



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**“Síntesis y estudios *docking* de nuevos  
sistemas guanidinio del ácido oleanólico como  
potenciales agentes antiproliferativos”**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Presenta:

**QFB. CINTHIA AMECA JÁCOME**

Directora de tesis:

**DRA. PENÉLOPE MERINO MONTIEL**

Codirector de tesis:

**DR. JOSE LUIS VEGA BÁEZ**

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la Dra. Penélope Merino Montiel y la codirección del Dr. José Luis Vega Báez. Así mismo, se contó con la participación del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, de la Universidad de Sevilla, España bajo la observación del Dr. Oscar López López. Para el uso de Métodos Predictivos Computacionales se contó con el apoyo de la Dra. Blanca Colín Lozano.

Para el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el otorgamiento de una beca de nivel Maestría (número de becario **966386**).

Aspectos relevantes de este trabajo fueron presentados en:

2019. XXIV Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas. Puebla.  
2020 1° Forum for Latin American Chemistry Community. Congreso virtual vía Twitter.

# DEDICATORIA

*“Qué ella, cuyo toque trae éxtasis,  
Ella quien activa el propio masculino,  
quien abre el ojo espiritual de la sabiduría,  
quien es alabada y honorada por todos  
los más elevados y realizados sabios, me bendiga y que  
siempre sirva mi más elevado bienestar.”*

Haux, Haux

# AGRADECIMIENTOS

*“Tlasotlalistli amo kipa chikawalistli, sanke yajani pajtli tlen nochi  
kokolistli.”*

Inicio este día agradeciendo a todo y todos quienes se encuentran en mi vida.

Envío mis bendiciones sobre todos los que se cruzan en mi camino y que ninguna pena pueda alcanzarlos. Ofrezco gratitud y aprecio a todos en mi vida, pues mi gratitud es otra expresión de amor.

Agradezco nacer en un hogar donde no me falta nada.

Agradezco las experiencias que me han transformado en la persona que soy ahora. Soy agradecida por las oportunidades que recibo día con día para convertirme en la persona que deseo ser.

Doy gracias y acepto mi situación actual. Sé que todo es temporal. Manifiesto aquello para lo que estoy lista. Y si eso que quiero aún no llega, no significa que no sea adecuado para mí, podría significar que no es adecuado por ahora. No sé lo que me espera hoy, Gran Espíritu, por eso pido que estés al frente de todo y que protejas mi sendero.

Gran espíritu, agradezco porque me muestras en las pequeñas cosas cuán grande es tu amor por mí y cuán valioso es tu poder. Estoy agradecida porque he aprendido diariamente que los sueños no envejecen, que las bendiciones se derraman todos los días y quien cree en el Gran Misterio no ora en vano. Aún y con todas mis fallas, cuando dude, tómame de la mano y no me dejes desviar del camino.

*“Todo fluye, todo se diluye; lo que tiene principio tiene fin, lo nacido muere y lo compuesto se descompone. Todo es transitorio, insustancial y por lo tanto insatisfactorio. No hay nada fijo de que aferrarse”. Buda*

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Cáncer, como un problema de salud público.....	6
Una nueva diana terapéutica: la mitocondria como objetivo. ....	8
Ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-olean-12-en-28-oico). ....	12
CAPÍTULO I .....	15
<b>Síntesis de sistemas guanidino del ácido oleanólico.....</b>	<b>15</b>
ANTECEDENTES .....	16
Dirigiendo moléculas bioactivas a las mitocondrias: Empleo de DLC. ....	18
Estructuras de guanidina y su perspectiva a futuro. ....	22
Esterificación en triterpenos.....	23
Formación de alquil-azida en triterpenos .....	26
Formación de guanidinas a partir de tioureas con agentes desulfurantes.....	28
OBJETIVOS .....	31
Objetivo General: .....	31
Objetivos Particulares: .....	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	32
Ácido oleanólico ( <b>1</b> ).....	33

3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-bromohexilo (2) .....	36
3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-azidohexilo (5) .....	43
3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-[(trifenil-fosfaniliden)imino]hexilo (8) .....	48
3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-(3-feniltioureido)hexilo (11) .....	53
3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-(2-bencil-3-fenilguanidinio)hexilo (16) .....	55
CONCLUSIONES .....	60
CAPÍTULO II .....	61
<b>Caracterización <i>in silico</i> de nuevos derivados del OA como potenciales agentes anticancerígenos.</b> .....	61
ANTECEDENTES .....	62
De los métodos <i>in vitro</i> a los métodos <i>in silico</i> .....	63
Proteínas intracelulares: Receptores estrogénicos .....	65
OBJETIVOS .....	69
Objetivo General: .....	69
Objetivos Particulares: .....	69
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	70
Predicción de perfiles farmacocinéticos .....	71
<i>Docking</i> molecular .....	92
Compuestos guanidinos del ácido oleanólico (16-20).....	95
Compuestos tioureidos del ácido oleanólico (11-15). .....	104
CONCLUSIONES .....	114
PARTE EXPERIMENTAL: Cap. I .....	115
Métodos generales .....	115
Productos comerciales .....	117

Descripción del trabajo experimental.....	119
Procedimiento general I: compuestos <b>2-4</b> .....	119
Procedimiento general II: compuestos <b>5-7</b> .....	120
Procedimiento general III: compuestos <b>8-10</b> .....	121
Procedimiento general IV: compuestos <b>11-15</b> .....	122
Procedimiento general V: compuesto <b>16</b> .....	123
PARTE EXPERIMENTAL: Cap. II .....	124
Descripción del trabajo experimental.....	124
Predicción de perfiles farmacocinéticos .....	124
<i>Docking</i> molecular .....	125
Preparación estructural de la proteína. ....	125
Preparación del ligando .....	126
Validación del método <i>Docking</i> .....	126
Análisis del <i>Docking</i> Molecular .....	127
Visualización del <i>Docking</i> Molecular .....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	128

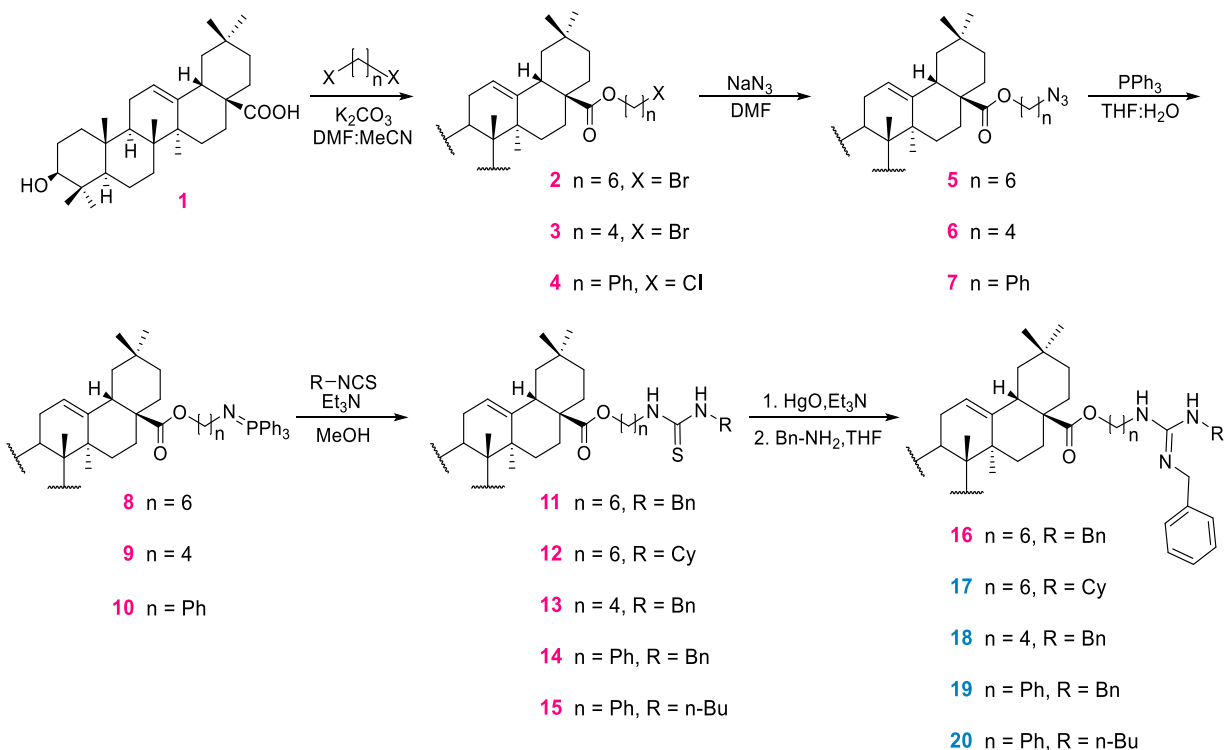
# ABREVIATURAS

$\delta$	Desplazamiento químico en RMN
$\Delta$	Doble enlace
$\Delta_r$	Calentamiento a reflujo
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana interna mitocondrial
AcOEt	Acetato de etilo
ATP	Adenosin 5'-trifosfato
Ax	Axial
c	Señal cuádruple
COSY	Espectroscopía de correlación ( <i>Correlation Spectroscopy</i> )
CPP	Péptidos penetrantes de células
d	Señal doble
dc	Señal doble de cuádruple
dd	Señal doble de doble
ddd	Señal doble de doble de doble
DLC	Cationes lipofílicos con carga deslocalizada
DMF	Dimetilformamida
E2	Estradiol
dt	Señal doble de triples
Ec	Ecuatorial
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces ( <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> )
HSQC	Espectroscopía de Correlación Heteronuclear de Cuanto Único ( <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> )
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
IMM	Membrana Mitocondrial Interna
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MTS	Péptidos de señal mitocondrial
OA	Ácido Oleanólico
ppm	Partes por millón
Pf	Punto de fusión
RE $\alpha$	Receptor Estrogénico $\alpha$
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal simple
t	Señal triple
t. a.	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina

# RESUMEN

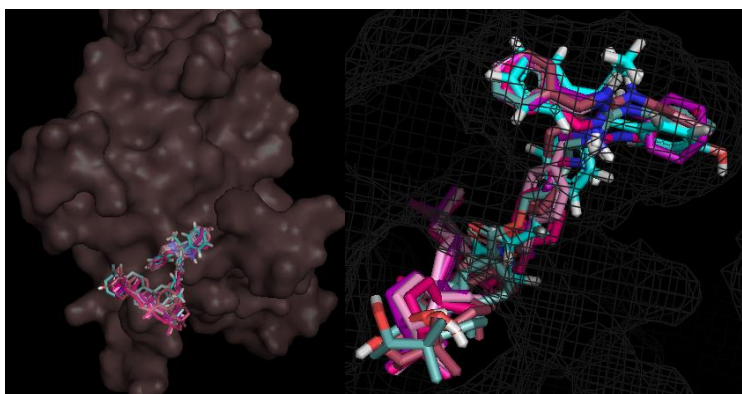
El presente trabajo se encuentra dividido en 2 capítulos que describen transformaciones del triterpenoide natural ácido oleanólico (OA).

En el capítulo I, se describe una ruta sintética de 5 pasos (**Esquema 1**) para obtener compuestos con un fragmento guanidinio a partir del OA (**16**); así mismo, se generaron compuestos con el fragmento tiureido (**11-15**) empleando reacciones de acoplamiento con isotiocianatos comerciales como intermediarios sintéticos clave en la preparación de los derivados de tipo guanidino. Cabe mencionar que los compuestos **17-20** no fueron posibles de sintetizar de manera experimental debido a la contingencia por COVID-19 que suscitó el cierre de labores a partir de marzo 2020.

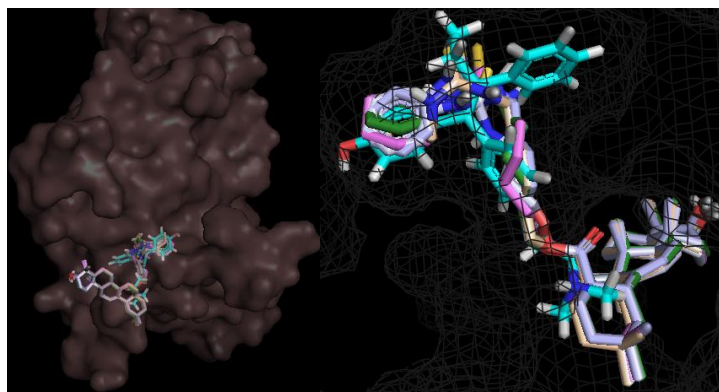


*Esquema 1. Metodología para la obtención de los compuestos híbridos (11-20) del ácido oleanólico.*

En el capítulo II se describen los perfiles farmacocinéticos y de toxicidad de los compuestos **11-20** usando programas de predicción computacional, adicionalmente, se presenta la relación estructura-actividad de los compuestos **11-20** con estudios *docking* en la proteína RE $\alpha$ , debido a que son responsables de controlar la transcripción de ADN nuclear necesaria para el desarrollo y la reproducción humana (clave **PDB: 3ERT**) (**Figura 1 y 2**) teniendo de referencia al fármaco Tamoxifeno (**77**).



**Figura 1.** Diagrama 3D de la distribución espacial de los compuestos **16-20** en el sitio de unión de la proteína **3ERT**. Por PyMOL.



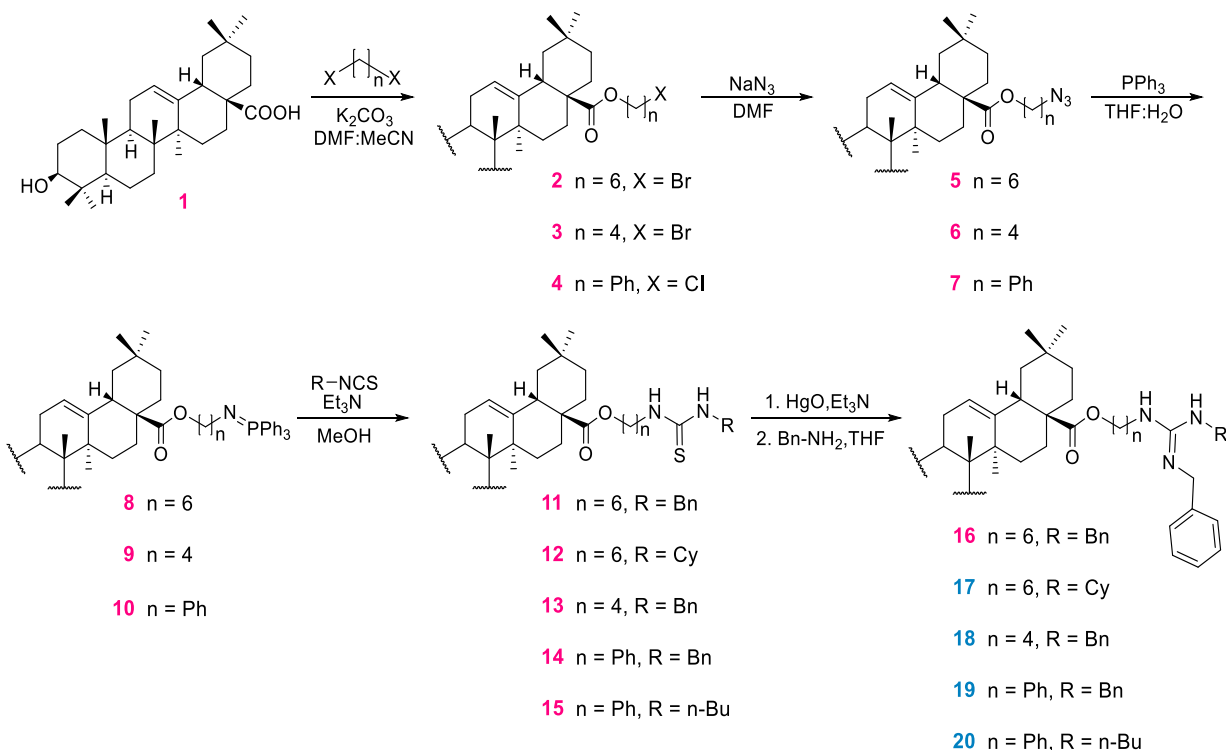
**Figura 2.** Diagrama 3D de la distribución espacial de los compuestos **11-15** en el sitio de unión de la proteína **3ERT**. Por PyMOL.

**Palabras clave:** ácido oleanólico, guanidinas, tioureas, *docking*, proteína 3ERT, agentes anticancerígenos.

# ABSTRACT

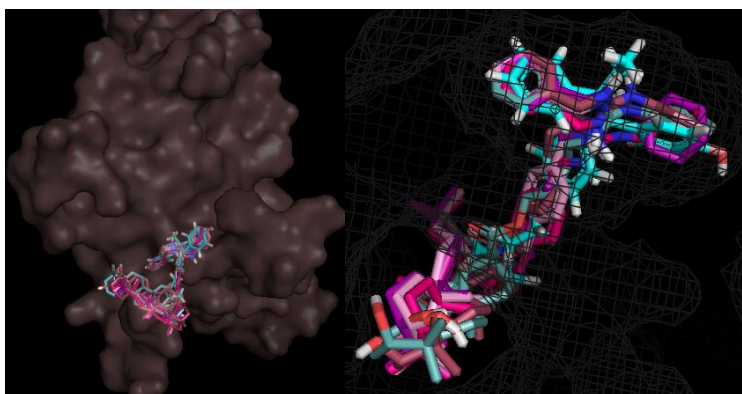
This Thesis is divided in two chapters which describe the transformation of biologically meaningful triterpenoid oleanolic acid.

Chapter I describes a five-step synthetic pathway (**Scheme 1**) to obtain guanidinium compounds derived from oleanolic acid (**16-20**); furthermore, thioureas (**11-15**) were generated using coupling reactions with commercially available isothiocyanates as key synthetic intermediates in the preparation of guanidinio derivatives. It should be mentioned that compounds **17-20** were not possible to synthesize due to the COVID-19 contingency that led to closure of Works from March 2020.

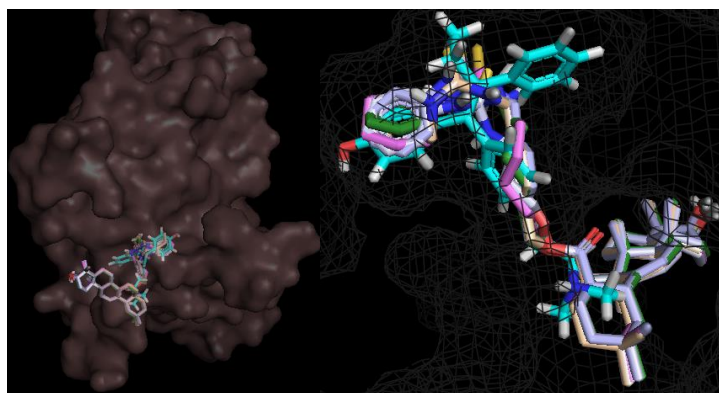


**Scheme 1.** Methodology for obtaining the hybrid compounds (**11-20**) of the oleanolic acid.

In chapter II, it is described the pharmacokinetic and toxicity profile of compounds (11-20) using predictive softwares; moreover, it has been discussed the structure-activity relationship of compounds 11-20 with docking studies on the RE $\alpha$  Protein, because they are responsible for controlling nuclear DNA transcription necessary for human development and reproduction (code **PDB: 3ERT**) (**Figure 1 and 2**) with reference to the drug Tamoxifen (77).



*Figure 1. 3D binding diagram of compounds 16-20 in to the 3ERT Protein ligand site. By PyMOL.*



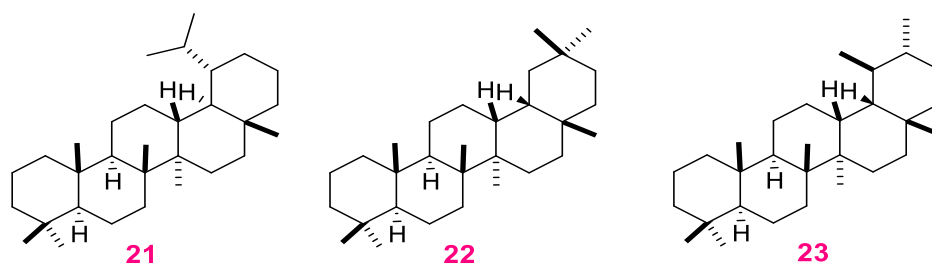
*Figure 2. 3D binding diagram of compounds 11-15 in to the 3ERT Protein ligand site. By PyMOL.*

**Keywords:** Oleanolic acid, guanidines, thioureas, docking, 3ERT Protein, anticancer agents.

# INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales ha sido documentado desde la antigüedad, gracias a esto se han podido encontrar diversos metabolitos secundarios. El aislamiento e identificación de estas estructuras orgánicas ha dado lugar al descubrimiento de su actividad terapéutica; a partir de modificaciones químicas con la finalidad de incrementar su actividad;<sup>1</sup> ya sea en la preparación de sustancias bioactivas o como materia prima para la síntesis de nuevas sustancias con interés farmacológico.

Dentro de la variedad existente de productos naturales que producen los seres vivos, se encuentran los compuestos terpénicos o terpenoides; los cuales derivan a partir de la unión de 5 átomos de carbono (unidades de isopreno) tienen importantes aplicaciones.<sup>2</sup> Dentro de esta gama de moléculas, los triterpenoides pentacíclicos procedentes de las familias de lupano (**21**), oleanano (**22**) y ursano (**23**) (**Figura 3**) han resultado ser excelentes farmacóforos en el tratamiento del cáncer. Entre los más significativos se encuentran los ácidos betulínico, oleanólico y ursólico, los cuales se extraen fácilmente de plantas.<sup>3</sup>



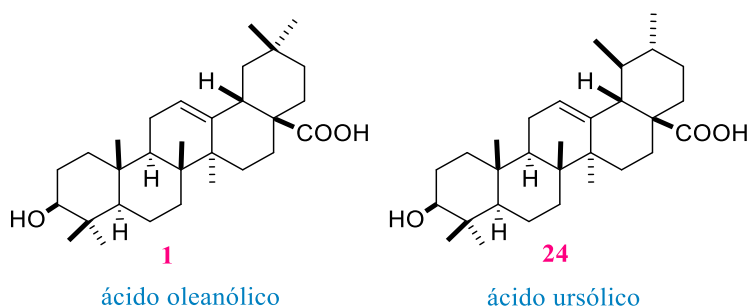
**Figura 3.** Representación de las estructuras de triterpenoides.

<sup>1</sup> Villareal-Ibarra, E.; García-López, E.; López, P.; Palma-López, D.; Lagunes-Espinoza, L.; Ortiz-García, C.; Oranday-Cárdenas, A. *Polibotánica*, **2014**, *37*, 109-134.

<sup>2</sup> Anulika, N. P.; Ignatius, E. O.; Raymond, E. S.; Osasere, O. I.; Abiola, A. H. *Int. J. Technol. Enhanc. Merg. Eng. Res.*, **2016**, *4*, 2347-4289.

<sup>3</sup> Shanmugam, M. K.; Dai, X.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H.; Sethi, G.; Bishayee, A. *Cancer Lett.* **2014**, *346*, 206-216.

Se ha estudiado intensamente al ácido oleanólico (**1**) que junto a su isómero el ácido ursólico (**24**) (**Figura 4**), comparten diversas propiedades biológicas.<sup>4,5</sup> Se ha mostrado que funciona como un agente anti-inflamatorio, anti-HIV, anti-diabético y antiproliferativo<sup>4,5</sup> Cabe destacar que el compuesto **1** tiene la actividad de inhibir la angiogénesis, la invasión y la metástasis de células tumorales;<sup>6</sup> así como también, es capaz de inducir un mecanismo de apoptosis intrínseco a través de un efecto directo sobre las mitocondrias.<sup>7</sup>



**Figura 4.** Representación de las estructuras del ácido oleanólico y su isómero el ácido ursólico.

## Cáncer, como un problema de salud público.

El cáncer es una enfermedad extraordinariamente compleja, de naturaleza multifactorial, con incidencia mundial, la cual es responsable de más de diez millones de muertes anuales en todo el mundo; se considera una de las principales causas actuales de mortalidad y morbilidad.<sup>8</sup> Esta enfermedad afecta a personas de diferente edad; sin embargo, los pacientes de edad avanzada (>65 años) cuentan con una esperanza de vida más baja en comparación con otros grupos de edad, esto se debe principalmente, a que su estado físico presenta una mayor fragilidad, y con cambios fisiológicos propios de la edad, por consiguiente las personas geriátricas no se benefician tanto de los avances en el tratamiento

<sup>4</sup> Cheng, K. G.; Su, C.H.; Huang, J. Y.; Liu, J.; Zheng, Y. T.; Chen, Z. F. *Chem. Biol. Drug Des.* **2016**, 1-12.

<sup>5</sup> Walter-Pertino, M.; Lopez, C.; Theoduloz, C.; Schmeda-Hirschmann, G. *Molecules*, **2013**, 18, 7661-7674.

<sup>6</sup> Shyu, M.H.; Kao, T.C.; Yen, G.C. *Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 6110-6118.

<sup>7</sup> Yan, S.; Huang, C.; Wu, S.; Yin, M. *Tox. In Vit.* **2010**, 24, 842-848.

<sup>8</sup> Gouverneur, A.; Salvo, F.; Berdai, D.; Moore, N.; Fourrier-Réglat, A.; Noize, P. *Geriatr. Oncol.* **2018**, 9, 15-23.

del cáncer como los pacientes más jóvenes. Esto en parte, se debe a los déficits en la tolerancia a los tratamientos (quimioterapia) y esta razón es porque los pacientes de edad avanzada no son incluidos en ensayos clínicos aleatorios, lo que resulta en una falta de conocimiento sobre la relación beneficio/riesgo de las estrategias para los tratamientos.<sup>6</sup>

Ésta enfermedad multifactorial tiene diferentes requerimientos metabólicos, uno de ellos es la glicolisis aumentada (pese a la existencia de niveles normales de oxígeno) lo que se denominó “glicolisis aeróbica” mejor conocida como efecto Warburg; se caracteriza por un aumento en la captación y el consumo de glucosa, una disminución en la fosforilación oxidativa y un aumento en la producción de lactato. Con un suministro ilimitado de glucosa es capaz de producir energía a un ritmo más rápido; teniendo un impacto en varias rutas metabólicas,<sup>9</sup> lo que conlleva a la acumulación de mutaciones y a su vez a la transformación maligna que se ha descrito como una enfermedad de evolución clonal. Lo anterior provoca que la célula tumoral se insensibilice al control ambiental y local. Algunas células pueden adquirir características hipóxicas y de crecimiento rápido o pueden desarrollar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), etc. Este es un aspecto ampliamente aceptado de la generación y propagación del cáncer.<sup>10</sup>

Existen distintas mutaciones que pueden favorecer la formación o proliferación del cáncer, ya sea mediante mutaciones en oncogenes, en genes supresores de tumores y/o de proteínas relacionadas con la transducción de señales que pueden desembocar en cambios metabólicos. Por ejemplo, los oncogenes y factores de transcripción, tales como AKT, NF- $\kappa$ B, c-MYC, Ras, p53 y HIF-1, que regulan positivamente diversos componentes de la vía glicolítica.<sup>11</sup> Debido a que existen más de 100 tipos de cánceres con fenotipos diferentes, resulta crucial identificar alteraciones esenciales y comunes en la fisiología celular que nos permita englobar características inequívocas para la malignidad de las células tumorales. Entre éstas podemos encontrar: potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, evasión de la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, invasión de tejidos y metástasis.<sup>12</sup> Todas estas mutaciones otorgan ventajas

---

<sup>9</sup> Lobo, N. A.; Shimono, Y.; Qian, D.; Clarke, M. F. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2007**, *23*, 675-699.

<sup>10</sup> Yu, C.; Liu, Q.; Chen, C.; Wang, J. *Front. Genet.*, **2020**, *10*, 1-13.

<sup>11</sup> Batra, S.; Adekola, K. U. A.; Rosen, S.; Shanmugam, M. *Oncology.*, **2013**, *27*, 460-467.

<sup>12</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. *Cell.*, **2000**, *100*, 57-70.

selectivas que conllevan a la progresión de la enfermedad, el desarrollo y crecimiento tumoral y su posterior diseminación al resto de los órganos de la persona afectada.<sup>13</sup> El diagnóstico precoz y el tratamiento preciso reduciendo las reacciones adversas, son el principal objetivo en todo el mundo. A pesar del amplio arsenal de agentes quimioterapéuticos utilizados en la actualidad, aún no se han conseguido resultados satisfactorios para todos los casos, siendo la alta toxicidad<sup>6</sup> y el desarrollo de quimiorresistencia los principales inconvenientes en las terapias antitumorales.<sup>11</sup> Es por ello que el desarrollo de nuevos fármacos selectivos, con nuevos mecanismos de acción y nuevas dianas terapéuticas sea un área de desarrollo.

Un tema que surgió como resultado de observaciones pioneras en el campo de la muerte celular fue que, cuando falla la apoptosis surge algún tipo de cáncer<sup>14-16</sup> lo que sugiere que la maquinaria apoptótica es un mecanismo supresor inherente de tumores. En este sentido, la mitocondria fue identificada como el “orgánulo preferente” en la ejecución eficiente de señales apoptóticas; una de ellas con la expresión del citocromo C, además de que es uno de los orgánulos que presentan una mayor diferenciación entre células normales y las células tumorales.<sup>17,18</sup> Una nueva diana terapéutica de interés es mediante la inducción de apoptosis celular de manera selectiva con la expresión del citocromo C, afectando de manera directa la respuesta mitocondrial.

### Una nueva diana terapéutica: la mitocondria como objetivo.

Las mitocondrias son un orgánulo celular multifuncional con un prominente estado semiautónomo.<sup>19</sup> Se consideran la parte central del metabolismo energético en el ser humano, albergan a las enzimas, dan soporte estructural como a las membranas (externa e interna) y tienen participación en diversos procesos como en el ciclo de Krebs, oxidación de ácidos

<sup>13</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. *Cell.*, **2011**, *144*, 646-676.

<sup>14</sup> Kometiani, P.; Liu, L.; Askari, A. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 929-936.

<sup>15</sup> Levine, A. J.; Puzio-Kuter, A. M. *Science*, **2010**, *330*, 1340-1344.

<sup>16</sup> Webb, B. A.; Chimenti, M.; Jacobson, M. P.; Barber, D. L. *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, *11*, 671-677.

<sup>17</sup> Spinazzi, M.; Casarin, A.; Pertegato, V.; Salviati, L.; Angelini, C. *Nat. PROTOCOL*, **2012**, *7*, 1235-1246.

<sup>18</sup> Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. *CA Cancer J. Clin.*, **2011**, *61*, 69-90.

<sup>19</sup> Luna-Ortiz, P.; Flores-Chávez, P.; Martínez-Rosas, M. *Rev. Mex. Anestesiología*, **2014**, *37*, 283-296.

grasos y a la biosíntesis del centro catalítico hierro-azufre y parte del metabolismo de los aminoácidos.<sup>20</sup> Tienen la particularidad de ser una buena diana terapéutica debido a que son centrales en la muerte celular, y en neoplasias, y participan en la diferenciación celular, en el sistema inmune innato, en la detección de los niveles de oxígeno y de la hipoxia, en el metabolismo del calcio, producción de ROS,<sup>21</sup> en el metabolismo de esteroides y, la mitocondria es el único orgánulo que contiene ADN (aparte del núcleo celular) mitocondrial independiente (ADNmt); el cual, codifica 37 genes, incluidos dos RNA ribosómicos (rRNA), 13 subunidades de péptidos mitocondriales y 22 RNA de transferencia.<sup>22</sup>

Las células cancerosas exhiben cambios que les ayudan a escapar de la muerte celular, mantener su exacerbada proliferación y cambiar su metabolismo hacia la producción de energía a través de la glicolisis. Por lo tanto, se conocen como elementos claves en muchas áreas de la ciencia biomédica, debido a que la alteración de cualquier papel funcional de la mitocondria contribuye a diversas patologías, y entre estas al cáncer.<sup>18,20</sup>

La estructura de la mitocondria (**Figura 5**) es de dos compartimientos bien definidos (matriz y espacio intermembranal) delimitadas por dos membranas: interna y externa, con características morfológicas, funcionales y de permeabilidad muy diferentes.<sup>23</sup> Por ejemplo, la IMM resulta impermeable a iones debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina (que aumenta la densidad de carga negativa en la membrana), colesterol (que puede disminuir la difusión pasiva de H<sup>+</sup> y otros iones, lo que provoca consecuentemente una menor permeabilidad de H<sup>+</sup><sup>24</sup>) y a la gran cantidad de bombas y transportadores específicos. En cambio, la permeabilidad de la membrana externa es menos selectiva, gracias a la presencia de una proteína denominada porina, la cual es dependiente de voltaje, permitiendo el paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6.000 Da.<sup>25</sup>

---

<sup>20</sup> Szeto, H. H.; Schiller, P. W. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2669-2679.

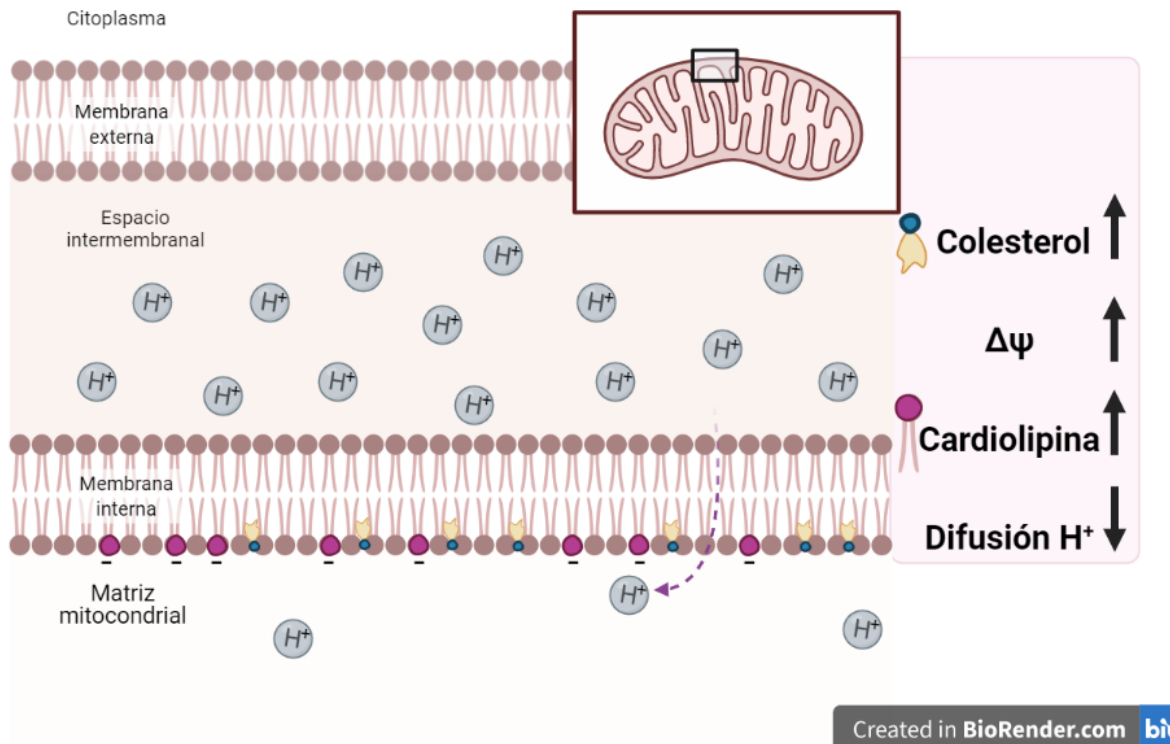
<sup>21</sup> James, A. M.; Cochemé, H. M.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. *Bio. Chem.* **2005**, *280*, 21295-21312.

<sup>22</sup> Li, N.; Zhan, X. *Wiley Online Library*, **2020**, *00*, 1-28

<sup>23</sup> Tornero, D.; Ceña, V.; Jordan, J. *OFFARM*, **2002**, *21*, 98-102.

<sup>24</sup> Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. *FEBS J.*, **2007**, *274*, 1393-1418.

<sup>25</sup> Matilainen, O.; Quiros, P. M.; Auwerx, J. *Trends. Cell. Biol.*, **2017**, *27*, 453-463.



**Figura 5.** Características en la composición lipídica de las membranas mitocondriales. Imagen creada en BioRender, exclusivo para su uso en esta tesis.

El tránsito de electrones a través de los complejos de la cadena transportadora de protones en la IMM genera un gradiente electroquímico, esto se traduce en una diferencia de  $\Delta\Psi_m$  mayor. Se alcanzan valores de 150 – 180 mV, encontrándose cargada negativamente en la cara interna de IMM.<sup>23,26,27</sup> La magnitud de esta carga en las células cancerosas es más alto que las no malignas, por lo tanto, hay una diana selectiva.

Además, las células tumorales muestran una marcada disminución en el número de sus mitocondrias, como también en la actividad de las enzimas que participan en el ciclo de Krebs y en la fosforilación; consecuentemente, cualquier modificación en estas enzimas mitocondriales tiene un efecto directo en la formación de ATP.<sup>24</sup> El mecanismo predominante por el cual las moléculas contra el cáncer orientadas a la mitocondria destruyen las células se basa en la capacidad de estos fármacos para interrumpir los sistemas de producción de

<sup>26</sup> Happo, L.; Strasser, A.; Cory, S. *Cell. Sci.*, **2012**, *125*, 1081-1087.

<sup>27</sup> Grimm, S. *Mitochondrion*, **2013**, *13*, 189-194.

energía de las células tumorales, lo que aumenta la acumulación de ROS y la activación de las vías de señalización de muerte dependientes de mitocondria, activando la apoptosis.<sup>28</sup>

La inducción de la apoptosis intrínseca en la mitocondria genera en la membrana mitocondrial su permeabilización liberando factores apoptogénicos al citoplasma como el citocromo C, el factor inductor de la apoptosis (AIF), ATP y Smac/Diablo; esto conlleva a la activación de la caspasa-9 lo que produce la consecuente activación de la caspasa-3, iniciando así el proceso apoptótico.<sup>29</sup> La estrategia de tratamientos dirigidos a las mitocondrias podría ser prometedora para mejorar la eficacia terapéutica del cáncer, al tiempo en que los efectos secundarios adversos son minimizados.

La importancia de las mitocondrias como objetivo emergente en perspectiva para los agentes anticancerígenos se corrobora con los hallazgos recientes en la introducción de estructuras catiónicas, las cuales tienden a acumularse en el citosol debido a la atracción producida por la diferencia de  $\Delta\Psi_m$  (mayor concentración de carga negativa en el interior de la membrana mitocondrial).<sup>23-25,28</sup> En conclusión, una estrategia para la farmacología mitocondrial, es realizar la síntesis de moléculas que se acumulen dentro de la mitocondria de manera selectiva y genere el proceso apoptótico intrínseco,<sup>30</sup> es decir, el uso de ligandos (que actúen como moléculas transportadoras) conjugados con estructuras bioactivas con la finalidad de mejorar su eficacia, citotoxicidad y lograr la permeabilidad de la membrana.

El uso de especies catiónicas con un fragmento guanidinio es poco explorado. La estructura de guanidina tiene una alta basicidad ( $pK_a = 13.6$ ), por lo que a pH fisiológico es protonado formando el catión guanidinio.<sup>31</sup> Este tipo de compuestos catiónicos podrían dirigirse a la IMM, debido a que poseen grandes superficies hidrofóbicas y una carga positiva deslocalizada; por lo tanto, presentan una mayor citotoxicidad y selectividad.

---

<sup>28</sup> Boukalova, S.; Rohlenova, K.; Rohlena, J.; Neuzil, J. *Nat.*, **2018**, 613-635.

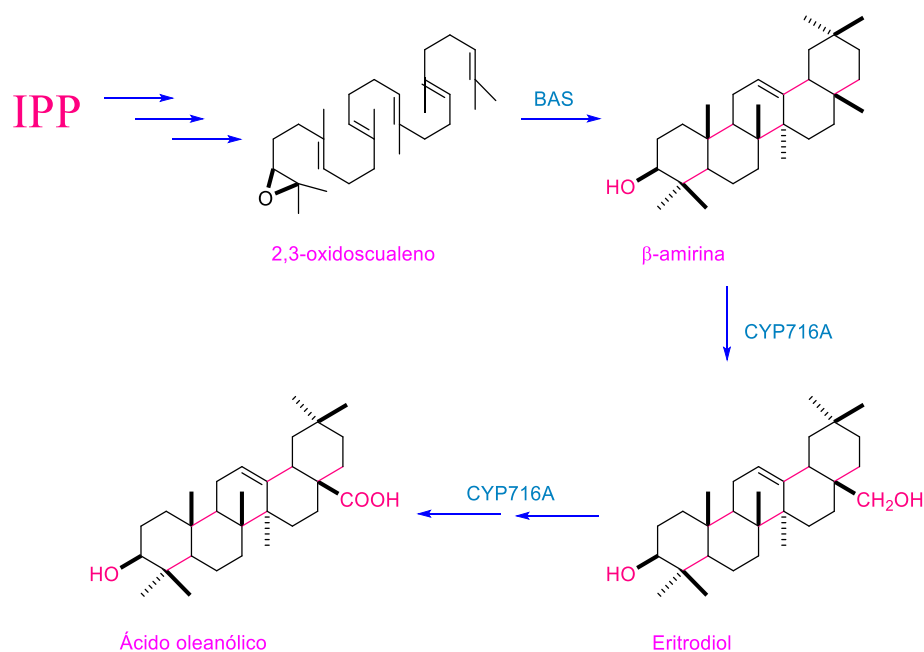
<sup>29</sup> García, V.; González-Moles, M. A.; Martínez, A. *Ad. Odontoestomatol.*, **2005**, 21, 287-295.

<sup>30</sup> Yin, H.; Zhou, Y.; Zhu, M.; Hou, M.; Hou, S.; Li, Z.; Zhong, H.; Lu, J.; Meng, T.; Wang, J.; Xia, L.; Xu, Y.; Wu, Y. *Mitochondrion*, **2013**, 13, 209-224.

<sup>31</sup> Berlinck, R. G.S.; Burtoloso, A. C. B.; Trindade-Silva, A. E.; Romminger, S.; Morais, R. P.; Bandeira, K.; Mizuno, C. M. *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, 27, 1871-1907.

## Ácido oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-olean-12-en-28-oico).

Con el fin de lograr la eficiencia en el tratamiento contra el cáncer, los investigadores se han centrado en estudios farmacológicos con compuestos bioactivos extraídos de plantas o derivados semi-sintéticos a partir de los compuestos naturales. En particular, el ácido oleanólico es un triterpenoide pentacíclico biológicamente activo,<sup>5</sup> el cual ha sido encontrado en mayor prevalencia en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae* (razón por la cual su nombre procede de su aislamiento en este tipo de plantas), por ejemplo, la Oliva (*Olea europea*). Su ruta biosintética (**Figura 6**) en células vegetales comienza a partir del isopentenil pirofosfato (el cual es un derivado de la vía del mevalonato) generando el precursor 2,3-oxidosqualeno, el cual mediante la acción de la enzima BAS se cicla a  $\beta$ -amirina. El paso final es a través de la oxidación de la  $\beta$ -amirina de manera secuencial en tres pasos en la posición C-28 por una isoforma del citocromo P450, generando, en primera instancia, el eritrodíol que posteriormente produce al ácido oleanólico.<sup>32</sup>

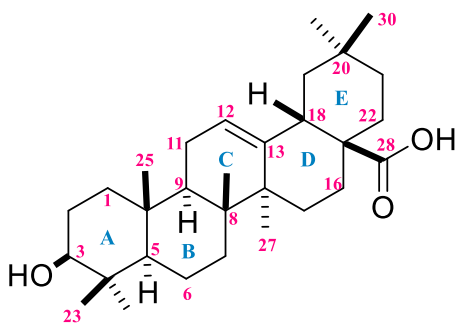


**Figura 6.** Ruta biosintética del OA. BAS =  $\beta$ -amirin sintetasa, IPP = isopentenil pirofosfato.

<sup>32</sup> Pollier, J.; Goossens, A. *Phytochemistry*, **2012**, 77, 10-15.

Este producto natural ha mostrado poseer muchas propiedades farmacológicas, tales como efectos hepatoprotectores,<sup>4,5</sup> actividad anti-inflamatoria,<sup>4,33</sup> anticancerígena,<sup>2,4,33-35</sup> anti-tumoral,<sup>33</sup> anti-hepatitis,<sup>34</sup> anti-HIV,<sup>34,35</sup> anti-hiperglicémico,<sup>33,34</sup> en actividades cardiovasculares,<sup>34</sup> se ha usado como insecticida,<sup>35</sup> diurético,<sup>35</sup> y también tiene actividad antioxidante.<sup>35</sup>

El tema en esta tesis es buscar una estructura que presente un efecto positivo en el tratamiento del cáncer, por lo tanto se describe una eficiente transformación del ácido oleanólico a partir del grupo ácido carboxílico que contiene (**Figura 7**); obteniendo con ello nuevas estructuras con un fragmento guanidino con posible actividad biológica.



**Figura 7.** Estructura del ácido oleanólico.

Una de las limitantes en el desarrollo de nuevos fármacos es la falta de acción farmacológica debido a problemas en el proceso de absorción y/o incluso en su propia eliminación en el organismo; o bien, falta de parámetros esenciales para su selección como candidatos viables. Este tipo de problemática conduce a la necesidad de implementar cálculos computacionales con el objetivo de dar predicciones sobre la adsorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad de moléculas bioactivas (ADME).<sup>36</sup>

<sup>33</sup> Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 841-850.

<sup>34</sup> Li, J.; Guo, W.; Yang, Q. *World J. Gastroenterol.*, **2002**, *8*, 493-495.

<sup>35</sup> Hao, J.; Liu, J.; Wen, X.; Sun, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 2074-2077

<sup>36</sup> Waterbeemd, H.; Gifford, E. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 192-204.

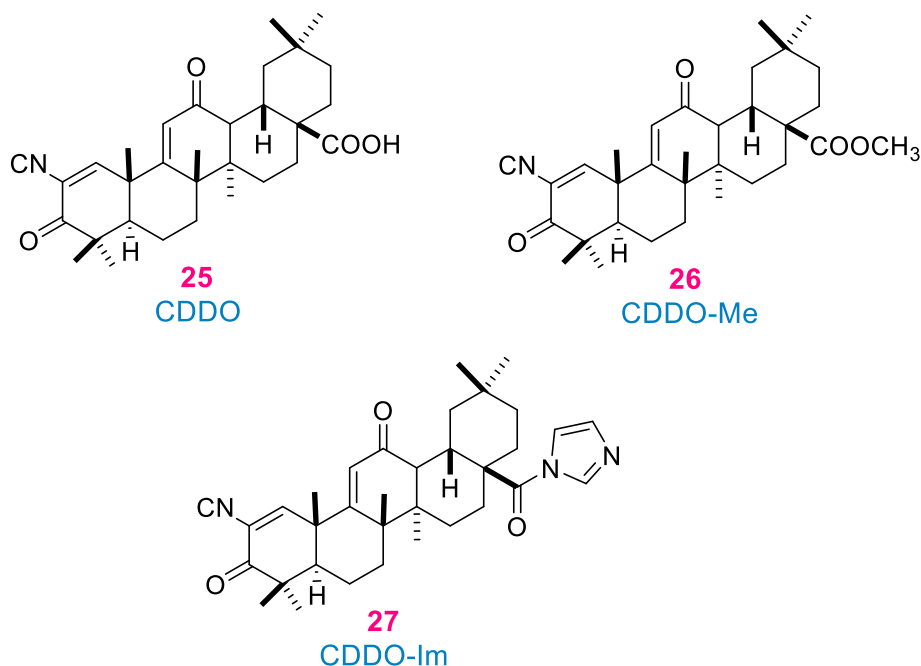
El uso de diferentes programas computacionales conocidos como DiFAC (diseño de fármacos asistido por computadora) nos proporcionó predicciones de las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los compuestos sintetizados. Así mismo, se realizaron estudios *in silico* utilizando como herramienta el acoplamiento molecular automatizado o *docking* con la finalidad de ampliar la relación estructura-actividad. La predicción o cálculo del modo de unión de un ligando con su receptor es muy valiosa para el entendimiento del modo de acción de moléculas con actividad biológica.<sup>36</sup> Como consecuencia, el acoplamiento molecular es un auxiliar muy útil para el diseño de nuevas estructuras, por lo que los derivados catiónicos de OA se analizaron frente a los sitios activos del receptor estrogénico  $\alpha$  (RE $\alpha$ ).

# **CAPÍTULO I**

## **Síntesis de sistemas guanidino del ácido oleanólico**

## ANTECEDENTES

Cada modificación que se emplea en la estructura del OA es esencial para alguna actividad biológica que se esté buscando, por ejemplo cuando se habla acerca del cáncer existe una diversa variedad de estructuras sintetizadas. Se han descrito algunos derivados sintéticos del ácido oleanólico (**Figura 8**) que han mostrado ser eficaces en la prevención y tratamiento de algunos tipos de cáncer.<sup>2,37</sup>



**Figura 8.** Derivados sintéticos del OA con potente actividad antitumoral.

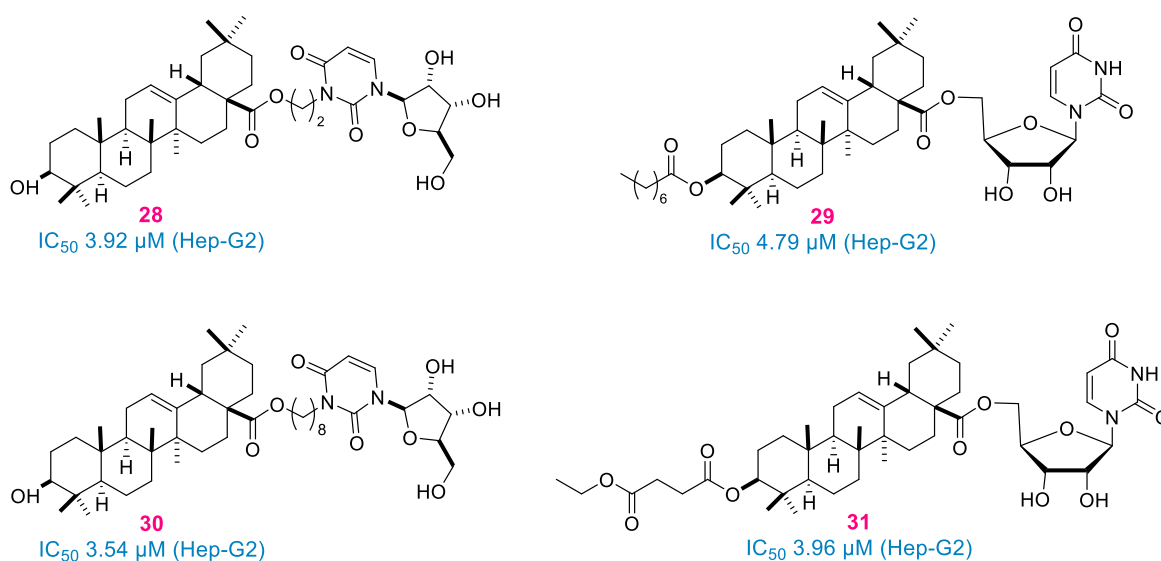
Sin embargo, el OA presenta como inconveniente su alta hidrofobicidad, ocasionando que se dificulte el uso de sus derivados como fármacos citotóxicos.<sup>38</sup>

<sup>37</sup> Xu, K.; Chu, F.; Li, G.; Xu, X.; Wang, P.; Song, J.; Zhou, S.; Lei, H. *Pharmazie*, **2014**, *69*, 483-495.

<sup>38</sup> Ye, Y.; Zhang, T.; Yuan, H.; Li, D.; Lou, H.; Fan, P. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 6353-6363.

## CAPÍTULO I

Un método común de derivatización del OA es la formación de grupos éster a partir de la función ácido. Algunos esteres de uridina (**Figura 9**) han mostrado excelentes propiedades antiproliferativas en diferentes líneas celulares cancerosas, algunos de ellos (**28** y **29**) con baja citotoxicidad frente a células sanas; inclusive el compuesto **28** mostró un aparente efecto apoptótico y capacidad de generar modificaciones en el potencial de membrana mitocondrial.<sup>4</sup> La inducción de un proceso apoptótico es en particular un tema de interés, pues las células tumorales adquieren fácilmente resistencia a dirigir la muerte celular.



**Figura 9.** Derivados de uridina con propiedades antiproliferativas.

De acuerdo con el estudio realizado por Siewert y col.,<sup>39</sup> con respecto a diferentes ésteres y amidas del ácido maslínico, otro triterpeno natural, se ha determinado que la presencia de algún residuo lipofílico en la posición C-28 mejora la actividad citotóxica, teniendo en cuenta que los residuos de éster al ser voluminosos parecen capaces de interactuar bien con una diana intracelular aún desconocida hasta ahora, al tiempo que conserva su capacidad para desencadenar la apoptosis. Además, la relación estructura-actividad del triterpeno ácido revela que su citotoxicidad depende del *Log P* (o factor de

<sup>39</sup> Siewert, B.; Pianowski, E.; Obernauer, A.; Csuk, R. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 594-625.

hidrofobicidad) por lo que se sugiere que al momento de realizar las modificaciones estructurales cuente con dos funcionalidades: por un lado que sea formadora de enlaces de hidrógeno, como un donante de H y que tenga un grupo carbonilo, ya que se demostró que exhiben una actividad citotóxica mejorada;<sup>40</sup> esto nos indica en qué parte del esqueleto triterpénico realizar las posteriores modificaciones.

Por lo tanto, la estrategia planteada es dirigir los agentes terapéuticos, en este caso el OA a las mitocondrias de las células cancerosas con el empleo de moléculas transportadoras (tales como cationes lipofílicos), con la finalidad de mejorar su biodisponibilidad, su selectividad y el perfil de toxicidad.<sup>6,7,39,41,42</sup>

## Dirigiendo moléculas bioactivas a las mitocondrias: Empleo de DLC.

En la última década se han investigado compuestos con actividad antitumoral que inducen la apoptosis a través de la desestabilización mitocondrial. Existen múltiples variaciones para el diseño y desarrollo ideal de fármacos dirigidos a las mitocondrias, un ejemplo es la selección de ligando, la cual se basa, entre otras cosas, en la utilización de péptidos penetrantes de células (CPP), péptidos de señal mitocondria (MTS), el uso de nanopartículas y el uso de cationes lipofílicos con carga deslocalizada (DLC).<sup>43</sup> Todos estos conjuntos de compuestos son denominados “mitocans” (deriva de mitocondria y cáncer)<sup>44,45</sup> los cuales ejercen cierto grado de selectividad para producir una mínima toxicidad en tejidos normales.<sup>46</sup> En esta sección, nos centraremos en las estrategias del uso de DLC; las cuales ofrecen excelentes ventajas para dirigir y transmitir moléculas terapéuticas.

<sup>40</sup> Mallavadhani, U. V.; Mahapatra, A.; Pattnaik, B.; Vanga, N.; Suri, N.; Saxena, A. K. *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 1263-1269.

<sup>41</sup> Reily, C.; Mitchell, T.; Chacko, B. K.; Benavides, G. A.; Murphy, M. P.; Darley-Usmar, V. M. *Redox Biol.*, **2013**, *1*, 86-93.

<sup>42</sup> Liu, Q. C.; Guo, T. T.; Zhang, L.; Yu, Y.; Wang, P.; Yang, J. F.; Li, Y. X. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *63*, 511-522.

<sup>43</sup> Dhanasekaran, S.; Venugopal, D.; Al-Dayyan, N.; Ravinayagam, V.; Mohammed, A. *Saudi J. Bio. Sci.*, **2020**, 1-29.

<sup>44</sup> Ralph, S.; Low, P.; Dong, L.; Lawen, A.; Neuzil, J. *Recent. Pat. Anticancer Drug Discov.*, **2006**, *1*, 327-346.

<sup>45</sup> Neuzil, J.; Dong, L. F.; Rohlena, J.; Truksa, J.; Ralph, S. P. *Mitochondrion.*, **2013**, *13*, 199-208.

<sup>46</sup> Biasutto, L.; Dong, L. F.; Zoratti, M.; Neuzil, J. *Mitochondrion.*, **2010**, *10*, 670-681.

## CAPÍTULO I

Los DLC son moléculas cargadas positivamente, es decir, poseen estructuras electrónicas deslocalizadas a través de la estabilización por resonancia de la molécula lipofílica.<sup>47</sup> La carga positiva, por su parte, se distribuye en el área molecular hidrófoba, por lo que requiere una entrada de entalpía más baja para desolvatar estas especies cargadas. Su movimiento a través de las bicapas lipídicas requiere una energía de activación mucho menor, a comparación de los cationes hidrófilos como el de Na<sup>+</sup>,<sup>48</sup> reconociendo que cualquier catión es capaz de permear las membranas biológicas utilizando el gradiente de voltaje de transmembrana a través de la IMM. El aprovechamiento del gradiente de voltaje transmembranal es la característica más llamativa de las mitocondrias, debido a que propician que estas estructuras tiendan a acumularse en la matriz mitocondrial obedeciendo la ley de Nernst, que predice una relación de acumulación de 10 veces por cada 60 mV de diferencia de voltaje transmembrana.<sup>46,49</sup>

El desarrollo de cationes lipofílicos dirigidos a la mitocondria se basa en llevar a una concentración dramáticamente más alta del compuesto en cuestión dentro de las mitocondrias, lo que incrementa su potencia y permite que se use menor cantidad del compuesto; por lo tanto, minimiza el metabolismo extra mitocondrial que podría llevar a la inactivación del fármaco, a su excreción o a desarrollar efectos secundarios tóxicos.<sup>19,20</sup>

El uso de derivados de TPP<sup>+</sup> se han descrito desde 1970.<sup>50</sup> La síntesis de estructuras catiónicas es mediante una cadena alquílica, por ejemplo, el ácido betulínico (**32**) que al asociarse mediante un enlace éster con un catión lipofílico (sales de fosfonio) (**Figura 10**) dirige dichos compuestos a las mitocondrias aumentando su especificidad y eficacia.<sup>38,51-53</sup>

<sup>47</sup> Qian, K.; Chen, H.; Qu, C.; Qi, J.; Du, B.; Ko, T.; Xiang, Z.; Kandawa-Schulz, M.; Wang, Y.; Cheng, Z. *Nanomedicine*, **2019**, 1-11.

<sup>48</sup> Jiang, Z.; Liu, H.; He, H.; Yadava, N.; Chambers, J.; Thayumanavan, S. *Bioconjugate Chem.*, **2020**, 31, 1344-1353.

<sup>49</sup> Shoshan-Barmatz, V.; Ben-Hail, D. *Mitochondrion*, **2012**, 12, 24-34.

<sup>50</sup> Trnka, J.; Elkalaf, M.; Andel, M. *PLoS One*, **2015**, 1-14.

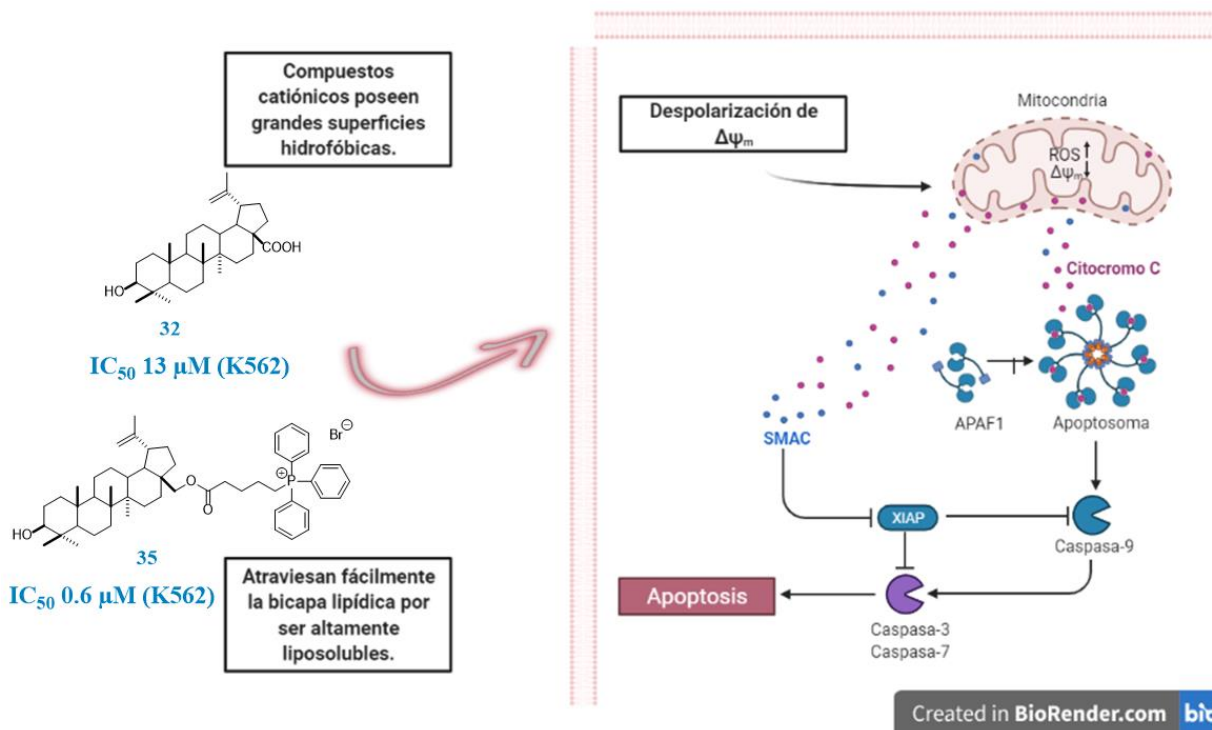
<sup>51</sup> Nedopekina, D. A.; Gubaidullin, R. R.; Odinokov, V. N.; Maximchik, P. V.; Zhivotovsky, B.; Bel'skii, Y. P.; Khazanov, V. A.; Manuylova, A. V.; Gogvadze, V.; Spivak, A. Y. *Med. Chem. Commun.*, **2017**, 8, 1934-1945.

<sup>52</sup> Spivak, A. Y.; Nedopekina, D. A.; Khalitova, R. R.; Gubaidullin, R. R.; Odinokov, V. N.; Bel'skii, Y. P.; Khazanov, V. A. *Med. Chem. Res.*, **2017**, 1-14.

<sup>53</sup> Strobrykina, I. Y.; Belenok, M. G.; Semenova, M. N.; Semenov, V. V.; Babaev, V. M.; Rizvanov, I. K.; Mironov, V. F.; Kataev, V. E. *J. Nat. Prod.*, **2015**, 1-9.



CAPÍTULO I



**Figura 11.** Entrada de cationes de trifenilfosfonio a las mitocondrias de células tumorales. Imagen creada en BioRender, exclusivo para su uso en esta tesis.

Como los cationes alquiltrifenilfosfonio atraviesan fácilmente la bicapa lipídica por ser altamente liposolubles, no necesitan de transportadores, por ende, se encuentran en las mitocondrias de todos los tejidos, en contraste con los compuestos hidrófilos que necesitan de transportadores para su expresión específica. Así, estas moléculas entran al torrente sanguíneo y se dirigen a las mitocondrias de las células, en especial a aquellas células tumorales que presentan un  $\Delta\Psi_m$  mayor que las mitocondrias normales.

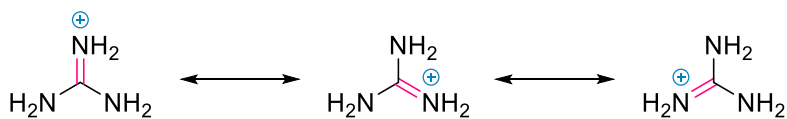
Este tipo de sales ha dado lugar a una familia de compuestos mitocondriotrópicos proporcionando un “motor mitofocalizado”.<sup>54</sup> A menudo se asume que el fragmento catiónico no exhibe ninguna actividad biológica significativa; sin embargo, su alta afinidad por las membranas de fosfolípidos hace que sea probable que altere la integridad de la membrana.<sup>50</sup> Su utilización se basa en aprovechar el mayor potencial eléctrico de

<sup>54</sup> Locatelli, C.; Filippin-Monteiro, F. B.; Creczynski-Pasa, T. B. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *60*, 233-239.

transmembrana mitocondrial de las células cancerosas. Estos cationes tienden a acumularse en el citosol debido a la diferencia de potencial de la membrana plasmática, que corresponde aproximadamente entre -30 y -60 mV (con la carga negativa en el interior).<sup>45,50</sup> Una vez en el interior celular esta diferencia aumenta de 100-500 veces dentro de las mitocondrias de las células cancerosas, donde se genera una magnitud de  $\Delta\Psi_m$  de unos -150 a -180 mV a través de la membrana mitocondrial interna (carga negativa hacia la matriz mitocondrial).<sup>45,50,51,55</sup>

### Estructuras de guanidina y su perspectiva a futuro.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, el uso de cationes ha facilitado la entrega eficiente de moléculas bioactivas; sin embargo, la información disponible es para cationes de  $\text{TPP}^+$ , por lo que la existencia de otro tipo de catión es un tema de interés y con expectativas prometedoras. Para poder competir contra los cationes de  $\text{TPP}^+$  ya descritos, en primera instancia se puede considerar una estructura que tenga ciertos criterios de parentesco, de la cual la más importante es que sea un catión altamente estable en solución acuosa. En este contexto, la mayoría de los derivados de guanidina se protonarán fácilmente debido a su alta basicidad, generando al catión guanidinio. Este ion es estable debido a la eficiente estabilización por resonancia de la carga y por la solvatación de las moléculas de agua (**Figura 12**).



**Figura 12.** Formas resonantes del catión guanidinio.

<sup>55</sup> You, B. R.; Moon, H. J.; Han, Y. H.; Park, W. H. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, 48, 1334-1340.

## CAPÍTULO I

El interés por la obtención de derivados de guanidina se ha incrementado en los últimos años, siendo muy adecuados para el desarrollo de potenciales nuevos fármacos debido a su versatilidad como catalizadores,<sup>56</sup> como componentes de líquidos iónicos,<sup>57</sup> en miméticos de nucleótidos,<sup>58</sup> como péptidos,<sup>59</sup> como contra iones en la química del receptor de aniones,<sup>60</sup> como súper bases,<sup>61</sup> para la fijación de CO<sub>2</sub><sup>62</sup> y como transportadores moleculares.<sup>63,64</sup> La característica más relevante de este tipo de compuestos es su alta basicidad ( $pK_a = 13.6$ )<sup>65</sup> lo que indica que, a pH fisiológico se protona formando el catión guanidinio. Este catión además de ser estable, suele ser útil para la unión a un *target* con la formación de HBs e interacciones iónicas.<sup>66</sup>

Considerando todo lo descrito anteriormente, se presenta una breve descripción de las principales transformaciones desarrolladas en el C-28 del ácido oleanólico (**1**) para obtener los compuestos de interés.

### Esterificación en triterpenos

En el año 2009, Cheng y cols.<sup>33</sup> realizaron la síntesis de glucoconjugados a partir del ácido oleanólico (**1**) unidos por un espaciador de tipo éster como inhibidores de la enzima glucógeno fosforilasa. Esta síntesis consistió en tratar al compuesto **1** con un bromuro de alquilo (1,6-dibromohexano, 3.8 mmol) en DMF y como base se usó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.8 mmol) a 40 °C, generando el compuesto **2** con un 52% de rendimiento (**Esquema 2**) y el glucoconjugado

<sup>56</sup> Noritake, S.; Shibata, N.; Nomura, Y.; Huang, Y.; Matsnev, A.; Nakamura, S.; Toru, T.; Cahard, D. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3599-3604.

<sup>57</sup> Rozas, I.; Sánchez-Sanz, G.; Alkorta, I.; Elguero, J. *J. Phys. Org. Chem.*, **2013**, *26*, 378-385.

<sup>58</sup> Trujillo, C.; Previtali, V.; Rozas, I. *Theor. Chem. Acc.*, **2016**, 260-266.

<sup>59</sup> Xiao, J.; Chen, R.; Pawlicki, M.; Tolbert, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 13616-13618.

<sup>60</sup> Jadhav, V. D.; Herdtweck, E.; Schidtchen, F. P. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 6098-6109.

<sup>61</sup> Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**, *60*, 598-607.

<sup>62</sup> Diez-Cecilia, E.; Carson, R.; Kelly, B.; Schaeybroeck, S. M.; Rozas, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 4287-4292.

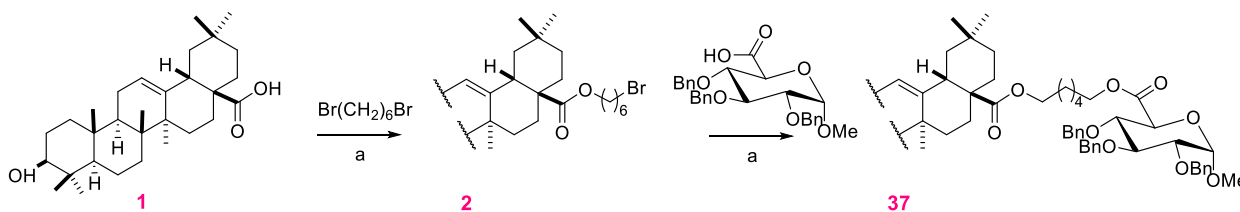
<sup>63</sup> Dardonville, C.; Caine, B. A.; De-la-Fuente, M. N.; Herranz, G. M.; Mariblanca, B. C.; Popelier, P. L.A. *New J. Chem.*, **2017**, *41*, 11016-11028.

<sup>64</sup> Berlinck, R. G. S.; Trindade-Silva, A. E.; Santos, M. F. C. *Nat. Prod. Rep.*, **2012**, *29*, 1369-1484.

<sup>65</sup> Ishikawa, T. *Superbases for Organic Synthesis*, **2009**, John Wiley & Sons, Ltd, 93-143.

<sup>66</sup> Previtali, V.; Trujillo, C.; Amet, R.; Zistetet, D. M.; Rozas, I. *Med. Chem. Commun.*, **2018**, *9*, 735-743.

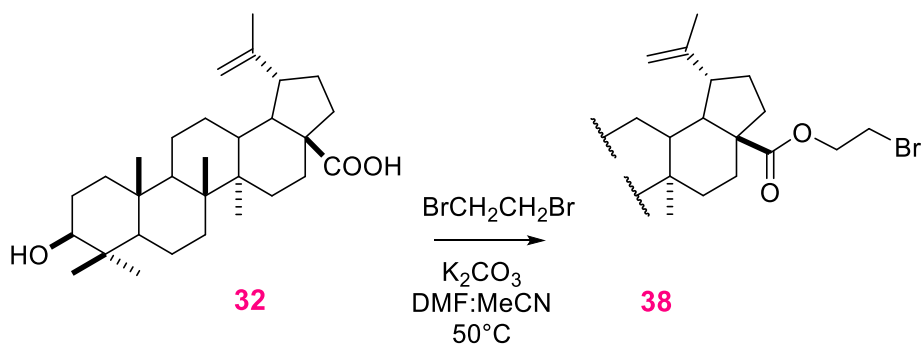
(**37**) con un rendimiento del 88%. La formación de **37** fue mediante la esterificación adicional de **2** con derivados glucosídicos.



**Esquema 2.** Transformación de **1** a un compuesto glucoconjugado (**37**).

Donde a:  $K_2CO_3$ , DMF, t.a o  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . 52-88% de rendimiento.

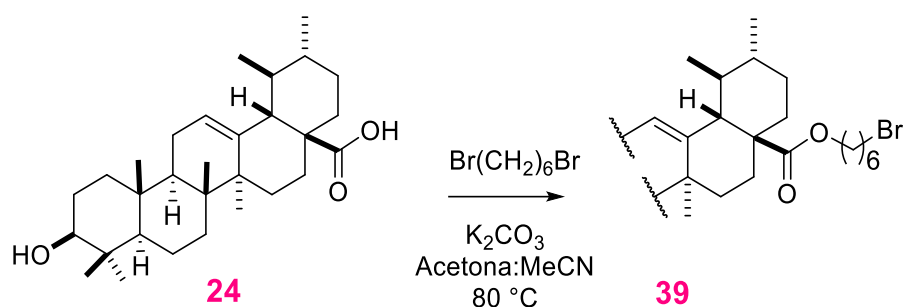
Se ensayaron otras condiciones de reacción para mejorar el rendimiento de formación de ésteres triterpénicos, por ejemplo, el cambio de equivalentes con los mismos reactantes. Biedermann y cols.<sup>67</sup> en el 2010 describieron el éster (**38**) utilizando 1,2-bromoetano para el ácido betulínico (**32**) teniendo un rendimiento del 81%. Su ruta de síntesis se basó en añadir al bromuro de alquilo (10 eq),  $K_2CO_3$  (1 eq) con el ácido triterpénico (**32**) en una mezcla DMF:MeCN a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 h (**Esquema 3**).



**Esquema 3.** Esterificación del ácido betulínico (**32**).

<sup>67</sup> Biedermann, D.; Eignerova, B.; Hajduch, M.; Sarek, J. *Synthesis*, **2010**, 22, 3839-3848.

De acuerdo con la revisión de Sousa y cols.,<sup>68</sup> la metodología descrita por Liu y cols., obtienen rendimientos del 63-70% para la esterificación de **32** con las cadenas dibromadas 1,3 y 1,6 respectivamente. Sin embargo, al realizar la réplica metodológica para el compuesto **1** con 1,2-dibromoetano, obtuvieron un rendimiento del 52%.<sup>67</sup> Otra alternativa para incrementar el rendimiento para el compuesto **1** fue al utilizar disolventes anhidros. Mallavadhani y cols.<sup>40</sup> sintetizaron análogos del ácido ursólico (**24**) con actividad anticancerígena mediante esterificaciones con diversas cadenas dibromadas. Su metodología consistió en la introducción de bromuro de alquilo (3 eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (1.5 eq) en Acetona:DMF durante 5-8 h a 80 °C. El rendimiento fue de 85% (compuesto **39**) en el caso de la cadena 1,6-dibromohexano (**Esquema 4**).



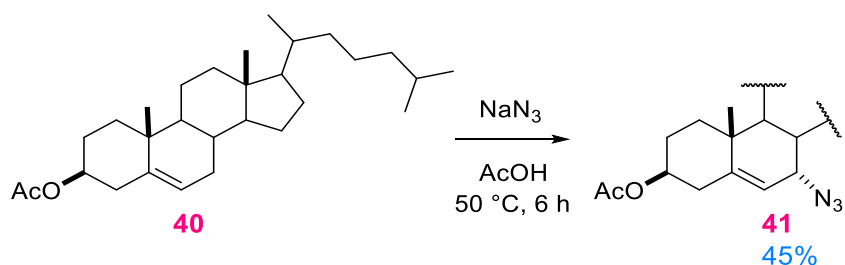
*Esquema 4. Esterificación del ácido ursólico (**24**).*

Con los datos anteriormente citados, se aprecia que la temperatura para la esterificación ha sido descrita entre 40-80 °C. Sin embargo, Spivak y cols.<sup>52</sup> en el 2016 esterificaron en el C-28 del ácido betulínico (**32**) a una temperatura de 50 °C durante 3 h con las cadenas dibromadas 1,2-dibromoetano, 1,4-dibromobutano y 1,8-dibromooctano con rendimientos del 75, 60 y 60% respectivamente. Un año después, Nedopekina y cols.<sup>51</sup> realizaron la misma metodología pero en el ácido ursólico (**24**) teniendo rendimientos del 69% con el reactivo 1,4-dibromobutano.

<sup>68</sup> Sousa, J. L. C.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, A. M. S. *Molecules*, **2019**, *24*, 355-390.

## Formación de alquil-azida en triterpenos

La literatura sobre el uso de  $\text{NaN}_3$  para la formación de azidas es muy vasta. En 1987 Moriarty y cols.<sup>69</sup> realizaron la síntesis de acetato de  $7\alpha$ -azidocolest-5-en- $3\beta$ -ol (**41**) (**Esquema 5**), a partir de una solución de yodobenceno y acetato de colesterilo (**40**) en reacción con  $\text{NaN}_3$  en ácido acético (6 h,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ).

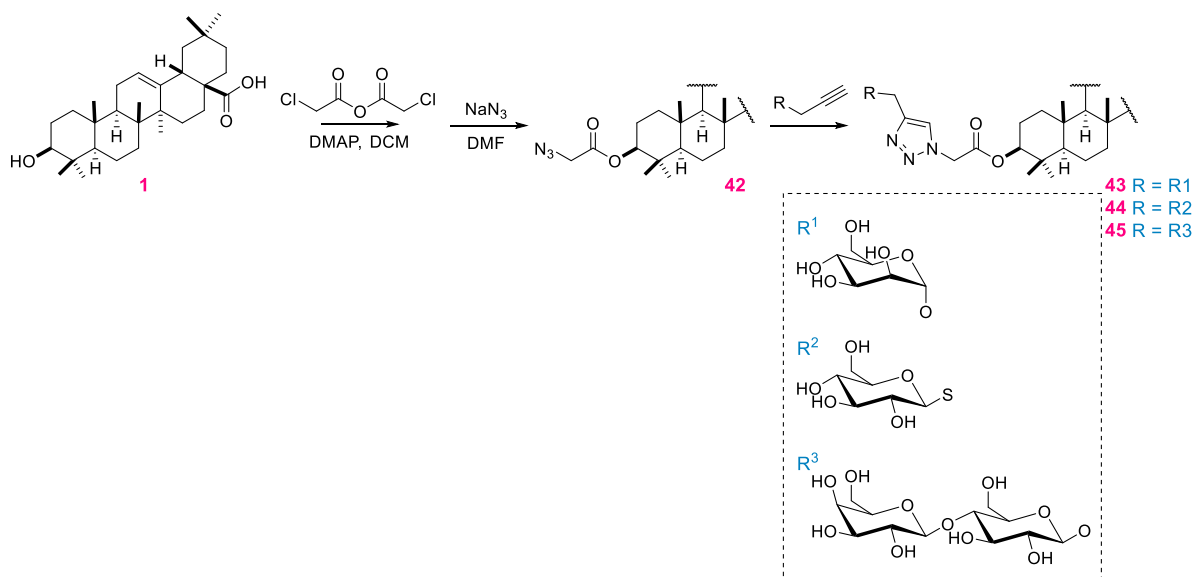


*Esquema 5. Síntesis de azidoesteroides.*

Este tipo de reacción, con el paso de los años ha tenido sus variantes, ligeras modificaciones en cuanto el uso de concentración, tiempo, temperatura o el medio de reacción, lo cual ha dado lugar a numerosos artículos con diferente metodología; por ejemplo, Ortega-Muñoz y cols.<sup>70</sup> en el 2018 describieron glicoconjugados (**43-45**) del OA (**1**) para su evaluación contra la línea celular T-84. Durante la síntesis se obtuvo el intermediario (**42**) con un rendimiento del 79% (**Esquema 6**). Su metodología incluyó  $\text{NaN}_3$  en DMF.

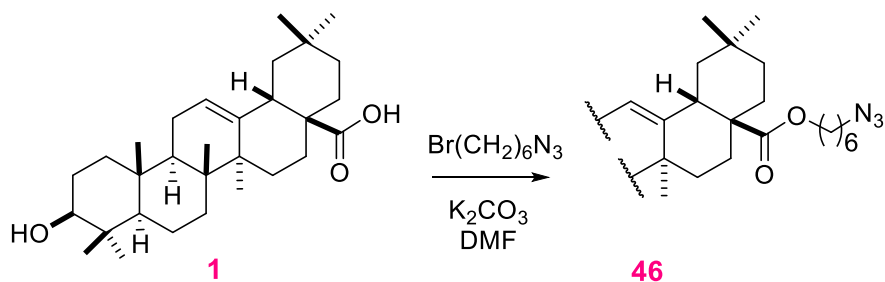
<sup>69</sup> Moriarty, R. M.; Khosrwhahí, J. S. *Synth. Commun.*, **1987**, *17*, 89-94.

<sup>70</sup> Ortega-Muñoz, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Reyes-Berbel, E.; Mut-Salud, N.; Hernández-Mateo, F.; Rodríguez-López, A.; Garrido, J. M.; López-Jaramillo, F. J.; Santoyo-González, F. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 11455-11468.



*Esquema 6. Glicoconjugados de 1 con intermediario azida triterpénica (42).*

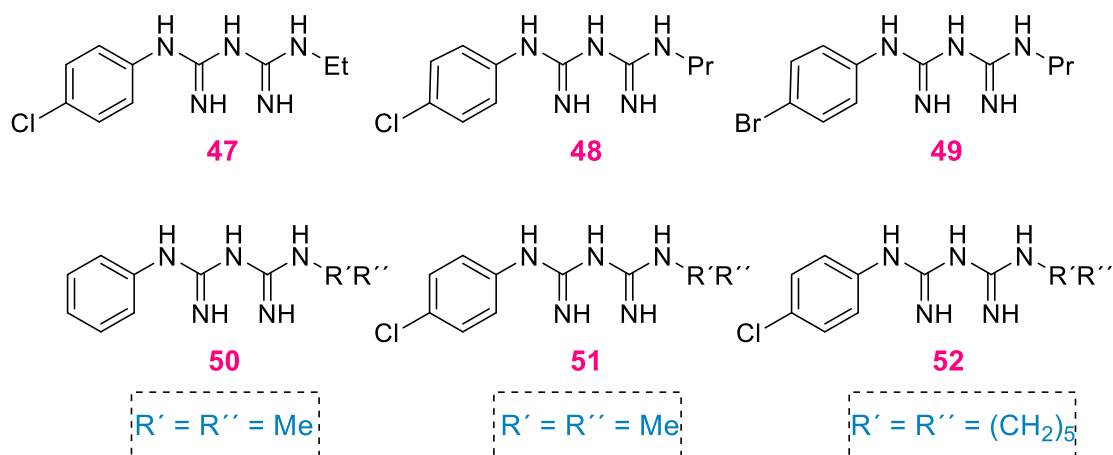
El uso de  $\text{NaN}_3$  se puede replicar en una gran variedad de compuestos debido a que es versátil y conduce a las moléculas deseadas con rendimientos diversos que dependen de la variación en concentración, tiempo y temperatura. Por otro lado, la síntesis de compuestos con un fragmento azida pueden generarse a partir de otros reactivos, por ejemplo, Chen y cols.<sup>33</sup> (**Esquema 7**) describen una esterificación a partir del OA (1) con 1-azido-6-bromohexano para dar su correspondiente azida triterpénica (46).



*Esquema 7. Síntesis de azida del OA (46) mediante otra ruta metodológica.*

## Formación de guanidinas a partir de tioureas con agentes desulfurantes

Como se ha mencionado con anterioridad, el grupo funcional guanidina desempeña un papel importante en los procesos biológicos, siendo uno de los más reconocidos el ser transportador molecular.<sup>63,64</sup> De esta manera, la síntesis para este tipo de compuestos ha aumentado en la investigación y se han desarrollado nuevos métodos sintéticos eficientes y efectivos para generar diferentes tipos de compuestos de guanidina.<sup>71</sup> Se tiene el registro en 1948 por Crowther y cols.<sup>72</sup> de la síntesis de compuestos antimalarios haciendo uso de estructuras diguanidínicas (**Figura 13**), de las cuales los compuestos **47-52** tuvieron acción profiláctica contra las diferentes malarias aviarias y humanas. Estos 6 compuestos se sintetizaron a partir de tioureas con un agente desulfurante: HgO.



**Figura 13.** Compuestos diguanidínicos antimalarios.

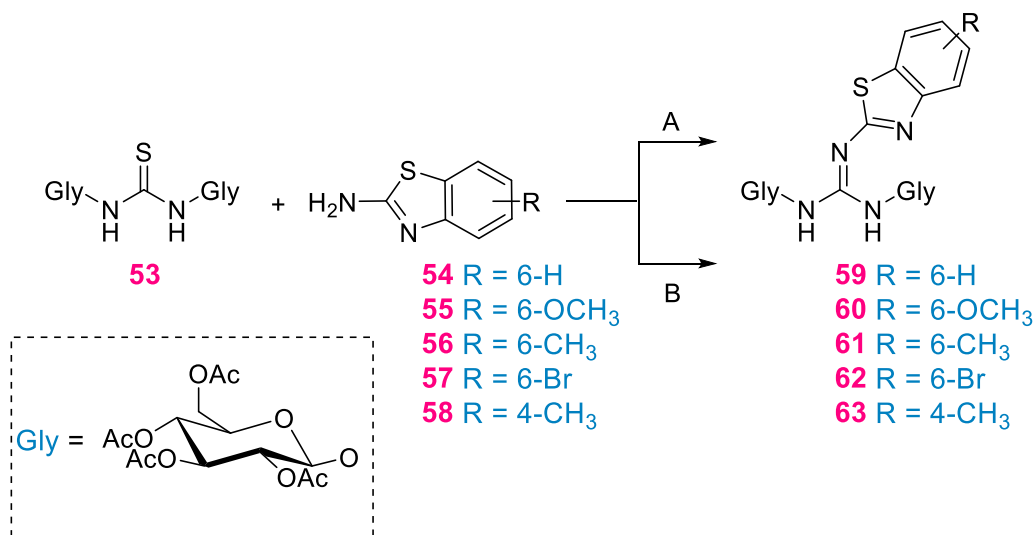
El uso de agentes desulfurantes en la formación de guanidinas a partir de tioureas se basa en el empleo de un metal de transición que permite la ciclación mediante la oxidación

<sup>71</sup> Chen, H. M.; Li, G.; Cao, L. H. *J. Chin. Chem. Soc.*, **2008**, 55, 474-478.

<sup>72</sup> Crowther, A. F.; Curd, F. H. S.; Richardson, D. M.; Rose, F. L. *J. Chem. Soc.*, **1948**, 1636-1645.

de las moléculas azufradas. Típicamente, la síntesis de guanidinas implica el tratamiento de aminas con carbodiimidas;<sup>71</sup> por su parte la carbodiimida es el producto resultante de una desulfuración oxidativa. Algunos reactivos que son utilizados en la desulfuración oxidativa son:  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_2/\text{SiO}_2$ ,  $\text{PbO}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CuI}$ <sup>71</sup> y  $\text{CH}_3\text{I}$ ;<sup>73</sup> sin embargo, la mayoría de estos mostraron la limitante de ser materiales de partida inestables.

Chen y cols.<sup>71</sup> sintetizaron diglicósidos guanidínicos (**Esquema 8**) usando dos métodos; el método A consistía en usar el agente  $\text{HgCl}_2$  en DMF y el método B fue con el uso de  $\text{HgO}$  en  $\text{CHCl}_3$ . El resultado que obtuvieron fue que la guanidinilación con  $\text{HgO}$  procedió de una manera más suave y con rendimientos más altos que con  $\text{HgCl}_2$  (**Tabla 1**), pero se requirieron tiempos de reacción más largos. Esto, debido al hecho de la formación de una carbodiimida que posteriormente participa con la amina (Método A = 16 h a t.a, método B = 34 h a t.a).



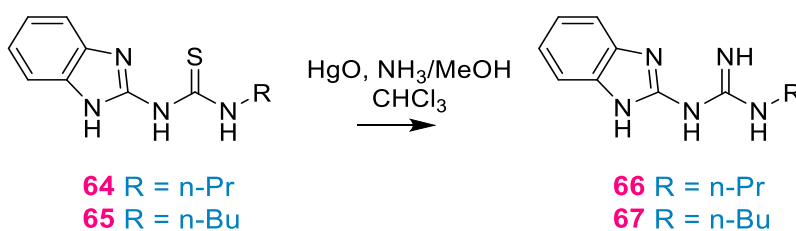
**Esquema 8.** Obtención de diglicósidos de guanidina utilizando dos métodos diferentes.  
 Donde A:  $\text{HgCl}_2/\text{DMF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ . B:  $\text{HgO}/\text{CHCl}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$

<sup>73</sup> Pulka-Ziach, K.; Antunes, S.; Perdriaun, C.; Kauffmann, B.; Pasco, M.; Douat, C.; Guichard, G. *J. Org. Chem.*, **2018**, *83*, 2530-2541.

**Tabla 1.** Síntesis de di-glucósidos de guanidina mediante Hg(II).

Compuesto	Rendimiento (%)	
	Método A	Método B
59	71.5	75.5
60	50.5	65.2
61	66.7	69.1
62	48.9	55.0
63	72.5	75.8

El alto uso de HgO como agente desulfurante en diversas síntesis orgánicas muestra un grado de efectividad para proponer su aplicación en triterpenos. Otro ejemplo de su aplicación es en síntesis de guanidinas (**66** y **67**) como la realizada por Thomas y cols.<sup>74</sup> en el 2020 (**Esquema 9**), la cual da rendimientos moderados del 40 al 65% con el uso de HgO en cloroformo. Con base en estos antecedentes nuestro grupo de trabajo se basó en la metodología descrita con anterioridad para generar guanidinas acopladas al ácido oleanólico.

**Esquema 9.** Uso de HgO en síntesis de guanidinas a partir de tioureas

<sup>74</sup> Thomas, S. J.; Balónová, B.; Cinatl, J.; Wass, M. K.; Serpell, C. J.; Blight, B. A.; Michaelis, M. *J. Med. Chem.*, **2020**, *15*, 349-353.

# OBJETIVOS

## Objetivo General:

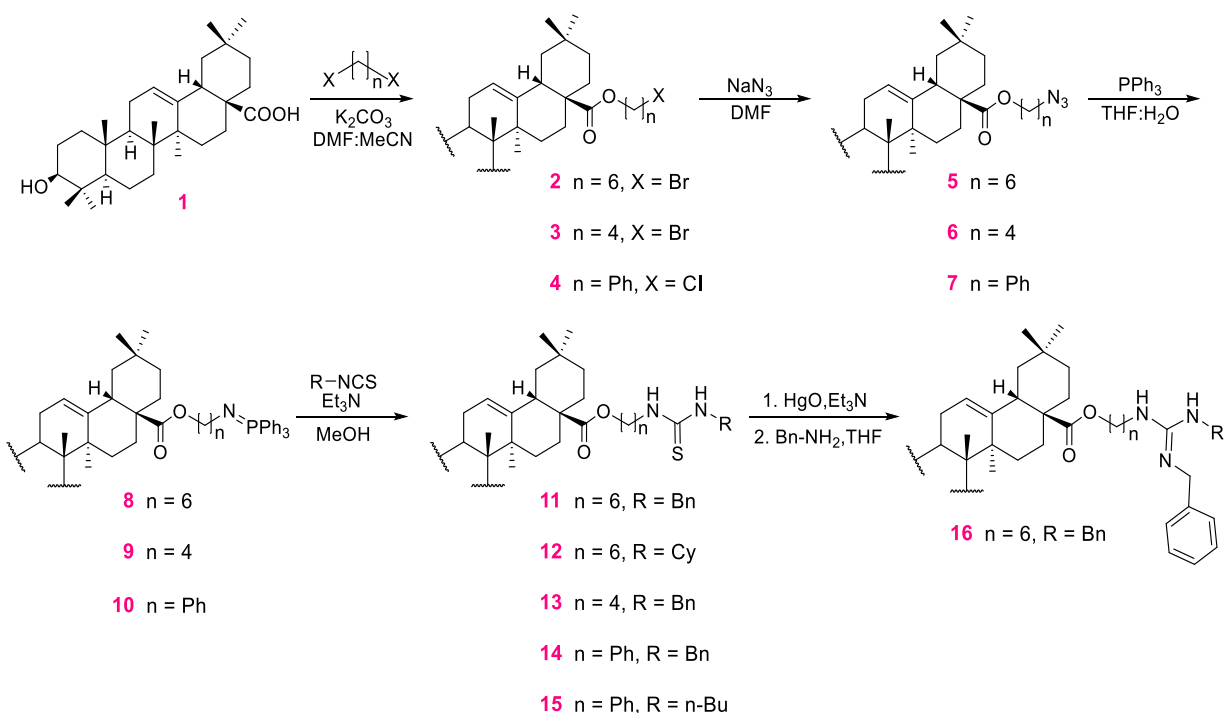
- ✚ Generar nuevos DLCs provenientes de sistemas guanidinio a partir del ácido oleanólico, que actúen como agentes mitocondriotrópicos y ejerzan actividad anticancerígena.

## Objetivos Particulares:

- ✚ Investigar los efectos estructuras híbridas del OA sobre la apoptosis celular.
- ✚ Dirigir específicamente al ácido oleanólico a las mitocondrias de células cancerosas mejorando su citotoxicidad y selectividad.
- ✚ Caracterizar los productos obtenidos por medio de diversas técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear de 1 y 2 dimensiones.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

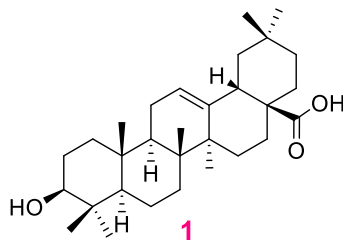
En la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral, se diseñó un camino sintético de 5 pasos para obtener estructuras catiónicas de guanidina (**16**) acopladas al ácido oleanólico (**1**). Como primer paso se realizó la esterificación del grupo carboxilo con diferentes cadenas alquílicas (1,6-dibromohexano y 1,4-dibromobutano), así como la introducción de un compuesto aromático ( $\alpha,\alpha'$ -dicloro-*p*-xileno), dando origen a los compuestos **2-4**. Posteriormente se sustituyó la función halógeno por azida (**5-7**), las cuales se redujeron bajo condiciones de Staudinger generando los compuestos **8-10**. El acoplamiento de cada compuesto con diferentes isotiocyanatos en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  formó las tioureas **11-15**. Finalmente, se realizó una reacción de desulfuración oxidativa en presencia de  $\text{HgO}$  generando una carbodiimida intermediaria que no pudo ser aislada, la cual se trató con bencilamina dando origen a la guanidina deseada **16** (**Esquema 10**).



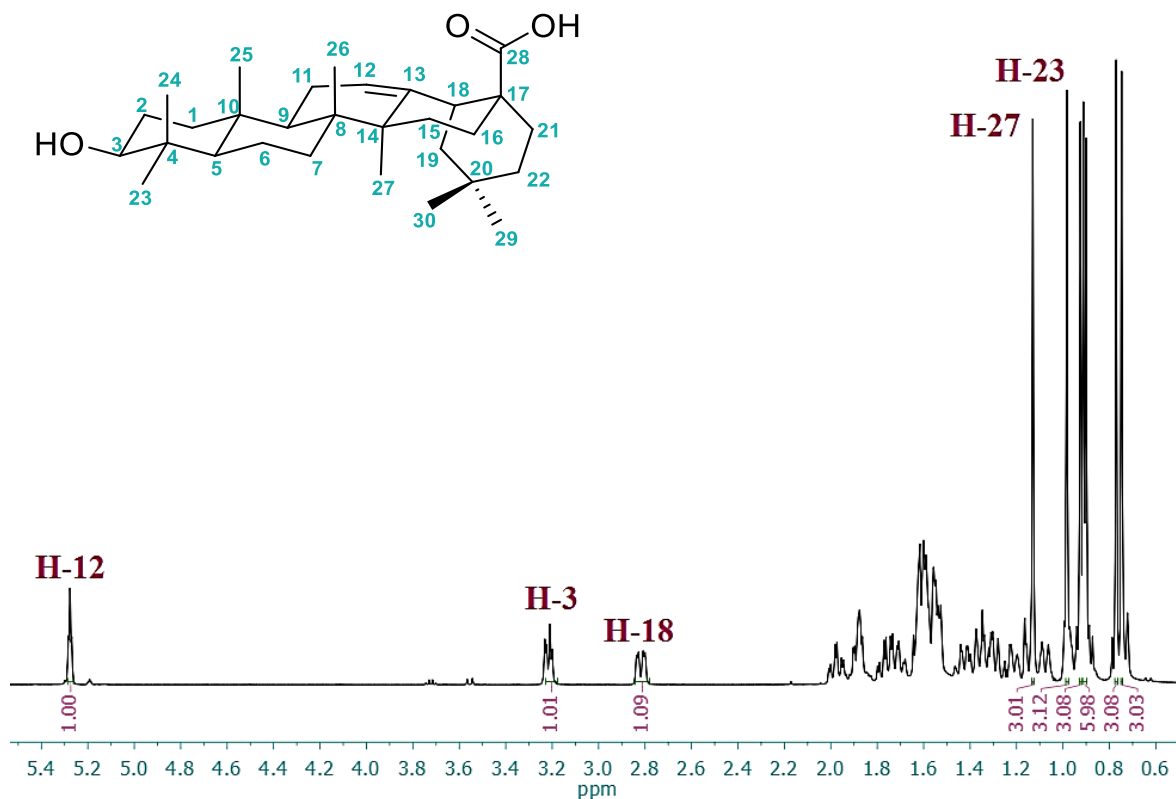
*Esquema 10. Síntesis para obtener la guanidina 16 a partir del ácido oleanólico.*

## CAPÍTULO I

Se evaluaron por RMN los derivados sintetizados iniciando con la materia prima **1** con la finalidad de comparar los espectros obtenidos en cada etapa de reacción y posteriormente elucidar la estructura de cada uno de ellos.

Ácido oleanólico (**1**)

El experimento de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 1**) del compuesto **1**; al igual que otro compuesto triterpénico presentan una complejidad en la elucidación de los  $^1\text{H}$  en el rango de 1-2 ppm debido al solapamiento de un elevado número de señales alifáticas. Sin embargo; se pueden observar una señal en 5.27 ppm que corresponde al protón vinílico del C-12. En 3.24 ppm aparece una señal múltiple que corresponde al protón base del oxígeno de C-3 y junto a esta señal aparece otra en 2.53 ppm que corresponde al protón del C-18. Así mismo, se puede observar a frecuencias bajas señales pertenecientes a los grupos metilos de la estructura triterpénica; por ejemplo, el protón del C-27 que se encuentra como un señal simple en 1.13 ppm, seguido del protón de C-23 en 0.98 ppm.

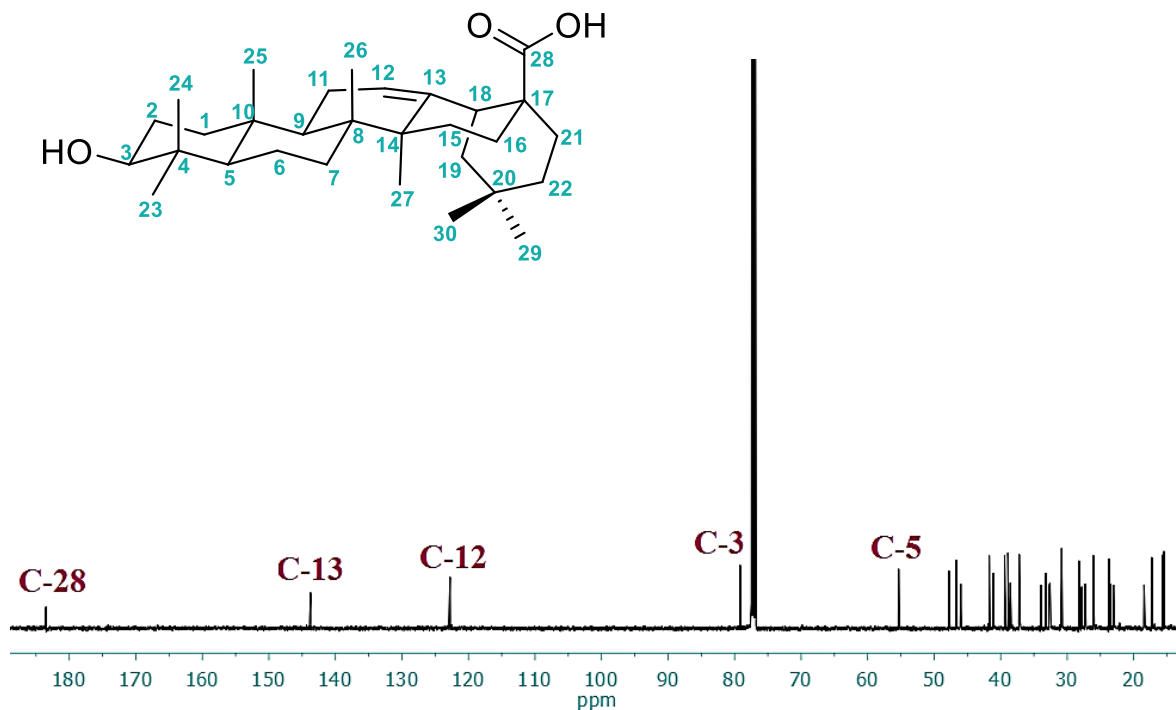


*Espectro 1. RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 1 a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$ .*

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 2**) se pueden observar dos señales, una en 143.7 ppm y otra en 122.7 ppm que corresponden a los carbonos vinílicos de C-13 y C-12, respectivamente. De igual manera otra señal característica del compuesto **1** es en 183.4 ppm que corresponde al carbono del ácido carboxílico (C-28); así mismo, se encuentra C-3 en 79.1 ppm y C-5 en 55.3 ppm, confirmando así la estructura química de la materia prima.

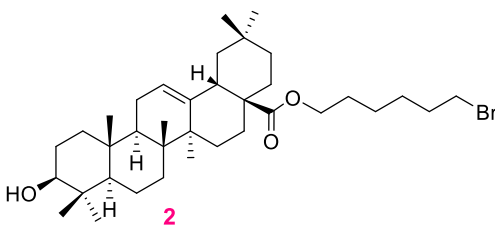
Estas señales son similares a las descritas en la bibliografía.<sup>75</sup>

<sup>75</sup> Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. *Magn. Reson. Chem.*, **2003**, *41*, 636-638.

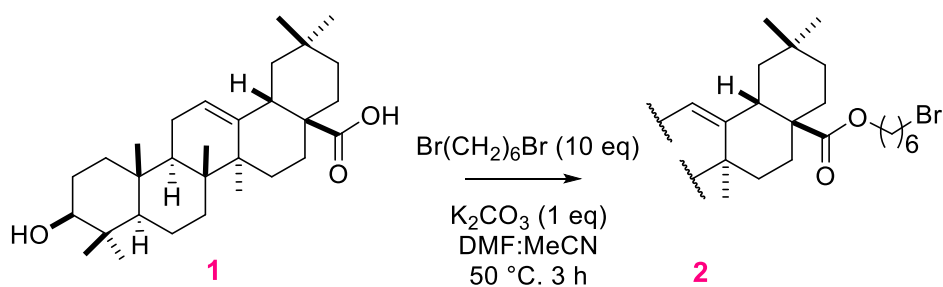


*Espectro 2. RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1 a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$ .*

Los espectros de RMN a continuación son de la serie proveniente de la cadena de 6 carbonos (compuestos **2**, **5**, **8**, **11** y **16**). La caracterización de los compuestos **3**, **4**, **6**, **7**, **9**, **10**, **12**, **13**, **14** y **15** no se logró a completar debido a factores externos. La existencia de dichos compuestos se comprueba en RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz con señales representativas, sin embargo, los espectros obtenidos se vieron afectados por la suspensión de labores.

3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-bromohexilo (**2**).

La obtención del compuesto **2**, se realizó mediante la esterificación del grupo carboxilo del C-28 con 1,6-dibromohexano. Nuestro grupo de trabajo decidió ensayar la metodología con el ácido oleanólico tomando en cuenta los antecedentes de esterificación en triterpenos que se mencionó con anterioridad al emplear condiciones anhidras y el manejo de los equivalentes (**Esquema 11**).<sup>4,51,52,67</sup> En este caso la reacción del ácido oleanólico transcurrió en menor tiempo con un rendimiento del 90-97%, mejorando notablemente. Bajo el tratamiento antes mencionado el ácido oleanólico (**1**) condujo a la formación del derivado **2** (**Esquema 11**).



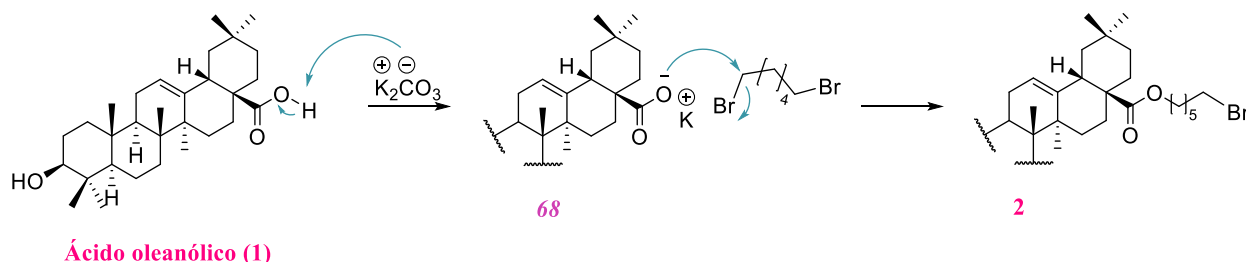
*Esquema 11. Esterificación del ácido oleanólico (1).*

Adicionalmente, esta metodología tiene la virtud de llevar a cabo la reacción en 3 h, con un rendimiento prácticamente cuantitativo.

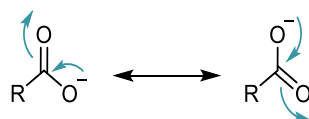
## CAPÍTULO I

El mecanismo de reacción (**Esquema 12**) para esta reacción está basado en el comportamiento ácido del hidrogeno del ácido carboxílico, el cual puede presentar un valor de  $pK_a$  comprendido entre 4 y 5.<sup>76,77</sup> Al adicionar una base como el carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ), el carbonato es lo suficientemente fuerte como para desprotonar al ácido carboxílico del compuesto **1**, generando el ion carboxilato **68**.

En la estructura **68** tenemos a un átomo cargado negativamente, donde la carga se distribuye por igual entre los dos átomos de oxígeno (**Figura 14**) resultando ser una especie nucleofílica, la cual procede mediante una reacción de tipo  $S_N2$  con el reactante 1,6-dibromohexano. Esto genera un ataque nucleofílico a  $180^\circ$  al carbono unido al nucleófilo. El nucleófilo (en este caso el bromuro) es liberado del lado opuesto al ataque para formar el producto **2**.



*Esquema 12. Mecanismo de reacción de la esterificación.*



*Figura 14. Deslocalización de los electrones sobre el sistema  $\pi$*

El espectro de RMN de  $^1H$  a 500 MHz, de la estructura haluro de alquilo proveniente del OA (**2**) aportó valiosa información para su caracterización (**Espectro 3**). El protón

<sup>76</sup> Rypkema, H.; Sinha, A.; Francisco, J. *J. Phys. Chem.*, **2015**, 1-8.

<sup>77</sup> Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. En *Organic Chemistry.*, **2012**, New York: Oxford University Press Inc, 205-207.

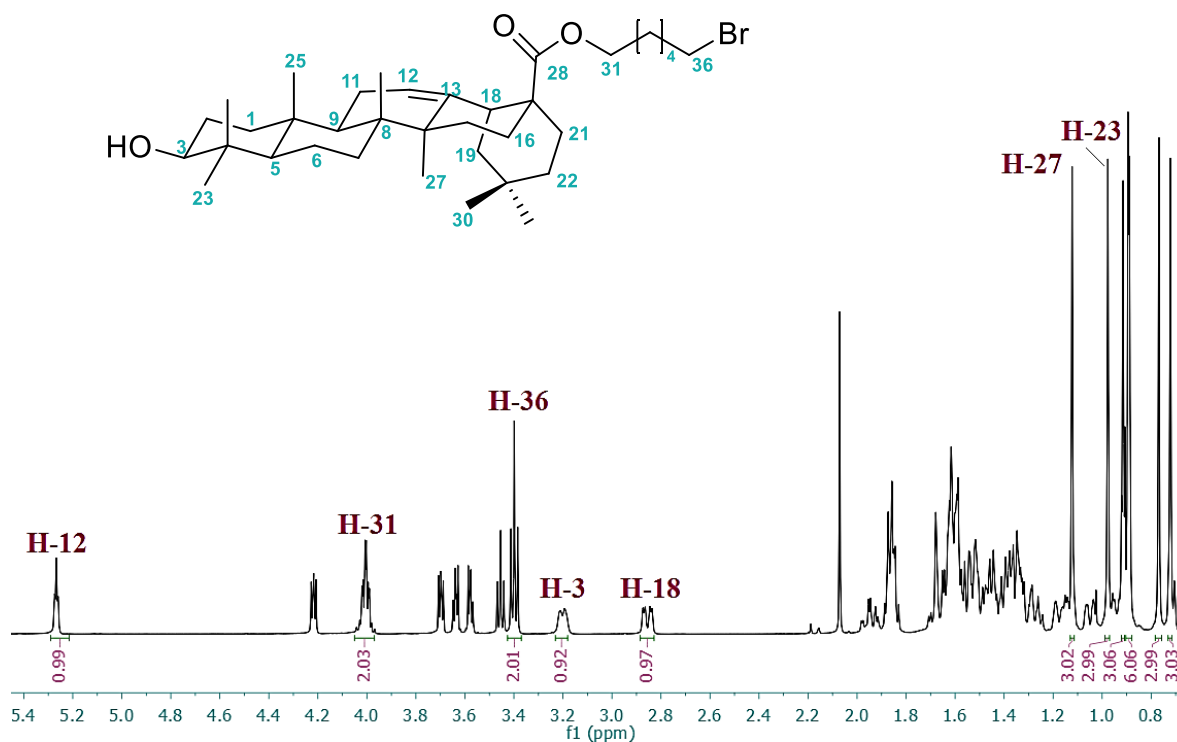
## CAPÍTULO I

vinílico de  $\Delta^{12}$  se observa en 5.27 ppm como una señal doble de dobles (*dd*) con  $J_{12-11ax} = J_{12-11ec} = 3.7$  Hz. La señal múltiple (*m*) del H-3 se desplaza ligeramente a frecuencias altas en 3.20 ppm, esto se debe a la influencia de la densidad electrónica del oxígeno perteneciente al grupo hidroxilo que ejerce a través del espacio. De igual manera se observa el H-18 con un desplazamiento de 2.85 ppm, la cual se aprecia como una señal doble de dobles (*dd*) con  $J_{18-19ax} = 13.9$  Hz,  $J_{18-19ec} = 4.6$  Hz; constantes que de acuerdo con el diagrama de Karplus se confirmó que para el valor de  $J = 13.9$  Hz corresponde al acoplamiento de H-18 con H-19<sub>ax</sub> dado que forma un ángulo diedro cercano a 180 grados, por lo que su constante de acoplamiento es grande a comparación del acoplamiento de H-18 con H-19<sub>ec</sub>.

La subsistencia de las señales para los 7 metilos de la estructura triterpénica se pueden observar en frecuencias bajas; por ejemplo, el protón del C-27 se encuentra como un señal simple (*s*) en 1.12 ppm, seguido del metilo (C-23) en 0.98 ppm, así como también las demás señales simples (*s*) en 0.91, 0.77, 0.72 ppm (3 x CH<sub>3</sub>) y en 0.89 ppm que le corresponde una integración de 6H (2 x CH<sub>3</sub>).

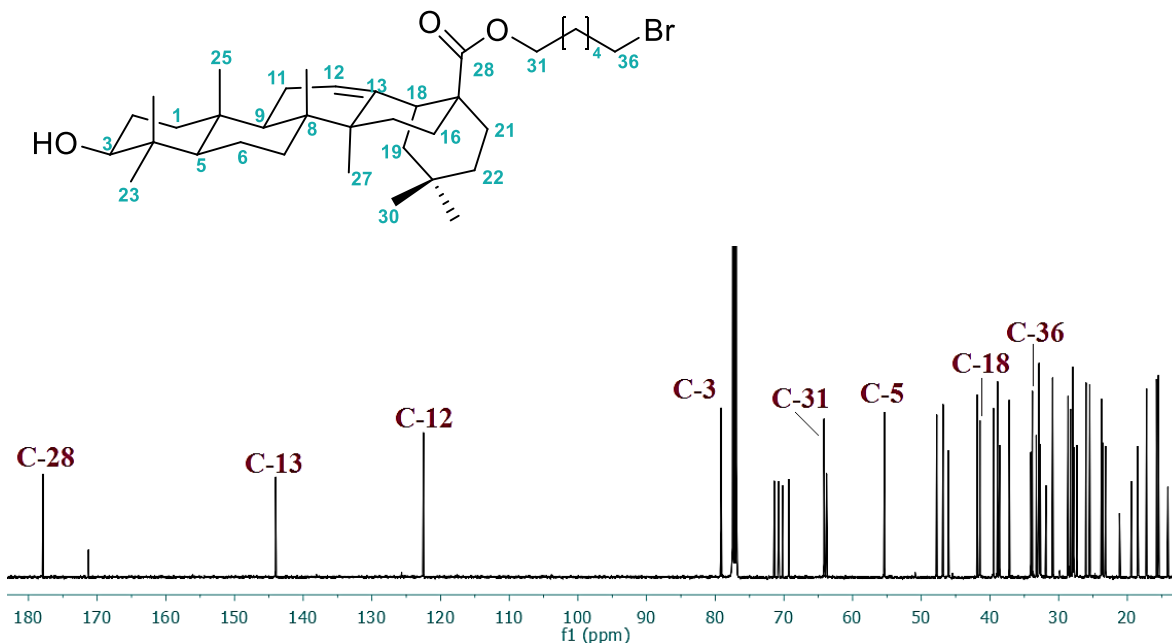
Las nuevas señales que integran para 2 protones fueron relacionados a las modificaciones químicas (H-31 y H-36). Ambas señales se encuentran a frecuencias altas debido al desapantallamiento que ejercen los grupos electronegativos que se encuentran con proximidad a ellos. El protón H-31 se observa como una señal triple de dobles (*td*) a 4.01 ppm, su multiplicidad se debe al CH<sub>2</sub> vecinal con una  $J_{31-32} = 6.4$  Hz y, por otro lado a la multiplicidad con  $J_{31-31gem} = 2.4$  Hz. Para el H-36, se observa como una señal triple (*t*) a 3.40 ppm con una  $J_{36-35} = 6.8$  Hz.

Cada asignación se verificó de acuerdo con la literatura empleada.<sup>4</sup>



*Espectro 3. RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz del compuesto **2** en  $\text{CDCl}_3$ .*

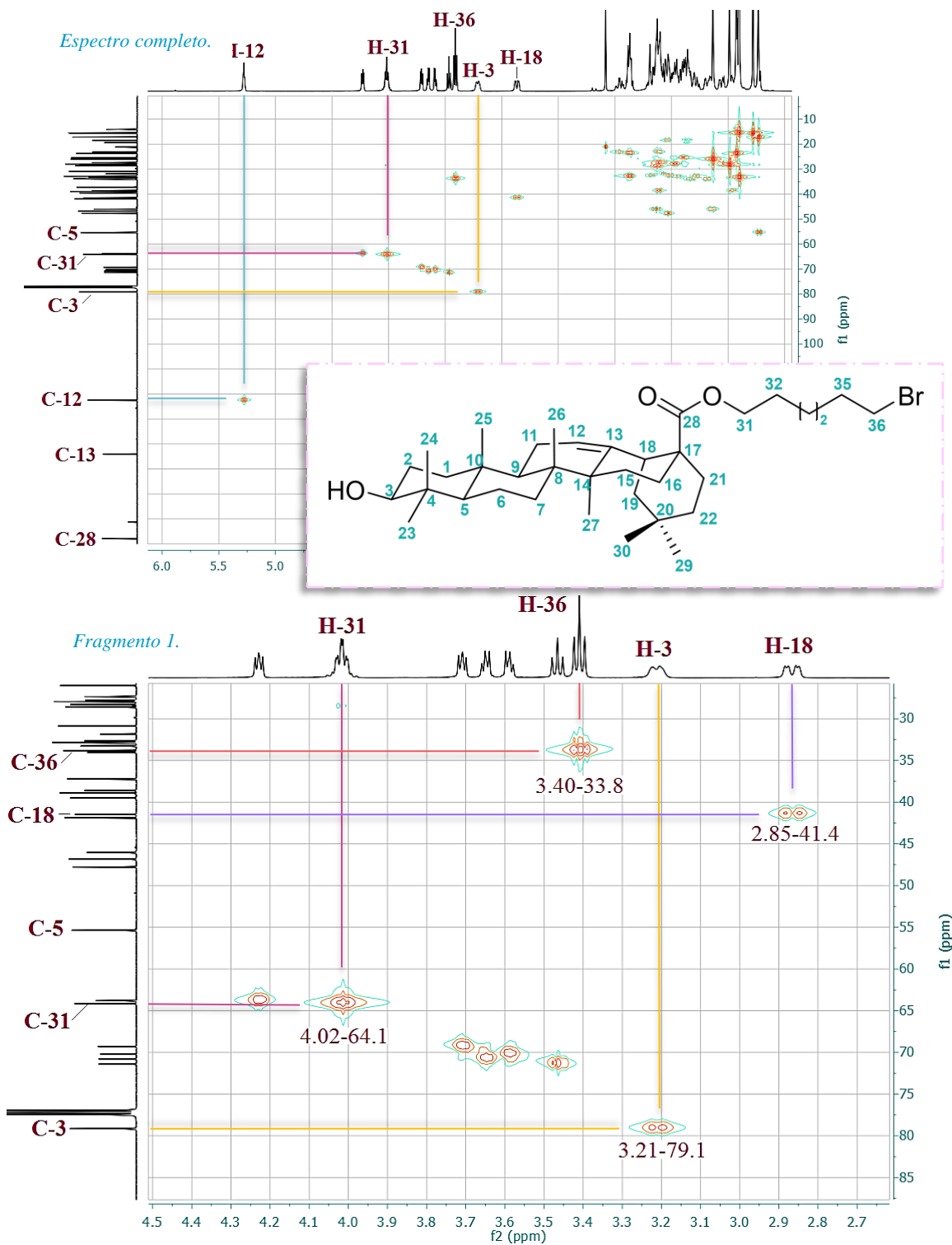
En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 4**) para el compuesto **2** se observa a una frecuencia alta la señal del carbono para el carbonilo del grupo éster (C-28) en 177.8 ppm. En 144.2 y 122.6 ppm aparecen las señales típicas del  $\Delta^{12}$ , las cuales pertenecen a los C-13 y C-12, respectivamente. Otras señales representativas para el esqueleto triterpénico son el C-3 en 79 ppm y el C-18 en 41.4 ppm. La señal en 64 ppm corresponde al C-31 y para el C-36 se encuentra una señal en 33.8 ppm. Cada asignación se verificó de acuerdo con la literatura empleada.<sup>4</sup>



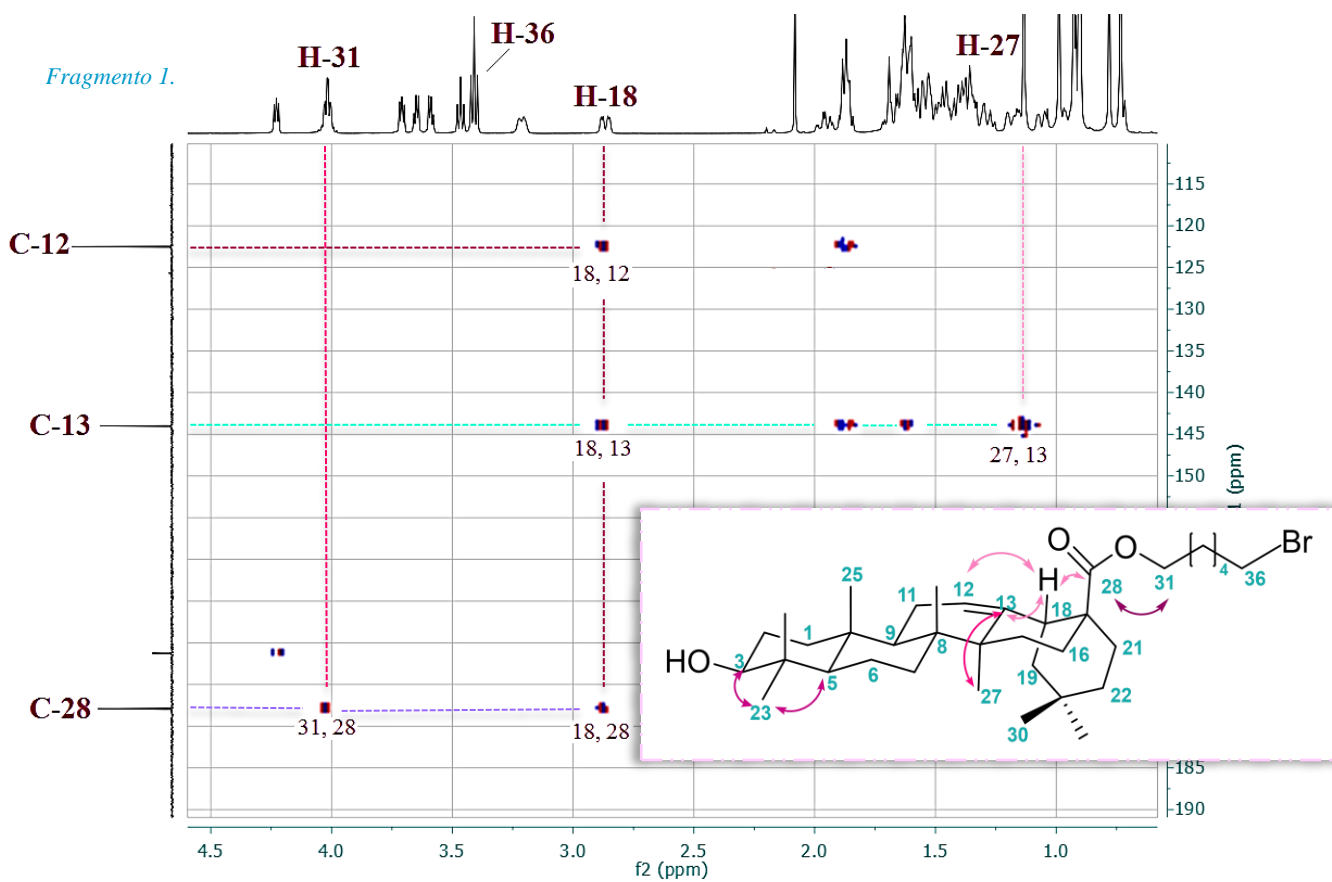
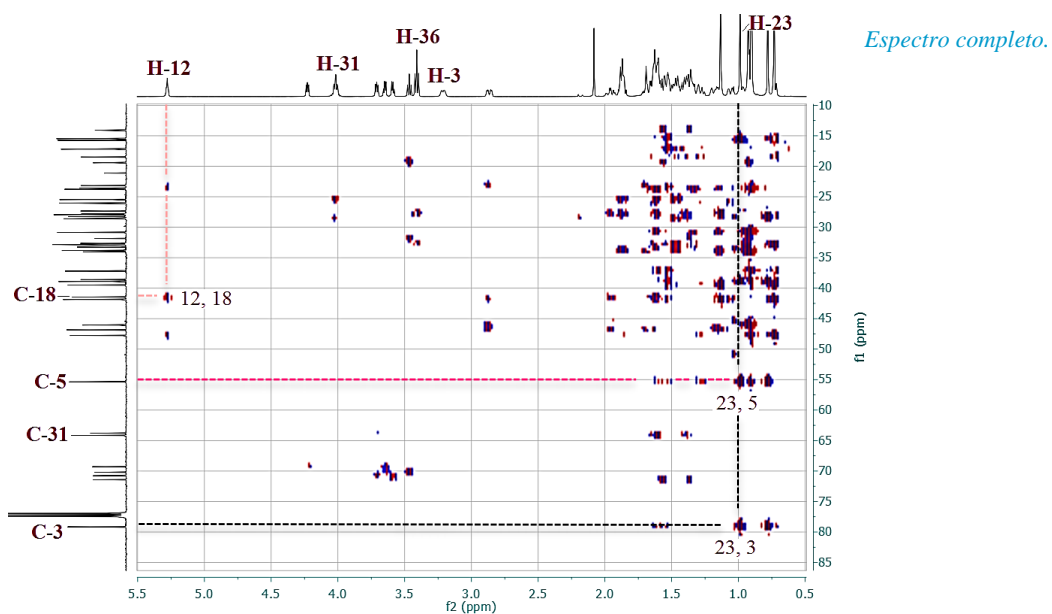
*Espectro 4. RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz del compuesto **2** en  $\text{CDCl}_3$ .*

En el **espectro 5** se presenta el espectro completo y una ampliación del fragmento más representativo para el experimento HSQC de **2**. En la ampliación del fragmento se aprecia a una frecuencia alta las correlaciones de los protones H-18, H-3, H-36 y H-31, así como la correlación del protón vinílico H-12 con sus correspondientes carbonos.

En el **espectro 6** del experimento HMBC se ilustran las zonas representativas del compuesto **2** a tres enlaces, con la cual se reafirma su caracterización. El espectro completo a frecuencias bajas nos demuestra la complejidad del esqueleto triterpénico; sin embargo, se puede apreciar la correlación del protón del metilo 23 (H-23) con los carbonos 5 y 3 (C-5, C-3); así mismo se destaca la correlación del protón vinílico H-12 con el C-18. En el fragmento 1 podemos visualizar las correlaciones representativas del compuesto **2**. En la zona de frecuencias altas tenemos la correlación de H-18 con C-12, C-13 y C-28. Para el caso de H-31 se correlaciona con C-28 y para el protón del metilo 27 con su respectiva correlación con C-13.

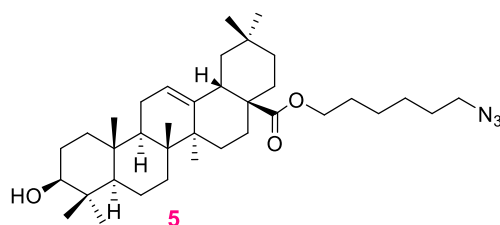


Espectro 5. Regiones representativas del experimento de HSQC del compuesto 2.

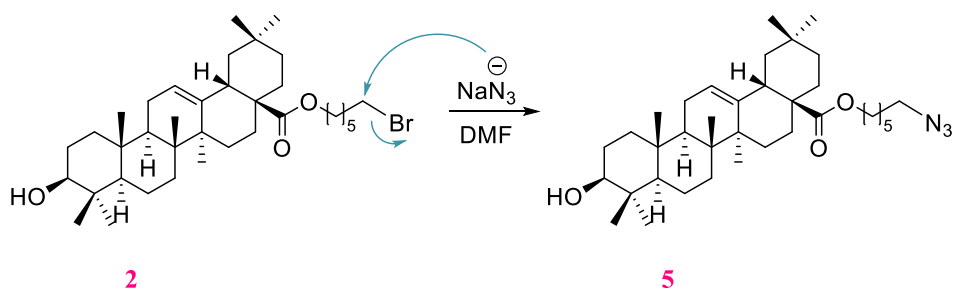


*Espectro 6. Regiones representativas del experimento de HMBC del compuesto 2.*

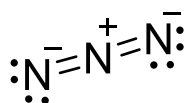
### 3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-azidohexilo (5).



El mecanismo de reacción para el compuesto **5** (**Esquema 13**) es el de una  $S_N2$ , en la que se utilizó un compuesto iónico como la azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ). El ion azida ( $\text{N}_3^-$ ) es una especie triatómica lineal, nucleofílica en ambos extremos; la cual, es capaz de insertarse en casi cualquier sitio electrofílico. La azida reacciona con el haluro de alquilo (**2**) una sola vez, esto es debido a que la alquil azida (**5**) ya no es una especie nucleofílica (**Figura 15**).<sup>78</sup>



**Esquema 13.** Mecanismo de reacción para la formación de una alquil azida (5).



**Figura 15.** Estructura para el ion azida  $\text{N}_3^-$

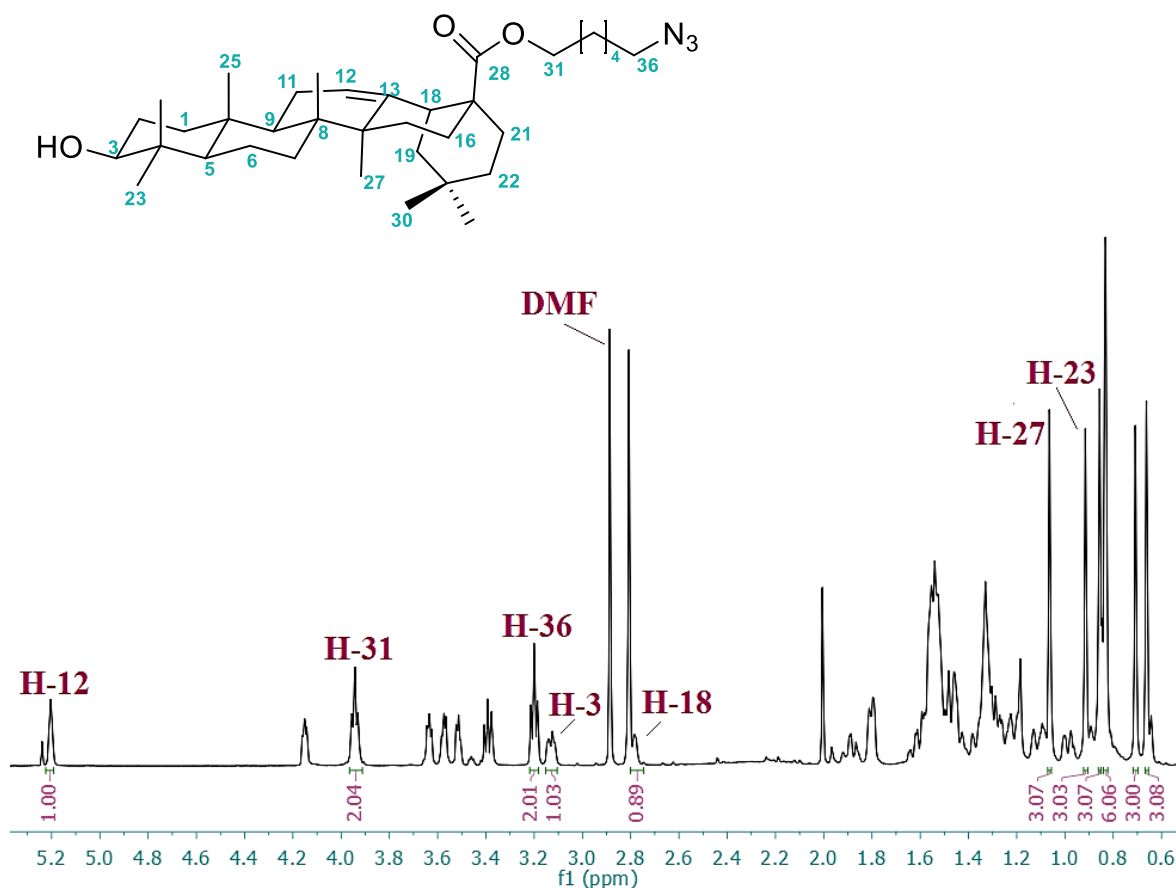
<sup>78</sup> Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. En *Organic Chemistry*, 2012, New York: Oxford University Press Inc, 353-354.

## CAPÍTULO I

Dentro de su caracterización, el compuesto **5** posee un  $R_F$  casi idéntico al compuesto **2** y presentó básicamente las mismas señales; en el **espectro 7 y 8** se muestran los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ , respectivamente.

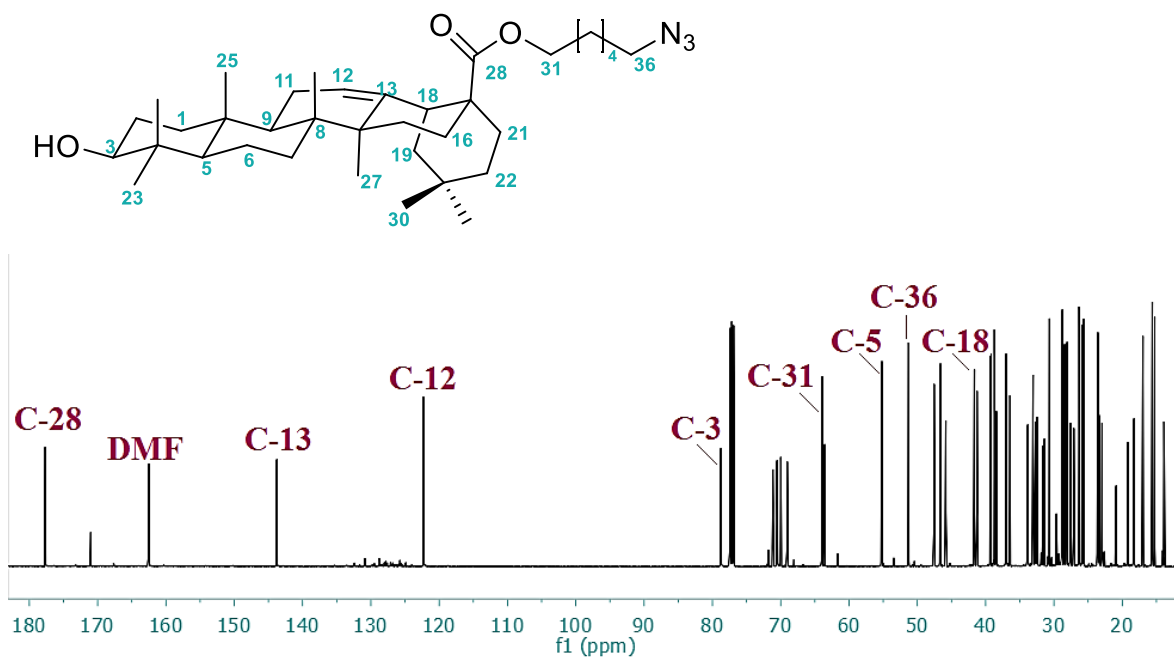
Es evidente que la mayoría de los núcleos no presenta variación significativa en sus desplazamientos a excepción del protón y carbono 36. La señal de H-36 como se observa en el **espectro 7** se muestra como una señal triple de dobles a 3.20 ppm con una  $J_{36-35} = 7.0$  Hz,  $J_{36-36gem} = 1.6$  Hz.

Para el **espectro 8** el desplazamiento de C-36 se encuentra a 51.3 ppm. Cada asignación se verificó de acuerdo con la literatura empleada.<sup>79</sup>



**Espectro 7.** RMN de  $^1H$  a 500 MHz del compuesto **5** en  $CDCl_3$ .

<sup>79</sup> Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 841-850.

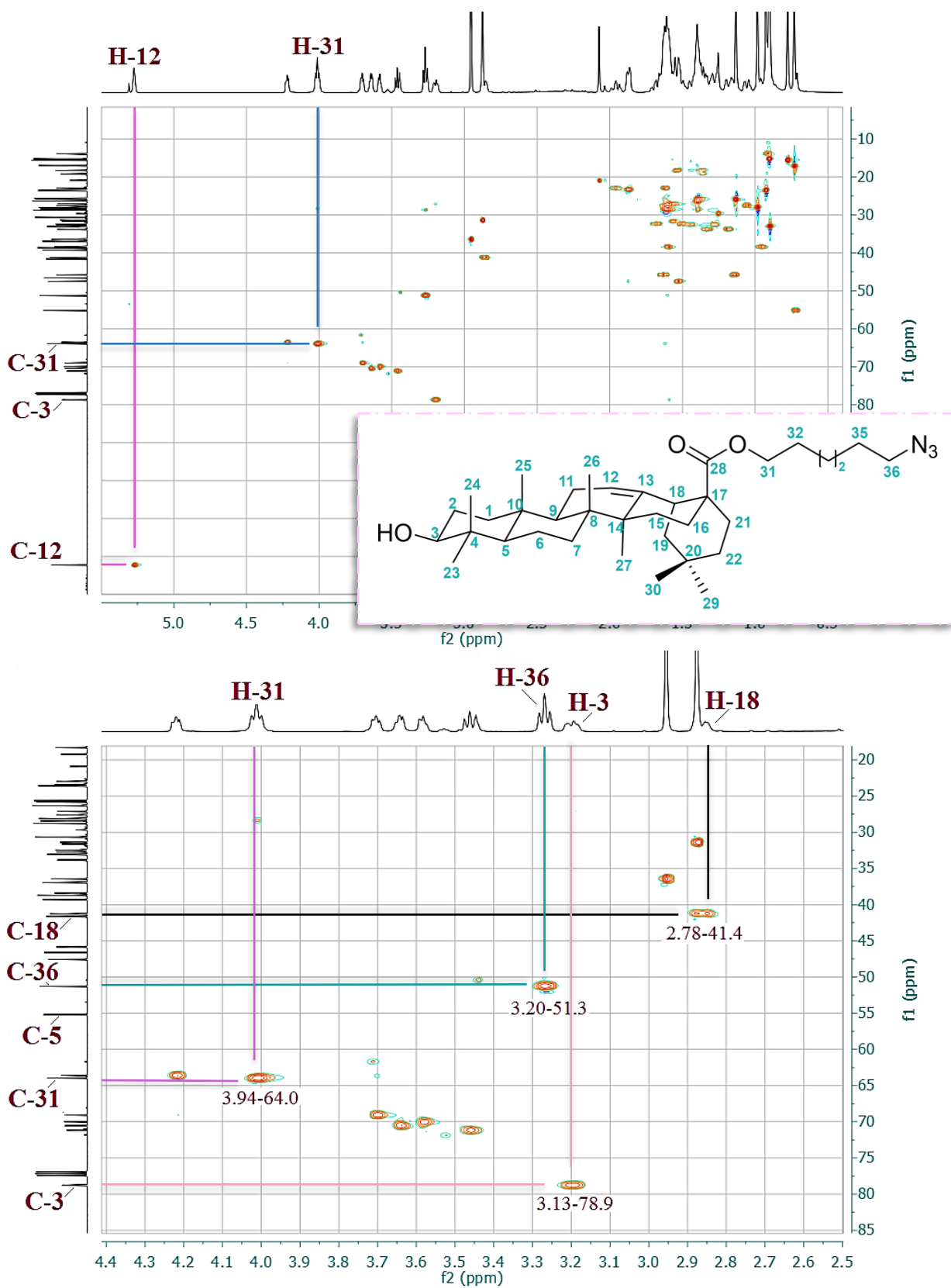


*Espectro 8. RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz del compuesto 5 en  $\text{CDCl}_3$*

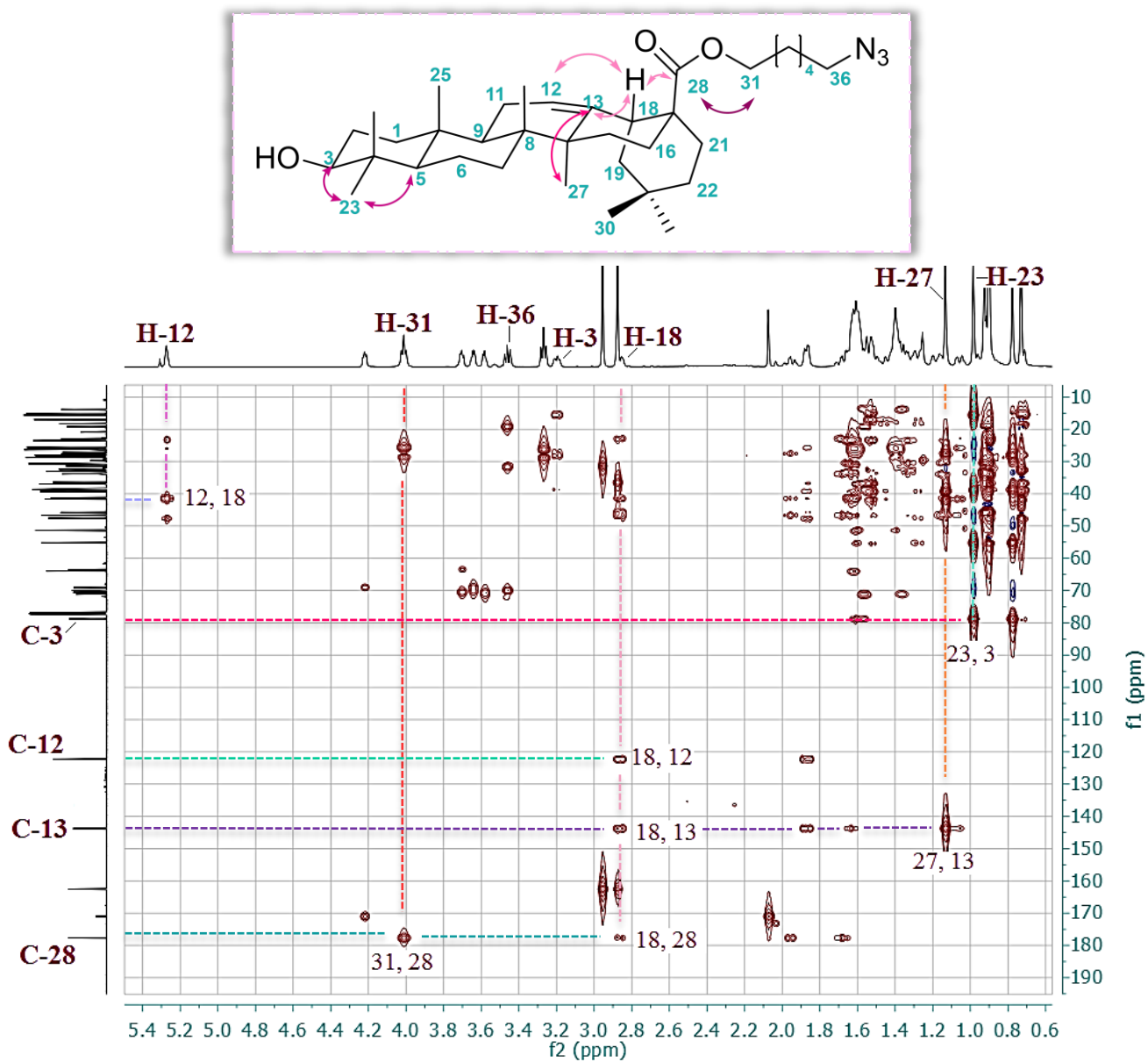
Se exponen los desplazamientos de las señales que caracterizan al compuesto 5 (Tabla 2). Así mismo, en los espectros 9 y 10 se corrobora la asignación de las señales de acuerdo con los experimentos de HSQC y HMBC, respectivamente.

*Tabla 2. Señales (en ppm) representativas del compuesto 5.*

Posición	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
3	3.13	78.9
5		55.08
12	5.20	122.4
13		143.9
18	2.78	41.4
23	0.92	
27	1.06	
28		177.7
31	3.94	64
36	3.20	51.3

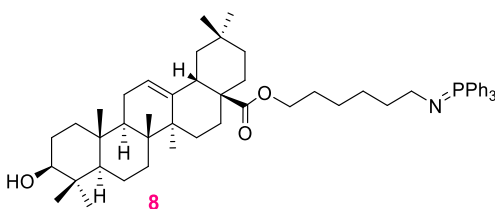


*Espectro 9. Regiones representativas del experimento de HSQC del compuesto 5.*

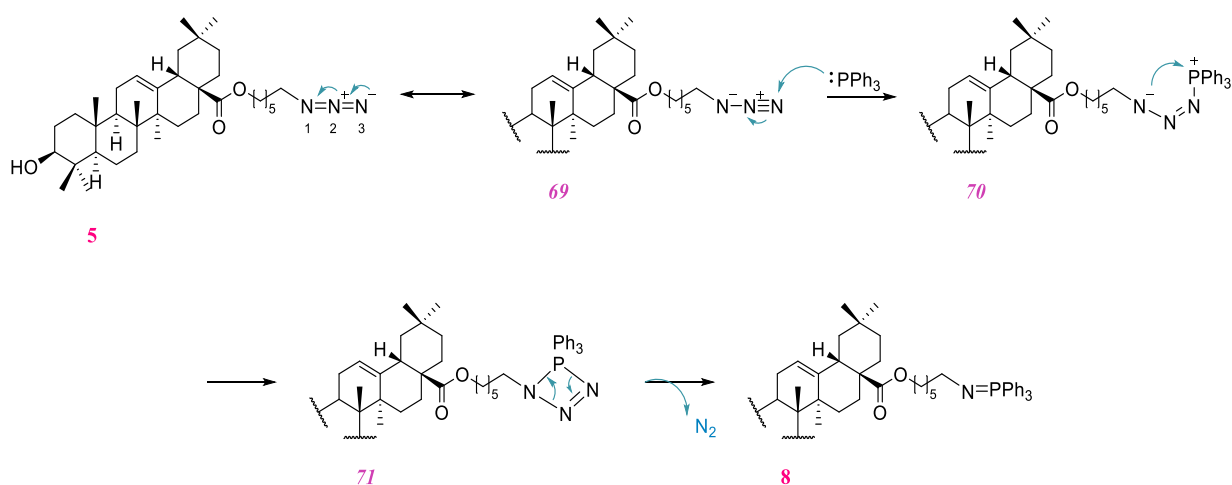


*Espectro 10. Regiones representativas del experimento de HMBC del compuesto 5.*

### 3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-[(trifenil-fosfaniliden)imino]hexilo (**8**)



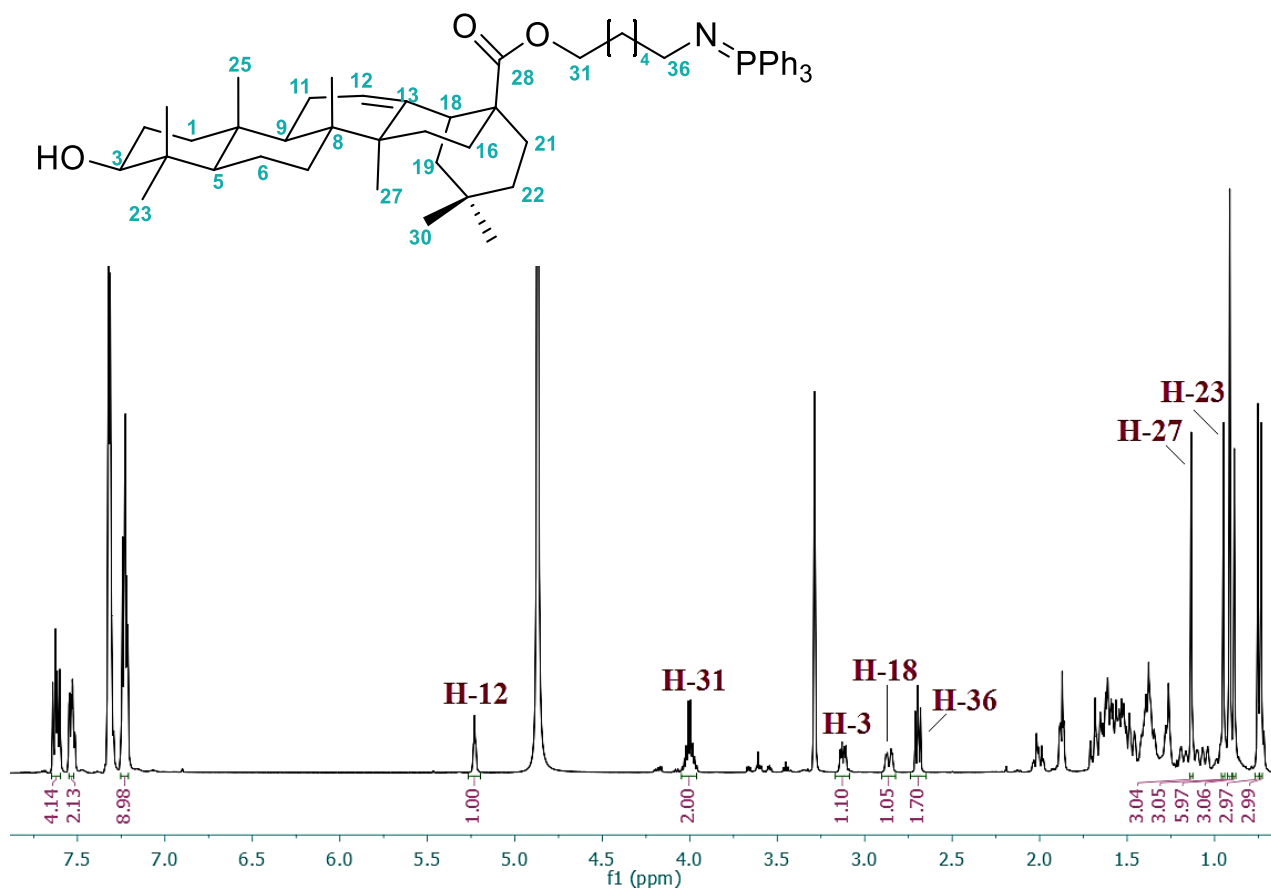
Las azidas tienen un carácter electrofílico en el cual un nucleófilo puede atacar en el N<sub>3</sub> debido al efecto de resonancia involucrado entre los tres nitrógenos **69**. La reducción de la azida con hidrogenación catalítica no fue la opción más viable ya que se tendría el riesgo de reducir también el doble enlace del OA, razón por la cual para generar el compuesto **8** se realizó empleando trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>), esta reacción es conocida como reducción o reacción de Staudinger (**Esquema 14**). El mecanismo implica el ataque de la trifenilfosfina sobre la azida, generando como intermediario la fosfazida **70**, la cual a través de un intermediario de cuatro miembros cíclico **71** elimina N<sub>2</sub> para formar al compuesto 3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-[(trifenil-fosfaniliden)imino]hexilo (**8**).



**Esquema 14.** Reducción de Staudinger a partir de **5** para generar iminofosforano (**8**).

## CAPÍTULO I

En el **espectro 11** de RMN de  $^1\text{H}$  confirma las señales en la región de los aromáticos de 7.20 a 7.65 ppm, señales con una multiplicidad múltiple y con una integración correspondiente a 15H; concordando la presencia de los tres grupos fenilos del  $\text{PPh}_3$ . Los cambios en cuanto al desplazamiento de las señales; el cual a comparación de su antecesor el compuesto **5**, fueron significativos y se mantuvieron similares (**Tabla 3**). Sin embargo, el desplazamiento para H en  $(\text{CH}_2\text{N}=\text{P})$  con 2.70 ppm se muestra como una señal triple con una  $J_{36-35} = 7.2 \text{ Hz}$ ; este desplazamiento es debido a que un átomo de nitrógeno es ligeramente menos electronegativo a comparación de la especie  $\text{N}_3$  y a su vez (comparándolo con el compuesto **2**) que el Br (valores de electronegatividad, en la escala de Pauling para el átomo de nitrógeno 3.0 y del bromo de 2.8); otro factor que puede responder ante este comportamiento es lo que se conoce como la influencia del “átomo pesado”.

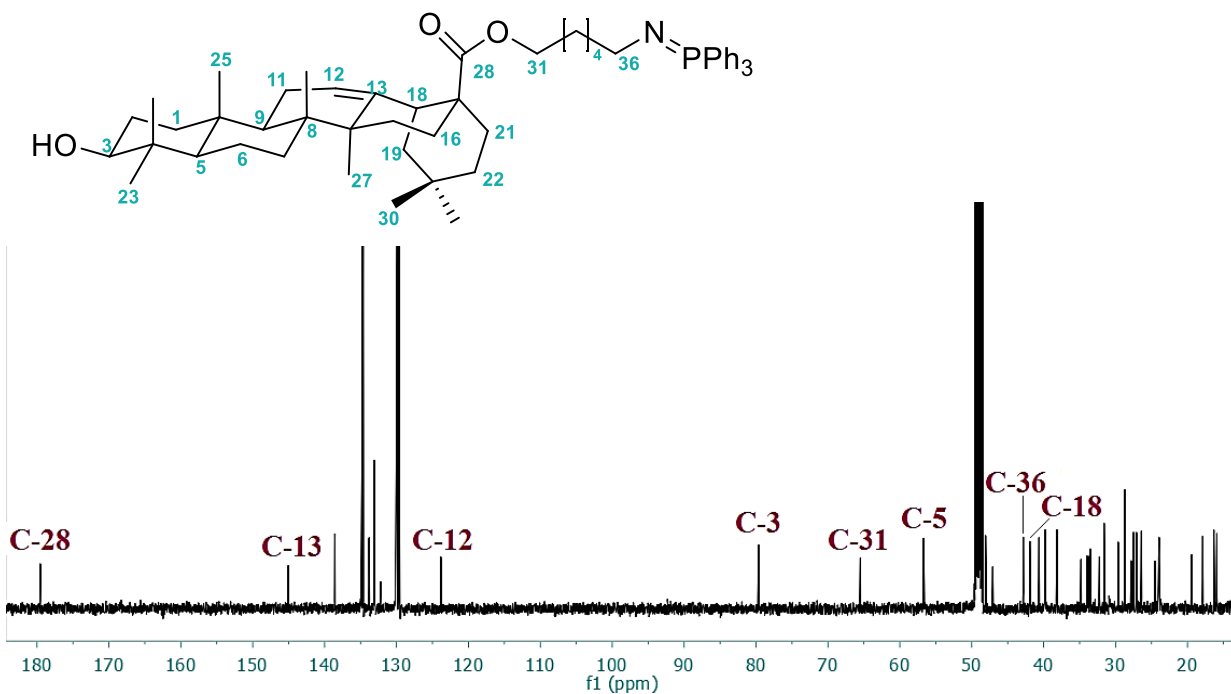


**Espectro 11.** RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz del compuesto **8** en  $\text{CD}_3\text{OD}:\text{CDCl}_3$ .

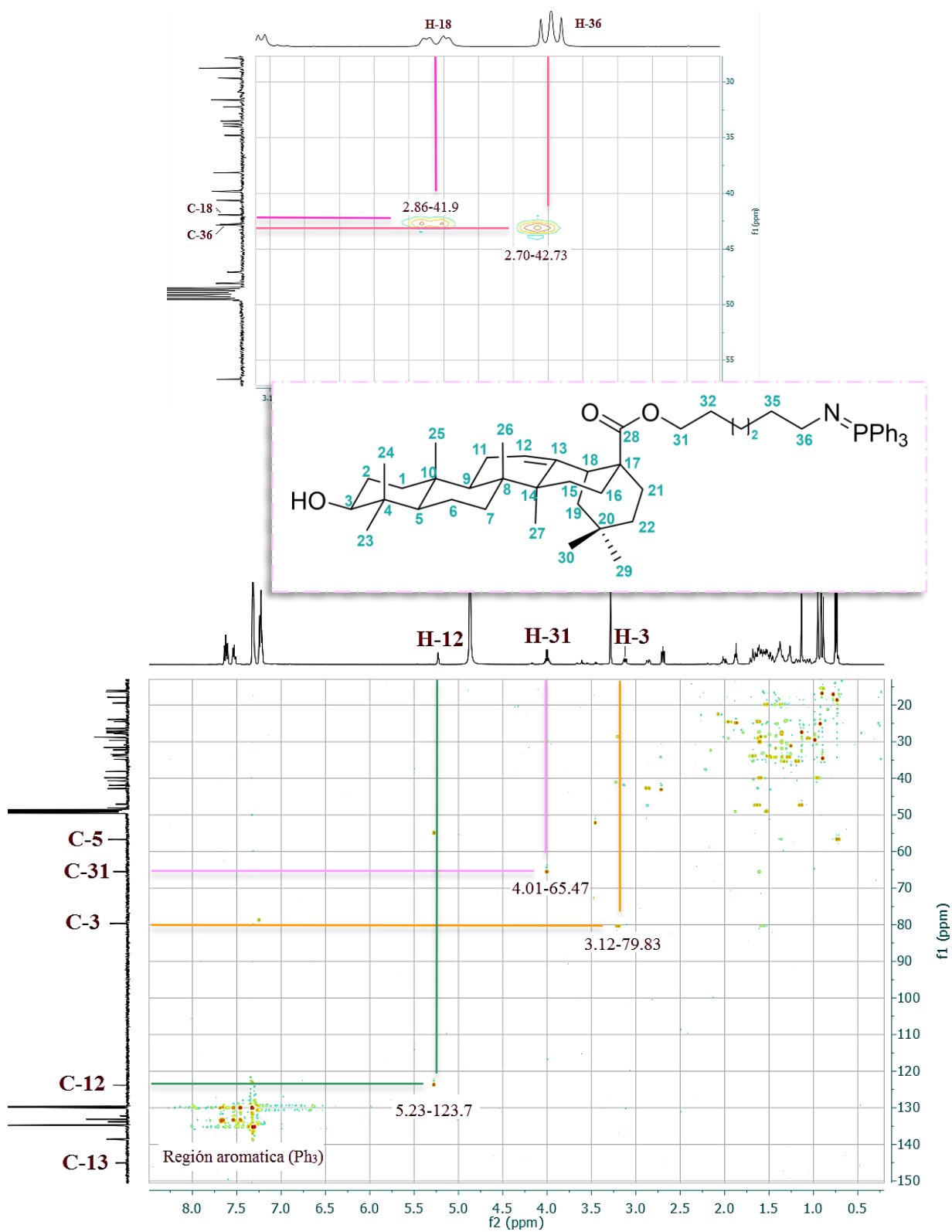
**Tabla 3.** Señales (en ppm) representativas del compuesto 8.

Posición	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
3	3.12	79.8
5		56.6
12	5.23	123.7
13		144.8
18	2.86	41.9
23	0.95	
27	1.13	
28		179.3
31	4.01	65.4
36	2.70	42.73

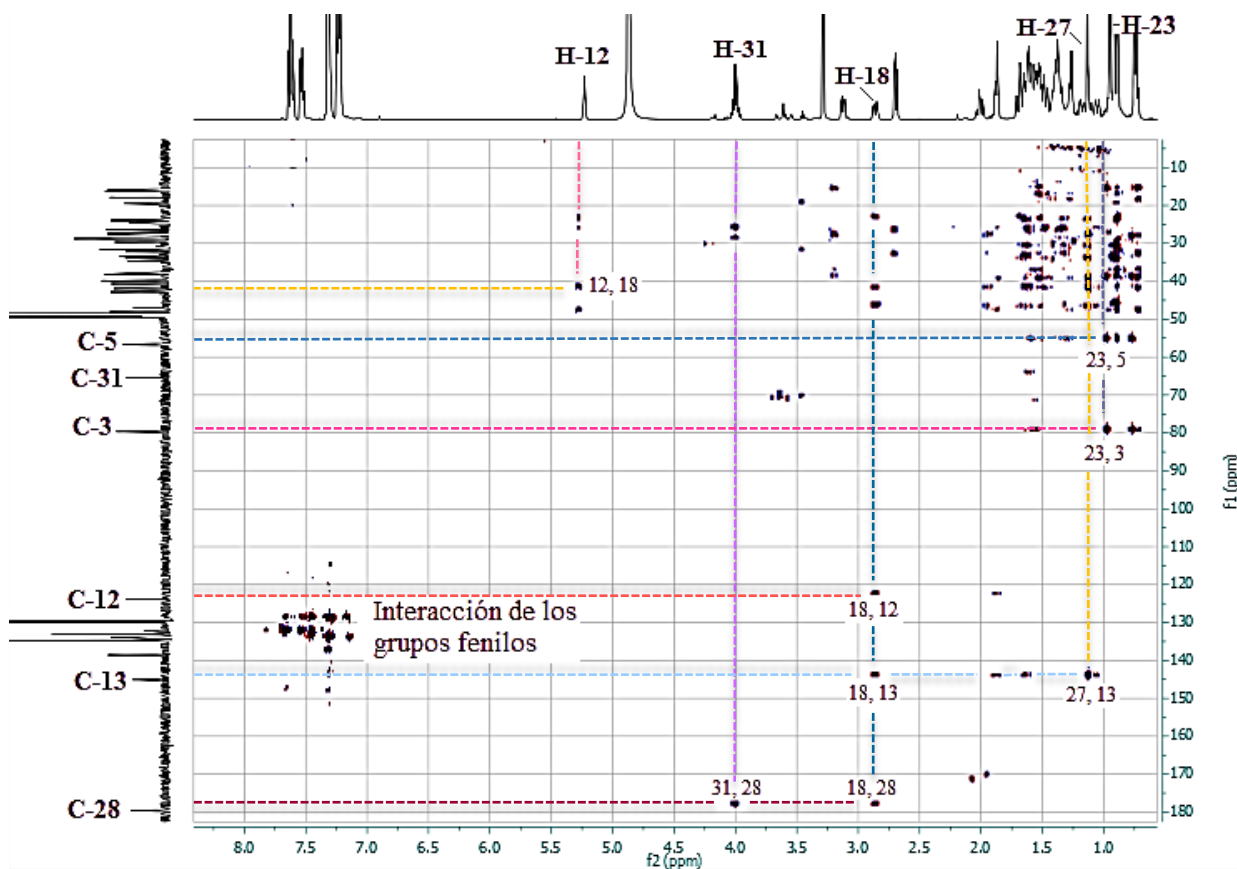
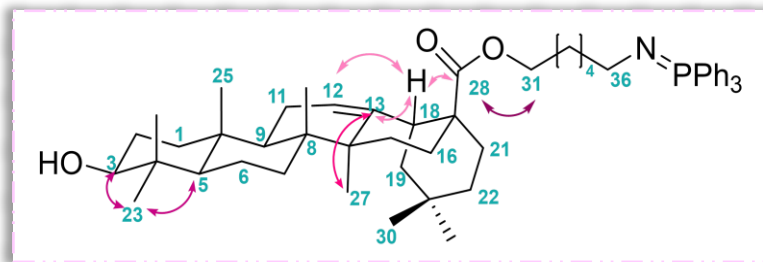
De la misma manera en el **espectro 12** de RMN de  $^{13}\text{C}$ , se puede distinguir el cambio en el desplazamiento a frecuencias relativamente bajas para el C-36 a 42.73 ppm y la aparición a frecuencias altas de señales de C-aromáticos. Los **espectros 13 y 14** corroboran la asignación de cada señal de acuerdo con los experimentos de HSQC y HMBC, respectivamente.



**Espectro 12.** RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz del compuesto 8 en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

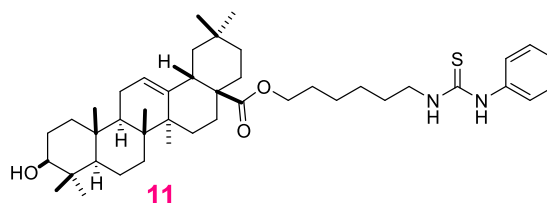


Espectro 13. Regiones representativas del experimento de HSQC del compuesto 8.



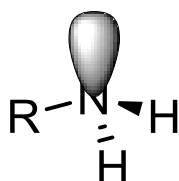
*Espectro 14. Regiones representativas del experimento de HMBC del compuesto 8.*

### 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-(3-feniltioureido)hexilo (11)



La síntesis de la tiourea (**11**) a partir del compuesto **8**, estuvo favorecida por las condiciones del disolvente (MeOH) y la base (TEA) para generar una amina *in situ* **73**, la que posteriormente reacciona con el isotiocianato de fenilo (**Esquema 15**).

El mecanismo propuesto comienza con el MeOH atacando nucleofílicamente al fósforo de PPh<sub>3</sub>. Este ataque proporciona que los electrones del enlace  $\pi$  capten un protón del medio de reacción, formando el intermediario **72**. Para la formación de la correspondiente amina **73** ocurre la ruptura del enlace NH-P(OCH<sub>3</sub>)Ph<sub>3</sub>, liberando al medio de reacción P(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Ph<sub>3</sub> y generando una amina primaria *in situ* no aislada **73**. El comportamiento nucleofílico de las aminas es debido al par de electrones no enlazantes en el átomo de nitrógeno (**Figura 16**).

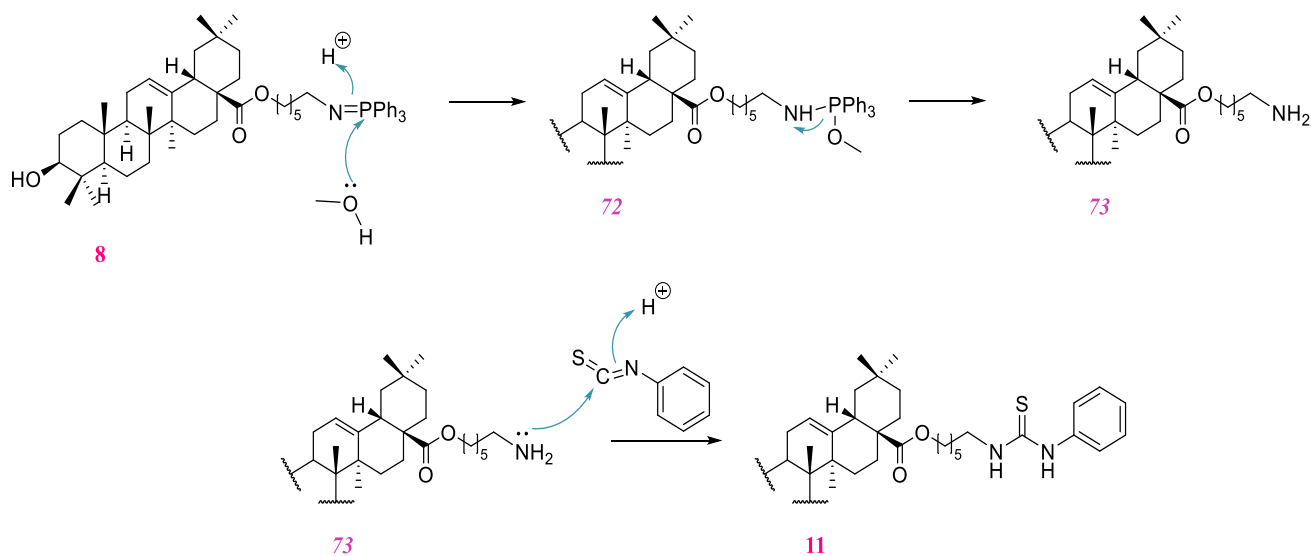


**Figura 16.** Estructura de la amina.

El par de electrones disponibles en el intermediario **73** reacciona con el carbono electrofílico del isotiocianato de fenilo, esto es, debido a que el átomo de carbono central

## CAPÍTULO I

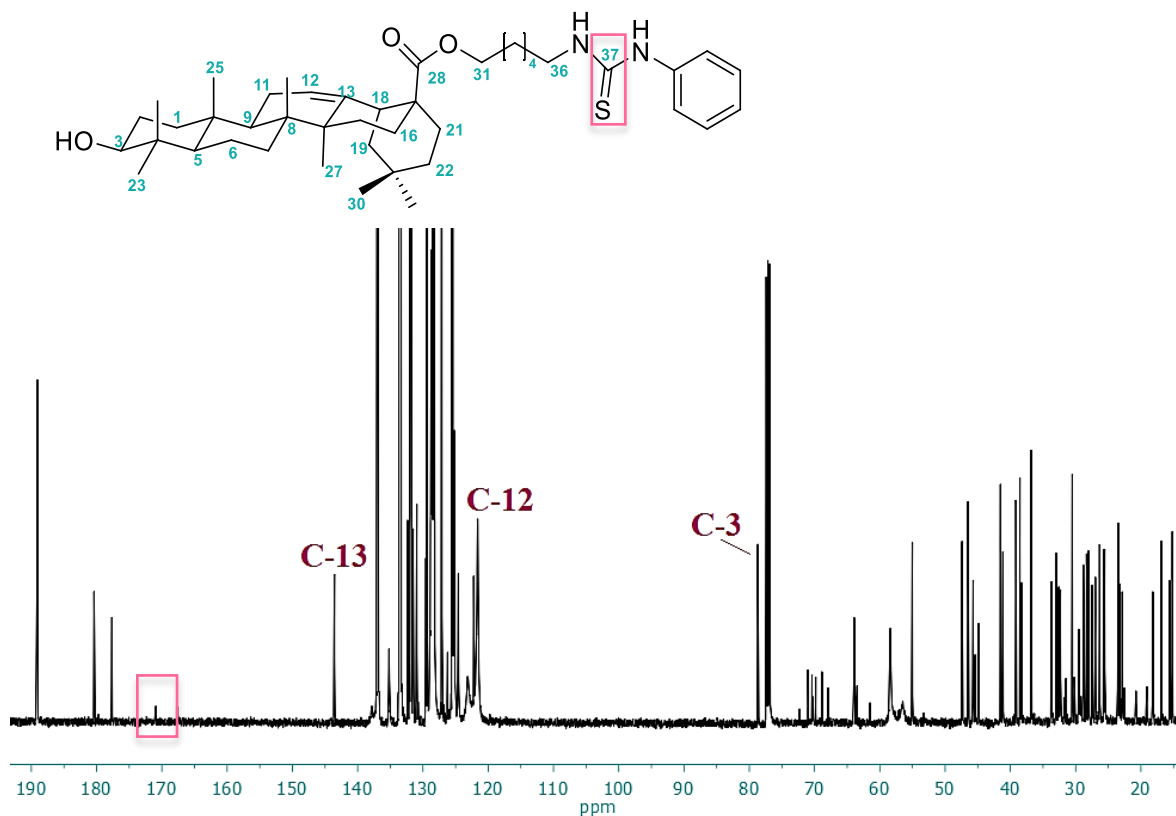
posee una carga parcial positiva al encontrarse entre dos átomos de mayor electronegatividad respecto de este.



*Esquema 15. Propuesta de mecanismo de reacción para la formación de la tiourea 11.*

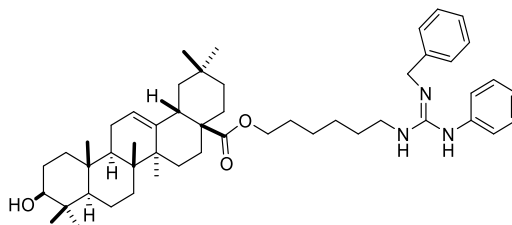
Para el caso del compuesto **11**, en el **espectro 15** de RMN de  $^{13}\text{C}$  se muestra el crudo de reacción debido a que por factores externos el complejo tioureido no pudo ser caracterizado de manera completa. Sin embargo, podemos observar en frecuencias bajas las señales del esqueleto triterpénico, así mismo se observa en 143.53 ppm una señal para C-13 y una para C-12 en 122.19 ppm.

También se confirma la presencia de C-aromáticos en la región comprendida entre 124.54-137.08 ppm, en los cuales se incluyen las  $\text{PPh}_3$  residuales, además se observa el C-28 en 177.68 ppm y el C-3 en 78.8 ppm. La presencia de una señal en 170.92 ppm podría pertenecer al carbono cuaternario de la tiourea, confirmado la existencia del compuesto.

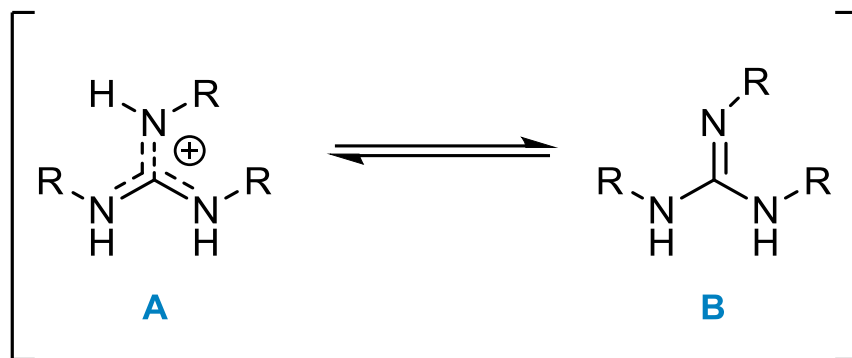


*Espectro 15. RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz del compuesto 11 en  $\text{CDCl}_3$ .*

### 3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-(2-bencil-3-fenilguanidinio)hexilo (**16**)



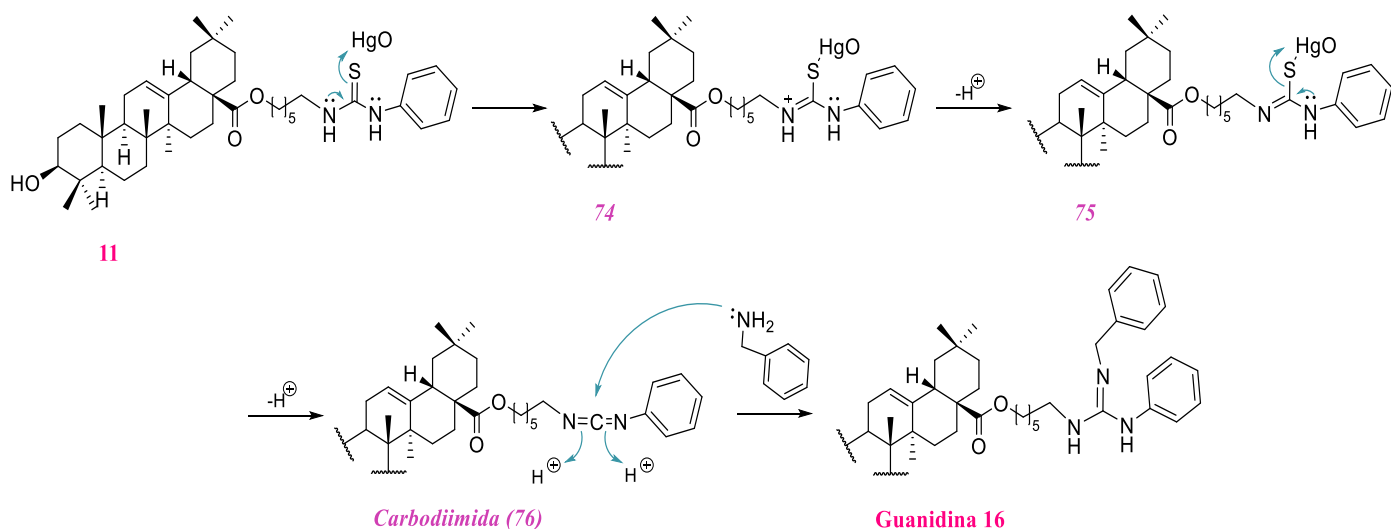
Como se ha descrito con anterioridad, las guanidinas son moléculas básicas que se protonan a pH fisiológico (**Figura 17**), siendo útiles como moléculas transportadoras.



**Figura 17.** Estructura canónica del ion guanidinio.  
Donde A) es la forma protonada de la estructura de guanidina y B) guanidina

Para la síntesis de guanidinas acopladas al ácido oleanólico se empleó la técnica de desulfuración oxidativa con HgO. El mecanismo de reacción se basa en el empleo de un metal de transición en este caso el HgO (II), conocido por ser una especie conocida peroxometálica.

El  $\text{Hg}^{2+}$  posee dos electrones menos en su última capa de valencia, por lo tanto tiene la capacidad de aceptar electrones (acidez superficial del tipo Lewis), a su vez oxidando las moléculas azufradas. Simultáneamente, el par electrónico de uno de los nitrógenos del compuesto **11** lo ingresa al sistema generando que los electrones del enlace  $\pi$  sean atraídos electrostáticamente para quedar adsorbidos en el sitio activo del catalizador **74**. Este proceso se repite con el segundo nitrógeno **75** ocasionando la eliminación del azufre coordinado al HgO, esto se debe al incremento en la densidad electrónica en el átomo de azufre. La salida del azufre con el complejo peroxometálico forma como intermediario una carbodiimida **76** no aislada; que posee un carbono electrofílico susceptible a una adición nucleofílica por parte de la bencilamina para generar la guanidina deseada **16** (**Esquema 16**).

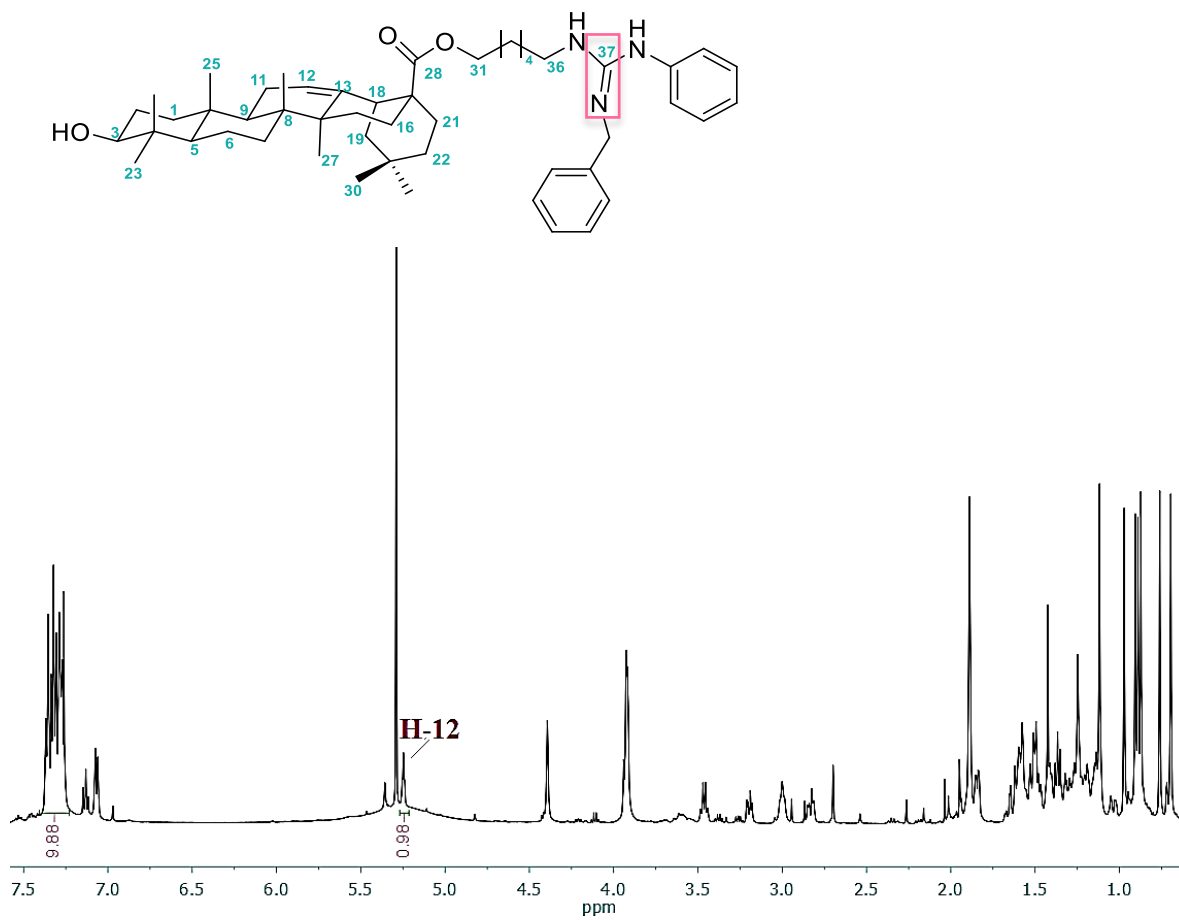


*Esquema 16. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de guanidinas.*

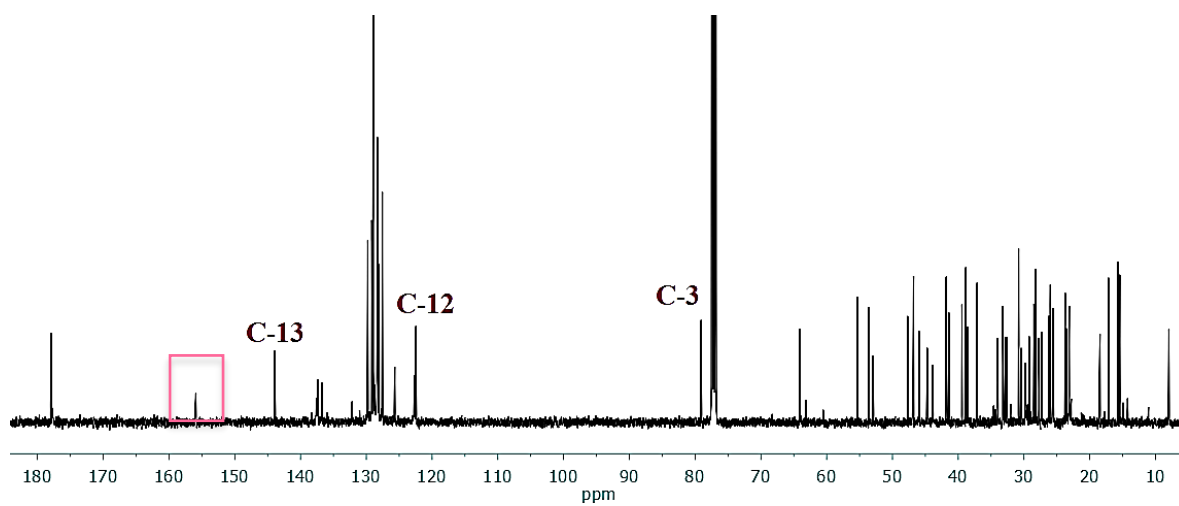
La obtención de la guanidina **16** fue corroborada por sus espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Los espectros mostrados son del crudo de reacción debido a la contingencia por COVID-19 que suscitó el cierre de labores a partir de marzo 2020.

En el **espectro 16** de RMN de <sup>1</sup>H, se observa al protón vinílico del C-12 a 5.25 ppm, así como la integración para 10 protones en el rango de 7.0-7.5 ppm que corresponden a los grupos fenilo y bencilo. Por su parte, en el **espectro 17** de RMN de <sup>13</sup>C, podemos observar a frecuencias bajas las señales del esqueleto triterpénico, así mismo se observa en 143.85 ppm una señal para C-13 y para C-12 en 122.51 ppm.

También se confirma la presencia de C-aromáticos en la región comprendida entre 125.67-131.94 ppm. Para el C-28 se encuentra en 177.82 ppm y en 79.07 la señal para C-3. Se observa la presencia de una nueva señal a 156.19 ppm la cual pertenece probablemente al carbono cuaternario de la guanidina.



*Espectro 16. RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz del compuesto 16 en  $\text{CDCl}_3$ .*

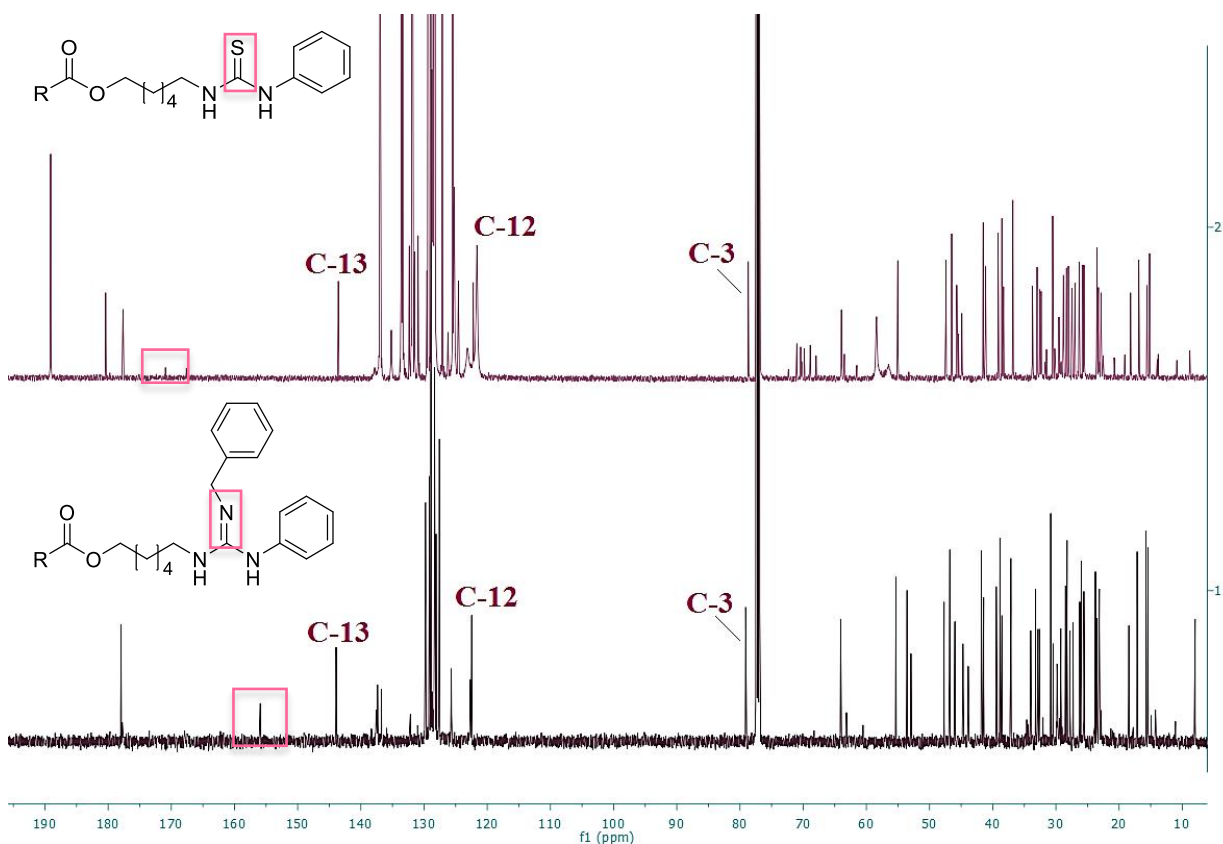


*Espectro 17. RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz del compuesto 16 en  $\text{CDCl}_3$ .*

## CAPÍTULO I

Tomando en cuenta lo anterior y basándonos en los espectros mostrados, se puede considerar que se trata de la guanidina acoplada al ácido oleanólico.

Conforme aumenta el número de pasos en la síntesis de una sustancia, aumenta también la formación de subproductos y como consecuencia el rendimiento disminuye. Esta ruta de 5 pasos permitió obtener el compuesto final aunque el rendimiento global fue bajo, razón por la cual es deseable optimizar la síntesis. Por otro lado, en el **espectro 18** de RMN de  $^{13}\text{C}$ , se apilan los espectros del compuesto **11** y **16**, esto con la finalidad de hacer hincapié en la distinción de las señales de cada uno; cabe señalar que no se cuenta con la caracterización completa de los compuestos debido a la situación de contingencia del presente año; sin embargo, los espectros emitidos muestran la efectividad de la reacción, por lo que dichos compuestos deberán ser objeto de estudios posteriores.



*Espectro 18. RMN apilados de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz de los compuestos 11 y 16 en  $\text{CDCl}_3$ .*

## CONCLUSIONES

- ✚ El trabajo experimental nos permitió sintetizar nuevas moléculas potencialmente bioactivas.
- ✚ Se permitió diseñar una metodología de 5 pasos para obtener la guanidina **16** a partir del ácido oleanólico; los cuales son compuestos que no habían sido antes descritos en la literatura.
- ✚ Se diseñaron compuestos tioureidos con rendimientos moderadamente buenos a partir de compuestos inminofosforanos, los cuales no tienen reportes en la literatura.
- ✚ Los nuevos sistemas híbridos del ácido oleanólico fueron desarrollados con rutas eficientes para la preparación de cada intermediario, obteniendo buenos rendimientos en cada paso de reacción (80%).
- ✚ Cada estructura fue caracterizada mediante técnicas espectroscópicas de RMN con experimentos de 1D y 2D.
- ✚ Esta ruta sintética dará origen a nuevas estructuras catiónicas derivadas del ácido oleanólico como candidatos a ensayos como agentes anticancerígenos.

## **CAPÍTULO II**

**Caracterización *in silico* de nuevos derivados del OA como potenciales agentes anticancerígenos.**

## ANTECEDENTES

El desarrollo e investigación de nuevos fármacos es un proceso complejo. Históricamente, el descubrimiento de nuevos fármacos en la industria farmacéutica se ha basado en la síntesis de productos naturales; sin embargo, el desarrollo de estas moléculas bioactivas implica una inversión considerable de dinero y tiempo.<sup>80</sup> Uno de los nuevos métodos es el uso de programas computacionales, en los cuales se tiene la ventaja de realizar en menor tiempo simulaciones de procesos biológicos, así como también el cálculo de algunas propiedades farmacológicas.

Su evolución histórica puede remontarse a los estudios de Corwin Hansch quien, en la década de los sesenta, inicio el desarrollo del método de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR);<sup>81</sup> este tipo de herramientas o programas de predicción son conocidos como: Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC); el cual, forma parte de un esfuerzo multidisciplinario y está conformado por una serie de disciplinas científicas que abarcan modelado molecular, quimio-informática, química teórica y química computacional.<sup>82</sup> Sus objetivos principales son: descubrir moléculas activas, optimizar moléculas activadas ya conocidas y seleccionar de un grupo dado de estructuras, a los candidatos que tengan mayor o menor probabilidad de convertirse en fármacos exitosos.<sup>10</sup>

Sin embargo, a pesar de ser herramientas útiles, la práctica incorrecta al usarlos contribuye a crear falsas expectativas de que los métodos de cómputo pueden diseñar fármacos por sí solos. Esta falsa percepción del DiFAC conduce a preguntas como “¿algún medicamento se ha diseñado por estos medios?” la respuesta es sí.<sup>74, 83</sup> A continuación se presenta ejemplos representativos de fármacos diseñados por estos medios (**Tabla 4**). Se debe aclarar que los métodos de cómputo no diseñan de forma automatizada los medicamentos, como se mencionó con anterioridad son simulaciones y deben validarse para encontrar los

<sup>80</sup> Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. *Edu. Química*, **2017**, 28, 51-58.

<sup>81</sup> Hansch, C.; Muir, R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Geiger, E.; Streich, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2817-2824.

<sup>82</sup> Medina-Franco, J. L.; Fernández-de-Gortari, E.; Naveja, J. J. *Edu. Química*, **2015**, 1-7.

<sup>83</sup> Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **2018**, 21, 124-134.

parámetros adecuados, para que posteriormente den resultados confiables; así como también, deben estar integrados con pruebas experimentales.<sup>75</sup>

*Tabla 4. Ejemplos de fármacos desarrollados por métodos DiFAC.*

Nombre	Farmacéutica que lo desarrolló	Uso
Captopril	Bristol Myers-Squibb	Inhibidor de la ECA (Antihipertensivo)
Oseltamivir	Gilead Sciences	Inhibidor de la neuroaminidasa (Antiviral)
Dorzolamida	Merck	Inhibidor de la AC- $\alpha$ (Glaucoma)
Aliskiren	Novartis	Inhibidor de renina (Antihipertensivo)
Boceprevir	Schering-Plough	Hepatitis C (Antiviral)

### De los métodos *in vitro* a los métodos *in silico*

La tecnología se desarrolla de una manera exponencial, en la cual una de las aplicaciones para los químicos se ha centrado en darle una mayor importancia a los métodos computacionales para descubrir y diseñar estructuras químicas que tengan las propiedades adecuadas para entrar en el proceso de desarrollo de un fármaco.

Estos métodos son útiles como se ha mencionado, pero no solo son capaces de descubrir moléculas u optimizar a los fármacos ya existentes, sino también, son empleados para la predicción de posibles actividades biológicas. Otra aplicación es para la predicción de propiedades farmacocinéticas como: absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad de moléculas bioactivas. Entre esta amplia variedad de programas, los más sobresalientes son: Molinspiration, PASS, Swiss Target Prediction, Swiss ADME, CLC-

Pred, GLORYx, AdmetSar. Dichos programas son de acceso libre y son herramientas muy útiles, los cuales se basan en el análisis de similitud en dos dimensiones en la que compara a la molécula de estudio con otras moléculas que ya se tienen en la base de datos.

Otras de sus aplicaciones es sobre las propiedades farmacodinámicas, pues entender el modo de acción de moléculas activas a nivel molecular tiene gran interés científico y práctico. Una de las aplicaciones es proponer cambios específicos a las estructuras químicas para ayudar a incrementar su afinidad con la diana terapéutica y en principio, aumentar su actividad biológica.<sup>10</sup> El acoplamiento molecular automatizado tiene como finalidad buscar la conformación y posición óptima de un ligando dentro de un blanco molecular o la posición y conformación más favorable de 2 macromoléculas.<sup>10, 74, 75, 84</sup> Los estudios de acoplamiento molecular o *docking* han tenido éxito en el desarrollo de nuevos fármacos; por ejemplo, el fármaco Crizotinib que fue desarrollado por Pfizer y ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón, de la misma manera el fármaco Rilpivirina con aplicación antiviral con el virus de VIH, el cual fue desarrollado por Janssen Pharmaceuticals.<sup>85, 86</sup> Este estudio, se basa en la estimación energética del modelo de unión entre dos moléculas; que generalmente, consisten en interacciones proteína-ligando,<sup>87</sup> por otro lado, al ser simulaciones de unión, los datos obtenidos deben de ser complementadas con pruebas biofísicas o biológicas.

En el presente capítulo, se evaluaron las propiedades farmacológicas de los nuevos derivados guanidinos del OA usando métodos *in silico*. Cabe mencionar que, para el estudio *docking* de todos estos compuestos se necesitó la búsqueda de un receptor en específico, puesto que, como se describió en el CAPÍTULO I la actividad de estas estructuras catiónicas están basadas en el potencial eléctrico ocasionando su acumulación en el citosol de células cancerosas por el  $\Delta\Psi_m$  de la mitocondria; es decir, son estructuras que no cuentan con una diana en específico, por lo que la elección de una se basó en la búsqueda bibliográfica descrita a continuación.

<sup>84</sup> Medina-Franco, J. L.; López-Vallejo, F.; Castillo, R.; *Edu. Química.*, **2006**, 28, 51-58.

<sup>85</sup> Scior, T.; Bernard, P.; Medina-Franco, J. L.; Maggiora, G. M. *Med. Chem.*, **2007**, 7, 851-860.

<sup>86</sup> Talele, T. T.; Khedkar, S. A.; Rigby, A. C. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2010**, 10, 127-141.

<sup>87</sup> Prieto-Martínez, F. D.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J. L. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **2018**, 21, 65-87.

## Proteínas intracelulares: Receptores estrogénicos

Como se ha descrito anteriormente, los cationes de TPP transportan las moléculas bioactivas a las mitocondrias. Por su parte, los receptores de estrógeno RE (en sus dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , normalmente activados por la hormona endógena 17 $\beta$ -estradiol) son responsables de controlar la transcripción de ADN nuclear necesaria para el desarrollo y la reproducción humana; así mismo, están asociados con la membrana plasmática y se han encontrado en las mitocondrias de algunos tipos de células.<sup>88</sup> Las irregularidades en la actividad de RE pueden conducir a una serie de afecciones que incluyen cánceres de mama, ovario, colon, próstata y endometrio.<sup>89,90</sup>

Los RE  $\alpha$  y  $\beta$  son proteínas intracelulares; por su parte, el E2 tiene un efecto sobre la apoptosis. El RE ligado, se une como homodímero a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) en el ADN nuclear y regula la transcripción mediante la interacción con moduladores de transcripción y el reclutamiento de la maquinaria de transcripción general,<sup>91</sup> además, se han encontrado secuencias similares en el ADN mitocondrial.<sup>92</sup> Al igual que otro miembro de la familia del receptor de hormonas nucleares (NHR), los RE presentan dominios funcionales que cumplen funciones específicas; los dominios principales son: dominio N-terminal (NTD), dominio de enlace de ADN (DBD), dominio de enlace de ligandos (LBD). Dentro de NTD y LBD, hay dos dominios de función de activación (AF): AF1 (funciona de manera independiente de la hormona) y AF2 (requiere la presencia de hormona/esteroide), los cuales son los responsables de regular la actividad de transcripción.<sup>93</sup>

El subtipo ER $\alpha$  llamó la atención debido a que mostraba el cambio en la función endocrina por la unión a xenoestrógenos o SERM.<sup>94</sup> Se han resuelto las estructuras

<sup>88</sup> Salisbury, J. P.; Williams, J. C.; *Bioinformatics*, **2009**, *3*, 303-307.

<sup>89</sup> Cotterill, J. V.; Palazzolo, L.; Ridgway, C.; Price, N.; Rorije, E.; Moretto, A.; Peijnenburg, A.; Eberini, L. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2019**, *378*, 1-9.

<sup>90</sup> Forsare, C.; Bendahl, P. O.; Moberg, E.; Jorgensen, C. L. T.; Jansson, S.; Larsson, A. M.; Aaltonen, K.; Rydén, L. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 2885-2898.

<sup>91</sup> Kovács, T.; Szabó-Meleg, E.; Ábrahám, I. M. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 3177-3192.

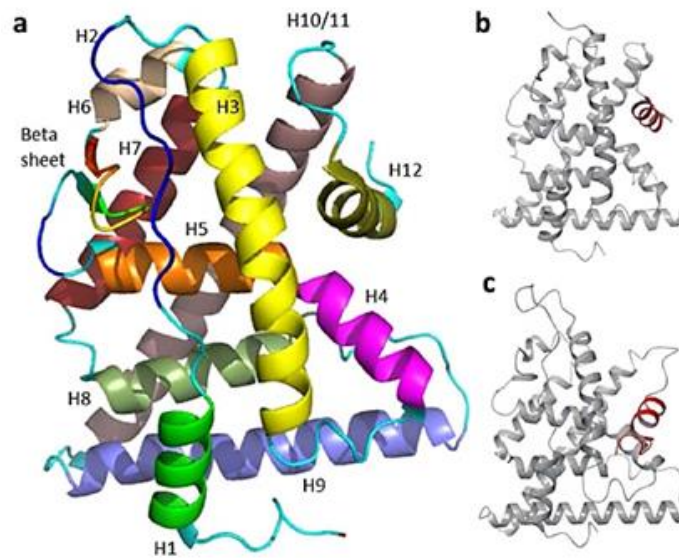
<sup>92</sup> Psarra, A. M. G.; Sekeris, C. E. *Biochim. Biophys Acta*, **2008**, 1-11.

<sup>93</sup> Kumar, R.; Zakharov, M. N.; Khan, S. H.; Miki, R.; Jang, H.; Toraldo, G.; Singh, R.; Bhasin, S.; Jasuja, R. *J. of Amino Acids.*, **2011**, 1-7.

<sup>94</sup> Puranik, N. V.; Srivastava, P.; Bhatt, G.; John-Mary, D. J. S.; Limaye, A. M.; Sivaraman, J. *Nat.*, **2019**, *9*, 1-11.

## CAPÍTULO II

tridimensionales del dominio DBD y del LBD. El dominio LBD (o dominio E) de RE $\alpha$  distingue varias moléculas según sus estructuras y/o propiedades químicas, además, es la primera estructura cristalográfica de un RE $\alpha$  ligado a su ligando natural E2; RE $\alpha$ -LBD (**Fig. 18a**) está constituido por doce hélices  $\alpha$  (H1-H12) y una horquilla  $\beta$ . El H12 de LBD adopta una conformación dependiente del ligando, la cual es la responsable de la activación (**Figura 18b y 18c**). Al unirse al estrógeno, el LBD se transforma en una conformación activa, en la que H12 descansa sobre H3 y H11, formando una hendidura para acomodar la unión del co-regulador. La interacción de LBD con un antiestrogénico inhibe la activación del receptor 14, esto es porque H12 migra de su posición natural provocando la distorsión de la indentación de unión al co-regulador.<sup>88</sup>



**Figura 18.** Estructura de la proteína RE $\alpha$ -LBD.

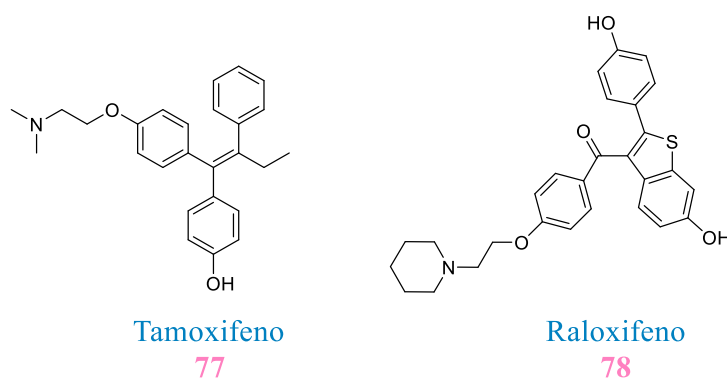
(a) Hélices coloreadas de manera diferente para una mejor distinción. (b) Conformación de un RE activo. (c) Conformación de un RE inactivo. La diferencia entre b y c radica en la conformación de H12, mostrada en rojo.

Por otro lado, se demostró que en una cavidad elipsoide se compacta el ligando E2 y se encuentra en un entorno altamente hidrófobo; dentro de este *pocket* (formado por 22 residuos), los grupos hidroxilos del E2 en los anillos A y D generan una interacción por puentes de hidrogeno con Glu353 de H3, Arg394 de H5 y una molécula de agua ayuda en la

## CAPÍTULO II

interacción con His524 de H11.<sup>87</sup> Debido al papel central de la señalización de estrógenos en diversas enfermedades que van desde el cáncer hasta el envejecimiento se han desarrollado varios ligandos sintéticos a ER $\alpha$ .

Los SERM son compuestos sintéticos utilizados para modular la actividad de RE; por ejemplo, en la (Figura 19) se muestra el tamoxifeno (77) y el raloxifeno (78), los cuales han tenido éxito en el tratamiento y prevención tanto del cáncer de mama como de la osteoporosis;<sup>88,95,96</sup> además, estos SERM se muestran como agonistas, antagonistas o con efectos neutros sobre los RE dependiendo del subtipo de RE específico y del tipo celular en el que está presente el RE; por consiguiente, se pueden utilizar para tratar una variedad de trastornos que conlleva a diversas patologías.<sup>88,89,97,98</sup>



**Figura 19.** Estructura orgánica del Tamoxifeno (77) y Raloxifeno (78) pertenecientes a Moduladores Selectivos del RE.

Sin embargo, a pesar de que los SERM tienen ventajas, la administración a largo plazo de tamoxifeno (77) conduce al desarrollo de cáncer de endometrio y resistencia a los fármacos, por lo que la búsqueda de nuevos SERM con menos efectos adversos está teniendo más la atención de compañías farmacéuticas.<sup>92</sup>

<sup>95</sup> Jordan, V. C. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2007**, *99*, 350-356.

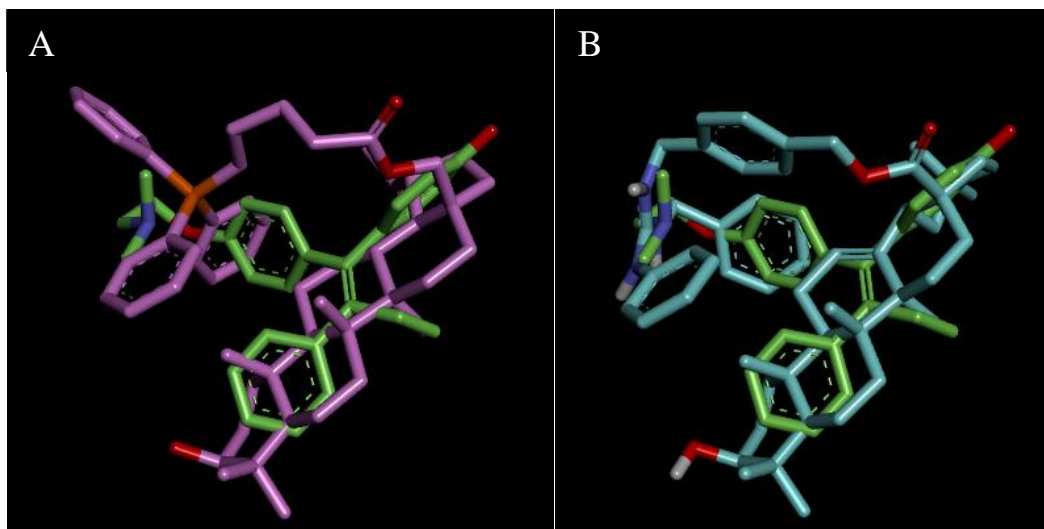
<sup>96</sup> Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. *Cell.*, **1998**, *95*, 927-937.

<sup>97</sup> Hsu, H. C.; Chu, N. M.; Kao, S. H. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, 1713-1730.

<sup>98</sup> Pang, X.; Fu, W.; Wang, J.; Kang, D.; Xu, L.; Zhao, Y.; Liu, A. L.; Du, G. H. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 1-11.

## CAPÍTULO II

Una característica importante es que los SERM, en especial el compuesto sintético **77**, tienen una similitud espacial a los cationes de TPP y a los compuestos de guanidina del OA (**Figura 20**).



**Figura 20.** A) Alineamiento flexible para la estructura del Tamoxifeno **77** (**verde**) y catión de TPP del ácido betulínico **35** (**rosado**). B) Alineamiento flexible para la estructura del Tamoxifeno **77** (**verde**) y catión de guanidina del ácido oleanólico **19** (**qzul**). Visualización del programa BIOVIA Discovery studio.

Salisbury y cols.<sup>88</sup> realizaron acoplamiento de moléculas comerciales de TPP con la estructura cristalográfica de RE $\alpha$ , obteniendo resultados positivos que relaciona que podrían servir como potentes SERM mitocondriales. En conclusión y de acuerdo con lo mencionado, se llevó a cabo un acoplamiento molecular para considerar posibles interacciones de un conjunto de cationes de guanidina en los sitios activos de RE $\alpha$ -LBD usando la estructura de la proteína cristalizada de **3ERT** (*pocket* antagonista), la cual fue obtenida desde *Protein Data Bank* (PDB); para el uso del acoplamiento molecular, se usó el programa *Autodock Vina*.

# OBJETIVOS

## Objetivo General:

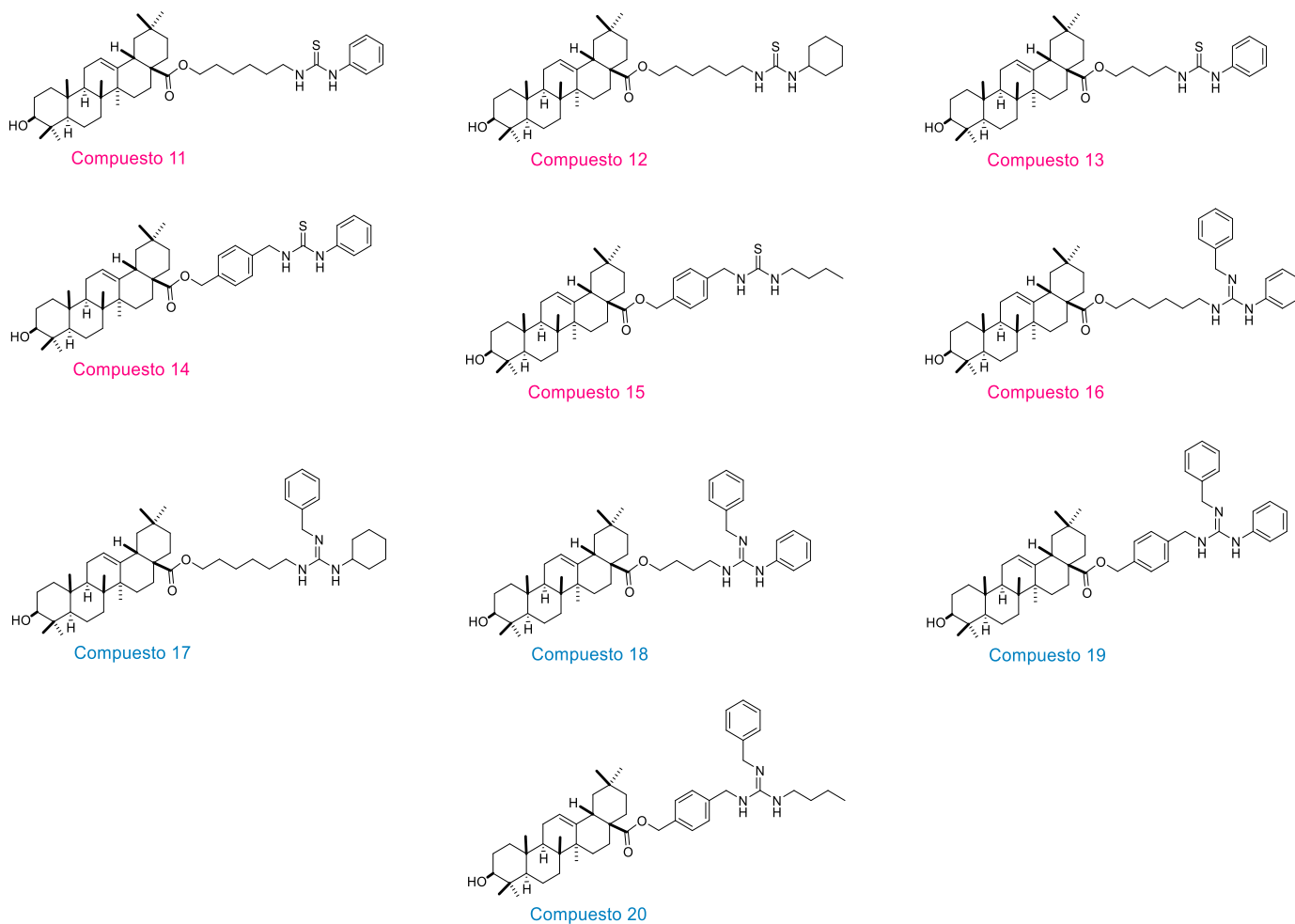
- ✚ Establecer una relación estructura-actividad de los compuestos **11-20** como agentes anticancerígenos aplicando los estudios de *docking* molecular.

## Objetivos Particulares:

- ✚ Evaluar las energías de acoplamiento (*Docking score*) de los compuestos con los sitios de unión en la proteína **3ERT**.
- ✚ Evaluar en **MOLINSPIRATION** cada compuesto para extraer características fisicoquímicas.
- ✚ Evaluar en **PASS** cada compuesto para extraer las posibles actividades biológicas y posibles efectos adversos o toxicológicos; en la cual se hará una comparación entre su probabilidad de actividad y probabilidad de inactividad.
- ✚ Evaluar en **SwissTargetPrediction** cada compuesto para extraer la posible actividad de cada uno con algún tipo de *target*.
- ✚ Evaluar en **SwissADME** y **AdmetSar** cada compuesto para obtener información sobre las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas; es decir, predecir parámetros ADME.
- ✚ Evaluar en **CLC-Pred** cada compuesto para obtener una predicción *in silico* sobre su efecto citotóxico en líneas de células cancerosas y células normales.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los métodos *in silico* son necesarios para reducir el tiempo y el costo de una experimentación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de agentes anticancerosos, por consiguiente, teniendo como objetivo la identificación de las características moleculares responsables del específico reconocimiento biológico, se muestran los resultados obtenidos de los programas computacionales de los compuestos (**Figura 21**) identificados del **11-20**. Cabe mencionar que los compuestos **17-20** no fueron sintetizados debido a la contingencia por COVID-19.



**Figura 21.** Compuestos evaluados como posibles agentes anticancerígenos.

## Predicción de perfiles farmacocinéticos

En el presente análisis farmacológico se combinan los resultados de los ensayos, basándose en la premisa de obtener una mayor coincidencia de resultados que den soporte a los compuestos **11-20**; es decir, que posean un perfil farmacocinético adecuado, siendo más confiable su selección o por el contrario, excluir el compuesto (análisis de consenso farmacológico). Los resultados estarán sujetos a comparación con el fármaco de referencia Tamoxifeno (77).

Uno de los parámetros de vital importancia es la absorción que presente el compuesto, ya que de él dependerá la dosis del fármaco y con ello la elección de las formas farmacéuticas (p. ej., comprimidos, cápsulas, soluciones) para que puedan ser administradas por diversas vías (p. ej., oral, bucal, sublingual, rectal, etc.). Es conocido en el área farmacéutica que durante la absorción de una sustancia en el organismo, una fracción de esta sustancia se adherirá a proteínas en el fluido extracelular; si el fármaco es de carácter ácido se adherirá a la proteína conocida como albúmina; por el contrario, si el fármaco es de carácter básico, se unirá a la  $\alpha$ -glicoproteína, por consiguiente la parte que no se adhiere a estas proteínas se conoce como fracción de fármaco libre, la cual será aquel que se acople a los tejidos para ejercer su función. La absorción es dependiente de las características fisicoquímicas como liposolubilidad, polaridad y carga eléctrica de las moléculas (área superficial), el tamaño de la molécula o la similitud con sustancias endógenas.

Las membranas celulares son barreras biológicas que inhiben selectivamente el flujo de las moléculas de los fármacos; depende de su permeabilidad. Los cationes de guanidina, al poseer la carga deslocalizada a pH fisiológico atraviesan fácilmente la bicapa lipídica por ser altamente liposolubles; por lo tanto, no necesitan de moléculas transportadoras; concluyendo que pueden atravesar las membranas por difusión pasiva. Dentro de los parámetros fisicoquímicos que pueden perturbar la difusión pasiva, están aquellos que afectan la facilidad de movimiento del fármaco al interior de la membrana. El parámetro LogP es usado en investigación para calcular la permeabilidad de la membrana celular; es importante el tamaño de la molécula, debido a que, entre mayor tamaño molecular mayor

## CAPÍTULO II

dificultad de movimiento. Otro parámetro de interés es el número de enlaces rotables, que nos indica la flexibilidad para que interaccione con otras dianas y el TPSA que nos indica el área polar superficial, el cual se expresa como la suma de todos los átomos polares presentes en la molécula. Un total de 10 compuestos sintetizados fueron ingresados al servidor web Molinspiration, SwissADME y AdmetSAR para obtener propiedades fisicoquímicas moleculares. Los resultados obtenidos se exponen a continuación (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Cálculos de Propiedades moleculares de los derivados del ácido oleanólico (11-20) con el fármaco de referencia **77**, empleando el programa Molinspiration.

<i>Compuestos</i>	<i>LogP</i>	<i>TPSA</i> Å	<i>No.</i> <i>Átomos</i>	<i>MW</i> <i>g/mol</i>	<i>nON</i>	<i>noHNH</i>	<i>nrobt</i>	<i>Vol.</i>	<i>nViol.</i>
<b>77</b>	<b>5.58</b>	<b>32.70</b>	<b>29</b>	<b>387.52</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>384.15</b>	<b>1</b>
11	9.07	102.68	49	691.08	4	3	9	696.99	2
12	9.33	102.68	49	697.13	4	3	9	715.58	2
13	8.65	102.68	47	663.02	4	3	7	663.39	2
14	9.01	102.68	51	711.07	4	3	6	701.19	2
15	9.14	102.68	49	691.08	4	3	8	696.75	2
16	9.50	82.95	56	764.15	4	3	11	780.60	2
17	9.54	82.95	56	770.20	4	3	11	799.19	2
18	9.24	82.95	54	736.10	4	3	9	747.00	2
19	9.46	82.95	58	784.14	4	3	8	784.80	2
20	9.39	82.95	56	764.15	4	3	10	780.36	2

## CAPÍTULO II

Como se observa (**Tabla 5**), los compuestos **11-20** difieren en tamaño con **77** y por lo tanto la similitud de los resultados; sin embargo, los 10 compuestos presentan buenas puntuaciones de similitud con otros fármacos. Se puede observar que tienen un TPSA en un rango aceptable al no ser  $>140$  y  $<60$ , lo que significa que los compuestos tendrán una buena absorción por vía oral, por otro lado, no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica ( $<60$ ) y no son lo suficientemente polares, lo que podría generar que sean impermeables a través de las membranas biológicas ( $>140$ ). Otros de los parámetros aceptables para los compuestos son el No. de aceptores de puentes de Hidrogeno (nON) que son  $<10$  y el número de donadores de puentes de Hidrogeno (nOHNH) que son  $<5$ . Y para finalizar, los compuestos presentan un valor  $\leq 10$  para nrotb, lo que podría significar que, los compuestos en teoría no entrarían a un grado de libertad para interaccionar con otros *targets*, para el caso de los compuestos **16** y **17** se tiene un valor de 11 en este parámetro.

Los valores dados para nViol., hacen hincapié a las violaciones de la regla de Lipinski, este postulado nos indica si las moléculas tendrán problemas de permeabilidad o de absorción; el cual no debe tener un  $\text{LogP} > 5$ , o un  $\text{MW} > 500$ . No obstante, para el caso de los productos naturales, estos 2 parámetros del postulado de Lipinski no aplican, esto se debe a que, a pesar de que el parámetro  $\text{LogP}$  muestre resultados  $>5$  (los resultados de todos los compuestos tienen un promedio de 9.2) no significa que ocurra una bioacumulación en lípidos de los compuestos; por su parte, lo que sucedería es que la absorción sería más lenta, pero se realizará de manera completa. Lo que sucede en los casos para los fármacos que provengan de productos naturales, en el momento de formulación o en el proceso de estandarización se debe realizar con mayor cantidad de la molécula bioactiva para que sea capaz de absorberse con mayor fuerza y ejerza su acción, en el caso de que se quiera realizar por administración vía oral. Si se dosifica en otra forma farmacéutica, este parámetro no aplica.

Otro programa predictor, el Bioactivity score (puntuación de bioactividad) (**Tabla 6**) muestra para moléculas orgánicas, la posibilidad en que si el Bioactivity score es  $>0$ ; entonces la molécula es activa; si está en  $-5,0-0,0$ , entonces es moderadamente activa y si  $<-5,0$ ; es inactiva. Los resultados del score están relacionados a la similitud con algún fármaco de cada

## CAPÍTULO II

compuesto y con el proceso específico de cada uno. Los resultados se obtuvieron mediante el programa Molinspiration.

*Tabla 6. Bioactivity score de los compuestos 11-20 y 77.*

<i>Compuesto</i>	<i>Ligando GPCR</i>	<i>Modulador de canal iónico</i>	<i>Inhibidor quinasa</i>	<i>Ligando receptor nuclear</i>	<i>Inhibidor proteasa</i>	<i>Inhibidor de enzimas</i>
<i>77</i>	<i>0.33</i>	<i>0.05</i>	<i>0.05</i>	<i>0.66</i>	<i>0.06</i>	<i>0.36</i>
<i>11</i>	-0.50	-1.44	-1.26	-0.67	-0.33	-0.48
<i>12</i>	-0.43	-1.35	-1.35	-0.71	-0.26	-0.44
<i>13</i>	-0.31	-1.14	-1.01	-0.39	-0.20	-0.23
<i>14</i>	-0.76	-1.75	-1.54	-1.04	-0.48	-0.79
<i>15</i>	-0.43	-1.31	-1.34	-0.69	-0.25	-0.43
<i>16</i>	-1.35	-2.63	-2.41	-2.19	-0.97	-1.62
<i>17</i>	-1.29	-2.63	-2.44	-2.15	-0.95	-1.60
<i>18</i>	-1.00	-2.19	-1.98	-1.73	-0.69	-1.23
<i>19</i>	-1.78	-2.98	-2.92	-2.65	-1.29	-2.07
<i>20</i>	-1.30	-2.61	-2.45	-2.13	-0.94	-1.58

Se deben analizar los resultados de una manera objetiva, esto con la finalidad de relucir que *77* es una molécula más pequeña que los compuestos derivados de un esqueleto

CAPÍTULO II

triterpénico y por lo tanto en estos parámetros **77** tiene un rango de bioactividad >0. Los resultados muestran que; para ligando GPCR, se observa que los compuestos **11-20** son moderadamente activos ( $\leq$ ); sin embargo, los compuestos **13, 12, 15, 11 y 14**, a pesar de tener la actividad moderada relevan mejores resultados que los demás compuestos.

Para el modulador de canal iónico, así como el inhibidor de la quinasa se encuentra que todos los compuestos son moderadamente activos ( $\leq$ ); en el caso de los compuestos **13, 11, 15 y 12** se observa una actividad moderada ( $\leq$ ) hacia el ligando del receptor nuclear, obteniendo una mejor bioactividad en comparación con los demás compuestos que también tienen una actividad moderada. Por otra parte, los 10 compuestos presentan actividad moderada ( $\leq$ ) para inhibidor de proteasa e inhibidor de enzimas, en el que el compuesto **13** refleja un mejor resultado en ambos parámetros. Estos parámetros fisicoquímicos son la base para tener un buen desarrollo farmacocinético, por su lado el desarrollo farmacocinético y la biodisponibilidad de los compuestos darán información relevante del funcionamiento de las moléculas bioactivas para su posterior dosificación y administración adecuada, siempre y cuando los compuestos cumplan la actividad farmacológica deseada.

Para el cálculo de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas (**Tabla 7**) se utilizó el servidor SwissADME y se complementó con AdmetSAR. La identificación e interpretación de estos parámetros conocidos como ADME, implican la utilización y manejo de conceptos básicos para comprender las características de los compuestos.

**Tabla7.** Predicción de propiedades farmacocinéticas para **77** y los compuestos **11-20**.  
 Dónde: GIA = Absorción gastrointestinal, BBB = Blood-brain barrier (barrera hemoencefálica), P-gp = permeabilidad a glucoproteínas

	<b>77</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<i>GIA</i>	<b>Alta</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>	<b>Baja</b>
<i>Permeabilidad BBB</i>	<b>Si</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

## CAPÍTULO II

<i>Substrato P-gp</i>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	No	No	No	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>
<i>Inhibidor de CYP1A2</i>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<i>Inhibidor de CYP2C19</i>	<b>Si</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<i>Inhibidor de CYP2C9</i>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<i>Inhibidor de CYP2D6</i>	<b>Si</b>	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
<i>Inhibidor de CYP3A4</i>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	No	<b>Si</b>	No	No	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>
<i>Log K<sub>p</sub></i> (permeabilidad en piel) cm/s	-3.84	-3.03	-2.89	-3.37	-3.25	-3.34	-2.64	-2.53	-2.98	-2.86	-2.96

Los compuestos **11-20** muestran una GIA lenta, sin embargo, se ha estimado que algunos de los fármacos provenientes de productos naturales en desarrollo tienen escasa biodisponibilidad debido a la baja solubilidad acuosa por lo que se puede considerar el incremento de solubilidad en el tracto gastrointestinal si en el proceso de estandarización se añade el excipiente ideal, por ej. formación de sales, nanopartículas, capsulas llenadas con líquido, técnicas de formulación convencional con surfactantes y/o agentes anti-núcleos y dispersiones sólidas. O bien, el diseño de otra forma de administración farmacéutica.

En cuanto a la permeabilidad a la barrera hematoencefálica, los 10 compuestos no la atraviesan. Lo cual es bueno debido a que los compuestos no fueron diseñados para actuar a nivel del SNC, estos compuestos al compararlos con **77** se encuentran en una mejor posición debido a que **77** tiene la probabilidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Se reportó

desde 1978 por Kaiser Kupfer y cols. que específicamente ocurre toxicidad ocular y Ashford y cols. se lo atribuye a la dosis empleada.<sup>99</sup> Se menciona que los compuestos **11**, **12**, **16** al **20** formarían parte de sustratos de la glucoproteína P, esto significa que posiblemente tendrían resistencia farmacológica al igual que **77**. Los compuestos **13**, **14** y **15** indican que tiene baja afinidad por la glucoproteína.

Todos los compuestos tienen un valor de Log  $K_p$  superior a -2.5 cm/s por consiguiente tienen un escaso potencial de penetración cutánea. Estos compuestos no podrán inhibir a CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, lo que se puede interpretar en que no son inhibidores para las isoformas del citocromo P450 y por lo tanto no tendrán interacciones fármaco – fármaco. Para el caso de los compuestos **12**, **14** y **15** no son inhibidores del CYP3A4, para los compuestos **11**, **13**, **16** al **20** podrían inhibir CYP3A4 indicando la potencia de detener la oxidación de esteroides, ácidos grasos, xenobióticos, así como la síntesis y degradación de hormonas, y estos compuestos si tendrían interacciones fármaco – fármaco, significando que en una duplicación terapéutica esta interacción (en general las estructuras de tipo esteroidal tienen un carácter inhibitorio) podría reducir los efectos de uno o de ambos fármacos, también podría haber una implicación de que alguno de los dos fármacos llegue a concentraciones tóxicas debido a que no se esté metabolizando. Sin embargo, el hecho de que sean inhibidores de CYP3A4 no es una razón para excluir a este grupo de biomoléculas puesto que se deben diseñar terapias adecuadas para evitar el uso concomitante de otros fármacos, actualmente se encuentran la existencia de fármacos ya comercializados de carácter inhibitorio, por ejemplo, el clotrimazol.

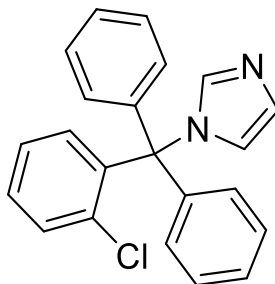
El clotrimazol (**79**) (**Figura 22**) es un derivado imidazólico usado como medicamento antimicótico en afecciones de micosis dérmicas superficiales y vaginales, este fármaco es un potente inhibidor específico del citocromo P450 y sin embargo, se encuentra en venta pública,<sup>100</sup> su uso se debe a que el beneficio proporcionado es mayor que su riesgo y además, es administrado en una dosis y forma farmacéutica adecuada (en crema o en forma de gotas óticas). Otro claro ejemplo es el propio tamoxifeno (**77**), el cual tiene un efecto inhibidor

<sup>99</sup> Lasso-Vega, M. C.; Zapater, P.; Such, J.; Sola-Vera, J.; Payá, A.; Horga, J. F.; Mateo-Pérez, M. *Gastroenterol. Hepatol.*, **2002**, *25*, 247-250.

<sup>100</sup> Khabnadideh, S.; Rezaei, Z.; Khalafi-Nezhad, A.; Pakshir, K.; Roosta, A.; Baratzadeh, Z. *AIAMC.*, **2008**, *7*, 215-218.

## CAPÍTULO II

para CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 y a pesar de los efectos adversos, los beneficios del fármaco son muy superiores a sus inconvenientes ya que mejora la supervivencia de los pacientes.



79

*Figura 22. Estructura química del Clotrimazol (79).*

Los resultados fueron complementados con otros parámetros farmacocinéticos, tales como la absorción en intestino humano, permeabilidad en células Caco-2, así como la biotransformación de fármacos midiendo su actividad como sustrato a familias del citocromo P450 (**Tabla 8**) permitiendo comprender el comportamiento de los compuestos mediante la relación estructura-actividad (SAR).

*Tabla 8. Propiedades farmacocinéticas de los compuestos 11-20 y 77*

<i>Modelo</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Resultado</i>	<i>Probabilidad (%)</i>
<i>Absorción</i>			
	77	+	99.7
	11	+	99.2

## CAPÍTULO II

	12	+	98.5
	13	+	99.2
<i>Absorción en intestino humano</i>	14	+	99.2
	15	+	99.2
	16	+	99.0
	17	+	99.1
	18	+	99.1
	19	+	99.1
	20	+	99.1
	<b>77</b>	<b>+</b>	<b>54.2</b>
	11	-	82.5
	12	-	82.4
	13	-	81.7
<i>Caco-2</i>	14	-	83.4
	15	-	83.1
	16	-	84.2
	17	-	84.4
	18	-	83.7

	19	-	84.6
	20	-	84.9
<b>Metabolismo</b>			
	<b>77</b>	<b>+</b>	<b>75.4</b>
	11	+	72.3
	12	+	71.9
	13	+	72.5
<i>3A4 (Sustrato)</i>	14	+	71.9
	15	+	72.4
	16	+	73.5
	17	+	73.6
	18	+	73.3
	19	+	73.1
	20	+	73.0
	<b>77</b>	<b>+</b>	<b>66.6</b>
	11	-	81.0
	12	-	83.8
	13	-	80.7

<i>2D6 (Sustrato)</i>	14	-	80.7
	15	-	80.7
	16	-	79.2
	17	-	79.2
	18	-	79.2
	19	-	79.2
	20	-	79.2
	<b>77</b>	<b>+</b>	<b>83.7</b>
	11	-	80.8
	12	-	82.0
	13	-	80.8
<i>2C9 (Sustrato)</i>	14	-	80.8
	15	-	80.8
	16	-	81.0
	17	-	80.8
	18	-	80.8
	19	-	79.2
	20		80.8

## CAPÍTULO II

Los resultados arrojan que estos compuestos tienen altas probabilidades de una buena absorción en el intestino humano. Por otra parte, mostraron alta probabilidad de no tener permeabilidad en células Caco-2, es decir para la permeabilidad gastrointestinal. Sin embargo, este parámetro que resulta de su LogP se puede estandarizar bajo el uso de normativas de la tecnología farmacéutica.

En la parte de metabolismo o biotransformación de fármacos, todos los compuestos finales son sustratos de la isoforma 3A4 con una probabilidad de 73%, siendo una buena probabilidad. Al decir que son sustratos significa que los compuestos serán metabolizados por el CYP3A4. Al compararlo con **77**, podemos observar que los parámetros son similares y aceptables. Además, dentro de la evaluación mediante el programa SwissTargetPrediction se obtuvo el resultado en que todos los compuestos tendrían afinidad para unirse a receptores estrogénicos. Además, se muestran los resultados de toxicidad mediante prueba de AMES que nos indica si es o no carcinogénico, así como la hepatotoxicidad de cada compuesto (**Tabla 9**).

*Tabla 9. Predicción de toxicidad.*

<i>Modelo</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Resultado</i>	<i>Probabilidad</i>
<i>Toxicidad</i>			
	<b>77</b>	-	<b>72.0</b>
	11	-	84.8
	12	-	73.8
	13	-	86.0
<i>Mutagénesis de AMES</i>	14	-	67.00
	15	-	59.0

	16	-	75.0
	17	-	70.0
	18	-	77.0
	19	-	57.0
	20	-	56.0
	<b>77</b>	-	<b>81.4</b>
	11	-	85.7
	12	-	91.4
	13	-	85.7
<i>Carcinogénesis</i>	14	-	85.7
	15	-	85.7
	16	-	88.5
	17	-	88.5
	18	-	88.5
	19	-	88.5
	20	-	88.5
	<b>77</b>	<b>+</b>	<b>92.5</b>
	11	-	65.0

	12	-	65.0
	13	-	55.0
<i>Hepatotoxicidad</i>	<b>14</b>	+	<b>52.5</b>
	15	-	50.0
	16	-	52.5
	17	-	67.5
	<b>18</b>	+	<b>55.0</b>
	19	-	55.0
	20	-	55.0

En el apartado de toxicidad se puede apreciar que todos los compuestos no presentan mutagénesis al igual que **77**, de acuerdo con la prueba de AMES y tampoco son carcinogénicos. Para nuestro fármaco de referencia es conocido que uno de los efectos adversos es su hepatotoxicidad;<sup>101</sup> lo que concuerda con la predicción dada por el programa, por otro lado, solo los compuestos **14** y **18** se colocaron en una probabilidad media, mientras que el resto de los compuestos aparentemente no son hepatotóxicos.

Conociendo la fase farmacocinética (ADME) de los resultados anteriores, podemos intuir que los compuestos a pesar de presentar el problema de absorción en GI, tienen parámetros en rangos aceptables; ahora es necesario corroborar que las moléculas ejercen una funcionalidad o actividad en la diana terapéutica. Para estimar las múltiples actividades biológicas de las sustancias químicas, se pueden realizar estudios pre-clínicos, pruebas clínicas ó biosimulaciones predictivas (*in silico*). Estas simulaciones tienen la ventaja de

<sup>101</sup> Osborne, C. K. *J. Med.*, **1998**, 339, 1609-1618.

## CAPÍTULO II

disminuir el tiempo, costo y que se pueden utilizar estructuras virtuales de moléculas bioactivas con las de la diana terapéutica. Los resultados obtenidos por el programa PASS Online, nos brindó un perfil de actividad sobre múltiples blancos terapéuticos en las que nuestros compuestos pudieran incluirse basándose en el principio de la relación estructura-actividad (SAR) de otras moléculas registradas en su base de datos. Se evaluó la actividad biológica de los compuestos **11-20** (**Tabla 10**) y dentro de las diversas actividades mostradas en el programa se seleccionaron 3 actividades representativas para el cáncer.

**Tabla 10.** Actividades biológicas relacionadas con el cáncer de los compuestos **11-20** y **77**.  $P_a$  = Probabilidad de actividad.  $P_i$  = Probabilidad de inactividad.

<i>Modelo</i>	<i>Compuesto</i>	<i>P<sub>a</sub> (%)</i>	<i>P<sub>i</sub> (%)<sup>i</sup></i>
	<b>77</b>	<b>64.0</b>	<b>2.0</b>
	11	91.6	0.2
	12	92.5	0.2
	13	91.1	0.2
<i>Antagonista de la integridad de la membrana</i>	14	---	---
	15	82.3	0.5
	16	92.0	0.2
	17	91.5	0.2
	18	91.4	0.2
	19	69.6	1.4
	20	84.0	0.5

	<b>77</b>	<b>23.0</b>	<b>1.19</b>
	11	85.4	0.2
	12	85.1	0.2
	13	85.7	0.2
<i>Estimulante del Factor de Transcripción (en especial el factor NF-κB)</i>	14	85.7	0.2
	15	85.3	0.2
	16	83.5	0.2
	17	82.8	0.2
	18	83.8	0.2
	19	85.2	0.2
	20	84.4	0.2
		<b>77</b>	<b>31.1</b>
	11	73.0	1.2
	12	71.8	1.3
	13	73.0	1.2
<i>Agonista de Apoptosis</i>	14	73.3	1.2
	15	70.3	1.4
	16	68.2	1.7

## CAPÍTULO II

17	65.1	2.0
18	68.3	1.6
19	69.3	1.5
20	69.0	0.5

Los resultados mostraron que todos los compuestos se presentan como anticancerígenos en una probabilidad aceptable; o incluso con resultados favorables con respecto a **77**, mostrando que la actividad biológica más afín es como antagonista de la integridad de la membrana.

A pesar de que estos compuestos están diseñados para inducir apoptosis por vía intrínseca, se debe aclarar que los resultados que arroja PASS Online detallan que este tipo de estructuras no se han reportado en su base de datos, significando que Pa para alguna actividad no hace referencia a la probabilidad de éxito; por el contrario, se refiere a que nuestros compuestos se parecen a los ya reportados en la base de datos, arrojando una probabilidad de actividad o inactividad. Por consiguiente, estos resultados fueron complementados por las predicciones de CLC-Pred. Estas predicciones nos proporcionan la citotoxicidad de los compuestos en varias líneas celulares cancerígenas; que posteriormente, se pueden evaluar en el cribado experimental.

Los compuestos demostraron citotoxicidad en una amplia variedad de líneas celulares, dentro de las cuales fueron seleccionadas las provenientes en los tejidos de ovario, tejido hematopoyético y linfoide, y para tejido pancreático (**Tabla 11**).

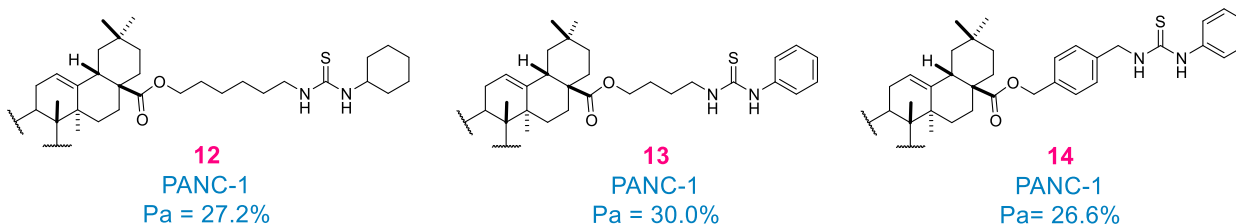
**Tabla 11.** Predicción del efecto citotóxico de los compuestos químicos 11-20 y 77 en líneas de células cancerosas.

<i>Tejido</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Línea celular</i>	<i>Pa (%)</i>	<i>Pi (%)</i>
		SK-OV-3	51.7	2.0
	<b>77</b>	OVCAR-8	26.0	11.6
		OVCAR-3	22.8	10.0
	11	OVCAR-5	37.0	6.2
	12	OVCAR-5	31.2	9.2
<i>Ovario</i>		A2780	18.9	6.4
	13	OVCAR-5	35.4	6.3
	14	A2780	21.7	5.3
	15	A2780	22.0	5.2
	<b>16</b>	<b>A2780</b>	<b>38.0</b>	<b>2.0</b>
	17	A2780	31.5	2.7
	<b>18</b>	<b>A2780</b>	<b>38.1</b>	<b>1.9</b>
	<b>19</b>	<b>A2780</b>	<b>44.8</b>	<b>1.3</b>
	20	A2780	30.4	3.0
	<b>77</b>	<b>HL-60</b>	<b>20.1</b>	<b>13.8</b>
	<b>11</b>	<b>H9</b>	<b>37.1</b>	<b>2.5</b>

	<b>12</b>	<b>H9</b>	<b>37.5</b>	<b>2.4</b>
	<b>13</b>	<b>H9</b>	<b>37.3</b>	<b>1.1</b>
<i>Tejido hematopoyético y linfoide</i>	14	H9	36.6	2.7
	15	H9	36.8	2.6
	16	H9	32.0	5.0
	17	H9	32.3	4.7
	18	H9	32.2	4.7
	19	H9	34.1	3.7
	20	H9	34.1	3.7
		<b>77</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
	11	---	---	---
<i>Páncreas</i>	<b>12</b>	<b>PANC-1</b>	<b>27.2</b>	<b>4.5</b>
	<b>13</b>	<b>PANC-1</b>	<b>30.0</b>	<b>3.7</b>
	<b>14</b>	<b>PANC-1</b>	<b>26.6</b>	<b>4.7</b>
	15	PANC-1	21.8	6.6
	16	PANC-1	26.0	5.1
	17	PANC-1	24.1	5.6
	18	PANC-1	26.0	5.0

19	PANC-1	22.0	6.5
20	PANC-1	24.0	2.9

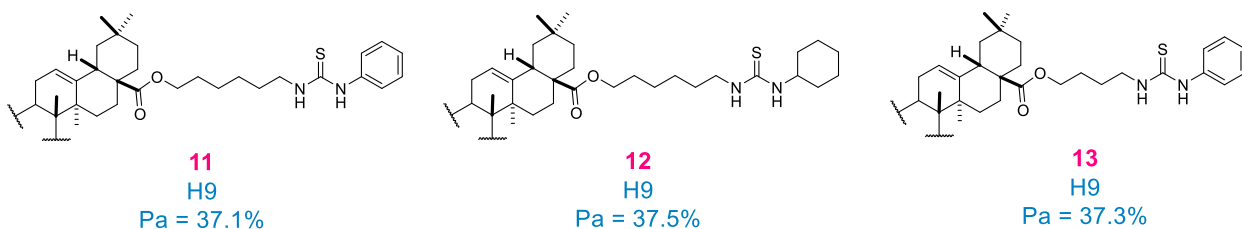
La elección de los tejidos se basó en que el cáncer de tejido ovárico está relacionado con las irregularidades en la actividad de RE; por su parte para el tema de leucemia y cáncer de páncreas es por la mortalidad existente, colocándolos en los tipos de cáncer con mayor frecuencia. Los resultados son interesantes debido a que demuestran que para el tejido ovárico tienen una mayor citotoxicidad, en comparación con los otros dos tejidos. De acuerdo con los resultados los compuestos, a excepción del compuesto **11**, presentan un efecto en la línea celular PANC-1 (carcinoma pancreático). Los compuestos **12**, **13** y **14** tuvieron valores de  $Pa$  más altos en comparación con los demás (**Figura 23**).



**Figura 23.** Compuestos con probable efecto citotóxico en la línea celular cancerígena PANC-1.

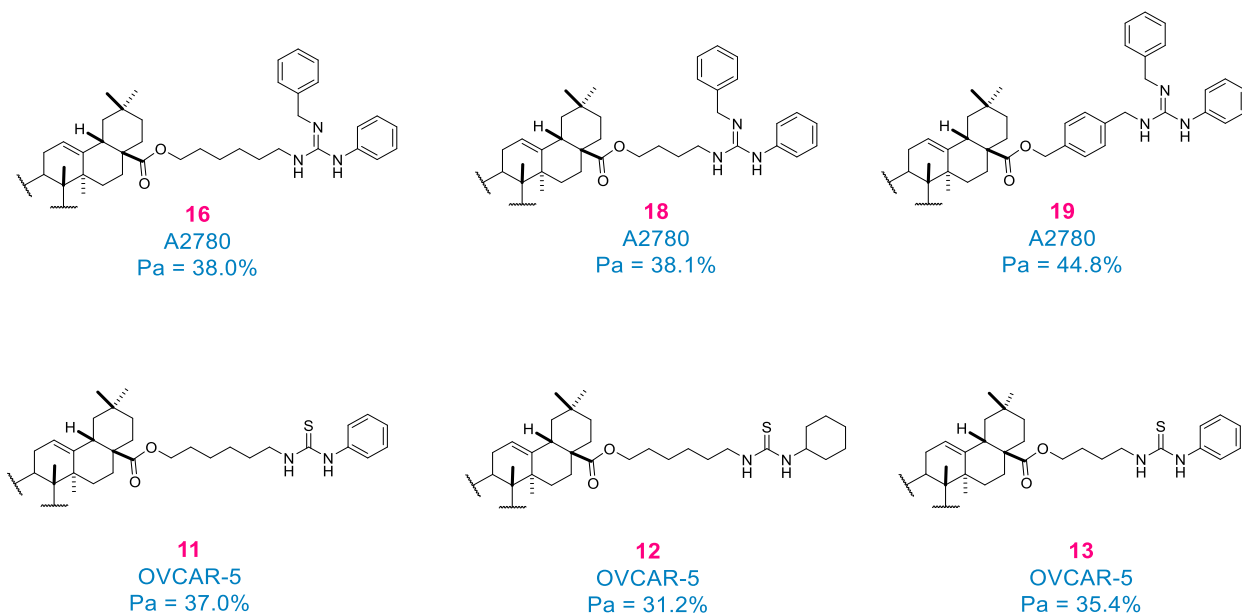
Para el caso del cáncer relacionado a problemas relacionados con la serie blanca, los compuestos tienen probabilidad de actividad en la línea celular H9 (Leucemia), en la que los compuestos **11**, **12** y **13** presentan una probabilidad de actividad más alta (**Figura 24**).

## CAPÍTULO II



**Figura 24.** Compuestos con probable efecto citotóxico en la línea celular cancerígena H9.

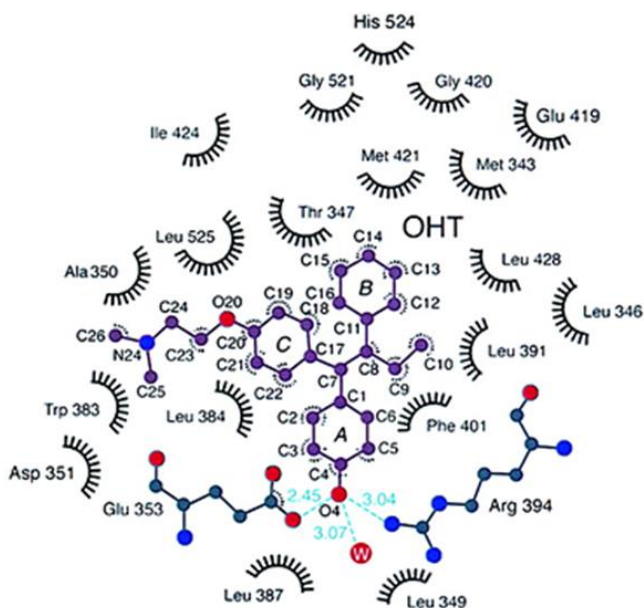
Los compuestos **11-20** mostraron que podrían ejercer actividad para dos líneas celulares en tejido ovárico: A2780 (carcinoma ovárico) y OVCAR-5 (adenocarcinoma ovárico). Los 10 compuestos presentan actividad para A2780; sin embargo, los compuestos representativos para la línea celular A2780 son el **16**, **18** y **19**, mientras que, para la línea celular OVCAR-5 los compuestos que presentan citotoxicidad son **11**, **12** y **13** (**Figura 25**).



**Figura 25.** Compuestos citotóxicos para las líneas celulares cancerígenas A2780 y OVCAR-5.

## Docking molecular

El cáncer es una enfermedad de proliferación descontrolada de células que contribuye al crecimiento y diseminación celular anormal. Por su parte, el cáncer de ovario es uno de tumores más frecuentes en la mujer;<sup>102</sup> en el cual, su tratamiento es sumamente costoso y complejo.<sup>103</sup> Actualmente, el ER $\alpha$  (receptor de estrógeno alfa) juega un papel vital en la regulación de la proliferación celular inducida por estrógenos de forma autocrina.<sup>104</sup> En este momento, se usan diversos antiestrógenos para bloquear los efectos del estrógeno en las células cancerosas; pongamos como ejemplo al tamoxifeno (**77**), el cual ha sido cocrystalizado con ER $\alpha$  (Clave: **3ERT**).<sup>105</sup> Shlau y cols.<sup>105</sup> brindaron la información necesaria para conocer las interacciones proteína-ligando del fármaco de referencia (**77**) con la finalidad de identificar a los aminoácidos más importantes para el reconocimiento del sitio activo; lo que incide en el diseño racional de nuevos agentes anti-estrogénicos (**Figura 26**).



**Figura 26.** Interacción 2D de Tamoxifeno (**77**) en RE $\alpha$  (Clave: **3ERT**).

<sup>102</sup> Novoa-Vargas, A. *Ginecol. Obstet. Mex.*, **2014**, 82, 613-622.

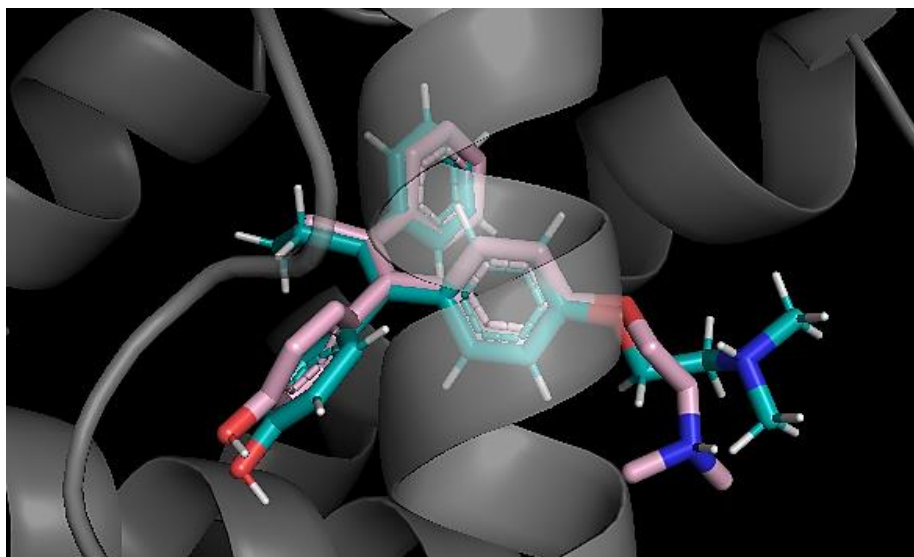
<sup>103</sup> Hannibal, C. G.; Cortes, R.; Engholm, G.; Krüger-Kjaer, S. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica.*, **2008**, 87, 1353-1360.

<sup>104</sup> Ananth, A. H.; Manikandan, N.; Rajan, R. K.; Elancheran, R.; Lakshmithendral, K.; Ramanathan, M.; Bhattacharjee, A.; Kabilan, S. *Chem. Biodiversity.*, **2020**, 17, 2-14.

<sup>105</sup> Shlau, A. K.; Bastard, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. *Cell.*, **1998**, 95, 927-937.

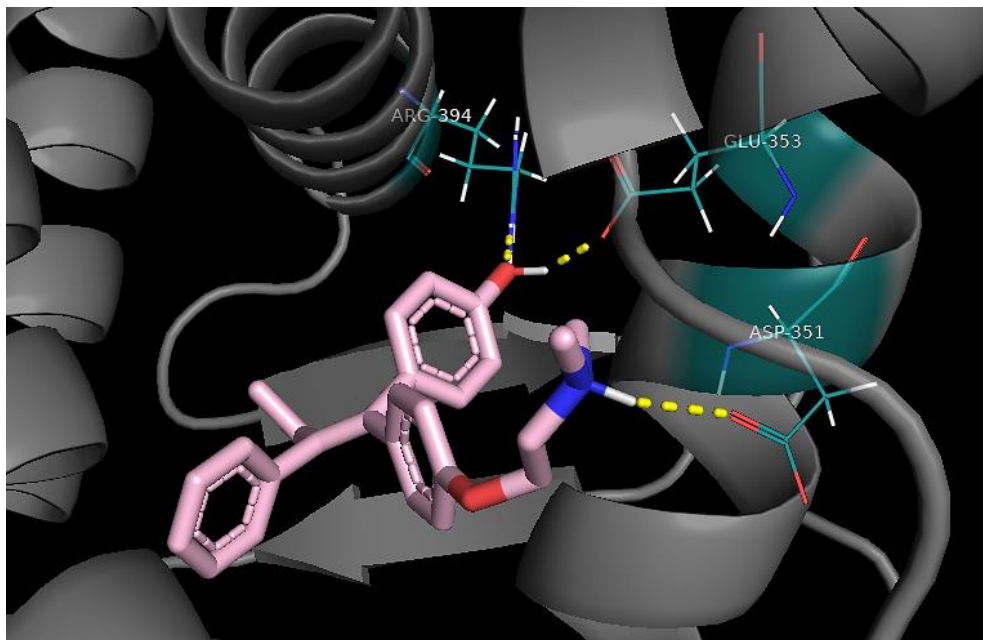
## CAPÍTULO II

Los estudios de *docking* en la proteína 3ERT con una resolución de 1.90 Å se realizaron para los compuestos **11-20** por presentar estructuras químicas con predicciones farmacocinéticas favorables, previamente mencionadas en el estudio DiFAC. Los parámetros del estudio de *docking* fue validado mediante un *re-docking* por triplicado, usando el promedio de los *RMSDs* de las mejores poses del ligando antagonista (**77**) con respecto al ligando cocrystalizado, obteniendo así un *RMSD* de  $1.682 \pm 0.213$  Å; el cual indica un resultado favorable para analizar el acoplamiento molecular de los compuestos híbridos del ácido oleanólico (**Figura 27**).

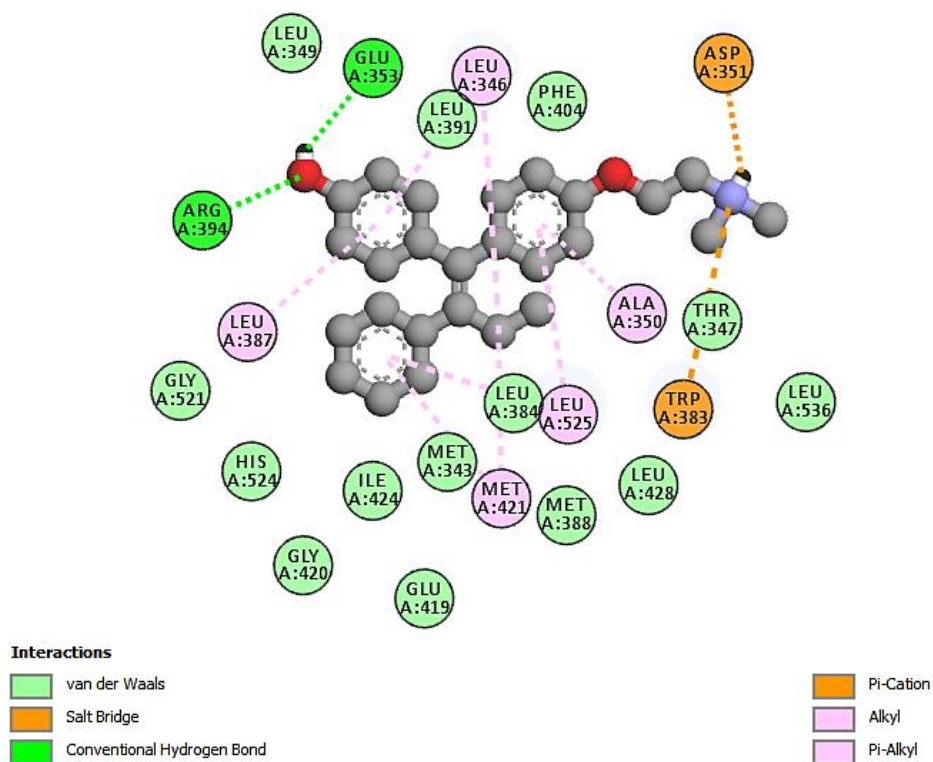


**Figura 27.** *Re-docking del compuesto 77 (azul) y del ligando cocrystalizado (rosado) en la proteína 3ERT con un *RMSD* de  $1.682 \pm 0.213$  Å. By PyMOL.*

Actualmente, se conocen las interacciones en 3D (**Figura 28**) y 2D (**Figura 29**) de los aminoácidos de la actividad antagonista del Tamoxifeno (**77**) en la proteína **3ERT**, de la cual destaca el anillo A con sus interacciones por puentes de H con los aminoácidos Glu353 y Arg394. Por otro lado, están las interacciones de tipo van der Waals sobre Met343, Leu346, Thr347, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384 y Leu525 en el anillo C. En el caso de la cadena dimetilaminoetilo se estabiliza por contactos de van der Waals con Thr347, Ala350 y Trp383; mientras que en el grupo amonio interacciona por puente salino con Asp351.



*Figura 28. Diagrama de 3D de las interacciones polares del compuesto 77 en el sitio de unión de la proteína 3ERT. By PyMOL.*

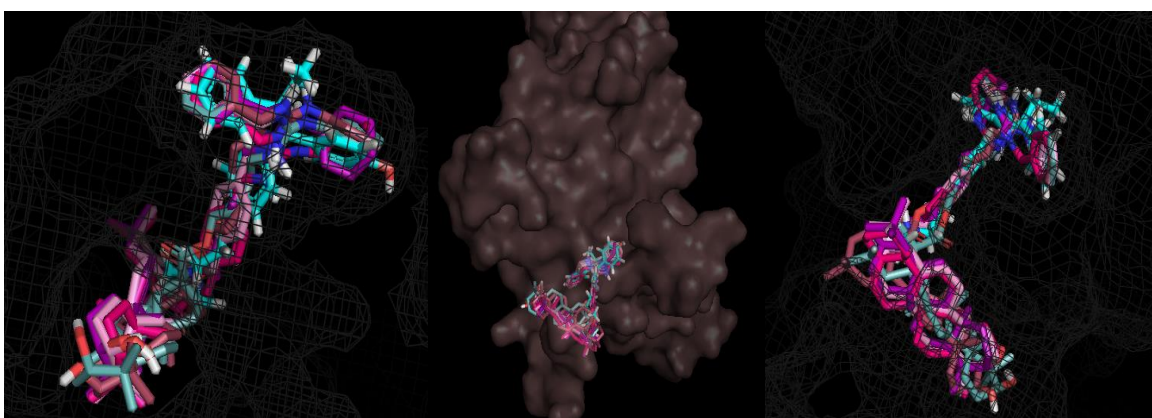


*Figura 29. Diagrama de 2D de las interacciones polares del compuesto 77 en el sitio de unión de la proteína 3ERT. By BIOVIA Discovery studio.*

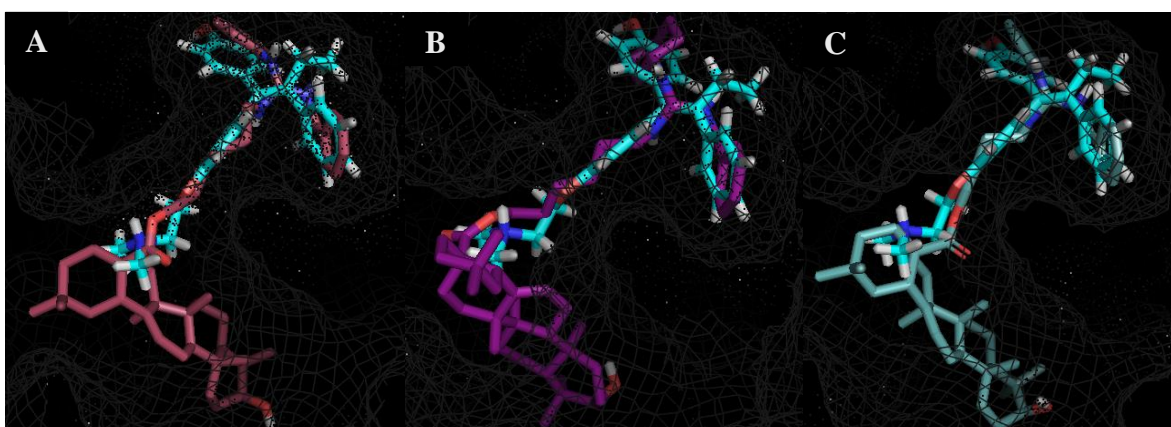
## CAPÍTULO II

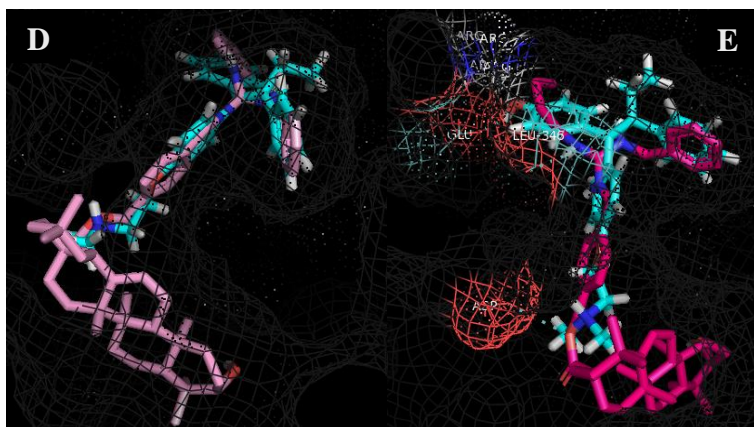
## Compuestos guanidínios del ácido oleanólico (16-20).

El antiestrógeno tamoxifeno (**77**) antagoniza la transcripción de genes que requieren la región AF-2 para la transactivación mediada por RE. A continuación (**Figura 30 y 31**) se muestran los modos de unión de los compuestos **16-20** en el sitio de unión de la proteína **3ERT** en compañía del ligando cocrystalizado (**77**).



*Figura 30. Distribución espacial de los compuestos 16-20 con 77 (azul-cyan) en el sitio de unión de la proteína 3ERT. By PyMOL.*

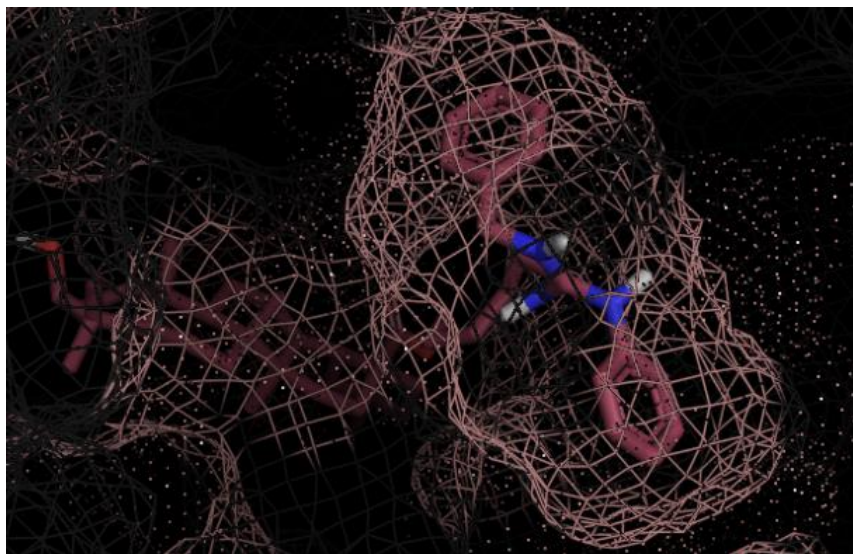
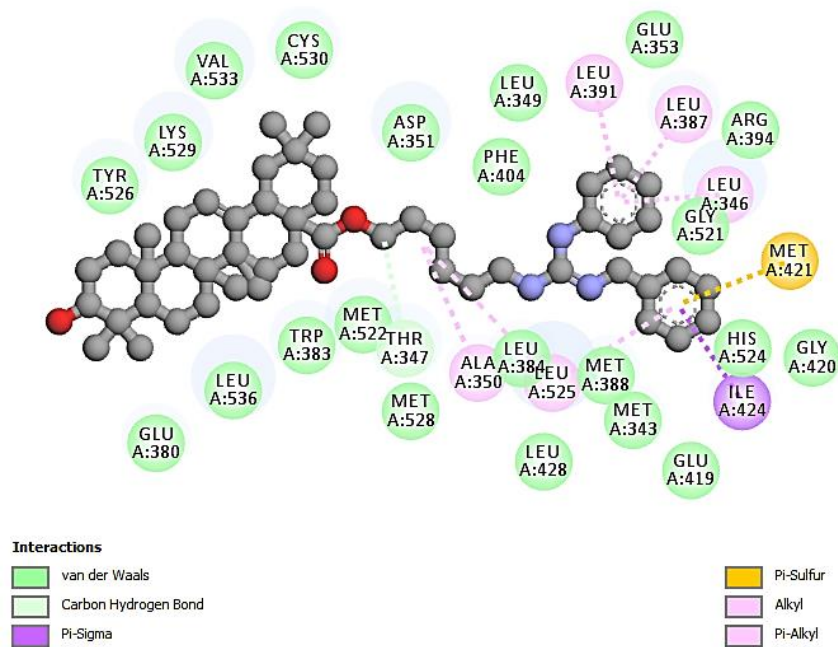




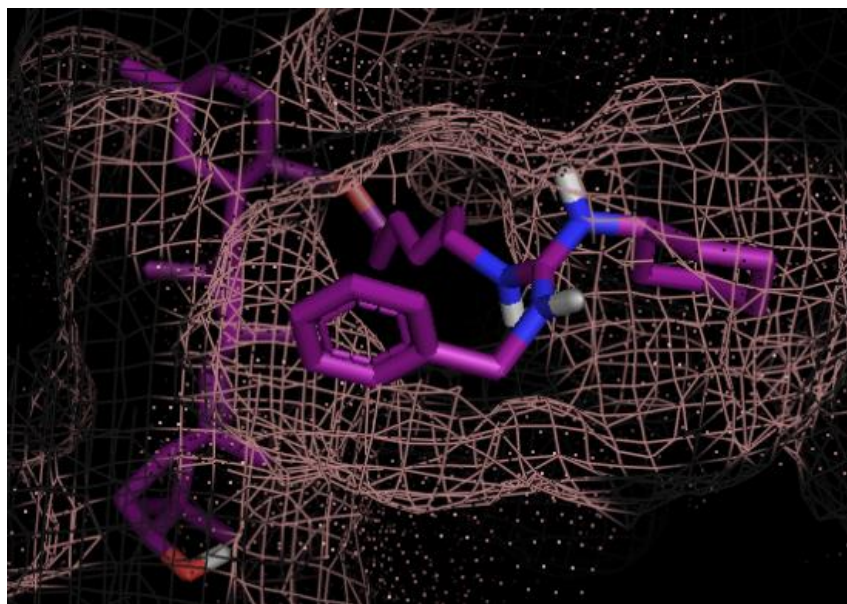
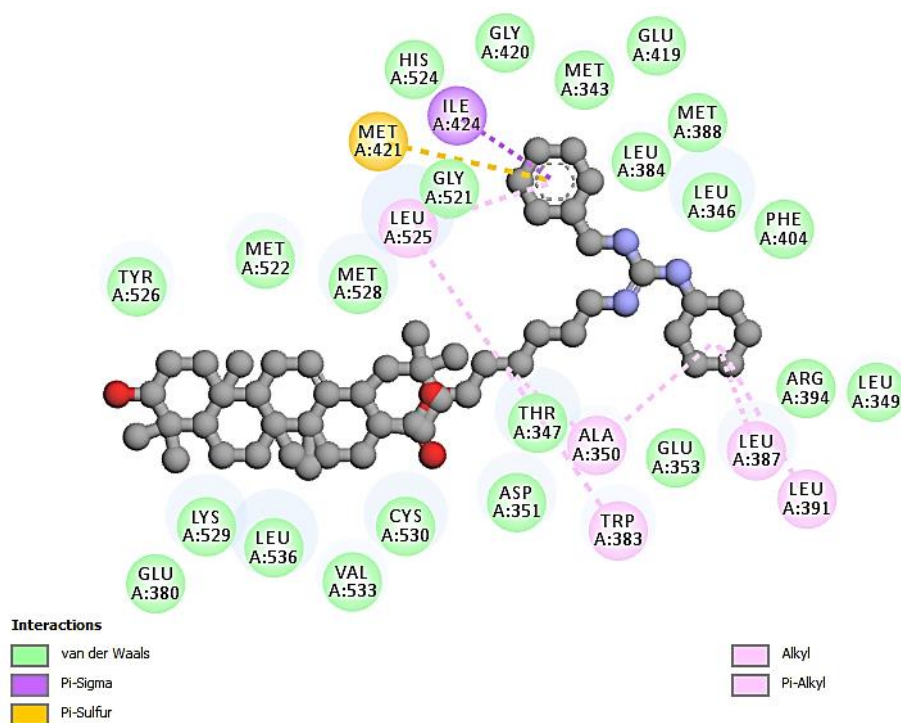
**Figura 31.** Modos de unión de todos los compuestos en el sitio de unión de **3ERT**, donde **77** (azul-cyan): **A**= compuesto **16**; **B**= compuesto **17**; **C**= compuesto **18**; **D**= compuesto **19** y **E**= compuesto **20**. By PyMOL.

En este caso se observan las poses para los compuestos guanidínios (**16-20**) con respecto al compuesto **77**, en donde, se aprecia que la estructura de la guanidina para cada compuesto tiene una distribución espacial análoga a los 3 anillos aromáticos de **77**, propiciando que el esqueleto triterpénico se amolde alrededor de la proteína ejerciendo diferentes interacciones.

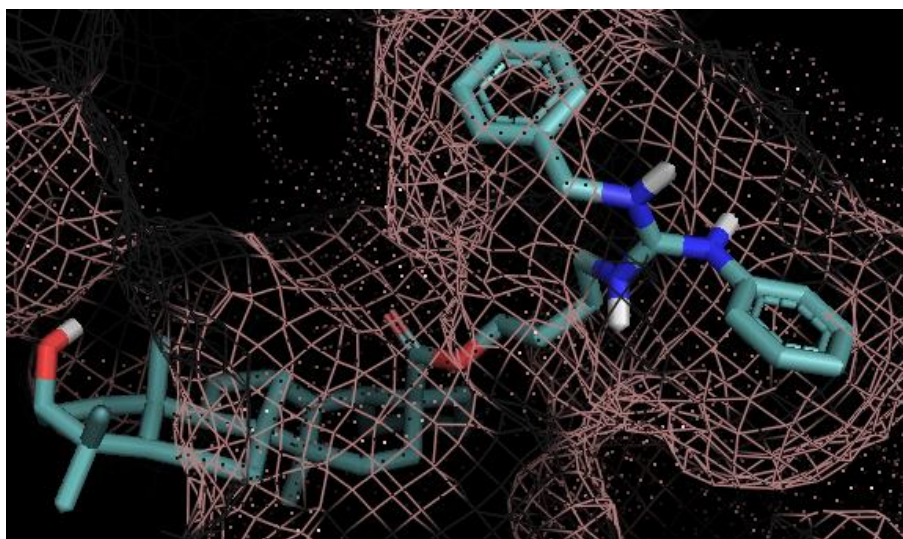
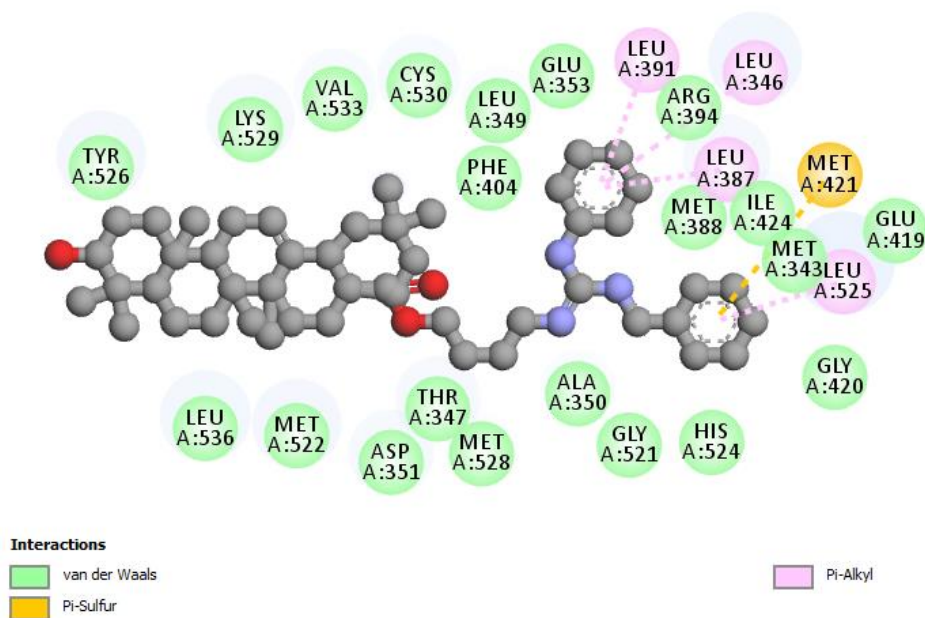
Se muestran las representaciones en 2D y 3D de las interacciones proteína-ligando (**Figura 32 a 36**) de los compuestos **16-20**, además de las mejores energías de acoplamiento (kcal/mol) para dichos compuestos (**Tabla 12**). En los diagramas 2D se resumen las interacciones de los compuestos con los aminoácidos atribuidos a la unión del compuesto **77**.



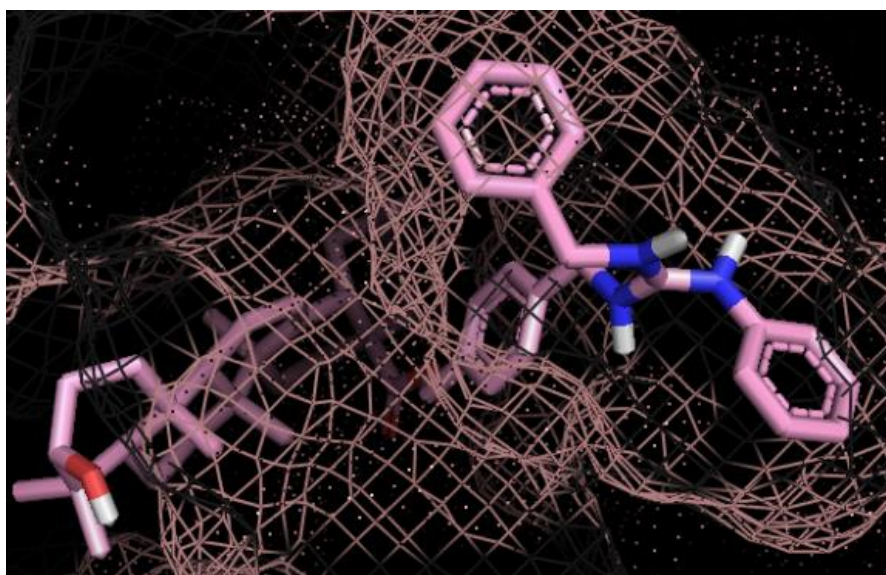
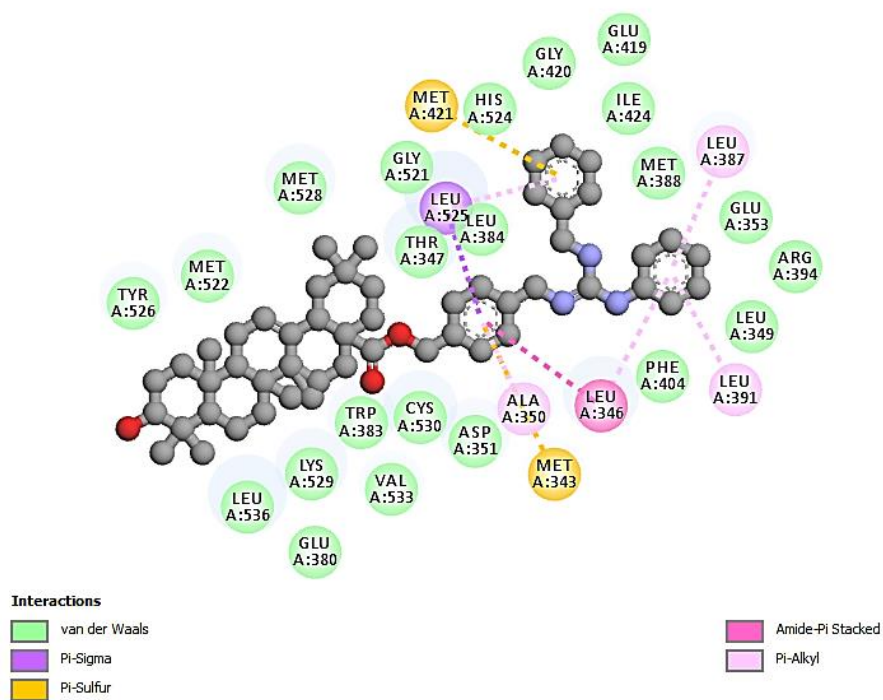
**Figura 32.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **16** con la proteína **3ERT**.



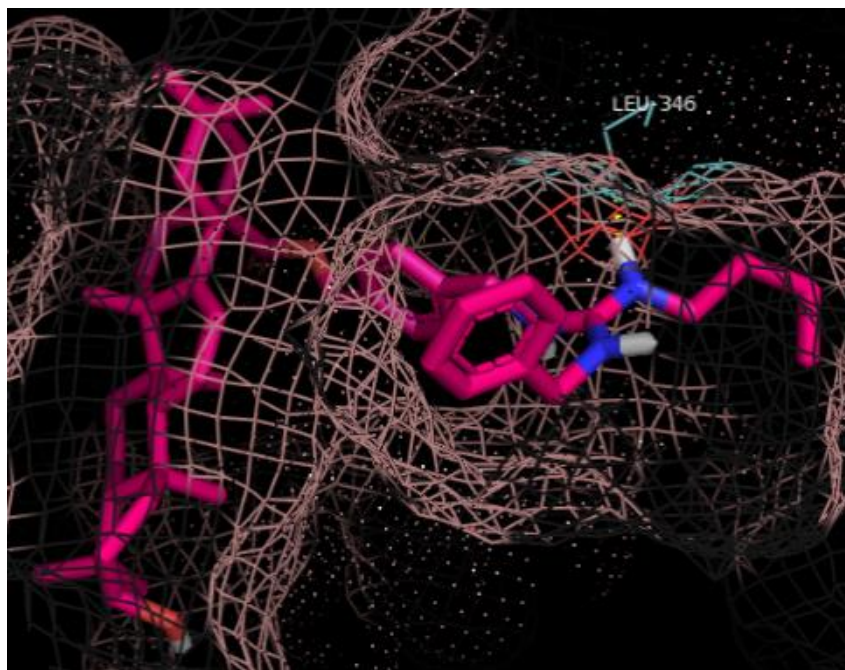
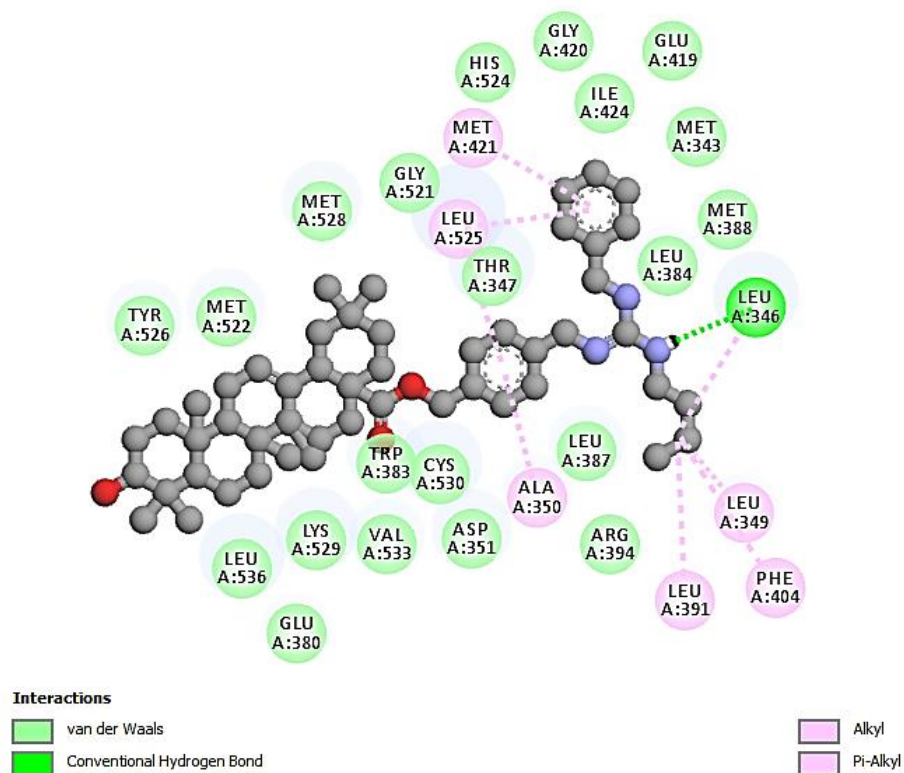
**Figura 33.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **17** con la proteína **3ERT**.



**Figura 34.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **18** con la proteína **3ERT**.

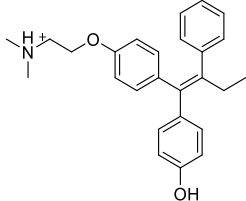
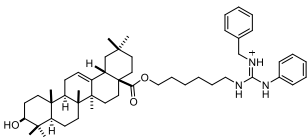
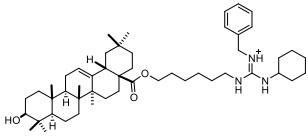
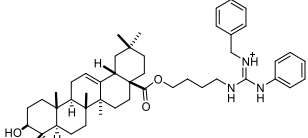
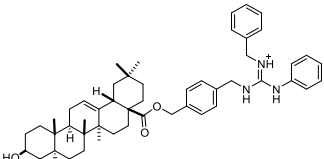
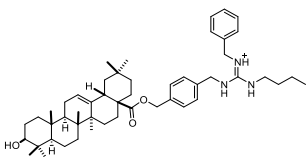


**Figura 35.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **19** con la proteína **3ERT**.



**Figura 36.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **20** con la proteína **3ERT**.

**Tabla 12.** Score e interacciones proteína-ligando de los compuestos **16-20** y **77** con los aminoácidos de la proteína **3ERT**. Dónde: *N/A* = *No Aplica*

Código	Estructura química	Docking score (kcal/mol)	Interacciones van der Waals	Interacción puente salino	Interacción puente H
<b>77</b>		-10.0	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347 y Trp383	Asp351	Glu353 y Arg394
<b>16</b>		-11.4	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353, Arg394	N/A	N/A
<b>17</b>		-11.5	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353, Arg394	N/A	N/A
<b>18</b>		-12.1	Met343, Leu346, Ala350, Leu387, Leu525, Thr347, Asp351, Glu353, Arg394	N/A	N/A
<b>19</b>		-13.5	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353 y Arg394	N/A	N/A
<b>20</b>		-12.1	Met343, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Arg394	N/A	Leu346

Las energías de acoplamiento (**Tabla 12**) para los compuestos **16** al **20** tomando como referencia a **77**; son de -11.4, -11.5, -12.1, -13.6, -12.1 y -10 kcal/mol, respectivamente. La diferencia energética de los compuestos **16-20**, se atribuye principalmente, a sus estructuras triterpénicas, presentando más interacciones de van der Waals que el compuesto **77**.

## CAPÍTULO II

Este resultado demuestra en términos energéticos que cuanto más negativo sea el valor de energía de interacción proteína-ligando, mejor será la afinidad de unión con el receptor.<sup>106</sup> Sin embargo, esto no se debe de interpretar de manera directa con la actividad biológica pero con la interacción de los residuos esenciales del sitio activo para asegurar dicha actividad.

En la comparación de las interacciones de los compuestos **16-20** con **77**, se demuestra que, para los compuestos **16**, **17** y **19** tienen los mismos contactos con los aminoácidos principales de la proteína; pero dichas interacciones son de diferente naturaleza. Para el caso del compuesto **18**, no cuenta con las interacciones en los aminoácidos Trp383, Leu384, Trp383 y para **20** con el aminoácido Glu353, sin embargo, tiene una interacción por puentes de H con Leu346. Es necesario mencionar que a pesar de que los compuestos **18** y **20** no presentan ciertos contactos de aminoácidos, si muestran mayores interacciones con respecto al compuesto **77**.

Por su parte, para todos los compuestos, todas sus interacciones son de tipo van der Waals o sus derivados como interacciones amida-*pi*, sulfuro-*pi* y *pi*-alquil, entre otras,<sup>107</sup> mientras que el compuesto **77** forma un puente salino con Asp351 y puentes de H con Glu353 y Arg394, estos resultados coinciden con la estructura química de los compuestos ya que no presentan un grupo donador de protones en la posición *p*-fenilo de las guanidinas.

A pesar de estas 3 diferencias de interacción, se deben evaluar los compuestos en pruebas anticancerígenas, ya que, su diseño y síntesis se debieron a las propiedades que presentan sus 2 estructuras por separado; pues tanto el ác. Oleanólico y los cationes guanidinio cuentan con actividad antiproliferativa (ver CAPITULO I) y la afinidad de unión a ER $\alpha$  fue basada en el programa SwissTargetPrediction y admetSAR.

---

<sup>106</sup> Bassyouni, F.; Hefnawi, M. E.; Rashed, A. E.; Rehim, M. A. *Drug Des.*, **2017**, 6, 1-6.

<sup>107</sup> Zauhar, R. J.; Colbert, C. L.; Morgan, R. S.; Welsh, W. J. *Biopolymers.*, **2000**, 53, 233-248.

## Compuestos tioureidos del ácido oleanólico (11-15).

Como se ha descrito anteriormente; los **RE** son responsables de controlar la transcripción de ADN nuclear necesaria para el desarrollo y la reproducción humana. Se ha sustentado que el Tamoxifeno (**77**) reduce a la proteína quinasa activada por mitogenos en tratamientos de primera línea para pacientes con cáncer de mama metastásico.<sup>108, 109</sup> Este tipo de proteínas tiene un papel importante en cuanto a la transición de señales que regulan la división y diferenciación celular. Dentro de esta familia de quinasas receptoras, cabe resaltar la quinasa de crecimiento epidérmico (EGFR); la cual es importante en el cáncer. Su activación puede deberse a una sobreexpresión, mutaciones que resultan en activación constitutiva o la expresión autocrina del ligando.<sup>110</sup>

La expresión de EGFR se ha estudiado en el cáncer de mama, así como también para el cáncer de ovario,<sup>111</sup> en el cáncer de pulmón,<sup>112</sup> y en el cáncer de próstata. Por lo tanto, aquellos compuestos que sean capaces de inhibir la activación de las EGFR son de interés potencial como nuevos agentes terapéuticos antitumorales. Las tioureas y análogos (ureas), son compuestos orgánicos que contienen átomos de azufre y nitrógeno (en el caso particular de las ureas es oxígeno en lugar de azufre), los cuales han mostrado actividad farmacológica como inhibidores contra las proteínas tirosina quinasa (PTK) y NADH oxidasa, que desempeñan papeles críticos en aspectos de tumorogénesis.<sup>113</sup> Por consiguiente, los compuestos **11-15** fueron candidatos a ensayos de acoplamiento molecular sobre la proteína **3ERT**; a pesar de que dichos compuestos no presentan una similitud estructural a **77** no significa que no tengan una distribución espacial análoga, además, los resultados en cuanto a sus predicciones farmacéuticas fueron favorables y mostraron una bioactividad afín al fármaco de referencia (**77**). A continuación, se muestran los modos unión (**Figura 37 y 38**) de los compuestos **16-20** en el sitio activo de la proteína **3ERT** en compañía de **77**.

<sup>108</sup> Gómez, A.; Erazo-Valle, A. A.; Aldaco, F. *Rev. Esp. Med-Quir.*, **2004**, 9, 1-6.

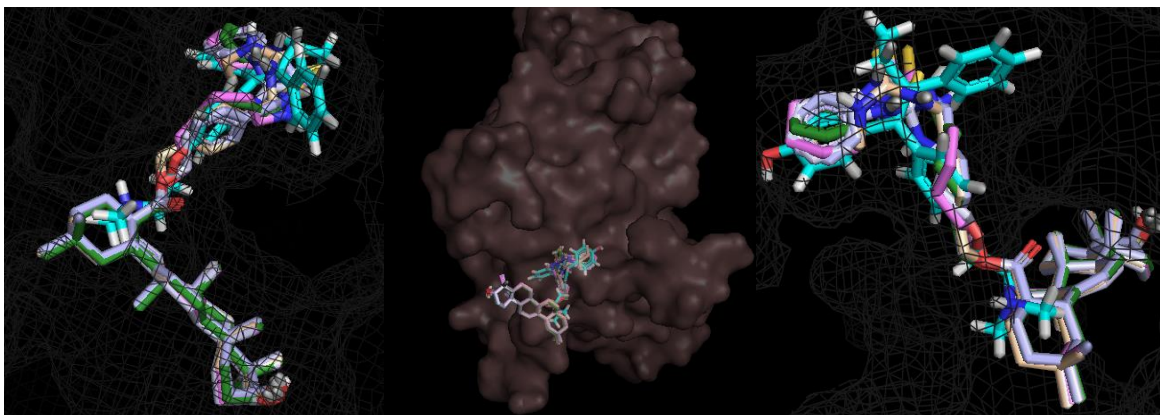
<sup>109</sup> Kurokawa, H.; Arteaga, C. L. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, 4436s-4442s.

<sup>110</sup> Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. *Science.*, **1987**, 253, 177-182.

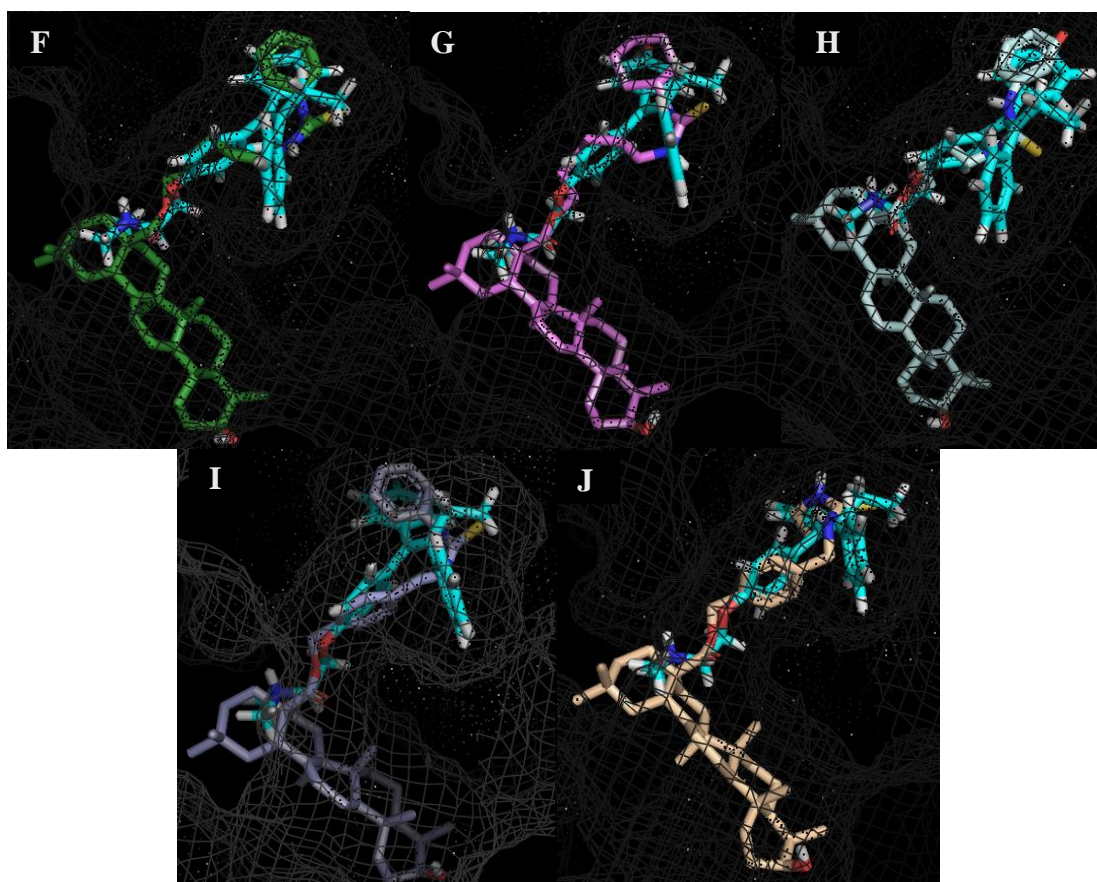
<sup>111</sup> Chang, J.; Ren, H.; Zhao, M.; Chong, Y.; Zhao, W.; He, Y.; Zhao, Y.; Zhang, H.; Qi, C. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 138, 669-688.

<sup>112</sup> Cox, G.; Vyberg, M.; Melgaard, B.; Askaa, J.; Oster, A.; O'Byrne, K. J. *Int. J. Cancer.*, **2001**, 92, 480-483.

<sup>113</sup> Asghar, F.; Lal, B.; Badshah, A.; Butler, I. S.; Tahir, M. N. *Inorganica Chim. Acta.*, **2019**, 488, 8-18.



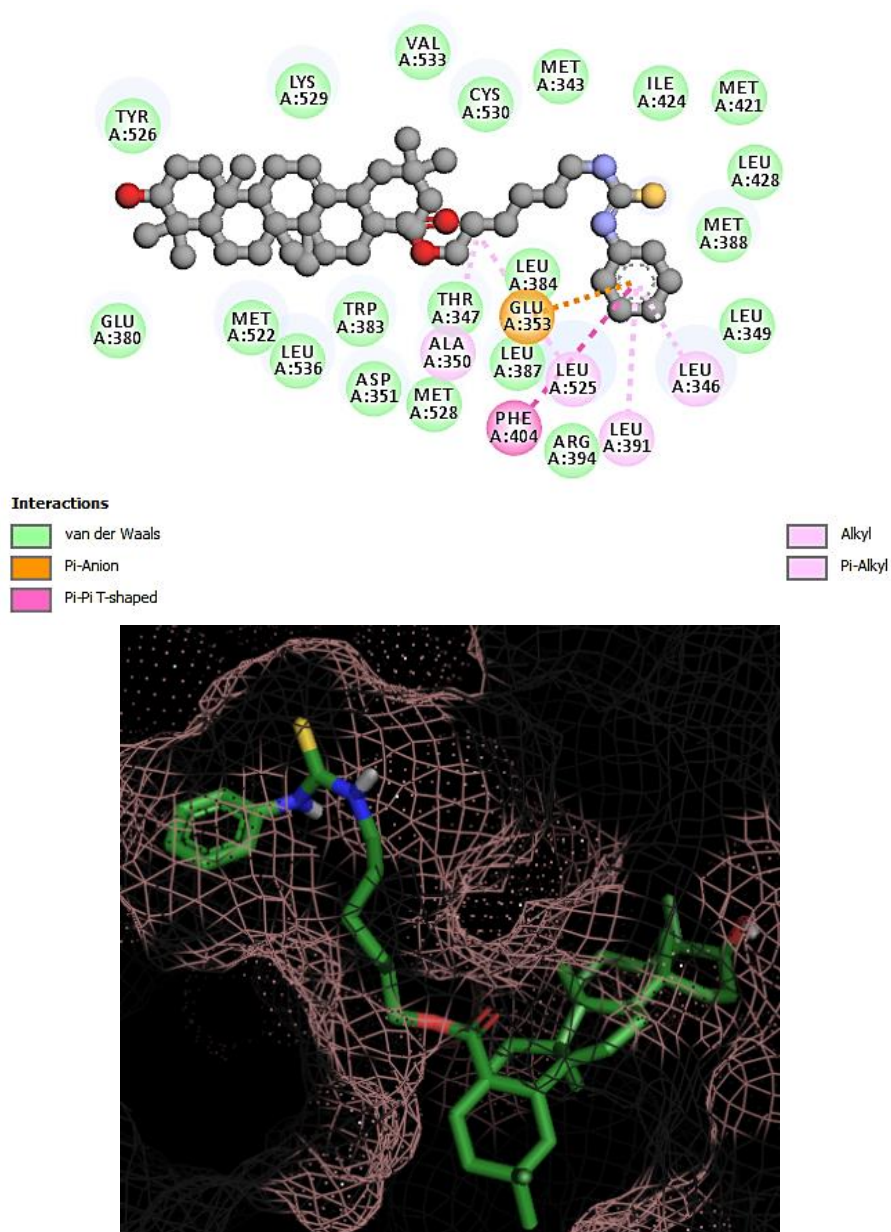
*Figura 37. Distribución espacial de los compuestos 11-15 con 77 (azul-cyan) en el sitio de unión de la proteína 3ERT. By PyMOL.*



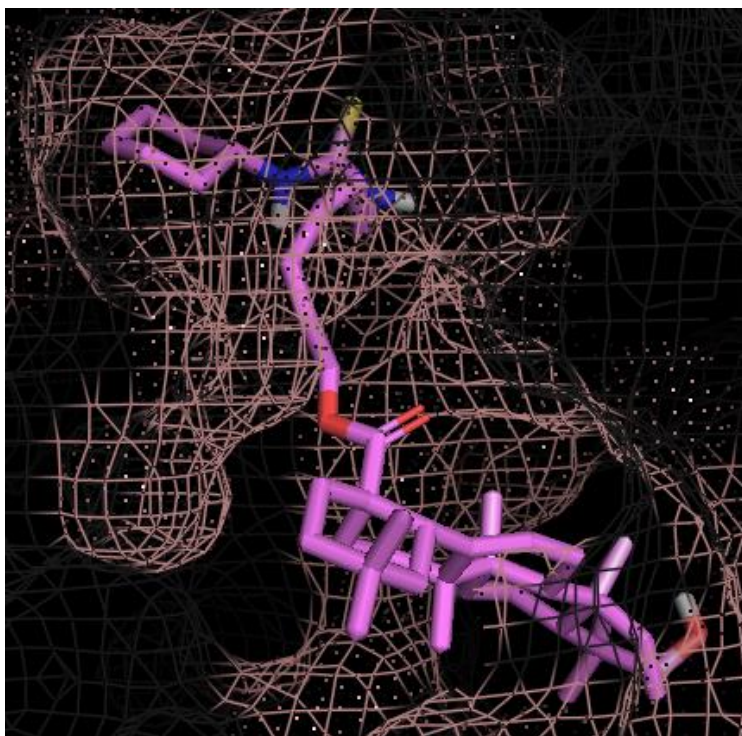
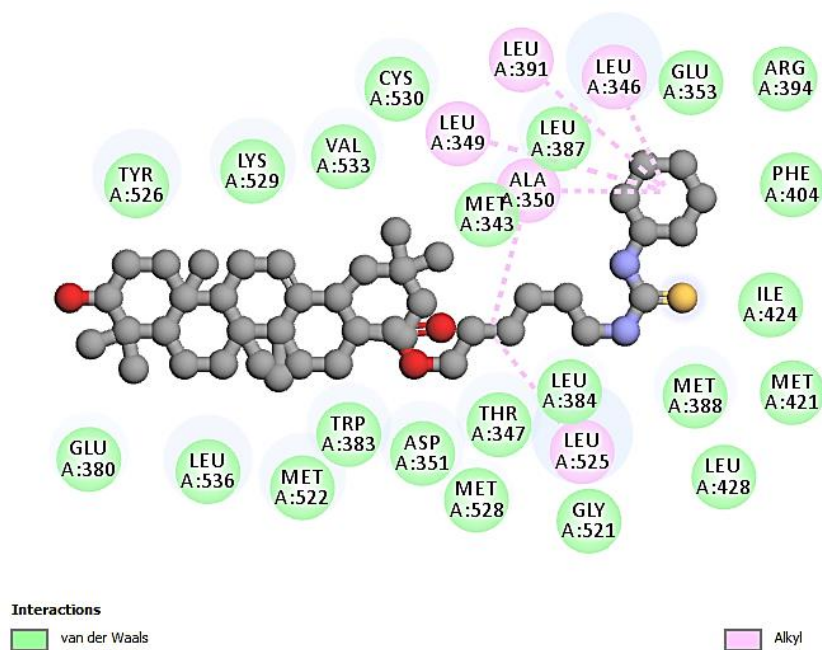
*Figura 38. Modos de unión de todos los compuestos en el sitio de unión de 3ERT, donde 77 (azul-cyan); F= compuesto 11; G= compuesto 12; H= compuesto 13; I= compuesto 14 y J= compuesto 15. By PyMOL.*

## CAPÍTULO II

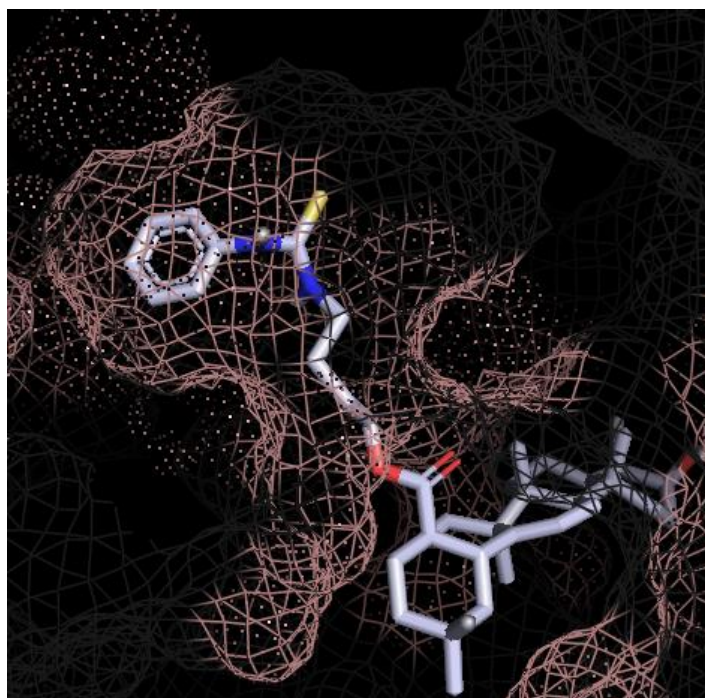
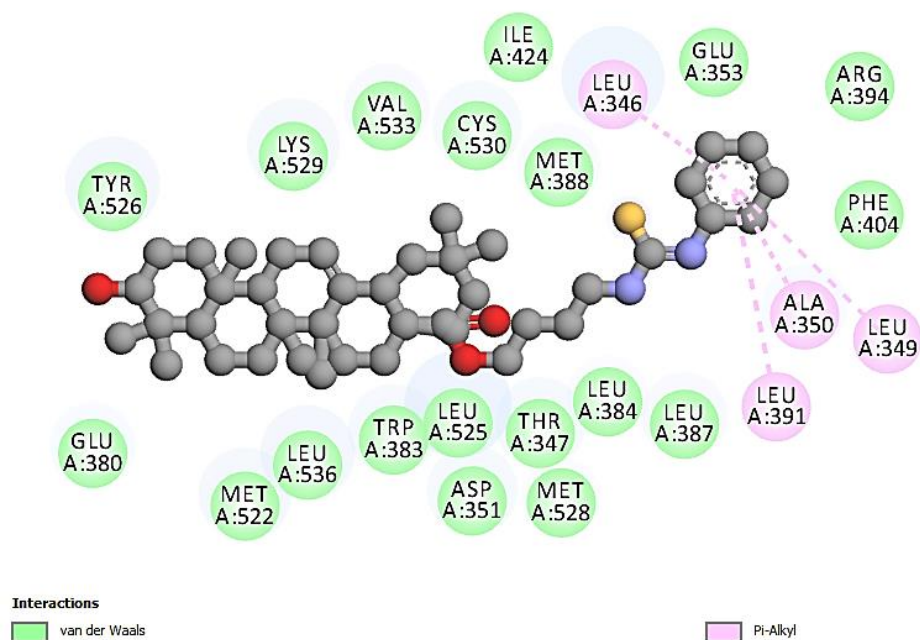
Se observan las poses para los compuestos tioureidos (**11-15**) con respecto al compuesto **77**, se aprecia que la estructura que forma la tiourea para cada compuesto tiene una distribución espacial similar a **77**, propiciando que el esqueleto triterpénico se amolde alrededor de la proteína ejerciendo diferentes interacciones (**Figura 38**). El análisis de *docking* nos brindó las representaciones 2D y 3D de las interacciones proteína-ligando (**Figura 39 a 43**) de los compuestos **11-15**, así mismo, de las mejores energías de acoplamiento (kcal/mol) (**Tabla 13**).



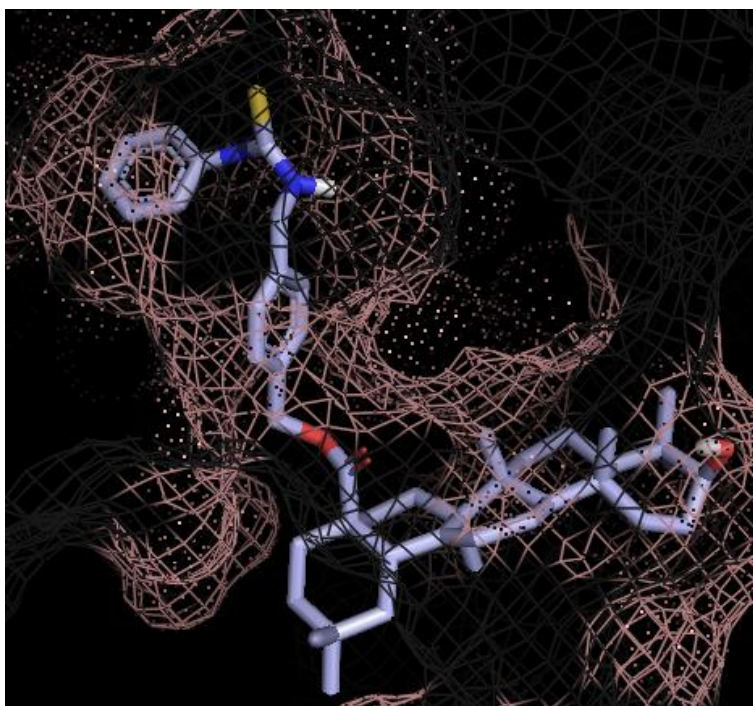
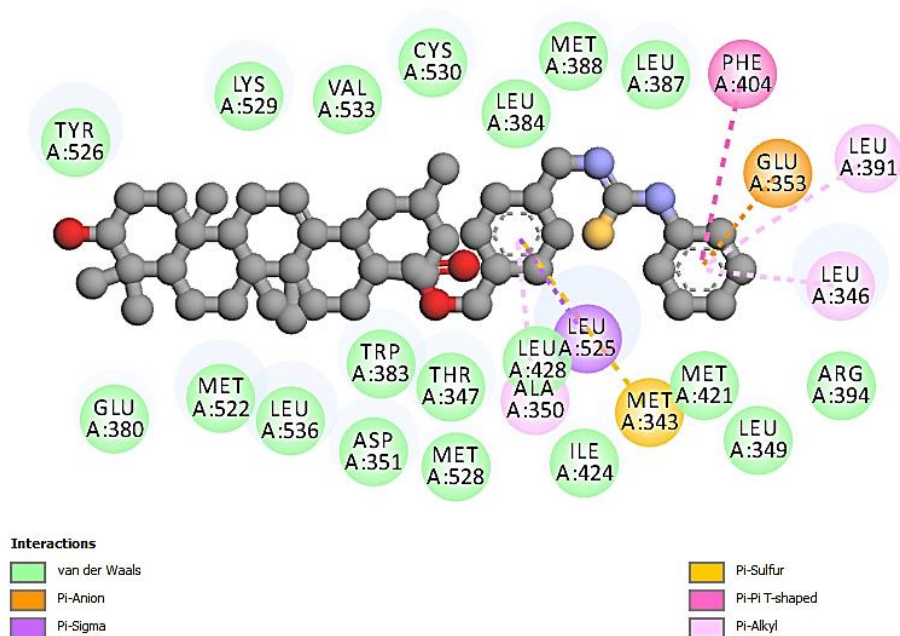
**Figura 39.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **11** con la proteína **3ERT**.



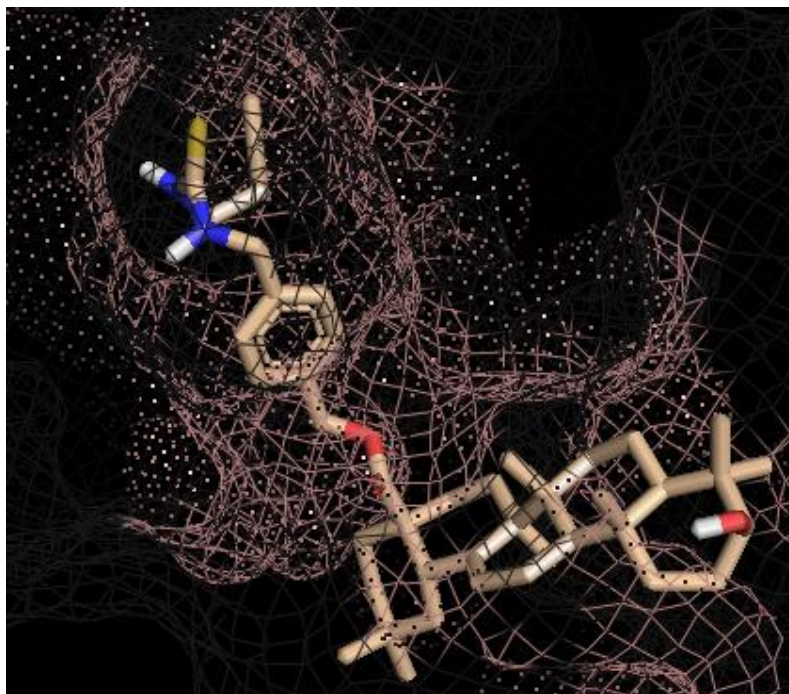
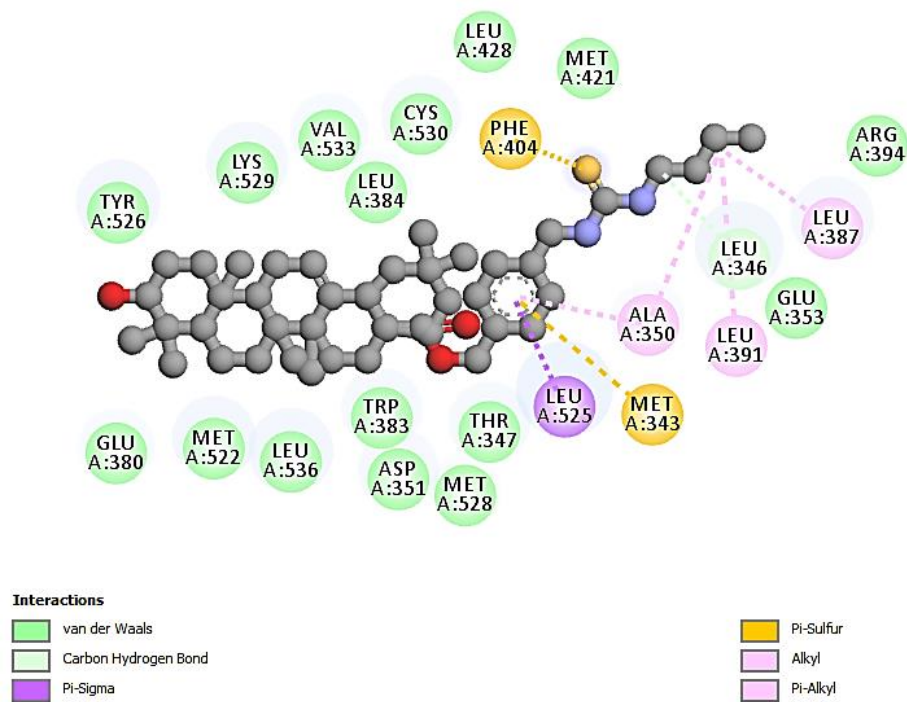
**Figura 40.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **12** con la proteína **3ERT**.



**Figura 41.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **13** con la proteína **3ERT**.



**Figura 42.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto **14** con la proteína **3ERT**.

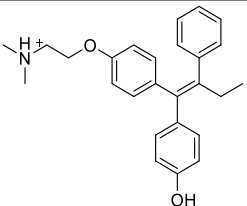
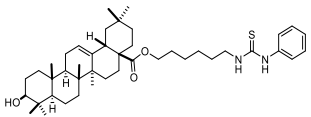
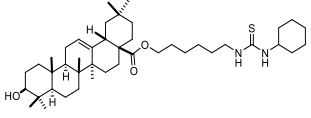
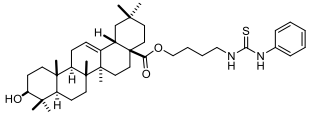
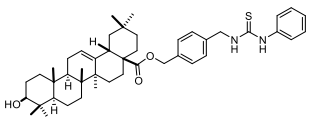


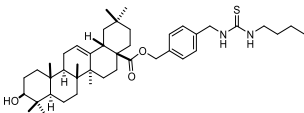
**Figura 43.** Diagrama de 2D (mediante el uso del programa BIOVIA Discovery studio) y 3D (mediante el uso del programa PyMOL) de las interacciones del compuesto 15 con la proteína 3ERT.

## CAPÍTULO II

La diferencia energética de los compuestos **11-15** se atribuye principalmente a sus estructuras triterpénicas, presentando más interacciones de van der Waals que el compuesto **77**; pero para el caso de **12** se tuvo una energía de acoplamiento ligeramente inferior a **77** (-9.9 kcal/mol con respecto a -10 kcal/mol), la cual se puede atribuir al tipo de estructura química que presenta (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Score e interacciones proteína-ligando de los compuestos **11-15** con **77**.

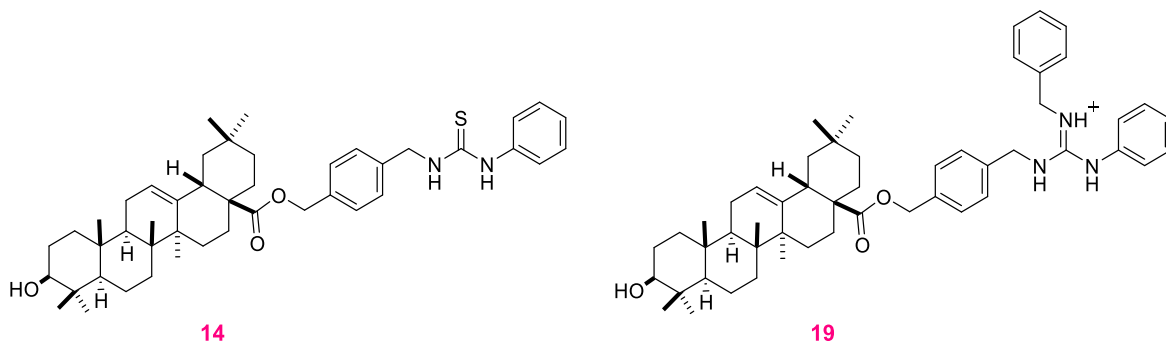
Código	Estructura química	Docking score (kcal/mol)	Interacciones van der Waals	Interacción puente salino	Interacción puente H
<b>77</b>		-10.0	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347 y Trp383	Asp351	Glu353 y Arg394
<b>11</b>		-10.3	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353, Arg394	N/A	N/A
<b>12</b>		-9.9	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353, Arg394	N/A	N/A
<b>13</b>		-10.4	Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353 y Arg394	N/A	N/A
<b>14</b>		-12.3	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353 y Arg394	N/A	N/A

15		-10.7	Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383, Asp351, Glu353 y Arg394	N/A	N/A
----	---	-------	---	-----	-----

Dentro de las interacciones que presenta el Tamoxifeno (**77**) los aminoácidos Met343, Leu346, Ala350, Trp383, Leu387, Leu384, Leu525, Thr347, Trp383 Glu353, Arg384 y Asp351 son importantes para su reconocimiento con la proteína **3ERT**.

Las ilustraciones en 2D de los compuestos **11-15** (**Figuras 39-43**) demuestran que los compuestos presentan contacto con los aminoácidos previamente mencionados, pero dichas interacciones son de diferente naturaleza, en específico son de tipo van der Waals o derivados de (amida-pi, sulfuro-pi y pi-alquil, entre otras);<sup>116</sup> sin embargo para el caso del compuesto **13** no se tiene la interacción con el aminoácido Met343.

En resumen, para los 5 compuestos guanidinos se hace énfasis en el compuesto **19**; y para los 5 compuestos tioureidos el mejor compuesto fue el **14** (**Figura 44**). Esto se debe a que ambos compuestos presentaron las mejores características en cuanto a su estructura química, lo que les permitió una mejor energía de acoplamiento que los demás compuestos y principalmente con la estructura de referencia planteada (**77**); además de que sus predicciones farmacocinéticas fueron favorables y en los diagramas de 2D se aprecia que dichos compuestos tienen las mismas interacciones de aminoácidos que el Tamoxifeno (**77**), siendo moléculas de interés en futuras investigaciones.



**Figura 44.** Compuesto **14** y **19** como probables mejores moléculas de acuerdo los parámetros analizados en el CAPITULO II.

Finalmente, se debe mencionar que los estudios *docking* empleados en el presente capítulo son a partir de predicciones *in silico*, podrían sufrir biotransformaciones y manifestar diferentes interacciones o comportamientos a nivel *in vivo*, por lo que es recomendable realizar pruebas biológicas a los 10 compuestos mencionados, teniendo en cuenta la información recabada en estos estudios.

## CONCLUSIONES

- ✚ Los estudios farmacocinéticos expresan información relevante por el probable comportamiento de los compuestos sintetizados **11-20**. De los 10 compuestos tuvieron resultados prometedores con ligeras variaciones.
- ✚ Mediante el programa Pass se predijo que todos los compuestos tienen actividad biológica relacionada al cáncer y tuvieron un porcentaje de probabilidad más elevado que **77**; a excepción del compuesto **14** que no tuvo alguna probabilidad como antagonista de la integridad de la membrana.
- ✚ Mediante el programa CLC-Pred se predijo la efectividad y selectividad *in silico* de los compuestos sintetizados en líneas celulares cancerígenas; siendo moléculas bioactivas anticancerígenas para los siguientes tejidos: ovario, tejido hematopoyético y linfoide y para el páncreas.
- ✚ Los estudios *docking* de la proteína preparada **3ERT** con los **10** compuestos exhibieron resultados prometedores, por lo que se sugiere la realización de pruebas biológicas. De los 10 compuestos evaluados, **14** y **19** tuvieron resultados más significativos.
- ✚ Se comprobó la capacidad de unión para especies de tioureas al receptor de estrógeno  $\alpha$  en la proteína **3ERT**. Así mismo, que los compuestos **11-15** cuentan con una distribución espacial similar al Tamoxifeno (**77**).
- ✚ Se amplió la relación estructura-actividad de los híbridos del ácido oleanólico con base en estudios *in silico* de nuevas moléculas guanidínicas y tioureidos, los cuales presentan un gran número de interacciones de tipo Van Der Waals en la proteína **3ERT**.

# PARTE EXPERIMENTAL: Cap. I

## Métodos generales

Cada reacción química fue monitoreada mediante **cromatografía en capa fina (TLC)** con fines cualitativos, empleando placas comerciales con gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de grosor, con indicador de fluorescencia (F<sub>254</sub>), soportadas en aluminio.

La revelación de las placas de cromatografía se realizó empleando luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara Mineralight UV-G-54) y la carbonización de la materia orgánica con una disolución de EtOH con 10% de vainillina y 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (revelador de vainillina; 2 g de vainillina y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 100 mL de EtOH)

Los compuestos fueron purificados, haciendo uso de **cromatografía en columna**. Para las cuales se utilizaron columnas de vidrio empacadas con gel de sílice grado 60 (230-400 mallas), empleando diferentes sistemas de gradientes de disolventes orgánicos como eluyentes. Los reactivos que se utilizaron fueron grado analítico y se utilizaron directamente sin purificar. Todos los disolventes se re-destilaron y secaron de acuerdo con las técnicas publicadas en la literatura.<sup>114</sup>

Los **rendimientos porcentuales** de cada reacción química se obtuvieron a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{rendimiento real}}{\text{rendimiento teórico}} \times 100\%$$

---

<sup>114</sup> Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*, 1996, 6, 7-20.

Los espectros de **RMN de  $^1\text{H}$**  y de  $^{13}\text{C}$  junto con los experimentos bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC), se obtuvieron en un equipo Bruker Avance III de 500 MHz equipado con una sonda de gradiente QCI de 5 mm enfriada criogénicamente.

Los disolventes empleados fueron cloroformo-d ( $\text{CDCl}_3$ ) y metanol-d4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Se usó como referencia interna la señal del disolvente residual:  $\text{CDCl}_3$ , *s*, 7.26,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , *s*, 4.87 para RMN de  $^1\text{H}$ , y  $\text{CDCl}_3$ , 77.16,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 49.00 para RMN de  $^{13}\text{C}$ .

El manejo de los FIDs se realizó en el software MestReNova versión 12, obteniendo espectros químicos con los desplazamientos químicos que se expresan en ppm ( $\delta$ ), las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales de los espectros de  $^1\text{H}$  está referida como: *s* para una señal simple, *d* para una señal doble, *dd* para una señal doble de dobles, *ddd* para una señal doble de doble de dobles, *dt* para una señal triple de dobles y *m* para una señal múltiple.

La asignación de las señales de  $^1\text{H}$ -RMN se ha realizado mediante experimentos de COSY (*Correlated Spectroscopy*).

La asignación de las señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN se ha realizado mediante técnicas de correlación Heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ : HSQC ( *$^1\text{H}$  detection mode Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

## Productos comerciales

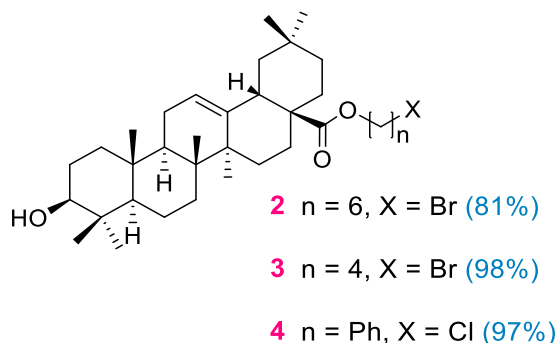
- ✚ Acetato de etilo
- ✚ Acetonitrilo anhidro
- ✚ Ácido oleanólico
- ✚ Ácido sulfúrico
- ✚ Agua deuterada
- ✚ Argón
- ✚ Azida de sodio
- ✚ Bencilamina
- ✚ Bicarbonato de sodio
- ✚ Carbonato de potasio
- ✚ Celita 545
- ✚ Ciclohexano
- ✚ Cloroformo
- ✚ Cloroformo deuterado
- ✚  $\alpha,\alpha'$ -Dicloro-*p*-xileno
- ✚ 1,4-Dibromobutano
- ✚ 1,6-Dibromohexano
- ✚ Diclorometano
- ✚ Dimetilformamida
- ✚ Dimetilformamida anhídrida
- ✚ Etanol
- ✚ Éter dietílico
- ✚ Hexano, mezcla de isómeros
- ✚ Isotiocianato de ciclohexilo
- ✚ Isotiocianato de bencilo
- ✚ Isotiocianato de butilo
- ✚ Metanol
- ✚ Metanol deuterado

## CAPÍTULO I

- ✚ Óxido de mercurio
- ✚ Sulfato de sodio anhidro
- ✚ Tetrahidrofurano
- ✚ Tetrahidrofurano anhidro
- ✚ Trietilamina
- ✚ Trietilamina anhidra
- ✚ Trifenilfosfina
- ✚ Vainillina

## Descripción del trabajo experimental

### Procedimiento general I: compuestos 2-4

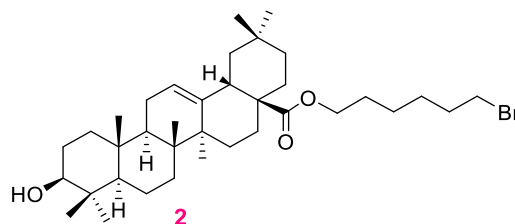


Se disolvieron 200 mg (0.43 mmol) del compuesto **1** con  $K_2CO_3$  (0.43 mmol) en un matraz de fondo redondo en una mezcla de DMF:MeCN (3:1) bajo condiciones anhidras. Posteriormente a la mezcla de reacción se añadió el correspondiente reactivo dihalogenado (10 eq). La disolución resultante estuvo bajo atmosfera de Ar y se mantuvo a una agitación constante durante 3 h con una temperatura de 50 °C. Pasado el tiempo de reacción se vertió agua fría (5 mL). La fase orgánica se extrajo con AcOEt, se lavó con una disolución sobresaturada de  $NaHCO_3$  (3x20mL) y agua destilada (2x20 mL) se secó sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El residuo se percoló al vacío con sílice y un sistema Hex:AcOEt (9:1), proporcionando los compuestos 2, 3 y 4.

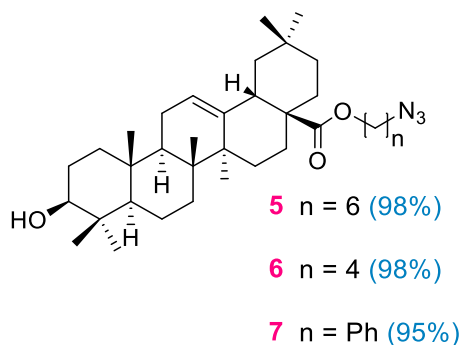
**3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-bromohexilo (2).** Se preparó a partir del OA (200 mg, 0.43 mmol) y 1,6-dibromohexano (0.67 mL, 4.3 mmol) de acuerdo con el procedimiento general I. Rendimiento: 81%, compuesto sólido blanco.

**RMN  $^1H$**  (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 5.27 (1H, *dd*,  $J_{12-11ax} = J_{12-11ec} = 3.7$  Hz, H-12), 4.01 (2H, *td*,  $J_{31-32} = 6.4$ ,  $J_{31-31gem} = 2.4$  Hz, H-31,  $CH_2CH_2$ ), 3.40 (2H, *t*,  $J_{36-35} = 6.8$  Hz, H-36,  $CH_2Br$ ), 3.20 (1H, *m*, H-3), 2.85 (1H, *dd*,  $J_{18-19ax} = 13.9$  Hz,  $J_{18-19ec} = 4.6$  Hz, H-18), 1.12 (3H, *s*, H-27), 0.98 (3H, *s*, H-23), 0.91, 0.77, 0.72 (cada uno 3H, 3*s*, 3 x  $CH_3$ ), 0.89 (6H, *s*, 2 x  $CH_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 177.85 (C-28), 144 (C-13), 122.62 (C-12), 79.1 (C-3), 41.4 (C-18), 64.14 (C-31), 55.3 (C-5), 33.8 (C-36).



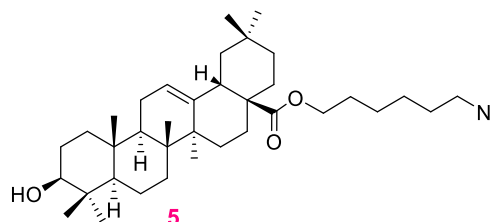
### Procedimiento general II: compuestos 5-7



En un matraz de fondo redondo se agregó uno de los compuestos **2**, **3** o **4** (1 eq) con  $\text{NaN}_3$  (2 eq) en DMF (5 mL). La mezcla se mantuvo en agitación constante a t.a durante 12 h. Posteriormente, se extrajo la fase orgánica con AcOEt, se lavó con una disolución sobresaturada de  $\text{NaHCO}_3$  (5x40 mL) se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. Se observó por TLC la presencia de un solo producto, por lo cual, no se consideró una purificación por columna, proporcionando así los compuestos **5**, **6** y **7**.

**3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-azidohexilo (5)**. Este compuesto se preparó a partir del compuesto **2** (0.354 mmol) y  $\text{NaN}_3$  (0.046 g, 0.7 mmol). Se efectuó de acuerdo con el procedimiento general II. Rendimiento: 98%, compuesto incoloro de consistencia aceitosa.

**RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.20 (1H, *dd*,  $J_{12-11ax} = J_{12-11ec} = 3.8$  Hz H-12), 3.94 (2H, *td*,  $J_{31-32} = 6.5$  Hz,  $J_{31-31gem} = 2.0$  Hz, H-31,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.20 (2H, *dd*,  $J_{36-35} = 7.0$ ,  $J_{36-36gem} = 1.6$  Hz, H-36,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 3.13 (1H, *ddd*,  $J_{3-2ax} = J_{3-2ec} = 5.2$  Hz,  $J_{3-Hvec} = 4.7$  Hz, H-3), 2.78 (1H, *dd*,

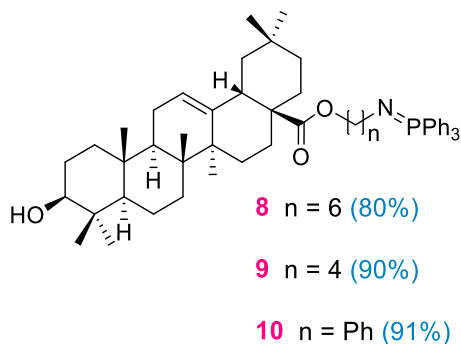


## CAPÍTULO I

$J_{18-19ax} = J_{18-19ec} = 4.4$  Hz, H-18), 1.06 (3H, *s*, H-27), 0.92 (3H, *s*, H-23), 0.86, 0.71, 0.766 (cada uno 3H, 3*s*, 3 x CH<sub>3</sub>), 0.83 (6H, *s*, 2 x CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 177.7 (C-28), 143.9 (C-13), 122.4 (C-12), 78.9 (C-3), 64.0 (C-31), 55 (C-5), 51.3 (C-36), 41.4 (C-18).

## Procedimiento general III: compuestos 8-10



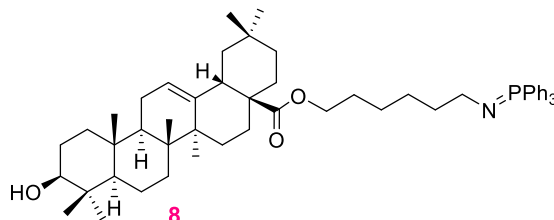
En un matraz de fondo redondo se agregó uno de los compuestos **5**, **6** o **7** (1 eq) con PPh<sub>3</sub> (3 eq) en una mezcla de THF:H<sub>2</sub>O (4:3). Se mantuvo en agitación constante a t.a durante 24 h. Al término de la reacción se adicionó agua fría y se extrajo la fase orgánica con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DCM), se lavó con una disolución sobresaturada de NaHCO<sub>3</sub> (4x25 mL) se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida; posteriormente, se realizaron 2 lavados con éter frío (2x5 mL) dando como resultado los compuestos **8**, **9** y **10**.

**3 $\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oato de 6-[(trifenil-fosfaniliden)imino]hexilo (8)**. Este compuesto se preparó a partir del compuesto **5** (0.38 mmol) y PPh<sub>3</sub> (0.30 g, 1.13 mmol). Se efectuó de acuerdo con el procedimiento general III. Rendimiento: 80%, compuesto sólido blanco.

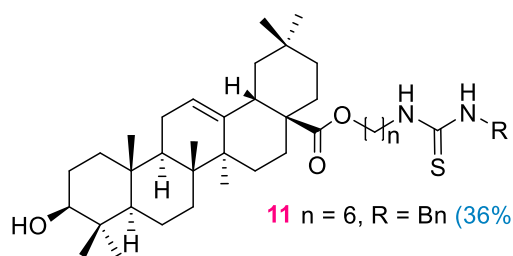
## CAPÍTULO I

**RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz, MeOD:  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.20-7.65 (15H, *m*, Ph), 5.23 (1H, *s*, H-12), 4.01 (2H, *td*,  $J_{31-32} = 11.0$  Hz,  $J_{31-31\text{gem}} = 5.3$  Hz, H-31,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.12 (1H, *ddd*,  $J_{3-2\text{ax}} = J_{3-2\text{ec}} = 11.4$  Hz,  $J_{3-\text{Hvec}} = 4.7$  Hz, H-3), 2.86 (1H, *d*,  $J_{18-19} = 10.2$  Hz, H-18), 2.70 (2H, *t*,  $J_{36-35} = 7.2$  Hz, H-36,  $\text{CH}_2\text{N}=\text{P}$ ), 1.13 (3H, *s*, H-27), 0.95 (3H, *s*, H-23), 0.89, 0.75, 0.73 (cada uno 3H, 3*s*, 3 x  $\text{CH}_3$ ), 0.91 (6H, *s*, 2 x  $\text{CH}_3$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (125 MHz, MeOD)  $\delta$ : 179.67 (C-28), 144.87 (C-13), 123.75 (C-12), 79.83 (C-3), 65.47 (C-31), 56.6 (C-5), 42.73 (C-36), 41.92 (C-18).



## Procedimiento general IV: compuestos 11-15



**11**  $n = 6$ , R = Bn (36%)

**12**  $n = 6$ , R = Cy (35%)

**13**  $n = 4$ , R = Bn (58%)

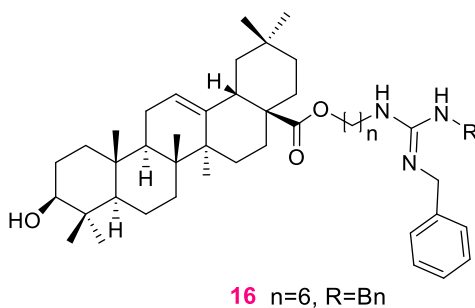
**14**  $n = \text{Ph}$ , R = Bn (46%)

**15**  $n = \text{Ph}$ , R = Bu (48%)

En un matraz de fondo redondo se agregó uno de los compuestos **8**, **9** o **10** (1 eq) y se añadió el isotiocianato correspondiente (3 eq) empleando como base  $\text{Et}_3\text{N}$  (1eq). Se disolvió la mezcla con 5 mL de MeOH y se mantuvo en agitación constante con una temperatura de 40 °C durante 24 h. Posteriormente, se concentró hasta sequedad y el residuo se purificó por cromatografía en columna usando el eluyente indicado en la siguiente tabla. Sin embargo, su correcta caracterización mediante RMN para estos compuestos no se pudo efectuar debido a la suspensión de actividades por la contingencia de marzo 2020.

Compuesto	n	R	Hex:AcOEt
11	6	Bn	7:3
12	6	Cy	8:2
13	4	Bn	7:3
14	Ph	Bn	7:3
15	Ph	Bu	7:3

### Procedimiento general V: compuesto 16



La metodología que se describe a continuación fue la empleada para obtener una reacción de tipo “one pot”; por lo tanto, en un matraz de fondo redondo se mezcló el compuesto **11** (1 eq) con HgO (1 eq) usando como base TEA (0.5 eq) y bencilamina (2.5 eq) en THF anhidro (30 mL) bajo condiciones anhidras. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación bajo la presencia de Ar, aislada de cualquier fuente de luz, durante 4 h a una temperatura de 40 °C. Al término de la reacción se procedió a filtrarlo sobre celita neutra usando DCM:MeOH (40:1) y el filtrado se concentró hasta sequedad. Se purificó mediante lavados de éter frío (3x5 mL). Sin embargo, la caracterización mediante RMN para este compuesto no se pudo efectuar debido a la suspensión de actividades de marzo 2020.

## PARTE EXPERIMENTAL: Cap. II

### Descripción del trabajo experimental

#### Predicción de perfiles farmacocinéticos

Para el uso de los siguientes programas, fue necesario utilizar el correspondiente código *SMILE* de cada compuesto usando *ChemDraw Professional* versión 17.1.0.105 para Windows.

Las características físicas y moleculares de los compuestos son de importancia para la selección de estos agentes como candidatos a fármacos.<sup>115</sup> Las propiedades fisicoquímicas y moleculares de los derivados del ácido oleanólico se analizaron en los servidores en línea de *MOLINSPIRATION*<sup>116</sup> un software de acceso libre que se utiliza como herramienta que proporciona parámetros como *MiLogP*, *TPSA* se mide mediante el procedimiento establecido por el software como una suma de fragmentos. Su utilidad radica en que este parámetro está asociado a la permeabilidad a través de la membrana celular, por su parte: el parámetro *TPSA* está asociado con el potencial de enlace de hidrógeno del compuesto. Otro software utilizados fueron *SwissTargetPrediction*<sup>117</sup> y *SwissADME*;<sup>118-120</sup> ambos programas fueron desarrollados por el Grupo de Modelado Molecular del SIB Instituto Suizo de Bioinformática, y permiten estimar los objetivos macromoleculares más probables de una molécula supuestamente bioactiva.

La predicción se basa en una combinación de similitud 2D y 3D con una biblioteca de 370,000 activos conocidos en más de 3000 proteínas de tres especies diferentes.

---

<sup>115</sup> Daina, A.; Zoete, V. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*, 1-12.

<sup>116</sup> *MOLINSPIRATION*. (s.f.). Obtenido de <http://www.molinspiration.com>

<sup>117</sup> Gfeller, D.; Michielin, O.; Zoete, V. *Bioinformatics.*, **2013**, *29*, 3073-3079.

<sup>118</sup> Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 42717.

<sup>119</sup> Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54*, 1-18.

<sup>120</sup> Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *Chem. Med. Chem.*, **2016**, *11*, 1117-1121.

## CAPÍTULO II

También se utilizó el programa *AdmetSar*<sup>121,122</sup> para validarlos *in silico* como posibles ligandos de acuerdo con sus propiedades farmacocinéticas.

Para seleccionar los compuestos adecuados como candidatos a fármacos, se utilizó un servidor en línea que predice los efectos farmacológicos de cada compuesto, basado en su información estructural. El servidor en línea PASS,<sup>123</sup> es una herramienta que se basa en el análisis de similitud en 2D, comparando a nuestros ligandos con otras moléculas que ya se tienen en la base de datos.

Posteriormente, se utilizó un servidor web para la predicción *in silico* de los efectos citotóxicos de los nuevos derivados del OA ante una amplia variedad de líneas celulares cancerígenas. CLC-Pred,<sup>124</sup> es una herramienta de acceso libre que proporciona una predicción de la citotoxicidad de un compuesto químico para evaluar la relevancia de la sustancia en el cribado experimental. La predicción se basa en la tecnología PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) y sobre la base de datos sobre citotoxicidad recuperados de ChEMBLdb (versión 23).

### Docking molecular

#### Preparación estructural de la proteína.

La estructura en 3D para RE $\alpha$ -LBD fue obtenida desde *Protein Data Bank* (RCSB PDB); se utilizó la estructura con el siguiente **PDB ID: 3ERT** RE $\alpha$ -LBD con su ligando co-cristalizado 4-hidroxitamoxifen (**77**) a una resolución de 1.90 Å. Como la estructura de la proteína es dímera, solo se seleccionó la cadena A para el estudio de acoplamiento. Así mismo, la macromolécula de la proteína fue optimizada, utilizando el campo de fuerza AMBER y un estado de protonación de los grupos ionizables a pH 7 por el método PROPKA,

<sup>121</sup> Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, G.; Tang, Y. *Bioinformatics.*, **2018**.

<sup>122</sup> Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J. W.; Liu, G.; Lee, P.; Tang, Y. *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, *52*, 3099-3105.

<sup>123</sup> Lagunin, A.; Stepanchikova, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. *Bioinformatics.*, **2000**, *16*, 747-748.

<sup>124</sup> Lagunin, A.; Dubovskaja, V. L.; Rudik, A. V.; Pogodin, P. V.; Druzhilovskiy, D. S.; Glorizova, T. A.; Filimonov, D. A.; Sastry, N. G.; Poroikov, V. V. *PLOS-one*, **2018**, *13*, 1-13.

## CAPÍTULO II

usando *Chimera 1.14rc* y el servidor PDB2PQR. El tamaño para la caja de lectura fue de  $x=20$ ,  $y=20$ ,  $z=20$  con el ligando natural (**77**) co-cristalizado en el centro de la caja de simulación.

## Preparación del ligando

La preparación de los ligandos se realizó con las estructuras 2D de cada compuesto usando *ChemDraw Professional* versión 17.1.0.105 para Windows. Las coordenadas 3D de las estructuras fueron generados y optimizados con MM2 implementado en *Chem3D Ultra 13*. Todos los ligandos fueron convertidos en formato PDBQT (entrada para *AutoDock Vina*). Las cargas en los átomos de los ligandos se generaron utilizando el modelo Gasteiger, los hidrógenos no polares se fusionaron y los enlaces rotativos predeterminados se conservaron utilizando la utilidad TORSDOF en *AutoDock Tools 1.5.6*.

Validación del método *Docking*

La validación del método de acoplamiento se realizó mediante un *re-docking* del ligando natural (**77**) con el mismo ligando co-cristalizado de la proteína. La conformación obtenida se alineó con la conformación del ligando original y se evaluó por *Root Mean Square Deviation* (RMSD). El valor de RMSD menor o igual a 2,0 ( $\leq 2,0$  Å) indicó que el método utilizado puede ser confiable y utilizado para acoplar los ligandos de la muestra.<sup>125</sup>

---

<sup>125</sup> Kontoyianni, M.; McClellan, L. M.; Sokol, G. S. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 558-565.

## CAPÍTULO II

### Análisis del *Docking* Molecular

Las simulaciones de acoplamiento molecular, se realizaron utilizando el programa *AutoDockVina*.<sup>126</sup> Los sitios activos de las proteínas se mantuvieron rígidos y sin flexión. El programa *AutoDockVina* predice la conformación adoptada de los ligandos con la unión de la proteína (kcal/mol). Se corrió 25 veces cada ligando en la proteína y se seleccionó la energía de unión más baja con el mayor número de repeticiones como el modo de unión representativo de ese ligando en particular.

### Visualización del *Docking* Molecular

El complejo proteína-ligando se visualizó con *PyMol* y *Discovery Studio Visualizer*<sup>127</sup> con la finalidad de observar las interacciones entre los compuestos sintetizados con los residuos de aminoácidos de la proteína. La energía de enlace ( $\Delta G$ ) obtenida se tabuló y se comparó con el ligando nativo.

---

<sup>126</sup> Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 455-41.

<sup>127</sup> BIOVIA, D. S. (2018). *Discovery Studio Visualizer 4.5*. San Diego: Dassault Systemes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Villarreal-Ibarra, E.; García-López, E.; López, P.; Palma-López, D.; Lagunes-Espinoza, L.; Ortiz-García, C.; Oranday-Cárdenas, A. *Polibotánica*, **2014**, *37*, 109-134.
2. Anulika, N. P.; Ignatius, E. O.; Raymond, E. S.; Osasere, O. I.; Abiola, A. H. *Int. J. Technol. Enhanc. Merg. Eng. Res.*, **2016**, *4*, 2347-4289.
3. Shanmugam, M. K.; Dai, X.; Kumar, A. P.; Tan, B. K. H.; Sethi, G.; Bishayee, A. *Cancer Lett.* **2014**, *346*, 206-216.
4. Cheng, K. G.; Su, C.H.; Huang, J. Y.; Liu, J.; Zheng, Y. T.; Chen, Z. F. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2016**, 1-12.
5. Walter-Pertino, M.; Lopez, C.; Theoduloz, C.; Schmeda-Hirschmann, G. *Molecules*, **2013**, *18*, 7661-7674.
6. Shyu, M.H.; Kao, T.C.; Yen, G.C. *Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 6110-6118.
7. Yan, S.; Huang, C.; Wu, S.; Yin, M. *Tox. In Vit.*, **2010**, *24*, 842-848.
8. Gouverneur, A.; Salvo, F.; Berdaï, D.; Moore, N.; Fourrier-Réglat, A.; Noize, P. *Geriatr. Oncol.*, **2018**, *9*, 15-23.
9. Lobo, N. A.; Shimono, Y.; Qian, D.; Clarke, M. F. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2007**, *23*, 675-699.
10. Yu, C.; Liu, Q.; Chen, C.; Wang, J. *Front. Genet.*, **2020**, *10*, 1-13.
11. Batra, S.; Adekola, K. U. A.; Rosen, S.; Shanmugam, M. *Oncology.*, **2013**, *27*, 460-467.
12. Hanahan, D.; Weinberg, R. *Cell.*, **2000**, *100*, 57-70.
13. Hanahan, D.; Weinberg, R. *Cell.*, **2011**, *144*, 646-676.
14. Kometiani, P.; Liu, L.; Askari, A. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 929-936.
15. Levine, A. J.; Puzio-Kuter, A. M. *Science*, **2010**, *330*, 1340-1344.
16. Webb, B. A.; Chimenti, M.; Jacobson, M. P.; Barber, D. L. *Nat. Rev. Cancer.*, **2011**, *11*, 671-677.
17. Spinazzi, M.; Casarin, A.; Pertegato, V.; Salviati, L.; Angelini, C. *Nat. PROTOCOL*, **2012**, *7*, 1235-1246.
18. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. *CA Cancer J. Clin.*, **2011**, *61*, 69-90.
19. Luna-Ortiz, P.; Flores-Chávez, P.; Martínez-Rosas, M. *Rev. Mex. Anestesiología*, **2014**, *37*, 283-296.
20. Szeto, H. H.; Schiller, P. W. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2669-2679.
21. James, A. M.; Cochemé, H. M.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. *Bio. Chem.*, **2005**, *280*, 21295-21312.
22. Li, N.; Zhan, X. *Wiley Online Library*, **2020**, *00*, 1-28
23. Tornero, D.; Ceña, V.; Jordan, J. *OFFARM*, **2002**, *21*, 98-102.
24. Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. *FEBS J.*, **2007**, *274*, 1393-1418.
25. Matilainen, O.; Quiros, P. M.; Auwerx, J. *Trends. Cell. Biol.*, **2017**, *27*, 453-463.
26. Happe, L.; Strasser, A.; Cory, S. *Cell. Sci.*, **2012**, *125*, 1081-1087.
27. Grimm, S. *Mitochondrion*, **2013**, *13*, 189-194.
28. Boukalova, S.; Rohlenova, K.; Rohlena, J.; Neuzil, J. *Nat.*, **2018**, 613-635.
29. García, V.; González-Moles, M. A.; Martínez, A. *Ad. Odontoestomatol.*, **2005**, *21*, 287-295.
30. Yin, H.; Zhou, Y.; Zhu, M.; Hou, M.; Hou, S.; Li, Z.; Zhong, H.; Lu, J.; Meng, T.; Wang, J.; Xia, L.; Xu, Y.; Wu, Y. *Mitochondrion*, **2013**, *13*, 209-224.
31. Berlinck, R. G.S.; Burtoloso, A. C. B.; Trindade-Silva, A. E.; Romminger, S.; Morais, R. P.; Bandeira, K.; Mizuno, C. M. *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, *27*, 1871-1907.
32. Pollier, J.; Goossens, A. *Phytochemistry*, **2012**, *77*, 10-15.
33. Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 841-850.

34. Li, J.; Guo, W.; Yang, Q. *World J. Gastroenterol*, **2002**, *8*, 493-495.
35. Hao, J.; Liu, J.; Wen, X.; Sun, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 2074-2077
36. Waterbeemd, H.; Gifford, E. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 192-204.
37. Xu, K.; Chu, F.; Li, G.; Xu, X.; Wang, P.; Song, J.; Zhou, S.; Lei, H. *Pharmazie*, **2014**, *69*, 483-495.
38. Ye, Y.; Zhang, T.; Yuan, H.; Li, D.; Lou, H.; Fan, P. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 6353-6363.
39. Siewert, B.; Pianowski, E.; Obernauer, A.; Csuk, R. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 594-625.
40. Mallavadhani, U. V.; Mahapatra, A.; Pattnaik, B.; Vanga, N.; Suri, N.; Saxena, A. K. *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 1263-1269.
41. Reily, C.; Mitchell, T.; Chacko, B. K.; Benavides, G. A.; Murphy, M. P.; Darley-USmar, V. M. *Redox Biol.*, **2013**, *1*, 86-93.
42. Liu, Q. C.; Guo, T. T.; Zhang, L.; Yu, Y.; Wang, P.; Yang, J. F.; Li, Y. X. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *63*, 511-522.
43. Dhanasekaran, S.; Venugopal, D.; Al-Dayyan, N.; Ravinayagam, V.; Mohammed, A. *Saudi J. Bio. Sci.*, **2020**, 1-29.
44. Ralph, S.; Low, P.; Dong, L.; Lawen, A.; Neuzil, J. *Recent. Pat. Anticancer Drug Discov.*, **2006**, *1*, 327-346.
45. Neuzil, J.; Dong, L. F.; Rohlena, J.; Trusksa, J.; Ralph, S. P. *Mitochondrion.*, **2013**, *13*, 199-208.
46. Biasutto, L.; Dong, L. F.; Zoratti, M.; Neuzil, J. *Mitochondrion.*, **2010**, *10*, 670-681.
47. Qian, K.; Chen, H.; Qu, C.; Qi, J.; Du, B.; Ko, T.; Xiang, Z.; Kandawa-Schulz, M.; Wang, Y.; Cheng, Z. *Nanomedicine.*, **2019**, 1-11.
48. Jiang, Z.; Liu, H.; He, H.; Yadava, N.; Chambers, J.; Thayumanavan, S. *Bioconjugate Chem.*, **2020**, *31*, 1344-1353.
49. Shoshan-Barmatz, V.; Ben-Hail, D. *Mitochondrion.*, **2012**, *12*, 24-34.
50. Trnka, J.; Elkalaf, M.; Andel, M. *PLoS One.*, **2015**, 1-14.
51. Nedopekina, D. A.; Gubaidullin, R. R.; Odinkov, V. N.; Maximchik, P. V.; Zhivotovsky, B.; Bel'skii, Y. P.; Khazanov, V. A.; Manuylova, A. V.; Gogvadze, V.; Spivak, A. Y. *Med. Chem. Commun.*, **2017**, *8*, 1934-1945.
52. Spivak, A. Y.; Nedopekina, D. A.; Khalitova, R. R.; Gubaidullin, R. R.; Odinkov, V. N.; Bel'skii, Y. P.; Khazanov, V. A. *Med. Chem. Res.*, **2017**, 1-14.
53. Strobrykina, I. Y.; Belenok, M. G.; Semenova, M. N.; Semenov, V. V.; Babaev, V. M.; Rizvanov, I. K.; Mironov, V. F.; Kataev, V. E. *J. Nat. Prod.*, **2015**, 1-9.
54. Locatelli, C.; Filippin-Monteiro, F. B.; Creczynski-Pasa, T. B. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *60*, 233-239.
55. You, B. R.; Moon, H. J.; Han, Y. H.; Park, W. H. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, *48*, 1334-1340.
56. Noritake, S.; Shibata, N.; Nomura, Y.; Huang, Y.; Matsnev, A.; Nakamura, S.; Toru, T.; Cahard, D. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3599-3604.
57. Rozas, I.; Sánchez-Sanz, G.; Alkorta, I.; Elguero, J. *J. Phys. Org. Chem.*, **2013**, *26*, 378-385.
58. Trujillo, C.; Previtali, V.; Rozas, I. *Theor. Chem. Acc.*, **2016**, 260-266.
59. Xiao, J.; Chen, R.; Pawlicki, M.; Tolbert, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 13616-13618.
60. Jadhav, V. D.; Herdtweck, E.; Schidtchen, F. P. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 6098-6109.
61. Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**, *60*, 598-607.
62. Diez-Cecilia, E.; Carson, R.; Kelly, B.; Schaebybroeck, S. M.; Rozas, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 4287-4292.
63. Dardonville, C.; Caine, B. A.; De-la-Fuente, M. N.; Herranz, G. M.; Mariblanca, B. C.; Popelier, P. L. A. *New J. Chem.*, **2017**, *41*, 11016-11028.
64. Berlinck, R. G. S.; Trindade-Silva, A. E.; Santos, M. F. C. *Nat. Prod. Rep.*, **2012**, *29*, 1369-1484.
65. Ishikawa, T. *Superbases for Organic Synthesis*, **2009**, John Wiley & Sons, Ltd, 93-143.
66. Previtali, V.; Trujillo, C.; Amet, R.; Zistetet, D. M.; Rozas, I. *Med. Chem. Commun.*, **2018**, *9*, 735-743.
67. Biedermann, D.; Eignerova, B.; Hajduch, M.; Sarek, J. *Synthesis*, **2010**, *22*, 3839-3848.

68. Sousa, J. L. C.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, A. M. S. *Molecules*, **2019**, *24*, 355-390.
69. Moriarty, R. M.; Khosrwhshahí, J. S. *Synth. Commum.*, **1987**, *17*, 89-94.
70. Ortega-Muñoz, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Reyes-Berbel, E.; Mut-Salud, N.; Hernández-Mateo, F.; Rodríguez-López, A.; Garrido, J. M.; López-Jaramillo, F. J.; Santoyo-González, F. *ACS Omega*, **2018**, *3*, 11455-11468.
71. Chen, H. M.; Li, G.; Cao, L. H. *J. Chin. Chem. Soc.*, **2008**, *55*, 474-478.
72. Crowther, A. F.; Curd, F. H. S.; Richardson, D. M.; Rose, F. L. *J. Chem. Soc.*, **1948**, 1636-1645.
73. Pulka-Ziach, K.; Antunes, S.; Perdriaun, C.; Kauffmann, B.; Pasco, M.; Douat, C.; Guichard, G. *J. Org. Chem.*, **2018**, *83*, 2530-2541.
74. Thomas, S. J.; Balónová, B.; Cinatl, J.; Wass, M. K.; Serpell, C. J.; Blight, B. A.; Michaelis, M. *J. Med. Chem.*, **2020**, *15*, 349-353.
75. Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. *Magn. Reson. Chem.*, **2003**, *41*, 636-638.
76. Rypkema, H.; Sinha, A.; Francisco, J. *J. Phys. Chem.*, **2015**, 1-8.
77. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. En *Organic Chemistry*, **2012**, New York: Oxford University Press Inc, 205-207.
78. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. En *Organic Chemistry*, **2012**, New York: Oxford University Press Inc, 353-354.
79. Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 841-850.
80. Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. *Edu. Química*, **2017**, *28*, 51-58.
81. Hansch, C.; Muir, R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Geiger, E.; Streich, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2817-2824.
82. Medina-Franco, J. L.; Fernández-de-Gortari, E.; Naveja, J. J. *Edu. Química*, **2015**, 1-7.
83. Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **2018**, *21*, 124-134
84. Medina-Franco, J. L.; López-Vallejo, F.; Castillo, R.; *Edu. Química*, **2006**, *28*, 51-58.
85. Scior, T.; Bernard, P.; Medina-Franco, J. L.; Maggiora, G. M. *Med. Chem.*, **2007**, *7*, 851-860.
86. Talele, T. T.; Khedkar, S. A.; Rigby, A. C. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2010**, *10*, 127-141.
87. Prieto-Martínez, F. D.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J. L. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **2018**, *21*, 65-87.
88. Salisbury, J. P.; Williams, J. C.; *Bioinformatics*, **2009**, *3*, 303-307.
89. Cotterill, J. V.; Palazzolo, L.; Ridgway, C.; Price, N.; Rorije, E.; Moretto, A.; Peijnenburg, A.; Eberini, L. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2019**, *378*, 1-9.
90. Forsare, C.; Bendahl, P. O.; Moberg, E.; Jorgensen, C. L. T.; Jansson, S.; Larsson, A. M.; Aaltonen, K.; Rydén, L. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 2885-2898.
91. Kovács, T.; Szabó-Meleg, E.; Ábrahám, I. M. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 3177-3192.
92. Psarra, A. M. G.; Sekeris, C. E. *Biochim. Biophys Acta*, **2008**, 1-11 .
93. Kumar, R.; Zakharov, M. N.; Khan, S. H.; Miki, R.; Jang, H.; Toraldo, G.; Singh, R.; Bhasin, S.; Jasuja, R. *J. of Amino Acids.*, **2011**, 1-7.
94. Puranik, N. V.; Srivastava, P.; Bhatt, G.; John-Mary, D. J. S.; Limaye, A. M.; Sivaraman, J. *Nat.*, **2019**, *9*, 1-11.
95. Jordan, V. C. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2007**, *99*, 350-356.
96. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. *Cell.*, **1998**, *95*, 927-937.
97. Hsu, H. C.; Chu, N. M.; Kao, S. H. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, *18*, 1713-1730.
98. Pang, X.; Fu, W.; Wang, J.; Kang, D.; Xu, L.; Zhao, Y.; Liu, A. L.; Du, G. H. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 1-11.
99. Lasso-Vega, M. C.; Zapater, P.; Such, J.; Sola-Vera, J.; Payá, A.; Horga, J. F.; Mateo-Pérez, M. *Gastroenterol. Hepatol.*, **2002**, *25*, 247-250.

- 100.Khabnadideh, S.; Rezaei, Z.; Khalafi-Nezhad, A.; Pakshir, K.; Roosta, A.; Baratzadeh, Z. *AIAMC.*, **2008**, *7*, 215-218.
- 101.Osborne, C. K. *J. Med.*, **1998**, *339*, 1609-1618.
- 102.Novoa-Vargas, A. *Ginecol. Obstet. Mex.*, **2014**, *82*, 613-622.
- 103.Hannibal, C. G.; Cortes, R.; Engholm, G.; Krüger-Kjaer, S. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica.*, **2008**, *87*, 1353-1360.
- 104.Ananth, A. H.; Manikandan, N.; Rajan, R. K.; Elancheran, R.; Lakshmithendral, K.; Ramanathan, M.; Bhattacharjee, A.; Kabilan, S. *Chem. Biodiversity.*, **2020**, *17*, 2-14.
- 105.Shlau, A. K.; Bastard, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. *Cell.*, **1998**, *95*, 927-937.
- 106.Bassyouni, F.; Hefnawi, M. E.; Rashed, A. E.; Rehim, M. A. *Drug Des.*, **2017**, *6*, 1-6.
- 107.Zauhar, R. J.; Colbert, C. L.; Morgan, R. S.; Welsh, W. J. *Biopolymers.*, **2000**, *53*, 233-248.
- 108.Gómez, A.; Erazo-Valle, A. A.; Aldaco, F. *Rev. Esp. Med-Quir.*, **2004**, *9*, 1-6.
- 109.Kurokawa, H.; Arteaga, C. L. *Clin. Cancer Res.*, **2001**, 4436s-4442s.
- 110.Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; Mcguire, W. L. *Science.*, **1987**, *253*, 177-182.
- 111.Chang, J.; Ren, H.; Zhao, M.; Chong, Y.; Zhao, W.; He, Y.; Zhao, Y.; Zhang, H.; Qi, C. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *138*, 669-688.
- 112.Cox, G.; Vyberg, M.; Melgaard, B.; Askaa, J.; Oster, A.; O'Byrne, K. J. *Int. J. Cancer.*, **2001**, *92*, 480-483.
- 113.Asghar, F.; Lal, B.; Badshah, A.; Butler, I. S.; Tahir, M. N. *Inorganica Chim. Acta.*, **2019**, *488*, 8-18.
- 114.Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*, **1996**, *6*, 7-20.
- 115.Daina, A.; Zoete, V. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20*, 1-12.
- 116.*MOLINSPIRATION*. (s.f.). Obtenido de <http://www.molinspiration.com>
- 117.Gfeller, D.; Michielin, O.; Zoete, V. *Bioinformatics.*, **2013**, *29*, 3073-3079.
- 118.Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 42717.
- 119.Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54*, 1-18.
- 120.Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. *Chem. Med. Chem.*, **2016**, *11*, 1117-1121.
- 121.Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, G.; Tang, Y. *Bioinformatics.*, **2018**.
- 122.Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J. W.; Liu, G.; Lee, P.; Tang, Y. *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, *52*, 3099-3105.
- 123.Lagunin, A.; Stepanchikova, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. *Bioinformatics.*, **2000**, *16*, 747-748.
- 124.Lagunin, A.; Dubovskaja, V. L.; Rudik, A. V.; Pogodin, P. V.; Druzhilovskiy, D. S.; Glorizova, T. A.; Filimonov, D. A.; Sastry, N. G.; Poroikov, V. V. *PLOS-one*, **2018**, *13*, 1-13.
- 125.Kontoyianni, M.; McClellan, L. M.; Sokol, G. S. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 558-565.
- 126.Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 455-41.
- 127.BIOVIA, D. S. (2018). Discovery Studio Visualizer 4.5. San Diego: Dassault Systemes.