



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Obtención y evaluación de las propiedades citotóxicas,  
antiinflamatorias y su capacidad de inhibir la óxido nítrico  
sintasa inducible de los derivados acilados de las argentatinas  
A, B y la 7-O- $\beta$ -D-glucosil-acacetina.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JOSÉ EMANUEL ARMAS PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

ASESOR DE TESIS: M. EN C. FRANCISCO OSCAR GUADARRAMA MORALES

MEXICO, D.F

2008



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.

## *AGRADECIMIENTOS*

Agradezco muy sinceramente a mi director de tesis, el Dr. Mariano Martínez Vázquez por toda la paciencia, todo el apoyo y toda la dedicación mostrada para la realización de este trabajo y por haber creído en mí, así como mi asesor de tesis, el M. en C. Oscar Guadarrama Morales, por todo el apoyo brindado para este trabajo.

A la Dra. Parra por su gran ayuda, al Q.F.B. Cesar Luna Toledo gracias por tu gran apoyo amigo y a la Q.F.B. Martha por tu gran ayuda.

Agradezco a mis sinodales el Q.F.B. Ángel Tlapanco Ochoa, la Q. María Teresa Mendoza Mata y la M. en C. Juana Rosado Pérez por sus observaciones y aportaciones en la revisión de este trabajo.

Agradezco al departamento de Productos Naturales del Instituto de Química por las facilidades mostradas.

Agradezco a esa gran institución que es la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado mi formación académica y profesional.

## *DEDICATORIAS*

Primeramente quiero dedicar y agradecer a Dios por el haberme dado todo lo necesario para poder estar aquí, y que me permita por muchos años más el poder seguir creciendo como persona.

A mis hermanos de sangre, Sandra, Geno, Julio, Víctor y Liliana y Antonio Torres Barrientos, Jorge Ocampo, Manuel y los hermanos Soriano que son como mis hermanos, son parte de mi familia y me demuestran cada día que se puede ser mejor y a mis sobrinos Luis, Yuliana y Fernanda, que son esa lucecita de esperanza y una alegría que llena mi corazón cada día de mi vida.

A todos mis compañeros de la Fes Zaragoza, como Chuchin, Toby, Alan, Mago, Daniel Alberto Araujo, el señor Julio, Samo, Luis, Miguel, y del grupo Águila-Cóndor Erick (gordo), Legazpi, José (tocayo), Héctor (mini), Daniel (Mono), Rocha, Ana flor, Guicha, Alberto (coco), Alejandro (popeye), Fenox, Lorena, Keny, Omar, Elena, Jessica, Micha, y demás, con los que curse toda mi carrera e hicieron de paso por la facultad algo inolvidable. A todos ustedes les deseo muchísima suerte en la vida, que logren todas sus metas y recuerden que nunca los olvidare.

A mis amigos del Apolo Gym Selene, Fernando González, Fernando (el instructor), Raúl Villegas gracias por tus consejos, Raúl Mejia (Maestro), Jaime(eléctrico), Minerva, Karina, Chaparrito, Aron, la banda del chino y los que me faltaron a los que considero mis amigos de toda la vida, por estar ahí en los momentos precisos y que a pesar de todas las dificultades que la vida nos ha impuesto han sabido a mantener ese lazo de amistad que nos ha unido desde hace muchos años hasta el día de hoy y con lo cual he aprendido que lo mas importante al encontrar a un amigo, es conservarlo.

A todos mis compañeros del departamento de productos naturales que han hecho de mi estancia algo muy agradable y en los que he encontrado muy buenos amigos, como lo son el Dr. José Luís Figueroa gracias por sus sabios consejos y su gran amistad, Dr. Jardon gracias por su gran ayuda para salir adelante de mi problema, Mario que con tus consejos salí adelante, la Dr. Rosas, Q.F.B. Rodrigo gracias por tus conocimientos, Erick gracias por tu compañía, Paola, Ideni , y los que me faltaron mil gracias.

Al profesor Carlos Salvador que a pesar de su carácter duro tiene un gran corazón, gracias por todos sus valiosos consejos, al Profesor Rodolfo Carreon y Jerardo por brindarme sus conocimientos y amistad.

Y todos los profesor que me impartieron clase como son la profesora Roa, Lourdes, Reina, Celia, los profesores Jesús Betanzos, José Núñez, Marco Antonio, San Pedro, Armando Aguirre, Ramón Rodríguez, Ramón Soto, Gabriel, Oscar y todos los que me faltaron del Cbtis #6 y Fes Zaragoza mil gracias por brindarme sus conocimientos.

A mis alumnos del Cbtis numero 6 gracias por su gran apoyo niños.

A la familia Trujillo a la que considero mi segunda gran familia y como si fueran mis hermanos Jorge, Pablo, Paco, Raúl gracias por todo el apoyo incondicional y la gran amistad brindada durante muchos años.

A la familia Martínez Vázquez que en su momento me brindo todo su apoyo mil gracias.

A la familia Anaya García por su gran apoyo en todo momento mil gracias.

A la familia Berrum por todo el apoyo brindado y su gran amistad mil gracias

A una mujer muy especial, que donde quieras que estés, te agradezco muchas cosas que jamás olvidare, gracias a ti Paola y tu niña Ereidi que dios las bendiga y gracias por haber estado en mi vida.

Y a una personita muy especial en mi vida que me a apoyado en todo y ha estado conmigo con cariño, amor y respeto mil gracias por todo Verenice (flaquita).

Pero muy especialmente dedico este trabajo a las 2 personas más importantes que tengo en la vida, a mi padre Sr. Julián Alfonso Armas Ballesteros y mi Madre la Sra. Rosalina Pérez Domínguez, por todo el amor y apoyo brindado, gracias por creer en mí, finalmente quiero agradecer a todos aquellas personas que de alguna manera hicieron la terminación de este trabajo de tesis y que no las mencione. Gracias a todos.

## CONTENIDO

I. MARCO TEÓRICO.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. CÁNCER.....	4
2.1. Definición de cáncer.....	4
2.2. El cáncer como problema de salud pública.....	5
2.3. El tratamiento del cáncer.....	6
2.3.1. Quimioterapia.....	6
2.4. Principios antineoplásicos aislados de especies vegetales.....	8
3. INFLAMACIÓN.....	12
3.1. Inflamación aguda.....	12
3.2. Mediadores moleculares de la inflamación aguda.....	12
3.2.1. Prostaglandinas.....	13
3.2.2. Leucotrienos.....	14
3.3. Oxido nítrico.....	15
3.4. Reparación del daño tisular en la inflamación aguda.....	17
3.5. Inflamación crónica.....	17
3.6. Terapéutica de la inflamación.....	18
3.6.1 Fármacos antiinflamatorios esteroidales.....	18
3.6.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroidales.....	19
4. DISTRIBUCIÓN Y LIPOSOLUBILIDAD EN FÁRMACOS.....	20
5. TERPENOS.....	23
5.1. Clasificación.....	24
5.2. Origen biosintético.....	27
5.3. Triterpenos.....	28
5.3.1. Biogénesis.....	28

5.3.2. Actividad biológica.....	31
5.3.2.1. Como potenciales agentes antiinflamatorios.....	31
5.3.2.2. Como potenciales agentes anticancerosos.....	31
6. <i>Parthenium argentatum</i> .....	32
6.1. La resina.....	33
6.2. Metabolitos del guayule.....	34
6.3. Estudios previos de la actividad biológica.....	36
7. FLAVONAS.....	37
7.1. Fuentes naturales de flavonas.....	38
7.2. Tipos de flavonas.....	39
7.3. Estructura base de las flavonas.....	40
7.4. Clasificación.....	40
7.5. Actividad biológica de las flavonas.....	41
7.6. Biogénesis.....	43
7.7. Actividad moduladora en la carcinogenesis.....	45
8. <i>Agastache mexicana</i> .....	46
8.1, Usos etnomedicos.....	46
8.2. Actividad biológica.....	47
9. METODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLOGICA.....	49
9.1. Ensayos <i>in Vivo</i> .....	49
8.1.1. Modelo de edema inducido por TPA .....	49
9.2. Ensayos <i>in Vitro</i> .....	51
9.2.1. Producción de nitritos en macrófagos peritoneales en ratón.....	51
9.3. Ensayos de citotoxicidad in Vitro.....	53
II JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	55

III OBJETIVO GENERAL, PARTICULARES E HIPÓTESIS.....	57
IV SECCIÓN EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....	60
1. QUÍMICA.....	61
1.1. Material y equipo.....	61
1.1.1. Material diverso.....	62
1.1.2. Equipos.....	63
1.1.3. Reactivos para el aislamiento de los metabolitos secundarios y la preparación de los derivados.....	63
1.1.4. Reactivos pruebas biológicas.....	64
1.2. Esquema general de los derivados.....	64
1.3. Obtención del (16S, 17R, 20S, 24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan -3-ona y la 16 $\beta$ , 24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona).....	65
1.3.1. Resina.....	65
1.3.2. Aislamiento de las argentatinas [1] y [2].....	65
1.4. Obtención de los derivados de las argentatinas [1] y [2].....	66
1.4.1. Obtención del cloruro de hexadecanoilo.....	66
1.4.2. Obtención de la 16,25-dipalmitil- (16S, 17R, 20S, 24R) -20,24-epoxi-cicloartan-3-ona [3].....	67
1.4.3. Obtención de la 25-palmitil-16 $\beta$ ,24- epoxi-cicloart-1,2-en-3-ona [4].....	68
1.5. Obtención de la 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosil-acetina (glucosido de acetina) [5]... 70	70
1.5.1. Material vegetal.....	70
1.5.2. Obtención del precipitado soluble en metanol.....	70
1.5.3. Obtención de la 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosil-acetina [5].....	70
1.6. Obtención del pentacetil 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [6].....	71
2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	73
2.1. Métodos <i>in Vivo</i> .....	73
2.1.1. Modelo de edema inducido por TPA.....	73
2.1.1.1. Procedimiento.....	74

2.1.1.2. Resultados.....	75
2.2. Métodos <i>in Vitro</i> .....	76
2.2.1. Producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón	76
2.2.1.1 Procedimiento.....	76
2.2.1.1.1. Aislamiento y cultivo primario de macrófagos...	76
2.2.1.1.2. Producción del óxido nítrico.....	76
2.2.1.1.3. Determinación del óxido nítrico.....	77
2.2.1.1.4. Viabilidad celular.....	78
2.2.1.2. Resultados.....	79
2.3. Ensayo de citotoxicidad.....	79
2.3.1. Condiciones generales.....	79
2.3.2. Procedimiento.....	80
2.3.3. Resultados.....	81
V DISCUSIÓN.....	83
2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	96
2.1. Modelo inducido por TPA.....	96
2.1.1. Actividad de las argentatinas A, B, la 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosil-acetina y sus derivados acilados.....	96
2.2. Modelo de producción de óxido nítrico.....	97
2.2.1. Actividad de las argentatinas A, B, la 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosil-acetina y sus derivados acilados.....	97
2.3. Citotoxicidad en líneas celulares por las argentatinas A, B, y la 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosil-acetina y sus derivados acilados.....	98
VI CONCLUSIONES.....	100
VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	116
ESPECTROS	

# *I. MARCO TEÓRICO*

## 1. INTRODUCCIÓN.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente tres cuartas partes de la población mundial recurre a los remedios tradicionales, para la procuración de la salud principalmente de especies vegetales. La importancia de las especies vegetales como agentes terapéuticos es relevante ya que, suelen ser la materia prima o los constituyentes activos de casi en un 30 por ciento del arsenal farmacéutico actual. Algunos ejemplos son la aspirina, la atropina, la efedrina, la digoxina, la morfina, la quinina, la reserpina, la tubocurarina y el taxol todos provenientes de especies vegetales (Anwarul y Atta-ur-Rahman, 2005).

En México, se han utilizado las especies vegetales con fines terapéuticos, estableciéndose una fuerte tradición, de tal forma que el uso de especies vegetales con fines terapéuticos constituye un rasgo cultural de la sociedad mexicana (Martínez 1996).

Sin embargo, la mayoría de estas especies no se les han realizado estudios químicos o farmacológicos que avalen las propiedades que se les atribuyen en medicina folklórica. Esto explica que en ocasiones los resultados obtenidos de su uso no sean satisfactorios (Jiménez *et al.*, 2000). Por otro lado, México es un país con una extensa diversidad de climas que originan una riqueza de la flora, la fauna y así como una variada micología.

En México, el cáncer constituye un problema de salud pública. Una de las principales estrategias para el tratamiento terapéutico o paliativo del cáncer lo constituye la quimioterapia. Aunque existen varios fármacos anticancerosos en la clínica, la poca selectividad de éstos así como el desarrollo de la resistencia de las células cancerosas a los diferentes fármacos hace imperiosa la necesidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento del mismo.

A través del tiempo, los productos naturales han contribuido de manera importante para el descubrimiento y desarrollo de fármacos anticancerosos, entre ellos podemos mencionar, los alcaloides vinblastina y vincristina aislados de *Cantharantus roseau*, o los derivados semisintéticos irinotecan y etoposido provenientes de la epipodofilotoxina o el taxol

aislado del *Taxus brevifolia*, todos ellos usados hoy en día en la clínica (Mann 2002; Chabner y Roberts 2005; Cragg y Newman 2005).

Por otra parte, la inflamación es un mecanismo fisiológico de defensa en respuesta a la presencia de un agente xenobiótico. Este proceso comprende una serie de eventos que inician con el aumento en la permeabilidad vascular, la salida de fluidos y proteínas sanguíneas y la infiltración preferente de leucocitos. Estas células en coordinación con otras producen una variedad de moléculas que regulan, mantienen y concluyen la inflamación tras la remoción del agente causal (Cirino, 1998).

La terapéutica de la inflamación comprende el uso de fármacos de tipo esteroidal y no esteroidal. Los glucocorticoides, cuya naturaleza es esteroidal, inhiben la transcripción de genes proinflamatorios y suprimen la respuesta inmune (Adcock, 2000). En tanto, los fármacos no esteroidales inhiben la enzima ciclooxigenasa (COX) entre otras, sin embargo, se asocian con complicaciones de tipo gastrointestinal y renal (Fung *et al.*, 1999).

El óxido nítrico, es un radical sin carga con un electrón no apareado, la ausencia de carga permite su libre difusión a través de las membranas y, en particular, el electrón desapareado le confiere una gran reactividad y rápida conversión *in vivo* en especies reactivas derivadas de nitrógeno (ERN). Estas moléculas lipofílicas poseen gran capacidad de difusión y por lo tanto interaccionan con una variedad de moléculas y de enzimas.

El óxido nítrico también tiene otras funciones como por ejemplo regulan de manera endógena diferentes procesos fisiológicos, como el control de la presión sanguínea, la neurotransmisión, la agregación plaquetaria y la acción citostática de los macrófagos (Wink y mitchell, 1998; Davis *et al.*, 2001).

Aparte en una estrategia de búsqueda de nuevos principios activos, los triterpenos atraen la atención por sus propiedades citotóxicas y antiinflamatorias (Martínez y Parra 2007), al igual que las flavonas por sus efectos antiinflamatorios (R. Estrada R. *et al* 2004),

## 2. CÁNCER.

### 2.1. Definición.

Existen numerosos textos y referencias que intentan definir el cáncer, sin embargo 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 (Figura 1).

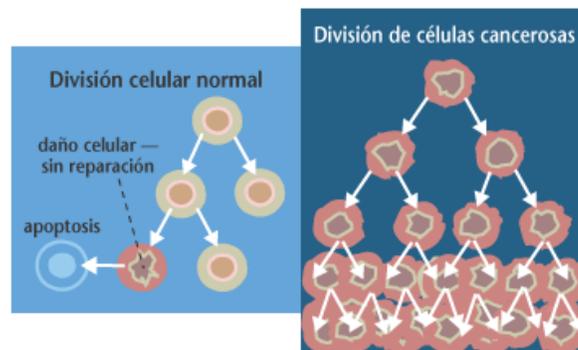


Fig. 1. Proceso tisular de células normales y anormales.

El cáncer se origina en cualquier tipo de célula y no se puede considerar como una enfermedad, sino que en realidad es un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen.

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. 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).

## 2.2. 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, seis millones morirán. Esta cifra representa el 12 por ciento 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 2, 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.

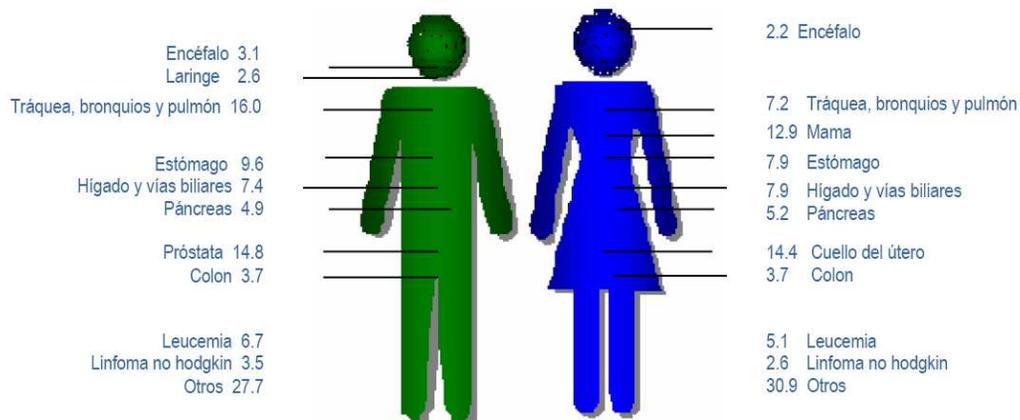


Fig. 2. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México durante el año 2002.

## **2.3. 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.

### **2.3.1. 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 linfóide 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, éste 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. y Roberts T. 2005) (Bertino en Browman y Rand 1984). No obstante de que los primeros resultados utilizando quimioterapia en contra del cáncer fueron limitados, fue 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 y Roberts 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 (tabla 1), 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 por ciento. 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).

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 derivados</i>
Actinomicina D	Vincristina, Vinblastina
Doxorrubicina, daunorrubicina	Vinorelbina, Etopósido, Tenipósido
Epírrubicina, Bleomicina	Paclitaxel, Docetaxel

---

	Derivados de la camptotecina
<i>Diversos</i>	<i>Hormonas</i>
L- Asparaginasa	Glucocorticoides
Hidroxiureas	Tamoxifeno
	Agentes progestacionales
	Agentes antiandrógenos

---

## 2.4. Principios antineoplásicos aislados de especies vegetales.

Se ha reconocido que las llamadas plantas medicinales constituyen el principal recurso terapéutico y en ocasiones la única fuente de alivio en 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 por ciento de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Parra 2006).

Se calcula que los metabolitos secundarios de origen vegetal representan alrededor del 50 por ciento de los fármacos de uso clínico en países desarrollados y de estos el 25 por ciento derivan de plantas superiores como la Vincristina y la Vinblastina (Figura 4) (Calabresi y Chabner en Hardman y cols. 1996; Cragg y Newman 2005, Laza y Rodríguez 2003). Aparte 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 especie de interés.

En 1982, se publicaron aproximadamente 3000 especies de plantas que etnomedicamente 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 3).

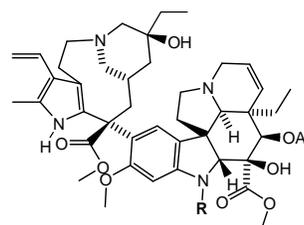
Esta especie había sido referida como hipoglucémica; sin embargo, cuando se estudiaron sus efectos farmacológicos se encontró que provocaba granulocitopenia y depresión de la

médula ósea de la rata. Investigaciones posteriores, 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 4). Los dos primeros, se convirtieron en agentes clínicamente importantes para el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer testicular (Calabresi y Chabner en Hardman y cols. 1996; Cragg y Newman 2005).



Fig. 3. *Catharanthus roseus* L.



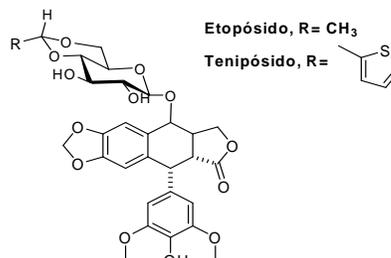
Vinblastina, R= CH<sub>3</sub>  
Vincristina, R=CHO

Fig. 4. Metabolitos aislados de *Catharanthus roseus* L.

Otro ejemplo lo constituye el *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 5). A partir de esta planta, se aisló la podofilotoxina, de la cual, se obtuvieron dos glucósidos semisintéticos, el etopósido y el tenipósido (Figura 6), los cuales tienen aplicación en el cáncer testicular y en el carcinoma de células pequeñas del pulmón.



Fig. 5. *Podophyllum peltatum*



Etopósido, R= CH<sub>3</sub>  
Tenipósido, R= 

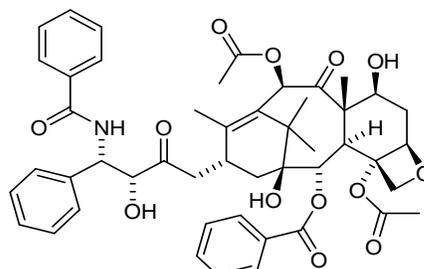
En la década de los años 60 se realizó una evaluación masiva de las propiedades citotóxicas de cientos de extractos de especies vegetales por el Instituto Nacional del

Cáncer de Estados Unidos (EUA). Como un resultado de esta búsqueda, se descubrió las propiedades citotóxicas del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) (Figura 7). 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).



Fig. 7. *Taxus brevifolia*

El taxol hoy comercializado con el nombre de paclitaxel (Figura 8) 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).



**Taxol (Paclitaxel).**

Fig. 8. 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 9). Este último empleado en Francia para el tratamiento del cáncer de mama (Cragg y Newman 2005).

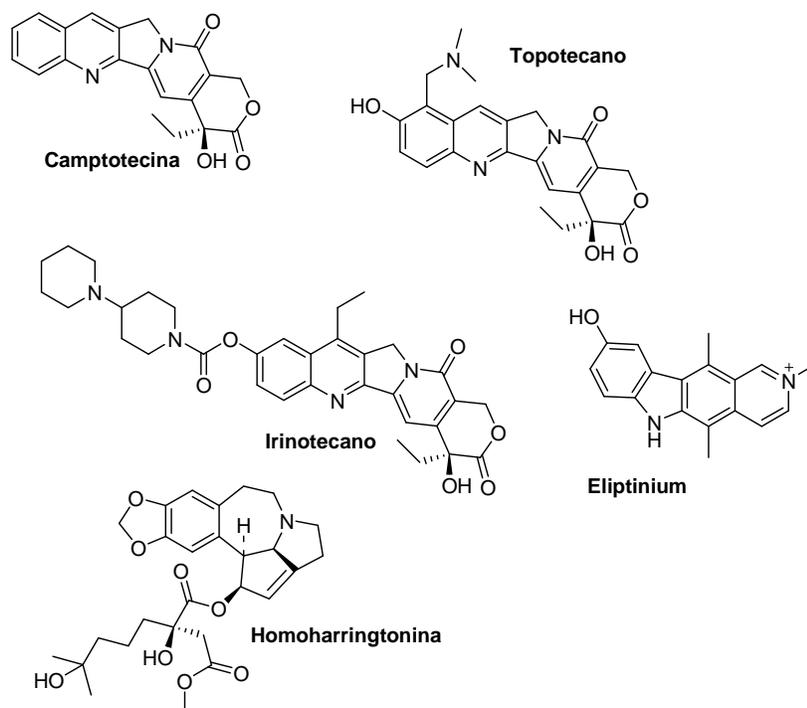


Fig. 9. Compuestos de origen natural y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer.

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 estos 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-Delgado 2006). Como era de suponer, los mecanismos de acción involucrados en la actividad citotóxica de estos grupos de compuestos son muy variados.

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

### 3. INFLAMACIÓN

La inflamación se desarrolla como parte de los mecanismos de defensa del organismo en respuesta a estímulos de naturaleza diversa. Estos pueden ser externos, como traumatismos mecánicos y productos químicos; o internos, como lesiones provocadas por procesos isquémicos, patogénicos (virus, parásitos y bacterias) autoinmunes, entre otras.

La inflamación se localiza generalmente en el tejido conectivo, en donde ocurre la degeneración de las paredes de los vasos sanguíneos y se produce un incremento en la permeabilidad. Estos eventos conducen a una extensa salida de plasma y células, que luego penetran en el espacio intersticial y migran hacia la zona dañada. A nivel macroscópico, el proceso se manifiesta por la presencia de eritema, edema, calor y dolor. Estas expresiones clínicas fueron distinguidas por Celso (siglo I *d. C*) como signos cardinales de la inflamación. Virchow (siglo XIX *d. C.*) sumó un signo más, refiriendo la pérdida de la función tisular (Nathan, 2002).

#### 3.1. Inflamación aguda.

La inflamación aguda contribuye con la eliminación de células muertas, la neutralización de infecciones locales y la promoción de la acción del sistema inmune. La respuesta aguda se controla por mediadores celulares y moleculares. Los componentes celulares incluyen células endoteliales, eosinófilos, neutrófilos, monocitos-macrófagos, mastocitos-basófilos, linfocitos y plaquetas. En tanto los mediadores de la inflamación comprenden las proteasas plasmáticas, incluidas los sistemas de complemento, de cininas y de coagulación; los mediadores lipídicos, como las prostaglandinas, los leucotrienos y el factor activador de plaquetas; los neuropeptidos y las aminas vasoactivas; las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno; y las citocinas (Espinosa *et al.*, 2004).

#### 3.2. Mediadores moleculares de la inflamación aguda.

Desde que la histamina se sugirió como mediador se ha descrito un sin número de moléculas de naturaleza y orígenes diversos, quienes son responsables de las distintas fases y manifestaciones de la inflamación (Espinosa *et al.*, 2004). La inflamación inicia con fenómenos vasculares y de reclutamiento vascular. Durante las primeras horas (6-24h), los

leucocitos poliformonucleares (LPMN), en especial los neutrófilos se encuentran en permanente actividad.

Después, son reemplazados por los monocitos, que al diferenciarse en macrófagos actúan en la fagocitosis y digestión de cuerpos extraños y residuos celulares. Lo anterior a través de la liberación de una variedad de productos tóxicos, como enzimas hidrolíticas y proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Lawrence *et al.*, 2002). Cuando el endotelio vascular se dilata, aumenta la permeabilidad, el flujo sanguíneo y la afluencia de componentes plasmáticos y celulares hacia la zona afectada. Las aminas (histamina y serotonina) participan en la regulación del tono vasomotor endotelial.

Son varias las moléculas que intervienen en la inflamación; sin embargo, las prostaglandinas, los leucotrienos y el óxido nítrico han sido considerados como las moléculas más activas durante el proceso. La producción de estas moléculas se promueve por el factor de activación nuclear tipo kappa B (NF-kB). Los mecanismos y funciones biológicas que desempeñan estos mediadores, así como la importancia de NF-kB en la inflamación se describen en los siguientes párrafos.

### **3.2.1. Prostaglandinas.**

Las prostaglandinas son los autacoides más abundantes y se encuentran prácticamente en todos los tejidos y fluidos del organismo. Su producción se incrementa por una variedad de estímulos y su espectro de acción es muy variado. Desde hace años se ha visto que la inhibición de su síntesis es una opción terapéutica antiinflamatoria muy interesante (Espinosa *et al.*, 2004).

Las ciclooxigenasas (COX) son las enzimas responsables de la producción de prostaglandinas. Se ubica en la membrana microsomal y nuclear, catalizan tanto la ciclación del ácido araquidónico a prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) como su conversión inmediata en prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Este endoperóxido es sustrato de varias isomerazas específicas (Fung y Kirschenbaum, 1999). La sintasa de prostaciclina convierte a PGH<sub>2</sub> en prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), la cual participa en la vaso dilatación y en la inhibición

de la agregación plaquetaria. En tanto la sintasa de tromboxano transforma a  $\text{PGH}_2$  en tromboxano. Así que posee acciones opuestas a las de  $\text{PGI}_2$ .

También, a partir de la  $\text{PGH}_2$  y por la acción de tres sintasa, se originan las prostaglandinas  $\text{D}_2$ ,  $\text{E}_2$  y  $\text{F}_{2\alpha}$ . En procesos alérgicos, los mastocitos liberan la  $\text{PGD}_2$ , este mediador posee funciones similares a la prostaciclina  $\text{PGI}_2$ , además actúan en los receptores del dolor. La  $\text{PGE}_2$  activa a los leucocitos y las plaquetas, produce broncoconstricción por su acción sinérgica junto con bradicinina, IL-1 e histamina y promueve la fiebre, el edema y el eritema. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  posee su acción principal en la vasoconstricción (Malgor y Valsecia, 2000; smith *et al.*, 2000).

Existen dos isoformas de ciclooxigenasa COX-1 y la COX-2. La COX-1 está presente en casi todas las células del organismo, con excepción de los hematíes. Esta enzima constitutiva es responsable de la producción permanente de prostaciclina  $\text{PGI}_2$ . Las prostaglandinas derivadas de COX-1 controlan el flujo y la distribución sanguínea renal, la reabsorción de sodio y agua así como la liberación de renina (Malgor y Valsecia, 2000; Smith *et al.*, 2000; Espinos *et al.*, 2004).

En tanto la COX-2 no está presente en condiciones normales, no obstante, se sospecha su existencia en el cerebro. Esta enzima se induce únicamente en la inflamación, como respuesta a citocinas proinflamatorias (IL, IL-6 y FNT- $\alpha$ ); algunos factores de crecimiento y el lipopolisacárido (LPS). Su expresión se inhibe por citocinas antiinflamatorias y fármacos esteroidales (Malgor y Valsecia, 2000; Espinos *et al.*, 2004).

### **3.2.2. Leucotrienos.**

Reciben este nombre porque se forman en los leucocitos y tienen en su molécula, de 20 átomos de carbono, tres dobles uniones conjugadas. Al igual que las prostaglandinas, derivan del ácido araquidónico, por la acción enzimática de la 5-lipooxigenasa (Espinos *et al.*, 2004). Las lipooxigenasas (LO) son enzimas citosólicas que incorporan una molécula de oxígeno en la estructura del ácido araquidónico. Dependiendo de la posición en la cual producen la oxigenación, existen tres formas en la estructura del ácido araquidónico: 5-LO, 12-LO y 15-LO. Los productos correspondientes son los hidroperóxidos (HPETEs): 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE.

La 5-LO es la enzima más importante, se localiza principalmente en los neutrófilos, los eosinófilos, los macrófagos y los mastocitos. La enzima inactiva se transloca hacia la membrana nuclear, en donde interacciona con su proteína activadora, posteriormente, produce el 5-HPETE. Éste nuevamente es sustrato de 5-LO y, se transforma en un epóxido inestable y muy reactivo, el leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Dicho intermediario puede convertirse en LTB<sub>4</sub>; o conjugarse con una molécula de glutatión, originando el LTC<sub>4</sub>. Este último, por la pérdida sucesiva de residuos de aminoácidos, se transforma en LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Alternativamente, el 5-HPETE por la acción de una peroxidasa de glutatión, se convierte en 5-HETE, de acciones quimiotáctica y mitogénica (Titos 2004). El LTB<sub>4</sub> estimula la quimiotaxis, adhesión celular, producción del ion superóxido y liberación de enzimas hidrolíticas de neutrófilos. Los LTs C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub> se conocen cisteinil-LTs y tienen acción en la constricción de vasos sanguíneos (Malgor y Valsecia 2000; Espinos *et al.*, 2004).

### 3.3. Oxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) (Figura 10), por la ausencia de carga permite su libre difusión a través de las membranas y, en particular, el electrón le confiere una gran reactividad y rápida conversión *in vivo* en especies reactivas derivadas de nitrógeno (ERN). Estas moléculas lipofílicas poseen gran capacidad de difusión y, por lo tanto interaccionan con una variedad de moléculas y de enzimas. El óxido nítrico es un importante regulador endógeno de diferentes procesos fisiológicos, como el control de la presión sanguínea, la neurotransmisión, la agregación plaquetaria y la acción citostática de los macrófagos (Wink y mitchell, 1998; Davis *et al.*,2001).

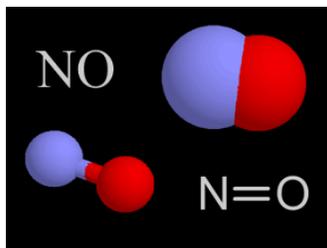


Fig. 10. Estructura del óxido nítrico

La sintetasa produce NO catalizando la oxidación de cinco electrones del nitrógeno guanidina de L-arginina (L-Arg). La oxidación de L-Arg a L-citrulina ocurre en dos vías

sucesivas de reacciones de monooxigenación, produciendo  $N^{\omega}$ -hidroxi-L-arginina (NOHLA) como intermediario. Dos moles de  $O_2$  y 1,5 moles de NADPH se consumen por mol de NO formado (Figura 11). La síntesis de óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la reacción entre el oxígeno y el aminoácido L-arginina y producen el NO y la citrulina. Existen tres isoformas de esta enzima: la neuronal (NOSn), la inducible (NOSi) y la endotelial (NOSe). Las formas constitutivas (NOSe y NOSn) se encuentran en células endoteliales y en algunas neuronas, respectivamente. Sin embargo, también se localizan en plaquetas, LPMN y células de músculo cardiaco. Estos subtipos se encargan de la producción basal del NO responsable de la integridad endotelial, la función de macrófagos y fagocitos se inhiben por los glucocorticoides (Moncada *et al.*, 1991). El NO producido por esta vía es un vasodilatador potente, promueve la permeabilidad vascular y la producción de prostaglandinas, asimismo, posee acción tóxica contra bacterias, hongos, parásitos y otros agentes patógenos. Sin embargo, el NO y sus metabolitos también regulan mecanismos de defensa y promueven la reconstrucción del tejido dañado. Por lo anterior, el NO es una molécula moduladora de la inflamación (Wink y Mitchell, 1998; Wu, 2004).

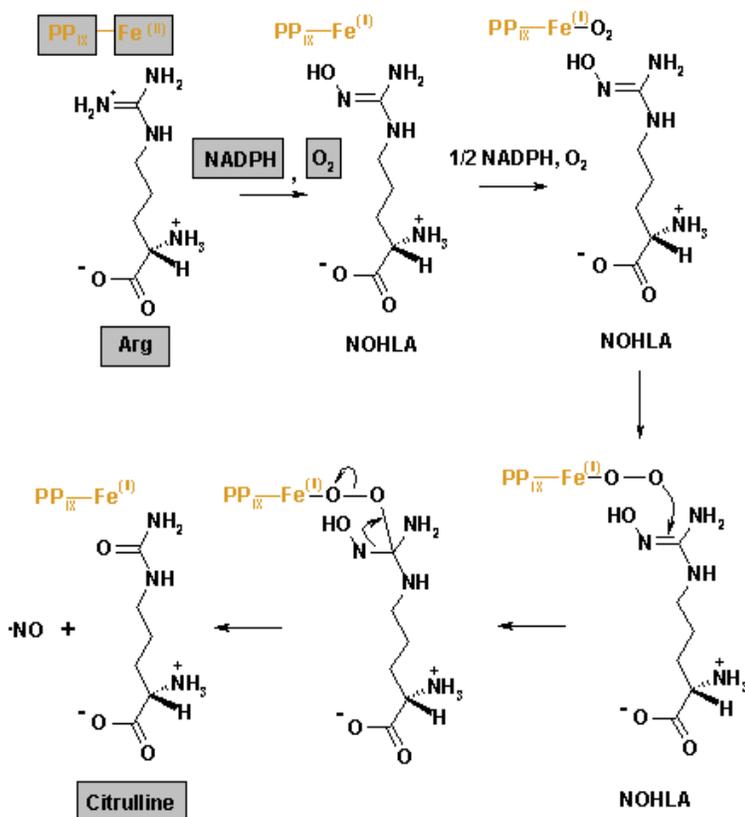


Fig. 11. Biosíntesis del óxido nítrico.

### **3.4. Reparación del daño en la inflamación aguda.**

Con la acción de los mediadores celulares y moleculares proinflamatorios se logra controlar el estímulo, de manera que comienzan a operar los mecanismos de reparación de los tejidos dañados. Las fases de regeneración y cicatrización están al cargo principalmente de macrófagos y neutrófilos, quienes además producen y liberan los factores de crecimiento tisular. (Lawrence *et al.*, 2002). La estructura y la función normal del tejido se restablecen por la presencia de células nuevas. La reconstrucción del tejido dañado se caracteriza por el recubrimiento de células del tejido conectivo (fibroblastos y células endoteliales). El mecanismo comprende cuatro etapas: la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis); la migración y la proliferación de fibroblastos; la exudación y el depósito de fibrina en la matriz extracelular; y el desarrollo y la organización del tejido fibroso (Lawrence *et al.*, 2002).

### **3.5. Inflamación crónica.**

La inflamación crónica es una respuesta prolongada con evidentes signos de inflamación activa y notable destrucción tisular. De manera simultánea y descontrolada funcionan los mecanismos de aislamiento, destrucción y eliminación del xenobiótico y de reparación del tejido dañado.

La inflamación crónica puede ser consecuencia de una respuesta aguda, por la permanencia del xenobiótico, la disfuncionalidad de algunos medios antiinflamatorios endógenos. Otras causas pueden ser las infecciones persistentes, la exposición constante a agentes tóxicos y autoinmunes. La evolución persistente descontrolada de la inflamación constituye el origen de una variedad de enfermedades, como el reumatismo, el asma, la esclerosis múltiple, la arterosclerosis, la osteoporosis, el cáncer y otras. Por lo tanto, la regulación de los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación resulta de gran interés terapéutico (Nathan, 2002).

### **3.6. Terapéutica de la inflamación.**

Las estrategias terapéuticas de la inflamación se han abordado considerando la diversidad de mediadores celulares y moleculares. Desde hace algunos años se tenía la esperanza en la manipulación farmacológica de las citocinas proinflamatorias, como el factor FNT- $\alpha$ ; las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, quimiocinas y otras. Sin embargo, la modulación de éstas no ha solucionado el problema. El descubrimiento de ciertas citocinas de acción antiinflamatorias (como la IL-4 y la IL-10) ha permitido conocer los mecanismos de acción de algunos fármacos antiinflamatorios. También, se ha dirigido la atención hacia las enzimas: fosfolipasa A<sub>2</sub>, ciclooxigenasa, lipooxigenasa y sintasa de óxido nítrico, las cuales tienen una participación activa en los procesos inflamatorios. Los estudios acerca de los isoformas inducibles de la COX y la NOS han ampliado las expectativas de encontrar fármacos antiinflamatorios eficaces. Aunque el control terapéutico de la inflamación no se ha logrado por completo y aun es un reto por conquistar, hoy en día en la clínica se utilizan principalmente los fármacos antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales (Espinosa *et al.*, 2004).

#### **3.6.1. Fármacos antiinflamatorios esteroidales.**

Los glucocorticoides (GCs) representan un grupo de sustancias esteroideas de acción antiinflamatoria endógena. Los GCs son hormonas de acción endocrina producidas en la corteza suprarrenal. Éstos se encargan del mantenimiento de la glucemia y la tensión arterial normal, así mismo modulan procesos de inmunidad, inflamación y de adaptación por el estrés (Borne, 1995; Adcock, 2000; Newton, 2000).

Ciertos receptores hormonales citoplasmáticos específicos reconocen y se unen con los GCs. Posteriormente, el complejo receptor-GC se dirige hacia el núcleo y antagoniza la transcripción de genes para moléculas proinflamatorias. También, los GCs inducen la expresión de anexina-1 (olipocortina-1), quien inhibe la producción de prostaglandinas e impide la migración de neutrófilos y de monocitos. Otras acciones de los GCs son el efecto inmunosupresor de linfocitos T y la inhibición de la mitosis celular (Adcock, 2000; Newton, 2000). Sin embargo, los GCs producen una gran variedad de efectos secundarios, como la exacerbación de los niveles sanguíneos de glucosa, insulina y lípidos; la inhibición

de la acción de la hormona antidiurética, con incremento en la eliminación de agua; la acción mineralocorticoide con retención de sodio y eliminación de potasio y la producción de hipertensión arterial (Espinosa *et al.*, 2004). El cortisol es un glucocorticoide prototipo precursor de fármacos muy activos, como la betametasona, la dexametasona y la triamcinolona (Figura 12). Éstos GCs no producen efectos mineralocorticoides (Borne, 1995).

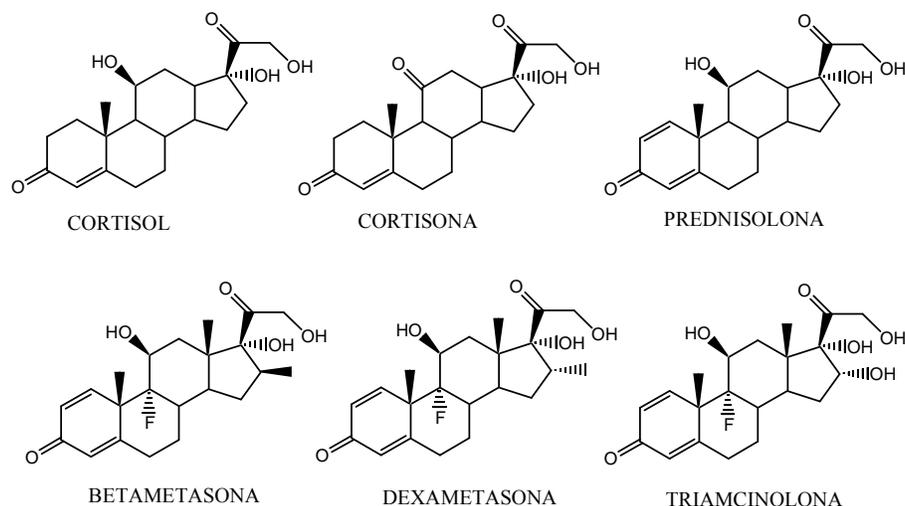


Fig 12. Algunos fármacos antiinflamatorios esteroidales. (Tomada de Borne, 1995).

### 3.6.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroidales

Los antiinflamatorios no esteroidales (AINES) constituyen un grupo de fármacos químicamente heterogéneos (Figura 13) con acciones analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. También, pueden ser antiagregantes plaquetarios y uricosúrico.

Los AINES son ampliamente utilizados en la terapéutica general, incluyendo patologías del aparato locomotor como artrosis, artritis reumatoide, trastornos músculoesqueléticos; así como fiebre, cólicos nefríticos y biliares, cefaleas, dismenorrea, traumatismos, entre otros. El mecanismo de acción principal de los AINES clásicos consiste en la inhibición de la COX. Sin embargo, se ha asociado con complicaciones como la enfermedad ulcerosa péptica, la hemorragia digestiva y la insuficiencia renal (Espinosa *et al.*, 2004).

Dependiendo de su selectividad por las dos isoformas de COX, los AINES se han clasificado en cuatro grupos: a) selectivos a COX-1, se incluye solamente la aspirina, en dosis bajas; b) no selectivos a COX, abarcan los fármacos de AINES clásicos, como

ibuprofeno, indometacina, piroxicam, entre otros; c) selectivos moderadamente a COX-2, como salicilatos y meloxicam; y d) muy selectivos a COX-2, como celecoxib y rofecoxib.

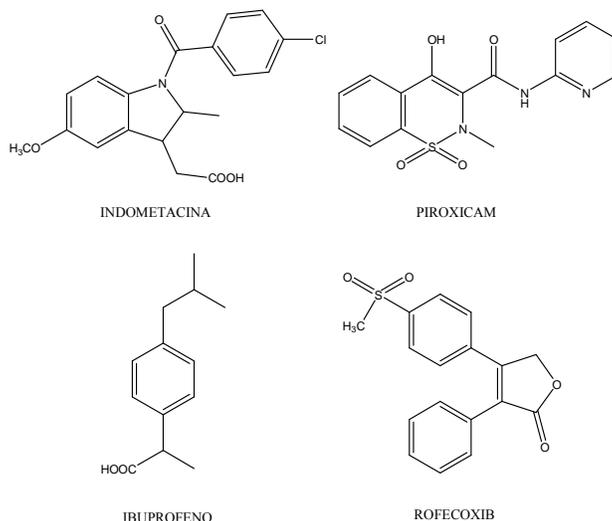


Fig. 13. Algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos

#### 4. DISTRIBUCIÓN Y LIPOSOLUBILIDAD EN FÁRMACOS.

El manejo clínico de los medicamentos obliga a tener en cuenta principios farmacocinéticos, puesto que además de la cantidad de fármaco administrado los cambios en la absorción, distribución, metabolismo y eliminación determinan no solo la magnitud del efecto terapéutico sino sus efectos indeseables. Una vez administrado el fármaco, éste entra en contacto con una superficie absorbente y se inician una serie de fenómenos secuenciales conocidos como procesos cinéticos. La distribución de los fármacos permite su acceso a los órganos en los que debe actuar y a los órganos que los van a eliminar, y condiciona las concentraciones que alcanzan en cada tejido. Tiene especial importancia en la elección del fármaco más adecuado para tratar enfermedades localizadas en áreas especiales como el sistema nervioso central (SNC), y en la valoración del riesgo de los fármacos durante el embarazo y lactancia. También, es importante para entender el retraso en el comienzo del efecto de algunos fármacos como la digoxina o la terminación del efecto de otros como el diazepam y el tiopental (Calabresi, P, 1996.) El paso del medicamento a través de membranas para llegar a la circulación sistémica. Este proceso involucra los mecanismos que utilizan los fármacos para penetrar estructuras lipídicas como son las membranas celulares (Figura 14).

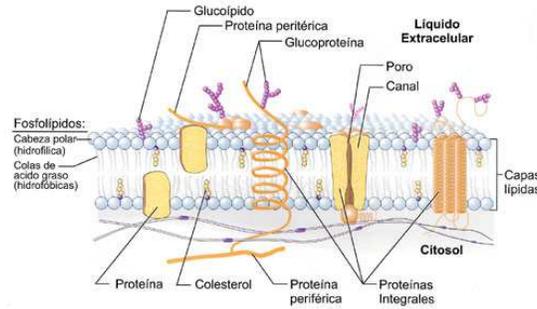


Fig. 14. Estructura de la membrana celular.

Por lo anterior en el proceso de absorción influyen los siguientes factores:

- Transporte a través de membrana
- Solubilidad del fármaco en lípidos y agua
- Vía de administración
- Superficie o área de absorción
- Irrigación de la superficie absorbente

La liposolubilidad se determina por el grado de ionización del fármaco en la superficie absorbente, ya que estas moléculas son más liposolubles cuando predominan en su forma no ionizada y más hidrosolubles cuando están más ionizadas (más polares). El grado de ionización y su liposolubilidad depende del pH de la superficie absorbente y del pK del medicamento; por lo tanto conocer los datos anteriores, permite establecer el grado de ionización aplicando la fórmula de Henderson-Hasselbach para ácidos y bases débiles.

Los procesos de transporte especializado incluyen la difusión facilitada, mecanismo que utilizan medicamentos de baja liposolubilidad pero que encuentran un gradiente de concentración favorable. La característica fundamental de este proceso es la participación de una molécula portadora que conforma el complejo fármaco-portador que tiene la liposolubilidad de la que carece el medicamento en forma independiente.

La barrera hematoencefálica que separa el sistema nervioso del organismo es impermeable a medicamentos muy ionizados o de alto peso molecular, por ello a este compartimento difunden adecuadamente agentes liposolubles o de bajo peso molecular. La barrera placentaria permite el paso de medicamentos liposolubles por lo que es de especial

importancia desde el punto de vista teratológico y de reacciones adversas fetales. En resumen, los factores más importantes que determinan la distribución de los medicamentos son: la unión a proteínas plasmáticas, el flujo sanguíneo, la capacidad de difusión a través de membranas y la solubilidad tisular.

El fármaco disuelto en la sangre pasa de los capilares a los tejidos a favor del gradiente de concentración. Este paso depende de las características del fármaco (tamaño de la molécula, liposolubilidad y grado de ionización), de su unión a las proteínas plasmáticas, del flujo sanguíneo del órgano, de la luz capilar, del grado de turgencia y de las características del endotelio capilar. Un fármaco muy liposoluble accederá más fácilmente a los órganos muy irrigados, como el cerebro, el corazón, hígado o los riñones, más despacio al músculo y con mayor lentitud a la grasa y otros tejidos poco irrigados como las válvulas cardíacas. Incluso puede haber diferencias dentro de un órgano, por ejemplo entre la corteza y medula renal, o entre el hueso cortical y el esponjoso. Un fármaco menos liposoluble llegará bien a los tejidos cuyos capilares son ricos en hendiduras intercelulares, como es el caso de las sinusoides hepáticas cuyas abundantes fenestraciones y hendiduras intercelulares permiten el paso de sustancias con elevado peso molecular, pero tendrá dificultad para acceder a los tejidos que carecen de ellas, como el SNC.

La inflamación produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, lo que puede aumentar la concentración alcanzada en algunos tejidos. Cuando la concentración plasmática disminuye, el fármaco pasa de nuevo de los tejidos a los capilares a favor del gradiente de concentración. Dentro de un órgano, el fármaco puede estar disuelto en el líquido intersticial y en el agua intracelular (cuando accede al interior de la célula) o fijado a diversos componentes, como proteínas o lípidos. La forma del fármaco que accede al líquido intersticial del tejido celular subcutáneo, a las cavidades peritoneales, pleural y articular, a los alvéolos y bronquios es la forma libre, por lo que depende de las variaciones en la unión a proteínas. El acceso al interior de las células y a las estructuras intracelulares se realiza por difusión pasiva y depende de la liposolubilidad y del grado de ionización que puede variar en circunstancias patológicas. La mayoría de los fármacos tienen la capacidad de fijarse a determinados tejidos, en los que alcanzan concentraciones más altas que en el resto del organismo, incluso aunque estén un poco irrigados, como sucede con la acumulación de los fármacos liposolubles en la grasa, las tetraciclinas en el

hueso o la griseofulvina en la piel. La fijación intensa a ciertos tejidos puede reducir la concentración del fármaco en su lugar de acción: por ejemplo, la acción anestésica del tiopental termina cuando el fármaco deja el SNC para pasar al músculo y la grasa (Flore. J., 1996)

## 5. TERPENOS.

Los terpenos, algunas veces referidos como isoprenoides, son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos. El nombre proviene de que los primeros miembros de esta clase fueron derivados del aguarrás ("turpentine" en inglés, "terpentin" en alemán) (R. Croteau, 2000). Los terpenos pueden verse formados por unidades de 5-carbonos (Figura 15), ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes, siempre basadas en el esqueleto del isopreno.

La mayoría de los terpenos tiene estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono. Los monómeros generalmente son referidos como "unidades de isopreno" porque la descomposición por calor de muchos terpenos da por resultado ese producto; y porque en condiciones químicas adecuadas, se puede inducir al isopreno a polimerizarse en múltiplos de cinco carbonos, generando numerosos esqueletos de terpenos. (R. Croteau, 2000)

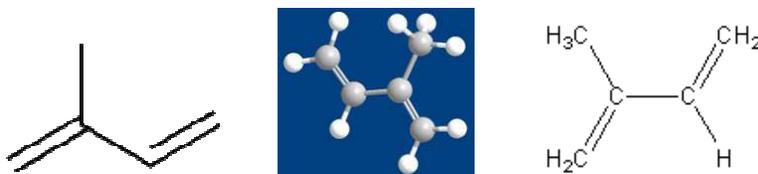


Fig. 15. Estructura del isopreno.

Estos lípidos se encuentran en toda clase de seres vivos, y son biosintetizados en las plantas, donde son importantes en numerosas interacciones bióticas (Goodwin 1971). En las plantas los terpenos cumplen varias funciones primarias por ejemplo algunos pigmentos como los carotenos. Los terpenos también cumplen una función de aumentar la fijación de algunas proteínas a las membranas celulares, lo que es conocido como isoprenilación.

Particularmente los monoterpenos son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios, y se están investigando sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos. Están presentes, por ejemplo, en las esencias del eucalipto, los sabores del clavo y el jengibre. También, en el citral, mentol, alcanfor, y los cannabinoides. (R. Croteau, 2000)

## 5.1. Clasificación.

Los terpenos son hidrocarburos cuyo esqueleto hidrocarbonado pueden verse como una combinación de numerosas unidades isopreno, por lo general unidas de forma cabeza-cola, pero también pueden darse combinaciones cabeza-cabeza y algunos compuestos están formados por uniones cabeza-medio. La clasificación de los terpenos según su estructura química, se basa en el número de unidades isopreno presentes.

Hemiterpenos igual a una unidad de isopreno son los terpenos más pequeños, con una sola unidad de isopreno. Poseen cinco carbonos. El hemiterpeno más conocido es el isopreno mismo, un producto volátil que se desprende de los tejidos fotosintéticamente activos, su fórmula molecular es  $C_5H_8$  algunos derivados contienen oxígeno tales como el prenol (Figura 16) y el, ácido isovalérico.

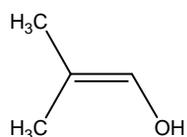


Fig 16. Estructura química del prenol.

Monoterpenos contienen dos unidades de isopreno. Terpenos de 10 carbonos llamados así porque los primeros terpenos aislados fueron del aguarrás en el año 1850, fueron considerados la unidad base, a partir de la cual se formuló la nomenclatura de este tipo de compuestos. Los monoterpenos mejor conocidos son aquellos presentes en las esencias volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, de las cuales forman hasta el 5 por ciento en peso de la planta seca. Tiene la fórmula molecular de  $C_{10}H_{16}$ , ejemplo de un alcohol monoterpénico es el geraniol (Figura 17).

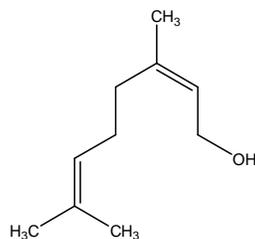


Fig 17. Estructura química del geraniol.

Sesquiterpenos igual a tres unidades de isopreno. Terpenos de 15 carbonos como los monoterpenos, muchos sesquiterpenos están presentes en los aceites esenciales. Además varios sesquiterpenos actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios, y como inhibidores de la alimentación de los herbívoros oportunistas. Por ejemplo, un alcohol sesquiterpenico es el farnesol (Figura 18).

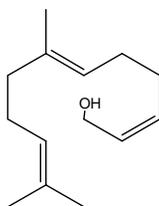


Fig 18. Estructura química del Farnesol.

Diterpenos igual a cuatro unidades de isopreno: Terpenos de 20 carbonos. Entre ellos se incluye el fitol, que es la parte hidrofóbica de la clorofila, el ácido labdanico (Figura 19), las hormonas giberelinas, los ácidos de las resinas de las coníferas, las fitoalexinas, y una serie de metabolitos farmacológicamente importantes, incluyendo el taxol, un agente anticancerígeno encontrado en muy bajas concentraciones (0,01 por ciento de peso seco) en la madera del tejo, así como la y forskolina, un compuesto usado para tratar el glaucoma.

Algunas giberelinas tienen presente 19 átomos de carbono por lo que no son consideradas diterpenos. Estas moléculas perdieron un átomo de carbono durante una reacción de ruptura.

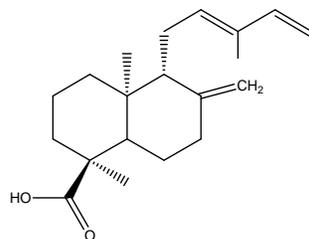


Fig 19. Estructura química del ácido labdanico.

Sesteterpenos igual a cinco unidades de isopreno, presentan 25 carbonos, son raros en relación a otros tamaños. Su fórmula molecular es  $C_{25}H_{40}$ .

Triterpenos igual a seis unidades de isopreno: Terpenos de 30 carbonos. Son por lo general generados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola. Esta clase de moléculas incluye a los brassinoesteroides, componentes de la membrana que son fitoesteroles, algunas fitoalexinas, varias toxinas y componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas. Consisten de seis unidades de isopreno y tiene la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}$ . El triterpeno lineal escualeno (Figura 20) es el mayor constituyente del Aceite de Hígado de Tiburón, es derivado de la unión reductiva de dos moléculas de farnesilpirofosfato. El escualeno es procesado biosintéticamente para generar lanosterol, el precursor estructural de todos los esteroides.

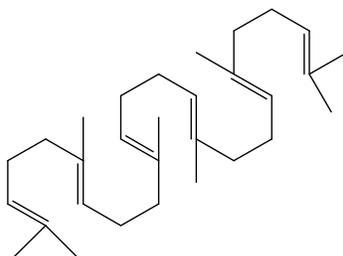


Fig 20. Estructura química del escualeno.

Tetraterpenos. Terpenos de 40 carbonos, contiene ocho unidades de isopreno. Los tetraterpenos más prevalentes son los carotenoides. Pigmentos que cumplen funciones esenciales en la fotosíntesis. Tienen la fórmula molecular  $C_{40}H_{56}$ . Entre los tetraterpenos biológicamente importantes, se encuentran, el licopeno un compuesto acíclico, el  $\gamma$ -caroteno y el  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno.

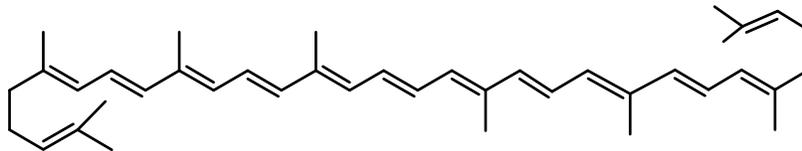


Fig 21. Estructura química del  $\beta$ -caroteno.

Politerpenos. Los politerpenos son sustancias, que contienen más de ocho unidades de isopreno, por ejemplo la plastoquinona y la ubiquinona, también poliprenoles de cadena larga relacionados con las reacciones de transferencia de azúcares (por ejemplo el dolicol), también el hule natural el cual está constituido de poli-isopreno.

Meroterpenos: Así se llama a los metabolitos secundarios de las plantas que tienen orígenes sólo parcialmente derivados de terpenos. Por ejemplo, tanto las citoquininas como numerosos fenilpropanoides contienen cadenas laterales de un isoprenoide de cinco carbonos. Algunos alcaloides, como las drogas anticancerígenas vincristina y vinblastina, contienen fragmentos de terpenos en sus estructuras. Además algunas proteínas modificadas incluyen una cadena lateral terpenoide de 15 o 20 carbonos, ésta le ayuda anclarse a la membrana.

Esteroides. Triterpenos basados en el sistema de anillos ciclopentano perhidrofenantreno. (Buchanan *et al* 2000), se componen de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, también de cuatro anillos fusionados de carbono que poseén diversos grupos funcionales y tienen partes hidrofílicas e hidrofóbicas. En los mamíferos como el ser humano, cumplen importantes funciones como reguladora, estructural y hormonal aunque no los consideran terpenoides (R. Croteau, 2000).

## 5.2. Origen biosintético.

Si bien sus funciones son muy diversas, los terpenos están unificados en su origen biosintético común. La biosíntesis de todos los terpenos a partir de metabolitos primarios puede simplificarse a cuatro pasos (Judd, W. S. 2002).

1. Síntesis del precursor fundamental, el isopentenil difosfato (IPP).
2. Adiciones repetitivas del IPP hasta formar una serie de homólogos del prenil difosfato, que sirve de precursor inmediato de muchas clases de terpenoides.
3. Elaboración de estos prenil difosfatos por sintetetasas específicas de terpenoides para producir el esqueleto principal del terpenoide.
4. Modificaciones enzimáticas secundarias a los esqueletos (en general reacciones redox).

### **5.3. Triterpenos.**

Los triterpenos comprenden un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuido en la naturaleza. Están constituidos por treinta átomos de carbono. Entre ellos se mencionan a los triterpenos tetracíclicos, los cuales convencionalmente se les han otorgado nombres triviales, como protostano, lanostano, cicloartano, damarano, eufano y tirucalano. Por su parte, los compuestos pentacíclicos pueden ser de tipo ursano, oleanano, friedelano, gamacerano, lupano y hopazo (Patocka 2003). Existen también otros tipos de esqueletos como el isomalabaricano, el limonoide, equasinoide y el saponinoide (Connolly y Hill, 20005).

#### **5.3.1. Biogénesis.**

Se produce una variedad de esqueletos policíclicos a partir del 2,3-óxidoescualeno (Figura 22) a través de una sucesión de reacciones, como transposiciones, ciclaciones y una apertura del grupo epoxido. El cicloartenol es el intermediario biosintético común de los triterpenos tetrácíclicos y pentacíclicos sintetizados en el reino vegetal. Su equivalente en el reino animal es el lanostano. El mecanismo postulado para la biosíntesis de cicloartenol involucra una serie de pasos concertados, similares a aquellos involucrados en la formación de lanosterol.

Inicialmente, la batería enzimática en la planta debe reconocer las conformaciones de pre-bote o pre-silla para el 3S-óxidoescualeno. Con ello, se inicia la apertura del anillo de oxirano (Figura 22) y con la participación de los dobles enlaces se producen la ciclación en cascada, que lleva a la formación del cation protosterilo. Esta estructura experimenta una

serie de transformaciones, como rearrreglos 1,2 o adiciones cationicas 1,2-antiperiplanares y se producen carbocationes de tipo Markonikov. Al final, se efectúa una eliminación 1,2 del protón en C-19 y en consecuencia, ocurre el cierre del anillo 9 $\beta$ ,19-ciclopropano. De esta manera, se origina la estructura del cicloartenol (Abe *et al.*, 1993; Wendt *et al.*, 2000),

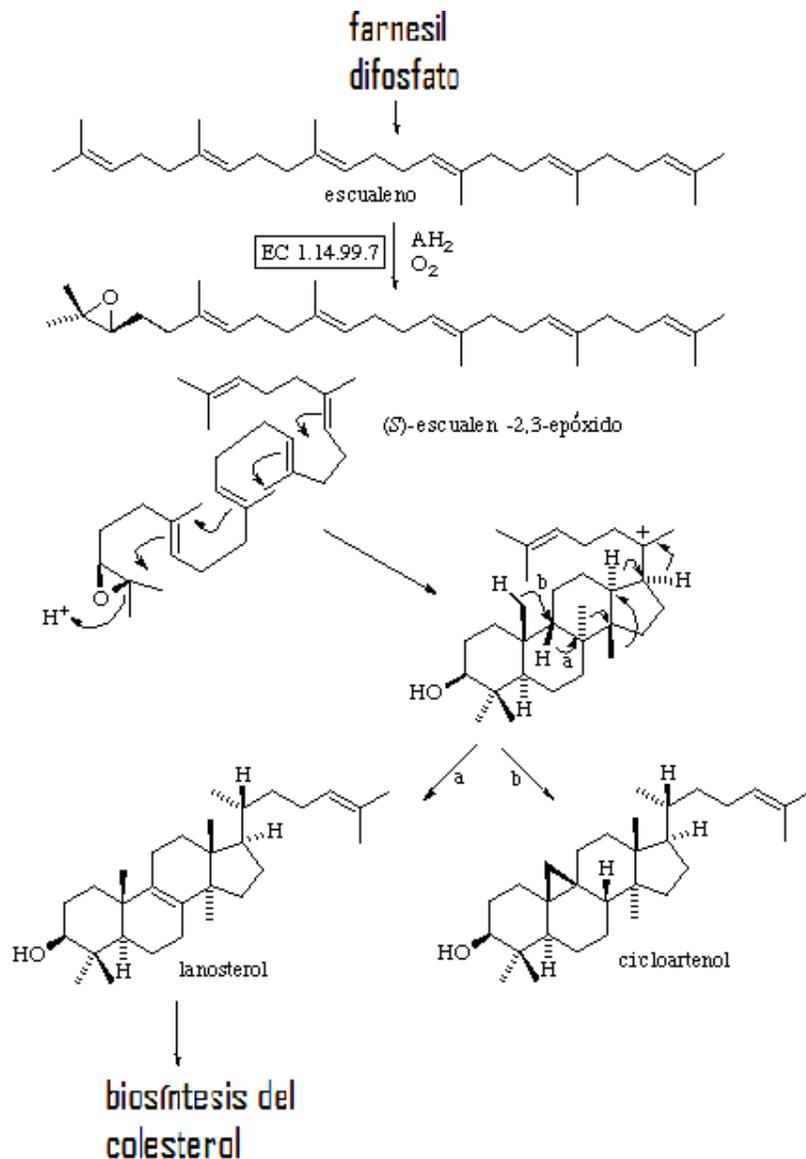


Fig. 22. Epoxidación del escualeno.

Los esqueletos tetracíclicos se caracterizan por presentar cuatro anillos fusionados, en donde los tres primeros son de seis miembros y el anillo D, por lo regular es un ciclopentano; además poseen una cadena lateral con una configuración R en la posición C20. Su estructura proviene de un acomodo conformacional del polieno, en el cual el

sistema  $\pi$  del doble enlace terminal se encuentra lo suficientemente distante de la cadena que origina al anillo D, de manera que ese sistema  $sp_2$  no participa en la ciclación (Abe *et al.*, 1993).

La mayoría de las especies vegetales poseen las enzimas necesarias para convertir al 3S-óxidoescualeno en 3 $\beta$ -triterpenoles. En tanto, es menos frecuente la transformación del 3R-óxidoescualeno en los correspondientes compuestos  $\alpha$ -axiales, probablemente porque los complejos enzimáticos indispensables están restringidos para ciertas especies. Los estudios biogénéticos sugieren la formación de los derivados 3 $\beta$  a partir de 3S-óxidoescualeno con una conformación pre-silla del anillo A. Por el contrario, el enantiómero 3R deriva de una conformación pre-bote del primer anillo en la estructura correspondiente (Abe *et al.*, 1993; Assimopoulou y Papa, 2005; Wendt *et al.*, 2000). La diversidad estructural de los triterpenos se puede explicar por las diferentes conformaciones que puede adoptar el escualeno al momento de ciclarse (Figura 23).

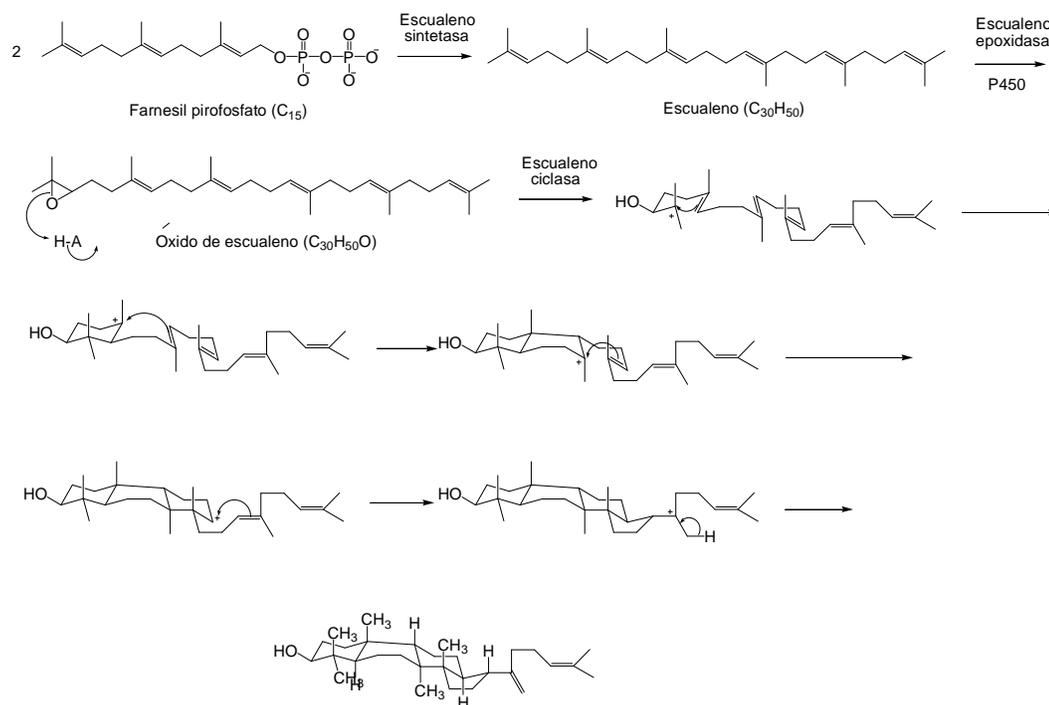


Fig. 23. Biosíntesis y ciclación del escualeno.

### **5.3.2. Actividad biológica.**

La diversidad estructural de los triterpenos es, quizás, la responsable de sus efectos biológicos y farmacológicos. La mayoría de ellos se encuentran en grandes cantidades en látex y en la resina de ciertas plantas, en donde constituyen un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros. Los triterpenos poseen una variedad de actividades biológicas, como bactericida, fungicida, antiviral, citotóxica, analgésica, antiinflamatoria, anticancerígena, hipocolesterolémica, espermicida, cardiovascular, antialérgica, entre otras (Mahato y Sen, 1997; Patocka, 2003). La naturaleza hidrofóbica de los triterpenos es una característica importante en relación con sus propiedades biológicas (Abe *et al.*, 1993; Mahato y Sen, 1997).

#### **5.3.2.1. Como potenciales agentes antiinflamatorios.**

En la literatura se han señalado las acciones antiinflamatorias de los triterpenos, abarcando desde experimentos *in vitro* hasta *in vivo*. Los efectos son referidos principalmente a su interferencia con diversas moléculas o mecanismos del proceso de inflamación (Mahato y Sen, 1997; Calix *et al.*, 2003; Rao y Reddy, 2004).

Los triterpenos son capaces de inhibir y modular la acción y la expresión de diversas moléculas y complejos enzimáticos como la ciclooxigenasa y la sintetasa inducible de óxido nítrico (NOSi). Por ejemplo, su acción antiprostanoide se asocia con la inhibición de la expresión de COX-2 y de NOSi. Al respecto, el ácido ursólico puede inhibir la acción del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) sobre las proteínas cinasas, estas enzimas promueven la expresión de COX-2 al interactuar sobre la región promotora del gen de la enzima. Por ejemplo, el lupeol es capaz de disminuir la producción de PGE<sub>2</sub> sin afectar la de LTC<sub>4</sub>. Por el contrario, ciertos triterpenos inhiben la acción de la enzima 5-LO. Al respecto, se sugirió que el tipo de núcleo policíclico era el responsable de su actividad (Calixto *et al.*, 2003).

#### **5.3.2.2. 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.

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. 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.

## 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 (Figura 24), el cual tiene como nombre “guayule”, vocablo que literalmente significa “árbol de hule” (Campos 1981), éste 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).



Fig. 24. *Parthenium argentatum*

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 el único de este género que contiene cantidades suficientes de hule para ser de importancia económica. (Campos 1981). De todas las fuentes de hule natural solo 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. 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 más 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 ésta 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 llamo “la resina”.

## **6.1. La resina**

Como una fuente natural de hule, el guayule ha sido intensamente estudiado y es conocido que por cada kilogramo de hule extraído 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 por ciento de la resina (Figura 25) (Komoroski 1986) se puede disponer de cantidades considerables de estos metabolitos. Aunado a su gran parecido estructural con compuestos esteroides, es una fuente potencial de intermediarios susceptibles a sufrir transformaciones químicas, esto con el propósito de obtener compuestos con posibles propiedades biológicas (Martínez R. 1990).



Fig. 25. Resina obtenido del arbusto de *Parthenium argentatum*.

## 6.2. Metabolitos del guayule

La investigación química orientada a aislar e identificar metabolitos secundarios distintos al hule se inicio en 1911, año en el que se publicó el aislamiento del parteniol (**1**) (Figura 26) (un alcohol sesquiterpénico) a partir de un extracto acetónico del guayule (Alexander 1911), más 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 V. (**2**) (Figura 26). Por otra parte, Haagen-Smit en 1944 informó las propiedades físicoquímicas, la composición y la distribución de los aceites esenciales encontrados en el guayule ( $\alpha$ -pineno, limoneno, felandral, entre otros).

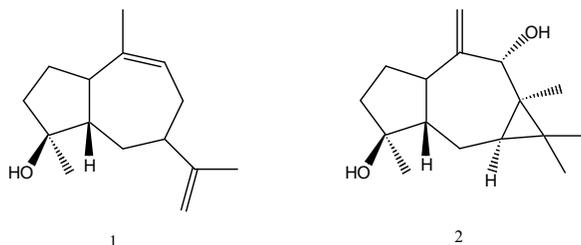


Fig. 26. Estructura del parteniol propuesta por Hageen-Smit en 1948 (**1**) y estructura correcta (**2**) del parteniol determinada por Martínez V. en 1986.

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-Vázquez y Rodríguez-Hann en 1986, aislaron e identificaron las guayulinas C y D (figura 27).

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, aislaron la argentatina D, a partir de un extracto hexánico de las raíces de *P. argentatum*.

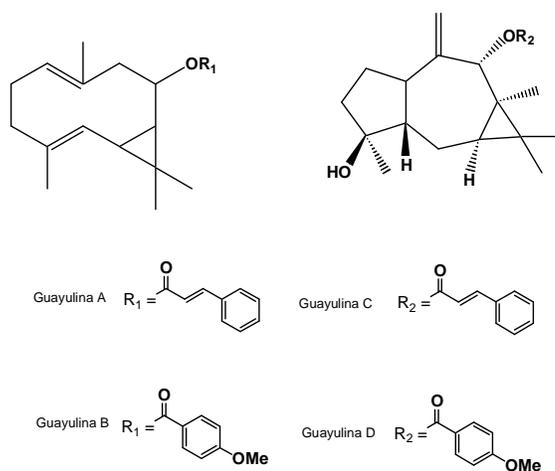


Fig. 27. Estructuras de las guayulinas.

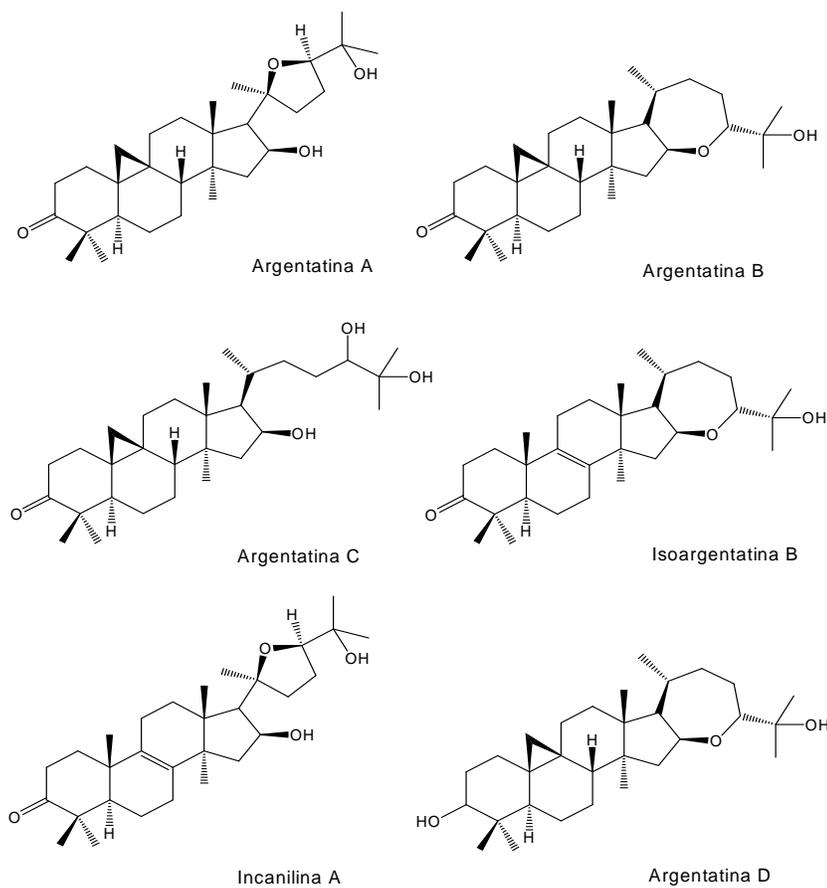


Fig. 28. Estructura de los triterpenos del guayule

### 6.3. 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-Vázquez 1994). Se ha informado que las argentatinas A, B y D inhiben el crecimiento de tumores hormona-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  $IC_{50}$  en un rango de 25 a 33  $\mu$ 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-Delgado 2005). Así mismo estudios cuantitativos de estructura-actividad de la argentatina B ha permitido sintetizar un derivado (**1**) (Figura 29) de este triterpeno, con potente actividad citotóxica, similar a la doxorrubicina (**2**) (Figura 29) (Parra-Delgado 2005).

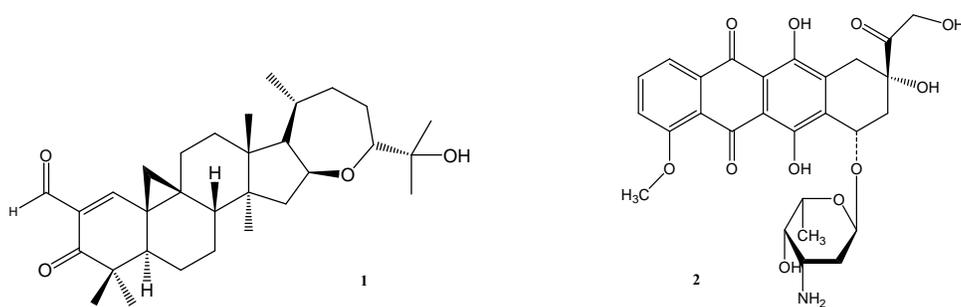


Fig. 29. Derivado con potente actividad citotóxica (**1**) similar a la doxorrubicina (**2**).

## 7. FLAVONAS.

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, por ejemplo la flor de *Tillandsia aeranthos* el pigmento que le da el color a sus pétalos es un flavonoide (Figura 30). Están presentes en frutas, verduras, diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Winkel-Shirley, B. 2001)



Fig. 30. Flor de *Tillandsia aeranthos* su color debido a un flavonoide.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C) (Singleton, 1981). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidróxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Aherne 2002., Havsteen B.1983). Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la arterosclerosis o el cáncer (Havsteen B 1983, Peres W.1994).

## 7.1. Fuentes naturales de flavonas.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, también, en cerveza, vino, té verde, té negro y soya (Figura 31) los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales.



Fig. 31 Fuentes de flavonoides.

Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas.

Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización por los colores llamativos, que atraen a los insectos y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Formica JV y Regelson W. 1995). Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercitina (Figura 32) (Hertog MGL, Hollman PCH 1996).

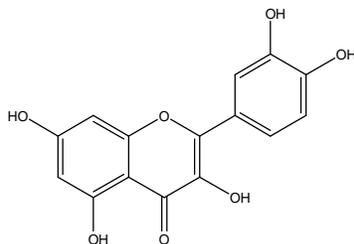


Fig. 32. Estructura de la quercitina.

El vino tiene un alto contenido en compuestos polifenólicos, aproximadamente se conocen unos 500, la mayoría de los cuales provienen de la uva y del proceso fermentativo. En la uva estas moléculas se localizan en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las semillas. Su cantidad y tipo depende principalmente de la variedad, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo (Infante R 1997).

La cerveza también contiene importantes cantidades de flavonoides entre los que destacan los polihidroxi flavanos (catequina y epicatequina), los antocianógenos (leucocianidina o leucopelargonidina) y los flavonoles (grupo de quercitinas: kaempferol o mirecitina) (Charalambous. G 1997).

## **7.2. Tipos de flavonas.**

Se han identificado más de 5,000 (Ross JA y Kasum CM 2002) flavonoides entre los que se pueden destacar:

1. Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, naringina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócolis, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naringina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.
2. Flavonoides de la soya o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soya tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Las más conocidas son la genisteína y la daidzeína.
3. Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.
4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.
5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.

7. Kaemferol: aparece en berros, brócolis, rábano, endibias y remolacha roja (Ross JA y Kasum CM 2002)

### 7.3. Estructura base de las flavonas.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6) (Figura 33), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico).

Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura. 26). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors W, Heller W, Christa M, 1990).

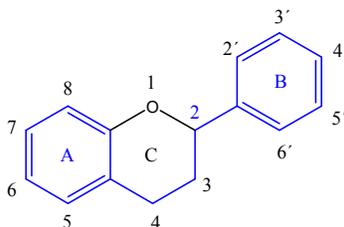


Fig. 33. Esqueleto base de las flavonas (C6-C3-C6),

### 7.4. Clasificación.

La estructura básica de las flavonas, permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Figura 34). En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi.
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3.
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Letan A 1966).

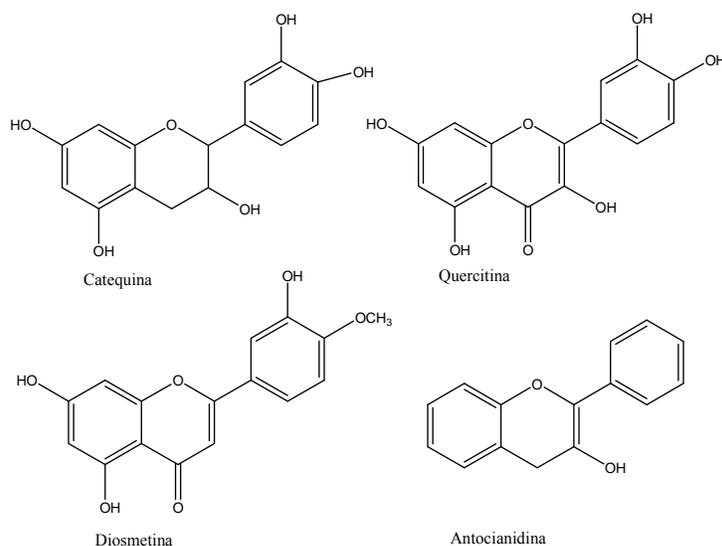


Fig. 34. Diferentes tipos de bases (C6-C3-C6) sustituidas.

## 7.5. Actividad biológica de las flavonas.

Los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica. Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos.

También, son conocidos por los productores de plantas ornamentales, que manipulan el ambiente de las plantas para aumentar la concentración de flavonoides responsables del color de las hojas y de las flores. Debido a las importantes funciones metabólicas de los flavonoides en las plantas y los animales, las vías biosintéticas y mecanismos de regulación de este tipo de compuestos están siendo cuidadosamente estudiadas. Son parte importante en la dieta del ser humano (Winkel-Shirley, B. 2001).

Las propiedades antirradicales libres de los flavonoides se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Jovanovic.1998.), se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas antiprostanoide y antiinflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de arteroma) (Pace-Asciak CR 1995, Yang K 2000, Geleijnse JM 2002.).

Los mecanismos moleculares que determinan la actividad de los flavonoides en ese sentido, se basan en la formación de un radical aroxilo lábil o de un complejo flavonoide hierro redox lábil. En el primer caso, la autooxidación del radical aroxilo genera anión superóxido ( $O_2^-$ ) que, siguiendo la secuencia conocida, genera el dañino radical hidroxilo (HO). Estos mecanismos pueden constituir la base de las acciones mutagénicas y citotóxicas descritas para algunos flavonoides (Honick W, Milosalvjevic E 1988). Debe destacarse que las propiedades prooxidantes y mutagénicas de los flavonoides, se hallan unidas a la acción de eliminar radicales libres que tienen estos compuestos. Sin embargo, lo que determina el carácter antioxidante o prooxidante de esta reacción inicial es, como ya se mencionó previamente, la estabilidad/labilidad redox del compuesto radical formado a partir del flavonoide original (da Silva J, Herrmann SM, 2002, Laughton MJ, Evans PJ 1991.).

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación; tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo 450-P, entre otras. (Stahl W, Ale-Agha N 2002). Además, evitan el daño producido al endotelio vascular al prevenir la sobre regulación de mediadores inflamatorios (IL-8, MCP-1 y ICAM-1) a través de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (Youdim KA. 2002, Wang J y Mazza G. 2002.). En el hígado se ha descrito que algunas flavonas son capaces de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (Kawada N, Seki S, 1998.) y en estudios *in vitro* se ha comprobado que diversos flavonoides inhiben la expresión de la óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por Lipopolisacáridos. Además combaten la inflamación y las alergias (Sen

CK, Khanna S 2002, Bagchi D, Bagchi M, 2000.) y aumentan la efectividad de las células del sistema inmunológico (Bagchi D, Bagchi M, 2000.). Muchos de estos efectos antiinflamatorios y antialérgicos podrían explicarse a través de su acción inhibidora sobre el factor de transcripción nuclear kappa B, activador de muchas citosinas proinflamatorias (Bremner P y Heinrich M. 2002, Muraoka K, Shimizu K. 2002.). También, ejercerían su acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa, así como por su actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de la matriz (Sartor L, Pezzato2002.).

## 7.6. Biogénesis.

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente varias modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos (Winkel-Shirley, B. 2001). La vía del ácido shikímico (Figura 35) se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa 4-fosfato con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales.

Pero la vía del ácido shikímico normalmente prosigue y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina. La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides (J. Palazón, R.M. Cusidó 2002).

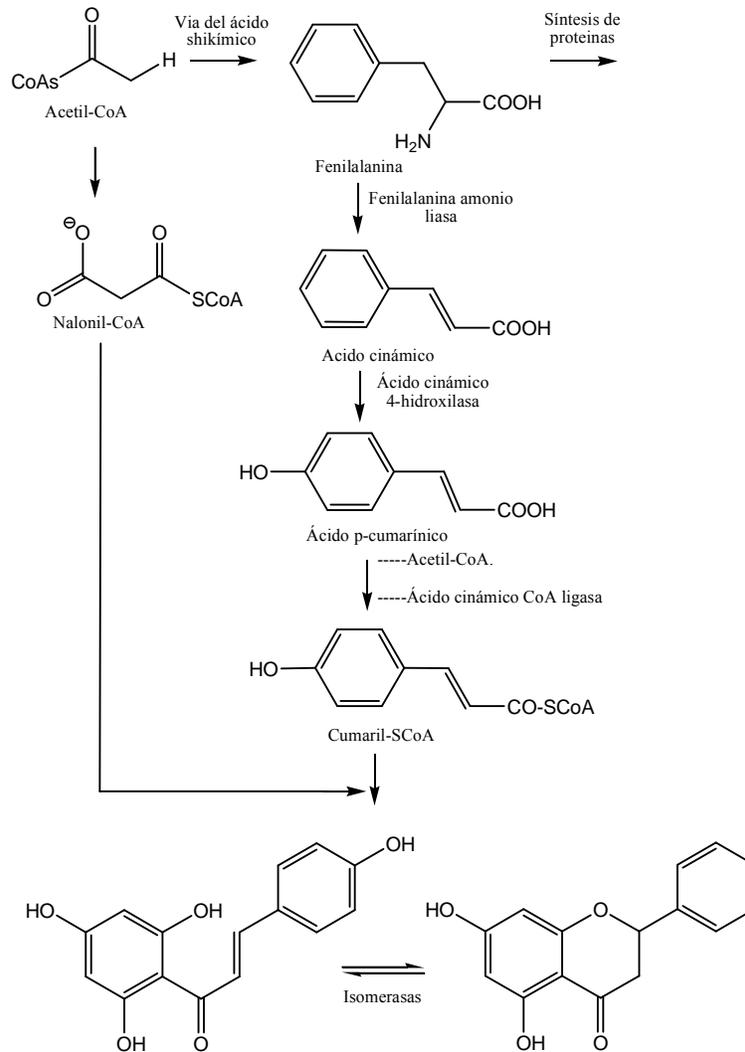


Fig. 35 Via biosintética de los flavonoides.

Los flavonoides se biosintetizan en casi todas las especies vegetales (*Taxón Embryophyta* y también en algunas algas *Charophyta*), que aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies y son susceptibles a los cambios ambientales.

Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones.

Como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo. Una función importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores (Winkel-Shirley, B. 2001)

## **7.7. Actividad moduladora en la carcinogénesis.**

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladoras del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos. Diversos datos experimentales han demostrado la acción antiproliferativa y anticarcinogénica, así como el papel quimiopreventivo de los flavonoides (Hardigree AA y Epler 1978, Stacvric B 1994, Birt Df, Hendrich S 2001). Entre los numerosos fenómenos que tienen lugar durante el proceso carcinogénico y que ofrecen opción para la modulación mediante factores externos, se encuentran la formación de metabolitos carcinógenos, que se forman por la acción de enzimas citosólicas y microsómicas. Estas enzimas controlan este paso crítico en el proceso carcinógeno.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los flavonoides pueden modular su actividad. En experimentos *in vitro* se ha confirmado el papel protector de la quercitina (Figura 32), la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon (Ranelletti FO, Ricci R 1992.), glándula mamaria y ovario; en región gastrointestinal (Yoshida M, Sakai T y Hosokawa N 1990) en leucemia (Yoshida M 1992, Teofili L1992, Ren W. 2001.). Una posible explicación a estos efectos anticancerígenos podría derivarse del incremento que algunos flavonoides producen en las concentraciones intracelulares de glutatión a través de la regulación de la expresión de la enzima limitante en su síntesis. Asimismo, en lo que respecta a la prevención del cáncer de mama, podría deberse a su potente capacidad de inhibir la actividad de la aromatasas evitando con esto la formación de andrógenos a partir de estrógenos (Pouget C, Fagnere C, Basly JP 2002). La autotoxidación del radical aroxilo o la formación de compuestos ternarios entre el ADN, el cobre y los flavonoides, son posibles explicaciones de la mutagenicidad mediada

por los flavonoides (Ahmad Ms, Fazal F, Rahaman 1992) ahora bien, dichas acciones sólo parecen producirse cuando las dosis de flavonoides utilizadas son muy altas (da Silva J, Herrmann SM, 2002, Laughton MJ, Evans PJ 1991.).

## 8. *Agastache mexicana*.

El género *Agastache* (Lamiaceae) (Figura 36) abarca cerca de 22 especies, de los perennials herbáceos aromáticos, casi exclusivamente natural de Norteamérica (Roger G, Rzedowki J 2001). En México, ciertas especies de *Agastache* se conocen como "toronjil". Sin embargo, el nombre del "toronjil" también describe otras especies, tales como la *Dracocephalum moldavica* y *Cedronella mexicana* (Sanders 1987).

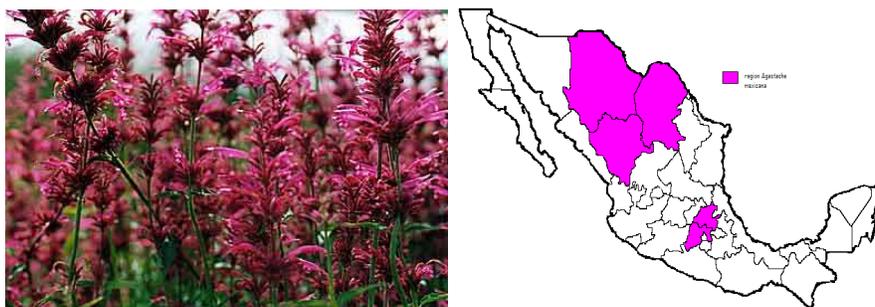


Fig. 36. *Agastache mexicana*.

Los estudios de Etnobotánica en mercados mexicanos revelaron nuevos taxos de *Agastache* entre ellos está el subs. (Hisopo blanco), que demuestra diferencia del típico *Agastache mexicana* (Hisopo púrpura o rojo) (Robert Bye, Edelmira Linares 1987). Por otra parte, el *Dracocephalum moldavica* (Hisopo azul o extranjero) es una especie europea, que pertenece también a la familia *Lamiaceae*, que se ha adaptado en México, y ahora se cultiva sistemáticamente, para su proceso de comercialización.

### 8.1. Usos etnomédicos.

En México central un complejo de la planta medicinal formado por *Agastache mexicana* subs. *xolocotziana* (toronjil blanco), *Agastache mexicana* subs *mexicana* (toronjil morado) y *Dracocephalum moldavica* son conocidos como "los tres toronjiles", el cual se utiliza extensamente en la medicina popular para aliviar desórdenes nerviosos y también para superar impresiones fuertes, así como disturbios en el sueño aunado a sus efectos sedantes.

El uso en la medicina popular, de estos tres toronjiles, ha variado a través de la historia, por ejemplo el Hisopo rojo, se ha empleado desde los tiempos prehispánicos como fuente de remedio para las heridas y su infusión se ha empleado como agente antiespasmódico y contra problemas estomacales. Mientras tanto, el toronjil blanco ha sido usado para las enfermedades cardíacas y el toronjil azul se ha utilizado como agente sedante y se ha divulgado sus características antioxidantes. Pueden ser utilizados solos o en combinación con los otros toronjiles. También, se combinan con otras especies como: raíces de valeriana (*Officinalis de valeriana*), "azhar" (*Aurantium de la fruta cítrica*), "hinojo" y "tila" (*Sylvatica del ternstroemia*). (Robert Bye 1999)

## 8.2. Actividad biológica.

Un estudio sobre su evaluación farmacológica, reveló un extracto acuoso de *A. mexicana*, puede producir un efecto ansiolítico en la rata macho (Molina-Hernández 2000).

Por otra parte investigaciones químicas sistemáticas de la familia de *Lamiaceae*, demostraron que los flavonoides y los glucósidos de flavonoides están presentes en la mayoría de las especies de *Agastache* (J.Exner, A 1981) y el *Dracocephalum moldavica*, de uso en la medicina tradicional (Hideji I, Keiichi S 1981).

Además muchos compuestos flavonoides poseen varias actividades a nivel sistema nervioso central (SNC), por ejemplo, las características ansiolíticas demostradas en la apigenina (1) (Figura 37) (H. Viola 1995) mientras que el luteolin (2) (Figura 37) posee un efecto protector sobre necrosis celular (M. Joyeux 1995) y la apigenina, 6,3-dinitroflavona, la quercitina (Figura 32) además de presentar efectos ansiolíticos demostraron actividad en los procesos de la memoria (J.B. Salgueiro 1997).

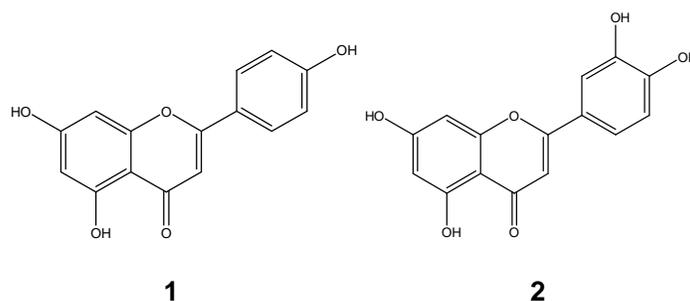


Fig. 37. Estructuras de la Apigenina (1) y Luteolin (2).

Las tres especies de toronjil antes dichas, se comercializan en mercados de plantas medicinales en casi todo México.

Aunque existe poca información científica tanto la relacionada a las características sedantes de este complejo, así como en la información química. Sin embargo, se han realizado estudios previos sobre el toronjil morado (*Agastache mexicana*, subsp *mexicana*) y el toronjil blanco (*A. mexicana* subsp *xolocotziana*) ambos utilizados en la medicina tradicional para aliviar el estrés y la ansiedad, han permitido el aislamiento de la 7-O- $\beta$ -D-glucosil-acetina (Figura 38) (R. Estrada R. et al 2004).

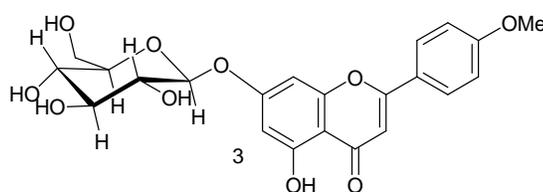


Fig. 38. 7-O- $\beta$ -D-glucosil-acetina

Aunque no se han determinado las actividades anticancerosa y antiinflamatoria de la 7-O- $\beta$ -D-glucosil-acetina, se conoce que la acetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona) (Figura 39), posee efectos antioxidantes y antiinflamatorios, (M.R. Cholbi, 1991, Y.H. Liao 1999, C. Kraft 2003).

Adicionalmente, se conoce que la acetina inhibe la glutatión reductasa, el citocromo P450, y la replicación de la DNA topoisomerasa (K. Zhang 1997, H. Doostdar 2000, F. Boege 1996). También, presenta actividad antiproliferativa induciendo apoptosis y bloqueando la progresión de los ciclos de la célula (Y.L. Hsu 2004, Y.L. Hsu b 2004, R.P. Singh 2005).

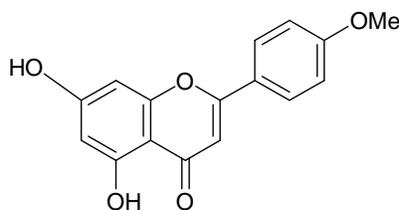


Fig. 39. Estructura de la acetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona).

## 9. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

### 9.1. Ensayos *in Vivo*.

Actualmente existe una diversidad de modelos experimentales aplicables al estudio de fármacos y principios activos antiinflamatorios. Entre ellos, los métodos *in vivo* constituyen una herramienta de uso frecuente en especial porque los experimentos son sencillos y reproducibles, de corta duración, no precisan instrumental costoso o sofisticado y, además se realizan en animales disponibles tal, como la rata y el ratón.

Por lo anterior, forman parte del grupo de ensayos de cribado. Los estudios *in vivo* valoran los principales signos de la inflamación, como el edema, el color (intensidad de eritema cutáneo), el dolor (contracciones abdominales, respuesta a la aplicación de presión), el calor (piresis), el aumento de la permeabilidad capilar (extravación de colorante), la formación de exudado (pleuritis), la migración de leucocitaria (pleuritis, fagocitosis) y la proliferación celular (fibroma, granuloma) (Willoughby, 2003). Los ensayos de edema se caracterizan por inducir una respuesta local y, la inhibición del edema es un indicativo del efecto antiinflamatorio de la sustancia que se evalúa.

Dentro de las sustancias que se promueven el edema se mencionan a los ésteres del forbol (por ejemplo, el acetato de tetradecanoilforbol, (TPA) (Figura 40), la carragenina tipo kappa, el propiolato de etilfenilo, el ácido araquidónico y la fosfolipasa, entre otras. Por último, los mecanismos por los cuales estas sustancias promueven el edema son muy diversos (Willoughby, 2003).

#### 9.1.1. Modelo de Edema inducido por TPA.

El modelo de edema inducido por TPA (Figura 40) en la oreja del ratón (De young *et al.*, 1989) comprende la aplicación del TPA en el pabellón auditivo del animal. La respuesta inflamatoria es local y consiste en edema infiltración de leucocito polimorfo nucleares (LPMN); además se liberan mediadores de tipo eicosanoide y se induce la degranulación

de mastocitos. Por lo tanto, las sustancias que inhiben la biosíntesis de prostaglandinas y de leucotrienos producen resultados considerables en este estudio.

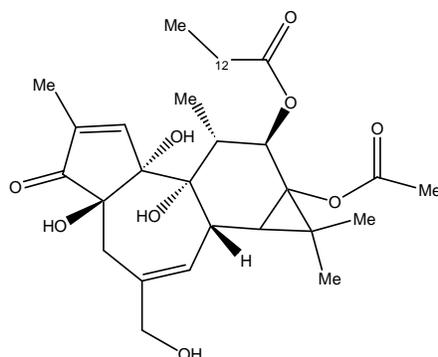


Fig. 40. Estructura química de tetradecanoilforbol (TPA).

Los ésteres del forbol son diterpenos aislados de especies de la familia *Euphobiaceae*, de acción procarcinogénica (Hecker, 1968). La respuesta biológica del TPA es multifactorial (Figura 41), sin embargo, algunos mecanismos no se conocen con precisión. La estereoquímica de los ésteres del forbol los hace análogos conformacionales al diacilglicerol y en consecuencia se desencadena una cascada de eventos bioquímicos vinculados con la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio.

Por otro lado, el TPA estimula la activación de  $PLA_2$  (Nam *et al.*, 1990) y con ello la consecutiva liberación de ácido araquidónico. El TPA favorece de manera especial, la translocación de 5-LO hacia la membrana nuclear (Werz *et al.*, 2001).

El TPA también participa en la inducción de quimiotaxis y en la diferenciación e infiltración de granulocitos y monocitos; estos últimos son responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y citocinas (Fürstenberger *et al.*, 1989) y de radicales libres ERN (Thannickal y Fanburg, 2000) en la respuesta de TPA. Recientemente, se ha sugerido una relación entre la activación del factor nuclear kB y la acción de TPA (Hayakawa *et al.*, 2003; Bowden, 2004).

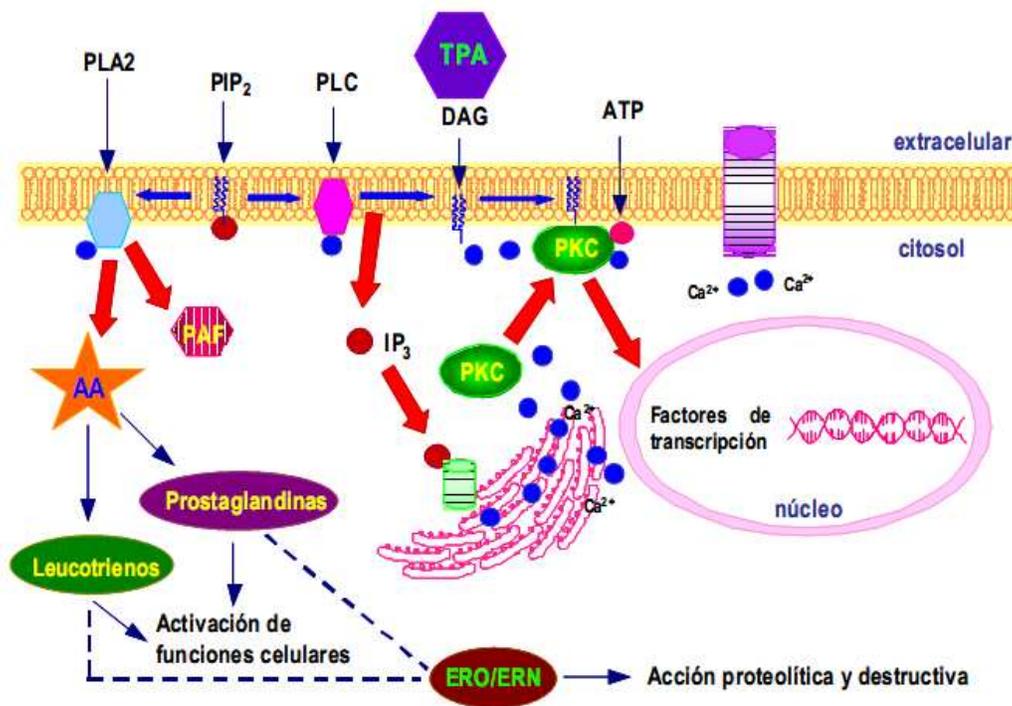


Fig. 41. Mecanismos involucrados en el edema inducido por TPA.

## 9.2. Ensayos *in Vitro*.

Los adelantos tecnológicos en nuestros días y la tendencia para reducir, mejorar o reemplazar los experimentos con animales han favorecido el desarrollo de una variedad de ensayos *in vitro*. Mediante estos métodos es posible determinar los modos de acción de la sustancias. Algunos triterpenos poseen efectos inhibitorios contra las enzimas lipooxigenasa y sintasa inducible del NO, entre ellos se ha demostrado que las argentatinas A y B, aislados de *Phartenium argentatum*, inhiben la producción de LTB<sub>4</sub>. Por otro lado, el LTB<sub>4</sub> y el NO participan en las respuestas inducidas en los ensayos *in vivo* descritos en párrafos anteriores.

### 9.2.1. Producción de nitritos en macrófagos peritoneales de ratón.

El ensayo de producción de óxido nítrico se efectúa en macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos estimulados sintetizan y liberan un gran número de moléculas, como las especies reactivas de oxígeno, las enzimas lisosomales de acción fagocítica, los mediadores lipídicos, los factores de complemento, coagulación, crecimiento, de diferenciación y las

citosinas. Los agentes estimulantes pueden ser el TPA, el zimosan y lipopolisacáridos (LPS). El modelo consiste en la obtención de una población de macrófagos del abdomen de ratones con peritonitis inducida por tioglicolato. Las células aisladas se estimulan con LPS y el NO producido se determina mediante la presencia de nitritos. Por último, el método de Griess permite la cuantificación de nitritos (Dirsch *et al.*, 1998). Durante el ensayo de producción de óxido nítrico se determinan los efectos de las sustancias sobre la viabilidad celular mediante el ensayo bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (2) (Figura 42) (Mossman, 1983). El ensayo consiste en la reducción de MTT (color amarillo) por la acción de las enzimas mitocondriales (deshidrogenasas de succinato o lactato) presentes en las células viables. El formazan (1) (Figura 42) producido al final se cuantifica mediante un espectrofotómetro, el compuesto es de color violeta, insoluble en agua y soluble en dimetilsulfóxido (DMSO). El método constituye una medida de la respiración celular y la cantidad de formazan es proporcional al número de células vivas.

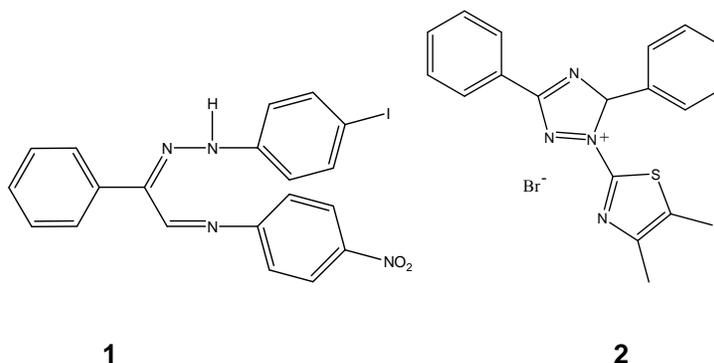


Fig. 42. Estructura química del Formazan y el MTT.

El NO regula diversos mecanismos de la inflamación (Figura 43). En el endotelio vascular, el NO producido constitutivamente inhibe las interacciones del leucocito al endotelio.

En tanto, la inflamación, el NO producido excesivamente es tóxico para los microorganismos y las células tumorales, también causa un severo daño tisular. Esto último a través de la oxidación de grupos sulfidrilos de aminoácidos y de la promoción de especies reactivas como óxidos de nitrógenos y peroxinitrito, moléculas consideradamente reactivas y oxidantes. También, el NO puede actuar sobre el factor NF- $\kappa$ B y coordina la producción de prostanoides y la respuesta inmune (Connelly *et al.*, 2001).

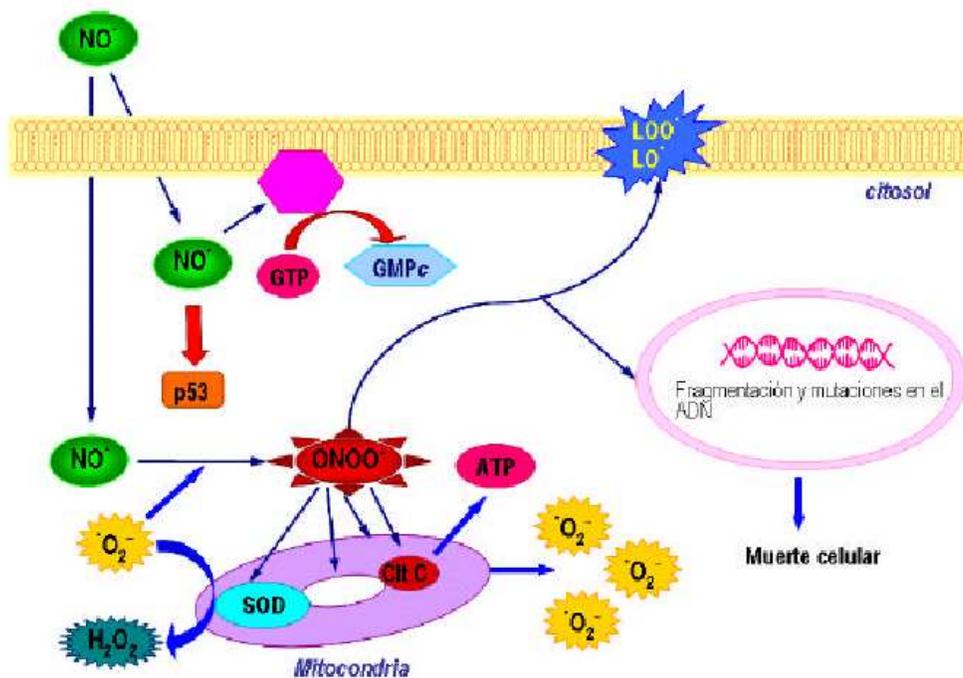


Fig. 43. Metabolismo óxido nítrico durante la inflamación. ADN, ácido desoxiribonucleico; ATP, trifosfato de adenosina; Cit C, citocromo C; CMPC, monofosfato de guanósina cíclico; GTP, trifosfato de guanósina;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno; LOO y LO, radicales lipoperóxido y lipoóxido; NO, óxido nítrico; ONOO, anión peroxinitrito;  $O_2^-$ , anión pueróxido; p53, proteína 53; SOD: dismutasa de superóxido.

### 9.3. Ensayos de citotoxicidad *in Vitro*.

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* establecen el índice de proliferación o viabilidad celular mediante el conteo de células vivas, los datos de inhibición indican la capacidad citotóxica de la sustancia evaluada. El ensayo consiste en la incubación de cultivos celulares de líneas tumorales en presencia o ausencia de sustancias de prueba; posteriormente, las células se fijan y el efecto de viabilidad se determinan mediante el ensayo colorimétrico de Sulforhodamina B (Figura 44) (SRB) (Skehan *et al.*, 1990).

El método se fundamenta en la tinción de proteínas celulares totales con el colorante SRB, el cual es un aminoxantano, que contiene dos sustituyentes sulfónicos y en condiciones ligeramente ácidas, el carácter aniónico de la SRB forma enlaces electrostáticos exclusivamente con aminoácidos básicos (histidina, lisina, arginina) de células vivas. El método es simple, seguro y genera resultados reproducibles (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991).

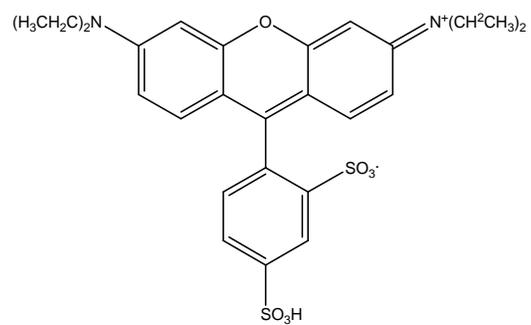


Fig. 44. Estructura química de la Sulforhodamina B.

## II. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.

# *II. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.*

## II. Justificación del tema.

Las plantas medicinales y los extractos obtenidos de ellas, presentan una alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades. En México grandes poblaciones utilizan a las plantas medicinales como único recurso para su salud. En la actualidad, varios fármacos incluyen una molécula de origen natural. La aspirina, la atropina, la efedrina, la digoxina, la morfina, la reserpina y la tubocumarina son algunos ejemplos de estos fármacos (Anwarul y Atta-ur-Rahman, 2005).

Por otro lado, los triterpenos son productos naturales que generalmente se encuentran en las especies vegetales, además poseen una variedad de propiedades biológicas. Por ejemplo, los triterpenos tetracíclicos poseen propiedades antimicrobianas (Cantrell *et al.*, 1996), citotóxica (Gan *et al.*, 1998), inmunomoduladora (Calis *et al.*, 1997), y antiinflamatoria entre otras. Otro dato interesante es que muchos triterpenos se han utilizado como moléculas prototipo para generar un número de derivados con actividad farmacológica en especial.

Por otro lado, los flavonoides han adquirido notoriedad pública a raíz de su actividad biológica en el hombre que los consume con los vegetales. Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos (Winkel-Shirley, B. 2001). A través del tiempo, los productos naturales han contribuido de manera importante para el descubrimiento y desarrollo de fármacos anticancerosos entre ellos podemos mencionar, los alcaloides vinblastina y vincristina aislados de *Cantharantus roseau*, o los derivados semisintéticos irinotecan y etoposido provenientes de la epipodofilotoxina o el taxol aislado del *Taxus brevifolia*, (Mann 2002; Chabner y Roberts 2005; Cragg y Newman 2005).

Tomando en cuenta lo anterior, en este proyecto se propone la obtención de la 25-O-palmitil argentatina B y la 16, 25 di-O-palmitil argentatina A a partir de las argentatinas A y B al ser tratadas por separado con el cloruro del ácido palmítico. También, se propone la obtención de la 7-O- $\beta$ -D-glucosil-acetina y su derivado tetra-acetilado además de sus evaluaciones biológicas

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

## *III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.*

## Objetivo General.

Obtención y evaluación de las propiedades citotóxicas, antiinflamatorias y como inhibidor del óxido nítrico sintasa inducible por las moléculas 25-*O*-palmitil argentatina B, la 16,25-di-*O*-palmitil argentatina A, 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil acetina y la penta-acetil 7-*O*-glucopiranosil acetina.

### Objetivos Particulares.

- Aislar las argentatinas A y 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).
- Aislar la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil acetina a partir de *Agastache mexicana* Subs. *mexicana*.
- Identificar las argentatinas A y B, así como a la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina por métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales (IR, RMN, EM).
- Obtener los derivados acilados de la argentatina A, la argentatina B y de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina.
- Caracterizar los derivados de la argentatina A y B así como de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales (IR, RMN, EM).
- Evaluar la actividad citotóxica de la 25-*O*-palmitil argentatina B, la 16,25-di-*O*-palmitil argentatina A, 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina y la penta-acetil 7-*O*-glucopiranosil acetina.

- Evaluar la actividad antiinflamatoria de la 25-*O*-palmitil argentatina B, la 16, 25 di-*O*-palmitil argentatina A, 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina y la penta-acetil 7-*O*-glucopiranosil acetina utilizando el método de inducción de edema por el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA).
- Evaluar la capacidad inhibitoria de las moléculas 25-*O*-palmitil argentatina B, la 16, 25 di-*O*-palmitil argentatina A, 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina y la penta-acetil 7-*O*-glucopiranosil acetina sobre la óxido nítrico sintasa inducible.

### **Hipótesis.**

Si los fármacos y principios activos con mayor carácter lipofílico pueden cruzar más fácilmente la membrana celular y por consiguiente tener un mayor efecto biológico, entonces los ésteres del ácido palmítico de la argentatina A, la argentatina B y el penta acetato de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina presentarán mayor potencia biológica que los compuestos de partida.

IV. SECCIÓN EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

*IV. SECCIÓN  
EXPERIMENTAL Y  
RESULTADOS*

## 1. QUÍMICA

### 1.1. Material y equipo.

Los diferentes disolventes utilizados, fueron purificados mediante destilación simple y fraccionada en condiciones normales y anhidras.

Los procedimientos de cromatografía en columna (cc) se efectuaron en columnas de vidrio de diferentes capacidades. Se utilizaron, tonsil, o sílice 60 Ahigram Sil G. kiesel, malla 70-230, (Merck), como soportes, para los diferentes procedimientos cromatográficos. Las cromatografías en capa fina (ccf) se realizaron en cromatofolios de aluminio cubiertos de sílice DC Fertigplatten Sil G200, UV (Merck), de 0.2 mm de espesor con indicador de fluorescencia UV 254. Como reveladores se emplearon una disolución de sulfato cérico ( $\text{Ce}_2\text{SO}_4$ ) al 1 por ciento en ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Baeker) 2N; y una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Cole Parmer 9815 series). La destilación de las diferentes mezclas de disolventes de las fracciones cromatográficas se realizó a presión reducida en un rotavapor Buchi 110.

Los puntos de fusión de los compuestos en estudio se determinaron en un equipo Fisher Johns y no fueron corregidos.

Los espectros de absorción en la región infrarroja (IR) se obtuvieron en los espectrofotómetros Nicolet modelo Magna 750 y Nicolet FT-IR5-SX. Las muestras se prepararon en mezcla con KBr (pastilla) o en solución en  $\text{CHCl}_3$ . Las absorbancias se midieron en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica RMN ( $^1\text{H}$ ) y de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) se adquirieron en espectrómetros Varian Gemini XL-200, Varian VXR 300. Para disolver las muestras, se utilizaron el cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) y el sulfoxido de dimetilo ( $\text{DMSO } d_6$ ) deuterados (Aldrich) se empleó el tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en partes por millón (ppm). Las señales protónicas se indicaron con las siguientes abreviaturas: (s) señal simple, (d) señal doble, (t) señal triple (q) señal cuadruple, y (m) múltiple. Las constantes de acoplamiento (J)

están expresadas en Hertz (Hz). Los experimentos adicionales de RMN incluyeron DEPT, COSY y HÉTCOR.

Los experimentos de espectrometría de masas (EM) se realizaron en un espectrómetro JEOL JMS AX 505 HA mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Los resultados se presentaron como relación de masa respecto de la carga (m/z).

#### 1.1.1. Material diverso.

- Matraz elernmeyer de 25mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL.
- Vaso de precipitado 50 mL, 100 mL, 250 mL.
- Frasco de vidrio de 500 mL.
- Soporte universal.
- Pinza de tres dedos con nuez.
- Agitador magnético.
- Matraz kitazato de 25mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL.
- Embudo de separación.
- Embudo büchner.
- Embudo kirsh.
- Embudo de tallo corto.
- Papel filtro.
- Agitador de vidrio.
- Equipo de destilación simple 24/40.
- Matraz balón entrada 24/40 de 50mL, 100 mL, 150 mL.
- Matraz balón de 3 bocas de 100 mL.
- Espátulas de acero inoxidable diferentes tamaños.
- Pissetas.
- Placas cromatográficas de vidrio de 20 x 20 cm<sup>2</sup> recubiertas con gel de sílice F<sub>254</sub> de 0.2 y 2 mm de espesor respectivamente CCf y CCP marca (Merck).
- Columnas de vidrio diferentes capacidades.
- Septum.
- Pipetas graduadas de 5mL y 10 mL.

- Perilla de seguridad.
- Pipetas Pasteur.

### **1.1.2. Equipos.**

- Balanza semi analítica Ohaus GT4800.
- Balanza analítica Sartorius AC211P.
- Rotavapor Buchi-B-480.
- Canastilla de calentamiento para matraces de 50, 100 , Osyma OO-23.
- Reóstato Grascot BL3122.
- Agitador magnético Curtin Matheson Magnestin 214-924.
- Parrilla de calentamiento con agitación Barnstead Cimarec SP131015.
- Lámpara UV Spectroline ENF-240C.
- Gabinete para lámpara UV Spectroline CM-10 análisis cabinet.
- Parrilla de calentamiento Osyma HP-85.
- IR m Nicolet FT-55X.
- RMN Varian XL-300.
- EM acoplado a CG Hewlett-Packard 59858.
- Fisher Johns.
- Baño maría Buchi-B-480.

### **1.1.3. Reactivos para el aislamiento de los metabolitos secundarios y la preparación de los derivados.**

- Hexano.
- Éter isopropílico.
- Éter etílico.
- Acetato de etilo.
- Metanol.
- Diclorometano.
- Etanol.
- Tetrahidrofurano.
- Agua destilada.
- Cloruro de tionilo.

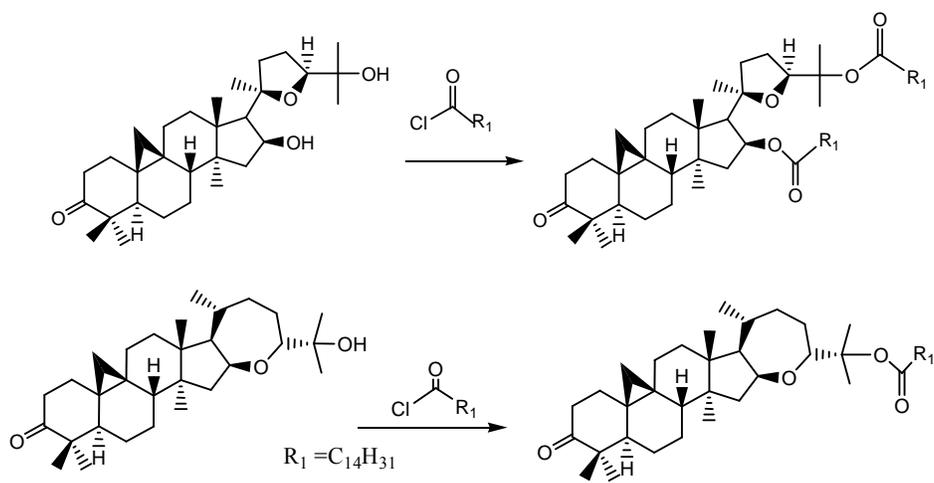
- Bicarbonato de sodio.
- TMS.

#### 1.1.4. Reactivos pruebas biológicas.

- TPA.
- Pentobarbital.
- Indometacina.
- Tioglicolato.
- Penicilina.
- Tripsina-EDTA.
- DMSO.
- Sulforrodamina.
- Ácido tricloroacético.
- Doxorrubicina.
- Agua destilada.
- Etanol.

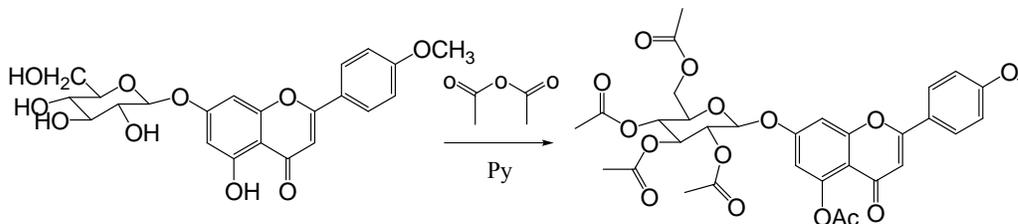
#### 1.2. Esquema general de los derivados.

La 25-*O*-palmitoil argentatina B y la 16, 25 di-*O*-dipalmitoil argentatina A, se obtuvieron a partir de la respectiva argentatina al ser tratadas con cloruro de palmitoil (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención de la 16 $\beta$ ,25-dipalmitoil-(16*S*, 17*R*, 20*S*, 24*R*)-20,24-epoxi-cicloartan-3-ona, y la 25-palmitoil-16 $\beta$ ,24-epoxi-cicloart-3-ona,

La obtención de la pentacetil 7-*O*-β-glucopiranosil acetina se llevó a cabo por la reacción de la 7-*O*-β-D-glucosil-acetina con anhídrido acético en piridina (Esquema 2).



Esquema 2. Obtención de la pentacetil 7-*O*-glucopiranosil acetina.

### 1.3. Obtención de la (16*S*, 17*R*, 20*S*, 24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona (argentatina A) y la 16β, 24*R*-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (argentatina B).

#### 1.3.1. Resina

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 natural a partir del guayule (*Parthenium argentatum*)

#### 1.3.2. Aislamiento de las argentatinas [1] y [2].

La resina (55.84 g) se absorbió en 100 g de tonsil y se cromatografió en una columna abierta empacada con tonsil (tonsil es el nombre comercial de una arcilla bentonítica con la siguiente composición: SiO<sub>2</sub> (72.5%), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (13%), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (5%), MgO (1.5%), CaO (7.2%), y H<sub>2</sub>O (8.5%), con un pH 3). La elusión se realizó inicialmente con hexano y posteriormente con mezclas de hexano acetato de etilo de polaridad creciente. Se obtuvieron 43 fracciones de 200 mL, reuniéndose aquellas fracciones con un perfil similar en ccf. (Tabla 2). De las fracciones 25-33, eluidas con mezclas de Hex:AcOEt (8:2), se obtuvo 7.675 g de argentatina B (**2**) (13.53 % de rendimiento a partir de la resina) y de las fracciones 34-43, eluidas con mezclas de Hex:AcOEt (7:3) se obtuvo 5.2 g de argentatina A (**1**) (17.25% de rendimiento a partir de la resina). La identificación de **1** y **2** se realizó por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura (Martínez-Vázquez, et al 1990, Parra *et al* 2005).

Tabla 2. Obtención de las argentatinas A y B, mediante cromatografía en columna de la resina del *P. argentatum*.

Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas	Compuestos	Rendimiento (%)
Hexano	100	-	-	-
Hexano:AcOEt	80-20	25-33	Argentatina B	13.53
Hexano:AcOEt	70-30	34-43	Argentatina A	17.25
AcOEt	100	-	-	-

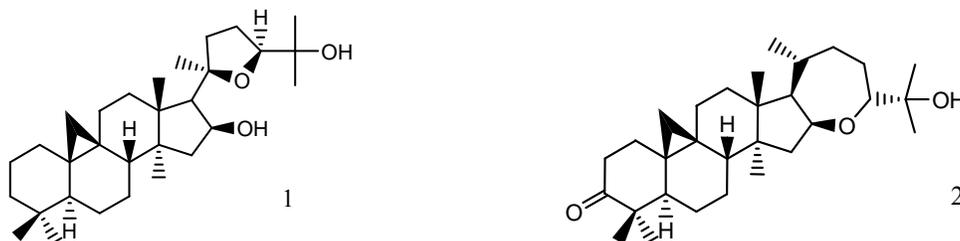
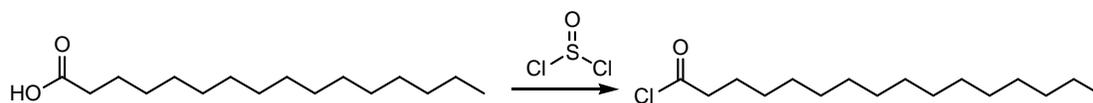


Fig. 45. Estructuras de la argentatinas A (1) y B (2).

#### 1.4. Obtención de los derivados de las argentatinas [1] y [2].

La reacción de las argentatinas A (1) y B (2) con el cloruro de hexadecanoilo (cloruro de palmitoilo) permitió la obtención de los respectivos ésteres. El cloruro de palmitoilo se preparó, a partir del ácido palmítico. A continuación, se describen los métodos de obtención y los datos fisicoquímicos y espectroscópicos de los derivados obtenidos a partir de las argentatinas A y B.

##### 1.4.1. Obtención del cloruro de hexadecanoilo (cloruro de palmitoilo).

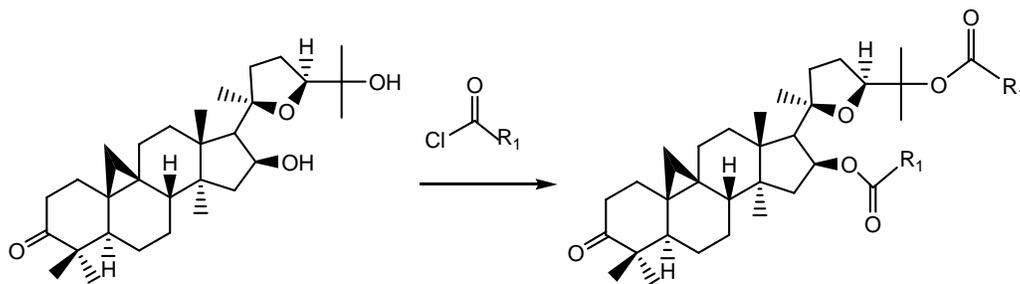


Esquema. 3. Obtención del cloruro de hexadecanoilo.

En un matraz de tres bocas se colocó 0.15 mmol de ácido palmítico, el cual, mediante un agitador magnético, se mantuvo en agitación constante. En una de las bocas se colocó un refrigerante en cuya parte superior se colocó una trampa de humedad unida a una manguera conectada a un vaso de precipitado que contenía una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , las dos bocas restantes se mantuvieron cerradas con tapones de neopreno

(septum). Posteriormente se inyectaron 2 mL de cloruro de tionilo, y la reacción se colocó en baño maría a una temperatura de 50°C. Durante el calentamiento, la liberación del cloruro de hidrógeno se observó como un burbujeo constante en el vaso de precipitado con la solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. El calentamiento se dejó durante 30 minutos adicionales, transcurrido este tiempo ya no se observó burbujeo en el vaso de precipitado. Posteriormente, mediante una destilación a presión reducida, el exceso de cloruro de tionilo, fue eliminado de la mezcla de reacción. Con el fin de prevenir la hidrólisis del producto, el sistema se mantuvo en atmósfera de helio (atmósfera inerte).

#### 1.4.2. Obtención de la 16,25-dipalmitoil- (16S, 17R, 20S, 24R)-20,24-epoxi-cicloartan-3-ona (dipalmitato de argentatina A) [3].



Esquema 4. Obtención del dipalmitato de argentatina A (**3**).

A 0.15 mmol de cloruro de hexadecanoilo, previamente obtenido y en atmósfera inerte se le adicionó 0.22 mmol de argentatina A, disueltos en 4 mL de diclorometano seco. La reacción se dejó en agitación por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, a la mezcla de reacción, se le agregó 15 mL de acetato de etilo y se colocó en un embudo de separación.

La fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada y tres veces con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a presión reducida. La mezcla de reacción fue cromatografiada en columna abierta y empacada con sílice. Como mezcla de elución se utilizó la mezcla hexano-acetato de etilo (7:3). De las fracciones 3-8 se obtuvieron 50 mg de un sólido blanco amorfo con p.f. de 246 °C con un rendimiento de 70 %.

**IR** (solución  $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2920.70, 2851.35 (CH), 1732.60 (C=O), 1707.92 (C=O), 1463.77, 1379.20, 1270.56, 1153.83.

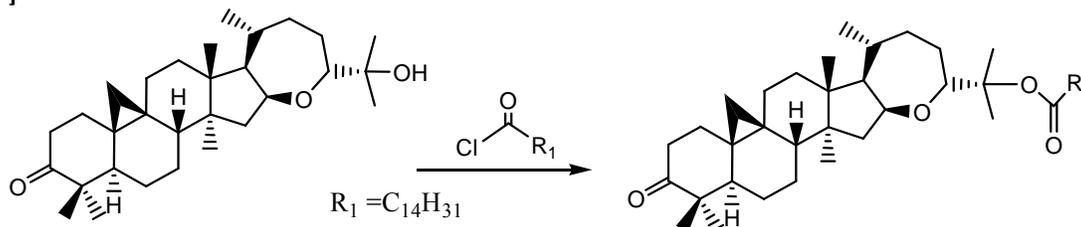
**EM-FAB**  $^+$  m/z, (%): 948 (1), 933 (5), 437 (77), 381 (34), 125 (100), 43 (93).

**EM-IE** (70 eV), m/z, (%): 692 [ $\text{M}^+$  - ác. palmítico] (6), 436 (24), 381 (22), 256 (22), 125 (100), 43 (54).

**RMN**  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 5.44 (1H, ddd  $J=5.4$ ,  $J=2.7$  y  $J=12.3$  Hz, H-16), 3.66 (1H, dd,  $J=6.9$  Hz y  $J=8.51$  Hz, H-24), 1.38 (3H, s), 1.25 (m, para dos grupos  $\text{CH}_3$  y varios  $\text{CH}_2$  del residuo de palmitato), 1.14 (3H, s), 1.09 (3H, s), 1.04 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.81 (1H, d,  $J=4.3$  Hz, H-19a), 0.59 (1H, d,  $J=4.3$  Hz, H-19b).

**RMN**  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 215.68 (C3), 175.46 y 172.91 (carbonilos de los ésteres de palmitato), 81.91 (C24), 81.89 (C25), 74.45 (C16), 56.35 (C17), 49.58 (C4), 47.84 (C8), 47.15 (C5), 46.15 (C13), 46.02 (C14), 44.91 (C15), 35.97 (C2), 36.80 (C22), 33.64 (C1), 32.64 (C12), 29.56 (C19), 29.54 (metilenos del residuo de palmitato), 29.01 (C20), 26.30 (C11), 25.88 (C7), 27.90 (C26), 27.36 (C27), 24.40 (C23), 21.61 (C21), 21.61 (C18), 20.19 (C29), 19.63 (C30), 14.07 (Metilos del palmitato).

#### 1.4.3. Obtención de la 25-palmitoil-16 $\beta$ , -24-epoxi-cicloart-3-ona (palmitato de argentatina B) [4].



Esquema 5. Obtención del palmitato de argentatina B (4).

A 0.15 mmol de cloruro de hexadecanoilo, previamente obtenido y en atmósfera inerte se le adicionó 0.23 mmol de argentatina B disuelto en 4 mL de diclorometano seco. La reacción se dejó en agitación por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se le agregó 15 mL

de acetato de etilo y se colocó en un embudo de separación. La fase orgánica se lavó tres veces con agua destilada y tres veces con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo sólido resultante fue purificado por cristalizaciones sucesivas con hexano y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se obtuvieron 70 mg de un sólido blanco amorfo con p. f. de 237 °C con un rendimiento de 80%.

**IR** (Disolución  $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2925.93, 2854.13 (CH), 1732.04 (C=O), 1708.51(C=O), 1462.96, 1379.60, 1235.63, 1183.89.

**EM-FAB<sup>+</sup>**: Análisis elemental. Experimental 694.5907 m/z, para una formula  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_4$  calculado 694.5900.

**EM-IE** (70 eV), m/z, (%): 694 (3), 438 (100), 397 (78), 379 (24), 311 (35), 43 (18).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 4.61 (1H, dd J=7.98 y J=14.83 Hz, H-16), 3.80 (1H, dd, J=1.92 y J=12.51 Hz, H-24), 1.43 (3H, s), 1.40 (3H, s), 1.25 (m,  $\text{CH}_2$  del residuo de palmitato), 1.16 (3H, s), 1.09 (3H, s), 1.04 (3H, s), 0.93 (3H, d, J=6.3 Hz, H-21), 0.81 (1H, d, J= 4.3 Hz, H-19a), 0.58 (1H, d, J=4.3 Hz, H-19b).

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 216.35 (C3), 173.00 (carbonilo del palmitato), 84.81 (C24), 80.50 (C25), 74.44 (C16), 57.28 (C17), 50.21 (C4), 48.45 (C5), 47.35 (C8), 45.72 (C13), 45.72 (C14), 44.85 (C15), 37.4 (C2), 35.35 (C22), 33.80 (C1), 32.74 (C12), 29.70 (C19), 29.54 (metilenos del residuo de palmitato), 29.01 (C20), 26.30 (C11), 26.00, (C7), 25.26 (C27), 23.36 (C23), 22.19 (C29), 21.08 (C30), 14.07 (Me del palmitato).

## 1.5. Obtención de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acacetina (glucosido de acacetina) [5].

### 1.5.1. Material vegetal.

Las partes aéreas del toronjil morado (*Agastache mexicana* susp. *mexicana*), fueron recolectadas en Ozumba Estado de México.

### 1.5.2. Obtención del precipitado soluble en metanol.

Se colocaron 500g de flores de toronjil morado en 2 litros de metanol, dejándose en reposo durante 3 días. Posteriormente, se filtro desechando el residuo vegetal y la solución se concentró mediante destilación a presión reducida utilizando un rotavapor. Al extracto obtenido, se le realizó extracciones con 300 mL de hexano separando la fase hexánica (H1). La fracción metanólica se extrajo con 300 mL de diclorometano, separando de igual manera la fase de diclorometano (DC). Las fases H1 y DC se concentraron para su posterior separación. El disolvente de la fracción metanólica fue eliminado por destilación a presión reducida obteniéndose un residuo sólido (S1). Con el fin de disolver S1, se trató con metanol a temperatura ambiente, obteniéndose una solución metanólica (M1) y un sólido el cual se filtró (S2). El residuo S2 se trató con metanol caliente, obteniéndose una solución (M2) y un sólido (S3) el cual se filtró. Al colocar la solución M2 sobre hielo precipito un sólido (S3).

### 1.5.3. Obtención de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acacetina (glucosido de acacetina) [5].

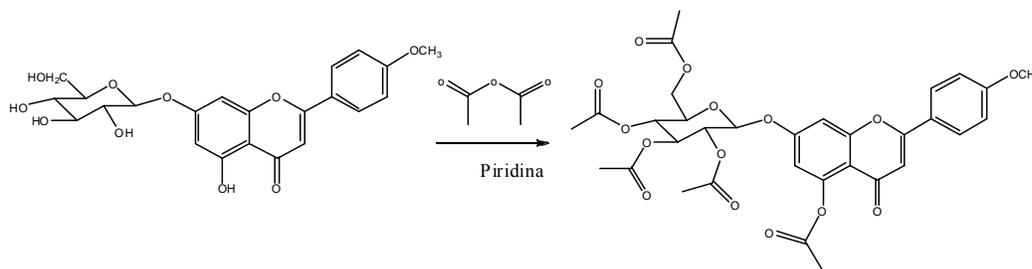
El precipitado S3 (10 g), fue cromatografiado en una columna abierta empacada con sílice (30 g). Inicialmente el sistema de elusión fue hexano, obteniéndose 5 fracciones. Posteriormente, se cambió de polaridad, utilizando una mezcla de elución conformada por 9.9 acetato de etilo y 0.01 mL de una mezcla constituida por 0.05 mL de metanol y 0.05 mL de agua. La polaridad de elusión se incrementó, aumentando la proporción de la mezcla metanol agua, como se indica en la tabla 3. Se obtuvieron 5 fracciones en cada mezcla Todas las fracciones presentaron precipitados, los cuales fueron filtrados y purificados con mezclas de metanol, éter isopropílico.

Tabla 3. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto metanólico de *Agastache mexicana* susp. *mexicana*.

Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas	Compuestos
Hexano	100	5	-
AcOEt:mezcla a.	99:9-0.1	5	A
AcOEt:mezcla b	99.8-0.2	5	B
AcOEt:mezcla c	99.7-0.3	5	C
AcOEt:mezcla d	99.6-0.4	5	D

Mezcla a: metanol:agua (0.05:0.05 mL), mezcla b: metanol:agua (0.1:0.1 mL), mezcla c: metanol:agua (0.15:0.15 mL), mezcla d: metanol:agua (0.2:0.2 mL). La comparación de los corrimientos en ccf de los cuatro precipitados obtenidos (A-D) indicó que se trataba del mismo compuesto. La identificación de este producto se logró por la comparación de sus datos físicos y espectrales con aquellos publicados para la 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [ 5 ] (R. Estrada R. *et al* 2004).

### 1.6. Obtención del pentacetil 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [6].



Esquema 6. Obtención del pentacetil 7-*O*- $\beta$ -glucopiranosil acetina.

Se pesaron 0.22 mmol de 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina y se colocaron en un matraz redondo de 50 mL, al cual se le agregó 2 mL de piridina y 2 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se calentó a 60°C por 24 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo, precipitándose el producto de acetilación el cual se filtró. El sólido, así obtenido se disolvió en acetato de etilo. Para eliminar el agua residual, la solución

orgánica fue tratada con sulfato de sodio anhidro, se filtró para eliminar el desecante y se concentró a presión reducida. Obteniéndose un sólido el cual fue purificado por cristalización con éter isopropílico, obteniéndose un sólido amorfo con un punto de fusión de 295°C.

**IR**(Pastilla KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2950.13, 2845.12 (CH), 1752.74 (C=O), 1645.51(C=O), 1610.47(C=C),1037.09(-O-), 1430.96, 1303.25, 1221.42, 1176.59.

**EM-IE** (70 eV), m/z, (%): 656 (5) formula molecular  $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$ , 331 (38), 169 (100), 109 (44), 43 (45).

**RMN**  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm:: 7.79 (2H, d, J= 9 Hz, H-6' y H-2' ), 7.00 (2H, d, J= 9 Hz, H-5' y H-3' ), 6.99 (1H, d, J= 1.5 Hz, H-8), 6.67 (1H, d, J= 2.4 Hz, H-6), 6.53 (1H, s, H-3), 5.34-3.95 (7H, m, glucosa), 3.88 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 2.43 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ), 2.02-2.04 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{COO}$ ).

**RMN**  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz, DMSO),  $\delta$  (ppm): 176.27 (C-4), 170.43 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ , C-6''), 170.08 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ , C-4''), 169.54 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ , C-2''), 169.34 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ , C-3''), 169.17 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ , C-5), 162.52 (C-7), 162.42 (C-9), 159.83 (C-5), 158.31 (C-2), 150.69 (C-4'), 127.88 (C-2', C-6'), 123.35 (C-1'), 114.49 (C-3', C-5'), 112.82 (C-10), 109.17 (C-6), 107.09 (C-3), 102.72 (C-8), 98.16 (C-1'') 72.50 (C-5''), 72.45 (C-2''), 70.95 (C-4''), 68.19 (C-3''), 61.98 (C-6''), 55.52 ( $\text{OCH}_3$ ), 21.10 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ , C-5), 20.57 ( $\text{CH}_3\text{COO}$  de glucosa)

## 2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano, el efecto antiinflamatorio y la modulación de la producción de óxido nítrico en macrófagos, de derivados menos polares de la argentatinas A y B así como de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acacetina y su derivado penta acilado.

En esta investigación se emplearon dos modelos de experimentación biológica:

Un experimento *in vivo*:

- Edema inducido por TPA en la oreja de ratón.

Dos experimentos *in vitro*:

- Producción de NO en macrófagos peritoneales de ratón,
- Citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.

Los animales utilizados en los ensayos se adquirieron en el bioterio del instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se manipularon de acuerdo con la condiciones establecidas por el Comité de Usos y Cuidados de Animales de Experimentación, de acuerdo a la Ley General de Salud (PROY-NOM 087-ECOL-SSA1-2000). Esta norma establece la colocación de los animales de experimentación dentro de cajas de polipropileno translucidas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, y en condiciones ambientales controladas (20-22 °C de temperatura y 50-60% de humedad). Los animales recibieron agua y una dieta estándar de laboratorio.

### 2.1. Métodos *in vivo*.

#### 2.1.1. Modelo de edema inducido por TPA.

Se utilizaron ratones machos de la cepa NIH con un peso comprendido entre 25-30g. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupo (n=4-9) control (recibieron TPA más el vehículo), de prueba (recibieron TPA más las sustancias problema) y de referencia (recibieron TPA más indometacina o ácido ursólico).

### 2.1.1.1. Procedimiento.

El ensayo se realizó conforme a la técnica establecida por De Young *et al.* 1989 y con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). A continuación se describe el procedimiento realizado (Figura 46).

Los ratones se anestesiaron con 0.25 mL de pentobarbital (Sedalforte<sup>R</sup>, 0.063 g/mL) por vía intraperitoneal (*ip*). Posteriormente, una disolución etanólica de 2.5 µg de TPA (sigma) se administró en el pabellón de la oreja derecha de todos los animales (5 µL en cada lado. Las sustancias de prueba y los fármacos de referencia se aplicaron 10 min. Después (10 µL en cada lado).

La oreja izquierda sirvió como control negativo; primero se administraron 10 µL de etanol (EtOH), y luego 20 µL del vehículo correspondiente. Después de 4 h, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y de ambas orejas se obtuvieron las biopsias con ayuda de un sacabocados circular.

El edema se determinó de la diferencia de pesos (en mg) del tejido tratado (oreja derecha), respecto al tejido no tratado (oreja izquierda). Los porcentajes de inhibición del edema (%*IE*) se calcularon de acuerdo con la ecuación (1). En donde A corresponde el valor promedio del edema en el grupo control, B el valor promedio del edema en el grupo de prueba o de referencia.

$$\% IE = 100 - [B / A \times 100] \quad (1)$$

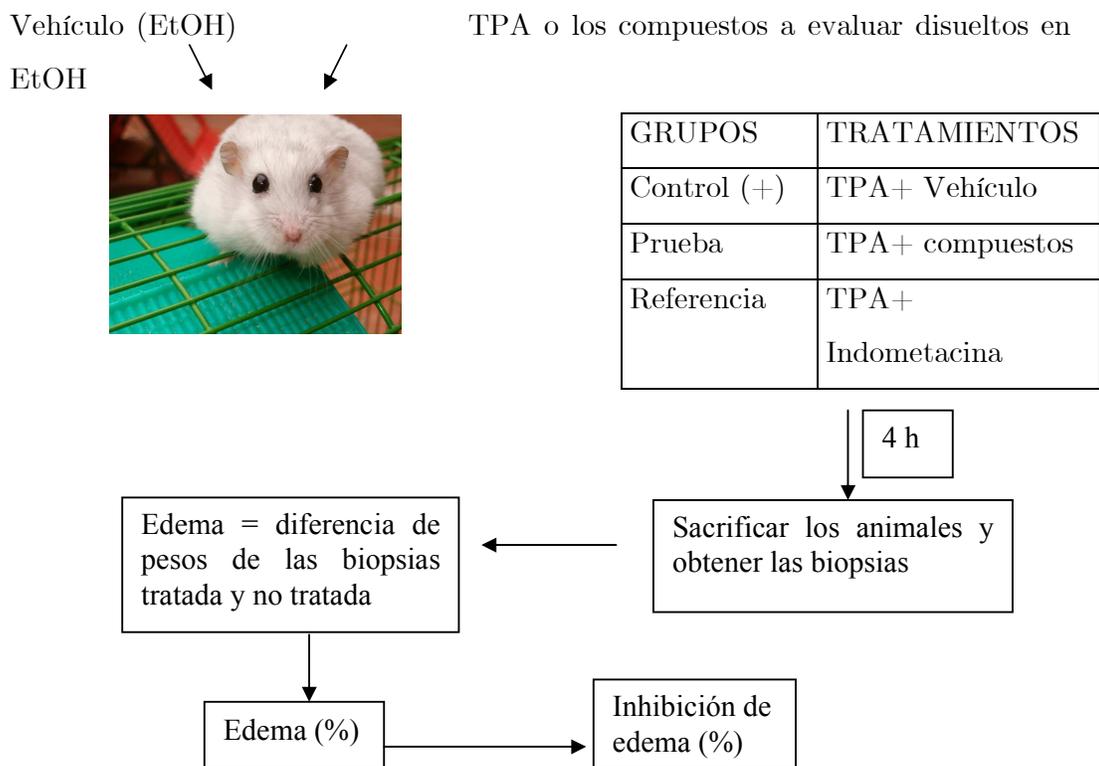


Fig. 46. Modelo de edema agudo inducido por TPA en la oreja de ratón.

### 2.1.1.2. Resultados.

Los resultados (tabla 4) se expresaron en valores de media y error estándar (media +/- EEM)

Tabla 4. Resultados obtenidos en el modelo de TPA de los derivados sintetizados a partir de las argentatinas A, B y del glucósido de acetina.

Muestra	Dosis mg	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	-----	14.35	-----
Argentatina A [1]	1	4.4	83.65
Dipalmitato de argentatina A [3]	1	7.7	47.50
Argentatina B [2]	1	4.7	84.99
Palmitato de argentatina B [4]	1	3.87	73.05
Glucosido de acetina [5]	1	14.45	- 3.07
Pentacetilado de acetina [6]	1	2.30	81.94

## **2.2. Métodos *in Vitro*.**

### **2.2.1. Producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón.**

Las células se obtuvieron de la cavidad de ratones Swiss y CD-1, hembras de 25-30 g (n = 3-5). El lipopolisacárido (LPS) provenía de *Escherichia coli*. Serotipo 055:B5 (Sigma). Se evaluaron las argentatinas A, B y la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina [1] [2] [5], así como sus derivados esterificados [3] [4] [6].

#### **2.2.1.1 Procedimiento.**

El procedimiento (Figura 47) se realizó de acuerdo con las especificaciones establecidas por Fushiya *et al.* (1998). Con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004 y 2005).

##### **2.2.1.1.1. Aislamiento y cultivo primario de macrófagos.**

En el peritoneo de los animales se aplicó 1 mL del medio tioglicolato de Brewer (BD bioxon, becton Dickinson de México) al 3% p/v. después de 72 h, se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> en la pared abdominal se administraron 10 mL de medio de cultivo modificado duilbecco's (DMEM) (GIBCO, Gran isla, Nueva York, Estados Unidos), suplementado con penicilina 8 (50  $\mu$ g/mL), estreptomina (50UI/mL) y suero bovino fetal (SBF,GIBCO) al 5%. Se realizó un masaje abdominal vigoroso, y se extrajo el líquido peritoneal. A continuación se colocó en tubos de polipropileno y se centrifugó durante 6 min a 3400 rpm y una temperatura de 20°C, los eritrocitos contaminantes se destruyeron con agua desionizada. El extracto celular final se suspendió en DMEM, y se depositó en platos de cultivo de 24 pozos (Becton Dickinson, Oxnard, California, Estados Unidos) a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup>células/mL. Las placas se colocaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% durante 2h a 37 °C. Posteriormente, se lavaron con medio fresco adicionado SBF al 10%.

##### **2.2.1.1.2. Producción del óxido nítrico.**

Los macrófagos fijados (más de 95% de acuerdo con un análisis citomorfológico y tinción de Giemsa observados en un microscopio de contraste de fases) se resuspendieron en medio DMEM y se manipularon de dos maneras. En una, 100  $\mu$ L de un cultivo de

macrófagos  $80.5 \times 10^6$  células/mL) se trataron con LPS ( $50 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia o presencia de sustancias de prueba o de referencia ( $50 \mu\text{L}$ ). La adición de LPS se efectuó en tiempos diferentes; en el protocolo I se agregó simultáneamente con las sustancias a evaluar; y en el protocolo II se adicionó 4 h después de las sustancias. Las placas se incubaron durante 24 h, a  $37^\circ\text{C}$  (Oviedo-Chavez *et al.*, 2004).

El otro procedimiento comprendió el tratamiento preliminar de los macrófagos ( $0.5 \times 10^6$  células/mL) con una disolución de enzima dismutasa de superóxido (SOD), a una dosis de  $60 \text{ U/mL}$ . Posteriormente, las células se trataron con o sin LPS ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), en ausencia o en presencia de los triterpenos o ácido ursólico como referencia. Las placas se incubaron durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  (Oviedo-Chavez *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.1.3. Determinación del óxido nítrico.**

La producción del óxido nítrico en los sobrenadantes de cultivo celular se efectuó mediante la cuantificación de nitritos, la cual se realizó a través de la reacción de Griess (Dirsch *et al.*, 1998). Primero se preparó el reactivo constituido por una mezcla, en una relación 1:1, de una disolución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5%, y diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina al 0.1% en agua desionizada. A continuación, en una placa de 96 pocillos se mezclaron  $100 \mu\text{L}$  de cada sobrenadante con  $100 \mu\text{L}$  del reactivo de Griess.

La placa se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación, durante 10 min. Posteriormente, las absorbancias se determinaron en un lector de placas 8 Eix 808, BIO-TEK instruments, Inc, a una longitud de onda de 515 nm. La concentración de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) se obtuvo por la interpolación de los resultados de densidades ópticas (DO) en una curva estándar de nitrito de sodio; la cual se construyó con concentraciones desde 0.01 hasta  $50 \mu\text{M}$ . Las absorbancias se relacionaron directamente con la concentración del óxido nítrico. La inhibición de la cantidad del óxido nítrico (% I) se calculó de acuerdo con la ecuación 2, en donde A corresponde al valor promedio de concentraciones de óxido nítrico en el grupo control y B es la cantidad de óxido nítrico de cada grupo de ensayo.

$$\% \text{ I } 100 - [ \text{ B } / \text{ A } \times 100 ] \quad (2)$$

#### 2.2.1.1.4. Viabilidad celular.

Los efectos de las sustancias de ensayo sobre la viabilidad celular se determinaron mediante el método colorimétrico de MTT (Mossman, 1983). A continuación se describe el procedimiento. Se preparó una disolución de MTT (Sigma) en amortiguador de fosfatos (Sigma) a una concentración final de 5 mg/mL, enseguida, la disolución se adicionó a la placa con células tratadas (10 µL/pozo). Posteriormente, la placa se incubó durante 4 h a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Los cristales de Formazan generados en cada pozo se disolvieron en DMSO (100µL). La placa se mantuvo en agitación durante 10 minutos, posteriormente se midieron las absorbancias a 515 nm y 690 nm de referencia. En la figura 47, se describe el procedimiento mencionado. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon considerando las absorbancias de cada grupo de ensayo con respecto a las del grupo control.

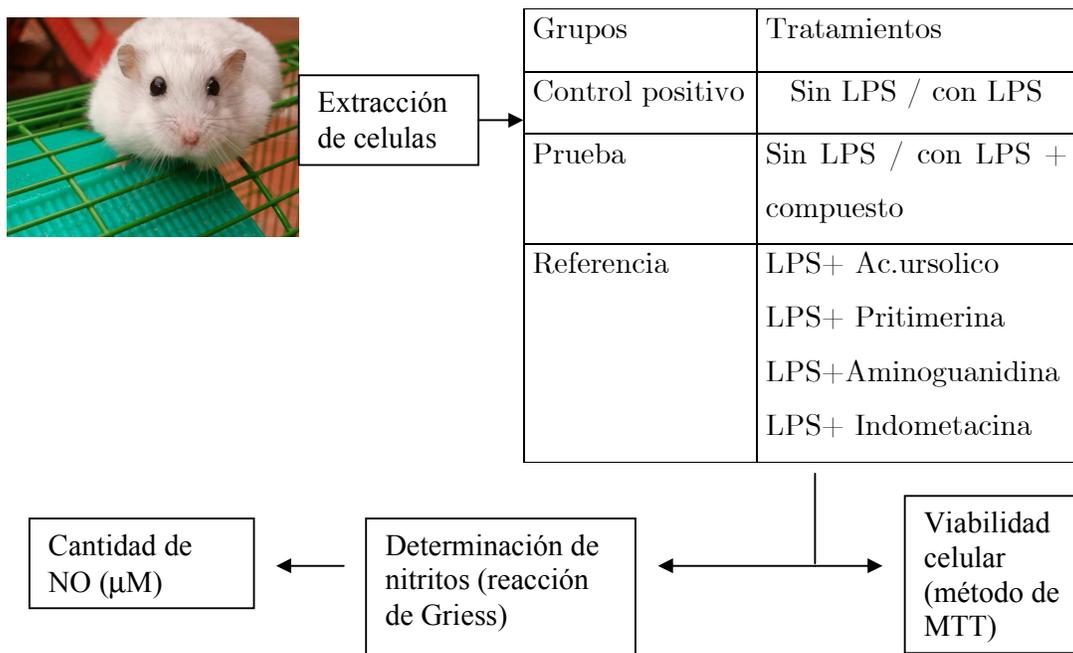


Fig. 47. Producción del óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón.

### 2.2.1.2. Resultados.

En la tabla 5 se muestran los resultados (media +/-EEM) como concentración del óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) y porcentajes de inhibición (%I) en macrófagos estimulados por LPS, y tratados con las argentatinas A, B y la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina así como sus derivados esterificados.

Tabla 5. Resultados obtenidos del modelo de óxido nítrico por macrófagos sensibilizados con lipopolisacaridos de los derivados sintetizados a partir de las argentatinas A y B así como del glucósido de acetina y su derivado.

Grupo	Concentración de NO ( $\mu\text{M}$ )	Viabilidad (%I)
Control	15.14	100
Argentatina A [1]	13.30	63.00
Dipalmitato de Argentatina A [3]	16.86	99.03
Argentatina B [2]	12.20	53.03
Palmitato de argentatina B [4]	15.26	96.3
Glucosido de acetina [5]	10.6	100
Pentacetilado de acetina [6]	9.26	56.78

### 2.3. Ensayo de citotoxicidad.

#### 2.3.1. Condiciones generales.

La citotoxicidad en líneas celulares tumorales se determinó de acuerdo con los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos (Skehan et al., 1990; Monks et al., 1991). Se evaluaron las argentatinas [1], [2] y la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina [5]. También se evaluaron los siguientes derivados dipalmitato de argentatina A (16,25-dipalmitil- (16S, 17R, 20S, 24R)-20,24-epoxi-cicloartan-3-ona) [3], palmitato de argentatina B (25-palmitil-16 $\beta$ , -24-epoxi-cicloart-1,2-en-3-ona) [4] y la pentacetil 7-*O*-glucopiranosil acetina [6]. El ensayo se efectuó en las siguientes líneas celulares de cáncer humano: colon (HCT-15), mama (MCF-7), SNC células glia (U-251), próstata (PC-3) pulmón (SKUL) y leucemia promielocítica (K-562). Las líneas se obtuvieron del INC. La doxorrubicina (Sigma) y el ácido ursólico se usaron como fármaco de referencia.

### 2.3.2. Procedimiento.

Para la evaluación citotóxica de los compuestos aislados 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 Instituto Nacional Cáncer de Estados Unidos (NCI). La citotoxicidad de los compuestos fue determinada en microcultivos, midiendo la viabilidad y crecimiento celular de manera indirecta por el método de la sulforrodamina B de acuerdo a los procedimientos validados por el INC. La metodología (Figura 48) 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  $\mu\text{M}$ . Las células se mantuvieron en incubación en un ambiente saturado de humedad en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% a una temperatura de 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 hematocímetro, 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  $\mu\text{M}$  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  $\text{CO}_2$  al 5% 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de solución de sulforrodamina B (0.4% p/v en ácido acético al 1%), después de 10 minutos el exceso de sulforrodamina B se removió lavando 5 veces con ácido acético al 1%. Finalmente se obtuvo el boton de células el cual se solubilizó con buffer base Tris (Sigma), 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. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas, por lo tanto, a mayor coloración menor porcentaje de inhibición del crecimiento celular. La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación (3). En dónde A corresponde al valor de DO de las células sin tratar, y B al valor de DO de las células tratadas con las sustancias de prueba o de referencia.

$$\% / C = 100 - [B / A \times 100] \quad (3)$$

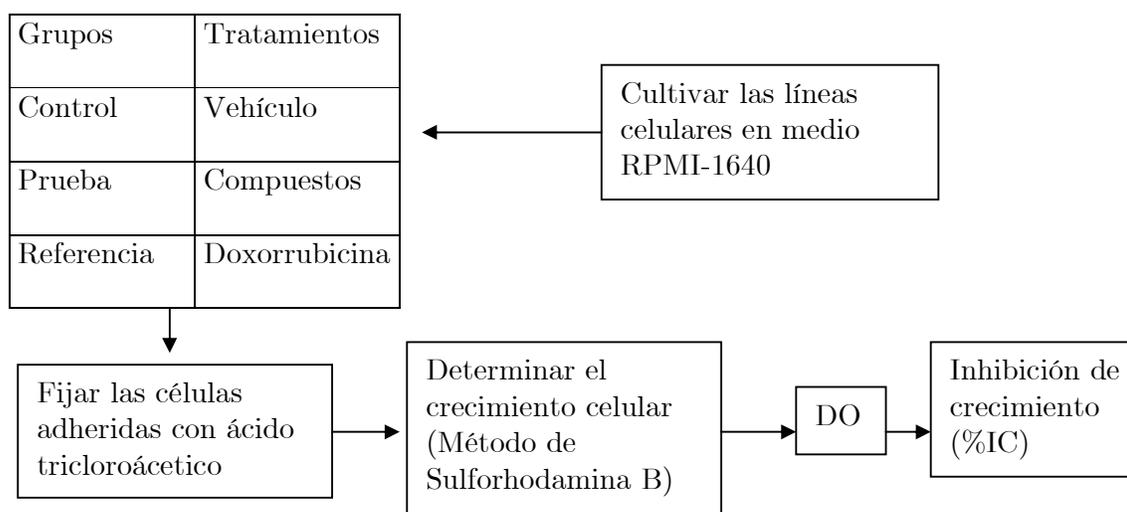


Fig.48. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.

### 2.3.3. Resultados.

En la tabla 6 se muestran los datos de porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) de las argentatinas A, B y la 7-*O*-β-D-glucosil-acetina así como sus derivados esterificados en líneas celulares humanas de cáncer de próstata (PC-3), sistema nervioso central (U251), colon (HCT-15), leucemia, (K562) pulmón (SKUL) y mama (MCF7) respectivamente.

Tabla 6. Citotoxicidad de las argentatinas A, B y la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina así como sus derivados esterificados.

Línea celular	% de inhibición del crecimiento (50 $\mu$ M)					
	PC-3	U251	HCT-15	K562	SKUL	MCF7
Argentatina A [1]	20.2	27.3	31.7	38.6	0.0	26.6
Dipalmitato de argentatina A[3]	14.7	54.0	37.69	86.9	19.2	2.98
Argentatina B [2]	33.4	36.4	24.14	79.4	0.0	31.39
Palmitato de argentatina B [4]	23.2	6.7	11.4	17.3	7.27	39.8
Glucosido de acetina [5]	37.4	27.5	55.1	42.6	52.5	29.3
Pentacetilado de acetina [6]	29.9	25.9	0	17.2	66.6	26.1

V. DISCUSIÓN.

## *V. DISCUSIÓN.*

Nuestro grupo ha informado de las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de las argentatinas A [1] y B [2] (Figura 49), triterpenos del tipo del cicloartano que constituyen los principales metabolitos secundarios en la resina proveniente de la extracción de hule natural del *Parthenium argentatum*, comúnmente conocido como guayule.

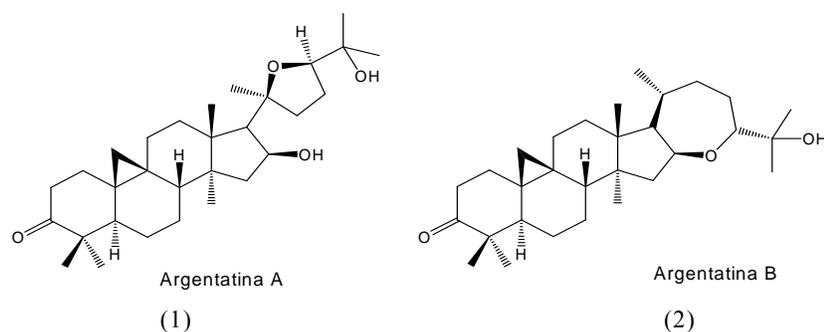


Fig.49. Argentatinas A [1] y B [2].

Tomando en cuenta lo anterior, y con el fin de establecer relaciones de actividad citotóxica en función de cambios estructurales realizados por métodos químicos, hemos sintetizado varios derivados de estos triterpenos. Los resultados de estos estudios, indican que los derivados con mayor actividad citotóxica son aquellos que presentan una doble ligadura en C1-C-2 conjugada al carbonilo en C-3, como el 2-formil-(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [7] (Figura 50).

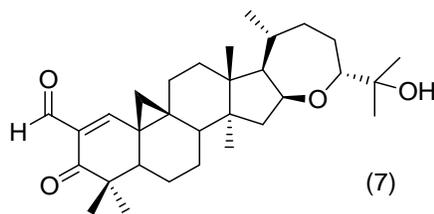


Fig.50. 2-formil-(16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [7].

El compuesto [7] mostró mayor actividad citotóxica que la argentatina B [2], el compuesto líder, y fue menos tóxico a linfocitos que la doxorrubicina que fue el fármaco de referencia (Parra 2006). No obstante, los buenos resultados mostrados por algunos de los derivados de las argentatinas A y B, existen otras aproximaciones que mejorarían aún más las propiedades citotóxicas de estos triterpenos, entre estas se ubica la síntesis de los llamados conjugados. Estos compuestos sintéticos se caracterizan por ser la unión química de por lo

menos dos compuesto, con propiedades complementarias, las cuales al estar presentes en un solo compuesto se esperaría mejoraran la acción biológica.

Por ejemplo, se ha publicado que la unión de la heparina, el ácido fólico y el litocolato, el cual presenta propiedades anfotericas que le permiten entrar a la célula donde ejercerá sus propiedades apoptoticas y antiangiogénicas. (Mi Kyung 2007). Por otro lado, se conoce que la lipofilicidad de los diversos principios activos es muy importante para su acción biológica. Fácilmente se puede suponer que a mayor grado de lipofilicidad mayor facilidad para entrar al interior de la célula.

Tomando en cuenta lo anterior, en este proyecto se propuso la síntesis de los conjugados a partir de las argentatinas A y B con el ácido palmítico. La idea fundamental de sintetizar estos conjugados es combinar las propiedades citotóxicas y antiinflamatorias de estos triterpenos con la liposolubilidad del ácido palmítico. Para la obtención de los conjugados se tomo en cuenta que las argentatinas poseen grupos hidroxilos, los cuales pueden ser utilizados para la esterificación con el ácido palmítico y de esta manera obtener los compuestos requeridos. Para llevar a cabo la reacción de esterificación se procedió a obtener el cloruro del ácido palmítico (Figura 51), a partir del ácido palmítico y el cloruro de tionilo.

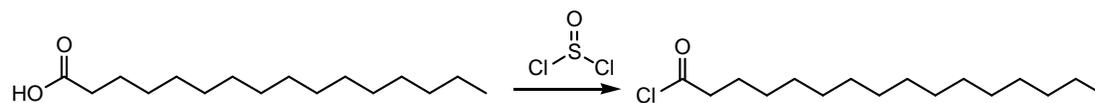


Fig.51. Obtención del cloruro del ácido palmítico.

Una vez obtenido el cloruro del ácido palmítico este se hizo reaccionar, por separado, con las argentatinas A y B (Figura 52).

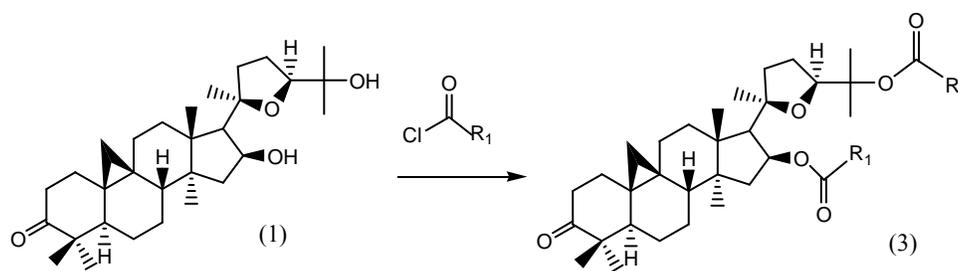
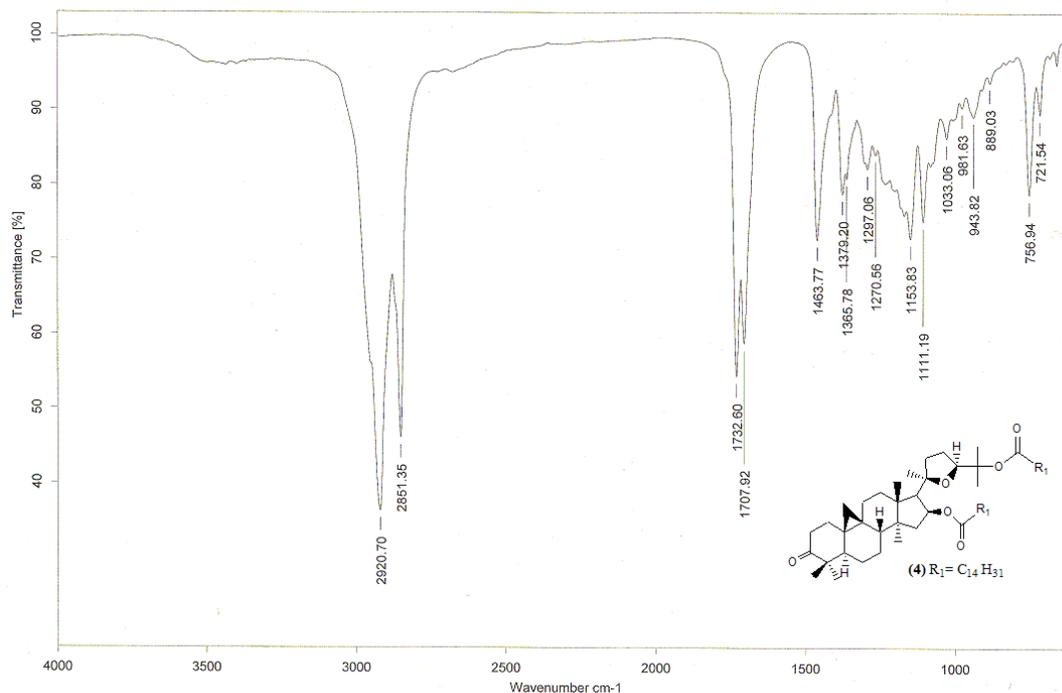


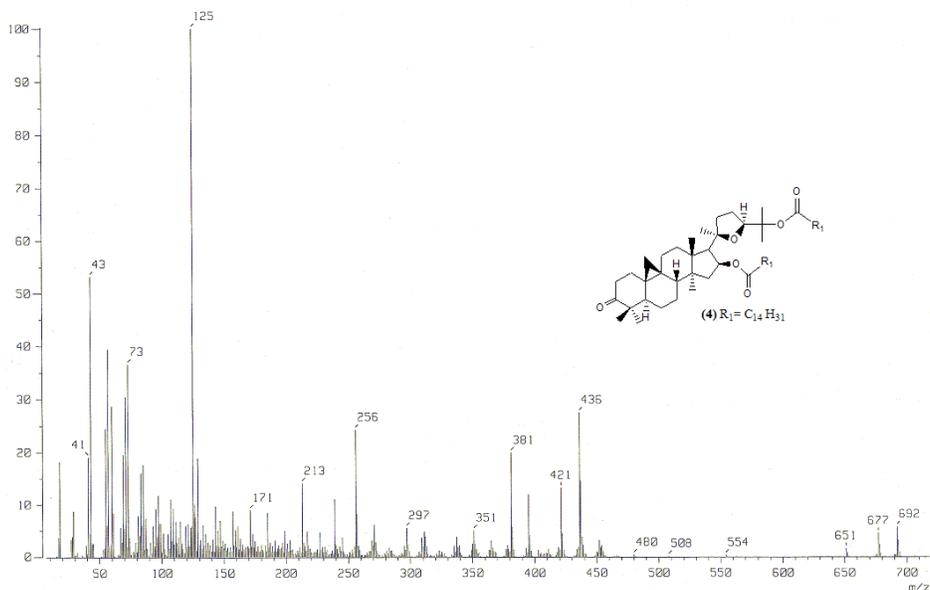
Fig.52. Formación del conjugado dipalmitato de argentatina A [3].

La formación del dipalmitato de la argentatina A **[3]** fue evidente por sus datos espectroscópicos. Así en el espectro de IR de **[3]** se observa una señal a  $1732\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo del ester formado (**espectro 4**), adicional a la banda en  $1709\text{ cm}^{-1}$  asignada al carbonilo de la cetona en C-3 de la argentatina A. También, se observa en el espectro de IR de **[3]**, la eliminación de la banda asignada a los grupos hidroxilos.



**Espectro (4)** de IR del dipalmitato de argentatina A **[3]**.

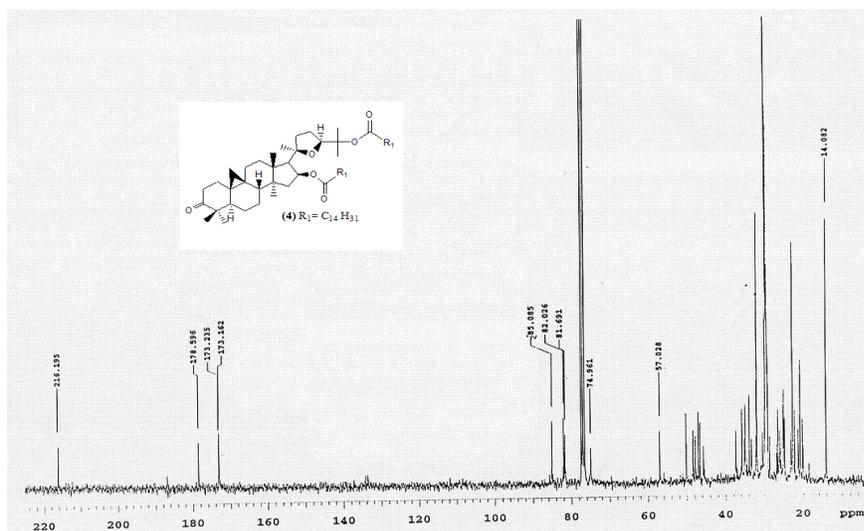
El espectro de masas adquirido bajo la modalidad de bombardeo rápido de electrones ( $\text{FAB}^+$ ) mostró el ion molecular a  $948\text{ m/z}$ , que corresponde a la fórmula  $\text{C}_{62}\text{H}_{108}\text{O}_6$  del dipalmitato de argentatina A. Por otro lado, el espectro de masas adquirido por impacto electrónico mostró un pico a  $692\text{ m/z}$  que corresponde a la pérdida de una molécula de ácido palmítico a partir de **[3]**.



**Espectro (5)** de masas del compuesto **[3]** adquirido por impacto electrónico.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **[3]**, se observó las señales características de la argentatrina A aunadas a una señal intensa a 1.25 ppm asignada a los grupos metílenos del ácido palmítico (**espectro 6**).

Las señales a 178.5 y 173.1 ppm del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **[3]**, asignadas a los átomos de carbono de dos grupos carbonilos del éster, así como también la señal intensa a 29 ppm asignada a los grupos metílenos del residuo del ácido palmítico, claramente señalan la formación de los dos ésteres, también se observan las señales asignadas a la argentatrina A (**espectro 7**).



**Espectro (7)** de RMN  $^{13}\text{C}$  de **[3]**.

Por otro lado, el tratamiento de la argentatina B con el cloruro del ácido palmítico (Figura 53) proporciona el palmitato de la argentatina B [4].

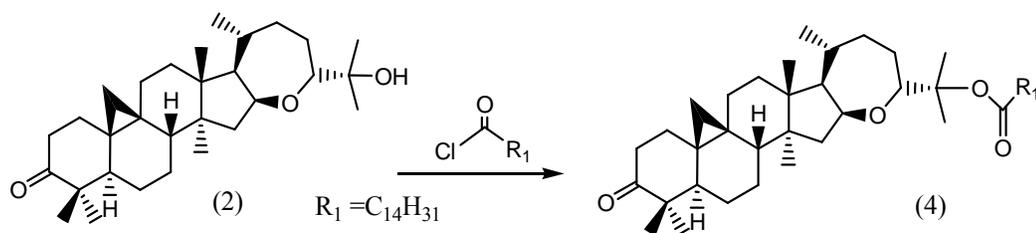
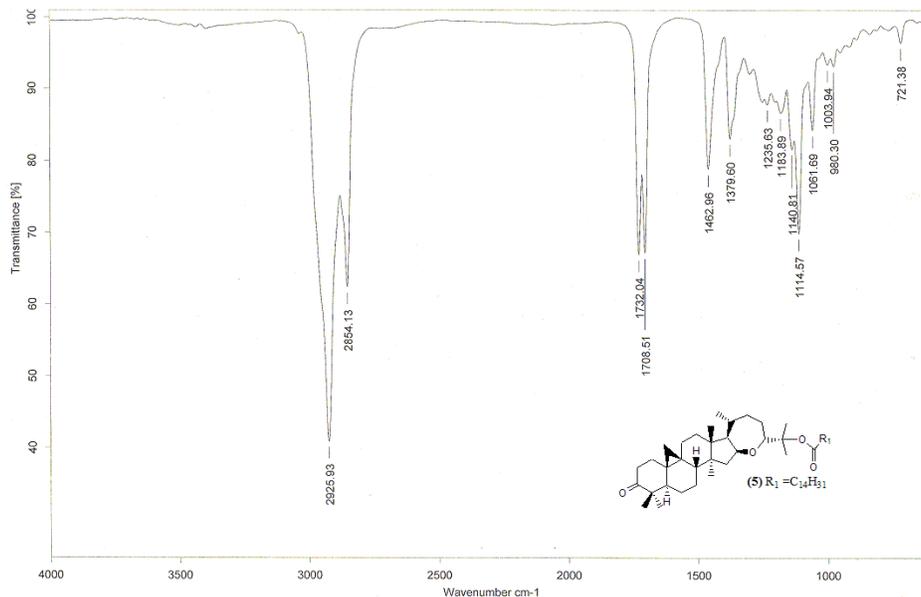


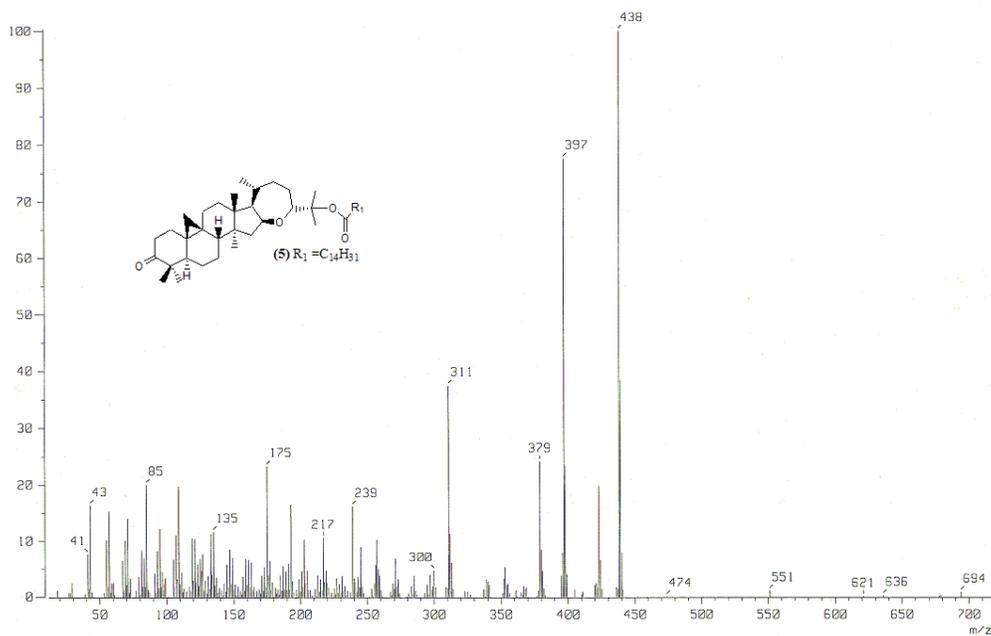
Fig.53. Formación del palmitato de argentatina B [4].

El espectro de IR de **5** muestra las bandas a 1732 y 1708  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a los carbonilos del ester formado y a la cetona en C-3, respectivamente (**espectro 12**). También es evidente la eliminación de la banda asignada a los grupos hidroxilos de la argentatina B.



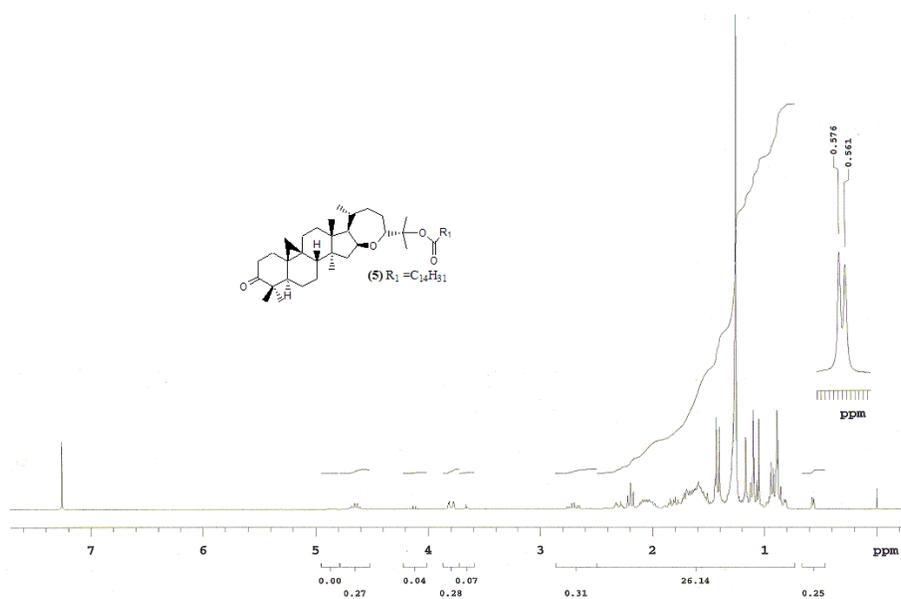
**Espectro (12)** de IR del palmitato de argentatina B [4].

El espectro de masas adquirido (**espectro 13**) señalan un peso molecular de 694.5907 m/z,  $[\text{H}^+_1]$  para una fórmula  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_4$  que es la esperada para el palmitato [4].

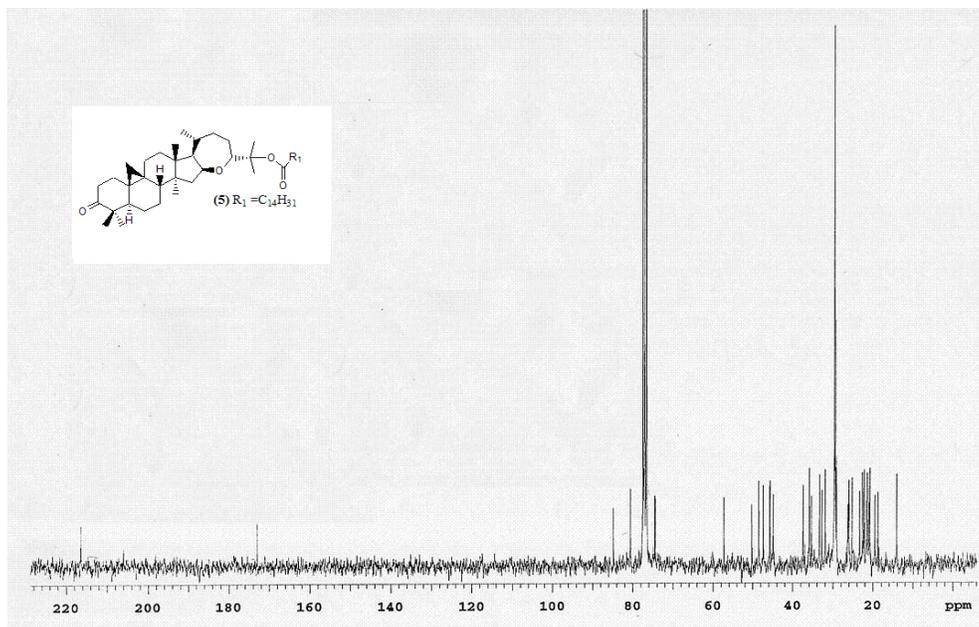


**Espectro (13)** de masas del compuesto **[4]** adquirido por impacto electrónico.

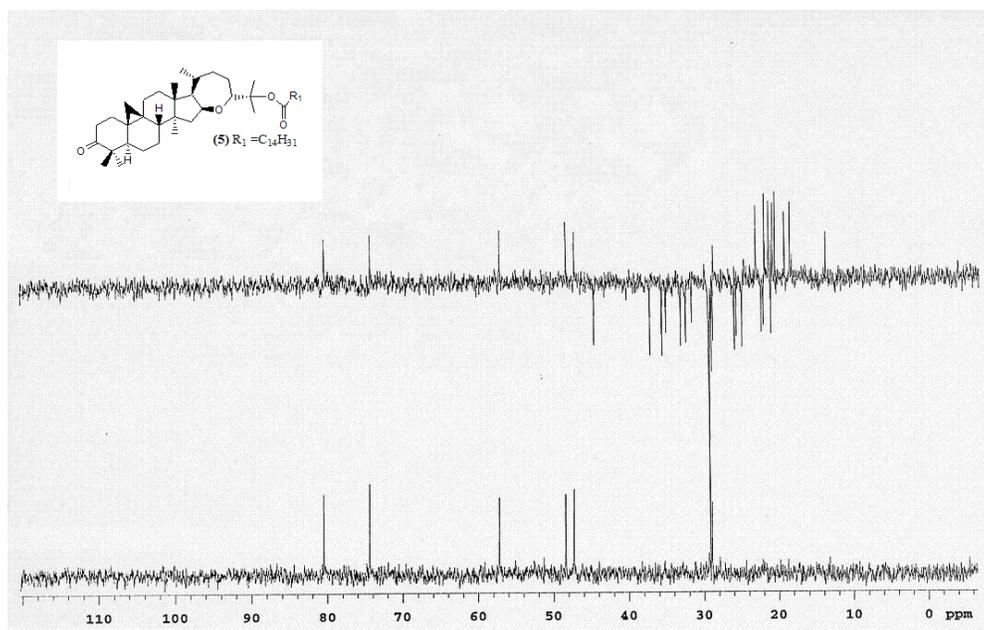
El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **[4]** claramente señala una señal intensa 1.25 ppm asignada a los metilenos del residuo del éster palmitato que junto a la señal a 173 ppm, en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , asignada al átomo de carbono del carbonilo del ester formado demuestran la formación del conjugado **[4]**. En ambos espectros se observan las señales asignadas a la parte correspondiente de la argentinina B (**espectros 14 y 15**).



**Espectro (14)** de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **[4]**.



**Espectro (15)** de RMN  $^{13}\text{C}$  de [4].



**Espectro (16)** de DEPT del compuesto [4] donde se observaron señales para 8  $\text{CH}_3$ , 5  $\text{CH}$  y varios  $\text{CH}_2$ .

Por otro lado, continuando con la determinación de actividad biológica de compuestos de polaridad diferente a los compuestos originalmente aislados, se propuso la obtención de la pentacetil 7- $O$ - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [6] a partir de la 7- $O$ - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [5] (Figura 54), mediante una reacción de acetilación en piridina y anhídrido acético.

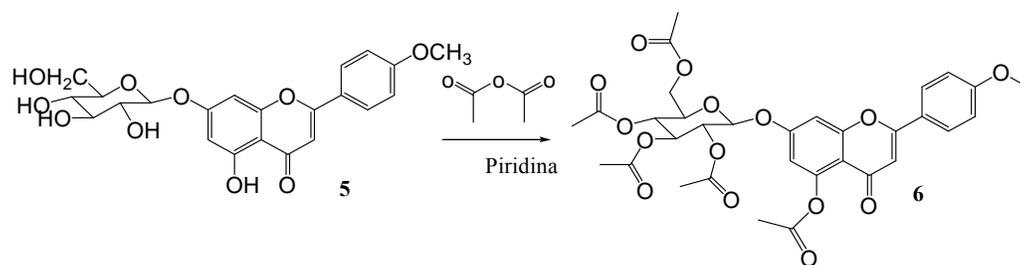
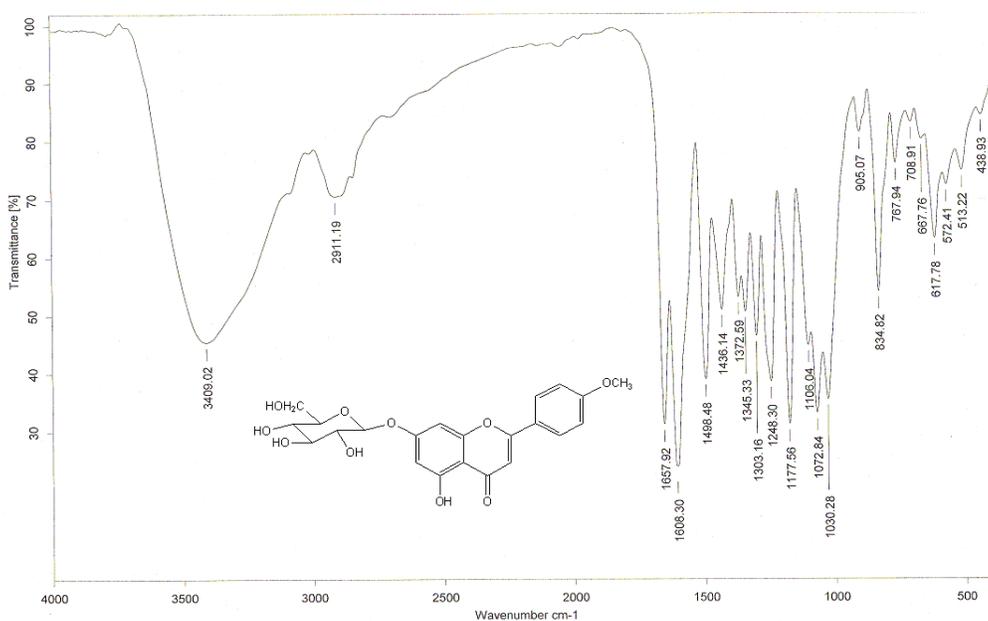


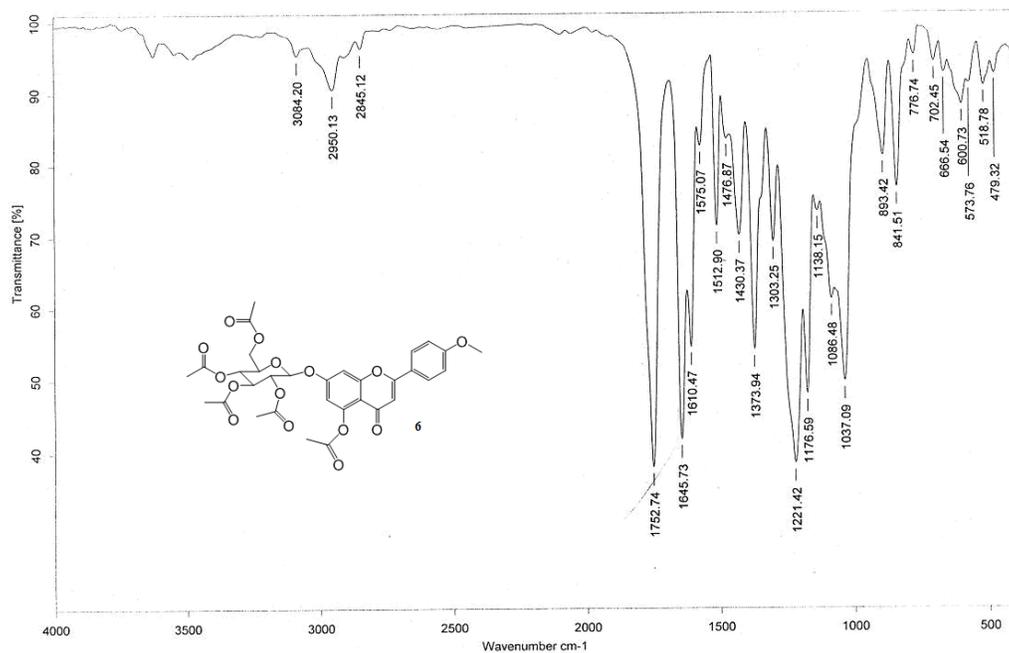
Fig.54. Formación del pentacetil 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [6]

La 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [5], fue aislada de la planta medicinal toronjil morado (*Agastache mexicana* subsp. *Mexicana*) como se describió y su identificación se logró por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados para esta flavona (M.R. Cholbi, 1991, Y.H. Liao 1999, C. Kraft 2003).



**Espectro (17)** de IR de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [5].

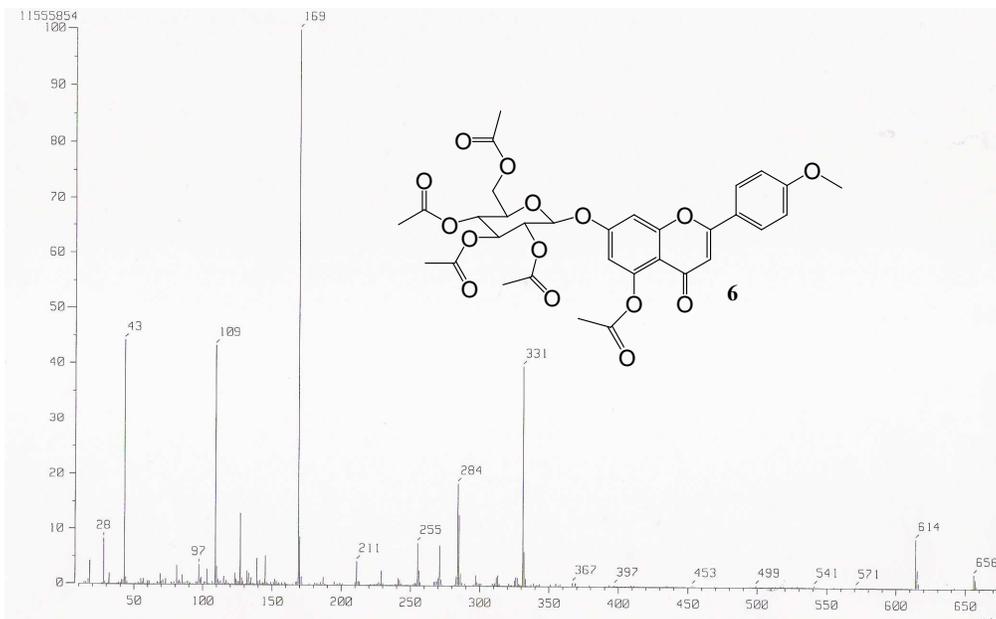
El espectro de IR de [6] muestra una banda a 1752 cm<sup>-1</sup> asignada a los carbonilos de los grupos acetilos, también se muestra una clara disminución de la banda asignada a los grupos hidroxilos (espectro 20).



**Espectro (20)** de IR del compuesto **[6]**.

En el espectro de masas de **[6]** (**espectro 21**) obtenido por impacto electrónico se observa el ión molecular a 656 m/z correspondiente a la molécula C<sub>32</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>, también se observa una señal a 331 m/z la cual corresponde al fragmento de glucosa peracetilada cuya fórmula es C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>.

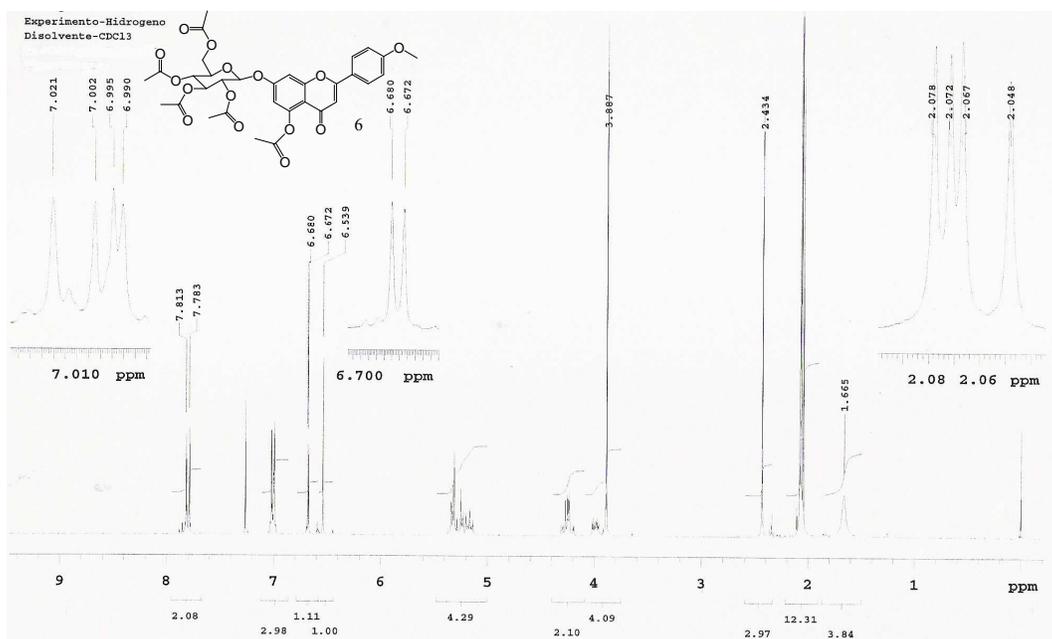
Así mismo se observa un pico a 284 m/z correspondiente a la fórmula C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, las fragmentaciones que se observan en 169 y 109 m/z corresponden a los fragmentos C<sub>11</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. También se observa una pico a 43 m/z la cual corresponde a la fragmento C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O. Todos estos datos confirman la acetilación de la 7-O-β-glucopiranosil acetina.



**Espectro (21)** de masas del compuesto [6] adquirido por impacto electrónico a 70 eV.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto [6] (**espectro 22**) se observan dos dobletes a 7.79 y 7.00 ppm, cada una de ellas integran para dos protones, con una constante de acoplamiento de 9 Hz. Este patrón de señales se identifica como un sistema de acoplamiento AA' BB' y se asigna a los protones H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente. El singulete que integra para tres protones a 3.88 ppm se asigna a los protones del grupo metoxilo unido al C-4'. A 6.99 ppm se observa un singulete que integra para un protón, el cual fue asignado al protón H-3.

El conjunto de señales que se observa en 5.34-3.95 ppm corresponden a los protones unidos a los átomos de carbono del anillo de glucosa. El doblete que integra para un protón a 6.67 ppm se asigna al protón H-8, a campo alto con respecto a al doblete en 6.53 ppm se que integra para un protón, el cual corresponde a H-6. En 2.43 ppm se observa un singulete que integra para tres protones del grupo acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), el cual se encuentra unido al C-5. En la región entre 2.078 y 2.048 ppm, se observan cuatro singuletes, cada uno de ellos integra para tres protones y fueron asignados a los grupos metilos ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ) de los acetatos formados.

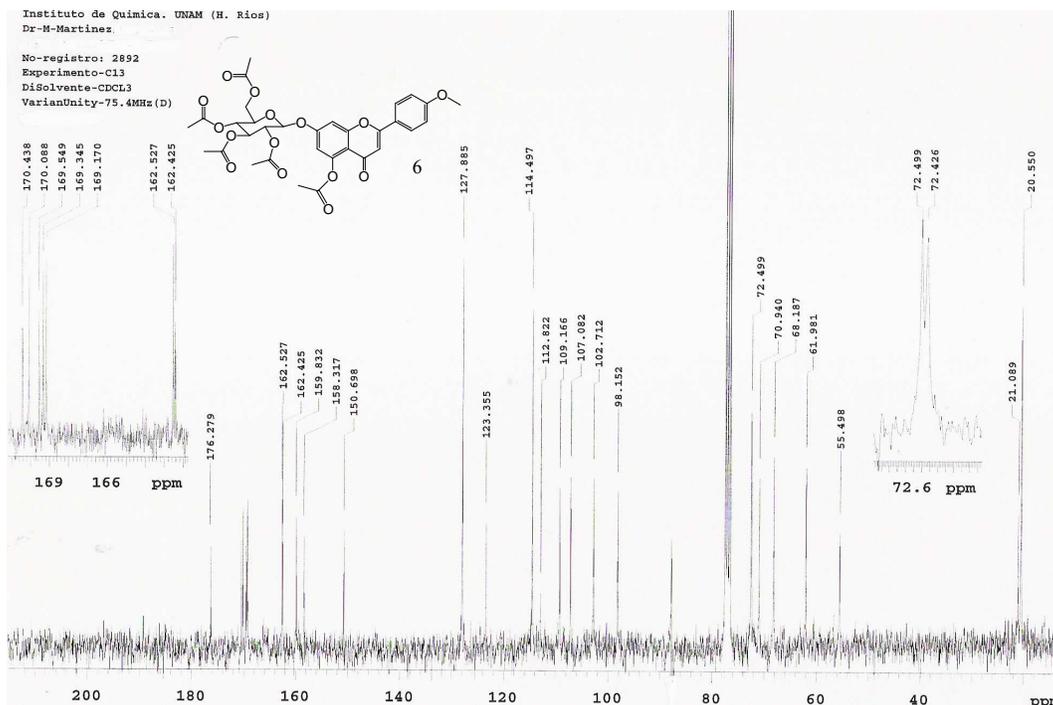


**Espectro (22)** de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **[6]**.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **[6]** (**espectro 23**) se observan 27 señales. En la zona de campo bajo a 176.27 ppm se tiene una señal asignada al carbonilo de la cetona conjugada en el carbono C-4. También se observan las señales de los diferentes tipos de átomos de carbono aromáticos que conforman los anillos del esqueleto principal (anillos A y B). El conjunto de señales que se observan a 170.43, 170.08, 169.54 y 169.34 ppm, corresponden a los carbonos de carbonilos de los grupos acetatos ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), presentes en el anillo de glucosa.

Por otro lado, la señal en 169.17 ppm corresponde a un carbono de carbonilo de un grupo acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ), que se encuentra unido al C-5. En 162.52, 162.42, 159.83, 158.31 y 150.69 ppm se observan las señales de C-7, C-9, C-5, C-2 y C-4' respectivamente, todas estas señales corresponden a los átomos de carbono aromáticos unidos a un oxígeno. Las señales para los átomos de carbono  $\text{sp}^2$  no protonados aparecen en 123.35 ppm para el C-1' y 112.82 ppm para el C-10, esta última señal se encuentra a campo alto con respecto a la anterior debido a la protección que generan los átomos de oxígeno en posición *orto*. Por otra parte las señales de los átomos de carbono  $\text{sp}^2$  protonados del anillo B, se observan en 127.85 ppm para C-2' y C-6', 114.49 ppm para C-3' y C-5', la señal en 109.17 ppm corresponde al C-8, mientras la señal a 107.09 ppm se asignó al C-6 y la señal a 102.72 ppm se asignó al C-3. Con respecto a los carbonos que se encuentran formando el anillo de

glucosa se observan las señales en 98.16 ppm, el cual corresponde a en carbono anomérico C-1'', en 72.50, 72.45, 70,95, 68.19 ppm, corresponden a los CH y la señal en 61.99 ppm corresponde a el CH<sub>2</sub> presente en el anillo. Para finalizar, en la región de los carbonos sp<sup>3</sup>, se observan las señales en 55.52 ppm que corresponde a el OCH<sub>3</sub> unido al C-4, en 21.10 ppm que corresponde a un carbono de metilo de un grupo acetato (CH<sub>3</sub>COO) que se encuentra unido al C-5 del anillo A del esqueleto principal, y en 20.57 ppm se observa una señal asignada a cuatro carbonos de metilo de grupos acetato que se encuentran unidos al anillo de glucosa.



**Espectro (23)** de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **[6]**.

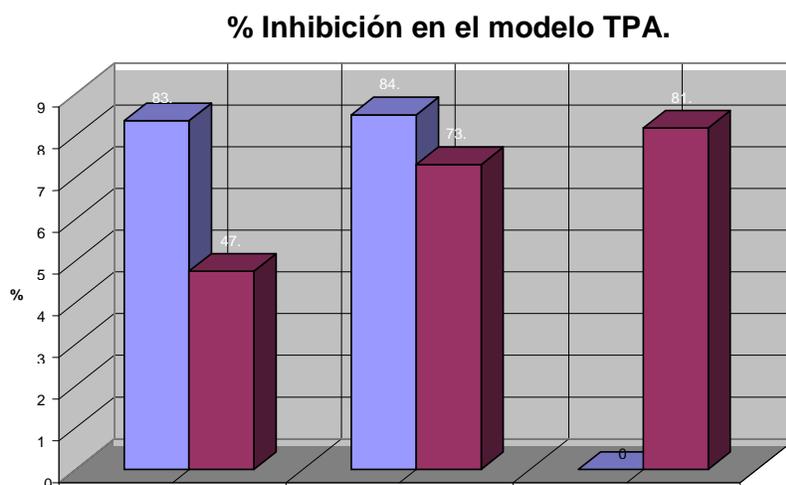
## 2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

### 2.1. Modelo inducido por TPA.

#### 2.1.1. Actividad de las argentatinas [1] [2], la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina [5] y sus derivados acilados [3] [4] [6].

Como ya se mencionó, en la inducción del edema por TPA participan varios mecanismos y una variedad de mediadores químicos y celulares. No obstante, esta falta de especificidad del TPA, los resultados que se obtienen indican en cierta medida la potencialidad como antiinflamatorios que tienen los diferentes compuestos que se ensayan. En la gráfica (1) se muestra los resultados de la actividad antiinflamatoria de los diversos compuestos que se ensayaron.

Como se observa las argentatinas A [1] y B [2] presentaron mayor actividad antiinflamatoria que sus respectivos conjugados [3] y [4]. Estos hallazgos indican que la acción de los derivados, no depende de una mayor lipofilia, a pesar que la administración sea tópica, sino que sugieren que la actividad biológica depende de la acción de las argentatinas libres sobre los blancos de acción y no así de sus conjugados. Por el contrario, el derivado pentacetilado de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina mostró una actividad antiinflamatoria del 82% que comparada con la nula actividad de la flavona original [5], sugieren que una mayor lipofilia puede resultar en una mayor actividad biológica.



Gráfica 1. Actividad antiinflamatoria de las argentatinas A y B, de los conjugados de palmitato y de la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina y su derivado peracetilado

## 2.2. Modelo de producción de óxido nítrico.

### 2.2.1. Actividad de las argentatinas [1] [2], la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acacetina [5] y sus derivados acilados [3] [4] [6].

El óxido nítrico es un neurotransmisor que de manera constitutiva sintetizan varias células. Existen tres isoformas de la enzima que sintetiza el óxido nítrico a partir de L arginina para producir L citrulina., dos son constitutivas, la neuronal nNOS y la endotelial eNOS y una inducible la iNOS. Esta última enzima se expresa en condiciones patológicas, ya que al incrementar la producción de óxido nítrico se favorece el proceso de inflamación y se incrementa la producción de peroxinitritos y las nitrosaminas, responsables de iniciar y sostener procesos cancerosos (Liva 2005). Por lo anterior, la inhibición de la producción de óxido nítrico es de interés en la búsqueda de fármacos anticancerosos.

Nuestros resultados de la inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos sensibilizados con LPS por las argentatinas A y B, así como por sus conjugados y las dos flavonas, se muestran en la tabla 5. Las argentatinas A y B mostraron inhibición en la producción de óxido nítrico, sin embargo esta disminución se debió a que ambos triterpenos fueron citotóxicos a los macrófagos. Mientras que el dipálmato de argentatina A [3] y el palmitato de la argentatina B [4] no fueron tóxicos a los macrófagos, sin embargo no inhibieron la producción de óxido nítrico. Estos hallazgos indican que al incrementar la lipofilidad de los triterpenos ensayados, éstos muestran una toxicidad menor a los macrófagos, aunque no inhibieron la producción de óxido nítrico.

Por otro lado, la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acacetina [5], presento una inhibición del 30 % en la producción de óxido nítrico y no mostró ser tóxica los macrófagos. Mientras que su derivado pentacetilado [6] resultó ser tóxico a los macrófagos con una viabilidad del 56.78 %. Estos resultados indican que un aumento en la lipofilidad de la flavona, aumenta la citotoxicidad a los macrófagos. De manera general estos hallazgos indican que los conjugados [4] y 5 fueron menos tóxicos a los macrófagos que las argentatinas A y B. Mientras que el derivado peracetilado [6] fue más toxico a éstas células que la flavona [5].

Este comportamiento de toxicidad puede verse reflejado en la citotóxicidad de células cancerosas. Así los conjugados [3] y [4] deberían ser menos tóxicos que las argentatinas A y B, mientras que el derivado acetilado [6] sería más citotóxico que la flavona [5].

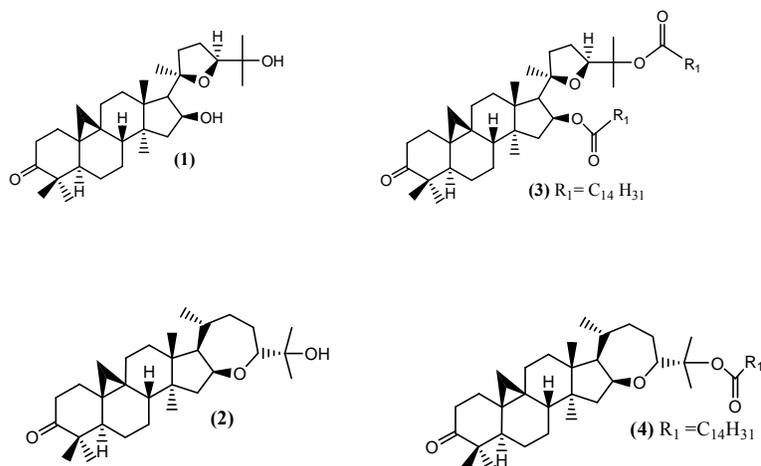
Grupo	Concentración de NO <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	Viabilidad(%I)
Control	15.14	100
Argentatina A (1)	13.30	63.00
Dipalmitato de Argentatina A (3)	16.86	99.03
Argentatina B (2)	12.20	53.03
Palmitato de argentatina B (4)	15.26	96.3
7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina (5)	10.6	100
pentacetil 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina (6)	9.26	56.78

### 2.3. Citotoxicidad en líneas celulares por las argentatinas [1] [2] y la 7-*O*- $\beta$ -D-glucosil-acetina [5] y sus derivados acilados [3] [4] [6].

Los resultados de la determinación citotóxica de los compuestos [1], [2], [3], [4], [5] y [6] en varias líneas de cáncer humano, se muestran en la tabla 6. En general se observa que los conjugados [3] y [4] son menos tóxicos que las argentatinas [1] y [2], resultado que esta de acuerdo con la toxicidad a los macrófagos, previamente determinada en el ensayo de producción de óxido nítrico en macrófagos activos con LPS. Por el contrario el derivado peracetilado [6] no mostró ser más tóxico que la flavona [5], resultado contrario a la toxicidad a los macrófagos, en el ensayo de producción de óxido nítrico, donde [6] resultó ser más tóxico a éstas células que la flavona [5].

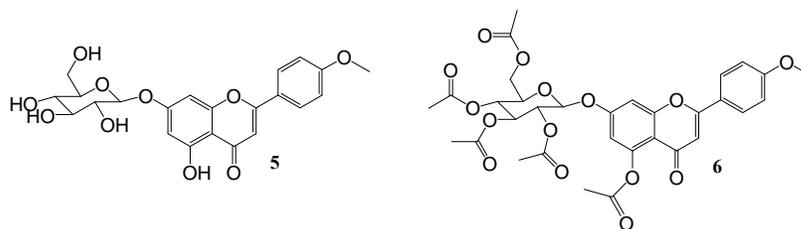
Compuesto	% de inhibición del crecimiento (50 $\mu$ M)					
	PC-3	U251	HCT-15	K562	SKUL	MCF7
Argentatina A (1)	20.2	27.3	31.70	38.6	0.0	26.6
Dipalmitato de argentatina A (3)	14.7	54.0	37.69	86.9	19.2	2.98
Argentatina B (2)	33.4	36.4	24.14	79.4	0.0	31.39
Palmitato de argentatina B (4)	23.2	6.7	11.40	17.3	7.27	39.8

Líneas de cáncer humano: colon (HCT-15), mama (MCF-7), SNC células glia (U-251), próstata (PC-3) pulmón (SKUL) y leucemia promielocítica (K-562)



Compuesto	% de inhibición del crecimiento (50 $\mu$ M)					
	7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina (5)	37.4	27.5	55.10	42.6	52.5
pentacetil 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina (6)	29.9	25.9	0	17.2	66.6	26.1

Líneas de cáncer humano: colon (HCT-15), mama (MCF-7), SNC células glia (U-251), próstata (PC-3) pulmón (SKUL) y leucemia promielocítica (K-562)



**VI. CONCLUSIONES.**

# ***VI. CONCLUSIONES.***

## CONCLUSIONES

En general las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de los conjugados [3] y [4] fueron menores que aquellas de los triterpenos [1] y [2] respectivamente. Estos hallazgos indican que un aumento de la lipofilidad en los compuestos [3] y [4] no mejoran su perfil antiinflamatorio ni citotóxico, en comparación con los triterpenos originales [1] y [2]. Esta disminución de las propiedades biológicas, posiblemente se deba a que el éster formado no es metabolizado por la célula impidiendo de esta manera la acción de las argentatinas, no obstante, de que estos conjugados posiblemente atraviesen la membrana celular con mayor facilidad.

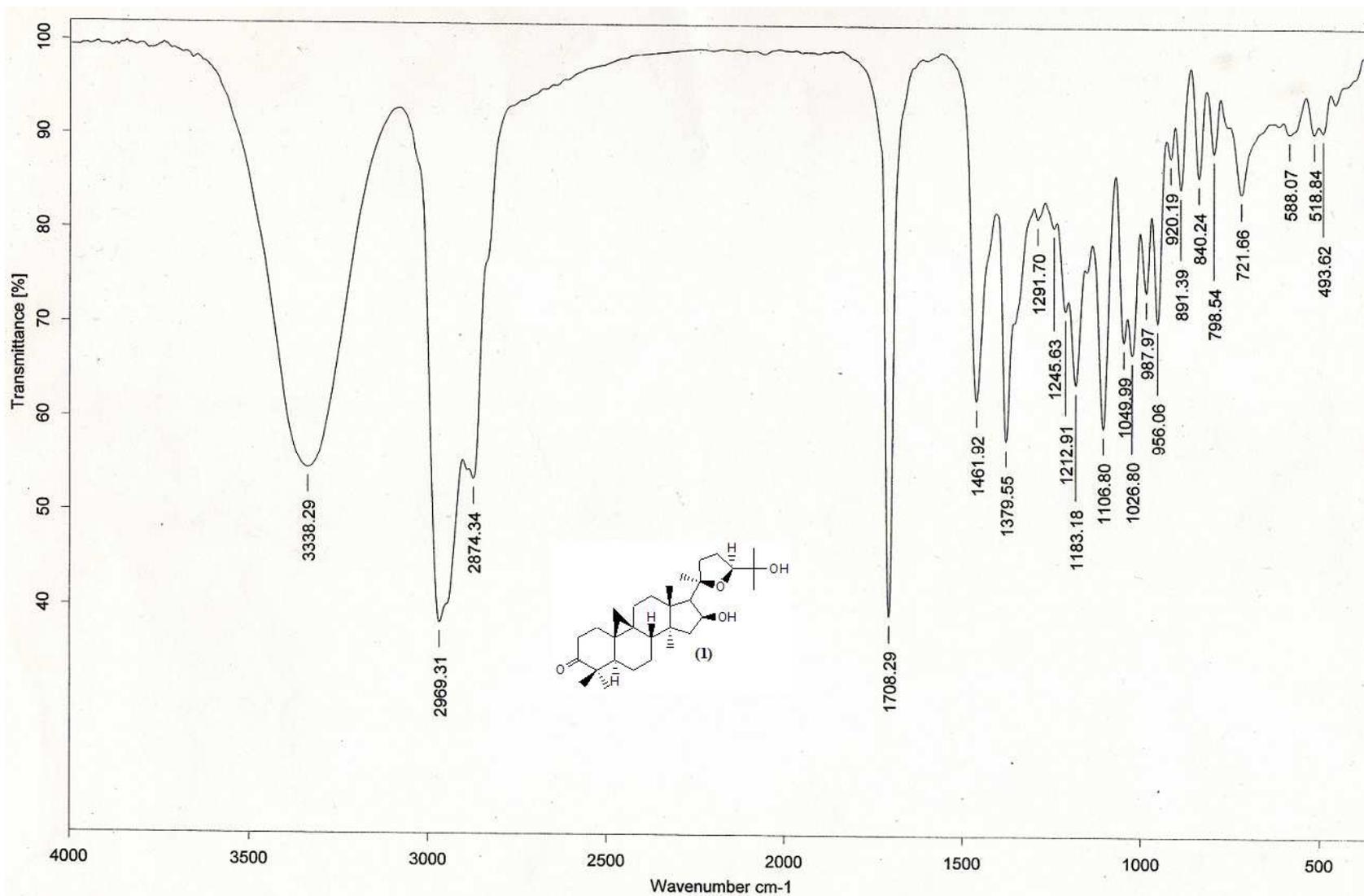
Por el contrario, el peracetilado [6] mostró una mayor actividad antiinflamatoria que la 7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-acetina [5], posiblemente debido a que atraviesa con mayor facilidad la epidermis del animal de prueba. También, mostró una mayor toxicidad a los macrófagos en la prueba de inhibición de la producción de óxido nítrico, citotoxicidad que no se vio reflejada en la prueba de inhibición de crecimiento de líneas de cáncer humano flavona original [5].

En conclusión, los conjugados [3] y [4] no presentaron actividades biológicas superiores a los triterpenos originales [1] y [2], posiblemente a que el éster formado no es metabolizado por las células impidiendo con esto la acción biológica de las argentatinas. Por el contrario, el compuesto peracetilado [6] mostró un mejor perfil de actividad antiinflamatoria que la flavona original. Debido, posiblemente, a que [6] atraviesa con mayor facilidad que [5] la epidermis de los animales de prueba.

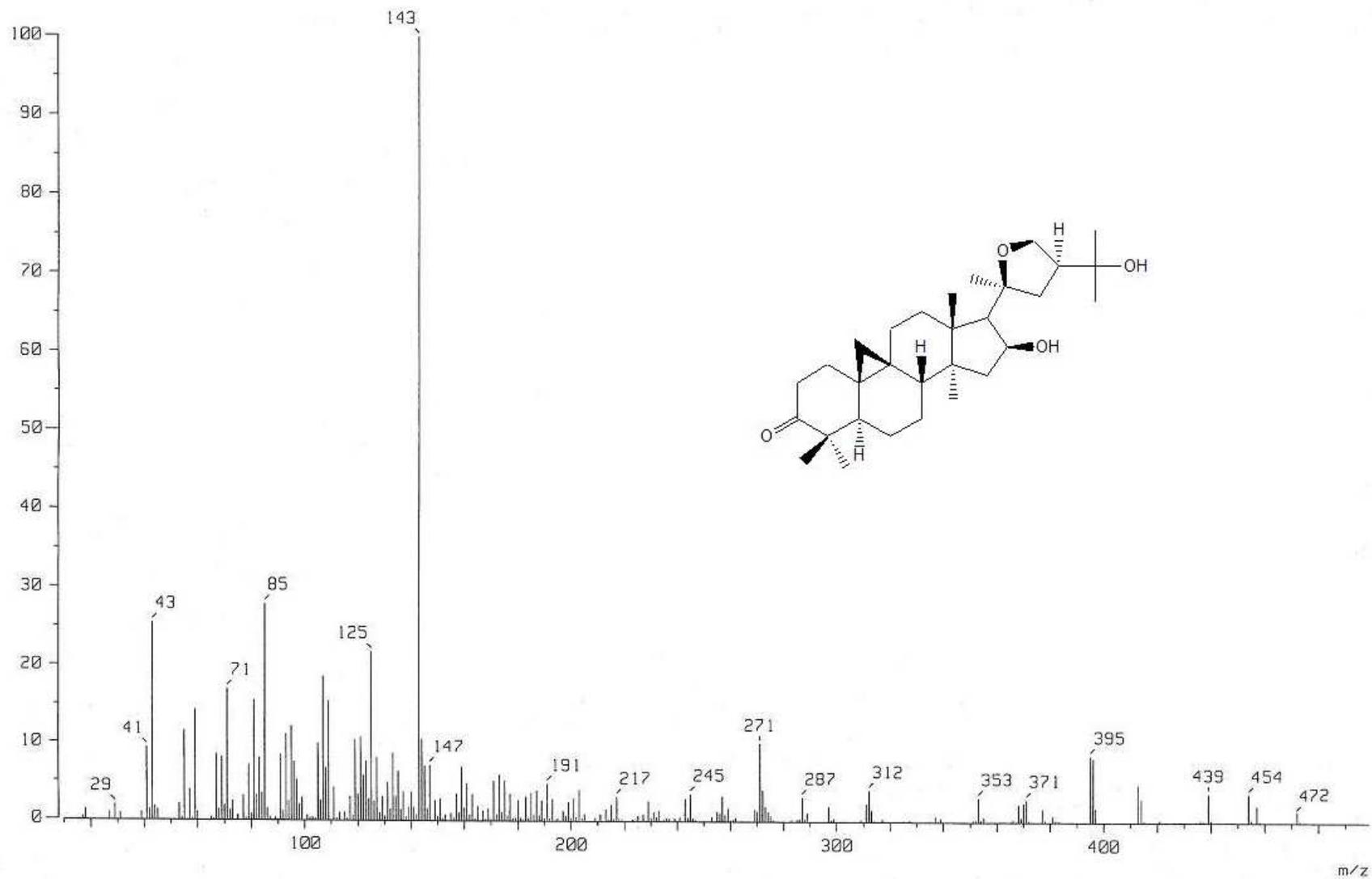
## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

AcOEt	acetato de etilo
AINES	antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
°C	grados centígrados
<sup>13</sup> C-DEPT	espectros de engrandecimiento de transferencia de polarización de menor distorsión de <sup>13</sup> C
cc	cromatografía en columna
ccf	cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	cloruro de metileno
COX	ciclooxigenasa
δ	desplazamiento químico
ε	coeficiente de extinción molar
DMEM	medio de cultivo modificado de Dulbecco
DMSO	sulfoxido de dimetilo
%EI	porcentajes de inhibición del edema
EM	espectrometría de masas
ERN	especies reactivas derivadas de nitrógeno
ERO	especies reactivas de oxígeno
EtOH	etanol
FNT-α	factor de necrosis tumoral tipo alfa
GCs	glucocorticoides
HCT-15	líneas celulares cancerosas de colon
Hex	Hexano
Hz	Hertz
INC	Instituto Nacional de Cáncer
IP	intraperitoneal
IL-β	interleucina 1 tipo beta
K562	líneas celulares cancerosas de

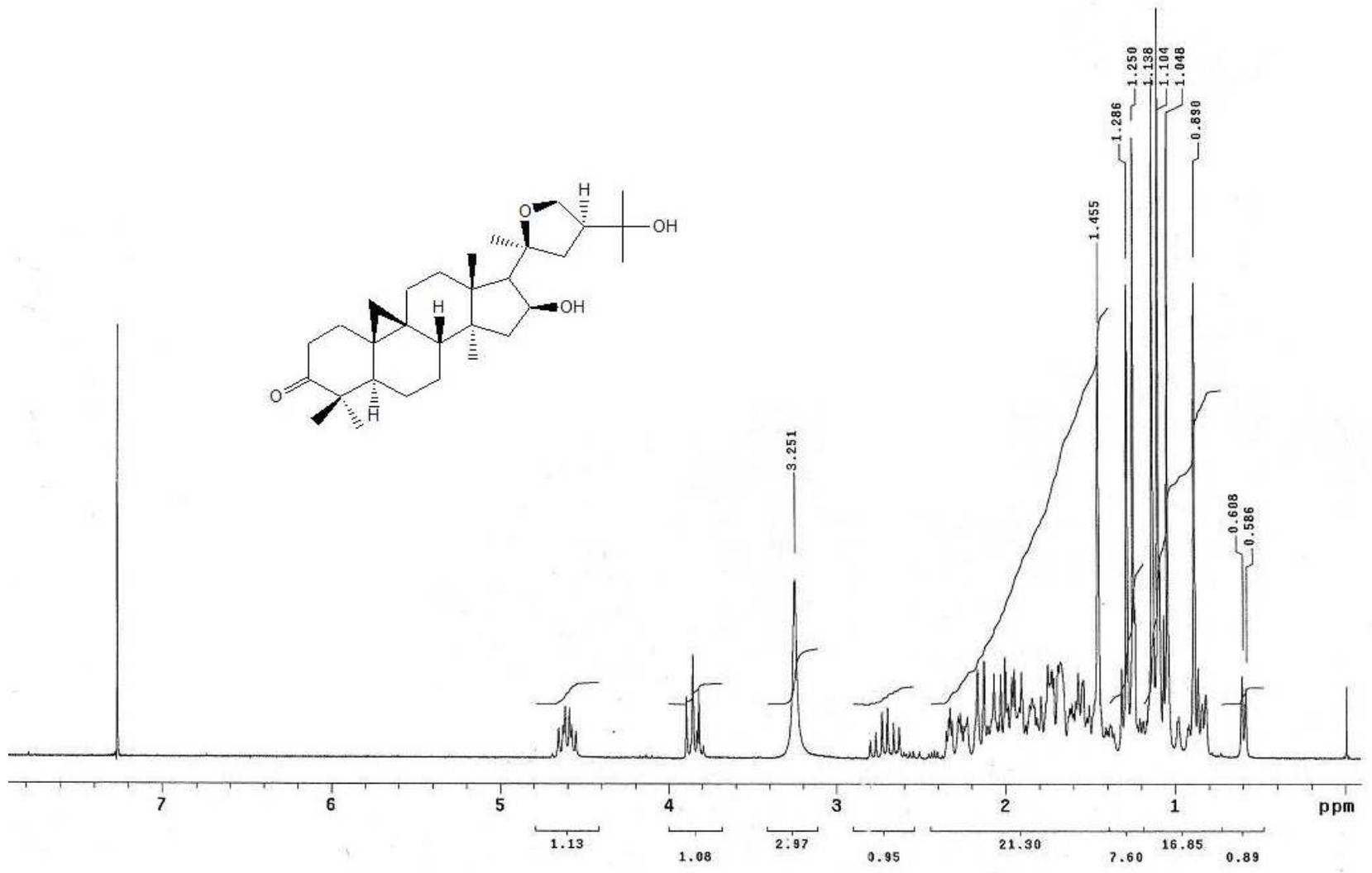
L-Arg	L-arginina
LO	lipooxigenasas
LPMN	leucocitos poliformonucleares
LPS	lipopolisacarido
MCF-7	líneas celulares cancerosas de mama
MeOH	metanol
NF_κB	factor de activación nuclear tipo kappa B
NO	óxido nítrico
NOHLA	<i>N</i> <sup>o</sup> -hidroxi-L-arginina
IR	espectrofotometría de infrarrojo
m/z	masa respecto de la carga
PAF	factor activador de plaquetas
PAL	fenilalanina amoniolias
PC-3	líneas celulares cancerosas de próstata
PEP	eritrosa 4-fosfato con el <u>fosfoenolpiruvato</u>
PGG <sub>2</sub>	prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina
PKC	proteína c kinasa
ppm	partes por millón
RMN <sup>1</sup> H	resonancia magnética nuclear protónica
SNC	sistema nervioso central
SKUL	pulmón
SRB	Sulforhodamina B
TMS	tetrametilsilano
TPA	acetato de tetradecanoilforbol
U251	líneas celulares cancerosas de células glia



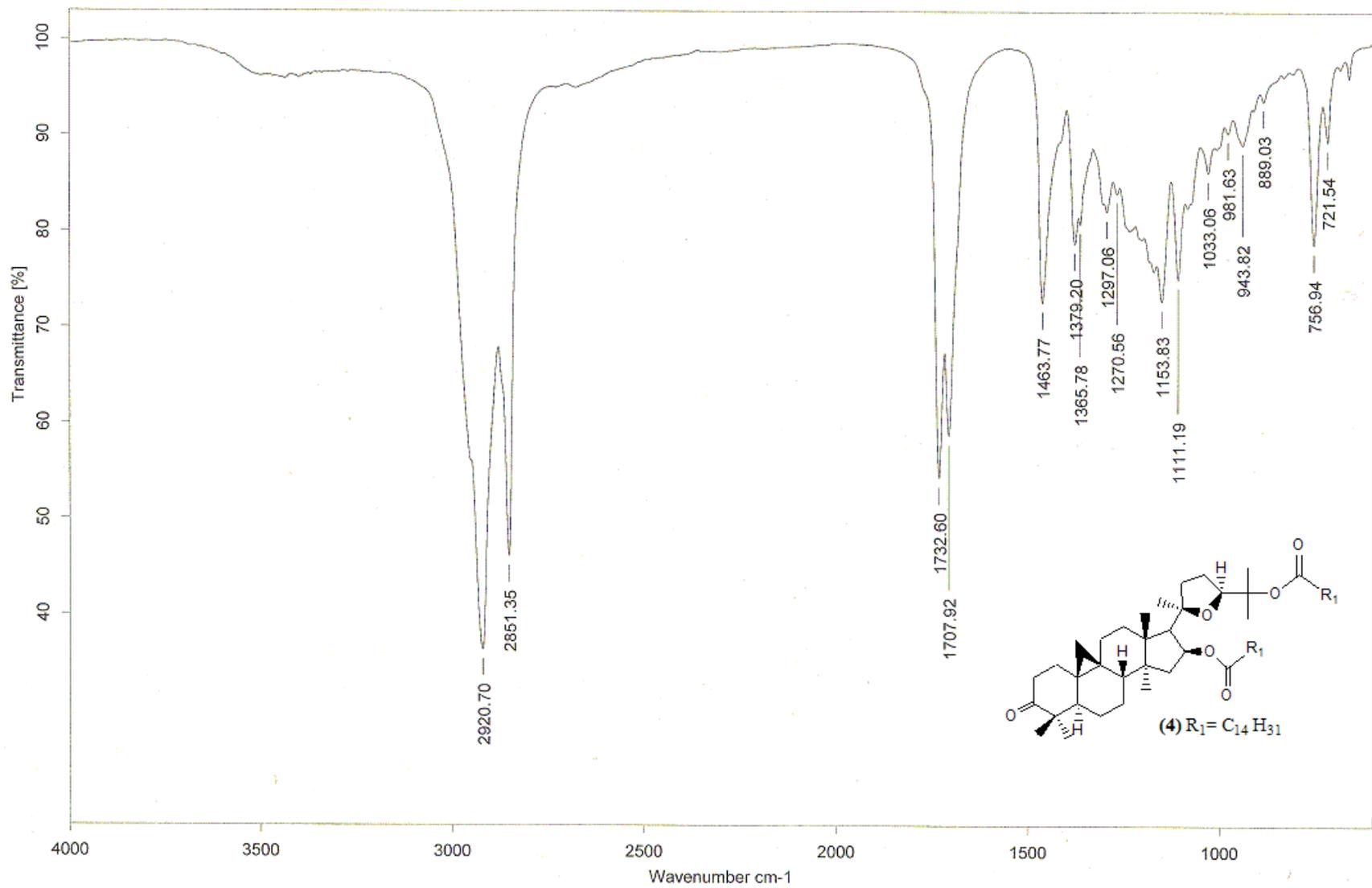
Espectro (1) de IR argentatina A.



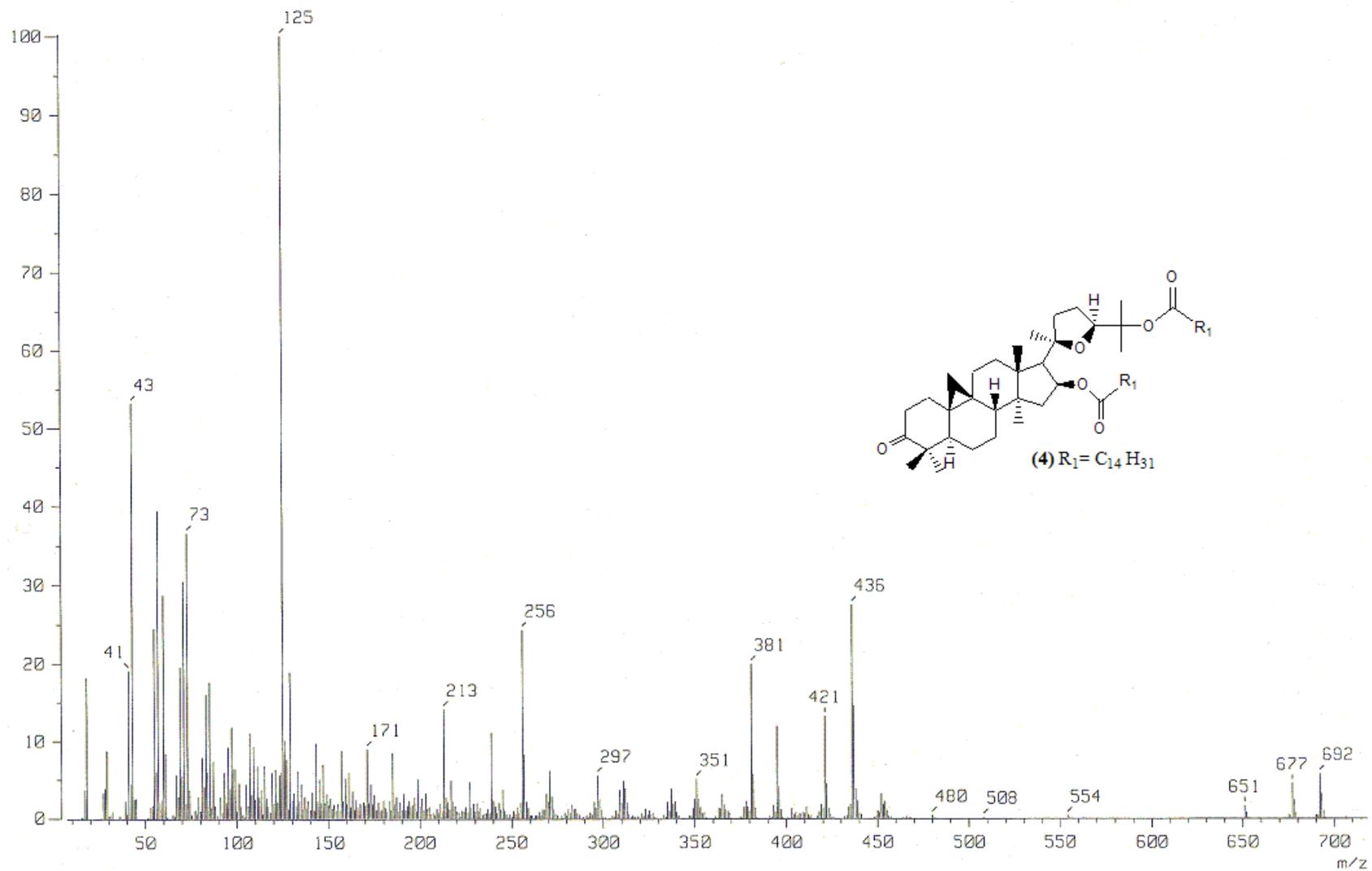
**Espectro (2)** de masas argentatina A.



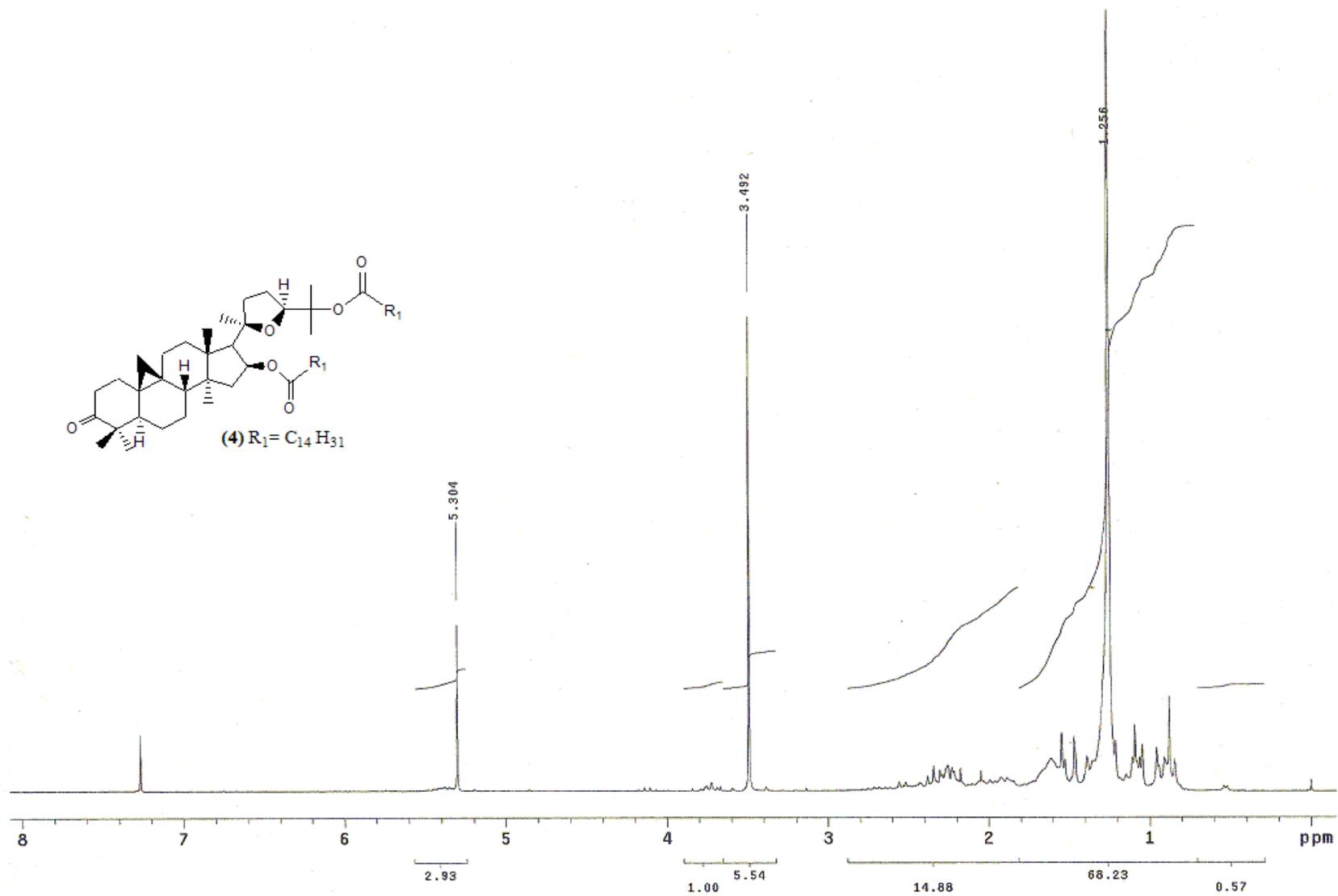
**Espectro (3)** de RMN <sup>1</sup>H argentatina A.



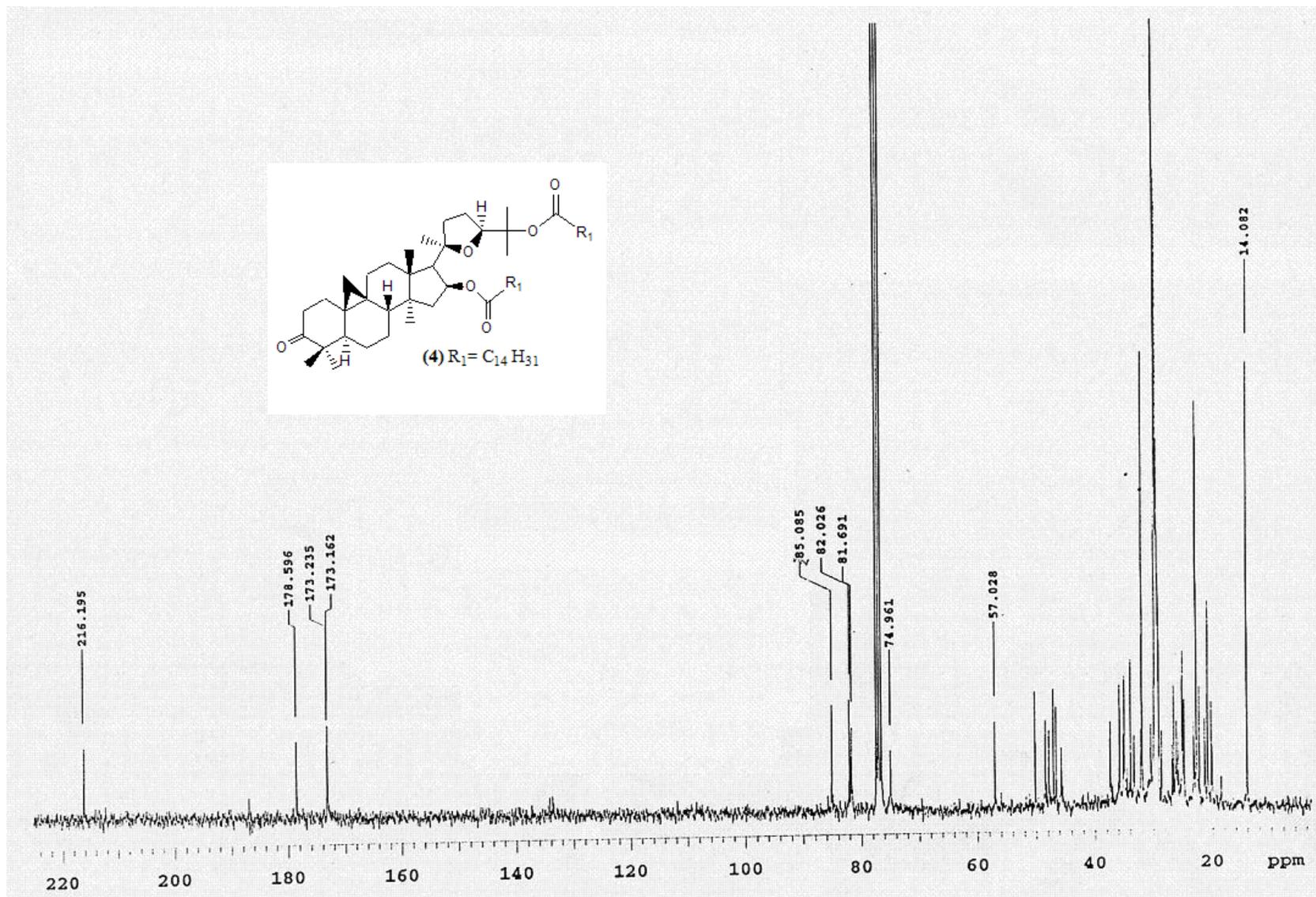
. Espectro (4) de IR dipalmitato de argentinina A.



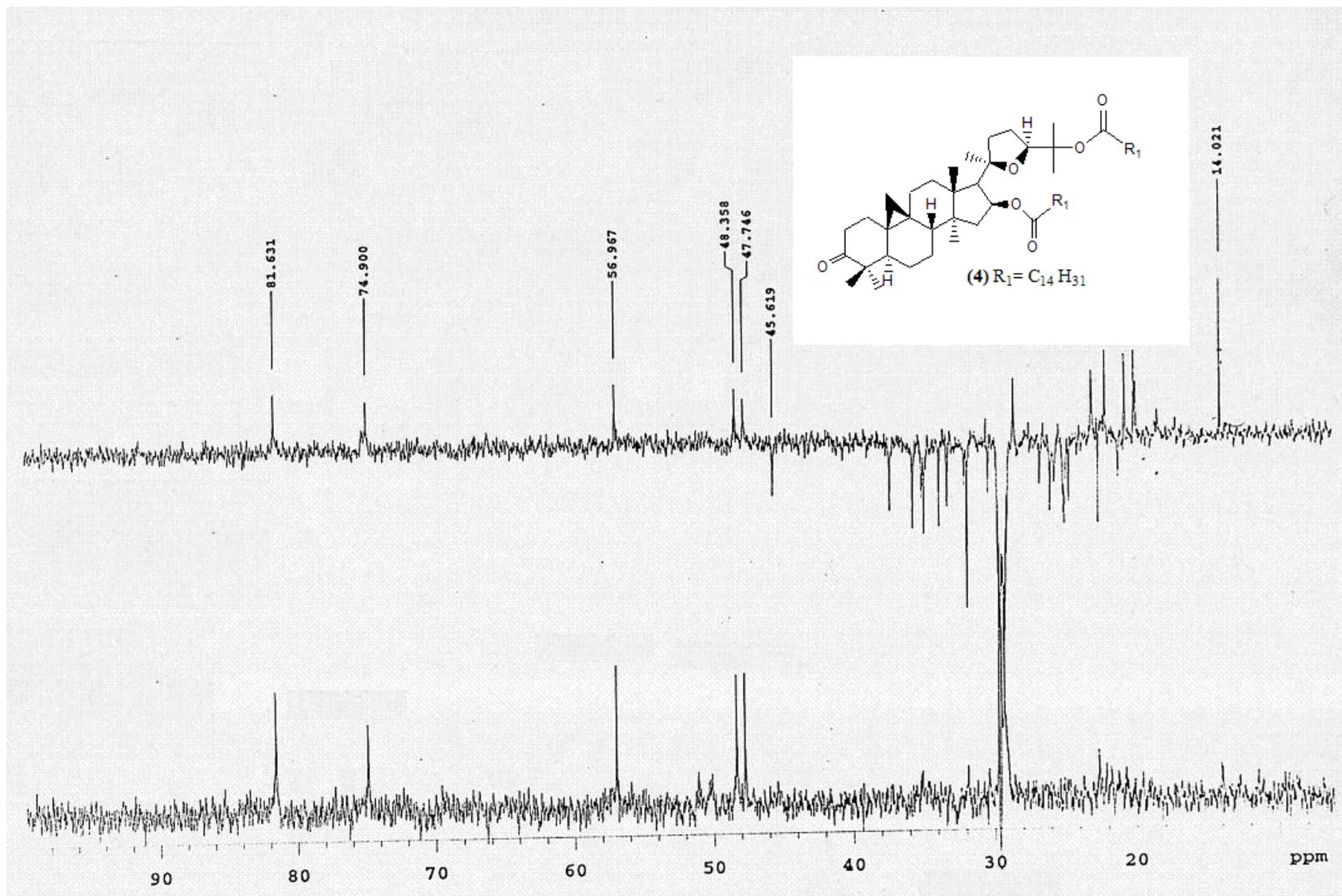
. Espectro (5) de Masas dipalmitato de argentatina A.



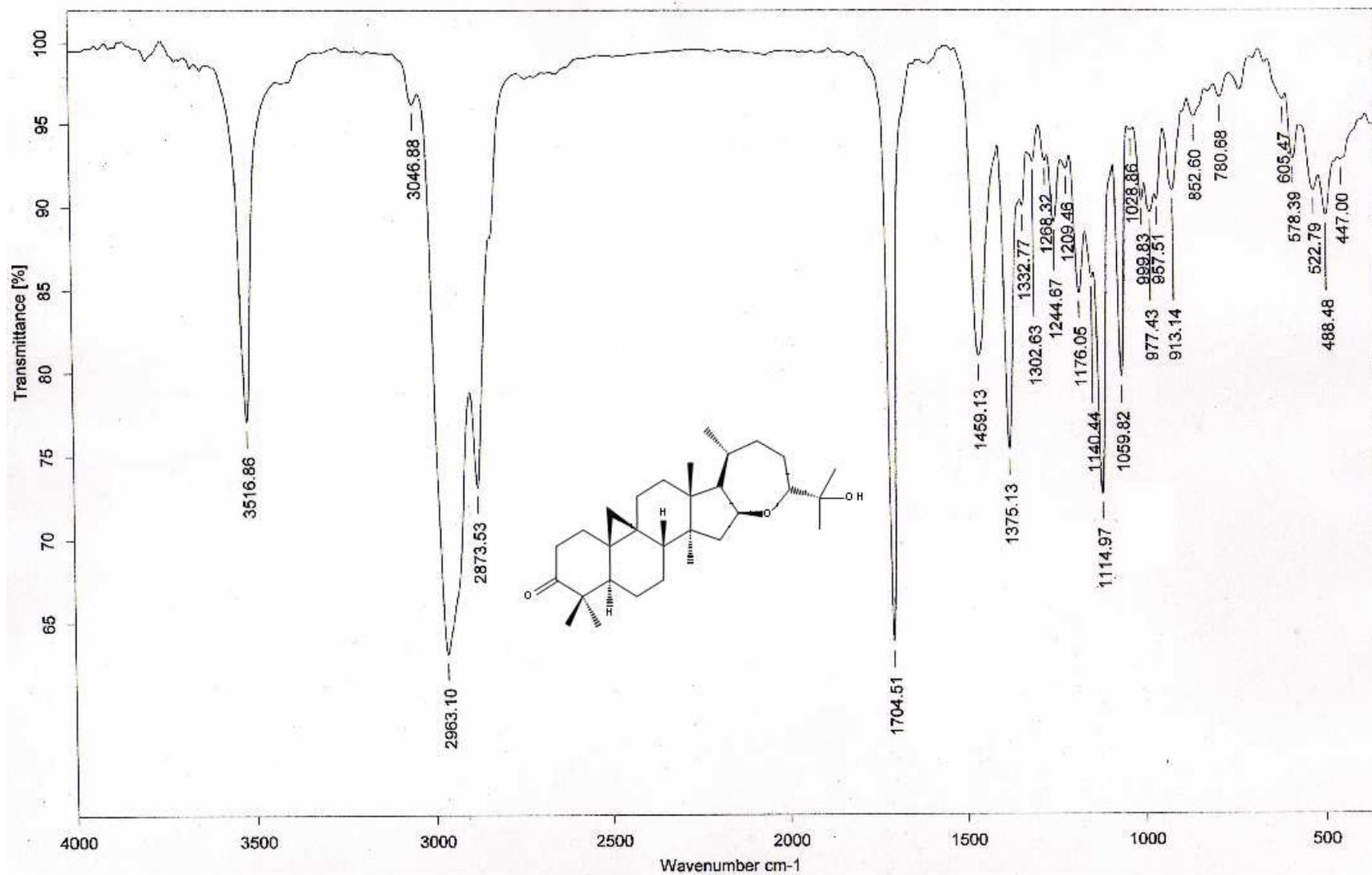
Espectro (6) de RMN <sup>1</sup>H dipalmitato de argentinina A.



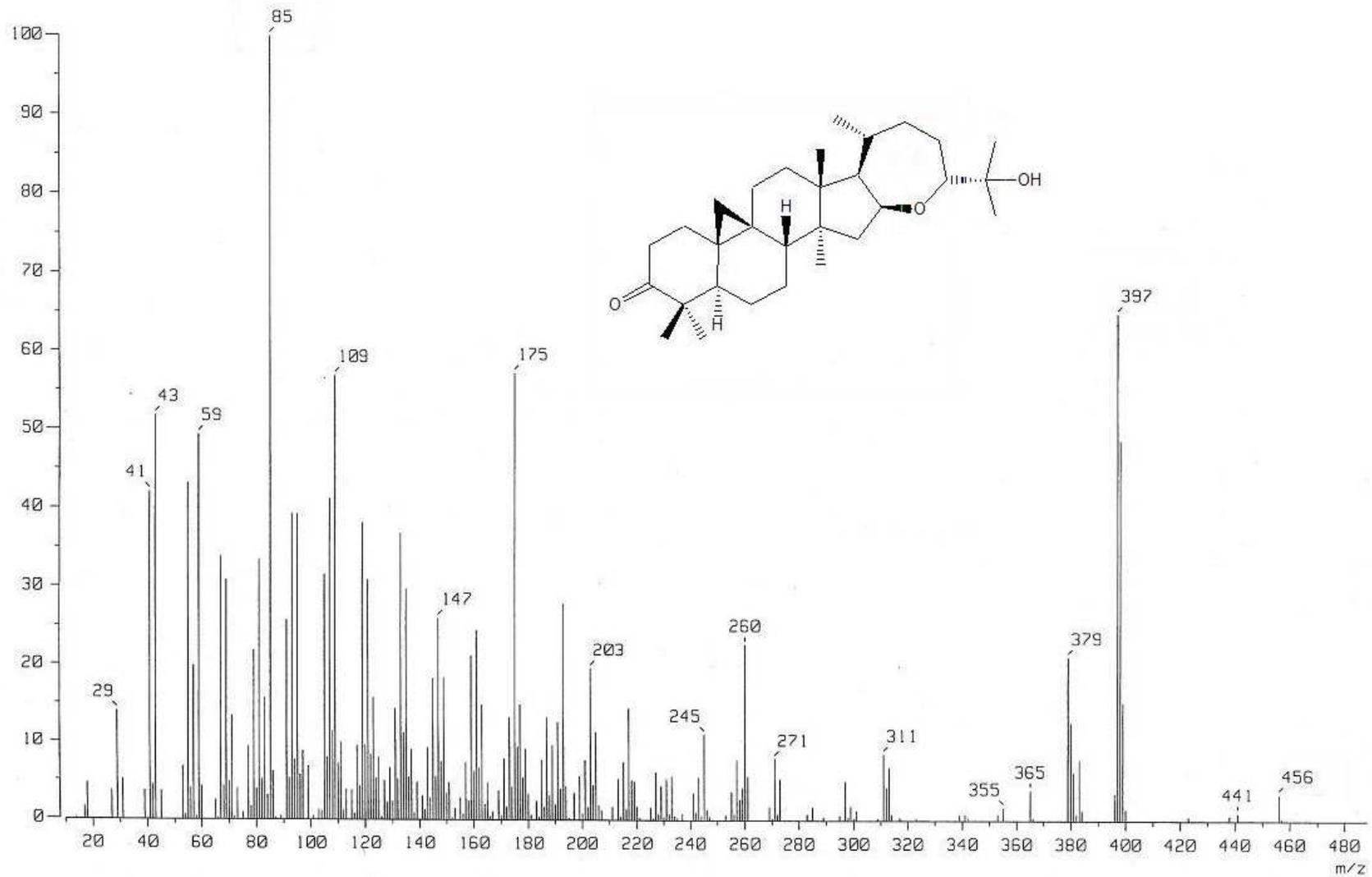
Espectro (7) de RMN  $^{13}\text{C}$  dipalmitato de argentinina A.



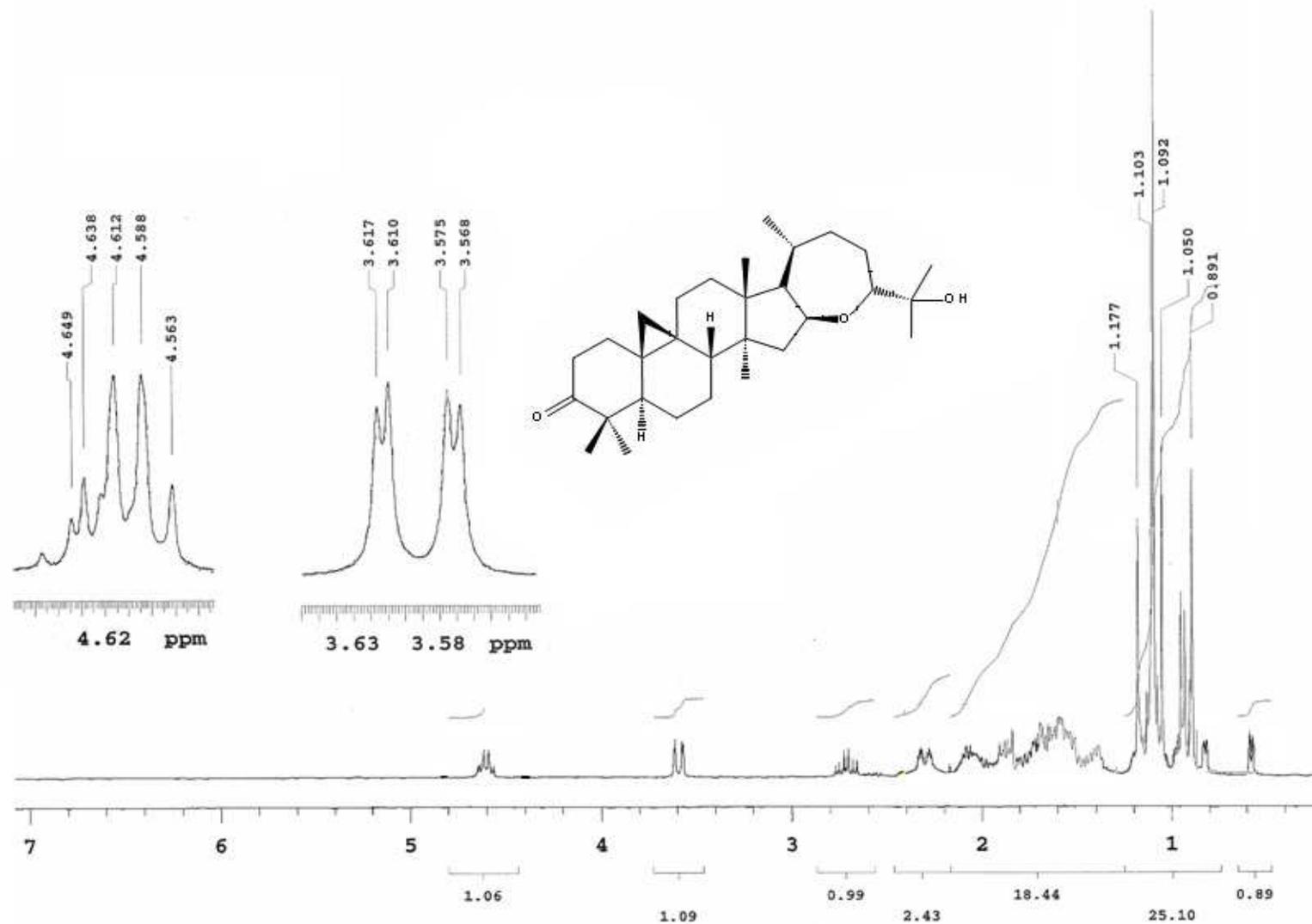
. Espectro (8) de DEPT dipalmitato de argentinina A.



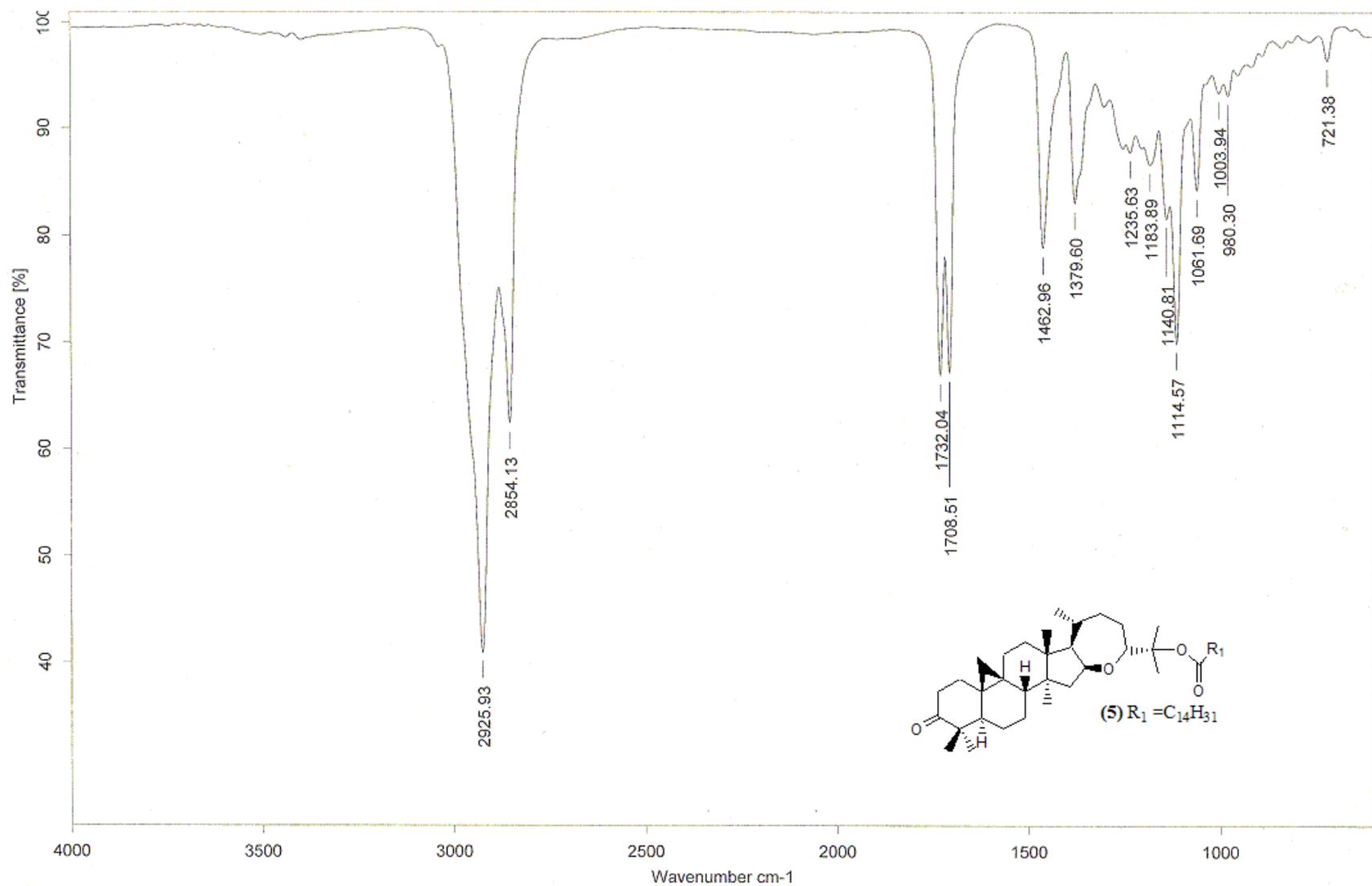
Espectro (9) de IR argentatina B.



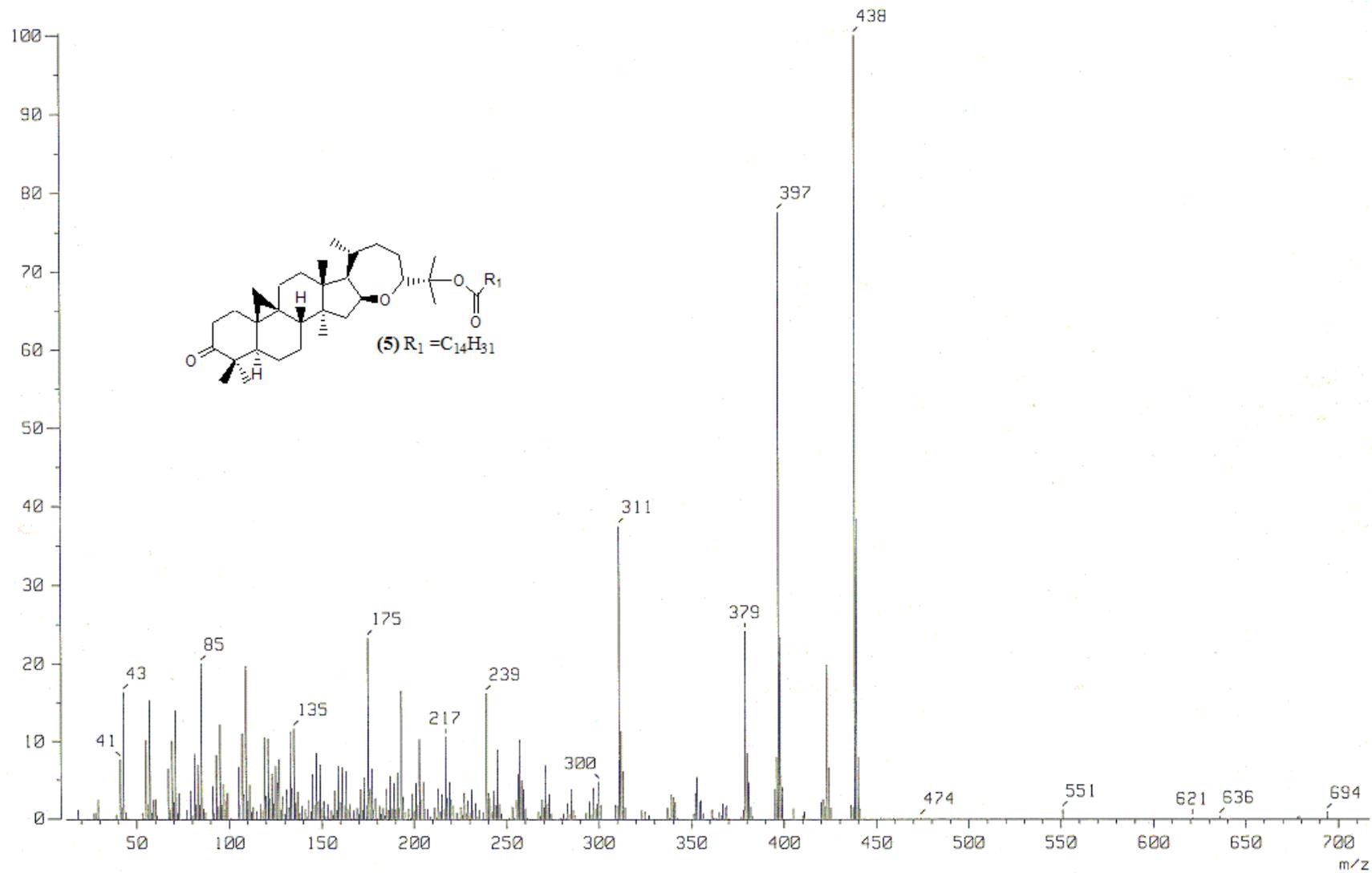
**Espectro (10) de masas argentina B.**



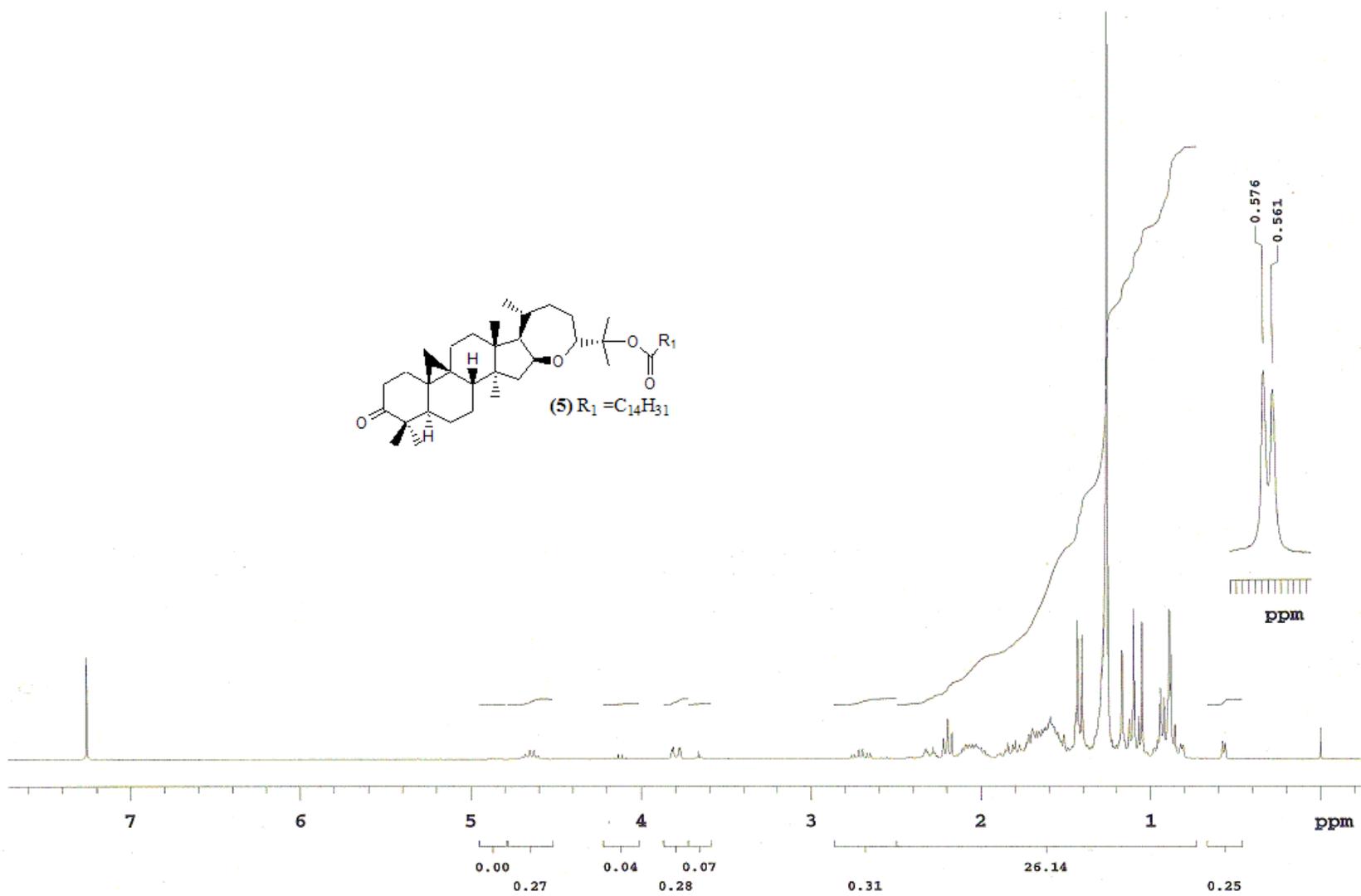
Espectro (11) de RMN  $^1\text{H}$  argentatina B.



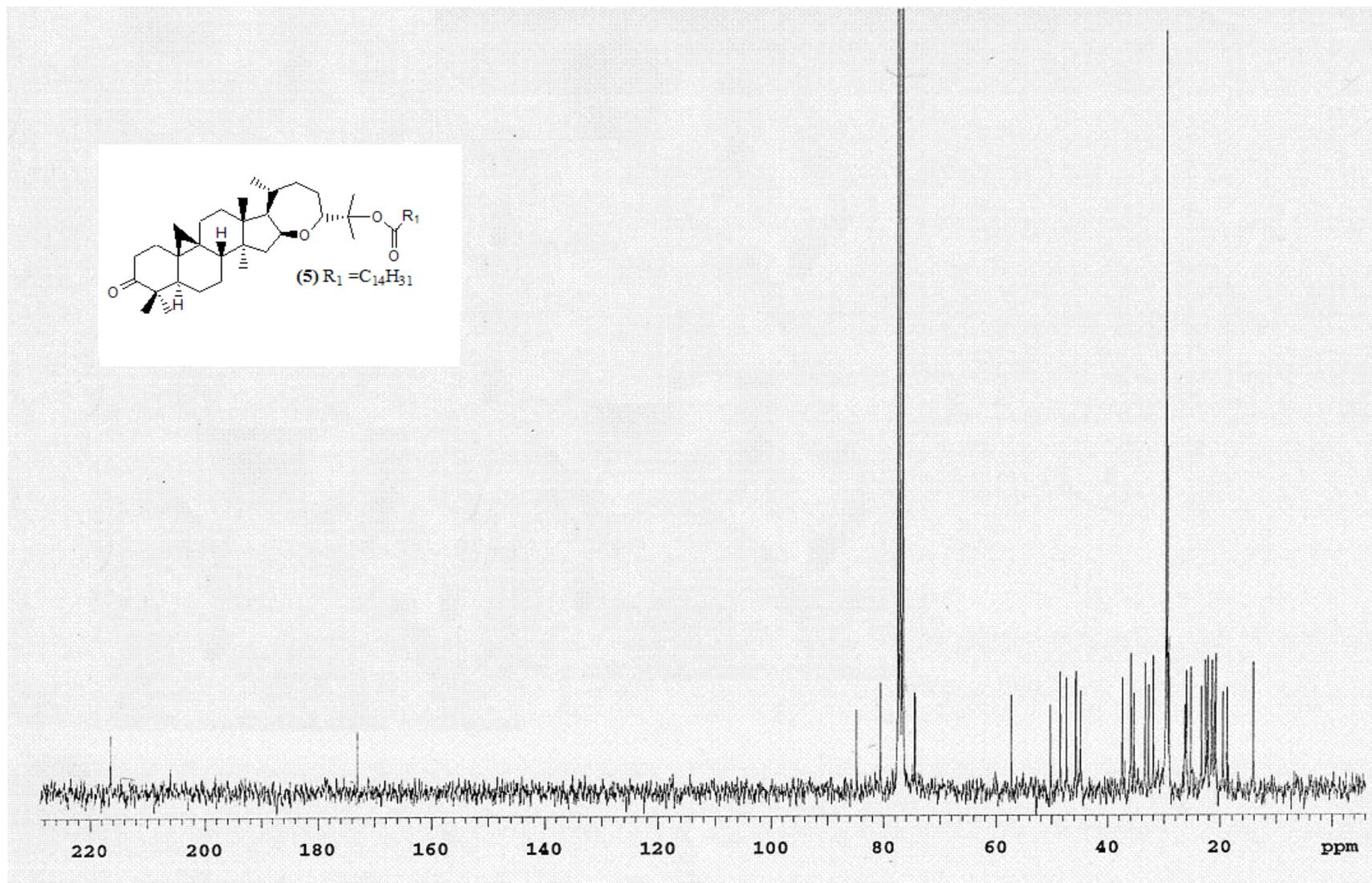
**Espectro (12)** de IR palmitato de argentatina B.



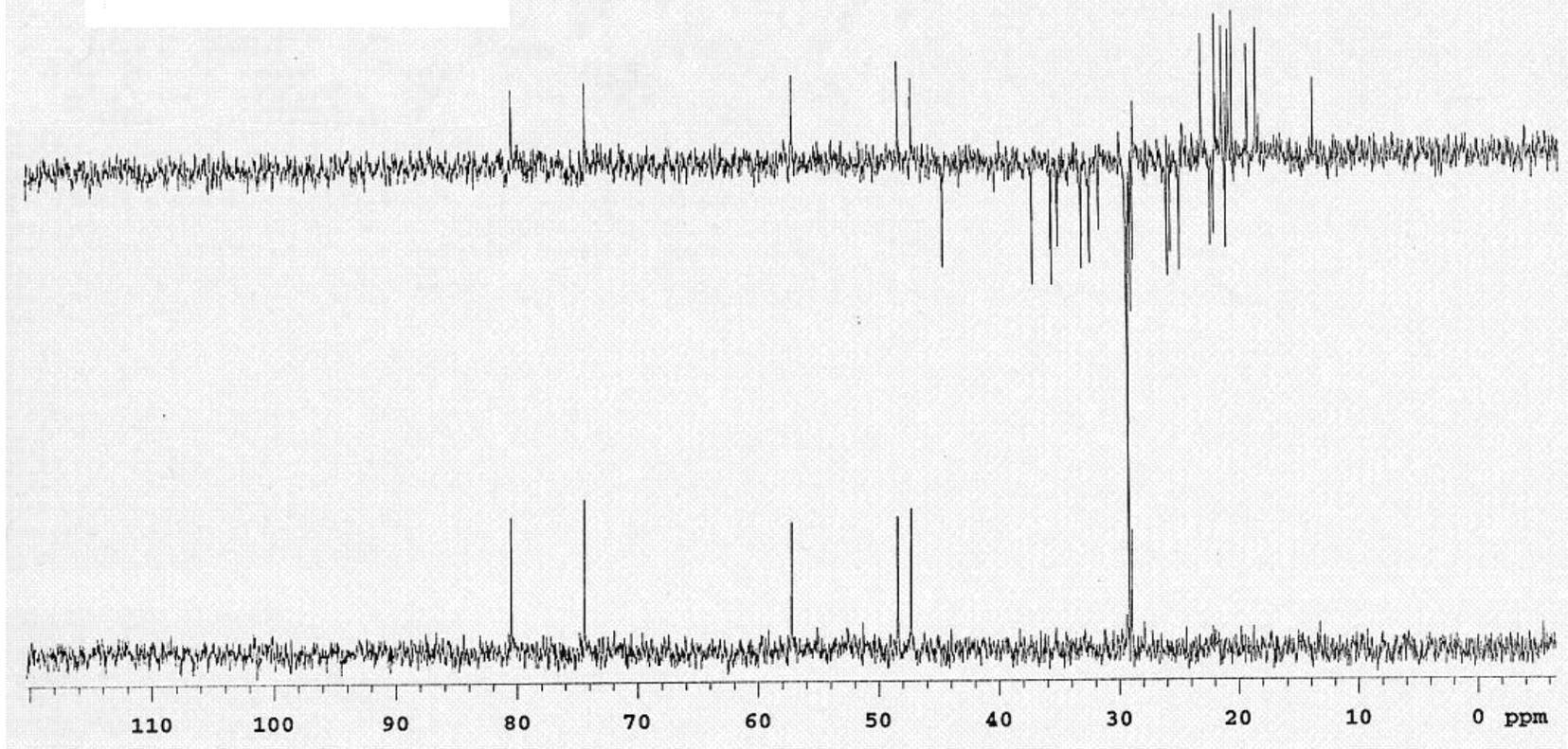
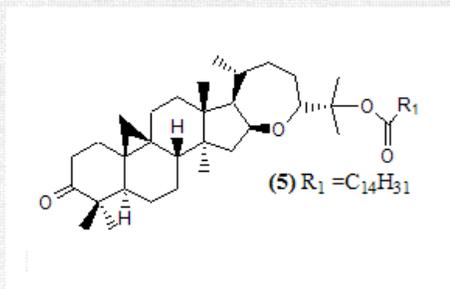
**Espectro (13)** de Masas palmitato de argentatina B.



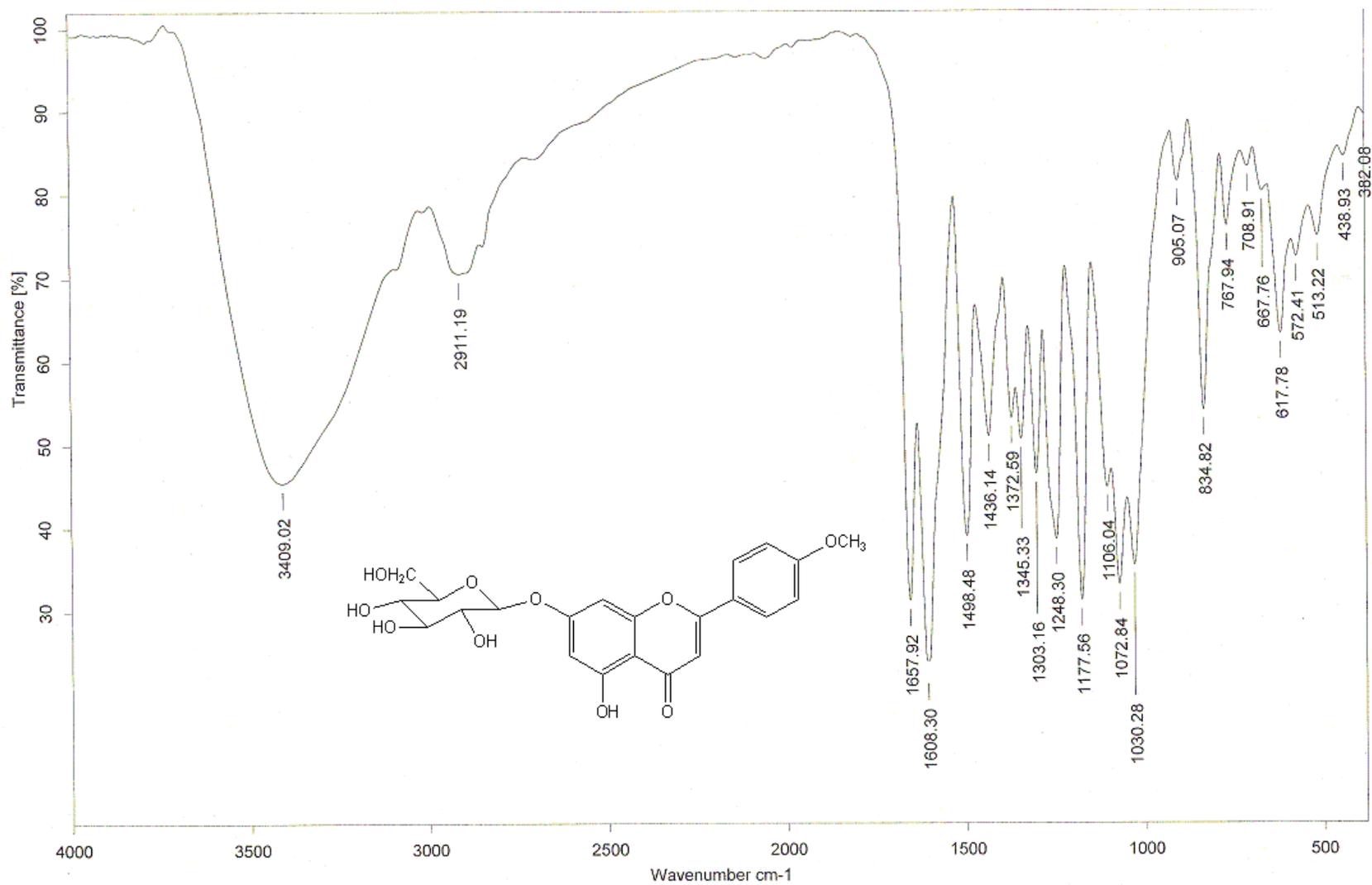
Espectro (14) de RMN  $^1\text{H}$  palmitato de argentinina B.



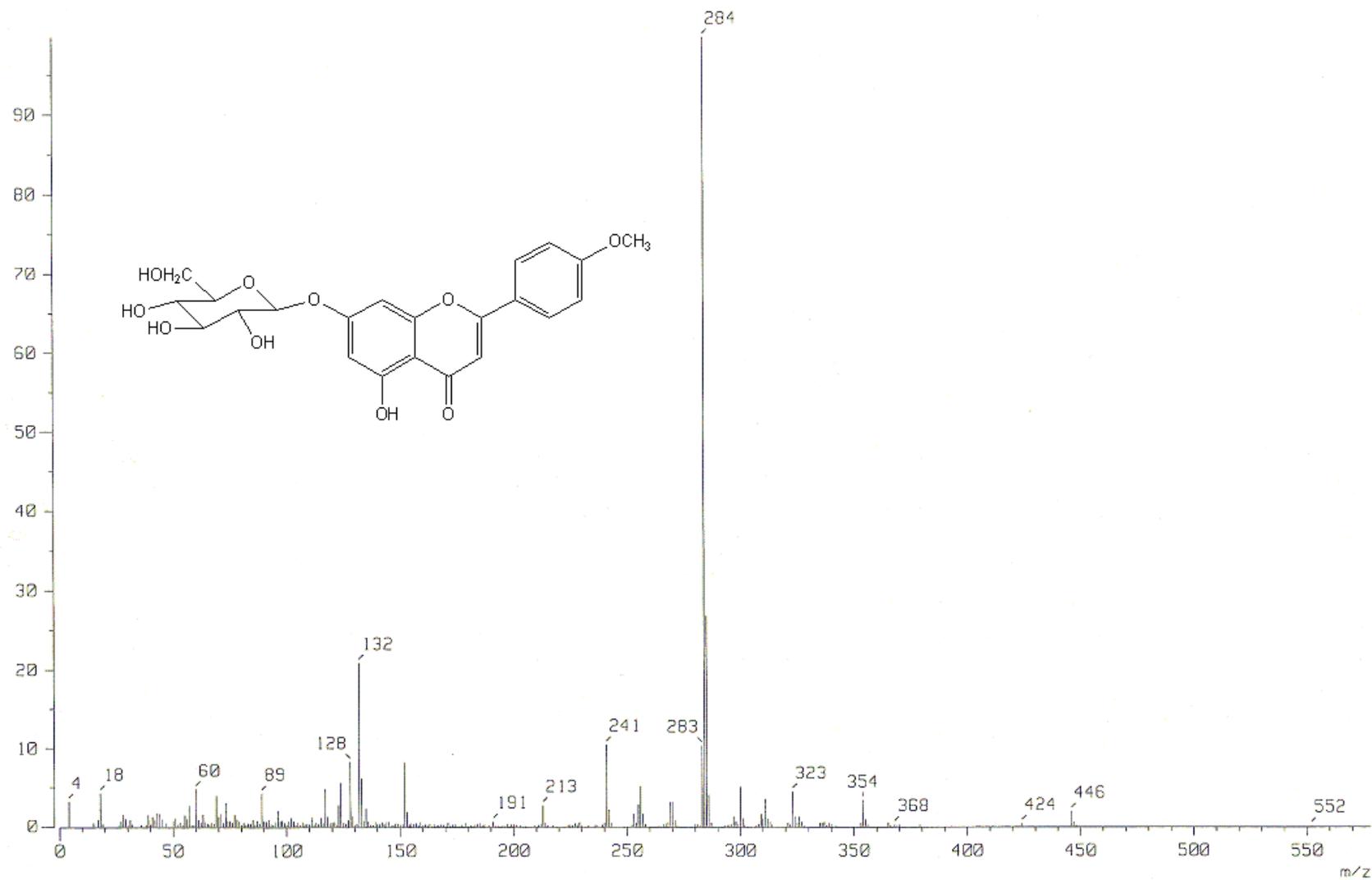
**Espectro (15)** de RMN  $^{13}\text{C}$  palmitato de argentinina B.



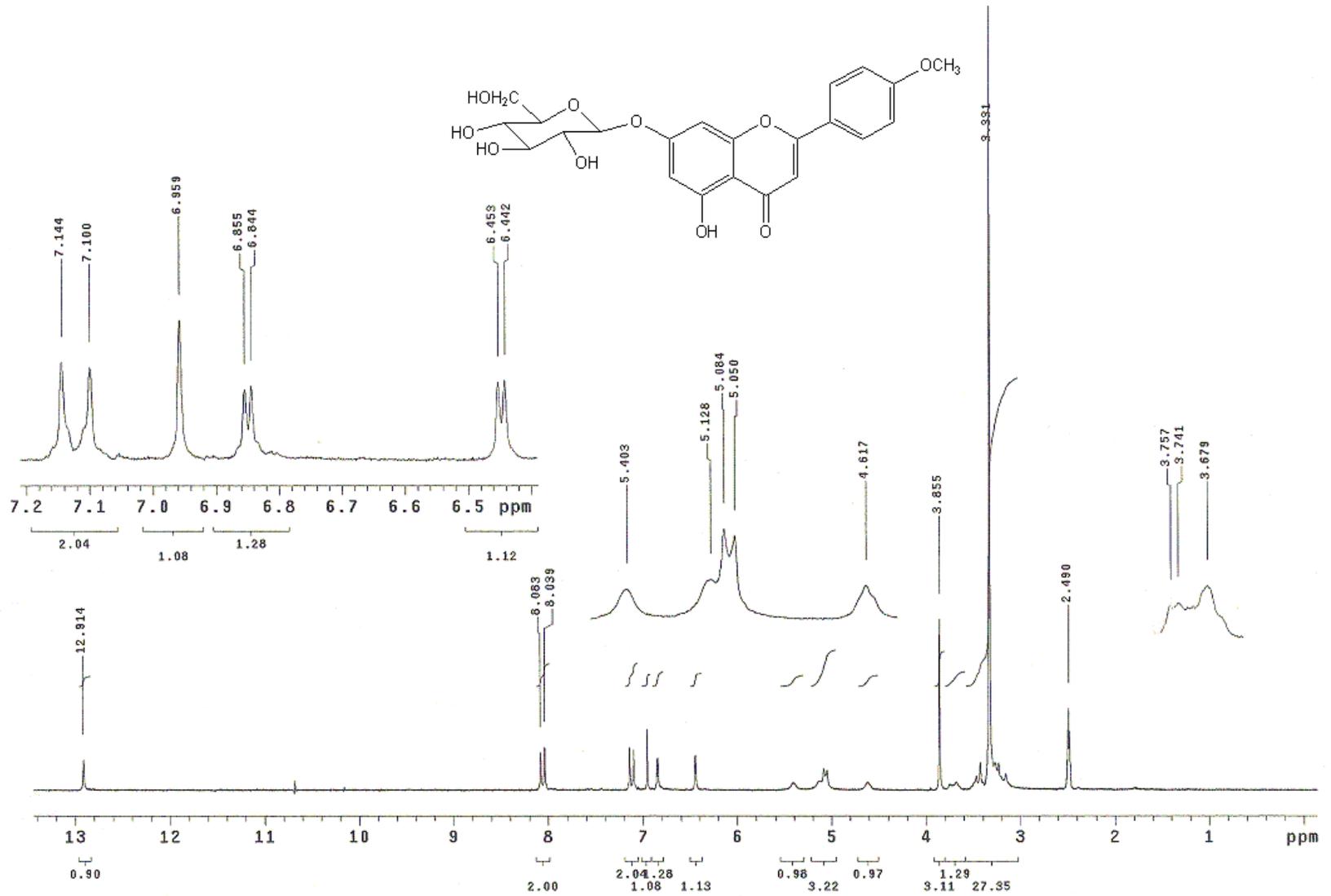
**Espectro (16)** de DEPT palmitato de argentatina B.



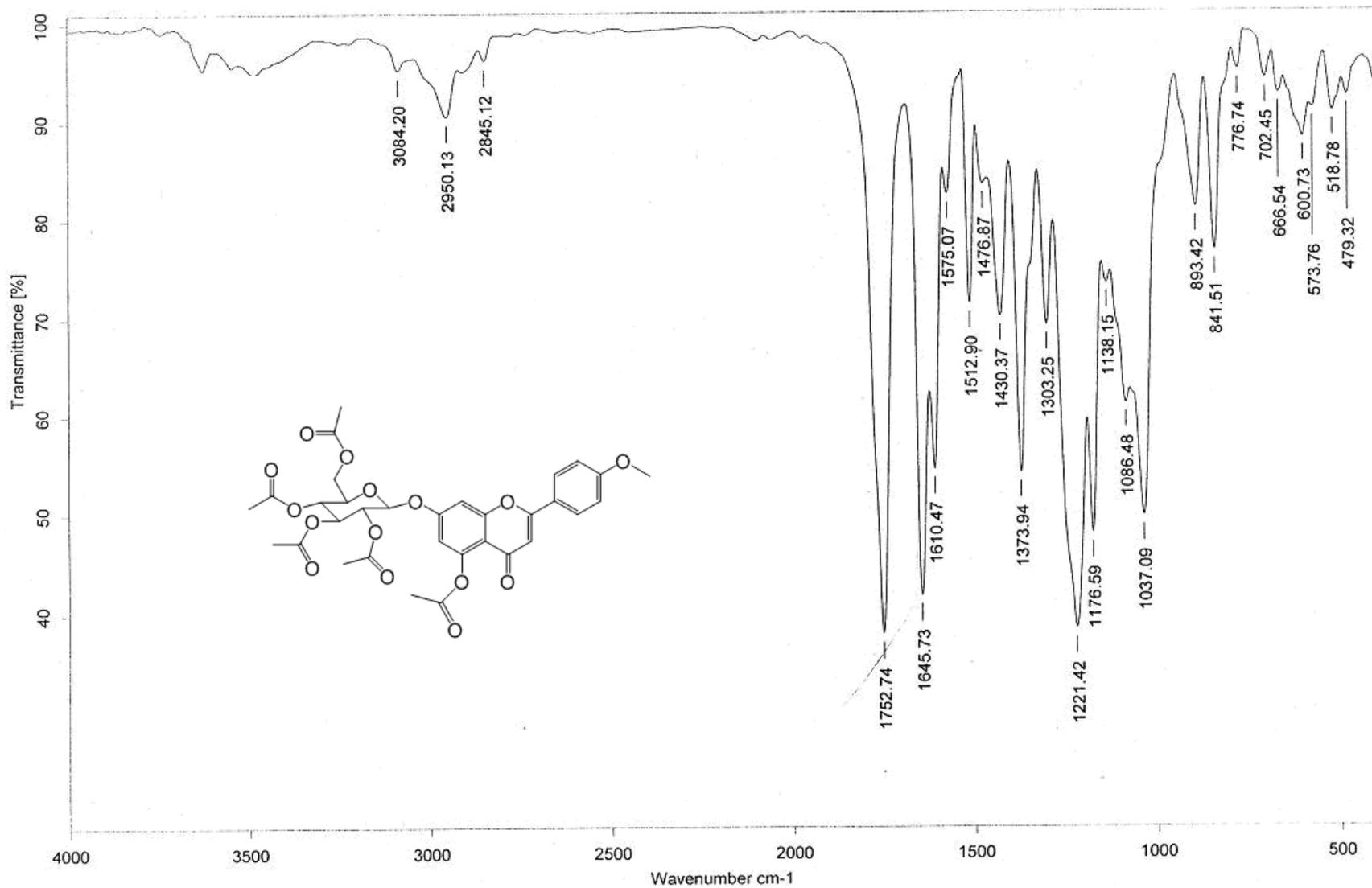
**Espectro (17)** de IR de la 7-O-β-D-glucosil-acetina.



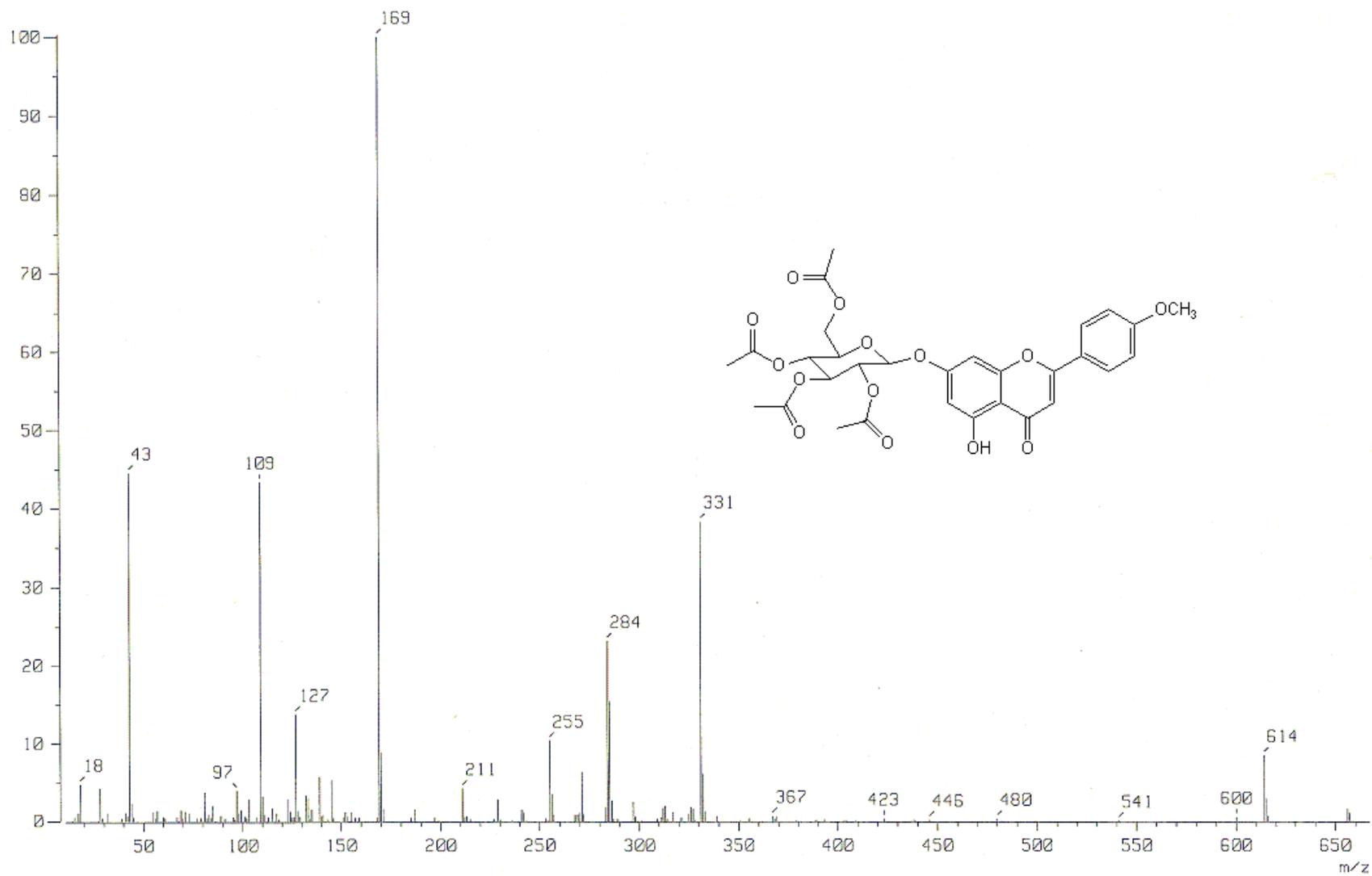
**Espectro (18)** de Masas de la 7-*O*-β-D-glucosil-acacetina.



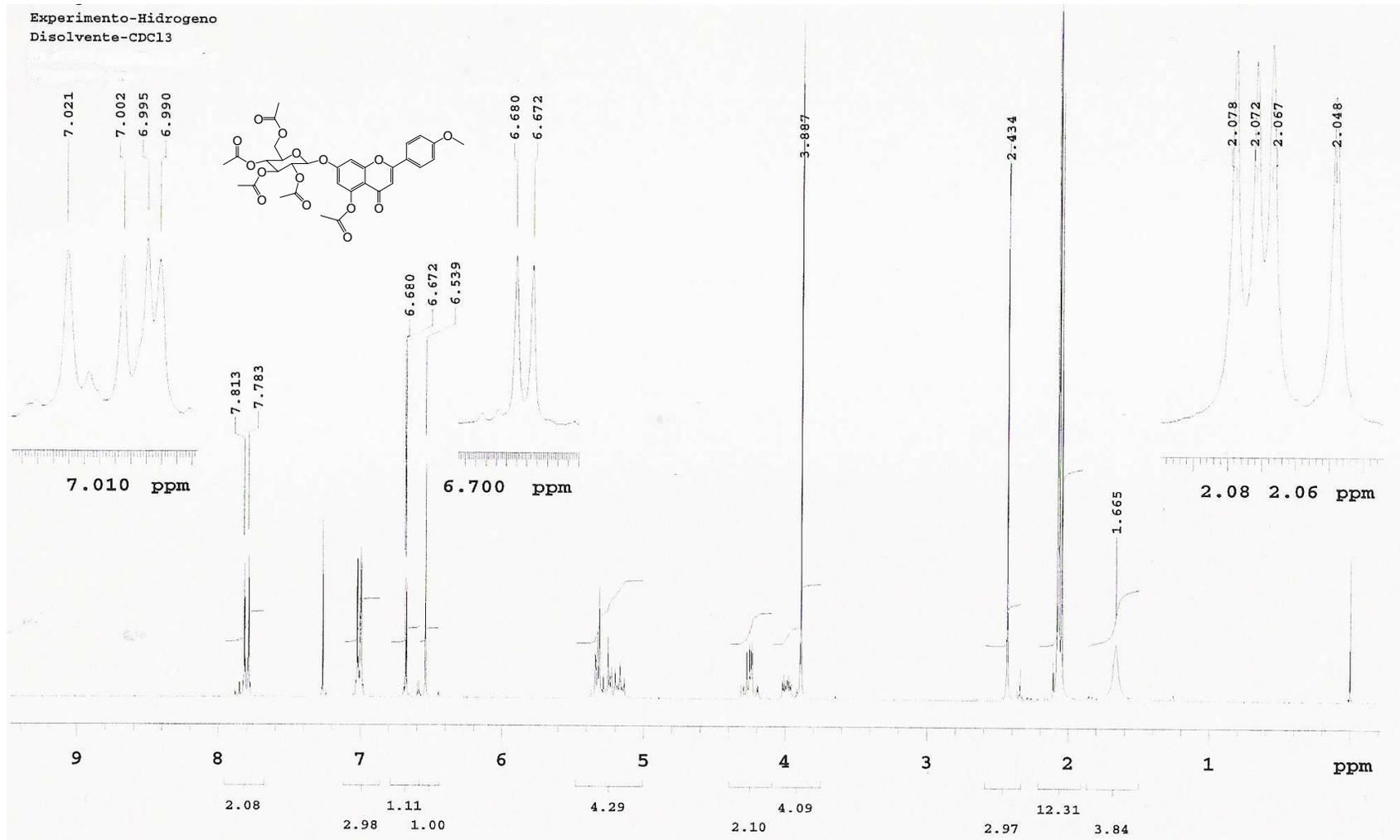
. Espectro (19) de RMN <sup>1</sup>H de la 7-O-β-D-glucosil-acetina.



. Espectro (20) de IR de la tetra-acetil 7-*O*-glucopiranosil acetina



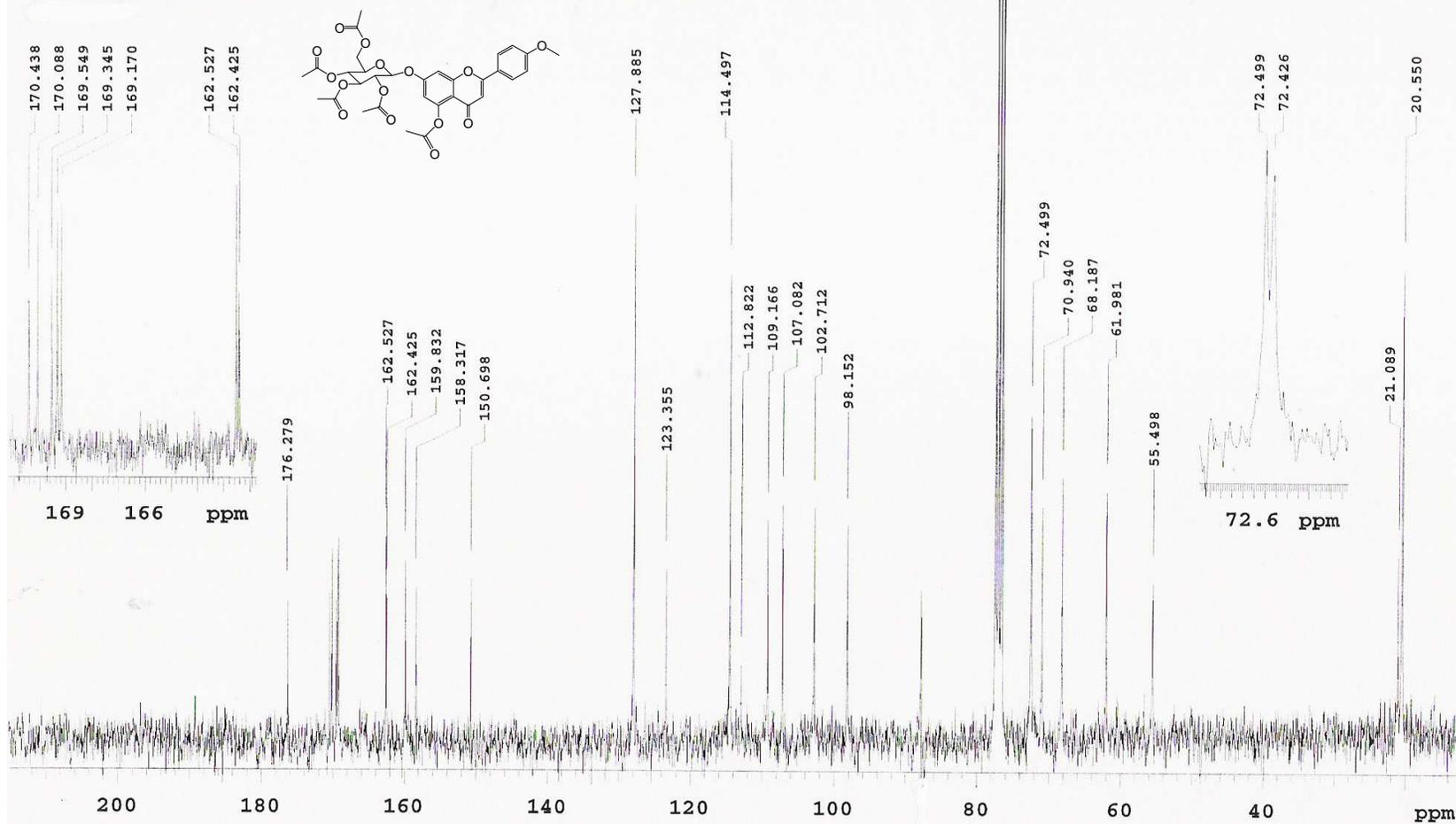
**Espectro (21)** de Masas de la penta-acetil 7-*O*-glucopiranosil acetina



Espectro (22) de RMN <sup>1</sup>H de la penta-acetil 7-O-glucopiranosil acetina

Instituto de Quimica. UNAM (H. Rios)  
Dr-M-Martinez

No-registro: 2892  
Experimento-C13  
DiSolvente-CDCL3  
VarianUnity-75.4MHz (D)



Espectro (23) de RMN <sup>13</sup>C del penta-acetil 7-O-glucopiranosil acetina

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to steroids and triterpenes. *Chemical reviews*. **1993**;93:2,189:2206.
- Adcock, I. M. Molecular mechanisms of glucocorticoids actions. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. **2000**;13:115-126.
- Aggarwal, B. B.; Selthi. G.; Nair. A.; Ichikawa. H. Nuclear factor-kB: A holy grail in cancer prevention and therapy. *Current signal Transduction therapy*. **2006**;1:25-52.
- Aherne SA y O'Brien NM.: Dietary flavonols: chemistry, foodcontent, and metabolism. *Nutrition*, **2002**, 18:75-81
- Ahmad Ms, Fazal F, Rahaman y cols.: activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu (II): correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis*, 1992, 13:605-608.
- Alexander, P., *Ber*, **1911**, 44, 2324
- Angulo, S. J. L. and Quero-Gutiérrez, E., *C.I.Q.A.*, (**1984**).
- Anwarul, H. G. & Atta-ur-Rahman. Perspective paper: Trends in ethnopharmacology. **2005**; 100:43-49.
- Assimopoulou, A. N. & Papageorgiou, V. P. GC-MS analysis of penta- and-tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. pistacia lenticus var. Chia. *Biomedical Chromatography*. **2005**;19:285-311.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Ray SD, Sen CK y Preuss HG: Cellular Protection with Proanthocyanidins Derived from Seeds. *Ann N Y Acad Sci*, **2002**, 957:260-270
- 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.
- Birt Df, Hendrich S y Wang W: Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, **2001**, 90:157-177
- Borne, R. F. Non-esteroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, W. O.: Lemke, T. L.: Williams, D. A. *Principies of Medical Chemistry*. 4<sup>a</sup>

- Bors W, Heller W, Christa M y cols. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, **1990**, 186:343-355
- Bowden, G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light. *Nature Reviews Cancer*. **2004**;4:23-35.
- Bremner P y Heinrich M: Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*, **2002**, 54; 453-472.
- 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.
- Calis, I.; Yuruker, A.; Sticher, O.; Luo, Y. D.; Pezzuto, J. M. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus melanophrurius*. *Planta Medica*. **1997**;63:183-186.
- Calixto, J. B.; otuki, M. F.; Santos. A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB(NF-kB). *Planta medica*. **2003**;69:973-983.
- Calzada, L., Salazar, E. L., Téllez, J., Martínez, M., and Martínez, R., *Med. Sci. Res.*, (**1995**), 23, 815-816.
- Campos, E., (comp.) *Guayule. Reencuentro en el Desierto*, 3ª ed., México, CONACYT, (**1981**),13.
- Cantrell, C. L.; Lu, T.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; Adams, L. B.; Franzblau, S. G.; Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*.
- Céspedes, C. L., Martínez-Vázquez, M., Calderón, J. S., Salazar, J. R. and Aranda, E. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, (**2001**), 56c, 95-105.
- Chabner, B. A. y Roberts, T. J. Jr., *Nature*, (**2005**), 5, 65-72.
- Charalambous G y Bruckner KJ: Analysis of metal ions in brewing materials, wort, beer and wine by inductively coupled argon plasma-atomic emission spectroscopy. *Technical Quarterly*, **1977**, 14:197-208

- Cirino, G. Multiple controls in inflammation. *Biochemical Pharmacology*; **1998**;55:105-111.
- Connelly, L.; Palacios-Callender, M.; Ameixa, C.; Moncada, S.; Hobbs, A. J. Biphasic regulation of NF-kB activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of immunology*. **2001**;166:3873-3881.
- 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.
- D´Acquisto, F.; May. M. J.: Ghosh, S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-kB): An Emerging theme in Anti-inflammatory Therapies. *Molecular interventions*. **2002**;2:22-35.
- da Silva J, Herrmann SM, peres W, Possa Marroni N, Gonzalez Gallego J y Erdtmann B: Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, **2002**, 40:941-947.
- Devis. K. L; Martin, E.; Turko I.V.; Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **2001**;41:203-236.
- De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. L.; Young, J. M. edema and cell infiltration in the phorbol ester treated mouse ear are temporally separate and can be diferentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*. **1989**;26:335-341.
- Dirsch, V. M.; Sluppner, H.; Vollmar, A. M. The griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extract?. *Planta Medica*. **1998**;64:423-426.
- Espinós, D.; López, A.; Calvo, E. Bases farmacologicas y tratamiento de la inflamación. En: Monografía xv, Nuevos avances en medicamentos. Eds Avendaño, C.& Tarmargo, J. Real Academia de farmacia España. **2004**; 237-286.
- Estrada -Reyes, R., García -Argáez, A., Martínez-Vázquez, M., Comparative chemical composition of Agastache mexicana subs. mexicana and A. mexicana xocolotziana. *Biochemical Systematic and Ecology* (**2004**), 32, 685-694.

- F. Boege, T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jakob and J. Kohrle, Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), . 2262–2270.
- Flores J., Armijo J. A., Mediavilla A., Sección III: Distribucion de fármacos y farmacocinetica. *Farmacologia Humana.*, 4.a edicion. Edit. Masson, Barcelona España (1996) 642-645.
- Formica JV y Regelson W.: Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 1995, 33:1061-1080
- Fung, H.B. & Kirschenbalum H. L. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clinical Therapeutics*. 1999;21:1131-1157.
- Fürstenberger, G.; Gross, M.; Marks, F Eicosanolds and multistage carcinogenesis in NMRI mouse skin: role of prostaglandins E and F in conversion (first stage of tumor promotion) and promotion (second stage of tumor promotion). *Carcinogenesis*. 1989;10:91-96.
- Fushiya, S.; Kabe, Y.; Ikegaya, Y.; Takano, F. (+)-Rhododendrol and epi-rhododendrin suppress the NO production by activated macrophages in vivo. *Planta Medica*. 1998;64:598-602.
- Gan, K. H.; Fann, Y.; Hsu, S. H.; Kuo, K. W.; Lin, C. N. 1998. Mediation of the cytotoxicity of lanostanolds and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*. 1998;61:485-487.
- Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A y Witteman JC.: Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75:880-886.
- Gibbs, J. B., *Science*, (2000), 287, 1969-1973.
- Gonzalez de Mejia E., Chandra S., Ramirez-Mares Marco V., Wang W., *Food and Chemical Toxicology*, (2006), 44, 1191–1203.
- Goodwin TW. 1971. *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Londres.

- H. Doostdar, M.D. Burke and R.T. Mayer, Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* 144 (2000), . 31–38
- Hardigree AA y Epler: Comparative mutagenesis of plants flavonoids in microbial system. *Mutation Res*, **1978**, 58:231.
- Hartwell, J. L. Plants used against cancer. Quaterman Publications, Lawrens, MA. (**1982**).
- Havsteen B: Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, **1983**,32:1141-1148.
- Hayakawa, M.; Miyashita, H.; Sakamoto, I.; Kitagawa, M.; tanaka, H.; Yasuda, H.; Karin, M.; Kikugawa, K. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF\_κB activation. *European Molecular Biology Organization Journal*. **2003**;22:3356-3366.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-κB. *Genes & Development*. **2004**;18:2195-2224.
- Hecker, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Eupobiaceae. *Cancer research*. **1968**;28:2338-2349.
- Hertog MGL, Hollman PCH y Putte van de B: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea, infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem*, **1996**, 41:1242-1246.
- Hideji I, Keiichi S, Koichi T., Structures of Isoagastochoside and Agastache, New glucosyflavones isolated from *Agastache rugosa*, *Chem. Pharm. Bull.*, 29 (6), 1777-1779, **1981**.
- Honick W, Milosaljevic E, Nelson J y cols.: Electrochemistry of flavonoids. *Biochem Pharmacol*, **1988**, 37:2607-2611.
- H. Viola, C. Wasowki, M. Levi de Stein, C. Wolfman, R. Silverira, F. Dajas, J.H. Medina, and A.C. Paladini. Apigenin, a component of *matricaria reticulata* flowers is a central Benzodiazepine receptor-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica*, 61, 213-216, **1995**.
- Infante R: Polifenoles del vino y oxidabilidad de las lipoproteínas ¿Blanco o tinto? *Clin Invest Arterioesclerosis*, **1997**, 9:19-22

- 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](http://www.inegi.gob.mx), 15 de Noviembre de 2005.
- J.B. Salgueiro, P.Ardenghi, M. Dias , M.B.C. Ferreira, I. Izquierdo, and J.H. Medina. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have noeffect on memory tasks in rats.Pharmacology Biochemistry and Behavior. 58, 4, 887-891, 1997.
- J.Exner, A. Ulubelen, and T. J. Marby. Chemistry of *Agastache*, Part II Falvonids of *Agastache Aurantiaca*. Rev Latinoamer. Quim. 12, 37-38, 1981.
- Jiménez M, Ruiz R, Navarro A, Hernández JM, Reyes R. Plantas usadas en México para curar la diarrea (estudio químico y bacteriológico). Rev Cubana Quím. 2000;13(2):4-22.
- Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG y Hara Y: Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electrontransfer reactions of flavonoid radicals. En: Rice Evans C, Parker L (eds.): *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Nueva York, 1998, 137-161
- J. Palazón, R.M. Cusidó y C. Morales [\*Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino\*](#), Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.
- Judd, W. S. Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach, Second Edition*.Sinauer Axxoc, USA.
- Karin, M. & greten. F. R. NF-kB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progresión Nature Reviews immunology. 2005;5:749-759.
- Katzung, B. G. Farmacología básica y clínica, 7a edición. Ed. El manual Moderno, México, (1986), 1011-1013.
- Kawada N, Seki S, Inoue M y Kurobi T: Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the function of cultured

- rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*, **1998**, 27:1265-1274.
- Klug s. W., Cummings R. M. **1999**. Conceptos de Genética. 1ª edición, Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp 625-626.
  - Komoroski, R.A., Gregg, E.C., Shockcor, J.P. and Geckle, J.M., *Magn. Res. Chem.*, (**1986**), 24 , 534.
  - K. Zhang, E.B. Yang, W.Y. Tang, K.P. Wong and P. Mack, Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 54 (**1997**), . 1047–1053.
  - Lastra, A. L., Ramírez, T. O., Salazar, L., Martínez, M., Trujillo-Ferrara, J.. *Journal of Ethnopharmacology*, (**2004**), 95, 221-227.
  - Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA y cols. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol*, **1991**, 42:1673-1681.
  - Lawrence, T.; D. A.; Gilroy. D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews immunology*. **2002**;2:787-795.
  - 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&Ing=es&nrm=iso](http://scimed@infomed.sld.cuhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issues&pid=1028-4796&Ing=es&nrm=iso)
  - Letan A: The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivates. *J Food Sci*, **1966**, 31:518-523.
  - Liva Harinantenaina, Dang Ngoc Quang, Nishizawa Takeshi, Toshihiro Hashimoto, Chie Kohchi, Gen-Ichiro Soma, and Yoshinori Asakawa Bis(bibenzyls) from Liverworts Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Inducible NOS in RAW 264.7 Cells: A Study of Structure-Activity Relationships and Molecular Mechanism. *Journal of Natural Products* 2005.
  - Mahato, S. B. & Sen, S. Advances in triterpenoid research, **1990-1994**. *Phytochemistry*. **1997**;44:1185-1236.

- Malgor, L. A. & Valsecia, M. E. Prostaglandinas y productos relacionados. En: Farmacología Médica V.1.4.2000; 93-111. Disponible en: [http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacología/temas\\_farma/indice\\_v4.htm](http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacología/temas_farma/indice_v4.htm)
- Mann, J. 2002. *Nature Reviews*, (2002), 2, 143-148.
- Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 6ta ed. México, DF: Editorial Botas; 1996. p. 656.
- Martínez, R., Martínez-Vázquez, M., and Zamorano-Macías, *Organic Mass Spectrometry*, (1990), 25, 237.
- Martínez-Vázquez, M., Flores, G., Romo de Vivar, A., Reynolds, G. W., Rodríguez, E., *Journal of Natural Products*, (1986), 49, 1102.
- Martínez-Vázquez, M., Martínez, R., Espinosa, P. G., *Fitoterapia*, (1994), 4, 371-372.
- Martinez-Vazquez, M., Parra Delgado H. Natural products and potencial anti-cancer agents in *Advances in Cancer Research at UNAM*. Manual Moderno 2007.
- Mi Kyung Yu, ,j Dong Yun Lee, ,j Yoo Shin Kim, Kyeongsoon Park, Soo Ah Park, Dai Hyun Son, Gee Young Lee, Jong Hee Nam, Sang Yoon Kim, In San Kim, Rang Woon Park, and Youngro Byun. Antiangiogenic and Apoptotic Properties of a Novel Amphiphilic Folate-Heparin-Lithocholate Derivative Having Cellular Internality for Cancer Therapy *Pharmaceutical Research*, 2007; 24, 705-714.
- Molina-Hernández, P. Téllez-Alcántara and E. Martínez. Agastache mexicana may produce anxiogenic-like actions in the male rat. *Phytomedicine*, 7, 3, 199-203, 2000.
- Moncada, S.; palmer, R. M.; Higos, e. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*, 1991; 43:109-142.
- Monk, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; R.; Paul, K.; K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley. J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer

drug screen using a diverse panel cultured human tumor cell lines. Journal of the National Cancer institute. **1991**;38:757-766.

- Moore, M. J y Goldenberg, G. J. Capítulo 60, Fármacos antineoplásicos *En Kalant*, H y Roshlau, W. H. E. **1998**. Principios de Farmacología clínica, Oxford University press México, sexta edición.
- M.R. Cholbi, M. Paya and M.J. Alcaraz, Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 47 (**1991**), 195–199.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological Methods. **1983**;65:55-63.
- Muraoka K, Shimizu K, sun X y cols.: Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF-kappaB. *Transplant Proc*, **2002**, 34: 1335-1340.
- NCI. National Institute Cancer U.S.  
<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/espanol/cancer/Slide2>
- Nam, K. Y.; Morino, A.; Kimura, S.; Fujiki, H.; Imanishi, Y. Modulation of phospholipase A2 activity by the tumour promoters phorbol esters and teleocidin. *Biochemical Journal*. **1990**;268:169-173.
- Nathan, C. Points of controls in inflammation. *Nature*. 2002;420:846-852.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Kingston, D. G. I . En Wermuth C. G., *Elsevier*, (En prensa), (**2003**), 91-109.
- Newton, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?. *Thorax*. **2000**;55:603-613.
- Oviedo-Chávez I., Ramirez-Apan, T., Soto-hernandez, M., Martínez-Vázquez M., Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. **2004**;11:436-445.
- Oviedo-Chávez I., Ramirez-Apan, T., Martínez-Vázquez M., Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucaliane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and pharmacology*. **2005**;57:1087-1091.

- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G y Goldberg DM.: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation in eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, **1995**, 235:207-219.
- 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.
- Parra-Delgado, H., García-Pillado, F., Sordo, M., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M., Ostrosky-Wegman, P., *Life sciences*, (**2005**), 77, 2855-2865.
- Parra-Delgado, H., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M., *Bioorg. And Med. Chem. Lett.*, (**2005**), 15, 1005-1008.
- Patocka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*. **2003**;1:7-12.
- Phuwapraisirisan, P., Surapinit S., Sombund S., Pongpun S. and Santi T., *Tetrahedron Letters*, (**2006**), 47, 3685–3688.
- Pouget C, Fagnere C, Basly JP y cols: Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. *Pharm res*, 2002, 19:286-291.
- Ranelletti FO, Ricci R y Larocca LM: Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer*, 1992, 50:486-492.
- Rao, C. V. & Raddy, B. S. NSAIDs and chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*. **2004**;4:29-42.
- R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis. "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: *Buchanan*, Gruissem, Jones (editores). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. **2000**.
- R.P. Singh, P. Agrawal, D. Yim, C. Agarwal and R. Agarwal, Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure–activity relationship with linarin and linarin acetate, *Carcinogenesis* 26 (**2005**)., 845–854.

- Ren W, Qiao Z, Wang H y cols.: tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **2001**, 23:427-432.
- Robert Bye, Edelmira Linares, T. P Ramamoorthy, Federico García, Ofelia Collera, Guadalupe palomino, and Victor Corona. *Agastache mexicana* subsp *xolocotziana* (mamiaceae). A new taxon from the mexicana medicinal plants. *Phytologia*, No. 3, 156-163, **1987**.
- Ross JA y Kasum CM: Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, **2002**, 22:19-34.
- Rzedowki J. Calderon G. *Flora Farnerógamica del Valle de México*. CONABIO. Instituto de Ecología y Centro Regional del Bajío, México. **2001**, pp 1405.
- Sander, R.W., **1987**. Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae-Nepeteae). *Syst. Bot Monogr*. 15,1-92.
- Sartor L, Pezzato E, Dell Aica I, Caniato R, Biggin S Garbisa S: Inhibition of matrix-proteases by polyphenoles: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol*, **2002**, 64: 229-237.
- Schloman, W., Jr., *Ind. Eng. Chem. Res.*, (**1988**), 27, 712-716.
- Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M y Roy S: Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing: A Emerging Paradigm. *Ann N Y Acad Sci*, **2002**, 957:239-249.
- Shanley, T. P.; Warner, R. L.; Ward. P. A. the role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Molecular today*. **1995**;1:40-45.
- Shishodia. S.; Majumdar. S.; Banerjee. S.; Aggarwal. B. B. ursolic acid inhibits nuclear factor-kB activation induced by carcinogenic agents through suppression of I $\kappa$ B  $\alpha$  kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Research* **2003**;63:4375-4383.

- Singleton VL: Flavonoids. En: Childester CO, Mrak EM, Ste-wart Gf (eds.): *Advances in Food Research*. New York: Aca-demic Press, **1981**, 149-242
- Skehan, P.; R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd. M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer institute*. **1990**;82:1107-1112.
- SMEO. Sociedad Mexicana de Oncología.  
<http://www.smeo.org.mx/entcancerquees.htm>
- SSA. Secretaria de Salud.  
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm#situacion>
- Stacvric B: Quercetin in our diet: From potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clinical Biochemistry*, **1994**, 27: 245-248.
- Stahl W, Ale-Agha N y Polidori MC: Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem*, **2002**, 383:553-558.
- Teofili L, pierlli y lovino MS.: the combination of quercetin and cytosine arabinoside synergistically inhibits leukemic cell growth. *Leukemia Res* **1992**,16:497-503.
- Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of Physiology lung Cellular and Molecular Physiology*. **2000**;279:L1005-L1028.
- Titos-Rodríguez, E. **2004**. Biosíntesis de mediadores lipidicos derivados de la 5-lipooxigenasa en el sinusoide hepático. Implicaciones en la fibrogénesis hepática. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona, Barcelona, España, 1-3.
- Wang J y Mazza G: Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, **2002**, 50:4183-4189.
- Wendt, K. U.; Schulz, G. E.; Corey, E. J.; liu, D. R. enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angewandte Chemie-International Edition*. **2000**;39:2812-2833.

- Werz, O.; Klemm, J.; Samuelsson, B.; Radmark, O. *Blood*. **2001**;97:2467-2495.
- WHO. World Health Organization <http://www.who.int/cancer/en/>
- Willoughby, D. A. In vivo models of inflammation. En: inflammation protocols. *Methods in Molecular Biology*. Editado por Willoughby, D. A. & Winyard, P. G. Humana Press. Totowa, EUA. **2003**;109-138.
- Wink, D. A. & Mitchell J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical Biology and medicine*. **1998**;25:434-456.
- Winkel-Shirley, B. **2001**. "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology". *Plant Physiology* 126: 485-493.
- Winkel-Shirley, B. **2001b**. "It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism". *Plant Physiology* 127: 1399-1404.
- Wu, C. C. nitric oxide and inflammation. *Current Medicinal Chemistry- Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents*, **2004**; 3 : 217-222.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of Clinical investigation*. **2001**;107:135-142.
- Yang K, Lamprecht SA, Liu Y y cols.: Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*, **2000**, 21:1655-1660.
- Y.H. Liao, P.J. Houghton and J.R. Houtt, Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.* 62 (**1999**), 1241–1245.
- Y.L. Hsu, P.L. Kuo and C.C. Lin, Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis, *Biochem Pharmacol* 67 (**2004**),. 823–829.
- Y.L. Hsu, P.L. Kuo, C.F. Liu and C.C. Lin, Acacetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells, *Cancer Lett* 212 (**2004**),53–60.

- Yoshida M, Sakai T y Hosokawa N: The effects of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett*, **1990**, 260: 10-13
- Yoshida M. Yamamoto M y Nikaido T: Quercetin arrests human leukemic T-cell in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* **1992**, 52:6676-6681.
- Youdim KA, McDonald J, Kalt W y Joseph JA: Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (smallstar, filled). *J Nutr Biochem*, **2002**, 13:282-288.
- Zhang, S., Li, X., Zhang, F., Yang, P., Gao, X., Song, Q., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, (2006), 3888-3895.