



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Diseño *in silico* y semisíntesis de derivados de ácido ursólico  
e isatina con actividad antiinflamatoria”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. en C. Maritza Leonor Maldonado Santiago**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Laura P. Alvarez Berber**

Cuernavaca, Morelos

Noviembre, 2020

**DR. JEAN MCHÉL GRÉVY MACQUART  
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS  
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “**Diseño *in silico* y semisíntesis de derivados de ácido ursólico e isatina con actividad antiinflamatoria**” que presenta la alumna **Maritza Leonor Maldonado Santiago (5620140901)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas IQ-UNAM	APROBADO	
Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez CIBIS-IMSS	APROBADO	
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Cesar Millán Pacheco Farmacia-UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Laura Patricia Alvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2020-10-28 16:11:25 | Firmante**  
 PW+B3kCG2jBMml16TISVEaMzC8qBZr19bdkiosfXuVC+TpOLvoBjsPPiX1mhQitODIzfyOc++1VNA5harvBA+beJVO5k99XWSZwiyOmpdtJ0BgtmskE3UK7mmgnlb/JzCE+tlCD6368BYoxlPjJkNR1cmt+FiQJaZ6bykbgT6ewPYwOiOnpxD1Zk5twR7pkE3CUr/IQOGx7NXpRqReYNNzQWosiYyng6yQqgnHlv1ZMux+duWzZSNrHEGRlQ/BOY9SjIM5PIU6pwoBOMpiCI8yui3G7E6v56oa8XDSM6el4cnk5b2D/MQailU5H1Ey9bb+d0ex/B3dvsj6A==

**LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2020-10-28 16:13:44 | Firmante**  
 RZjgJAM2t0K6J047AJZp2tjvsv6vGJ8KbA8A19WnxPZXSnA9phE/nyQAFWUURVuKTw+XWnroAUG8HM8GwhD0VhW2Lhe7vp5I4RbTQ2eFwAhMwrlwB7vliUrxnbymt54lg93T4YGa/z7JdO7dQsTaL+IW6KkJXRtPV1ds7nTzJZZC161U/q55eZ2SgcPQpuCwC/cKag9R2NqieFqZNNrfqLmsdzeYKNpYc0givyK98y7zsk8r4DG3rr2LtcQsweq/y8OciEA7NypuKVSNwRAH4Lde4FncvUn+8Y8xIw89InSdtWLBtWQ3slnpKpjuq4sqYBoUo5hnsagtyl+A==

**ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2020-10-28 16:42:42 | Firmante**  
 ToCrFgK24G2eRODS0HjHz8Sj7vSUDWWhnZTiMppvlwPbacwa0Hg1FoH6+NO2Y3j058ih8RzeD48vC9Zbvfw3MNGBNxRBCG17VSzgbp3+DalqJsznx9dn+c69uW/C6+sPI88Uw6JG1Jy32OqNhcMXOC2lQqY2cFLz6jOmSqt7Aax7vq2e1//FEZREMg723TD8CYShT7UHVdyZDYPBB7cfomDfjPZINr1PciU5DE9dJpXqQy7FJNiimBRLOCoYEN/+4+5imrt/7v8WF+ra/ezy8RNUk5O8QSUF7gEl6PFELPjFJilgw52dDzARsUuYa06jaHfDkUl+BWQRDYUKg==

**HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA | Fecha:2020-10-28 17:03:15 | Firmante**  
 aGs/WY4F8j6m0BxTct8GI21pagcTYDIEvYhihSfKyhTPP8LGD8KVDfKzsZ7Ut8J+MW35Ja5Cdo2ToCgW8qp7nbij6PT5ZBNC+uu7ulUexLhggWdfl+0fo7LPaOdINBjtYJIGz4LC8A5HV0U6O9pEvmc/9RAJgXP7iN2zLQ1mNXfB9BIBf2gEJiJIMq1s0pUy9ZdbfCrkdiJMSq9xp+YytaVWgk88HIG1wFuc12bUGEj+8jeTrCJh7XFx25mFBpLs+crJvq9FRE8y72gisLz44u5GijqRA7ZuvybkqmdTpApfWJF13LNMht2F5uYXqalGFFcm8JdYdwn4g==

**CESAR MILLAN PACHECO | Fecha:2020-10-30 07:36:57 | Firmante**  
 bQ+zxnx1HhORFYR04t0rSVTB6H7jqcF4JvY5Fey1nBYhSqqZugLmEn2y9FgE7mYWRZMxH0+Vr/ablxRVknfrhizVlp8eS0yI00gxGGRYy6ty1P3ih/rzjq7UkxEo9jqvmtKxLLY8OsK8nGGzDq6TpidU0JLi0OJNMJJaR97yvMCm+Til8VRJZGjXUHT468b6211MeiSisOP1gNXYDed2FkEyEETpFTb3zPQBfOUdu5vikaDUja40cCZS2HbwkZLNkedcPLZE++yoW68toP+DZdYV/OOg0Vb/xiqE4YATeJFIQhXZHOJpv+alMVuhRjXqAfw/Yvkz6P2eVpTiQ==

**RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2020-11-01 10:29:42 | Firmante**  
 bR/DjHpkNxFvTJHmLNQeWzyczl7Oee66xfxbR2xHvpXDcPM5Fjg8KXcHAZ+Qx2OrTOjI7z5RLJ/b8kmFzWLFiGri37saWZy0ifP5gs/cs6feUuwp0YLHs0lgn073CqRj3Ywv9dNefWzdVAwDoE+7i+zV3E4pr10RKI8Apub0J5u9PkMj6Us7zwWeGp4IExsFW/WonuWU9SALoEGZZIQD/zhY3iUgO7YT7dM+KIBjkH5H+ORD65uW7G+PPSLbbid8raB/dst3nC6jg72oKR+X5NykEmmlf0c2Var5d/+oLjDCW3R11UwrHMTzBBSmm+mBgNwid1VYdQghkww==

**EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS | Fecha:2020-11-16 18:04:29 | Firmante**  
 MnVIRQRs+r+DeIwGEO5ht7nAsm1mj7IV5ixkZ/CVWGX0ziQlmvNEqzxOJjgSTquJZ4zSd20cZPZOYiWQD8psnbHag2HdB4/1iH4rrzOAOEgNgdHZ3PwRlR/Lk5Dmg/q2IfkayTKwvB0ekrsIacMOESjp7nbzQWIT3OZhO03wOj0AduP1hM5ub4MilCzpcapzFhzZpk2KgVYg3jPY+a1hTOyl+Pr5F191T1nujWWAzR9sGeDX1rhF0Y1w82a5EF5vGv9OgKqtPALPMwnFxDj6/u+0juvCT1EU5PHP1eeUHXSgpTE14oEEmqssLGY4ZIXvx6MhYv9pciDBHO7mth0w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



cWf7XJ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/o1hBRyZMXAbM4JXRMPBalnNjTOQCTyGf>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

La realización de este proyecto fue posible gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 305319, así como al apoyo financiero parcial de CONACyT para el proyecto de Ciencia Básica CB240801 y el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LN294406).



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química de Productos Naturales 321 del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra. Laura Patricia Alvarez Berber.

La determinación de la inhibición enzimática COX-1 y COX-2 fue realizada bajo la dirección de la Dra. María Crystal Columba Palomares.



El efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS fue realizado bajo la dirección del Dr. Israel Hurtado Díaz en colaboración con el laboratorio 13 de Inmunidad Innata de la Facultad de Farmacia (UAEM) dirigido por la Dra. Judith González Christen.

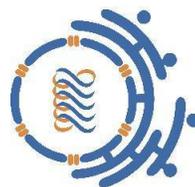


La parte teórica de este proyecto fue realizada bajo la dirección del Dr. Rodrigo Said Razo Hernández del Centro de Investigación en Dinámica Celular. El acoplamiento molecular con el ADN se trabajó en colaboración con el Dr. Ángel Santiago del CIDC.



## Integrantes del Jurado:

Presidente:	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas	IQ – UNAM
Secretario:	Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña	CIQ- UAEM
Vocal:	Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez	CIBIS-IMSS
Vocal:	Dra. Carmen Nina Pastor Colón	CIDC-UAEM
Vocal:	Dr. Cesar Millán Pacheco	Farmacia-UAEM
Suplente:	Dr. Rodrigo Said Razo Hernández	CIDC-UAEM
Suplente:	Dra. Laura Patricia Alvarez Berber	CIQ- UAEM



Este trabajo generó la siguiente publicación:

Maldonado-Santiago, Maritza; Santiago, Ángel; Pastor, Nina; Alvarez, Laura and Razo-Hernández, Rodrigo Said. Isatin derivatives as DNA minor groove-binding agents: a structural and theoretical study. *Structural Chemistry*, **2020**, 31,1289–1307.

## DEDICATORIAS

A MI ESPOSO

Oscar Torres Cruz

A MIS HIJOS

Leonora y Leonardo André

A MIS PADRES

Aristeo Maldonado Bahena

Teresa Santiago Rojas

A MIS HERMANOS

Isa, Guille, Javi, Yuri, Josué, Emily y Joyce

A MIS SOBRINAS

Frida y Natalia

# Contenido

Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas.....	XXI
Abreviaturas.....	XXIV
Resumen.....	XXVI
Capítulo 1. Antecedentes.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes generales.....	8
1.2.1. Inflamación.....	8
1.2.2. Agentes antiinflamatorios.....	11
1.2.2.1. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	11
1.2.2.2. Los glucocorticoides.....	13
1.2.2.3. Compuestos de origen natural con actividad antiinflamatoria.....	13
1.3. Actividad antiinflamatoria del ácido ursólico.....	14
1.3.1. Posibles mecanismos de acción antiinflamatoria atribuidos al ácido ursólico.....	15
1.3.2. Derivados semi-sintéticos del ácido ursólico con actividad antiinflamatoria.....	17
1.4. Química del ácido ursólico.....	21
1.5. Isatina.....	25
1.6. Diseño y desarrollo de fármacos.....	26
1.6.1. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).....	26

1.6.2. Estrategias generales de los métodos computacionales.....	27
Justificación.....	28
Hipótesis .....	29
Objetivos .....	29
Objetivo general .....	29
Objetivos particulares .....	30
Capítulo 2. Evaluaciones <i>in silico</i> para isatina .....	33
2.1. Introducción.....	33
2.2. Detalles computacionales .....	33
2.2.1. Obtención del modelo matemático QSAR.....	33
2.2.1.1. Búsqueda de moléculas .....	33
2.2.1.1.1. Construcción y optimización de la geometría molecular .....	36
2.2.1.2. Cálculo de descriptores moleculares .....	36
2.2.1.3. Obtención del modelo matemático QSAR .....	41
2.2.1.4. Validación estadística del modelo QSAR .....	41
2.2.2. Análisis de similitud molecular .....	42
2.2.3. Acoplamiento molecular .....	45
2.2.4. Evaluación de los híbridos ácido ursólico (AU)-isatina en el modelo QSAR generado .....	46
2.3. Resultados y discusión.....	47
2.3.1. Análisis QSAR para los derivados de isatina en la línea celular Hela .	47
2.3.2. Análisis de similitud molecular .....	56

2.3.3. Análisis del acoplamiento molecular.....	58
2.3.4. Análisis de los resultados obtenidos de la evaluación de los híbridos ácido ursólico (AU)-isatina en el modelo QSAR .....	69
2.4. Conclusiones.....	72
Anexo Capítulo 2.....	74
Capítulo 3. Acoplamiento molecular para ácido ursólico y sus derivados.....	105
3.1. Introducción.....	105
3.2. Detalles computacionales .....	105
3.2.1. Construcción y optimización de la geometría molecular (M1-M13) ...	105
3.2.2. Metodología de acoplamiento molecular serie de compuestos M1-M13 .....	105
3.2.3. Análisis de similitud molecular en los programas Spartan y Dragon.	107
3.2.4. Acoplamiento molecular para los compuestos D1- D11 .....	108
3.3. Discusión y resultados .....	110
3.3.1. Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos de la serie M1-M13. ....	110
3.3.1.1. Formación de complejos con acoplamiento molecular flexible ...	111
3.3.1.2. Análisis de similitud molecular para los derivados de ácido ursólico de la serie M1-M13. ....	121
3.3.2. Análisis de resultados del acoplamiento molecular para los compuestos de la serie D1-D11 .....	124
3.4. Conclusiones.....	130

Capítulo 4. Purificación y semisíntesis de ácido ursólico y sus derivados. ....	133
4.1. Introducción.....	133
4.2. Resultados y discusión.....	133
4.2.1. Metodología de obtención del ácido ursólico.....	133
4.2.2. Identificación del ácido (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oico (1).....	134
4.2.3. Procedimientos de semisíntesis .....	136
4.2.3.1. Semisíntesis del compuesto M7 .....	136
4.2.3.1.1. Identificación del compuesto (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7) .....	137
4.2.3.2. Escisión radicalaria-oxidación .....	138
4.2.3.2.1. Identificación de productos derivados de la escisión radicalaria-oxidación del (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7).....	141
4.2.3.3. Reducción.....	142
4.2.3.3.1. Identificación del compuesto D1 .....	143
4.2.3.3.2. Identificación del compuesto D1' .....	146
4.3. Procedimientos experimentales .....	148
4.3.1. Información general .....	148
4.3.1.1. Reactivos y reacciones .....	148
4.3.2. Recolección de la especie vegetal fuente de ácido ursólico.....	149
4.3.3. Preparación del material vegetal .....	149
4.3.4. Obtención de la mezcla ácido ursólico-ácido oleanólico.....	150

4.3.5. Oxidación de la mezcla natural de ácido ursólico y ácido oleanólico con ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico (AMCPB).....	151
4.3.6. Procedimientos de semisíntesis .....	152
4.3.6.1. Semisíntesis de (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7) a partir de la esterificación de ácido ursólico en C-28.....	152
4.3.6.2. Escisión radicalaria-oxidación del (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7) .....	153
4.3.6.3. Reducción de la mezcla de compuestos A1 y A2 .....	154
4.4. Conclusiones.....	155
Anexo Capítulo 4 Espectros.....	157
Capítulo 5. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> .....	167
5.1. Introducción.....	167
5.2. Resultados y discusión.....	169
5.2.1. Viabilidad en cultivo de células RAW 264.7.....	169
5.2.1.1. Compuestos de la serie D.....	169
5.2.1.2. Compuestos de la serie M .....	170
5.2.2. Efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS.....	171
5.2.2.1. Compuestos de la serie D.....	171
5.2.2.2. Compuestos de la serie M .....	172
5.2.3. Inhibición de la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2. ....	174
5.2.3.1. Compuestos de la serie D.....	174

5.2.3.2. Correlación de los datos obtenidos <i>in vitro</i> con los obtenidos <i>in silico</i> . .....	176
5.2.3.3. Compuestos de la serie M .....	177
5.2.3.4. Correlación de los resultados <i>in vitro</i> con los obtenidos <i>in silico</i> de la serie M. ....	178
5.3. Procedimientos experimentales .....	180
5.3.1. Cultivo de células RAW 264.7 .....	180
5.3.2. Viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7.....	180
5.3.3. Efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS.....	181
5.3.3.1. Determinación de la concentración de ON en RAW 264.7 .....	181
5.3.4. Inhibición de la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2. ....	182
5.4. Conclusiones.....	182
6. Conclusiones generales .....	185

## Lista de figuras

Figura 1. Ácido ursólico (M1) y sus derivados (M2-M13) utilizados en los ensayos in silico. ....	4
Figura 2. Propuesta para evaluar el incremento de volumen sobre los derivados de ácido ursólico con isatina. ....	6
Figura 3. Derivados del ácido ursólico D1-D11, propuesta de derivados con modificaciones menores D1 y D2 e híbridos que incluyen isatina en la estructura de los compuestos. ....	7
Figura 4. Mecanismo mediante el cual una infección o daño induce una respuesta antiinflamatoria regenerativa. Adaptado de Karin, M. Nature, 2016. <sup>9</sup> .....	10
Figura 5. Mecanismo de acción de los AINEs.....	12
Figura 6. La propiedad antiinflamatoria del ácido ursólico a través de STAT 3, Akt / mTOR, y las vías mediadas por NF- $\kappa$ B. <sup>22</sup> .....	16
Figura 7. Modificaciones realizadas al AU (1), donde el compuesto modificado con mejor actividad es el modelo probado es M4. ....	18
Figura 8. El círculo verde muestra la modificación en la posición C-3 con un carbonilo para los derivados de ácido ursólico que tuvo mejor porcentaje de inhibición del edema inducido por ATF en oreja de ratón. ....	19
Figura 9. Modificaciones realizadas al AU (1), donde el compuesto modificado con mejor actividad es el modelo probado es 3a. ....	20
Figura 10. Biosíntesis del ácido ursólico a través de la vía del mevalonato. <sup>17</sup> ..	24
Figura 11. Estructura de isatina .....	25
Figura 12. Compuestos de la serie D1-D11, propuesta de derivados con modificaciones menores D1 y D2 e híbridos que incluyen isatina D3-D11 en la estructuras de los compuestos.....	30

<b>Figura 13.</b> Estructura de los 55 derivados de isatina utilizados para los ensayos in silico. ....	35
<b>Figura 14.</b> Moléculas reportadas como agentes intercaladores y de unión al surco menor del ADN. ....	44
<b>Figura 15.</b> I <sub>11</sub> agente de unión al surco menor del ADN, con la circunferencia morada se muestran la selección de CFDs utilizados para el análisis de similitud molecular, donde se realizó la comparación de esta molécula con los 55 derivados de isatina utilizados. ....	45
<b>Figura 16.</b> a) Gráfico de <i>logCI50CAL</i> vs <i>logCI50</i> de los derivados de isatina. b) Gráfico de <i>logCI50PRED</i> vs <i>logCI50</i> de la actividad experimental para los derivados de isatina. ....	52
<b>Figura 17.</b> El compuesto <b>16</b> no presenta interacción del átomo de cloro con la cadena alifática. En comparación, el compuesto <b>17</b> tiene una conformación diferente en la cadena alifática presente en su estructura por la interacción de esta con el átomo del cloro. ....	53
<b>Figura 18.</b> Estructura 3D de los derivados de isatina. Los compuestos más activos se presentan en amarillo y los menos activos se presentan en color rojo. ....	54
<b>Figura 19.</b> Alineamiento estructural de I <sub>11</sub> con los derivados de isatina. (a) <b>18</b> ; (b) <b>19</b> ; (c) <b>20</b> ; (d) <b>53</b> ; (e) <b>54</b> ; (f) <b>55</b> ; (g) <b>13</b> . ....	57
<b>Figura 20.</b> Acoplamiento molecular de los derivados de isatina sobre el surco menor del ADN. a) Sitio de enlace para I <sub>11</sub> , que se muestra en un cubo azul. b) Correlación de la puntuación de energía obtenida de Autodock 4.2 frente a los valores de Log CI <sub>50</sub> . Las mejores poses obtenidas para (c) <b>13</b> ; (d) <b>18</b> ; (e) <b>19</b> ; (f) <b>20</b> ; (g) <b>53</b> ; (h) <b>54</b> ; (i) <b>55</b> . El ADN y los derivados de isatina se muestran como superficie y barras respectivamente. ....	60

<b>Figura 21.</b> Representaciones 2D para tres confórmers estructurales de cada molécula utilizada en el análisis de acoplamiento molecular.....	62
<b>Figura 22.</b> Fragmentos de ADN a) y b) que incluyen ligando en su estructura cristalográfica, c) y d) no incluyen ligando.....	64
<b>Figura 23.</b> Interacción del compuesto <b>13</b> con las cuatro estructuras de ADN seleccionadas.....	67
<b>Figura 24.</b> Interacción del compuesto <b>53</b> con las cuatro estructuras de ADN seleccionadas.....	68
<b>Figura 25.</b> Híbridos <b>D3-D11 AU-isatina</b> , probados en el modelo QSAR para predecir su posible actividad citotóxica en la línea celular Hela. ....	70
<b>Figura 26.</b> a) Cofactor, en malla verde la cavidad seleccionada para COX-1. b) cofactor, en malla verde la cavidad seleccionada para COX-2. ....	106
<b>Figura 27.</b> Derivados del ácido ursólico ( <b>D1-D11</b> ) utilizados en el ensayo in silico para la elección de moléculas con mayor probabilidad de tener un efecto inhibidor de ciclooxigenasa. ....	109
<b>Figura 28.</b> Resumen de metodología de acoplamiento molecular para los compuestos <b>D1-D11</b> (especificada a detalle en la sección 3.2.2). ....	109
<b>Figura 29.</b> Validación del método en COX-1 con un derivado de la indometacina, la conformación verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento molecular. ....	110
<b>Figura 30.</b> Validación del método en COX-2 con ácido meclofenámico, la conformación verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento molecular. .	111
<b>Figura 31.</b> Derivado del ácido ursólico ( <b>M9</b> ) en verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento para ciclooxigenasa, en gris se observa la conformación del ligando activo indometacina. ....	112

<b>Figura 32.</b> COX-2 con un derivado del ácido ursólico ( <b>M9</b> ), la conformación verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento, y en gris se observa la conformación del ligando activo ácido meclofenámico. ....	112
<b>Figura 33.</b> Diferencias estructurales entre los canales de unión al sustratos de las ciclooxigenasas, los residuos de aminoácidos Val434, Arg513 y Val523 forman una bolsa lateral en COX-2 que esta ausente en COX-1. Adaptado de Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. <sup>88</sup> .....	114
<b>Figura 34.</b> Interacción de enlace de hidrógeno del compuesto <b>M4</b> con COX-1 y COX-2. ....	116
<b>Figura 35.</b> Interacciones por enlace de hidrógeno para los compuestos <b>M5</b> , <b>M8</b> y <b>M10</b> con ciclooxigenasa 2. ....	118
<b>Figura 36.</b> Interacciones por enlace de hidrógeno para los compuestos <b>M6</b> , <b>M9</b> y <b>M11</b> con ciclooxigenasa 2 .....	120
<b>Figura 37.</b> Interacciones por enlace de hidrógeno para el compuesto <b>M12</b> con ciclooxigenasas.....	121
<b>Figura 38.</b> Resultados del análisis molecular, rangos propuestos para obtener compuestos derivados de ácido ursólico con actividad biológica.....	124
<b>Figura 39.</b> Compuesto seleccionado por su mayor probabilidad de tener actividad antiinflamatoria. ....	125
<b>Figura 40.</b> Enlaces de hidrógeno presentes en las dos isoformas de ciclooxigenasas para el compuesto <b>D1</b> . A ciclooxigenasa-1 donde no se observan enlaces de hidrógeno, B ciclooxigenasa-2 enlace de hidrógeno con Ser 353 mediante el éster metílico de la posición 28.....	126

Figura 41. Interacciones hidrofóbicas (líneas punteadas en gris) y enlace de hidrógeno (línea azul) para el compuesto <b>D1</b> .....	127
Figura 42. Interacciones de los derivados de ácido ursólico que incluyen isatina ( <b>D3-D11</b> ) en su estructura con las enzimas coclooxigenasas.....	129
Figura 43. Epoxidación de la mezcla <b>AU+AO</b> para la obtención de ácido ursólico con un 23% de rendimiento.....	134
Figura 44. Estructura del ácido ursólico, señal del protón 18 y acoplamiento del protón 18 con protón 19. ....	135
Figura 45. a) Señal H-12, b) Señal H-3, c) Acoplamientos H-3 del ácido ursólico ( <b>M1</b> ).....	135
Figura 46. Señales del espectro de $^{13}\text{C}$ para el ácido ursólico. ....	136
Figura 47. Semisíntesis del compuesto <b>M7</b> . ....	137
Figura 48. Fragmentos del espectro de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ , expansiones de del espectro de HMBC y HSQC para el compuesto <b>M7</b> . ....	138
Figura 49. Esquema de reacción para la escisión radicalaria-oxidación del compuesto <b>M7</b> .....	139
Figura 50. Estructura del compuesto <b>M7</b> , en la superficie azul-rojo se observa el orbital <sup>o</sup> molecular ocupado de más energía del (HOMO, por sus siglas en inglés). ....	140
Figura 51. a) CCF del crudo de reacción escisión radicalaria-oxidación del compuesto <b>M7</b> (en punteado rojo, identificación de la mezcla de aldehídos), b), c), d), e) señales características para la mezcla de aldehídos. La mezcla eluyente en las cromatoplasmas fue 90:10 hexano-acetato de etilo. ....	142
Figura 52. Esquema de la reacción de reducción de la mezcla de compuestos <b>A1</b> y <b>A2</b> . ....	143

<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H para el compuesto <b>D1</b> , incluyendo expansiones de las señales características del mismo. ....	144
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para el compuesto <b>D1</b> .....	145
<b>Figura 55.</b> Expansión del espectro de HSQC del compuesto <b>D1</b> , correlación carbono-hidrógeno de la posición C-3.....	145
<b>Figura 56.</b> Espectro de <sup>1</sup> H para el compuesto <b>D1'</b> . ....	146
<b>Figura 57.</b> Expansión del espectro de HSQC para el compuesto <b>D1'</b> que incluye iodo en su estructura. ....	147
<b>Figura 58.</b> Metodología de purificación de la mezcla ácido ursólico ácido oleanólico del extracto de acetato de etilo obtenido de la planta <i>Astianthus viminalis</i> . ....	150
<b>Figura 59.</b> Compuestos de la serie <b>M</b> y <b>D</b> evaluados mediante experimentos in vitro en la línea celular RAW 264.7 para obtener su viabilidad y porcentaje de inhibición de óxido nítrico, así como porcentajes de inhibición en ciclooxygenasas. ....	168
<b>Figura 60.</b> Porcentajes de inhibición en ciclooxygenasas 1 y 2 para derivados del grupo ursano incluido el ácido ursólico ( <b>AU</b> ). ....	175
<b>Figura 61.</b> Diferencia estructural para los compuestos <b>D1</b> y <b>D1'</b> para este último átomo de iodo en la posición C24, resaltado en una circunferencia amarilla. ....	176

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resultados de la evaluación biológica en el modelo de inflamación inducida por ATF (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón para los compuestos M1-M13.El ensayo fue realizado utilizando una $n$ de tres ratones para cada compuesto. ....	3
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos según su selectividad para la ciclooxygenasa. <sup>12</sup> .....	12
<b>Tabla 3.</b> Descriptores moleculares usados para la generación del modelo matemático QSAR.....	37
<b>Tabla 4.</b> Valores de los descriptores moleculares para todos los derivados de isatina utilizados en el modelo QSAR y datos experimentales de $CI_{50}$ para la actividad citotóxica en la línea celular Hela. ....	48
<b>Tabla 5.</b> Valores de actividad biológica experimental ( $logCI_{50}$ ), calculada ( $logCI_{50CAL}$ ) y predicha ( $logCI_{50PRED}$ ) para los derivados de isatina utilizados para la generación del modelo QSAR. ....	50
<b>Tabla 6.</b> Valores de puntaje del acoplamiento molecular para los derivados de isatina seleccionados. ....	58
<b>Tabla 7.</b> Valores de $K_i$ predichos, obtenidos del acoplamiento molecular para los derivados de isatina seleccionados.....	59
<b>Tabla 8.</b> Valores de puntuación obtenidos del acoplamiento molecular de los derivados de isatina con cuatro estructuras de ADN diferentes. ....	65
<b>Tabla 9.</b> Valores calculados de los descriptores moleculares. $LogCI_{50}$ y $CI_{50}$ predicha mediante el modelo QSAR para los compuestos D3-D11 en la línea celular Hela.....	70

<b>Tabla 10.</b> Descriptores calculados con el programa DRAGON para el análisis de similitud molecular de los compuestos <b>M1-M13</b> en comparación con indometacina. ....	108
<b>Tabla 11.</b> Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos <b>M1-M13</b> , energías de interacción ligando- proteína. ....	115
<b>Tabla 12.</b> Descriptores moleculares obtenidos del programa Spartan para ácido ursólico ( <b>M1</b> ), derivados de ácido ursólico ( <b>M2-M13</b> ) e indometacina ( <b>14</b> ). ....	122
<b>Tabla 13.</b> Descriptores moleculares obtenidos del programa Dragon, indometacina ( <b>14</b> ). ....	123
<b>Tabla 14.</b> Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos <b>D1-D11</b> , energías de interacción ligando- proteína (COX-1 y COX-2). ....	125
<b>Tabla 15.</b> Rendimientos obtenidos para la mezcla de ácido ursólico-ácido oleanólico ( <b>AU+AO</b> ) y rendimiento para ácido ursólico puro ( <b>AU</b> ). ....	133
<b>Tabla 16.</b> Modificaciones a las condiciones de la reacción de fotólisis, MP=materia prima ( <b>M7</b> ). Resaltado en azul se indican las condiciones óptimas. ....	140
<b>Tabla 17.</b> Cantidad, rendimiento y características físicas de los extractos obtenidos. ....	149
<b>Tabla 18.</b> Efecto de los compuestos <b>D1</b> y <b>D1'</b> sobre la viabilidad de células RAW 264.7. En rojo resultados en los que los compuestos no presentan viabilidad. ...	170
<b>Tabla 19.</b> Efecto de los compuestos <b>M4</b> , <b>M6</b> , <b>M11</b> y <b>M12</b> sobre la viabilidad de células RAW 264.7. En rojo resultados en los que los compuestos no presentan viabilidad. ....	171
<b>Tabla 20.</b> Efecto de los compuestos <b>D1</b> y <b>D1'</b> sobre la producción de ON en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. ....	172

<b>Tabla 21.</b> Efecto de los compuestos <b>M4, M6, M11</b> y <b>M12</b> sobre la producción de ON en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. ....	174
<b>Tabla 22.</b> Resultados obtenidos a una concentración de 10 $\mu$ M para los compuestos <b>D1</b> y <b>D1'</b> , para la inhibición de COX-1 y COX-2. ....	175
<b>Tabla 23.</b> Resultados obtenidos a una concentración de 10 $\mu$ M para los compuestos <b>M4, M6, M11</b> y <b>M12</b> para la inhibición de COX-1 y COX-2. ....	178

## Abreviaturas

---

°C	Grados Celsius
Å	Ångström
<sup>1</sup> H	Protón
<sup>13</sup> C	Carbono 13
ASM	Análisis de Similitud Molecular
ATF	acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AU	Ácido Ursólico
AMCPB	Ácido meta-cloperbenzoico
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de doble
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamidin
DMSO	Dimetil sulfóxido
DCM	Diclorometano
DIB	(Diacetoxiyodo)benceno
DMF	Dimetilformamida
δ	Desplazamiento químico
EtOH	Etanol

FM	Fórmula molecular
h	Hora
Hela	Línea celular de cáncer cervicouterino humano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
M	Molaridad
mg	Miligramos
µg/mL	Microgramos sobre mililitro
µL	Microlitro
µM	Micro molar
MHz	Mega Hertz
ON	Óxido nítrico
PDB	Protein Data Bank
ppm	Partes por millón
QSAR	Relación cuantitativa estructura actividad
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

---

## Resumen

Actualmente, se cuenta con una amplia variedad de fármacos disponibles para controlar un proceso inflamatorio. A pesar de esto, la búsqueda de nuevas y mejores alternativas es constante. Por su parte las plantas nos brindan una fuente de compuestos bioactivos que han servido para el desarrollo de muchos fármacos disponibles comercialmente. El ácido ursólico (**AU**) es un producto natural que representa uno de los componentes principales de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional. El **AU** exhibe una amplia gama de actividades biológicas y cuenta con reportes que confirman su actividad antiinflamatoria. La realización de modificaciones estructurales al ácido ursólico ha servido como punto de partida para nuevas investigaciones de sus derivados.

Como primera parte de esta investigación se desarrolló una metodología de acoplamiento molecular para 12 moléculas derivadas del ácido ursólico (**M1-M13**), frente a su posible blanco biológico, las ciclooxigenasas 1 y 2. Como antecedente, las moléculas fueron evaluadas en el modelo de inflamación inducida por ATF (acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón para probar su potencial como agentes antiinflamatorios. Los compuestos **M4** (3-oxours-12-en-28-oico), **M11** (3-oxours-12-en-28-oato de propilo), **M6** (3 $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-oato de propilo), y **M12** (3-oxours-12-en-28-oato de metilo) indujeron el mayor porcentaje de inhibición: 75.47%, 48.80%, 46.36% y 54.06%, respectivamente. Los resultados obtenidos del análisis de acoplamiento molecular se correlacionaron con los resultados experimentales encontrando las posibles interacciones de los compuestos con ciclooxigenasa 1 y 2. A partir de estos resultados y con la metodología de acoplamiento molecular desarrollada, se probó una serie de nuevos derivados (**D1-D11**) que incluyen compuestos con apertura en el anillo A, dos de ellos con

modificaciones pequeñas (**D1** y **D2**) e híbridos con isatina incluida en las estructuras (**D3-D11**). Por medio del ensayo *in silico* QSAR se evaluó si el tamaño de los híbridos de **AU**-isatina influiría de manera negativa en la actividad biológica que pudieran presentar. Debido a la falta de información reportada con respecto a la actividad antiinflamatoria, se utilizó la actividad citotóxica.

Para la obtención del modelo QSAR se utilizaron 55 derivados de isatina con actividad citotóxica reportada para la línea celular de cáncer cervicouterino humano (HeLa). A partir de estos resultados obtenidos, se realizó un análisis de similitud molecular (MSA) de los derivados de isatina con una serie de agentes de unión al surco menor e intercaladores del ADN. Se encontró similitud molecular de los derivados de isatina con mejor actividad citotóxica y DAPI (un agente de unión al surco menor del ADN), por lo que se realizó el acoplamiento molecular de los derivados de isatina con diferentes estructuras de ADN y se sugirió que el mecanismo de acción molecular de estos compuestos puede ser como agentes de unión al surco menor del ADN.

Posteriormente, mediante el modelo QSAR obtenido se predijo la  $IC_{50}$  de los híbridos **AU**-isatina (**D1-D11**) y se observó que estos compuestos pueden presentar actividad citotóxica frente a la línea celular Hela. Con lo anterior se descartó que el incremento en el tamaño de la estructura híbrida de estos compuestos les impidiera tener alguna actividad biológica.

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos **D1-D11** se obtuvo su acoplamiento molecular con las enzimas ciclooxigenasas 1 y 2. El compuesto **D1** resultó ser el de mayor probabilidad de tener actividad antiinflamatoria, por lo que fue sintetizado mediante la modificación química del anillo A del ácido ursólico por

medio de una reacción escisión radicalaria-oxidación y posterior reducción. Se debe mencionar que es la primera vez que se reportan derivados de **AU** con este tipo de modificaciones estructurales, lo que hace a **D1** un compuesto novedoso.

Finalmente, se determinó el efecto sobre la inhibición de la producción de ON (óxido nítrico) y sobre la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2 de los derivados **D1**, **M4**, **M6**, **M11** y **M12**. Los resultados obtenidos muestran que en estas estructuras, el carbonilo en C3 es determinante en la actividad biológica, ya que en su ausencia, el compuesto no tiene viabilidad a concentraciones mayores a 25  $\mu\text{M}$ . Se comprobó que el compuesto **D1** presenta actividad antiinflamatoria con un valor de porcentaje de inhibición de ON de 41.3% a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , valor comparable con el control positivo utilizado indometacina que cuenta con un valor de 45.2% de inhibición de ON a una concentración mayor (41.9  $\mu\text{M}$ ). Los valores de actividad sobre las ciclooxigenasas 1 y 2 superan a los reportados para este tipo de compuestos y se sugiere que uno de los posibles mecanismos de acción por el cual el **D1** ejerce su efecto biológico es vía ciclooxigenasas.

Finalmente, la metodología de acoplamiento molecular fue efectiva para la selección de compuestos con actividad antiinflamatoria selectiva a ciclooxigenasas.

---

# **Capítulo 1**

## **Antecedentes**

---

---

## Capítulo 1. Antecedentes

### 1.1. Introducción

Hoy en día existe una variedad de fármacos antiinflamatorios entre los que se destacan los no esteroideos (AINEs). Son fármacos muy prescritos para tratamiento sintomático de procesos inflamatorios agudos y crónicos. Dichos antiinflamatorios son comerciales y se consumen en grandes cantidades por automedicación. Aunque se cree que los AINEs son fármacos relativamente seguros, pueden presentar efectos adversos e interacciones potencialmente graves que amenazan la vida. Se estima que entre el 21 y 25% de los consumidores de estos medicamentos presentan reacciones adversas sobre todo gastrointestinales, renales y cardiovasculares. Por lo que la búsqueda de nuevas alternativas es constante.<sup>1</sup>

Por otro lado, a partir de las plantas se han aislado agentes antiinflamatorios como el ácido salicílico, compuesto modelo en la síntesis de nuevos agentes antiinflamatorios. De igual forma, se han identificado compuestos bioactivos, como el ácido ursólico que se encuentra presente en numerosas especies botánicas y presenta variadas actividades biológicas reportadas, dentro de las que se destaca la antiinflamatoria.<sup>2,3</sup>

---

<sup>1</sup> Prieto, Y. C.; Vargas, C. Problemas de uso de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en pacientes con patología crónica asociada. *Inf Ter del Sist Nac Salud médica*. **2000**, 24, 85-91.

<sup>2</sup> Hernández, A. E.; Hernández, M.; Serafín, C.; Basterrachea, R. M.; Fuentes, V. R.; Torres, M. Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Celestrum Laurifolium* L'Herit. *Rev CENIC Ciencias Químicas*. **2007**, 38, 243-247.

<sup>3</sup> Reddy, L. H., Couvreur, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug delivery Reviews*. **2009**, 61, 1412-1426.

Las modificaciones a la estructura base del ácido ursólico han llevado a diversos hallazgos como la mejora de sus propiedades antiinflamatorias y la disminución de la toxicidad.<sup>4</sup> La búsqueda de nuevos derivados de este compuesto con actividad antiinflamatoria continúa en el presente trabajo. Para ello se integró el uso de métodos computacionales para el diseño y análisis de las propiedades moleculares de los derivados de ácido ursólico, y su posterior selección según la probabilidad de éxito. Posteriormente, se realizó la semisíntesis y los ensayos experimentales para evaluar nuestra hipótesis y, de esta forma, entender el posible mecanismo de acción de las nuevas estructuras.

Como antecedente a la primera parte de los estudios realizados en el capítulo 2, se menciona la realización de semisíntesis de 12 estructuras derivadas del ácido ursólico (**figura 1**) y su posterior evaluación biológica (**tabla 1**).<sup>4</sup> Las sustancias fueron evaluadas en el modelo de inflamación inducida por ATF (acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón para probar su potencial como agentes antiinflamatorios. Los compuestos **M4** (3-oxours-12-en-28-oico), **M11** (3-oxours-12-en-28-oato de propilo), **M6** (3 $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-oato de propilo), y **M12** (3-oxours-12-en-28-oato de metilo) indujeron el mayor porcentaje de inhibición; 75.47%, 48.80%, 46.36% y 54.06%, respectivamente.

---

<sup>4</sup> Maldonado, M. Síntesis de triterpenos derivados del ácido ursólico con actividad antiinflamatoria. Tesis de Maestría CIQ-UAEM. 2015

**Tabla 1.** Resultados de la evaluación biológica en el modelo de inflamación inducida por ATF (acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón para los compuestos **M1-M13**. El ensayo fue realizado utilizando una *n* de tres ratones para cada compuesto.

Compuesto (1 mg/oreja)	Edema auricular inducido por ATF
	% Inhibición de edema
<b>M1</b>	34.21 ±1.23
<b>M2</b>	30.19 ±1.20
<b>M3</b>	26.52 ± 2.73
<b>M4</b>	<b>75.47 ± 3.48</b>
<b>M5</b>	19.30 ± 3.29
<b>M6</b>	<b>47.40± 1.25</b>
<b>M7</b>	46.89± 0.66
<b>M8</b>	18.32 ± 0.33
<b>M9</b>	9.11 ± 1.16
<b>M10</b>	24.04± 3.68
<b>M11</b>	<b>48.80± 1.65</b>
<b>M12</b>	<b>48.76± 1.15</b>
<b>M13</b>	24.01± 1.72
<b>Indometacina</b>	87.37± 0.05

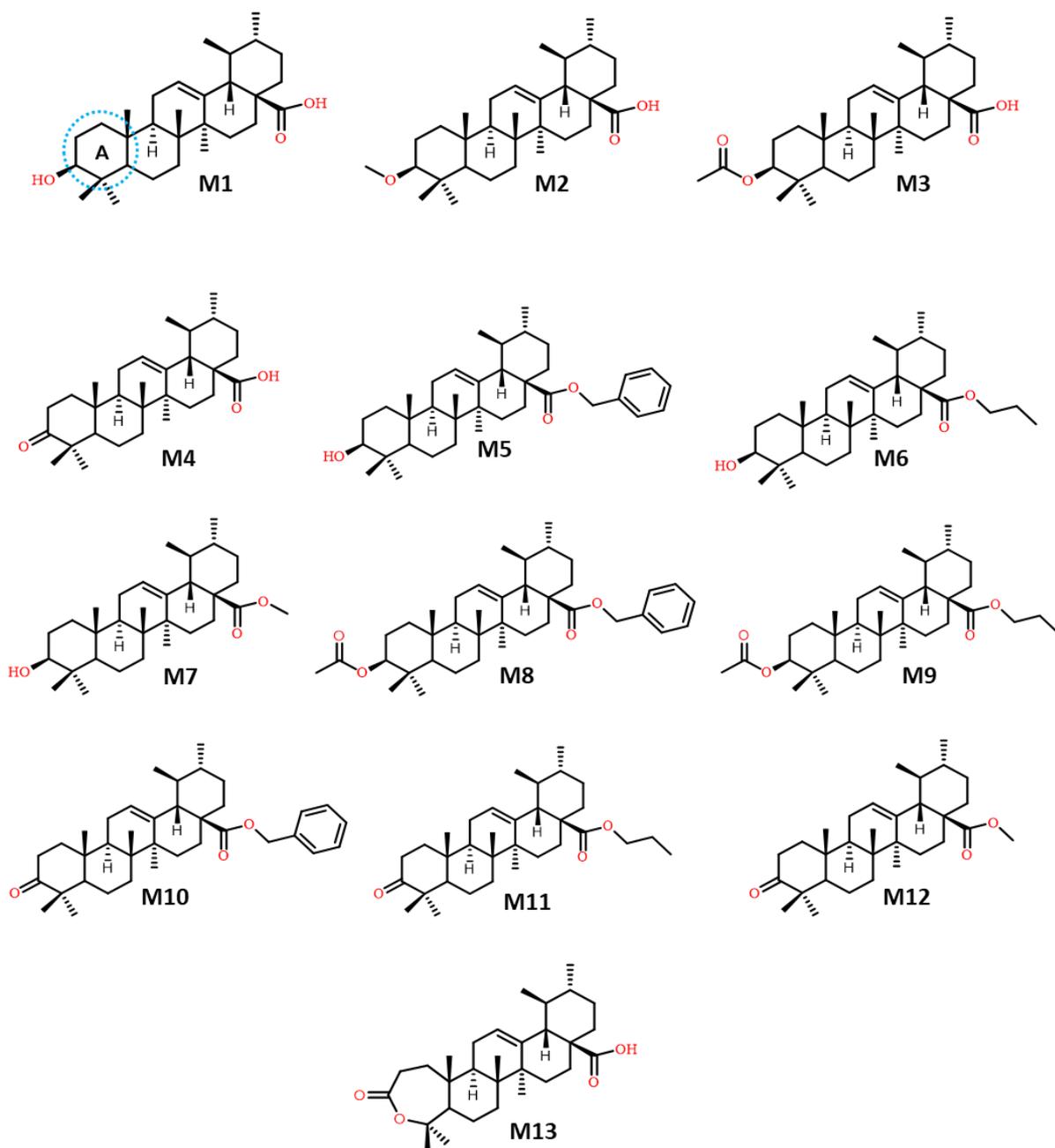
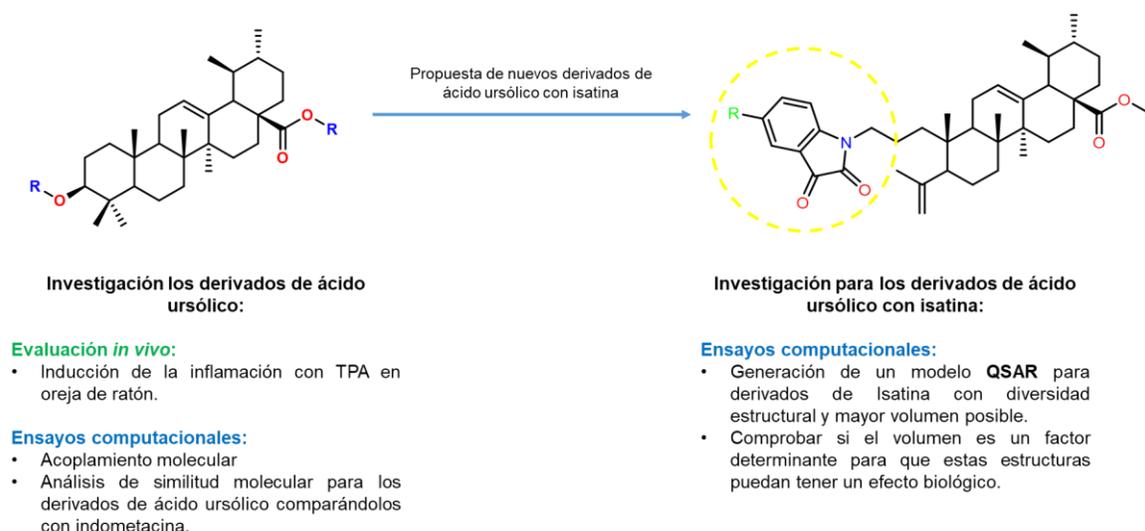


Figura 1. Ácido ursólico (M1) y sus derivados (M2-M13) utilizados en los ensayos *in silico*.

Adicional a los resultados obtenidos de la serie de compuestos M1-M13, se ha observado que modificaciones a compuestos de tipo triterpeno en el anillo A (figura

1 punteado en azul) han tenido mejoras en la actividad biológica, por lo que se propuso realizar la apertura de este anillo.<sup>43,44</sup> Lo anterior se hizo con el objetivo de incluir modificaciones pequeñas y formación de híbridos con isatina, debido a la actividad biológica reportada tanto para ácido ursólico como para isatina.

Al proponer el desarrollo de nuevos derivados de ácido ursólico se realizaron estudios de acoplamiento molecular para las moléculas de la serie **M1-M13**, y al mismo tiempo estudios sobre las moléculas nuevas con isatina incluida en su estructura. En las moléculas nuevas (**D3-D11**) se observó que al incluir isatina en la estructura base de estos derivados, se estaba generando un incremento considerable en su volumen. Con la finalidad de observar si el incremento de volumen afecta la actividad biológica en la serie de compuestos **D3-D11**, se propuso desarrollar un modelo QSAR que nos diera una idea de cómo se comportarían estos derivados en un sistema biológico. Se realizó la búsqueda del panorama general de experimentos para actividad inflamatoria tanto para derivados de ácido ursólico y derivados de isatina. Los resultados encontrados no fueron suficientes para la generación de un estudio QSAR. En cuanto a otros resultados experimentales se encontró buena cantidad de información para derivados de isatina con actividad citotóxica. Así, se decidió utilizar un modelo QSAR que describiera la actividad citotóxica para derivados de isatina y con este comparar si los compuestos propuestos **D3-D11** tenían la capacidad tener un efecto biológico a pesar del incremento de volumen (**figura 2**).



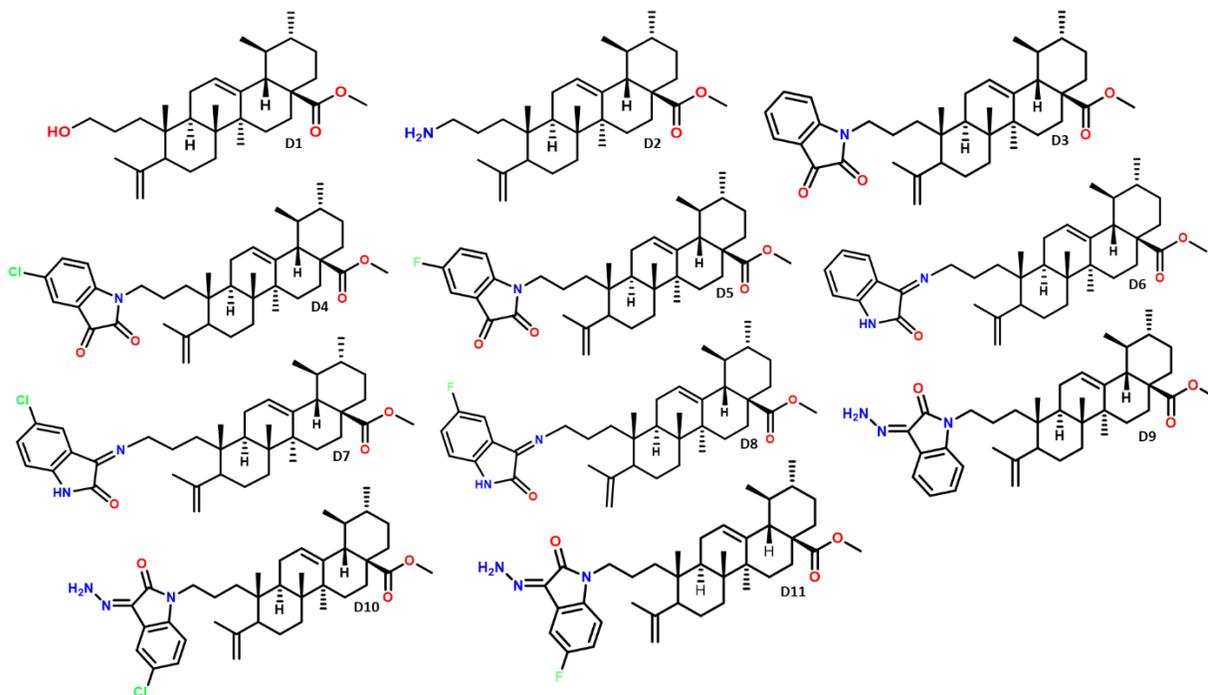
**Figura 2.** Propuesta para evaluar el incremento de volumen sobre los derivados de ácido ursólico con isatina.

Lo anterior derivó a resultados que permitieron proponer un mecanismo de acción para los derivados de isatina con mayor actividad citotóxica, esto por medio de un análisis de similitud molecular y diferentes ensayos de acoplamiento molecular.

Se tiene conocimiento de que el ácido ursólico y sus derivados presentan actividad antiinflamatoria con mecanismos de acción propuestos como actividad frente a ciclooxigenasas.<sup>5</sup> Por ello, en el capítulo 3 se describen los experimentos *in silico* realizados para el ácido ursólico y sus derivados (**M1-M13**) a partir de evaluaciones biológicas experimentales. Primero se detalla el acoplamiento molecular de los compuestos **M1-M13**, realizado con el propósito de encontrar el modo de unión más estable de estos compuestos con las enzimas ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. Adicionalmente, se desarrolló una metodología de acoplamiento molecular que correlacionó con los resultados biológicos obtenidos

<sup>5</sup> López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. *Food Research International*. **2018**, 103, 130-149.

experimentalmente, para los compuestos **M1-M13**, que permitiera la selección de nuevos derivados de ácido ursólico de la serie **D1-D11** con posible actividad antiinflamatoria mostrados en la **figura 3**.



**Figura 3.** Derivados del ácido ursólico **D1-D11**, propuesta de derivados con modificaciones menores **D1** y **D2** e híbridos que incluyen isatina en la estructura de los compuestos.

Para continuar la investigación en el capítulo 4, se detalla la metodología de obtención de ácido ursólico de la planta *Astianthus viminalis*, las metodologías de reacción para la obtención de los derivados semisintéticos y la identificación de cada uno de los compuestos obtenidos.

Finalmente, debido a los estudios realizados al ácido ursólico y sus derivados, se les atribuye actividad como antiinflamatorios con mecanismos de acción propuestos que consisten en la inhibición de la liberación de histamina, lipoxigenasas, inhibición

de óxido nítrico y actividad frente a las ciclooxigenas entre otros.<sup>6</sup> En el capítulo 5, se detallan los procedimientos experimentales *in vitro* que se realizaron a los compuestos obtenidos por medio de semisíntesis química que incluyen a los compuestos de la serie **D** (**D1** y **D1'**) y los compuestos de la serie **M** (**M4**, **M6**, **M11** y **M12**). De los experimentos realizados se obtuvieron resultados de viabilidad en la línea celular RAW 264.7, porcentajes de inhibición de óxido nítrico y de ciclooxigenasas para los compuestos.

## 1.2. Antecedentes generales

### 1.2.1. Inflamación

Las personas a menudo reaccionan a la inflamación y sus signos: dolor, calor, enrojecimiento e hinchazón tomando un medicamento antiinflamatorio. Sin embargo, la inflamación constituye una respuesta natural de carácter protector importante que, junto con la eliminación de sus desencadenantes (organismos extraños, células muertas o irritantes físicos), desempeña un papel crucial en la regeneración de tejidos lesionados.<sup>7</sup> Esta reacción biológica producida por la interrupción de la homeostasis de un tejido, tiene como objetivos principales la rápida destrucción o aislamiento de la fuente de perturbación, eliminación del tejido dañado y el restablecimiento de la homeostasis. En la respuesta inflamatoria se involucra el reclutamiento de productos derivados de la sangre, tales como las proteínas del plasma, fluido y leucocitos, los cuales migran al tejido afectado. Este proceso de migración es facilitado por alteraciones en la vasculatura local, con lo

---

<sup>6</sup> López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. *Food Research International*. **2018**, 103, 130-149.

<sup>7</sup> Borges, A. A.; Alvarado, L. M. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares Inflammatory Acute Response. *Revista Finlay*, **2015**, 5, 2221-2434.

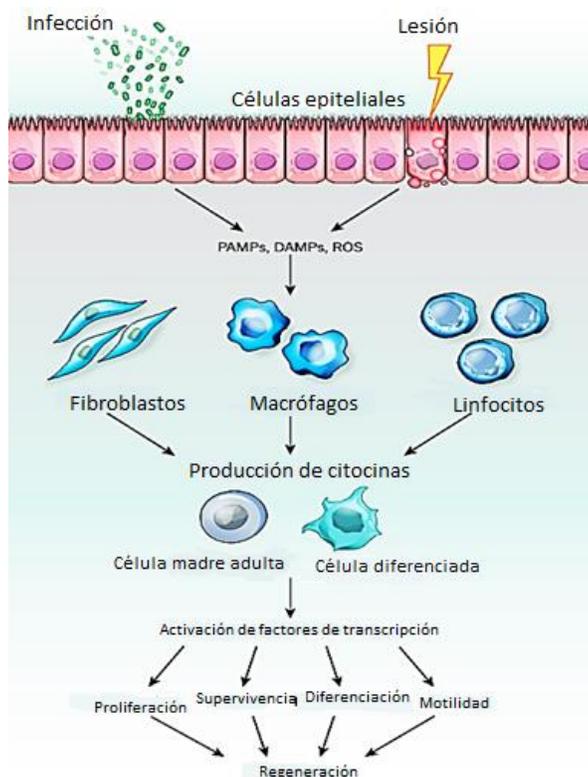
que se produce vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular y aumento del flujo sanguíneo.<sup>8</sup>

El proceso inflamatorio como respuesta natural a una infección y lesión induce una respuesta inflamatoria regenerativa. La lesión o infección de los tejidos epiteliales conduce a la generación de receptores para patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos inducen la producción de citocinas (factor de necrosis tumoral, interleucinas (IL-1, IL-11, IL-17 ó IL-22)) a través de componentes del tejido, como células inmunes. Algunas de las citocinas inflamatorias más comunes desencadenan vías de señalización en las células madre adultas o las células diferenciadas normales que culminan la activación de factores de transcripción (AP-1, NF-kB, STAT3). Dichos factores promueven una respuesta regenerativa mediante la inducción de genes que codifican factores de crecimiento, estimulan la progresión del ciclo celular, evitan la muerte celular, promueven la diferenciación, mejoran la motilidad y la migración celular. Todo lo anterior tiene la finalidad de reparar el daño y restablecer la homeostasis del tejido (figura 4).<sup>9</sup>

---

<sup>8</sup> Ashley, N. T.; Weil, Z. M.; Nelson, R. J. Inflammation : Mechanisms , Costs , and Natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **2012**, 43, 385–406.

<sup>9</sup> Karin, M.;Clevvers, H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, **2016**, 529, 307–315.



**Figura 4.** Mecanismo mediante el cual una infección o daño induce una respuesta antiinflamatoria regenerativa. Adaptado de Karin, M. *Nature*, 2016.<sup>9</sup>

A pesar de que la respuesta inflamatoria está estrechamente relacionada con la reparación, en ciertas situaciones este proceso puede ser excesivo y producir un daño inclusive mayor al agente que lo inició. Por lo tanto, es necesario frenar este proceso, el cual puede ser detenido por medio de fármacos de tipo antiinflamatorio.<sup>10</sup>

<sup>10</sup> Bonkanka, C. X. *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal*. Universidad de la Laguna, España, 2007.

## 1.2.2. Agentes antiinflamatorios

Actualmente se utilizan diferentes agentes antiinflamatorios, entre los más prescritos en todo el mundo están:

### 1.2.2.1. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Los AINES se utilizan principalmente en el tratamiento de la inflamación, dolor y edema, así como en la osteoartritis, artritis reumatoide y disturbios musculoesqueléticos.<sup>11</sup> Los AINES son un grupo de agentes de estructura química variada que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (**figura 5**).<sup>12</sup> Esta clase heterogénea de fármacos incluye agentes inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), selectivos o no (**tabla 2**). Los AINES no selectivos son los más antiguos, designados tradicionales o convencionales. Los AINES selectivos para la COX-2 se designan COXIBEs.<sup>5</sup>

---

<sup>11</sup> Batlouni, M. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares , Cerebrovasculares y Renales. *Arq Bras Cardiol*, **2010**, 94, 538–546.

<sup>12</sup> Valsecia, M. Analgésicos Antipiréticos y Antiinflamatorios no esteroides ( AINES ). *Jano*, **2010**, 112–132.

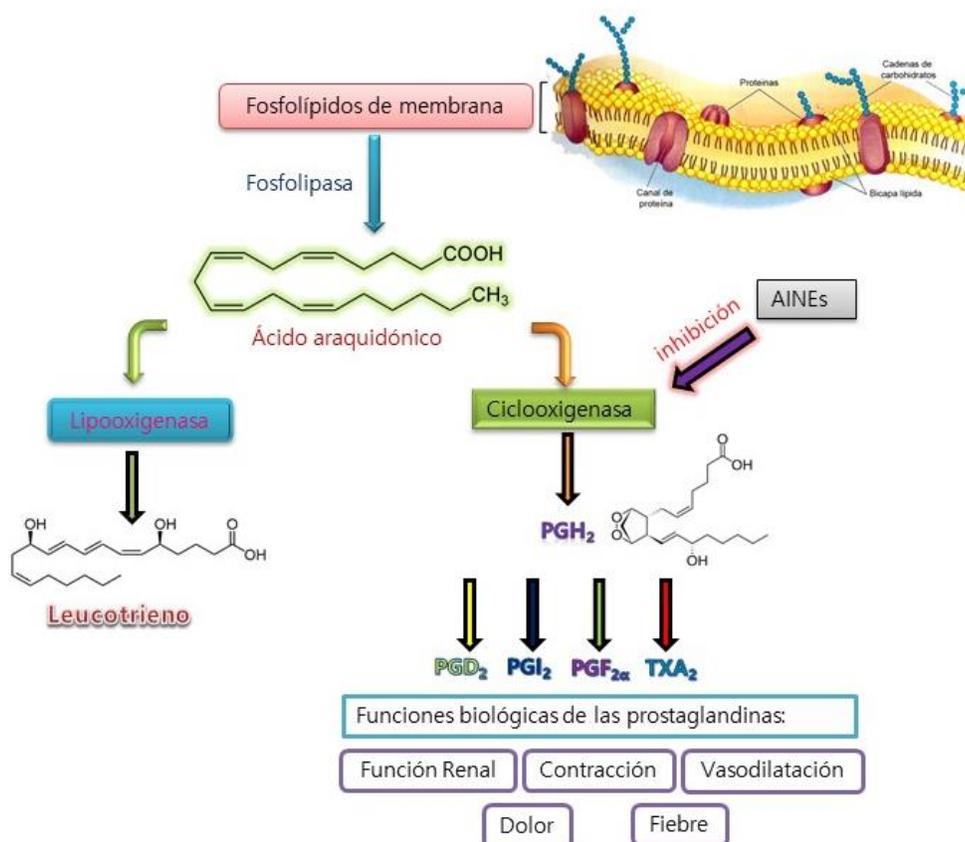


Figura 5. Mecanismo de acción de los AINEs.

Tabla 2. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos según su selectividad para la ciclooxigenasa.<sup>12</sup>

Antiinflamatorios no Esteroides Clasificación	
No Selectivos (COX-1 y 2) (tradicionales, convencionales)	Selectivos (COX-2) (COXIBEs)
Aspirina	Rofecoxib (Vioxx)
Indometacina (Indocid)	Parecoxib
Ibuprofeno (Motrin, Dalsy)	Celecoxib (Celebra)
Naproxeno (Naprosin)	Etoricoxib (Arcoxia)
Sulindac (Clinoril)	Lumiracoxib (Prexige)
Diclofenaco (Voltaren)	Valdecoxib (Bextra)
Piroxicam (Feldene)	<b>Otros</b>
β-Piroxicam (Cycladol)	Meloxicam (Movatec)

### 1.2.2.2. Los glucocorticoides.

Los glucocorticoides son un grupo de fármacos antiinflamatorios indispensables con alta prevalencia de uso con un 0.9% de la población adulta.<sup>13</sup> El mecanismo de acción por el cual los glucocorticoides ejercen su efecto antiinflamatorio es a partir del RG (receptor de glucocorticoides) que media su acción biológica. El RG es un factor de transcripción que pertenece a la familia de receptores esteroideos activados por hormonas. En este proceso el glucocorticoide se une a RG presente en el citoplasma y se encuentra asociado, entre otras, a dos subunidades de proteínas activadas por calor (hsp90). La unión del GC (glucocorticoide) al RG ocasiona la disociación de estas proteínas y la activación del RG, permitiendo la translocación del complejo GC-RG al núcleo, donde se une a secuencias específicas del ADN, denominadas elementos de respuesta de los GC (ERG), localizadas en la región promotora de genes diana. Esta unión, junto con determinados coactivadores, dará lugar a la inducción de la transcripción de genes que codifican para proteínas antiinflamatorias (transactivación).<sup>14</sup>

### 1.2.2.3. Compuestos de origen natural con actividad antiinflamatoria.

Las plantas son conocidas por producir una variedad de metabolitos bioactivos que se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades. Los metabolitos secundarios tienen un papel importante en la regulación de las interacciones de la planta con el ambiente que la rodea. Se estima que más del 40% de los

---

<sup>13</sup> Bordag, N.; Klie, S.; Jurchott, K.; Vierheller, J.; Schiewe, V.A.; Tonn, J.C.; Schwartz, C.; Schichor, C.; Selbig, J. Glucocorticoid (dexamethasone)-induced metabolome changes in healthy males suggest prediction of response and side effects. *Sci. Rep.* **2015**, 3, 15954. doi: 10.1038/srep15954.

<sup>14</sup> Embid, C.; Fernández-Bertolín, L.; Pujols, L.; Alobid, I.; Mullol, J.; Picado, C. Translocación nuclear del receptor de glucocorticoides en fibroblastos de pacientes asmáticos con poliposis nasal insensible al tratamiento glucocorticoideo. *Arch. Bronconeumol.* **2011**, 47, 115–121. doi:10.1016/j.arbres.2010.09.016

medicamentos tienen sus orígenes en estos productos naturales.<sup>15</sup> Es importante mencionar que el mecanismo molecular de acción de estas moléculas bioactivas puede abrir nuevas vías para el desarrollo o mejoramiento de nuevos enfoques terapéuticos.<sup>16</sup>

Un grupo de productos naturales que ha tenido una destacada importancia biológica son los triterpenos pentacíclicos. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos con actividad antiinflamatoria son el ácido ursólico, ácido oleanólico, el epilupeol y la  $\alpha$ -amirina que cuentan con reportes que sustentan esta información.<sup>17,18</sup>

### 1.3. Actividad antiinflamatoria del ácido ursólico.

Mencionado anteriormente, el ácido ursólico (**AU**) es un producto natural que representa uno de los componentes principales de algunas hierbas utilizadas en la medicina tradicional. El **AU** exhibe una amplia gama de actividades biológicas y cuenta con reportes que confirman su actividad antiinflamatoria.<sup>19</sup> Se han descrito posibles mecanismos mediante los cuales realiza el efecto antiinflamatorio, y a continuación se describen algunos de ellos.

---

<sup>15</sup> Kashyap, D.; Tuli, H. S.; Sharma, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* **2016**, 146, 201–213. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.017

<sup>16</sup> Babalola, I. T.; Shode, F. O. Ubiquitous Ursolic Acid : A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, 2, 214–222.

<sup>17</sup> Otuki, F.O.; Vieira-Lima, F.; Malheiros, A.; Yunes R. A.; Calixto, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extrac from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amirin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology.* **2005**, 507, 253-259.

<sup>18</sup> Romero, A. Estudio de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los derivados sintéticos de epilupeol y  $\alpha$ -amirina presentes en *B. copallifera*. Tesis de Maestría CIQ-UAEM. **2012**.

<sup>19</sup> Wang, J.; Jiang, Z.; Xiang, L. Li, Y.; Ou, M.; Yang, X.; Shao, J.; Lu, Y.; Lin, L.; Chen, J.; Dai, Y. Jia, L. Synergism of ursolic acid derivative US597 with 2-deoxy-D-glucose to preferentially induce tumor cell death by dual-targeting of apoptosis and glycolysis. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 5006.

### 1.3.1. Posibles mecanismos de acción antiinflamatoria atribuidos al ácido ursólico.

Se-Eun Jang y colaboradores realizaron un ensayo con ácido ursólico en macrófagos estimulados con LPS, donde observaron la inhibición potencial del factor nuclear kB (NF-kB) potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Se investigó el posible mecanismo antiinflamatorio de **AU**, y se observó que inhibió la producción de las interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , ciclooxigenasa (COX-2), la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), así como la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) y los niveles de ON de los macrófagos estimulados.<sup>20</sup>

La actividad antiinflamatoria del ácido ursólico, se analizó a una concentración de 0.14 mM, se estudió utilizando un modelo de inducción de edema mediante aceite de croton en ratones albinos suizos. La liberación de citocinas proinflamatorias (IL-2 (interleucina-2), INF- $\gamma$  (interferón- $\gamma$ ) y TNF- $\alpha$ ) fue reducida en las células de ratones artríticos BALB/c, que fueron tratados con **AU**. Las enzimas proinflamatorias como enzimas PLA2 secretorias (sPLA2) que hidrolizan los fosfolípidos en una diversa gama de mediadores inflamatorios, son inhibidas en presencia del **AU**. En un estudio realizado por Takada y colaboradores se usaron células endoteliales de vena umbilical humana y reportaron que **AU** regula la expresión de E-selectina reduciendo su expresión, esto lo hace vía inhibición de la translocación NF-k $\beta$  en el núcleo.<sup>21</sup> En estudios *in vivo* en corteza prefrontal de ratón se ha observado que el **AU** no solo reduce la formación de productos finales

---

<sup>20</sup> Jang, S. E.; Jeong, J. J.; Hyam, S. R.; Han, M. J.; Kim, D. H. Ursolic acid isolated from the seed of cornus officinalis ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 on macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 9711–9721.

<sup>21</sup> Kashyap, D.; Tuli, H. S.; Sharma, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* **2016**, 146, 201–213.

de glicación avanzada y también suprimió significativamente la expresión de INOS (óxido nítrico sintasa inducible) y COX-2 (Ciclooxigenasa-2), IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$  (figura 6). Del mismo modo en un estudio con ratones, se reportó que el AU redujo el crecimiento de tumor y por consiguiente aumentó la tasa de supervivencia de los ratones mediante la disminución de la activación de mediadores inflamatorios entre los que se incluye a STAT3 e IKKa/b.<sup>22</sup>

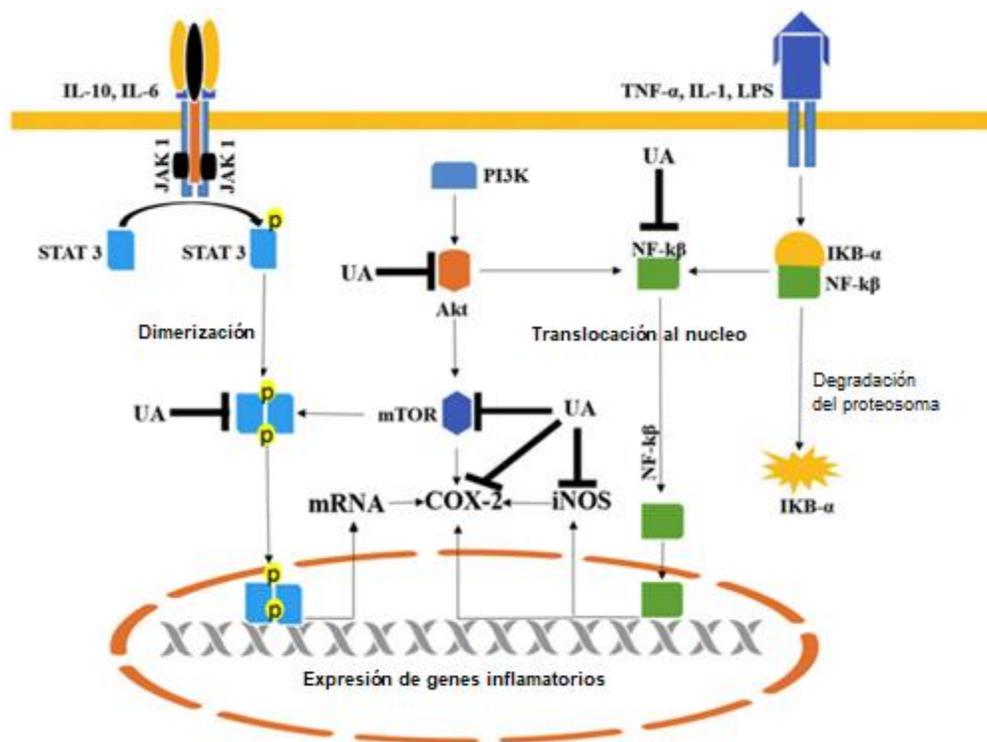
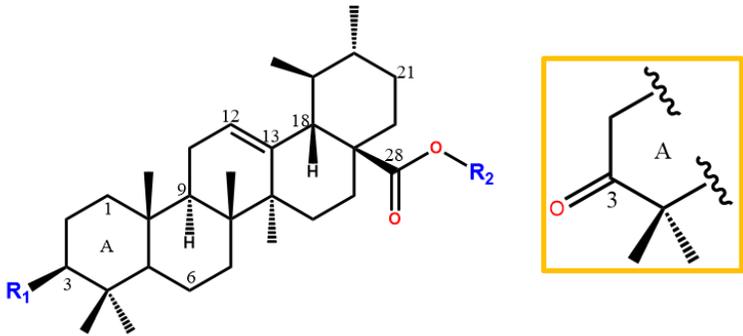


Figura 6. La propiedad antiinflamatoria del ácido ursólico a través de STAT 3, Akt / mTOR, y las vías mediadas por NF- $\kappa$ B.<sup>22</sup>

<sup>22</sup> Takada, K.; Nakane, T.; Masuda, K.; Ishii, H. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF- $\alpha$ -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine*. **2010**, *17*, 1114–1119.

### 1.3.2 Derivados semi-sintéticos del ácido ursólico con actividad antiinflamatoria.

Los antecedentes mencionados sugieren que el ácido ursólico podría tener un enorme potencial en el desarrollo de un compuesto bioactivo que pueda ser candidato para el desarrollo de un fármaco antiinflamatorio eficaz. Por otro lado, en trabajos anteriores se observaron propuestas de modificaciones en este triterpeno realizadas para mejorar la actividad antiinflamatoria (**figuras 7 y 9**).

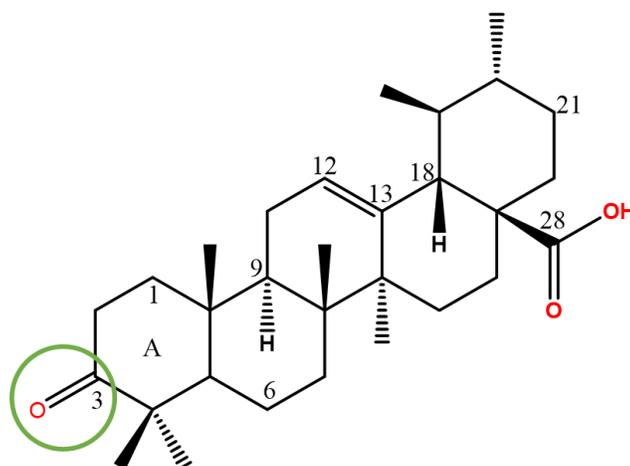


Derivado	Sustituyente (R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> )	Edema auricular inducido por TPA
		% Inhibición de edema (1 mg/oreja)
<b>1</b>	R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> = H	34.21 ± 1.23
<b>M2</b>	R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = H	30.19 ± 1.20
<b>M3</b>	R <sub>1</sub> =OAc, R <sub>2</sub> = H	26.52 ± 2.73
<b>M4</b>	R <sub>1</sub> =O, R <sub>2</sub> =H	75.47 ± 3.48
<b>M5</b>	R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =Bn	19.30 ± 3.29
<b>M6</b>	R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	47.40 ± 1.25
<b>M7</b>	R <sub>1</sub> =OH, R <sub>2</sub> =-CH <sub>3</sub>	46.89 ± 0.66
<b>M8</b>	R <sub>1</sub> =OAc, R <sub>2</sub> = Bn	18.32 ± 0.33
<b>M9</b>	R <sub>1</sub> =OAc, R <sub>2</sub> =-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	9.11 ± 1.16
<b>M10</b>	R <sub>1</sub> =O, R <sub>2</sub> =Bn	24.04 ± 3.68
<b>M11</b>	R <sub>1</sub> =O, R <sub>2</sub> =-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	48.80 ± 1.65
<b>M12</b>	R <sub>1</sub> =O, R <sub>2</sub> =-CH <sub>3</sub>	48.76 ± 1.15
<b>M13</b>	A= 4-heptanolida, R <sub>2</sub> =H	24.01 ± 1.72
<b>14</b>	Indometacina	87.37 ± 0.05

**Figura 7.** Modificaciones realizadas al AU (1), donde el compuesto modificado con mejor actividad es el modelo probado es **M4**.

En el trabajo de Maldonado y colaboradores<sup>4</sup> se realizaron modificaciones sobre la estructura del ácido ursólico en los carbonos C-3 y C-28. Las modificaciones se observan en la **figura 7**, donde el modelo en el que se probaron los derivados fue inhibición del edema inducido por ATF en oreja de ratón. El análisis de la respuesta biológica con las diferentes sustituciones realizadas al ácido

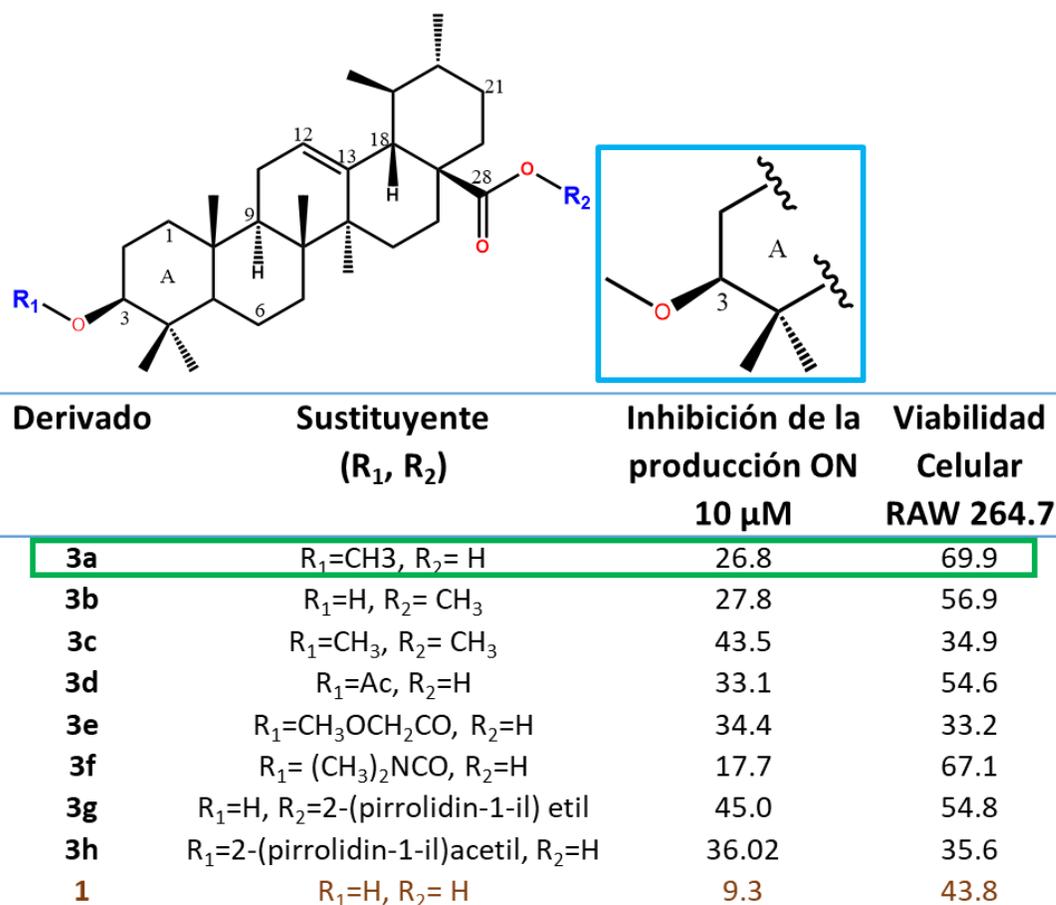
ursólico, culminó en la propuesta de un posible farmacóforo (**figura 8**), donde la modificación en C-3 por una cetona favorece inhibición de la inflamación.



**Figura 8.** El círculo verde muestra la modificación en la posición C-3 con un carbonilo para los derivados de ácido ursólico que tuvo mejor porcentaje de inhibición del edema inducido por ATF en oreja de ratón.

Otro ejemplo de estas modificaciones es el de Kwon y colaboradores, donde se observan diferentes modificaciones en los carbonos similares al trabajo anterior en las posiciones C-3 y C-28, **figura 9**.<sup>23</sup>

<sup>23</sup> Kow, T.; Lee, B.; Chung, S., Kim, D-H.; Lee, Y. Synthesis and NO Production Inhibitory Activities of Ursolic Acid and Oleanolic Acid Derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, 30, 119-123.



**Figura 9.** Modificaciones realizadas al AU (1), donde el compuesto modificado con mejor actividad es el modelo probado es **3a**.

En este trabajo se evaluaron 8 derivados del ácido ursólico en la línea celular RAW 264.7. Para observar el efecto antiinflamatorio se calculó la inhibición de la producción de óxido nítrico para cada compuesto a una concentración de 10 µM. En la **figura 9** se observa que los compuestos afectan a las células debido a que tienen viabilidades por debajo del 60%. Lo anterior podría ser causa de la toxicidad de los derivados frente a las células. El mejor compuesto de la serie es el **3a**, que tiene un éter metílico en el C-3 y presenta una inhibición de la producción de ON de 26.8 con la mejor viabilidad celular cerca del 70%.

## 1.4. Química del ácido ursólico

El ácido ursólico (**AU**) o ácido 3 $\beta$ -hidroxiurs-12-en-28-oico, es un triterpeno pentacíclico con fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, su peso molecular es de 456.00  $\frac{g}{mol}$  y su punto de fusión se reporta entre 283-285 °C. El ácido ursólico es un polvo amorfo de color blanco y se disuelve completamente en mezclas terciarias de disolventes orgánicos.<sup>24</sup> La biosíntesis de **AU** procede través de la vía del mevalonato. El proceso en general consiste en la ciclación del 2,3-óxidoescualeno catalizada por óxidoescualeno ciclasas (OSCs), que generan las dos conformaciones de estructura base de los triterpenos que provienen de la conformación silla, silla, silla (**SSS**), así como la de los esteroides que se derivan de la conformación silla, bote, silla (**SBS**). En el proceso se involucra la unión del sustrato y preorganización (plegable) así como la iniciación de la reacción por protonación del epóxido, que conduce a la ciclación inicial al catión dammarenilo C-20, además de la ciclación y reordenamiento de las especies de carbocationes derivados de este, que incluyen la expansión del anillo y metilo y transposiciones 1,2 de hidruro que se mueven a través de una serie de intermediarios carbocatiónicos, generando una variedad de compuestos intermediarios del esqueleto a lo largo del camino. El proceso culmina con la captación de agua para producir los triterpenos pentacíclicos (**figura 10**). En resumen, el catión dammarenilo se somete a expansión de anillo y ciclación adicional para formar el quinto anillo característico en los compuestos de tipo

---

<sup>24</sup> Babalola, I. T.; Shode, F. O. Ubiquitous Ursolic Acid : A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. *J. Pharmacogn. Phytochem. Ubiquitous*, **2013**, 2, 214–222.

triterpeno como el lupeol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, ácido oleanólico y ácido ursólico.<sup>25</sup>

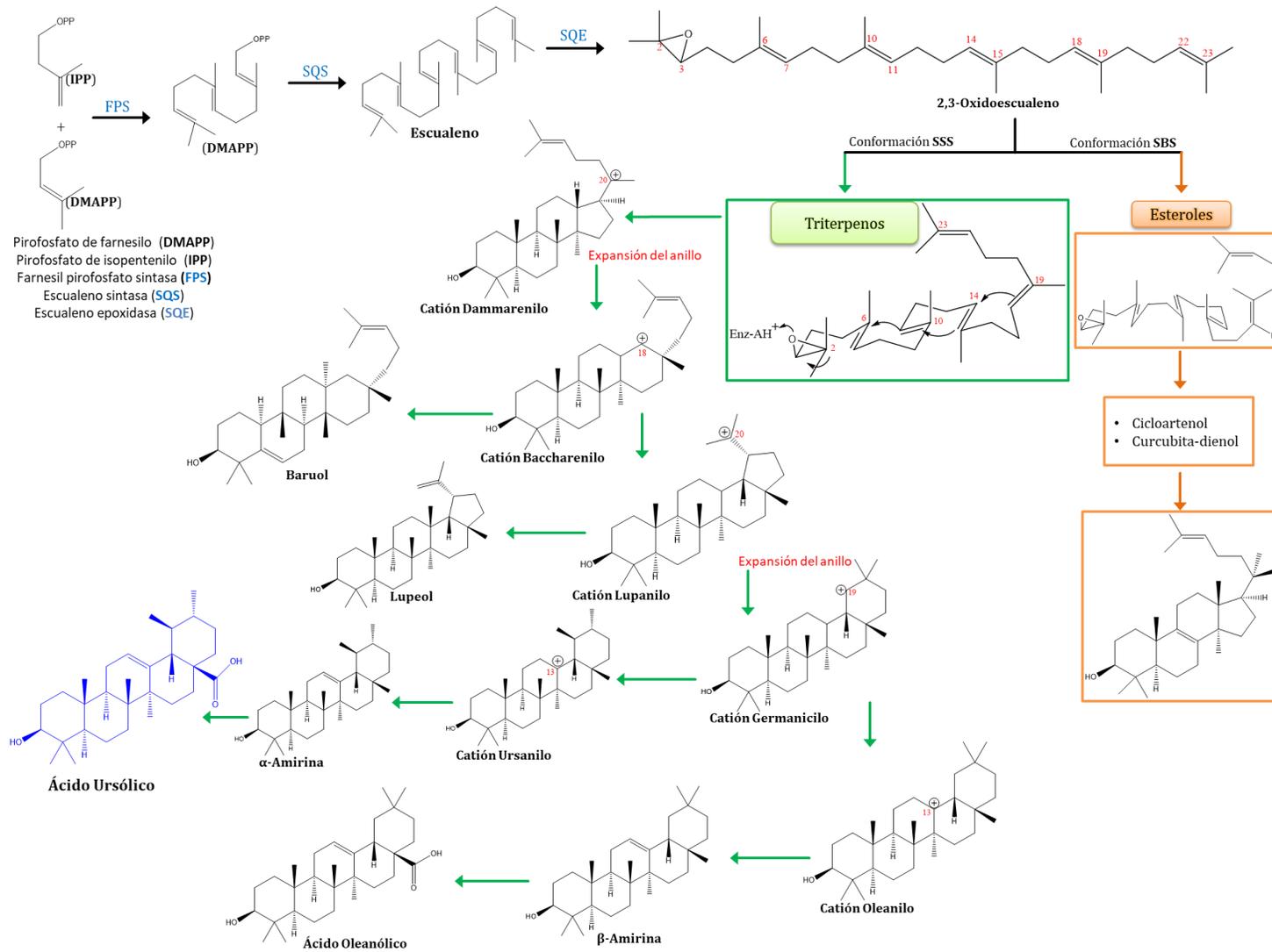
26

---

<sup>25</sup> Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O'Maille, P.; Osbourn, A. Triterpene biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, 65, 225–57.

<sup>26</sup> Salvador, J.; R., Moreira, V. M.; Gonçalves, B. M. F.; Leal, A. S.; Jing, Y. Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1463–79.

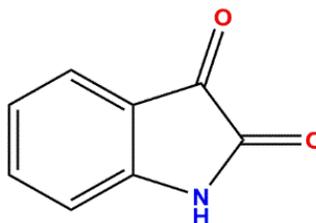
# Capítulo 1



**Figura 10.** Biosíntesis del ácido ursólico a través de la vía del mevalonato.<sup>17</sup>

## 1.5 Isatina

La isatina (1H-indol-2,3-diona (**figura 11**)), pertenece a la familia de derivados de tipo indol. Se encuentra en la naturaleza en determinadas especies de plantas, en algunos animales, y en humanos, como derivado metabólico de la adrenalina. En los últimos años las isatinas han sido el tema de interés de varios grupos de investigación, debido a la gran variedad de aplicaciones potenciales en los aspectos clínicos y medicinales.<sup>27</sup> Existen reportes en la literatura que revelan un amplio espectro de actividades farmacológicas atribuidas a los derivados de isatina que incluyen actividades como: antifúngica, anticonvulsiva, antibacteriana, antiinflamatoria, analgésica, antidepresiva y antioxidante.<sup>28,29</sup> Derivados de isatina abrieron un panorama prometedor en la química orgánica sintética debido a sus propiedades biológicas y farmacológicas.<sup>21</sup>



**Figura 11.** Estructura de isatina

<sup>27</sup> Debarati ,R.; Bijan K.P.; Guchhait, N. Differential binding modes of anti-cancer, anti-HIV drugs belonging to isatin family with a model transport protein: A joint refinement from spectroscopic and molecular modeling approaches. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2013**, 127, 18–27.

<sup>28</sup> Venkateshwarlu, E.; Venkateshwar R. J.; Umasankar, K.; Dheeraj, G. Study of Anti-Inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activity of Novel Isatin Derivatives. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, 5, 4–7.

<sup>29</sup> Chang, Y.; Yuan, Y.; Zhang, Q.; Rong, Y.; Yang, Y.; Chi, M.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Yu, P.; Teng, Y. Effects of an isatin derivatives on tumor cell migration and angiogenesis. *RSC Adv.* **2020**, 10, 1191-1197.

## 1.6. Diseño y desarrollo de fármacos

Muchos de los fármacos disponibles para uso clínico son el resultado de una amplia investigación; donde son caracterizados mediante técnicas de cribado (rastreo) convencionales, que consisten en la evaluación con múltiples ensayos biológicos de una colección de sustancias lo más amplia posible. Esta metodología es aplicada a compuestos de origen natural o sintético, y la elección de los compuestos es a prueba y error. Con ello se identifica un compuesto que sobresalga en una determinada actividad biológica y después de esto se hacen análogos que puedan ser mejores que el compuesto inicial.<sup>30</sup>

A pesar de que el descubrimiento y desarrollo de medicamentos depende de las metodologías experimentales, se espera que este proceso se pueda acelerar con la ayuda de métodos computacionales (*in silico*), que permiten el uso de modelos teóricos precisos y con capacidad de procesamiento de grandes cantidades de datos.<sup>31</sup>

### 1.6.1. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

El diseño de fármacos asistido por computadora consiste en aplicar un proceso por medio de una estrategia computacional para relacionar la actividad de un compuesto con su estructura química. Tiene tres objetivos principales:

- Diseño y descubrimiento de moléculas activas.
- Seleccionar candidatos de un grupo dado de estructuras, lo que proporciona un enfoque de las probabilidades de menor y mayor éxito, para direccionar las mejores estructuras a las pruebas experimentales.

---

<sup>30</sup> Sheridan, R.P.; Venkataraghavan, R. *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 322-329.

<sup>31</sup> Saldívar, G.F; Prieto, M.F.; Medina, F.J. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química.* **2017**, 28, 51-58.

- Optimización de moléculas (líderes) para mejorar sus propiedades para entrar en el proceso de desarrollo de un fármaco.<sup>32</sup>

### 1.6.2. Estrategias generales de los métodos computacionales.

La acción de gran cantidad de fármacos radica en su interacción con una macromolécula presente en el organismo (blanco biológico). Tomando este principio, los métodos DIFAC se dividen en dos partes:

- 1) Diseño basado en la estructura del ligando. Estos métodos se centran particularmente en el estudio de la estructura química de la molécula que presenta actividad biológica.
- 2) Diseño basado en la estructura del receptor. Estos métodos consideran la estructura tridimensional de la macromolécula con la que interactúa el ligando.

Por otro lado, la elección de la metodología depende del conocimiento que se tenga sobre el sistema. Cuando se conoce tanto el ligando y el receptor, se debe hacer uso de ambas estrategias para un estudio más preciso y, por ende, con mayor probabilidad de resultados de éxito.<sup>30</sup>

---

<sup>32</sup> Medina-Franco, J. Diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química* (2006).

## Justificación

Actualmente se cuenta con una variedad de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Aunque se cree que son fármacos relativamente seguros, en algunos casos pueden presentar efectos que amenazan la vida, por ello se continúa con la búsqueda de más alternativas.

El ácido ursólico (**AU**) es un producto natural que representa uno de los componentes principales de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional. El **AU** exhibe una amplia gama de actividades biológicas y cuenta con reportes que confirman su actividad antiinflamatoria<sup>33</sup> y mecanismos de acción por los cuales ejerce su efecto (sección 1.3.1).<sup>34</sup>

Derivados del ácido ursólico y del grupo ursano con modificaciones en el anillo A, han resultado tener efectos antiinflamatorios notables.<sup>35,36,20</sup> En este trabajo se propone incluir derivados de ácido ursólico con modificaciones menores en el anillo A e híbridos que incluyan isatina en la estructura de los compuestos. Estos antecedentes sugieren que el ácido ursólico podría tener un enorme potencial en el desarrollo de un compuesto bioactivo, que pueda ser candidato a un fármaco antiinflamatorio eficaz.

Por lo tanto, en este proyecto se plantea el desarrollo de una metodología de acoplamiento molecular con COX-1 y COX-2 a partir de 12 moléculas derivadas del

---

<sup>33</sup> Wozniak, L.; Skapska, S.; Marszalek, K. Ursolic Acid-A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Molecules*. **2015**, 20, 20614–20641.

<sup>34</sup> Jang, S. E.; Jeong, J. J.; Hyam, S. R.; Han, M. J.; Kim, D. H. Ursolic acid isolated from the seed of *Cornus officinalis* ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 on macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 9711–9721.

<sup>35</sup> Honda, T.; Finlay H.J.; Gribble, G.W.; Suh N.; Sporn, M.B. New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1997**, 7, 1623-1628.

<sup>36</sup> Suh, N.; Wang, Y.; Honda, T.; Gordon, W. G.; Dmitrovsky, E. A Novel Synthetic Oleanane Triterpenoid, 2-Cyano-3, 12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic Acid, with Potent Differentiating, Antiproliferative, and Anti-Inflammatory Activity. *Cancer Research*. **1999**, 59, 336-341.

ácido ursólico (**figura 1**).<sup>4</sup> Las moléculas fueron evaluadas experimentalmente en el modelo de inflamación inducida por ATF en oreja de ratón para probar su potencial como agentes antiinflamatorios. Posteriormente mediante la metodología de acoplamiento molecular desarrollada, elegir el o los compuestos candidatos de la serie **D1-D11** con mayor probabilidad de presentar efecto antiinflamatorio para realizar su semisíntesis química y evaluación de la actividad antiinflamatoria. Asimismo, se propone un análisis estructural de los híbridos que incluyen isatina mediante una metodología de relación estructura actividad QSAR que permita evaluar el incremento de volumen debido a la unión de ambas moléculas **AU** e isatina.

### Hipótesis

El diseño *in silico* para derivados de ácido ursólico modificados en el anillo A y conjugados con isatina, permitirá identificar a los derivados con mayor probabilidad de presentar actividad antiinflamatoria. Los compuestos del ácido ursólico con modificaciones en el anillo A semisintetizados presentarán actividad antiinflamatoria.

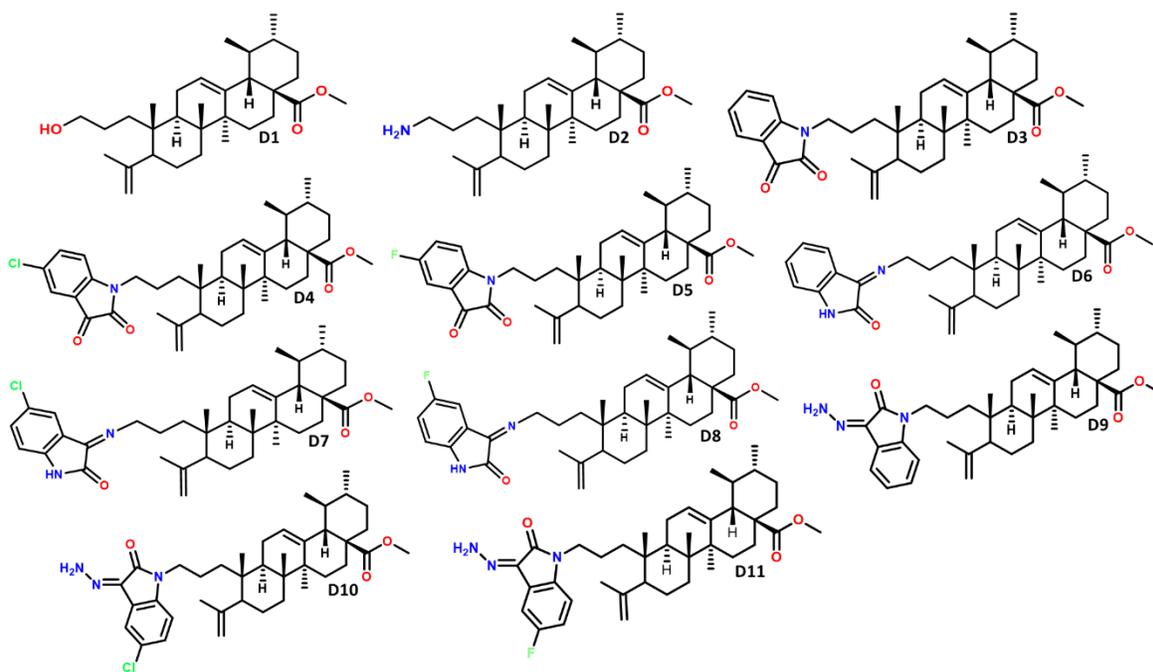
### Objetivos

#### Objetivo general

Llevar a cabo el análisis estructural *in silico* de derivados de ácido ursólico, incluyendo los híbridos con isatina, y sintetizar el o los derivados con mayor probabilidad de presentar actividad antiinflamatoria.

## Objetivos particulares

1. Identificar si el incremento de volumen en los híbridos de ácidos ursólico-isatina propuestos (**figura 12**) tendrán características estructurales que afecten sus propiedades fisicoquímicas. Lo anterior se hará por medio del diseño *in silico* para derivados de isatina con variabilidad estructural.



**Figura 12.** Compuestos de la serie D1-D11, propuesta de derivados con modificaciones menores D1 y D2 e híbridos que incluyen isatina D3-D11 en la estructuras de los compuestos.

2. Obtención de un modelo matemático QSAR tanto descriptivo como predictivo que permita la evaluación de derivados de isatina con actividad citotóxica.
3. Proponer el posible mecanismo de acción de los derivados de isatina con mejor actividad utilizados en la generación del modelo matemático QSAR.
4. Generación de un modelo de acoplamiento molecular que permita correlacionar la actividad antiinflamatoria *in vivo* con las posibles

interacciones específicas de los derivados **M1-M13** con las enzimas COX-1 y COX-2.

5. Usar la metodología de acoplamiento molecular para elegir el derivado de la serie **D1-D12** (figura 12) con mayor probabilidad de tener actividad antiinflamatoria.
6. Aislar y purificar el ácido úrsólico de su fuente natural *Astianthus viminalis* (Bignoniaceae), utilizando la metodología descrita previamente.<sup>4</sup>
7. Realizar la metilación de ácido ursólico (**M7**) utilizado como materia prima.
8. Obtener al ácido ursólico abierto en el anillo A mediante reacción de escisión radicalaria-oxidación.
9. Realizar la semisíntesis del derivado de ácido ursólico seleccionado por su mayor probabilidad de tener actividad antiinflamatoria.
10. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos, utilizando los modelos de Inhibición de la producción de ON en células RAW 264.7, e inhibición de la actividad específica de las enzimas COX-1/COX-2.

Con la finalidad de discutir adecuadamente los resultados obtenidos, este trabajo de tesis fue dividido en cuatro capítulos correspondientes a los diferentes aspectos del estudio realizado. Estos son: Cap. 2. Evaluaciones *in silico* para isatina; Cap. 3. Acoplamiento molecular de ácido ursólico y sus derivados con las ciclooxygenasas COX; Cap. 4. Aislamiento y purificación del ácido ursólico y semisíntesis de sus derivados; Cap. 5. Evaluaciones *in vitro*.

---

# Capítulo 2

## Evaluaciones *in silico* para isatina

## Capítulo 2. Evaluaciones *in silico* para isatina

### 2.1. Introducción

En este capítulo se describen los detalles de la generación de un modelo matemático QSAR para la evaluación de la actividad citotóxica en la línea celular Hela de los compuestos derivados de isatina, así como los híbridos AU-isatina.

### 2.2. Detalles computacionales

#### 2.2.1. Obtención del modelo matemático QSAR

##### 2.2.1.1. Búsqueda de moléculas

Se realizó una búsqueda de los derivados de isatina con actividad citotóxica utilizando la aplicación SCIFINDER, donde se seleccionaron cinco referencias entre 2011 y 2016<sup>37,38,39,40,41,42,43</sup>, de las cuales se tomaron las moléculas utilizadas en este estudio. Se obtuvieron 55 moléculas con actividad citotóxica experimental reportada para la línea celular Hela de cáncer cervicouterino humano (**figura 13**). Los valores experimentales de actividad citotóxica se reportaron como  $CI_{50}$ ,

---

<sup>37</sup> Nagarsenkar, A.; Guntuku, L.; Guggilapu, S.D.; Bai, D.K.; Gannaju, S.; Naidu, V.G.M.; Bathini, N.B. Synthesis and apoptosis inducing studies of triazole linked 3-benzylidene isatin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2016**, 124, 782-793.

<sup>38</sup> Evdokimov, N.M.; Magedov, I.V.; McBrayer, D.; Kornienko, A. Isatin derivatives with activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2016**, 26, 1558-1560.

<sup>39</sup> Sewar, K.R.; Sharma, P.; Reddy, T.S.; Jeengar, M.K.; Nayak, V.L.; Naidu, V.G.M.; Kamal, A.; Shankaraiah, N. Spirooxindole-derived morpholine-fused-1,2,3-triazoles: Design, synthesis, cytotoxicity and apoptosis inducing studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2015**, 102, 413-424

<sup>40</sup> Reddy, S.S.; Pallela, R.; Kim, D.M.; Won, M.S.; Shim, Y.B. Synthesis and evaluation of the cytotoxic activities of some isatin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 2013, **61**, 1105-1113.

<sup>41</sup> Gudipati, R.; Anreddy, R.N.R.; Manda, S. Synthesis, anticancer and antioxidant activities of some novel *N*-(benzo[d]oxazol-2-yl)-2-(7-or 5-substituted-2-oxindolin-3-ylidene) hydrazinecarboxamide derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2011**, 26, 813-818.

<sup>42</sup> Liang, C.; Xia, J.; Lei, D.; Li, X.; Yao, Q.; Gao, J. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of symmetrical bis-Schiff base derivatives of isatin. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2014**, 74, 742-750.

<sup>43</sup> Modi, N.R.; Shah, R.J.; Patel, M.J.; Suthar, M.; Chauhan, B.F.; Patel, L.J. Design, synthesis, and QSAR study of novel 2-(2,3-dioxo-2, 3-dihydro-1H-indol-1-yl)-*N*-phenylacetamide derivatives as cytotoxic agents. *Med Chem Res*. **2011**, 20, 615-625.

obtenidos midiendo el número de células vivas después del tratamiento con el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).<sup>44,45,46,47, 48</sup>

---

<sup>44</sup> Chengyuan L, Juan X, Dong L, Xiang L, Qizheng Y, Jing G (2014) Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of symmetrical bis-Schiff base derivatives of isatin. *European J Med Chem* 74:742-750.

<sup>45</sup> Nagarsenkar A, Guntuku L, Guggilapu SD, Bai K. D, Gannoju S, Naidu VM, Bathini NB (2016) Synthesis and apoptosis inducing studies of triazole linked 3-benzylidene isatin derivatives. *Eur J Med Chem* 124:782-793.

<sup>46</sup> Sewar KR, Sharma P, Reddy T, Jeengar MK, Nayak V, Naidu V, Kamal A, Shankaraiah N (2015) Spirooxindole-derived morpholine-fused-1,2,3-triazoles: Design, synthesis, cytotoxicity and apoptosis inducing studies. *Eur J Med Chem* 102: 413-424.

<sup>47</sup> Sanapalli SR, Ramjee P, Dong-Min K, Mi-Sook W, Yoon-Bo S (2013) Synthesis and Evaluation of the Cytotoxic Activities of Some Isatin Derivatives. *Chem Pharm Bull* 61:105-1113.

<sup>48</sup> Rajyalakshmi G, Rama NRA, Saranagapani M (2011) Synthesis, anticancer and antioxidant activities of some novel N-(benzo[d]oxazol-2-yl)-2-(7-or 5-substituted-2-oxoindolin-3-ylidene) hydrazinecarboxamide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem* 26:813–818.

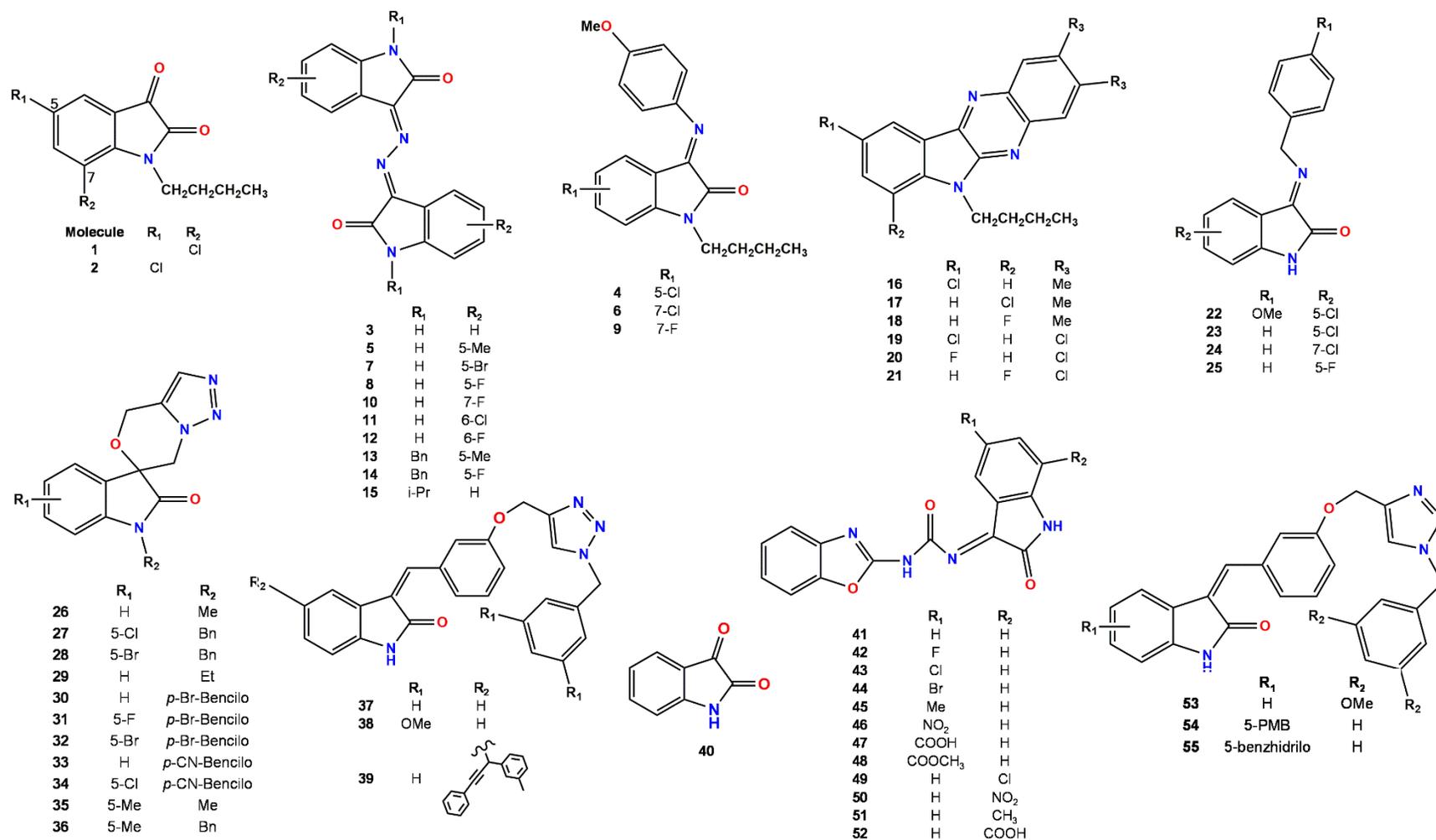


Figura 13. Estructura de los 55 derivados de isatina utilizados para los ensayos *in silico*.

### 2.2.1.1.1. Construcción y optimización de la geometría molecular

Las estructuras de los 55 derivados de isatina se construyeron con el programa Spartan 14.<sup>49</sup> El conformero de equilibrio de cada estructura se obtuvo analizando 10,000 conformaciones con el campo de fuerza MMFFaq.<sup>50</sup> Posteriormente, la geometría optimizada se adquirió a través del método semi-empírico PM6 (método paramétrico número 6).<sup>51</sup> Se realizó un cálculo de sus frecuencias vibratorias (IR) para corroborar que las estructuras estaban en un mínimo en la superficie de energía potencial.

### 2.2.1.2. Cálculo de descriptores moleculares

Empleando las estructuras optimizadas con los programas DRAGON<sup>50</sup> y Spartan 14, se obtuvieron ocho familias de descriptores moleculares (**tabla 3**). La selección de familias de descriptores constitucionales y fragmentos centrados en átomos permitió considerar el tipo de átomos y su distribución en la molécula. Las familias de descriptores topológicos obtenidos son importantes porque están relacionadas con la forma de la molécula y son independientes de su conformación. Adicional a estas familias, se calculó una serie de descriptores moleculares tridimensionales que dependen de la conformación de la molécula como: descriptores mecano-cuánticos y descriptores geométricos. Estos descriptores pueden sugerir una forma en cómo las moléculas en estudio interactúan con su blanco biológico por medio de su densidad electrónica. También se calculó una familia de descriptores de propiedades moleculares, relacionada con propiedades moleculares como el volumen y la lipofilia.

---

<sup>49</sup> Spartan'14 Wavefunction, Inc. Irvine, CA.

<sup>50</sup> Halgren TA, (1996) Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, parameterization, and Performance of MMFF94. J Comput Chem 17:490-519.

<sup>51</sup> D. f. W. (. f. M. D. C. Talete srl, Talete srl, DRAGON for Windows (Software for Molecular Descriptor Calculations). Version 5.4-2006, 2006.

**Tabla 3.** Descriptores moleculares usados para la generación del modelo matemático QSAR.

Dimensión del descriptor	Familia	Descriptor	Programa
<b>0D</b>	1. Descriptores constitucionales	MW, AMW, SV, Se, Sp, Ss, Mv, Me, Mp, Ms, nAT, nSK, nBT, nBO, nBM, SCBO, ARR, nCIC, nCIR, RBN, RBF, nDB, nTB, nAB, nH, nC, nN, nO, nP, nS, nF, nCL, nBK, nI, nB, nHM, nX, nR03, nR04, nR05, nR06, nR07, nR08, nR09, nR10, nR11, nR12, nBnZ	DRAGON
		CPK v, CPK a, CFD(HBD), CFD(POS), CFD(NEG)	Spartan14
<b>1D</b>	18. Fragmentos centrados en átomos	C-001, C-002, C-003, C-004, C-005, C-006, C-007, C-008, C-009, C-010, C-011, C-012, C-013, C-014, C-015, C-016, C-017, C-018, C-019, C-020, C-021, C-022, C-023, C-024, C-025, C-026, C-027, C-028, C-029, C-030, C-031, C-032, C-033, C-034, C-035, C-036, C-037, C-038, C-039, C-040, C-041, C-042, C-043, C-044, C-045, H-046, H-047, H-048, H-049, H-050, H-051, H-052, H-053, H-054, H-055, O-056, O-057, O-058, O-059, O-060, O-061, O-062, O-063, O-064, O-065, N-066, N-067, N-068, N-069, N-070, N-071, N-072, N-073, N-074, N-075, N-076, N-077, N-078, N-079, N-080, F-081, F-082, F-083, F-084, F-085, Cl-086, Cl-087, Cl-088, Cl-089, Cl-090, Br-091, Br-092, Br-093, Br-094, Br-	DRAGON

		095, I-096, I-097, I-098, I-099, I-100, S-101, S-102, S-103, S-104, S-105, S-106, S-107, S-108, S-109, S-110, S-111, S-112, S-113, S-114, S-115, P-116, P-117, P-118, P-119, P-120	
<b>2D</b>	2. Descriptores topológicos	ZM1, ZM1V, ZM2, ZM2V, Qindex, SNar, HNar, GNar, Xt, Dz, Ram, Pol, LPRS, VDA, MSD, SMTI, SMTIV, GMTI, GMTIV, Xu, SPI, W, WA, Har, Har2, QW, TI1, TI2, STN, HyDp, RHyDp, w, ww, Rww, D/D, Wap, WhetZ, Whetm, Whetv, Whete, Whetp, J, JhetZ, Jhetm, Jhetv, Jhete, Jhetp, MAXDN, MAXDP, DELS, TIE, SOK, S1K, S2K, S3K, PHI, BLI, PW2, PW3, PW4, PW5, PJI2, CSI, ECC, AECC, DECC, MDDD, UNIP, CENT, VAR, BAC, Lop, ICR, D/Dr03, D/Dr04, D/Dr05, D/Dr06, D/Dr07, D/Dr08, D/Dr09, D/Dr10, D/Dr11, D/Dr12, T(N..N), T(N..O), T(N..S), T(N..P), T(N..F), T(N..Cl), T(N..Br), T(N..I), T(O..O), T(O..S), T(O..P), T(O..F), T(O..Cl), T(O..Br), T(O..I), T(S..S), T(S..P), T(S..F), T(S..Cl), T(S..Br), T(S..I), T(P..P), T(P..F), T(P..Cl), T(P..Br), T(P..I), T(F..F), T(F..Cl), T(F..Br), T(F..I), T(Cl..Cl), T(Cl..Br), T(Cl..I), T(Br..Br), T(Br..I), T(I..I)	DRAGON
	Mecano-cuánticos	E HOMO (kJ/mol), E LUMO (kJ/mol), PSA, Dipole	Spartan14

<p><b>3D</b></p>	<p>12. Descriptores geométricos</p>	<p>W3D, J3D, H3D, AGDD, DDI, ADDD, G1, G2, RGyr, SPAN, SPAM, MEcc, SPH, ASP, FDI, PJI3, L/Bw, SEig, HOMA, RCI, AROM, HOMT, DISPm, QXXm, QYYm, QZZm, DISpv, QXXv, QYYv, QZZv, DISPe, QXXe, QYYe, QZZe, DISPp, QXXp, QYYp, QZZp, G(N..N), G(N..O), G(N..S), G(N..P), G(N..F), G(N..Cl), G(N..Br), G(N..I), G(O..O), G(O..S), G(O..P), G(O..F), G(O..Cl), G(O..Br), G(O..I), G(S..S), G(S..P), G(S..F), G(S..Cl), G(S..Br), G(S..I), G(P..P), G(P..F), G(P..Cl), G(P..Br), G(P..I), G(F..F), G(F..Cl), G(F..Br), G(F..I), G(Cl..Cl), G(Cl..Br), G(Cl..I), G(Br..Br), G(Br..I), G(I..I)</p>	<p>DRAGON</p>
<p><b>Otros</b></p>	<p>19. Descriptores de carga</p>	<p>qpmax, qnmax, Qpos, Qneg, Qtot, Qmean, Q2, RPCG, RNCG, SPP, TE1, TE2, PCWTe, LDI</p>	<p>DRAGON</p>
	<p>20. Descriptores de propiedades moleculares</p>	<p>Ui, Hy, AMR, TPSA(NO), TPSA(Tot), MLOGP, MLOGP2, ALOGP, ALOGP2</p>	

Para este estudio, los descriptores de lipofilia y volumen que se emplearon fueron  $\pi$  y  $\Delta MR$ . Su descripción y cálculo son se muestran a continuación: el descriptor  $\pi$  define el efecto hidrofóbico ejercido por el sustituyente en la molécula del andamio, se calcula de la siguiente manera:

$$\pi = \log P_x - \log P_H \quad (1)$$

Donde  $\text{Log } P_x$  es el coeficiente de partición n-octanol/agua del compuesto y  $\text{Log } P_H$  es el coeficiente de partición n-octanol/agua de la molécula andamio. El programa DRAGON calcula Log P a través de dos modelos: el coeficiente de partición n-octanol/ agua de Moriguchi ( $M\text{Log } P$ ),<sup>52,53</sup> y el coeficiente de partición n-octanol/ agua de Ghose-Crippen-Viswanadha ( $A\text{Log } P$ ).<sup>54,55,56</sup> En este estudio QSAR ambos descriptores fueron usados para el cálculo de  $\pi$ :  $\pi_M$  y  $\pi_A$  para los modelos de Moriguchi y Ghose-Crippen-Viswanadha respectivamente.

Para medir el volumen del sustituyente y su posible efecto sobre la actividad biológica, proponemos el descriptor  $\Delta MR$  que se calcula con la siguiente ecuación:

$$\Delta MR = AMR_x - AMR_H \quad (2)$$

Donde  $AMR_x$ , es el valor de refractividad molar del compuesto con  $X$  sustituyente y  $AMR_H$  es el valor de refractividad molar de la molécula andamio. El valor de AMR para todas las moléculas se obtuvo por el método de contribución atómica de Ghose Crippen y modelo Viswanadhan.<sup>57</sup>

<sup>52</sup> Moriguchi, I.; Hirono, S; Liu, Q.; Nakagome, I.; Matshushita, Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem Pharm Bull*, **1992**, *1*,127-130.

<sup>53</sup> Moriguchi, I.; Hirono, S; Nakagome, I.; Hirano, H. Comparison of Reliability of log P values for Drugs Calculated by Several Methods. *Chem Pharm Bull*, **1994**, *42*,976-978.

<sup>54</sup> Ghose, A. K.; Crippen, G. M. Atomic Physicochemical Parameters for Three-Dimensional Structure-Directed Quantitative Structure-Activity Relationships I. Partition Coefficients as a Measure of Hydrophobicity. *J Comput Chem*, **1986**, *7*, 565-577.

<sup>55</sup> Viswanadhan, V. N.; Reddy, R.M.; Bacquet, R. J.; Erion, M. D. Assessment of methods used for predicting lipophilicity: Application to nucleosides and nucleoside bases. *J Comput Chem*, **1993**, *14*, 1019-1026.

<sup>56</sup> Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. *J Phys Chem A*, **1998**, *21*,3762-3772.

<sup>57</sup> Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski WJJ (1999) A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J Comb Chem* 1:55-68.

### 2.2.1.3. Obtención del modelo matemático QSAR

La generación de modelos matemáticos se realizó a través del programa MobyDigs Professional Versión 1.0<sup>58</sup>. Se utilizó la técnica de algoritmos genéticos (GA) para calcular los modelos de regresión. GA es un método evolutivo ampliamente utilizado para la optimización de problemas complejos. Para la obtención de los modelos, se utilizaron los 283 descriptores moleculares y la concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ) como variables independientes ( $X$ ) y variables dependientes ( $Y$ ), respectivamente. La generación del modelo matemático se realizó en dos fases: la fase de entrenamiento y la fase de validación. En la fase de entrenamiento, los modelos se generaron considerando todas las moléculas en el estudio y después de identificar los valores atípicos se inició la fase de validación, por lo tanto, el 30% de todas las moléculas fueron seleccionadas al azar por el programa para verificar la capacidad predictiva del modelo encontrado en la fase de entrenamiento. La obtención del modelo matemático se realizó empleando un máximo de siete variables independientes (descriptores moleculares). Se realizaron múltiples transformaciones a la variable dependiente ( $\log y$ ,  $1/\log y$ ,  $1 - \log y$ ,  $-1/\log y$ ) para el análisis de GA. Este procedimiento se hace con el fin de normalizar los datos para poder comparar valores con diferentes escalas de magnitud.

### 2.2.1.4. Validación estadística del modelo QSAR

Para validar el modelo matemático, se usó la regla QUIK ( $DK$ ) que sirve para eliminar modelos con co-linealidad y el reglas de redundancia ( $R^p$ ) y sobreajuste ( $R^N$ ) para rechazar modelos con un exceso de "buenos" y "malos" descriptores, respectivamente. Se utilizó la prueba F de Fishers ( $F$ ) para comprobar que el modelo no fuera obra del azar, además empleamos la desviación estándar ( $s$ ) y el

---

<sup>58</sup> Todeschini R, Ballabio D, Mauri V, MobyDigs-Version 1.0, MobyDigs-Version 1.0, 2004.

coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para determinar la correlación lineal del modelo. Lo anterior toma en cuenta que valores pequeños de  $s$  y valores altos de  $F$  indican modelos confiables.<sup>59,60</sup>

Para validar la capacidad predictiva de nuestro modelo, empleamos el coeficiente de validación cruzada ( $Q_{LOO}^2$ ); que utiliza el método Leave-One-Out (LOO), la regla  $Q^2$  asintótica para garantizar su futura capacidad predictiva y la técnica de validación externa ( $Q_{ext}^2$ ).<sup>61,62,63</sup> Para más detalles matemáticos de los parámetros estadísticos, se muestran en el anexo al capítulo 2 sección 2.2.1.4.

## 2.2.2. Análisis de similitud molecular

Después de una extensa investigación sobre el posible mecanismo de acción de los derivados de isatina en la literatura, se encontró que algunos derivados de isatina inducen apoptosis sobre las células cancerosas<sup>64,65</sup> y otros derivados de isatina actúan como activadores de P53.<sup>60,66</sup> A partir de esta información,

---

<sup>59</sup> Ahmed, M. S.; Yousry, A. A.; Amany, B.; Marwa, A. M.S.; Yehia, A. M.; Ahmed, B. M. M.; Gameel, A. M.E. A.; Ahmed, R. Design, synthesis, molecular docking and biological activity evaluation of some novel indole derivatives as potent anticancer active agents and apoptosis inducers. *Bioorg Chem*, **2019**, 85,399-412.

<sup>60</sup> Bulatov, E.; Sayarova, R.; Mingaleeva, R.; Miftakhova, R.; Gomzikova, M.; Ignatyev, Y.; Petukhov, A. Davidovich, P.; Rizvanov, A.; Barlev, N. A. Isatin-Schiff base-copper(II) complex induces cell death in p53-positive tumors. *Cell Death*, **2018**, 4, 103.

<sup>61</sup> Davidovich, P.; Aksenova, V.; Prtrova, V.; Tentler, D.; Orlova, D.; Smirnov, S.; Gurzhiy, V.; Okorokov, A.; Garabadzhiu; Melino, G.; Barlev, N.; Tribulovich, V. Discovery of Novel Isatin-Based p53 Inducers. *Med Chem Lett*, **2015**, 6, 856-860.

<sup>62</sup> Leung, K.K.K.; Shilton, B. H. Binding of DNA-Intercalating Agents to Oxidized and Reduced Quinone Reductase 2. *Biochemistry*, **2015**, 54, 7438-7448.

<sup>63</sup> Greschner, A. A.; Bujold, K. E.; Sleiman, H. F. Intercalators as Molecular Chaperones in DNA Self-Assembly. *J Am Chem Soc*, **2013**, 113, 11283- 11288.

<sup>64</sup> Yao, Z.; Hong-Ye, Z.; Kai-Lin, H.; Yao, Y.; Bin-Bin, S.; Qian-Nan, G.; Zhen-Chuan, F.; Young-Min, Z.; Yu-Ou, T.; Peng, Y. 5-(2-Carboxyethenyl) isatin derivative induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2014**, 450, 1650-1655.

<sup>65</sup> Ahmed, M. Sh.; Yousry, A. A.; Amany, B.; Marwa, A. M. Sh.; Yehia, A. M.; Ahmed, B. M. M.; Gameel, A. M. E. A.; Ahmed, R. Design, synthesis, molecular docking and biological activity evaluation of some novel indole derivatives as potent anticancer active agents and apoptosis inducers. *Bioorg Chem*, **2019**, 85,399-412.

<sup>66</sup> Bulatov, E.; Sayarova, R.; Mingaleeva, R.; Miftakhova, R.; Gomzikova, M.; Ignatyev, Y.; Petukhov, A.; Davidovich, P.; Rizvanov, A.; Barlev, N. A. Isatin-Schiff base-copper(II) complex induces cell death in p53-positive tumors. *Cell Death Discov*, **2018**, 4, 103.

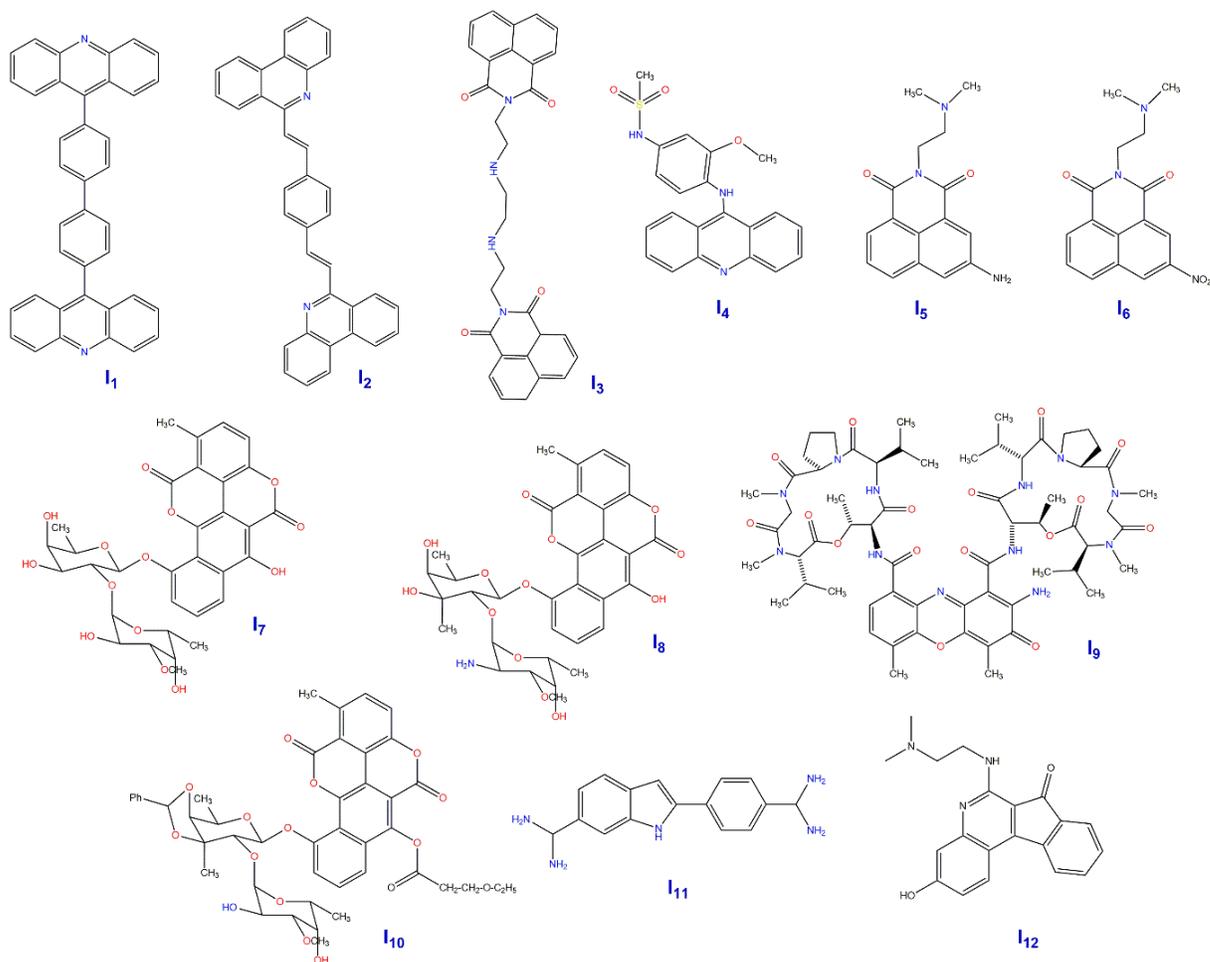
proponemos que algunos derivados de isatina actúen por la vía intrínseca de la apoptosis. De acuerdo con nuestro modelo QSAR, los derivados de isatina poseen una alta probabilidad de actuar como agentes intercaladores de ADN o en específico como agentes que se unen al surco menor del ADN. Esto se puede notar en la forma plana, extensa y en algunos casos la presencia de átomos ionizables positivos en su estructura. Por lo tanto, se realizó una búsqueda estructural de moléculas que actúen bajo este mecanismo de acción.<sup>61,62, 67,68,69</sup> Se seleccionaron doce moléculas para realizar el **ASM** con los derivados de isatina en Spartan14 (**figura 14**). La selección de las moléculas de unión al surco menor y de intercalación de ADN se basó en su carga total; solo se consideraron compuestos neutros, ya que todos los derivados de isatina son moléculas neutras. La geometría de equilibrio de los compuestos encontrados tanto intercaladores como de unión al surco menor del ADN se calculó de la misma forma que para los derivados de isatina usados en este trabajo.

---

<sup>67</sup> Wheate, N. J.; Brodie, C. R.; Collins, G. J.; Kemp, S. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. *Mini-Rev Med Chem*, **2007**, *7*,627-648.

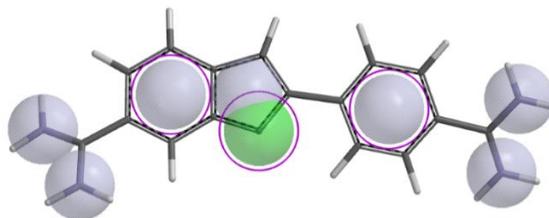
<sup>68</sup> Maggiora, G; Vogt, M.; Stumpfe, D.; Bajorath, J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.*, 2014, *57*, 3186-3204.

<sup>69</sup> Reha, D.; Kabela'c, M.; Ryja'cek, F.; Sponer, J.; Sponer, J. E.; Elstner, M.; Suhaj, S.; Hobza, P. Intercalators. 1. Nature of Stacking Interactions between Intercalators (Ethidium, Daunomycin, Ellipticine, and 4, 6-Diaminide-2-phenylindole) and DNA Base Pairs. Ab Initio Quantum Chemical, Density Functional Theory, and Empirical Potential Study. *J Am Chem Soc*, **2002**, *124*, 3366-3376.



**Figura 14.** Moléculas reportadas como agentes intercaladores y de unión al surco menor del ADN.

Para cada uno de los 55 derivados de isatina se obtuvo una biblioteca de confórmeros. Más tarde, esta biblioteca se utilizó para el **ASM** con los agentes intercaladores y de unión al surco menor del ADN que se encontraron en la literatura, donde se eligieron los descriptores funcionales químicos (CFD) de las estructuras para el **ASM** (figura 15), que según nuestro modelo QSAR son clave para la citotoxicidad de los compuestos.



**Figura 15.** I<sub>11</sub> agente de unión al surco menor del ADN, con la circunferencia morada se muestran la selección de CFDs utilizados para el análisis de similitud molecular, donde se realizó la comparación de esta molécula con los 55 derivados de isatina utilizados.

### 2.2.3. Acoplamiento molecular

Para evaluar el potencial de los derivados de isatina como intercaladores de ADN y la correlación con su actividad biológica, fue necesario un ensayo de acoplamiento molecular. Se realizó el acoplamiento molecular utilizando los compuestos con mejor similitud con el agente de unión al surco menor de ADN DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamidin, I<sub>11</sub> en la **figura 16**), así como los compuestos **13, 18, 19, 20, 53, 54 y 55**. Además, se realizó un análisis conformacional utilizando el campo de fuerza MMFFaq, con lo que se obtuvieron los confórmeros con la mínima energía potencial. El análisis de acoplamiento molecular se realizó sobre un dúplex B-DNA del Protein Data Bank (PDB: 5T4W, resolución de 2.3 Å), estructura que incluye DAPI unido en el surco menor. Todos los hidrógenos se agregaron con el servidor CHARMM-GUI, después de haber eliminado las moléculas de agua y los iones.

El programa Autodock 4.2 se utilizó para llevar a cabo el acoplamiento molecular. Tanto el ADN como los compuestos se prepararon con Autodock Tools 1.5.6, para obtener los archivos pdbqt. Todos los acoplamientos se colocaron sobre el surco menor de ADN (sitio de unión de DAPI), con dimensiones de rejilla de 22 Å x 24 Å x 20 Å, usando un espacio de 1 Å. Previo al acoplamiento se calcularon los mapas de cuadrícula con AutoGrid4 para cada compuesto en Autodock Tools. Lamarckian

GA se seleccionó como algoritmo de búsqueda y todos los parámetros de acoplamiento se configuraron como predeterminados. El acoplamiento se hizo manteniendo rígida la estructura del ADN y los derivados de isatina flexibles. Se generaron diez poses para cada compuesto, y se buscó una correlación entre los valores de  $Cl_{50}$  y los valores de puntuación (score) obtenidos. Además, para evaluar la flexibilidad del ADN, realizamos el acoplamiento sobre dos pares diferentes de dúplex B-DNA: el primer par dúplex B-DNA tiene la misma secuencia que 5T4W d(CGTGAATTCACG), un dúplex que forma un complejo con metilproamina (PDBID 1QV4) y el otro no incluye ligando (PDBID 1D29); el segundo par dúplex de B-DNA tiene la secuencia d(CGTGAATTCACG), un dúplex que forma un complejo con proamina (1QV8) y el otro no incluye ligando (6CQ3). Se usaron las mismas dimensiones y parámetros de cuadrícula en todos los experimentos de acoplamiento, esto para los tres conformeros de cada derivado de isatina con las cuatro estructuras de ADN, dado un total de doce experimentos para cada molécula. Las mejores poses se visualizaron con Molegro Virtual Docker.<sup>70</sup> Para más detalles del acoplamiento molecular consulte el anexo al capítulo 2 sección 2.2.3.

#### 2.2.4. Evaluación de los híbridos ácido ursólico (AU)-isatina en el modelo QSAR generado

Las estructuras de los híbridos AU-isatina D3-D11 se construyeron con el programa Spartan 14. El conformero de equilibrio y la geometría optimizada se obtuvo de la misma forma que para los derivados utilizados para la generación de modelo QSAR. Posteriormente, con las estructuras obtenidas se calcularon los descriptores moleculares en el programa DRAGON, y se seleccionaron los que se

---

<sup>70</sup> Thomsen, R.; Christensen, M. H. A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3315–3321.

incluyen en la ecuación (3) del modelo QSAR para que por medio de esta se pudiera predecir su actividad citotóxica en la línea celular Hela.

## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1. Análisis QSAR para los derivados de isatina en la línea celular Hela

A partir de la técnica de algoritmos genéticos se seleccionó la ecuación 3 como el mejor modelo matemático de acuerdo con los parámetros estadísticos de validación y la capacidad descriptiva de la actividad inhibitoria ( $CI_{50}$ ) en la línea celular Hela.

$$\begin{aligned} \log IC_{50} = & -0.00037W3D + 0.00204QYYv - 0.0234CFD(POS) + 0.13587nAT \\ & + 27.48336Xt - 18.30201PW2 - 0.11132H - 046 \\ & + 1.50338 \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} Q_{Loo}^2 = 77.54 \quad R^2 = 84.15 \quad s = 0.21 \quad F = 21.23 \quad Q_{ext}^2 = 79.57 \\ Dk = 0.018 \quad DQ = 0.039 \quad Rp = 0.073 \quad Rn = -0.028 \end{aligned}$$

Los valores de  $R^2(84.15)$  y  $Q_{Loo}^2(77.54)$  muestran la buena correlación y capacidad de predicción del modelo. Para comprobar la confiabilidad del modelo se utilizaron los valores de  $s$  y  $F$  (0.21 y 21.23, respectivamente), tomando en cuenta que valores pequeños de  $s$  y valores grandes de  $F$  indican modelos confiables.  $Dk$ ,  $DQ$ ,  $Rp$  y  $Rn$  satisfacen las reglas de sobre ajuste y redundancia  $QUIK$ ,  $Q_{ASYM}^2$ , descartando la colinealidad del modelo y asegurando con esto que no se tiene exceso de “buenos o malos descriptores moleculares”.

En la **tabla 4** se presentan los valores de los descriptores calculados para cada derivado de isatina. En el anexo al capítulo 2 sección 2.3.1, se muestran más detalles de cómo calcular los descriptores moleculares incluidos en el modelo matemático QSAR.

**Tabla 4.** Valores de los descriptores moleculares para todos los derivados de isatina utilizados en el modelo QSAR y datos experimentales de  $CI_{50}$  para la actividad citotóxica en la línea celular Hela.

Molécula	<i>W3D</i>	<i>QYYv</i>	<i>CFD(POS)</i>	<i>nAT</i>	<i>Xt</i>	<i>PW2</i>	<i>H-046</i>	<i>CI<sub>50</sub></i>
1	1584.16	135.73	0	28	0.31	0.58	5.00	273.38
2	1642.66	133.24	0	28	0.31	0.58	5.00	282.26
3	2714.50	303.20	2	32	0.24	0.59	0.00	13.44
4	6054.99	410.46	0	46	0.24	0.57	5.00	64.45
5	4121.92	374.15	2	38	0.24	0.60	6.00	8.60
6	6297.11	467.14	0	46	0.24	0.57	5.00	100.85
7	2747.21	347.80	2	32	0.24	0.60	0.00	14.09
8	2726.61	308.38	2	32	0.24	0.60	0.00	9.45
9	6012.59	401.40	0	46	0.24	0.57	5.00	176.35
10	2727.32	312.94	2	32	0.24	0.60	0.00	30.82
11	2747.17	372.27	2	32	0.24	0.60	0.00	24.58
12	2727.52	313.70	2	32	0.24	0.60	0.00	4.71
13	14665.25	1010.76	0	64	0.19	0.59	6.00	3.37
14	11840.66	1044.67	0	58	0.19	0.59	0.00	48.65
15	8051.26	593.85	0	50	0.22	0.59	0.00	65.10
16	5378.37	362.88	1	44	0.24	0.59	11.00	187.63
17	5564.69	381.88	1	44	0.24	0.59	11.00	84.65
18	5358.21	351.56	1	44	0.24	0.59	11.00	5.54
19	3636.70	300.33	1	38	0.24	0.59	5.00	8.56
20	3625.21	293.20	1	38	0.24	0.59	5.00	11.98
21	3620.90	293.08	1	38	0.24	0.59	5.00	54.30
22	3000.25	303.07	1	34	0.26	0.58	0.00	138.02
23	2089.77	205.33	1	30	0.27	0.58	0.00	265.66
24	2093.88	225.11	1	30	0.27	0.58	0.00	8.61
25	2008.81	171.29	1	30	0.27	0.58	0.00	59.35
26	2067.17	159.30	0	31	0.26	0.60	0.00	48.00
27	4164.11	256.32	0	41	0.22	0.59	0.00	15.14
28	4170.98	258.29	0	41	0.22	0.59	0.00	31.47
29	2570.78	174.48	0	34	0.25	0.59	0.00	11.24
30	4171.75	289.23	0	41	0.22	0.60	0.00	15.48
31	4180.65	290.35	0	41	0.22	0.60	0.00	14.61
32	4200.40	295.56	0	41	0.22	0.60	0.00	12.02
33	4479.47	303.02	0	42	0.22	0.59	0.00	21.40
34	4501.52	308.20	0	42	0.22	0.59	0.00	22.27
35	2637.72	179.70	0	34	0.26	0.61	3.00	10.23
36	4971.93	258.23	0	44	0.22	0.59	3.00	18.19

37	7211.33	355.36	1	51	0.20	0.58	0.00	32.33
38	9588.63	401.65	1	59	0.19	0.58	0.00	22.01
39	20140.26	878.92	1	79	0.17	0.58	4.00	32.80
40	402.54	38.19	1	16	0.36	0.59	0.00	421.90
41	3547.29	428.54	3	35	0.23	0.58	0.00	44.61
42	3553.46	434.10	3	35	0.23	0.59	0.00	18.82
43	3563.23	465.40	3	35	0.23	0.59	0.00	16.97
44	3567.94	486.88	3	35	0.23	0.59	0.00	15.88
45	4671.80	618.56	3	38	0.23	0.59	3.00	21.35
46	4413.86	616.52	3	37	0.22	0.59	0.00	29.67
47	4698.78	631.48	3	38	0.22	0.59	0.00	23.58
48	5647.42	670.37	3	41	0.22	0.59	0.00	32.39
49	3560.46	452.90	2	35	0.23	0.59	0.00	25.95
50	4465.55	654.07	3	37	0.22	0.59	0.00	23.65
51	4741.62	657.30	3	38	0.23	0.59	3.00	20.97
52	4417.60	504.93	3	38	0.22	0.59	0.00	18.52
53	10895.64	547.81	1	59	0.19	0.58	0.00	33.80
54	19731.03	1187.86	1	74	0.17	0.57	1.00	4.28
55	17420.11	1245.50	1	68	0.18	0.58	2.00	7.70

Todos los valores del logaritmo experimental de la actividad biológica ( $\log CI_{50}$ ) calculados y predichos ( $\log CI_{50CAL}$  y  $\log CI_{50PRED}$ ) se muestran en la **tabla 5**. También se incluye la diferencia entre el  $\log IC_{50}$  con  $\log IC_{50CAL}$  (*Err.Calc.*) y el  $\log CI_{50}$  con  $\log CI_{50PRED}$  (*Err.Pred.*). Las **figuras 16a** y **16b** muestran la comparación gráfica entre los valores de la actividad biológica experimental, actividad calculada y predicha. En la gráfica 16a se observa una buena correlación lineal entre el  $\log CI_{50CAL}$  vs  $\log IC_{50}$  con un  $R^2 = 0.912$ . Esto muestra que el modelo tiene una capacidad descriptiva adecuada.

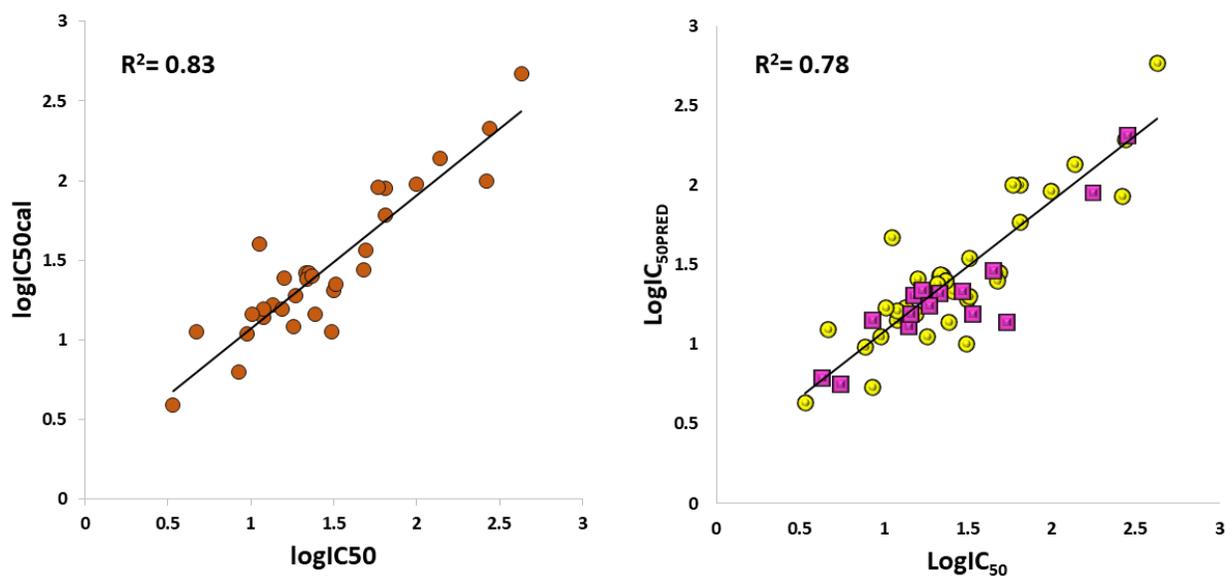
**Tabla 5.** Valores de actividad biológica experimental ( $\log CI_{50}$ ), calculada ( $\log CI_{50CAL}$ ) y predicha ( $\log CI_{50PRED}$ ) para los derivados de isatina utilizados para la generación del modelo QSAR.

<b>Molécula</b>	<b><math>\log IC_{50}</math></b>	<b><math>\log IC_{50CAL}</math></b>	<b><math>\log IC_{50PRED}</math></b>	<b><i>Err. Calc.</i></b>	<b><i>Err. Pred.</i></b>
<b>1</b>	2.44	2.45	2.45	0.01	0.02
<b>2</b>	2.45	2.45	2.45	0	0
<b>3</b>	1.13	1.35	1.37	0.22	0.24
<b>4</b>	1.81	2.01	2.05	0.2	0.24
<b>5</b>	0.93	0.68	0.61	-0.25	-0.32
<b>6</b>	2	2.07	2.09	0.07	0.09
<b>7</b>	1.15	1.02	1.01	-0.12	-0.14
<b>8</b>	0.98	-	0.95	-	-0.03
<b>9</b>	2.25	2.03	1.98	-0.22	-0.26
<b>10</b>	1.49	-	0.98	-	-0.51
<b>11</b>	1.39	1.08	1.05	-0.31	-0.34
<b>12</b>	0.67	0.96	0.99	0.28	0.32
<b>13</b>	0.53	0.59	0.62	0.06	0.09
<b>14</b>	1.69	1.56	1.48	-0.12	-0.2
<b>15</b>	1.81	1.76	1.73	-0.05	-0.08
<b>16</b>	2.27	-	0.73	-	-1.55
<b>17</b>	1.93	-	0.73	-	-1.2
<b>18</b>	0.74	0.73	0.72	-0.01	-0.02
<b>19</b>	0.93	1.12	1.14	0.19	0.21
<b>20</b>	1.08	1.11	1.11	0.03	0.03
<b>21</b>	1.73	-	1.13	-	-0.6
<b>22</b>	2.14	2.08	2.08	-0.06	-0.06
<b>23</b>	2.42	2	1.93	-0.42	-0.49
<b>24</b>	0.93	-	2.04	-	1.11
<b>25</b>	1.77	1.96	1.99	0.18	0.22
<b>26</b>	1.68	1.48	1.44	-0.21	-0.24
<b>27</b>	1.18	1.29	1.3	0.11	0.12
<b>28</b>	1.5	-	1.29	-	-0.2
<b>29</b>	1.05	-	1.74	-	0.69
<b>30</b>	1.19	1.34	1.35	0.15	0.16
<b>31</b>	1.16	1.18	1.18	0.02	0.02
<b>32</b>	1.08	1.19	1.2	0.11	0.12
<b>33</b>	1.33	1.43	1.44	0.1	0.11
<b>34</b>	1.35	1.28	1.27	-0.07	-0.08
<b>35</b>	1.01	1.13	1.17	0.12	0.16
<b>36</b>	1.26	1.05	1.03	-0.21	-0.23

<b>37</b>	1.51	1.42	1.39	-0.09	-0.11
<b>38</b>	1.34	1.4	1.46	0.05	0.12
<b>40</b>	2.63	2.71	2.86	0.09	0.23
<b>41</b>	1.65	1.43	1.41	-0.22	-0.24
<b>42</b>	1.27	1.24	1.24	-0.04	-0.04
<b>43</b>	1.23	1.3	1.31	0.07	0.08
<b>44</b>	1.2	1.35	1.36	0.15	0.16
<b>45</b>	1.33	1.29	1.28	-0.04	-0.05
<b>46</b>	1.47	-	1.37	-	-0.1
<b>47</b>	1.37	1.42	1.42	0.04	0.05
<b>48</b>	1.51	1.52	1.52	0.01	0.01
<b>49</b>	1.41	1.42	1.42	0	0
<b>50</b>	1.37	1.48	1.49	0.1	0.12
<b>51</b>	1.32	1.37	1.38	0.05	0.06
<b>52</b>	1.27	-	1.28	-	0.01
<b>53</b>	1.53	-	1.27	-	-0.26
<b>54</b>	0.63	0.59	0.55	-0.04	-0.08
<b>55</b>	0.89	0.95	0.97	0.06	0.09

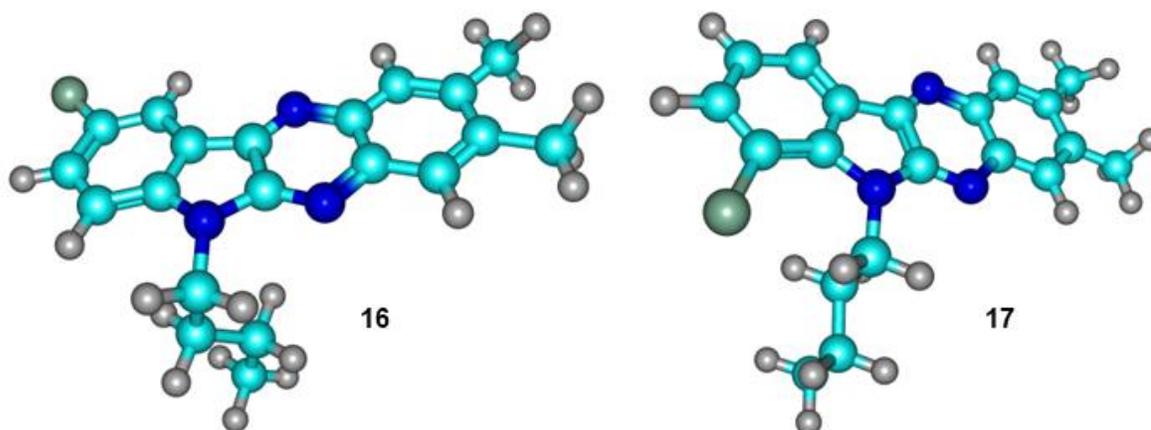
La **figura 16b** muestra el  $\log CI_{50PRED}$  vs  $\log CI_{50}$ . En este gráfico se puede observar que el modelo QSAR tiene una capacidad de predicción aceptable debido a su  $R^2 = 0.78$ . Es importante mencionar la existencia de moléculas con valores atípicos (**16**, **17**, **24** y **39**), encontrando una diferencia estructural considerable de estas con respecto a las otras moléculas. Para **16** y **17**, la posición del cloro es importante para su actividad citotóxica. En el caso de la molécula **16** tiene una marcada diferencia con respecto a las otras moléculas, ya que el cloro es el único sustituyente en su estructura, en el caso de la molécula **17** se observa una conformación diferente en comparación con todas las moléculas con estructura similar, debido a la interacción entre su cadena alifática y el átomo de cloro (**figura 17**). El compuesto **24** es estructuralmente diferente, debido a la posición del átomo de cloro en su estructura. Por su parte el compuesto **39** no se incluyó para la generación del modelo por la diferencia estructural con los 55 derivados de isatina utilizados en este trabajo. Todas las moléculas descritas anteriormente tienen una

marcada diferencia estructural con respecto a los otros derivados de isatina utilizados para la generación del modelo QSAR, por ello se denominan atípicas y son moléculas para las que el modelo QSAR tiene una interpretación deficiente.



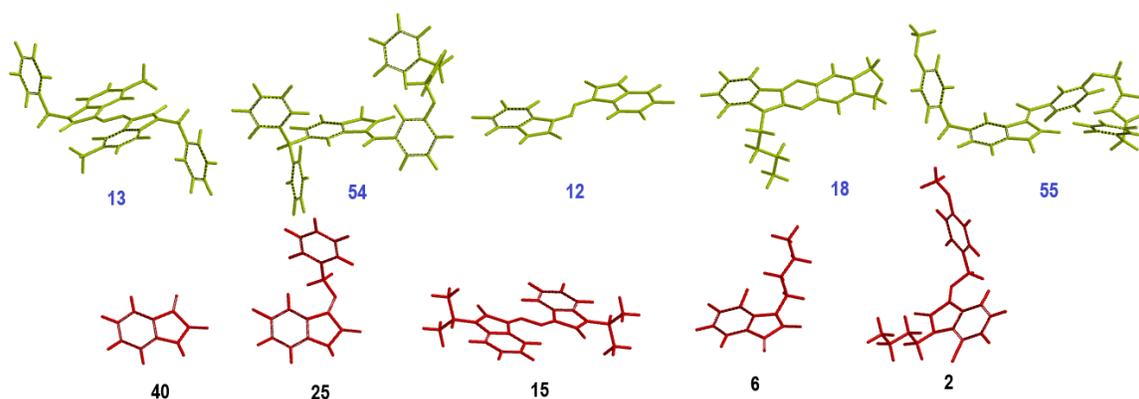
**Figura 16.** a) Gráfico de  $\log CI_{50CAL}$  vs  $\log CI_{50}$  de los derivados de isatina. b) Gráfico de  $\log CI_{50PRED}$  vs  $\log CI_{50}$  de la actividad experimental para los derivados de isatina.

Por otro lado, el compuesto **29** tiene el mayor valor tanto de *Err.cal* como de *Err.pred* en comparación con todo el conjunto de moléculas. Esto puede asociarse con el hecho de que es el único compuesto con un sustituyente etilo presente en la amina de su estructura, lo que lo hace diferente con respecto a las moléculas en el estudio.



**Figura 17.** El compuesto **16** no presenta interacción del átomo de cloro con la cadena alifática. En comparación, el compuesto **17** tiene una conformación diferente en la cadena alifática presente en su estructura por la interacción de esta con el átomo del cloro.

El índice de Wiener (*W3D*) se ve influenciado por las conformaciones de la molécula. Los valores más grandes corresponden a las conformaciones más extendidas, y los valores pequeños corresponden a las conformaciones más compactas. En la **figura 18** se puede observar la estructura 3D de las moléculas más activas (**13**, **54**, **12**, **18** y **55** en color amarillo) y las moléculas menos activas (**40**, **25**, **15**, **6**, **2** en color rojo) respectivamente. Las moléculas más activas tienen una conformación más extendida en comparación con las moléculas menos activas. Esta característica podría dar un indicio de cuál es la forma en que los derivados de isatina con mayor actividad biológica ejercen su efecto biológico, si son comparados con compuestos que actúan como intercaladores del surco menor del ADN, debido a que su forma plana y tamaño extendido se observa altamente correlacionado con su efecto biológico. El valor del descriptor *W3D* de la molécula más activa (**13**) es 14665.25 y para la molécula menos activa (**40**) fue 402.54. Este descriptor influye favorablemente en la actividad citotóxica aumentando su valor, y se correlaciona con el coeficiente negativo del descriptor en el modelo QSAR.



**Figura 18.** Estructura 3D de los derivados de isatina. Los compuestos más activos se presentan en amarillo y los menos activos se presentan en color rojo.

Derivado del análisis se observa que el aumento del descriptor  $Q_{yyv}$  es proporcional al incremento de anillos aromáticos en la estructura de los derivados de isatina (**13**, **14**, **54** y **55**). Esta característica estructural mejora la distribución de carga, aumenta el momento cuadrupolar e incrementa la hidrofobicidad de la molécula.

El descriptor  $Xt$  proporciona un valor que se relaciona con las conexiones entre los átomos presentes en la molécula. Se observa que al aumentar el volumen y la complejidad estructural de los derivados de isatina, el valor de  $Xt$  disminuye porque el número de ramificaciones es mayor, la actividad de estos compuestos incrementa y este aumento se ve correlacionado con el coeficiente positivo para este descriptor en el modelo QSAR. Por ejemplo, **13** (molécula más activa) tiene un valor  $Xt$  de 0.185 en comparación con **40** (molécula menos activa) que tiene un valor  $Xt$  de 0.588.

El descriptor  $PW2$  depende de la forma de la molécula y es independiente del tamaño de la misma. En moléculas con forma esférica el valor del descriptor se acerca más a uno.<sup>74</sup> En los compuestos con valores de  $PW2$  superiores a 0.590 se observa un aumento de la actividad citotóxica con valores de  $Cl_{50}$  inferiores a 20  $\mu M$

en la mayoría de los casos. Las estructuras con sustituyente tipo morfolina (26-36) mostraron los valores más altos de PW2 alrededor de 0.602 y 0.594, debido a que la morfolina aumenta la forma esférica de los derivados de isatina. Los valores más bajos de PW2  $\sim$  0.567 corresponden a los derivados 4, 6 y 9, con los valores más bajos de actividad biológica ( $CI_{50} \geq 60 \mu\text{M}$ ).

Dentro del conjunto de moléculas utilizadas se tienen valores de  $H - 046$  entre 1-11, en relación con la estructura de estas, se observa que al incrementar el valor de este descriptor se da un aumento en el número de átomos de hidrógeno unidos a un carbono  $sp_3$ . Con esta observación se propone un incremento en el carácter lipofílico de la molécula que le favorezca con una mejor distribución en un organismo. Por ejemplo en las moléculas 3 y 5 tienen valores de cero y seis para el descriptor  $H - 046$  y poseen un valor de citotoxicidad de 13.44 y 8.60  $\mu\text{M}$  respectivamente. El aumento del valor de  $H - 046$  aumentará también la actividad biológica. Sin embargo, la falta de este descriptor en una molécula no es determinante para tener un efecto biológico, ejemplos de esto son los compuestos 8 y 12 con valores de actividad biológica menores de 10  $\mu\text{M}$ .

Se observó que los valores del descriptor  $CFD (POS)$  para los derivados de isatina con mejor actividad biológica están entre cero y dos. Todos los derivados con valor de tres tienen disminución de la actividad biológica. Las moléculas pueden tener uno o dos  $CFD (POS)$  como máximo y estos sitios pueden usarse para incorporar modificaciones en la estructura que aumenten la actividad, por ejemplo el compuesto 13 que posee anillos aromáticos.

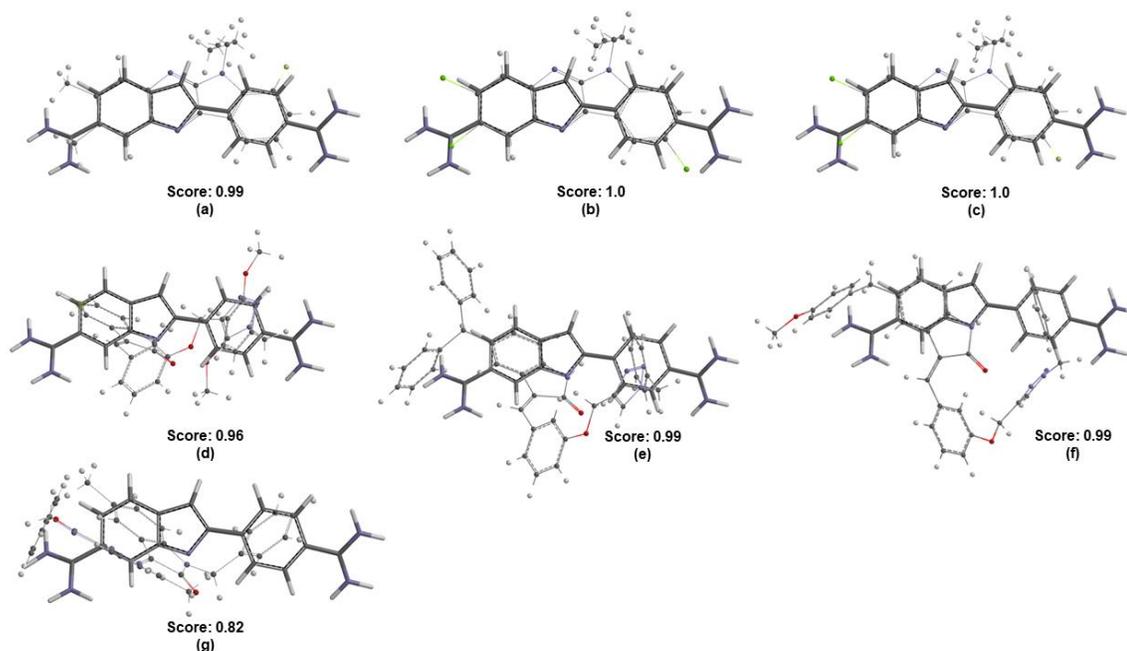
Finalmente, el valor para el número total de átomos ( $nAT$ ) se observa en los compuestos con mayor actividad de la serie y concuerda con el aumento en la complejidad y el volumen de los mismos.

A partir de la literatura en la que se ha demostrado que los derivados de isatina tienen un efecto citotóxico, además se tienen reportes donde estos compuestos experimentan la vía intrínseca apoptótica, y los descriptores moleculares en el modelo QSAR, proponemos que algunos de los derivados de isatina tengan su efecto biológico generando un daño a nivel de ADN. Para evaluar esta suposición, realizamos estudios de análisis de similitud molecular (**ASM**) con agentes de intercalación de ADN conocidos.

### 2.3.2. Análisis de similitud molecular

Como se menciona en detalles computacionales, la comparación de la estructura de derivados de isatina con compuestos con un mecanismo de acción reportado podría darnos un indicio de cómo estas moléculas ejercen su actividad biológica. Los resultados obtenidos del análisis de similitud para todos los agentes intercaladores de ADN y los derivados de isatina se muestran en la **tabla S3** (anexo al capítulo 2). Ocho de los doce compuestos de interés (intercaladores del ADN o agentes de unión al surco menor del ADN) tienen similitud con al menos uno de los derivados de isatina. El agente de unión al surco menor de ADN **I<sub>11</sub>** (DAPI) posee la mayor similitud con los compuestos **13**, **54**, **55**, **19**, **18** y **20** (**figura 19**). Estas moléculas muestran una notable actividad citotóxica, con  $CI_{50}$  entre 3 y 12  $\mu$ M. En la **figura 19** se puede observar la alineación de la estructura **I<sub>11</sub>** con cada uno de los derivados de isatina. En el caso de las moléculas **18**, **19** y **20**, obtuvimos un buen valor de puntuación de similitud. Los compuestos **53**, **54** y **55** mostraron más similitud estructural con **I<sub>11</sub>** que la molécula **13**, que tiene una estructura más rígida. Tres de los compuestos más activos (**13**, **54** y **55**) también poseen similitud con la actinomicina D (**I<sub>9</sub>**), agente intercalador del ADN. Sin embargo, estas similitudes estaban con otra parte de la estructura en lugar de la subestructura de isatina (**figura**

S3, anexo al capítulo 2). Por esta razón, estos resultados no se consideraron para el propósito de este trabajo, en el que se propuso encontrar un posible mecanismo de acción de los derivados de isatina y cómo la modificación estructural afecta su actividad biológica.



**Figura 19.** Alineamiento estructural de I<sub>11</sub> con los derivados de isatina. (a) 18; (b) 19; (c) 20; (d) 53; (e) 54; (f) 55; (g) 13.

Se observó que la similitud molecular entre DAPI y los derivados de isatina se relaciona con los anillos aromáticos presentes en las estructuras. En el modelo QSAR se analizó que la presencia de anillos aromáticos en los derivados de isatina provee a las estructuras una forma plana y rígida lo aumenta la actividad biológica. Adicional a esto el descriptor *CFD (POS)* presente en las estructuras comparadas permite que las moléculas interactúen por enlaces de hidrógeno.

Con base en los resultados anteriores, la mayor similitud molecular entre la estructura base de isatina y los agentes intercaladores o de unión al surco menor del ADN utilizados en el análisis de similitud fue con DAPI. Empleamos la estructura cristalina del DAPI unido al ADN (PDB: 5t4w) para realizar una metodología de

acoplamiento molecular que ayudó a respaldar el posible mecanismo de acción de los derivados de isatina que eran muy similares con este agente de unión al surco menor del ADN.

### 2.3.3. Análisis del acoplamiento molecular

Para llevar a cabo el acoplamiento molecular se seleccionó una estructura de ADN unida a I<sub>11</sub> y se realizaron los cálculos sobre el surco menor de ADN (figura 20). Los resultados del acoplamiento molecular para las mejores poses se enumeran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Valores de puntaje del acoplamiento molecular para los derivados de isatina seleccionados.

Molécula	Score(Kcal/mol)	LogCI <sub>50</sub>
13	-7.2	0.59
18	-7.3	0.73
19	-7.8	1.12
20	-7.6	1.12
53	-6.3	1.53
54	-7.4	0.63
55	-6.5	0.89

Los valores mostraron una tendencia con respecto a los valores de Log CI<sub>50</sub>, excepto 19 y 20 (figura 20b). Los compuestos con Log CI<sub>50</sub> más bajo se agruparon (13, 54 y 18), mientras que el compuesto con el Log CI<sub>50</sub> más alto (53) tiene la energía de unión más baja, lo que sugiere su potencial como un intercalador de surco menor de ADN. Por otro lado, se observó que los valores de Ki predichos a 298 K también eran comparables a los valores de CI<sub>50</sub> (tabla 7).

**Tabla 7.** Valores de  $K_i$  predichos, obtenidos del acoplamiento molecular para los derivados de isatina seleccionados.

Molécula	$K_i$ at 298 K ( $\mu M$ )	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )
<b>13</b>	4.69	3.37
<b>18</b>	4.38	5.54
<b>19</b>	1.84	8.56
<b>20</b>	2.83	11.98
<b>53</b>	24.02	33.8
<b>54</b>	3.52	4.28
<b>55</b>	15.28	7.70

Todas las mejores poses encajan en el surco menor del ADN, donde las interacciones principales son hidrofóbicas a través de los carbonos de los anillos de azúcar del ADN (figura 20c-j). Los derivados de isatina **53** y **55** mostraron un mal ajuste de sus andamios sobre el surco menor debido a las conformaciones más expuestas al solvente. Esto ayudó a explicar los valores bajos de puntuación de para estos compuestos que correlacionan con sus valores altos de  $\text{Log } CI_{50}$ . Las conformaciones de pose los compuestos **18**, **19** y **20** fueron las mismas, sin embargo, los valores de energía favorables para **19** y **20** pueden estar relacionados con mejores interacciones  $VdW$  en el surco menor debido a los átomos de cloro presentes en su estructura. El radio del cloro es mayor que el del flúor, que puede asociarse con un valor de energía ligeramente inferior para **18** y **20**, en comparación con **19**. Los derivados de isatina **13** y **54** también mostraron valores de puntaje altos debido a una mejor interacción, en contraste con **53** y **55**. Todos estos derivados tienen conformaciones más extendidas en comparación con el resto de las moléculas, una característica posiblemente relacionada con su mayor peso molecular. El análisis QSAR muestra que las moléculas con un alto valor de  $W3D$  (relacionado con una conformación más extendida) mostrarán una inhibición potente. Esto se correlaciona con una puntuación de energía alta para **54** y **13** que tiene el mayor valor de  $W3D$  en comparación con el resto de las moléculas.

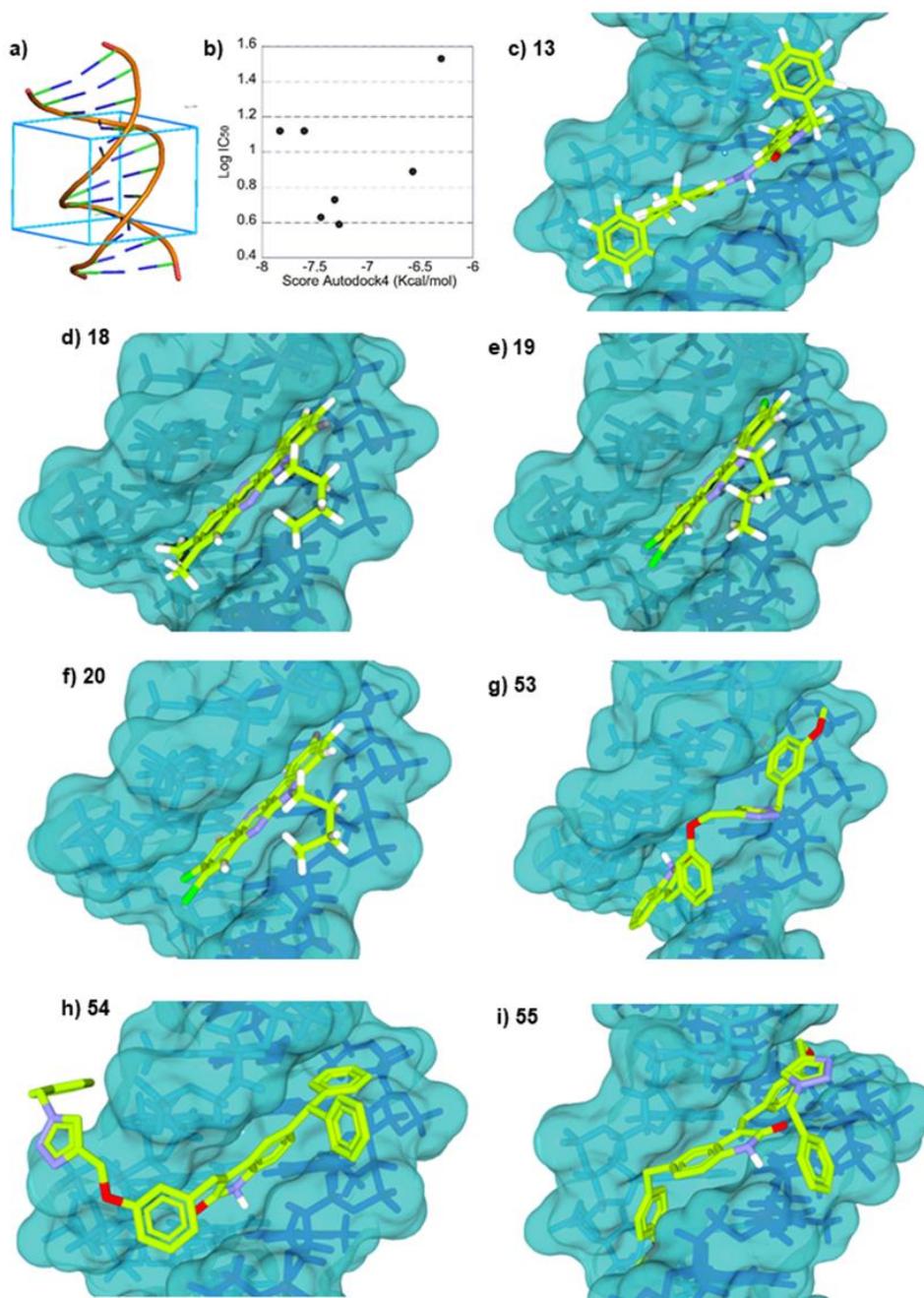


Figura 20. Acoplamiento molecular de los derivados de isatina sobre el surco menor del ADN. a) Sitio de enlace para I<sub>11</sub>, que se muestra en un cubo azul. b) Correlación de la puntuación de energía obtenida de Autodock 4.2 frente a los valores de Log IC<sub>50</sub>. Las mejores poses obtenidas para (c) 13; (d) 18; (e) 19; (f) 20; (g) 53; (h) 54; (i) 55. El ADN y los derivados de isatina se muestran como superficie y barras respectivamente.

El análisis de acoplamiento molecular realizado muestra una correlación adecuada con la actividad biológica de los derivados de isatina con los parámetros obtenidos para cada compuesto en el modelo QSAR, lo que sugiere que estas moléculas pueden actuar como agentes de unión al surco menor del DNA. Para respaldar esta suposición, evaluamos un espacio conformacional más grande para cada ligando y el DNA. Como primer paso, se realizó un análisis conformacional donde se obtuvieron las conformaciones de mínima energía de superficie potencial para cada molécula (**13, 18, 19, 20, 53, 54 y 55**). Se eligieron conformeros de los derivados de isatina con la mayor diversidad estructural (**figura 21**), para realizar el acoplamiento molecular sobre cuatro estructuras de ADN. Los resultados se describen a continuación.

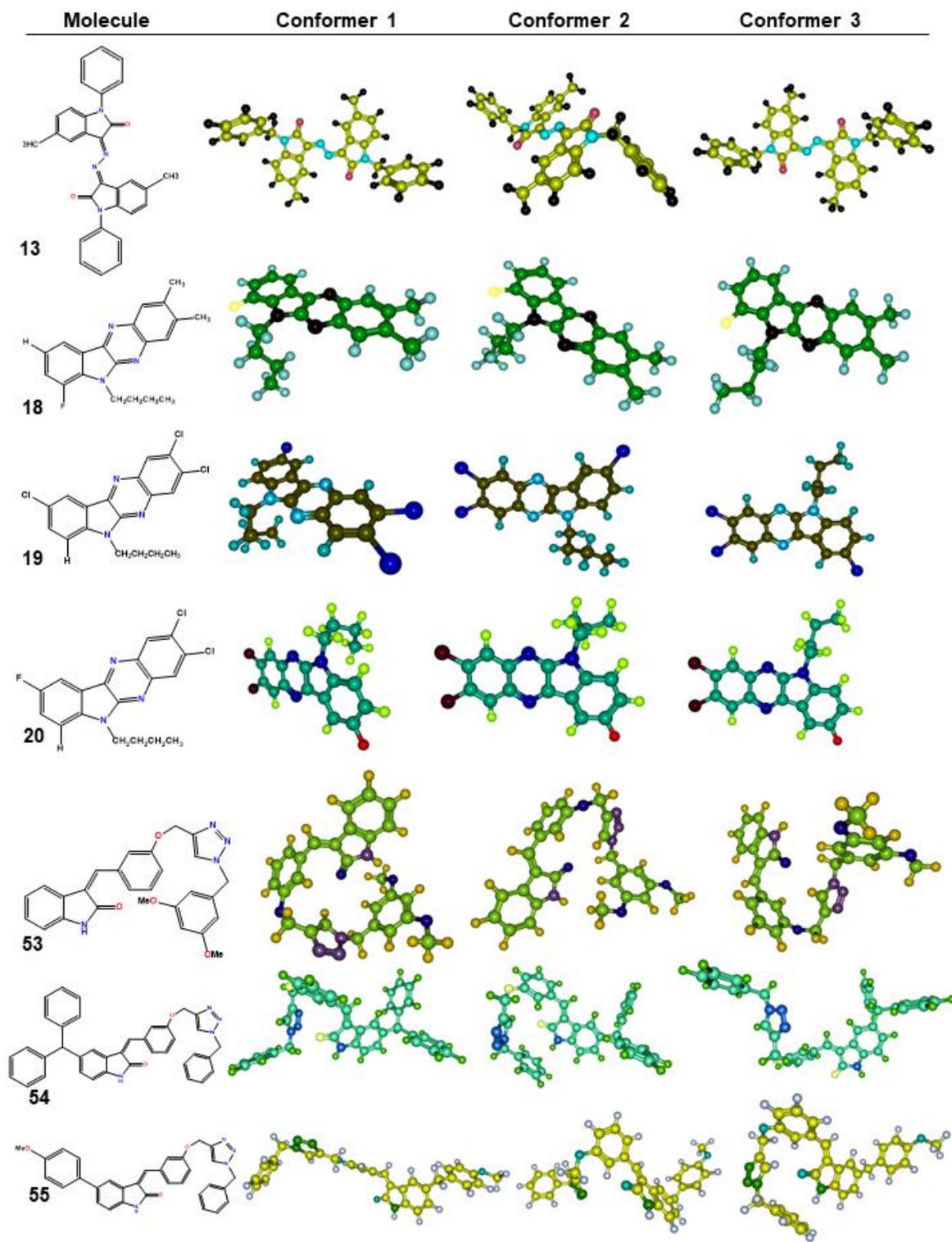
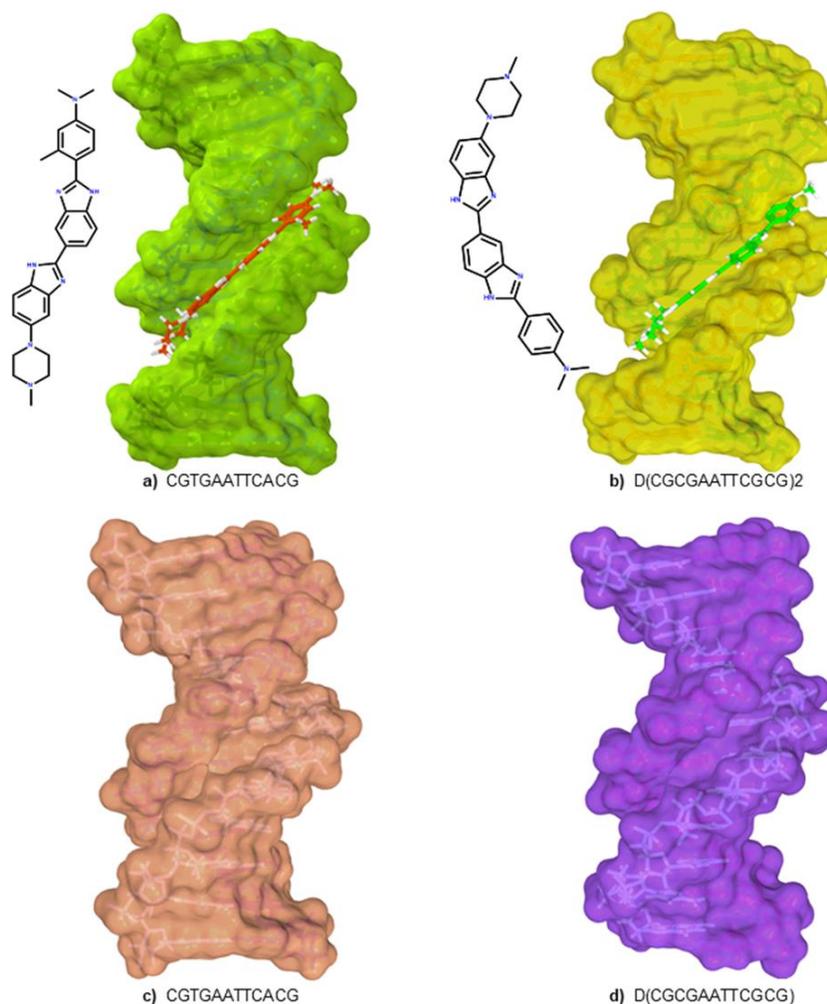


Figura 21. Representaciones 2D para tres conformeros estructurales de cada molécula utilizada en el análisis de acoplamiento molecular.

Se seleccionaron cuatro estructuras de ADN que contienen la secuencia AATT en el surco menor (**figura 22**), sitio de unión de DAPI, compuesto con alta similitud molecular en comparación con los derivados de isatina. Dentro de fragmentos de ADN seleccionados, hay dos que incluyen diferentes ligandos en su estructura cristalográfica, PDB: 1QV4 (dodecámero B-ADN d(CGTGAATTCACG) complejo que incluye metilproamina en el surco menor) y PDB: 1QV8 (dodecámero B-DNA d(CGCGAATTCGCG) complejo que incluye proamina en el surco menor). Estas dos estructuras permitieron el análisis del efecto de diferentes ligandos en el ancho del surco menor del ADN. Adicionalmente, se eligieron dos fragmentos del ADN sin ligando PDB: 1D29 (dodecámero B-DNA d(CGTGAATTCACG) y PDB: 6CQ3 (dodecámero B-DNA d(CGCGAATTCGCG)) para comparar los resultados de estos fragmentos cuando no están influenciados por el efecto inductivo del ligando.



**Figura 22.** Fragmentos de ADN a) y b) que incluyen ligando en su estructura cristalográfica, c) y d) no incluyen ligando.

En la **tabla 8** se muestran las energías de interacción (kcal/mol) de los tres conformeros derivados de isatina con las cuatro estructuras del ADN. Cabe señalar que los resultados no muestran una marcada tendencia entre energía de interacción y la  $Cl_{50}$  como se encontró en los estudios de acoplamiento molecular con el ADN unido a DAPI. Esto puede explicarse debido a la alta similitud estructural de los derivados de isatina con DAPI y porque la estructura de ADN utilizada para el acoplamiento molecular unido a DAPI posee un efecto inductivo causado por la

unión con este (un estrechamiento del surco menor), lo que favorece la interacción con los derivados de isatina.

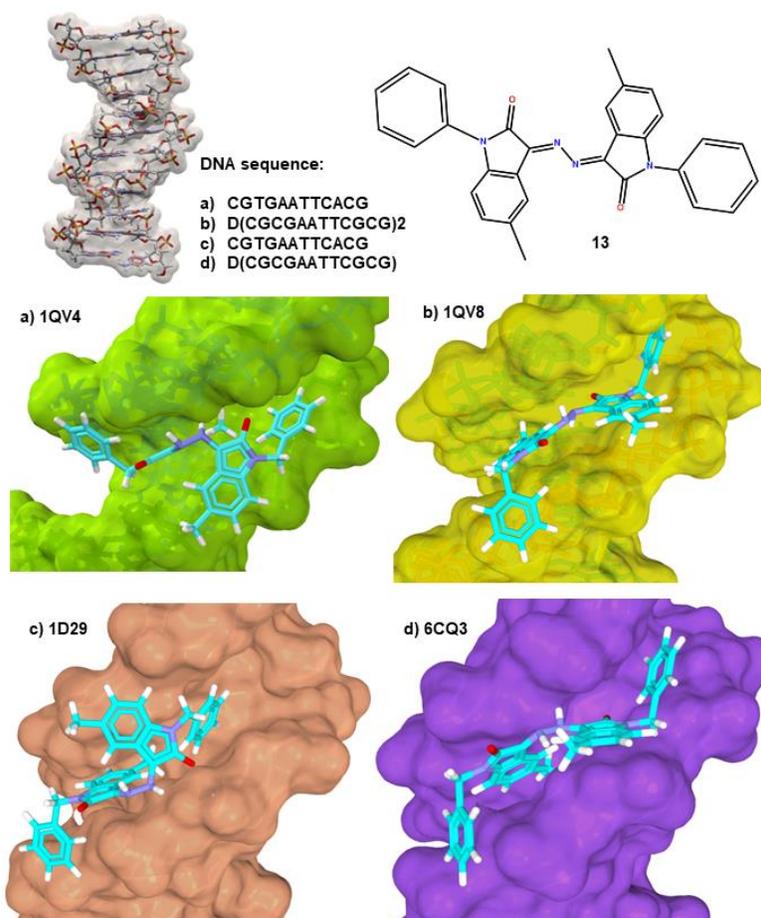
**Tabla 8.** Valores de puntuación obtenidos del acoplamiento molecular de los derivados de isatina con cuatro estructuras de ADN diferentes.

Molécula	Fragmento de ADN (PDB:ID)				$CI_{50}$ ( $\mu M$ )
	1QV4	1QV8	1D29	6CQ3	
	<i>Score(Kcal/mol)</i>				
<b>13</b>	-7.33±0.15	-7.60±0.20	-6.53±0.15	-5.80±0.35	3.37
<b>18</b>	-7.60±0.00	-7.83±0.06	-6.90±0.00	-6.43±0.06	5.54
<b>19</b>	-7.87±0.06	-8.20±0.10	-7.80±0.00	-6.63±0.12	8.56
<b>20</b>	-7.67±0.12	-8.10±0.17	-7.17±0.06	-6.67±0.06	11.98
<b>53</b>	-8.13±0.68	-7.73±0.67	-5.63±0.35	-4.57±0.23	33.8
<b>54</b>	-8.60±0.36	-9.07±0.32	-6.53±1.10	-5.10±0.80	4.28
<b>55</b>	-8.17±0.50	-8.90±0.87	-6.50±0.61	-5.53±0.38	7.70

Además, se puede obtener una correlación entre la energía de interacción y el  $CI_{50}$  cuando consideramos el número de anillos y enlaces rotables incluidos en la estructura de cada derivado de isatina. En este sentido, aumentar el número de anillos aromáticos en la molécula puede estar asociado con un aumento en las interacciones  $\pi - \pi$  entre el ADN y los derivados de isatina. El número de anillos aromáticos en el compuesto **13** es cuatro; en **18**, **19** y **20** son tres; en **53**, **54** y **55** son cuatro, seis y cinco respectivamente. Por otro lado, aumentar el número de enlaces rotables se asocia con una mayor pérdida entrópica, que afecta la interacción con el ADN; para el compuesto **13** el número es siete; para el **18**, **19** y **20** son tres; para el **53**, **54** y **55** el número es ocho y nueve respectivamente. Con respecto a lo anterior, los valores de  $CI_{50}$  de estas moléculas se pueden

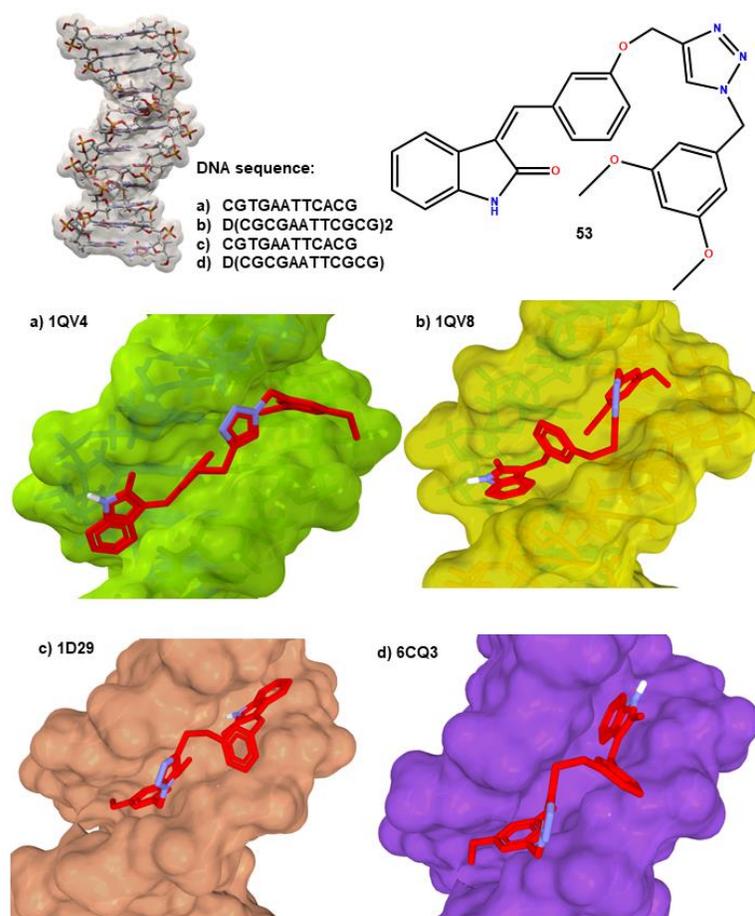
correlacionar con su energía de interacción con el ADN solamente si se considera el número de anillos aromáticos y de enlaces rotables.

En la **figura 23** se muestran las interacciones entre el compuesto **13** que presenta la mejor  $CI_{50}$  de los derivados de isatina utilizados en este estudio y las cuatro estructuras de ADN. A pesar del número de enlaces rotables, el compuesto **37** se une de manera favorable en el surco menor cada estructura de ADN. Podemos explicar estos modos de unión favorable debido a los anillos y las conformaciones moleculares que este compuesto (**13**) puede adoptar. Esta molécula tiene un centro rígido plano formado por las dos estructuras de isatina incluidas en su estructura, y los enlaces rotables en las esquinas de la molécula permiten que los anillos de fenilo se unan siguiendo la geometría del surco menor de la estructura del ADN.



**Figura 23.** Interacción del compuesto **13** con las cuatro estructuras de ADN seleccionadas.

La interacción del compuesto **53**, molécula con la menor actividad de los derivados de isatina evaluados, se muestra en la **figura 24**, donde se observa que el compuesto **53** presenta una mayor dificultad para unirse al surco menor de las cuatro estructuras de ADN. Asociamos esto con el mayor número y ubicación de enlaces rotables presentes en su estructura molecular. Esta característica impide una buena unión en el surco menor del ADN, asociada al menor número de anillos aromáticos, a diferencia del compuesto **54** que tiene un mayor número de anillos aromáticos lo que puede correlacionarse con su mayor actividad. El resto de los derivados de isatina y su interacción con las cuatro estructuras de ADN se muestran en el anexo al capítulo 2.



**Figura 24.** Interacción del compuesto **53** con las cuatro estructuras de ADN seleccionadas.

En las **figuras 23 y 24**, se observa que, a pesar de que ambos compuestos tienen el mismo número de anillos aromáticos en su estructura, los compuestos **13** y **53** interactúan de diferente forma con las estructuras de ADN. **13** tiene mayor rigidez estructural, presenta conformaciones alargadas y extendidas que ayudan con una mejor interacción con el ADN. En comparación, el compuesto **53** presenta una mayor movilidad debido al número de enlaces rotables en su estructura, lo que favorece diferentes conformaciones que no interactúan de manera favorable con las estructuras de ADN. Para los compuestos **18, 19** y **20**, su alto grado de rigidez les permite una buena interacción con las estructuras de ADN, ya que sus enlaces

rotables están presentes en solo una parte de la estructura de estos compuestos. Para los compuestos **54** y **55**, el aumento en el número de anillos aromáticos confiere un mejor modo de unión con el ADN.

En resumen, la actividad biológica de estos compuestos puede estar relacionada con su capacidad de unirse al ADN, pero debemos considerar otras características moleculares, como el número de anillos aromáticos, la forma de las estructuras, la ubicación y el número de enlaces rotables de los derivados de isatina.

#### 2.3.4. Análisis de los resultados obtenidos de la evaluación de los híbridos ácido ursólico (AU)-isatina en el modelo QSAR

Para realizar la predicción de los valores de  $CI_{50}$  de los compuestos **D3-D11** (figura 25) se calcularon los descriptores moleculares que están presentes en la ecuación tres del QSAR. Los valores obtenidos para cada compuesto se presentan en la tabla 9.

$$\log IC_{50} = -0.00037W3D + 0.00204QYYv - 0.0234CFD(POS) + 0.13587nAT + 27.48336Xt - 18.30201PW2 - 0.11132H - 046 + 1.50338 \quad (3)$$

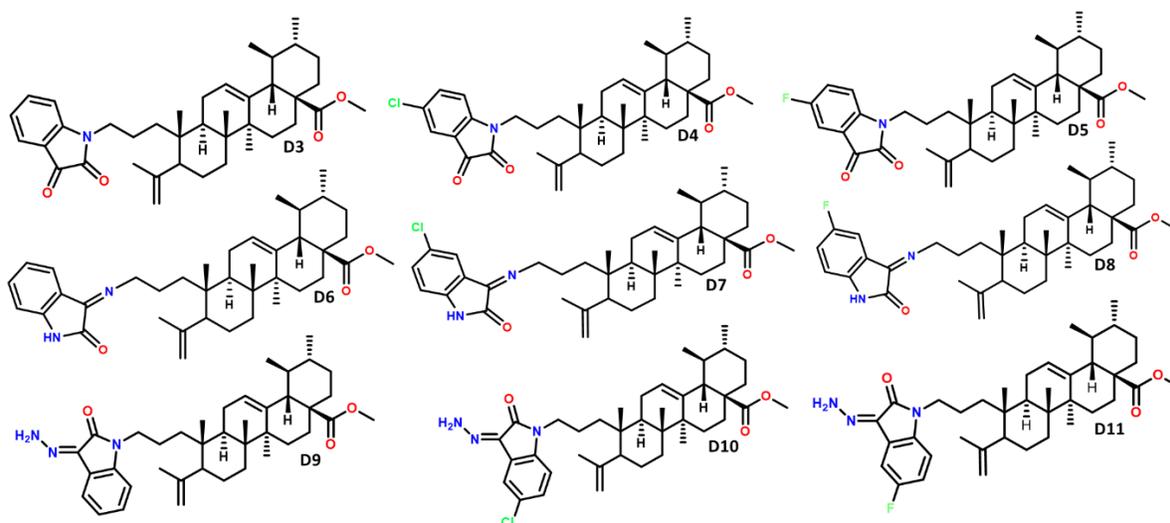


Figura 25. Híbridos D3-D11 AU-isatina, probados en el modelo QSAR para predecir su posible actividad citotóxica en la línea celular Hela.

Tabla 9. Valores calculados de los descriptores moleculares. LogCl<sub>50</sub> y Cl<sub>50</sub> predicha mediante el modelo QSAR para los compuestos D3-D11 en la línea celular Hela.

Híbrido	W3D	QYYv	CDF(POS)	nAT	Xt	PW2	H – 046	IC <sub>50</sub>	LogIC <sub>50</sub>
D3	30397.69	1220.17	0	97	0.18	0.619	39	1.59E-05	-4.80
D4	30444.03	1284.79	1	97	0.179	0.611	39	2.58E-05	-4.59
D5	30410.16	1228.38	1	97	0.179	0.614	39	1.80E-05	-4.75
D6	32369.11	1170.15	1	98	0.179	0.614	39	3.52E-06	-5.45
D7	32384.58	1204.25	1	98	0.178	0.611	39	4.34E-06	-5.36
D8	31868.93	1011.55	1	98	0.178	0.613	39	2.50E-06	-5.60
D9	32754.29	1231.26	1	100	0.178	0.613	39	6.18E-06	-5.21
D10	32806.02	1293.34	1	100	0.177	0.611	39	8.09E-06	-5.09
D11	32788.61	1247.75	0	100	0.177	0.616	39	5.66E-06	-5.25

Los resultados obtenidos muestran valores predichos para los compuestos D3-D11 en un orden de valores en micro unidades para la Cl<sub>50</sub>. Son resultados prometedores para la actividad biológica que pueden presentar estos compuestos. Al realizar la conjugación de las moléculas isatina y ácido ursólico se observan características diferentes como el incremento de volumen, la complejidad

estructural (debido al aumento de conexiones en la molécula), la forma de la molécula y el aumento del carácter lipofílico. Haciendo un análisis de las similitudes con los descriptores moleculares para el derivado de isatina **13** con mayor actividad experimental, observamos que para los compuestos **D3-D11** el índice de Wiener (*W3D*) y el descriptor *QYY<sub>v</sub>* tienen un valor mayor siendo un valor para el derivado **13** de 14665.5 y 1010.76 y un promedio para los compuestos **D3-D11** de 31802.60 y 12010.18 respectivamente, lo que concuerda con el aumento de volumen en las moléculas de esta serie. Cabe destacar que para los híbridos **AU-isatina W3D** el valor es casi el doble que para el derivado **13** con mayor actividad biológica experimental. *Xt* tiene un valor similar para todos los derivados **D3-D11**, con un valor promedio de 0.18 y para el derivado **13** un valor de 0.19 con lo que se observa que la conectividad de los compuestos de la serie **D** es poco menor que para **13**.

El descriptor *PW2* relacionado con la forma de las moléculas se ve incrementado en los híbridos **D3-D11** se observa un promedio de 0.614, se mencionó que para los derivados de isatina con una mejor actividad biológica experimental el valor observado debía encontrarse por arriba de 0.590, esto se observó en compuestos con forma más esférica.

Para los derivados de isatina se encontró que el número de centros ionizables positivos (*CDF(POS)*) debía estar entre cero y dos para mantener buena actividad biológica, lo que se cumple en los híbridos **AU-isatina** que cuentan con valores entre cero y uno. El número de átomos totales (*nAT*) de los híbridos se incrementó con un valor promedio de 98 lo que se esperaba al incrementar la complejidad estructural favoreciendo la actividad biológica.

Finalmente, el incremento de carbonos  $sp_3$  unidos a otro carbono descriptor *H* – **046** es evidente en los compuestos **D3-D11**, tomando en cuenta la adición del ácido ursólico en las moléculas híbridas con un valor promedio de 39 en comparación de

seis para el compuesto **13**. Lo anterior se nota como un cambio muy marcado en el valor del descriptor molecular  $H - 046$ , se esperaría un aumento de la lipofilidad de las moléculas que podría mejorar distribución en un ambiente biológico.

## 2.4. Conclusiones

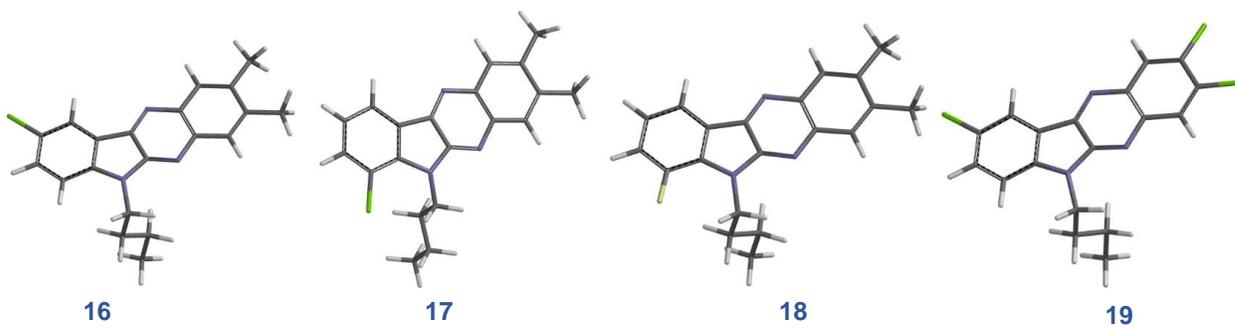
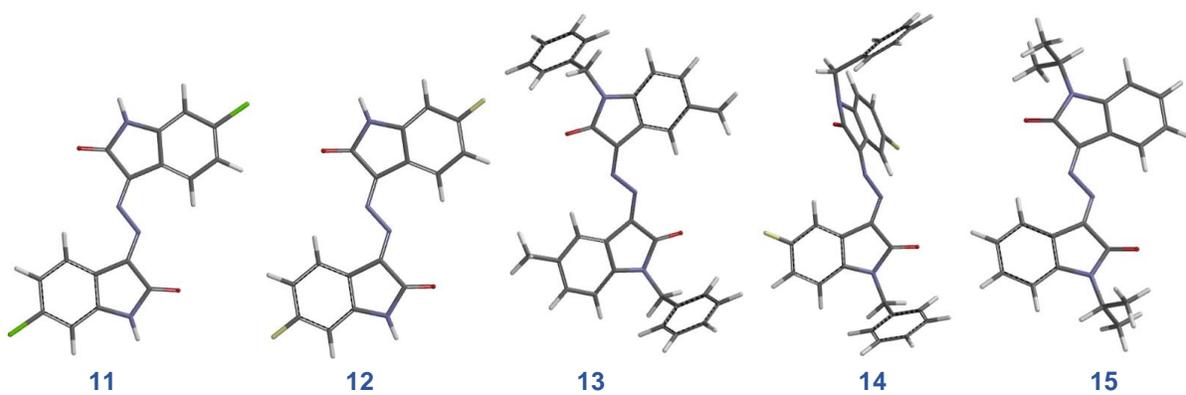
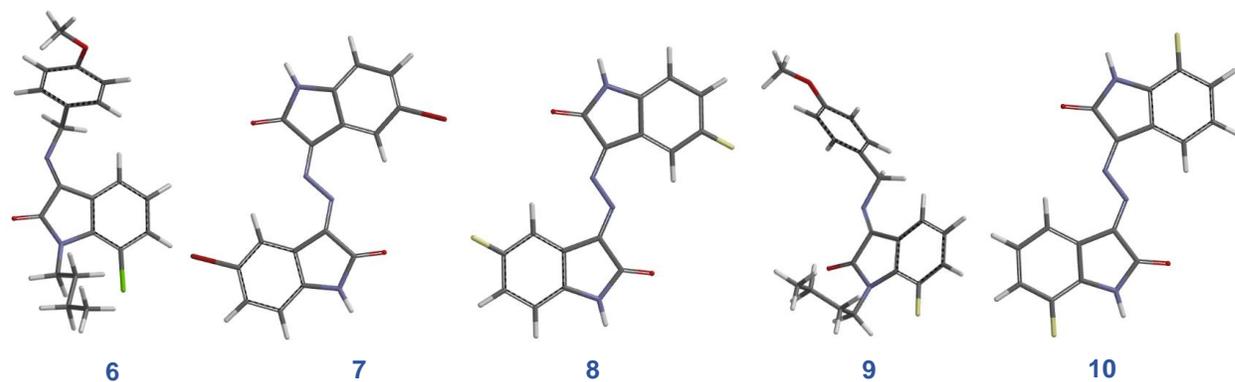
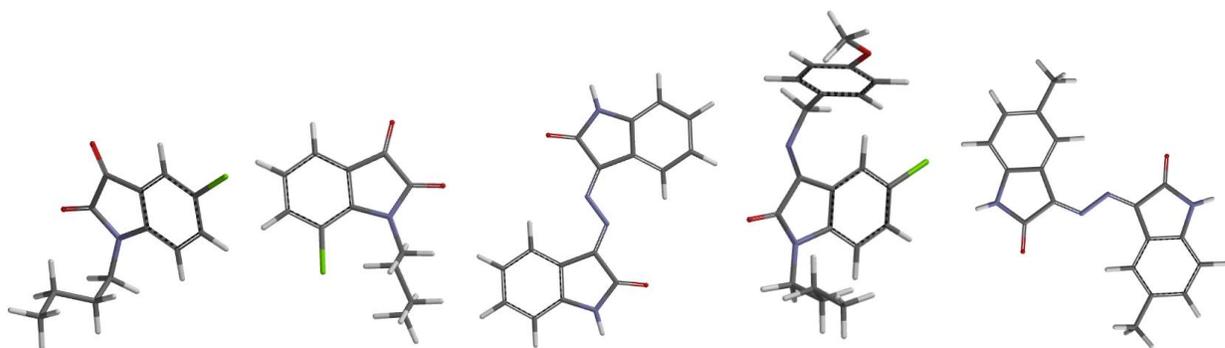
De los derivados de isatina utilizados en este trabajo, se obtuvo un buen modelo QSAR descriptivo y predictivo de acuerdo con todos los parámetros estadísticos evaluados. El modelo QSAR relaciona la forma molecular de los derivados de isatina con la actividad citotóxica, donde las moléculas planas y extendidas presentan mayor actividad biológica. Según el modelo, el aumento de la complejidad y el volumen de la molécula favorecen su actividad biológica. En algunos casos, la adición de grupos alquilo a la estructura base de isatina mejora la actividad citotóxica como en los compuestos **13** y **18**, esto se ve relacionado con un mejoramiento de la lipofilia de la molécula, y por lo tanto, su distribución en un sistema biológico. Los sitios ionizables positivos como las aminas secundarias y las iminas pueden ayudar a incrementar las interacciones de los derivados de isatina con su blanco biológico. A partir del modelo QSAR, proponemos que los derivados de isatina con mayor actividad pueden tener su efecto como agentes de unión al surco menor del ADN, debido a que una forma plana extendida y sitios ionizables positivos incrementan la actividad citotóxica.

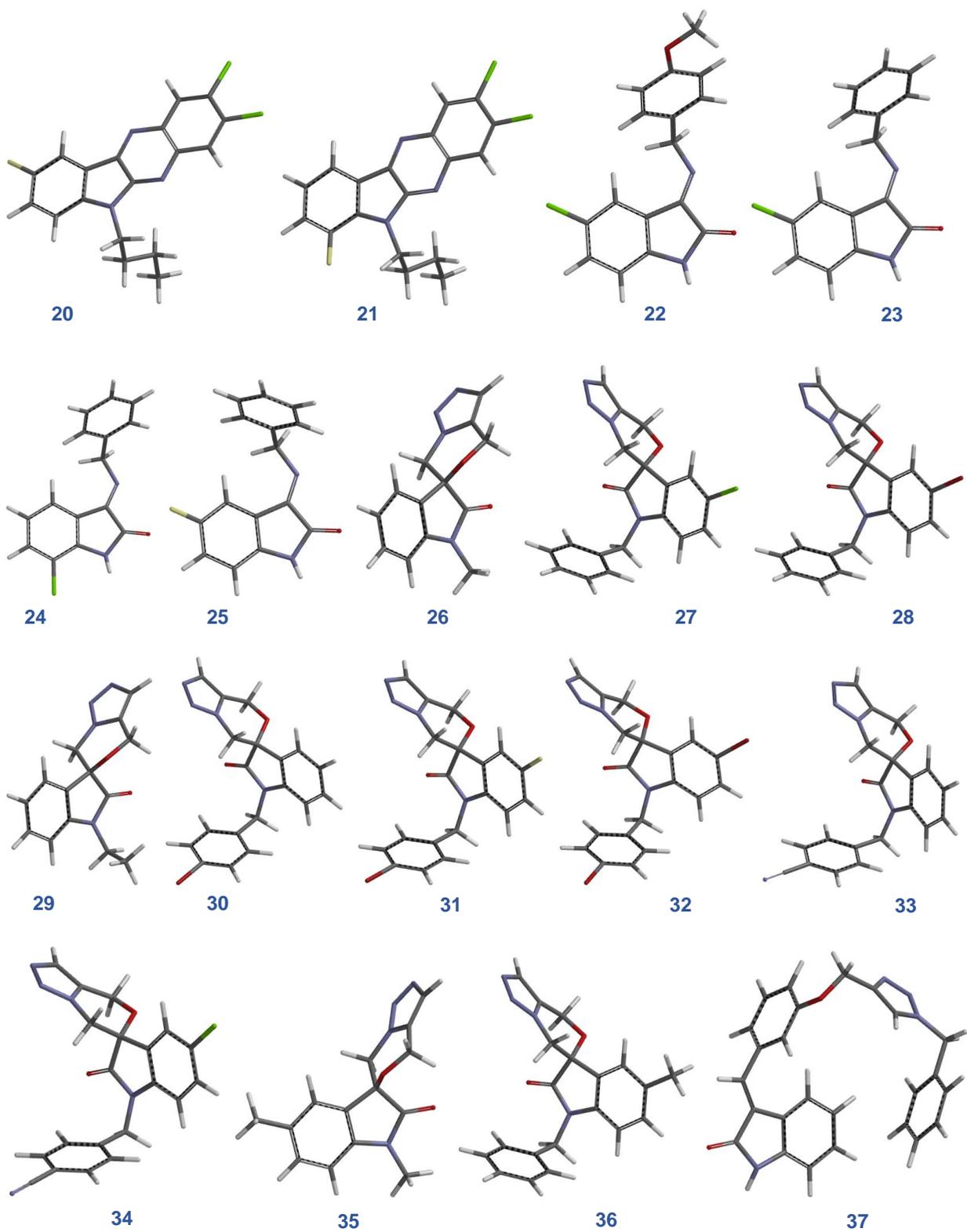
A partir del análisis de similitud molecular, observamos características estructurales similares de los derivados de isatina con algunos agentes con un mecanismo de acción conocido como unión al surco menor del ADN reportados en la literatura. Por lo tanto, después de realizar el acoplamiento molecular sobre el ADN con estos compuestos, observamos una alta correlación de los valores de puntaje con los valores experimentales de  $Cl_{50}$ , lo que sugiere su posible mecanismo de acción como agentes de unión al surco menor de ADN. Otros

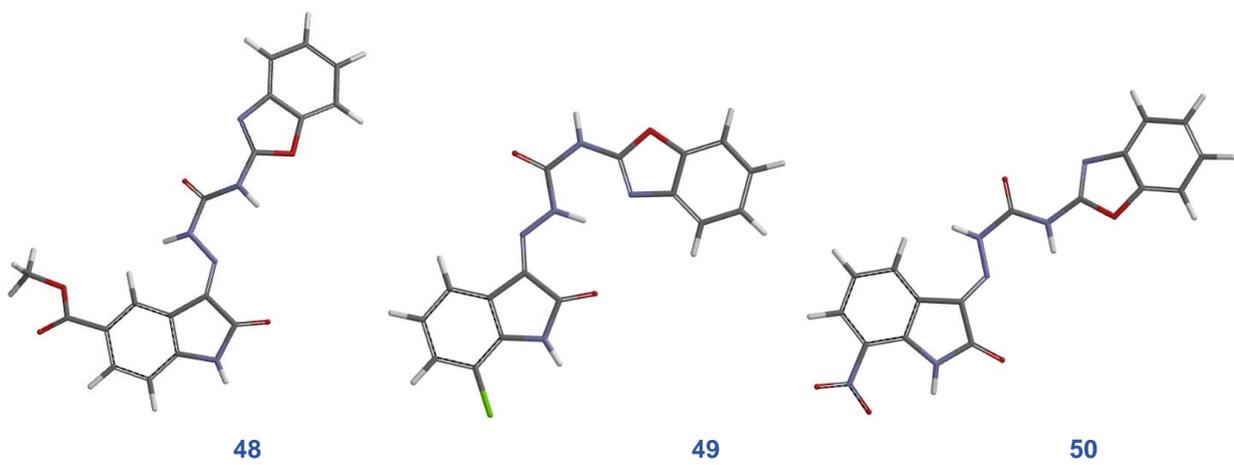
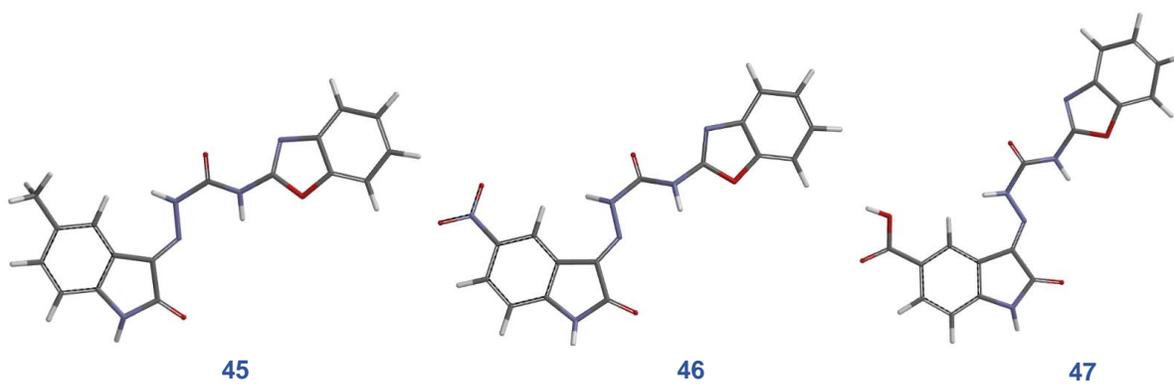
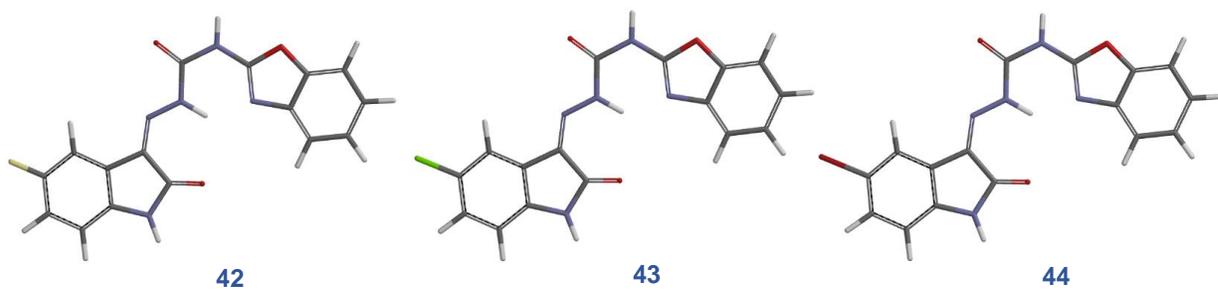
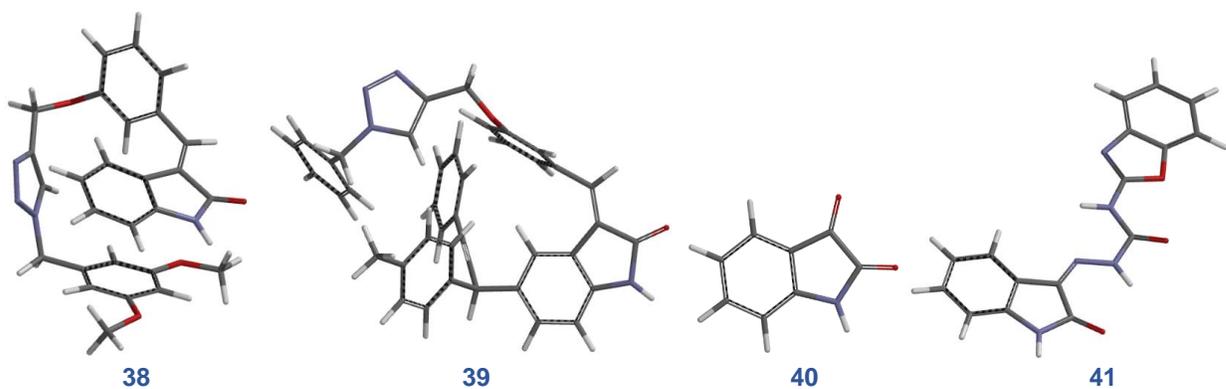
cálculos de acoplamiento sobre diferentes estructuras de ADN mostraron la importancia del número de anillos aromáticos y enlaces rotables en los derivados de isatina para la unión en el surco menor de ADN.

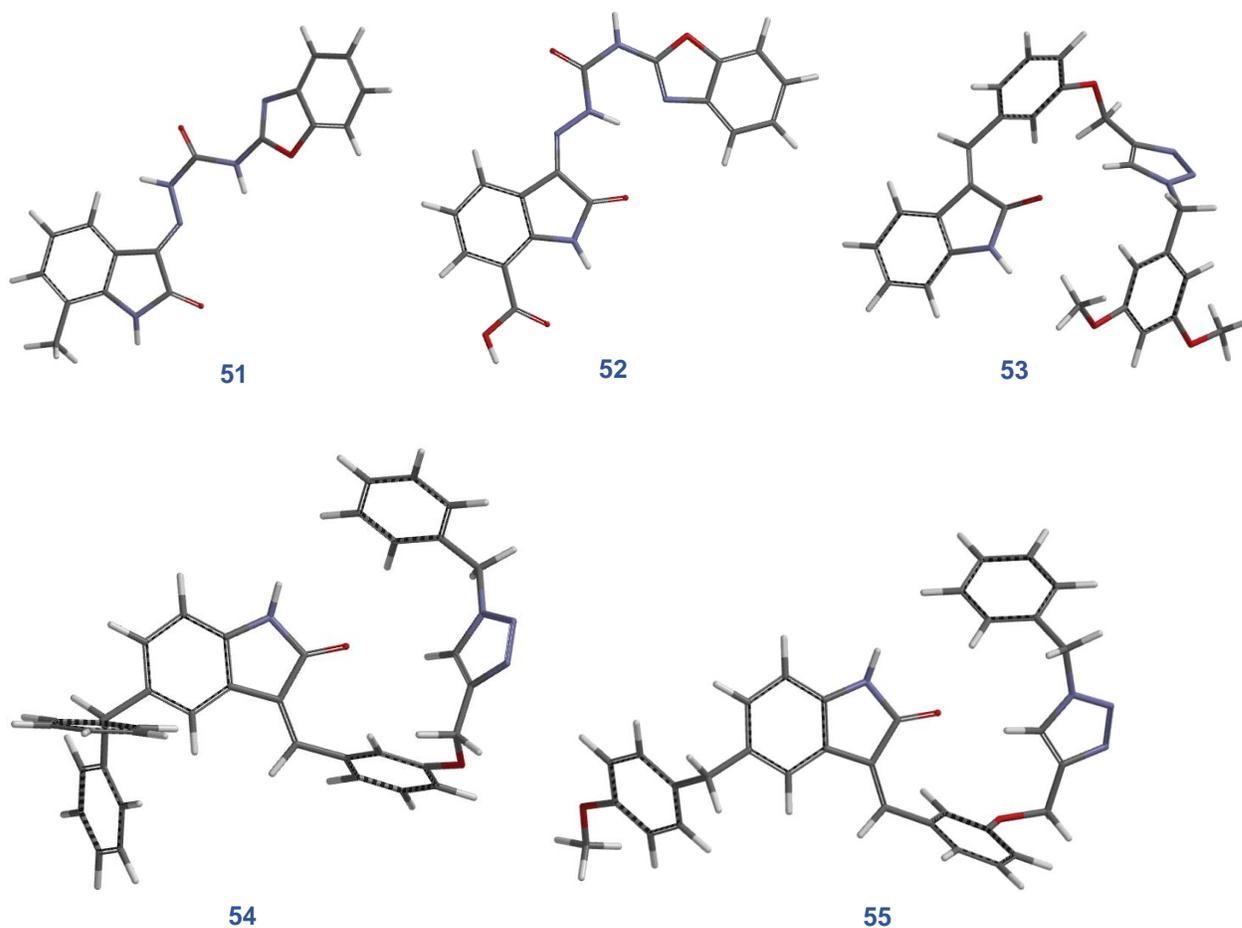
Finalmente, derivado del análisis de los híbridos **D3-D11 AU**-isatina en el modelo QSAR, los valores de los descriptores moleculares obtenidos para estos compuestos se ven relacionados con el aumento de volumen, la complejidad estructural y forma de la molécula lo que arroja una predicción de valores para la  $CI_{50}$  prometedores para que estos compuestos presenten actividad citotóxica en la línea celular Hela. Por lo tanto se concluye que el aumento de volumen en los híbridos **AU**-isatina no presenta un problema para que estas moléculas puedan tener un efecto biológico.

Anexo Capítulo 2









**Figura S1.** Estructuras en 3D para los 55 derivados de isatina usados en la generación del modelo QSAR.

### 2.2.1 QSAR

El análisis cuantitativo de la relación estructura-actividad (QSAR) es un enfoque práctico mediante el cual la estructura química de una molécula se correlaciona cuantitativamente con la actividad biológica o reactividad química. El QSAR se realiza a través de modelos matemáticos que tienen como fin tratar de predecir

ciertas propiedades fisicoquímicas o biológicas a partir de propiedades más simples experimentales o calculadas.<sup>71</sup>

En las técnicas QSAR la actividad biológica se interpreta como una función de diferentes aspectos en la estructura química de una molécula, expresado por Hansch en la siguiente ecuación:

$$\ln A = f_h(X_h) + f_e(X_e) + f_s(X_s) + cte \quad (2.1)$$

Donde A es la actividad biológica dependiente de las funciones  $f_h(X_h) + f_e(X_e) + f_s(X_s) + cte$ , siendo estas funciones cualquier propiedad de la molécula como electrónica, lipofílica, estérica entre otras.<sup>72</sup>

### Metodología QSAR

Las metodologías QSAR tienen como objetivo disminuir sustancialmente el tiempo y esfuerzo necesario para el descubrimiento de nuevos principios activos que puedan ser utilizados para el desarrollo de fármacos. Un paso importante en la construcción de los modelos QSAR es encontrar un conjunto de descriptores moleculares que representen variaciones de las propiedades estructurales de la molécula. El análisis QSAR emplea métodos estadísticos para derivar una relación matemática cuantitativa entre la estructura química y la actividad biológica. El proceso del modelado QSAR se puede dividir en cuatro etapas: selección de

---

<sup>71</sup> Ishikawa, T.; Hirano, H.; Saito, H.; Sano, K.; Ikegami, Y.; Yamaotsu, N.; and Hirono, S. Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) Analysis to Predict Drug–Drug Interactions of ABC Transporter ABCG2. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2012**, 12, 505-5014.

<sup>72</sup> Hansch, C.; Hoekman, D.; Leo, A.; Weininger, D.; Selassie, C.D. Chem-Bioinformatics: Comparative QSAR at the interface between Chemistry and Biology. *Chemical Reviews*. **2002**, 102, 783-812.

moléculas, cálculo de descriptores moleculares, generación del modelo matemático y validación estadística del modelo matemático generado (figura S2).

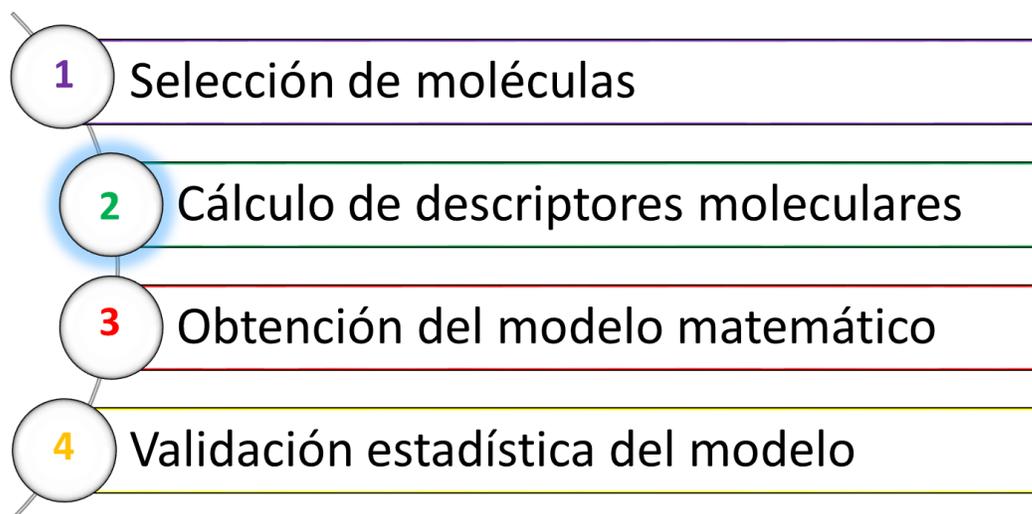


Figura S2. Pasos involucrados en la metodología QSAR.

#### 2.2.1.1 Selección de moléculas

En la etapa de desarrollo del modelo QSAR se incluye la selección de datos. La selección de datos es de vital importancia debido a que cualquier aplicación basada en la estructura depende en gran medida del conjunto inicial de moléculas, debido a que esto influirá en la cantidad, tipo de información capturada e incluida en los modelos. Por otro lado, cualquier error en los datos se propagará al modelo desarrollado, limitará su confiabilidad y aplicabilidad. Al mismo tiempo se debe hacer un análisis detallado de los datos incluidos, por ejemplo datos biológicos o toxicológicos, protocolos experimentales, para asegurar que sean confiables y que no contengan valores anómalos o errores, esto es crucial para garantizar un modelo de utilidad<sup>73</sup>. En este trabajo como parte de la selección de moléculas, las estructuras moleculares encontradas se construyen en tercera dimensión, para posteriormente realizar cálculos de minimización de energía y optimización de geometría utilizando un software como Spartan 14.

### 2.2.1.2 Descriptores moleculares

Los descriptores moleculares están directamente relacionados con las estructuras moleculares y juegan un papel fundamental en la investigación científica. De hecho, los descriptores moleculares se basan en varias teorías, como la química cuántica, teoría de la información, química orgánica, teoría de grafos etc. Los descriptores moleculares pueden definirse como la información esencial de una molécula en términos de sus propiedades fisicoquímicas, algunos ejemplos son descriptores: constitucionales, electrónicos, geométricos, hidrofóbicos, lipófilos, solubilidad, propiedades estéricas, químico cuánticos y topológicos.<sup>73</sup>

Para el cálculo de los descriptores moleculares se pueden utilizar diferentes niveles de complejidad (dimensionalidad). Esto se muestra en la **figura S3** donde las diferentes representaciones moleculares contienen información según la dimensionalidad que tengan por ejemplo:

0-Dimensional (0D): Es la representación molecular más simple. Es la fórmula química, es decir la especificación de los elementos químicos y su aparición en la molécula. Por lo tanto, los descriptores moleculares obtenidos de la fórmula química se denominan descriptores 0D, son muy simples de calcular e interpretar y muestran un bajo contenido de información y alto grado de degeneración, es decir pueden tener valores iguales para diferentes moléculas. Algunos ejemplos son recuento de átomos (por ejemplo, número de átomos de carbono), peso molecular y suma promedio de propiedades atómicas (por ejemplo, volúmenes atómicos de van der Waals).

1-Dimensional (1D): Según esta representación las moléculas se perciben como un conjunto de subestructuras, como grupos funcionales o fragmentos centrados en

---

<sup>73</sup> Muhammad, U; Uzairu, A; Arthur, DE. Review on quantitative structure activity relationship (QSAR) modeling. *J Anal Pharm Res.* **2018**; 7(2):240–242.

átomos. Esta representación no requiere el conocimiento completo de las estructuras moleculares. Los descriptores derivados de esta representación son los 1D, que generalmente son binarios (que codifican la presencia/ausencia de subestructuras dadas) o frecuencias de ocurrencia.

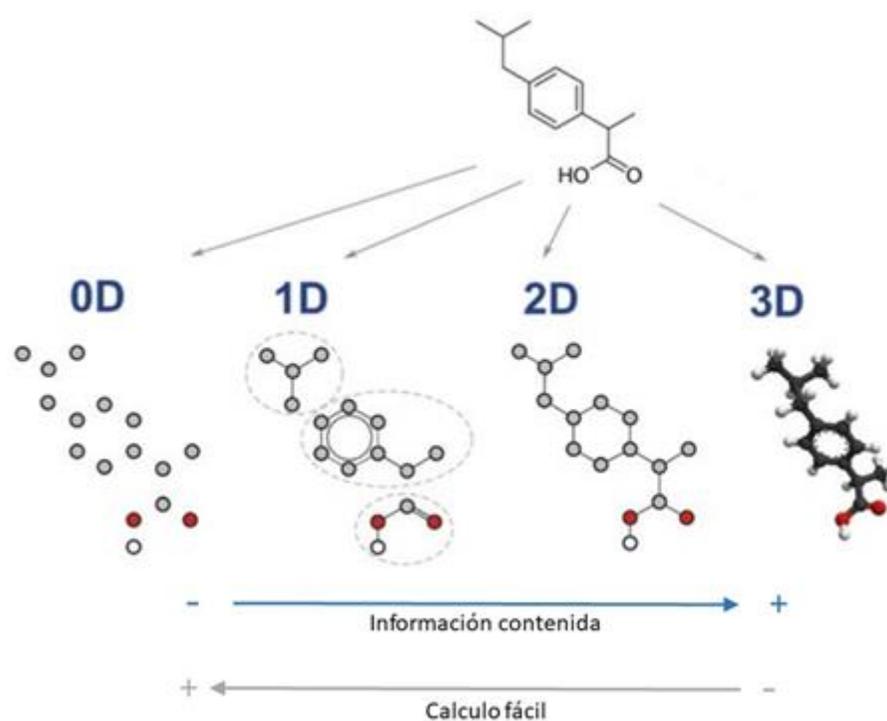
2-Dimensional (2D): Esta representación agrega un nivel de información adicional a la representación 1D, al considerar cómo están conectados los átomos y la naturaleza del enlace químico. Por lo general la molécula se representa como un gráfico cuyos vértices son los átomos y los bordes los enlaces. A partir de una representación gráfica, varios cuantificadores numéricos de topología molecular se derivan matemáticamente de manera directa e inequívoca. Son comúnmente conocidos como índices topológicos (IT). Los IT codifican propiedades topológicas (por ejemplo, adyacencia, conectividad) y generalmente son sensibles a características estructurales como el tamaño, la forma, la simetría, la ramificación y la ciclicidad. A menudo, se consideran propiedades químicas específicas de los átomos, por ejemplo, masa, polarización, presencia de donadores/aceptores de enlaces de hidrógeno. Los índices topológicos se pueden dividir en dos categorías:

(1) Índices estructurales, que codifican solo información sobre adyacencia y distancias de enlace entre átomos.

(2) Índices topoquímicos, que cuantifican información sobre topología pero también propiedades químicas específicas de los átomos, como su identidad química y estado de hibridación.

3-Dimensional (3D): Se puede agregar un nivel adicional de complejidad al percibir la molécula no solo en términos de tipo de átomo, conectividad y adyacencia, sino también viéndola como un objeto geométrico en el espacio, caracterizado por la configuración espacial de los átomos. En otras palabras, la molécula se define en términos de tipos de átomos y sus coordenadas x-y-z. Los descriptores derivados de la representación 3D tienen un alto contenido de

información y en la utilización de estos. Se deben tener en cuenta varios problemas relacionados con la optimización geométrica de las moléculas, como la influencia del método de optimización en los valores de coordenadas, la presencia de más de una conformación de energía mínima similar para moléculas altamente flexibles y la diferencia entre la geometría bioactiva y la geometría optimizada. El grado de deformación depende del número de enlaces libremente rotativos en la molécula. Por estas razones, el costo / beneficio del uso de descriptores 3D depende del caso y debe evaluarse cuidadosamente.<sup>74</sup>



**Figura S3** Ejemplo de diferentes representaciones moleculares para la estructura del ibuprofeno. Adicionalmente se relaciona la dimensionalidad/ el contenido de información / facilidad de cálculo de los descriptores moleculares que se pueden calcular para cada representación molecular.<sup>74</sup>

<sup>74</sup> Grisoni, F.; Ballabio, D.; Todeschini, R.; Consonni, V. Molecular Descriptors for Structure-Activity Applications: A Hands-On Approach. *Computational Toxicology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2018, 1800. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1_1)

En este trabajo se realizó el cálculo de descriptores moleculares de cero, una, dos y tres dimensiones. Los cálculos se realizaron en los programas DRAGON Professional versión 5.4-2006 y Spartan 14.

### 2.2.1.3 Generación del modelo matemático QSAR

Para la generación del modelo, la información sobre la relación entre los descriptores moleculares y la propiedad a predecir se extrae y formaliza en un modelo matemático. Generalmente los datos se dividen en dos conjuntos, uno de entrenamiento y otro de prueba. El conjunto de entrenamiento se usa para formular el modelo QSAR, mientras que el conjunto de prueba se usa para evaluar su predictibilidad y precisión. El conjunto de datos generalmente se divide de tal manera que ambos conjuntos ocupan todo el espacio del descriptor. En la construcción de modelos matemáticos QSAR se utilizan métodos estadísticos para la selección de características cuando hay un gran número de descriptores. Los métodos estadísticos se pueden clasificar en enfoques basados en regresión, enfoques basados en clasificación y técnicas de aprendizaje automático. Por su parte, el método de regresión lineal múltiple ayuda a establecer la correlación entre las variables independientes y dependientes. Aquí, las variables dependientes son la actividad biológica o la propiedad fisicoquímica del sistema que se está estudiando y las variables independientes son descriptores moleculares obtenidos de diferentes representaciones. En los modelos de regresión lineal, la variable dependiente se predice usando solo un descriptor o característica. Los modelos de regresión lineal múltiple consideran más de un descriptor para la predicción de la propiedad o actividad en cuestión. El modelo basado en la regresión lineal se puede representar como una ecuación matemática dada a continuación:

$$y = a + bx \dots$$

donde,  $y$  es la variable dependiente o respuesta que representa la propiedad fisicoquímica o la actividad biológica,  $x$  es la variable independiente o predictiva que

representa el descriptor molecular y  $b$  es el coeficiente de regresión.<sup>75</sup> La línea de regresión de un gráfico clásico de regresión, expresa la mejor predicción de la variable dependiente ( $Y$ ) dada la variable independiente ( $X$ ). Sin embargo, la naturaleza rara vez es perfectamente predecible y generalmente hay una variación sustancial de los puntos observados alrededor de la línea de regresión ajustada. La desviación de un punto particular de la línea de regresión (su valor predicho) se llama valor residual. Cuando el punto final necesita ser modelado usando más de un descriptor (seleccionado por diferentes enfoques), entonces se aplican técnicas multivariadas. Existen muchos métodos multivariados diferentes para el análisis de regresión, aplicado en los estudios QSAR: Regresión lineal múltiple, Regresión de componentes principales, Mínimos cuadrados parciales, redes neuronales artificiales.

### 2.2.1.4 Validación estadística del modelo matemático QSAR

Después de la generación de los modelos matemáticos se llevó a cabo su validación con los parámetros estadísticos que se muestran en la tabla 24. En este trabajo para la generación del modelo matemático QSAR se utilizó el programa MobyDigs Professional Versión 1.0-2004.

---

<sup>75</sup> Swathik, C.P.; Jaspreet, K.D.; Vidhi, M.; Navaneethan, R.; Mannu, J.; Durai, S. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR): Modeling Approaches to Biological Applications. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 2018. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20197-0

Tabla S1 Parámetros estadísticos utilizados en la validación del modelo matemático QSAR.

Parámetros estadísticos	Descripción
$Q_{L00}^2$	Coficiente de validación cruzada
$R^2$	Coficiente de determinación
$s$	Desviación estándar
$F$	Pruebas F de Fishers
$Dk$	Regla QUIK
$R^P$	Reglas de redundancia
$R^N$	Reglas de sobreajuste

La técnica de algoritmos genéticos (AG) fue empleada con el software MobyDigs 01<sup>76</sup> para la construcción del modelo matemático QSAR. Los descriptores moleculares de reactividad química y la actividad biológica ( $IC_{50}$ ) de los derivados de isatina, fueron usados como variables independientes ( $X$ ) y variable dependiente ( $Y$ ) respectivamente. Para la validación del modelo QSAR fueron empleados los parámetros estadísticos como el coeficiente de determinación ( $R^2$ ),  $R^2$  de validación cruzada ( $Q^2$ ), desviación estándar ( $s$ ) y la prueba de Fisher ( $F$ ).

$R^2$  es la varianza total de la actividad biológica (en este caso, la  $IC_{50}$ ) explicada por el modelo de regresión. Se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.2)$$

Donde  $\hat{y}_i$  es el valor estimado de la actividad biológica por el modelo QSAR,  $y_i$  es el valor de la actividad biológica experimental y  $\bar{y}$  corresponde a su promedio.

<sup>76</sup> Todeschini, R.; Consonni, V.; Mauri, A.; Pavan, M. Detecting “bad” regression models: multicriteria fitness functions in regression analysis. *Anal Chim Acta*, **2004**, 515,199–208.

$Q^2$  es la varianza en la predicción explicada por el modelo matemático. Se obtiene por la siguiente ecuación:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i/i})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (2.3)$$

Donde  $\hat{y}_{i/i}$  denota la actividad biológica de la molécula *i-ésima*.  $Q^2$  generalmente se emplea para evaluar la capacidad predictiva de los modelos QSAR.

$F$  y  $s$  son parámetros que proporcionan información sobre cuál es la probabilidad de que el modelo matemático ocurra casualmente y cómo la correlación entre las actividades experimentales y calculadas se ve afectada por el número de moléculas en el estudio (**ecuación 2.4** y **2.5** respectivamente).

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2} \quad (2.4)$$

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / df_M}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / df_E} \quad (2.5)$$

En la **ecuación 2.4**,  $n$  representa el número de moléculas en el estudio. En la **ecuación 2.5**  $df_M$  y  $df_E$  se refiere a los grados de libertad en el modelo (descriptores moleculares en el modelo) y el error, respectivamente.

En el modelo matemático,  $s$  y  $F$  deben tener los valores más pequeños y más grandes posibles, respectivamente, para asegurar que el modelo QSAR sea confiable.<sup>77</sup>

---

<sup>77</sup> Pérez, D; Sarabia, O.; Villanueva-García, M.; Pineda-Urbina, K.; Ramos-Organillo, A.; Gonzalez-Gonzalez, J.; Gomez-Sandoval, Z.; Razo-Hernández, R.S. *In silico* receptor-based drug design of X, Y- benzenesulfonamide derivatives as selective COX-2 inhibitors. *Comptes Rendus Chimie*, **2017**, 20,169–180.

Además, para hacer una validación más sofisticada, se utilizaron las reglas de redundancia QUIK,  $Q_{ASYM}^2$  redundancia ( $R^P$ ) y sobreajuste ( $R^N$ ); Para obtener más detalles sobre estas reglas, consultar la referencia 1.

### 2.3.1. Descriptores moleculares del modelo matemático QSAR

Los descriptores moleculares presentes en el modelo matemático muestran las características que se deben encontrar en los derivados de isatina para mejorar su actividad citotóxica. El descriptor geométrico 3D-índice de Wiener (**W3D**), se asocia con la extensión de las moleculares debida a su complejidad estructural. Se calcula como la suma de todas las distancias geométricas interatómicas en una molécula. Se incluyen los hidrógenos presentes en la molécula. **W3D** se calcula con la ecuación:

$${}^3D W_H \equiv Wi(G) = \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^A rij \quad (2.6)$$

Donde  $rij$  es la distancia interatómica entre los átomos  $ith$  y  $jth$ .<sup>78,79</sup>

Por otro lado, los descriptores moleculares COMMA se refieren al método de análisis comparativo de momentos moleculares en 3D a partir de la geometría molecular calculada en diferentes momentos moleculares con respecto al centro de masa, centro de carga y centro del dipolo de la molécula.<sup>80</sup> Un ejemplo es el descriptor  $Qyyv$  que está ponderado por los volúmenes atómicos de van der Waals. El descriptor **QYYv** (el valor del  $QYYv$  análisis comparativo del momento

<sup>78</sup> Mekenyan, O.; Peitchev, D.; Bonchev, D.; Trinajstic, N.; Bangov, I.; Arzneimittel-Forschung. Modelling the interaction of small organic molecules with biomacromolecules. I. Interaction of substituted pyridines with anti-3-azopyridine antibody. *Europe PMC*, **1986**, 36, 176-183.

<sup>79</sup> Bogdanov, B.; Nikolic, S.; Trinajstic, N. On the three-dimensional wiener number. *J Math Chem*, **1989**, 3, 299-309.

<sup>80</sup> Silverman, D. B. Three-Dimensional Moments of Molecular Property Fields. *J Chem Inf Comput Sci*, **2000**, 40, 1470-1476.

molecular/promedio de los volúmenes atómicos de van der Waals), está basado en la geometría molecular, se calcula con respecto a un marco de referencia inicial cuyo centro de origen coincide con el centro del dipolo, en este caso se calcula la inercia del cuádruplo.

El descriptor  $X_T$  se define como el índice de conectividad estructural total. Este índice de conectividad extrema representa todos los vértices en el gráfico molecular como:<sup>81</sup>

$$X_T = \left( \prod_{i=1}^A \delta_i \right)^{-1/2} \quad (2.7)$$

donde  $\delta_i$  es el grado de vértice.

El índice de forma de Randic Path/Walk 2 (**PW2**) es un descriptor topológico que está relacionado con las distancias de enlace de la molécula. Los índices atómicos path/walk son derivados de la matriz de distancia/distancia (matriz D/D) y se definen para cada átomo como la relación del recuento de los caminos atómicos  ${}^m P_i$ , sobre el conteo de caminatas atómicas  $awc_i^{(m)}$  de la misma longitud  $m$ , como se muestra en la siguiente ecuación:<sup>82</sup>

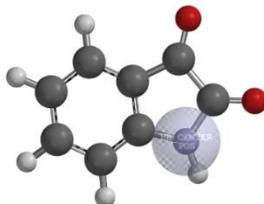
$$(P/W)_i^m = \frac{{}^m P_i}{awc_i^{(m)}} \quad (2.8)$$

---

<sup>81</sup> Needham, D.; Wei, I-C.; Seybold, P. G. Molecular Modeling of the Physical Properties of the Alkanes. *J Am Chem Soc*, **1988**, 110, 4186-4194.

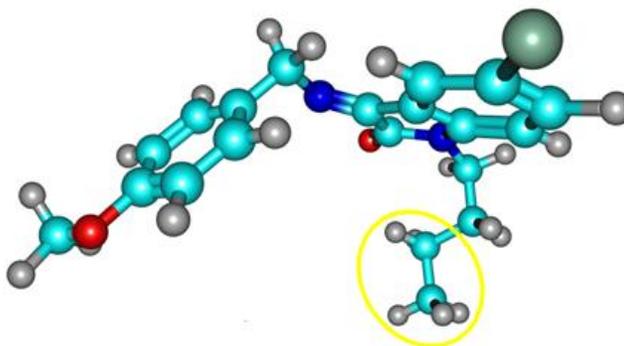
<sup>82</sup> Todeschini, R.; Consonni, V. Molecular Descriptors for Cheminformatics, Volumes I & II, vol. I & II, Milan: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGqA. **2009**

*CDF (POS)* es un descriptor constitucional que toma en cuenta sitios ionizables o básicos positivos en la molécula, un ejemplo se muestra en la estructura de la isatina (Figura S4).



**Figura S4.** *CDF (POS)* presente en la estructura de la isatina.

**H-046** pertenece a la familia de descriptores de fragmentos centrados en átomos e indica el número de átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono con hibridación  $sp^3$ , adicional a esto el carbono  $sp^3$  está unido a otros carbonos. Un ejemplo de este descriptor lo tiene el compuesto **4** con cinco **H-046** (figura S5)



**Figura S5** Estructura del compuesto **4**, en la circunferencia azul se denotan los cinco átomos de hidrógeno descritos por el descriptor H-046.

Por otro lado, los descriptores constitucionales como *CDF* (descriptores de función química), son descriptores dados a una molécula con el fin de caracterizar o anticipar su comportamiento químico o para identificar la varianza entre las moléculas con diferentes estructuras.

El último descriptor molecular presente en el modelo QSAR, también pertenece a la familia de descriptores constitucionales y corresponde al número total de átomos presentes en la molécula (*nAT*).

### 2.2.3 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es uno de los métodos más utilizados debido a su capacidad de predecir las conformaciones de moléculas en un sitio de unión específico. Tras el desarrollo de los primeros algoritmos en la década de 1980, el acoplamiento molecular se convirtió en una herramienta esencial en el desarrollo de fármacos. Los algoritmos de acoplamiento molecular ejecutan predicciones cuantitativas de energías de interacción, proporcionando una clasificación al acoplamiento con base en esta energía. El acoplamiento molecular puede dividirse en dos secciones:

**Algoritmo de búsqueda**, donde se realiza la exploración de un espacio conformacional grande que representa varios modos de unión potenciales. Los siguientes algoritmos numéricos son aplicados para el análisis del acoplamiento, como punto complementario, Monte Carlo, algoritmos genéticos basados en fragmentos, búsquedas sistemáticas, geometría de distancia entre otros.

**Función de puntaje**, se refiere a la predicción de la energía de interacción asociada con cada una de las conformaciones de la unión entre el ligando y el blanco biológico. Proporciona un modo para clasificar a los ligandos. Idealmente, la puntuación debería corresponder directamente a la afinidad de unión del ligando por la proteína, de modo que los mejores ligandos sean aquellos con un puntaje más alto (energías de interacción más bajas).<sup>83</sup> Las funciones de puntaje más empleadas

---

<sup>83</sup> Ferreira, L.G.; dos Santos, N.R.; Glaucius, O.; Andricopulo, A.D. Molecular Docking and Structure-based Drug Desing Strategies. *Molecules*. **2015**, 20, 13384-13421.

se pueden agrupar en tres clases: funciones basadas en campos de fuerza, funciones basadas en el conocimiento y funciones empíricas de evaluación.

Las funciones basadas en campos de fuerza aplican leyes de la mecánica molecular clásica. Calculan la energía libre de unión de los complejos ligando-proteína tomando en cuenta la suma de interacciones de van der Waals y electrostáticas.

Las funciones de puntaje empíricas estiman la energía libre de unión sumando términos de interacción derivados de parámetros estructurales obtenidos de manera empírica. Se obtienen ajustando la función de puntaje a constantes experimentales de un conjunto de prueba de complejos proteína-ligando.

En este trabajo se usó el programa Molegro Virtual Docker que utiliza la función de puntuación MolDock (MolDock Score), esta función se define mediante los siguientes términos de energía<sup>84</sup>:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{Interna} \quad (2.8)$$

Donde  $E_{inter}$  es la energía de interacción proteína-ligando:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligando}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[ E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (2.9)$$

La función de puntaje utilizada por MolDock incluye el término de enlace de hidrógeno. La suma en la ecuación 2.9 se ejecuta sobre todos los átomos pesados en el ligando y la proteína, incluidos los átomos del cofactor y los átomos de las moléculas de agua que puedan estar presentes (en nuestro trabajo las moléculas de agua fueron removidas antes de realizar el acoplamiento molecular). El termino

---

<sup>84</sup> Thomsen, R.; Christensen, M. MolDock: Anew Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *Journal Medicinal chemistry*. **2006**, 49, 3315-3321.

$E_{PLP}$  es el potencial lineal por partes ecuación (2.9). El segundo término describe las interacciones electrostáticas entre los átomos cargados. Esto se refiere al potencial de Coulomb con una constante dieléctrica dependiente de la distancia dada por  $D(r) = 4r$ . El valor numérico de 332.0 fija las unidades de energía electrostática a  $Kcal/mol$ . Para distancias inferiores a 2.0 Å, la energía electrostática se corta al nivel correspondiente a una distancia de 2.0 Å para garantizar que ninguna contribución de energía pueda ser mayor que la penalización de choque.  $E_{PLP}$  es un potencial lineal por partes que utiliza dos conjuntos diferentes de parámetros: un conjunto para aproximar el término estérico (van der Waals) entre átomos y el otro potencial más fuerte para enlaces de hidrógeno.

MolegroVirtualDocker calcula la parte de los enlaces de hidrógeno por separado. El término de enlace de hidrógeno PLP mencionado anteriormente solo depende de la distancia entre los átomos. Para tener en cuenta la direccionalidad del enlace de hidrógeno, se examina la geometría del enlace, y el siguiente factor,  $H_{factor}$  se multiplica por la fuerza del enlace de hidrógeno PLP:

$$HB = \Phi(\langle_{D-H-A}; 90^\circ; 100^\circ) \cdot \Phi(\langle_{H-A-AA}; 90^\circ; 100^\circ) \cdot \Phi(\langle_{H-A-AA}; 90^\circ; 150^\circ) \quad (2.10)$$

Donde,  $AA$  (antecedente del aceptor) es un átomo pesado conectado al aceptor ( $A$ ),  $D$  es el donador y  $H$  es el átomo de hidrógeno donado. La función de rampa  $\Phi$  se define como  $\Phi(A; A_{min}; A_{max}) = 0$  para  $A \leq A_{min}$  y  $\Phi(A; A_{min}; A_{max}) = 1$  para  $A \geq A_{max}$  y se interpola linealmente entre estos valores para  $A_{min} < A < A_{max}$ .

$E_{interna}$  es la energía interna del ligando:

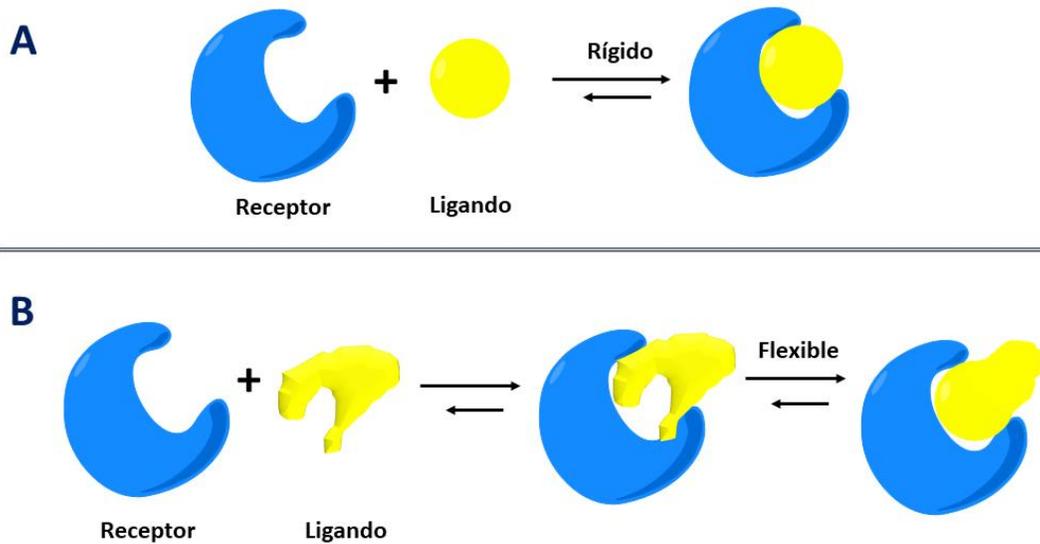
$$E_{interna} = \sum_{i \in \text{ligando}} \sum_{j \in \text{ligando}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{Enlaces flex}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_o)] + E_{choque} \quad (2.11)$$

Donde el primer término es la doble suma entre todos los pares de átomos en el ligando, excluyendo los pares de átomos que están conectados por dos o menos enlaces. El segundo término es de energía de torsión, parametrizado de acuerdo con los tipos de hibridación de los átomos unidos.  $\theta$  es el ángulo de torsión del enlace.<sup>32</sup>

Las siguientes metodologías, son las que se utilizan principalmente en acoplamiento molecular. En la primera, el enfoque de cuerpo rígido está estrechamente relacionado con el modelo clásico de Emil Fisher: la llave y la cerradura. En esta aproximación (**figura S6 A**) se asume que el ligando y la proteína son dos cuerpos independientes que se reconocen entre sí en función de la forma y el volumen que están rígidos durante su interacción. La segunda aproximación (**figura S6 B**) se deriva del modelo de ajuste inducido, en el acoplamiento inducido el ligando y la proteína son conformacionalmente flexibles, este enfoque considera un efecto recíproco de reconocimiento de proteína-ligando en la conformación de cada parte. En cada rotación se calcula la ocupación y la energía de la celda de superficie; luego se selecciona la pose óptima.<sup>85</sup>

---

<sup>85</sup> Fan, J.; Fu, A.; Zhang, L. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*. 2019, 7, 83-89.



**Figura S6** Dos modelos de acoplamiento molecular. **A** modelo de la llave y la cerradura. **B** modelo de ajuste inducido.

En general una metodología de acoplamiento molecular consiste en los siguientes pasos:

Paso 1. Preparación de la proteína: la estructura tridimensional de la proteína debe obtenerse del banco de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) en caso de contar con esa información experimental, de lo contrario se debe generar un modelo por homología de proteínas, posteriormente la estructura obtenida debe ser procesada. En este proceso se realiza la eliminación de moléculas de agua (dependiendo del caso de estudio), asignación de cargas parciales, llenado de residuos faltantes, y generación de cadenas laterales, entre otros. En su mayoría las moléculas de agua y los heteroátomos se eliminan si están presentes.

Paso 2. Predicción del sitio activo: después de la preparación de la proteína, se puede predecir el sitio o los sitios unión de la proteína. El receptor podría poseer muchos sitios de unión, por lo que se debe realizar la selección del sitio de unión de interés.

Paso 3. Preparación del ligando: Los ligandos pueden recuperarse de varias bases de datos como ZINC, Pub, Chem o se pueden construir con programas como Spartan 14, ChemDraw, Chemcraft entre otros.

Paso 4. Acoplamiento: el ligando se acopla con la proteína y se analizan las interacciones. La función de puntuación proporciona una puntuación del valor de la energía de interacción del ligando acoplado a proteína.<sup>86</sup>

### 2.2.3.1 Validación de la metodología de acoplamiento molecular

Como parte del proceso la metodología de acoplamiento molecular debe validarse, este proceso incluye dos aspectos el estructural y energético. En el aspecto estructural una práctica común para la validación de la metodología es reproducir el acoplamiento de un ligando activo. Esto se hace para probar si el algoritmo de acoplamiento produce una pose correcta y si la función de puntuación puede identificarlo como una pose adecuada.

Como una medida estándar o común de validación, se usa la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) que compara las coordenadas de la conformación predicha frente a la inicial de todos los átomos pesados de ambas conformaciones. En general los valores de RMSD deben ser inferiores a 2.0 Å. Una desviación importante indica que el programa de acoplamiento molecular no es adecuado para predecir la pose de acoplamiento.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_{ci} - X_{di})^2 + (Y_{ci} - Y_{di})^2 + (Z_{ci} - Z_{di})^2} \quad (2.12)$$

donde la raíz de la desviación cuadrática media es para dos conjuntos de datos de  $N$  átomos en las coordenadas  $c$  y  $d$ . Además de RMSD, la evaluación correcta

de la pose debe basarse en la interacción-recuperación, lo que significa que las interacciones proteína-ligando deben coincidir para la referencia y la predicción.<sup>87</sup>

Por su parte, la validación energética se realizó utilizando moléculas de referencia. Se correlacionaron las energías de los ligandos de referencia al reproducir la pose con la metodología de acoplamiento molecular generada. Para los ligandos que fueron probados en el acoplamiento molecular se comparó la energía obtenida con respecto a las moléculas de referencia.

**Tabla S1.** Valores de TPSA (NO) y ALOGP para todos los compuestos.

Molecula	TPSA(NO)	ALOGP
1	39.07	2.87
2	39.07	2.87
3	90.44	1.657
4	43.59	4.697
5	90.44	2.63
6	43.59	4.697
7	90.44	3.154
8	90.44	2.068
9	43.59	4.238
10	90.44	2.068
11	90.44	2.986
12	90.44	2.068
13	68.72	6.209
14	68.72	5.647
15	68.72	3.522
16	30.71	6.447
17	30.71	6.447
18	30.71	5.988
19	30.71	6.803
20	30.71	6.344
21	30.71	6.344
22	54.45	3.163
23	45.22	3.179
24	45.22	3.179

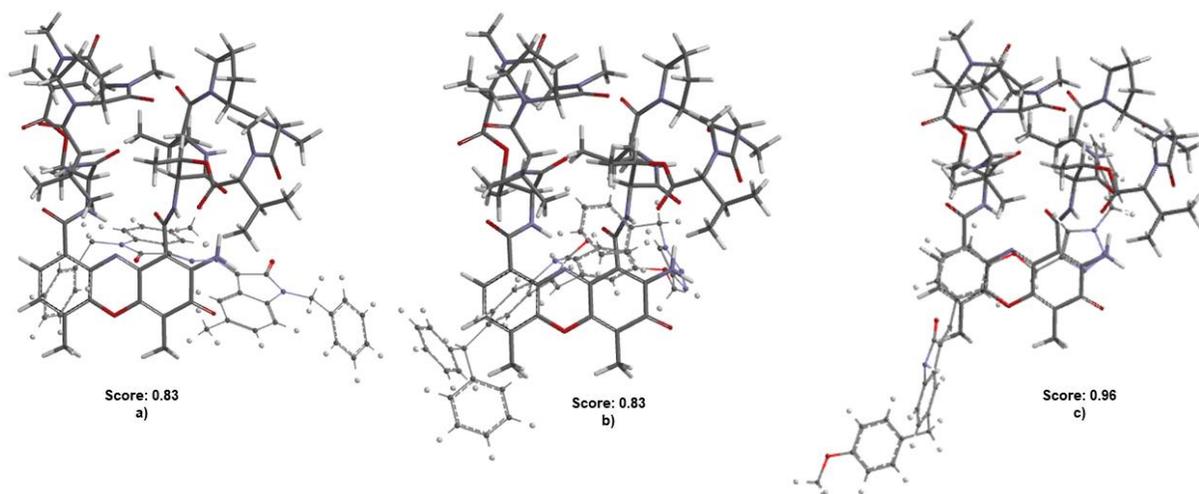
<sup>87</sup> Prieto-Martínez, F. D.; Arciniega, M.; Medina-Franco, J.L. MOLECULAR DOCKING: CURRENT ADVANCES AND CHALLENGES. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2018, 21, 65-87.

---

<b>25</b>	45.22	2.72
<b>26</b>	60.25	0.621
<b>27</b>	60.25	2.869
<b>28</b>	60.25	2.953
<b>29</b>	60.25	0.969
<b>30</b>	60.25	2.953
<b>31</b>	60.25	3.158
<b>32</b>	60.25	3.701
<b>33</b>	84.04	2.083
<b>34</b>	84.04	2.747
<b>35</b>	60.25	1.107
<b>36</b>	60.25	2.69
<b>37</b>	72.8	4.493
<b>38</b>	91.26	4.46
<b>40</b>	49.93	0.671
<b>41</b>	112.38	1.74
<b>42</b>	112.38	1.946
<b>43</b>	112.38	2.404
<b>44</b>	112.38	2.488
<b>45</b>	112.38	2.226
<b>46</b>	158.2	1.634
<b>47</b>	149.68	1.344
<b>48</b>	138.68	1.595
<b>49</b>	112.38	2.404
<b>50</b>	158.2	1.634
<b>51</b>	112.38	2.226
<b>52</b>	149.68	1.344
<b>53</b>	91.26	4.46
<b>54</b>	72.8	7.751
<b>55</b>	82.03	6.451

**Tabla S3.** Resultados del análisis de similitud para los derivados de isatina con un score mayor a 0.80.

Agentes intercaladores del ADN	Derivados de isatina con similitud
I <sub>1</sub>	38
I <sub>2</sub>	13, 55, 38, 15, 6, 2
I <sub>3</sub>	---
I <sub>4</sub>	48, 6
I <sub>5</sub>	---
I <sub>6</sub>	19, 20, 32, 6, 2
I <sub>7</sub>	19
I <sub>8</sub>	19
I <sub>9</sub>	13, 54, 55
I <sub>10</sub>	---
I <sub>11</sub>	13, 54, 55, 19, 18, 20, 32
I <sub>12</sub>	13, 55, 52, 42, 38, 41, 25, 6, 2



**Figura S7.** Estructuras obtenidas de la alineación de I<sub>9</sub> con los derivados de isatina. (a) 13; (b) 54; (c) 55.

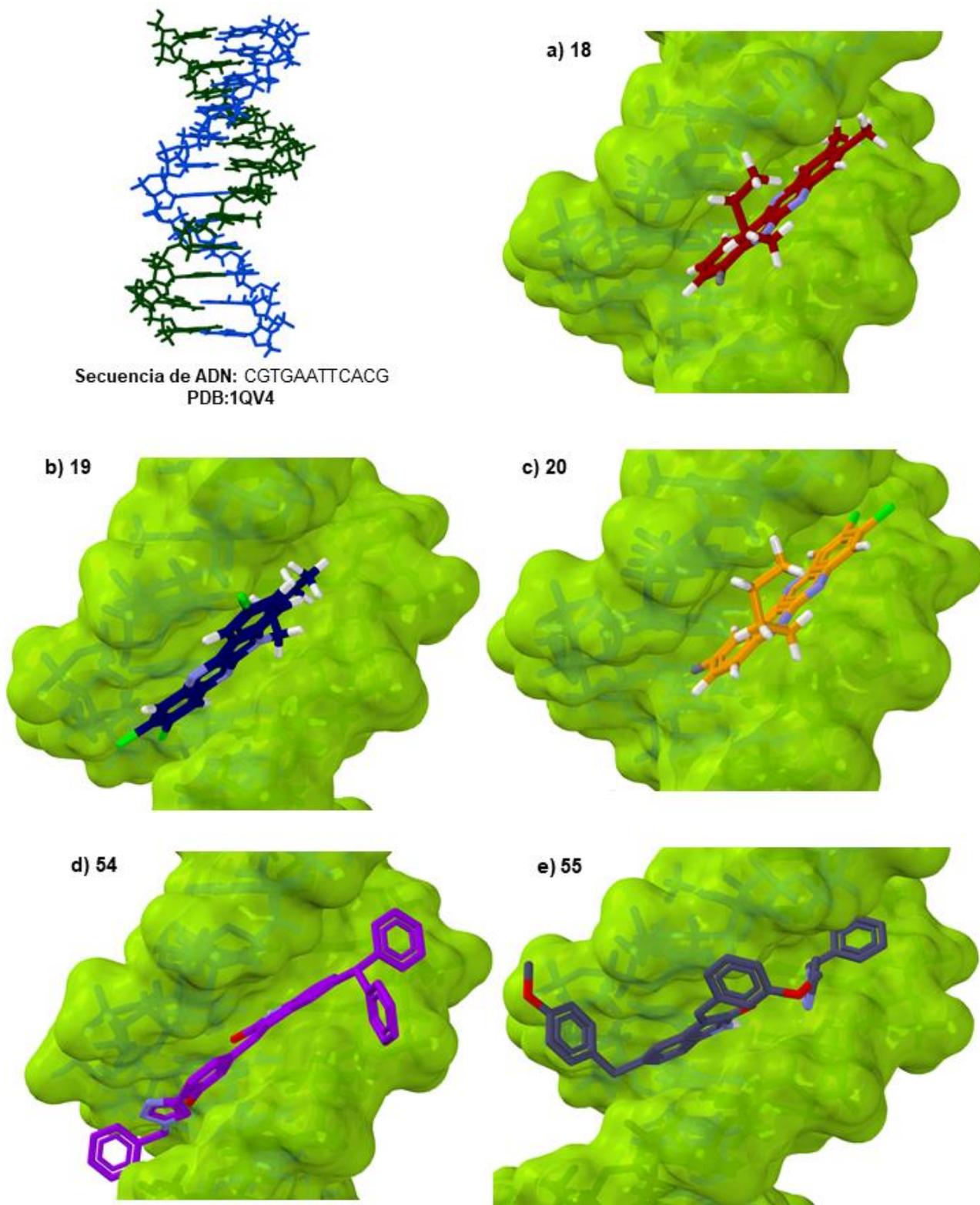


Figura S8. Interacción de 18, 19, 20, 54 y 55 con la estructura de ADN 1VQ4.

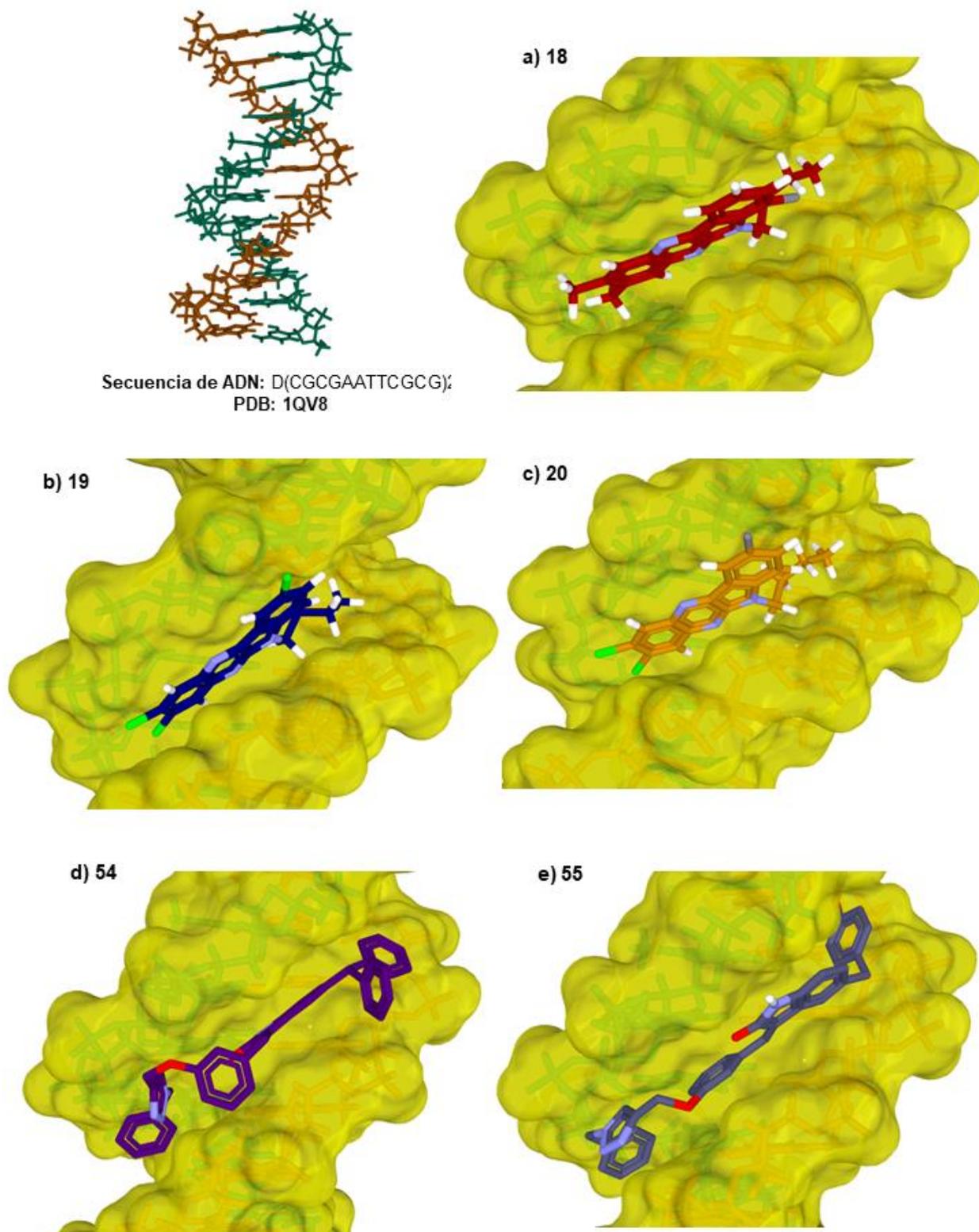


Figura S9. Interacción de 18, 19, 20, 54 y 55 con la estructura de ADN 1VQ8.

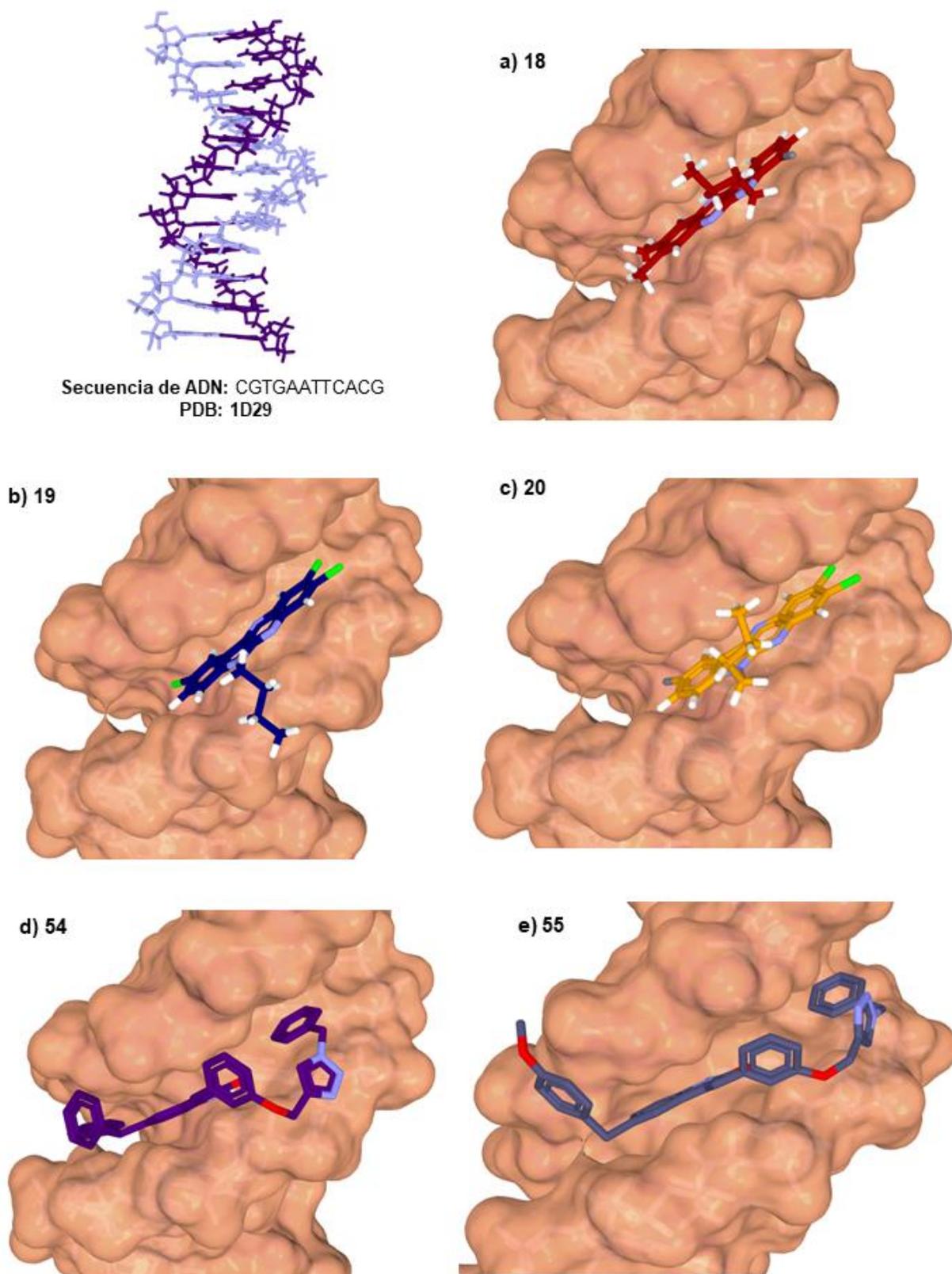


Figura S10. Interacción de 18, 19, 20, 54 y 55 con la estructura de ADN 1D29.

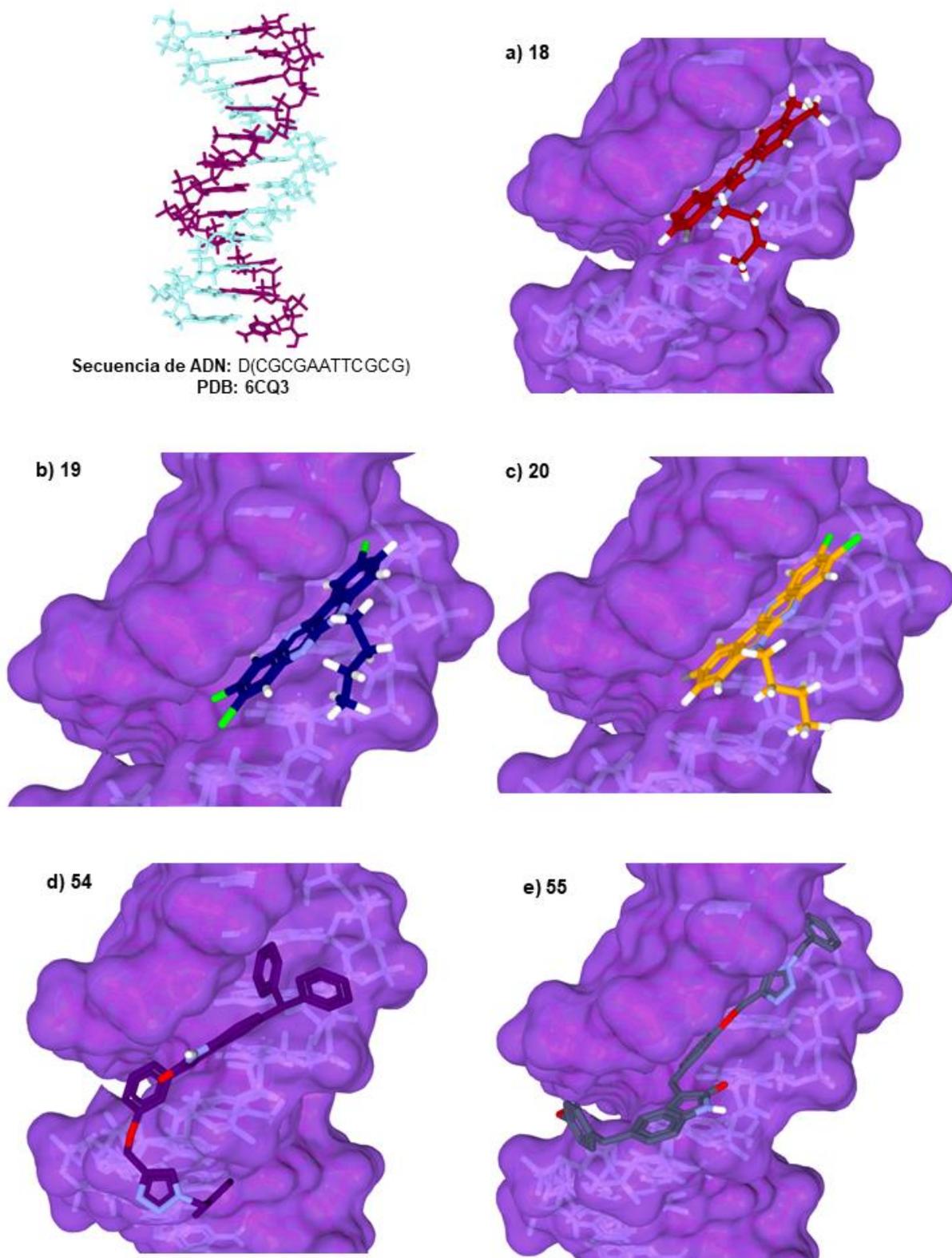


Figura S11. Interacción de 18, 19, 20, 54 y 55 con la estructura de ADN 6CQ3.

---

# **Capítulo 3**

## **Acoplamiento molecular para ácido ursólico y sus derivados**

---

## Capítulo 3. Acoplamiento molecular para ácido ursólico y sus derivados

### 3.1. Introducción

En este capítulo se describen los experimentos *in silico* realizados para el ácido ursólico y sus derivados (M1-M13) a partir de evaluaciones biológicas experimentales. Posteriormente, se realizó la selección del compuesto de la serie D1-D11 con mayor probabilidad de tener efecto antiinflamatorio.

### 3.2. Detalles computacionales

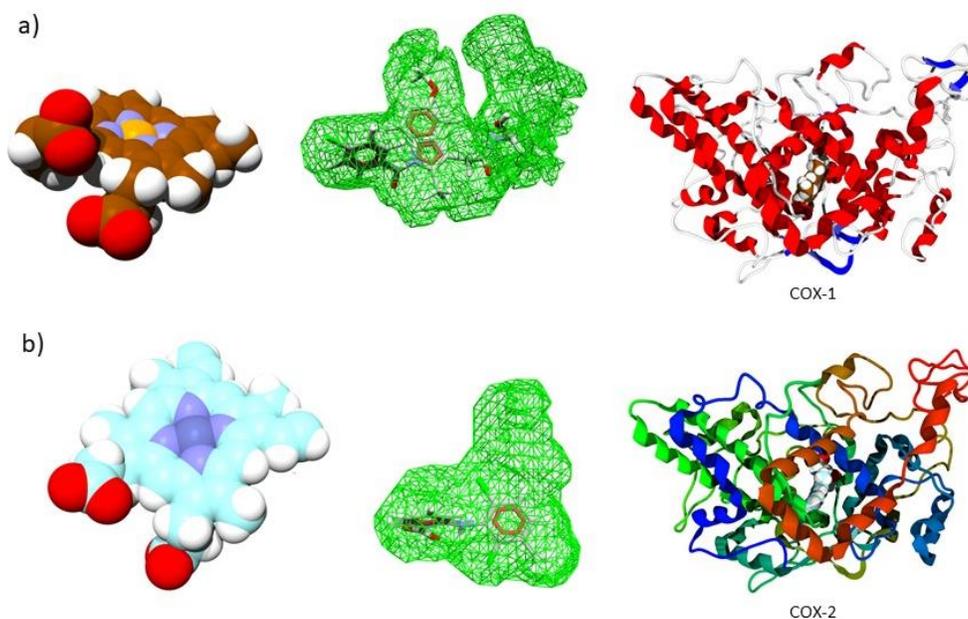
#### 3.2.1. Construcción y optimización de la geometría molecular (M1-M13)

Las 13 moléculas se construyeron con el programa Spartan 14<sup>2</sup>. Se obtuvo el conformero de equilibrio de cada estructura analizando 10 000 conformaciones con el campo de fuerza MMFFaq<sup>3</sup>. Posteriormente se optimizó la geometría de las moléculas a través del método semi-empírico PM3 (método paramétrico número 3). Adicional a lo anterior se realizó un cálculo de las frecuencias vibratorias (IR) para corroborar que las estructuras estuvieran en un mínimo de la superficie de energía potencial.

#### 3.2.2. Metodología de acoplamiento molecular serie de compuestos M1-M13

Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron utilizando el programa Molegro Virtual Docker (MVD) 6.01. El blanco biológico fue la cicloxigenasa. Se utilizaron las estructuras cristalinas de los complejos: indometacina-(*R*)-alfa-etil-etanolamida (PDB: 2OYE) para COX-1 y ácido meclofenámico (PDB: 5IKQ) para COX-2. Los cálculos de unión correspondientes se realizaron en el denominado sitio de unión para cada isoforma, el cual fue seleccionado a partir de las cavidades encontradas para COX-1 (486.4 Å<sup>3</sup>) y COX-2 (344.064 Å<sup>3</sup>) respectivamente. Se

tomó en cuenta que los volúmenes de las cavidades fueran grandes para que no se tuviera problema con el volumen de los ligandos. Se eligieron de humano (COX-2) y ovino (COX-1) porque son las que se encuentran comercialmente disponibles para hacer los ensayos *in vitro*. En la **figura 26** se muestra el esquema de las cavidades seleccionadas para cada enzima y los ligandos cristalizados en ellas.



**Figura 26.** a) Cofactor, en malla verde la cavidad seleccionada para COX-1. b) cofactor, en malla verde la cavidad seleccionada para COX-2.

Se emplearon las estructuras optimizadas con la geometría mínima de todos los derivados de ácido ursólico como punto de partida y las cargas parciales utilizadas se establecieron a partir de los cálculos de PM3 (tipo electrostático). Como primera parte se realizó un enfoque de acoplamiento rígido, para ambas isoformas. Se empleó una función MolDock Optimizer para COX-1 y COX-2 que utiliza un algoritmo genético durante la búsqueda del sitio de unión de la enzima. Para MolDock Optimizer, se usó un total de 15 ejecuciones con un máximo de 3000 iteraciones utilizando una población de 50 individuos por ejecución. Para calcular la energía de interacción, se utilizó la función de puntuación Moldock Score [GRID].

La función de puntuación GRID se estableció en 0.2 Å, la esfera de búsqueda se fijó en un radio de 13 Å. Para el análisis energético del ligando, se consideraron las interacciones electrostáticas internas, los enlaces internos de hidrógeno y las torsiones  $sp^2 - sp^2$  para el cálculo de la puntuación.

La metodología se validó reproduciendo la conformación experimental de las moléculas de indometacina-(*R*)-alfa-etil-etanolamida (PDB: 2OYE) y ácido meclofenámico (PDB: 5IKQ) en las estructuras cristalinas de los complejos COX-1 y COX-2 respectivamente. El modo de unión del inhibidor de referencia se obtuvo con una raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de 0.77 Å para COX-1 y 0.52 Å para COX-2, el ensayo se realizó por triplicado. Posteriormente se realizó un enfoque de acoplamiento flexible con todos los parámetros de acoplamiento rígido seleccionados anteriormente. Se consiedaron los residuos a una distancia de 3 Å de los ligandos para hacerlos flexibles, totalizando 64 para COX-1 y 44 para COX-2 con factor de resistencia para residuos flexibles. Se establecieron 2000 pasos de minimización para cada residuo flexible y 2000 pasos de minimización global por ejecución. Además, se analizaron las energías de interacción en comparación con el porcentaje de inhibición experimental.

### 3.2.3. Análisis de similitud molecular en los programas Spartan y Dragon.

Como parte del análisis de acoplamiento molecular se realizó un análisis de similitud molecular enfocado al ácido ursólico **M1** y los derivados **M2-M13**, en comparación con indometacina fármaco de referencia utilizado en el ensayo *in vivo* de inducción de edema por ATF en oreja de ratón. Lo anterior se debe a la necesidad de obtener mayor información de las estructuras que nos ayudará a correlacionar los resultados de acoplamiento molecular con la actividad biológica experimental obtenida para estos compuestos. Se realizó preparando las estructuras **M1-M13** en el programa Spartan, por lo que se buscó el confórmero de

equilibrio analizando 10,000 conformaciones con el campo de fuerzas MMFFaq. Posteriormente se calculó la geometría de equilibrio a través del método PM6. Después se extrajeron los descriptores moleculares del tipo electrónico: E HOMO (kJ/mol), E LUMO (kJ/mol), CPK volumen (A<sup>3</sup>), PSA (A<sup>2</sup>) y Dureza.

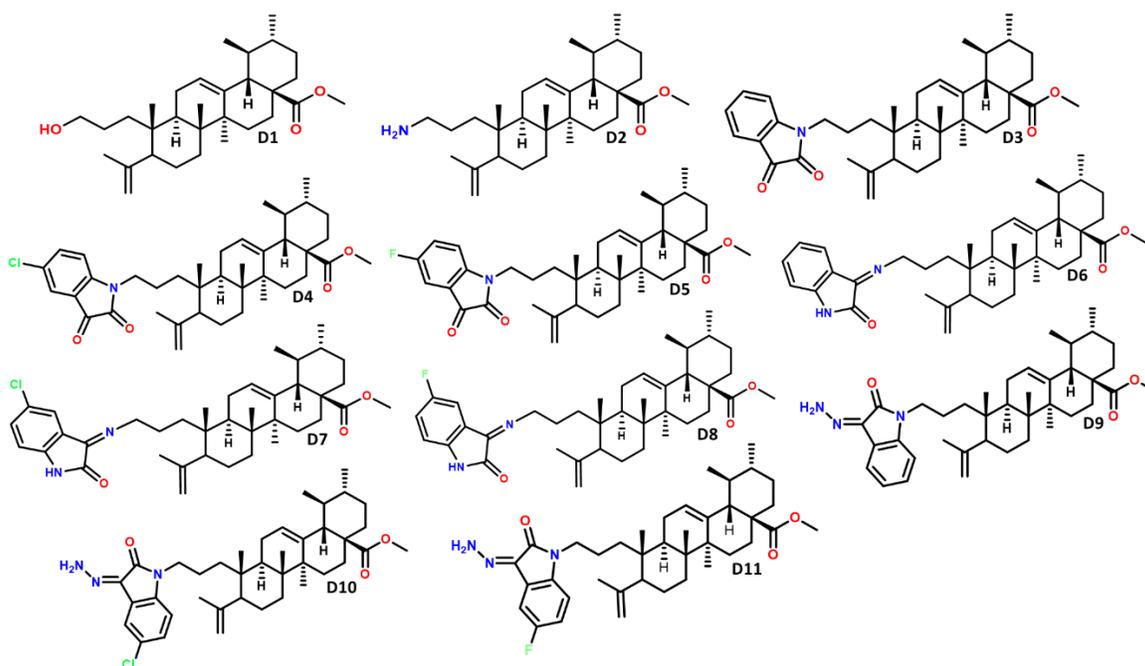
De igual forma, en el programa Dragon se realizó el cálculo de los descriptores moleculares: Asfericidad (**ASP**), Refractividad Molar (**AMR**), Coeficiente de partición octanol-agua (**ALOGP**) y Área superficial polar topológica (**TPSA (Tot)**). Los resultados se muestran en la **tabla 12** sección 3.3.1.2.

**Tabla 10.** Descriptores calculados con el programa DRAGON para el análisis de similitud molecular de los compuestos **M1-M13** en comparación con indometacina.

Descriptor	Significado
<b>ALOGP</b>	Coeficiente de partición octanol-agua Ghose-Crippen
<b>AMR</b>	Refractividad molar Ghose-Crippen
<b>CPK</b>	Volumen Corey-Pauling-Koltun
<b>TPSA(Tot)</b>	Área de superficie polar topológica usando contribuciones polares N, O, S, P.
<b>ASP</b>	La asfericidad, descriptor que mide la desviación de la forma esférica

#### 3.2.4. Acoplamiento molecular para los compuestos D1- D11

La metodología de acoplamiento molecular utilizada para el ensayo *in silico* de los derivados de ácido ursólico **D1-D11** (**figura 27**), fue la misma que se validó con la serie de compuestos **M1-M13**. Se describe en resumen en la **figura 28**.



**Figura 27.** Derivados del ácido ursólico (D1-D11) utilizados en el ensayo *in silico* para la elección de moléculas con mayor probabilidad de tener un efecto inhibitor de ciclooxigenasa.

### 1. Acoplamiento molecular rígido

-Selección de las poses de mínima energía.

### 2. Acoplamiento molecula flexible

-Partiendo de las poses de mínima energía

-Se realizaron 5 repeticiones del ensayo

### 3. Análisis de los resultados

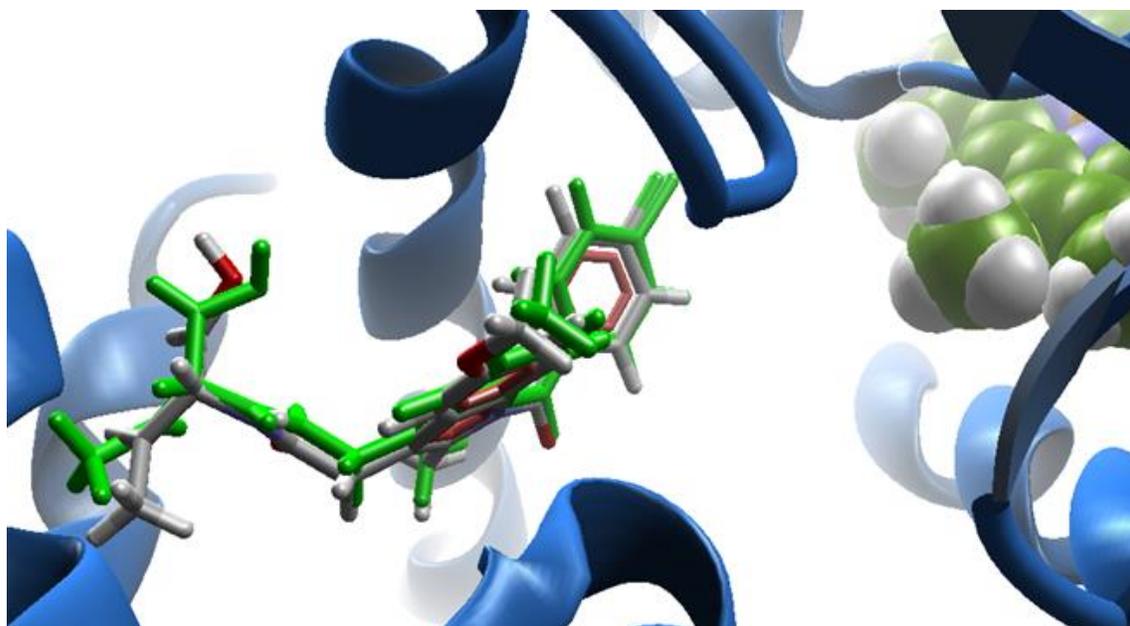
-Cálculo de la diferencia de energías de unión entre COX-1 y COX-2.

**Figura 28.** Resumen de metodología de acoplamiento molecular para los compuestos D1-D11 (especificada a detalle en la sección 3.2.2).

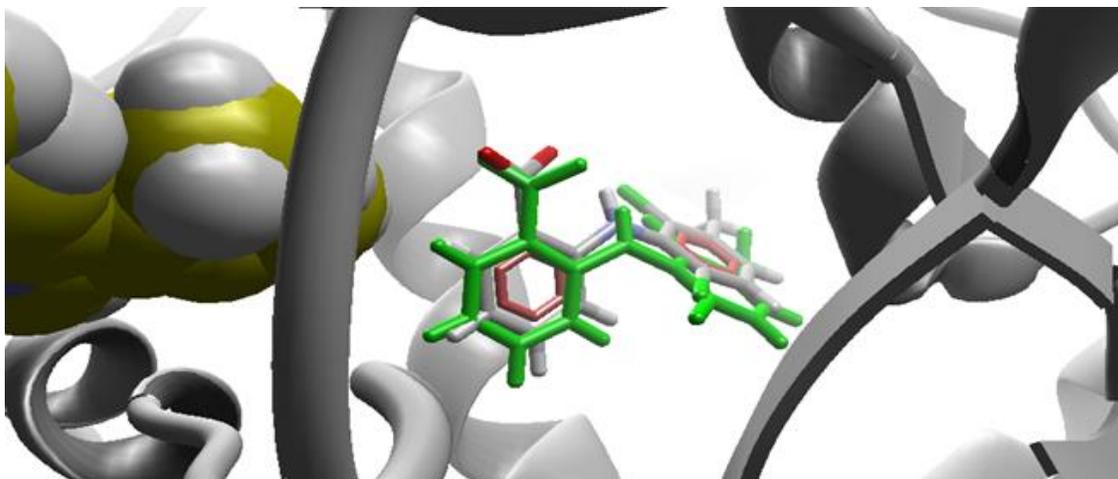
### 3.3. Discusión y resultados

#### 3.3.1. Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos de la serie M1-M13.

Se partió de un acoplamiento molecular rígido donde el ligando y la enzima permanecieron sin movimiento. El detalle de todos los parámetros de búsqueda y puntaje se describe en los detalles computacionales sección 3.2.2. La metodología de acoplamiento molecular generada que fue validada por medio de la reproducción de la conformación del ligando cristalizado para cada enzima, COX-1: indometacina-(R)-alfa-etil-etanolamida (PDB: 2OYE) y COX-2: ácido meclofenámico (PDB: 5IKQ) **figuras 29 y 30** respectivamente.



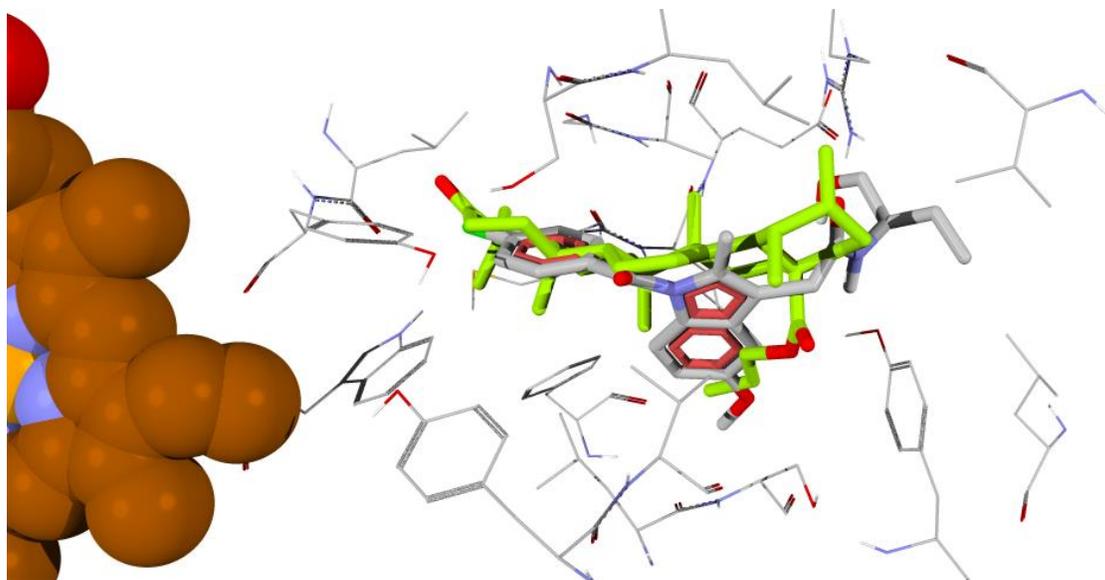
**Figura 29.** Validación del método en COX-1 con un derivado de la indometacina, la conformación verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento molecular.



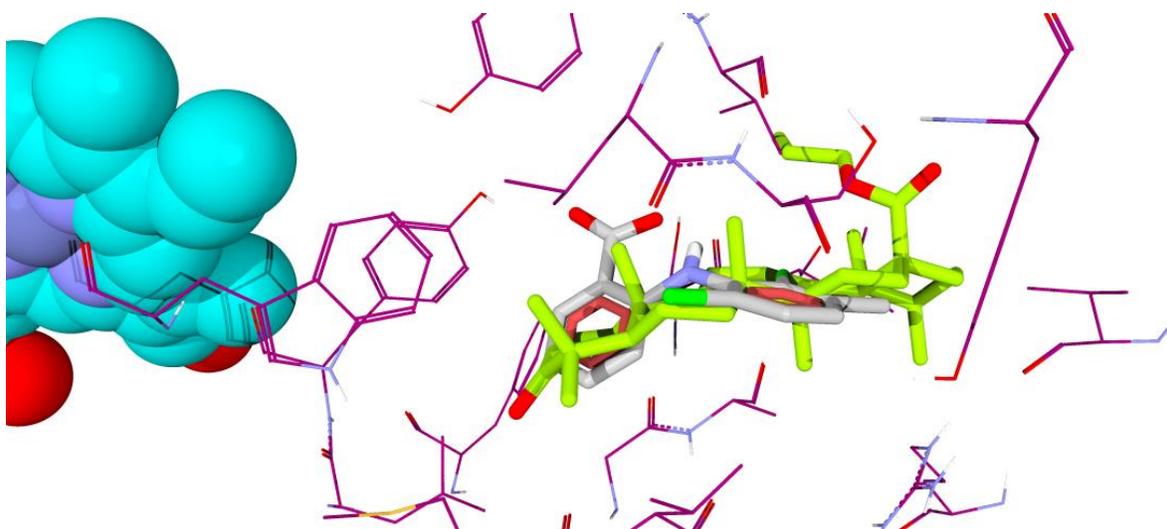
**Figura 30.** Validación del método en COX-2 con ácido meclofenámico, la conformación verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento molecular.

#### 3.3.1.1. Formación de complejos con acoplamiento molecular flexible

En el acoplamiento molecular flexible se permitió la movilidad de la proteína siendo las cadenas laterales las que poseen flexibilidad. Las estructuras utilizadas en el ensayo fueron las conformaciones de menor energía obtenidas en el acoplamiento molecular rígido para los compuestos **M1-M13**. Se utilizaron los mismos parámetros de función de puntaje y búsqueda que en el acoplamiento molecular rígido. Como ejemplo, en las **figuras 31 y 32** se observan las predicciones obtenidas por el algoritmo de COX-1 y COX-2 para el compuesto **M9**. Donde se observa que el compuesto reproduce la conformación del ligando cristalizado en las enzimas ciclooxigenasas.



**Figura 31.** Derivado del ácido ursólico (M9) en verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento para ciclooxygenasa, en gris se observa la conformación del ligando activo indometacina.



**Figura 32.** COX-2 con un derivado del ácido ursólico (M9), la conformación verde es la predicción del algoritmo de acoplamiento, y en gris se observa la conformación del ligando activo ácido meclufenámico.

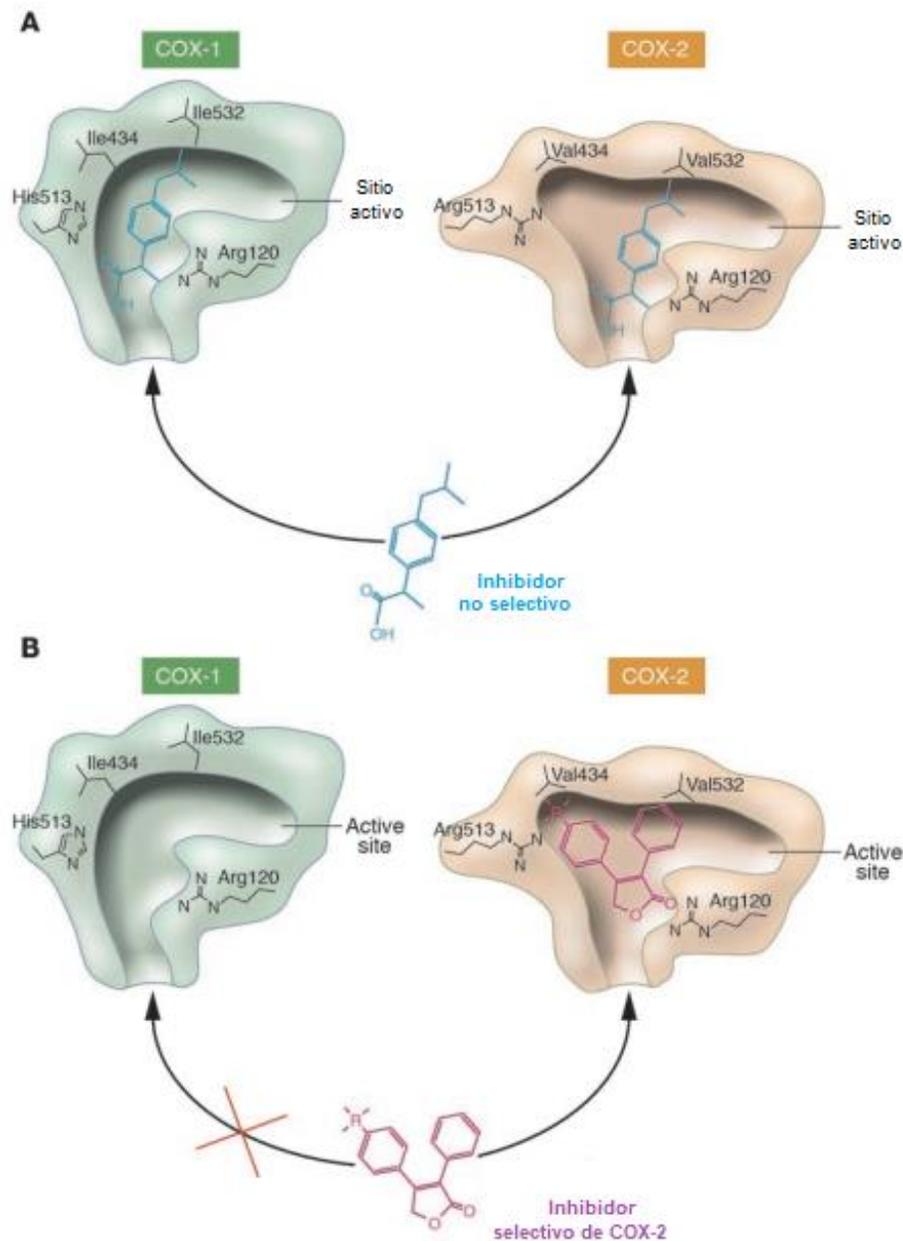
En la **tabla 11** se muestran los resultados obtenidos de las energías de interacción de los compuestos **M1-M13** con los blancos moleculares. Se calculó la diferencia de energías de interacción entre COX-1 y COX-2. Los resultados obtenidos se interpretan de la siguiente manera: cuando la diferencia de energías es positiva la selectividad del compuesto es por COX-2, mientras que un resultado negativo, indica selectividad por COX-1; por ejemplo, la indometacina utilizada como fármaco de referencia, fármaco no selectivo que tiene preferencia para COX-1 con un valor de  $-34.92 \text{ Kcal/mol}$ .

Las enzimas ciclooxigenasas tienen diferencias estructurales entre los canales de unión al sustrato que promueven la selectividad hacia una u otra isoforma. Los residuos de aminoácidos Val434, Arg513 y Val523 forman una bolsa lateral en COX-2 que está ausente en COX-1. En la **figura 33 (A)** los inhibidores no selectivos tienen acceso a los canales de unión de ambas isoformas. En la **figura 33 (B)** los residuos más voluminosos en COX-1, Ile434, His513 e Ile532, obstruyen el acceso de las cadenas laterales voluminosas de los inhibidores de COX-2.<sup>88</sup> Cabe mencionar que los residuos relevantes para tener interacciones en las isoformas de ciclooxigenasa se mencionan a continuación en diferentes secciones según la ubicación que tengan en la enzima: aminoácidos ubicados en el bolsillo lateral (**LP**: Ala 527, Leu 531 y Val 349), canal de constricción (**CC**: Arg 120, Glu 524 y Tyr 355), bolsa lipofílica (Lip: Val523), además de Arg 513 e His 90.<sup>89</sup>

---

<sup>88</sup> Grosser, T.; Fries, S.; FitzGerald, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*. **2006**, 116, 4-15.

<sup>89</sup> Pérez, D.J.; Sarabia, O.; Villanueva-García, M; Pineda-Urbina, K.; Ramos-Organillo, A.; Gonzalez-Gonzalez, J.; Gómez-Sandoval, Z.; Razo-Hernández, R.S. *In silico* receptor-based drug design of X,Y-benzenesulfonamide derivatives as selective COX-2 inhibitors. *Comptes Rendus Chimie*. **2017**, 20, 169-180.



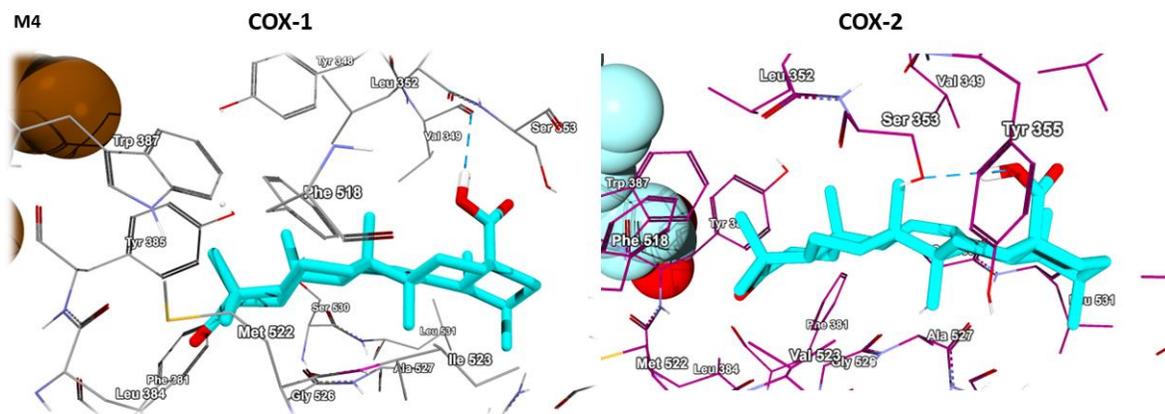
**Figura 33.** Diferencias estructurales entre los canales de unión al sustratos de las ciclooxygenasas, los residuos de aminoácidos Val434, Arg513 y Val523 forman una bolsa lateral en COX-2 que esta ausente en COX-1. Adaptado de Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities.<sup>88</sup>

**Tabla 11.** Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos **M1-M13**, energías de interacción ligando- proteína.

Compuesto	COX1	COX2	Diferencia
	<i>Kcal/mol</i>		
<b>M1</b>	-118.11	-120.23	2.12
<b>M2</b>	-124.49	-126.06	1.57
<b>M3</b>	-133.49	-141.57	8.08
<b>M4</b>	-124.18	-114.08	-10.1
<b>M5</b>	-133.86	-155.8	21.94
<b>M6</b>	-121.5	-151.73	30.18
<b>M7</b>	-110.66	-116.77	6.11
<b>M8</b>	-162.55	-187.15	24.59
<b>M9</b>	-140.27	-181.05	40.77
<b>M10</b>	-138.09	-158.07	19.97
<b>M11</b>	-129.71	-157.64	27.93
<b>M12</b>	-111.32	-121.4	10.08
<b>M13</b>	-127.135	-125.94	-1.19
<b>Indometacina</b>	-182.03	-147.11	-34.92

Los compuestos **M4** y **M13** tuvieron afinidad por la ciclooxigenasa-1. En el análisis de similitud molecular se observó que estas estructuras tienen mucha similitud con la indometacina en los valores de sus descriptores lipofílico, volumen y de polaridad (el análisis de similitud molecular para los compuestos se detalla en la sección 3.3.1.2). El compuesto **M4**, presenta una mejor energía de interacción frente a COX-1 en comparación con todos los derivados de la serie. Las interacciones de hidrógeno que presenta frente a las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 son con Val-349 y Ser353, respectivamente. La parte de **M4** que interacciona es el OH de la posición C-28 (**figura 34**). Este compuesto presentó el mejor porcentaje de inhibición en el ensayo *in vivo* de ATF en oreja de ratón con un porcentaje de

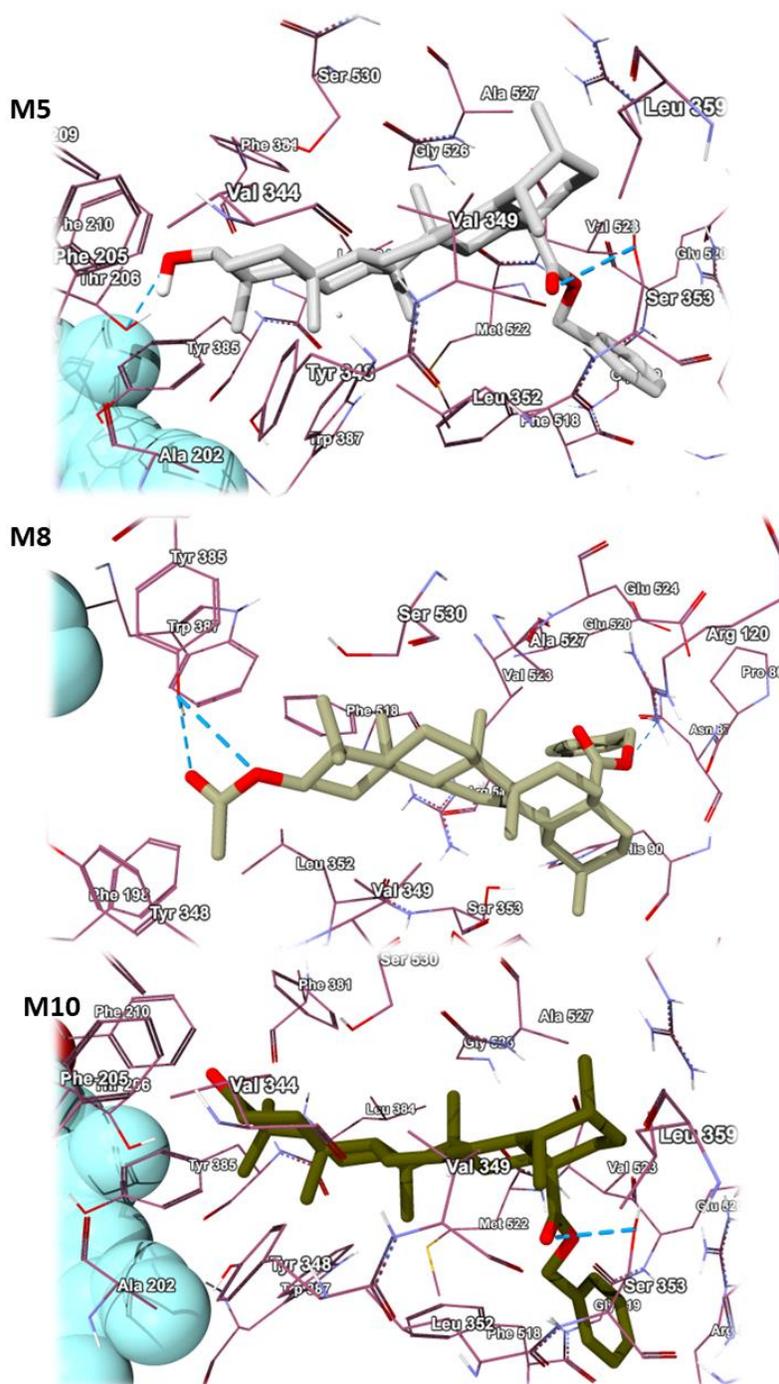
inhibición de 75%, y esto podría relacionarse con las características fisicoquímicas que presenta **M4** similares a indometacina.



**Figura 34.** Interacción de enlace de hidrógeno del compuesto **M4** con COX-1 y COX-2.

Para los compuestos **M5**, **M8** y **M10** la diferencia de energía entre el acoplamiento de COX-1 y COX-2 es positiva (arriba de 10 unidades). Con este resultado se pensó que estos compuestos podrían ser elegidos como inhibidores selectivos de COX-2, pero la correlación con el análisis de similitud molecular muestra que las estructuras se ven afectadas debido al aumento de volumen y coeficiente de partición, por lo que la adición del éster bencílico en el carbono 28, favorece la disminución de la actividad antiinflamatoria. Esto se corrobora con el ensayo *in vivo* donde estos compuestos tienen un bajo porcentaje de inhibición de la inflamación con valores de 21.94, 24.54 y 19.97%, respectivamente. Estos porcentajes de inhibición sugieren que al ser tan poco polares, su solubilidad se ve afectada lo que los hace menos disponibles en el ensayo *in vivo*. Sin embargo, se podría suponer que la poca cantidad de compuesto que llega a traspasar las membranas tiene un buen efecto antiinflamatorio, y si una de las vías por las cuales tiene su efecto es cixlooxigenasa-2, el efecto lipofílico que le proporciona el bencilo a la estructura es favorable para tener mejores interacciones con la enzima. Por ejemplo, el

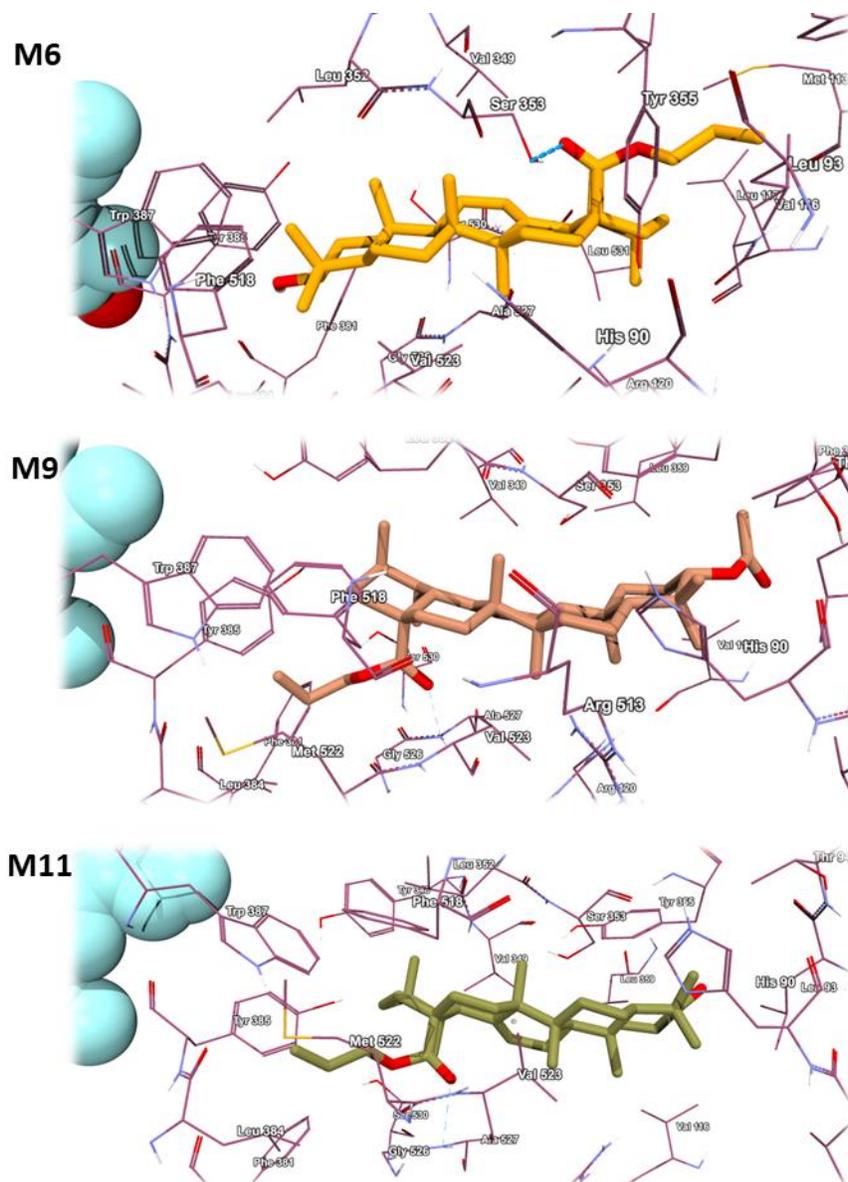
compuesto **M8** presenta una doble interacción con COX-2 , con el grupo acetoxi en C-3 y triptófano387 y carbonilo del ester en C-28 y arginina120 que forma parte de la bolsa del la enzima, estos enlaces de hidrógeno hacen que tenga una mayor interacción con la enzima en comparación con los compuestos **M5** y **M10** (figura 35), que tienen un hidroxilo y una cetona en C-3, respectivamente.



**Figura 35.** Interacciones por enlace de hidrógeno para los compuestos **M5**, **M8** y **M10** con ciclooxygenasa 2.

Los compuestos **M6**, **M9**, **M11** (figura 36) con un éster propílico como sustituyente en C-28, fueron los que tuvieron un valor mayor de puntaje, destacándose el

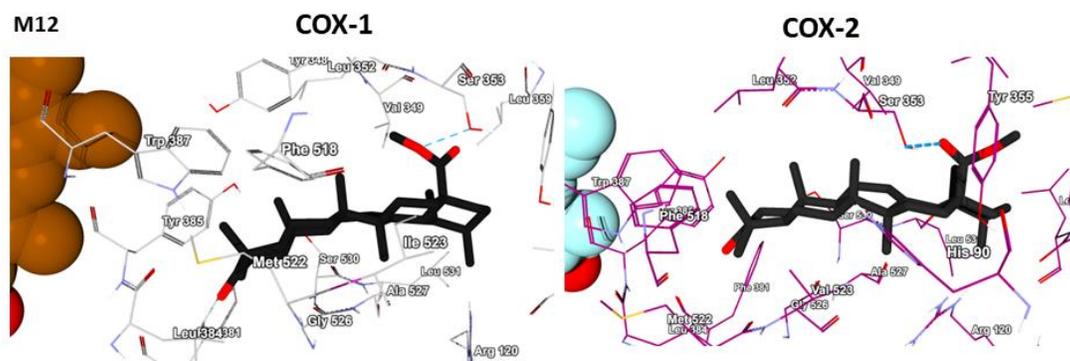
compuesto **M9** con un valor de score de 40.77 *Kcal/mol*. Esta diferencia es muy notable por el incremento de lipofilia en la molécula al adicionar un grupo acilo en C-3 en combinación de un éster propílico, combinación que aumenta drásticamente el ALOGP de la molécula con un valor de 8.30, el doble observado con indometacina (sección 3.3.1.2). Es importante mencionar que se tiene una interacción por medio de un enlace de hidrógeno en el bolsillo lateral de la enzima entre Ala 527 y el carbonilo del éster propílico, lo que mejora la selectividad de **M9** hacia COX-2. Sin embargo, en el ensayo *in vivo* la actividad antiinflamatoria se ve afectada por la lipofilia, teniendo un 9% de inhibición del edema en comparación con los compuestos que tienen un sustituyente hidroxilo (**M6**) y carbonilo (**M11**) en C-3 que los hace menos lipófilos dándoles mejores porcentajes de inhibición en ATF con valores de 47 y 48% respectivamente.



**Figura 36.** Interacciones por enlace de hidrógeno para los compuestos **M6**, **M9** y **M11** con ciclooxygenasa 2

Los compuestos **M7** y **M12** muestran un patrón diferente para los valores de volumen y polaridad. Registran los valores más bajos de la serie de compuestos totales. Los valores de puntaje obtenidos en el acoplamiento molecular para estos compuestos son positivos pero de los más bajos de la serie de compuestos, aunque no se puede descartar su actividad antiinflamatoria, ya que *in vivo* inhibieron el edema por 46.89 y 48.79 % respectivamente. Se observa que la modificación en C-

28 con el éster metílico (**M12**) no incrementa tanto la lipofilicidad de la molécula en comparación con el éster propílico (**M11**), con valores de ALOGP de 6.68 y 7.91 respectivamente, por lo que el compuesto **M12** tiene menos problemas de solubilidad, lo que presentan prácticamente el mismo efecto inhibitorio en el ensayo *in vivo* (48.80 %, compuesto **M11**, y 48.76 %, compuesto **M12**). Las interacciones del compuesto **M12** se pueden observar en la **figura 37** donde en las dos enzimas se observa un enlace de hidrógeno con el oxígeno del éster metílico en C-28 para COX-1 y con el oxígeno del carbonilo en C-28 para COX-2, ambas interacciones se realizan con la parte del bolsillo lateral de la enzima con Ser353. Se puede observar que la interacción tiene diferente valor energético para COX-1 y para COX-2 con valores de  $-0.92$  y  $-2.5$  *Kcal/mol*, respectivamente; esto puede explicar la diferencia de energía de interacción más positiva para **M-12** siendo mejor el valor hacia COX-2.



**Figura 37.** Interacciones por enlace de hidrógeno para el compuesto **M12** con ciclooxigenasas.

### 3.3.1.2. Análisis de similitud molecular para los derivados de ácido ursólico de la serie M1-M13.

La selección de los descriptores se realizó de acuerdo con su correlación con la actividad biológica. Se buscaron coincidencias entre los valores de los

descriptores moleculares de compuestos con mayor o menor actividad biológica. Por ejemplo, para los compuestos con menor actividad se encontró que el volumen fue un factor determinante para la disminución de la actividad en el ensayo *in vivo* de inducción de edema en oreja de ratón por ATF, debido a que ninguno los compuestos con un éster bencílico en el carbono 28 presentó actividad biológica significativa.

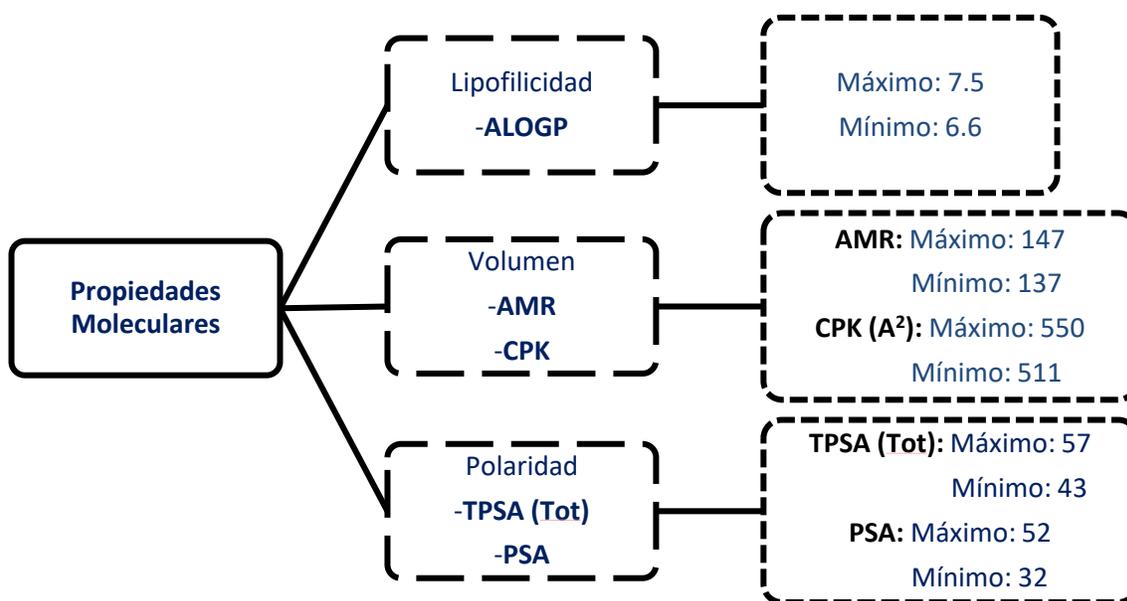
**Tabla 12.** Descriptores moleculares obtenidos del programa Spartan para ácido ursólico (M1), derivados de ácido ursólico (M2-M13) e indometacina (14).

Compuesto	E HOMO (kJ/mol)	E LUMO (kJ/mol)	CPK Volumen (Å <sup>3</sup> )	PSA (Å <sup>2</sup> )	Dureza
M1	-570.13	19.05	496.6	50.56	0.11
M2	-567.98	17.15	524.75	38.58	0.11
M3	-581.08	3.29	536.12	53.08	0.11
M4	-904.53	90.91	490.76	47.11	0.19
M5	-580.33	-20.02	598.37	35.86	0.11
M6	-903.69	101.31	550.62	35.88	0.19
M7	-580.27	20.2	515.82	36.59	0.11
M8	-912.11	12.59	639.09	37.48	0.18
M9	-889.8	106.74	594.08	37.54	0.19
M10	-912.53	10.93	593.9	31.35	0.18
M11	-589.52	-27.92	546.15	31.37	0.11
M12	-590.56	-26.61	511.35	32.08	0.11
M13	-581.36	-11.73	508.47	52.21	0.11
14	-542.99	-121.9	341.99	55.78	0.08

**Tabla 13.** Descriptores moleculares obtenidos del programa Dragon, indometacina (**14**).

Compuesto	ASP	AMR	TPSA(Tot)	ALOGP
<b>M1</b>	0.53	133.70	57.53	6.47
<b>M2</b>	0.55	138.45	46.53	6.88
<b>M3</b>	0.58	142.85	63.6	6.85
<b>M4</b>	0.50	134.04	63.6	6.21
<b>M5</b>	0.41	146.92	43.37	7.55
<b>M6</b>	0.41	172.23	52.6	8.68
<b>M7</b>	0.42	147.74	46.53	7.59
<b>M8</b>	0.50	138.47	46.53	6.72
<b>M9</b>	0.28	163.08	46.53	8.30
<b>M10</b>	0.52	132.88	54.37	6.43
<b>M11</b>	0.49	156.89	52.6	7.97
<b>M12</b>	0.49	137.65	43.37	6.68
<b>M13</b>	0.27	162.26	43.37	8.26
<b>14</b>	0.35	94.30	68.53	4.21

A partir de este análisis se propusieron rangos de valores (**figura 38**) en los parámetros seleccionados. Se recomienda que se tomen en cuenta para el diseño de nuevos compuestos derivados del ácido ursólico, tomando en cuenta que las modificaciones realizadas en los carbonos 3 y 28 se realicen con sustituyentes similares a las utilizadas en los compuestos **M2-M13**.



**Figura 38.** Resultados del análisis molecular, rangos propuestos para obtener compuestos derivados de ácido ursólico con actividad biológica.

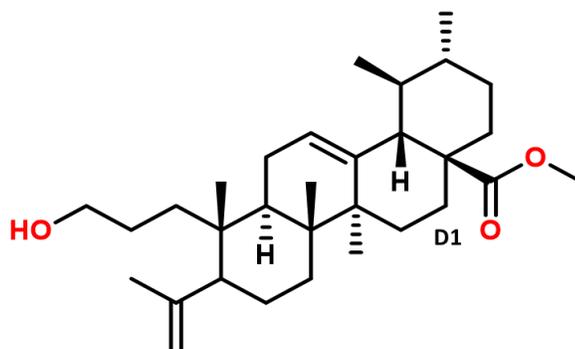
### 3.3.2. Análisis de resultados del acoplamiento molecular para los compuestos de la serie D1-D11

Los compuestos de la serie D fueron propuestos debido a que se observó que las modificaciones en el anillo A de estos compuestos pueden tener un efecto favorable para mejorar la actividad biológica. Se propusieron compuestos con cambios menores como D1 y D2, así como moléculas híbridas de ácido ursólico con isatina como D3-D11.

Para el acoplamiento molecular se realizaron cinco repeticiones. El promedio de los valores se utilizó para el cálculo de la diferencia de energía de cada compuesto. Estos resultados nos dan un panorama general de la actividad biológica (tabla 14), se propone la semisíntesis química del compuesto con mayor probabilidad de presentar actividad antiinflamatoria D1. Su estructura se muestra en la figura 39.

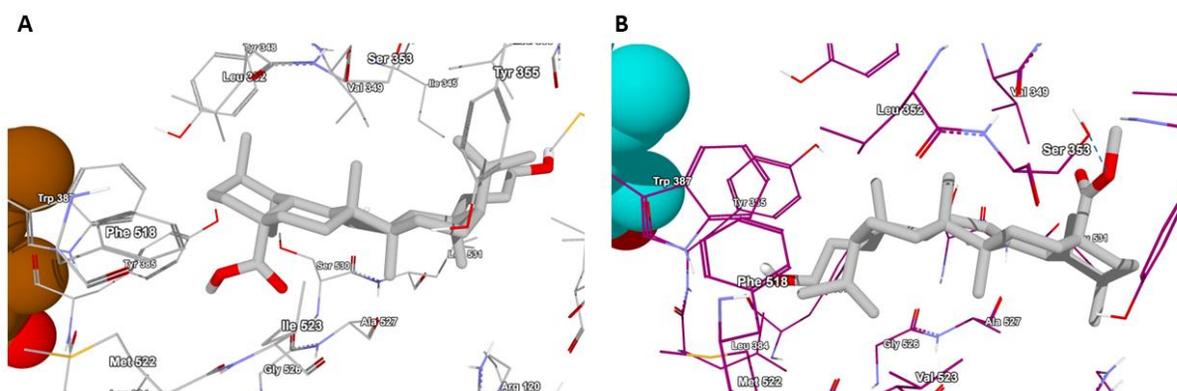
**Tabla 14.** Resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos D1-D11, energías de interacción ligando- proteína (COX-1 y COX-2).

Compuesto	COX-1	COX-2	Diferencia
	<i>Kcal/mol</i>		
<b>D1</b>	-158.72±2.85	-183.48±0.70	24.76
<b>D2</b>	-162.47±3.87	-183.60±7.48	21.13
<b>D3</b>	-226.25±3.32	-242.01±10.46	15.76
<b>D4</b>	-232.33±0.82	-249.00±1.35	16.67
<b>D5</b>	-228.79±3.00	-243.67±8.87	14.88
<b>D6</b>	-220.75±2.46	-237.46±2.92	16.71
<b>D7</b>	-223.27±5.35	-246.08±17.19	22.81
<b>D8</b>	-236.07±4.98	-252.19±7.05	16.12
<b>D9</b>	-238.95±4.21	-245.84±14.61	6.89
<b>D10</b>	-248.78±0.78	-251.74±14.47	2.97
<b>D11</b>	-237.16±4.89	-252.18±4.19	15.02
<b>Indometacina</b>	-182.03	-147.11	-34.92



**Figura 39.** Compuesto seleccionado por su mayor probabilidad de tener actividad antiinflamatoria.

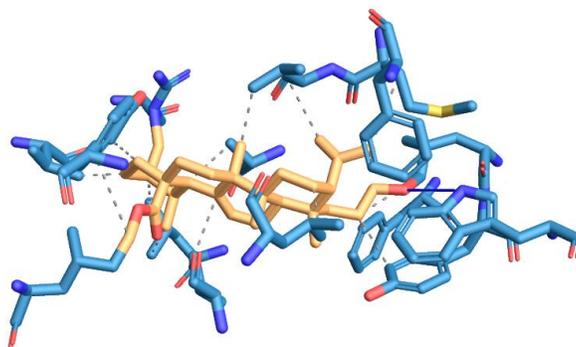
El acoplamiento molecular para el compuesto **D1** muestra que este compuesto tiene mayor probabilidad de tener actividad antiinflamatoria con una preferencia hacia ciclooxigenasa-2. Esto se puede relacionar con la diferencia en las interacciones con las dos isoformas de ciclooxigenasa (**figura 40**).



**Figura 40.** Enlaces de hidrógeno presentes en las dos isoformas de ciclooxigenasas para el compuesto **D1**. A ciclooxigenasa-1 donde no se observan enlaces de hidrógeno, B ciclooxigenasa-2 enlace de hidrógeno con Ser 353 mediante el éster metílico de la posición 28.

Adicional a lo anterior se calcularon las interacciones no covalentes en la plataforma Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP)<sup>90</sup>, un servicio web para el análisis de interacciones no covalentes en complejos proteína-ligando. Para ello se utilizó el archivo PDB del complejo **D1** con COX-2. En su mayoría las interacciones encontradas fueron de tipo hidrofóbicas que concuerda con el tipo de estructura que tiene el compuesto **D1**, conformado en mayor proporción por átomos de carbono e hidrógeno que favorecen las interacciones en la cavidad de ciclooxigenasa-2 debido a que es ligeramente más lipófila; se debe mencionar que el servidor PLIP toma una distancia máxima de 4 Å entre átomos de carbono. Por otra parte, se observa un enlace de hidrógeno con TRP 387 y el oxígeno de la posición 3 de **D1** el cual se calculó con una distancia máxima entre el aceptor y el donador de enlace de hidrógeno de 3.79 Å y un ángulo de 114.91°. Las interacciones mencionadas se muestran en la **figura 41**.

<sup>90</sup> Salentin, S. et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. Nucl. Acids Res. (1 July 2015) 43 (W1): W443-W447. doi: 10.1093/nar/gkv315



**Figura 41.** Interacciones hidrofóbicas (líneas punteadas en gris) y enlace de hidrógeno (línea azul) para el compuesto **D1**.

Dentro del grupo de derivados que incluyen isatina en su estructura (**D3-D11**), se realizó un comparativo de 3 compuestos **D7**, **D4** y **D10** con energías de interacción con valores de 22.81, 16.67, 2.97 *Kcal/mol*, respectivamente. Se observa que el compuesto **D7** tiene una mejor y diferente interacción con la ciclooxigenasa-2 debido a que presenta un enlace de hidrógeno con Ser353. Este enlace es con la parte del triterpeno de la molécula específicamente con el oxígeno del éster en el C-28; se debe señalar que en COX-2 esta molécula está en diferente disposición espacial que los demás derivados de isatina. El compuesto **D4** presenta enlaces de hidrógeno con ambas ciclooxigenas con el oxígeno del C-5 del núcleo de isatina, interacciona con COX-1 por medio de dos enlaces de hidrógeno con Arg83 y un enlace de hidrógeno con Val116 con COX-2. El compuesto con un valor menor de energía de interacción **D10** muestra tres enlaces de hidrógeno con cada ciclooxigenasa con la parte de la hidrazona sustituyente en la posición 3 del núcleo de isatina con COX-1 dos enlaces de hidrógeno con Arg83 y uno con Pro86, con COX-2 dos enlaces de hidrógeno con Ser119 y uno con Val89. Todas las interacciones antes mencionadas se observan en la **figura 42** y se incluye una imagen con las estructuras de todos los derivados **D3-D11** donde se agrupan por colores. El compuesto con mejor energía de interacción **D7** se observa en morado, los compuestos **D3**, **D4**, **D5**, **D6**, **D8**, **D11** con un rango de energía de interacción

entre 14.88-16.71 *Kcal/mol* se representan en azul y finalmente los compuestos con menor energía de interacción de 6.8 para **D9** y 2.97 **D10** *Kcal/mol* se representan en amarillo. Se observó que las interacciones de todos los derivados **D3-D11** se dan en la misma región de la ciclooxigenasa-1 con una posición casi idéntica en la parte del triterpeno y una posición con muy poca variación en la parte de isatina. Por su parte, las interacciones de estos compuestos con ciclooxigenasa-2 se observan agrupadas en diferentes regiones de la enzima según su valor de energía de interacción.



### 3.4. Conclusiones

Se generó una metodología validada de acoplamiento molecular para el ácido ursólico **M1** y sus derivados **M2-M13**. Adicionalmente se realizó un análisis de similitud molecular (**ASM**) para los compuestos **M1-M13** en comparación con indometacina. En este **ASM** se calcularon diferentes descriptores moleculares para los compuestos que ayudaron a correlacionar los resultados de acoplamiento molecular con los datos experimentales obtenidos del ensayo *in vivo* de inducción de la inflamación por ATF en oreja de ratón. Los hallazgos encontrados al realizar el análisis de acoplamiento molecular fueron que los compuestos **4** y **13** tuvieron mayor similitud con indometacina en cuanto a lipofilidad, volumen y polaridad. El compuesto **4** por su parte tuvo la menor diferencia de energía de interacción entre COX-1 y COX-2 con un valor de  $-10.1 \text{ Kcal/mol}$ , lo que indica mayor selectividad hacia COX-1, lo que concuerda con un valor de 75% de inhibición en el ensayo *in vivo*. Se observó que los compuestos con un éster bencílico en la posición 28 (**5**, **8**, **10**) se ven afectados por un aumento de lipofilidad y volumen, lo que disminuye la actividad en el ensayo *in vivo* biológico disminuyendo porcentajes de inhibición con valores por debajo del 20%. Se observó que la modificación estructural en C-28 por un éster metílico (**12**) o un éster propílico (**11**) hacen diferencia en el coeficiente de partición de la molécula pero el efecto *in vivo* se mantiene en el mismo porcentaje.

Las interacciones observadas para los derivados **D3-D11**, moléculas que incluyen isatina en su estructura tuvieron similitudes entre ellas. Para la enzima COX-1 se observa un empalme similar para todas. En el caso de COX-2 la molécula que tuvo una mejor energía de interacción se forma un enlace de hidrógeno con la parte del triterpeno y no con isatina. Se observó que las moléculas con un sustituyente hidrazona en el núcleo de isatina tienen más interacciones con la enzima en regiones que no se ven favorecidas hacia COX-2.

Finalmente, la metodología de acoplamiento molecular generada se utilizó para seleccionar el compuesto **D1** con mayor probabilidad de tener efecto antiinflamatorio. Se realizó el análisis de las interacciones para **D1** en COX-1 y COX-2 encontrándose, interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno en la molécula.

---

# **Capítulo 4**

## **Purificación y semisíntesis de ácido ursólico y sus derivados**

## Capítulo 4. Purificación y semisíntesis de ácido ursólico y sus derivados.

### 4.1. Introducción

En este capítulo se detalla la metodología de obtención de ácido ursólico, las metodologías de reacción para la obtención de los derivados semisintéticos y la identificación de cada uno de los compuestos obtenidos.

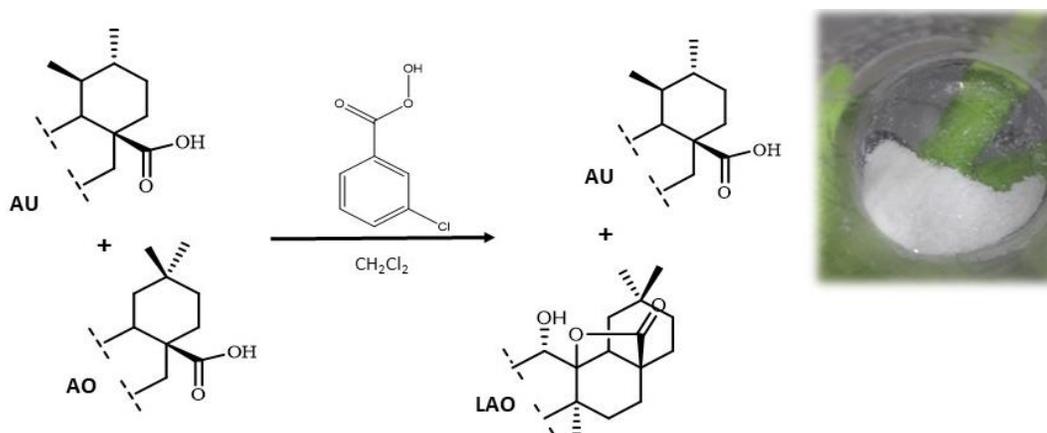
### 4.2. Resultados y discusión

#### 4.2.1. Metodología de obtención del ácido ursólico.

La metodología de obtención del ácido ursólico de una de sus fuentes naturales como *Astianthus viminalis* se logró estandarizar y optimizar. Los rendimientos obtenidos desde el extracto de acetato de etilo se muestran en la tabla 15, donde se observa 75% de rendimiento para la mezcla de triterpenos ácido ursólico-ácido oleanólico tomando como referencia 60g del extracto de acetato de etilo; posteriormente se realizó la reacción de epoxidación de la mezcla y se obtuvo un 21% de rendimiento para ácido ursólico puro tomando como referencia 12.6 g de la mezcla de ácido ursólico-ácido oleanólico (figura 43).

**Tabla 15.** Rendimientos obtenidos para la mezcla de ácido ursólico-ácido oleanólico (AU+AO) y rendimiento para ácido ursólico puro (AU).

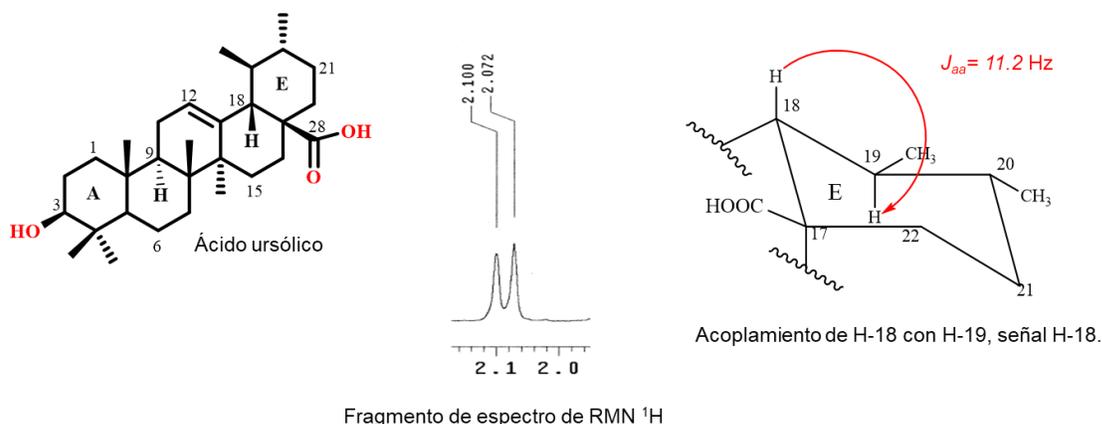
Compuestos	Rendimiento/g
Mezcla AU+AO	75% / 60 g
AU	23% / 12.6 g



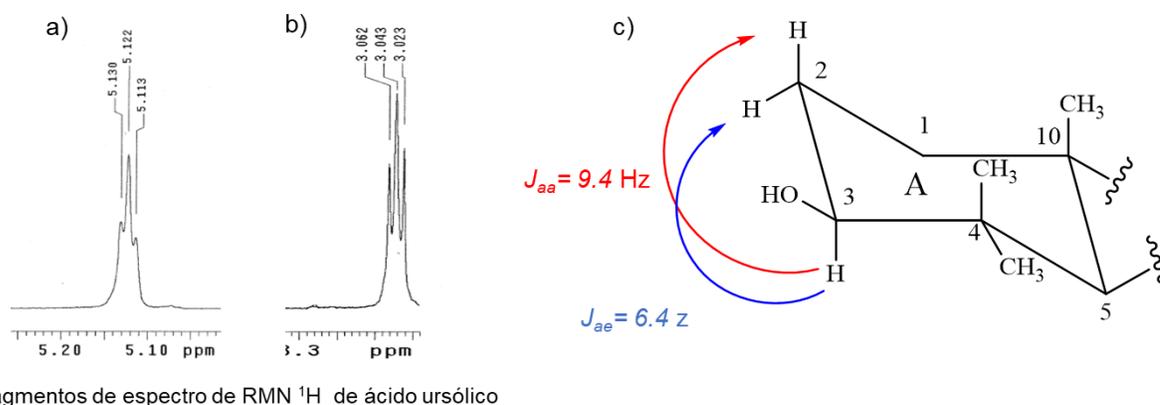
**Figura 43.** Epoxidación de la mezcla AU+AO para la obtención de ácido ursólico con un 23% de rendimiento.

#### 4.2.2. Identificación del ácido (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oico (1).

El ácido ursólico que fue obtenido del extracto de *Astianthus viminalis*, se caracterizó mediante el uso de espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H), y carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C). Las señales características de ácido ursólico (**M1**) en el espectro de protón, son las siguientes: La señal *d* en 2.08 ppm que corresponde al protón de la posición 18 (**figura 44**), tiene una constante de acoplamiento  $J_{aa} = 11.2 \text{ Hz}$  que corresponde a un acoplamiento *axial-axial*; alrededor de 3.04 ppm se observa la señal *dd*, que corresponde al protón base de oxígeno H-3 debido a los acoplamientos que tiene con los protones de la posición 2 (**figura 45 c**) y finalmente en 5.12 ppm se muestra la señal ancha por interacción alílica que corresponde al protón vinílico presente en la molécula (**figura 45a**).

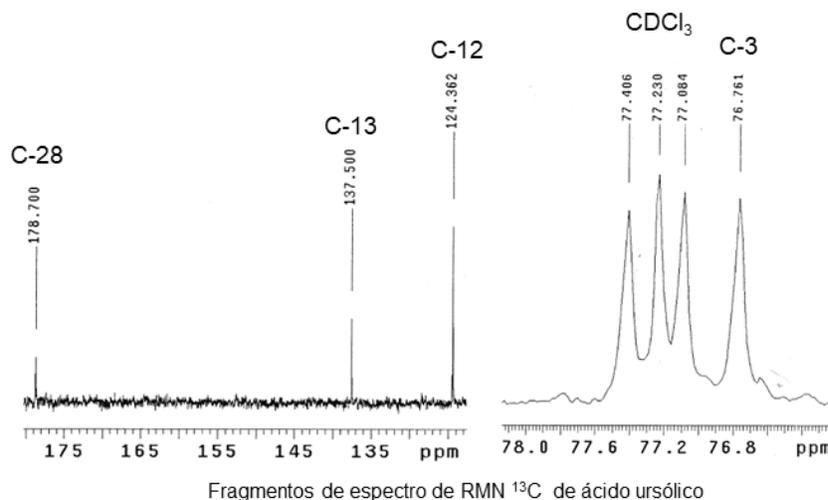


**Figura 44.** Estructura del ácido ursólico, señal del protón 18 y acoplamiento del protón 18 con protón 19.



**Figura 45.** a) Señal H-12, b) Señal H-3, c) Acoplamientos H-3 del ácido ursólico (M1).

En el espectro de <sup>13</sup>C (figura 46) se observa una señal a 76.76 ppm (C-3) que corresponde al carbono base de oxígeno, así como las señales de los carbonos correspondientes al doble enlace 124.4 (C-12) y 137.5 ppm (C-13), finalmente en 178.7 ppm (C-28) se encuentra la señal del carbonilo del ácido carboxílico.



**Figura 46.** Señales del espectro de  $^{13}\text{C}$  para el ácido ursólico.

La identidad del ácido ursólico fue confirmada por comparación con los datos físicos y espectroscópicos descritos en la literatura.<sup>91</sup>

Tomando en consideración la información referente al ácido ursólico y para identificar los cambios estructurales en los compuestos semisintéticos, se mencionan por compuesto las señales que marcan la diferencia con respecto a las modificaciones realizadas a la estructura base del ácido ursólico.

### 4.2.3. Procedimientos de semisíntesis

#### 4.2.3.1. Semisíntesis del compuesto M7

La semisíntesis de **M7** se realizó para obtener el compuesto que serviría de materia prima para la reacción de escisión radicalaria-oxidación. Las condiciones de reacción utilizadas dieron un 89.4% de rendimiento para el compuesto **M7**.

<sup>91</sup> Jaki, B.U.; Franzblau, S.G.; Chadwick, L.R. Purity - Activity Relationships of Natural Products : The Case of Anti-TB Active Ursolic Acid. *J Nat Prod.* **2008**, 71, 1742-1748.

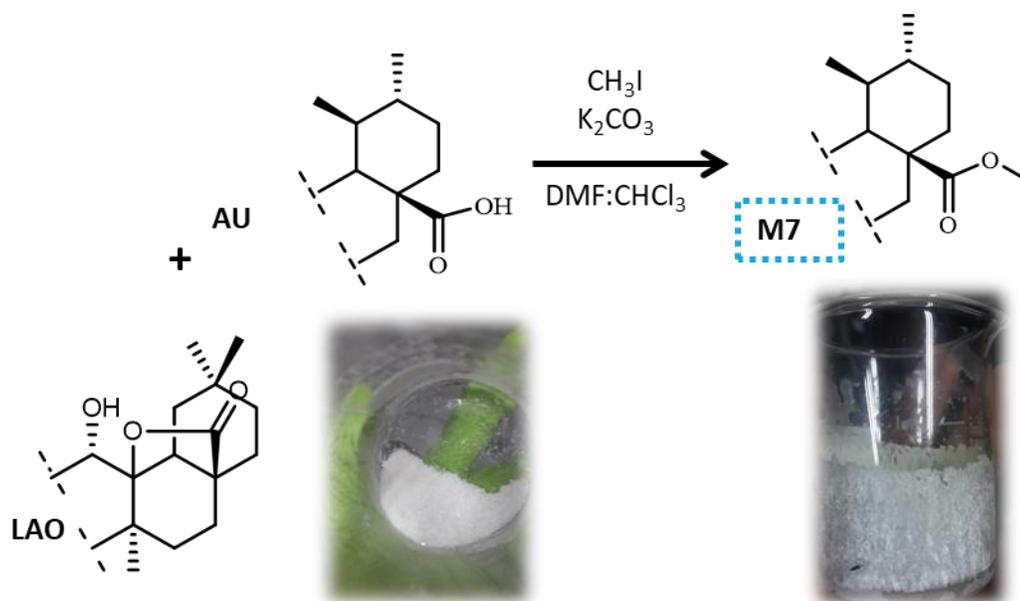
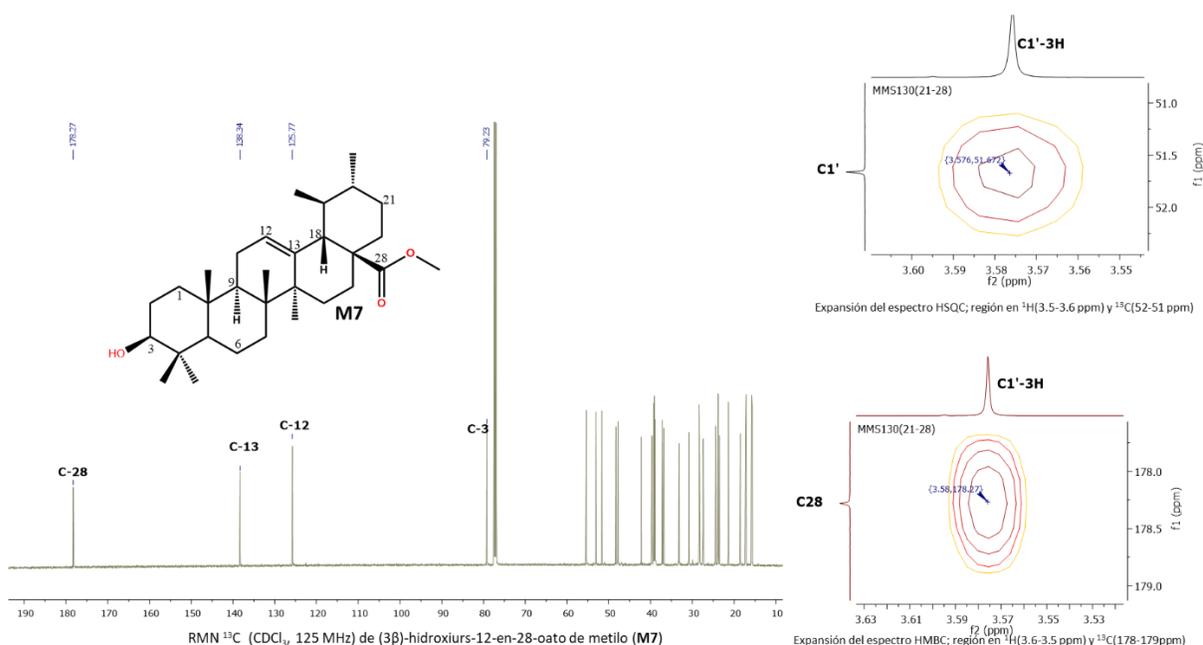


Figura 47. Semisíntesis del compuesto M7.

#### 4.2.3.1.1. Identificación del compuesto (3β)-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7)

Al realizar la esterificación del ácido ursólico con yoduro de metilo en la posición 28, el espectro de protón se observa una señal singlete en 3.60 ppm que integra para los tres protones del metilo adicionado. En el espectro de <sup>13</sup>C se observa una señal en 178.27 para el carbono 1', que se correlaciona con el espectro de protón en un experimento HMBC (figura 48). La identidad del compuesto fue confirmada por comparación con los datos físicos y espectroscópicos descritos en la literatura.<sup>92</sup>

<sup>92</sup>Kwon, T.H.; Lee, B.; Chung, S.H.; Kim, D.H.; Lee, Y.S. Synthesis and NO production inhibitory activities of ursolic acid and oleanolic acid derivatives. Bull Korean Chem Soc. **2009**, 30, 119-123. doi:10.5012/bkcs.2009.30.1.119.



**Figura 48.** Fragmentos del espectro de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, expansiones de del espectro de HMBC y HSQC para el compuesto M7.

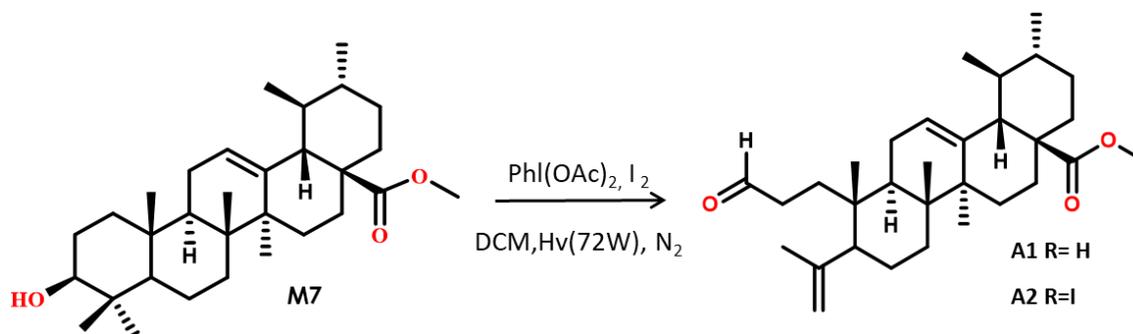
#### 4.2.3.2. Escisión radicalaria-oxidación

Uno de los procesos estudiados por Romero, I. y colaboradores<sup>93</sup> se inician con la conversión de un alcohol en un *O*-radical (denominado radical alcóxido si se genera a partir de alcoholes). Debido a la fuerza de enlace de O-H (104 *Kcal/mol*), no es posible la preparación de un *O*-radical partiendo directamente del R-O-H, el enlace O-H debe transformarse en un enlace más débil como de tipo O-heteroátomo con fuerzas de enlace menor (O-I, 56 *Kcal/mol*). El R-O-X se puede transformar en el *O*- radical por medio de descomposición térmica o fotoquímica, por ejemplo, de hipoyoditos R-O-I. Estos hipoyoditos se pueden generar mediante el tratamiento del alcohol con reactivos de yodo hipervalente como (diacetoxiyodo) benceno (DIB).

<sup>93</sup> Romero, I. Procesos Secuenciales para la síntesis de aminas quirales a partir de amino ácidos y péptidos. Tesis Doctorado, Universidad de La Laguna, 2014.

Este a su vez reacciona con el sustrato R-O-H, dando lugar a un hipoyodito de alquilo y ácido acético.

A partir del compuesto **M7** se inició la semisíntesis de los derivados de ácido ursólico con apertura en el anillo A. Se realizó la reacción de escisión radicalaria-oxidación para el compuesto **M7** que fue tratado con yodo, (diacetoxiyodo) benceno (DIB) y se irradió con luz visible usando una lámpara de wolframio de 72 W (**figura 49**). Se realizaron varias pruebas cualitativas de esta reacción para obtener las mejores condiciones y rendimiento. Como primera parte se hizo una variación en los equivalentes de iodo manteniendo los equivalentes de DIB fijos en 1.5. Se observó que cuando se utilizan 0.25 equivalentes de iodo, la materia prima no se agota. Al aumentar los equivalentes de iodo se incrementa el número de subproductos en la reacción, por ello se eligió 0.5 como proporción idónea. Finalmente, se realizó una prueba con el tiempo para ver si el incremento de tiempo daba mejores resultados, pero se dejó establecido un tiempo óptimo de 30 min (**tabla 16**). Estas condiciones nos dieron los mejores rendimientos de la mezcla de aldehídos que necesitábamos como materia prima para la siguiente reacción.

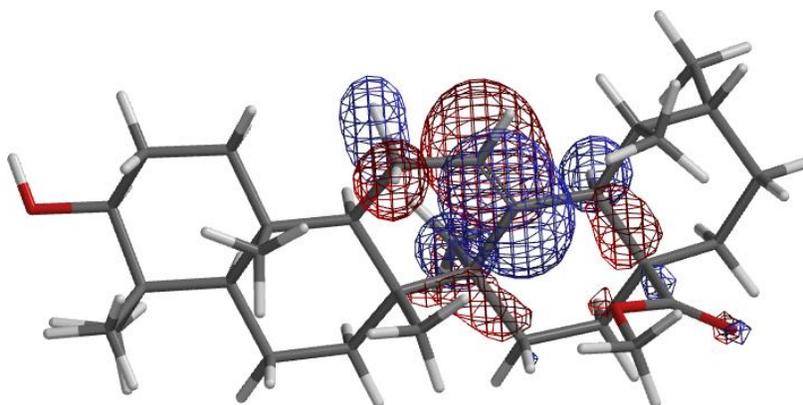


**Figura 49.** Esquema de reacción para la escisión radicalaria-oxidación del compuesto **M7**.

**Tabla 16.** Modificaciones a las condiciones de la reacción de fotólisis, MP=materia prima (**M7**). Resaltado en azul se indican las condiciones óptimas.

Entrada	DIB (equivalentes)	I <sub>2</sub>	Tiempo de reacción (min)
1	1.5	0.25	30
2	1.5	0.5	30
3	1.5	1	30
4	2	0.5	30
5	2.5	0.5	30
6	3	0.5	30
7	1.5	0.5	60

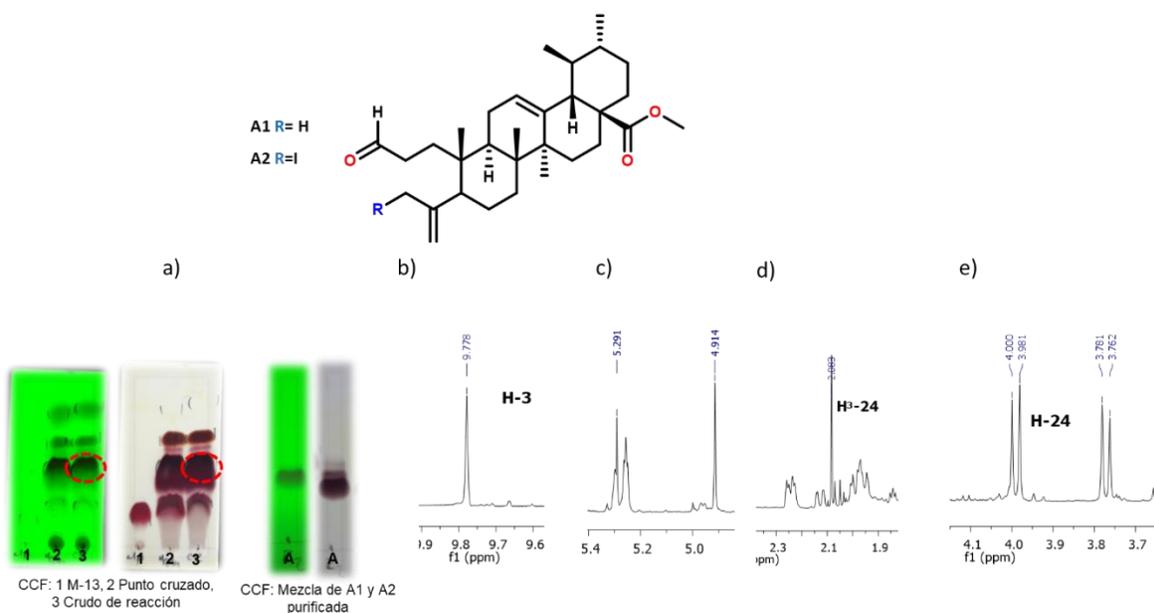
Debido a la complejidad observada en el crudo de reacción, a pesar de encontrar las mejores condiciones de reacción, se realizó el cálculo de orbital molecular ocupado de más energía (HOMO, por sus siglas en inglés) del compuesto **M7** utilizado como materia prima en la reacción de fotólisis. El resultado se observa en la **figura 50** donde se observa que el HOMO de la molécula se encuentra en el doble enlace de la posición 12, lo que podría generar que esta parte de la molécula también reaccionara y daría explicación a la obtención de otros subproductos que se observan en el crudo de reacción.



**Figura 50.** Estructura del compuesto **M7**, en la superficie azul-rojo se observa el orbital<sup>o</sup> molecular ocupado de más energía del (HOMO, por sus siglas en inglés).

#### 4.2.3.2.1. Identificación de productos derivados de la escisión radicalaria-oxidación del (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7).

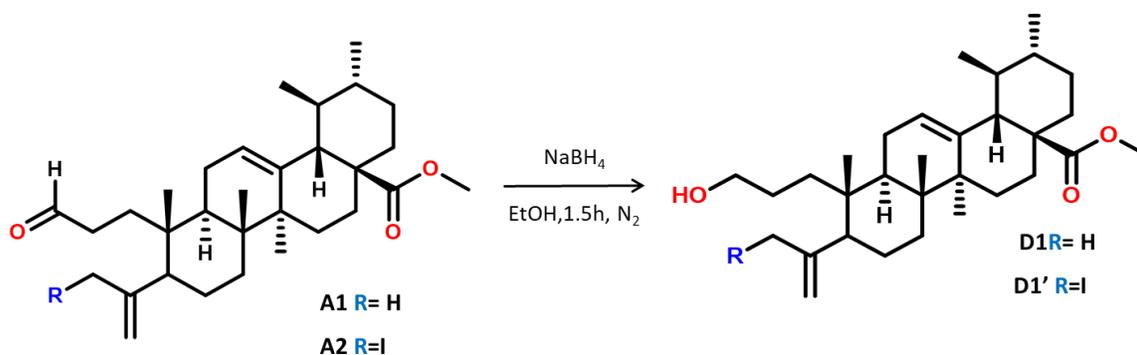
Debido a la complejidad, inestabilidad y similitud de los subproductos derivados del crudo de reacción de escisión radicalaria, se identificó una mancha de interés por medio de CCF **figura 51 a)** circunferencia punteada en color rojo. Las señales características para la mezcla de aldehídos **A1** y **A2** purificada son las siguientes: para ambos compuestos se observa una señal ancha en  $\delta_H$  9.77 que corresponde al protón del aldehído en la posición 3 (**figura 51 b)**). También se observan dos señales singuletes en  $\delta_H$  5.29 y 4.91 que corresponden a los protones vinílicos H<sub>2</sub>-23 (**figura 51 c)**). Para el compuesto **A1** con un CH<sub>3</sub> en la posición 24 se observa una señal simple en  $\delta_H$  2.0 que corresponde a los tres protones del metilo vinílico presente en la molécula (**figura 51 d)**). Por otro lado el compuesto **A2** con FM C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>I O<sub>3</sub> se diferencia del otro aldehído obtenido por integrar en su estructura un átomo de iodo en la posición 24, esta diferencia se puede observar en el espectro de protón por la presencia del sistema AB en  $\delta_H$  4.0 ( $J = 9.5$  Hz) y  $\delta_H$  3.77 ( $J = 9.5$  Hz) que integra para un protón cada una, correspondientes al metileno unido al yodo H<sub>2</sub>-24.



**Figura 51.** a) CCF del crudo de reacción escisión radicalaria-oxidación del compuesto **M7** (en punteado rojo, identificación de la mezcla de aldehídos), b), c), d), e) señales características para la mezcla de aldehídos. La mezcla eluyente en las cromatoplasas fue 90:10 hexano-acetato de etilo.

#### 4.2.3.3. Reducción

La mezcla de aldehídos **A1** y **A2** obtenida mediante la reacción de escisión radicalaria-oxidación fue tratada con  $\text{NaBH}_4$  y se colocó en agitación durante 1.5 horas a temperatura ambiente (22 °C) dando lugar a la mezcla de alcoholes **D1** y **D1'** como se observa en la **figura 52**.

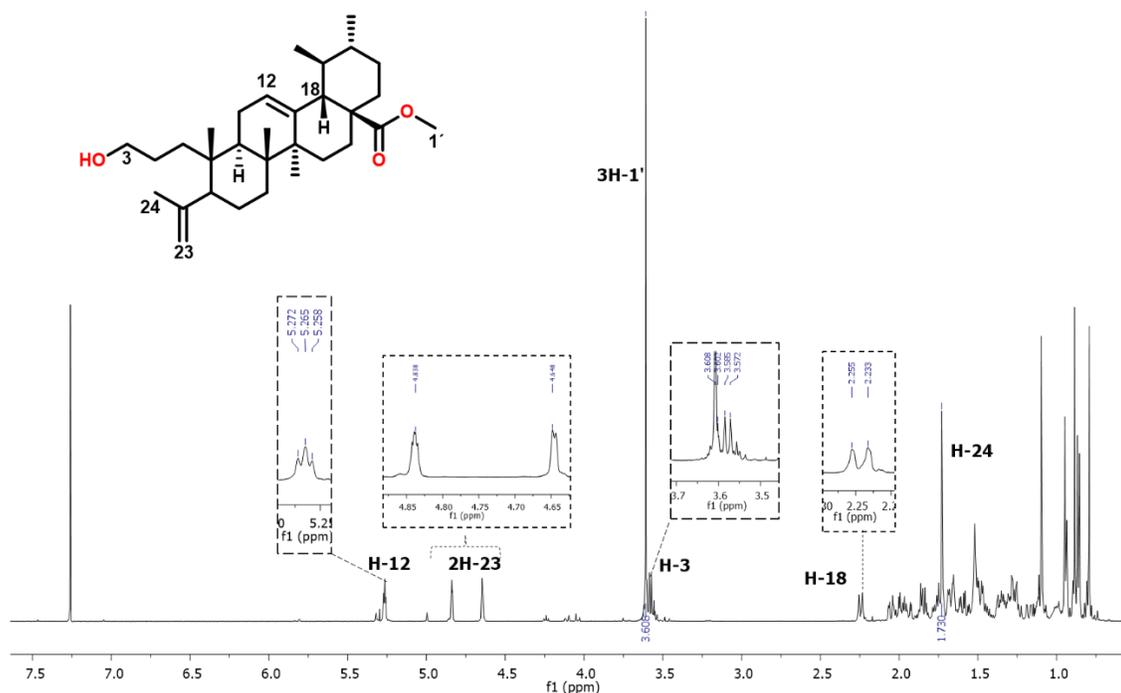


**Figura 52.** Esquema de la reacción de reducción de la mezcla de compuestos A1 y A2.

#### 4.2.3.3.1. Identificación del compuesto D1

Para el compuesto **D1** se describen las señales características presentes en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 53**). En el espectro de protón se observa una señal ancha en  $\delta_{\text{H}}$  5.26 (pseudo- t,  $J = 3.5$ ,  $J = 7$ ) para el protón de la posición 12. En  $\delta_{\text{H}}$  4.83 y 4.64 se observan dos señales singulete anchas que integran cada una para un protón y corresponden a los protones vinílicos de la posición H<sub>2</sub>-23. En  $\delta_{\text{H}}$  3.60 se observa una señal singulete que corresponde a los tres protones del metilo del éster metílico de la posición C-1'. Una característica de que se llevó a cabo la reducción del aldehído es una señal multiplete en  $\delta_{\text{H}}$  3.58 que integra para dos protones correspondientes al metileno carbinol de la posición 3, en consecuencia se observa la desaparición de la señal del aldehído en  $\delta_{\text{H}}$  9.7. En  $\delta_{\text{H}}$  2.45 se encuentra una señal doble que corresponde a protón de la posición 18 (d,  $J = 11$  Hz). Adicionalmente, se observa una señal singulete  $\delta_{\text{H}}$  1.73 que corresponde a los protones del metilo vinílico en la posición 24 (H<sub>3</sub>-24). Finalmente, se observan tres señales simples  $\delta_{\text{H}}$  1.09, 0.88, 0.79 características de los metilos situados en carbonos  $sp^3$  cuaternarios, dos dobletes en  $\delta_{\text{H}}$  0.94 (d, H<sub>3</sub>-29,  $J = 6\text{Hz}$ , H-19) y 0.86

(d, H<sub>3</sub>-30, *J* = 6.5 Hz, H-20) que son típicas para protones situados en carbonos *sp*<sup>3</sup> terciarios.



**Figura 53.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H para el compuesto **D1**, incluyendo expansiones de las señales características del mismo.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observan señales para un total de 30 átomos de carbono (**figura 54**). En  $\delta_c$  178.35 se observa la señal del carbono unido al carbonilo de la posición 28. Las señales del doble enlace C4-C23 se encuentran en  $\delta_c$  148.24 y 113.36 respectivamente. De igual forma en se observa la señal del doble enlace típico del compuesto de tipo ursano, formado por C13-C12 en  $\delta_c$  138.38 y 128.83, respectivamente. Adicionalmente se resalta la señal en  $\delta_c$  23.71 para el carbono 24 y la señal en  $\delta_c$  63.92 del carbono base de oxígeno en la posición 3 que corrobora la reducción del aldehído al alcohol de la cual se incluye la respectiva expansión del espectro HSQC (**figura 55**).

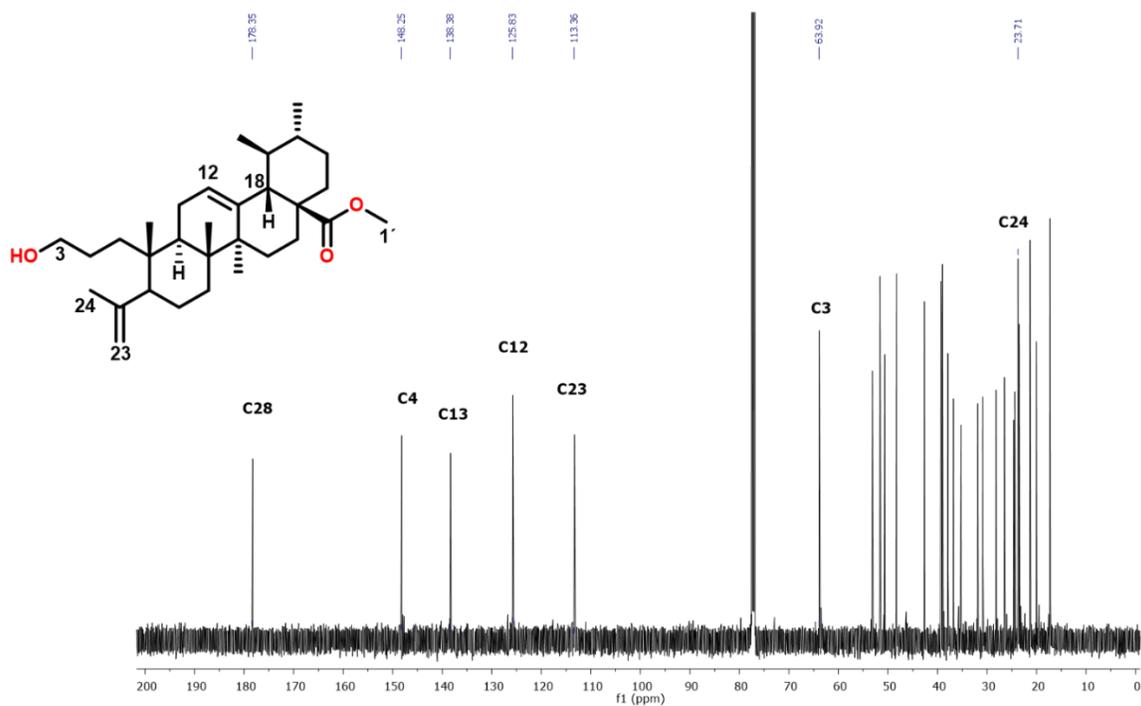


Figura 54. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto D1.

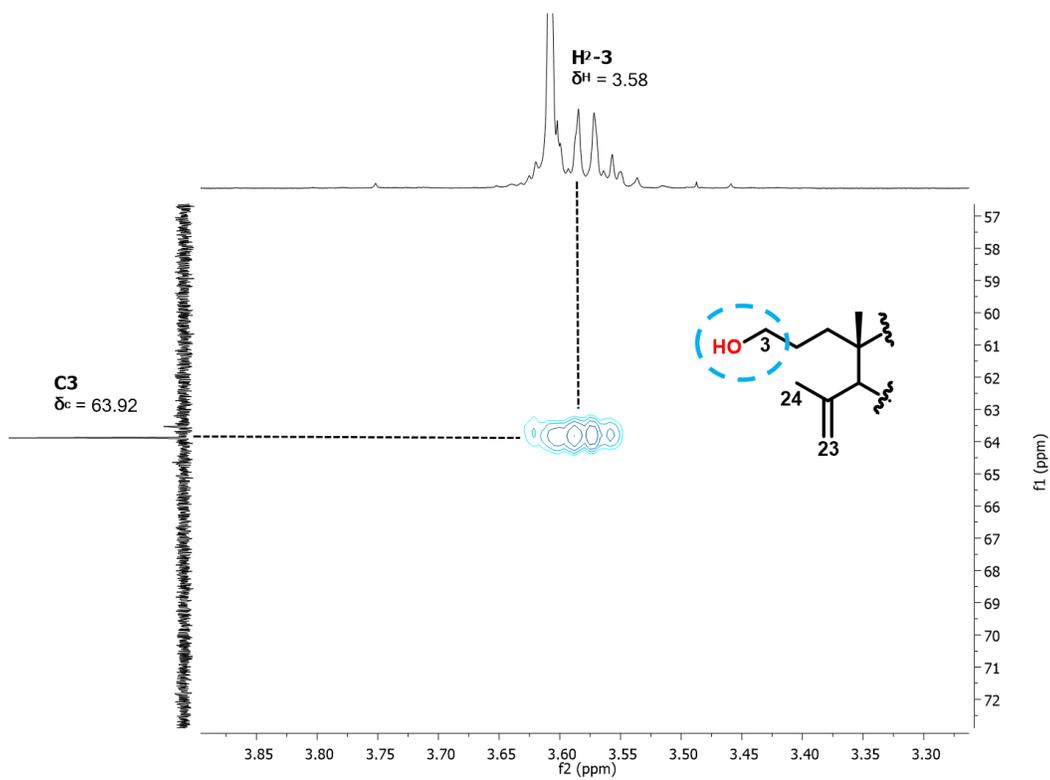
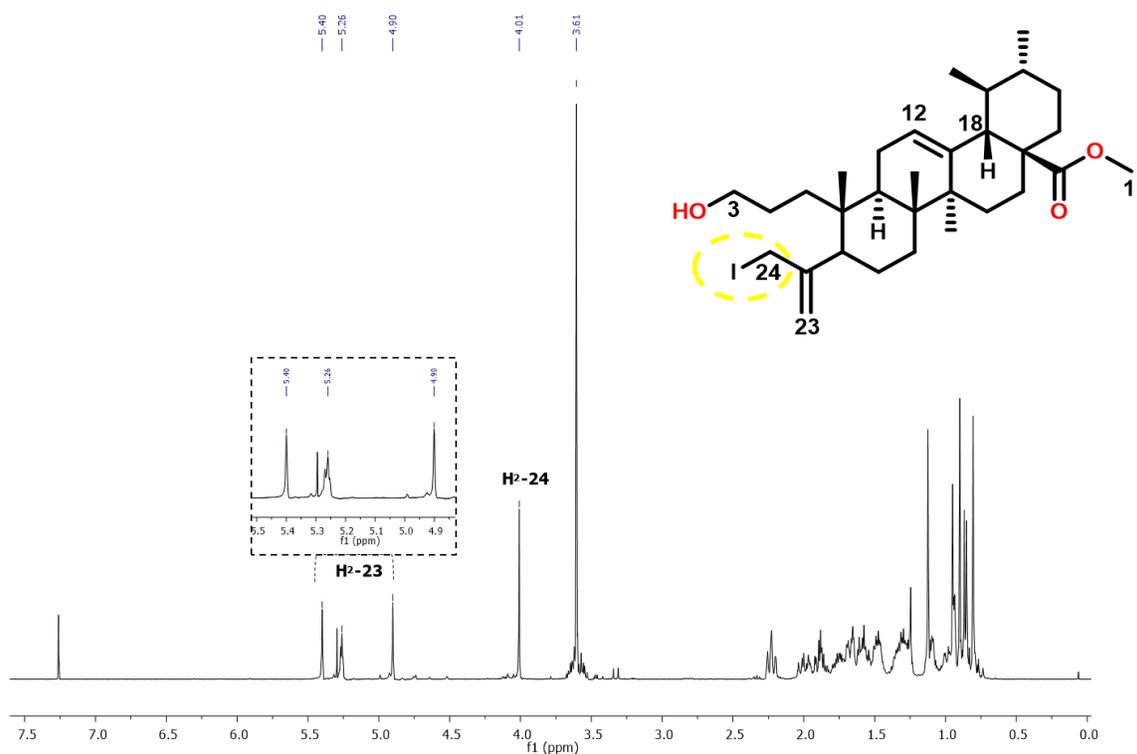


Figura 55. Expansión del espectro de HSQC del compuesto D1, correlación carbono-hidrógeno de la posición C-3.

#### 4.2.3.3.2. Identificación del compuesto D1'

El compuesto **D1'** se caracterizó tomando como referencia al compuesto **D1**, debido a que la única diferencia entre ambos es la presencia de iodo en la estructura **D1'**. A continuación se resaltan las diferencias observadas en los espectros de RMN para el compuesto **D1'**. Las diferencias observadas en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  son un efecto desprotector para los protones que integran el doble enlace C4-C23, debido a que se observa un desplazamiento de las señales hacia campo bajo con  $\delta_{\text{H}}$  5.40 y 4.90 (**figura 56**). En  $\delta_{\text{H}}$  4.01 se observa una señal singulete que corresponde a los protones del metileno vinílico unido a iodo (**figura 56**).



**Figura 56.** Espectro de  $^1\text{H}$  para el compuesto **D1'**.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observa una señal típica de carbono unido a halógeno en  $\delta_{\text{C}}$  15.35 para el carbono de la posición 24. La conectividad de las

señales fue corroborada por medio de un experimento de HSQC donde se observan las correlaciones entre protón y carbono de las posiciones 23, 24 y 3 (figura 57).

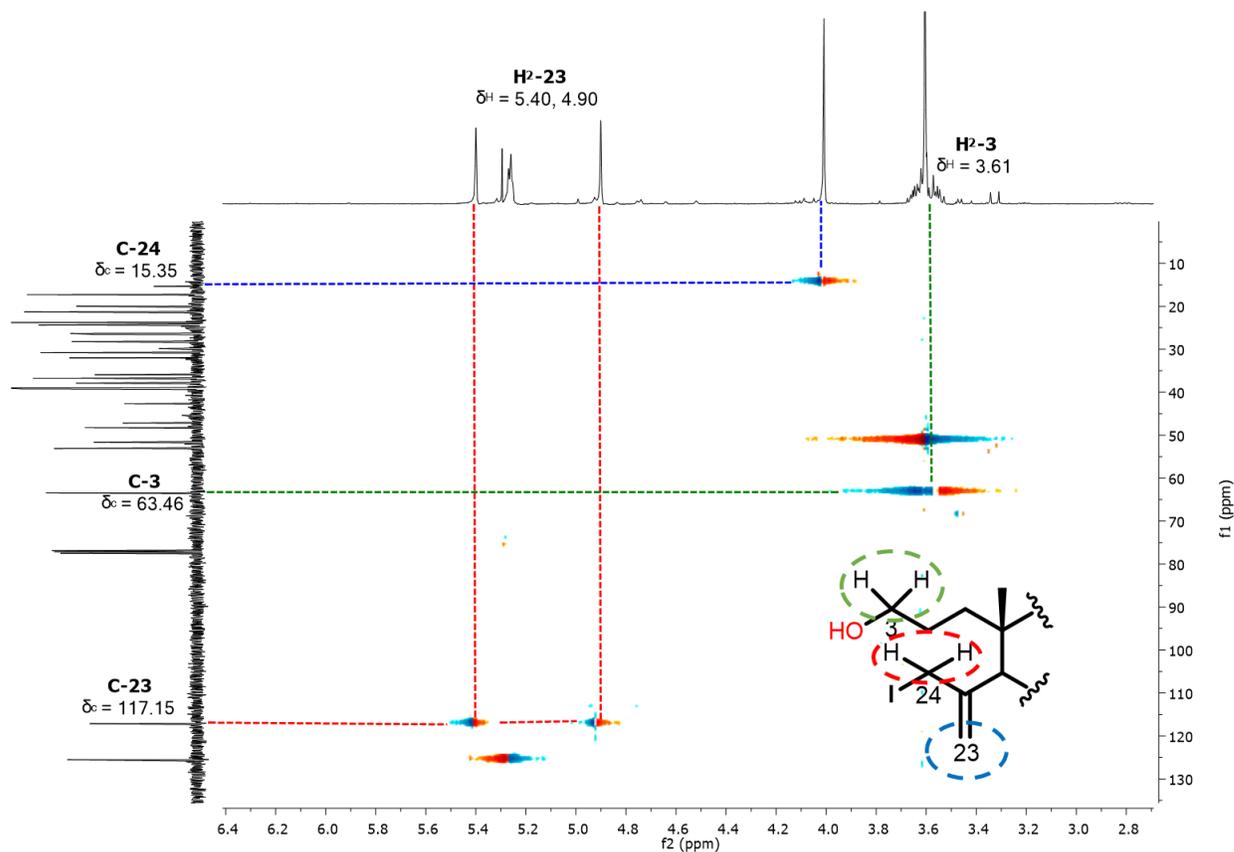


Figura 57. Expansión del espectro de HSQC para el compuesto D1' que incluye iodo en su estructura.

## 4.3. Procedimientos experimentales

### 4.3.1. Información general

#### 4.3.1.1. Reactivos y reacciones

En general todos los reactivos utilizados fueron obtenidos por proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional. La evolución de las reacciones se observó mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios de aluminio de silicagel 60 F254 marca Merck dotados con indicador UV a 254 nm. La purificación de cada crudo de reacción se realizó mediante el uso de cromatografía en columna (CC).

#### Técnicas de separación

Los metabolitos y crudos de reacción obtenidos a partir del presente trabajo se encontraban en mezcla, por lo que fue necesario el uso de técnicas de purificación cromatográfica, principalmente la cromatografía en columna (CC) utilizando gel de sílice Merck Kieselgel (tamaño de partícula 0.063-200  $\mu\text{m}$ ) y Sílica Flash (Merck grado 9385, 230-400) como fase estacionaria. Los disolventes orgánicos empleados como fase móvil en la purificación fueron previamente destilados y utilizados en mezclas según el caso.

La cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice se utilizó como herramienta para el monitoreo del fraccionamiento realizado en cromatografía en columna (CC), utilizando como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y lámpara UV.

#### Técnicas de caracterización de los compuestos obtenidos

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ), carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ), se determinaron en un equipo Varian UNITY de 400 MHz, empleando como disolvente principal cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y como referencia interna TMS (Tetrametilsilano). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están reportados en partes por millón (ppm), las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz y la multiplicidad

de las señales está indicada por medio de las siguientes abreviaturas: (*s*) singulete, (*d*) doble o doblete, (*t*) triple, (*c*) cuarteto, (*dd*) doble de doble y (*m*) múltiple. Los espectros de masas fueron obtenidos en mediante la técnica FAB modo positivo y negativo. Los puntos de fusión fueron determinados en un fusiómetro Fisher Johns y no están corregidos.

#### 4.3.2. Recolección de la especie vegetal fuente de ácido ursólico

*Astianthus viminalis* fue recolectada en Jales de las minas de Huautla. Municipio de Tepalcingo del Estado de Morelos en Marzo de 2006, por Rolando Ramírez 2437; Brenda Santiago, Efraín Tovar y Fidel Ocampo. Una muestra botánica del ejemplar fue depositada en el herbario (HUMO) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos con el número de registro 25059.

#### 4.3.3. Preparación del material vegetal

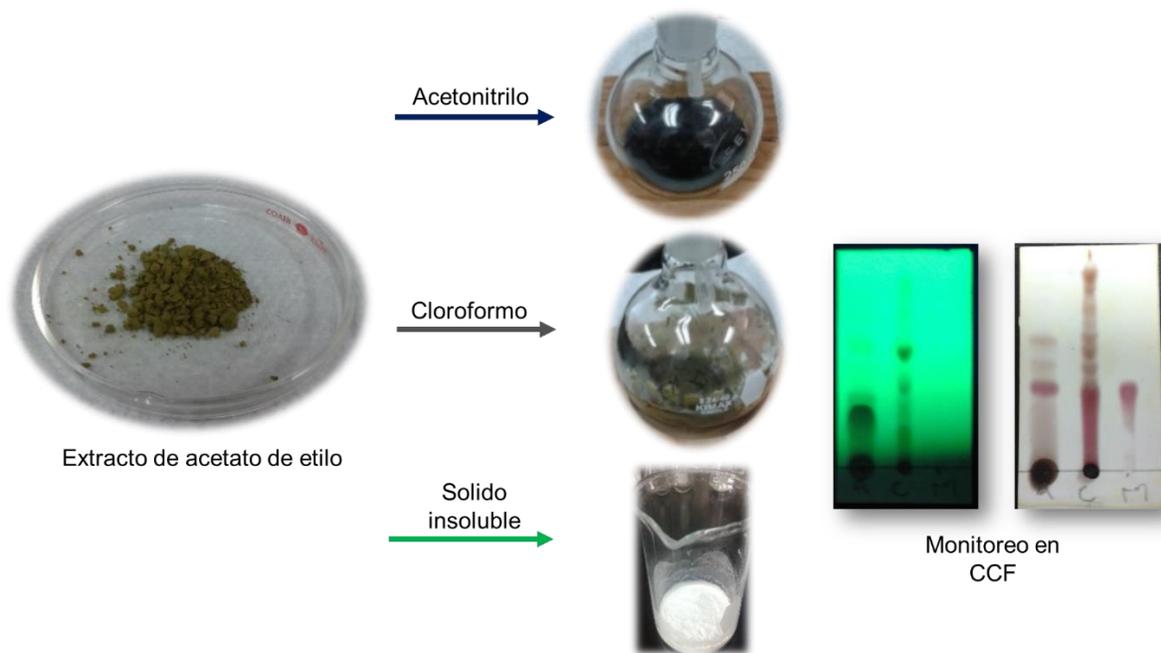
Las partes aéreas de la planta (580 g) se secaron a temperatura ambiente y bajo la sombra. El material vegetal se molió en un triturador industrial. El material obtenido fue pesado y macerado durante 24 horas en hexano, y posteriormente en acetato de etilo, haciendo extracciones consecutivas que fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina. Los extractos obtenidos se evaporaron a sequedad en un rota-evaporador (Buchi Modelo R-124), y se obtuvieron las siguientes cantidades y rendimientos con respecto al peso de la planta seca (**tabla 17**).

**Tabla 17.** Cantidad, rendimiento y características físicas de los extractos obtenidos.

Extracto	Cantidad (g)	Rendimiento (%)	Observaciones
Hexano	17.9	3	Color verde oscuro, con aspecto resinoso
Acetato de Etilo	29.85	5	Polvo color verde oscuro

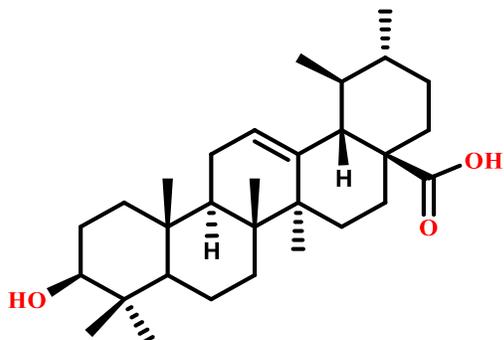
#### 4.3.4. Obtención de la mezcla ácido ursólico-ácido oleanólico

Se realizó el tratamiento de 80 g de extracto de acetato de etilo obtenidos de la planta *Astianthus viminalis*. El extracto fue colocado en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 300 mL de acetonitrilo, la mezcla de extracto con disolvente se sometió a filtración con un embudo Büchner; el sólido retenido se reservó y la fracción obtenida con acetonitrilo se llevó a sequedad en un rota evaporador. Posteriormente, el sólido resultado de la filtración, se mezcló con 300mL de cloroformo para después repetir la filtración con el embudo büchner a la mezcla obtenida. Esta metodología se repitió por triplicado para cada uno de los disolventes y hasta obtener un sólido libre de coloración. Las fracciones fueron monitoreadas con cromatografía en capa fina (70:30 hexano: acetato de etilo) (Figura 58). La mezcla ácido ursólico-ácido oleanólico se obtuvo con un 75% de rendimiento.



**Figura 58.** Metodología de purificación de la mezcla ácido ursólico ácido oleanolico del extracto de acetato de etilo obtenido de la planta *Astianthus viminalis*.

### 4.3.5. Oxidación de la mezcla natural de ácido ursólico y ácido oleanólico con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB)



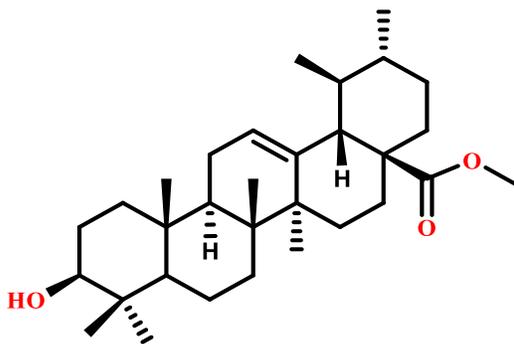
Una solución de la mezcla natural ácido ursólico-ácido oleanólico (2120 mg, 4.61mmol) en diclorometano a 0°C se trató con AMCPB (1602 mg, 9.28 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 min, a continuación se dejó alcanzar

temperatura ambiente y se agitó 24 horas. Posteriormente, se vertió sobre una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% y se extrajo con DCM. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y concentró bajo vacío. El residuo resultante fue purificado por medio de cromatografía en columna hexano: acetato de etilo (85:15), obteniéndose el ácido ursólico (**M-1**) (594 mg, 28%) como un sólido amorfo blanco y la lactona del ácido oleanólico como un sólido cristalino (161 mg, 10%). **Ácido ursólico:** p.f. 282-285°C ; **RMN <sup>1</sup>H** (95:05 CDCl<sub>3</sub>: DMSO, 400 MHz): δ (ppm) 5.12 (*pseudo-t*, *J*=3.6, *J*=6.8, H-12); 3.04 (*dd*, *J*= 6.4, 9.4 Hz, H-3); 2.09 (*d*, *J*=11.2 Hz, H-18); 0.99 (*s*, 3H-27); 0.88 (*s*, 3H-23); 0.85 (*d*, 3H-29, *J*=6 Hz, H-19); 0.82 (*s*, 3H-25) 0.76 (*d*, 3H-30, *J*=6 Hz, H-20); 0.72 (*s*, 3H-24); 0.66 (*s*, 3H-26). **RMN <sup>13</sup>C** (95:05 CDCl<sub>3</sub>: DMSO, 400 MHz ): δ (ppm) 178.7(C, C28); 137.5(C, C13); 124.36(CH, C12); 77.40(CH, C3); 54.41(CH, C5); 51.9(CH, C18); 46.64(C, C17); 46.61(CH, C9); 41.2(C, C14); 38.18(C, C8); 38.02(C, C4); 37.90(CH<sub>2</sub>, C1); 37.86(C, C10); 37.86(CH<sub>2</sub>, C22); 36.08(CH, C19); 35.91(CH, C20); 32.18(CH<sub>2</sub>, C7); 29.84(CH<sub>2</sub>, C21); 27.47(CH<sub>2</sub>, C15); 27.15(CH<sub>3</sub>, C23); 26.40(CH<sub>2</sub>, C2); 23.37(CH<sub>2</sub>, C16); 22.70(CH<sub>3</sub>, C27); 22.47(CH<sub>3</sub>, C30); 20.40(CH<sub>2</sub>, C11); 17.48(CH<sub>3</sub>, C29); 16.31(CH<sub>2</sub>, C6); 16.24(CH<sub>3</sub>, C26); 15.07(CH<sub>3</sub>, C24); 14.617(CH<sub>3</sub>, C25).

**Lactona del ácido oleanólico:** p.f. 245-249°C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 3.88 (*dd*,  $J = 2.8$  Hz, 1H, CH-12), 3.21 (*dd*,  $J = 4.8, 11.2$  Hz, 1H, CH-3), 2.13 (*ddd*,  $J = 6.0, 13.0, 13.2$  Hz, 1H, CH-16 $\alpha$ ), 1.29 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-27), 1.14 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-26), 0.98 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-23), 0.97 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-29), 0.89 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-30), 0.87 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-25) y 0.77 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>-24). **RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  (ppm) 180.01 (C=O, C28), 90.76 (C, C13), 79.07 (CHOH, C3), 76.65 (CHOH, C12), 55.46 (CH, C5), 51.36 (CH, C18), 44.93 (C, C17), 44.83 (CH, C9), 42.56 (C, C14), 42.31 (C, C8), 39.67 (CH<sub>2</sub>, C19), 39.10 (CH<sub>2</sub>, C1), 39.10 (C, C4) 36.70 (C, C10), 34.38 (CH<sub>2</sub>, C21), 34.22 (CH<sub>2</sub>, C7), 33.49 (CH<sub>3</sub>, C29), 31.79 (C, C20), 29.04 (CH<sub>2</sub>, C11), 28.29 (CH<sub>3</sub>, C23), 28.23 (CH<sub>2</sub>, C15), 27.72 (CH<sub>2</sub>, C22), 27.50 (CH<sub>2</sub>, C2), 24.12 (CH<sub>3</sub>, C30), 21.45 (CH<sub>2</sub>, C16), 18.84 (CH<sub>3</sub>, C27), 18.77 (CH<sub>3</sub>, C26), 17.98 (CH<sub>2</sub>, C6), 16.52 (CH<sub>3</sub>, C25), 15.56 (CH<sub>3</sub>, C24).

#### 4.3.6. Procedimientos de semisíntesis

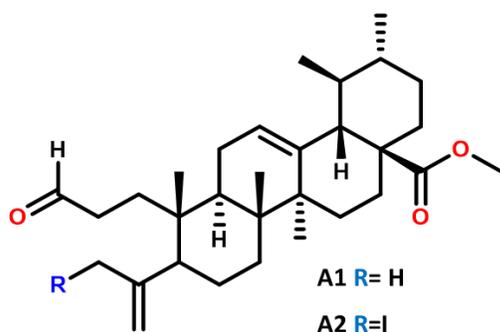
4.3.6.1. Semisíntesis de (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7) a partir de la esterificación de ácido ursólico en C-28.



A una mezcla de AU (1000 mg, 2.13 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (352.80 mg, 2.55 mmol) se le adicionó una solución de: triclorometano/DMF 3:1 a 0°C. La mezcla se mantuvo en agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente, posteriormente fue tratada con iodo metano (0.29 mL, 4.5 mmol) y puesta a reflujo durante 3 h. El crudo de reacción se purificó en CC 95:05 hexano:acetato de etilo.<sup>6</sup> **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 700 MHz):  $\delta$ (ppm) 5.22 (*pseudo-t*,  $J = 3.5, J = 6.8$ , H-12); 3.57 (*s*, 3H-1'); 3.19 (*dd*,  $J = 5.2, J = 10.8$  Hz, H-3); 2.20 (*d*,  $J = 11.2$  Hz, H-18); 1.05 (*s*, 3H-27); 0.96 (*s*, 3H-23); 0.91 (*d*, 3H-29,  $J = 6.4$  Hz, H-19); 0.89 (*s*, 3H-25); 0.83 (*d*,  $J = 6.8$ , 3H-30); 0.75 (*s*, 3H-24;  $J = 6.3$  Hz, H-20); 0.71 (*s*, 3H-26).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 175 MHz):  $\delta$ (ppm) 177.29 (C, C28); 138.36 (C, C13); 125.78(CH, C12); 79.26 (CH, C3); 55.43 (CH, C5); 53.10 (CH, C18); 51.67 (CH, C1'); 48.31 (C, C17); 47.77 (CH, C9); 42.21 (C, C14); 39.71 (C, C8); 39.27 (C, C4); 39.09 (CH<sub>2</sub>, C1); 38.96(C, C10); 38.83(CH<sub>2</sub>, C22); 37.19(CH, C19); 36.85(CH, C20); 33.19(CH<sub>2</sub>, C7); 30.86 (CH<sub>2</sub>, C21); 28.35 (CH<sub>2</sub>, C15); 28.24 (CH<sub>3</sub>, C23); 27.45 (CH<sub>2</sub>, C2); 24.45 (CH<sub>2</sub>, C16); 23.82 (CH<sub>3</sub>, C27); 23.52 (CH<sub>3</sub>, C30); 21.39 (CH<sub>2</sub>, C11); 18.52 (CH<sub>3</sub>, C29); 17.25 (CH<sub>2</sub>, C6); 17.13 (CH<sub>3</sub>, C26); 15.83 (CH<sub>3</sub>, C24); 15.65 (CH<sub>3</sub>, C25);  
EM-FAB+(m/z):470 [M]<sup>+</sup>

#### 4.3.6.2. Escisión radicalaria-oxidación del (3 $\beta$ )-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7)



Empleando la metodología descrita por Boto y colaboradores<sup>94,95</sup> una disolución del compuesto **M7** (500mg, 0.95 mmol) en DCM seco, fue tratado con (diacetoxiyodo) benceno (DIB) (458 mg, 1.4 mmol) y yodo (120.3 mg, 0.47 mmol). La mezcla de reacción se irradió

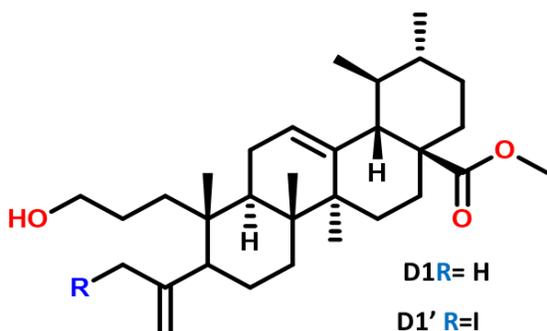
durante 30 min con luz visible a 26 °C usando una lámpara de wolframio de 72 W. Finalmente la mezcla de reacción se vertió sobre una solución acuosa al 10% de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  y se extrajo con DCM. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró, posteriormente el exceso de disolvente fue eliminado al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna 99:01 hexano:AcOEt dando

<sup>94</sup> Boto, A.; Hernández, R.; Suárez, E. Tandem Carbon-Radical Peroxidation-Addition to Carbonyl Grups Reaction. A New Synthesis of Steroidal  $\beta$ -Peroxy Lactones. *The Journal of Organic Chemistry*, **1995**, 60, 8209-8217.

<sup>95</sup> Romero-Estudillo, I.; Boto, A. Creating Diversity by Site-Selective Peptide Modification: A Customizable Unit Affords Amino Acids with High Optical Purity. *Organic Letters*, **2013**, 15, 55778-5781.

lugar a la mezcla de compuestos (**A1** y **A2**). La presencia de los compuestos en la mezcla fue corroborada mediante RMN (anexo capítulo 4 espectros).

#### 4.3.6.3. Reducción de la mezcla de compuestos **A1** y **A2**



Se utilizó la metodología descrita por Romero y colaboradores, 2013.<sup>78</sup> Una disolución de la mezcla de aldehídos **A1** y **A2** (275 mg, 0.47 mmol) en EtOH, fue tratada con borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) (147.3 mg, 3 mmol) a 26 °C durante 1.5 h.

Para finalizar la reacción se adicionó hielo para eliminar el exceso de NaBH<sub>4</sub> y se eliminó el exceso de EtOH al vacío. Posteriormente, la reacción se extrajo con DCM y la fase orgánica se secó con sulfato sodio anhidro y se filtró, el exceso de disolvente fue eliminado al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna 95:05 hexano:AcOEt dando lugar al compuesto **D1** y **D1'**. **D1**: RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) 5.26 (*pseudo-t*, *J*=3.5, *J*=7, H-12); 4.83 (*s*, 2H-23); 4.64 (*s*, 2H-23); 3.58 (*m*, H-3); 3.60 (*s*, 3H-1'); 2.24 (*d*, *J*=11 Hz, H-18); 1.73 (*s*, 3H-24); 1.09 (*s*, 3H-27); 0.9 (*d*, 3H-29, *J*=6 Hz, H-19); 0.88 (*s*, 3H-25); 0.86 (*d*, *J*= 6.5, 3H-30); 0.79 (*s*, H-20, 3H-26). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) 178.35 (C, C28); 148.25 (C, C4); 138.38 (C, C13); 125.83 (CH, C12); 113.36 (CH<sub>3</sub>, C23); 63.92 (CH, C3); 53.10 (CH, C18); 51.61 (CH, C1'); 50.62 (CH, C5); 48.30 (C, C17); 42.66 (CH, C9); 42.66 (C, C14); 39.35 (C, C8); 39.27 (CH<sub>2</sub>, C1); 39.22 (C, C10); 39.02 (CH<sub>2</sub>, C22); 37.92 (CH, C19); 36.79 (CH, C20); 35.25 (CH<sub>2</sub>, C7); 31.88 (CH<sub>2</sub>, C21); 30.84 (CH<sub>2</sub>, C15); 28.21 (CH<sub>2</sub>, C2); 26.48 (CH<sub>2</sub>, C16); 24.62 (CH<sub>2</sub>, C11); 24.40 (CH<sub>2</sub>,

C6); 23.71 (CH<sub>3</sub>, C24); 23.51 (CH<sub>3</sub>, C27); 21.32 (CH<sub>3</sub>, C29); 20.07 (CH<sub>3</sub>, C26); 17.29 (CH<sub>3</sub>, C25); 24.27 (CH<sub>3</sub>, C30).

**D1'**: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) 5.26 (*pseudo-t*, *J*=3.6, *J*'=6.4, H-12); 5.40 (*s*, 2H-23); 4.90 (*s*, 2H-23); 4.01 (*s*, 3H-24); 3.59 (*m*, H-3); 3.61 (*s*, 3H-1'); 2.24 (*d*, *J*'=11.2 Hz, H-18); 1.12 (*s*, 3H-27); 0.94 (*d*, 3H-29, *J*'=6 Hz, H-19); 0.89 (*s*, 3H-25); 0.86 (*d*, *J*'=6.8, 3H-30); 0.81 (*s*, H-20, 3H-26). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) 178.23 (C, C28); 149.11 (C, C4); 138.43 (C, C13); 125.54 (CH, C12); 117.15 (CH<sub>3</sub>, C23); 63.46 (CH, C3); 53.10 (CH, C18); 51.63 (CH, C1'); 48.26 (C, C17); 47.16 (CH, C5); 42.69 (CH, C9); 42.69 (C, C14); 39.29 (C, C8); 39.26 (CH<sub>2</sub>, C1); 39.22 (C, C10); 39.00 (CH<sub>2</sub>, C22); 37.88 (CH, C19); 36.76 (CH, C20); 35.93 (CH<sub>2</sub>, C7); 32.00 (CH<sub>2</sub>, C21); 30.80 (CH<sub>2</sub>, C15); 28.20 (CH<sub>2</sub>, C2); 26.52 (CH<sub>2</sub>, C16); 26.30 (CH<sub>2</sub>, C11); 24.36 (CH<sub>2</sub>, C6); 23.78 (CH<sub>3</sub>, C27); 21.31 (CH<sub>3</sub>, C29); 19.98 (CH<sub>3</sub>, C26); 17.31 (CH<sub>3</sub>, C25); 17.27 (CH<sub>3</sub>, C30); 15.35 (CH<sub>3</sub>, C24).

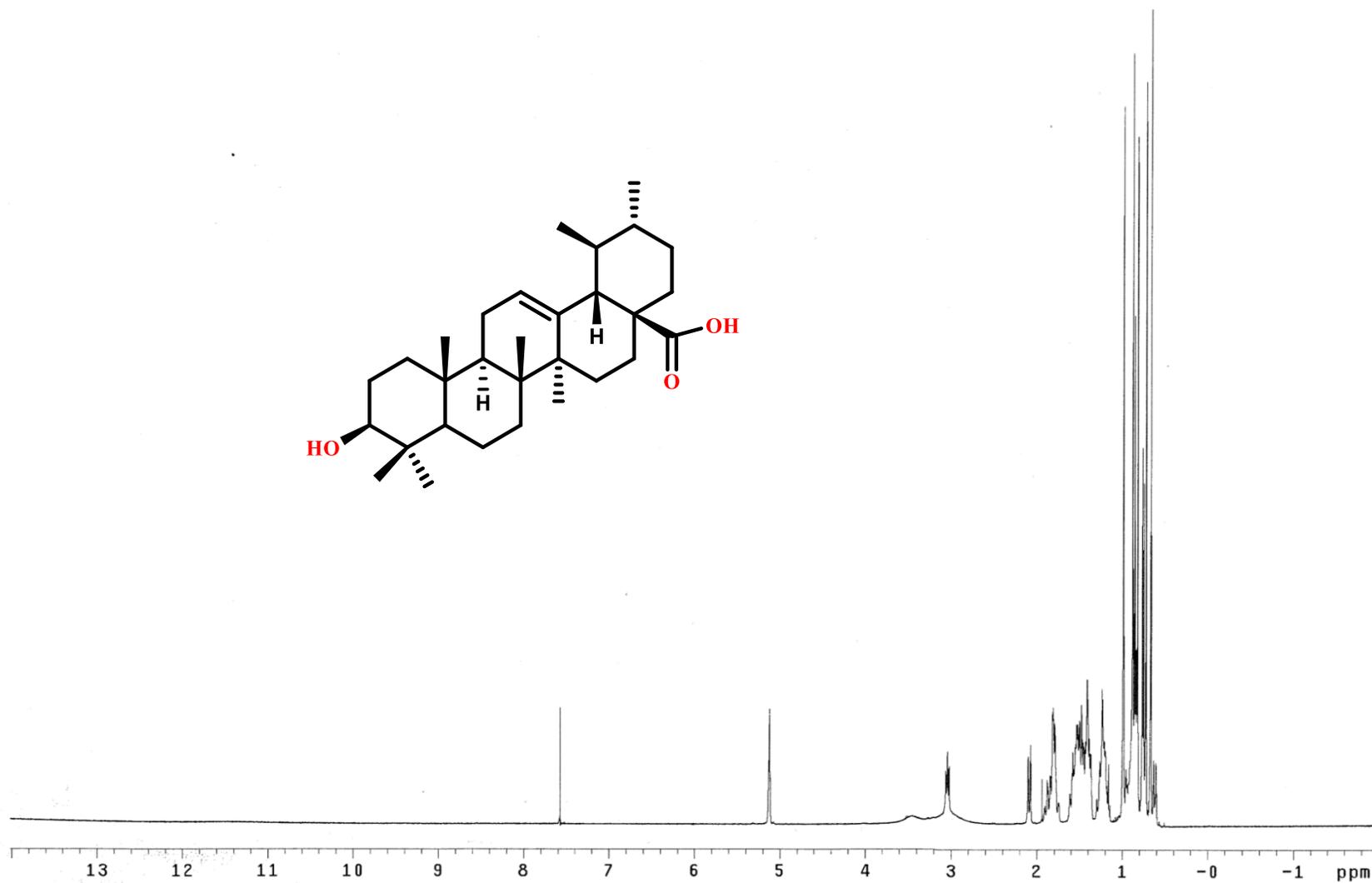
#### 4.4. Conclusiones

Se logró estandarizar y optimizar una metodología para la obtención de la mezcla de triterpenos ácido ursólico-ácido oleanólico (**AU-AO**), en la cual se obtuvo un rendimiento para la mezcla de 75% desde el extracto de acetato de etilo de la planta *Astianthus viminalis*. Es importante mencionar que es la primera vez que se obtiene este rendimiento desde la planta. Posteriormente, se obtuvo un rendimiento para ácido ursólico, compuesto de interés, del 21% a partir de la mezcla **AU-AO**. Se realizó la semisíntesis del compuesto **M7** materia prima de partida para la reacción de la fotólisis con un rendimiento del 90%. También se realizó la reacción de escisión radicalaria-oxidación del (3β)-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (**M7**), en la que se optimizaron las condiciones de reacción logrando un 20% de rendimiento para la mezcla de aldehídos **A1-A2**. Derivado de la reducción de la mezcla **A1-A2** se obtuvieron los derivados **D1** y **D1'** con un 45% y 55% de rendimiento,

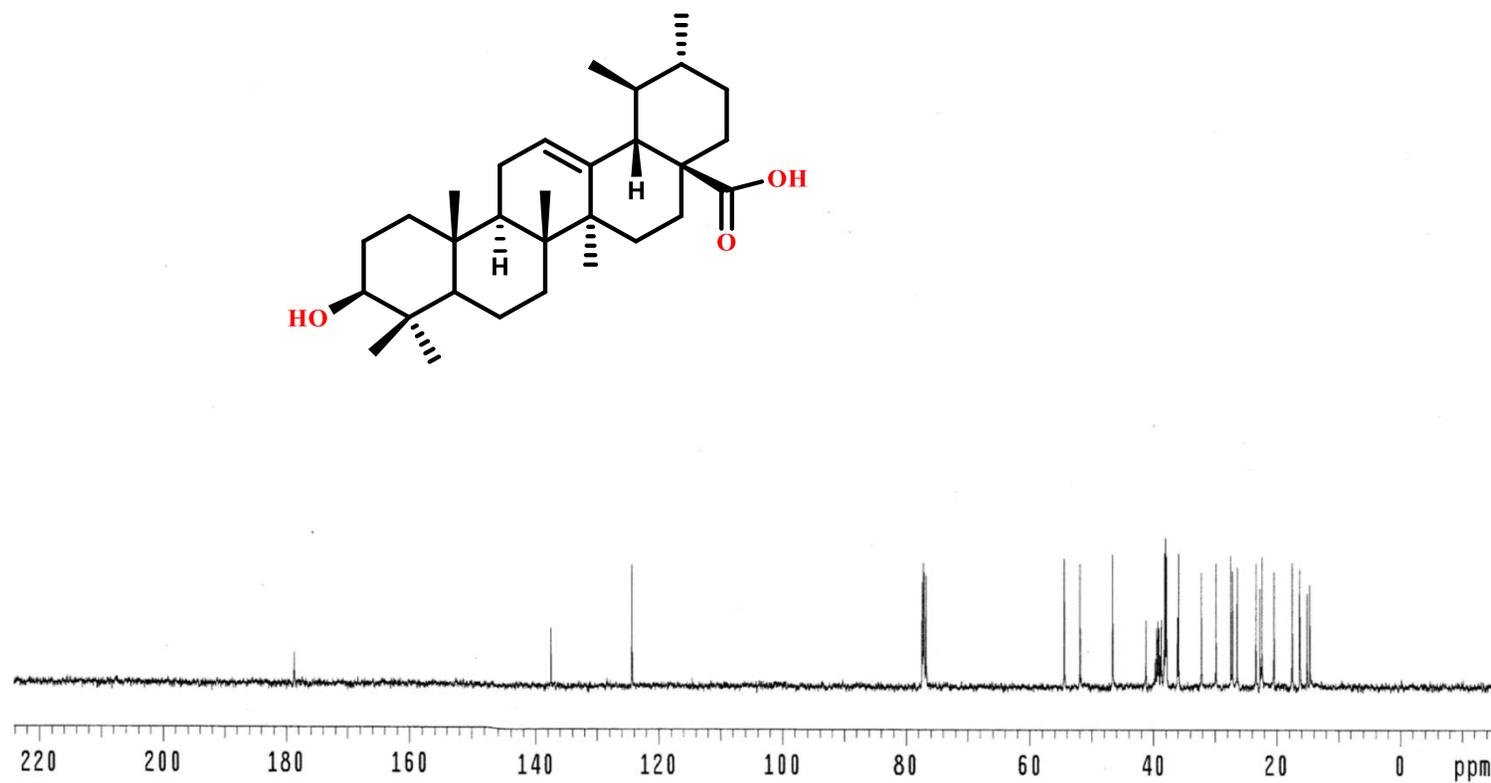
respectivamente. Todos los compuestos obtenidos se identificaron por medio de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y en algunos casos espectros de dos dimensiones. Es pertinente mencionar que, a través de la serie de experimentos realizados desde la colecta de la planta y las semisíntesis intermedias, se logró la obtención del compuesto **D1** con mayor probabilidad de tener efecto antiinflamatorio.

---

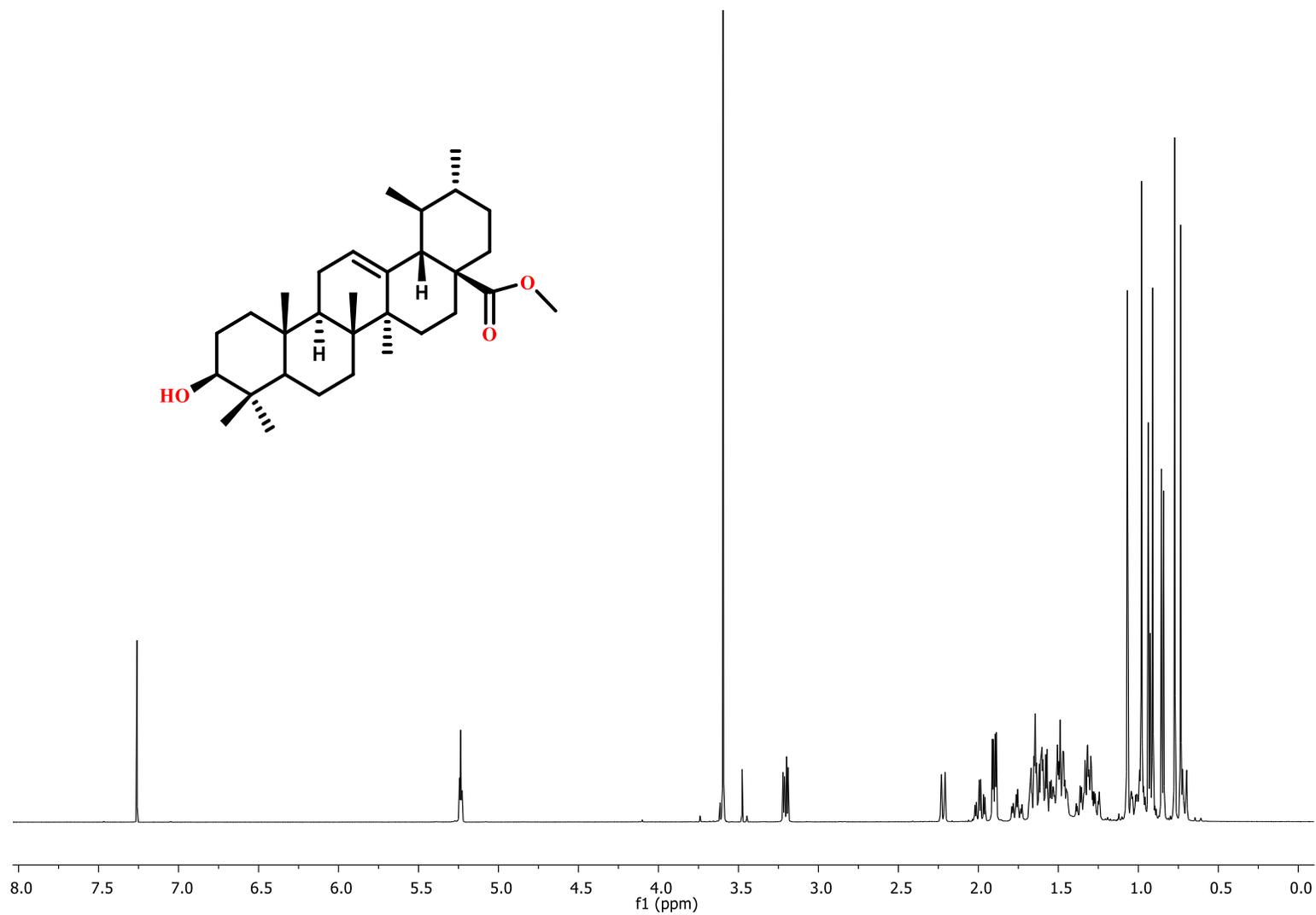
**Anexo Capítulo 4 Espectros**



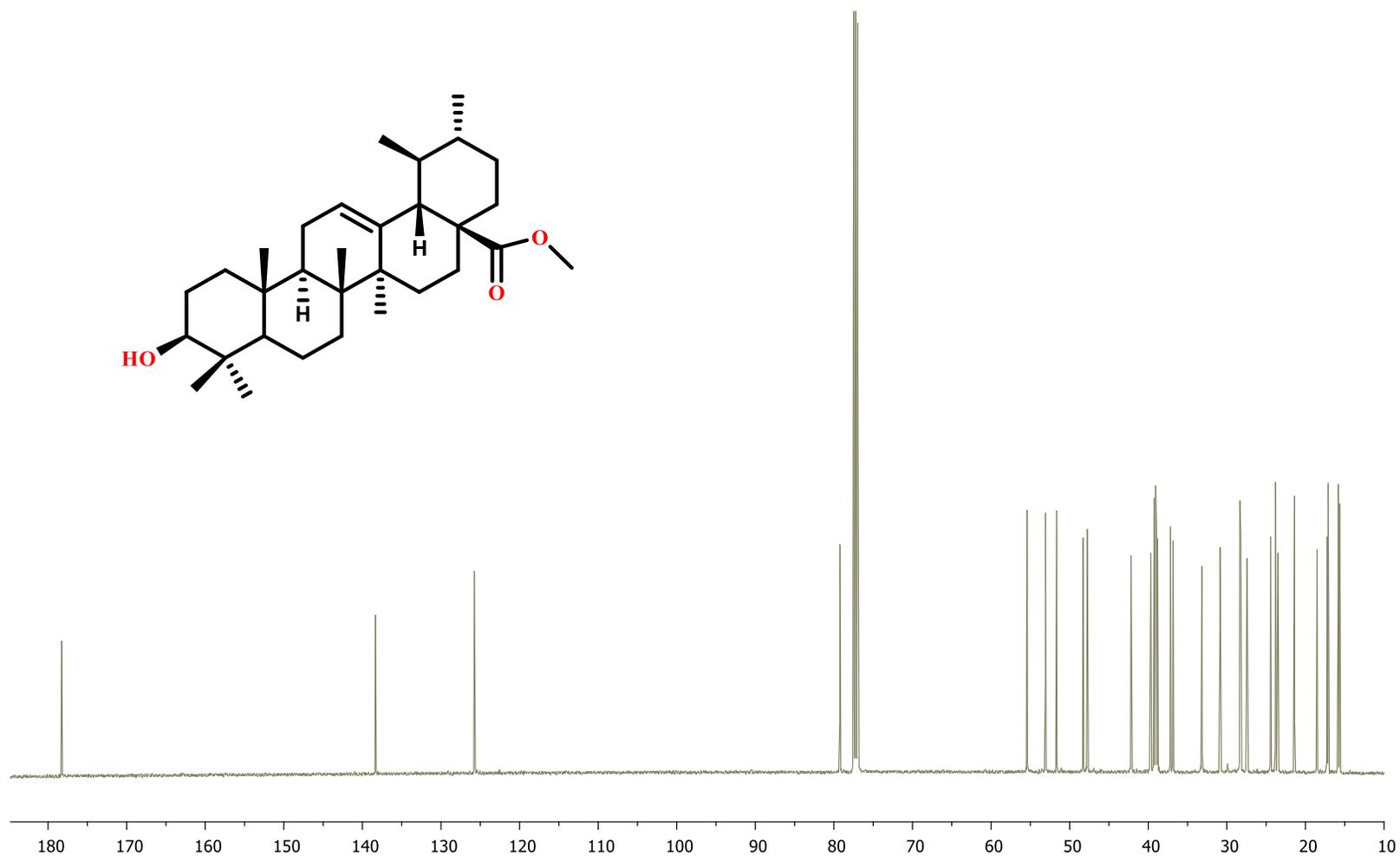
Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (95:05 CDCl<sub>3</sub>: DMSO, 400 MHz) de (3β)-3-hidroxiurs-12-en-28-oico (M1).



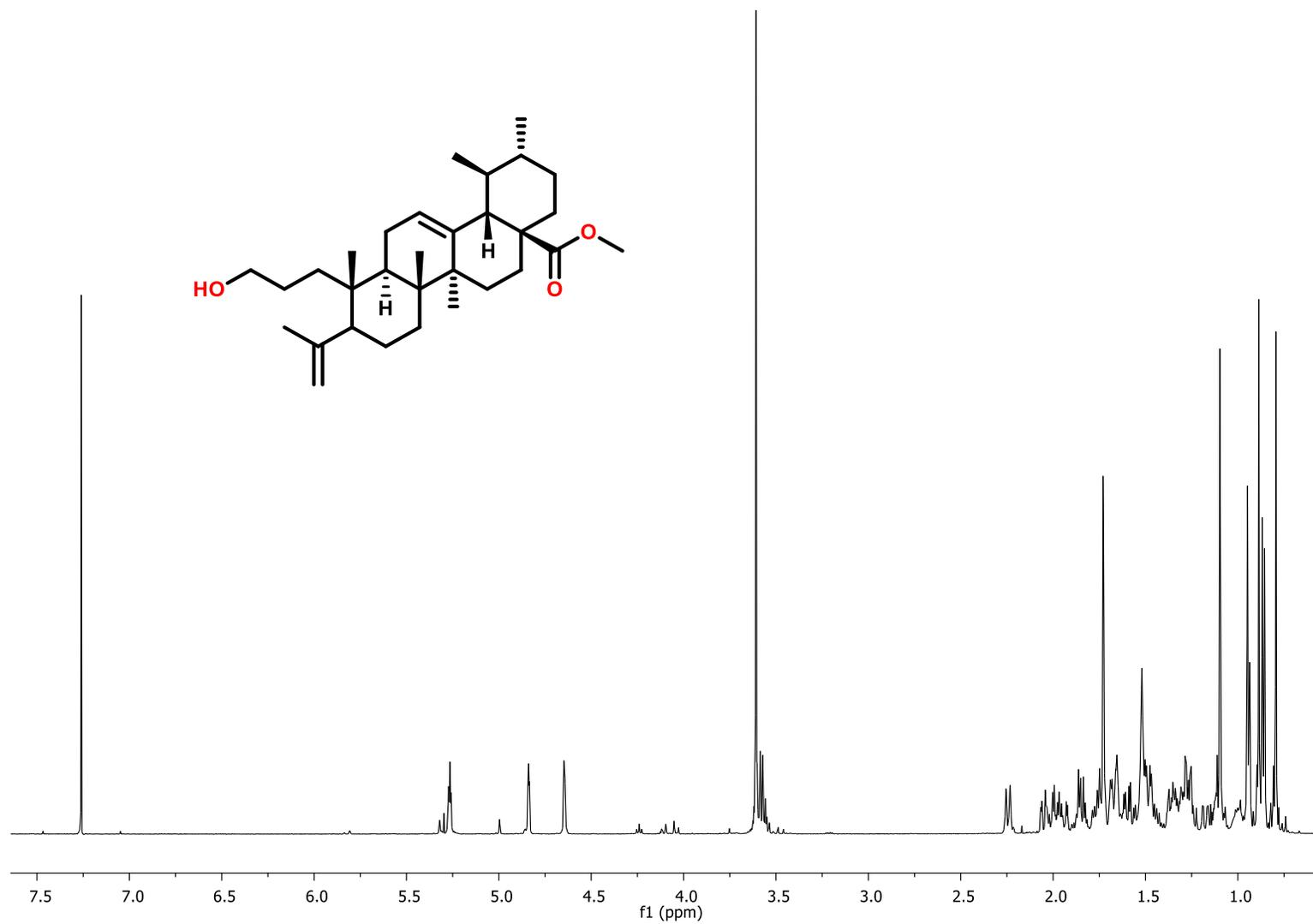
**Espectro 1.** RMN <sup>13</sup>C (95:05 CDCl<sub>3</sub>: DMSO, 100 MHz) de (3β) hidroxurs-12-en-28-oico (M1).



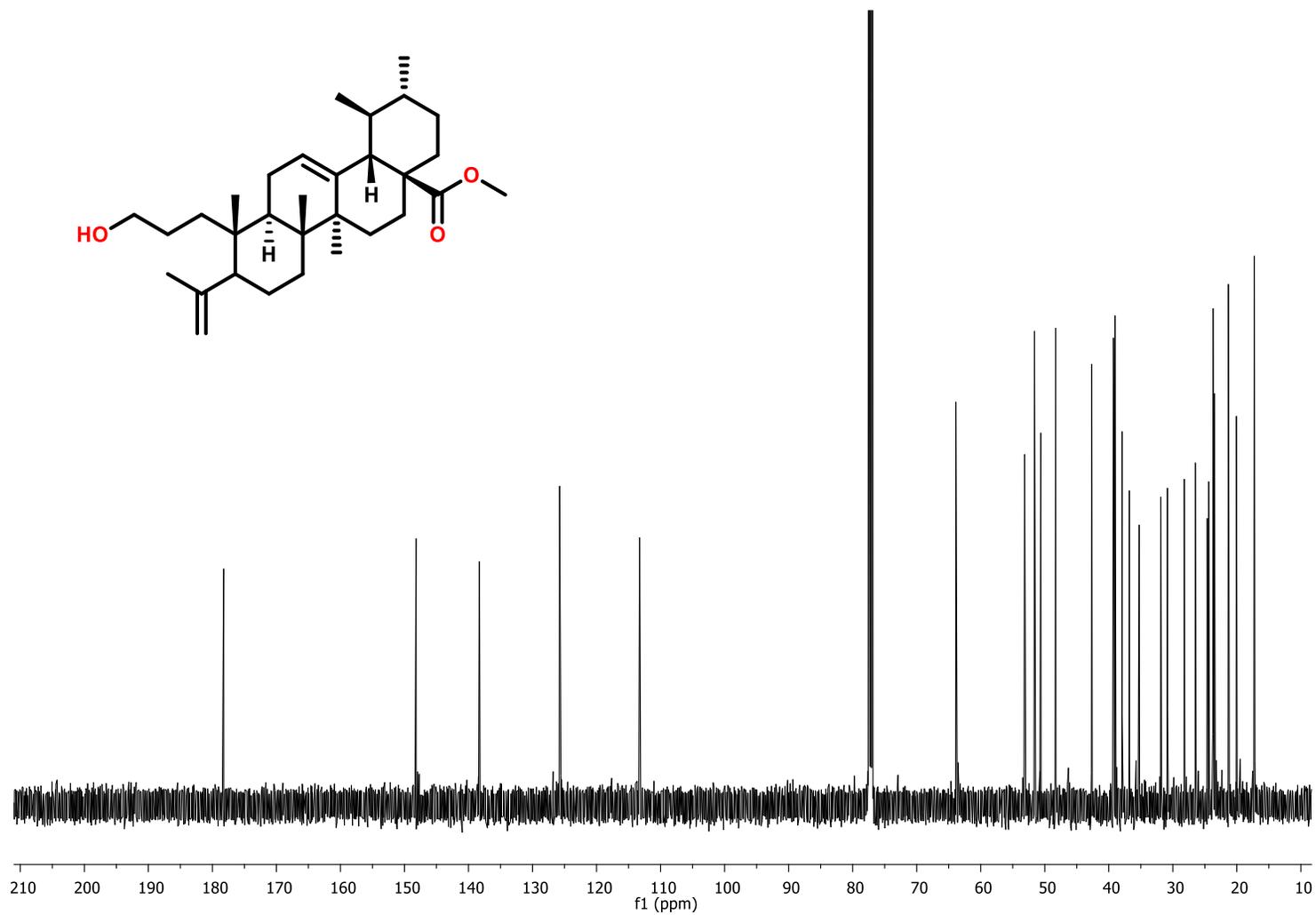
Espectro 3. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 700 MHz) de (3β)-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7).



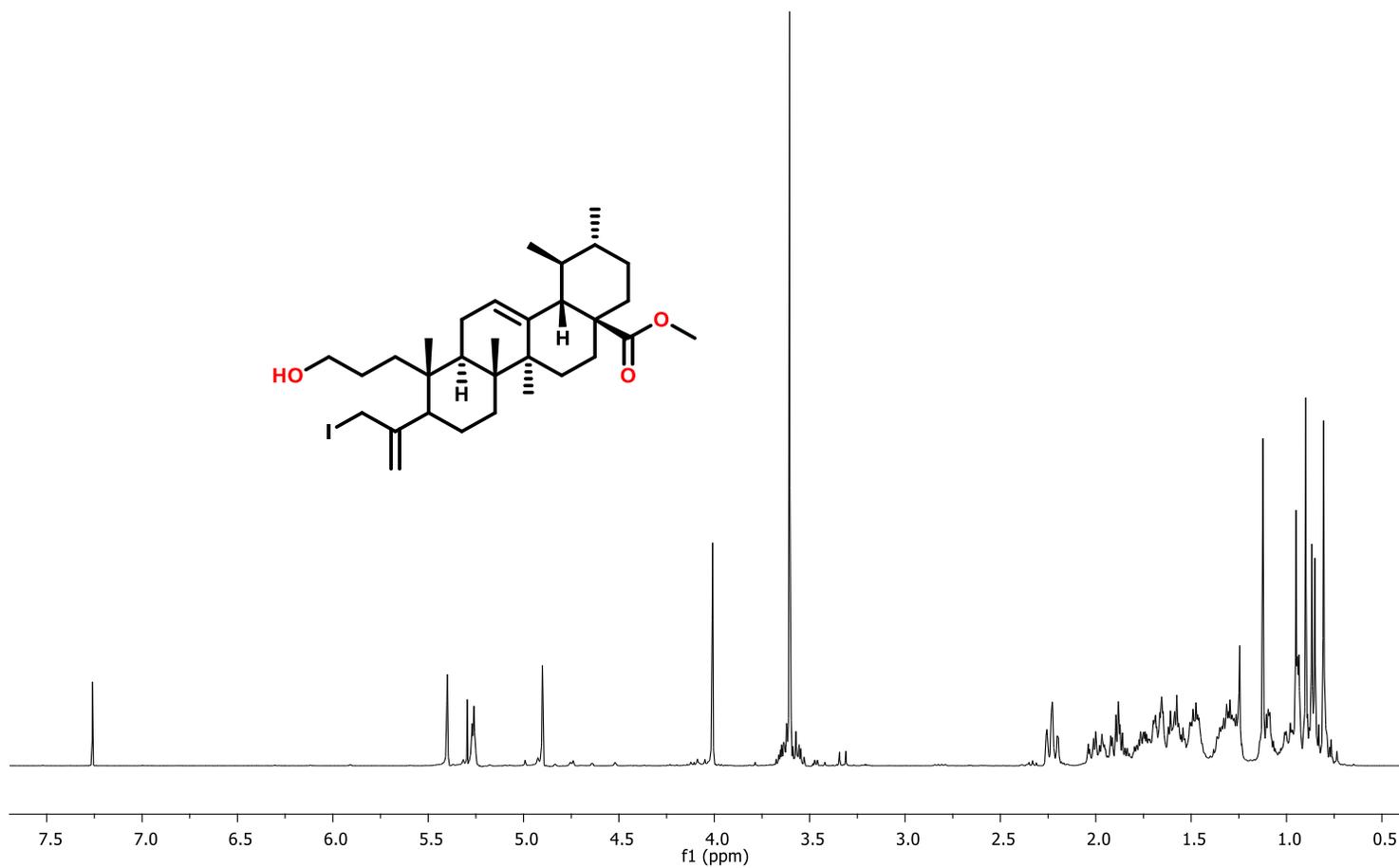
Espectro 4. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz) de (3β)-hidroxiurs-12-en-28-oato de metilo (M7).



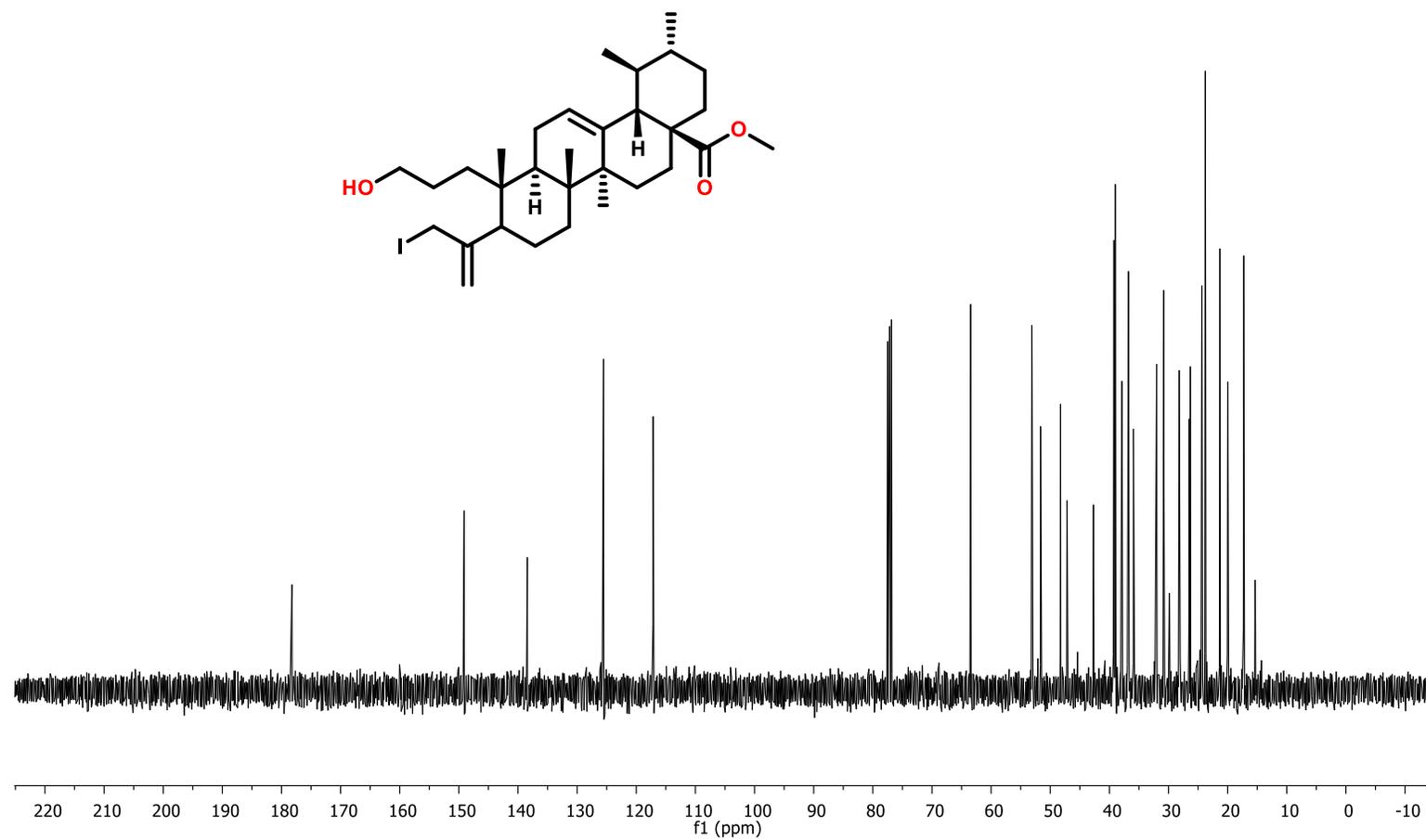
**Espectro 5.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> 500 MHz) de 3,4-seco-urs-4(23),12(13) dien-3-ol-28-oato de metilo (D1).



**Espectro 6.** RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de 3,4-seco-urs-4(23),12(13) dien-3-ol-28-oato de metilo (D1).



**Espectro 7.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de 25-yodo-3,4-seco-urs-4(23),12(13) dien-3-ol-28-oato de metilo (D1').



Espectro 7. RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de 25-yodo-3,4-seco-urs-4(23),12(13) dien-3-ol-28-oato de metilo (D1')



## Capítulo 5

### Actividad antiinflamatoria *in vitro*



## Capítulo 5. Actividad antiinflamatoria *in vitro*

### 5.1. Introducción

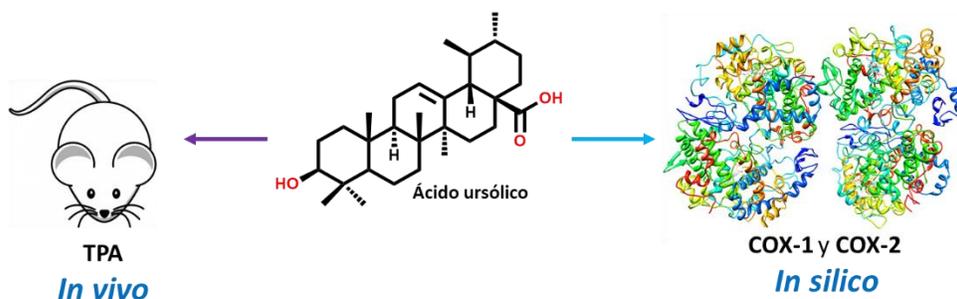
El ácido ursólico ha sido ampliamente estudiado y actualmente se conocen diferentes derivados estructurales de este compuesto. Al ácido ursólico y sus derivados se les atribuye actividad como antiinflamatorios con mecanismos de acción propuestos que consisten en la inhibición de la liberación de histamina, lipoxigenasas, inhibición de producción de óxido nítrico, y actividad frente a las ciclooxygenas entre otros.<sup>96</sup>

En este capítulo se detallan los procedimientos experimentales *in vitro* que se realizaron a los compuestos obtenidos por medio de semisíntesis química que incluyen a los compuestos de la serie **D** (**D1** y **D1'**) y los compuestos de la serie **M** (**M4**, **M6**, **M11** y **M12**) que se muestran en la figura 62. De los experimentos realizados se obtuvieron resultados de viabilidad en la línea celular RAW 264.7, porcentajes de inhibición de producción de óxido nítrico y de ciclooxygenas para los compuestos.

---

<sup>96</sup> López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. *Food Research International*. **2018**, 103, 130-149.

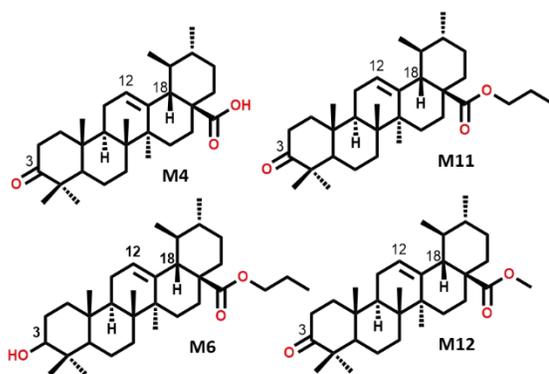
Derivados del ácido ursólico



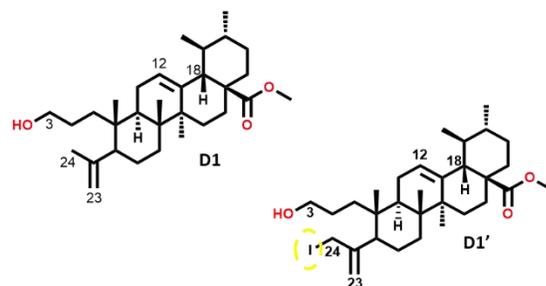
Selección por su mayor porcentaje de inhibición en el ensayo in vivo con TPA en oreja de ratón.

Selección del derivado **D1** mediante la metodología de acoplamiento molecular por su mayor probabilidad de tener efecto en ciclooxigenasas.

Derivados de la serie M



Derivados de la serie D



Evaluaciones *in vitro*:  
**Línea celular RAW 264.7**

- viabilidad celular
- porcentaje de inhibición de óxido nítrico

**Ciclooxigenasas**

- Porcentaje de inhibición en COX-1
- Porcentaje de inhibición en COX-2

**Figura 59.** Compuestos de la serie **M** y **D** evaluados mediante experimentos *in vitro* en la línea celular RAW 264.7 para obtener su viabilidad y porcentaje de inhibición de óxido nítrico, así como porcentajes de inhibición en ciclooxigenasas.

## 5.2. Resultados y discusión

Se realizaron las evaluaciones biológicas del compuesto **D1** (seleccionado por su mayor probabilidad de presentar actividad antiinflamatoria en los ensayos *in silico*) y **D1'** obtenido como subproducto de la reacción de reducción. También se obtuvieron las evaluaciones para los compuestos de la serie **M** que tuvieron mejor actividad antiinflamatoria *in vivo* en el ensayo de ATF en oreja de ratón **M4**, **M6**, **M11** y **M12**.

### 5.2.1. Viabilidad en cultivo de células RAW 264.7

#### 5.2.1.1. Compuestos de la serie D

Para la evaluación de la viabilidad de los compuestos se utilizaron tres concentraciones: 100, 50, 25, y 1  $\mu\text{M}$ , utilizando DMSO para solubilizarlos (0.42 % de concentración final). Lo anterior tuvo con el objetivo de evaluar diferentes concentraciones para observar el efecto de los compuestos en las células antes de los ensayos y observar a qué concentraciones los compuestos no tienen un efecto tóxico sobre las células. En la tabla 18, se muestran los resultados de la evaluación para cada compuesto en las diferentes concentraciones. Por su parte, el compuesto **D1** tiene una drástica disminución de la viabilidad celular a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  donde se obtuvo un 18.4%. A la concentración de 50  $\mu\text{M}$  se observa una disminución de la viabilidad menos marcada con un 72.7%. El compuesto **D1'** tuvo una disminución de la viabilidad casi en todo el abanico de concentraciones excepto a 1  $\mu\text{M}$ . Se observa que este compuesto tiene un efecto mayor que el control positivo utilizado etopósido. Se estableció la máxima concentración para el compuesto **D1** como 25  $\mu\text{M}$  y para el compuesto **D1'** de 1  $\mu\text{M}$ , concentraciones en las que se espera estos compuestos no tengan un efecto tóxico que pueda interferir con los resultados de los ensayos a realizar.

**Tabla 18.** Efecto de los compuestos **D1** y **D1'** sobre la viabilidad de células RAW 264.7. En rojo resultados en los que los compuestos no presentan viabilidad.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Compuesto	
	Viabilidad %	
	D1	D1'
100	18.4 $\pm$ 0.4	10.4 $\pm$ 0.0
50	72.7 $\pm$ 10.8	9.9 $\pm$ 0.1
25	97.0 $\pm$ 1.1	10.1 $\pm$ 0.0
10	97.7 $\pm$ 3.0	34.0 $\pm$ 3.7
1	96.2 $\pm$ 0.9	104.8 $\pm$ 2.3
Control -	100	
Control + Etoposido*	49.4 $\pm$ 3.9	

Los datos representan la media  $\pm$  D.E. de al menos tres experimentos independientes.

\* El control positivo etoposido fue evaluado a 53.6  $\mu\text{M}$ .

Control – fue DMSO

### 5.2.1.2. Compuestos de la serie M

Para la evaluación de la viabilidad de los compuestos se utilizaron las concentraciones: 100, 75, 50, 25, y 1  $\mu\text{M}$ , utilizando DMSO para solubilizarlos (0.42% de concentración final). Lo anterior tuvo con el objetivo de evaluar diferentes concentraciones para observar el efecto de los compuestos en las células antes del ensayo y observar a que concentraciones los compuestos no tienen un efecto tóxico sobre las células. En la **tabla 19** se muestran los resultados de la evaluación para cada compuesto en las diferentes concentraciones. Los cuatro compuestos tienen pocas diferencias entre ellos. El compuesto **M4** (que tiene un carbonilo en C3) presenta la mayor toxicidad frente a esta línea celular, solo tiene una viabilidad por arriba del 90% a las concentraciones de 10 y 1  $\mu\text{M}$ . Al transformar a un éster propílico al ácido carboxílico en C28, la toxicidad disminuye, así que el compuesto **M11** que tiene viabilidad en un rango de 50-1  $\mu\text{M}$ . Esto a diferencia del compuesto **M6** que tiene el mismo éster en C28 pero en C3 tiene un OH que lo hace viable en

un rango menor entre 25-1  $\mu\text{M}$ . Por su parte el compuesto **M12** es el que tiene mejor viabilidad en los compuestos de la serie presentando un rango de viabilidad mayor a todos entre 75-1  $\mu\text{M}$ , con lo que se puede ver que al disminuir la cadena hidrocarbonada del éster en C-28 la toxicidad disminuye.

**Tabla 19.** Efecto de los compuestos **M4**, **M6**, **M11** y **M12** sobre la viabilidad de células RAW 264.7. En rojo resultados en los que los compuestos no presentan viabilidad.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Compuesto			
	Viabilidad %			
	<b>M4</b>	<b>M6</b>	<b>M11</b>	<b>M12</b>
<b>100</b>	<b>45.9 <math>\pm</math> 5.7</b>	ND	<b>65.9 <math>\pm</math> 3.0</b>	ND
<b>75</b>	ND	<b>29.62 <math>\pm</math> 2.8</b>	ND	125.0 $\pm$ 9.0
<b>50</b>	<b>48.0 <math>\pm</math> 10.9</b>	<b>70.7 <math>\pm</math> 4.1</b>	113.3 $\pm$ 8.2	115.8 $\pm$ 4.1
<b>25</b>	<b>59.1 <math>\pm</math> 25.3</b>	120.6 $\pm$ 15.4	118.5 $\pm$ 9.2	115.9 $\pm$ 3.7
<b>10</b>	96.5 $\pm$ 15.7	118.5 $\pm$ 22.4	119.0 $\pm$ 2.5	111.6 $\pm$ 4.2
<b>1</b>	110.7 $\pm$ 14.4	115.9 $\pm$ 8.2	112.4 $\pm$ 6.6	112.2 $\pm$ 3.2
<b>Control -</b>			100	
<b>Control + Etoposido*</b>			49.4 $\pm$ 3.9	

Los datos representan la media  $\pm$  D.E. de al menos tres experimentos independientes.

\* El control positivo etoposido fue evaluado a 53.6  $\mu\text{M}$ .

En color rojo se marcan las concentraciones a las que los compuestos no presentan viabilidad aceptable.

## 5.2.2. Efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS.

### 5.2.2.1. Compuestos de la serie D

Se evaluó el efecto inhibitorio de los compuestos **D1** y **D1'** sobre la producción de ON en células RAW 264.7 estimulados con LPS. Los resultados se observan en la tabla 20. El ensayo se realizó con las concentraciones seleccionadas mediante el ensayo de viabilidad celular (**D1**: 25, 1  $\mu\text{M}$  y para **D1'**: 1  $\mu\text{M}$ ). Las células fueron

tratadas con las concentraciones seleccionadas durante dos horas y posteriormente estimuladas con 10 µg de LPS. El experimento fue mantenido durante 20 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La concentración de nitrito fue utilizada como indicador de la producción de ON en el medio. Los resultados experimentales mostraron que el nivel de ON en las células RAW 264.7 incrementó al estimularlas con LPS, este efecto se vio disminuido de manera significativa para el compuesto **D1** en una concentración menor (25 µM, 41.3% de inhibición) a la que se utilizó con el control positivo (indometacina 41.9 µM, 45.2 % de inhibición) (**tabla 20**). Por su parte, el compuesto **D1'** no tuvo un porcentaje de inhibición notable a la concentración probada 1 µM. Es importante mencionar que no existen reportes acerca de estudios de inhibición de la producción de ON para ninguno de los compuestos evaluados.

**Tabla 20.** Efecto de los compuestos **D1** y **D1'** sobre la producción de ON en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Concentración (µM)	Compuestos	
	% inhibición ON	
	D1	D1'
25	41.3 ± 3.0	ND
10	8.7 ± 0.5	ND
1	6.3 ± 2.2	11.1 ± 0.9
<b>Indometacina #</b>	45.2 ± 0.0	

Los datos representan la media ± D.E. de al menos tres experimentos independientes.

# El control positivo indometacina fue evaluado a 41.9 µM. ND= no determinado

#### 5.2.2.2. Compuestos de la serie M

Se evaluó el efecto inhibitorio de los compuestos de la serie **M** sobre la producción de ON en células RAW 264.7 estimulados con LPS. Para el ensayo se utilizaron las concentraciones seleccionadas mediante el ensayo de viabilidad celular (**M4**: 10, 1 µM; **M6**: 25, 10, 1 µM; **M11**: 50, 25, 10, 1 µM; **M12**: 75, 50, 25, 10, 1 µM). Las células RAW 264.7 fueron tratadas con las concentraciones seleccionadas durante dos

horas y posteriormente estimuladas con 10 µg de LPS, el experimento fue mantenido durante 20 horas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La concentración de nitrito fue utilizada como indicador de la producción de ON en el medio. Los resultados experimentales mostraron que el nivel de ON en las células RAW 264.7 incrementó al estimularlas con LPS. Este efecto se vio disminuido de manera significativa para el compuesto **M4** a una concentración de 10 µM con un porcentaje de inhibición a 33.3%. En los compuestos de esta serie se sigue observando el mismo patrón con respecto a los sustituyentes, siendo el éster propílico en C-28 un sustituyente que mejora la viabilidad y en los compuestos. En el caso del compuesto **M11** se observa un porcentaje de inhibición de 33.3 a 50 µM, se necesita una mayor concentración para obtener el mismo porcentaje del compuesto **M4**. En estas estructuras el carbonilo en C3 es determinante en la actividad biológica ya que en su ausencia, el compuesto no tiene viabilidad a concentraciones mayores a 25 µM y su porcentaje de inhibición está en 27.4 % como es el caso de **M6**. Con los resultados obtenidos se puede observar que al disminuir la cadena hidrocarbonada con un éster metílico en C28, la inhibición en la producción ON se pierde aún cuando se conserve el carbonilo en C-3, compuesto **M12**. Es importante mencionar que no existen reportes acerca de estudios de inhibición de la producción de ON para ninguno de los compuestos de la serie **M** evaluados.

**Tabla 21.** Efecto de los compuestos **M4**, **M6**, **M11** y **M12** sobre la producción de ON en células RAW 264.7 estimuladas con LPS.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Compuestos			
	% inhibición ON			
	M4	M6	M11	M12
75	ND	ND	ND	11.5 $\pm$ 2.3
50	ND	ND	33.6 $\pm$ 2.2	5.6 $\pm$ 1.0
25	ND	27.4 $\pm$ 5.0	8.1 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 1.1
10	33.3 $\pm$ 5.1	14.1 $\pm$ 4.2	3.5 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 1.4
1	1.6 $\pm$ 2.0	7.9 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.2
<b>Indometacina #</b>	45.2 $\pm$ 0.0			

Los datos representan la media  $\pm$  D.E. de al menos tres experimentos independientes.

# El control positivo indometacina fue evaluado a 41.9  $\mu\text{M}$ . ND= no determinado

### 5.2.3. Inhibición de la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2.

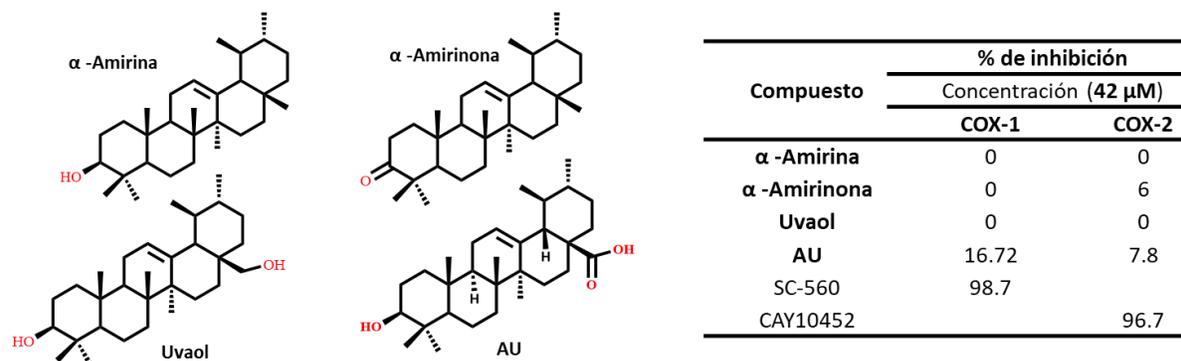
#### 5.2.3.1. Compuestos de la serie D

Para la evaluación de la inhibición específica en COX-1 y COX-2, se utilizó un kit de la marca Cayman (número: 701050, lote: 0570602) con las instrucciones del fabricante. Los compuestos se evaluaron a tres concentraciones 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ , el disolvente utilizado en el experimento fue DMSO, disolvente que no interfiere en el ensayo. El experimento fue realizado por triplicado en el mismo ensayo. Al realizar el experimento se observó que los compuestos tienen dificultades de solubilidad al combinarse con la solución buffer del kit por lo que los datos obtenidos para la concentración mayor se tuvo que descartar. En la **tabla 22** se presentan los resultados derivados del experimento a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Se utilizaron como controles positivos inhibidores de ciclooxigenasa presentando los resultados a la misma concentración.

**Tabla 22.** Resultados obtenidos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  para los compuestos D1 y D1', para la inhibición de COX-1 y COX-2.

Compuesto	% de inhibición	
	Concentración (10 $\mu\text{M}$ )	
	COX-1	COX-2
D1	22	33
D1'	15	11
Indometacina	96.24	75.93
Rofecoxib	35.74	84.81

En evaluaciones realizadas a triterpenos y en específico al tipo ursano como el ácido ursólico se reportan porcentajes de inhibición débiles para las enzimas COX, con porcentajes de inhibición de 28 y 19.9% para COX-1 y COX-2 respectivamente a una concentración de 42  $\mu\text{M}$ , se observan en la **figura 60**.<sup>97</sup>

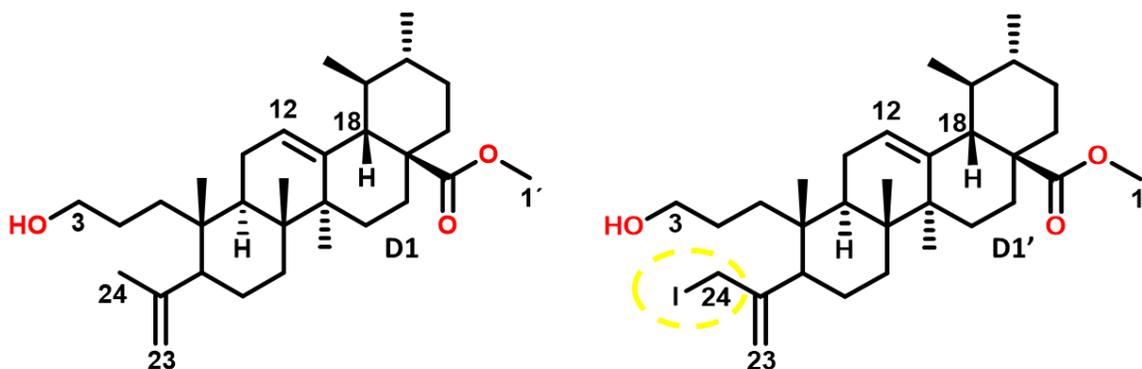


**Figura 60.** Porcentajes de inhibición en ciclooxygenasas 1 y 2 para derivados del grupo ursano incluido el ácido ursólico (AU).

En comparación para los resultados obtenidos, los porcentajes de inhibición obtenidos son parecidos a los que se encuentran en reportes recientes. Por ejemplo el compuesto D1' con porcentajes de inhibición bajos con valores de 15 y 11% para

<sup>97</sup> Qhynch Vo, N.N.; Nomura, Y.; Muranaka, T.; Fukushima, E.O. Structure-Activity Relationships of Pentacyclic Triterpenoids as Inhibitors of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Enzymes. *Natural Products*. **2019**, *82*, 3311-3320.

COX-1 y COX-2 respectivamente. Se resalta al compuesto **D1** que mostró un porcentaje de inhibición mayor para las dos enzimas con valores de 22 y 33% para COX-1 y COX-2 respectivamente. Es importante mencionar que la concentración a la que fueron probados los compuestos **D1** y **D1'** es 4 veces menor a la de los reportes, por lo que se piensa que a concentraciones en el rango de 11 y 100  $\mu\text{M}$  se podrían obtener porcentajes de inhibición mayores antes de llegar a las concentraciones con problemas de solubilidad como 100  $\mu\text{M}$ . Lo anterior no pudo realizarse en un segundo experimento debido a la disponibilidad de la enzima. Se observa que la diferencia estructural entre los compuestos evaluados al incluir el átomo de yodo en C24 para el compuesto **D1'**, disminuye los porcentajes de inhibición hacia ciclooxygenasas (**figura 61**).



**Figura 61.** Diferencia estructural para los compuestos **D1** y **D1'** para este último átomo de yodo en la posición C24, resaltado en una circunferencia amarilla.

#### 5.2.3.2. Correlación de los datos obtenidos *in vitro* con los obtenidos *in silico*.

Por medio de los datos obtenidos de manera experimental e *in silico* se puede observar que al modificar al ácido ursólico con la apertura del primer anillo del triterpeno se incrementa la actividad antiinflamatoria, caso del derivado **D1** que obtuvo mejores resultados en los ensayos *in vitro* en comparación con todos los derivados probados. En el experimento de inhibición de producción de ON, el

compuesto **D1** obtuvo un 41.3% a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , ninguno de los derivados de **AU** obtuvo un porcentaje mayor o igual a este. Este primer indicio nos lleva a pensar en la posibilidad de que este compuesto actué vía ciclooxygenasas, lo podemos correlacionar con la energía de interacción observada en el acoplamiento molecular donde obtuvo un valor de 24.76  $Kcal/mol$  (valor para compuestos con mejor interacción con COX-2). Este valor y las interacciones que se observaron en el análisis de acoplamiento molecular donde el compuesto presenta una interacción de tipo enlace de hidrógeno con Ser353 cerca del bolsillo lateral de la enzima COX-2 confirma los valores obtenidos de manera *in vitro* donde se obtuvieron porcentajes de inhibición de 22 y 33% para COX-1 y COX-2 respectivamente.

#### 5.2.3.3. Compuestos de la serie M

La evaluación de la inhibición específica sobre las enzimas ciclooxygenasa 1 y 2 para los compuestos de la serie **M** (**M4**, **M6**, **M11**, **M12**) se utilizó la misma metodología utilizando un kit de la marca Cayman con las instrucciones del fabricante, los compuestos se evaluaron a tres concentraciones 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ , el disolvente utilizado en el experimento fue DMSO, disolvente que no interfiere en el ensayo. Al realizar el experimento se observó que los compuestos tienen baja de solubilidad al combinarse con la solución buffer del kit. En la tabla 23 se presentan los resultados derivados del experimento a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Los porcentajes de inhibición para los derivados de la serie **M** presentan porcentajes de inhibición para ciclooxygenasas similares a los de los compuestos reportados, cabe mencionar que las modificaciones realizadas a estos compuestos mejoran los porcentajes de inhibición para ciclooxygenasas 1 y 2 en comparación con los reportados para compuestos de tipo ursano.

**Tabla 23.** Resultados obtenidos a una concentración de 10  $\mu$ M para los compuestos **M4**, **M6**, **M11** y **M12** para la inhibición de COX-1 y COX-2.

Compuesto	% de inhibición	
	Concentración (10 $\mu$ M)	
	COX-1	COX-2
<b>M4</b>	10.5	10.3
<b>M6</b>	15.7	17.0
<b>M11</b>	18.12	7.2
<b>M12</b>	16.72	7.8
Indometacina	96.24	75.93
Rofecoxib	35.74	84.81

**5.2.3.4. Correlación de los resultados *in vitro* con los obtenidos *in silico* de la serie M.**

A partir de los resultados obtenidos tanto experimentales como *in silico* se observa que los derivados del ácido ursólico con pequeñas modificaciones **M4**, **M6**, **M11** y **M12** tienen interacciones más fuertes o débiles según los sustituyentes que presenten las estructuras. De los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular con ciclooxigenasas, se observa que el compuesto **M4** e indometacina interactúa de forma similar con estas enzimas con energías de interacción de -10.1 *Kcal/mol* y -34.9 *Kcal/mol*, respectivamente. También se observa similitud en el ensayo *in vivo* de TFA en oreja de ratón donde estos compuestos presentan los porcentajes de inhibición más altos con valores de 75% y 87.37% para **M4** e indometacina, respectivamente. De forma experimental se puede observar que el compuesto **M4** es un inhibidor no selectivo de ciclooxigenasas al igual que indometacina, por los resultados obtenidos en el experimento *in vitro* donde se obtuvieron porcentajes de inhibición similar de 10.48 y 10.37 para COX-1 y COX-2, respectivamente; se debe

mencionar que el compuesto **M4** presentó un porcentaje de inhibición bajo en el estudio *in vivo*, en comparación con la indometacina, con porcentajes de 96 y 76 % para COX-1 y COX-2, respectivamente. En el análisis de acoplamiento molecular para el compuesto **M4** se encontraron dos interacciones de tipo enlace de hidrógeno con ambas ciclooxygenasas Val349 y Ser353 para COX-1 y COX-2 respectivamente, lo que podría deberse a una interacción similar con ambas ciclooxygenasas con la parte del OH en C-28 del compuesto **M4**.

Los compuestos **M6**, **M11** y **M12** mostraron porcentajes de inhibición entre 47 y 48% en el ensayo de ATF en oreja de ratón. A pesar de que los compuestos no presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50% fueron seleccionados por tener los mejores resultados de la serie de compuestos. Experimentalmente el compuesto **M6** inhibió la actividad de COX-2 un 17.03% esto podría deberse a la interacción que presenta con la parte del carbonilo en C-28 y Ser353 cerca del bolsillo lateral de la enzima. **M11** y **M12** conservan mayor selectividad experimental hacia COX-1 con porcentajes de inhibición *in vitro* de 15.72% y 18.12% respectivamente. El compuesto **M11** en el acoplamiento molecular muestra una interacción por enlace de hidrógeno con His90 con COX-1, lo que podría explicar el porcentaje de inhibición mayor que tiene hacia COX-1, debido a que este aminoácido es de importancia en las interacciones con ciclooxygenasas. El compuesto **M12** interacciona con ambas ciclooxygenasas y el éster metílico en C28 (**figura 37**), es probable que la interacción con el O del éster y COX-1 sea más favorecida y por ello tenga un mayor porcentaje de inhibición experimental con esta enzima.

### 5.3. Procedimientos experimentales

#### 5.3.1. Cultivo de células RAW 264.7

Los macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 fueron cultivados en medio ADVANCED DMEM/F12 (GIBCO) + 1% de GlutaMAX™ (GIBCO) suplementado con 3.5% de SFB (GIBCO) sin antibiótico en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y se incubaron en condiciones de atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C. Al alcanzar un rango de confluencia entre 70-80% se retiró el medio de cultivo y las células fueron desprendidas con 0.7 mL de tripsina (GIBCO). Posteriormente el frasco fue incubado en un período de 5-10 min en las mismas condiciones en las que se incubó el cultivo celular. El desprendimiento de la película celular se completó realizando golpes suaves en las partes laterales del frasco de cultivo e inmediatamente la tripsina fue inactivada con 5 mL de medio de cultivo. A continuación, la suspensión celular se colocó en un tubo falcon de 15 mL y fue centrifugada a 1250 rpm durante 5 min. Finalmente, se decantó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo para su posterior conteo en cámara de Neubauer para subcultivar en frascos de 75 cm<sup>2</sup> o placas de 96 pozos.

#### 5.3.2. Viabilidad celular en macrófagos RAW 264.7

Las células RAW 264.7 se sembraron en una placa de 96 pozos, colocando 10,000 células por pozo con 0.1 mL de medio de cultivo ADVANCED DMEM/F12 + 1% de GlutaMAX™ con 3.5% de SFB y se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, la placa sembrada fue incubada durante 20 h más colocando los tratamientos (D1 y D1') y dejando pozos control (100% viabilidad). Los compuestos de estudio se evaluaron a diferentes concentraciones en un rango de 1-10 µM, también se evaluó el vehículo en el que fueron disueltas las muestras dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.21 y 0.47% y el control positivo etopósido

a 20 y 40 µg/mL. Después del tiempo de incubación se agregaron 20 µL de MTS (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation assay de Promega) a cada uno de los pozos y se incubó durante dos horas más. Finalmente, la densidad óptica se midió a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

### 5.3.3. Efecto de los compuestos en el proceso inflamatorio inducido por el tratamiento de los macrófagos RAW 264.7 con LPS

Las células RAW 264.7 se sembraron en una placa de 96 pozos, colocando 20,000 células por pozo con 0.2 mL de medio de cultivo ADVANCED DMEM/F12 + 1% de GlutaMAX™ con 3.5% de SFB y se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, la placa sembrada fue incubada durante 2 h más colocando los tratamientos **D1** y **D1'**. Los compuestos de estudio se evaluaron a diferentes concentraciones en un rango de 1-10 µM, también se evaluó el vehículo en el que fueron disueltas las muestras dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.21 y 0.47% y el control positivo indometacina a una concentración de 20 y 40 µg/mL. A continuación, se agregaron 10 µg/mL de LPS y la placa fue incubada por 20 h. finalmente se colectaron los sobrenadantes (libres de células) para cuantificar ON mediante la reacción de Griess.

#### 5.3.3.1. Determinación de la concentración de ON en RAW 264.7

El nitrito es el producto final estable de ON; para determinar la presencia de nitrito en el medio de cultivo, se utilizó la reacción de Griess<sup>98</sup>. Para ello se tomaron 50 µL de cada sobrenadante libre de célula se incubaron durante 10 minutos en una

---

<sup>98</sup> Romero, A. "Estudio de triterpenos pentacíclicos modificados en el anillo A: Síntesis y evaluación de su efecto sobre la inflamación inducida *in vivo* e inhibición *in vitro* de la producción de óxido nítrico y de la actividad de las enzimas COX y PLA<sub>2</sub>". Tesis Doctoral, **2017**, Centro de Investigaciones Químicas UAEM.

placa de ELISA de 96 pozos con 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess (50  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida 1% y 50  $\mu\text{L}$  de dicloruro de *N*-(1-naftil)-etilendiamina al 0.1% ambos en 2.5% de ácido fosfórico) a temperatura ambiente. Se midió la densidad óptica a 540 nm con un lector de placas de ELISA y la concentración de nitrito presente en las muestras se calculó por comparación en la densidad óptica de una curva estándar de  $\text{NaNO}_2$  preparada en medio de cultivo fresco.

### 5.3.4. Inhibición de la actividad de las enzimas COX-1 y COX-2.

Se probó el efecto de los compuestos **D1** y **D1'** sobre las enzimas COX-1 y COX-2 mediante un kit para la detección de inhibidores de COX-1 (ovino) y COX-2 (humano) No. 701050 de la marca Cayman Chemical, el ensayo se realizó conforme las instrucciones del fabricante. Se probaron los compuestos **D1**, **D1'**, indometacina en COX-1, y rofecoxib en COX-2 en un rango de concentraciones de 1-100  $\mu\text{M}$  todos disueltos en DMSO.

## 5.4. Conclusiones

Se determinó la viabilidad celular para los compuestos de la serie **M** y **D**, se observó que el compuesto **D1'** presenta una alta toxicidad debida al iodo presente en su estructura.

El compuesto **D1** inhibió la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7 estimuladas con LPS en forma sobresaliente (25 $\mu\text{M}$ , 41.3% de inhibición) en comparación con el control utilizado indometacina (41.9 $\mu\text{M}$ , 45.2% de inhibición) que tiene porcentaje de inhibición similar a una mayor concentración. El compuesto **D1'** no presentó inhibición de óxido nítrico notable a la concentración probada.

En el ensayo de inhibición de la actividad en ciclooxygenasas el compuesto **D1** tiene valores de porcentaje de inhibición mejores con respecto al ácido ursólico y

sus derivados, por lo que se puede concluir que las modificaciones realizadas a este compuesto incrementan la actividad sobre estas enzimas.

El compuesto **D1** seleccionado por tener mayor probabilidad de presentar actividad antiinflamatoria, muestra resultados exitosos en cuanto a la inhibición de la producción de ON, a pesar de que los porcentajes de inhibición en ciclooxigenasas no son tan altos, podría ser uno de los mecanismos de acción por los cuales este compuesto ejerce su efecto antiinflamatorio. Debido a que se sabe que el ON se expresa en respuesta a la acción de algunas citocinas como la IL-1, INF  $\gamma$  y TNF  $\alpha$ , se sugiere el estudio de otros posibles mecanismos de acción para este compuesto. Finalmente, es importante mencionar que no existen reportes de ninguno de los ensayos biológicos realizados al compuesto **D1**.

Para los compuestos de la serie **M4**, **M6**, **M11**, **M12**, las modificaciones realizadas mejoraron la actividad antiinflamatoria en los diferentes experimentos realizados en comparación con ácido ursólico. El compuesto **M4** es el que presenta mejor porcentaje de inhibición de ON (33.3%, 10  $\mu$ M), aunque no presentó selectividad frente a ciclooxigenasas. Se debe mencionar que los porcentajes de inhibición frente a ciclooxigenasas los cuatro compuestos de la serie **M**, fueron bajos en comparación a indometacina y rofecoxib, que son los fármacos utilizados como referencia.

---

# **Capítulo 6**

## **Conclusiones Generales**

## 6. Conclusiones generales

Se obtuvo un modelo matemático tanto predictivo como descriptivo de la relación entre la estructura actividad biológica (QSAR), para verificar si la propuesta de híbridos de **AU**-isatina podría tener un problema por el incremento de volumen por la unión de estas dos moléculas. En el análisis se encontraron las características de derivados de isatina e híbridos de **AU**-isatina para presentar actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer Hela.

Se propuso un posible mecanismo de acción para los derivados de isatina con mejor actividad citotóxica utilizados en la generación del modelo QSAR.

Con el QSAR generado se probaron los híbridos de **AU**-isatina obteniendo resultados prometedores para estos compuestos **D3-D11** de actividad citotóxica en la línea celular Hela.

Se generó una metodología de acoplamiento molecular utilizando como blanco biológico enzimas ciclooxigenasa 1 y 2, y como ligandos al ácido ursólico (**M1**) y sus derivados (**M2-M13**). En este estudio *in silico* se determinaron las posibles interacciones entre las enzimas y los compuestos **M1-M13**. Mediante un análisis de similitud molecular de los compuestos en comparación con indometacina, se correlacionaron los resultados del acoplamiento molecular y el ensayo *in vivo* de inducción de la inflamación por ATF en oreja de ratón.

Con la metodología de acoplamiento molecular se probaron los compuestos de la serie **D**, en los que se incluyen compuestos con apertura del primer anillo del triterpeno (**D1** y **D2**) e híbridos que incluyen isatina. Debido al análisis de acoplamiento molecular se seleccionó el compuesto **D1** con mayor probabilidad de tener efecto antiinflamatorio. Mediante el análisis de acoplamiento molecular se pudieron identificar todas las posibles interacciones de los compuestos de la serie **D** con ciclooxigenasas 1 y 2.

---

Por otro lado, el compuesto seleccionado **D1**, fue semisintetizado con una metodología que partió desde el procesamiento de la planta *Astianthus viminalis* de donde se obtuvo el ácido ursólico con un procedimiento optimizado, se realizó la semisíntesis de intermediarios e identificación del compuesto **D1**.

Por primera vez se realizaron evaluaciones biológicas de viabilidad celular, inhibición de óxido nítrico e inhibición de ciclooxigenasas 1 y 2 para los compuestos **D1**, **D1'** y **M4**, **M6**, **M11**, **M12**.

Se comprobó que el compuesto **D1** presenta actividad antiinflamatoria con un valor de porcentaje de inhibición de la producción de ON de 41.3% a una concentración de 25  $\mu$ M valor comparable con el control positivo utilizado indometacina que cuenta con un valor 45.2 % de inhibición de la producción de ON a una concentración mayor (41.9  $\mu$ M). La actividad específica para ciclooxigenasa 1 y 2 para **D1** tiene valores de 22 y 33% respectivamente, estos valores superan a los reportados para este tipo de compuestos y se sugiere que la vía ciclooxigenasas es uno de los posibles mecanismos de acción por el cual el **D1** ejerce su efecto biológico. A pesar de que los porcentajes de inhibición en ciclooxigenasas no son tan altos, podría ser uno de los mecanismos de acción por los cuales este compuesto ejerce su efecto antiinflamatorio, ya que se sabe que el ON se expresa en respuesta a la acción de algunas citocinas como la IL-1, INF  $\gamma$  y TNF  $\alpha$ . Se sugiere el estudio de otros posibles mecanismos de acción para este compuesto. Se puede concluir que los estudios teóricos realizados ayudaron a la selección del compuesto **D1** que por medio de ensayos experimentales se comprobó su potencial antiinflamatorio.

Para los compuestos **M4**, **M6**, **M11**, **M12** se debe destacar que las modificaciones realizadas afectan directamente los resultados de viabilidad celular y actividad

biología siendo el mejor compuesto con inhibición de ON **M4** (33.3%, 10  $\mu$ M), y los más selectivos frente a COX-1 los compuestos **M11**, **M12** y frente a COX-2 **M6**.

A pesar de que los porcentajes de inhibición frente a ciclooxigenasas no fueron muy altos en comparación a los de los controles utilizados en los ensayos *in vitro* indometacina y rofecoxib, la metodología de acoplamiento molecular fue efectiva para la selección de compuestos con actividad frente a ciclooxigenasas con lo que se supera a lo reportado para este tipo de compuestos con porcentajes de inhibición mucho menores.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in silico* e *in vitro* fueron correlacionados para obtener las posibles interacciones de los compuestos de la serie **M** y **D** con ciclooxigenasa 1 y 2

