

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***SÍNTESIS DE NUEVOS CATIONES LIPOFÍLICOS FOSFORADOS
DERIVADOS DEL ÁCIDO CAFEICO CON POTENCIAL
ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN CÉLULAS TUMORALES***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Química área de Especialización en Química
Medicinal y Memoria para optar al Título de Química
Farmacéutica por:**

LEYLA VIVIANA OLGUÍN SEPÚLVEDA

Director de Tesis: Dr. Hernán Armando Pessoa Mahana

Santiago-CHILE

Enero 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

LEYLA VIVIANA OLGUÍN SEPÚLVEDA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Medicinal y Título de Química Farmacéutica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Hernán Pessoa Mahana _____

Co-director de Tesis:

Dr. Mario Faúndez Cáceres _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Claudio Olea Azar _____

Dr. Claudio Saitz Barria _____

Dr. Miguel Reyes Parada _____

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile, que permitieron el desarrollo de esta tesis en sus instalaciones. Asimismo, agradezco a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, que financió este proyecto a través de los FONDECYT regulares número 1130347 y 1170269.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es el final de un largo camino que comenzó con una carrera distinta y, en la búsqueda del equilibrio entre lo que quería entregar a la sociedad versus lo que ella y su sistema me entregaban para concretar esto, llegué a una Facultad escondida en un barrio de hospitales donde estudié una carrera que me hace sentir plena, con mucho que aportar a la calidad de vida de las personas y que me permitió conocer realidades y personas maravillosas que, de otro modo, hubiesen pasado inadvertidas.

Mi tesis está dedicada a mi madre, Nelda, una mujer que ha hecho de todo para que concrete mis sueños: ha trabajado de noche y de día, bajo el sol y la lluvia, bajo techo y en la calle. Ella se merece todo. Junto a ella, van los nombres de Juan y Olga, quienes dieron lo mejor que tenían.

Agradezco profundamente las conversaciones y lo enseñado por mi Director de Tesis, profesor Pessoa, así como por mi Codirector, profesor Faúndez. En ellos encontré personas incansables y comprometidas por descubrir conocimiento y compartirlo con sus estudiantes y, particularmente en el caso del profesor Pessoa, con quien se les cruce en el camino, literalmente.

Sebastián, Ruth, Macarena, Javiera, Raúl, Rodolfo, Claudio, Carla, Ignacio, Fernanda, Diego, Max, Alejandro, Francisco, David ¿Qué hubiese sido de mi paso por la Facultad sin ustedes? Desde paros, tomas, asambleas, votaciones,

protocolos, comisiones hasta, incluso, estudiar. El mayor aprendizaje fue con ustedes. Vuelvo a David: hace unos años no hubiese pensado que mi amigo terminaría siendo mi pareja, el padre de mi hijo y mi compañero en la vida que se viene por delante. A él y a nuestro hijo que pronto nacerá, Gael, les dedico este trabajo y todos mis retos, éxitos y fracasos futuros.

A la profesora Edda y a la profesora Olosmira, con quienes compartí varios años en el Departamento de Tecnología Farmacéutica en ayudantías, electivos y fueron quienes me tomaron el Examen de Farmacia. Gracias por todo lo que me enseñaron, todas las risas y, sobretodo, la paciencia.

Al Senado Universitario, cuerpo colegiado del cual formé parte entre el 2012 y 2014, a sus integrantes y sus funcionarios, quienes fueron parte importante de mi paso por la Universidad y de quienes guardo los mejores recuerdos y enseñanzas.

A Bárbara, a Mariana y a Marlene a la distancia. Ellas me vieron crecer y fueron pilares fundamentales del inicio de este camino. Nunca me dejaron sola.

A Carlos, sin él no hubiese sido posible la obtención de mis resultados biológicos. Gracias a él y al resto de los tesisistas del profesor Faúndez por hacer tan ameno mi breve paso por ese laboratorio.

A todos ellos, gracias totales.

“Hágasele amar la ciencia más que a las joyas y las sedas.

Que consagre a ella los mejores años de su vida. Que los libros científicos se coloquen en sus manos como se coloca el Manual de Piedad.

Y se alzará con toda su altivez y su majestad, ella que se ha arrastrado desvalida y humillada.

Que la gloria resplandezca en su frente y vibre su nombre en el mundo intelectual.”

“La instrucción de la mujer” (extracto)

Lucila Godoy Alcayaga

*“Por la Estela, por la Juana, que lavan pañales,
cinco mil cuatrocientos pañales por niño -creced y multiplicaos-,
por la Carmen, de rodillas en el barro cosechando porotos,
tomates, la simiente que plantó;
por las miles de Marías que infatigablemente cocinan - friegan –
limpian trapos y platos ajenos.
Por Ester, la de los dedos rotos de pelar almendras, en silencio,
junto a sus hermanas, en cadena de agro-industria”*

“Ocho de marzo”

Julieta Kirkwood

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PORTADA	i
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xv
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xviii
ZUSAMMENFASSUNG	xix
INTRODUCCIÓN	1
El cáncer	1
Apoptosis y cáncer	3
La mitocondria tumoral como diana farmacológica	8
Influencia de las especies reactivas del oxígeno en el cáncer	11
El ácido cafeico y sus ésteres como agentes antioxidantes	15
Ácido de Meldrum en la síntesis de ésteres de ácido cafeico	22
Reacción de Knoevenagel con modificación de Doebner	24
Trifenilfosfina	27
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
PARTE QUÍMICA	35
Consideraciones retrosintéticas	35
Síntesis de alquilbromoésteres derivados de ácido cafeico	37
Caracterización espectral de los alquilbromoésteres	42
Síntesis de cationes lipofílicos fosforados	67
Caracterización espectral de los cationes lipofílicos fosforados	70

	Página
RESULTADOS ESTUDIO BIOLÓGICO	87
Alquilbromoésteres	87
Cationes lipofílicos fosforados	91
Comparación de resultados en el estudio de viabilidad celular: alquilbromoésteres (9-Br, 10-Br y 11-Br) y cationes lipofílicos fosforados (9-P, 10-P y 11-P) sobre las mismas líneas celulares	94
Selectividad sobre HeLa	96
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFÍA	105

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1: Tautomerización del ácido de Meldrum.	23
Esquema 2: Reacción de Perkin. En la reacción general, podemos reemplazar el benzaldehído por otro aldehído aromático y la sal de ácido por otra con un largo de cadena distinto, siendo sódica o potásica, más su correspondiente forma anhidra.	24
Esquema 3: Reacción de Knoevenagel.	25
Esquema 4: Mecanismo general de la reacción de Knoevenagel con modificación de Doebner.	26
Esquema 5: Retrosíntesis de cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico. Donde n=9, 10, 11.	35
Esquema 6: Retrosíntesis de alquiltbromoésteres derivados de ácido cafeico. Donde n=9,10,11.	36
Esquema 7: Retrosíntesis de monoésteres alquiltbromados del ácido malónico. Donde n=9, 10, 11.	37
Esquema 8: Reacción general para la obtención de monoésteres alquiltbromados del ácido malónico. Donde n=9, 10, 11.	37
Esquema 9: Mecanismo de la reacción para la obtención de monoésteres alquiltbromados del ácido malónico. Donde R= (CH ₂) _n -Br; n= 9, 10, 11.	38
Esquema 10: Mecanismo de la reacción de Knoevenagel-Doebner para la obtención de alquiltbromoésteres derivados de ácido cafeico.	39

	Página
Esquema 11: Retrosíntesis de cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico.	67
Esquema 12: Mecanismo de reacción para la obtención de cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico. Donde n=9, 10, 11.	68

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

	Página
Figura 1: Características de las células tumorales.	2
Figura 2: Esquema vía extrínseca de la apoptosis.	4
Figura 3: Formación del apoptosoma.	6
Figura 4: Esquema de la vía intrínseca de la apoptosis.	6
Figura 5: Mecanismos de evasión de apoptosis en células tumorales.	7
Figura 6: Mitocondria y sus principales componentes. Además, se muestra detalle de la porción Fo y F1 de la proteína ATPsintasa.	9
Figura 7: Cadena transportadora de electrones.	10
Figura 8: Formación de EROs.	12
Figura 9: Ciclo celular.	14
Figura 10: Reacción de Fenton.	15
Figura 11: Ácido cafeico: ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoico	15
Figura 12: Ácido cinámico: ácido (E)-3-fenil-2-propenoico.	16
Figura 13: Éster 2-feniletílico del ácido cafeico (CAPE).	17
Figura 14: Estructura general de los ésteres de ácido cafeico probados por Costa, donde $R=C_nH_{2n+1}$ y $n=1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16$.	18

	Página
Figura 15: Ácido de Meldrum.	22
Figura 16: Trifenilfosfina.	27
Figura 17: Ampliación del sistema conjugado en el ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.	43
Figura 18: Ampliación del sistema catecólico en el ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.	43
Figura 19: Ampliación de señales correspondientes a protones de carbonos adyacentes a grupo éster y halógeno en el ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.	45
Figura 20: Espectro de protones ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.	46
Figura 21: Ampliación de porción alifática del ¹³ C-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.	48
Figura 22: Espectro de carbono ¹³ C-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.	49
Figura 23: Ampliación del sistema conjugado en el ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.	50
Figura 24: Ampliación de señales correspondientes a protones de carbonos adyacentes a grupo éster y halógeno en el ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo	52
Figura 25: Ampliación del sistema catecólico en el ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.	53
Figura 26: Espectro de protones ¹ H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.	54

	Página
Figura 27: Ampliación de porción alifática del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.	56
Figura 28: Espectro de carbono ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.	57
Figura 29: Ampliación del sistema conjugado en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.	58
Figura 30: Ampliación de señales correspondientes a protones de carbonos adyacentes a grupo éster y halógeno en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.	60
Figura 31: Ampliación del sistema catecólico en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.	61
Figura 32: Espectro de protones ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.	62
Figura 33: Ampliación del sistema alifático del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.	64
Figura 34: Espectro de carbono ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.	65
Figura 35: Monoéster alquil bromado de ácido malónico que se presenta como contaminante en muestras de cada alquilbromoéster. Donde n=9, 10, 11.	66
Figura 36: Ampliación del sistema catecólico en el ^1H -RMN de bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.	71
Figura 37: Ampliación del sistema conjugado en el ^1H -RMN de bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.	72

	Página
Figura 38: Espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.	74
Figura 39: Espectro de carbono ^{13}C -RMN de bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.	76
Figura 40: Ampliación del sistema conjugado del espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio.	78
Figura 41: Espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio.	79
Figura 42: Espectro de protones ^{13}C -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio.	81
Figura 43: Ampliación del sistema conjugado del espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.	83
Figura 44: Espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.	84
Figura 45: Espectro de protones ^{13}C -RMN de bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.	86
Figura 46: Gráficos correspondientes a cada línea celular ensayada que permiten comparar la actividad de los tres alquilbromoésteres sobre cada una.	90
Figura 47: Gráficos correspondientes a cada línea celular ensayada que permiten comparar la actividad de los tres cationes lipofílicos fosforados sobre cada una.	93

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Algunas especies reactivas del oxígeno.	13
Tabla 2: Efecto antitumoral de ácido gálico, ácido cafeico, trifenilfosfina y ésteres de ácido cafeico y ácido gálico y sus correspondientes IC ₅₀ . 1-4: Fiuza, 2004. 5-10: Jara, 2014. 11: Xia, 2008. 12: Nam, 2001. Líneas celulares no tumorales: L-132 y MM3MG.	21
Tabla 3: Alquilbromoésteres obtenidos.	40
Tabla 4: Cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico obtenidos.	68
Tabla 5: IC ₅₀ de alquilbromoésteres en ensayo con Rojo Neutro sobre distintas líneas celulares.	89
Tabla 6: IC ₅₀ de cationes lipofílicos fosforados en ensayo con MTT sobre distintas líneas celulares.	92
Tabla 7: Comparación de los resultados obtenidos para propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo (9-Br) y bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio (9-P) sobre HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero.	95
Tabla 8: Comparación de los resultados obtenidos para propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo (10-Br) y bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio (10-P) sobre HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero.	95
Tabla 9: Comparación de los resultados obtenidos para propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo (11-Br) y bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio (11-P) sobre HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero.	96
Tabla 10: Comparación de los resultados obtenidos para los cationes lipofílicos fosforados sobre HeLa y Vero.	97

	Página
Tabla 11: Valores de IC50 para cisplatino sobre las líneas HeLa (Fiuza y col, 2004), MCF-7 (Suberu y col, 2014), HCT-116 (Smith y col, 2001) y Vero (Sharifah Sakinah y col, 2007) y los obtenidos para los cationes lipofílicos y los alquilbromoésteres ensayados sobre las mismas líneas celulares.	98
Tabla 12: Logaritmo del coeficiente de reparto o partición calculado, lo cual indica, a mayor número, mayor lipofilicidad.	100

RESUMEN

El presente trabajo de investigación informa sobre la preparación de dos familias de compuestos: cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico y bromoésteres derivados de ácido cafeico como compuestos citotóxicos mitocondriotrópicos selectivos para células tumorales.

Para el diseño de las moléculas, se consideró:

- (1) Largo de cadena entre los componentes farmacofóricos.
- (2) Presencia o ausencia de carga que permita o no dirigirlas hacia la mitocondria
- (3) Incorporación de grupos funcionales con capacidad antioxidante

Las moléculas fueron ensayadas en las líneas celulares: HCT-116, H1975, HeLa, MCF-7, HL60 y Vero, con MTT y Rojo Neutro, dando como resultado mayor citotoxicidad para los cationes lipofílicos fosforados, mejores resultados para ésteres bromados y cationes fosforados con cadena de 10 carbonos y mayor selectividad para HeLa con 9-P.

SUMMARY

This research work provides information on the preparation of families of compounds: lipophilic cations derived from caffeic acid and bromoesters derived from caffeic acid as selective cytotoxic mitochondrotropic compounds for tumor cells.

For the design of the molecules, it was considered:

- (1) Chain length between the pharmacophoric moieties.
- (2) Presence or absence of charge that allows or does not direct them towards the mitochondria
- (3) Presence of antioxidant groups

The molecules were tested in the cell lines: HCT-116, H1975, HeLa, MCF-7, HL60 and Vero, with MTT and Neutral Red, resulting in greater cytotoxicity for the phosphorus lipophilic cations, better results for brominated esters and phosphorus cations with chain of 10 carbons and greater selectivity for HeLa with 9-P.

ZUSAMMENFASSUNG

Diese Forschungsarbeit liefert Informationen über die Herstellung von Verbindungsfamilien: lipophile Kationen aus Kaffeesäure und Bromester aus Kaffeesäure als selektive cytotoxische mitochondrotrope Verbindungen für Tumorzellen.

Für das Design der Moleküle wurde berücksichtigt:

- (1) Kettenlänge zwischen den pharmakologischen Komponenten.
- (2) Vorhandensein oder Fehlen von Ladung, die sie zu den Mitochondrien leitet oder nicht
- (3) Einbau von funktionellen Gruppen mit antioxidativer Kapazität.

Die Moleküle wurden in den Zelllinien HCT-116, H1975, HeLa, MCF-7, HL60 und Vero mit MTT und Neutralrot getestet, was zu einer höheren Zytotoxizität für die lipophilen Phosphor-Kationen führte, bessere Ergebnisse für bromierte Ester und Phosphor-Kationen mit einer Kette von 10 Kohlenstoffe und größere Selektivität für HeLa mit 9-P.

INTRODUCCIÓN

El cáncer

Se reconoce como “cáncer” al grupo de patologías caracterizadas por el crecimiento descontrolado de algún tipo de células. En general, cada cáncer recibe el nombre según el órgano o tejido donde se origina. Su origen es genético y su desarrollo se ve influenciado por factores como exposición ambiental, infecciones crónicas y estilos de vida poco saludables (Ministerio de Salud de Chile: Estrategia Nacional de Cáncer, 2016).

En Chile, el Ministerio de Salud (MINSAL), indica que, al año 2016, el cáncer fue la primera causa de carga de enfermedad, correspondiente a un 14% del total, posicionándose por sobre las enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, las neoplasias se ubican como la segunda causa de muerte en Chile, bajo las enfermedades cardiovasculares.

En el cáncer, las células patológicas se caracterizan por evadir la apoptosis, ser autosuficientes en cuanto a las señales de crecimiento, volverse insensibles a las señales que detienen el crecimiento, invadir otros tejidos, desarrollar angiogénesis y tener un potencial replicativo infinito (Hanahan & Weinberg, 2000), además de poseer un metabolismo energético alterado, altamente

capacitado para producir ATP en condiciones anaeróbicas (Hanahan & Weinberg, 2011), tal como lo muestra la figura 1.



Figura 1. Características de las células tumorales (Sánchez, 2013).

Un metabolismo energético alterado, suele ser uno de los cambios más importantes en las células al volverse tumorales. El aumento de la capacidad glicolítica en ausencia de oxígeno, como condición que se instala en una célula tumoral toma lugar gracias al proceso de fermentación láctica, en reemplazo de la respiración celular, esto es llamado “efecto Warburg”, y puede llegar a proporcionar hasta el 50% del ATP requerido por la célula, siendo que, en condiciones normales, aproximadamente, el 90% del ATP es producido por la mitocondria (Pedersen, 2007).

Otto Warburg propuso que, en el cáncer, las mitocondrias ven alterada su función: sugiere que “son apagadas” por los genes cancerosos ya que éstas son responsables del comienzo de la cascada de apoptosis por vía intrínseca (Pedersen, 2007). Josephine Modica-Napolitano planteó, el 2004, que las diferencias entre las mitocondrias de células tumorales y células no tumorales ofrecen una alternativa para desarrollar nuevas terapias farmacológicas diseñadas bajo esta premisa, hecho que permitiría una mayor selectividad de su citotoxicidad. Adicionalmente, Modica-Napolitano, propone utilizar cationes lipofílicos ya que estos se acumularían selectivamente en células tumorales atraídos por el potencial de membrana incrementado detectado en las mitocondrias tumorales.

Apoptosis y cáncer

Se conoce como “apoptosis” a la muerte celular programada. La principal característica de este tipo de muerte es que no es accidental, permite el recambio celular de células viejas, o que presenten fallas en su estructura o funcionamiento, por células nuevas y permite eliminar tejidos vestigiales en el desarrollo embrionario, como las membranas interdactilares en humanos que sí conservan algunas aves, como los patos.

La apoptosis puede iniciarse por señales externas o internas. En el primer caso, llamado vía extrínseca (figura 2), la cascada apoptótica se inicia por la unión de TNF (Factor de Necrosis Tumoral, TNF por sus siglas en inglés), citoquinas liberadas por el sistema inmune, a su respectivo receptor ubicado en la membrana celular (Locksley y colaboradores, 2001). Luego de esto, la procaspasa 8 es activada por proteólisis a caspasa 8 y liberada al citoplasma, donde activa a la procaspasa 3 por proteólisis a caspasa 3 que es la responsable de la fragmentación del ADN de la célula y la formación de cuerpos apoptóticos que, más tarde, son fagocitados (Kataoka y colaboradores, 1998).

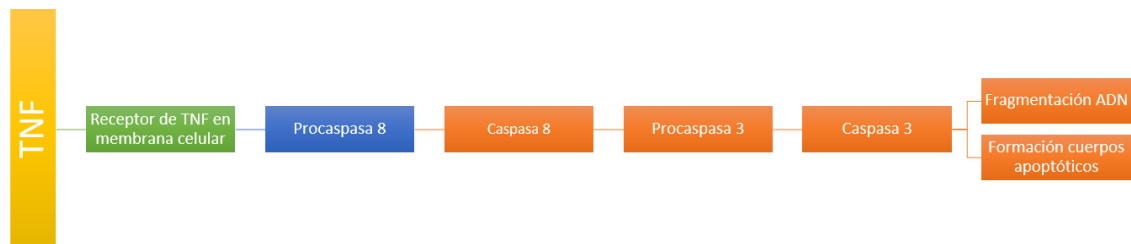


Figura 2. Esquema vía extrínseca de la apoptosis. Elaboración propia.

La vía intrínseca de la apoptosis (figura 4) se inicia por señales intracelulares negativas o positivas: las negativas consideran la ausencia de factores de crecimiento, hormonas o citoquinas, mientras que las señales positivas consideran la presencia de toxinas, radiación, hipoxia, hipertermia, radicales libres e infecciones virales, entre otros. Estos estímulos causan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) que comunica a la

matriz mitocondrial con el citoplasma, previa activación del gen p53, permitiendo la salida de dos grupos de proteínas pro apoptóticas (Chinnaiyan, 1999). El primer grupo consta del citocromo c, Smac/DIABLO y una proteasa conocida como HtrA2/Omi. El citocromo c activa a Apaf-1 y a la procaspasa 9, formando un apoptosoma. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi son las encargadas de inhibir a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP, por sus siglas en inglés) (Ekert & Vaux, 2005). El segundo grupo de proteínas liberadas desde la mitocondria al citosol, consta de AIF, endonucleasa G y CAD, pero esto ocurre tardíamente respecto a la liberación del primer grupo. AIF se transloca al núcleo y es la responsable de la fragmentación del ADN y la condensación del ADN nuclear periférico a cromatina, conocido como “etapa I”. En la “etapa II” de la condensación del ADN se observa una cromatina mucho más condensada gracias a la endonucleasa G y CAD (Susin y colaboradores, 2000). El apoptosoma se forma, en primera instancia, por la unión del citocromo c a Apaf-1 formando un primer complejo al cual, a continuación, se une la procaspasa 9 a su sitio correspondiente en Apaf-1, en presencia de ATP, que fue liberado gracias a la unión con el citocromo c (figura 3). La procaspasa 9 es activada por proteólisis a caspasa 9, quien es responsable de activar la cascada de caspasas (Cascales, 2003).



Figura 3. Formación del apoptosoma. Imagen extraída del sitio web del Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional <<http://gmot.uib.es>> [última visita: 09 de septiembre de 2017].

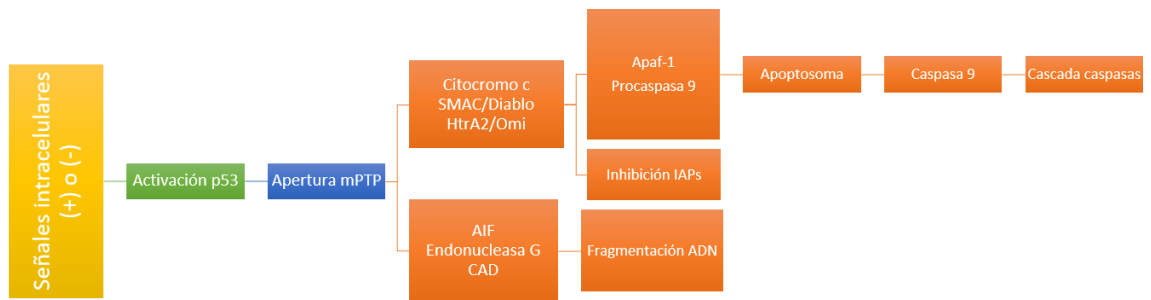


Figura 4. Esquema de la vía intrínseca de la apoptosis. Elaboración propia.

Al igual que en la vía extrínseca, el final de la apoptosis está caracterizado por la formación de cuerpos apoptóticos que, buscando guiar su fagocitosis por macrófagos, exponen hacia el medio extracelular a la fosfatidilserina que, normalmente, se encuentra expuesta hacia el citosol.

En el cáncer, podemos observar que, tanto la vía extrínseca como la intrínseca de la apoptosis, se encuentran alteradas, de forma que las células tumorales son capaces de evadir la muerte celular programada (figura 5). Algunos de los mecanismos involucrados corresponden a una sobreexpresión de IAP, disminución en la actividad de las caspasas, un desbalance entre la expresión de proteínas anti y pro apoptóticas y defectos o mutaciones en el gen p53 (Sánchez, 2013).

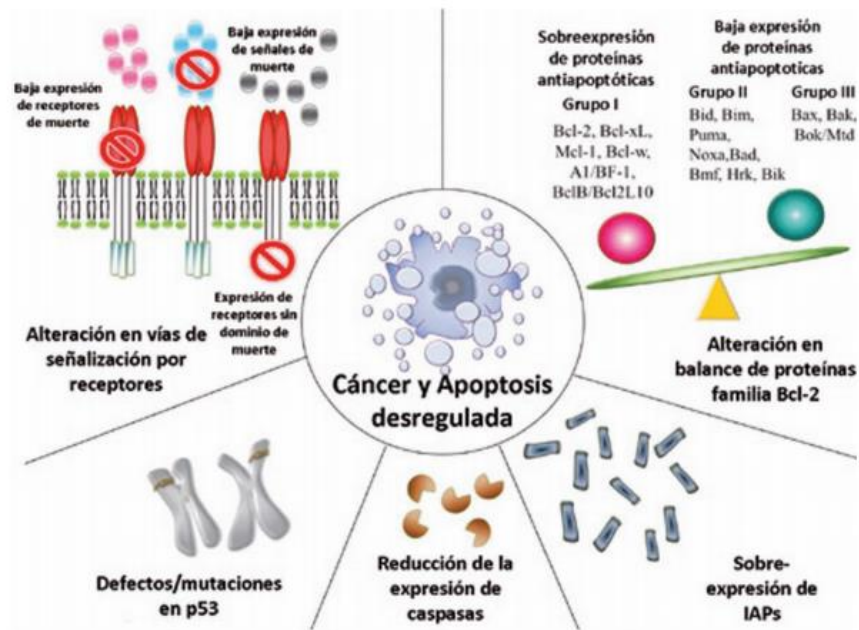


Figura 5. Mecanismos de evasión de apoptosis en células tumorales (Sánchez, 2013).

La mitocondria tumoral como diana farmacológica

La mitocondria (figura 6) es un organelo que cuenta con su propio ADN, participa de la vía intrínseca de la apoptosis y es el responsable de generar energía para la célula.

El ADN de la mitocondria (ADNmt) representa menos del 1% del material genético de una célula en los mamíferos, no contiene intrones ni histonas y se encuentra expuesto a los efectos deletéreos de las especies reactivas del Oxígeno (EROs) generadas por la fosforilación oxidativa (Modica-Napolitano, 2004). Esto causa que el ADNmt acumule una mayor cantidad de mutaciones que el ADN del núcleo, que han sido reportadas en varios tipos de cáncer.

La vía intrínseca de la apoptosis también recibe el nombre de “vía mitocondrial”, debido a que comienza con la liberación del citocromo C al citosol desde la mitocondria por activación del gen p53. Esta vía se activa por señales que indican que la célula no funciona bien: daño en el ADN, aumento anormal de Calcio en el citosol o estrés oxidativo. Esta vía es la responsable de que, las células que han perdido su funcionalidad, mueran de forma programada y permite la mitosis de células normales en su reemplazo.

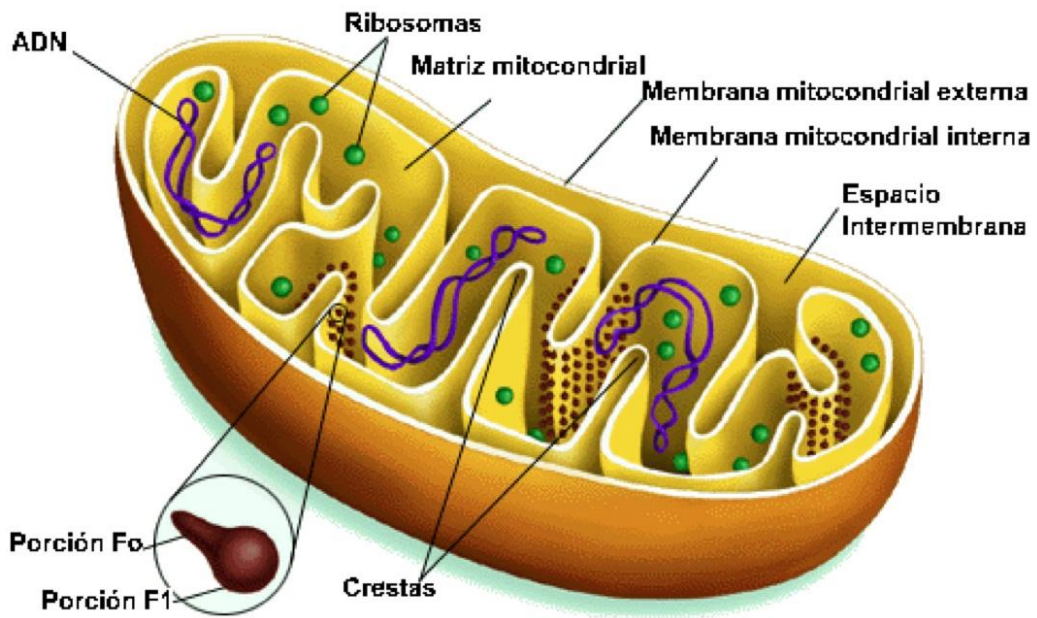


Figura 6. Mitocondria y sus principales componentes. Además se muestra detalle de la porción Fo y F1 de la proteína ATPsintasa. Imagen extraída del sitio web de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitaria de La Región de Murcia <<http://www.ffis.es>> [última visita: 09 de septiembre de 2017].

La mitocondria es el organelo responsable de generar energía en la célula en condiciones aeróbicas. Una vez completada la glicólisis en el citosol, el piruvato generado entra a la mitocondria para ser convertido en Acetil-CoA y entrar al Ciclo de Krebs el cual genera NADH, una coenzima con electrones con alto potencial de transferencia, que son incorporados al oxígeno a través de la Cadena Transportadora de Electrones, donde se utiliza la energía liberada de la oxidación del NADH para bombear protones y generar el gradiente electroquímico necesario para que la ATPsintasa sintetice ATP (figura 7). En

células tumorales, este mecanismo se encuentra anulado y la energía se genera por la síntesis anaeróbica de ácido láctico a partir de piruvato en el citosol. Esto genera un aumento del potencial de membrana de la mitocondria, en comparación a una mitocondria de una célula normal.

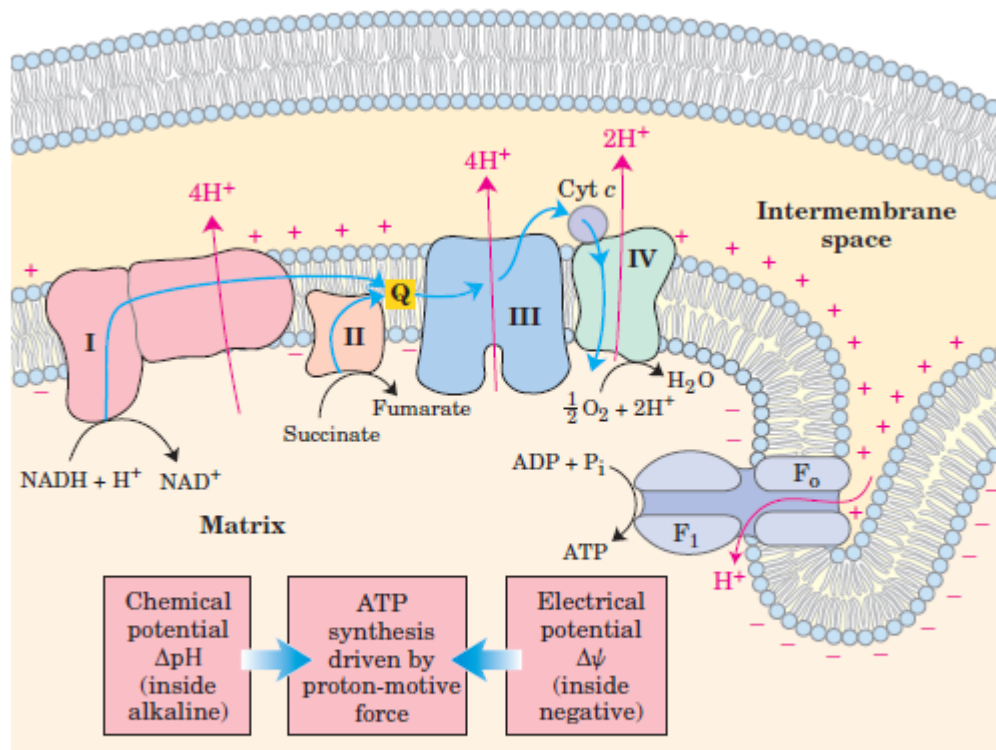


Figura 7. Cadena transportadora de electrones. Lehninger, Principles of Biochemistry.

El potencial de membrana de una mitocondria normal es de $\sim -140\text{mV}$ y el de una mitocondria cancerosa es de $\sim -220\text{mV}$, encontrándose hiperpolarizada (Forrest, 2015). El cambio en el potencial de membrana en la mitocondria cancerosa se debe a que se encuentra en condiciones anaeróbicas, las que podrían reducir la velocidad del transporte de electrones. (Solaini, 2010)

La probabilidad de fallas en el ADNmt, el importante rol de la mitocondria en la vía intrínseca de la apoptosis y su potencial de membrana aumentado por el cambio en su funcionalidad en una célula tumoral, vuelven a este organelo una interesante diana en el estudio de estrategias farmacológicas selectivas para el tratamiento del cáncer.

Influencia de las especies reactivas del oxígeno en el cáncer

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) se generan de forma endógena en las células no tumorales, específicamente en la mitocondria, como productos secundarios de la fosforilación oxidativa. Son iones, radicales o moléculas derivadas del oxígeno que poseen un electrón desapareado en su última capa de electrones. Constituyen especies altamente reactivas y pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: radicales libres oxigenados y EROs no radicalarios (Geou-Yarh Liou y Storz, 2010), como se muestra en la tabla 1.

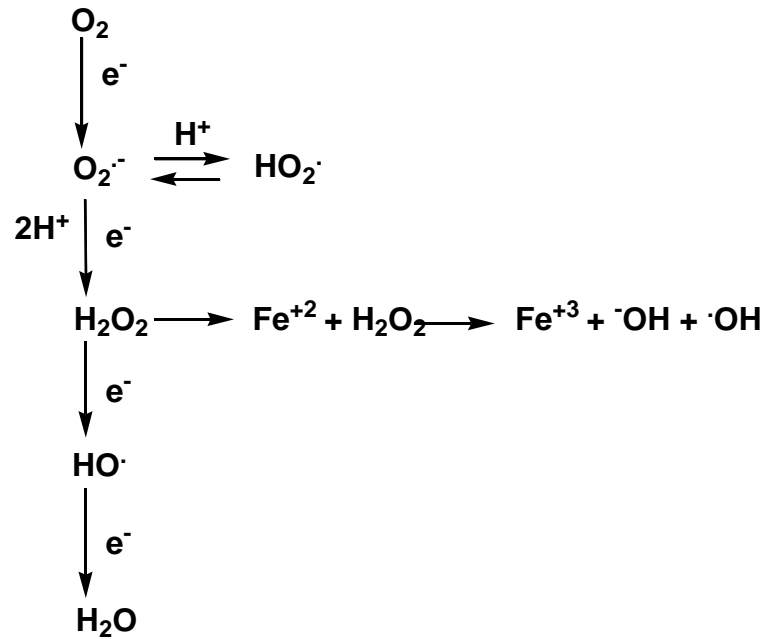


Figura 8. Formación de EROs. Elaboración propia.

De las especies descritas, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, han sido las especies más estudiadas en cáncer por su capacidad de interferir los procesos celulares normales (Geou-Yarh Liou y Storz, 2010). La formación de estas especies se muestra en la figura 8.

Radicales libres oxigenados	ERO no radicalarios
Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical hidroxilo (OH^{\cdot})	Oxígeno singulete (1O_2)
Radical hidroperóxido (O_2H^{\cdot})	Ozono (O_3)
Radicales peroxilo (ROO)	Hidroperóxidos orgánicos (ROOH)
Radicales alcoxilo (RO)	Peroxinitrito ($ONO^{\cdot-}$)

Tabla 1. Algunas especies reactivas del oxígeno.

Como se mencionó, las EROs tienen la capacidad de interferir en el ciclo celular (figura 9), contribuyendo a la proliferación descontrolada en el cáncer, donde los mecanismos intracelulares que mantienen los niveles normales, se encuentran “apagados”. Su aporte al aumento en la proliferación celular, ocurre gracias a que las EROs tienen la capacidad de provocar un aumento en los niveles de ARNm de ciclinas que participan en el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y, con esto, favorecen la mitosis por sobre la muerte celular gracias a que el control entre estas dos fases, ejercido por p53, se encuentra anulado (Felty, 2005).

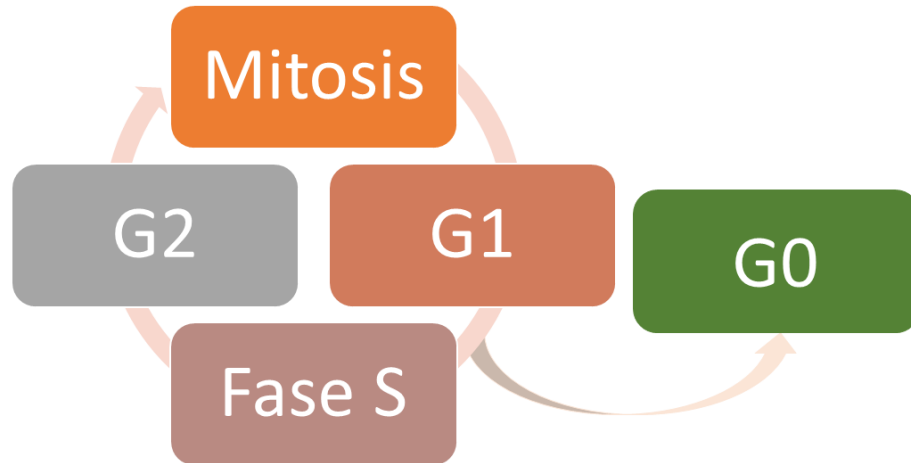


Figura 9. Ciclo celular. Elaboración propia.

El radical hidroxilo (OH) es la principal ERO involucrada en la reacción de iniciación de la peroxidación lipídica, proceso que compromete las propiedades de barrera de las membranas biológicas al alterar la estructura de los lípidos que las conforman (Gogvadze, 2008), además de atacar otros componentes celulares. El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), por su parte, es poco reactivo, pero tiene la capacidad de liberar Fe^{2+} al interactuar con proteínas que contienen hierro, el cual forma parte de la iniciación de la reacción de Fenton (figura 10), que permite generar radical hidroxilo en presencia de Fe^{2+} y peróxido de hidrógeno (Puppo, 1988).

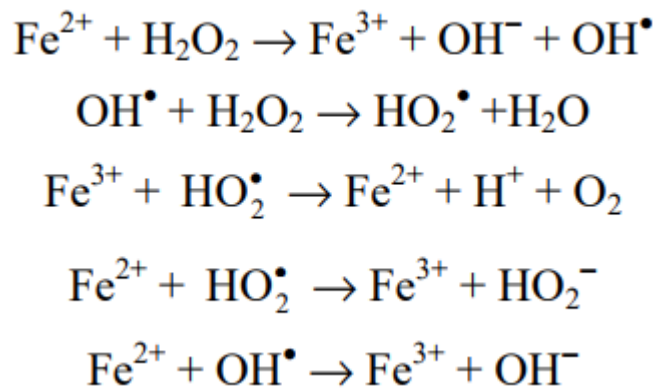


Figura 10. Reacción de Fenton. Barbusinski, 2009.

El ácido cafeico y sus ésteres como agentes antioxidantes

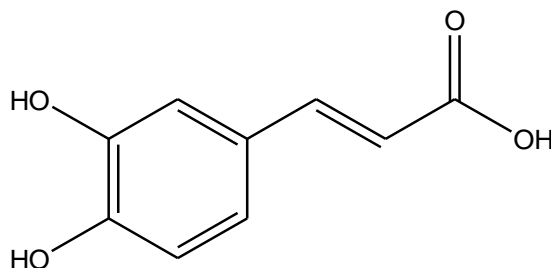


Figura 11. Ácido cafeico: ácido (E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoico

El ácido cafeico (figura 11) es un compuesto antioxidante presente en plantas, frutos y subproductos obtenidos a partir de ellos, tales como el vino, debido a que es un intermediario en la síntesis de la lignina: polímero encargado de formar paredes celulares y tejidos de soporte en el Reino Vegetal (Mariangel, 2013). La

estructura del ácido cafeico consta de un anillo catecólico conectado a un ácido acrílico, siendo considerado un ácido hidroxicinámico, tal como el ácido ferúlico y p-cumárico, que son derivados del ácido cinámico (figura 12) hidroxilados en el anillo aromático.

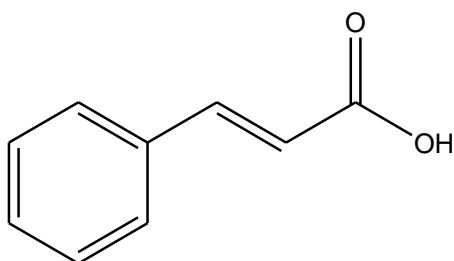


Figura 12. Ácido cinámico: ácido (E)-3-fenil-2-propenoico.

Asimismo, se ha encontrado que el éster 2-feniletílico del ácido cafeico (figura 13), en inglés abreviado como CAPE, presente en el propóleo, muestra actividad antitumoral *in vivo* frente a hepatoma de ratón H22 y sarcoma de ratón S180, entre otros tipos de tumores (Xia, 2008).

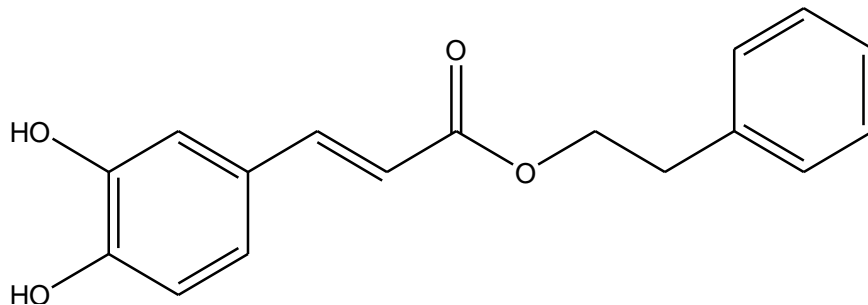


Figura 13. Éster 2-feniletílico del ácido cafeico (CAPE)

CAPE ha mostrado ser un inhibidor específico del factor nuclear implicado en procesos de estrés oxidativo NF- κ B, suprimiendo la vía de las lipooxigenasas del metabolismo del ácido araquidónico. A una concentración de 10 μ M, es capaz de bloquear completamente la producción de EROs en neutrófilos humanos y el sistema xantina/xantina oxidasa (Ozturk, 2012), llevando a una considerable disminución de estrés oxidativo.

Otros estudios han evaluado el efecto antioxidante de ésteres de ácido cafeico en emulsiones con aceite de oliva, obteniendo el máximo efecto en el éster con una cadena de 8 carbonos y, además, se observa que más del 70% de ellos se ubica en la interfase incluso cuando se ha añadido poco surfactante a la emulsión. Los ésteres probados corresponden los de largo de cadena indicado en la figura 14 (Costa, 2015).

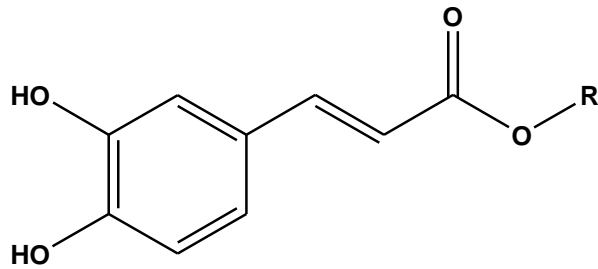
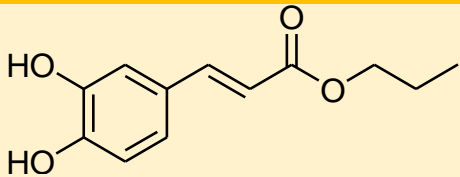
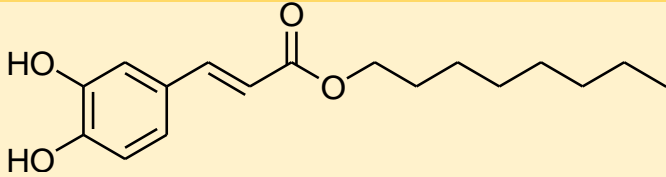
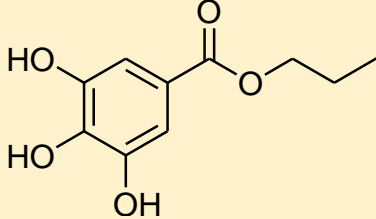
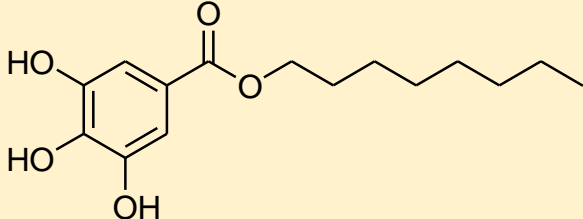
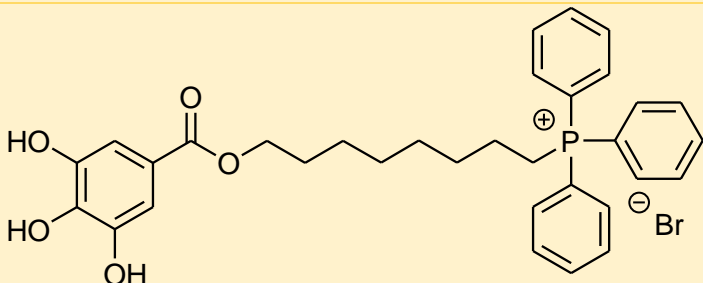
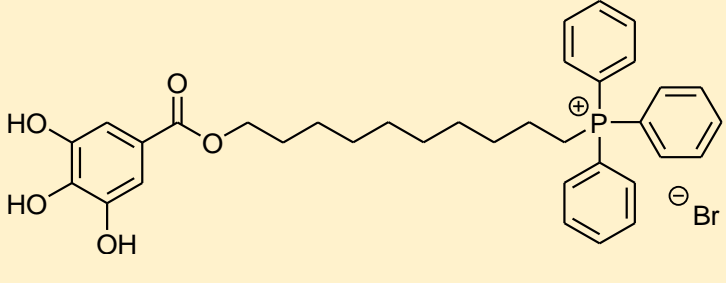
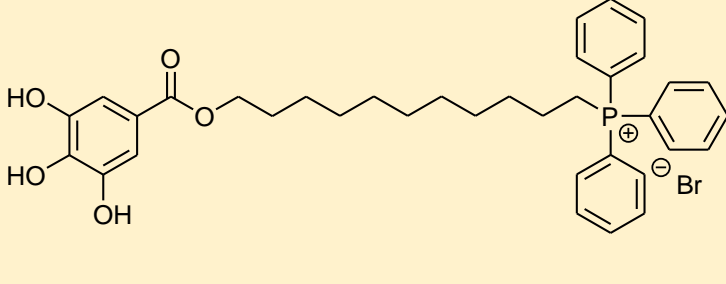
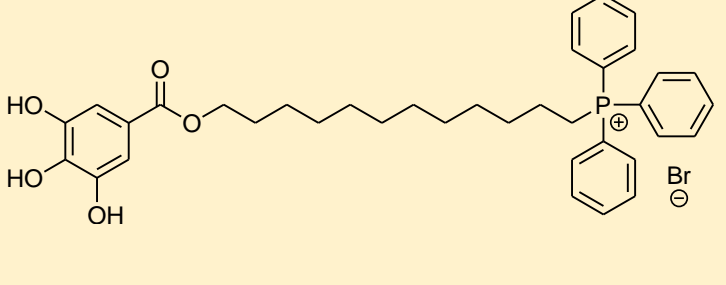
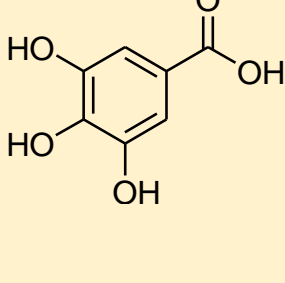
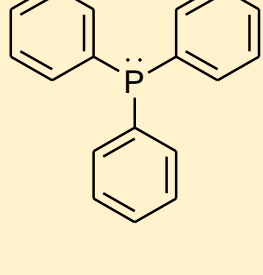


Figura 14. Estructura general de los ésteres de ácido cafeico probados por Costa, donde $R=C_nH_{2n+1}$ y $n=1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16$.

En estudios farmacológico con ésteres de ácido cafeico y ácido gálico, se ha visto que ambas clases muestran ser citotóxicos a partir de una cadena propílica y no presentan selectividad por células tumorales en comparación a células no tumorales cuando dichos ésteres presentan una naturaleza alquílica sin cargas (Fiuza, 2004). Por otra parte, al enfocarnos en el largo de cadena, podemos ver en cationes lipofílicos fosforados derivados del ácido gálico, que el compuesto más activo como antitumoral es el galato con una cadena de 10 carbonos (Jara, 2014). Además, al estudiar cationes lipofílicos fosforados derivados del ácido gálico como antichagásicos, se observó una mejora en su actividad al aumentar la lipofilidad con cadenas largas, sin embargo, al tener cadenas que superen los 14 carbonos, las moléculas en cuestión mostraron comportarse como detergentes (Cortes, 2015). Lo anteriormente dicho, se muestra en la tabla 2.

Molécula	IC ₅₀ (μM)	Línea celular
	12,0	HeLa
	9,0	L-132
	70,0	Hela
	22,0	L-132
	8,0	HeLa
	10,0	L-132
	45,0	HeLa
	20,0	L-132
	13,4	TA3/HA
	14,4	TA3-MTX-R
	34,6	CCRF-CEM
	29,4	MM3MG

Molécula	IC ₅₀ (μM)	Línea celular
	0,4	TA3/HA
	0,4	TA3-MTX-R
	1,6	CCRF-CEM
	7,1	MM3MG
	6,4	TA3/HA
	3,7	TA3-MTX-R
	19,7	CCRF-CEM
	14,3	MM3MG
	0,7	TA3/HA
	1,2	TA3-MTX-R
	0,6	CCRF-CEM
	1,4	MM3MG
	163,1	TA3/HA
	160,2	TA3-MTX-R
	>200	CCRF-CEM
	>200	MM3MG
	190,0	TA3/HA
	>200	TA3-MTX-R
	184,0	CCRF-CEM
	>200	MM3MG

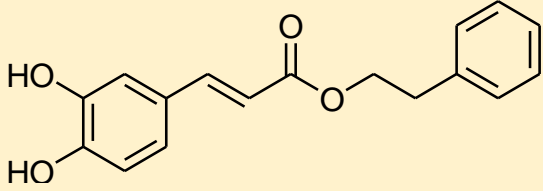
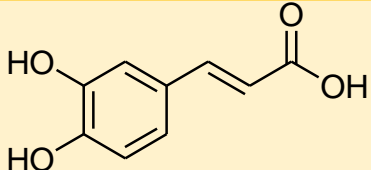
Molécula	IC ₅₀ (µM)	Línea celular
	5,5	BEL-7404
	26,7	MCF-7
	83,6	A549
	44,7	BCG832
	>30	B16
	>30	HCT116
	>30	A431

Tabla 2. Efecto antitumoral de ácido gálico, ácido cafeico, trifenílfosfina y ésteres de ácido cafeico y ácido gálico y sus correspondientes IC₅₀. 1-4: Fiuza, 2004. 5-10: Jara, 2014. 11: Xia, 2008. 12: Nam, 2001. Líneas celulares no tumorales: L-132 y MM3MG.

El anillo catecólico es parte esencial de la actividad antioxidante y citotóxica del ácido cafeico y sus ésteres derivados, lo cual se ha comprobado al metilar uno de sus grupos hidroxilo, o ambos, y observar que las propiedades antes mencionadas desaparecen al ser sometidas a ensayos de viabilidad celular en las líneas tumorales B16, HCT116 y A431 (Nam, 2001).

Considerando lo anteriormente expuesto, es posible sintetizar ésteres a partir del ácido cafeico y añadir propiedades que podrían afectar su selectividad, tal como

la presencia de un grupo funcional que porte una carga positiva deslocalizada, considerando a la mitocondria cancerosa como diana farmacológica. Al presentar un potencial de membrana más negativo que la mitocondria normal, se plantea la idea de añadir una carga positiva que dirija los ésteres hacia ella, sintetizando cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico.

Ácido de Meldrum en la síntesis de ésteres de ácido cafeico

El ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona) (figura 15) es un compuesto que fue obtenido en 1908 a partir de la condensación del ácido malónico con acetona. Tiene un pKa de 4,83 que es comparable al del ácido acético (pKa 4,76) (McNab, 1961).

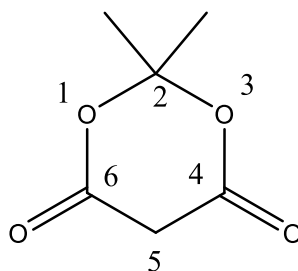
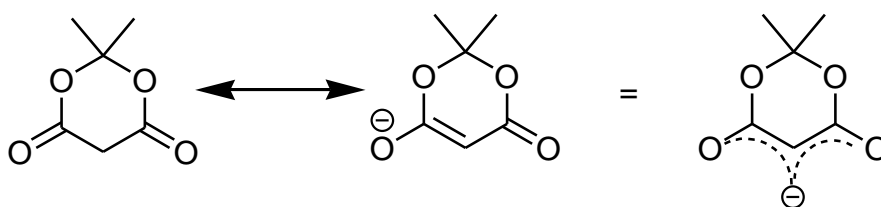


Figura 15. Ácido de Meldrum.

El ácido de Meldrum se encuentra principalmente en su forma tautomérica monoenólica (esquema 1) y la propiedad química de nuestro interés es su susceptibilidad a ataques electrofílicos en la posición 5, que mantiene al abrir el anillo en forma análoga al ácido malónico (McNab, 1961. Lipson, 2009).

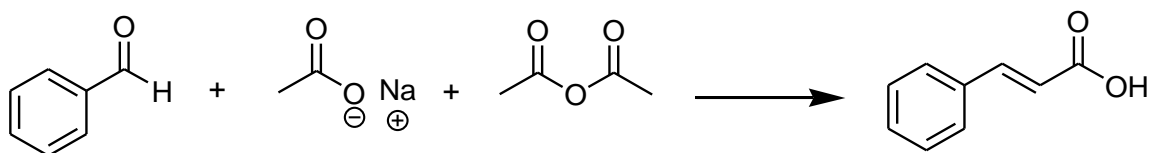


Esquema 1. Tautomerización del ácido de Meldrum.

Estas propiedades, permiten utilizar al ácido de Meldrum en la síntesis de ésteres de ácido cafeico: en primer lugar, generando ésteres con la cadena carbonada de largo deseado conectado a un sistema conjugado con el anillo catecólico que se formará cuando, posteriormente se añada 3,4-dihidroxibenzaldehído por condensación de Knoevenagel con modificación de Doebner.

Reacción de Knoevenagel con modificación de Doebner

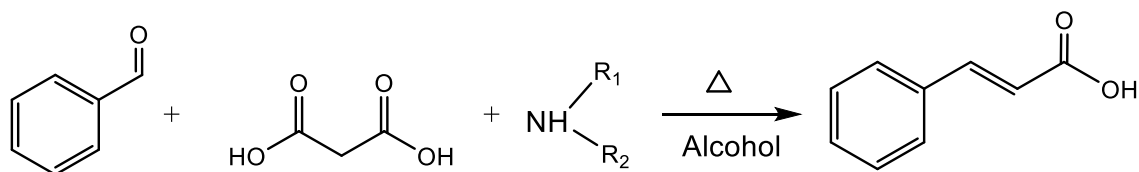
La reacción de Knoevenagel es una reacción de condensación que, originalmente, surgió como la reacción de Perkin modificada.



Esquema 2. Reacción de Perkin. En la reacción general, podemos reemplazar el benzaldehído por otro aldehído aromático y la sal de ácido por otra con un largo de cadena distinto, siendo sódica o potásica, más su correspondiente forma anhidra.

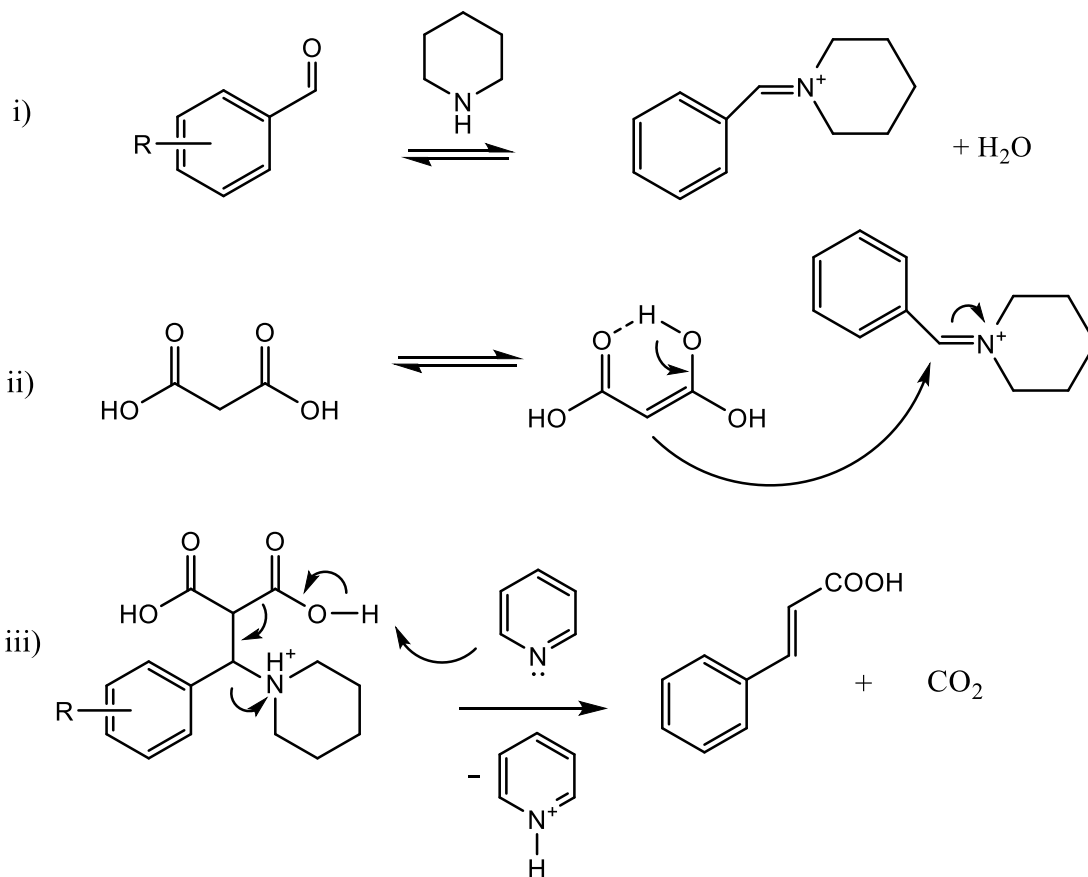
La reacción de Perkin (esquema 2) busca formar ácido cinámico por calentamiento de benzaldehído con acetato de sodio y anhídrido acético, teniendo la desventaja de requerir una alta temperatura y un largo tiempo de calentamiento que, 21 años más tarde, Knoevenagel modificó usando ácido malónico y amonio o una amina primaria o secundaria como catalizador básico, en alcohol como solvente (esquema 3). El resultado de esta modificación fue

pasar de 5 horas a 180°C, con la reacción de Perkin, a 2-4 horas a 100°C. Además, pasó de un rendimiento del 50-70% al 70-80% (Rosenberg, 1951).



Esquema 3. Reacción de Knoevenagel.

Años más tarde, en 1901, Doebner publicó el trabajo donde usa piridina como solvente y trazas de piperidina como catalizador en la reacción de benzaldehído con ácido malónico para obtener ácido cinámico (esquema 4). El rendimiento de dicho procedimiento, fue de un 80-90%, luego de calentar por 2 horas a 100°C (Doebner, 1901. Rosenberg, 1951).



Esquema 4. Mecanismo general de la reacción de Knoevenagel con modificación de Doebner.

Por tanto, es posible combinar las propiedades del ácido de Meldrum con la reacción de Knoevenagel-Doebner para obtener ésteres de diversos ácidos asociados a un sistema conjugado, como el ácido cafeico y, a partir de ellos, conseguir nuevos cationes lipofílicos que respondan a las propiedades de las células tumorales previamente expuestas.

Trifenilfosfina

La trifenilfosfina (figura 16) es un compuesto ampliamente usado para formar la porción catiónica de diversas moléculas mitocondriótropas (He, 2015). Esto se debe a su baja toxicidad: se requieren de altas y repetidas dosis para producir signos clínicos de irritación respiratoria y disminución de peso en ratas (Waritz, 2010).

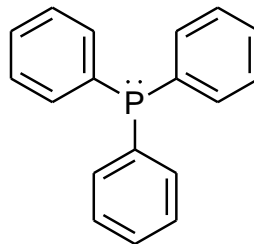


Figura 16. Trifenilfosfina.

Además, el par de electrones libres ubicados en el fósforo, le permiten reaccionar mediante una sustitución nucleofílica tipo 2 frente a buenos grupos salientes, como un átomo de bromo, permitiendo formar cationes fosforados a partir de precursores bromados.

En relación a lo expuesto, y a nuestros intereses investigativos, nos pareció de importancia implementar un estudio de síntesis y ensayos biológicos de nuevos cationes lipofílicos fosforados derivados del ácido cafeico específicamente explorando la potencial capacidad antitumoral de estos compuestos, en vista de aportar al estudio de la búsqueda de nuevas estructuras bioactivas en el tratamiento antineoplásico.

HIPÓTESIS

“Nuevos cationes lipofílicos fosforados derivados de ésteres del ácido cafeico, exhibirán un mayor efecto citotóxico sobre células tumorales en función de la reconocida capacidad antioxidante del anillo catecólico enlazado y conjugado a una agrupación estructural de cinamoilo, conectado a una cadena polimetilénica de longitud variable de 9 a 11 carbonos, que se enlaza a una función trifenilfosfonio responsable de su direccionalidad mitocondrial.”

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar cationes lipofílicos fosforados derivados de ésteres del ácido cafeico con cadena polimetilénica de longitud variable y evaluar su actividad citotóxica en células tumorales y no tumorales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Sintetizar los correspondientes precursores bromados de cada catión lipofílico por reacción de Knoevenagel-Doebner.
- (2) Sintetizar tres cationes lipofílicos derivados de ésteres del ácido cafeico, cuya porción catiónica corresponda a la agrupación de trifenilfosfina. Cada uno de estos derivados portarán diferentes largos de cadena polimetilénica que va desde 9 a 11 carbonos.
- (3) Estudiar la actividad citotóxica de los cationes lipofílicos sintetizados y sus intermediarios, en células no tumorales Vero y tumorales HCT-116, H1975, HeLa, MCF-7 y HL60.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Solventes y soportes de purificación

Los solventes utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich y Merck en Grado Reactivo Analítico (p.a.) que corresponden a:

- Acetato de etilo $\geq 99,8\%$ para cromatografía líquida. Merck.
- n-Hexano $\geq 98,0\%$ para cromatografía de gas. Merck.
- Acetonitrilo $\geq 99,9\%$ para cromatografía líquida. Merck.
- Metanol $\geq 99,8\%$ para análisis. Merck.
- Tolueno $\geq 99,5\%$ para análisis, Merck
- Sílica gel para cromatografía en columna (60 A, 70-230 mesh, 63-200 μm)
- Bicarbonato de sodio grado técnico
- Sulfato de sodio anhidro grado técnico
- Ácido clorhídrico concentrado 37% p/v
- Placas de sílica gel F-254 para cromatografía en capa fina

De grado técnico, purificados por destilación y posterior secado con sulfato de sodio anhidro para su uso en cromatografía en capa fina y para cromatografía en columnas se utilizó acetato de etilo y n-hexano.

Reactivos síntesis de alquilbromoésteres y cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico

- 9-bromo-1-nonanol 95%, Sigma-Aldrich
- 10-bromo-1-decanol 90%, Sigma-Aldrich
- 11-bromo-1-undecanol >99,0%, Sigma-Aldrich
- 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona 98%, Sigma-Aldrich
- 3,4-dihidroxibenzaldehído 97%, Sigma-Aldrich
- Piperidina $\geq 99,5\%$, Sigma- Aldrich
- Piridina $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich
- Trifenilfosfina 99%, Sigma-Aldrich

Líneas celulares

- HCT116
- H1975
- HeLa
- MCF-7
- HL60
- Vero

Metodología de ensayos de viabilidad

A. MTT:

El ensayo de viabilidad utilizando MTT, consiste en la valoración colorimétrica de la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por parte de las oxidoreductasas NAD(P)H-dependientes celulares. El MTT es un compuesto de color amarillo que al ser reducido a formazán se torna en un color violáceo en células vivas (Liu *et al.* 1997). El protocolo consiste en la siembra de las células a evaluar (1×10^6 células/mL) en placas de 96 pocillos, y agregar los compuestos a diferentes concentraciones e incubar a 37°C por 72 horas. Posterior a la incubación agregar $10 \mu\text{L}$ /pocillo de la solución de MTT, y luego de 4 horas agregar $100 \mu\text{L}$ /pocillo de una solución de SDS 10%, incubar 24 horas y finalmente cuantificar en un lector de placas a 570 nm. La viabilidad celular se calcula como porcentaje de absorbancia en relación al control (células a las que se les agrega el solvente, DMSO o DMF). Se calcula el valor de IC_{50} a través de un análisis de porcentaje de viabilidad vs logaritmo de la concentración del fármaco.

B. Rojo Neutro:

El ensayo de viabilidad utilizando Rojo Neutro se basa en la habilidad de las células vivas de incorporar y unir la tinción de Rojo Neutro. Esta tinción catiónica se concentra en los lisosomas donde se une vía interacciones electrostáticas hidrofóbicas a los grupos aniónicos y fosfatos de la matriz lisosomal. La tinción

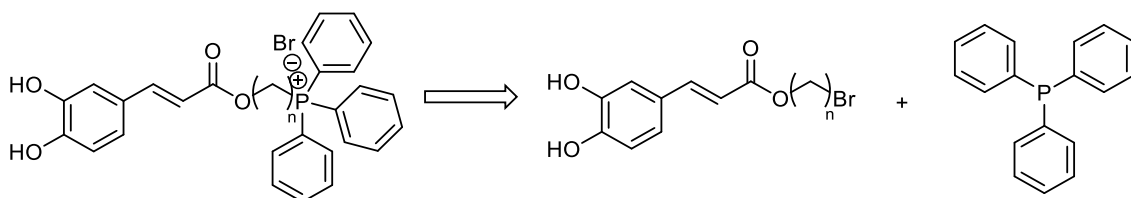
es posteriormente extraída de las células viables utilizando una solución de etanol acidificada, y la absorbancia de la tinción solubilizada es cuantificada vía espectrofotometría (Repetto et al., 2008). El protocolo consiste en la siembra de las células a evaluar (5×10^4 células/mL aprox), agregar los compuestos a evaluar a diferentes concentraciones (5-150 μ M) e incubar por 72 horas. Posteriormente a la incubación se descarta el medio de la placa (vía aspiración o decantación), y se adicionan 100 μ L de la solución de Rojo Neutro 40 μ g/mL a cada pocillo. La placa es incubada por 2 horas para posteriormente remover el medio con Rojo neutro (vía aspiración o decantación), y lavar la placa con PBS. Luego se adicionan 150 μ L de la solución de desteñido (50% etanol, 49% agua deionizada, 1% ácido acético glacial) por pocillo, dejando la placa en agitación por 10 minutos para finalmente cuantificar en un lector de placas la absorbancia a 540 nm. La viabilidad celular se calcula como porcentaje de absorbancia en relación al control (células a las que se les agregó el solvente, DMSO o DMF). Se calcula el valor de IC₅₀ a través de un análisis de Porcentaje de viabilidad vs Logaritmo de la concentración del fármaco.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

PARTE QUÍMICA

Consideraciones Retrosintéticas.

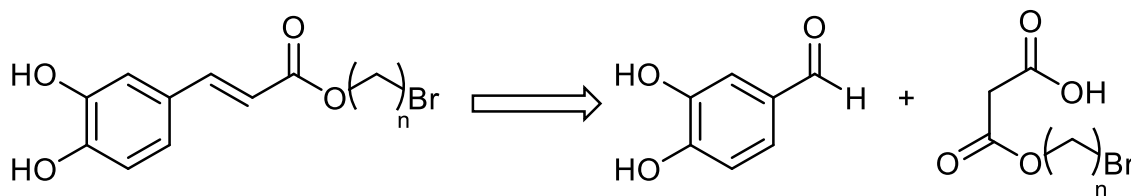
En relación a lo expuesto, se exponen los resultados obtenidos según la propuesta central del proyecto. En el esquema 5 se muestra la retrosíntesis abordada como diseño estratégico para la obtención para nuestras moléculas objetivo.



Esquema 5. Retrosíntesis de cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico. Donde $n=9, 10, 11$.

Esta desconexión se basa en la reacción de formación de una sal de fosfonio a través del ataque nucleofílico S_N2 de trifenilfosfina sobre alquilbromoésteres del ácido cafeico.

Por su parte, el derivado bromado de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo se obtuvo según el esquema retrosintético adjunto (esquema 6).



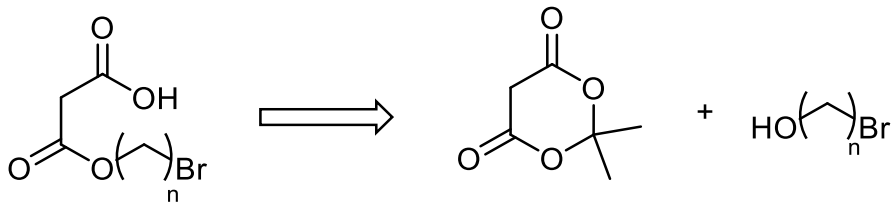
5

Esquema 6. Retrosíntesis de alquilbromoésteres derivados de ácido cafeico.

Donde $n=9,10,11$.

Tal como se aprecia en el esquema 6 los derivados bromados pueden sintetizarse a través una reacción de adición-eliminación entre monoesteres alquilbromados del ácido malónico con 3,4-dihidroxi-benzaldehído.

Por su parte, los monoésteres correspondientes a cada alquilbromoéster ($n= 9, 10, 11$) fueron obtenidos por reacción del ácido de Meldrum con los correspondientes bromoalcoholes de cadena larga con longitud de cadena polimetilénica $n= 9, 10, 11$, siendo todos productos comerciales (esquema 7).

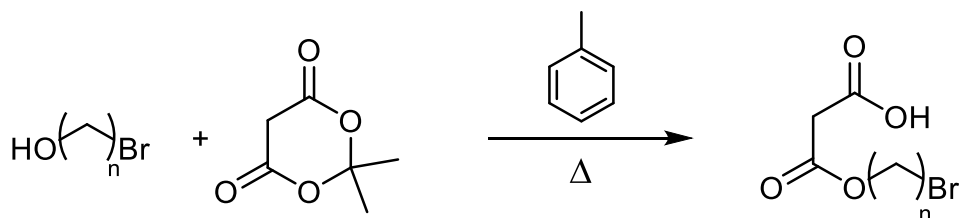


Esquema 7. Retrosíntesis de monoésteres alquilbromados del ácido malónico.

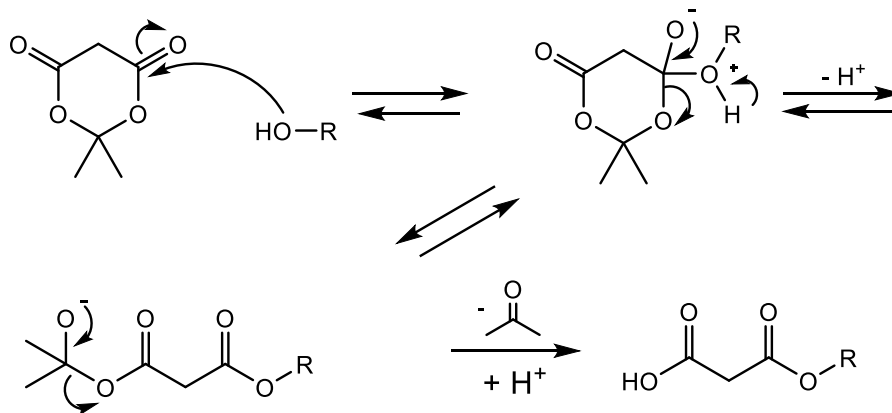
Donde $n=9, 10, 11$.

Síntesis de alquilbromoésteres derivados de ácido cafeico.

Inicialmente, se llevó a cabo la reacción de los siguientes alcoholes (9-bromo-1-nonanol, 10-bromo-1-decanol y 11-bromo-1-undecanol) con ácido de Meldrum en presencia de tolueno a reflujo (Xia, 2008), tal como se aprecia en los esquemas 8 y 9.

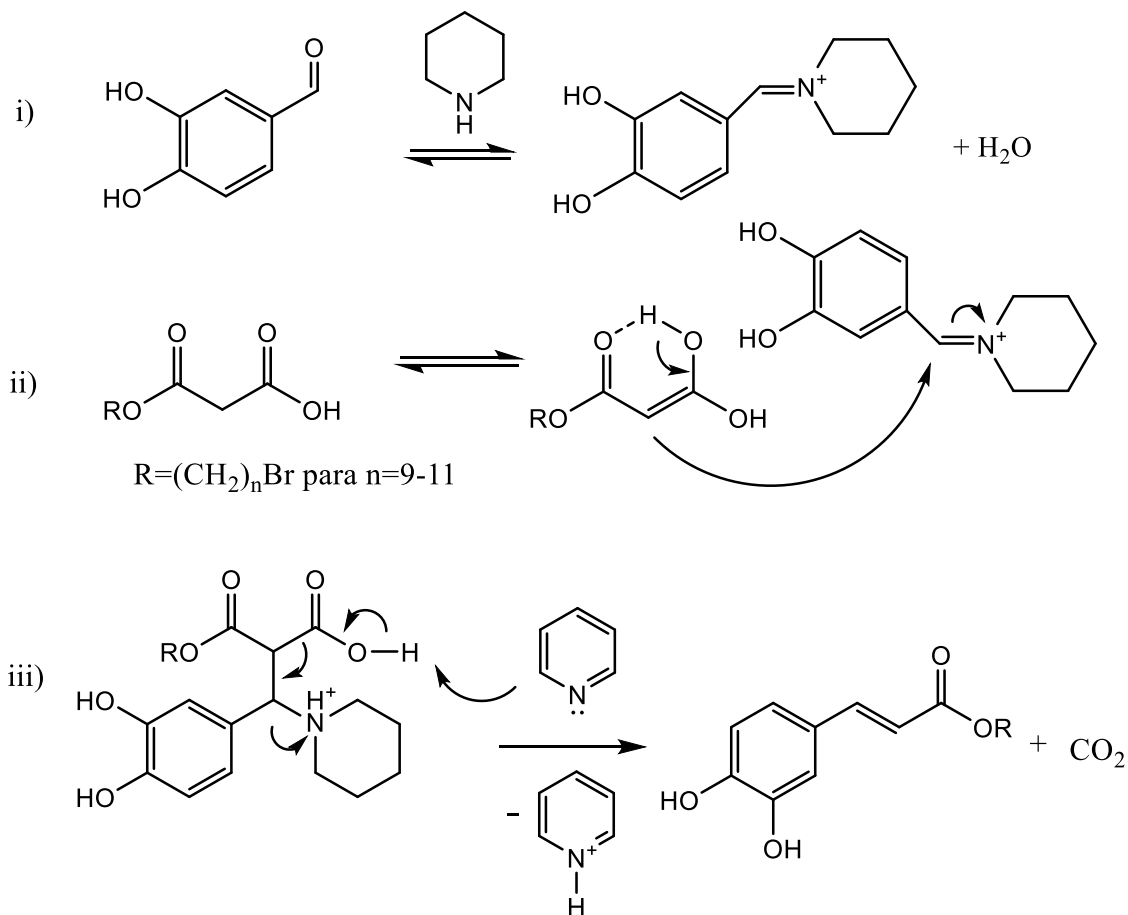


Esquema 8. Reacción general para la obtención de monoésteres alquilbromados del ácido malónico. Donde $n=9, 10, 11$.



Esquema 9. Mecanismo de la reacción para la obtención de monoésteres alquilbromados del ácido malónico. Donde R= (CH₂)_n-Br; n= 9, 10, 11.

La reacción se conduce en un período de 5 horas. Luego de esto, los monoésteres alquilbromados ácidos reaccionan *in situ* con el 3,4-dihidroxibenzaldehído en presencia de piridina y piperidina en una reacción tipo Knoevenagel-Doebner según mecanismo general adjunto (esquema 10).



Esquema 10. Mecanismo de la reacción de Knoevenagel-Doebner para la obtención de alquilbromoésteres derivados de ácido cafeico.

Esta reacción se basa en una condensación de Knoevenagel con posterior modificación de Doebner, en la cual el carbonilo benzaldhídico reacciona con piperidina que actúa como catalizador en una relación molar 1:1 y cuyo objetivo es de activar la función carbonílica, formando un catión iminio intermediario que experimenta ataque nucleofílico del componente enólico del ácido malónico bajo

la forma de su monoéster, para dar un aducto sobre el cual finalmente actúa la piridina como agente desprotonante favoreciendo la descarboxilación bajo las condiciones de calentamiento regulado (60 °C), generando los correspondientes ésteres como derivados del ácido acrílico.

Esta reacción de condensación, generó, finalmente, los alquilbromoésteres α,β -insaturados como productos oleosos de color amarillo pálido con rendimientos entre 11-17%.

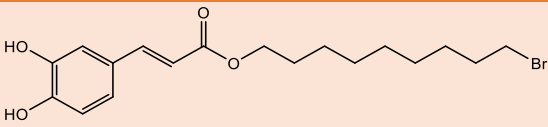
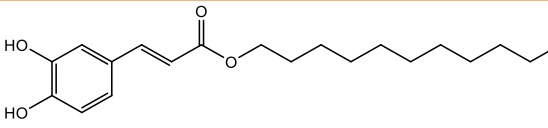
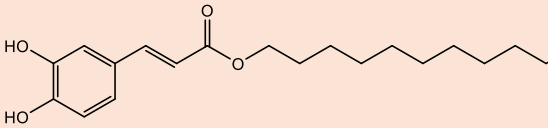
Estructura	Nombre IUPAC	Rendimiento
 C₁₈H₂₅O₄Br	propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo (9-Br)	17%
 C₁₉H₂₇O₄Br	propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo (10-Br)	14%
 C₂₀H₂₉O₄Br	propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo (11-Br)	11%

Tabla 3. Alquilbromoésteres obtenidos.

Es interesante destacar que en virtud del tiempo que cubre esta reacción (20 hrs), se decidió, en términos de mejorar la eficiencia, efectuar un ensayo ocupando el principio de irradiación por microondas en intervalos de 5 minutos. hasta llegar a los 15 minutos, donde los primeros 5 minutos se realizaron a una temperatura de 60°C, y los siguientes 10 minutos, a 90°C. Los resultados no fueron los esperados: se observó inicialmente una importante fracción de producto de partida sin reaccionar. Esta condición permaneció incluso al incrementar el tiempo y temperatura de exposición. En las placas de TLC se observó producto final y reactivos iniciales, donde, luego de los primeros 5 minutos, el producto final se encontró en una proporción de un 10-20% respecto a los reactantes y, al completar los siguientes intervalos, alcanzó un máximo de 50-60%. No se observaron nuevos productos.

La estructura, nombre y rendimiento de las moléculas obtenidas se indica en la tabla 3.

Caracterización espectral de los alquilbromoésteres

El compuesto propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo fue caracterizado por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. En el espectro de protones, se aprecia un doblete a $\delta=6,24$ ppm con una constante de acoplamiento $J=15,9$ Hz y otro doblete a $\delta=7,47$ ppm con exactamente la misma constante de acoplamiento: $J=15,9$ Hz. Dichas señales son asignadas a acoplamientos del tipo AM de los protones del sistema olefínico conjugado. El doblete a $\delta=7,47$ ppm se asignó al hidrógeno en posición β al éster y el doblete a $\delta=6,24$ ppm se asignó al hidrógeno conectado al carbono sp^2 α a la función éster.

Las señales $\delta=7,04$ ppm, $\delta=6,97$ ppm y $\delta=6,77$ ppm fueron asignados a los 3 protones del anillo catecólico, a $\delta=7,04$ ppm se destaca un doblete asignable al protón de C-5. El doblete a $\delta=6,97$ ppm se asignó al hidrógeno de C-9 y el doblete a $\delta=6,77$ ppm al hidrógeno del C-8 (figura 17).

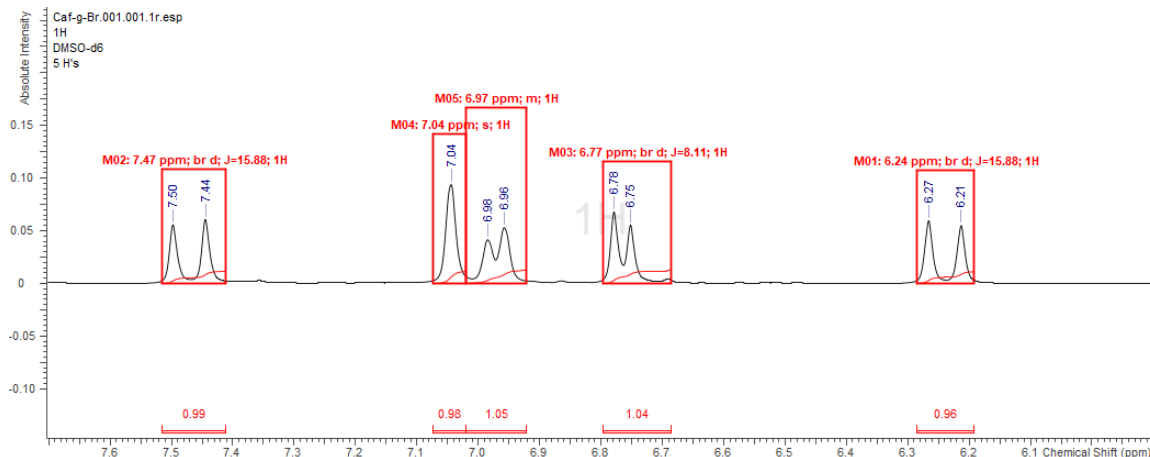


Figura 17. Ampliación del sistema conjugado en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxiifenil)-9-bromononilo.

El sistema catecólico exhibe, por su parte, un par de señales singulete anchos a $\delta=9,14$ ppm y $\delta=9,59$ ppm (figura 18).

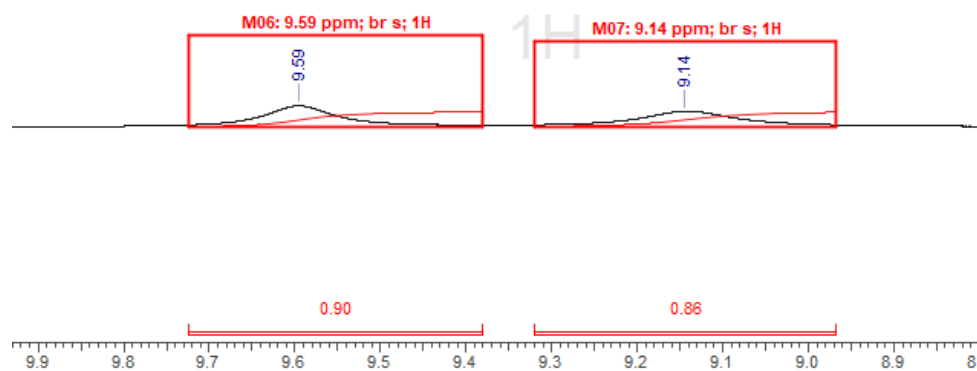


Figura 18. Ampliación del sistema catecólico en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxiifenil)-9-bromononilo.

En relación a la porción alifática (figura 19), el metileno conectado al átomo de bromo aparece como un multiplete a $\delta=3,48$ ppm producto del desapantallamiento inducido por el halógeno. Esta señal presenta una integración superior a los 2H esperados, debido muy probablemente a la presencia residual del producto intermediario derivado de la reacción del ácido de Meldrum y el 9-bromo-1-nonanol.

Se aprecia otro multiplete a $\delta=4,05$ ppm para el metileno adyacente al oxígeno del éster, donde también se aprecia que la señal exhibe una integración mayor a la esperada, cuya diferencia se asigna a un compuesto intermediario contaminante.

Junto a la señal a $\delta=4,05$ ppm, se aprecia un multiplete a $\delta=3,96$ ppm con menor presencia, un contaminante mayoritario. Siendo estas señales la principal diferencia entre el contaminante y el alquilbromoéster, a través de la integración de sus señales, podemos inferir que el propenoato de (E)-3-(4,4dihroxifenil)-9-bromonilo y su respectivo contaminante, del que se habla con mayor detalle al final de la sección, se encuentran en razón 1:5 de abundancia.

Las restantes señales a campo más alto $\delta = 1,5-1,8$ ppm dan cuenta de las señales metilénicas faltantes.

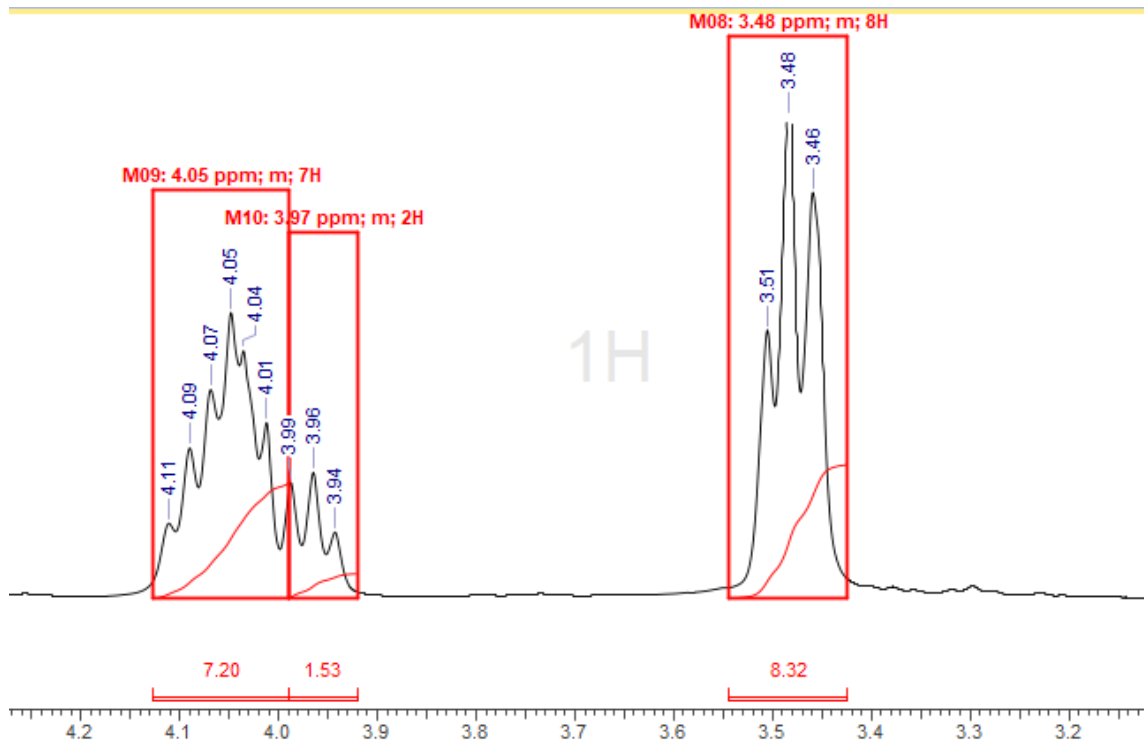


Figura 19. Ampliación de señales correspondientes a protones de carbonos adyacentes a grupo éster y halógeno en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.

A continuación, en la figura 20, se entrega detalle de las señales del ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo.

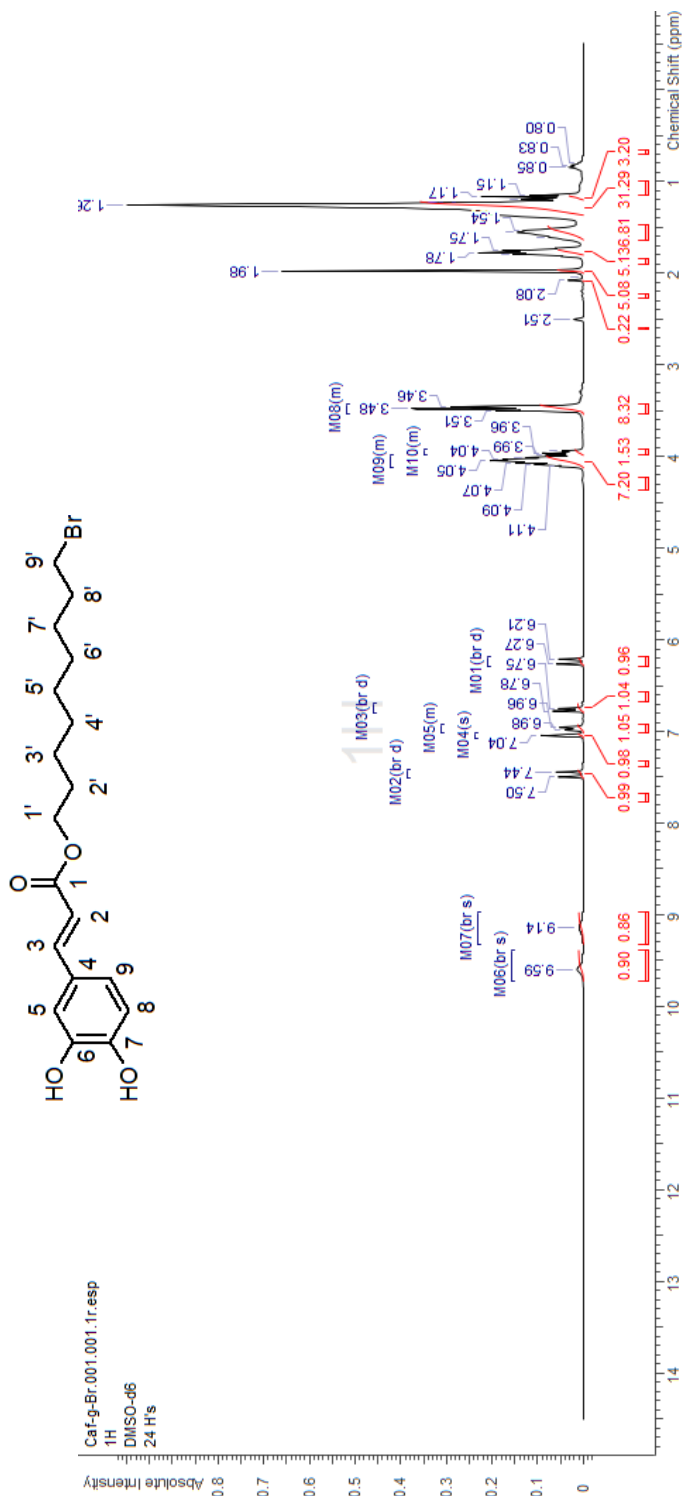


Figura 20. Espectro de protones ¹H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4-dihidroxiifenil)-9-bromononilo.

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 1,25 (m, 10H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'H), 1, 57 (m, 2H, 8'-H), 1,78 (q, 2H, 2'-H, J=6,8 Hz), 3,48 (m, 2H, 9'-H), 4,05 (m, 2H, 1'-H), 6,24 (d, 1H, 2-H, J=15,9 Hz), 6,76 (d, 1H, 8-H, J=8,1 Hz), 6,96 (dd, 1H, 9-H), 7,04 (d, 1H, 3-H, J=15,9 Hz), 7,47 (d, 1H, 3-H, J=15,9 Hz), 9,14 (s, 1H, OH), 9,59 (s, 1H, OH).

Por su parte el espectro de ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo presenta una señal a $\delta=166,98$ ppm asignable al carbonilo tipo éster, coexistiendo junto a dos señales carbonílicas a $\delta=166,87$ y $170,69$ ppm que corresponderían, como se mencionó anteriormente, a un producto intermediario derivado de la reacción del ácido de Meldrum y el 9-bromo-1-nonanol. También se aprecian 4 singuletes a $\delta=114,30$, $115,12$, $116,08$ y $121,65$ ppm asignables a los 3 carbonos aromáticos tipo C-H más el carbono α a la función carbonilo del éster.

Las señales $\delta=145,42$, $146,05$ y $148,84$ ppm corresponden a los carbonos α a los dos hidroxilo del anillo catecólico y al carbono β al carbonilo del éster.

La señal $\delta=65,16$ ppm, corresponde al carbono alifático adyacente al oxígeno del éster. El conjunto de señales a $\delta=25,74$ ppm a $\delta=35,33$ ppm corresponden al resto de los carbonos metilénicos de la cadena alifática (figura 21).

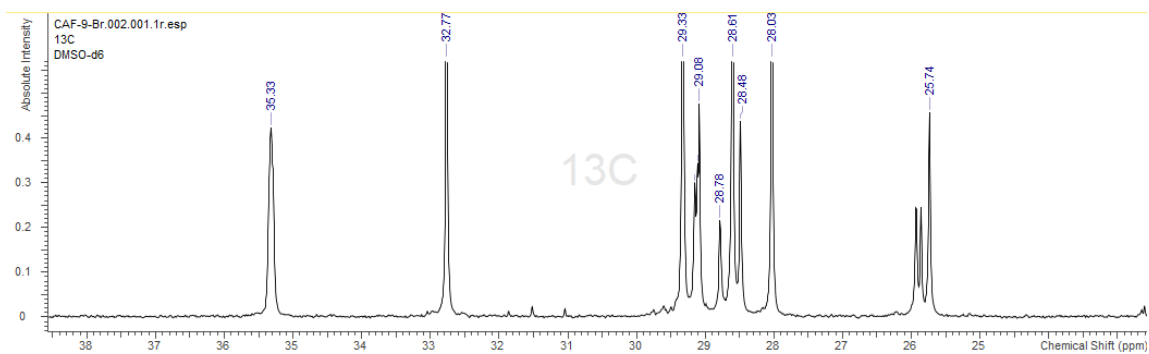


Figura 21. Ampliación de porción alifática del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihroxifenil)-9-bromononilo.

A continuación, en la figura 22, se entrega detalle de las señales del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihroxifenil)-9-bromononilo.

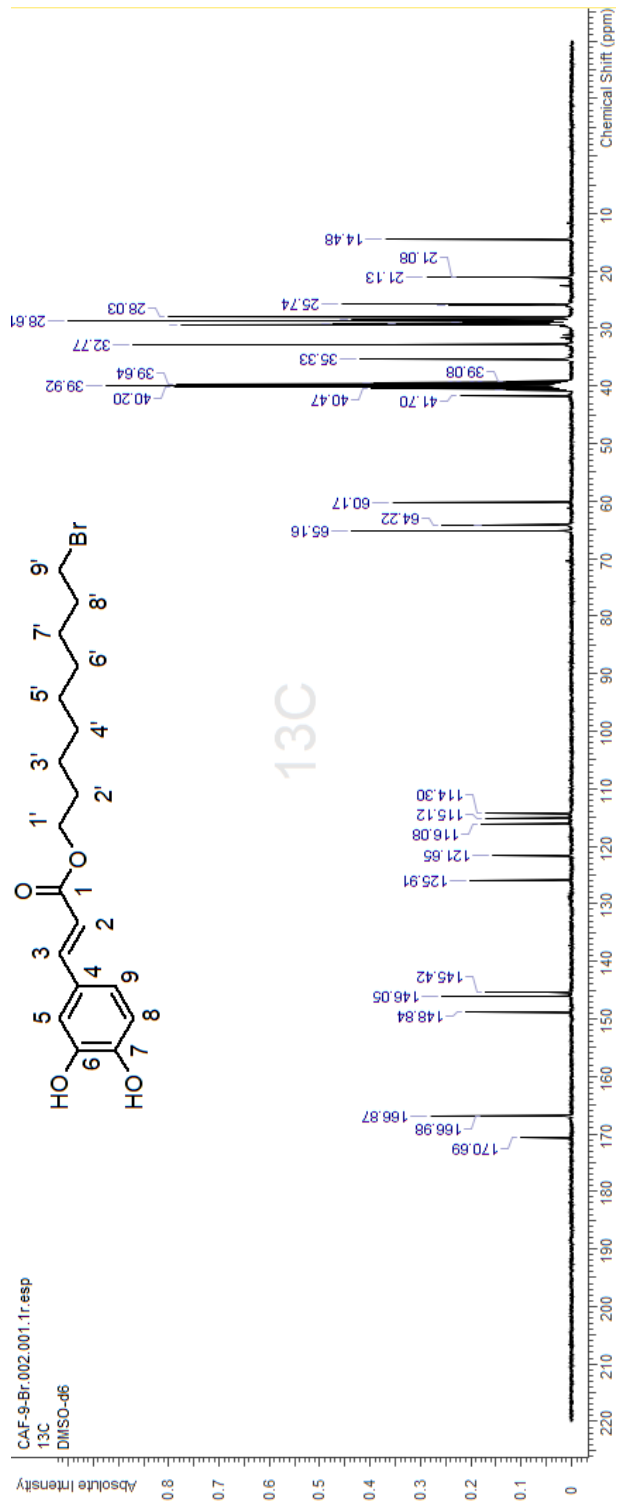


Figura 22. Espectro de carbono ¹³C-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxiifenil)-9-bromononilo.

¹³C-RMN (DMSO-d6) δ: 25,74, 28,03, 28,48. 28,61, 29,08, 29,60, 32,77, 35,33, 65,16, 114,30, 115,12, 116,08, 121,65, 125,91, 145,42, 146,05, 148,84, 166,98.

Por su parte, el propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo como compuesto perteneciente a la serie homóloga, exhibe un espectro de ^1H -RMN muy similar: dos señales dobletes a $\delta=6,25$ ppm y $\delta=7,47$ ppm con una constante de acoplamiento recíproca de $J=15,9$ Hz.

El doblete a $\delta=7,04$ ppm, el doblete doblete a $\delta=7,00$ ppm y el doblete a $\delta=6,76$ ppm se asignaron a los protones del anillo catecólico no hidroxilos (figura 23).

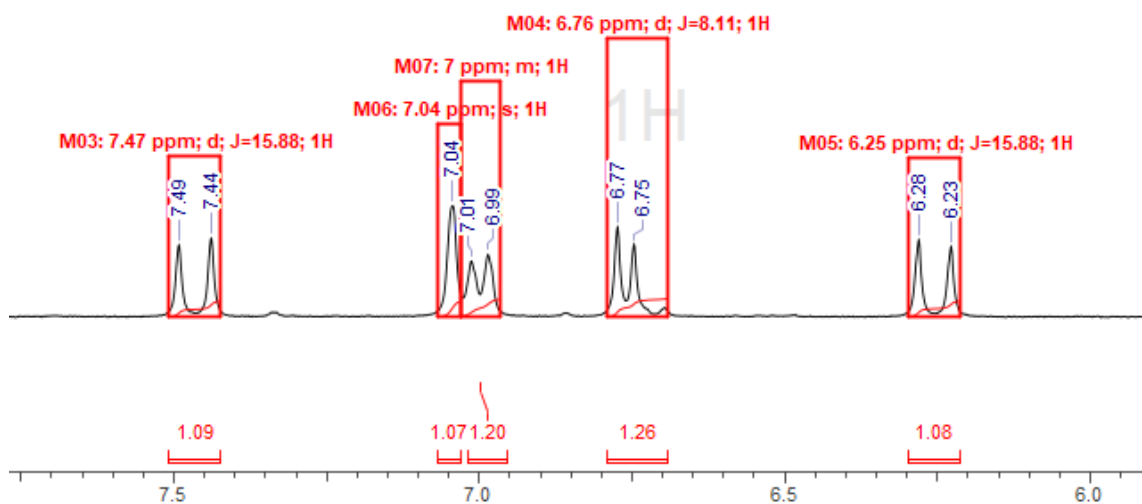


Figura 23. Ampliación del sistema conjugado en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.

En relación a la porción alifática (figura 24), el metileno conectado al átomo de bromo aparece como un multiplete a $\delta=3,51$ ppm producto del desapantallamiento inducido por el halógeno. Esta señal presenta una integración superior a los 2H esperados, debido probablemente a la presencia residual de un producto intermediario derivado de la reacción del ácido de Meldrum y el 10-bromo-1-nonanol.

Se aprecia otro multiplete a $\delta=4,10$ ppm por el metileno adyacente al oxígeno del éster, donde también se aprecia una integración mayor, cuya diferencia se asigna a un compuesto intermediario contaminante.

Junto a la señal a $\delta=4,10$ ppm, se aprecia un multiplete a $\delta=3,97$ ppm con menor presencia, un contaminante mayoritario. Siendo estas señales la principal diferencia entre el contaminante y el alquilbromoéster, a través de la integración de sus señales, podemos inferir que el propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo y su respectivo contaminante, del que se habla con mayor detalle al final de la sección, se encuentran en razón 1:5 de abundancia.

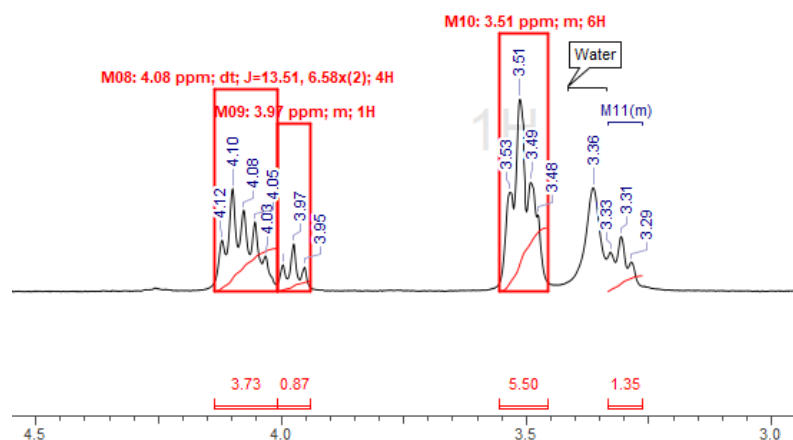


Figura 24. Ampliación de señales correspondientes a protones de carbonos adyacentes a grupo éster y halógeno en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.

Las dos señales a $\delta=9,14$ ppm y $\delta=9,61$ ppm asignables a los hidroxilos catecólicos se presentan en el ampliado siguiente (fig. 25)

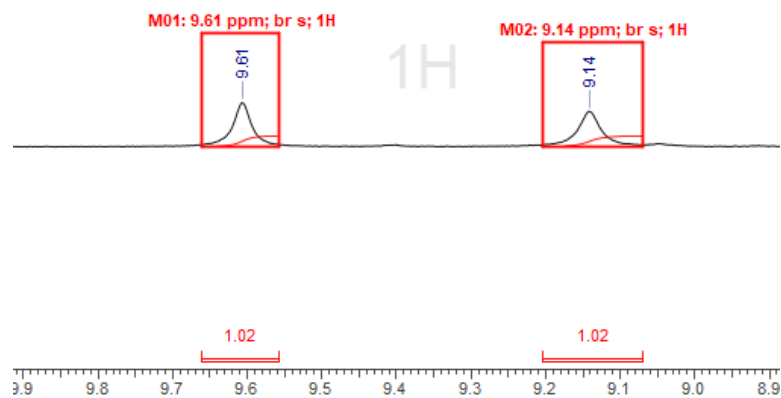


Figura 25. Ampliación del sistema catecólico en el $^1\text{H-NMR}$ de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.

A continuación, en la figura 26, se muestran las señales del $^1\text{H-NMR}$ de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo.

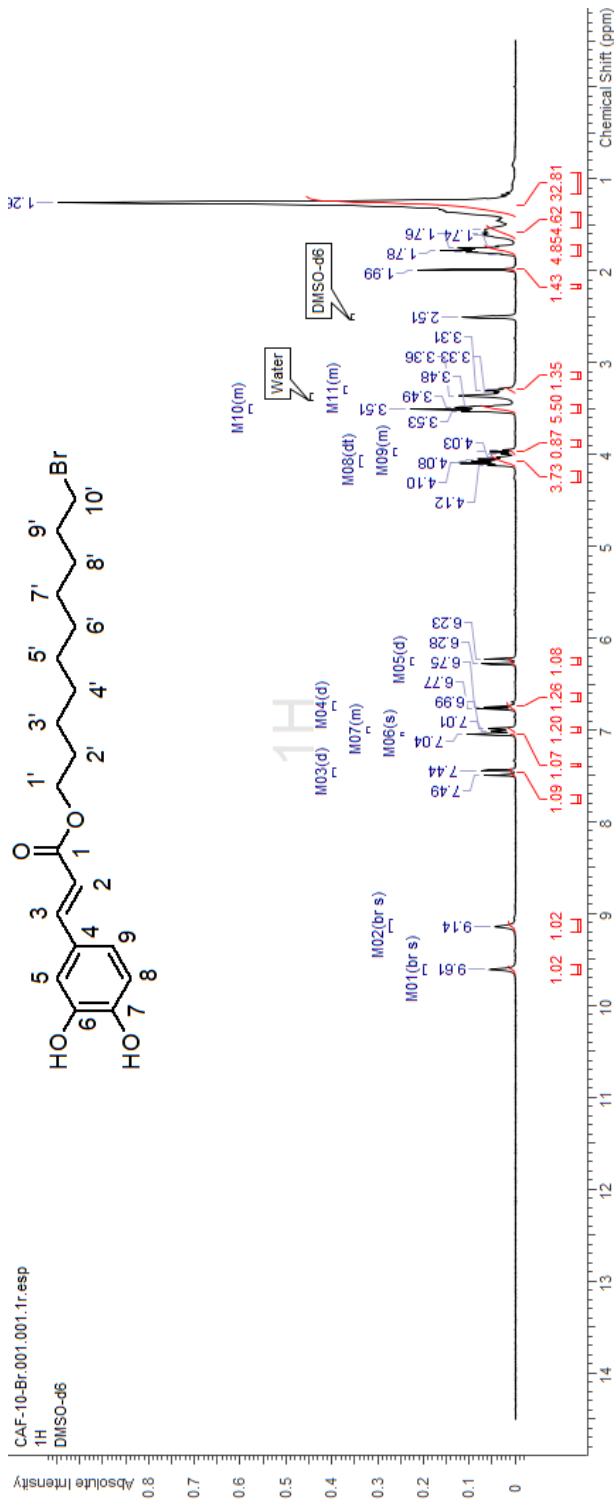


Figura 26. Espectro de protones ¹H-RMN de propenoate de (E)-3-(4,4-dihydroxifenil)-10-bromodecilo.

¹H-RMN (DMSO-d6) δ: 1,26 (m, 12H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 8'-H), 1,59 (m, 2H, 9'-H), 1,78 (q, 2H, 2'-H, J=6,6 Hz), 3,51 (t, 2H, 10'H, J=6,2 Hz), 4,10 (t, 2H, 1'H, J=6,3 Hz), 6,25 (d, 1H, 2-H, J=15,9 Hz), 6,76 (d, 1H, 8-H, J=8,1 Hz), 7,01 (dd, 1H, 9-H), 7,04 (d, 1H, 5-H), 7,47 (d, 1H, 3-H, J=15,9 Hz), 9,14 (s, 1H, OH), 9,61 (s, 1H, OH).

El espectro de ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo presenta una señal a $\delta=167,06$ ppm asignable al carbonilo tipo éster. También se aprecian 4 singuletes a $\delta=114,44$, 115,26, 116,16 y 121,78 ppm asignables a los 3 carbonos aromáticos tipo C-H más el carbono alfa a la función carbonilo del éster.

Las señales $\delta=145,47$, 146,02 y 148,84 ppm corresponden a los carbonos alfa a los dos hidroxilos del anillo catecólico y al carbono beta al carbonilo del éster.

La señal $\delta=64,16$ ppm, corresponde al carbono alifático adyacente al oxígeno del éster. Como se espera, las señales en el rango de $\delta=25,73$ ppm a $\delta=35,65$ ppm corresponden al resto de carbonos de la cadena alifática (figura 27).

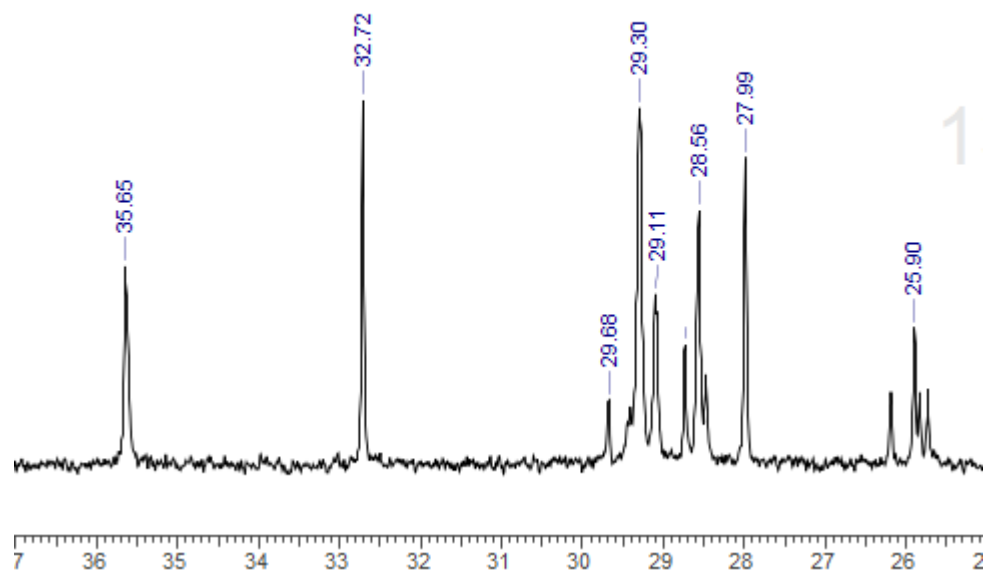


Figura 27. Ampliación de porción alifática del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxfenil)-10-bromodecilo.

A continuación, en la figura 28, se muestran las señales del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxfenil)-10-bromodecilo.

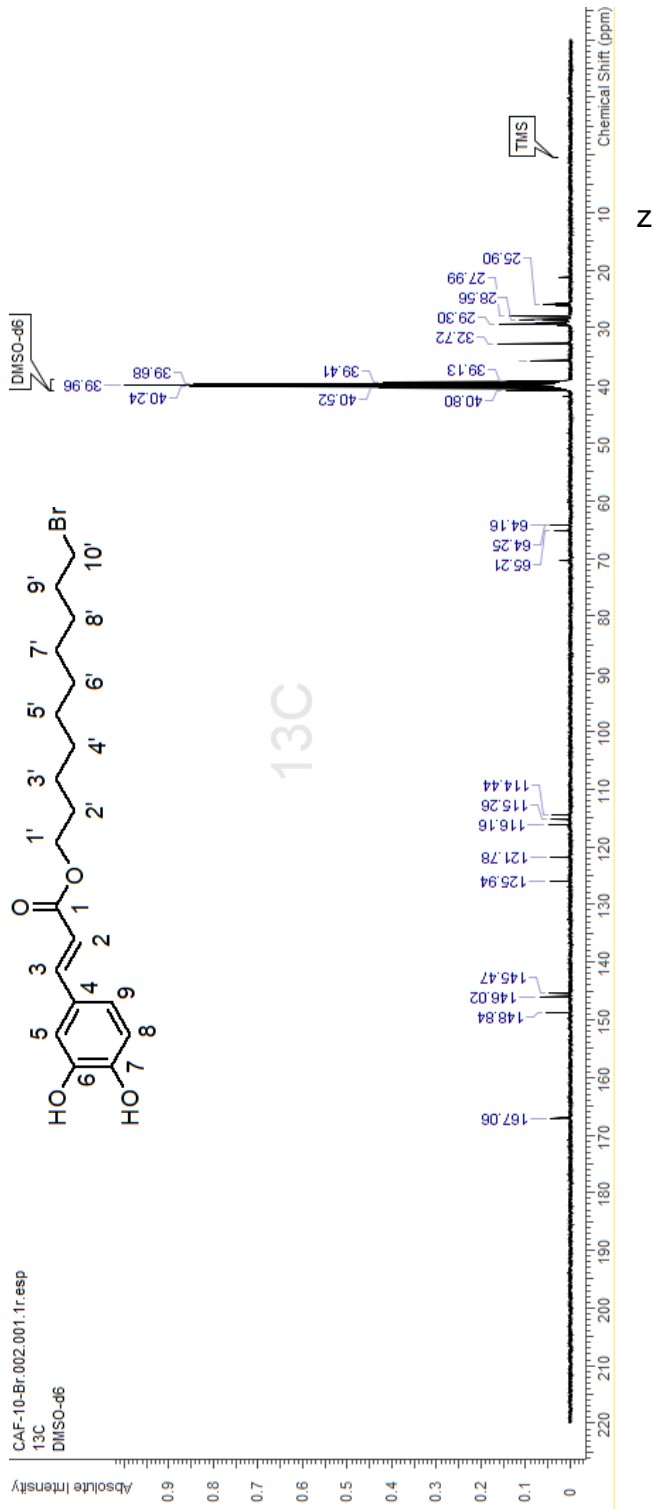


Figura 28. Espectro de carbono ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4-dihidroxiifenil)-10-bromodecilo.

^{13}C -RMN (DMSO-d6) δ : 25,90, 27,99, 28,56, 28,73, 29,11, 29,30, 29,68, 32,72, 35,65, 64,16, 64,25, 114,44, 115,26, 116,16, 121,78, 145,47, 146,02, 148,84, 167,06.

El propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo, exhibe un espectro de ^1H -RMN similar a las dos moléculas anteriormente mostradas: dos señales dobles a $\delta=6,24$ ppm y $\delta=7,46$ ppm con una constante de acoplamiento recíproca de $J=15,9$ Hz. Las señales a $\delta=6,76$, $6,98$ y $7,04$ ppm fueron asignadas a los protones del anillo aromático catecólico (figura 29).

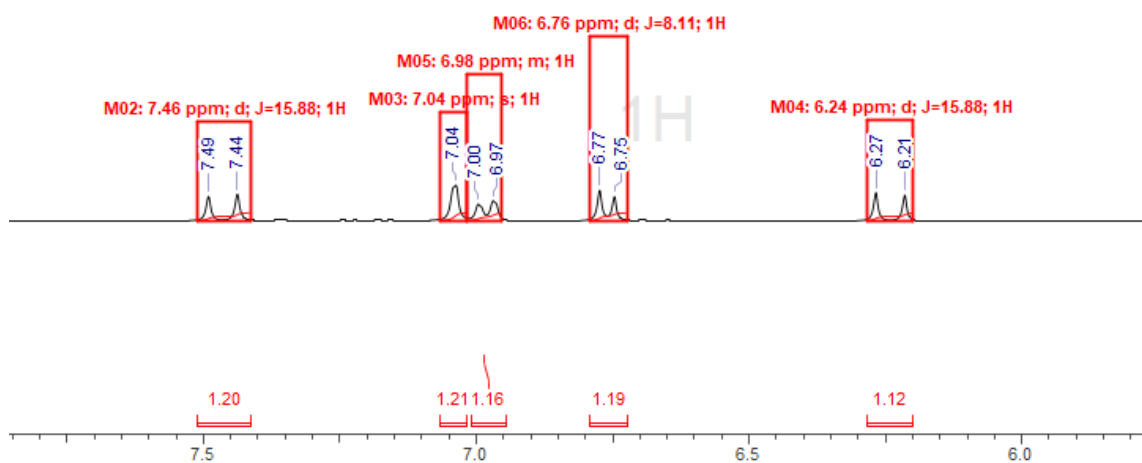


Figura 29. Ampliación del sistema conjugado en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.

En relación a la porción alifática (figura 30), el metileno conectado al átomo de bromo aparece como un multiplete a $\delta=3,50$ ppm producto del desapantallamiento inducido por el halógeno. Esta señal presenta una integración superior a los 2H esperados, debido a la presencia residual de probablemente de un producto intermediario derivado de la reacción del ácido de Meldrum y el 11-bromo-1-nonanol.

Se aprecia otro multiplete a $\delta=4,05$ ppm por el metileno adyacente al oxígeno del éster, donde también se aprecia una integración mayor, cuya diferencia se asigna a un compuesto intermediario contaminante.

Junto a la señal a $\delta=4,05$ ppm, se aprecia un multiplete a $\delta=3,97$ ppm con menor presencia, un contaminante mayoritario. Siendo estas señales la principal diferencia entre el contaminante y el alquilbromoéster a través de la integración de sus señales, podemos inferir que el propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo y su respectivo contaminante, del que se habla con mayor detalle al final de la sección, se encuentran en razón 1:6 de abundancia.

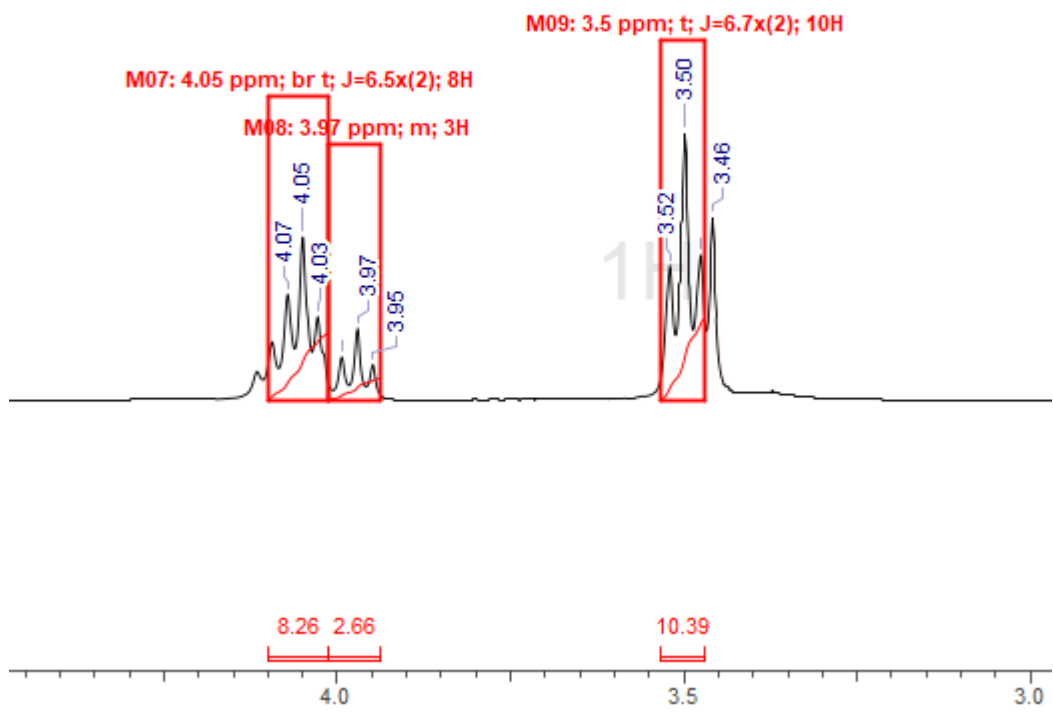


Figura 30. Ampliación de señales correspondientes a protones de carbonos adyacentes a grupo éster y halógeno en el ¹H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.

Las señales correspondientes a los hidroxilos catecólicos se observan a $\delta=9,13$ ppm y $\delta=9,59$ ppm (figura 31).

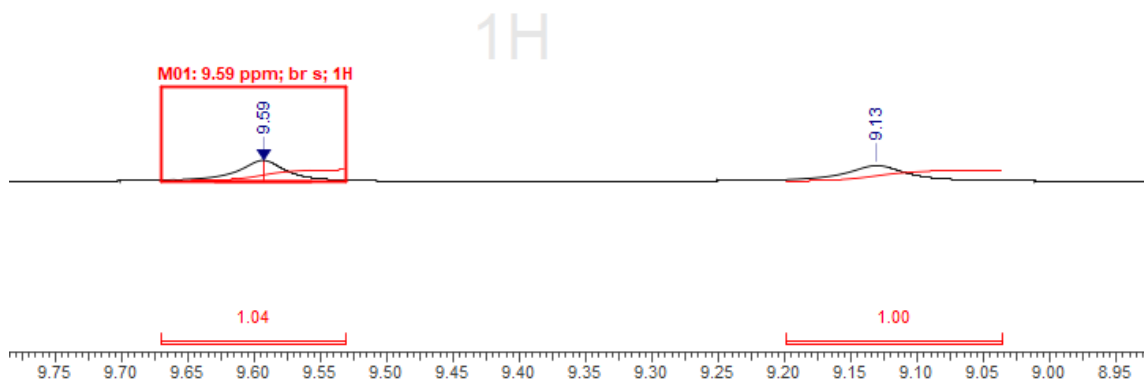


Figura 31. Ampliación del sistema catecólico en el ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.

A continuación, en la figura 32, se entrega detalle de las señales del ^1H -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo.

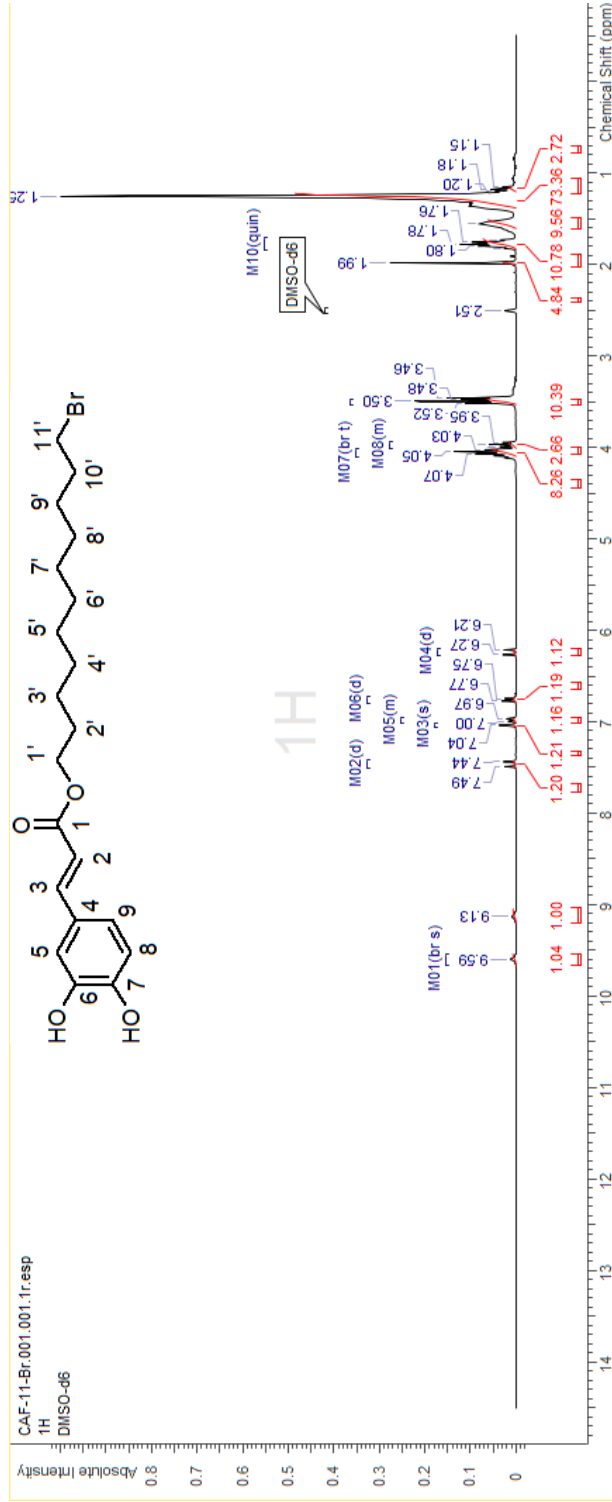


Figura 32. Espectro de protones ¹H-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4-dihidroxiifenil)-11-bromoundecilo.

¹H-RMN (DMSO-d₆) δ: 1,25 (m, 14H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, 8'-H, 9'-H), 1,56 (m, 2H, 10'-H), 1,78 (q, 2H, 2'-H, J=6,9 Hz), 3,50 (t, 2H, 10'H, J=6,3 Hz), 4,05 (t, 2H, 1'H, J=6,7 Hz), 6,24 (d, 1H, 2-H, J=15,9 Hz), 6,76 (d, 1H, 8-H, J=8,1 Hz), 7,00 (dd, 1H, 9-H), 7,04 (d, 1H, 5-H), 7,46 (d, 1H, 3-H, J=15,9 Hz), 9,13

Por su parte el espectro de ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo presenta una señal a $\delta=166,90$ ppm asignable al carbonilo tipo éster, coexistiendo junto a dos señales carbonílicas a $\delta=167,00$ y $170,78$ ppm que corresponderían, como se mencionó anteriormente, a un producto intermediario derivado de la reacción del ácido de Meldrum y el 11-bromo-1-undecanol. También se aprecian 4 singuletes a $\delta=114,36$, $115,20$, $116,12$ y $121,70$ ppm asignables a los 3 carbonos aromáticos tipo C-H más el carbono α a la función carbonilo del éster.

Las señales $\delta=145,44$, $146,04$ y $148,84$ ppm corresponden a los carbonos α a los dos hidroxilo del anillo catecólico y al carbono β al carbonilo del éster.

La señal $\delta=65,18$ ppm, corresponde al carbono alifático adyacente al oxígeno del éster. Las señales de $\delta=25,77$ ppm a $\delta=35,48$ ppm corresponden al resto de carbonos de la cadena alifática (figura 33).

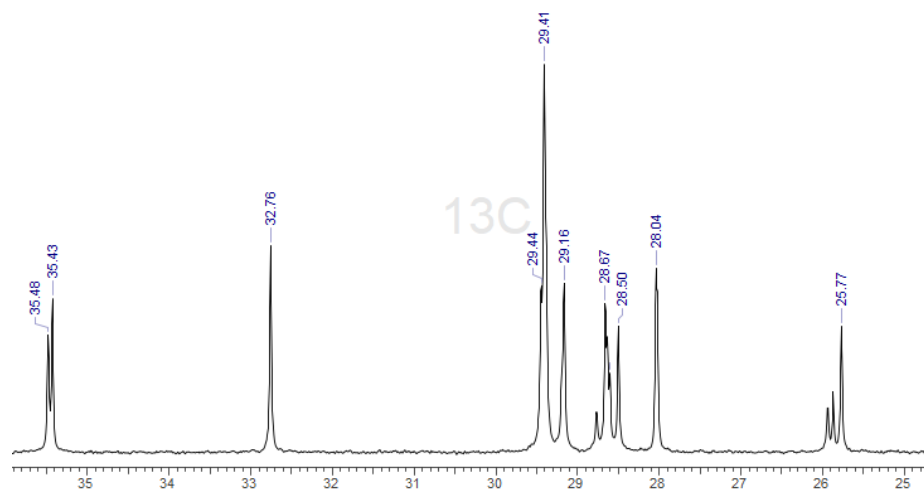


Figura 33. Ampliación del sistema alifático del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxiifenil)-11-bromoundecilo.

A continuación, en la figura 34, se entrega detalle de las señales del ^{13}C -RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxiifenil)-11-bromoundecilo.

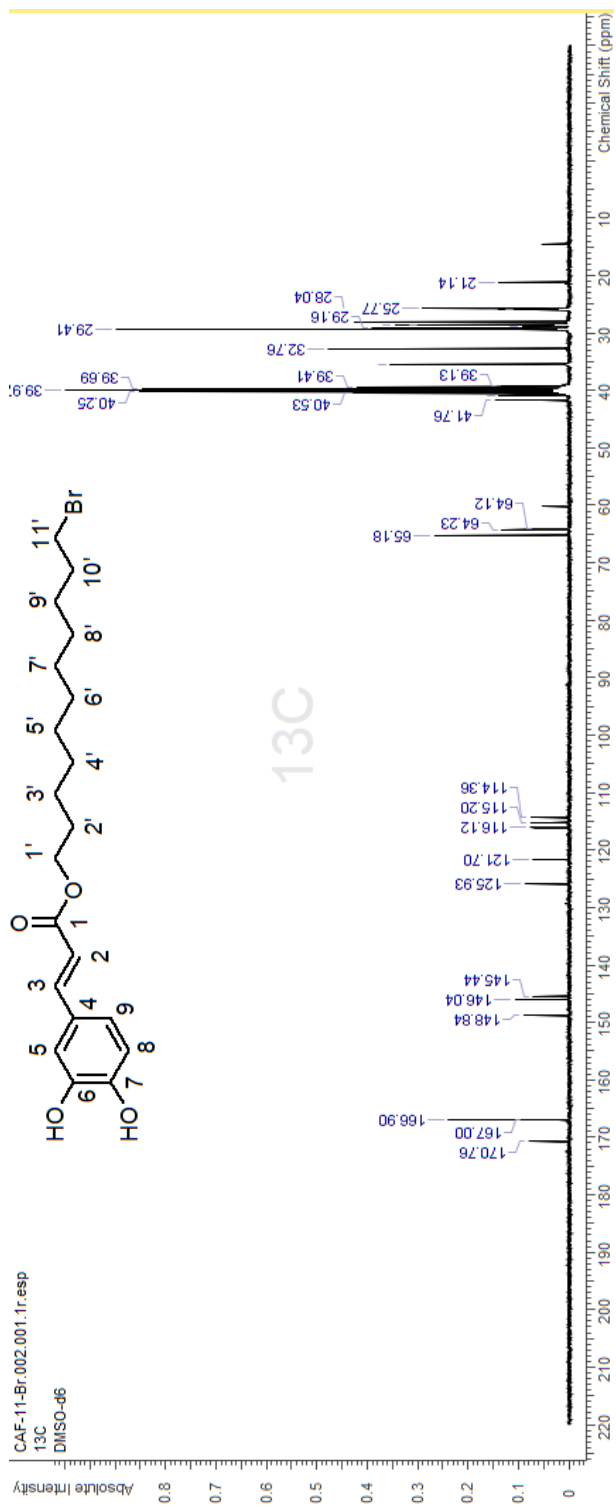


Figura 34. Espectro de carbono ¹³C-RMN de propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxiifenil)-1-bromoundecilo.

¹³C-RMN (DMSO-d6) δ: 25,77, 28,04, 28,50, 28,67, 29,16, 29,41, 29,44, 32,76, 35,43, 35,48, 65,18, 114,36, 115,20, 116,12, 121,70, 125,93. 145,44, 146,04, 148,84, 166,90.

En los espectros de carbono descritos, es posible apreciar un conjunto de señales a campo muy alto, inferiores en desplazamiento químico a 25 ppm (figuras 22, 28 y 34), que corresponderían probablemente a contaminantes hidrocarbonados parafínicos utilizados en el ensamblaje de coplas para los evaporadores rotatorios.

No obstante, el principal contaminante observado sería el respectivo monoéster alquil bromado de ácido malónico correspondiente a uno de los pasos intermedios en la síntesis de cada alquilbromoéster (figura 35).

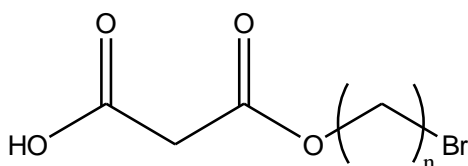
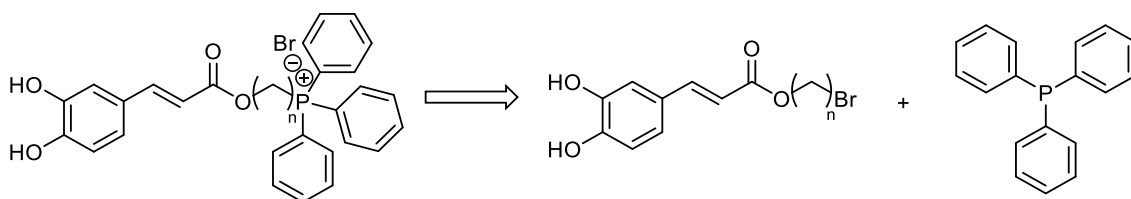


Figura 35. Monoéster alquil bromado de ácido malónico que se presenta como contaminante en muestras de cada alquilbromoéster. Donde $n=9, 10, 11$.

La presencia del contaminante, explica las dos señales extra a $\delta=165-171$ ppm, pues corresponden a sus dos carbonos carbonílicos. La señal en $\delta=41-43$ ppm corresponde al carbono ubicado entre los carbonilos y, la señal en $\delta=64-65$ ppm, al carbono alfa a la función éster.

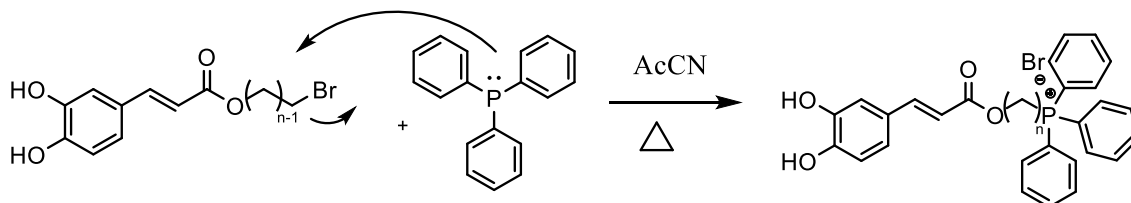
Síntesis de cationes lipofílicos fosforados

Finalmente, la conexión entre los bromoésteres con trifenilfosfina, se llevó a cabo según el esquema retrosintético adjunto (esquema 11).



Esquema 11. Retrosíntesis de cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico.

Experimentalmente, esta reacción (esquema 12) cursó por adición de ambos reactivos en acetonitrilo bajo condiciones de reflujo. La reacción resultó de una cinética lenta, ya que después de los primeros 5 días de calentamiento, se observó por cromatografía en capa fina, solo trazas de producto formado y gran presencia de los reactivos iniciales. Frente a estos resultados, decidimos continuar con el calentamiento por 5 días más, resultando en la obtención de una mayor cantidad de producto formado, pero aún con una fuerte presencia de los reactivos de partida. La cantidad máxima obtenida detectada por visualización de la placa cromatográfica fue en estos 10 días.



Esquema 12. Mecanismo de reacción para la obtención de cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico. Donde $n=9, 10, 11$.

Estructura	Nombre IUPAC	Rendimiento
 C₃₆H₄₀O₄P	Bromuro de (E)-9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio (9-P)	46%
 C₃₇H₄₂O₄P	Bromuro de (E)-10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio (10-P)	50%
 C₃₈H₄₄O₄P	Bromuro de (E)-11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio (11-P)	43%

Tabla 4. Cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico obtenidos.

En tal sentido al finalizar la reacción, se disponía de un líquido de color ámbar correspondiente a una mezcla en la que en el mejor de los casos habría un 50% de sales de fosfonio formado para los 3 compuestos en estudio.

La metodología de separación para los 3 productos obtenidos se basó en la condición no migrante de las sales de fosfonio en cromatografía en gel de sílice en el sistema de solvente hexano/acetato de etilo 1:1, por lo que se decidió hacer una columna cromatográfica eluída en este sistema de solvente, para separarlo de los reactivos iniciales no reaccionados. Una vez logrado este propósito, para lograr aislar la sal de fosfonio retenida por la sílica se hizo uso de la técnica cromatográfica en gradiente de polaridad creciente, cambiando el eluyente por metanol. Se apreció a simple vista que el producto formado comenzó a migrar, logrando separar una mancha ámbar en un rendimiento de un 50%, aproximadamente.

La estructura, nombre y rendimiento de las moléculas obtenidas se indica en la tabla 4.

Caracterización espectral de los cationes lipofílicos fosforados

Al observar los espectros de protones ^1H -RMN y los espectros de carbono ^{13}C -RMN de los tres cationes lipofílicos, se aprecia un fenómeno de desdoblamiento de señales asignada a una rotación restringida de los tres carbonos de la cadena alifática vecinos al grupo fosfonio y de los tres fenilos del mismo grupo. Esto se ve reflejado en señales desdobladas para cada carbono e hidrógeno en las posiciones mencionadas.

En el espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio, encontramos a campo bajo una señal $\delta=9,30$ ppm, asignada a uno de los protones de los grupos hidroxilo del anillo catecólico, no se aprecia la segunda señal hidroxílica (figura 36).

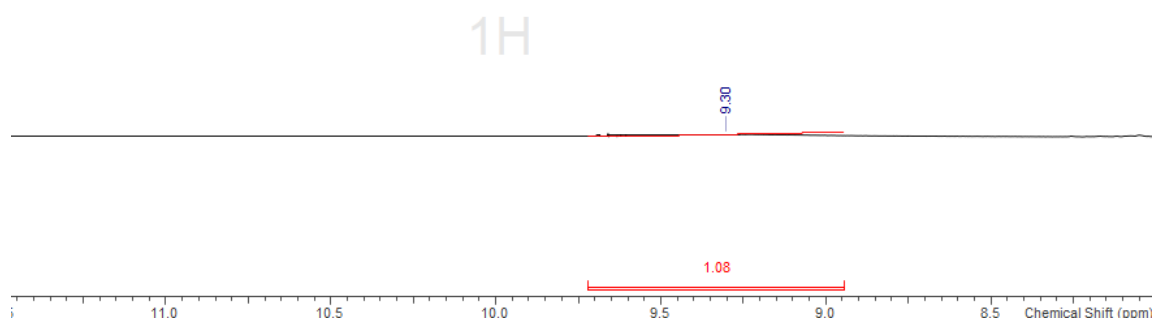


Figura 36. Ampliación del sistema catecólico en el ^1H -RMN de bromuro de (E)-
(9-((3-(3,4-dihidroxi)fenil)acrilil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.

A campo más alto, se aprecia un doblete a $\delta=6,25$ ppm con una constante de acoplamiento $J=15,9$ Hz y otro doblete a $\delta=7,45$ ppm con la misma constante de acoplamiento: $J=15,9$ Hz. Dichas señales son asignadas a acoplamientos del tipo AM de los protones del sistema olefínico conjugado. El doblete a $\delta=7,45$ ppm se asignó al hidrógeno en posición β al éster y el doblete a $\delta=6,25$ ppm se asignó al hidrógeno conectado al carbono sp^2 α a la función éster.

Las señales $\delta=7,07$ ppm, $\delta=6,99$ ppm y $\delta=6,78$ ppm fueron asignados a los 3 protones del anillo catecólico, a $\delta=7,07$ ppm se destaca un doblete asignable al protón de C-5. El doblete a $\delta=6,99$ ppm se asignó al hidrógeno de C-9 y el doblete a $\delta=6,78$ ppm al hidrógeno del C-8.

Por otra parte, el multiplete en $\delta=7,9$ ppm y el singulete a $\delta =7,78$ ppm corresponden a protones de los 3 fenilos presentes en el sal de fosonio en compañía de trifenilfosfina (figura 37).

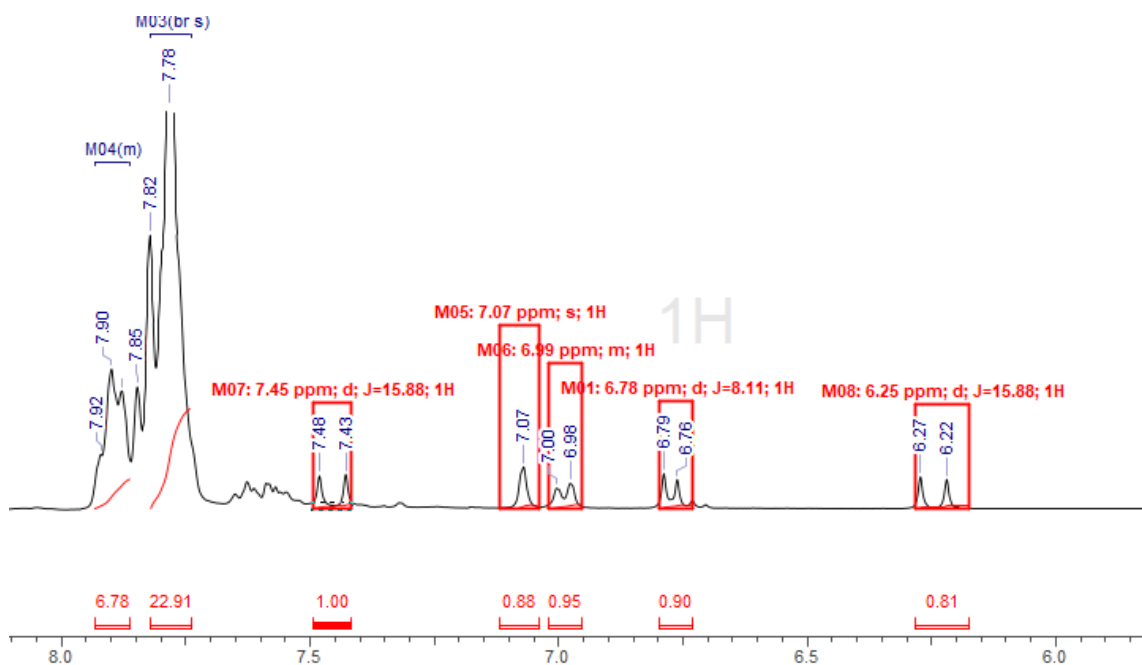


Figura 37. Ampliación del sistema conjugado en el ^1H -RMN de bromuro de (E)-9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acrilóil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.

A $\delta=3,61$ ppm, encontramos la señal asignable a los protones del carbono α al grupo fosonio, mientras en $\delta=4,05$ vemos la señal asignable al carbono 1', enlazado al oxígeno de la función éster. También se observa la señal del DMSO-

d6 a $\delta=2,51$, agua a $\delta=3,39$ y un singulete a $\delta=3,16$ que correspondería al metanol. La señal es grande, indicando que la evaporación de este solvente no fue exitosa.

A continuación, en la figura 38, se entrega detalle de las señales del $^1\text{H-RMN}$ de bromuro de (E)-9-((3-(3,4-dihroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.

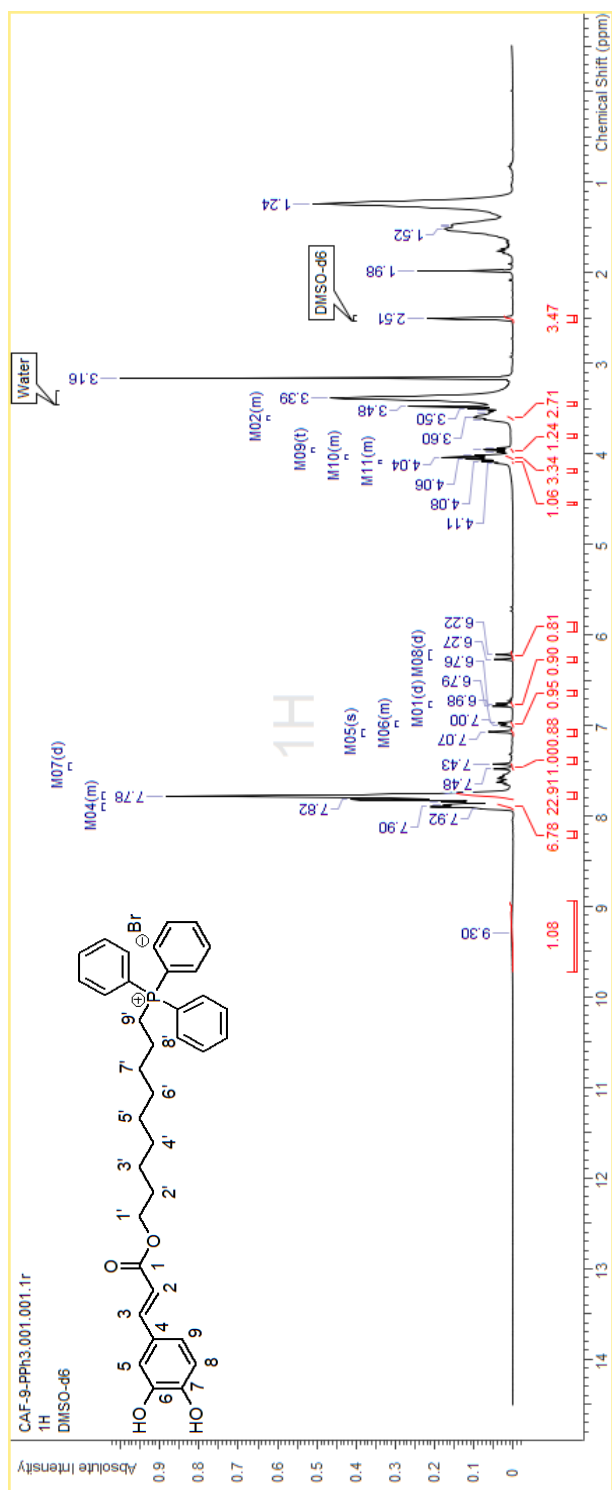


Figura 38. Espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloi)oxi)nonil)trifenilfosfonio.

^1H -RMN (DMSO-d6) δ : 1,24 (s, 10H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H), 1,52 (m, 2H, 2'-H), 1,98 (s, 2H, 8'-H), 3,61 (m, 2H, 9-H), 4,05, (m, 2H, 1'-H), 6,25 (d, 1H, 2-H, J=15,9 Hz), 6,78 (d, 1H, 8-H, J=8,1 Hz), 6,99 (dd, 1H, 9-H, J=8,2 Hz), 7.07 (d, 1H, 5-H), 7.45 (d, 1H, 3-H, J=15.9 Hz), 7.82 (m, 15H, fenilos), 9.30 (s, 1H, OH).

En el espectro de carbono ^{13}C -RMN (figura 39), se aprecia una señal a $\delta=167,06$ ppm que se asigna al carbono de la función éster. Las señales entre $\delta=130,62$ ppm y $\delta=135,36$ ppm se asignan a los tres fenilos, donde, a medida que estos carbonos se acercan en posición al carbono unido al fósforo, se encuentran más desapantallados.

A $\delta=118,49$ ppm y $\delta=119,61$ ppm aparecen el carbono α a la función éster y 8-C, respectivamente.

A campo alto, se observan las señales correspondientes a los carbonos de la cadena alifática, desde 2'-C a 9'-C, mientras que el carbono unido al oxígeno aparece en $\delta=65,20$ ppm.

La señal a $\delta=49,05$ ppm, corresponde al carbono del metanol, mostrándonos que la evaporación de este solvente no se completó.

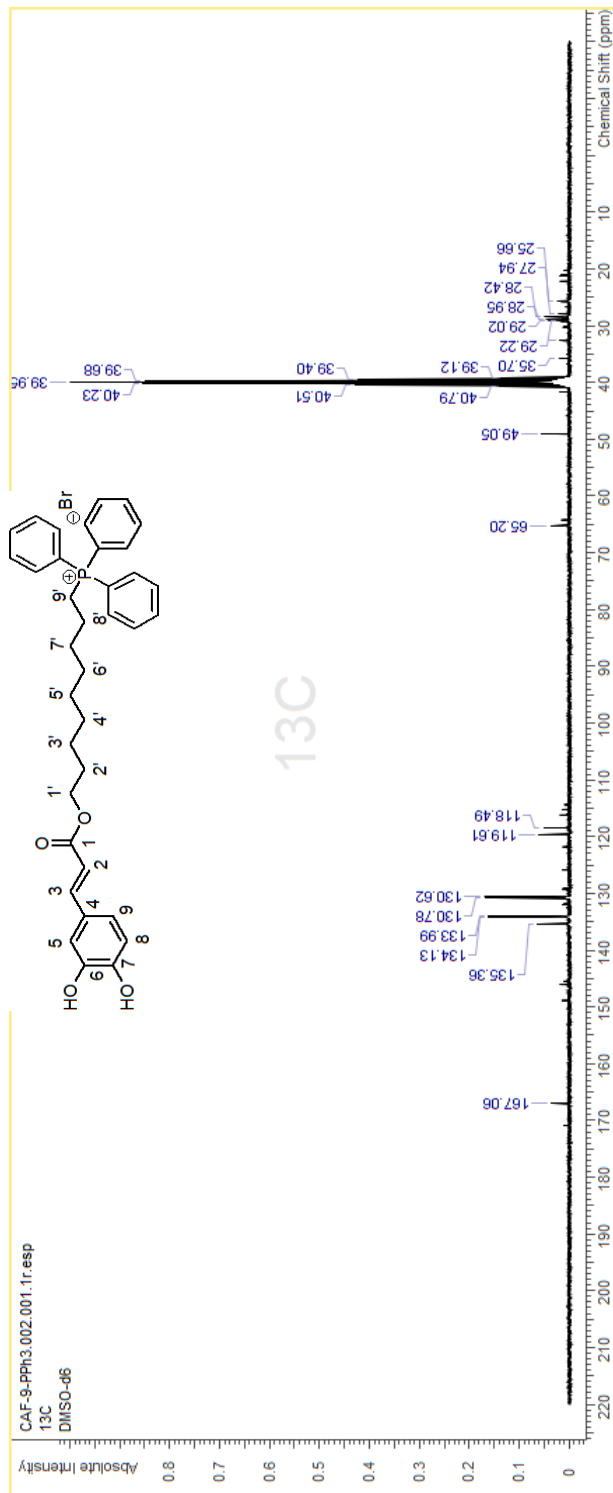


Figura 39. Espectro de carbono ¹³C-RMN de bromuro de (E)-9-((3,4-dihidroxi)acrilil)oxi)nonil)trifenilfosfonio.

¹³C-RMN (DMSO-d6) δ: 25,66, 27,94, 28,42, 28,95, 29,02, 29,22, 35,70, 65,20, 118,49, 119,61, 130,62, 130,78, 133,99, 134,13, 135,36, 167,06.

En el espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio no es posible ver las señales correspondientes a los hidroxilos catecólicos.

Como se espera, a $\delta=6,24$ ppm, se aprecia un doblete con una constante de acoplamiento $J=15,9$ Hz y otro doblete a $\delta=7,45$ ppm con la misma constante de acoplamiento: $J=15,9$ Hz. Dichas señales son asignadas inequívocamente a acoplamientos del tipo AM de los protones del sistema olefínico conjugado. El doblete a $\delta=7,45$ ppm se asignó al hidrógeno en posición β al éster y el doblete a $\delta=6,24$ ppm se asignó al hidrógeno conectado al carbono sp^2 α a la función éster.

Las señales $\delta=7,07$ ppm, $\delta=6,98$ ppm y $\delta=6,78$ ppm fueron asignados a los 3 protones del anillo catecólico, a $\delta=7,07$ ppm se destaca un doblete asignable al protón de C-5. El doblete a $\delta=6,98$ ppm se asignó al hidrógeno de C-9 y el doblete a $\delta=6,78$ ppm al hidrógeno del C-8.

A $\delta=7,59$ ppm, se ve un multiplete que integra para 3 protones, asignado a los hidrógenos unidos al carbono en posición para al carbono unido al fósforo.

Por otra parte, el multiplete en $\delta=7,82$ que presenta una integración para 26 protones, se asignó a los hidrógenos de los fenilos presentes en el grupo trifenilfosfina residual, y los del derivado de fosfonio que se encuentran más a campo más bajo en el espectro (figura 40).

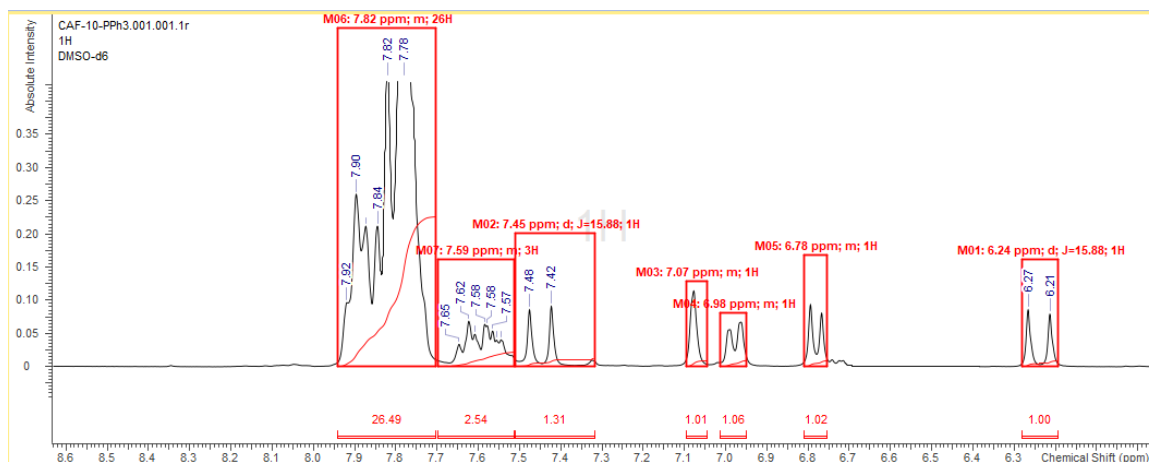


Figura 40. Ampliación del sistema conjugado del espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihydroxyfenil)acrilol)oxi)decil)trifenilfosfonio.

A $\delta=3,50$ ppm, encontramos la señal asignable a los protones del carbono α al grupo fosfonio, mientras en $\delta=4,08$ vemos la señal asignable al carbono 1', enlazado al oxígeno de la función éster. También se observa la señal del DMSO-d6 a $\delta=2,51$, agua a $\delta=3,39$ y un singulete a $\delta=3,16$ que correspondería al solvente metanol.

A continuación, en la figura 41, se entrega detalle de las señales del ^1H -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihydroxyfenil)acrilol)oxi)decil)trifenilfosfonio.

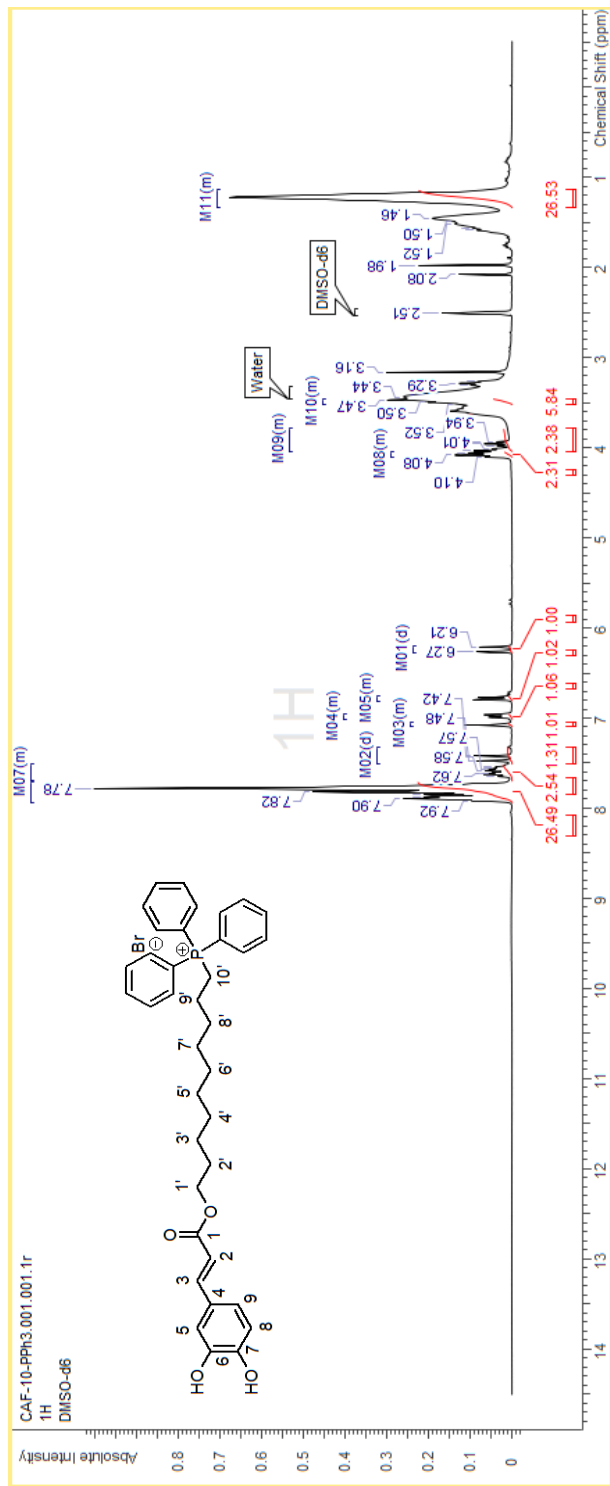


Figura 41. Espectro de protones ¹H-RMN de bromuro de (E)-10-((3-(3,4-dihidroxiifenil)acrilil)oxi)deci)trifenilfosfonio

¹H-RMN (DMSO-d6) δ: 1,23 (s, 12H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'H, 8'H), 1,50 (m, 2H, 2'-H), 1,98 (s, 2H, 8-H), 3,61 (m, 2H, 9'-H), 3,50 (t, 2H, 1'-H), 6,27 (d, 1H, 2-H, J=15,9 Hz), 6,78 (d, 1H, 8-H, J=8,1 Hz), 6,98 (dd, 1H, 9-H, J=8,2 Hz), 7,07 (d, 1H, 5-H), 7,45 (d, 1H, 3-H, J=15,9 Hz), 7,82 (m, 15H, fenilos).

En el espectro de carbono ^{13}C -RMN, se aprecia una señal a $\delta=167,09$ ppm correspondiente al carbono de la función éster. Las señales entre $\delta=130,61$ ppm y $\delta=135,62$ ppm se asignan a los tres fenilos, donde, a medida que estos carbonos se acercan en posición al carbono unido al catión fósforo, se encuentran más desapantallados.

Las señales a $\delta=118,47$ ppm y $\delta=119,61$ ppm corresponderían al carbono α a la función éster y 8-C, respectivamente.

En $\delta=121,83$ ppm y $\delta=125,85$ ppm, se aprecian las señales asignadas a los carbonos C-9 y C-4, respectivamente. Por su parte, las señales a $\delta=145,50$ ppm se asigna a 3-C, $\delta=146,06$ ppm se asigna a 6-C y, $\delta=148,91$ ppm, a 7-C.

A campo alto, se observan las señales correspondientes a los carbonos de la cadena alifática, desde 2'-C a 10'-C, mientras que el carbono unido al oxígeno aparece en $\delta=64,15$ ppm.

A continuación, en la figura 42, se entrega detalle de las señales del ^{13}C -RMN de bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acril)oxi)decil)trifenilfosfonio.

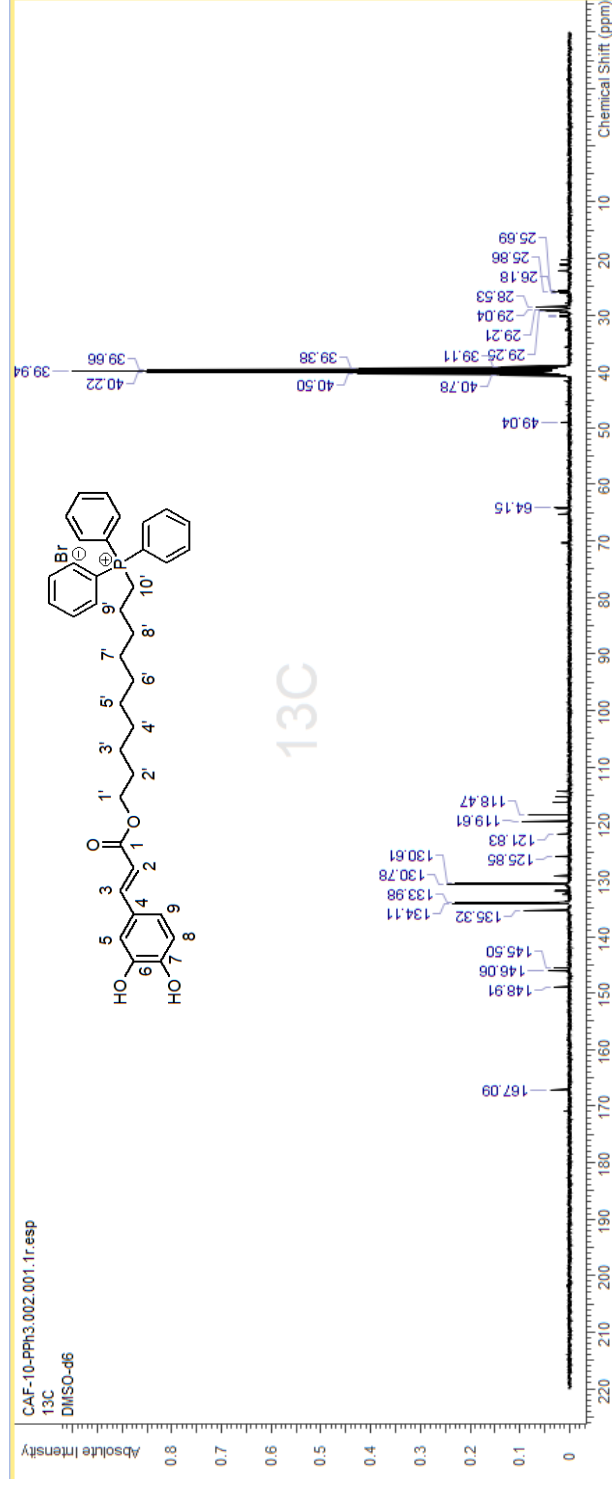


Figura 42. Espectro de protones ¹³C-RMN de bromuro de (E)-10-((3-(3,4-dihidroxi)fenil)acriloi)oxi)deci)trifenilfosfonio

¹³C-RMN (DMSO-d6) δ: 25,69, 25,86, 28,53, 28,70, 29,04, 29,21, 29,25, 30,10, 30,32, 118,47, 119,61, 121,83, 125,85, 130,61, 130,78, 133,98, 134,11, 135,32, 135,35, 145,50, 146,06, 148,91, 167,09.

En el espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato)oxi)undecil)trifenilfosfonio no es posible observar señales correspondientes a los hidroxilos catecólicos.

La porción de acrilato, se observa como un doble doblete a $\delta=6,24$ ppm y $\delta=7,45$ ppm, con una constante de acoplamiento $J=15,9$ Hz, asignables a una isomería geométrica de tipo trans para los hidrógenos de la porción olefínica. Dichas señales pueden ser asignadas a un acoplamiento spin-spin del tipo AM para los protones del sistema olefínico conjugado. El doblete a $\delta=7,45$ ppm se asignó al hidrógeno en posición β al éster y el doblete a $\delta=6,24$ ppm se asignó al hidrógeno conectado al carbono sp^2 α a la función éster.

Las señales $\delta=7,07$ ppm, $\delta=6,98$ ppm y $\delta=6,78$ ppm fueron asignados a los 3 protones del anillo catecólico, a $\delta=7,07$ ppm se destaca un doblete asignable al protón de C-5. El doblete a $\delta=6,98$ ppm se asignó al hidrógeno de C-9 y el doblete a $\delta=6,78$ ppm al hidrógeno del C-8.

A $\delta=7,59$ ppm, se ve un multiplete que integra para 3 protones, asignado a los hidrógenos unidos al carbono en posición para al carbono unido al fósforo.

La señal multiplete en el rango $\delta=7,75-7,92$ ppm se asignó a los protones de los fenilos presentes para el derivado de fosfonio (figura 43).

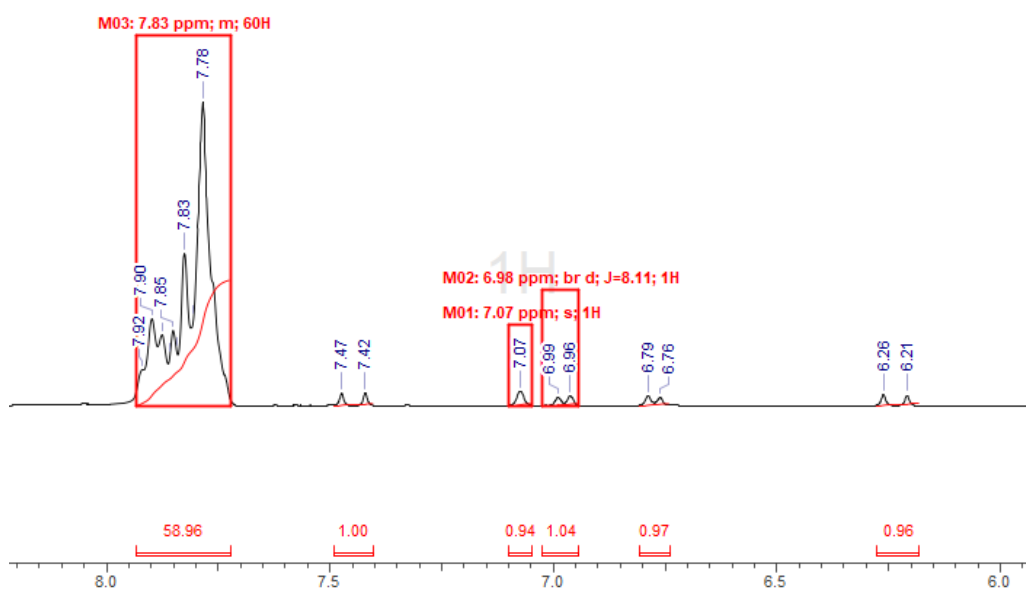


Figura 43. Ampliación del sistema conjugado del espectro de protones ^1H -RMN de bromuro de (E)-11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acrililoil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.

A $\delta=3,50$ ppm, encontramos la señal asignable a los protones del carbono α al grupo fosfonio, mientras en $\delta=4,06$ vemos la señal asignable al carbono 1', enlazado al oxígeno de la función éster. También se aprecia la típica señal del DMSO- d_6 a $\delta=2,51$ ppm, agua a $\delta=3,39$ ppm y un singulete a $\delta=3,16$ que correspondería al metanol.

A continuación, en la figura 44, se entrega detalle de las señales del ^1H -RMN de bromuro de (E)-11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acrililoil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.

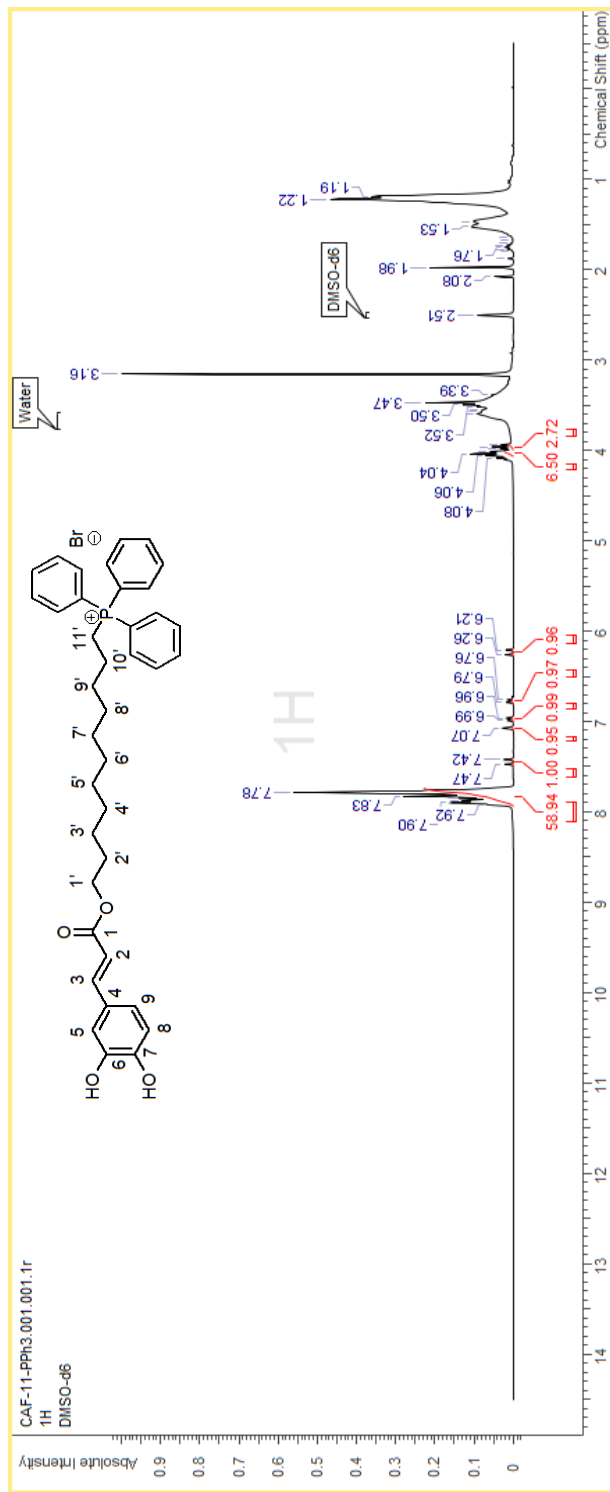


Figura 44. Espectro de protones ¹H-RMN de bromuro de (E)-11-((3-(3,4-dihidroxiifenil)acrilil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.

¹H-RMN (DMSO-d6) δ: ¹H-RMN (DMSO-d6) δ: 1,22 (s, 14H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'H, 8'H, 9'H), 1,53 (m, 2H, 2'-H), 1,98 (m, 2H, 10'-H), 3,50 (m, 2H, 11'-H), 4,06 (t, 2H, 1'-H), 6,24 (d, 1H, 2-H, J=15,9 Hz), 6,78 (d, 1H, 5-H, J=8,1 Hz), 6,98 (dd, 1H, 6-H, J=8,2 Hz), 7,07 (d, 1H, 9-H), 7,45 (d, 1H, 3-H, J=15,9 Hz), 7,83 (m, 15H, fenilos).

En el espectro de carbono ^{13}C -RMN, se aprecia una señal a $\delta=167,03$ ppm que se asigna al carbono de la función éster. Las señales entre $\delta= 130,61$ ppm y $\delta=135,35$ ppm se asignan a los tres fenilos, donde, como ya se comentó, los carbonos vecinos al fósforo, se encuentran más desapantallados.

A $\delta=118,48$ ppm y $\delta=119,61$ ppm aparecen el carbono α a la función éster y 8-C, respectivamente. No se aprecian las señales correspondientes a los carbonos 3, 4, 6, 7 y 9.

A campo alto, se observan las señales correspondientes a los carbonos de la cadena alifática, desde 2'-C a 10'-C, mientras que el carbono unido al oxígeno aparece en $\delta=65,21$ ppm.

A continuación, en la figura 45, se entrega detalle de las señales del ^{13}C -RMN de bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio.

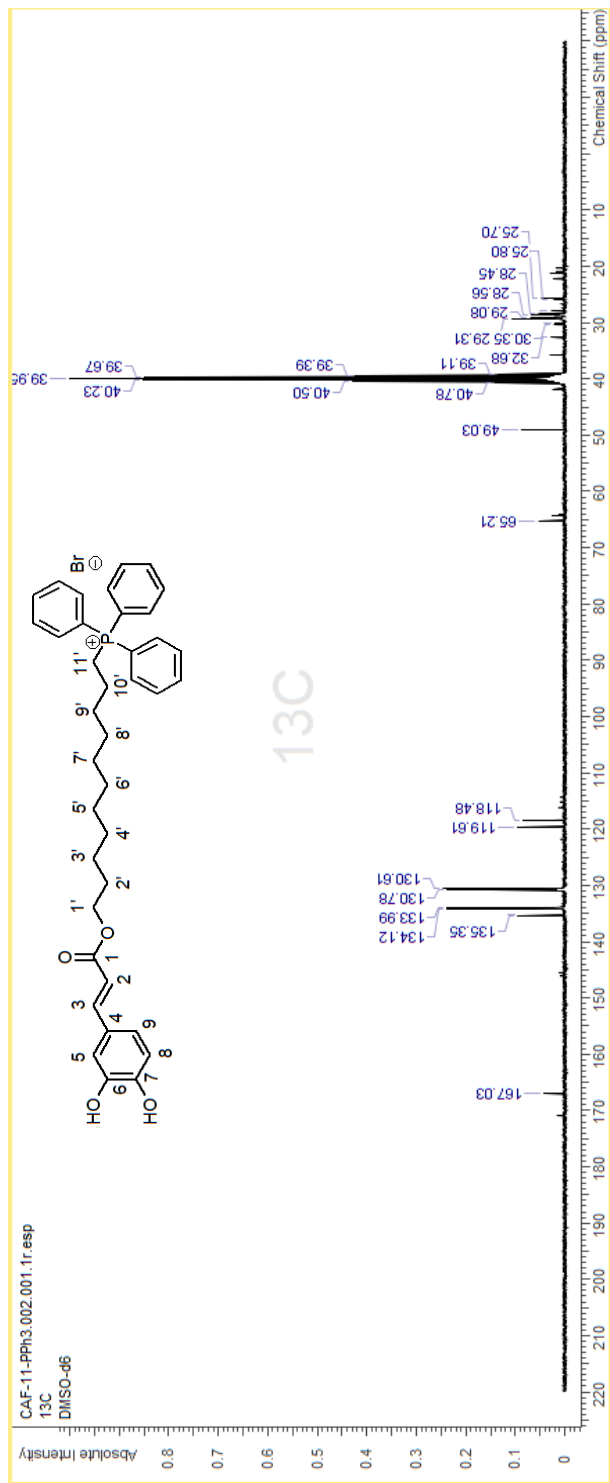


Figura 45. Espectro de protones ¹³C-RMN de bromuro de (E)-11-((3,4-dihidroxi)acrilil)undecil)trifenilfosfonio.

³C-RMN (DMSO-d6) δ: 25,70, 25,80, 27,96, 28,45, 28,56, 29,08, 29,31, 30,13, 30,35, 32,68, 65,21, 118,48, 119,61, 130,61, 130,78, 133,99, 134,12, 135,31, 135,35, 167,03.

RESULTADOS ESTUDIO BIOLÓGICO

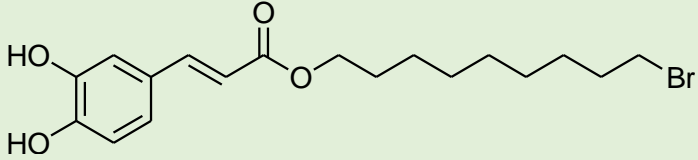
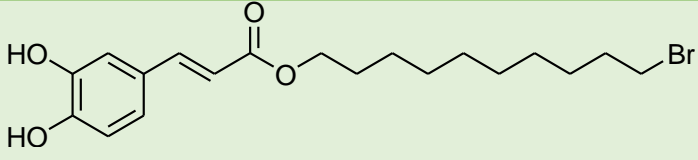
En un estudio exploratorio, las seis moléculas obtenidas fueron probadas en distintas líneas celulares tumorales y una línea celular sana (Vero) con el objetivo de comprobar si son citotóxicas y si presentan selectividad entre células tumorales y células no tumorales.

Los alquilbromoésteres fueron ensayados con Rojo Neutro y, por su parte, los cationes lipofílicos fosforados, fueron ensayados con MTT.

Alquilbromoésteres

Las líneas celulares que se mostraron más sensibles a los alquilbromoésteres fueron HCT, Vero y HeLa. MCF-7 mostró una sensibilidad mayor al 10-Br y una bastante menor a 11-Br. HL-60 mostró una sensibilidad media al 10-Br y una baja sensibilidad al 9-Br. Por su parte, H1975 no se mostró afectada a ninguno de los alquilbromoésteres.

En general, el 10-Br fue el alquilbromoéster más citotóxico de los tres, mostrando su mayor efecto sobre HCT. Sobre HeLa, MCF-7 y Vero presenta una actividad similar (tabla 5).

Molécula	Línea celular	IC ₅₀ (μM)
 9-Br	HeLa	25,8±13,6
	MCF-7	23,8±19,4
	HCT-116	4,7±2,8
	H1975	164,6±47,9
	HL-60	93,1±10,8
	Vero	17,6±1,1
 10-Br	HeLa	12,9±2,6
	MCF-7	17,9±10,4
	HCT-116	3,2±2,4
	H1975	156,6±30,0
	HL-60	42,5±3,9
	Vero	14,1±4,4

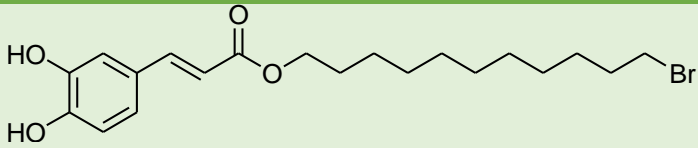
Molécula	Línea celular	IC ₅₀ (μM)
 11-Br	HeLa	22,0±3,3
	MCF-7	53,6±26,2
	HCT-116	4,0±0,6
	H1975	144,2±26,1
	HL-60	56,3±7,8
	Vero	22,9±5,8

Tabla 5. IC₅₀ de alquilbromoésteres en ensayo con Rojo Neutro sobre distintas líneas celulares.

Los mejores resultados se obtuvieron con 10-Br, sin embargo, muestra ser selectivo sólo frente a HCT, al igual que los otros dos alquilbromoésteres ensayados.

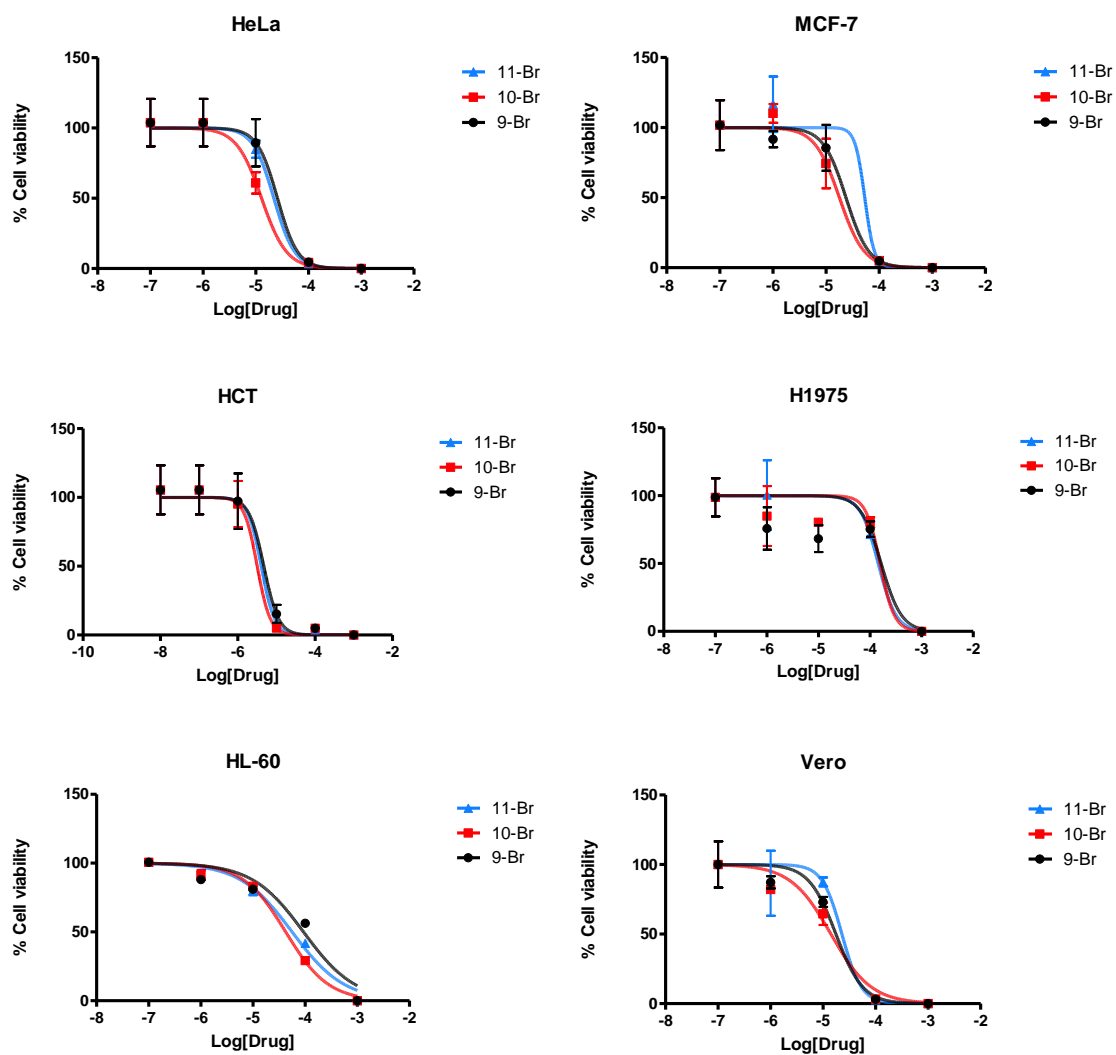


Figura 46. Gráficos correspondientes a cada línea celular ensayada que permiten comparar la actividad de los tres alquilbromoésteres sobre cada una.

Cationes lipofílicos fosforados

Los cationes lipofílicos fosforados mostraron ser citotóxicos frente a las cuatro líneas celulares ensayadas: HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero. La línea más sensible a estos compuestos es HeLa, siendo la única línea tumoral frente a la que los cationes lipofílicos fosforados ensayados se muestran selectivos.

Los resultados obtenidos para MCF-7, HCT-116 y Vero, no muestran diferencias significativas entre sí (tabla 6).

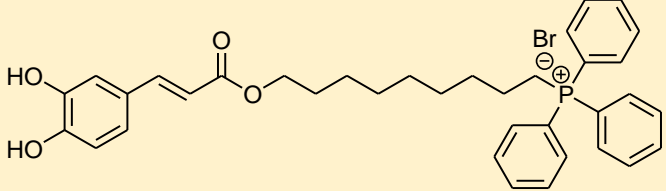
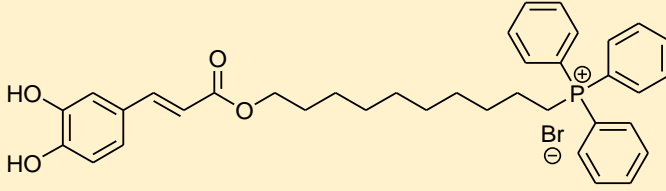
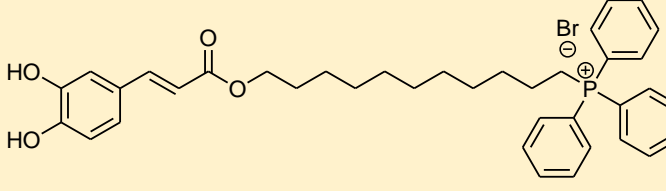
Molécula	Línea celular	IC ₅₀ (μM)
 9-P	HeLa	9,0±2,1
	MCF-7	28,9±3,1
	HCT-116	43,5±8,0
	Vero	30,6±6,4
 10-P	HeLa	8,5±1,0
	MCF-7	23,0±0,7
	HCT-116	27,6±2,0
	Vero	21,1±1,4
 11-P	HeLa	13,5±1,1
	MCF-7	32,6±7,0
	HCT-116	38,5±4,7
	Vero	26,6±9,5

Tabla 6. IC₅₀ de cationes lipofílicos fosforados en ensayo con MTT sobre distintas líneas celulares.

Al igual que en los alquilbromoésteres, los mejores resultados se obtuvieron con la molécula de cadena de 10 carbonos: 10-P.

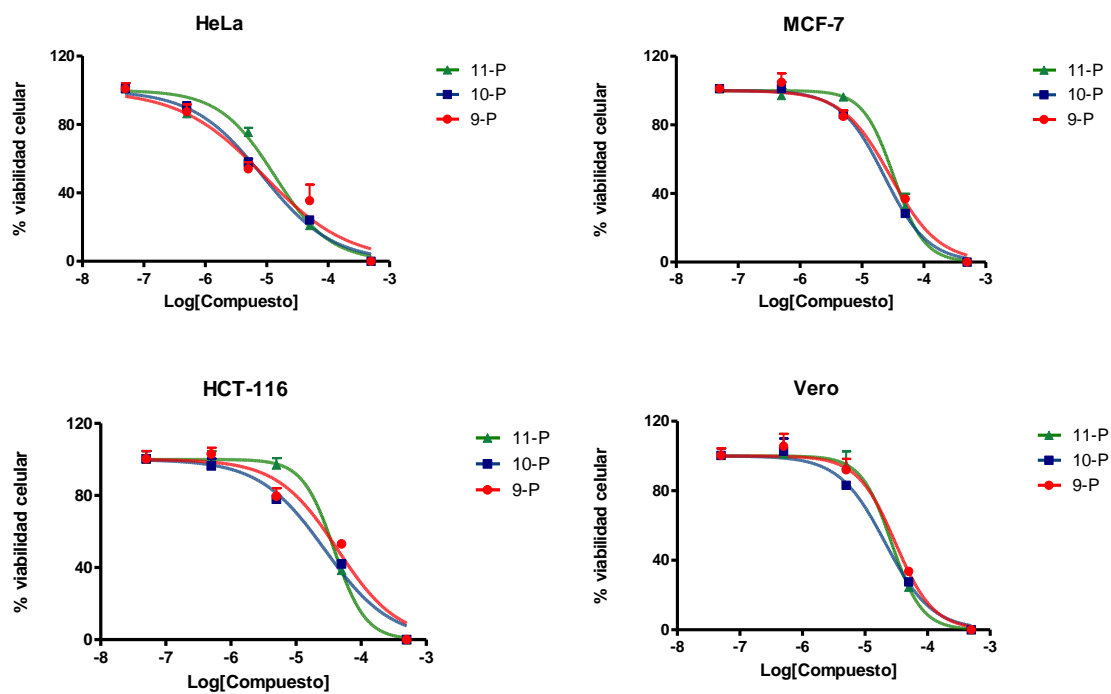


Figura 47. Gráficos correspondientes a cada línea celular ensayada que permiten comparar la actividad de los tres cationes lipofílicos fosforados sobre cada una.

Comparación de resultados en el estudio de viabilidad celular: alquilbromoésteres (9-Br, 10-Br y 11-Br) y cationes lipofílicos fosforados (9-P, 10-P y 11-P) sobre las mismas líneas celulares

Las líneas celulares HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero fueron analizadas con ambas familias de compuestos.

Se obtuvieron resultados similares en el análisis de la citotoxicidad de los alquilbromoésteres sobre HeLa, MCF-7 y Vero. Sólo en el caso de 11-Br, se obtuvo un IC_{50} mayor para MCF-7 (tabla 9). Al comparar con los cationes lipofílicos fosforados, se observa una considerable disminución del IC_{50} sobre HeLa, principalmente para 9-P (tabla 7) y 10-P (tabla 8), además de un aumento sobre Vero para los mismos compuestos, siendo aún mayor para 9-P.

Los tres alquilbromoésteres mostraron ser selectivos para HCT-116 respecto a Vero, a diferencia de los cationes lipofílicos fosforados que mostraron mayor selectividad para células no tumorales que para esta línea de células cancerosas. 10-Br fue el alquilbromoéster que mostró mayor selectividad para HCT-116. Sin embargo, al encontrarse en proporción minoritaria respecto al contaminante, no es posible atribuir el efecto citotóxico a los alquilbromoésteres.

Molécula	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ MCF-7 (μM)	IC ₅₀ HCT-116 (μM)	IC ₅₀ Vero (μM)
9-Br	25,8±13,6	23,8±19,4	4,7±2,8	17,6±1,1
9-P	9,0±2,1	28,9±3,1	43,5±8,0	30,6±6,4

Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos para propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-9-bromononilo (9-Br) y bromuro de (E)-(9-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)nonil)trifenilfosfonio (9-P) sobre HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero.

Molécula	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ MCF-7 (μM)	IC ₅₀ HCT-166 (μM)	IC ₅₀ Vero (μM)
10-Br	12,9±2,6	17,9±10,4	3,2±2,4	14,1±4,4
10-P	8,5±1,0	23,0±0,7	27,6±2,0	21,1±1,4

Tabla 8. Comparación de los resultados obtenidos para propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-10-bromodecilo (10-Br) y bromuro de (E)-(10-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)decil)trifenilfosfonio (10-P) sobre HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero.

Molécula	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ MCF-7 (μM)	IC ₅₀ HCT-166 (μM)	IC ₅₀ Vero (μM)
11-Br	22,0±3,3	53,6±26,2	4,0±0,6	22,9±5,8
11-P	13,5±1,1	32,6±7,0	38,5±4,7	26,6±9,5

Tabla 9. Comparación de los resultados obtenidos para propenoato de (E)-3-(4,4dihidroxifenil)-11-bromoundecilo (11-Br) y bromuro de (E)-(11-((3-(3,4-dihidroxifenil)acriloil)oxi)undecil)trifenilfosfonio (11-P) sobre HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero.

Los resultados obtenidos nos indican que la misma molécula puede o no tener un efecto similar sobre distintas líneas celulares. La mayor diferencia entre células tumorales y células no tumorales está dada por los cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico sobre HeLa y Vero, que analizaremos a continuación.

Selectividad sobre HeLa

Al comparar los resultados obtenidos de los tres cationes lipofílicos fosforados sobre HeLa (tabla 10), se observa que el menor IC₅₀ corresponde a 10-P, pero

la mayor diferencia entre el IC₅₀ para HeLa y para células no tumorales, corresponde a 9-P, para el cual se necesitan 3,4 veces la concentración de compuesto para matar a la mitad de las células no tumorales presentes respecto a las tumorales. Para 10-P se requiere 2,5 veces la concentración de compuesto y, para 11-P, 2,0 veces para el mismo objetivo.

Molécula	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ Vero (μM)	IC ₅₀ Vero/ IC ₅₀ HeLa
9-P	9,0±2,1	30,6±6,4	3,4
10-P	8,5±1,0	21,1±1,4	2,5
11-P	13,5±1,1	26,6±9,5	2,0

Tabla 10. Comparación de los resultados obtenidos para los cationes lipofílicos fosforados sobre HeLa y Vero.

En cuanto a resultados generales, el mejor efecto antitumoral se observó con alquilbromoésteres y cationes lipofílicos fosforados con cadena de 10 carbonos. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos sobre HeLa y Vero con los compuestos fosforados, observamos una mayor selectividad con 9-P, quien entrega la mayor diferencia de concentraciones necesaria para ejercer un efecto citotóxico sin dañar a las células no tumorales.

Molécula	IC ₅₀ HeLa (μM)	IC ₅₀ MCF-7 (μM)	IC ₅₀ HCT-116 (μM)	IC ₅₀ (μM) Vero
Cisplatino	2,0	5,8	2,8	30,2
9-P	9,0±2,1	28,9±3,1	43,5±8,0	30,6±6,4
10-P	8,5±1,0	23,0±0,7	27,6±2,0	21,1±1,4
11-P	13,5±1,1	32,6±7,0	38,5±4,7	26,6±9,5
9-Br	25,8±13,6	23,8±19,4	4,7±2,8	17,6±1,1
10-Br	12,9±2,6	17,9±10,4	3,2±2,4	14,1±4,4
11-Br	22,0±3,3	53,6±26,2	4,0±0,6	22,9±5,8

Tabla 11. Valores de IC₅₀ para cisplatino sobre las líneas HeLa (Fiuza y col, 2004), MCF-7 (Suberu y col, 2014), HCT-116 (Smith y col, 2001) y Vero (Sharifah Sakinah y col, 2007) y los obtenidos para los cationes lipofílicos y los alquilbromoésteres ensayados sobre las mismas líneas celulares.

En tabla 11 se comparan los resultados obtenidos para cationes lipofílicos y alquilbromados con los entregados por la literatura respecto al cisplatino sobre las líneas HeLa, MCF-7, HCT-116 y Vero. En ellos, observamos que los resultados más cercanos a los del cisplatino, corresponden a los de 9-P sobre HeLa y Vero, donde el primero entrega una razón de IC₅₀ Vero/ IC₅₀ HeLa de 15,1

y 9-P de 3,4, lo que nos indica que el mejor resultado para HeLa corresponde a un cuarto de la selectividad del cisplatino, fármaco usado en el tratamiento del cáncer en la actualidad. En cuanto a los alquilbromados, el mejor resultado se obtiene para 11-Br, que entrega una razón $IC_{50} \text{ Vero} / IC_{50} \text{ HCT-116}$ de 5,7, mientras que la del cisplatino corresponde a 10,8, mostrando que el mejor resultado para HCT-116 corresponde a la mitad de la selectividad del cisplatino.

Al comparar estos resultados con los entregados por la literatura en la tabla 2, nos encontramos que para HeLa, los ésteres derivados de ácido cafeico con cadena de 3 y 8 carbonos, mostraron ser de 1,3 a 3,2 veces más tóxicos para células no tumorales L-132 que para HeLa (Fiuza y col, 2004).

En cuanto a los cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido gálico mostrados en la tabla 2 (Jara y col, 2014), el mejor resultado corresponde al de cadena de 10 carbonos que muestra un $IC_{50} \text{ TA3/HA}$ y para TA3-MTX-R de 0,4 μM y un IC_{50} para MM3MG, que corresponde a la línea no tumoral, de 7,1 μM , dando una razón $IC_{50} \text{ TA3} / IC_{50} \text{ MM3MG}$ de 17,75. Para el resto de los cationes lipofílicos ensayados en el trabajo de Jara y colaboradores, que tienen cadenas de 8, 11 y 12 carbonos, la razón entre el mejor IC_{50} de las células tumorales y el IC_{50} de las no tumorales, es de 2,2, 3,9 y 2, respectivamente, que son similares a los obtenidos para los cationes lipofílicos fosforados derivados de ácido cafeico

ensayados en el presente trabajo. Sin embargo, es necesario considerar que el estudio de Jara se realizó en líneas celulares distintas a las aquí ensayadas: TA3/HA cáncer mamario de ratón, TA3-MTX-R adenocarcinoma mamario de ratón resistente a metotrexato y MM3MG glándula mamaria no tumoral de ratón.

Las diferencias en los resultados obtenidos para las dos familias de moléculas en las distintas líneas celulares ensayadas, sugieren que se deberían a una estrecha relación con las características morfológicas y fisiológicas correspondientes a su tejido de origen y cómo las respectivas estructuras moleculares interactúan con ellas según su tamaño y lipofilicidad (tabla 12).

Molécula	clogP
9-Br	5,286
10-Br	5,815
11-Br	6,344
9-P	10,343
10-P	10,872
11-P	11,401

Tabla 12. Logaritmo del coeficiente de reparto o partición calculado, lo cual indica, a mayor número, mayor lipofilicidad.

Para trifenilfosfina (Jara y col, 2014) y ácido cafeico (Nam y col, 2001) por separado (tabla 2), los resultados indican que no son citotóxicos por sí mismos, lo que nos sugiere que realizar las modificaciones estructurales aquí propuestas sí permitiría aumentar el efecto citotóxico del ácido cafeico, pues la cadena de sus ésteres le entregaría la lipofilidad suficiente para penetrar y cruzar membranas y, por otro lado, la carga positiva deslocalizada permitiría guiar estas moléculas hacia la mitocondria, permitiendo que allí los grupos catecol y cinamoil conjugados del ácido cafeico ejerzan su efecto antioxidante.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron tres alquilbromoésteres y tres cationes fosforados lipofílicos derivados del ácido cafeico con rendimientos de 11-17% y 43-50% respectivamente utilizando el método de Knoevenagel-Doebner con 3,4-dihidroxibenzaldehído, piridina, piperidina y los respectivos intermediarios obtenidos en la reacción con ácido de Meldrum y 9-bromo-1-nonanol, 10-bromo-1-decanol y 11-bromo-1-undecanol, con posterior sustitución nucleofílica, los cuales no pudieron ser completamente purificados.

El método de Knoevenagel-Doebner utilizado dio bajos rendimientos en la obtención de alquilbromoésteres: 17% para 9-Br, 14% para 10-Br y 11% para 11-Br. Esto puede deberse al medio utilizado para realizar la reacción, específicamente a la cantidad de piridina añadida y que esto se realizó sobre el tolueno.

La reacción final entre los alquilbromados 9-Br, 10-Br y 11-Br con trifenilfosfina dirigida a la obtención los cationes lipofílicos 9-P, 10-P y 11-P, demostró presentar muy baja reactividad dados los tiempos y rendimiento obtenidos: 10 días para obtener de un 43 al 50% de rendimiento. Estas desventajas hacen necesario repensar esta metodología y buscar nuevas rutas sintéticas.

El método de purificación utilizado en la primera etapa, no permitió separar del todo a los alquilbromoésteres del resto de intermediarios de su síntesis. Es

necesario repensar esta metodología y buscar nuevas mezclas eluentes que permitan una mejor separación. Respecto a la purificación de los cationes lipofílicos, se observó que la cromatografía con elución por gradiente de polaridad creciente es un método eficiente, pero es necesario contar con un evaporador rotatorio en buen estado que permita separar el agua del compuesto final, en caso de utilizar un alcohol.

Los cationes lipofílicos fosforados mostraron mayor citotoxicidad tanto para células tumorales como no tumorales. Por lo tanto, la presencia de una carga deslocalizada sí mejora el efecto antitumoral de las moléculas sintetizadas.

En una relación más acotada, se constataron mejores rendimientos y efecto biológico para ésteres bromados y cationes fosforados con cadena de 10 carbonos. Por lo tanto, el largo de cadena sí se relaciona con el efecto citotóxico deseado.

Los tres cationes lipofílicos fosforados mostraron mayor selectividad para HeLa frente a células no tumorales. De estos, fue el de cadena de 9 carbonos (9-P) quien mostró el mejor resultado, quien se muestra mucho más liposoluble que las moléculas alquilbromadas y menos que 10-P y 11-P. Por lo tanto, la alta liposolubilidad y el menor tamaño respecto al resto de los cationes lipofílicos, facilitaría el ingreso de 9-P a HeLa.

Considerando que los alquilbromoésteres no se encontraban puros, este estudio debe tomarse como exploratorio y abre las puertas a nuevas investigaciones con

ésteres derivados de ácido cafeico que permitan dilucidar su real potencial antitumoral en vista de diseñar nuevas terapias farmacológicas con mayor selectividad y, por lo tanto, menos efectos adversos en el tratamiento del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

1. BARBUSIŃSKI, K. 2009. Fenton reaction - controversy concerning the chemistry. *Ecological chemistry and engineering S*, 16: 347-358.
2. CASCALES, M. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 69: 43-70.
3. CHINNAIYAN, A. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1(1): 5-15.
4. CORTÉS, K. 2012. Mecanismos de muerte celular inducida por cationes lipofílicos derivados del ácido gálico. Memoria para optar al título de Bioquímico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 67p.
5. CORTES, L., CASTRO, L., PESCE, B., MAYA, J. D., FERREIRA, J., CASTRO-CASTILLO, V., PARRA, E., JARA, J. A. y LÓPEZ-MUÑOZ, R. 2015. Novel gallate triphenylphosphonium derivatives with potent antichagasic activity. *Plos one*, 10(8): 1-17.
6. COSTA, M., LOSADA-BARREIRO, S., PAIVA-MARTINS, F., BRAVO-DÍAZ, C. y ROMSTED, L. S. 2015. A direct correlation between the antioxidant efficiencies of caffeic acid and its alkyl esters and their concentrations in the interfacial region of olive oil emulsions. The pseudophase model interpretation of the “cut-off” effect. *Food Chemistry*, 175: 233-242.
7. DAVIS, S., WEISS, M. J., WONG, J. R., LAMPIDIS, T. J. y CHEN, L. B. 1985. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 260(25): 13844-13850.
8. DENIZOT, F. y LANG, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89(2): 271-277.

9. EKBLAD, L., WELINDER, C., KJELLÉN, E., BRUN, E. y WENNERBERG, J. 2015. Anti- or pro-proliferation – Conditional options for TGF- α and cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 51(1): 46-52.
10. EKERT, P. G. y VAUX, D. L. 2005. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6): 626-630.
11. ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4): 495-516.
12. FANTIN, V. R., BERARDI, M. J., SCORRANO, L., KORSMEYER, S. J. y LEDER, P. 2002. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer cell*, 2(1): 29-42.
13. FELTY, Q., SINGH, K. P. y ROY, D. 2005. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene*, 24(31): 4883-4893.
14. FERNÁNDEZ, C. Participación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) en preconditionamiento por taquicardia. Memoria para optar al título de Bioquímico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 60p.
15. FIUZA, S. M., GOMES, C., TEIXEIRA, L. J., GIRAO DA CRUZ, M. T., CORDEIRO, M. N. D. S., MILHAZES, N., BORGES, F. y MARQUES, M. P. M. 2004. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties— a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 12(13): 3581-3589.
16. FORREST, M. 2015. Why cancer cells have a more hyperpolarised mitochondrial membrane potential and emergent prospects for therapy. *Biorxiv*, 1-42.
17. FREZZA, C. y GOTTLIEB, E. 2009. Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Seminars in cancer biology*, 19: 4-11.
18. GOGVADZE, V., ORRENIUS, S. y ZHIVOTOVSKY, B. 2008. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in cell biology*, 18(4): 165-173.

19. GOVINDAN, S. V., KULSUM, S., PANDIAN, R. S., DAS, D., SESHADRI, M., HICKS, W. JR., KURIOAKOSE, M. A. y SURESH, A. 2015. Establishment and characterization of triple drug resistant head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Molecular medicine reports*, 12: 3025-3032.
20. GRIMM, M., CETINDIS, M., LEHMANN, M., BIEGNER, T., MUNZ, A., TERIETE, P., KRAUT, W. y REINERT, S. 2014. Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis – indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? *Journal of translational medicine*, 12(1): 208-229.
21. GÜLCIN, I. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217:213-220.
22. GUO, X., SHEN, L., TONG, Y., ZHANG, J., WU, G., HE, Q., YU, S., YE, W., ZOU, L., ZHANG, Z. y LIAN, X. Y. 2013. Antitumor activity of caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester and its pharmacokinetic and metabolic properties. *Phytomedicine*, 20(10): 904-912.
23. HALLIWELL, B. 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *British journal of experimental pathology*, 70(6): 737-757.
24. HANAHAN, D. y WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
25. HANAHAN, D. y WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 520-527.
26. HE, H., LI, D. W., YANG, L. Y., ZHU, X. J., WONG, W. K., JIANG, F. L. y LIU, Y. 2015. A novel bifunctional mitochondria- targeted anticancer agent with high selectivity for cancer cells. *Scientific reports*, 5: 1-10.
27. HU, W. X., XIA, C. N., WANG, G. H. y ZHOU, W. 2006. One-pot preparation of caffeic acid esters from 3,4-dihydroxybenzaldehyde. *Journal of chemical research*, 9: 586-588.

28. JARA, J., CASTRO-CASTILLO, V., SAAVEDRA-OLAVARRÍA, J., PEREDO, L., PAVANNI, M., JAÑA, F., LETELIER, M. E., PARRA, E., BECKER, M. I., MORELLO, A., KEMMERLING, U., MAYA, J. D. y FERREIRA, J. 2014. Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation *in vivo* in syngenic mice. *Journal of medicinal chemistry*, 57(6): 2440-2454.
29. JONES, G. 1964. The Knoevenagel condensation. En: *Organic Reactions*. 204-273.
30. KATAOKA, T., SCHRÖTER, M., HAHNE, M., SCHNEIDER, P., IRMLER, M., THOME, M., FROELICH, C. J. y TSCHOPP, J. 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme b, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *Journal of immunology*, 161(8): 3936-3942.
31. KATAOKA, T., BUDD, R. C., HOLLER, N., THOME, M., MARTINON, F., IRMLER, M., BURNS, K., HAHNE, M., KENNEDY, N., KOVACSOVICS, M y TSCHOPP, J. 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Current biology*, 10(11): 640-648.
32. KOMISSAROV, V. V., PANOVA, N. G. y KRITZYN, M. 2008. Polymethylene derivatives of nucleic bases with w -functional groups: vi. [8-(2-oxocyclohexyl)-9-oxooctyl]pyrimidines as potential inhibitors of pyrimidine phosphorylases. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 34(1): 67-73.
33. KOUFAKI, M., THEODOROU, E., ALEXI, X. y ALEXIS, M. N. 2010. Synthesis of a second generation chroman/catechol hybrids and evaluation of their activity in protecting neuronal cells from oxidative stress-induced cell death. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 18(11): 3898-3909.
34. KUBO, I., FUJITA, K. I., NIHEI, K. I. y NIHEI, A. 2004. Antibacterial Activity of Akyl Gallates against *Bacillus subtilis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 1072-1076.
35. LIOU, G. Y. y STORZ, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical res.* 44(5): 1-31.

36. LIPSON, V. V. y GOROBETS, N. Y. 2009. One hundred years of Meldrum's acid: advances in the synthesis of pyridine and pyrimidine derivatives. *Molecular diversity*, 13(4): 399-419.
37. LIU, Y., PETERSON, D. A., KIMURA, H. y SCHUBERT, D. 1997. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69(2): 581-593.
38. LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N. y LENARDO, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4): 487-501.
39. MARIANGEL, E., REYES-DIAZ, M., LOBOS, W., BENSH, E., SCHALCHLI, H. e IBARRA, P. 2013. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 40(1): 161-170.
40. MASAKI, H., OKAMOTO, N., SAKAI, S. y SAKURAI, H. 1997. Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides. *Biol. Pharm. Bull.* 20(4): 304-308.
41. MINISTERIO DE SALUD. 2016. Estrategia nacional de cáncer, Chile 2016. 72p.
42. MODICA-NAPOLITANO, J. S., y SINGH, K. K. 2004. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 92(4): 755-762.
43. MODICA-NAPOLITANO, J. S., KULAWIEC, M. y SINGH, K. K. 2007. Mitochondria and human cancer. *Current molecular medicine*, 7: 121-131.
44. MORENO-SÁNCHEZ, R., RODRÍGUE-ENRÍQUEZ, S., MARÍN-HERNÁNDEZ, A. y SAAVEDRA, E. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS journal*, 274(6): 1393-1418.
45. MURPHY, M. 2008. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1777: 1028-1031.
46. NAM, N. H., YOU, Y. J., HONG, D. H., KIM, H. M. y AHN, B. Z. 2001. Syntheses of certain 3-aryl-2-propenoates and evaluation of their cytotoxicity. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 11(9): 1173-1176

47. OZTURK, G., GINIS, Z., AKYOL, S., ERDEN, G., GUREL, A. y AKYOL, O. 2012. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *European review for medical and pharmacological sciences*, 16(15): 2064-2068.
48. PEDERSEN, P. L. 2007. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen.
49. PUPPO, A. y HALLIWELL, B. 1988. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *The biochemical journal*, 249: 185-190.
50. REPETTO, G., DEL PESO, A. y ZURITA, J. L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7): 1125-1131.
51. RIERA, P. y MARTÍNEZ, B. 2005. Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Revista médica de Chile*, 133(5): 555-563.
52. ROSENBERG, E. 1953. The Doebner modification of the Knoevenagel reaction. Submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Arts. Harvard University. 37p.
53. SÁNCHEZ, C. 2013. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24: 553-562.
54. SANDOVAL-ACUÑA, C., FUENTES-RETAMAL, S., GUZMÁN-RIVERA, D., PEREDO-SILVA, L., MADRID-ROJAS, M., REBOLLEDO, S., CASTRO-CASTILLO, V., PAVANI, M., CATALÁN, M., MAYA, J. D., JARA, J. A., PARRA, E., CALAF, G. M., SPEISKY, H. y FERREIRA, J. 2016. Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP+-linked-polyhydroxybenzoates. *Toxicology and applied pharmacology*, 309: 2-14.
55. SERRANO, A., PALACIOS, C., ROY, G., CESPÓN, C., VILLAR, M. L., NOCITO, M. y GONZÁLEZ-PORQUÉ, P. 1998. Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 350(1): 49-54.

56. SHARIFAH SAKINAH, S. A., HANDAYANI, T. y HAWARIAH, A. 2007. Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio. *Cancer cell international*, 7(4): 1-11.
57. SHIEH, R. L., LIN, R. L., HWANG, J. J. y JWO, J. J. 1998. Kinetic study of the substitution reactions of triphenylphosphine with chlorobenzyl chlorides, dimethylbenzyl chloride, and methylbenzyl bromides in various two-phase organic solvent/water media. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 45: 517-523.
58. SMITH, V., RAYNAUD, F., WORKMAN, P. y KELLAND, L. R. 2001. Characterization of a Human Colorectal Carcinoma Cell Line with Acquired Resistance to Flavopiridol. *Molecular pharmacology*, 60(5): 885-893.
59. SOLAINI, G., BARACCA, A., LENZA, G y SGARBI, G. 2010. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1797: 1171-1177.
60. SUBERU, J. O., ROMERO-CANELÓN, I., SULLIVAN, N., LAPKIN, A. A. y BARKER, G. C. 2014. Comparative cytotoxicity of artemisinin and cisplatin and their interactions with chlorogenic acids in MCF7 breast cancer cells. *ChemMedChem*, 9: 2791-2797.
61. SUSIN, S. A., DAUGAS, E., RAVAGNAN, L., SAMEJIMA, K., ZAMZAMI, N., LOEFFLER, M., COSTANTINI, P., FERRI, K. F., IRINOPOULOU, T., PRÉVOST, M. C., BROTHERS, G., MAK, T. W., PENNINGER, J., EARNSHAW, W. C., y KROEMER, G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The journal of experimental medicine*, 192(4): 571-580.
62. TAKAI, E., HIRANO, A. y SHIRAKI, K. 2011. Effects of alkyl chain length of gallate on self-association and membrane binding. *The journal of biochemistry*, 150(2): 165-171.
63. UWAI, K., OSANAI, Y., IMAIZUMI, T., KANNO, S. I., TAKESHITA, M. y ISHIKAWA, M. 2008. Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 16: 7795-7803.

64. VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. y THOMPSON, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930): 1029-1033.
65. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2013. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 55p.
66. XIA, C. N., LI, H. B., LIU, F. y HU, W. X. 2008. Synthesis of trans-cafeate analogues and their bioactivities against HIV-1 integrase and cancer cell lines. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 18(24): 6553-6557.
67. ZHANG, G., ZHANG, J., WANG, X., YANG, W., SUN, Z., KUMAR, C. N., GUAN, H. y GUAN, J. 2014. Apoptosis of human tongue squamous cell carcinoma cell (CAL-27) induced by *Lactobacillus* sp. A-2 metabolites. *J appl oral science*, 22(4): 282-286.