

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO URSÓLICO CON  
ACTIVIDAD VASODILATADORA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**Q.F.B. GIOVANNY AGUILERA DURÁN**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. RUBÉN ANTONIO ROMO MANCILLAS**

**QUERÉTARO**  
**CENTRO UNIVERSITARIO**  
**OCTUBRE DE 2016**  
**MÉXICO**



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO URSÓLICO CON ACTIVIDAD  
VASODILATADORA.

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

Q.F.B. Giovanni Aguilera Durán.

**Dirigido por:**

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas.

**SINODALES**

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Presidente

Firma

Dr. César Ibarra Alvarado

Secretario

Firma

Dra. Eugenia Josefina Aldeco Pérez

Vocal

Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

Firma

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca  
Piña  
Director de Investigación y Posgrado

QUERÉTARO  
CENTRO UNIVERSITARIO  
OCTUBRE DE 2016  
MÉXICO

## Agradecimientos

Agradezco enormemente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero para realizar mis estudios de Maestría así como al plan de retención CONACYT no. 245558, convocatoria 2014-1, otorgado al Dr. Romo Mancillas con el proyecto “Modelado molecular de triterpenos y síntesis de derivados al ácido ursólico con posible actividad vasodilatadora” y a las Redes Temáticas SEP-PRODEP por el apoyo para el proyecto “Estudio químico, farmacológico y nutrimental de especies empleadas en la Medicina Tradicional Mexicana”.

Dedico este trabajo a todos mis amigos y compañeros del posgrado Ciencias Químico Biológicas que me enseñaron a siempre superar mis límites y ser mejor estudiante y persona, durante estos dos años. Al laboratorio de productos naturales que me permitió llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones y a la Universidad Autónoma de Querétaro por brindar un espacio donde crecer académicamente.

Mención especial al grupo de trabajo de síntesis orgánica, los cuales, en cada momento, bueno o malo, siempre me apoyaron y brindaron sus conocimientos para poder llegar a buen término el desarrollo de este trabajo y el desarrollo personal y al Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas del cual siempre recibí apoyo personal y profesional durante el desarrollo de este trabajo.

A cada una de esas personas que son especiales para mí, gracias por siempre estar allí en las buenas y en las malas y siempre apoyarme para seguir adelante. A mi familia que fueron el pilar que me sostuvo en esta travesía, gracias por todo su apoyo y sacrificio para que el objetivo se lograra, sin ellos yo no sería nada y a esa persona especial que siempre estuvo a mí lado.

A Dios le agradezco haberme guiado hasta este punto, sin él no soy nada y da sentido a mi vida. Por ultimo a todos y cada uno que de alguna forma me brindo aprendizaje para poder llegar a este punto, amigos, conocidos, profesores y trabajadores de la Facultad de Química. Gracias a todas las personas que me acompañaron en este viaje de la vida que fue la Maestría en Ciencias Químico Biológicas.

¡Hasta la victoria siempre! Ernesto "Che" Guevara 1928-1967.

## Resumen

La hipertensión es un problema de salud a nivel mundial, que incrementa el riesgo de desarrollar otras enfermedades cardiovasculares como el accidente cerebrovascular y la isquemia cardiaca. Aunque existen fármacos para tratar esta enfermedad, es necesario la búsqueda de nuevas moléculas que puedan servir para el desarrollo de fármacos alternativos para tratar la hipertensión. El objetivo de este trabajo fue la síntesis de cinco derivados del ácido ursólico, esterificando el grupo hidroxilo presente en el C-3, y evaluar la actividad vasodilatadora de estos compuestos (GAD-001, GAD-002, GAD-003, GAD-004 y GAD-005). Adicionalmente, por medio de técnicas computacionales se identificaron los diferentes aminoácidos que podrían estar involucrados en la interacción con la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Todos los derivados evaluados presentaron un efecto vasodilatador menor al efecto producido por el ácido ursólico ( $p < 0.05$ ), donde los más efectivos fueron GAD-001 y GAD-004 con un efecto máximo de  $45.61 \pm 8.27$  % y  $54.7 \pm 3.01$  %, respectivamente. Según el estudio de *docking*, las interacciones de los compuestos con la región catalítica del homodímero de la eNOS fueron de tipo puente de hidrógeno para el ácido ursólico y GAD-001 y tipo puente de hidrógeno y puente salino para el resto de los compuestos. Las modificaciones al ácido ursólico mostraron ir en detrimento de su actividad vasodilatadora, posiblemente por un cambio en las interacciones con eNOS, que a su vez pudieron provocar un cambio en la producción de NO, gasotransmisor incrementado por la interacción del ácido ursólico con esta enzima.

**Palabras clave:** ácido ursólico, derivados, vasodilatación, induced-fit docking, eNOS

## Summary

Hypertension is a health problem worldwide that increases the risk of other cardiovascular diseases such as stroke and cardiac ischemia. Although there are drugs for the treatment of this disease, it is necessary to find new molecules that can serve as a possible treatment. The aim of this work was the synthesis of five ursolic acid derivatives, esterified at the C-3 moiety, and to evaluate the vasorelaxant activity of these compounds, namely GAD-001, GAD-002, GAD-003, GAD-004 and GAD-005. Additionally, using computational techniques, we identified the possible interactions with different amino acids that could be involved in the interaction of these compounds with the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS). All derivatives tested showed lower vasorelaxant effect compared to the effect of ursolic acid ( $p < 0.05$ ), where the most effective derivatives were GAD-001 and GAD-004, with  $E_{max}$  values of  $45.61 \pm 8.27\%$  and  $54.7 \pm 3.01\%$ , respectively. According to molecular docking calculations, the interactions of the compounds with the catalytic subunit of the eNOS were through hydrogen bonds for ursolic acid and GAD-001, and hydrogen bonds and salt bridges to the other derivatives; these interactions were with polar amino acids. The modifications performed on ursolic acid showed to be detrimental to the vasorelaxant activity, possibly due to changes in the interactions with eNOS, which in turn could lead to a change in the synthesis of NO, a gasotransmitter increased by the interaction of this enzyme with ursolic acid.

**Keywords:** ursolic acid, derivatives, vasorelaxant activity, induced-fit docking, eNOS

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
2.	ANTECEDENTES .....	2
2.1.	La hipertensión arterial como problema de salud pública .....	2
2.2.	Etiología de la hipertensión .....	4
2.3.	Tratamiento de la hipertensión .....	7
2.4.	La medicina tradicional como alternativa para el tratamiento de la HT.....	8
2.5.	Actividades biológicas del ácido ursólico .....	9
2.5.1.	Actividad vasodilatadora .....	11
2.6.	Modificaciones estructurales en el ácido ursólico .....	12
2.7.	Herramientas computacionales para el desarrollo y evaluación de nuevas moléculas.....	15
2.7.1.	Métodos de estructura electrónica (Química cuántica) .....	17
2.7.2.	Mecánica molecular .....	18
2.7.3.	Métodos de acoplamiento molecular .....	19
3.	JUSTIFICACIÓN.....	21
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	22
5.	HIPÓTESIS.....	22
6.	OBJETIVO GENERAL .....	23
6.1.	Objetivos específicos.....	23
7.	METODOLOGÍA .....	24
7.1.	Síntesis orgánica e identificación estructural.....	24
7.2.	Acoplamiento molecular de ajuste inducido.....	25
7.2.1.	Estructuras de los ligandos y la molécula diana. ....	26

7.2.1.2.	Preparación de la estructura de la óxido nítrico sintetasa endotelial...	26
7.2.2.	Acoplamiento molecular. ....	27
7.3.	Evaluación Farmacológica de los derivados.....	28
7.3.1.	Mantenimiento y manejo de animales de experimentación. ....	28
7.3.2.	Ensayo de aorta aislada de rata.....	29
8.	RESULTADOS.....	30
8.1.	Síntesis de derivados del ácido ursólico y su identificación estructural .....	30
8.2.	Acoplamiento molecular de ajuste inducido (IFD).....	35
8.2.1.	GAD-001. Ácido 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oico.....	36
8.2.2.	GAD-002. Ácido 3β-(propioniloxi)urs-12-en-28-oico.....	37
8.2.3.	GAD-003. Ácido 3β-(butanoiloxi)urs-12-en-28-oico.....	38
8.2.4.	GAD-004. Ácido 3β-[(2-metil)propioniloxi]urs-12-en-28-oico.....	39
8.2.5.	GAD-005. Ácido 3β-[(3-metil)butanoiloxi]urs-12-en-28-oico.....	40
8.2.6.	Ácido ursólico.....	41
8.3.	Evaluación farmacológica.....	42
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
10.	CONCLUSIONES .....	54
11.	PERSPECTIVAS DE TRABAJO .....	55
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
13.	Anexo I.....	62
13.1.	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C.....	62
13.1.	Espectrometría de masas.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Figura 1. Mortalidad total por cardiopatía isquémica y accidente cerebro-vascular	3
Figura 2.	Previsión de la evolución de mortalidad de las enfermedades cardiovasculares	4
Figura 3.	Conformación del vaso sanguíneo	5
Figura 4.	Estructura de la eNOS	7
Figura 5.	Estructura química del ácido ursólico	8
Figura 6.	Actividades biológicas del ácido ursólico	9
Figura 7.	Modificaciones estructurales del ácido ursólico	12
Figura 8.	Actividad biológica relacionada a modificaciones del ácido ursólico	14
Figura 9.	Reacción de acetilación de la estructura triterpénica pentacíclica de la $\alpha$ - y $\beta$ -amirina con anhídrido acético	14
Figura 10.	Reacción de la acetilación del ácido ursólico con anhídrido acético y piridina como solvente	15
Figura 11.	Acoplamiento molecular del ácido ursólico con la región catalítica del homodímero de la eNOS	20
Figura 12.	Esquema general de la síntesis de los compuestos GAD-001-005	24
Figura 13.	Interacciones de GAD-001 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS	36
Figura 14.	Interacciones de GAD-002 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS	37
Figura 15.	Interacciones de GAD-003 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS	38
Figura 16.	Interacciones de GAD-004 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS	39
Figura 17.	Interacciones de GAD-005 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS	40

Figura 18.	Interacciones del ácido ursólico con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS	41
Figura 19.	Curva concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos sintetizados (GAD-001-004) y del ácido ursólico	43
Figura 20.	Placa cromatográfica de los derivados del ácido ursólico obtenidos por columna cromatográfica	45
Figura 21.	Placa cromatográfica de los derivados del ácido ursólico purificados mediante cristalizaciones	45
Figura 22	Placa cromatográfica de los derivados del ácido ursólico purificados	46
Figura 23	Fragmentación propuesta del ion molecular por EM-IES	48
Figura 24	Comparación de las conformaciones estructurales de GAD-004 en su interacción con la región catalítica del homodímero de la eNOS	51

## ANEXO I

Figura 1'	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GAD-001	62
Figura 2'	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de GAD-001	63
Figura 3'	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GAD-002	64
Figura 4'	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de GAD-002	65
Figura 5'	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GAD-003	66
Figura 6'	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de GAD-003	67
Figura 7'	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GAD-004	68
Figura 8'	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de GAD-004	69
Figura 9'	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de GAD-005	70
Figura 10'	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de GAD-005	71
Figura 11'	Espectro de masas de GAD-001	72
Figura 12'	Espectro de masas de GAD-002	73
Figura 13'	Espectro de masas de GAD-003	74
Figura 14'	Espectro de masas de GAD-004	75
Figura 15'	Espectro de masas de GAD-005	76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Actividades biológicas del ácido ursólico	10
Tabla 2.	Diferentes sustituyentes en los derivados del ácido ursólico	13
Tabla 3.	Aspectos y objetivos de la química computacional	16
Tabla 4.	Fenómenos químicos y niveles de teoría recomendados para su estudio computacional	16
Tabla 5.	Rendimiento de la síntesis de los derivados del ácido ursólico	30
Tabla 6.	<i>IFD-Score</i> de los derivados y tipos de interacciones con los diferentes aminoácidos involucrados en la interacción con la eNOS	35
Tabla 7.	Porcentaje de relajación y CE50 de los compuestos obtenidos mediante el ensayo de aorta aislada de rata	42

## 1. INTRODUCCIÓN

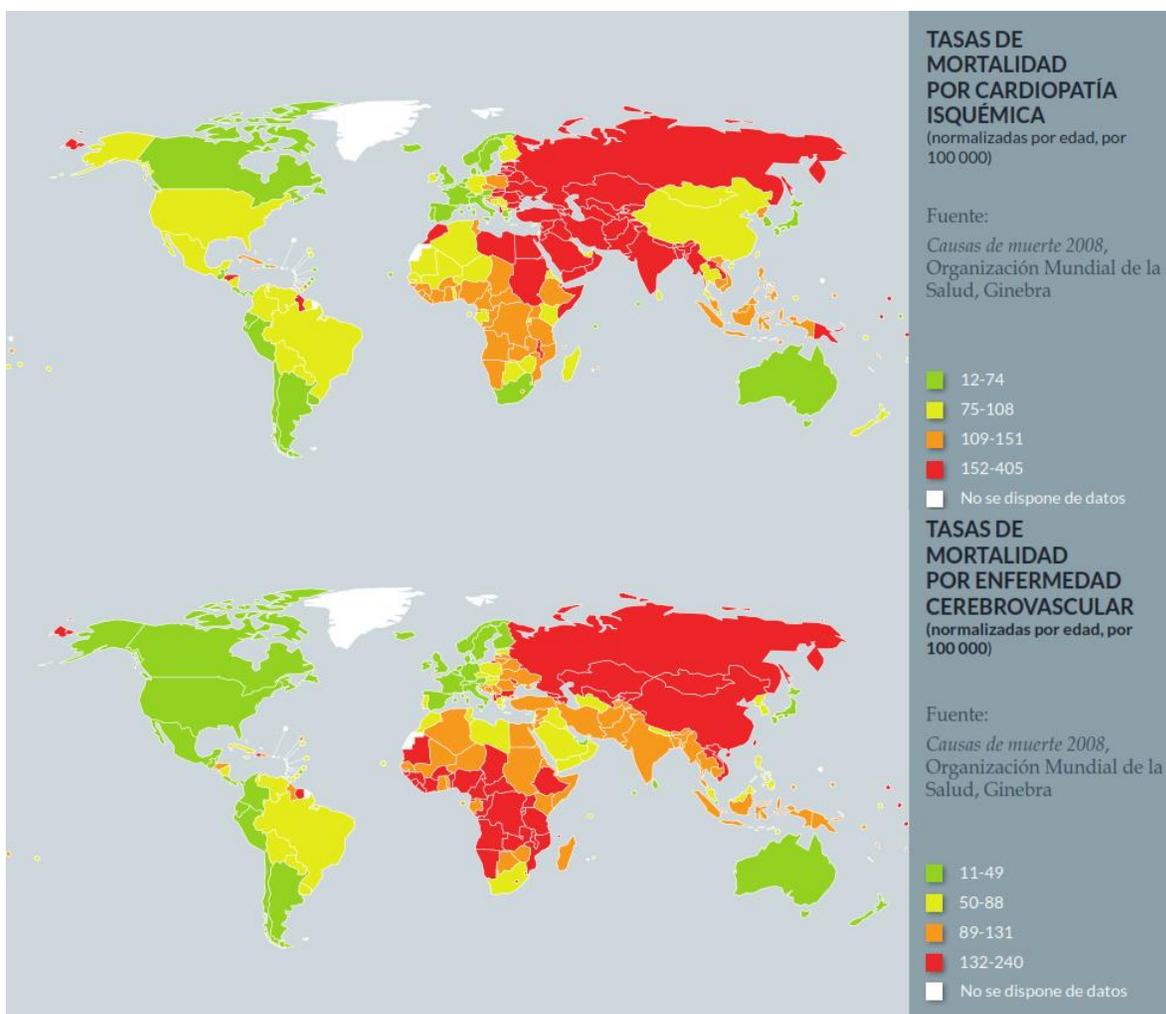
Las enfermedades cardiovasculares son relevantes a nivel mundial, ya que son causa de 17 millones de muertes al año, de las cuales 9.4 millones son causadas por las complicaciones de la hipertensión. Aunque existen fármacos dirigidos contra esta patología, caracterizada por niveles elevados de presión arterial (140 mmHg sistólica/90 mmHg diastólica), presentan efectos secundarios o no son efectivos para toda la población. Por este motivo, es importante encontrar nuevas moléculas que puedan ser utilizadas como posible tratamiento contra esta patología. Los productos naturales son una gran fuente de moléculas con actividad biológica que pueden ser útiles en esta condición patológica. Tal es el caso de un triterpeno pentacíclico denominado ácido ursólico el cual posee varias actividades biológicas, una de ellas es el efecto vasodilatador. Aunque se han reportado varias modificaciones estructurales para mejorar sus características fisicoquímicas y farmacológicas del ácido ursólico, no se ha evaluado el efecto vasodilatador de estos derivados. El objetivo de este trabajo fue sintetizar e identificar la estructura de una serie homóloga de ésteres derivados del ácido ursólico con el propósito de mejorar su efecto vasodilatador, el cual fue evaluado en anillos de aorta aislada de rata. Los tipos de interacciones que estos derivados presentan con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la óxido nítrico sintetasa endotelial, se lograron identificar mediante un acoplamiento molecular de ajuste inducido.

## 2. ANTECEDENTES

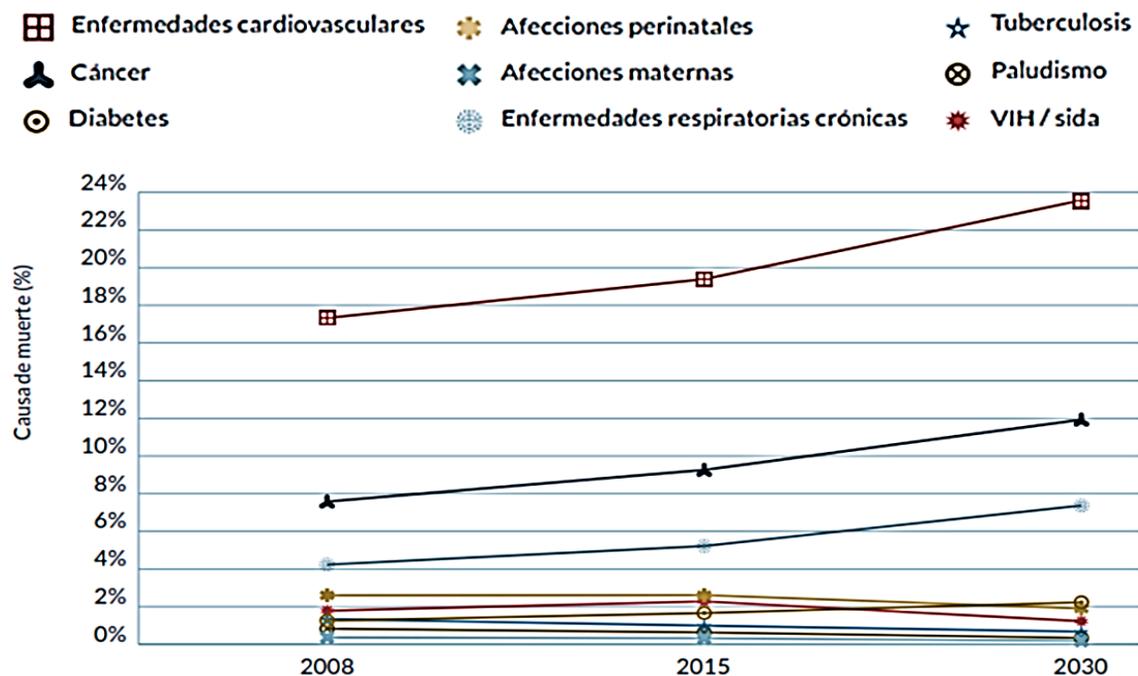
### 2.1. La hipertensión arterial como problema de salud pública

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año. Entre estas, las complicaciones de la hipertensión (HT) causan anualmente 9.4 millones de muertes. La HT es una patología caracterizada por valores de presión arterial por encima de 140 mmHg sistólica/90 mmHg diastólica, cuando los valores normales son 120 mmHg/80 mmHg. La HT es la causa de por lo menos el 45 % de las muertes por cardiopatías y el 51 % de las muertes por accidente cerebrovascular (ACV). En la Figura 1 se puede observar la tasa de mortalidad que se presenta alrededor del mundo de la cardiopatía isquémica y de la enfermedad cerebrovascular, las cuales son elevada, particularmente en zonas de Europa central y África. Adicionalmente, en la Figura 2 se muestra la previsión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) con respecto a la mortalidad por complicaciones cardiovasculares en un futuro, la OMS prevé que para el 2030 las enfermedades cardiovasculares serán las causantes de, al menos, el 24 % de las muertes a nivel mundial, superando otras patologías como el cáncer, afecciones respiratorias crónicas entre otras (OMS 2013). A nivel mundial, la presión arterial alta incrementa el riesgo de mortalidad por ACV, enfermedades renales crónicas e insuficiencia cardiaca (Parra-Carillo y col., 2009) y es la responsable del 27 % de los casos de enfermedades vasculares en mujeres y el 37 % en hombres; por otra parte, es responsable del 39 % de los casos de insuficiencia cardiaca crónica en hombres y el 59 % en mujeres. Así como el 56 % de las enfermedades renales (Pickering y col., 2008). A nivel nacional, la HT presentó una prevalencia del 24.4 % de 2006 a 2010. La incidencia de hipertensión arterial presenta una tendencia poco variable. En 2009 se registró el mayor número de casos nuevos con este padecimiento (718 casos nuevos por cada 100 mil habitantes de 15 años o más) y en 2010, la más baja (686 personas). Al considerarse la HT una enfermedad de seguimiento epidemiológico, el Sistema de Notificación Semanal registra todos los casos que se presentan en nuestro país. Así, en 2006 la región sur del país

presentó la incidencia más baja de hipertensión comparada con la del norte, comportamiento sostenido hasta 2010, en donde el norte del país detectó el mayor número de casos nuevos de hipertensión. Las entidades con incremento de casos nuevos de 2006 a 2010 son Chihuahua (483 casos más respecto a 2006), Sonora (130) y Michoacán (102); en tanto, en los estados de Jalisco (228), Coahuila (225) y Guanajuato (168 personas) se redujo la incidencia en el mismo periodo (INEGI, 2013).



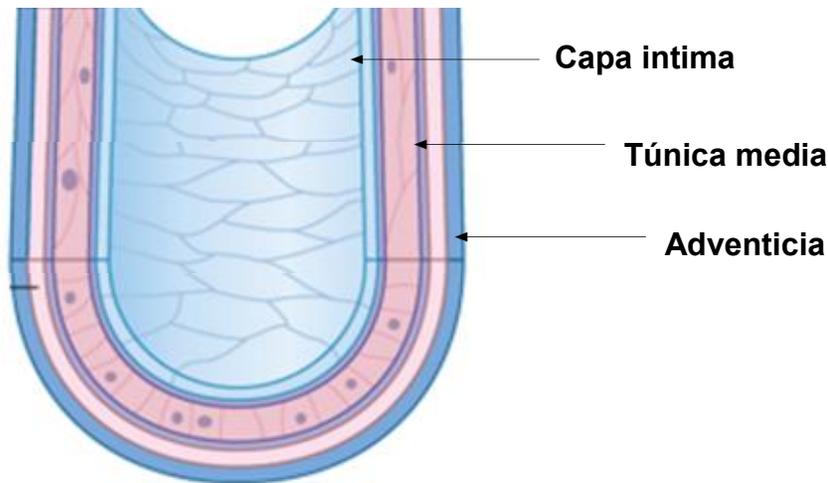
**Figura 1. Mortalidad total por cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular (OMS, 2013).**



**Figura 2. Previsión de la evolución de mortalidad de las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2013).**

## 2.2. Etiología de la hipertensión

Los vasos sanguíneos son los responsables del transporte de sangre en el organismo. Están compuestos por tres capas de diferentes tipos celulares, la capa íntima compuesta por células endoteliales. La túnica media conformada por una capa de células de músculo liso, y la adventicia que consiste en matriz extracelular, fibroblastos y terminaciones nerviosas, como se observa en la Figura 3 (Loscalzo, 2015). Las células endoteliales forman una sutil monocapa y son responsables de la regulación del tono vascular mediante diferentes factores donde el óxido nítrico (NO) es uno de los gasotransmisores más estudiados (Boulanger, 2016)



**Figura 3. Conformación del vaso sanguíneo. Modificado de Loscalzo, 2015.**

El endotelio es el regulador más importante de la homeostasis vascular, por lo que un desequilibrio en su función promueve el desarrollo de enfermedades cardiovasculares e hipertensión. En este sentido, una producción y actividad adecuada del NO es fundamental para la homeostasis endotelial (Sierra y Larrousse, 2010). En este equilibrio es crucial la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y la biodisponibilidad del NO (Föstermann, 2006). La NOS presenta tres isoformas distribuidas en el organismo: la óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS o NOS I), la inducible (iNOS o NOS II) y la predominante en endotelio, la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS o NOS III) (Föstermann y Li, 2011).

La eNOS es una proteína anclada en las caveolas (pequeñas invaginaciones) de la membrana plasmática y en la membrana del aparato de Golgi (Heiss y Dirsch, 2014). Es una enzima constituida por dos monómeros, cada monómero consta de un dominio reductasa en el extremo carboxilo terminal y un dominio oxidasa o catalítico en el extremo amino terminal (Föstermann, 2006). El mecanismo de reacción de esta enzima inicia con la transferencia de electrones desde el dominio reductasa hacia el dominio catalítico donde se encuentra el grupo prostético hemo, dicha transferencia es mediada por la (6*R*)-5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) que

es un cofactor fundamental para la funcionalidad de la enzima; en el dominio catalítico se localiza el sitio de unión del oxígeno molecular y el sustrato, donde se promueve la oxidación de la L-arginina para liberar L-citrulina y NO (Fösterman y Li, 2011). El NO es un gasotransmisor liberado desde el endotelio al músculo liso, donde activa la guanilato ciclasa soluble (sGC) que produce monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que a su vez activa a la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) que estimula la fosforilación de diferentes proteínas que tendrán como resultado final la disminución de los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico y la desfosforilación de la cadena ligera de miosina, provocando la reducción de la contracción vascular del músculo liso, obteniendo como resultado final la vasodilatación (Derbyshire y Marletta, 2012). Para la funcionalidad de la eNOS, es necesario la participación del complejo  $Ca^{+2}$ /Calmodulina (CaM), como se observa en la Figura 4 (Heiss y Dirsch, 2014). Adicionalmente, la eNOS puede sufrir cambios postraduccionales como fosforilaciones para activar o inhibir su función: en humanos, la fosforilación en el residuo serina 1177 promueve la activación, mientras que la fosforilación en el residuo treonina 495 promueve la inactivación de la enzima. Por otra parte, el NO, además de presentar efectos vasodilatadores, tiene la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria, presenta protección contra la aterogénesis y promueve la disminución del estrés oxidativo; por tanto, la pérdida de la función de la enzima y, por consiguiente, la disminución en la producción de NO presenta consecuencias fisiopatológicas importantes, sobre todo en enfermedades cardiovasculares (Heiss y Dirsch, 2014).

Un factor relevante en la patogénesis de la HT son las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales promueven el incremento de la contractibilidad del vaso sanguíneo y la actividad hipertensiva, además de provocar una disminución en los niveles de NO por medio del desacoplamiento de la eNOS, debido a que el anión superóxido reacciona con el NO formando peroxinitrito, el cual disminuye los niveles de  $BH_4$  (Fostermann y Li, 2011).

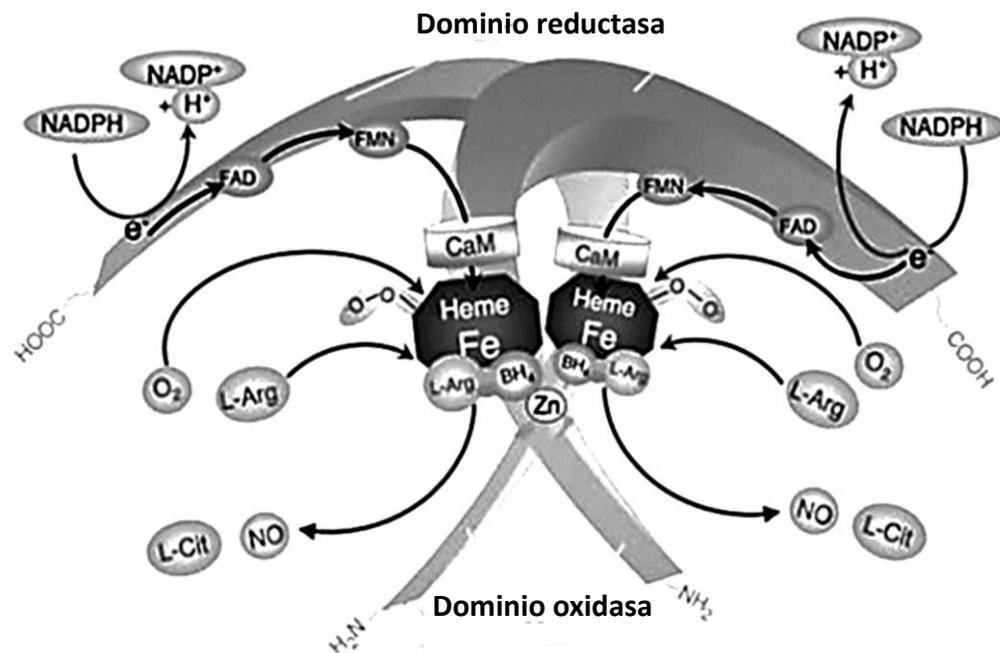


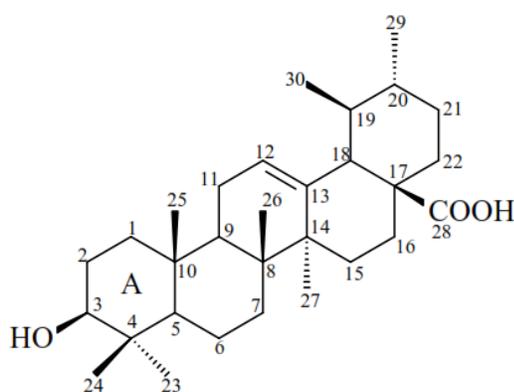
Figura 4. Estructura de la eNOS (modificado de Föstermann, 2006).

### 2.3. Tratamiento de la hipertensión

La terapia contra la HT abarca diferentes tipos de fármacos como los  $\beta$ -bloqueadores, los antagonistas ARaII (antagonistas a receptores de angiotensina II), los IECA (Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina), los diuréticos, simpaticolíticos de acción central (agonistas  $\alpha_2$ ) y vasodilatadores (Nicandro, 2008). El tratamiento de primera elección para la HT son los  $\beta$ -bloqueadores, recomendados para aquellos pacientes con falla cardíaca o síndrome agudo coronario conjuntamente con la hipertensión (Kuyper y col., 2014). Desafortunadamente, dicho tratamiento es relativamente costoso en México: un estudio realizado en 2009 determinó que el costo del tratamiento con ARA II representaba el 44.2 % del salario mínimo en México (Parra-Carillo y col., 2009), por lo que es importante la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que superen estas y otras dificultades.

## 2.4. La medicina tradicional como alternativa para el tratamiento de la HT

Aunque existen varios tratamientos farmacológicos para la HT, la medicina tradicional es una alternativa importante para el descubrimiento de nuevos fármacos que puedan actuar en contra de esta patología, brindando nuevos compuestos líderes, así como blancos terapéuticos novedosos. El ácido ursólico (AU) es un metabolito pentacíclico de naturaleza triterpénica presente en muchas especies de plantas distribuidas alrededor del planeta como manzana, albahaca, arándano, menta, romero, orégano y ciruela, cuya estructura se muestra en la Figura 5 (Ibarra-Alvarado y col., 2010). El AU es responsable de la actividad vasodilatadora atribuible a la especie *Prunus serotina*, empleada en la medicina tradicional (Ibarra-Alvarado y col., 2010). Por lo tanto, este compuesto de origen natural emerge como una opción interesante para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la hipertensión; además, se ha demostrado que los triterpenos constituyen un grupo importante de metabolitos activos de las plantas medicinales. Debido a lo anterior, existe un creciente interés en estudiar estas moléculas (Rios y col., 2012).



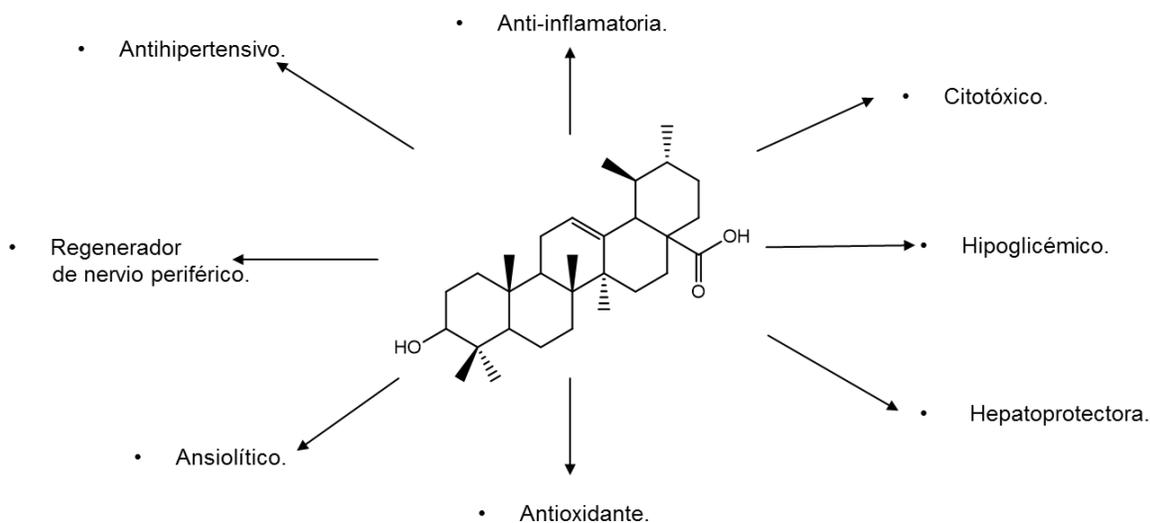
**Figura 5. Estructura química del ácido ursólico (Nascimento y col., 2014).**

El UA está constituido por un sistema policíclico, considerado una estructura privilegiada; que son aquellas estructuras químicas capaces de interactuar con diversos blancos y realizar acciones terapéuticas múltiples para el tratamiento de diversos procesos patológicos (Gutiérrez y Estévez, 2009). El AU presenta baja

solubilidad en agua lo que limita la biodisponibilidad de mismo, por lo que la creación de derivados que permitan mejorar sus características fisicoquímicas y farmacodinámicas, ha sido motivo de estudio en años recientes (Song y col., 2014). Los derivados del AU más comunes que se han estudiado son los productos de la esterificación ya sea del lado del grupo carboxilo en C-28 o del grupo hidroxilo en C-3. Estas derivatizaciones se realizan ya sea para corroborar si el extracto de una planta contiene AU, separarlo de su isómero el ácido oleanólico y/o mejorar las características fisicoquímicas o farmacológicas de la molécula, ya que la solubilidad de una molécula limita su eficacia como agente terapéutico (Zacchigna y col., 2014).

## 2.5. Actividades biológicas del ácido ursólico

Al contar con una estructura privilegiada, el AU cuenta con diversas actividades biológicas, mismas que se engloban de forma breve en la Figura 6 y en la Tabla 1.



**Figura 6. Actividades biológicas del ácido ursólico**

**Tabla 1. Actividades biológicas del ácido ursólico.**

<b>Actividad biológica</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencias</b>
<b>Anti-inflamatoria</b>	Inhibición de enzimas como la elastasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa, iNOS, así como inmunoregulación.	Hsu y col., 1997; Checker y col., 2012 y Chen y col., 2014.
<b>Actividad antioxidante</b>	Disminución de ROS, incremento de la actividad de GPx, SOD, catalasa y glutatión S-transferasa e inhibición de NOX4.	Somova y col., 2003; Yasutaka y col., 2008 y Ulleving y col., 2014.
<b>Actividad antibacteriana</b>	Sinergismo con antibióticos aminoglucósidos y actividad contra Gram positivas.	Nascimento y col., 2014 y Acebey y col., 2011.
<b>Actividad antitumoral</b>	Inhibición de la expresión de oncogenes e inducción de apoptosis.	Liu, 2005, Sharma y col., 2007; Yasutaka y col., 2008; Song y col., 2014, y Chen y col., 2014.
<b>Actividad antiprotozoaria</b>	Inhibición de la $\beta$ -hematina e interrupción de la homeostasis de $Ca^{+2}$ en <i>P. falciparum</i> .	Innocente y col., 2012 y Silva y col., 2013.
<b>Actividad hepatoprotectora</b>	Reversión de esteatosis hepática, lesión hepática y promoción de la expresión de metalotioneínas.	Lui y col., 1995; Liu, 2005; Yasutaka y col., 2008; Li y col., 2014 y Ulleving y col., 2014.
<b>Actividad ansiolítica</b>	Actuando como agonista del receptor GABA <sub>A</sub> .	Kazmi y col., 2013.
<b>Actividad hipoglicemiante</b>	Disminución de la glucosa pospandrial por la inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa.	Wu y col., 2014.

### 2.5.1. Actividad vasodilatadora

Algunos triterpenos tienen la capacidad de promover la expresión de eNOS, enzima responsable de la liberación de NO, factor fundamental para la homeostasis del endotelio. Adicionalmente, reducen la expresión de NADPH oxidasa, que es una enzima que juega un papel importante en el desacoplamiento de la eNOS, lo que desencadena un mal funcionamiento de ésta y, por tanto, la disminución de la síntesis de NO. También promueven la regresión al estado normal de la eNOS desacoplada. Estas actividades se han reportado en dos triterpenos principalmente, el ácido betulínico y el ácido ursólico (Föstermann y Li., 2010).

Se ha demostrado que el ácido ursólico es un buen agente vasodilatador ya que promueve la liberación de NO (Ibarra-Alvarado y col., 2010). Por otra parte, posee actividad diurética, natriurética y antioxidante, además de también disminuir el ateroma en aterosclerosis relacionada con hipertensión (Somova y col., 2003). Asimismo, en líneas celulares EAhy926 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , promueve la expresión de eNOS sin incrementar su actividad e inhibe la expresión de NOX4 (NADPH oxidasa 4), mientras que, a conc

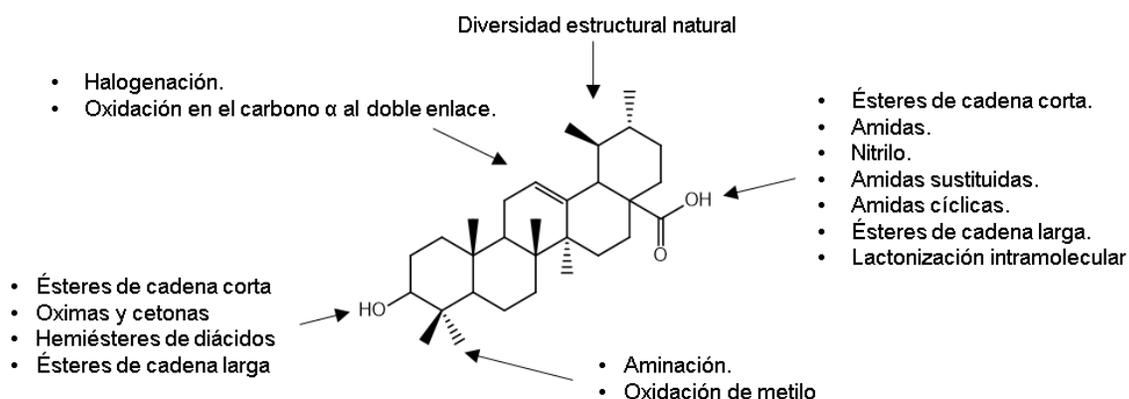
entraciones mayores, este compuesto incrementa la actividad de la eNOS (Steinkamp-Fenske y col., 2007).

La capacidad del ácido ursólico de ejercer un efecto vasodilatador se ha evaluado mediante el ensayo de aorta aislada de rata. El ácido ursólico mostró un  $\text{CE}_{50} = 44.15 \pm 6.1 \mu\text{M}$  y una  $\text{E}_{\text{max}} = 97.2 \pm 2.1 \%$  después de que la aorta fuera contraída con noradrenalina (NA), no observándose dicho efecto en el anillo de aorta sin endotelio. El uso de inhibidores de la eNOS como el L-NAME ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil éster) y de la guanilato ciclasa como el ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona) demostró la participación de estas enzimas en el efecto vasodilatador producido por el AU (Aguirre-Crespo y col., 2006). Luna-Vázquez y col., 2016, reportaron el efecto vasodilatador del UA aislado del extracto de diclorometano de *Prunus serotina* (*P. serotina*) mediante el ensayo de aorta aislada de rata con una  $\text{CE}_{50} = 47.1 \mu\text{M}$  y  $\text{E}_{\text{max}} = 97.2\%$  (Luna-Vázquez y col., 2016)

En un análisis SAR de varios triterpenos (*Structure-Activity Relationship*, Relación Estructura-Actividad) se encontró que para ejercer el efecto vasodilatador se necesita conservar el esqueleto pentacíclico, así como la presencia de aceptores de puentes de hidrógeno en el C-3 (Rios y col., 2012). Por otra parte, estudios de acoplamiento molecular (*docking*), indicaron que el carboxilo en el C-28 es importante para la interacción con la enzima eNOS (Luna-Vázquez y col., 2016).

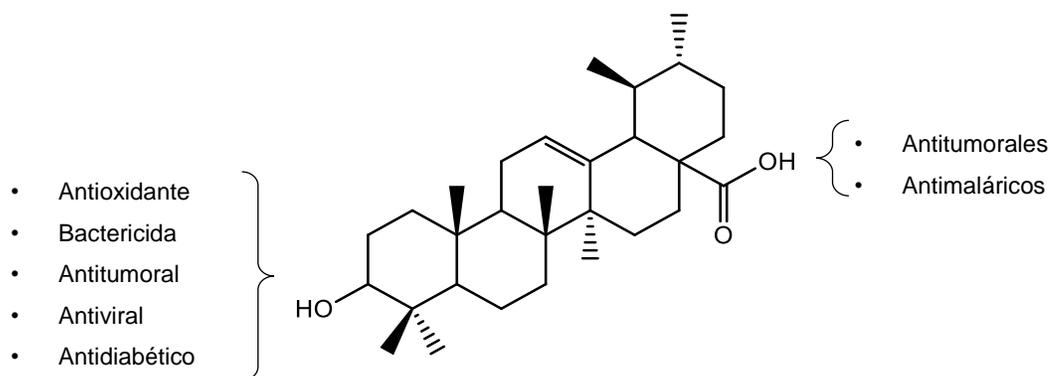
## 2.6. Modificaciones estructurales en el ácido ursólico

Las modificaciones realizadas en la estructura del AU se muestran en la Figura 7. Dichas modificaciones han sido dirigidas para mejorar alguna actividad biológica propia del AU. La posición de los metilos en la zona de diversidad estructural natural, distingue al ácido ursólico del ácido oleanólico: los metilos en posición *gem* del C-20 correspondería a la estructura del ácido oleanólico y los metilos en el C-19 y el C-20 pertenecen al ácido ursólico. Los diferentes derivados que han surgido de la optimización del ácido ursólico en el C-3 y el C-28 y que se han evaluado para observar su efecto biológico se enlistan en la Tabla 2.



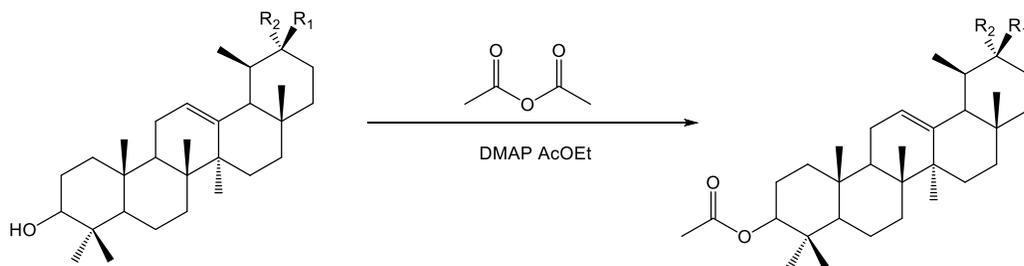
**Figura 7. Modificaciones estructurales del ácido ursólico.**





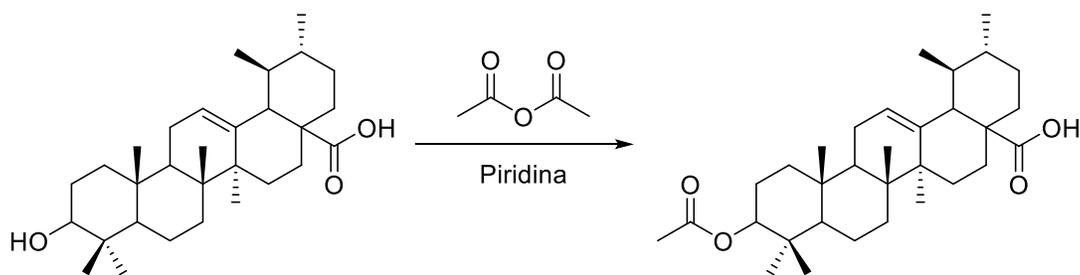
**Figura 8. Actividad biológica relacionada a modificaciones del ácido ursólico.**

Con respecto a la derivatización de triterpenos, se ha reportado, entre otras reacciones, la acetilación de la estructura triterpénica pentacíclica de la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -amirina, como se puede apreciar en la Figura 9, por medio de anhídrido acético, catalizado con 4-dimetilaminopiridina (DMAP) disuelto en acetato de etilo en reflujo (Soldi y col., 2008).



**Figura 9. Reacción de acetilación de la estructura triterpénica pentacíclica de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina con anhídrido acético.** La reacción fue catalizada por dimetil amino piridina (DMAP) disuelto en acetato de etilo,  $\alpha$ -amirina  $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ;  $\beta$ -amirina  $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$  (Soldi y col., 2008).

Por otra parte, también han reportado la acetilación del ácido ursólico con anhídrido acético y con piridina como solvente a temperatura ambiente y en agitación por 24 horas como se muestra en la Figura 10 (Nascimento y col., 2014).



**Figura 10. Reacción de acetilación del ácido ursólico (Nascimento y col., 2014).**

## **2.7. Herramientas computacionales para el desarrollo y evaluación de nuevas moléculas**

La química computacional generalmente se define como “Aquellos aspectos de la química que son explicados o realizados mediante ordenadores” y es una disciplina que se extiende de tal manera que rebasa los límites que separan a la química, la física, la biología y la computación, permitiendo la investigación de átomos, moléculas y macromoléculas mediante un sistema computacional, cuando la investigación de estos no se pueda realizar en el laboratorio por diversas cuestiones (económicas o de otra índole) (Briones, 2009). El objetivo de la química computacional consiste en obtener cada vez una mejor descripción de la geometría, la estructura electrónica y de la energía de los sistemas químicos de estudio y, por ende, una buena predicción de las propiedades físicas y químicas. En la Tabla 3 se presenta un resumen de los objetivos de la química computacional (Nicolás, 2009).

La química computacional permite a los investigadores estudiar fenómenos físicos y químicos mediante cálculos computacionales en lugar de examinar las reacciones y compuestos experimentalmente. Algunos métodos pueden utilizarse para modelar no solo moléculas estables, si no también, aquellas moléculas de vida corta, intermediarios inestables e incluso estados de transición (Foresman, 1996).

**Tabla 3. Aspectos y objetivos de la química computacional.**

<p><b>Aspectos de la química computacional</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelado molecular.</li> <li>• Métodos computacionales.</li> <li>• Diseño asistido por computadora: fármacos, síntesis orgánica, materiales, etc.</li> <li>• Quimioinformática: creación y búsqueda de bases de datos (Foresman, 1996).</li> </ul>
<p><b>Objetivos de la química computacional</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Representar a las moléculas en tres dimensiones de manera que puedan ser descritas por sus propiedades incluyendo la interpretación, caracterización y predicción de sus propiedades geométricas (distancias y ángulos de enlace), funciones de onda (orbitales naturales, coeficientes, mapas de contorno de orbitales moleculares) y energía (potencial de ionización, afinidad electrónica, energía electrónica, energía de interacción), entre otras (Nicolás, 2009)</li> <li>• Simula estructuras químicas y reacciones basadas en leyes fundamentales de la física o parte de ellas (Foresman, 1996).</li> </ul>

Las áreas de la química computacional están definidas por el nivel de teoría que son el fundamento de la misma: son la mecánica molecular o campo de fuerzas y la química cuántica. Dependiendo de la complejidad como el nivel de profundidad al cual se estudiarán las características del sistema químico a evaluar, se elige un nivel de teoría computacional, como se muestra en la Tabla 4 (Nicolás, 2009).

**Tabla 4. Fenómenos químicos y niveles de teoría recomendados para su estudio computacional.**

Fenómeno a observar	Nivel de teoría recomendado
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cálculo de propiedades electrónicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Química cuántica</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descripción de sistemas dinámicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mecánica molecular</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacciones químicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Química cuántica, métodos híbridos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacciones no covalentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Química cuántica, métodos híbridos o mecánica molecular</li> </ul>

### 2.7.1. Métodos de estructura electrónica (Química cuántica)

Estos métodos utilizan las leyes de la mecánica cuántica como base para el cálculo de las propiedades del sistema. La mecánica cuántica establece que la energía y otras propiedades relacionadas de una molécula se pueden obtener mediante la resolución de la ecuación de Schrödinger; dado que la solución exacta de dicha ecuación no es posible, ésta se resuelve haciendo diferentes aproximaciones o tomando parámetros derivados de la experimentación. Existen dos clases principales de métodos:

- Métodos semiempíricos. Usan parámetros derivados de datos experimentales para simplificar la resolución de la ecuación de Schrödinger. Algunos ejemplos son AM1, NNDO, MINDO3, PM3, PM6, etc.
- Métodos *ab initio*. No usan parámetros experimentales, están basados únicamente en los principios y leyes de la mecánica cuántica y se apoyan en constantes físicas como la velocidad de la luz, las masas y cargas de los electrones y núcleo, así como la constante de Planck, entre otras (Foresman, 1996).

Los cálculos semiempíricos son poco costosos y proveen descripciones cualitativas razonables de sistemas moleculares y una predicción cuantitativa bastante exacta de la energía y estructura de sistemas donde existe un buen grupo de parámetros. En contraste, los sistemas *ab initio* proveen una predicción cuantitativa de alta calidad para un amplio rango de sistemas, sólo limitado por la infraestructura computacional disponible, siendo posible incluso la descripción dinámica de sistemas macromoleculares (Foresman, 1996).

Un caso especial de los métodos *ab initio* son los basados en la teoría de funcionales de la densidad (DFT), que se distinguen de los métodos de correlación de electrones o Hartree-Fock, porque solucionan la ecuación de Schrödinger reemplazando la interacción real electrón-electrón por una interacción promedio o densidad (Jensen, 2007).

Por otra parte, los métodos híbridos constituyen la aplicación de diferentes niveles de descripción electrónica detallada de una zona del sistema químico (zona caliente) embebida en una zona de mayor tamaño y, que se estima, de poca influencia electrónica y, por tanto, descrita con un nivel menor de teoría (zona fría) (Foresman, 1996).

### **2.7.2. Mecánica molecular**

Esta usa las leyes clásicas de la física para predecir estructuras y propiedades de las moléculas. Existen diferentes métodos de mecánica molecular, cada uno de ellos caracterizado por su campo de fuerza:

- Un grupo de ecuaciones que definen cómo la energía potencial de las moléculas varía con la localización de los átomos que las componen.
- Definiciones de tipos de átomos, para determinar las características de un elemento dentro de un contexto químico específico.
- Uno o más grupos de parámetros que ajuste la ecuación y los tipos de átomos a los datos experimentales (Foresman, 1996).

Los cálculos de mecánica molecular no tratan explícitamente los electrones en un sistema molecular, en su lugar, se realizan cálculos basados en la interacción considerando a los átomos partículas con carga eléctrica. Los efectos electrónicos están implícitamente incluidos en campos de fuerza a través de la parametrización (Foresman, 1996).

Esta aproximación hace a los cálculos de mecánica computacional bastante económicos computacionalmente, y permite utilizarlos en sistemas muy grandes que contienen incluso miles de átomos. Aunque, también existen ciertas limitaciones, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- Cada campo de fuerza consigue buenos resultados para una clase limitada de moléculas relacionadas con aquellas para las cuales este campo fue diseñado.

- Los métodos de mecánica molecular no pueden tratar problemas químicos donde predominan los efectos electrónicos (Foresman, 1996).

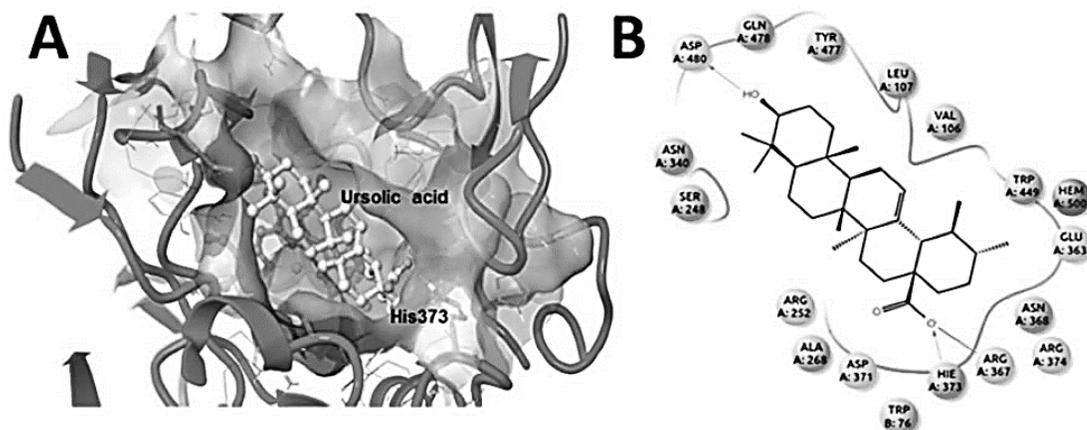
Una herramienta computacional muy útil en el estudio de sistemas bioquímicos y basada en los métodos de mecánica molecular es el acoplamiento molecular (*docking*).

### 2.7.3. Métodos de acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o *docking*, es una herramienta importante para el diseño de fármacos asistido por computadora. El objetivo de esta herramienta es predecir y caracterizar la conformación estructural predominante en la interacción de un ligando con una proteína que cuenta con una estructura tridimensional conocida. Presenta una variedad de usos y aplicaciones como el análisis de relaciones entre estructura química y actividad biológica (SAR), optimización de estructuras líder o búsqueda de compuestos en bibliotecas virtuales; además, provee información de cómo dos estructuras pueden interactuar entre ellas, permitiendo una aproximación y una predicción de lo que puede suceder en modelos biológicos reales. Para poder realizar un *docking* es necesario contar con la estructura cristalizada del ligando y la macromolécula diana. En caso que no se cuente con esta última, se pueden crear modelos basados en homología de proteínas conocidas y tener un modelo de la macromolécula diana viable para uso en *docking*. Esta herramienta necesita una función de puntuación denominada *score function* o función de evaluación para clasificar los modos de unión de los ligandos a las moléculas diana y, de esta manera, categorizar los resultados. Dicha función de evaluación generalmente está basada en ecuaciones de energía potencial similar a un campo de fuerza, por tanto, la obtención del mejor modo de unión del ligando y la molécula diana representa la estructura de mínima energía que, a su vez, es la más estable y la evaluación de resultados dependerá de la complementariedad química entre ligando y diana, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, puentes salinos, entre otras (Kukol, 2008). Los diferentes programas

computacionales permiten la posibilidad de utilizar diferentes niveles de precisión que van desde precisión estándar, alta precisión y el *docking* de mayor precisión, el acoplamiento molecular de ajuste inducido o *Induce-Fit Docking* (IFD).

Se han realizado estudios de acoplamiento molecular de algunos triterpenos, incluyendo al ácido ursólico, con la región catalítica del homodímero de la eNOS, indicando que esta molécula interacciona de manera directa con algunos aminoácidos de la eNOS, así como los tipos de interacción que se presentan (Rios y col., 2012; Luna-Vázquez y col., 2016) algunas de estas interacciones son de tipo puente de hidrógeno y puente salino, entre el ácido ursólico y la región catalítica del homodímero de la eNOS como se observa en la Figura 11 (Luna-Vázquez y col., 2016).



**Figura 11. Acoplamiento molecular del ácido ursólico con la región catalítica del homodímero de la eNOS (Luna-Vázquez y col., 2016).**

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la HT, surge la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades, tanto desde el punto de vista económico y del impacto en la salud pública.

La capacidad de los triterpenos para promover la expresión de eNOS e incrementar la liberación de NO, así como para disminuir el estrés oxidativo y, por tanto, la recuperación de la homeostasis endotelial en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (Föstermann y Li, 2011), aumenta la importancia en la obtención de derivados del ácido ursólico, que puedan servir para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de este tipo de patologías.

El hecho de que no se han evaluado ninguna de las modificaciones del ácido ursólico previamente mencionadas en su efecto vasodilatador, abre el panorama para investigar el potencial de ciertos derivados como agentes vasodilatadores. La modificación de una estructura privilegiada como lo es la del ácido ursólico podría modificar su actividad vasodilatadora. Se propone realizar esta modificación sobre el grupo OH en el C-3 ya que realizar modificaciones en el COOH del C-28, podría causar la pérdida de la actividad, debido a que éste grupo se ha propuesto como un centro importante en la interacción con la eNOS según estudios previos de *docking* (Luna-Vázquez y col., 2016).

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

*¿La modificación estructural del ácido ursólico, por medio de la esterificación del grupo OH en el C-3, promoverá un incremento en su actividad vasodilatadora?*

#### **5. HIPÓTESIS**

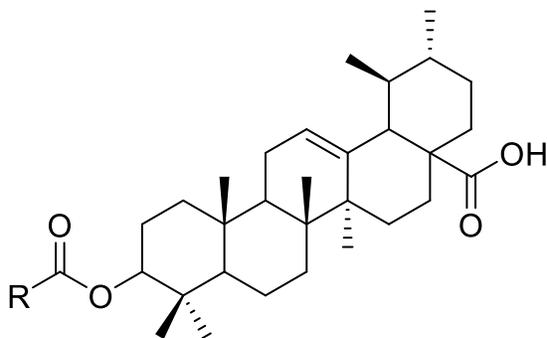
La esterificación del ácido ursólico en el OH del C-3 incrementará su actividad vasodilatadora, mediante un aumento de las interacciones con la enzima eNOS.

## 6. OBJETIVO GENERAL

- Sintetizar ésteres derivados del ácido ursólico y evaluar su actividad vasodilatadora en el modelo de aorta aislada de rata.

### 6.1. Objetivos específicos

- Sintetizar una serie homóloga de 5 ésteres del ácido ursólico.



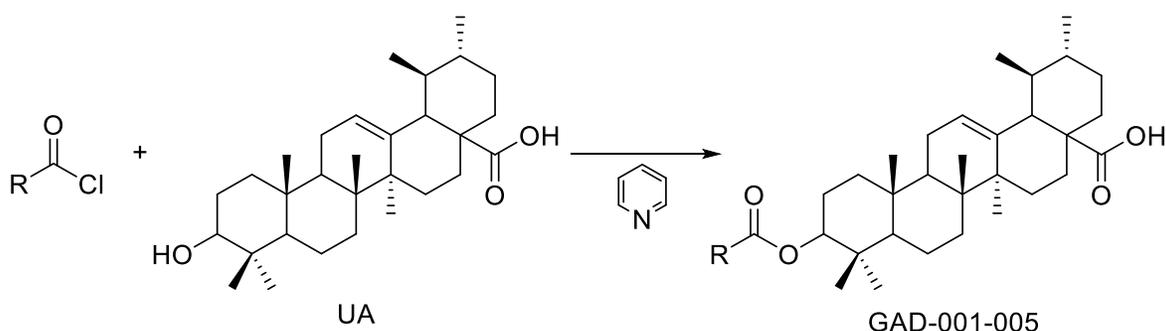
R	Compuesto
CH <sub>3</sub>	GAD-001
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	GAD-002
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	GAD-003
CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	GAD-004
CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	GAD-005

- Identificar por medio de acoplamiento molecular de ajuste inducido los tipos de unión de los compuestos derivados del ácido ursólico con la región catalítica del homodímero de la eNOS.
- Identificar los compuestos sintetizados mediante técnicas espectrométricas (espectrometría de masas) y espectroscópicas (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C).
- Evaluar la capacidad vasodilatadora de los compuestos sintetizados a partir del ácido ursólico mediante el modelo de aorta aislada de rata.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Síntesis orgánica e identificación estructural

La síntesis de la serie homóloga de ésteres de ácido ursólico se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. En la Figura 12 se observa la ruta de síntesis general planteada para la obtención de los derivados del ácido ursólico.



**Figura 12. Esquema general de la síntesis de los compuestos GAD-001-005.**

En este trabajo se utilizaron cloruros de ácido comerciales de número de carbonos correspondiente a los derivados propuestos (cloruro de acetilo, de propilo, de butirilo, de isobutirilo y de isovalerilo). La síntesis de los derivados se llevó a cabo siguiendo la metodología mostrada en la Figura 12: a temperatura ambiente, agitación constante y atmósfera de nitrógeno. Los métodos de purificación efectuados fueron cristalizaciones y posteriormente, se filtraron al vacío durante 2 h a temperatura ambiente, para obtener el producto seco.

Los solventes (J. T. Baker) y reactivos (Sigma-Aldrich) utilizados para la síntesis y purificación fueron de grado reactivo o de un grado de pureza mayor a 98 %, con excepción del ácido ursólico que fue del 90 %. Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de

aluminio de 5X2 cm, recubiertas con gel de sílice (Sigma-Aldrich), utilizando como sistema de elución una mezcla de hexano/cloroformo/acetato de etilo (50:35:15).

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un equipo Fisher T.E.M.S.A. modelo JTR-02 y no están corregidos.

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en el Instituto de Química Aplicada de la Universidad del Papaloapan, en colaboración con el Dr. Adolfo López Torres. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en un equipo Variant modelo MR-400 MHz serie 0191666413 a 400 MHz y 101 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente y se muestran en el Anexo I de este documento. Se utilizó el MestreNova™ Versión: 6.0.2 para el procesamiento de los FIDs; los desplazamientos químicos se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresaron en Hz. Se utilizó acetona deuterada como solvente. El análisis de masas se realizó por ionización en electrospray (EM-IES) en metanol y se obtuvo en el equipo Synapt G2-Si de Waters (Q-TOF). Todos los espectros fueron adquiridos a modo de ESI negativo. Se utilizó Masslynx como software de análisis.

## **7.2. Acoplamiento molecular de ajuste inducido**

La evaluación de la interacción de los derivados de ácido ursólico con la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial, se llevó a cabo en el programa computacional Maestro 10.4 de Schrödinger (Schrödinger Release 2015-4: Maestro, v.10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015). En dicho programa se realizaron los procesos de preparación de las estructuras de la proteína, de los ligandos y el cálculo de acoplamiento molecular en diferentes modalidades.

## **7.2.1. Estructuras de los ligandos y la molécula diana.**

### **7.2.1.1. Construcción y preparación de las estructuras del ácido ursólico y los compuestos GAD-001-005.**

La estructura cristalográfica del ácido ursólico se encuentra disponible en la base de datos *PubChem Substance and Compound Database* (PubChem, 2016) a través del número de identificación de sustancias CID: 64945, la cual se usó como base para la construcción virtual de la serie homóloga de los compuestos GAD-001 hasta GAD-005. Se obtuvo la conformación de mínima energía y estado de ionización a pH de 7.0 del ácido ursólico y sus 5 derivados mediante el módulo *Ligand preparation* disponible en Maestro 10.4. (Schrödinger Release 2015-4: LigPrep v.3.6, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015).

### **7.2.1.2. Preparación de la estructura de la óxido nítrico sintetasa endotelial.**

En el caso de la óxido nítrico sintetasa endotelial, se obtuvo la estructura tridimensional de la parte catalítica de la eNOS de *H. sapiens* en la base de datos pública "Protein Data Bank" (PDB) con código PDB: 3NOS (Fischmann y col., 1999). A esta estructura se le removieron las moléculas de agua, iones y coadyuvantes de cristalización presentes en la estructura, a excepción de los cofactores necesarios para la función de la proteína (BH<sub>4</sub> y el grupo hemo) y el sustrato natural (L-arginina). Se asignó un estado apropiado de protonación a pH de 7.0, y se realizó una minimización de energía para la relajación de la estructura. Este proceso de preparación se realizó a través del módulo *Protein Preparation Wizard* disponible en el programa Maestro 10.4 (Schrödinger Release 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Protein Preparation Wizard; Epik v.3.4; Impact v.6.9; Prime v. 4.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015).

### 7.2.2. Acoplamiento molecular.

El estudio de los tipos de interacción entre el ácido ursólico y sus derivados con la región catalítica del homodímero de la eNOS se efectuó mediante *docking* realizado en el módulo *Glide* (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-4: *Glide*, v.6.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015). Este acoplamiento molecular se situó utilizando los residuos identificados como relevantes para la unión de triterpenos de tipo ursano descritos en trabajos previos (Rios y col., 2012, Luna-Vázquez y col., 2016); asimismo, se llevaron a cabo utilizando los niveles de precisión estándar (SP) y alta precisión (XP) (Schrödinger Release 2015-4: Maestro, versión 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015).

Posteriormente, los resultados obtenidos por acoplamiento de alta precisión se utilizaron para estudiar la influencia que tienen estos compuestos sobre el sitio de unión encontrado. Estos estudios de acoplamiento molecular de ajuste inducido se realizaron según el protocolo *Induced-Fit Docking* disponible en Maestro 10.4 (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-4: Schrödinger Suite 2015-4 Induced Fit Docking protocol; *Glide* v.6.9; Prime v.4.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015, Schrödinger Release 2015-4: Maestro, versión 10.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015).

De todas las conformaciones que el estudio arrojó, fueron tomadas en cuenta aquellas que tuvieron una diferencia menor a 1 kcal/mol con respecto a la conformación estructural que presentó el menor *IFD-Score* para cada compuesto. El *IFD-Score* es la manera en la que el programa define cuál es la conformación estructural de mayor estabilidad.

### **7.3. Evaluación Farmacológica de los derivados**

#### **7.3.1. Mantenimiento y manejo de animales de experimentación.**

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (250-300 g). Las ratas se mantuvieron el menor tiempo posible (menos de 4 días) en un espacio especial para mantenimiento temporal de animales de experimentación en la planta baja del edificio 2 de la Facultad de Química de la UAQ (NOM-062-ZOO-1999 apartado 6.1), en jaulas de acrílico con condiciones de agua y alimento *ad libitum* (NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.1). Los residuos peligrosos biológico-infecciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SSA-2002 por un periodo no mayor a 30 días. Posteriormente, se contrató un servicio especial dedicado al tratamiento y procesamiento de estos residuos.

### 7.3.2. Ensayo de aorta aislada de rata

Las ratas Wistar macho (275-325 g) se sacrificaron por decapitación y se extrajo la aorta descendente para posteriormente colocarla en solución oxigenada de Krebs-Henseleit enfriada con hielo de la siguiente composición: NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, y 5 mM D-glucosa (pH 7.4). La aorta se lavó inmediatamente con solución de Krebs-Henseleit para prevenir la formación de coágulos intravasculares. Libre de tejido conectivo y adiposo, la aorta se diseccionó en segmentos de 4 a 5 mm, los cuales se montaron entre ganchos de acero inoxidable y fueron colocados en cámaras de incubación con solución de Krebs-Henseleit a 37.2 °C y burbujeo constante de carbógeno.

Los tejidos se dejaron equilibrar durante 30 min bajo una tensión de reposo de 1.5 g. Durante este período, el medio se cambió cada 10 min. Después del ajuste final de la tensión de reposo pasiva a 1.5 g, los segmentos aórticos se contrajeron con KCl 100 mM. Una vez que se alcanzó un tono contráctil estable, se cambió el medio para restaurar una tensión de reposo de 1.5 g.

Posteriormente, los tejidos fueron contraídos con 1 μM L-fenilefrina y se tomó la contracción como el 100 %. Se construyeron las curvas concentración-respuesta adicionando de manera acumulativa los diferentes derivados (1-1000 μg/ml). La tensión isométrica se mide generalmente con un transductor de fuerza-desplazamiento Grass FT03 unido a un polígrafo Grass 7D. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de la contracción inicial conseguida con fenilefrina (Ibarra-Alvarado y col., 2010).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Síntesis de derivados del ácido ursólico y su identificación estructural

A partir de ácido ursólico (Sigma-Aldrich) se obtuvo la serie homóloga de los 5 derivados con un rendimiento aceptable, con excepción de GAD-005 que presentó un rendimiento bajo, como se observa en la Tabla 5. Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como los espectros de masas, se presentan en el Anexo I, en los cuales se identificaron las señales relevantes que hicieron posible la identificación del compuesto tomando como base la información bibliográfica reportada con anterioridad (Seebacher y col., 2003; Silva y col., 2013; Nascimento y col., 2014), y la predicción por MestreNova. El punto de fusión de GAD-005 no se determinó debido al bajo rendimiento que se obtuvo.

**Tabla 5. Rendimiento de la síntesis de los derivados del ácido ursólico.**

Compuesto	Rendimiento (%)	Rendimiento (mg, mmol)	Punto de fusión (°C)
<b>GAD-001</b>	88.0	26.4, 0.05	242
<b>GAD-002</b>	76.6	25.5, 0.049	286-290
<b>GAD-003</b>	93.9	29.1, 0.055	254-258
<b>GAD-004</b>	88.2	27.7, 0.052	282-284
<b>GAD-005</b>	14.7	4.4, $8 \times 10^{-3}$	N.D.

N.D.: No determinado

En los espectros de masas de los cinco compuestos sintetizados se realizaron 3 análisis: en verde se presenta el análisis por TOF con ventana espectral de 200 a 1000 m/z, fragmento principal [ $\text{M}^- - 1$ ], ion molecular [ $\text{M}^-$ ], dianión molécula [ $\text{M}^- / 2$ ]. Este último se presenta por una doble ionización de la molécula. En morado el

análisis MS/MS (no necesariamente es fragmentación), donde se filtró el ion de interés con el cuadrupolo (Q-TOF) y en negro la fragmentación del ion molecular, el cual es muy estable, con una energía de colisión de 50 eV; se observa el ion molecular  $[M^+]$  y la pérdida del grupo aciloxi y dos hidrógenos (Anexo I, Figura 11', 12', 13', 14' y 15').

A continuación, se describen las rutas sintéticas definitivas, los rendimientos obtenidos y las señales relevantes para la identificación estructural para cada compuesto sintetizado. Los carbonos e hidrógenos de la cadena alquílica del grupo acilo se representan como 1', 2', 3', 4' y 5', dependiendo del compuesto en cuestión.

#### **8.1.1. GAD-001.** Ácido 3 $\beta$ -acetoxi-urs-12-en-28-oico.

Se colocaron 30 mg (0.065 mmol) de AU en un matraz de reacción de 4 mL y se disolvieron en 1500  $\mu$ L de diclorometano y 100  $\mu$ L de piridina. Posteriormente se hicieron reaccionar con 25  $\mu$ L de cloruro de acetilo. La reacción se llevó a cabo en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 24 h, la mezcla de reacción se lavó con una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 %, la fase orgánica fue secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posteriormente recristalizada para obtener 26.4 mg del producto GAD-001 (0.053 mmol, rendimiento del 88 %). La masa molecular exacta calculada fue de 498.37 g/mol, que coincide con el ion molecular en 498.39 m/z  $[M^+]$  encontrado por EM-IES. Señales relevantes para la identificación en RMN: RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, acetona-d, ppm) 10.42 (s, 1H, COOH), 5.22 (t,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-12), 4.45 (dd,  $J = 11.2, 5.1$  Hz, 1H, H-3), 1.99 (s, 3H, H-2'); RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, acetona-d, ppm) 178.72 (COOH), 170.83 (RCOOR), 139.43 (C-13), 126.20 (C-12), 81.13 (C-3), 39.94 (C-20), 39.08 (C-19), 21.21 (C-2'), 19.06 (C-29), 17.78 (C-30).

### 8.1.2. GAD-002. Ácido 3β-(propioniloxi)urs-12-en-28-oico.

Se colocaron 33.3 mg (0.072 mmol) de AU en un matraz de reacción de 4 mL los cuales se disolvieron en 200 µL de piridina y se hicieron reaccionar con 100 µL de cloruro de propionilo, transcurridas 24 h de reacción, se realizó una segunda adición de 200 µL de piridina y de 100 µL de cloruro de propionilo. En un segundo matraz se hicieron reaccionar 15 mg (0.029 mmol) de UA empleando las condiciones de reacción antes mencionadas. Ambas reacciones se llevaron a cabo en agitación constante a temperatura ambiente y atmosfera de nitrógeno. Después de 48 h de reacción, la mezcla se cristalizó con una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 %, posteriormente se filtró al vacío durante 2 h para obtener 25.5 mg (0.049 mmol) y 11.5 mg (0.022 mmol), respectivamente, del producto GAD-002 (rendimientos del 76.57 % y 76 %). La masa molecular exacta calculada de 512.3866 g/mol, que coincide con el ion molecular en 512.41 m/z [M<sup>+</sup>] por EM-IES. Señales relevantes para la identificación en RMN: RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, acetona-d, ppm) 5.23 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-12), 4.48 (dd, *J* = 11.1, 5.1 Hz, 1H, H-3), 2.36 – 2.27 (m, 2H, H-2'); RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, acetona-d, ppm) 177.69 (COOH), 173.10 (RCOOR), 138.42 (C-13), 125.19 (C-12), 79.92 (C-3), 38.07 (C-19), 36.75 (C-20), 27.54 (C-2'), 18.04 (C-29), 16.66 (C-30), 8.70 (C-3').

### 8.1.3. GAD-003. Ácido 3β-(butanoiloxi)urs-12-en-28-oico.

Para la síntesis de GAD-003 se siguieron las mismas condiciones mencionadas en la síntesis de GAD-002 utilizando 31 mg (0.067 mmol) y 21.2 mg (0.046 mmol) de AU y cloruro de butirilo. Después de 48 h de reacción, la mezcla se cristalizó con una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 %, posteriormente se filtró al vacío durante 2 h para obtener 29.1 mg (0.055 mmol) y 17.3 mg (0.032 mmol), respectivamente, del producto GAD-003 (rendimientos del 93.87 % y 81.6 %). La masa molecular exacta calculada de 526.40 g/mol, que coincide con el ion molecular en 526.42 m/z [M<sup>+</sup>] por EM-IES. Señales relevantes para la identificación por RMN: RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz,

acetona-d, ppm) 5.23 (t,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-12), 4.48 (dd,  $J = 11.0, 5.2$  Hz, 1H, H-3), 2.31 – 2.22 (m, 4H, H-2'), 1.71 – 1.57 (m, 9H, H-26, H-27, H-3'); RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, acetona-d, ppm) 178.63 (COOH), 173.06 (RCOOR), 139.19 (C-13), 125.98 (C-12), 80.69 (C-3), 39.71 (C-19), (C-20), 36.83 (C-2'), 19.10 (C-29), 17.56 (C-3'), 17.45 (C-30), 13.80 (C-4').

#### **8.1.4. GAD-004.** Ácido 3 $\beta$ -[(2-metil)propioniloxi]urs-12-en-28-oico.

Para la síntesis de GAD-004 se siguieron las mismas condiciones mencionadas en la síntesis de GAD-002 utilizando 31.4 mg (0.068 mmol) y 14.7 mg (0.032 mmol) de UA y cloruro de isobutirilo. Después de 48 h de reacción, la mezcla se cristalizó con una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 %, posteriormente se filtró al vacío durante 2 h para obtener 27.7 mg (0.052 mmol), para el segundo matraz de reacción se lavó con una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 %; posteriormente, se disolvió en acetona y se cristalizó con agua destilada fría, se filtró y lavó con agua destilada fría para obtener 6 mg (0.011 mmol) respectivamente, del producto GAD-004 (rendimientos del 88.21% y 40.81%). La masa molecular exacta calculada de 526.40 g/mol, que coincide con el ion molecular en 526.41 m/z [M<sup>-</sup>] por EM-IES. Señales relevantes para la identificación por RMN: RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, acetona-d, ppm) 10.37 (s, 1H, COOH), 5.23 (t,  $J = 3.6$  Hz, 1H, H-12), 4.46 (dd,  $J = 11.3, 4.9$  Hz, 1H, H-3), 2.53 (h,  $J = 13.9, 6.9$  Hz, 1H, H-2'), 1.14 (d,  $J = 7.1, 1.1$  Hz, 3H, H-3', H-4'); RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, acetona-d, ppm) 178.67 (COOH), 176.62 (RCOOR), 139.47 (C-13), 126.24 (C-12), 80.80 (C-3), 39.98 (C-19), 39.09 (C-20), 33.94 (C-2'), 19.07 (C-29), 17.81 (C-30), 17.70 (C-3', C-4').

### 8.1.5. GAD-005. Ácido 3 $\beta$ -[(3-metil)butanoiloxi]urs-12-en-28-oico.

Se disolvieron 30 mg (0.065 mmol) de AU en 1500  $\mu$ L de diclorometano y 100  $\mu$ L de piridina, se hicieron reaccionar con 25  $\mu$ L de cloruro de isovalerilo. La reacción se llevó a cabo en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 24 h, la mezcla de reacción se lavó con una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %, fue secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posteriormente recristalizada para obtener 4.4 mg (8x10<sup>-3</sup> mmol) del producto GAD-005 (rendimiento del 14.7 %). La masa molecular exacta calculada de 540.42 g/mol, que coincide con el ion molecular en 540.44 m/z [M<sup>-</sup>] por EM-IES. Señales relevantes para la identificación por RMN: RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, acetona-d, ppm) 10.30 (s, 1H, COOH), 5.19 – 5.11 (m, 1H, H-12), 4.41 (S, 1H, H-3), 2.13 – 2.07 (m, 3H. H-2', H-3'), 0.92 (s, 6H, H-4', H-5'); RMN-<sup>13</sup>C (101 MHz, acetone-d, ppm) 178.69 (COOH), 172.77 (RCOOR), 139.44 (C-13), 126.20 (C-12), 80.99 (C-3), 43.00 (C-2'), 39.79 (C-19), 37.71 (C-20), 26.55 (C-3'), 22.78 (C-4'), 22.70 (C-5'), 19.07 (C-29), 17.78 (C-30).

## 8.2. Acoplamiento molecular de ajuste inducido (IFD)

La Tabla 6 presenta los *IFD-Score*, los cuales nos indican la posible afinidad teórica de los derivados con la región catalítica del homodímero de la eNOS, así como los tipos de interacciones y los aminoácidos involucrados.

**Tabla 6. *IFD-Score* de los derivados y los tipos de interacciones con los diferentes aminoácidos involucrados en la interacción con la eNOS.**

Compuestos	IFD Score (kcal/mol)	Interacciones	
		Aminoácidos	Tipo
GAD-004	-1764.620	ASN 338 ARG 242	Puente de hidrógeno y puente salino
GAD-003	-1753.706	ARG 250 GLN247	Puente salino y puente de hidrógeno
GAD-002	-1753.612	GLN 247 ARG 250	Puente de hidrógeno y puente salino
GAD-001	-1752.989	Sustrato SER 246	Puente de hidrógeno
GAD-005	-1752.895	ARG 242 ASN 338	Puente salino y puente de hidrógeno
AU	-1752.189	Sustrato GLN 247	Puente de hidrógeno

Se obtuvieron diferentes estructuras en el IFD; sin embargo, se tomaron en cuenta solo aquellas estructuras que tuvieran el *IFD-Score* más negativo, ya que esto indica la afinidad teórica de la molécula: mientras menor sea el número, más afín será la molécula con la enzima debido a que se calcula como ciclo termodinámico, aunque este número no tiene representación física real.

### 8.2.1. GAD-001. Ácido 3β-acetoxi-urs-12-en-28-oico.

GAD-001 presentó 4 estructuras posibles de interacción con la enzima. En la Figura 13 se muestra la conformación estructural más estable, donde se puede apreciar las interacciones tipo puente de hidrógeno de la cadena lateral del sustrato (HAR 512) y el aminoácido serina 246 con el carboxilo de GAD-001. El éster se encuentra en exposición al solvente (sombra gris) y no participa en una interacción directa con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero, mientras el grupo carboxilo en C-28 se orienta hacia el centro catalítico.

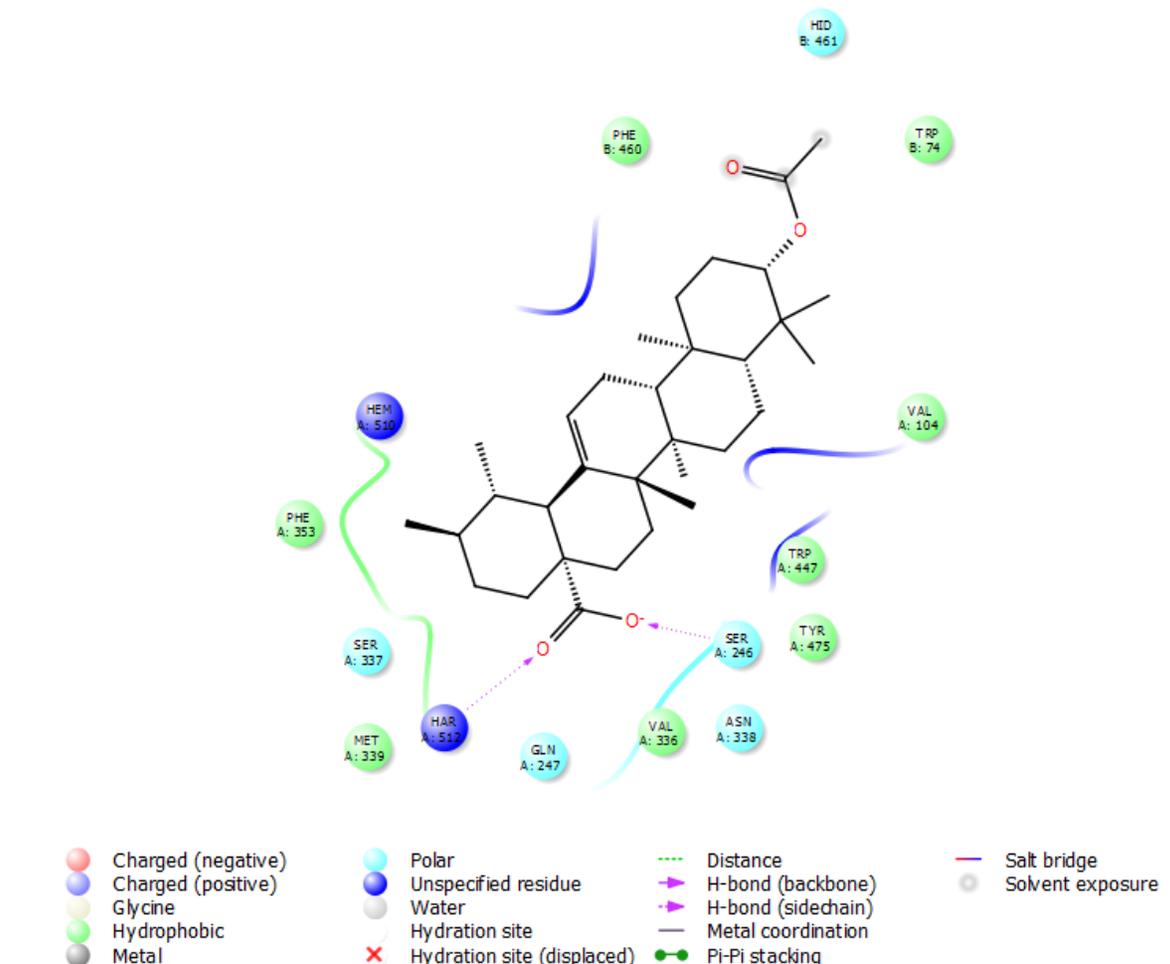


Figura 13. Interacciones de GAD-001 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS.

### 8.2.2. GAD-002. Ácido 3 $\beta$ -(propioniloxi)urs-12-en-28-oico.

GAD-002 presentó 6 posibles conformaciones para interactuar con eNOS. En la Figura 14 se muestra la conformación más estable, la cual presenta interacción tipo puente de hidrógeno y puente salino del aminoácido glicina 247 y arginina 250, respectivamente, con el carboxilato de GAD-002. Los carbonos de la cadena del éster presentan interacción con el solvente (sombra gris) y no participa de manera directa en la interacción con algún aminoácido de la eNOS, orientándose hacia el canal de entrada al sitio catalítico de la enzima.

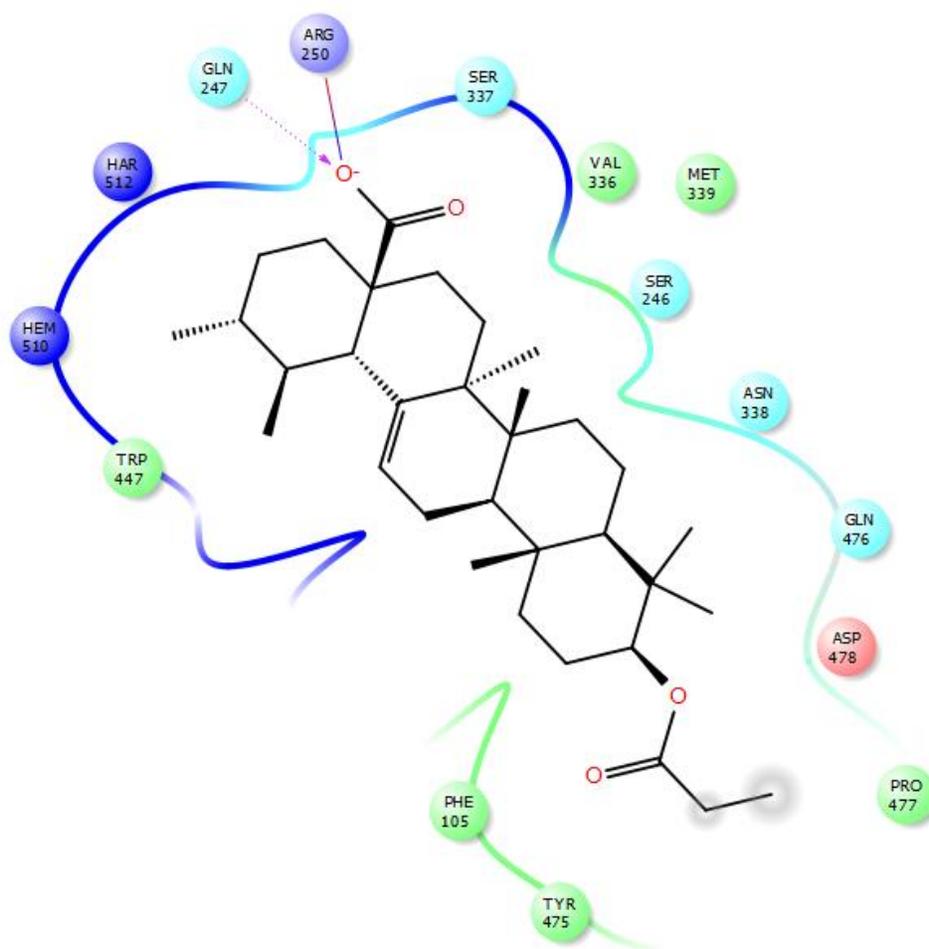


Figura 14. Interacciones de GAD-002 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS.

### 8.2.3. GAD-003. Ácido 3 $\beta$ -(butanoiloxi)urs-12-en-28-oico.

GAD-003 presentó 6 posibles conformaciones para interactuar con la eNOS. En la Figura 15 se muestra la conformación más estable, donde se puede apreciar la interacción tipo puente de hidrógeno y puente salino de la glicina 247 y la arginina 250, respectivamente, con el carboxilato de GAD-003. Los carbonos de la cadena del éster presentan una exposición al solvente (sombra gris) y no participa de manera directa en la interacción con los aminoácidos de la eNOS. El grupo éster se orienta hacia el canal de entrada al sitio catalítico del homodímero.

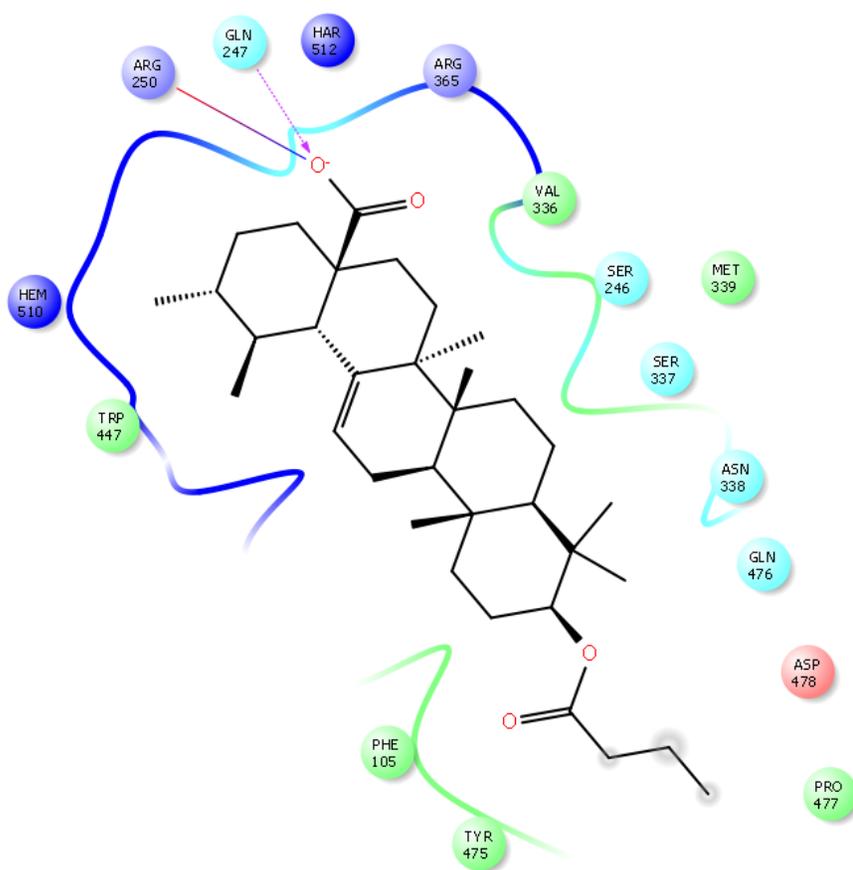


Figura 15. Interacciones de GAD-003 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS.

#### 8.2.4. GAD-004. Ácido 3β-[(2-metil)propioniloxi]urs-12-en-28-oico.

GAD-004 presentó 2 posibles conformaciones para interactuar con la eNOS. En la Figura 16 se muestra la conformación más estable, se puede apreciar la interacción tipo puente de hidrógeno del aminoácido asparagina 338 con el oxígeno del carboxilo de GAD-004 y un puente salido de la arginina 242 con el carboxilato. Se aprecia que algunos de los carbonos de la cadena del éster presentan exposición al solvente (sombra gris) y no participa de manera directa en la interacción con los aminoácidos de la eNOS y se orienta hacia el centro catalítico del homodímero.

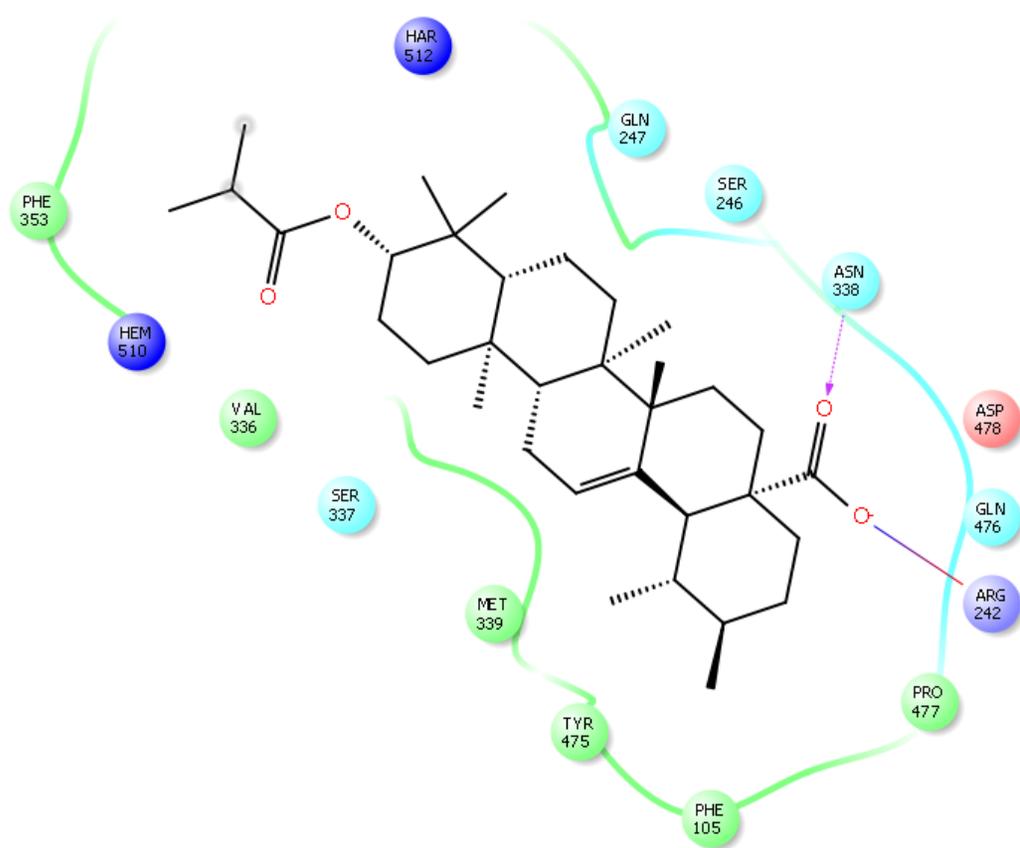


Figura 16. Interacciones de GAD-004 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS.

### 8.2.5. GAD-005. Ácido 3 $\beta$ -[(3-metil)butanoiloxi]urs-12-en-28-oico.

GAD-005 presentó 11 posibles conformación para interactuar con la eNOS. En la Figura 17 se muestra la conformación más estable. Se puede apreciar la interacción de tipo puente salino y puente de hidrógeno de la arginina 242 y la asparagina 338, respectivamente, con el carboxilato de GAD-005. El éster, por su parte, no presenta interacción directa con los aminoácidos de la eNOS y se orienta hacia el centro catalítico del homodímero.

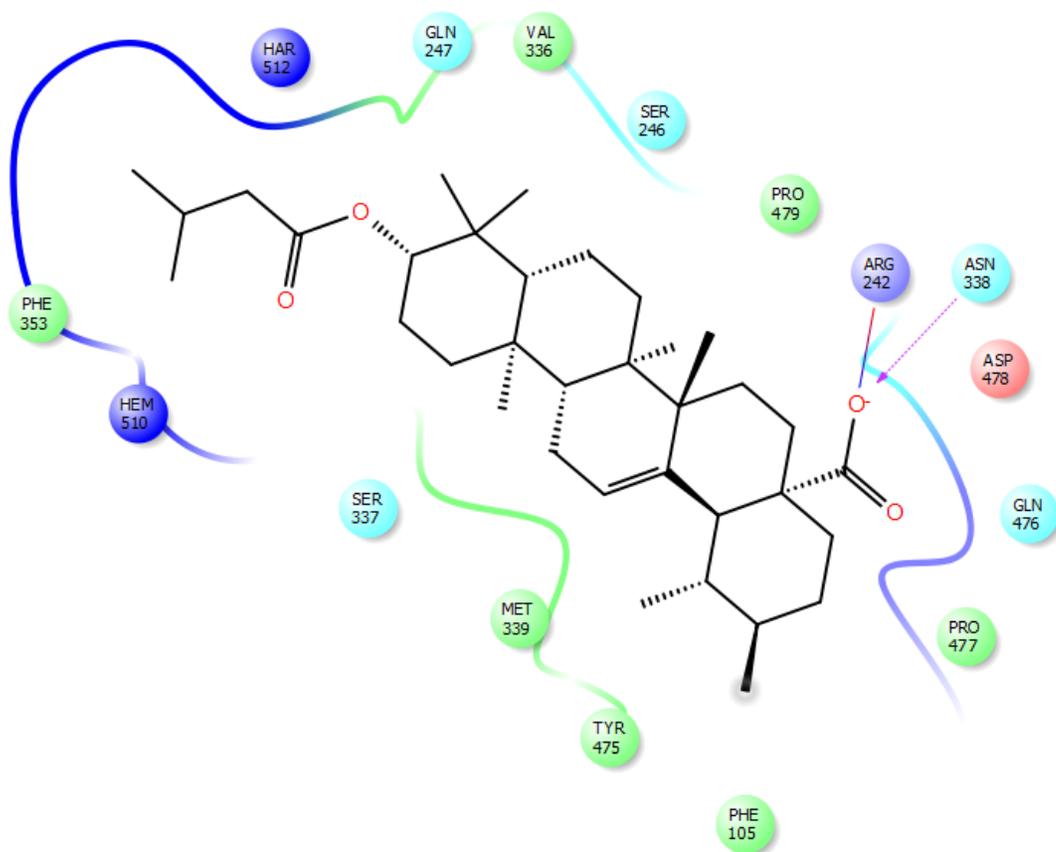


Figura 17. Interacciones de GAD-005 con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS.

### 8.2.6. Ácido ursólico.

El ácido ursólico presentó 6 conformaciones estructurales para interactuar con la eNOS. En la Figura 18 se muestra la conformación más estable, la cual presenta interacciones tipo puente de hidrógeno del aminoácido glicina 247 con el carboxilato y del sustrato natural, L-arginina (HAR-512), con el oxígeno del carboxilo del AU. El grupo hidroxilo se orienta hacia el canal de entrada del sustrato de la eNOS.

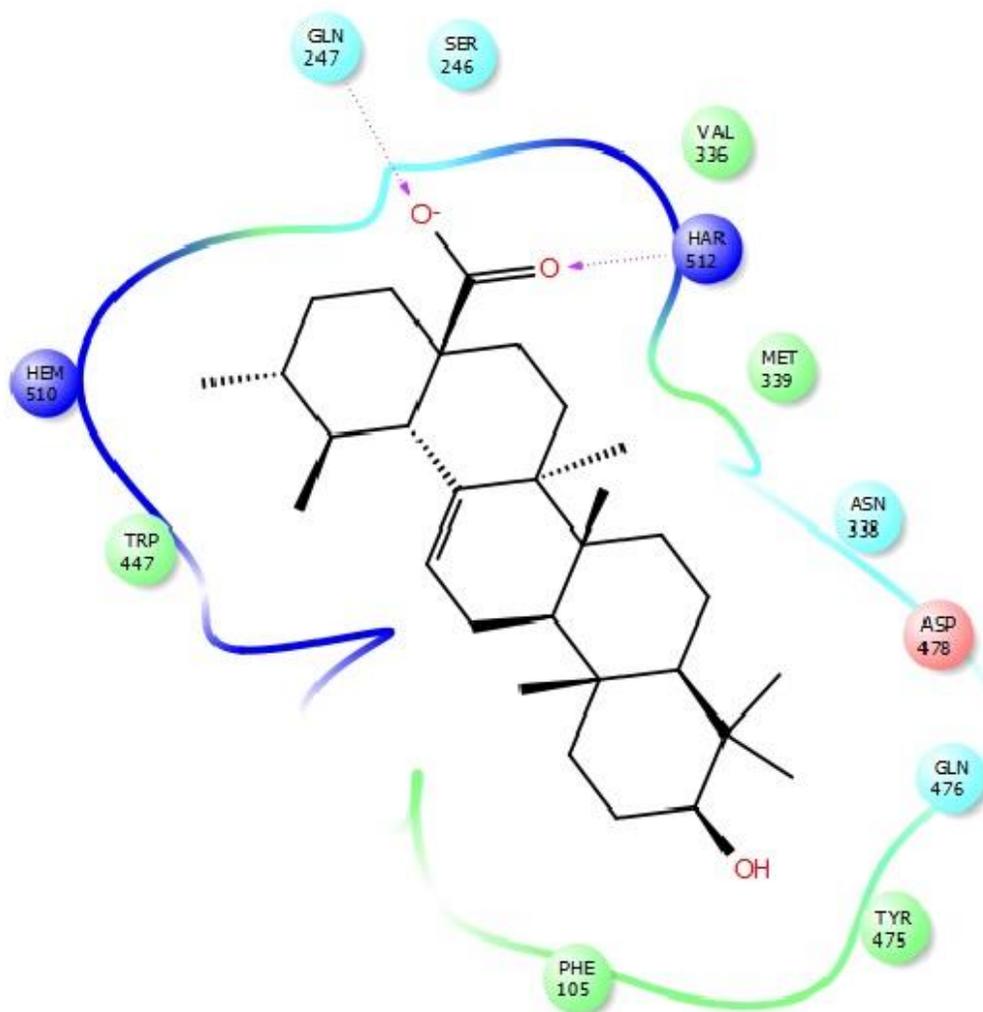


Figura 18. Interacciones del ácido ursólico con los aminoácidos de la región catalítica del homodímero de la eNOS.

### 8.3. Evaluación farmacológica.

La construcción de las curvas concentración-respuesta del efecto vasodilatador producido por los derivados del ácido ursólico sintetizados, permitió calcular la CE50 (concentración efectiva 50) así como el Emin y Emax (efecto mínimo y efecto máximo). La Tabla 7 resume estos datos.

**Tabla 7. Porcentaje de relajación y CE50 de los compuestos obtenidos mediante el ensayo de aorta aislada de rata.** Los datos de GAD-005 no fueron determinados debido al rendimiento obtenido en su síntesis.

Compuesto	CE50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SEM	Emin (%) $\pm$ SEM	Emax (%) $\pm$ SEM
AU	21.57 $\pm$ 1.31	8.48 $\pm$ 4.84	97.2 $\pm$ 3,95
GAD-001	173.6 $\pm$ 2.02	5.36 $\pm$ 3.01	45.61 $\pm$ 8.27
GAD-002	49.78 $\pm$ 1.38	5.28 $\pm$ 1.59	35.94 $\pm$ 2.03
GAD-003	11.93 $\pm$ 1.40	2.68 $\pm$ 3.13	42.03 $\pm$ 1.83
GAD-004	52.50 $\pm$ 1.37	8.93 $\pm$ 2.30	54.70 $\pm$ 3.01
GAD-005	ND	ND	ND

N.D.: No determinado.

En la Figura 19 se presenta la gráfica del efecto vasodilatador de los compuestos sintetizados y del ácido ursólico. Todos los compuestos evaluados (GAD-001-004) relajaron la aorta de rata de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, las modificaciones estructurales redujeron más del 45 % el efecto vasodilatador producido por el ácido ursólico ( $p < 0.05$ ). El derivado que presentó mayor efecto vasodilatador fue GAD-004 con una Emax de 54.70  $\pm$  3.01 %.

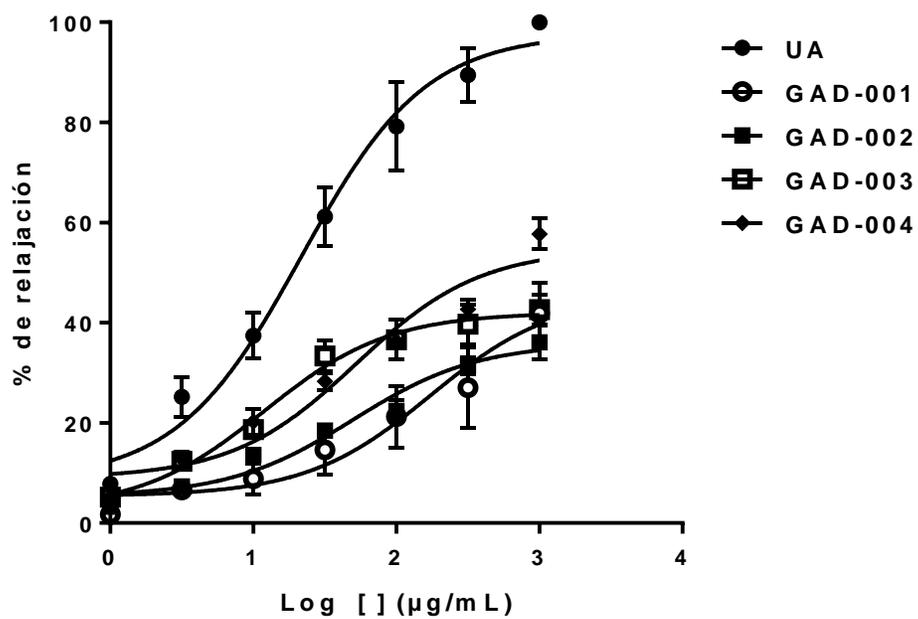
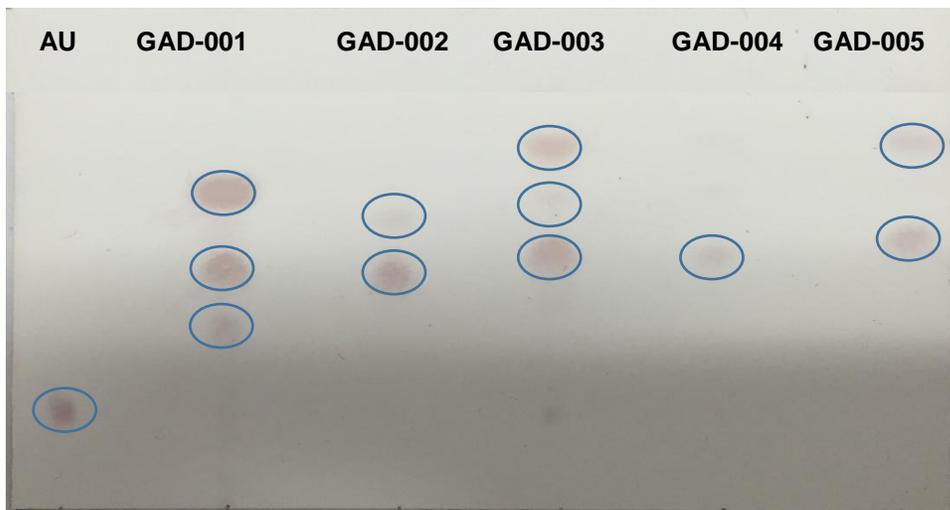


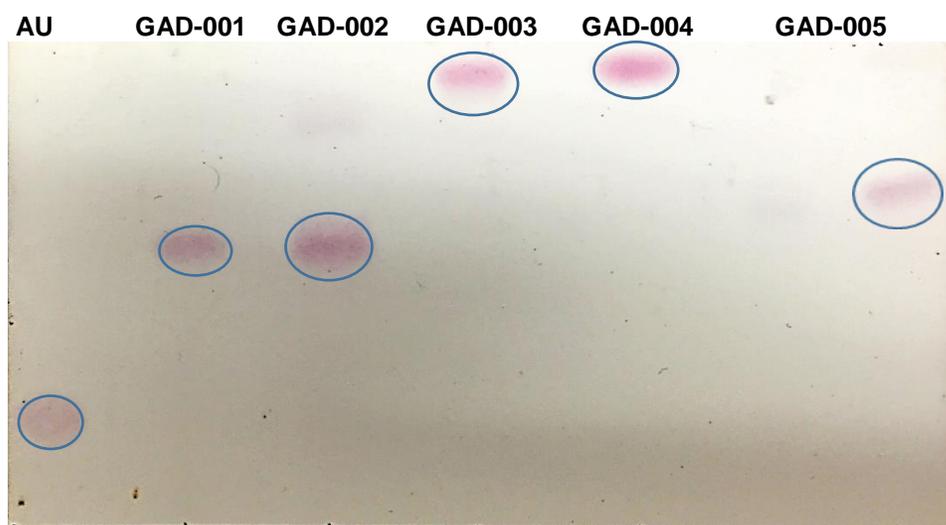
Figura 19. Curva de concentración-respuesta del efecto vasodilatador de los compuestos sintetizados (GAD-001-004) y del ácido ursólico.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Obtener la ruta de síntesis y los procedimientos de purificación adecuados de los cinco derivados de ácido ursólico fue un reto debido a las dificultades que se presentaron antes de llegar a la ruta sintética definitiva. Se evaluaron diferentes métodos sintéticos caracterizados por el uso de diferentes solventes como 1,4-dioxano, acetonitrilo y tetrahidrofurano, para evitar usar solventes de difícil manejo medioambiental, así como la dificultad que presentaba eliminar los residuos. Al utilizar los primeros solventes la reacción no procedía y solo se desperdiciaba materia prima, debido a que ésta no era soluble en dichos disolventes. El uso de diclorometano permitió la solubilidad del ácido ursólico y, por tanto, promovió que la reacción se llevara a cabo; sin embargo, la obtención de productos secundarios fue un problema grave. Dos métodos de purificación se utilizaron para poder separar el producto deseado de los productos secundarios y del ácido ursólico remanente: cromatografía en columna y cristalizaciones. Se utilizó cromatografía en capa fina (CCF) para monitorear la reacción, con un sistema de elución de tres fases hexano/cloroformo/acetato de etilo y el reactivo de Lieberman-Burchard como revelador, las placas cromatográficas revelaban la presencia de dos o más compuestos y, en ocasiones, la presencia de ácido ursólico. La cromatografía en columna con cloroformo como eluyente no fue efectiva para separar los productos y obtener un producto puro, como se muestra en la Figura 20. Con el uso de cristalizaciones con metanol/H<sub>2</sub>O, acetona/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, se logró la separación de los productos, pero con un rendimiento menor a los 10 mg y en el caso de GAD-003 y GAD-004, se obtuvo un derivado no deseado en bajo rendimiento. Esto se dedujo debido al patrón de elución de los compuestos y por comparación con los productos identificados positivamente por técnicas espectroscópicas como los derivados deseados. En la Figura 21, se puede observar la placa cromatográfica de los 5 derivados del ácido ursólico, obtenidos con esta metodología de purificación.

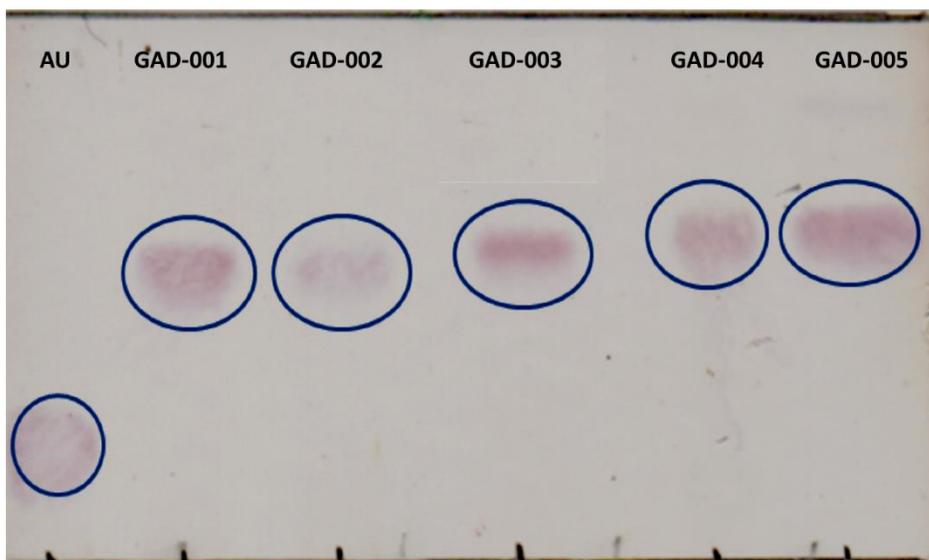


**Figura 20. Placa cromatográfica de los derivados del ácido ursólico obtenidos por columna cromatográfica.** Placa de 10X10 cm, hexano/cloroformo/acetato de etilo como eluyente y reactivo de Lieberman-Buchard como revelador.



**Figura 21. Placa cromatográfica de los derivados del ácido ursólico purificados mediante cristalizaciones.** Placa de 10X10 cm, hexano/cloroformo/acetato de etilo como eluyente y reactivo de Lieberman-Buchard como revelador.

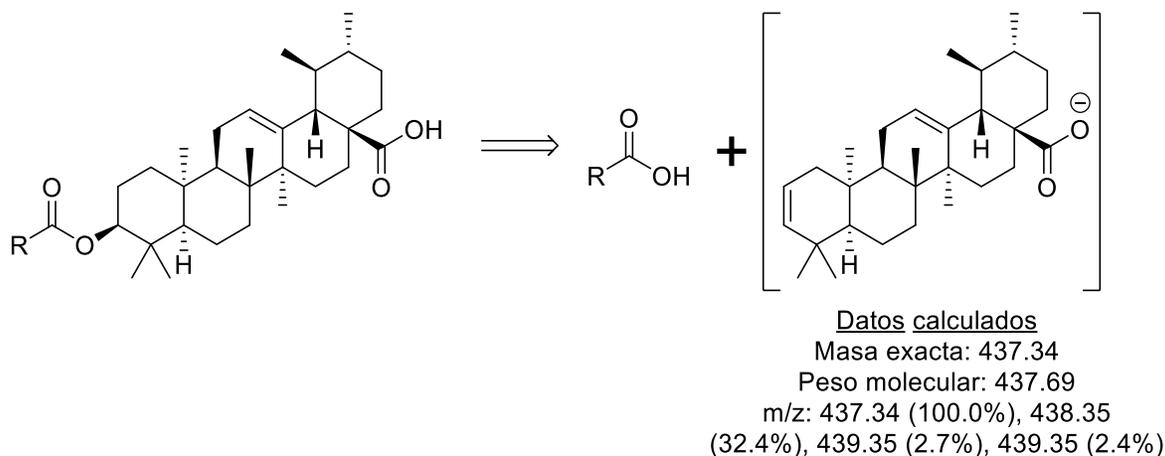
La obtención de productos secundarios limitaba el rendimiento del producto deseado; su formación se debía, posiblemente, a la oxidación por parte del doble enlace del ácido ursólico por el oxígeno presente en el sistema de reacción, sin embargo, no fue posible corroborar esta afirmación, ya que no se aislaron los productos en cantidad suficiente para realizar los análisis espectroscópicos y espectrométricos. Para solventar este problema y aumentar el rendimiento obtenido de los derivados en las primeras metodologías que se utilizaron, se optó por utilizar piridina como solvente en concordancia con lo reportado en la bibliografía (Nascimento y col., 2014), y agregar una atmosfera de nitrógeno para desplazar el oxígeno presente en el matraz de reacción; de esta manera se obtuvo un solo compuesto, indicando que el oxígeno del medio probablemente, si tenía relación con la formación de un producto secundario, como se observa en la Figura 22.



**Figura 22. Placa cromatográfica de los derivados del ácido ursólico purificados.** Placa de 10X10 cm, hexano/cloroformo/acetato de etilo como eluyente y reactivo de Lieberman-Buchard como revelador.

De las cinco síntesis realizadas en este trabajo, la síntesis y purificación del compuesto GAD-005 fue la que más dificultades presentó; su purificación fue posible, pero con un rendimiento muy bajo, por lo cual no pudo determinarse su punto de fusión, ni ser evaluado en el ensayo de aorta asilada de rata, para poder observar su capacidad vasodilatadora. Exceptuando el compuesto GAD-005, todos los derivados se obtuvieron en cantidades suficientes para llevar a cabo la identificación estructural y su evaluación farmacológica; por lo tanto, queda como perspectiva mejorar el proceso de síntesis de GAD-005 para su futura evaluación. El motivo por el cual se realizaron dos adiciones de cloruro, excediendo el número de moles requeridos para la reacción según los cálculos estequiométricos, se debió a que en el monitoreo por CCF de cada reacción, había presencia de ácido ursólico, por este motivo se agregó un exceso y se logró consumir por completo la materia prima. Lo anterior ocurrió posiblemente por la humedad presente en el ácido ursólico o que los cloruros estaban parcialmente hidrolizados, por lo cual fue necesario agregar más cantidad de cloruro.

El análisis de espectrometría de masas, permitió conocer el peso molecular de los compuestos sintetizados, los cuales correspondieron a las masas exactas, calculadas en el módulo de *Analysis* del programa *ChemDraw Professional 15.0*. Al ser la EM-IES un método de ionización suave, se obtuvieron iones negativos que correspondían a las masas exactas de los compuestos esperados. Como parte del análisis espectrométrico, se realizó la fragmentación del ion (Figura 11', A, Anexo I), el cual muestra, para todos los compuestos un fragmento  $m/z$  de 437.38 correspondiente a la pérdida del grupo aciloxi y dos hidrógenos y que es coincidente con la masa exacta del fragmento de ácido ursólico sin el grupo hidroxilo en el C-3 y dos hidrógenos, como se muestra en la Figura 23; cabe mencionar que el ion molecular analizado parece ser muy estable, ya que se utilizó una energía de colisión de 50 eV que es relativamente alta ya que por lo general se aplican de 10 a 20 eV en este tipo de análisis. Por tanto, con esta información, en la espectroscopia de RMN se buscó únicamente las señales confirmatorias de la transformación química del ácido ursólico.



**Figura 23. Fragmentación propuesta del ion molecular por EM-IES.**

Basándose en reportes previos de la síntesis de estos derivados (Seebacher y col., 2003; Silva y col., 2013; Nascimento y col., 2014), se llevó a cabo la identificación estructural de los compuestos sintetizados. Se tomaron como base en la identificación estructural las señales de los hidrógenos en C-3, 12, 28 y los hidrógenos de los carbonos de la cadena del éster, del espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Estas señales se utilizaron para definir si la estructura de las moléculas sintetizadas, correspondía a las moléculas propuestas. La señal del hidrógeno del C-3 permitió comprobar que se había formado el éster y no se conservaba el alcohol ya que el ácido ursólico presenta una señal con un desplazamiento químico de 3.44 ppm (Seebacher y col., 2003). En contraste GAD-001 presenta una señal con un desplazamiento químico de 4.45 ppm, correspondiente a un hidrógeno unido a un carbono unido a un grupo aciloxi. La señal del hidrógeno del C-12 con desplazamiento químico de 5.22 ppm, indicó la conservación del doble enlace en esta posición, comprobando que el esqueleto pentacíclico se conservó. La señal correspondiente a los hidrógenos H-2' se presentó con un desplazamiento químico de 1.99 ppm (Silva y col., 2012; Nascimento y col., 2014). El hidrógeno presente en el grupo carboxilo (C-28), se logró identificar en GAD-001, GAD-004 y GAD-005, mientras que en GAD-002 y GAD-003 no se observó la señal de este hidrógeno.

En cuanto a la espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  se usaron las señales correspondientes a C-3, 12, 13, 28, 29, 30 y los carbonos del grupo acilo para la identificación de los compuestos, siendo la señal del carboxilo de gran importancia para definir que no se había perdido este grupo funcional, ya sea por una lactonización intramolecular o por la formación de un anhídrido mixto de ácido. La señal del C-1' con un desplazamiento químico de 139.43 ppm y del C-2' con un desplazamiento químico de 21.21 ppm, junto a las señales de los hidrógenos previamente señalados, confirmaron la presencia del éster en posición C-3 y la estructura para GAD-001. De manera similar, las señales correspondientes a los hidrógenos y los carbonos específicos para cada compuesto se obtuvieron con algunas variaciones; las señales de los carbonos e hidrógenos de la cadena del éster fueron determinantes para poder corroborar la estructura y su correspondencia con la bibliografía reportada (Seebacher y col., 2003; Silva y col., 2013; Nascimento y col., 2014). Con estas evidencias, podemos asegurar que los compuestos sintetizados corresponden a las moléculas propuestas, ya que coinciden con lo reportado en la bibliografía y las predicciones realizadas en el programa MestReNova, programa especializado en el análisis y predicción de espectroscopia de RMN.

Los resultados del acoplamiento molecular de ajuste inducido (IFD) arrojaron varias conformaciones estructurales que pueden estar interactuando con la región catalítica del homodímero de la eNOS. Aquellas conformaciones que presentaron el mejor *IFD-Score* (un número más negativo) para cada molécula se tomaron como la estructura más estable, las demás conformaciones se analizaron tomando en cuenta el mejor *IFD-Score* y, aquellas que no presentaban una diferencia mayor a 1 kcal/mol entre sí, se compararon individualmente con la conformación de menor energía para observar las diferencias en las interacciones y los aminoácidos de interacción. Cabe destacar que todos los derivados tuvieron un mejor *IFD-Score* que el propio ácido ursólico, por lo cual se consideró que presentan una mejor afinidad teórica con la enzima. Las conformaciones más estables presentaron variaciones en la orientación del grupo éster y en la orientación del grupo carboxilo con respecto a la interacción con la enzima. Previamente se habían reportado diferentes sitios de

unión de triterpenos en la región catalítica del homodímero de la eNOS, el sitio “S”, que corresponde al sitio de unión del sustrato (centro catalítico). Los sitios “C1” y “C2”, los cuales corresponden a las regiones del homodímero donde se unen los triterpenos y, por último, el sitio “M”, el cual corresponde a la región donde está presente el grupo hemo. Los triterpenos no se unen al sitio “S”, ni al sitio “M”, sin embargo, pueden estar orientados hacia el sitio “S” o hacia el canal de entrada del sustrato (Rios y col., 2012). En el caso del ácido ursólico, GAD-002 y GAD-005, los dos grupos funcionales se orientan hacia el centro catalítico, en tanto que en los compuestos GAD-001, GAD-003 y GAD-004, los grupos funcionales se orientan hacia el canal de entrada del sustrato.

Todas las interacciones de los compuestos sintetizados y el ácido ursólico se presentan en el carboxilo del esqueleto pentacíclico, esto concuerda con lo reportado en estudios previos (Luna-Vázquez y col., 2016), lo cual indica que el carboxilo es importante para la interacción con la enzima, debido a que puede aceptar puentes de hidrógeno y a la capacidad de formar puentes salinos. Los aceptores de puentes de hidrógeno en el C-3 influyen de manera positiva en la actividad vasodilatadora de algunos triterpenos (Rios y col., 2012); sin embargo, en los estudios de IFD que se realizaron no se observó una interacción directa por parte del hidroxilo y tampoco por parte del éster. Es posible que las interacciones hidrofóbicas y la estereoquímica, jueguen un papel importante en la conformación final del complejo enzima-ligando, ya sea por un acomodo espacial específico o una interacción hidrofóbica directa con algún aminoácido presente en la enzima.

El derivado GAD-004 presentó el mejor *IFD-Score*, por lo cual se consideró que es la molécula con mayor afinidad teórica con la región catalítica del homodímero de la eNOS con respecto a otros derivados, incluyendo al ácido ursólico. GAD-004 presentó 2 conformaciones estructurales de menor energía y, por tanto, más estables, las cuales difieren entre ellas de manera clara, como se observa en la Figura 24. La diferencia más importante es la interacción con el sustrato (HAR-512) en la conformación 2, el puente salino con la arginina 242 y el puente de hidrogeno



Los resultados de los experimentos farmacológicos indicaron que los derivados ( $E_{max} < 55\%$ ) presentaron un efecto vasodilatador menor al producido por el ácido ursólico ( $E_{max} = 97.7\%$ ). GAD-004 presentó el efecto máximo mayor ( $54.71\% \pm 3.01$ ). El comportamiento que los derivados presentaron en su efecto vasodilatador, podría explicarse por la pérdida de un donador de puentes de hidrógeno en el C-3, indicando que un grupo donador es importante en esta región. A diferencia de otros reportes donde se observa interacción tipo puente de hidrógeno con la asparagina 480 del hidroxilo (Luna-Vázquez y col., 2016), el IFD no mostró interacción directa tipo puente de hidrógeno del hidroxilo (ácido ursólico) con los aminoácidos presentes en el sitio de interacción en la eNOS. Sin embargo, la diferencia entre los dos análisis, dejando de lado el nivel de cálculo, es la presencia del sustrato, el cual está incluido en la cristalografía, ya que se intentó obtener el comportamiento más cercano a la función nativa de la enzima. En estas condiciones, se observa que las modificaciones realizadas en el ácido ursólico en esa posición causaron un efecto negativo en la actividad del ácido ursólico.

Asimismo, GAD-002 presenta la misma interacción que el ácido ursólico con la glicina 247, con la diferencia que esta conformación presenta un puente salino con la arginina 250 y su orientación está dirigida hacia el canal de entrada y no hacia el centro catalítico. De la misma forma GAD-003 presenta únicamente la interacción con el aminoácido glicina 247 y su orientación es hacia el canal de entrada, de tal forma que la actividad puede estar relacionada con la orientación espacial de la conformación estructural que se obtiene al momento de la interacción de las moléculas con la eNOS. GAD-003 fue el derivado que presentó mayor potencia, entre los compuestos sintetizados y el ácido ursólico, al requerir solo de  $11.93 \pm 1.40 \mu\text{g/mL}$  para ejercer su efecto vasodilatador; sin embargo, su efecto máximo no excede el 50 % de relajación.

Por otro lado, la afinidad teórica incrementa conforme aumenta el volumen estérico en los derivados, con excepción de GAD-005. Las interacciones hidrofóbicas y el acomodo espacial que presentan los compuestos (orientación hacia el centro

catalítico o el canal de entrada) puede influir en la actividad de la molécula. Los resultados farmacológicos indican que GAD-001 y GAD-004 son los que presentan mayor porcentaje de relajación. GAD-001 conserva una mayor similitud estructural con el ácido ursólico y sus interacciones son similares (puentes de hidrógeno), además, presenta interacción con el sustrato e interacción con la serina 246, en comparación con el ácido ursólico que presenta interacción con el sustrato y con la glicina 247. Los dos interactúan de manera similar en sus respectivos aminoácidos. GAD-001 mediante un puente de hidrógeno de la cadena lateral de la serina 246 con el carboxilato y un puente de hidrógeno de la cadena lateral del sustrato con el oxígeno del carboxilo y el ácido ursólico tiene el mismo comportamiento solo cambiando el aminoácido por la glicina 247. Adicionalmente, los dos están orientados hacia el centro catalítico y no al canal de entrada. GAD-004, por su parte, presenta diferencias en cuanto a la interacción con el aminoácido correspondiente: solo un puente de hidrógeno de la cadena lateral de la asparagina 338 con el oxígeno del carboxilo y se orienta hacia el centro catalítico, de igual manera que GAD-001 y que el ácido ursólico.

Posiblemente, el aumento de las interacciones hidrofóbicas o la conformación estructural adoptada por las moléculas, promovió una mayor afinidad de los compuestos con la enzima que inhibiera de cierta manera su actividad catalítica, dando como resultado una reducción del efecto vasodilatador. Un estudio de dinámica molecular y un análisis QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics), el cual es un análisis que permite entender las interacciones de manera electrónica, podría darnos más información para entender la forma en que los compuestos interactúan con la enzima y como estas interacciones tienen influencia directa en la pérdida de actividad de la eNOS. Además, para comprobar si los compuestos actúan como inhibidores de la actividad enzimática, es necesario realizar la cuantificación de la liberación de NO, para poder observar si la vasodilatación es causada directamente por la enzima o participan otras vías de señalización.

## 10. CONCLUSIONES

- Se sintetizó la serie homóloga de 5 ésteres de ácido ursólico y se realizó su identificación estructural.
- El análisis de acoplamiento molecular de ajuste inducido proporcionó evidencia de los tipos de interacción más importantes presentes entre el ácido ursólico y sus derivados con la eNOS: los puentes de hidrógeno con el carboxilo, y la orientación espacial de las moléculas son importantes para explicar su efecto vasodilatador.
- Los compuestos sintetizados presentaron una actividad vasodilatadora inferior a la producida por el ácido ursólico. Entre los derivados obtenidos, GAD-004 presentó el mayor efecto vasodilatador ( $55.70\% \pm 3.01$ ).
- La disminución del efecto vasodilatador de los derivados del ácido ursólico podría ser causada por la pérdida de un donador de puente de hidrógeno o a la orientación que toman las moléculas al interactuar con la eNOS.

## 11. PERSPECTIVAS DE TRABAJO

- Realizar estudios complementarios de dinámica molecular y QM/MM para comprender cómo influyeron las modificaciones químicas en la pérdida de la actividad vasodilatadora de los derivados del ácido ursólico.
- Cuantificar la producción de NO en los anillos de aorta, en presencia de los derivados del ácido ursólico, para descartar la posibilidad que los compuestos funcionen como inhibidores de la enzima y confirmar que la actividad vasodilatadora es producida por un incremento en los niveles de NO y no mediante la participación de otras vías de señalización involucradas en la vasodilatación.
- Obtener una ruta de síntesis adecuada para el compuesto GAD-005 y evaluar su actividad vasodilatadora.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Acebey-Castellon, I., Voutquenne-Nazabadioko, L., Doan Thi Mai, H., Roseau, N., Bouthagane, N., Muhammad, D., Le Magrex Debar, E., Gangloff, S., Litaudon, M., Sevenet, T., Hung, N., Lavaud, C. (2011). Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J Nat Prod.* 74, 2: 163-8.
- Aguirre-Crespo, F., Vergara-Galicia, J., Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J., Navarrete-Vasquez, G., Estrada-Soto, S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 7, 1062-8.
- Briones, j., Salas R. (2009). Principios de química computacional, 3ª edición, UNAM, Ciudad de México, pp. 1-7.
- Checker, R., Sandur, S., Sharma, D., Patwardhan, R., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B., Sainis, K. (2012). Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS One.* 7, 2, e31318.
- Chen, J., Fu, H., Wang, Z., Yin, F., Li, J., Hua, Y., Cai Z. (2014). A New Synthetic Ursolic Acid Derivative IUA with Anti-Tumor Efficacy Against Osteosarcoma Cells via Inhibition of JNK Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 34: 724-33.
- Derbyshire, E. R., Marletta, M. A. 2012. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem.* 81, 533-59.
- Fischmann, T., Hruza, A., Niu, X., Fossetta, J., Lunn, C., Dolphin, E., Prongay, A., Reichert, P., Lundell, D., Narula, S., Weber, P. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* 6, 233-42.
- Foresman J. B., (1996). Exploring Chemistry with Electronics Structure Methods: in computacional models and model Chemistry: 2ª edición, Gaussian inc pitsburg, P.A. pp.3-11.

- Förstermann, U. (2006). Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem.* 387(12),1521-33.
- Förstermann, U., Li, H. (2011). Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol.* 164, 213-33.
- Gutiérrez, A., Estévez, A. (2009) Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. R. Acad Cienc Exact Fis Nat.* 103, 2, 409-19.
- Heiss, H., E., Dirsch, M., V. (2014). Regulation of eNOS Enzyme Activity by Posttranslational Modifications. *Curr Pharm Des.* 20(22), 3503-3513.
- Hsu, H., Yang, J., Lin, C. (1997). Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett.* 111, 1-2, 7-13.
- Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A. Mendoza, S., Bah, M., Gutiérrez, D. M., Hernández-Sandoval, L., Martínez, M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plantas used in mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm Biol.* 48, 7, 732-39.
- Innocente, A., Silva, G., Cruz, L., Moraes, M., Nakabashi, M., Sonnet, P., Gosmann, G., Garcia, C., Gnoatto, S. (2012). Synthesis and antiplasmodial activity of betulinic acid and ursolic acid analogues. *Molecules.* 17, 10, 12003-14.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía Aguascalientes, Ags. (2013). A propósito del día internacional de la salud. Consultado el 14 de febrero del 2015 [www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/juventud0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/juventud0.pdf)
- Jensen, F., (2007) Introduction to computational Chemistry. 2ª edición, Ed. Jhon Wiley and sons, Ltd. England. pp. 2, 134-136.
- Kazmi, I., Afzal, M., Ali, B., Damanhour, Z., Ahmaol, A., Anwar, F. (2013). Anxiolytic potential of ursolic acid derivative-a stearyl glucoside isolated from *Lantana camara* L. (vervanaceace). *Asian Pac J Trop Med.* 433-7.

- Kukol, A. (2008). Molecular Docking. Cap. 19. En *Molecular Modeling of Proteins*. Ed. Humanna Pres, Hertfordshire, United Kingdom.
- Kyuper, L.M., Khan, N.A. (2014). Atenolol vs Nonatenolol  $\beta$ -Blockers for the Treatment of Hypertension: A- meta-analysis. *Can J Cardiol*. 30, 547-53.
- Li, S., Liao, X., Meng, F., Wang, Y., Sun, Z., Guo, F., Li, X., Meng, M., Li, Y., Sun, C. (2014). Therapeutic role of ursolic acid on ameliorating hepatic steatosis and improving metabolic disorders in high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease rats. *PLoS One*. 9, e86724.
- Lisiak, N., Paszel-Jaworska, A., Bednarczyk-Cwynar, B., Zaprutko, L., Kaczmarek, M., Rybczynska, M. (2014). Methyl 3-hydroxyimino-11-oxoolean-12-en-28-oate (HIMOXOL), a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chem Biol Interact*. 208, 47–57.
- Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 49, 37-68.
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol*. 100(1-2), 92-4.
- Luna-Vázquez, F., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Romo-Mancillas, A., López-Vallejo, F., Solís-Gutiérrez, M., Rojas-Molina, J. I., Rivero-Cruz, F. (2016). Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Vasodilator Effect of Ursolic Acid and Uvaol from Black Cherry *Prunus serotina* Fruits. *Molecules* 21,78.
- Mazumder, K., Tanaka, K., Fukase, K. (2013). Cytotoxic Activity of Ursolic Acid Derivates obtained by isolation and oxidative derivatization. *Molecules* 18, 8929-44.
- Nascimento, P., Lemus, T., Bizerra A., Arriaga A., Ferreira D, Santiago G., Braz-Filho R., Costa J. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivates. *Molecules*. 19, 1317-1327.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=64945, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64945> (accessed June 9, 2016).

- Nicandro, M. (2008). Sistema cardiovascular. Cap. 8. En Farmacología médica. Ed. Medica panamericana, México, D.F. 477-493.
- Nicolás, M., I., Marín E., Castro, F., M., Miranda, R. (2006). Algunos aspectos básicos de la química computacional. México. D. F. 11-15.
- Organización Mundial de la Salud. Consultado el 13 de febrero del 2015. [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/global\\_brief\\_hypertension/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/es/).
- Parra-Carrilo, J., Verdejo-Paris, J., Lemus-Carmona, E., Saucedo-Sánchez, N. (2009). Costo-efectividad del tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial sistémica. *Rev Mex Cardiol*. 20, 3, 141-8.
- Pickering, T., Phil, D., Miller, N., Ogedegbe, G., Krakoff, L., Artinian, N., Goff, D. (2008). Call to Action on Use and Reimbursement for Home Blood Pressure Monitoring A Joint Scientific Statement From the American Heart Association, American Society of Hypertension, and the Preventive Cardiovascular Nurses Association. *J Hypertens*. 52, 10-29.
- Rios, M., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vazquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S. (2012). Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *Ex vivo* and *in silico* studies. *Fitoterapia*. 8, 1023–9.
- Seebacher, W., Nebojsa, S., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. (2003). Spectral Assignments and Reference Data. *Magn Reson Chem*. 41, 636-8.
- Sharma, M., Sharma, P.D., Bansal, M.P., Singh, J. (2007). Synthesis, cytotoxicity, and antitumor activity of lantadene-A congeners. *Chem Biodivers*. 4, 5, 932-9.
- Sierra, A., Larrousse, M. (2010). Endothelial dysfunction is associated with increased levels of biomarkers in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 24, 373-9.

- Silva, G., Maria, N., Schuk, D., Cruz, I., Morales, M., Nakabashi, M., Graebic, C., Gosmann, G., Garcia, C., Gnoatto, S. (2013). Two of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in antimalarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malar J.* 12, 89.
- Loscalzo J, Libby P, Epstein JA. Basic Biology of the Cardiovascular System. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 19e. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. <http://accessmedicine.mhmedical.com/www.e-revistas.ugto.mx/content.aspx?bookid=1130&Sectionid=79741475>. Consultado el 19 de octubre del 2016.
- Soldi, C., Pizzolatti, M., Luiz, A., Marcon, R., Meotti, F., Miotto, L., Santos, A. (2008). Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorg Med Chem.* 16, 3377–86.
- Somova, L., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F. (2003). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine.* 10, (2-3), 115-21.
- Song, J., Wang, Y., Song, T., Chan, H., Bi, C., Yang, X., Yan, R., Wang, Y., Zheng, Y. (2014). Development and Characterization of ursolic acid Nanocrystals. Without Stabiliser Having Improved Dissolution Rate and *In vitro* Anticancer activity. *AAPS Phar Scitech.* 15.
- Steinkamp-Fenske, K., Bullinger, L., Voller, N., Xu, H., Yao, Y., Bauer, R., Forstermann, U., Huige, L. (2007). Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia mitorrhiza L.*) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cell. *Atherosclerosis.* 195, e104-e111.
- Ullevig, S. L., Kim, H. S., Nguyen, H. N., Hambright, W. S., Robles, A. J., Tavakoli, S., Asmis, R. (2014). Ursolic acid protects monocytes against metabolic stress-induced priming and dysfunction by preventing the induction of Nox4. *Redox Biol.* 2, 259-66.
- Wu, P., Zhang, K., Lu, Y., He, P., Zhao, S. (2014). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. *Eur J Med Chem.* 80, 502-8.

- Yasutaka, I., Akira, M., Hajime, O. (2008). Ursolic acid: An anti-and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 26-42.
- Yu, D., Sakurai, Y., Chen, C., Chang, F., Huang, L., Kashwada, Y., Lee, K. (2006). Anti-AIDS Agents 69. Moronic Acid and Other Triterpene Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents. *J Med Chem.* 49, 18, 5462-69.
- Zacchigna, M., Cateni, F., Drioli, S., Procida, G., Altieri, T. (2014). PEG-Ursolic Acid Conjugate: Synthesis and *In vitro* release studies. *SciPharm.* 82, 411-21.

### 13. Anexo I

#### 13.1. Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .

GAD-001

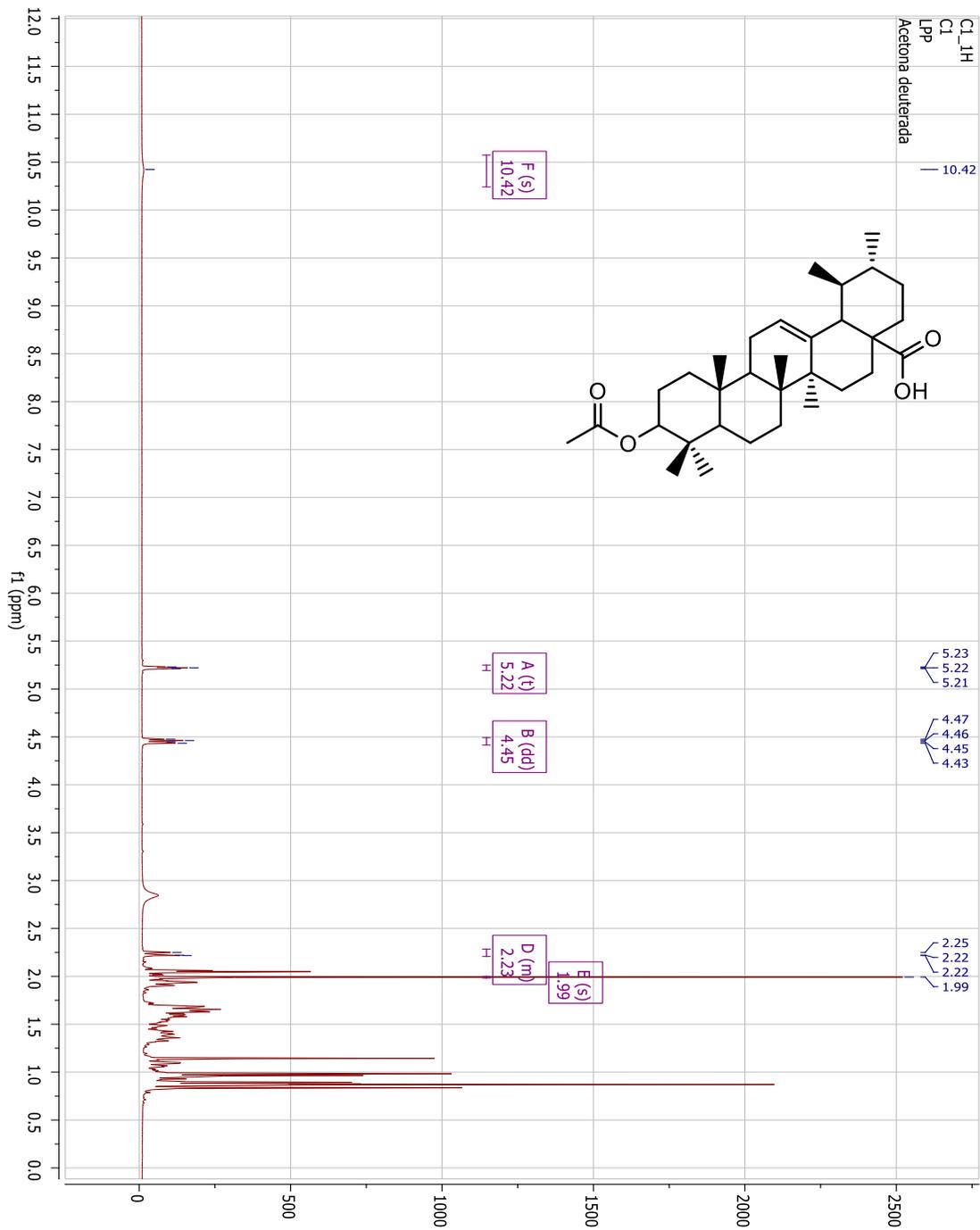


Figura 1'. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GAD-001

GAD-001

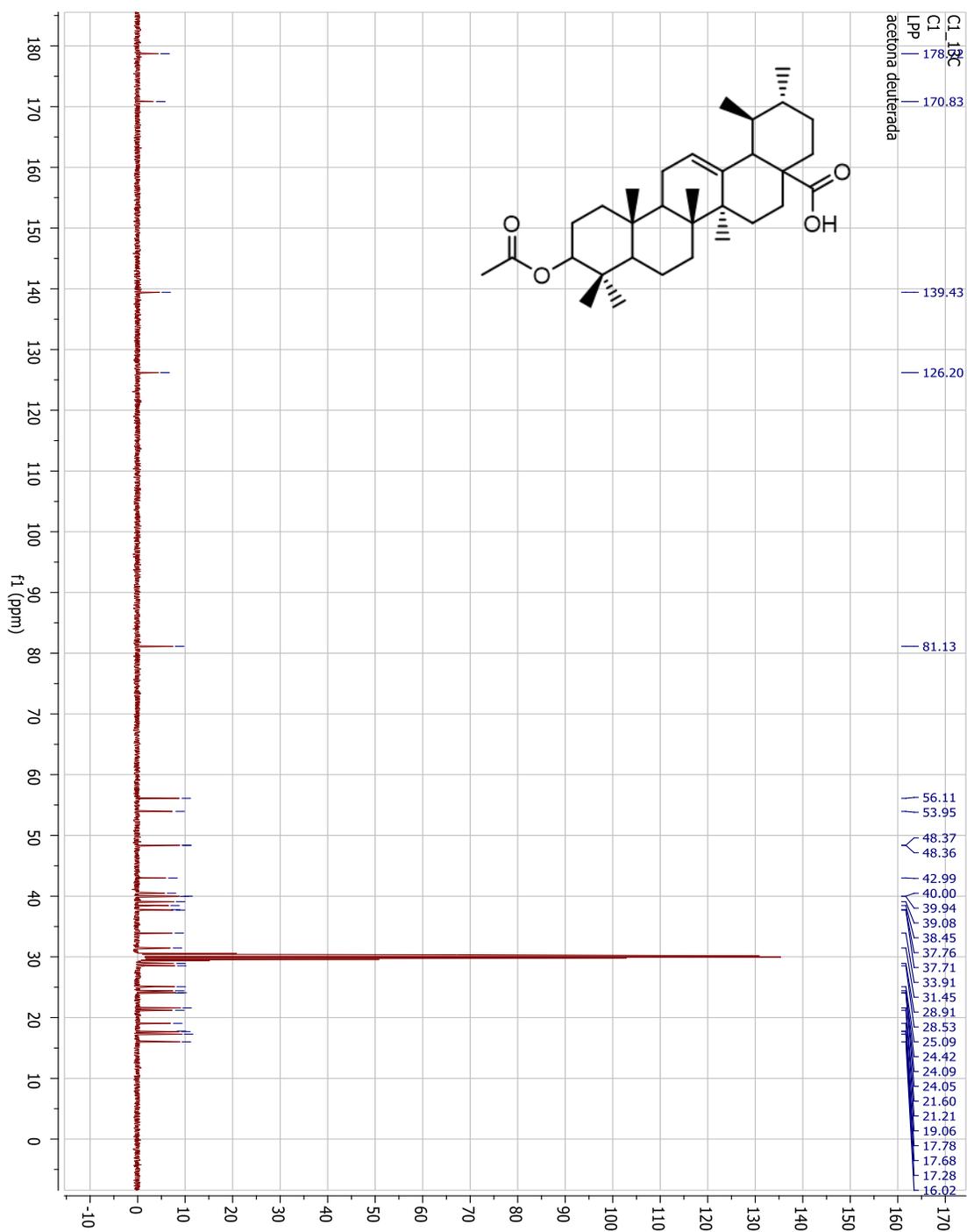


Figura 2'. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de GAD-001

# GAD-002

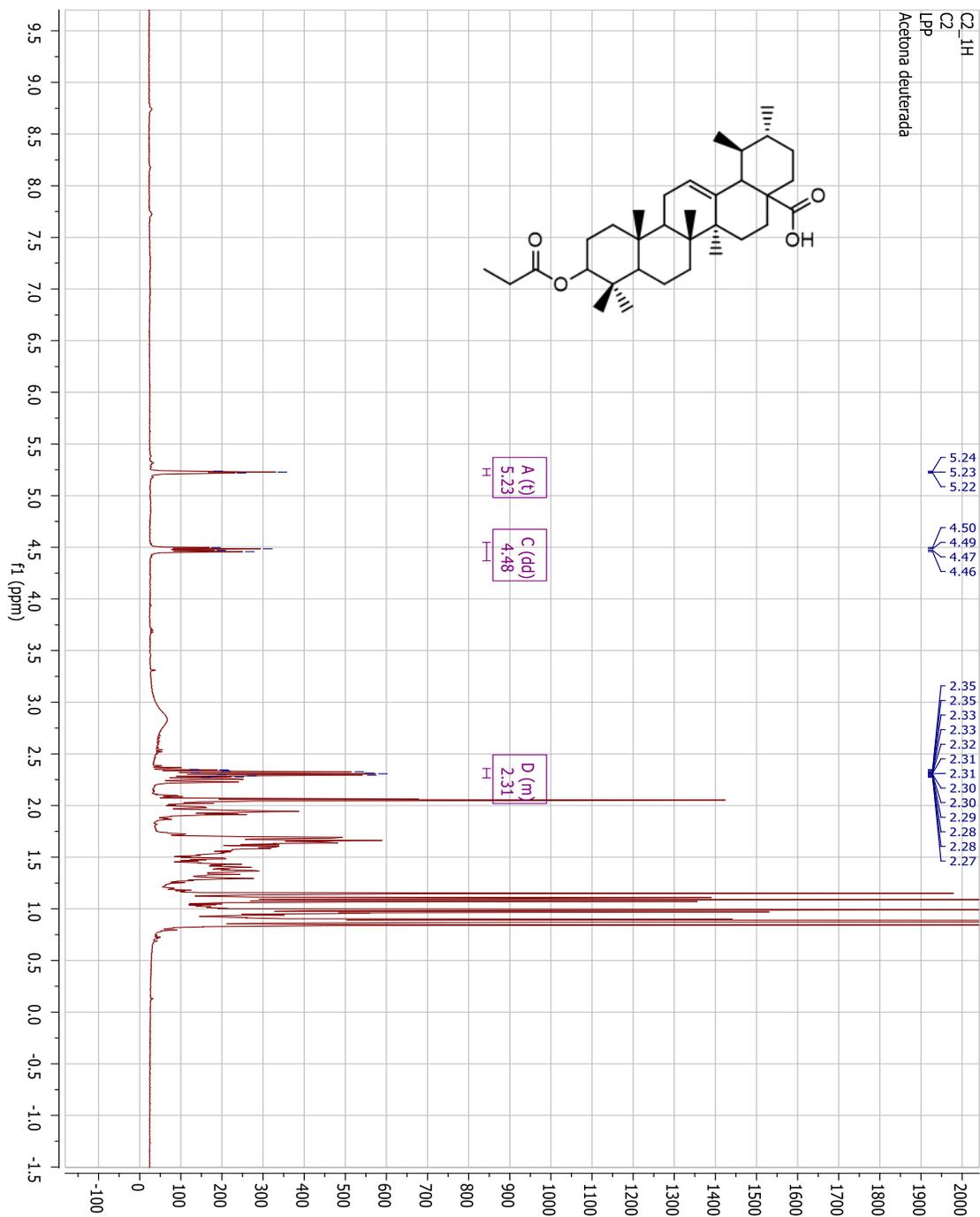


Figura 3'. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de GAD-002

GAD-002

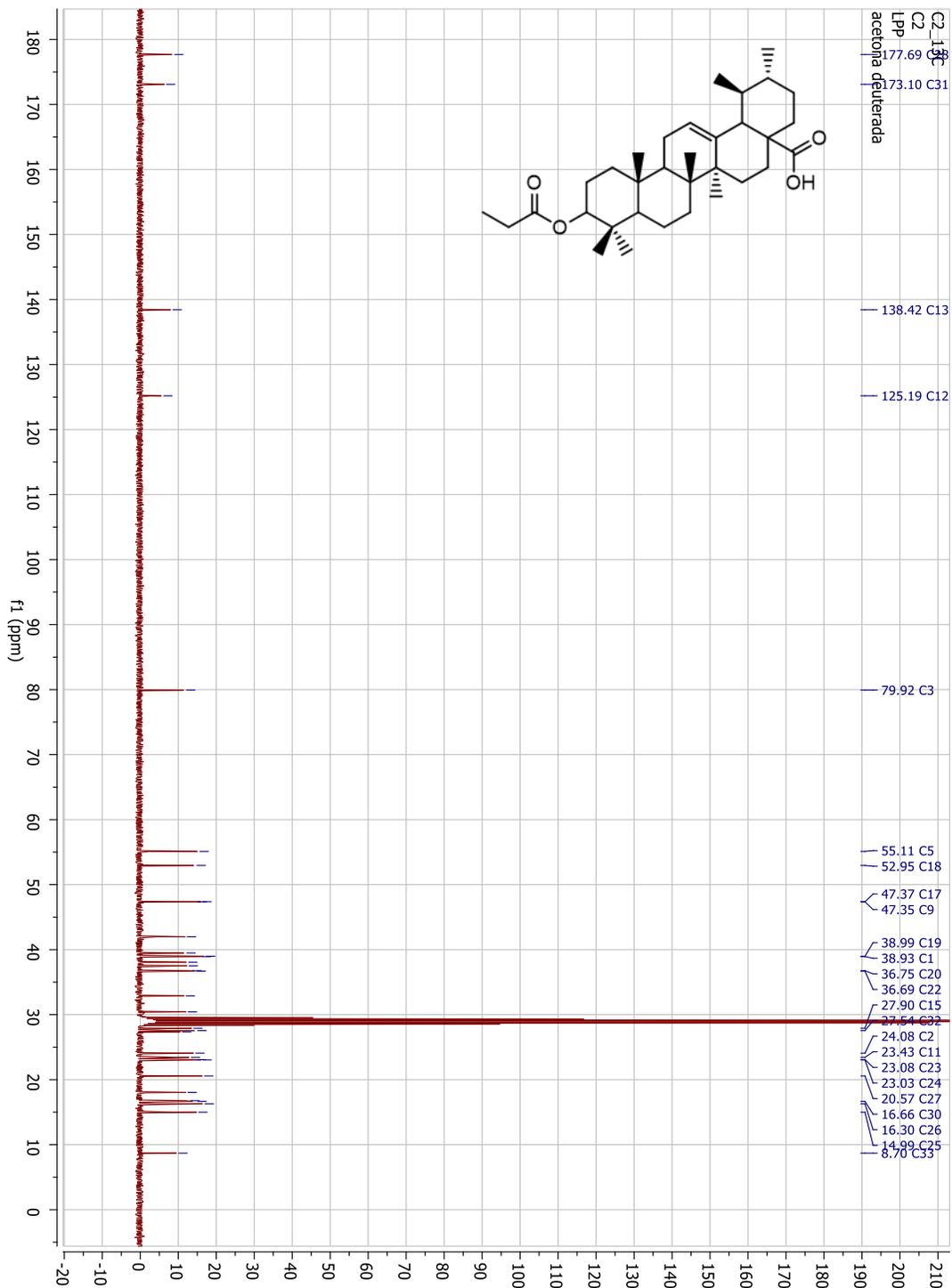


Figura 4'. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de GAD-002

# GAD-003

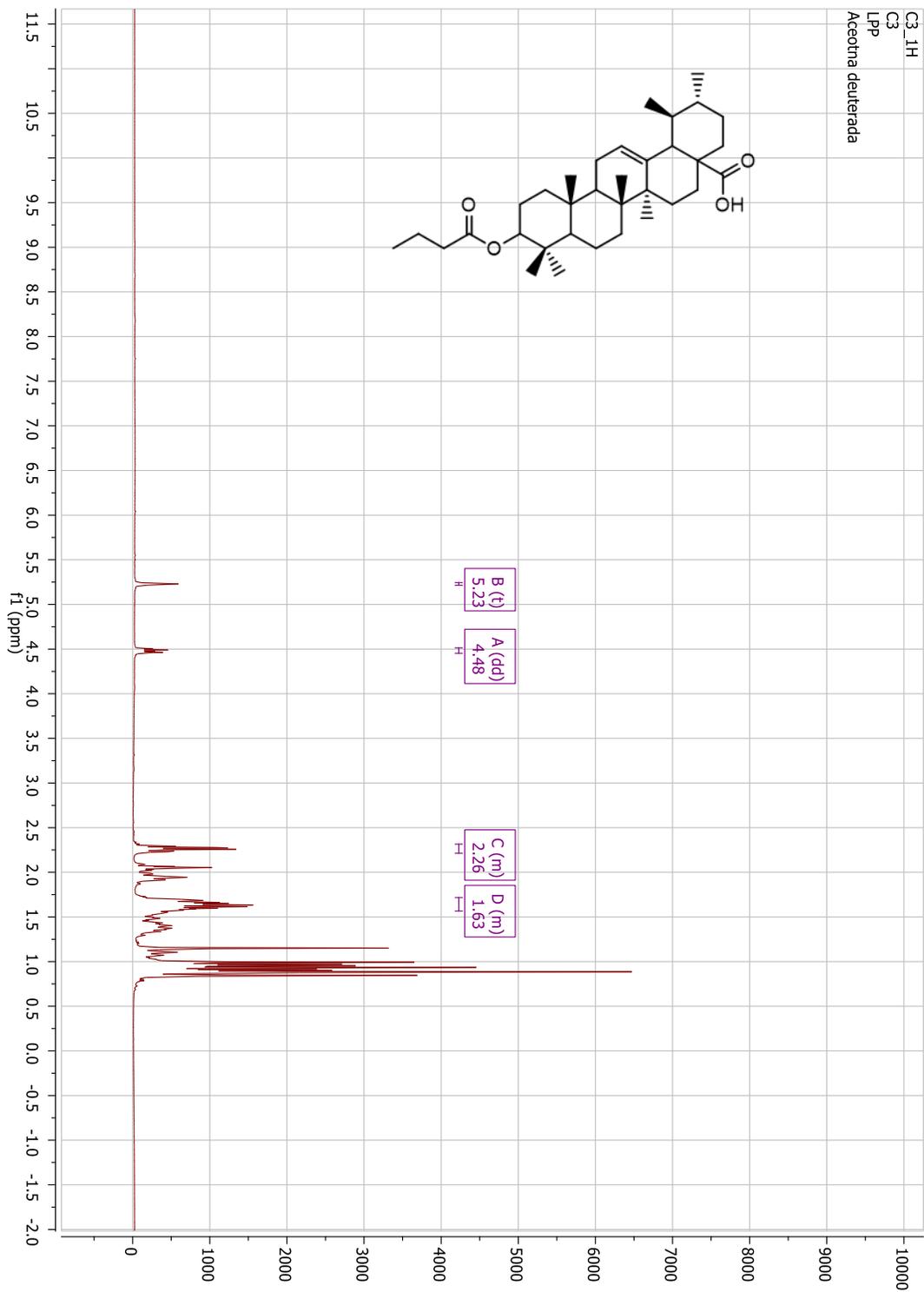


Figura 5'. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de GAD-003

# GAD-003

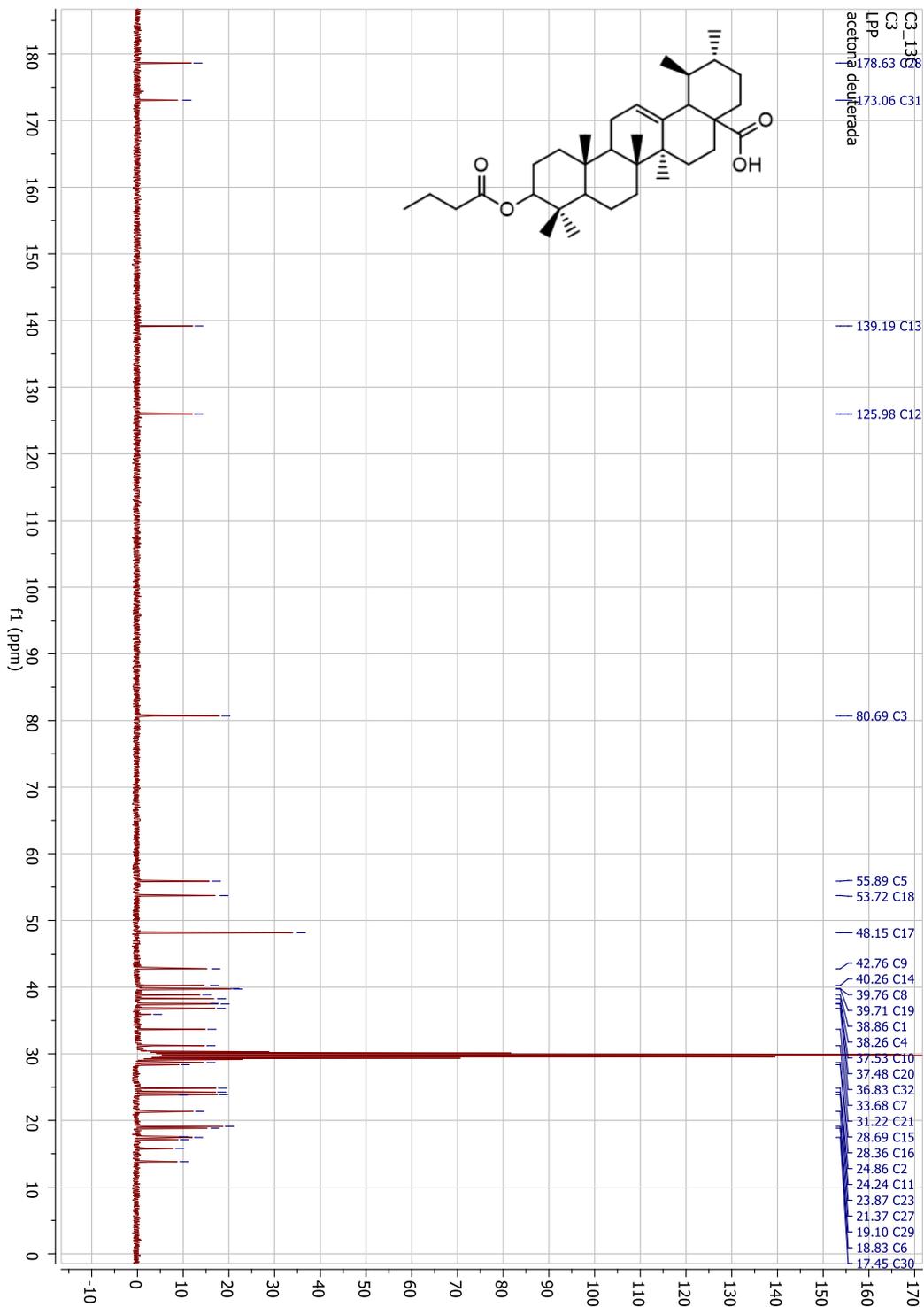


Figura 6'. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de GAD-003

# GAD-004

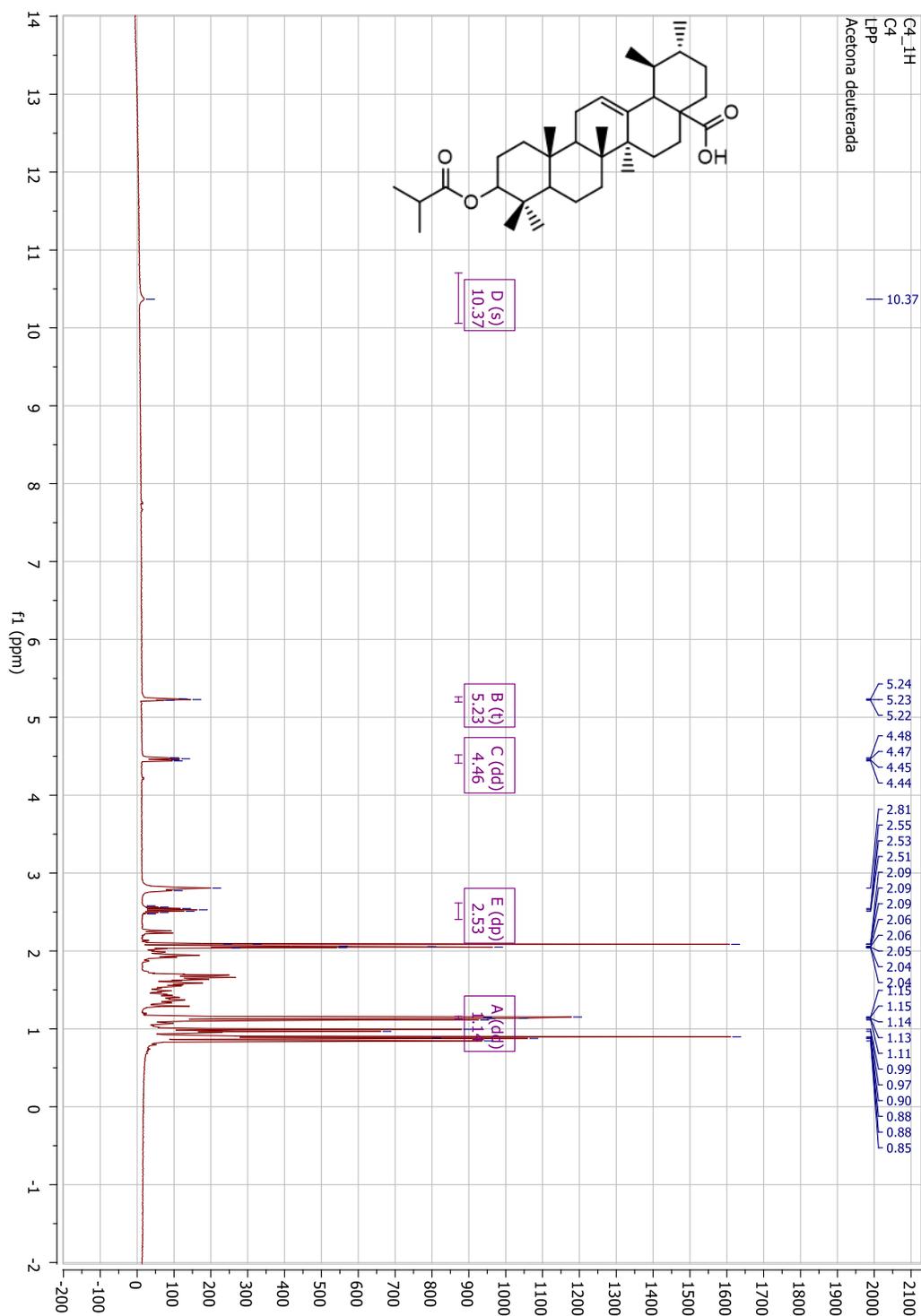


Figura 7'. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de GAD-004

# GAD-004

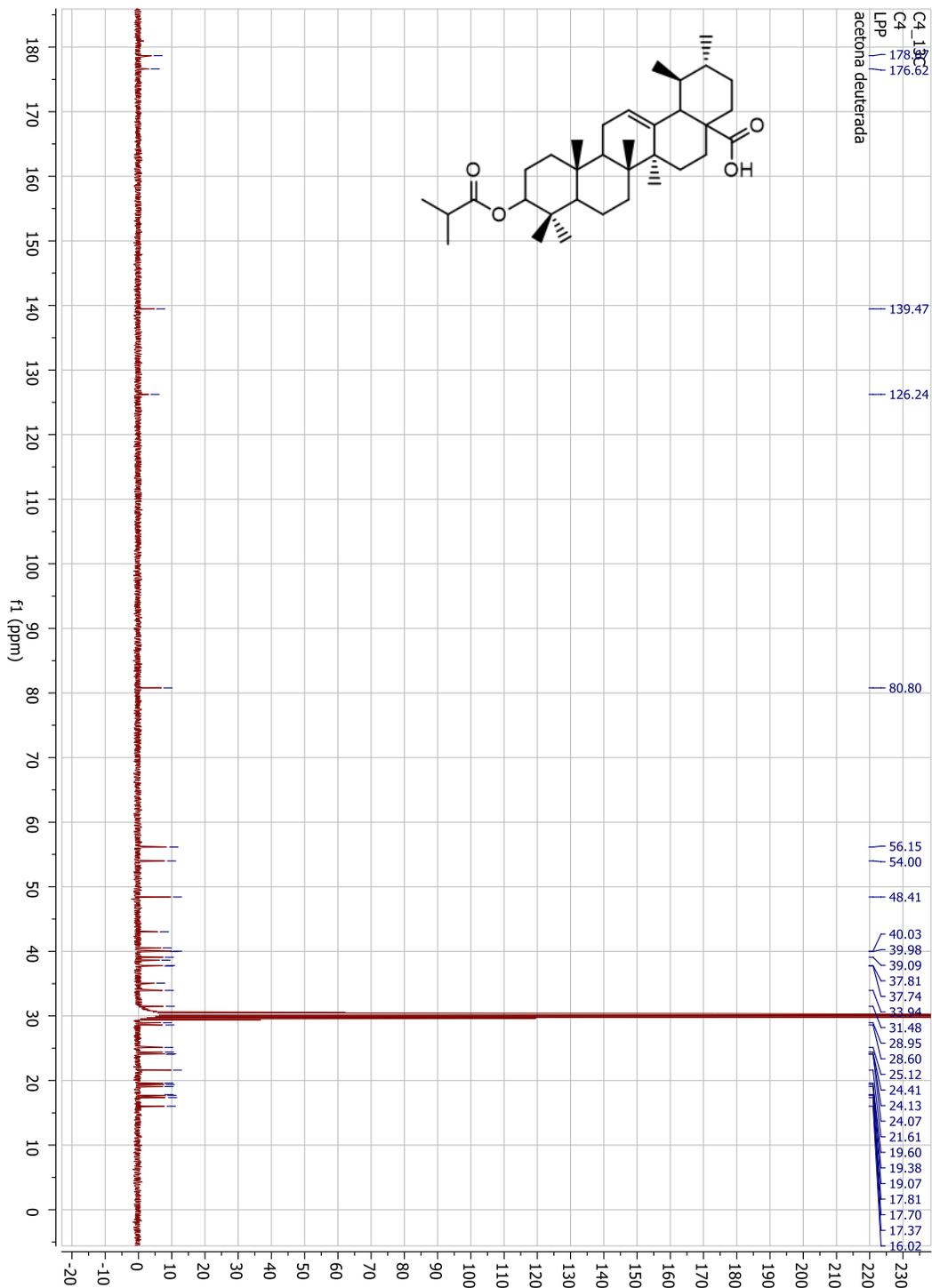


Figura 8'. Espectro de RMN <sup>13</sup>C de GAD-004

GAD-005

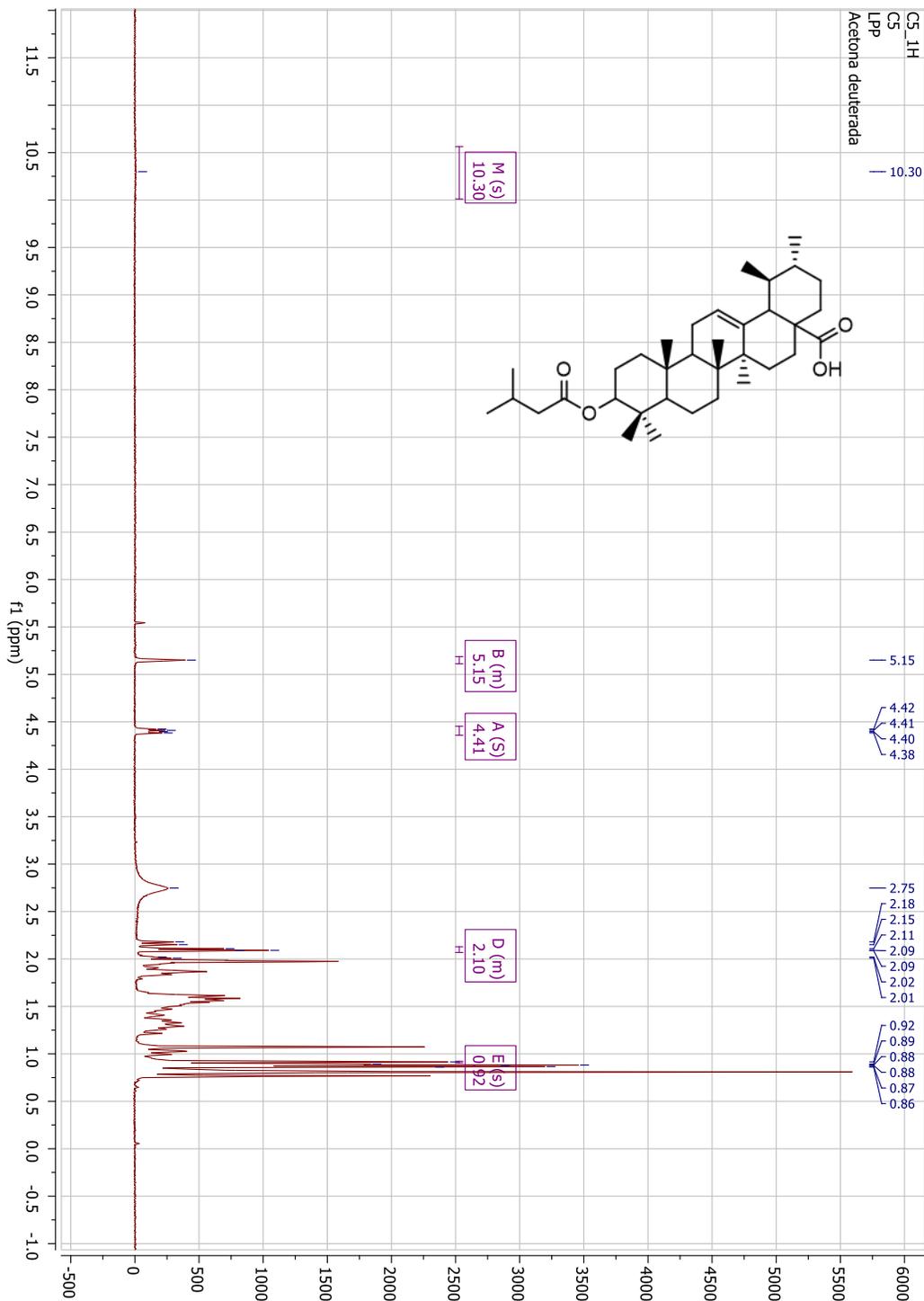


Figura 9'. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de GAD-005

# GAD-005

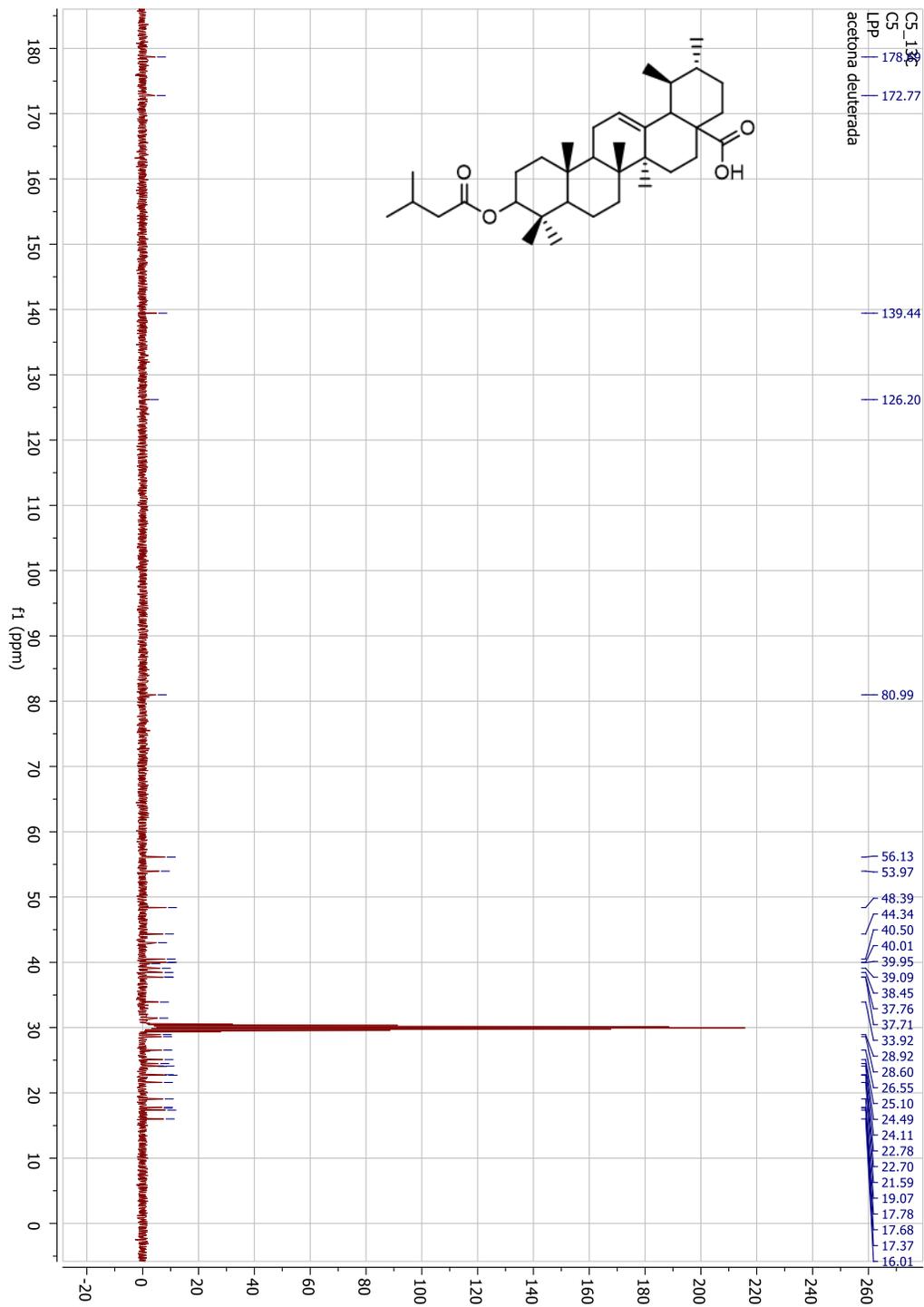
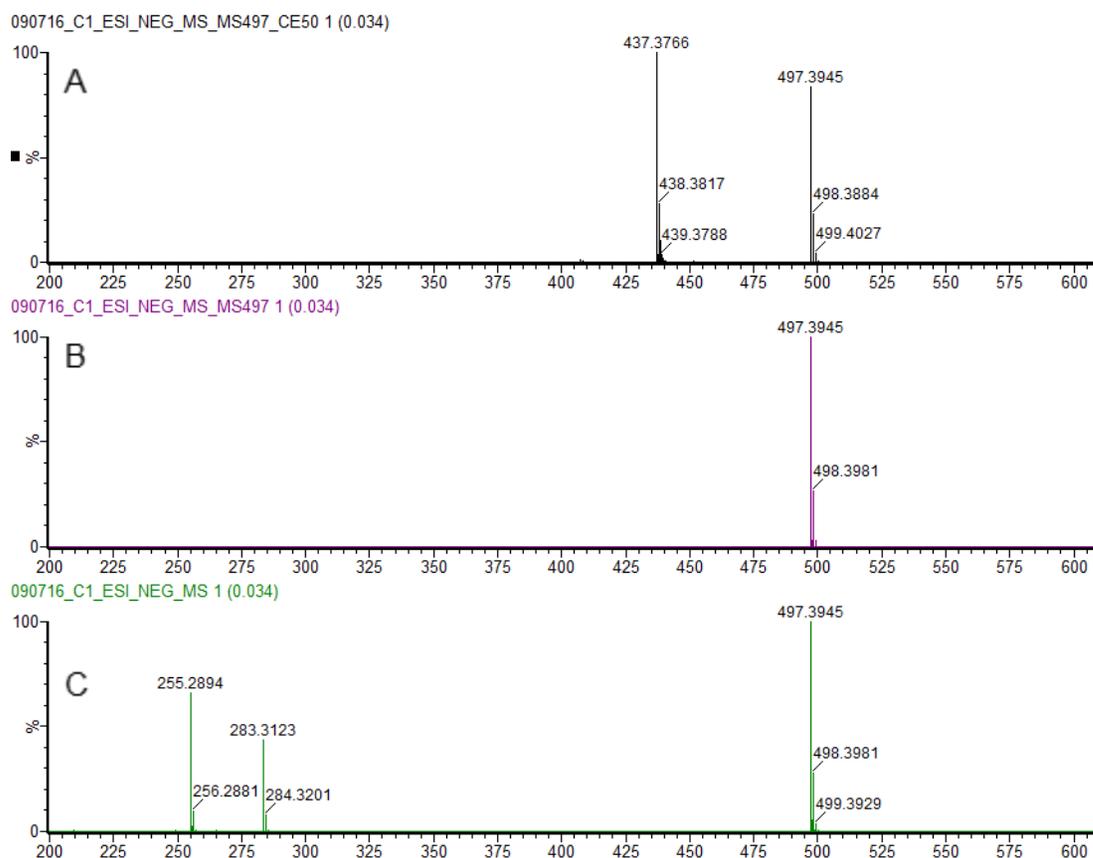


Figura 10'. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de GAD-005

## 13.1. Espectrometría de masas.

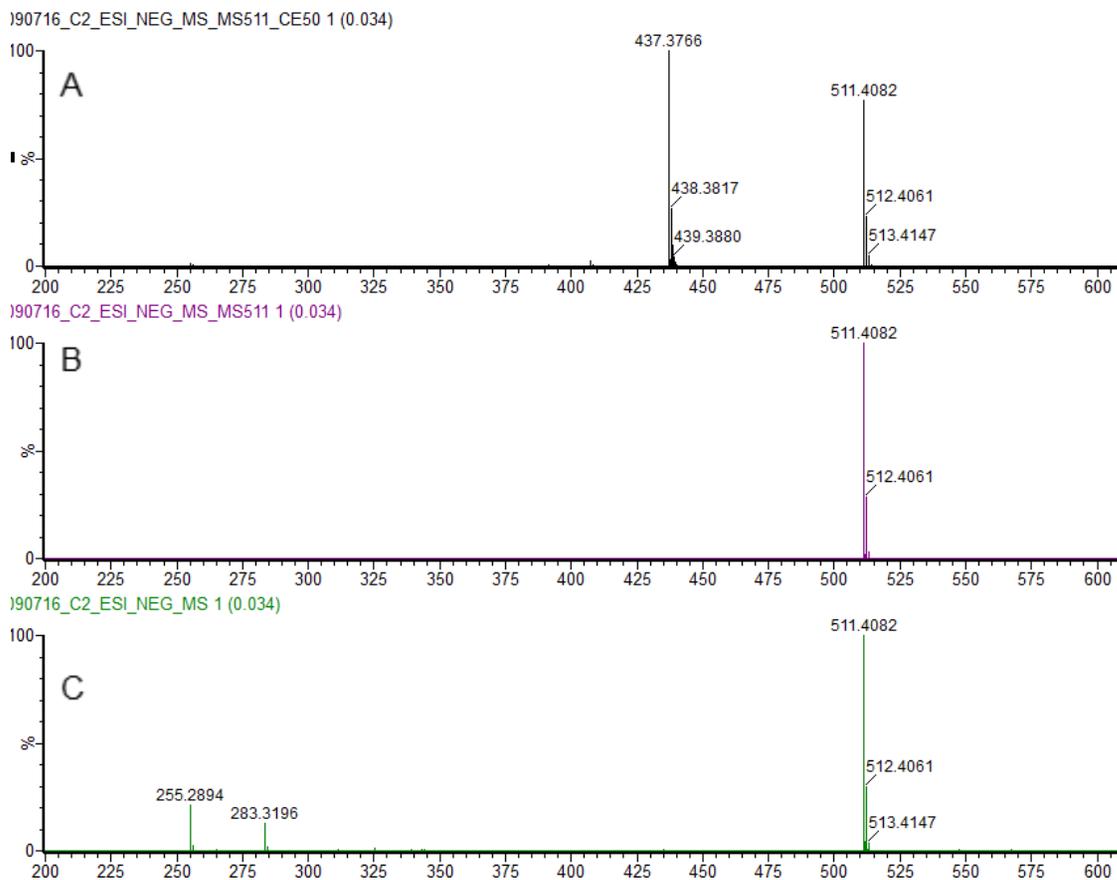
### GAD-001



**Figura 11'. Espectro de masas de GAD-001**

GAD-001 presenta una masa molecular exacta calculada de 498.37 g/mol, que coincide con el ion molecular en 498.39 m/z [ $M^-$ ]. En el análisis también se observa el ion [ $M+1$ ] en 499.40 m/z y el ion [ $M-1$ ] 497.39 m/z, consistentes con la protonación o desprotonación del ion molecular. Adicionalmente, se encuentra el fragmento debido a la pérdida del grupo acetiloxi y dos hidrógenos en 437.38 m/z [ $M-60$ ].

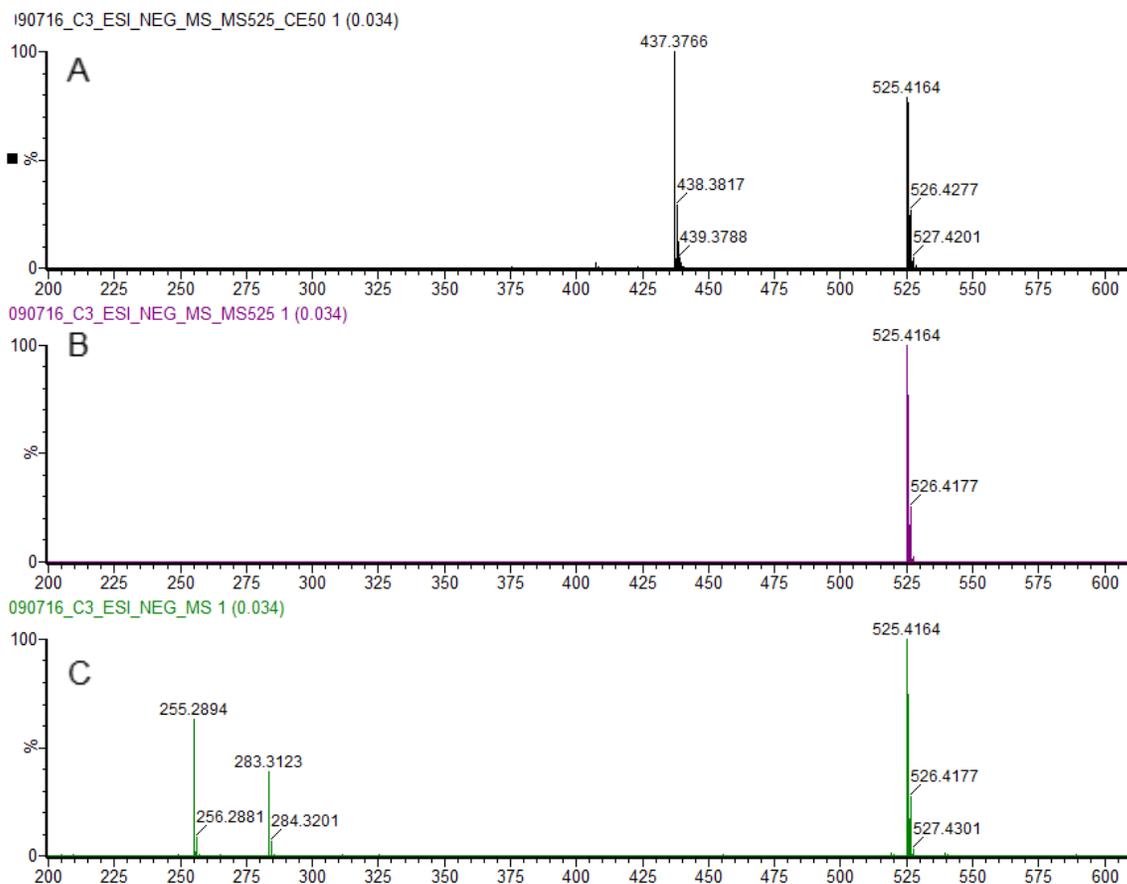
## GAD-002



**Figura 12'. Espectro de masas de GAD-002**

GAD-002 presenta una masa molecular exacta calculada de 512.3866 g/mol, que coincide con el ion molecular en 512.41 m/z [ $M^-$ ]. En el análisis también se observa el ion [ $M+1$ ] en 513.41 m/z y el ion [ $M-1$ ] 513.41 m/z, consistentes con la protonación o desprotonación del ion molecular, además de mostrar la pérdida del grupo propioniloxi y dos hidrógenos en 437.38 m/z [ $M^-74$ ].

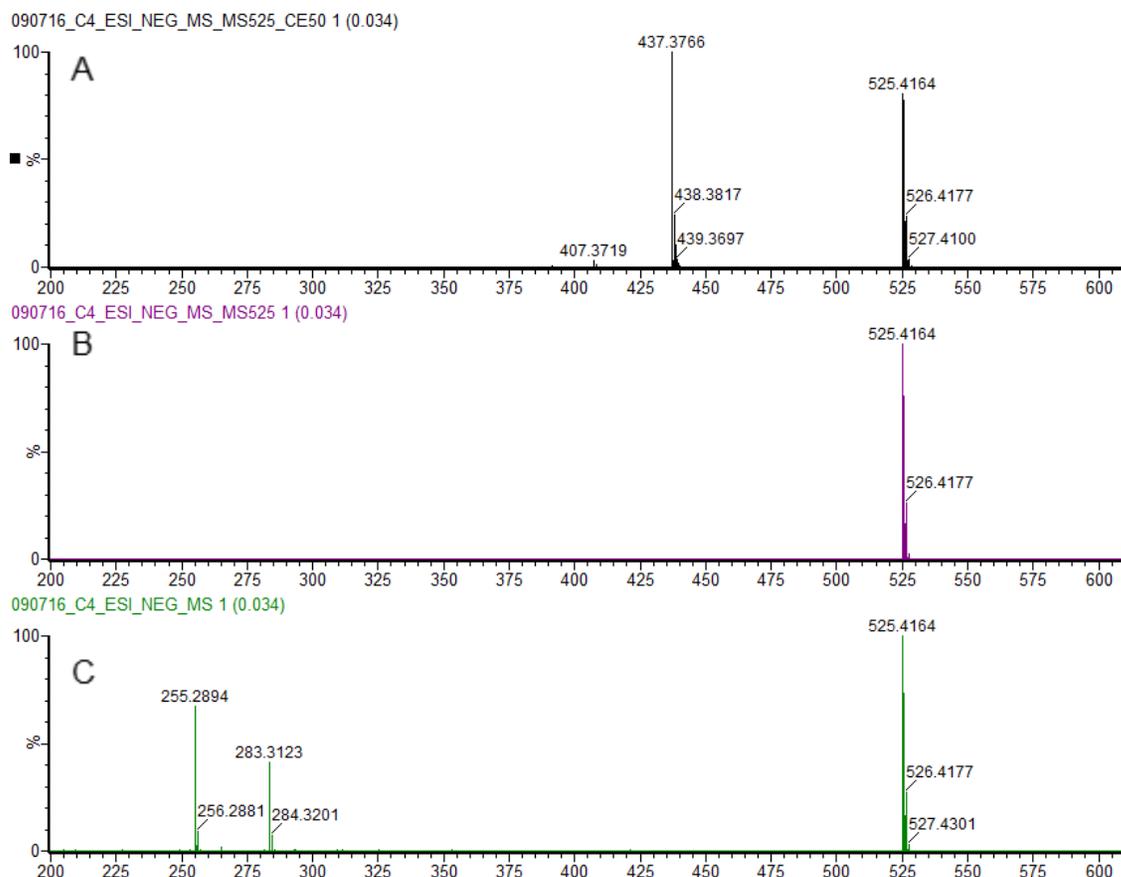
## GAD-003



**Figura 13'. Espectro de masas de GAD-003.**

GAD-003 presenta una masa molecular exacta calculada de 526.40 g/mol, que coincide con el ion molecular en 526.42 m/z [ $M^-$ ]. En el análisis también se observa el ion [ $M+1$ ] en 527.43 m/z y el ion [ $M-1$ ] 525.41 m/z, consistentes con la protonación o desprotonación del ion molecular. Al igual que los casos anteriores, se observa el ion 437.37 m/z [ $M-80$ ], correspondiente a la pérdida del grupo butiriloxi y dos hidrógenos.

## GAD-004

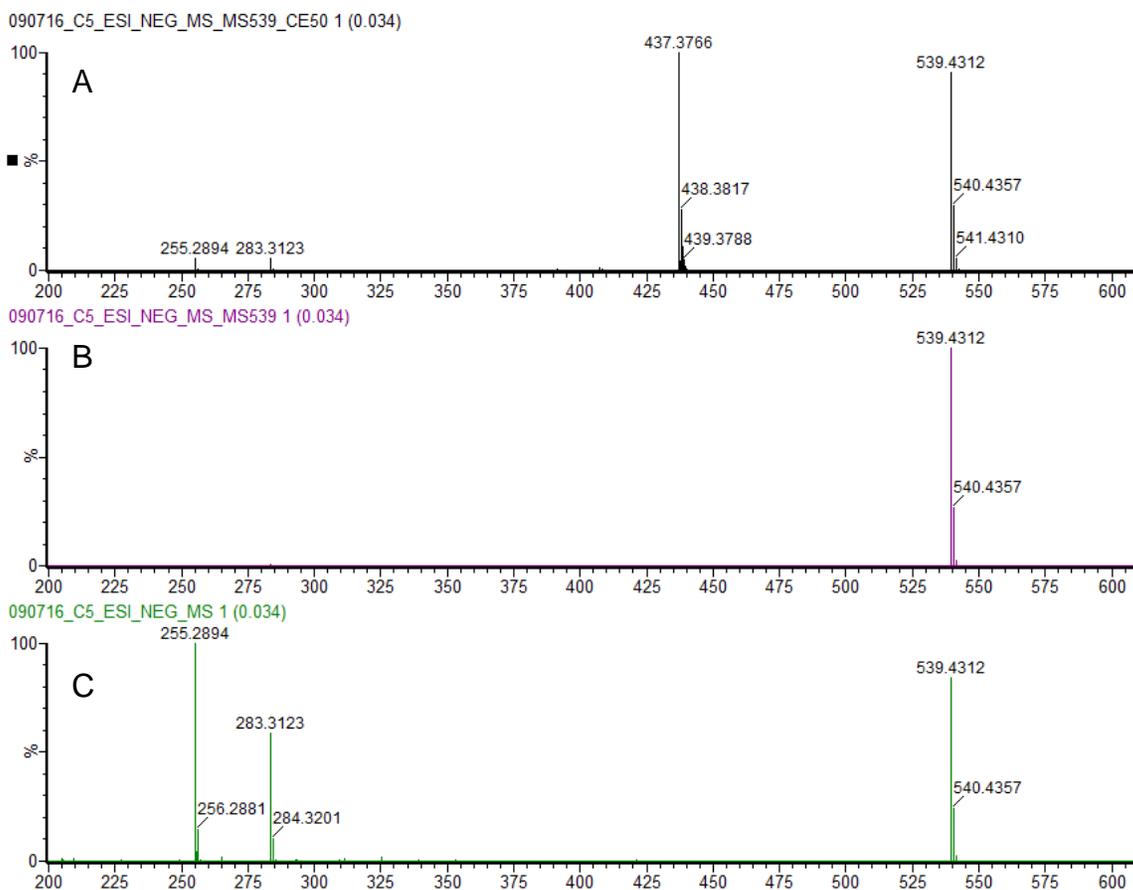


**Figura 14'. Espectro de masas de GAD-004**

GAD-004 presenta una masa molecular exacta calculada de 526.40 g/mol, que coincide con el ion molecular en 526.41 m/z [ $M^-$ ]. En el análisis también se observa el ion [ $M+1$ ] en 527.41 m/z y el ion [ $M-1$ ] 525.41 m/z, consistentes con la protonación o desprotonación del ion molecular. Adicionalmente, se encuentra el fragmento debido a la pérdida del grupo isobutiriloxi y dos hidrógenos en 437.38 m/z [ $M-80$ ].

GAD-003 y GAD-004 son isómeros estructurales, su masa es la misma y se conserva un patrón de fragmentación muy parecido, solo se observan pequeñas variaciones en los iones y en el peso molecular.

## GAD-005



**Figura 15'. Espectro de masas de GAD-005**

GAD-005 presenta una masa molecular exacta calculada de 540.42 g/mol, que coincide con el ion molecular en 540.441 m/z [ $M^-$ ]. En el análisis también se observa el ion [ $M+1$ ] en 541.43 m/z y el ion [ $M-1$ ] 439.43 m/z, consistentes con la protonación o desprotonación del ion molecular. Adicionalmente, se encuentra el fragmento debido a la pérdida del grupo isovaleriloxi y dos hidrógenos en 437.38 m/z [ $M-102$ ].