



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CITOTÓXICOS
A PARTIR DE UN TRITERPENO TETRACÍCLICO
DE TIPO CICLOARTANO (ARGENTATINA B)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

CÉSAR LUNA TOLEDO



MÉXICO, D.F.

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente

Dra. Yolanda Caballero Arroyo

Vocal

Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents

Secretario

Dr. Mariano Martínez Vázquez

1er. Suplente

Dr. Francisco Hernández Luis

2do. Suplente

Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

Sitio en donde se desarrollo el tema:

Instituto de Química, UNAM.

Asesor del tema:

Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Sustentante:

Luna Toledo César

Agradecimientos:

Al Dr. Mariano Martínez, a la Dra. Hortensia Parra por su asesoría en la elaboración de este trabajo.

A todos mis maestros los cuales contribuyeron en mi formación académica y personal, en especial al Maestro Gustavo Garduño.

A la Universidad Nacional Autónoma de México la cual fue mi segunda casa en estos años y a la cual debo mi educación.

Dedicatorias:

A mi madre, Gracias por apoyarme en todo momento, eres un gran estímulo en mi vida, Te quiero.

A mi padre, espero nunca decepcionarte.

A mi admirado hermano Israel y a Mony, los quiero.

A mis queridas sobrinas Fany y Arely.

A mi family de Michoacán, no importa que estén tan lejos.

A mis amigos del Instituto: Martha y Horte Rosas.

A mis Amigas: Alma y Perla Deyanira gracias por apoyarme y por su amistad.

A mis amiguitos: Martín, Víctor, Rodolfo, Rosa, Mariana, Elena y Mario Almaraz,

A mi querida Andrea por estar conmigo hasta el final.

Contenido

Índice de esquemas	Pag. III
Índice de figuras	III
Índice de tablas	IV
Abreviaturas	V
Cuadro de compuestos preparados	VI

1. Introducción

1.1 Definición de cáncer.	1
1.2 El cáncer como problema de salud publica.	3
1.3 El tratamiento del cáncer.	4
1.4 Principios antineoplásicos aislados de especies vegetales.	7
1.5 Los triterpenos como potenciales agentes anticancerígenos.	13
1.6 <i>Parthenium argentatum</i> .	15
1.7 Metabolitos del guayule.	16
1.8 La resina.	20
1.9 Estudios previos de actividad biológica.	20

2. Hipótesis

22

3. Objetivos

22

3.1 Objetivos particulares	22
----------------------------	----

4. Resultados y discusión

23

4.1 Extracción y Aislamiento de la 16 β , 24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (argentatina B) (1).	25
4.2 Obtención de 25-acetiloxi-16 β ,24R-cicloartan-3-ona (2).	25
4.3 Reacción de la 25-acetiloxi-16 β ,24R-cicloartan-3-ona (2) con eterato de trifluoruro de boro BF ₃ -OEt ₂ .	25
4.3.1 Obtención de 16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (3) y de de la 16 β -hidroxi-cicloartan 3,24-diona (4).	26
4.3.2 Obtención de 5.	31
4.4 Obtención de la 2 α -bromo-16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (6).	38
4.5 Obtención de la 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloart-1-en-3-ona (7).	38
4.6 Obtención de la 25- acetiloxi-16 β ,24R-epoxi-cicloart-1-en-3-ona (8).	39
4.7 Obtención de la 16 β -hidroxi-cicloart-1-en-3,24-diona (9).	39
4.8 Actividad citotóxica de los derivados obtenidos.	41

5. Conclusiones	45
6. Parte experimental	48
6.1 Caracterización de los compuestos obtenidos.	49
6.2 Aislamiento de la 25-hidroxi-16 β ,24R-cicloartan-3-ona (1) (argentatina B).	50
6.3 Obtención de 25-acetiloxi-16 β ,24R-cicloartan-3-ona (2).	50
6.4 Reacción de 25-acetiloxi-16 β ,24R-cicloartan-3-ona (2) con eterato de trifluoruro de boro BF ₃ -OEt ₂ .	51
6.4.1 16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (3) y de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (4).	52
6.4.2 Obtención de 5 .	55
6.5 Obtención de 2 α -bromo-16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (6).	56
6.6 Obtención de 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloart-1-en-3-ona (7).	57
6.7 Obtención de 25-acetiloxi-16 β ,24R-epoxi-cicloart-1-en-3-ona (8).	58
6.8 Obtención de 16 β -hidroxi-cicloart-1-en-3,24-diona (9).	59
6.9 Evaluación citotóxica de los compuestos preparados (Método de la sulforrodamina B).	60
7. Bibliografía	62
8. Anexos	66

Índice de esquemas

Esquema

1. Obtención de 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloart-1-en-3-ona (9).	24
2. Posible mecanismo de formación del isomero de tipo lanostano.	28
3. Posible mecanismo de reacción del acetato de argentatina B (2) y BF ₃ -OEt ₂ , para la obtención de 4 .	30
4. Mecanismo de reacción propuesto para la aromatización de 2 .	37
5. Obtención del acetilado en C-25 de la argentatina B.	50
6. Apertura de la argentatina B acetilada.	52
7. Obtención del derivado aromático de la argentatina B (5).	55
8. Obtención de 2 α -bromo argentatina B (6).	56
9. Formación del doble enlace en la argentatina B bromada.	57
10. Obtención del acetilado de argentatina B insaturada (8).	58
11. Transformación de la enona con BF ₃ -OEt ₂ .	59

Índice de figuras

Figura

1. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México durante el año 2002.	4
2. <i>Catharanthus roseus</i> L.	9
3. Metabolitos aislados de <i>Catharanthus roseus</i> L.	9
4. <i>Podophyllum peltatum</i> .	10
5. Metabolitos aislados de <i>Podophyllum peltatum</i> .	10
6. <i>Taxus brevifolia</i> .	11
7. Metabolito aislado de <i>Taxus brevifolia</i> .	11
8. Compuestos de origen natural y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer.	12
9. Biosíntesis y ciclación del escualeno.	14
10. Estructura del parteniol propuesta por Hageen-Smit en 1948 (1) y estructura correcta del parteniol (2) determinada por Martínez en 1986.	17
11. Estructuras de las guayulinas.	18
12. Estructura de los triterpenos del guayule.	19
13. Residuos encontrados en el espectro de masas de la mezcla binaria de 3 y 4 .	27
14. Residuo obtenido de la fragmentación de la mezcla binaria de 3 y 4 .	27
15. Mezcla binaria de ismeros estructurales.	28
16. Estereoestructura de la mezcla binaria de 16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (3) y de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (4), obtenida por medio de un estudio de difracción de rayos X.	29
17. Espectro de RMN ¹³ C de la mezcla binaria de 3 y 4 .	29

18. Espectro de masas de la mezcla binaria de 3 y 4 .	31
19. Patrón de fragmentación de 5 .	32
20. Desplazamientos químicos de los hidrógenos de 5 , provenientes del espectro de RMN ¹ H.	32
21. Espectro de RMN ¹ H del derivado aromático de la argentatina B (5).	33
22. Señales de RMN ¹³ C experimento DEPT de 5 .	34
23. Espectro de RMN ¹³ C de 5 .	34
24. Fragmentos importantes encontrados en el espectro de masas de 5 .	35
25. Espectro de masas del derivado aromático de la argentatina B (5).	35
26. Estereoestructura de la mezcla binaria de 16β-hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (3) y de 16β-hidroxi-cicloartan-3,24-diona (4), obtenida por medio de un estudio de difracción de rayos X.	55
27. Espectro de RMN ¹ H de la argentatina B (1).	66
28. Espectro de RMN ¹ H del acetato de argentatina B (2).	67
29. Espectro de RMN ¹ H de la mezcla binaria de 3 y 4 .	68
30. Espectro de RMN ¹ H de 5 .	69
31. Espectro de RMN ¹ H de bromo argentatina B (6).	70
32. Espectro de RMN ¹ H de 1-en-argentatina B (7).	71
33. Espectro de RMN ¹ H de acetato de 1-en-argentatina B (8).	72
34. Espectro de RMN ¹ H de 16β-hidroxi-cicloart-1-en-3,24-diona (9).	73

Índice de tablas

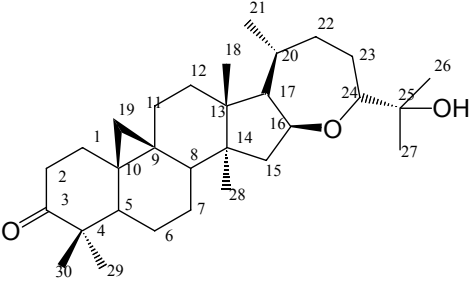
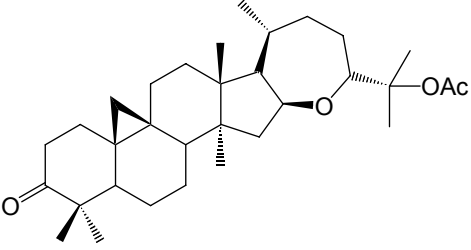
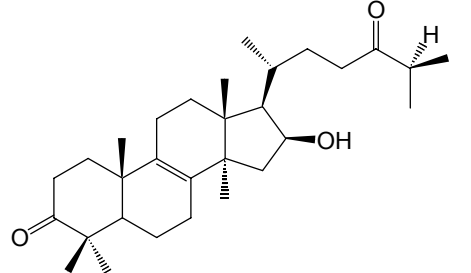
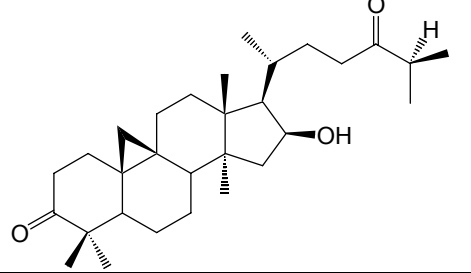
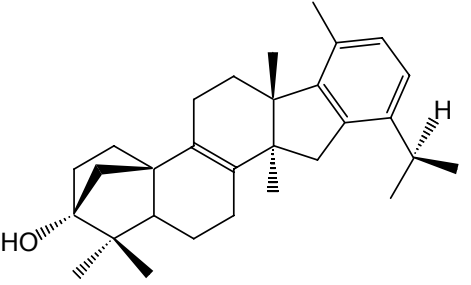
Tabla

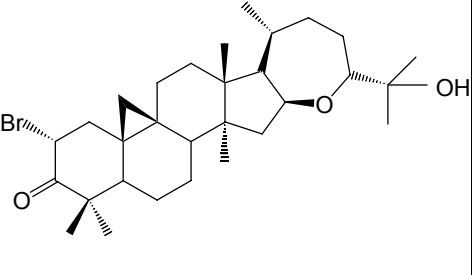
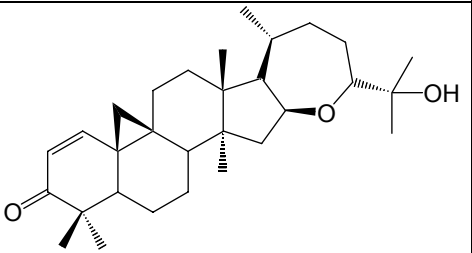
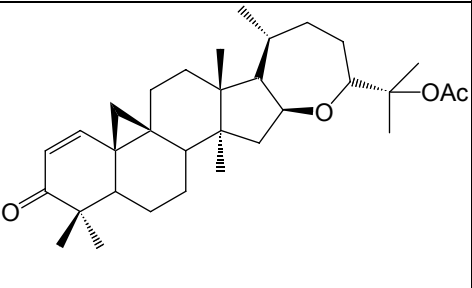
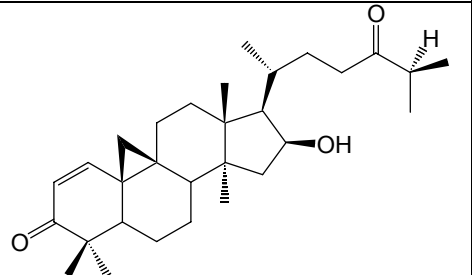
1. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen.	7
2. Suma de grupos funcionales de C para la fórmula parcial de 5	33
3. Citotoxicidad de los derivados 5 y 9 de la argentatina B.	42
4. IC ₅₀ de la mezcla de isómeros estructurales.	43
5. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la resina del <i>P. argentatum</i> .	49
6. Resultados de un estudio de rayos X de 3 y 4 .	54

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
c	cuarteto
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
d	doblete
dd	doble de doble
DMSO	Dimetilsulfoxido
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
m	multiplete
MeOH	Metanol
ppm	partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
s	singulete
sa	señal ancha
t	triplete

Cuadro de compuestos preparados

Nomenclatura semisistemática	Nombre trivial	Estructura	Pág.
16 β , 24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (1) .	Argentatina B		25
25-acetiloxi-16 β , 24R-epoxi-cicloartan-3-ona (2) .	Acetilado de argentatina B		25
16 β -hidroxi-lanost-8,9-en-3,24-diona (3) .	Derivado lanostano de argentatina B		26
16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (4) .	Derivado cicloartano de argentatina B		26
(5)	Derivado aromático de argentatina B		31

<p>2α-bromo-16β, $24R$-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (6).</p>	<p>2α-Br-argentatina B</p>		<p>38</p>
<p>16β,$24R$-epoxi-25-hidroxi-cicloart-1-en-3-ona (7).</p>	<p>1-en-argentatina B</p>		<p>38</p>
<p>25 acetiloxi-16β,$24R$-epoxi-25-hidroxi-cicloart-1-en-3-ona (8).</p>	<p>Acetato de 1-en-argentatina B</p>		<p>39</p>
<p>16β-hidroxi-cicloart-1-en-$3,24$-diona (9).</p>			<p>39</p>

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 CANCER.

Definición.

Aunque existen numerosos textos y referencias que intentan definir el cáncer, quizás la definición más simple es la enunciada por la Sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society). De acuerdo con esta Sociedad, el cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células anormales, así como su dispersión a través de todo el organismo.

Por consiguiente, se puede entender al cáncer como un proceso de crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos.

El cáncer, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única, sino que en realidad es un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen.

Aunque, existen varias formas de cáncer, los tres subtipos principales son: los sarcomas, los carcinomas y las leucemias

1.- Los sarcomas proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.

2.- Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de

la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.

3.- En el tercer subtipo, se encuentran las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Este tipo de enfermedades producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y existe una sobreproducción de células blancas inmaduras.

Por otro lado, de acuerdo con Sir Rupert Willis, una neoplasia, es una masa anormal de tejido que no está coordinado por los mecanismos reguladores normales y cuyo crecimiento excede al del tejido normal. Adicionalmente, varios tipos de neoplasias persisten, aunque haya finalizado el estímulo que suscitó su alteración (Cotran y cols., 1995). De manera formal, una neoplasia no constituye un cáncer hasta que presente metástasis. Las neoplasias malignas tienen la capacidad de sufrir metástasis y formar tumores secundarios.

Como ya se mencionó, una característica del cáncer es la alteración en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación de las células (Katzung 1986). Esta alteración es el resultado de anomalías genéticas que puede aparecer por la mutación de un grupo específico de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y su pérdida o inactivación da lugar a una división celular acelerada (Gibbs 2000).

1.2 EL CÁNCER COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

Actualmente, de acuerdo con los estudios estadísticos disponibles, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte de la humanidad. Se calcula que cada año más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer, de las cuales, 6 millones morirán. Esta cifra representa el 12% de las posibles defunciones totales a nivel mundial. Adicionalmente, se ha estimado que para el año 2020 el número de nuevos casos se incrementará a 15 millones (Klug y Cummings 1999).

En México, según los registros de la Secretaría de Salud, desde 1990, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte. De tal forma, que en el año 2002, el cáncer provocó 58,599 defunciones. Llama la atención, el hecho de que, para el grupo de mujeres entre 35 y 64 años de edad, el cáncer constituye ya la primera causa de muerte (INEGI, 2005). En la Figura 1, se muestra la distribución porcentual, por sexo, del tipo de tumor maligno.

Sin duda, el cáncer constituye un problema de salud pública a nivel mundial y ocupa un lugar de especial importancia en los programas de asistencia médica, prevención e investigación.

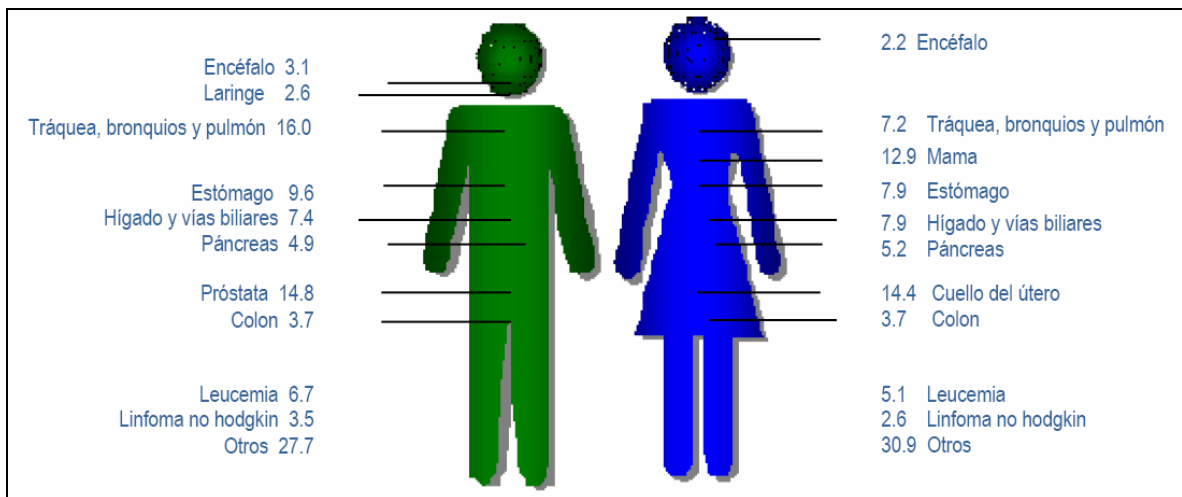


Fig. 1. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México durante el año 2002.

1.3 EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.

Es conocido, que por su etiología genética el cáncer se desarrolla de manera muy particular de paciente a paciente. Tomando en cuenta lo anterior, hoy en día, se tratan de establecer terapias individuales en las cuales se combinan los procedimientos quirúrgicos con regímenes de radioterapia y de quimioterapia.

Quimioterapia.

Existen algunos antecedentes históricos que dan cuenta del empleo de compuestos químicos para tratar este tipo de padecimientos. Por ejemplo, hace aproximadamente 500 años, se utilizaron algunas preparaciones de plata, zinc y mercurio o la llamada solución de Fowler (arsenito de potasio) que Lissauer, en 1865, la utilizó para tratar a un paciente con leucemia (Parra 2006). No obstante, la era moderna de la quimioterapia se inició en la década de los años 1940, con la introducción de las mostazas nitrogenadas, las cuales fueron sintetizadas como armas químicas.

Las autopsias realizadas a los soldados muertos por exposición al llamado gas mostaza indicaban que estas víctimas presentaban una hipoplasia linfoide generalizada así como mielosupresión.

Con el fin de evaluar el potencial terapéutico de esta serie de toxinas desarrolladas para la guerra química, en 1942, Louis Goodman y Alfred Gilman fueron reclutados por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos. Tomando en cuenta los datos obtenidos por las autopsias, Goodman y Gilman propusieron que en dosis bajas, de un agente similar podría causar una regresión de un tumor linfático. En mayo de 1942, después de evaluaciones exitosas en ratones, ambos farmacólogos convencieron a su colaborador, el cirujano Gustav Lindskog para que tratara a un paciente que sufría de un linfoma del tipo no-Hodgkin con la mecloroetamina, una mostaza nitrogenada. No obstante, que se produjo una remisión del tumor por algunas semanas, este continuó su crecimiento hasta la muerte del paciente. Sin embargo, por primera vez se estableció que la administración sistemática de algunos fármacos puede inducir la regresión de tumores cancerosos.

Una de las principales características de estos derivados nitrogenados es su habilidad alquilante, propiedad que permitió su desarrollo para el uso clínico. (Chabner B, 2005; Bertino, 1984).

No obstante de que los primeros resultados utilizando quimioterapia en contra del cáncer fueron limitados, era claro que esta aproximación mostraba un enorme potencial para obtener fármacos antineoplásicos. Este argumento, motivó la creación de un programa de desarrollo de fármacos anticancerosos, en especial en Estados Unidos de América y en 1955, se autorizó la creación del Centro de Servicio Nacional de la Quimioterapia de Cáncer en el Instituto

Nacional del Cáncer. Desde entonces se han aprobado más de 30 fármacos para el uso en el tratamiento de los pacientes con enfermedades malignas (Chabner, 2005). Algunos de estos fármacos, curan a la mayoría de los pacientes con coriocarcinoma, cáncer testicular, leucemia linfocítica aguda y diversos tipos de linfomas.

Adicionalmente, el tratamiento combinado de fármacos antineoplásicos, mejora la respuesta farmacológica en pacientes con cáncer de ovario o con leucemia mielocítica aguda, aunque, la tasa de curación alcanza solo del 10 al 20%. Desafortunadamente, otros tipos de cáncer son menos susceptibles al tratamiento quimioterapéutico.

Uno de los usos terapéuticos más frecuentes de los fármacos antineoplásicos es

su empleo como adyuvantes. Para ello, los fármacos se administran antes (neoadyuvante) o después del tratamiento definitivo (cirugía o radioterapia).

En la tabla 1, se nombran algunos de los agentes antineoplásicos más representativos.

Tabla 1. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen (Moore y Goldenberg en Kalant y Roshlau 1998).

<i>Agentes alquilantes y de unión a ADN</i>	<i>Antimetabolitos</i>
Mecloroetamina	Metotrexato
Melfalan	5-Fluorouracilo
Ciclofosfamida e Ifosfamida	Arabinósido de citosina
Clorambucil	Gemcitabina
Busulfan	6- mercaptopurina y 6-tioguanina
Nitrosoureas	2-clorodesoxiadenosina
Cisplatino y carboplatino	
Dacarbacida y Procarbacida	
Mitomicina C	
<i>Antibióticos</i>	<i>Compuestos de origen natural y/o sus derivados</i>
Actinomicina D	Vincristina, Vinblastina
Doxorrubicina, daunorrubicina	Vinorelbina, Etopósido, Tenipósido
Epirrubicina, Bleomicina	Paclitaxel, Docetaxel
	Derivados de la camptotecina
<i>Diversos</i>	<i>Hormonas</i>
L- Asparaginasa	Glucocorticoides
Hidroxiureas	Tamoxifeno
	Agentes progestacionales
	Agentes antiandrógenos

1.4 PRINCIPIOS ANTINEOPLÁSICOS AISLADOS DE ESPECIES

VEGETALES

Se ha reconocido que las llamadas plantas medicinales constituyen el principal recurso terapéutico y en varias ocasiones el único, de las sociedades en los países pobres o en desarrollo. Este fenómeno es debido a la fácil accesibilidad, el bajo costo y los antecedentes etnofarmacológicos de las especies vegetales utilizadas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80 % de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud.

Se calcula que los metabolitos secundarios de origen vegetal representan alrededor del 50 % de los fármacos de uso clínico en países desarrollados y de estos el 25 % derivan de plantas superiores (Laza, 2003).

A lo largo del tiempo, se han utilizado varias estrategias para el aislamiento de compuestos antineoplásicos de origen vegetal, como son el tamizaje y la evaluación de estructuras novedosas. Sin embargo, la más utilizada es aquella que toma en cuenta los antecedentes etnomédicos o etnofarmacológicos de las especies de interés.

En 1982, se publicaron aproximadamente 3000 especies de plantas que etnomédicamente se habían referido como anticancerosas (Hartwell 1982).

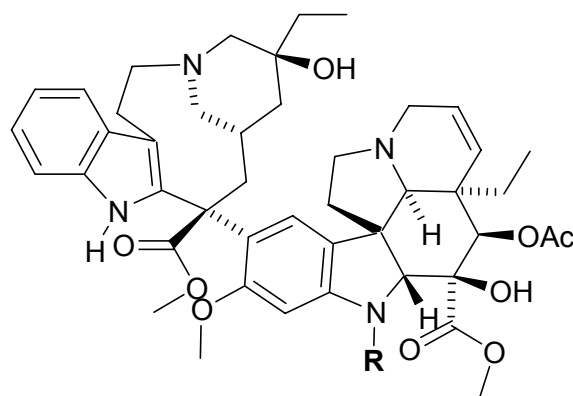
Sin embargo, debido a que algunos síntomas del cáncer se pueden confundir con procesos inflamatorios simples, es difícil separar las posibles especies anticancerosas con aquellas que presentan propiedades antiinflamatorias.

Uno de los ejemplos más acabados de especies con antecedentes etnobotánicos lo constituye el *Catharantus roseus*, especie anteriormente clasificada como *Vinca rosea*, por lo que hoy en día se le conoce simplemente como vinca. (Figura 2). Esta especie había sido referida como hipoglicémica; sin embargo, cuando se estudiaron sus efectos farmacológicos se encontró que provocaba granulocitopenia y depresión de la médula ósea de la rata. Investigaciones posteriores realizadas por Johnson y colaboradores, demostraron que algunas fracciones de alcaloides de esta planta tenían actividad contra neoplasia linfocítica murina. El estudio químico permitió el aislamiento de cuatro alcaloides diméricos activos: vinblastina, vincristina,

vinleurosina y vinrosina (Figura 3). Los dos primeros, se convirtieron en agentes clínicamente importantes para el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer testicular (Calabresi, 1996; Cragg, 2005).



Fig. 2. *Catharanthus roseus* L.



Vinblastina, R= CH₃
Vincristina, R=CHO

Fig. 3. Metabolitos aislados de
Catharanthus roseus L.

Otro ejemplo lo constituye la famosísima mandrágora, *Podophyllum peltatum*, con amplios antecedentes mágicos en la Europa medieval. Sin embargo, es una especie que se empleó como remedio popular por sus efectos eméticos, catárticos y antihelmínticos por los indígenas de América y los primeros colonizadores de este continente (Figura 4). A partir de esta planta, se aisló la podofilotoxina, de la cual, se obtuvieron dos glucósidos semisintéticos, el etopósido y el tenipósido (Figura 5), los cuales tienen aplicación en el cáncer testicular y en el carcinoma de células pequeñas del pulmón.



Fig. 4. *Podophyllum peltatum*

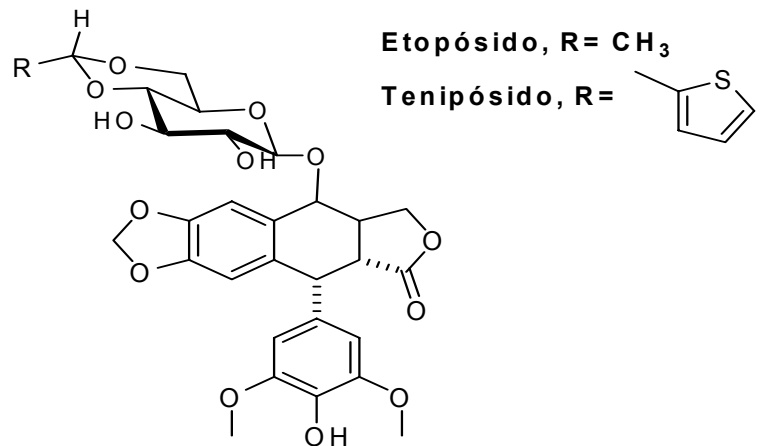


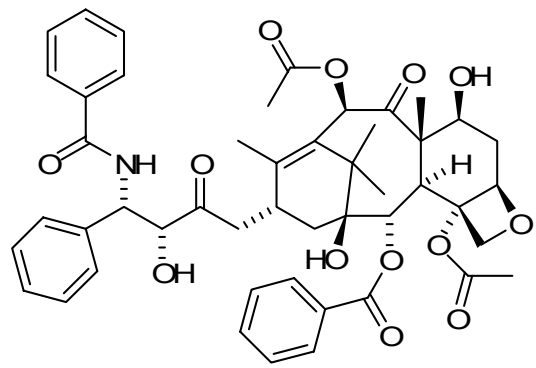
Fig. 5. Metabolitos aislados de *Podophyllum peltatum*

En la década de los años 60 se realizó una evaluación masiva de las propiedades citotóxicas de cientos de extractos de especies vegetales por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (EUA). Como un resultado de esta búsqueda, se descubrieron las propiedades citotóxicas del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) (Figura 6). Estudios posteriores permitieron el aislamiento y elucidación estructural del taxol, un diterpeno responsable de las propiedades citotóxicas de la especie.

(Mann 2002; Chabner y Roberts 2005; Cragg y Newman 2005).

El taxol hoy comercializado con el nombre de paclitaxel (Figura 7) es sin duda, el compuesto anticanceroso más vendido en el mundo. En el 2000, las ganancias por la venta de este compuesto superaban a los 1500 millones de dólares anuales (Mann 2002).





Paclitaxel

Fig. 6. *Taxus brevifolia*

Fig. 7. Metabolito aislado de *Taxus brevifolia*.

Otros compuestos con importancia clínica son la camptotecina y sus derivados, el irinotecano y el topotecano. Así también la homoharringtonina, la elipticina y su derivado, el eliptinium (Figura 8). Este último empleado en Francia para el tratamiento del cáncer de mama (Cragg y Newman 2005).

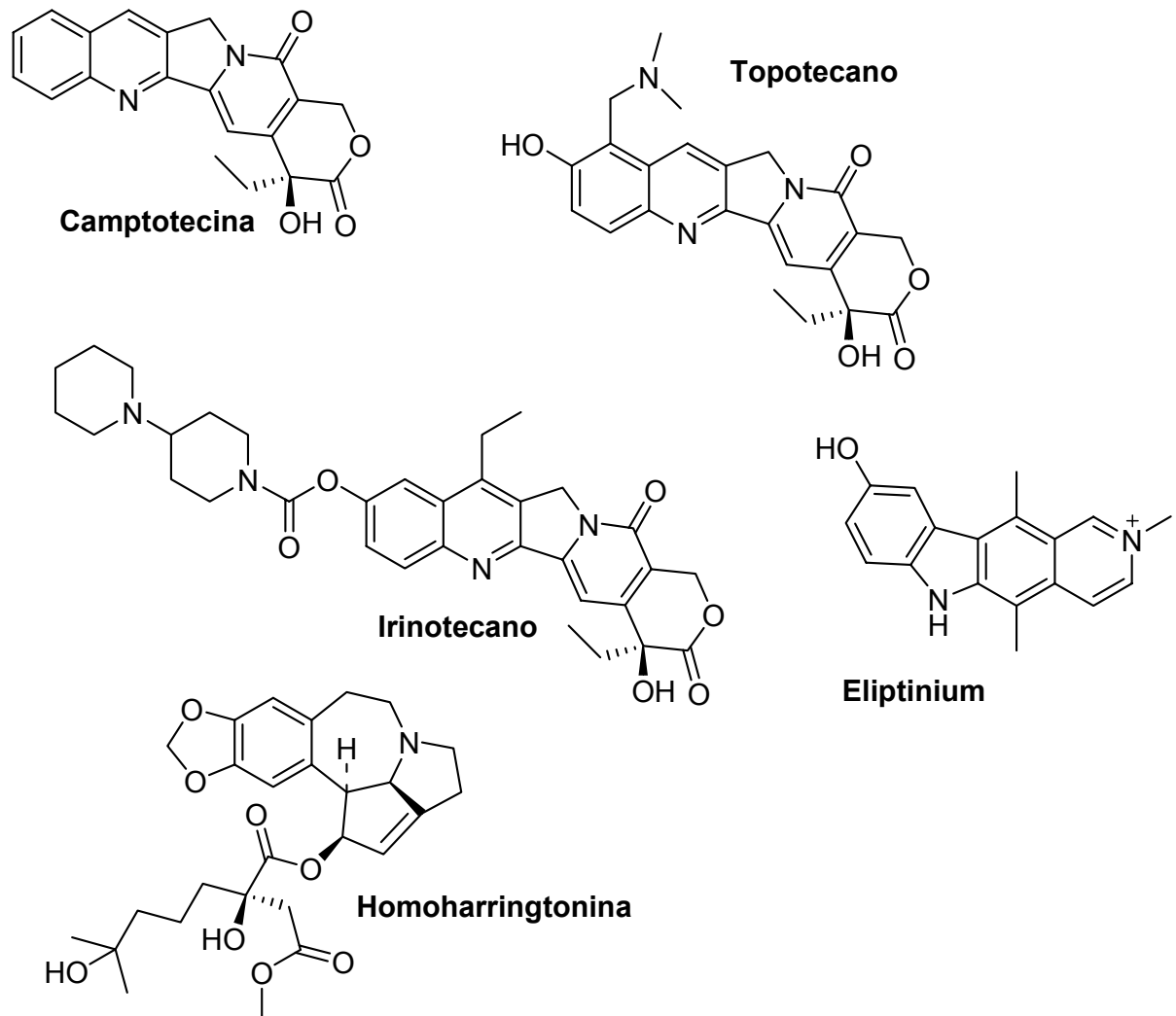


Fig. 8. Compuestos de origen natural y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer.

No obstante que los compuestos antes mencionados ocupan un lugar preponderante en la clínica, existe una gran diversidad de metabolitos secundarios, con probada actividad contra líneas celulares de cáncer humano. Así es posible encontrar en cada tipo de metabolito secundario algún representante con propiedades citotóxicas. Entre éstos podemos mencionar las cumarinas (Phuwapraisirisan 2006), los flavonoides (González de Mejía 2006), los sesquiterpenos (Lastra 2004), los diterpenos (Zhang 2006) y los triterpenos

(Oviedo, 2005; Parra, 2006). Como era de suponer, los mecanismos de acción involucrados en la actividad citotóxica de estos grupos de compuestos son muy variados (Gordon and col. 2005).

Por lo anterior es fácil entender que, las plantas y microorganismos son una fuente invaluable de sustancias activas. Por ejemplo en 2000, se estimó que aproximadamente el 53% de los fármacos en estudios clínicos correspondía a metabolitos secundarios y sus derivados o a compuestos obtenidos a partir de un farmacóforo de un producto natural (Newman y cols., 2003).

1.5 LOS TRITERPENOS COMO POTENCIALES AGENTES ANTICANCEROSOS

Existe una inmensa información publicada que da cuenta de las propiedades citotóxicas y anticancerosas de algunos triterpenos. La mayoría de los compuestos que se han evaluado actúan a nivel de la replicación del DNA, generalmente inhibiendo enzimas como la DNA polimerasa y/o las topoisomerasas. Debido a esto, los triterpenoides se perfilan como potenciales agentes antineoplásicos.

Los triterpenos son metabolitos secundarios cuya estructura fundamental posee 30 átomos de carbono y que son sintetizados partir de la ciclación del escualeno. La diversidad estructural de los triterpenos se puede explicar por las diferentes conformaciones que puede adoptar el escualeno al momento de ciclarse (figura 9).

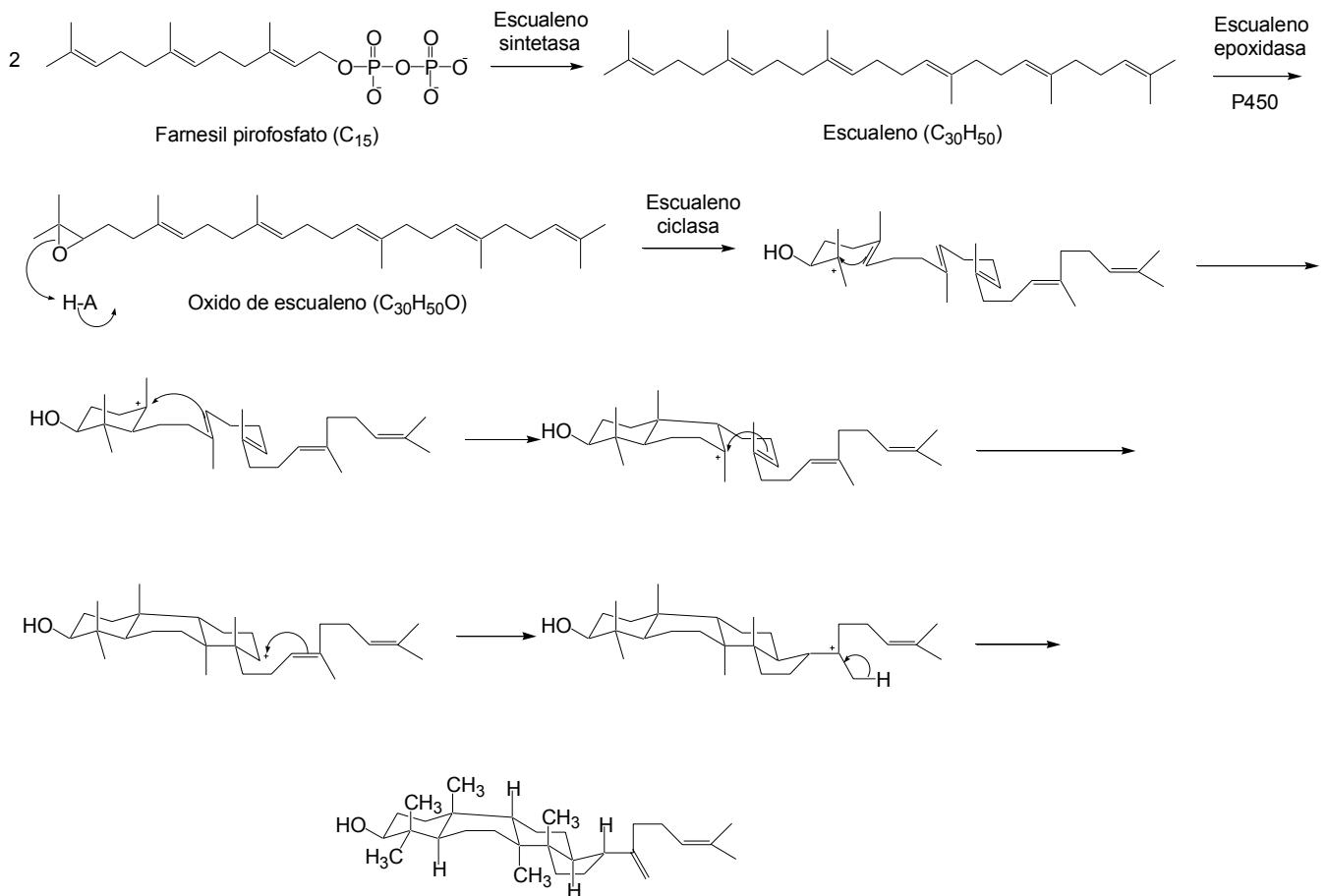


Fig. 9. Biosíntesis y ciclacion del escualeno

Si bien los triterpenoides han sido ampliamente empleados con propósitos medicinales en muchos países asiáticos, esta clase de moléculas no han tenido un impacto en las prácticas medicinales occidentales.

En la literatura se encuentran descritos una gran variedad de triterpenoides que muestran actividad anti-proliferativa (citostática) y citotóxica. Los triterpenos más estudiados corresponden a los tipos, ursano y oleanano, mientras que uno de los grupos menos estudiados corresponde al de los cicloartanos. Las excelentes actividades citotóxicas, en líneas de cáncer humano, de algunos triterpenos, hacen de este tipo de compuestos candidatos promisorios en la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos.

1.6 *Parthenium argentatum*

El *Parthenium argentatum* es un arbusto que crece en las zonas áridas del norte del país y sur de los Estados Unidos, el cual tiene como nombre vulgar el de guayule, vocablo que literalmente significa “árbol de hule” (Campos 1981), este fue descubierto por J. M. Bigelow en 1852, y sus características botánicas fueron descritas por Asa Gray de la Universidad de Harvard en 1859 (Angulo 1984).

El hule, en el guayule, está almacenado como una suspensión coloidal de látex confinado en células individuales y está presente prácticamente en todos los órganos de la planta, tallos, raíces y hojas (Angulo 1984). Se ha encontrado que esta especie es la única de este género que contiene cantidades suficientes de hule para ser de importancia económica (Campos 1981). De todas las fuentes de hule natural sólo el de *Hevea brasiliensis* y el de *P. argentatum* han sido puestos en circulación en el mercado mundial.

El interés de producir hule a partir del guayule se remonta al año 1852, año en que fue descubierto, continuando hasta el final de la II Guerra Mundial, cuando con el surgimiento de hules sintéticos disminuye el interés por las fuentes renovables de hule natural. El aprovechamiento del guayule de manera industrial se llevó a cabo en México de 1903 a 1951 exportando a los Estados Unidos 125,000 toneladas de hule (Campos 1981).

La extracción se realizaba por el método de flotación que era el económicamente mas atractivo (Schloman 1988), éste consistía en colocar el material vegetal seco y molido en un estanque. Posteriormente se adicionaba una solución diluida de hidróxido de sodio, con lo que se facilitaba la extracción del látex. De esta forma el hule, en mezcla con un residuo vegetal, flotaba en la solución alcalina. El hule se purificaba mediante lavados con acetona. Finalmente, la recuperación de acetona mediante destilación, dejaba un residuo al cual se le llamó “la resina”.

1.7 METABOLITOS DEL GUAYULE

La investigación química orientada a aislar e identificar metabolitos secundarios distintos al hule se inició en 1911, año en el que se publicó el aislamiento del parteniol (un alcohol sesquiterpenico) a partir de un extracto acetónico del guayule (Alexander 1911), mas tarde Walter en 1944 describió las propiedades del parteniol, posteriormente Haagen-Smit en 1948 propuso una estructura para el parteniol, siendo posteriormente corregida en 1986 por Martínez.

Por otra parte Haagen-Smit en 1944 informó las propiedades físico-químicas, la composición y la distribución de los aceites esenciales encontrados en el guayule (α -pineno, limoneno felandral, entre otros).



Fig. 10. Estructura del parteniol propuesta por Hageen-Smit en 1948 (**1**) y estructura correcta (**2**) del parteniol determinada por Martínez en 1986.

Además de aceites esenciales, se han aislado por métodos cromatográficos del extracto etanólico de esta especie, flavonoides metoxilados derivados de la quercetagina (Campos 1981).

Adicionalmente, en 1970, Romo de Vivar y colaboradores, aislaron dos sesquiterpenos llamados guayulinas A y B, a partir del extracto etanólico, así como dos triterpenos del tipo cicloartano las argentatinas A y C. Posteriormente Martínez y Rodríguez-Hann en 1986, aislaron e identificaron las guayulinas C y D. Ese mismo año Romo de Vivar y colaboradores, lograron aislar la isoargentatina B, a partir de un extracto acetónico de la resina y en 1990, este mismo grupo de investigadores, aisla la argentatina D, a partir de un extracto hexánico de las raíces de *P. argentatum*.

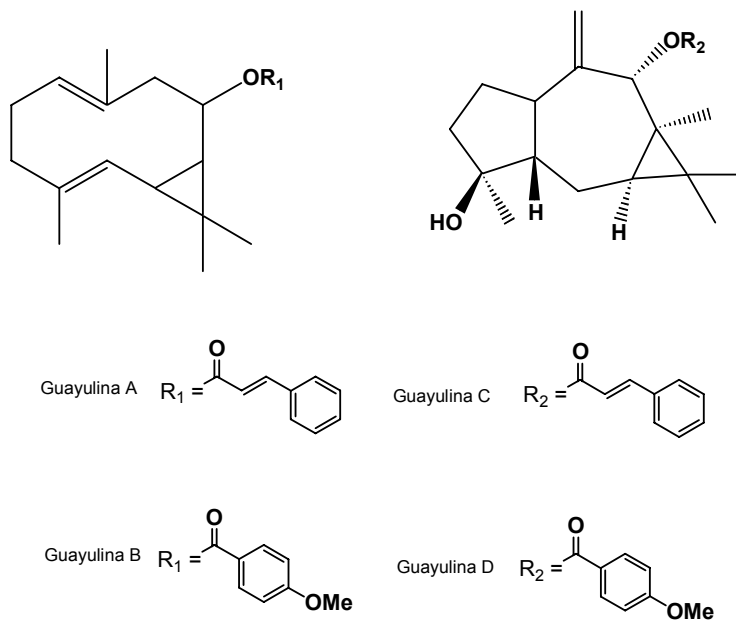


Fig. 11. Estructuras de las guayulinas

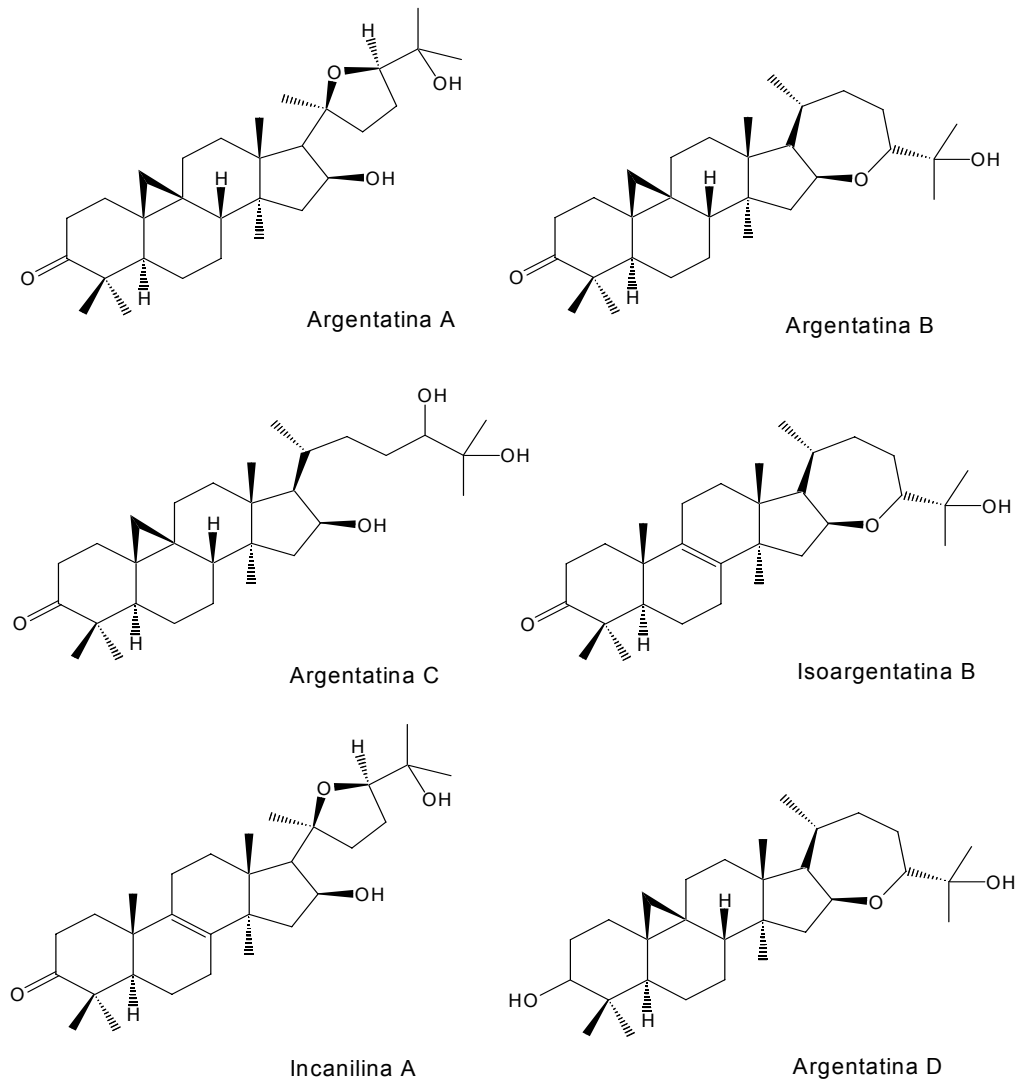


Fig. 12. Estructura de los triterpenos del guayule

1.8 LA RESINA

Como una fuente natural de hule, el guayule ha sido intensamente estudiado y es conocido que por cada kilogramo de hule obtenido se obtiene al menos un kilogramo de resina. Desde un inicio, se pensó que para hacer más atractiva la explotación del guayule, era necesario buscar un beneficio económico adicional en la resina, por lo tanto, el conocer la constitución química de este residuo se convirtió en un asunto de interés y las primeras investigaciones hechas a la resina fueron con fines industriales usándola en la fabricación de adhesivos y barnices. Tomando en cuenta que las argentatinas comprenden 27% de la resina, (Komoroski 1986) se puede disponer de cantidades considerables de estos metabolitos. Aunado a su gran parecido estructural con compuestos esteroides, son una fuente potencial de intermediarios susceptibles a sufrir transformaciones químicas, esto con el propósito de obtener compuestos con posibles propiedades biológicas (Martínez, 1990).

1.9 ESTUDIOS PREVIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En cuanto a la actividad biológica se ha observado que las argentatinas A y B así como el extracto metanólico del guayule presentaron actividad insecticida significativa en gusanos de *Spodoptera frugiperda* (Céspedes 2001). Por otra parte, la argentatina A, también presentó actividad antibacteriana *in vitro* contra varias bacterias patógenas como *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Martínez, 1994).

Se ha informado que las argentatinas A, B y D inhiben el crecimiento de tumores hormono-dependientes, antagonizando la acción del estradiol por medio de una inhibición no competitiva de su receptor (Calzada 1995).

Adicionalmente, nuestro grupo ha demostrado que las argentatinas A y B poseen actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer humano (K562, MCF-7, PC-3, HCT-15 y U251) obteniéndose valores de IC₅₀ en un rango de 25 a 33 μ M, además de presentar efectos citoestáticos. Sin embargo, no obstante sus propiedades citotóxicas y citoestáticas, estos compuestos no mostraron actividad genotóxica sobre la proliferación de linfocitos, lo cual abre un campo muy prometedor sobre sustancias antineoplásicas sin efecto sobre el DNA (Parra, 2005).

Así mismo estudios cuantitativos de estructura-actividad de la argentatina B han permitido sintetizar un derivado de este triterpeno, con potente actividad citotóxica, similar a la doxorrubicina. (Parra, 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se propuso la evaluación citotóxica, en cinco líneas celulares de cáncer humano, de derivados obtenidos, mediante la posible apertura del éter entre C-16 y C-24 de la argentatina B con BF₃-OEt₂.

2. HIPÓTESIS

-Debido a que se conocen las propiedades citotóxicas de las argentatinas y de algunos derivados de éstas, es factible suponer, que por medio de ciertas transformaciones químicas específicas se obtengan moléculas que inhiban el crecimiento de células de cáncer.

3. Objetivo general

- Evaluar la actividad citotóxica de derivados obtenidos a partir de la reacción de la argentatina B con $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$

3.1 Objetivos particulares

- Aislar e identificar la argentatina B a partir de la resina obtenida como subproducto en el proceso de obtención natural del hule a partir de la especie *Parthenium argentatum* (Gray).
- Obtener derivados a partir de la reacción de la argentatina B con $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$.
- Caracterizar los derivados sintetizados mediante métodos espectroscópicos (RMN, IR) y espectrométricos (Espectrometría de masas).

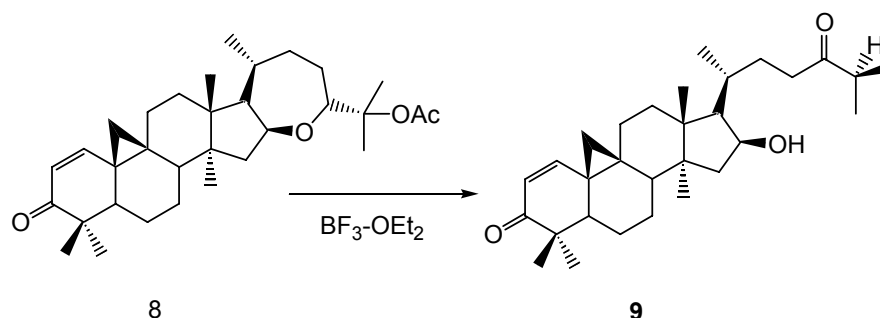
Determinar la actividad citotóxica de estos derivados en la proliferación de células de cáncer humano

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestro grupo ha realizado un esfuerzo continuo para obtener sustancias biológicamente activas a partir de las argentatinas A y B. Así, hemos obtenido sustancias con actividades citostáticas y citotóxicas pero con baja actividad genotóxica (Parra, 2006).

Con la finalidad de obtener nuevos derivados a partir de estos triterpenos y sabiendo que la 25-acetil-16 β ,24-epoxi-cicloart-1,2-en-3-ona (**8**), un derivado de la argentatina B, en presencia del etereato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3\text{-OEt}_2$) produce la 16 β -hidroxi-cicloart-1,2-en-3,24-diona (**9**) (Carmona 2004), se propusieron en este trabajo, las transformaciones de la 16 β , 24-epoxi-cicloartan-3-ona (**1**) (argentatina B) y la 25-acetil-16 β , 24-epoxi-cicloartan-3-ona (**2**) (acetato de argentatina B) con $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$. Así mismo, con la finalidad de evaluar sus propiedades citotóxicas se propuso de nuevo la obtención de la 16 β -hidroxi-cicloart-1,2-en-3,24-diona (**9**).



Esquema 1. Obtención de 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloart-1-en-3-ona (**9**).

4.1 Extracción y aislamiento de la 16 β , 24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (**1**) (argentatina B).

La resina utilizada como materia prima para la obtención de las argentatinas **1** fue donada por la compañía CONAZA. Esta resina se obtiene como subproducto del proceso industrial para obtener hule natural a partir del guayule. La cromatografía de la resina en una columna empacada con “Tonsil” (tonsil es el nombre comercial de una arcilla bentonítica con la siguiente composición: SiO₂ (72.5%), Al₂O₃ (13%), Fe₂O₃ (5%), MgO (1.5%), CaO (7.2%), y H₂O (8.5%), con un pH 3) permitió el aislamiento de la argentatina B. La identificación de este compuesto se logró por medio de la comparación de sus datos químicos y espectroscópicos con muestras auténticas (Parra, 2005). La presencia del anillo de tres miembros formado por los carbonos C-9, C-10 y C-19 con una orientación β ubica a **1** como un triterpeno de tipo cicloartano. Como se observa en la figura 12.

4.2 Obtención de 25-acetiloxi-16β,24R-cicloartan-3-ona (**2**) (acetato de argentatina B)

El tratamiento convencional de argentatina B con anhídrido acético y acetato de sodio permitió la formación del acetato de argentatina B en el C-25, con un rendimiento del 70%.

El espectro de RMN ¹H del producto de esta reacción mostró un singulete a 1.96 ppm que integra para tres protones asignado al grupo metilo del acetato así como las esperadas señales características de la argentatina B.

4.3 Reacción de 25-acetiloxi-16β,24R-cicloartan-3-ona (**2**) (acetato de argentatina B) con BF₃-OEt₂

La reacción de **2** con el eterato de trifluoruro de boro (BF₃-OEt₂) produjo una mezcla de productos, la cual fue separada por medio de una columna de cromatografía empacada con gel de sílice y eluída con mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente.

4.3.1 Obtención de 16β-hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (**3**) y de la 16β-hidroxi- cicloartan 3,24-diona (**4**).

De las fracciones 17-18, eluídas con una mezcla 8:2 Hex-AcOEt se aisló un producto cristalino con p.f. de 122-124°C. El espectro de IR mostró bandas a 3482 y 1701 cm^{-1} asignados a grupos hidroxilo y carbonilo, respectivamente. Por otro lado, el espectro de masas, obtenido por impacto electrónico, mostró un ión molecular a 456 M^+ para una fórmula mínima de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. No obstante que en la cromatografía en placa fina en distintas mezclas de elución siempre se observó una sola mancha, en un análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) demostró que el producto cristalino aislado era en realidad una mezcla binaria.

Pese a todo, el espectro de RMN de ^1H de la mezcla, no resultó tan complicado como era de suponerse, lo que indicó que los dos productos eran estructuralmente muy similares. Así se observó un multiplete centrado a 4.56 ppm, que integra para dos protones asignado a dos protones enlazados a un carbono unido a un átomo de oxígeno. Siendo ésta una diferencia notable con respecto al espectro de RMN de ^1H de **2**, donde se observan las señales doble de doble a 4.63 y 3.82 ppm asignadas a los protones de las posiciones 16 α y 24R respectivamente. La comparación de estos dos espectros señalaba que los productos de reacción solamente habían conservado el protón 16 α y que necesariamente en esta posición se ubicaba el grupo hidroxilo señalado por el espectro de IR. Hipótesis apoyada por la correlación, detectada por un experimento de correlación heteronuclear (HETCOR), entre la señal múltiple, que integra para dos protones a 4.56 ppm y las señales a 72.38 y 72.17 ppm en el espectro de RMN ^{13}C , así como la pérdida, señalada en el espectro de masas a 438 m/z, de una molécula de agua a partir del ión molecular (M^+ 456-18).

De acuerdo con lo anterior, se pudo deducir que ambos compuestos poseían un grupo hidroxilo en la posición 16 β . Otro residuo estructural que tuvieron ambos compuestos fue un grupo isopropilo. La presencia de este grupo fue evidenciado por la interacción de la señal múltiple a 2.63 ppm con las señales dobles de grupos metilos a 1.06 ppm en un experimento de correlación homonuclear (COSY), así como las interacciones de la señal a 2.63 ppm con la

señal de un metino a 40.91 ppm y la señal a 1.06 ppm con aquellas de grupos metilo a 22.61 ppm en un experimento HETCOR.

Los picos a 43 y 71 m/z en el espectro de masas indicaban que el grupo isopropilo estaba unido a un grupo carbonilo.

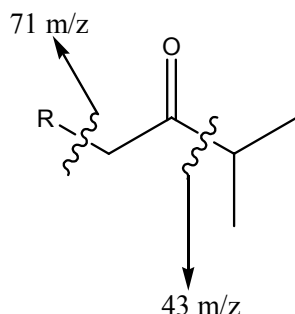


Fig. 13. Residuos encontrados en el espectro de masas de la mezcla binaria de **3** y **4**.

Tomando en cuenta lo anterior, se dedujo que el trifluoruro de boro abrió el éter entre las posiciones 16 β y 24R del acetato de la argentatina B (**2**), dejando un grupo alcohol en 16 β y formando una cadena de ocho átomos de carbono la cual en su posición terminal tendría un grupo isopropilo. Hipótesis apoyada por un pico a 127 m/z en el espectro de masas.

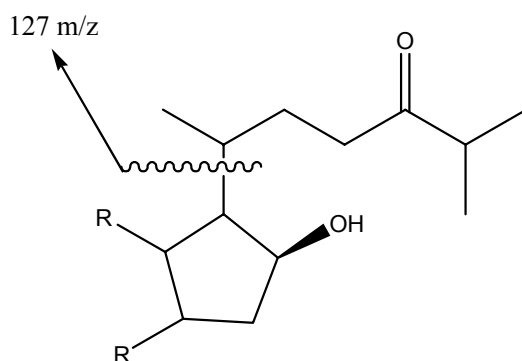
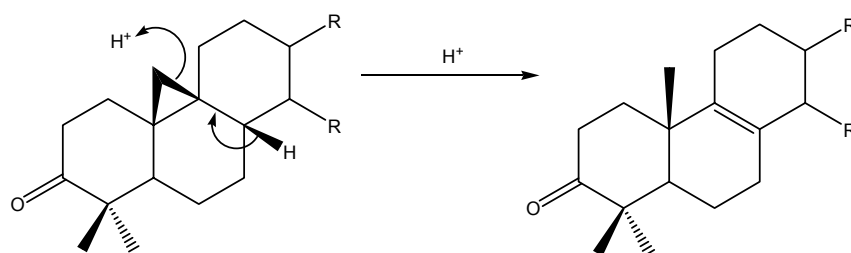


Fig. 14. Residuo obtenido de la fragmentación de la mezcla binaria de **3** y **4**.

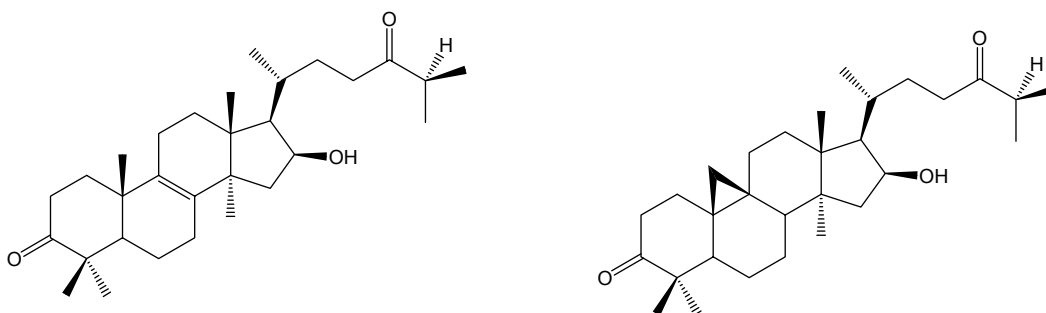
También, en el espectro de RMN de ^1H de esta mezcla, se observaron los dobletes característicos de los protones del ciclopropano en C-19 a 0.56 y 0.82 ppm. Sin embargo, la integración de estas señales indicaba que sólo uno de los productos tenía esta funcionalidad. Un análisis cuidadoso del espectro de RMN ^{13}C permitió la asignación del C-19 a 29.82 ppm, la cual correlacionó en un experimento HETCOR con los protones del ciclopropano en la posición 19.

Adicionalmente, también se observaron señales a 135.03 y 133.34 ppm de átomos de carbono sp^2 cuaternarios. La presencia de estos átomos indicó la isomerización, en uno de los productos, del ciclopropano en C-19 a una doble ligadura tetrasustituida entre C-8 y C-9, así como la formación de un grupo metilo en C-10. (Figura 16).



Esquema 2. Posible mecanismo de formación del isómero de tipo lanostano.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se propone que la mezcla cristalina aislada como producto de la reacción del acetato de argentatina B (**2**) con $BF_3 \cdot OEt_2$, está formada por la 16 β -hidroxi-lanostan-3,24-diona (**3**) y 16 β -hidroxi-ciclolartan-3,24-diona (**4**).



16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (**3**)

16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**4**)

Fig. 15. Mezcla binaria de isómeros estructurales.

La propuesta fue confirmada por un análisis de difracción de rayos X de la mezcla cristalina, en donde se observa la presencia de ambos isómeros en un 70 % para **3** y 30 % para **4**.

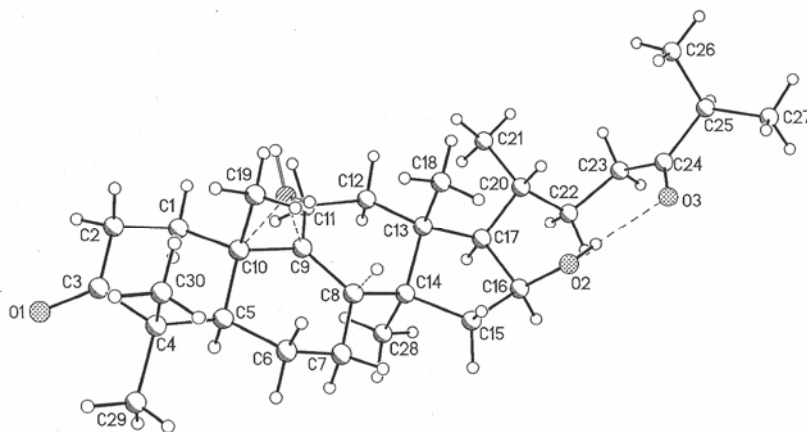


Fig. 16. Estereoestructura de la mezcla binaria de 16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (**3**) y de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**4**), obtenida por medio de un estudio de difracción de rayos X.

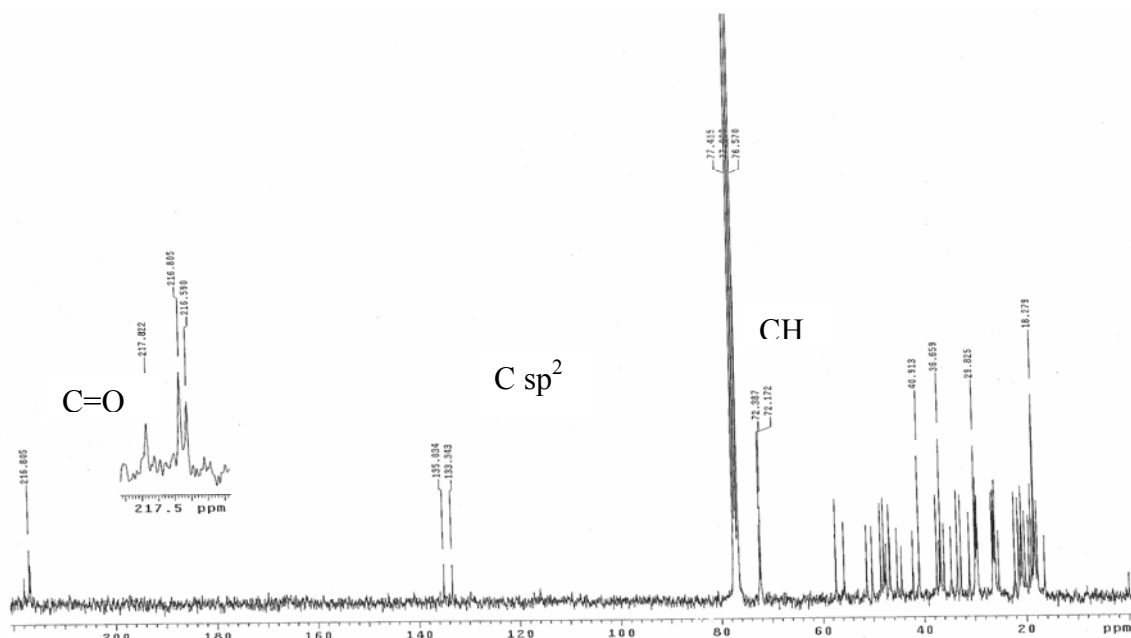
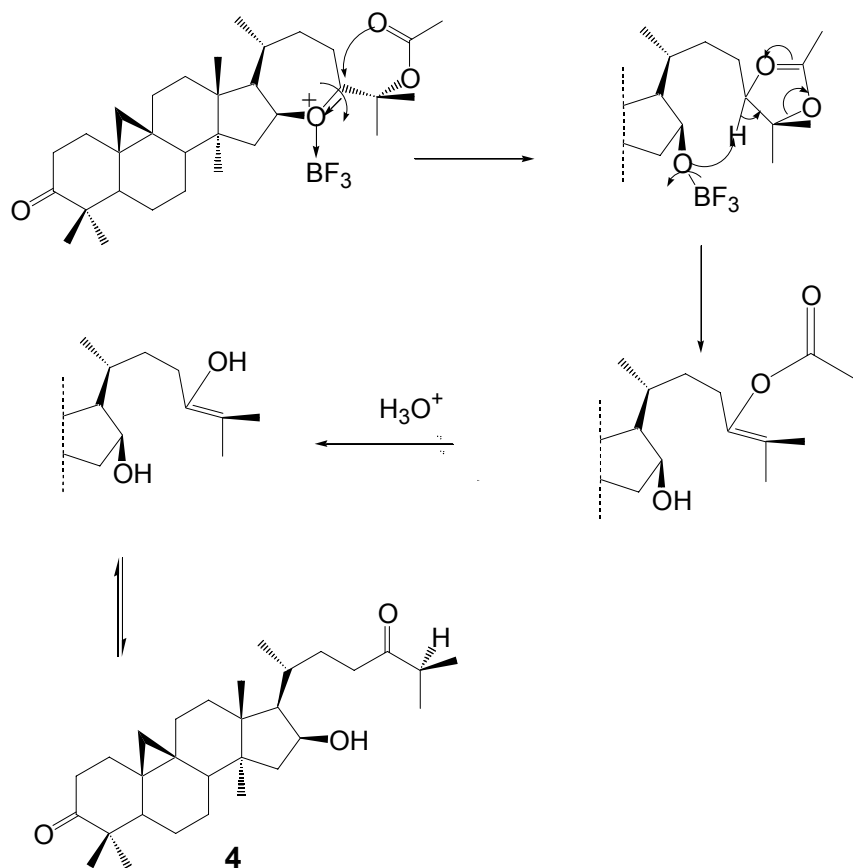


Fig. 17. Espectro de RMN ^{13}C de la mezcla binaria de **3** y **4**. En éste se observan los grupos CH a 72 ppm de carbonos unidos a un átomo de oxígeno, así como dos átomos de C cuaternarios sp^2 alrededor de 134 ppm asignados a C8 y C9.

En el espectro de RMN ^{13}C se observaron a 215 ppm señales de carbonos de grupos carbonilo, así como a 133-135 ppm señales de C sp^2 .



Esquema 3. Posible mecanismo de reacción del acetato de argentatina B (**2**) y $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$, para la obtención de **4**.

Un posible mecanismo para explicar la formación de **3** y **4** es postular inicialmente el ataque del BF_3 sobre el átomo de oxígeno que esta formando el éter entre la posición 16β y la $24R$. La apertura de este éter conduciría a la participación del grupo acetoxilo y así distribuir la carga positiva generada. La transposición del grupo acetato de la posición 25 a la 24 generaría un acetato de enol, el cual al hidrolizarse propiciaría la formación del grupo carbonilo en C-24 vía un enol.

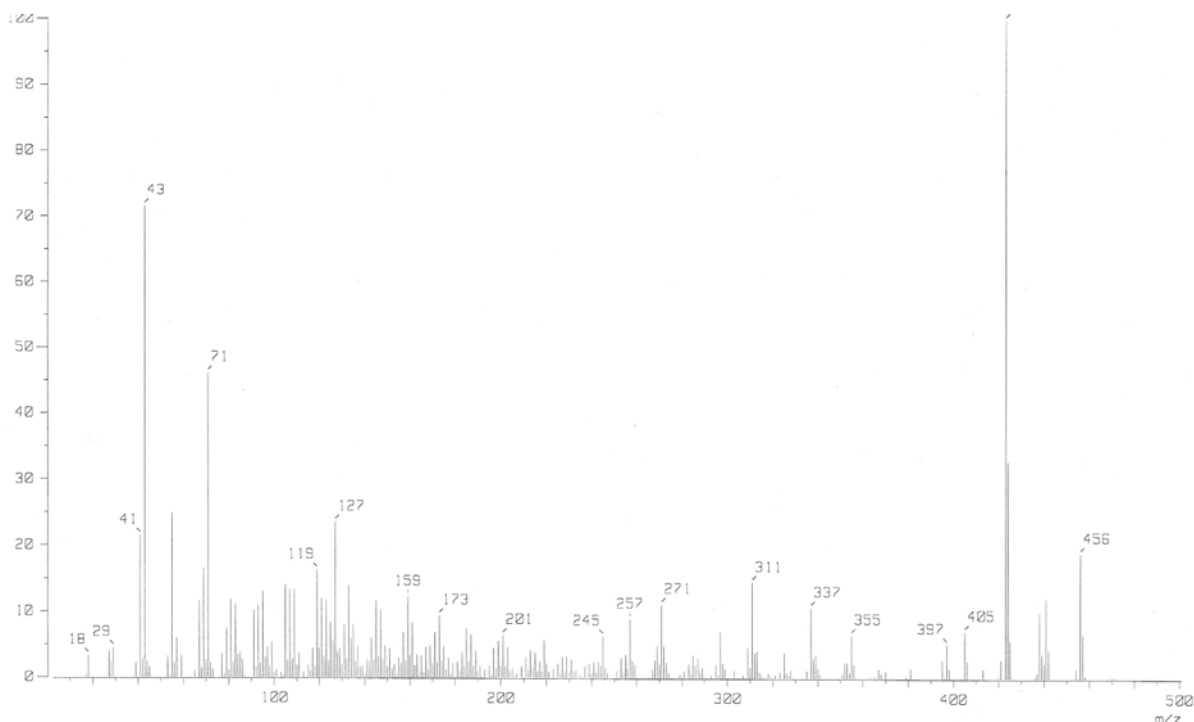


Fig. 18. Espectro de masas de la mezcla binaria de **3** y **4**, donde se observa el ión molecular de 456 M^+ , así como los residuos importantes a 43 m/z asignada al isopropilo, y a 438 m/z asignada a la pérdida de una molécula de agua a partir del ión molecular.

4.3.2 Obtención de **5**

Adicionalmente a la obtención de la mezcla de **3** y **4**, también de las fracciones 81-93 eluidas con una mezcla 7:3 Hex:AcOEt, de la columna de cromatografía, se logró separar un compuesto sólido. El espectro de masas de este compuesto mostró un ión molecular a 418 M^+ para una fórmula mínima $C_{30}H_{42}O$ (Figura 25).

En el espectro de RMN de 1H de este producto, no se observó a 2 ppm la señal característica del grupo metilo del acetato de la molécula original **2**, indicando la pérdida de este residuo. Sin embargo, se observaron señales a 1.21 y a 1.15 ppm, las cuales mostraron una correlación en un experimento COSY, con una señal heptuplete, a 2.8 ppm que integra para un protón de un grupo metino,

indicando la posible presencia de un grupo isopropilo en esta estructura (Figura 21).

Adicionalmente, las señales a 1.21 y a 1.15 ppm de los grupos CH₃ mostraron correlación en un experimento HETCOR con las señales de los metilos a 23.3 y 23.2 ppm respectivamente.

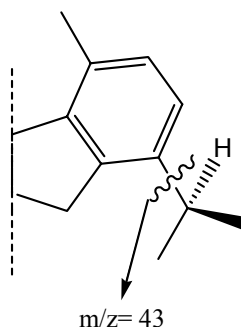


Fig. 19. Patrón de fragmentación de **5**.

Adicionalmente, al heptuplete a 2.8 ppm, en el espectro de RMN ¹H se observa que dicha señal se encuentra traslapada con un sistema AB que fueron asignados a los protones del átomo C19. Así mismo, se observa una señal singulete a 2.36 ppm que integra para tres protones asignado a un grupo metilo unido a un grupo aromático.

En este espectro también se pueden observar las señales a 6.91 y 6.95 de 2 protones aromáticos (Figura 21).

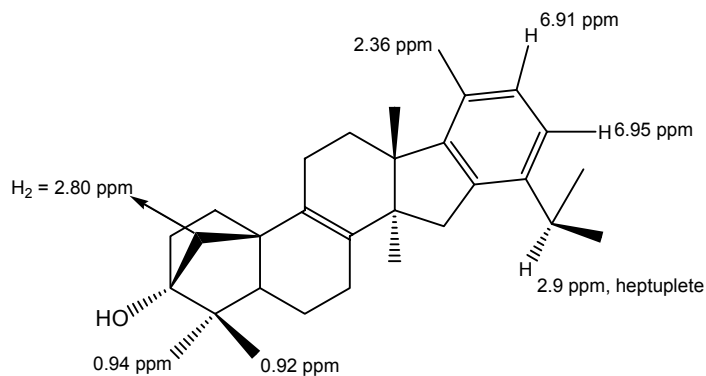


Fig. 20. Desplazamientos químicos asignados en el espectro de RMN ¹H de **5**.

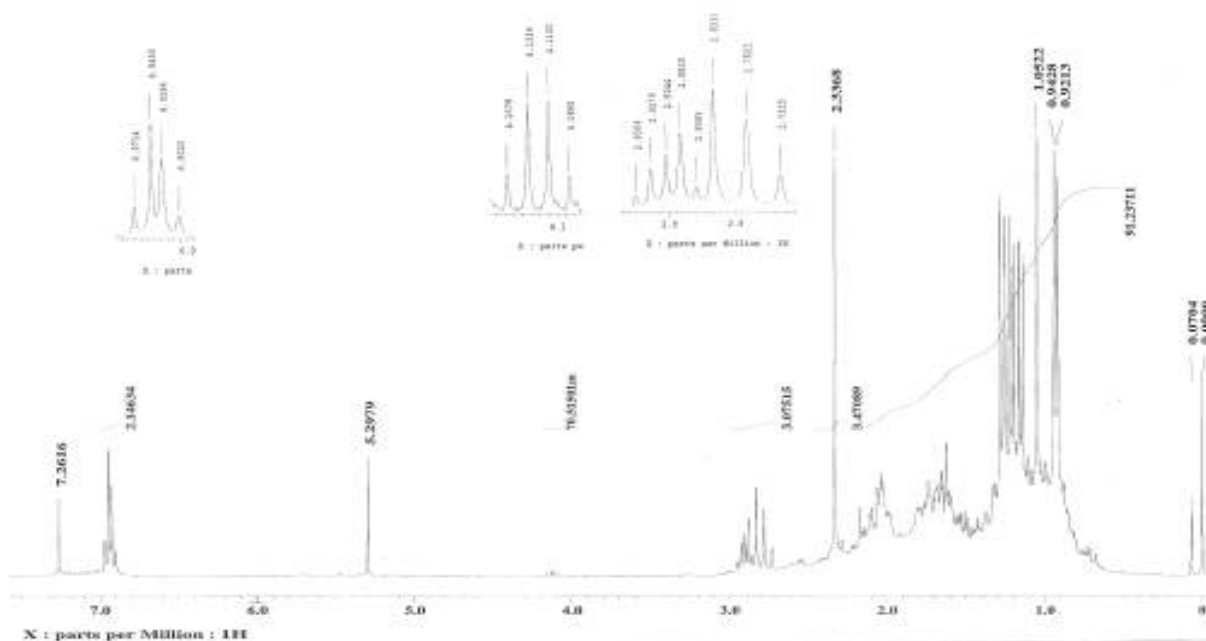


Fig. 21. Espectro de RMN ^1H del derivado aromático de la argentatina B (**5**). En este se observa un heptuplete a 2.8 ppm, que corresponde de un grupo CH unido a dos metilos, dicha señal se encuentra traslapada con un cuarteto que corresponde a los protones del C19. En este espectro también se pueden observar las señales a 6.91 y 6.95 de 2 protones aromáticos.

Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C se observaron señales para 7 CH_3 , 8 CH_2 , 4CH y 11C. De los cuales, 8 átomos de carbono presentaban hibridación sp^2 , siendo 2 de ellos metinos y 6 sin unión a átomos de hidrógeno (Figura 23). Tomando en cuenta los datos de RMN ^{13}C , se puede proponer una fórmula parcial de $\text{C}_{30}\text{H}_{41}$, que aunado a la presencia de un grupo hidroxilo se llega a la fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}$, previamente calculada por espectrometría de masas para este producto.

7 x CH_3	—————>	C_7H_{21}
8 x CH_2	—————>	C_8H_{16}
4 x CH	—————>	C_4H_4
11 x C	—————>	C_{11}
		$\text{C}_{30}\text{H}_{21}$

Tabla 2. Suma de grupos funcionales de C para la fórmula parcial de **5**.

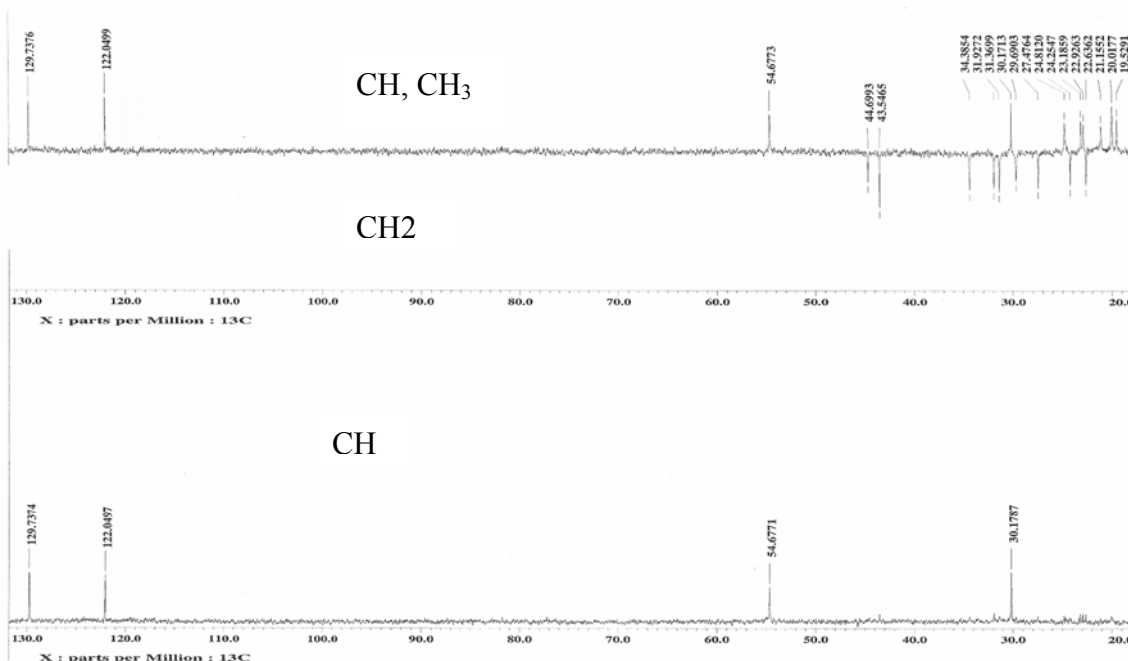


Fig. 22. Señales de RMN ¹³C experimento DEPT de **5** en la cual se observan claramente los CH sp² desplazados a 122-130 ppm provenientes del anillo aromático.

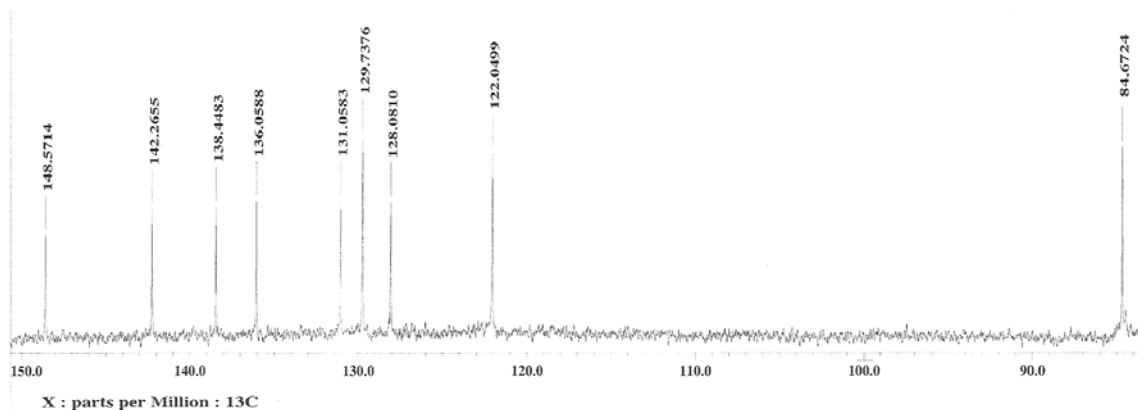


Fig. 23. Espectro de RMN ¹³C de **5**. En este se observan los 8C sp², desplazados entre 122-148 ppm, así como una señal a 84.67 ppm para un átomo cuaternario y unido a un heteroátomo.

La presencia, evidenciada por las señales de RMN de ¹H y ¹³C, de un anillo aromático, así como la desaparición de las señales de los hidroxilos en C-16β y C-24R permiten proponer la aromatización del acetato de argentatina B, formando un nuevo anillo en las posiciones C-16 a C-23 de dicha molécula. Hipótesis que se ve apoyada por la fragmentación de este producto en el espectro de masas.

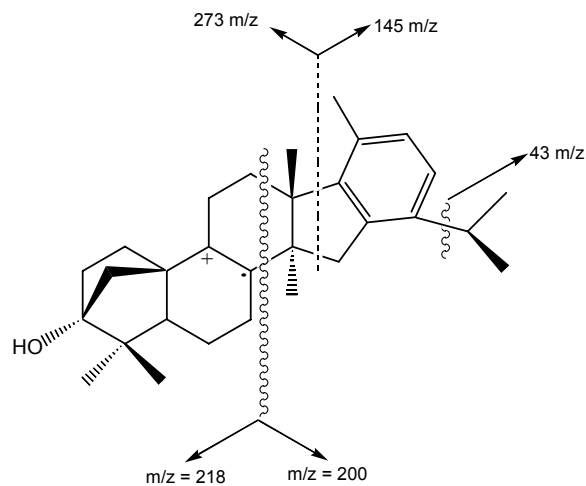


Fig. 24. Fragmentos importantes asignados en el espectro de masas de **5**.

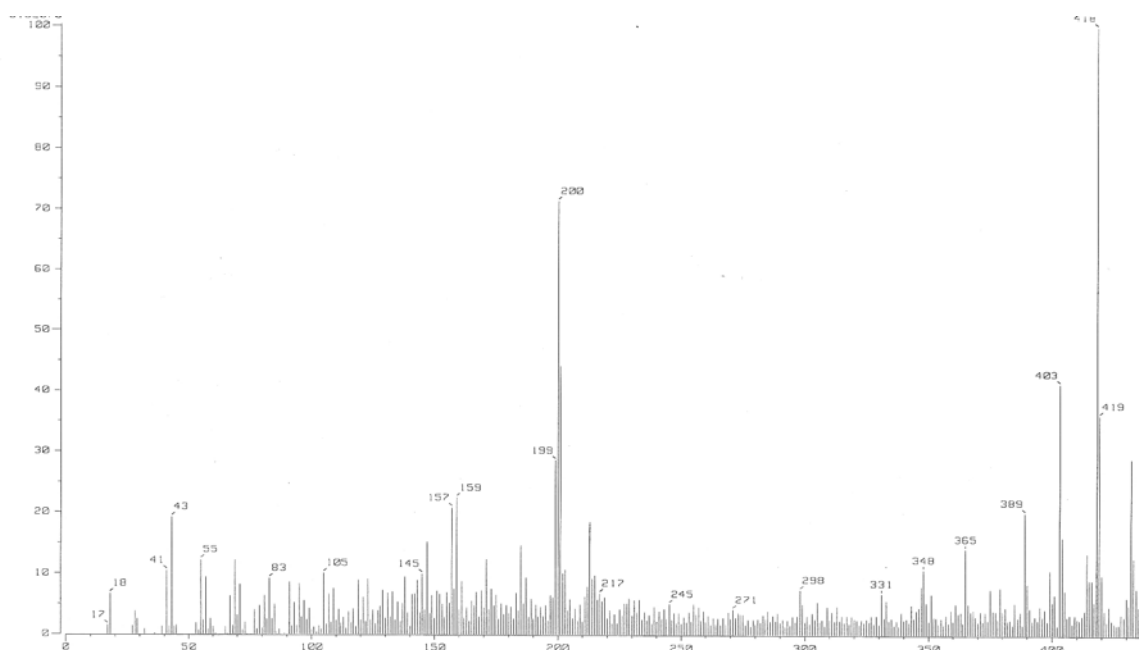
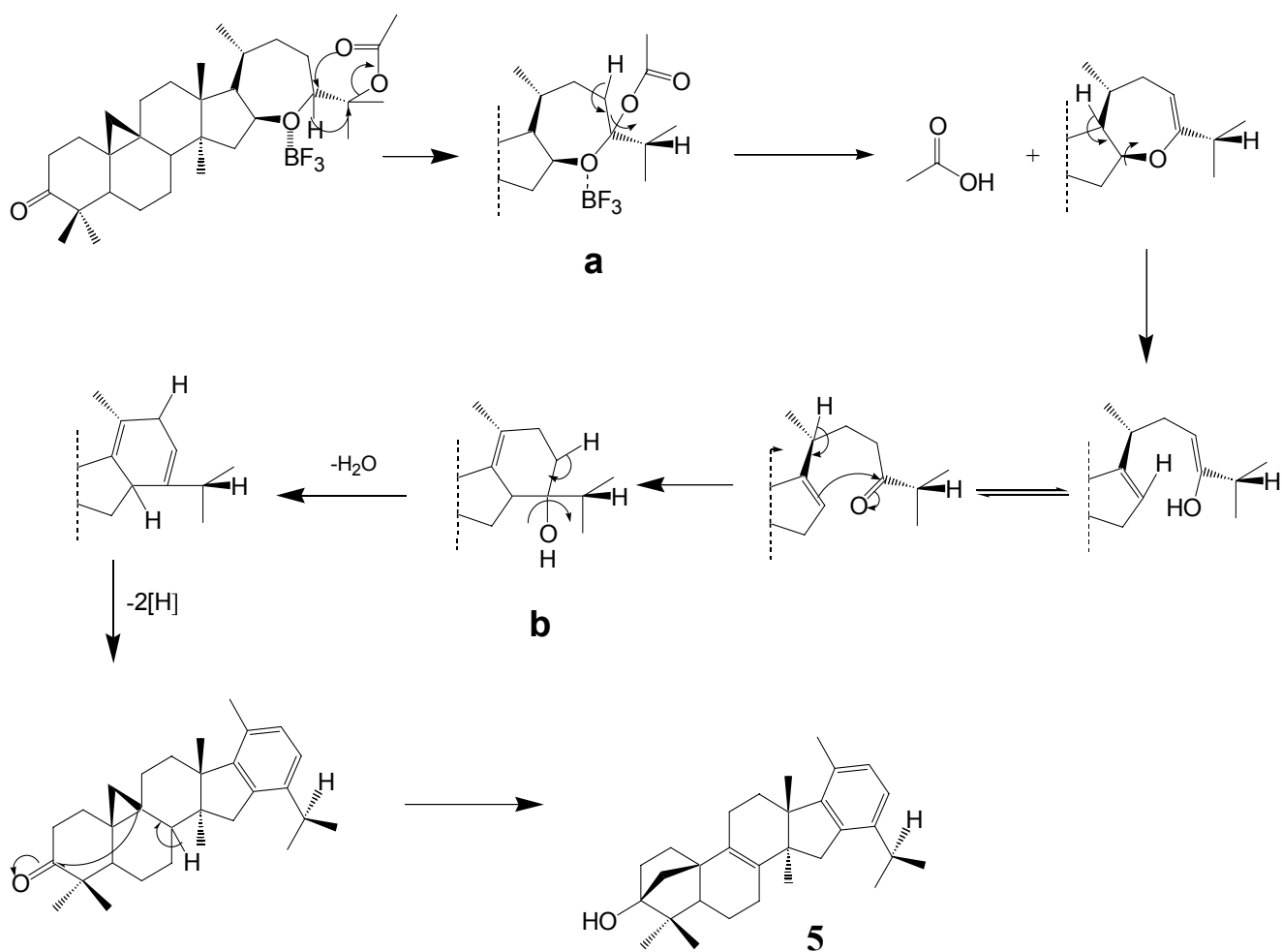


Fig. 25. Espectro de masas del derivado aromático de la argentatina B (**5**).

Un mecanismo probable, para explicar la formación de **5**, es postular inicialmente la unión del BF_3 sobre el átomo de oxígeno del anillo de siete miembros, esto causaría la formación de un incipiente carbocatión en el átomo

de carbono en la posición 24 (C-24), lo cual favorecería un ataque nucleofílico interno por uno de los oxígenos del acetato a el C-24. Dicho ataque ayudará a distribuir la carga positiva generada, induciendo la transposición del grupo acetato del C-24 al C-25. El intermediario formado **(a)** sufrirá una serie de transformaciones, las cuales llevarán a la pérdida de ácido acético, la ruptura del enlace entre el C-16 y el oxígeno del éter, estos eventos producirán la formación de un doble enlace en las posiciones C-16 y C-17, además de un grupo enólico. El grupo enolato al estar en equilibrio con su forma cetónica sufrirá un ataque nucleofílico por parte del doble enlace de las posiciones C-16 y C-17 formando un anillo de seis miembros **(b)**. La pérdida de una molécula de agua y de hidrógenos del intermediario **b** dará paso a la formación de un anillo bencénico (Ríos 1999).

Adicionalmente, a la formación del anillo bencénico, otro cambio que sufrió **2** para la formación de **5**, fue la transposición del ciclopropano en C-19, pasando a formar un biciclo de 5 miembros teniendo en común las posiciones C-3, C-10 y C-19. Esta serie de sucesos químicos está ilustrada en el esquema 4.



Esquema 4. Mecanismo de reacción propuesto para la aromatización de **2** (Ríos 1999).

4.4 Obtención de 2 α -bromo-16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (**6**).

Al tratar la argentatina B (**1**) con una solución 1 M de bromo en ácido acético glacial (Nace 1964) se obtuvo el 2 α -bromo-16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (**6**) con un rendimiento del 90.5%.

En el espectro de RMN ^1H se observaron las señales características para los protones del ciclopropano, así como las asignadas a los protones de C-16 y C-24, también se observaron las señales de los siete grupos metilos.

En 5.1 ppm se observó una señal doble de doble, con constantes de acoplamiento de $J = 12.8$ y 6.6 Hz, que se asignó al protón geminal al átomo de bromo en el C-2.

En el espectro de masas se observó un ion molecular $[\text{M}]^+$ a $m/z = 534$ que corresponde a una fórmula mínima de $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{BrO}_3$,

También se observaron en el espectro de masas picos a $m/z = 175$ (pico base), 85, 396, 477 entre otros.

4.5 Obtención de 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-1-en-3-ona (**7**)

El tratamiento de la α -bromo cetona (**6**) con una suspensión de N,N-dimetilacetamida en carbonato de calcio (Green 1961) generó el compuesto **7** con un rendimiento del 55.7%.

En el espectro de RMN ^1H de **7** se observaron dos dobletes, uno en 0.75 ppm y otro en 1.32 ppm, teniendo ambos la misma constante de acoplamiento (4.7 Hz), estas señales pertenecían a los protones del anillo de tres miembros. También se observó un doblete en 5.9 ppm y otro en 6.7 ppm, con similar constante de acoplamiento de 10 Hz, estas señales pertenecían a los hidrógenos vinílicos de los carbonos C-1 y C-2.

En el espectro de masas se observó un ion molecular $[\text{M}]^+$ a $m/z = 454$ que corresponde a una fórmula mínima de $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$,

También se observaron en el espectro de masas picos a $m/z = 18$ (pico base), 137, 159, 396, 436 entre otros.

4.6 Obtención de 25-acetiloxi-16 β ,24R-epoxi--cicloartan-1-en-3-ona (**8**).

El tratamiento convencional de **7** con anhídrido acético y acetato de sodio permitió la formación del derivado acetilado de **7**. El rendimiento de **8** fue del 43.2%.

En el espectro de RMN ^1H de **8** se observó un singulete a 1.96 ppm que corresponde al metilo del grupo acetato, así como un par de señales dobles en 5.9 y 6.7 ppm, con similar constante de acoplamiento de 10.2 Hz, atribuibles a los hidrógenos vinílicos en los C-1 y C-2 de la función enona. Por último se observaron en 0.74 y 1.32 ppm dobletes de los hidrógenos del anillo de tres miembros, con una constante de acoplamiento de 4.8 Hz.

4.7 Obtención de 16 β -hidroxi-cicloartan-1-en-3,24-diona (**9**)

Al tratar el derivado acetilado **8** con $\text{BF}_3\text{-O}(\text{Et})_2$ (Mandal 1986) se obtuvo el compuesto **9** con un rendimiento del 6%.

En el espectro de RMN ^1H de **9** se observó una señal de un hidrógeno del anillo de tres miembros en 0.77 ppm con una $J = 4.2$ Hz. También se observaron las señales entre 0.89 y 1.12 ppm, que integran para los 7 metilos que presenta esta molécula, así como las señales características de dos hidrógenos vinílicos conjugados a un carbonilo (5.93 ppm, d, $J=10.2$ Hz y 6.77 ppm, d, $J=10.2$ Hz), y una señal múltiple en 4.55 ppm que es la perteneciente al hidrógeno del C-16 ligado a un hidroxilo. Cabe recalcar que en el espectro no se observó la señal de 3.7 ppm del hidrógeno de C-24, presente en todos los derivados obtenidos a partir de la argentatina B, lo que implicó que el anillo de 7 miembros se abrió.

En el análisis del espectro de masas se observó un ion molecular $[\text{M}]^+$ a $m/z = 454$ que corresponde a una fórmula mínima de $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$.

Como un punto importante con respecto a la diferencia en reactividad entre la argentatina B y su acetato, se menciona que la argentatina B (**1**) no reaccionó con el $\text{BF}_3\text{-O}(\text{Et})_2$ en las mismas condiciones que lo hizo **2** (acetato de

argentatina B) y **8**. Este resultado indica que es necesaria la presencia del acetato en C 25 para que se efectúe la reacción.

Al tratar el compuesto **8** con BF_3 presentó la apertura del anillo de 7 miembros formándose una cetona en la cadena lateral (**9**), por otro lado cuando **2** fue tratado con BF_3 , el resultado de esta reacción fue la formación de 2 productos mayoritarios; uno de estos productos fue una mezcla de isómeros estructurales (**3** y **4**) similares a **9**, el segundo producto obtenido fue aquel que presentó la transformación del anillo de 7 miembros a un anillo bencénico (**5**). Esta transformación, hasta el momento, es única en este tipo de triterpenos.

En la literatura se ha reportado la aromatización de moléculas con BF_3 , pero el mecanismo no ha sido totalmente elucidado (Ríos et al; 1999).

4.8 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS DERIVADOS OBTENIDOS

El objetivo de este estudio fue la obtención de derivados de la argentatina B, los cuales se esperaba presentaran actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano.

Al someter los compuestos **9** y **5** a pruebas biológicas de cernimiento citotóxico a una concentración de 50 μ molar, se observó que ambos presentaron interesante actividad, alcanzando porcentajes de inhibición del crecimiento celular del 100% en 5 de 6 líneas celulares (Tabla 3). Estos resultados sugirieron como paso posterior el cálculo de su IC₅₀, pero, debido a que tanto **5** como **9** son compuestos químicamente inestables como se comprobó por cromatografía en capa fina, esto no fue posible.

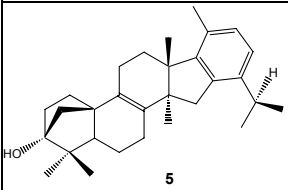
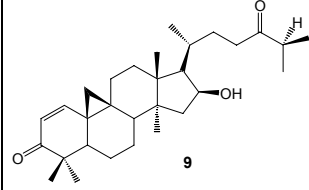
Línea celular	% de inhibición del crecimiento (50 μ M)					
	PC-3	U251	HCT-15	K562	skul	MCF7
 5	85.6	100	100	74.4	100	100
 9	96.3	100	100	100	100	100

Tabla 3. Citotoxicidad de los derivados **5** y **9** de la argentatina B en líneas celulares humanas de cáncer de próstata, sistema nervioso central, colon, leucemia, pulmón y mama respectivamente.

Al someter la mezcla de **3** y **4** a pruebas biológicas de cernimiento citotóxico, se obtuvo, que al igual que **9** y **5**, la mezcla presentó buena actividad citotóxica. Los valores de la IC₅₀ obtenidos para la mezcla de **3** y **4**, se encontraron en un rango entre 18 y 38 μ M (Tabla 4), los cuales fueron similares a los obtenidos anteriormente para la argentatina B (Parra 2005), lo cual sugiere que el cambio químico realizado a la argentatina B no condujo a compuestos de mayor citotoxicidad, al menos para las líneas celulares de cáncer evaluadas.

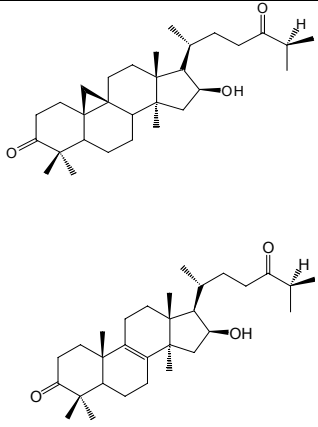
Compuesto	Concentración inhibitoria media de la mezcla de isómeros estructurales 3 y 4 (μM).				
	PC-3	U251	HCT-15	MCF7	SKUL-1
 (Mezcla binaria de 3 y 4)	33.33 \pm 0.3	31.64 \pm 1.3	27.54 \pm 2.6	18.96 \pm 1.7	38.94 \pm 2.6

Tabla 4. IC₅₀ de la mezcla de isómeros estructurales.

Aunque aún no está bien establecido el mecanismo de citotoxicidad de este tipo de triterpenos, los resultados de citotoxicidad muestran una ligera selectividad de los derivados de la argentinina B hacia las líneas celulares HCT-15 y MCF-7. Resultado que está de acuerdo con lo informado en la literatura donde algunos triterpenos de tipo cicloartano han sido reportados por tener una notable citotoxicidad *in vitro* para estas mismas líneas celulares de cáncer (Setzer *Et al.*, 2003).

Por otro lado, se sabe que algunos triterpenos de los tipos ursano y oleanano actúan incrementando los niveles de calcio y citocromo c intracelular, presentando actividad citostática y apoptótica (Gurfinkel 2006).

Recientemente se ha informado que en este tipo de triterpenos su actividad apoptótica tiene una relación directa a su actividad antioxidante, además estos compuestos disparan eventos tempranos de muerte celular como rompimiento del retículo endoplásmico y activación de las caspasas (Cipak 2006).

Así mismo, se ha informado que ciertos grupos funcionales en este tipo de triterpenos aparentemente son importantes para la actividad citotóxica, por mencionar, grupos OH en la posición C-3, epoxido en C-24 y C-25, así como

carbonilos α,β insaturados. Esto podría estar involucrado en la actividad citotóxica que presentaron **5** y **9** (Setzer *et al.*, 2003).

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Debido a que la argentatina B no sufrió ninguna modificación al tratarla con BF_3 y de acuerdo con nuestros resultados, la presencia del grupo acetato en los derivados **2** y **8** es indispensable para reaccionar frente al BF_3 .

Por otro lado, la diferencia de reactividad observada entre **2** y **8** al tratarlos con BF_3 , se vio reflejada en el hecho de que el doble enlace presente en **8** permite obtener mezclas de reacción menos complejas que aquellas reacciones realizadas con **2**.

La obtención de **3** y **4**, cuyas estructuras fueron deducidas por métodos espectroscópicos y confirmadas por un estudio cristalográfico de rayos X, evidenciaron, que además de la esperada apertura del éter entre C-16 y C-24, también el anillo de ciclopropano era modificado por la acción del BF_3 .

De manera similar, la obtención de **5**, evidenció que los centros de reacción también fueron el éter y el anillo de ciclopropano, pero las modificaciones sufridas fueron totalmente diferentes a las sufridas para producir **3** y **4**.

En el caso de **5**, el éter cíclico entre C-16 y C-24 fue substituido por un anillo bencénico y la apertura del ciclopropano, propició el ataque nucleofílico del átomo de C-10 hacia el carbonilo en C-3, produciendo el alcohol respectivo.

Esta es la primera vez que se informa una aromatización en el anillo D para este tipo de triterpenos, así como la transposición del anillo de ciclopropano, para la formación de un biciclo.

En cuanto a la actividad citotóxica de estos derivados, en un cernimiento a 50 μM todos mostraron una magnífica actividad, sin embargo, debido a la inestabilidad química de los derivados **5** y **9** no fue factible la determinación de los valores de IC_{50} , en cuanto a los valores de la mezcla de **3** y **4**, estos fueron similares a la argentatina B, aunque con cierta selectividad a las líneas MCF-7 y HCT-15, tendencia similar a la informada en la literatura para este tipo de triterpenos.

Por otro lado, a pesar de sufrir importantes cambios estructurales con respecto a la argentatina B, la actividad citotóxica de los derivados **3** y **4**, mostró valores de IC_{50} similares a las de este triterpeno.

No obstante que los resultados de citotoxicidad no fueron lo importantes que se esperaban, es claro, que este trabajo esta indicando que la apertura de los éteres cíclicos de las argentatinas en medio ácido, es una de las transformaciones que junto con otras deberán de ser contempladas para la eventual obtención de compuestos con mayor actividad citotóxica.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones, y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un espectrómetro Perkin-Elmer mod. 337, en solución empleando como disolvente CHCl_3 .

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron determinados en un espectrómetro Varian XL-300, utilizando como disolvente CDCl_3 y como referencia interna TMS. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm. Las constantes de acoplamiento están expresadas en Hertz. La multiplicidad de las señales se expresa como sigue: (s) señal simple, (d) señal doble, (t) señal triple y (m) multiplete.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Hewlett-Packard 59858 con sistema acoplado de CG-EM.

El estudio de difracción de rayos x se realizó con un difractómetro SIEMENS P4, utilizando radiación de Mo (Monocromador de grafito, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$).

La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se realizó con las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (silical gel 60/UV250, Alugram), como revelador luz UV y/o sulfato cerico al 1% en ácido sulfúrico 2 N. Para la purificación por cromatografía en columna se utilizó como fase estacionaria gel de sílice con tamaño de 0.070-0.230 mm.

El eterato de trifluoruro de boro utilizado fue comprado en Sigma-Aldrich Co.

Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas	Compuesto	Rendimiento (%)
Hexano	100	-	-	-
Hexano: AcOEt	80:20	25-33	Argentatina B	3.5
AcOEt	100	-	-	-

Tabla 5. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la resina del *P. argentatum*.

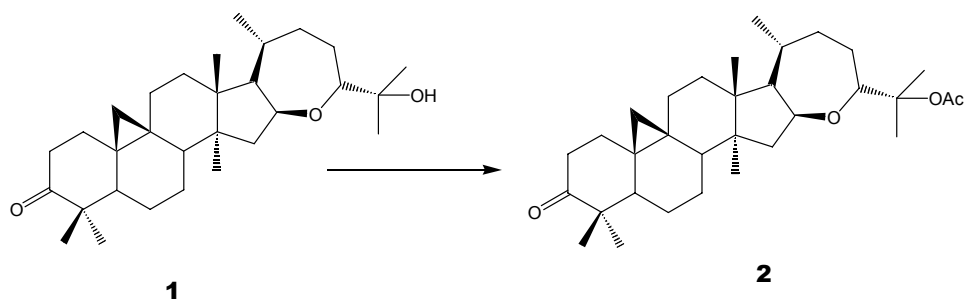
6.2 Aislamiento de la 16 β , 24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (argentatina B).

La resina utilizada para la realización de este estudio fue donada por la empresa Complejo Agro-Industrial CONAZA ubicada en Saltillo Coahuila y fue obtenida durante la extracción, a nivel industrial, de hule a partir de *Parthenium argentatum*.

La resina (55.84 g) se sometió a un proceso cromatográfico en una columna abierta y empacada con Tonsil en una proporción 1:15 con respecto al peso de la resina. La columna fue eluida, inicialmente con hexano y posteriormente con mezclas de hexano acetato de etilo de polaridad creciente.

Se obtuvieron fracciones de 250 mL, reuniéndose aquellas fracciones cromatográficamente similares. (Tabla 5). De las fracciones eluidas con mezclas de Hex:AcOEt (8:2) se obtuvieron 1.675 g de argentatina B (**1**) (3.5 % de rendimiento a partir de la resina). La identificación de **1** se realizó por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura (Martínez, 1990).

6.3 Obtención de 25-acetiloxi-16 β ,24R-epoxi-cicloartan-3-ona (**2**)



Esquema 5. Obtención del acetilado en C-25 de la argentatina B.

En 16 mL de anhídrido acético se mezclaron 1000 mg de argentatina B (2.2 mmoles) y 337.6 mg de acetato de sodio (4.1 mmoles). La mezcla de reacción se colocó a reflujo por 1.5 h. Al terminar este tiempo se agregaron 50 g de hielo. El precipitado obtenido se filtró y se disolvió en acetato de etilo. Esta fase se lavó con bicarbonato de sodio al 10 %. Se secó la fase orgánica y se concentró evaporando el disolvente. La mezcla de reacción obtenida se separó por cromatografía en columna obteniendo 700 mg de **2**.

Datos espectroscópicos de **2** :

IR (Película) cm^{-1} : 2932.7, 2872.7 (CH), 1733.1 (C=O), 1705.7 (C=O), 1463.3, 1368.2, 1255.5, 1115.4. **EM-IE** m/z, (%): 498 (1.5), 440, 438, 397 (100), 143, 85.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.57 (d, $J=4.2$, H-19), 0.815 (d, $J=4.4$, H-19'), 0.888 (s, 3H, CH_3), 1.048 (s, 3H, CH_3), 1.101 (s, 3H, CH_3), 1.164 (s, 3H, CH_3), 1.394 (s, 3H, CH_3), 1.455 (s, 3H, CH_3), 0.929 (d, $J=6.4$ Hz, CH_3 -21), 1.964 (s, CH_3 -acetato), 2.72 (m, 1H, H-2), 3.82 (m, 1H, H-24), 4.62 (m, 1H, H-16).

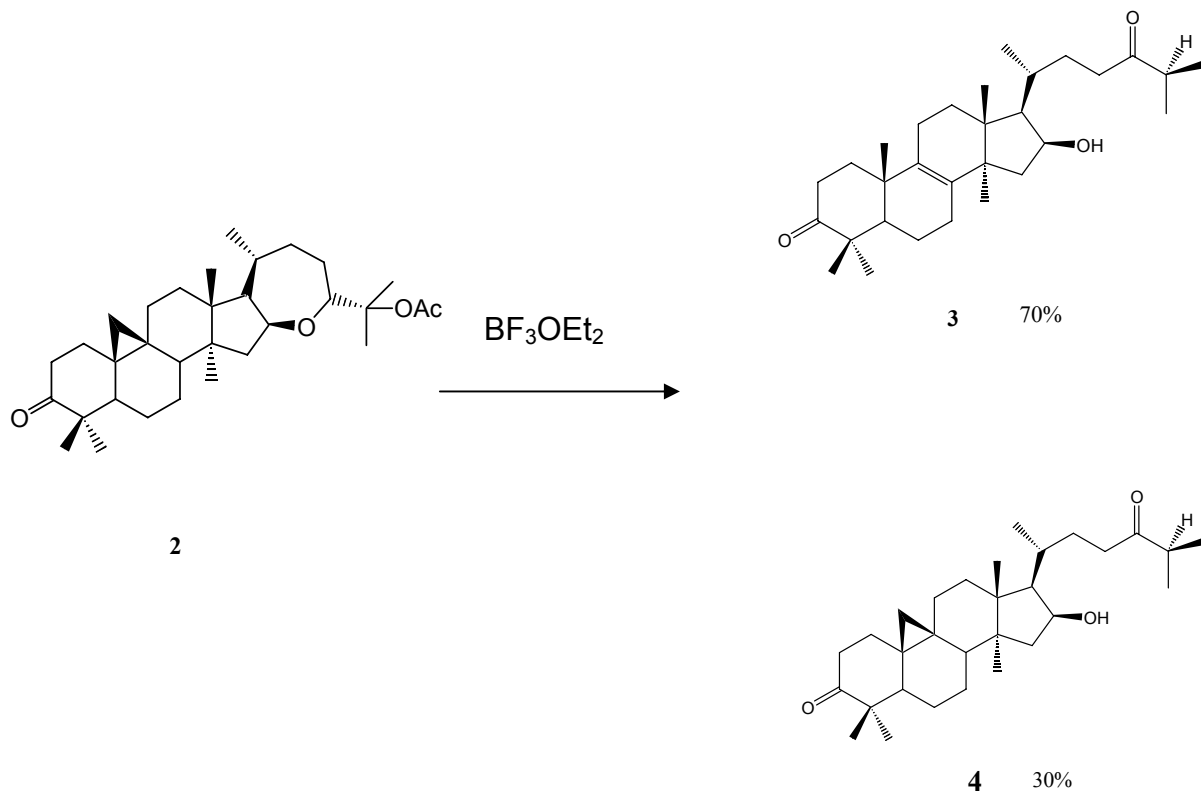
RMN ^{13}C (75.5 MHz) ppm: 33.3 (C-1), 46 (C-2), 205.6 (C-3), 55.0 (C-4), 48.4 (C-5), 21.2 (C-6), 20.9 (C-7), 47.4 (C-8), 21.3 (C-9), 26.19 (C-10), 26.4 (C-11), 32.4 (C-12), 45.9 (C-13), 47.5 (C-14), 44.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.3 (C-17), 18.7 (C-18), 29.2 (C-19), 29.2 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.2 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 19.5 (C-28), 20.8 (C-29), 23.0 (C-30).

6.4 Reacción de 25-acetiloxi-16 β ,24R-epoxi-cicloartan-3-ona (**2**) + Eterato de BF₃

Se disolvieron en 50 mL de cloroformo 713 mg de acetato de argentatina B (**2**). A esta solución se agregó 20 mL de eterato de BF₃, manteniéndose en agitación magnética 1 h, transcurrido este tiempo se neutralizó la reacción con solución de bicarbonato de sodio al 10%, y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con agua destilada y se secó con sulfato de sodio anhidro. Los productos de reacción se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como sistema de elución una mezcla de Hex:AcOEt (8:2).

De esta reacción se obtuvieron dos productos en mayor proporción, 81.5 mg de **3 y 4** que resultó una mezcla de isómeros estructurales y 20.3 mg de **5**.

6.4.1 16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (**3**) y de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**4**).



Esquema 6. Apertura de la argentatina B acetilada.

P.f. de la mezcla binaria de **3** y **4**: 122-124 °C. Análisis elemental determinado por espectrometría de masas de alta resolución (FAB+): C₃₀ H₄₈ O₃ (P.M. estimado 456.3603, P.M. observado 456.3600)

Datos espectroscópicos de **3**:

IR (Pastilla-KBr) cm⁻¹: 2950.2, 2873.5, 1701.8 (C=O), 1705.7 (C=O), 1463.7, 1377.6, 1265.5, 1112.4, 3482.2 (OH). **EM-IE** m/z (%): 438 [M]⁺ (1.8), 456 (20), 423 (100), 218 (7), 200 (72), 71 (45), 43 (72), 41 (20). **RMN ¹H** ppm: 0.57 (d, J=4.5 Hz, H-19), 0.82 (d, J=4.5 Hz, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.94 (s, 3H, CH₃), 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.070 (s, 3H, CH₃), 1.09 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.17 (s, 3H, CH₃), 4.53 (m, CH, 1H). **RMN ¹³C** (300 MHz) ppm: 34.5 (C-1), 35.9 (C-2), 217.8 (C-3), 46.6 (C-4), 51.2 (C-5), 19.3 (C-6), 26.2 (C-7), 135.0 (C-8), 133.3 (C-9), 36.9 (C-10), 20.6 (C-11), 30.9 (C-12), 46.6 (C-13), 47.4 (C-14), 42.13 (C-15), 72.17 (C-16), 55.7 (C-17), 16.3 (C-18), 18.2 (C-19), 29.5 (C-20), 18.9 (C-21), 35.9 (C-22), 40.9 (C-25), 25.2 (C-28), 26.13 (C-29), 21.2 (C-30).

Datos espectroscópicos de **4**:

IR (Pastilla-KBr) cm⁻¹: 2950.2, 2873.5, 1701.8 (C=O), 1705.7 (C=O), 1463.7, 1377.6, 1265.5, 1112.4, 3482.2 (OH). **EM-IE** m/z (%): 438 [M]⁺ (1.8), 456 (20), 423 (100), 218 (7), 200 (72), 71 (45), 43 (72), 41 (20). **RMN ¹H** ppm: 0.57 (d, J=4.5 Hz, H-19), 0.82 (d, J=4.5 Hz, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.94 (s, 3H, CH₃), 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.070 (s, 3H, CH₃), 1.09 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.17 (s, 3H, CH₃), 4.53 (m, CH, 1H). **RMN ¹³C** (300 MHz) ppm: 33.8 (C-1), 37.4 (C-2), 216.6 (C-3), 50.2 (C-4), 48.4 (C-5), 21.4 (C-6), 26.2 (C-7), 47.8 (C-8), 20.9 (C-9), 26.1 (C-10), 26.4 (C-11), 32.6 (C-12), 47.7 (C-13), 47.4 (C-14), 36.6 (C-15), 72.2 (C-16), 51.2 (C-17), 18.5 (C-18), 29.8 (C-19), 29.5 (C-20), 18.1 (C-21), 35.9 (C-22), 20.1 (C-28), 22.1 (C-29), 20.7 (C-30).

Tabla 6. Datos cristalinos y refinamiento estructural de la mezcla binaria de **3** y **4**

Formula empírica	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	
Peso molecular	456.68	
Temperatura (K)	308	
Longitud de onda (Å)	0.71073	
Sistema cristalino	Ortorrómico	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Dimensiones de la celda unitaria	a = 6.2195(7) Å b = 13.2968(14) Å c = 33.38184) Å	α = 90° β = 90° γ = 90°
Volumen (Å ³)	2760.6(5)	
Z	4	
Densidad calculada (Mg/m ³)	1.099	
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	0.068	
F(000)	1008	
Tamaño del cristal /forma /color	0.40 x 0.13 x 0.13 mm/ Prisma/ incoloro	
Rango de θ para la recolección de datos	1.65 a 25.00°	
Rangos	-7<=h<=7, -15<=k<=15, -39<=l<=39	
% a θ = 25.00°	99.8%	
Datos / restricciones / parámetros	4879/10/318	
F ^{2*}	0.711	
Índices finales R [>2σ(I)]	R1 = 0.0414, wR2 = 0.0504	
Índices R (Todos los datos parámetro estructural absoluto)	R1 = 0.1409, wR2 = 0.0608	
LDPH ** (e. Å ⁻³)	0.090 y -0.066	

* Goodness-of-fit on F², ** Largest diff. Peak and hole.

El compuesto presento desorden estadístico en el carbono C19, el cual fue refinado en dos posiciones 70% correspondiente al compuesto con metilo y 30% correspondiente al compuesto con ciclopropano. La configuración absoluta no fue determinada, la estereoquímica de los diversos centros quirales se estableció con referencia a C19 β.

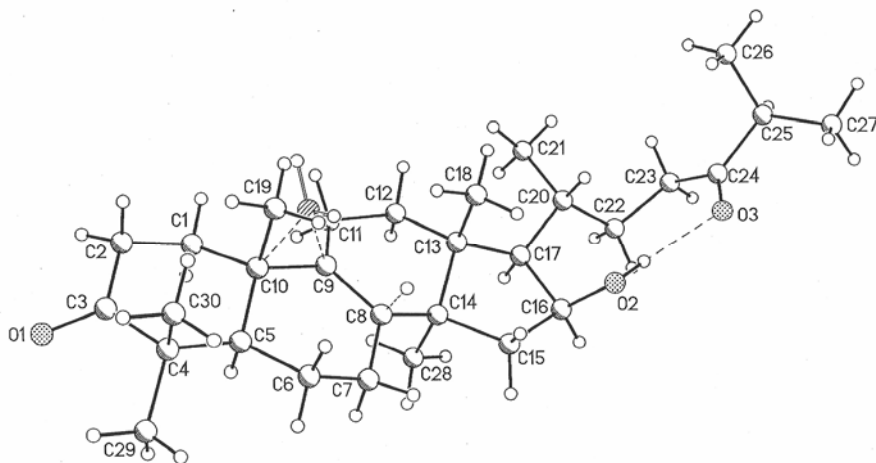
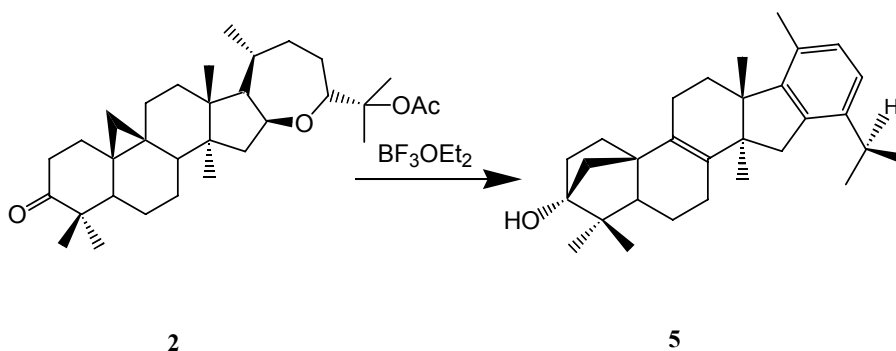


Fig. 26. Estereoestructura de la mezcla binaria de 16 β -hidroxi-lanostan-8,9-en-3,24-diona (**3**) y de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**4**), obtenida por medio de un estudio de difracción de rayos X.

6.4.2 Obtención de 5



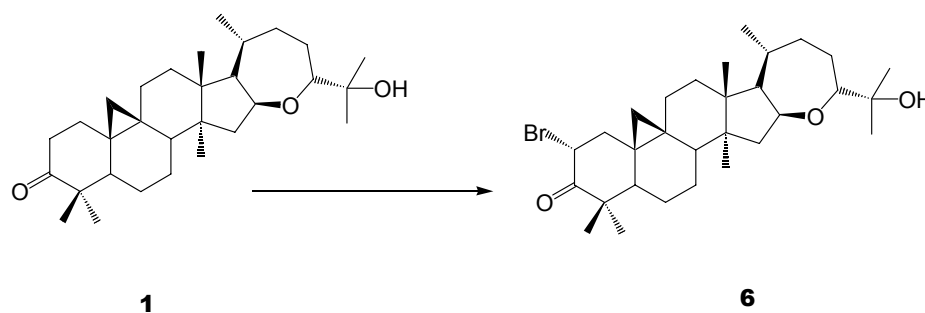
Esquema 7. Obtención del derivado aromático de la argentina B (**5**).

Datos espectroscópicos de **5**:

EM-IE m/z (abundancia %): 484 [M]⁺ (1.8), 418 (100), 365 (16), 272 (5), 218 (7), 200 (72), 145 (9), 43 (20). **RMN** ¹H ppm: 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.94 (s, 3H, CH₃), 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.27 (d, 3H, CH₃, J = 9.3 Hz), 1.21 (d, 3H, CH₃, J = 6.7 Hz), 1.15 (d, 3H, CH₃, J = 7.0 Hz), 2.34 (s, 3H, CH₃ unido a anillo aromático), sistema A/B: 2.75 (d, J = 15.2 Hz, H-19, 1H), 2.85 (d, J = 14.9 Hz, H-19', 1H), 2.90 (m, 1H, CH), 6.95 (d, 1H, CH, J = 7.9 Hz), 6.91 (d, 1H, CH, J = 7.9 Hz).

RMN ^{13}C , (300 MHz) ppm: 24.25 (C-1), 31.92 (C-2), 84.67 (C-3), 48.80 (C-4), 54.67 (C-5), 27.47 (C-6), 29.69 (C-7), 138.44 (C-8), 136.05 (C-9), 41.24 (C-10), 22.68 (C-11), 31.36 (C-12), 47.64 (C-13), 49.03 (C-14), 34.38 (C-15), 128.08 (C-16), 148.57 (C-17), 24.8 (C-18), 43.54 (C-19), 131.05 (C-20), 19.51 (C-21), 129.73 (C-22), 122.04 (C-23), 142.26 (C-24), 30.17 (C-25), 23.17 (C-26), 22.92 (C-27), 20.01 (C-28), 21.15 (C-29), 20.01 (C-30). **HETCOR $^{13}\text{C}/^1\text{H}$** ppm: 19.51/2.36, 20.01/0.94, 20.01/1.28, 21.13/0.92, 22.92/1.15 (d), 23.17/1.2 (d), 24.8/1.05, 30.17/2.9, 43.54/2.8, 122.04/6.91, 129.73/6.95. **DEPT** ppm: CH_3 (19.59, 20.01, 20.01, 21.15, 22.92, 23.18, 24.8), CH_2 (22.68, 24.25, 27.47, 29.69, 31.36, 31.92, 34.38, 43.59, 44.69), CH (30.17, 54.67, 122.04, 129.73), C (41.24, 47.69, 48.8, 49.03, 84.67) C sp^2 (128.08, 131.05, 136.05, 138.44, 142.26, 148.57). **COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$** : 2.9/1.15 y 1.2.

6.5 Obtención de 2 α -bromo-16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (**6**)



Esquema 8. Obtención de 2 α -bromo argentatina B (**6**).

En 35 mL de ácido acético glacial se disolvieron 922 mg de argentatina B (2.0 mmoles), posteriormente se agregaron a la mezcla de reacción 2.1 mL de bromo 1 M en ácido acético, la mezcla de reacción fue mantenida en agitación a temperatura ambiente durante 75 minutos, posteriormente se agregó una solución de bicarbonato de sodio y el sólido formado se filtró. El sólido se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se lavó con una solución de bicarbonato de sodio al 10%, se secó en sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida.

Se evidenció el proceso de la reacción por la formación de un sólido color naranja el cual se recristalizó con hexano y se obtuvieron 834.3 mg de **6**.

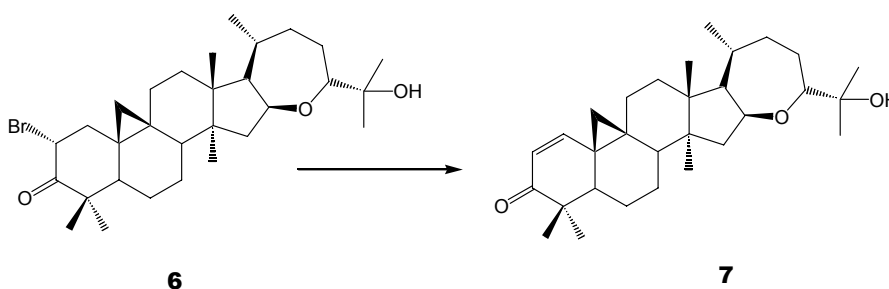
Datos físicos y espectroscópicos de **6**:

Formula molecular: C₃₀H₄₇BrO₃

p.f.: 189-190 °C

EM-IE m/z (%): 534 [M]⁺ (7.3), 536 [M+2]⁺ (5), 477 (63), 475 [M-59]⁺ (56), 459 (32), 397 (58), 396 (58), 193 (44), 175 (100), 85 (84). **RMN** ¹H ppm: 0.71 (d, J=4.4 Hz, H-19), 0.881 (s, 3H, CH₃), 0.885 (s, 3H, CH₃), 0.925 (s, 3H, CH₃), 0.957 (s, 3H, CH₃), 1.092 (s, 3H, CH₃), 1.153 (s, 3H, CH₃), 1.161 (s, 3H, CH₃), 5.1 (dd, J=12.8 Hz y J= 6.6 Hz, Hβ-2) 3.59 (m, 1H, H-24), 4.6 (m, 1H, H-16). **RMN** ¹³C ppm: 205.7 (C-3), 82.6 (C-24), 73.2 (C-25), 74.8 (C-16), 57.4 (C-17), 54.9 (C-2), 51.3 (C-4), 48.5 (C-5), 46.9 (C-8), 46.0 (C-15), 45.8 (C-13), 45.7 (C-1), 35.4 (C-22), 32.5 (C-12), 29.3 (C-19), 29.0 (C-20), 27.8 (C-10), 26.4 (C-11), 25.7 (C-7), 25.6 (C-23), 23.9 (C-27), 23.8 (C-26), 22.2 (C-29), 21.3 (C-6), 21.2 (C-21), 20.9 (C-9), 20.8 (C-30), 19.5 (C-28), 18.7 (C-18).

6.6 Obtención de 16β,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-1-en-3-ona (**7**)



Esquema 9. Formación del doble enlace en la argentatina B bromada.

A una suspensión en ebullición de carbonato de calcio (615 mg, 6.15 mmoles) en dimetilacetamida (30 mL) se colocaron 729 mg de 2α-bromo-argentatina B (1.362 mmoles). La mezcla se dejó reaccionar por una hora en reflujo y agitación constante, posteriormente se dejó enfriar y se agregaron 75 mL de ácido clorhídrico al 10% y el sólido formado se filtró.

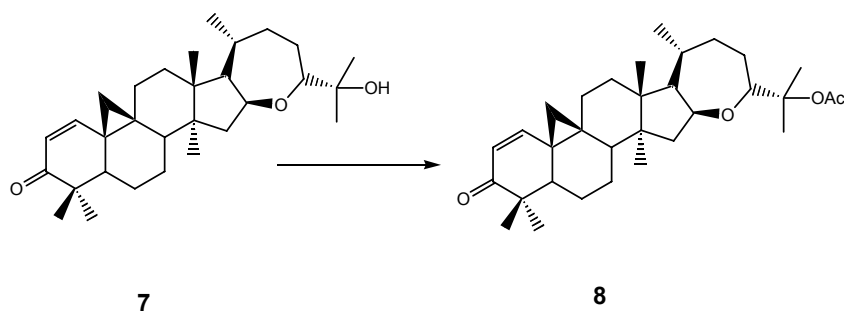
La purificación del producto se realizó vía recristalización con hexano, obteniéndose 406 mg de **7**.

Datos físicos y espectroscópicos de **7**:

p.f.: 154-155 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3536, 2959, 2877, 1664 y 1612. **EM-IE** m/z (%): 532 [M]⁺ (3), 454 (30), 436 (25), 396 (45), 395 (25), 137 (58), 18 (100). **RMN** ¹H ppm: 0.75 (d, J=4.8 Hz, H-19), 1.32 (d, J=4.6 Hz, H-19'), 0.882 (s, 3H, CH₃), 0.925 (s, 3H, CH₃), 0.963 (s, 3H, CH₃), 1.093 (s, 3H, CH₃), 1.101 (s, 3H, CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 5.9 (d, J=10 Hz, H-2), 6.7 (d, J=10 Hz, H-1), 3.58 (m, 1H, H-24), 4.59 (m, 1H, H-16).

6.7 Obtención de 25- acetiloxi-16β, 24R-epoxi--cicloartan-1-en-3-ona (**8**)



Esquema 10. Obtención del acetilado de argentatina B insaturada (**8**).

A 350 mg de 16β,24R-epoxi-25-cicloartan-1-en-3-ona (0.771 mmoles), en 5.6 ml de anhídrido acético se colocaron 118.6 mg de acetato de sodio (1.44 mmoles). La mezcla de reacción se colocó a reflujo por 1.5 h, al terminar este tiempo se agregaron 50 g de hielo. El precipitado obtenido se filtró y se disolvió en acetato de etilo. Esta fase se lavó con bicarbonato de sodio al 10 %.

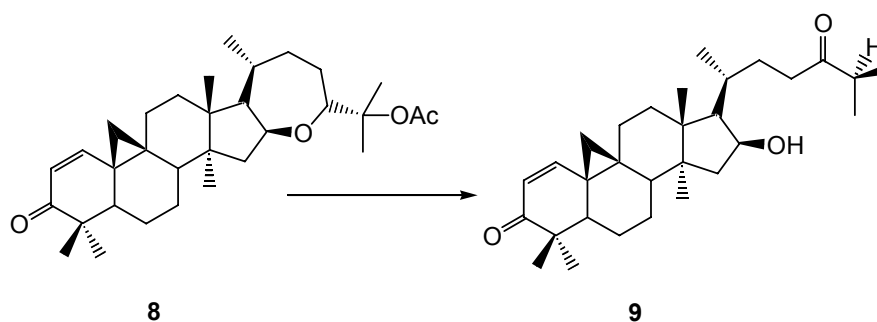
Se secó la fase orgánica y se concentró evaporando el disolvente. Se obtuvieron 218.2 mg de producto, recristalizándose después con hexano y obteniéndose 151.2 mg de **8**.

Datos físicos y espectroscópicos de **8**:

p.f.:156-157°C

EM-IE m/e (%): 574 [M]⁺(2), 496 (22), 436 (100), 395 (35), 377 (33), 219 (83), 109 (90) y 43 (96). **RMN ¹H** ppm: 0.74 (d, J=4.8 Hz, H-19), 1.32 (d, J=4.8 Hz, H-19'), 0.879 (s, 3H, CH₃), 0.962 (s, 3H, CH₃), 1.095 (s, 3H, CH₃), 1.101 (s, 3H, CH₃), 1.129 (s, 3H, CH₃), 1.395 (s, 3H, CH₃), 1.441 (s, 3H, CH₃), 5.9 (d, J=10.2 Hz, H-2), 6.78 (d, J=10.2 Hz, H-1), 3.82 (m, 1H, H-24), 4.62 (m, 1H, H-16), 1.965 (s, CH₃-acetato).

6.8 Obtención de 16β-hidroxi-cicloartan-1-en-3,24-diona (**9**)



Esquema 11. Transformación de la enona con eterato de trifluoruro de boro.

A 155 mg de 25-acetiloxi-16β, 24R-epoxi-cicloartan-1-en-3-ona (**8**) (0.31 mmoles) en 5 mL de cloroformo a 0° C se colocaron 2.5 mL de eterato de trifluoruro de boro. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 1.5 horas, transcurrido este tiempo se neutralizó la reacción con solución de bicarbonato de sodio al 10%, y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con agua destilada y se secó con sulfato de sodio anhidro. Los producto de reacción (138.2 mg) se fraccionaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como sistema de elusión una mezcla de Hex:AcOEt (8:2). De este proceso se obtuvieron 10 mg de 16β-hidroxi-cicloartan-1-en-3,24-diona.

Datos físicos y espectroscópicos de **9**:

p.f.: 133-134°C P.M. C₃₀H₄₆O₃

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3460, 2953, 2876, 1702, 1663 y 1605. **EM-IE** m/e (%): 546 [M]⁺ (1), 436 (81), 219 (100), 201 (27), 159 (44), 133 (52), 71 (64), 43 (77).

RMN ¹H ppm: 0.77 (d, J=4.2 Hz, H-19), 0.897 (s, 3H, CH₃), 0.912 (s, 3H, CH₃), 1.089 (s, 3H, CH₃), 1.093 (s, 3H, CH₃), 1.104 (s, 3H, CH₃), 1.123 (s, 3H, CH₃), 1.128 (s, 3H, CH₃), 5.93 (d, J=10.2 Hz, H-2), 6.77 (d, J=10.2 Hz, H-1), 4.55 (m, 1H, H-16).

RMN ¹³C ppm: 216.9 (C-24), 205.3 (C-3), 154.0 (C-1), 126.6 (C-2), 71.92 (C-16), 57.1 (C-17), 45.8 (C-23), 44.6 (C-25), 44.2 (C-5), 40-9 (C-8), 36.6 (C-22), 32.2 (C-12), 30.17 (C-19), 29.6 (C-20), 29.4 (C-11), 23.7 (C-15), 21.4 (C-29), 20.9 (C-6), 19.7 (C-21), 19.1 (C-30), 18.4 (C-28), 18.3 (C-18), 17.85 (C-26), 17.85 (C-27).

6.9 Evaluación citotóxica de los compuestos obtenidos

Para la evaluación citotóxica de los compuestos obtenidos se emplearon 6 líneas celulares: HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), K-562 (leucemia), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata) y SKUL (pulmón), provenientes del National Cancer Institute (NCI) de Estados Unidos. La citotoxicidad de los compuestos fue determinada en microcultivos, midiendo la viabilidad y crecimiento celular indirectamente por el método de la sulforrodamina B de acuerdo a los procedimientos validados por el NCI. La metodología se describe a continuación:

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal de bovino (SFB) y glutamina 2.0 µM. Las células se mantuvieron en incubación en un ambiente saturado de humedad en una atmósfera de 5% de CO₂ y a 37° C. Posteriormente la células que se adhirieron a los frascos de cultivo fueron removidas suavemente con una solución de tripsina-EDTA al 0.05% utilizando una pipeta. La determinación de la densidad y de la viabilidad de las líneas celulares se llevó a cabo en un hematocitometro, utilizando la técnica por exclusión con azul de tripano.

Después de que se contaron las células, se hizo una dilución para obtener una densidad adecuada. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos.

Todas las líneas celulares se incubaron por un periodo de 24 horas a 37 °C y fueron estabilizadas antes de adicionar los compuestos a evaluar.

Los compuestos fueron evaluados a una concentración de 50 µM y solubilizados en dimetil sulfóxido (DMSO), las disoluciones preparadas fueron depositadas en cada uno de los pozos y estos fueron incubados por 48 horas a 37° C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad. El crecimiento y viabilidad celular se determinó mediante la técnica de la sulforrodamina B.

Posteriormente a la incubación, los cultivos celulares fueron fijados in situ con 50 µL de ácido tricloroacético frío (50% m/v) y se incubaron 1 hora a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a desechar el sobrenadante y los cultivos se lavaron 5 veces con agua desionizada. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 100 µL de solución de sulforrodamina B (0.4% p/v en ácido acético al 1%), después de 10 minutos el exceso de sulforrodamina se removió lavando 5 veces con ácido acético al 1%. Finalmente se obtuvo el botón de células y se solubilizó con buffer tris, para determinar su densidad óptica, la cual es inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto de prueba y proporcional al crecimiento celular. Esta última se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm (Lector de ELISA BIO-TEK, ELx 808).

Los compuestos de referencia de actividad utilizados fueron doxorubicina y cisplatino.

7. Bibliografía

1. Alexander, P., *Ber*, (1911), **44**, 2324.
2. Angulo, S. J. L. and Quero-Gutiérrez, E., *C.I.Q.A.*, (1984).
3. Bertino, J. R. Cap. 58, Quimioterapia del cáncer *En* Browman W. C. y Rand J. M. 1984. Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. Nueva Editorial Interamericana. México.
4. Calabresi, P. y Chabner, B. A. Sección X: Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas *En* Hardman, J. G., Limbird, L. E. , Molinof, P. B., Ruddon, R. W., Goodman-Gilman, A. (1996), Goodman and Gilman, Las bases Farmacológicas de la terapéutica . Vol. II, 9° ed., Edit. Mc-Graw-Hill/Interamericana.
5. Calzada, L., Salazar, E. L., Téllez, J., Martínez, M., and Martínez, R., *Med. Sci. Res.*, (1995), **23**, 815-816.
6. Campos, E., (comp.) *Guayule. Reencuentro en el Desierto*, 3ª ed., México, CONACYT, (1981),13.
7. Carmona, David. S., Tesis de Maestría. Programa de Postgrado en Ciencias Químicas UNAM. 2004. (Química Orgánica).
8. Céspedes, C. L., Martínez-Vázquez, M., Calderón, J. S., Salazar, J. R. and Aranda, E. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, (2001), **56c**, 95-105.
9. Chabner, B. A. y Roberts, T. J. Jr., *Nature*, (2005), **5**, 65-72.
10. Cipak, L., Grasuova, L., Miadokova, E., Novotny, L., Rauko, P., *Arch Toxicol.*, (2006), **80**, 429-435.
11. Clinton, R. O., Manson, A. J., Stonner, F. W., Neumann, H. C., Christiansen, R. G., Clarke, R. L., Ackerman, J. H., Page, D. F., Dean, J. W., Dickinson, W. B. and Carabateas, C. *Journ. of Am. Chem. Soc.*, (1961), **83**, 1478-1491.
12. Cragg, G. M. Y Newman, D. J., Plants as source of anti-cancer agents, *Journal of Ethnofarmacology*. (2005), Vol. **100**, Issues 1-2, 22., 72-79.
13. Gibbs, J. B., *Science*, (2000), **287**, 1969-1973.
14. Gonzalez de Mejia E., Chandra S., Ramirez-Mares Marco V., Wang W., *Food and Chemical Toxicology*, (2006), **44**, 1191–1203.
15. Green, G. H. and Long, A. G., *Journal. Chem. Soc.*, (1961), 2537.

16. Gurfinkel, D. M., Chow, S., Hurren, R., Gronda, M., Henderson, C., Berube, C., Hedley, D. W., Schimmer, A. D., *Apoptosis*, (2006), **11**, 1463-1471.
17. Haagen-Smit, A.J., Siu, R., (1944), **66**, 2073.
18. Haagen-Smit, A.J., and Fong, C.T.O., *J. Am. Chem. Soc.*, (1948), **70**, 2075.
19. Hartwell, J. L. Plants used against cancer. Quaterman Publications, Lawrens, MA. (1982).
20. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. "Información sobre tumores malignos", boletín del 3 de febrero de 2005 basado en Estadísticas Vitales 2002, Base de datos y Estadísticas demográficas 2003. www.inegi.gob.mx, 15 de Noviembre de 2005.
21. Katzung, B. G. Farmacología básica y clínica, 7a edición. Ed. El manual Moderno, México, (1986), 1011-1013.
22. Komoroski, R.A., Gregg, E.C., Shockcor, J.P. and Geckle, J.M., *Magn. Res. Chem.*, (1986), **24**, 534.
23. Lastra, A. L., Ramírez, T. O., Salazar, L., Martínez, M., Trujillo-Ferrara, J.. *Journal of Ethnopharmacology*, (2004), **95**, 221-227.
24. Laza, L. D., Rodríguez, L. I., *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, (2003). **8**, ISSN 1028-4796 [on line].
ecimed@infomed.sld.cuhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issues&pid=1028-4796&lng=es&nrm=iso.
25. Mandal, Shroto, Ghogare, *Synthesis*, (1986), **3**, 221.
26. Mann, J. 2002. *Nature Reviews*, (2002), **2**, 143-148.
27. Martínez, R., Martínez-Vázquez, M., and Zamorano-Macías, *Organic Mass Spectrometry*, (1990), **25**, 237.
28. Martínez-Vázquez, M., Martínez, R., Espinosa, P. G., *Fitoterapia*, (1994), **4**, 371-372.
29. Martínez-Vázquez, M., Flores, G., Romo de Vivar, A., Reynolds, G. W., Rodríguez, E., *Journal of Natural Products*, (1986), **49**, 1102.
30. Matsubara, C., Romo de Vivar, A., *Phytochemistry*, (1985), **24**, 613.
31. Nace, H. R. and Lacona, N. R., *Journal Org. Chem.*, (1964), **29**, 3498.

32. NCI. National Institute Cancer U.S.
<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/espanol/cancer/Slide2>
33. Newman, D. J., Cragg, G. M., Kingston, D. G. I. En Wermuth C. G., *Elsevier*, (En prensa), (2003), 91-109.
34. Oviedo I., Ramirez T. and Martínez-Vázquez M., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2005), **57**, 1087-1091.
35. Parra-Delgado, H., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M., *Bioorg. And Med. Chem. Lett.*, (2005), **15**, 1005-1008.
36. Parra-Delgado, H., Compadre M. C., Ramírez-Apan, T., Muñoz-Fambuena, M.J., Ostrosky-Wegman, P., Martínez-Vázquez, M., *Bioorg. And Med. Chem. Lett*, (2006), **14**, 1889-1901.
37. Parra-Delgado, H., García-Pillado, F., Sordo, M., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M., Ostrosky-Wegman, P., *Life sciences*, (2005), **77**, 2855-2865.
38. Phuwapraisirisan, P., Surapinit S., Sombund S., Pongpun S. and Santi T., *Tetrahedron Letters*, (2006), **47**, 3685–3688.
39. Ríos, M. Y., Delgado, G., *Revista de la Sociedad Química de México*, (1999), **43**, 127-132.
40. Romo de Vivar, A., Guerrero, C. and Wittgreen, G., *Rev. Latinoamericana de Quím.* (1970), **1**, 39.
41. Romo de Vivar A., Ortega A., and Díaz E., *Rev. Latinoamericana de Quím.*, (1970), **1**, 132.
42. Romo de Vivar, A., Martínez, M., Matsubara, C. and Pérez, G., *Phytochem.*, (1990), **29**.
43. Romo de Vivar, A. and Matsubara, M., *Rev. Latinoam. Quím.*, (1986), **17**, 8.
44. Romo, J., Romo de Vivar, A., Ortega, A., and Díaz, E., *Rev. Latinoam. Quím.*, (1970), **2**, 1944.
45. Schloman, W., Jr., *Ind. Eng. Chem. Res.*, (1988), **27**, 712-716.
46. Setzer, W. N., Setzer, M. C., *Mini Rews. in Med. Chem.*, (2003), **3**, 540-556.
47. SMEO. Sociedad Mexicana de Oncología.
<http://www.smeo.org.mx/entcancerquees.htm>

48. SSA. Secretaria de Salud.

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm#situacion>

49. Walter, E. D., *J. Am. Chem. Soc.*, (1944), **66**, p. 419-421.

50. WHO. World Health Organization <http://www.who.int/cancer/en/>

46. Watkins, S. F., Fronczek, F. R., Chiari, G., Reynolds, G. W., Rodriguez, E., *Journal of Natural Products*, (1985), **48**, 631.

47. Zhang, S., Li, X., Zhang, F., Yang, P., Gao, X., Song, Q., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**, (2006), 3888-3895.

48. Anticancer agents from natural products. Gordon M. Cragg, Davis G. I. Kingston, David J. Newman Eds. Taylor and Francis CRC Press, London 2005.

Anexos

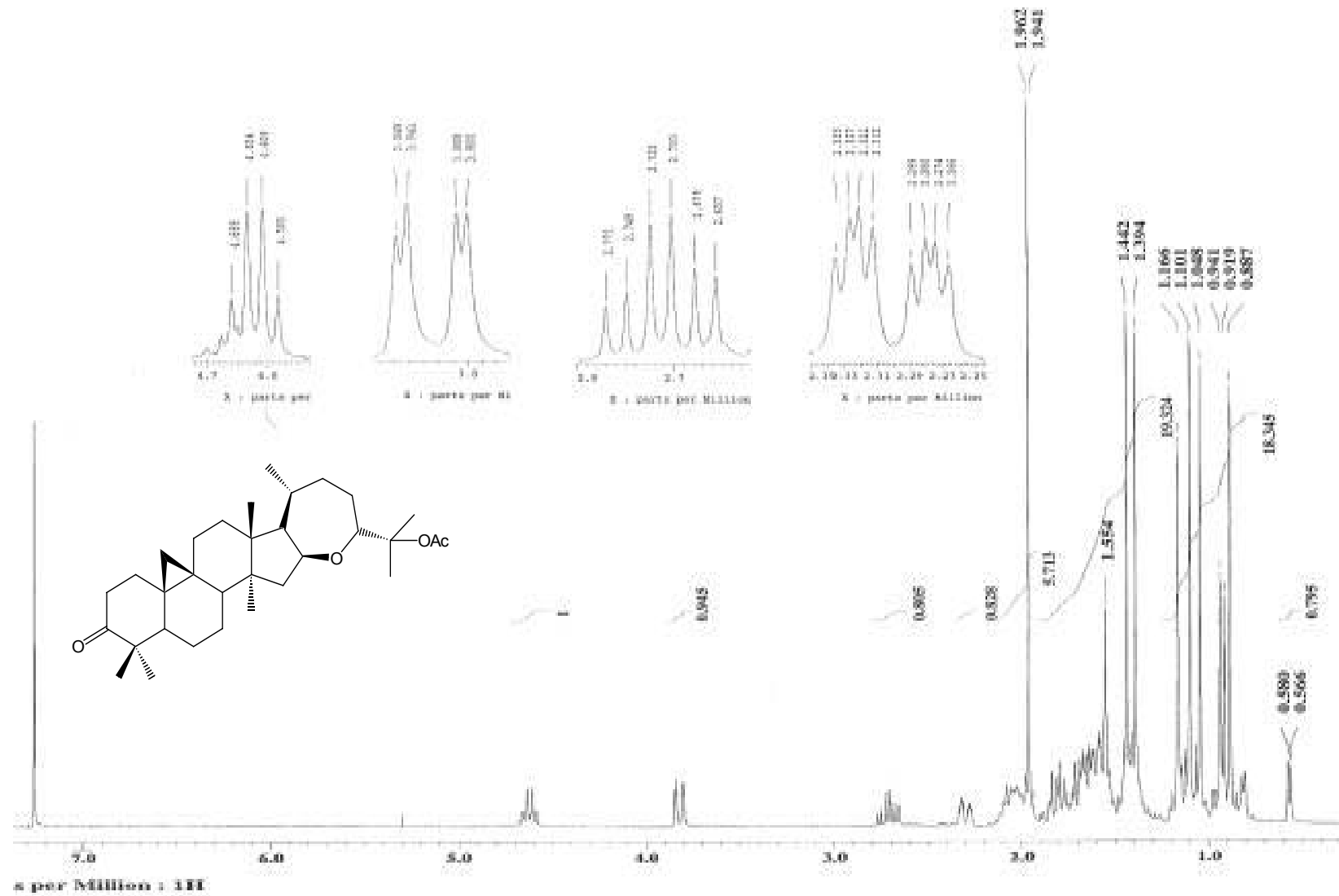


Fig. 28. Espectro de RMN 1H del acetato de argentinina B (2).

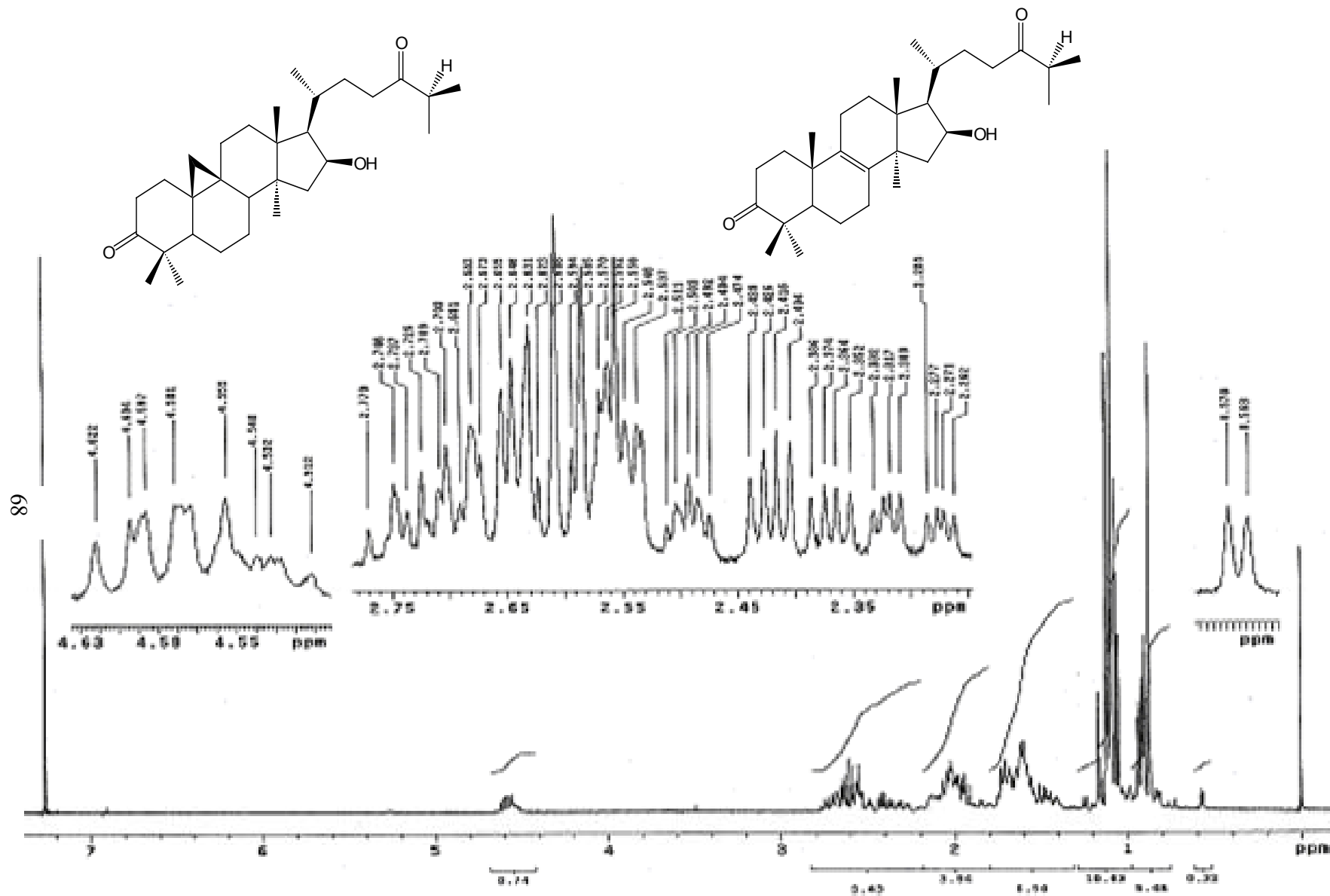


Fig. 29. Espectro de RMN ^1H de la mezcla binaria de 3 y 4.

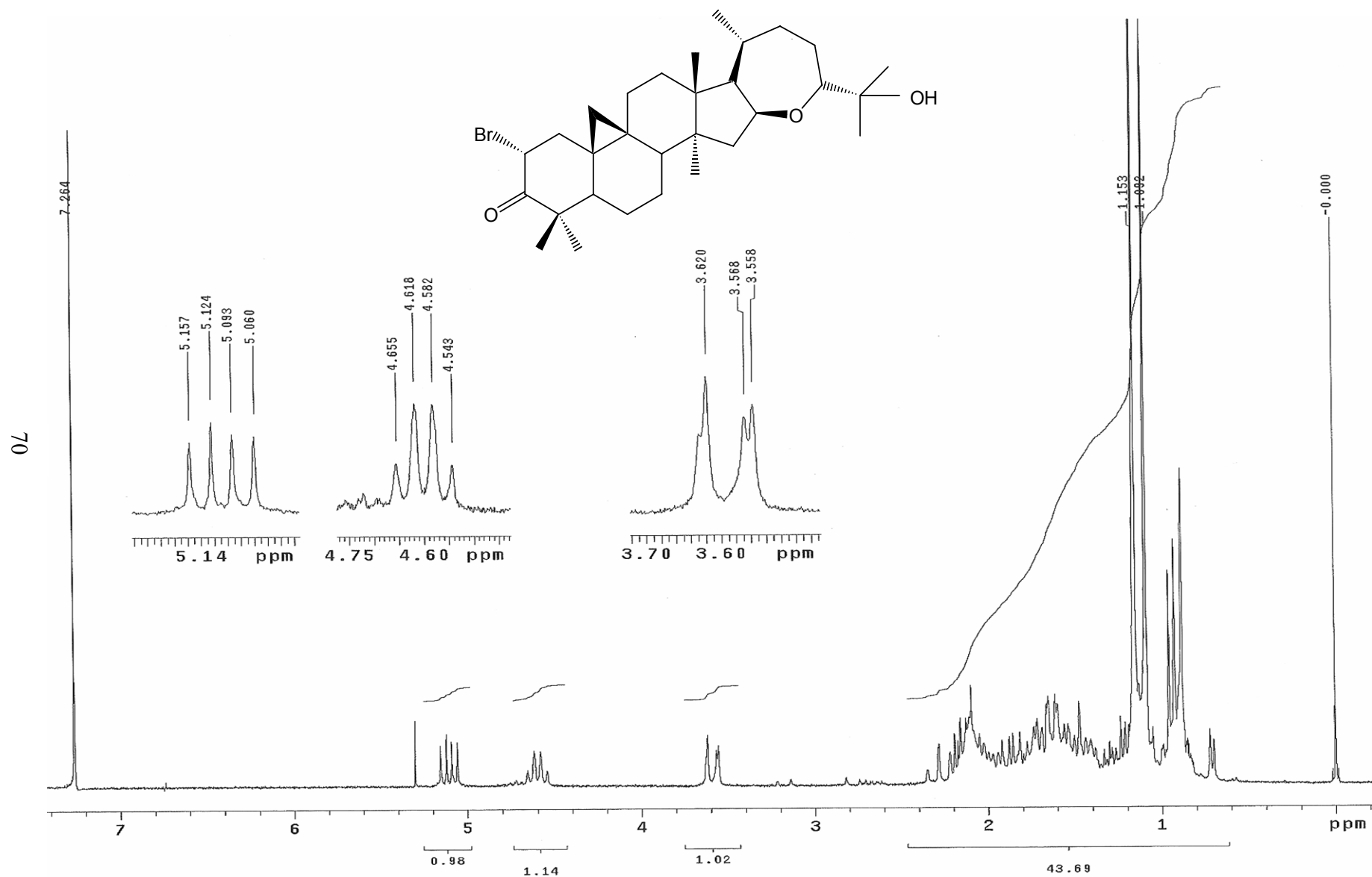


Fig. 31. Espectro de RMN ^1H de bromo argentina B (6).

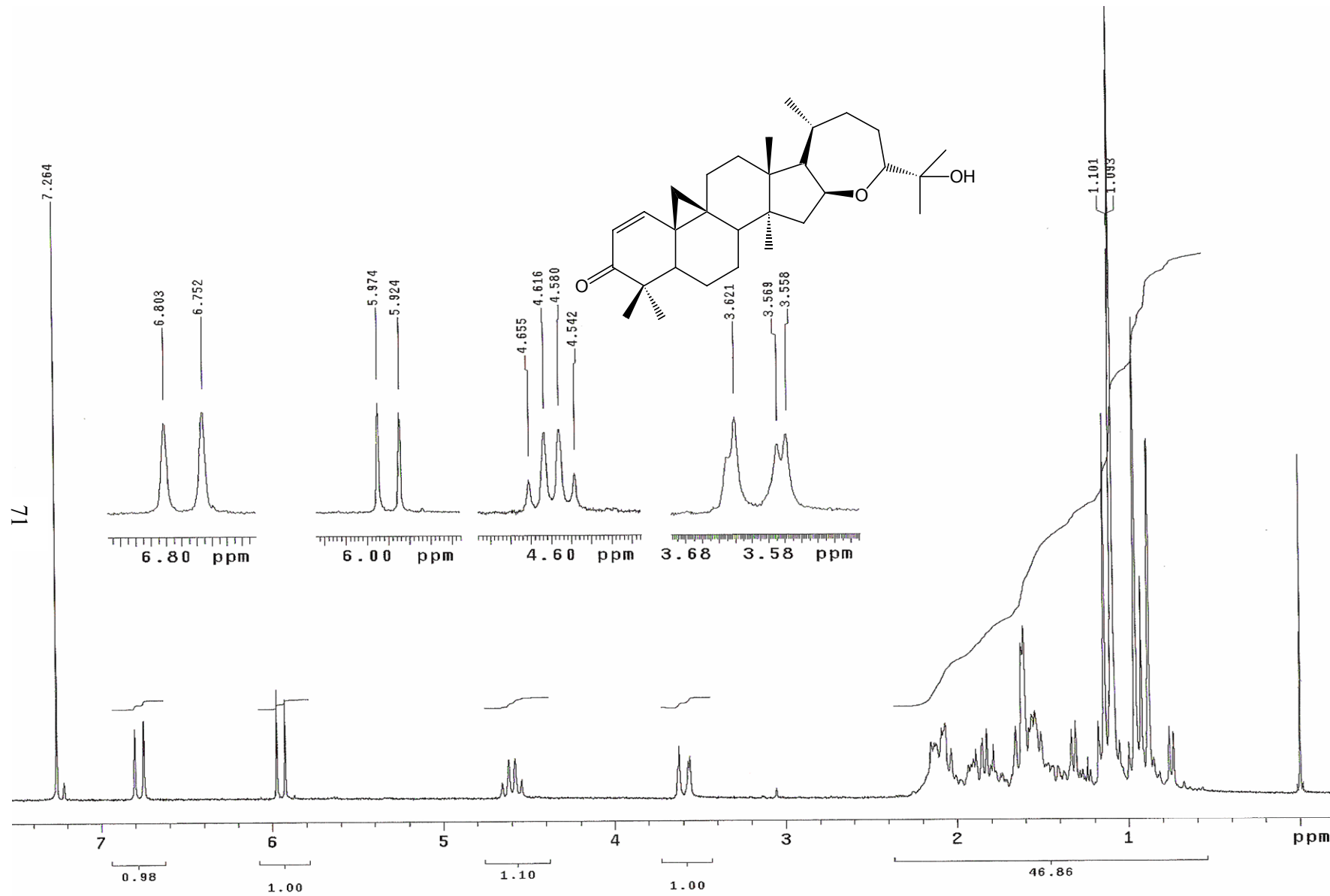


Fig. 32. Espectro de RMN ^1H de 1-en-argentatina B (7).

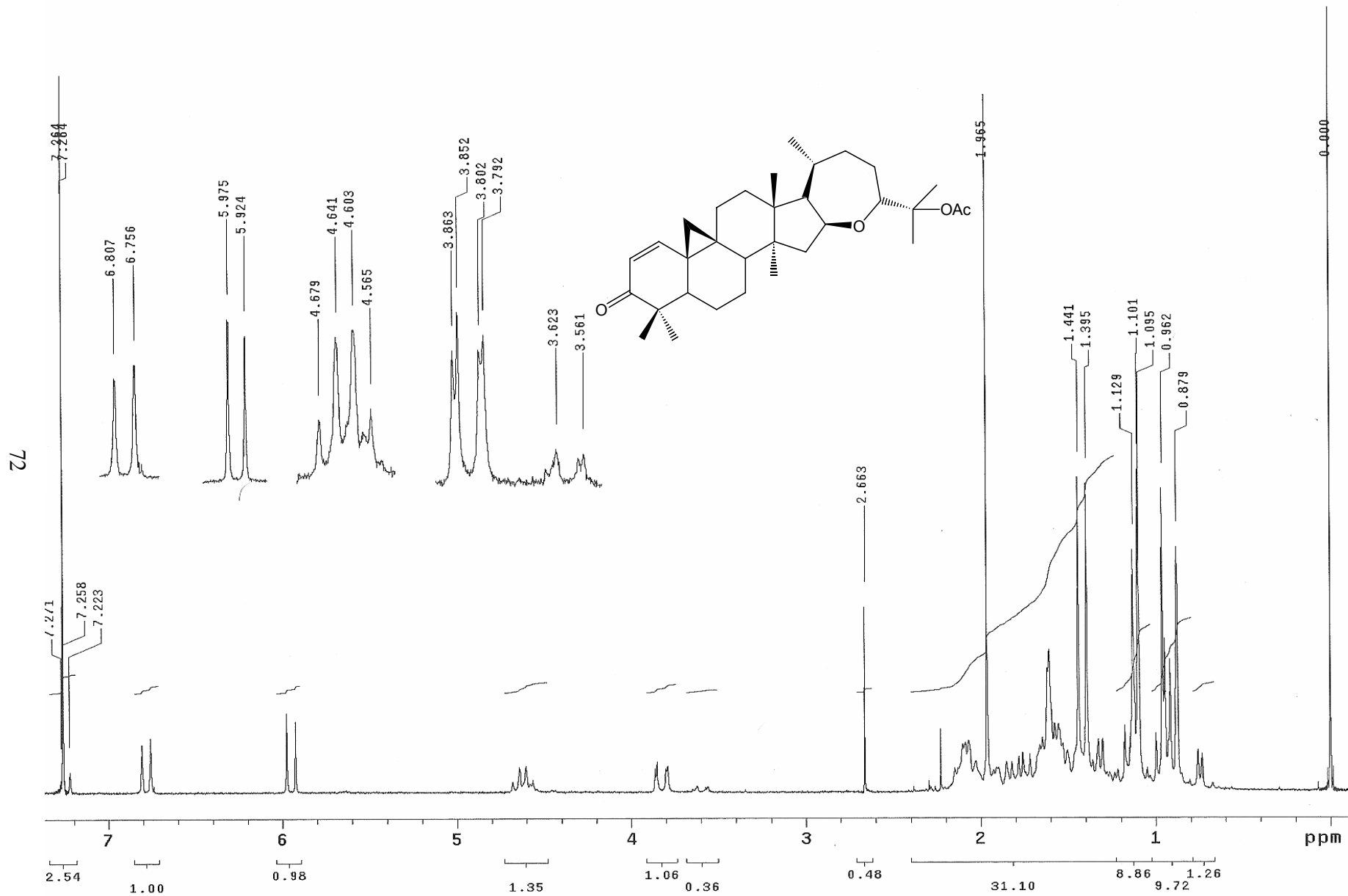


Fig. 33. Espectro de RMN ^1H de acetato de 1-en-argentatina B (**8**).

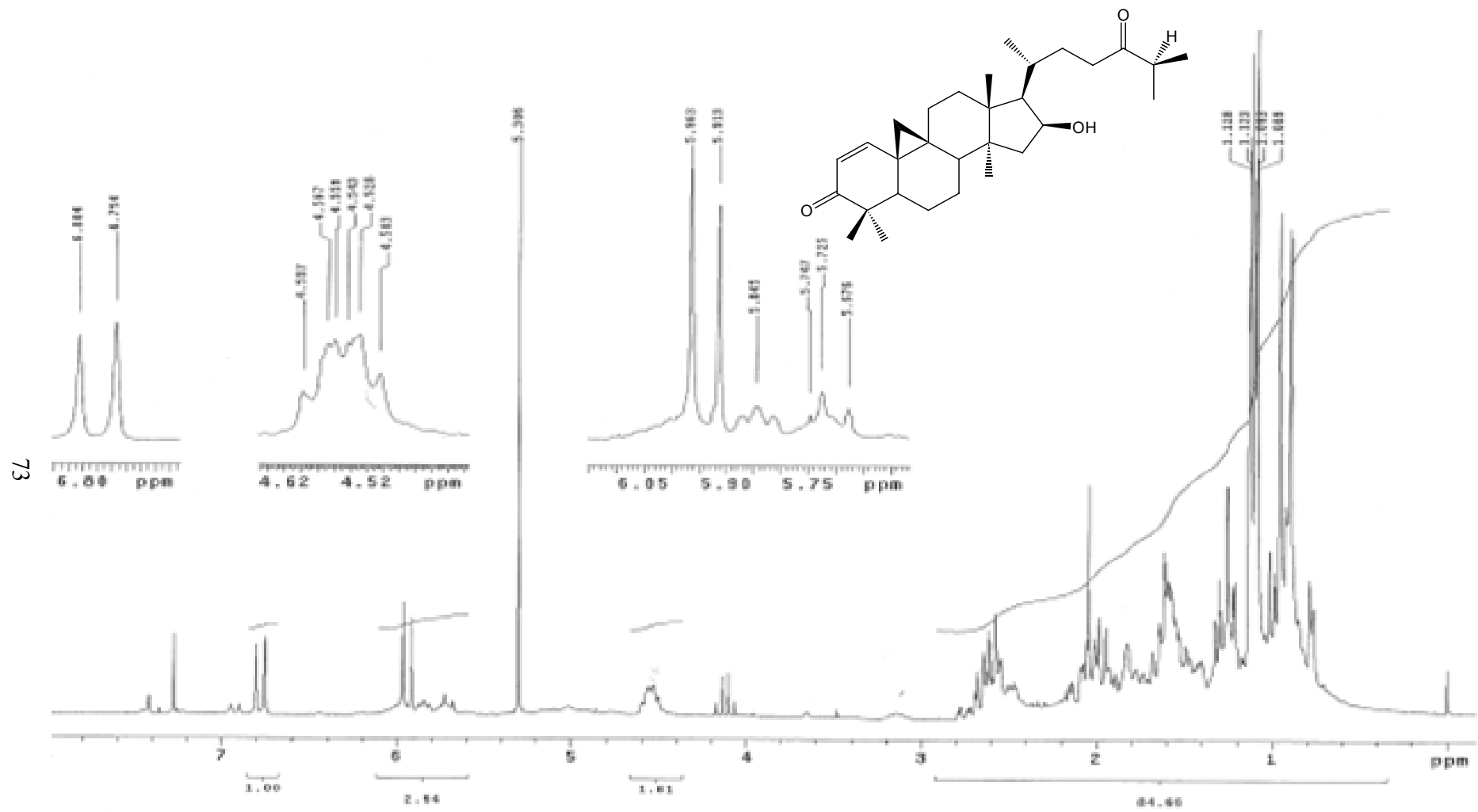


Fig. 34. Espectro de RMN ¹H de 16β-hidroxi-cicloart-1-en-3,24-diona (9)

