



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE DERIVADOS POR TRANSFORMACIONES
QUÍMICAS DE TRITERPENOS CITOTÓXICOS Y
ANTIINFLAMATORIOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

AUREA CAROLINA PRADO RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Guillermina Salazar Vela

VOCAL: Profesor: Rogelio Gregorio Pereda Miranda

SECRETARIO: Profesor: Mariano Martínez Vázquez

1er. SUPLENTE: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

2° SUPLENTE: Profesor: Claudia Ivonne Araiza Saldaña

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 1-4,

DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ.

SUSTENTANTE (S): AUREA CAROLINA PRADO RAMÍREZ.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química.

Al Doctor Mariano Martínez Vázquez y al Instituto de Química.

A mi papá el mejor ejemplo de fortaleza y lucha por la vida.

A mi mamá por todo su amor, fortaleza y dedicación mostrados.

A mi hermana y a mi primo Eduardo, quienes junto con mis padres me han apoyado siempre. Los amo. Gracias.

A mi abuela y a todos y cada uno de mis tías, tíos y primos quienes fueron nuestro apoyo moral, económico y sentimental cuando mi familia y yo más lo necesitamos. Gracias.

A mis amigas Adriana, Dení, Lila y Gabriela; a mis amigos David, Miguel y Mario gracias por escucharme, por apoyarme, por tantas alegrías y tristezas compartidas. Gracias.

Finalmente todo tiene su momento y todo tiene su lugar, puedo decir que durante mi estancia en la universidad además de aprender Química, aprendí aspectos fundamentales de la vida, entonces, es importante darse cuenta que uno aprende y lo puede hacer de tres maneras: con amor, con dolor y con trabajo, curiosamente algunas cosas que se las aprendí haciendo uso de las dos ultimas formas, pero de ahora en adelante seguro que elegiré la primera.

Vendrá un nuevo amanecer

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE CUADROS	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
1. Terpenos	3
1.1. Biogénesis.	3
1.2. Clasificación.	4
1.3. Triterpenos.	4
1.3.1. Biogénesis.	4
1.3.2. Lupeol	6
2. Cáncer	
2.1. Definición.	8
2.2. Cáncer como problema de salud pública.	8
2.3. Tratamientos del cáncer.	9
2.3.1. Quimioterapia.	10
2.3.1.1. Principios antineoplásicos aislados de especies vegetales.	10
3. Inflamación	
3.1. Definición.	11
3.2. Inflamación aguda e inflamación crónica.	11
3.3. Relación cáncer – inflamación.	12
4. Métodos para evaluar las propiedades de inhibición del crecimiento de células de cáncer humano y antiinflamatoria.	
4.1. Método de sulforrodamina B (SRB) <i>in vitro</i> .	13
4.2. Modelo de edema inducido por TPA.	14
III. OBJETIVOS	15
Objetivo principal	
Objetivos Particulares	
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
V. EXPERIMENTAL	16
5.1. Procedimientos generales.	16
5.1.1. Análisis cromatográficos.	16
5.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	16
5.2. Materia prima.	17
5.3. Caracterización del lupeol.	17
5.3.1. Reacción de 1 con ácido m-cloro perbenzoíco.	18
5.3.2.1. Reacción de oxidación de 1 con trióxido de cromo y ácido sulfúrico.	20
5.3.2.2. Reacción de 2 con ácido m-cloro perbenzoíco.	22
5.3.2.3. Obtención de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (7).	24
5.5. Evaluaciones de las propiedades de inhibición del crecimiento de células	

de cáncer humano y antiinflamatoria.	
5.5.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) <i>in vitro</i> .	26
5.5.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.	30
VI. DISCUSIÓN	33
6.1.1. Caracterización del 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).	35
6.1.2. Caracterización de 20,29-epoxi-lupenona (4).	41
6.1.3. Caracterización de 29-norlupan-3,20-diona (6).	42
6.1.4. Caracterización de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (7).	45
6.2. Evaluaciones de las propiedades de inhibición del crecimiento de células de cáncer humano y antiinflamatoria.	
6.2.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) <i>in vitro</i> .	49
6.2.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.	49
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. BIBLIOGRAFÍA	52
IX. APÉNDICE	60
9.1. Espectro HMBC de 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).	60
9.2. Datos cristalográficos de 20,29-epoxi-lupenona (4).	61
9.3. Espectro HMBC de 29-norlupan-3,20-diona (6).	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
FPP	Pirofosfato de farnesilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
NCI	Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América
COX-2	Ciclooxigenasa, isoforma 2
PKC	Proteína cinasa C
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
SRB	Sulforrodamina B
CCF	Cromatografía en capa fina
CCA	Cromatografía de Columna Abierta
mm	milímetros
nm	nanómetros
cm	centímetros
g	gramos
mmol	milimoles
mL	Mililitros
mg	miligramos
°C	Grados Celsius
%	Por ciento
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µmol	Micromoles
µM	Micromolar
IR	Infrarrojo
v	Numero de onda
KBr	Bromuro de Potasio
Sol/CHCl ₃	Solución / cloroformo
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
COSY	Correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
MHz	Megahertz
δ	Desplazamiento químico
ppm	Partes por millón
s	Singulete
dd	Doble de dobles

ddd	Doble de dobles de dobles
CD ₃ COCD ₃	Acetona deuterada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
EM	Espectro de Masas
EM-IE	Espectro de Masas-Impacto Electrónico
eV	Electrón-Volts
M ⁺	Ion molecular
m/z	Masa/Carga
m-CPBA	Ácido m-cloroperbenzoico
CrO ₃	Trióxido de cromo
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
CO ₂	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DMSO	Dimetilsulfóxido
p/v	Peso/Volumen
D/O	Densidad óptica
sa	Sin actividad

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Unidades de los Terpenos.	3
2	Biosíntesis de esteroides.	5
3	Biosíntesis de triterpenos pentacíclicos.	6
4	Lupeol.	6
5	Estructura química de lupeol (1).	18
6	Reacción de lupeol con ácido m-cloro perbenzoico.	18
7	Reacción de Oxidación del lupeol.	20
8	Reacción de la lupenona con ácido m-cloro perbenzoico.	22
9	Obtención de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (7).	24
10	Esquema de Trabajo de Modelo de Citotoxicidad <i>in vitro</i> .	28
11	Derivados del lupeol. Porcentaje de Inhibición del crecimiento por la línea celular.	29
12	Esquema de Trabajo de Modelo edema inducido por TPA.	31
13	Derivados del Lupeol. Porcentaje de inhibición de edema inducido por TPA.	32
14	Estructura química del 20,29-epoxilupan-3- β -ol (3).	35
15	Estructura química del 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).	36
16	Patrón de fragmentación propuesto para el 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).	37
17	Principales interacciones C-H a tres ligaduras para el 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).	37
18	Mecanismo de fragmentación oxidativa del m-CPBA.	40
19	Estructura cristalina de la 20,29-epoxi-lupenona (4).	41
20	Patrón de fragmentación propuesto para la 29-norlupan-3,20-diona (6).	43
21	Principales interacciones C-H a tres ligaduras para la 29-norlupan-3,20-diona (6).	43
22	Estructura química de la 29-norlupan-3,20-diona (6).	44
23	Estructura química de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (7).	46
24	Esquema de semisíntesis para la obtención de derivados del lupeol.	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
1	Principios antineoplásicos derivados de especies vegetales.	10
2	Porcentaje de Inhibición del crecimiento por la línea celular.	29
3	Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.	32
4	Asignaciones en RMN ^{13}C para 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5). (500MHz, CD_3COCD_3)	39

I. INTRODUCCIÓN

Los triterpenos, como el lupeol, son constituyentes de la dieta humana y están presentes en diversas especies vegetales. Estos metabolitos secundarios poseen un amplio espectro de actividades biológicas. Aunque las propiedades antiinflamatorias y de inhibición del crecimiento de líneas de cáncer humano del lupeol han sido probadas, éste triterpeno se ha tomado como punto de origen para la obtención de varios derivados con mejores perfiles de actividad. Así, algunos estudios de relación estructura-actividad de los derivados del lupeol han mostrado que incrementando el grado de oxidación del átomo de carbono C-30 favorece la inhibición del crecimiento en algunas líneas de cáncer humano (JP2009191018). Tomando en cuenta lo anterior, es factible suponer que el 20,29-epoxilupan-3- β -ol (**3**) pudiese incrementar la actividad citotóxica del lupeol. Una búsqueda en la literatura indicó que **3** ha sido aislado como metabolito secundario de especies vegetales, sin embargo no se encontró su obtención a partir del lupeol.

Con el fin de obtener el 20,29-epoxilupan-3- β -ol (**3**) y la 20,29-epoxilupenona (**4**) a partir del lupeol (**1**) y lupenona (**2**), respectivamente, estos triterpenos se trataron con el ácido m-cloro perbenzoíco (m-CPBA). Contrario de lo que se esperaba, el producto de reacción a partir de **1** fue la obtención del 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (**5**) mientras que de **2**, adicionalmente al epóxido **4**, se obtuvo la 29-norlupan-3,20-diona (**6**). La apertura del epóxido **4**, en medio ácido, produjo la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**).

A pesar de que los derivados **5**, **6** y **7** presentaron mayor grado de oxidación en el átomo de C-29, ninguno presentó una mayor actividad de inhibición del crecimiento de células cancerosas que el lupeol. De todos los derivados evaluados, **7** fue el que mostró mayor actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.

I. MARCO TEÓRICO

1. Terpenos.

Los terpenos son productos naturales estructuralmente diversos y ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos de ellos se han asociado con el aroma de las especies vegetales. El nombre proviene de los primeros miembros derivados del aguarrás (“turpentine” en inglés, “terpentin” en alemán). Algunas veces son referidos como “isoprenoides” porque las dos unidades biosintéticas el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y el pirofosfato de isopentenilo (IIP), de los cuales provienen los terpenos son las unidades biogénicas equivalentes al isopreno.

1.1. Biogénesis.

Los terpenos inicialmente derivan de las reacciones entre el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y su isómero el pirofosfato de isopentenilo (IPP) ambos compuestos con cinco átomos de carbono. Estas unidades son biosintetizadas, en las especies vegetales, ya sea por la vía del ácido mevalónico o por la vía del fosfato de la desoxixilulosa (Heinrich et al., 2004).

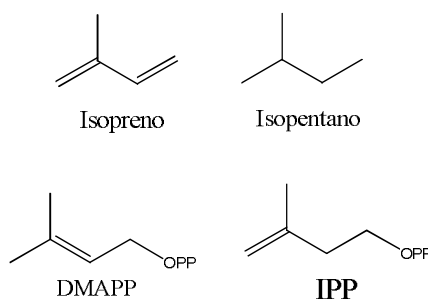


Figura No. 1. Unidades de los terpenos.

1.2. Clasificación.

Los terpenos se clasifican según el número de carbonos presentes en la molécula en hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C) y tetraterpenos (40C).

1.3. Triterpenos

Los triterpenos son compuestos que en su estructura fundamental contiene 30 átomos de carbono, procedentes de la ciclización del escualeno. En la naturaleza existen varios tipos de triterpenos, entre ellos se encuentran los ursanos, los oleananos, los tirucalanos, entre otros. Esta variedad estructural se debe a la configuración y a la conformación adoptada por el escualeno antes de la ciclización (Bruneton, 2001).

1.3.1. Biogénesis.

La biosíntesis comienza con la unión de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo (FPP) para generar escualeno. Cuando el escualeno adquiere la conformación silla-bote-silla-bote se epoxida, para formar el intermediario A, el cual se postula como el precursor de esteroides y esterol como el lanosterol.

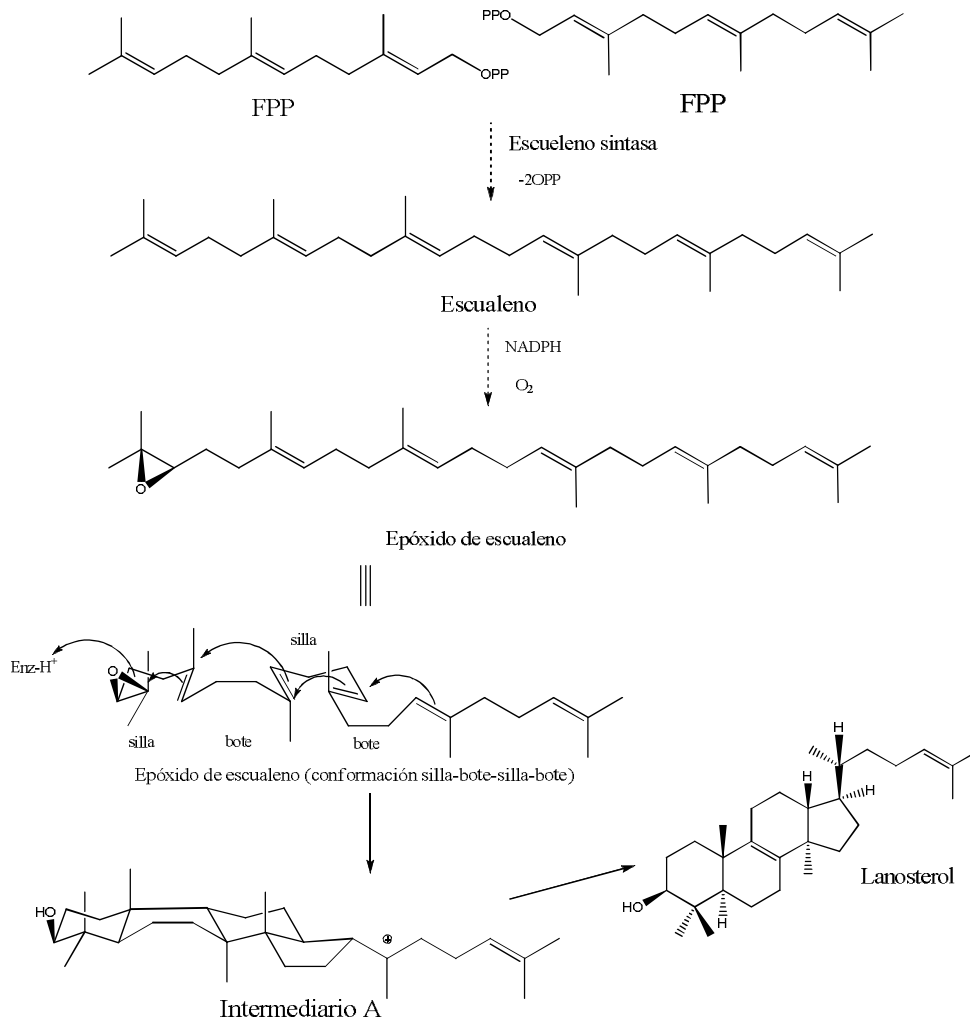


Figura No. 2. Biosíntesis de esteroides.

Si el escualeno adquiere una conformación silla-silla-silla-bote, la ciclización da la formación del intermediario B, que por una serie de arreglos en la molécula, da origen a triterpenos pentacíclicos.

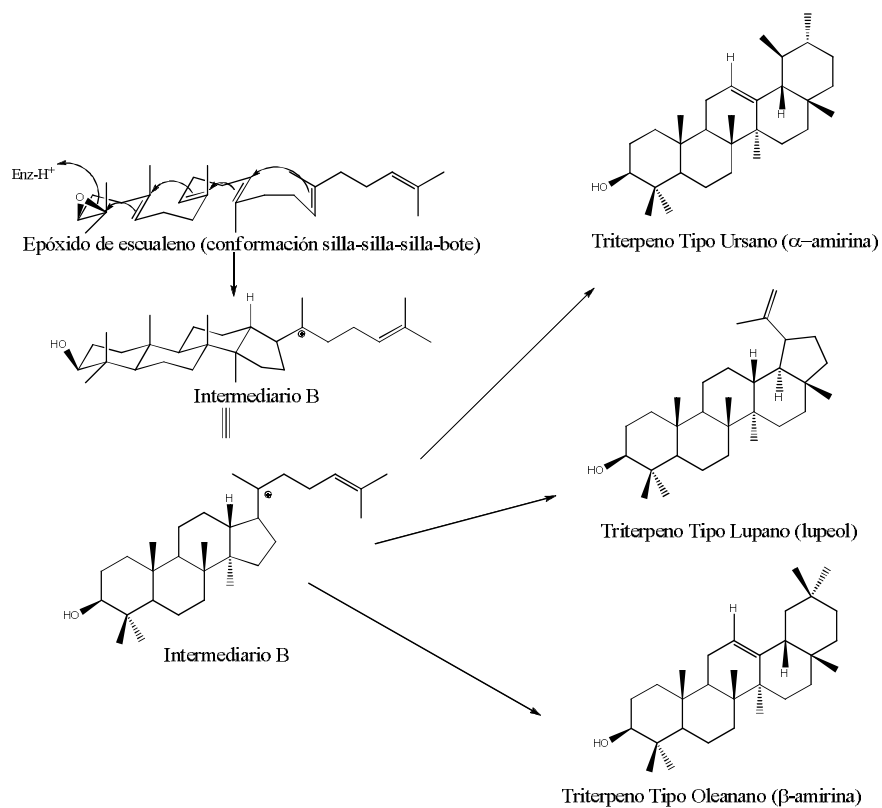


Figura No. 3. Biosíntesis de triterpenos pentacíclicos.

1.3.2. *Lupeol*.

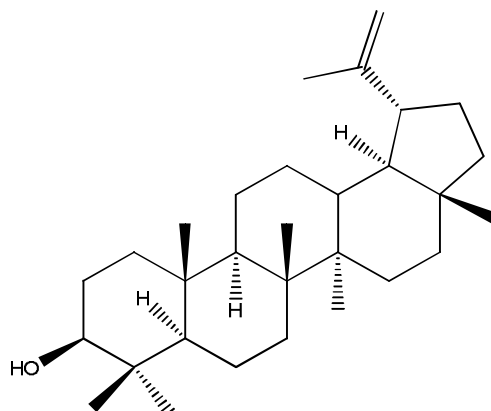


Figura No. 4. Lupeol (1).

El lupeol [lup- 20(29)-en-3 β -ol] (1) es un triterpeno pentacíclico que se encuentra en un gran numero de plantas medicinales y en vegetales como la col,

el pimiento, el pepino, el jitomate y las frutas como el higo, el mango, la fresa y la uva roja. Adicionalmente, se ha aislado de la corteza de *Crataeva nurvala* Buch Ham (Capparidaceae) con buenos rendimientos.

Se ha informado que el lupeol y algunos de sus derivados poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiartríticas que pueden estar vinculadas en la prevención y cura de procesos inflamatorios. Propuesta que puede ser apoyada por el hecho de que **1** ha mostrado una inhibición significativa, dependiente de la dosis, contra el incremento de edema inducido por TPA; así como la expresión de enzimas involucradas en procesos inflamatorios (Fernández et al., 2001, Vasconcelos et al., 2008).

También se ha informado que presentan actividades antimutagénicas, antipalúdicas, antiurolítica, hepatoprotectiva y antilipidémica en animales de laboratorio (Fotie et al., 2006; Srinivasan et al., 2002; Sudhahar et al., 2008). De manera interesante, se ha demostrado, *in vivo*, que la administración oral del lupeol tiene efectos protectores contra la cardiotoxicidad que induce la ciclofosfamida (Sudhahar et al., 2008).

Asimismo, se ha informado que **1** induce el arresto del ciclo celular seguido de apoptosis en líneas celulares de melanoma metastásico (células 451Lu). Además, en un modelo de xenotrasplante en ratón, **1** inhibió la propagación de estas células en los animales de estudio (Saleem et al., 2008). También, inhibió el crecimiento de cáncer de próstata, tanto en aquellos casos de células sensibles a los andrógenos como aquellos que no respondieron a tratamientos hormonales sin afectar las células normales. El arresto del ciclo celular y la modulación del

ensamblaje de los microtúbulos fueron observados durante esta inhibición (Saleem et al., 2009).

También, se han observado que **1**, en modelos *in vitro*, presenta efectos sinérgicos de citotoxicidad al ser administrado en conjunto con el cisplatino. Ha demostrado ser un inhibidor selectivo de la actividad catalítica de la topoisomerasa II (Chaturvedi et al., 2008).

Por otro lado, la administración oral de dosis de 2g/Kg de peso en ratas y ratones no produjo citotoxicidad ni mortalidad después de 96 horas de administración. Resultado que indica la baja toxicidad de este metabolito secundario (Saleem et al., 2008).

2. Cáncer

2.1. Definición

El cáncer es un término que agrupa más de 100 enfermedades crónicas degenerativas que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se caracterizan por un crecimiento anormal de células, transmitido a células hijas y manifestado por un descontrol en el crecimiento y función celulares (OMS, 2010) que surgen como consecuencia de daños irreparables en el ADN.

2.2. Cáncer como problema de salud pública.

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la primera causa de mortalidad a nivel mundial (OMS, 2010). En el 2007 se le atribuyeron 7,9 millones de defunciones debidas a cáncer de pulmón (primer lugar para hombres),

estómago, hígado, colon y mama (primer lugar para mujeres). Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando.

Con la información disponible de 2004 a 2007, en México, existe un incremento en los casos de cáncer (INEGI, 2010). El cáncer de mama fue la principal causa de muerte para mujeres, seguido tumores en cuello del útero, estómago e hígado. Para hombres el cáncer de próstata fue la principal causa, seguido de cánceres de tráquea, bronquios y pulmón.

Las transformaciones de células normales a tumorales son resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y agentes exteriores físicos (luz ultravioleta y radiación ionizante), químicos (asbesto y tabaco) y biológicos (infecciones virales, bacterianas o parasitarias). Aunque el envejecimiento, la alimentación, el exceso de peso y la obesidad son factores importantes para su desarrollo.

2.3. Tratamientos del cáncer

Los tratamientos para el cáncer tienen como objetivos eliminar células cancerosas, prevenir o demorar su reaparición o tratar los síntomas, si este no es curable (OMS, 2010). Los tratamientos dependen del tipo de cáncer y ocasionalmente del estado del paciente, pueden abarcar cirugía, radiación y quimioterapia.

2.3.1. Quimioterapia.

El término se refiere frecuentemente a medicamentos empleados para combatir el cáncer. Los productos naturales han tenido un gran impacto en el descubrimiento de compuestos antineoplásicos, aproximadamente el 60% de los medicamentos usados en clínica provienen de productos naturales. Según su origen los productos naturales pueden agruparse como marinos, microbianos y vegetales (Heinrich et al., 2004).

2.3.1.1. Principios antineoplásicos aislados de especies vegetales.

A pesar de que sólo un pequeño porcentaje de especies vegetales ha sido investigado (Heinrich, M; et al., 2004), los mejores principios antineoplásicos derivados de esta fuente se encuentran en el mercado:

Cuadro No 1. Principios antineoplásicos derivados de especies vegetales.

Especie vegetal	Metabolito aislado	Derivado sintetizado
<i>Camptotheca acuminata</i> (<i>Nyssaceae</i>)	Camptotecina y 10-hidroxicamptotecina	Irinotecan y Topotecan
<i>Taxus brevifolia</i> (<i>Taxaceae</i>)	Taxol (Paclitaxel®)	Docetaxel (Taxotere®)
<i>Podophyllum peltatum</i> (<i>Berberidaceae</i>)	podofilotoxina	Teniposido y Etoposido (Vepesid®)
<i>Catharanthus roseus</i> (<i>Apocynaceae</i>)	Vincristina (Velbe®) y Vinblastina (Oncovin®)	Vindesine (Eldisine®) y Vinorelbina (Navelbine®)

3. Inflamación

3.1. Definición.

La inflamación se presenta como una respuesta del organismo cuando existe daño celular causado por diversos estímulos nocivos (agentes químicos, físicos, infecciosos e inmunes) y tiene como objetivo eliminarlos. Consiste en la acumulación local de líquido acompañado de edema, enrojecimiento y dolor, producidos por cambios inducidos en los capilares sanguíneos locales que conducen a un aumento de su diámetro, una reducción de la velocidad del flujo sanguíneo y un incremento de la permeabilidad de la pared vascular (Roitt et al., 1994).

El aumento del aporte de sangre a la región causa el enrojecimiento local y el calor asociados con la inflamación. El aumento de la permeabilidad vascular permite el desplazamiento del líquido, proteínas plasmáticas y leucocitos, lo que causa edema y dolor (Roitt et al., 1994).

3.2. Inflamación aguda e inflamación crónica.

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica (Smith y Reynard, 1993). La inflamación aguda es de duración corta, (minutos, horas o algunos días) y se inicia rápidamente; es caracterizada por aumento de la irrigación sanguínea en el área afectada, exudado de fluidos plasmáticos y migración de neutrófilos al sitio de la lesión.

La inflamación crónica es de carácter sistémico (dura semanas, meses o incluso años), se caracteriza por dolor persistente, tumefacción y proliferación

celular, sin rubor ni calor, con una pérdida crónica e importante de la función. El infiltrado celular está compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, principalmente, además de que se promueve la formación de tejido fibroso sobre el exudado de líquidos.

Los orígenes de la inflamación crónica son diversos: progresión de una inflamación aguda, episodios recurrentes de inflamación aguda e inflamación crónica inicialmente, asociada a infecciones intracelulares (tuberculosis, lepra, etc.).

3.3. Relación cáncer – inflamación.

En 1863 Virchow propuso que el origen del cáncer se encontraba en los sitios de inflamación crónica ya que algunas clases de irritantes junto con una lesión de tejido y el proceso inflamatorio, generaban proliferación celular.

Se considera que durante la inflamación crónica o el daño a un tejido se puede promover el microambiente necesario para transformar la célula a través de daño al ADN o de factores proinflamatorios que producen células tumorales (Lawrence, 2007). En el proceso inflamatorio se sintetizan productos potencialmente genotóxicos o mutagénicos que pueden causar daño al ADN induciendo la transformación de células normales a cancerosas, afectando su crecimiento, induciendo la no diferenciación, la proliferación y la resistencia a la apoptosis. Por otro lado, se ha establecido que el cáncer puede promover y exacerbar las infecciones y la inflamación (Chaturvedi et al., 2008).

En algunos cánceres existe la sobreexpresión de las isoformas de la ciclooxigenasa, implicando una producción anómala de prostaglandinas que acentúa el ambiente inflamatorio, se favorece la síntesis de compuestos que inhiben la apoptosis o favorecen los procesos de angiogénesis. Además el factor nuclear NF- κ B se activa en respuesta a la inflamación y su activación se asocia a procesos cancerosos (Chaturvedi et al., 2008).

La sobreexpresión de COX-2 ha sido implicada en varios tumores y se ha demostrado que la administración de inhibidores de COX-2 como el Celecoxib, previenen la angiogénesis, el crecimiento tumoral y metástasis en tumores de mama (Folkman, 2007). La aspirina al ser inhibidor de ambas ciclooxigenasas, ha sido utilizada como coadyudante en el tratamiento del cáncer de colon (Larsson et al., 2006).

4. Métodos para evaluar las propiedades de inhibición del crecimiento de células de cáncer humano y antiinflamatoria.

4.1. Método de sulforrodamina B (SRB) in vitro.

El método fue establecido en 1990 y posteriormente fue adoptado como método rutinario en el Instituto Nacional del Cáncer (Papazisis et al., 1997). Consiste en la incubación de cultivos celulares de líneas tumorales en presencia o ausencia de sustancias de prueba, el efecto de viabilidad se determina mediante un ensayo colorimétrico con sulforrodamina B (SRB). El fundamento de este método se encuentra en la tinción de proteínas celulares totales con el colorante SRB, el cual es un aminoxanteno que contiene dos sustituyentes sulfónicos y en

condiciones ligeramente ácidas, el carácter aniónico de la SRB forma enlaces electrostáticos exclusivamente con aminoácidos básicos (arginina, histidina y lisina) de células vivas. La intensidad del color es directamente proporcional a la viabilidad celular (Vichai y Kirtikara, 2006). Este método es sencillo, seguro y proporciona resultados reproducibles.

4.2. Modelo de edema inducido por TPA.

Comprende la aplicación del 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en el pabellón auditivo del animal. Se propicia una respuesta inflamatoria local aguda (Masao et al., 2006). El mecanismo por el cual el TPA induce al incremento de los eicosanoides no es conocido completamente, pero se piensa que debido a que es un análogo conformacional del diacilglicerol, desencadena una cascada de eventos bioquímicos vinculados con la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio (Robles, 2010); la inducción de la ciclooxigenasa y la traslocación/activación de la lipooxigenasa.

Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como la indometacina. La ventaja del método es la rapidez y poca muestra necesaria para desarrollar el estudio (Masao et al., 2006).

I. OBJETIVOS

Objetivo Principal

Evaluar las propiedades de inhibición del crecimiento de células de cáncer humano y antiinflamatoria del 20,29-epoxi-lupeol y la 20,29-epoxilupenona, obtenidos mediante transformaciones químicas, a partir de lupeol y la lupenona, respectivamente.

Objetivos Particulares

- Obtener el 20,29-epoxi-lupeol y la 20,29-epoxilupenona mediante una reacción de epoxidación con ácido meta-cloroperbenzoico a partir del lupeol y lupenona respectivamente.
- Evaluar la inhibición del crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer humano de los derivados obtenidos.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se ha informado que a mayor grado de oxidación en el C-30 del lupeol mayor su actividad como agente citotóxico a líneas de cáncer humano. Por lo tanto, es factible suponer que el 20,29-epoxi-lupeol podría ser más activo en contra de células cancerosas que el lupeol.

III. EXPERIMENTAL

5.1. Procedimientos generales.

5.1.1. Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) de tipo analítica se realizaron sobre placas de aluminio de 2.5 x 5 cm recubiertas con gel de sílice ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄, con un espesor de película de 0.25mm, empleando diversos sistemas de elución. Las placas se visualizaron con lámpara de luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm) y, posteriormente, fueron reveladas con una solución de sulfato cérico seguido de calentamiento.

La cromatografía de columna abierta (CCA) se realizó usando gel de sílice MN-Kieselgel G empacado en columnas de vidrio de 1.5 x 30 cm, 3 x 30 cm y 2.5 x 15 cm y empleando diversos sistemas de elución.

El equipo de Cristalografía de Rayos X empleado fue Bruker Smart Apex CCD diffractometer.

5.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono se adquirieron en espectrómetros VarianUnity-300 MHz y VarianInova-500 MHz, los valores de los desplazamientos químicos se reportan en ppm utilizando tetrametilsilano como referencia interna.

Los espectros de masas fueron realizados en un espectrofotómetro de masas JEOL GCmate utilizando impacto electrónico a 70 eV.

Los puntos de fusión fueron determinados en el equipo Fisher-Johns y se reportan sin corrección.

5.2. Materia prima.

El lupeol (2.0696 g), utilizado en esta tesis como materia prima, fue previamente aislado de *Mortonia hidalgensis* (Rodríguez-Hahn et al., 1986).

5.3. Caracterización del lupeol.

Lupeol (lup- 20(29)-en-3b-ol) (**1**), sólido blanco, con fórmula mínima $C_{30}H_{50}O$, peso molecular 426g/mol y punto de fusión 197-200°C. IR (KBr/pastilla), ν_{\max} cm^{-1} : 3310.96 (O-H), 2943.71, 2863.00 (C-H), 1641.62 (>C=CH₂). RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.770 (s, 3H, CH₃), 0.841 (s, 3H, CH₃), 0.948 (s, 3H, CH₃), 0.977 (s, 3H, CH₃), 1.041 (s, 3H, CH₃), 3.200 (dd, 1H, H-3), 4.572 (1H, H-29b), 4.686 (1H, H29a). RMN ¹³C (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 38.74 (C-1), 27,46 (C-2), 79.02 (C-3), 38.87 (C-4), 55.33 (C-5), 18.33 (C-6), 34.32 (C-7), 50.48 (C-9), 37.18 (C-10), 20.96 (C-11), 25.19 (C-12), 38.10 (C-13), 42.85 (C-14), 27.46 (C-15), 35.62 (C-16), 43.01 (C-17), 48.34 (C-18), 47.99 (C-19), 150.96 (C-20), 29.89 (C-21), 40.02 (C-22), 27,94 (C-23), 15.36 (C-24), 16.10 (C-26), 14.56 (C-27), 18.01 (C-28), 109.31 (C-29), 19.31 (C-30). EM-IE (70eV) m/z: 426 [M⁺], 409, 218, 207, 189.

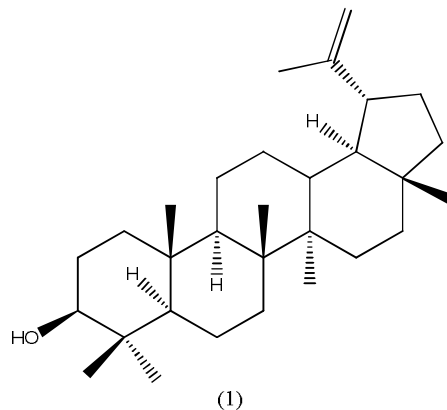


Figura No. 5. Estructura química de lupeol (1).

La identificación de **1** como lupeol se logró mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los datos en literatura (Burns et al., 2000, Fotie et al., 2006).

5.3.1. *Reacción de 1 con ácido m-cloroperbenzoico.*

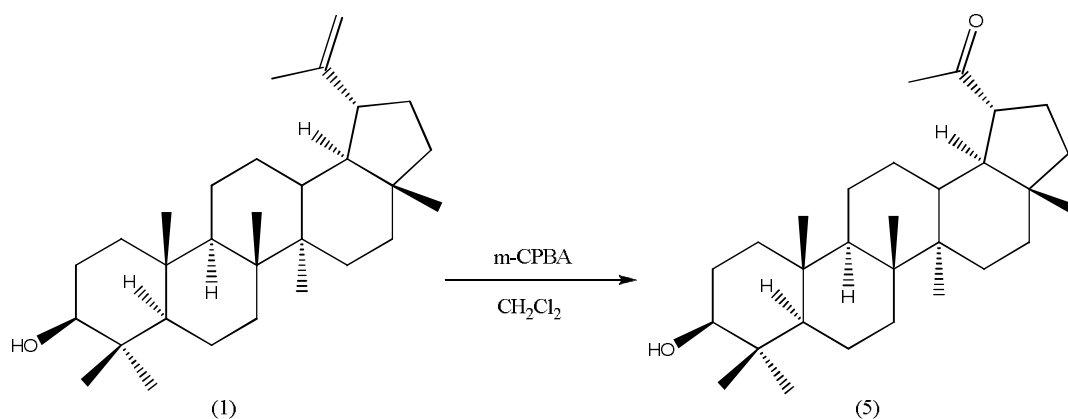


Figura No. 6. Reacción de lupeol con ácido m-cloroperbenzoico.

A una solución de lupeol (1.17mmol lupeol) en diclorometano (50 mL) se le agregó ácido m-cloroperbenzoico (m-CPBA, 2.23 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación constante durante 3 horas.

Posteriormente, la fase orgánica fue lavada sucesivamente con una solución de sulfito de sodio al 10% (3 x 30 mL) y con agua destilada (3 x 20 mL). Finalmente, la fase orgánica fue tratada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida. Se obtuvieron 533.3 mg de producto de reacción el cual fue separado por CCA (4266.4g de gel de sílice se utilizaron para empacar la columna). La elución de la columna se realizó con diferentes mezclas de disolventes de polaridad ascendente, iniciando con hexano 100%, seguido de mezclas de hexano-acetato de etilo, continuando con acetato de etilo 100%, mezclas de acetato de etilo-metanol y metanol 100%. Se obtuvieron 66 fracciones.

De las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo (9: 1), se obtuvieron 5.6 mg (rendimiento 1.1 %) de un sólido blanco cristalino **5** con punto de fusión de 221-224 °C. IR (Sol/CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 3469.17 (O-H), 2945.50, 2867.35 (C-H), 1702.54 (C=O). RMN ¹H (500MHz, CD₃COCD₃) δ ppm: 0.748 (s, 3H, CH₃), 0.798 (s, 3H, CH₃), 0.851 (s, 3H, CH₃), 0.954 (s, 3H, CH₃), 0.970 (s, 3H, CH₃), 1.055(s, 3H, CH₃), 1.843 (t, 1H, H-18), 2.102 (s, 3H, CH₃), 2.627(ddd, 1H, H-19), 3.114(dd, 1H, H-3). RMN ¹³C (500MHz, CD₃COCD₃) δ ppm: 39.57 (C-1), 28.19 (C-2), 78.43 (C-3), 39.60 (C-4), 56.30 (C-5), 19.10 (C-6), 35.10 (C-7), 41.61 (C-8), 51.27 (C-9), 37.99 (C-10), 21.69 (C-11), 27.92 (C-12), 37.96 (C-13), 43.40 (C-14), 28.16 (C-15), 35.78 (C-16), 43.70 (C-17), 49.95 (C-18), 52.87 (C-19), 211.39 (C-20), 28.25 (C-21), 40.58 (C-22), 28.57 (C-23), 16.08 (C-24), 16.58 (C-25), 16.40 (C-26), 14.85 (C-27), 18.52 (C-28), 29.19 (C-29). COSY: ¹H/¹H: 3.1/1.58, 2.62/1.82, 2.62/1.41, 1.06/2.83, 1.62/1.84, 0.75/0.95, 0.8/1.29, 0.8/1.42, 0.85/0.96, 0.97/1.32, 1.60/1.26,

1.60/1.32, 2.102/1.42, 2.102/1.30. HSQC: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$: 3.11/78.43, 0.74/56.30, 2.62/52.87, 1.35/51.27, 1.38/51.27, 1.84/49.95, 1.31/40.58, 1.44/40.58, 1.650/39.57, 0.94/39.57, 1.61/37.96, 1.41/35.78, 1.493/35.78, 1.407/35.102, 2.102/29.199, 0.954/28.577, 1.519/28.255, 1.065/28.196, 1.041/28.167, 1.106/27.925, 1.449/21.693, 1.537/19.100, 0.798/18.258, 0.851/16.588, 1.055/16.405, 0.748/16.083, 0.969/14.859. En el espectro de masas (EM) se observó el ion molecular a 428 m/z que corresponde a una fórmula mínima de $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$. EM-IE (70 eV) m/z: 428 [M^+], 410, 395, 367, 248, 207, 189, 163, 135, 121, 95, 81 43.

La identificación de **5** como 3β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano se logró mediante la interpretación de los datos espectroscópicos y espectrométricos y el análisis de los experimentos HSQC y HMBC.

5.3.2.1. Reacción de oxidación de **1** con trióxido de cromo y ácido sulfúrico.

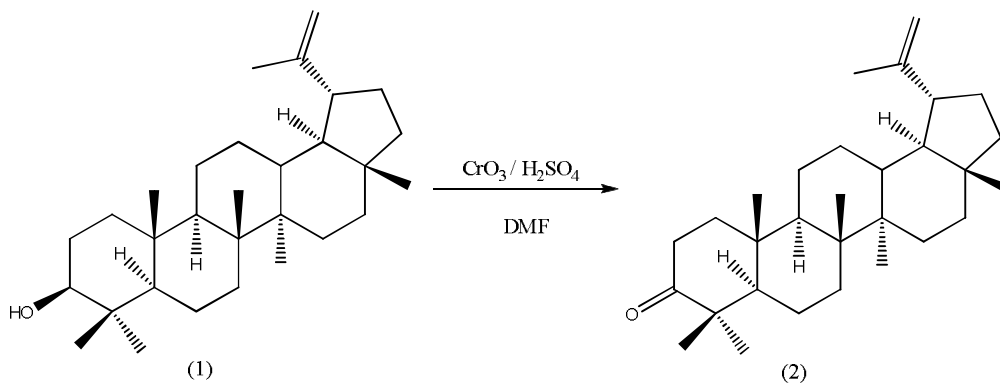


Figura No. 7. Reacción de Oxidación del lupeol.

A una solución de lupeol (200 mg) en dimetilformamida (10mL) se adicionaron 200mg trióxido de cromo (CrO_3) y una gota de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

La mezcla se colocó en agitación contante a temperatura ambiente por 16 horas. Posteriormente, el producto de reacción fue vertido sobre agua destilada en agitación constante y se mantuvo por 30 minutos, transcurrido el tiempo la mezcla fue filtrada obteniendo un sólido (**3**) como producto de oxidación (Urban et al., 2004).

Por otro lado, el filtrado fue extraído con porciones de acetato de etilo (3 x 50 mL), y la fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida, obteniéndose un residuo el cual por comparación en CCF resultó ser el mismo que el producto de oxidación previamente obtenido.

Se obtuvieron 185.6 mg (rendimiento 94.7 %) de un sólido blanco **2**. IR (Sol/CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 2946.43, 2865.20 (C-H), 1698.14 (C=O). RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.799 (s, 3H, CH₃), 0.934 (s, 3H, CH₃), 0.958 (s, 3H, CH₃), 1.026 (s, 3H, CH₃), 1.072 (s, 6H, 2 CH₃), 1.685 (s, 3H, CH₃), 4.696 (1H, H-29a), 4.574 (1H, H-29b).

La identificación de **2** como lupenona se logró por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los datos en la literatura (Puapairoj et al., 2005).

5.3.2.2. Reacción de 2 con ácido *m*-cloroperbenzoíco.

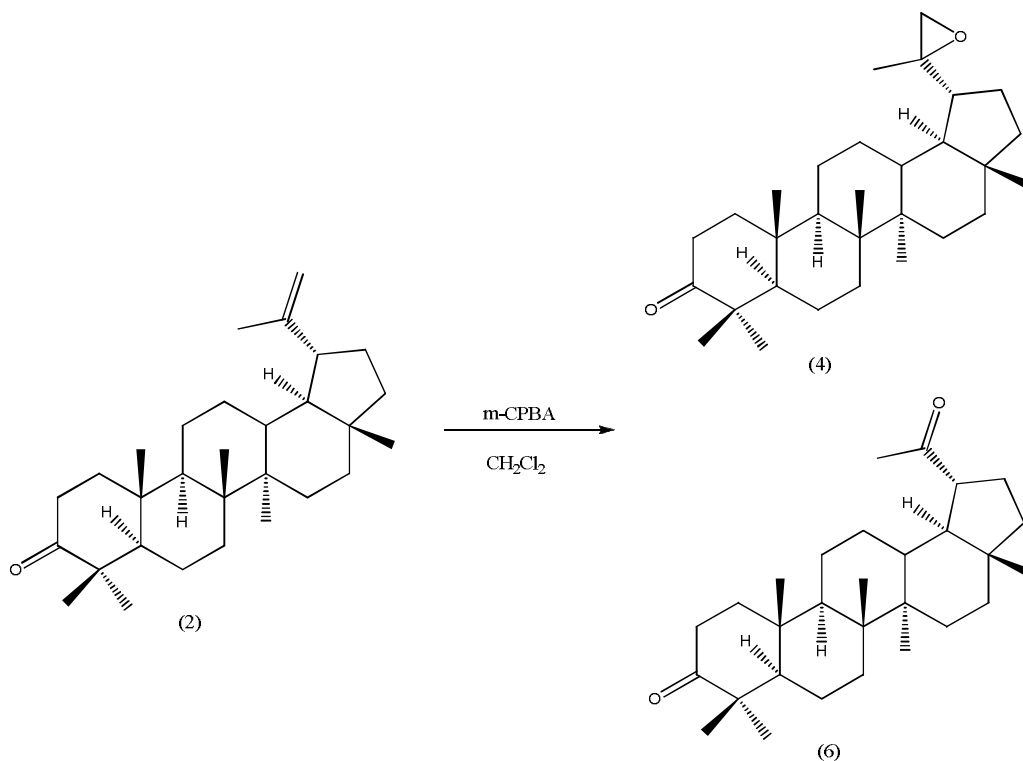


Figura No. 8. Reacción de la lupenona con ácido *m*-cloroperbenzoíco.

A una solución de lupenona (200 mg, 0.47 mmol) en diclorometano (10 mL) se le adicionó una solución de *m*-CPBA (211.4 mg, 0.94 mmol) en diclorometano (10 mL). La mezcla fue colocada en agitación constante a temperatura ambiente por 4 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción fue lavada sucesivamente con una solución de sulfito de sodio al 10% (3 x 30 mL) y agua destilada (3 x 20 mL). Finalmente la fase orgánica fue tratada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida. Se obtuvieron 199 mg de producto de la reacción, los cuales fueron separados por CCA (1.592 g de gel de sílice para empacar la columna). La elución de la columna se realizó con diferentes mezclas de disolventes de polaridad ascendente, iniciando con hexano 100%, seguido de mezclas de

hexano-acetato de etilo, continuando con acetato de etilo 100%, mezclas de acetato de etilo-metanol y metanol 100%. Se obtuvieron 56 fracciones.

De las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo (9.5: 0.5), se obtuvieron 65.5 mg (rendimiento 34.0%), de un sólido incoloro cristalino **4**, con un punto de fusión 184-186 °C, el cual mediante difracción de rayos X se identificó como 20,29-epoxi-lupenona. En el espectro de masas (EM) se observó el ion molecular a 440 m/z que corresponde a una fórmula mínima de $C_{30}H_{48}O_2$. EM-IE (70 eV) m/z: 440 [M^+], 425, 422, 382.

De las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo (9.5: 0.5), se obtuvieron 5.1 mg (rendimiento 2.7%) de un sólido blanco cristalino **6** con un punto de fusión de 207-209°C. IR (Sol/ $CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 2942.95, 2866.90 (C-H), 1699.54 (C=O). RMN 1H (500MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.785 (s, 3H, CH_3), 0.921 (s, 3H, CH_3), 0.979 (s, 3H, CH_3), 1.024 (s, 3H, CH_3), 1.055 (s, 3H, CH_3), 1.073(s, 3H, CH_3), 1.843 (t, 1H, H-18), 2.153 (s, 3H, CH_3), 2.580 (ddd, 1H, H-19). RMN ^{13}C (500MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 39.53 (C-1), 27.32 (C-2), 218.05 (C-3), 36.88 (C-4), 54.82 (C-5), 19.68 (C-6), 33.47 (C-7), 40.69 (C-8), 49.62 (C-9), 47.28 (C-10), 21.46 (C-11), 27.20 (C-12), 37.15 (C-13), 42.75 (C-14), 34.09 (C-15), 34.92 (C-16), 43.03 (C-17), 49.51 (C-18), 52.56 (C-19), 212.70 (C-20), 27.64 (C-21), 39.83 (C-22), 21.02 (C-23), 26.74 (C-24), 15.96 (C-25), 15.70 (C-26), 14.41 (C-27), 18.00 (C-28), 29.19 (C-29). COSY: $^1H/^1H$: 2.58/1.84, 2.85/1.480, 2.44/1.88, 2.44/1.38, 2.05/1.48, 1.85/1.60, 1.88/1.38, 1.67/1.50, 1.67/1.43, 1.68/0.97, 1.46/1.05, 1.46/1.13,

1.28/1.05, 1.38/0.92, 1.46/0.78, 1.34/0.78. HSQC: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$: 1.34/54.82, 2.58/52.56, 1.38/49.62, 1.40/49.62, 1.82/49.51, 1.84/49.51, 1.86/49.51, 1.36/39.83, 1.48/39.83, 1.40/39.53, 1.88/39.53, 1.59/37.15, 1.44/34.92, 1.51/34.92, 2.44/34.09, 1.43/33.47, 0.87/33.47, 2.15/29.19, 1.48/27.64, 2.05/27.64, 1.06/27.32, 1.67/27.32, 1.11/27.20, 1.12/27.20, 1.07/26.74, 1.45/21.46, 1.44/21.46, 1.47/19.68, 1.02/21.02, 0.78/18.00, 0.92/15.96, 1.05/15.70, 0.97/14.41. En el espectro de masas (EM) se observó el ion molecular a 426 m/z que corresponde a una fórmula mínima de $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2$ EM-IE (70 eV) m/z: 426 [M^+], 408, 383, 340, 231, 205, 177, 163, 149, 135, 121, 107, 95, 81, 55, 43.

La identificación de **6**, como 29-norlupan-3,20-diona, se logró mediante la interpretación de los datos espectroscópicos y espectrométricos y el análisis de los experimentos HSQC y HMBC.

5.3.2.3. Obtención de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**).

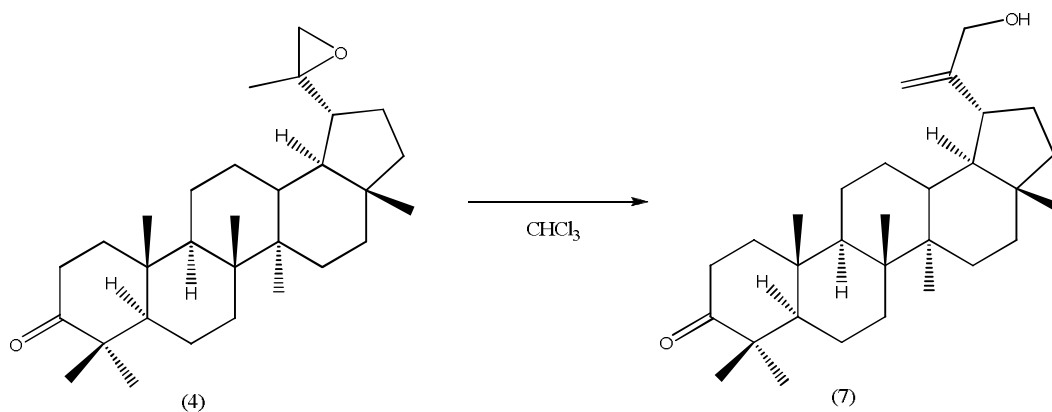


Figura No. 9. Obtención de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**).

La obtención de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**) se logró al disolver **4** en cloroformo. Se obtuvo un sólido blanco **7**, con punto de fusión de 163-166 °C. IR

(Sol/CHCl₃), ν_{\max} cm⁻¹: 3627.45 (O-H), 2952.94, 2868.91 (C-H), 1698.31 (C=O), 1604.58 (>C=CH₂). RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.793 (s, 3H, CH₃), 0.930 (s, 3H, CH₃), 0.958 (s, 3H, CH₃), 1.026 (s, 3H, CH₃), 1.073 (s, 3H, CH₃), 1.081 (s, 3H, CH₃), 4.122 (s, H-30), 4.911 (1H, H-29b), 4.945 (1H, H29a). RMN ¹³C (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 39.59 (C-1), 34.13 (C-2), 47.31 (C-4), 54.93 (C-5), 19.69 (C-6), 33.62 (C-7), 40.83 (C-8), 49.76 (C-9), 36.89 (C-10), 21.58 (C-11), 27.25 (C-12), 38.16(C-13), 42.87 (C-14), 27.41 (C-15), 35.42 (C-16), 43.03 (C-17), 48.88 (C-18), 43.80 (C-19), 154.73 (C-20), 31.78(C-21), 39.84 (C-22), 26.70 (C-23), 21.04 (C-24), 15.96 (C-25), 15.81 (C-26), 14.47 (C-27), 17.74 (C-28), 106.96 (C-29), 65.07 (C-30). En el espectro de masas (EM) se observó el ion molecular a 440 m/z que corresponde a una fórmula mínima de C₃₀H₄₈O₂ EM-IE (70 eV) m/z: 440 [M⁺], 422, 234, 221, 205, 55.

La identificación de **7** como 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona se logró por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los datos en la literatura (Bohlmann y Jakupovic, 1979; Tinto et al., 1992; Ribeiro et al., 2005).

5.5. Evaluaciones de las propiedades de inhibición del crecimiento de células de cáncer humano y antiinflamatoria.

5.5.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) in vitro.

La evaluación de los compuestos se llevó a cabo en las líneas celulares de cáncer humano: colon (HCT-15), mama (MCF-7), sistema nervioso central (U251), leucemia mieloblástica crónica (K-562), pulmón (SKUL-1) y próstata (PC-3), provenientes del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos de América. El método de sulforrodamina B empleado se siguió de acuerdo a los procedimientos validados por el NCI.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y glutamina 2.0 μ M. Los cultivos celulares se incubaron en un ambiente saturado de humedad y una atmósfera de 5% CO₂ a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, las células que se adhirieron a las paredes del frasco fueron removidas haciendo uso de una solución de tripsina-EDTA al 0.05%. La determinación de la densidad y viabilidad de las líneas celulares se llevó a cabo en un hematocitómetro, utilizando la técnica de exclusión con azul de tripano.

Contadas las células, se hizo una dilución para obtener la densidad adecuada. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos y se sometieron a un período de incubación de 24 h a 37°C.

Los compuestos fueron solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO) para ser evaluados en una concentración de 50 $\mu\text{mol/mL}$. Se agregó 100 μL de la solución a cada uno de los pozos de las líneas celulares, para obtener un volumen total de 200 μL por pozo. Se empleó como control negativo DMSO. Los cultivos se incubaron durante 48 horas a 37°C en una atmosfera al 5% de CO_2 y una atmósfera saturada de humedad. El crecimiento de los cultivos celulares se evaluó mediante el ensayo de sulforrodamina B (SRB), usando como control positivo 5-fluoracilo.

Transcurridas 48 horas de incubación, los cultivos celulares se fijaron *in situ* con 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) frio (50% p/v), posteriormente se incubaron durante 60 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y los cultivos celulares se lavaron cinco veces con agua desionizada, dejándolos secar por 24 horas. Una vez secos, se adicionó 100 μL de SRB (0,4% p/v en ácido acético al 1%), se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente el exceso de SRB se removió lavando cinco veces con ácido acético al 1% y dejando secar por 24 horas. Finalmente, la densidad óptica (DO) fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. Considerando que la densidad óptica es proporcional a la cantidad proteica celular total e inversamente proporcional a la capacidad del compuesto o extracto a prueba de inhibir el crecimiento celular. La citotoxicidad fue reportada como porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = 100 - \left[\left(\frac{DO_r (\text{muestra})}{DO_r (\text{vehículo})} \right) * 100 \right]$$

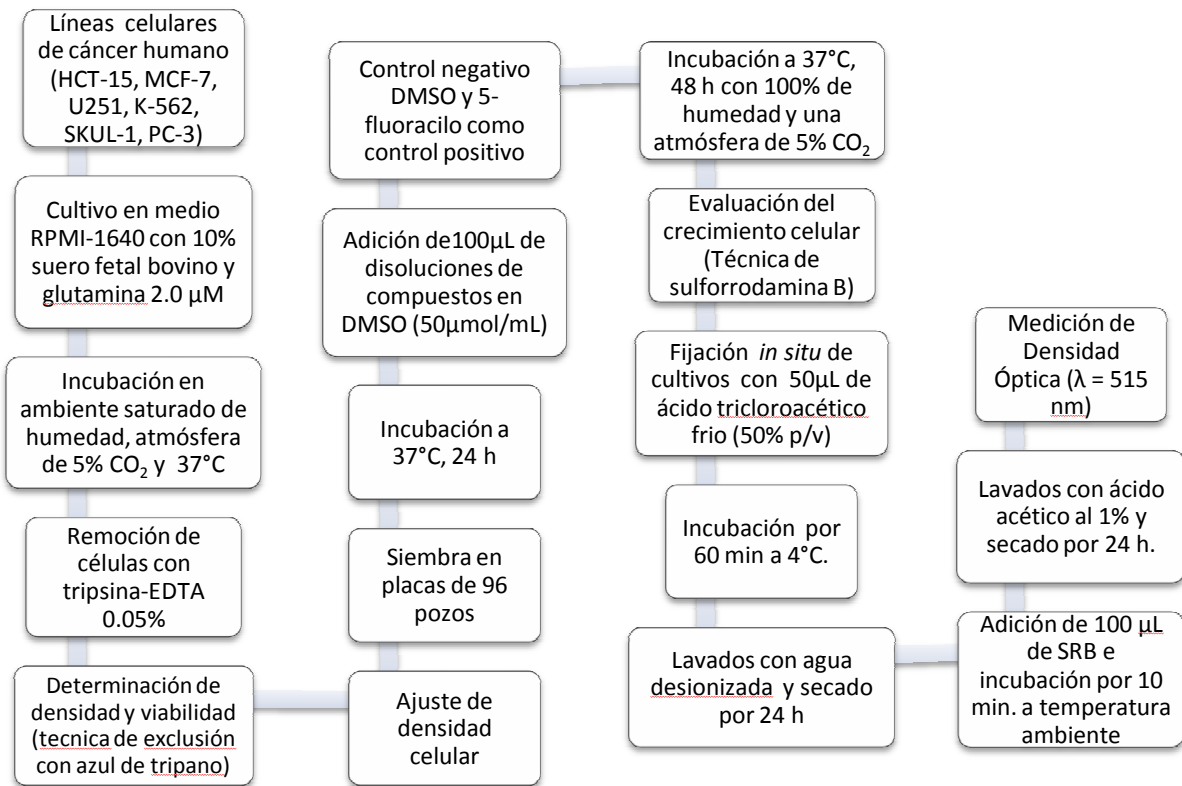


Figura No. 10. Esquema de Trabajo de Modelo de Citotoxicidad.

Cuadro No. 2. Porcentaje de Inhibición del crecimiento por la línea celular.

Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKUL-1
1	sa	23.5	0.39	19.5	46.3	16.1
4	49.39	sa	26.5	sa	26.18	0.6
5	5.37	sa	7.35	sa	4.85	9.83
5-fluoracilo	56.9	52.0	60.5	73.28	63.5	77.3

Concentración (50 µM) en DMSO. U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF7=mama, SKUL-1 adenocarcinoma de pulmón, sa = sin actividad.

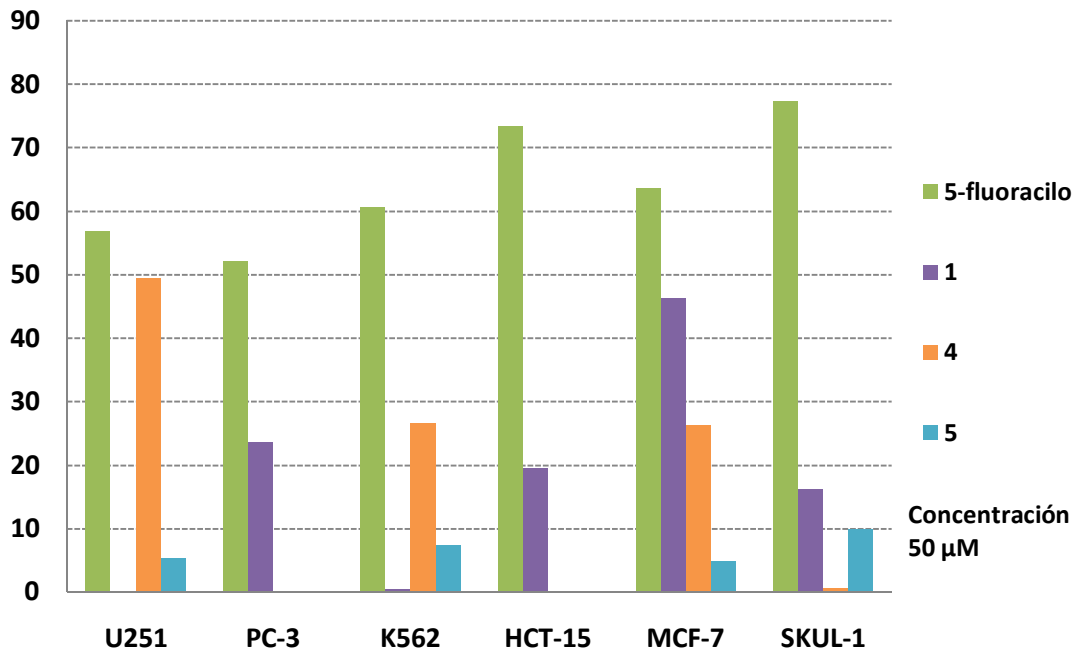


Figura No. 11. Derivados del lupeol. Porcentaje de Inhibición del crecimiento por la línea celular.

5.5.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.

Se emplearon ratones machos (cepa CD1, de 20 a 25g) los cuales fueron pesados y separados al azar en grupos de tres: dos grupos control (positivo y de vehículo) y un grupo tratado. Cada grupo (n=3) fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 0.1 mL de pentobarbital/10 g de peso de ratón vía intraperitoneal. En cada grupo se aplicó tópicamente una solución etanólica de TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol 25 µg/mL) sobre la superficie posterior e inferior de la oreja derecha del ratón (10µL x cada lado) para inducir la inflamación. Posteriormente se aplicó 20µL de etanol en la superficie posterior e inferior de la oreja izquierda. Diez minutos después de la aplicación del TPA al grupo tratado se le aplicó 20µL del compuesto de estudio disuelto en su vehículo correspondiente a una dosis de de 0.31 µmol/oreja, en ambas caras de la oreja derecha, mientras que la oreja izquierda solo se aplicó 20 µL de vehículo. Se empleó indometacina como control positivo. Transcurridas 4 horas después de la aplicación de cada grupo, sacrificado en una cámara saturada con CO₂, se tomó biopsia de cada oreja con un sacabocados de 7 mm de diámetro. Las orejas control como las orejas tratamiento fueron pesadas. Una vez obtenidos los pesos, se calculó el porcentaje de la inhibición de la inflamación según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{\bar{x} \text{ tratado}}{\bar{x} \text{ control}} \right) * 100 \right]$$

Los resultados se analizaron mediante la prueba de *t* de Student, con un nivel de significancia de $p \leq 0.01$, usando el programa Sigma-stat (2.0).

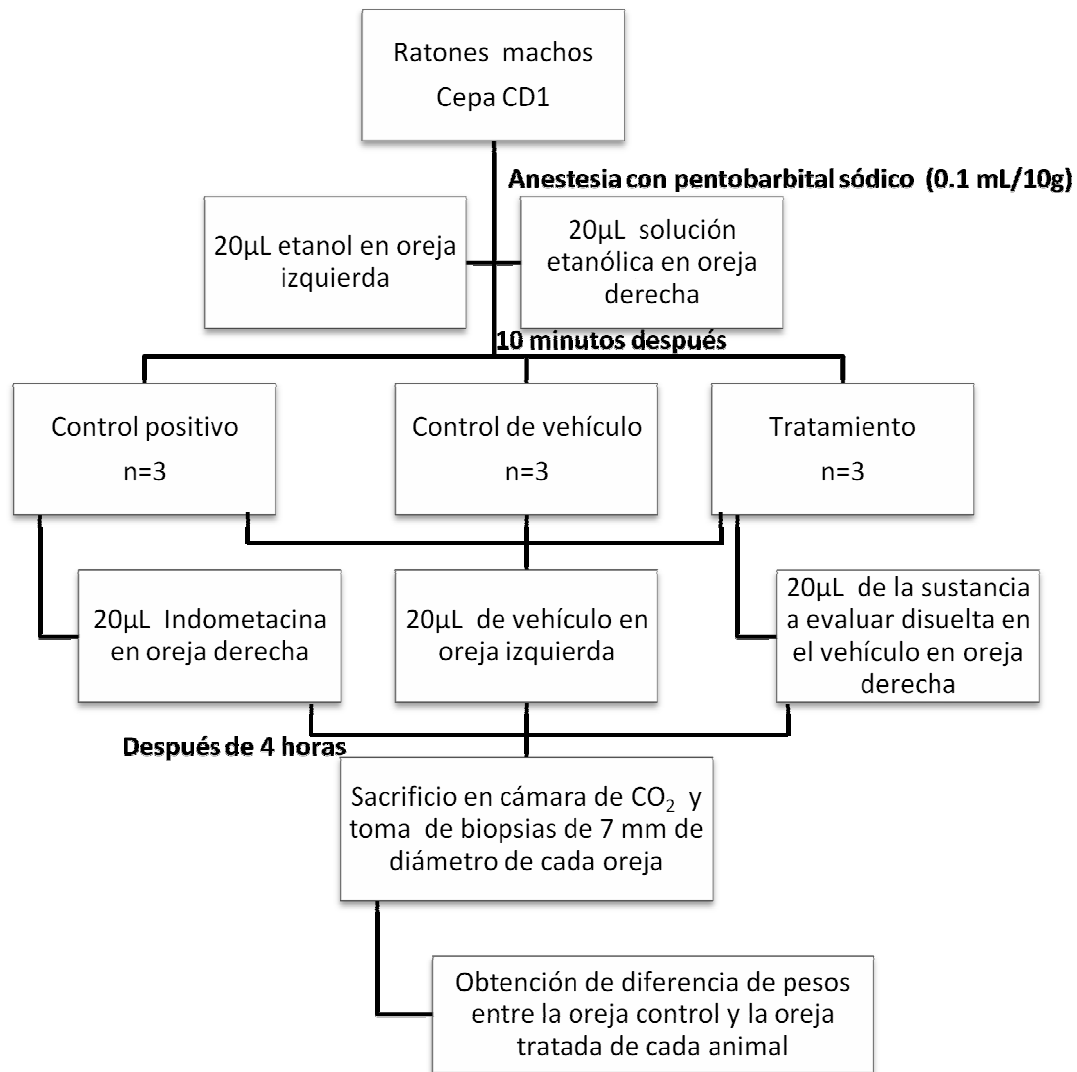


Figura No. 12. Esquema de Trabajo de Modelo edema inducido por TPA.

Cuadro No. 3. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
Acetona	-	16.53 ± 0.44	-
1	1 μmol/oreja	7.95 ± 1.01	51.92**
4	1 μmol/oreja	12.87 ± 0.65	21.24**
5	1 μmol/oreja	8.30 ± 1.41	49.80**
7	0.7 μmol/oreja	6.20 ± 1.50	56.64**
Indometacina	1 μmol/oreja	2.88 ± 0.73	78.76**

Los valores de $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control.

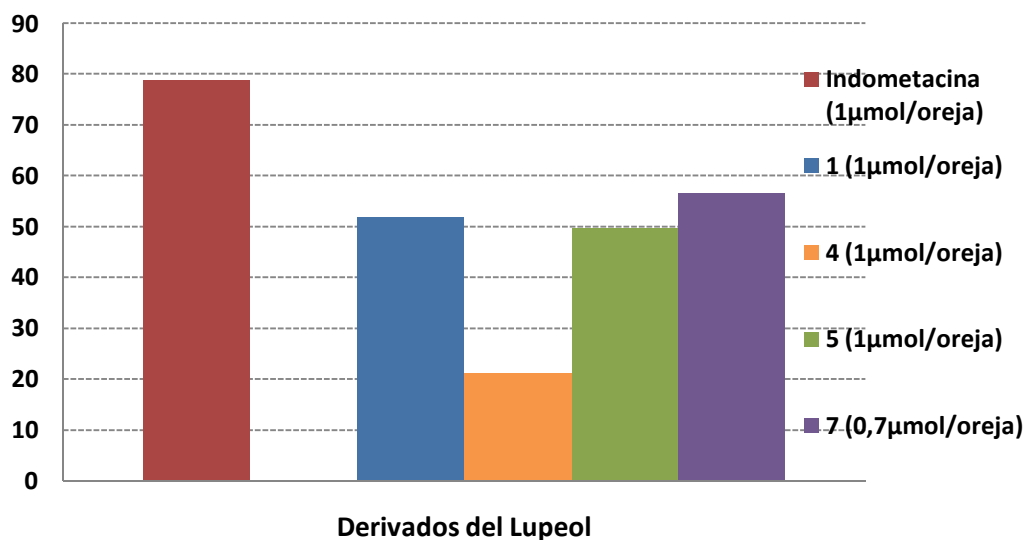


Figura No. 13. Derivados del Lupeol. Porcentaje de inhibición de edema inducido por TPA.

I. DISCUSIÓN

Son varias las razones, que pueden explicar, que hoy en día exista un interés creciente en el estudio de los triterpenos naturales. Una de ellas, es tratar de conocer el papel que desempeñan estos metabolitos secundarios en las especies que los sintetizan, por ejemplo, se conoce que estos metabolitos secundarios son importantes componentes estructurales de sus membranas celulares (Liby et al, 2007). Otra, es el posible papel que desempeñan en el ser humano ya que es conocido que los triterpenos son componentes naturales de la dieta humana. En los países occidentales un promedio de 250 mg por día de diferentes triterpenos, contenidos principalmente en aceites vegetales, cereales, frutas y verduras son consumidos. (Moreau et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones realizadas es acerca de sus propiedades biológicas (Ovesna et al., 2004). Mucho de este interés se debe al hecho de que varios de estos metabolitos secundarios han demostrado bajar los niveles de colesterol en la sangre y evidencia de este interés son por lo menos 25 estudios clínicos, 20 patentes y la venta de por lo menos 10 productos conteniendo principalmente triterpenos (Moreau et al., 2002).

Uno de estos metabolitos secundarios es el lupeol (**1**). La estructura pentacíclica de **1** es evidenciado por sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Así, en el espectro de masa de alta resolución se observa el ión molecular a 426.3861 para una fórmula de $C_{30}H_{50}O$ mientras que en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN 1H) se observan los siete

singuletes asignados a los grupos metilos, así como para los protones vinílicos (Martelanc et al, 2007).

Debido a sus efectos antiinflamatorios, tanto *in vitro* como *in vivo*, (Fernandez et al., 2001), su actividad anti mutagénica en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Lira Wde, et al., 2008 y Nigam et al., 2007) y su capacidad de inhibición del crecimiento de tumores de melanoma humano, sin afectar melanocitos normales (Saleem et al., 2008), el lupeol ha sido extensamente estudiado y todos los hallazgos encontrados sugieren que este triterpeno puede ser utilizado como un agente quimiopreventivo y terapéutico en el cáncer de piel. (Hata et al., 2005)

Adicionalmente, estudios de relación de la actividad biológica con la modificación estructural del lupeol indicaron que modificaciones en el C-30, principalmente la formación de grupos aldehídos y ácidos carboxílicos aumentan la apoptosis de células de algunos cánceres humanos. Estos hallazgos sugieren que aumentar el grado de oxidación en C-30 aumenta la actividad citotóxica a líneas de cáncer humano. (JP2009191018) Siguiendo este orden de ideas es factible suponer que un epóxido formado en la doble ligadura entre C-20 y C-29 del lupeol podría aumentar la actividad en contra de células cancerosas.

Una búsqueda en la literatura señaló que el 20,29-epoxilupan-3- β -ol (**3**) ha sido obtenido como metabolito secundario de algunas especies vegetales pero no se encontró informes de la obtención de este derivado, por métodos químicos a partir de lupeol.

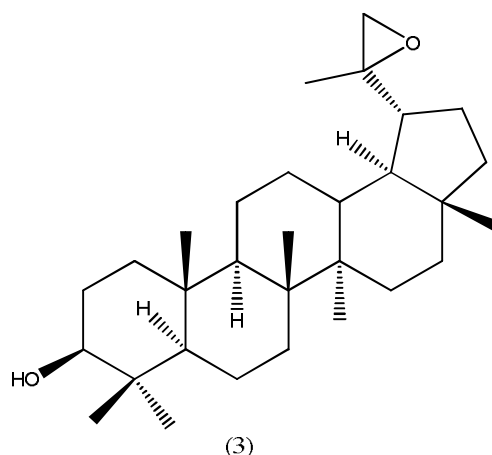


Figura No. 14. Estructura química del 20,29-epoxilupan-3-β-ol (3).

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió obtener de manera paralela los derivados epoxidados del lupeol (1) y la lupenona (2). Esta última obtenida a partir de la oxidación, con trióxido de cromo y ácido sulfúrico, de 1. El lupeol, punto de partida de esta tesis fue previamente aislado de la especie vegetal *Mortonia hidalgensis* (Martínez et al., 1982). La caracterización de 1 y 2 se logró por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los informados en la literatura. (Burns et al., 2000; Fotie et al., 2006; Puapairoj et al., 2005).

6.1.1. Caracterización del 3β-hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).

De la reacción de lupeol (1) con m-CPBA se obtuvo el 3β-hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5), la elucidación estructural de este compuesto se logró mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

Así en el espectro de masas (EM) de **5** se observó un ion molecular a 428 m/z correspondiente a una fórmula mínima de $C_{29}H_{48}O_2$. Al analizar el espectro de infrarrojo (IR), se observó una banda a 1702.54 cm^{-1} correspondiente a la energía de vibración del enlace C=O. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron señales correspondientes a 29 átomos de carbono, señalados en la fórmula mínima. También en este espectro se mostró la presencia de siete señales a 28.57, 16.08, 16.58, 16.40, 14.85, 18.52, 29.19 ppm, asignadas a siete grupos metilos observados en el espectro del experimento DEPT. Además se observaron 6 CH, 10 CH_2 y por diferencia con el número total de señales observadas en el espectro, se calcularon 6 átomos de carbono sin hidrógenos. La señal a 211.3 fue asignada a un grupo carbonilo que junto a la señal del metilo a 29.1 ppm en RMN ^{13}C (2.102 ppm en RMN 1H) y la evidente pérdida de la señal asignada al metileno vinílico en C-29 indicaban la formación de un radical metilcetona en C-20. Tomando en cuenta lo anterior se propuso la estructura **5** para este compuesto. Propuesta apoyada por el patrón de fragmentación asignado a este compuesto.

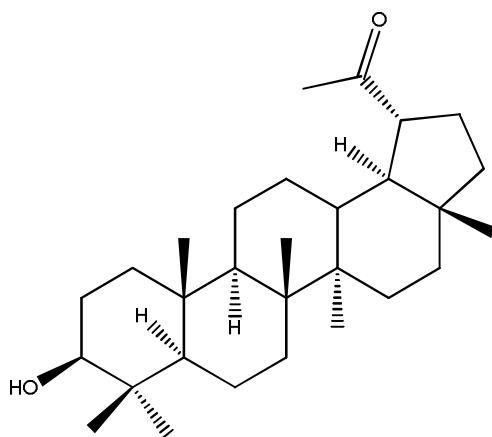


Figura No. 15. Estructura química del 3β-hidroxi-20-oxo-30-norlupano (**5**).

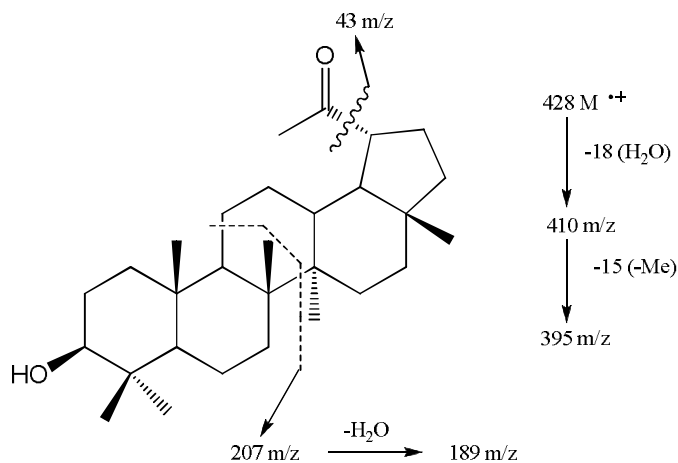


Figura No. 16. Patrón de fragmentación propuesto para el 3β-hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).

Esta propuesta estructural fue comprobada mediante los experimentos HSQC y HMBC.

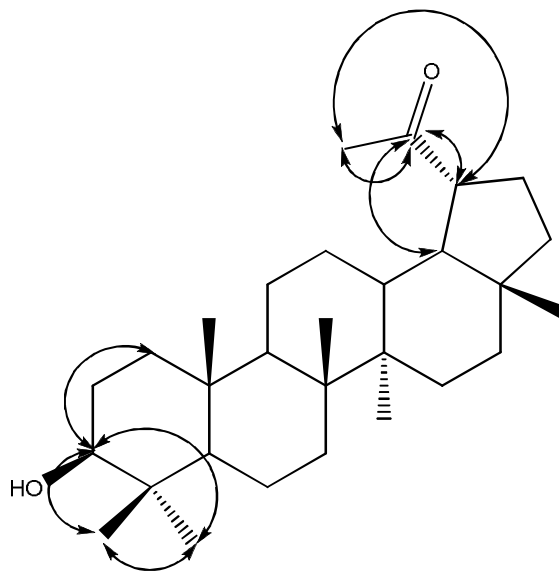


Figura No. 17. Principales interacciones C-H a tres ligaduras para el 3β-hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).

En la literatura se encontró un sólo informe acerca de la preparación de la cetona **5**. En este trabajo se utilizó como compuesto de partida el 3 β -acetoxilup-20(29)-eno el cual se trató con trióxido de osmio, seguido de LiAlH₄ (Corbett et al., 1987). Adicionalmente, **5** se ha aislado como metabolito secundario de especies de líquenes como *Pseudocyphellaria rubella* (Corbett et al., 1987) y de otras especies como *Salvia nubicola* (Ali et al., 2005), *Koelipinia linearis* (Koul et al., 1999), así como de la corteza del abedul amarillo, *Betula alleghaniensis* (Cole et al., 1991; Habiyaemye et al., 2002), de las partes aéreas *Salacia chinensis* (Zhang et al., 2008), y de *Saussurea ussuriensis* (Li et al., 2008), entre otras. (Thompson y Bowers, 1968; Ponglimanont y Thongdeeying, 2005; Kotowicz et al., 2005; Wang et al., 2008)

Aunque los datos espectroscópicos de RMN ¹H y ¹³C para **5** han sido publicados (Thompson y Bowers, 1968; Cole et al., 1991; Koul et al., 1999; Ali et al., 2005; Kotowicz et al., 2005), al comparar estos datos entre sí se observaron inconsistencias, las cuales fueron evidentes al compararlos con los datos generados en el presente estudio. En el siguiente cuadro se observan las asignaciones para la cetona **5**, los cuales fueron confirmados por los experimentos de HSQC y HMBC.

Cuadro No. 4. Asignaciones en RMN ^{13}C para 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5). (500MHz, CD_3COCD_3)

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-1	39.57	C-16	35.78
C-2	28.19	C-17	43.70
C-3	78.43	C-18	49.95
C-4	39.60	C-19	52.87
C-5	56.30	C-20	211.39
C-6	19.10	C-21	28.25
C-7	35.10	C-22	40.58
C-8	41,61	C-23	28.57
C-9	51.27	C-24	16.08
C-10	37.99	C-25	16.58
C-11	21.69	C-26	16.40
C-12	27.92	C-27	14.85
C-13	37.96	C-28	18.52
C-14	43.40	C-29	29.19
C-15	28.16		

De acuerdo con lo anterior, este es el primer informe acerca de la obtención de **5** a partir del tratamiento de **1** con ácido m-cloro perbenzoico (m-CPBA)

Con el fin de establecer un probable mecanismo de reacción que explicara la transformación de **1** a **5**, se realizó una búsqueda en la literatura de reacciones similares, el resultado indicó dos informes donde el ácido m-cloroperbenzoico (m-CPBA) promovió la fragmentación oxidativa de dobles ligaduras endocíclicas para formar dicetonas (Borowitz et al., 1966 y 1968) y un informe donde el m-CPBA

realizó la fragmentación en dobles ligaduras terminales para formar benzofenonas (Singh et al., 2009).

Tomando en cuenta estos informes, se propone el siguiente mecanismo para la obtención de la cetona **5** a partir del lupeol.

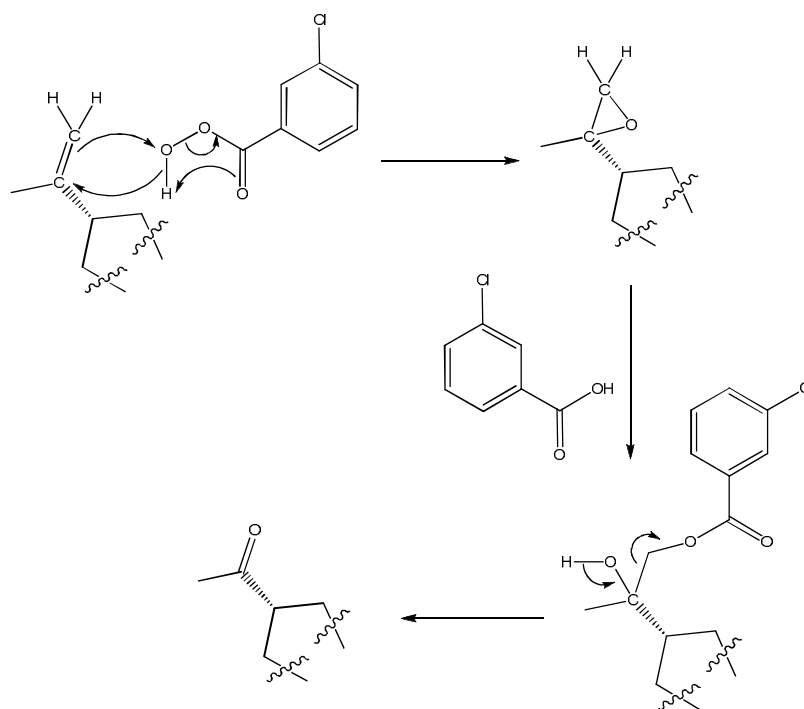


Figura No. 18. Mecanismo de fragmentación oxidativa del m-CPBA.

El bajo rendimiento obtenido (1.1 %) de esta reacción se podría justificar por la probable inestabilidad, especialmente en condiciones ácidas, del oxirano que se postula como intermediario de la metil cetona formada.

6.1.2. Caracterización de 20,29-epoxi-lupenona (4).

La reacción entre la lupenona (2) y el m-CPBA produjo dos productos los cuales fueron separados mediante CCA de la mezcla de reacción, el primero fue caracterizado por difracción de rayos X como la 20,29-epoxi-lupenona (4) y el segundo fue caracterizado mediante el análisis sus datos espectroscópicos como la 29-norlupan-3,20-diona (6).

Los resultados de difracción de rayos X de 4, indicaron la formación de un oxirano en las posiciones C-20 y C-29 y permitieron establecer la estereoquímica de la molécula.

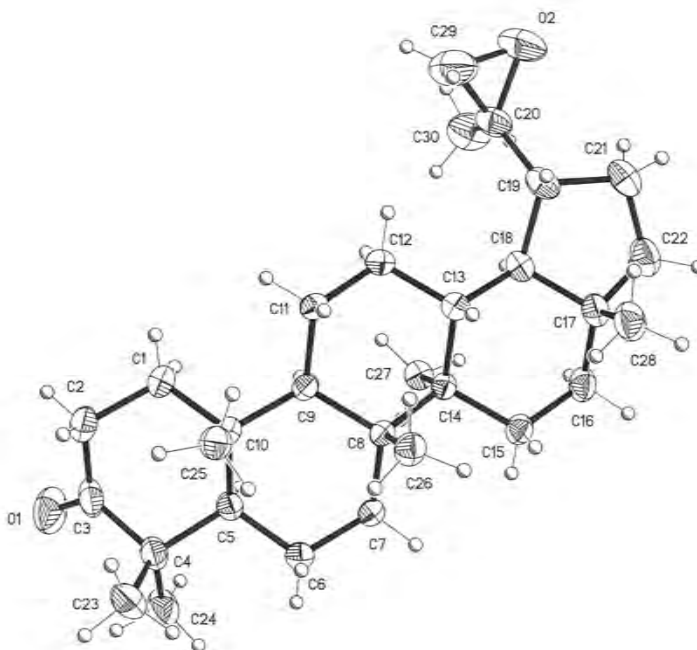


Figura No. 19. Estructura cristalina de la 20,29-epoxi-lupenona (4).

El derivado **4** ha sido aislado como metabolito secundario de *Flourensia heterolepis* (Bohlmann y Jakupovic, 1979). Sin embargo una búsqueda en la literatura no indicó que **4** haya sido obtenido por modificación de la lupenona o por otro triterpeno similar ni como producto de una síntesis total. De acuerdo con lo anterior, éste es el primer informe de la obtención de **4** a partir de fuentes no naturales.

6.1.3. Caracterización de 29-norlupan-3,20-diona (**6**).

La elucidación estructural de la 29-norlupan-3,20-diona (**6**) se logró mediante el análisis de sus datos espectroscópicos. En el espectro de masas (EM) se observó un ion molecular a 426 m/z correspondiente a la fórmula mínima de $C_{29}H_{46}O_2$. En el espectro de IR mostró una banda a 1699.54 cm^{-1} correspondiente a la energía de vibración del enlace C=O. El espectro de RMN ^{13}C evidenció la pérdida de un átomo de carbono en la estructura triterpénica, mostrando 29 señales correspondientes a 29 carbonos. Las señales a 218.0 y 212.7 ppm, en el espectro de RMN ^{13}C , indicaron la presencia de dos grupos carbonilos en la molécula. Todos estos datos indicaron que **6**, podría corresponder al derivado oxidado en C-3 con un residuo de metilcetona como **5**. Propuesta que fue apoyada por el patrón de fragmentación asignado a **6**.

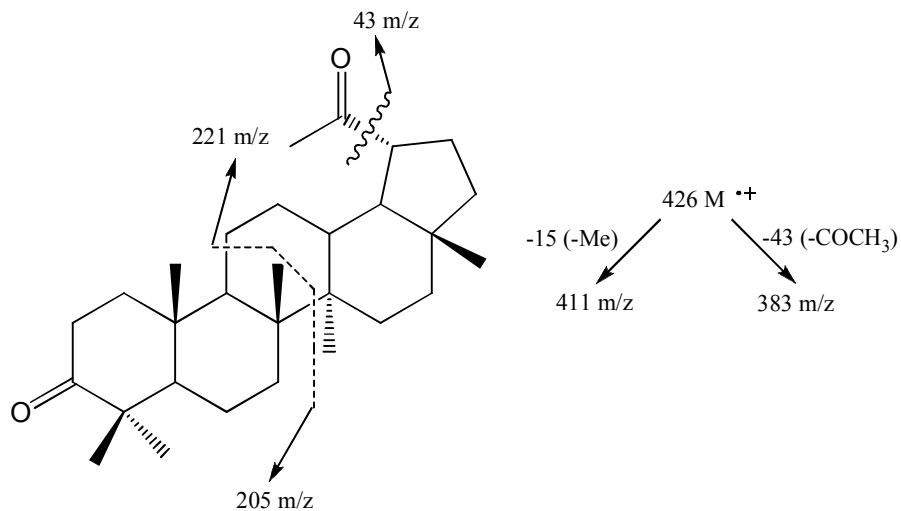


Figura No. 20. Patrón de fragmentación propuesto para la 29-norlupan-3,20-diona

(6).

La estructura propuesta fue comprobada al hacer el análisis de los experimentos HSQC y HMBC.

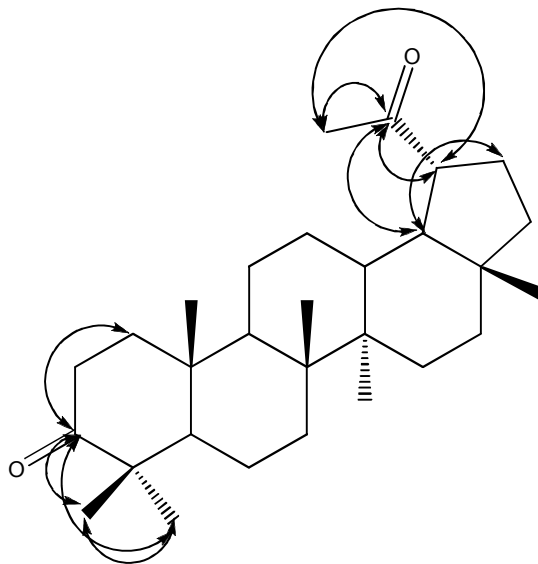


Figura No. 21. Principales interacciones C-H a tres ligaduras para la 29-norlupan-3,20-diona (6).

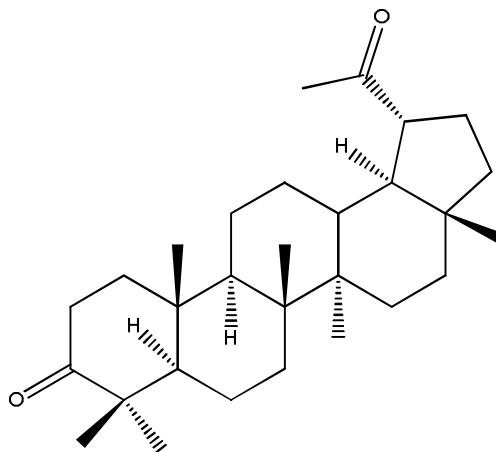


Figura No. 22. Estructura química de la 29-norlupan-3,20-diona (**6**).

Los rendimientos de la cetona **6** a partir de **2**, resultaron muy pobres, al igual que los rendimientos del derivado **5** a partir del lupeol. Estos resultados indican, que aunque la reacción se efectuó, posiblemente el oxirano, propuesto como intermediario para la formación de la metil cetona, sea inestable. También, es posible que los derivados **5** y **6** sean inestables en las condiciones de separación.

Por otro lado, resultado de una búsqueda bibliográfica se encontró que **6** ha sido aislado como metabolito secundario de la corteza exterior de *Betula alleghaniensis* (abedul amarillo) (Cole et al., 1991; Habiyaemye et al., 2002) y de hojas de *Salacia chinensis* (Zhang et al., 2008). Sin embargo, no se encontraron informes donde se obtenga por síntesis química. Por lo anterior, este es el primer informe de la obtención de **6** a partir de modificaciones químicas.

6.1.4. Caracterización de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**).

A pesar de que la estructura de **4** fue determinada por análisis de rayos x, los espectros de RMN, adquiridos en CDCl_3 , no correspondían a esta estructura. Por lo que se decidió establecer la estructura del producto recuperado de estos análisis.

En el espectro de masas (EM) se observó un ion molecular a 440 m/z correspondiente a una fórmula mínima de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$. El espectro de IR mostró una banda 3627.45 cm^{-1} correspondiente a la energía vibración del enlace O-H, una banda a 1698.31 cm^{-1} correspondiente a la energía de vibración el enlace C=O. Estos resultados indicaron que el oxirano presente en **4**, sufrió una apertura, posiblemente por la acidez del disolvente, dando un alcohol. Propuesta que fue apoyada por las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C donde se observaron la presencia de seis señales correspondientes a los carbonos de los metilos, una señal a 65.02 ppm correspondiente al C-30 unido al alcohol y las señales a 154.73 y 106.96 ppm correspondientes a los C-20 y C-29 respectivamente, que conforman el doble enlace. Por su parte el espectro de RMN ^1H presentó seis singuletes asociados a los metilos con los que cuenta la estructura, un singulete ligeramente desplazado a campo alto correspondiente al protón del hidrógeno 30 y dos señales asociadas a los protones vinílicos de la estructura.

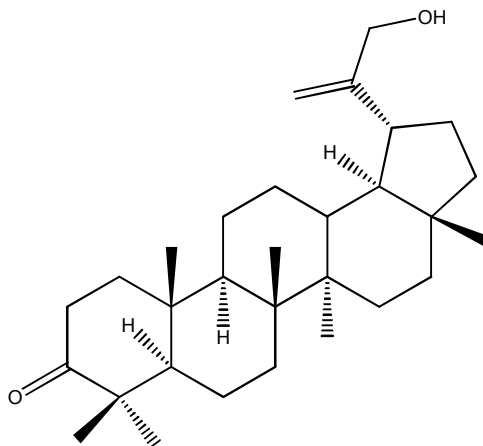


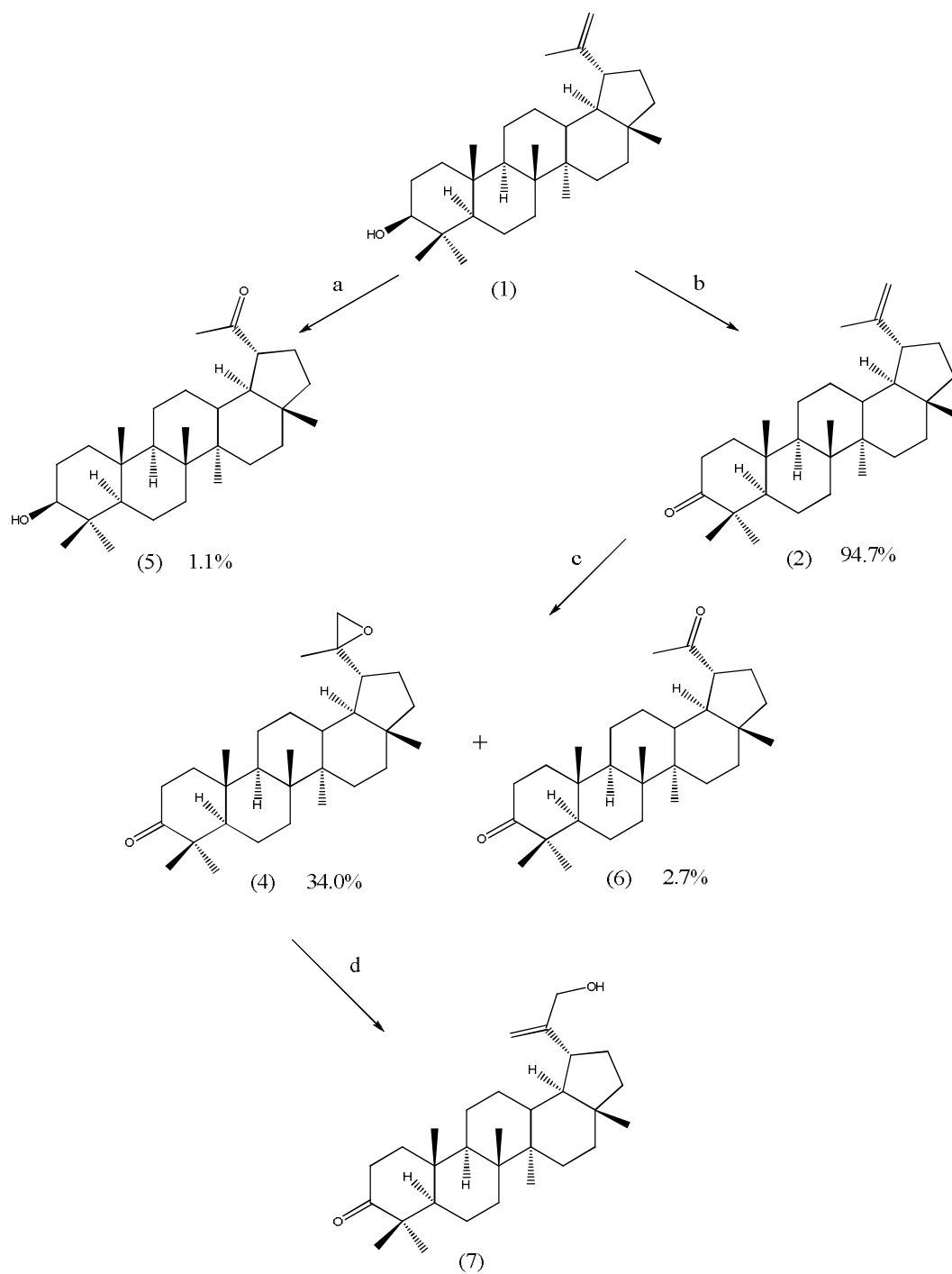
Figura No. 23. Estructura química de la 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**).

El derivado **7** han sido aislado como metabolito secundario de especies vegetales como *Flourensia heterolepis* (Bohlmann y Jakupovic, 1979), *Salacia cordata* (Tinto et al., 1992), *Cassine papillosa* (Drewes y Mashimbye, 1993), de tallos y ramas de *Maytenus imbricata* (Ribeiro et al., 2005), *Acacia mellifera* (Mutai et al., 2007), *Maytenus nemerosa*, donde mostró una inhibición significativa de crecimiento de células KB a 10 $\mu\text{g/mL}$, (Fang et al., 1984) y de *Cassipourea madagascariensis*, (Prakash et al., 2006) en donde fue evaluada frente a células de cáncer de ovario, determinando una $\text{IC}_{50} = 16.4\mu\text{g/mL}$. Los resultados de una búsqueda en la literatura indicaron que no existen informes acerca de la obtención de **7** mediante transformaciones químicas. De acuerdo con lo anterior, este el primer informe de la obtención de **7** por métodos químicos.

De acuerdo a la literatura y a nuestros resultados es posible que la formación de los derivados **5** y **6** sea a partir de los oxiranos respectivos, como se ha propuesto en el mecanismo de reacción. Aunque las consideraciones

termodinámicas y cinéticas involucradas en estas transformaciones están más allá de los objetivos de este trabajo, es evidente que existe una diferente estabilidad en los epóxidos propuestos como intermediarios. El epóxido **4**, obtenido a partir de la lupenona **3**, se logró aislar con un rendimiento de un poco más del 30%, mientras que el epóxido formado a partir del lupeol no fue posible aislarlo. Estos resultados podrían indicar que el epóxido **4** es más estable que aquel producido a partir del lupeol. Por otro lado, el rendimiento de los derivados **5** y **6** es muy similar en ambos casos.

La formación del alcohol **7** a partir del oxirano **4** ilustra la facilidad de reacción, frente a medios ácidos, de este tipo de derivados.



(a) m-CPBA/CH₂Cl₂; (b) CrO₃, H₂SO₄/DMF; (c) m-CPBA/CH₂Cl₂; (d) CHCl₃.

Figura No. 24. Esquema de semisíntesis para la obtención de derivados del lupeol.

6.2. Evaluaciones de las propiedades de inhibición del crecimiento de células de cáncer humano y antiinflamatoria.

6.2.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) in vitro.

En cuanto a los resultados de la capacidad de inhibición de crecimiento de líneas celulares de cáncer humano, mostrados en el Cuadro No. 2 y la Figura No. 11, del lupeol (**1**) y sus derivados sintetizados (3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (**5**) y 20,29-epoxi-lupenona (**4**)), se observa que el lupeol fue poco activo en comparación con el 5-fluoracilo; de la misma forma, las modificaciones efectuadas en los dos derivados no favorecieron la actividad y también resultaron poco activos en comparación al fármaco de referencia. Con esta información se puede establecer que las modificaciones efectuadas en las posiciones C-3, C-20 y C-29 de la molécula del lupeol e incluso la pérdida del C-30 no están involucradas con su capacidad de inhibir el crecimiento celular de líneas de cáncer humano.

6.2.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.

De acuerdo a los resultados mostrados en el Cuadro No. 3 y en la Figura No. 13 se puede establecer que el lupeol (**1**) como su derivado 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (**5**) no muestran una actividad antiinflamatoria mayor a la indometacina, por lo que la pérdida de un carbono y la formación de un carbonilo en C-20 del derivado no modifica la actividad antiinflamatoria. De la misma

manera, para el derivado 20,29-epoxi-lupenona (**4**), la presencia del epóxido en los carbonos C-20 y C-29 no favorece la actividad antiinflamatoria.

Sin embargo, para el derivado 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**) tanto la presencia del grupo alcohol en el C-30, así como la presencia del grupo carbonilo en el C-3 favorece la actividad antiinflamatoria e inclusive supera a la indometacina.

A pesar que se ha informado que un mayor grado de oxidación en el átomo de C-30 del lupeol puede aumentar su actividad en contra de líneas de cáncer humano, la presencia de un grupo hidroxilo en el C-30, como en **7**, o de grupos carbonilo en los C-20 y C-3, como **5** y **6**, e incluso la presencia del grupo epóxido en los C-20 y C-29, como **4**, no fueron suficientes para que estos derivados fueran más activos que el lupeol. Estos resultados indican que adicionalmente al grado de oxidación, debe existir otro factor, posiblemente estérico, para que se aumente la actividad biológica.

I. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron el 3 β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (**5**) y la 29-norlupan-3,20-diona (**6**) a partir de una reacción de fragmentación oxidativa de lupeol (**1**) con m-CPBA.
- Es la primera vez que se obtienen los derivados **5** y **6** a partir de modificaciones a lupeol (**1**) y lupenona (**2**) respectivamente, usando m-CPBA como reactivo.
- La reacción del lupeol (**1**) con m-CPBA no favorece la formación del derivado epoxidado en las posiciones C-20 y C-29, pero si para la lupenona (**2**).
- En disolventes ácidos se favorece la apertura del oxirano **4** permitiendo la formación de un producto mas estable el 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**7**).
- Las modificaciones efectuadas en los C-3, C-20, C-29 y C-30, e incluso la pérdida de un carbono en la estructura triterpénica, no favorece la actividad de inhibición de crecimiento de células de cáncer humano.
- El derivado **7** fue el más activo de todos los derivados obtenidos en el modelo de edema inducido por TPA.
- El grado de oxidación de los derivados obtenidos del lupeol no es suficiente para mejorar la propiedad citotóxica.

I. BIBLIOGRAFÍA

Ali, M.; Ahmed, S.; Ibrahim, S. y Tareen, R. **Characterization and Bioscreening of a New Triterpenoid and a Flavone Isolated from *Salvia nubicola***. *Chem. & Biod.* 2 (2005) 910-916.

Bohlmann, F. y Jakupovic, J. **Neue sesquiterpene, triterpene, flavanone und andere aromatische verbindungen aus *Flourensia heterolepis***. *Phytochemistry* 18 (1979) 1189-1194.

Borowitz, I.; Gonis, G.; Kelsey, R.; Rapp, R. y Williams, G. **The Synthesis of 6-Ketononanolides from Chromans**. *J. Org. Chem.* 31 (1966) 3032-3037.

Borowitz, I.J.; Williams, G.; Groos, L. y Rapp, R. **The Synthesis of 6-Ketononanolides, 6- and 7-Ketodecanolides, and 7-Ketoundecanolide via Enamine Reactions**. *J. Org. Chem.* 33 (1968) 2013-2020.

Bruneton, J. **Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales**. 2a edición, ACRIBIA S. A., España. 2001. Pp 653.

Burns, D.; Reynolds, W.; Buchanan, G.; Reese P. y Enriquez, R., **Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives**. *Magn. Reson. Chem.* 38 (2000) 488-493.

Chaturvedi, P.; Bhui, K. y Shukla, Y. **Lupeol: Connotations for chemoprevention**. *Canc. Lett.* 263 (2008) 1-13.

- Chell, S.; Kadi, A.; Williams, A. y Paraskeva, C. **Mediators of PGE₂ synthesis and signaling downstream of COX-2 represent potential targets for the prevention/treatment of colorectal cancer.** *Bio. et Bio. Acta* 1776 (2006) 104-119.
- Cole, B.; Bentley, M.; Yun Hua y Lin Bu. **Triterpenoid constituents in the outer bark of *Betula alleghaniensis* (yellow birch).** *J. Wood. Chem. Technol.* 11 (1991) 209-203.
- Corbett, R.; Cong, A.; Holland, P. y Wilkins, A. **Lichens and Fungi XVIII. Extractives from *Pseudocyphellaria rubella*.** *Aust. J. Chem.* 40 (1987) 461-468.
- Drewes, S. y Mashimbye, M. J., **Flavonoids and triterpenoids from *Cassine papillosa* and the absolute configuration of 11,11-dimethyl-1,3,8,10-tetra-hydroxy-9-methoxypeltogynan,** *Phytochemistry* 32 (1993) 1041-1044.
- Fang, S.; Berry, D.; Lynn, D.; Hecht, S.; Campbell, J. y Lynn, W. **The chemistry of toxic principles from *Maytenus nemerosa*,** *Phytochemistry* 23 (1984) 631-633.
- Fernández, M.; De las Heras, B.; García, M.; Sáenz, M. y Villar, A. **New insights into mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol.** *J. of P. and Pharm.* 53 (2001) 1533-1539.
- Folkman, J. **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?.** *Nat. Rev.* 6 (2007) 273-285.
- Fotie, J.; Bohle, S.; Leimanis, L.; Georges, E.; Rukunga, G. y Nkengfack, A. **Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*.** *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 62-67.

- Habiyaremye, I.; Stevanovic-Janezic, T.; Riedl, B.; Garneau, F. y Jean, F. **Pentacyclic triterpene constituents of yellow birch bark from Quebec.** *J. of Wood Chem. and Tech.* 22 (2002) 83-91.
- Hata, K.; Kazuyuki, H.; Yasuo, F.; Takashi, I.; Kenji, S. y Toshiyuki, M. **Anticancer triterpene derivatives and anticancer agents and health foods containing them.** JP 2009191018.
- Hata, K.; Kazuyuki, H.; Murata, J. y Takahashi, S. **Remodeling of actin cytoskeleton in lupeol-induced B16 2F2 cell differentiation,** *J. Biochem.* 138 (2005) 467–472.
- Heinrich, M.; Barnes, J.; Gibbons, S. y Williamson, E. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.** EL SEVIER, Hungary. 2004. Pp. 60, 132-142.
- Hecker, E. **Cocarcinogenic principles from the seed oil from the *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae.** *Canc. Res.* 28 (1968) 2338-2349.
- Herz, W.; Santhanam. P. y Ahlberg, I. **3-epi-betulinic acid, a new triterpenoid from *Picramnia pentandra*.** *Phytochemistry* 11 (1972) 3061-3063.
- Katzung, B. G. **Basic and Clinical Pharmacology.** 10th edition, Mc Graw Hill (Medical), USA, 2007. Pp. 294-297.
- Kotowicz, C.; Catalán, C.; Griffin, C. y Herz, W. **Triterpenes and other constituents of *Nassauvia axillaris*.** *Bio. Sys. and Ecol.* 33 (2005) 737-742.
- Lawrence, T. **Inflammation and cancer: a failure of resolution?.** *Pharm. Sci.* 28 (2007) 162-165.
- Larsson, S.; Giovannucci, E. y Wolk, A. **Long-term aspirin use and colorectal cancer skin: a cohort study in Sweden.** *B. J. of Canc.* 95 (2006) 1277-1279.

- Liby, K.; Yore, M. y Sporn, M. **Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer**, *Nat. Rev. Cancer*. 7 (2007) 357–369
- Lira Wde, M.; dos Santos, F.; Sannomiya, M.; Rodrigues, C.; Vilegas, W. y Varanda, E. **Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays**, *J. Med. Food* 11 (2008) 111–119.
- Mahato, S.; Kundu, A. **^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features**. *Phytochemistry* 37 (1994) 1517-1575.
- Martelanc, M.; Vovk, I. y Simonovska, B. **Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection**, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 145–152.
- Martínez, M.; Romo De Vivar, A.; E. Díaz, E.; Jiménez, M. y Rodríguez-Hahn, L. **The sesquiterpene constituents of *Mortonia hidalgensis***, *Phytochemistry* 21 (1982) 1335-1338.
- Masao M.; Yamaoka, K.; Tanaka, Y. y Fukuda, Y. **Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice**. *Bioch. Pharm.* 71 (2006) 1331-1336.
- Moreau, R.; Whitaker, B. y Hicks, K. **Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses**, *Prog. Lipid. Res.* 41 (2002) 457–500.
- Mukhtar, H.; Saleem, M., **Lupeol anti-tumor agent and uses thereof**. Patent Application Publication, US 2008/0227762 A1.

- Mutai, C.; Abatis, D.; Vagias, C.; Moreau, D.; Roussakis, C. y Roussis, V. **Lupane triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity**, *Molec.* 12 (2007) 1035-1044.
- Nigam, N.; Prasad, S. y Shukla, Y. **Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin**, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 2331–2335.
- Ovesna, Z.; Vachálková, A.; Horváthová, K. y Tóthová, D. **Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds**, *Minireview Neoplasma.* 51 (2004) 327–333.
- Papazisis, K.; Geromichalos, G.; Dimitriadis, K. y Kortsaris, A. **Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay**. *J. Inm. Methods* 208 (1997) 151-158.
- Ponglimanot, C.; Thongdeeying, P. **Lupane-Triterpene Esters from the Leaves of *Ceriops decantra* (Griff.) Ding Hou**. *Aust. J. Chem.* 58 (2005) 615-618.
- Prakash, S.; Norris, A.; Miller, J.; Ratovoson, F.; Andriantsiferana, R.; Rasamison, V. y Kingston, D. **Citotoxic diterpenes from *Cassipourea madagascariensis* from the Madagascar Rainforest**, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 287-289.
- Puapairoj, P.; Naengchomnong, W.; Kijjoa, A.; Pinto, M.; Pedro, M.; Nascimento, M.; Silva, A. y Herz, W. **Cytotoxic Activity of Lupane – Type Triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* Two of which Induce Apoptosis**. *Planta Med.* 71 (2005) 208-213.
- Ribeiro, S.; de Fátima Silva, G.; Almeida, L.; Pains, L. y Vieira, S. **Lupane pentacyclic triterpenes isolated from stem and branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae)**, *Helv. Chim. Acta* 88 (2005) 1102-1109.

- Robles, M. **Proteína cinasa C: Mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular**. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. (<http://www.smb.org.mx/text/beb/beb92111511.pdf>, consultada 2 de febrero de 2010).
- Rodríguez-Hahn, L, Antúnez, M.; Martínez, M.; Sánchez, A.; Esquivel, B.; Soriano-García, M. y Toscano, A. **Minor polyhydroxyagarofuran derivatives from *Mortonia hidalgensis***, *Phytochemistry* 25 (1986) 1655-1658.
- Roitt, I.; Delves P. **Inmunología**. 3a edición, Ediciones científicas y técnicas S. A., España, 1994. Pp 1.10, 13.6-13.7.
- Saleem, M. **Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene**. *Cancer Lett.* (2009), doi:10.1016/j.canlet.2009.04.033
- Saleem, M.; Maddodi, N.; Abu Zaid, M; Khan, N.; Hafeez, B.; Asim, M.; Suh, Y.; Yun, Jung-Mi; Setaluri, V. y Mukhtar, H. **Lupeol Inhibits Growth of Highly Aggressive Human Metastatic Melanoma Cells *In vitro* and *In vivo* by Inducing Apoptosis**. *Clin Cancer Res* 14 (2008) 2119-2117.
- Saleem, M.; Murtaza, I.; Witkowsky, O.; Kohl, A. y Maddodi, N. **Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: Disrupts surviving/cFLIP activation in prostate cancer cells**. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 388 (2009) 576-582.
- Singh, F.; Milagre, H.; Eberlin, M. y Stefani, H. **Synthesis of benzophenones from germinal biaryl ethenes using m-chloroperbenzoic acid**. *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 2312-2316.

- Smith, C.; Reynard, A. **Farmacología**. Editorial Médica Panamericana S. A., Argentina, 1993. Pp. 393-394.
- Srinivasan, T.; Srivastava, G.; Pathak, A.; Batra, S.; Raj, K.; Singh, K.; Purib, S. y Kundua, B. **Solid-Phase Synthesis and Bioevaluation of Lupeol-Based Libraries as Antimalarial Agents**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 2803-2806.
- Koul, S.; Razdan, T.; Andotra, C.; Kalla, A.K.; Koul, S.; Taneja, S. y Dhar, K. **Koelpinin-A, B and C – three triterpenoids from *Koelipinia linearis***. *Phytochemistry* 53 (2000) 305-309.
- Sudhahar, V.; Veena, C. y Varalakshmi, P. **Antiuro lithic Effect of Lupeol and Lupeol Linolate in Experimental Hyperoxaluria**. *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 1509-1512.
- Sudhahar, V.; Kumar, S.; Varalakshmi, P. y Sundarapandiyan, R. **Mitigating role of lupeol and lupeol linoleate on hepatic lipemic-oxidative injury and lipoprotein peroxidation in experimental hypercholesterolemia**. *Molec. and Cell. Bioch.* 295 (2007) 189-198.
- Sudharsan, P.; Mythili, Y.; Selvakumar, E. y Varalakshmi, P. **Lupeol and its ester ameliorate the cyclophosphamide provoked cardiac lysosomal damage studied in rat**. *Molec. and Cell. Bioch.* 282 (2006)23-29.
- Thompson, M.; Bowers, W. **Lupeol and 30-norlupan-3 β -ol-20-one from the coating of the castor bean (*Ricinus communi L.*)**. *Phytochemistry* 7 (1968) 845-847.
- Tinto, W.; Blair, L.; Alli, A.; Reynolds, W. y McLean, S. **Lupane triterpenoids of *Salacia cordata***, *J. Nat. Prod.* 55 (1992) 395-398.

- Urban, M.; Sarek, J.; Klinot, J.; Korinkova, G. y Hajduch, M. **Synthesis of A-seco Derivates of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity.** *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 1100-1105.
- Vasconcelos, J.; Teixeira, M.; Barbosa-Filho, J.; Lúcio, A.; Almeida, J.; de Queiroz, L.P.; Ribeiro-dos-Santos, R.; Soares, M. **The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model.** *I. Immun.* 8 (2008) 1216-1221.
- Vichai, V.; Kirtikara, K. **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening.** *Nat. protocols.* 1 (2006) 1112-1116.
- Wang, X. ; Wu, Q. y Shi, Y. **Triterpenoids and Sterols from *Saussurea cauloptera*.** *Chem. & Bio.* 5 (2008) 279-289.
- Li, X.; Feng, J. y Shi, Y. **Triterpenoids from *Saussurea ussuriensis*.** *Can. J. Chem.* 86 (2008) 281-284.
- Zhang, Y.; Nakamura, S.; Wang, T.; Matsuda, H. y Yoshikawa, M. **The absolute stereostructures of three rare D.B-friedobaccharane skeleton triterpenos from the leaves of *Salacia chinensis*.** *Tetrahedron* 64 (2008) 7347-7352.

Paginas de Internet consultadas:

<http://www.cancer.gov/drugdictionary/> consultada 2 febrero de 2010.

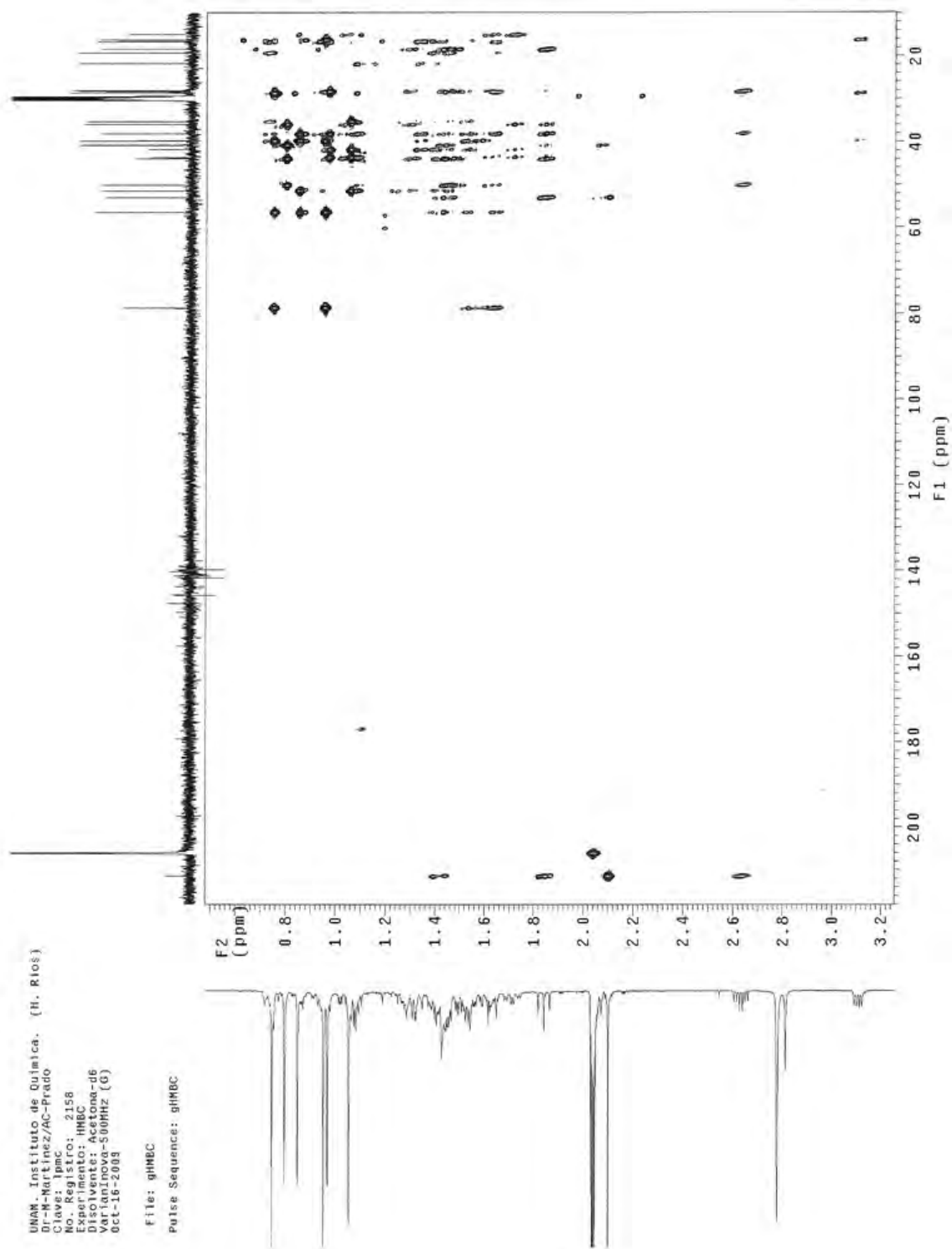
<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2750&ep=27> Consultada 6 de febrero de 2010.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002063.htm>, consultada 2 de febrero de 2010.

<http://www.who.int/cancer/en/index.html>. Consultada 6 de febrero de 2010.

I. APÉNDICE

9.1. Espectro HMBC de β -hidroxi-20-oxo-30-norlupano (5).



9.2. Datos cristalográficos de 20,29-epoxi-lupenona (4).

Fórmula empírica	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	
Peso molecular	440.68	
Temperatura	298 (2)K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Ortorrómbico	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Dimensiones de la unidad de celda	a=10.850(1) Å	α=90°
	b=13.792(1) Å	β=90°
	c=17.386(1) Å	γ=90°
Volumen	17.386(1) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.125 Mg/m ³	
coeficiente de absorción	0.068 mm ⁻¹	
F(000)	976	
Tamaño de cristal / color / forma	0.388 x 0.172 x 0.162 mm / incoloro / prism	
Rango de theta para datos corregidos	1.88 a 27.29°	
Rangos de índices	-14 ≤ h ≤ 14, -18 ≤ k ≤ 18, -22 ≤ l ≤ 22	
Reflexiones recogidas	34476	
Reflexiones independientes	3475 [R(int)=0.0576]	
integridad para theta = 27.89°	99.8%	
Dispositivo de medición	Bruker Smart Apex CCD diffractometer	
Corrección de la absorción	Semi-empírica de los equivalentes	
Max. y min. transmisión	0.9862 y 0.9236	
Método de refinamiento	Matriz completa de mínimos cuadrados en F ²	
Datos / restricciones / parámetros	3475/0/296	
Bondad de ajuste en F ²	1.012	
Índices R final [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0533, wR2 = 0.1308	
R índices (todos los datos)	R1 = 0.0732, wR2 = 0.1441	
Parámetro de la estructura absoluta	Fusión de datos	
Máxima diferencia entre pico y agujero	0.244 y -0.139 e.Å ⁻³	

9.3. Espectro HMBC de 29-norlupan-3,20-diona (6).

