



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto de
Ciencias
Doctorado en Ciencias Químicas

Universidad de Sevilla

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Doctorado en Química

“Diseño y evaluación de nuevas plataformas basadas en productos naturales frente a enfermedades degenerativas”

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Químicas
en el área de Química Orgánica**

Presenta

M. C. Rosa Isela Martínez Lara

Directores de tesis

Dra. Penélope Merino Montiel

Dr. Óscar López López



Puebla, México. Octubre 2024



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto de
Ciencias
Doctorado en Ciencias Químicas

Universidad de Sevilla

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Doctorado en Química

Memoria presentada por la M.C. Rosa Isela Martínez Lara para optar
al grado de Doctora en Química

Puebla, México. Octubre 2024



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto de
Ciencias
Doctorado en Ciencias Químicas

Universidad de Sevilla

Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Doctorado en Química

Vº Bº. De los Directores de la tesis

Fdo. Dra Penelope Merino Montiel

Fdo. Dr. Óscar López López



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la D. C. María Concepción Sara Montiel Smith, D.C. José María Fernández-Bolaños Guzmán, D.C. Inés Maya Castilla, D.C. Estibaliz Sansinenea Royano y el D.C Jorge R. Juárez Posadas, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Diseño y evaluación de nuevas plataformas basadas en productos naturales frente a enfermedades degenerativas”**, que presenta la alumna **M. en C. Rosa Isela Martínez Lara** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los nueve días del mes de octubre del año dos mil veinticuatro.

ATENTAMENTE

D. C. María Concepción Sara Montiel Smith

D. C. José María Fernández-Bolaños Guzmán

D.C. Inés Maya Castilla

D.C. Estibaliz Sansinenea Royano

D.C Jorge R. Juárez Posadas



El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, así como en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla, España bajo la dirección de la Dra. Penélope Merino y del Dr. Óscar López López, con el apoyo de la beca nacional otorgada por CONAHCyT (CVU/Becario) 472799/758819 del 1 de enero de 2020 al 31 de diciembre de 2023 y de la VIEP-BUAP con el apoyo en los gastos de transporte para la estancia de investigación realizada en la Universidad de Sevilla, España.

Novel Coumarin-Steroid/Terpenoid Hybrids: In Vitro and In Silico Anticancer Studies

Rosa I. Martínez-Lara,^[a] Luis A. Cobos-Ontiveros,^[a] Silvia A. Meza-Ireta,^[a] Mónica Martínez-Montiel,^[a] Blanca Colín-Lozano,^[b] Adrián Puerta,^[c] José M. Padrón,^[c] Óscar López,^[d] José Luis Vega-Báez,^[a] Penélope Merino-Montiel,^{*(a)} and Sara Montiel-Smith^{*(a)}

Values represent mean \pm standard deviation of at least three independent experiments.

We have synthesized a series of novel coumarin-steroid and triterpenoid hybrids and evaluated their potential anticancer activity through molecular docking calculations and *in vitro* antiproliferative assays. These hybrids, derived from estrone and oleanolic acid, were linked via hydrocarbon spacers of varying lengths. Molecular docking studies against human aromatase revealed strong interactions, particularly for com-

pound **11d**, which exhibited significant binding affinity (-12.6308 kcal/mol). *In vitro* assays demonstrated that compounds **6b** and **11d** had notable antiproliferative effects, with GI_{50} values of 5.4 and 7.0 μ M against WiDr (colon) and HeLa (cervix) cancer cells, respectively. These findings highlight the potential of these hybrids as novel anticancer agents targeting aromatase, warranting further investigation and optimization.

Introduction

Cancer stands as the foremost global cause of mortality,^[1] marked by pathological tissue growth arising from the persistent and prolonged proliferation of aberrant cells, ultimately resulting in the invasion and destruction of tissues.^[2]

Conventional cancer treatment predominantly involves chemotherapy, often complemented by surgery and radiotherapy. Despite its widespread use, many cancers remain inoperable, and resistance to chemotherapeutic drugs frequently emerges. Intolerable drug-induced side effects may also lead to treatment reduction or discontinuation.^[3]

Given the diminished efficacy and considerable toxicity associated with numerous current chemotherapeutic agents, there exists a clear and pressing need for the development of novel, effective, and non-toxic drugs for cancer treatment.^[4]

Steroids are commonly employed as supportive therapy in patients with solid tumours. In certain cases, they constitute an essential part of cancer treatment, such as in prostate cancer or

for managing symptoms like cerebral edema, nausea, vomiting, or anorexia.^[5]

Furthermore, the antitumor properties of coumarins are associated to their distinctive, flat, and aromatic structure. This arrangement allows numerous non-covalent interactions, including π - π stacking, electrostatic interactions, hydrophobic interactions, metal coordination, hydrogen bonding, and van der Waals forces, with active sites on receptors or enzymes in various organisms.^[6]

The coumarin nucleus serves as an intriguing starting point for the development of new drugs targeting various cancer types. Incorporating diverse pharmacophores into this nucleus within a single molecular architecture could potentially modulate affinity and antitumor activity while mitigating side effects and preventing drug chemoresistance.^[7]

In the present study, the conjugation of coumarin units to steroid or triterpenoid derivatives (estrone and oleanolic acid, respectively) via aliphatic linkers of varying lengths is described. The choice of such design pursues the preparation of multi-target drugs to address the high complexity and multifactorial origin of cancer.^[8] It has been widely documented^[9] that integrating different pharmacophores targeting key pathways in such diseases often results in better efficiency and safer safety profiles compared to the administration of a cocktail of drugs. This approach, known as the multitarget-directed ligand (MTDL) strategy, has emerged as significantly more effective than the classical polypharmacy.^[10] In this context, we envisioned the incorporation of a coumarin residue (2*H*-chromen-2-ones or benzopyrones), an ubiquitous phytochemical frequently found in medicinal plants.^[11] Coumarins have been associated with a wide array of antiproliferative mechanisms, like the inhibition of key enzymes (e.g. carbonic anhydrases), blockade of PI3 K-mediated signalling pathways, inhibition of microtubule polymerization, activation of apoptotic events, interference

[a] R. I. Martínez-Lara, L. A. Cobos-Ontiveros, S. A. Meza-Ireta, M. Martínez-Montiel, J. L. Vega-Báez, P. Merino-Montiel, S. Montiel-Smith
Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico
E-mail: penelope.merino@correo.buap.mx
maria.mopntiel@correo.buap.mx

[b] B. Colín-Lozano
Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

[c] A. Puerta, J. M. Padrón
BioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Universidad de La Laguna, 38206 La Laguna, Spain

[d] Ó. López
Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202401315>

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en los siguientes congresos:

- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Blanca Colin Loza, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Óscar López. Estudios computacionales de ésteres del ácido oleanólico. Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2021, "Al ritmo de nuevos tiempos" (Cartel, modalidad virtual). 30 de agosto del 2021.
- Rosa Isela Martínez Lara, Blanca Colin Loza, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Óscar López. Estudios computacionales de ésteres del ácido oleanólico frente a diversas anhidrasas carbónicas. LatinXChem Twitter Conference 2021 (Cartel, modalidad virtual). 20 de septiembre del 2021.
- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Óscar López. Híbridos ácido oleanólico-cumarinas con potencial actividad anticancerígena. XVII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica A.C. (Cartel, modalidad presencial, Puebla). 25 de agosto del 2022.
- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Óscar López. Estudios computacionales de ésteres de ácido oleanólico frente a diversas anhidrasas carbónicas. Simposio interno XXVI del posgrado en Ciencias Químicas, BUAP (Ponencia, modalidad virtual). 9 de noviembre de 2022.
- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Óscar López. Síntesis de híbridos de ácido oleanólico con potencial actividad anticancerígena. LatinXChem Twitter Conference 2022 (Cartel, modalidad virtual). 28 de noviembre del 2022.
- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Óscar López. Síntesis de ésteres de ácido oleanólico con potencial actividad anticancerígena. 3er

Simposio de Egresados de la Maestría en Química Bioorgánica (Ponencia, modalidad virtual). 30 de noviembre del 2022.

- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Adrián Puerta, José M. Padrón, José G. Fernández Bolaños, Óscar López. Selenocianatos derivados de ácido oleanólico con potencial actividad antiproliferativa. Congreso Internacional de la Sociedad de Química de México 2023 (Ponencia, modalidad virtual). 2 de octubre del 2023.
- Rosa Isela Martínez Lara, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith, José Luis Vega Báez, Adrián Puerta, José M. Padrón, José G. Fernández Bolaños, Óscar López. Derivados organoselénicos de triterpenoides. Evaluación de la actividad antiproliferativa. LatinXChem Twitter Conference 2023 (Cartel, modalidad virtual). 16 de octubre del 2023.

Agradecimientos

A mis directores de tesis la Dra. Penélope Merino Montiel y el Dr. Oscar López López, por aceptarme como alumna de doctorado y por todo su apoyo ante las adversidades que se presentaron en la realización en este trabajo de tesis y sobre todo por todas sus enseñanzas y dedicación.

A mi comité revisor, por su tiempo y observaciones para el presente trabajo de tesis:

Dra. Inés Maya Castilla

Dra. María Concepción Sara Montiel Smith

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

Dr. Jorge R. Juárez Posadas

Dr. José María Fernández-Bolaños Guzmán

Al grupo de trabajo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, Tenerife, España), por el apoyo en la realización de las pruebas antiproliferativas.

Al grupo de trabajo del Dr. Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia, Italia) y a la Dra. Paloma Begines Aguilar, por el apoyo en la realización de las pruebas de inhibición de anhidrasas carbónicas.

Al grupo de trabajo del Dr. Maikel Castellano (Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España), por su apoyo en la realización de los estudios de mecanismo de muerte celular y en los estudios *in vivo* con *C. elegans*.

A CONAHCYT, por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

A la VIEP BUAP, por el apoyo otorgado para la realización de la estancia en la Universidad de Sevilla, España.

Dedicatorias

A mis padres, por todo el apoyo que día a día me siguen dando, por siempre estar ahí y ser la fuerza para lograr una meta más en mi vida, porque sin ustedes nada de esto habría sido posible. Son un gran ejemplo de fortaleza y dedicación que me ha ayudado a seguir luchando por salir adelante. Gracias eternas por jamás dejarme sola.

A mi hermano, por los buenos momentos compartidos y por el apoyo que siempre me brindas a pesar de la distancia.

A mis compañeros de laboratorio Ale, Cobos y Jazmín por los buenos momentos compartidos y por el apoyo para el trabajo experimental en esa época complicada que pasamos durante la pandemia.

A mis compañeras Diana, Elvia y Mónica por todos los momentos divertidos dentro y fuera del laboratorio, por su amistad y por el apoyo también en el trabajo de laboratorio.

A la Dra. Paloma Begines Aguilar por su apoyo en el trabajo experimental de la presente Tesis doctoral.

A mis profesores, por ser un ejemplo y motivación, gracias por todas sus enseñanzas y consejos.

Índice

1. Resumen	VII
2. Relación de nuevos compuestos.....	XX
3. Introducción general	1
4. Síntesis de derivados del ácido oleanólico con potencial actividad antiproliferativa	7
4.1. Introducción.....	7
4.1.1. Aspectos generales del ácido oleanólico.....	7
4.1.2. Aspectos generales de las cumarinas	16
4.1.3. Aspectos generales de los compuestos organoselénicos	26
4.2. Objetivo general de sección	34
4.3. Objetivos particulares de sección	34
4.4. Discusión de resultados	35
4.4.1. Híbridos ácido oleanólico-cumarinas.....	35
4.4.2. Derivados de selenio	41
5. Derivados mitocondriotrópicos	52
5.1. Introducción.....	52
5.1.1. Papel de la mitocondria en el cáncer.....	52
5.1.2. Tipos de agentes mitocondriotrópicos	59
5.1.3. Ejemplos de agentes mitocondriotrópicos con actividad antiproliferativa	69
5.2. Objetivo general de sección	75
5.3. Objetivos particulares de sección.....	75
5.4. Discusión de resultados	76
6. Derivados de cumarina como potenciales inhibidores duales de NAMPT y anhidrasas carbónicas	89
6.1. Introducción.....	89
6.1.1. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺).....	89
6.1.2. Papel de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) en el cáncer	93
6.1.3. Inhibidores de NAMPT como potenciales agentes antitumorales	96
6.1.4. Anhidrasas carbónicas	107
6.2. Objetivo general de sección	114
6.3. Objetivos particulares de sección.....	114
6.4. Discusión de resultados	115

7. Ensayos biológicos.....	129
7.1. Ensayos de actividad antiproliferativa	129
7.1.1. Ensayos de actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de híbridos ácido oleanólico-cumarina	130
7.1.2. Ensayos de actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de híbridos ácido oleanólico-selenocianato	130
7.1.3. Estudio de imágenes continuas de células vivas sin marcaje en híbridos OA-selenocianato	134
7.1.4. Análisis del mecanismo de muerte celular inducido por los híbridos de OA-Selenocianato	135
7.1.5. Estudios de actividad antiproliferativa <i>in vivo</i> de híbridos OA-selenocianato	143
7.1.6. Ensayos de actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de derivados mitocondriotrópicos	153
7.1.7. Ensayos de actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de los híbridos piridina-cumarinas	155
7.2. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de anhidrasas carbónicas humanas	156
8. Conclusiones	159
9. Parte experimental	169
9.1. Métodos generales	169
9.2. Estudios de actividad antiproliferativa <i>in vitro</i>	170
9.3. Imágenes continuas de células vivas sin marcaje	171
9.4. Estudios de mecanismo de acción de muerte celular	172
9.5. Estudios de actividad antiproliferativa <i>in vivo</i>	174
9.6. Ensayo de inhibición de anhidrasas carbónicas	175
9.7. Materias Primas	176
9.8. Nuevas investigaciones	198
10. ANEXO	235

1. Resumen

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el seno de los grupos de investigación *Síntesis y Modificación de Productos Naturales* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México) y *Química Fina de Carbohidratos* (Universidad de Sevilla (US), Sevilla, España), cuyas líneas de investigación se centran en la obtención de productos bioactivos frente a enfermedades degenerativas, como el cáncer, diabetes o Alzheimer.

La investigación mostrada en esta memoria ha sido financiada por los proyectos de Ciencia Básica (CB-2015/257464, CONACyT, México), Paradigmas y controversias 2022 (320334, CONACyT, México), Síntesis y estudios *in silico* de agentes antiproliferativos a partir de productos naturales (VIEP, 2023-2024, BUAP, México), así como por los proyectos del Plan Estatal de Investigación de España, Moléculas y Macromoléculas con Actividad Multidiana frente a Enfermedades Degenerativas (CTQ2016-78703-P) y Sistemas Químicos para la Vectorización y Liberación Selectiva de Nuevos Inhibidores Enzimáticos Citotóxicos (PID2020-116460RB-I00), del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN, España).

La Tesis se ha estructurado en tres bloques diferenciados, cada uno abordando enfoques innovadores para el desarrollo de nuevos productos con potencial actividad antitumoral.

En el Capítulo 4 se describe la preparación de derivados del ácido oleanólico, un triterpenoide pentacíclico aislado de más de 1600 especies de plantas, especialmente abundante en la familia *Oleaceae*, principalmente el olivo. El ácido oleanólico exhibe interesantes actividades biológicas, especialmente antitumorales, lo cual sugiere que puede constituir una excelente plataforma para la obtención de nuevos derivados con actividades mejoradas.

En este Capítulo se ha abordado la derivatización del ácido oleanólico a través de la posición C-3 (grupo hidroxilo) y C-28 (ácido carboxílico), empleando dos

aproximaciones distintas. Por un lado, se han preparado híbridos ácido oleanólico-cumarina con objeto de analizar la posible sinergia en las actividades de ambos fragmentos; las cumarinas, cuya estructura procede de la fusión de benceno y α -pirona, son sistemas fenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, y considerados como *estructuras privilegiadas* en investigación biomédica.

Estos híbridos han sido preparados mediante la inserción de un espaciador hidrocarbonado en las posiciones C-28 del ácido oleanólico y C-7 de la cumarina. Se ha modificado tanto la distancia entre ambos farmacóforos, como los sustituyentes sobre las posiciones C-3 y C-4 de la cumarina, con objeto de obtener relaciones estructura-actividad en sus propiedades antiproliferativas; esto permitió obtener 9 híbridos, cuya estructura general se muestra en la Figura 1.1.

La conexión entre el residuo de cumarina, obtenido de manera eficaz mediante condensación de Pechmann de resorcinol con diferentes β -cetoésteres, y el ácido oleanólico transcurrió con buenos rendimientos. La evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro*, efectuada sobre 6 líneas de tumores sólidos humanos, reveló que sólo el compuesto **4** ($R^1=CH_3$, $R^2=H$, $n=3$) mostraba actividad destacada; dicho compuesto mostró buena actividad frente a la línea tumoral HeLa (cáncer de cérvix, $GI_{50}= 7.0 \mu M$), con potencia sensiblemente superior a la mostrada por el fármaco abiraterona, empleado como referencia.

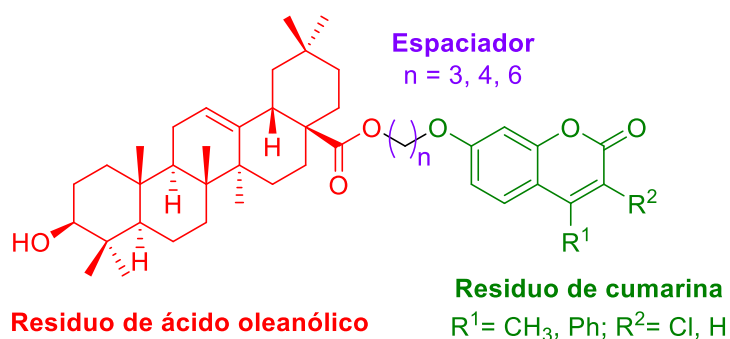


Figura 1.1. Estructura general de los híbridos ácido oleanólico-cumarina preparados.

La segunda aproximación para la derivatización del ácido oleanólico ha sido la combinación con un segundo farmacóforo de naturaleza organoselénica, en concreto, selenocianato. Dicha estrategia ha sido fruto de la vasta experiencia que poseen los grupos de investigación en los que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral en la preparación de compuestos organoselénicos con actividad biológica.

La incorporación del residuo organoselénico se ha efectuado, tanto en la posición C-3, como C-28 del ácido oleanólico, empleando, al igual que lo mostrado en la sección anterior, un espaciador. Se ha analizado la influencia tanto, de la flexibilidad conformacional del espaciador (hidrocarbonado vs. *p*-fenileno), como de su longitud, la posición de derivatización en el ácido oleanólico (C-3 vs. C-28), y la naturaleza de C-3 (OH vs. OAc); esto permitió el acceso, con buenos rendimientos globales, a 14 híbridos cuya estructura general se muestra en la Figura 1.2.

El estudio de las propiedades antiproliferativas *in vitro* reveló resultados prometedores. Por un lado, los derivados sustituidos en C-28, con longitudes de espaciador de hasta 6 carbonos, se comportaron como potentes agentes antiproliferativos, con valores de GI₅₀ en el rango micromolar bajo (1.3–2.4 μM), lo cual supone un incremento de la actividad de hasta 19 veces con respecto al ácido oleanólico natural, y de más de 77 veces con respecto a la abiraterona, un fármaco sintético de naturaleza esteroidal empleado en quimioterapia. El empleo de cadenas de mayor longitud (n=9) condujo a una reducción significativa de la actividad; no se observó diferencia de actividad al modificar la flexibilidad conformacional del espaciador. Los derivados sustituidos en la posición C-28 que poseen el grupo hidroxilo en C-3 libre resultaron ser más potentes que los correspondientes derivados O-acetilados; y, por otro lado, la sustitución en C-28 resultó ser más beneficiosa que la efectuada en C-3, especialmente para las líneas celulares resistentes a multifármaco.

Con objeto de profundizar sobre el modo de acción de estos compuestos, el selenocianato **11** (sustitución en C-28, n=3, R=H) fue sometido a un estudio

mediante técnicas de imagen holotomográfica 3D en células vivas (SW1573, célula de pulmón no pequeña); dicho estudio reveló la inducción de necrosis en las células tumorales. Este tipo de muerte celular podría llevarse a cabo por afectaciones en la replicación durante la fase S por efecto del selenocianato **13**, específicamente en células malignas HeLa, que, como consecuencia, llevó a una reducción de células mitóticas, lo que indica daño en la replicación también durante la fase M del ciclo celular.

Adicionalmente, los selenocianatos **11** y **14** (sustitución en C-28, $n=6$, $R=H$; OH libre o OAc en C-3, respectivamente) se evaluaron *in vivo* empleando *Caenorhabditis elegans*, un nematodo con genoma secuenciado, y considerado como un modelo validado en investigación oncológica. Los resultados indicaron que dichos compuestos, por un lado, mostraban una excelente selectividad, no provocando alteraciones morfológicas ni fisiológicas del organismo, pero sí una notable reducción del tamaño de la línea germinal tumoral, presumiblemente mediante una acción citostática.

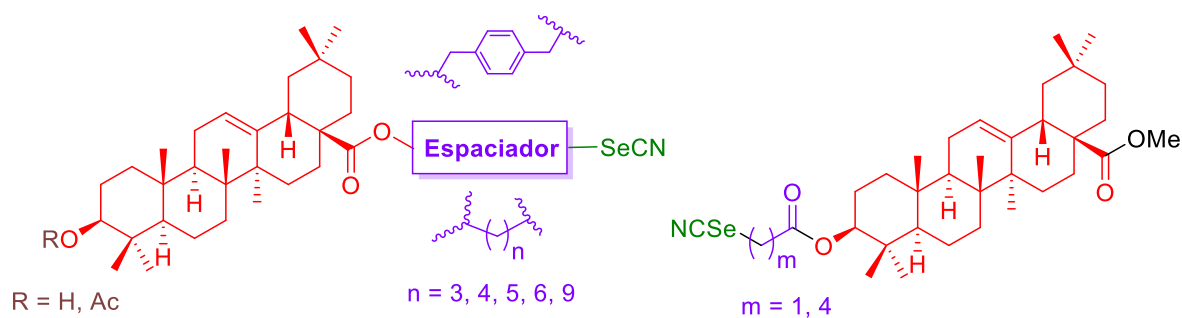


Figura 1.2. Estructura general de los selenocianatos derivados del ácido oleanólico preparados.

En el capítulo 5 se ha abordado una aproximación novedosa para la obtención de agentes antiproliferativa con actividad selectiva hacia las células tumorales (Figura 1.3). Dicha aproximación ha consistido en la combinación de dos fragmentos fundamentales, empleando un núcleo central de *p*-aminofenol para la unión de ambos. Por un lado, un residuo de tipo selenocianato, como farmacóforo que proporcione actividad antiproliferativa y, por otro lado, un catión lipofílico diseñado

para actuar como vehículo selectivo hacia las mitocondrias de las células tumorales. Los compuestos con estructura de este tipo se denominan agentes mitocondriotrópicos, y cuando manifiestan actividad antitumoral, mitocans (*mitocondria + cáncer*).

Se ha obtenido una amplia diversidad estructural, modificando la naturaleza, tipo y longitud del conector (fragmento hidrocarbonado, tiourea, amida), así como la naturaleza del catión lipofílico (trifenilfosfonio (TPP), piridinio, quinolinio, *N*-metilimidazolio, rodamina B), conduciendo a 8 derivados.

Los datos de la actividad antiproliferativa de estos derivados arrojaron que presentan un efecto de inhibición del crecimiento celular sobre las 6 líneas celulares de tumores sólidos estudiadas en el rango micromolar bajo, destacando los cationes de tipo trifenilfosfonio y rodamina, donde **25** fue el derivado cabeza de serie siendo hasta casi 9 veces más potente que los fármacos de referencia sobre la línea celular resistente a multifármacos. Por otro lado, la adición del fragmento de selenio a la rodamina B permitió aumentar la actividad de esta hasta 11 veces en la línea celular resistente a multifármacos.

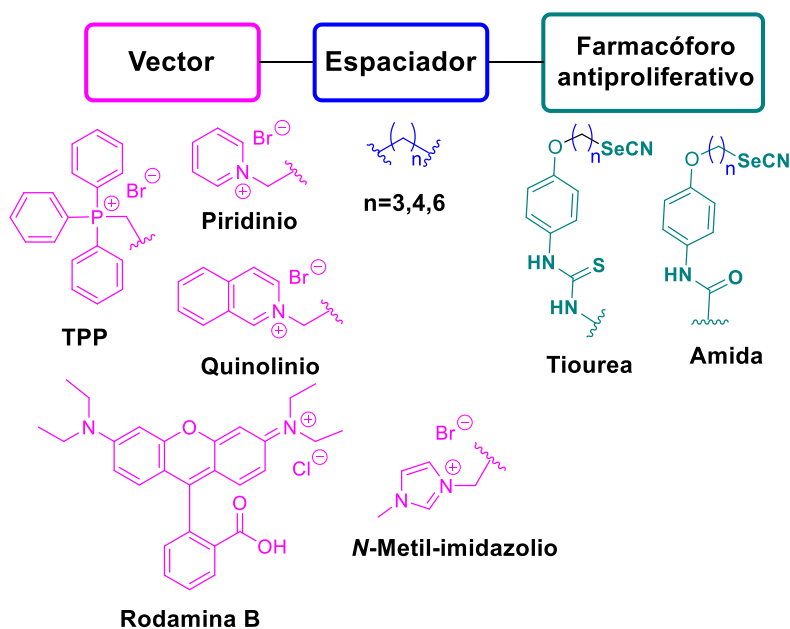


Figura 1.3. Estructura general de los agentes mitocondriotrópicos preparados.

Finalmente, en el Capítulo 6 se ha llevado a cabo la preparación de inhibidores duales de anhidrasas carbónicas y NAMPT (nicotinamida adenina dinucleótido fosforribosiltransferasa), como ejemplos de fármacos multidiana con actividad antitumoral; la Figura 1.4 muestra la estructura general de los 10 híbridos obtenidos.

Ambas enzimas se consideran en la actualidad como dianas terapéuticas de interés frente al cáncer. Las anhidrasas carbónicas, sobreexpresadas en tumores hipóxicos, son responsables del microambiente ácido del tumor, que permite su supervivencia y expansión; como farmacóforo para su inhibición se ha seleccionado un residuo de cumarina, que actúa como *inhibidor suicida*. Por otro lado, la NAMPT es la enzima limitante de biosíntesis de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), altamente demandado por las células tumorales; para su inhibición se ha empleado un residuo de piridina, sustituido en C-3 ó C-4, como mimético de la nicotinamida (NAM).

El diseño de inhibidores de ambas enzimas sigue un patrón relativamente análogo, con la existencia de una cabeza que interaccionan con el centro activo de la enzima, y una cola hidrofóbica, que puede establecer interacciones de van der Waals favorables. Como fragmento heterocíclico mimético de la NAM se ha empleado un residuo de piridina, sustituido bien en la posición C-3 ó C-4, con conectores de tipo cianoguanidina, tiourea o amida. El espaciador fue, en todos los casos, un fragmento de tipo hexametileno; por otro lado, en la cumarina se incorporaron distintos sustituyentes en las posiciones C-3 y C-4.

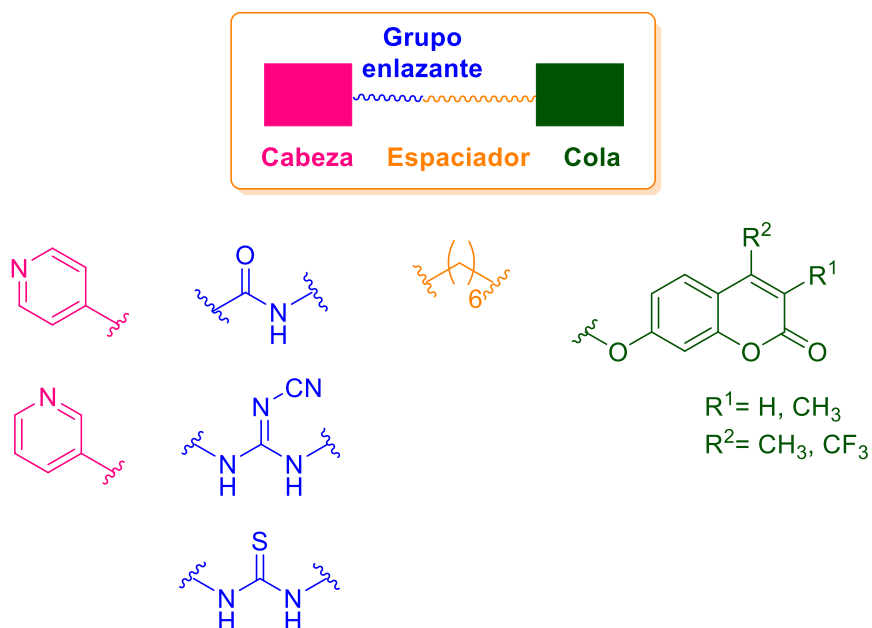


Figura 1.4. Diseño estructural para la preparación de inhibidores duales de anhidrasas carbónicas-NAMPT.

Todos los derivados resultaron ser inhibidores potentes y selectivos de las dos isoformas de anhidrasas carbónicas humanas involucradas en procesos tumorales (CA IX y XII), con un rango de actividad nanomolar-submicromolar e índice de selectividad superior a 8700 con respecto a isoformas citosólicas. El orden de actividad observado fue: amida > cianoguanidina C-4 > tiourea C-3 > cianoguanidina C-3. Estos compuestos se evaluarán también próximamente como inhibidores del NAMPT.

Por otro lado, con respecto a las actividades antiproliferativas, si bien no se observa un patrón claro, el empleo de cianoguanidinas en C-4 y tioureas en C-3 del fragmento de piridina, así como cumarinas dimetiladas proporcionó las mejores actividades en la mayoría de las líneas celulares evaluadas. De esta forma, la tiourea **41** podría considerarse como el derivado cabeza de serie, con valores de GI_{50} en el rango micromolar bajo para 5 de las 6 líneas, incluyendo las dos líneas de tumores resistentes a multifármaco.

1. Abstract

This Doctoral Thesis has been developed within the research groups *Síntesis y Modificación de Productos Naturales* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México) and *Química Fina de Carbohidratos* (Universidad de Sevilla), whose research is focused on the preparation of bioactive compounds targeting degenerative diseases like cancer, diabetes, or Alzheimer's disease.

Research presented in this document was funded by projects of Basic Science (CB-2015/257464, CONACyT, México), Paradigms and Controversies 2022 (320334, CONACyT, México), Synthesis and *in silico studies* of antiproliferative agents from natural products (VIEP, 2023-2024, BUAP, México), and by projects from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIN), Molecules and Macromolecules with Multitarget Activity towards Degenerative Diseases (CTQ2016-78703-P) and Chemical Systems for the Vectorization and Selective Release of New Cytotoxic Enzyme Inhibitors (PID2020-116460RB-I00), from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIN, Spain).

The Thesis is structured into three different sections, each of them addressing innovative approaches for the development of new products with potential antitumor activity.

Chapter 4 describes the preparation of derivatives of the pentacyclic triterpenoid oleanolic acid, isolated from more than 1600 plant species, particularly abundant in the *Oleaceae* family, mainly in the olive tree. Oleanolic acid exhibits interesting biological activities, especially antitumoral, suggesting that it can serve as an excellent building block for obtaining new derivatives with enhanced activities. In this Chapter, the derivatization of oleanolic acid at the C-3 (hydroxyl group) and C-28 (carboxylic acid) positions has been accomplished, using two different approaches.

Thus, oleanolic acid-coumarin hybrids have been prepared to analyse the possible synergy in the activities of both fragments; coumarins, whose structure

comes from the fusion of benzene and α -pyrone, are phenolic systems widely distributed in nature and considered as *privileged structures* in biomedical research.

These hybrids were prepared by inserting a hydrocarbon spacer at the C-28 position of the oleanolic acid and C-7 of the coumarin. Both, the distance between these pharmacophores, and the substituents on the C-3 and C-4 positions of the coumarin were modified, aiming to obtain structure-activity relationships in their antiproliferative properties; this allowed to obtain 9 hybrids, whose general structure is shown in Figure 1.1.

The connection between the coumarin residue, obtained in an efficient fashion through the Pechmann condensation of resorcinol and different β -ketoesters, and the oleanolic acid took place with good yields. The *in vitro* evaluation of antiproliferative activity, performed on 6 human solid tumour cell lines, revealed that only compound **4** ($R^1=CH_3$, $R^2=H$, $n=3$) showed appreciable activity; this compound demonstrated good activity against the HeLa tumor line (cervical cancer, $GI_{50}= 7.0 \mu M$), with potency significantly superior to that shown by the reference drug abiraterone.

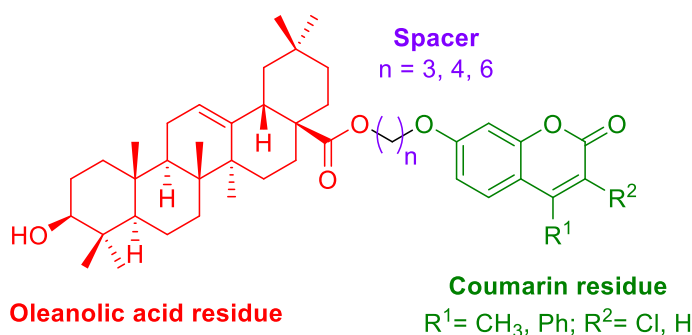


Figure 1.1. General structure of the oleanolic acid-coumarin hybrids prepared herein.

The second approach for the derivatization of oleanolic acid involved its combination with a second pharmacophore of organoselenium nature, specifically selenocyanate. This strategy comes from the vast experience of the research groups

involved in this Doctoral Thesis in the preparation of organoselenium compounds with biological activity.

The incorporation of the organoselenium residue was carried out at both the C-3 and C-28 positions of oleanolic acid, using a spacer as shown in the previous section. The influence of the conformational flexibility of the spacer (hydrocarbon vs. *p*-phenylene), its length, the derivatization position on oleanolic acid (C-3 vs. C-28), and the nature of C-3 (OH vs. OAc) were analyzed; this allowed the synthesis, with good overall yields, of 14 hybrids whose general structure is shown in Figure 1.2.

The study of the *in vitro* antiproliferative properties revealed promising results. On the one hand, derivatives substituted at C-28, with spacer lengths of up to six carbons, acted as potent antiproliferative agents, with GI₅₀ values in the low micromolar range (1.3–2.4 μM), representing an up to 19-fold increased activity compared to natural oleanolic acid, and higher than 77-fold compared to abiraterone, a synthetic steroidal drug used in chemotherapy. The use of longer chains (n=9) led to a significant decrease in activity; no difference in activity was observed when modifying the conformational flexibility of the spacer. Derivatives substituted at C-28 with the free hydroxyl group at C-3 proved to be more potent than their O-acetylated counterparts; furthermore, substitution at C-28 proved to be more beneficial than that at C-3, especially for multidrug resistant cell lines.

To further investigate into the mode of action of these compounds, selenocyanate **11** (substitution at C-28, n=3, R=H) was subjected to a study using 3D holotomographic imaging techniques on living cells (SW1573, non-small cell lung); this study revealed the induction of necrosis in tumor cells. This type of cell death could be carried out by replication impairments over the S phase provoked by selenocyanate **13**, specifically in malignant HeLa cells, which as a consequence, led to a reduction in mitotic cells, indicating damage to replication also during the M phase of the cell cycle.

Additionally, selenocyanates **11** and **14** (substitution at C-28, $n=6$, $R=H$) were evaluated *in vivo* using *Caenorhabditis elegans*, a nematode with a sequenced genome, considered as a validated model in oncological research. The results indicated that these compounds showed excellent selectivity, causing no morphological or physiological alterations in the organism, but a notable reduction in the size of the tumor germline, presumably through a cytostatic action.

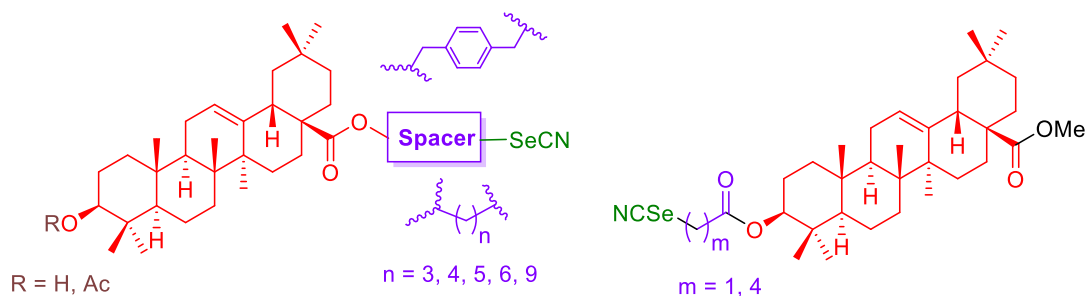


Figure 1.2. General structure of oleanolic acid-derived selenocyanates prepared herein.

In Chapter 5, a novel approach has been addressed for obtaining antiproliferative agents with selective activity against tumor cells (Figure 1.3). This approach involved the combination of two key fragments using a core of *p*-aminophenol for their incorporation. On the one hand, a selenocyanate residue that would act as a pharmacophore providing antiproliferative activity, and on the other hand, a lipophilic cation designed to serve as a selective vehicle targeting the mitochondria of tumor cells. Compounds with this structure are called mitochondriotropic agents, and when they exhibit antitumor activity, they are known as mitocans (*mitochondria* + *cancer*).

A wide structural diversity has been achieved by modifying the nature, type, and length of the linker (hydrocarbon fragment, thiourea, amide), as well as the nature of the lipophilic cation (triphenylphosphonium (TPP), pyridinium, quinolinium, *N*-methylimidazolium, rhodamine B), leading to 8 derivatives. The antiproliferative activity data of these derivatives showed that they induce the inhibition of cell growth on the 6 solid tumor cell lines in the low micromolar range. The best results were obtained when triphenylphosphonium bromide and rhodamine were used as

lipophilic cations, compound **25** being the lead derivative, roughly 9-fold stronger than the reference drug against WiDr cell line. Interestingly, the addition of the selenium fragment to rhodamine B allowed to increase its cellular inhibition effect up to 11 times in the multidrug-resistant cell line.

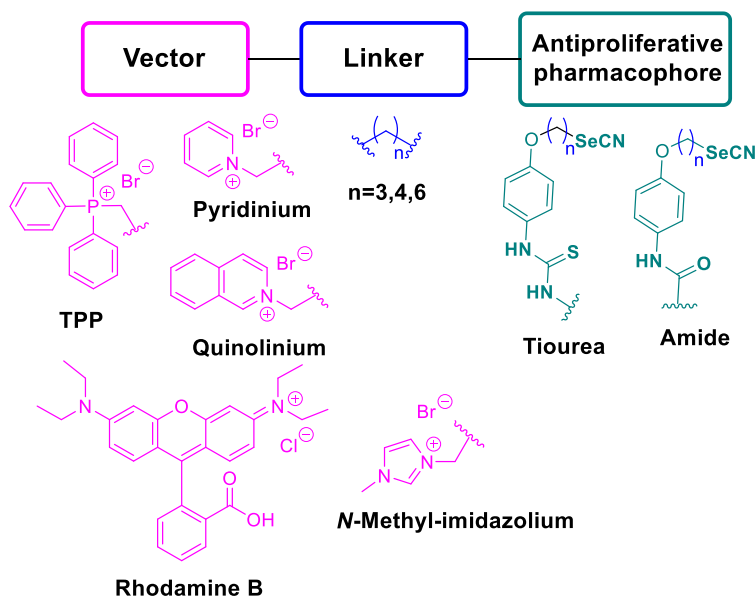


Figure 1.3. General structure of the mitochondriotropic agents prepared herein.

Finally, in Chapter 6, the preparation of dual inhibitors of carbonic anhydrases and NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) enzymes has been accomplished as examples of multitarget drugs with antitumor activity; Figure 1.4 shows the general structure of the 10 hybrids obtained.

Both enzymes are currently considered as therapeutic targets of interest against cancer. Carbonic anhydrases, overexpressed in hypoxic tumors, are responsible for the acidic microenvironment of the tumor, which allows its survival and expansion; a coumarin residue, acting as a *suicide inhibitor*, has been selected as the pharmacophore for their inhibition. On the other hand, NAMPT is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide), highly demanded by tumor cells; a pyridine residue substituted at C-3 or C-4, acting as a nicotinamide (NAM) mimic, has been selected for its inhibition.

The design of inhibitors for both enzymes follows a relatively similar pattern, featuring a head that interacts with the enzyme active center, and a hydrophobic tail, which can establish favorable van der Waals interactions. A pyridine residue substituted either at the C-3 or C-4 position was used for mimicking the heterocyclic moiety of NAM, with linkers such as cyanoguanidine, thiourea, or amide. The spacer was, in all cases, a hexamethylene fragment, and the coumarin incorporates different substituents at the C-3 and C-4 positions.

All derivatives proved to be potent and selective inhibitors of the two human carbonic anhydrase isoforms involved in tumor processes (CA IX and XII), with activities in the nanomolar-submicromolar range and a selectivity index relative to cytosolic isoforms greater than 8700. The observed activity order was: amide > C-4 cyanoguanidine > C-3 thiourea > C-3 cyanoguanidine. These compounds will also be evaluated as potential NAMPT inhibitors.

Regarding antiproliferative activities, although a no clear pattern was observed, the use of C-4 cyanoguanidines and C-3 thioureas, as well as dimethylated coumarins, provided the best activities in most of the evaluated cell lines. Thus, thiourea **41** could be considered the leading derivative, with GI₅₀ values in the low micromolar range for 5 out of the 6 lines, including the two multi-drug resistant tumor lines.

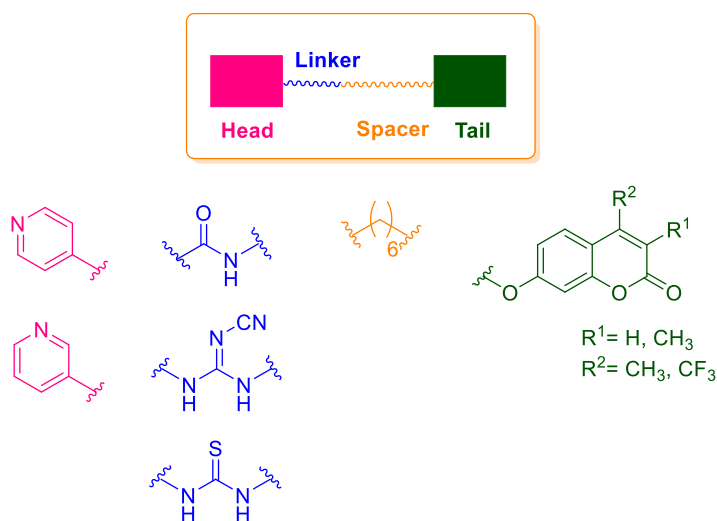
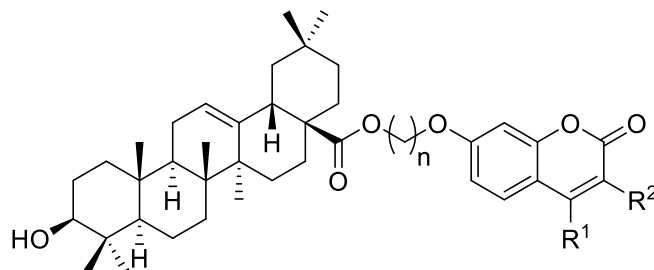


Figure 1.4. Structural design for the dual carbonic anhydrases-NAMPT inhibitors.

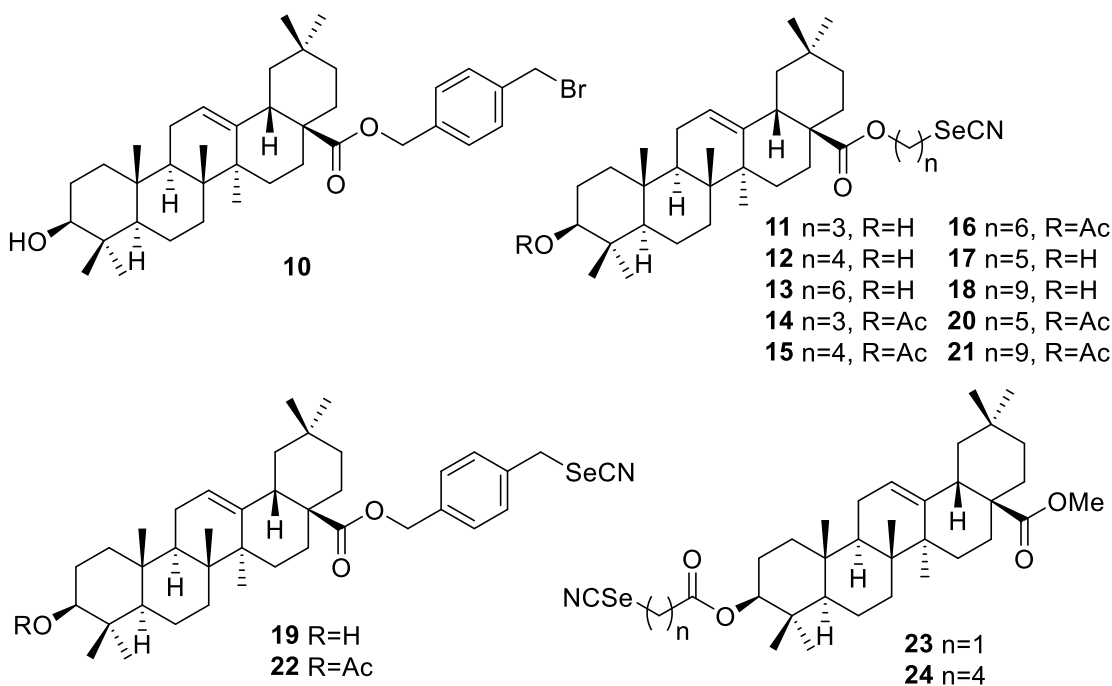
2. Relación de nuevos compuestos

Híbridos ácido oleanólico-cumarinas

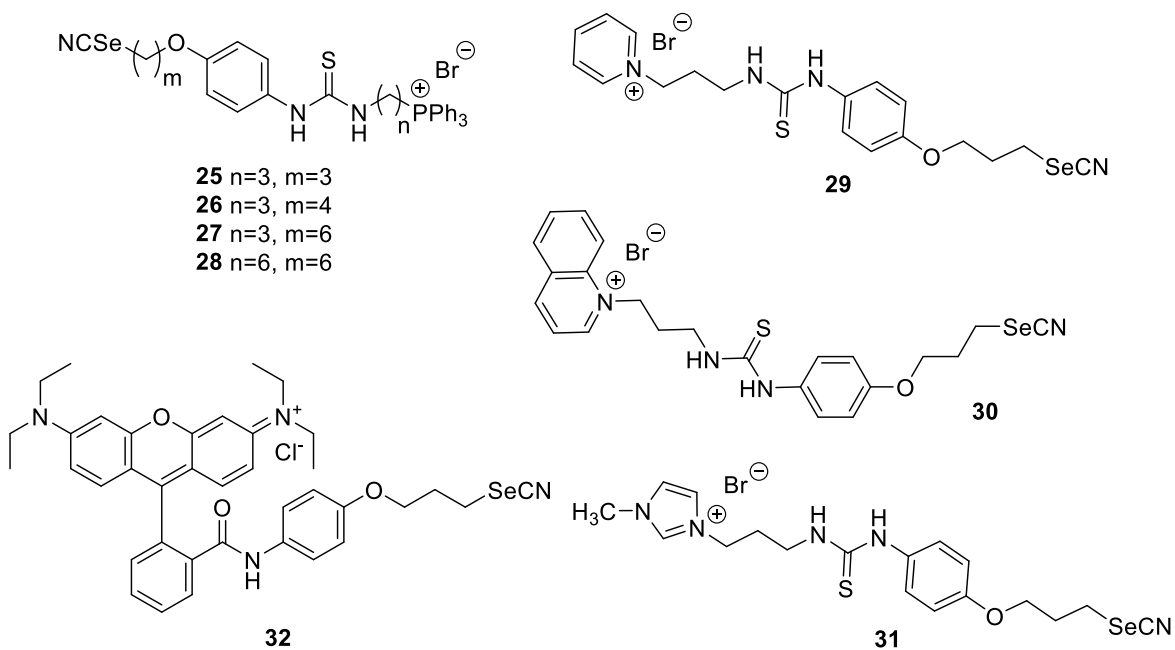


- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1 $R^1=CH_3, R^2=Cl, n=3$ | 6 $R^1=CH_3, R^2=H, n=6$ |
| 2 $R^1=CH_3, R^2=Cl, n=4$ | 7 $R^1=Ph, R^2=H, n=3$ |
| 3 $R^1=CH_3, R^2=Cl, n=6$ | 8 $R^1=Ph, R^2=H, n=4$ |
| 4 $R^1=CH_3, R^2=H, n=3$ | 9 $R^1=Ph, R^2=H, n=6$ |
| 5 $R^1=CH_3, R^2=H, n=4$ | |

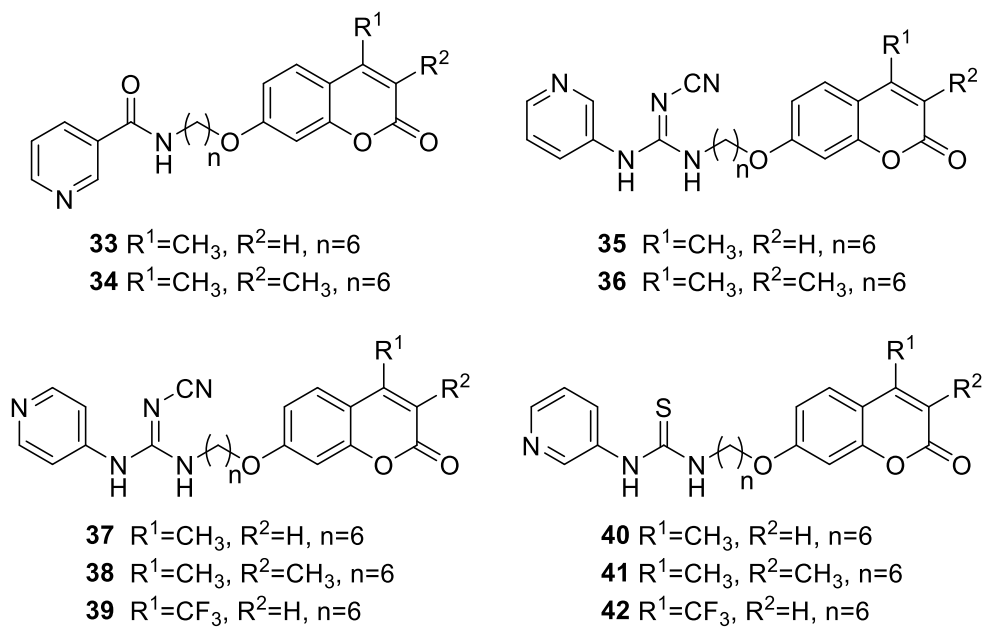
Híbridos ácido oleanólico-selenocianato



Derivados mitocondriotrópicos



Derivados de cumarina como potenciales inhibidores duales de NAMPT y anhidrasas carbónicas



Abreviaturas

5-FU	5-Fluorouracilo
A2780	Línea celular de cáncer de ovario
A549	Línea celular de adenocarcinoma alveolar
AAA	ATPasas Asociadas con diversas Actividades celulares
ADNmt	ADN mitocondrial
ARNmt	ARN mitocondrial
ATC	Ciclo del ácido tricarbónico
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Serina/Treonina quinasa
B16-F10	Línea celular de melanoma de ratón
BAS	β -Amirina
Boc₂O	Dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
BzPR	Receptor de benzodiazepina periférico
CA I	Anhidrasa carbónica I
CA II	Anhidrasa carbónica II
CA IX	Anhidrasa carbónica IX
CA XII	Anhidrasa carbónica XII
CAs	Anhidrasas carbónicas
CDDP	Cisplatino (<i>cis</i> -diaminodicloroplatino)
Chk1	Serina/Treonina quinasa de control 1
Chk2	Serina/Treonina quinasa de control 2
Cyp	Ciclofilina
CYP2A6	Citocromo P-450 2A6
DDR	Respuesta al Daño del ADN
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DLCs	Cationes lipofílicos deslocalizados
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DMAPP	Dimetilalilo pirofosfato
DMBA	7,12-Dimetilbenz[a]antraceno
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DSBs	Roturas de doble cadena del ADN

DQA	Decualinio
E3	Ubiquitina ligasa
EC₅₀	Concentración media efectiva
EdU	5-Etil-2'-desoxiuridina
eNAMPT	Nicotinamida fosforribosiltransferasa extracelular
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FPP	Pirofosfato de farnesilo
FPS	Pirofosfato de farnesilo sintasa
GPXs	Glutación peroxidasas
HCT116	Línea de celular de cáncer de colon
HDAC	Histona desacetilasa
HEK-293	Células embrionarias de riñón humano
HeLa	Línea celular de cáncer de cérvix
HepG2	Células de cáncer hepático
HR	Recombinación homóloga
HT29	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal
HuH7	Línea celular de cáncer de colon
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IMM	Membrana mitocondrial interna
IMS	Espacio intermembrana
iNAMPT	Nicotinamida fosforribosiltransferasa intracelular
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
J	Constante de acoplamiento
K_i	Constante de inhibición
LPO	Lipoperoxidasa
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama
MHz	Megahercios
MiaPaCa-2	Línea celular de cáncer de páncreas
MitoK_{ATP}	Canal de potasio regulador de ATP mitocondrial
MPP	Potencial de membrana
MPPs	Péptidos de penetración mitocondrial
MPT	Transición de permeabilidad mitocondrial
NA	Ácido nicotínico

NAAD	Ácido nicotínico adenina dinucleótido
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAM	Nicotinamida
NAMPT	Nicotinamida fosforribosiltransferasa
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
NMDA	<i>N</i> -metil-D-Asparatato
NMN	Mononucleótido de nicotinamida
NMNAT	Mononucleótido de nicotinamida adenilil transferasa
OA	Ácido oleanólico
OCA	Ácido <i>O</i> -cumárico
OCS	Oxidoescualeno ciclasa
OMM	Membrana mitocondrial externa
OxPHOS	Fosforilación oxidativa
PARP	Poli-ADP-ribosa polimerasa
P-gp	Glicoproteína P
PHA	Fitohemaglutinina
pH_e	pH extracelular
pH_i	pH intracelular
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE1	Células epiteliales pigmentarias de la retina
SAR	Estudio de relación estructura-actividad
SELENOK	Selenoproteína K
SGC-7901	Línea celular de cáncer gástrico
SH-SY5Y	Línea celular de neuroblastoma
SIRT	Sirtuinas
Sk-Ov-3	Línea celular de cáncer de ovario
SOD	Superóxido dismutasa
SPS2	Selenofosfato sintetasa 2
SQE	Escualeno epoxidasa
SQS	Escualeno sintasa
SS	Péptidos <i>Szeto-Schiller</i>
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético

THF	Tetrahidrofurano
TPP	Trifenilfosfonio
TXNRDs	Tioreduxina reductasas
Ub	Ubiquitina
VDAC	Canales aniónicos dependientes de voltaje
WiDr	Línea celular de cáncer de colon
ZBG	Grupo de unión al Zinc
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

3. Introducción general

El cáncer es un conglomerado de cientos de enfermedades donde las células presentan un desarrollo descontrolado y tiene el potencial de extenderse a diferentes partes del cuerpo,¹ siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en el año 2022 hubo cerca de 20 millones de nuevos casos de cáncer y alrededor de 9.7 millones de defunciones a nivel global, estimándose más de 35 millones de nuevos casos para el año 2050.²

En México se registraron cerca de 848 mil muertes en el año 2022, de las cuales un 10.6% fue causado por tumores malignos, principalmente a partir de los 50 años en ambos sexos. Por otro lado, entre los diferentes rangos de edad de la población, los principales causantes de defunciones relacionadas con el cáncer fueron leucemia, linfoma no Hodgking y tumores de mama, colon, estómago, ovario y pulmón.³

Los principales tratamientos existentes contra el cáncer son la cirugía, radioterapia y quimioterapia, incluyendo la inmunoterapia.⁴ Sin embargo, en algunos casos estos tratamientos resultan poco efectivos, debido en parte a la quimiorresistencia adquirida por las células tumorales a los diferentes agentes quimioterapéuticos, o son causantes de efectos secundarios severos, a consecuencia de su falta de selectividad. Todo esto hace que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos sea un área prioritaria en la investigación biomédica.⁵

-
1. Dutta S., Mahalanobish S., Saha S., Ghosh S., Sil P.C. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *128*, 240–255.
 2. OMS. <https://www.who.int/es/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>. [Último acceso: 20/10/2024].
 3. INEGI. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_CANCER24.pdf. [Último acceso: 20/10/2024].
 4. Tian W., Huang J., Zhang W., Wang Y., Jin R., Guo H., Tang Y., Wang Y., Lai H., Leung E.L. Harnessing natural product polysaccharides against lung cancer and revisit its novel mechanism. *Pharmacol. Res.* **2024**, *199*, 107034.
 5. Chen T., Xiao Z., Liu X., Wang T., Wang Y., Ye F., Su J., Yang X., Xiong L., Yang D. Natural products for combating multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Res.* **2024**, *202*, 107099.

Los productos naturales en el tratamiento del cáncer han cobrado gran relevancia en la industria farmacéutica, gracias a su buena selectividad contra las células “anormales” y a su amplia variedad estructural, lo cual los convierte en interesantes farmacóforos.⁶ Muchos de ellos interfieren en algunas fases del ciclo celular, ya que durante el desarrollo de la enfermedad se observan mutaciones en el desarrollo de algunos genes que regulan la producción de proteínas de señalización celular, factores de crecimiento y sus receptores, así como proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas o a factores de transcripción; estos últimos se siguen utilizando como algunas de las dianas terapéuticas para el descubrimiento de fármacos anticancerígenos.⁷ Aproximadamente un 80% de los medicamentos aprobados para el tratamiento del cáncer deriva de los productos naturales, siendo un 75% de estos provenientes de plantas.^{8,9}

Los principales productos naturales derivados de plantas como agentes anticancerígenos, ya aprobados clínicamente, se han clasificado en cuatro grandes grupos: alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos y camptotecinas (figura 3.1). Entre los alcaloides procedentes de la vinca, la vinblastina y la vincristina se han utilizado en quimioterapia durante 40 años, donde su mecanismo de acción es la interrupción de la formación del huso mitótico por el ensamblaje con la β -tubulina, lo que detiene el ciclo celular en la metafase lo que a su vez lleva a la muerte celular, y se emplean principalmente contra el linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón y de mama.¹⁰

6. Harvey A.L., Edrada-Ebel R., Quinn R.J. 1 The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 111–129.

7. Liao Y., Y, G., Li Q., An, J., Wang, D. The signaling pathways and targets of natural products from traditional Chinese medicine treating gastric cancer provide new candidate therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* **2023**, *1878*, 188998.

8. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803.

9. Taïbi K., Abderrahim L.A., Ferhat K., Betta S., Taïbi F., Bouraada F., Boussaid M. Ethnopharmacological study of natural products used for traditional cancer therapy in Algeria. *Saudi Pharm. J.* **2020**, *28*, 1451–1465.

10. van der Heijden L.T., Gebretensae A., Thijssen B., van Andel L., Nijstad A.L., Wang Y., Rosing H., Huitema A.D.R., Beijnen J.H. A highly sensitive bioanalytical method for the quantification of

La podofilotoxina se aisló de la resina de *Podophyllum peltatum* L., pero se descubrió que era demasiado tóxica en ratones; su derivatización y estudio posterior condujo al etopósido como el primer fármaco clínicamente aprobado derivado de este fitoquímico. El etopósido detiene la etapa premitótica de la división celular mediante la inhibición de la topoisomerasa II. Por otro lado, la camptotecina, aislada de la corteza y hojas del árbol de origen chino *Camptotheca acuminata*, actúa sobre la topoisomerasa I, inhibiendo la replicación del ADN y la transcripción del ARN; tanto el etopósido como la camptotecina son utilizados en varios tipos de cáncer.¹¹

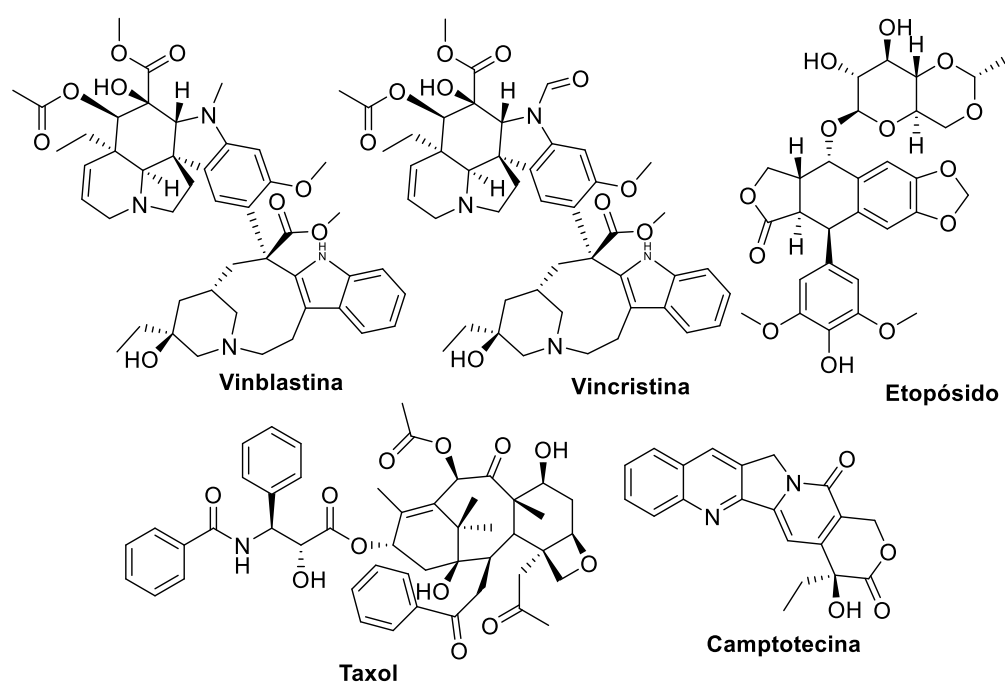


Figura 3.1. Principales productos naturales derivados de plantas.

Del grupo de los taxanos, el paclitaxel o Taxol® es de los fármacos anticancerígenos más utilizados, y se ha aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* Nutt. (tejo del Pacífico; Nutt. abreviatura del autor taxonómico para *Thomas Nuttall*) y se siguen proponiendo rutas sintéticas debido a la pequeña

vinblastine, vincristine, vinorelbine and 4-O-deacetylvinorelbine in human plasma using LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2022**, 215, 114772.

11. Topkaya C., Aslan S., Hökelek T., Göktürk T., Kincal S., Altuntas D.B., Güp R. Syntheses, crystal structures, hirshfeld surface analyses and electrochemical etoposide/camptotechin sensor applications of acetaldehyde oxime derivatives. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1265, 133339.

cantidad aislada de su fuente natural. La corteza de un solo árbol proporciona del orden de 0.5 g de taxol, y para el tratamiento efectivo de un paciente se requerirían de 1 a 3 árboles.¹² Como alternativa, de las agujas del tejo se aisló un compuesto denominado bacatina III, sin comprometer la integridad del árbol, y que puede ser transformado en taxol mediante un proceso de semisíntesis. Su principal mecanismo de acción es sobre la tubulina, lo que causa problemas en el ensamblaje del huso mitótico y segregación cromosómica, bloqueando la mitosis, lo cual conduce a su vez a la apoptosis celular de las células tumorales.¹³

Además de los compuestos mencionados anteriormente, los triterpenos pentacíclicos son un grupo de metabolitos secundarios prometedores para el tratamiento del cáncer. Los triterpenos que pertenecen a los grupos lupano, oleano o ursano tienen potencial para tratar el cáncer mediante diferentes modos de acción, principalmente por su efecto inductor de apoptosis,¹⁴ lo cual se abordará con mayor detalle en el Capítulo 4 en la preparación de los derivados del ácido oleanólico.

Una de las dianas utilizadas en la actualidad en la terapia contra el cáncer es la mitocondria, orgánulo responsable de la producción de la energía celular. En este contexto, se diseñan moléculas de bajo peso molecular que actúan como ‘vectores’ para la administración selectiva de fármacos hacia el interior de la mitocondria, a lo que se denomina agentes mitocondriotrópicos.¹⁵ Un mecanismo para la obtención de este tipo de moléculas es mediante la adición a los farmacóforos de algunos cationes lipofílicos, esto debido a que la membrana mitocondrial presenta un potencial negativo, más acusado en las células tumorales, permitiendo de esta

12. Li Y., Zhang G., Pfeifer B.A. Current and Emerging Options for Taxol Production. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **2015**, *148*, 405–425.

13. Lv L., Wang S.C., Mo J.Y., Huang K.L., Xu M.L., Liu J. Effects and mechanism of FBXO31 on Taxol chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *586*, 129–136.

14. Chan E.W.C., Soon C.Y., Tan J.B.L., Wong S.K., Hui Y.W. Ursolic acid: An overview on its cytotoxic activities against breast and colorectal cancer cells. *J. Integr. Med.* **2019**, *17*, 155–160.

15. Horobin R.W., Trapp S., Weissig V. Mitochondriotropics: a review of their mode of action, and their applications for drug and DNA delivery to mammalian mitochondria. *J. Control. Release.* **2007**, *121*, 125–136.

manera la acumulación de derivados de carga positiva en su interior.¹⁶ Un ejemplo, es la incorporación del grupo trifenilfosfonio ($+PPh_3$, TPP^+), lo que aumenta la eficacia de compuestos antiproliferativos sin alterar su mecanismo de acción;¹⁷ esta temática se desarrollará en el Capítulo 5.

Otra de las estrategias para la búsqueda de moléculas anticancerígenas es la inhibición de enzimas clave en el desarrollo y/o funcionamiento celular.

En este contexto, existe interés en el desarrollo de compuestos que, mediante la inhibición de alguna enzima, afecte alguna de las fases del metabolismo celular; ejemplo de esto es el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD), el cual funciona como cofactor en procesos como la glucólisis y en la síntesis y oxidación de lípidos, donde la NAMPT (nicotinamida fosforribosiltransferasa) actúa como enzima reguladora de su biosíntesis.¹⁸ Se ha observado que en células cancerígenas hay un aumento en el consumo de NAD, por lo que la inhibición de NAMPT resulta una diana atractiva para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos.¹⁹ Entre los derivados sintéticos reportados con actividad sobre NAMPT, considerados de primera generación, destacan derivados de piridina de tipo amida como el compuesto FK866 y cianoguanidinas como el compuesto CHS-828 (figura 3.2).²⁰

-
16. Hicke F.J., Puerta A., Dinić, J., Pešić M., Padrón J.M., López Ó., Fernandez-Bolanos J.G. Straightforward access to novel mitochondriotropics derived from 2-arylethanol as potent and selective antiproliferative agent. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *228*, 113980.
 17. Dong L., Jameson V.J., Tilly D., Černý J., Mahdavian E., Marín-Hernández Á., Hernández-Esquivel, L., Ledvina M., Salvatore B.A., Moreno-Sánchez R., Coster M.J., Neužil J. Mitochondrial targeting of Vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3717–3728.
 18. He T., Wang L., Wang T., Yang J., Zheng S., Tong J., Jiang S., Zhang X., Zhang K. Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *258*, 115607.
 19. Dong G., Chen W., Wang X., Yang X., Xu T., Wang P., Zhang W., Rao Y., Miao C., Sheng C. Small molecule inhibitors simultaneously targeting cancer metabolism and epigenetics: Discovery of novel nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7965–7983.
 20. Ozgencil F., Eren G. Field-based 3D-QSAR studies on amide- and urea-containing NAMPT inhibitors. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2023**, *242*, 104984.

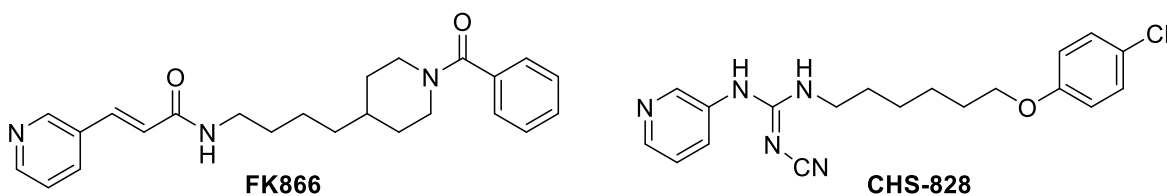


Figura 3.2. Inhibidores de NAMPT de primera generación.

Otro ejemplo son las anhidrasas carbónicas, este es un grupo de metaloenzimas cuya función es catalizar la hidrólisis reversible de CO_2 a bicarbonato y protón.²¹ Estas enzimas se han categorizado en 8 familias, donde la familia α corresponde a las anhidrasas carbónicas humanas. De entre las 15 isoformas de estas últimas, las anhidrasas carbónicas IX y XII son de interés por su sobreexpresión en células tumorales, lo que las convierte en una diana terapéutica interesante para el descubrimiento de moléculas bioactivas contra el cáncer.²² Entre los principales inhibidores de anhidrasas carbónicas humanas destacan las cumarinas, las cuales se encuentran categorizadas como inhibidores no clásicos, y varios grupos de investigación han demostrado su efectividad.²³ Lo anterior se abordará más detalladamente en el Capítulo 6.

-
21. Takla F.N., Zaib S., Bayoumi W.A., Shehzadi K., El-Messery S.M., Anjum S., Faisal A., Nasr M.N. Targeting carbonic anhydrases II/IX/XII with novel series of coumarin-based compounds: Synthesis, biological activity and molecular dynamics analysis. *J. Mol. Struct.* **2024**, 1300, 137277.
22. Singh P., Goud N.S., Swain B., Supuran C.T., Ullah Q., Supuran C.T., Arifuddin M. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel thiazole-coumarin hybrids as selective and potent human carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 268, 131548.
23. Buran K., Bua S., Poli G., Bayram F.E.Ö., Tuccinardi T., Supuran C.T. Novel 8-substituted coumarins that selectively inhibit human carbonic anhydrase IX and XII. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 1208.

4. Síntesis de derivados del ácido oleanólico con potencial actividad antiproliferativa

4.1. Introducción

4.1.1. Aspectos generales del ácido oleanólico

El ácido oleanólico (*ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico*, (OA, figura 4.1) es un triterpenoide pentacíclico, aislado de aproximadamente 1620 especies de plantas tanto medicinales, como de uso alimentario. Este compuesto es abundante en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, principalmente el olivo (*Olea europea*), del cual adquirió su nombre.^{24,25} Se encuentra también en plantas como la *Lantana camara* y *Lisgustrum lucidum*, usadas en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos.²⁶

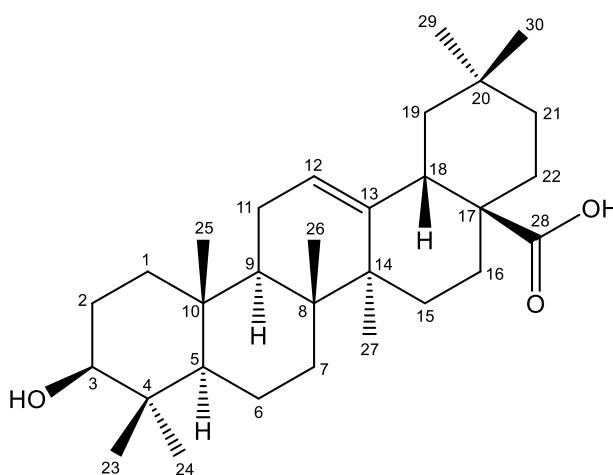


Figura 4.1. Estructura del ácido oleanólico con la numeración de su esqueleto carbonado.

En la naturaleza, el OA se encuentra en forma de ácido libre o como glicósidos de saponinas triterpenoides, y comúnmente viene acompañado de su isómero, el ácido ursólico.²⁵ Es un compuesto de color amarillo claro, no volátil,

24. Pollier J., Goossens A. Oleanolic acid. *Phytochemistry*, **2012**, 77, 10–15.

25. Lee J.H., Yoo E.S., Han S.H., Jung G.H., Han E.J., Jung S.H., Kim B.S., Cho S.D., Nam J.S., Choi C., Che J.H., Jun J.Y. Oleanolic acid induces apoptosis and autophagy via the PI3K/AKT/mTOR pathway in AGS human gastric cancer cells. *J. Funct. Foods*, **2021**, 87, 104854.

26. Ayeleso T.B., Matumba M.G., Mukwevho E. Oleanolic acid and its derivatives: Biological activities and therapeutic potential in chronic diseases. *Molecules*, **2017**, 22, 1915–1930.

soluble en butanol y acetato de etilo, y menos soluble en etanol, propan-2-ol, metanol, acetona y agua.²⁷

La biosíntesis de OA en plantas tiene como precursor primario al 2,3-oxidoescualeno (sintetizado por la vía del mevalonato), que se cicla a β -amirina, por mediación de la enzima β -amirina sintasa. Posteriormente, la enzima citocromo P450 oxida en tres pasos a la β -amirina en la posición C-28 para producir el OA (figura 4.2).^{26,28} Gracias a su actividad biológica, disponibilidad y bajo costo de producción, el OA se considera como una plataforma interesante para la obtención de derivados mediante semisíntesis. Las tres posiciones reactivas del OA, C-3 (grupo hidroxilo), C-12 y C-13 (doble enlace) y C-28 (ácido carboxílico), han dado lugar, mediante transformaciones químicas, a nuevas series de triterpenoides con distintos efectos biológicos.²⁹

27. Castellano J.M., Ramos-Romero S., Perona J.S. Oleanolic acid: Extraction, characterization and biological activity. *Nutrient*, **2022**, 31, 623–651.

28. Gill B.S., Kumar S., Navgeet. Triterpenes in cancer: significance and their influence. *Mol. Biol. Rep.* **2016**, 43, 881–896.

29. Rali S., Oyedeji O.O., Aremu O.O., Oyedeji A.O., Nkeh-Chungag B.N. Semisynthesis of derivatives of oleanolic acid from *Syzygium aromaticum* and their antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Mediat. Inflamm.* **2016**, 8401843.

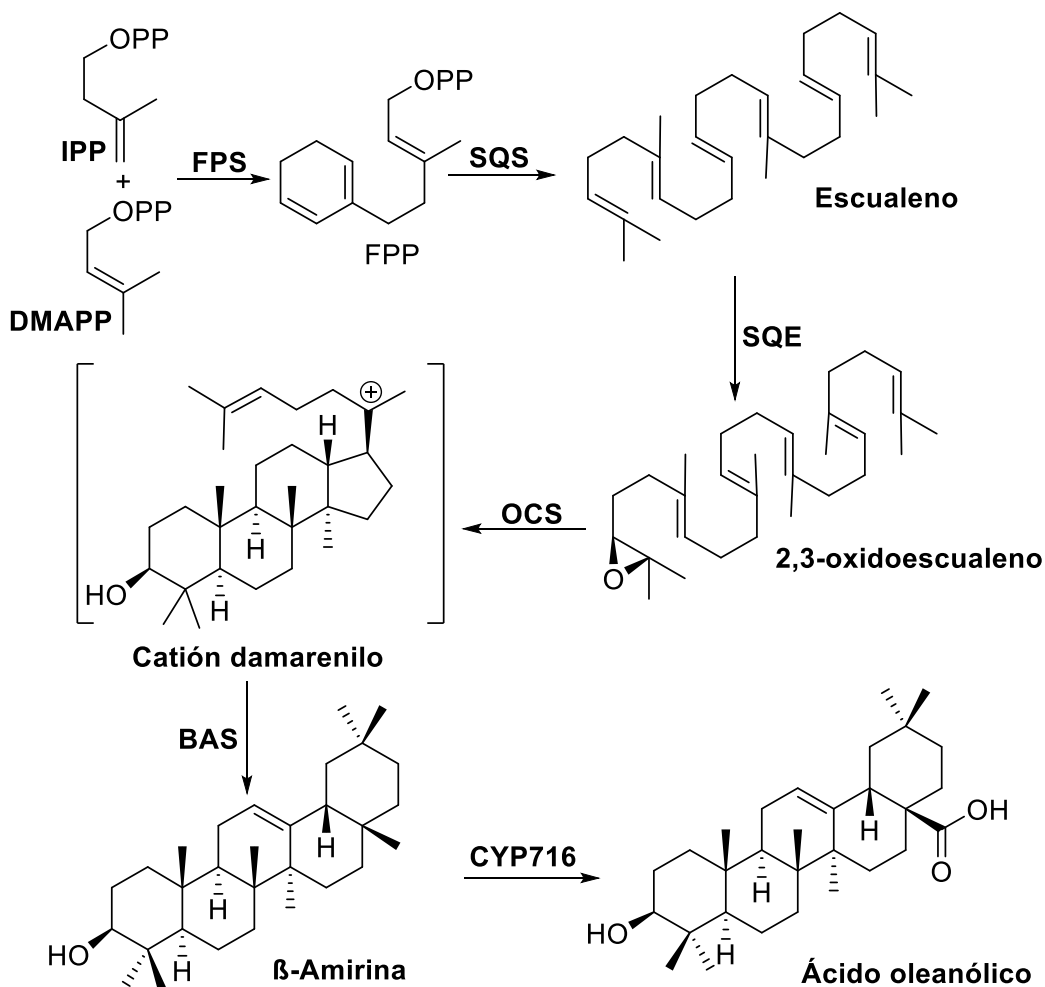


Figura 4.2. Ruta biosintética del ácido oleanólico. Abreviaturas: IPP, pirofosfato de isopentenilo; DMAPP, difosfato de dimetilalilo; FPS, pirofosfato de farnesilo sintasa; FPP, pirofosfato de farnesilo; SQS, escualeno sintasa; SQE, escualeno epoxidasa; OCS, oxidoescualeno ciclasa; BAS, β-amirina sintasa; CYP716, enzima del citocromo P450 que pertenece al grupo CP71.

Adaptado de Borela *et al.*³⁰

La biodisponibilidad es la proporción de un compuesto que ingresa a la circulación sistémica con respecto a la cantidad inicialmente introducida en el organismo;³¹ estudios experimentales y clínicos describieron la presencia de ácido

30. Borella R., Forti L., Gibellini L., de Gaetano A., de Biasi S., Nasi M., Cossarizza A., Pinti M. Synthesis and anticancer activity of CDDO and CDDO-Me, two derivatives of natural triterpenoids. *Molecules*, **2019**, *24*, 4097–4116.

31. Abuhassira-Cohen Y., Livney Y.D. Enhancing the bioavailability of encapsulated hydrophobic nutraceuticals: Insights from in vitro, in vivo, and clinical studies. *Curr. Opin. Food Sci.* **2022**, *45*, 100832.

oleanólico en sangre varias horas después de la ingesta sin ser metabolizado, debido a su biodisponibilidad oral baja por su poca solubilidad en agua (4.61 mg/L a 20°C).³² Debido a su baja biodisponibilidad, la baja solubilidad y poca permeabilidad en membranas biológicas, se ha clasificado al OA dentro de la categoría IV de fármacos, y una de las soluciones a estos problemas es su posible administración en nanoemulsiones, liposomas o nanopartículas, así como la bioconjugación con proteínas, por ejemplo albúmina.³³

Entre las propiedades biológicas más importantes del OA se encuentra su efecto antiinflamatorio, antibacteriano,³⁴ antiviral,³⁵ antidiabético,³⁶ antioxidante³⁷ y anticancerígeno.³⁸ Tal actividad anticancerígena la ejerce mediante la inducción de apoptosis celular y mediante vía mitocondrial por la activación de caspasas, como la caspasa C, disminución de la actividad de Bcl-2 y sobreexpresión del regulador

-
32. Jiang, Q., Yang, X., Du, P., Zhang, H., Zhang, T. Dual strategies to improve oral bioavailability of oleanolic acid: Enhancing water-solubility, permeability, and inhibiting cytochrome P450 isozymes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *99*, 65–72.
 33. Dopierala K., Krajewska M., Weiss M. Physicochemical characterization of oleanolic acid–human serum albumin complexes for pharmaceutical and biosensing applications. *Langmuir*, **2020**, *36*, 3611–3623.
 34. Yan S., Lin H., Huang H., Yang M., Xu B., Chen G. Microbial hydroxylation and glycosidation of oleanolic acid by *Circinella muscae* and their anti-inflammatory activities. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 1849–1855.
 35. Medina-O'Donnell M., Rivas F., Reyes-Zurita F.J., Cano-Muñoz M., Martínez A., Lupiañez J.A., Parra A. Oleanolic acid derivatives as potential inhibitors of HIV-1 protease. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 2886–2896.
 36. Silva F.S., Oliveira P.J., Duarte M.F. Oleanolic, ursolic, and betulinic acids as food supplements or pharmaceutical agents for type 2 diabetes: promise or illusion? *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2991–3008.
 37. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. In vitro antioxidant activities of phenols and oleanolic acid from mango peel and their cytotoxic effect on A549 cell line. *Molecules*, **2018**, *23*, 1395–1402.
 38. Žiberna L., Šamec D., Mocan A., Nabavi S.F., Bishayee A., Farooqi A.A., Sureda A., Nabavi S. M. Oleanolic acid alters multiple cell signaling pathways: Implication in cancer prevention and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 643–658.

de apoptosis Bax.³⁹ El OA es un fármaco autorizado en China para el tratamiento de padecimientos en el hígado desde hace décadas.⁴⁰

El efecto anticancerígeno del OA ya ha sido evaluado en diferentes líneas celulares, incluyendo cáncer de hígado, pulmón, mama, colon, vejiga, próstata, páncreas, gástrico, vesícula biliar, osteosarcoma, neoplasias hematológicas, así como en cánceres del sistema nervioso central, como el glioma maligno.⁴¹

La primera síntesis total enantioselectiva de ácido oleanólico se reportó en 1993.⁴² Pero no fue hasta 1998 que Honda y colaboradores, sintetizaron derivados del OA, en un intento por identificar nuevos inhibidores de la producción de óxido nítrico en los macrófagos, a fin de reducir la actividad inflamatoria.⁴³ Más recientemente, derivados acetilados y fluoroacetilados del OA en las posiciones C-3 y C-28 fueron evaluados como agentes antiinflamatorios y analgésicos. Se observó que los derivados del OA acetilados presentan mejor efecto analgésico, mientras que los fluoroacetilados poseen mejor efecto antiinflamatorio,²⁹ este último involucrado en dolencias como el cáncer.²⁵

Hasta la fecha, los principales derivados sintéticos del OA se han obtenido mediante la acetilación del grupo hidroxilo en C-3, obtención de diferentes enonas en la posición C-2, modificaciones en el doble enlace de C-12 y C-13, así como

-
39. Shyu M.H., Kao T.C., Yen G.C. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 Human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6110–6118.
 40. Lin C., Wen X., Sun H. Oleanolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 643–655.
 41. Wang X., Bai H., Zhang X., Liu J., Cao P., Liao N., Zhang W., Wang Z., Hai, C. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK–p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis. *Carcinogenesis*, **2013**, *34*, 1323–1330.
 42. Corey E.J., Lee J. Enantioselective total synthesis of oleanolic acid, erythrodiol, beta-amyrin, and other pentacyclic triterpenes from a common intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8873–8874.
 43. Honda T., Finlay H.J., Gribble, G.W., Suh N., Sporn M.B. New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1623–1628.

obtención de ésteres y amidas sobre el ácido carboxílico en C-28, los cuales han demostrado una actividad antiproliferativa mayor que la del ácido oleanólico (figura 4.3).⁴⁴

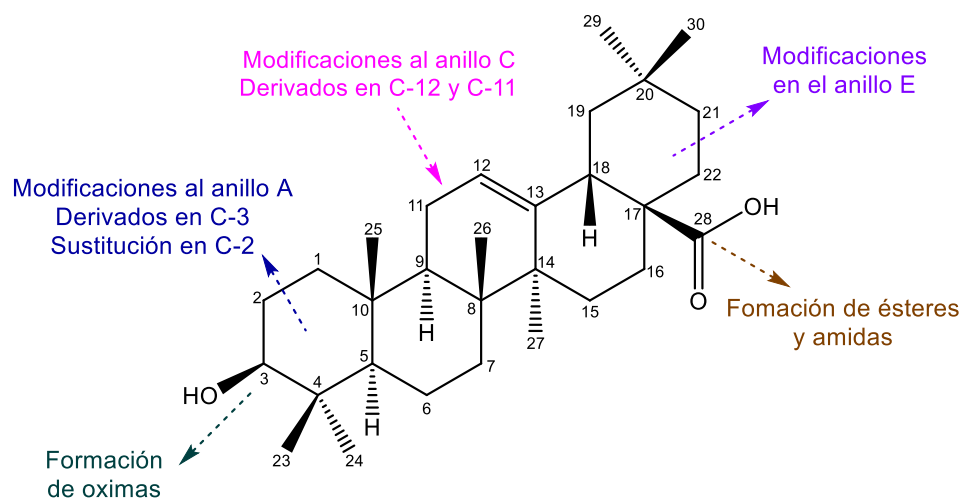


Figura 4.3. Principales modificaciones sintéticas al OA para mejorar su actividad biológica.

Adaptado de Baer-Dubowska *et al.*⁴⁵

Los ésteres de ácido oleanólico han demostrado buena actividad antiproliferativa, como se observa en los derivados descritos por Ali *et al.*⁴⁶ (figura 4.4), evaluados en células T sanas estimuladas con PHA (fitohemaglutinina). Los derivados **44** y **45** mostraron una inhibición en el desarrollo de las células T a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ del 78.9 y 87.1% respectivamente, mientras que el compuesto **43** tuvo una actividad del 6.8%. El compuesto más potente en este estudio fue, por tanto, el **45**, con una $\text{IC}_{50} = 4.249 \mu\text{g/mL}$, lo cual se le atribuyó a la presencia de un átomo de bromo. La actividad inhibitoria de estos derivados sobre la proliferación de células T, fue atribuida al grupo carboxilo, y al ser esterificado mostró una disminución en la actividad inhibitoria. Por otro lado, la introducción de átomos de nitrógeno favoreció la actividad inhibitoria en el compuesto **44**.

44. Masullo M., Pizza C., Piacente S. Oleanane derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, 27, 237–255.

45. Baer-Dubowska W., Narożna M., Krajka-Kuźniak V. Anti-cancer potential of synthetic oleanolic acid derivatives and their conjugates with NSAIDs. *Molecules*, **2021**, 26, 4957.

46. Ali M.S., Ahmed G., Mesaik M.A., Shah M.R., Lateef M., Ali M.I. Facile one-pot syntheses of new C-28 esters of oleanolic acid and studies on their antiproliferative effect on T cells. *Z. Naturforsch C. J. Biosci.* **2018**, 73c, 417–421.

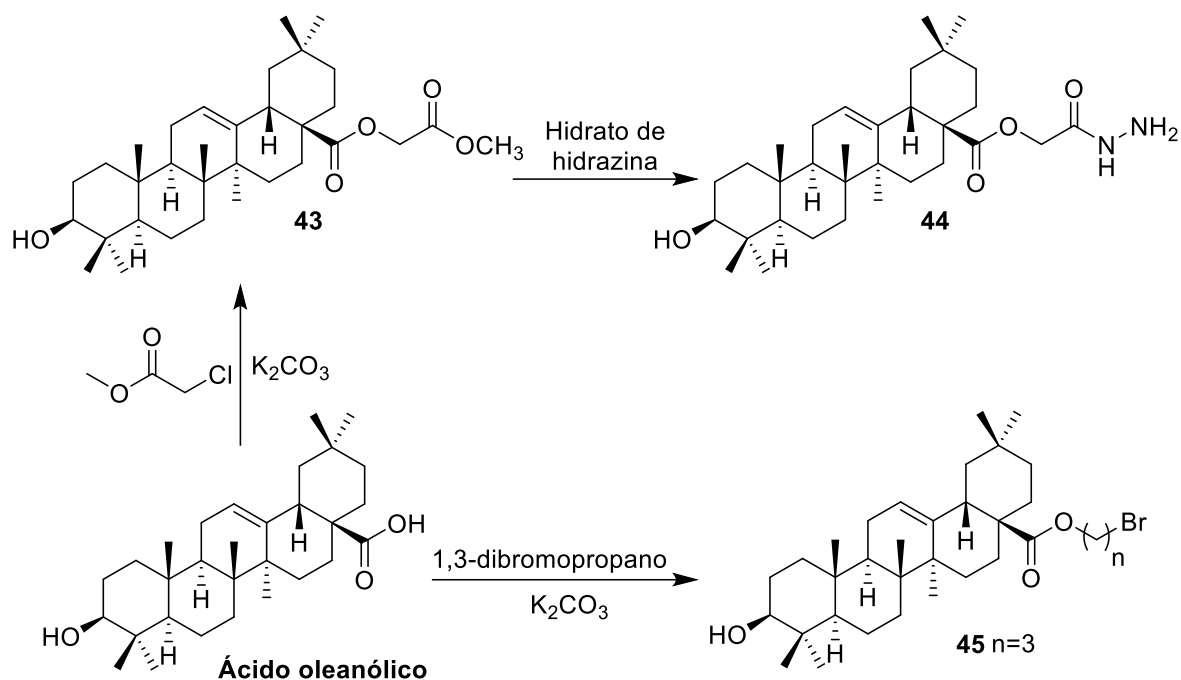


Figura 4.4. Ejemplos de ésteres de OA.⁴⁶

Una de las vías para el tratamiento del cáncer es mediante la inducción de apoptosis (muerte celular programada). Se ha reportado que el OA ejerce apoptosis en células tumorales como las HepG2 hepáticas, MCF-7 de cáncer de mama, HuH7 de cáncer de colon, y de cáncer de próstata. Uno de los derivados reportados del ácido oleanólico con tal efecto fueron diversas amidas (figura 4.5). Se observó que conforme se aumentaba el tamaño de la cadena alquílica disminuye su actividad, siendo el compuesto **50**, $n=5$, el mejor con una $EC_{50}=1.2\pm 0.1 \mu M$ sobre células tumorales HT29.⁴⁷

47. Kahnt M., Loesche A., Serbian I., Hoenke S., Fischer L., Al-Harrasi A., Csuk R. The cytotoxicity of oleanane derived aminocarboxamides depends on their aminoalkyl substituents. *Steroids*, **2019**, *149*, 108422.

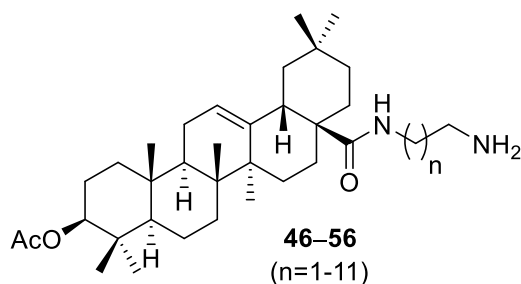


Figura 4.5. Ejemplo de amidas derivadas del ácido oleanólico.⁴⁷

En base a las modificaciones en C3 y C-28, que son relevantes por su posible efecto antitumoral, se han reportado diversos derivados en anillo A con heterociclos de nitrógeno y ésteres en C-28 (**57** y **58**) del ácido oleanólico (figura 4.6). Los compuestos analizados mostraron actividad contra células SGC-7901 y A549. Los compuestos **57d** y **57e** tuvieron mejor efecto inhibitorio en células SGC-7901 ($IC_{50}=4.1 \mu\text{M}$, $2.6 \mu\text{M}$, respectivamente) y con células A549 ($IC_{50}=12.5 \mu\text{M}$, $8.7 \mu\text{M}$, respectivamente). Ambos compuestos mostraron de 7.4 a 11.7 veces mejor actividad anticancerígena que el control gefitinib. Se observó que, al aumentar el tamaño de cadena alquílica en el éster hasta 6 carbonos, la actividad anticancerígena aumentaba; así mismo, al obtener mejores resultados para los derivados **57**, el anillo de quinoxalina, combinado con el ácido oleanólico, puede constituir un buen farmacóforo en el tratamiento del cáncer (figura 4.7).⁴⁸

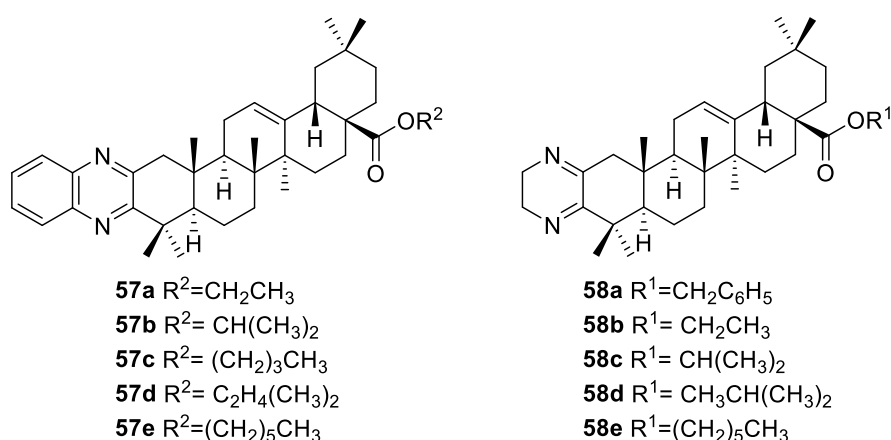


Figura 4.6. Ejemplos de derivados de ácido oleanólico en C-2, C-3 y C-28.

48. Meng Y.Q., Zhao Y.W., Kuai Z.Y., Liu L.W., Li W. Synthesis and antitumor activity evaluation of novel oleanolic acid derivatives. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2017**, *19*, 1000–1010.

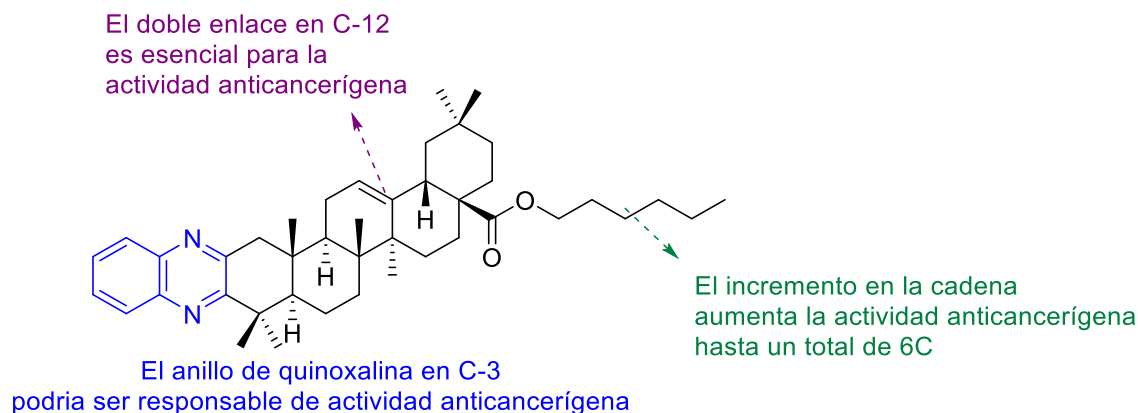


Figura 4.7. Estudio de estructura-actividad de derivados de OA. Adaptado de Meng *et al.*⁴⁸

Una de las bases para los tratamientos modernos del cáncer es mediante terapias combinadas (polifarmacia, uso de un cocktail de fármacos), para aumentar la eficacia del tratamiento o para prevenir y retrasar el desarrollo de quimiorresistencia; sin embargo, estas terapias combinadas han mostrado en algunos casos ser poco viables, ya sea por interacciones farmacológicas indeseables, problemas de farmacocinética y farmacodinamia causantes de toxicidad, además del incumplimiento de tratamientos por parte de los pacientes por la necesidad de ingesta de un número elevado de fármacos.⁴⁹ Por lo tanto, se han reportado moléculas con acción sobre múltiples dianas terapéuticas simultáneamente conocidos como *fármacos multidiana*. Estos últimos presentan la ventaja de tener una acción terapéutica más potente a los fármacos existentes, además de un mejor control de sus propiedades farmacológicas.⁵⁰

En base a lo anterior, en la presente Tesis Doctoral se abordó el diseño de moléculas multidiana frente al cáncer a partir de ácido oleanólico en combinación con diferentes 7-hidroxycumarinas o con un residuo organoselénico.

49. Krishnaiah M., Yada B., Kumari S., McHale C., Pal D., Durden D.L. Recent advances in multitarget-directed ligands via in silico drug discovery. *Drug Discov. Today*. **2024**, *29*, 103904.

50. Li X., Liu F., Li S., Shi D. Rational multitargeted drug design strategy from the perspective of a medicinal chemist. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* 10581–10605.

4.1.2. Aspectos generales de las cumarinas

Las cumarinas (*2H-1-benzopirán-2-onas*) son metabolitos secundarios derivados del ácido *o*-hidroxicinámico, cuyo nombre deriva de la palabra francesa ‘*coumarou*’ referido a la planta del haba tonka (*Dipteryx odoranta* Wild; botánico Carl Ludwig Willdenow), de la cual fueron aisladas por primera vez en 1820. Hasta la fecha se han descrito cerca de 1300 cumarinas ampliamente distribuidas en plantas, hongos y bacterias.^{51,52}

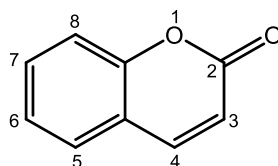


Figura 4.8. Esqueleto de las cumarinas.

Las cumarinas pertenecen a la clase de sustancias polifenólicas, ya que suelen poseer uno o varios grupos hidroxilos fenólicos, y se componen de la fusión de benceno y α -pirona, de los cuales se han identificado en cerca de 150 especies de plantas pertenecientes a 30 familias distintas, entre las que destacan las del género *Umbelliferae*, *Clusiacea*, *Guttifera*, *Oleaceae*, y *Rutaceae*. Habitualmente están presentes en aceites esenciales de la canela, aceite de hojas de casia, en el té verde y en alimentos como la achicoria.^{53–55}

Los compuestos derivados de cumarinas tanto naturales como sintéticos son de relevancia actualmente para el diseño de fármacos debido a su diversidad de

-
51. Thakur A., Singla R., Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 476–495.
 52. Abdelmohsen U.R., Albohy A., Abdulrazik B.S., Bayoumi S.A., Malak L.G., Khallaf I., Bringmann G., Farag S. Natural coumarins as potential anti-SARS-CoV-2 agents supported by docking analysis. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 16970–16979.
 53. Dandriyal J., Singla R., Kumar M., Jaitak V. Recent developments of C-4 substituted coumarin derivatives as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 141–168.
 54. Kubrak T., Podgórski R., Sompor M.M. Natural and synthetic coumarins and their pharmacological activity. *Eur. J. Clin. Exp. Med.* **2017**, *15*, 169–175.
 55. Lončar M., Jakovljević M., Šubarić D., Pavlič M., Služek V.B., Cindrić I., Molnar M. Coumarins in food and methods of their determination. *Foods*, **2020**, *9*, 645.

propiedades biológicas, como antiinflamatorias,⁵⁶ antibacterianas,⁵⁷ antivirales, antioxidantes, antitrombóticos, anti-Alzheimer y efectos antitumorales.^{58–61} Su efecto biológico puede atribuirse a la capacidad de formar interacciones no covalentes, de tipo π - π , hidrofóbicas, electrostáticas, enlaces de hidrógeno, coordinación con metales y fuerzas de van der Waals con diferentes enzimas y dianas terapéuticas; adicionalmente, suelen exhibir una reducida toxicidad.^{62,63}

La ingesta o contacto dérmico con plantas que contienen cumarinas permite su absorción al torrente sanguíneo, sin embargo, su actividad puede ser variable debido a diferentes factores como la estabilidad o su absorción intestinal. La administración directa por vía oral de las cumarinas, a diferencia de su consumo por fuentes alimentarias, dan lugar a concentraciones mucho mayores en el torrente sanguíneo. Se ha reportado la presencia de furanocumarinas en plasma 15 minutos después de su administración y su concentración máxima a los 60 minutos, lo que

-
56. Song S., Ren B., Wu X., Xie Y., Cheng B., Wei Q., Pang W., Wu Z., Zhang X., Li X., Xiao W. Asiaticasics A-O, structurally intriguing coumarins from *Toddalia asiatica* with potential inflammatory inhibitory activity. *Phytochemistry*, **2024**, 221, 114042.
 57. Loganathan V., Ahamed A.J., Surendrakumar R., Gaafar A.Z., Raman G., Idhayadhulla, A. Synthesis of anthraquinone-connected coumarin derivatives via grindstone method and their evaluation of antibacterial, antioxidant, tyrosinase inhibitory activities with molecular docking, and DFT calculation studies. *Heliyon*, **2024**, 10, e25168.
 58. Al-Warhi T., Sabt A., Elkaeed E.B., Eldehna W.M. Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review. *Bioorg. Chem.* **2020**, 103, 104163.
 59. Cervi A., Aillard P., Hazeri N., Petit L., Chai, C.L.L., Willis A.C., Banwell, M.G. Total syntheses of the coumarin-containing natural products *Pimpinellin* and *Fraxetin* using Au(I)-catalyzed intramolecular hydroarylation (IMHA) chemistry. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 9876–9882.
 60. Gangopadhyay A. Plant-derived natural coumarins with anticancer potentials: future and challenges. *J. Herb. Med.* **2023**, 42, 100797.
 61. Mustafa Y.F., Ismael R.N., Jebir R.M. Natural coumarins from two cultivars of watermelon seeds as biosafe anticancer agents, an algorithm for their isolation and evaluation. *J. Mol. Struct.* **2024**, 1295, 136644.
 62. Ahmed E.Y., Abdelhafez O.M., Zaafar D., Serry A.M., Ahmed Y.H., El-Telbany R.F.A., Abd Elmageed, Z.Y., Ali, H.I. Antitumor and multikinase inhibition activities of some synthesized coumarin and benzofuran derivatives. *Archiv. Pharm.* **2022**, 355, 2100327.
 63. Zeki N.M., Mustafa, Y.F. 6,7-Coumarin-heterocyclic hybrids: A comprehensive review of their natural sources, synthetic approaches, and bioactivity. *J. Mol. Struct.* **2024**, 1303, 137601.

indica una fácil absorción por vía gastrointestinal y rápida distribución al resto del organismo.⁶⁴

Las cumarinas se metabolizan inicialmente por enzimas monooxigenasas del citocromo P-450 (CYP2A6) en el hígado, lo que lleva a una hidroxilación (mayoritariamente en la posición 7 y 3 para dar 7-hidroxicumarina o 3-hidroxicumarina) antes de la conjugación en el metabolismo de fase II principalmente con ácido glucurónico.⁶⁵ La presencia de ácido O-cumárico (OCA), principal metabolito biodisponible de cumarinas en plasma puede indicar una ruta metabólica alternativa de las cumarinas en humanos (figura 4.9). Las cumarinas permanecen intactas en el medio ácido del estómago, en el intestino son hidrolizadas en el medio básico para formar OCA y se absorbe con el resto de cumarina para llegar al hígado y se metaboliza por la enzima CYP2A6 por metabolismo de fase I, mientras que otra parte sufre metabolismo de fase II para dar el glucurónido de 7-hidroxicumarina.^{60,66}

64. Melough M. M., Cho E. Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *113*, 99–107.

65. Annunziata F., Pinna C., Dallavalle S., Tamborini L., Pinto A. An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4618.

66. Leonart L.P., Gasparetto J.C., Pontes F.L.D., Cerqueira L.B., De Francisco T.M.G., Pontarolo R. New metabolites of coumarin detected in human urine using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry. *Molecules*, **2017**, *22*, 2031.

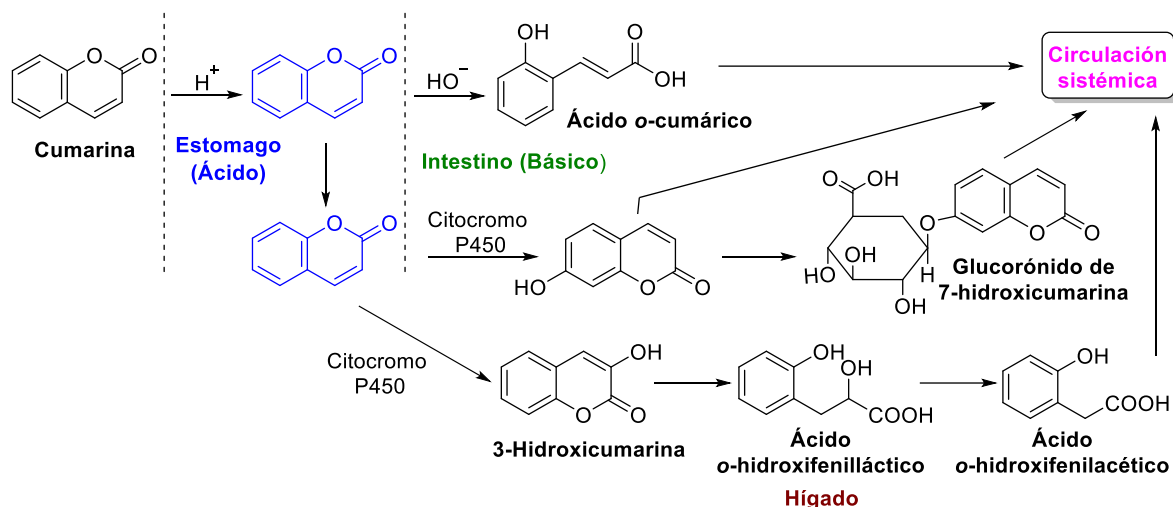


Figura 4.9. Metabolismo de cumarinas en humanos. Adaptado de Gangopadhyay *et al.*⁶⁰

Las cumarinas han tenido un rol importante también la industria alimenticia y cosmética, como blanqueadores ópticos, como anticoagulantes y en la preparación de insecticidas, así como en el campo de los sensores, celdas solares, diodos orgánicos emisores de luz y tintes de láseres.^{67–69}

Las cumarinas se sintetizaron por primera vez en 1868, con el tratamiento de la sal sódica de salicilaldehído con anhídrido acético, conocida como *reacción de Perkin*. Otros métodos son con el tratamiento de salicilaldehído con ynamidas utilizando bromuro de zinc como catalizador⁷⁰ o mediante la irradiación con microondas a 1,3-dihidrobenceno con acetoacetato de etilo en condiciones libres de

67. Amoozadeh A., Ahmadzadeh M., Kolvari E. Easy access to coumarin derivatives using alumina sulfuric acid as an efficient and reusable catalyst under solvent-free conditions. *J. Chem.* **2013**, 767825.

68. Lee J.H., Jeong A.R., Shin I., Kim H., Hong J. Fluorescence Turn-On sensor for cyanide based on a cobalt(II)-coumarinylsalen complex. *Org. Lett.* **2010**, 12, 764–767.

69. Zhou S., Jia J., Gao J., Li H., Li Y., Wei S. The one-pot synthesis and fluorimetric study of 3-(2'-benzothiazolyl)coumarins. *Dyes Pigments*, **2010**, 86, 123–128.

70. Yoo H.J., Youn S.W. Zn(II)-catalyzed one-pot synthesis of coumarins from ynamides and salicylaldehydes. *Org. Lett.* **2019**, 21, 3422–3426.

disolvente;⁷¹ no obstante, la condensación de Pechmann continúa siendo la metodología más utilizada para la síntesis de cumarinas.⁷²

La reacción de Pechmann consiste en la condensación de fenoles con β -cetoésteres, usualmente en presencia de diferentes ácidos como catalizadores, para dar lugar a cumarinas 4-sustituidas (figura 4.10).⁷³ Se ha reportado que la naturaleza del grupo presente en la posición C-4 va a condicionar la actividad contra células cancerígenas.^{51,74}

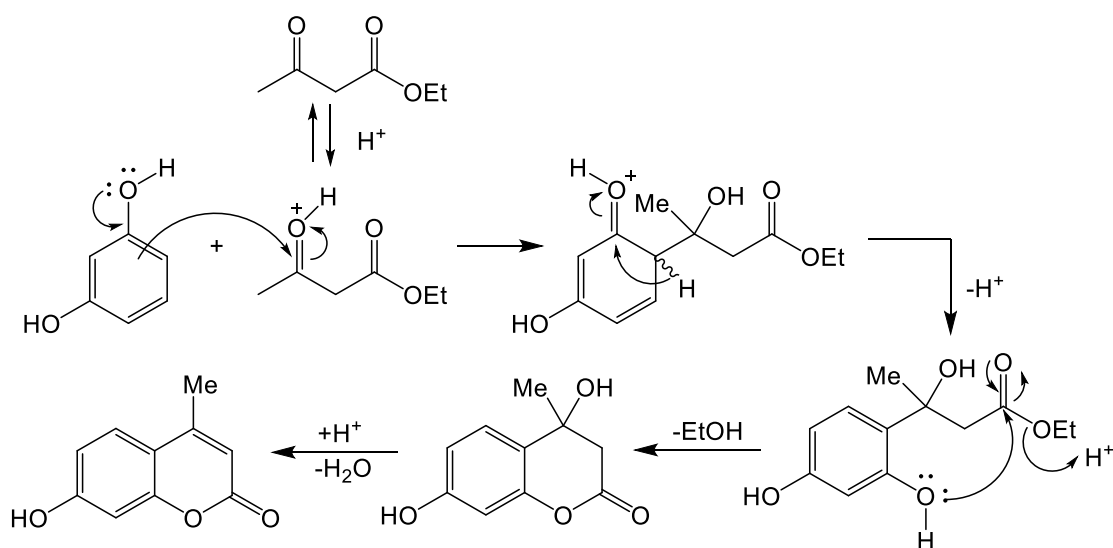


Figura 4.10. Mecanismo de reacción propuesto por Amoozadeh *et al.* de la condensación de Pechmann.⁶⁷

Algunos derivados de cumarinas han demostrado la capacidad de desencadenar la detención del ciclo celular, inhibición de angiogénesis, inhibición de quinasas, inhibición de telomerasas, inhibición de transportadores de

71. Bouasla S., Amaro-Gahete J., Esquivel D., López M., Jiménez-Sanchidrián C., Teguche M., Romero-Salguero F. Coumarin derivatives solvent-free synthesis under microwave irradiation over heterogeneous solid catalysts. *Molecules*, **2017**, *22*, 2072.

72. Chandrakanth M., Thomas N.M., Arya C.G., Fabitha K., Banothu J. Coumarin-1,2,4-triazole hybrids: Recent advances in synthesis and medicinal applications. *J. Mol. Struct.* **2024**, *1299*, 137197.

73. Vargas-Soto F.A., Céspedes-Acuña C.L., Aqueveque-Muñoz P.M., Alarcón-Enos J.E. Toxicity of coumarins synthesized by Pechmann-Duisberg condensation against *Drosophila melanogaster* larvae and antibacterial effects. *Food. Chem. Toxicol.* **2017**, *109*, 1118–1124.

monocarboxilatos, inhibición de anhidrasas carbónicas, inhibición de la aromatasas y sulfatasas en diferentes líneas celulares de cáncer, incluidas aquellas con quimiorresistencia.⁷⁴ Por todo ello, muchos de estos derivados muestran actividades antitumorales prometedoras.

La aromatasas es una enzima responsable de la conversión de andrógenos en estrógenos, y altos niveles de esta enzima están relacionados en el desarrollo del cáncer de mama, de endometrio y de próstata.⁷⁵ En este contexto, *Chen y et al.*⁷⁶ sintetizaron derivados de cumarina con posible actividad inhibitoria de aromatasas y emplearon como grupos funcionales bencilo y metilo para modular tal actividad. Se observó que el grupo metilo y bencilo tuvieron mejor afinidad hacia el grupo hemo de la aromatasas, sin embargo, solo se observa la actividad inhibitoria cuando C-4 está sustituido por un grupo bencilo (figura 4.11).

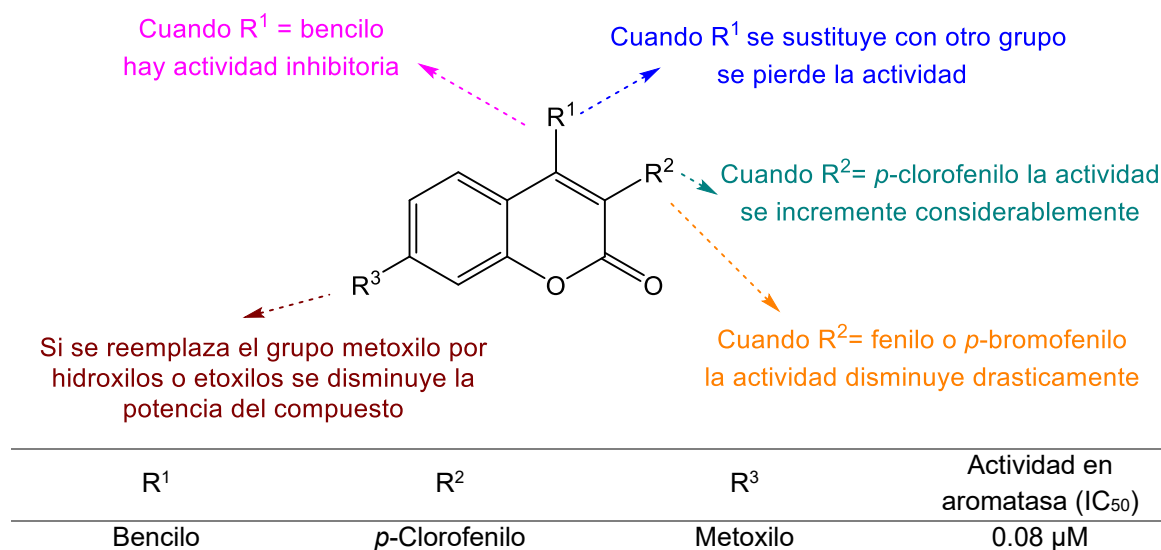


Figura 4.11. Estudio SAR de derivados de cumarinas con actividad sobre aromatasas. Modificado de Dandriyal *et al.*⁵³

74. Zhang L., Xu Z. Coumarin-containing hybrids and their anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *181*, 111587.

75. Molehin, D., Filleur S., Pruitt, K. Regulation of aromatase expression: Potential therapeutic insight into breast cancer treatment. *Mol. Cell Endocrinol.* **2021**, *531*, 111321.

76. Chen S., Cho M., Karlsberg K., Zhou D., Yuan Y.C. Biochemical and biological characterization of a novel anti-aromatase coumarin derivative. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48071–48078.

Otra de las dianas terapéuticas contra el cáncer de las cuales se han diseñado numerosos derivados de cumarinas son las anhidrasas carbónicas (CAs). Este grupo de metaloenzimas catalizan la hidratación reversible del dióxido de carbono para generar HCO_3^- e hidronio; esto permite mantener la homeostasis del pH inter- e intracelular, y el transporte transmembrana de iones, que pueden afectar el metabolismo celular.⁷⁷ Entre los varios tipos de anhidrasas carbónicas, se ha observado que las isoformas de tipo transmembrana CA IX y CA XII de la familia α (mamíferos) se encuentran sobreexpresadas en ciertos tipos de tumores y son una buena diana para el diseño de agentes anticancerígenos.⁷⁸ Se proporciona una descripción más detallada de estas enzimas en el Capítulo 6 de la presente Tesis Doctoral.

A modo de ejemplo, Zengin *et al.* desarrollaron compuestos basados en cumarinas y sulfonamidas, con el objetivo de observar su actividad inhibitoria sobre CA I, CA II (citosólicas, usadas como control para el estudio de la selectividad), CA IX y CA XII y la relación entre esta inhibición y su actividad sobre células de cáncer de colon. Con ello determinaron que el compuesto **59** muestra una inhibición selectiva en la proliferación celular y en la actividad de CA IX y XII con una $K_i=45.5$ nM y 596.6 nM respectivamente,⁷⁹ así como derivados de bis-cumarinas, donde el derivado **60** mostró una $K_i=144.6$ nM y 71.5 nM sobre estas mismas anhidrasas (figura 4.12).⁸⁰ En este último, al realizar un estudio SAR observaron que la adición de un grupo metilo en C-4 de la cumarina, así como un aumento del tamaño del espaciador eran de importancia en el aumento de la actividad sobre CA IX.

77. Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibition and the management of hypoxic tumors. *Metabolites*, **2017**, *7*, 48.

78. Wu Y., Xu J., Liu Y., Zeng Y., Wu G. A review on anti-tumor mechanisms of coumarins. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 592853.

79. Zengin Kurt B.Z., Sonmez F., Ozturk D., Akdemir A., Angeli A., Supuran C.T. Synthesis of coumarin-sulfonamide derivatives and determination of their cytotoxicity, carbonic anhydrase inhibitory and molecular docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*, 111702.

80. Kurt B.Z., Dag A., Doğan B., Durdagi S., Angeli A., Nocentini A., Supuran C.T., Sonmez F. Synthesis, biological activity and multiscale molecular modeling studies of bis-coumarins as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors with effective cytotoxicity against hepatocellular carcinoma. *Bioorg. Chem.* **2019**, *87*, 838–850.

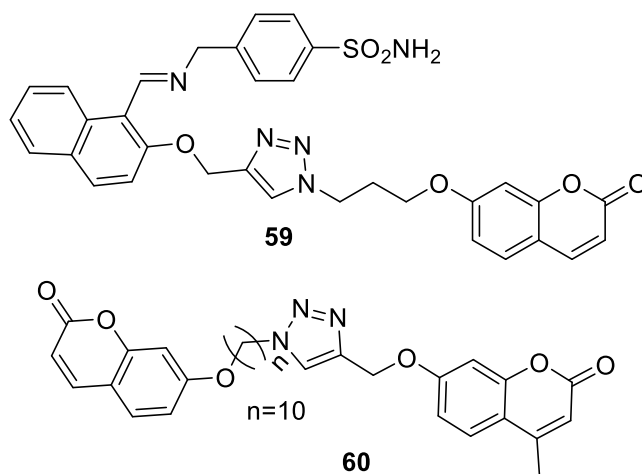


Figura 4.12. Triazoles derivados de cumarinas obtenidos por Zengin *et al.*^{79,80}

Otro ejemplo de derivados de 7-hidroxicumarinas, fue el reportado por Thacker *et al.*⁸¹ En particular, prepararon 7-hidroxicumarina-3-carboxamidas, destacando el derivado **61** (figura 4.13), con una $K_i = 200$ nM sobre CA IX. Estudios de *docking* molecular revelaron, interacciones de **61** y los aminoácidos del sitio activo de CA IX (His94, Thr198 y Pro200).

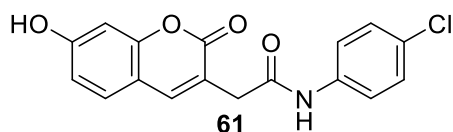


Figura 4.13. Derivado de 7-hidroxicumarina con actividad sobre CAs.⁸¹

En los grupos de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral se han sintetizado una amplia variedad de derivados cumarínicos con potencial actividad sobre anhidrasas carbónicas. Ejemplo reciente es el reportado por Fuentes-Aguilar *et al.*⁸² Se sintetizaron dos familias de mitocans con actividad dual

81. Thacker P.S, Alvala M., Arifuddin M., Angeli A., Supuran C.T. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin-3-carboxamides as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2019**, *8*, 386–392.

82. Fuentes-Aguilar A., González-Bakker A., Jovanović M., Stojanov S.J., Puerta A., Gargano A.D., Dinić J., Vega-Báez J.L., Merino-Montiel P., Montiel-Smith S., Alcaro S., Nocentini A., Pešić M., Supuran C.T., Padrón, J.M., Fernandez-Bolaños J.G., López, Ó. Coumarins-lipophilic cations conjugates: Efficient mitocans targeting carbonic anhydrases. *Bioorg. Chem.* **2024**, *145*, 107168.

mediante la combinación de cumarinas sustituidas en C-3 y C-4 con potencial actividad sobre CA IX y XII y un fragmento lipófilo cargado positivamente (grupo fosfonio y sal de guanidinio) como vector selectivo hacia las mitocondrias de las células malignas. Se observó que los derivados monosustituidos en C-4 ($R^1=CH_3$), o disustituidos en C-3 y C-4 (Me/Me, Cl/Me) y un grupo espaciador pentilo tuvieron actividad sobre CA IX y XII en el rango nM y fueron agentes antiproliferativos selectivos frente a células tumorales. El compuesto **63f** presentó la mejor actividad inhibitoria con valores de $K_i=7.8$ y 8.1 nM contra CA IX y XII, respectivamente (figura 4.14).

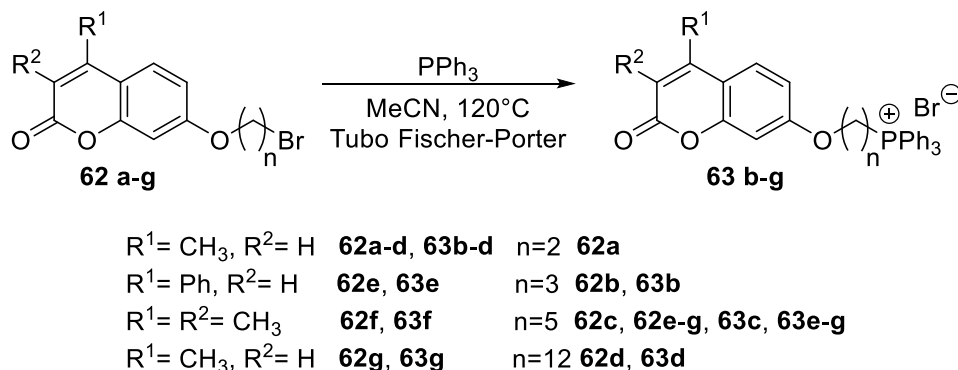


Figura 4.14. Derivados cumarínicos con actividad sobre CAs.⁸²

Por otro lado, se sintetizaron híbridos de cumarina-aminobenzoxazol como inhibidores potenciales de CA IX y CA XII, modificándose la naturaleza de los sustituyentes sobre la cumarina y el residuo de benzoxazol, así como la longitud del espaciador hidrocarbonado (figura 4.15). Todos los derivados presentaron actividad selectiva (rango nM) sobre las CAs IX y XII implicadas en procesos tumorales. También mostraron actividad antiproliferativa en el rango μM , siendo el compuesto **64e** el que presentó mejor actividad, con un valor de $GI_{50}=2.6$ μM sobre células A549 (cáncer de pulmón).⁸³

83. Fuentes-Aguilar A., Merino-Montiel P., Montiel-Smith S., Meza-Reyes S., Vega-Báez J.L., Puerta A., Fernandes M X., Padrón J M., Petreni A., Nocentini A., Supuran C.T., López Ó., Fernandez-Bolaños J.G. 2-Aminobenzoxazole-appended coumarins as potent and selective inhibitors of tumour-associated carbonic anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *37*, 168–177.

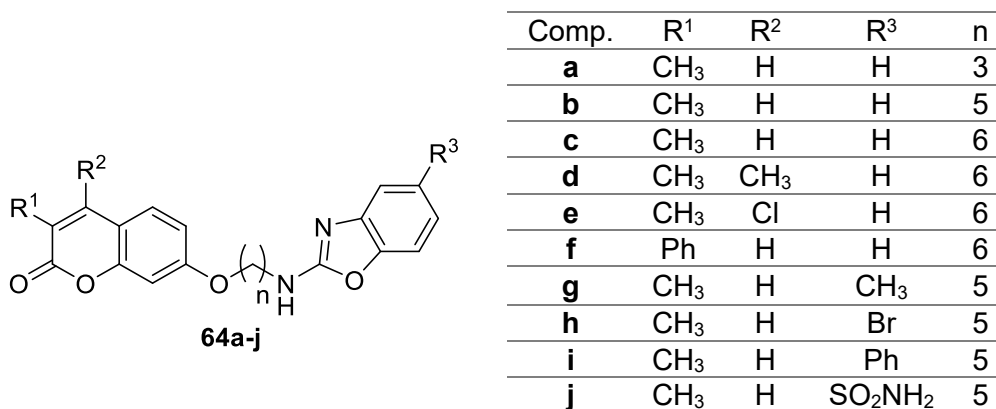


Figura 4.15. Ejemplo de híbridos cumarina-benzoxazole.⁸³

Por otro lado, se han desarrollado derivados cumarínicos conjugados con triterpenos. Vega *et al.*⁸⁴ sintetizaron derivados del ácido maslínico sobre los hidroxilos en C-2 y C-3 y en el grupo ácido de C-28 con diferentes cumarinas comerciales, utilizando diaminas primarias de diferente longitud de cadena como grupo espaciador (figura 4.16). La finalidad era obtener sondas que funcionaran como marcadores de moléculas biológicas pequeñas, y a su vez evaluar la actividad citotóxica en varias líneas de células de cáncer y en células sanas. El derivado **66** presentó los mejores resultados citotóxicos, al poseer dos moléculas de ácido cumarino-3-carboxílico acoplado a los grupos hidroxilo en C-2 y C-3 del triterpeno, contra las líneas celulares B16-F10, HT29 y Hep G2 con una IC₅₀ = 0.6, 1.1 y 0.9 μM respectivamente; adicionalmente, mostraron una excelente selectividad manteniendo una viabilidad celular del 90% en células no tumorales a una dosis igual que su IC₅₀ determinado para células de cáncer.

84. Vega-Granados K., Medina-O'Donnell M., Rivas F., Reyes-Zurita F. J., Martínez A., Álvarez De Cienfuegos L., Lupiáñez J. A., Parra, A. Synthesis and biological activity of triterpene-coumarin conjugates. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 1587–1597.

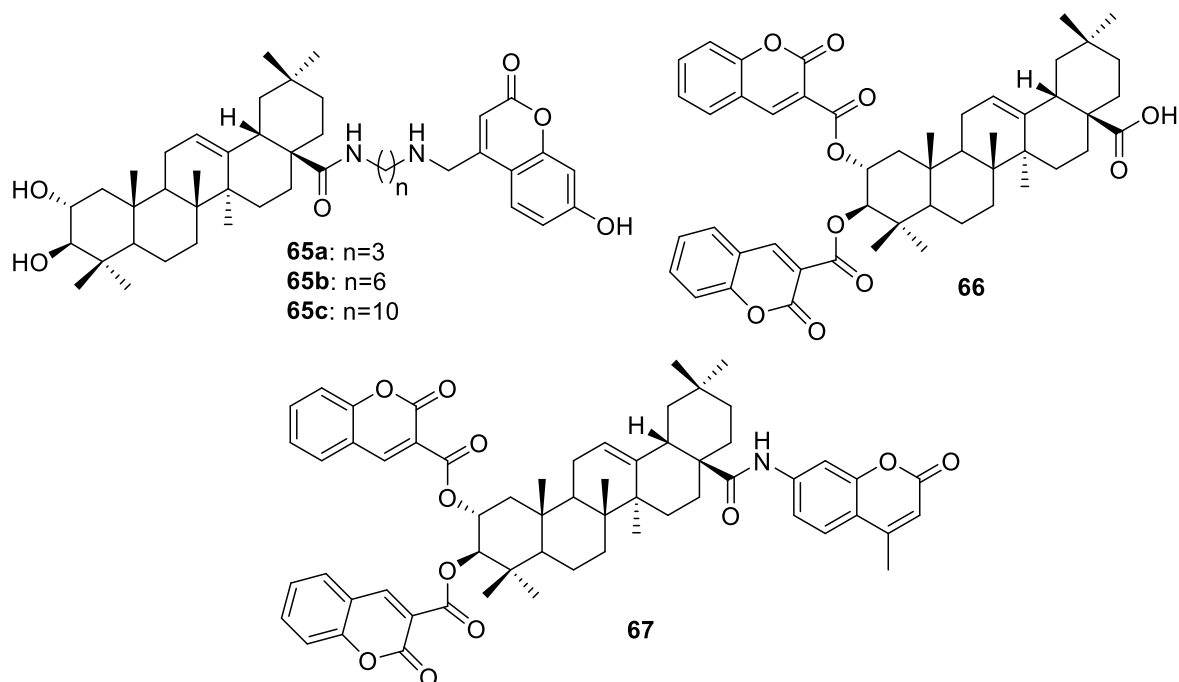


Figura 4.16. Conjugados ácido maslínico-cumarina sintetizados por Vega *et al.*⁸⁴

4.1.3. Aspectos generales de los compuestos organoselénicos

El selenio (Se) es un micronutriente esencial en el cuerpo humano y es obtenido a través de la dieta o de suplementos alimenticios.⁸⁵ La cantidad de selenio requerida para mantener una salud óptima es de 55 $\mu\text{g}/\text{día}$ (0.7 $\mu\text{mol}/\text{día}$) en adultos; un consumo por debajo de 15 $\mu\text{g}/\text{día}$ en la dieta podría ser un riesgo para el organismo, al igual que un consumo superior a los 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ puede ser causante de una intoxicación por Se denominada *selenosis*.^{86,87}

La ingesta de selenio es variable por área geográfica, ya que depende de factores como la cantidad de Se en tierras de cultivo y forraje, pH del suelo, contenido de materia orgánica y presencia de algunos iones que pueden formar complejos con el Se. Algunos efectos de la deficiencia de consumo de este elemento

85. Tan H.W., Mo H.Y., Lau A.T.Y., Xu Y.M. Selenium species: Current status and potentials in cancer prevention and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*, 75.

86. Loscalzo J. Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 1756–1760.

87. Sutter M.E.; Thomas J.D.; Brown J.; Morgan B. Selenium toxicity: a case of selenosis caused by a nutritional supplement. *Ann. Intern. Med.* **2008**, *148*, 970–971.

en la salud son principalmente a nivel inmunitario (mayor riesgo de adquirir infecciones virales), problemas de fertilidad, deficiencias cognitivas, riesgo de cáncer y desordenes autoinmunes en el tiroides.^{88,89}

El Se es necesario para la biosíntesis de selenoproteínas tiroideas, cuyo papel fundamental es la defensa antioxidante, ya que protegen al tiroides del exceso de peróxido de hidrógeno generado en la síntesis de hormonas tiroideas, y la deficiencia de este elemento es causante de padecimientos tiroideos como la orbitopatía de Graves (autoinmunidad relacionada con la enfermedad de Graves) y la tiroiditis de Hashimoto.⁹⁰

La forma predominante de Se ingerido por los humanos es la selenometionina y selenocisteína, la cual se metaboliza en diferentes selenocompuestos de bajo peso molecular que pueden afectar a procesos celulares, como la reparación de ADN. Algunos metabolitos bioactivos son el seleniuro de hidrógeno y ácido metilselenínico, al cual se le atribuyen efectos quimiopreventivos.⁸⁹

Se han identificado cerca de 25 selenoproteínas que cumplen un papel fundamental en la respuesta inmune, y pueden actuar como enzimas involucradas en reacciones redox. Entre las principales enzimas de selenoproteínas con funciones en la respuesta inmune destacan la glutatión peroxidasa (GPXs), tioredoxina reductasas (TrxR), y selenofostato sintetasa 2 (SPS2), y entre las selenoproteínas no enzimáticas destaca la selenoproteína K (SELENOK).⁹¹

88. Rayman M.P. Selenium intake, status, and health: a complex relationship. *Hormones*, **2019**, *19*, 9–14.

89. Avery J.C., Hoffmann, P. Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients*, **2018**, *10*, 1203.

90. Wu Q., Rayman M.P., Lv H., Schomburg L., Cui B., Gao C., Chen P., Zhuang G., Zhang Z., Peng X., Li H., Zhao Y., He X., Zeng G., Qin F., Hou P., Shi, B. Low population selenium status is associated with increased prevalence of thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 4037–4047.

91. Fredericks G.J., Hoffmann P.R. Selenoprotein K and protein palmitoylation. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23*, 854–862.

Algunos reportes indican la relación entre las concentraciones de Se y la reducción de procesos inflamatorios, en la regulación de la presión sanguínea y en la prevención de enfermedades del corazón y efecto quimiopreventivo,⁹² influencia en la regulación del ciclo celular, estimulación de apoptosis y en la inhibición de células tumorales;⁹³ sin embargo, se ha reportado que bajos niveles de Se están asociados a ciertos tipos de cáncer, principalmente de garganta y de pulmón.⁹⁴

El Se desempeña un papel fundamental como antioxidante en vías redox, lo que ayuda a prevenir el daño genético, que es el causante de desarrollo tumoral debido a los cambios epigenéticos de oncogenes críticos o supresores de tumores.⁹⁵ Por este motivo, el desarrollo de compuestos orgánicos de Se han atraído la atención en la búsqueda de compuestos anticancerígenos.⁹⁶ Los compuestos orgánicos de Se se han clasificado en diferentes familias en base a su estructura química en: seleniuros/diseleniuros, selenocianatos, selenoaminoácidos, ácido metilselenínico, compuestos heterocíclicos de Se, entre otros.⁸⁵ Estos compuestos tienen entre sus mecanismos de acción contra el cáncer la acción redox, inducción de apoptosis y potenciador de la acción de fármacos quimioterapéuticos.⁹⁷

-
92. Li C., Salmen S.H., Alahmadi T.A., Veeraraghavan V.P., Surapaneni K.M., Natarajan N., Subramanian S. Anticancer effect of selenium/chitosan/polyethylene glycol/allyl isothiocyanate nanocomposites against diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **2022**, *29*, 3354–3365.
93. Domínguez-Álvarez E., Rácz B., Maré M.A., Nasim M.J., Szemerédi N., Viktorová J., Jacob C., Spengler G. Selenium and tellurium in the development of novel small molecules and nanoparticles as cancer multidrug resistance reversal agents. *Drug Resist. Updat.* **2022**, *63*, 100844.
94. Pietrzak S., Wójcik J., Scott R.J., Kashyap A., Grodzki T., Baszuk P., Bielewicz M., Marciniak W., Wójcik N., Dębniak T., Masojć B., Pieróg J., Cybulski C., Gronwald J., Wojtyś M., Kubisa B. Influence of the selenium level on overall survival in lung cancer. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2019**, *56*, 46–51.
95. Sravani A.B., Ghaté V., Lewis, S. Human papillomavirus infection, cervical cancer and the less explored role of trace elements. *Biol. Trace Elem. Res.* **2023**, *201*, 1026–1050.
96. Ali D., Mondal N., Panday A.K., Choudhury L.H. Synthesis of selenocyanates and selenoethers of amino pyrazoles and amino uracils by in situ triselenium dicyanide from malononitrile and selenium dioxide. *ACS Omega*, **2023**, *8*, 25349.
97. Domracheva I., Kanepé-Lapsa I., Jackevica L., Vasiljeva J., Arsenyan P. Selenophenoquinolinones and coumarins promote cancer cell apoptosis by ROS depletion and caspase-7 activation. *Life Sci.* **2017**, *186*, 92–101.

Se ha reportado que la inducción de apoptosis celular por parte de selenoderivados ocurre por distintos mecanismos, dependiendo del tipo de célula, su metabolismo y de la estructura de la función organoselénica estudiada, pero puede deberse a la activación o inhibición de ciertas quinasas y por interrupción del ciclo celular por la vía PI3K.⁹⁸ Algunos estudios también indican que este elemento puede inhibir la proliferación de células tumorales actuando sobre la expresión del gen supresor de apoptosis *Bcl-2* y del gen supresor de tumores *p53*, importantes en el control de ciclo celular y replicación del ADN; además, derivados de Se y algunas selenoproteínas podrían actuar como agentes antimetastásicos.⁹⁹ Ejemplo de selenoproteínas involucradas en la prevención y promoción del cáncer son TXNRD1, SELENOK y GPx2, indicando nuevamente que los niveles bajos de Se en el organismo podrían estar relacionados con el riesgo de desarrollo del cáncer.¹⁰⁰

Por su parte, el grupo de los selenocianatos (R-SeCN), constituye una de las familias de compuestos organoselénicos más relevantes, no sólo por sus marcadas propiedades biológicas, sino también por la posibilidad de ser empleados como intermediarios para la obtención de otros selenocompuestos como los ácidos selenínicos, selenolatos, selenoles, selenoureas y diselenuros.^{101,102}

La preparación de selenocianatos puede llevarse mediante síntesis directa e indirecta. La síntesis directa incluye reacciones de sustitución nucleofílica (^-SeCN),

98. Sanmartín C., Plano D., Sharma A.K., Palop J.A. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9649–9672.

99. Rúa R.M., Nogales F., Carreras O., Ojeda M.L. Selenium, selenoproteins and cancer of the thyroid. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2023**, *76*, 127115.

100. Hurst R., Hooper L., Norat T., Lau R., Aune D., Greenwood D.C., Vieira R., Collings R., Harvey L. J., Sterne J.A.C., Beynon R., Savović J., Fairweather-Tait S.J. Selenium and prostate cancer: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 111–122.

101. Du P, Viswanathan UM, Xu Z, Ebrahimnejad H, Hanf B, Burkholz T, Schneider, M., Bernhardt I., Kirsch G., Jacob C. Synthesis of amphiphilic seleninic acid derivatives with considerable activity against cellular membranes and certain pathogenic microbes. *J. Hazard. Mater.* **2014**, *269*, 74–82.

102. Baquedano Y., Moreno E., Espuelas S., Nguewa P., Font M., Gutierrez K.J., Jiménez-Ruiz A., Palop J.A., Sanmartín C. Novel hybrid selenosulfonamides as potent antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 116–123.

sustitución electrofílica ($^+\text{SeCN}$) y reacciones radicalarias ($^{\cdot}\text{SeCN}$). El método de síntesis indirecta involucra reacciones de cianación de selenio orgánico para obtener el selenocianato y también incluye reacciones de sustitución nucleofílica (^-CN), sustitución electrofílica (^+CN) y reacciones radicalarias ($^{\cdot}\text{CN}$), entre otras (figura 4.17).¹⁰³



Figura 4.17. Metodologías para la preparación de selenocianatos.¹⁰³

La preparación clásica de derivados de SeCN es por reacciones de sustitución nucleofílica. Se emplean selenocianatos metálicos como nucleófilos (NaSeCN, KSeCN, CuSeCN, CsSeCN y AgSeCN), los cuales son fáciles de usar ante compuestos con buenos grupos salientes.^{104,105}

En los grupos de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral se han sintetizado una amplia variedad de derivados de selenio. Con respecto a derivados de tipo selenocianato, Roldán *et al.*¹⁰⁶ prepararon a partir de una diamina aromática los compuestos **69**, **71** y **72**, con una cadena de 6C como espaciador entre el grupo amino y SeCN por un lado, y Boc y enamina como grupos protectores, así como la amina libre mediante la desprotección de **71**. El *p*-amino selenocianato **72**, mediante acoplamiento peptídico con la D-biotina, dio lugar a **73** (figura 4.18),

103. Karmaker P.G., Huo F. Organic selenocyanates: Rapid advancements and applications in the field of organic chemistry. *Asian J. Org. Chem.* **2022**, *11*, e2022002.

104. Shlyaykher A., Ehmann M., Karttunen A.J., Tambornino F. A comprehensive study on the full series of alkali-metal selenocyanates $\text{A}^{\text{I}}[\text{SeCN}]$ ($\text{A}^{\text{I}} = \text{Li-Cs}$). *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 13552.

105. Wijeyasinghe N., Tsetseris L., Regoutz A., Sit W., Fei Z., Du T., Wang X., McLachlan M.A., Vourlias G., Patsalas P., Payne D.J., Heeney M., Anthopoulos T.D. Copper (I) selenocyanate (CuSeCN) as a novel hole-transport layer for transistors, organic solar cells, and light-emitting diodes. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1707319.

106. Roldán-Peña J.M., Puerta A., Dinić J., Stojanov S.J., González-Bakker A., Hicke F.J., Mishra A., Piyasaengthong A., Maya I., Walton J.W., Pešić M., Padrón, J.M., Fernandez-Bolaños J.G, López Ó. Biotinylated selenocyanates: Potent and selective cytostatic agents. *Bioorg. Chem.* **2023**, *133*, 106410.

que fue diseñado como un vector selectivo hacia las células tumorales, como consecuencia de la sobreexpresión de los receptores de biotina en las células malignas. Estos derivados fueron analizados frente a 7 líneas de células de tumores sólidos, donde ejercieron un efecto inhibitor potente en 6 de las 7 líneas estudiadas, con valores de GI_{50} en el rango nM. Estudios adicionales demostraron que el selenocianato biotilado ejercía un efecto citostático, impidiendo la división celular, conduciendo posteriormente a apoptosis.

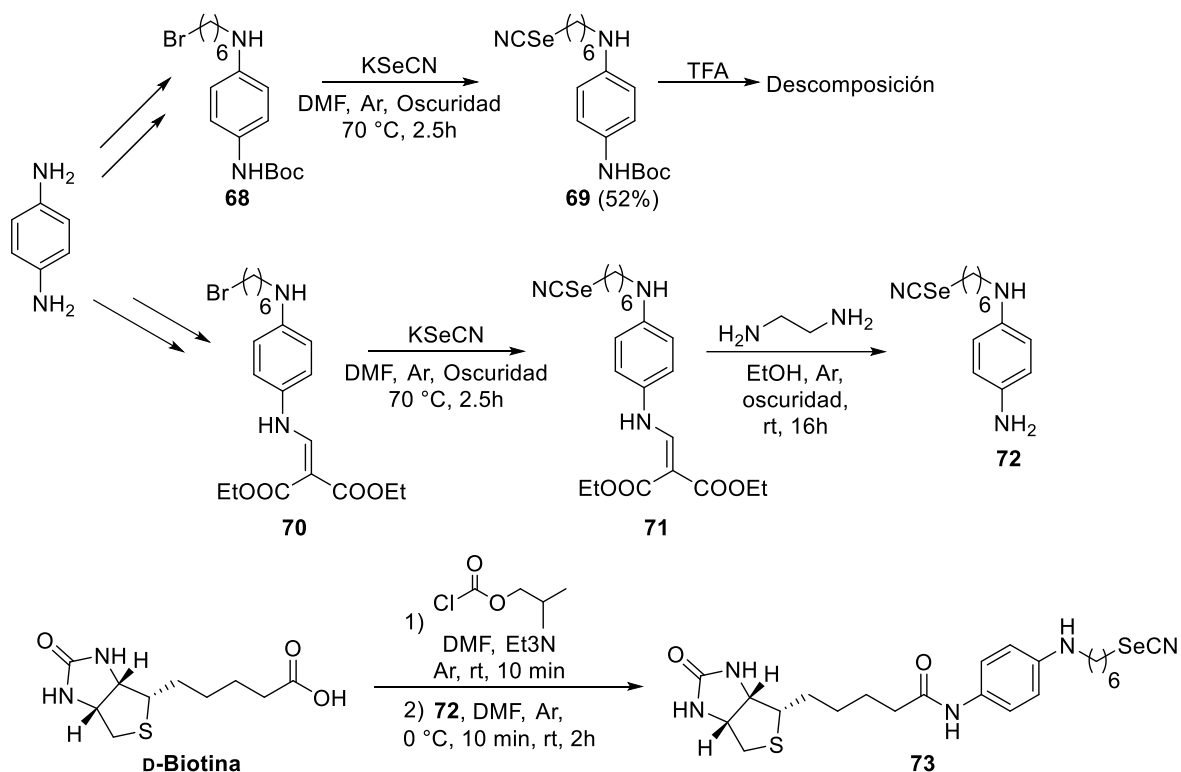


Figura 4.18. Selenocianatos de biotina como agentes citostáticos. Adaptado de Roldán *et al.*¹⁰⁶

En un primer reporte de monoselenocianatos de alquilo se determinó la capacidad del selenocianato de metilo, propilo, pentilo y heptilo (figura 4.19) de prevenir el crecimiento de tumores inducidos por DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antraceno) en modelo de ratas, y se observó una mejor actividad inhibitoria de crecimiento del tumor conforme se aumentó el tamaño de la cadena.

Así mismo, también se observó una disminución en la formación de aductos de ADN con DMBA con el alargamiento de la cadena alquílica.¹⁰⁷

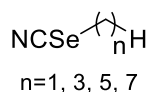


Figura 4.19. Monoselenocianatos de alquilo evaluados por Ip et al.¹⁰⁷

Con la finalidad de reducir la toxicidad inherente de agentes quimioterapéuticos como el cisplatino, lo cual conduce a la aparición de efectos secundarios, se ha reportado el estudio del compuesto **74** (figura 4.20). Los autores observaron la reducción en la toxicidad del cisplatino, así como un aumento en su actividad al administrar **74** como coadyuvante en ratones; tal efecto se le atribuyó a la inhibición en la producción de ROS, NO y la aparición de LPO, lo que propició un aumento de enzimas antioxidantes en el riñón (superóxido dismutasa, catalasa, tioredoxina reductasa, y glutatión peroxidasa), disminuyendo, por lo tanto, el daño al ADN causado por el cisplatino. Estos resultados sugieren un posible mecanismo quimioprotector de los selenocianatos.¹⁰⁸

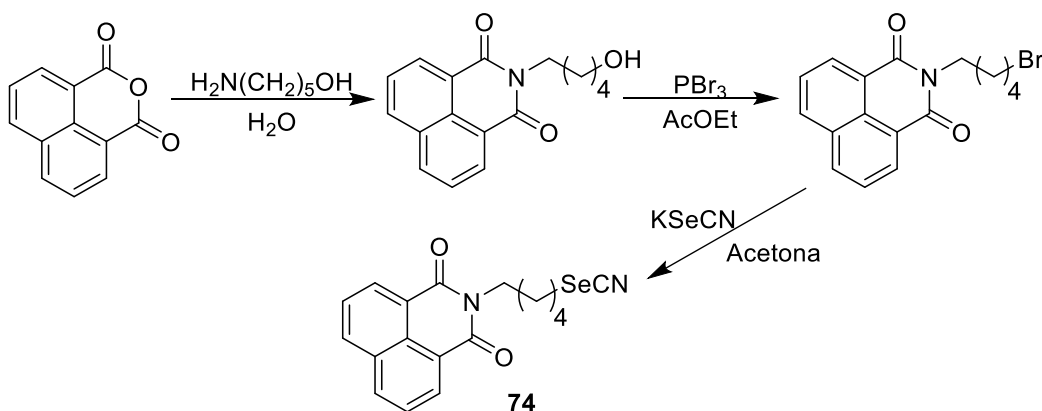


Figura 4.20. Ruta de síntesis del compuesto **74** con potencial efecto quimioprotector.¹⁰⁸

107. Ip C., Vadhanavikit S., Ganther H. Cancer chemoprevention by aliphatic selenocyanates: effect of chain length on inhibition of mammary tumors and DMBA adducts. *Carcinogenesis*, **1995**, *16*, 35–38.

108. Ghosh P., Singha Roy S., Basu A., Bhattacharjee A., Bhattacharya S. Sensitization of cisplatin therapy by a naphthalimide based organoselenium compound through modulation of antioxidant enzymes and p53 mediated apoptosis. *Free Radic. Res.* **2015**, *49*, 453–471.

Recientemente se ha reportado la síntesis de derivados de selenocianatos esteroideos. Huang *et al.*¹⁰⁹ sintetizaron selenocianatos de estradiol y analizaron su actividad antiproliferativa frente a líneas celulares dependientes de hormonas (figura 4.21). Observaron que la introducción del grupo SeCN al esteroide le otorgó la probabilidad de inhibir el crecimiento de células tumorales, siendo el compuesto **75e** (n=8) el que mostró mejor actividad sobre células HeLa (cáncer cervicouterino, IC₅₀= 5.69 μM). Es de destacar, que conforme aumentaba la cadena del fragmento selenoalquílico también aumentó la actividad de los compuestos **75a–75f**, hasta los 8 carbonos.

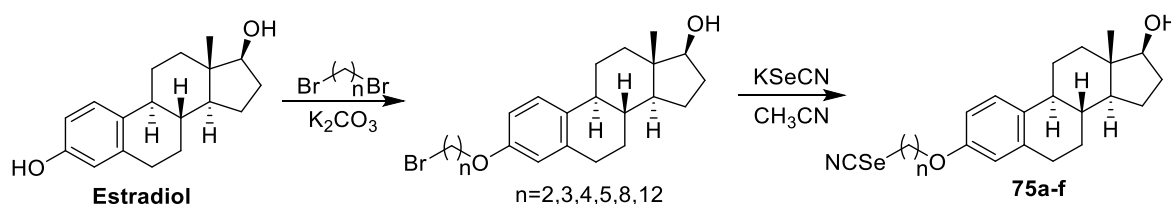


Figura 4.21. Metodología para la obtención de selenocianatos de estradiol.¹⁰⁹

Huang *et al.*¹¹⁰ sintetizaron selenocianatos a partir de la posición 17, 3 y 2 de la estrona, mediante la formación de amidas, ésteres, éteres u oximas. Evaluaron la actividad antiproliferativa sobre líneas de células tumorales, observando que el grupo selenocianato incrementó la actividad de la estrona, manteniéndose la actividad citotóxica hasta un total de 8 carbonos. Las amidas con el grupo SeCN en la posición 2 de la estrona fueron los que presentaron mejor actividad citotóxica seguidos de los ésteres. El compuesto **81a** fue el que tuvo la actividad inhibitoria más potente (IC₅₀=1 μM en células HepG2 y IC₅₀=2.6 μM en células Sk-Ov-3) en comparación a abiraterona y 2-metoxiestradiol. Por otro lado, el compuesto **81c** indujo apoptosis en células Sk-Ov-3 y el compuesto **77d** presentó mejor actividad *in vivo*.

109. Huang Y., Peng Z., Wei M., Gan C., Zhang Y., Chen S., Xiao J., Cui J. Synthesis and antiproliferative evaluation of some novel estradiol selenocyanates. *Steroids*, **2022**, *181*, 108992.

110. Huang Y., Wei M., Peng Z., Cheng Y., Zhang Y., Li J., Xiao J., Gan C., Cui J. Synthesis of estrone selenocyanate Compounds, anti-tumor activity evaluation and structure-activity relationship analysis. *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, *76*, 117086.

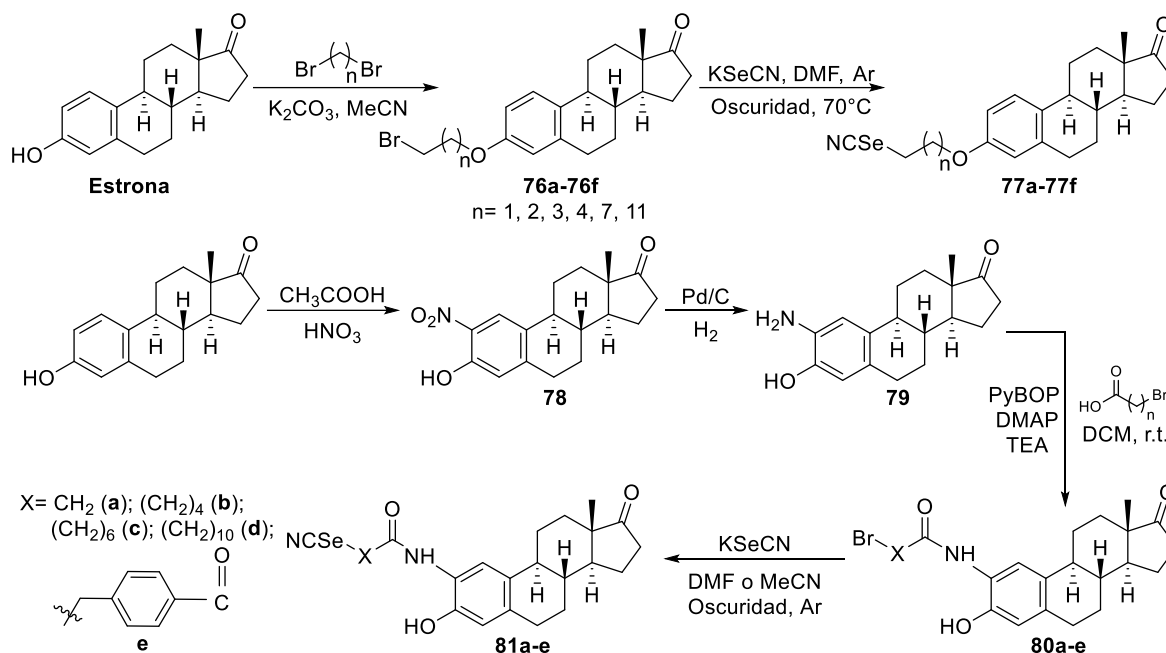


Figura 4.22. Selenocianatos derivados de estrona. Adaptado de Huang *et al.*¹¹⁰

4.2. Objetivo general de sección

Preparar híbridos de ácido oleanólico y 7-hidroxicumarinas sustituidas en C-3 y/o C-4 mediante esterificación de la posición C-28 del ácido oleanólico, así como híbridos ácido oleanólico-selenocianatos modificando tanto las posiciones C-3 como C-28 del triterpenoide, y analizar ambas familias como potenciales agentes antiproliferativos.

4.3. Objetivos particulares de sección

Parte A:

- Sintetizar 7-hidroxicumarinas a partir de resorcinol con tres diferentes β -ceto ésteres (2-cloroacetato de etilo, acetoacetato de etilo y benzoilacetato de etilo) mediante la condensación de Pechmann.
- Realizar la mono-alkilación de cada 7-hidroxicumarina con diferentes dibromoalcanos (1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano y 1,6-dibromohexano) en medio básico (K_2CO_3).
- Preparar híbridos de ácido oleanólico-cumarina mediante la reacción de cada cumarina alkilada con ácido oleanólico en medio básico (K_2CO_3).

- Evaluación de la actividad antiproliferativa (Capítulo 7).

Parte B:

- Realizar la mono-alkilación de ácido oleanólico con diferentes α,ω -dibromoalcanos (1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano, 1,5-dibromopentano, 1,6-dibromohexano y 1,9-dibromononano), así como α,α' -*p*-dibromoxileno en medio básico (K_2CO_3).
- Sintetizar los selenocianatos a partir de ácido oleanólico alquilado mediante la sustitución con KSeCN.
- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de los diferentes selenocianatos sintetizados frente a líneas celulares de tumores sólidos humanos y realizar un análisis estructura-actividad.
- Profundizar en el modo de acción del derivado cabeza de serie.
- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vivo* y selectividad de los derivados más potentes mediante el modelo de *C. elegans*.

4.4. Discusión de resultados

4.4.1. Híbridos ácido oleanólico-cumarinas

En este capítulo se abordará la preparación de híbridos de ácido oleanólico-cumarinas, que podría conducir a una sinergia de las actividades biológicas exhibidas por ambos tipos de farmacóforos; la estructura general de dichos híbridos se muestra en la figura 4.23. Ambos fragmentos pueden proporcionar actividad antiproliferativa, y en el caso de la cumarina, podría provenir de la inhibición de CAs, aromatasas, sulfatasas o telomerasas. Adicionalmente, la presencia de un espaciador hidrocarbonado podría modular las propiedades físico-químicas del híbrido.

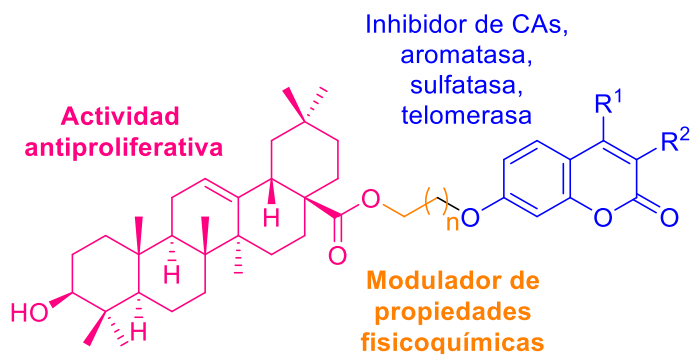
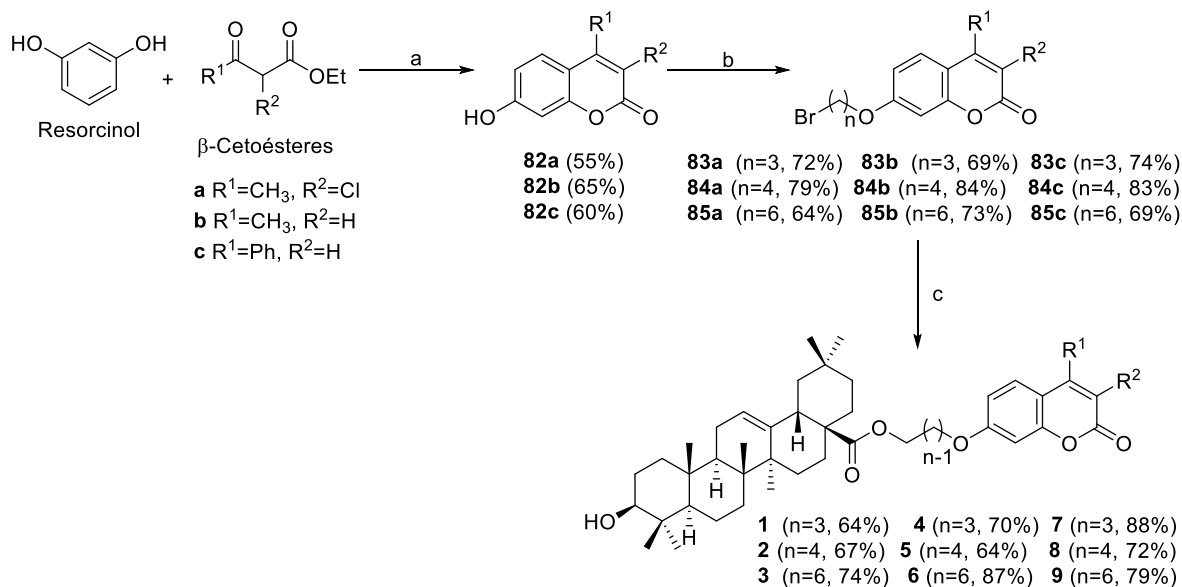


Figura 4.23. Diseño de híbridos de ácido oleanólico-cumarina.

La ruta de síntesis para la obtención de estos derivados se muestra en el esquema 4.1.



Esquema 4.1. Ruta de síntesis de híbridos ácido oleanólico-cumarina. a) H_2SO_4 al 60%, 24h, t.a.; b) α,ω -Dibromoalcano, K_2CO_3 , MeCN anhidro, 4h, 65°C; c) Ácido oleanólico, K_2CO_3 , MeCN-DMF anhidro (3:1), 24h, 65°C.

Como se ha mencionado en la introducción, uno de los procedimientos más utilizados para la preparación de cumarinas es la reacción de Pechmann, la cual consiste en la condensación de fenoles, en este caso resorcinol comercial, con distintos β -cetoésteres en medio ácido (H_2SO_4 al 60%) como catalizador, para dar lugar a cumarinas sustituidas en las posiciones 3 y 4, y con un grupo hidroxilo

funcionalizable en la posición C-7. Las cumarinas se obtuvieron con un rendimiento moderado (55%–65%) tras precipitación y purificación cromatográfica.

Posteriormente, se llevó a cabo la alquilación de cada cumarina sobre el hidroxilo en la posición 7, con un exceso de diferentes α,ω -dibromoalcanos en medio básico (K_2CO_3) para la obtención de los compuestos **83–85**. Esta última es una reacción tipo Williamson para la obtención de éteres fenólicos a partir de un haluro de alquilo primario con un ion fenolato (nucleófilo) mediante un mecanismo S_N2 .¹¹¹ Finalmente, cada cumarina alquilada reaccionó con el ácido oleanólico en medio básico (K_2CO_3) para obtener el híbrido (**1–9**) mediante una reacción S_N2 del ion carboxilato sobre el grupo metileno terminal.

Esta metodología sencilla permitió la obtención de 9 ésteres derivados de ácido oleanólico con rendimientos de moderados a excelentes (64%–88%). Se observó que al aumentar ligeramente los equivalentes de base (de 1.0 a 1.5 equiv.) hubo una mejoría en los rendimientos.

Los espectros de 1H - y ^{13}C -RMN confirmaron las estructuras **1–9**. En la figura 4.24 se muestra, a modo de ejemplo, el espectro de 1H -RMN del compuesto **2**. Destacan las señales en 5.27, 3.19 y 2.85 ppm correspondientes a H-12, H-3 y H-18 del triterpenoide; los dos tripletes a 4.09 y 4.05 ppm se corresponden con los metilenos de las posiciones H-1' y H-4' de la cadena alquílica. La presencia del fragmento cumarínico se confirma mediante el patrón de señales que resuenan entre 7.51-6.80 ppm: un doblete a 7.51, con $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, asignada a H-5'', un doble de dobles a 6.89 ($J_{5'',6''}=8.9$ Hz, $J_{8'',6''}=2.4$ Hz), correspondiente a H-6'' y un doblete ($J_{8'',6''}=2.4$ Hz), de H-8''.

Igualmente, en la figura 4.25 se observa a modo de ejemplo el espectro de ^{13}C -RMN para el compuesto **2**. Destacan las señales en 177.9 y 162.0

111. Yearty K.L., Maynard R.K., Cortes C.N., Morrison, R. A multioutcome experiment for the Williamson ether synthesis. *J. Chem. Educ.* **2020**, *97*, 578–581.

correspondientes a los grupos carbonilo del triterpenoide (C-28) y de la cumarina (C-2''), respectivamente. El fragmento cumarínico se confirma por las señales entre 157.6-101.4 ppm, a excepción de las señales en 143.9 y 122.5 ppm que corresponden a C-13 y C-12 del triterpenoide, respectivamente. Con respecto a la cadena alquílica, se observan las señales en 68.2 y 63.7 ppm para los metilenos C-1' y C-4' unidos a oxígeno.

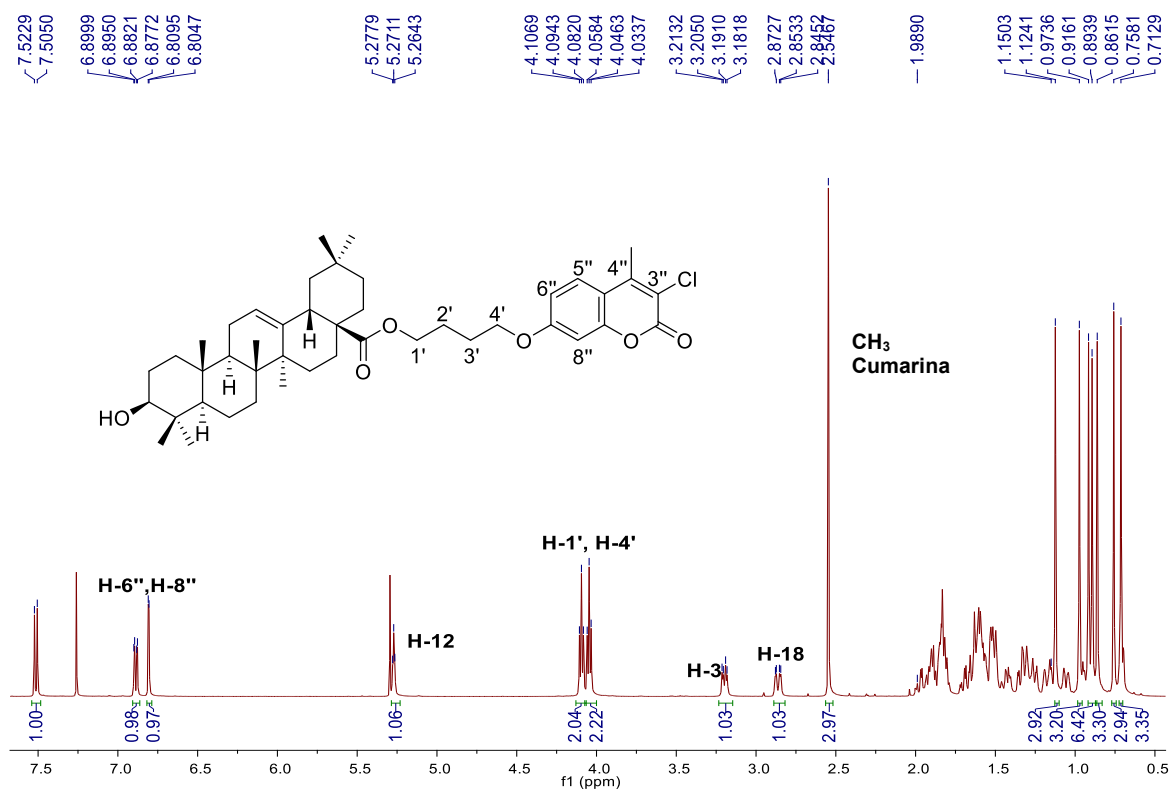


Figura 4.24. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 2.

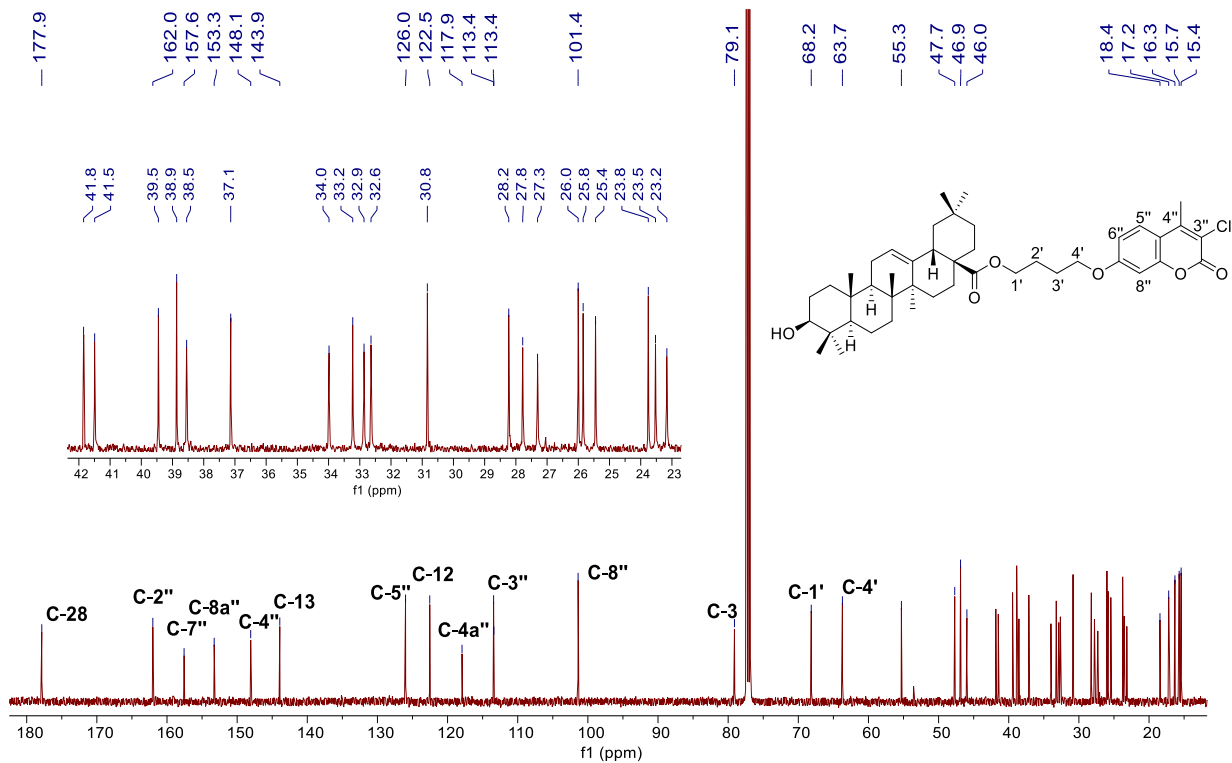


Figura 4.25. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**.

Otro ejemplo es el espectro de ^1H -RMN del compuesto **8**, el cual se muestra en la figura 4.26. Destaca el multiplete en 7.47 ppm correspondiente al grupo fenilo en C-4 de la cumarina, y una señal simple en 6.21 ppm que corresponde a H-3'' de la cumarina. Por otro lado, en el espectro de ^{13}C -RMN (figura 4.27) destacan las señales para el grupo fenilo en C-4 de la cumarina en 129.7 (Ar-Cipso), 128.9 (Ar-Cm), 128.5 (Ar-Co) y 128.1 (Ar-Cp) ppm.

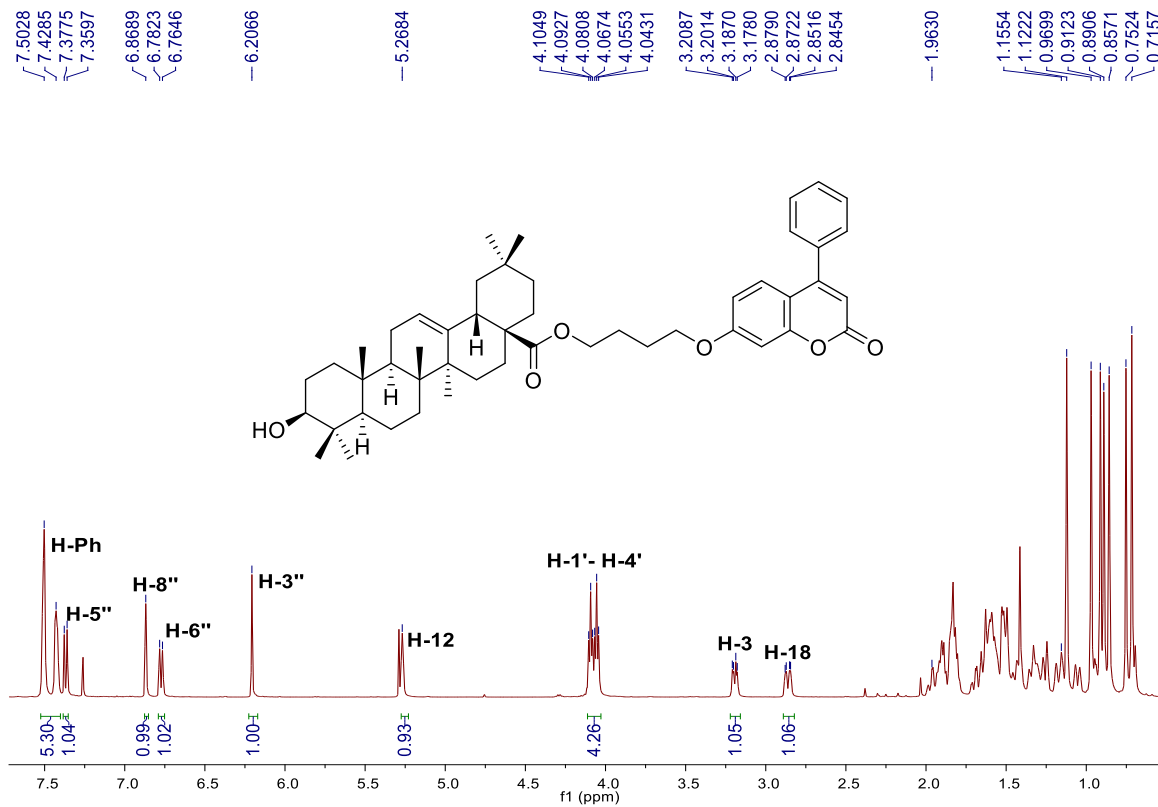


Figura 4.26. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**.

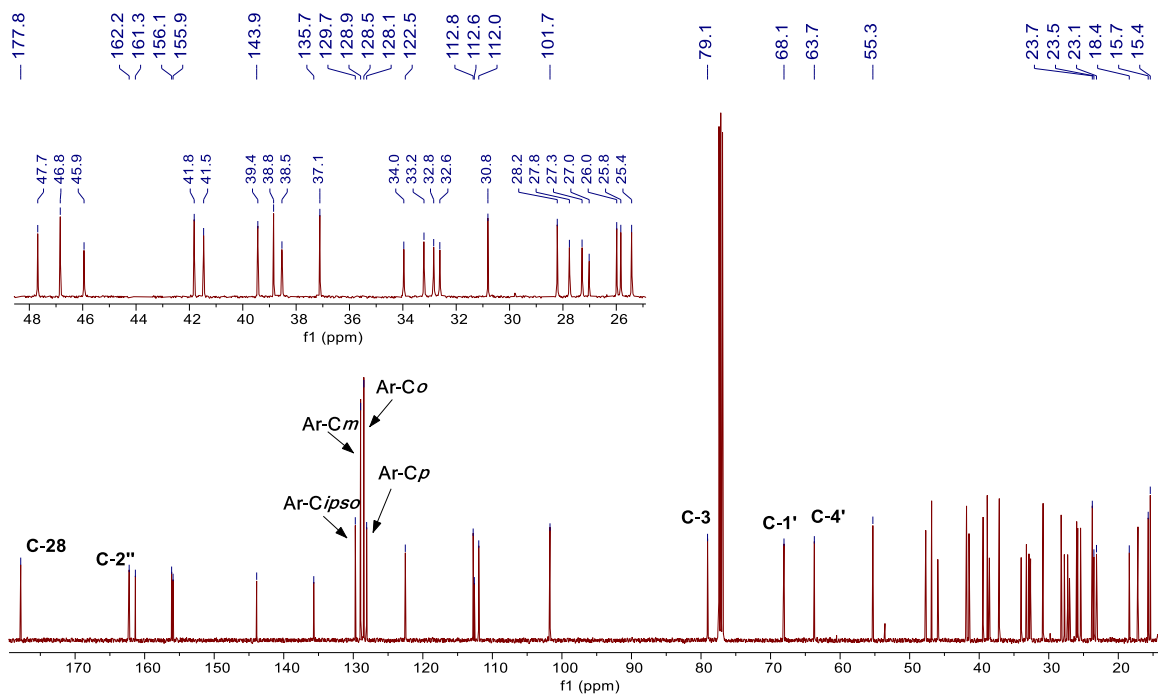


Figura 4.27. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**.

4.4.2. Derivados de selenio

En esta sección abordamos la combinación del ácido oleanólico con una función organoselénica, en concreto, selenocianato, como potenciales agentes antiproliferativos, siguiendo la estructura general mostrada en la figura 4.27. Se pretende analizar la influencia de la sustitución en C-3 y C-28, la longitud y la libertad conformacional del espaciador, así como de la naturaleza del grupo sobre C-3 (R= H, Ac) en las propiedades biológicas exhibidas.

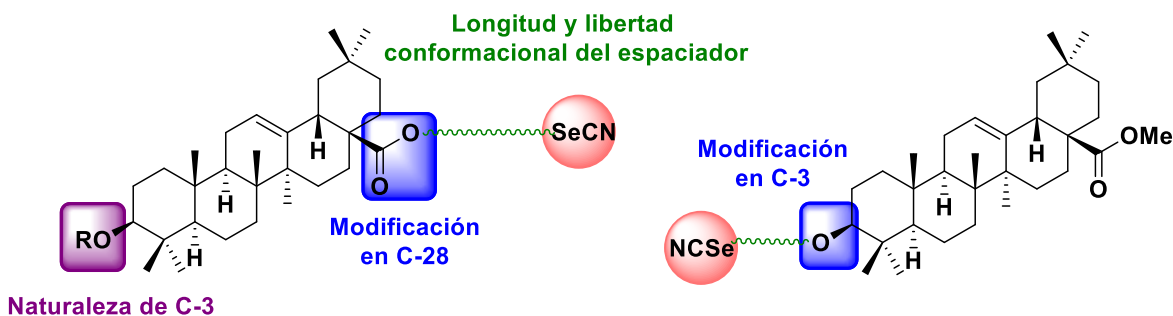
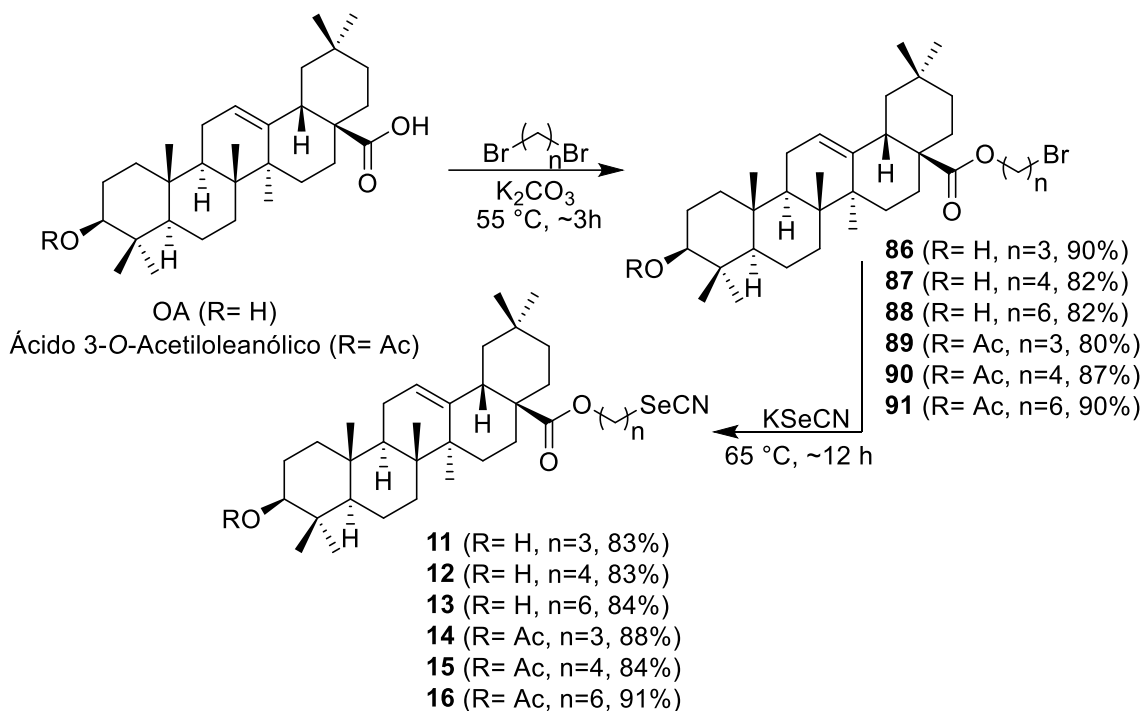


Figura 4.28. Estructura general de los híbridos ácido oleanólico-selenocianato preparados en esta Tesis Doctoral.

De esta forma, una primera aproximación para la obtención de selenocianatos del ácido oleanólico fue derivatizar la posición C-28 (ácido carboxílico), y emplear la posición C-3 tanto libre como acetilada; a tal efecto se emplearon cadenas alquílicas de diferente longitud como grupo espaciador.

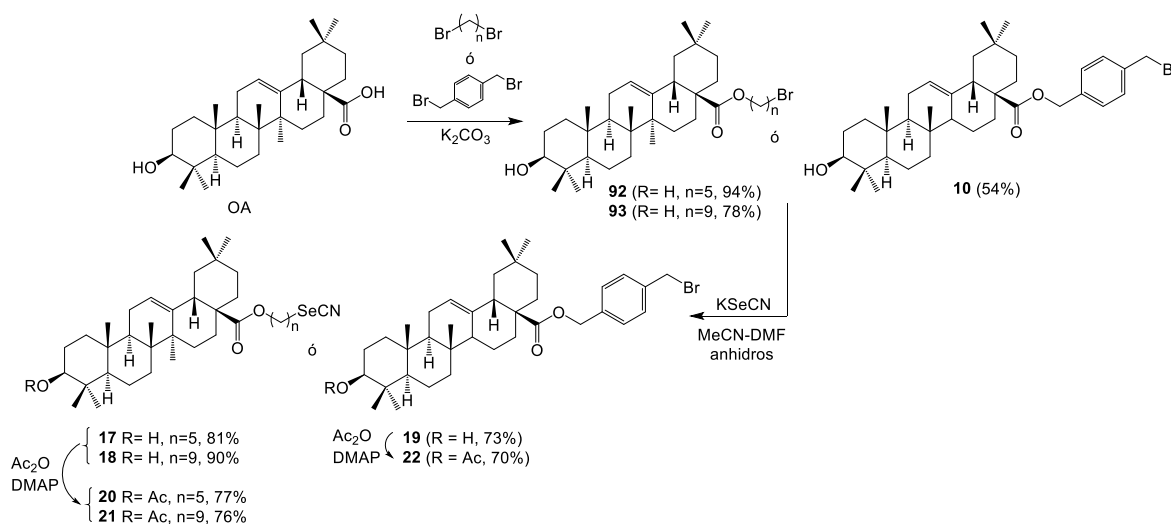
En un primer paso, se llevó a cabo la alquilación del ácido oleanólico y el ácido 3-O-acetiloleanólico en la posición C-28 empleando diversos α,ω -dibromoalcanos (1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano y 1,6-dibromohexano), en medio básico (K_2CO_3) para obtener los derivados **86–91**. Posteriormente, sobre el metileno terminal de la cadena alquílica se llevó a cabo una sustitución nucleofílica con $KSeCN$, realizada en condiciones anhidras y de oscuridad para la obtención de los selenoderivados **11–16** (esquema 4.2).



Esquema 4.2. Ruta de síntesis para la obtención de selenocianatos de ácido oleanólico.

Se obtuvieron así un total de 6 selenoderivados de ácido oleanólico (compuestos **11–16**) con rendimientos de buenos a excelentes (83–91%). La caracterización espectroscópica se describe en la sección de metodología.

Alternativamente, y con objeto de comparar ambas metodologías, también se evaluó la posibilidad de realizar la síntesis invirtiendo el orden de las tres etapas implicadas. Así pues, se procedió en primer lugar a la alquilación del ácido oleanólico empleando espaciadores de tipo *p*-fenileno, pentil y nonil (compuestos **10**, **92**, **93**), seguido de desplazamiento nucleofílico con KSeCN (compuestos **17–19**) y, finalmente, acetilación (compuestos **20–22**), según lo indicado en el esquema 4.3. No se observaron diferencias significativas en el rendimiento global de las metodologías mostradas en los esquemas 4.2 y 4.3, por lo que ambas variantes son apropiadas para el acceso a los productos deseados.



Esquema 4.3. Ruta alternativa para la obtención de selenocianatos de ácido oleanólico.

De esta forma, en total se obtuvieron 12 selenocianatos sobre la posición C-28 del ácido oleanólico, con rendimientos de moderados a buenos. A modo de ejemplo se muestran los espectros de RMN para el selenocianato **17**. En el espectro de ^1H -RMN destacan las señales en 5.27 (H-12), 3.21 (H-3), y 2.85 (H-18) ppm, correspondientes al triterpenoide y las señales en 4.02 (H-1'), 3.05 (H-5') ppm de la cadena alquílica (figura 4.29). La señal en 101.4 ppm del espectro de ^{13}C -RMN (figura 4.30) se asigna al grupo selenocianato, lo cual confirma la incorporación de éste; este desplazamiento químico coincide con selenocianatos alifáticos preparados previamente en nuestro grupo de investigación.¹¹²

112. Roldán-Peña J. M., Puerta A., Dinić J., Stojanov S.J., González-Bakker A., Hicke F.J., Mishra A., Piyasaengthong A., Maya I., Walton J.W., Pešić M., Padrón J.M., Fernandez-Bolaños J.G., López Ó. Biotinylated selenocyanates: Potent and selective cytostatic agents. *Bioorg. Chem.* **2023**, *133*, 106410.

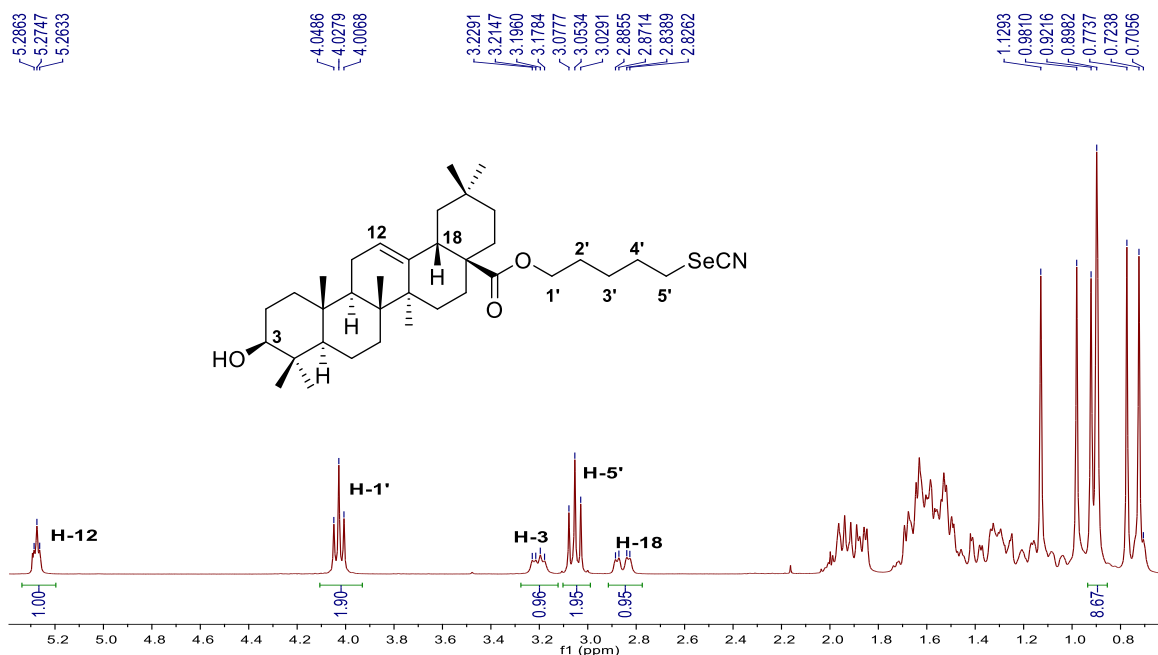


Figura 4.29. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.

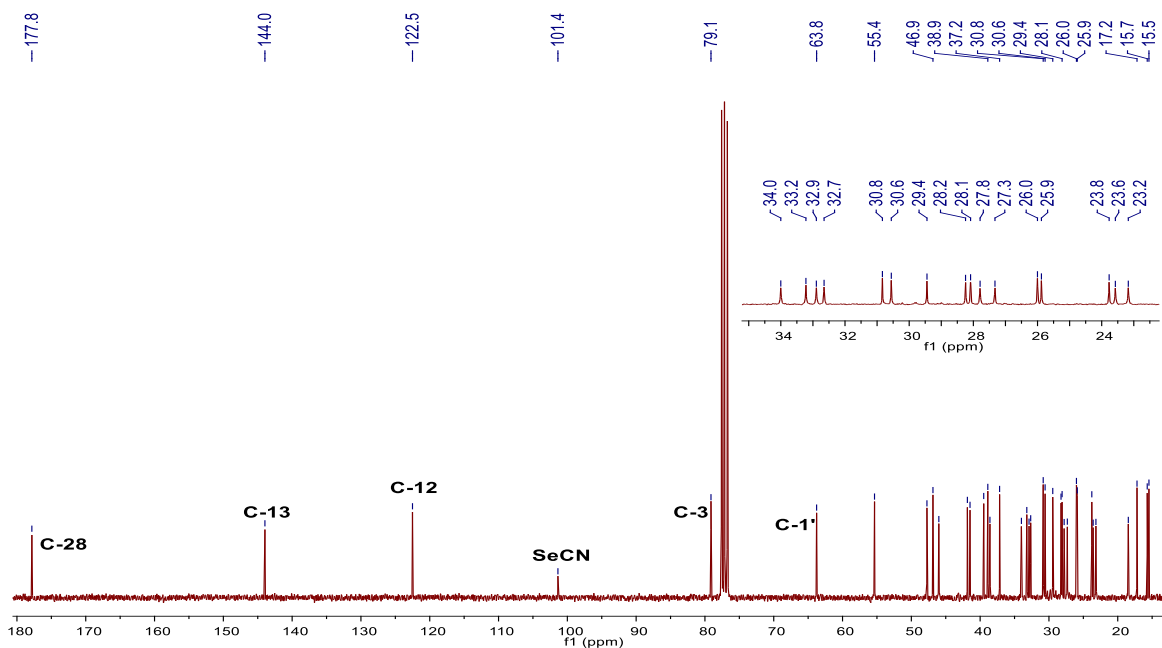


Figura 4.30. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **17**.

El derivado acetilado **20** presentó como señales representativas de ^1H -RMN a 5.28 (H-12), 4.48 (H-3), y 2.85 (H-18) ppm del triterpenoide, destacando un fuerte desapantallamiento para el H-3 (1.27 ppm) tras la acetilación de C-3; también cabe

mencionar las señales en 4.03 (H-1'), 3.05 (H-5') ppm de la cadena alquílica. La acetilación se confirmó por la señal simple a 2.04 ppm característico de metilo de acetilo (figura 4.31). Con respecto a los datos de ^{13}C -RMN, se observó la señal de carbonilo de acetilo a 171.1 ppm, lo que confirma la acetilación del derivado, además de la señal para SeCN en 101.4 ppm (figura 4.32).

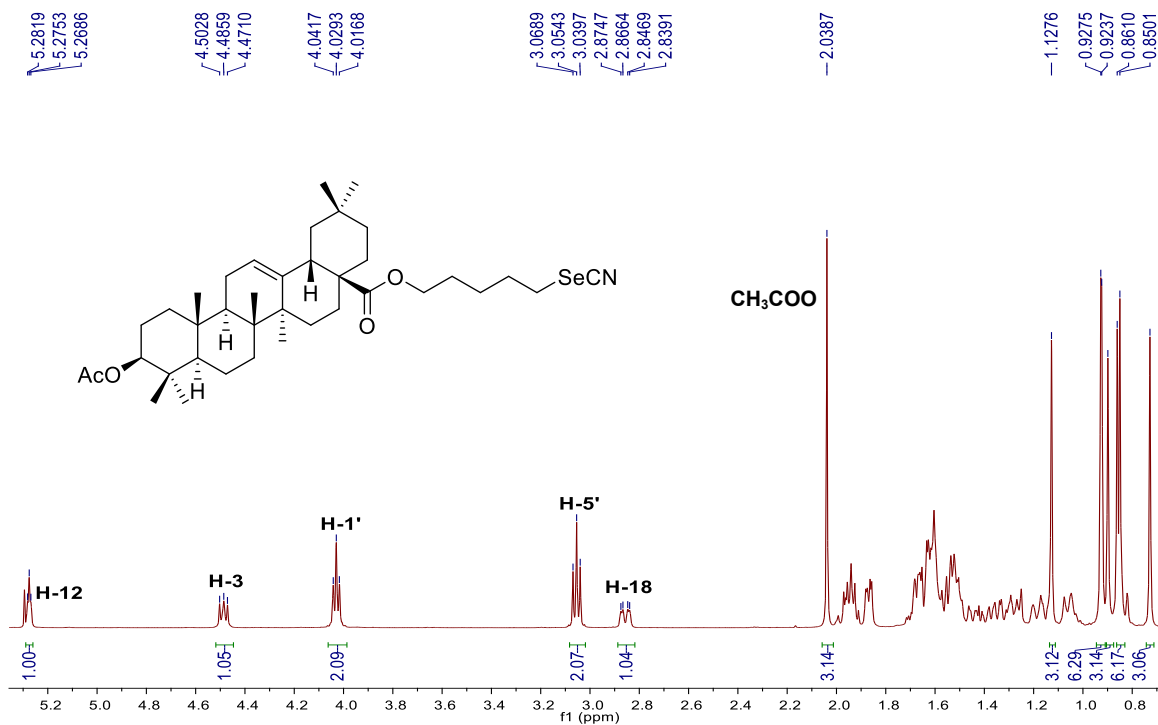


Figura 4.31. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 20.

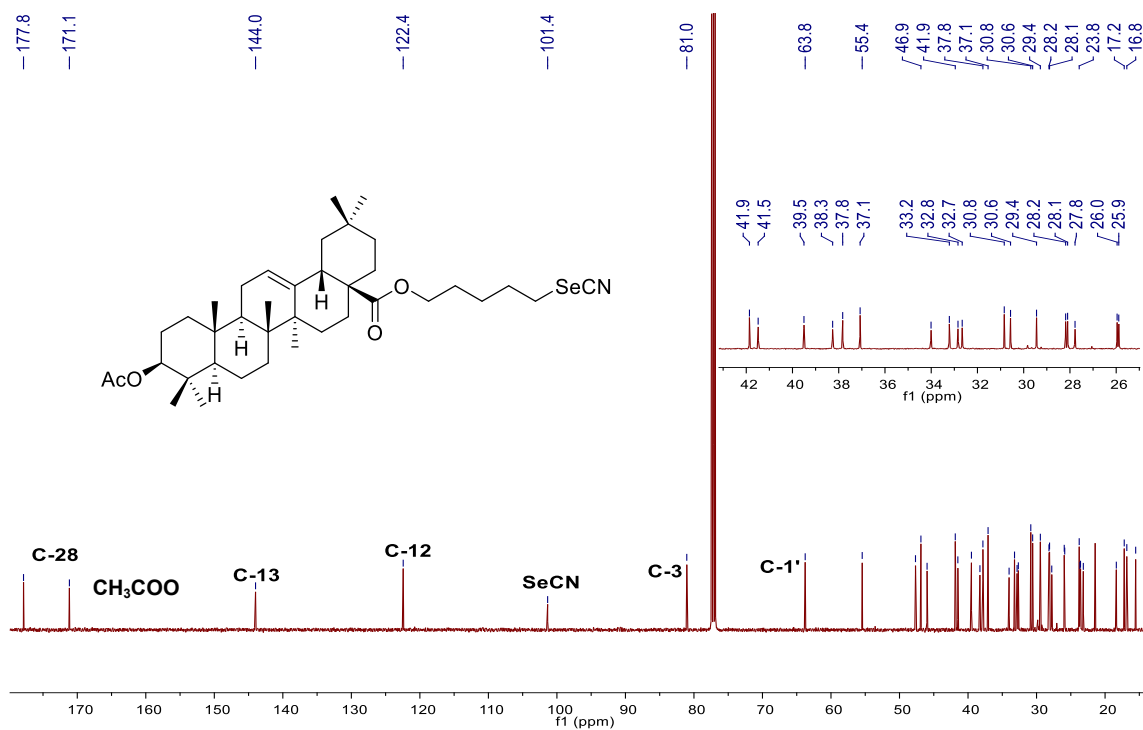


Figura 4.32. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **20**.

Para el derivado **19**, el cual presenta un espaciador de tipo *p*-fenileno, en ^1H -RMN mostró un multiplete en 7.34 ppm para los protones de fenilo, así como señales a 5.28, 3.20 y 2.89 ppm para el H-12, H-3 y H-18 respectivamente, del triterpenoide (figura 4.33). Por otro lado, en ^{13}C -RMN se observaron las señales en 137.3–128.8 ppm correspondientes al residuo de *p*-fenileno, que confirman la esterificación en C-28 del triterpenoide, mientras que a 101.8 se presenta la señal correspondiente al SeCN (figura 4.34), desplazamiento químico análogo a todos los compuestos de esta serie.

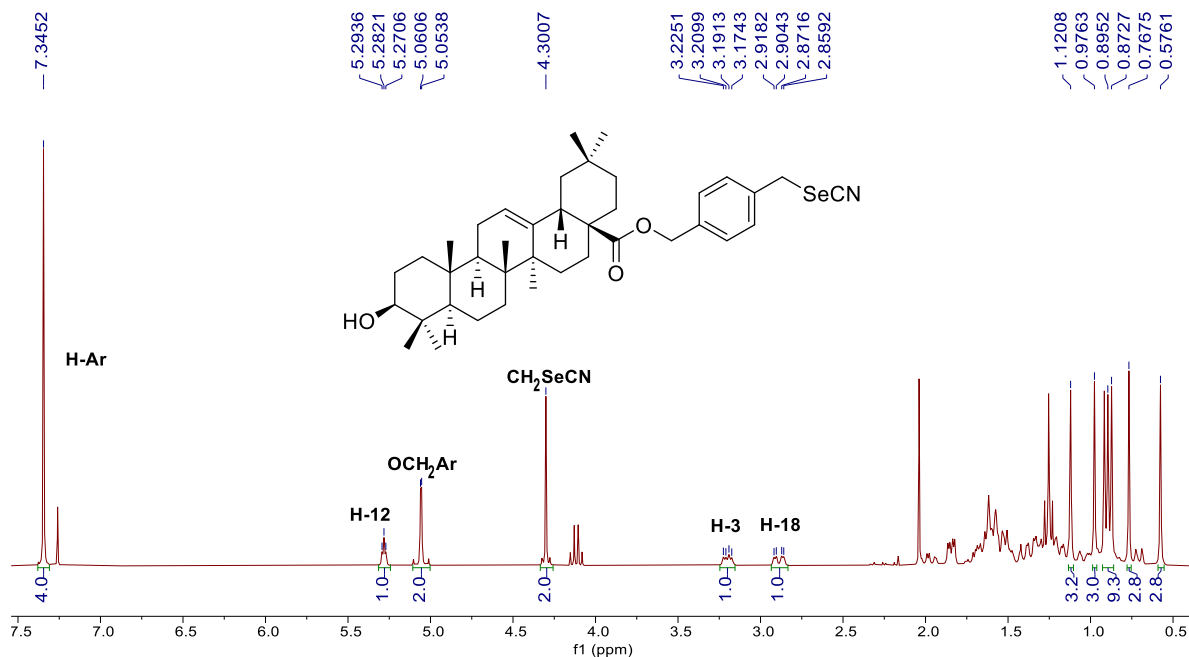


Figura 4.33. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 19.

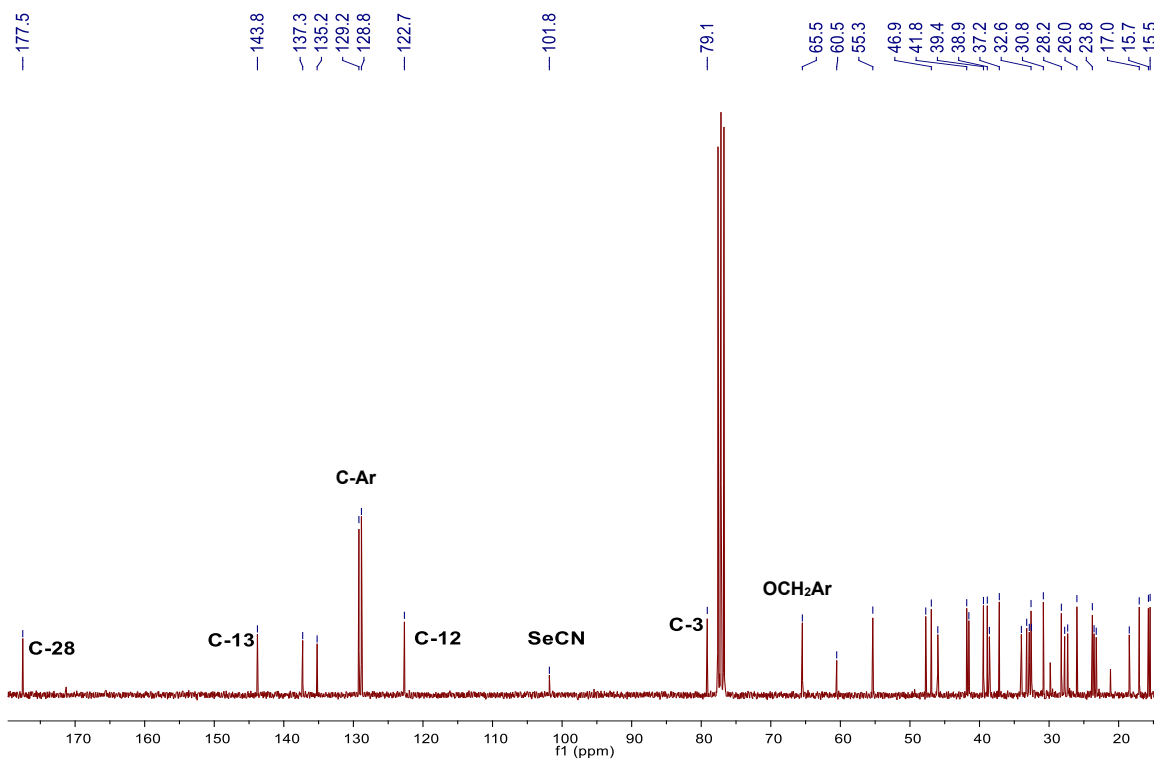


Figura 4.34. Espectro de ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) del compuesto 19.

El derivado acetilado **22** presentó de forma análoga en ^1H -RMN a 4.47 ppm la señal para H-3 por el fuerte desapantallamiento ejercido por el grupo acetilo en C-3 del triterpenoide, y un singlete en 2.03 ppm correspondiente al metilo de acetilo (figura 4.35); además en ^{13}C -RMN se observó a 171.1 ppm la señal correspondiente a carbonilo de acetilo (figura 4.36).

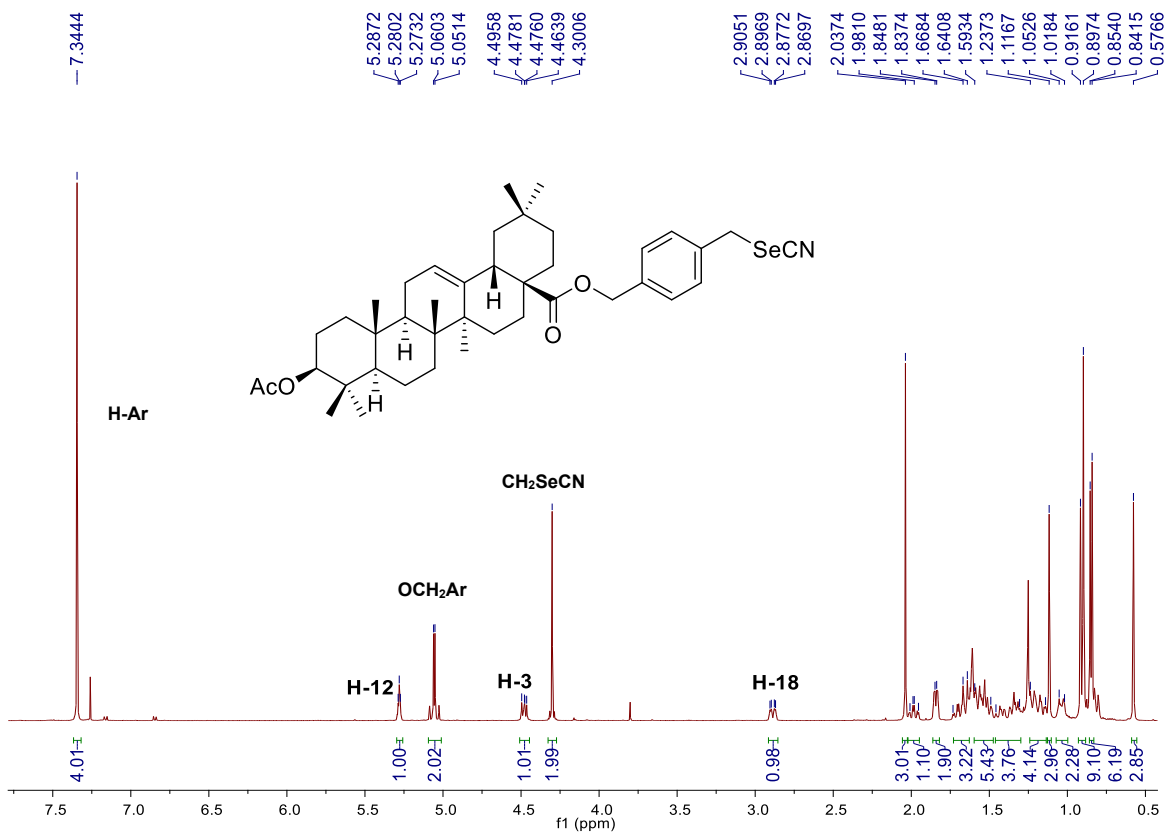


Figura 4.35. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **22**.

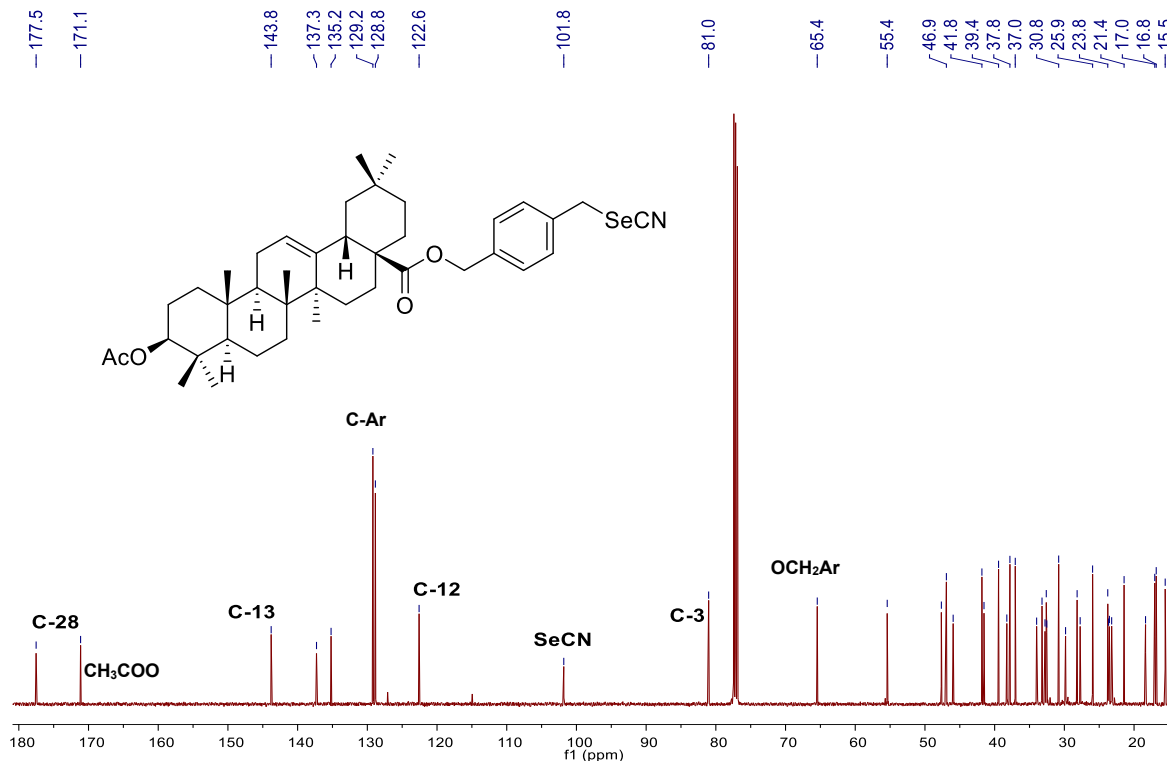


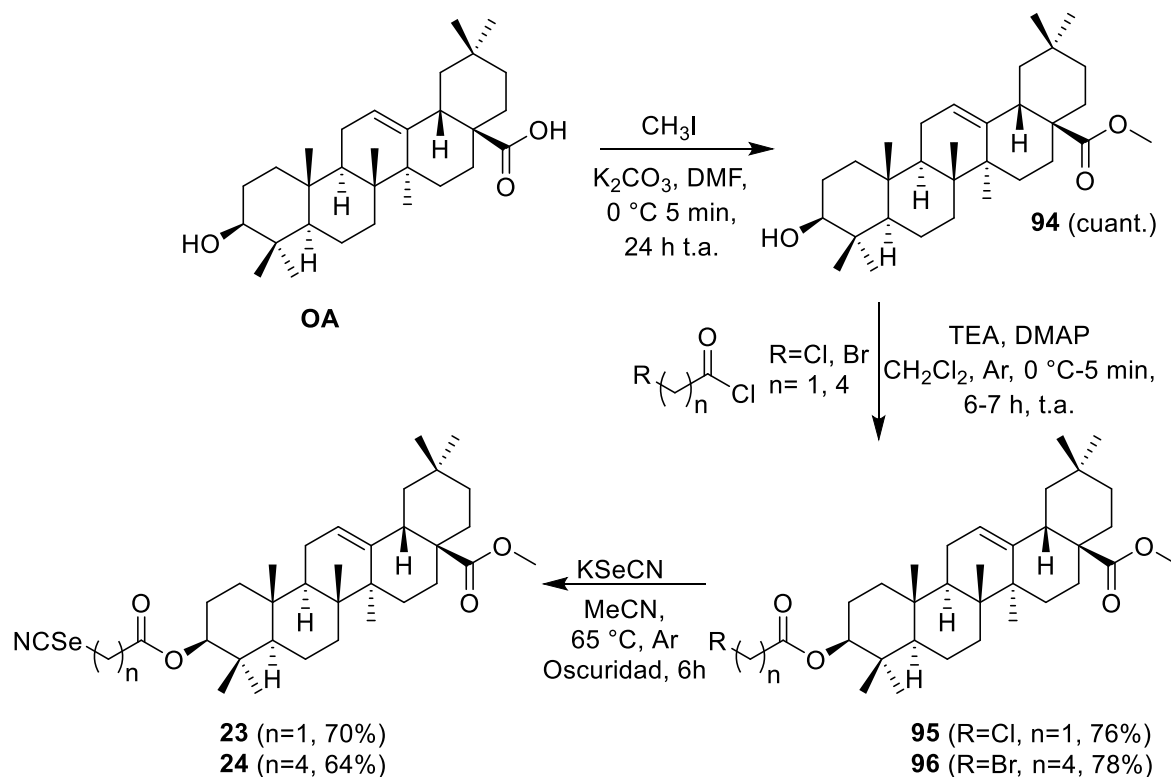
Figura 4.36. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **22**.

Para los selenocianatos en C-3 del ácido oleanólico se siguió la ruta de síntesis del esquema 4.4. Como primer paso, se llevó a cabo la transformación del grupo ácido (C-28) en éster metílico mediante la alquilación con CH_3I en medio básico (K_2CO_3) para obtener el 3 β -hidroxiolean-28-oato de metilo (**94**) con rendimiento cuantitativo.

Posteriormente, se realizó la esterificación en C-3 del ácido oleanólico con dos haluros de ácido comerciales de tamaño de cadena variable (cloruro de cloroacetilo y cloruro de 5-bromovalerilo) en medio básico (TEA) y utilizando DMAP como catalizador. Se obtuvieron así los compuestos **95** y **96** con buenos rendimientos (76 y 78%, respectivamente).

Este paso fue difícil de monitorear por cromatografía en capa fina, lo que dificultó la purificación de los ésteres en C-3. Como tercer paso, sobre el metileno terminal se llevó a cabo una sustitución nucleofílica con KSeCN , en condiciones

anhidas y de oscuridad para la obtención de los selenoderivados **23** y **24**, con rendimientos del 70 y 64%, respectivamente.



Esquema 4.4. Ruta de síntesis para la obtención de selenocianatos en C-3 de ácido oleanólico.

A modo de ejemplo, se muestran las señales características de RMN para el compuesto **24**. En ^1H -RMN se observaron como señales representativas las de 5.28, 4.51 y 2.85 ppm del H-12, H-3 y H-18 del triterpenoide; a 3.62 ppm se observa la señal del metoxilo, mientras que a 3.06 y 2.37 ppm resuenan los protones en 2' y 5' de la cadena alquílica (figura 4.37). En ^{13}C -RMN destaca la señal del carbonilo del éster en C-3 (172.8 ppm) y la señal de selenocianato en 101.4 ppm (figura 4.38), que confirman la esterificación del hidroxilo en C-3 del OA.

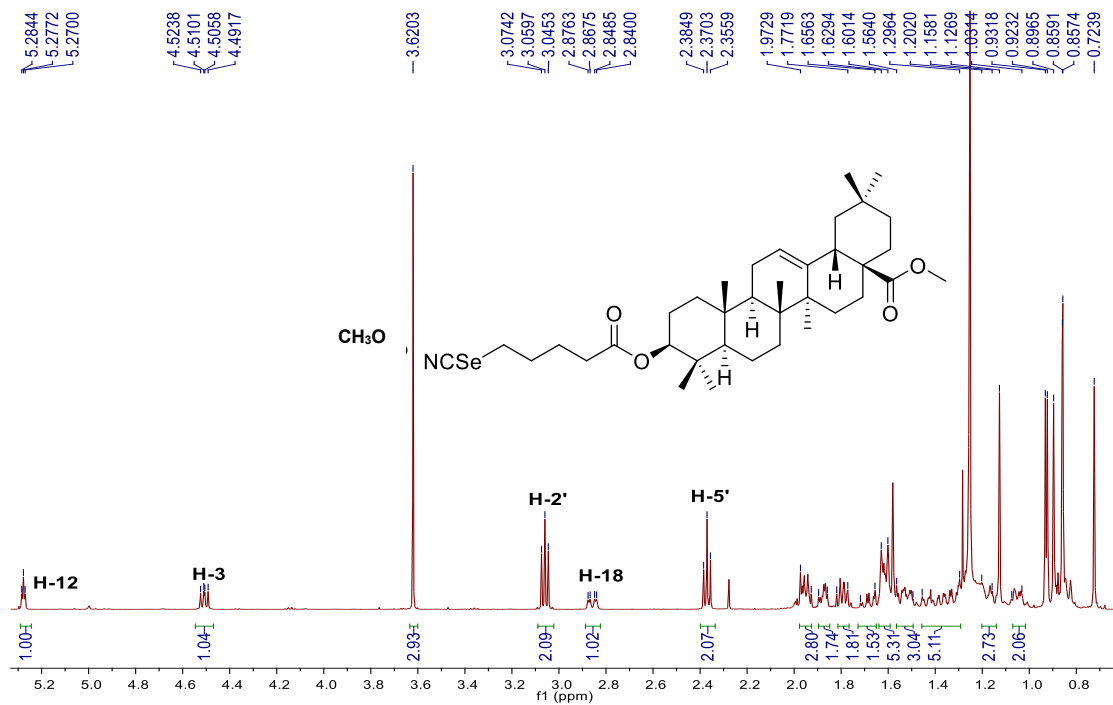


Figura 4.37. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **24**.

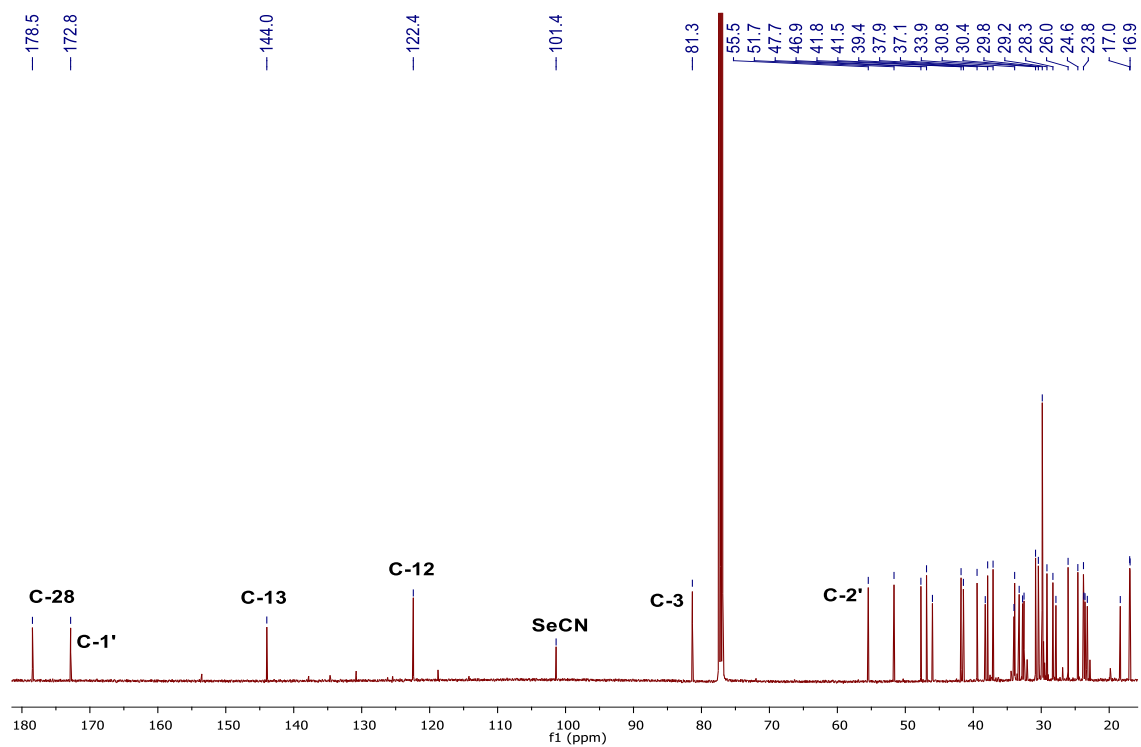


Figura 4.38. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto **24**.

5. Derivados mitocondriotrópicos

5.1. Introducción

5.1.1. Papel de la mitocondria en el cáncer

Las mitocondrias son el principal orgánulo en la célula eucariota, cuya función principal es la producción de energía, controlar el metabolismo de carbohidratos, la regulación de la transducción de señales y la muerte celular. Estos orgánulos presentan un diámetro y longitud variable entre 0.5 a 1.0 μm ,^{113,114} y además se caracterizan por poseer una doble membrana, siendo este aspecto estructural fundamental en el diseño de los compuestos abarcados en esta sección.

Las mitocondrias están conformadas por cuatro compartimentos: la membrana mitocondrial externa (OMM), el espacio intermembrana (IMS), membrana mitocondrial interna (IMM) y la matriz mitocondrial. La caracterización de este orgánulo cerrado por una doble membrana se estableció por Palade y Sjöstrand en el año 1950. Este orgánulo presenta una variabilidad estructural dependiendo del tejido, el estado fisiológico y la etapa de desarrollo, pero algunas variaciones pueden relacionarse a ciertos padecimientos en humanos.^{115,116}

Un papel importante de la mitocondria es el de almacén de cationes calcio (Ca^{2+}), siendo la membrana mitocondrial externa permeable a estos.¹¹⁷ La transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) es un aumento instantáneo de la permeabilidad hacia el espacio intermembrana a moléculas menores a los 1500 Da.

113. Roy S., Das A., Bairagi A., Das D., Jha A., Srivastava A.K., Chatterjee N. Mitochondria act as a key regulatory factor in cancer progression: Current concepts on mutations, mitochondrial dynamics, and therapeutic approach. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2024**, 793, 108490.

114. Liu P., Ho P. Mitochondria: A master regulator in macrophage and T cell immunity. *Mitochondrion*, **2018**, 41, 45–50.

115. Zick M., Rabl R., Reichert A.S. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2009**, 1793, 5–19.

116. Wang Z., Guo W., Kuang X., Hou S., Liu, H. Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective. *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**, 12, 498–508.

117. Bagur R., Hajnóczky G. Intracellular Ca^{2+} sensing: its role in calcium homeostasis and signaling. *Mol. Cell.* **2017**, 66, 780–788.

La apertura de MPT se da por ciertos estímulos causados por especies reactivas de oxígeno, aumentos de niveles de Ca^{2+} , estrés del RE, ácidos grasos o presencia de fosfato inorgánico. Sin embargo, la apertura a largo plazo del MPT es perjudicial y puede llevar a la muerte celular, mediante la liberación de citocromo c y activación de caspasas (familia de las BCL-2) que dan lugar a la apoptosis.^{118,119}

La membrana interna se caracteriza por plegarse hacia dentro y formar crestas, lo que le da mayor superficie y es donde se lleva a cabo principalmente la producción de ATP. El ATP es la fuente de energía celular y se transporta dentro de las células en procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa (OxPhos) o la glucólisis. En este mismo espacio se encuentra también la cadena de transporte de electrones, donde participa principalmente la ATP sintasa, la cual es responsable de producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.¹²⁰ Todos estos procesos metabólicos son importantes para la supervivencia celular.

El espacio intermembrana (IMS) es el menor de los compartimentos de la mitocondria y juega un papel fundamental en el transporte y modificación de proteínas, lípidos e iones metálicos, además en la regulación y montaje de los complejos de la cadena respiratoria. El IMS también está involucrado en la coordinación de los pasos claves de la muerte celular por apoptosis.¹²¹

El espacio intermembrana proporciona un espacio activo redox que promueve la oxidación de residuos de cisteína con un potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) de -220

118. Kalkavan H., Green D.R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* **2017**, *25*, 46–55.

119. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazán N.G., Bernassola F., Bertrand M., Bianchi K., Manic G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541.

120. Lu P., Bruno B., Rabenau M., Lim C.S. Delivery of drugs and macromolecules to the mitochondria for cancer therapy. *J. Control. Release*, **2016**, *240*, 38–51.

121. Vögtle F., Burkhart J.M., Rao S.R., Gerbeth C., Hinrichs J., Martinou J., Chacińska A., Sickmann A., Zahedi R.P., Meisinger C. Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol. Cell. Proteom.* **2012**, *11*, 1840–1852.

mV en células cancerígenas y de -108 a -180 mV en una célula normal debido a que la ATP sintasa está regulada negativamente por su unidad alfa mutada, lo que provoca incapacidad para utilizar el gradiente de protones formado, conllevando a su acumulación en el espacio intermembrana.¹²² Para la síntesis de ATP se requiere un gradiente electroquímico (de protones) entre IMS y la matriz mitocondrial para el correcto funcionamiento de la ATP sintasa, lo que hace que la membrana interna mitocondrial este altamente polarizada negativamente, y que lleva a concentraciones de protones más altas (mayor acidez) en el espacio intermembrana con respecto a la matriz mitocondrial, causando mayor potencial de membrana en una célula cancerosa que en una célula normal.¹²³

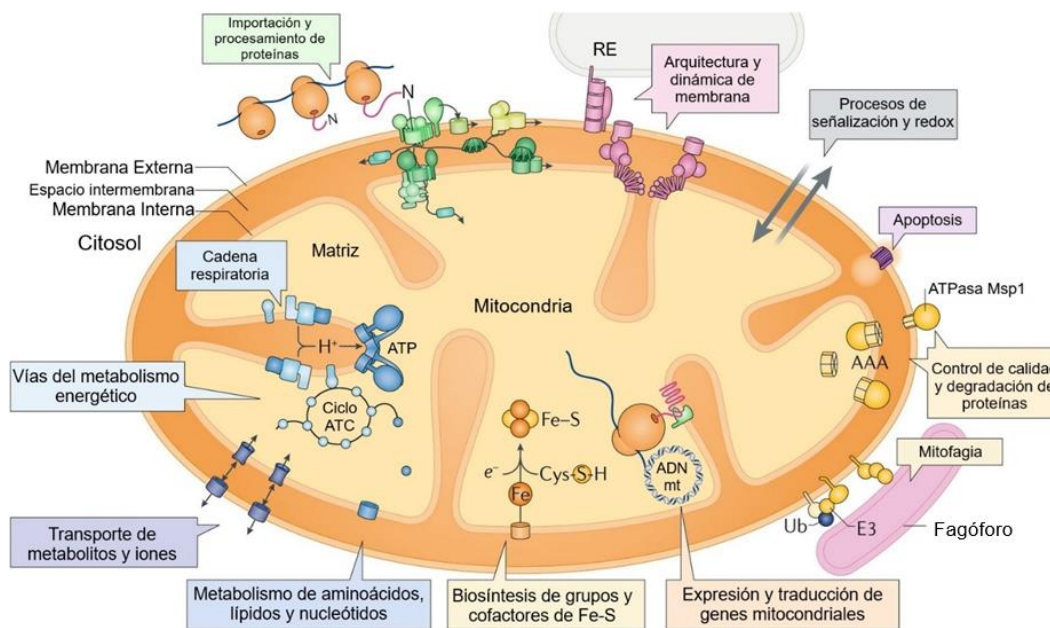


Figura 5.1. Funciones biológicas de la mitocondria. Abreviaturas: AAA, proteasas dependientes de ATP de la membrana interna; E3, ubiquitina-proteína ligasa; RE, retículo endoplásmico; ADNmt, ADN mitocondrial; ATC, ciclo del ácido tricarbóxico; Ub, ubiquitina. Adaptado de Pfanner y col.¹²⁴

122. Nuebel E., Manganas P., Tokatlidis K. Orphan proteins of unknown function in the mitochondrial intermembrane space proteome: New pathways and metabolic cross-talk. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, 1863, 2613–2623.

123. Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Pevzner I.B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., Zorov D.B. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **2018**, 552, 50–59.

124. Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, 20, 267–284.

La matriz mitocondrial contiene hasta 10 000 unidades de ADN mitocondrial (ADNmt), con estructura de doble hélice cíclica, y un tamaño de 16.6 kb. Tiene, a su vez, enzimas y cofactores implicados en una serie de reacciones y vías metabólicas, incluido el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC), la fosforilación oxidativa, la degradación de ácidos grasos, el ciclo de la urea y la gluconeogénesis.¹²⁵

Se estima que, entre el 0.2–2.0% del oxígeno consumido por la mitocondria en la cadena respiratoria, se reduce hasta anión superóxido y otras especies reactivas del oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno. De hecho, las mitocondrias son responsables de la generación de aproximadamente un 90% de los ROS celulares.¹²⁶

Los ROS liberados por las mitocondrias provocan la oxidación de lípidos y proteínas, daño al ADNmt/ARNmt, la activación de los canales dependientes de Ca^{2+} , así como la activación y liberación del citocromo c. Lo anterior conlleva a la formación del apoptosoma, complejo multiproteico que inicia el proceso de la muerte celular por apoptosis.¹²⁷ Es por lo anterior que las mutaciones genéticas de proteínas mitocondriales y estrés oxidativo causan disfunciones en la mitocondria que están relacionadas con padecimientos como el cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas e insuficiencia cardíaca.^{116,128}

En una célula normal, el superóxido generado en la fosforilación oxidativa se convierte a peróxido de hidrógeno mediante el superóxido dismutasa (SOD) y es

125. Singh B., Modica-Napolitano J.S., Singh, K.K. Defining the momiome: Promiscuous information transfer by mobile mitochondria and the mitochondrial genome. *Semin. Cancer Biol.* **2017**, *47*, 1–17.

126. Tirichen H., Yaigoub H., Xu W., Wu C., Li R., Li Y. Mitochondrial reactive oxygen species and their contribution in chronic kidney disease progression through oxidative stress. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 627837.

127. Dong L., Neuzil J. Targeting mitochondria as an anticancer strategy. *Cancer Commun.* **2019**, *39*, 1–3.

128. Porporato P.E., Filigheddu N., Pedro J.M.B., Kroemer G., Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res.* **2017**, *28*, 265–280.

eliminado como agua por acción de la peroxidasa.¹²⁹ Los niveles de ROS en una célula cancerígena son hasta 5000 veces más altos (~0.1 mM) con respecto a una célula normal (~20 nM). Es por ello que se postula que el control de ROS podría constituir un objetivo interesante en el diseño de fármacos anticancerígenos.¹³⁰ No obstante, existe aún bastante controversia en el tipo de compuestos que se deberían utilizar para combatir el desequilibrio entre los niveles de ROS y el sistema antioxidante en cáncer, ya que se pueden emplear agentes antioxidantes (reducción de los niveles de ROS) o agentes pro-oxidantes (incremento de los niveles de ROS para generar muerte celular probablemente por apoptosis).¹³¹

La importancia de las mitocondrias en el cáncer radica en su participación en la tumorigénesis, la progresión y resistencia terapéutica, debido a que el metabolismo mitocondrial se ve alterado, lo que favorece su rápida proliferación al tener mayor suministro energético y de otros precursores biosintéticos.¹³²

En una célula normal el ATP es producido mediante la fosforilación oxidativa, sin embargo, cuando se transforma a una célula cancerosa por agentes como la radiación, carcinógenos, oncogenes u oncoproteínas, la célula cambia su mecanismo de producción preferente de ATP mediante glucólisis. Como consecuencia, el piruvato formado se convierte a lactato y se libera extracelularmente, por lo que el pH extracelular se torna ácido ($\text{pH}_e=6.2-6.9$), mientras que el pH intracelular se torna alcalino ($\text{pH}_i=7.12-7.65$). El pH alcalino en la matriz mitocondrial podría ayudar a mejorar la solubilidad de fármacos débilmente

129. Oyewole A.O., Birch-Machin M.A. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.* **2015**, *29*, 4766–4771.

130. Weinberg F., Chandel N.S. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1177*, 66–73.

131. Kim S.J., Kim H.S., Seo Y.R. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–12.

132. Singh D. A sojourn on mitochondria targeted drug delivery systems for cancer: Strategies, clinical and future prospects. *Mitochondrion*, **2024**, *74*, 101826.

ácidos o acoplados a nanopartículas, lo que podría mejorar su afinidad hacia este tipo de células como tratamiento del cáncer.^{133–135}

Otro factor importante para la mitocondria es el oxígeno, ya que funciona como aceptor de electrones durante la síntesis de ATP, consumiéndose cerca del 85–90% de oxígeno intracelular.¹³⁶ En una célula cancerosa, el nivel de oxígeno intracelular es menor por el ambiente hipóxico de los tumores, pero el oxígeno mitocondrial presenta mayores niveles a comparación de una célula normal.^{135,137} Debido a que la síntesis de ATP es menor en mitocondrias cancerosas, el oxígeno es empleado en su mayoría para la producción de ROS lo que causa, entre otros efectos, un mayor daño al ADN, favoreciendo la tumorigénesis.¹³⁸

-
133. Shirmanova M V., Druzhkova I., Lukina M.M., Matlashov M.E., Belousov V.V., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Dudenkova V.V., Lukyanov S., Zagaynova E.V. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2015**, *1850*, 1905–1911.
134. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques.* **2011**, *50*, 98–115.
135. Cho H., Cho Y., Shim M.S., Lee J.Y., Lee H.S., Kang H.C. Mitochondria-targeted drug delivery in cancers. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*, 165808.
136. Kurokawa H., Ito H., Inoue M., Tabata K., Sato Y., Yamagata K., Kizaka-Kondoh S., Kadonosono T., Yano S., Inoue M., Kamachi T. High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10657.
137. Kueh H.Y., Niethammer P., Mitchison T.J. Maintenance of mitochondrial oxygen homeostasis by cosubstrate compensation. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1338–1348.
138. Moreno A.C.R., Olean-Oliveira A., Olean-Oliveira T., Nunes M.T., Teixeira M.F., Seraphim P.M. Resistance training prevents damage to the mitochondrial function of the skeletal muscle of rats exposed to secondary cigarette smoke. *Life Sci.* **2022**, *309*, 121017.

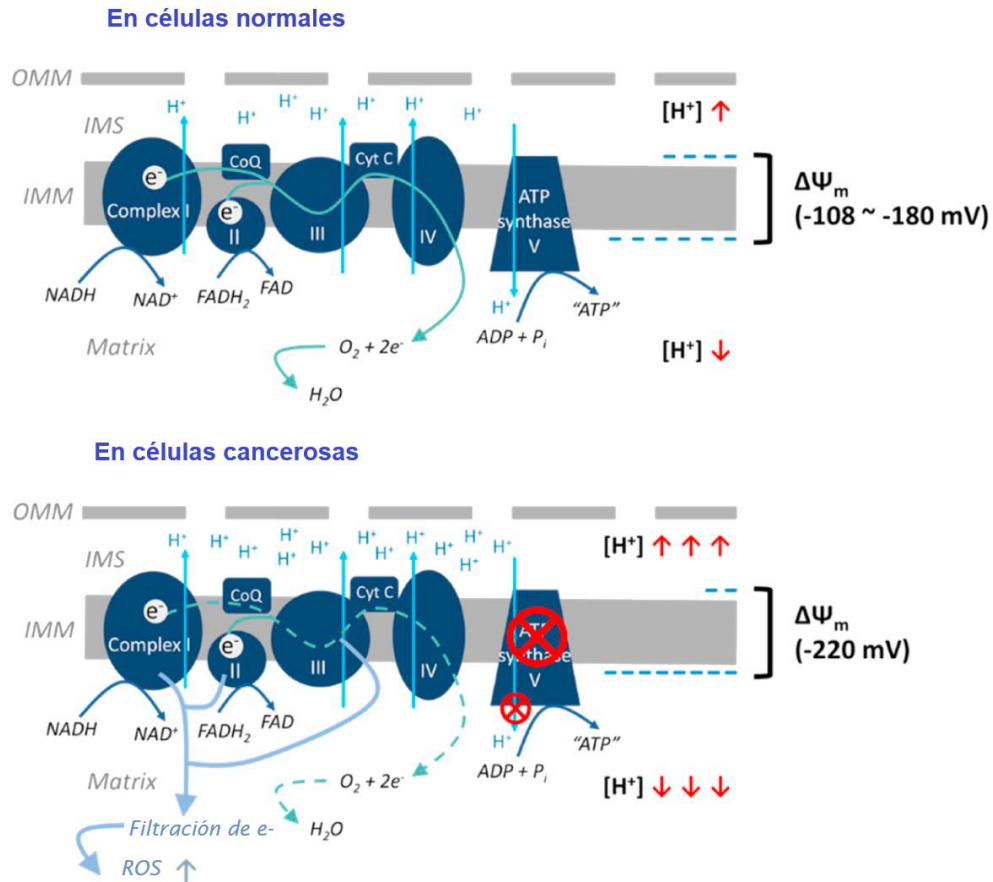


Figura 5.2. Diferencias estructurales en la membrana mitocondrial en una célula normal y una célula cancerosa. Adaptado de Cho *et al.*¹³⁵

En este sentido, un objetivo terapéutico contra el cáncer que ha generado un interés creciente en el seno de la comunidad científica en los últimos años es el diseño de moléculas con especificidad hacia la mitocondria de la célula cancerosa para reducir efectos secundarios producidos en la quimioterapia por su acción hacia otros compartimentos celulares. Sin embargo, lograr esta especificidad es complicado debido a la heterogeneidad tumoral, que causa también diferencias en las propiedades mitocondriales de células cancerosas con respecto a una célula

normal, por lo que los tratamientos se deben adaptar a esa variabilidad para dirigirse efectivamente a estas poblaciones mitocondriales en tumores.^{139–141}

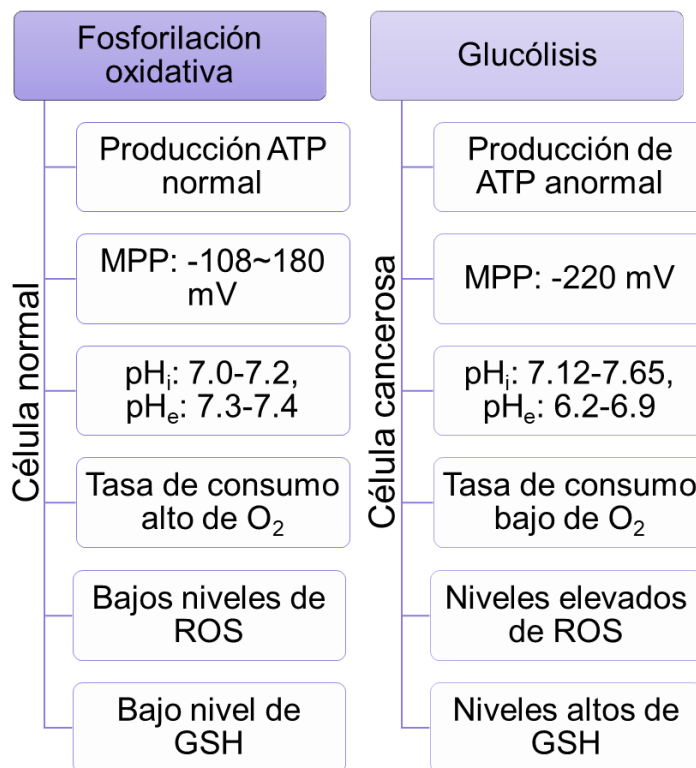


Figura 5.3. Diferencias metabólicas mitocondriales entre células normales y células cancerosas.¹³⁵

5.1.2. Tipos de agentes mitocondriotrópicos

Se denomina agente mitocondriotrópico (mitocondria + tropismo, movimiento a causa de un estímulo) a compuestos de bajo peso molecular, que, en base a sus propiedades fisicoquímicas, muestran una elevada afinidad hacia las mitocondrias y en algunos casos, cumplen la función de “vectores”. Una vez dentro de la célula,

139. Rahman K.M.M., Bist G., Kumbham S., Foster B.A., Woo S., You Y. Mitochondrial targeting improves the selectivity of singlet-oxygen cleavable prodrugs in NMIBC treatment. *Photochem. Photobiol.* **2024**, *En prensa*, doi.org/10.1111/php.13928.

140. Allemailem K.S., Almatroudi A., Alsahli M.A., Aljaghwan A., El-Kady A.M., Rahmani A.H., Khan A. A. Novel strategies for disrupting cancer-cell functions with mitochondria-targeted antitumor drug-loaded nanoformulations. *Int. J. Nanomed.* **2021**, *16*, 3907–3936.

141. Teixeira J., Amorim R., Santos K., Soares P., Datta S., Cortopassi G.A., Serafim T.L., Sardão V. A., Garrido J., Borges F., Oliveira P.J. Disruption of mitochondrial function as mechanism for anti-cancer activity of a novel mitochondriotropic menadione derivative. *Toxicology*, **2018**, *393*, 123–139.

los agentes mitocondriotropicos pueden acumularse en la mitocondria sin requerir un sistema de administración específico, lo que ha permitido el diseño de moléculas con diferentes aplicaciones clínicas y que han ayudado a identificar distintas dianas terapéuticas, vías o mecanismos de acción en la mitocondria para diversos padecimientos.¹⁴² En la tabla 5.1 se muestran algunas de las dianas terapéuticas dentro de la mitocondria, su localización y algunos compuestos con actividad biológica sobre estos. Cuando, en particular, esos agentes mitocondriotropicos ejercen una acción antitumoral se denominan mitocans (“mitocondria” + “cáncer”).

Tabla 5.1. Dianas terapéuticas mitocondriales y compuestos con actividad sobre estas. Adaptado de: Guzman-Villanueva *et al.*¹⁴² y Milane *et al.*¹⁴³

Localización	Diana terapéutica	Compuesto
OMM	Familia de las Bcl-2	Miméticos de BH3: Gosipol Navitoclax (ABT-263) y ABT-737, Antimicina A, α -Tocoferol succinato
	VDAC: Canales aniónicos dependientes de voltaje	Geldanamicina y derivados, Derivados de arsénico, Bencil isotiocianato
	Hexoquinasa	Lonidamina, 3-Bromopiruvato (Inhibidor del complejo II), 2-Desoxiglucosa
	BzPR: Receptor benzodiazepina mitocondrial	PK11195, Endozepina, Protoporfirina IX, Triacontatetra-neuropéptido, Fosfolipasa A2, Ro5-4864, XK469, 4'-Clorodiazepam,

142. Guzmán-Villanueva D., Weissig V. Mitochondria-targeted agents: Mitochondriotropics, Mitochondriotoxics, and Mitocans. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, 240, 423–438.

143. Milane L., Trivedi M.S., Singh A., Talekar M., Amiji M.M. Mitochondrial biology, targets, and drug delivery. *J. Control Release*, **2015**, 207, 40–58.

		BBL22, FGIN-1-27, SSR180575
	P-gp: Glicoproteína-P	Sustratos de P-gp: Digoxina, Fexofenadina, Indinavir, Vincristina, Colchicina, Topotecan, Paclitaxel, Rodamina
	Translocasa de la membrana externa	Ceramida
	Bax	Activadores como ABT-737
	Otros	Trifenilfosfonio, Mito Q, MKT-077, F-16
	Adenina nucleótido translocasa	Ácido de Bongkrek, Carboxiatractilósido
IMM	Complejo I	Inhibidor: Rotenona, <i>Anonaceous acetogenina</i> , Metformina
	Complejo II	Vitamina E y análogos
	Complejo III	Inhibidores: Antimicina A, Mixotiazol
	Complejo IV	Inhibidor: Cianuro
	Complejo V	Oligomicina, Apoptolidinas, Bz- 423, Resveratrol, Dindolil metano, Aurovertina, PK11195
	ROS scavenger	Péptidos Szeto-Schiller
	Bloqueador de canal MitoK _{ATP} (canal de potasio regulador de ATP mitocondrial)	Glibenclamida, Ácido 5- hidroxidecanoico, MCC-134
	Abridor de canal MitoK _{ATP} (canal de potasio regulador de ATP mitocondrial)	Diazoxido, Nicorandil, BMS180448, BMS-191095
	Proteínas desacopladas	2,4-Dinitrofenol,

		[(3-clorofenil)hidrazo]malononitrilo
	Piruvado deshidrogenasa quinasa	Dicloroacetato
	Receptores mitocondriales de estrógenos	Tamoxifen, Derivados de estrógenos
Matriz mitocondrial	DNA mitocondrial	Ciprofloxacino
	Ciclofilina (Cyp)	Ciclosporina A
	Activadores generales de apoptosis por la vía intrínseca	Paclitaxel, Antraciclinas, Trióxido de arsénico, Irinotecan, 5-Fluorouracilo, Cisplatino, Ácido betulínico, Doxorubicina,

Una de las vías para el diseño de fármacos anticancerígenos es aprovechar el potencial de membrana mitocondrial, el cual es mayor en células cancerígenas con respecto a las células normales (potencial más negativo), lo que permite una administración selectiva hacia células malignas, mediante el uso de ciertos “vectores”.¹⁴⁴ Las principales estrategias para el diseño de moléculas mitocondriótropas es utilizando moléculas pequeñas (cationes lipofílicos), péptidos, liposomas y nanopartículas cargadas.^{120,145}

144. Zielonka J., Joseph J., Sikora A., Hardy M., Ouari O., Vásquez-Vivar J., Cheng G., López M., Kalyanaraman B. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: Syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10043–10120.

145. Qin J., Gong N., Liao Z., Zhang S., Timashev P., Huo S., Liang X. Recent progress in mitochondria-targeting-based nanotechnology for cancer treatment. *Nanoscale*, **2021**, *13*, 7108–7118.

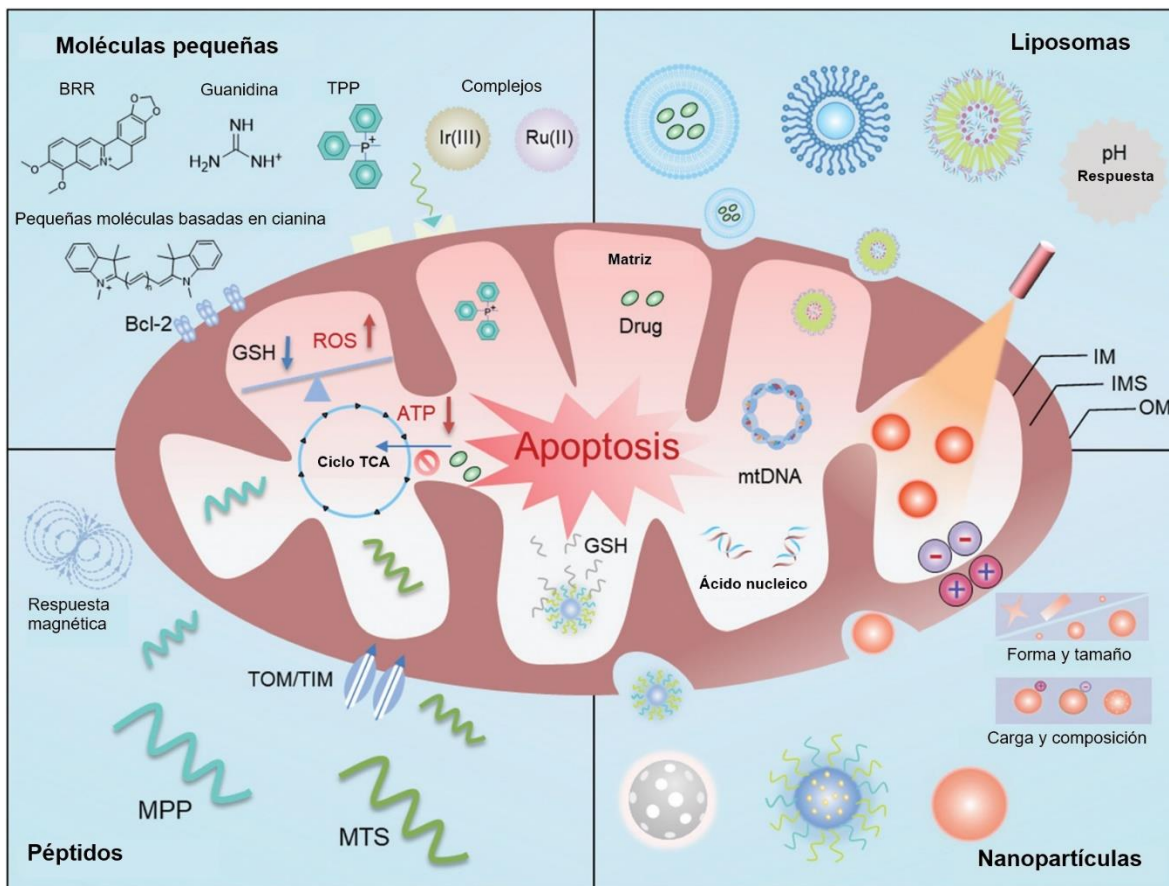


Figura 5.4. Principales agentes mitocondriotropos para la construcción de agentes anticancerígenos. Adaptado de Qin *et al.*¹⁴⁵

5.1.2.1. Cationes lipofílicos deslocalizados (DLCs)

Algunos cationes lipofílicos como el Verde de Janus y Rodamina 123, fueron reportados desde los años 80's, pero su mecanismo de dirigirse hacia las mitocondrias se descubrió muchos años después.¹⁴⁶

Una de las estrategias para la administración dirigida de moléculas bioactivas hacia la mitocondria es su conjugación con cationes lipófilos de bajo peso molecular, lo que les permite mayor acumulación dentro de la mitocondria gracias a su carga catiónica. Esta penetración es más fácil debido al mayor potencial de membrana en las células cancerígenas ($\Delta\Psi_m = -220$ mV), lo que además le confiere mejor

146. Smith R.A., Hartley R.C., Murphy M.P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid. Redox. Signal.* **2011**, *15*, 3021–3038.

selectividad.^{144,147} Entre los cationes lipofílicos capaces de penetrar la membrana mitocondrial destacan la Rodamina-123, la rodacianina MKT-077, el decualinio (DQA), trifenilfosfonio (TPP⁺), guanidinio y el recientemente descubierto F16 (figura 5.5).¹⁴⁷

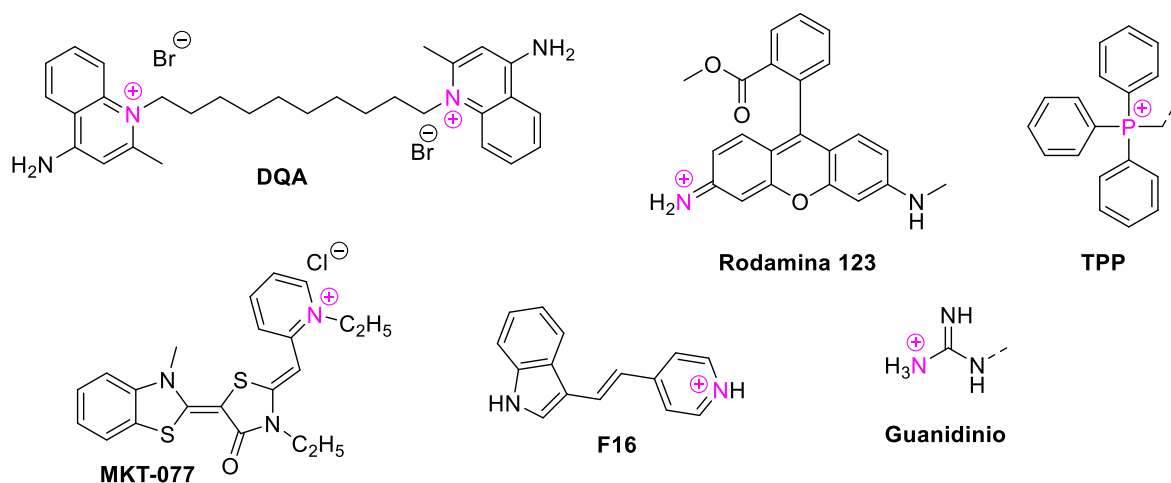


Figura 5.5. Ejemplos de cationes lipofílicos dirigidos hacia la mitocondria.

Derivados acoplados a DQA han mostrado efecto inhibitorio hacia la enzima NADH-ubiquinona reductasa, perteneciente a la cadena respiratoria de la mitocondria, en la sobreproducción de ROS y en la apertura del poro MPT dependiente de calcio.¹⁴⁸ La rodamina-123 es capaz de acumularse dentro de la matriz mitocondrial e inhibe a la ATP sintasa afectando las funciones bioenergéticas de la mitocondria y algunos derivados sintéticos que incorporan aminas han mostrado buena actividad antiproliferativa.^{149,150}

147. Spivak A.Y., Nedopekina D.A., Gubaidullin R.R., Dubinin M.V., Belosludtsev K.N. Conjugation of natural triterpenic acids with delocalized lipophilic cations: Selective targeting cancer cell mitochondria. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 470–489.

148. Modica-Napolitano J.S., Weissig V. Treatment strategies that enhance the efficacy and selectivity of mitochondria-targeted anticancer agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 17394–17421.

149. Behera P.C., Karmakar V., Ghosh A., Dey S., Rangra N.K., Bag B. Anti-cancer potential of substituted “amino-alkyl-rhodamine” derivatives against MCF-7 human breast cancer cell line. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2023**, *396*, 1001–1007.

150. Allemailem K.S., Almatroudi A., Alsahli M.A., Aljaghawani A., El-Kady A.M., Rahmani A.H., Khan A. A. novel strategies for disrupting cancer-cell functions with mitochondria-targeted antitumor drug-loaded nanoformulations. *Int. J. Nanomedicine*, **2021**, *16*, 3907–3936.

El derivado F-16 ha sido recientemente descubierto y se acumula selectivamente en la matriz mitocondrial de células tumorales. Altas concentraciones de este catión inducen la muerte celular mediante la interrupción de la cadena respiratoria, disminución de los niveles intracelulares de ATP e inducción de la apoptosis.^{151,152}

El análogo derivado de rodacianina MKT-077 es un catión lipófilo soluble en agua y presenta la capacidad de inhibir miembros de la familia HSP70 mitocondrial (*Heat Shock Protein*, proteína sobreexpresada en situación de estrés celular) lo que provoca la desestabilización de la membrana mitocondrial; sin embargo, algunos estudios clínicos de derivados de MKT-077 han mostrado toxicidad renal,^{153,154} lo que reduce su posibilidad de aplicación clínica.

Uno de los cationes lipófilos más utilizados es el trifenilfosfonio (TPP⁺), el cual presenta una carga positiva estabilizada por la presencia de tres grupos fenilo, y normalmente se acopla a moléculas bioactivas mediante un conector alifático.^{155,156} Fue implementado por primera vez por Murphy *et al.* mediante la síntesis de

-
151. Peng Y., Zha, Z L., L, T., Xi, G J., Chen, J., Den, T.G., Sun Y., Li X., Hu X., Zhang X.B., Ye M., Tan W.A Multi-mitochondrial anticancer agent that selectively kills cancer cells and overcomes drug resistance. *Chem. Med. Chem.* **2017**, *12*, 250–256.
152. Spivak A.Y., Nedopekina D.A., Gubaidullin R.R., Davletshin E., Tukhbatullin A.A., D'yakonov V. A., Yunusbaeva M.M., Dzhemileva L.U., Dzhemilev U.M. Pentacyclic triterpene acid conjugated with mitochondria-targeting cation F16: Synthesis and evaluation of cytotoxic activities. *Med. Chem. Res.* **2021**, *30*, 940–951.
153. Hong S., Starenki D., Johnson O.T., Gestwicki J.E., Park J.I. Analogs of the heat shock protein 70 inhibitor MKT-077 suppress medullary thyroid carcinoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1063–1076.
154. Shao H., Li X., Moses M.A., Gilbert L.A., Kalyanaraman C., Young Z.T., Chernova M., Journey S. N., Weissman J.S., Hann B., Jacobson M.P., Neckers L., Gestwicki J.E. Exploration of benzothiazole rhodacyanines as allosteric inhibitors of protein–protein interactions with heat shock protein 70 (Hsp70). *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6163–6177.
155. Chen Z., Li M., Zhang L., He J., Wu L., Xiao Y., Duan J., Cai T., Li W. Mitochondria-targeted drug delivery system for cancer treatment. *J. Drug Target.* **2015**, *24*, 492–502.
156. Zinovkin R.A., Zamyatnin A.A. Mitochondria-targeted drugs. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2019**, *12*, 202–214.

bromuro de tiobutiltrifenilfosfonio.¹⁵⁷ El acoplamiento de TPP a moléculas bioactivas tiene como ventaja la vectorización de estos derivados hacia la mitocondria, mejorar sus propiedades lipofílicas e hidrofílicas y una síntesis y purificación sencillas.¹⁴⁴ Los derivados de TPP tienen tendencia a unirse a biomembranas, como consecuencia de su carga y lipofilicidad. De esta forma, la fracción cargada tiende a asociarse a la cabeza de los fosfolípidos, cargadas negativamente, y si el resto de la molécula es lipófila puede acumularse en el espacio intermembrana y en la matriz.¹⁵⁸ De esta forma, el principal mecanismo de acción de TPP es mediante su acumulación en la mitocondria de células cancerosas, aumentando la generación de ROS, induciendo la muerte celular por apoptosis.¹⁵⁹

5.1.2.2. Péptidos mitocondriotrópicos

Comparado con los cationes lipofílicos, los péptidos presentan un gran potencial para el diseño de agentes mitocondriotrópicos debido a la biocompatibilidad con los componentes celulares, lo que disminuye su toxicidad. Los péptidos de penetración mitocondrial (MPPs) están conformados por 4–16 aminoácidos, que contienen un resto catiónico (arginina, lisina) y un resto hidrofóbico (fenilalanina, tirosina e isoleucina) y su efectividad para dirigirse hacia la mitocondria dependerá del potencial de membrana y su lipofilicidad y han funcionado como una poderosa herramienta para el diseño de moléculas antineoplásicas (figura 5.6).^{145,160}

157. Burns R.J., Smith R A., Murphy M. Synthesis and characterization of thiobutyltriphenylphosphonium bromide, a novel thiol reagent targeted to the mitochondrial matrix. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 322, 60–68.

158. Szabó I., Zoratti M., Biasutto L. Targeting mitochondrial ion channels for cancer therapy. *Redox Biol.* **2021**, 42, 101846.

159. Neužil J., Dong L., Rohlena J., Truksa J., Ralph S.J. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*, **2013**, 13, 199–208.

160. Wu J., Li J., Wang H., Liu, C. Mitochondrial-targeted penetrating peptide delivery for cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, 15, 951–964.

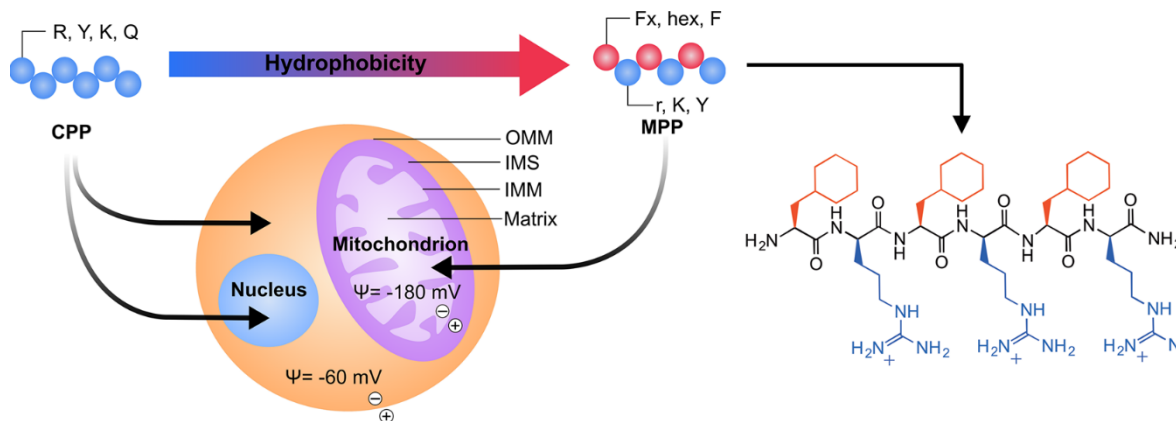


Figura 5.6. Optimización para el diseño de péptidos penetrantes de células (CPP) y de mitocondrias (MPP). Abreviaturas: Fx, ciclohexilalanina; hex, hexilo; r, D-arginina; OMM; membrana mitocondrial externa; IMS, espacio intermembrana; IMM, membrana mitocondrial interna. Imagen tomada de Jean *et al.*¹⁶¹

Una clase de péptido mitocondriotrópico son los denominados *Szeto-Schiller* (SS). Estos están formados por aminoácidos aromáticos y básicos alternados (10 aminoácidos de carga +3 y un D-aminoácido en la primera y segunda posición).¹⁶² Su mecanismo de acción es la reducción de la producción de ROS, alteración de la permeabilidad mitocondrial y subsecuente liberación del citocromo c.^{156,163} La función antioxidante la lleva a cabo el residuo de tirosina o dimetiltirosina. A diferencia de los cationes lipófilos, estos péptidos ingresan a la célula independientemente de la energía y libremente a pH fisiológico. Se cree que su ingreso a la mitocondria tiene lugar como consecuencia de las interacciones electrostáticas con los grupos fosfato de las cardiolipinas en la membrana interna mitocondrial.^{164,165}

161. Jean S.R., Ahmed M., Lei E.K., Wisnovsky S., Kelley S. O. Peptide-mediated delivery of chemical probes and therapeutics to mitochondria. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1893–1902.

162. Szeto, H.H. Development of Mitochondria-targeted Aromatic-cationic peptides for neurodegenerative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 112–121.

163. Szeto, H. H., Liu, S. Cardiolipin-targeted peptides rejuvenate mitochondrial function, remodel mitochondria, and promote tissue regeneration during aging. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *660*, 137–148.

164. Szeto H.H. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2029–2050.

165. Gasanoff E.S., Yaguzhinsky L.S., Garab, G. Cardiolipin, non-bilayer structures and mitochondrial bioenergetics: relevance to cardiovascular disease. *Cells*, **2021**, *10*, 1721–1745.

5.1.2.3. Nanopartículas y liposomas

El uso de nanoportadores ha permitido la vehiculización de moléculas bioactivas a sitios específicos para mejorar su eficacia y evitar el riesgo de toxicidad. Destacan nanoportadores basados en micelas, polímeros, materiales a base de carbono, liposomas, nanopartículas metálicas y dendrímeros (figura 5.7), principalmente con un enfoque quimioterapéutico.¹⁶⁶

Un nanoportador se encuentra en un rango de 10 a 200 nm de diámetro, lo que les permite el fácil acceso a diferentes tejidos, y específicamente para direccionarse a la mitocondria se conjugan con diferentes ligandos catiónicos, siendo los más empleados el TPP y DQA. Estas nanopartículas permiten mejorar problemas de solubilidad, selectividad y quimiorresistencia, permitiendo su acumulación dentro de la mitocondria.¹⁶⁷ Algunos de los mecanismos de acción de derivados de nanopartículas es la destrucción de células cancerosas selectivamente mediante la generación de ROS, alteración del potencial de membrana mitocondrial y el bloqueo de la síntesis de ATP.¹²⁷

Por otro lado, los liposomas mitocondriotrópicos (MITO-porter) se diseñaron como portadores eficientes de moléculas pequeñas o macromoléculas hacia la mitocondria. Su especificidad es debida a la presencia de cargas positivas deslocalizadas en los liposomas, principalmente derivados de DQA y TPP,¹⁶⁸ y son capaces de liberar moléculas bioactivas de diferentes tamaños y diferentes características químicas y fisicoquímicas, lo que aumenta su capacidad de

166. Zeng Z., Fang C., Zhang Y., Chen C., Zhang Y., Zhang, K. Mitochondria-targeted nanocarriers promote highly efficient cancer therapy: A review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 784602.

167. Tabish T.A., Narayan R.J. Mitochondria-targeted graphene for advanced cancer therapeutics. *Acta Biomater.* **2021**, *129*, 43–56.

168. Benien P., Almuteri M., Shah S., Böhlke M., Mehanna A.S., D'Souza G.G.M. Synthesis of triphenylphosphonium phospholipid conjugates for the preparation of mitochondriotropic liposomes. En *Methods in molecular biology-Mitochondrial Medicine* (Eds. Weissig V., Edeas M.), **2015**, Vol. 2, pp. 51–57.

transportar agentes a la mitocondria, y son una buena alternativa para el tratamiento del cáncer.^{144,145,169}

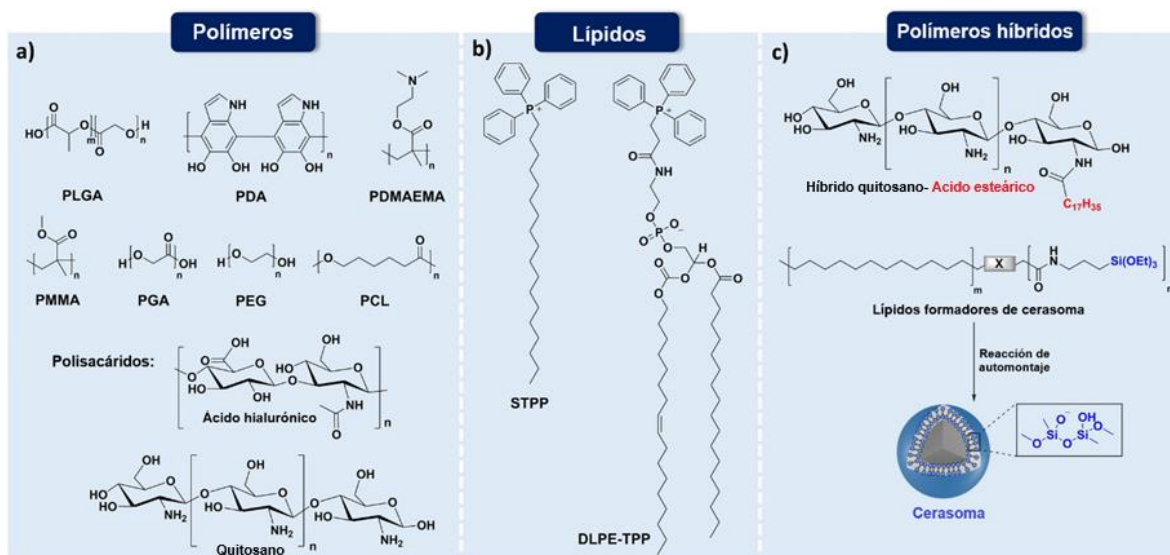


Figura 5.7. Estructuras para el diseño de nanoportadores mitocondriales. Adaptado de Liew *et al.*¹⁷⁰

Abreviaturas: PLGA, poli(ácido láctico-glicólico); PDA: poli(dopamina); PDMAEMA: poli[2-(Dimetilamino) etil metacrilato]; PMMA: poli(Metil metacrilato); PGA: poli(Ácido glicólico); PGE: poli(etilenglicol); PCL, Policaprolactona; STTP: Estearil-TPP; DLPE-TPP, 1,2-Dilauroil-*sn*-glicero-3-fosforiletanolamina-TPP.

5.1.3. Ejemplos de agentes mitocondriotrópicos con actividad antiproliferativa

Méndez y col.¹⁷¹ diseñaron diferentes *o*-carbonilhidroquinonas bicíclicas conectadas a un catión de trifenilfosfonio mediante una cadena alquílica corta (figura 5.8), con la finalidad de evaluar su efecto antiplaquetario evitando la formación de coágulos, y mejorando de esta manera la salud cardiovascular. El derivado **104** fue el que mostró mejor efecto antiplaquetario y baja citotoxicidad a dosis de 10-100 μM

169. Benien P., Solomon M., Nguyen P., Sheehan E.M., Mehanna A.S., D'Souza G.G.M. Hydrophobized triphenyl phosphonium derivatives for the preparation of mitochondriotropic liposomes: choice of hydrophobic anchor influences cytotoxicity but not mitochondriotropic effect. *J. Liposome Res.* **2015**, *26*, 21–27.

170. Liew S.S., Qin X., Zhou J., Li L., Huang W., Yao S Q. Smart design of nanomaterials for mitochondria-targeted nanotherapeutics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 2232–2256.

171. Méndez D., Tellería F., Monroy-Cárdenas M., Montecino-Garrido H., Mansilla S., Castro L., Trostchansky A., Muñoz-Córdova F., Zickermann V., Schiller J., Alfaro S., Caballero J., Araya-Maturana R., Fuentes E. Linking triphenylphosphonium cation to a bicyclic hydroquinone improves their antiplatelet effect via the regulation of mitochondrial function. *Redox Biol.* **2024**, *72*, 103142.

en plaquetas, al dirigirse y acumularse correctamente a la mitocondria gracias a la unión con el catión TPP⁺. El mecanismo de acción propuesto fue la actividad a nivel de OxPhos, alterando la producción de ROS mitocondrial.

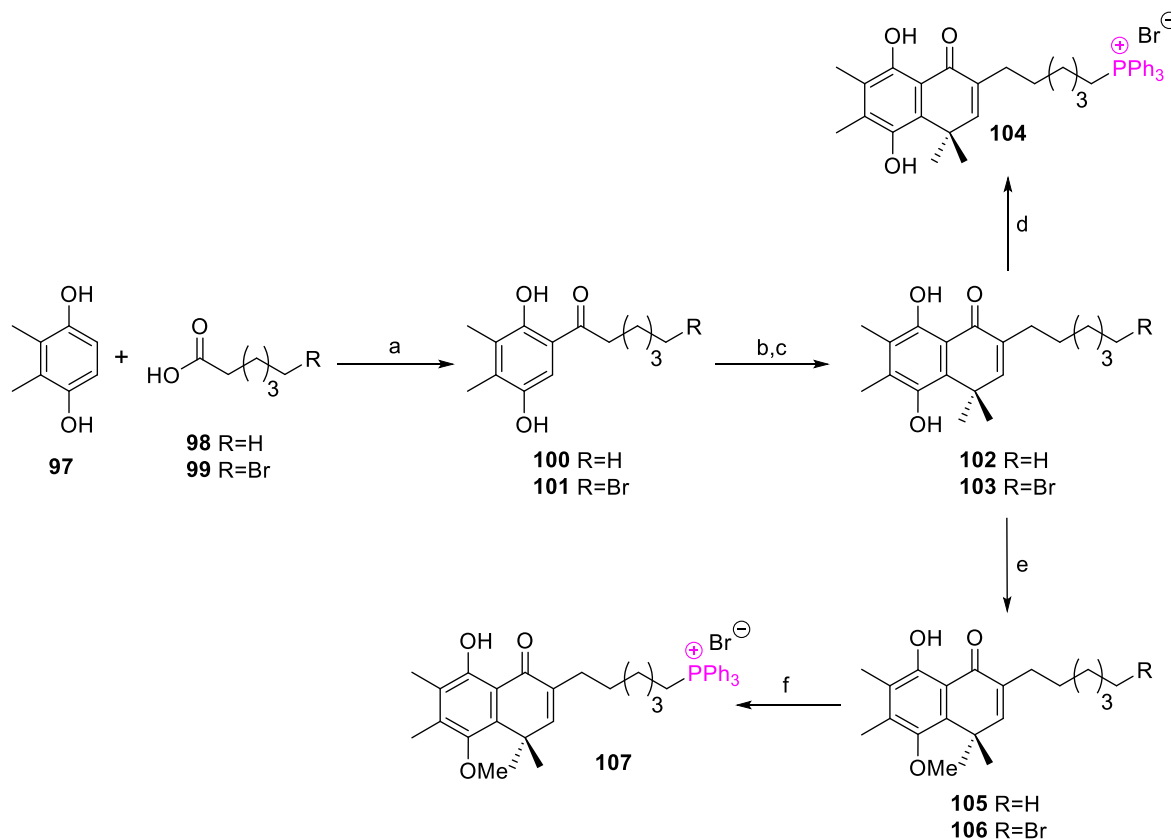


Figura 5.8. Derivados de hidroquinonas bicíclicas y sus sales de fosfonio.¹⁷¹ a) BF₃·2H₂O, 140 °C, 30 min; b) Ag₂O, CH₂Cl₂, 4-(2-metil-1-propenil)-morfolina; c) HCl, EtOH, reflujo; d) PPh₃, MeCN, 130 °C, 30 min; e) CH₃I, K₂CO₃, acetona; f) PPh₃, MeCN, 130 °C, 30 min.

El ácido glicirretínico (figura 5.9) ha sido estudiado por su actividad antitumoral; sin embargo, presenta la desventaja de poseer una pobre biodisponibilidad por su reducida solubilidad en agua. Jin y col.¹⁷² sintetizaron derivados a partir del triterpenoide funcionalizando la posición C-3 o C-30 con TPP⁺ y cadenas alquílicas de diferente longitud a modo de espaciadores, con la finalidad de biodirigirlo a la mitocondria. Así mismo, evaluaron su actividad citotóxica en

172. Jin L., Dai L., Ji M., Wang H. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium conjugated glycyrrhetic acid derivatives as potent anticancer drugs. *Bioorg. Chem.* **2019**, *85*, 179–190.

diferentes líneas celulares, tanto tumorales como no tumorales, para comparar su selectividad gracias al acoplamiento del catión lipófilo. Los derivados mostraron un incremento en su actividad citotóxica con respecto al ácido glicirretínico sin funcionalizar. El derivado **111b** mostró buena citotoxicidad sobre líneas de cáncer ($IC_{50}=5.25-9.22 \mu M$) y bajos valores de citotoxicidad en células normales de hígado HL-7702 ($IC_{50}=68.22 \mu M$), además de inducir la producción de ROS que podría conllevar a la muerte celular por apoptosis (figura 5.9).

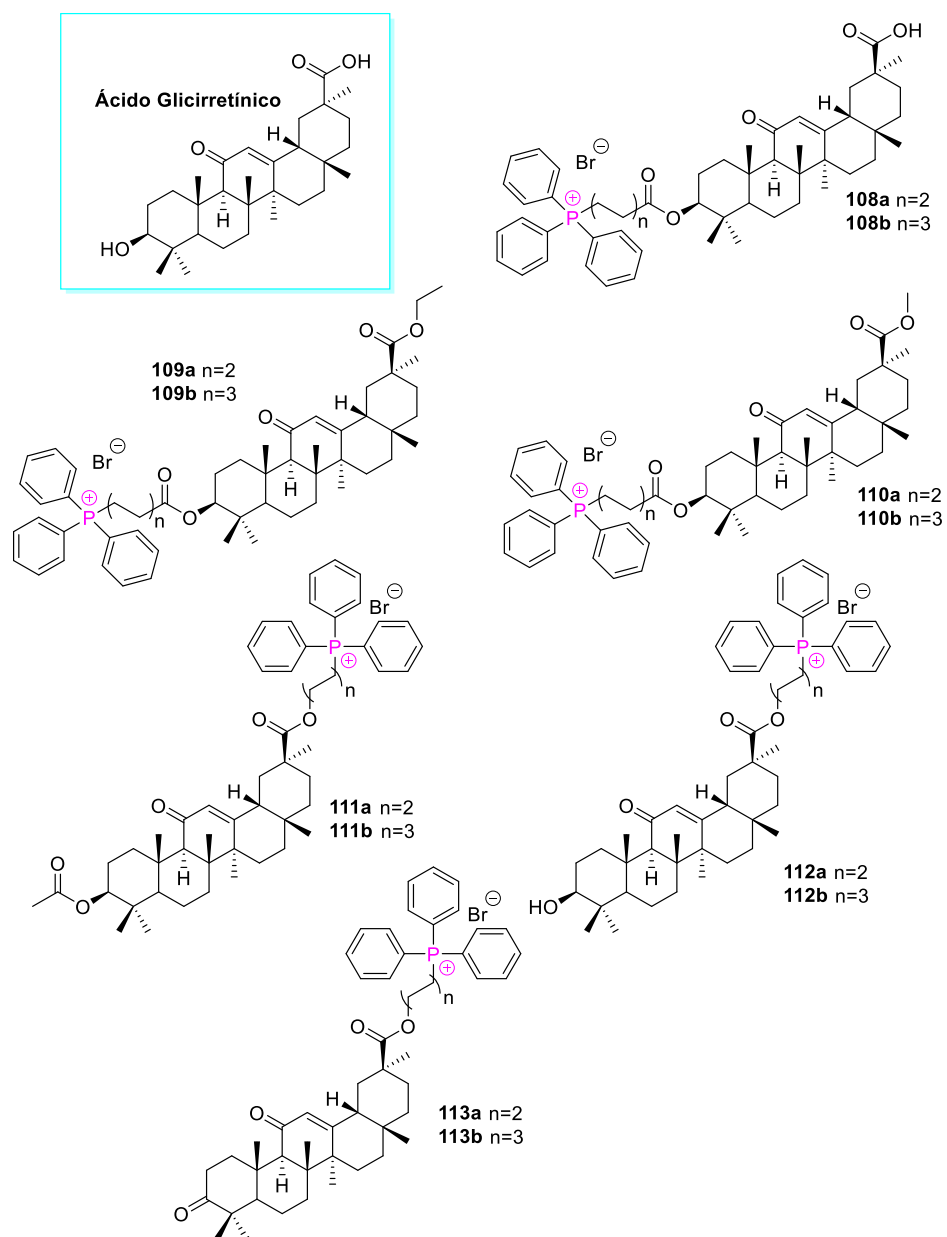


Figura 5.9. Derivados del ácido glicirretínico-TPP funcionalizados en C-3 y C-30.¹⁷²

Con la finalidad de inhibir la enzima colina quinasa $\alpha 1$, como una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer, Rubinni *et al.*,¹⁷³ sintetizaron una nueva clase de derivados piridinio/quinolinio asimétricos (figura 5.10). La actividad antiproliferativa fue evaluada frente a un panel de 6 líneas celulares: carcinoma de cérvix (HeLa), células T de leucemia (Jurkat), carcinoma alveolar (A549), células de leucemia promielocítica (HL-60), adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) y carcinoma de colon (HT-29). Todos los derivados presentaron actividad antiproliferativa, que osciló el rango nanomolar y el micromolar bajo.

Los derivados **117–121** presentaron la mejor actividad antiproliferativa; entre ellos destaca el compuesto **119**, con valores de GI_{50} en el rango 0.05 a 0.90 μM para las líneas en las que fue evaluado. Los compuestos **120** y **121**, dos de los más potentes de la serie, fueron evaluados frente a linfocitos periféricos de la sangre, mostrando una actividad claramente inferior con respecto a la observada en las células tumorales ($GI_{50}=10$ y 5.1 μM , respectivamente). No obstante, en presencia de fitohemaglutinina, un estímulo mitogénico, dicho valor de GI_{50} bajó hasta 1.5 μM , indicando que su acción depende de la velocidad de crecimiento celular.

Por otro lado, el derivado **121** fue el que presentó mejor actividad inhibitoria sobre la colina quinasa ($IC_{50}=0.29$ μM). En base a lo anterior, concluyeron que la adición de dos cabezas catiónicas mejora la actividad antiproliferativa y de inhibición enzimática, con el beneficio de una baja citotoxicidad hacia células sanas.

173. Rubbini G., Buades A.B., Kimatrai-Salvador M., Entrena A., Gallo-Mezo M.Á., Ríos-Marco P., Marco C., Mattiuzzo E., Bortolozzi R., Mariotto E., Greco F., Macchiarulo A., Carrasco-Jiménez M. P., Viola G., Cara C.L. Lead optimization-hit expansion of new asymmetrical pyridinium/quinolinium compounds as choline kinase $\alpha 1$ inhibitors. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 1769–1786.

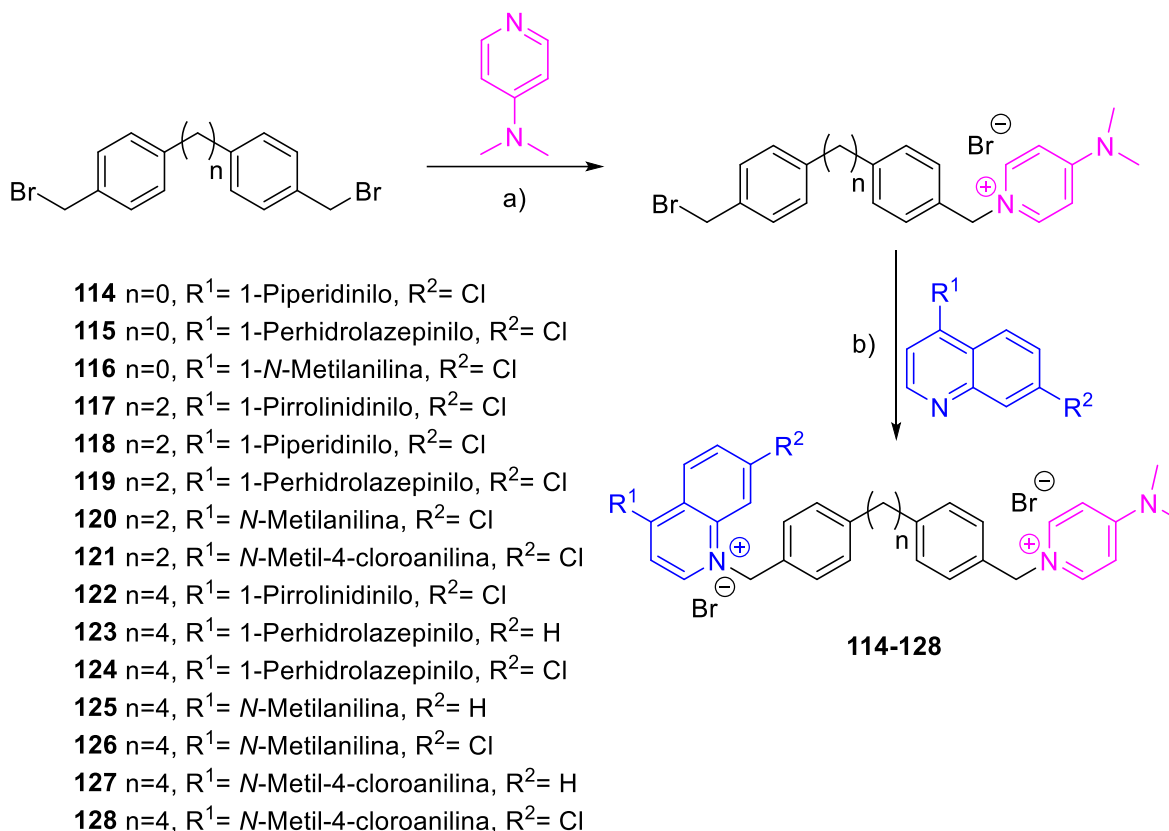


Figura 5.10. Derivados asimétricos piridinio/quinolínio. a) t.a., butanona, 72 h; b) 140 °C (Reflujo), MeCN, $P > 1$ atm, 72 h.¹⁷³

Otro catión lipófilo utilizado como vector mitocondrial es la rodamina B **133**. Kraft y col. sintetizaron como agentes citotóxicos híbridos del triterpenoide ácido asiático con el catión lipofílico rodamina B y fueron evaluados en diferentes líneas celulares de tumores sólidos, así como su selectividad con fibroblastos no malignos (figura 5.11). Observaron que la adición de un grupo espaciador en el carboxilo del anillo E del triterpenoide permitió modular su actividad, donde los derivados **131a**, **131b** y **133** presentaron valores similares de citotoxicidad, pero la adición de la rodamina aumentó considerablemente su citotoxicidad y selectividad hacia líneas celulares de cáncer. El derivado **132b** fue el que presentó la mejor actividad inhibitoria ($EC_{50}=0.8$ nM) en células A2780 (cáncer de ovario). Por su parte, el análisis de función mitocondrial demostró el efecto de **132b** sobre el metabolismo

energético como principal mecanismo de acción observándose una disminución casi total en los niveles de producción de ATP.¹⁷⁴

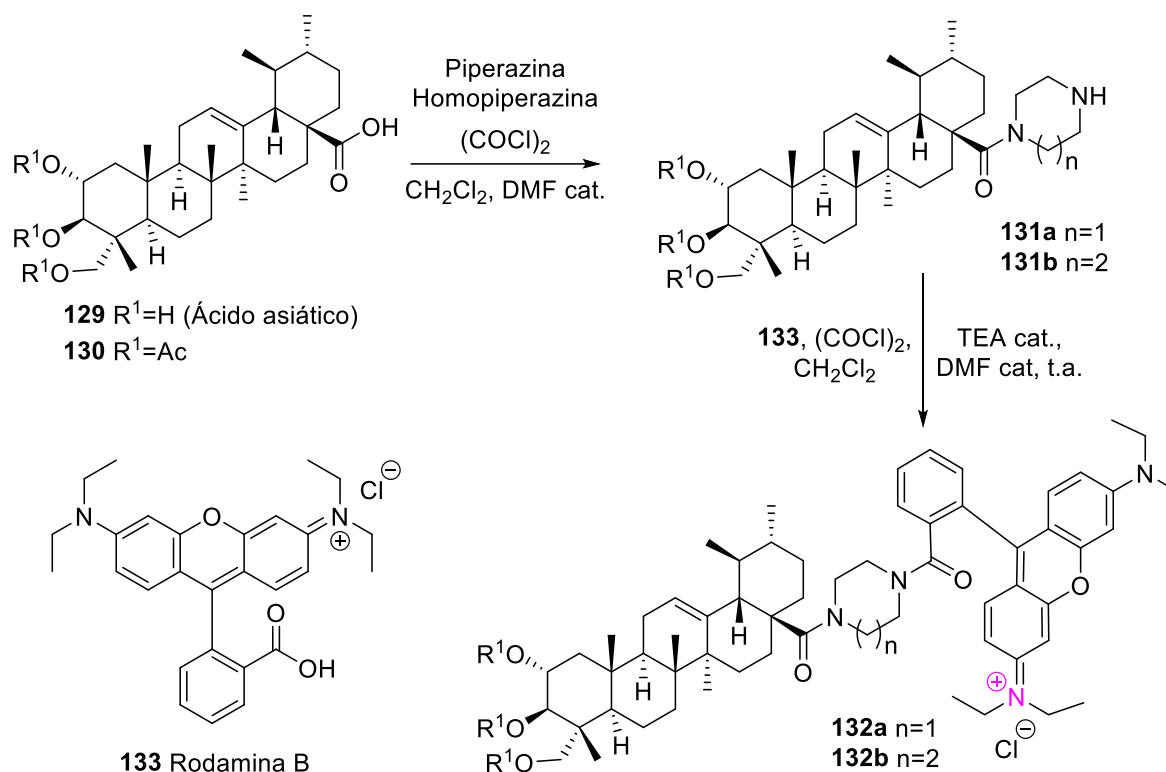


Figura 5.11. Híbrido ácido asiático-Rodamina B.¹⁷⁴

Battula *et al.* diseñaron tres amidas derivadas de rodamina B. El grupo carboxilo fue funcionalizado con aminas secundarias, para dar lugar a las amidas correspondientes (figura 5.12). Evaluaron la viabilidad celular en diferentes líneas de células tumorales y obtuvieron valores de IC₅₀ en el rango de 14 a 61 μM en células A549, B16F10 y MDA-MB-231, donde la amida **134** fue la que presentó mejor efecto sobre la línea A549 (IC₅₀=14.86 μM). Los derivados presentaron

174. Kraft O., Hartmann A., Brandt S., Hoenke S., Heise N.V., Csuk R., Mueller T. Asiatic acid as a leading structure for derivatives combining sub-nanomolar cytotoxicity, high selectivity, and the ability to overcome drug resistance in human preclinical tumor models. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *250*, 115189.

toxicidad mínima (274-670 μM) en células normales HEK-293 (células embrionarias de riñón), lo que indicó buena selectividad hacia las células malignas.¹⁷⁵

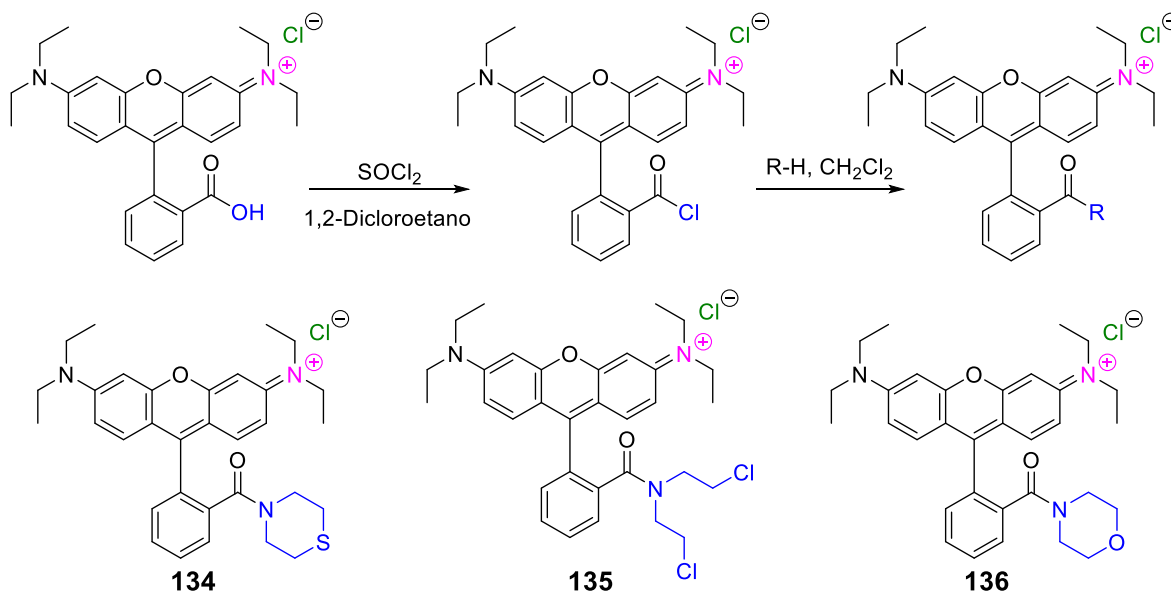


Figura 5.12. Amidas derivadas de Rodamina B.¹⁷⁵

5.2. Objetivo general de sección

Sintetizar diferentes selenocianatos combinados con una serie de cationes lipofílicos, como trifenilfosfonio (TPP^+), piridinio, quinolinio, imidazolio y rodamina B, para la obtención de agentes mitocondriotrópicos derivados de selenio con potencial actividad antiproliferativa. Como plataforma para la incorporación de ambos farmacóforos se empleará *p*-aminofenol.

5.3. Objetivos particulares de sección

- Derivatización del *p*-aminofenol para incorporar los dos farmacóforos previstos: selenocianato (residuo organoselénico con actividad antiproliferativa) y catión lipofílico (vector mitocondriotrópico).

175. Battula H., Bommi S., Bobde Y., Patel T., Ghosh B., Jayanty, S. Distinct rhodamine B derivatives exhibiting dual effect of anticancer activity and fluorescence property. *J. Photochem. Photobiol.* **2021**, *6*, 100026.

- Alquilación del hidroxilo fenólico con α,ω -dibromoalcanos de distinta longitud previa protección del grupo amino.
- Conversión del grupo amino en isotiocianato para introducir un conector de tipo tiourea entre el núcleo aromático y el catión lipofílico.
- Obtención de alquilaminas con un catión lipofílico en la posición ω (TPP⁺, quinolinio, piridinio, imidazolio).
- Acoplamiento de la alquilamina con el isotiocianato anterior.
- Obtención de los selenocianatos mediante desplazamiento nucleofílico del bromo terminal con KSeCN.
- Preparación de derivados de rodamina B mediante acoplamiento peptídico.
- Evaluación de la actividad antiproliferativa. Análisis estructura-actividad.

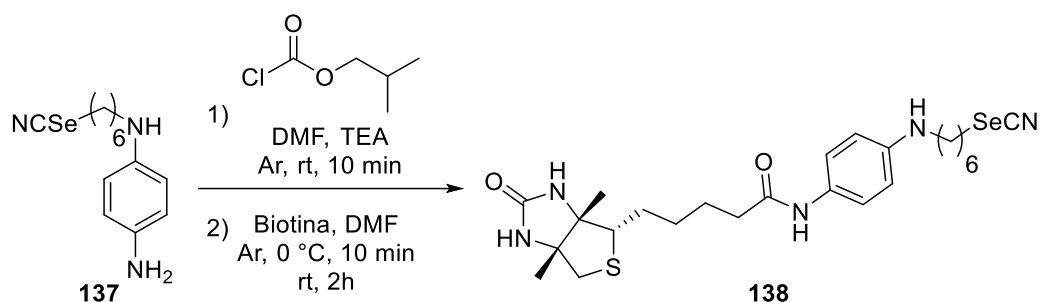
5.4. Discusión de resultados

Tal y como se ha mencionado en la sección anterior, en el presente capítulo de la Tesis Doctoral se llevará a cabo la preparación de agentes antiproliferativos que incorporen dos unidades fundamentales: un fragmento organoselénico (en particular, selenocianato), y un catión lipofílico que actúe como vector en el transporte selectivo del fármaco hacia las mitocondrias de las células tumorales. Como plataforma central se empleará *p*-aminofenol; la elección de este fragmento se debe a que en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral se ha descrito recientemente el selenocianato alquílico **137** (figura 5.13), derivado de la *p*-fenilendiamina, como un buen agente antiproliferativo (rango nanomolar-submicromolar).¹⁷⁶

Como parte de una línea de investigación de obtención de agentes antiproliferativos selectivos, dicho compuesto fue conectado mediante acoplamiento peptídico a biotina (vitamina H), cuyo receptor se encuentra sobreexpresado en

176. Roldán-Peña J.M., Puerta A., Dinić J., Stojanov S.J., González-Bakker A., Hicke F.J., Mishra A., Piyasaengthong A., Maya I., Walton J.W., Pešić M., Padrón J.M., Fernandez-Bolanos J., López Ó. Biotinylated selenocyanates: Potent and selective cytostatic agents. *Bioorg. Chem.* **2023**, *133*, 106410.

células tumorales, y que podría, por tanto, actuar como vector selectivo hacia las células malignas. La correspondiente amida **138** exhibió un aumento significativo de la actividad antiproliferativa (rango nanomolar en todas las líneas), y una excelente selectividad hacia las células tumorales (índice de selectividad superior a 7700 veces).¹⁷⁶



Actividad antiproliferativa frente a células tumorales y no tumorales (GI_{50} μ M)

Compuesto	A549 (Pulmón)	HBL-100 (Mama)	HeLa (cérvix)	SW1573 (Pulmón)	T-47D (Mama)	WiDr (colon)	BJ-hTert (Fibroblastos)
137	0.21 \pm 0.00	0.18 \pm 0.01	0.086 \pm 0.019	0.13 \pm 0.03	0.026 \pm 0.011	0.12 \pm 0.06	91 \pm 11
138	0.066 \pm 0.026	0.051 \pm 0.018	0.013 \pm 0.005	0.017 \pm 0.009	0.059 \pm 0.020	0.023 \pm 0.011	>100
5-FU	4.4 \pm 0.7	16 \pm 5	3.3 \pm 1.2	43 \pm 16	49 \pm 7	5.5 \pm 0.5	0.1 \pm 1.3
CDDP	1.9 \pm 0.2	1.8 \pm 0.5	2.7 \pm 0.4	17 \pm 3	26 \pm 4	14 \pm 2	0.5 \pm 7.4

Figura 5.13. Selenocianatos conjugados con biotina y actividad antiproliferativa.¹⁷⁶

De esta forma, los compuestos sintetizados en este capítulo poseen la estructura general mostrada en la figura 5.14, constituida por tres unidades fundamentales ensambladas sobre la plataforma central de tipo *p*-aminofenol en lugar de *p*-fenilendiamina empleada en **137**. Dichas unidades son: un catión lipofílico que actúe como vector mitocondriotrópico (TPP⁺, piridinio, quinolinio, imidazolio, rodamina B), un espaciador hidrocarbonado de longitud variable y el farmacóforo (selenocianato). La conexión del vector al núcleo central se efectuará mediante uniones de tipo tioureido o amida en el caso de la rodamina B.

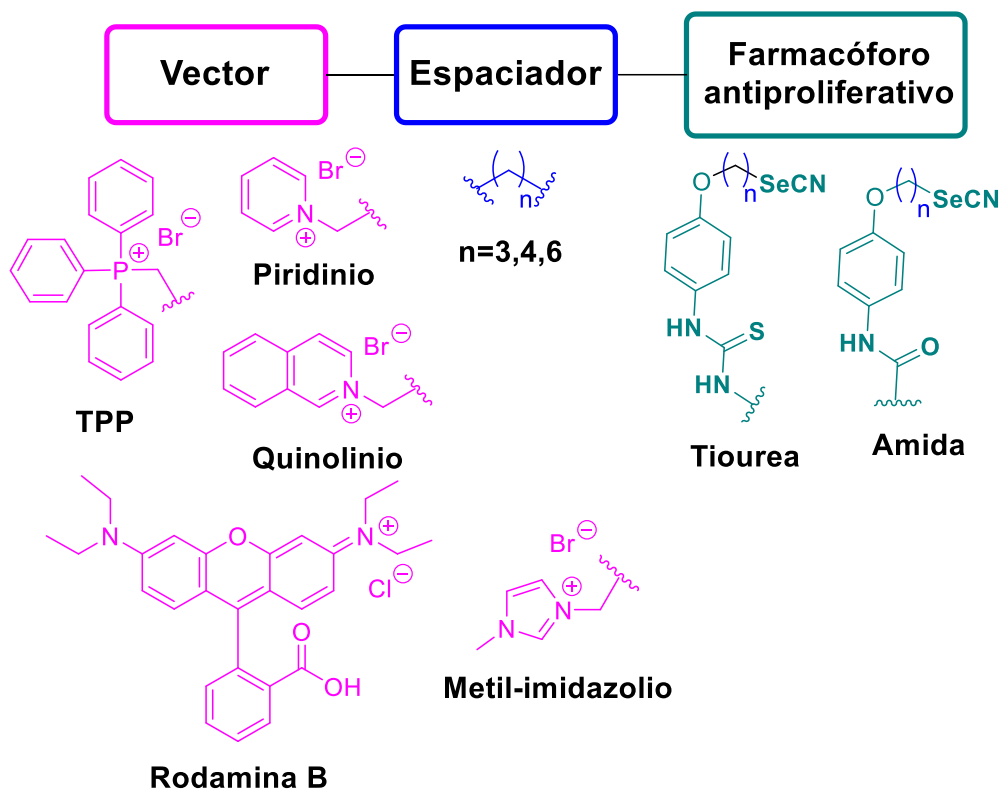
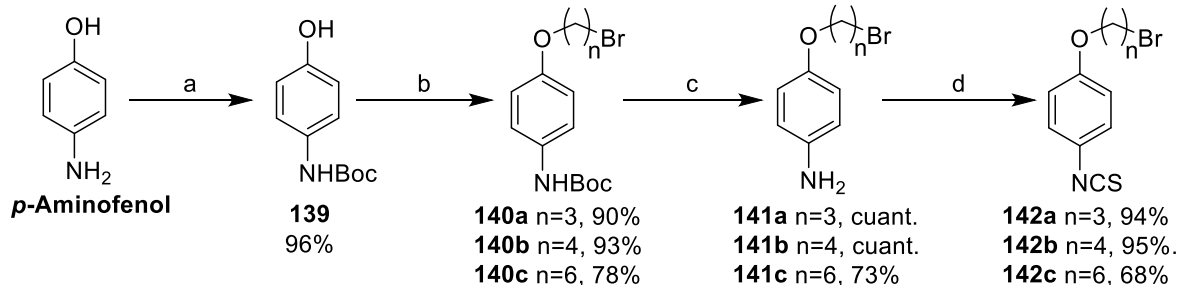


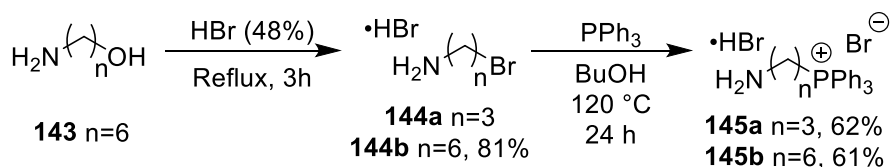
Figura 5.14. Características estructurales de los agentes mitocondriotrónicos sintetizados.

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de isotiocianatos derivados del *p*-aminofenol *O*-alquilados, siguiendo la metodología mostrada en el esquema 5.1. Se realizó una *N*-protección empleando Boc como grupo protector, obteniéndose **139** con rendimiento casi cuantitativo (96%). El grupo hidroxilo libre se sometió a una alquilación con un exceso de 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano y 1,6-dibromohexano en medio básico (K_2CO_3), para dar lugar a **140a–140c** con rendimientos de buenos a excelentes (78–93%). Posteriormente se realizó una *N*-desprotección con TFA para obtener las aminas **141a–141c** con rendimientos cuantitativos a excepción de **141c** (73%). Finalmente se realizó una reacción de isotiocianación con tiosfogeno como agente tionante y $CaCO_3$ como base en un medio trifásico para obtener los isotiocianatos **142a–142c**, con rendimientos prácticamente cuantitativos a excepción de **142c** (68%) (esquema 5.1).



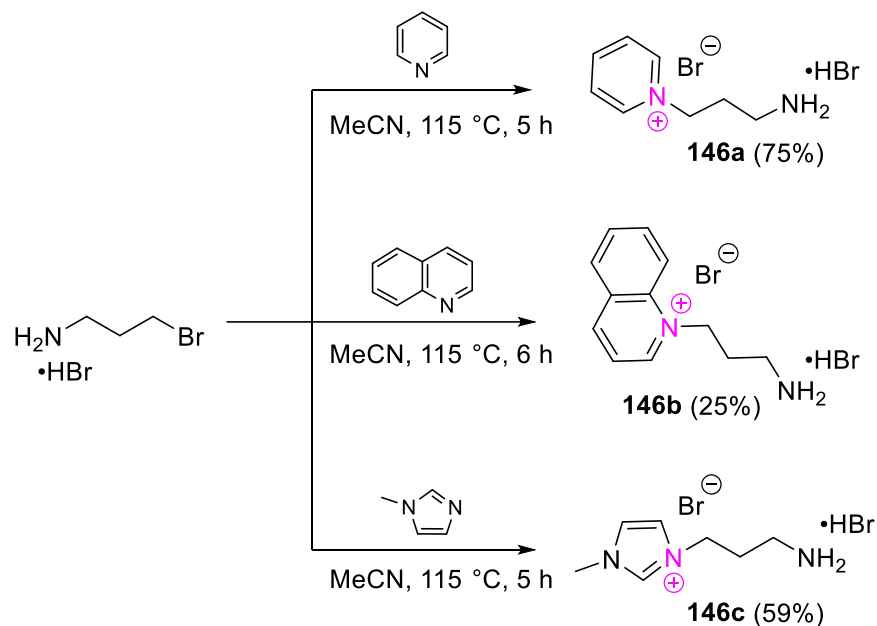
Esquema 5.1. Ruta de síntesis para la preparación de isotiocyanatos derivados del *p*-aminofenol O-alkilados. a) Boc_2O , THF, t.a., 12 h; b) 1,3-dibromopropano, 1,4-dibromobutano, 1,6-dibromohexano, K_2CO_3 , MeCN, 90°C , 20 h; c) Ácido trifluoroacético, CH_2Cl_2 , t.a., 1.5 h; d) Tiofosgeno, CaCO_3 , CH_2Cl_2 - H_2O , t.a., 2h.

Por otro lado, se prepararon dos derivados de tipo trifenilfosfonio alquílicos con un grupo amino en el extremo (esquema 5.2). En primer lugar, a partir de 6-amino-1-hexanol se llevó a cabo una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ con HBr (al 48%), obteniéndose **144b** con buen rendimiento (81%), mientras que **144a** es comercial. A continuación, mediante una nueva reacción de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ en un tubo Fischer-Porter entre trifenilfostina y los hidrobromuros de amonio correspondientes, se obtuvieron las sales de trifenilfosfonio **145a** y **145b** con rendimientos moderados (62% y 61%, respectivamente).



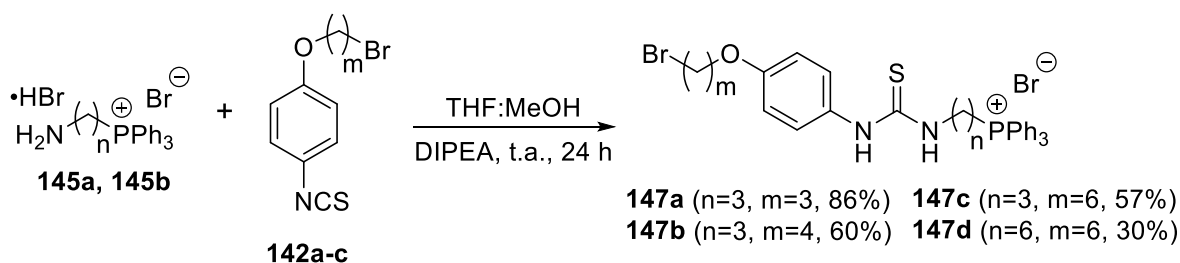
Esquema 5.2. Ruta de síntesis para la preparación de los bromuros de trifenilfosfonio.

Análogamente, para la preparación de los cationes lipófilos derivados de heterociclos, en un tubo Fischer-Porter se llevó a cabo una reacción de sustitución nucleofílica entre hidrobromuro de 3-bromopropilamina y los heterociclos aromáticos piridina, quinolina y 1-metilimidazol. El rendimiento modesto obtenido para el derivado de quinolina **146b** (25%) pone de manifiesto la baja nucleofilia exhibida por este heterociclo.



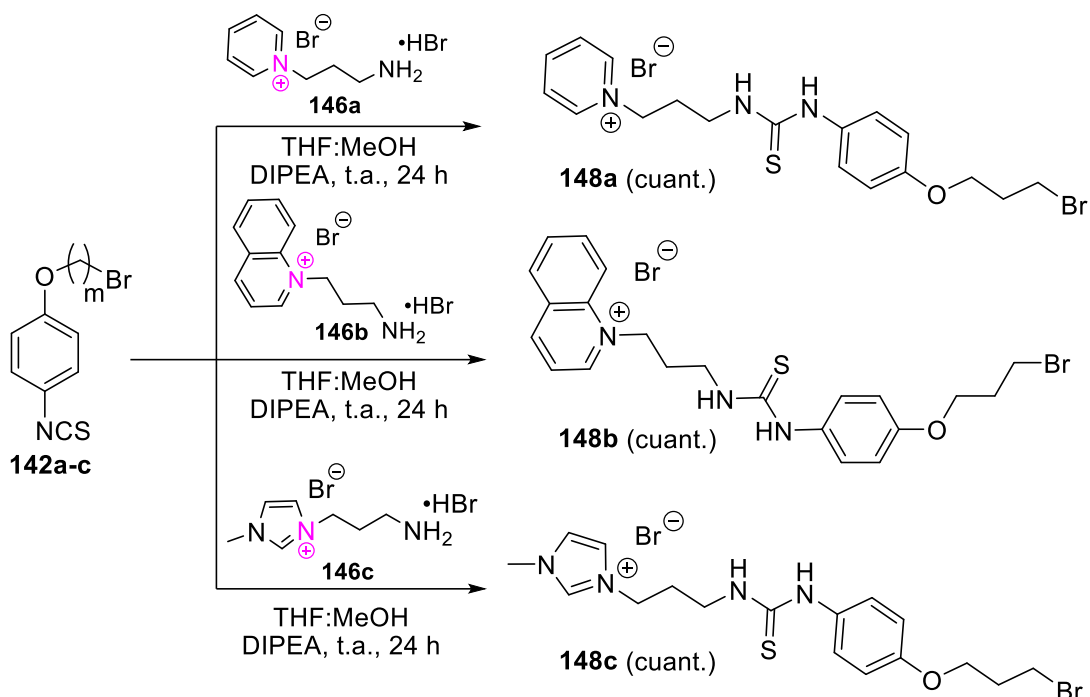
Esquema 5.3. Ruta de síntesis para la preparación de piridinio, quinolinio y metilimidazolio.

Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de adición entre los isotiocyanatos **142a–142c** y el correspondiente catión lipofílico **145a** ó **145b** en medio básico (DIPEA). Esto condujo a las tioureas **147a–147d** (esquema 5.4), las cuales se emplearon para el siguiente paso de reacción sin purificación previa.



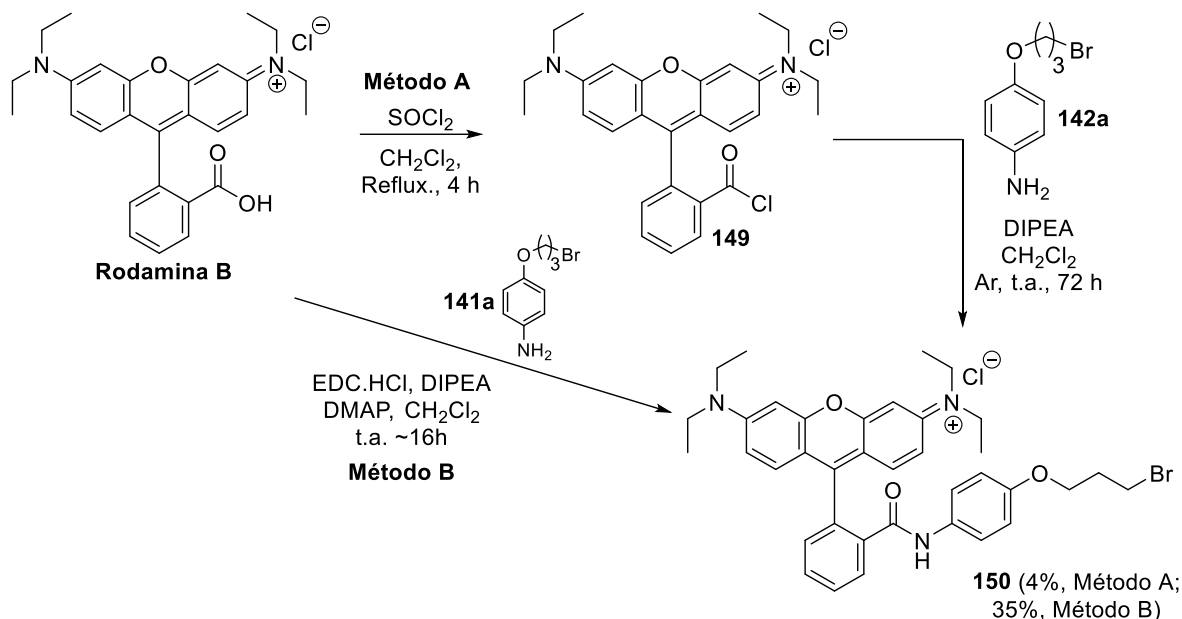
Esquema 5.4. Ruta de síntesis para la preparación de tioureas derivadas de trifetilfosfonio.

De igual forma, se llevó a cabo la preparación de las tioureas con los cationes lipofílicos **146a–146c** mediante una reacción de adición con los isotiocyanatos **142a–c**, para dar lugar a las tioureas **148a–c** (esquema 5.5), los cuales se emplearon sin purificación previa para el siguiente paso de reacción.



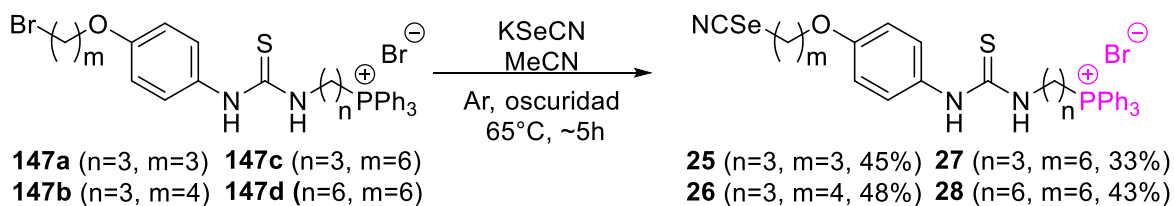
Esquema 5.5. Ruta de síntesis de tioureas derivadas de piridinio, quinolinio y *N*-metilimidazolio.

Con respecto a la rodamina B, se intentó llevar a cabo la conexión mediante enlace de tipo amida con el *p*-aminofenol *O*-alquilado **141a**, empleando para ellos una reacción tipo Schotten-Baumann; ésta consiste en la reacción de una amina con un haluro de ácido para la obtención de amidas. Como primer paso, se hizo reaccionar rodamina B con SOCl_2 y al finalizar se concentró a sequedad para dar lugar al haluro de ácido **149**. Este último se hizo reaccionar con la amina **141a** en medio básico (DIPEA) durante 72 h para dar lugar a **150**, que fue obtenido en cantidades de traza tras purificación cromatográfica (4%). Alternativamente, se optó por la reacción de rodamina B con un agente acoplante (EDC•HCl) en medio básico (DIPEA) y en presencia de cantidades catalíticas de DMAP. Con esta metodología se obtuvo a **150** con un rendimiento moderado (35%) (esquema 5.6), pero sensiblemente superior al obtenido mediante la reacción de Schotten-Baumann.



Esquema 5.6. Ruta de síntesis para la preparación de amida a partir de rodamina B.

Una vez sintetizadas las tioureas **147a–d**, **148a–c** y la amida de rodamina **150** se llevó a cabo la obtención de selenocianatos, mediante una reacción de sustitución nucleofílica sobre el fragmento bromoalquílico con KSeCN. Los híbridos selenocianatos-cationes lipofílicos **25–28** se obtuvieron con rendimientos moderados (13–56%, esquemas 5.7 y 5.8).



Esquema 5.7. Ruta de síntesis para la obtención de selenocianatos mitocondriotrópicos de trifetilfosfonio.

A modo de ejemplo se muestra en la figura 5.15 el espectro de ^1H -RMN de **25**. Destacan las señales en 7.80 ppm de los protones del trifetilfosfonio, los multipletes en 7.31 y 6.87 ppm de los H del fragmento *p*-aminofenol y las señales en el rango 2.10–4.12 ppm, correspondientes a las cadenas alquílicas.

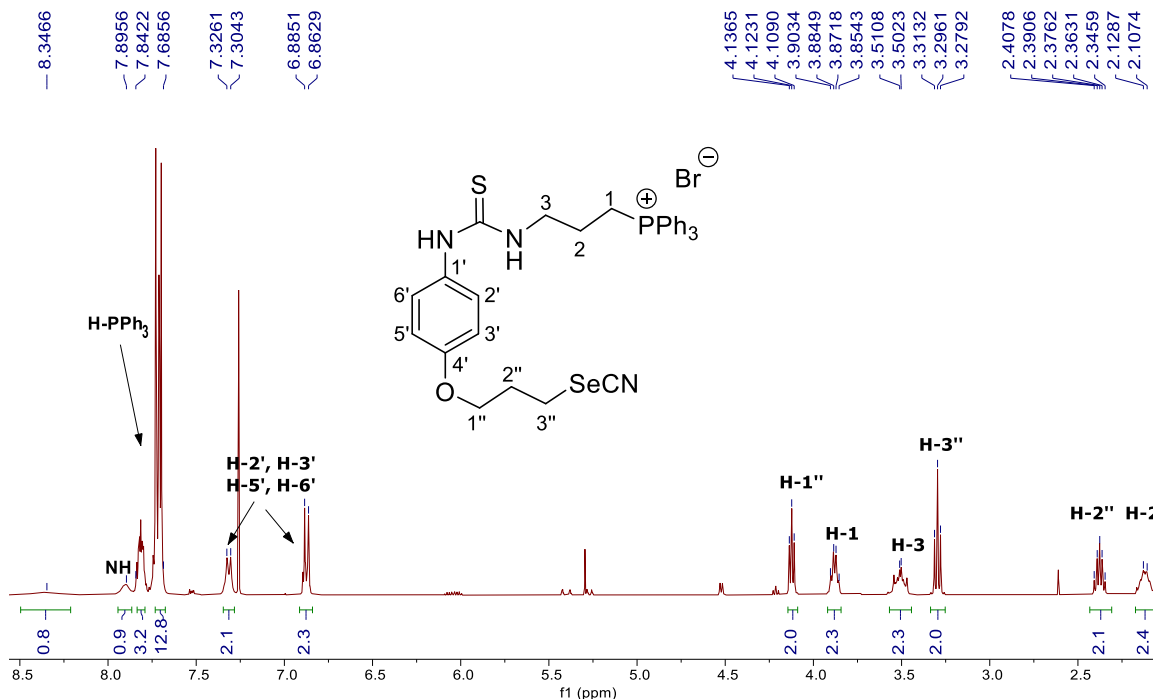


Figura 5.15. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **25**.

En la figura 5.16 se muestra el espectro de ^{13}C -RMN de **25**, destacando la señal en 182.5 ppm de $\text{C}=\text{S}$ del grupo tiureido; las señales dobles en 135.4, 133.7 y 130.8 ppm de los carbonos de la unidad del trifenilfosfonio: Ar-C_{para} ($^4J_{\text{C,P}}=3.0$ Hz), Ar-C_{orto} ($^2J_{\text{C,P}}=10.1$ Hz) y Ar-C_{meta} ($^3J_{\text{C,P}}=12.8$ Hz) y sobre 118.1 ppm el doblete de Ar-C_{ipso} ($^1J_{\text{C,P}}=86.1$ Hz), todos ellos acoplados al átomo de fósforo. La formación del selenocianato se confirma con la señal en 102.4 ppm. Por otro lado, las señales de 66.4 a 20.3 ppm correspondieron a los carbonos de las cadenas alquílicas; se destaca la señal doble en 44.1 ppm para C-2 ($^2J_{\text{C,P}}=16.0$ Hz), el doblete en 22.5 ppm de C-3 ($^3J_{\text{C,P}}=3.9$ Hz) y el doblete en 20.6 ppm de C-1 ($^1J_{\text{C,P}}=51.9$ Hz) correspondientes a la cadena alquílica unida al fragmento del trifenilfosfonio. Con lo anterior, se confirma la formación del compuesto **25**.

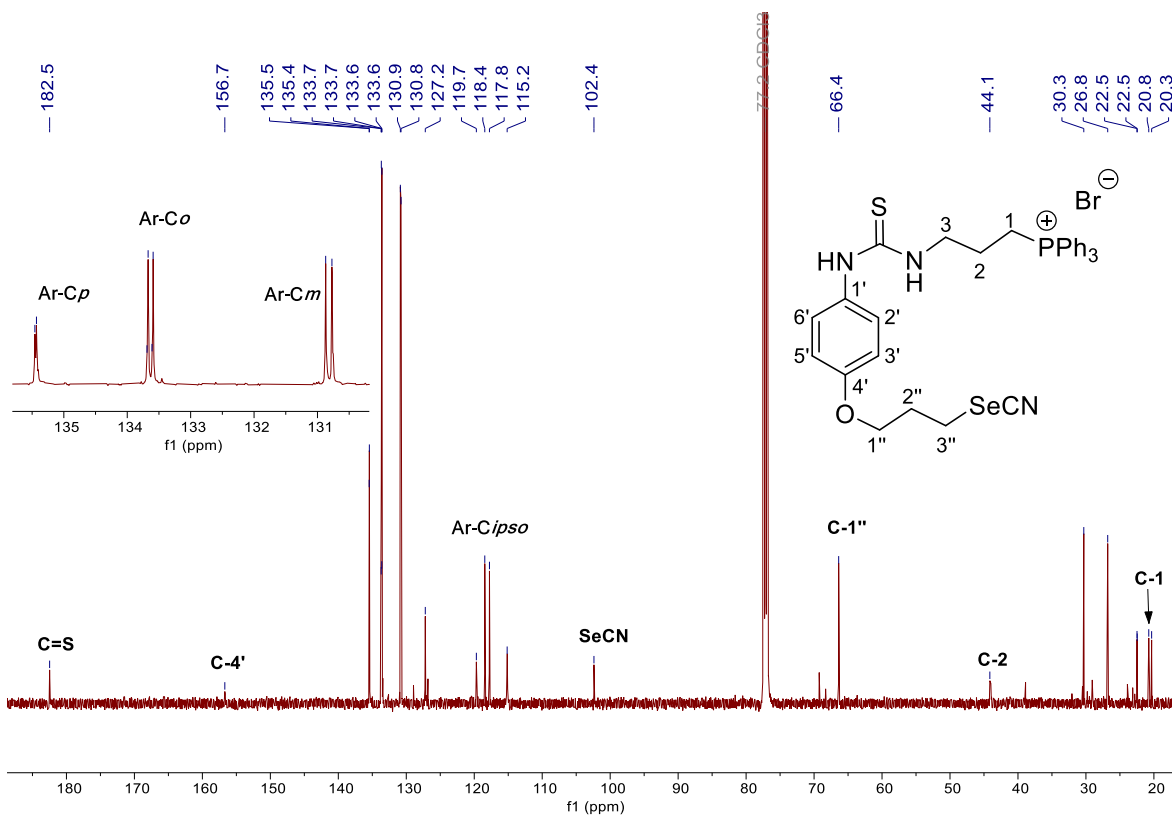
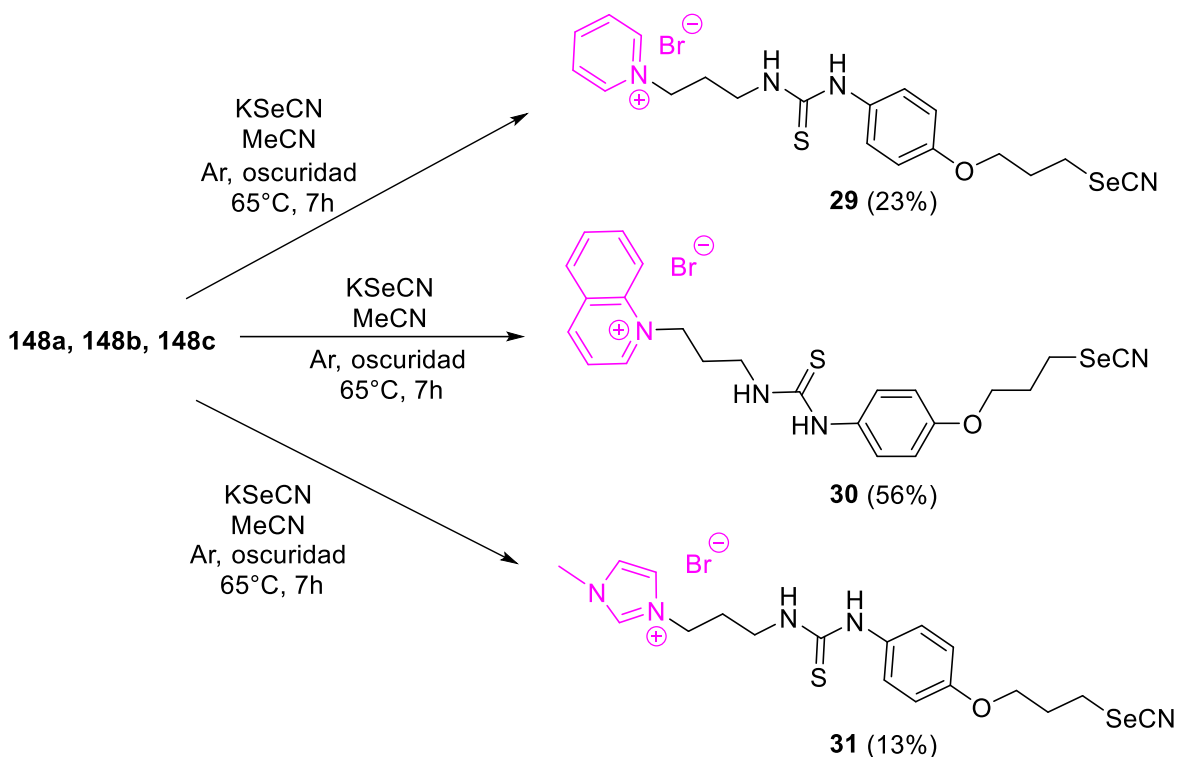


Figura 5.16. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto **25**.

El esquema 5.8 muestra la metodología para acceder a los selenocianatos **29–31**, derivados de piridina, quinolina y *N*-metilimidazolio.



Esquema 5.8. Ruta de síntesis para la obtención de selenocianatos de piridinio, quinolinio y *N*-metilimidazolio.

A modo de ejemplo se muestra el espectro de ^1H -RMN de **29** en la figura 5.17. Destacan las señales en 9.06 a 8.10 ppm, correspondientes a los protones del núcleo piridínico, los multipletes en 7.18 y 6.98 ppm de los protones de fenilo y el conjunto de señales de 4.73 a 2.30 ppm de los hidrógenos de las cadenas alquílicas. En el espectro de ^{13}C -RMN de **29** se confirma la presencia del grupo tioureido con la señal en 182.9 ppm (C=S), y la formación del selenocianato por la señal en 104.3 ppm (figura 5.18).

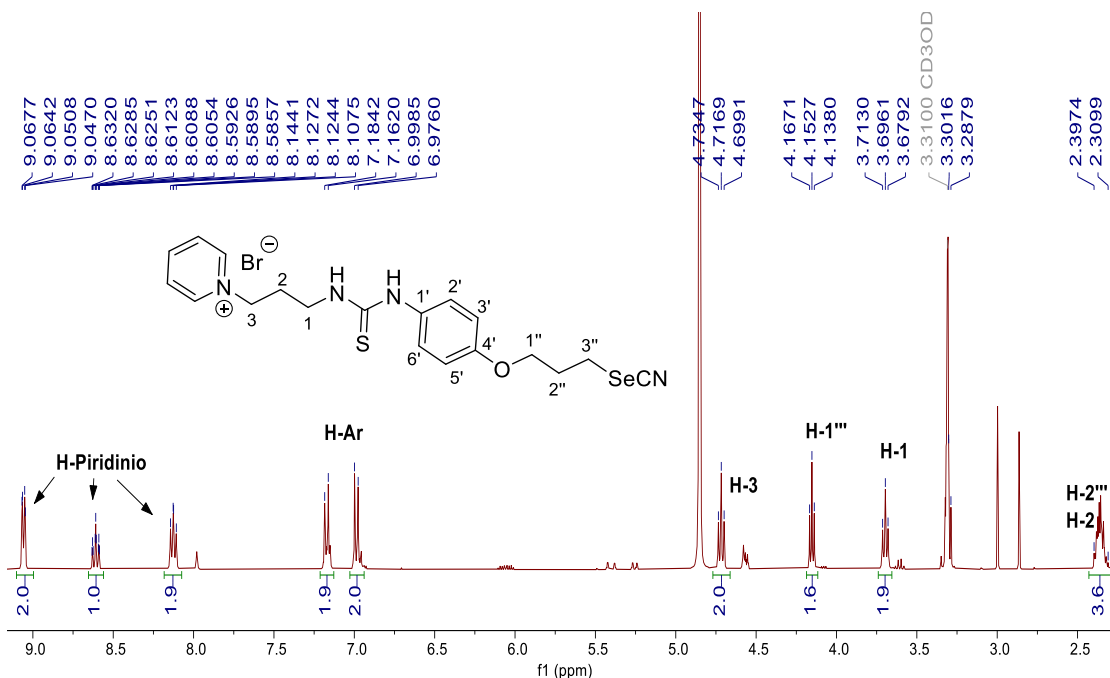


Figura 5.17. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) del compuesto **29**.

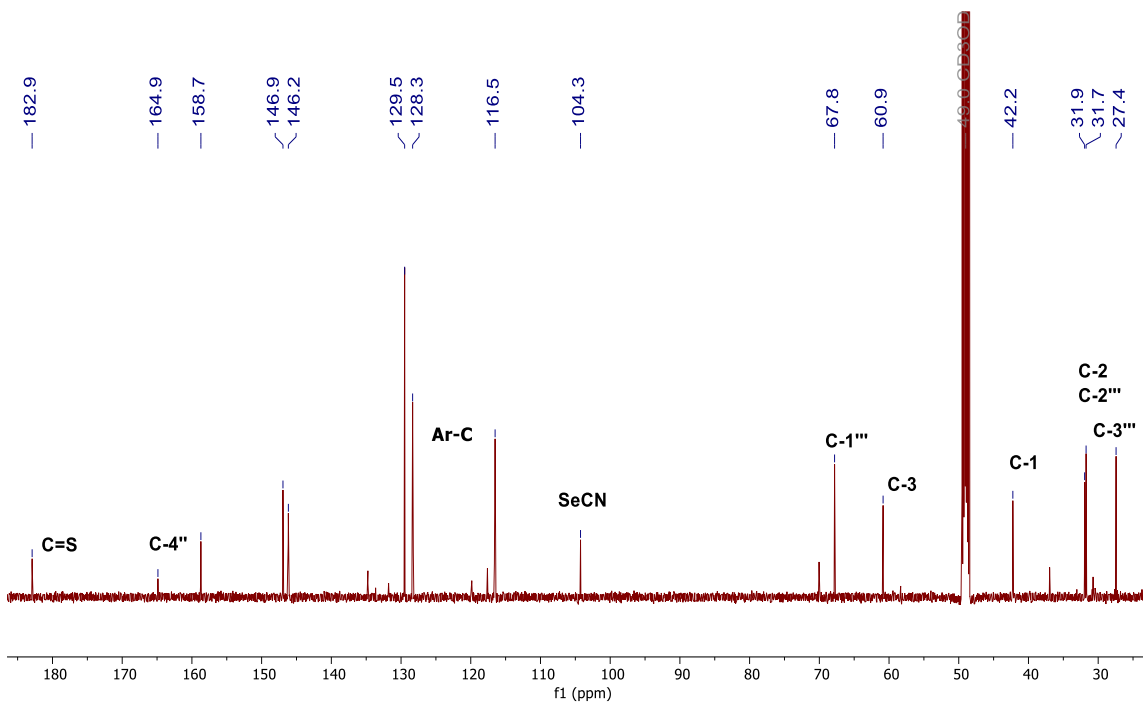
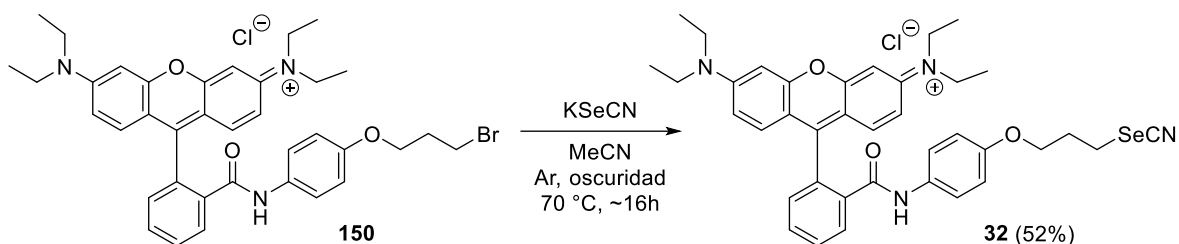


Figura 5.18. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CD₃CD) del compuesto **29**.

Finalmente se llevó a cabo la preparación del selenocianato derivado de rodamina B. A partir de la amida **150** y con una reacción de sustitución nucleofílica

sobre el fragmento bromoalquílico **150** con KSeCN se obtuvo el compuesto **32** con un rendimiento del 52% (esquema 5.9).



Esquema 5.9. Ruta de síntesis del selenocianato de rodamina B.

En la figura 5.19 se observa el espectro de ^1H -RMN para **32**. Destacan las señales en 7.99 y 7.16 ppm de los H-3' y H-4', respectivamente, el multiplete sobre 6.65–6.59 ppm de los protones de fenilo (H-2'', H-3'', H-5'', H-6'') y H-8 de la rodamina; Las señales en 3.95, 3.21 y 2.20 ppm corresponden a los protones de la cadena selenoalquílica y sobre 3.32 (CH₂) y 1.15 (CH₃) ppm se observan las señales del grupo dietilamino de rodamina B. Con respecto a las señales de ^{13}C -RMN, se observa en 167.8 la señal de carbonilo de amida, la señal de SeCN en 102.0 ppm, las señales en 66.0, 30.2 y 26.5 ppm de los carbonos de la cadena selenoalquílica y las señales en 44.4 y 12.7 de CH₂ y CH₃ del grupo dietilamina de la rodamina B (figura 5.20). Lo anterior confirma la obtención de **32**.

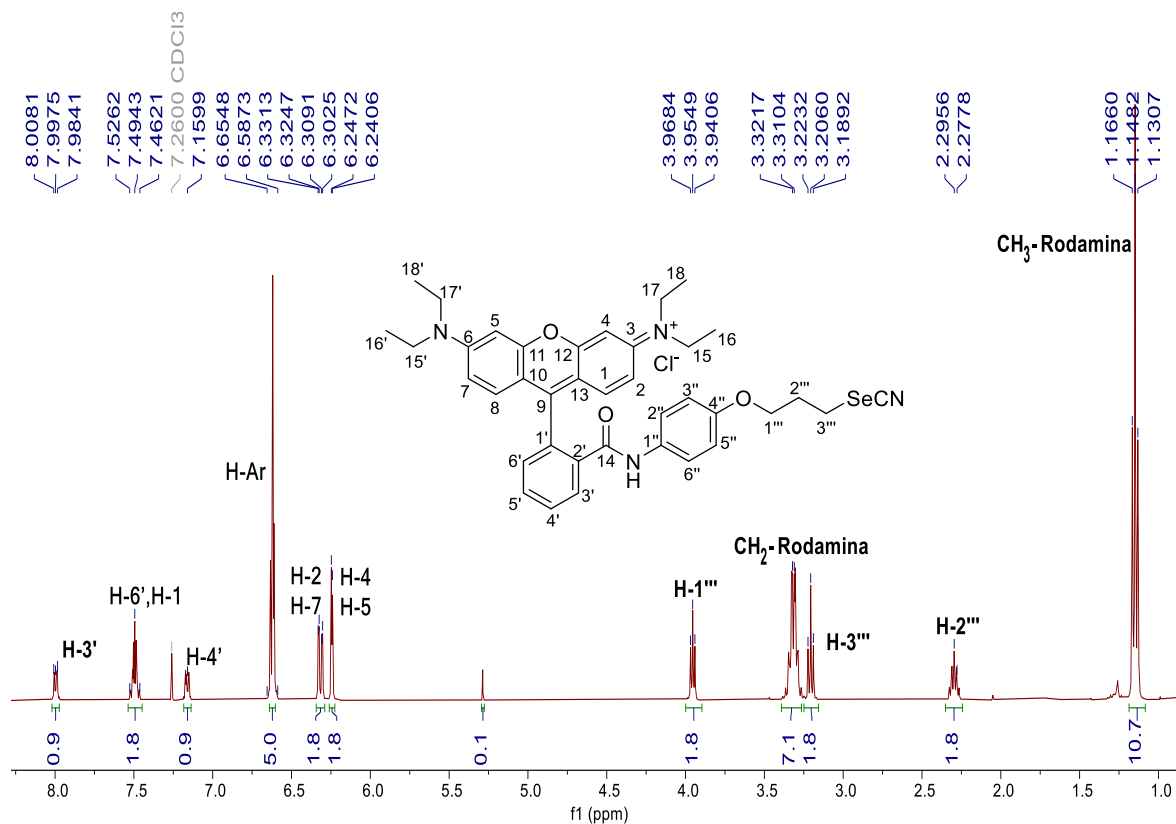


Figura 5.19. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **32**.

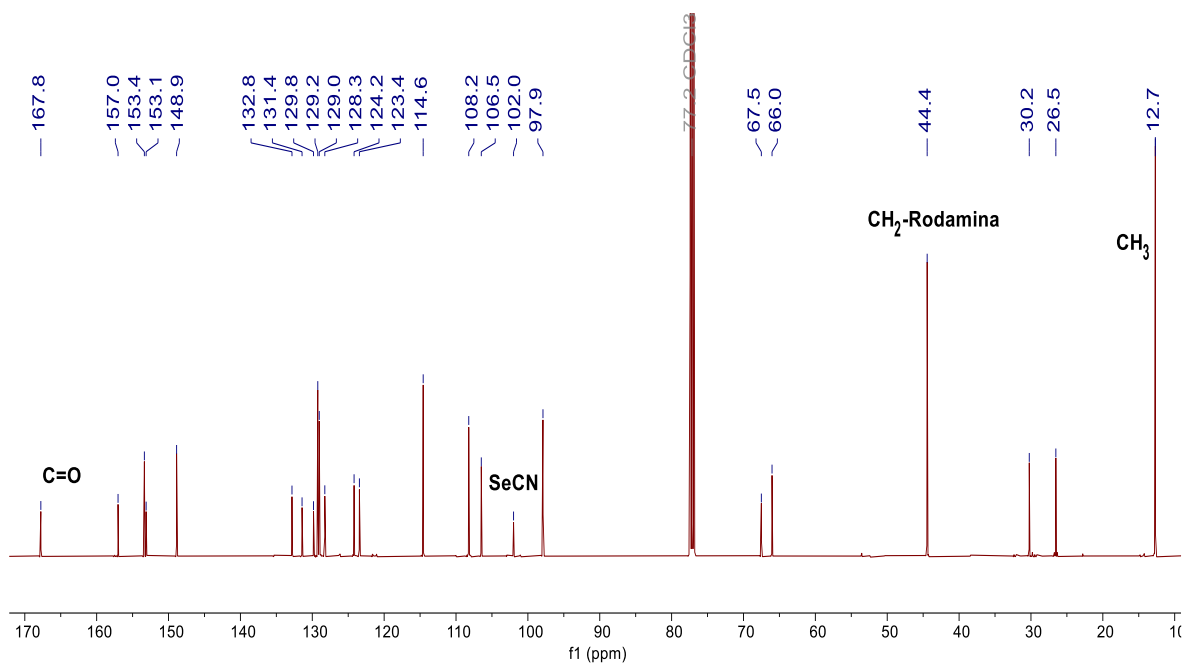


Figura 5.20. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **32**.

6. Derivados de cumarina como potenciales inhibidores duales de NAMPT y anhidrasas carbónicas

6.1. Introducción

6.1.1. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺)

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es un metabolito que desempeña un papel esencial en la homeostasis celular, principalmente como cofactor de reacciones de oxido-reducción relacionadas con la producción de energía, la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la fosforilación oxidativa, oxidación de ácidos grasos y biosíntesis de serina.^{177,178}

El NAD⁺ se describió por primera vez en 1906 por Arthur Harden como un cofactor necesario en la fermentación del alcohol. Años después, en 1929, Hans von Euler-Chelpin identificó a este cofactor como un fosfato de azúcar nucleósido. Posteriormente, en 1935, Otto Warburg aisló al NADP⁺ y describió su papel en la transferencia de hidrógeno en reacciones bioquímicas como una coenzima importante para el metabolismo energético.¹⁷⁹

El NAD se presenta en dos formas, la oxidada (NAD⁺) y la forma reducida (NADH), y su equilibrio es crucial para mantener la funcionalidad en humanos y su consumo y regeneración se regulan por diferentes vías del metabolismo (figura 6.1).¹⁸⁰ Es de destacar, que la relación de NAD⁺/NADH disminuye con la edad, lo que causa una disminución en la capacidad de reparación del ADN y a la resistencia

177. Yaku K., Okabe K., Nakagawa T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *47*, 1–17.

178. Yaku K., Okabe K., Hikosaka K., Nakagawa, T. NAD metabolism in cancer therapeutics. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 622.

179. Cantó C., Menzies K.J., Auwerx, J. NAD(+) metabolism and the control of energy homeostasis: A balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 31–53.

180. Nishigaki J., Ishida T., Honma T., Haruta M. Oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by Au cluster and nanoparticle catalysts aiming for coenzyme regeneration in enzymatic glucose oxidation. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 10413–10422.

de radicales libres, por lo que mantener los niveles es una estrategia contra el envejecimiento y problemas relacionados.^{181,182}

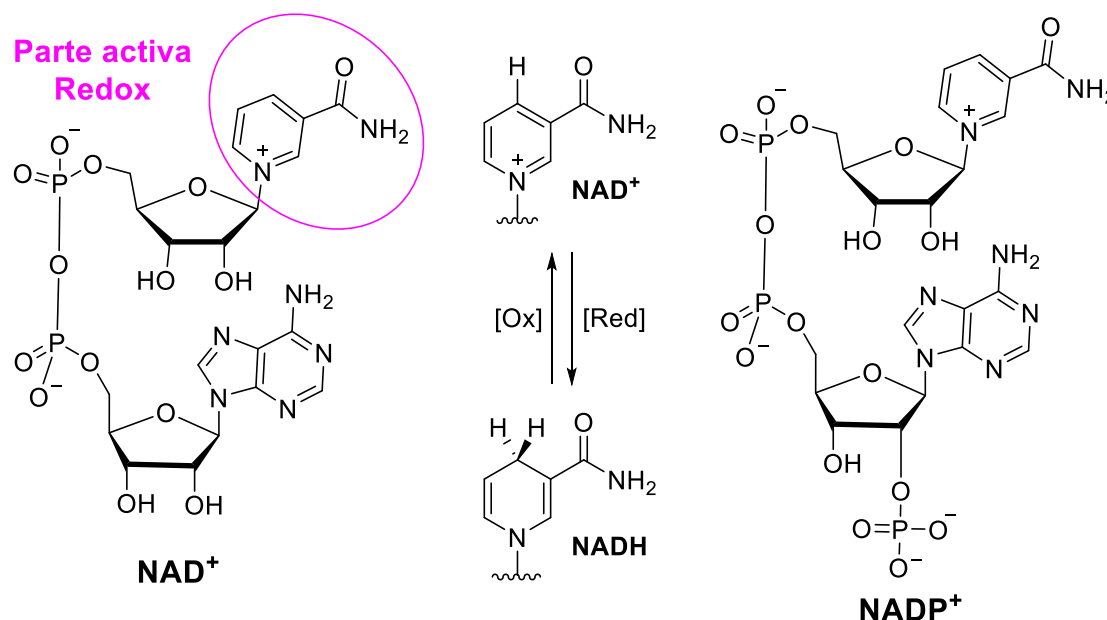


Figura 6.1. Estructura química de NAD⁺ y NADP⁺.¹⁸⁰

Es normal encontrar a NAD⁺ en su forma oxidada como forma mayoritaria, con una proporción NAD⁺/NADH que varían de 10/1 a 700/1, con una concentración celular total entre 0.3 y 1.0 mM en mamíferos. A su vez, NAD⁺ puede fosforilarse a NADP⁺ por la NAD quinasa, y también presentarse en su forma reducida (NADPH), cuyo papel principal es actuar como reductor en reacciones anabólicas, como la biosíntesis de ácidos nucleicos o de lípidos y también tienen un papel importante en la homeóstasis del calcio y en la supervivencia o muerte celular. Las concentraciones de NADP(H) se encuentran en un 10% con respecto a los niveles

181. Zhang H., Ryu D., Wu Y., Gariani K., Wang X., Luan P., D'Amico D., Ropelle E.R., Lütolf M.P., Aebersold R., Schoonjans K., Menzies K.J., Auwerx, J. NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science*, **2016**, 352, 1436–1443.

182. Li X., An Q., Ma Z., Zhang Y., Chen X., Chai Y., Meng F. Bioactive NAD⁺ regeneration promoted by multimetallic nanoparticles based on graphene–polymer nanolayers. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2022**, 14, 39285–39292.

totales de NAD(H).^{183,184} La concentración extracelular de NAD⁺ en suero sanguíneo de mamíferos oscila entre 0.1 y 0.5 μM .¹⁸⁵

El NAD se sintetiza por tres mecanismos: la vía *de novo*, la vía Preiss-Handler y la vía de rescate; estas vías utilizan triptófano, ácido nicotínico (NA) y nicotinamida (NAM), respectivamente. Con respecto a los mamíferos, dos enzimas claves son la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) y la nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT), cuya función es regular la vía de rescate, la cual es dominante para mantener los niveles y suministro intracelular de NAD⁺.^{178,186}

La vía *de novo* o vía del aspartato es la ruta para eucariotas fotosintéticos, mientras que la ruta de la quinurenina es la ruta *de novo* en mamíferos. Esta última comienza con el catabolismo de triptófano que en dos pasos forma la quinurenina, como metabolito intermedio del triptófano que, a su vez, origina NAD⁺, ácido quinurénico o ácido xanturénico. Estos derivados tienen un papel importante en funciones neuronales, ya que conllevan a la formación de los neurotransmisores glutamato y acetilcolina, pero también pueden regular la actividad del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y la producción de radicales libres.^{187,188}

La vía de Preiss Handler tiene lugar a partir del ácido nicotínico (NA) y mediante tres pasos da lugar al intermediario adenina dinucleótido del ácido nicotínico (NAAD), donde las adenililtransferasas de nicotinamida mononucleótido

183. Tedeschi P.M., Bansal N., Kerrigan J.E., Abali E.E., Scotto K.W., Bertino J.R. NAD⁺ kinase as a therapeutic target in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5189–5195.

184. Fletcher R., Lavery G.G. The emergence of the nicotinamide riboside kinases in the regulation of NAD⁺ metabolism. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *61*, R107–R121.

185. Navas L.E., Carnero A. NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 2.

186. Wei Y., Xiang H., Zhang W. Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 970553.

187. Vécsei L., Szalárdy L., Fülöp F., Toldi, Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *J. Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, *12*, 64–82.

188. Lautrup S., Sinclair D., Mattson M.P., Fang E.F. NAD⁺ in brain aging and neurodegenerative disorders. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 630–655.

(NMNAT) juegan un papel fundamental, y también participan en las vías *de novo* y de rescate.¹⁸⁸

La vía de rescate comienza mediante el reciclaje de nicotinamida (NAM) por el catabolismo de NAD⁺ por la acción de la NADasa. El NAM reciclado se convierte en mononucleótido de nicotinamida (NMN) por acción de la nicotinamida fosforribosiltransferasa intracelular (iNAMPT), seguido de la transformación de NMN en NAD⁺ por la NMNAT (figura 6.2).^{189,190}

La concentración de NAD⁺ oscila a lo largo del día mediante una regulación circadiana, lo que lleva a la activación de NAMPT de forma cíclica cada 24 h, lo que aumenta la producción de NAD⁺, el cual tiene una vida media de ~1 h en mamíferos y capacidad limitada para difundir a través de membranas celulares, lo que permite su regulación en procesos fisiológicos. Solo NA y NAM pueden cruzar membranas plasmáticas.¹⁸⁵

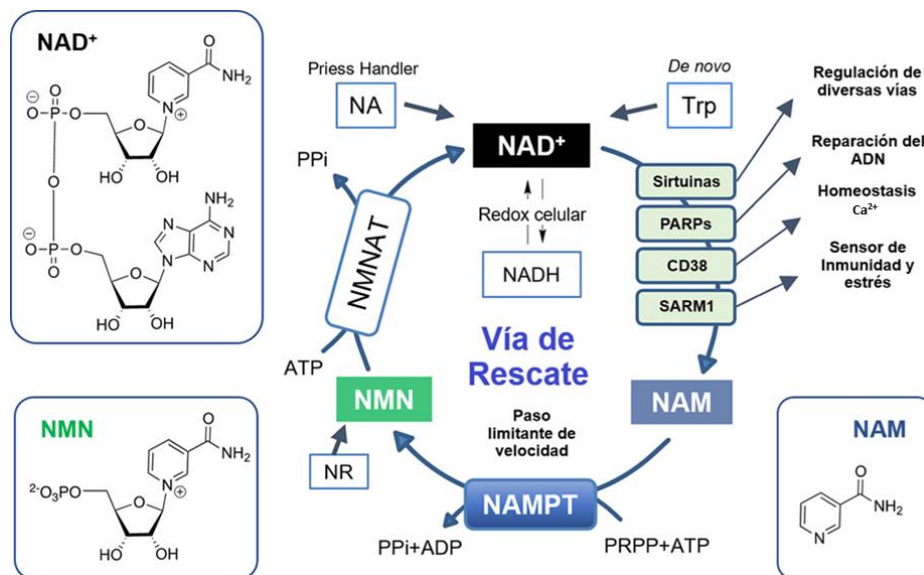


Figura 6.2. Vía de rescate para la producción de NAD⁺. Adaptado de Gordon *et al.*¹⁸⁹

189. Verdin, E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*, **2015**, *350*, 1208–1213.
 190. Gordon-Blake J., Ratia K., Weidig V., Reddy V.G., Ackerman-Berrier M., Penton C., Musku S.R., Alves E.R., Driver T.G., Tai L.M., Thatcher G.R.J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase positive allosteric modulators attenuate neuronal oxidative stress. *ACS Med. Chem. Lett.* **2024**, *15*, 205–214.

6.1.2. Papel de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) en el cáncer

El papel enzimático de NAMPT fue descubierto en 1957 por Preiss y Handler. Esta enzima tiene un peso molecular próximo a los 55 kDa, conformada en su estructura primaria por 491 aminoácidos y cuya estructura cristalográfica ya se encuentra registrada y reconocida como una clase dimérica de fosforribosiltransferasas de tipo II.¹⁹¹ Las estructuras reportadas de NAMPT contienen un homodímero con dos sitios activos, donde los ligandos inhibidores de NAMPT normalmente ocupan el sitio activo al que se une NAM y además posee una cavidad en forma de túnel que se extiende desde el sitio de unión de NAM (figura 6.3).¹⁹²

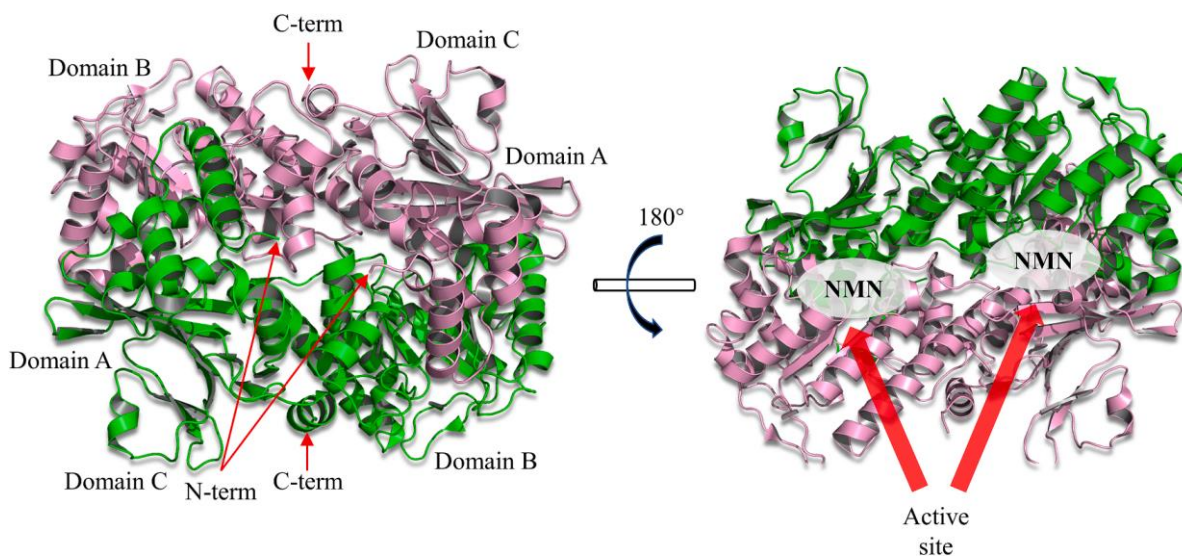


Figura 6.3. Estructura cristalográfica de NAMPT humana (PDB ID: 2E5B).¹⁹³

NAMPT también es conocido como visfatina o factor potenciador de colonias de células pre-B, ya que originalmente se identificó como un factor similar a una

191. Wang T., Zhang X., Bheda P., Revollo J.R., Imai S., Wolberger C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 661–662.

192. Wei Y., Xiang H., Zhang W. Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 970553.

193. Wen F., Gui G., Wang X., Li Y., Qin A.X., Zhou C., Zha X. Drug discovery targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT): Updated progress and perspectives. *Bioorg. Med. Chem.* **2024**, *99*, 117595.

citocina con sinergia a la interleucina-7 y al factor de células madres para promover la formación de colonias de células pre-B.¹⁹⁸ El eje NAMPT-NAD es vital para la producción energética conectado a las sirtuinas (SIRT), las poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) y la CD38 (enzima transmembranal, que juntas constituyen un sistema de defensa endógeno). NAMPT se expresa en todos los tejidos y su secuencia codificante esta conservada en algunas especies de mamíferos y organismo inferiores como insectos, esponjas y procariotas.^{194,195}

NAMPT tiene dos formas: NAMPT intracelular (iNAMPT) y NAMPT extracelular (eNAMPT). iNAMPT se expresa en el citoplasma, el núcleo y mitocondrias y es la enzima limitante de la velocidad en la vía de rescate para la biosíntesis de NAD⁺, afectando indirectamente a enzimas dependientes de este último, así como a la energía celular, y es de destacar que se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer.^{193,196} eNAMPT es una citoquina excretada principalmente en el tejido adiposo, pero también por macrófagos, células hepáticas, condrocitos, glóbulos blancos y células cancerosas de estómago y circula en el plasma y otros fluidos extracelulares, y se excreta en respuesta al estrés oxidativo y señales inflamatorias y también por células cancerosas.¹⁹⁷ Afecta las vías de señalización intracelular al unirse a receptores de superficie celular y participa en procesos celulares como la adaptación a respuestas de estrés, el antienvjecimiento, apoptosis, proliferación celular y regulación redox celular; sin

194. Wang S., Xu T., Li W., Miao C. Targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase as a potential therapeutic strategy to restore adult neurogenesis. *CNS Neurosci. Ther.* **2016**, *22*, 431–439.

195. Wang S., Miao C. Targeting NAMPT as a therapeutic strategy against stroke. *Stroke. Vasc. Neurol.* **2019**, *4*, 83–89.

196. Butler M.J., Volkoff H. The role of visfatin/ NAMPT in the regulation of feeding in goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, **2023**, *160*, 170919.

197. Indini A., Fiorilla I., Ponzone L., Calautti E., Audrito, V. NAD/NAMPT and mTOR pathways in melanoma: Drivers of drug resistance and prospective therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9985.

embargo, su mecanismo sigue sin estar completamente dilucidado.^{198,199} eNAMPT está sobreexpresado en ciertos tipos de neoplasias malignas que contribuyen a la supervivencia celular, la proliferación y resistencia al tratamiento por quimioterapia.^{197,200} NAMPT como enzima intracelular y extracelular tiene un papel sobre las células tumorales aumentando la agresividad del tumor por la regulación de ciertos procesos metabólicos que incluyen la adaptación, la reparación del ADN, la expresión génica, vías de señalización, invasión celular, metástasis, angiogénesis, regulación inmune, secreción de citoquinas proinflamatorias e inmunosupresoras y resistencia al estrés genotóxico.^{201,202}

NAMPT puede exhibir respuestas adaptativas a procesos patológicos mediante la regulación de la respuesta inflamatoria, apoptosis celular, metabolismo de la glucosa y el estrés oxidativo.²⁰³ La sobreexpresión de NAMPT se ha detectado en varios procesos malignos humanos, como el cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer colorrectal, entre otros asociado a tumorigénesis.^{185,204}

La NAMPT es la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de NAD⁺ y debido a que las células cancerígenas tienen una alta demanda de este último, la

-
198. Sampath D., Zabka T.S., Misner D., O'Brien T.G., Dragovich P.S. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacol. Therapeut.* **2015**, *151*, 16–31.
199. Travelli C., Colombo G., Mola S., Genazzani A.A., Porta, C. NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. *Pharmacol. Res.* **2018**, *135*, 25–36.
200. Li D., Chen Y., Wang S., Liu J., Chai L., Zhang Q., Qiu Y., Chen H., Shen N., Shi X., Li M. NAMPT mediates PDGF-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation by TLR4/NF- κ B/PLK4 signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *961*, 176151.
201. Gasparrini M., Audrito V. NAMPT: A critical driver and therapeutic target for cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2022**, *145*, 106189.
202. Dalamaga M., Christodoulatos G.S., Mantzoros, C.S. The role of extracellular and intracellular nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cancer: Diagnostic and therapeutic perspectives and challenges. *Metabolism*, **2018**, *82*, 72–87.
203. Zhu Y., Xu P., Huang X., Wen S., Liu L., Shuai Z., Zhao R., Hu X., Wang G. From rate-limiting enzyme to therapeutic target: The promise of NAMPT in neurodegenerative diseases. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 920113.
204. Zhang P., Wang W., Guo M., Zhou L., Dong G., Xu D., Sheng C. Discovery of potent NAMPT-targeting PROTACs using FK866 as the warhead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2023**, *92*, 129393.

inhibición de NAMPT podría detener la proliferación celular y con ello se convierte en una diana terapéutica interesante para el tratamiento del cáncer.²⁰⁵

6.1.3. Inhibidores de NAMPT como potenciales agentes antitumorales

El primer intento de identificar inhibidores de NAMPT se remonta a 1972, donde se evaluaron inhibidores derivados de nicotinamida; sin embargo, al no contar con la enzima purificada era difícil comprender su mecanismo de acción, pero estos compuestos funcionaron como modelo para desarrollar moléculas inhibitoras de NAMPT. A partir del año 2013 los análisis estructurales, de actividad biológica y potencial terapéutico de inhibidores de NAMPT, favorecieron el diseño racional de inhibidores de esta enzima.²⁰⁶

El diseño de inhibidores de NAMPT clásico consiste en la combinación de una cabeza (heterociclo de nitrógeno, normalmente piridina sustituida en *meta* o en *para*), como mimético de NAM, un espaciador y un grupo hidrofóbico como cola (figura 6.4).^{198,207} Los primeros inhibidores de NAMPT con potencial uso oncológico fueron los compuestos FK866 y CHS828, los cuales se han estudiado en fase clínica; sin embargo, mostraron toxicidad gastrointestinal y trombocitopenia a ciertas dosis, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes.²⁰⁸

FK866 fue identificado por Max Hasmann e Isabel Shemainda en 2002 como una clase nueva de compuestos inductores de muerte celular y fue el primer

205. Ozgencil F., Eren G. Field-based 3D-QSAR studies on amide- and urea-containing NAMPT inhibitors. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2023**, *242*, 104984.

206. Galli U., Travelli C., Massarotti A., Fakhfour G., Rahimian R., Tron G.C., Genazzani, A.A. Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6279–6296.

207. Dong G., Chen W., Wang X., Yang X., Xu T., Wang P., Zhang W., Rao Y., Miao C., Sheng, C. Small molecule inhibitors simultaneously targeting cancer metabolism and epigenetics: discovery of novel nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7965–7983.

208. Bai J., Majjigapu S.R., Sordat B., Poty S., Vogel P., Elías-Rodríguez P., Vargas Â., Carmona A.T., Caffa I., Ghanem M., Khalifa A., Monacelli F., Cea M., Robina I., Gajate C., Mollinedo F., Bellotti A., Nahimana A., Duchosal M.A., Nencioni A. Identification of new FK866 analogues with potent anticancer activity against pancreatic cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *239*, 114504.

inhibidor de NAMPT del que hay reporte, con capacidad para inducir apoptosis en HepG2 (carcinoma hepático), con una IC_{50} de aproximadamente 1.0 nM. Se comprobó que su mecanismo de acción es suprimir la actividad respiratoria mitocondrial debido a la reducción de la producción de NAD.^{186,209}

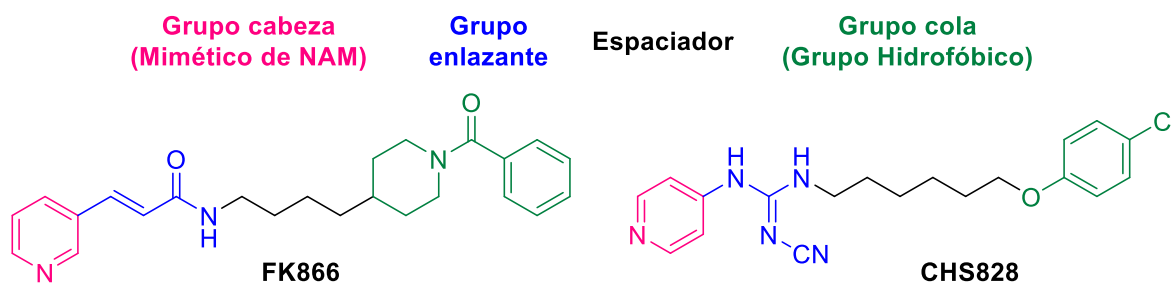


Figura 6.4. Inhibidores de NAMPT de primera generación.

CHS828 es una piridinil cianoguanidina con actividad anticancerígena desarrollado por la compañía Leo Pharma A/S (Dinamarca). Fue reportado en 1997 por Björkling y colaboradores, y mostró un potente efecto anticancerígeno contra células de cáncer de pulmón y de mama ($IC_{50}=31$ nM en células MCF-7 y $IC_{50}=2.7$ nM en células NYH, respectivamente).²¹⁰ No fue hasta 2008 que Olesen *et al.* demostraron su actividad de bloqueo de NAMPT en células cancerígenas llevando a su muerte celular al reducir la producción de NAD.²¹¹ Gracias a su evaluación en fase clínica, se han diseñado diversos profármacos con mejor farmacocinética y solubilidad.¹⁸⁶

Otro inhibidor de NAMPT en fase clínica I es OT-82 (figura 6.5) y fue diseñado por OncoTaris en 2019. Su mecanismo de acción es por el control en la producción

209. Hasmann M., Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res.* **2003**, 63, 7436–7442.

210. Schou C., Ottosen E.R., Petersen H., Björkling F., Latini S., Hjarnaa P.V., Bramm E., Binderup L. Novel cyanoguanidines with potent oral antitumour activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 3095–3100.

211. Olesen U.H., Christensen M.K., Björkling F., Jäätelä M., Jensen P.B., Sehested M., Nielsen S. Anticancer agent CHS-828 inhibits cellular synthesis of NAD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 367, 799–804.

de NAD y ATP que llevó a la muerte celular por apoptosis. Este compuesto presentó una fuerte acción contra neoplasias malignas hematopoyéticas con una $IC_{50}= 2.89$ nM y en células no hematopoyéticas con una $IC_{50}=13.03$ nM y una potente inhibición de NAMPT, con $IC_{50}=41$ nM. Por otro lado, en estudios toxicológicos realizados en ratones y primates no se observaron efectos toxicológicos a nivel cardíaco, neurológico o en retinas, por lo que OT-82 es un candidato para el tratamiento de neoplasias hematológicas.²¹²

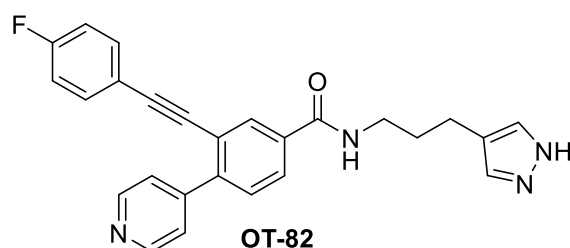


Figura 6.5. Inhibidor de NAMPT OT-82.

Los inhibidores de NAMPT de segunda generación han sido clasificados por He y col.²¹³ en cuatro tipos: 1) inhibidores de NAMPT siguiendo el modelo clásico; 2) inhibidores de NAMPT estructuralmente distintos; 3) inhibidores de NAMPT sin sustrato; 4) inhibidores duales.

Ejemplo de derivados que siguen el modelo clásico fueron los reportados por Zheng *et al.*²¹⁴ Presentaron una serie de ureas y tioureas como inhibidores de NAMPT. De entre todos los derivados, el análogo con grupo enlazante tioureido **151**

212. Korotchkina L.G., Kazylkin D., Komarov P.G., Polinsky A., Andrianova E.L., Joshi S., Gupta M., Vujcic S., Kononov E., Toshkov I., Tian Y., Krasnov P., Chernov M.V., Veith J., Antoch M.P., Middlemiss S., Somers K., Lock R.B., Norris M.D., Gudkov, A.V. *et. al.* OT-82, a novel anticancer drug candidate that targets the strong dependence of hematological malignancies on NAD biosynthesis. *Leukemia*, **2020**, *34*, 1828–1839.

213. He T., Wang L., Wang T., Yang J., Zheng S., Tong J., Jiang S., Zhang X., Zhang K. Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *258*, 115607.

214. Zheng X., Bauer P., Baumeister T., Buckmelter A.J., Caligiur, M., Clodfelter K.H., Han B., Ho Y.K., Kley N., Lin J., Reynolds D.J., Sharma G., Smith C.C., Wang Z., Dragovich P.S., Oh A., Wang W., Zak M., Gunzner-Toste J., Bair K. W. *et. al.* Structure-based identification of ureas as novel nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4921–4937.

y ureido **152** fueron potentes inhibidores de NAMPT ($IC_{50}=7$ y 3 nM, respectivamente). Estudios computacionales predijeron la existencia de interacciones de ambos compuestos con Asp219 y Ser241 de la cadena lateral de NAMPT a través de enlaces de hidrógeno. Observaron que al sustituir el grupo ureido por una amida para obtener el derivado **153** se mejoraba la energía de interacción con NAMPT originando una $IC_{50}=9$ nM y una fuerte actividad antiproliferativa ($IC_{50}=10$ nM) frente a células A2780 (cáncer de ovario humano). La modificación de los grupos cabeza y cola con diferentes fragmentos originó los derivados **154** (GNE-617), **155** y **156**, con actividades inhibitorias y antiproliferativas (A2780) en el rango nM bajo (figura 6.6).

Es de destacar que GNE-617 en modelos *in vivo* de ratón provocó una regresión tumoral con xenoinjerto U251 a los 7 días de tratamiento (dosis: 25 mg/kg) y los efectos perduraron aun después de terminado el tratamiento, e inhibición de crecimiento tumoral de cáncer de colon a una dosis de 15 mg/kg. Sin embargo, GNE-617 presentó baja solubilidad en agua y provocó daño a la retina.²¹⁴

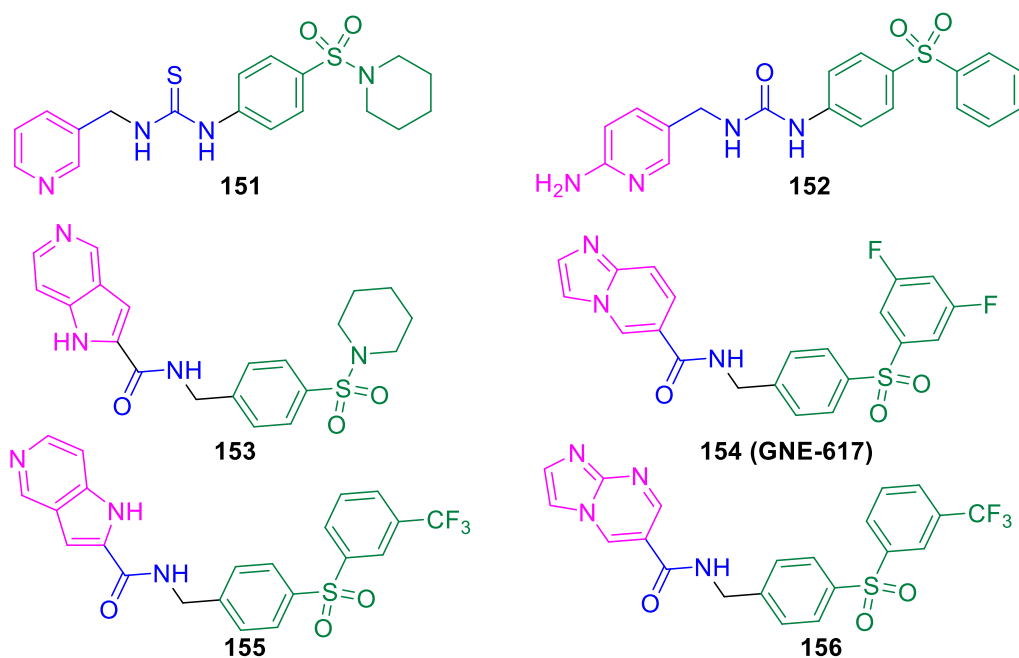


Figura 6.6. Tioureas, ureas y amidas con actividad inhibitoria de NAMPT.²¹⁴

Otro grupo enlazante como potencial inhibidor de NAMPT son los triazoles. Los primeros triazoles inhibidores de NAMPT fueron reportados por Tron y colaboradores en 2010.²¹⁵ Ellos reemplazaron la 3-(piridin-3-il) acrilamida de FK866 con un triazol 1,4-disustituido (figura 6.7). Los derivados con la piridina *meta* sustituida presentaron actividad citotóxica en el rango nM. Al realizar un estudio de relación estructura-actividad observaron que el mejor efecto lo tuvo el grupo cola bifenilo >> 1,1'-difenil éter > 1,1'-bifenilmetano ≥ 1,1'-difeniletano y con respecto al grupo espaciador la mejor actividad fue para n=8 > n=6 > n=7. En base a lo anterior, el compuesto **158b** fue el que presentó mejor actividad antiproliferativa frente a líneas de cáncer de leucemia, colon, melanoma, ovario, renal y próstata.

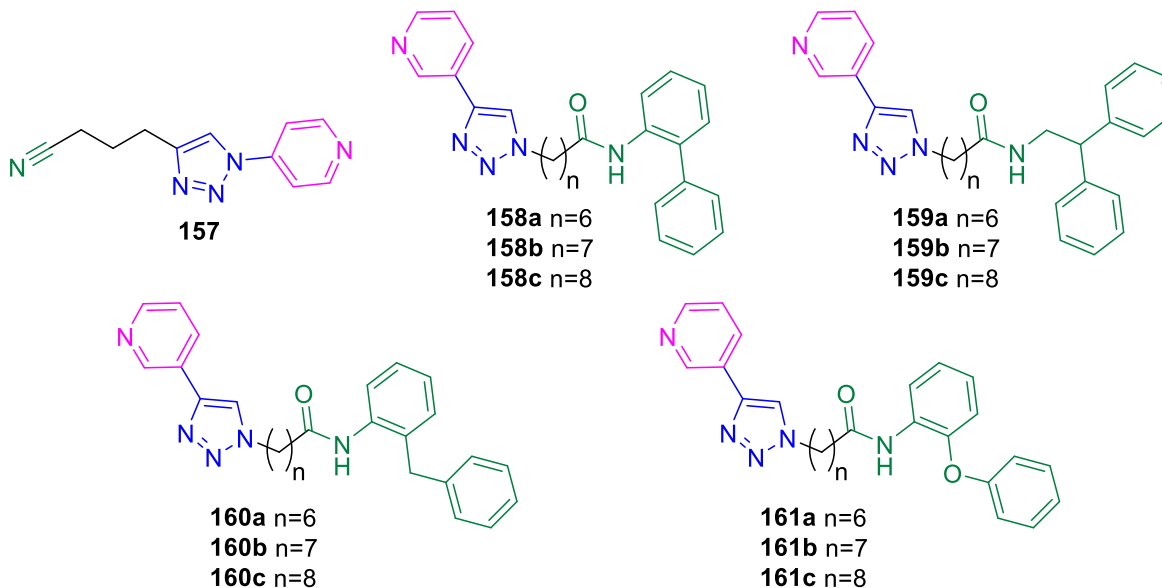


Figura 6.7. Primeros derivados de triazol inhibidores de NAMPT sintetizados por Colombano *et al.*²¹⁵

En base a lo reportado por Tron y colaboradores, más recientemente Travelli *et al.* sintetizaron una serie de derivados de triazol con diferentes grupos cola

215. Colombano G., Travelli C., Galli U., Caldarelli A., Chini M.G., Canonico P.L., Sorba G., Bifulco G., Tron G.C., Genazzani A.A. A novel potent nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor synthesized via *click* chemistry. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 616–623.

hidrofóbicos como potenciales inhibidores de NAMPT (figura 6.8).²¹⁶ El compuesto más activo fue el **165c** en modelos de xenoinjerto y aloinjerto lo que corroboró su potencial antiproliferativo ($EC_{50}=5.2$ nM, células SH-SY5Y neuroblastoma) por medio de la inhibición de NAMPT ($IC_{50}=3.8$ nM) y disminución de los niveles de NAD ($IC_{50}=6.7$ nM). Adicionalmente, este derivado ayudó a disminuir la colitis en ratones, siendo el primer inhibidor de NAMPT con este tipo de efecto.

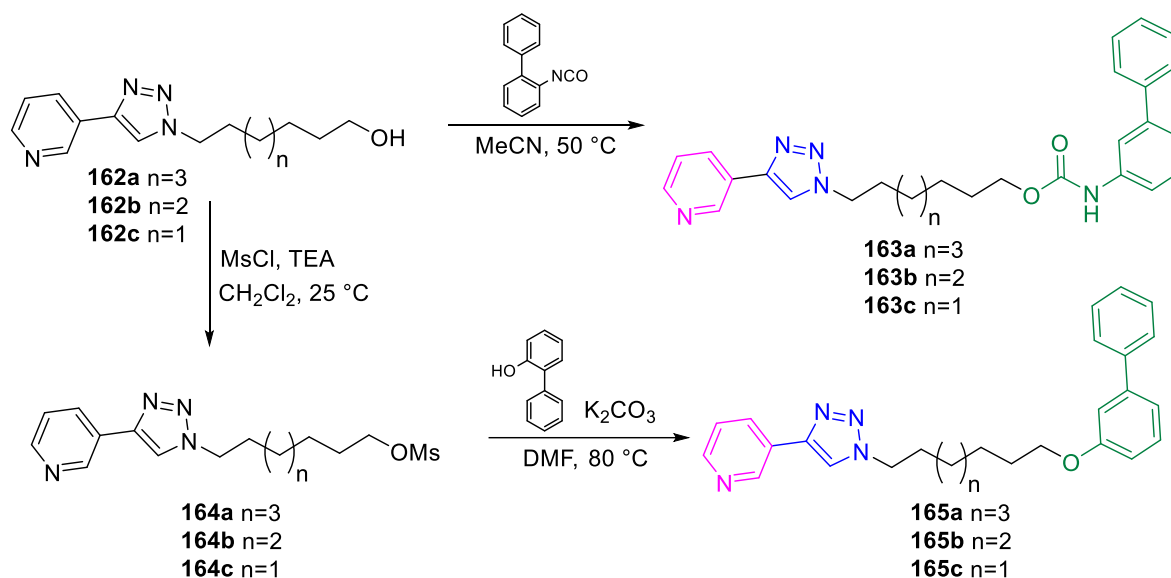
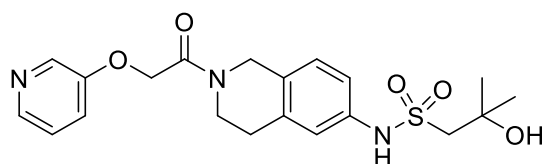


Figura 6.8. Ejemplo de algunos triazoles con actividad inhibitoria de NAMPT.²¹⁶

Un ejemplo de derivado inhibidor de NAMPT estructuralmente diferente es el descubierto por Zhao *et al.*, el LSN3154567, en la búsqueda de inhibidores selectivos de NAMPT para disminuir el riesgo de daño a retina al disminuir su permeabilidad (figura 6.9). Este derivado presentó un $IC_{50}=3.2$ nM contra NAMPT y estudios *in vivo* demostraron una disminución en el contenido de NAD a una dosis de 2 mg/kg en ratones, además de poseer actividad antiproliferativa en varias líneas celulares de cáncer. Con la administración oral general moderada de 2 mg/kg se

216. Travelli C., Aprile S., Rahimian R., Grolla A.A., Rogati F., Bertolotti M., Malagnino F., Di Paola R., Impellizzeri D., Fusco R., Mercalli V., Massarotti A., Stortini G., Terrazzino S., Del Grosso E., Fakhfour G., Troiani M.P., Alisi M.A., Grosa G., Sorba G., Canonico P.L., Orsomando G., Cuzzocrea S., Genazzani A.A., Galli U., Tron G.C. Identification of novel triazole-based nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors endowed with antiproliferative and antiinflammatory activity. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1768–1792.

reportó una biodisponibilidad del 39% (C_{max} = 57 nM) y un aclaramiento renal alto (CL =158.73 ml/min/kg). Al evaluar la toxicidad de este compuesto no se observó retinopatía en ratas en comparación con otros inhibidores de NAMPT y en combinación con ácido nicotínico se pudo tratar a perros con toxicidad retiniana.²¹⁷



LSN3154567

NAMPT IC_{50} = 3.1 nM

A2780 IC_{50} = 11.5 nM

Figura 6.9. Estructura del inhibidor de NAMPT LSN3154567.²¹⁷

Con el objetivo de obtener inhibidores de NAMPT con mejor solubilidad en agua, Marra y colaboradores recientemente sintetizaron β -D-iminoribofuranósidos formados por diferentes heterociclos conectados a través de la posición anomérica del carbohidrato (figura 6.10). Evaluaron su actividad inhibitoria en diferentes líneas de células tumorales, la inhibición enzimática de NAMPT y la disminución intracelular de los niveles NAD^+ . Sin embargo, la presencia del iminoazúcar produjo una reducción en la potencia tanto de la inhibición de NAMPT, como antiproliferativa en comparación con FK866 (IC_{50} =2.4nM). De los derivados preparados, el compuesto **174** tuvo la mejor actividad antiproliferativa, aunque moderada en células MiaPaCa-2 (células de cáncer de páncreas) con una IC_{50} =32 μ M. Para este último, el agotamiento de NAD^+ a dosis de 100 mM, después de 24 h, fue del 79%. Por lo cual, este tipo de derivados son prometedores para el desarrollo de inhibidores de NAMPT.²¹⁸

217. Zhao G., Green C.F., Hui Y., Prieto L., Shepard R L., Dong S., Wang T., Tan B., Gong X., Kays L., Johnson R.L., Wu W., Bhattachar S., Del Prado M., Gillig J.R., Fernandez M., Roth K.D., Buchanan S.G., Kuo M., Geeganage S., Burkholder T.P. Discovery of a highly selective NAMPT inhibitor that demonstrates robust efficacy and improved retinal toxicity with nicotinic acid coadministration. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2677–2688.

218. Conforti I., Benzi A., Caffa I., Bruzzone S., Nencioni A., Marra A. Iminosugar-based nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors as potential anti-pancreatic cancer agents. *Pharmaceutics*, **2023**, *15*, 1472.

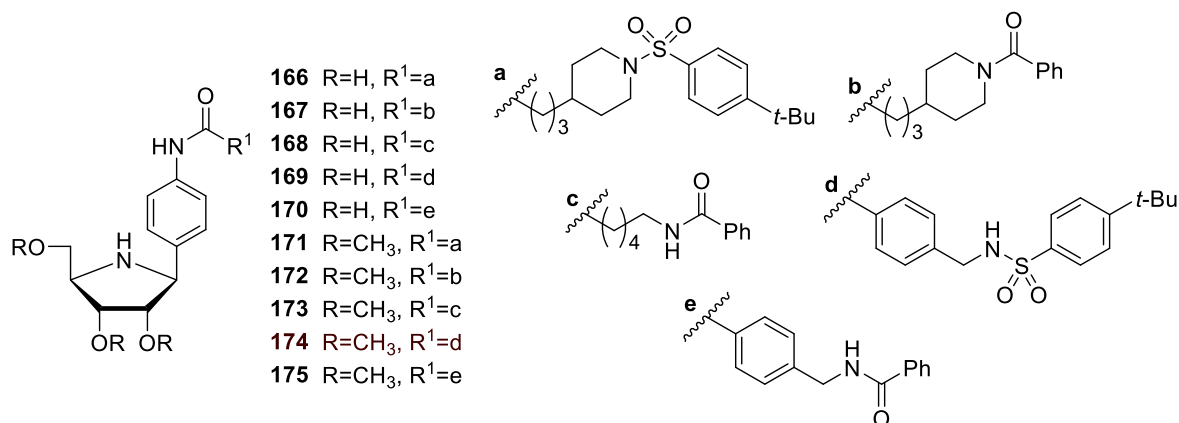


Figura 6.10. Derivados β -D-Iminoribofuranósidos inhibidores de NAMPT.²¹⁸

Ejemplo de inhibidores de NAMPT sin sustrato fueron las ureas de isoindolina reportados por Curtin *et al.*²¹⁹ Los inhibidores de NAMPT cuentan con un átomo de nitrógeno básico indispensable para la interacción con la enzima, sin embargo, las ureas reportadas carecían del heteroátomo con nitrógeno como grupo cabeza. De la serie de compuestos preparados, el **176** y **177** (figura 6.11) presentaron una buena actividad antiproliferativa en el rango nM y actividad antitumoral *in vivo* en modelo de xenoinjerto en ratón. Ambos compuestos presentaron una excelente disponibilidad oral (100 y 59% respectivamente), aclaramiento renal de 0.11 L/h/kg y 0.26 L/h/kg y una vida media de 4.8 y 3 h, respectivamente. Los valores de reducción de crecimiento tumoral en ratón fueron del 90% y 78% para **177** y **176**, respectivamente. Al evaluar la inhibición de NAMPT obtuvieron valores de K_i = 56 y 83 nM para **176** y **177**, respectivamente. Los resultados, aunque no son mejores a moléculas inhibitoras de NAMPT de referencia, marcaron la pauta para nuevos derivados de este tipo.

219. Curtin M.L., Heyman H.R., Clark R.F., Sorensen B.K., Doherty G., Hansen T.M., Frey R.R., Sarris K., Aguirre A.L., Shrestha A., Tu N.P., Woller K.R., Pliushchev M., Sweis R.F., Cheng M., Wilsbacher J.L., Kovar P., Guo J., Cheng D., Longenecker K.L., Raich D., Korepanova A.V., Soni N.B., Algire M.A., Richardson P.L., Marin V.L., Badagnani I., Vasudevan A., Buchanan F.G., Maag M., Chiang G.G., Tse C., Michaelides M. SAR and characterization of non-substrate isoindoline urea inhibitors of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 3317–3325.

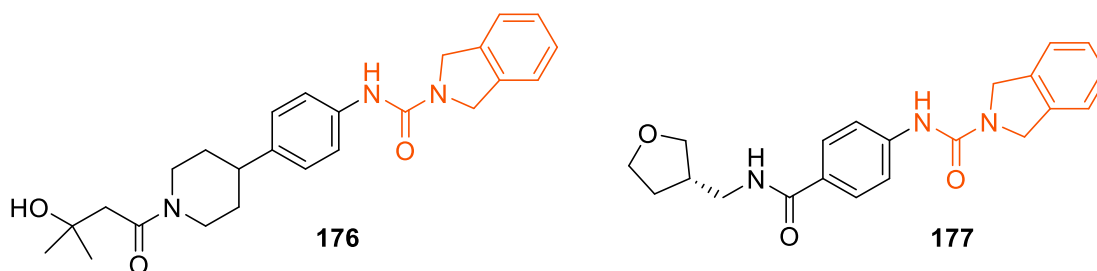


Figura 6.11. Ureas de isoindolina con potencial actividad inhibitoria de NAMPT.²¹⁹

Con la finalidad de mejorar problemas de farmacoresistencia, farmacocinética y de toxicidad se ha optado por el diseño de moléculas híbridas, que puedan presentar dos mecanismos de acción diferentes (inhibidores duales) para el desarrollo de fármacos. En algunos casos, son más beneficiosos en comparación a las terapias combinadas, sobre todo por la disminución de efectos secundarios.¹⁸⁶

Un ejemplo de inhibidor dual es el reportado por Dong *et al.* (figura 6.12).²⁰⁷ Diseñaron moléculas que inhibían simultáneamente a NAMPT e histona desacetilasa (HDAC). Las HDAC's tienen un papel importante en la regulación de la expresión genética de la tumorigénesis y el mantenimiento del tumor y constituyen la diana terapéutica de diversos fármacos en el tratamiento del cáncer cutáneo y de linfomas de células T.²²⁰ De los derivados reportados, el compuesto **178** presentó una actividad excelente y equilibrada contra NAMPT ($IC_{50}=31$ nM) y HDAC1 ($IC_{50}=55$ nM), y su posible mecanismo de acción sería la inducción de apoptosis, autofagia y consecuente muerte celular. Además, **178** presentó eficacia antitumoral *in vivo* en modelo de xenoinjerto en ratón con células HCT116 a una dosis de 25 mg/kg dos veces al día durante 21 días consecutivos. A dosis de 2 mg/kg en rata se observó que la vida media de **178** fue de 1.8 h y un aclaramiento plasmático de 745 ng/ml, lo cual indicó problemas de farmacocinética. Sin embargo, estos compuestos constituyen una buena base para el diseño de otras moléculas duales.

220. Zhou M., Yuan M., Zhang M., Lei C., Aras Ö., Zhang X., An F. Combining histone deacetylase inhibitors (HDACis) with other therapies for cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 226, 113825.

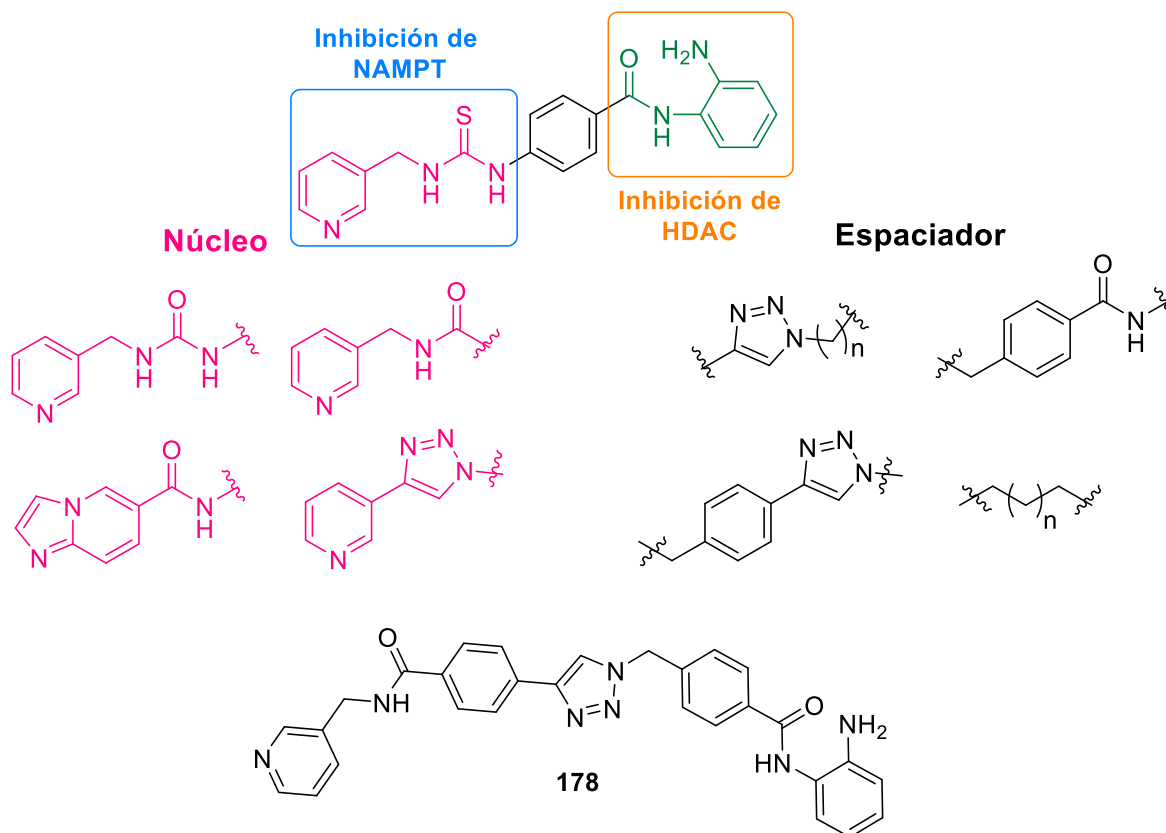


Figura 6.12. Diseño de inhibidores duales de NAMPT/HDAC.²²⁰

En base a todo lo anterior, un reporte reciente de derivados con actividad inhibitoria sobre NAMPT con actividad antitumoral por parte de Robina y colaboradores,²²¹ se basó en la preparación de tres familias de compuestos basados en inhibidores de NAMPT de primera generación (figura 6.13), que contienen grupos (piridin-3-il)triazol, (piridin-3-il)tiourea y (piridin-3/4-il)cianoguanidinas como grupo conector y un grupo furano como grupo cola (como mimético del grupo benzamida en FK866).

Los derivados se evaluaron en diferentes líneas de células de cáncer hematológico y de tumores sólidos, mostrando una actividad citotóxica en el rango

221. Fratta S., Binięcka P., Moreno-Vargas A.J., Carmona A.T., Nahimana A., Duchosal M.A., Piacente F., Bruzzone S., Caffa I., Nencioni A., Robina I. Synthesis and structure-activity relationship of new nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors with antitumor activity on solid and haematological cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 250, 115170.

nM o subnanomolar, inferiores a los reportados para el compuesto de referencia FK866. De los derivados sintetizados los compuestos **179**, **180** y **181** mostraron actividad citotóxica contra células ML2 (células de leucemia mieloide aguda) con una IC_{50} =18, 46 y 49 pM y contra MiaPaCa-2 (células de cáncer pancreático) con una IC_{50} =0.005, 0.455 y 2.81 nM, respectivamente, siendo la del compuesto **179** mucho más potente que FK866 (IC_{50} =2.4 nM). También es de destacar que cuando emplearon como grupo espaciador cadenas alquílicas, la cadena de 6C fue la que presentó mejor efecto citotóxico y de entre los grupos enlazantes, el grupo triazol fue el que presentó menor actividad citotóxica con respecto a las tioureas y cianoguanidinas. Se observó por otro lado, que al modificar el grupo piridina por isoindolina la actividad antitumoral decayó.

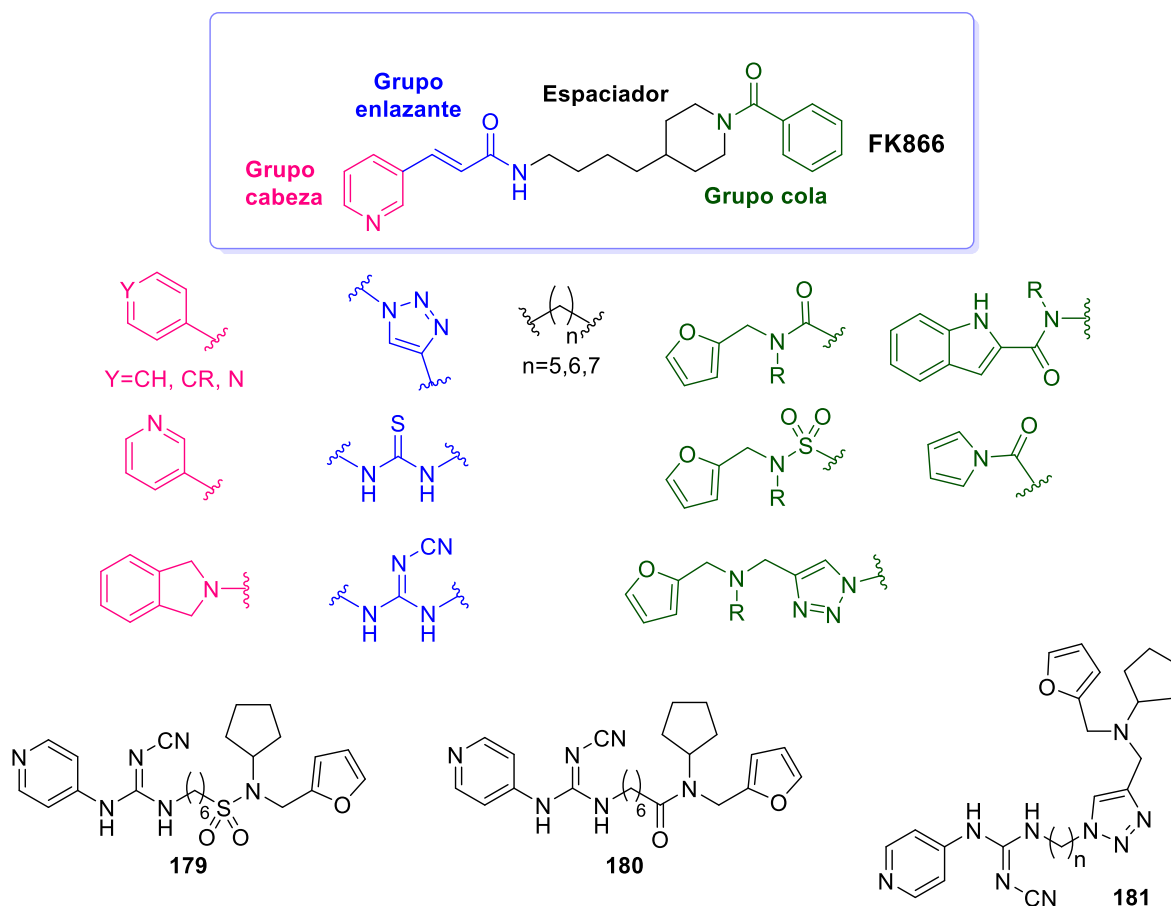


Figura 6.13. Inhibidores de NAMPT basados en FK866.²²¹

Con respecto a la inhibición de NAMPT el derivado **179** fue el más potente con una $IC_{50}=3.5$ nM, virtualmente idéntica a la del compuesto de referencia (FK866, $IC_{50}=3.3$ nM). En el estudio de concentración intracelular de NAD^+ , el cual se llevó a cabo en células MiaPaca-2, todos los compuestos evaluados redujeron la concentración de NAD^+ , lo que coincide con la posible inhibición de NAMPT como mecanismo de acción antitumoral. Sin embargo, la disminución dependiente del tiempo de los niveles de NAD^+ y ATP, podría indicar que la citotoxicidad puede deberse a la inducción de apoptosis y no a la reducción de los niveles de NAD^+ .²²¹

6.1.4. Anhidrasas carbónicas

Las anhidrasas carbónicas (CAs), son un grupo importante de metaloenzimas, aisladas por primera vez a partir de eritrocitos en 1933, y hasta la fecha se han caracterizado diferentes isoenzimas, cuya función principal es catalizar la conversión reversible de dióxido de carbono y agua, en bicarbonato y protón ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$).^{222,223} Las anhidrasas carbónicas se distribuyen en 8 familias genéticas, identificadas por letras griegas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \zeta, \eta, \theta, \iota$), y distribuidas en todos los seres vivos.²²⁴ Los mamíferos sólo codifican las α -CAs, y en particular, en el ser humano existen 15 isoformas, que se diferencian por su actividad enzimática y ubicación celular: CA II, CA III, CA VII, CA VIII, CA X, CA XI y CA XIII en el citosol; CA IV, IX, XII y XIV en la membrana celular; CA VA y VB en la mitocondria; y CA VI se encuentra en la saliva (figura 6.14).^{225,226} Este conjunto de enzimas ayuda a mantener el equilibrio ácido-base en tejidos y sangre, y participan en la respiración, en el transporte de CO_2 e iones, reabsorción ósea, ureagénesis, gluconeogénesis,

222. Berber N., Şahutoğlu A.S., Gökçe B., Çıkırıkçı K., Gençer N. Synthesis, characterization, carbonic anhydrase inhibitor activity, and docking studies of phenylthiazol-2(3h)-ylidene-isoquinoline-5-amine Derivatives. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1291, 136061.

223. Shao P., Ye J., Shen Y., Zhang S., Zhao J. Recent advancements in carbonic anhydrase for CO_2 capture: A mini review. *J. Nat. Gas Sci. Eng.* **2014**, 123, 205237.

224. Nocentini A., Supuran C.T., Capasso C. An overview on the recently discovered iota-carbonic anhydrases. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2021**, 36, 1988–1995.

225. Pinard M.A., Mahon B.P., McKenna R. Probing the surface of human carbonic anhydrase for clues towards the design of isoform specific inhibitors. *Biomed Res. Int.* **2015**, 2015, 453543.

226. Parn S., Lewis G., Knight M. Inhibition of carbonic anhydrase using aspirin is a novel method to block schistosomiasis infection of the parasitic trematode, *Schistosoma mansoni*, in the intermediate snail host, *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* **2023**, 254, 108618.

lipogénesis y secreción de electrolitos.²²⁷ Una expresión anómala de estas enzimas está relacionada a padecimientos como la obesidad, osteoporosis, glaucoma, edema, epilepsia y cáncer.²²⁸

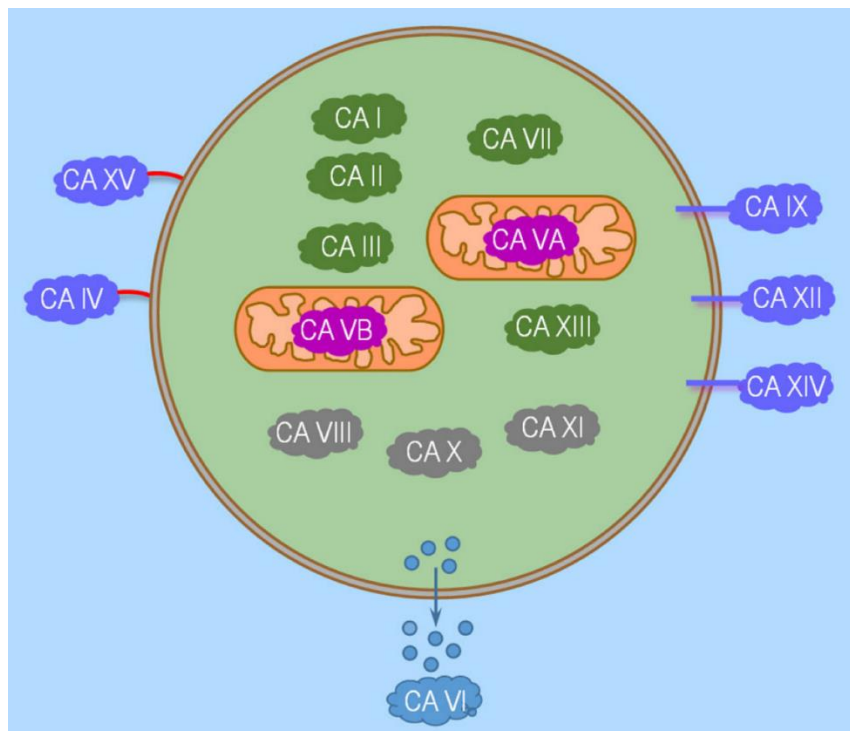


Figura 6.14. Representación gráfica de la localización de los miembros de la familia α-CA. Citosólicas: CA I, CA II, CA III, CA VII, CA VIII, CA X, CA XI y CA XIII; mitocondriales: CA VA y CA VB; secretoras: SA VI; transmembranales: CA IV, CA IX, CA XII, CA IV y CA XV.²²⁹

El sitio activo de las CAs presenta, en la mayor parte de los casos, un ion metálico de zinc (Zn^{2+}) coordinado tetraédricamente con tres residuos de histidina (His94, His96 y His119) y una molécula de agua/ion hidróxido, indispensable para la transformación del CO_2 a bicarbonato con una tasa de conversión de $10^4 - 10^6$

227. Mete E., Comez B., Inci G. H., Gulcin I., Supuran C.T. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory activities of new thienyl-substituted pyrazoline benzenesulfonamides. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, 31, 1–5.

228. Poggetti, V., Salerno, S., Baglini, E., Barresi, E., Da Settimo Passetti, F., Taliani, S. Carbonic Anhydrase Activators for Neurodegeneration: An Overview. *Molecules*, **2022**, 27, 2544.

229. Lee S., Boron W.F., Occhipinti R. Potential Novel role of membrane-associated carbonic anhydrases in the kidney. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 4251.

s⁻¹,²³⁰ lo que la convierte en una de las enzimas de mayor actividad catalítica. La catálisis de las CAs tiene como primer paso la formación del ion hidróxido de Zn mediante la desprotonación de la molécula de agua coordinada al zinc, posteriormente el ion hidróxido formado ataca nucleofílicamente al CO₂ para formar un intermediario de bicarbonato y finalmente el ion bicarbonato se libera por la adición de una molécula de agua, finalizando el ciclo catalítico (figura 6.15).²³¹

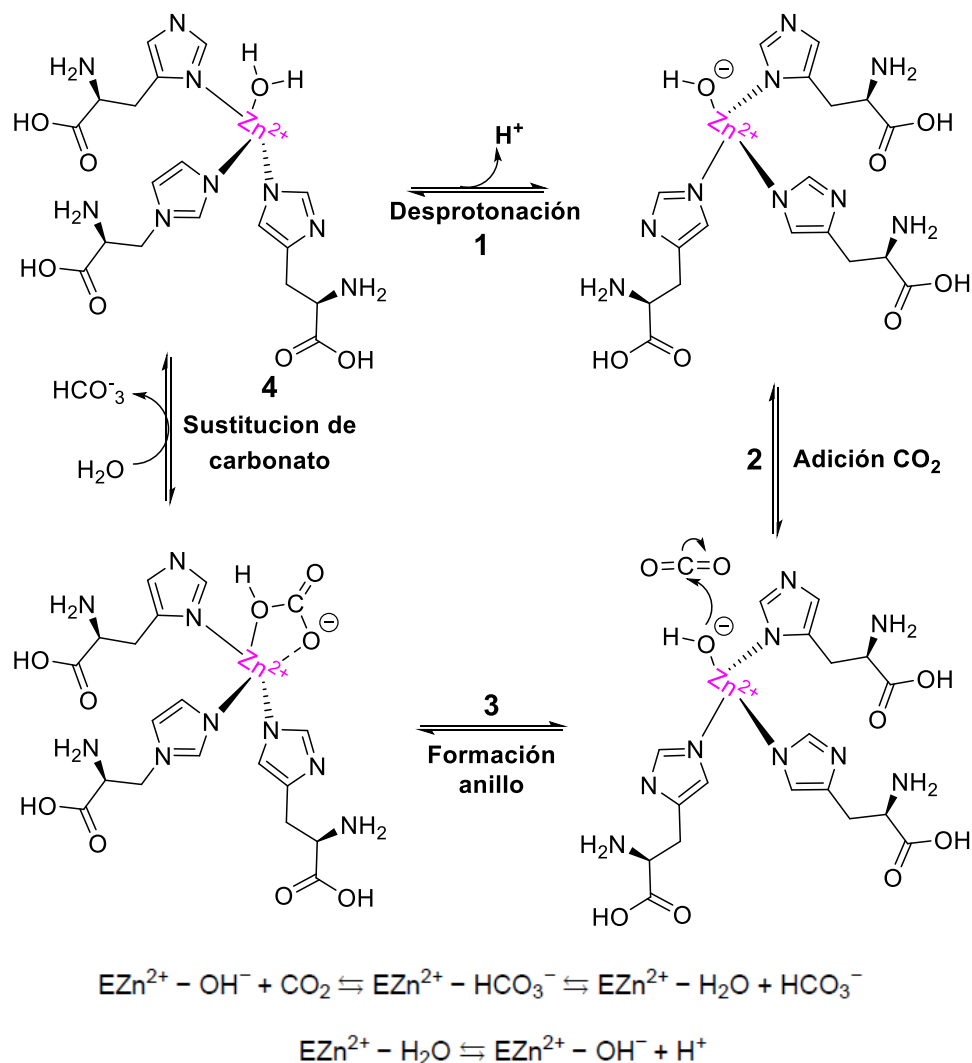


Figura 6.15. Ciclo catalítico de las anhidrasas carbónicas. Modificado de Sharma *et al.*²³⁰

230. Sharma T., Sharma S., Kamyab H., Kumar A. Energizing the CO₂ utilization by chemo-enzymatic approaches and potentiality of carbonic anhydrases: A review. *J. Clean. Prod.* **2020**, *247*, 119138.

231. Lomelino C.L., Andring J.T., McKenna, R. Crystallography and its impact on carbonic anhydrase research. *Int. J. Med. Chem.* **2018**, *2018*, 9419521.

A excepción de la CA IX, todas las CAs se encuentran expresadas en células de tejidos diferenciados, por lo que niveles anormales de CA IX se asocian a tumores, ya que no se expresa significativamente en tejidos normales, y principalmente se sobreexpresa en tumores hipóxicos. Estos niveles elevados de la CA IX también están correlacionados con la resistencia a las radio y quimioterapias dado que la acidosis extracelular afecta negativamente la absorción de fármacos y de la radiación,²³² así como a las inmunoterapias, ya que la acidosis inhibe las funciones de linfocitos T efectores.²³³ Por otro lado, la CA XII se encuentra presente en tejidos normales, y su expresión induce hipoxia, que se ha detectado en ciertos tipos de tumores renales, de ovario, mama, pancreático y gastrointestinal, y sobre todo está asociada a fenotipos de cáncer menos agresivos y bien diferenciados, en comparación con los fenotipos de los tumores que expresan CA IX.^{234,235} Por otro lado, las anhidrasas carbónicas I y II humanas se encuentran en el citosol y en esta Tesis se han considerado como isoenzimas no objetivo, por su amplia distribución en glóbulos rojos y otros tejidos. De esta manera, se han empleado para determinar la selectividad de los inhibidores de CAs preparados, para evitar efectos secundarios y de toxicidad.²³⁶

Gracias al estudio del mecanismo, las anhidrasas carbónicas se consideran en la actualidad como una diana terapéutica validada, habiéndose descrito un

232. Nocentini A., Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibitors as antitumor/antimetastatic agents: a patent review (2008-2018). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 729–740.

233. Pastorekova S., Gillies R.J. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 65–77.

234. Supuran C.T., Alterio V., Di Fiore A., Ambrosio K.D., Carta F., Monti S.M., De Simone G. Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*, 1799–1836.

235. Supuran C.T. Carbonic anhydrases and metabolism. *Metabolites*, **2018**, *8*, 25–30.

236. Baronas D., Knašienė B., Mickevičiūtė A., Jachno J., Naujalis E., Zubrienė A., Matulis D. Inhibitor binding to metal-substituted metalloenzyme: Sulfonamide affinity for carbonic anhydrase IX. *J. Inorg. Biochem.* **2024**, *256*, 112547.

elevado número de activantes²³⁷ e inhibidores de estas enzimas, algunos de los cuales se comercializan en la actualidad.²³⁸

Estructuralmente los inhibidores de CAs poseen tres unidades estructurales fundamentales: un grupo de unión a zinc (ZBG, *zinc binding group*), un soporte intermedio (aromático o heteroaromático) y una región “cola” de estructura variable. El ZBG tiene como función anclar moléculas al sitio activo de las CAs, coordinándose al ion $Zn(II)$ e interaccionando con los residuos Thr199 y Glu106, conservados en el sitio activo de todas las α -CA. El soporte a su vez interacciona con otros residuos del sitio activo y ayuda a estabilizar al ligando, mientras que la cola puede tener naturaleza tanto polar como lipofílica, con objeto de interaccionar con las mitades hidrofílica o hidrofóbica de la región próxima al centro activo de la enzima (figura 6.16).

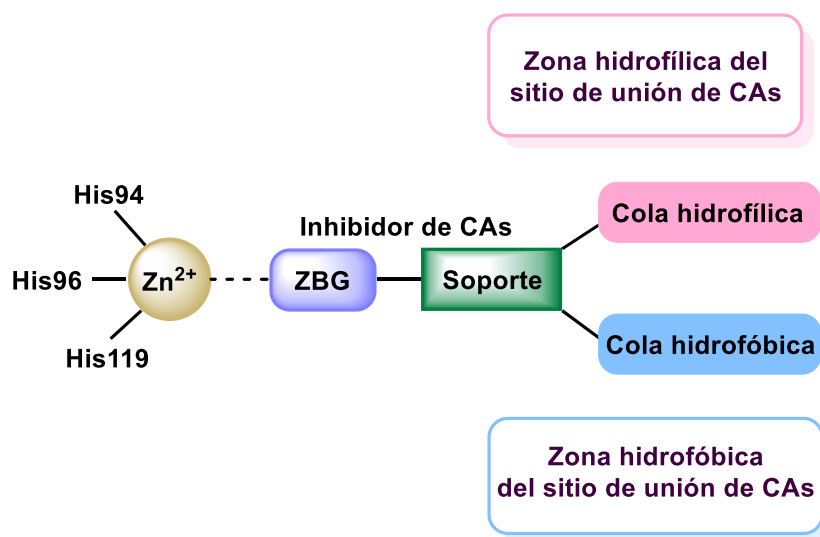


Figura 6.16. Representación esquemática de la estructura de los inhibidores de CAs. Adaptado de Cuffaro *et al.*²³⁹

237. Nocentini, A.; Cuffaro, D.; Ciccone, L.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Nuti, E.; Rossello, A.; Supuran, C.T. Activation of carbonic anhydrases from human brain by amino alcohol oxime ethers: towards human carbonic anhydrase VII selective activators *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 48–57.
238. Kumar S., Rulhania S., Jaswal S., Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2021**, *209*, 112923.
239. Cuffaro D., Nuti E., Rossello A. An overview of carbohydrate-based carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1906–1922.

Los inhibidores de CAs se dan dividido en dos grupos: inhibidores clásicos y no clásicos.^{225,240} Los inhibidores clásicos más estudiados son las sulfonamidas primarias (R-SO₂NH₂), aromáticas o heterocíclicas, sus isómeros (sulfamatos y sulfamidas) y tioésteres. Estos derivados se unen en su forma desprotonada de la sulfonamida mediante la coordinación con Zn con una estructura tetraédrica, y en su mayoría ejercen valores de inhibición en el rango micro y nanomolar (figura 6.17).^{234,241}

Ejemplos de estos inhibidores aprobados en fase clínica son la acetazolamida, metazolamida, dorzolamida, diclofenamida, zonisamida, indisulam, brimonidina (figura 6.17), entre otros, empleados para tratar enfermedades como el mal de altura, la hipertensión ocular, glaucoma, edema y epilepsia.²³⁸

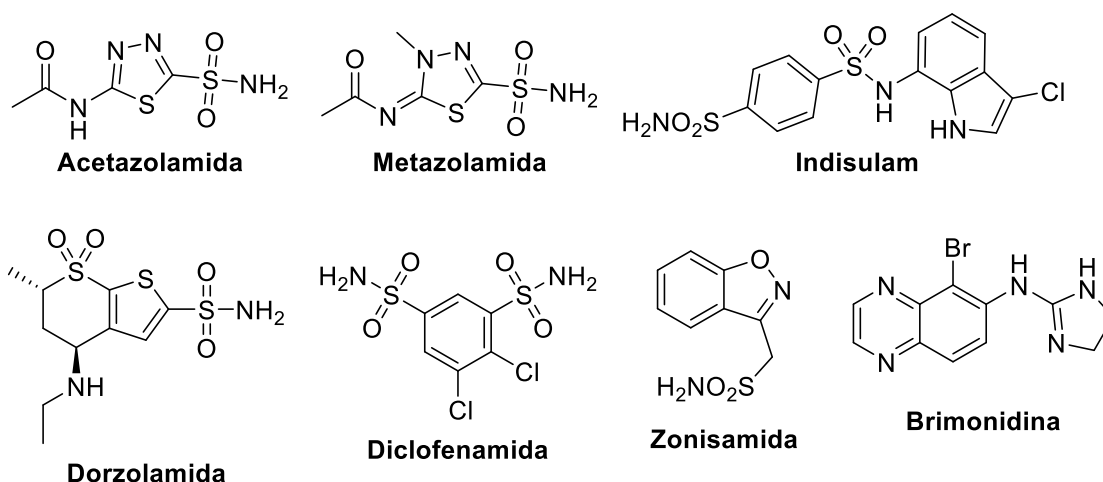


Figura 6.17. Ejemplos de inhibidores de anhidrasas carbónicas en fase clínica.

Entre los inhibidores no clásicos se han incluido a los fenoles, poliaminas, ácidos carboxílicos, cumarinas y sus derivados, y fullerenos (figura 6.18), estos compuestos interaccionan con las CA's por diferentes mecanismos. Por un lado, pueden anclarse al agua/ion hidróxido unido a Zn(II), o interaccionar con el borde

240. Singh S., Lomelino C.L., Mboge M.Y., Frost S.C., McKenna R. Cancer drug development of carbonic anhydrase inhibitors beyond the active site. *Molecules*, **2018**, *23*, 1045.

241. Lomelino C.L., McKenna R. Carbonic anhydrase inhibitors: A review on the progress of patent literature (2011–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 947–956.

exterior del sitio catalítico, lo que impide el ingreso de sustratos, inhibiendo la catálisis de la anhidrasa carbónica.^{241,242}

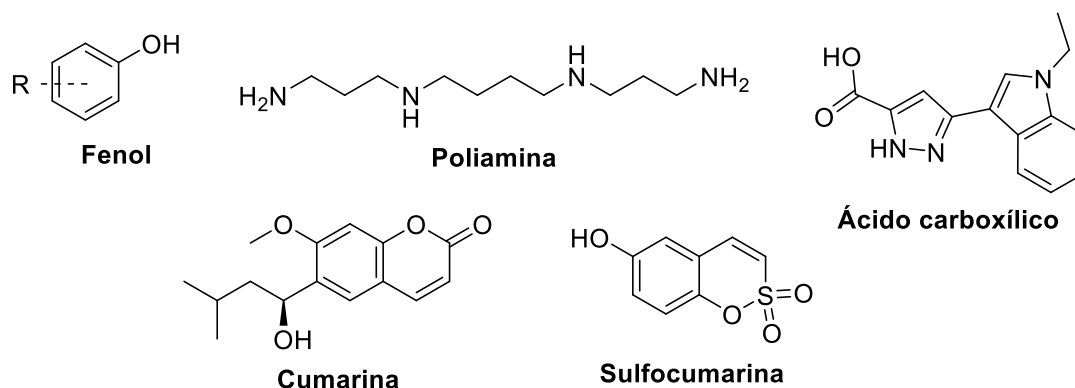


Figura 6.18. Ejemplos de inhibidores no clásicos de anhidrasas carbónicas.

En particular, las cumarinas, que son los inhibidores de CAs abordados en este capítulo de la Tesis Doctoral, actúan en realidad como profármacos; las CAs tienen también actividad de tipo lipasa, pudiendo hidrolizar la lactona de las cumarinas, originando un derivado del ácido o-hidroxicinámico, que ocluye la entrada al sitio activo de la enzima (*inhibidor suicida*). Las cumarinas suelen comportarse como inhibidores muy selectivos de CA IX y CA XII, y, por tanto, pueden ser un punto de partida interesante para el desarrollo de fármacos antitumorales.^{243,244}

242. Lomelino C.L., Supuran C.T., McKenna R. Non-classical inhibition of carbonic anhydrase. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1150.

243. Giovannuzzi S., De Luca V., Nocentini A., Capasso C., Supuran C.T. Coumarins inhibit η-class carbonic anhydrase from *Plasmodium falciparum*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2022**, *37*, 680–685.

244. Gümüş A., Bozdağ M., Akdemir A., Supuran C.T., Selleri S., Carta F., Supuran C.T. Thiosemicarbazide-substituted coumarins as selective inhibitors of the tumor associated human carbonic anhydrases IX and XII. *Molecules*, **2022**, *27*, 4610.

6.2. Objetivo general de sección

Sintetizar inhibidores duales de NAMPT y CAs IX y XII como potenciales agentes antiproliferativos. Como farmacóforo en la inhibición de NAMPT se empleará un residuo de piridin-3(ó 4)-il unido a un conector de tipo tiourea, cianoguanidina o amida. Por otro lado, se incorporará una unidad de cumarina con diferentes sustituyentes en C-3 y C-4 como profármaco en la inhibición de CAs relacionadas con procesos tumorales. Ambos farmacóforos estarán conectados por un espaciador de longitud fija (hexametileno).

6.3. Objetivos particulares de sección

- Sintetizar 7-hidroxicumarinas a partir de resorcinol, y tres diferentes β -cetoésteres (acetoacetato de etilo, 2-metilacetoacetato de etilo y 4,4,4-trifluoroacetoacetato de etilo).
- Realizar la alquilación de cada hidroxicumarina con 1,6-dibromohexano, seguido de la preparación de la consecuente azida con NaN_3 , e hidrogenación catalítica estándar para originar las correspondientes aminas en posición ω de la cadena alquílica.
- Sintetizar (piridin-3-il)amidas a partir de ácido nicotínico y los amino-derivados de cumarina.
- Preparar los intermediarios para la síntesis de cianoguanidinas (carbamimidatos) a partir de 3 y 4-aminopiridina con imidocarbonato de *N*-cianodifenilo.
- Sintetizar las correspondientes (piridin-3/4-il)cianoguanidinas, mediante la reacción de las aminas de cumarina con el correspondiente carbamimidato.
- Sintetizar las tioureas a partir de las aminas de cumarina con 3-piridilisotiocianato comercial.
- Evaluar la actividad antiproliferativa.
- Evaluar la inhibición de CAs humanas relacionadas con procesos tumorales (CA IX, XII), así como el índice de selectividad.
- Evaluar la inhibición de NAMPT.
- Establecer relaciones estructura-actividad.

6.4. Discusión de resultados

Para el diseño de los derivados inhibidores de NAMPT, este estudio se basó en el reporte de Fratta *et al.*²²¹ En este capítulo se abordó la preparación de 3 familias de inhibidores duales de NAMPT y CAs: tioureas, cianoguanidinas y amidas incorporando una unidad de piridina y de cumarina sustituida en cada extremo del espaciador (figura 6.19).

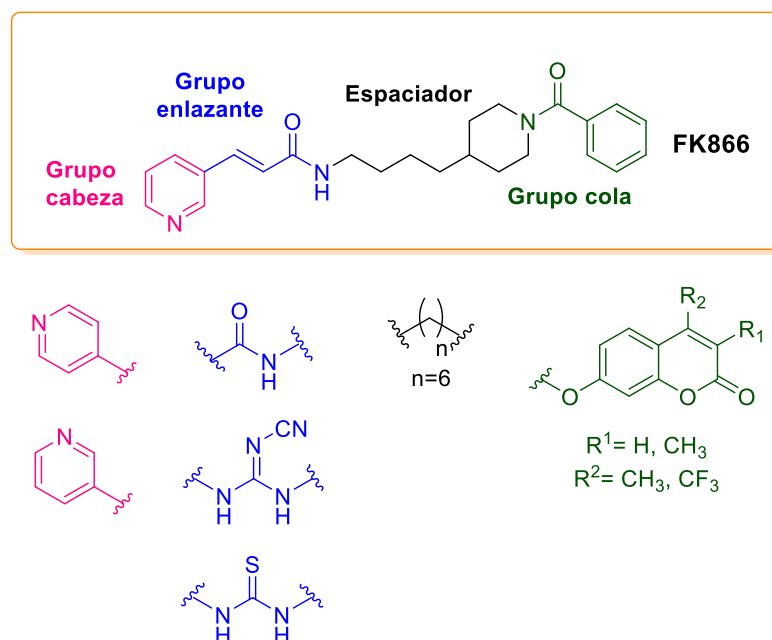
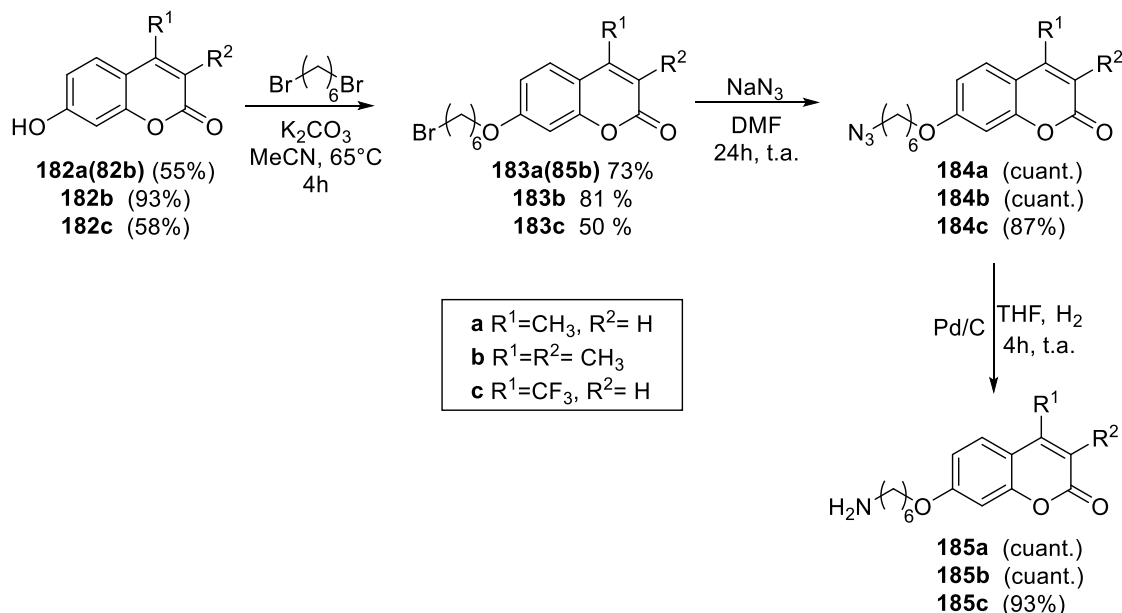


Figura 6.19. Diseño estructural de la familia de compuestos inhibidores duales de NAMPT-CAs sintetizados.

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de las 7-hidroxycumarinas **182a–c** (reacción de Pechmann entre resorcinol y diversos β -cetoésteres) y su alquilación en el hidroxilo fenólico mediante síntesis de Williamson (compuestos **183a–c**).

La preparación de las azidas de cumarina se realizó por una reacción S_N2 con azida de sodio, en DMF, obteniéndose los derivados **184a–c** con rendimientos de excelente a cuantitativos. Las azidas se utilizaron sin purificar para el siguiente paso de reacción (esquema 6.1), una hidrogenación estándar con catálisis

heterogénea, para originar las correspondientes aminas **185a–c**, intermedios clave en la preparación de las tres familias de inhibidores abordadas en este capítulo de la Tesis Doctoral.



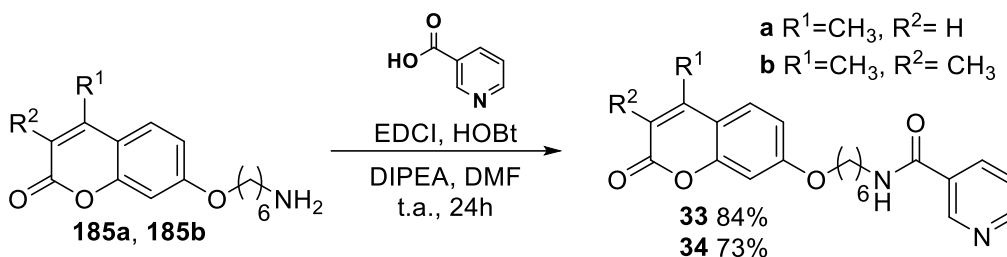
Esquema 6.1. Ruta de síntesis para la preparación de aminas derivadas de cumarinas.

Para la síntesis de amidas, se utilizó como reactivo de partida ácido nicotínico comercial que se acopló con las aminas **185a** y **185b** en medio básico (DIPEA), tal y como se muestra en el esquema 6.2, en presencia de EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y HOBt (1-hidroxibenzotriazol) como agentes acoplantes. EDCI tiene como función activar al ácido carboxílico para dar lugar a un intermediario más reactivo (*O*-acilisourea), que a su vez reacciona con HOBt para originar un éster (esquema 6.3),²⁴⁵ capaz de reaccionar más fácilmente con aminas y dar lugar a las amidas **33** y **34**.

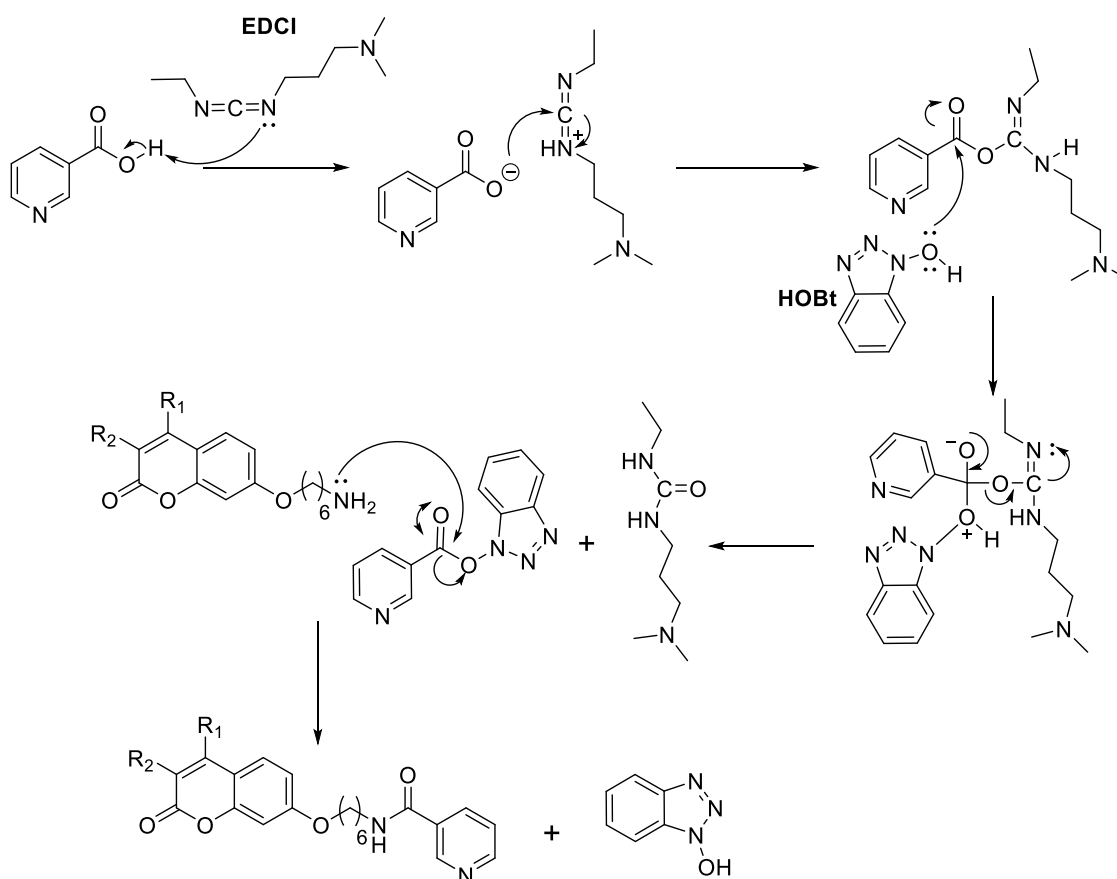
El mecanismo de reacción para la obtención de amidas con estos agentes acoplantes se muestra en el esquema 6.3. Consiste en primer lugar, en la formación del ion carboxilato del ácido nicotínico, seguida de la adición nucleofílica de éste a EDCI para formar el intermediario *O*-acilisourea. Posteriormente, se da una nueva

245. Magano J. Large-scale amidations in process chemistry: practical considerations for reagent selection and reaction execution. *Org. Process Res. Dev.* **2022**, 26, 1562–1689.

adición al carbonilo por parte de HOBt para dar lugar a la eliminación de la urea de EDCI y el correspondiente éster del ácido nicotínico con HOBt. Finalmente, se produce el ataque nucleofílico al carbonilo de dicho éster por parte de la amina de cumarina para dar las correspondientes amidas y eliminación de HOBt.



Esquema 6.2. Síntesis de amidas con potencial inhibición dual de NAMPT-CAs.



Esquema 6.3. Mecanismo de reacción para la formación de amidas mediada por EDCI/HOBt.

A modo de ejemplo, en la figura 6.20, se muestra el espectro de ^1H -RMN para el compuesto **34**. Las señales en 8.96, 8.71, 8.11 y 7.37 ppm corresponden a los protones de piridina; las señales en 7.47, 6.82, 6.76 ppm corresponden a los protones H-5', H-6', H-8', respectivamente, de la cumarina. Por otro lado, la señal en 6.32 ppm se asigna al NH del grupo amida y las señales localizadas en 3.99 (triplete) y 3.49 (cuartete) ppm se corresponden con los extremos de la cadena alquílica (H-6 y H-1, respectivamente). Por su parte, en el espectro de ^{13}C -RMN, la resonancia en 165.8 ppm, asignada al grupo carbonilo de amida, confirma la formación de esta (figura 6.21).

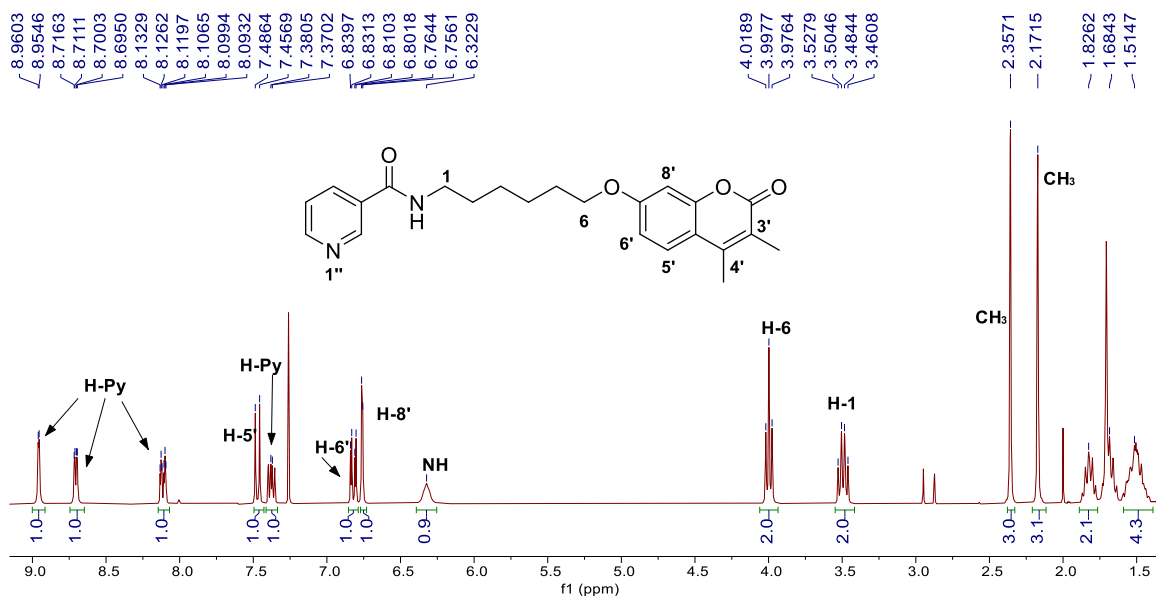


Figura 6.20. Espectro de ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) del compuesto **34**.

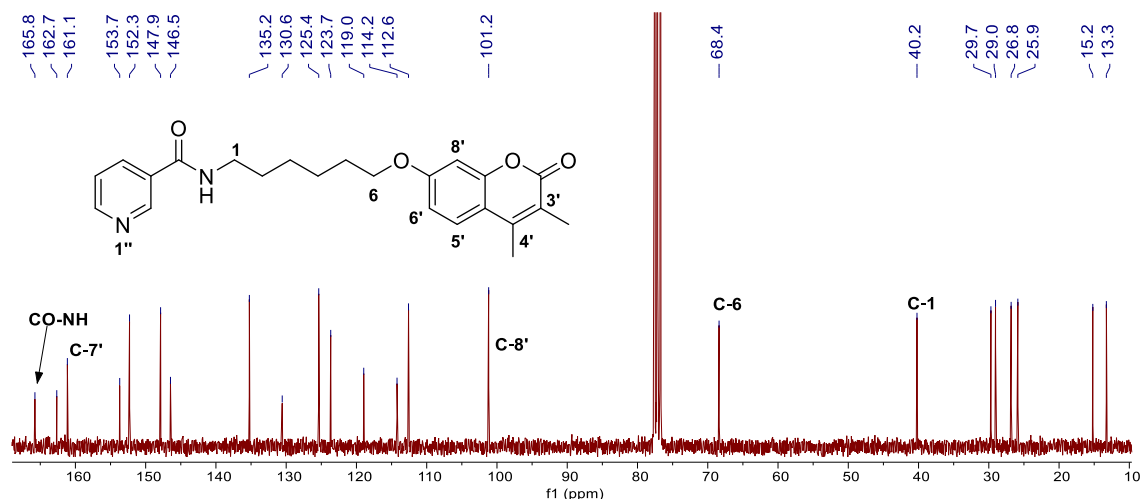
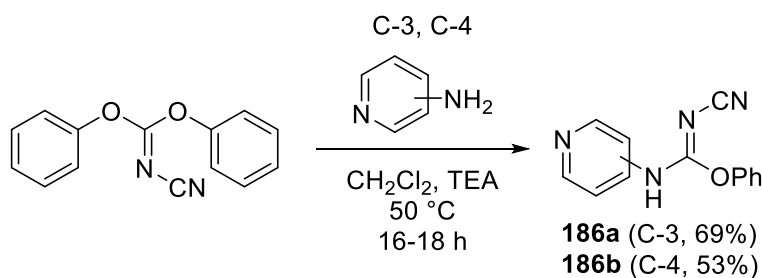


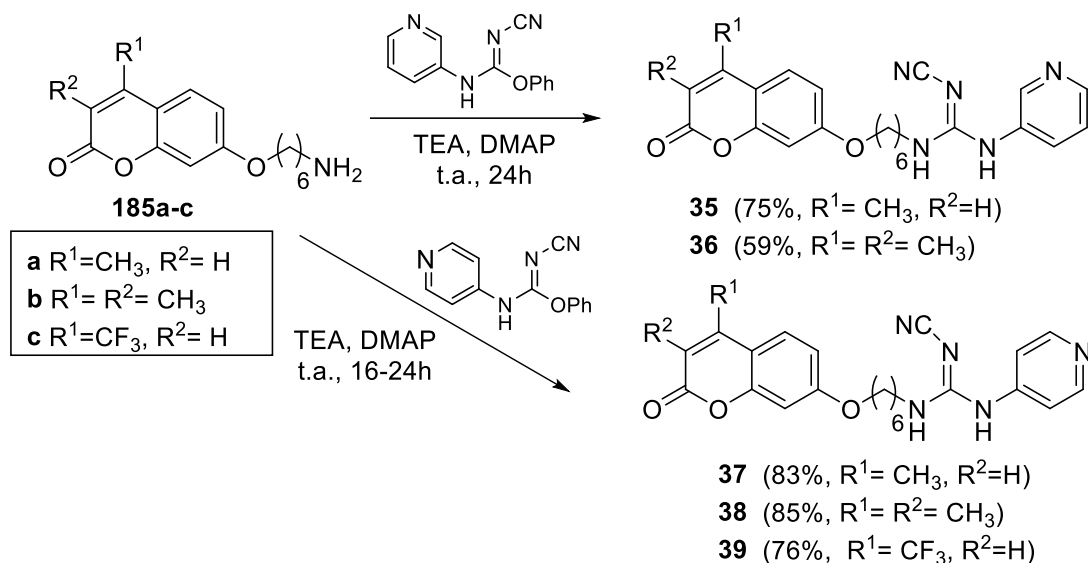
Figura 6.21. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **34**.

También se abordó la preparación de cianoguanidinas derivadas de piridina sustituidas en las posiciones C-3 y C-4. Para ello, en primer lugar, se sintetizó el correspondiente cianocarbamimidato de fenilo, a partir de cianocarbonimidato de difenilo comercial con 3 ó 4-aminopiridina en medio básico (TEA, esquema 6.4). Los carbamimidatos se obtuvieron con rendimientos moderados de 69% para **186a** y de 53% para **186b**.



Esquema 6.4. Ruta de síntesis de los carbamimidatos **186a,b**.

A continuación, se llevó a cabo el acoplamiento de los carbamimidatos **186a** ó **186b** con un exceso de las cumarinas **185a–c** en medio básico (TEA), en presencia de DMAP como catalizador (esquema 6.5). En total se obtuvieron 6 cianoguanidinas con rendimientos de moderados (**36**, 59%) a buenos (**38**, 85%).



Esquema 6.5. Síntesis de cianoguanidinas derivadas de cumarinas como potenciales inhibidores duales de NAMPT-CAs.

A modo de ejemplo, la figura 6.22 muestra el espectro de ¹H-RMN de la cianoguanidina **36** sustituida en C-3' de la piridina, de gran semejanza al indicado previamente para el compuesto **34**; en él se observan los protones del residuo de piridina (8.55, 8.50, 7.50 y 7.36 ppm) y de cumarina (7.47, 6.84 y 6.80 para H-5', H-6' y H-8', respectivamente). También pueden observarse las señales de los grupos NH unidos a la piridina y a la cadena alifática (7.72 y 5.17 ppm, respectivamente). En la región alifática destacan las señales que resuenan en 3.97 y 3.33 ppm, asignadas de nuevo a los extremos de la cadena hidrocarbonada (H-6 y H-1), así como los singuletes en 2.36 y 2.17 ppm, correspondientes a los dos grupos metilo sobre las posiciones C-3' y C-4' de la cumarina.

Por otro lado, en el espectro de ¹³C-RMN de **36** destacan las señales en 162.7 ppm (grupo carbonilo de la cumarina), 161.1 ppm (grupo imino de la cianoguanidina), así como la del grupo ciano (114.3 ppm). Adicionalmente, las señales en 68.3 y 42.3 ppm corresponden a los carbonos metilénicos situados en los extremos de la cadena alquílica y sobre 15.2 y 13.3 ppm las señales para los metilos de cumarina en las posiciones C-3' y C-4' (figura 6.23). Todo ello corrobora la formación de la cianoguanidina esperada.

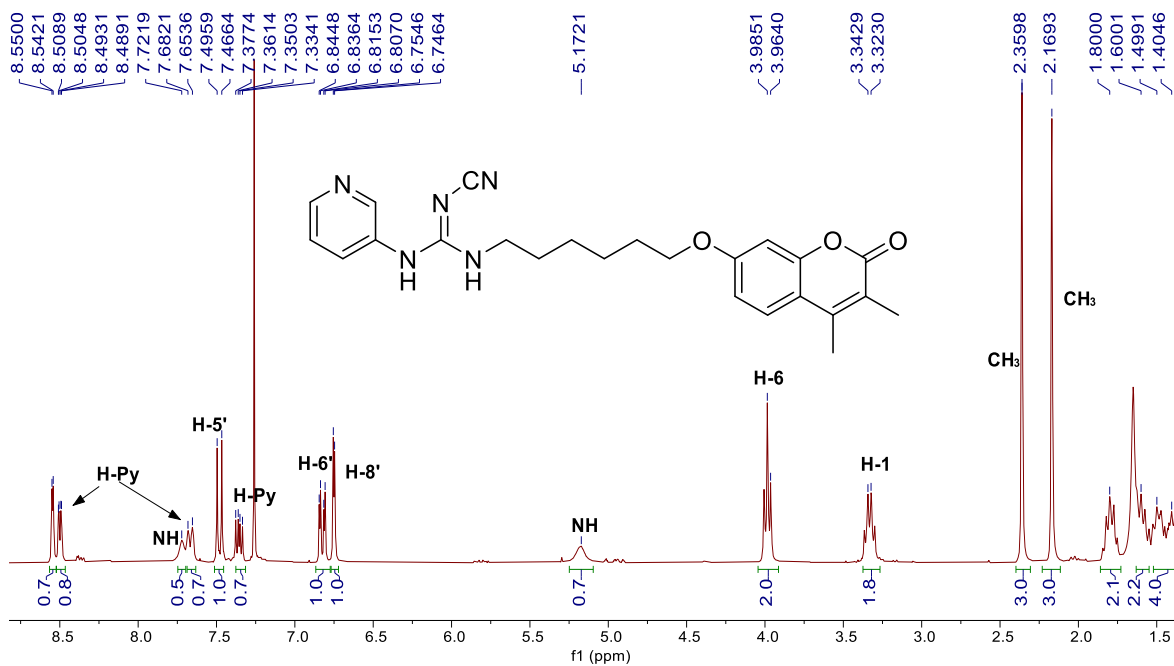


Figura 6.22. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 36.

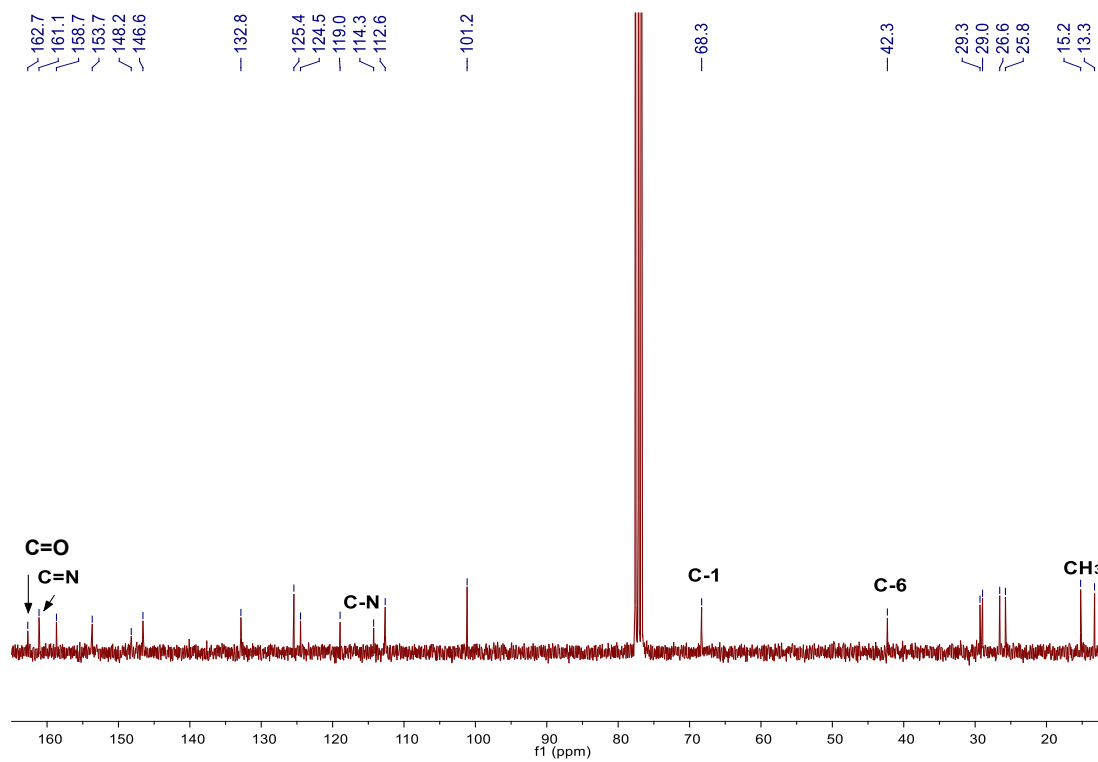


Figura 6.23. Espectro de ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) del compuesto 36.

También se incluyen los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN de la cianoguanidina **37** sustituida en C-4' de la piridina (figuras 6.24 y 6.25, respectivamente). Con respecto a los derivados anteriormente indicados, destaca la ausencia de sustituyentes en la posición C-3' de la cumarina, por lo que se observa un cuartete ancho correspondiente al protón H-3' en 6.07 ppm, con una $^4J_{\text{H,H}}=1.2$ Hz, por su acoplamiento alílico con los protones del CH_3 en C-4' de la cumarina, el cual se observa como una señal doble en 2.36 ppm.

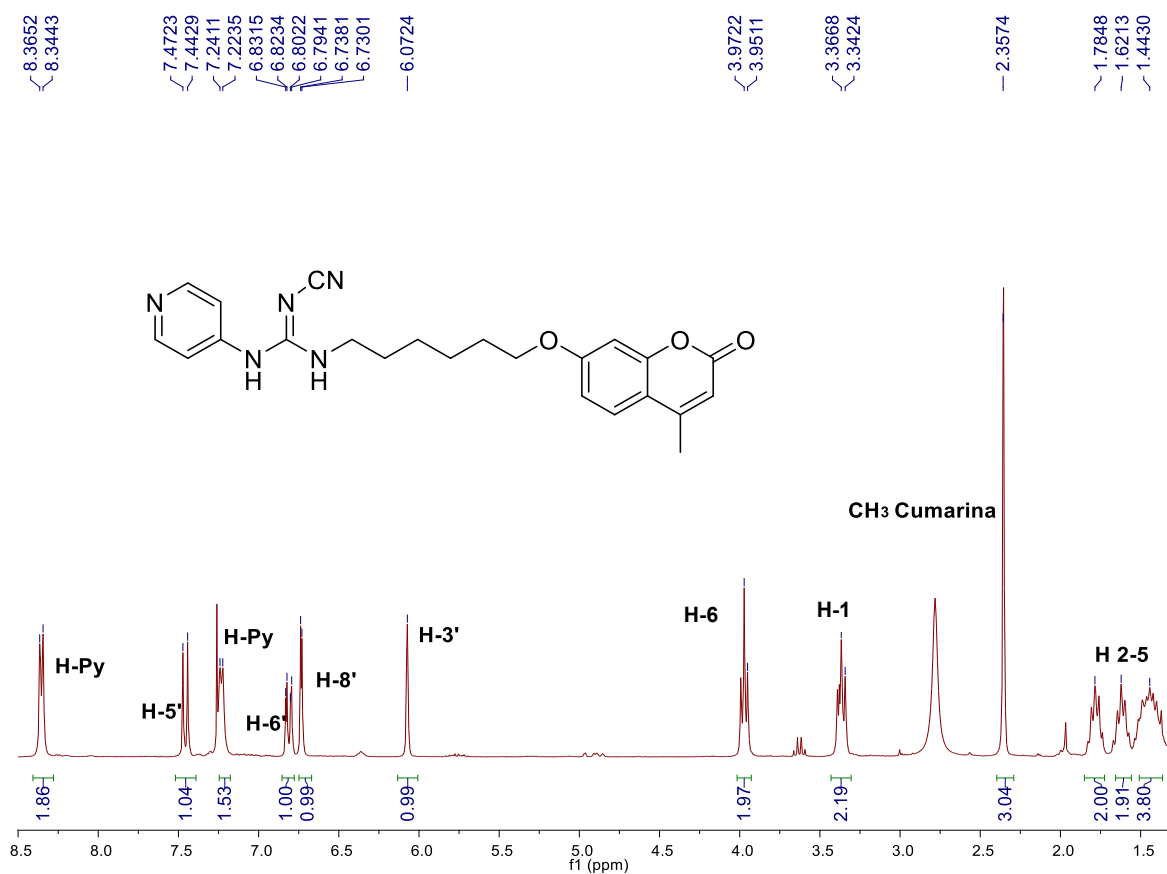


Figura 6.24. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **37**.

El espectro de ^{13}C -RMN de **37** posee una gran analogía con el mostrado para la cianoguanidina **36**, destacando las señales a 160.2 y 114.6 ppm, que demuestran la presencia del grupo cianoguanidino.

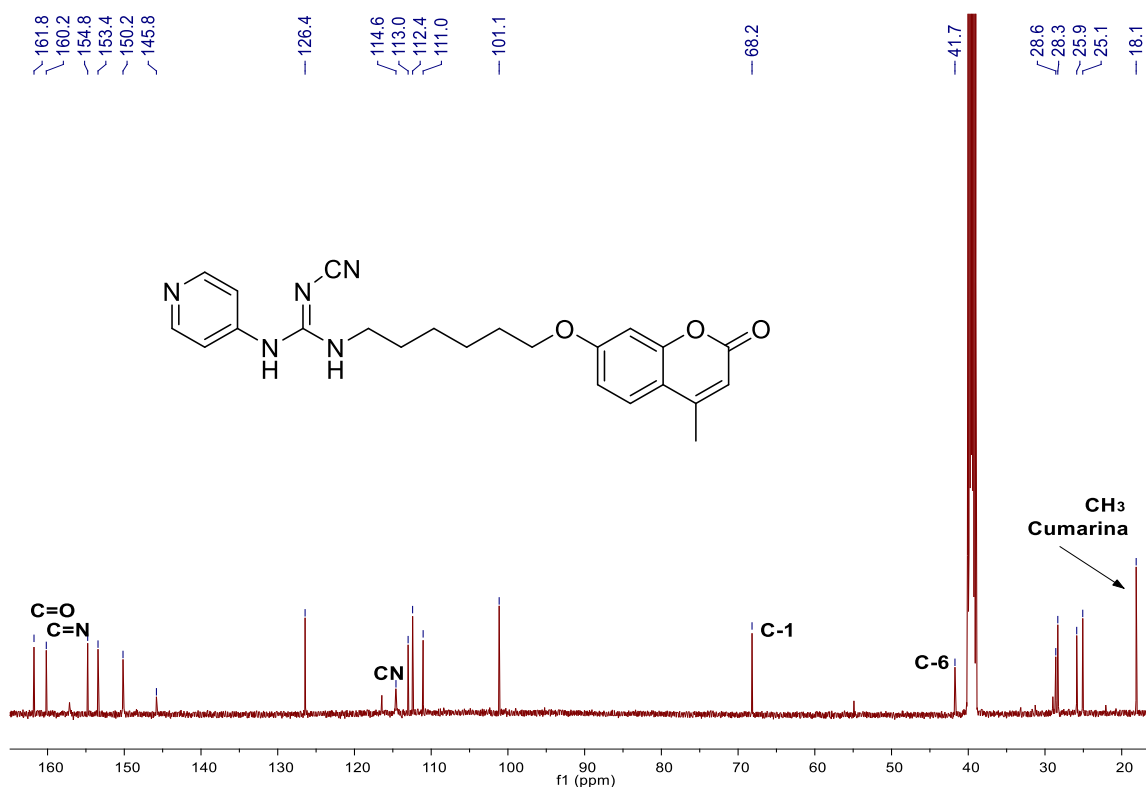


Figura 6.25. Espectro de ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-d₆) del compuesto **37**.

Igualmente se incluyen los espectros de RMN del compuesto **39** (figura 6.26 y 6.27), exhibiendo el espectro de ¹H-RMN una gran analogía con el mostrado **37**.

El espectro de ¹³C-RMN de **39** (figura 6.27) resulta especialmente interesante, ya que, además de poseer un patrón análogo al resto de cianoguanidinas, la presencia de átomos de flúor, activos en RMN (¹⁹F, I=1/2) provoca el acoplamiento de éste con los carbonos próximos del núcleo de cumarina, apareciendo dichos carbonos como cuartetos. Esto es lo observado para el propio carbono del grupo trifluorometilo ($\delta = 121.7$ ppm, $^1J_{C,F}=275.7$ Hz), C-3' ($\delta = 122.2$, $^3J_{C,F}=5.7$ Hz), C-4' ($\delta = 141.8$, $^2J_{C,F}=32.7$ Hz).

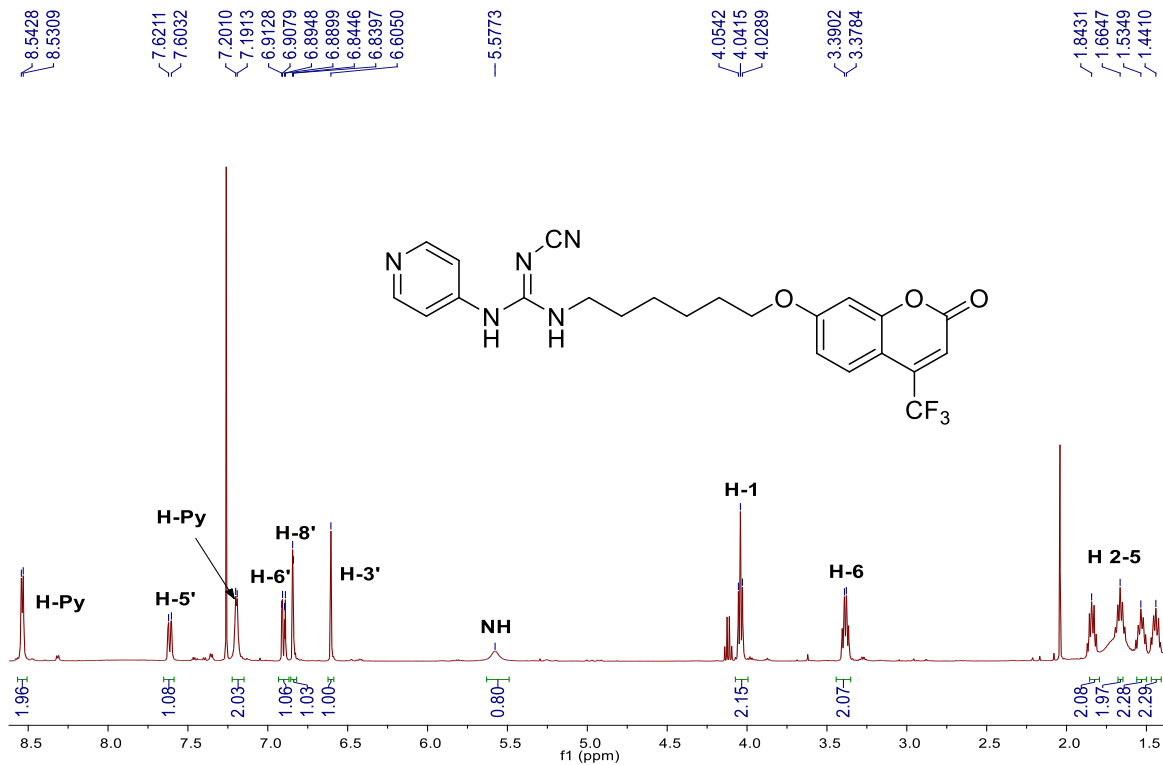


Figura 6.26. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **39**.

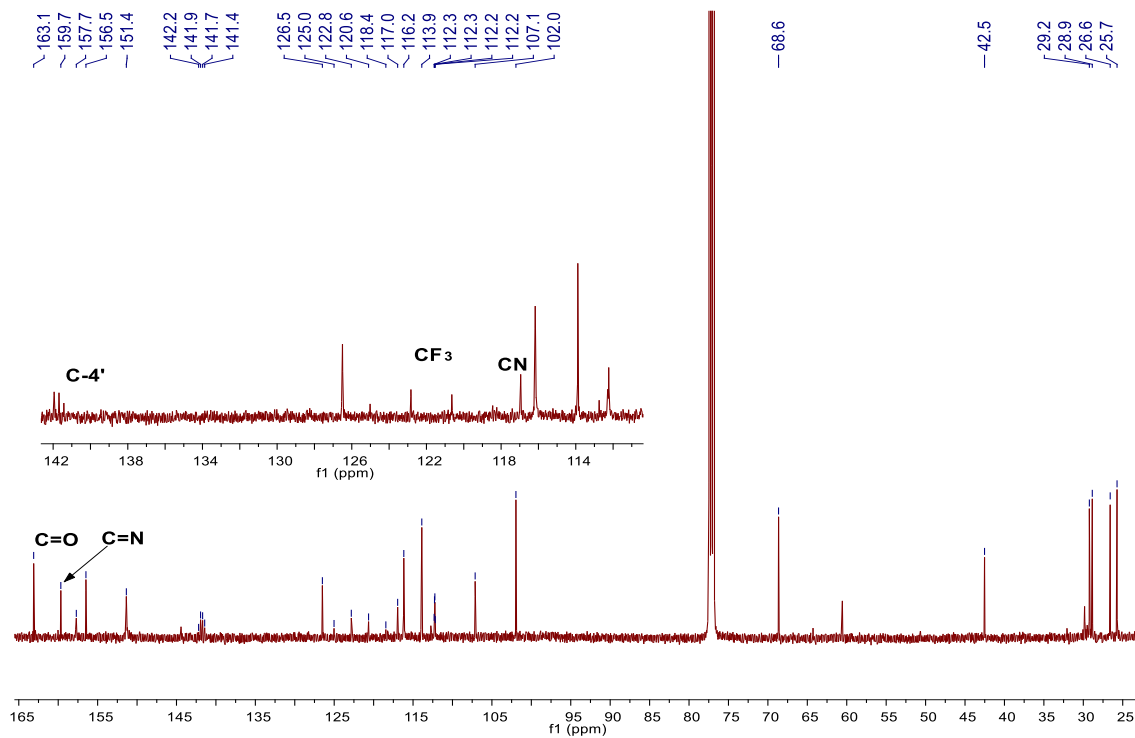
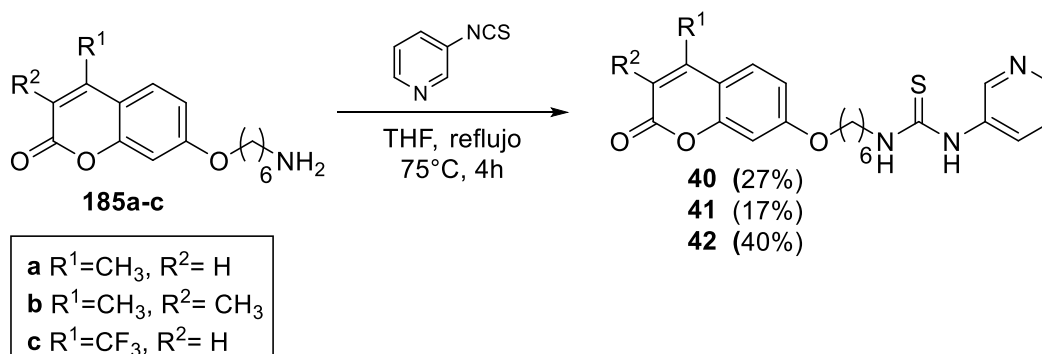


Figura 6.27. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 Hz, CDCl_3) del compuesto **39**.

También se llevó a cabo la preparación de las *N*-(piridin-3-il)tioureas; para ello se realizó una reacción de adición de las aminas **185a-c** sobre el 3-piridinilisotiocianato comercial (esquema 6.6). Los rendimientos de estos compuestos fueron moderados (17–41%), debido a la elevada inestabilidad del isotiocianato.



Esquema 6.6. Ruta de síntesis para la preparación de *N*-(piridin-3-il)tioureas como potenciales inhibidores duales de NAMPT-CAs.

A modo de ejemplo, se muestran los espectros de RMN para el compuesto **40**. En el espectro de ¹H-RMN (figura 6.28) se observan como señales representativas las de 8.54, 8.53 y 7.36 ppm (anillo de piridina), así como las que resuenan en 7.48, 6.83, 6.76 y 6.12 ppm (H-5', H-6', H-8', H-3', respectivamente, del fragmento de cumarina). También son significativas las señales de NH de la tiourea en 7.87 (NH-Ar) y 6.12 (NH-CH₂) ppm, así como las señales de la cadena alquílica en 3.99 y 3.65 ppm (H-6 y H-1) y la señal de metilo de cumarina en 2.39 ppm. En el espectro de ¹³C-RMN (figura 6.29) destaca especialmente la señal de 181.4 ppm correspondiente al grupo tiona (C=S), que demuestra inequívocamente la formación del grupo tioureido.

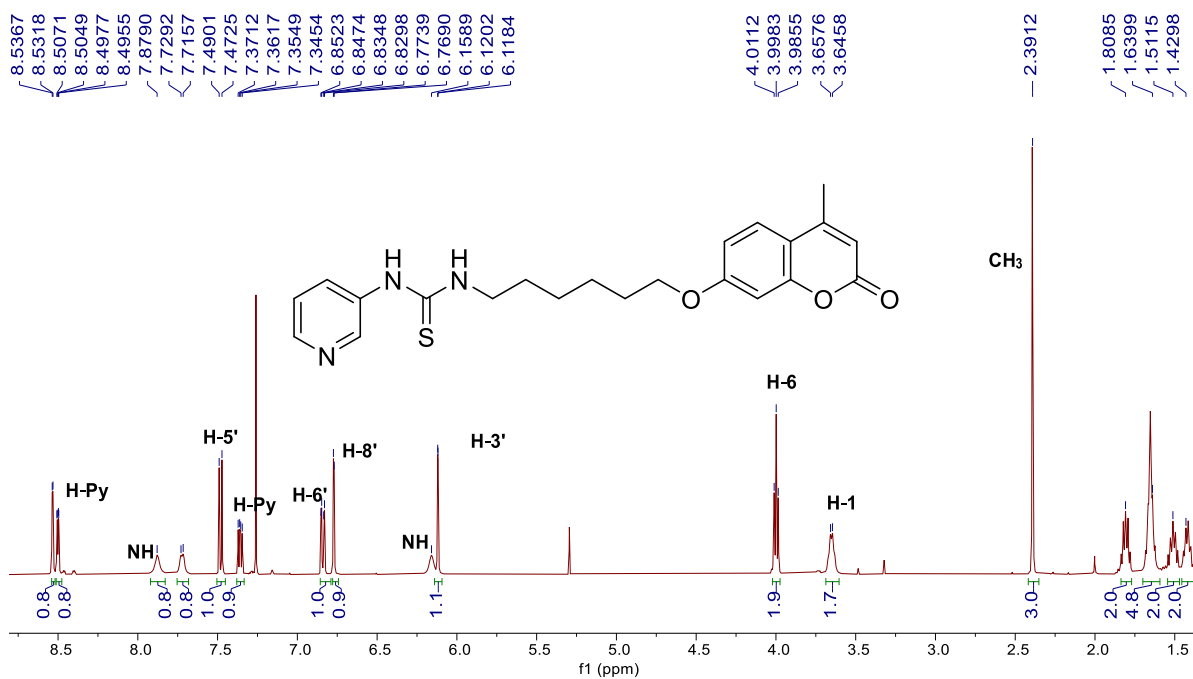


Figura 6.28. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 40.

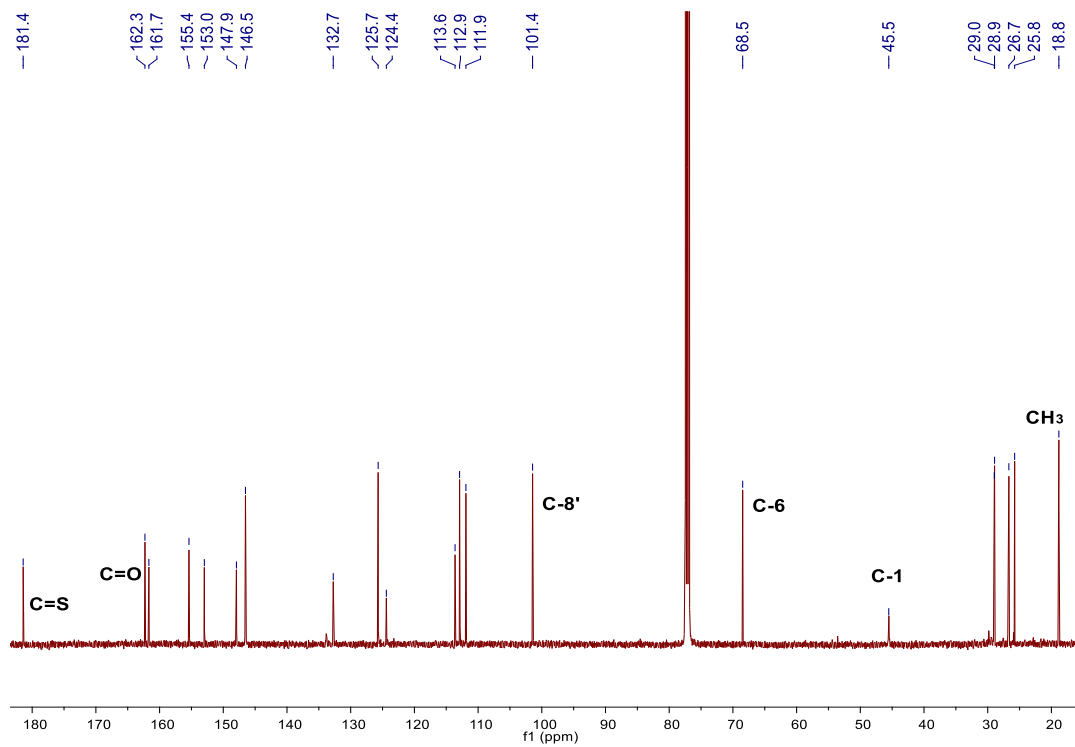


Figura 6.29. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto 40.

De forma similar, el compuesto **42** muestra un patrón análogo al exhibido por la tiourea **40**, tanto en los espectros de ^1H - (figura 6.30), como de ^{13}C -RMN (figura 6.31). Destacan las señales de ^1H -RMN en 8.53, 7.65, 7.60 ppm (piridina) 7.62, 6.90, 6.85 (H-5, H-6, H-8) y 6.60 (H-3) ppm, del núcleo de cumarina. De nuevo se observan dos grupos NH, a 7.73 (Ar-NH) y 6.01 (NH-CH₂) ppm, compatibles con la formación del grupo tioureido; por otro lado, el metileno en posición C-1 de la cadena alquímica aparece como un cuartete ensanchado, debido al acoplamiento con J análogas con el metileno vecino, así como con NH. En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **42** (figura 6.31), además de destacar el grupo tiona (181.4 ppm), vuelve a observarse el acoplamiento de los átomos de flúor con los carbonos próximos: carbono del grupo trifluorometilo ($\delta = 121.7$ ppm, $^1J_{\text{C,F}} = 272.1$ Hz), C-3' ($\delta = 112.2$, $^3J_{\text{C,F}} = 5.7$ Hz), C-4' ($\delta = 141.9$ ppm, $^2J_{\text{C,F}} = 33.1$ Hz).

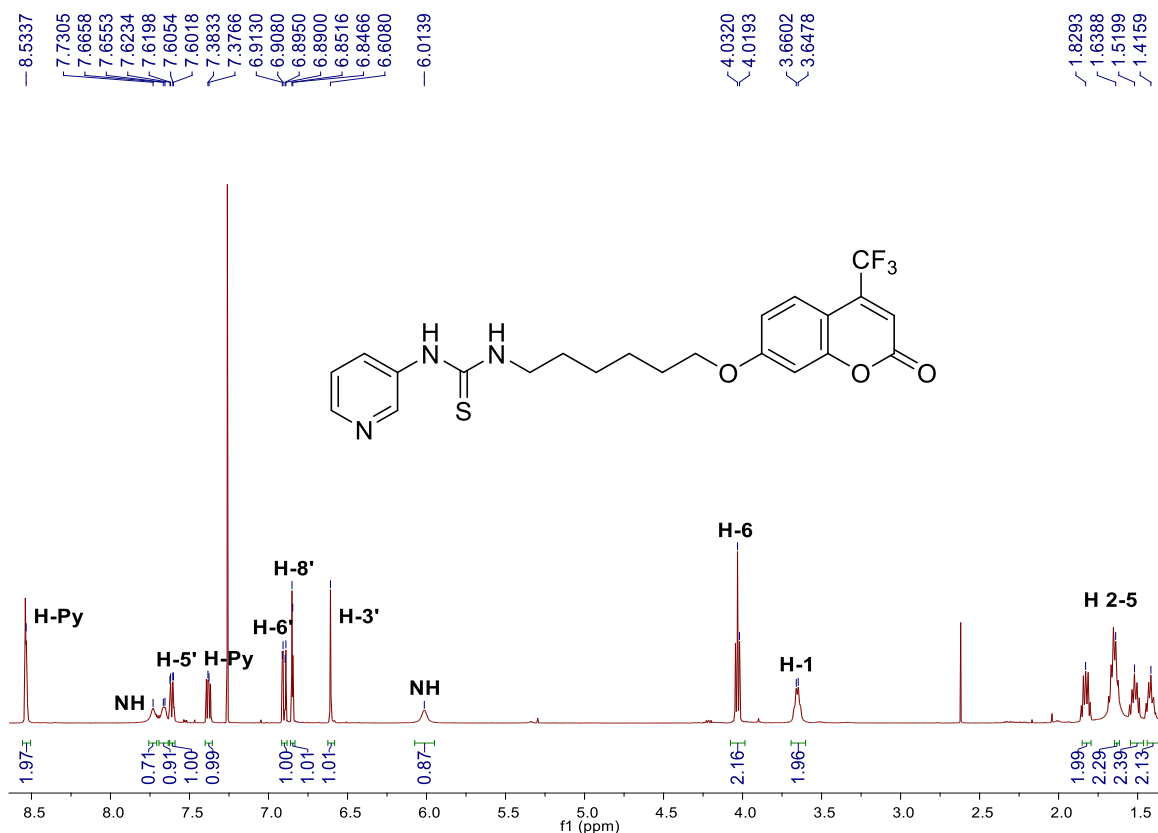


Figura 6.30. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **42**.

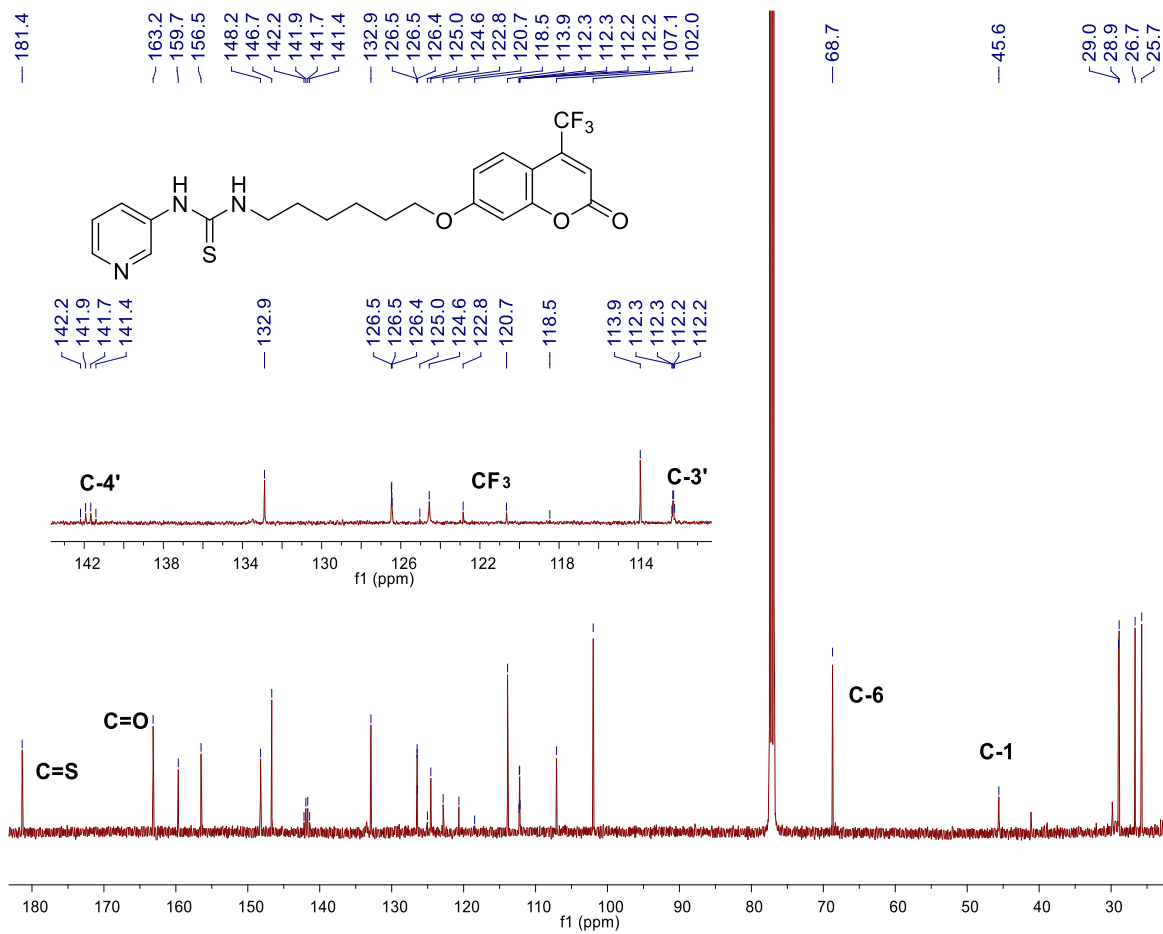


Figura 6.31. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **42**.

7. Ensayos biológicos

7.1. Ensayos de actividad antiproliferativa

Todos los compuestos finales de los tres bloques de la presente Tesis Doctoral han sido evaluados, o lo están siendo en la actualidad, como agentes antiproliferativos *in vitro*: los híbridos de ácido oleanólico–cumarinas **1–9**, ácido oleanólico–selenocianato **11–24**, los agentes mitocondriotrópicos **25–32** y los inhibidores duales NAMPT–CAs **33–42**.

En particular, han sido evaluados en el grupo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de La Laguna, Tenerife, España) frente a un panel de 6 líneas de tumores sólidos humanos: A549 (células de pulmón no pequeñas), HBL-100 (mama), HeLa (cérvix), SW1573 (células de pulmón no pequeñas), como ejemplos de líneas sensibles a fármacos, y la T-47D (mama) y WiDr (colon), como ejemplo de líneas resistentes a multifármaco. Para los compuestos **28**, **33–42** se reemplazó la línea HBL-100, por MIA PaCa-2 (carcinoma hepático).

Se incluyen también, a modo comparativo, los datos de antiproliferación de los fármacos empleados en quimioterapia: 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino (CDDP), abiraterona y galeterona, estos dos últimos, de naturaleza esteroideal.

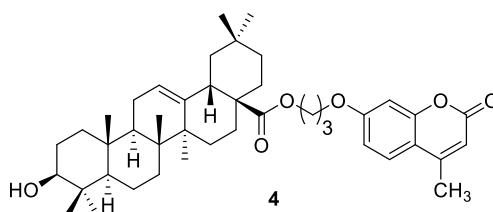
Para estos ensayos se utilizó el método de la sulforodamina B (SBR), con 48 h de exposición al fármaco, tal y como se describe en la Sección 9.2.2. Los resultados, indicados como el promedio de 3–4 medidas, se expresan como GI₅₀ (concentración del compuesto requerida para disminuir al 50% la velocidad de proliferación celular) ± desviación estándar.

Los compuestos más prometedores fueron sometidos a algunos estudios adicionales (ej. técnicas de imagen de células vivas, modelos *in vivo*) con objeto de dilucidar su modo de acción.

7.1.1. Ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* de híbridos ácido oleanólico-cumarina

Se evaluó la actividad antiproliferativa de los derivados **1–9**. Desafortunadamente, todos los derivados presentaron valores de $GI_{50} > 100 \mu\text{M}$ (máxima concentración evaluada), a excepción del compuesto **4**, cuyos valores de inhibición celular se muestran en la tabla 7.1. Se puede observar que la actividad de **4** resultó análoga a la del ácido oleanólico sin modificar, por lo que la conjugación con cumarinas no ayudó a mejorar su actividad antiproliferativa. Sí destaca la línea HeLa (cáncer cérvico-uterino), donde el compuesto **4** duplicó la potencia con respecto al OA ($GI_{50} = 7.0$ vs. 14.0).

Tabla 7.1. Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) frente a líneas celulares de tumores sólidos del híbrido OA-cumarina **4**



Compuesto	GI_{50} (μM) ^a					
	A549 (Pulmón)	HBL-100 (Mama)	HeLa (Cérvix)	SW1573 (Pulmón)	T-47D (Mama)	WiDr (Colon)
4	15±3.9	13±6.4	7.0±2.0	23±6.8	27±4.3	22±5.1
OA	7.2±1.6	24±7.2	14±0.9 1	26±2.8	36±7.2	32±8.1
Abiraterona	95±8.0	>100	7.9±0.5	85±8.9	24±4.5	42±7.7
Galeterona	3.9±1.3	10±0.1	5.3±0.4	3.9±0.5	2.1±0.1	2.7±0.2

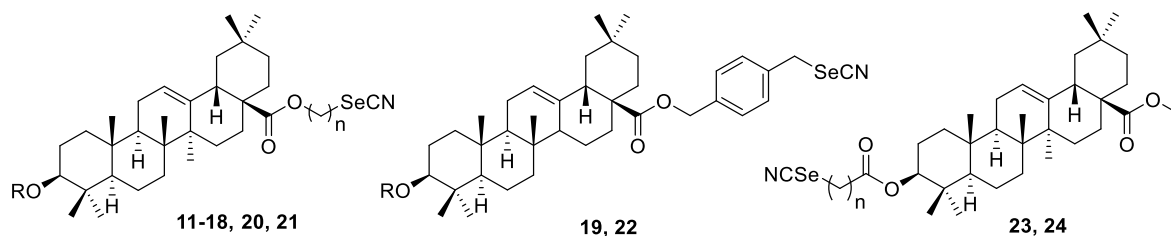
^aLos valores representan el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.1.2. Ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* de híbridos ácido oleanólico-selenocianato

La tabla 7.2 muestra los efectos antiproliferativos (GI_{50}) de los selenocianatos **11–16**, **18–21**, **23** y **24** evaluados frente al panel de seis líneas tumorales indicado en la sección 7.1. Los compuestos **17** y **22** no pudieron ser evaluados debido a su baja solubilidad en las condiciones del ensayo. Los análogos esteroidales

abiraterona y galeterona se utilizaron como compuestos de referencia para comparar la potencia de los compuestos analizados. Con excepción del compuesto **21**, los análogos restantes probados indujeron efectos antiproliferativos en todas las líneas celulares y la mayoría en un rango bajo de μM .

Tabla 7.2. Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de híbridos OA-selenocianato



Compuesto	Línea celular					
	A549 (Pulmón)	HBL-100 (Mama)	HeLa (Cérvix)	SW1573 (Pulmón)	T-47D (Mama)	WiDr (Colon)
11 (n=3)	1.8±0.1	1.8±0.2	1.9±0.2	2.4±0.6	1.9±0.1	1.8±0.3
C-28, R = H 12 (n=4)	1.6±0.6	1.6±0.5	1.9±0.1	1.7±0.7	1.9±0.1	1.7±0.1
13 (n=6)	1.4±0.4	1.3±0.6	1.9±0.2	1.4±0.3	1.9±0.3	1.8±0.1
18 (n=9)	17±3.7	12±5.9	25±2.1	11±1.6	86±20	66±14
14 (n=3)	2.3±1.1	1.9±0.4	3.0±1.2	2.2±0.8	18±1.5	15±5.0
C-28, R = Ac 15 (n=4)	1.2±0.2	1.0±0.1	1.8±0.1	1.3±0.3	5.8±1.8	5.5±2.6
20 (n=5)	1.6±0.6	1.1±0.2	1.7±0.2	1.2±0.3	11±3.0	12±2.0
16 (n=6)	5.7±2.7	2.2±0.4	15±3.0	2.1±0.9	22±6.0	24±6.8
21 (n=9)	86±2.8	25±11	>100	18±0.4	>100	>100
R = H 19	1.8±0.1	1.8±0.3	1.9±0.3	2.1±0.2	2.0±0.2	1.9±0.1
C-3 23 (n=1)	1.8±0.3	4.5±1.9	3.1±0.4	1.7±0.1	19±2.8	16±1.0
24 (n=4)	14±2.4	20±3.1	27±1.4	16±4.8	40±15	34±11
OA	7.2±1.6	24±7.2	14±0.91	26±2.8	36±7.2	32±8.1
Control Abiraterona	95±8.0	>100	7.9±0.5	85±8.9	24±4.5	42±7.7
Galeterona	3.9±1.3	10±0.1	5.3±0.4	3.9±0.5	2.1±0.1	2.7±0.2

^aLos valores representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados de la actividad antiproliferativa se pueden observar en el gráfico del rango de GI_{50} (figura 7.1). De acuerdo con esto, los compuestos se podrían clasificar en tres grupos:

- a) El grupo de compuestos más potentes comprende los análogos **11**, **12**, **13**, **15** y **19** con valores de GI_{50} menores a los 10 μM . En este primer grupo, el análogo acetilado **15** mostró el mayor rango de GI_{50} , a consecuencia de una actividad reducida hacia las células T-47D y WiDr.
- b) Compuestos con una potencia intermedia, representados por los derivados **14**, **16**, **20**, **23**, de nuevo con un amplio rango de GI_{50} debido a una reducción de la actividad frente a las líneas resistentes a multifármaco.
- c) El análisis de relación estructura-actividad reveló que los espaciadores de cadena larga ($n=9$, **18** y **21**) redujeron drásticamente la actividad biológica. Se mantiene una potencia elevada para todas las líneas para espaciadores de hasta 6 carbonos de longitud con el grupo hidroxilo libre en C-3; las líneas resistentes a multifármaco (T-47D, WiDr) parecen ser más sensibles a la elongación del espaciador. En esta categoría se incluye también el derivado **24**, derivatizado en la posición C-3 del OA con el espaciador de mayor tamaño.

Otro resultado relevante está relacionado con el grupo hidroxilo presente en la posición C-3. La esterificación de dicha posición produjo un impacto negativo en la actividad biológica (**11–13**, **18** vs. **14–16**, **20**, **21**), evidenciado por una disminución de la actividad antiproliferativa (mayor valor de GI_{50}). De esta forma, en la estructura optimizada, la posición C-3 debe contener al hidroxilo libre.

Por otro lado, una restricción de la flexibilidad conformacional del espaciador (compuesto **19**, espaciador de tipo *p*-xilileno) no parece tener efectos negativos sobre la actividad biológica, comportándose dicho compuesto como un potente agente antiproliferativo, con valores de GI_{50} inferiores a 2.0 μM para todas las líneas celulares evaluadas.

La incorporación del fragmento organoselénico en la posición C-3 empleando un espaciador corto (**23**) condujo a actividades de antiproliferación potentes frente a las líneas sensibles a fármacos, pero disminuida en el caso de las líneas resistentes a multifármaco. De manera análoga a lo observado para los derivados sustituidos en la posición C-28, la elongación del espaciador (**24**) condujo a una disminución de la actividad biológica.

Cabe destacar que los mejores compuestos de la serie (**11-13, 19**) mostraron un incremento sustancial de la actividad biológica con respecto al OA nativo (hasta 19 veces); también resultaron ser sensiblemente más potentes que la abiraterona (incremento superior a 77 veces) y galeterona, aunque en este caso, de manera más moderada. Es por ello por lo que estos compuestos que resultaron ser muy prometedores se sometieron a una serie de ensayos adicionales.

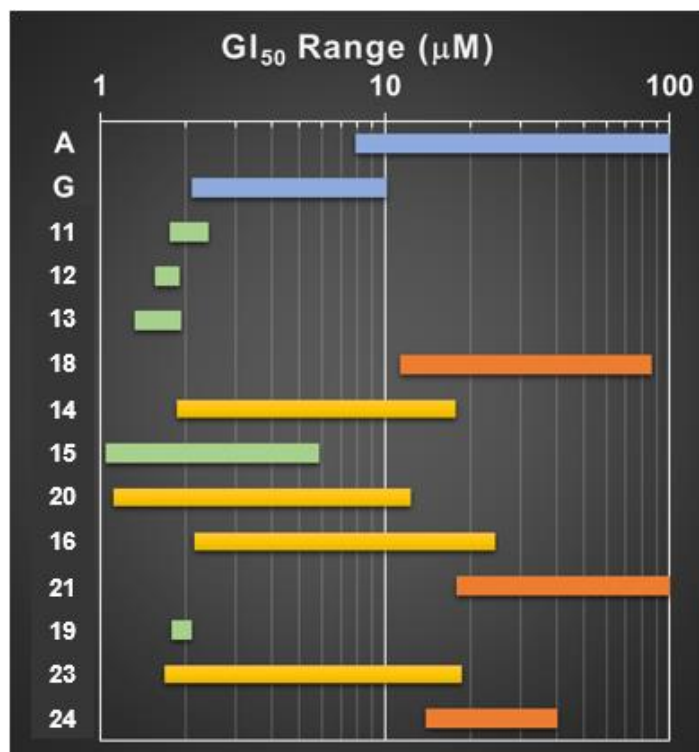


Figura 7.1. Gráfico de rango de valores de GI₅₀ reportado en la tabla 7.1. Las barras azules representan los compuestos de referencia abiraterona (A) y galeterona (G). Las barras verdes, amarillas y rojas indican los compuestos activos, intermedios y poco activos, respectivamente.

7.1.3. Estudio de imágenes continuas de células vivas sin marcaje en híbridos OA-selenocianato

Para un mejor entendimiento del modo en que se efectúa la actividad antiproliferativa, se realizó un seguimiento de células SW1573 (células de carcinoma alveolar) tratadas con el selenocianato **11** (10 μ M durante 20 h) mediante imágenes continuas de células vivas obtenidas en un microscopio holotomográfico 3D; este ensayo fue realizado también en el laboratorio del Dr. Padrón (Universidad de La Laguna, Tenerife, España). Esta técnica novedosa permite observar el modo de acción de cualquier compuesto en condiciones sin marcaje, lo que proporciona información sobre los efectos citostáticos²⁴⁶ o de muerte celular para cada célula individual.^{247–249}

Las células SW1573 no tratadas se movieron libremente y se dividieron, mientras que las células expuestas a **11** experimentaron muerte celular después de 2 h de exposición. Los rasgos morfológicos eran características de la muerte celular necrótica, con células aumentando drásticamente su volumen, mostrando núcleo circular y pérdida de membrana plasmática. El análisis después de la segmentación de las células individuales proporcionó información más precisa (figura 7.2).

El análisis del ensayo de muerte celular de las células SW1573 tratadas con **11** confirmó la necrosis como modo de muerte celular (figura 7.2A). El recuento de células (figura 7.2B) experimentó un aumento esperado en la población de células de control, mientras que en las células tratadas se mantuvo constante. En el gráfico

246. Roldán-Peña J.M., Puerta A., Dinić J., Stojanov S.J., González-Bakker A., Hicke F.J., Mishra A., Piyasaengthong A., Maya I., Walton J.W., Pešić M., Padrón J.M., Fernández-Bolaños J.G., López Ó. Biotinylated selenocyanates: Potent and selective cytostatic agents. *Bioorg. Chem.* **2023**, *133*, 106410.

247. Padilla-Pérez M.C., Sánchez-Fernández E.M., González-Bakke, A., Puerta A., Padrón J.M., Martín-Loro F., Arroba A.I., García Fernández J.M., Ortiz Mellet C. Fluoro-labelled sp²-iminoglycolipids with immunomodulatory properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *255*, 115390.

248. Lacret R., Puerta A., Granica S., González-Bakker A., Hevia D., Teng Y., Sánchez-Mateo C.C., Pérez de Páz P.L., Padrón J.M. Bioactive potential: A pharmacognostic definition through the screening of four *Hypericum* species from the Canary Islands. *Molecules*, **2022**, *27*, 6101.

249. Puerta A., González-Bakker A., Santos G., Padrón J. M. Early pharmacological profiling of antiproliferative compounds by live cell imaging. *Molecules*, **2022**, *27*, 5261.

de densidad de masa seca característica (CDMD) (figura 7.2C) fue posible seguir la división celular de la muestra control (indicada como picos). Este efecto no fue observado en las células SW1573 tratadas con el selenocianato **11**. El CDMD de las células tratadas permaneció aproximadamente igual después de que todas las células murieron por necrosis, después de 4 h de iniciado el tratamiento. De forma similar, el factor de forma del parámetro fenotípico (figura 7.2D) permitió definir el rango de tiempo en el que ocurrió la necrosis de las células SW1573.

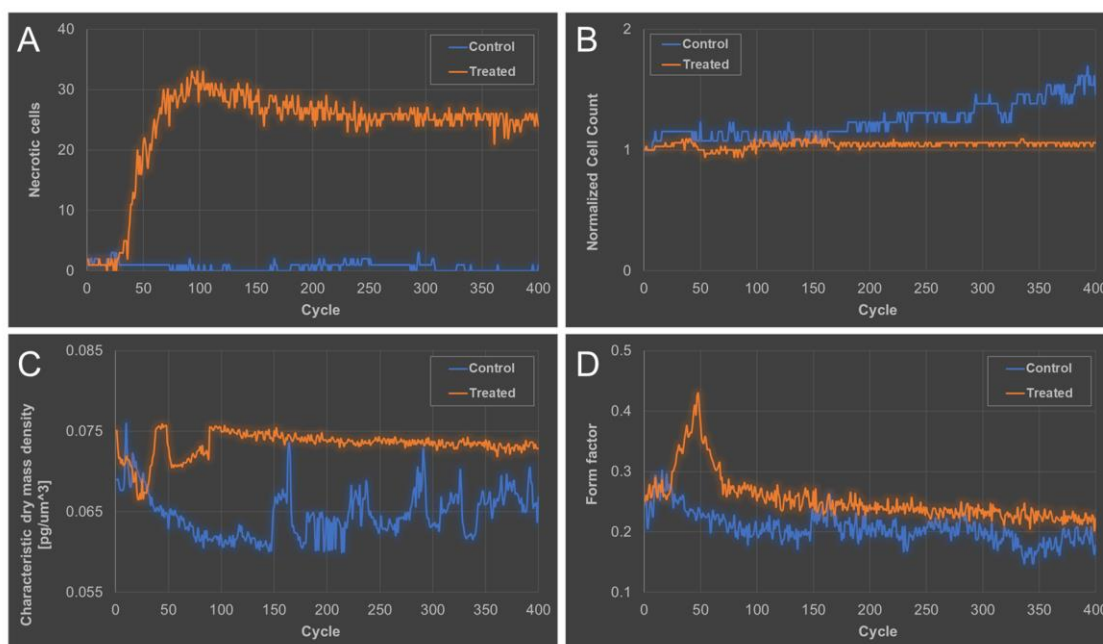


Figura 7.2. Cinética para células SW1573 no tratadas (azul) y células expuestas al compuesto **11** (naranja) a una dosis de 10 μM durante 20 h. El tiempo de adquisición de datos fue de 3 min.

7.1.4. Análisis del mecanismo de muerte celular inducido por los híbridos de OA-Selenocianato

Las roturas de doble cadena (DSBs) representan uno de los tipos de daño al ADN más difíciles de reparar. Las DSBs pueden ser causadas por factores externos, como sustancias químicas o radiación, así como por fuentes internas, como

problemas durante la transcripción o la replicación.^{250–252} A diferencia de otras lesiones del ADN, las DSBs son particularmente desafiantes porque carecen de una cadena complementaria intacta que sirva de guía durante la reparación. Cuando se producen, activan una respuesta celular sofisticada, conocida como *Respuesta al Daño del ADN* (DDR), que altera significativamente el metabolismo celular. Entre los actores clave de este proceso se encuentran las quinasas como ATM, ATR, Chk1 o Chk2.^{251,253} Las células tienen múltiples vías disponibles para reparar las roturas de extremos de ADN, que se clasifican en dos mecanismos principales: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ).^{254,255} Una vez que se detecta una rotura de extremos de ADN, la célula debe decidir qué vía de reparación utilizar, en función de varios factores, incluida la fase de la célula en el ciclo celular. La NHEJ, que une los extremos de ADN rotos con un procesamiento mínimo y sin necesidad de una plantilla, puede funcionar durante todo el ciclo celular y es el mecanismo de reparación más común para las roturas de extremos de ADN.²⁵⁴

7.1.4.1. Los híbridos de OA-SeCN promueven la acumulación de DSBs que desencadena la activación de la vía de reparación NHEJ durante la progresión de la fase S

Para explorar el modo de acción de los híbridos OA-SeCN y su actividad antiproliferativa en la inducción de muerte celular por necrosis, se analizó si el tratamiento con el compuesto **13** induce la formación de roturas en la doble hélice del ADN (DSBs), una de las lesiones de ADN más difíciles de reparar. Estudios

250. Jackson S., Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **2009**, *461*, 1071–1078.

251. Ciccio A., Elledge S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell*. **2010**, *40*, 179–204.

252. Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell*. **2017**, *168*, 644–656.

253. Blackford A.N., Jackson S.P. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol. Cell*. **2017**, *66*, 801–817.

254. Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 495–506.

255. Ranjha L., Howard S.M., Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, **2018**, *127*, 187–214.

previos han demostrado que la acumulación de DSBs puede activar la respuesta al daño del ADN, lo que puede conducir a la apoptosis o necrosis si no se corrige.^{256,257}

Para comprobarlo, se empleó la forma fosforilada de la variante de histona H2AX (γ H2AX) como marcador de DSBs.²⁵⁸ Para evaluar en profundidad la posible especificidad de los selenocianatos como compuestos bioactivos contra las células tumorales, se incluyó a células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE1) no tumorales y células HeLa de carcinoma cervical en el estudio (figura 7.3A). El tratamiento con **13** no indujo la acumulación de γ H2AX en las células RPE1, que mostraron niveles similares de focos a los exhibidos por el control (figura 7.3A). Por otro lado, en similitud con hallazgos anteriores sobre ácido oleanólico,²⁵⁹ se observó cierta acumulación de focos de γ H2AX en las células HeLa después del tratamiento con el derivado de selenio.

En particular, el tratamiento con el compuesto **13** (20 μ M) durante 240 min aumentó significativamente los focos de γ H2AX, particularmente en las células HeLa en comparación con las células RPE1 (figura 7.3A). Aunque el aumento en células HeLa puede parecer modesto, esta diferencia podría tener un profundo impacto en la evolución del tumor.²⁶⁰ A continuación, se estudió si este daño al ADN activa vías específicas de reparación. Las DSBs se pueden reparar por varios mecanismos y una de las vías principales es la unión de extremos no homólogos (NHEJ). El estudio se centró en la NHEJ y uno de sus factores clave, el

256. Di Fagagna F.D. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8, 512–522.

257. Bohgaki T., Bohgaki M., Hakem R. DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integr.* **2010**, 1, 15.

258. Prabhu K.S., Kuttikrishnan S., Ahamad N., Habeeba U., Mariyam Z., Suleman M., Bhat A.A., Uddin S. H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy. *Biomed. Pharmacother.* **2024**, 175, 116663.

259. Tang Z., Li Y., Tang Y., Ma X., Tang Z. Anticancer activity of oleanolic acid and its derivatives: Recent advances in evidence, target profiling and mechanisms of action. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, 145, 112397.

260. O'Connor M.J. Targeting the DNA damage response in cancer. *Mol. Cell.* 2015, 60, 547–560.

53BP1.^{254,255,261} La NHEJ repara las DSBs al ligar directamente los extremos rotos del ADN con un procesamiento mínimo y sin plantilla, un proceso que puede ocurrir durante todo el ciclo celular.²⁵⁴ Es importante destacar que la acumulación de focos de 53BP1 solo se observó en células HeLa después del tratamiento con el compuesto **13** (figura 7.3B). Lo anterior sugiere que el daño del ADN inducido por **13** en las células HeLa, en comparación con las células RPE1, activa la vía de reparación de NHEJ y que, además, la reparación tardía o incompleta de estas roturas podría conducir a la necrosis, como lo sugieren los resultados previos de la sección 7.1.3.

Dado que la replicación del ADN durante la fase S es particularmente vulnerable al daño,²⁶² se analizó si el aumento del daño del ADN y la acumulación de focos de 53BP1 en células HeLa eran específicos durante la fase S. Para ello, se monitoreó la replicación del ADN utilizando la incorporación de EdU, un análogo de timidina. EdU sirve como un marcador cuantitativo de la proliferación celular, ya que su incorporación durante la replicación del ADN se puede detectar a través de una *reacción clic* catalizada por cobre con un conjugado flúor-azida AlexaTM. Sorprendentemente, la acumulación de focos de γ H2AX se observó solo en células en replicación activa (EdU+) y tratadas con el compuesto **13** (figura 7.3C).

Las células que no estaban en fase S (EdU-) no mostraron un daño significativo del ADN bajo el mismo tratamiento (figura 7.3C). Estos datos resaltan la vulnerabilidad de las células HeLa a los selenocianatos de OA durante la fase S, enfatizando la acumulación selectiva de daño del ADN en células HeLa en relación con células RPE1, ya que solo las células en fase S podrían verse afectadas por el tratamiento con **13** (figura 7.3A). En conclusión, los resultados indican que los híbridos de OA-SeCN inducen daño al ADN y promueven la reparación de DSBs al

261. Jasin M., Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol.* **2013**, 5, a012740.

262. Bartek J., Lukas C. Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 792–804.

estimular la vía NHEJ, específicamente en una línea celular maligna durante la fase S.

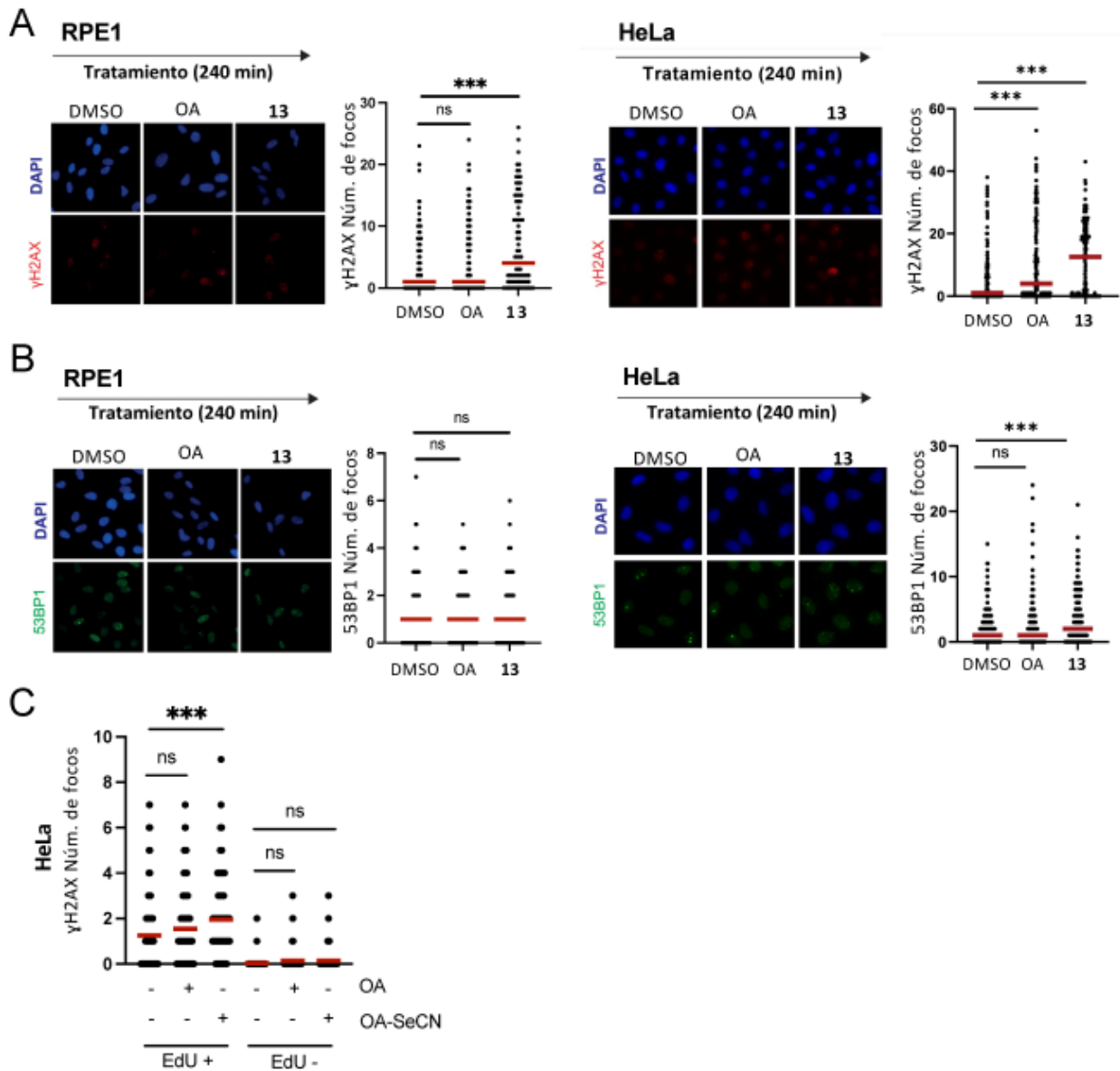


Figura 7.3. El compuesto **13** desencadena una respuesta de daño del ADN durante la fase S en células tumorales HeLa. Las células RPE1 (izquierda) y HeLa (derecha) fueron tratadas durante 240 min con el compuesto **13**, el vehículo DMSO u OA como control. Se cuantificó el número de focos γH2AX (A) y 53BP1 (B) por célula para al menos 100 células por cada tratamiento empleando el software FIJI, cuyos resultados se indican en las gráficas. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones independientes con resultados similares para cada análisis, junto con imágenes representativas en el lado izquierdo. En particular, el compuesto **13** aumenta significativamente el daño del ADN en las células HeLa, como lo indica la acumulación de focos γH2AX, que

posteriormente conduce a la activación de la respuesta de daño del ADN, evidenciada por la acumulación de 53BP1. (C) Las células HeLa fueron tratadas durante 240 min con el compuesto **13** y OA como control (indicado por un signo +). El doble signo menos indica el tratamiento con el vehículo DMSO. Es importante destacar que el compuesto **13** aumenta específicamente el daño al ADN durante la fase S (EdU+) pero no en otras fases del ciclo celular (EdU-), como lo indica la acumulación de focos γ H2AX. A menos que se indique lo contrario, la significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías. El promedio está representado por la línea roja, y los valores p se indican con uno ($p < 0.05$), dos ($p < 0.01$) o tres ($p < 0.001$) asteriscos.

7.1.4.2. Los híbridos de OA-SeCN provocan la detención del ciclo celular en la fase S y G2/M

A continuación, se evaluó si la acumulación de daño al ADN observada previamente durante la progresión de la fase S (figura 7.3) podría interrumpir la progresión normal del ciclo celular. Para explorar esto, se analizó el perfil del ciclo celular utilizando FACS (*Clasificación de células activadas por fluorescencia, Fluorescence-activated cell sorting*, figura 7.4A). No se observaron perturbaciones importantes en la distribución del ciclo celular después del tratamiento con el compuesto **13** en células RPE1 o HeLa, con porcentajes similares a los de los grupos de control DMSO y OA.

Aunque no es estadísticamente significativo, en las células HeLa tratadas con **13**, se observó un ligero aumento en el porcentaje de células en fase G1 y una leve acumulación de células en fase S y G2 (figura 7.4A).

Este cambio sutil puede indicar una diferencia potencial, aunque no fue detectable debido a las limitaciones de esta técnica. Para explorar más a fondo estas posibles alteraciones del ciclo celular, se midió la progresión de fases celulares específicas, mediante la evaluación de la replicación activa del ADN. Se empleó inmunofluorescencia para detectar la incorporación de EdU durante un pulso de 30 min (figura 7.4B). El tratamiento con OA no mostró un cambio en la intensidad de EdU en comparación con el control y los cursos de replicación de ADN fueron normales. Sin embargo, tanto las células RPE1 como las HeLa exhibieron una marcada disminución en la incorporación de EdU por célula bajo el tratamiento

con el compuesto **13**, siendo el efecto particularmente pronunciado en las células HeLa. La mayoría de las células HeLa mostraron una acumulación muy baja de EdU, lo que indica que la replicación de la fase S se ve afectada significativamente por el compuesto **13**, especialmente en las células HeLa (figura 7.4B).

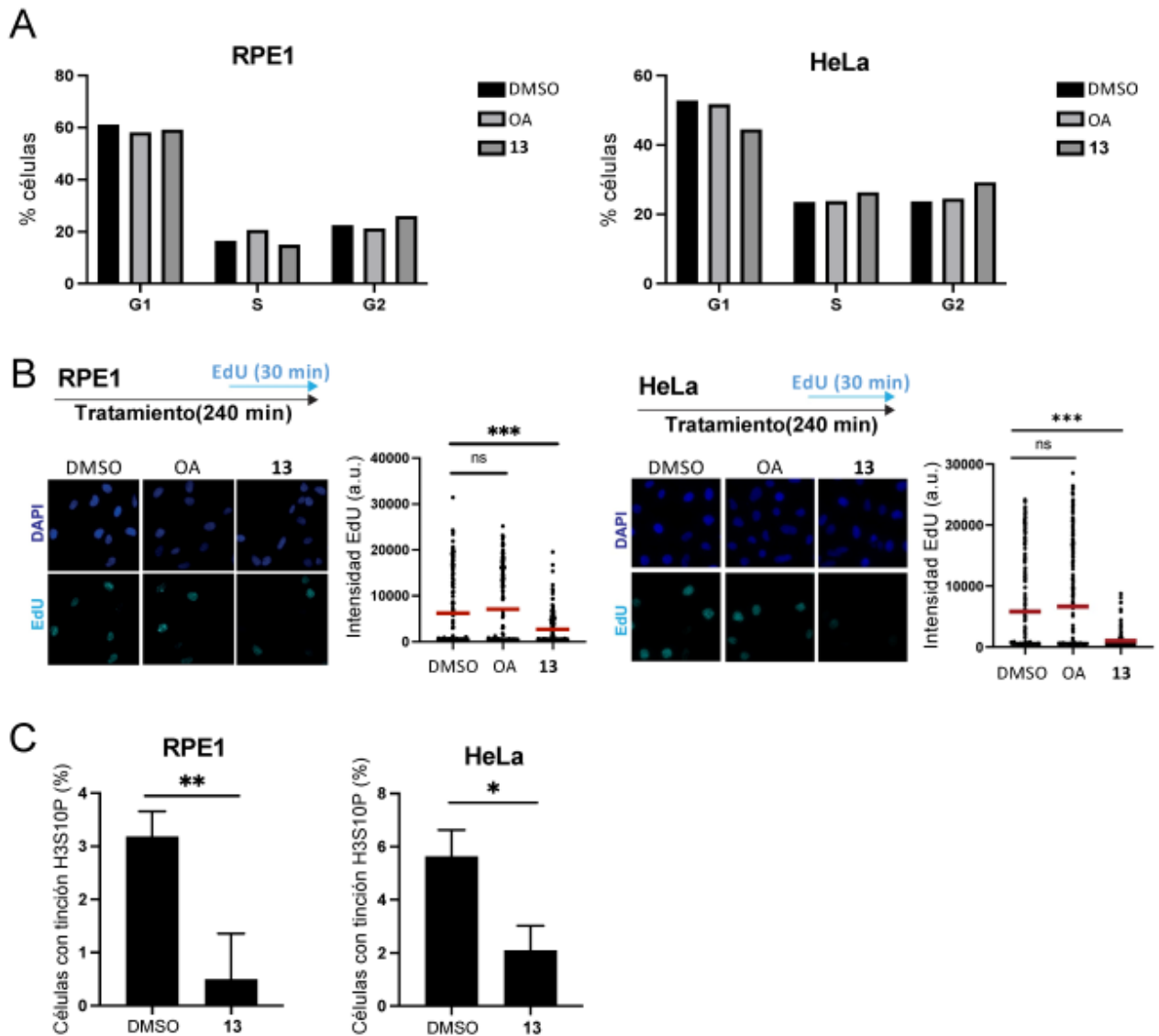


Figura 7.4. La acumulación de daño en el ADN durante la progresión de la fase S causada por el tratamiento con el compuesto **13** conduce a defectos en la progresión del ciclo celular, afectando específicamente la replicación del ADN y las fases G2/M. (A) La distribución del ciclo celular en las fases G1, S y G2/M, en células RPE1 (izquierda) y HeLa (derecha) después del tratamiento con el compuesto **13**, DMSO como control del vehículo u OA como control, se midió mediante análisis FACS. (B) La replicación de la fase S en células RPE1 (izquierda) y HeLa (derecha) se evaluó mediante la incorporación de EdU. Las células se trataron durante 240 min y se añadió EdU durante

los últimos 30 min de tratamiento (DMSO, OA o compuesto **13**). La intensidad de EdU por célula se cuantificó para al menos 100 células por condición utilizando el software FIJI, y se graficaron los resultados. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones independientes con resultados similares, junto con imágenes representativas a la izquierda. En particular, el compuesto **13** altera específicamente la progresión de la fase S, como se evidencia por una incorporación reducida de EdU por célula individual, siendo este efecto particularmente pronunciado en las células HeLa. (C) Las células RPE1 (izquierda) y HeLa (derecha) fueron tratadas durante 240 min con el compuesto **13** y DMSO. Se cuantificó el número de células positivas para la fosforilación de H3S10 (un marcador mitótico) para al menos 100 células por condición utilizando el software FIJI, y se graficaron los resultados. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Es importante destacar que el compuesto **13** reduce el número de células en mitosis, lo que indica un impacto específico en la progresión mitótica. Para todas las figuras, a menos que se indique lo contrario, la significancia estadística se determinó utilizando ANOVA de dos vías. El promedio está graficado (línea roja) y los valores p están representados por un asterisco ($p < 0.05$), dos asteriscos ($p < 0.01$) o tres asteriscos ($p < 0.001$).

Finalmente, se examinó si la alteración en la progresión de la fase S afectaba a las fases G2/M posteriores. Se evaluó el número de células que mostraban fosforilación de la histona H3 de la serina 10 (H3S10P), un marcador mitótico asociado con la condensación de la cromatina y la segregación cromosómica durante la mitosis (figura 7.4C).²⁶³ El tratamiento con el compuesto **13** resultó en una reducción significativa en el número de células mitóticas tanto en las células RPE1 como en las células HeLa, lo que sugiere que los híbridos OA-SeCN también alteran la progresión normal a través de la fase M (figura 7.4B).

Además, algunas células presentan una progresión normal del ciclo celular a pesar de la acumulación de daño en el ADN durante la fase S, lo que exagera aún más la toxicidad de los híbridos OA-SeCN. Esto conduce a una mayor acumulación de daño y posiblemente a la necrosis, lo que podría explicar la falta de una detención pronunciada del ciclo celular en el análisis FACS (figura 7.4A). Sin embargo, el defecto en la fase M podría ser probablemente resultado de la detención previa de

263. Castellano-Pozo M., Santos-Pereira J.M., Rondón A.G., Barroso S., Andújar E., Pérez-Alegre M., García-Muse T., Aguilera A. R loops are linked to histone H3 S10 phosphorylation and chromatin condensation. *Mol. Cell.* **2013**, 52, 583–590.

la fase S (figura 7.4B), causada por la acumulación de daño en el ADN (figura 7.3), que, si no se resuelve, podría conducir a eventos celulares catastróficos. Las células que experimentan una detención prolongada del ciclo celular debido a la acumulación de daño en el ADN pueden eventualmente desencadenar el bloqueo del ciclo celular, lo que lleva a necrosis o apoptosis, lo que se explica en los hallazgos previos de necrosis descritos en la sección 7.1.3. Además, algunas células podrían progresar durante el ciclo celular a pesar de la acumulación de daño en el ADN a lo largo de la fase S, lo que motiva aún más la toxicidad de los híbridos OA-SeCN, lo que lleva a la acumulación de daño y probablemente a la necrosis, lo que explica una detención no tan grande del ciclo celular en el análisis FACS.

7.1.5. Estudios de actividad antiproliferativa *in vivo* de híbridos OA-selenocianato

Los dos híbridos OA-selenocianato más prometedores (compuestos **11** y **13**) fueron evaluados *in vivo* usando el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelo de organismo vivo. Estos ensayos han sido realizados por el Dr. Maikel Castellano (Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, España).

7.1.5.1. *Caenorhabditis elegans* como modelo para estudiar el cáncer de forma sistémica

El estudio de la biología del cáncer es altamente complejo y el uso de modelos con organismos supone una ayuda esencial, al proporcionar información valiosa sobre los procesos oncogénicos. En este contexto, *Caenorhabditis elegans*, un nematodo de suelo y con genoma secuenciado, funciona como un excelente modelo para la investigación del cáncer.^{264,265} Este modelo permite, a través de técnicas de fácil aplicación, analizar en profundidad las vías genéticas y función de

264. Kirienko N.V., Mani K., Fay, D.S. Cancer models in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Dynam.* **2010**, 239, 1413–1448.

265. Cerón J. *Caenorhabditis elegans* for research on cancer hallmarks. *Dis. Model. Mech.* **2023**, 16, dmm050079.

proteínas, incluida la capacidad de evaluar compuestos o fuentes externas que pueden alterar estos procesos.²⁶⁶

Se ha reportado que *C. elegans* comparte genes conservados y mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular, las vías de daño y reparación del ADN y de respuesta apoptótica con los humanos, lo que facilita las comparaciones directas.²⁶⁷ De esta forma, los estudios en *C. elegans* han proporcionado información valiosa sobre la oncogénesis y podrían emplearse como referencia para comprender los efectos en la salud o toxicidad en humanos.²⁶⁸

Otra de las ventajas de *C. elegans* es que el uso de un modelo multicelular permite el análisis del mecanismo de respuesta de un tejido, aspecto relevante ya que muchas investigaciones se centran en las respuestas al estrés de células autónomas. Un tejido donde se mantiene la integridad del genoma es crucial para la línea germinal, con énfasis en células germinales sin diferenciar. Así pues, las alteraciones genéticas en estas células pueden ser transmitidas y heredadas por todas las células de la descendencia, causando abortos espontáneos, defectos congénitos o enfermedades genéticas, como el cáncer, en generaciones posteriores.²⁶⁹

La línea germinal de *C. elegans* (conjunto de células responsables de la reproducción, localizadas en la parte posterior del gusano) está organizada espacial y temporalmente desde el extremo distal al proximal. En una situación normal, cada

266. García-Rodríguez F.J., Martínez-Fernández C., Brena D., Kukhtar D., Serrat X., Nadal E., Boxem M., Honnen S., Miranda-Vizueté A., Villanueva A., Cerón, J. Genetic and cellular sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to the chemotherapeutic agent cisplatin. *Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*, dmm033506.

267. van den Heuvel S. The *C. elegans* cell cycle: overview of molecules and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *296*, 51–67.

268. Lai C., Chou C., Ch'ang L., Liu C., Lin, W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res.* **2010**, *10*, 703–713.

269. Comaills V., Castellano-Pozo M. Chromosomal instability in genome evolution: From cancer to macroevolution. *Biology*, **2023**, *12*, 671.

línea germinal contiene, en el extremo distal, un compartimento de células germinales indiferenciadas que proliferan mitóticamente, seguido del compartimento meiótico. El inicio de este compartimento meiótico se reconoce fácilmente por la región denominada *Zona de Transición*, donde el núcleo presenta forma de medialuna. A partir de este punto, las células pasan por las diferentes fases del programa meiótico, fácilmente reconocibles por la organización y estructura del ADN (figura 7.5).

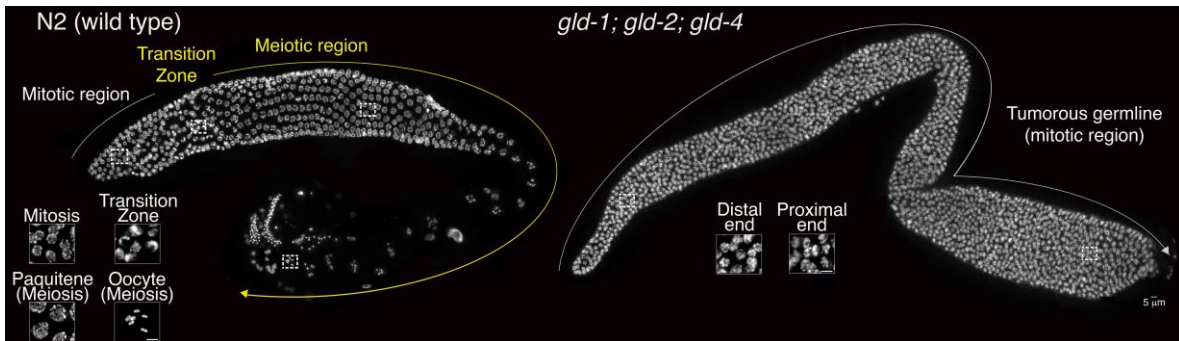


Figura 7.5. Línea germinal de *C. elegans* como sistema de modelo de cáncer. Ejemplo representativo de líneas germinales de *C. elegans* disecadas y teñidas con DAPI de tipo silvestre N2 (izquierda) y una línea germinal tumoral triple mutante *gld-2; gld-1; gld-4* (derecha), indicando las diferentes regiones que lo componen. Escala: 5 µM en todos los paneles.

En una situación de tipo silvestre, en el extremo distal, las células germinales sufren divisiones mitóticas, formando el denominado compartimento mitótico, hasta un punto donde se desencadena el programa meiótico, llamado *Zona de Transición*. En esta zona, los cromosomas se polarizan hacia un lado del núcleo, impartiendo una apariencia distinguible en forma de medialuna a la cromatina teñida con DAPI.

A continuación, aparece el compartimento meiótico, que permite observar la meiosis, donde los cromosomas adquieren diferentes morfologías estructurales distinguibles dependiendo de la fase meiótica en la que se encuentren. La vista ampliada de estas diferentes áreas revela estructuras de ADN reconocibles por DAPI. El *gld-2; gld-1; gld-4* mutante da como resultado una proliferación excesiva de células germinales y una imposibilidad de ingresar al programa meiótico, lo que

lleva a una línea germinal tumoral prominente compuesta únicamente de células germinales proliferadas mitóticamente.

Las mutaciones en varios genes asociados con el control del ciclo celular pueden inducir defectos de hiperproliferación de células somáticas en *C. elegans*.²⁶⁵ Especialmente, las mutaciones que conducen a una proliferación excesiva de la línea germinal pueden dar lugar a tumores auténticos.²⁶⁴ Las vías NOS-3/GLD-4–GLD-1 y GLD-2–GLD-3 funcionan de forma redundante para promover la entrada y progresión meiótica. La alteración de ambas vías en las triples mutaciones *gld-2; gld-1; gld-4* da como resultado un fenotipo tumoral "sintético" caracterizado por la acumulación de células germinales mitóticamente activas en la línea germinal.²⁷⁰

Esto conduce a una línea germinal más grande que la de tipo silvestre, y compuesta exclusivamente de células germinales desde el extremo distal al proximal, debido a divisiones mitóticas tumorales no controladas (figura 7.5). La línea germinal *gld-2; gld-1; gld-4* proporciona un sistema ideal para investigar los efectos de objetivos específicos en un tejido germinal tumoral. Por lo tanto, al aprovechar la simplicidad y la manejabilidad genética de *C. elegans*, los investigadores pueden obtener información sobre las complejidades moleculares de la progresión del cáncer, descubriendo potencialmente nuevos objetivos terapéuticos y contribuyendo a la comprensión de la biología del cáncer humano.

7.1.5.2. Efectos de los selenocianatos 11 y 13 sobre la capacidad reproductora de la variedad silvestre de *C. elegans*

Para investigar si los selenocianatos derivados del OA influyen en el desarrollo normal de *C. elegans*, se expusieron nematodos L4 aislados (la etapa previa a alcanzar la fase adulta, organismos sanos) en DMSO, como control, y se evaluó el efecto que provocaban los selenocianatos **11** y **13**, en concentraciones

270. Millonigg S., Minasaki R., Nusch M., Novák J., Eckmann C.R. GLD-4-mediated translational activation regulates the size of the proliferative germ cell pool in the adult *C. elegans* germ line. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004647.

crecientes de 1 a 100 μM (tabla 7.3). El tamaño de progenie estándar para *C. elegans* es de aproximadamente 300 huevos puestos por gusano, lo que indica, a tenor de los resultados mostrados en la tabla 7.3, una homeostasis normal en las células germinales y una progresión de la meiosis, como se observó en el control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas tras la exposición a concentraciones crecientes de selenocianatos, excepto a altas concentraciones de 50 y 100 μM , donde se observó una muy ligera disminución en el número de huevos, en comparación con el DMSO.

Esta disminución puede estar relacionada con un aumento en el número de células que sufren apoptosis en la línea germinal, eliminando así una parte de las células que inician el proceso de formación de ovocitos. En relación con este resultado, se evaluó la letalidad embrionaria, que representa la cantidad de huevos capaces de desarrollarse correctamente y eclosionar. Como era de esperar, a tenor de los resultados anteriores, sólo las exposiciones a 50 y 100 μM de ambos compuestos afectaron la viabilidad de los embriones, no observándose ninguna diferencia significativa entre los tratamientos con **11** y **13**.

También se monitoreó el desarrollo de estos embriones y se midió el porcentaje de nematodos machos, como indicador de inestabilidad genética por la pérdida de un cromosoma sexual durante la gametogénesis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la apariencia de los machos en ningún tratamiento con los selenocianatos (tabla 7.3). Tampoco se observaron anomalías de desarrollo durante la fase embrionaria (datos no mostrados), lo que refuerza la idea de que los selenocianatos no tienen efectos citotóxicos en tejidos no tumorales.

Tabla 7.3. Letalidad embrionaria de *C. elegans* silvestre a dosis elevadas.

Tratamiento	n	Huevos totales	Progenie viable	Letalidad embrionaria (%)	Tamaño de cría	Machos (%)	
DMSO	5	1481	1462	1.28	296.2±8.1	0	
11	1 µM	5	1489	1480	0.60	297.8±13	0
	2	5	1505	1493	0.80	301±7.2	0
	5	5	1479	1458	1.42	295.8±12.8	0
	10	5	1459	1427	2.19	291.8±12.9	0
	50	5	1398	1318	5.72**	279.6±12.1*	0.14
	100 µM	5	1345	1201	10.71***	269±16.7*	0.37
13	1 µM	5	1481	1460	1.42	296.2±7.7	0
	2	5	1483	1471	0.81	296.6±7	0
	5	5	1458	1441	1.17	291.6±12.6	0
	10	5	1412	1370	2.97	282.4±13	0.07
	50	5	1379	1301	5.66***	275.8±5.5**	0.22
	100 µM	5	1333	1172	12.08***	266.6±15.7**	0.45

La letalidad embrionaria se calificó comparando el número de huevos que eclosionaron para producir una progenie viable con el número total de huevos puestos. Se probaron un número de 5 nematodos N2 por cada condición (n), DMSO como control y diferentes concentraciones de **11** y **13**. Tamaño promedio de cría ± DE. El porcentaje de machos se determinó comparando el número de machos en la progenie viable con el número total de huevos puestos (***) indica valor de P <0.001, ** indica valor de P <0.01 y * indica valor de P <0.05; Prueba t de Student).

7.1.5.3. Efecto de los selenocianatos 11 y 13 sobre células germinales no tumorales

Para analizar un tejido específico, se extrajeron líneas germinales de gusanos adultos tratados en las mismas condiciones descritas anteriormente. Tras la fijación y tinción con DAPI, se cuantificó el número total de células germinales en la región proliferativa de la línea germinal (figura 7.6). Como se esperaba, y en correlación con datos anteriores, no se observaron diferencias entre los tratamientos de control con DMSO y aquellos que contenían a los compuestos **11** y **13**, con aproximadamente 150 células germinales por compartimento mitótico (figura 7.6B). Se observó una ligera disminución, pero estadísticamente significativa en el número de células en la región proliferativa a 100 µM, lo que coincide con hallazgos anteriores, indicando defectos proliferativos para altas concentraciones

de estos compuestos (muy superiores a las dosis terapéuticas, tal y como se mostró en la sección anterior).

De particular interés es la observación de que algunas células germinales tratadas con menos de 50 μM de ambos selenocianatos exhibieron un tamaño mayor en comparación con el resto de las células germinales (indicado por flechas en la figura 7.6A), un fenómeno conocido como *detención del ciclo celular*. Se ha descrito que las células expuestas a agentes que dañan el ADN activan el punto de control de la fase S, deteniendo el ciclo celular y aumentando el tamaño de la célula.²⁷¹ Los tratamientos a 100 μM de ambos selenocianatos condujeron a una mayoría de células con detención del ciclo celular (figura 7.6A). Este fenómeno podría atribuirse a agentes citostáticos, que ralentizan o detienen la progresión del ciclo celular, lo que representa un posible modo de acción de estos compuestos de selenocianatos en las células germinales del nematodo. No se han detectado diferencias entre el efecto de **11** y **13** (figura 7.6). Por lo tanto, estos estudios revelan que los selenocianatos derivados del OA ejercen, a concentraciones bajas, un impacto mínimo en tejidos no tumorales de *C. elegans*, así como en el proceso reproductivo, en cuanto al número de huevos, tamaño de la cría y desarrollo embrionario.

7.1.5.4. Efecto de 11 y 13 sobre líneas germinales tumorales de *C. elegans*

Para evaluar si los selenocianatos **11** y **13** son selectivos hacia las células cancerosas y tienen actividad antiproliferativa en células germinales tumorales, *gld-2*; *gld-1*; *gld-4* mutantes, los gusanos se trataron con 2 y 5 μM de cada selenocianato analizado, utilizando un tratamiento con DMSO como control. En todos los casos se utilizaron adultos jóvenes de la misma edad (20 horas desde larvas L4). Las líneas germinales se extrajeron, fijaron y tiñeron con DAPI para obtener una mayor resolución. Se observó una clara reducción en el tamaño total de la línea germinal

271. Gartner A., MacQueen A.J., Villeneuve A.M. Methods for analyzing checkpoint responses in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol. Biol.* **2004**, 280, 257–274.

tumoral tratada con ambos selenocianatos, más pronunciada en el tratamiento con una concentración 5 μM (figura 7.7A).

Un resultado interesante, es el aumento del tamaño de algunas células germinales después de ambos tratamientos con selenocianatos, lo que indica una detención del ciclo celular debido a la acumulación de defectos y la activación del punto de control (figura 7.7B). Para cuantificar este fenotipo, se definieron áreas establecidas en la línea germinal, contando el número de células germinales que caben en el área establecida. Un número menor de células germinales indica células más grandes. Se observó una clara reducción en el número de células en las áreas establecidas, más pronunciado a 5 μM , y similar para ambos compuestos (figura 7.7B), reforzando la idea de un modo de acción citostático de este grupo de compuestos, como se había observado previamente para altas concentraciones en tejidos no tumorales (figura 7.6).

Por lo tanto, el efecto de inhibición del crecimiento de células tumorales provocado por ambos compuestos a dosis bajas de 2–5 μM en tejidos de células germinales tumorales, en comparación con el muy ligero defecto observado en líneas germinales de tipo silvestre no tumorales a 50–100 μM , indica claramente la elevada selectividad de los híbridos OA-selenocianato hacia células tumorales.

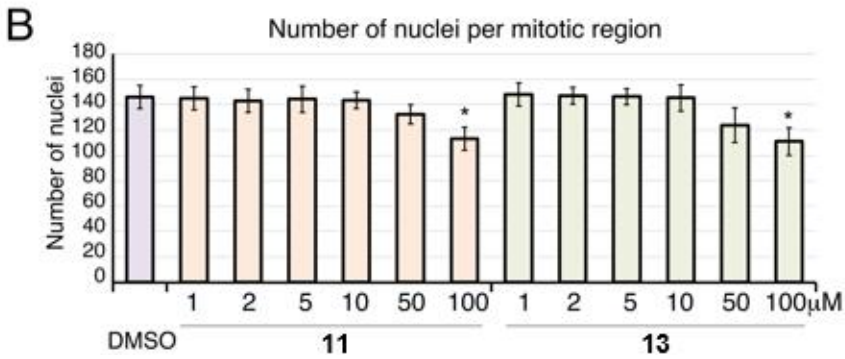
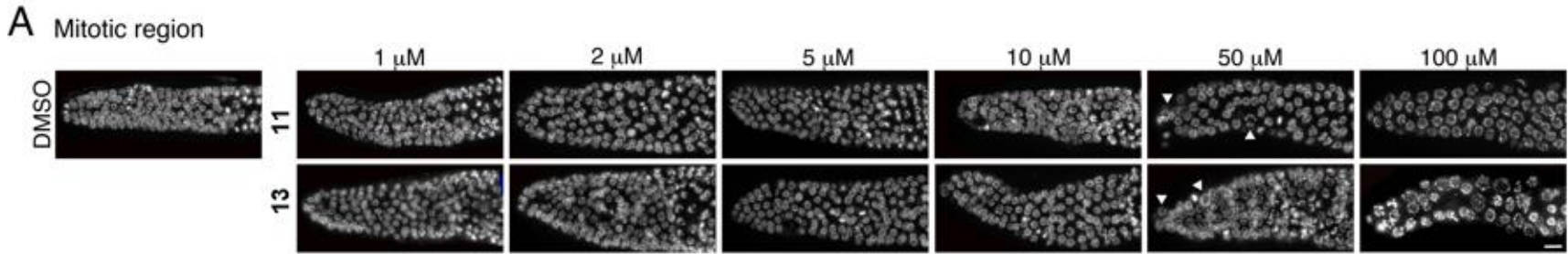


Figura 7.6. Los selenocianatos **11** y **13** inducen la detención del ciclo celular solo a concentraciones elevadas en células germinales de *C. elegans* silvestres. (A) Las imágenes muestran proyecciones del compartimento mitótico de líneas germinales silvestres que contienen células germinales en proliferación mitótica, tratadas con DMSO (control), y las concentraciones indicadas de ambos compuestos probados, **11** y **13**. La tinción con DAPI reveló la presencia de algunas células germinales agrandadas (puntas de flecha), indicativas de detención del ciclo celular, a 50 μ M de ambos compuestos probados. Obsérvese un aumento y una reducción general en el número de células por debajo de 100 μ M de ambos compuestos. (B) Los gráficos muestran la cuantificación del número de células mitóticas. Se puntuaron tres líneas germinales por genotipo y se analizó el número total de células germinales por región mitótica. Las columnas indican el valor promedio de células germinales por región mitótica, las barras de error muestran la desviación estándar y la significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student (* indica valor de $P < 0.05$). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Escala: 5 μ m en todos los paneles.

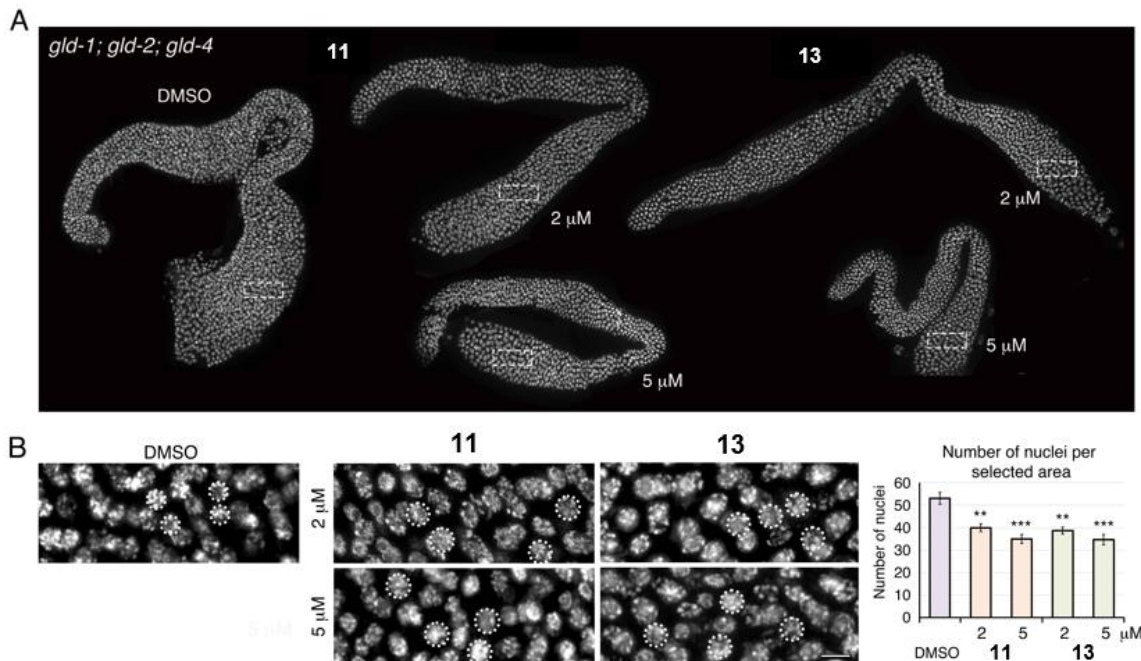


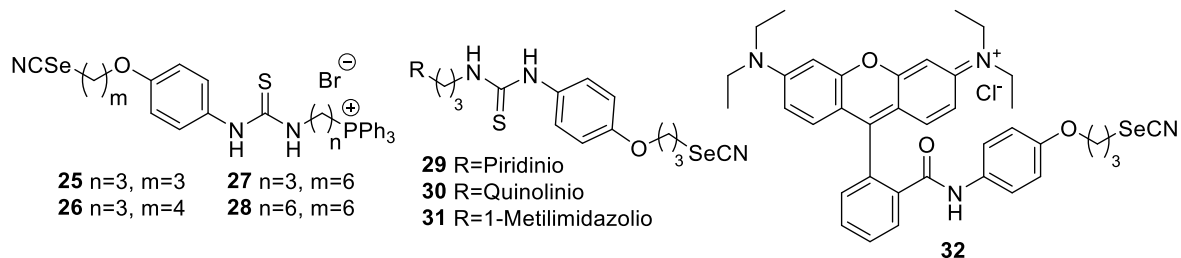
Figura 7.7. La exposición a **11** y **13** da como resultado líneas germinales tumorales más pequeñas debido a una reducción en la cantidad de células germinales proliferativas. (A) Líneas germinales disecadas representativas teñidas con DAPI del triple mutante *gld-2; gld-1; gld-4*, tratado con DMSO (control), y las concentraciones indicadas de los selenocianatos probados. Se observa un tamaño más pequeño de las líneas germinales tumorales en ambos tratamientos. (B) Los gráficos muestran la cuantificación del número de células germinales mitóticas en áreas rectangulares de dimensiones establecidas en condiciones anteriores. Un número menor de células germinales que caben en el área establecida indica células más grandes. Los círculos puntiagudos resaltan el tamaño de diferentes células germinales en diferentes condiciones. El área es mayor con tratamientos de selenocianatos que con DMSO. Se puntuaron tres líneas germinales por condición. Las columnas indican el valor promedio de células germinales por área establecida, las barras de error muestran la desviación estándar y la significación estadística se calculó mediante la prueba *t* de Student (** indica valor de $P < 0.01$ y *** indica valor de $P < 0.001$). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Escala: 5 μm en todos los paneles.

En conclusión, la exposición a los selenocianatos **11** y **13** da como resultado una reducción notable en el tamaño de la línea germinal tumoral al disminuir el número de células germinales proliferativas, lo que sugiere un efecto citostático prometedor. Estos hallazgos proporcionan información valiosa sobre las acciones selectivas y citostáticas de los selenocianatos analizados, y ofrecen direcciones valiosas para futuras investigaciones en biología del cáncer.

7.1.6. Ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* de derivados mitocondriotrópicos

La tabla 7.4 muestra los efectos antiproliferativos (GI_{50}) de los derivados mitocondriotrópicos **25–32** evaluados frente a un panel de seis líneas de tumores sólidos humanos, donde únicamente el compuesto **30** no pudo ser evaluado por su baja solubilidad en las condiciones del ensayo. Se emplearon como compuestos de referencia a la rodamina y los fármacos 5-fluorouracilo (5-FU) y cisplatino (CDDP), como controles positivos.

Tabla 7.4. Valores de actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los derivados mitocondriotrópicos^a



Compuesto	Línea celular					
	A549 (Pulmón)	HeLa (Cérvix)	MIA PaCa-2 (Páncreas)	SW1573 (Pulmón)	T-47D (Mama)	WiDr (Colon)
25	3.9±0.6	2.9±0.8	12±1.0	4.1±0.9	4.1±0.4	2.9±0.4
26	5.5±1.4	3.8±0.3	12±3.8	4.4±1.2	4.6±0.5	3.7±0.6
27	15±6.9	6.7±2.0	22±0.7	11±1.6	18±5.0	20±4.1
28	5.3±1.0	4.8±1.6	4.1±0.5	4.5±0.8	4.4±0.3	3.8±0.8
29	32±0.5	20±5.6	36±5.1	36±6.7	24±2.3	18±8.7
30	No soluble bajo las condiciones de estudio					
31	35±8.6	25±6.2	44±11	42±14	35±5.6	31±4.4
32	4.3±1.7	3.9±1.2	8.0±0.06	6.3±2.1	5.1±0.7	3.2±0.7
Rodamina	31±8.1	24±7.3	38±2.2	41±13	45±12	34±7.3
5-FU	2.2±0.3	16±5	---	3.3±1.2	43±16	49±7
CDDP	4.9±0.2	1.8±0.5	---	2.7±0.4	17±3	26±4

^aLos valores representan el promedio de $GI_{50} \pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes.

Se puede observar que los análogos probados indujeron un efecto antiproliferativo en las líneas celulares estudiadas en el rango μM bajo. Puede observarse que, con respecto al tipo de catión lipofílico, el que condujo a los mejores resultados fue el trifenilfosfonio, con valores de actividad claramente superiores a piridinio y 1-metilimidazolio cuando se comparan las estructuras con el mismo tamaño de espaciador (**25** vs. **29** y **31**, respectivamente).

Del grupo de compuestos analizados, el derivado **25** (trifenilfosfonio, cadena de propileno para ambos espaciadores) fue el que presentó mejores valores de antiproliferación para casi todas las líneas celulares evaluadas, destacando especialmente HeLa y WiDr ($\text{GI}_{50}=2.9 \mu\text{M}$), con un incremento de actividad en esta última línea resistente a multifármaco de hasta 16.8 y 8.9 veces con respecto a los fármacos de referencia 5-FU y CDDP, respectivamente.

También cabe destacar que, manteniendo constante la distancia del grupo trifenilfosfonio al núcleo aromático ($n=3$), se observó una clara disminución de la actividad al incrementar la distancia del grupo selenocianato a dicho fragmento aromático ($n=3, 4, 6$, compuestos **25**, **26**, **27**, respectivamente). Curiosamente, el uso del tamaño mayor para ambos espaciadores ($n= m= 6$, compuesto **28**) permitió mantener una actividad antiproliferativa análoga a la mostrada por **25**, e incluso superarla para la línea MIA PaCa-2 ($\text{GI}_{50}=12$ y $4.1 \mu\text{M}$ para **25** y **28**, respectivamente).

Destaca, así mismo, el compuesto **32** con un catión lipofílico de tipo rodamina ($\text{GI}_{50}=3.2\text{--}8.0 \mu\text{M}$), con actividades muy parecidas al derivado de tipo trifenilfosfonio **25**. Adicionalmente, el compuesto **32** mejoró significativamente su actividad antiproliferativa (hasta casi 11 veces) con respecto a la rodamina B sin modificar, lo que indica que la adición del grupo SeCN mejoró su acción biológica. Resultó especialmente activo frente a las líneas HeLa ($\text{GI}_{50}=3.9 \mu\text{M}$) y la línea celular resistente a multifármacos WiDr ($\text{GI}_{50}=3.2 \mu\text{M}$), donde este último fue 15.3 y 8 veces mejor con respecto a los fármacos de referencia 5-FU y CDDP, respectivamente.

Es de esperar que el compuesto **32**, debido al carácter fluorogénico de la rodamina, permita obtener información interesante en estudios posteriores, mostrando, por ejemplo, el lugar de acumulación dentro de la célula tumoral.

7.1.7. Ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* de los híbridos piridina-cumarinas

La tabla 7.5 muestra los valores de GI_{50} para los híbridos piridina-cumarina **33–37** y **39–42** (el compuesto **38** se encuentra aún pendiente de evaluación) evaluados como agentes antiproliferativos frente a 6 líneas de tumores sólidos humanos. Se incluyen, a efectos de comparación, los fármacos 5-fluorouracilo (5-FU) y cisplatino (CDDP).

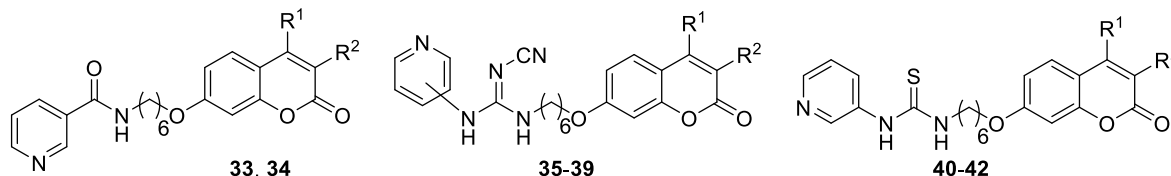
Aunque no se observa un patrón claro en cuanto a la influencia de la estructura en la actividad biológica, el empleo de cianoguanidinas en C-4 y tioureas en C-3, así como cumarinas dimetiladas proporcionó las mejores actividades en la mayoría de las líneas celulares evaluadas. De esta forma, la tiourea **41** podría considerarse como el derivado cabeza de serie, con valores de GI_{50} en el rango micromolar bajo para 5 de las 6 líneas evaluadas, incluyendo las dos líneas de tumores resistentes a multifármaco.

La cianoguanidina **35**, con una sustitución en C-3 sobre el residuo de piridina, fue el más potente sobre la línea celular SW1573 ($GI_{50}=1$ nM), siendo 3300 y 2700 veces más potente que el 5-FU y el CDDP, respectivamente, para esa línea celular.

De acuerdo con las características estructurales de los derivados analizados, es de destacar que las amidas y tioureas presentaron mejores valores de inhibición sobre células T-47D quimioresistentes en un rango de $GI_{50}=3.5–9.6$ μ M. Los derivados **33**, **35** y **37**, las cuales presentan un metilo en la posición 4 de la cumarina, fueron menos potentes que el resto de los derivados frente a células HeLa (**33** $GI_{50}=22$ μ M; **35** $GI_{50}=49$ μ M; **37** $GI_{50}=35$ μ M). De las cianoguanidinas evaluadas,

el derivado **36** presentó mejor actividad inhibitoria sobre la línea celular HeLa con un $GI_{50}=1.5 \mu\text{M}$ y **35** sobre la línea celular SW1573 con un $GI_{50}=1 \text{ nM}$.

Tabla 7.5. Actividad antiproliferativa (GI_{50} , μM) de los híbridos piridina-cumarinas^a



Compuesto		Línea celular					
		A549 (Pulmón)	HeLa (Cérvix)	MIA PaCa-2 (Páncreas)	SW1573 (Pulmón)	T-47D (Mama)	WiDr (Colon)
Amidas	33 ($R^1=\text{CH}_3$, $R^2=\text{H}$)	21±1.5	22±1.3	42±2.9	2.8±0.7	7.8±0.6	48±14
	34 ($R^1=R^2=\text{CH}_3$)	7.7±0.6	7.9±0.6	75±23	1.6±0.3	3.5±0.5	65±32
Ciano- guanidinas	35 ($R^1=\text{CH}_3$, $R^2=\text{H}$), C-3	38±2.8	49±2.9	48±0.2	0.001±0	13±1.8	33±8.4
	36 ($R^1=R^2=\text{CH}_3$), C-3	8.8±4.1	1.5±0.2	20±4.4	4.3±1.9	91±15	84±19
	37 ($R^1=\text{CH}_3$, $R^2=\text{H}$), C-4	5.9±0.6	35±14	3.2±0.3	14±3.6	59±20	27±1.6
	39 ($R^1=\text{CF}_3$, $R^2=\text{H}$), C-4	7.4	50±13	40±16	1.9	33±9.5	23±7.1
Tioureas	40 ($R^1=\text{CH}_3$, $R^2=\text{H}$)	6.8±2.6	10±1.2	22±7.2	20±2.2	9.6±4.6	27±11
	41 ($R^1=R^2=\text{CH}_3$)	4.8±1.7	29±6.5	7.3±0.8	3.8±1.5	7.0±2.5	8.5±1
	42 ($R^1=\text{CF}_3$, $R^2=\text{H}$)	10±2.2	15±3.9	32±4.7	2.2±0.7	5.2±0.8	19±8.0
Control	5-FU	2.2±0.3	16±5	---	3.3±1.2	43±16	49±7
	CDDP	4.9±0.2	1.8±0.4	---	2.7±0.4	17±3	26±4

^aLos valores representan el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

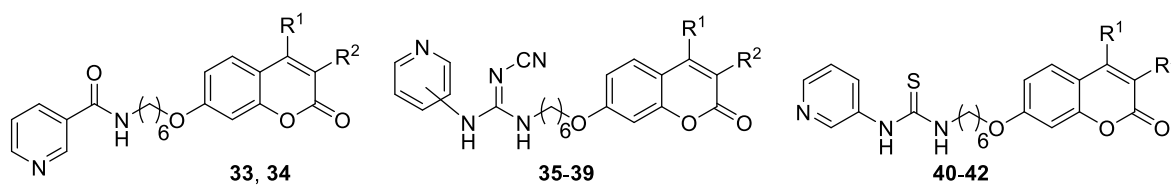
7.2. Ensayos de inhibición *in vitro* de anhidrasas carbónicas humanas

Los compuestos **33–42** fueron evaluados *in vitro* como potenciales inhibidores de anhidrasas carbónicas humanas relacionadas con procesos tumorales (las CA

transmembrana IX, XII). Con objeto de analizar la selectividad de esta inhibición, se han incluido también en el estudio las CAs citosólicas I y II, no consideradas aquí como dianas. Se incluyó también la acetazolamida (AAZ) como control positivo.

Las enzimas empleadas fueron recombinantes, y los parámetros cinéticos necesarios para el cálculo de las constantes de inhibición fueron obtenidos mediante el ensayo de hidratación de CO₂ de flujo detenido. Dichos ensayos se realizaron en el laboratorio del Profesor Claudiu T. Supuran (Universidad de Bolonia, Italia), y los resultados se muestran en la tabla 7.6.

Tabla 7.6. Valores de K_i de derivados de cumarina frente a anhidrasas carbónicas



Compuesto	K_i (nM) ^{a,b}				
	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII	
Amidas	33 (R ¹ =CH ₃ , R ² =H)	>100000	>100000	60.1	54.9
	34 (R ¹ =R ² =CH ₃)	>100000	>100000	48.9	11.4
Ciano-guanidinas	35 (R ¹ =CH ₃ , R ² =H), C-3	>100000	>100000	179.2	92.7
	36 (R ¹ =R ² =CH ₃), C-3	>100000	>100000	98.3	125.7
	37 (R ¹ =CH ₃ , R ² =H), C-4	>100000	>100000	132.9	16.4
	38 (R ¹ =R ² =CH ₃), C-4	>100000	>100000	68.4	35.9
	39 (R ¹ =CF ₃ , R ² =H), C-4	>100000	>100000	118.4	81.2
Tioureas	40 (R ¹ =CH ₃ , R ² =H)	>100000	>100000	104.8	42.1
	41 (R ¹ =R ² =CH ₃)	>100000	>100000	74.2	105.6
	42 (R ¹ =CF ₃ , R ² =H)	>100000	>100000	153.1	30.2
Control	AAZ	250.0	12.0	25.0	5.7

^aMedia de 3 ensayos diferentes, mediante la técnica de flujo detenido (los errores estuvieron en el rango de \pm 5-10% de los valores reportados). ^bTiempo de incubación E-I de 6h.

Se puede observar que los derivados analizados presentaron únicamente efecto inhibitor sobre anhidrasas carbónicas transmembrana IX y XII, las cuales se encuentran sobreexpresadas en células tumorales, lo que indica una excelente selectividad hacia estas últimas (índice de selectividad comprendido entre 558 y 8772). Todos los derivados resultaron ser, por tanto, potentes y selectivos inhibidores de las isoformas de anhidrasas carbónicas humanas involucradas en procesos tumorales (CA IX y XII), con un rango de actividad nanomolar-submicromolar. El orden de actividad observado fue: Amida > Cianoguanidina C-4 > Tiourea C-3 > Cianoguanidina C-3. Aunque en ningún caso se mejoró la potencia de la AAZ, empleada como referencia, sí se aumentó extraordinariamente la selectividad; para la AAZ, el índice de selectividad oscila entre 10–44 para CA I y entre 0.48–2 para CA II. El derivado más potente fue la amida **34** con una $K_i=48.9$ nM para hCA IX y $K_i= 11.4$ nM para hCA XII.

En base a lo anterior, se seleccionarán a los compuestos con mejor valor de antiproliferación y de inhibición sobre CAs para ser evaluados como potenciales inhibidores de NAMPT. Actualmente, y en colaboración con el Dr. Padrón (Universidad de la Laguna, Tenerife, España), se están realizando estudios de *docking* sobre los derivados más potentes, con objeto de dilucidar las interacciones clave en la inhibición de las CAs IX y XII.

8. Conclusiones

Híbridos ácido oleanólico-cumarina

PRIMERA

Se ha desarrollado de manera satisfactoria una metodología sintética que ha permitido la derivatización del ácido oleanólico en la posición C-28 y la preparación de 9 híbridos ácido oleanólico-cumarinas con buenos rendimientos. Las etapas sintéticas fueron: condensación de Pechmann, monoalquilación de la posición C-7 de la cumarina y reacción S_N2 con ácido oleanólico.

SEGUNDA

De entre los 9 híbridos ácido oleanólico-cumarinas preparados, sólo el compuesto **4** presentó actividad antiproliferativa: moderada ($GI_{50}=13-27 \mu M$) para las líneas A549 (pulmón), HBL-100 (mama), SW1573 (pulmón), T-47D (mama) y WiDr (colon), y buena actividad ($GI_{50}=7.0 \mu M$) para la línea HeLa (cervix). Los resultados obtenidos para **4** fueron similares a los del ácido oleanólico sin funcionalizar, lo que indica que su conjugación con cumarinas no potencia su actividad antiproliferativa.

Híbridos ácido oleanólico-selenocianato

TERCERA

Se ha desarrollado una metodología práctica para el acceso eficaz a una familia de 14 compuestos de selenoderivados del ácido oleanólico como potenciales agentes antiproliferativos, modificando las posiciones C-3 (hidroxilo) o C-28 (ácido carboxílico). Para los derivados en C-28 se partió, bien del ácido oleanólico natural, o bien de su derivado 3-O-acetilado, que fueron monoalquilados con α,ω -dibromoalcanos de diferente longitud y flexibilidad conformacional, seguido de sustitución nucleofílica con KSeCN. Por otro lado, para la modificación de la posición C-3, el ácido oleanólico se convirtió en el éster metílico en C-28, seguido de esterificación en el hidroxilo de C-3 con cloruros de ω -haloalcanoílos de distinta longitud, y por último, desplazamiento nucleofílico con KSeCN.

CUARTA

La evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro* de los híbridos OA-selenocianato **11–24** reveló que los derivados más potentes eran aquellos en los que la sustitución se había efectuado en la posición C-28, y que poseían espaciadores de hasta 6 átomos de carbono, o un fragmento de *p*-xileno, con el grupo hidroxilo de la posición C-3 libre. De esta forma, los selenocianatos **11–13** y **19** exhibieron valores de GI₅₀ inferiores a 2.0 µM para la mayoría de las 6 líneas tumorales evaluadas. Por consiguiente, tanto la elongación de la cadena hidrocarbonada del espaciador, como la acetilación de la posición C-3, condujo a una reducción significativa de la actividad, siendo las líneas resistentes a multifármaco, las más sensibles a estos cambios estructurales.

QUINTA

Con objeto de profundizar en el mecanismo de acción de los híbridos OA-selenocianato, se empleó la técnica de monitorización de células vivas sin marcaje, empleando un microscopio holotomográfico 3D, para estudiar el efecto de **11** sobre las células tumorales SW1573 (pulmón). El análisis de los cambios morfológicos de estas células sugiere una muerte celular por necrosis. Para corroborar lo anterior, se llevó a cabo un estudio de daño al ADN en células HeLa (tumoral) y RPE1 (no tumoral) provocado por el compuesto **13**. Se observó que los híbridos de OA-selenocianato inducen daño al ADN y promueven la reparación de DSBs por la vía NHEJ específicamente en las células de cáncer maligno durante la fase S del ciclo celular. Igualmente, la incorporación del marcador de proliferación celular EdU demostró afectaciones en la replicación durante la fase S, que como consecuencia llevó a una disminución de células mitóticas, lo que, a su vez, también indica afectaciones durante la fase M del ciclo celular.

SEXTA

Los selenocianatos **11** y **13** fueron evaluados *in vivo* en un modelo de *C. elegans*, con objeto de analizar su selectividad y modo de acción en un organismo vivo. Estos compuestos mostraron una excelente selectividad, no provocando

alteraciones morfológicas ni fisiológicas en organismos sanos hasta dosis muy superiores a la terapéutica. Por otro lado, en el modelo tumoral, produjeron una reducción notable en el tamaño de la línea germinal tumoral y reducción en el número de células germinales proliferativas, lo que indica un efecto citostático de los selenocianatos evaluados.

Agentes mitocondriotrópicos

SÉPTIMA

Se ha desarrollado una metodología efectiva para la preparación de 8 selenocianatos con acción mitocondriotrópica empleando *p*-aminofenol como plataforma de partida para la incorporación de los dos farmacóforos: el grupo selenocianato, y un catión lipofílico como vector (bromuro de trifenilfosfonio, piridinio, quinolinio, metilimidazolio y Rodamina B).

OCTAVA

Los derivados **25–32**, a excepción del compuesto **30**, presentaron efecto antiproliferativo en las 6 líneas celulares analizadas en el rango μM bajo, donde el compuesto **25** con catión lipofílico de bromuro de trifenilfosfonio fue el que presentó mejor efecto de inhibición sobre las células HeLa y células resistentes a multifármacos WiDr ($\text{GI}_{50}=2.9 \mu\text{M}$), 16.8 y 8.9 veces mejor a los fármacos de referencia.

NOVENA

En los derivados analizados con catión lipofílico de bromuro de trifenilfosfonio, se observó que el aumento de la cadena selenoalquílica hasta 6C, causó una ligera disminución en la inhibición celular con respecto al resto de estos compuestos. Por su parte, la incorporación de los cationes lipofílicos piridinio y 1-metilimidazolio en los derivados de selenio **29** y **31** disminuyó el efecto de inhibición celular con respecto a los otros cationes lipofílicos analizados.

DÉCIMA

La adición del fragmento de SeCN a la rodamina B en el compuesto **32** aumentó hasta 11 veces sus valores de inhibición de crecimiento celular con respecto a la rodamina B sin modificar, además de incrementar la potencia hasta 15.3 u 8 veces frente a células HeLa ($GI_{50}=3.9 \mu\text{M}$) y WiDr ($GI_{50}=3.2 \mu\text{M}$) con respecto a los fármacos de referencia.

Inhibidores duales de NAMPT y CAs

UNDÉCIMA

Se realizó un diseño novedoso para la obtención de una nueva familia de agentes antiproliferativos (10 compuestos, **33–42**), consistente en la combinación de un residuo de piridina sustituida en C-3 o C-4 (inhibición de NAMPT) con una unidad de cumarina con diversos sustituyentes en las posiciones C-3 y C-4 (*inhibidor suicida* de CAs). Ambos farmacóforos se conectaron a través de un espaciador de longitud fija (hexametileno) y un conector de tipo amida, cianoguanidina o tiourea.

Desde un punto de vista sintético, el acceso a estos derivados transcurrió con rendimientos de buenos a excelentes para el caso de las amidas y cianoguanidinas, y moderados para las tioureas, presumiblemente debido a la reducida estabilidad del piridin-3-il isotiocianato.

DUODÉCIMA

No existe una correlación directa entre las estructuras de los derivados duales **33–42** con las actividades como agentes antiproliferativos. El empleo de cianoguanidinas en C-4 y tioureas en C-3 con cumarinas dimetiladas proporcionó los mejores resultados en la mayoría de las líneas tumorales evaluadas. La tiourea **41** podría considerarse como el derivado cabeza de serie, con valores de GI_{50} en el rango micromolar bajo en 5 de las 6 líneas evaluadas, incluyendo las dos resistentes a multifármaco. De manera inesperada, la cianoguanidina **35** mostró actividad en el rango nM bajo ($GI_{50}=1 \text{ nM}$) para la línea SW1573 (pulmón).

DECIMOTERCERA

Los derivados **33–42** se comportaron como inhibidores potentes (rango submicromolar-nanomolar) y selectivos de las CAs transmembrana asociadas a tumores (CA IX y XII), no mostrando actividad apreciable frente a las CAs citosólicas CA I y II. El orden de actividad observado fue: amida > cianoguanidina en C-4 > tiourea en C-3 > cianoguanidina en C-3. Aunque no mejoraron la potencia del fármaco de referencia (acetazolamida, AAZ), sí mejoraron extraordinariamente la selectividad, por lo que podrían reducir posibles efectos secundarios. El derivado cabeza de serie fue la amida **34**, con $K_i=49.9$ nM para CA IX y 11.4 nM para CA XII.

DECIMOCUARTA

El uso de un diseño multidiana en las tres aproximaciones novedosas consideradas en esta Tesis doctoral (híbridos OA-selenocianato, selenocianato-vector mitocondriotrópico e inhibidores duales de NAMPT-CAs) ha mostrado ser efectivo en el desarrollo de nuevos agentes antiproliferativos. Esto abre nuevas oportunidades para el desarrollo futuro de agentes citotóxicos que permitan un tratamiento más eficaz del cáncer.

8. Conclusions

Hybrids oleanolic acid-coumarin

FIRST

A new synthetic methodology has been successfully developed, allowing the derivatization of oleanolic acid on the C-28 position and the preparation of 9 oleanolic acid-coumarins hybrids with good overall yields. The synthetic steps were: Pechmann condensation, monoalkylation of C-7 position of coumarin, and S_N2 reaction with oleanolic acid.

SECOND

Among the 9 oleanolic acid-coumarins hybrids prepared, only compound **4** exhibited antiproliferative activity: moderate ($GI_{50}=13-27 \mu M$) for the lines A549 (lung), HBL-100 (breast), SW1573 (lung), T-47D (breast) and WiDr (colon), and good activity ($GI_{50}=7.0 \mu M$) for HeLa line (cervix). Results obtained for **4** were like the ones obtained for non-functionalized oleanolic acid, indicating that its conjugation with coumarins does not potentiate its antiproliferative properties.

Oleanolic acid-selenocyanate hybrids

THIRD

A practical methodology has been developed for the efficient access to a 14-compound family of oleanolic acid selenoderivatives as potential antiproliferative agents, modifying positions C-3 (hydroxyl group) or C-28 (carboxylic acid). For derivatives on C-28, the synthetic pathway started from either natural oleanolic acid, or its 3-O-acetyl counterpart, and they were alkylated with α,ω -dibromoalkanes of different length and conformational flexibility, followed by nucleophilic substitution with $KSeCN$. Additionally, for the modification of C-3 position, oleanolic acid was converted into its methyl ester on C-28, followed by esterification of C-3 hydroxyl group with ω -haloalkanoyl chlorides of different lengths, and finally, nucleophilic displacement with $KSeCN$.

FORTH

Evaluation of the *in vitro* antiproliferative activity of OA-selenocyanate hybrids **11–24** revealed that the most potent derivatives were those substituted on C-28, with an up to 6-carbon linker, or a *p*-phenylene fragment, and with the free OH on C-3 position. Thus, selenocyanates **11–13** and **19** exhibited GI₅₀ values lower than 2.0 µM for most of the 6 tumor cell lines evaluated. Therefore, both linker elongation and acetylation on C-3 position led to a significant diminishment of activity, the multidrug resistant cell lines being the most sensitive to those structural changes.

FIFTH

With the aim of getting inside the mode of action of OA-selenocyanate hybrids, the labelling-free live cells monitoring was accomplished using a 3D holotomography microscope, to study the effect of **11** on SW1573 tumor cells (lung). Analysis of morphological changes of these cells suggested necrosis as the cell death mechanism. To demonstrate the above, a study of DNA damage in HeLa (tumor, cervix) and RPE1 (non-tumor, retina) cells provoked by compound **13** was carried out. It was observed that OA-selenocyanate hybrids induce DNA damage and promote the repair of DSBs by the NHEJ pathway, specifically in malignant cancer cells during the S phase of the cell cycle. Moreover, incorporation of the cell proliferation marker EdU showed alterations in the replication step during this same phase, what led to a decrease in mitotic cells, what also indicates also effects during the M phase of the cell cycle.

SIXTH

Selenocyanates **11** and **13** were *in vivo* evaluated using a *C. elegans* model with the aim of analyzing their selectivity and mode of action in a living organism. These compounds showed an excellent selectivity, leading to no morphological nor physiological alterations in healthy organisms, up to doses much higher than therapeutic ones. Moreover, in the tumoral model, they produced a notable reduction of the size of proliferating tumorous germline, suggesting a cytostatic effect of selenocyanates evaluated.

Mitochondriotropic agents

SEVENTH

An efficient methodology has been developed for the preparation of 8 selenocyanates with mitochondriotropic action, using *p*-aminophenol as the initial platform for incorporating both pharmacophores: selenocyanate group and a lipophilic cation as a vector (triphenylphosphonium, pyridinium, quinolinium, methylimidazolium bromide, and rhodamine B).

EIGHTH

Derivatives **25–32**, except for compound **30**, showed antiproliferative activity in the 6 cell lines analyzed in low μM range, where compound **25** with the lipophilic triphenylphosphonium bromide cation had the best inhibitory effect on HeLa and WiDr cells multidrug-resistant cells ($\text{GI}_{50}=2.9 \mu\text{M}$), 16.8 and 8.9 times better than the reference drugs.

NINTH

Within derivatives bearing the lipophilic triphenylphosphonium bromide cation, it was observed that the increase of the selenoalkyl chain up to 6C caused a slight decrease in the antiproliferative activity. Moreover, the incorporation of the lipophilic cations pyridinium and 1-methylimidazolium in the selenium derivatives **29** and **31** decreased the antiproliferative activity.

TENTH

The addition of the SeCN moiety to rhodamine B in compound **32** increased its cell growth inhibition values up to 11-fold with respect to unmodified rhodamine B, in addition to increasing the potency up to 15.3 or 8-fold against HeLa ($\text{GI}_{50}=3.9 \mu\text{M}$) and WiDr ($\text{GI}_{50}=3.2 \mu\text{M}$) cells compared to the reference drugs.

Dual NAMPT and CAs inhibitors

ELEVENTH

A novel design for obtaining a new family of antiproliferative agents was accomplished (10 compounds, **33–42**), consisting of the combination of a pyridine residue substituted at C-3 or C-4 (NAMPT inhibition) with a coumarin core bearing different substituents at C-3 and C-4 (CAs *suicide inhibitor*). Both pharmacophores were connected through a spacer with a fixed length (hexamethylene) and an amide, cyanoguanidine or thiourea-type linker. From a synthetic point of view, access to these derivatives proceeded with good to excellent yields for amides and guanidines, and moderate for thioureas, presumably due to the reduced stability of pyridine-3-yl isothiocyanate.

TWELFTH

There is not a direct correlation between the structures of dual derivatives **33–42** and the activities as antiproliferative agents. The use of cyanoguanidines at C-4 and thioureas at C-3 pyridine positions, with dimethylated coumarins furnished the best results in most of the tested cell lines. Thiourea **41** could be considered as the lead compound, with GI_{50} values in the low micromolar range for 5 out of 6 tested lines, including the two multidrug resistant cell lines. Unexpectedly, cyanoguanidine **35** showed activity in the low nM range ($GI_{50}=1$ nM) against SW1573 line (lung).

THIRTEENTH

Derivatives **33–42** behaved as potent (submicromolar-nanomolar range) and selective inhibitors of transmembrane CAs associated to tumors (CA IX and XII), not showing appreciable activity against cytosolic CAs I and II. The observed activity order was: amide > cyanoguanidine at C-4 > thiourea at C-3 > cyanoguanidine at C-3. Although they did not improve the potency of the reference drug (acetazolamide, AAZ), they did increase the selectivity in an outstanding fashion, and thus, might reduce intrinsic side-effects.

The lead derivative was amide **34**, with K_i = 49.9 nM for CA IX and 11.4 nM for CA XII.

FORTEENTH

The use of a multitarget design in the three novel approaches considered in this Thesis (OA-selenocyanate hybrids, selenocyanate-mitochondriotropic vector and dual NAMPT-CAs inhibitors) proved to be effective in the design of new antiproliferative agents. This opens new opportunities for the future development of cytotoxic agents that enable a more effective cancer treatment.

9. Parte experimental

9.1. Métodos generales

La cromatografía en capa fina se realizó con placas cromatográficas de aluminio recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (Merck 60 F₂₆₄). La visualización fue mediante luz UV ($\lambda=254$ nm) y revelando por carbonización con vainillina etanólica al 10% conteniendo un 1% de H₂SO₄ o con ácido fosfomolibdico en etanol al 5%.

La purificación por cromatografía en columna se llevó a cabo con gel de sílice como fase estacionaria (Merck 60; 40-63 μm de tamaño de partícula) y como eluyentes mezclas de disolventes en gradiente que se indican en cada caso. La elución fue por gravedad y por ligera presión con bomba de aire.

Los puntos de fusión se realizaron con un equipo *Electrothermal*, con la técnica de capilar abierto y se proporcionan sin corregir.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo *Bruker Ascend 500* (500.13 MHz para ¹H y 125.77 MHz para ¹³C) de la Facultad de Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. También, del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS), se utilizó un espectrómetro *Bruker Avance III 300* (300 MHz para ¹H y 75.5 para ¹³C) o un *Bruker Avance III 500* (500.13 MHz para ¹H y 125.77 para ¹³C), este último equipado con una criosonda TCI (triple resonancia criosonda inversa).

Como disolventes deuterados se han empleado CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆, donde su señal residual fue empleada para calibrar los espectros obtenidos.

Las asignaciones se confirmaron mediante experimentos homo y heteronucleares 2D (COSY y HSQC). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

Los espectros de masas se registraron utilizando un espectrómetro *Qexactive*, mediante ionización por electrospray (ESI). La inyección de la muestra (MeOH y DMSO como disolvente) se realizó mediante UHPLC sin columna (50 ml y adquisición durante 3 min a 0.200 ml/min). La adquisición se realiza con escaneo completo a una resolución de 60 000. La temperatura del capilar fue de 350 °C y el voltaje de la fuente de 3.5 kV. Los espectros se registraron en modo positivo y se calibraron utilizando la solución de calibración de iones positivos *Pierce™ LTQ Velos ESI (Thermo Fisher Scientific)*.

9.2. Estudios de actividad antiproliferativa *in vitro*

9.2.1. Líneas celulares y condiciones de crecimiento

El Dr. Godefridus J. Peters (Cancer Center Amsterdam, Vrije Universiteit, Ámsterdam, Países Bajos) proporcionó las líneas celulares de tumores sólidos humanos utilizados en este estudio. Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con glutamina 1 mM, FBS (Fetal Bovine Serum) al 5% y antibióticos. Las condiciones de cultivo celular fueron a 37°C bajo una atmosfera humidificada con 5% de CO₂.

Para los estudios de mecanismo de acción de los híbridos OA-SeCN, las células HeLa se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, Sigma-Aldrich) con alto contenido de glucosa suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (todos de Sigma-Aldrich). De manera similar, las células RPE1 se mantuvieron en medio DMEM/F-12 con alto contenido de glucosa (Sigma-Aldrich) con los mismos suplementos: 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

9.2.2. Ensayos de inhibición del crecimiento celular

La medición de inhibición de crecimiento celular *in vitro* fue realizada por el equipo de trabajo del Dr. José Manuel Padrón (Universidad de la Laguna, Tenerife, España), mediante modificaciones al protocolo del Instituto Nacional del Cáncer

(NCI) de EE. UU.²⁷² Se utilizaron las siguientes densidades de siembra (células por pocillo): 2500 (A549, HBL-100, HeLa, SW1573) y 5000 (T-47D y WiDr). Para cada producto, los valores de GI₅₀ (Growth Inhibition 50%) se calcularon según las fórmulas del NCI.

Los derivados sintéticos se disolvieron en DMSO, empleando una solución madre de 40.0 mM, y una concentración inicial por pocillo de 100 µM, con 48 h de incubación. Posteriormente se fijaron las células monocapa con 25 µL de una solución fría de ácido tricloroacético (50% m/v) durante 60 min a 4 °C. Luego, las placas se enjuagaron con agua, seguido de la adición de 25 µL de una solución de SRB (sulforodamina B, 0.4% m/v en ácido acético al 1%) durante 15 min. La SRB no unida se lavó con ácido acético al 1%, seguido de la disolución de la SRB unida a las células con 150 µL de una solución de Tris (tris(hidroximetil)aminometano, 10 mM a pH 10.5). Finalmente se realizaron las mediciones de densidad óptica de cada pocillo a longitudes de onda de 530 y 620 nm.

Para las células control se utilizaron concentraciones equivalentes de DMSO (0.25% V/V, control negativo). Para los compuestos con actividad superior al 50% de inhibición de crecimiento celular se calculó el valor de GI₅₀, con un rango de concentraciones de 0.001-100 µM. Los resultados se expresaron como el promedio ± SD.

9.3. Imágenes continuas de células vivas sin marcaje

Se sembraron células SW1573 (100 000 células/placa) en una placa de vidrio µ-dish de 35 mm de altura (IBIDI, Alemania). Transcurridas 24 h se realizó el cambio de medio por RPMI 1640 sin rojo de fenol y las células fueron tratadas con el selenocianato **11** a una dosis de 10 µM y se colocaron inmediatamente las placas en el sistema de imágenes de células sin marcaje CX-A (Nanolive S.A., Suiza). Las imágenes en un área de 236 µm x 236 µm se tomaron cada 3 min en un lapso de

272. Puerta A., Alexis R.G., Abdilla R., Demanuele K., Fernandes M.X., Bosica G., Padrón J.M. Naphthol-derived Betti bases as potential SLC6A14 blockers. *J. Mol. Clin. Med.* **2019**, 2, 35–40.

20 h. Después de la adquisición de imágenes, se utilizó el software de análisis y segmentación Eve y el módulo LIVE Cell Death Assay (Nanolive S.A., Suiza) para evaluar la respuesta fenotípica. Las mediciones se obtuvieron para cada célula en todos los ciclos de imágenes para cada tratamiento. La cantidad inicial de células por área de campo estuvo en un rango de 20-35 células.

9.4. Estudios de mecanismo de acción de muerte celular

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Maikel Castellano (Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España).

9.4.1. Inmunofluorescencia y microscopía

Para la visualización y cuantificación de los focos, las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm. Después de 240 min de tratamiento con DMSO, OA y el compuesto **13** (20 μ M), las células se lavaron una vez con PBS antes de continuar con el protocolo de inmunofluorescencia. Para el análisis de los focos de H3S10P, 53BP1 y γ H2AX, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) en PBS durante 20 min en hielo, se lavaron dos veces con PBS 1X y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.25% en PBS.

Para el análisis exclusivo de EdU, las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm y se trataron con DMSO, OA o el compuesto **13** durante 210 min (20 μ M). Después del tratamiento, las células se suplementaron con 10 μ M de EdU durante 30 min. Para el análisis combinado de focos de EdU y γ H2AX, se siguieron las mismas condiciones, excepto que la suplementación de EdU se produjo simultáneamente con los compuestos y duró 240 min. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS, se trataron con tampón de preextracción y se fijaron con paraformaldehído al 3,6% durante 15 min a t.a. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% en PBS durante 15 min, seguido de una incubación en BSA al 2 % en PBS durante 5 min. A continuación, se trataron con la solución Reaction Cocktail (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 25 mM reactivo de cobre, Alexa Fluor™ 488 Azide ThermoFisher A10266 y 62.38 mM de ácido L-

ascórbico) durante 30 min. A continuación, las células se lavaron tres veces con BSA al 3% en PBS, tampón de lavado (0,5 mM EDTA en PBS) y 1X PBS antes de bloquearlas para co-tinción con el anticuerpo γ H2AX, si fuera necesario.

En todos los tratamientos, las células se bloquearon durante 1 h con BSA al 1% en PBS después de dos lavados con PBS. A continuación, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios adecuados (anti- γ H2AX de conejo, Cell Signaling 2577L; anti-53BP1 de conejo, Novus Biologicals NB100-304; anti-H3S10P de conejo, Millipore 06-570) en solución de bloqueo. Después de lavarlas de nuevo con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes en tampón de bloqueo. Tras lavados adicionales con PBS y deshidratación con etanol al 100%, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando el medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories).

El análisis de la formación de focos se realizó utilizando el software ImageJ, que también se utilizó para detectar núcleos y cuantificar la intensidad de DAPI y EdU por núcleo. Esto permitió la identificación de cada fase del ciclo celular y facilitó la cuantificación.

9.4.2. Análisis del ciclo celular

Después de 240 min de tratamiento con DMSO, OA o el compuesto **13** (20 μ M), las células se recolectaron utilizando tripsina, se lavaron con PBS y se fijaron en etanol frío al 70% durante al menos 2 h. Posteriormente, las células se incubaron con 250 μ g/ml de ARNasa A (Sigma-Aldrich) y 10 μ g/mL de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 30 min. Después de la incubación, las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo LSRFortessa™ Cell Analyzer (BD). A continuación, los datos de distribución del ciclo celular se procesaron utilizando el software ModFit LT 5.0 (Verity Software House Inc).

9.5. Estudios de actividad antiproliferativa *in vivo*

Estos estudios también se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Maikel Castellano (Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España).

9.5.1. Condiciones de crecimiento y genética de *C. elegans*

Se utilizó como control la cepa *Bristol* N2 silvestre. Todos los gusanos se mantuvieron a 20 °C en un ambiente oscuro y se cultivaron en placas NGM que contenían *Escherichia coli* OP50. Se empleó la cepa triple mutante *gld-2(q497); gld-1(q485); gld-4(ef15)* l/hT2 [*bli-4(e937) let-?(q782) qIs48*] (I;III) que se construyó cruzando las cepas JK2879 (*gld-2(q497); gld-1(q485)*) y EV190 (*gld-4(ef15)*) obtenidas del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC).

9.5.2. Monitoreo de viabilidad y sensibilidad al daño en el ADN de *C. elegans*

Para cuantificar los niveles de viabilidad y anomalías en el desarrollo, se realizaron los procedimientos descritos por Silva y col.²⁷³ Los nematodos L4 cultivados en condiciones fisiológicas se recogieron individualmente y se transfirieron a placas nuevas cada 24 h, cada una de las cuales contenían los compuestos **11** y **13** a diferentes concentraciones, así como DMSO como control. Los tratamientos se mantuvieron durante todo el análisis experimental. El número de huevos fue cuantificado después de que las madres fueron transferidas a nuevas placas. La presencia de embriones muertos se evaluó 24 h después de que las madres fueron retiradas de cada placa; la presencia de gusanos machos y gusanos con anomalías de desarrollo en la progenie se cuantificó tres días después.

Para investigar el efecto de los selenocianatos en células germinales que proliferaron mitóticamente se siguió el esquema descrito también por Silva *et al.*²⁷³ Se recogieron los gusanos L4 en placas NGM (Nematode Growth Medium) que contenían diferentes concentraciones de **11** y **13** (1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM, 50 μM

273. Silva N., Castellano-Pozo M., Matsuzaki K., Barroso C., Román-Trufero M., Craig H.L., Brooks D. R., Isaac R.E., Boulton S.J., Martínez-Pérez E. Proline-specific aminopeptidase P prevents replication-associated genome instability. *PLoS Genet.* **2022**, *18*, e1010025.

y 100 μM) y *E. coli* OP50 como alimento. Los nematodos se dejaron en placas durante 20 h antes de ser disecados y fijados para la tinción DAPI, siguiendo el protocolo de disección y tinción descrito a continuación.

9.5.3. Disección de la línea germinal y tinción DAPI

La disección de la línea germinal y la tinción se llevaron a cabo según la metodología descrita por Castellano y col.²⁷⁴ Se diseccionaron líneas germinales de adultos L4 de 20 h de incubación, en un buffer EGG (NaCl 118 mM, KCl 48 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM y HEPES 5 mM) que contenía Tween20 al 0.1% y se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 1 % durante 5 min. Los portaobjetos se congelaron en nitrógeno líquido, luego se sumergieron durante 5 min en MeOH a -20 °C y fueron transferidos a PBST (1x PBS, Tween20 al 0.1%). Los portaobjetos se tiñeron con DAPI durante 5 min y luego se lavaron 3 veces durante 10 min en PBST y se montaron usando Vectashield. Todas las imágenes se adquirieron como pilas tridimensionales en un microscopio de fluorescencia Leica DM18 Thunder con un objetivo 100x OIL.

9.6. Ensayo de inhibición de anhidrasas carbónicas

El ensayo de inhibición se realizó en colaboración con el grupo del Profesor Claudiu T. Supuran (Universidad de Florencia, Italia). Para ello se empleó un instrumento de flujo detenido de Applied Photophysics (Leatherhead, Reino Unido) para el análisis de hidratación de CO₂ catalizado por anhidrasas carbónicas. Como indicador se empleó rojo de fenol (0.2 mM) con HEPES como buffer (20 mM, pH 7.5) y Na₂SO₄ (20 mM, para mantener la fuerza iónica), y se midió la absorbancia a 557 nm. Las constantes de inhibición se obtuvieron mediante el método de mínimos cuadrados no lineales empleando PRISM 3 y la ecuación de Cheng-Prusoff, para

274. Castellano-Pozo M., Pacheco S., Sioutas G., Jaso-Tamame A.L., Dore M., Karimi M., Martínez-Pérez E. Surveillance of cohesin-supported chromosome structure controls meiotic progression. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4345.

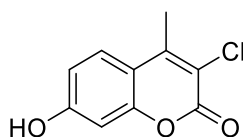
cada ensayo por triplicado. Las enzimas empleadas fueron recombinantes obtenidas según lo reportado en la literatura, a concentraciones de 5–12 nM.^{275,276}

9.7. Materias Primas

9.7.1. Procedimiento general para la preparación de 7-hidroxicumarinas

La preparación de 7-hidroxicumarinas (**82a–c**, **182b,c**) se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la literatura.²⁷⁷ El resorcinol (1.0 equiv.) se disolvió en 25 mL de H₂SO₄ al 60% y se colocó en agitación por 5 min a 0°C. A esta mezcla se le agregó el correspondiente β-cetoéster (1.1 equiv.). La reacción procedió en agitación a t.a. durante 24 h. La mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla agua-hielo, se filtró el precipitado y se realizaron lavados con agua. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con mezclas de ciclohexano–AcOEt (8:2→7:3).

9.7.1.1. 3-Cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina (**82a**)



Se utilizó resorcinol (0.92 g, 8.40 mmol) y 2-cloroacetoacetato de etilo (1.6 mL, 9.20 mmol) obteniéndose **82a** como un sólido amarillo claro (974 mg, 55%). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.70 (s, 1H, OH), 7.68 (d, 1H, *J*_{5,6}=8.8 Hz, H-5), 6.85 (dd, 1H, *J*_{6,8}=2.4 Hz, *J*_{6,5}=8.8 Hz, H-6), 6.75 (d, 1H, *J*_{8,6}=2.4 Hz, H-8), 2.51 (s, 3H, CH₃) ppm. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura.²⁷⁸

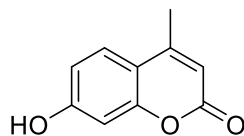
275. Nocentini A., Carta F., Ceruso M., Bartolucci G., Supuran C.T. Click-tailed coumarins with potent and selective inhibitory action against the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6955–6966.

276. Di Cesare Mannelli L., Micheli L., Carta F., Cozzi A., Ghelardini C., Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibition for the management of cerebral ischemia: *in vivo* evaluation of sulfonamide and coumarin inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, *31*, 894–899.

277. Xia Y.L., Wang J.J., Li S.Y., Liu Y., Gonzalez F.J., Wang P., Ge G.B. Synthesis and structure-activity relationship of coumarins as potent Mcl-1 inhibitors for cancer treatment. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *29*, 115851.

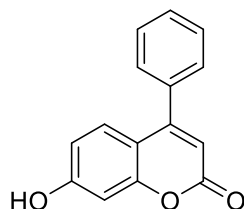
278. Ganeshapillai D., Woo L.W.L., Thomas M.P., Purohit, A., Potter B.V.L. C-3- and C-4-Substituted bicyclic coumarin sulfamates as potent steroid sulfatase inhibitors. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 10748–10772.

9.7.1.2. 7-Hidroxi-4-metilcumarina (**82b**)



Se empleó resorcinol (600 mg, 4.5 mmol) y acetoacetato de etilo (625 μ L, 9.15 mmol) obteniéndose **82b** como un sólido amarillo claro (642 mg, 81%). ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.54 (s, 1H, OH), 7.58 (da, 1H, $J_{5,6}$ = 8.6 Hz, H-5), 6.80 (da, 1H, $J_{6,5}$ = 8.6 Hz, H-6), 6.70 (sa, 1H, H-8), 6.12 (sa, 1H, H-3), 2.36 (sa, 3H, CH₃) ppm. Los datos espectroscópicos coinciden con lo reportado en la literatura.²⁷⁹

9.7.1.3. 4-Fenil-7-Hidroxycumarina (**82c**)



Se empleó resorcinol (903 mg, 8.20 mmol) y benzoilacetato de etilo (1.57 mL, 8.98 mmol) obteniéndose **82c** como un sólido amarillo claro (1.2 g, 60%); p.f.: 221-226 °C; ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.67 (s, 1H, OH), 7.54 (m, 5H, Ar-H), 7.28 (d, 1H, $J_{5,6}$ =8.7 Hz, H-5), 6.81 (sa, 1H, H-8), 6.78 (da, 1H, $J_{6,5}$ =8.7 Hz, H-6), 6.16 (s, 1H, H-3) ppm. Los datos espectroscópicos coinciden con lo reportado en la literatura.²⁸⁰

9.7.2. Procedimiento general para la ω -alquilación de 7-hidroxycumarinas

Las hidroxycumarinas (**82a-82c**, **182b-182c**) se sometieron a una alquilación empleando α,ω -dibromoalcanos según la metodología descrita por Yu *et al.*²⁸¹ Una

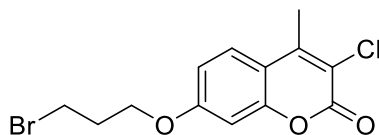
279. Samiei Z., Soleimani-Amiri S., Azizi Z. Fe₃O₄@C@OSO₃H as an efficient, recyclable magnetic nanocatalyst in Pechmann condensation: green synthesis, characterization, and theoretical study. *Mol. Divers.* **2020**, *25*, 67–86.

280. Zhou D., Zhuang Y., Sheng Z. Study on effective synthesis of 7-hydroxy-4-substituted coumarins. *Heterocycl. Commun.* **2022**, *28*, 181–187.

281. Yu H., Hou Z., Tian Y., Mou Y., Guo C. Design, synthesis, cytotoxicity and mechanism of novel dihydroartemisinin-coumarin hybrids as potential anti-cancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *151*, 434–449.

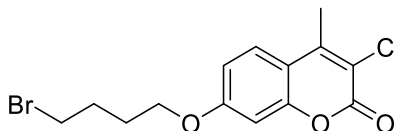
mezcla de la 7-hidroxycumarina correspondiente (1.0 equiv.) y K_2CO_3 (1.5 equiv.) en MeCN anhidro (5 mL) se agitó a 65 °C durante 5 min. A esta solución se le adicionaron los correspondientes α,ω -dibromoalcanos (8.0 equiv.). La reacción procedió con agitación a 65°C durante 4 h. Al finalizar la reacción se concentró a sequedad y el residuo se sometió a cromatografía en columna con mezclas de ciclohexano–AcOEt (95:5→90:10).

9.7.2.1. 7-(3'-Bromopropiloxi)-3-cloro-4-metilcumarina (83a)



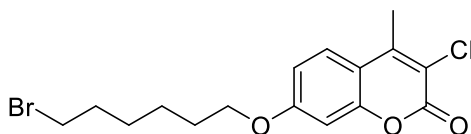
Se empleó la cumarina **82a** (90 mg, 0.43 mmol), 1,3-dibromopropano (350 μ L, 3.41 mmol) y K_2CO_3 (92.6 mg, 0.67 mmol) obteniéndose **83a** como un sólido blanco (102 mg, 72%).

9.7.2.2. 7-(4'-Bromobutiloxi)-3-cloro-4-metilcumarina (84a)



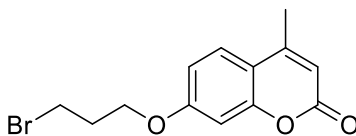
Se empleó la cumarina **82a** (65 mg, 0.31 mmol), 1,4-dibromobutano (296 μ L, 2.5 mmol) y K_2CO_3 (66.3 mg, 0.48 mmol) obteniéndose **84a** como un sólido blanco (85 mg, 79%).

9.7.2.3. 7-(6'-Bromohexiloxi)-3-cloro-4-metilcumarina (85a)



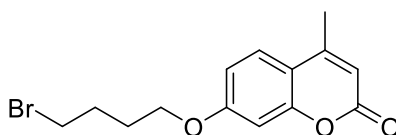
Se empleó la cumarina **82a** (194 mg, 0.92 mmol), 1,6-dibromohexano (1.14 mL, 7.38 mmol) y K_2CO_3 (190.7 mg, 1.38 mmol) obteniéndose **85a** como un sólido amarillo claro (219 mg, 64%).

9.7.2.4. 7-(3'-Bromopropiloxi)-4-metilcumarina (83b)



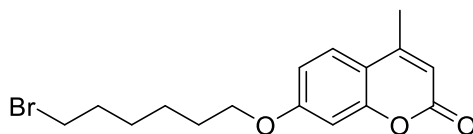
Se empleó la cumarina **82b** (84 mg, 0.48 mmol), 1,3-dibromopropano (390 μ L, 3.80 mmol) y K_2CO_3 (99.5 mg, 0.72 mmol) obteniéndose **83b** como un sólido blanco (98 mg, 69%).

9.7.2.5. 7-(4'-Bromobutiloxi)-4-metilcumarina (84b)



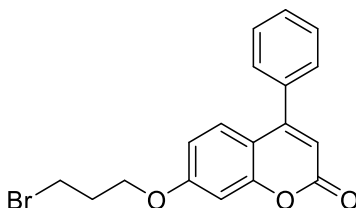
Se empleó la cumarina **82b** (152.5 mg, 0.87 mmol), 1,4-dibromobutano (1.03 mL, 8.68 mmol) y K_2CO_3 (181.0 mg, 1.31 mmol) obteniéndose **84b** como un sólido blanco (226 mg, 84%).

9.7.2.6. 7-(6'-Bromohexiloxi)-4-metilcumarina (85b)



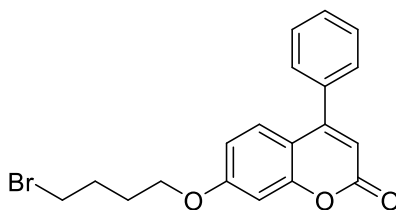
Se empleó la cumarina **82b** (96 mg, 0.55 mmol), 1,6-dibromohexano (670 μ L, 4.36 mmol) y K_2CO_3 (114.7 mg, 0.83 mmol) obteniéndose **85b** como un sólido blanco (135 mg, 73%).

9.7.2.7. 7-(3'-Bromopropiloxi)-4-fenilcumarina (83c)



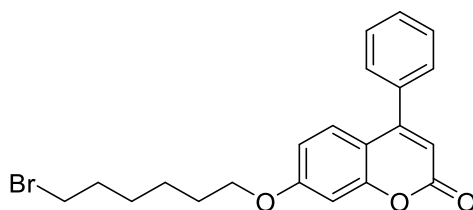
Se empleó la cumarina **82c** (118 mg, 0.49 mmol), 1,3-dibromopropano (401 μ L, 3.95 mmol) y K_2CO_3 (102.3 mg, 0.74 mmol) obteniéndose **83c** como un sólido blanco (131 mg, 74%).

9.7.2.8. 7-(4'-Bromobutiloxi)-4-fenilcumarina (**84c**)



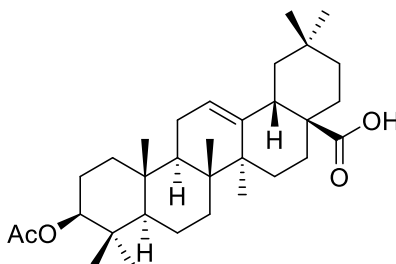
Se empleó la cumarina **82c** (169 mg, 0.71 mmol), 1,4-dibromobutano (677 μ L, 5.67 mmol) y K_2CO_3 (146.5 mg, 1.06 mmol) obteniéndose **84c** como un sólido blanco (221 mg, 83%).

9.7.2.9. 7-(6'-Bromohexiloxi)-4-fenilcumarina (**85c**)



Se empleó la cumarina **82c** (65 mg, 0.27 mmol), 1,6-dibromohexano (337 μ L, 2.19 mmol) y K_2CO_3 (55.3 mg, 0.40 mmol) obteniéndose **85c** como un sólido blanco (75 mg, 69%).

9.7.3. Ácido 3-O-acetiloleanólico (**187**)



Para la obtención de **187** se siguió la metodología descrita por Gnoatto *et al.*²⁸² A una solución de ácido oleanólico (91 mg, 0.2 mmol) en piridina anhidra (2.5 mL) se le adicionó lentamente anhídrido acético (2.5 mL). La reacción se agitó a t.a.

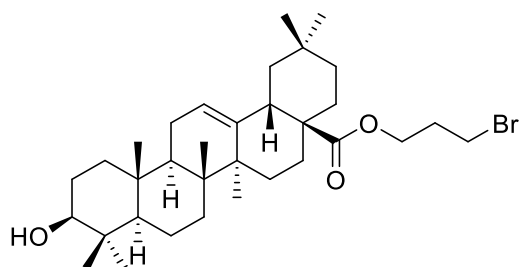
282. Gnoatto S.C., Dalla Vecchia L., Lencina C.L., Dassonville-Klimpt A., Da Nascimento S., Mossalayi D., Guillon J., Gosmann G., Sonnet P. Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, 23, 604–610.

durante 4 h; transcurrido ese tiempo, la solución resultante se vertió sobre una mezcla agua–hielo, y el precipitado se separó por filtración a vacío. El precipitado se lavó con agua y se disolvió en CH₂Cl₂, se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. Se obtuvo **187** como un sólido blanco (86 mg, 86%) que se utilizó directamente para la siguiente etapa, sin purificación adicional.

9.7.4. Procedimiento general para la esterificación de OA en C-28

La alquilación con α,ω -dibromoalcanos se llevó a cabo según la metodología descrita por Spivak *et al.*²⁸³ A una mezcla de ácido oleanólico o ácido 3-O-acetilooleanólico **187** (1.0 equiv.) y K₂CO₃ (1.5 equiv.) en MeCN–DMF anhidros (8 ml, 2:1) se adicionó el correspondiente α,ω -dibromoalcano (10.0 equiv.). La reacción procedió a 55 °C durante 3-4 h, con agitación y atmósfera inerte. Al finalizar, se adicionó agua (20 mL) al crudo de reacción y se extrajo con AcOEt (4x20 mL); la fase orgánica se lavó con salmuera (8x30 mL), se secó con Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna, usando como eluyente ciclohexano seguido de una mezcla ciclohexano–AcOEt 90:10→85:15.

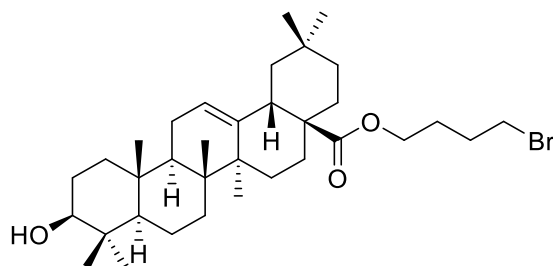
9.7.4.1. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 3'-bromopropilo (**86**)



Se empleó ácido oleanólico (84 mg, 0.18 mmol), 1,3-dibromopropano (186 μ L, 1.83 mmol) y K₂CO₃ (38 mg, 0.27 mmol) obteniéndose **86** como espuma blanca (97 mg, 92%).

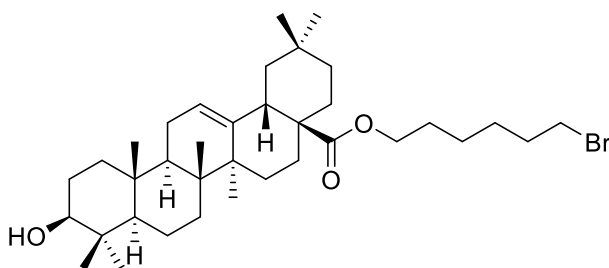
283. Spivak A.Y., Nedopekina D.A., Gubaidullin R.R., Davletshin E.V., Tukhbatullin A.A., D'yakonov V.A., Yunusbaeva M.M., Dzhemileva L.U., Dzhemilev U.M. Pentacyclic triterpene acid conjugated with mitochondria-targeting cation F16: Synthesis and evaluation of cytotoxic activities. *Med. Chem. Res.* **2021**, *30*, 940–951.

9.7.4.2. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-bromobutilo (**87**)



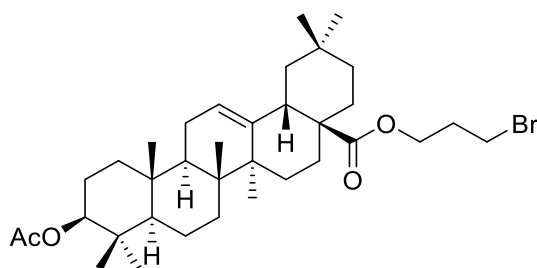
Se empleó ácido oleanólico (90 mg, 0.20 mmol), 1,4-dibromobutano (235 μ L, 2.0 mmol) y K_2CO_3 (41 mg, 0.30 mmol) obteniéndose **87** como espuma blanca (87 mg, 74%).

9.7.4.3. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 6'-bromohexilo (**88**)



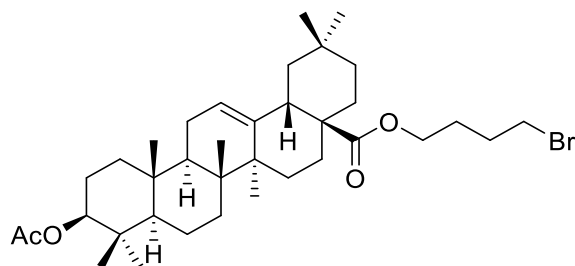
Se empleó ácido oleanólico (128 mg, 0.28 mmol), 1,6-dibromohexano (431 μ L, 2.80 mmol) y K_2CO_3 (58 mg, 0.42 mmol) obteniéndose **88** como espuma blanca (143 mg, 82%).

9.7.4.4. 3 β -Acetoxiolean-12-en-28-oato de 3'-bromopropilo (**89**)



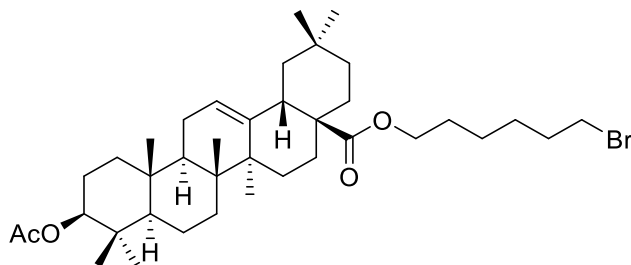
Se empleó el compuesto **187** (101 mg, 0.20 mmol), 1,3-dibromopropano (206 μ L, 2.0 mmol) y K_2CO_3 (42 mg, 0.30 mmol) obteniéndose **89** como espuma blanca (114 mg, 90%).

9.7.4.5. 3 β -Acetoxiolean-12-en-28-oato de 4'-bromobutilo (90)



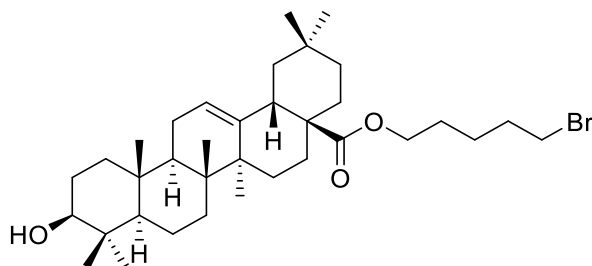
Se empleó el compuesto **187** (131 mg, 0.26 mmol), 1,4-dibromobutano (313 μ L, 2.6 mmol) y K_2CO_3 (54 mg, 0.39 mmol) obteniéndose **90** como espuma blanca (145 mg, 93%).

9.7.4.6. 3 β -Acetoxiolean-12-en-28-oato de 6'-bromohexilo (91)



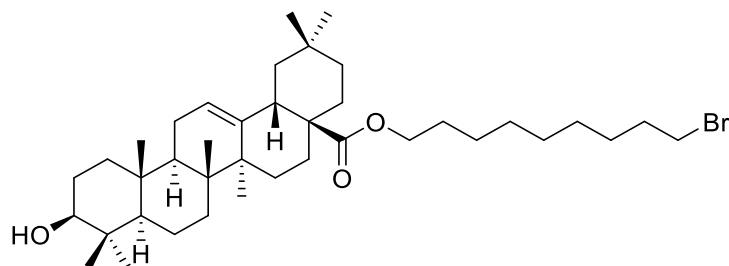
Se empleó el compuesto **187** (143 mg, 0.29 mmol), 1,6-dibromohexano (441 μ L, 2.87 mmol) y K_2CO_3 (59 mg, 0.43 mmol) obteniéndose **91** como espuma blanca (171 mg, 90%).

9.7.4.7. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 5'-bromopentilo (92)



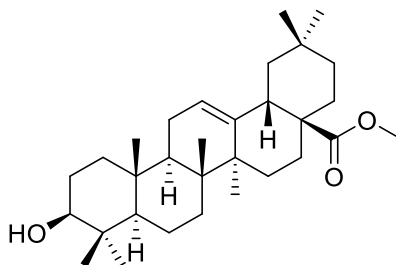
Se empleó ácido oleanólico (153 mg, 0.34 mmol), 1,5-dibromopentano (452 μ L, 3.4 mmol) y K_2CO_3 (69 mg, 0.50 mmol) obteniéndose **92** como espuma blanca (190 mg, 94%).

9.7.4.8. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 9'-bromononano (**93**)



Se empleó ácido oleanólico (150 mg, 0.33 mmol), 1,9-dibromononano (669 μ L, 3.3 mmol) y K_2CO_3 (68 mg, 0.49 mmol) obteniéndose **93** como espuma blanca (171 mg, 78%).

9.7.5. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de metilo (**94**)



A una solución de ácido oleanólico (420 mg, 0.92 mmol, 1.0 equiv.) en DMF anhidra (16 mL) se agregó K_2CO_3 (381 mg, 2.76 mmol, 3.0 equiv.) y CH_3I (114 μ L, 1.84 mmol, 2.0 equiv.); la reacción se mantuvo en agitación a 0 °C durante 5 min y 24 h a t.a. Transcurrido ese tiempo se añadió agua (20 mL) y se extrajo con AcOEt (5x15 mL). La fase orgánica resultante se lavó con salmuera (4x30 mL), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El compuesto **94** se obtuvo como un sólido blanco (433 mg, cuant.) que se utilizó sin ninguna purificación adicional. Los datos espectroscópicos coincidieron con los reportados en la literatura.²⁸⁴

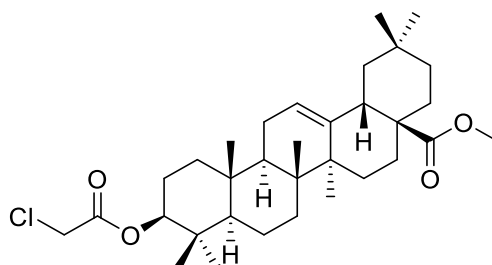
9.7.6. Procedimiento general para esterificación en C-3 de ácido oleanólico

A una solución del compuesto **94** (1.0 equiv.), TEA (7.1 equiv.) y DMAP (cat.) en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL), bajo atmósfera inerte y a 0 °C, se añade gota a gota el

284. Fu L., Gribble G.W. Efficient and scalable synthesis of bardoxolone methyl (CDDO-methyl ester). *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1622–1625.

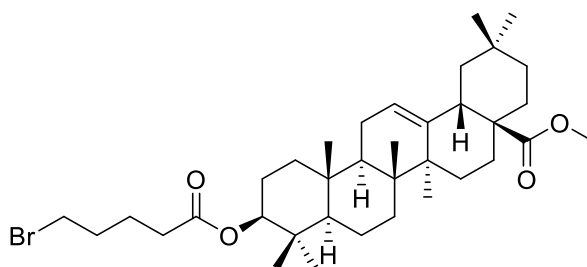
correspondiente cloruro de ω -haloalcanoilo (7.6 equiv.) disuelto en CH_2Cl_2 (2 mL). Al completar la adición la solución se deja en agitación a 0 °C durante 5 min y después a t.a. durante 6–7 h. La reacción se detuvo con agua (10 mL), se lavó con salmuera (2x10 mL), H_2SO_4 0.05 M (1x10 mL), NaHCO_3 ac. sat. (1x10 mL) y agua (1x10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla 98:2 de ciclohexano–AcOEt.

9.7.6.1. 3 β -(Cloroacetoxi)-olean-12-en-28-oato de metilo (95)



Se empleó el compuesto **94** (51 mg, 0.11 mmol), cloruro de cloroacetilo (62 μL , 0.84 mmol), TEA (109 μL , 0.78 mmol) y DMAP (cat.). Se obtuvo **95** como espuma blanca (89 mg, 76%). Los datos espectroscópicos coinciden con los reportados en la literatura.²⁸⁵

9.7.6.2. 3 β -(5'-Bromopentanoiloxi)-olean-12-en-28-oato de metilo (96)

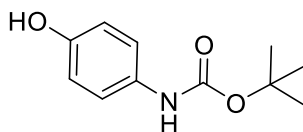


Se empleó el compuesto **94** (64 mg, 0.14 mmol), cloruro de 5-bromovalerilo (142 μL , 1.06 mmol), TEA (138 μL , 0.99 mmol) y DMAP (cat.). Se obtuvo **96** como

285. Lu J., Hu J., Liu C., Gao H., Ju Y. Water-induced gel formation of an oleanic acid–adenine conjugate and the effects of uracil derivative on the gel stability. *J. Soft Matter*. **2012**, 8, 9576.

espuma blanca (89 mg, cuant.). Los datos espectroscópicos coinciden con los reportados en la literatura.²⁸⁶

9.7.7. 4-Hidroxifenilcarbamato de *terc*-butilo (**139**)



A una solución de Boc₂O (9.72 mL, 42.0 mmol, 0.9 equiv.) en THF (25 mL) a 0°C se adiciona lentamente 4-aminofenol (5.17 g, 47.0 mmol, 1.0 equiv.). La mezcla resultante se dejó llegar a t.a y se mantuvo a esa temperatura durante 12 h. Al finalizar la reacción se concentró el disolvente a sequedad, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (30 mL) y se lavó con agua (2x40 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad y se utilizó sin purificar en el siguiente paso de reacción. Se obtuvo **139** como un sólido de color café (9.46 g, cuant.). Los datos espectroscópicos coincidieron con los reportados en la literatura.²⁸⁷

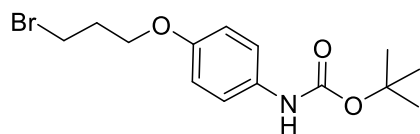
9.7.8. Método general para la alquilación de 4-hidroxifenilcarbamato de *terc*-butilo

A una solución del compuesto **139** (1.0 equiv.) y K₂CO₃ (1.5 equiv.) en MeCN (20 mL) se adicionó el correspondiente α,ω-dibromoalcano (10.0 equiv.). La mezcla resultante se refluyó durante una noche (~15 h). Al finalizar, se agregó agua (30 mL) a la reacción y se realizaron extracciones con AcOEt (3x30 mL); la fase orgánica se lavó con salmuera (2x20 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con mezclas 95:5→90:10 de ciclohexano–AcOEt.

286. Li Y., Zeng Q., Wang R., Wang B., Chen R., Wang N., Lu Y., Shi F., Dehaen W., Huai Q. Synthesis and discovery of mitochondria-targeting oleanolic acid derivatives for potential PI3K inhibition. *Fitoterapia*, **2022**, 162, 105291.

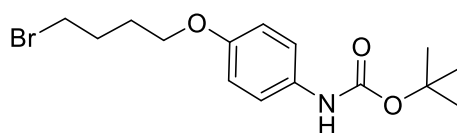
287. Khanra P., Singh A.K., Roy L., Das A. Pathway complexity in supramolecular copolymerization and blocky star copolymers by a hetero-seeding effect. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 5270–5284.

9.7.8.1. 4-[(3'-Bromopropil)oxi]fenilcarbamato de *terc*-butilo (**140a**)



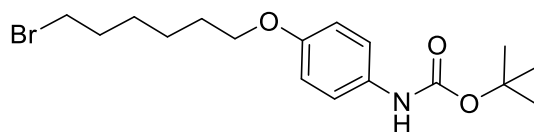
Se empleó **139** (1.51 g, 7.2 mmol), 1,3-dibromopropano (7.32 mL, 72.1 mmol) y K_2CO_3 (1.49 g, 11.0 mmol) obteniéndose **140a** como un sólido blanco (2.15 g, 90%).

9.7.8.2. 4-[(4'-Bromobutil)oxi]fenilcarbamato de *terc*-butilo (**140b**)



Se empleó el compuesto **139** (1.2 g, 5.7 mmol), 1,4-dibromobutano (6.84 mL, 57.3 mmol) y K_2CO_3 (1.19 g, 8.6 mmol) obteniéndose **140b** como un sólido blanco (1.84 g, 93%).

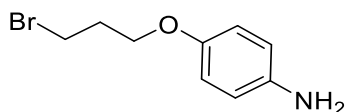
9.7.8.3. 4-[(6'-Bromohexil)oxi]fenilcarbamato de *terc*-butilo (**140c**)



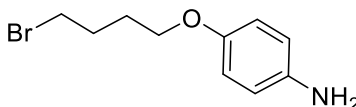
Se empleó el compuesto **139** (581 mg, 2.8 mmol), 1,6-dibromohexano (4.28 mL, 27.8 mmol) y K_2CO_3 (576 mg, 4.2 mmol) obteniéndose **140c** como un sólido blanco (804 mg, 78%).

9.7.9. Método general para la desprotección de carbamatos de *terc*-butilo

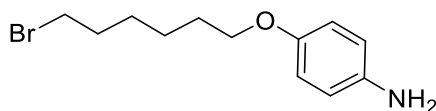
A una solución de **140a**, **140b** ó **140c** (1.0 equiv.) en CH_2Cl_2 (15 mL) se adicionó ácido trifluoroacético (30.0 equiv.) y se mantuvo en agitación a t.a. durante 1.5 h. Al finalizar la reacción, se concentró a sequedad y los crudos de reacción se emplearon para el siguiente paso sin purificación previa.

9.7.9.1. 4-(3'-Bromopropoxi)anilina (141a)

Se utilizó el compuesto **140a** (731 mg, 2.21 mmol) y ácido trifluoroacético (5.01 mL, 66.0 mmol), obteniéndose **141a** como espuma café claro (880 mg, cuant.).

9.7.9.2. 4-(4'-Bromobutoxi)anilina (141b)

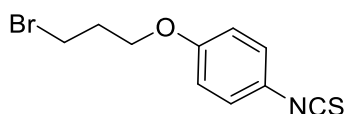
Se utilizó el compuesto **140b** (393 mg, 1.14 mmol) y ácido trifluoroacético (2.53 mL, 34.0 mmol), obteniéndose **141b** como espuma café claro (278 mg, cuant.).

9.7.9.3. 4-(6'-Bromohexiloxi)anilina (141c)

Se utilizó el compuesto **140c** (801 mg, 2.2 mmol) y ácido trifluoroacético (4.78 mL, 65.0 mmol), obteniéndose **141c** como un sólido café (425 mg, 73%).

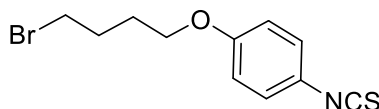
9.7.10. Método general para obtención de los isotiocianatos 142a-c

A una solución de la amina **141a**, **141b** ó **141c** (1.0 equiv.) en una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂-agua (5 mL) se añadió CaCO₃ (3.0 equiv.) y tiosgenio (1.5 equiv.) y se mantuvo en agitación a t.a. durante 2 h. Al finalizar la reacción, se filtró sobre un lecho de Celila® y el filtrado se extrajo con CH₂Cl₂ (3x15 mL) y se lavó con salmuera (3x15 mL) y agua (1x15 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El producto obtenido se utilizó sin purificar para el siguiente paso de reacción.

9.7.10.1. Isotiocianato de 4-(3'-bromopropoxi)fenilo (142a)

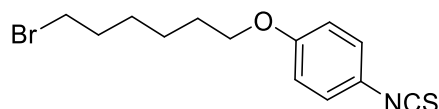
Se empleó **141a** (508 mg, 2.21 mmol), CaCO₃ (885 mg, 8.84 mmol) y tiofosgeno (223 μL, 4.42 mmol), obteniéndose **142a** como un sólido de color amarillo anaranjado (562 mg, 94%).

9.7.10.2. Isotiocianato de 4-(4'-bromobutoxi)fenilo (**142b**)



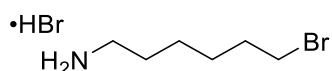
Se empleó la amina **141b** (262 mg, 1.07 mmol), CaCO₃ (321 mg, 3.21 mmol) y tiofosgeno (81 μL, 1.61 mmol), obteniéndose **142b** como un sólido de color amarillo anaranjado (291 mg, 95%).

9.7.10.3. Isotiocianato de 4-(6'-bromohexiloxi)fenilo (**142c**)



Se empleó la amina **141c** (64 mg, 0.24 mmol), CaCO₃ (71 mg, 0.71 mmol) y tiofosgeno (18 μL, 0.35 mmol), obteniéndose **142c** como un sólido de color amarillo anaranjado (50 mg, 68%).

9.7.11. Hidrobromuro de 6-bromohexil-1-amina (**144b**)



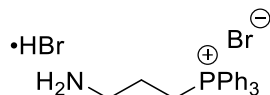
Una solución de 6-amino-hexan-1-ol (206 mg, 1.75 mmol), se disolvió en 5 mL de HBr al 48% y la reacción se reflujoó durante 3 h. Al finalizar la reacción se concentró a sequedad obteniéndose **144b** como un sólido de bajo punto de fusión y color amarillo claro (369 mg, 81%).

9.7.12. Procedimiento general para la preparación de los bromuros de trifenilfosfonio **145a,b**

A una solución del hidrobromuro correspondiente (1.0 equiv.) en BuOH (20 mL) contenida en un tubo Fischer-Porter se adicionó trifenilfosfina (1.85 equiv.) y se mantuvo en agitación a 120 °C durante 24 h. Al finalizar, la reacción se concentró a

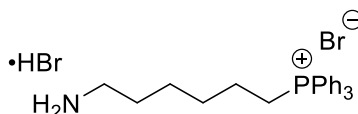
sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla 20:1→3:1 de CH₂Cl₂-MeOH.

9.7.12.1. Hidrobromuro de bromuro de (3-aminopropil)trifenilfosfonio (145a)



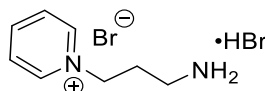
Se empleó **144a** (1.52 g, 6.92 mmol) y trifenilfosfina (3.36 g, 13.0 mmol) obteniéndose **145a** como un sólido blanco (2.06 g, 62%).

9.7.12.2. Hidrobromuro de bromuro de (6-aminohexil)trifenilfosfonio (145b)



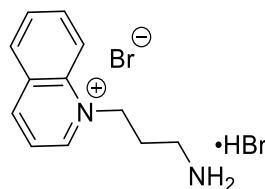
Se empleó **144b** (1.66 g, 6.4 mmol) y trifenilfosfina (3.10 g, 12.0 mmol) obteniéndose **145b** como un sólido blanco (1.03 g, 61%).

9.7.13. Hidrobromuro de bromuro de 1-(3'-aminopropil)piridin-1-inio (146a)



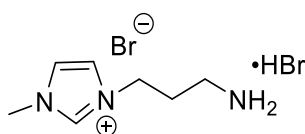
A una solución de hidrobromuro de 3-bromopropilamina comercial (254 mg, 1.2 mmol, 1.0 equiv.) en MeCN anhidro (15 mL), se le adicionó piridina anhidra (508 μL, 6.3 mmol, 5.4 equiv.) y se colocó en agitación en un tubo Fischer-Porter a 115 °C hasta observar la formación de un precipitado (~5 h). Al finalizar la reacción se dejó enfriar y se colectó el precipitado por filtración, se lavó con éter y se dejó secar, obteniéndose **146a** como un sólido blanco (261 mg, 75%).

9.7.14. Hidrobromuro de bromuro de 1-(3'-aminopropil)quinolin-1-inio (146b)



A una solución de hidrobromuro de 3-bromopropilamina comercial (280 mg, 1.3 mmol, 1.0 equiv.) en MeCN anhidro (15 mL), se le adicionó quinolina anhidra (818 μ L, 6.9 mmol, 5.4 equiv.) y se colocó en agitación en un tubo Fischer-Porter a 115 °C durante 6 h. Al finalizar la reacción se dejó enfriar y se colectó el precipitado por filtración, se lavó con éter y se dejó secar, dando lugar a **146b** como un sólido blanco (114 mg, 25%).

9.7.15. Hidrobromuro de bromuro de 3-(3-aminopropil)-1-metil-1*H*-imidazol-3-io (**146c**)

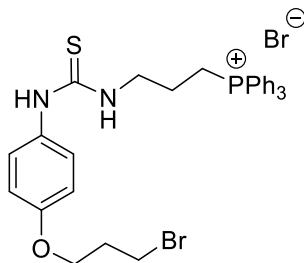


A una solución de hidrobromuro de 3-bromopropilamonio comercial (252 mg, 1.2 mmol, 1.0 equiv.) en MeCN anhidro (15 mL), se le adicionó 1-metil-1*H*-imidazol anhidro (510 mg, 6.2 mmol, 5.4 equiv.) y se colocó en agitación en un tubo Fischer-Porter a 115 °C durante 5 h. Al finalizar la reacción se dejó enfriar y se concentró a sequedad, dando lugar a **146c** como un gel incoloro (204 mg, 59%).

9.7.16. Procedimiento general para la preparación de tioureas de derivados mitocondriotrópicos

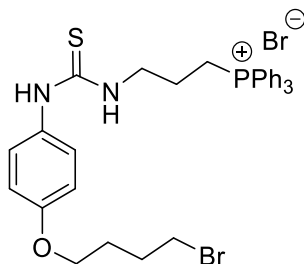
A una solución del isotiocianato **142a**, **142b** ó **142c** (1.0 equiv.) en THF (5 mL), se añadió el **145a**, **145b**, **146a**, **146b** ó **146c** (1.1–1.2 equiv.) disuelto en MeOH (4 mL). A la mezcla resultante se le adicionó DIPEA (2.0 equiv.) y se agitó vigorosamente a t.a. durante 24 h. Al finalizar la reacción, se concentró a sequedad y los crudos de reacción se utilizaron sin purificación adicional para la siguiente etapa.

9.7.16.1. Bromuro de 3-{3'-[4''-(3'''-bromopropoxi)fenil]tioureido}propiltrifenilfosfonio (147a)



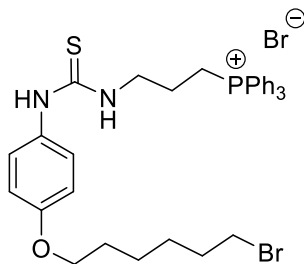
Se empleó el isotiocianato **142a** (56 mg, 0.21 mmol), **145a** (119 mg, 0.25 mmol, 1.2 equiv.) y DIPEA (72 μ L, 0.41 mmol), obteniéndose **147a** como espuma blanca (120 mg, 86%).

9.7.16.2. Bromuro de 3-{3'-[4''-(4'''-bromobutoxi)fenil]tioureido}propiltrifenilfosfonio (147b)



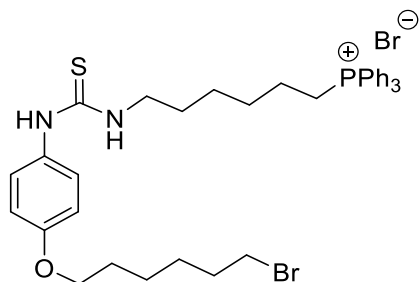
Se empleó el isotiocianato **142a** (65 mg, 0.23 mmol), **145a** (131 mg, 0.27 mmol, 1.2 equiv.) y DIPEA (79 μ L, 0.45 mmol), obteniéndose **147b** como espuma blanca (93 mg, 60%).

9.7.16.3. Bromuro de 3-{3'-[4''-(6'''-bromohexiloxi)fenil]tioureido}propiltrifenilfosfonio (147c)



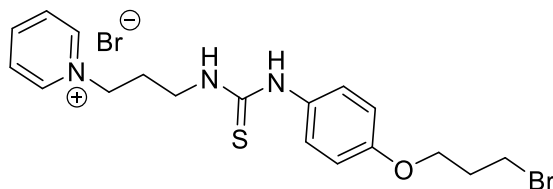
Se empleó el isotiocianato **142a** (49 mg, 0.16 mmol), **145b** (83 mg, 0.17 mmol, 1.1 equiv.) y DIPEA (54 μ L, 0.31 mmol), obteniéndose **147c** como espuma blanca (63 mg, 57%).

9.7.16.4. Bromuro de 6-{3'-[4''-(6'''-bromohexiloxi)fenil]tioureido}hexiltrifenil fosfonio (147d)



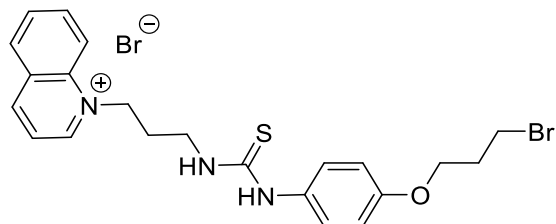
Se empleó el isotiocianato **142c** (67 mg, 0.21 mmol), **145b** (123 mg, 0.24 mmol, 1.1 equiv.) y DIPEA (74 μ L, 0.43 mmol), obteniéndose **147d** como espuma blanca (48 mg, 30%).

9.7.16.5. Bromuro de 1-{3'-[3''-(4'''-(3''''-bromopropoxi)fenil)tioureido]propil} piridin-1-io (148a)



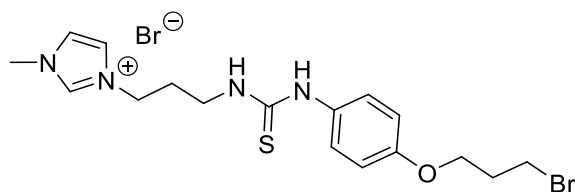
Se empleó el isotiocianato **142a** (52 mg, 0.19 mmol), **146a** (68 mg, 0.23 mmol, 1.2 equiv.) y DIPEA (67 μ L, 0.38 mmol), obteniéndose **148a** como espuma de color amarillo claro (93 mg, cuant).

9.7.16.6. Bromuro de 1-{3'-[3''-(4'''-(3''''-bromopropoxi)fenil)tioureido]propil}quinolin-1-io (148b)



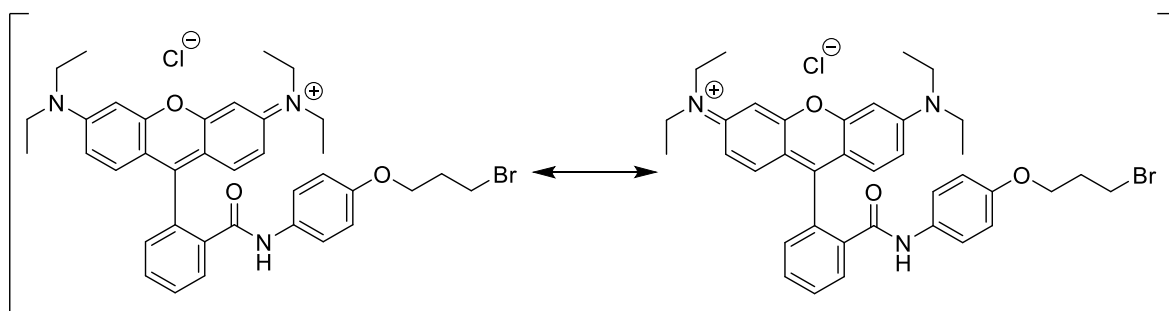
Se empleó el isotiocianato **142a** (47 mg, 0.17 mmol), **146b** (72 mg, 0.21 mmol, 1.2 equiv.) y DIPEA (60 μ L, 0.35 mmol), obteniéndose **148b** como espuma de color naranja (93 mg, cuant).

9.7.16.7. Bromuro de 3-{3'-[3''-(4'''-(3''''-bromopropoxi)fenil)tioureido]propil}-1-metil-1*H*-imidazol-3-io (148c)



Se empleó el isotiocianato **142a** (49 mg, 0.18 mmol), **146c** (65 mg, 0.22 mmol, 1.2 equiv.) y DIPEA (63 μ L, 0.36 mmol), obteniéndose **148c** como espuma de color amarillo claro (89 mg, cuant).

9.7.17. Cloruro de 3,6-bis(dietilamino)-9-{2'-[*N*-(4''-(3'''-bromopropoxi)fenil)carbamoil]fenil}xantilio (150)

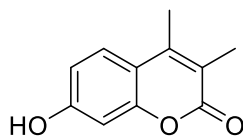


Método A. A una solución de rodamina B (400 mg, 0.84 mmol, 1.0 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (15 mL) se agregó SOCl_2 y se reflujo durante 4 h, bajo atmósfera inerte. Al finalizar la reacción se concentró a sequedad obteniéndose el cloruro de

ácido **149** como una espuma de color morado intensa (461.7 mg, cuant.). Posteriormente, a una disolución de **149** (461.7 mg, 0.93 mmol, 1.32 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (3 mL) a 0 °C y atmósfera inerte se añade lentamente la amina **142a** (162 mg, 0.70 mmol, 1.0 equiv.) y DIPEA (480 µL, 2.8 mmol, 4.0 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (3 mL) y se mantuvo en agitación a t.a. durante 72 h bajo atmósfera inerte. Al finalizar la reacción se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando como eluyente CH₂Cl₂, dando lugar a **150** como un sólido de color rosa (20.1 mg, 4%).

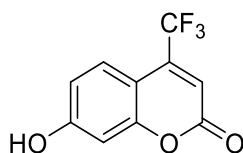
Método B. A una solución de la amina **142a** (241 mg, 1.05 mmol, 1.05 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (4 mL) se agregó DIPEA (142 mg, 1.1 mmol, 1.1 equiv.), rodamina B (477 mg, 0.99 mmol, 1.0 equiv.), EDC•HCl (382 mg, 1.99 mmol, 2.0 equiv.) y DMAP (cat.) y se colocaron en agitación a t.a. durante una noche. Al finalizar la reacción, se añadió CH₂Cl₂ (10 mL) y se realizaron lavados con HCl 1M (1x10 mL) y agua (1x10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna empleando CH₂Cl₂ como eluyente, dando lugar a **150** como un sólido de color rosa (231 mg, 35%).

9.7.18. 7-Hidroxi-3,4-dimetilcumarina (**182b**)



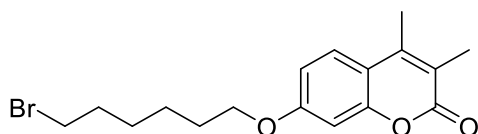
Se preparó según la metodología descrita en la sección 9.7.1. Se empleó resorcinol (528 mg, 4.80 mmol) y 2-metilacetoacetato de etilo (750 µL, 5.30 mmol), obteniéndose **182b** como un sólido de color amarillo claro (844 mg, 93%).

9.7.19. 7-Hidroxi-4-trifluorometilcumarina (**182c**)



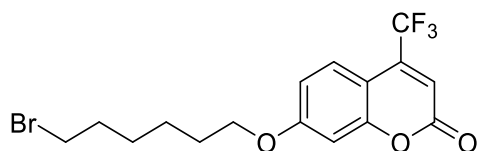
Se preparó según la metodología descrita en la sección 9.7.1. Se empleó resorcinol (0.429 mg, 3.90 mmol) y 4,4,4-trifluoroacetilacetato de etilo (0.625 mL, 4.30 mmol), obteniéndose **182c** como un sólido de color rosa anaranjado (523 mg, 58%).

9.7.20. 7-(6'-Bromohexiloxi)-3,4-dimetilcumarina (**183b**)



Se preparó según la metodología descrita en la sección 9.7.2. Se empleó la cumarina **182b** (844 mg, 4.44 mmol), 1,6-dibromohexano (5.46 mL, 35.0 mmol) y K_2CO_3 (920 mg, 6.66 mmol), obteniéndose **183b** como un sólido blanco (1.27 g, 81%).

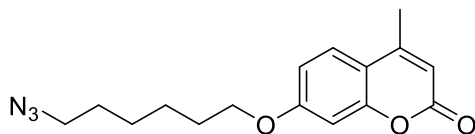
9.7.21. 7-(6'-Bromohexiloxi)-4-trifluorometilcumarina (**183c**)



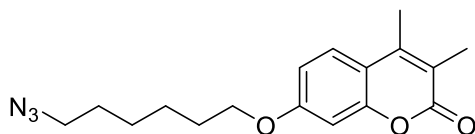
Se preparó según la metodología descrita en la sección 9.7.2. Se empleó la cumarina **182c** (300 mg, 1.30 mmol), 1,6-dibromohexano (1.6 mL, 10.4 mmol) y K_2CO_3 (270 mg, 1.95 mmol), obteniéndose **183c** como un sólido blanco (256 mg, 50%).

9.7.22. Procedimiento general para la preparación de azidas de cumarina

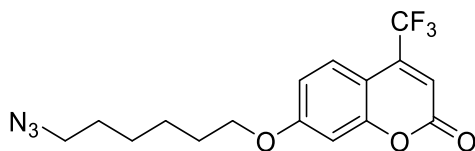
A una solución de **85b**, **183b** ó **183c** (1.0 equiv.) en DMF (10 mL), se añadió NaN_3 (3.0 equiv.) y se mantuvo en agitación durante 24 h a t.a. Al finalizar la reacción se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (20 mL) y se realizaron lavados con salmuera (3x20 mL). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. Los azidas se emplearon sin purificar para el siguiente paso de reacción.

9.7.22.1. 7-(6'-Azidohexiloxi)-4-metilcumarina (184a)

Se utilizó el compuesto **85b** (557 mg, 1.64 mmol) y NaN_3 (320 mg, 4.93 mmol). Se obtuvo **184a** como espuma blanca (494 mg, cuant.).

9.7.22.2. 7-(6'-Azidohexiloxi)-3,4-metilcumarina (184b)

Se utilizó **183b** (917 mg, 2.60 mmol) y NaN_3 (506 mg, 7.79 mmol). Se obtuvo **184b** como espuma blanca (815 mg, cuant.).

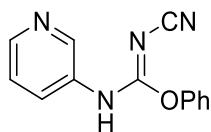
9.7.22.3. 7-(6'-Azidohexiloxi)-4-trifluorometilcumarina (184c)

Se utilizó **183c** (253 mg, 0.64 mmol) y NaN_3 (125 mg, 1.93 mmol). Se obtuvo **184c** como espuma de color café (198 mg, 87%).

9.7.23. Método general para la preparación de carbamimidatos de aminopiridina

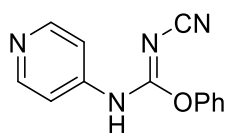
A una solución de la 3- ó 4-aminopiridina (1.0 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (6 mL) se agregó *N*-cianocarbonimidato de difenilo (1.4 equiv.) y TEA (1.4–1.8 equiv.). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 16–18 h a 50 °C. Al finalizar la reacción se eliminó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna con mezclas 60:1→30:1 de AcOEt–MeOH.

9.7.23.1. (Z)-N-ciano-N'-(piridin-3-il)carbamidato de fenilo (186a)



Se utilizó 3-aminopiridina (284 mg, 3.02 mmol), *N*-cianocarbonimidato de difenilo (1.0 g, 4.23 mmol) y TEA (587 μ L, 4.23 mmol), obteniéndose **186a** como un sólido blanco (444 mg, 69%).

9.7.23.2. (Z)-N-ciano-N'-(piridin-4-il)carbamidato de fenilo (186b)



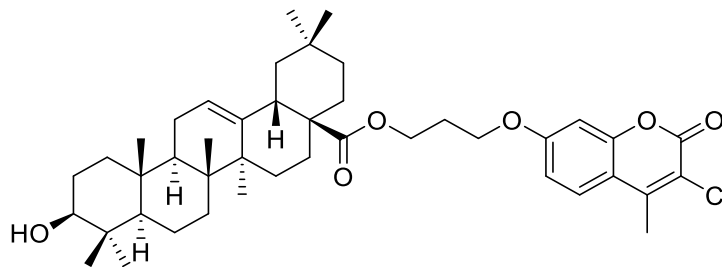
Se utilizó 4-aminopiridina (290 mg, 3.08 mmol), *N*-cianocarbonimidato de difenilo (1.014 mg, 4.26 mmol) y TEA (770 μ L, 5.54 mmol), obteniéndose **186b** como un sólido blanco (392 mg, 53%).

9.8. Nuevas investigaciones

9.8.1. Procedimiento general para la preparación de híbridos de ácido oleanólico-cumarinas

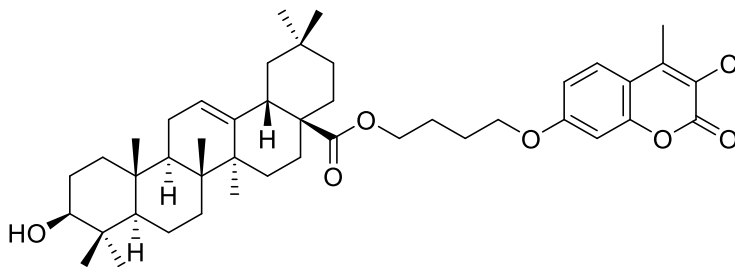
Una solución de ácido oleanólico (1.0 equiv.), ω -bromoalquilcumarina **83a-83c**, **84a-84c** ó **85a-85c** (1.0 equiv.) y K_2CO_3 (1.0–1.5 equiv.) en una mezcla de MeCN–DMF anhidros (8 mL, 3:1), se agitó a 65 °C bajo atmósfera de Ar durante 24 h. Al finalizar la reacción se añadió agua (15 mL) y se realizaron extracciones con AcOEt (4x25 mL); la fase orgánica resultante se lavó con salmuera (8x35 mL), se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de ciclohexano-AcOEt 88:12.

9.8.1.1. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 3'-[(3''-cloro-4''-metil-2''-oxo-2''-H-cromen-7''-il)oxi]propilo (1)



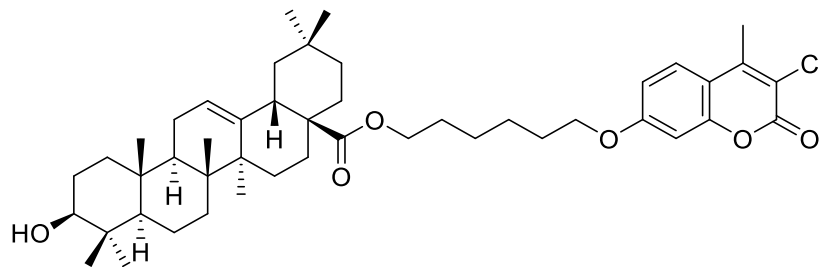
Se utilizó ácido oleanólico (128 mg, 0.28 mmol), **83a** (93 mg, 0.28 mmol) y K_2CO_3 (60 mg, 0.44 mmol), obteniéndose **1** como un sólido blanco (126 mg, 64%); p.f.: 81–85 °C. 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.51 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, H-5''), 6.87 (dd, 1H, $J_{6'',8''}=2.4$ Hz, H-6''), 6.79 (d, 1H, H-8''), 5.22 (t, 1H, $J_{12,11}=3.4$ Hz, H-12), 4.19 (m, 2H, H-1'), 4.07 (m, 2H, H-3'), 3.15 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.7$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.3$ Hz, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.1$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.7$ Hz, H-18), 2.53 (s, 3H, CH_3 -cum.), 2.14 (m, 2H, H-2'), 2.05-1.05 (m, 22H, H-1, H-2, H-9, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22), 1.09 (s, 3H, CH_3 -27), 0.93 (s, 3H, CH_3 -23), 0.90 (s, 3H, CH_3 -30), 0.88 (s, 3H, CH_3 -29), 0.74 (s, 3H, CH_3 -24), 0.72 (s, 3H, CH_3 -25), 0.53 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6 (C-28), 161.8 (C-2''), 157.4 (C-7''), 153.2 (C-8a''), 147.9 (C-4''), 143.7 (C-13), 125.9 (C-5''), 122.4 (C-12), 117.9 (C-4a''), 113.5 (C-3''), 113.3 (C-6''), 101.1 (C-8''), 78.9 (C-3), 64.7 (C-1'), 60.4 (H-3'), 55.0 (C-5), 47.5 (C-9), 46.8 (C-17), 45.8 (C-19), 41.6 (C-18), 41.3 (C-14), 39.2 (C-8), 38.7 (C-1), 38.3 (C-4), 36.9 (C-10), 33.8 (C-21), 33.8 (C-29), 33.1 (C-22), 32.5 (C-7), 30.7 (C-20), 28.2 (C-2'), 28.0 (C-23), 27.6 (C-15), 27.1 (C-27), 25.8 (C-16), 23.6 (C-30), 23.3 (C-2), 23.0 (C-11), 18.2 (CH_3 -cum.), 16.7 (C-6), 16.2 (C-24), 15.5 (C-26), 15.2 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{43}H_{59}ClNaO_6$ ($[M+Na]^+$): 729.3892, encontrado: 729.3878.

9.8.1.2. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-[(3''-cloro-4''-metil-2''-oxo-2''-H-cromen-7''-il)oxi]butilo (2)



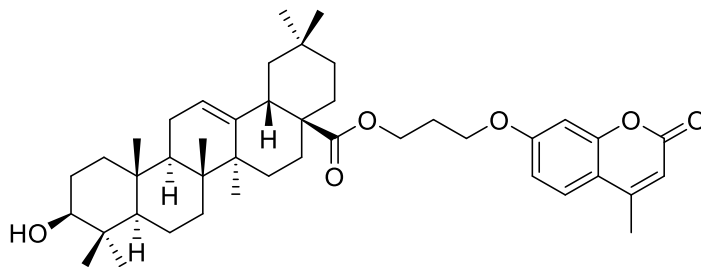
Se utilizó ácido oleanólico (79 mg, 0.17 mmol), **84a** (60 mg, 0.17 mmol) y K_2CO_3 (24 mg, 0.17 mmol), obteniéndose **2** como un sólido blanco (84 mg, 67%); p.f.: 86–91 °C. 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.50 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, H-5''), 6.88 (dd, 1H, $J_{8,6''}=2.4$ Hz, H-6''), 6.80 (d, 1H, H-8''), 5.26 (t, 1H, $J_{12,11}=3.4$ Hz, H-12), 4.08 (m, 2H, H-1'), 4.04 (m, 2H, H-4'), 3.19 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.4$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.3$ Hz, H-3), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.1$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.2$ Hz, H-18), 2.54 (s, 3H, CH_3 -cum.), 1.96–0.63 (m, 26H, H-1, H-2, H-9, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22, H-2', H-3'), 1.12 (s, 3H, CH_3 -27), 0.97 (s, 3H, CH_3 -23), 0.92 (s, 3H, CH_3 -30), 0.89 (s, 3H, CH_3 -29), 0.86 (s, 3H, CH_3 -24), 0.76 (s, 3H, CH_3 -25), 0.71 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.7 (C-28), 161.9 (C-2''), 157.4 (C-7''), 153.1 (C-8a''), 147.9 (C-4''), 143.8 (C-13), 125.9 (C-5''), 122.4 (C-12), 117.8 (C-4a''), 113.3 (C-3''), 113.2 (C-6''), 101.2 (C-8''), 78.9 (C-3), 68.0 (C-1'), 63.6 (C-4'), 55.1 (C-5), 47.5 (C-9), 46.7 (C-17), 45.8 (C-19), 41.7 (C-18), 41.3 (C-14), 39.3 (C-8), 38.7 (C-1), 38.4 (C-4), 37.0 (C-10), 33.8 (C-21), 33.1 (C-29), 32.7 (C-22), 32.5 (C-7), 30.7 (C-20), 28.1 (C-3'), 27.6 (C-23), 27.1 (C-15), 25.8 (C-27), 25.7, (C-16), 25.3 (C-2'), 23.6 (C-30), 23.4 (C-2), 23.0 (C-11), 18.3 (CH_3 -cum.), 17.0 (C-6) 16.2 (C-24) 15.5 (C-26), 15.3 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{44}H_{61}ClNaO_6$ ($[M+Na]^+$): 743.4049, encontrado: 743.4034.

9.8.1.3. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 6'-[(3''-cloro-4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexilo (**3**)



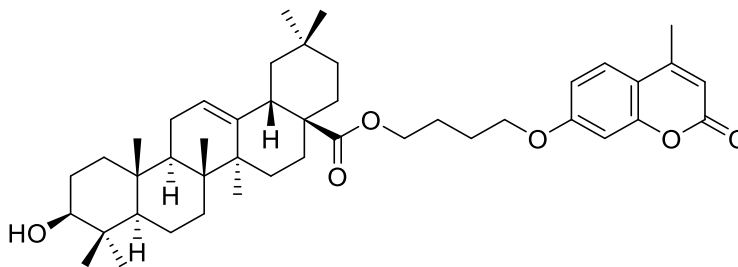
Se utilizó ácido oleanólico (98 mg, 0.21 mmol), **85a** (77 mg, 0.21 mmol) y K_2CO_3 (30 mg, 0.21 mmol), obteniéndose **3** como un sólido blanco (119 mg, 74%); p.f.: 126–131 °C. 1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.50 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, H-5''), 6.89 (dd, 1H, $J_{6'',8''}=2.4$ Hz, H-6''), 6.81 (d, 1H, H-8''), 5.28 (t, 1H, $J_{12,11}=3.4$ Hz, H-12), 4.03 (m, 4H, H-1',H-6'), 3.21 (m, 1H, H-3), 2.83 (m, 1H, H-18), 2.55 (s, 3H, CH_3 -cum.), 2.05-1.05 (m, 30H, H-1, H-2, H-9,H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22. H-2',H-3', H-4', H-5'), 1.12 (s, 3H, CH_3 -27), 0.97 (s, 3H, CH_3 -23), 0.91 (s, 3H, CH_3 -30) 0.89 (s, 3H, CH_3 -29), 0.88 (s, 3H, CH_3 -24), 0.75 (s, 3H, CH_3 -25), 0.73 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.8 (C-28), 162.0 (C-2''), 157.5 (C-7''), 153.1 (C-8a''), 148.0 (C-4''), 143.8 (C-13), 125.8 (C-5''), 122.6 (C-12), 117.7 (C-4a''), 113.4 (C-3''), 113.2 (C-6''), 101.2 (C-8''), 79.0 (C-3), 68.5 (C-1'), 64.0 (C-6'), 55.2 (C-5), 47.6 (C-9), 46.7 (C-17), 45.0 (C-19), 41.7 (C-18), 41.3 (C-14), 39.3 (C-8), 38.7 (C-1), 38.4 (C-4), 37.1 (C-10), 33.9 (C-21), 33.2 (C-29), 32.7 (C-22), 32.5 (C-7), 30.7 (C-20), 28.9 (C-5'), 28.5 (C-2'), 28.1 (C-4') , 27.6 (C-23), 27.2 (C-15), 25.8 (C-27), 25.6 (C-3'), 23.6 (C-30), 23.4 (C-2), 23.0 (C-11), 18.3 (CH_3 -cum.), 17.1 (C-6), 16.2 (C-24) , 15.5 (C-26), 15.3 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{46}H_{65}ClNaO_6$ ($[M+Na]^+$): 771.4362, encontrado: 771.4347.

9.8.1.4. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 3'-[(4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]propilo (4)



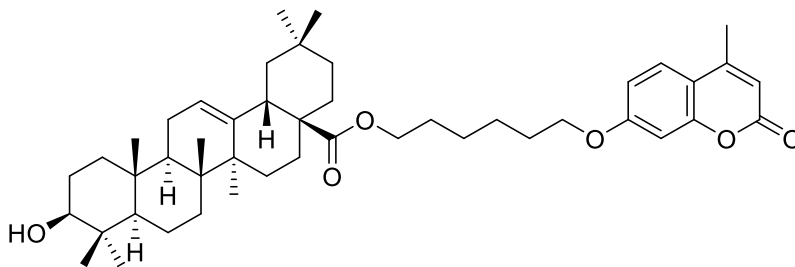
Se utilizó ácido oleanólico (146 mg, 0.32 mmol), **83b** (95 mg, 0.32 mmol) y K_2CO_3 (44 mg, 0.32 mmol), obteniéndose **4** como un sólido blanco (151 mg, 70%); p.f.: 77–82 °C. 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.8$ Hz, H-5''), 6.83 (dd, 1H, $J_{6'',8''}=2.4$ Hz, H-6''), 6.78 (d, 1H, H-8''), 6.13 (ca, 1H, $J_{H,H}=1.1$ Hz, H-3''), 5.22 (t, 1H, $J_{11,12}=3.4$ Hz, H-12), 4.18 (m, 2H, H-1'), 4.07 (m, 2H, H-3'), 3.15 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.4$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.1$ Hz, H-3), 2.83 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.1$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.7$ Hz, H-18), 2.38 (d, 3H, $J_{H,H}=1.1$ Hz, CH_3 -cum.), 2.13 (quint., 2H, $J_{1',2'}=J_{2',3'}=6.1$ Hz, H-2'), 2.05-0.97 (m, 22H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22), 1.06 (s, 3H, CH_3 -27), 0.92 (s, 3H, CH_3 -23), 0.89 (s, 3H, CH_3 -30) 0.87 (s, 3H, CH_3 -29), 0.72 (s, 3H, CH_3 -24), 0.71 (s, 3H, CH_3 -25), 0.54 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6 (C-28), 161.8 (C-2''), 161.2 (C-7''), 155.3 (C-8a''), 152.5 (C-4''), 143.7 (C-13), 125.5 (C-5''), 122.4 (C-12), 113.6 (C-4a''), 112.5 (C-3''), 111.9 (C-6''), 101.1 (C-8''), 78.8 (C-3), 64.5 (C-1'), 60.4 (C-3'), 55.0 (C-5), 47.4 (C-9), 46.7 (C-17), 45.7 (C-19), 41.6 (C-18), 41.2 (C-14), 39.1 (C-8), 38.6 (C-1), 38.3 (C-4), 36.8 (C-10), 33.8 (C-21), 33.0 (C-29), 32.5 (C-22), 32.4 (C-7), 30.6 (C-20), 28.2 (C-2'), 28.0 (C-23), 27.5 (C-15), 27.1 (C-27), 25.8 (C-16), 23.6 (C-30), 23.2 (C-2), 22.9 (C-11), 18.6 (CH_3 -cum.), 18.2 (C-6), 16.7 (C-24), 15.5 (C-26), 15.1 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{43}H_{60}NaO_6$ ($[M+Na]^+$): 695.4282, encontrado: 695.4265.

9.8.1.5. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-[(4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]butilo (5)



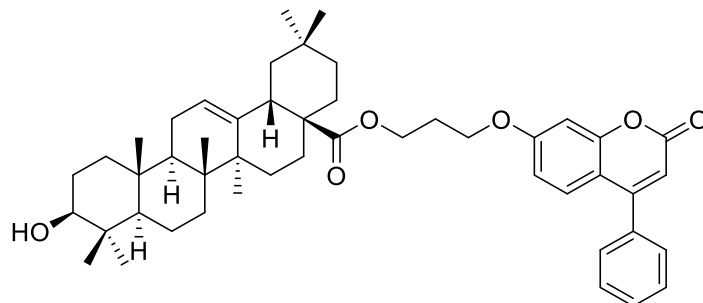
Se utilizó ácido oleanólico (385 mg, 0.85 mmol), **84b** (263 mg, 0.85 mmol) y K_2CO_3 (116 mg, 0.85 mmol), obteniéndose **5** como espuma blanca (376 mg, 64%). 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.8$ Hz, H-5''), 6.82 (dd, 1H, $J_{6'',8''}=2.4$ Hz, H-6''), 6.77 (d, 1H, H-8'') 6.10 (ca, 1H, $J_{H,H}=1.1$ Hz, H-3''), 5.24 (t, 1H, $J_{12,11}=3.3$ Hz, H-12), 4.08 (m, 2H, H-1'), 4.02 (m, 2H, H-4'), 3.17 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.4$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.4$ Hz, H-3), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.1$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.8$ Hz, H-18), 2.36 (d, 3H, $J_{H,H}=1.1$ Hz, CH_3), 2.04-1.05 (m, 26H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22, H-2', H-3'), 1.06 (s, 3H, CH_3 -27), 0.92 (s, 3H, CH_3 -23), 0.89 (s, 3H, CH_3 -30), 0.87 (s, 3H, CH_3 -29), 0.72 (s, 3H, CH_3 -24), 0.71 (s, 3H, CH_3 -25), 0.54 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6 (C-28), 161.9 (C-2''), 161.2 (C-7''), 155.2 (C-8a''), 152.5 (C-4''), 143.7 (C-13), 125.4 (C-5''), 122.3 (C-12), 113.5 (C-4a''), 112.5 (C-3''), 111.9 (C-6''), 101.3 (C-8''), 78.8 (C-3), 67.8 (C-1'), 63.5 (H-4'), 55.1 (C-5), 47.5 (C-9), 46.6 (C-17), 45.8 (C-19), 41.6 (C-18), 41.3 (C-14), 39.2 (C-8), 38.7 (C-1), 38.3 (C-4), 36.9 (C-10), 33.8 (C-21), 33.0 (C-29), 32.6 (C-22), 32.4 (C-7), 30.6 (C-20), 28.0 (C-3'), 27.6 (C-23), 27.1 (C-15), 26.8 (C-27), 25.8 (C-16), 25.2 (C-2'), 23.5 (C-30), 23.3 (C-2), 22.9 (C-11), 18.6 (CH_3 -cum.), 18.2 (C-6), 17.0 (C-24), 15.5 (C-26), 15.2 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{44}H_{62}NaO_6$ ($[M+Na]^+$): 709.4439, encontrado: 709.4424.

9.8.1.6. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 6'-[(4''-metil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexilo (6)



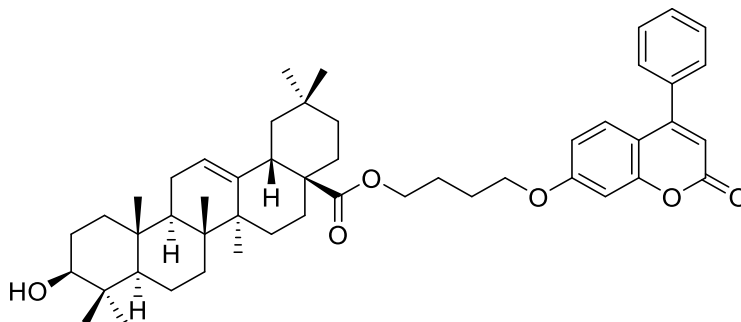
Se utilizó ácido oleanólico (315 mg, 0.69 mmol), cumarina **85b** (234 mg, 0.69 mmol) y K_2CO_3 (149 mg, 1.08 mmol), obteniéndose **6** como un sólido blanco (430 mg, 87%); p.f.: 88–97°C; 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.47 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.8$ Hz, H-5''), 6.83 (dd, 1H, $J_{6'',8''}=2.4$ Hz, H-6''), 6.78 (d, 1H, H-8''), 6.11 (ca, 1H, $J_{H,H}=1.1$ Hz, H-3''), 5.26 (t, 1H, $J_{11,12}=3.3$ Hz, H-12), 4.02 (m, 2H, H-1'), 3.99 (m, 2H, H-6'), 3.18 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.2$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.3$ Hz, H-3), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.1$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.8$ Hz, H-18), 2.38 (d, 3H, $J_{H,H}=1.1$ Hz, CH_3 -cum.), 2.02-0.97 (m, 30H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22, H-2', H-3', H-4', H-5'), 1.12 (s, 3H, CH_3 -27), 0.97 (s, 3H, CH_3 -23), 0.91 (s, 3H, CH_3 -30), 0.89 (s, 3H, CH_3 -29), 0.87 (s, 3H, CH_3 -24), 0.75 (s, 3H, CH_3 -25), 0.72 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.7 (C-28), 162.1 (C-2''), 161.3 (C-7''), 155.3 (C-8a''), 152.5 (C-4''), 143.8 (C-13), 125.4 (C-5''), 122.3 (C-12), 113.4 (C-4a''), 112.6 (C-3''), 111.8 (C-6''), 101.3 (C-8''), 78.9 (C-3), 68.3 (H-1'), 64.0 (H-6'), 55.2 (C-5), 47.6 (C-9), 46.7 (C-17), 45.8 (C-19), 41.7 (C-18), 41.3 (C-14), 39.3 (C-8), 38.7 (C-1), 38.3 (C-4), 37.0 (C-10), 33.8 (C-21), 33.1 (C-29), 32.7 (C-22), 32.5 (C-7), 30.7 (C-20), 28.9 (C-5'), 28.5 (C-2'), 28.1 (C-4'), 27.6 (C-23), 27.1 (C-15), 25.8 (C-27), 25.6 (C-3'), 23.6 (C-30), 23.4 (C-2), 23.0 (C-11), 18.6 (CH_3 -cum.), 18.3 (C-6), 17.0 (C-24), 15.5 (C-26), 15.3 (C-25). HRESI-MS m/z calcd. para $C_{46}H_{66}NaO_6$ ($[M+Na]^+$): 737.4752, encontrado: 737.4736.

9.8.1.7. 3β-Hidroiolean-12-en-28-oato de 3'-[(4''-fenil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]propilo (7)



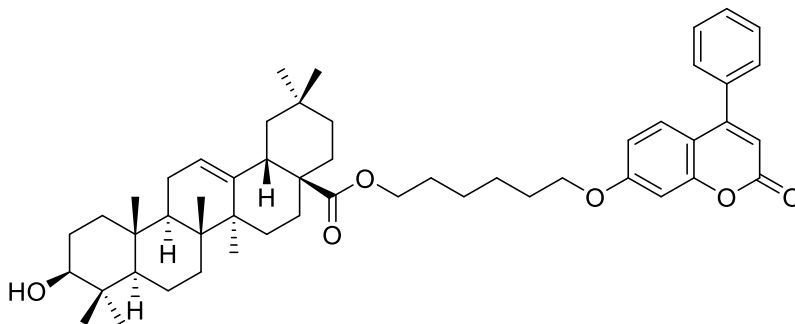
Se utilizó ácido oleanólico (108 mg, 0.24 mmol), cumarina **83c** (85 mg, 0.24 mmol) y K_2CO_3 (51 mg, 0.37 mmol), obteniéndose **7** como espuma blanca (154 mg, 88%). 1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz) δ 7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.38 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, H-5''), 6.87 (d, 1H, $J_{8'',6''}=2.4$ Hz, H-8''), 6.77 (dd, 1H, H-6''), 6.21 (s, 1H, H-3''), 5.23 (t, 1H, $J_{12,11}=3.3$ Hz, H-12), 4.20 (m, 2H, H-1'), 4.09 (m, 2H, H-3'), 3.16 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.5$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.4$ Hz, H-3), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.1$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.7$ Hz, H-18), 2.15 (m, 2H, H-2'), 1.99-0.64 (m, 22H, H-1, H-2, H-9, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22), 1.08 (s, 3H, CH_3 -27), 0.93 (s, 3H, CH_3 -23), 0.90 (s, 3H, CH_3 -30), 0.88 (s, 3H, CH_3 -29), 0.71 (s, 3H, CH_3 -24), 0.70 (s, 3H, CH_3 -25), 0.57 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6 (C-28), 162.0 (C-2''), 161.2 (C-7''), 156.0 (C-4''), 155.8 (C-8a''), 143.8 (C-13), 135.5 (C-5''), 129.6 (Ar), 128.8 (Ar), 128.3 (Ar), 128.0 (Ar), 122.4 (C-12), 112.7 (C-4a''), 112.5 (C-6''), 111.8 (C-3''), 101.4 (C-8''), 78.9 (C-3), 64.6 (C-1'), 60.4 (C-3'), 55.0 (C-5), 47.5 (C-9), 46.8 (C-17), 45.8 (C-19), 41.6 (C-18), 41.3 (C-14), 39.2 (C-8), 38.7 (C-1), 38.4 (C-4), 36.9 (C-10), 33.8 (C-21), 33.0 (C-29), 33.5 (C-22), 32.5 (C-27), 30.7 (C-20), 28.2 (C-2'), 28.1 (C-23), 27.5 (C-15), 27.1 (C-27), 25.9 (C-16), 23.6 (C-30), 23.3 (C-2), 23.0 (C-11), 18.2 (C-6), 16.8 (C-24), 15.5 (C-26), 15.1 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{48}H_{62}NaO_6$ ($[M+Na]^+$): 757.4439, encontrado: 757.4422.

9.8.1.8. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-[(4''-fenil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]butilo (8)



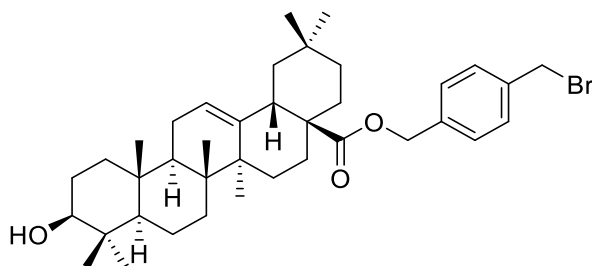
Se utilizó ácido oleanólico (269 mg, 0.59 mmol), cumarina **84c** (220 mg, 0.59 mmol) y K_2CO_3 (127 mg, 0.92 mmol), obteniéndose **8** como espuma blanca (316 mg, 72%). 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 (m, 5H, Ar-H), 7.36 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, H-5''), 6.86 (d, 1H, $J_{8'',6''}=2.1$ Hz, H-8''), 6.77 (dd, 1H, H-6''), 6.20 (s, 1H, H-3''), 5.27 (t, 1H, $J_{12,11}=3.3$ Hz, H-12), 4.08 (m, 2H, H-1'), 4.05 (m, 2H, H-4'), 3.18 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.1$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.3$ Hz, H-3), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.9$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.9$ Hz, H-18), 2.15 (m, 2H, H-2'), 1.97-1.17 (m, 24H, H-1, H-2, H-9, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22, H-3'), 1.12 (s, 3H, CH_3 -27), 0.97 (s, 3H, CH_3 -23), 0.91 (s, 3H, CH_3 -30), 0.89 (s, 3H, CH_3 -29), 0.86 (s, 3H, CH_3 -24), 0.75 (s, 3H, CH_3 -25), 0.72 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.7 (C-28), 162.1 (C-2''), 161.2 (C-7''), 156.0 (C-4''), 155.8 (C-8a''), 143.8 (C-13), 135.6 (C-5''), 129.6 (Ar), 128.8 (Ar), 128.4 (Ar), 128.0 (Ar), 122.4 (C-12), 112.7 (C-4a''), 112.5 (C-6''), 111.9 (C-3''), 101.6 (C-8''), 79.0 (C-3), 68.0 (C-1'), 63.6 (C-4'), 55.2 (C-5), 47.6 (C-9), 46.6 (C-17), 45.8 (C-19), 41.7 (C-18), 41.4 (C-14), 39.3 (C-8), 38.7 (C-1), 38.4 (C-4), 37.0 (C-10), 33.9 (C-21), 32.7 (C-29), 33.1 (C-22), 32.7 (C-27), 30.7 (C-20), 28.1 (C-3'), 27.7 (C-23), 27.2 (C-15), 26.9 (C-27), 25.9 (C-16), 25.3 (C-2'), 23.6 (C-30), 23.4 (C-2), 23.0 (C-11), 18.3 (C-6), 17.1 (C-24), 15.6 (C-26), 15.3 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{49}H_{64}NaO_6$ ($[M+Na]^+$): 771.4595, encontrado: 771.4578.

9.8.1.9. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 6'-[(4''-fenil-2''-oxo-2''H-cromen-7''-il)oxi]hexilo (9)



Se utilizó ácido oleanólico (88 mg, 0.19 mmol), cumarina **85c** (78 mg, 0.19 mmol) y K_2CO_3 (42 mg, 0.30 mmol), obteniéndose **9** como espuma blanca (150 mg, 79%). 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.35 (d, 1H, $J_{5'',6''}=8.9$ Hz, H-5''), 6.86 (d, 1H, $J_{8'',6''}=2.3$ Hz, H-8''), 6.76 (dd, 1H, H-6''), 6.19 (s, 1H, H-3''), 5.26 (t, 1H, $J_{12,11} = 3.3$ Hz, H-12), 4.01 (m, 4H, H-1',H-6'), 3.18 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.4$ Hz, $J_{3,2\beta}=11.3$ Hz, H-3), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\alpha}=4.0$ Hz, $J_{18,19\beta}=13.7$ Hz, H-18), 2.05-1.05 (m, 30H, H-1, H-2, H-9, H-5, H-6, H-7, H-9, H-11, H-15, H-16, H-19, H-21, H-22, H-2', H-3'), 1.12 (s, 3H, CH_3 -27), 0.97 (s, 3H, CH_3 -23), 0.91 (s, 3H, CH_3 -30), 0.89 (s, 3H, CH_3 -29), 0.87 (s, 3H, CH_3 -24), 0.75 (s, 3H, CH_3 -25), 0.72 (s, 3H, CH_3 -26) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 177.7 (C-28), 162.3 (C-2''), 161.2 (C-7''), 156.0 (C-8a''), 155.8 (C-4''), 143.8 (C-13), 135.6 (C-5''), 129.5 (Ar), 128.8 (Ar), 128.3 (Ar), 127.9 (Ar), 122.3 (C-12), 112.7 (C-4a''), 112.3 (C-6''), 111.7 (C-3''), 101.5 (C-8''), 78.9 (C-3), 68.4 (C-1'), 64.0 (C-6'), 55.1 (C-5), 47.5 (C-9), 46.6 (C-17), 45.8 (C-19), 41.7 (C-18), 41.3 (C-14), 39.3 (C-8), 38.7 (C-1), 38.4 (C-4), 37.0 (C-10), 33.8 (C-21), 33.1 (C-29), 32.7 (C-22), 32.4 (C-27), 30.7 (C-20), 28.9 (C-5'), 28.5 (C-2'), 28.1 (C-4'), 27.6 (C-23), 27.1 (C-15), 26.9 (C-27), 25.8 (C-16), 25.6 (C-3'), 23.6 (C-30), 23.4 (C-2), 23.0 (C-11), 18.3 (C-6), 17.0 (C-24), 15.5 (C-26), 15.3 (C-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{51}H_{68}NaO_6$ ($[M+Na]^+$): 799.4908, encontrado: 799.4891.

9.8.2. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-bromometilbencilo (10)



Se preparó según la metodología descrita en la sección 9.5.2. Se empleó ácido oleanólico (129 mg, 0.28 mmol), α,α' -dibromo-*p*-xileno (593 mg, 2.3 mmol) y K_2CO_3 (58 mg, 0.42 mmol), obteniéndose **10** como espuma blanca (96 mg, 54%). $[\alpha]_D^{21} +30$ (c 0.28, CH_2Cl_2). 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (m, 4H, Ar-H), 5.28 (ta, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.6$ Hz, H-12), 5.05 (s, 2H, CH_2OAr), 4.49 (s, 2H, CH_2Br), 3.20 (m, 1H, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.4$ Hz, H-18), 1.96 (m, 1H, H-16 α), 1.84 (m, 2H, H-11 α,β), 1.71–1.46 (m, 12H, H-1 β , H-2 α,β , H-6 α , H-7 α , H-9, H-15 β , H-16 β , H-19 α , H-21 α , H-22 α,β), 1.38–1.00 (m, 5H, H-6 β , H-7 β , H-15 α , H-19 β , H-21 β), 1.12 (s, 3H, CH_3 -27), 1.05 (m, 1H, H-1 α), 0.98 (s, 3H, CH_3 -23), 0.92 (s, 3H, CH_3 -30), 0.90 (s, 3H, CH_3 -29), 0.87 (s, 3H, CH_3 -24), 0.77 (s, 3H, CH_3 -25), 0.56 (s, 3H, CH_3 -26), 0.70 (m, 1H, H-5) ppm. ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 177.6 (C-28), 143.8 (C-13), 137.6, 136.9 (C-1', C-4'), 129.3 (C-3'), 128.6 (C-2'), 122.7 (C-12), 79.2 (C-3), 65.6 (OCH_2Ph), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.4 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2, 32.8 (C-7, CH_3 -29), 32.5 (C-22), 30.8 (C-20), 28.2 (CH_3 -23), 27.8 ($BrCH_2$), 27.3 (C-15), 27.1 (C-2), 26.0 (CH_3 -27), 23.8, 23.5, 23.2 (C-11, C-16, CH_3 -30), 18.5 (C-6), 17.0 (CH_3 -26), 15.7 (CH_3 -24), 15.5 (CH_3 -25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{38}H_{55}^{81}BrNaO_3$ ($[M+Na]^+$): 663.3206, encontrado: 663.3195.

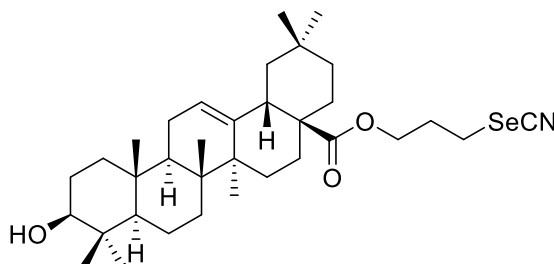
9.8.3. Procedimiento general para la preparación de selenocianatos de ácido oleanólico

Método A. Una mezcla de los compuestos **86–91** (1.0 equiv.) y $KSeCN$ (2.0 equiv.) en MeCN–DMF anhidros (7 mL, 4:3) se mantuvo en agitación durante 65°C 12h en atmósfera inerte y ausencia de luz. Transcurrido ese tiempo se añadió agua (20 mL) y se extrajo con AcOEt (5x20 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera

(8x35 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. Los compuestos se purificaron mediante cromatografía en columna, usando como eluyente una mezcla 9:1 ciclohexano–AcOEt.

Método B. Acetilación de selenocianatos. A una solución del selenocianato **17**, **18** ó **19** (1.0 equiv.) en CH₂Cl₂ (4 mL) se adicionó Ac₂O y una cantidad catalítica de DMAP. La mezcla a t.a. se agitó durante una noche (~16 h). Al finalizar la reacción se realizaron lavados con salmuera (2x15 mL), H₂SO₄ 0.05 M (1x15mL), NaHCO₃ aq. sat. (1x15mL) y agua (1x15mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de ciclohexano–AcOEt (98:2→96:4).

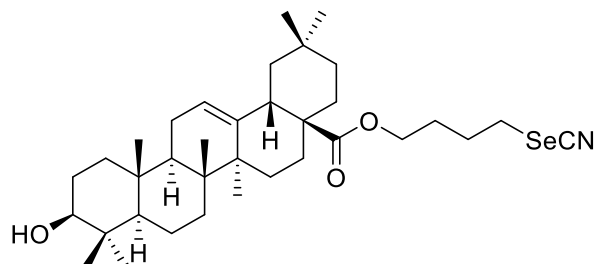
9.8.3.1. 3β-Hidroxiolean-12-en-28-oato de 3'-selenocianatopropilo (**11**)



Se empleó **86** (112 mg, 0.19 mmol) y KSeCN (42 mg, 0.29 mmol) para dar lugar a **11** como un sólido blanco (96 mg, 84%); p.f. de 157–162 °C. $[\alpha]_D^{23} +52$ (c 0.64, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.26 (ta, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.4$ Hz, H-12), 4.15 (m, 2H, H-1'), 3.18 (m, 1H, H-3), 3.10 (m, 2H, H-3'), 2.82 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.2$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.8$ Hz, H-18), 2.21 (m, 2H, H-2'), 1.96 (m, 1H, H-16α), 1.86 (m, 2H, H-11α,β), 1.69–1.46 (m, 11H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-16β, H-19α, H-22α,β), 1.43–1.05 (m, 5H, H-7β, H-6β, H-19β, H-21α,β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 1.08 (m, 1H, H-15α), 0.97 (s, 3H, CH₃-23), 0.91 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.89 (s, 3H, CH₃-24), 0.76 (s, 3H, CH₃-25), 0.70 (s, 3H, CH₃-26) 0.98 (m, 1H, H-1α), 0.73 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.7 (C-28), 143.9 (C-13), 122.6 (C-12), 101.2 (SeCN), 79.0 (C-3), 62.3 (C-1'), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 46.9 (C-17), 45.8 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.4 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1

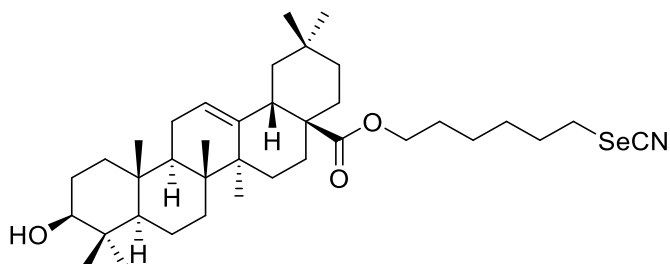
(C-10), 33.9 (C-21), 33.1 (Me-29), 32.8 (C-22), 32.6 (C-7), 30.8 (C-20), 30.0 (C-2'), 28.2 (CH₃-23), 27.7 (C-15), 27.2 (C-2), 26.2 (C-3'), 26.0 (CH₃-27), 23.7 (CH₃-30), 23.5 (C-11), 23.1 (C-16), 18.4 (C-6), 17.3 (CH₃-26), 15.7 (CH₃-24), 15.4 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₄H₅₃NNaO₃⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 626.3083, encontrado: 626.3071.

9.8.3.2. 3β-Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-selenocianatobutilo (12)



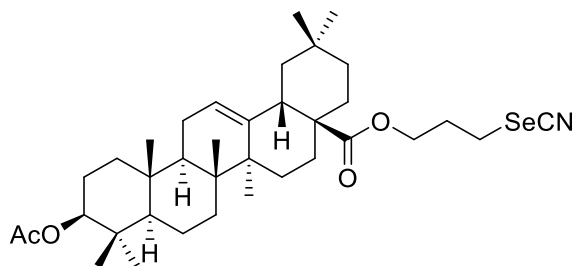
Se empleó el **87** (218 mg, 0.37 mmol) y KSeCN (80 mg, 0.56 mmol) dando lugar a **12** como un sólido blanco (190 mg, 83%); p.f.: 159–165 °C. $[\alpha]_D^{25} +49$ (c 0.77, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.4$ Hz H-12), 4.06 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.2$ Hz, H-1'), 3.19 (dd, 1H, $J_{3,2\beta} = 4.6$ Hz, $J_{3,2\alpha} = 10.9$ Hz, H-3), 3.07 (t, 2H, $J_{3',4'} = 6.2$ Hz, H-4'), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.8$ Hz, H-18), 2.03–1.94 (m, 3H, H-11α,β, H-16α), 1.88 (m, 2H, CH₂), 1.79 (quint, 2H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, CH₂), 1.72–1.50 (m, 11H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-16β, H-19α, H-22α,β), 1.48–1.25 (m, 5H, H-7β, H-6β, H-19β, H-21α,β), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 1.21-0.96 (m, 2H, H-1α, H-15α), 0.98 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.89 (s, 3H, CH₃-24), 0.77 (s, 3H, CH₃-25), 0.72 (s, 3H, CH₃-26), 0.73 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.8 (C-28), 143.9 (C-13), 122.6 (C-12), 101.2 (SeCN), 79.1 (C-3), 63.1 (C-1'), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 45.9 (C-19), 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.9 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1 (C-10), 33.9 (C-21), 33.2 (C-7), 32.8 (CH₃-29), 32.6 (C-22), 30.8 (C-20), 29.1 (C-2'), 28.3 (C-4'), 28.2 (CH₃-23), 27.9 (C-3'), 27.7 (C-15), 27.3 (C-2), 26.0 (CH₃-27), 23.7, 23.5, 23.1 (C-11, C-16, CH₃-30), 18.4 (C-6), 17.2 (CH₃-26), 15.7, 15.4 (CH₃-24, CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₅H₅₅NNaO₃⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 640.3239, encontrado: 640.3226.

9.8.3.3. 3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato de 6'-selenocianatohexilo (**13**)



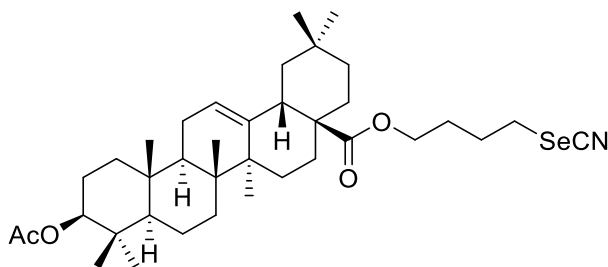
Se empleó **88** (265 mg, 0.43 mmol) y KSeCN (123 mg, 0.86 mmol) obteniéndose **13** como espuma blanca (233 mg, 84%). $[\alpha]_D^{24} +51$ (c 0.71, CH₂Cl₂). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha}=J_{12,11\beta}=3.4$ Hz H-12), 4.06 (t, 2H, $J_{1',2'}=6.5$ Hz, H-1'), 3.19 (dd, 1H, $J_{3,2\beta}=4.6$ Hz, $J_{3,2\alpha}=10.9$ Hz, H-3), 3.07 (t, 2H, $J_{5,6'}=7.4$ Hz, H-6'), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\beta}=4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha}=13.8$ Hz, H-18), 1.99–1.85 (m, 5H, H-11 α,β , H-16 α , CH₂), 1.71–1.45 (m, 16H, H-1 β , H-2 α,β , H-6 α , H-7 α , H-9, H-15 β , H-16 β , H-19 α , H-21 α , H-22 α,β , 2CH₂), 1.43–1.16 (m, 7H, H-6 β , H-7 β , H-15 α , H-19 β , H-21 β , CH₂), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 1.05 (m, 1H, H-1 α), 0.94 (s, 3H, CH₃-23), 0.88 (s, 3H, CH₃-30), 0.86 (s, 3H, CH₃-29), 0.85 (s, 3H, CH₃-24), 0.73 (s, 3H, CH₃-25), 0.69, (s, 3H, CH₃-26), 0.73 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.7 (C-28), 143.8 (C-13), 122.3 (C-12), 101.5 (SeCN), 78.9 (C-3), 63.9 (C-1'), 55.2 (C-5), 47.6 (C-9), 46.7 (C-17), 45.8 (C-19), 41.7 (C-14), 41.3 (C-18), 39.3 (C-8), 38.7 (C-4), 38.4 (C-1), 37.0 (C-10), 33.9 (C-21), 33.1, 32.7 (C-7, CH₃-29), 32.5 (C-22), 30.8 (C-20), 30.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 28.7 (CH₂'), 28.4 (CH₂), 28.1 (CH₃-23), 27.6 (C-15), 27.2 (C-2), 25.9 (CH₃-27), 25.4 (CH₂), 23.6, 23.4, 23.0 (C-11, C-16, CH₃-30), 18.3 (C-6), 17.0 (CH₃-26), 15.6 (CH₃-24), 15.3 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para C₃₇H₅₉NNaO₃⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 668.3552, encontrado: 668.3537.

9.8.3.4. 3 β -Acetoxiolean-12-en-28-oato de 3'-selenocianatopropilo (**14**)



Se empleó **89** (114 mg, 0.18 mmol) y KSeCN (40 mg, 0.28 mmol) obteniéndose **14** como un sólido blanco (105 mg, 89%); p.f.: 162–166 °C. $[\alpha]_D^{25} +56$ (c 0.67, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.26 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.4$ Hz H-12), 4.47 (m, 1H, H-3), 4.15 (m, 2H, H-1'), 3.10 (m, 2H, H-3'), 2.82 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.6$ Hz, H-18), 2.21 (m, 2H, H-2'), 2.03 (s, 3H, OCH₃), 1.96 (m, 1H, H-16α), 1.86 (m, 2H, H-11α,β), 1.70–1.41 (m, 11H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-16β, H-19α, H-22α,β), 1.39–1.24 (m, 3H, H-6β, H-7β, H-21α), 1.20–0.98 (m, 4H, H-1α, H-15α, H-19β, H-21β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 0.92 (s, 3H, CH₃-23), 0.91 (s, 3H, CH₃-30), 0.89 (s, 3H, CH₃-29), 0.85 (s, 3H, CH₃-24), 0.84 (s, 3H, CH₃-25), 0.83 (m, 1H, H-5), 0.71 (s, 3H, CH₃-26) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.7 (C-28), 171.1 (CH₃COO), 143.9 (C-13), 122.5 (C-12), 101.2 (SeCN), 81.0 (C-3), 62.3 (C-1'), 55.4 (C-5), 47.6 (C-9), 47.0 (C-17), 45.8 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.4 (C-8), 38.2 (C-1), 37.8 (C-4), 37.0 (C-10), 33.9 (C-21), 33.1 (CH₃-29), 32.6 (x2) (C-7, C-22), 30.8 (C-20), 30.0 (C-2'), 28.1 (CH₃-23), 27.7 (C-15), 26.2 (C-3'), 25.9 (CH₃-27), 23.7 (CH₃-30), 23.6, 23.5, (C-2, C-11), 23.1 (C-16), 21.4 (CH₃COO), 18.3 (C-6), 17.3 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₆H₅₅NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 668.3189, encontrado: 668.3174.

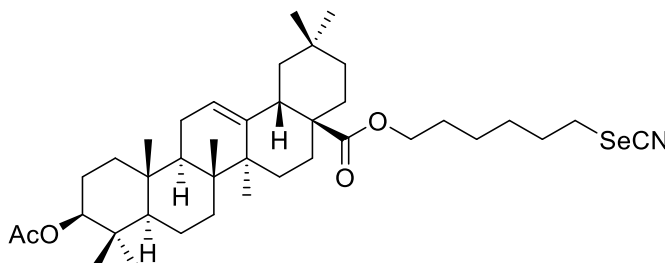
9.8.3.5. 3β-Acetoxiolean-12-en-28-oato de 4'-selenocianatobutilo (**15**)



Se empleó **90** (144 mg, 0.23 mmol) y KSeCN (49 mg, 0.34 mmol) obteniéndose **15** como sólido blanco (126 mg, 84%); p.f.: 122–125 °C. $[\alpha]_D^{25} +51$ (c 0.56, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.3$ Hz H-12), 4.48 (m, 1H, H-3), 4.06 (t, 2H, $J_{1'-2'} = 6.2$ Hz H-1'), 3.06 (t, 2H, $J_{4'-3'} = 7.3$ Hz, H-4'), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.2$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.6$ Hz, H-18), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 1.99 (m, 3H, H-16α, H-3'), 1.87 (m, 2H, H-11α,β), 1.71–1.40 (m, 11H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, C-15β, C-16β, H-19α, H-22α,β), 1.39–1.23 (m, 3H, H-6β, H-7β, H-21α), 1.12 (s,

3H, CH₃-27), 1.19–1.00 (m, 4H, H-1 α , H-15 α , H-19 β , H-21 β), 0.92 (s, 3H, CH₃-23), 0.91 (s, 3H, CH₃-30), 0.89 (s, 3H, CH₃-29), 0.85 (s, 3H, CH₃-24), 0.84 (s, 3H, CH₃-25), 0.71 (s, 3H, CH₃-26), 0.82 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.9 (C-28), 171.2 (CH₃COO), 143.9 (C-13), 122.5 (C-12), 101.3 (SeCN), 81.0 (C-3), 63.1 (C-1'), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 46.9 (C-17), 45.9 (C-19), 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.2 (C-1), 37.8 (C-4), 37.0 (C-10), 33.9 (C-21), 33.2 (CH₃-29), 32.7, 32.6 (C-7, C-22), 30.8 (C-20), 29.1 (C-4'), 28.3 (C-2'), 28.1 (CH₃-23), 27.9 (C-3'), 27.7 (C-15), 25.9 (CH₃-27), 23.7 (CH₃-30), 23.6, 23.5 (C-2, C-11), 23.1 (C-16), 21.4 (CH₃COO), 18.3 (C-6), 17.2 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₇H₅₇NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 682.3345, encontrado: 682.3331.

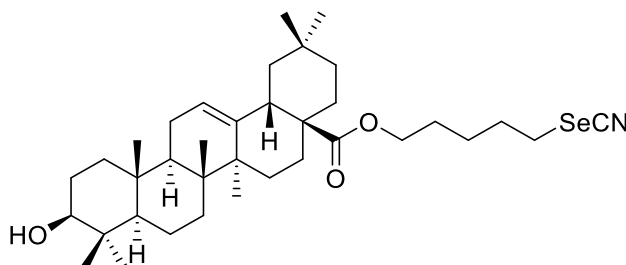
9.8.3.6. 3 β -Acetoxiolean-12-en-28-oato de 6'-selenocianatohexilo (16)



Se empleó **91** (170 mg, 0.26 mmol) y KSeCN (56 mg, 0.39 mmol) obteniéndose **16** como sólido blanco (161 mg, 91%); p.f.: 54–59 °C. $[\alpha]_D^{23}$ +46 (c 0.62, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.26 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.3$ Hz H-12), 4.48 (m, 1H, H-3), 4.00 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.5$ Hz, H-1'), 3.04 (t, 2H, $J_{6',5'} = 7.4$ Hz, H-6'), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.9$ Hz, H-18), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 1.95–1.84 (m, 5H, H-11 α,β , H-16 α , H-5'), 1.69–1.31 (m, 18H, H-1 β , H-2 α,β , H-6 α , H-7 α , H-9, H-15 β , H-16 β , H-19 α , H-21 α , H-22 α,β , 3CH₂), 1.29–1.09 (m, 4H, H-6 β , H-7 β , H-19 β , H-21 β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 1.06–1.01 (m, 2H H-1 α , H-15 α), 0.91 (s, 3H, CH₃-23), 0.90 (s, 3H, CH₃-30), 0.89 (s, 3H, CH₃-29), 0.85 (s, 3H, CH₃-24), 0.83 (s, 3H, CH₃-25), 0.71 (s, 3H, CH₃-26), 0.83 (H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.9 (C-28), 171.2 (CH₃COO), 143.9 (C-13), 122.3 (C-12), 101.6 (SeCN), 81.0 (C-3), 64.0 (C-1'), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 46.8 (C-17), 45.9 (C-19), 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.2 (C-1), 37.8 (C-4), 37.0 (C-10), 33.9 (C-21), 33.2 (CH₃-29), 32.7 (C-7), 32.6 (C-22), 30.8 (CH₂), 30.7 (C-20), 29.7 (C-6'), 28.9, 28.5 (2CH₂), 28.1 (CH₃-23),

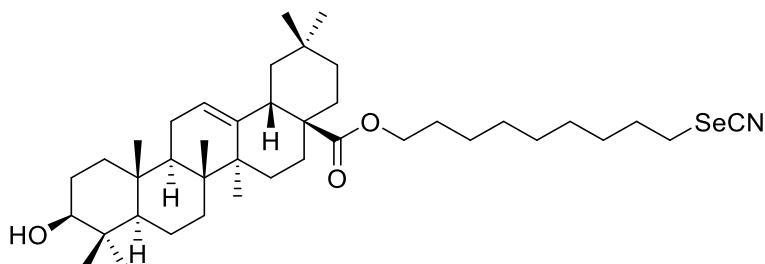
27.7 (C-15), 25.9 (CH₃-27), 25.5 (CH₂), 23.7 (CH₃-30), 23.6, 23.5 (C-2, C-11), 23.1 (C-16), 21.5 (CH₃COO), 18.3 (C-6), 17.1 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₉H₆₁NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 710.3658, encontrado: 710.3643.

9.8.3.7. 3β-Hidroiolean-12-en-28-oato de 5'-selenocianatopentilo (17)



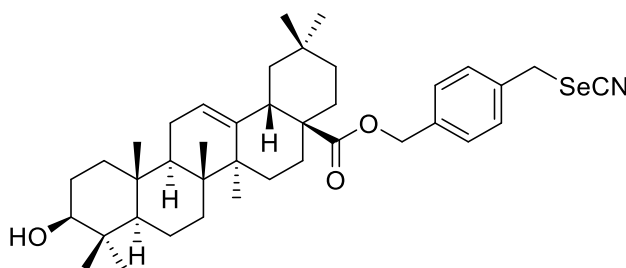
Se usó **92** (190 mg, 0.31 mmol) y KSeCN (90 mg, 0.62 mmol) dando lugar a **17** como espuma blanca (161 mg, 84%). $[\alpha]_D^{24} +44$ (c 0.70, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (t, 1H, $J_{12,11\alpha}=J_{12,11\beta}=3.4$ Hz H-12), 4.02 (t, 2H, $J_{1',2'}=6.3$ Hz, H-1'), 3.20 (dd, 1H, $J_{3,2\alpha}=4.3$ Hz, $J_{3,2\beta}=10.9$ Hz, H-3), 3.05 (t, 2H, $J_{4',5'}=7.3$ Hz, H-5'), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\beta}=4.2$ Hz, $J_{18,19\alpha}=13.6$ Hz, H-18), 1.96–1.85 (m, 5H, H-11α,β, H-16α, H-4'), 1.74–1.46 (m, 16H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-19α, H-16β, H-21α, H-22α,β, H-2', H-3'), 1.39 (m, 1H, H-6β), 1.35–1.06 (m, 4H, H-7β, H-15α, H-19β, H-21β), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 1.02 (m, 1H, H-1α), 0.98 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.89 (s, 3H, CH₃-24), 0.77 (s, 3H, CH₃-25), 0.72 (s, 3H, CH₃-26), 0.71 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.8 (C-28), 144.0 (C-13), 122.5 (C-12), 101.4 (SeCN), 79.1 (C-3), 63.8 (C-1'), 55.4 (C-5), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.9 (C-14), 41.5 (C-18), 39.5 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2 (CH₃-29), 32.9 (C-7), 32.7 (C-22), 30.8 (C-20), 30.6 (C-4'), 29.4 (C-5'), 28.2 (CH₃-23), 28.1 (C-2'), 27.8 (C-15), 27.3 (C-2), 26.0 (C-3'), 25.9 (CH₃-27), 23.8 (CH₃-30), 23.6 (C-11), 23.2 (C-16), 18.5 (C-6), 17.2 (CH₃-26), 15.7, 15.5 (CH₃-24, CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₆H₅₇NNaO₃⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 654.3396, encontrado: 654.3380.

9.8.3.8. 3β-Hidroxiolean-12-en-28-oato de 9'-selenocianatononilo (18)



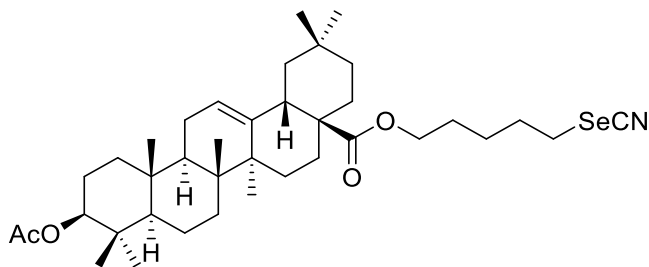
Se empleó **93** (171 mg, 0.26 mmol) y KSeCN (74 mg, 0.52 mmol) dando lugar a **18** como espuma blanca (159 mg, 90%). $[\alpha]_D^{25} +45$ (c 0.53, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.26 (ta, 1H, $J_{12,11\alpha}=J_{12,11\beta}=3.3$ Hz H-12), 3.99 (m, 2H, H-1'), 3.19 (dd, 1H, $J_{3,2\beta}=4.7$ Hz, $J_{3,2\alpha}=11.7$ Hz, H-3), 3.04 (t, 2H, $J_{9',8'}=7.4$ Hz, H-9'), 2.86 (dd, 1H, $J_{18,19\beta}=4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha}=13.7$ Hz, H-18), 1.95–1.85 (m, 5H, H-11α,β, H-16α, CH₂), 1.70–1.65 (m, 16H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-16β, H-19α, H-21α, H-22α,β, 2CH₂), 1.37–1.24 (m, 13H, H-6β, H-7β, H-15α, H-19β, H-21β, 4CH₂), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 1.05 (m, 1H, H-1a), 0.98 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.89 (s, 3H, CH₃-24), 0.77 (s, 3H, CH₃-25), 0.73 (s, 3H, CH₃-26), 0.72 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.9 (C-28), 144.0 (C-13), 122.4 (C-12), 101.6 (SeCN), 79.1 (C-3), 64.3 (C-1'), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.8 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.5 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2, 32.9, 32.6 (C-7, C-22, CH₃-29), 30.9 (C-20), 30.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (x2) (2CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.2 (CH₃-23), 27.8 (C-15), 27.3 (C-2), 26.1 (CH₃-27), 26.0 (CH₂), 23.8, 23.5, 23.1 (C-11, C-16, CH₃-30), 18.5 (C-6), 17.2 (CH₃-26), 15.7 (CH₃-24), 15.4 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₄₀H₆₅NNaO₃⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 710.4022, encontrado: 710.4006.

9.8.3.9. 3β-Hidroxiolean-12-en-28-oato de 4'-selenocianatometilbencilo (19)



Se empleó **10** (74 mg, 0.12 mmol) y KSeCN (33 mg, 0.23 mmol) dando lugar a **19** como espuma blanca (56 mg, 70%). $[\alpha]_D^{24} +42$ (c 0.44, CH₂Cl₂). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (sa, 4H, arilo), 5.28 (ta, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.6$ Hz, H-12), 5.05 (m, 2H, CH₂O), 4.30 (s, 2H, CH₂Se), 3.20 (m, 1H, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.5$ Hz, H-18), 1.96 (m, 1H, H-16α), 1.84 (m, 2H, H-11α,β), 1.71–1.46 (m, 12H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-16β, H-19α, H-21α, H-22α,β), 1.42–1.00 (m, 5H, H-6β, H-7β, H-15α, H-19β, H-21β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 1.05 (m, 1H, H-1α), 0.98 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.87 (s, 3H, CH₃-24), 0.77 (s, 3H, CH₃-25), 0.58 (s, 3H, CH₃-26), 0.71 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.5 (C-28), 143.8 (C-13), 137.3, 135.2 (C-1', C-4'), 129.2 (C-3'), 122.7 (C-12), 128.8 (C-2'), 101.8 (SeCN), 79.1 (C-3), 65.5 (OCH₂Ph), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.4 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2, 32.8, 32.6 (C-7, CH₃-29), 32.6, 32.5 (CH₂Se, C-22), 30.8 (C-20), 28.2 (CH₃-23), 27.8 (C-15), 27.3 (C-2), 26.0 (CH₃-27), 23.8, 23.5, 23.2 (C-11, C-16, CH₃-30), 18.5 (C-6), 17.0 (CH₃-26), 15.7 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₉H₅₅NNaO₃⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 688.3239, encontrado: 688.3229.

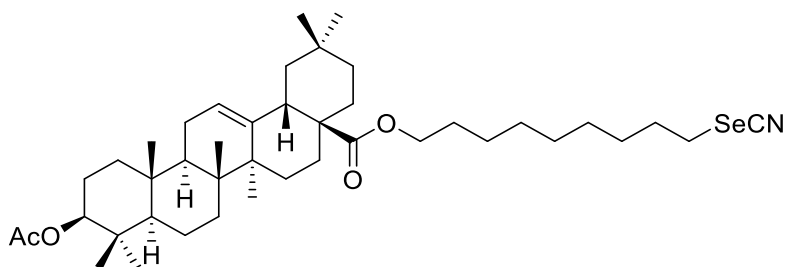
9.8.3.10. 3β-Acetoxiolean-12-en-28-oato de 5'-selenocianatopentilo (**20**)



Se utilizó **17** (59 mg, 0.094 mmol) y Ac₂O (9 μL, 0.094 mmol, 1.0 equiv.) para dar **20** como espuma blanca (47 mg, 74%). $[\alpha]_D^{24} +44$ (c 0.73, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.4$ Hz H-12), 4.49 (m, 1H, H-3), 4.03 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.3$ Hz, H-1'), 3.05 (t, 2H, $J_{5',4'} = 7.3$ Hz, H-5'), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.2$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.5$ Hz, H-18), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 1.94–1.91 (s, 3H, H-16α, CH₂), 1.86 (m, 2H, H-11α,β), 1.72–1.49 (m, 15H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-7α, H-9, H-15β, H-16β, H-19α, H-22α,β, 2CH₂), 1.46–1.25 (m, 3H, H-6β, H-7β, H-21α), 1.21–1.00 (m, 4H, H-

1 α , H-15 α , H-19 β , H-21 β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 0.83 (m, 1H, H-5), 0.93 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.86 (s, 3H, CH₃-24), 0.85 (s, 3H, CH₃-25), 0.73 (s, 3H, CH₃-26) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 177.8 (C-28), 171.2 (CH₃COO), 144.0 (C-13), 122.4 (C-12), 101.4 (SeCN), 81.0 (C-3), 63.8 (C-1'), 55.4 (C-5), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.9 (C-14), 41.5 (C-18), 39.5 (C-8), 38.3, 37.8 (C-1), C-4), 37.1 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2 (CH₃-29), 32.8, 32.7 (C-7, C-22), 30.8 (C-20), 30.6 (C-5'), 29.8 (CH₂), 29.4 (CH₂), 28.2 (CH₃-23), 28.1 (C-15), 27.8 (CH₂), 26.0 (CH₃-27), 25.9 (CH₂), 23.8 (CH₃-30), 23.7, 23.6, 23.2 (C-2, C-6, C-11), 18.4 (C-6), 17.2 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₈H₅₉NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 696.3502, encontrado: 696.3485.

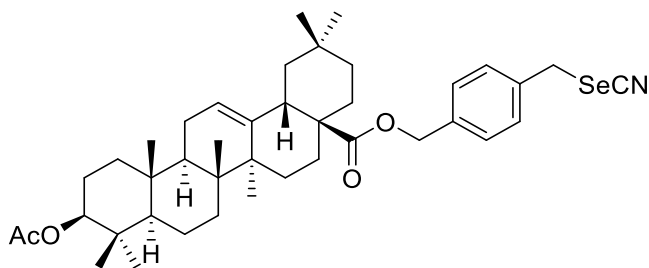
9.8.3.11. 3 β -Acetoxiolean-12-en-28-oato de 9'-selenocianatononilo (21)



Se utilizó **18** (82 mg, 0.12 mmol) y Ac₂O (108 μ L, 1.2 mmol, 10.0 equiv.) para dar **21** como espuma blanca (65 mg, 74%). [α]_D²⁰ +28 (c 0.52, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.26 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.3$ Hz H-12), 4.48 (m, 1H, H-3), 3.99 (m, 2H, H-1'), 3.19 (dd, 1H, $J_{3,2\beta} = 4.7$ Hz, $J_{3,2\alpha} = 11.7$ Hz, H-3), 3.04 (t, 2H, $J_{9',8'} = 7.3$ Hz, H-9'), 2.85 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.2$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.6$ Hz, H-18), 2.03 (s, 3H, CH₃O), 1.96–1.85 (m, 5H, H-11 α,β H-16 α , CH₂), 1.71–1.48 (m, 15H, H-1 β , H-2 α,β , H-6 α , H-7 α , H-9, H-15 β , H-16 β , H-19 α , H-22 α,β , 2CH₂), 1.45–1.25 (m, 13H, H-6 β , H-7 β , H-21 α , 5CH₂), 1.18–1.03 (m, 4H, H-1 α , H-15 α , H-19 β , H-21 β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 0.92 (s, 3H, CH₃-23), 0.91 (s, 3H, CH₃-30), 0.89 (s, 3H, CH₃-29), 0.86 (s, 3H, CH₃-24), 0.85 (s, 3H, CH₃-25), 0.73 (s, 3H, CH₃-26), 0.83 (m, 1H, H-5), ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.9 (C-28), 171.1 (CH₃COO), 144.0 (C-13), 122.4 (C-12), 101.6 (SeCN), 81.0 (C-3), 64.3 (C-1'), 55.4 (C-5), 47.7 (C-9), 46.8 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.5 (C-8), 38.9 (C-4), 38.3 (C-1), 37.8 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2 (C-7), 32.8 (C-29), 32.6 (C-22), 30.9 (C-20), 30.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.4 (CH₂),

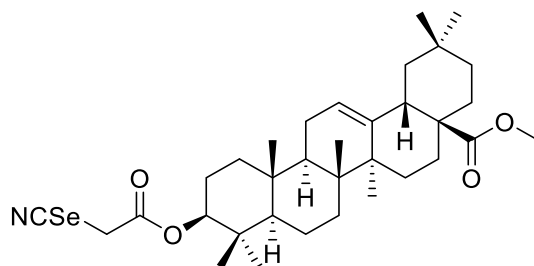
29.2 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.2 (CH₃-23), 27.8 (C-15), 27.3 (CH₂), 26.1 (CH₃-27), 25.9 (CH₂), 23.8 (C-16), 23.7 (C-2), 23.5 (C-11), 23.1 (CH₃-30), 18.4 (C-6), 17.2 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25), ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₄₂H₆₇NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 752.4128, encontrado: 752.4110.

9.8.3.12. 3β-Acetoxiolean-12-en-28-oato de 4-selenocianatometilbencilo (**22**)



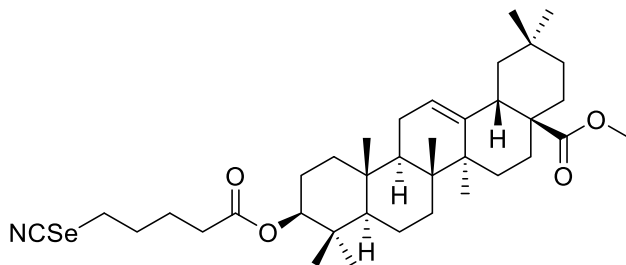
Se utilizó **19** (62 mg, 0.093 mmol) y Ac₂O (93 μL, 0.99 mmol, 10.6 equiv.) para obtener **22** como espuma blanca (46 mg, 70%). $[\alpha]_D^{23} +41$ (c 0.53, CH₂Cl₂). ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (sa, 4H, arilo), 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 3.6$ Hz, H-12), 5.05 (m, 2H, OCH₂Ar), 4.30 (s, 2H, CH₂SeCN), 3.20 (m, 1H, H-3), 2.89 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.1$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.6$ Hz, H-18), 2.04 (s, 3H, OCH₃), 1.98 (td, 1H, $J_{15\beta,16\alpha} = J_{16\alpha,16\beta} = 13.6$ Hz, $J_{15\alpha,16\alpha} = 3.8$ Hz, H-16α), 1.84 (m, 2H, H-11α,β), 1.73–1.49 (m, 11H, H-1β, H-2α,β, H-6α, H-9, H-15β, H-16α,β, H-19α, H-22α,β), 1.45–1.27 (m, 3H, H-6β, H-7α, H-21α), 1.24–1.02 (m, 5H, H-1α, H-7β, H-15α, H-19β, H-21β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 0.92 (s, 3H, CH₃-23), 0.90 (s, 3H, CH₃-30), 0.89 (s, 3H, CH₃-29), 0.85 (s, 3H, CH₃-24), 0.84 (s, 3H, CH₃-25), 0.58 (s, 3H, CH₃-26), 0.82 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 177.5 (C-28), 171.1 (CH₃COO), 143.8 (C-13), 137.3 (C-4'), 135.2 (C-1'), 129.2 (C-3'), 128.8 (C-2'), 122.6 (C-12), 101.8 (SeCN), 81.0 (C-3), 65.4 (OCH₂Ph), 55.4 (C-5), 47.6 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.4 (C-8), 38.3 (C-1), 37.8, 37.0 (C-4, C-10), 34.0 (C-21), 33.2 (CH₃-29), 32.8 (C-7), 32.6 (CH₂SeCN), 32.5 (C-22), 30.8 (C-20), 28.2 (CH₃-23), 27.7 (C-15), 25.9 (CH₃-27), 23.8 (CH₃-30), 23.6 (C-2), 23.5 (C-11), 23.2 (C-16), 21.4 (OCH₃), 18.4 (C-6), 17.0 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₄₁H₅₇NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 730.3345, encontrado: 730.3336.

9.8.3.13. 3 β -Selenocianatoacetoxiolean-12-en-28-oato de metilo (23)



Se usó **95** (107 mg, 0.20 mmol) y KSeCN (58 mg, 0.40 mmol) para obtener **23** como espuma blanca (86 mg, 70%). $[\alpha]_D^{24} +52$ (c 0.90, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 4.1$ Hz, H-12), 4.57 (m, 1H, H-3), 3.85 (s, 2H, SeCH₂), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 2.86 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.6$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.9$ Hz, H-18), 2.01–1.84 (m, 3H, H-11 α,β , H-16 α), 1.74–1.38 (m, 11H, H-1 β , H-2 α,β , H-6 α , H-7 α , H-9, H-15 β , H-16 β , H-19 α , H-22 α,β), 1.38–1.23 (m, 3H, H-6 β , H-7 β , H-21 α), 1.20–1.01 (m, 4H, H-1 α , H-15 α , H-19 β , H-21 β), 1.12 (s, 3H, CH₃-27), 0.94 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.91 (s, 3H, CH₃-29), 0.90 (s, 3H, CH₃-24), 0.89 (s, 3H, CH₃-25), 0.73 (s, 3H, CH₃-26), 0.83 (m, 1H, H-5) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 178.4 (C-28), 167.2 (CH₂COO), 144.0 (C-13), 122.3 (C-12), 100.6 (SeCN), 84.5 (C-3), 55.5 (C-5), 51.7 (OCH₃), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.4 (C-18), 39.4 (C-8), 38.2, 38.0 (C-1, C-4), 37.1 (C-10), 34.0 (C-21), 33.2 (CH₃-29), 32.7, 32.5 (C-7, C-22), 30.8 (C-20), 29.8 (CH₂Se), 28.6 (C-2), 28.2 (CH₃-23), 27.8 (C-15), 26.0 (CH₃-27), 23.8 (CH₃-30), 23.5 (C-11), 23.2 (C-16), 18.3 (C-6), 17.0 (CH₃-26), 16.8 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para C₃₄H₅₁NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 640.2876, encontrado: 640.2875.

9.8.3.14. 3 β -(5'-Selenocianatopentanoioxi)olean-12-en-28-oato de metilo (24)



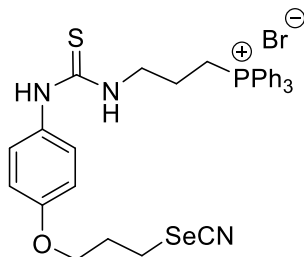
Se usó **96** (59 mg, 0.093 mmol) y KSeCN (27 mg, 0.19 mmol) para obtener **24** como espuma blanca (39 mg, 64%). $[\alpha]_D^{23} +82$ (c 0.53, CH₂Cl₂). ¹H-RMN (500

MHz, CDCl₃) δ 5.28 (t, 1H, $J_{12,11\alpha} = J_{12,11\beta} = 4.3$ Hz, H-12), 4.51 (dd, 1H, $J_{3,2\beta} = 6.7$ Hz, $J_{3,2\alpha} = 9.3$ Hz, H-3), 3.62 (s, 3H, OCH₃), 3.06 (t, 2H, $J_{4',5'} = 7.2$ Hz, H-5'), 2.84 (dd, 1H, $J_{18,19\beta} = 4.4$ Hz, $J_{18,19\alpha} = 13.6$ Hz, H-18), 2.37 (t, 2H, $J_{2',3'} = 7.5$ Hz, H-2'), 1.97–1.92 (m, 3H, H-22b, H-16a, H-15b), 1.89–1.85 (m, 2H, H-11a, H-11b), 1.81–1.76 (m, 2H, H-16b, H-22a), 1.71–1.65 (m, 2H, H-3'a, H-3'b), 1.63–1.60 (m, 6H, H-19a, H-9, H-6a, H-1b, H-4'a, H-4'b), 1.56–1.49 (m, 3H, H-21a, H-7b, H-6b), 1.45–1.28 (m, 3H, H-21b, H-19b, H-15a), 1.13 (s, 3H, CH₃-27), 1.07–1.03 (m, 2H, H-5a, H-1a), 0.93 (s, 3H, CH₃-23), 0.92 (s, 3H, CH₃-30), 0.90 (s, 3H, CH₃-29), 0.86 (s, 3H, CH₃-24), 0.86 (s, 3H, CH₃-25), 0.72 (s, 3H, CH₃-26) ppm. ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) δ 178.5 (C-28), 172.8 (C-1'), 144.0 (C-13), 122.4 (C-12), 101.4 (SeCN), 81.3 (C-3), 55.5 (C-5), 51.7 (OCH₃), 47.7 (C-9), 46.9 (C-17), 46.0 (C-19), 41.8 (C-14), 41.5 (C-18), 39.4 (C-8), 38.2 (C-1), 37.9 (C-4), 37.1 (C-10), 34.0 (C-21), 33.9 (C-2'), 33.5, 33.2 (CH₃-29), 32.7, 32.5 (C-7, C-22), 30.8 (C-20), 30.4 (CH₂), 29.8 (CH₃-23), 29.2 (CH₂), 28.3 (C-15), 27.8 (C-2), 26.0 (CH₃-27), 24.6 (CH₂), 23.8 (CH₃-30), 23.7 (C-5), 23.6 (C-11), 23.2 (C-16), 18.4 (C-6), 17.0 (CH₃-26), 16.9 (CH₃-24), 15.5 (CH₃-25) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₃₇H₅₇NNaO₄⁷⁷Se ([M+Na]⁺): 682.3345, encontrado: 682.3342.

9.8.4. Procedimiento general para la preparación de selenocianatos mitocondriotrópicos

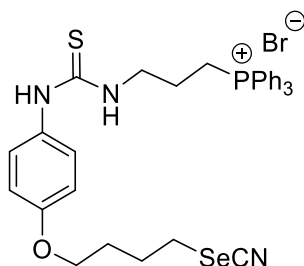
Una solución de la tiourea (**147a-d**, **148a-c**) o amida (**150**) correspondiente (1.0 equiv.) y KSeCN (3.0 equiv.) en MeCN anhidro (8 mL) se agitó a 65°C con atmósfera inerte y ausencia de luz hasta consumo de materia prima. Al finalizar la reacción se adicionó agua (10 mL) y se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ (3x20 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla 80:1→60:1 de CH₂Cl₂–MeOH.

9.8.4.1. Bromuro de 3-{3'-[4''-(3'''-selenocianatopropoxi)fenil]tioureido}propil trifenilfosfonio (25)



Se empleó **147a** (118 mg, 0.18 mmol) y KSeCN (76 mg, 0.53 mmol), obteniéndose **25** como espuma de color rosa (54.4 mg, 45%) tras 8 h de reacción. $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (sa, 1H, NH), 7.90 (sa, 1H, NH), 7.84–7.69 (m, 15H, PPh_3), 7.32 (m, 1H, H-2'', H-6''), 6.87 (m, 2H, H-3'', H-5''), 4.12 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.1$ Hz, H-1'''), 3.87 (c, 2H, $J_{\text{H,H}}=9.3$ Hz, H-3), 3.51 (m, 2H, H-1), 3.30 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=8.6$ Hz, H-3'''), 2.38 (q, 2H, $J_{\text{H,H}}=15.1$ Hz, $J_{\text{H,H}}=8.6$ Hz, H-2'''), 2.11 (m, 2H, H-2) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 182.5 (C=S), 156.7 (C-4''), 135.5 (d, $^4J_{\text{C,P}}=3.0$ Hz, Ar-C p Ph), 133.7 (d, $^2J_{\text{C,P}}=10.1$ Hz, Ar-C o Ph), 130.9 (d, $^3J_{\text{C,P}}=12.8$ Hz, Ar-C m Ph), 127.2 (C-2''), 118.1 (d, $^1J_{\text{C,P}}=86.1$ Hz, Ar-C $ipso$ Ph), 115.2 (C-3''), 102.4 (SeCN), 66.4 (C-1'''), 44.1 (d, $^2J_{\text{C,P}}=16.0$ Hz, C-2), 30.3 (C-2'''), 26.8 (C-3'''), 22.5 (d, $^3J_{\text{C,P}}=3.9$ Hz, C-3), 20.6 (d, $^1J_{\text{C,P}}=51.9$ Hz, C-1) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{OP}^+\text{S}^{77}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 618.1242, encontrado: 618.1225.

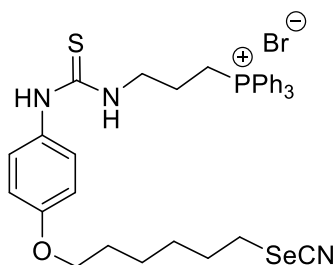
9.8.4.2. Bromuro de 3-{3'-[4''-(4'''-selenocianatobutoxi)fenil]tioureido}propil trifenilfosfonio (26)



Se empleó **147b** (90 mg, 0.13 mmol) y KSeCN (57 mg, 0.39 mmol) obteniéndose después de 9 h de reacción a **26** como espuma de color rosa (45 mg, 48%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (sa, 1H, NH), 7.86 (sa, 1H, NH), 7.84-7.69 (m, 15H, PPh_3), 7.29 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6.86 (m, 2H, H-3'', H-5''), 4.03 (t, 2H,

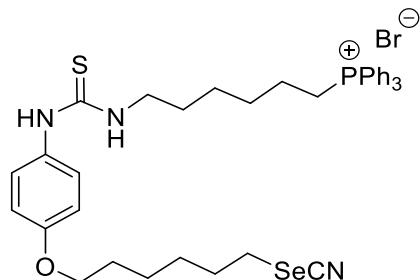
$J_{H,H}=7.4$ Hz, H-1'''), 3.87 (c, 2H, $J_{H,H}=6.0$ Hz, H-3), 3.51 (m, 2H, H-1), 3.17 (t, 2H, $J_{H,H}=9.1$ Hz, H-4'''), 2.12 (m, 4H, H-2''', H-3'''), 1.94 (m, 2H, H-2) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 182.4 (C=S), 157.1 (C-4''), 135.4 (d, $^4J_{C,P}=2.9$ Hz, Ar-C ρ Ph), 133.5 (d, $^2J_{C,P}=9.8$ Hz, Ar-Co Ph), 130.9 (d, $^3J_{C,P}=12.3$ Hz, Ar-C m Ph), 127.2 (C-1''), 119.6 (C-2''), 118.2 (d, $^1J_{C,P}=86.5$ Hz, Ar-C $ipso$ Ph), 115.2 (C-3''), 102.0 (SeCN), 67.2 (C-1'''), 44.2 (d, $^2J_{C,P}=17.7$ Hz, C-2), 29.6 (C-2'''), 28.6 (C-4'''), 27.9 (C-3'''), 22.5 (d, $^3J_{C,P}=3.3$ Hz, C-3), 20.5 (d, $^1J_{C,P}=52.6$ Hz, C-1) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{OP}^+\text{S}^{77}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 632.1398, encontrado: 632.1376.

9.8.4.3. Bromuro de 3-{3'-[4''-(6'''-selenocianatohexiloxi)fenil]tioureido}propil trifenilfosfonio (27)



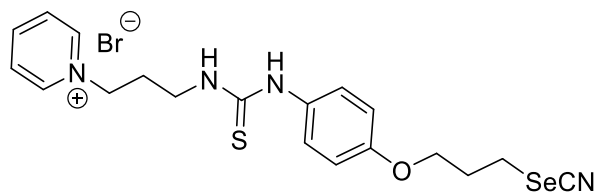
Se empleó **147c** (68 mg, 0.10 mmol) y KSeCN (54 mg, 0.38 mmol) obteniéndose después de 24 h de reacción a **27** como espuma de color rosa (23.2 mg, 33%). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.38 (sa, 1H, NH), 7.89 (sa, 1H, NH), 7.83-7.67 (m, 15H, PPh_3), 7.29 (m, 2H, H-2'', H-6'''), 6.85 (m, 2H, H-3'', H-5'''), 3.96 (t, 2H, $J_{H,H}=7.9$ Hz, H-1'''), 3.88 (m, 2H, H-3), 3.53 (m, 2H, H-1), 3.07 (t, 2H, $J_{H,H}=9.2$ Hz, H-6'''), 2.12 (m, 2H, H-2), 1.94 (m, 2H, H-2'''), 1.78 (m, 2H, H-5'''), 1.67 (m, 2H, H-4'''), 1.52 (m, 2H, H-3''') ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 182.4 (C=S), 157.3 (C-4''), 135.4 (d, $^4J_{C,P}=2.9$ Hz, Ar-C ρ Ph), 133.6 (d, $^2J_{C,P}=10.0$ Hz, Ar-Co Ph), 130.7 (d, $^3J_{C,P}=12.8$ Hz, Ar-C m Ph), 127.0 (C-2''), 119.7, 118.1 (d, $^1J_{C,P}=88.1$ Hz, Ar-C $ipso$ Ph), 115.0 (C-3''), 101.9 (SeCN), 67.9 (C-1'''), 44.2 (d, $^2J_{C,P}=14.5$ Hz, C-2), 30.9 (CH $_2$), 29.7 (CH $_2$), 29.1 (CH $_2$), 28.9 (CH $_2$), 25.5 (CH $_2$), 22.5 (d, $^3J_{C,P}=3.4$ Hz, C-3), 20.5 (d, $^1J_{C,P}=52.8$ Hz, C-1) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{OP}^+\text{S}^{77}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 660.1711, encontrado: 660.1691.

9.8.4.4. Bromuro de 6-{3'-[4''-(6'''-selenocianatohexiloxi)fenil]tioureido}hexil trifenilfosfonio (28)



Se empleó **147d** (30 mg, 0.04 mmol) y KSeCN (11 mg, 0.08 mmol) obteniéndose después de 4 h de reacción a **28** como espuma de color rosa (13 mg, 43%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.80-7.64 (m, 15H, Ar-H PPh_3), 7.16 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6.82 (m, 2H, H-3'', H-5''), 3.91 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=6.3$ Hz, H-1'''), 3.54 (m, 2H, H-6), 3.33 (m, 2H, H-1), 3.03 (t, $J_{\text{H,H}}=7.3$ Hz, H-6'''), 1.89 (m, 2H, H-2'''), 1.74 (m, 2H, H-5'''), 1.67-1.51 (m, 8H, H-3''', H-2, H-4, H-5), 1.42-1.36 (m, 4H, H-4''', H-3) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 181.2 (C=S), 157.5 (C-4''), 135.3 (d, $^4J_{\text{C,P}}=2.9$ Hz, Ar-C ρ Ph), 133.5 (d, $^2J_{\text{C,P}}=10.0$ Hz, Ar-C σ Ph), 130.7 (d, $^3J_{\text{C,P}}=12.6$ Hz, Ar-C m Ph), 127.1 (C-2''), 118.1 (d, $^1J_{\text{C,P}}=86.0$ Hz, Ar-C $ipso$ Ph), 115.2 (C-3''), 102.1 (SeCN), 67.9 (C-1'''), 44.4 (C-1), 30.8 (C-2'''), 29.8 (d, $^2J_{\text{C,P}}=15.9$ Hz, C-2), 29.6 (CH $_2$), 28.9 (CH $_2$), 28.8 (CH $_2$), 28.5 (CH $_2$), 25.7 (C-3'''), 25.4 (CH $_2$), 22.4 (d, $^1J_{\text{C,P}}=50.9$ Hz, C-1), 22.3 (d, $^3J_{\text{C,P}}=4.5$ Hz, C-3) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{OP}^+\text{S}^{77}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 702.2181, encontrado: 702.2178.

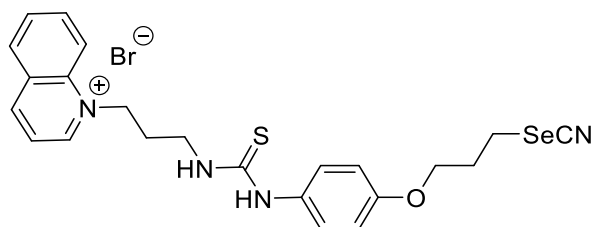
9.8.4.5. Bromuro de 1-{3'-[3''-(4'''-(3''''-selenocianatopropoxi)fenil)tioureido]propil}piridin-1-io (29)



Se empleó **148a** (90 mg, 0.16 mmol) y KSeCN (72 mg, 0.50 mmol) obteniéndose después de 7 h de reacción a **29** como espuma color anaranjado (22.7 mg, 23%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 9.05 (m, 2H, $J_{2,3}=8.5$ Hz, H-2, H-6), 8.61 (tt, 1H, $J_{4',3'}=9.9$ Hz, $J_{4,2}=3.5$ Hz, H-4), 8.12 (dd, 2H, $J_{3,2}=8.5$ Hz, $J_{3,4}=9.9$ Hz, H-3,

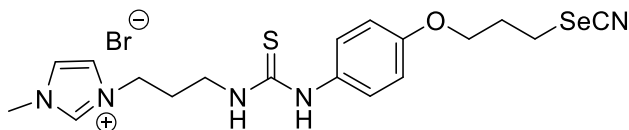
H-5), 7.17 (m, 2H, H-2''', H-6'''), 6.98 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 4.72 (t, 2H, $J_{H-H} = 8.9$ Hz, H-1'), 4.15 (t, $J_{H-H} = 7.4$ Hz, H-1'''), 3.70 (t, 2H, $J_{H-H} = 8.5$ Hz, H-3'), 3.30 (t, 2H, $J_{H-H} = 6.9$ Hz, H-3'''), 2.36 (m, 4H, H-2, H-2''') ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CD_3OD) δ 182.9 (C=S), 158.7 (C-4'''), 146.9 (C-2), 146.2 (C-4), 129.5 (C-3), 128.3 (C-2'''), 116.51 (C-3'''), 104.5 (SeCN), 67.8 (C-1'''), 60.9 (C-1), 42.2 (C-3), 31.9 (C-2'''), 27.4 (C-2), 18.4 (C-3''') ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{N}^+\text{OS}^{77}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 435.0752, encontrado: 435.0741.

9.8.4.6. Bromuro de 1-{3'-[3''-(4'''-(3''''-selenocianatopropoxi)fenil)tioureido]propil}quinolin-1-io (30)



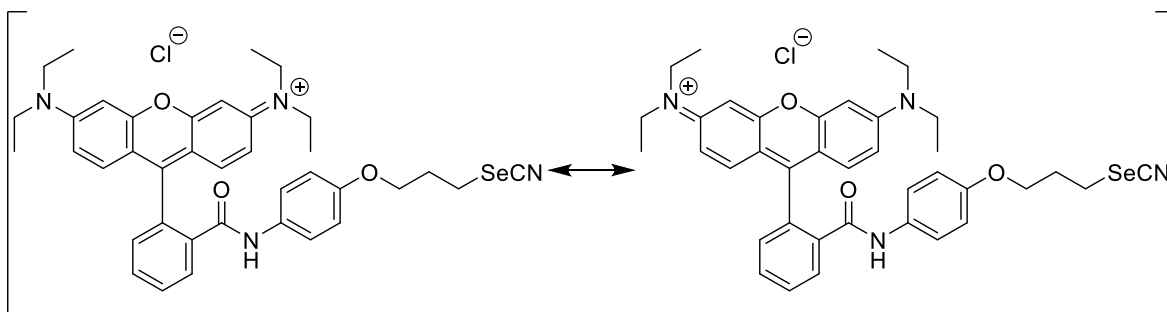
Se empleó **148b** (90 mg, 0.16 mmol) y KSeCN (72 mg, 0.50 mmol) obteniéndose después de 19 h de reacción a **30** como espuma de color naranja (50 mg, 56%). ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 10.14 (da, 1H, $J_{2,4} = 4.6$ Hz, H-2), 8.91 (d, 1H, $J_{4,3} = 8.2$ Hz, H-4), 8.48 (d, 1H, $J_{6,7} = 8.9$ Hz, H-6), 8.26 (d, 1H, $J_{9,8} = 8.9$ Hz, H-9), 8.07 (ta, 1H, $J_{8,7} = 8.0$ Hz, H-8), 8.01 (t, 1H, $J_{3,2} = 7.8$ Hz, H-3), 7.38 (m, 2H, H-2'', H-6'''), 6.84 (m, 2H, H-3''', H-5'''), 5.38 (ta, 2H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, H-1), 4.09 (t, 2H, $J_{H,H} = 5.6$ Hz, H-1'''), 3.85 (m, 2H, H-3), 3.29 (t, 2H, $J_{H,H} = 6.5$ Hz, H-3'''), 2.58 (m, 2H, H-2), 2.37 (quint., 2H, $J_{H,H} = 5.4$ Hz, H-2''') ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 182.6 (C=S), 150.3 (C-4'''), 147.0 (C-2), 138.0 (C-4), 136.8 (C-10), 131.0 (C-1'''), 130.8 (C-8), 130.2 (C-5), 126.8 (C-7), 122.6 (C-6), 118.7 (C-2''', C-6'''), 114.9 (C-3), 102.2 (SeCN), 66.4 (C-1'''), 40.9 (C-1), 30.3 (C-3), 29.8 (C-2'''), 29.5 (C-2), 26.7 (C-3''') ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{N}^+\text{OS}^{77}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 485.0909, encontrado: 485.0896.

9.8.4.7. Bromuro de 1-metil-3-{3'-[3''-(4'''-(3''''-selenocianatopropoxi)fenil)tioureido]propil}-1*H*-imidazol-3-io (31)



Se empleó **148c** (89 mg, 0.18 mmol) y KSeCN (78 mg, 0.54 mmol), obteniéndose **31** como espuma de color rosa (12 mg, 13%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 8.98 (s, 1H, H-2), 7.67 (m, 1H, H-5), 7.58 (m, 1H, H-4), 7.17 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6.99 (m, 2H, H-3'', H-5''), 4.28 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=8.6$ Hz, H-1), 4.15 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.4$ Hz, H-1'''), 3.93 (s, 3H, CH_3), 3.65 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=2.4$ Hz, H-3), 3.31 (m, 2H, H-3'''), 2.37 (quint., 2H, H-2), 2.20 (quint., 2H, H-2''') ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CDCl_3) δ 182.8 (C=S), 158.7 (C-4'''), 132.2 (C-2), 134.8 (C-1'''), 124.4 (C-2'', C-6''), 124.9 (C-4), 123.7 (C-5), 116.5 (C-3'', C-5''), 104.3 (SeCN), 67.8 (C-1'''), 42.4 (C-1), 36.5 (C-3), 31.7 (CH_3), 30.7 (C-2'''), 27.4 (C-2) ppm.

9.8.4.8. Cloruro de 3,6-bis(dietilamino)-9-{2'-[*N*-(4''-(3'''-selenocianatopropoxi)fenil)carbamoil]fenil}xantilio (32)



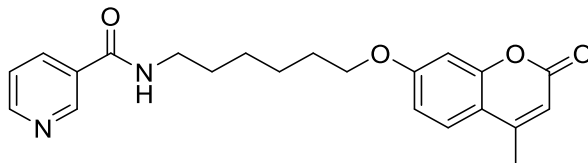
Se empleó **150** (69 mg, 0.10 mmol) y KSeCN (43 mg, 0.30 mmol) obteniéndose después de 2 h a **32** como espuma rosa (37.5 mg, 52%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (m, 1H, H-3'), 7.49 (m, 2H, H-6', H-1), 7.16 (m, 1H, H-4'/H-5'), 6.65-6.59 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6'', H-8), 6.32 (dd, 2H, $J_{2,1}=11.1$ Hz, $J_{2,4}=3.3$ Hz, H-2/H-7), 6.24 (d, 2H, $J_{4,2}=3.3$ Hz, H-4, H-5), 3.95 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.2$ Hz, H-1'''), 3.32 (m, 8H, H-15, H-15', H-17, H-17'), 3.21 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=8.4$ Hz, H-3'''), 2.30 (quint., 2H, $J_{\text{H,H}}=8.9$ Hz, H-2'''), 1.15 (t, 12H, $J_{\text{H,H}}=8.8$ Hz, H-16, H-16', H-18, H-18') ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (125.7 MHz, CD_3OD) δ 167.8 (C=O), 157.0 (C-11, C-12), 153.4 (C-4''),

153.1 (C-3/C-6), 148.9 (C-1''), 132.8 (C-1), 131.4 (C-9), 129.8 (C-8), 129.2, 129.0 (C-2'',C-6''), 128.3 (C-6'), 124.2 (C-4'), 123.4(C-3'), 114.6 (C-5''/C-3''), 108.2 (C-2/C-7), 106.5, 102.0 (SeCN), 97.9 (C-4/C-5), 67.5, 66.0 (C-1'''), 44.4 (C-15, C-15', C-17, C-17'), 30.2 (C-2'''), 26.5 (C-3'''), 12.7 (C-16, C-16', C-18, C-18') ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $C_{38}H_{41}N_3N^+O_3^{77}Se$ ($[M+H]^+$): 681.2317, encontrado: 681.2317.

9.8.5. Procedimiento general para la preparación amidas con potencial actividad inhibitoria de NAMPT

A una solución de ácido nicotínico (1.0 equiv.), amina **185a** ó **185b** (2.0 equiv.), EDCI (4.0 equiv.), y HOBt (1.5 equiv.) en DMF anhidra (3 mL) se adicionó DIPEA (1.5 equiv.). La reacción se mantuvo en agitación a t.a. hasta consumo de materia prima (~24h). Al finalizar la reacción, se concentró a sequedad y se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con NH_4Cl aq. sat. (2x10 mL), $NaHCO_3$ aq. sat. (2x10mL) y agua (1x15 mL). La fase orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (60:1→50:1).

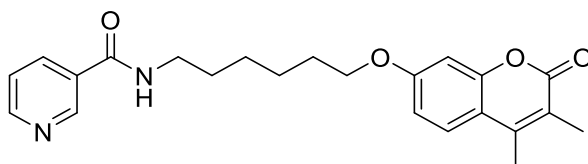
9.8.5.1. *N*-(6-[(4'-metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)oxi]hexil)nicotinamida (**33**)



Se empleó ácido nicotínico (17 mg, 0.14 mmol), **185a** (75 mg, 0.27 mmol), EDCI (104 mg, 0.54 mmol), HOBt (28 mg, 0.20 mmol) y DIPEA (26 mg, 0.20 mmol) obteniéndose **33** como espuma amarilla clara (20 mg, 73%). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.96 (dd, 1H, $J_{2'',6''}=1.7$ Hz, H-2''), 8.70 (dd, 1H, $J_{6'',4''}=1.6$ Hz, $J_{6'',5''}=4.8$ Hz, H-6''), 8.11 (ddd, 1H, $J_{4'',5''}=9.7$ Hz, $J_{4'',2''}=1.8$ Hz, $J_{4'',6''}=2.2$ Hz, H-4''), 7.47 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.8$ Hz, H-5'), 7.37 (m, 1H, H-5''), 6.83 (dd, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, $J_{6',5'}=8.8$ Hz, H-6'), 6.77 (d, 1H, $J_{8',6'}=2.5$ Hz, H-8'), 6.37 (sa, 1H, NH), 6.11 (ca, 1H, $J_{H,H}=1.3$ Hz, H-3'), 4.00 (t, 2H, $J_{H,H}=6.4$ Hz, H-6), 3.49 (c, 2H, $J_{H,H}=6.9$ Hz H-1), 2.38 (d, 3H, $J_{H,H}=1.3$ Hz, CH_3), 1.83 (m, 2H, H-5), 1.68 (m, 2H, H-2), 1.50 (m, 4H, H-3, H-4) ppm. ^{13}C -RMN (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8 (OC-NH), 162.3 (C-2'), 161.5 (C-7'), 155.4 (C-8a'),

152.8 (C-2''), 152.3 (C-6''), 147.9 (C-4'), 135.2 (C-4''), 130.6 (C-3''), 125.6 (C-5'), 123.7 (C-5''), 113.6 (C-3'), 112.8 (C-4a'), 112.0 (C-6'), 101.5 (C-8'), 68.5 (C-6), 40.2 (C-1), 29.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 26.8 (CH₂), 25.8 (CH₂), 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₂H₂₅N₂O₄ ([M+H]⁺): 391.1809, encontrado: 381.1818.

9.8.5.2. N-(6-[(3',4'-dimetil-2'-oxo-2'-H-cromen-7'-il)oxi]hexil)nicotinamida (**34**)

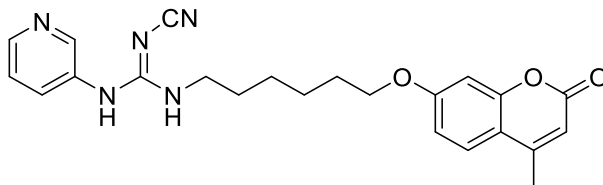


Se empleó ácido nicotínico (10 mg, 0.08 mmol), **185b** (47 mg, 0.16 mmol), EDCI (62 mg, 0.33 mmol), HOBT (16 mg, 0.12 mmol) y DIPEA (16 mg, 0.12 mmol) obteniéndose **34** como espuma amarilla clara (27 mg, 84%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.96 (dd, 1H, *J*_{2'',6''}=1.7 Hz, H-2''), 8.71 (dd, 1H, *J*_{6'',4''}=1.8 Hz, *J*_{6'',5''}=4.8 Hz, H-6''), 8.11 (ddd, 1H, *J*_{4'',5''}=8.0 Hz, *J*_{4'',2''}=1.8 Hz, *J*_{4'',6''}=2.0 Hz, H-4''), 7.85 (d, 1H, *J*_{5',6'}=8.9 Hz, H-5'), 7.38 (m, 1H, H-5''), 6.82 (dd, 1H, *J*_{6',8'}=2.5 Hz, *J*_{6',5'}=8.9 Hz, H-6'), 6.76 (d, 1H, *J*_{8',6'}=2.5 Hz, H-8'), 6.32 (sa, 1H, NH), 3.99 (t, 2H, *J*_{H,H}=6.3 Hz, H-6), 3.49 (c, 2H, *J*_{H,H}=7.0 Hz, H-1), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 1.83 (m, 2H, H-5), 1.68 (m, 2H, H-2), 1.51 (m, 4H, H-3, H-4) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 165.8 (OC-NH), 162.7 (C-2'), 161.1 (C-7'), 153.7 (C-8a'), 152.3 (C-2''), 147.9 (C-4'), 146.5 (C-6''), 135.2 (C-4''), 130.6 (C-3''), 125.4 (C-5'), 123.7 (C-5''), 119.0 (C-3'), 114.2 (C-4a'), 112.6 (C-6'), 101.2 (C-8'), 68.4 (C-6), 40.2 (C-1), 29.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 26.8 (CH₂), 25.9 (CH₂), 15.2, 13.3 (CH₃-3', CH₃-4') ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₃H₂₆N₂O₄ ([M+H]⁺): 395.1975, encontrado: 395.1975.

9.8.6. Método general para la preparación de cianoguanidinas con potencial actividad inhibitoria de NAMPT

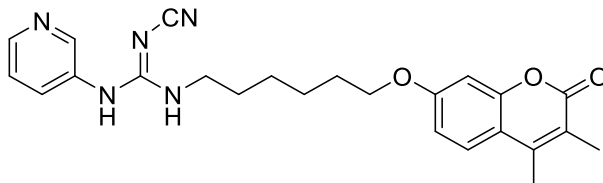
A una solución del carbamimidato **186a** ó **186b** (1.0 equiv.) en MeCN–DMF anhidros (3:1, 8mL), se le adicionó la amina correspondiente (1.3 equiv.), TEA (2.8 equiv.) y DMAP (cat.) y se agitó a 80 °C bajo atmósfera inerte durante una noche (~16 h). Al finalizar la reacción, se concentró a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna con una mezcla de AcOEt–MeOH 80:1→40:1.

9.8.6.1. N-Ciano-N'-(6-([4'-metil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il]oxi)hexil)-N''-piridin-3-il guanidina (35)



Se empleó **185a** (57 mg, 0.21 mmol), **186a** (38 mg, 0.16 mmol) y TEA (45 mg, 0.45 mmol) obteniéndose **35** como espuma blanca (50 mg, 75%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (dd, 1H, $J_{2'',4''}=2.3$ H-2''), 8.35 (da, 1H, $J_{6'',5''}=4.7$ Hz, H-6''), 7.67 (da, 1H, $J_{5',6'}=8.1$ Hz, H-5'), 7.44 (d, 1H, $J_{5',4''}=8.8$ Hz, H-5'), 7.27 (ddd, 1H, $J_{4'',6''}=4.8$ Hz, $J_{5'',4''}=8.5$ Hz, H-4''), 6.81 (dd, 1H, $J_{6',5'}=8.8$ Hz, $J_{6',8'}=2.4$ Hz, H-6'), 6.71 (d, 1H, $J_{6',8'}=2.4$ Hz, H-8'), 6.06 (ca, 1H, $J_{\text{H,H}}=1.3$ Hz, H-3'), 5.78 (sa, 1H, NH), 3.96 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=6.3$ Hz, H-1), 3.32 (m, 2H, H-6), 2.35 (d, 3H, $J_{\text{H,H}}=1.3$ Hz, CH_3), 1.77 (m, 2H, H-5), 1.59 (m, 2H, H-2), 1.42 (m, 2H, H-3, H-4) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ 162.3 (C=O), 161.6 (C-7'), 158.6 (C=N), 155.3 (C-8a'), 153.1 (C-4'), 147.1 (C-2''), 145.9 (C-6''), 133.6 (C-3''), 132.3 (C-4''), 125.7 (C-5'), 124.2 (C-5'') 117.8 (CN), 113.5 (C-4a'), 112.8 (C-6'), 101.4 (C-8'), 68.4 (C-6), 42.3 (C-1), 29.3 (CH_2), 28.9 (CH_2), 26.5 (CH_2), 25.7 (CH_2), 18.8 (CH_3) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 420.2030, encontrado: 420.2028.

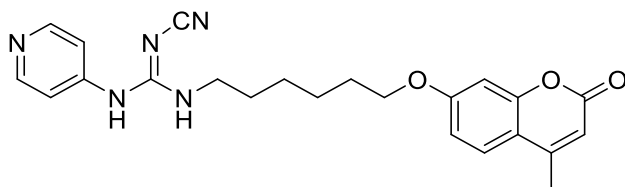
9.8.6.2. N-Ciano-N'-(6-([3',4'-dimetil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il]oxi)hexil)-N''-piridin-3-ilguanidina (36)



Se empleó **185b** (44 mg, 0.15 mmol), **186a** (28 mg, 0.11 mmol) y TEA (33 mg, 0.33 mmol) obteniéndose **36** como espuma blanca (30 mg, 59%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (dd, 1H, $J_{2'',4''}=2.4$ H-2''), 8.50 (dd, 1H, $J_{6'',5''}=8.5$ Hz, $J_{6'',4''}=1.2$ Hz, H-6''), 7.72 (sa, 1H, NH), 7.66 (da, 1H, $J_{5',6'}=8.5$ Hz, H-5''), 7.47 (d, 1H, $J_{5'',4''}=8.9$ Hz, H-5'), 7.36 (ddd, 1H, $J_{4'',6''}=4.8$ Hz, $J_{5'',4''}=8.1$ Hz, H-4''), 6.82 (dd, 1H, $J_{6',5'}=8.9$

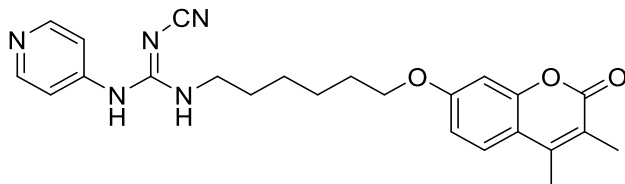
Hz, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, H-6'), 6.74 (d, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, H-8'), 5.17 (sa, 1H, NH), 3.97 (t, 2H, $J_{H,H}=6.3$ Hz, H-1), 3.33 (m, 2H, H-6), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 1.80 (m, 2H, H-5), 1.60 (m, 2H, H-2), 1.50 (m, 2H, H-3) 1.40 (m, 2H, H-4) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 162.7 (C=O), 161.1 (C-7), 158.7 (C=N), 153.7 (C-8a'), 148.2 (C-4'), 146.6 (C-2''), 132.8 (C-6''), 125.4 (C-3''), 124.5 (C-4''), 119.0 (CN), 114.3 (C-4a'), 112.6 (C-6'), 101.2 (C-8'), 68.3 (C-6), 42.3 (C-1), 29.3 (CH₂), 29.0 (CH₂), 26.6 (CH₂), 25.8 (CH₂), 15.2, 13.3 (CH₃-3', CH₃-4') ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₄H₂₈N₅O₃ ([M+H]⁺): 434.2187, encontrado: 434.2195.

9.8.6.3. *N*-Ciano-*N'*-(6-([4'-metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il]oxi)hexil)-*N''*-piridin-4-ilguanidina (37)



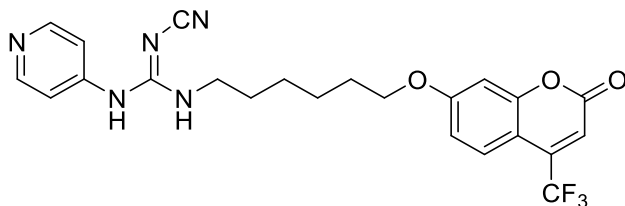
Se empleó **185a** (55 mg, 0.20 mmol), **186b** (37 mg, 0.15 mmol) y TEA (44 mg, 0.43 mmol) obteniéndose **37** como espuma blanca (54 mg, 83%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, 2H, $J_{2'',3''}=6.3$ Hz, H-2'', H-6''), 7.46 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.8$ Hz, H-5'), 7.23 (d, 2H, $J_{3',2'}=5.3$ Hz, H-3'', H-5''), 6.81 (dd, 1H, $J_{6',8'}=2.4$ Hz, $J_{6',5'}=8.8$ Hz, H-6'), 6.73 (d, 1H, $J_{6',8'}=2.4$ Hz, H-8'), 6.07 (ca, 1H, $J_{H,H}=1.0$ Hz, H-3'), 3.97 (t, 2H, $J_{H,H}=2.4$ Hz, H-1), 3.37 (t, 2H, $J_{H,H}=2.4$ Hz, H-6), 2.36 (d, 3H, $J_{H,H}=1.0$ Hz, CH₃), 1.78 (m, 2H, H-5), 1.62 (m, 2H, H-2), 1.44 (m, 4H, H-3, H-4) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-d₆) δ 161.8 (C=O), 160.2 (C=N), 157.1 (C-7'), 154.8 (C-8a'), 153.4 (C-2''), 150.2 (C-NH), 145.8 (C-3''), 126.4 (C-5'), 116.4 (C-4'') 114.6 (C-3'), 113.0 (C-4a'), 112.4 (C-4'), 111.0 (C-6'), 101.1 (C-8'), 68.2 (C-6), 41.7 (C-1), 28.6 (CH₂), 28.3 (CH₂), 25.9 (CH₂), 25.1 (CH₂), 18.1 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₃H₂₆N₅O₃ ([M+H]⁺): 420.2030, encontrado: 420.2027.

9.8.6.4. N-Ciano-N'-(6-([3',4'-dimetil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il]oxi)hexil)-N''-piridin-4-ilguanidina (38)



Se empleó **185b** (46 mg, 0.16 mmol), **186b** (29 mg, 0.12 mmol) y TEA (35 mg, 0.34 mmol) obteniéndose **38** como espuma blanca (45 mg, 85%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, MeOD) δ 8.60 (d, 2H, $J_{2'',3''}=6.2$ Hz, H-2'', H-6''), 7.82 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.8$ Hz, H-5'), 7.58 (d, 2H, $J_{3',2'}=5.2$ Hz, H-3'', H-5''), 7.14 (dd, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, $J_{6',5'}=8.8$ Hz, H-6'), 7.05 (d, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, H-8'), 4.29 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=6.3$ Hz, H-1), 3.68 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=7.2$ Hz, H-6), 2.65 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.10 (m, 2H, H-5), 1.94 (m, 2H, H-2), 1.77 (m, 4H, H-3, H-4) ppm. $^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, MeOD) δ 164.0 (C=O), 162.0 (C=N), 154.0 (C-7'), 153.4 (C-8a'), 150.0 (C-2''), 148.4 (C-NH), 147.7 (C-3''), 126.2 (C-5'), 118.9 (C-3'), 115.8 (C-4''), 114.7 (C-4a'), 114.4 (C-4), 113.3 (C-6'), 101.5 (C-8), 68.9 (C-6), 42.9 (C-1), 30.2 (CH₂), 29.8 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.2 (CH₂), 15.3, 13.1 (CH₃-3', CH₃-4') ppm. HRESI-MS m/z calcd. para C₂₄H₂₈O₃N₅ ([M+H]⁺): 434.2187, encontrado: 434.2186.

9.8.6.5. N-Ciano-N'-(6-([4'-trifluorometil-2'-oxo-2'H-cromen-7'-il]oxi)hexil)-N''-piridin-4-ilguanidina (39)



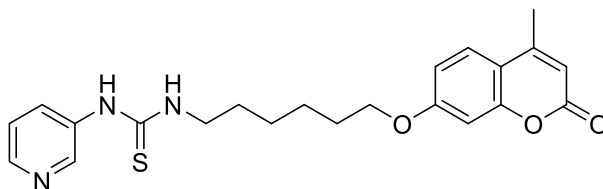
Se empleó **185c** (53 mg, 0.16 mmol), **186b** (29 mg, 0.12 mmol) y TEA (35 mg, 0.34 mmol) obteniéndose **39** como espuma amarillo claro (45 mg, 76%). $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (d, 2H, $J_{2'',3''}=5.9$ Hz, H-2'', H-6''), 7.61 (d, 1H, $J_{5',6'}=9.0$ Hz, H-5'), 7.20 (d, 2H, $J_{3',2'}=4.9$ Hz, H-3'', H-5''), 6.90 (dd, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, $J_{6',5'}=9.0$ Hz, H-6'), 6.83 (d, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, H-8'), 6.60 (s, 1H, H-3'), 5.58 (sa, 1H, NH), 4.04 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=6.3$ Hz, H-1), 3.38 (m, 2H, H-6), 1.84 (m, 2H, H-5), 1.66 (m,

2H, H-2), 1.53 (m, 2H, H-3) 1.44 (m, 2H, H-4) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 163.1 (C=O), 159.7 (C=N), 157.7 (C-7'), 156.5 (C-2''), 151.4 (C-NH), 142.2 (C-3''), 141.8 (c, $^2J_{\text{CF}}=32.7$ Hz, C-4'), 126.5 (C-5'), 121.7 (c, $^1J_{\text{CF}}=275.7$ Hz, CF_3), 117.0 (C-4''), 116.2 (C-4a'), 113.9 (C-2'), 112.2 (c, $^3J_{\text{CF}}=5.7$ Hz, C-3'), 107.1 (C-6') 102.0 (C-8'), 68.9 (C-6), 42.5 (C-1), 29.2 (CH_2), 28.9 (CH_2), 26.6 (CH_2), 25.7 (CH_2) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 474.1748, encontrado: 474.1754.

9.8.7. Método general para la preparación de tioureas con potencial actividad inhibitoria de NAMPT

A una solución de **185a**, **185b** ó **185c** (1.0 equiv.) en THF (5 mL), se adicionó 3-piridinil isotiocianato (1.5 equiv.) y se reflujoó durante 4 h. Al finalizar la reacción, se concentró a sequedad y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (90:1→80:1).

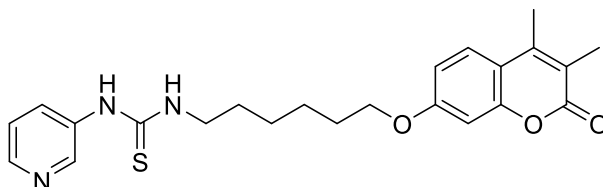
9.8.7.1. *N*-(6-[(4'-Metil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)oxi]hexil)-*N'*-(piridin-3-il)tiourea (40)



Se empleó **185a** (34 mg, 0.12 mmol) y 3-piridinil isotiocianato (25 mg, 0.19 mmol) obteniéndose **40** como espuma blanca (14 mg, 27%). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.53 (dd, 1H, $J_{2'',4''}=2.5$ Hz, H-2''), 8.50 (dd, 1H, $J_{6'',4''}=1.1$ Hz, $J_{6'',5''}=4.7$ Hz, H-6''), 7.88 (sa, 1H, NH), 7.71 (ddd, 1H, $J_{5'',6''}=6.8$ Hz, H-4''), 7.48 (d, 1H, $J_{5',6'}=8.8$ Hz, H-5'), 7.36 (m, 1H, H-5''), 6.84 (dd, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, $J_{6',5'}=8.8$ Hz, H-6'), 6.77 (d, 1H, $J_{8',6'}=2.5$ Hz, H-8'), 6.16 (sa, 1H, NH), 6.12 (ca, 1H, $J_{\text{H,H}}=1.2$ Hz, H-3'), 4.99 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=6.5$ Hz, H-6), 3.49 (m, 2H, H-1), 2.39 (d, 3H, $J_{\text{H,H}}=1.2$ Hz, CH_3), 1.81 (m, 2H, H-5), 1.64 (m, 2H, H-2), 1.51 (m, 2H, H-4), 1.43 (m, 2H, H-3) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 181.4 (C=S), 162.3 (C=O), 161.7 (C-7'), 155.4 (C-8a'), 153.0 (C-4'), 147.9 (C-6''), 146.6 (C-2''), 132.7 (C-3''), 125.7 (C-4''), 124.4 (C-5'), 113.6 (C-

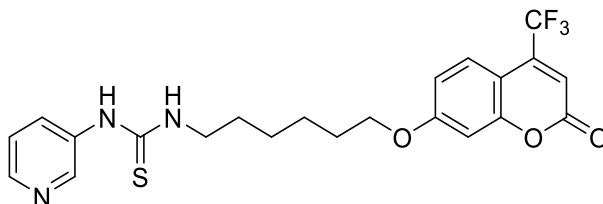
5''), 112.9 (C-3'), 111.9 (C-6'), 101.4 (C-8'), 68.5 (C-6), 45.5 (C-1), 29.0 (CH₂), 28.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 25.5 (CH₂), 18.8 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₂H₂₆N₃O₃S ([M+H]⁺): 412.1689, encontrado: 412.1701.

9.8.7.2. *N*-(6-[(3',4'-Dimetil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)oxi]hexil)-*N'*-(piridin-3-il)tiourea (41)



Se empleó **185b** (59 mg, 0.20 mmol) y 3-piridinil isotiocinonato (42 mg, 0.31 mmol) obteniéndose **41** como espuma blanca (14.8 mg, 17%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (dd, 1H, *J*_{2'',6''}=2.4 Hz, H-2''), 8.46 (dd, 1H, *J*_{6'',4''}=1.3 Hz, *J*_{6'',5''}=4.7 Hz, H-6''), 8.13 (sa, 1H, NH), 7.79 (da, 1H, *J*_{5'',6''}=8.2 Hz, H-5''), 7.63 (dd, 1H, *J*_{5',6'}=8.8 Hz, H-5'), 7.33 (m, 1H, H-5''), 6.82 (dd, 1H, *J*_{6',8'}=2.5 Hz, *J*_{6',5'}=8.9 Hz, H-6'), 6.77 (d, 1H, *J*_{8',6'}=2.5 Hz, H-8'), 6.34 (sa, 1H, NH), 3.97 (t, 2H, *J*_{H,H}=6.4 Hz, H-6), 3.64 (m, 2H, H-1), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, CH₃), 1.79 (m, 2H, H-5), 1.65 (m, 2H, H-2), 1.46 (m, 4H, H-4 y H-3) ppm. ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) δ 181.4 (C=S), 162.8 (C=O), 161.1 (C-7'), 153.4 (C-8a'), 146.9 (C-4'), 146.8 (C-6''), 145.8 (C-2''), 134.8 (C-3''), 125.3 (C-4''), 123.9 (C-5'), 118.6 (C-5''), 114.0 (C-3'), 112.6 (C-6'), 101.0 (C-8'), 68.3 (C-6), 45.1 (C-1), 29.8 (C-2), 28.9 (C-5), 26.6 (C-3), 25.7 (C-4), 15.2 (CH₃), 13.3 (CH₃) ppm. HRESI-MS *m/z* calcd. para C₂₃H₂₈N₃O₃S ([M+H]⁺): 426.1846, encontrado: 426.1855.

9.8.7.3. *N*-(6-[(4'-Trifluorometil-2'-oxo-2'*H*-cromen-7'-il)oxi]hexil)-*N'*-(piridin-3-il)tiourea (42)



Se empleó **185c** (33 mg, 0.10 mmol) y 3-piridinil isotiocinonato (20 mg, 0.15 mmol) obteniéndose **42** como espuma amarilla (19 mg, 40%). ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 8.53 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.73 (sa, 1H, NH), 7.65 (da, 1H, $J_{5'',6''}=5.2$ Hz, H-4''), 7.38 (m, 1H, H-5''), 6.90 (dd, 1H, $J_{6',8'}=2.5$ Hz, $J_{6',5'}=9.0$ Hz, H-6'), 6.77 (d, 1H, $J_{8',6'}=2.5$ Hz, H-8'), 6.60 (s, 1H, H-3), 6.01 (sa, 1H, NH), 4.02 (t, 2H, $J_{\text{H,H}}=6.4$ Hz, H-6), 3.65 (m, 2H, H-1), 1.82 (m, 2H, H-5), 1.64 (m, 2H, H-2), 1.52 (m, 2H, H-4), 1.42 (m, 2H, H-3) ppm. ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) δ 181.4 (C=S), 163.2 (C-7'), 159.7 (C=O), 156.5 (C-8a'), 148.2 (C-6''), 146.7 (C-2''), 141.8 (c, 1C, $^2J_{\text{CF}}=33.1$ Hz, C-4'), 132.9 (C-3''), 126.5 (C-4''), 124.6 (C-5'), 121.7 (c, 1C, $^1J_{\text{CF}}=272.1$ Hz, CF_3), 118.5 (C-5''), 113.9 (C-4a), 112.2 (c, 1C, $^3J_{\text{CF}}=5.7$ Hz, C-3'), 107.1 (C-6'), 102.0 (C-8'), 68.7 (C-6), 45.6 (C-1), 29.0 (CH_2), 28.9 (CH_2), 26.7 (CH_2), 25.7 (CH_2) ppm. HRESI-MS m/z calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 466.1407, encontrado: 466.1419.

10. ANEXO

Espectroscopía de RMN

10. ANEXO

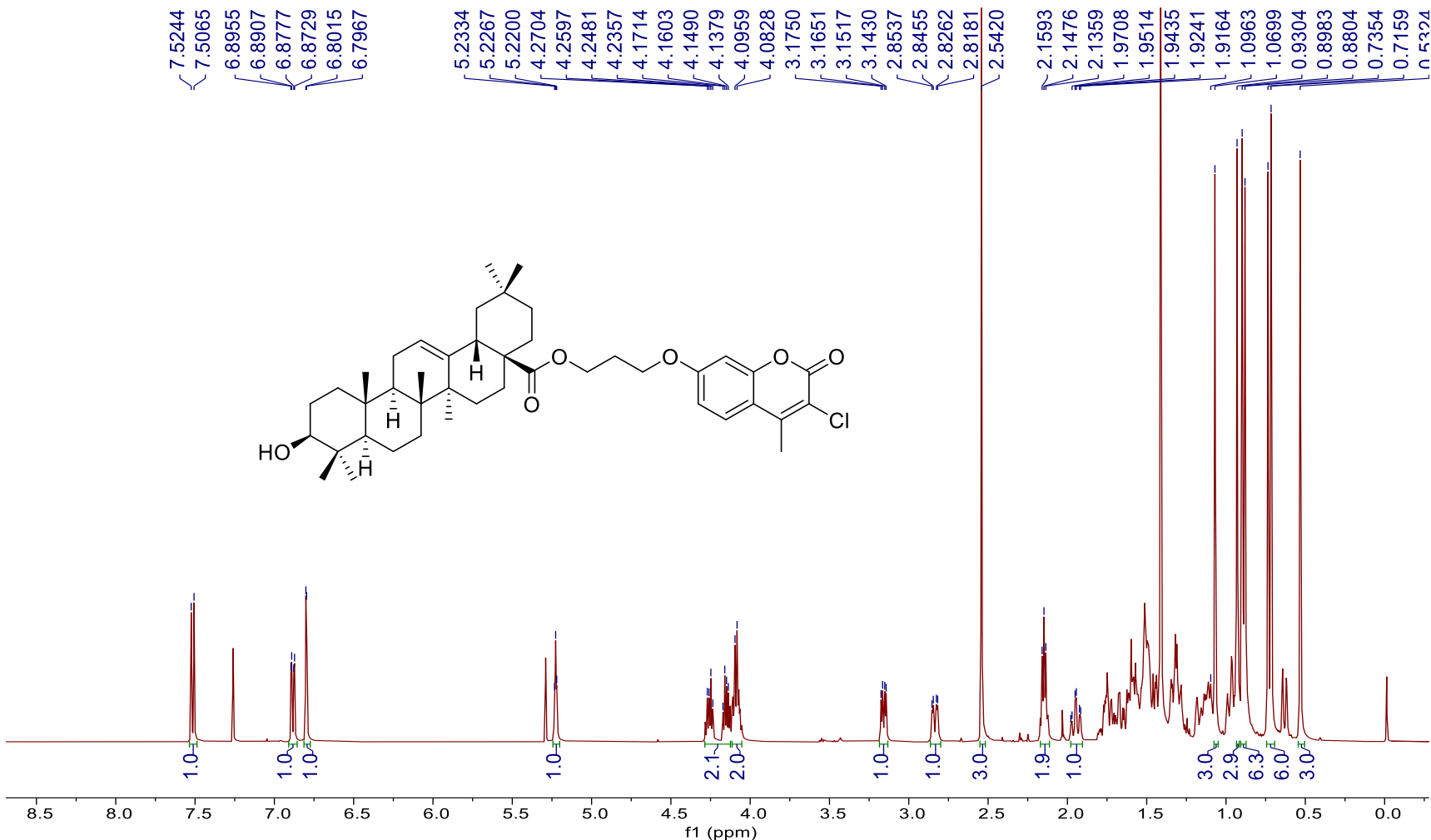


Figura 10.1. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 1.

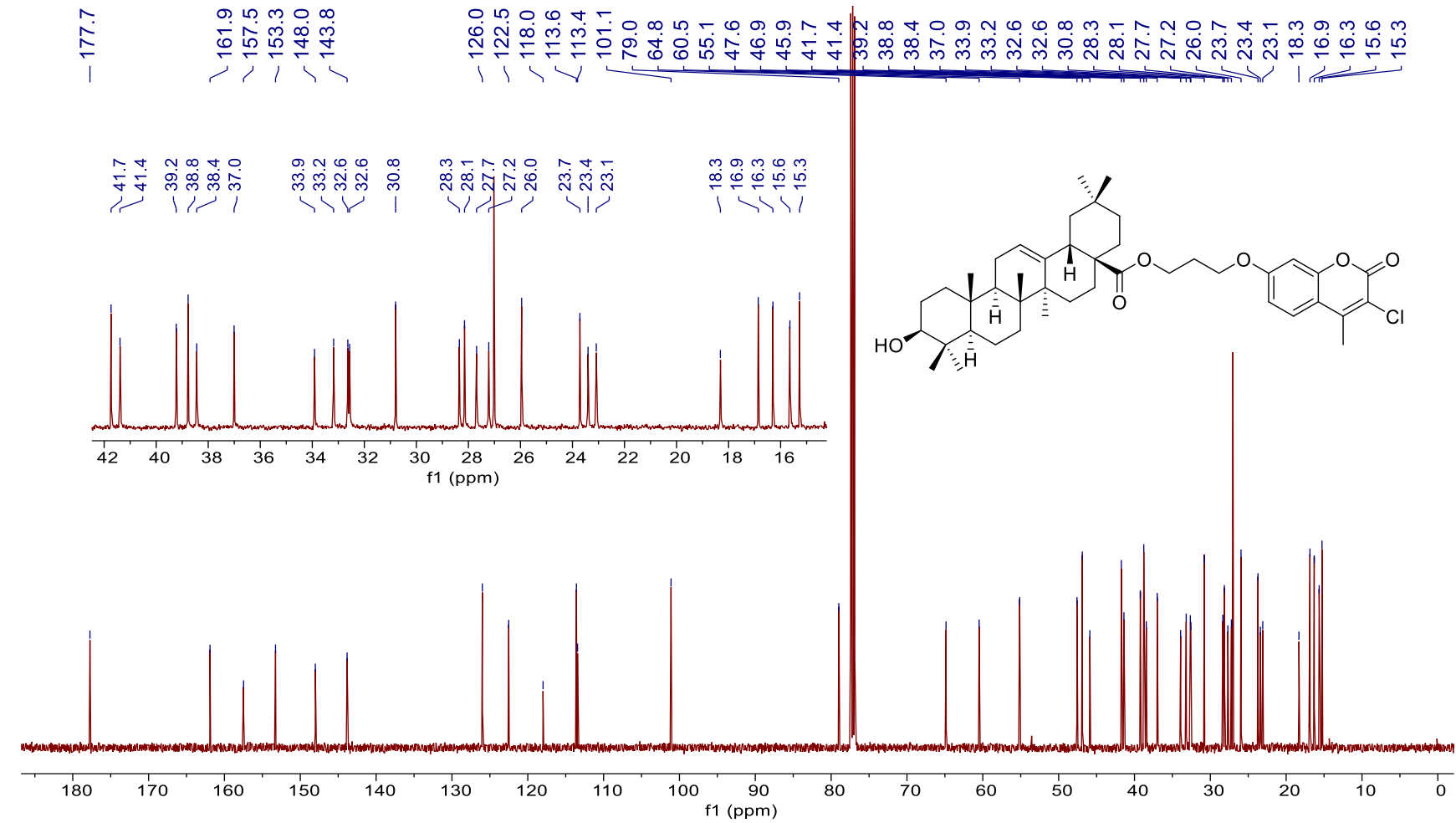


Figura 10.2. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 1.

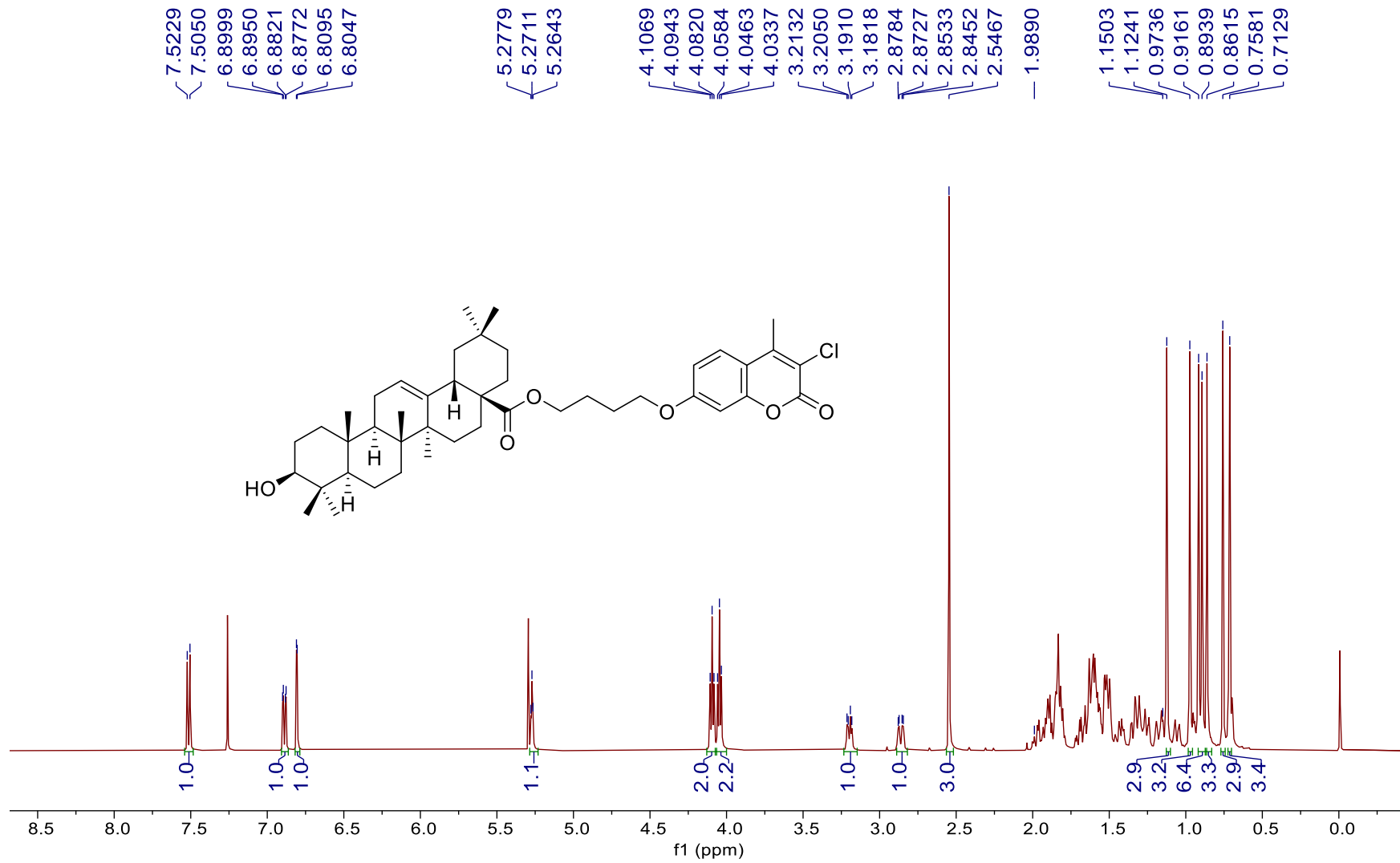


Figura 10.3. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 2.

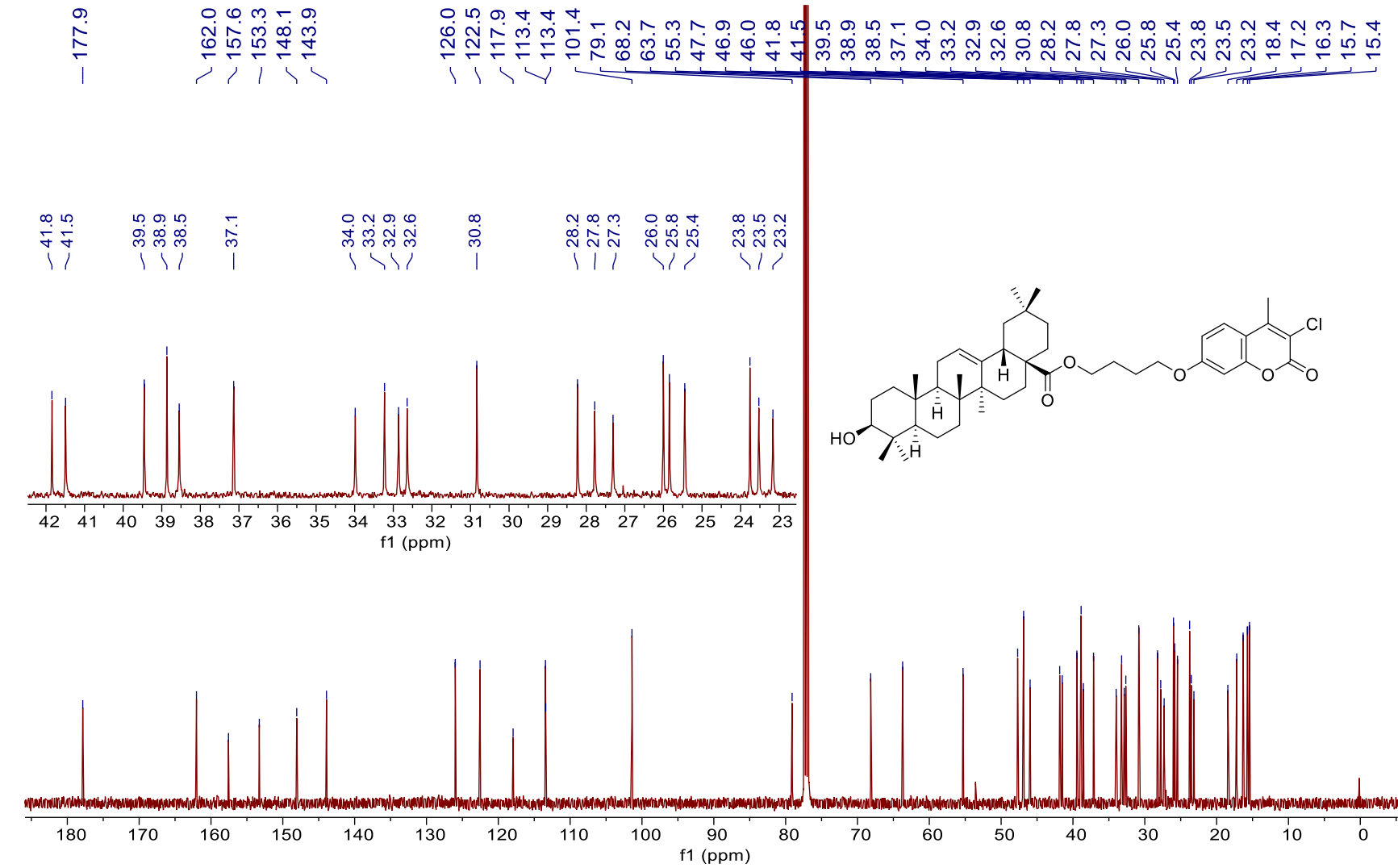


Figura 10.4. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 2.

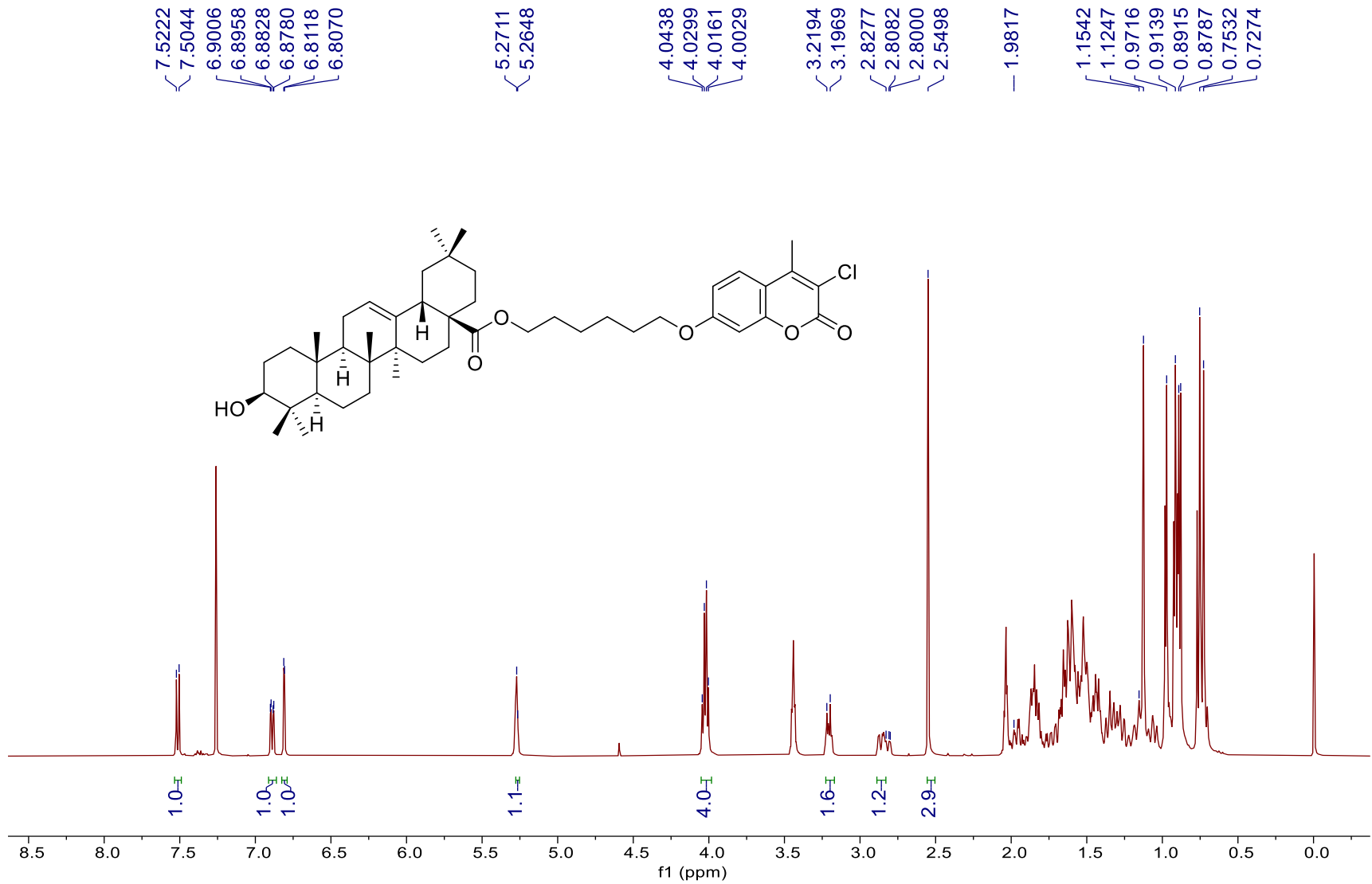


Figura 10.5. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 3.

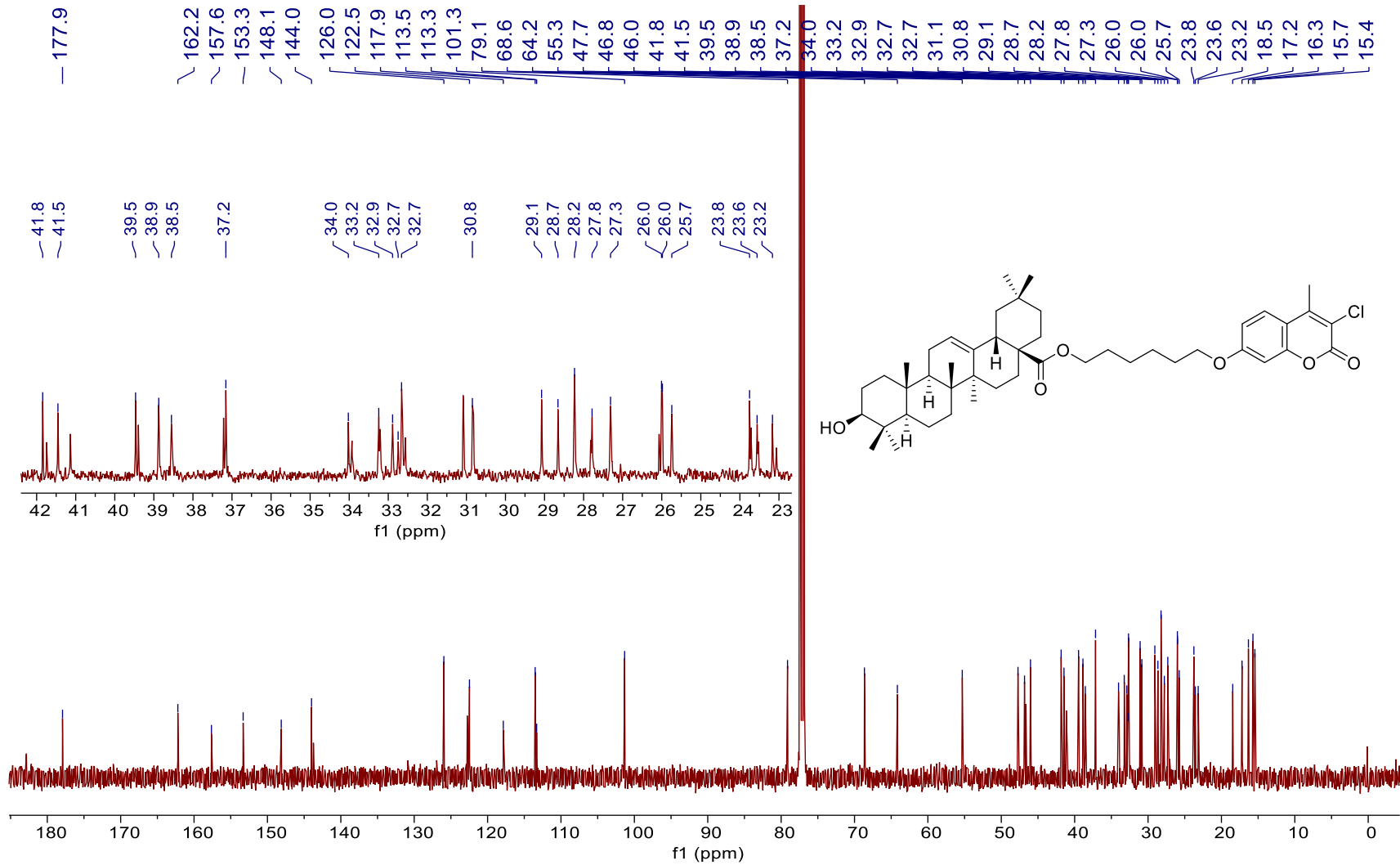


Figura 10.6. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **3**.

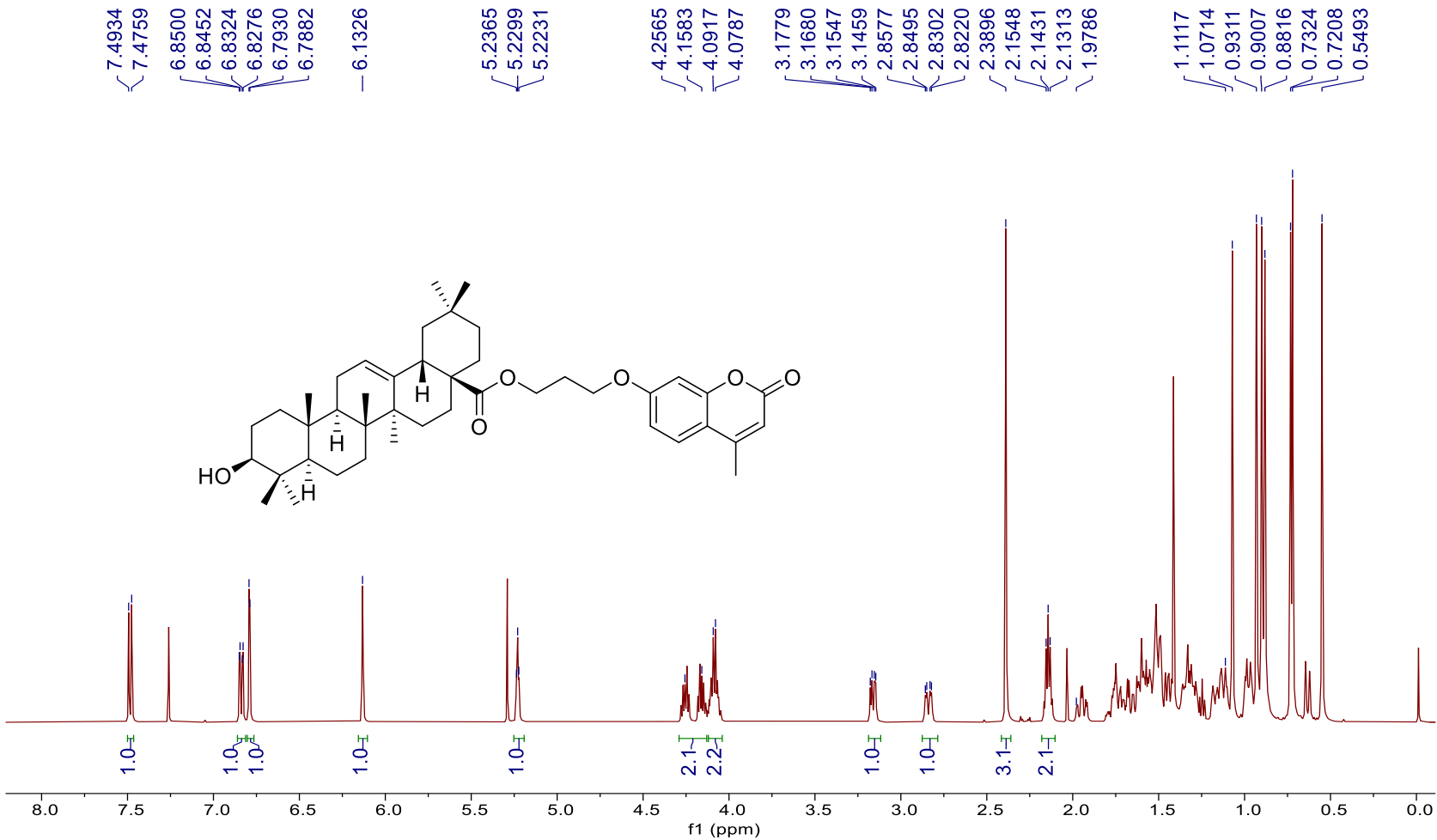


Figura 10.7. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 4.

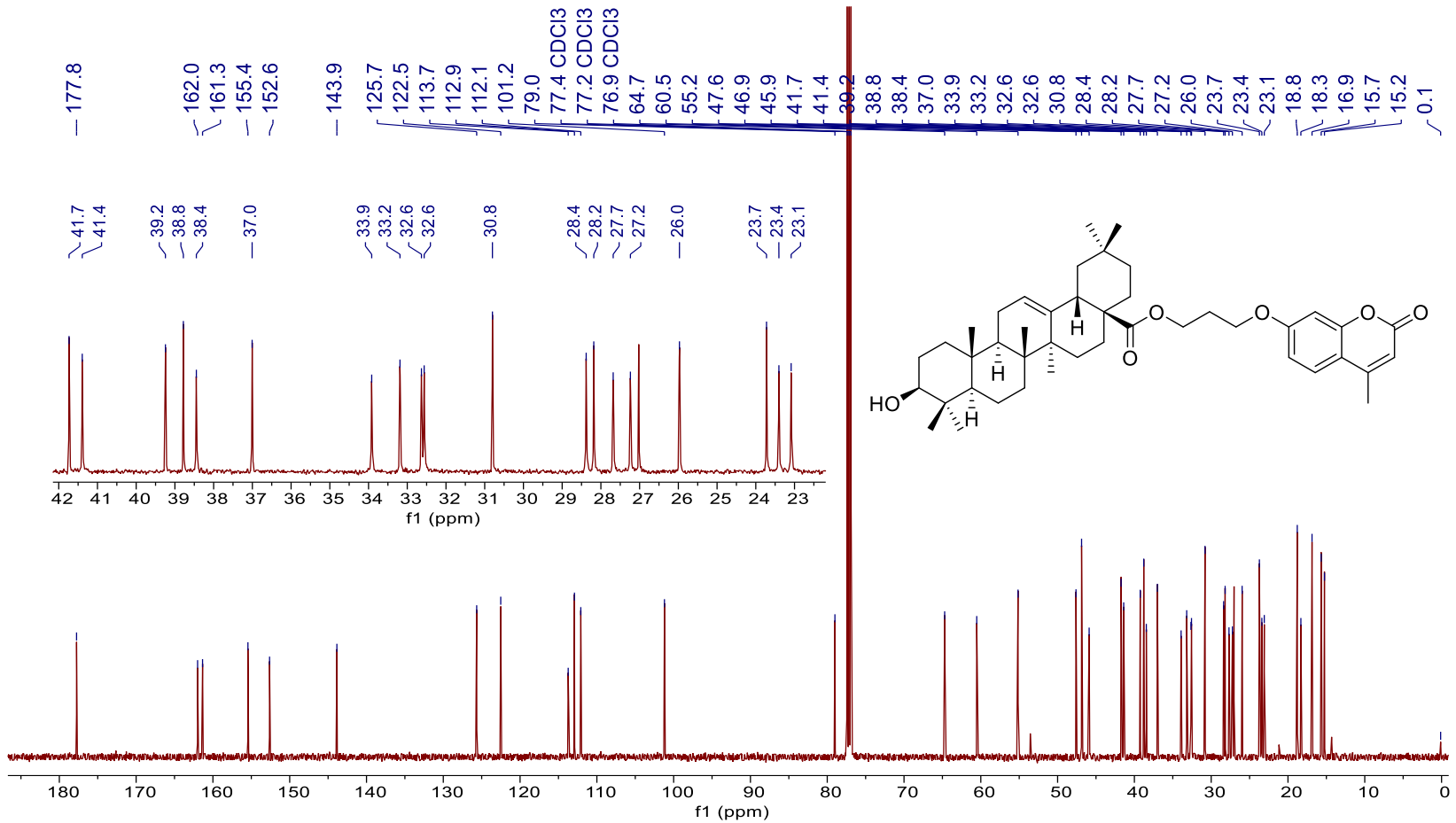


Figura 10.8. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 4.

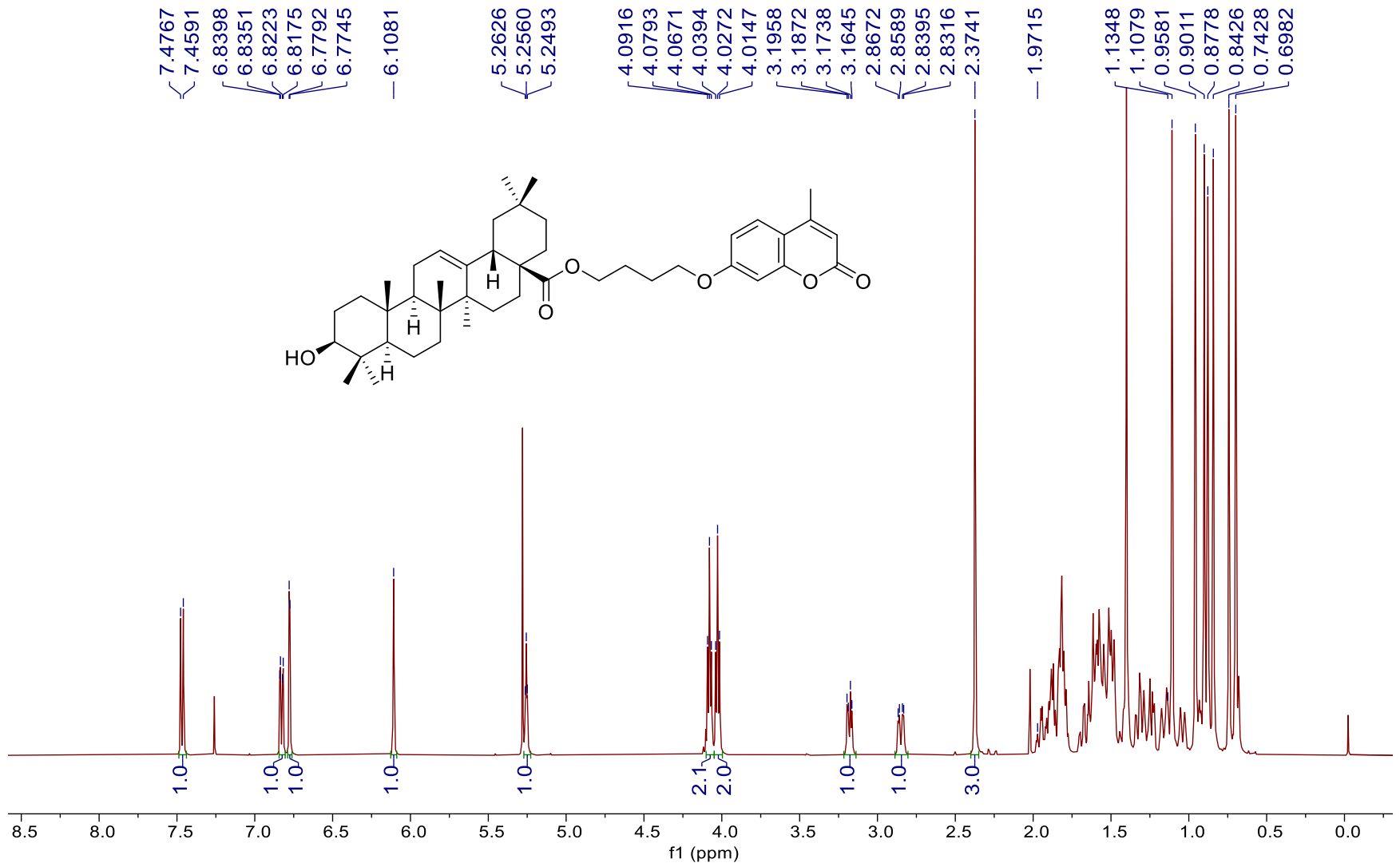


Figura 10.9. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 5.

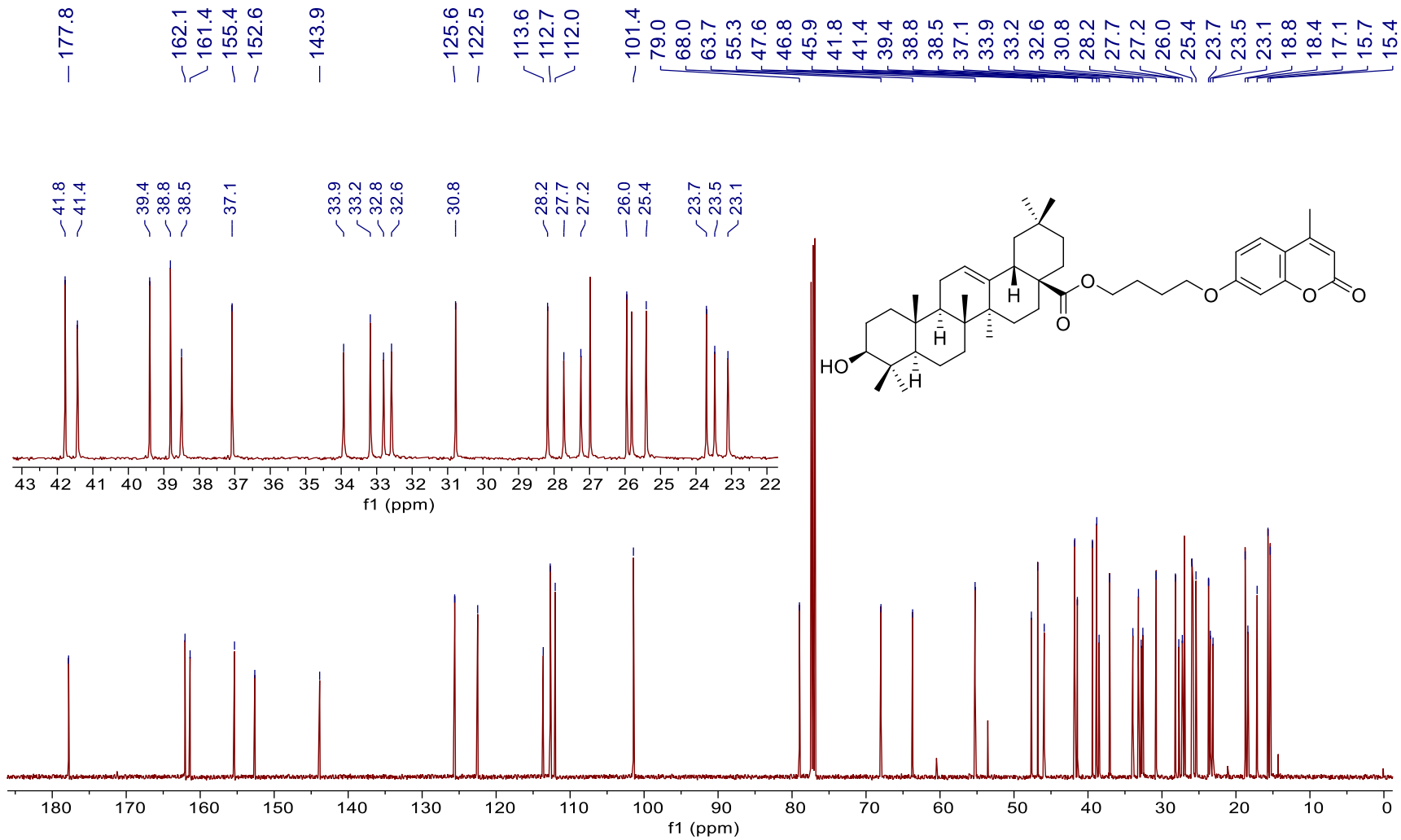


Figura 10.10. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 5.

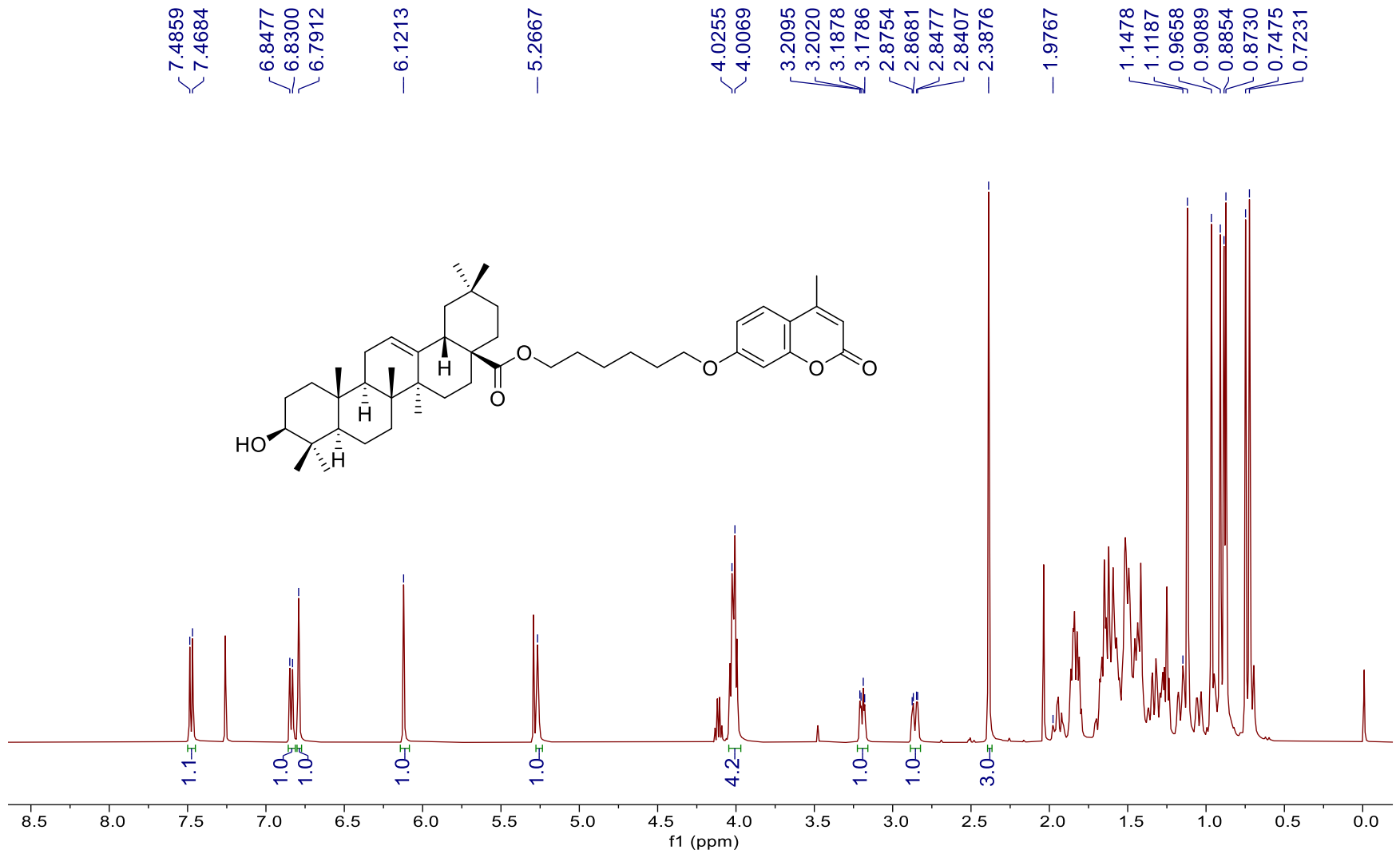


Figura 10.11. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 6.

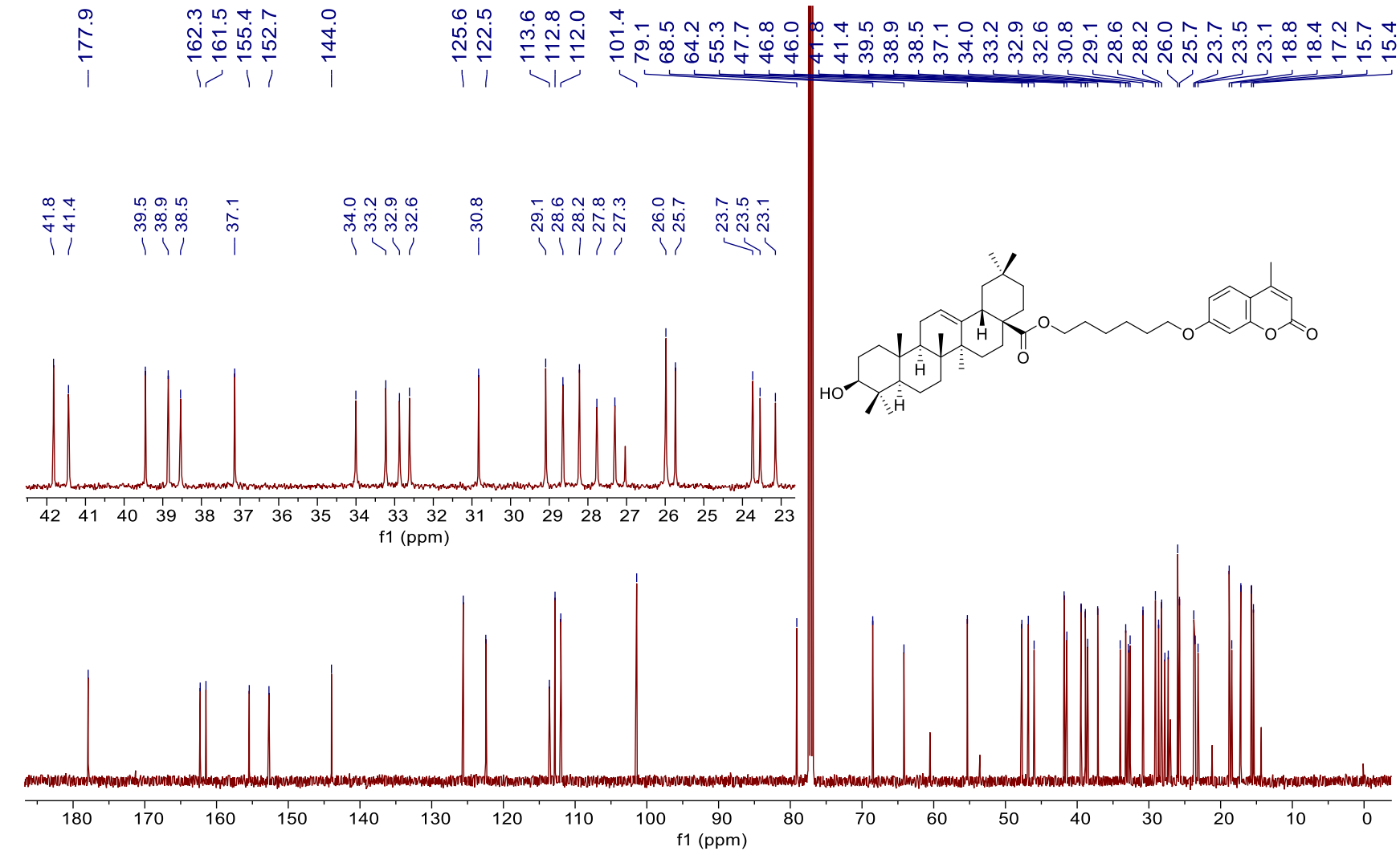


Figura 10.12. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 6.

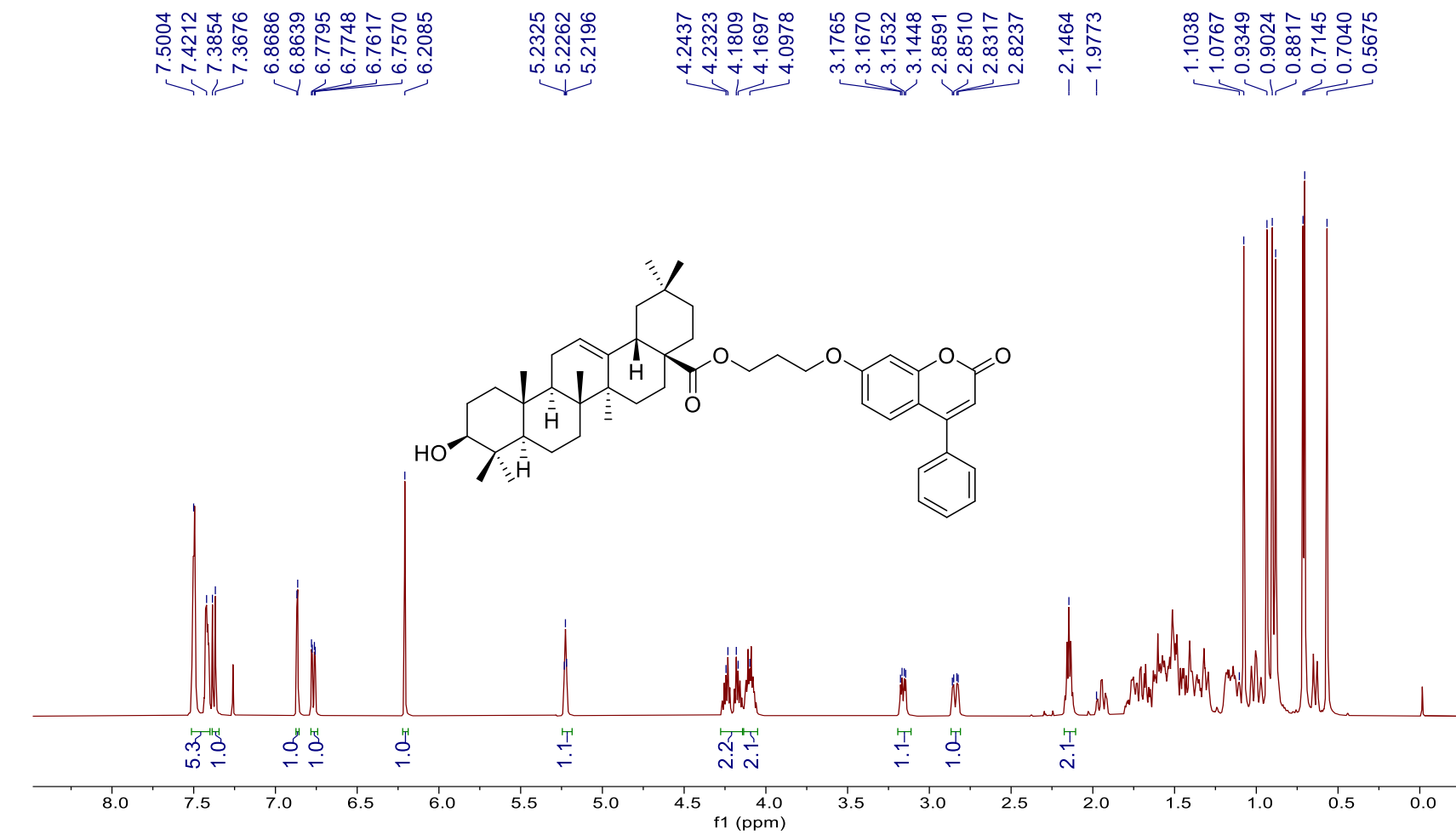


Figura 10.13. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 7.

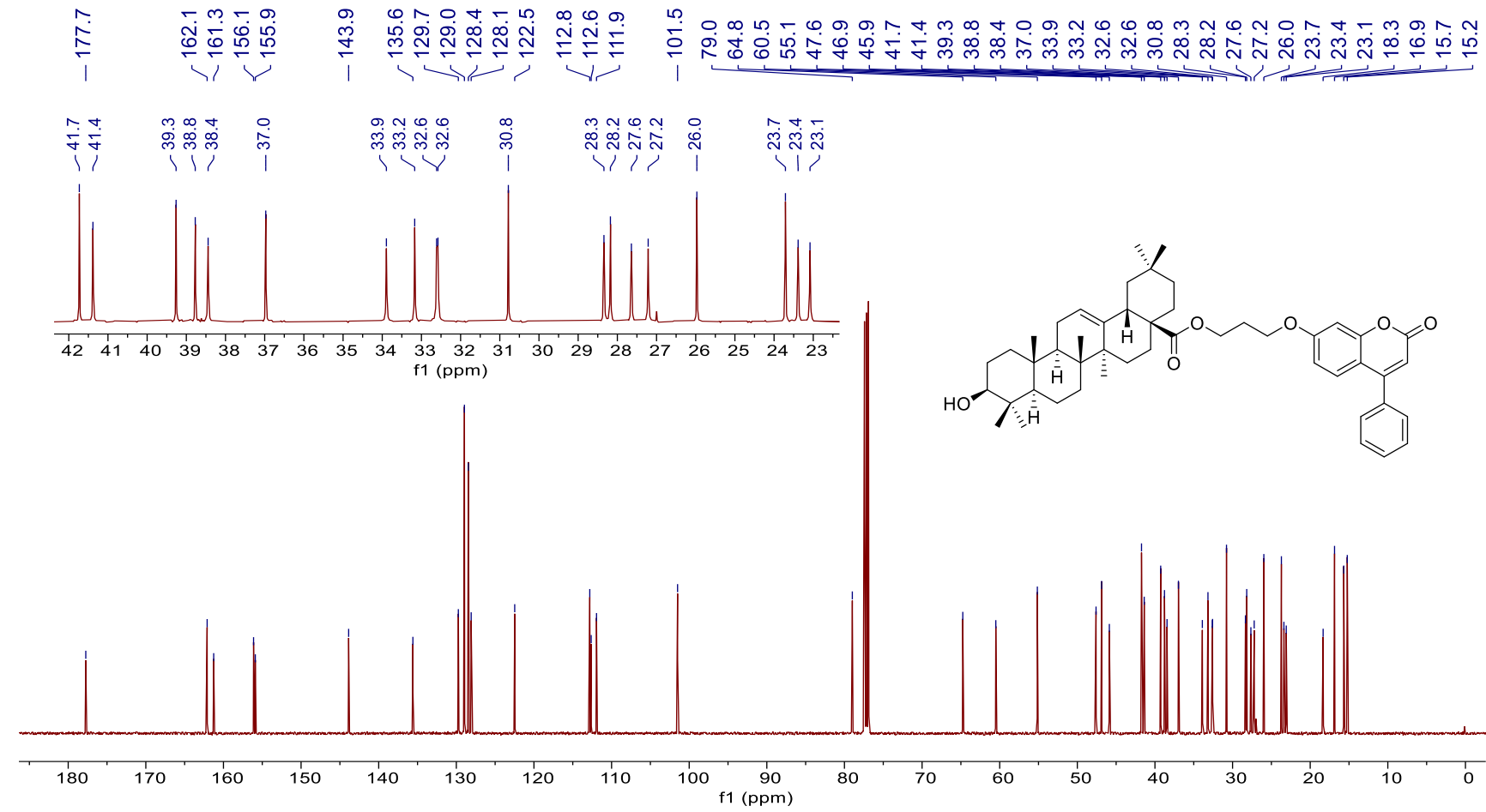


Figura 10.14. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto 7.

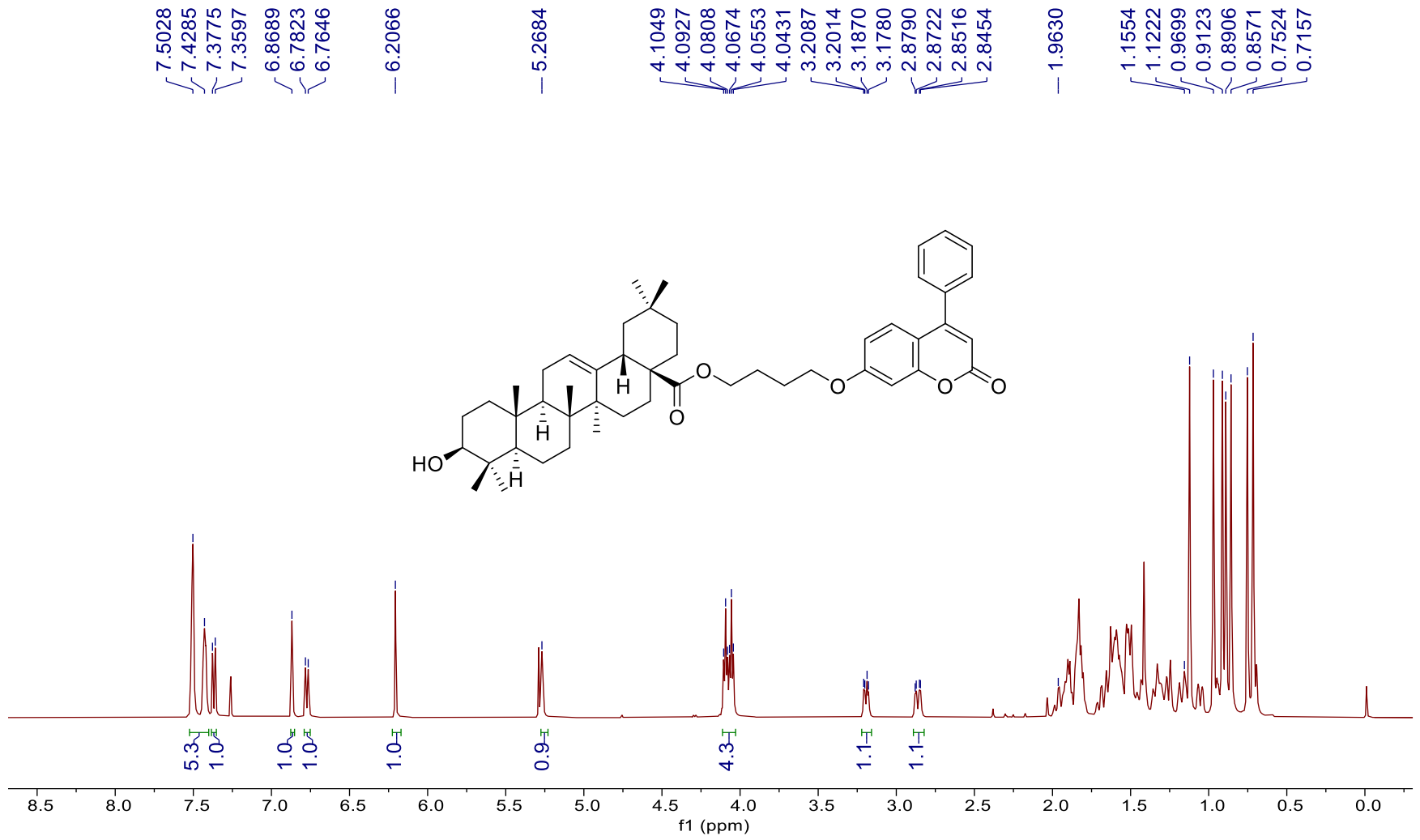


Figura 10.15. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**.

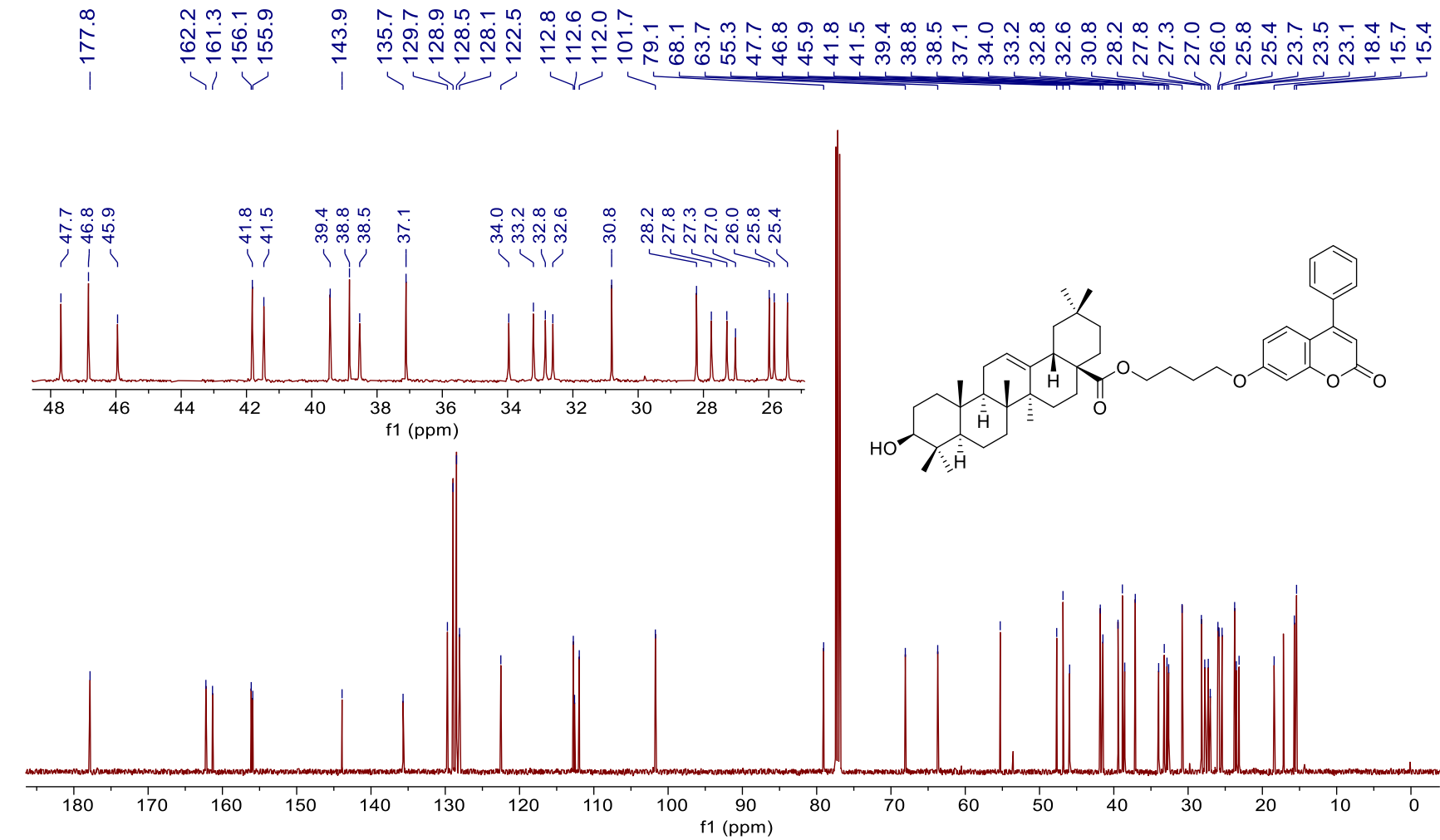


Figura 10.16. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **8**.

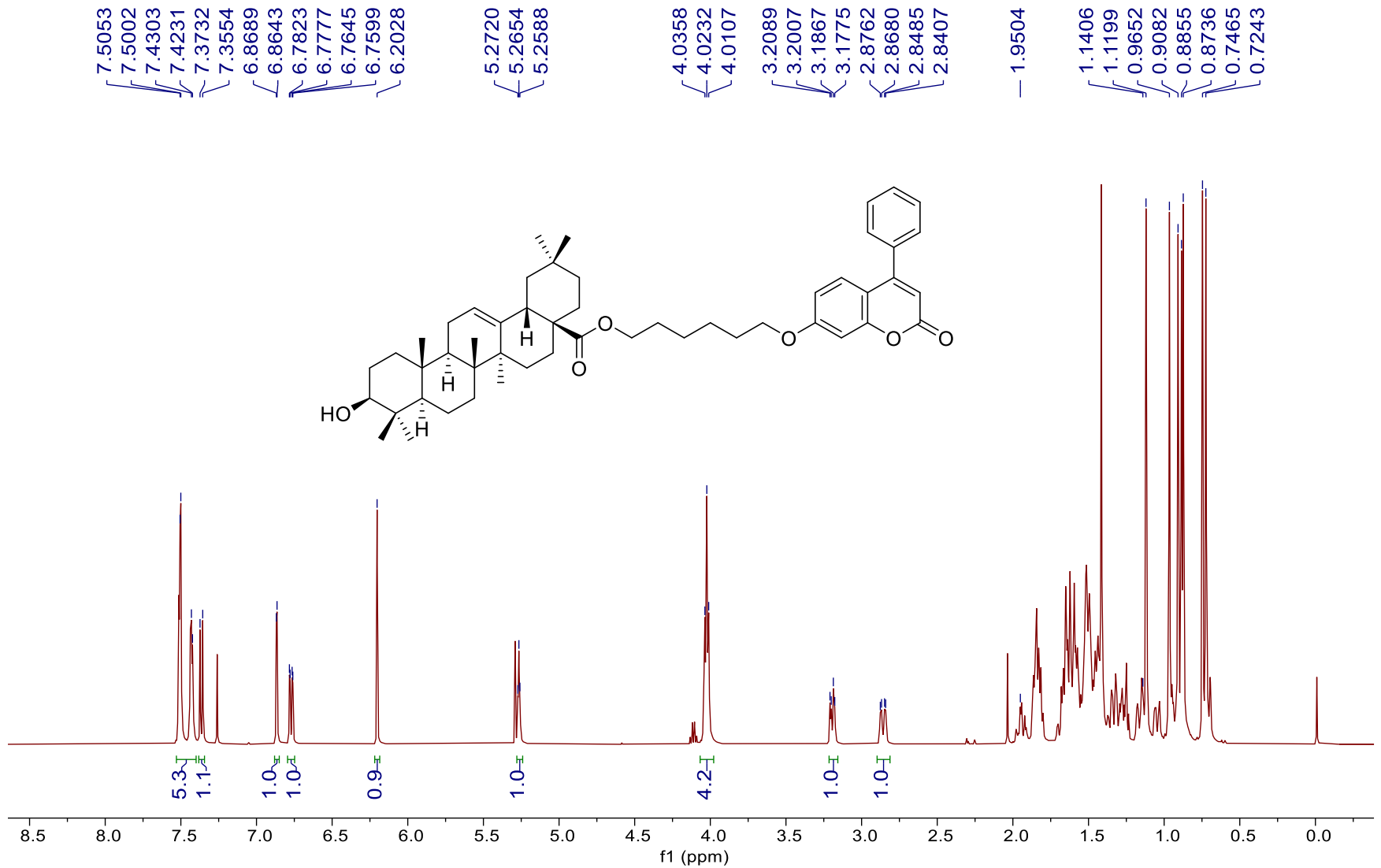


Figura 10.17. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 9.

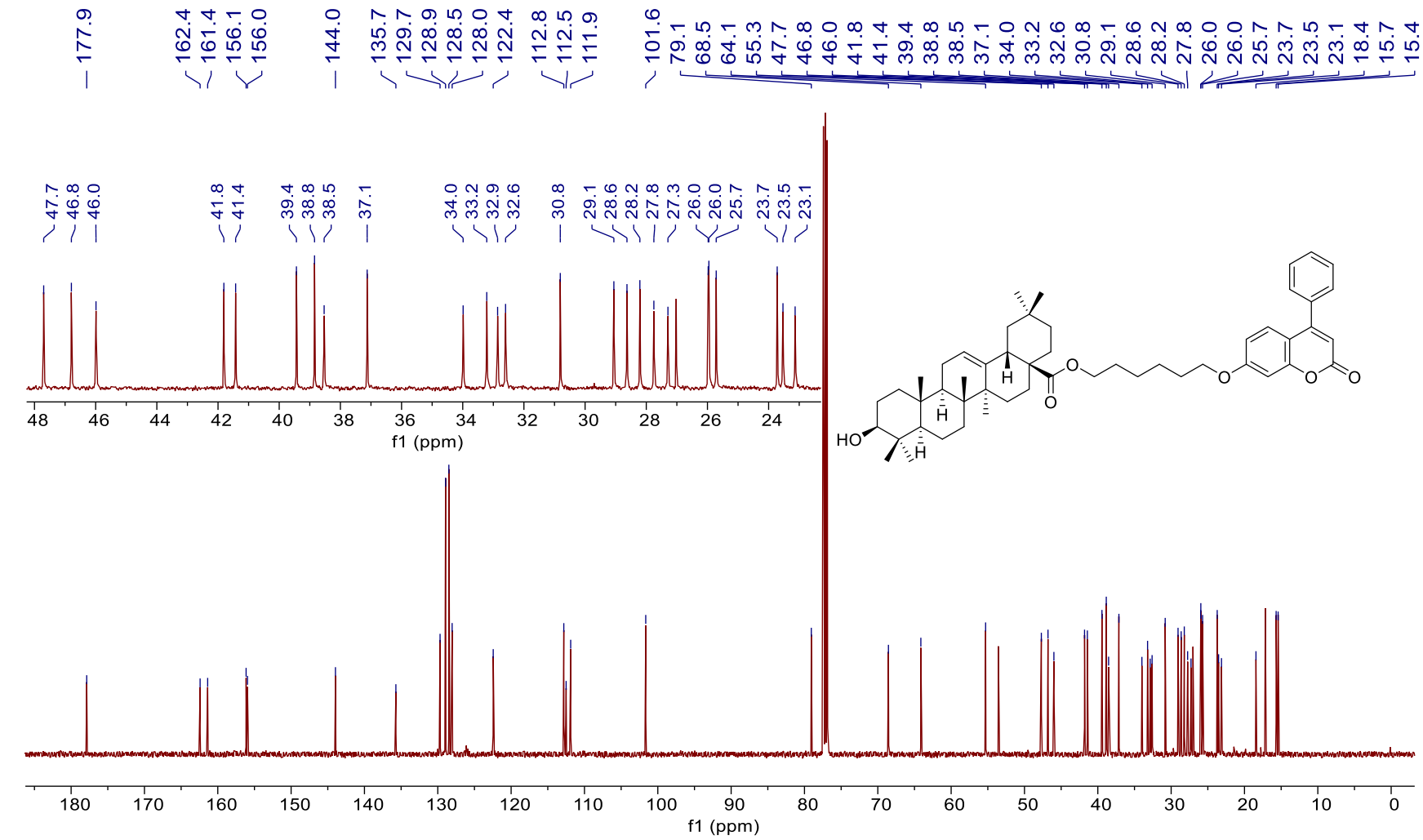


Figura 10.18. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto 9.

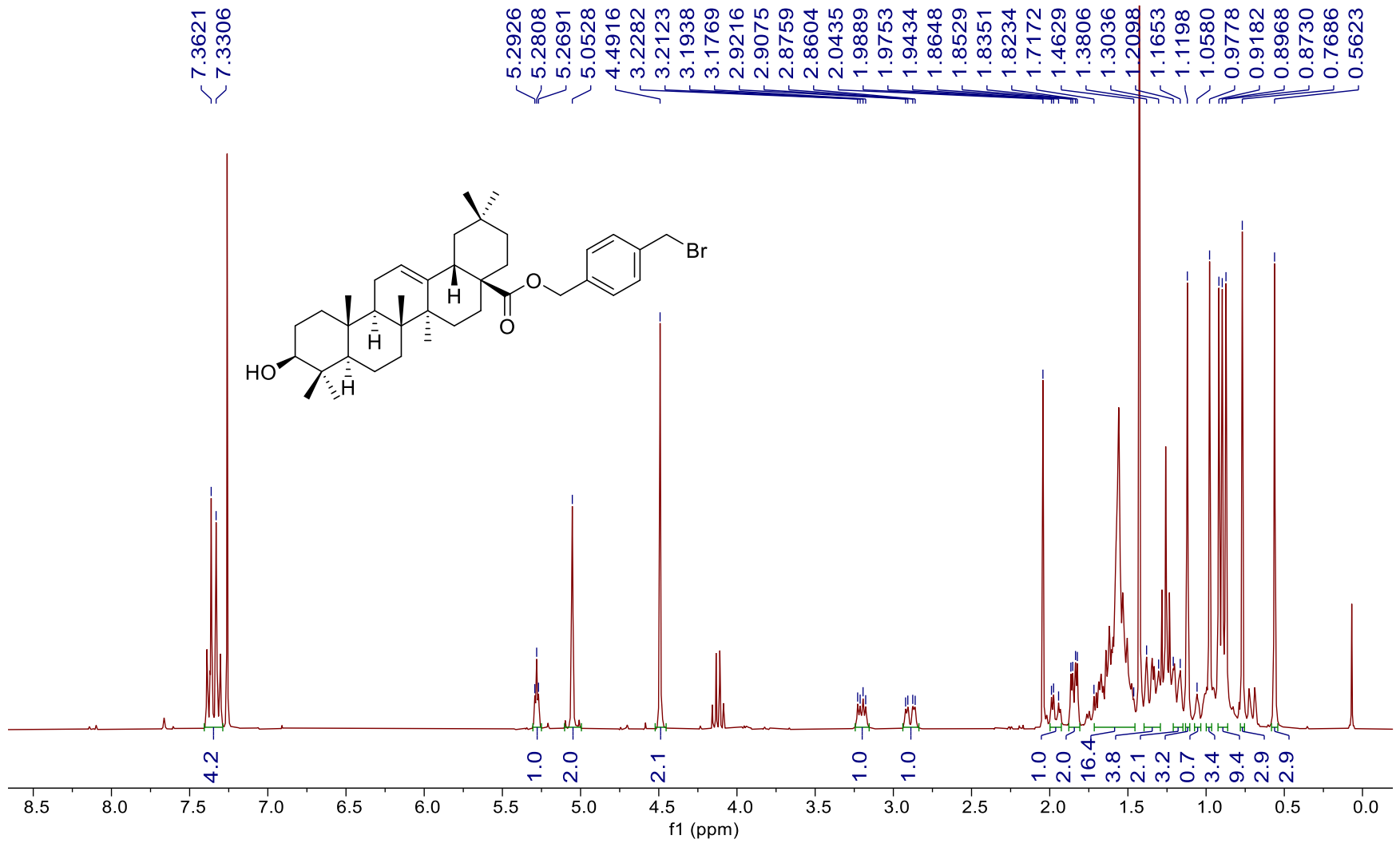


Figura 10.19. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **10**.

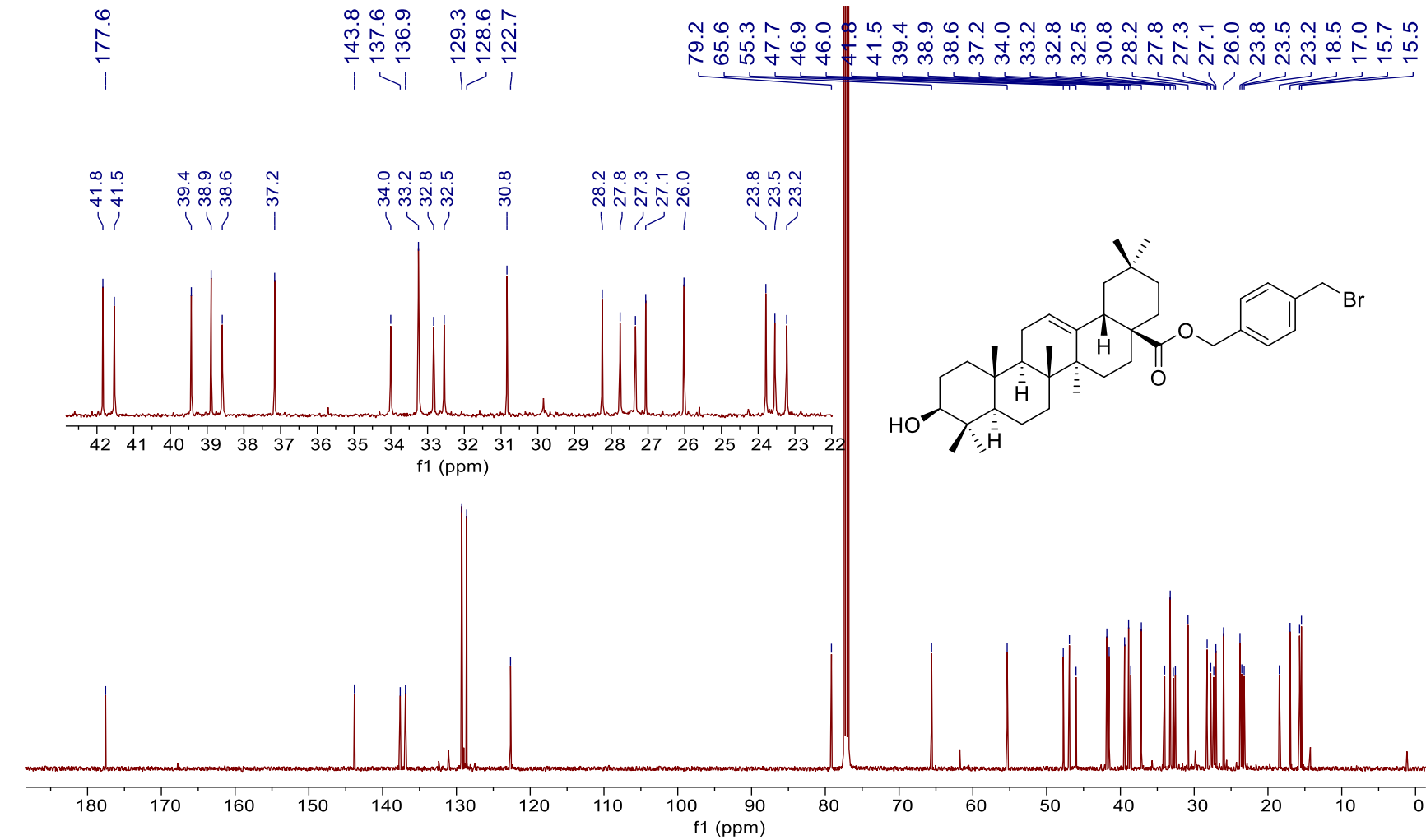


Figura 10.20. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **10**.

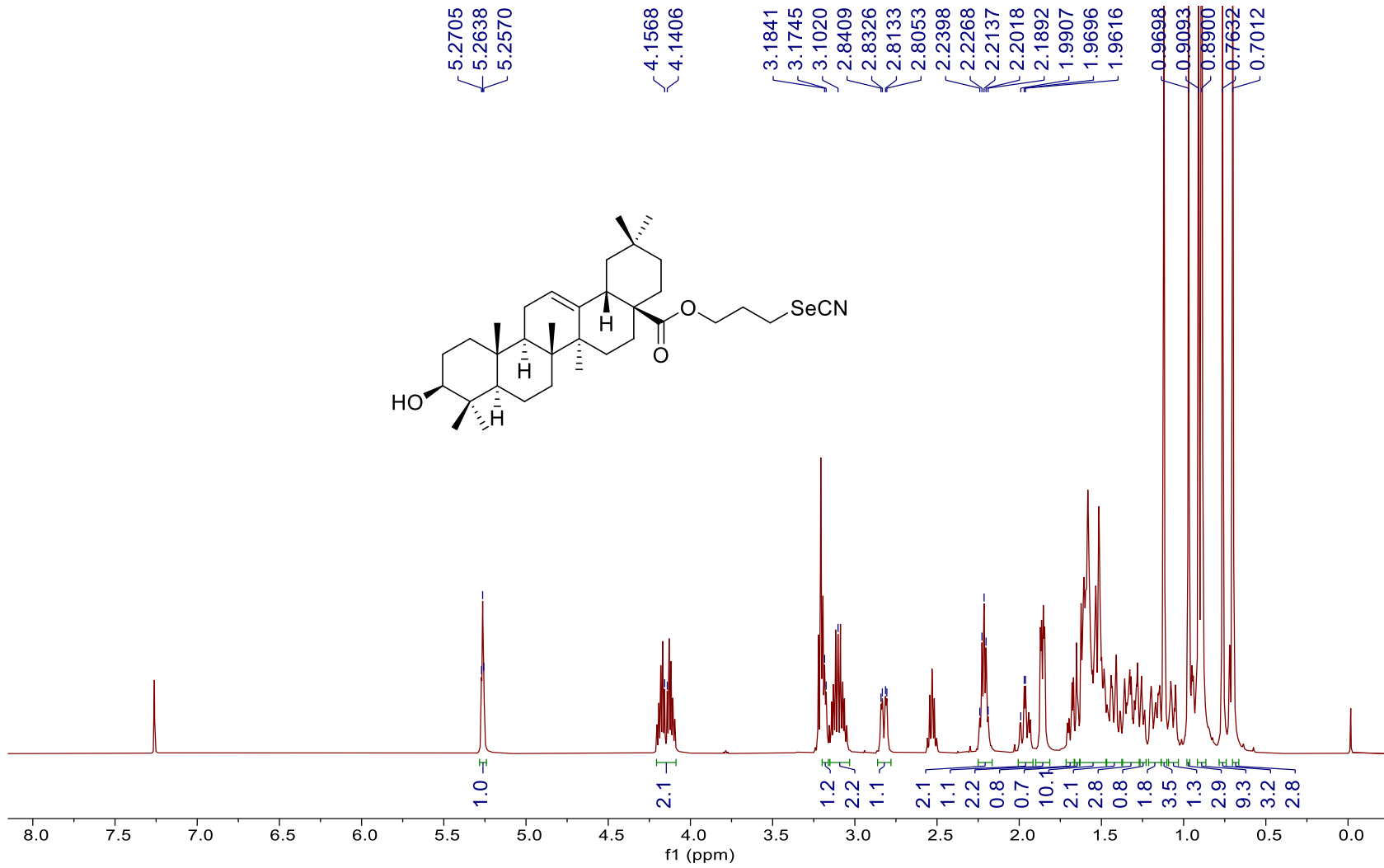


Figura 10.21. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 11.

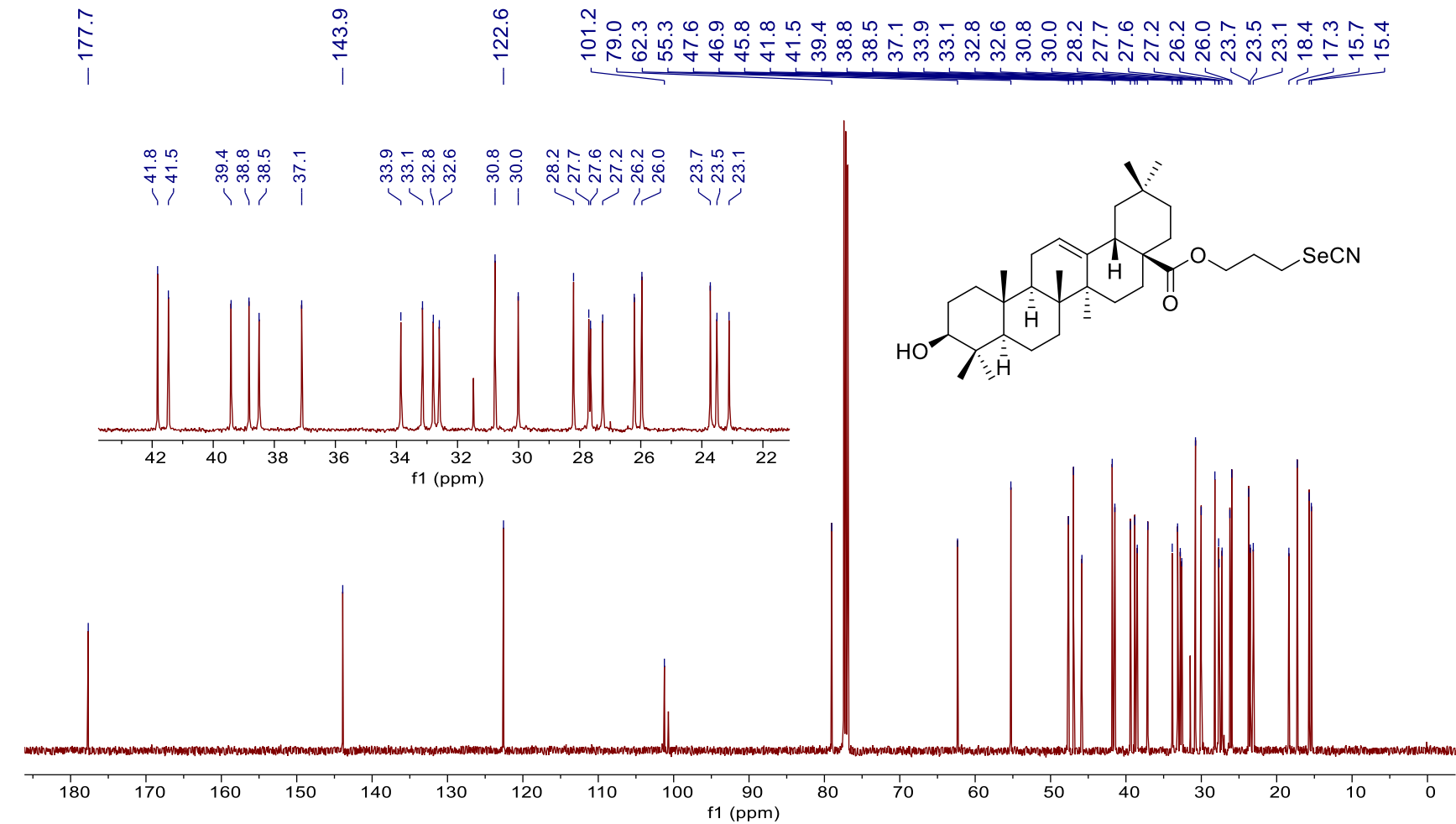


Figura 10.22. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 11.

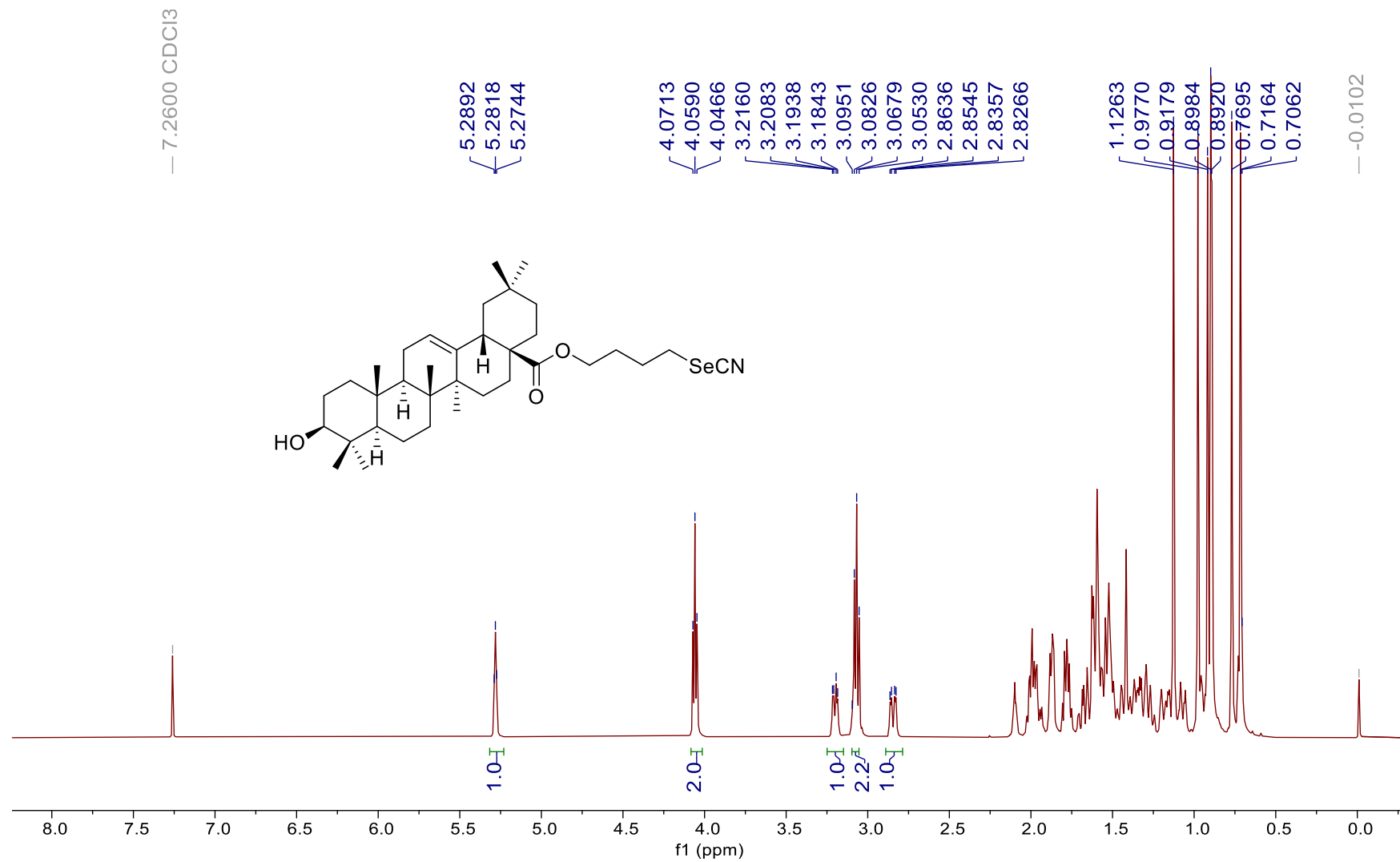


Figura 10.23. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 12.

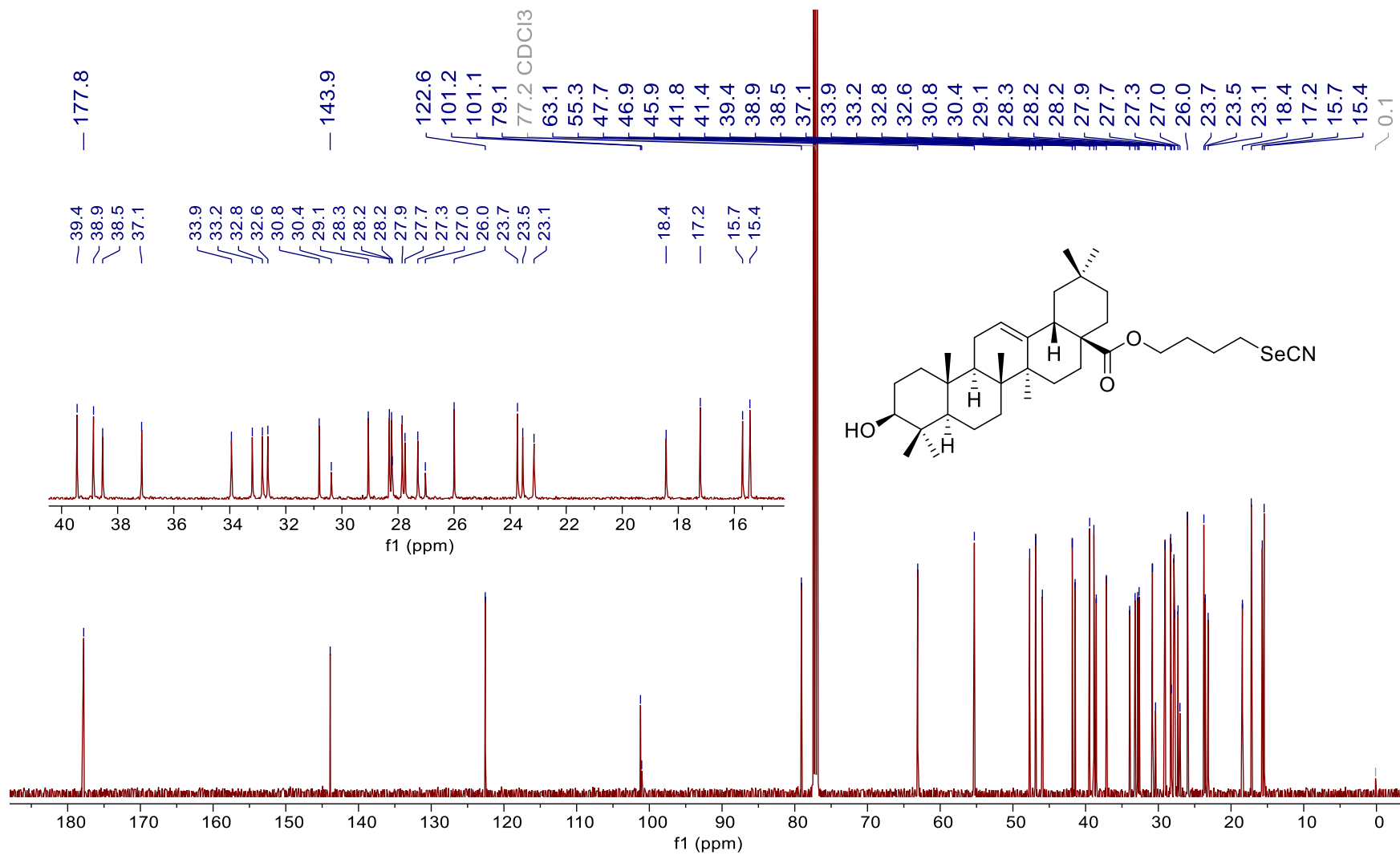


Figura 10.24. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 12.

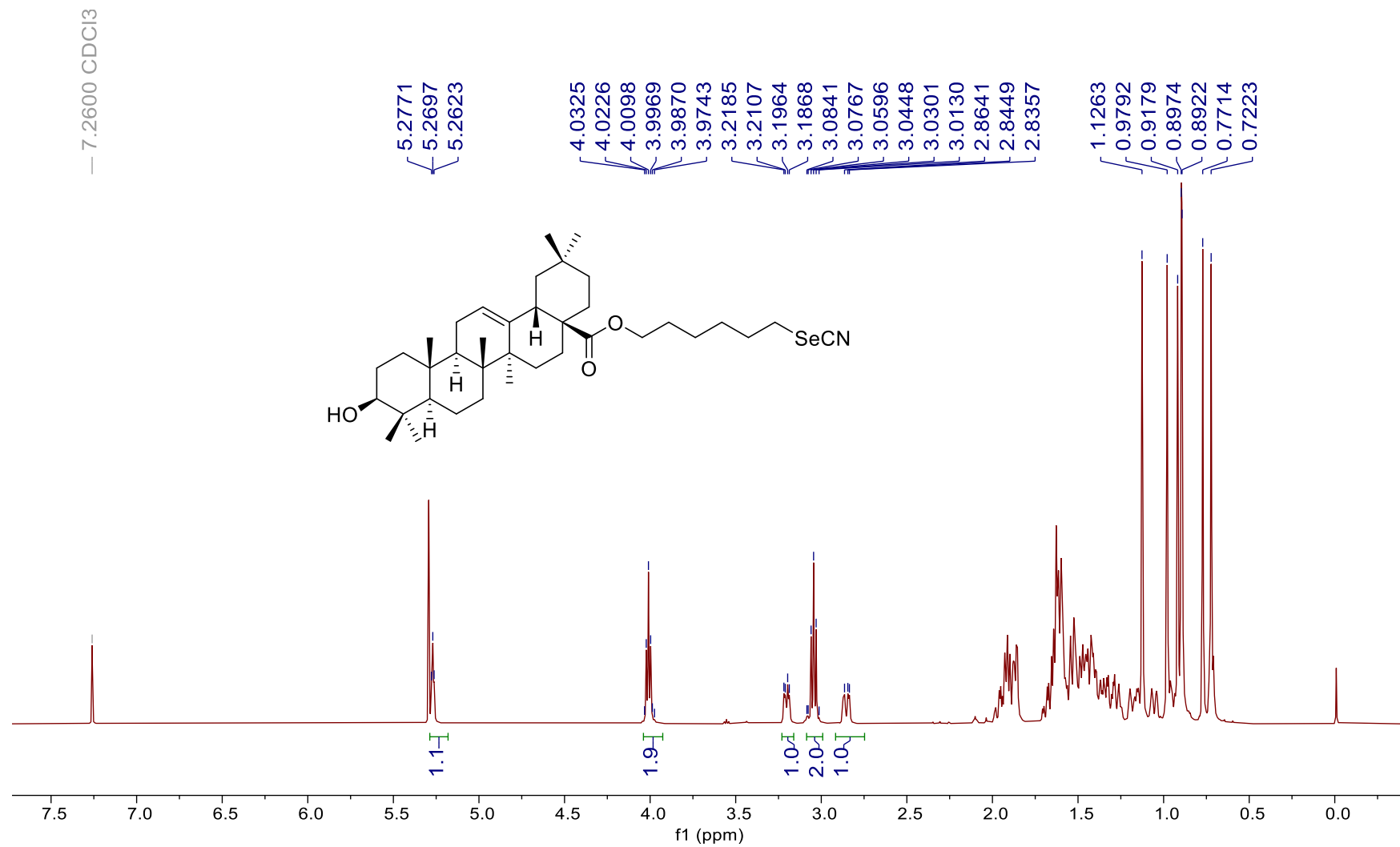


Figura 10.25. Espectro de 1H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **13**.

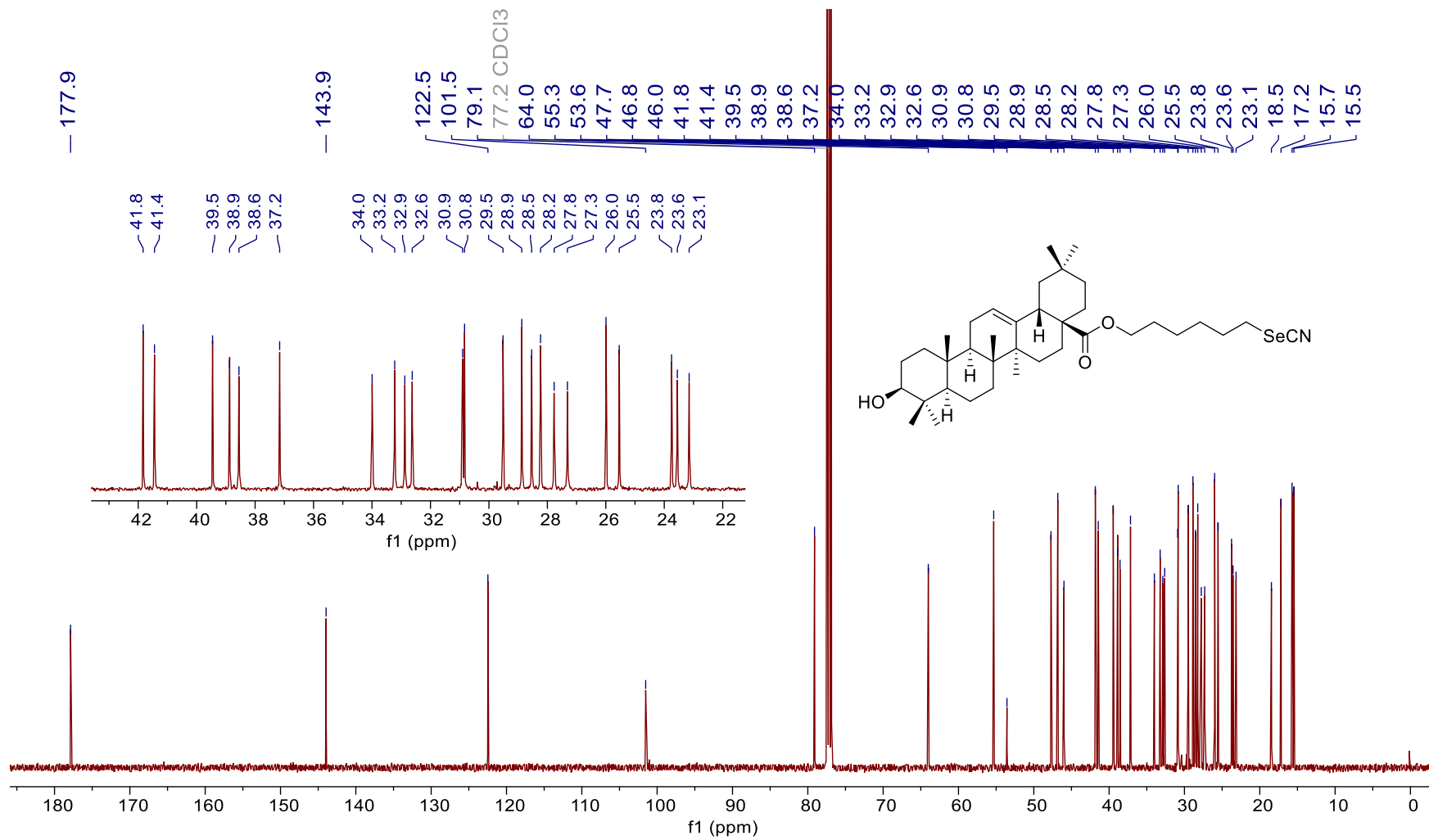


Figura 10.26. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto 13.

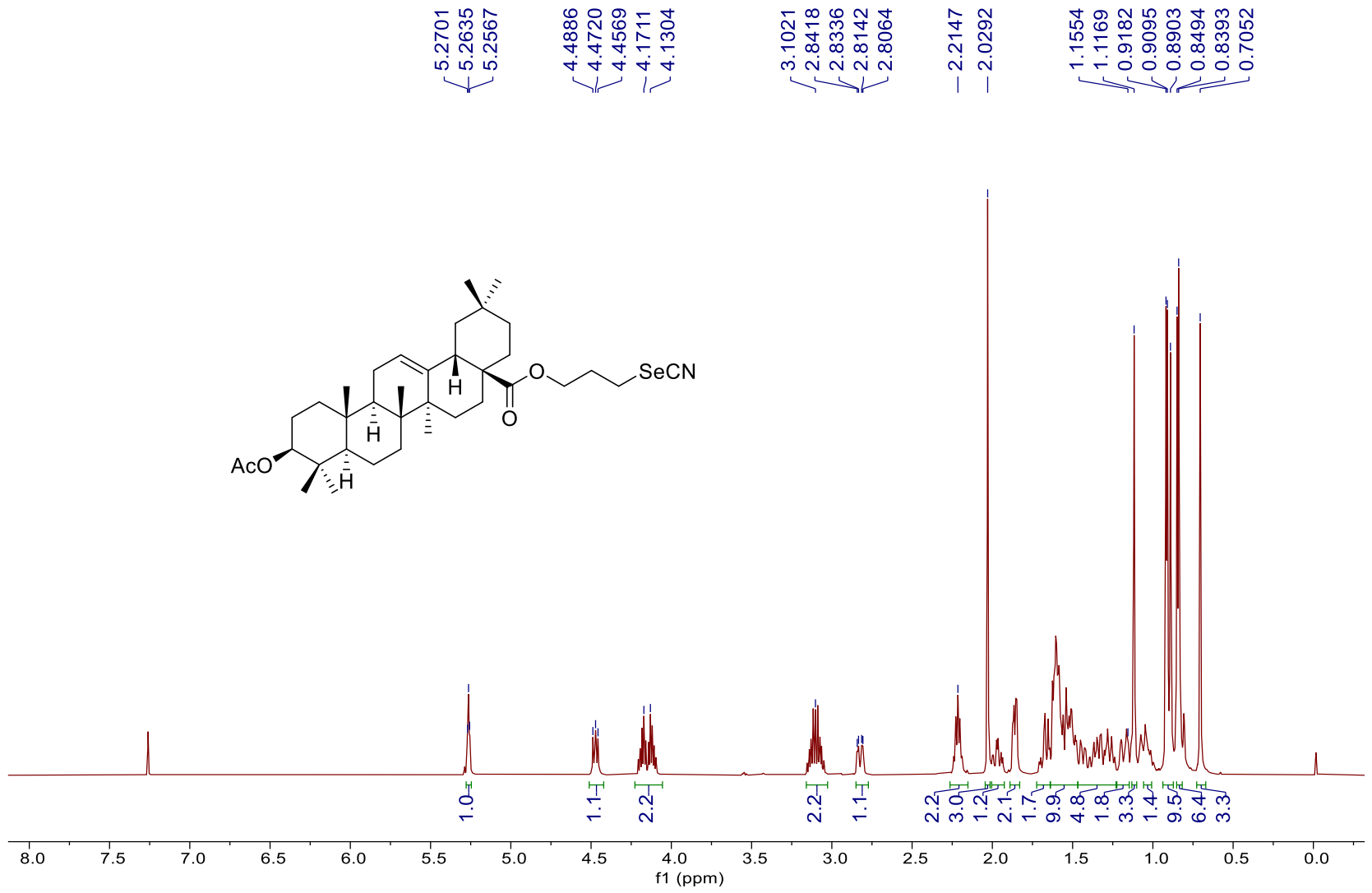


Figura 10.27. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 14.

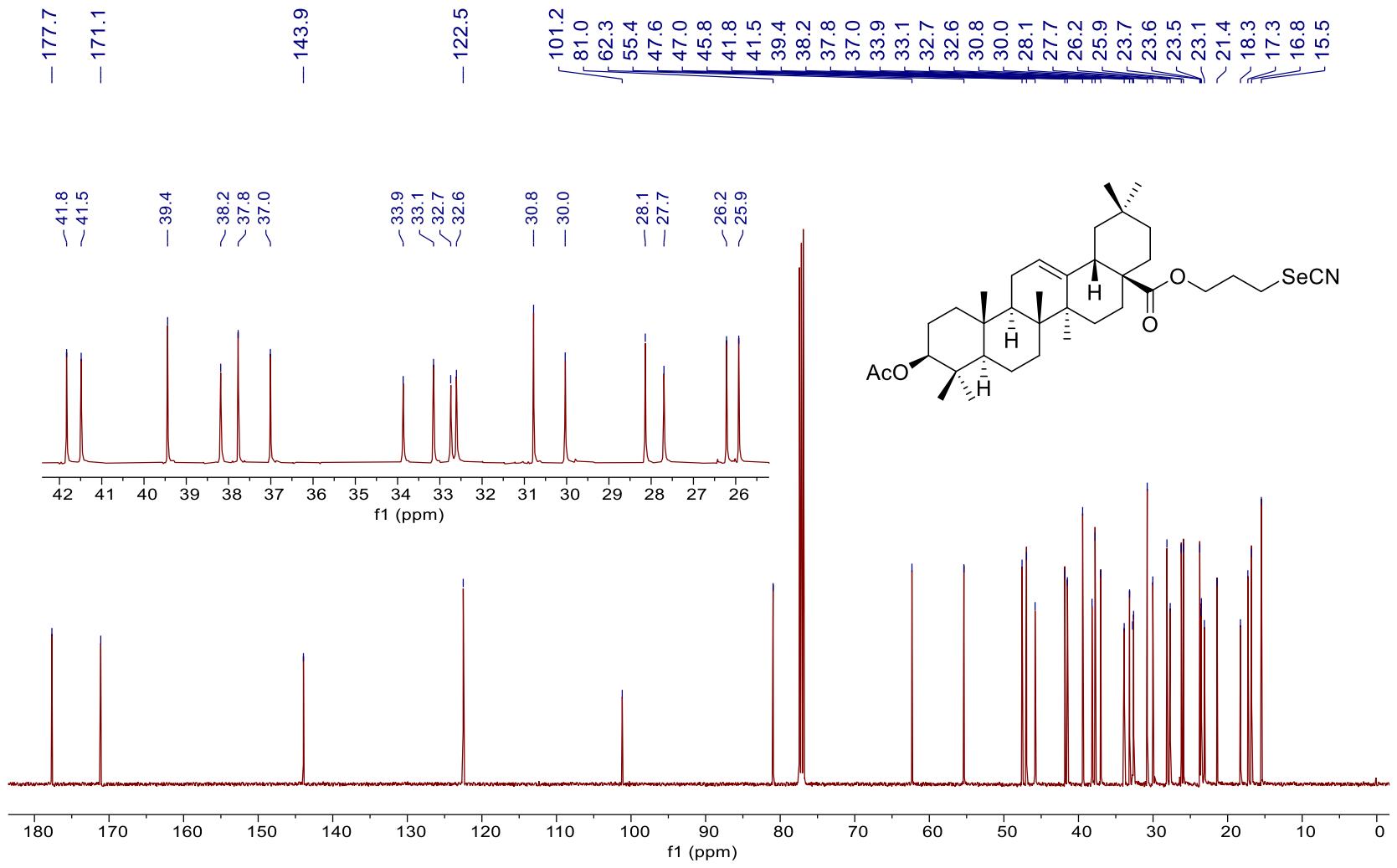


Figura 10.28. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 14.

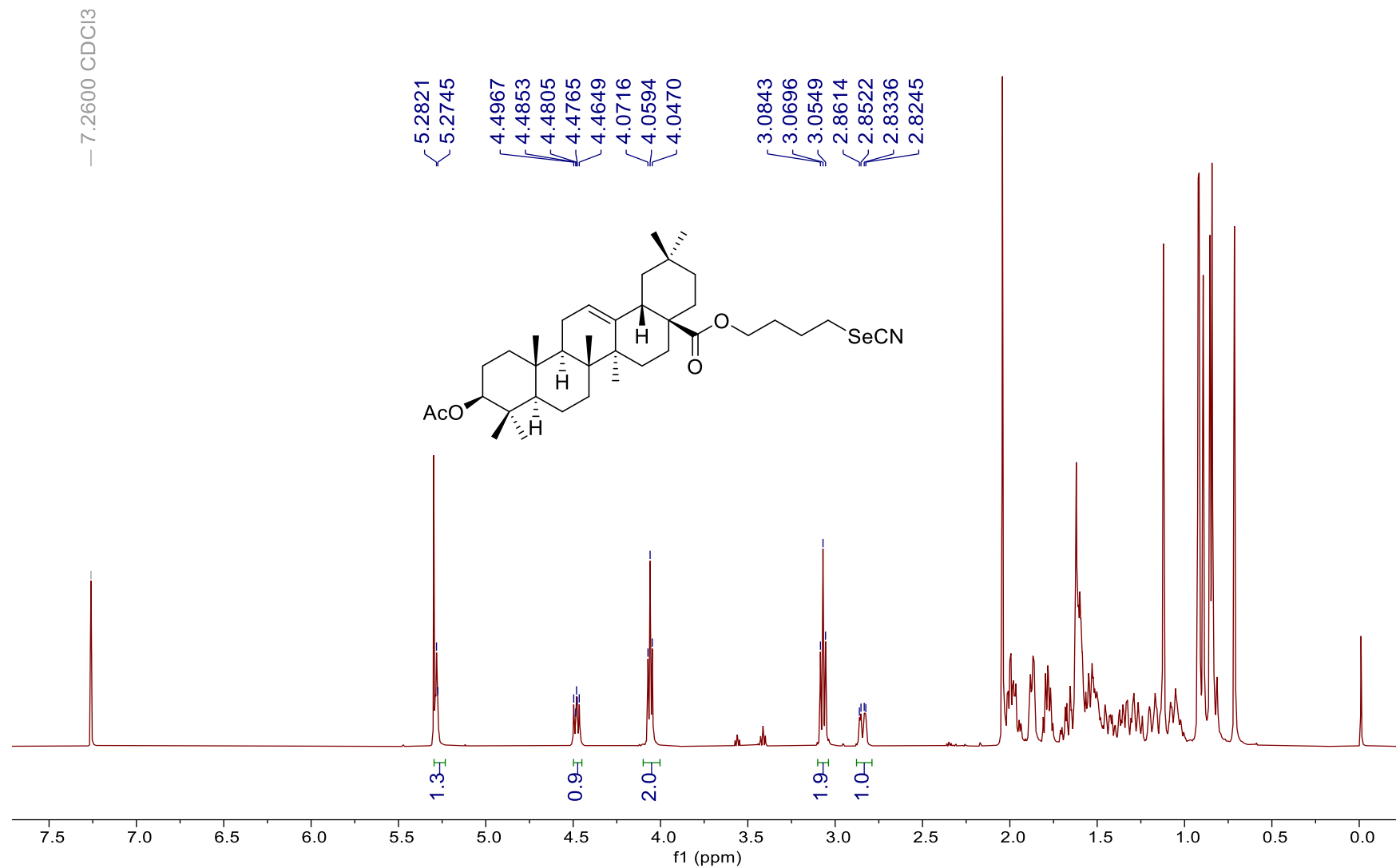


Figura 10.29. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **15**.

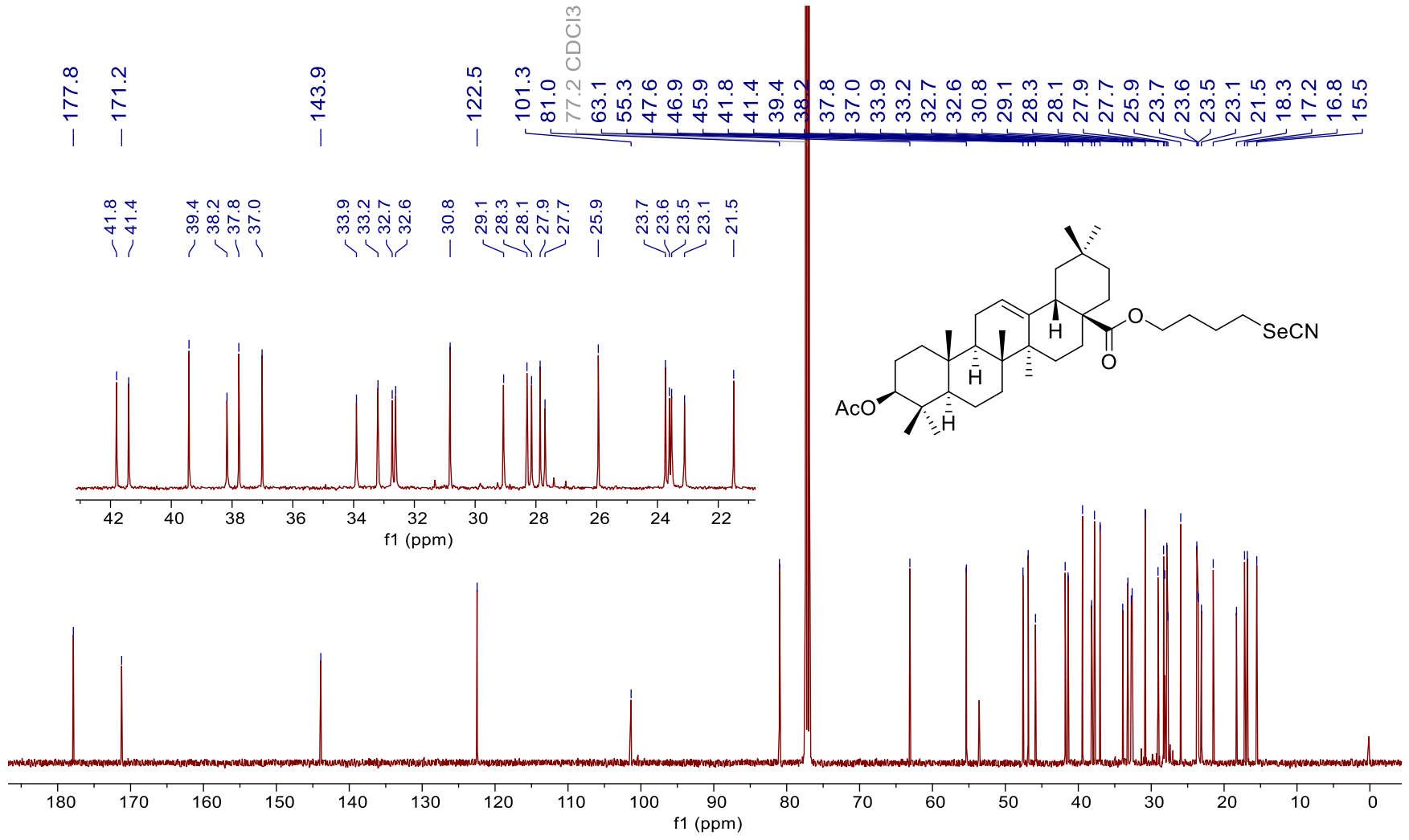


Figura 10.30. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto 15.

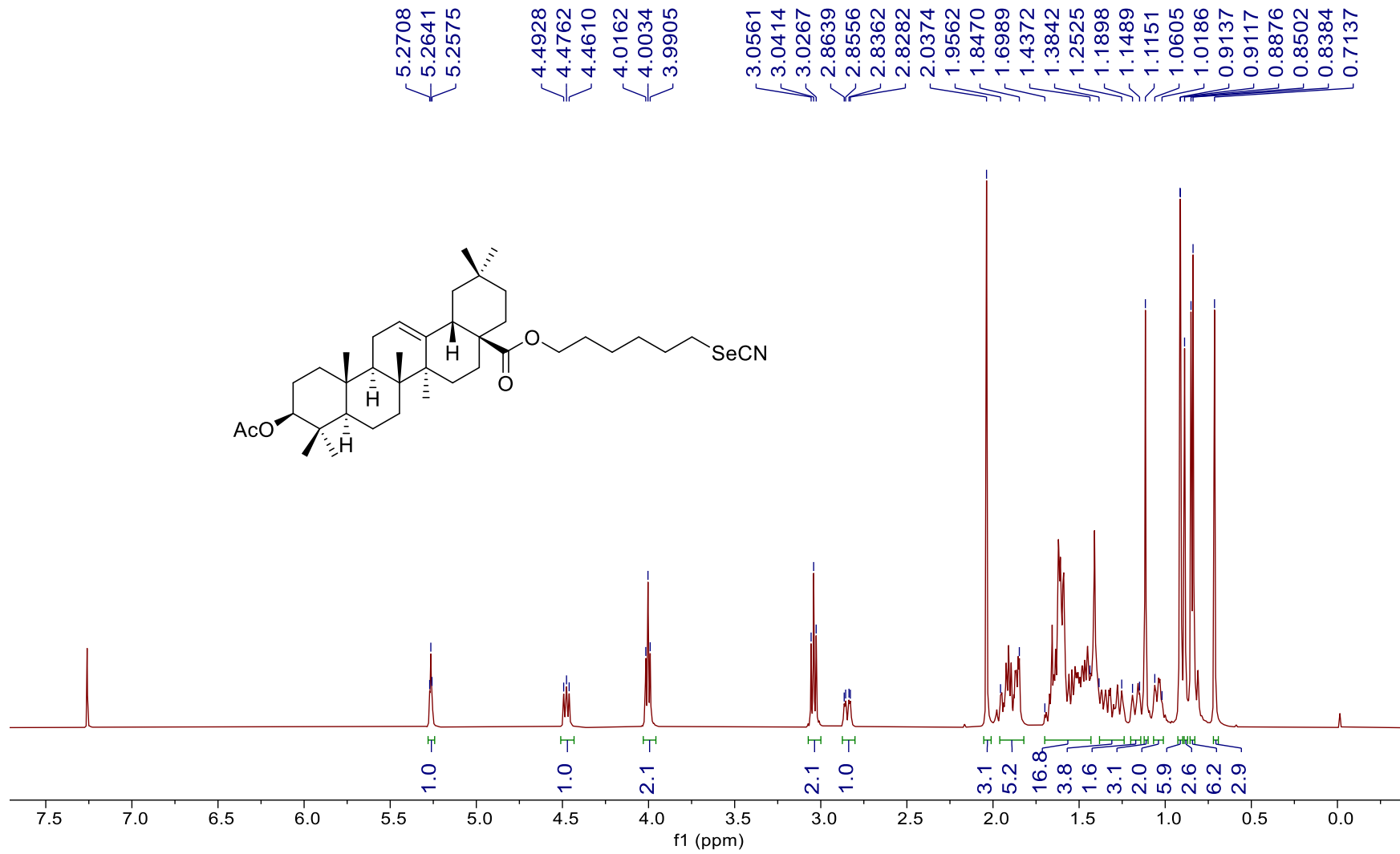


Figura 10.31. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **16**.

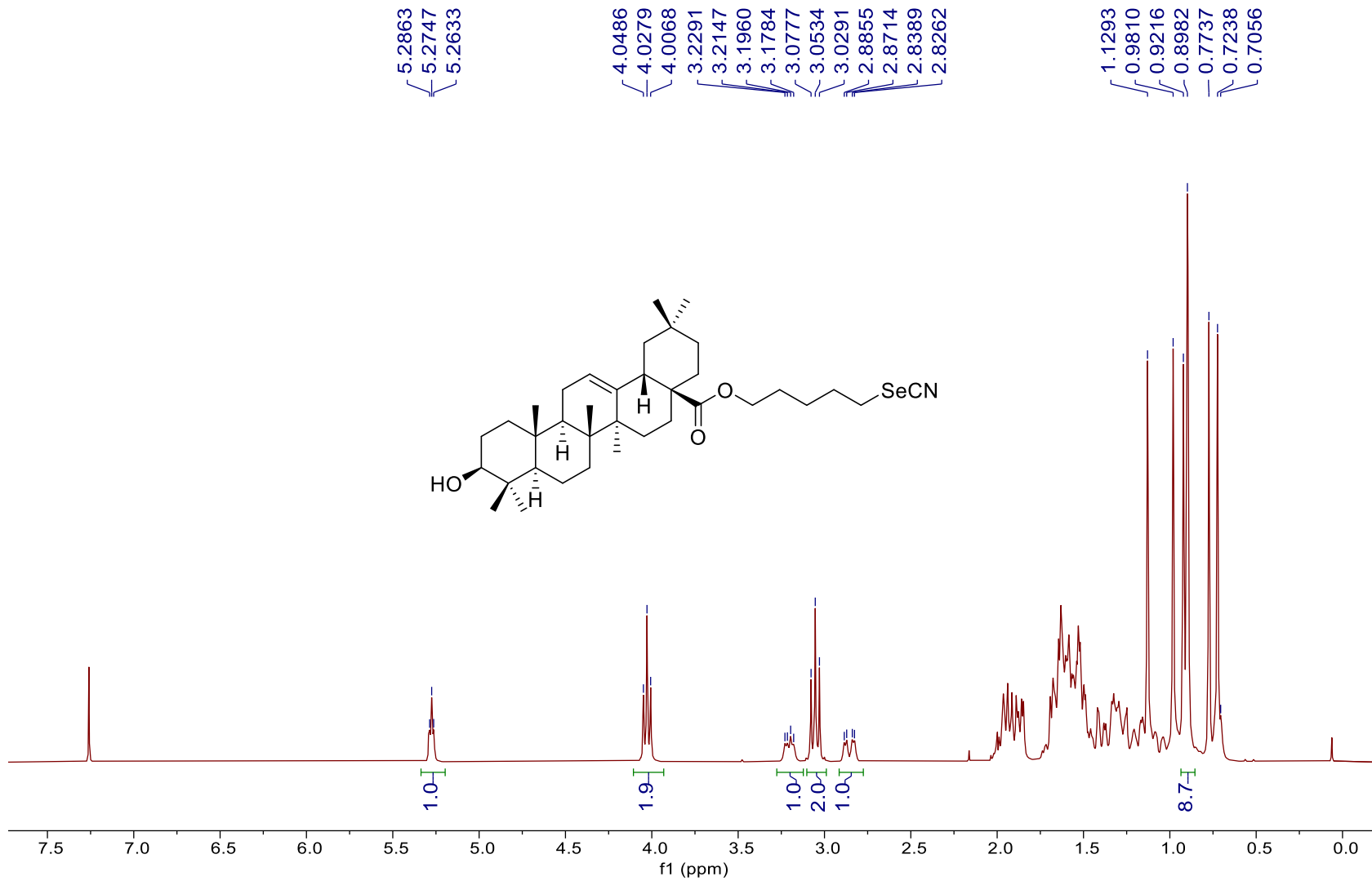


Figura 10.33. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 17.

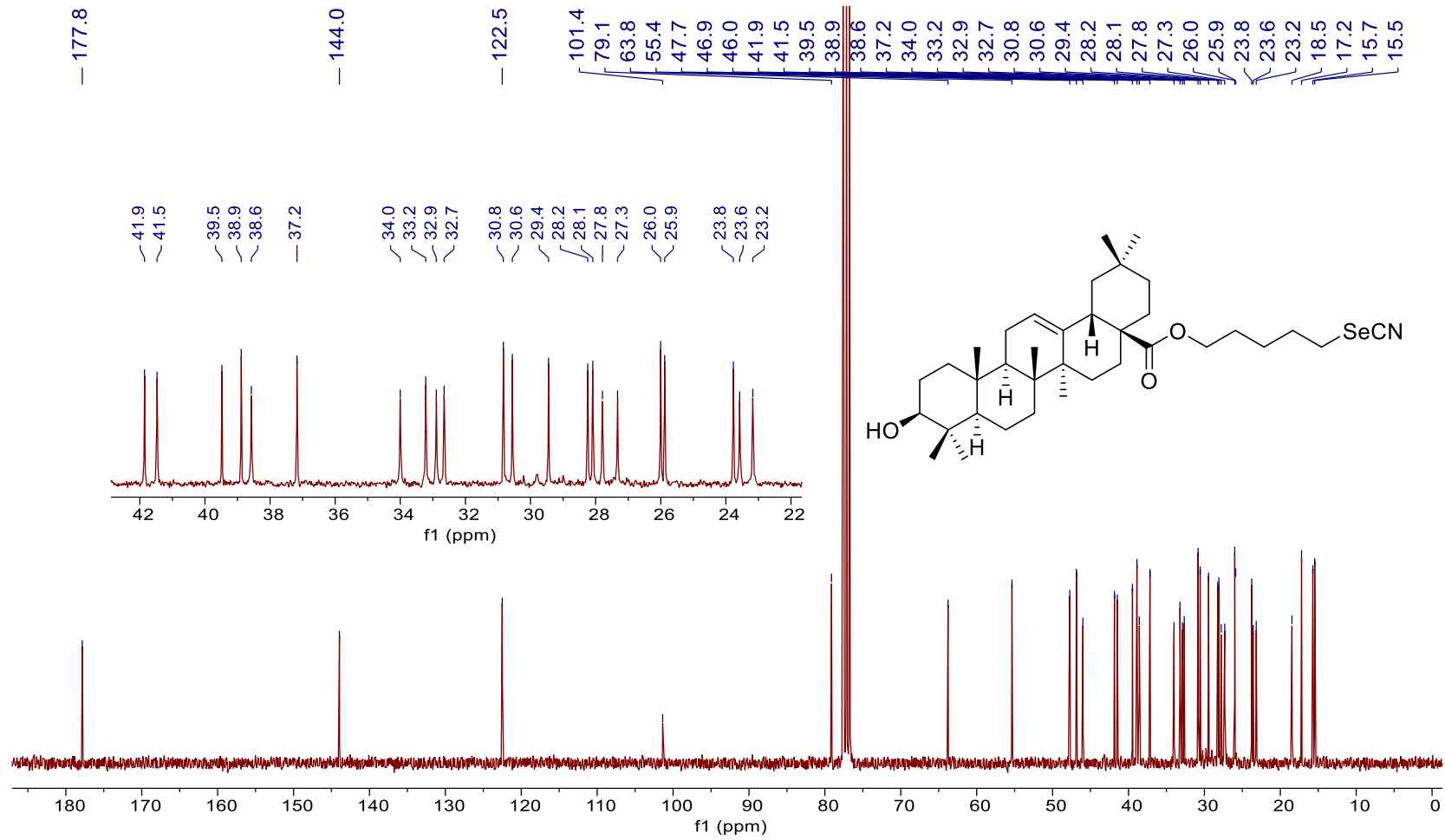


Figura 10.34. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 17.

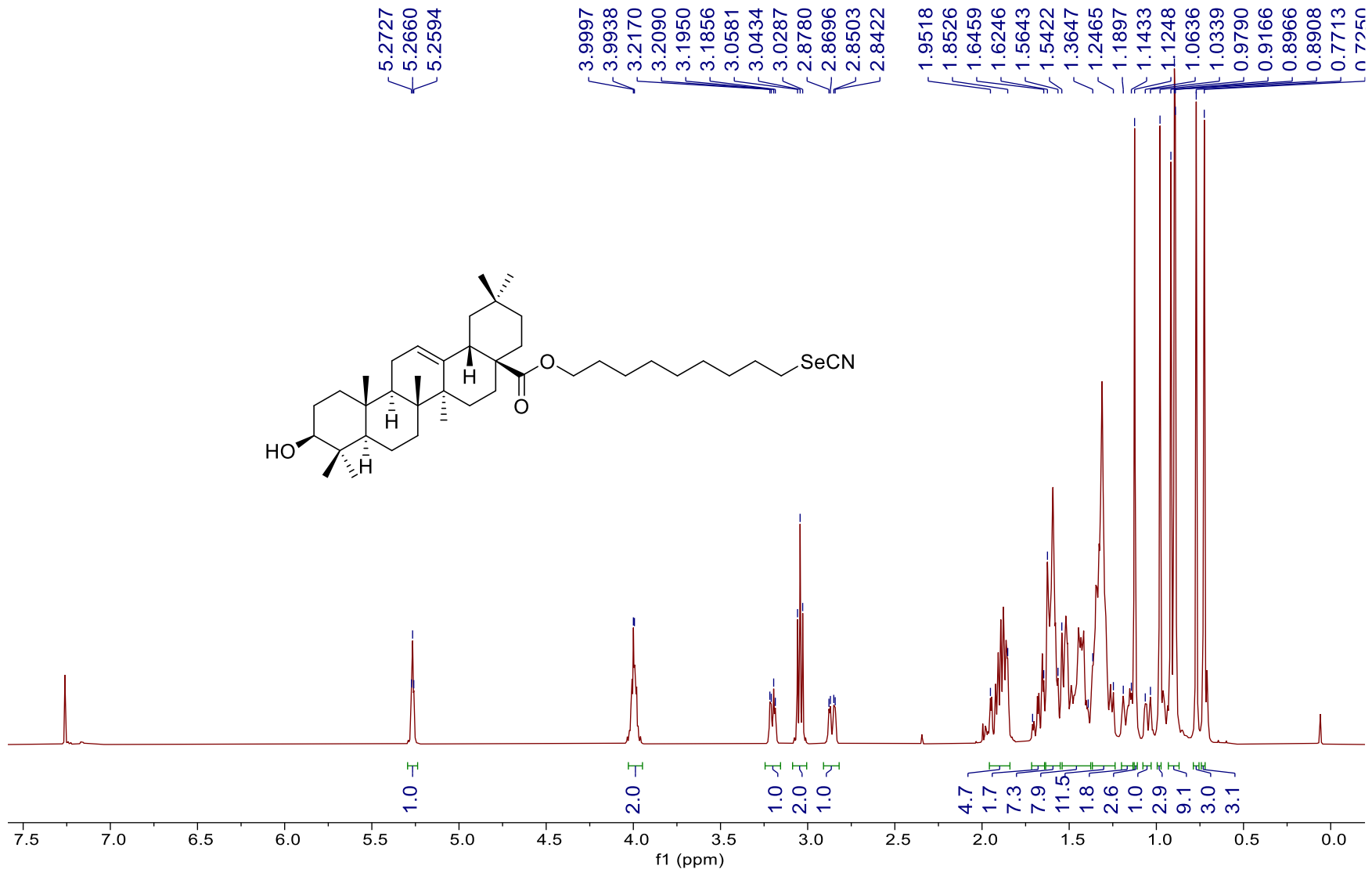


Figura 10.35. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **18**.

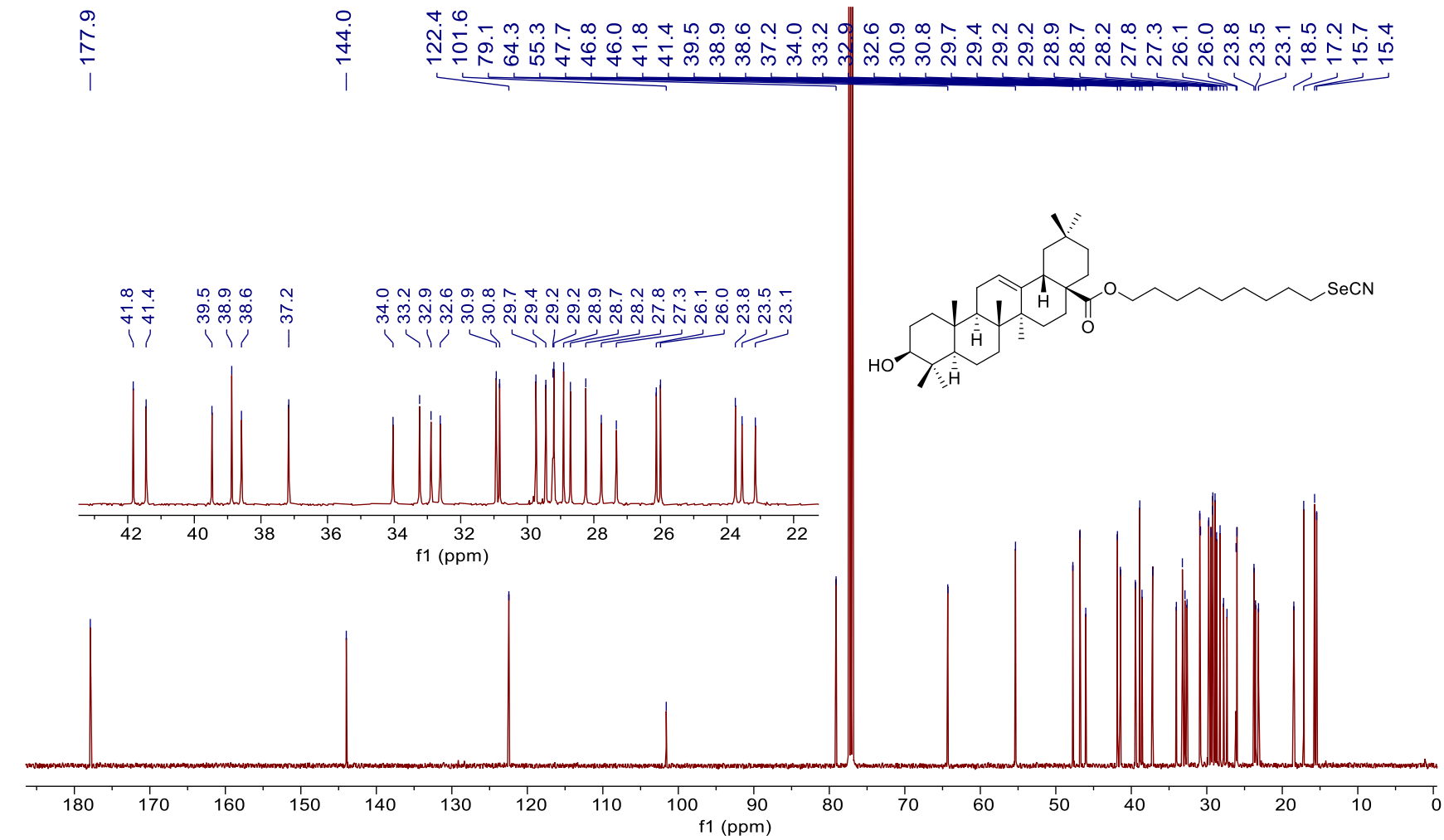


Figura 10.36. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **18**.

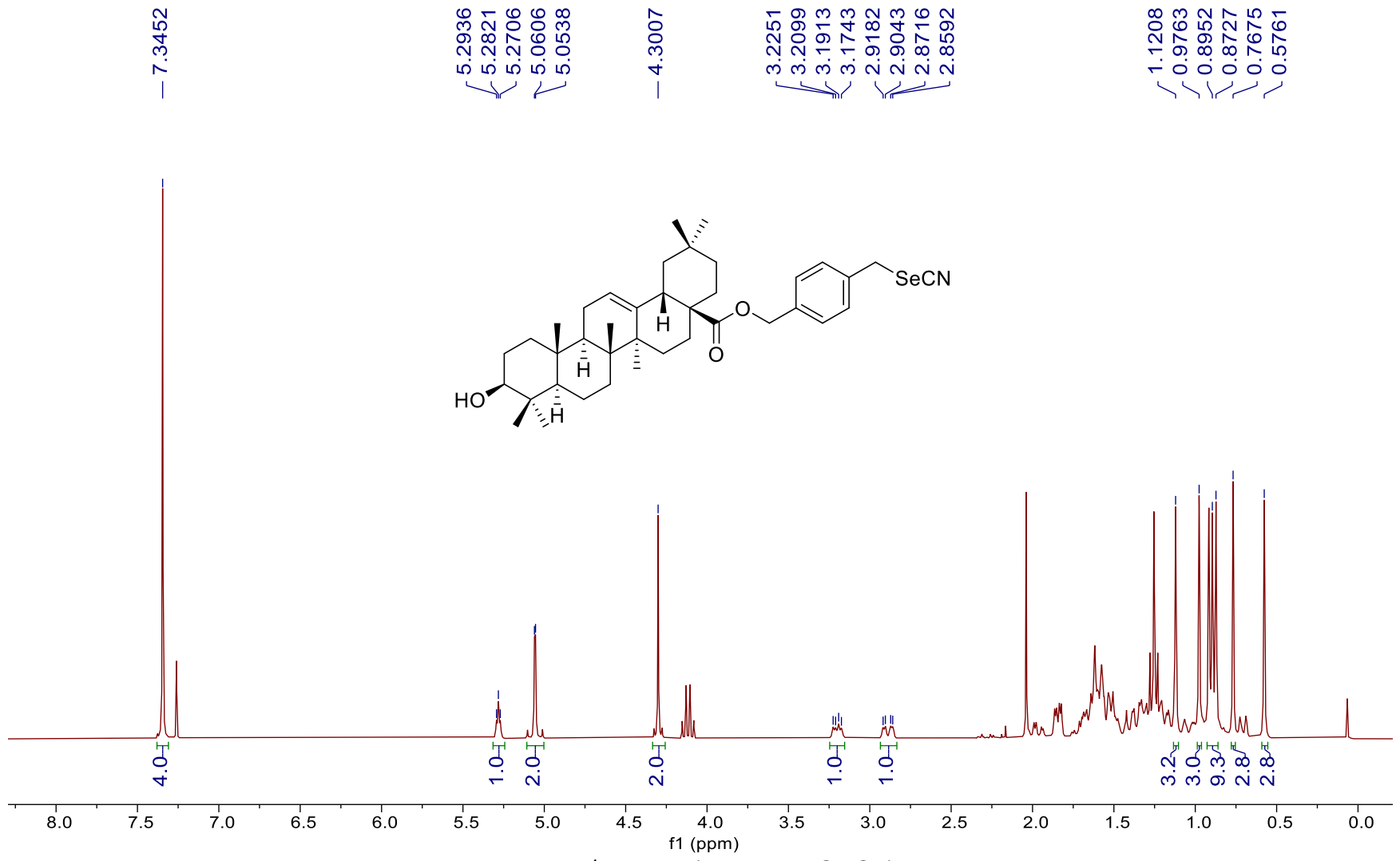


Figura 10.37. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **19**.

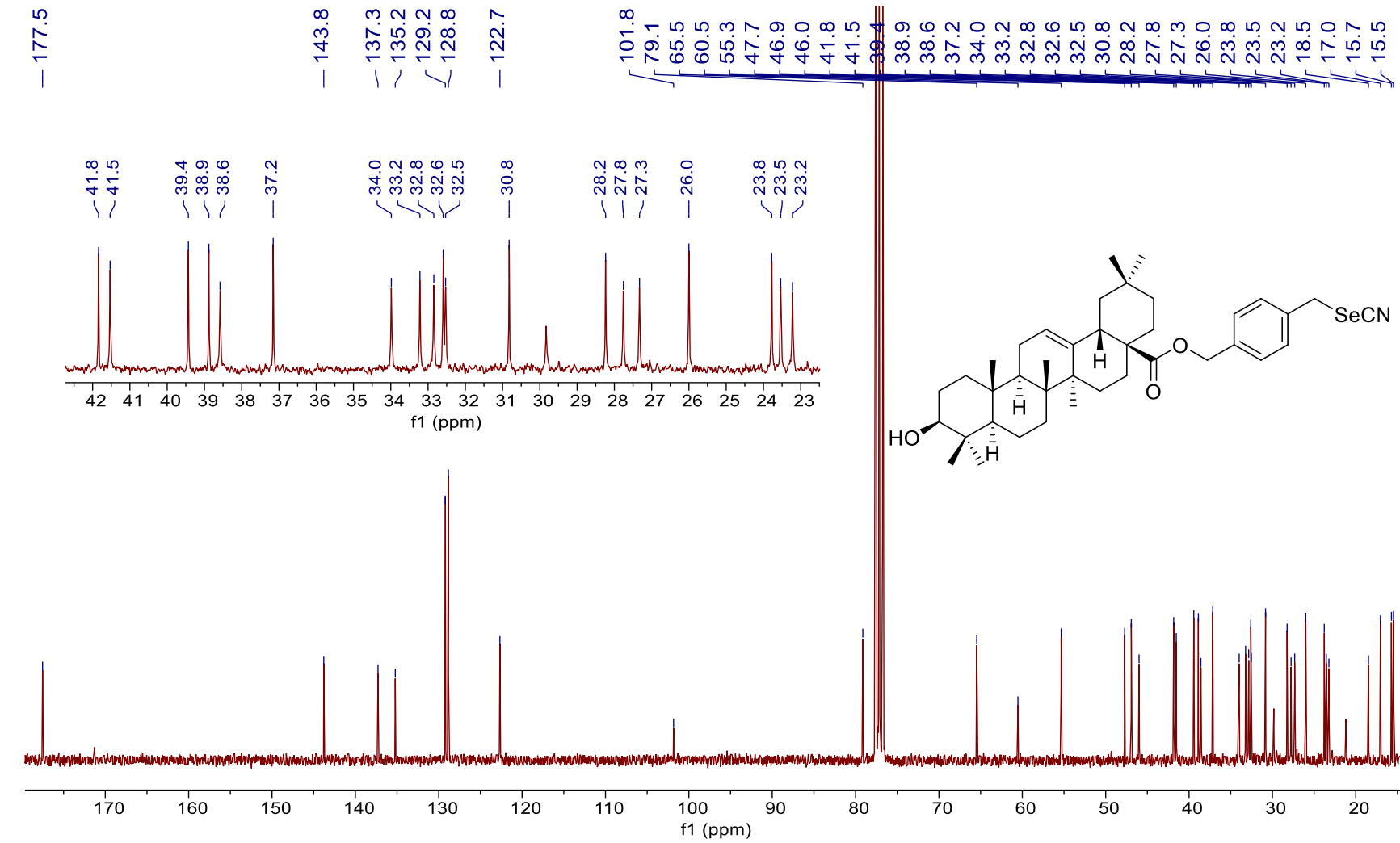


Figura 10.38. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto 19.

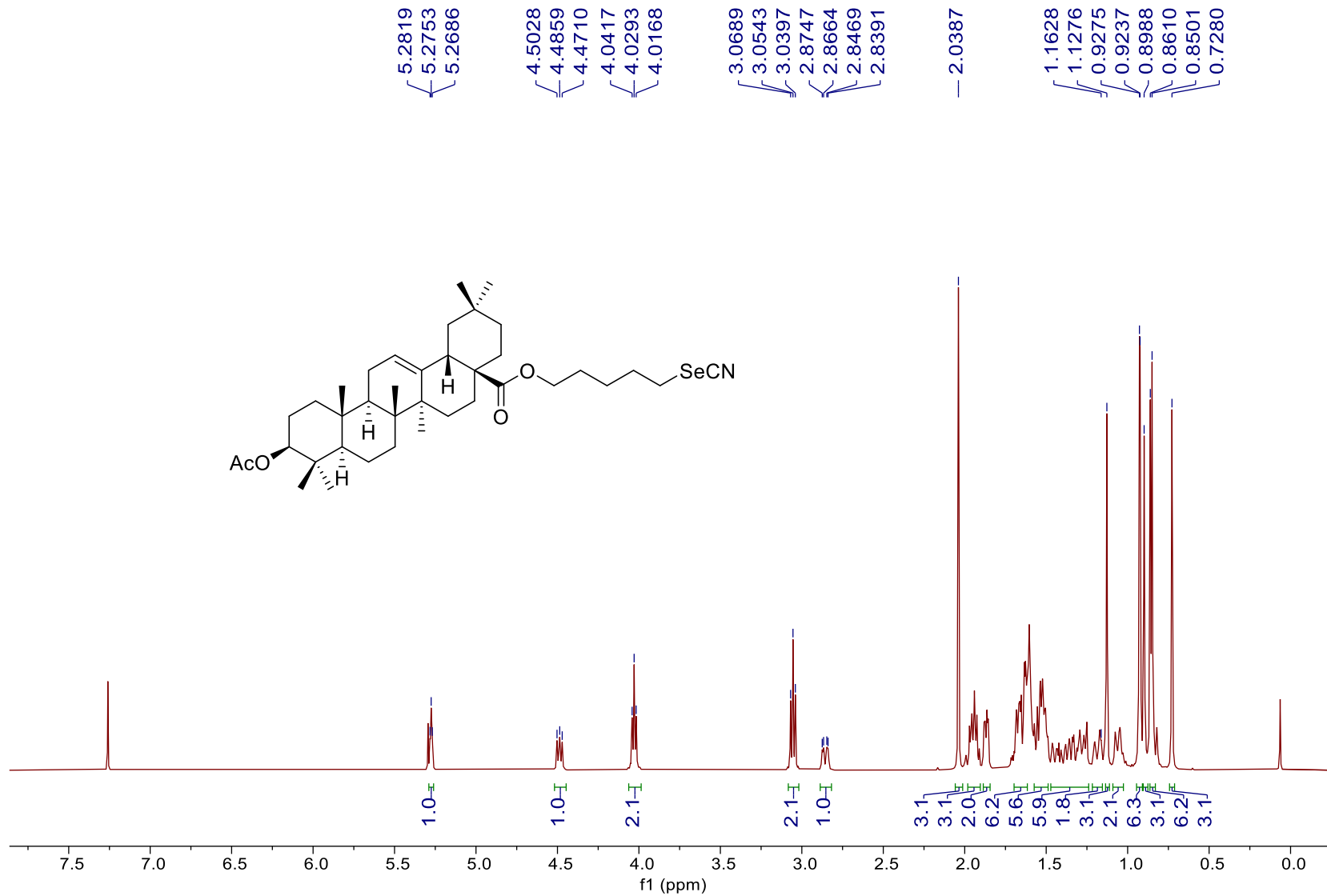


Figura 10.39. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **20**.

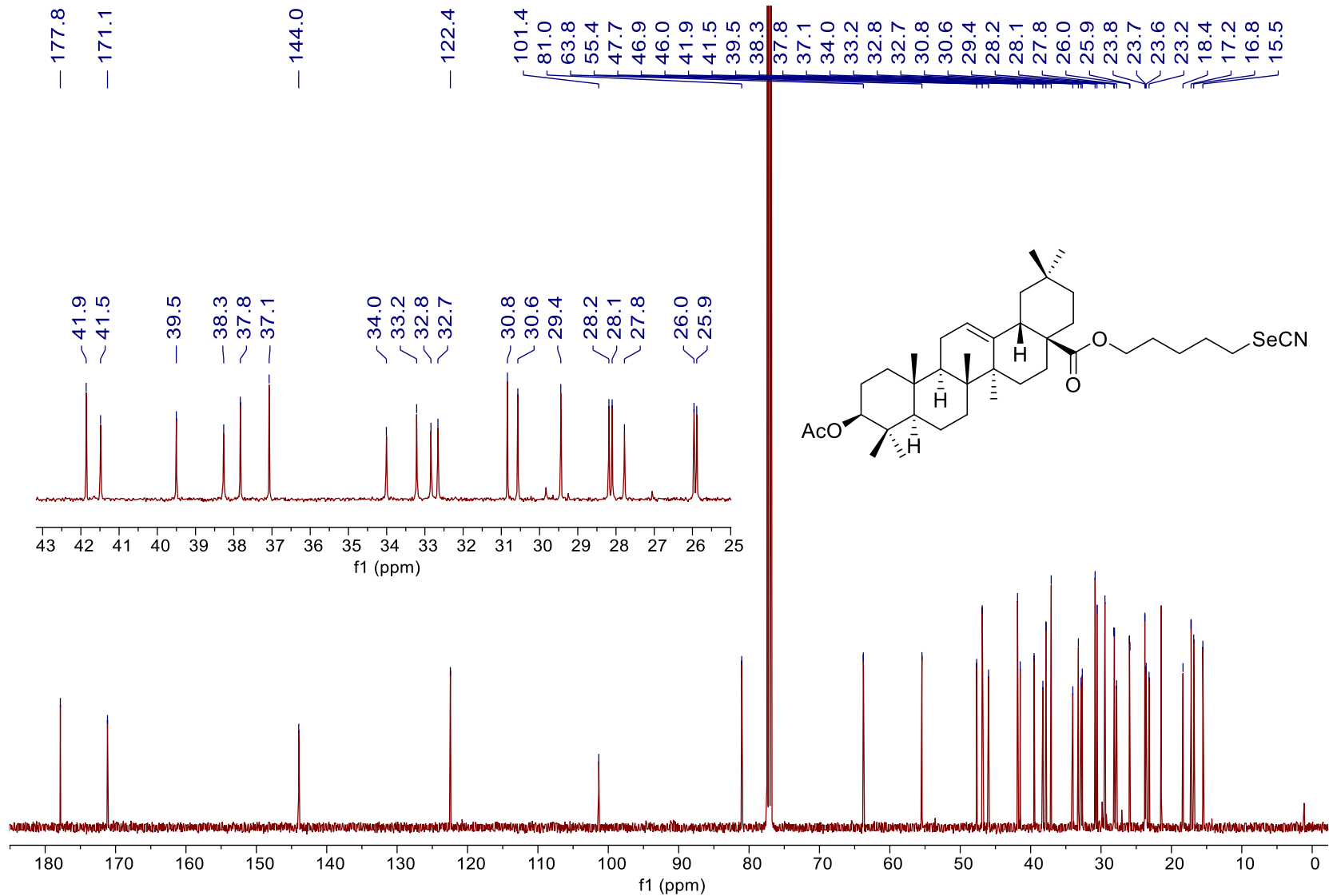


Figura 10.40. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **20**.

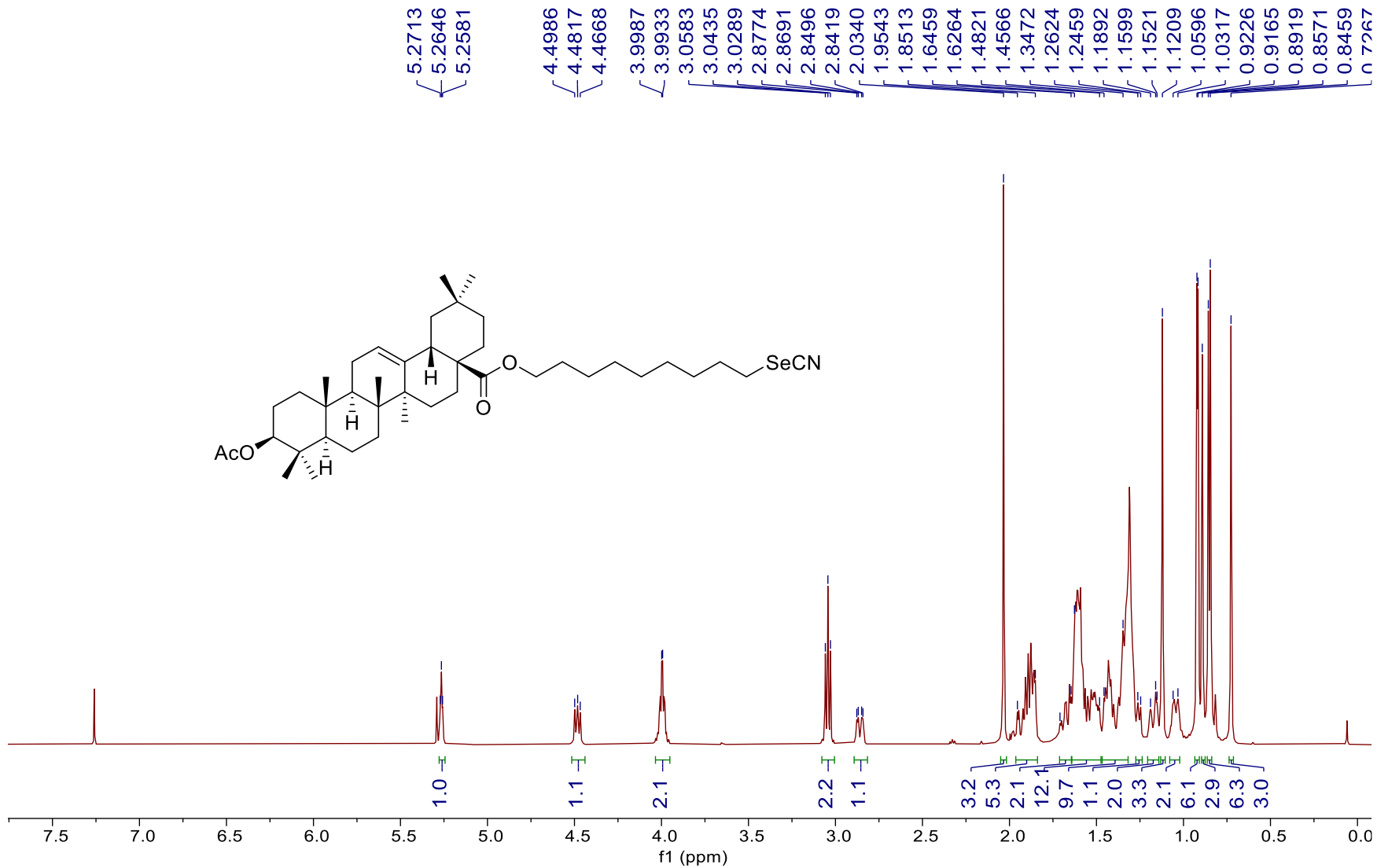


Figura 10.41. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **21**.

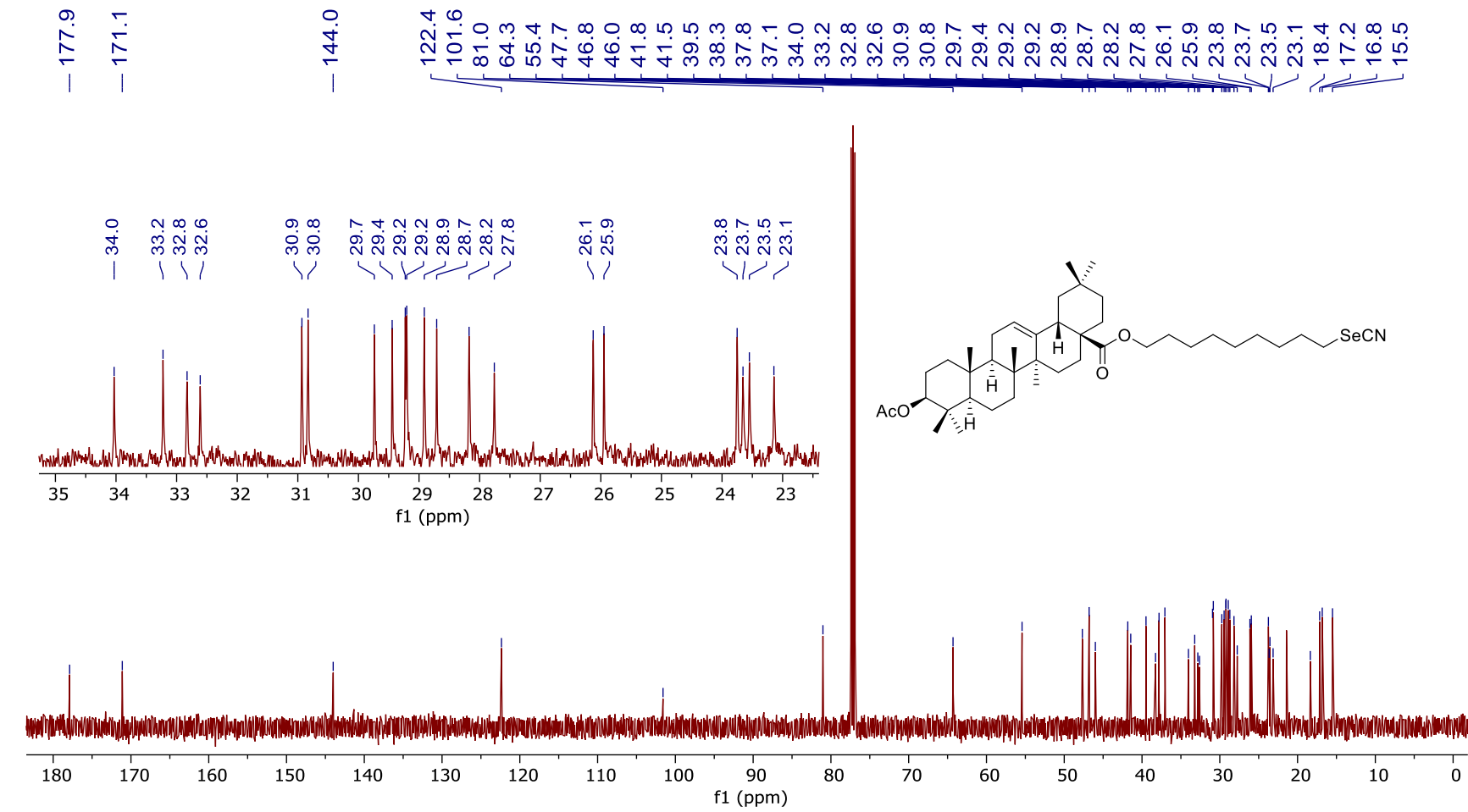


Figura 10.42. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **21**.

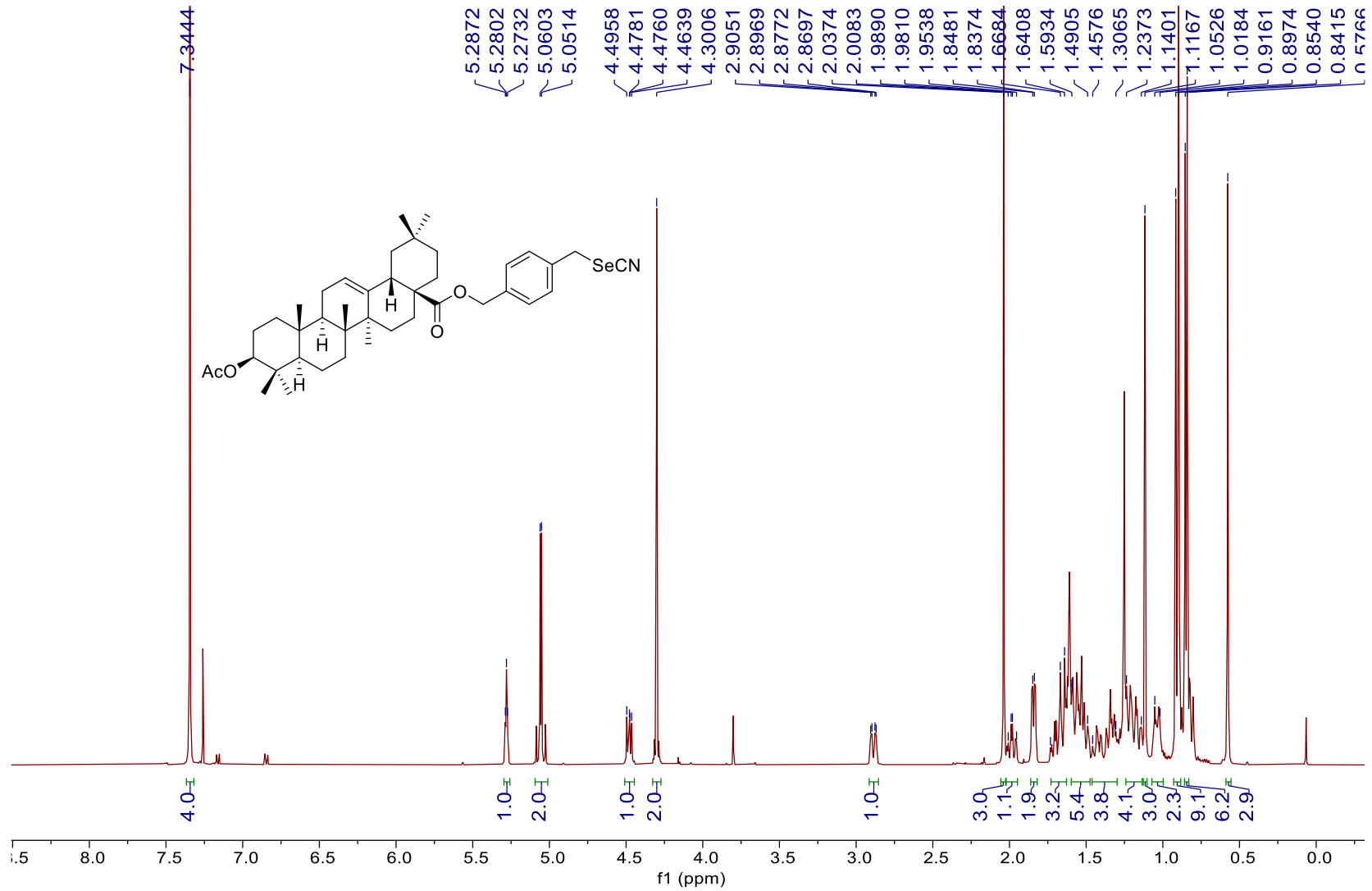


Figura 10.43. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **22**.

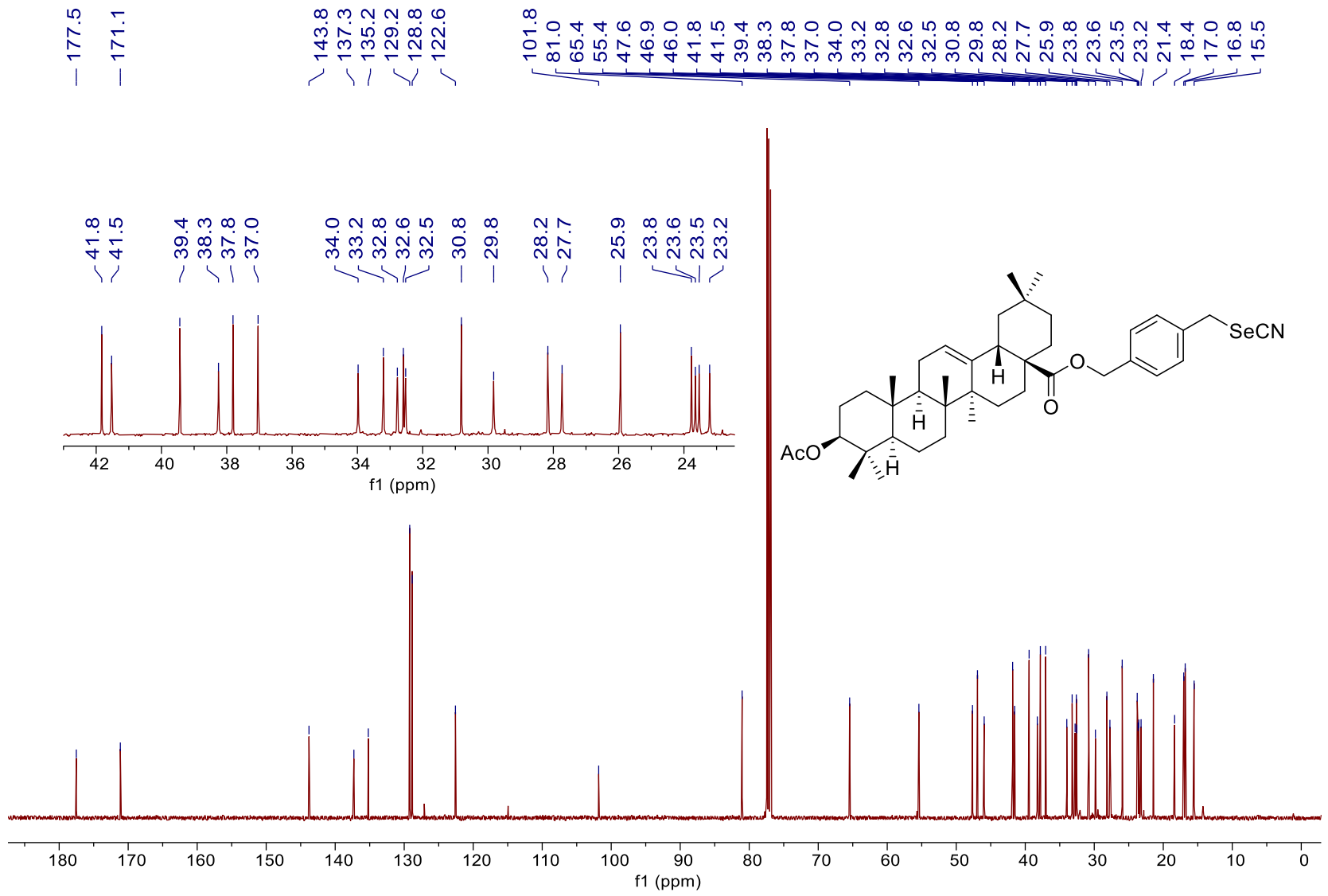


Figura 10.44. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **22**.

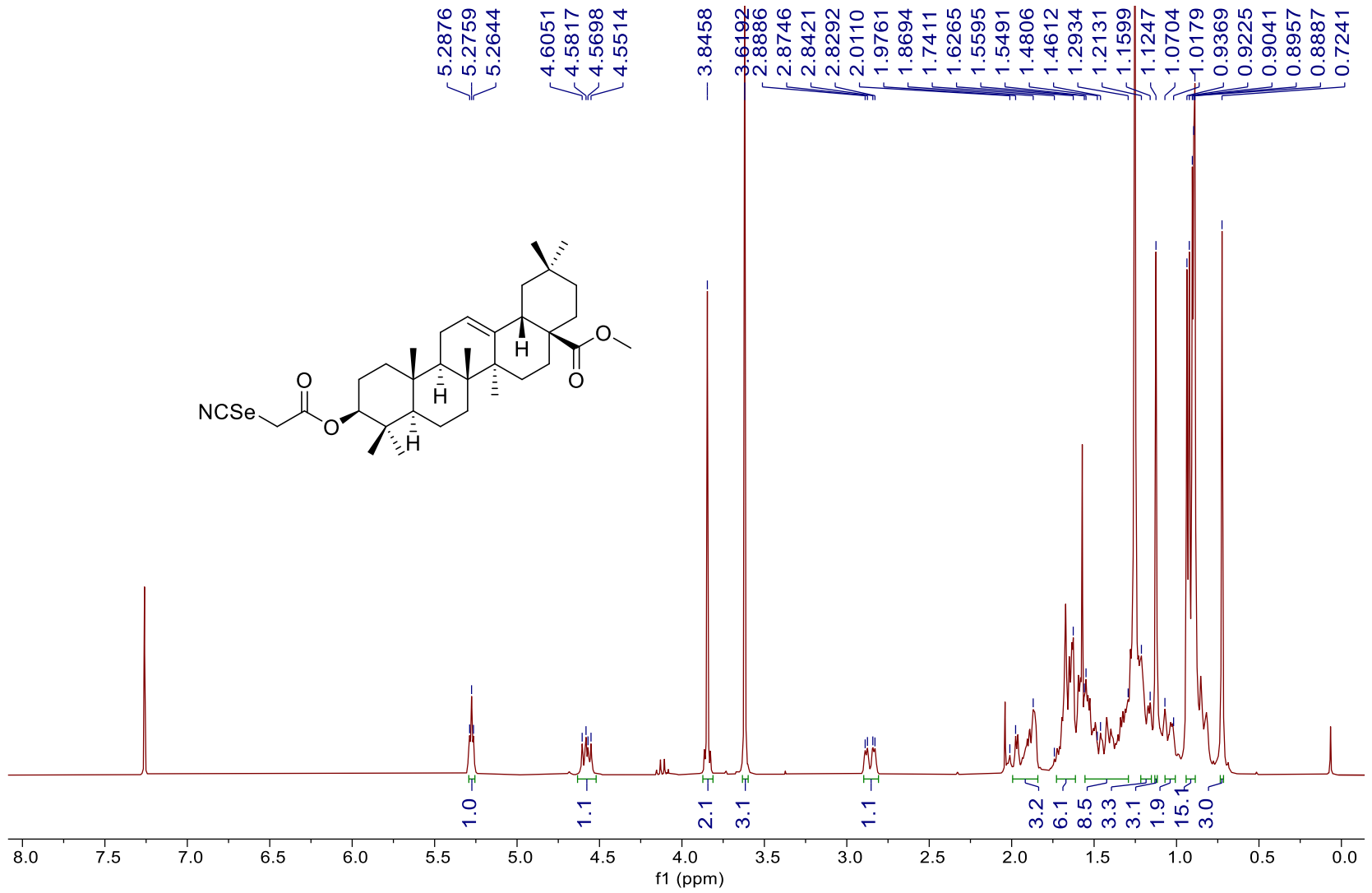


Figura 10.45. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **23**.

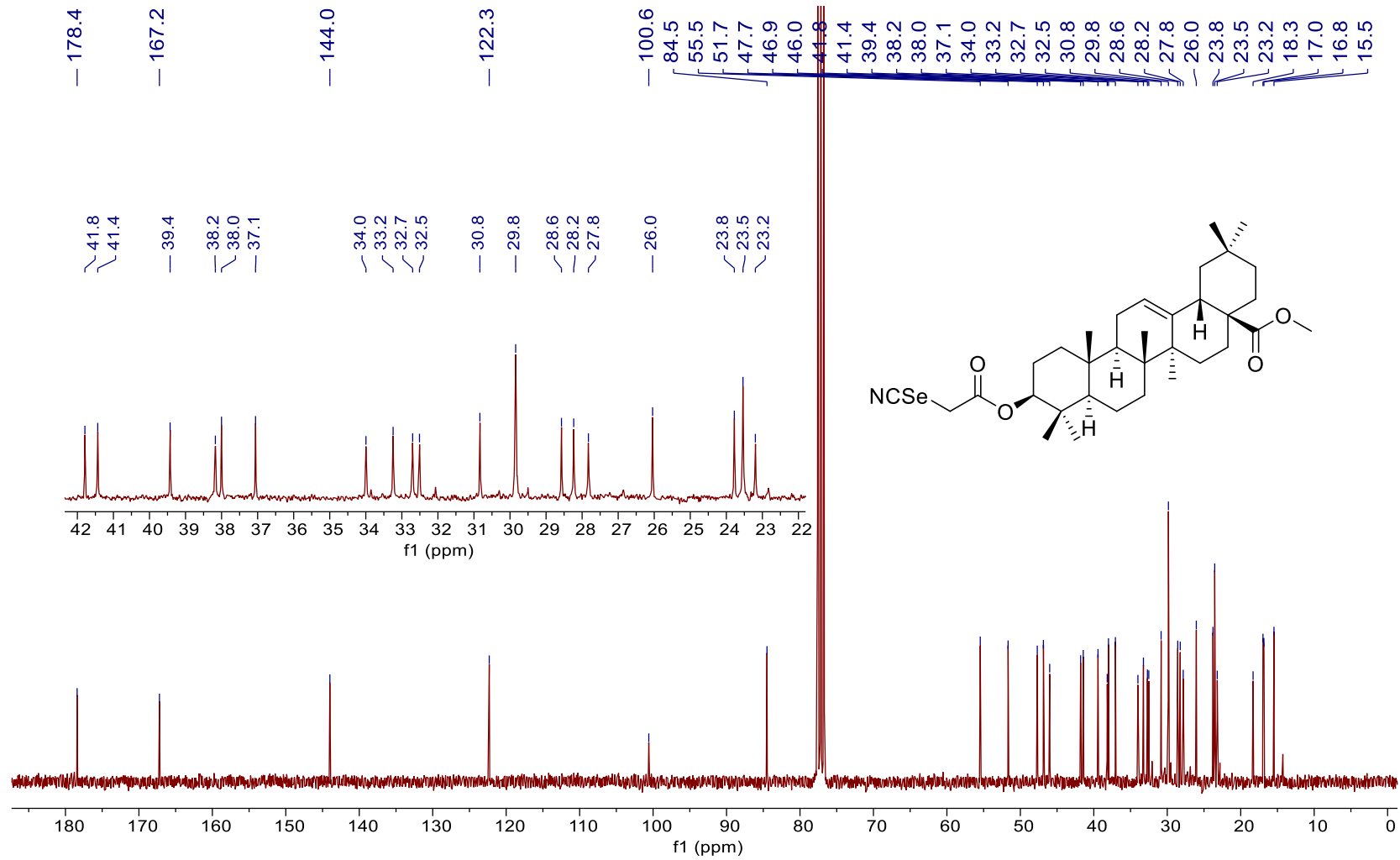


Figura 10.46. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **23**.

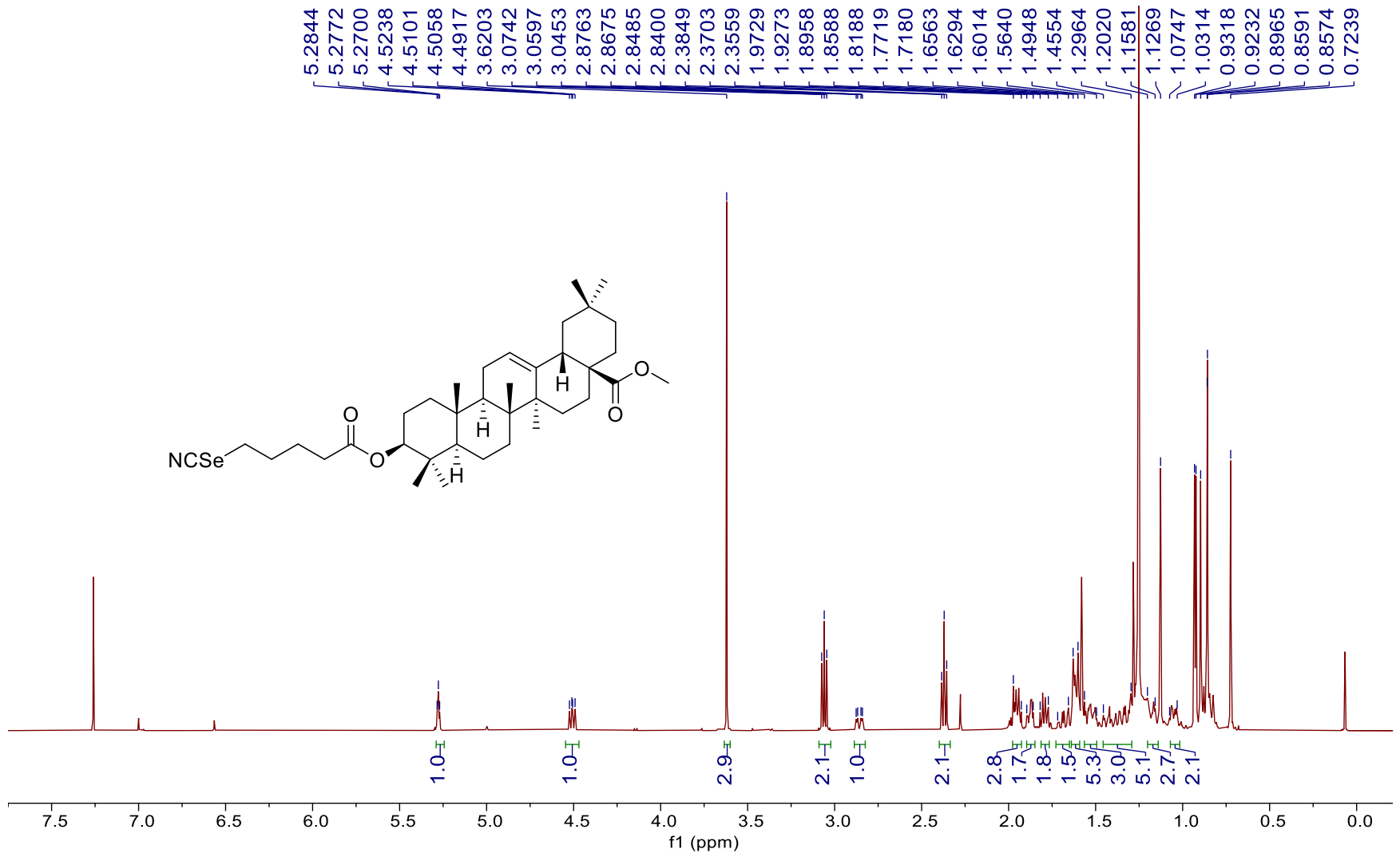


Figura 10.47. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **24**.

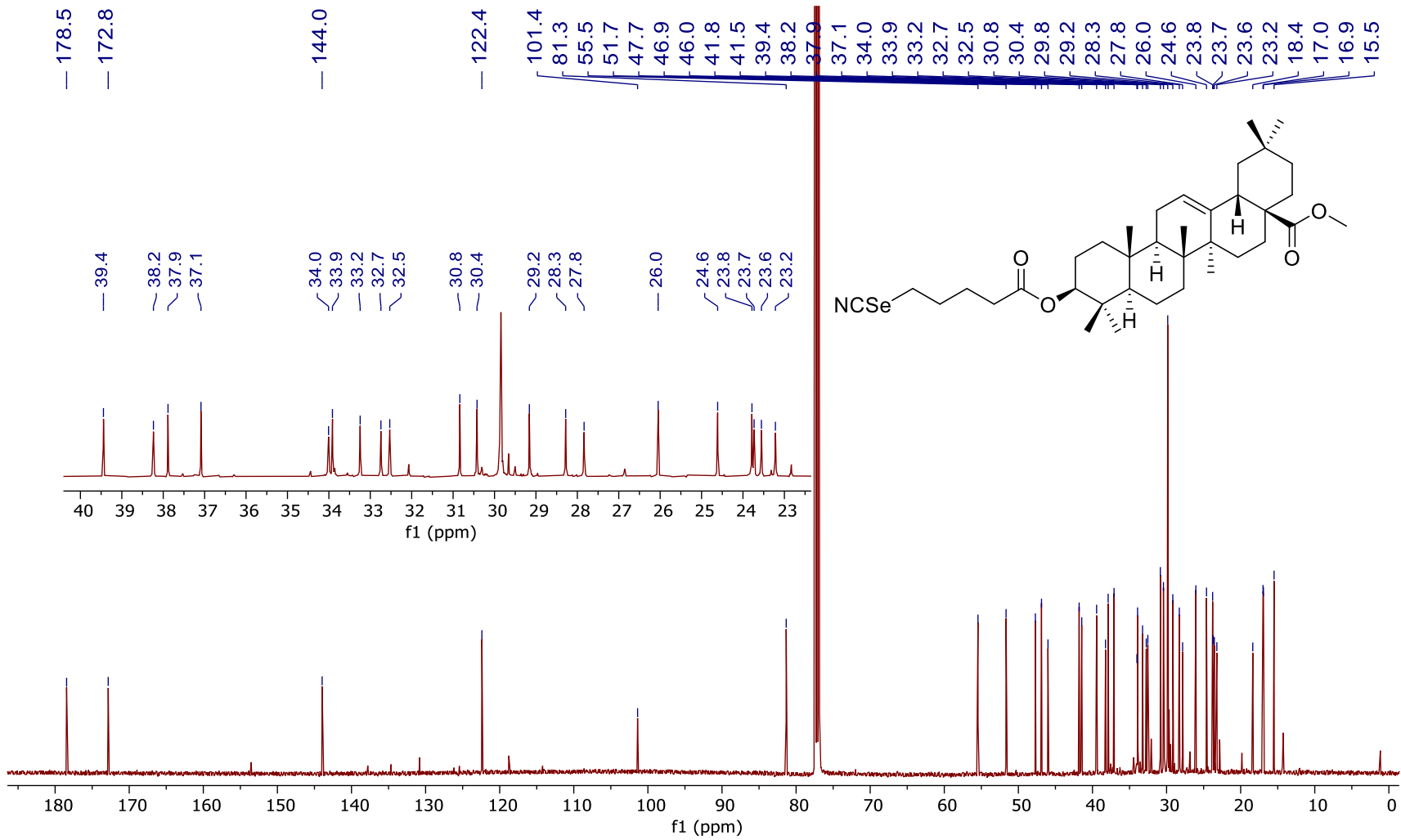


Figura 10.48. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 24.

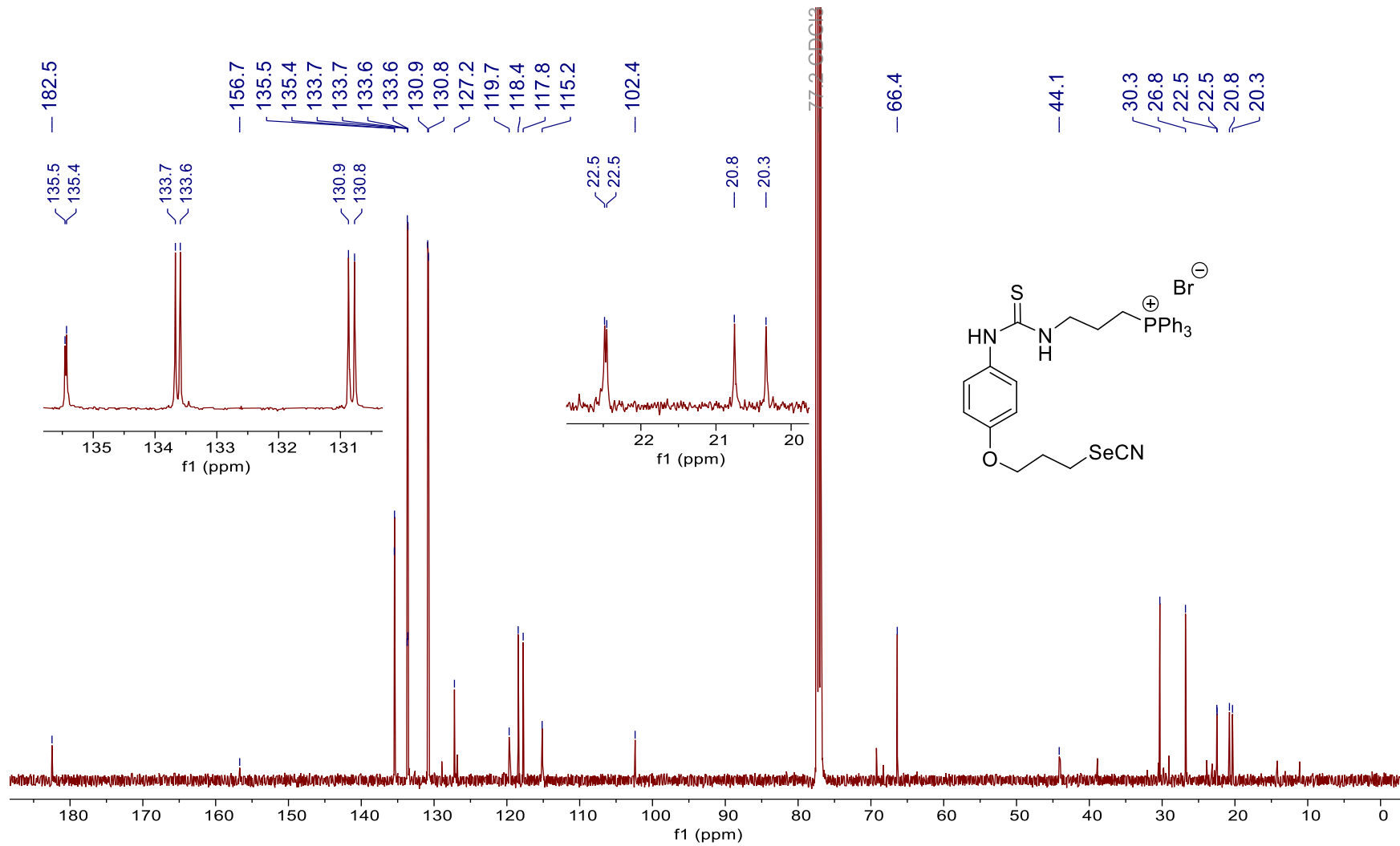


Figura 10.50. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto 25.

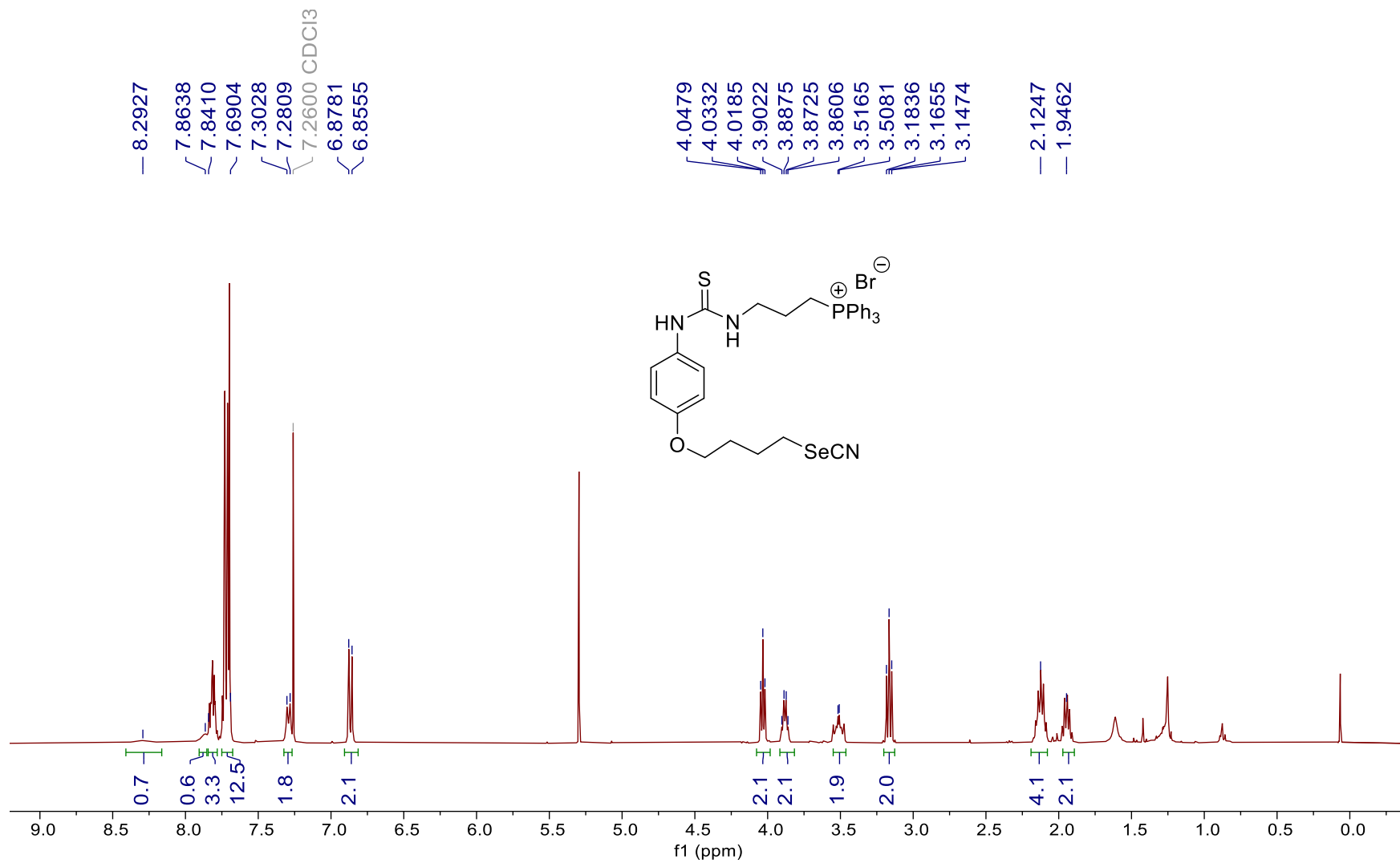


Figura 10.51. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 26.

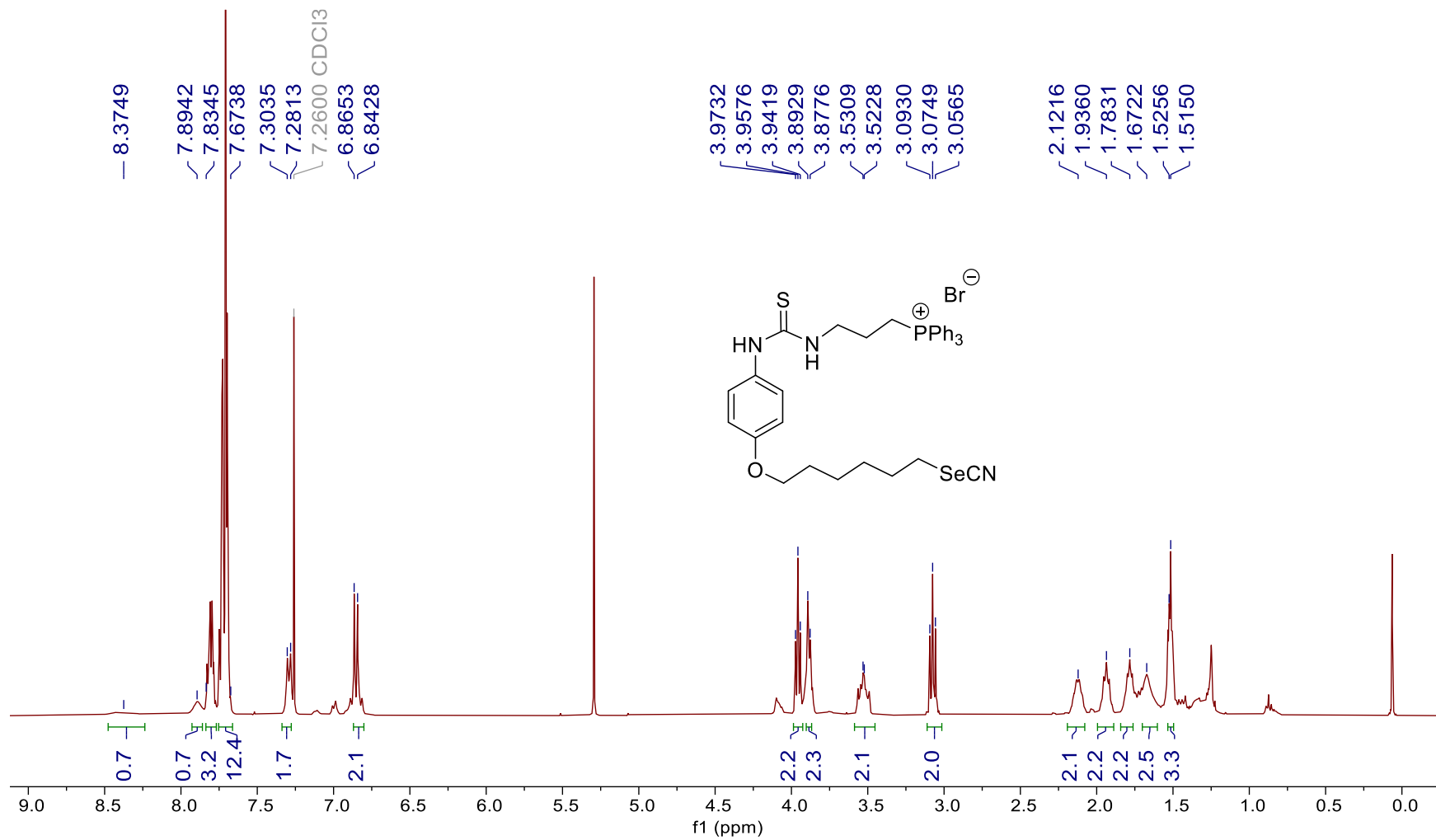


Figura 10.53. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto 27.

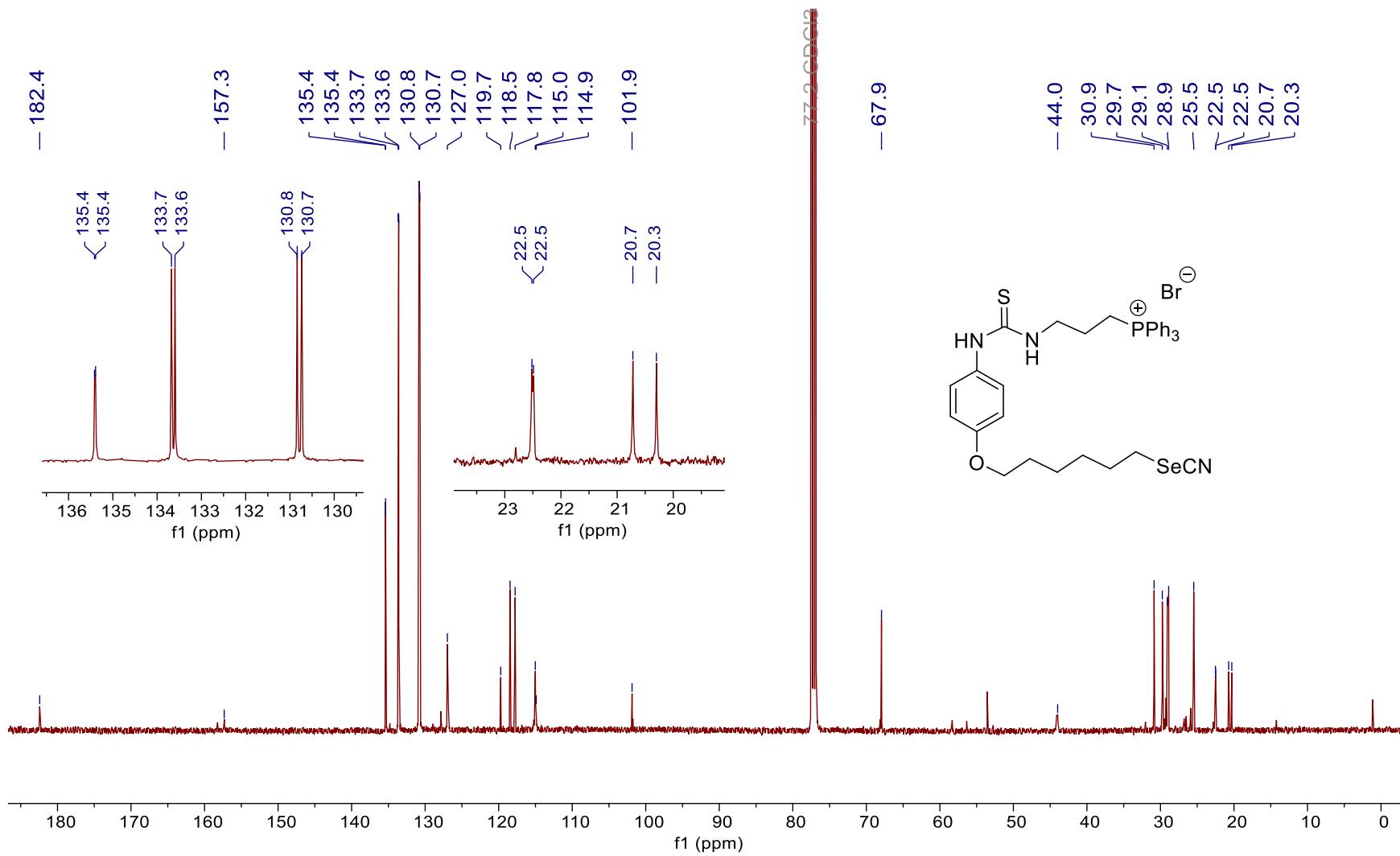


Figura 10.54. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **27**.

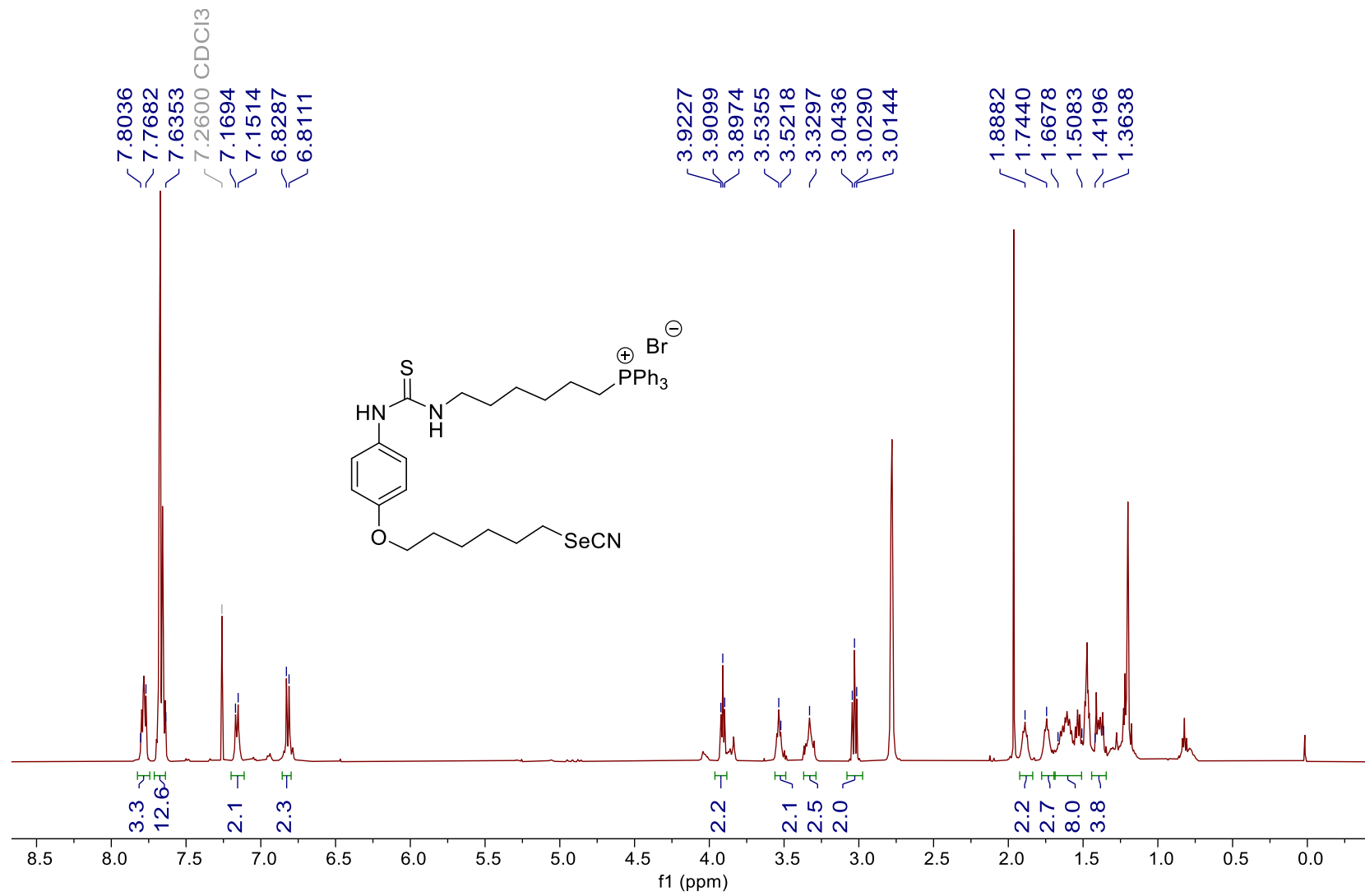


Figura 10.55. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **28**.

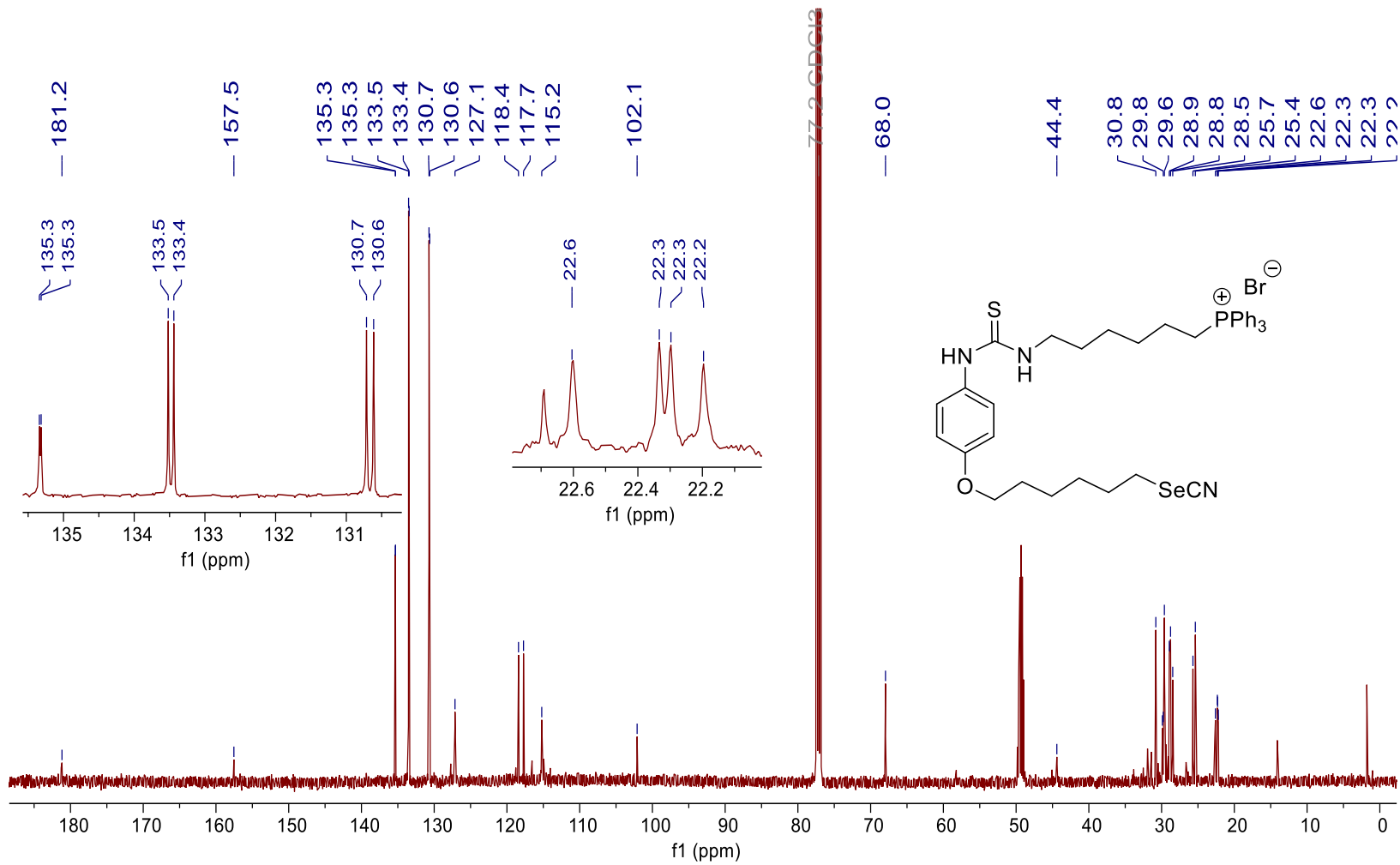


Figura 10.56. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **28**.

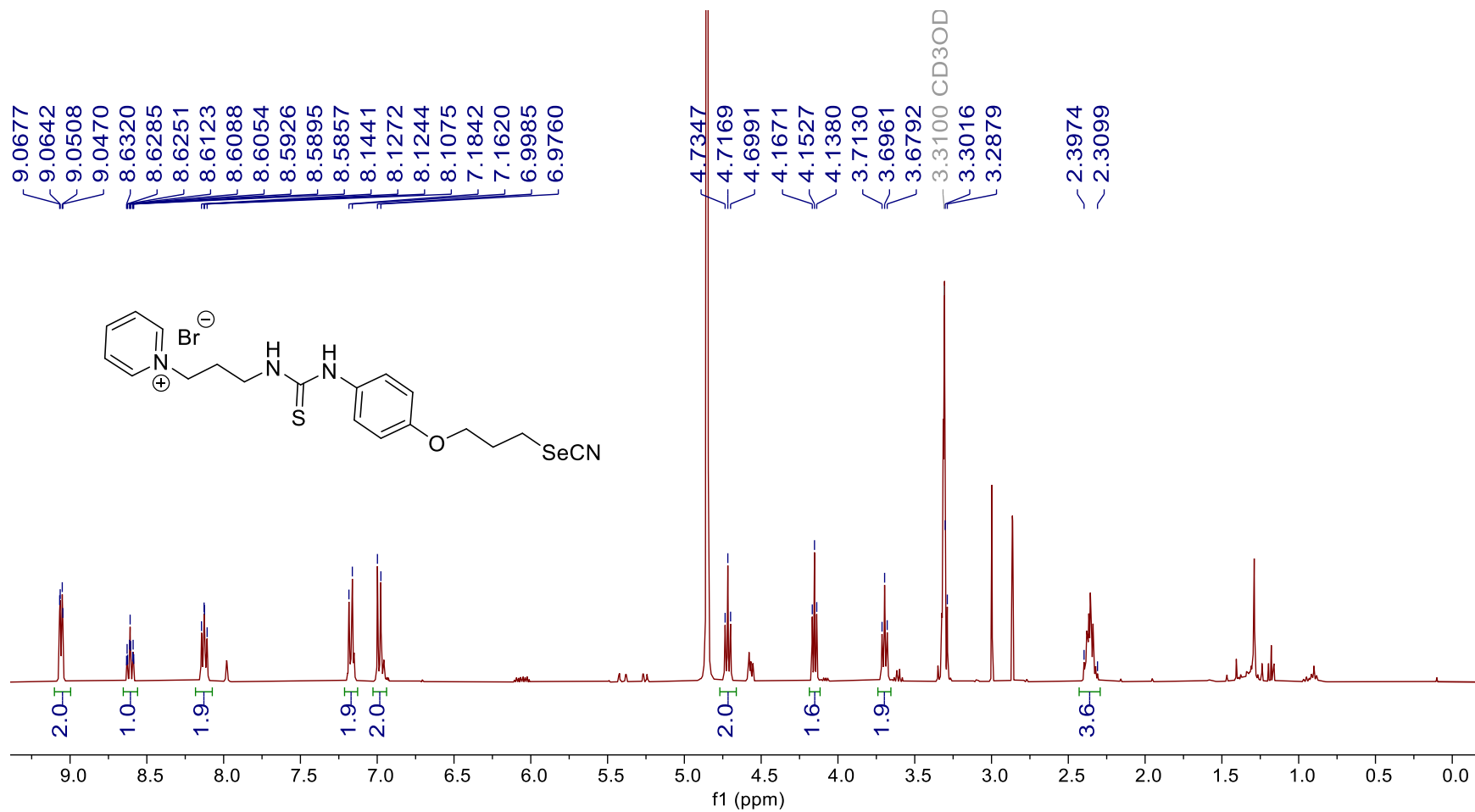


Figura 10.57. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **29**.

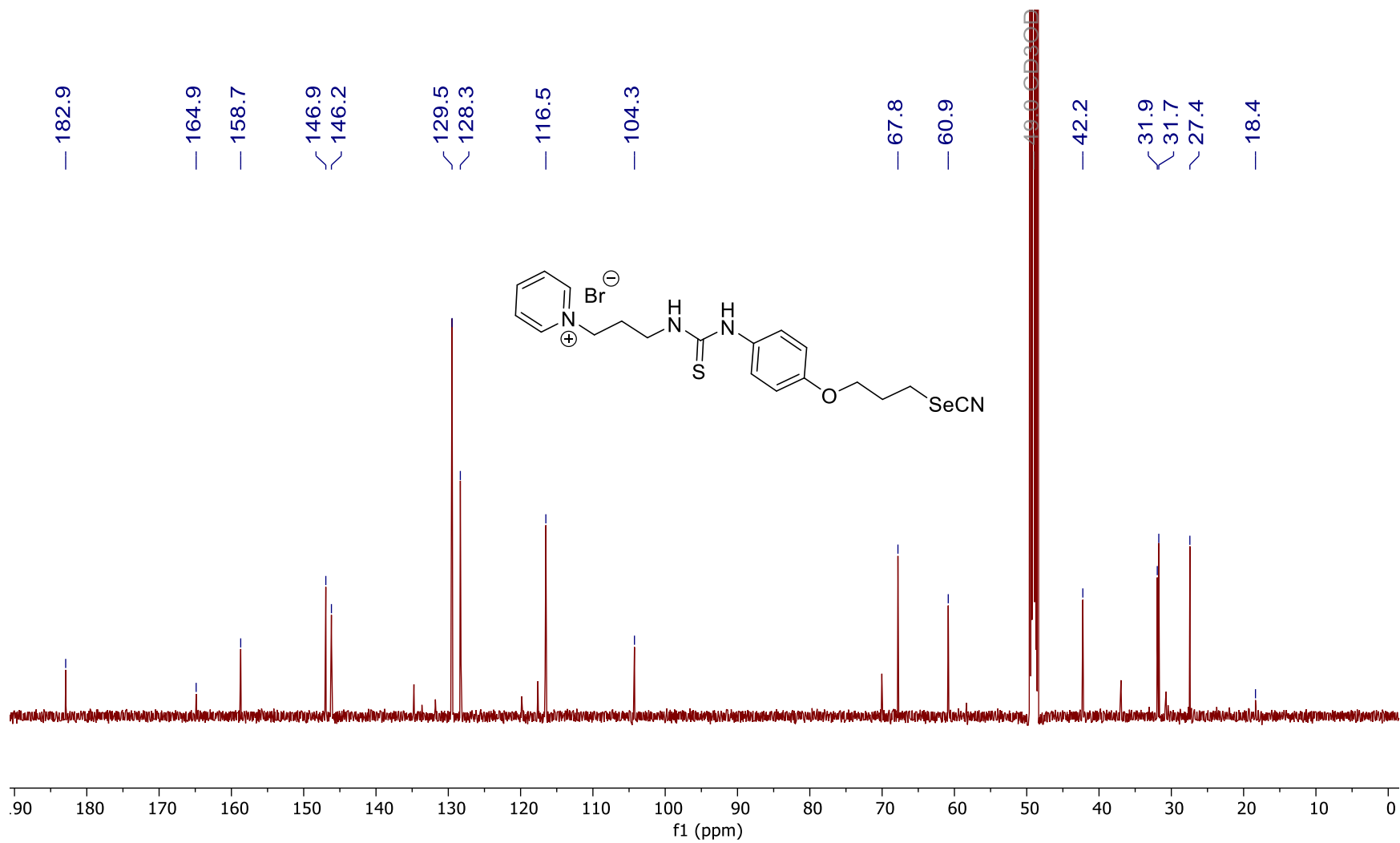


Figura 10.58. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **29**.

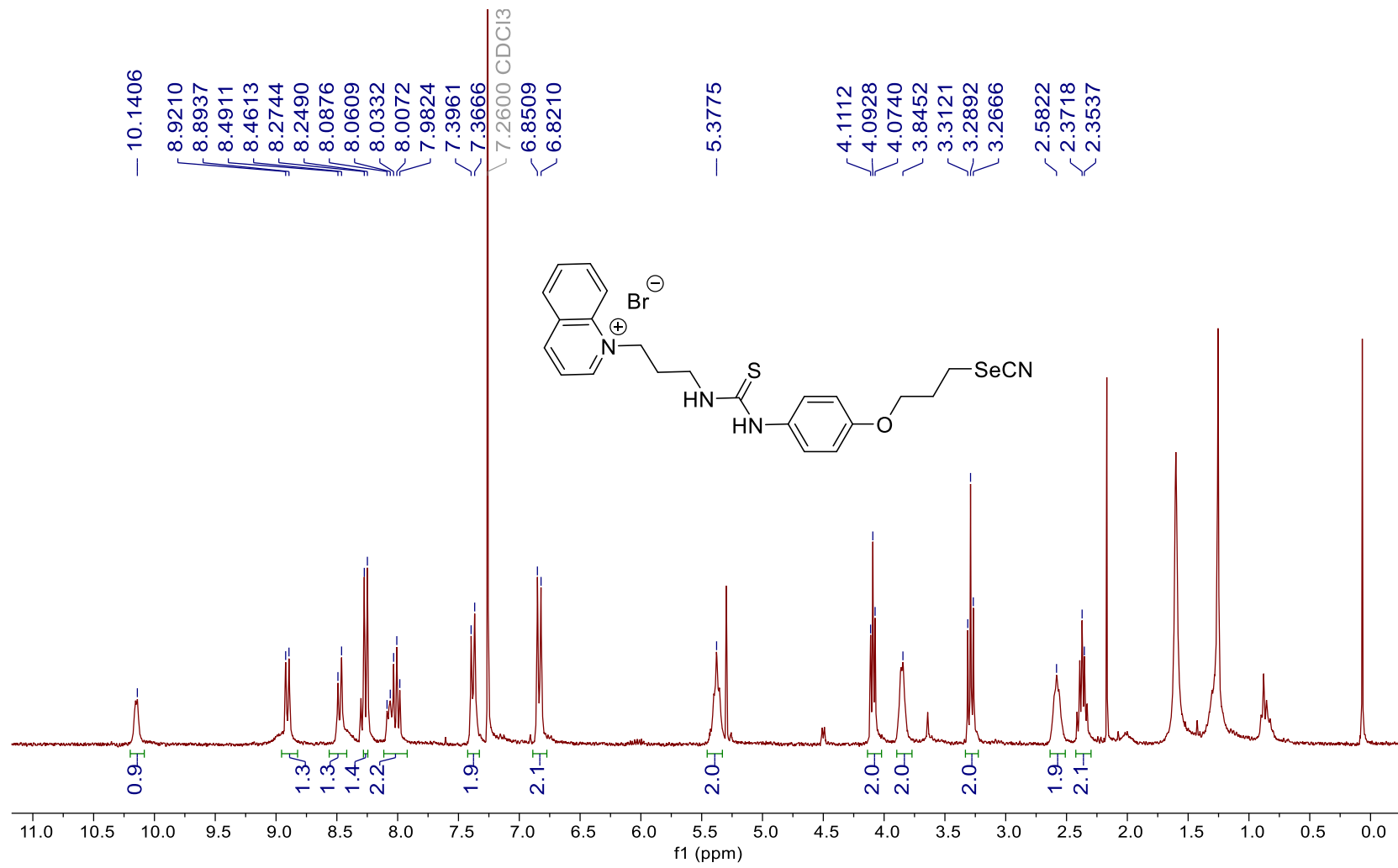


Figura 10.59. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **30**.

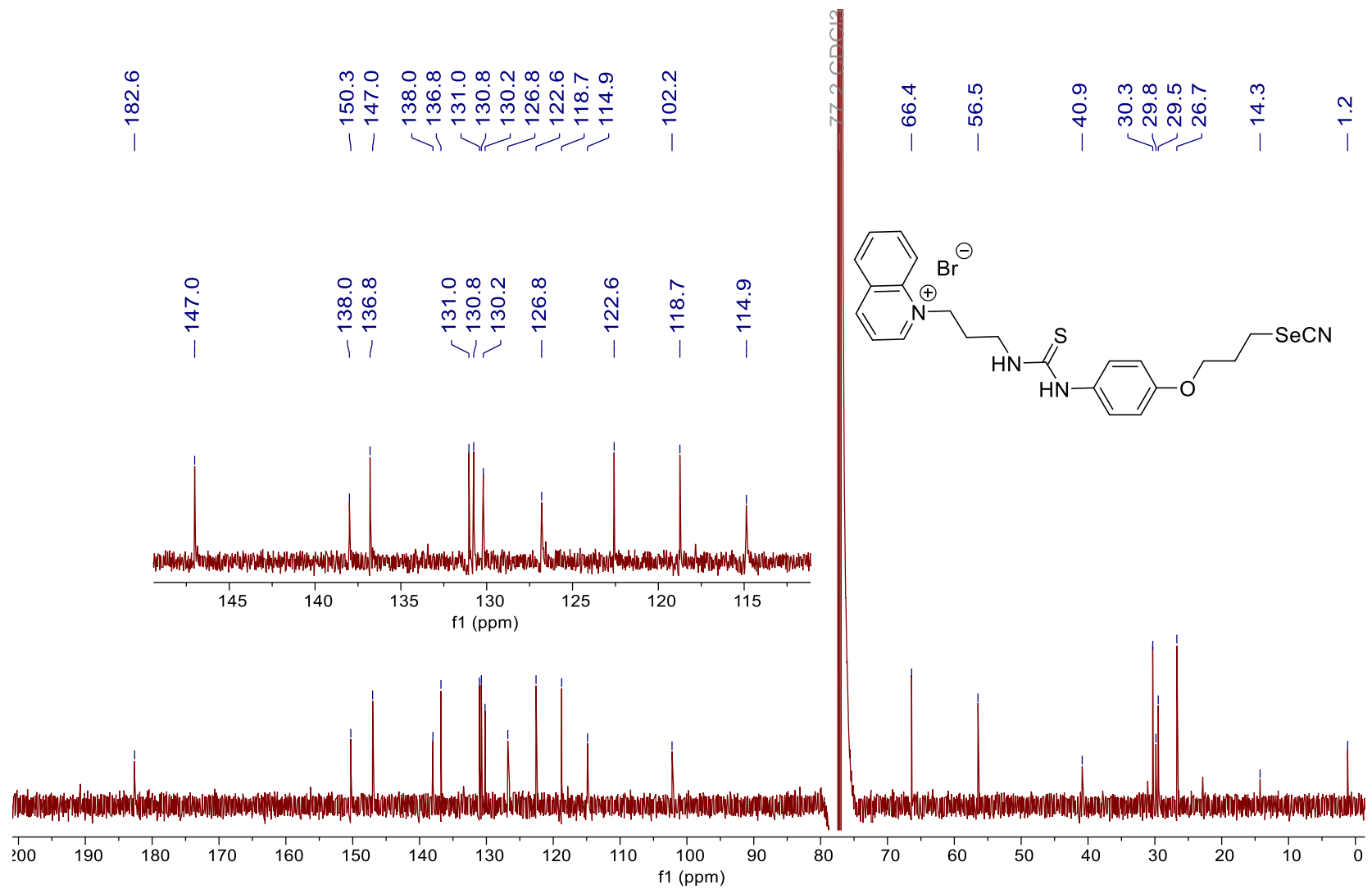


Figura 10.60. Espectro de ¹³C-RMN (125.7 MHz, CDCl₃) del compuesto **30**.

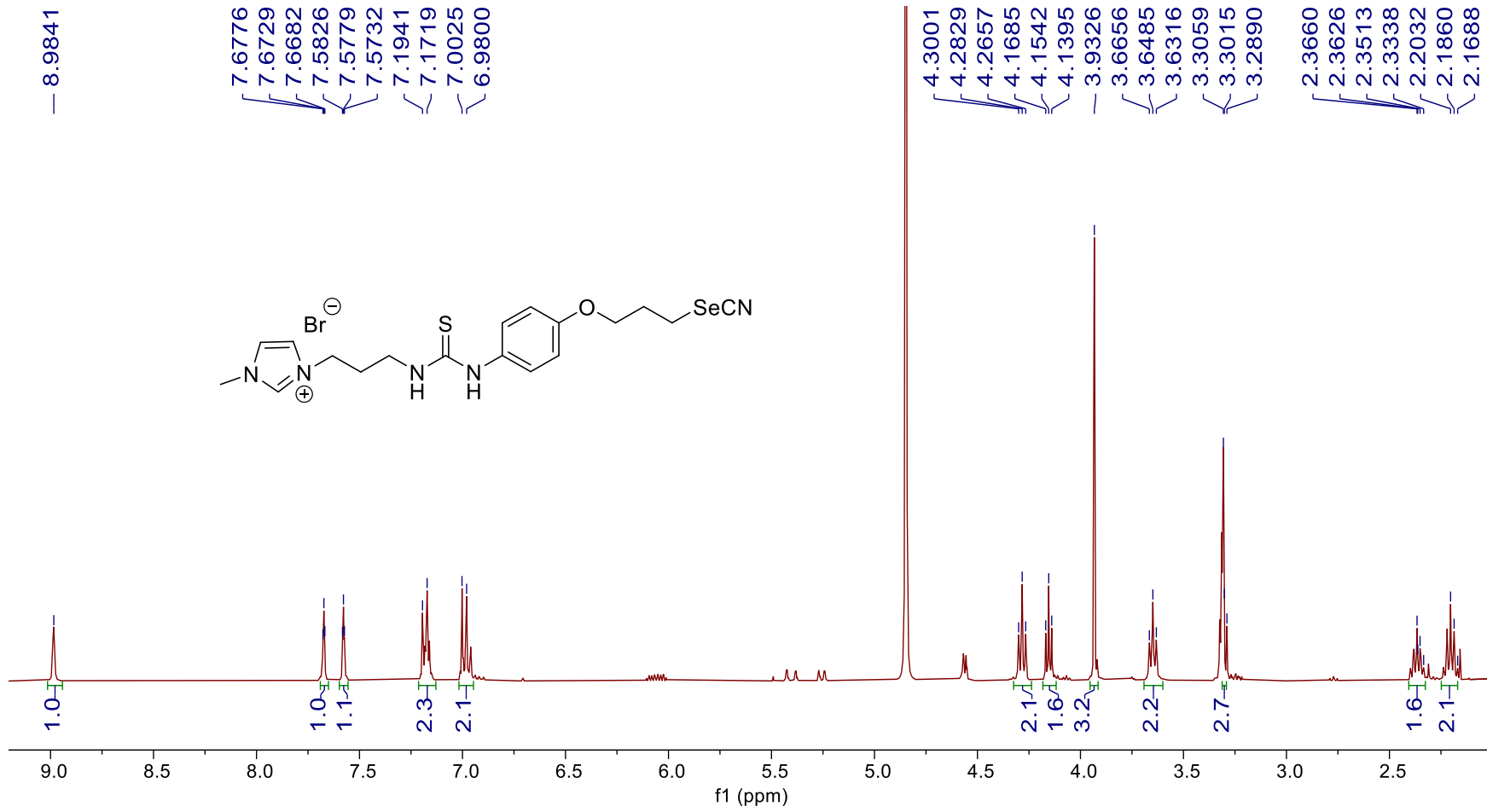


Figura 10.61. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) del compuesto **31**.

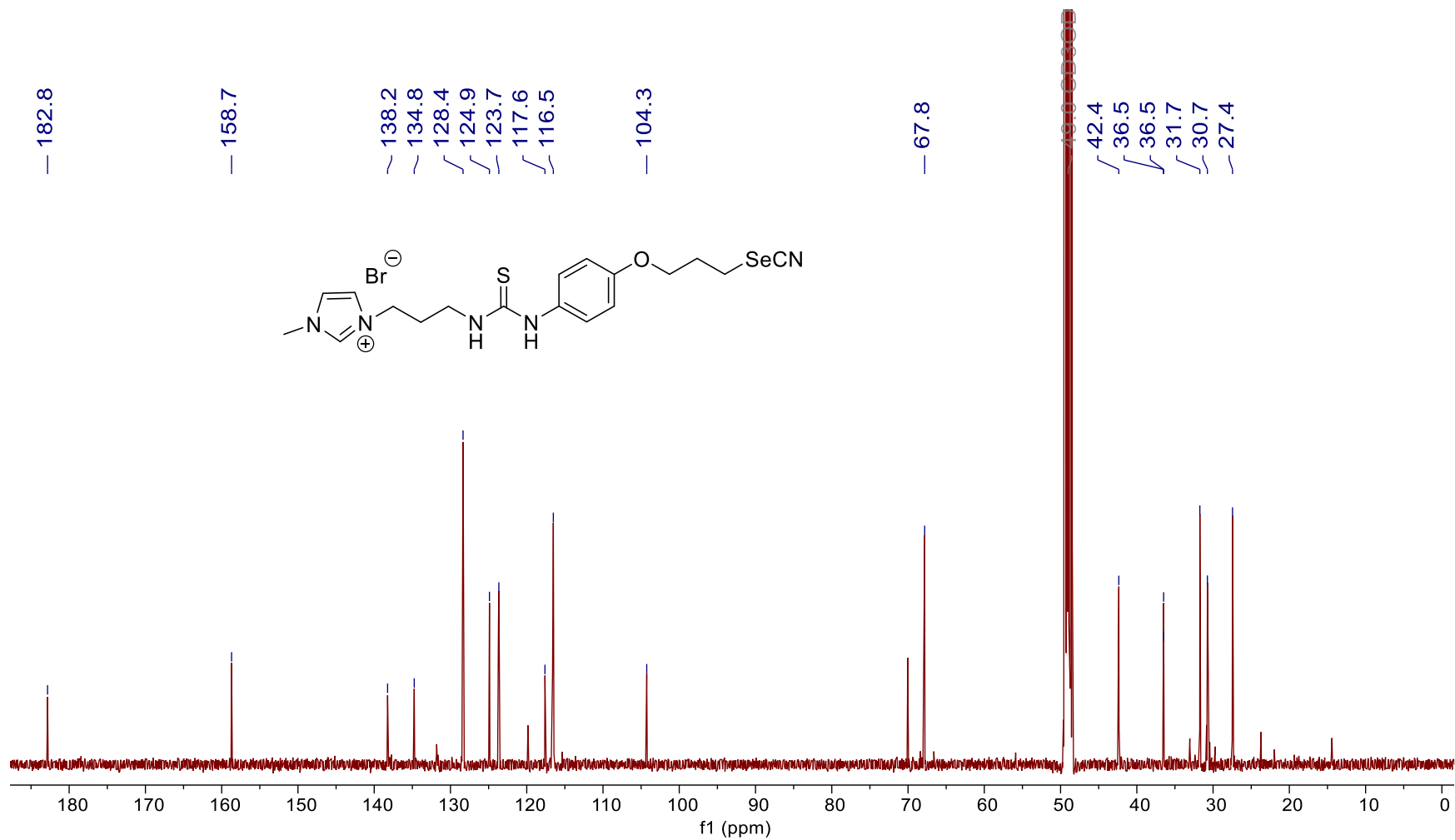


Figura 10.62. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CD_3OD) del compuesto 31.

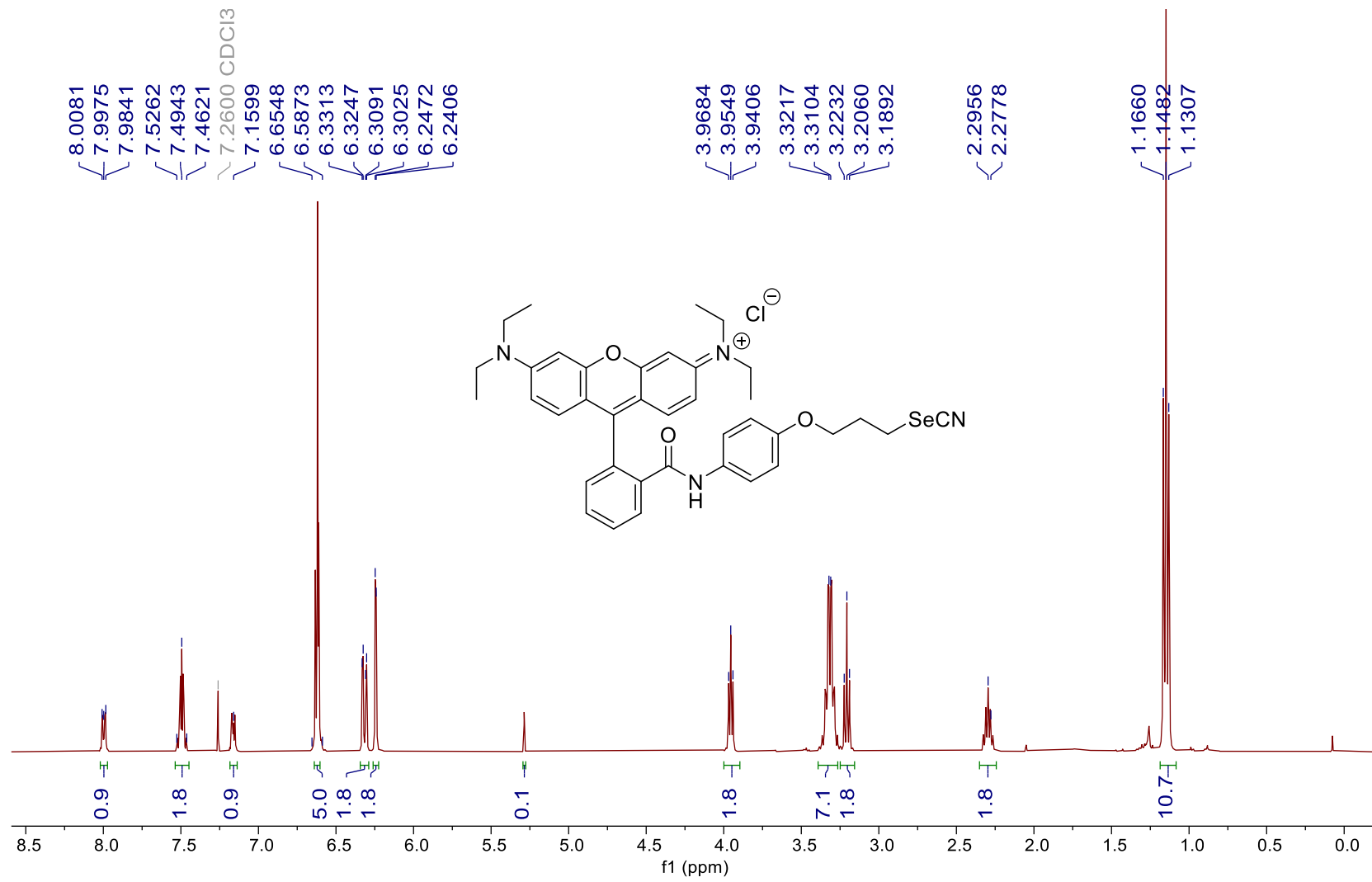


Figura 10.63. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **32**.

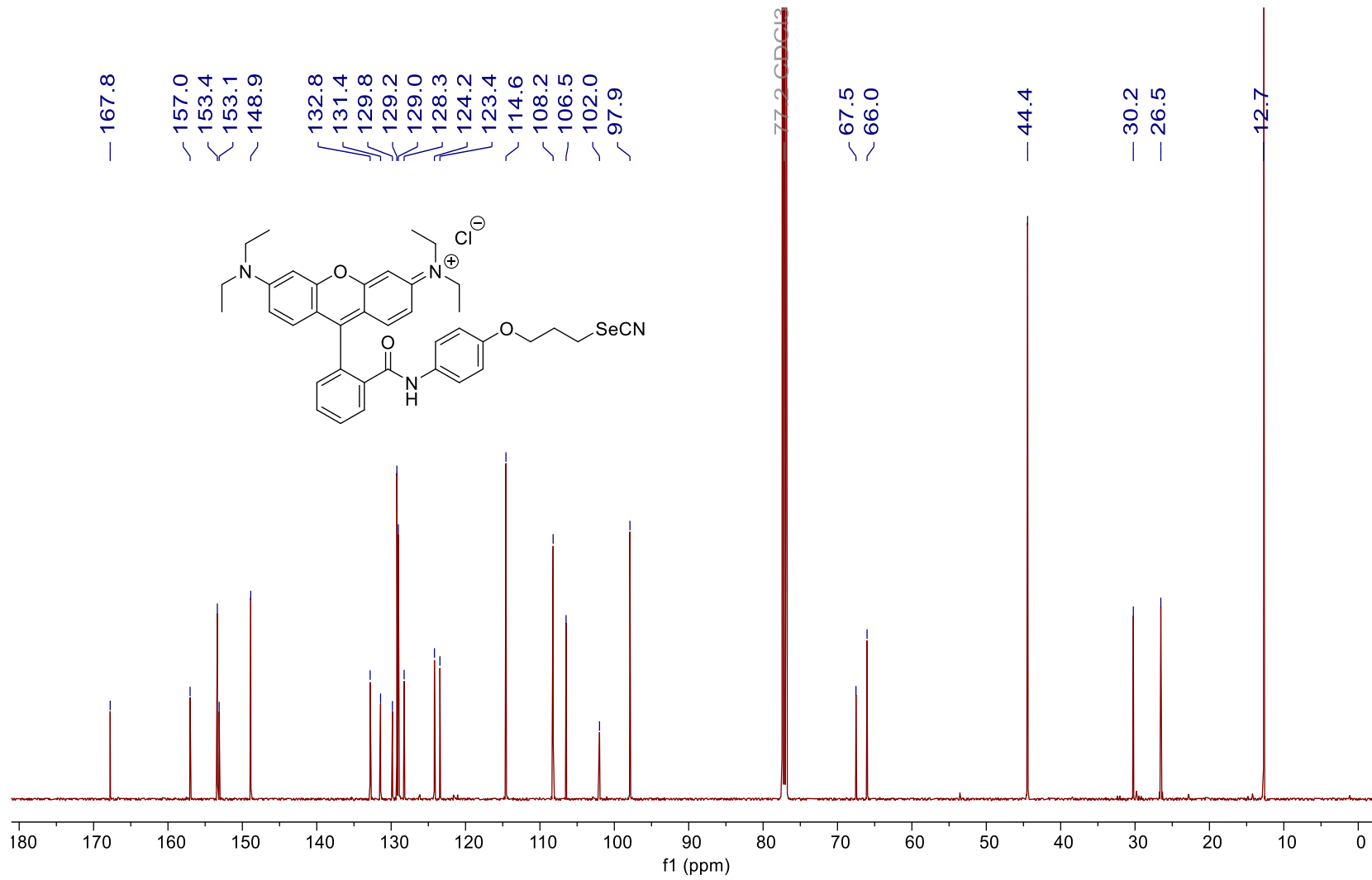


Figura 10.64. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **32**.

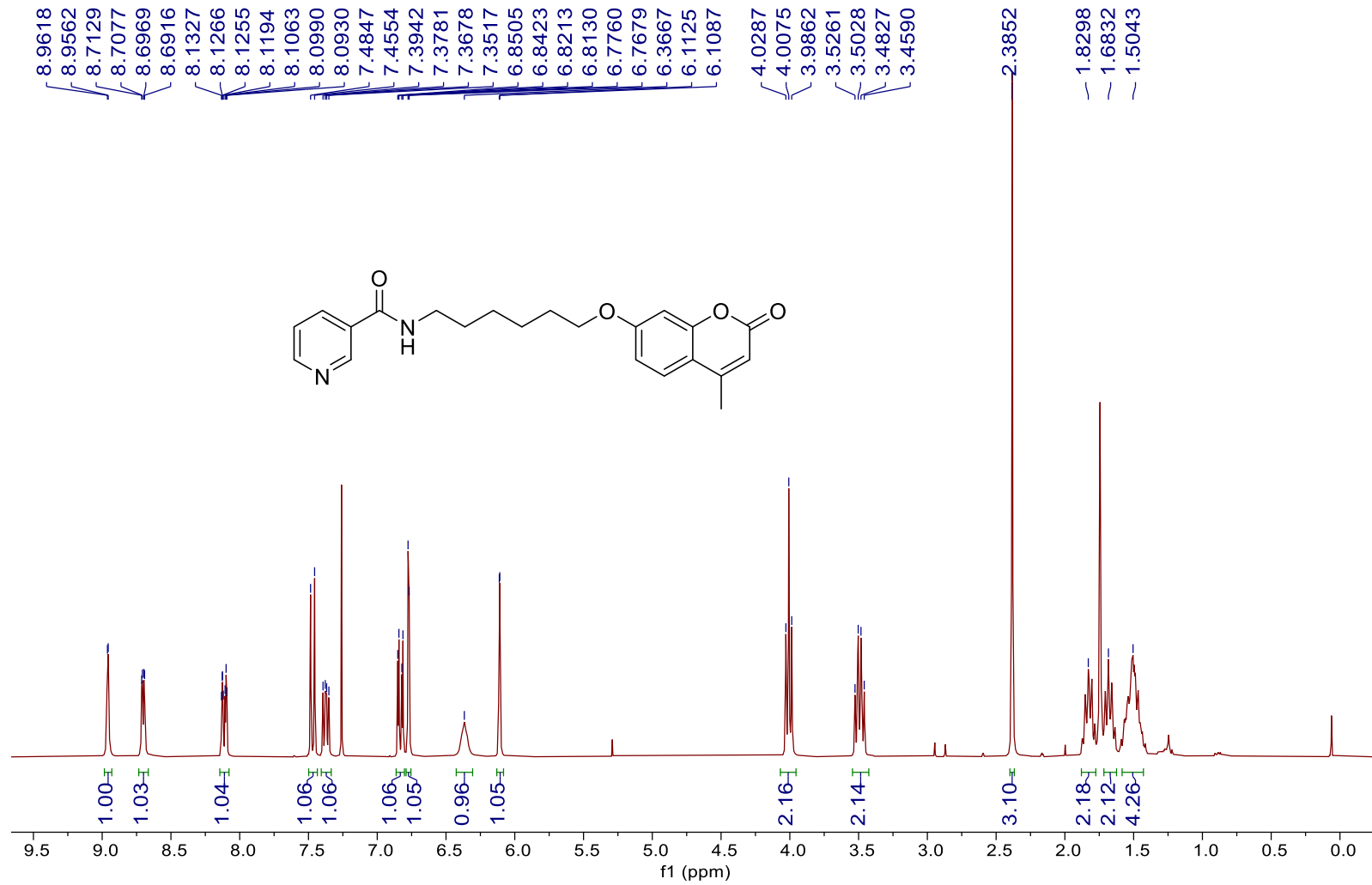


Figura 10.65. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **33**.

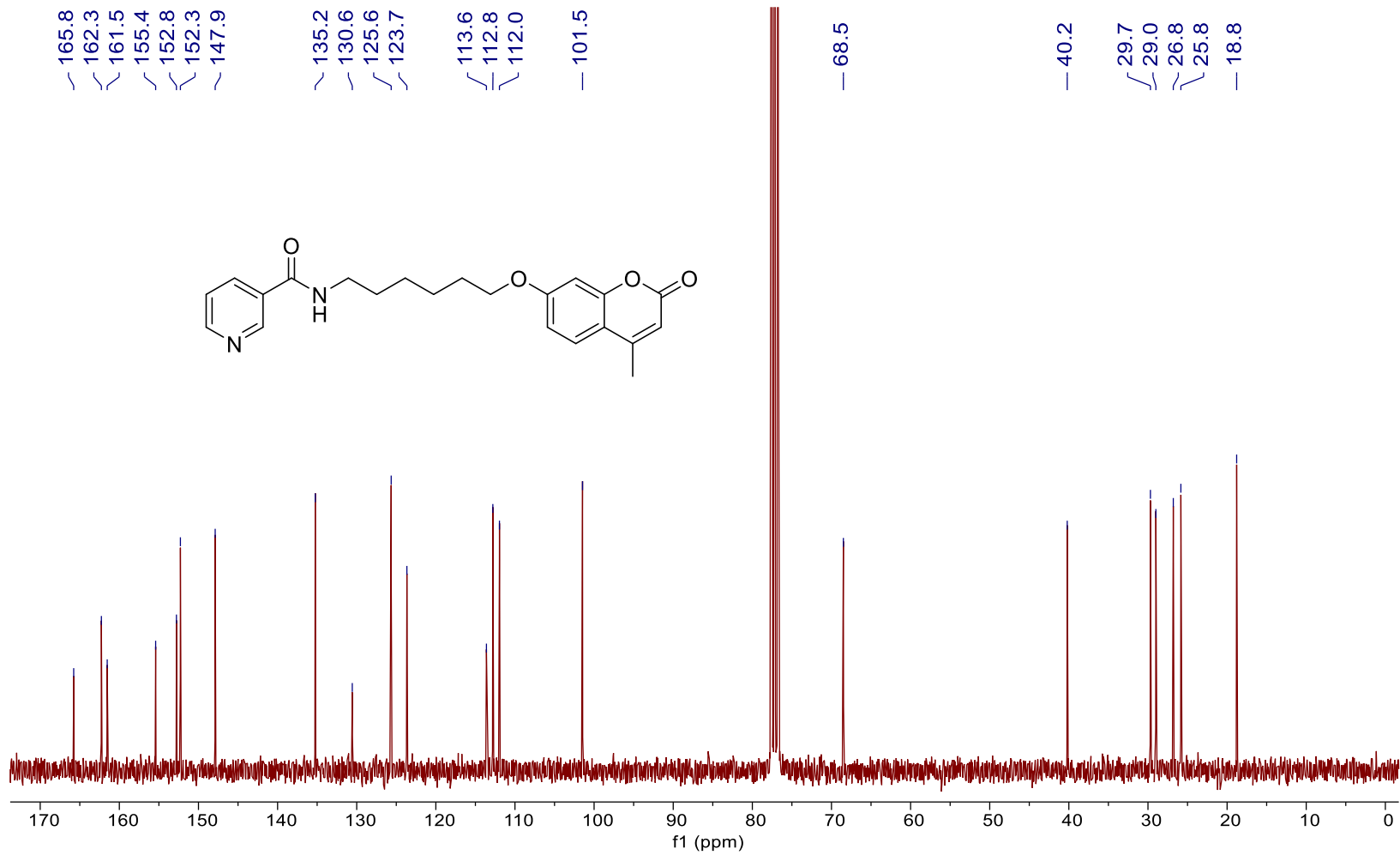


Figura 10.66. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto 33.

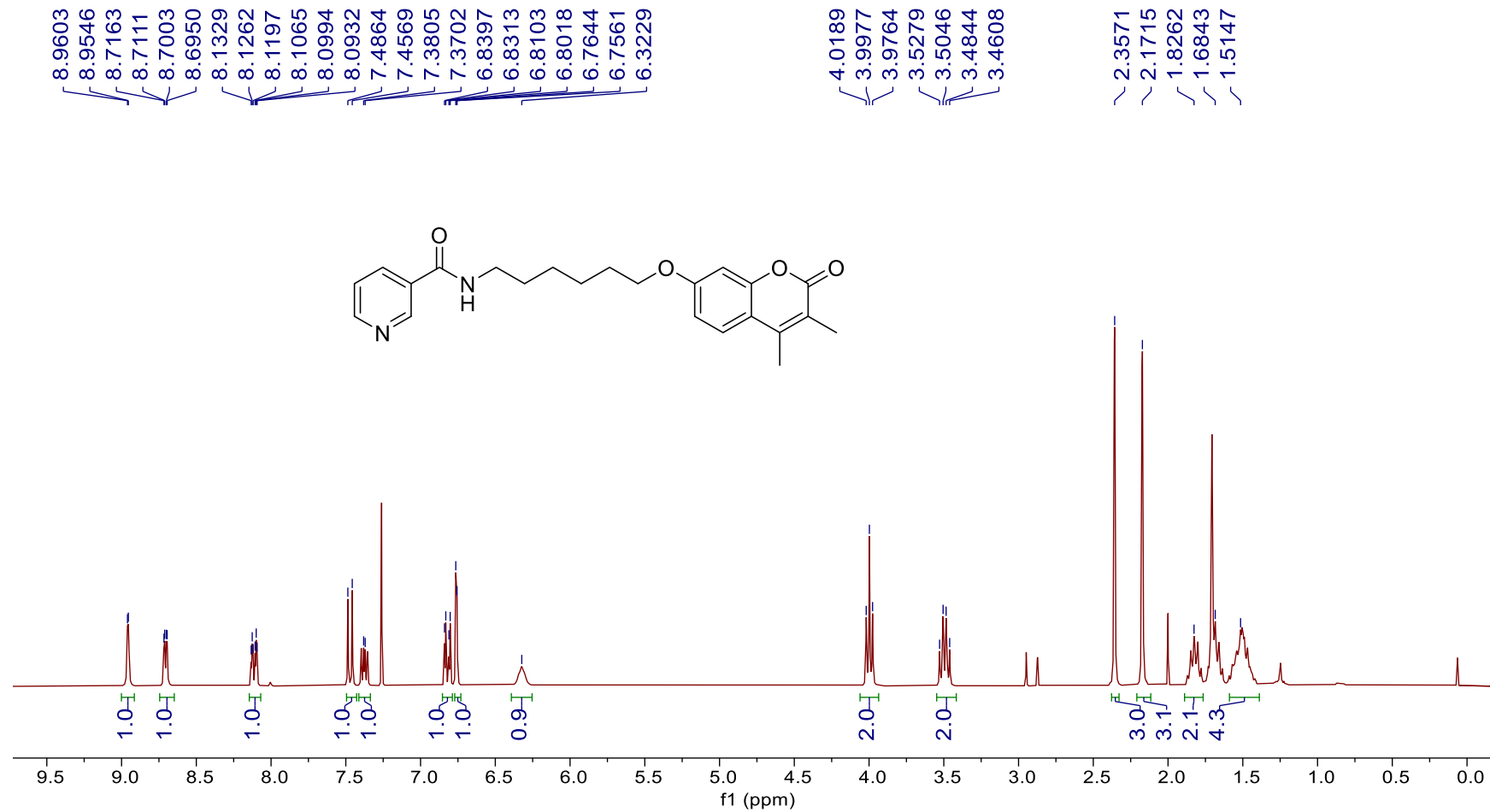


Figura 10.67. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **34**.

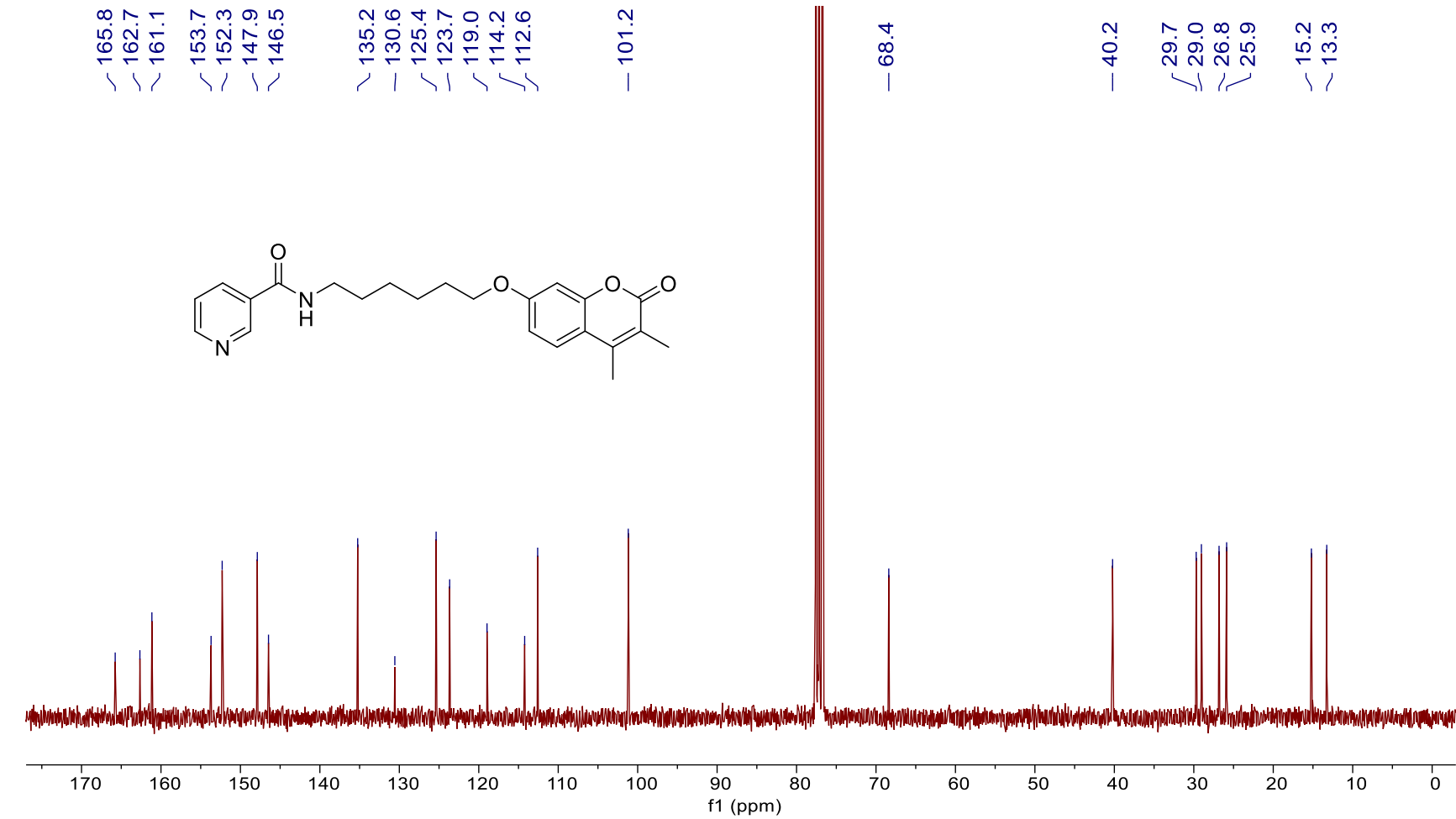


Figura 10.68. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **34**.

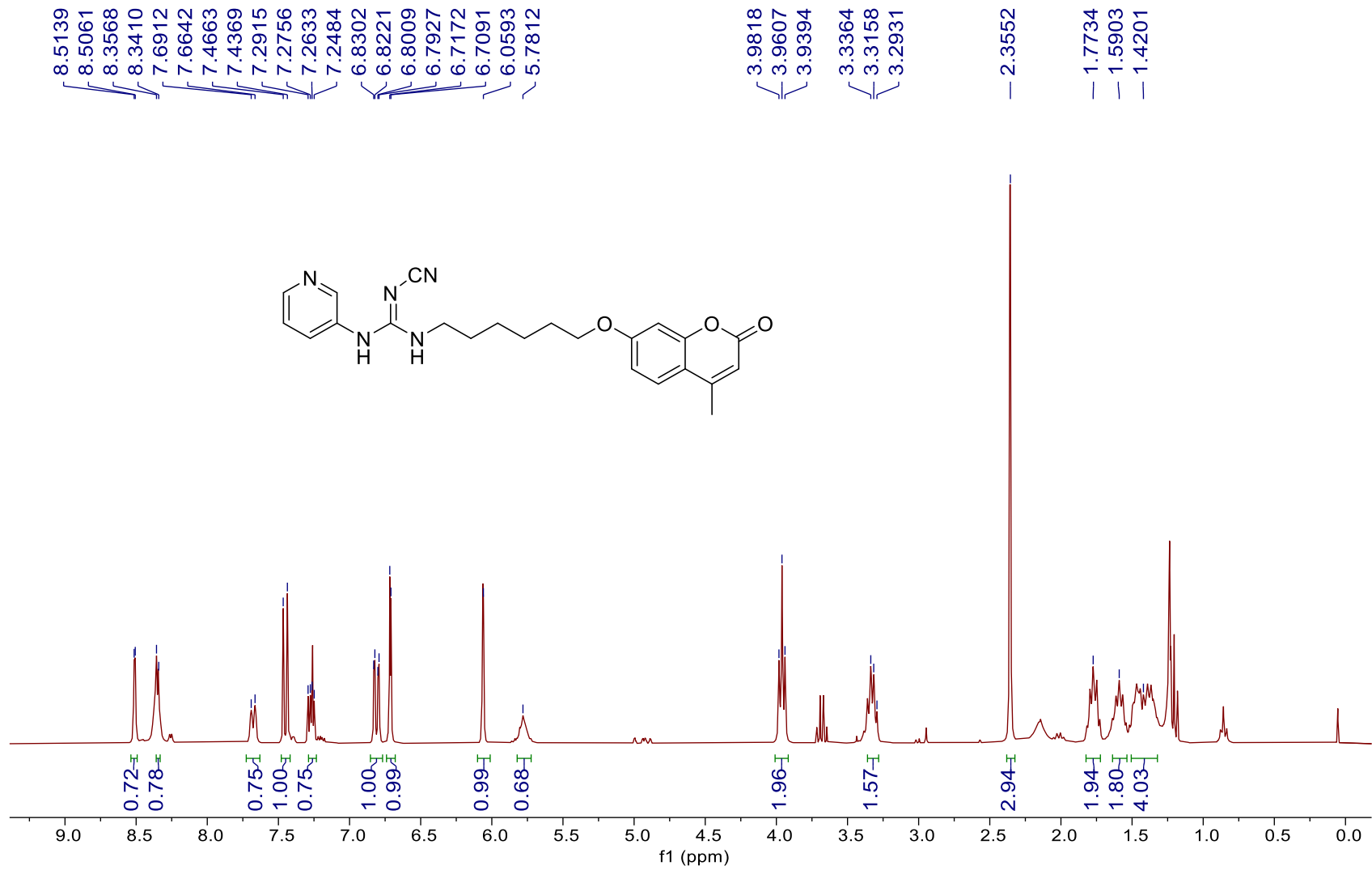


Figura 10.69. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **35**.

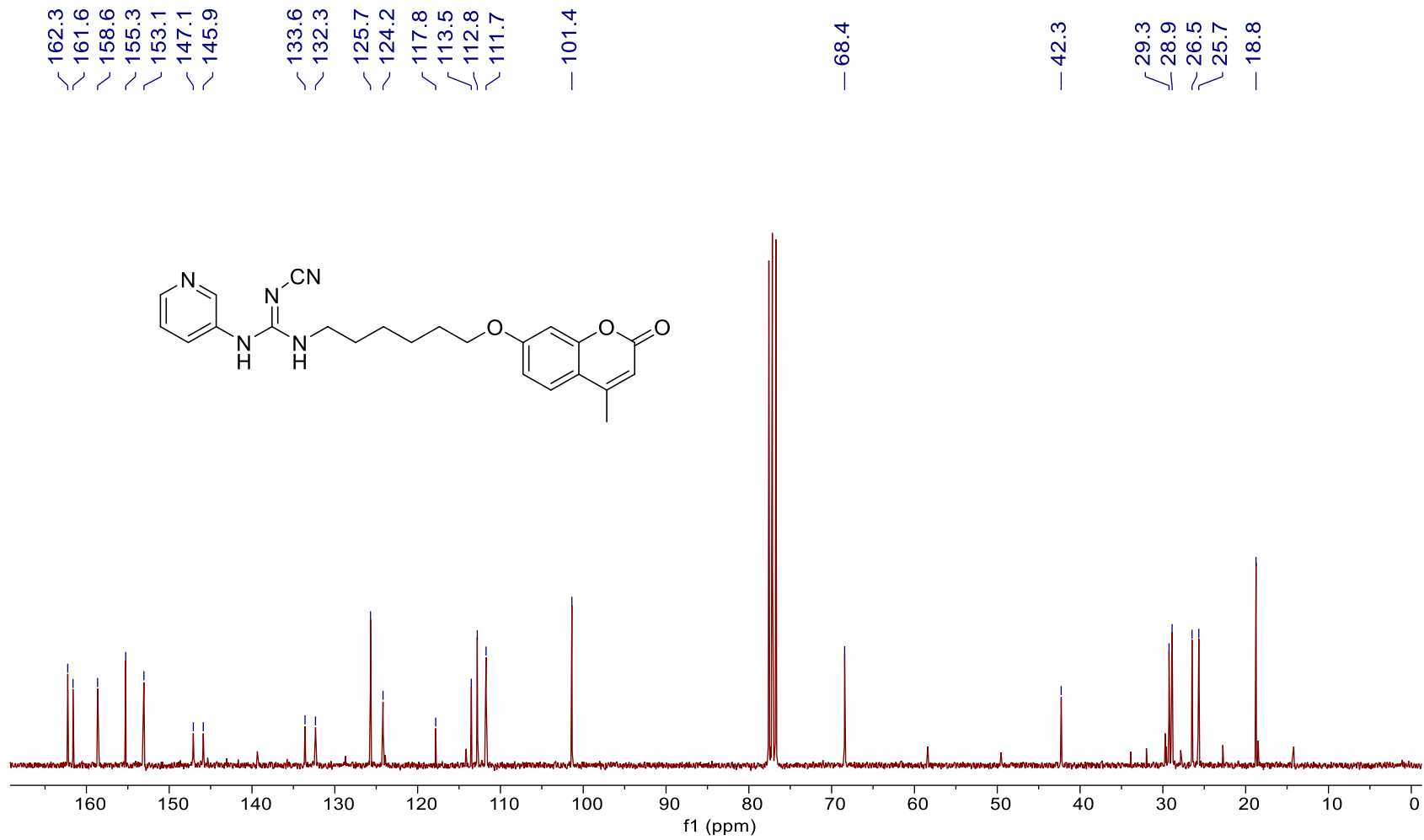


Figura 10.70. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto **35**.

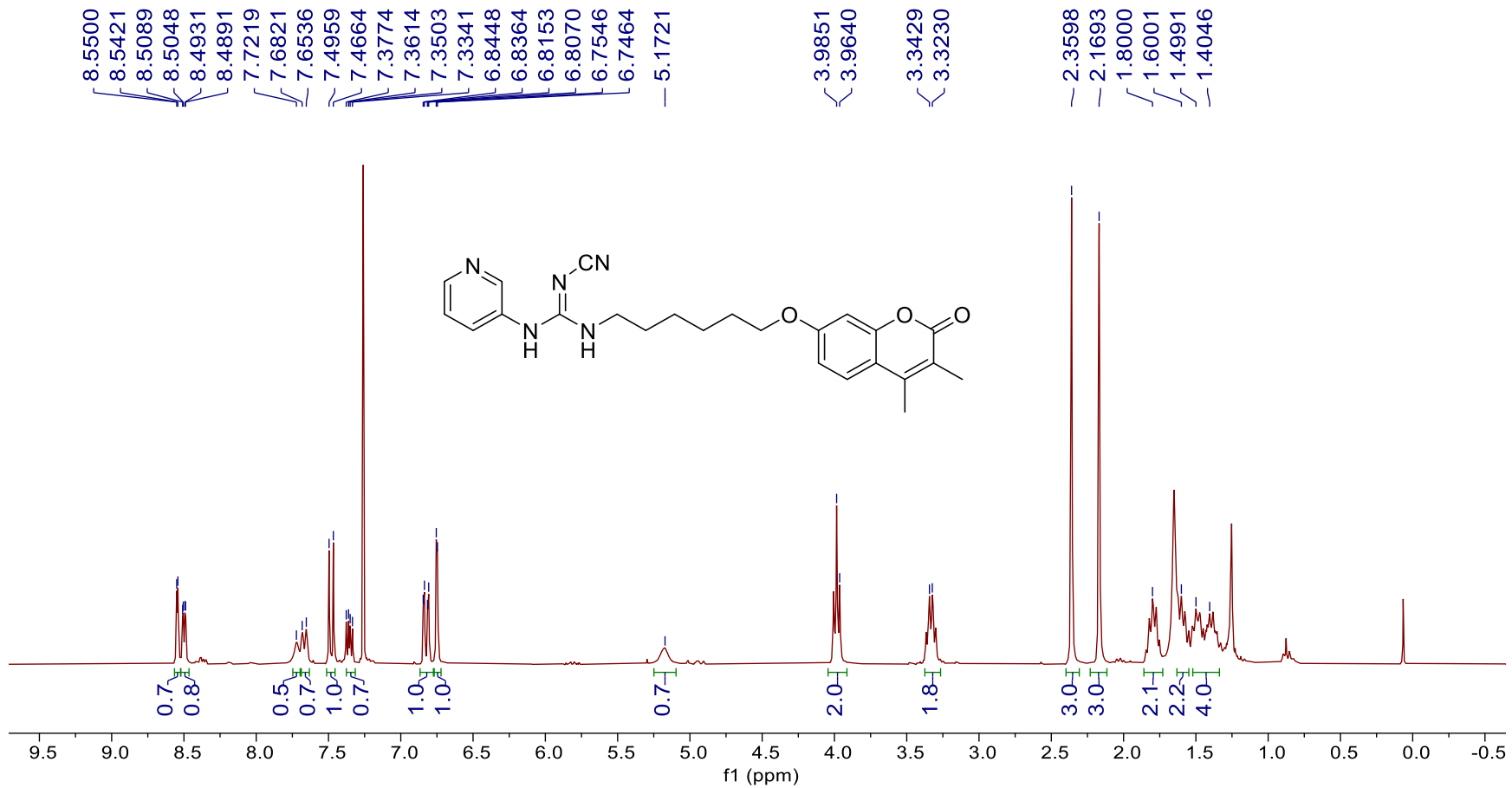


Figura 10.71. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **36**.

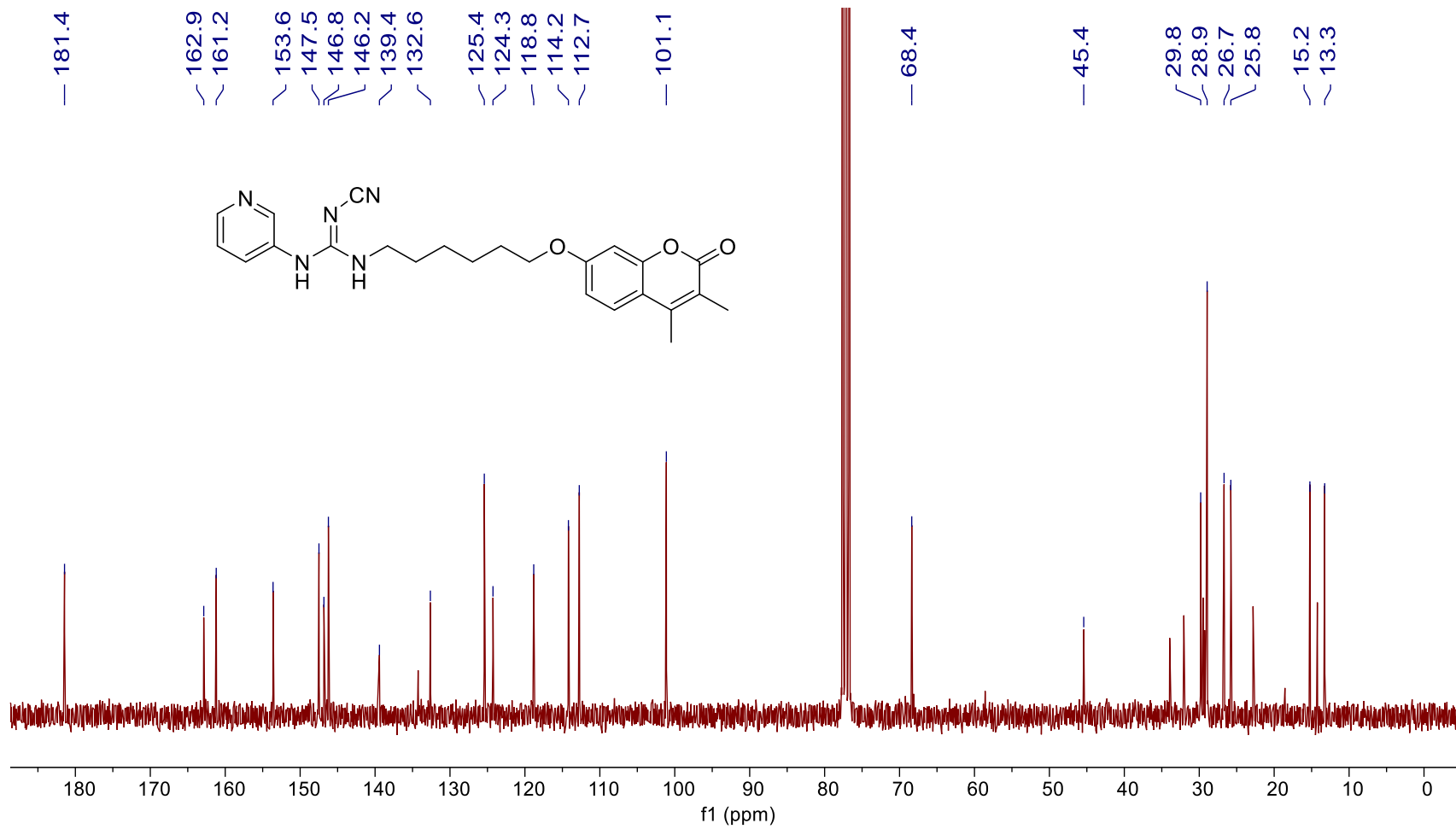


Figura 10.72. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto 36.

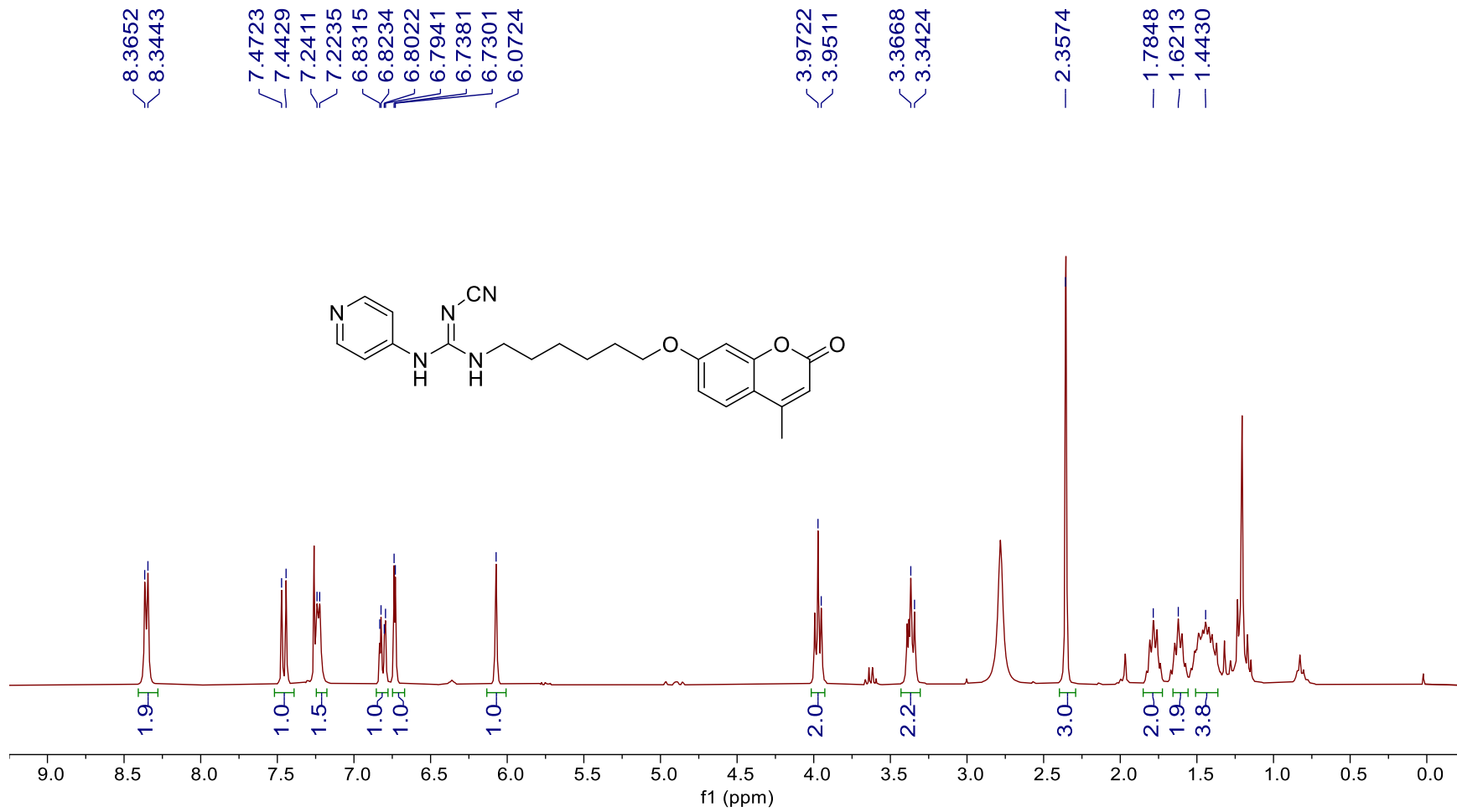


Figura 10.73. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **37**.

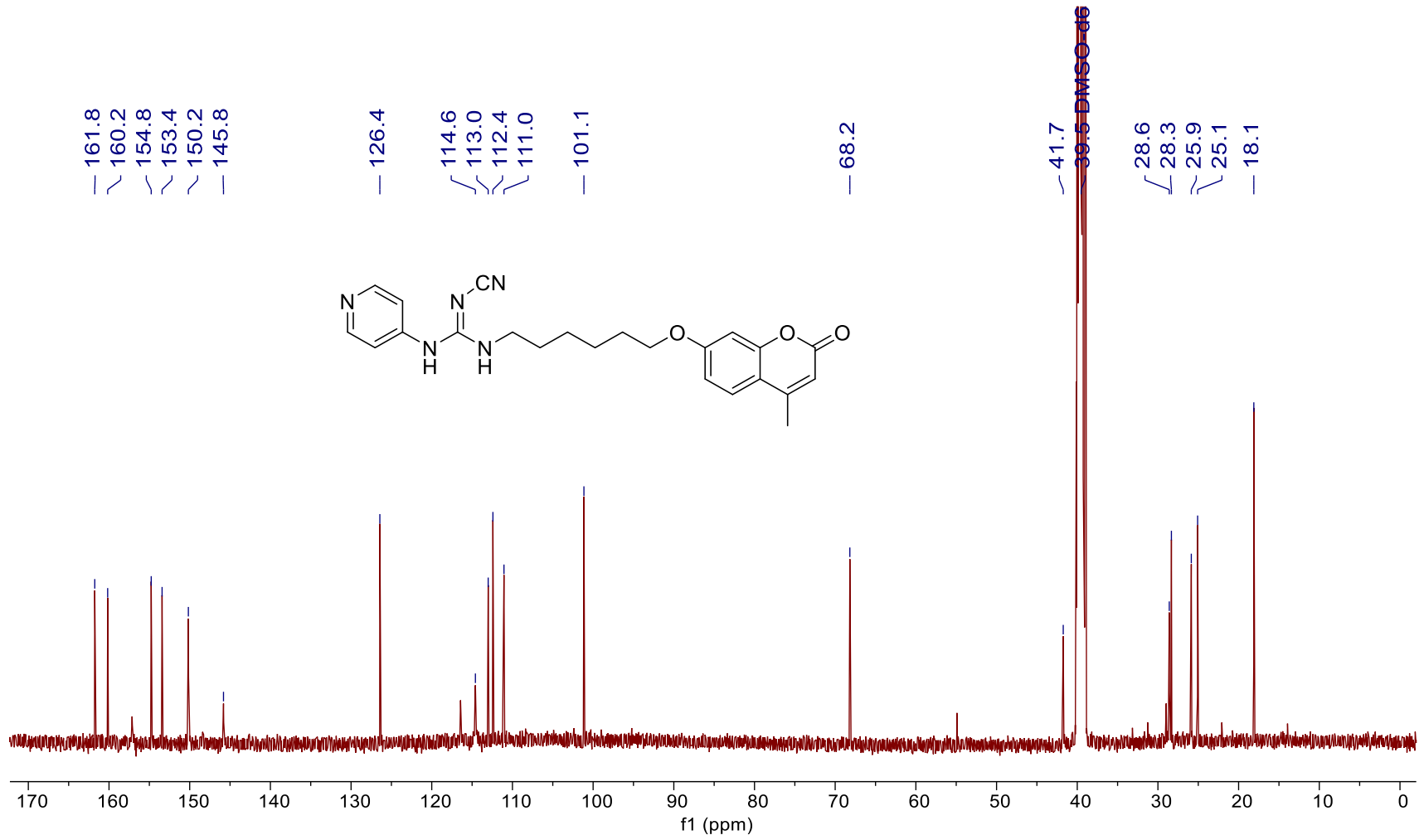


Figura 10.74. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, DMSO-d_6) del compuesto **37**.

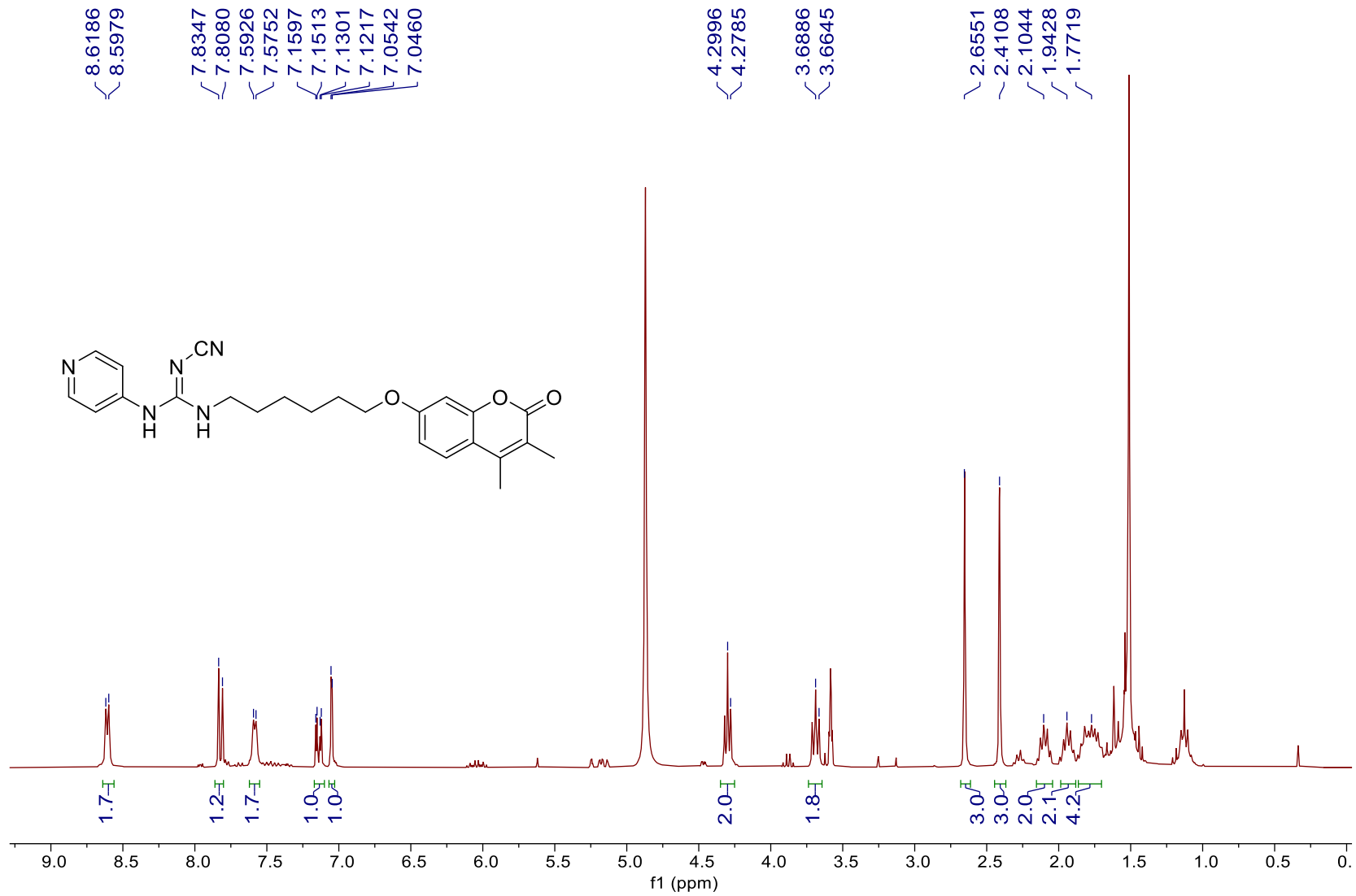


Figura 10.75. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **38**.

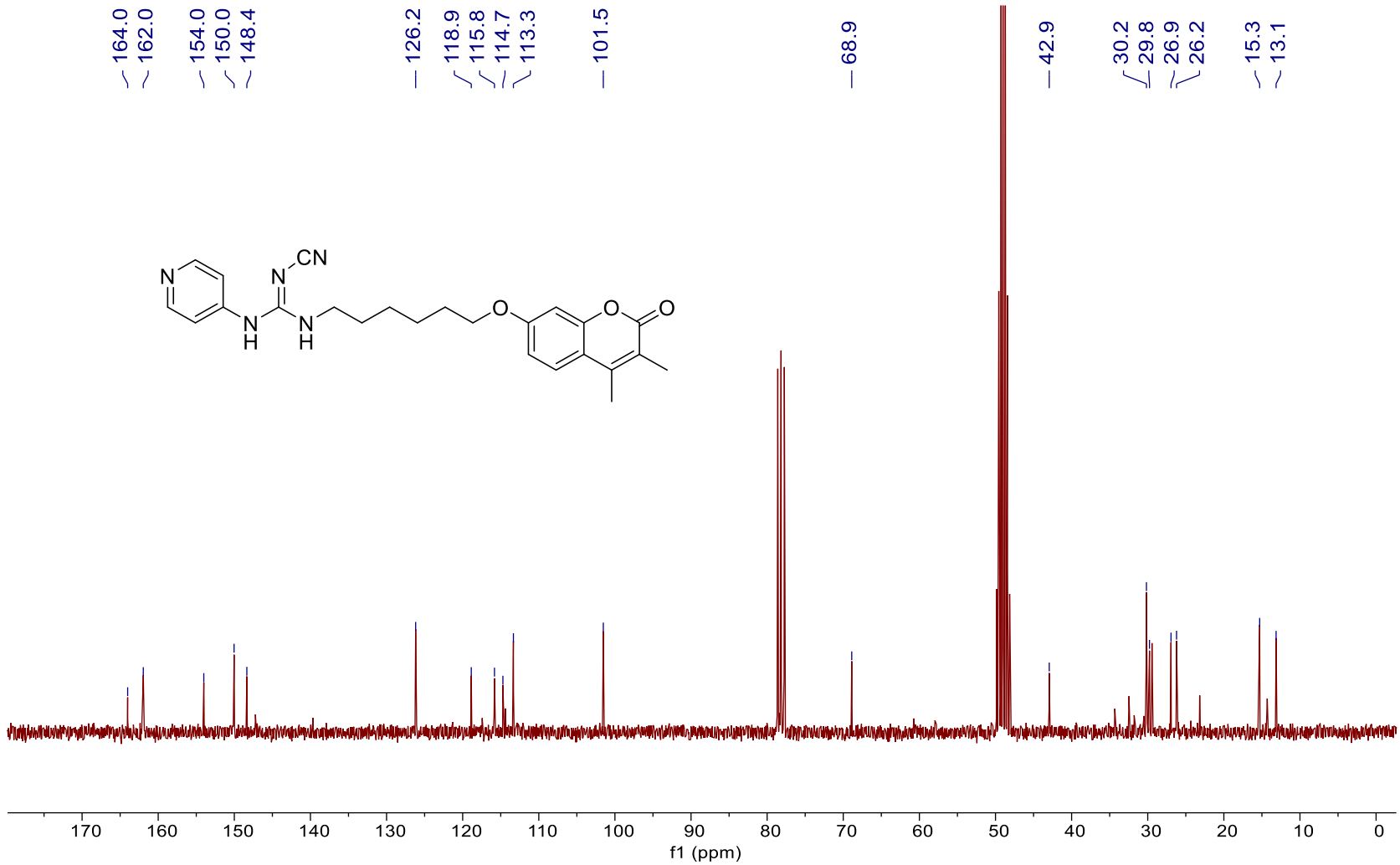


Figura 10.76. Espectro de ¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃) del compuesto 38.

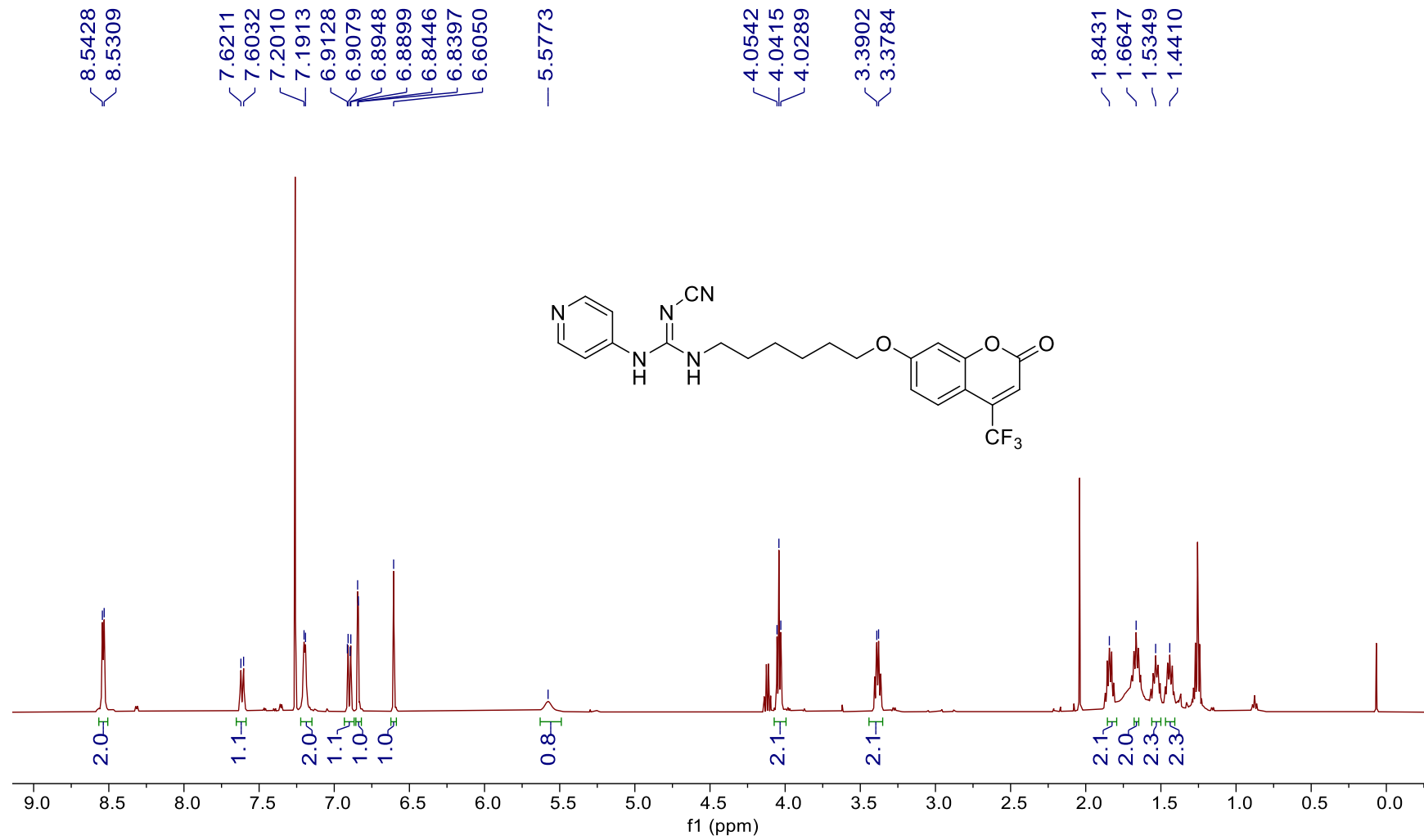


Figura 10.77. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **39**.

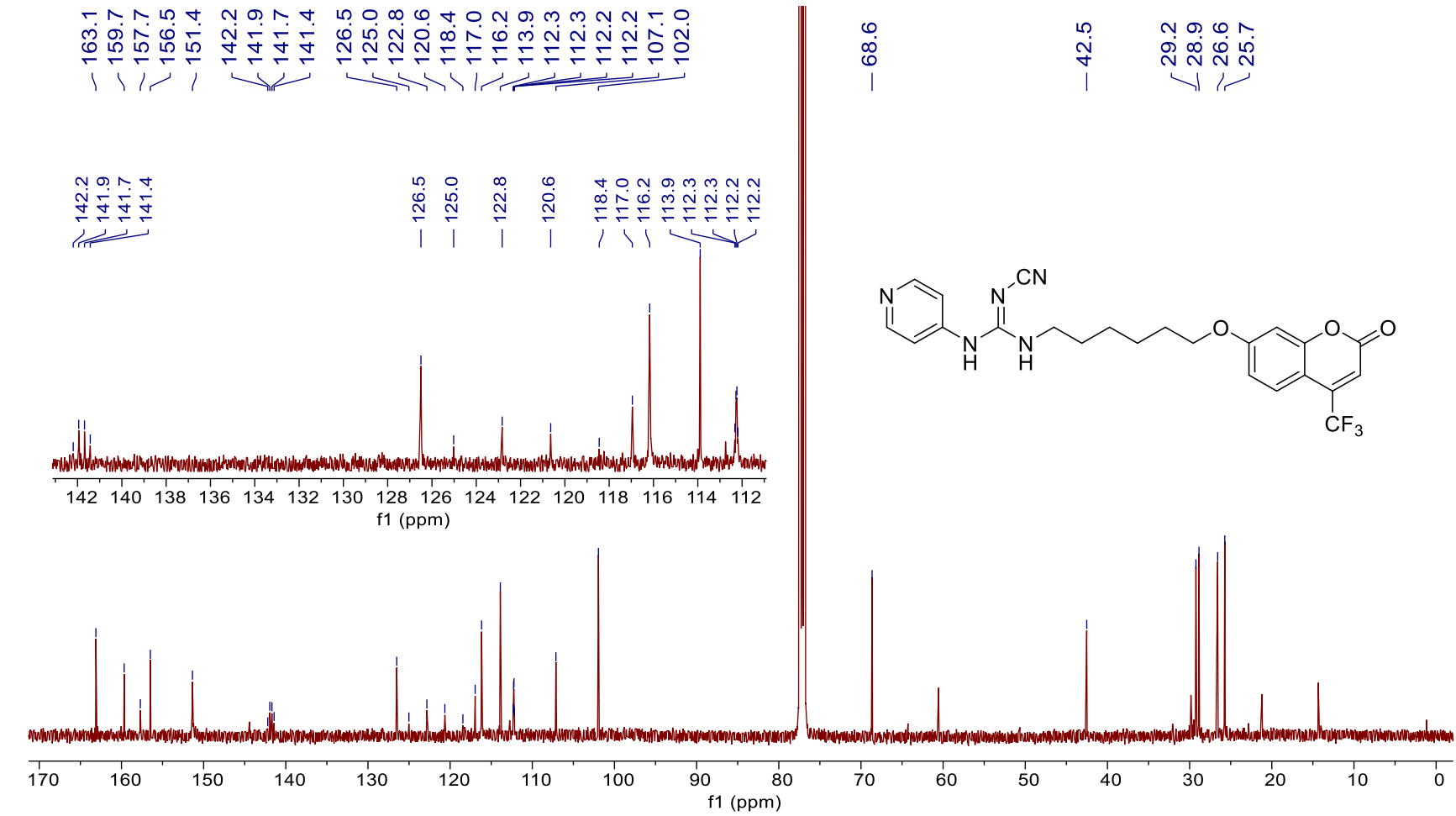


Figura 10.78. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **39**.

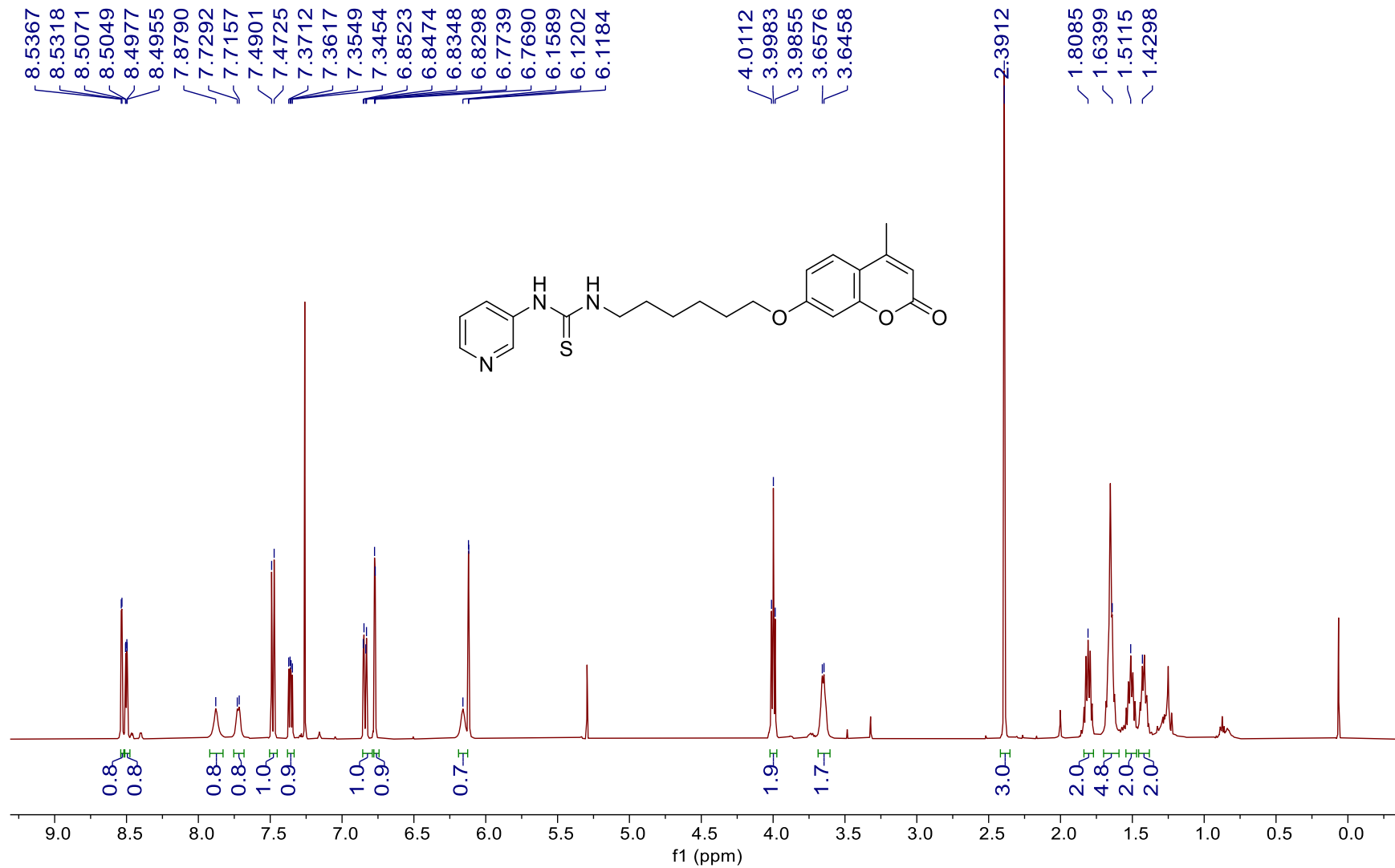


Figura 10.79. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **40**.

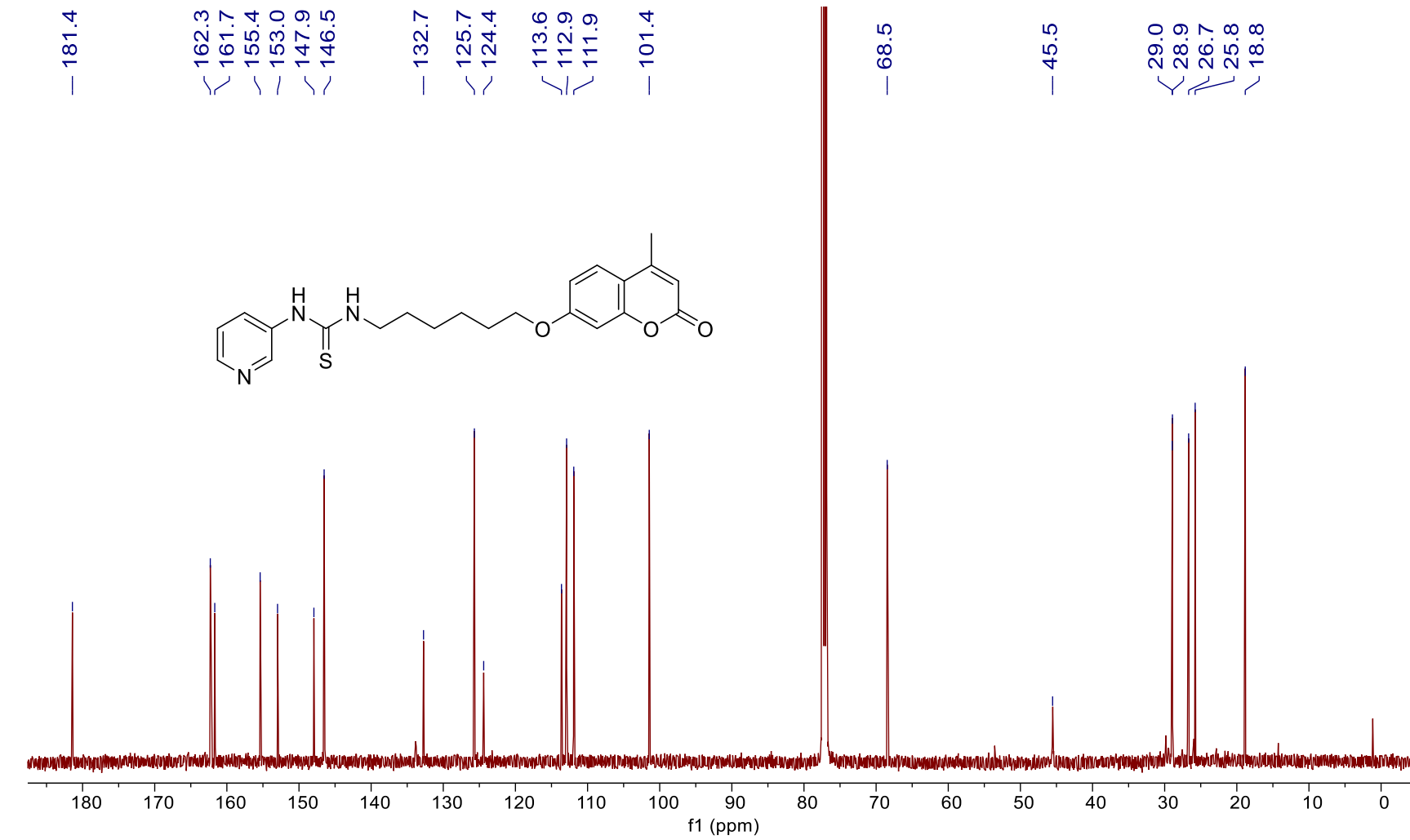


Figura 10.80. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto **40**.

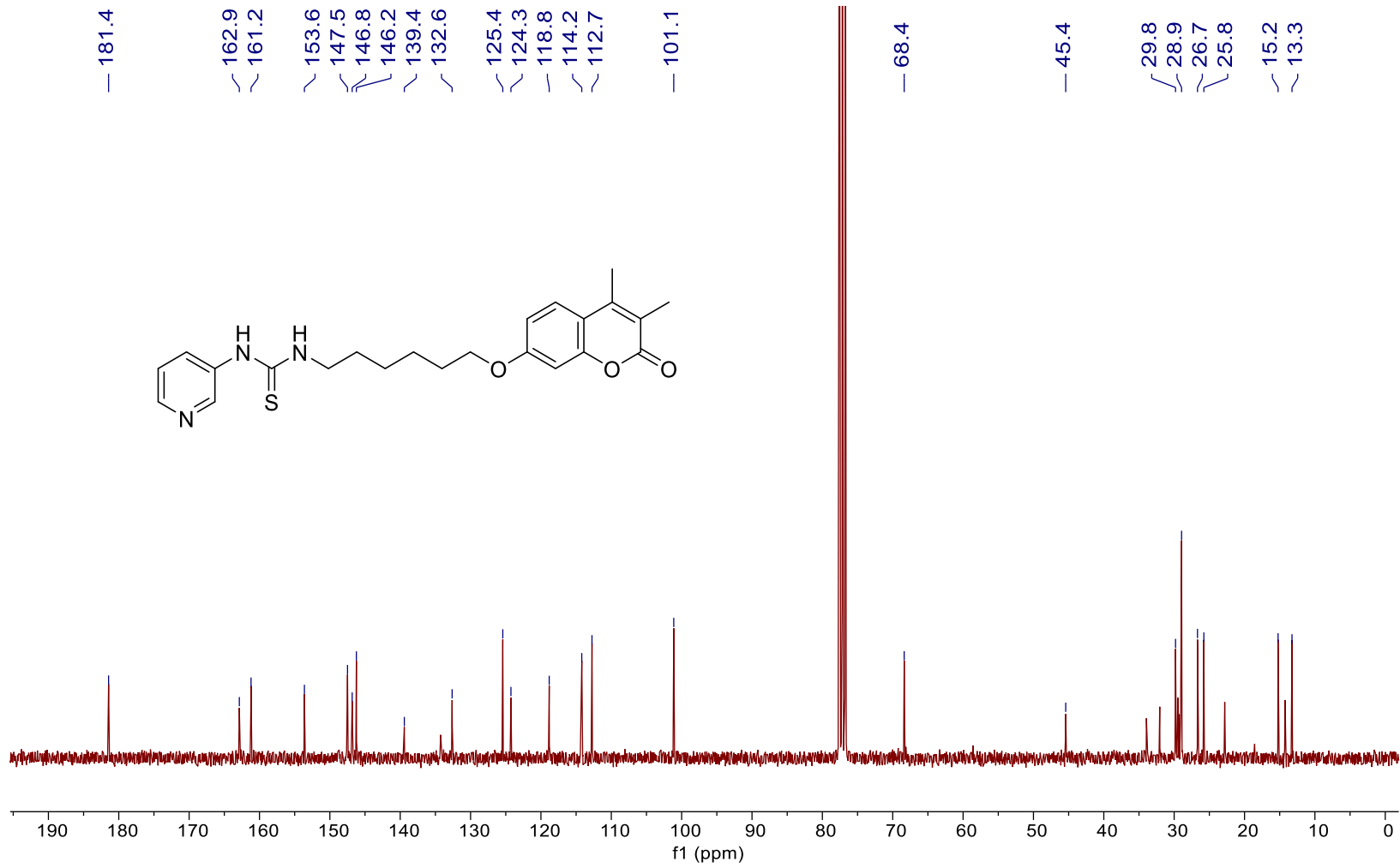


Figura 10.82. Espectro de ^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3) del compuesto 41.

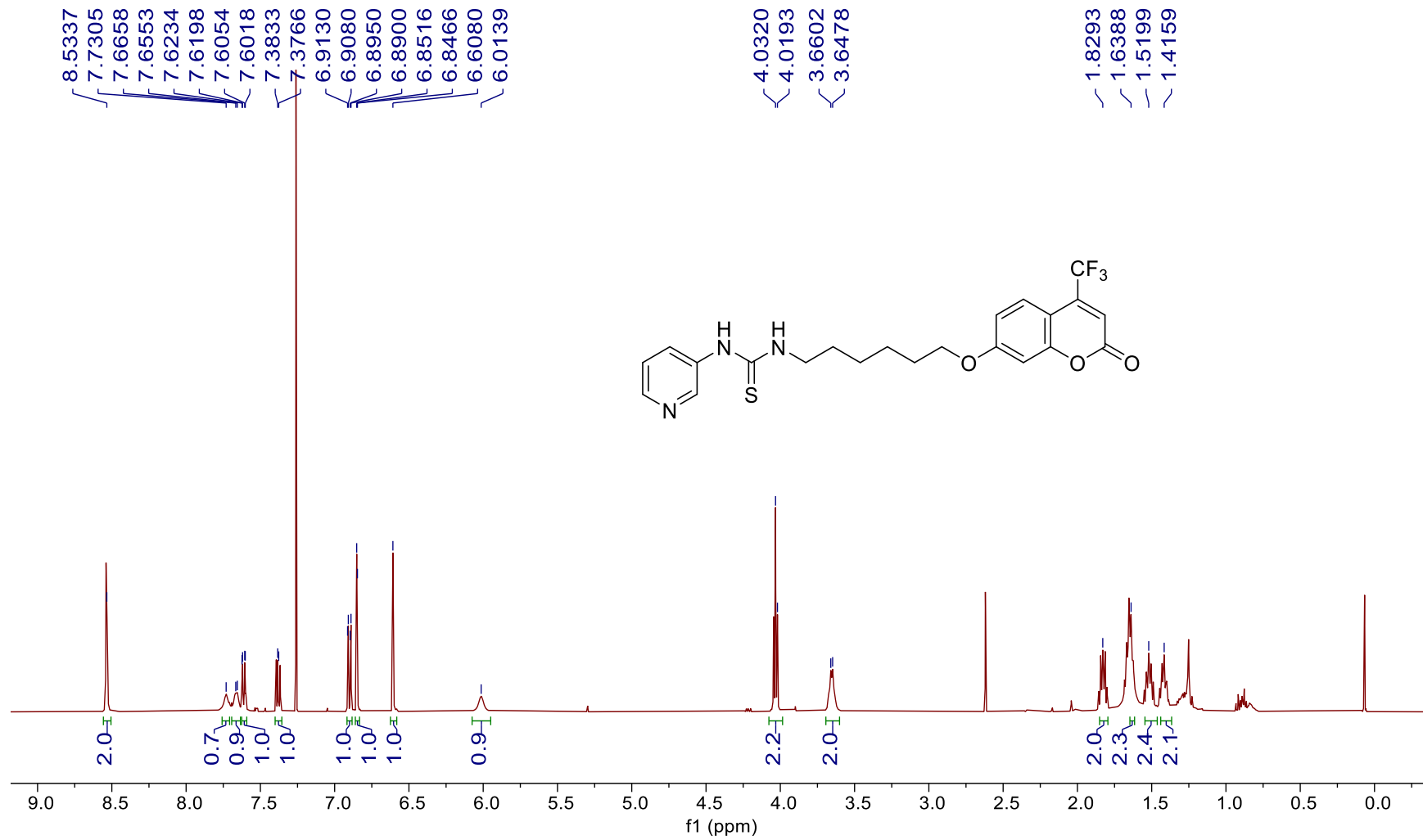


Figura 10.83. Espectro de ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) del compuesto **42**.

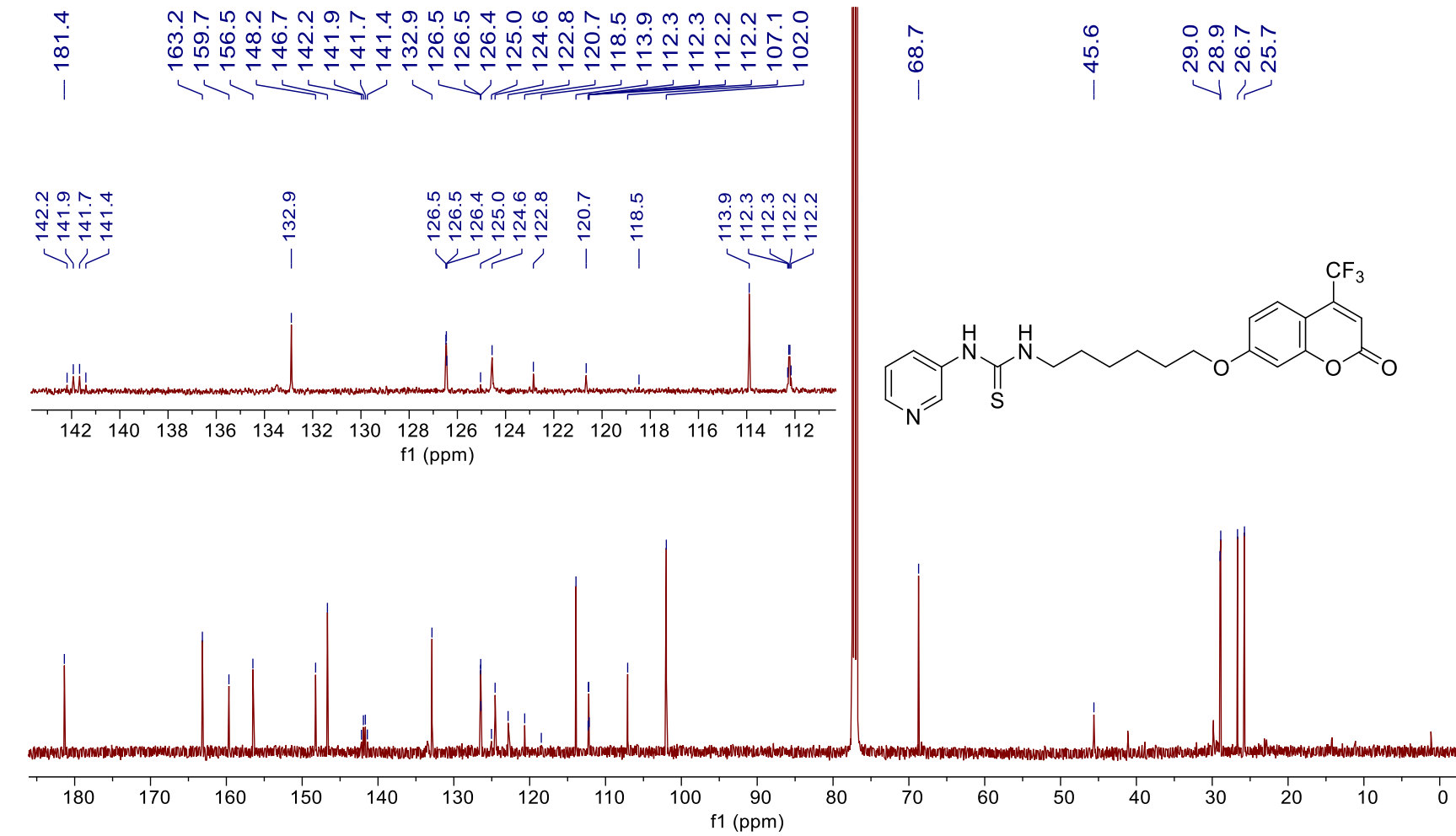


Figura 10.84. Espectro de ^{13}C -RMN (125.7 MHz, CDCl_3) del compuesto 42.