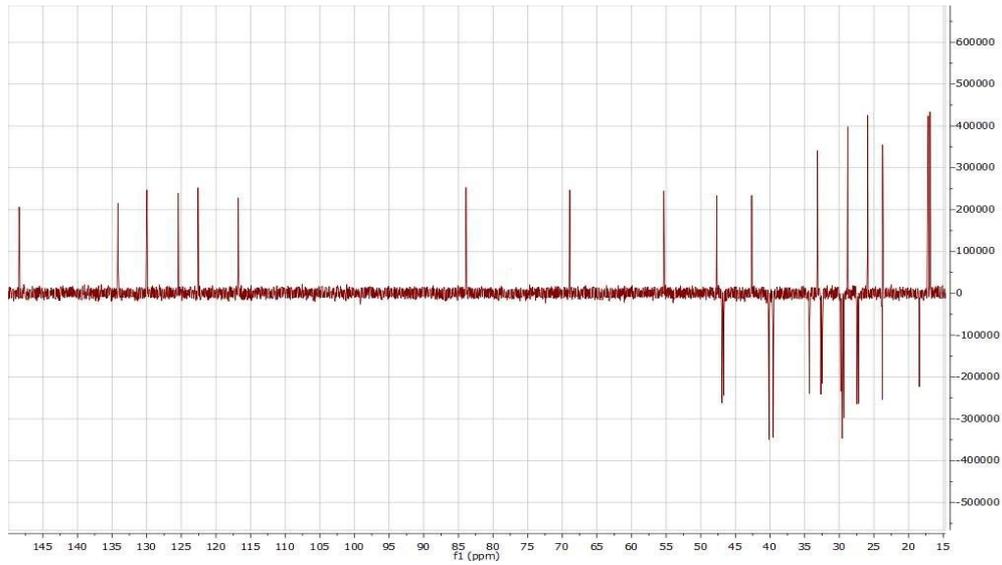
Compuesto 3

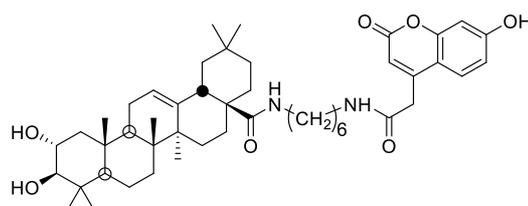


^1H RMN δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 8.90 (1H, s, H-4''), 8.83 (1H, t, 5.8, -NHCO-cumarina), 7.70-7.64, (2H, m, H-5'' y H-7''), 7.41-7.36, (2H, m, H-8'' y H-6''), 5.90, (1H, t, 5.5, AM-CONH-), 5.38 (1H, dd, 3.6, H-12), 3.71 (1H, ddd, 11.3, 9.5, 4.5, H-2), 3.45 (2H, c, 6.7, 5.8, 2H-10'), 3.34 y 3.01 (1H cada uno, m, 2H-1'), 2.99 (1H, d, 9.5, H-3), 2.49 (1H, dd, 13.2, 4.3, H-18), 1.16 (3H, s), 1.03 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.90 (6H, s), 0.82 (3H, s) y 0.77 (3H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz): ver Tabla C1; ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{50}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+1]^+$ 799.5625, encontrada 799.5612.

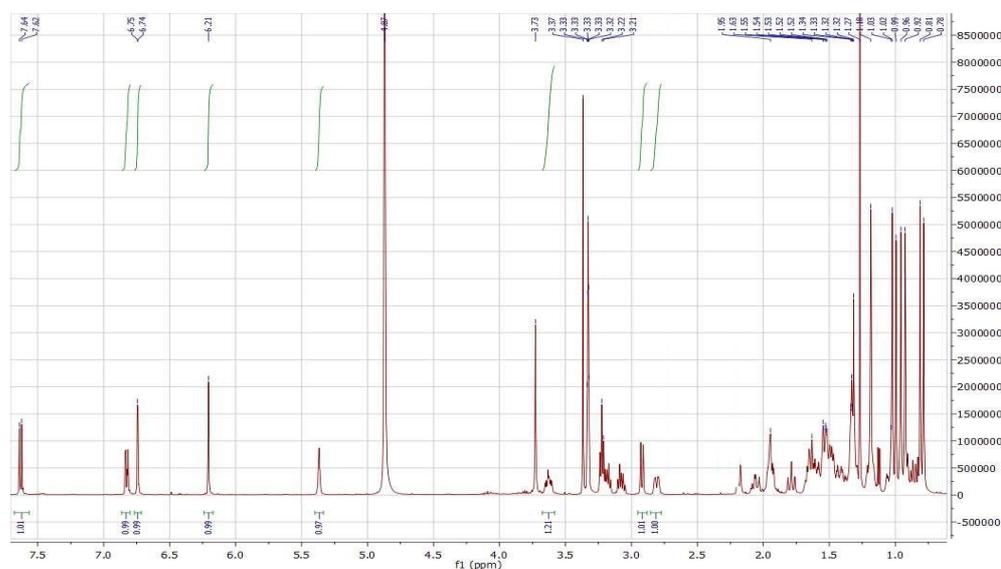
^1H RMN

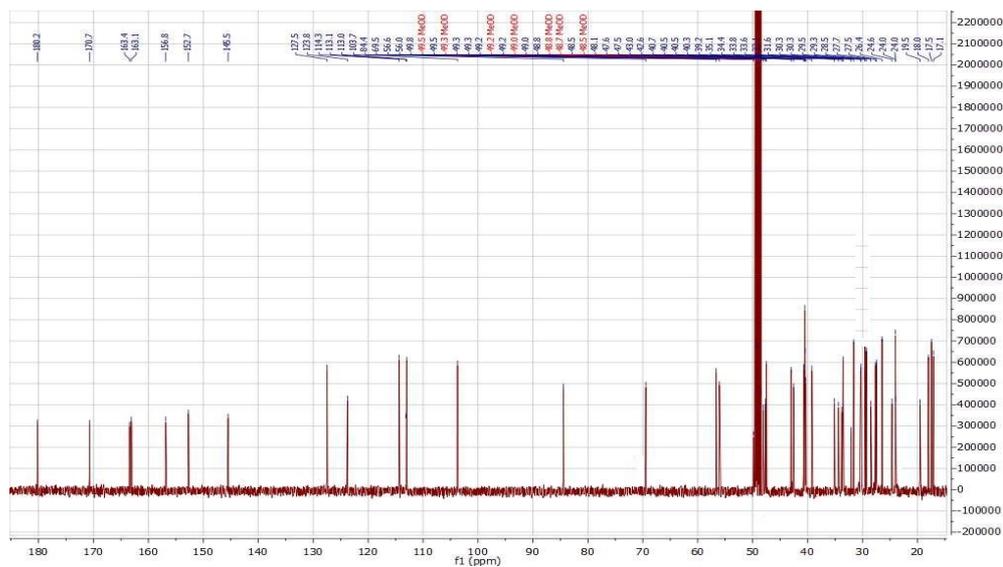
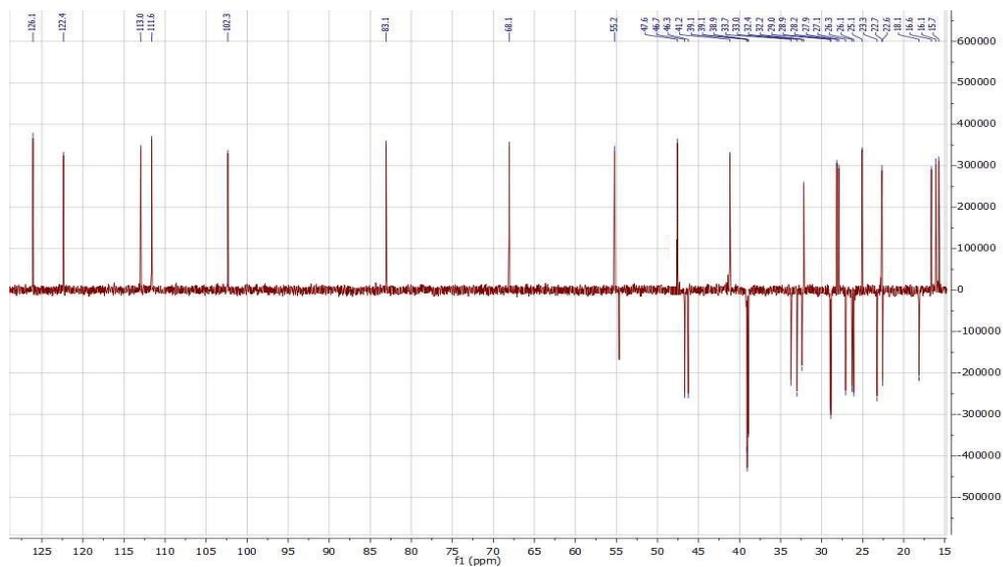


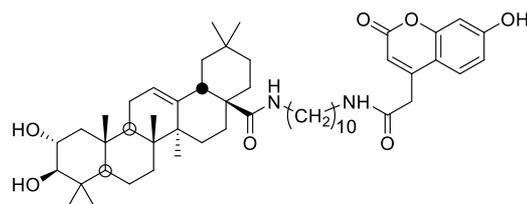
^{13}C RMN

Compuesto 5:

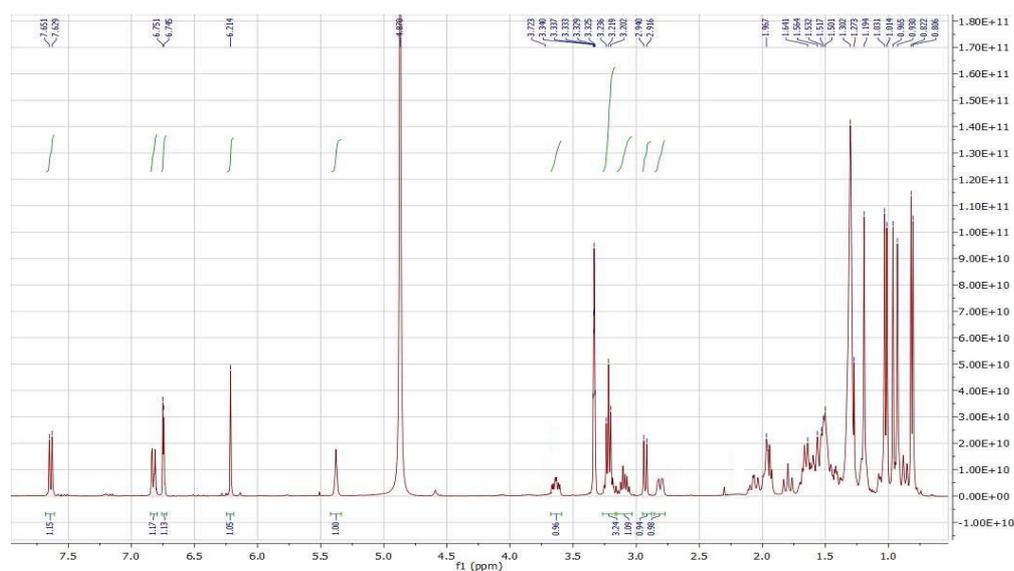
^1H RMN δ_{H} (MeOD, 500 MHz): 7.61 (1H, d,, 8.8, H-5'''), 6.81 (1H, dd, 8.8, 2.4, H-6'''), 6.73 (1H, d, 2.4, H-8'''), 6.21 (1H, s, H-3'''), 5.35 (1H, dd, 3.7, H-12), 3.73 (2H, s, -COCH₂-cumarina), 3.61 (1H, ddd, 11.3, 9.2, 4.4, H-2), 3.21 (2H, t, 6.8, 2H-6'), 3.17 y 3.06 (1H cada uno, m, 2H-1'), 2.91 (1H, d, 9.2, H-3), 2.79 (1H, dd, 4.4, 13.4, H-18), 1.17 (3H, s), 1.00 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.79 (3H, s) y 0.77 (3H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl₃, 100 MHz): ver Tabla C2; ESI-HRMS m/z calculada para C₄₇H₆₉N₂O₇ [M+1]⁺ 773.5105, encontrada 773.5108.

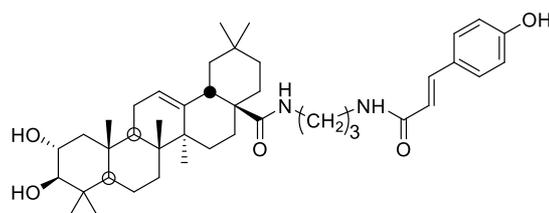
 ^1H RMN

^{13}C RMN

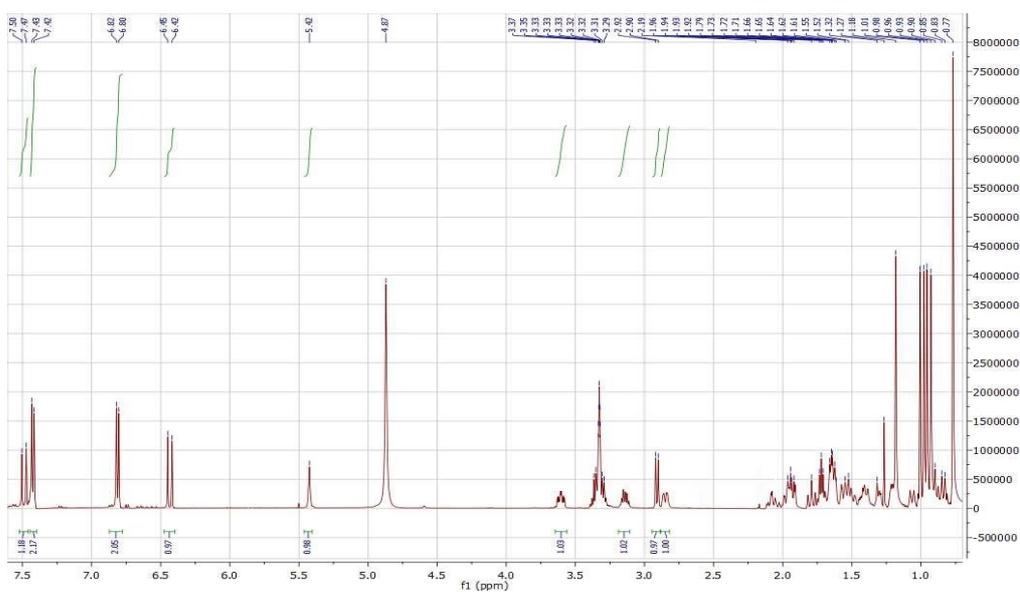
Compuesto 6:

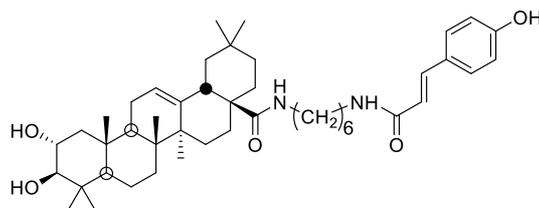
^1H RMN δ_{H} (MeOD, 400 MHz): 7.62 (1H, d, 8.8, H-5'''), 6.81 (1H, dd, 8.7, 2.4, H-6'''), 6.72 (1H, d, 2.4, H-8'''), 6.21 (1H, s, H-3'''), 5.36 (1H, dd, 3.5, H-12), 3.62 (1H, ddd 11.3, 9.5, 4.5, H-2), 3.25-3.05 (4H, m, 2H-1' y 2H-10'), 2.90 (1H, d, 9.5, H-3), 2.79 (1H, dd, 4.3, 13.1, H-18), 1.17 (3H, s), 1.01 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.80 (3H, s) y 0.78 (3H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl₃, 100 MHz): ver Tabla C2; ESI-HRMS m/z calculada para C₅₁H₇₇N₂O₇ [M+1]⁺ 829.5731, encontrada 829.5714.

 ^1H RMN

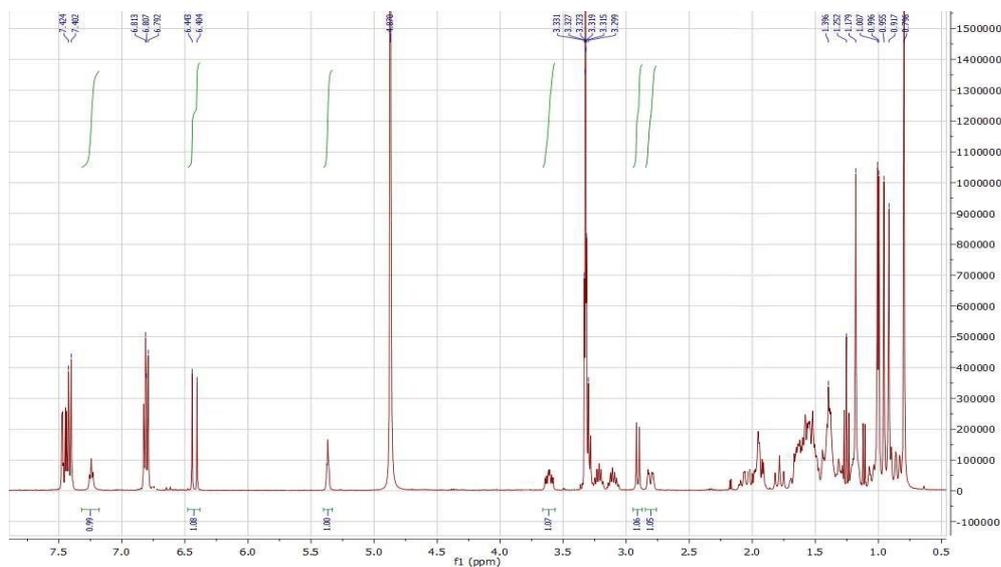
Compuesto 7:

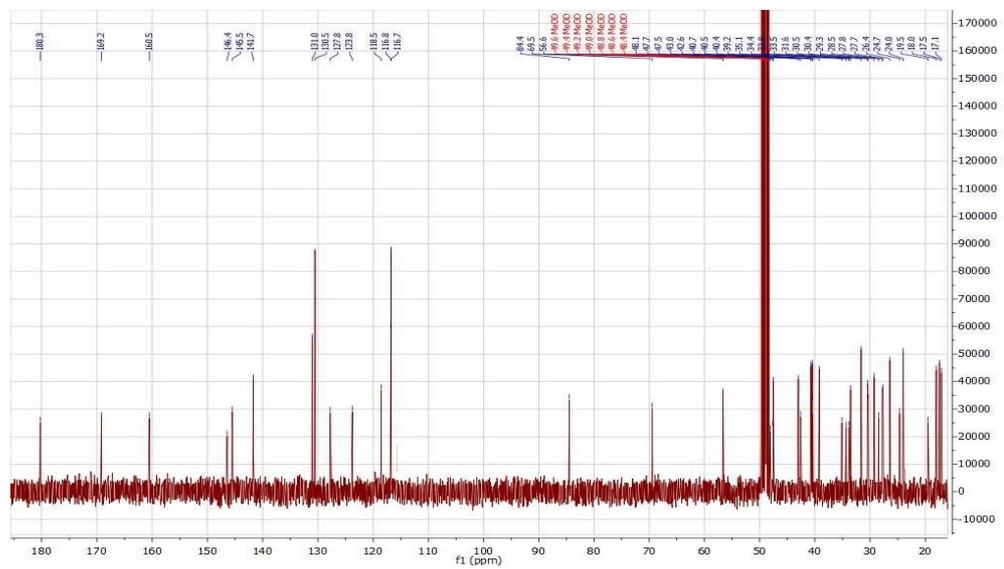
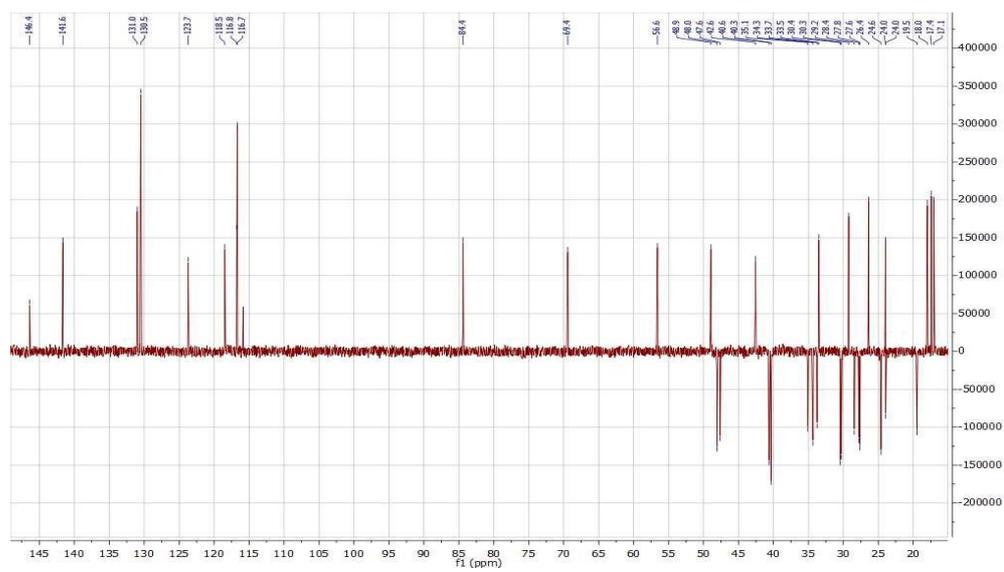
^1H RMN δ_{H} (MeOD, 500 MHz): 7.47 (1H, d, 15.7, H-2''), 7.41 (2H, d, 8.6, H-2''' y H-6'''), 6.79 (2H, d, 8.6, H-3''' y H-5'''), 6.42 (1H, d, 15.7, H-3''), 5.41 (1H, dd, 3.6, H-12), 3.59 (1H, ddd, 11.3, 9.5 4.5, H-2), 3.37-3.26 (3H) y 3.13 (1H) (4H, m, 2H-1' y 2H-3'), 2.89 (1H, d, 9.5, H-3), 2.83 (1H, dd, 13.4, 4.4, H-18), 1.17 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.91 (3H, s) y 0.75 (6H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl₃, 100 MHz): ver Tabla C3; ESI-HRMS m/z calculada para C₄₂H₆₃N₂O₅ [M+1]⁺ 675.4737, encontrada 675.4734.

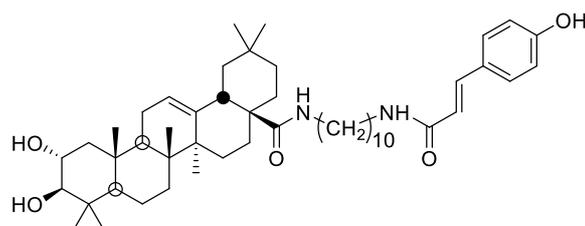
 ^1H RMN

Compuesto 8:

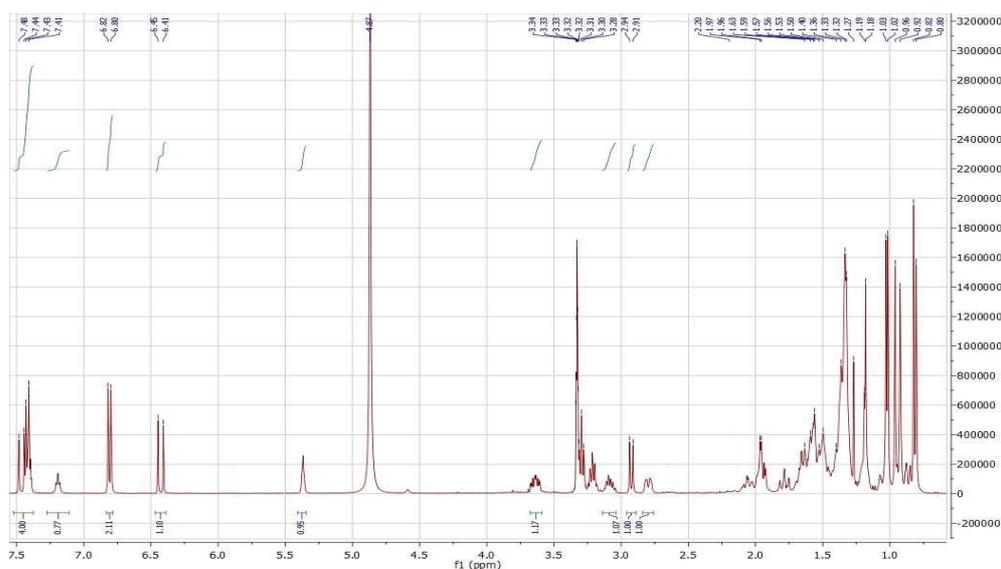
^1H RMN δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 7.45 (1H, d, 15.7, H-2''), 7.40 (2H, d, 8.6, H-2''' y H-6'''), 6.79 (2H, d, 8.6, H-3''' and H-5'''), 6.41 (1H, d, 15.7, H-3''), 5.35 (1H, dd, 3.6, H-12), 3.60 (1H, ddd, 11.3, 9.6 4.5, H-2), 3.29 (2H, m, 2H-1'), 3.21 y 3.09 (1H cada uno, m, 2H-6'), 2.89 (1H, d, 9.6, H-3), 2.83 (1H, dd, 4.3, 13.2, H-18), 1.17 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.90 (3H, s) y 0.78 (6H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz): ver Tabla C3; ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{45}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+1]^+$ 717.5206, encontrada 717.5211.

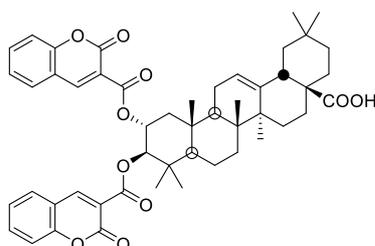
 ^1H RMN

^{13}C RMN

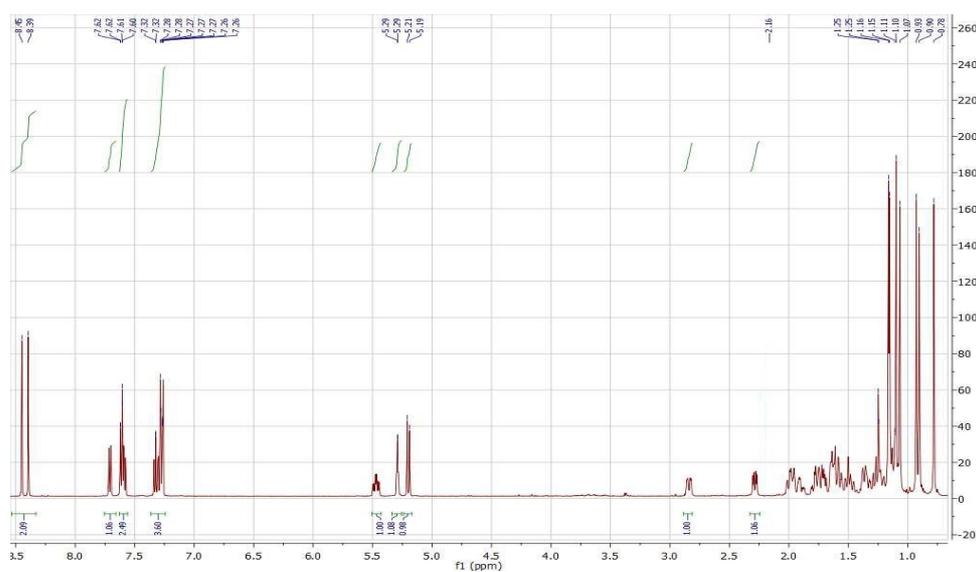
Compuesto 9:

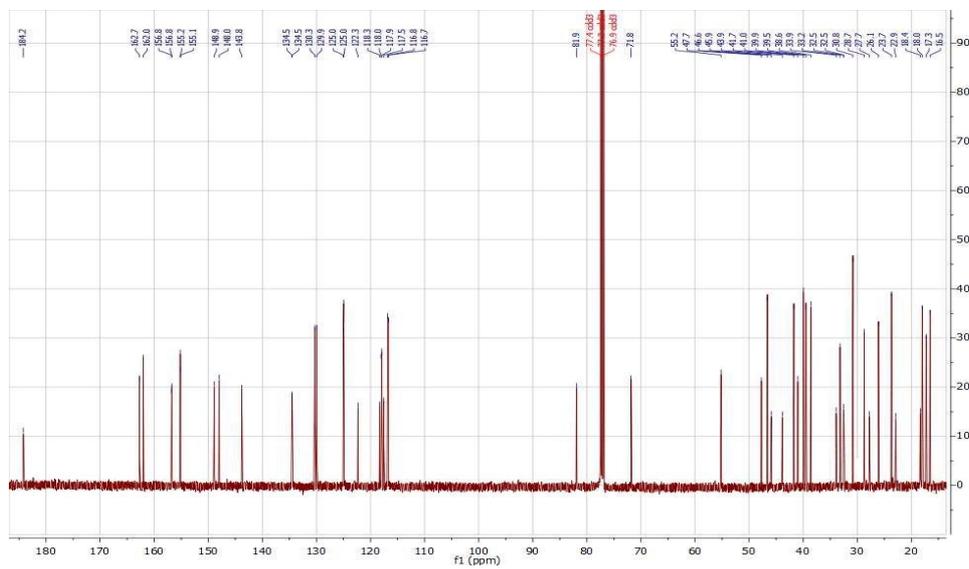
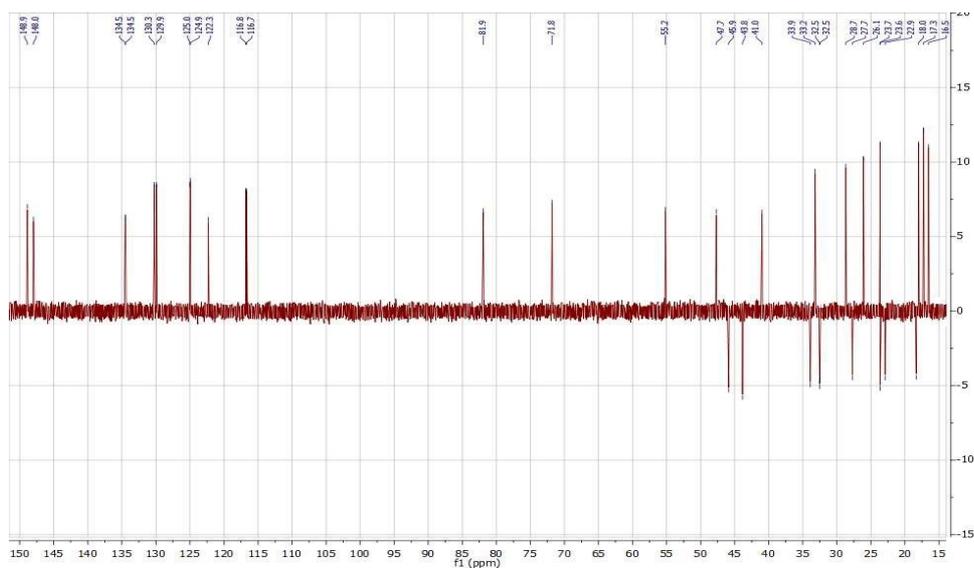
¹H RMN δ_H (MeOD, 400 MHz): 7.45 (1H, d, 15.7, H-2''), 7.41 (2H, d, 8.6, H-2''' y H-6'''), 6.79 (2H, d, 8.6, H-3''' and H-5'''), 6.41 (1H, d, 15.7, H-3'), 5.35 (1H, dd, 3.5, H-12), 3.62 (1H, ddd, 11.3, 9.6 4.4, H-2), 3.28 (2H, t, 7.2, 2H-1'), 3.19 y 3.07 (1H cada uno, m, 2H-10'), 2.90 (1H, d, 9.6, H-3), 2.78 (1H, dd, 4.2, 13.4, H-18), 1.16 (3H, s), 1.01 (3H, s), 1.00 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.80 (3H, s) y 0.78 (3H, s) (grupos metilo); ¹³C RMN δ_C (CDCl₃, 100 MHz): ver Tabla C3; ESI-HRMS m/z calculada para C₄₉H₇₇N₂O₅ [M+1]⁺ 773.5832, encontrada 773.5844.

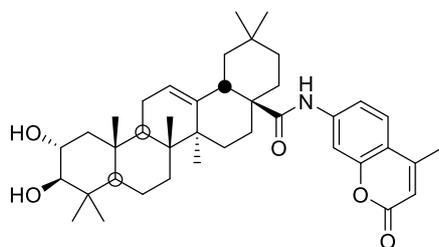
¹H RMN

Compuesto 10:

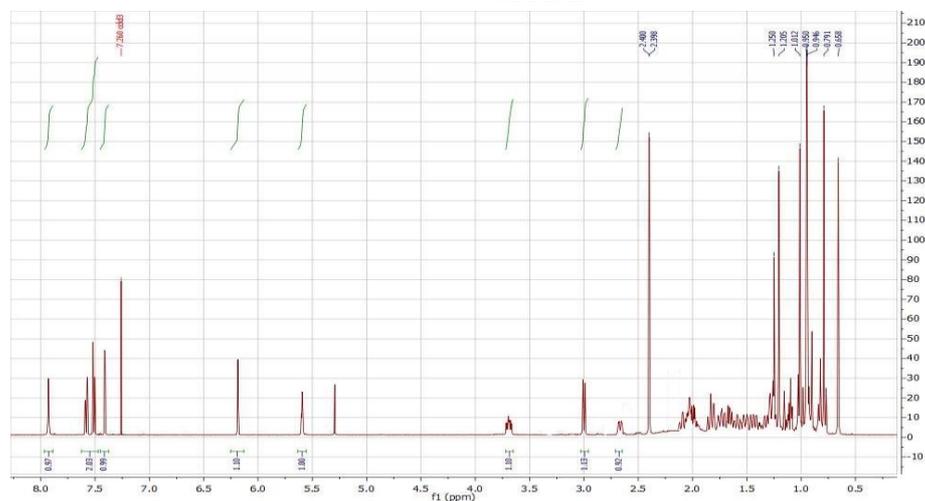
^1H RMN δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 8.45 (1H, s, H-4'), 8.40 (1H, s, H-4'), 7.73 (1H, m, 1H, H-5'), 7.63 (3H, m, H-5'', H-6' y H-6''), 7.33 (2H, m, H-7' y H-7''), 7.30 (2H, m, H-8' and H-8''), 5.47 (1H, ddd, 10.3, 10.3, 4.6, H-2), 5.29 (1H, dd, 3.7, H-12), 5.20 (1H, d, 10.3, H-3), 2.84 (1H, dd, 13.7, 4.7, H-18), 1.16 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.07 (3H, s), 0.930 (3H, s), 0.90 (3H, s) y 0.78 (3H, s) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz): ver Tabla C4; ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{50}\text{H}_{57}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+1]^+$ 817.3952, encontrada 817.3943.

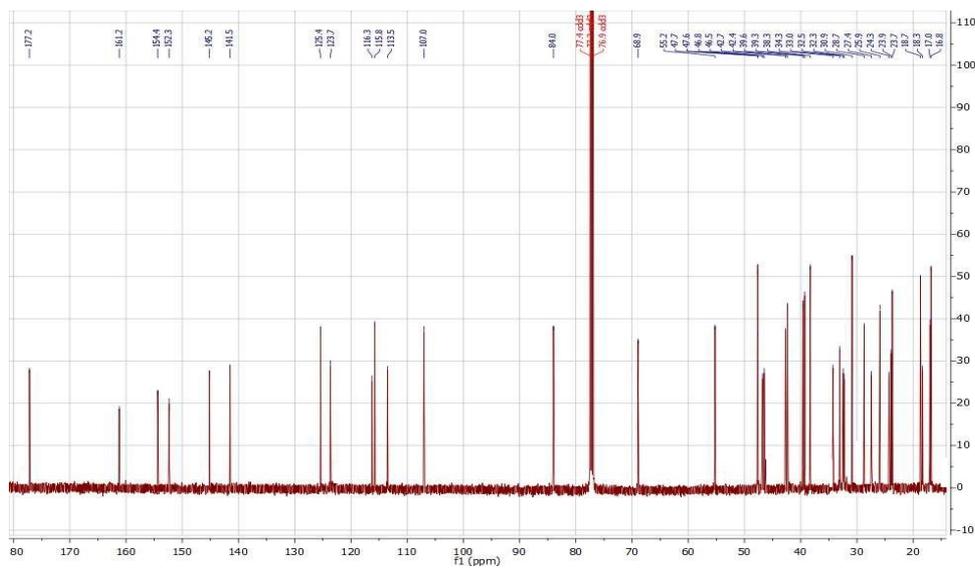
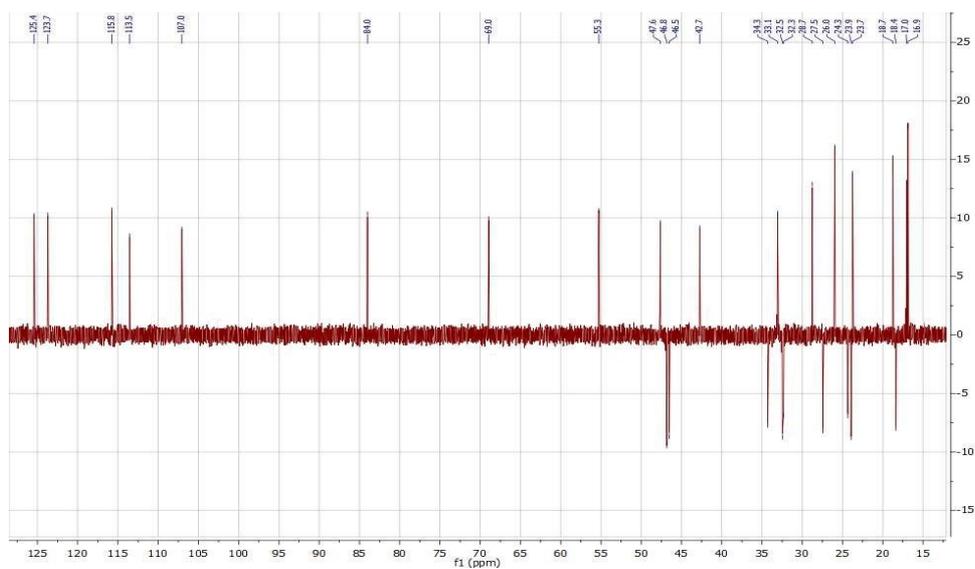
 ^1H RMN

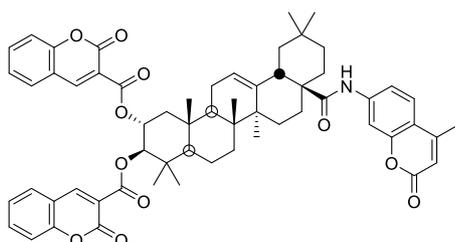
^{13}C RMN

Compuesto 11:

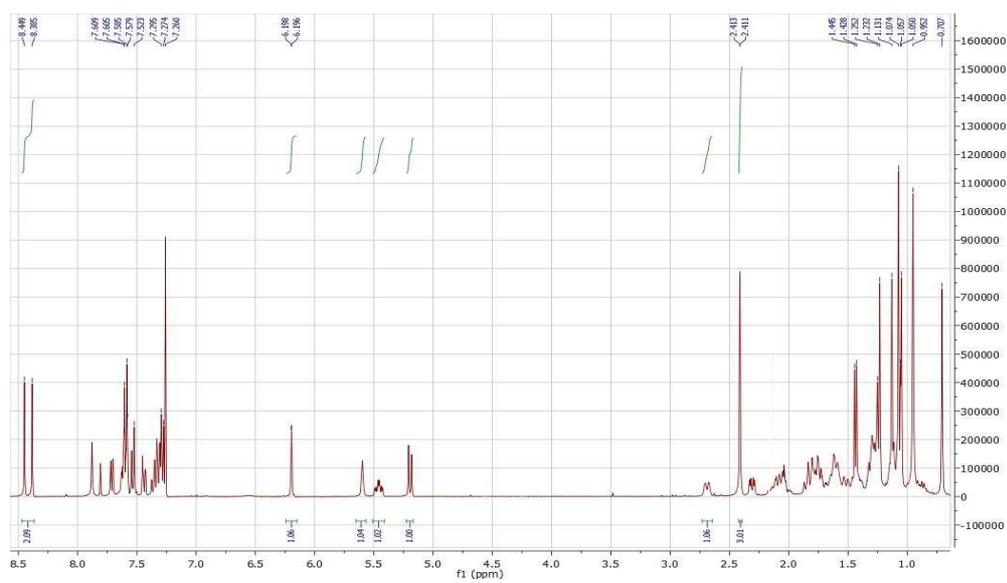
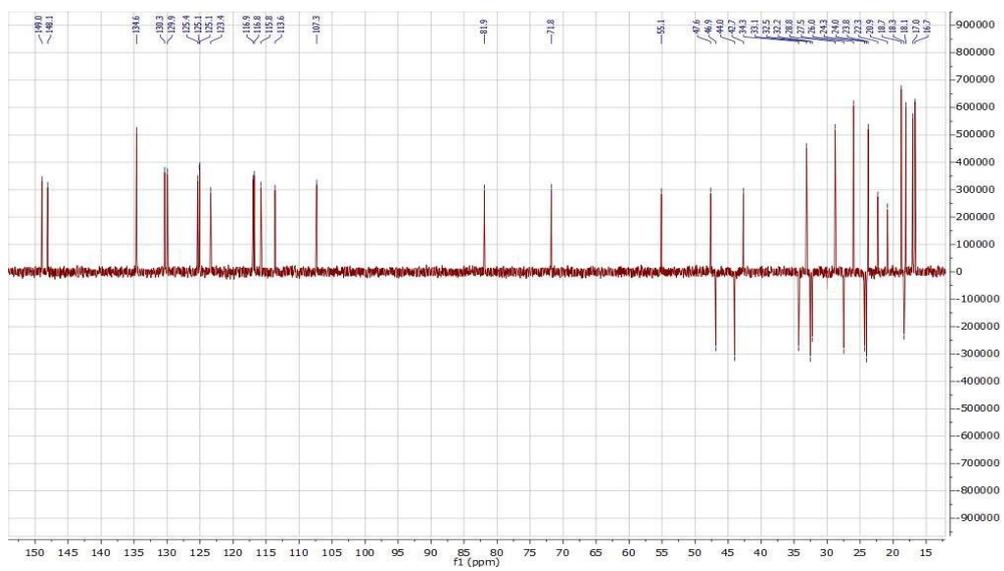
¹H RMN δ_H (CDCl₃, 400 MHz): 8.45 (1H, s H4'cumarina-c-2), 8.38 (1H, s H4'cumarina-c-3), 7.93(1H, sa, NH), 7.71 (1H, dd 7.8, 1.5, H5'cumarina-c-2), 7.58-6.18 (4H, H5'', H7' y H7''cumarinas en C-2 y C-3 y 8'''cumarina C-28), 7.53 (1H, d, 8.7, H5'''cumarina C-28), 7.44 (1H, dd, 8.7, 2.1, H-6'''cumarina C-28), 7.37-7.27 (5H, H-6', H6'', H8' y H8''cumarinas en C-2 y C-3 y 8'''cumarina C-28), 6.20 (1H, sa, H-3'''cumarina C-28), 5.59 (1H, t, 3.69, H-12), 5.46 (1H, ddd, 10.7, 10.7, 4.5, H-2), 5.19 (1H, d, 10.7, H-3), 2.66 (1H, dd, 12.1, 2.5, H-18), 2.39 (3H, sa, H-9'''cumarina C-28), 1.23 (3H, s, 3H-27), 1.13, 1.07, 1.05, (3H cada uno, s, 3H-23, 3H-24 y 3H-25), 0.95 (6H, s, 3H-29 y 3H-30) y 0.71 (3H, s, 3H-26) (grupos metilo); ¹³C RMN δ_C (CDCl₃, 100 MHz): ver Tabla C4; ESI-HRMS m/z calculada para C₆₀H₆₄NO₁₁ [M+1]⁺ 974.4479, encontrada 974.4480.

¹H RMN

^{13}C RMN

Compuesto 12:

^1H RMN δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz): 8.45 (1H, s H4'cumarina-c-2), 8.38 (1H, s H4'cumarina-c-3), 7.88(1H, sa, NH), 7.71 (1H, dd 7.8, 1.5, H5'cumarina-c-2), 7.64-7.58 (4H, H5'', H7' y H7''cumarinas en C-2 y C-3 y 8'''cumarina C-28), 7.53 (1H, d, 8.7, H5'''cumarina C-28), 7.44 (1H, dd, 8.7, 2.1, H-6'''cumarina C-28), 7.37-7.27 (5H, H-6', H6'', H8' y H8''cumarinas en C-2 y C-3 y 8'''cumarina C-28), 6.20 (1H, sa, H-3'''cumarina C-28), 5.58 (1H, t, 3.6, H-12), 5.46 (1H, ddd, 10.7, 10.7, 4.5, H-2), 5.19 (1H, d, 10.7, H-3), 2.69 (1H, dd, 12.1, 2.5, H-18), 2.41 (3H, sa, H-9'''cumarina C-28), 1.23 (3H, s, 3H-27), 1.13, 1.07, 1.05, (3H cada uno, s, 3H-23, 3H-24 y 3H-25), 0.95 (6H, s, 3H-29 y 3H-30) y 0.71 (3H, s, 3H-26) (grupos metilo); ^{13}C RMN δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz): ver Tabla C4; ESI-HRMS m/z calculada para $\text{C}_{60}\text{H}_{64}\text{NO}_{11}$ $[\text{M}+1]^+$ 974.4479, encontrada 974.4480.

^1H RMN ^{13}C RMN

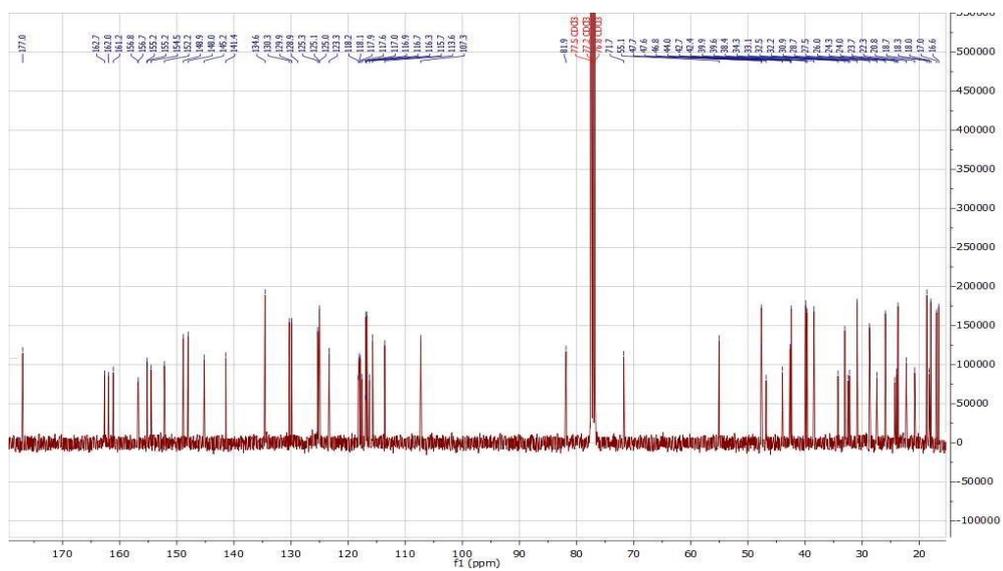


Tabla C1 ¹³C RMN δC

| Posición | 1 | 2 | 3 |
|----------|--------|--------|--------|
| 1 | 46.45 | 46.37 | 46.69 |
| 2 | 68.88 | 68.96 | 68.92 |
| 3 | 83.88 | 83.95 | 83.90 |
| 4 | 39.28 | 39.30 | 39.28 |
| 5 | 55.29 | 55.28 | 55.33 |
| 6 | 18.40 | 18.41 | 18.45 |
| 7 | 32.44 | 32.37 | 32.46 |
| 8 | 39.54 | 39.54 | 39.62 |
| 9 | 47.64 | 47.62 | 47.67 |
| 10 | 38.27 | 38.30 | 38.39 |
| 11 | 23.65 | 23.72 | 23.79 |
| 12 | 125.44 | 125.44 | 125.44 |
| 13 | 144.74 | 145.21 | 145.45 |
| 14 | 42.08 | 42.24 | 42.33 |
| 15 | 29.71 | 29.46 | 29.78 |
| 16 | 23.69 | 23.82 | 23.88 |
| 17 | 46.37 | 46.63 | 46.43 |
| 18 | 41.94 | 42.41 | 42.64 |
| 19 | 46.77 | 46.86 | 46.93 |
| 20 | 30.86 | 30.85 | 30.90 |
| 21 | 34.29 | 34.24 | 34.32 |
| 22 | 32.99 | 32.62 | 32.67 |
| 23 | 28.73 | 28.73 | 28.78 |
| 24 | 16.88 | 16.87 | 16.91 |
| 25 | 16.73 | 16.78 | 16.87 |
| 26 | 17.12 | 17.10 | 17.18 |
| 27 | 25.94 | 25.88 | 25.90 |
| 28 | 178.28 | 178.44 | 178.13 |
| 29 | 23.72 | 23.72 | 25.90 |
| 30 | 33.16 | 33.11 | 33.15 |
| 1' | 37.03 | 39.89 | 40.15 |
| 2' | 27.45 | 29.34 | 29.63 |
| 3' | 36.19 | 26.78 | 29.58 |
| 4' | - | 27.36 | 29.53 |
| 5' | - | 26.88 | 29.49 |
| 6' | - | 39.57 | 29.35 |
| 7' | - | - | 27.21 |
| 8' | - | - | 27.44 |
| 9' | - | - | 27.39 |

| | | | |
|------|--------|--------|--------|
| 10' | - | - | 39.55 |
| 2'' | 161.47 | 161.61 | 161.61 |
| 3'' | 118.36 | 118.56 | 118.68 |
| 4'' | 148.54 | 148.43 | 148.40 |
| 4a'' | 118.67 | 118.77 | 118.84 |
| 5'' | 129.88 | 129.93 | 129.95 |
| 6'' | 122.68 | 122.66 | 122.58 |
| 7'' | 134.28 | 134.17 | 134.13 |
| 8'' | 116.76 | 116.74 | 116.76 |
| 8a'' | 154.52 | 154.50 | 154.56 |
| 9'' | 162.22 | 161.63 | 161.65 |

Tabla C2 ^{13}C RMN δC

| Posición | 4 | 5 | 6 |
|----------|--------|--------|--------|
| 1 | 47.61 | 47.65 | 47.66 |
| 2 | 69.47 | 69.45 | 69.45 |
| 3 | 84.43 | 84.43 | 84.42 |
| 4 | 40.48 | | 40.49 |
| 5 | 56.60 | 56.62 | 56.61 |
| 6 | 19.52 | 19.52 | 19.55 |
| 7 | 33.70 | 33.77 | 33.77 |
| 8 | 40.66 | 40.71 | 40.72 |
| 9 | 48.94 | 48.96 | 48.94 |
| 10 | 39.17 | 39.21 | 39.23 |
| 11 | 23.94 | 23.97 | 24.00 |
| 12 | 123.94 | 123.75 | 123.74 |
| 13 | 145.15 | 145.48 | 145.54 |
| 14 | 42.91 | 42.98 | 43.01 |
| 15 | 30.23 | 30.35 | 30.62 |
| 16 | 24.59 | 24.64 | 24.66 |
| 17 | 47.57 | 47.48 | 47.49 |
| 18 | 42.49 | 42.57 | 42.63 |
| 19 | 48.07 | 48.08 | 48.08 |
| 20 | 31.62 | 31.61 | 31.62 |
| 21 | 35.11 | 35.12 | 35.13 |
| 22 | 34.40 | 34.38 | 34.34 |
| 23 | 29.30 | 29.30 | 29.31 |
| 24 | 17.48 | 17.46 | 17.48 |

| | | | |
|-------|--------|--------|--------|
| 25 | 17.11 | 17.09 | 17.15 |
| 26 | 17.81 | 18.02 | 18.07 |
| 27 | 26.47 | 26.45 | 26.45 |
| 28 | 180.40 | 180.17 | 180.12 |
| 29 | 24.04 | 24.04 | 24.04 |
| 30 | 33.55 | 33.55 | 33.56 |
| 1' | 37.47 | 40.45 | 40.66 |
| 2' | 28.51 | 28.47 | 30.62 |
| 3' | 37.54 | 27.67 | 28.48 |
| 4' | - | 27.48 | 30.40 |
| 5' | - | 30.26 | 30.45 |
| 6' | - | 40.48 | 30.40 |
| 7' | - | - | 27.95 |
| 8' | - | - | 28.24 |
| 9' | - | - | 30.31 |
| 10' | - | - | 40.74 |
| 1'' | 171.00 | 170.68 | 170.66 |
| 2'' | 37.84 | 40.32 | 40.34 |
| 2''' | 163.42 | 163.41 | 163.42 |
| 3''' | 113.19 | 112.99 | 113.00 |
| 4''' | 152.48 | 152.69 | 152.67 |
| 4a''' | 113.10 | 113.10 | 113.08 |
| 5''' | 127.51 | 127.47 | 127.51 |
| 6''' | 114.40 | 114.34 | 114.35 |
| 7''' | 163.10 | 163.09 | 163.10 |
| 8''' | 103.77 | 103.72 | 103.70 |
| 8a''' | 156.84 | 156.82 | 156.83 |

Tabla C3 ¹³C RMN δC

| Posición | 7 | 8 | 9 |
|----------|-------|-------|-------|
| 1 | 47.63 | 47.65 | 47.66 |
| 2 | 69.45 | 69.46 | 69.45 |
| 3 | 84.42 | 84.44 | 84.43 |
| 4 | 40.46 | 40.48 | 40.50 |
| 5 | 56.61 | 56.64 | 56.62 |
| 6 | 19.55 | 19.52 | 19.55 |
| 7 | 33.71 | 33.79 | 33.78 |
| 8 | 40.70 | 40.72 | 40.72 |
| 9 | 48.99 | 48.99 | 48.97 |
| 10 | 39.20 | 39.21 | 39.23 |

| | | | |
|------------|--------|--------|--------|
| 11 | 24.02 | 24.03 | 24.02 |
| 12 | 123.94 | 123.75 | 123.73 |
| 13 | 145.27 | 145.51 | 145.54 |
| 14 | 42.94 | 43.00 | 43.01 |
| 15 | 30.33 | 30.48 | 30.68 |
| 16 | 24.65 | 24.66 | 24.67 |
| 17 | 47.55 | 47.51 | 47.50 |
| 18 | 42.53 | 42.61 | 42.66 |
| 19 | 48.07 | 48.09 | 48.10 |
| 20 | 31.63 | 31.61 | 31.62 |
| 21 | 35.12 | 35.13 | 35.14 |
| 22 | 34.42 | 34.38 | 34.34 |
| 23 | 29.29 | 29.28 | 29.31 |
| 24 | 17.43 | 17.45 | 17.49 |
| 25 | 17.12 | 17.11 | 17.15 |
| 26 | 17.92 | 18.03 | 18.07 |
| 27 | 26.50 | 26.44 | 26.45 |
| 28 | 180.45 | 180.26 | 180.20 |
| 29 | 24.08 | 24.03 | 24.04 |
| 30 | 33.57 | 33.54 | 33.56 |
| 1' | 37.77 | 40.38 | 40.72 |
| 2' | 28.51 | 28.48 | 30.56 |
| 3' | 37.88 | 27.68 | 28.26 |
| 4' | - | 27.83 | 30.50 |
| 5' | - | 30.36 | 30.47 |
| 6' | - | 40.68 | 30.41 |
| 7' | - | - | 28.48 |
| 8' | - | - | 28.08 |
| 9' | - | - | 30.60 |
| 10' | - | - | 40.85 |
| 1'' | 169.41 | 169.16 | 169.16 |
| 2'' | 118.32 | 118.51 | 118.53 |
| 3'' | 141.96 | 141.68 | 141.66 |
| 1''' | 127.66 | 127.75 | 127.74 |
| 2''', 6''' | 130.58 | 130.53 | 130.52 |
| 3''', 5''' | 116.75 | 116.72 | 116.72 |
| 4''' | 160.56 | 160.49 | 160.48 |
| 4'' | - | 147.99 | 147.88 |
| 4a' | - | 118.29 | 118.10 |

| | | | |
|------|---|--------|--------|
| 4a'' | - | 118.03 | 117.91 |
| 5' | - | 130.28 | 130.16 |
| 5'' | - | 129.93 | 129.74 |
| 6' | - | 134.52 | 134.41 |
| 6'' | - | 134.46 | 134.41 |
| 7' | - | 125.02 | 124.92 |
| 7'' | - | 124.95 | 124.86 |
| 8' | - | 116.81 | 116.74 |
| 8'' | - | 116.68 | 116.58 |
| 8a' | - | 155.16 | 155.04 |
| 8a'' | - | 155.13 | 155.04 |

Tabla C4 ¹³C RMN δC

| Posición | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------|--------|--------|
| 1 | 46.50 | 43.87 | 43.85 |
| 2 | 68.93 | 71.82 | 71.61 |
| 3 | 83.98 | 81.92 | 81.72 |
| 4 | 39.29 | 39.94 | 39.77 |
| 5 | 55.25 | 55.18 | 54.93 |
| 6 | 18.34 | 18.36 | 18.15 |
| 7 | 32.30 | 32.55 | 32.07 |
| 8 | 39.60 | 39.50 | 39.51 |
| 9 | 47.61 | 47.73 | 47.53 |
| 10 | 38.28 | 38.58 | 38.29 |
| 11 | 23.91 | 22.91 | 23.85 |
| 12 | 123.66 | 122.32 | 123.18 |
| 13 | 145.15 | 143.79 | 145.05 |
| 14 | 42.39 | 41.74 | 42.51 |
| 15 | 27.44 | 27.75 | 27.31 |
| 16 | 24.31 | 23.66 | 24.15 |
| 17 | 47.67 | 46.63 | 47.46 |
| 18 | 42.73 | 41.00 | 42.27 |
| 19 | 46.80 | 45.90 | 46.69 |
| 20 | 30.88 | 30.81 | 30.75 |
| 21 | 34.25 | 33.90 | 34.12 |
| 22 | 32.45 | 32.49 | 32.37 |
| 23 | 28.72 | 28.70 | 28.59 |
| 24 | 16.84 | 18.00 | 17.87 |
| 25 | 16.84 | 16.55 | 16.48 |
| 26 | 17.02 | 17.28 | 16.85 |

| | | | |
|-------|--------|--------|--------|
| 27 | 25.94 | 26.09 | 25.82 |
| 28 | 177.17 | 184.17 | 176.86 |
| 29 | 23.73 | 23.69 | 23.59 |
| 30 | 33.05 | 33.19 | 32.92 |
| 2''' | 161.20 | - | 161.00 |
| 3''' | 113.51 | - | 113.45 |
| 4''' | 152.31 | - | 152.05 |
| 4a''' | 116.25 | - | 116.14 |
| 5''' | 125.38 | - | 125.17 |
| 6''' | 115.75 | - | 115.58 |
| 7''' | 141.49 | - | 141.27 |
| 8''' | 107.02 | - | 107.15 |
| 8a''' | 154.37 | - | 154.34 |
| 9''' | 18.72 | - | 18.57 |
| OCO' | - | 162.69 | 162.52 |
| OCO'' | - | 162.00 | 161.84 |
| 2' | - | 156.80 | 156.68 |
| 2'' | - | 156.75 | 156.59 |
| 3' | - | 117.90 | 117.75 |
| 3'' | - | 117.53 | 117.43 |
| 4' | - | 148.88 | 148.75 |
| 4'' | - | 147.99 | 147.88 |
| 4a' | - | 118.29 | 118.10 |
| 4a'' | - | 118.03 | 117.91 |
| 5' | - | 130.28 | 130.16 |
| 5'' | - | 129.93 | 129.74 |
| 6' | - | 134.52 | 134.41 |
| 6'' | - | 134.46 | 134.41 |
| 7' | - | 125.02 | 124.92 |
| 7'' | - | 124.95 | 124.86 |
| 8' | - | 116.81 | 116.74 |
| 8'' | - | 116.68 | 116.58 |
| 8a' | - | 155.16 | 155.04 |
| 8a'' | - | 155.13 | 155.04 |

IV.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hodon, J., Borkova, L., Pokorny, J., Kazakova, A. & Urban, M. Design and synthesis of pentacyclic triterpene conjugates and their use in medicinal research. *Eur. J. Med. Chem.* **182**, 111653 (2019).
2. Rascón, L. . V., Torres, H. M., Velázquez, C. C., Garibay, A. E. & Robles, R. . Z. *Triterpenoids : Synthesis , Uses in Cancer Treatment and other Biological Activities Complimentary Contributor Copy.* (2016).
3. Rufino-Palomares, E. E. *et al.* Anti-cancer and Anti-angiogenic Properties of Various Natural Pentacyclic Tri-terpenoids and Some of their Chemical Derivatives. *Curr. Org. Chem.* (2015) doi:10.2174/1385272819666150119225952.
4. Kahnt, M., Wiemann, J., Fischer, L., Sommerwerk, S. & Csuk, R. Transformation of asiatic acid into a mitocanic, bimodal-acting rhodamine B conjugate of nanomolar cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **159**, 143–148 (2018).
5. Grymel, M., Zawojak, M. & Adamek, J. Triphenylphosphonium Analogues of Betulin and Betulinic Acid with Biological Activity: A Comprehensive Review. *J. Nat. Prod.* **82**, 1719–1730 (2019).
6. Connolly, J. D. & Hill, R. A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 221–240 (1999) doi:https://doi.org/10.1039/A703937I.
7. Ayeleso, T. B., Matumba, M. G. & Mukwevho, E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules* **22**, (2017).
8. Medina-O'donnell, M. *et al.* Oleanolic Acid Derivatives as Potential Inhibitors of HIV-1 Protease. *J. Nat. Prod.* **82**, 2886–2896 (2019).
9. Krajka-Kuźniak, V. *et al.* Oleanolic acid oxime derivatives and their conjugates with aspirin modulate the NF-κB-mediated transcription in HepG2 hepatoma cells. *Bioorg. Chem.* **93**, 103326 (2019).

10. Castellano, J. M. *et al.* Oleanolic acid exerts a neuroprotective effect against microglial cell activation by modulating cytokine release and antioxidant defense systems. *Biomolecules* **9**, (2019).
11. Loesche, A. *et al.* Ursolic and oleanolic acid derivatives with cholinesterase inhibiting potential. *Bioorg. Chem.* **85**, 23–32 (2019).
12. Meng, L. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of amino acids-oleanolic acid conjugates as influenza virus inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **27**, 115147 (2019).
13. Vo, N. N. Q., Nomura, Y., Muranaka, T. & Fukushima, E. O. Structure-Activity Relationships of Pentacyclic Triterpenoids as Inhibitors of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Enzymes. *J. Nat. Prod.* **82**, 3311–3320 (2019).
14. Wei, Q., Zhang, B., Li, P., Wen, X. & Yang, J. Maslinic Acid Inhibits Colon Tumorigenesis by the AMPK-mTOR Signaling Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 4259–4272 (2019).
15. Lee, W., Lee, H., Lee, T., Park, E. K. & Bae, J. S. Inhibitory functions of maslinic acid, a natural triterpene, on HMGB1-mediated septic responses. *Phytomedicine* **69**, 153200 (2020).
16. Serbian, I., Siewert, B., Al-Harrasi, A. & Csuk, R. 2-O-(2-chlorobenzoyl) maslinic acid triggers apoptosis in A2780 human ovarian carcinoma cells. *Eur. J. Med. Chem.* **180**, 457–464 (2019).
17. Shimazu, K. *et al.* The Anti-Arthritis Effect of Olive-Derived Maslinic Acid in Mice is Due to its Promotion of Tissue Formation and its Anti-Inflammatory Effects. *Mol. Nutr. Food Res.* **63**, (2019).
18. García-Granados, A. *Process for the industrial recovery of oleanolic and maslinic acids contained in the olive milling subproducts.* (1998).

19. Wiemann, J., Heller, L. & Csuk, R. An access to a library of novel triterpene derivatives with a promising pharmacological potential by Ugi and Passerini multicomponent reactions. *Eur. J. Med. Chem.* **150**, 176–194 (2018).
20. Brandes, B., Hoenke, S., Fischer, L. & Csuk, R. Design, synthesis and cytotoxicity of BODIPY FL labelled triterpenoids. *Eur. J. Med. Chem.* **185**, (2020).
21. Sousa, J. L. C., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. & Silva, A. M. S. Recent developments in the functionalization of betulinic acid and its natural analogues: A route to new bioactive compounds. *Molecules* **24**, (2019).
22. Soral, M. *et al.* Preparation of Conjugates of Cytotoxic Lupane Triterpenes with Biotin. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2563–2570 (2015).
23. Liu, C. M. *et al.* Synthesis and cytotoxicity of pentacyclic triterpenes-aniline nitrogen mustard derivatives. *J. Chinese Chem. Soc.* **67**, 646–651 (2020).
24. Adamson, C. S., Waki, K., Ablan, S. D., Salzwedel, K. & Freed, E. O. Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Protease Inhibitors on Evolution of Resistance to the Maturation Inhibitor Bevirimat (PA-457). *J. Virol.* **83**, 4884–4894 (2009).
25. Adamson, C. S., Sakalian, M., Salzwedel, K. & Freed, E. O. Polymorphisms in Gag spacer peptide 1 confer varying levels of resistance to the HIV-1 maturation inhibitor bevirimat. *Retrovirology* **7**, 1–8 (2010).
26. Dang Thi, T. A. *et al.* Synthesis and cytotoxic evaluation of novel ester-triazole-linked triterpenoid-AZT conjugates. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **24**, 5190–5194 (2014).
27. Fouquier, J. & Guedj, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol. Res. Perspect.* **3**, (2015).

28. Xiong, J. *et al.* Conjugates of betulin derivatives with AZT as potent anti-HIV agents. *Bioorganic Med. Chem.* **18**, 6451–6469 (2010).
29. Bori, I. D., Hung, H.-Y., Qian, K., Chen, C.-H. & Susan L. Morris-Natschke, and K.-H. L. Anti-AIDS agents 88. Anti-HIV conjugates of betulin and betulinic acid with AZT prepared via click chemistry. *Tetrahedron Lett.* **53**, 1987–1989. (2012).
30. Dang, A. T. T. *et al.* New hybrids between triterpenoid acids and nucleoside HIV-RT inhibitors. *Mendeleev Commun.* **25**, 96–98 (2015).
31. Zhu, M. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel HIV-1 protease inhibitors with pentacyclic triterpenoids as P2-ligands. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **29**, 357–361 (2019).
32. Masullo, M., Pizza, C. & Piacente, S. Oleanane derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **27**, 237–255 (2017).
33. Yu, F. *et al.* Development of oleanane-type triterpenes as a new class of HCV entry inhibitors. *J. Med. Chem.* **56**, 4300–4319 (2013).
34. Parra, A. *et al.* Semi-synthesis of acylated triterpenes from olive-oil industry wastes for the development of anticancer and anti-HIV agents. *Eur. J. Med. Chem.* **74**, 278–301 (2014).
35. Parra, A. *et al.* Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 1139–1145 (2009).
36. Parra, A. *et al.* Solid-phase library synthesis of bi-functional derivatives of oleanolic and maslinic acids and their cytotoxicity on three cancer cell lines. *ACS Comb. Sci.* **16**, 428–447 (2014).
37. Wolfram, R. K., Heller, L. & Csuk, R. Targeting mitochondria: Esters of rhodamine B with triterpenoids are mitocanic triggers of apoptosis. *Eur. J. Med. Chem.* **152**, 21–30 (2018).

38. Sommerwerk, S., Heller, L., Kerzig, C., Kramell, A. E. & Csuk, R. Rhodamine B conjugates of triterpenoic acids are cytotoxic mitocans even at nanomolar concentrations. *Eur. J. Med. Chem.* **127**, 1–9 (2017).
39. Wolfram, R. K. *et al.* Homopiperazine-rhodamine B adducts of triterpenoic acids are strong mitocans. *Eur. J. Med. Chem.* **155**, 869–879 (2018).
40. Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014).
41. Emmerich, D., Vanchanagiri, K., Baratto, L. C., Schmidt, H. & Paschke, R. Synthesis and studies of anticancer properties of lupane-type triterpenoid derivatives containing a cisplatin fragment. *Eur. J. Med. Chem.* **75**, 460–466 (2014).
42. Kaluderović, G. N. *et al.* (18-Crown-6)potassium(I) trichlorido[28-acetyl-3-(tris-(hydroxylmethyl)amino-ethane)betulinic ester-κN]platinum(II): Synthesis and in vitro antitumor activity. *Inorganics* **5**, 56–69 (2017).
43. Flekhter, O. B. *et al.* The synthesis and the anti-inflammatory and antiulcer activities of a number of 2-substituted derivatives of betulonic acid, methylbetulone, and lupenone. *Pharm. Chem. J.* **34**, 588–591 (2000).
44. Spivak, A. Y. *et al.* Synthesis of conjugates of lupane triterpenoids with chromane antioxidants and in vitro study of their influence on the production of nitrogen monoxide and on the arginase activity in activated macrophages. *Russ. Chem. Bull.* **59**, 2219–2229 (2010).
45. Innocente, A. *et al.* Synthesis of isosteric triterpenoid derivatives and antifungal activity. *Chem. Biol. Drug Des.* **83**, 344–349 (2014).
46. Innocente, A. M. *et al.* Synthesis and antiplasmodial activity of betulonic acid and ursolic acid analogues. *Molecules* **17**, 12003–12014 (2012).

47. Blanco-Cabra, N. *et al.* Novel Oleanolic and Maslinic Acid Derivatives as a Promising Treatment against Bacterial Biofilm in Nosocomial Infections: An in Vitro and in Vivo Study. *ACS Infect. Dis.* **5**, 1581–1589 (2019).
48. Lee, W., Kim, J., Park, E. K. & Bae, J. S. Maslinic acid ameliorates inflammation via the downregulation of NF- κ B and STAT-1. *Antioxidants* **9**, 1–8 (2020).
49. Vega-Granados, K. *et al.* Atmospheric water triggers supramolecular gel formation of novel low molecular weight maslinic and oleanolic triterpenic derivatives. *Mater. Chem. Front.* **3**, 2637–2646 (2019).
50. Molina-Bolívar, J. A. *et al.* Maslinic acid conjugate with 7-amino-4-methylcoumarin as probe to monitor the temperature dependent conformational changes of human serum albumin by FRET. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **214**, 161–169 (2019).
51. Sun, Y. qi *et al.* Binding effect of fluorescence labeled glycyrrhetic acid with GA receptors in hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci.* **188**, 186–191 (2017).
52. Sun, Y. *et al.* Cellular uptake mechanism and clearance kinetics of fluorescence-labeled glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid–modified liposome in hepatocellular carcinoma cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **53**, 46–56 (2017).
53. Yao, H. *et al.* Synthesis, Biological Evaluation of Fluorescent 23-Hydroxybetulinic Acid Probes, and Their Cellular Localization Studies. *ACS Med. Chem. Lett.* **9**, 1030–1034 (2018).
54. Krajcovicova, S. *et al.* A Synthetic Approach for the Rapid Preparation of BODIPY Conjugates and their use in Imaging of Cellular Drug Uptake and Distribution. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 4957–4966 (2018).

55. Baxa, U. *et al.* Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, Salmonella O-antigen polysaccharide. *Biophys. J.* **71**, 2040–2048 (1996).
56. Irvine, G. B., Ennis, M. & Williams, C. H. Visual detection of peptidase activity using fluorogenic substrates in a microtiter plate assay. *Anal. Biochem.* **185**, 304–307 (1990).
57. Morodera, L. *et al.* Studies on Immunoassays of Peptide Factors: II. Fluorescence Enzyme Immunoassay for Human Little-Gastrin. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **368**, 831–838 (1987).
58. Manevich, Y., Held, K. D. & Biaglow, J. E. Coumarin-3-carboxylic acid as a detector for hydroxyl radicals generated chemically and by gamma radiation. *Radiat. Res.* **148**, 580–591 (1997).
59. Demant, E. J. F. Covalent complexes between serum albumin and 7-hydroxycoumarin-4-acetic acid: Synthesis and applications in the spectrophotometric detection of long-chain fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1304**, 43–55 (1996).
60. Demant, E. J., Richieri, G. V. & Kleinfeld, A. M. Stopped-flow kinetic analysis of long-chain fatty acid dissociation from bovine serum albumin. *Biochem. J.* **363**, 809–815 (2002).
61. Quinde-Axtell, Z. & Baik, B. K. Phenolic compounds of barley grain and their implication in food product discoloration. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9978–9984 (2006).
62. Brechun, K. E. *et al.* Detection of Incorporation of p-Coumaric Acid into Photoactive Yellow Protein Variants in Vivo. *Biochemistry* **58**, 2682–2694 (2019).
63. Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M. & Carotti, A. *Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds.* *Molecules* vol. 23 (2018).

64. Tsay, S. C. *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of imidazole-coumarin conjugates against hepatitis C virus. *Molecules* **21**, (2016).
65. Han, H. W. *et al.* The evaluation of potent antitumor activities of shikonin coumarin-carboxylic acid, PMMB232 through HIF-1 α -mediated apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **97**, 656–666 (2018).
66. Liu, X., Chen, L., Sun, F. & Zhang, G. Enhanced suppression of proliferation and migration in highly-metastatic lung cancer cells by combination of valproic acid and coumarin-3-carboxylic acid and its molecular mechanisms of action. *Cytotechnology* **65**, 597–608 (2013).
67. Singh, H. *et al.* Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for therapeutic coumarin hybrids. *Bioorganic Med. Chem.* **27**, 3477–3510 (2019).
68. Khatkar, A., Nanda, A., Kumar, P. & Narasimhan, B. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of p-coumaric acid derivatives. *Arab. J. Chem.* **10**, S3804–S3815 (2017).
69. Sandhu, S., Bansal, Y., Silakari, O. & Bansal, G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 3806–3814 (2014).
70. Bhatia, R. & Rawal, R. K. Coumarin Hybrids: Promising Scaffolds in the Treatment of Breast Cancer. *Mini-Reviews Med. Chem.* (2019) doi:10.2174/1389557519666190308122509.
71. Maiti, S. *et al.* Gemcitabine-coumarin-biotin conjugates: A target specific theranostic anticancer prodrug. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 4567–4572 (2013).
72. Zhang, X. *et al.* Fluorescent Coumarin-Artemisinin Conjugates as Mitochondria-Targeting Theranostic Probes for Enhanced Anticancer Activities. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 17415–17421 (2015).

73. Musa, M. A., Khan, M. O. F. & Cooperwood, J. S. Synthesis and antiproliferative activity of coumarin-estrogen conjugates against breast cancer cell lines. *Lett Drug Des Discov.* **6**, 133–138 (2009).