



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Obtención de derivados, por métodos químicos,
de triterpenos aislados de *Amphipterygium*
adstringens y su evaluación como agentes
citotóxicos y antiinflamatorios.

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

Presenta:

Revelo García José Carlos.



MÉXICO, D.F.

AÑO 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: Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents. _____

Vocal: Dra. Ernestina Cervera Flores. _____

Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez. _____

1er. Suplente: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas. _____

2°. Suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano. _____

Esta tesis se desarrollo en el laboratorio 1-4 de Productos Naturales y en la Unidad de Pruebas de Actividad Biológica del Instituto de Química.

Director de tesis:

Dr. Mariano Martínez Vázquez. _____

Sustentante:

Revelo García José Carlos. _____

A mis padres.

Leticia y Pedro:

Porque lo son todo para mí. Gracias por su infinito amor, apoyó y confianza. Gracias por sus consejos, paciencia, ejemplo y tiempo. Gracias por amarme tanto. Me siento tan orgulloso de ustedes y tan afortunado de ser su hijo, que el compartir mi vida con ustedes es mi mayor triunfo. Los amo.

A mi hermana.

Frida:

Por que eres lo que más quiero en la vida, siempre podrás contar conmigo, te amo hermana.

A Rafael y Guadalupe.

Tíos:

Por todas las enseñanzas que me han dado, los consejos, el apoyo, cariño y su gran amor. Son mi ejemplo a seguir. Me siento afortunado de tenerlos a mi lado.

Tía Dora:

Por todo tú cariño y amor, por todas tus atenciones. Te quiero tía.

A mis abuelitos.

Olivia y Gerardo:

Gracias por su amor, por brindarme siempre su apoyo.

Agradecimientos.

A mi asesor de tesis Dr. Mariano Martínez Vázquez, por el interés y paciencia que ha tenido durante la realización de este trabajo de investigación, además de concederme su tiempo y su valiosa ayuda. Gracias por todo Doctor.

A la Bióloga Adriana Martínez Vázquez, gracias por tú paciencia, ayuda y enseñanzas.

A los miembros del jurado: Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents, Dra. Ernestina Cervera Flores, Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas y Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano, por sus comentarios y sugerencias a este trabajo.

Contenido.

ÍNDICE DE FIGURAS. ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
1 Introducción.	1
2 Marco Teórico.	4
2.2 Cáncer.	5
2.2.1 Clasificación de los tipos de Cáncer.	6
2.2.2 Factores relacionados con la aparición de Cáncer.	6
2.2.3 El cáncer como problema de salud pública.	7
2.2.4 Tratamiento del cáncer.	8
2.2.5 Principios antineoplásicos aislados de especies vegetales.	10
2.3 Inflamación.	13
2.3.1 Inflamación aguda.	13
2.3.2 Mediadores moleculares de la inflamación aguda.	14
2.3.3 Derivados del ácido araquidónico.	15
2.3.4 Prostaglandinas.	15
2.3.5 Leucotrienos.	17
2.3.6 Óxido nítrico.	18
2.3.7 Inflamación crónica.	19
2.4 Terapéutica de la inflamación.	20
2.4.1 Fármacos antiinflamatorios esteroidales.	20
2.4.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroidales.	21
2.5 Relación cáncer inflamación.	21
2.6 Metabolito primario y secundario.	23
2.7 <i>Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht</i> (cuachalalate).	25
2.7.1 Usos etnomédicos.	26
2.7.2 Estudios fitoquímicos.	26
2.7.3 Estudios farmacológicos.	27
2.8 Triterpenos.	28
2.8.1 Biogénesis.	28
2.8.2 Actividad biológica.	30
2.8.3 Como potenciales agentes antiinflamatorios.	30
2.8.4 Como potenciales agentes anticancerosos	30
2.9 Ácidos masticadienónico (1) y 3α-hidroximasticadienónico (2).	31
2.10 Métodos para evaluar la actividad biológica.	32
2.10.1 Ensayos in vivo.	32
2.10.2 Modelo de edema inducido por TPA.	33
2.10.3 Ensayos in vitro.	34
2.10.4 Experimento in vitro: Ensayo de inhibición de proliferación de células cancerosas humanas.	34
3 Justificación del estudio.	35

4	Hipótesis y objetivos.	38
4.2.1	Objetivos particulares.	38
5	Sección experimental y resultados.	39
5.2	Material y equipo.	40
5.3	Obtención de los ácidos (1) y (2).	41
5.3.1	Fraccionamiento de los extractos.	42
5.3.2	Aislamiento de los ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2) de extractos obtenidos de estudios previos.	44
5.4	Datos físicos y espectroscópicos del ácido masticadienónico (1).	45
5.5	Datos físicos y espectroscópicos del ácido 3α-hidroximasticadienónico (2).	46
5.6	Obtención de los derivados químicos a partir del ácido (2).	46
5.6.1	Obtención del 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).	47
5.6.2	Obtención de 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4).	48
5.6.3	Obtención del 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).	49
5.6.4	Obtención del ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6).	50
5.6.5	Obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).	51
5.7	Actividad biológica.	52
5.7.1	Experimento in vitro: Ensayo de inhibición de proliferación de células cancerosas humanas.	52
5.7.2	Condiciones generales.	52
5.7.3	Procedimiento.	52
5.8	Resultados.	54
6	Discusión	55
6.2	Caracterización del ácido masticadienónico (1).	56
6.3	Caracterización del ácido 3α-hidroximasticadienónico(2).	60
6.4	Obtención de los derivados: 3α-hidroximasticadienolato de metilo (3), 3α-hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4), 3α-hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5), 3-7, a partir del ácido 3α-hidroximasticadienónico (2).	64
6.4.1	Esterificación.	65
6.4.1.1	Obtención del 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).	65
6.4.1.2	Caracterización de (3).	65
6.4.1.3	Obtención de 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).	68
6.4.1.4	Caracterización de (5).	68
6.4.2	Hidrogenación catalítica.	72
6.4.2.1	Caracterización de 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4).	72
6.4.3	Acetilación.	75
6.4.3.1	Caracterización del ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6).	75
6.4.3.2	Obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).	78
6.4.3.3	Caracterización de (7).	78
6.5	Inhibición de proliferación de células cancerosas.	82
7	Conclusiones.	88
8	BIBLIOGRAFIA.	91

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
TABLA II.1. Informe de casos de cáncer en México. (INEGI 2009).	7
TABLA II.2. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen.	9
TABLA II.3. Comparación de los tipos de prostaglandinas.	16
TABLA II.4. Aspectos diferenciales de la ONS constitutiva e inducible.	19
TABLA II.5. Acciones farmacológicas de los AINES.	21
TABLA II.6. Inflamaciones crónicas asociadas a neoplasias.	22
TABLA II.7. Clasificación de los metabolitos secundarios de acuerdo a su origen biosintético.	24
TABLA V. 1. Fraccionamiento del extracto hexánico.	42
TABLA V. 2. Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo #1.	43
TABLA V.3. Fraccionamiento de extracto de acetato de etilo #2.	44
TABLA V.4 Porcentaje de inhibición de proliferación celular de los compuestos 2-7 a una concentración de 50 µg/ml.	55
TABLA VI. 1. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (1).	59
TABLA VI. 2. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (2).	63
TABLA VI. 3. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (3).	66
TABLA VI. 4. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (5).	71
TABLA VI. 5. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (4).	74
TABLA VI. 6. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (6).	77
TABLA VI. 7. Señales del espectro de RMN ¹³ C de (7).	81
TABLA VI. 8. Esqueletos Hidrocarbonatos de (2), (3), (5) y (6).	84
TABLA VI.9 Porcentaje de inhibición de proliferación celular de los compuestos 2-7 a una concentración de 50 µg/ml.	87

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
FIGURA II.1. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo.	7
FIGURA II.2. <i>Catharanthus roseus</i> .	10
FIGURA II.3. Metabolitos aislados de <i>Catharanthus roseus</i> .	10
FIGURA II.4. <i>Podophyllum peltatum</i> .	11
FIGURA II.5. Metabolitos aislados de <i>Podophyllum peltatum</i> .	11
FIGURA II.6. <i>Taxus brevifolia</i> .	11
FIGURA II.7. Taxol. Metabolito aislado de <i>Taxus brevifolia</i> .	12
FIGURA II.8. Compuestos aislados de plantas, con importancia en la medicina.	12
FIGURA II.9. Metabolismo del ácido araquidónico (A.A).	17
FIGURA II.10. Síntesis de ON.	18
FIGURA II.11. <i>Amphipterygium Adstringens Schiede</i> (Cuachalalate).	25
FIGURA II.12. Triterpenos aislados de <i>A. Adstringens</i> .	27
FIGURA II.13. Conformaciones de la ciclación del Escualeno.	29
FIGURA II.14. Compuestos triterpénicos mayoritarios de <i>A. Adstringens</i> (Cuachalalate).	31
FIGURA II.15. Estructura química del TPA.	33
FIGURA II.16. Mecanismos involucrados en el edema inducido por TPA.	34
FIGURA V. 1. Aislamiento de los ácidos (1) y (2) .	41
FIGURA V. 2. Ácido masticadienónico (1) .	45
FIGURA V. 3. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) .	46
FIGURA V. 4. 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3) .	47
FIGURA V. 5. 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4) .	48
FIGURA V. 6. 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5) .	49
FIGURA V. 7. 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6) .	50
FIGURA V. 8. 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7) .	51

FIGURA V. 9. Ensayo de inhibición de proliferación de células cancerosas humanas.	53
FIGURA VI.1. Espectro de IR de (1) .	56
FIGURA VI.2. Espectro de masas de (1) .	56
FIGURA VI.3. Espectro de RMN ¹ H de (1) .	57
FIGURA VI.4. Espectro de RMN ¹³ C de (1) .	58
FIGURA VI.5. Ácido masticadienónico (1) .	59
FIGURA VI.6. Espectro de IR de (2) .	60
FIGURA VI.7. Espectro de masas de (2) .	60
FIGURA VI.8. Espectro de RMN ¹ H de (2) .	61
FIGURA VI.9. Espectro de RMN ¹³ C de (2) .	62
FIGURA VI.10. Ácido 3α-hidroximasticadienónico (2) .	63
FIGURA VI.11. Esquema general de modificaciones estructurales al ácido (2) .	64
FIGURA VI.12. Metilación del ácido 3α-hidroximasticadienónico (2) , para la obtención del 3α-hidroximasticadienolato de metilo (3) .	65
FIGURA VI.13. Espectro de RMN ¹³ C de (3) .	66
FIGURA VI.14. Espectro de RMN ¹ H de (3) .	67
FIGURA VI.15. 3α-hidroximasticadienolato de metilo (3) .	67
FIGURA VI.16. Obtención de 3α-hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5) .	68
FIGURA VI.17. Espectro de masas de (5) .	68
FIGURA VI.18. Espectro de RMN ¹ H de (5) .	69
FIGURA VI.19. Espectro de RMN ¹³ C de (5) .	70
FIGURA VI.20. 3α-hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5) .	71
FIGURA VI.21. Obtención de 3α-hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4) .	72
FIGURA VI.22. Espectro de RMN ¹ H de (4) .	73
FIGURA VI.23. Espectro de RMN ¹³ C de (4) .	73
FIGURA VI.24. 3α-hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4) .	74

FIGURA VI.25. Acetilación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) , para la obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6) .	75
FIGURA VI.26. Espectro de RMN ^1H de (6) .	75
FIGURA VI.27. Espectro de RMN ^{13}C de (6) .	76
FIGURA VI.28. DEPT de (6) .	76
FIGURA VI.29. Ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6) .	77
FIGURA VI.30. Acetilación de 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3) , para la obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7) .	78
FIGURA VI.31. Espectro de IR de (7) .	78
FIGURA VI.32. Espectro de masas de (7) .	79
FIGURA VI.33. Espectro de RMN ^1H de (7) .	79
FIGURA VI.34. Espectro de RMN ^{13}C de (7)	80
FIGURA VI.35. 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7) .	81
FIGURA VI.36. Imagen del ácido 3 α -hidroximasticadienónico obtenida por difracción de rayos x. (Phytochemistry, vol. 39, no. 3, pp. 537-547, 1995).	86
FIGURA VI.37. Imagen del ácido 3 α -hidroximasticadienónico obtenida por cálculos en MM2.	86
FIGURA VII.1. Esquema general de modificaciones estructurales al ácido (2) .	90

1 Introducción.

1.1 Introducción.

En este capítulo se describe:

- A la Medicina tradicional como sistema sanitario, cuyo objetivo es la procuración de la salud, mediante el uso principalmente de especies vegetales.
- El cáncer como un problema de salud a nivel mundial, el cual debe de ser atendido con urgencia.
- Las aportaciones de los productos naturales en el descubrimiento y desarrollo de fármacos anticancerosos, entre ellos los alcaloides vinblastina y vincristina aislados de *Catharanthus roseus*, etc.
- La relación que existe entre los procesos inflamatorios y el desarrollo de cáncer.
- El interés científico de la búsqueda de fármacos antiinflamatorios y anticancerosos en plantas para las cuales la tradición indica acciones etnomédicas o terapéuticas.

1.2 Introducción.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define la medicina tradicional como diversas prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias, que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, cuyo objetivo es prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades, para la manutención de la salud (OMS, 2002-2005).

De acuerdo con ésta organización, aproximadamente tres cuartas partes de la población mundial recurre a los remedios tradicionales, para la procuración de la salud, principalmente mediante el uso de especies vegetales (OMS, 2002-2005).

A nivel mundial la medicina tradicional crece rápidamente, constituyendo un sistema sanitario de gran importancia económica, debido a su fácil accesibilidad. (OMS, 2002-2005).

A lo largo de los más de 500 años en el que el mundo tiene noticias de la naturaleza maravillosa de América y de México en particular, quizá lo que más ha llamado la atención de propios y extraños ha sido su flora y fauna.

Específicamente la flora mexicana destaca por su biodiversidad vegetal, donde las plantas son un recurso cuyos valores medicinales, alimenticios y ornamentales, necesitan ser conocidos para conservarlos y, en su caso explotarlos de manera racional.

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

Sin embargo, a la mayoría de las especies utilizadas en la herbolaria no se les han realizado estudios farmacológicos o químicos de manera sistemática. Por lo tanto, para una verdadera contribución en la búsqueda de posibles fármacos anticancerosos, de origen vegetal, es necesario realizar estudios sistemáticos sobre las actividades biológicas y reactividad química de los diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes, en las especies utilizadas en la medicina tradicional.

A nivel mundial así como en México, el cáncer constituye un grave problema de salud. Aunque existen varios fármacos anticancerosos en la clínica, el desarrollo de resistencia de las células cancerosas a los diferentes tipos de fármacos y la poca selectividad de algunos, hace imperiosa la necesidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos anticancerosos.

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 *Catharanthus roseus*, o los derivados semisintéticos irinotecan y etoposido

provenientes de la podofilotoxina, 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 la permeabilidad vascular, la salida de fluidos y células, 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).

Sin embargo, en procesos inflamatorios, donde células con daño en el DNA que continúan en proliferación, sin lograr la remoción del agente causal, ubicadas en micro ambientes ricos en células inflamatorias y factores de crecimiento, pueden impulsar la instalación y crecimiento tumoral (Katsung, 1999; Coussens y Werb., 2002).

Recientemente se ha generado una vasta información que indica que los procesos inflamatorios crónicos son contribuyentes o quizás la causa de gran variedad de procesos cancerosos (Nathan, 2002).

El interés científico por la búsqueda de fármacos antiinflamatorios y anticancerosos en especies con tradición etnobotánica como remedios medicinales, se ha visto incrementado en los últimos años. Esto abre una amplia ventana de investigación, razón por la cual es más frecuente la incorporación de programas de investigación sobre las llamadas plantas medicinales.

Es en este contexto es que nuestro grupo de trabajo ha tomado gran interés sobre el estudio de la especie medicinal *Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht* (cuachalalate), de uso etnomédico para el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estomago, gastritis, inflamación estomacal y algunas lesiones cutáneas (Olivera *et al.*, 1999).

Es conocido que los triterpenos, metabolitos secundarios con treinta átomos de carbono, presentan una gran variedad de actividades biológicas, entre ellas están la antiinflamatoria (Safayhi *et al.*, 1997), antimicrobiana (Cantrell *et al.*, 1996), citotóxica (Gan *et al.*, 1998) e inmunomoduladora (Calis *et al.*, 1997), entre otras.

Nuestros estudios han demostrado que los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico son los principales triterpenos de tipo tirucalano sintetizados por *A. adstringens*, los cuales presentan actividad antiinflamatoria y antiproliferativa en contra de líneas de cáncer humano.

En este trabajo se dan a conocer los resultados de las evaluaciones de actividad antiproliferativa contra algunas líneas de cáncer humano de cinco derivados químicos del ácido 3 α -hidroximasticadienónico.

2 Marco Teórico.

2.1 Marco teórico.

En este capítulo se define:

El Cáncer de acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society).

- La clasificación de los tipos de cáncer de acuerdo al tipo de tejido donde el tumor emerge.
- Los factores relacionados con la aparición de cáncer.
- El tratamiento del cáncer.
- El cáncer como problema de salud

Inflamación.

- La inflamación aguda.
- Inflamación crónica.
- Los mediadores moleculares de la inflamación.
- Terapéutica de la inflamación.
- Relación cáncer inflamación.

Metabolito primario y secundario.

La especie medicinal *Amphipterygium adstringens* schiede ex schlecht (cuachalalate).

- Los usos etnomédicos.
- Estudios fitoquímicos.
- Estudios farmacológicos.

Triterpenos.

- Biogénesis.
- Actividad biológica
- Ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico.

Métodos para evaluar la actividad biológica.

- Métodos in vivo.
- Métodos in vitro.

2.2 Cáncer.

De acuerdo con la Sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society), éste se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento descontrolado de células anormales, así como su dispersión a través del organismo (World Health Organization, 2008).

Por lo tanto, se puede entender el cáncer como un proceso de crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales, la cual establece sus propias normas de crecimiento, no responden a diferenciación ni coordinación.

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

Una neoplasia, es una masa anormal de tejido que no está coordinado por los mecanismos reguladores normales y cuyo crecimiento excede al tejido normal. De manera formal, una neoplasia no constituye un cáncer hasta que presenta metástasis.

Virchow mencionó que, toda célula proviene de otra célula, las enfermedades no surgen en los órganos o tejidos en general, si no, de forma primaria en células individuales (Virchow et al., 1859), es decir que todo cáncer proviene de un proceso celular. Estos procesos celulares producen células anormales caracterizadas por su multiplicación sin control, invaden los tejidos próximos y se diseminan hacia órganos distantes reproduciendo allí el tumor, proceso denominado metástasis. Las neoplasias malignas tienen la capacidad de sufrir metástasis y formar tumores secundarios. Por tanto un tumor maligno siempre se considera como cáncer.

La transformación maligna de las células normales consiste en la adquisición progresiva de una serie de cambios genéticos específicos, que actúan desobedeciendo a los fuertes mecanismos antitumorales, produciendo el desarrollo de: Angiogenesis (Crecimiento de vasos sanguíneos, cuyo objetivo es obtención de alimento), crecimiento acelerado (incremento de la división celular, que hace que las células tumorales se encuentren en un ciclo celular incrementado), apoptosis lenta (las células no entran en apoptosis, esta se debe de inducir), Inmunidad(escapa del sistema inmunológico, macrófagos asociados a tumores), adherencia celular (la capacidad que tienen las células de unirse a elementos del medio externo o a otras células), reparación del DNA (la célula no envejece) (Gibbs, 2000).

2.2.1 Clasificación de los tipos de Cáncer.

Una clasificación general se relaciona al tipo de tejido donde un tumor emerge, los tres subtipos principales son: los sarcomas, los carcinomas y las leucemias.

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

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

3.- Leucemias y linfomas, incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Este tipo de enfermedades producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y existe una sobreproducción de células blancas inmaduras.

2.2.2 Factores relacionados con la aparición de Cáncer.

De acuerdo con la OMS dentro de los factores principales asociados al cáncer encontramos:

La herencia.

La historia familiar puede identificar personas con un riesgo aumentado de cáncer. En algunos casos, exámenes de ADN pueden ser utilizados para confirmar una mutación específica como causa de este riesgo heredado.

Los agentes carcinógenos.

Carcinógenos físicos: la luz ultravioleta y la radiación ionizante.

Carcinógenos químicos: el asbesto y el humo del tabaco.

Carcinógenos biológicos: las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

La edad.

El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer. La incidencia de cáncer aumenta con la edad, muy probablemente a que con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo para el desarrollo de cáncer, combinado con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad.

Factores ambientales.

La ingesta insuficiente de frutas y hortalizas, las infecciones por virus como el de la hepatitis B, hepatitis C y por virus del papiloma humano, son los principales factores de riesgo de cáncer en los países de ingresos bajos y medianos.

En los países de ingresos elevados, el consumo de tabaco, alcohol y el exceso de peso son causas muy importantes para el desarrollo de cáncer.

2.2.3 El cáncer como problema de salud pública.

De acuerdo con estudios estadísticos de la OMS, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Aproximadamente el 13% (7,9 millones) de las defunciones mundiales ocurridas en 2007, fueron debidas a padecimientos asociados con el cáncer. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 14 millones en 2030.

En México, de acuerdo con los registros de la secretaria de salud, desde 1990, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte. Con la información disponible en el informe realizado por INEGI en 2009, ver Tabla II.1, en los años de 2004 a 2008 se observa que existe un incremento año con año en los casos de cáncer.

Tabla II.1. Informe de casos de cáncer en México. (INEGI 2009).

Año	Casos reportados (miles)	% Hombres	%Mujeres
2004	135,522	43.7	56.3
2005	137,455	42.6	57.4
2006	145,144	43.5	56.5
2007	153,144	42.4	57.6
2008	158,445	42.1	57.9

De acuerdo con el INEGI 2009, ver Tabla II.1, los mayores porcentajes de casos de cáncer se encuentran en las mujeres, teniendo una distribución porcentual de defunciones por tumores malignos principalmente en el cáncer de mama, cuello de útero, estómago e hígado. Entre los hombres, el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón, es la principal causa de muerte, asociados principalmente al tabaquismo, ver Figura II.1.

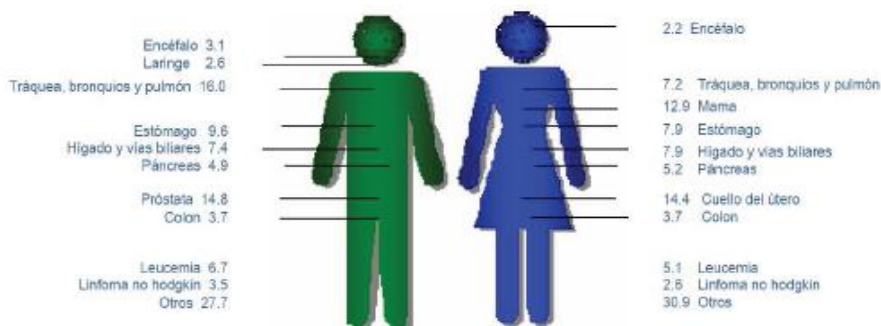


Figura II.1. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo. Tomada de INEGI, 2007-2008.

Sin duda, el cáncer constituye un problema de salud pública a nivel mundial, el cual debe de ser atendido con urgencia, mediante programas de asistencia médica, prevención e investigación.

2.2.4 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 procedimientos quirúrgicos con regímenes de radioterapia y de quimioterapia.

Quimioterapia.

Existen 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, 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 los años de 1940-1950, con la introducción de las mostazas nitrogenadas, las cuales fueron sintetizadas como armas químicas. Las autopsias realizadas a los soldados muertos por exposición al llamado gas mostaza, indicaban que estas víctimas presentaban una hipoplasia linfoide generalizada así como mielosupresión.

Con el fin de evaluar el potencial terapéutico de esta serie de toxinas desarrolladas para la guerra química, 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 una 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 Lindsborg para tratar a un paciente que sufría de un linfoma del tipo no-Hodking con la mecloroetamina, una mostaza nitrogenada. Con el tratamiento 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.

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. 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), ver Tabla II.2.

Algunos de estos fármacos, curan a la mayoría de los pacientes con cáncer testicular, leucemia linfocítica aguda y diversos tipos de linfomas. Adicionalmente, el tratamiento combinado de fármacos antineoplásicos, mejora la respuesta farmacológica en pacientes con cáncer de ovario ó con leucemia mielocítica aguda; aunque, la tasa de curación alcanza solo del 10% al 20%.

Desafortunadamente, otros tipos de cáncer son menos susceptibles al tratamiento quimioterapéutico.

Uno de los usos terapéuticos más frecuentes de los fármacos antineoplásicos es su empleo como adyuvantes. Para ello, los fármacos se administran antes (neoadyuvante) del tratamiento definitivo (cirugía ó radioterapia).

Tabla II.2. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen (Moore y Goldenberg en Kalant y Roshlau 1998).

Agentes alquilantes y de unión a ADN.

Mecloroetamida.
Melfalan.
Ciclofosfamida.
Clorambucil.
Busulfan.
6-mercaptopurina.
Nitrosoureas.
2- clordesoxiadenosina.
Cisplatino y caboplatino.
Dacarbacida y Procarbacida.
Mitomicina C.

Antimetabolitos.

Metotrexato.
5-Fluorouracilo.

Antibióticos.

Actinomicina D.
Doxorrubicina.
Epirubicina.

Compuestos de origen natural.

Vincristina, Vinblastina.
Etopósido, Tenipósido, Paclitaxel.
Derivados de la Camptotecina.

Diversos.

L-Asparaginasa.
Hidroxiureas.
Agentes progestacionales.
Agentes antiandrógenos.

Hormonas.

Glucocorticoides.
Tamoxifeno.

2.2.5 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 de bajo desarrollo. La OMS estima que aproximadamente el 80% de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Parra, 2006).

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 la especie de interés.

En 1982, se publicaron aproximadamente 3000 especies de plantas que etnomédicamente se habían referido como anticancerosas (Hartwell, 1982). Uno de los ejemplos más importantes es el de *Catharanthus roseus* L, ver Figura II.2. El estudio químico de esta especie permitió el aislamiento de cuatro alcaloides diméricos activos: vinblastina, vincristina, vinleurosina y vinrosina, ver Figura II.3. Los dos primeros se convirtieron en agentes clínicamente importantes para el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer testicular (Cragg y Newman 2005; Calabresi et al, 1996).



Figura II.2. *Catharanthus roseus* L.

Tomada de (<http://personal.iddei.es/plantas/vinca.htm>).

Vinblastina, R= CH₃
Vincristina, R= CHO

Figura II.3. Metabolitos aislados de *Catharanthus roseus* L.

Otro ejemplo lo constituye la mandrágora, *Podophyllum peltatum*, ver Figura II.4, a partir de esta planta, se aisló la podofilotoxina, de la cual se obtuvieron dos glucósidos semisintéticos, el etopósido y el tenipósido, ver Figura II.5, los cuales tienen aplicación en el cáncer testicular y en el carcinoma de células de pulmón.



Figura II.4. *Podophyllum peltatum*.

Tomada de (<http://personal.iddei.es/plantas/.htm>).

Figura II.5. Metabolitos aislados de *Podophyllum peltatum*.

En la década de los años 60 se realizó una evaluación masiva de las propiedades citotóxicas de cientos de extractos de especies vegetales por el Instituto del Cáncer de Estados Unidos (USA). Como un resultado de esta búsqueda, se descubrió las propiedades citotóxicas del tejo del pacífico, *Taxus brevifolia*, ver Figura II.6. Estudios posteriores permitieron el aislamiento y elucidación estructural del taxol, ver Figura II.7, un diterpeno responsable de las propiedades citotóxicas de la especie (Chabner y Roberts, 2005; Cragg y Newman, 2005; Mann, 2002).



Figura II.6. *Taxus brevifolia*.

Tomada de (www.cfr.washington.edu/confersas.htm)

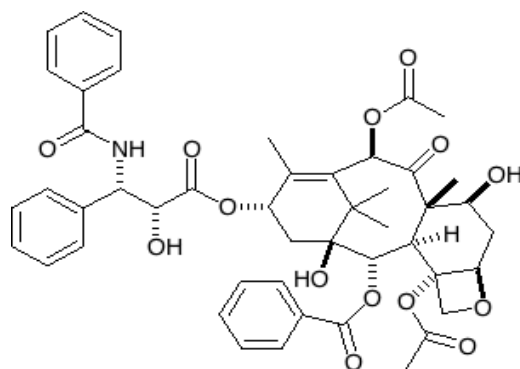


Figura II.7. Taxol. Metabolito aislado de *Taxus brevifolia*.

Otros compuestos con importancia son la camptotecina y sus derivados, el irinotecano y el topotecano. Así también la homoharringtonina, la elipticina y su derivado, el eliptinium (Cragg y Newman, 2005), ver Figura II.8.

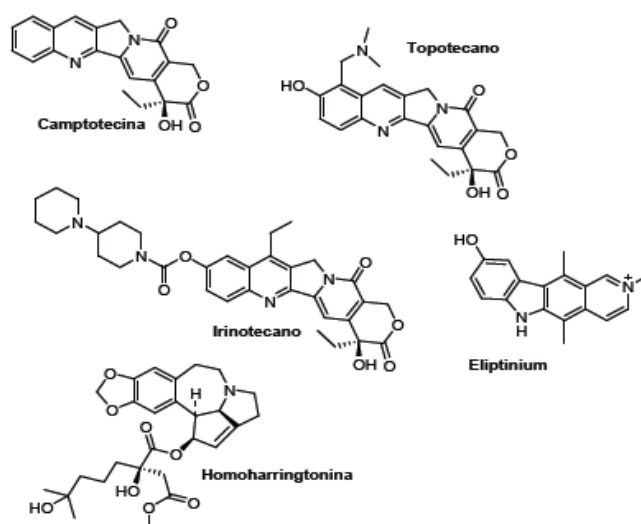


Figura II.8. Compuestos aislados de plantas, con importancia en la medicina.

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 estas 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 (Gordón et al, 2005).

Por lo anterior, es fácil entender, que las plantas y microorganismos son una fuente invaluable de sustancias activas (Newman et al, 2003).

2.3 Inflamación.

La inflamación es una respuesta fisiológica defensiva inespecífica y de naturaleza vascular, la cual se desarrolla en consecuencia de estímulos de naturaleza diversa (externos e internos). Externos: traumatismos mecánicos y productos químicos. Internos: lesiones provocadas por procesos isquémicos, patológicos (virus, parásitos y bacterias), autoinmunes, entre otras.

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acumulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. Virchow sumo un signo más, refiriendo la pérdida de la función tisular (Nathan, 2002).

El proceso de inflamación, como parte de un mecanismo de defensa inmune, es normal y, en consecuencia benéfico para el organismo. No obstante, en algunas condiciones se prolonga en forma indebida dando lugar a daño tisular y manifestaciones clínicas muy importantes (Nathan, 2002).

La inflamación se localiza generalmente en tejido conectivo, en donde ocurre la degeneración de las paredes de los vasos sanguíneos y se produce un incremento en la permeabilidad y flujo sanguíneo. Estos eventos conducen a una extensa salida de plasma y células, que luego penetran en el espacio intersticial y migran hacia la zona dañada.

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica.

2.3.1 Inflamación aguda.

La inflamación aguda se caracteriza por ser inmediata y de duración breve, donde predominan los procesos vasculares (vasodilatación, aumento de flujo y presión sanguínea), cuya función es contribuir con la eliminación de células muertas, la neutralización de infecciones locales y la promoción de la acción del sistema inmune.

La inflamación inicia con fenómenos vasculares y de reclutamiento celular. Durante las primeras horas (6 a 24 h), los linfocitos polimorfonucleares (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).

Por su parte, las citocinas controlan los mecanismos de proliferación, diferenciación y activación de las células que las producen, como linfocitos y macrófagos activados. En especial, las citocinas como el factor de necrosis tumoral tipo alfa (FNT- α) y la interleucina 1 tipo beta (IL-1 β) activan las vías de señalización que regulan la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio vascular. Estas citocinas de acción quimiotáctica facilitan la salida de leucocitos y su desplazamiento hacia el tejido dañado (Shanley et al., 1995).

2.3.2 Mediadores moleculares de la inflamación aguda.

La inflamación 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 moleculares de la inflamación comprenden las proteasas plasmáticas, incluidas dentro de los sistemas de complemento, los mediadores lipídicos, como las prostaglandinas, los leucotrienos y el factor activador de plaquetas; los neuropéptidos y las aminas vasoactivas; las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno; y las citocinas (Espinós et al., 2004).

Si estos mecanismos inflamatorios no logran devolver al tejido lesionado su estado original y no es posible la reparación del tejido, la situación evoluciona hasta un estado de inflamación crónica.

Son muchas 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- κ B).

El factor NF- κ B se encuentra en todas las células del organismo, inactivo en el citoplasma, unido a la molécula I κ B. La activación del péptido ocurre después de la fosforilización de I κ B, la cual se produce por estímulos diversos, como radicales libres, mediadores proinflamatorios, carcinógenos, promotores de tumores, endotoxinas, radiación gamma, luz ultravioleta y rayos X. Una vez activado se dirige hacia el núcleo y se une al ácido desoxirribonucleico (ADN).

El NF- κ B promueve la expresión de moléculas proinflamatorias, como FNT- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, PAF (factor activador de plaquetas), ON (óxido nítrico), PGs y LTs (Hayden y Ghosh, 2004).

El NF- κ B participa en la expresión de aproximadamente 400 genes, quienes se involucran en la supresión de la apoptosis, la inducción de eventos celulares como transformación, proliferación, invasión y metástasis, la inflamación, la replicación viral, la angiogénesis, el estrés oxidativo y la formación de osteoclastos (Aggarwal y Shishodia, 2004).

2.3.3 Derivados del ácido araquidónico.

Los eicosanoides son moléculas poliinsaturadas de 20 átomos de carbono, las cuales provienen del ácido araquidónico (AA). Dentro de este grupo se incluyen las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs), las prostaciclina, los leucotrienos (LTs) y las lipoxinas, ver Figura II.9.

El AA se almacena en la membrana como glicerofosfolípido y se libera por la acción de las fosfolipasas A2 (PLA2) y C (PLC) (Tithof et al., 1998).

Hasta el momento se han encontrado tres isoformas de la PLA2; la de secreción (PLA2s), la independiente de calcio (PLA2i) y, la citosólica dependiente de calcio (PLA2c). Los subtipos PLA2c y PLA2i liberan el AA intracelular; en tanto que la PLA2s actúa a nivel extracelular. Mientras las isoformas de secreción y la citosólica se involucran en la inflamación; la PLA2i se encarga de la homeostasis celular y reconstrucción de las membranas. Se sabe que diferentes formas de PLA2 pueden generar cáncer; no obstante, los mecanismos aún no se conocen con precisión (Laye y Gill, 2003).

Las características estructurales del AA y, en particular, la presencia de dobles enlaces, determinan su reactividad con el oxígeno. Este evento puede ser espontáneo o enzimático. La vía espontánea involucra la intervención de radicales libres, que generan los isoprostanos, los cuales participan en el estrés oxidativo (Montuschi et al., 2004).

La vía enzimática comprende tres oxigenasas: ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LO) y epoxigenasa o citocromo P450. Los productos correspondientes son las PGs y los TXs; los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) y los LTs; y, los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), isómeros de los HETEs. Por último, el AA intacto se reincorpora a la membrana mediante la acción de la acetiltransferasa de lisofosfatidilo (Smith et al., 2000; Titos, 2004).

2.3.4 Prostaglandinas.

Las prostaglandinas son los autacoides más abundantes, los cuales se encuentran prácticamente en todos los tejidos y fluidos del organismo.

Las ciclooxigenasas (COX) son las enzimas responsables de la producción de prostaglandinas. Se ubican en las membranas microsomal y nuclear. Las (COX) catalizan tanto la ciclación del AA a prostaglandina G2 (PGG2), como su conversión inmediata en prostaglandina H2 (PGH2). Este endoperóxido es sustrato de varias isomerasas específicas (Fung y Kirschenbaum, 1999). La sintasa de prostaciclina convierte a PGH2 en prostaciclina (PGI2), la cual participa en la vasodilatación y en la inhibición de la agregación plaquetaria. En tanto la sintasa de tromboxano transforma a PGH2 en tromboxano. Así que posee acciones opuestas a las de PGI2.

También, a partir de la PGH2 y por la acción de tres sintetas, se originan las prostaglandinas PGD2, PGE2 y PGF2 α . En la siguiente tabla se hace la comparación de los distintos tipos de prostaglandinas y sus distintas funciones, ver Tabla II.3:

**Tabla II.3. Comparación de los tipos de prostaglandinas.
(Tomada de Nellson, 2002).**

Tipo	Receptor	Función
PGI2	DP2	Vasodilatacion.
PGE2	EP1	Broncodilatador. Contracción del músculo liso.
	EP2	Broncodilatador. Vasodilatacion.
	EP3	Contracción del músculo liso del estomago.
PGF2α	FP	Vasoconstricción.

Existen dos isoformas de ciclooxigenasa COX-1 y 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 PGI2. Las prostaglandinas derivadas de COX-1 controlan el flujo y la distribución sanguínea renal, la reabsorción de sodio y agua y la liberación de renina (Malgor y Valsecia, 2000; Smith et al., 2000; Espinós et al., 2004).

La COX-2 es una enzima inducible, originada en la inflamación.

La COX-2 puede ser inducida por varios factores: la interleucina 1 (IL-1), el factor de crecimiento de fibroblastos b (bFGF), el factor de crecimiento de transformación (TGF), el factor de necrosis tumoral (TNF), los lipopolisacáridos (LPS) y la activación del factor de transcripción nuclear (NF κ B) mediante especies reactivas de oxígeno.

La expresión de COX-2 se inhibe por citocinas antiinflamatorias y fármacos esteroidales (Malgor y Valsecia, 2000; Espinós et al., 2004).

Desde hace años se ha visto que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas es una opción terapéutica antiinflamatoria muy interesante (Espinós et al., 2004).

2.3.5 Leucotrienos.

Reciben este nombre porque se forman en los leucocitos, en su molécula, de 20 átomos de carbono. Al igual que las prostaglandinas, derivan del AA, por la acción enzimática de la 5-lipooxigenasa (Espinós et al., 2004).

Las lipooxigenasas (LO) son enzimas citosólicas que incorporan una molécula de oxígeno en la estructura del AA. Dependiendo de la posición en la cual producen la oxigenación, existen tres formas de LOs: 5-LO, 12-LO y 15-LO. Los productos correspondientes son los hidroperóxidos (HPETEs): 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE (Titos, 2004).

La 5-LO es la enzima más importante, se localiza principalmente en los neutrófilos, los eosinófilos, los macrófagos y los mastocitos. El 5-HPETE es sustrato de 5-LO y, se transforma en un epóxido inestable y muy reactivo, el leucotrieno A₄ (LTA₄). Este intermediario puede convertirse en LTB₄ el cual estimula la quimiotaxis, adhesión celular, producción del ión superóxido y liberación de enzimas hidrolíticas de neutrófilos. Los LTs C₄, D₄ y E₄ se conocen como cisteinil-LTs y tienen acción en la constricción de vasos sanguíneos (Malgor y Valsecia, 2000; Espinós et al., 2004).

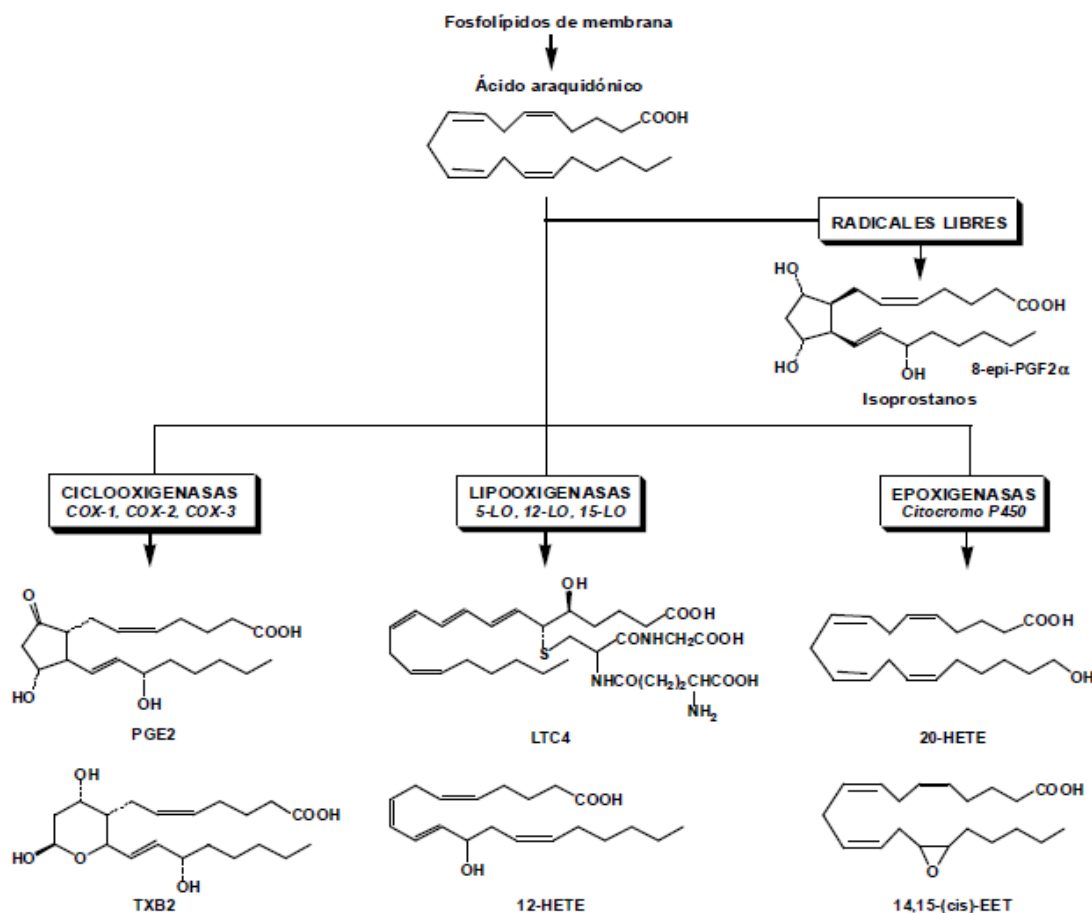


Figura II.9. Metabolismo del ácido araquidónico (A.A), Tomada de Titos 2004.

2.3.6 Óxido nítrico.

El óxido nítrico (ON) es un radical libre el cual 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; Devis et al., 2001).

El (ON) se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina a través de una reacción enzimática, catalizada por las sintasas de óxido nítrico (ONS), la cual requiere oxígeno y que produce (ON) y L-citrulina, ver Figura II.10.

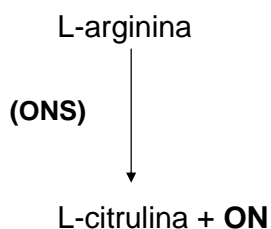


Figura II.10. Síntesis de ON.

Se han identificado tres isoformas de (ONS); dos constitutivas: la endotelial (ONSe) y la neuronal (ONS_n) y una inducible (ONSi).

Las formas constitutivas (ONSe y ONS_n) se encuentran en células endoteliales y en neuronas, respectivamente. Estos subtipos se encargan de la producción basal del (ON) responsable de la integridad endotelial, la función vascular normal y la comunicación interneuronal. En tanto, la ONSi se expresa en procesos de inflamación por macrófagos y fagocitos y, se inhibe por los glucocorticoides (Moncada et al., 1991). El ON 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 (Wink y Mitchell, 1998; Wu, 2004), ver Tabla II.4.

Las cantidades de ON producidas en procesos inflamatorios por la ONSi son mucho mayores que las producidas en las formas constitutivas (ONSe y ONS_n). El exceso de ON producido contribuye a la producción de peroxinitrilo, un poderoso oxidante que daña proteínas, lípidos y ADN. En enfermedades neurolódegenerativas como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer hay evidencias de un aumento de la formación de ON y peroxinitrito, lo que abre una línea de investigación centrada en la búsqueda de tratamientos con sustancias que regulen la producción de ON. Si bien estudios preclínicos con inhibidores ONS apuntan a beneficios superiores frente al daño neurológico que los tratamientos existentes (West et al., 2002), el progreso en la utilización de fármacos que modifiquen la actividad ONS con finalidades terapéuticas requiere más trabajos para concretar la participación del ON en los procesos neurodegenerativos y sus potenciales propiedades neuroprotectoras.

**Tabla II.4. Aspectos diferenciales de la ONS constitutiva e inducible.
(Tomada de Moncada, 2002).**

	Constitutiva endotelial (NOSe)	Constitutiva neuronal (NOSn)	Inducible (NOSi)
Localización.	Citosólica/membrana	Citosólica	Citosólica
Dependencia de Calcio ²⁺.	Sí.	Sí.	No.
Expresión en tejidos.	Células del endotelio vascular, plaquetas, células renales, osteoblastos y osteoclastos.	Sistema nervioso central (cerebelo, hipocampo y lóbulos olfatorios). Músculo esquelético humano.	Macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos.
Estímulo.	Vasodilatadores (Acetilcolina, adenosina, bradicinina,) y calcio.	Incremento en la concentración intraneuronal de Calcio Citoplasmático.	Procesos de inflamación o infección.
Volumen de producción de óxido nítrico.	Producción puntual de pequeñas cantidades (pmol).	Producción puntual de pequeñas cantidades (pmol).	Producción continuada de grandes cantidades (µmol).
Papel propuesto para el óxido Nítrico.	Regulación del tono vascular y de la función plaquetaria.	Neurotransmisor central y periférico.	Mediador de la respuesta inmunitaria Inespecífica.

2.3.7 Inflamación crónica.

La inflamación crónica es una respuesta prolongada, con evidentes signos de inflamación activa y notable destrucción tisular, la cual puede durar semanas, meses o incluso años. Se caracteriza por la presencia constante de linfocitos, monocitos, neutrofilos, fibroplastos, células plasmáticas, proliferación de pequeños vasos sanguíneos, incremento de tejido conjuntivo y destrucción tisular.

La inflamación crónica puede ser consecuencia de:

- Infección persistente: tuberculosis, sífilis, micosis.
- Exposiciones prolongadas a materiales inertes no degradables, como sílice, asbesto.
- Enfermedades autoinmunitarias: lupus eritematoso, artritis reumatoide.
- La evolución persistente e incontrolada de la inflamación.

Por lo tanto, la regulación de los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación resulta de gran interés terapéutico (Nathan, 2002).

2.4 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 las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, quimiocinas y otras. Sin embargo, la modulación de estas moléculas no ha solucionado el problema.

El descubrimiento de ciertas citocinas de acción antiinflamatoria (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 A2, ciclooxigenasa, lipooxigenasa y sintasa de óxido nítrico, enzimas activas en la participación en la inflamación. Los estudios acerca de las isoformas inducibles de la COX y la ONS han ampliado las expectativas de encontrar fármacos antiinflamatorios eficaces.

Aunque el control terapéutico de la inflamación no se ha logrado por completo, aún es un reto por conquistar, hoy en día en la clínica se utilizan principalmente los fármacos antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales (AINES) para su tratamiento. (Espinós et al., 2004).

2.4.1 Fármacos antiinflamatorios esteroidales.

Los glucocorticoides (GCs) representan un grupo de sustancias esteroidales de acción antiinflamatoria endógena. Los GCs son hormonas de acción endocrina producidas en la corteza suprarrenal. Estos se encargan del mantenimiento de la glucemia y la tensión arterial normal, asimismo 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 (o lipocortina-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 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 (Espinós et al., 2004).

2.4.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

Dependiendo de su selectividad por las dos isoformas de COX, los AINES se han clasificado en 4 grupos:

- a) Selectivos a COX-1, se incluye solamente la aspirina, en dosis bajas.
- b) No selectivos a COX, abarcan los fármacos AINES clásicos, como ibuprofeno, indometacina, piroxicam, entre otros.
- c) Selectivos moderadamente a COX-2, como salicilatos y meloxicam.
- d) Muy selectivos a COX-2, como celecoxib y rofecoxib.

Los AINES son fármacos ampliamente utilizados en la terapéutica general, debido a sus acciones farmacológicas, ver Tabla II.5.

**Tabla II.5. Acciones farmacológicas de los AINES.
(Tomada de Katzung, Bertram, 2007).**

Acción analgésica.	Alivian el dolor. En combinación con opioides alivian el dolor postoperatorio y pueden reducir su dosis.
Acción antitérmica.	Tienen efecto antipirético por inhibición de la producción de prostaglandinas e interferencia en los mecanismos de regulación de la temperatura.
Acción antiinflamatoria.	Reducen los componentes de la respuesta inflamatoria en los que los productos de la COX desempeñan un papel importante como es: la vasodilatación, el edema y el dolor.

MECANISMO DE ACCION.

El mecanismo de acción principal de los AINES clásicos consiste en la inhibición de la COX. Sin embargo, se han asociado con complicaciones como la enfermedad ulcerosa péptica, la hemorragia digestiva y la insuficiencia renal (Espinós et al., 2004).

2.5 Relación cáncer inflamación.

La percepción que indica que procesos de inflamación crónica, puede causar cáncer no es nueva. En 1863 Virchow, hipotetizo que el origen del cáncer se encuentra en sitios de inflamación crónica, su hipótesis se fundamento, principalmente, en la observación que algunos irritantes, aunado a un daño tisular y un proceso inflamatorio causaban un incremento en la proliferación celular (Nathan, 2002).

Hoy en día se conoce que la proliferación celular sostenida, en un microambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, ciertamente potencian y promueven riesgos neoplásicos (Pollard, 2004; Coussens y Werb, 2002).

De manera natural, durante un daño tisular asociado a una herida, la proliferación celular se aumenta mientras el tejido se regenera. La proliferación y la inflamación asociada al daño, desaparecen cuando el agente dañino es removido y la reparación tisular es completa. En contraste, en procesos inflamatorios, donde células con daño en el DNA que continúan en proliferación, sin lograr la remoción del agente causal, ubicadas en micro ambientes ricos en células inflamatorias y factores de crecimiento, pueden impulsar la instalación y crecimiento tumoral (Katsung, 1999; Coussens y Werb., 2002).

Recientemente se ha generado una vasta información que indica a los procesos inflamatorios como contribuyentes o quizá la causa de gran variedad de procesos cancerosos (Nathan, 2002), ver Tabla II.6. Actualmente se conoce que por lo menos el 15% de los tumores, a nivel mundial, tienen su origen en procesos infecciosos (Boyle et al., 2008). Generalmente los patógenos, causan una inflamación persistente. Quizás, los casos más documentados son los papeles desempeñados por el *Helicobacter pylori* en el cáncer gástrico (Vemura et al, 2001), los virus del papiloma humano en el cáncer cervical (Bernal et al., 2002) y los esquistomas en el cáncer de vejiga y uretra (Villar et al., 200).

**Tabla II.6. Inflamaciones crónicas asociadas a neoplasias.
(Tomada de Boyle, 2008).**

Condiciones patológicas.	Neoplasia asociada.	Posible agentes.
Inflamación de la piel.	Melanoma.	
Bronquitis.	Carcinoma de pulmón.	Silica, asbestos.
Inflamación de la vejiga.	Carcinoma de vejiga.	
Inflamación intestinal.	Carcinoma col-rectal.	
Inflamación del páncreas.	Carcinoma de páncreas.	Alcoholismo.
Reflujo esofágico.	Carcinoma de esófago.	Ácidos gástricos.
Inflamación de la glándula salival.	Carcinoma de glándula salival.	

En conjunto, estos datos indican que la inflamación crea un micro ambiente que promueve una transformación tisular, produciendo neoplasias y potenciando la instalación de procesos cancerosos (Pollard, 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, actualmente existe una tendencia en buscar una correlación entre las propiedades antiinflamatorias y de inhibición de proliferación celular de células cancerosas en extractos de plantas nativas de México, así, como de metabolitos secundarios responsables de estas actividades y algunos derivados químicos de estos.

2.6 Metabolito primario y secundario.

Las plantas son organismos autótrofos, producen tanto metabolitos primarios como secundarios. Los metabolitos primarios son sintetizados por el llamado metabolismo primario, el cual comprende una serie de procesos metabólicos mediante los cuales los organismos vivos sintetizan y degradan una serie de sustancias orgánicas que les son indispensables para vivir.

El metabolismo primario abarca procesos bioquímicos como son: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, duplicación del material genético, reproducción de células (crecimiento), absorción de nutrientes, etc. Estos procesos son similares en casi todos los organismos vivos y a los productos biosintetizados se les denomina METABOLITOS PRIMARIOS. Estos metabolitos cumplen una función vital en los seres vivos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Domínguez, 1973). Como ejemplos podemos citar a los aminoácidos, carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, etc.

El metabolismo secundario comprende una serie de procesos metabólicos mediante los cuales, los seres vivos sintetizan compuestos orgánicos que aparentemente no le son indispensables para vivir. Estos compuestos se forman a través de los metabolitos primarios, y los procesos que conllevan a su formación, pueden diferir en los diferentes organismos.

Los productos del metabolismo secundario se denominan METABOLITOS SECUNDARIOS, mismos que presentan una distribución taxonómica restringida (en ocasiones característico de un género, familia o especie), los cuales se sintetizan en pequeñas cantidades. Los metabolitos secundarios tienen funciones ecológicas específicas, como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Podemos clasificar a los metabolitos secundarios de acuerdo a su origen biosintético, ver Tabla II.7.

Tabla II.7. Clasificación de los metabolitos secundarios de acuerdo a su origen biosintético.

Ruta metabólica.	Metabolitos Secundarios.
1) Ácido siquímico.	Taninos, lignanos, cumarinas, alcaloides derivados de los aminoácidos triptofano, tiritona, fenilalanina y ácido antranílico, quinonas, antibióticos.
2) Acetato-malonato.	Policétidos aromáticos, ácidos grasos, antibióticos macrolidos.
3) Acetato-mevalonato.	Terpenoides (sesquiterpenoides, triterpenoides, y politerpenoides) y esteroides.
4) 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato(ruta DOXP).	Terpenoides(hemiterpenoides, monoterpenoides, diterpenoides, caroterpenoides)
5) Metabolitos derivados de aminoácidos no aromáticos.	Alcaloides.
6) Combinación de dos o más rutas.	Alcaloides, flavonoides, furanocumarinas, piranocumarinas, plastoquinonas, ubiquinonas y cannabinoides.

Los metabolitos secundarios, también conocidos como productos naturales, tienen un importante valor medicinal y económico, derivado éste último en su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes y principios activos.

2.7 *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht (cuachalalate).

Amphipterygium adstringens Schiede Schlecht (sinonimia *Juliania adstringens*, familia Julianaceae), es un árbol medicinal de aproximadamente 5 a 10 m de altura, generalmente de tronco retorcido y cuya corteza, color gris parduzco, es extremadamente astringente y de olor aromático, ver Figura II.11.



Figura II.11. *Amphipterygium adstringens* Schiede Schlecht.

En la República Mexicana se localiza principalmente en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Morelos (Argueta *et al.*, 1994).

Existe una variedad de nombres atribuibles a la especie. En las zonas nahuas del altiplano central que comprenden los estados de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Hidalgo y Distrito Federal, la especie se conoce como **Cuachalalate**, cuachalatl o cuachalalá. En Michoacán, como matixerán, macerán y pacheco. En Oaxaca como cuachinalá y en Puebla la gente la conoce como volador (Argueta *et al.*, 1994).

Sin embargo, Cuachalalate es la denominación más habitual. Cuachalalate es la hispanización de «cuauchachalatli», palabra de origen náhuatl. El análisis gramatical del vocablo cuauchachalatli compuesto por «cuáhuatl» que significa árbol y «chachalatli», nombre que designa a cierto pájaro hablador, mejor conocido como chachalaca, sugiere que la palabra cuachalalate significa «árbol de la chachalaca».

2.7.1 Usos etnomédicos.

Se conocen cerca de 40 usos terapéuticos tradicionales del Cuachalalate, destacando su frecuente uso para el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estómago, gastritis y algunas lesiones cutáneas (Olivera et al., 1999).

Las infusiones de la corteza, se consideran preparaciones medicinales, las cuales se emplean para el tratamiento de afecciones femeninas, como la infección vaginal, la fiebre puerperal, inflamación vaginal, caída de matriz y de ovarios. También se emplea en el tratamiento de padecimientos asociados con el estómago, el cáncer digestivo, dolores gástricos y la inflamación estomacal.

La corteza se utiliza también contra infecciones bucales, dolor de muelas y la gingivitis. Se ha referido a su uso en enfermedades del hígado y de la vesícula; para el tratamiento de la tifoidea; padecimientos respiratorios como tos, resfriados; enfermedades renales; fiebres, el paludismo, caída del cabello, manchas de piel, gangrena y diabetes, son padecimientos que se han tratado con la corteza (Martínez, 1992; Hersch-Martínez, 1995; Argueta et al., 1994).

2.7.2 Estudios fitoquímicos.

Los estudios fitoquímicos de la corteza de Cuachalalate han demostrado la presencia de triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos, así como ácidos anacardicos y cardándoles.

Dentro de los triterpenos tetracíclicos se mencionan a los ácidos:

- (1.1) 3 α -hidroxi-6-oxo-7, 24Z-tirucalandien-26-oico,
- (1.2.) 3,7-dioxo-8,24z-tirucalandien-26-oico,
- (1.3.) 3 α -hidroxi-7-oxo-,24Z-tirucalandien-26-oico,
- (1.4) 7,11-dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucalandien-26-oico,
- (1.5)3,8-dioxo-7 β -hidroxi-7, 9ciclo-7, 8-seco-24Z-tirucalandien-26-oico,
- (1.7) 3 β -hidroximasticadienónico,
- (1.8) masticadienónico (Soriano-García et al., 1987), isomasticadienoico, instipolinasico (Domínguez et al., 1983), cuachalálico (Watson et al., 1987),
- (1.6), 7,11-dioxo-3 α -hidroxieufa-8, 24-dien-26-oico, schinol y
- (1.13), β -fitoesterol (Argueta et al., 1994; Navarrete et al., 1989; Olivera et al., 1999; Makino et al.,2004), ver Figura II.12.

En tanto, los ácidos oleanólico (1.9), oleanólico (1.10) y 3-epioleanólico, 3 α -hidroxi-11 α , 12 α -epoxioleanan-28, 13 β -olido (1.11), 3 β -hidroxi-11 α , 12 α -epoxioleanan-28, 13 β -olido (1.12) y ocotilona (1.14) (Makino et al., 2004) forman parte del conjunto de triterpenos pentacíclicos, ver Figura II.12.

También se han aislado derivados del ácido salicílico con sustituyentes pentadecilo, heptadecilo y nonadecilo en la posición C-6. Estos compuestos se conocen como ácidos anacárdicos (Navarrete et al., 1989).

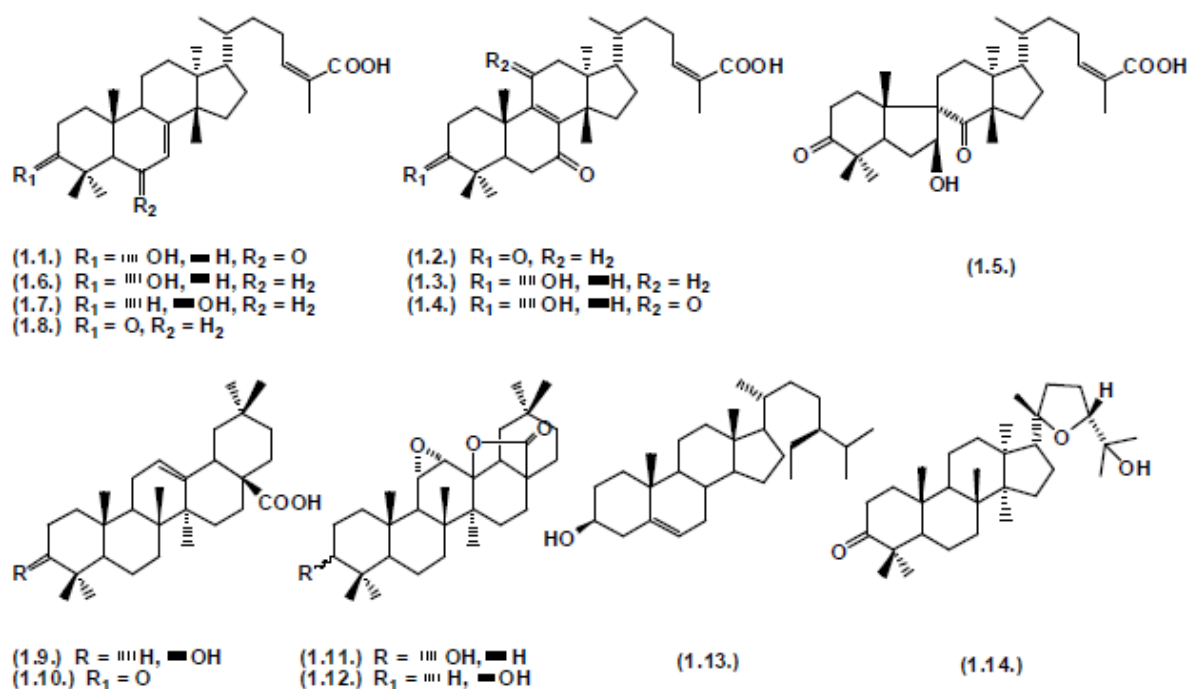


Figura II.12. Triterpenos aislados de *Amphipterygium adstringens*, (Tomada de Makino et al, 2004).

2.7.3 Estudios farmacológicos.

Los principales usos etnomédicos de cuachalalate como agente antiulceroso, gastroprotector, cicatrizante, hipocolesterolémico y antimicrobiano se han reconocido científicamente. Algunas de estas propiedades se atribuyen a la presencia de triterpenos (Arrieta *et al.*, 2003).

Se ha informado que el extracto de acetato de etilo (AcOEt) presenta efectos antiulcerogástricos en ratas; las muestras inhibían la secreción de jugo gástrico y contribuían con la rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica (Argueta *et al.*, 1994).

Otro estudio señaló los significativos efectos gastroprotector y antiulceroso de un extracto metanólico de *A. adstringens* y los ácidos 3-epioleanólico, 3 α -hidroximasticadienónico y β -fitosterol. En tanto, el ácido masticadienoico, también aislado de esa fracción orgánica, no mostró actividad (Navarrete *et al.*, 1998; Arrieta *et al.*, 2003). Por lo anterior, se sugirió que los triterpenos constituyentes eran los responsables de la actividad antiulcerosa, gastroprotectora y cicatrizante de la especie (Arrieta *et al.*, 2003).

Se ha demostrado también que el extracto metanólico de la especie administrado junto con diclofenaco, disminuía el daño gástrico provocado por el fármaco sin alterar sus efectos farmacológicos ni su farmacocinética (Navarrete *et al.*, 2005).

Otra investigación demostró que el extracto hexánico de la corteza poseía propiedad antigenotóxica y no inducía daño cromosómico (Martínez y Flores, 2003).

Un estudio sobre la acción hipocolesterolémica de la especie informo que un extracto hexánico reducía en un 31% el nivel de colesterol sanguíneo en roedores. De esa fracción orgánica se obtuvieron dos mezclas, una de ácidos anacardicos y la otra de aldehídos alquifenólicos. Ninguna porción mostró el efecto esperado (Mata et al., 1991). Por su parte, los ácidos masticadienonico y 3 α -hidroximasticadienoico administrados a una dosis de 17mg/Kg disminuyeron en 45 y 27%, respectivamente, las concentraciones de colesterol en ratas (Navarrete, 1982).

Recientemente se demostró la acción antibacteriana de ciertos extractos orgánicos de *A. adstringens* y de sus constituyentes triterpénicos. Observando que el 3 α -hidroximasticadienónico muestra una mayor actividad que el ácido masticadienónico en contra de *Micobacterium tuberculosis* (Rivero-Cruz et al., 2005).

2.8 Triterpenos.

Los triterpenos comprenden un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos 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 prostano, 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).

2.8.1 Biogénesis.

Se produce una variedad de esqueletos policíclicos a partir del 2-3-óxidoescualeno a través de una sucesión de reacciones, como transposiciones, ciclaciones, y una apertura del grupo éposito. 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 postula 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 prebote o pre-silla para el 3S-óxidoescualeno. Con ello, se inicia la apertura del anillo de oxirano y con la participación de los dobles enlaces se producen la ciclación en cascada, que lleva a la formación del catión protosterilo. Esta estructura experimenta una serie de transformaciones, como rearreglos 1,2 o adiciones cationicas 1,2-antiplanares 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 β , 19-ciclopropano. De esta manera, se origina la estructura del cicloartenol (Abe et al., 1993; Wendt et al., 2000).

Los esqueletos tetraciclicos 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 la cadena lateral con una configuración R en la posición C-20. Su estructura proviene de un acomodo conformacional del polieno, en el cual el sistema π del doble enlace terminal se encuentra lo suficientemente distante de la cadena original al anillo D, de manera que ese sistema sp² 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 β -triterpenoles. En tanto, es menos frecuente la transformación del 3R-óxidoescualeno en los correspondientes compuesto α -axiales, probablemente por que los complejos enzimáticos indispensables están restringidos para ciertas especies. Los estudios biogenéticos sugieren la formación de los derivados 3 β a partir de 3S-óxido escualeno con una conformación pre-bote de primer anillo en la estructura correspondiente (Abe et al., 1993; Assimopoulou y Papageorgiou, 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, ver Figura II.13.

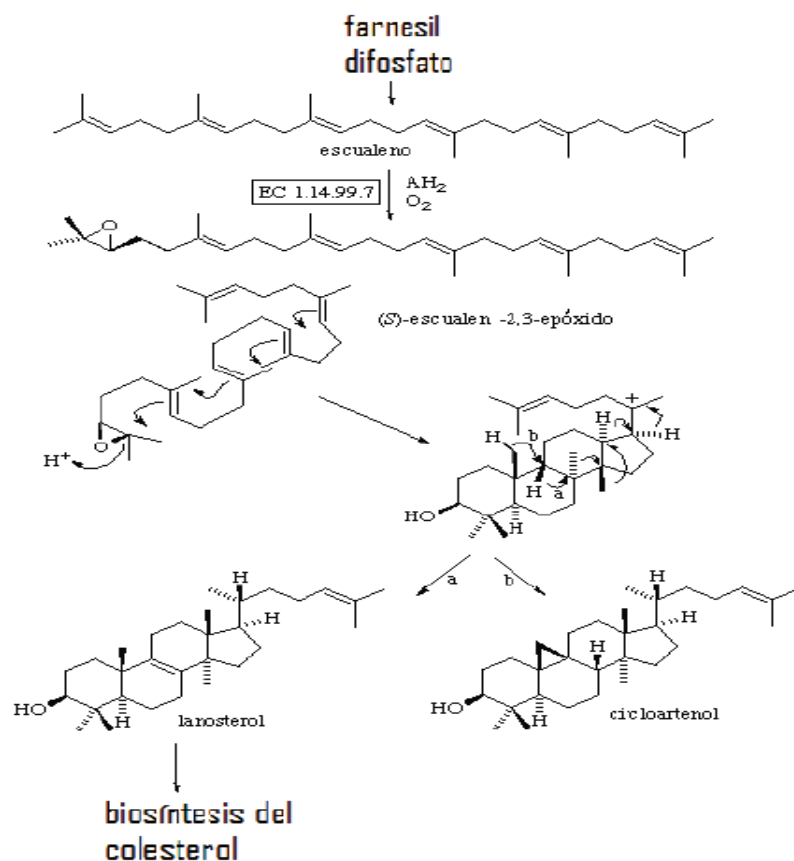


Figura II.13. Conformaciones de la ciclación del escualeno.

2.8.2 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, antialérgica, entre otras (Patocha, 2003). La naturaleza hidrofóbica de los triterpenos es una característica importante en relación con sus propiedades biológicas (Abe et al., 1993).

2.8.3 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 (Calis 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 (ONSi). Por ejemplo su acción antiprostanoide se asocia con la inhibición de la expresión de COX-2 y de ONSi. 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. (Calixto et al., 2003).

2.8.4 Como potenciales agentes anticancerosos

Existe una inmensa información publicada que da cuenta de las propiedades de inhibición de proliferación celular de células cancerosas de algunos triterpenos. La mayoría de los compuestos que se han evaluado actúan a nivel de la replicación del DNA, generalmente inhibiendo enzimas como la DNA polimerasa y o las topoisomerasas.

Debido a esto, los triterpenos se perfilan como potenciales agentes antineoplásicos (Patocha J. et al., 2003). Ejemplos de algunos triterpenos capaces de inhibir la proliferación celular de células cancerosas son los ácidos masticadienónico y el 3 α -hidroximasticadienónico, aislados de *Amphipterygium adstringens* Schide ex Schlecht, conocida como cuachalalate, (Oviedo et al., 2005), así como también el β -sitosterol y pristimerina aislados de *Hipopocratea excelsa* (HBK) (Setzer, 2003), compuestos aislados de la familia de las cucurbitáceas, los llamados cucurbitacinas (Witkowski y Woynarowska, 1984).

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 de inhibición de proliferación de celular de células cancerosas de algunos triterpenos, hacen de este tipo de compuestos candidatos promisorios en la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos.

2.9 Ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2).

Los ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2), ver Figura II.14, son los compuestos marcadores mayoritarios de la corteza de *A. adstringens* (Olivera y Martínez et al., 1999). Ambos triterpenos también se han aislado de las especies de la familia Anacardiaceae, como *Pistacia lentiscus* (Barton y Seoane, 1956; Papageorgiou et al., 1997).

Ambos ácidos son, en parte, responsables de las propiedades biológicas de las especies que los sintetizan (Navarrete et al., 1998; Giner-Larza et al., 2002; Arrieta et al., 2003; Makino et al., 2004; Oviedo-Chávez et al., 2004, 2005; Rivero-Cruz et al., 2005).

Ácido masticadienónico (1)

Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2)

Figura II.14. Compuestos triterpenicos mayoritarios de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht (Cuachalalate).

El ácido masticadienónico (1) se aisló por primera vez a partir de *Pistacia lentiscus* L. variedad Chia, mejor conocida como «goma mastica» (Barton y Seoane, 1956). El triterpeno posee un esqueleto tetracíclico de tipo tirucalano y se denomina como ácido 3-oxotirucala-7,24Z-dien-26-oico. También se conoce comúnmente como terebintona (Kier et al., 1963), su número de registro CAS es 514-49-8; su fórmula molecular de $C_{30}H_{46}O_3$ corresponde con un peso fórmula de 454.6844 g/mol.

Por su parte, ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2), también conocido como 3 α -hidroxi -tirucala-7, 24Z-dien-26-oico ó ácido 3-epimasticadienolico, tiene como fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O_3$ corresponde con un peso fórmula de 456.7003 g/mol.

Estos ácidos poseen efectos farmacológicos interesantes. Un estudio bioquímico demostró que ambos triterpenos, aislados de *Schinus terebinthifolius*, son inhibidores específicos de tipo competitivo de la enzima fosfolipasa A2 de secreción (PLA2s). Los compuestos impiden la alquilación de un residuo de histidina en el sitio activo y, además inhiben la acción de la enzima. Se señaló las características moleculares de estos triterpenos como responsables de la unión con la enzima (Jain et al., 1995).

Es importante recordar la participación de PLA2 en la generación de mediadores de la inflamación, como prostaglandinas, leucotrienos y el anión superóxido (Nevalainen et al., 2000). Las diferentes isoformas de PLA2 se han involucrado en el cáncer, por tanto, es un blanco molecular interesante para la farmacología y la terapéutica (Laye y Gill, 2003). Por lo anterior, resulta de gran importancia farmacológica la inhibición específica de la isoforma de secreción por parte de los triterpenos en cuestión.

Las actividades antiinflamatorias de los ácidos masticadienónico (**1**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) se han demostrado en varios experimentos in vivo, como los modelos de edema inducido por aplicaciones repetidas de TPA en la oreja del ratón y PLA2 en la pata de la rata (Oviedo, 2005).

Por otro lado, se ha reconocido la relación que existe entre los procesos de inflamación y el desarrollo de cáncer. Se ha mencionado que los mediadores de la inflamación, los cuales cubren una función específica dentro del proceso fisiológico, pueden actuar de manera descontrolada y con ello progresar hacia una fase procarcinogénica (Coussens y Werb, 2002).

2.10 Métodos para evaluar la actividad biológica.

2.10.1 Ensayos in vivo.

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

Los estudios in vivo valoran los principales signos de la inflamación, como el tumor (edema pulmonar y auricular), 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 (extravasación de colorante), la formación de exudado (pleuritis), la migración leucocitaria (pleuritis, fagocitosis) y la proliferación celular (fibroma, granuloma) (Willoughby, 2003).

2.10.2 Modelo de edema inducido por TPA.

El modelo de edema agudo inducido por TPA, ver Figura II.15, 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 e infiltración de 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.

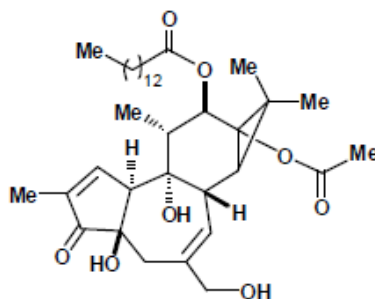


Figura II.15. Estructura química del TPA.

Los ésteres de forbol son diterpenos aislados de especies de la familia Euphorbiaceae, de acción procarcinogénica (Hecker, 1968). La respuesta biológica del TPA es multifactorial, sin embargo algunos mecanismos no se conocen con precisión. La estereoquímica de los ésteres de 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.

La acción mitogénica de los ésteres de forbol involucra la activación de las enzimas descarboxilasa de ornitina y ATPasa, del factor activador de plasminógeno, un intercambio iónico de Na⁺ / H⁺ a través de las membranas, la inhibición de la unión entre células alteradas, la fosforilación de ciertos receptores para factores de crecimiento y las modificaciones en el esqueleto celular (Tardón-García, 2001).

Por otro lado, el TPA estimula la activación de PLA₂ (Nam et al., 1990) y con ello la consecutiva liberación de AA. Sin embargo, 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). Existen evidencias de la participación del factor activador de plaquetas (PAF) (Ricupero et al., 1992) y de radicales libres ERN (Thannickal y Fanburg, 2000) en la respuesta de TPA.

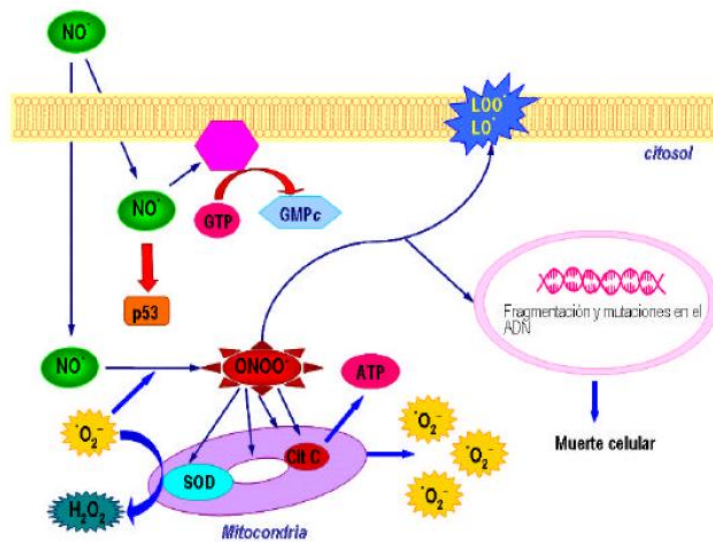


Figura II.16. Mecanismos involucrados en el edema inducido por TPA.

2.10.3 Ensayos in vitro.

Los adelantos tecnológicos de 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 las sustancias.

2.10.4 Experimento in vitro: Ensayo de inhibición de proliferación de células cancerosas humanas.

Los ensayos de inhibición de proliferación de células cancerosas humanas in vitro, establecen el índice de viabilidad celular mediante el conteo de células vivas.

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 determina mediante el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B (SRB) (Skehan et al., 1990). El método se fundamenta 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 (histidina, lisina, arginina) de células vivas.

Por lo tanto, la intensidad del color es directamente proporcional a la viabilidad celular. El método es simple, seguro y genera resultados reproducibles (Skehan et al., 1990; Monks et al., 1991).

3 Justificación del estudio.

3.1 Justificación del estudio.

En este capítulo se describe:

- La necesidad de la búsqueda de nuevos fármacos capaces de ofrecer una mejor acción terapéutica contra el cáncer. Encontrando en las plantas medicinales y sus metabolitos secundarios una alternativa, que permita el desarrollo de futuros fármacos anticancerosos.

En México al igual que en el resto del mundo, el cáncer constituye un grave problema de salud. Aunque en la clínica existen varios fármacos anticancerosos, el desarrollo de resistencia de las células cancerosas a éste tipo de compuestos, hace imperiosa la necesidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos antitumorales.

Las plantas medicinales y sus metabolitos secundarios, presentan una alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades.

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 epodofilotoxina, 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).

En México gran parte de la población utiliza plantas medicinales como único recurso para la procuración de su salud.

La literatura señala que *Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht (cuachalalate)*, es una especie medicinal. Hasta el momento, se han informado cerca de 40 usos terapéuticos tradicionales del cuachalalate, no obstante es muy frecuente su uso para el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estomago, gastritis e inflamación estomacal (Olivera et al., 1999).

Estudios fitoquímicos de la corteza de *A. adstringens* han demostrado que los ácidos masticadienónico (**1**) y 3 α - hidroximasticadienónico (**2**) son los constituyentes principales del extracto hexánico y de acetato de etilo de la corteza (Oviedo et al., 2005).

Como parte de nuestro estudio sistemático de los metabolitos secundarios presentes en *A. astringens*, hemos informado de las actividades de inhibición de crecimiento de células cancerosas y antiinflamatorias de los tirucalanos **1** y **2**, así como la obtención de varios derivados a partir de éstos triterpenos (Oviedo et al., 2005).

Por otro lado, se conoce que existe una relación entre procesos inflamatorios y desarrollo de cáncer. Quizás, los casos más documentados son los papeles desempeñados por el *Helicobacter pylori* en el cáncer gástrico (Vemura et al, 2001), los virus del papiloma humano en el cáncer cervical (Bernal et al., 2002) y los esquistomas en el cáncer de vejiga y uretra (Villar et al., 2000). Tomando en cuenta lo anterior se decidió obtener cinco derivados del ácido **2** para ser evaluados en 6 líneas celulares de cáncer humano.

No obstante que los derivados 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (**3**), 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**), 3 α -hidroxi-tirucala-8,24Z-dien-26-olato de etilo (**5**), 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (**6**) han sido

obtenidos durante otros estudios, la inhibición de proliferación de células cancerosas de éstos derivados no ha sido evaluada. Con el fin de tratar de establecer una relación de cambios estructurales con la actividad biológica, se decidió obtener éstos derivados, así como la obtención del nuevo 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).

4 Hipótesis y objetivos.

4.1 Hipótesis.

Tomando en cuenta que el ácido 3α -hidroximasticadienónico(2) tiene actividades antiinflamatorias y de inhibición de la proliferación de células cancerosas, entonces es factible suponer que los derivados: 3α -hidroximasticadienolato de metilo (3), 3α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4), 3α -hidroxi-tirucala-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5), 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6) y 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7) podrían incrementar la potencia de las actividades biológicas de 2.

4.2 Objetivo general.

Evaluar la inhibición de proliferación celular de células de cáncer humano del ácido 3α -hidroximasticadienónico (2) y sus derivados: 3α -hidroximasticadienolato de metilo (3), 3α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4), 3α -hidroxi-tirucala-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5), 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6) y 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).

4.2.1 Objetivos particulares.

- Caracterización química de los ácidos masticadienónico (1) y 3α -hidroximasticadienónico (2) por métodos espectroscópicos (IR, RMN) y espectrométricos (EM).
- Modificar químicamente el ácido 3α -hidroximasticadienónico (2) para la obtención de los derivados: 3α -hidroximasticadienolato de metilo (3), 3α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4), 3α -hidroxi-tirucala-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5), 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6) y 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).
- Caracterización de los derivados 3-7 por métodos espectroscópicos (IR, RMN) y espectrométricos (EM).
- Realizar la evaluación de la inhibición de la proliferación de células cancerosas del ácido 3α -hidroximasticadienónico (2) y sus derivados 3-7 mediante el ensayo de sulforodamina B in vitro en líneas de cáncer humano.
- Correlacionar los efectos de volumen (estéricos) con la actividad antiproliferativa de los compuestos 2, 3, 5 y 6.

5 Sección experimental y resultados.

5.1 Sección experimental y Resultados.

En este capítulo se describe:

- El material y el equipo utilizado para el desarrollo experimental.
- Los procesos de extracción empleados para la obtención de los ácidos masticadienónico (**1**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**2**).
- La caracterización de los ácidos **1** y **2** por métodos espectroscópicos (IR, RMN) y espectrométricos (EM).
- Las modificaciones químicas realizadas al ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) para la obtención de los derivados:
 - 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (**3**).
 - 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**).
 - 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (**5**).
 - 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (**6**).
 - 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (**7**).
- La caracterización de los derivados químicos del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) por métodos espectroscópicos (IR, RMN) y espectrométricos (EM).
- Evaluación de la inhibición de la proliferación de células cancerosas de los derivados **3-7** mediante el ensayo de sulforodamina B in vitro en líneas de cáncer humano.

5.2 Material y equipo.

La evaporación de los disolventes orgánicos se realizó en un rotavapor Buche 110.

Para las cromatografías en columna se utilizó sílice 60 de Ahigram Sil G, Kiesel, malla, 70-230, (Merck), con indicador de fluorescencia UV 254. Las cromatografías en capa fina se realizaron en cromatofolios de aluminio cubiertos de sílice DC Fertigplatten Sil G-200, UV Merck, de 0,2 de espesor. Como reveladores se emplearon una disolución de sulfato cérico (Ce_2SO_4) al 1% en ácido sulfúrico (H_2SO_4 , Baeker) 2N; y una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Cole Parmer 9815 series Lamps).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns y se informaron sin corrección.

Los espectros de absorción en la región infrarroja (IR) se obtuvieron en los espectrofotómetros Nicolete modelo Magna 750 y Nicolete FT-IR5-SX, con las técnicas de pastilla en KBr, y de disolución en CHCl_3 respectivamente. Las absorbancias se presentaron en cm^{-1} , para estas se indicaron las siguientes abreviaturas: d (débil), m (mediana), f (fuerte).

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), junto con los porcentajes de abundancia relativa (% ar).

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN (^1H) y de carbono 13 (^{13}C) se efectuaron en espectrómetros Varian Gemini 200, Varian VXR 300 y Bruker AS 300; se utilizaron los disolventes deuterados (Aldrich): Cloroformo (CDCl_3), sulfoxido de dimetilo (DMSO-d_6), benceno (C_6D_6) y Metanol (CD_3OD).

Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm); las señales protónicas se indicaron con las siguientes abreviaturas: s (simple), d (doble), t (triple), q (cuadruple), dd (doble de doble), dt (doble de triple), td (triple doble), qd (cuadruple doble), m (múltiple).

Las constantes de acoplamiento (J) se indicaron en Hertz.

La mayoría de los disolventes empleados se destilaron previamente, y se almacenaron en recipientes de color ámbar. De esta manera se manipularon el cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y el metanol (MeOH); el acetato de etilo (AcOEt) y el hexano se destilaron en presencia de CaCl_2 ; en tanto que, el etanol (EtOH) se trató con hojuelas de magnesio a reflujo durante 18 h y se destiló.

5.3 Obtención de los ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2).

La corteza de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate), se obtuvo de varios ejemplares recolectados en la barranca Honda, municipio de Tlaltizapan, Estado de Morelos, México, en 2008. El proceso utilizado para el aislamiento de 1 y 2 se esquematiza en la Figura VI.1.

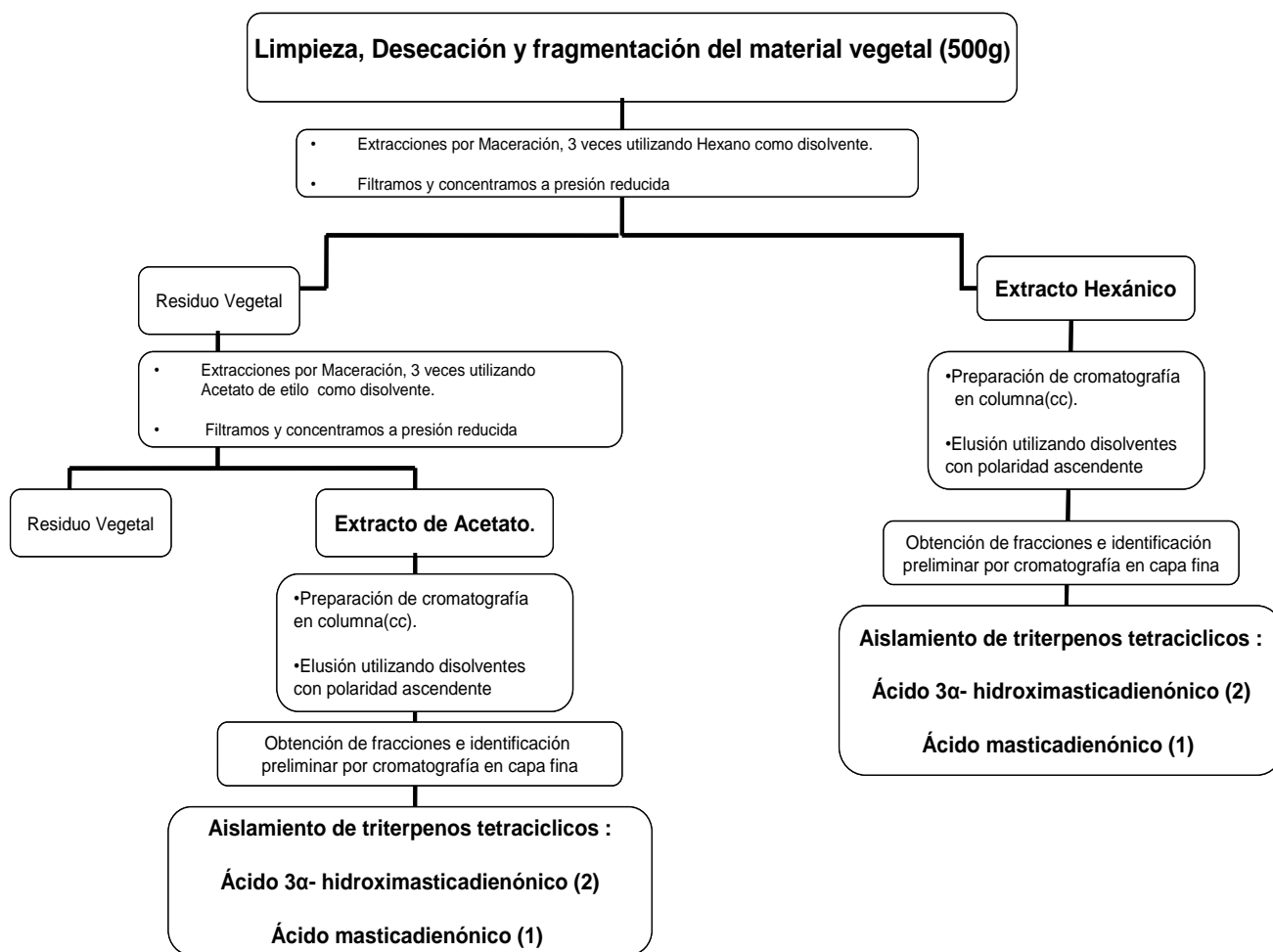


Figura V.1 Aislamiento de los ácidos 1 y 2.

El proceso de aislamiento de los ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2) comenzó con la limpieza del material vegetal recolectado, retirando la tierra y sustancias extrañas, además de seleccionar el material más adecuado, el que no presentara ningún daño.

La desecación del material vegetal, tuvo por objetivo privar al material recolectado, del agua que contiene. De esta forma garantizamos la calidad de la materia prima, evitando el enmohecimiento y ataque por bacterias. El proceso de secado se realizó a temperatura ambiente en una superficie seca.

Con la finalidad de facilitar la extracción de los ácidos 1 y 2, se molió el material vegetal ya que al disminuir el tamaño de partícula se aumenta la superficie de contacto con el disolvente, incrementando la eficiencia del proceso de extracción.

El proceso de extracción se realizó por maceración, utilizando hexano y acetato de etilo.

Extracto hexánico. El material vegetal seco y molido (500g) se trató 3 veces con 4L de hexano durante 24 h, a temperatura ambiente. Posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvieron 17.100 g de un residuo café, con un rendimiento del **3.42%** con respecto del peso inicial de la corteza.

Extracto de acetato de etilo. El residuo vegetal previamente macerado con hexano se trató 3 veces con 4 litros de acetato de etilo durante 24h, a temperatura ambiente. Posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniendo 15.12g de extracto con un rendimiento de **3.02%** con respecto del peso de la corteza.

5.3.1 Fraccionamiento de los extractos.

Se realizó el fraccionamiento de los extractos de hexano y acetato de Etilo.

Extracto hexánico.

El extracto hexánico se adsorbió en 2 g de sílice y se colocó en la parte superior de una columna cromatográfica empacada con 100 g de sílice, la cual fue eluida con un gradiente de hexano/Acetato de etilo/Metanol. Se colectaron 111 fracciones de 200mL. Se reunieron las fracciones con corrimiento cromatográfico (rf) semejante, resultando 7 porciones (F1-F7) como lo muestra la Tabla V.1.

Tabla V.1. Fraccionamiento del Extracto hexánico.

Fracciones	Número de fracciones reunidas.
F1	1-11 Hexano.
F2	12-48 relación 9: 1 Hexano: Acetato de etilo.
F3	49-60 relación 8: 2 Hexano: Acetato de etilo.
F4	61-81 relación 7: 3 Hexano: Acetato de etilo.
F5	81-91 relación 6: 4 Hexano: Acetato de etilo.
F6	92-101 Acetato de etilo.
F7	101-111 Metanol.

De la fracción F2, se logró aislar un sólido blanco el cual se purificó mediante cristalizaciones sucesivas con mezclas de hexano y acetato de etilo, obteniéndose 1.145 g de un sólido cristalino con punto de fusión de (163-171) °C. La comparación de sus datos físicos y espectroscópicos permitió la identificación de éste sólido como el ácido masticadienónico (1). El rendimiento con respecto al peso del extracto fue de **0.229%**.

Por otro lado, de la fracción F4 se logró aislar 0.6953 g del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2). El rendimiento con respecto del extracto fue de 0.139%. La identificación de 2 como el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) se logró por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados para este metabolito secundario.

En las fracciones F3, F5, F6 y F7, de acuerdo con la cromatografía en capa fina, no se observó presencia de 1 o 2, por lo que no recibieron tratamiento alguno.

Extracto de Acetato de Etilo.

El extracto de acetato de etilo se adsorbió en 2 g de sílice y se colocó en la parte superior de una columna cromatográfica empacada con 100 g de sílice, la cual fue eluida con un gradiente de hexano/Acetato de etilo/Metanol. Se colectaron 100 fracciones de 200mL. Se reunieron las fracciones con corrimiento cromatográfico semejante, obteniéndose y 7 porciones (F1-F7) como lo muestra la Tabla V.2.

Tabla V.2. Fraccionamiento del Extracto de acetato de etilo #1.

Fracciones	Número de fracciones reunidas.
F1	1-11 Hexano.
F2	12-35 relación 9: 1 Hexano: Acetato de etilo.
F3	36-50 relación 8: 2 Hexano: Acetato de etilo.
F4	50-71 relación 7: 3 Hexano: Acetato de etilo.
F5	71-81 6:4 relación 6: 4 Hexano: Acetato de etilo.
F6	82-91 Acetato de etilo.
F7	91-100 Metanol.

De la fracción F2, se logró aislar un sólido blanco el cual se purificó mediante cristalizaciones sucesivas con mezclas de hexano y acetato de etilo, obteniéndose 0.6550g del ácido masticadienónico (1). El rendimiento con respecto al peso del extracto fue de **0.131%** con respecto al peso del extracto.

Por otro lado, de la fracción F4 se logró aislar 0.953 g del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2). El rendimiento con respecto del extracto fue de **0.1906%**.

En las fracciones F3, F5, F6 y F7, de acuerdo con la cromatografía en capa fina no se observó la presencia de 1 o 2, por lo que no recibieron tratamiento alguno.

5.3.2 Aislamiento de los ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2) de extractos obtenidos de estudios previos.

Nuestros estudios previos sobre cuachalalate, colectado en 2004, habían permitido la obtención de 40 g de un extracto de acetato. Este extracto se cromatografio de manera similar al extracto de acetato de etilo anterior. Excepto, que debido a una escasez de hexano, la elusión de la columna se realizó con un gradiente de n-heptano/Acetato de etilo/ Metanol.

Se colectaron 120 fracciones de 200mL. Se reunieron las fracciones con desplazamiento cromatográfico similar (rf), resultando 7 porciones (F1-F7) como lo muestra la Tabla V.3.

Tabla V.3. Fraccionamiento de Extracto de acetato de etilo #2.

Fracciones	Número de fracciones reunidas.
F1	1-11 n-Heptano.
F2	12-35 relación 9:1 n-Heptano: Acetato de etilo.
F3	36-50 relación 8:2 n-Heptano: Acetato de etilo.
F4	50-71 relación 7:3 n-Heptano: Acetato de etilo.
F5	71-81 relación 6:4 n-Heptano: Acetato de etilo.
F6	82-91 Acetato te etilo.
F7	91-100 Metanol.

De la fracción F2, se aislaron 0.3550 g de 1, con un rendimiento con respecto del extracto de **0.8875%**.

Mientras que la fracción F4 se aislaron 6.053 g de 2, con un rendimiento del **15.1325%**, con respecto del extracto.

Como ya se mencionó la identificación de **1** como el ácido masticadienónico (**1**) y de **2** como el ácido 3 α - hidroximasticadienónico (**2**), se logró por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados para estos metabolitos secundarios (Barton y Seoane, 1956; Soriano-García et al., 1987; Papageorgiou et al., 1997; Oviedo y Martínez, 2005).

5.4 Datos físicos y espectroscópicos del ácido masticadienónico (**1**).

Figura V.2. Ácido masticadienónico (**1**).

(**1**) Ácido masticadienónico. Sólido cristalino color blanco.

Pf 163- 171°C.

IR (KBr, cm⁻¹) 2954.88 (f); 2601.84(m); 1682.44 (m); 1634.16 (d); 1457.48 (d); 1267.68 (m).

EMIE m/z (%ar) 454 (10) M⁺, 439(100) [M-Me]⁺, 393(8) [M-Me-HCOOH]⁺, 95(26) [C₃H₁₁O₃]⁺.

RMN ¹H (CDCL₃, 300 MHz) 6.09(td, 1H, H-24, J = 1.5, 7.5); 5.31(c,1H,H-7, J= 3.3, 6.3); 2.76 (td,1H,Hb-2, J= 5.4, 14.7); 2.25(dt,1-H,Ha-2); 1.92(d, 3H,Me-27,J=1.2); 1.12(s,3H,Me-29);1.01(s,3H,Me-28);1.08(s,3H,Me-30); 0.89(d,3H,Me21, J = 5.1); 0.81(s,3H,Me-18).

RMN ¹³C (CDCL₃, 300MHz) 216.92(C-3); 173.1 (C-26), 147.24(C-24); 145.97(C-8);125.82(C-25); 117.79(C-7); 52.86(C-5); 52.31(C-17); 51.17(C-14); 50.06(C-4); 48.47(C-9); 47.86(C-13); 43.52(C-10); 38.51(C-1); 36.04(C-20); 35.62(C-22); 34.90(C-2); 34.04(C-15); 33.62(C-12); 28.18(C-16); 27.40(C-30); 26.9(C-23); 24.53(C-28); 24.36(C-6); 21.94(C-18); 21.57(C-29); 20.51(C-27); 18.27(C-11); 18.21(C-21); 12.8(C-19).

5.5 Datos físicos y espectroscópicos del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2).

Figura V.3. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2).

(2) Ácido 3 α -hidroximasticadienónico. Sólido blanco amorfo.

Pf 140 -148 °C.

IR (KBr, cm⁻¹) 3438.83 (m), 2947.72 (f), 1696.65 (f), 1238.23 (m).

EMIE m/z (%ar) 456 (12) M⁺, 441(58) [M-Me]⁺, 423 (57) [M-Me-H₂O]⁺, 43(100) [C₂H₃O₂]⁺

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); 6.085(td, 1H, H-24, J = 1.2, 7.8), 5.25(c, 1H, H-7, J= 3, 6.45); 3.46(t, 1H, H-3, J=2.7); 1.92(d, 3H, Me-27, J=1.2); 1.64 (m, 2H, H-2); 0.97(s, 3H, Me-28); 0.94(s, 3H, Me-30); 0.88 (d, 3H, Me-21, J = 3.0), 0.82(s, 3H, Me-29), 0.77(s, 3H, Me-19).

RMN ¹³C (CDCl₃, 300MHz) 172.25(C-26); 147.11(C-24); 146.14(C-8); 125.7(C-25); 117.87(C-7); 76.32(C-3); 52.79(C-5); 51.25(C-14); 48.62(C-9); 44.52(C-17); 43.52(C-13); 37.41(C-4); 36.11(C-20); 35.68(C-22); 34.74(C-10); 34.01(C-15); 33.76(C-12); 31.25(C-1); 28.16(C-16); 27.74(C-30); 27.27(C-28); 26.89(C-23); 25.35 (C-2); 23.88 (C-6); 21.77(C-18); 21.03(C-29); 20.51(C-27) ;18.2(C-21); 17.95(C-11); 12.95 (C-19).

5.6 Obtención de los derivados químicos a partir del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2).

El ácido 2 se estableció como molécula de inicio y mediante modificaciones químicas se generaron cinco derivados.

A continuación se describen los métodos de obtención, y los datos fisicoquímicos y espectroscópicos de los derivados obtenidos a partir del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2). El análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos se realiza en el capítulo siguiente.

5.6.1 Obtención del 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).

Figura V.4. 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).

El éster **3** se logró obtener cuando **2** se trató con diazometano producido *in situ*. El diazometano se obtuvo a partir de diazald. Se preparó una mezcla de 7.1341g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfamida (Diazald al 99%, Sigma Aldrich) en 83mL de éter etílico (Et₂O, Merck) y se depositó en un embudo de separación de 150mL.

Por otro lado, en un matraz especial se colocó 7.6g de KOH disueltos en (100mL de una mezcla Etanol: Agua, 2:1). El matraz se calentó en baño maría hasta la temperatura de 60 ° C, manteniendo la temperatura constante.

La mezcla contenida en el embudo de separación se adicionó lentamente al matraz. El diazometano generado en forma de gas se recibió en un matraz con 100mL de éter el cual se encontraba en baño de hielo. La disolución preparada se adicionó lentamente, con una agitación constante, a una disolución de **2** (1.032g) en 150 ml de éter etílico hasta observar un cambio en la coloración en la disolución a amarillo paja.

La mezcla de reacción se dejó reposar 24 horas en la campana, posteriormente se concentró a presión reducida. El residuo obtenido era de características oleosas y se procedió a purificarlo por cromatografía en columna empacada con sílice, con un gradiente de hexano/AcOEt, obteniéndose un sólido blanco amorfo (320 mg, rendimiento de 31%).

Pf 92-94 °C.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 5.93(td, 1H, H₂₄, J=1.5,7.5); 5.25(c, 1H, H-7, J=2.7,6.5); **3.73(s, 3H, Me-31)**; 3.46(t, 1H, H-3, J=2.7); 0.97(s, 3H, Me-28); 0.94(s, 3H, Me-29); 0.91(s, 3H, Me-18), 0.90(d, 3H, Me-21, J=6.3); 0.82(s, 3H, Me-30), 0.77(s, 3H, Me-19).

RMN ¹³C (CDCl₃, 300MHz) 168.58(C-26); 146.12(C-24); 144.18(C-8); 126.38(C-25); 117.83(C-7); 76.3(C-3); 52.83(C-5); 51.2(C-14); **51.15(C-31)**; 48.62(C-9); 44.52(C-17); 43.46(C-13); 37.39(C-4); 36.03(C-20); 35.7(C-22); 34.71(C-10); 33.96(C-15); 33.76(C-12); 31.21(C-1); 28.18(C-16); 27.77(C-30); 27.25(C-28); 26.71(C-23); 25.37(C-2); 23.88(C-6); 21.88(C-18); 21.8(C-29); 20.71(C-27); 18.21(C-21); 17.95(C-11); 12.97(C-19)

5.6.2 Obtención de 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4).

Figura V.5. 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4).

Una mezcla de 50mg (0.106 mmol) de **3**, 50mg de Pd/C al 10% y 25mL de AcOEt se mantuvo en un sistema de hidrogenación durante 96 h, a presión y temperatura ambiente, con agitación constante. El desarrollo de la reacción se siguió por *ccf* con un gradiente de hexano/AcOEt 8:2. La mezcla resultante se filtró a presión reducida sobre una cama de celita, realizando lavados con AcOEt. El disolvente se evaporó a presión reducida. El producto obtenido fue un sólido amorfo blanco (25mg, rendimiento 50%).

Pf 92-95 °C.

RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) 5.25(c, 1H,H-7,J=2.7,6.5); **3.73(s,3H,Me-31)**; 3.46(t,1H,H-3,J=1.8); 2.44(td, 1H,H-25,J=1.2,8.4), 0.97(s,3H,Me-28);0.94(s, 3H, Me-29); 0.92(s,1H, Me-18), 0.81(s,3H,Me-30), 0.77(s,3H,Me-19).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 300MHz) 177.43(C-26); 146.16(C-8); 117.83(C-7); 76.3(C-3); 52.98(C-5); 51.43(C-14); **51.22(C-31)**; 48.65(C-9); 44.55(C-17); 43.45(C-13); **39.51(C-25)**, 37.39(C-4); 36(C-20); 35.84(C-22); 34.71(C-10); 33.98(C-15); 33.81(C-12); 31.23(C-1); 28.18(C-16); 27.76(C-30); 27.25(C-28); 25.39 (C -2); 24.13(C-23); 24.0(C-24); 23.9(C-6); 21.88(C-18); 18.33(C-29); 17.97(C-11); 17.23(C-27); 16.92(C-21);12.98(C-19).

5.6.3 Obtención del 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).

Figura V.6. 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).

A una disolución etanólica (EtOH anhidro, 80mL) de **2** (200 mg, 0.4385mmol) se adiciono lentamente H₂SO₄ concentrado (3mL), seguido de CH(OCH₃)₃ (4mL). La mezcla se reflujo durante 8h. Al término del reflujo se agregó de agua destilada (25mL) y se procedió la extracción con AcOEt (3*25mL). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ al 10% p/v (3*10mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cc con gradiente de hexano/AcOEt. Se obtuvo un polvo blanco amorfo (40 mg, rendimiento 20%).

Pf 112-114 °C.

EMIE m/z (%ar) 484 (22) M⁺, 469(54) [M-Me]⁺, 451(100) [M-Me-H₂O]⁺, 437(20) [M-Et-H₂O]⁺, 189(29) [C₁₀H₂₁O₃]⁺, 95) [C₃H₁₁O₃]⁺.

RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) 5.90(td, 1H, H-24H, J=1.5,7.2); **4.19(c, 2H, H-31, J=7.2, 14.1)**; 3.44(t, 1H, H-3, J=2.7); 1.89(d, 3H, Me-27), 1.31(t, 3H, Me-32, J=7.2); 0.97(s, 3H, Me-29); 0.96(s, 3H, Me-28); 0.94(d, 3H, Me-21, J=6), 0.87(s, 3H, Me-30), 0.77(s, 3H, Me-19).

RMN 13C (CDCl₃, 300MHz) 168.23(C-26); 143.37(C-24); **134.34(C-8)**; **133.26(C-9)**; 126.77(C-25); 76.0(C-3); **59.97(C-31)**; 50.06(C-5); 49.99(C-14); 44.8(C-17); 44.12(C-13); 37.63(C-4); 37.2(C-10); 36.4(C-20); 35.94(C-1); 30.77(C-7); 29.77(C-11, C-22); 28.02(C-23, C-29); 27.21(C-2); 26.61(C-15); 25.83(C-12); 24.38(C-30); 22.22(C-18); 21.38(C-6); 20.65(C-27); 19.91(C-28); 18.79(C-16); 18.58(C-21); 15.52(C-19); **14.3(C-32)**.

5.6.4 Obtención del ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6).

Figura V.7. 3 α -acetoxi-tirucala-7E, 24Z-dien-26-oico (6).

Una mezcla de 200 mg (0.4385 mmol) de **2**, 2mL de Piridina (Py) y 2mL de AC₂O, se colocaron en un matraz bola de 125mL, conectado a un refrigerante y una trampa de humedad. La mezcla se mantuvo en una temperatura de 40 °C durante 5h.

Posteriormente se agregó 10g de hielo, observando la formación de un precipitado, el cual se adhirió a las paredes del matraz. Se procedió a filtrar el agua y subsecuentemente a disolver el precipitado en ActOEt. El disolvente se evaporó a presión reducida, obteniendo un polvo color amarillo 100 mg, el cual se procedió a purificar mediante cromatografía preparativa. Se logro la obtención de un sólido blanco (80 mg, rendimiento 40%).

Pf 120 -122 °C.

RMN ¹H (CDCL₃, 400 MHz) 6.092(td,1H,H-24); 5.26(d,1H,H7,J=2.8); 4.69(d,1H,H-3,J=2.8); 2.07(s,3H,Me-32); 1.92(s,3H,Me-27,J=1.2); 0.98(s,3H,Me-30); 0.97(s,3H,Me-29); 0.85(s,3H,Me-18); 0.84(s,3H,Me-28); 0.78(s,3H,Me-19).

RMN ¹³C (CDCL₃, 100MHz) 172.82(C-26); **170.83(C-31)**; 147.29(C-24); 146.11(C-8); 125.71(C-25); 117.76 (C-7); 78.41(C-3); 52.82(C-5); 51.24(C-14); 48.61(C-17); 45.52(C-9); 43.51(C-13); 36.59(C-4); 36.11(C-20); 35.66(C-22); 34.7(C-10); 34.0(C-2); 33.68(C-15); 31.97(C-1); 28.19(C-12); 27.40(C-28); 27.27;(C-18); 26.93(C-16); 23.77(C-6); 22.93(C-23); 21.92(C-30); 21.44(C-29); 21.31(C-32); 20.54 (C-27); 18.23(C-21); 17.98(C-11); 12.96(C-19).

5.6.5 Obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).

Figura V.8. 3 α -acetoxi-tirucala-7E, 24Z-dien-26-olato de metilo (7).

Una mezcla de 50 mg (0.106 mmol) de **3**, 1mL de Piridina y 1mL de AC₂O, se colocaron en un matraz bola de 125mL, conectado a un refrigerante y una trampa de humedad. La mezcla se mantuvo en baño de calentamiento durante 4h.

Posteriormente se agregó 10g de hielo, observando la formación de un precipitado, el cual se adhirió a las paredes del matraz. Se procedió a filtrar el agua y subsecuentemente a disolver el precipitado en ActOEt. El disolvente se evaporó a presión reducida, obteniendo un producto aceitoso (40 mg, rendimiento 80%).

Pf nd.

IR (KBr, cm⁻¹) 2954.88 (f); 1713.51(f); 1682.44 (d); 1457.48 (d); 1267.68 (m).

EMIE m/z (%ar) 512 (20) M⁺, 497(38) [M-Me]⁺, 437(100) [C₃H₇O₂]⁺, 189(20) [C₁₀H₂₁O₃]⁺, 57(52) [C₃H₅O]⁺

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 5.93(td, 1H, H₂₄,J=1.2,7.8); 5.25(c, 1H,H-7,J=2.7,6.3); 4.69(t,1H,H-3,J=3.3); **3.73(s,3H,Me-33)**; **2.07(s,3H,Me-32)**;0.97(s,3H,Me28);0.91(s, 3H, Me-29); 0.89(s,1H, Me-18), 0.84(s,3H,Me-30), 0.78(s,3H,Me-19).

RMN ¹³C (CDCl₃,300MHz) 170.80(C-26); **168.55(C-31)**; 146.09(C-24); 144.13(C-8); 126.41(C-25); 117.74(C-7); 78.38(C-3); 52.81(C-5); 51.22(C-14); **51.17(C-33)**; 48.58(C-9); 45.50(C-17); 43.48(C-13); 36.56(C-4); 36.07(C-20); 35.7(C-22); 34.7(C-10); 33.98(C-15); 33.65(C-12); 31.935(C-1); 28.17(C-16); 27.37(C-30); 27.25(C-28); 26.72(C-23); 23.74(C-2); 22.91(C-6); 21.9(C-18); 21.42(C-29); 21.31(C-32); 20.69(C-27); 18.21(C-21); 17.94(C-11); 12.94(C-19)

5.7 Actividad biológica.

5.7.1 Experimento in Vitro: Ensayo de inhibición de proliferación de células cancerosas humanas.

5.7.2 Condiciones generales.

La inhibición de proliferación de líneas 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 los cinco derivados obtenidos a partir de **2**.

3 α -hidroximasticadienolato de metilo (**3**).

3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**).

3 α -hidroxi-tiruca-8,24-dien-26-olato de etilo (**5**).

3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (**6**).

3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (**7**).

El ensayo se efectuó en las siguientes líneas celulares de cáncer humano:

(**U-251**) sistema nervioso central.

(**PC-3**) próstata.

(**K-562**) leucemia promielocítica.

(**HCT -15**) colon.

(**MCF-7**) mama.

(**SKUL-1**) pulmón.

Las líneas se obtuvieron del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (INC). La doxorubicina (Sigma) se usó como fármacos de referencia.

Los derivados **3**, **4**, **5**, **6** y **7** se disolvieron en DMSO.

La concentración utilizada fue de 50 μ M para los compuestos; y de 1.6 a 75 μ M para el ácido ursólico.

5.7.3 Procedimiento.

El procedimiento general se representó en la Figura V.9. Las células se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina, 0.25 mg/ml de anfotericina B (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina (GIBCO). Se conservaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ l de cada línea celular. Las densidades celulares fueron las siguientes: 5 x 10⁴ células/ml de K-562 y MCF-7, 7.5 x 10⁴ células/ml de U-251, PC-3 y SKLU-1 y 10 x 10⁴ células/mL de HCT-15. A continuación, la placa se incubó durante 48 h, a 37 °C en CO₂ al 5 %. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de las sustancias de prueba o fármacos de referencia. La placa se incubó por 48 h en las mismas condiciones. Los grupos testigo contenían solo un volumen equivalente de cada línea celular.

Después, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 50 % p/v (50 µl /pozo). La placa se incubó durante 60 min a 4 °C. Los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó 3 veces con agua destilada desionizada y se dejó secar. Las células se trataron con 100 mL de sulforrodamina B (SRB, Sigma) al 0.4 % durante 30 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con una disolución de ácido acético al 1 %. El colorante se extrajo con una disolución 10 µM de base Tris (Sigma) no amortiguada.

Las absorbancias se determinaron en un lector de placas 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 inhibición de proliferación celular se calculó conforme con la *ecuación 1*. En donde *A* correspondía 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.

$$\%IC = 100 - \frac{B}{A \times 100} \quad (1)$$

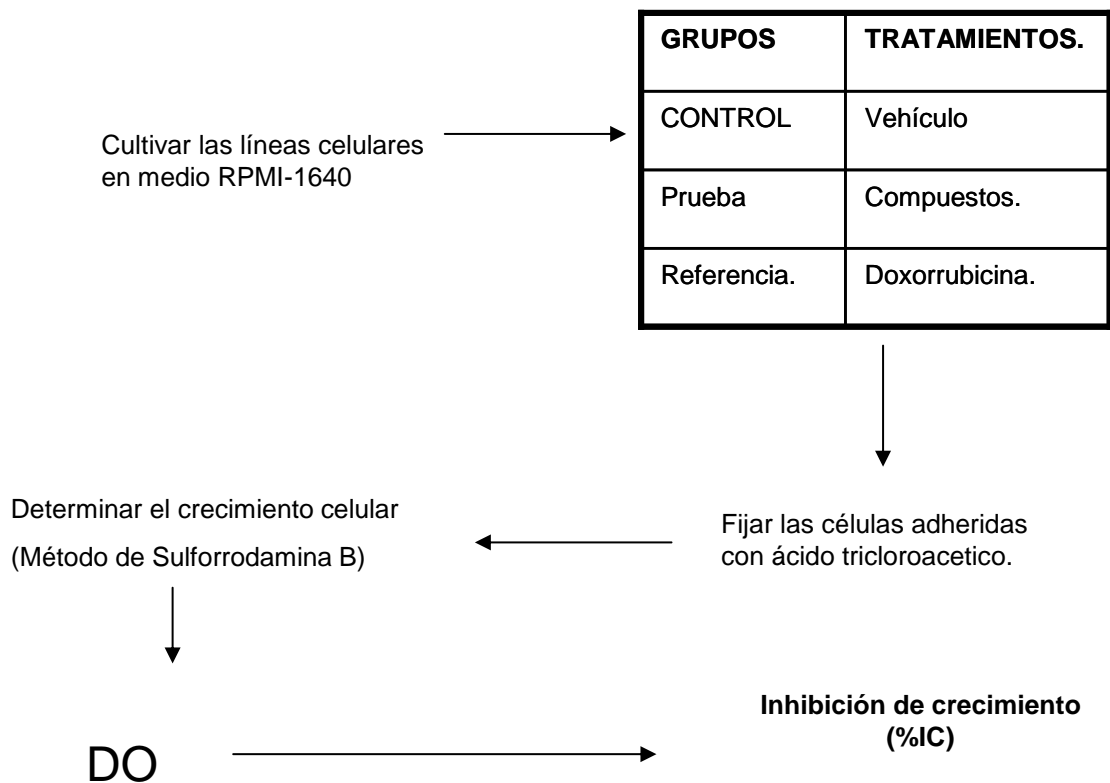


Figura V.9. Ensayo de Inhibición de proliferación de células cancerosas.

5.8 Resultados.

En la Tabla V.4 se muestra el porcentaje de inhibición de proliferación en líneas de cáncer humano por derivados del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) a una concentración de 50 μ g/mL.

Tabla V.4 Porcentaje de inhibición de proliferación celular de los compuestos 2-7 a una concentración de 50 μ g/mL.

Derivado	PC-3	HCT-15	SKUL-1	U-251	MCF-7	K-562
2	29.80	36.30	n.d	100.0	41.88	24.20
3	92.02	100.0	91.84	69.37	89.11	90.12
4	66.21	35.16	62.41	96.55	79.80	71.22
5	94.6	100	15.32	100.0	100.0	0.3
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	58.53
7	14.51	s.a.	19.33	3.90	s.a.	61

Líneas de cáncer humano: (**U-251**) sistema nervioso central, (**PC-3**) próstata, (**K-562**) leucemia promielocítica, (**HCT -15**) colon, (**MCF-7**) mama y (**SKUL-1**) pulmón. n.d= no determinado; s.a= sin actividad.

6. Discusión.

6.1 Discusión.

En este capítulo se describe:

- La caracterización química de los ácidos masticadienónico (1) y 3 α -hidroximasticadienónico (2).
- Las modificaciones químicas realizadas al ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2) para la obtención de los derivados:
 - 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).
 - 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4).
 - 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).
 - 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6).
 - 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).
- Evaluación de la inhibición de la proliferación de células cancerosas de los derivados 3-7 mediante el ensayo de sulforodamina B in vitro en líneas de cáncer humano.
- La correlación de los efectos de volumen (estéricos) con la actividad inhibitoria de 2 y sus derivados 3, 5 y 6.

6.2 Caracterización del ácido masticadienónico (1).

En el espectro de infrarrojo del compuesto 1 (Figura VI.1), se observan bandas correspondientes a grupos carbonilo y ácido carboxílico.

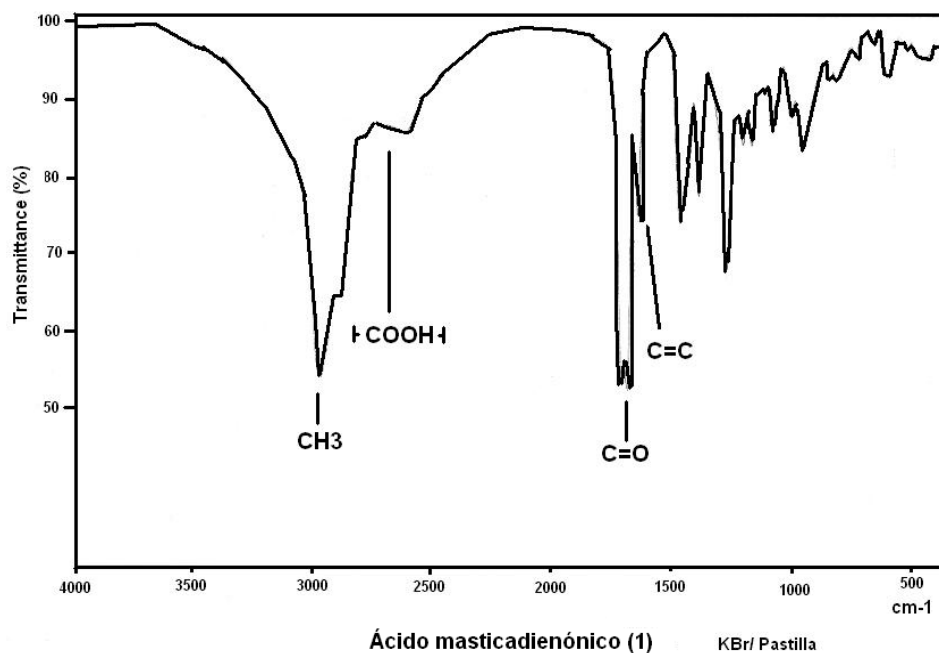


Figura VI. I. Espectro de IR de (1).

El espectro de masas de 1 (Figura VI.2), presentó un ión molecular a 454 m/z para una fórmula mínima de C₃₀H₄₆O₃.

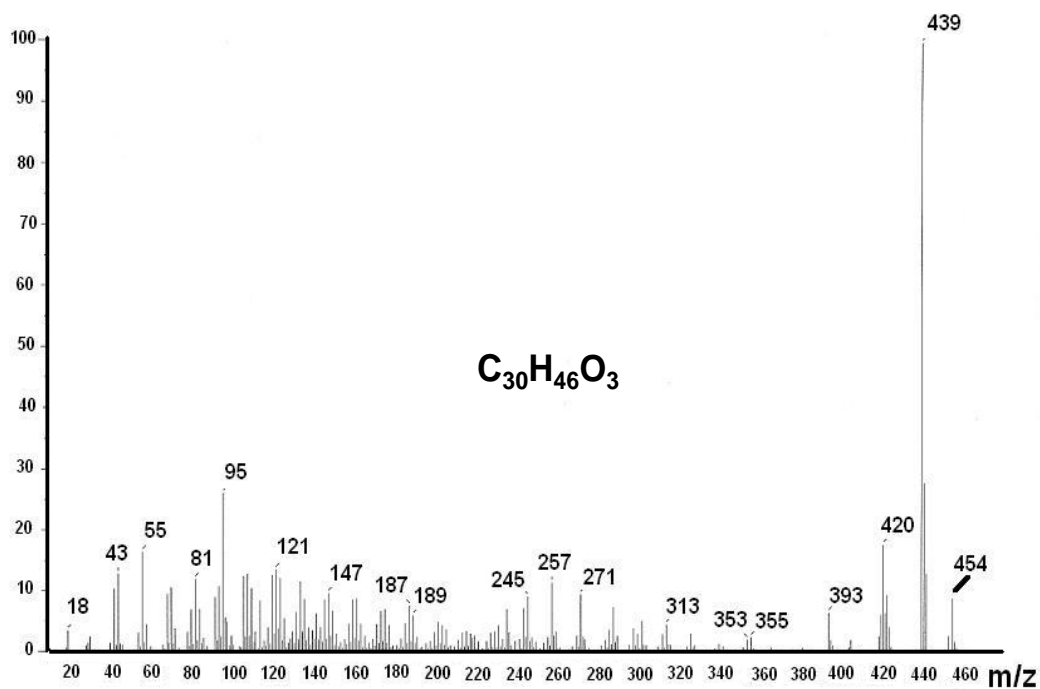


Figura VI.2. Espectro de masas de (1).

Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H de **1** (Figura VI.3) se observó una señal a 6.09 ppm que corresponde a un triple de dobles, la cual integra para un hidrogeno, esta señal se asignó al protón vinílico H-24. El desplazamiento inusual hacia campo bajo de este protón se explica por la conjugación de la doble ligadura C24-C25 con el carbonilo en C-26.

En 5.31 ppm se observó un cuarteto, que integra para 1H, la cual se asignó al protón vinílico H-7.

En 1.12 y 1.08 ppm se observan dos singuletes, que integran para 3 hidrógenos, correspondientes a Me-29 y Me-30 respectivamente.

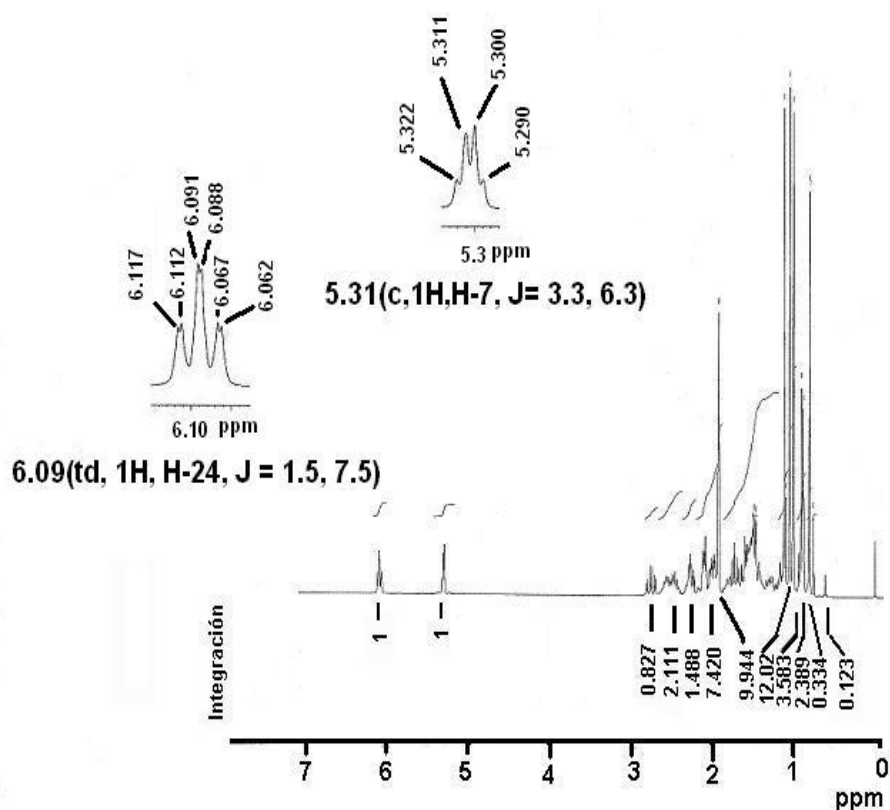


Figura VI.3. Espectro de RMN ^1H de (**1**).

En el espectro de RMN ^{13}C de **1** (Figura VI.4), se observaron las 30 señales de los 30 átomos de carbono que la fórmula determinada por EM había señalado.

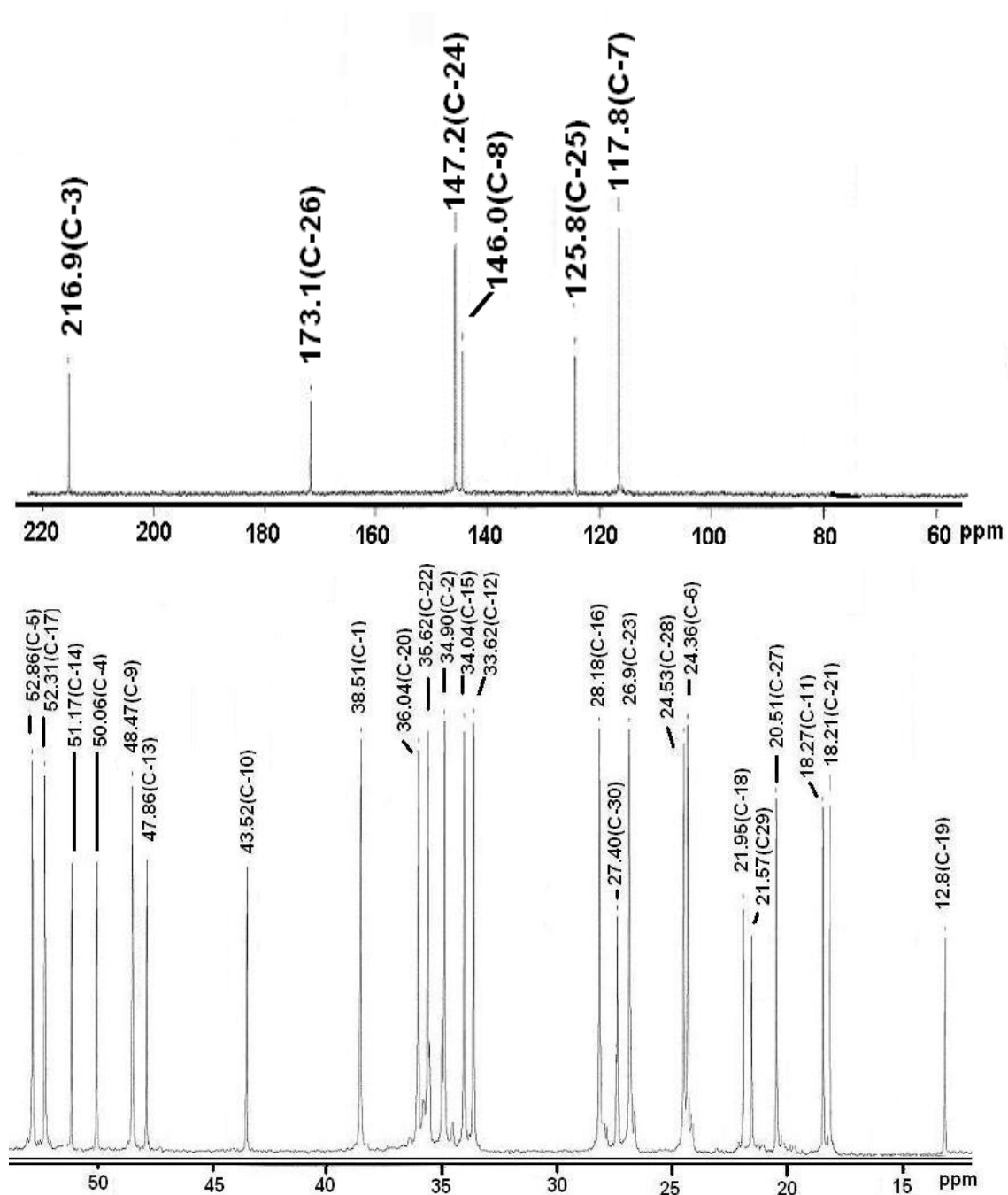


Figura VI.4. Espectro de RMN ^{13}C de (**1**).

Tabla VI. 1. Señales del espectro de RMN¹³C de (1).

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-3	216.92	C=O	C-22	35.52	CH ₂
C-26	173.27	C=O	C-2	34.90	CH ₂
C-24	147.24	H-C=C	C-15	34.04	CH ₂
C-8	145.95	C=C	C-12	33.62	CH ₂
C-25	125.82	C=C	C-16	28.18	CH ₂
C-7	117.79	H-C=C	C-30	27.40	CH₃
C-5	52.86	H-C	C-23	26.9	CH ₂
C-17	52.32	H-C	C-28	24.54	CH ₃
C-14	51.17	C	C-6	24.36	CH ₂
C-4	50.06	C	C-18	21.94	CH ₃
C-9	48.47	H-C	C-29	21.57	CH₃
C-13	47.86	C	C-27	20.5	CH ₃
C-10	43.52	C	C-11	18.27	CH ₂
C-1	38.51	CH ₂	C-21	18.20	CH ₃
C-20	36.04	CH	C-19	12.77	CH ₃

En la Tabla VI. 1 se muestran los 30 átomos de carbono y sus desplazamientos en ppm.

La identidad de **1** como el ácido masticadienónico (**1**) (Figura VI.5) se logró por la comparación de sus datos IR, EM y RMN de ¹H y ¹³C de **1** con aquellos publicados para éste metabolito secundario (Oviedo y Martínez, 2005).

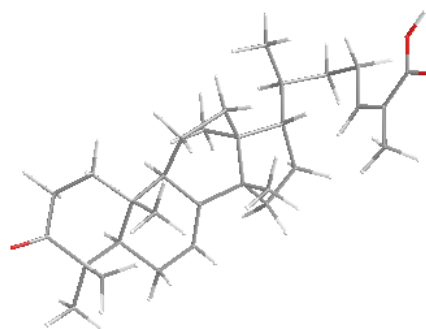


Figura VI.5. Ácido masticadienónico (1).

6.3 Caracterización del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2).

En el espectro de infrarrojo del compuesto **2** (Figura VI.6), se observaron bandas asignadas para grupos hidroxilo, carbonilo y ácido carboxílico.

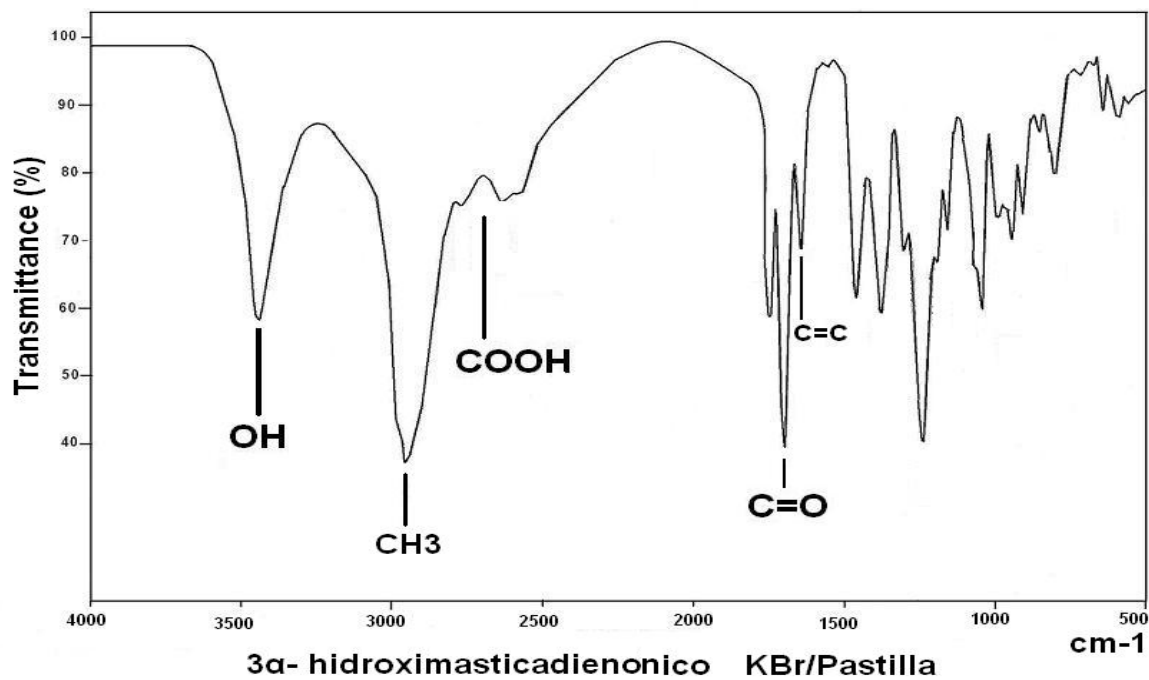


Figura VI.6. Espectro de IR de (2).

El espectro de masas de **2**, (Figura VI.7), se observó un ión molecular a 456 m/z para una fórmula mínima de C₃₀H₄₈O₃.

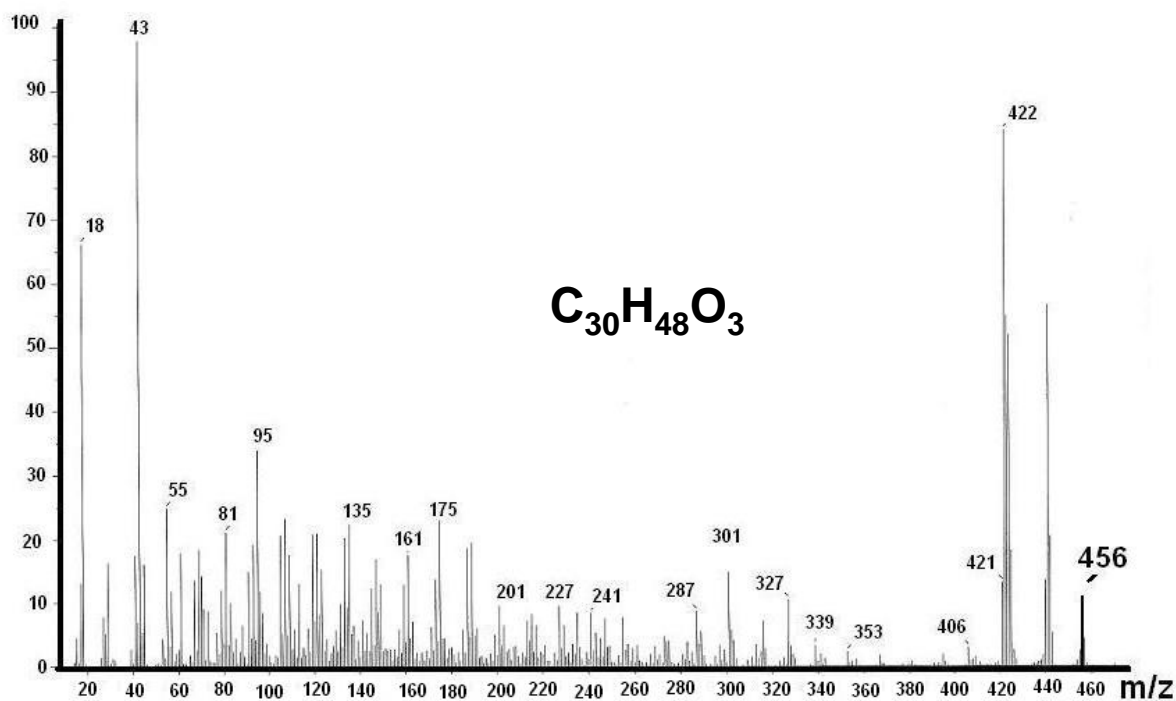


Figura VI.7. Espectro masas de (2).

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **2**, (Figura VI.8), se observó a 6.09 ppm un triple de dobles, que integra para un protón, el cual se asignó al protón vinílico en H-24.

En 5.31 ppm se observa un cuarteto, que integra para un protón, asignado al hidrógeno vinílico en H-7.

El desplazamiento de un triplete a 3.46 ppm, el cual integra para un protón, indica que este protón está unido a un átomo de carbono que soporta un átomo de oxígeno. Por lo anterior esta señal se asignó al H-3.

En 0.94 y 0.82 ppm se observan dos singuletes, cada uno integra para 3 protones, asignados a los grupos metilos a Me-29 y Me-30 respectivamente.

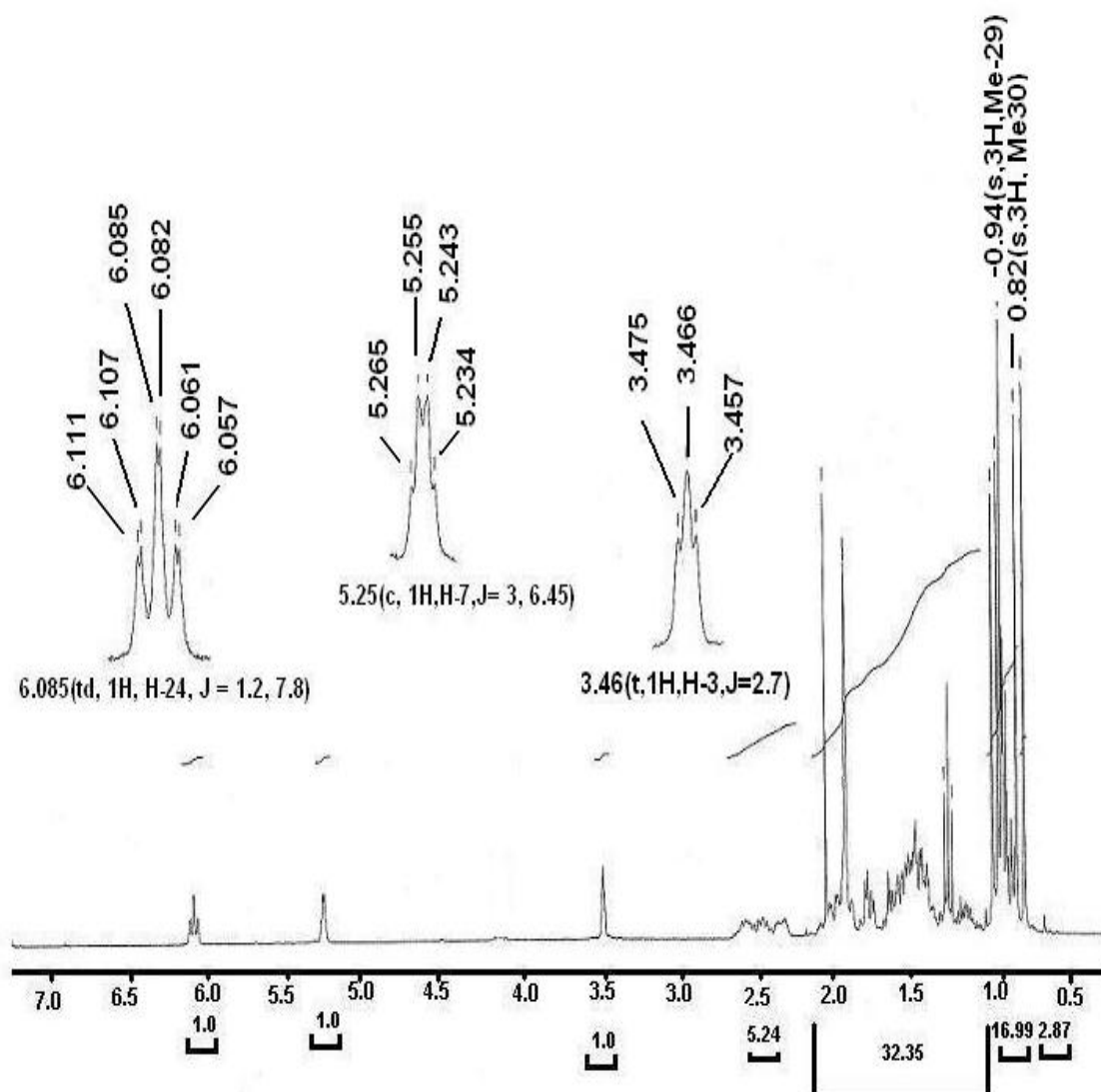


Figura VI.8. Espectro de RMN ^1H de (**2**).

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura VI.9), se observaron las 30 señales de los átomos de carbono señalados por la fórmula mínima obtenida en el espectro de masas.

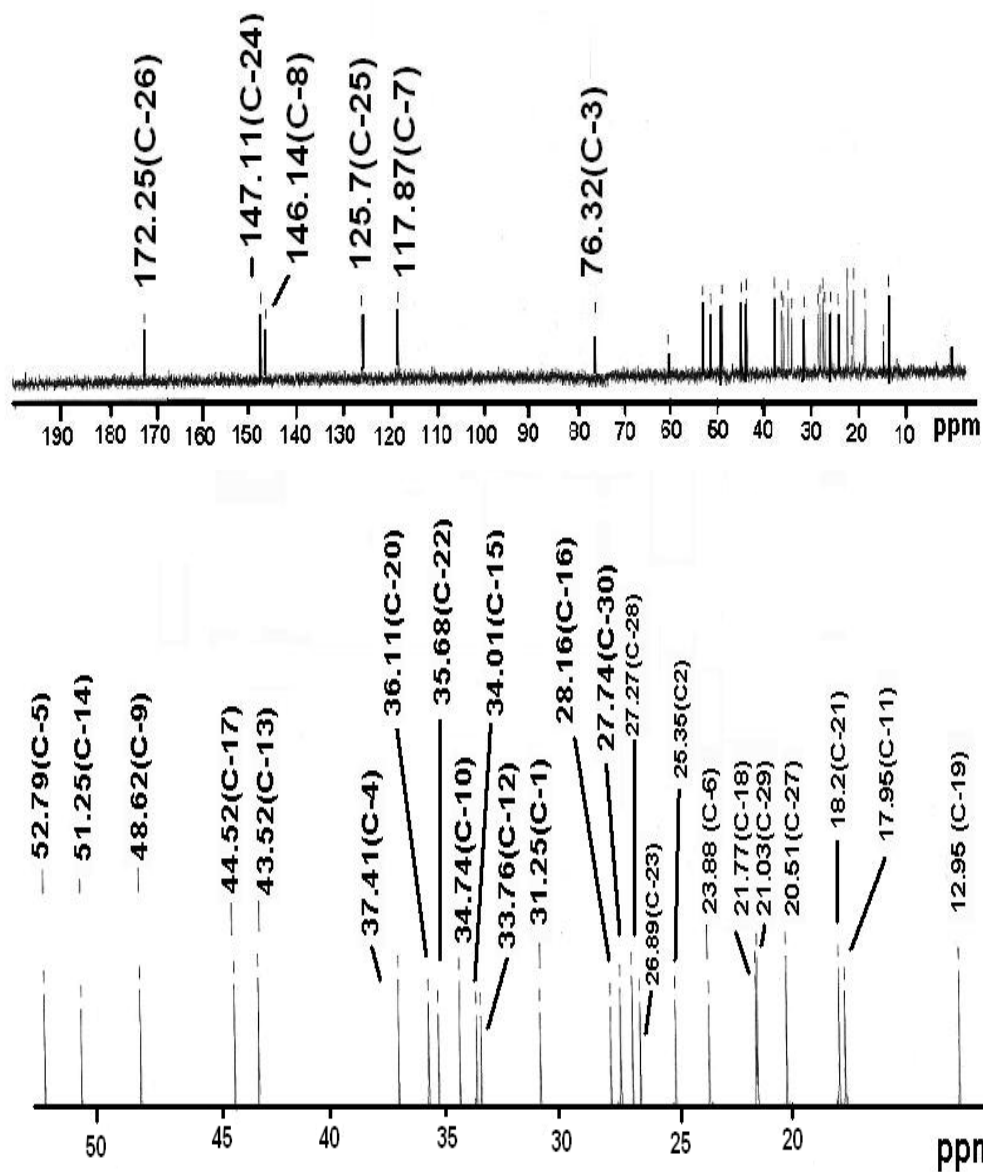


Figura VI.9. Espectro de RMN ^{13}C de (2).

Tabla VI. 2. Señales del espectro de RMN ^{13}C de (2).

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-26	172.25	C=O	C-15	34.01	CH ₂
C-24	147.11	H-C=C	C-12	33.76	CH ₂
C-8	146.14	C=C	C-1	31.25	CH ₂
C-25	125.7	C=C	C-16	28.16	CH ₂
C-7	117.87	H-C=C	C-30	27.74	CH₃
C-3	76.32	H-C-OH	C-28	27.27	CH ₃
C-5	52.79	H-C	C-23	26.89	CH ₂
C-14	51.25	C	C-2	25.35	CH ₂
C-9	48.62	H-C	C-6	23.88	CH ₂
C-17	44.62	H-C	C-18	21.77	CH ₃
C-13	43.52	C	C-29	21.03	CH₃
C-4	37.41	C	C-27	20.51	CH ₃
C-20	36.11	H-C	C-21	18.2	CH ₃
C-22	35.38	CH ₂	C-11	17.95	CH ₂
C-10	34.74	C	C-19	12.95	CH ₃

En la Tabla VI. 2 se muestran los átomos de carbono y sus desplazamientos en ppm.

La identidad de **2** como el ácido 3α -hidroximasticadienónico (Figura VI.10), se logró por la comparación de los datos de IR, EM RMN ^1H y ^{13}C de **2** con aquellos publicados para este triterpeno (Oviedo y Martínez, 2005).

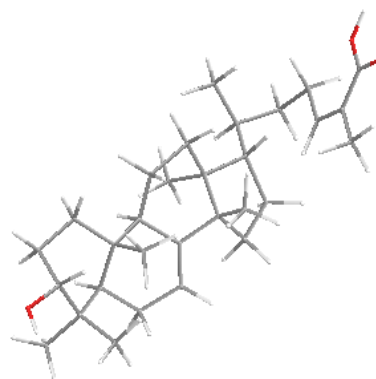


Figura VI. 10. Ácido 3α -hidroximasticadienónico (2).

6.4 Obtención de los derivados: 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3), 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4), 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5), 3-7, a partir del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (2). (Figura VI.11).

Una de las aproximaciones más utilizadas para incrementar la potencia de las actividades biológicas de algunos metabolitos secundarios, es modificar la estructura original por métodos químicos. En la literatura, se señalan varias modificaciones estructurales de varios triterpenos, principalmente de esqueletos de tipo ursano y oleanano (Mahato y Sen, 1997; Akihisa y Yasukawa, 2001; Patocka, 2003; Connolly y Hill, 2005,).

Como parte de nuestro estudio sistemático de los metabolitos secundarios presentes en *A. adstringens*, hemos informado de las actividades de inhibición de crecimiento de células cancerosas y antiinflamatorias de los tirucalanos **1** y **2**, así como la obtención de varios derivados a partir de éstos triterpenos.

Nuestros resultados indicaron que los derivados ácidos 24,25S-dihidromasticadienónico y masticadienónico (3 β -hidroxi-masticadienónico) mostraron mayor actividad contra las células de cáncer de colon (Oviedo y Martínez Vázquez, 2005).

No obstante que los derivados **3**, **4**, **5** y **6** han sido obtenidos durante otros estudios, la inhibición de proliferación de células cancerosas de éstos derivados no ha sido evaluada. Con el fin de tratar de establecer una relación de cambios estructurales con la actividad biológica, se decidió obtener éstos derivados, así como la obtención del nuevo 3 α -acetoxi-tirucala-7E, 24Z-dien-26-olato de metilo (**7**).

Figura VI.11. Esquema general de modificaciones estructurales al ácido (2).

6.4.1 Esterificación.

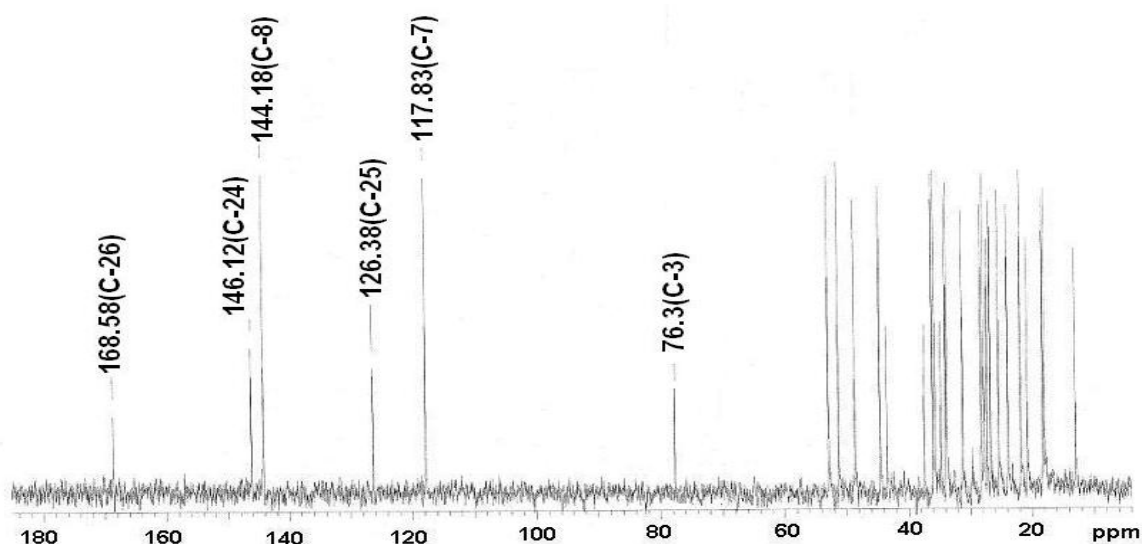
6.4.1.1 Obtención del 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).

El éster metílico **3**, se obtuvo al tratar el ácido **2** con una disolución etérea de diazometano, (Figura VI.12). El mecanismo de reacción se explica por el carácter nucleofílico de uno de los átomos de oxígeno del grupo carboxilo, quien ataca al grupo metilo del diazometano y tras la pérdida de la molécula de N₂ se origina el residuo de éster.

Figura VI.12. Metilación del ácido 3 α - hidroximasticadienónico (**2**), para la obtención del 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (**3**).

6.4.1.2 Caracterización del 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).

Los espectros de RMN ¹H (Figura VI.14) y ¹³C de **3** (Figura VI.13) son muy similares al del compuesto **2**, excepto que ahora se observaron las señales asociadas a la formación del éster metílico (51.15 ppm ¹³C, 3.73 ppm ¹H).



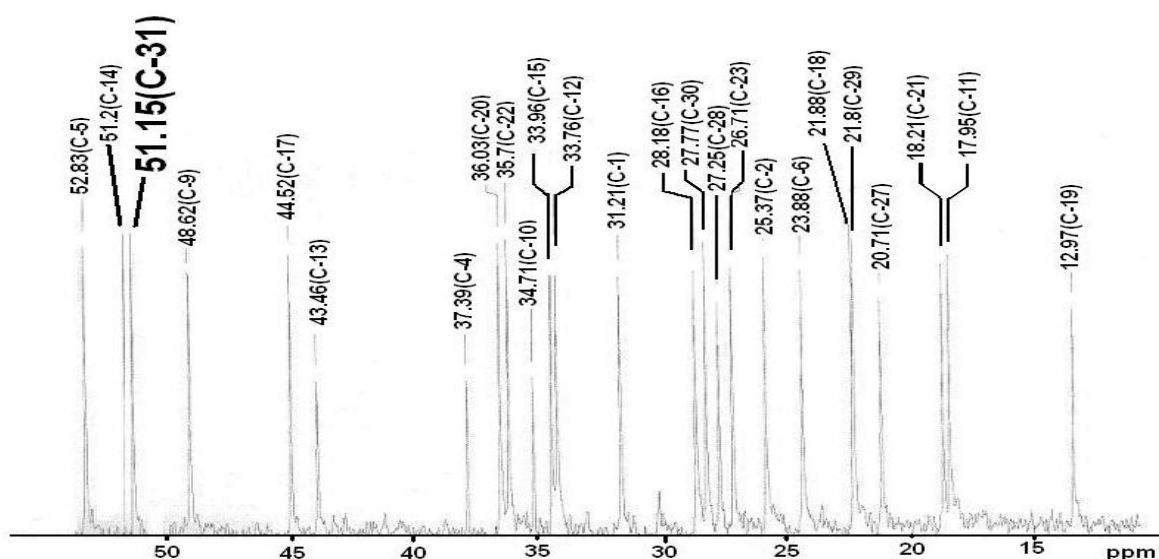


Figura VI.13. Espectro de RMN ^{13}C de (3).

Tabla VI. 3. Señales del espectro de RMN ^{13}C de (3).

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-26	172.25	C=O	C-15	33.96	CH ₂
C-24	147.11	H-C=C	C-12	33.76	CH ₂
C-8	146.14	C=C	C-1	31.25	CH ₂
C-25	125.7	C=C	C-16	28.16	CH ₂
C-7	117.87	H-C=C	C-30	27.74	CH ₃
C-3	76.32	H-C-OH	C-28	27.27	CH ₃
C-5	52.79	H-C	C-23	26.89	CH ₂
C-14	51.25	C	C-2	25.35	CH ₂
C-31	51.15	-O-CH₃	C-6	23.88	CH ₂
C-9	48.62	H-C	C-18	21.77	CH ₃
C-17	44.62	H-C	C-29	21.03	CH ₃
C-13	43.52	C	C-27	20.51	CH ₃
C-4	37.41	C	C-21	18.2	CH ₃
C-20	36.11	H-C	C-11	17.95	CH ₂
C-22	35.38	CH ₂	C-19	12.95	CH ₃
C-10	34.74	C			

En la Tabla VI. 3 se muestran los desplazamientos de los átomos de carbono en ppm, del espectro de RMN ^{13}C de **3** identificando los 31 átomos de carbono correspondientes al 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (**3**).

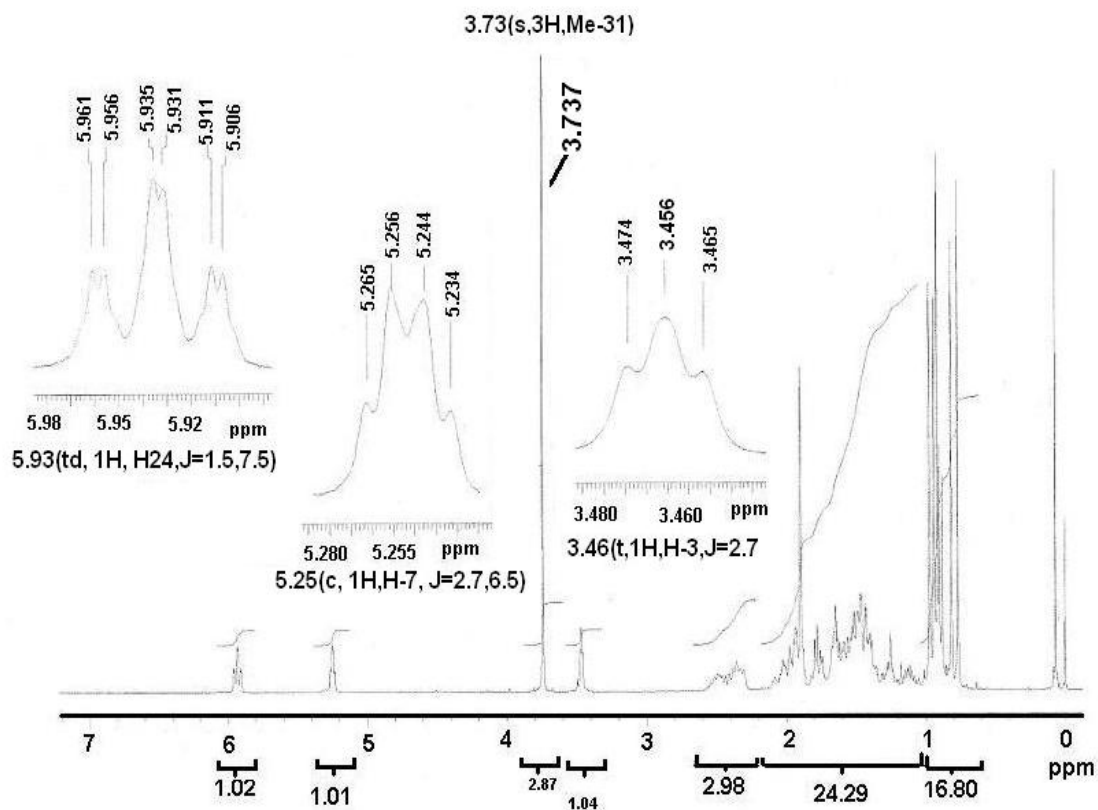


Figura VI.14. Espectro de RMN ^1H de (3).

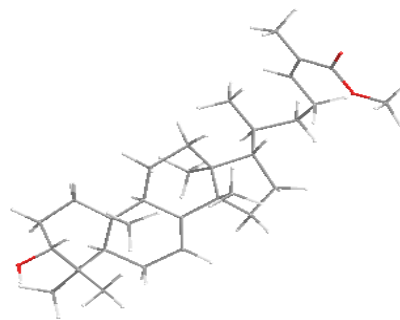


Figura VI.15. 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3).

6.4.1.3 Obtención de 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).

El derivado **5**, se obtuvo de la reacción de **2** con etanol anhidro catalizada por ácido sulfúrico (Figura VI.16). Los rendimientos moderados de la reacción se explican por la reversibilidad de los pasos implicados, es decir, la formación del éster se favorece por el exceso de etanol y el agua resultante interviene en la hidrólisis del éster.

Figura VI.16. Obtención de 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).

6.4.1.4 Caracterización del 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5)

La formación del éster etílico en **5** fue evidenciado por las señales del residuo de etilo en RMN ^1H y ^{13}C . Así, en el espectro de RMN de ^1H se observó un cuarteto a 4.19 ppm, que integra para 2H, esta señal se asignó a el grupo CH_2 en la posición C-31, mientras que el triplete a 1.25 ppm, que integra para tres protones fue asignado al grupo CH_3 de la posición C-32.

El espectro de masas de **5** presento un ión molecular de 484 m/z para una fórmula mínima de $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$, (Figura VI.17), la cual está de acuerdo con la formación del éster etílico de **2**.

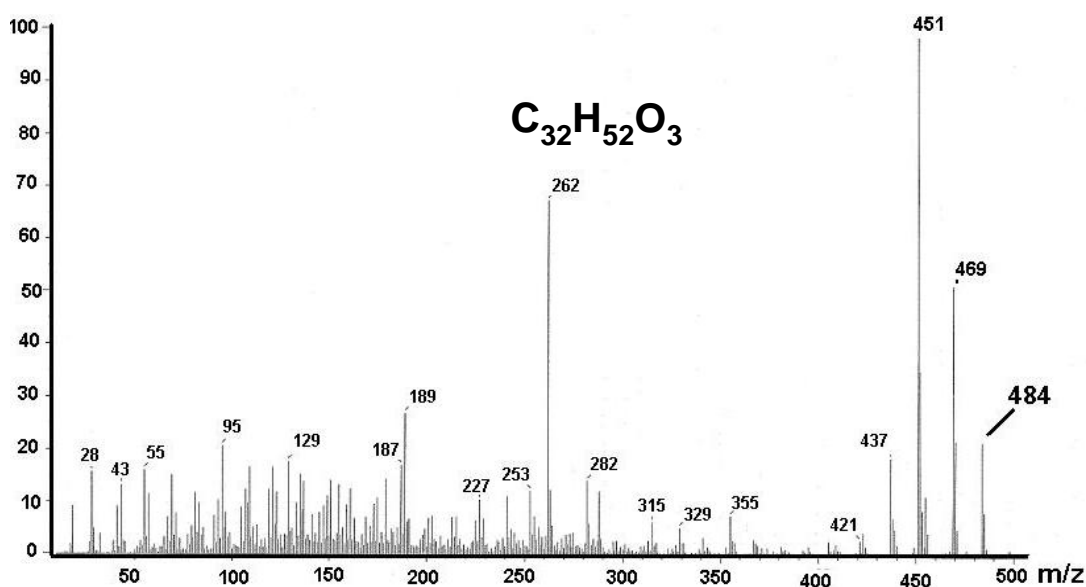


Figura VI.17. Espectro de masas de (5).

Adicionalmente, en el espectro de RMN ^1H de **5** (Figura VI.18) se observó a 5.90 ppm un triple de dobles, que integra para un protón, característico del carbono vinílico H-24. En 3.44 ppm se observó un triplete, que integra para un protón el cual fue asignado a H-3.

Sin embargo, la señal característica, en el compuesto **2**, del protón H-7 a 5.31 ppm, en el espectro de **5** no se observó.

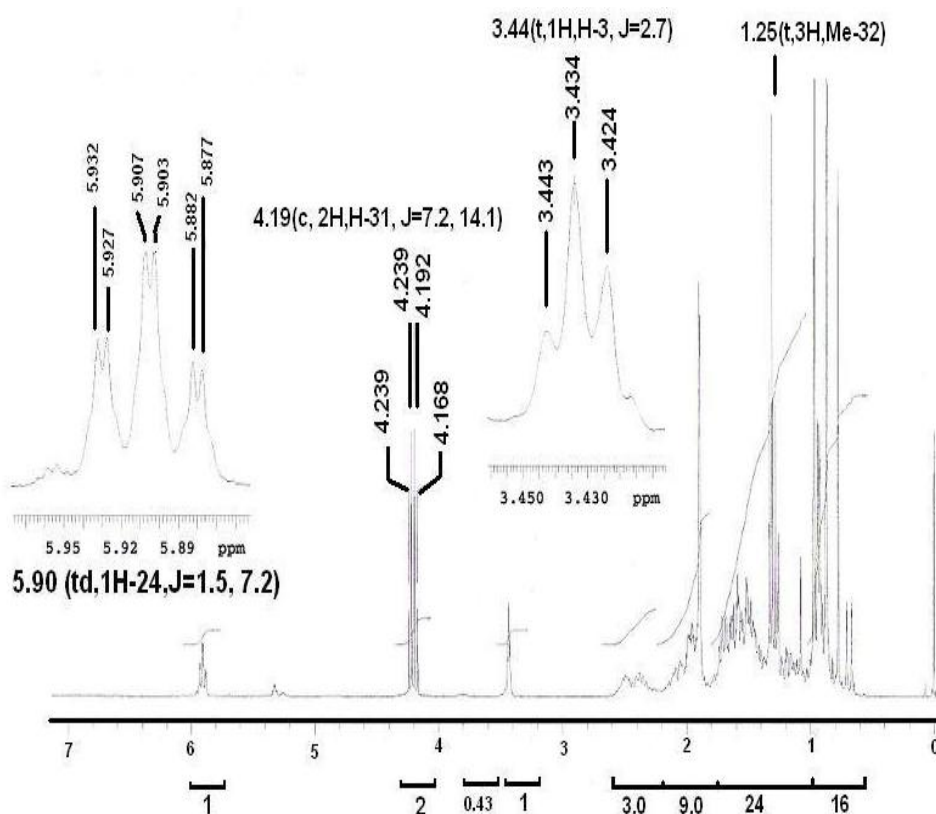


Figura VI.18. Espectro de RMN ^1H de (**5**).

En el espectro de RMN ^{13}C de **5**, (Figura VI.19), se observaron las 32 señales para los 32 átomos de carbono indicados por la fórmula mínima. También se observaron, con respecto al espectro de **2**, dos nuevas señales, una en 51.15 ppm asignada al metileno en C-31, mientras que la señal a 14.32 ppm fue asignada al grupo metilo en C-32, comprobando la formación del éster etílico.

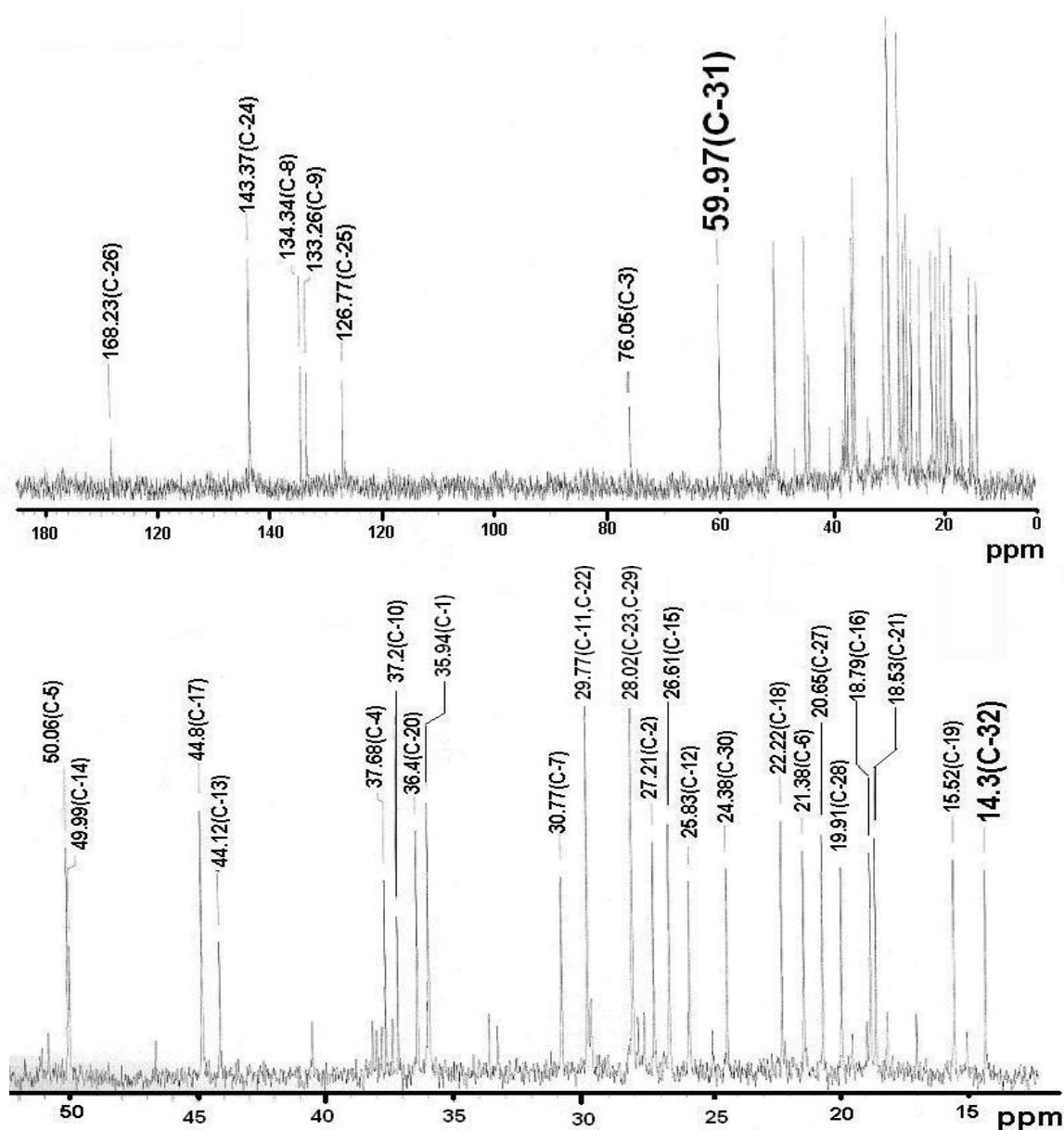


Figura VI.19. Espectro de RMN ^{13}C de (5)

La comparación de los espectros de RMN ^{13}C de **2** y **5**, mostró que en el espectro de **5**, la señal del carbono vinílico C-7 a 117.87ppm, característico de **2**, estaba ausente. Sin embargo se observaron dos nuevas señales a 134.34 ppm y a 133.26ppm para átomos de carbono que no están unidos a átomos de hidrógeno. Tomando en cuenta los datos de IR, EM y RMN ^1H y ^{13}C , se propuso que la doble ligadura en C7-C-8 presente en **2**, se desplazo, en el derivado **5**, a los átomos C8-C-9. Propuesta que fue confirmada por datos de la literatura (Oviedo y Martínez, 2005).

Tabla VI. 4. Señales del espectro de RMN ¹³C de (5).

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-26	168.23	C=O	C-7	30.77	CH₂
C-24	143.37	H-C=C	C-11,C-22	29.77	CH ₂
C-8	134.33	C=C	C-23,C-29	28.03	CH ₂
C-9	133.26	C=C	C-2	27.21	CH ₂
C-25	126.77	C=C	C-15	26.61	CH ₂
C-3	75.93	H-C-OH	C-12	25.83	CH ₂
C-31	59.97	CH₂	C-30	24.38	CH ₂
C-5	50.06	H-C	C-18	22.22	CH ₃
C-14	49.99	C	C-6	21.38	CH ₂
C-17	44.8	H-C	C-27	20.65	CH ₃
C-13	44.12	C	C-28	19.91	CH
C-4	37.68	C	C-16	18.78	CH ₂
C-10	37.17	H-C	C-21	18.58	CH ₃
C-20	36.4	CH ₂	C-19	15.52	CH ₃
C-1	35.94	C	C-32	14.32	CH₃

En la Tabla VI. 4 se muestran los átomos de carbono y sus desplazamientos en ppm, del espectro de espectro RMN ¹³C de 5, identificando los 32 átomos de carbono correspondientes al 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).

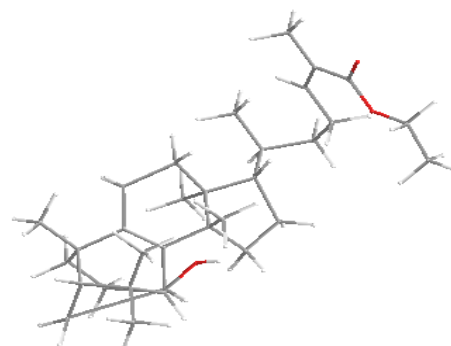


Figura VI.20. 3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (5).

6.4.2 Hidrogenación catalítica.

El 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**) se generó a partir de la hidrogenación de **3** utilizando Pd/C, como catalizador (Figura VI.21).

Figura VI.21. Obtención de 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (4**).**

6.4.2.1 Caracterización de 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**).

El espectro de RMN de ^1H de **4** es muy similar al espectro de **3**, excepto que, como era de esperarse, la señal a 6.09 ppm, asignado al protón H-24 en **3**, ya no se observa en el espectro del derivado **4** (Figura VI.22). Sin embargo a 5.25 ppm se observó un cuarteto, que integra para un protón, característico del protón vinílico H-7.

La comparación de los espectros de RMN ^{13}C de **3** y **4** (Figura VI.23) mostró que en éste último, las señales de los átomos de carbono vinílicos estaban ausentes, sin embargo se observaron dos nuevas señales, en 39.51 ppm asignada a (C-25) y otra en 24.0 ppm asignada a (C-24), comprobando que desapareció el doble enlace ubicado en C24-C25.

La quimioselectividad de la doble ligadura en C24-C-25 sobre aquella en C7-C8 posiblemente se debe a que ésta última presenta mayor efecto estérico que la primera. La estereoquímica S para el nuevo centro quiral formado se propuso tomando en cuenta la estereoquímica, determinada por rayos X, del ácido 24,25S dihidromasticadienónico obtenido a partir de la hidrogenación de **1**.

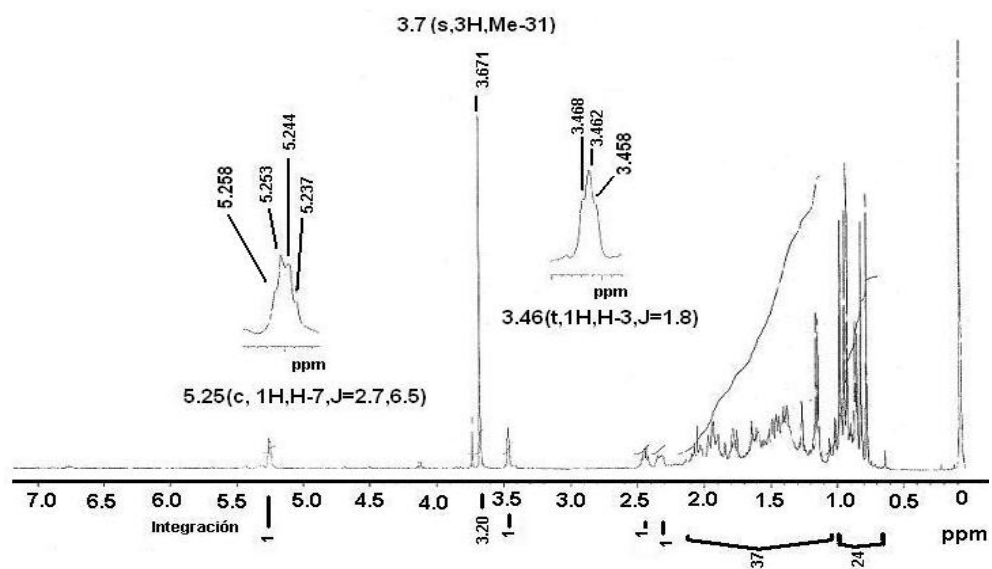


Figura VI.22. Espectro de RMN ^1H de (4).

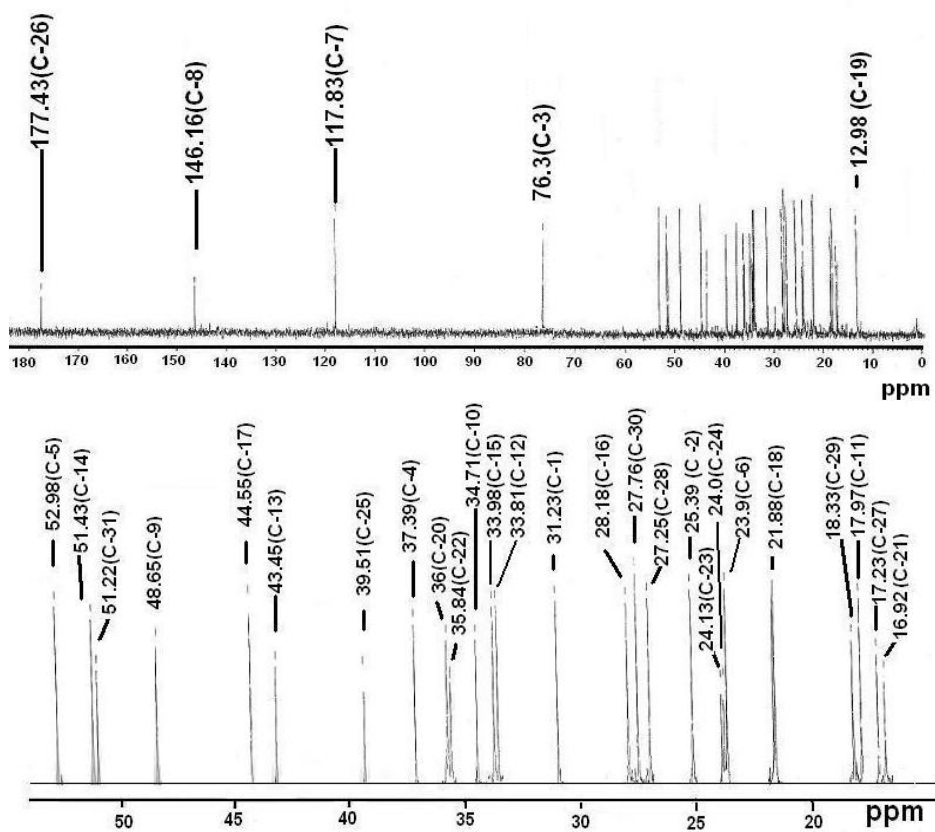


Figura VI.23. Espectro de RMN ^{13}C de (4).

En la Tabla VI. 5 se muestran los átomos de carbono y sus desplazamientos en ppm, del espectro de RMN ^{13}C de **4**, identificando los 31 átomos de carbono correspondientes al 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**).

Tabla VI. 5. Señales del espectro de RMN ^{13}C de (**4**).

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-26	177.43	C=O	C-12	33.81	CH ₂
C-8	146.16	H-C=C	C-1	31.23	CH ₂
C-7	117.83	C=C	C-16	28.18	CH ₂
C-3	76.32	H-C-OH	C-30	27.76	CH ₃
C-5	52.98	H-C	C-28	27.25	CH ₃
C-14	51.43	C	C-2	25.39	CH ₂
C-31	51.22	CH₃	C-23	24.13	CH ₂
C-9	48.65	H-C	C-24	24.0	CH₂
C-17	44.55	H-C	C-6	23.9	CH ₂
C-13	43.45	C	C-18	21.88	CH ₃
C-25	39.51	H-C	C-29	18.33	CH ₃
C-4	37.39	C	C-11	17.97	CH ₂
C-20	36.0	CH	C-27	17.23	CH ₃
C-22	35.8	CH ₂	C-21	16.92	CH ₃
C-10	34.72	C	C-19	12.98	CH ₃
C-15	33.98	CH ₂			

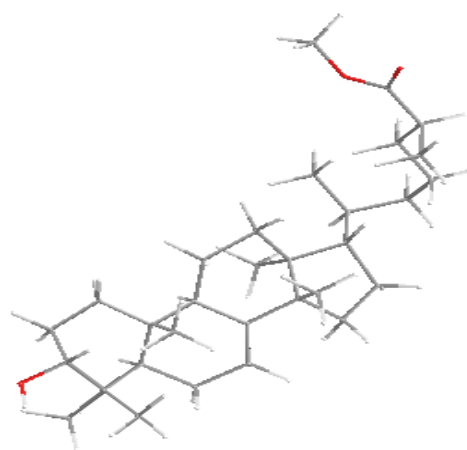


Figura VI.24. 3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**).

6.4.3 Acetilación.

Los derivados acetilados **6** y **7** se generaron a partir del tratamiento de **2** y **3**, respectivamente, con anhídrido acético y piridina (Figura VI.25) y (Figura VI.30).

Figura VI.25. Acetilación del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**), para la obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico(**6**).

6.4.3.1 Caracterización del ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (**6**).

La formación en **6** del nuevo grupo acetilo fue comprobado por las señales, en el espectro de RMN ^1H a 2.07 ppm (3H) y a 4.68 ppm, asignados al metilo del residuo de acetato y al protón en C-3, respectivamente.

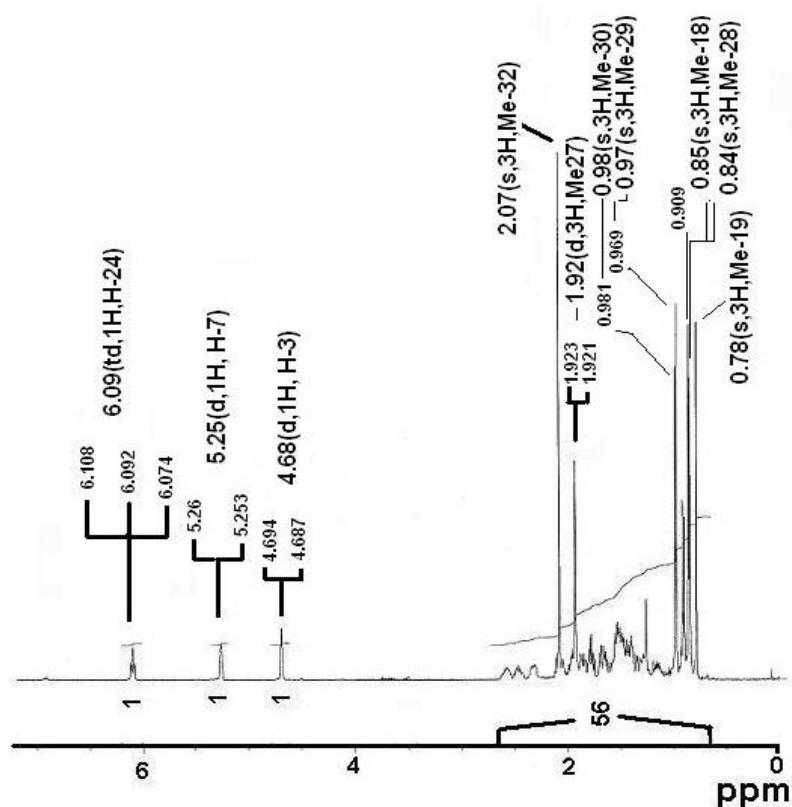


Figura VI.26. Espectro de de RMN ^1H de (**6**).

En el espectro de RMN ^{13}C de **6**, (Figura VI.27), se observan las señales asignadas al residuo de acetato a 170.83 (CO) ppm y a 21.31 (Me) ppm.

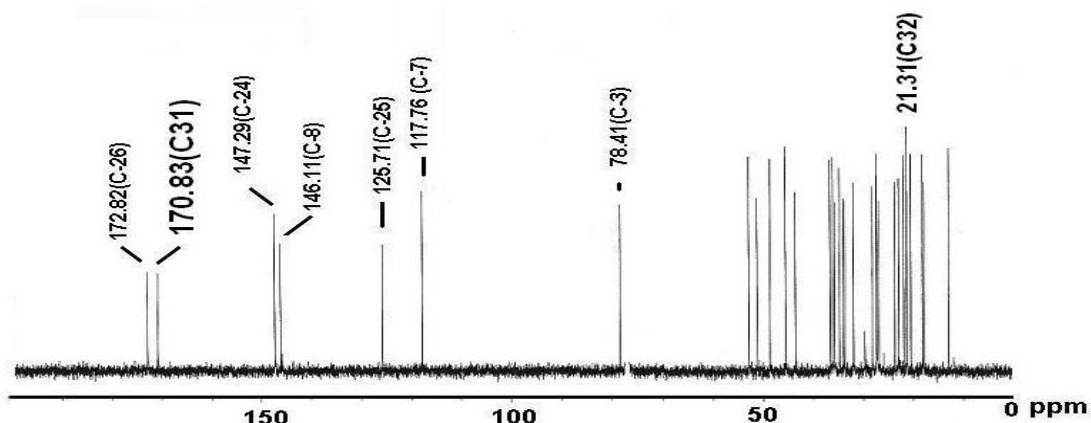


Figura VI.27. Espectro de de RMN ^{13}C de (6).

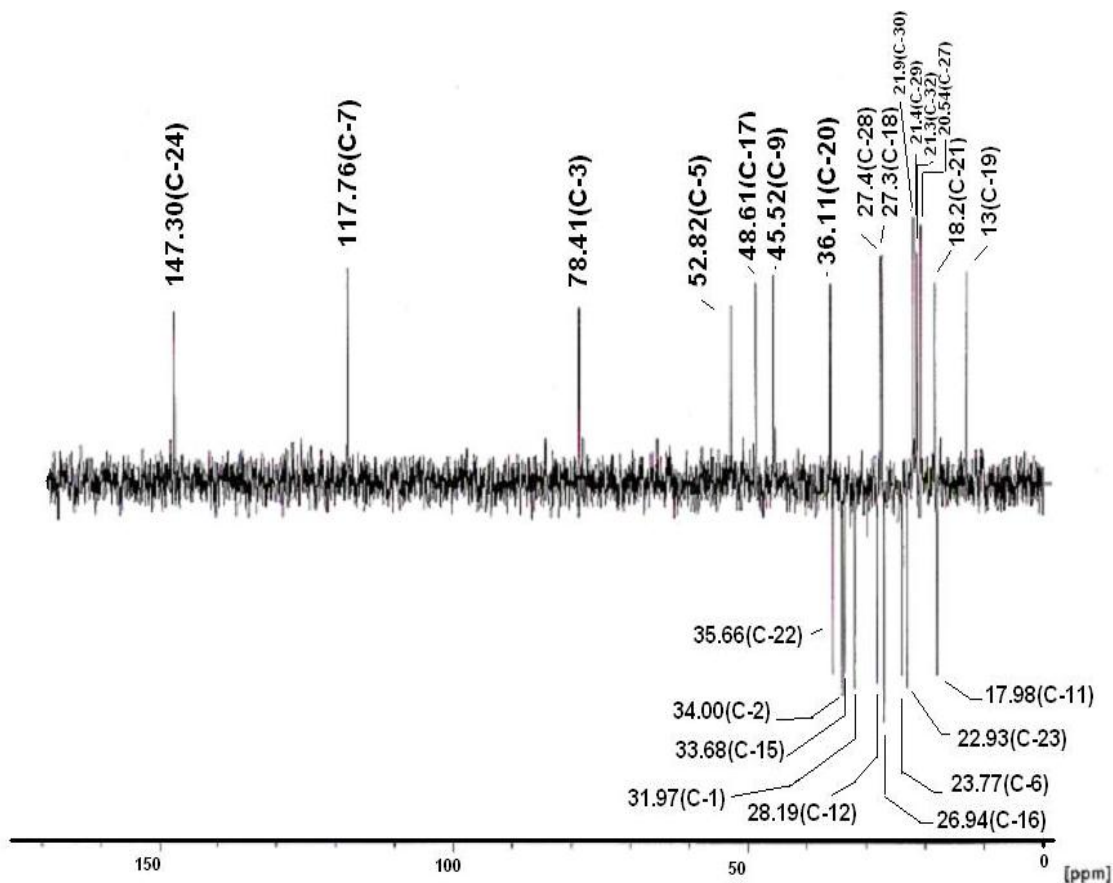


Figura VI.28. DEPT de (6).

En la Tabla VI. 6 se muestran los átomos de carbono y sus desplazamientos en ppm, del espectro RMN ^{13}C de 6, identificando los 32 átomos de carbono correspondientes al 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6).

Tabla VI. 6. Señales del espectro de RMN ^{13}C de (6).

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-26	172.25	C=O	C-2	34.0	CH ₂
C-31	170.83	C=O	C-15	33.7	CH ₂
C-24	147.29	H-C=C	C-1	31.96	CH ₂
C-8	146.11	C=C	C-12	28.19	CH ₂
C-25	125.71	C=C	C-28	27.39	CH ₃
C-7	117.76	H-C=C	C-18	27.27	CH ₃
C-3	78.41	H-C-O-	C-16	26.93	CH ₂
C-5	52.82	H-C	C-6	23.77	CH ₂
C-14	51.24	C	C-23	22.93	CH ₂
C-17	48.61	H-C	C-30	21.92	CH ₃
C-9	45.52	H-C	C-29	21.44	CH ₃
C-13	43.51	C	C-32	21.31	CH₃
C-4	36.59	C	C-27	20.54	CH ₃
C-20	36.11	H-C	C-21	18.23	CH ₃
C-22	35.66	CH ₂	C-11	17.98	CH ₂
C-10	34.70	C	C-19	12.96	CH ₃

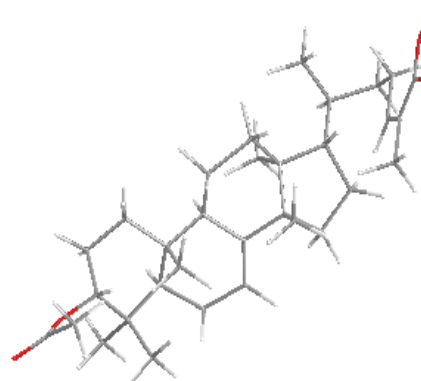


Figura VI.29. Ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (6).

6.4.3.2 Obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).

Figura VI.30. Acetilación de 3 α -hidroximasticadienolato de metilo (3), para la obtención de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo(7).

6.4.3.3. Caracterización de 3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7).

En el espectro de IR de 7, (Figura VI.31), se observa el aumento de la banda asociada al grupo carbonilo y es evidente la ausencia de la banda alrededor de 3500 cm⁻¹ asociada al grupo hidroxilo.

Por otro lado, en el espectro de masas de 7, (Figura VI.32), se observa el ión molecular a 512 m/z para una formula mínima de C₃₃H₅₂O₄. Estos datos indican la formación del acetato en 7.

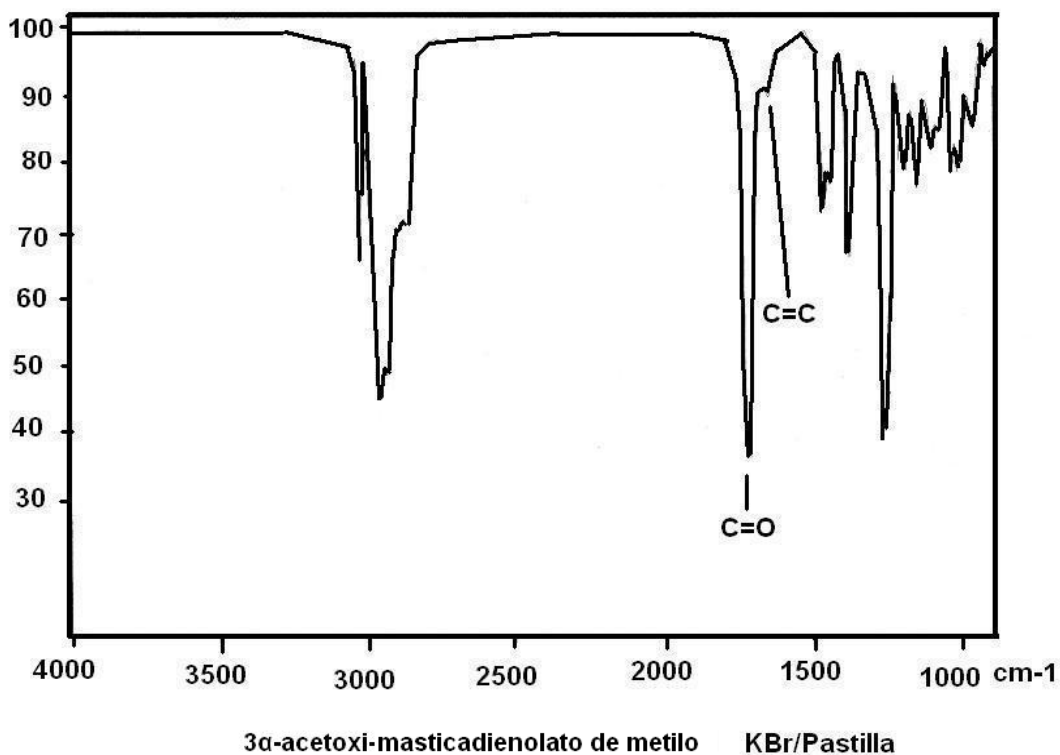


Figura VI.31. Espectro de IR de (7).

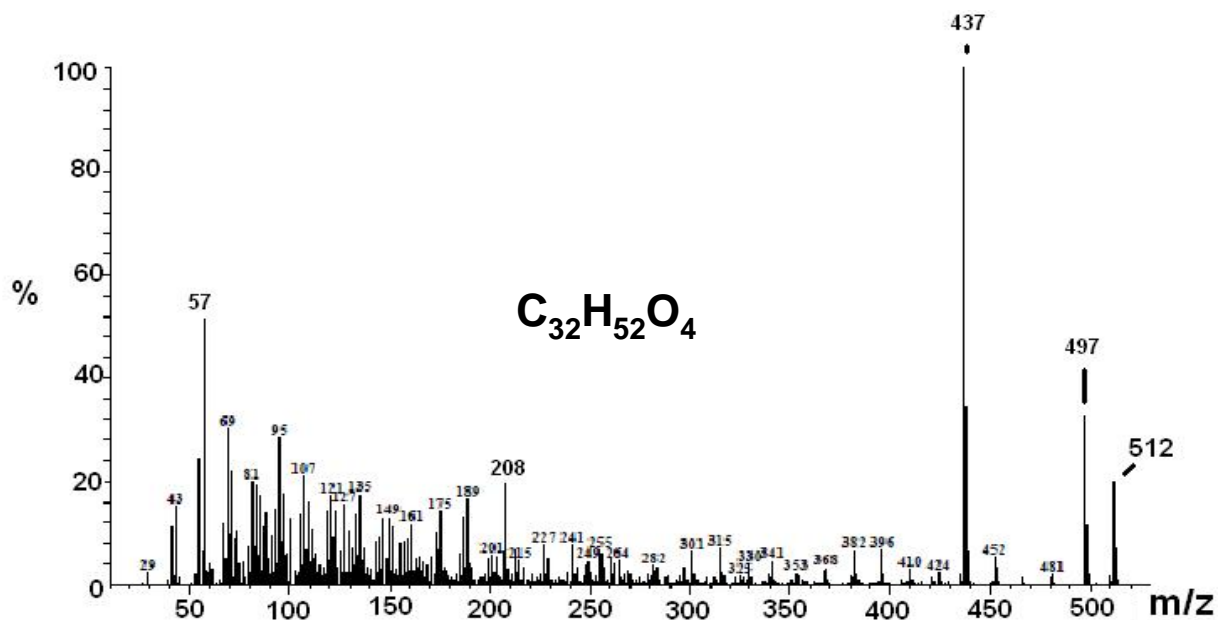


Figura VI.32. Espectro de masas de (7).

En el espectro de RMN ^1H de 7 (Figura VI.33) se observa un singulete a 2.07 ppm, que integra para 3 protones así como el corrimiento a campos bajos del protón en C-3 a 4.69 ppm. Estas señales corroboran la formación del acetato en C-3. En 3.73 ppm observamos un singulete que integra para tres protones, confirmando el éster metílico en 7.

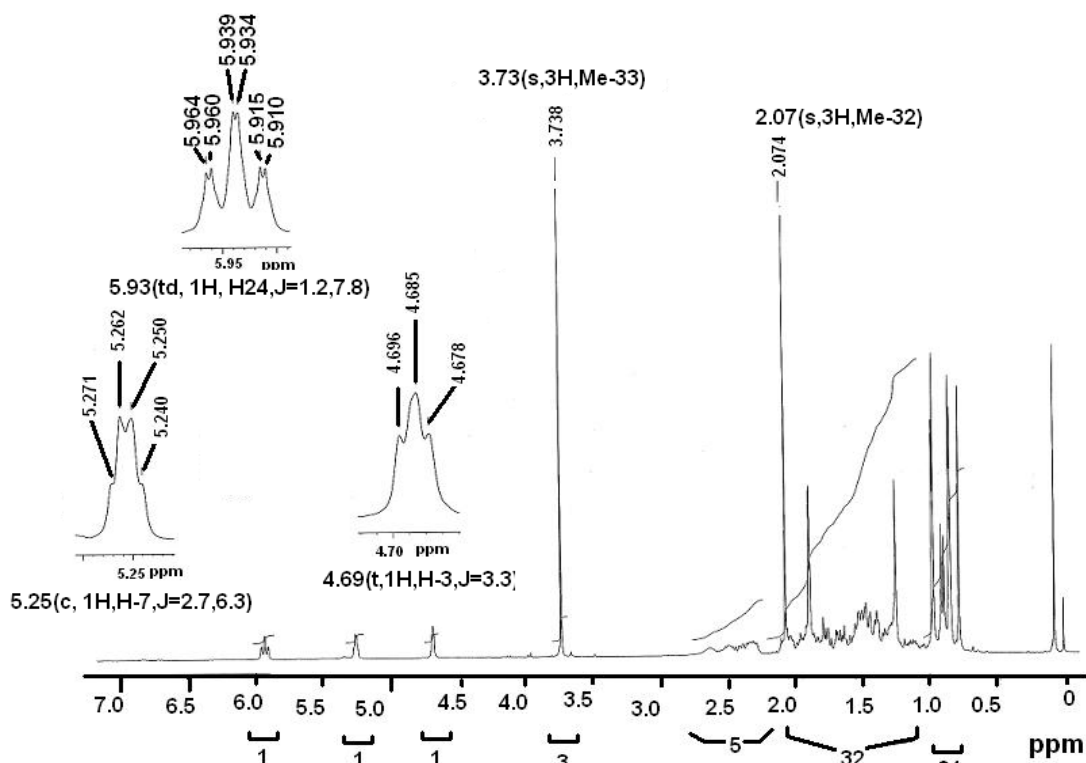


Figura VI.33. Espectro de RMN ^1H de (7).

En el espectro de RMN ^{13}C de 7, se observaron 33 señales, (VI.34). Se detectaron tres nuevas señales con respecto al espectro de RMN ^{13}C de 2. En 168.55 ppm que corresponde a un carbonilo (C-31) y 21.32 ppm asignada a un Metilo (C-32), juntas las dos señales confirman la inserción del grupo acetato, la otra señal está en 51.17 ppm que corresponde a un Metilo (C-33) que confirma el éster metílico.

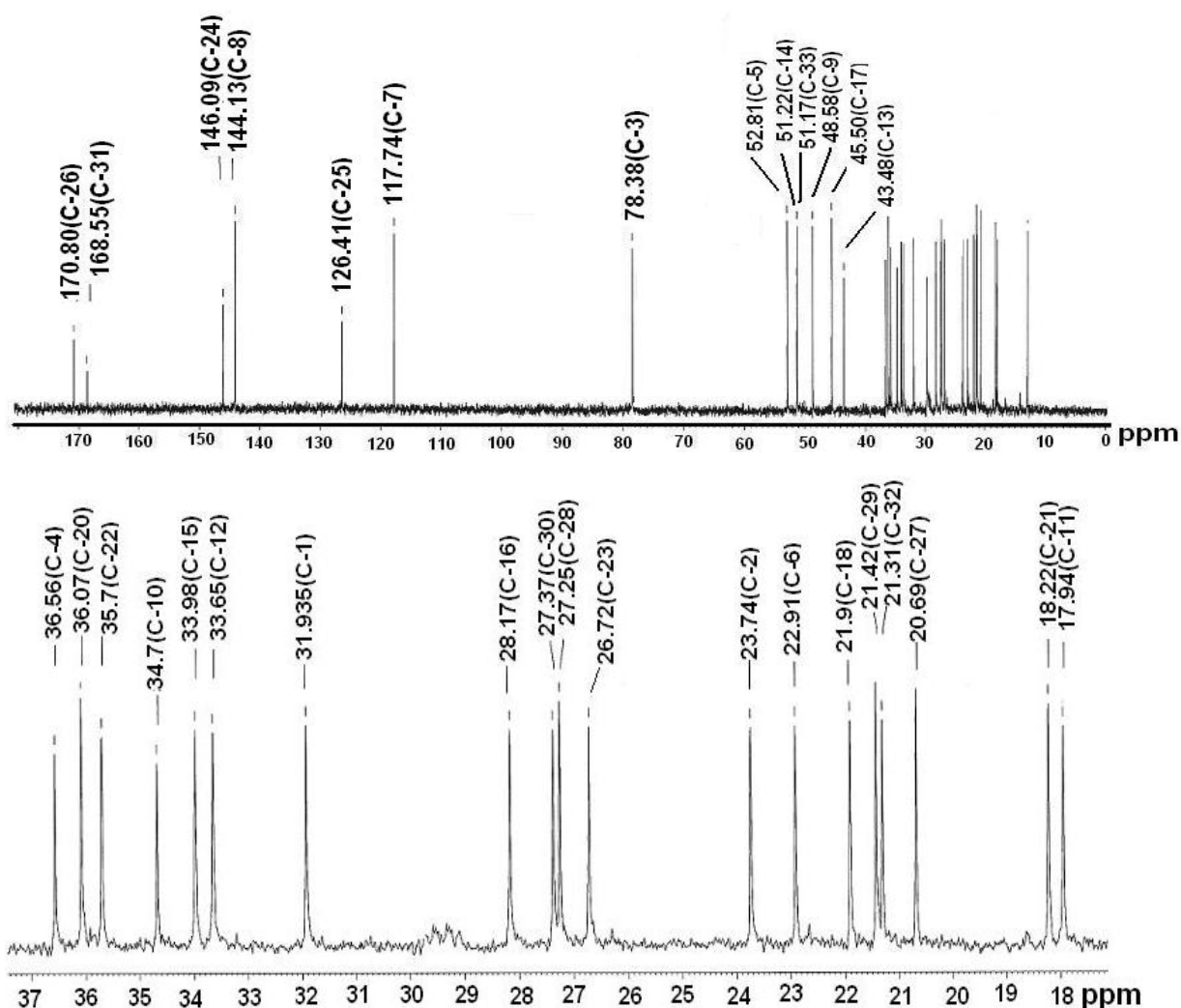


Figura VI.34. Espectro de RMN ^{13}C de (7).

En la Tabla VI.7 se muestran los átomos de carbono y sus desplazamientos en ppm, del espectro de RMN ^{13}C de **7**, identificando los 33 átomos de carbono correspondientes al 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (**7**).

Tabla VI. 7. Señales del espectro de RMN ^{13}C de (7**).**

Átomo	ppm	Tipo de Carbono	Átomo	ppm	Tipo de Carbono
C-26	170.80	C=O	C-15	33.98	CH ₂
C-31	168.55	C=O	C-12	33.65	CH ₂
C-24	146.09	H-C=C	C-1	31.93	CH ₂
C-8	144.13	C=C	C-16	28.17	CH ₂
C-25	126.41	C=C	C-30	27.37	CH ₃
C-7	117.74	H-C=C	C-28	27.25	CH ₃
C-3	78.30	H-C-OH	C-23	26.71	CH ₂
C-5	52.81	H-C	C-2	23.74	CH ₂
C-14	51.22	C	C-6	22.91	CH ₂
C-33	51.17	CH₃	C-18	21.9	CH ₃
C-9	48.58	H-C	C-29	21.44	CH ₃
C-17	45.50	H-C	C-32	21.31	CH₃
C-13	43.52	C	C-27	20.69	CH ₃
C-4	36.56	C	C-21	18.22	CH ₃
C-20	36.11	H-C	C-11	17.94	CH ₂
C-22	35.7	CH ₂	C-19	12.94	CH ₃
C-10	34.7	C			

De acuerdo con el análisis espectroscópico del compuesto **7**, confirmamos que esté se trata del 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (**7**).

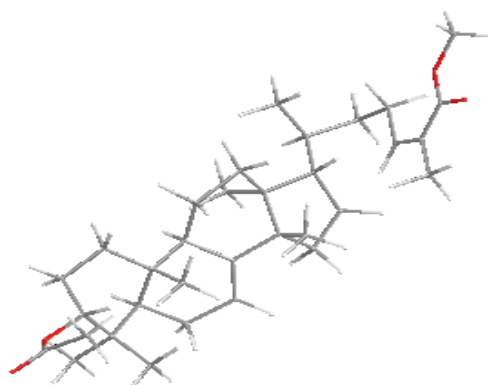


Figura VI.35. 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (7**).**

6.5 Inhibición de proliferación de células cancerosas.

Se evaluaron las actividades de inhibición de proliferación celular de **2** y sus derivados **3-7** en las líneas de cáncer humano: sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3), leucemia promielocítica (K-562), colon (HCT -15), mama (MCF-7) y pulmón (SKUL-1).

En la Tabla VI.9 se encuentran los resultados de la inhibición. El ácido 3α -hidroximasticadienónico (**2**) fue selectivo en contra de la línea de sistema nervioso central mientras que el derivado ácido 3α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (**6**) fue el que mostró 100% de inhibición en cinco líneas de las seis ensayadas.

Con la finalidad de realizar un análisis más preciso, se discutirán los resultados por línea celular comparando los valores de **2** con aquellos de **3-7**.

En las líneas de próstata (PC-3), el compuesto original **2**, solo mostró cerca del 30% de inhibición mientras que los compuestos **3** (92%), **5** (94.6%) y **6** (100%) mostraron mucho mayor actividad. La misma tendencia fue observada para las líneas de colon (HCT-15) y mama (MCF-7).

Aunque son varios los factores que pueden influir en la actividad inhibitoria de estos compuestos, no obstante el efecto estérico y los electrónicos influyen de manera importante para los efectos biológicos.

Con el fin de correlacionar los efectos de volumen (estéricos) con la actividad inhibitoria, se determinaron los conformeros más estables de **2** y sus derivados **3**, **5** y **6**.

En la Tabla VI. 8 solo se muestran los esqueletos carbonados de **2**, **3**, **5** y **6**, omitiéndose la representación de los protones. Los conformeros se calcularon

utilizando el método MM2 proporcionado en el programa Chem Bio Draw Ultra 12.0.

La comparación de las estereoestructuras **3**, **5** y **6** con aquella de **2** muestra que no existe una gran diferencia entre ellas. Este resultado sugiere que la diferencia de la actividad inhibitoria de la proliferación celular de estos triterpenos se debe principalmente a efectos electrónicos.

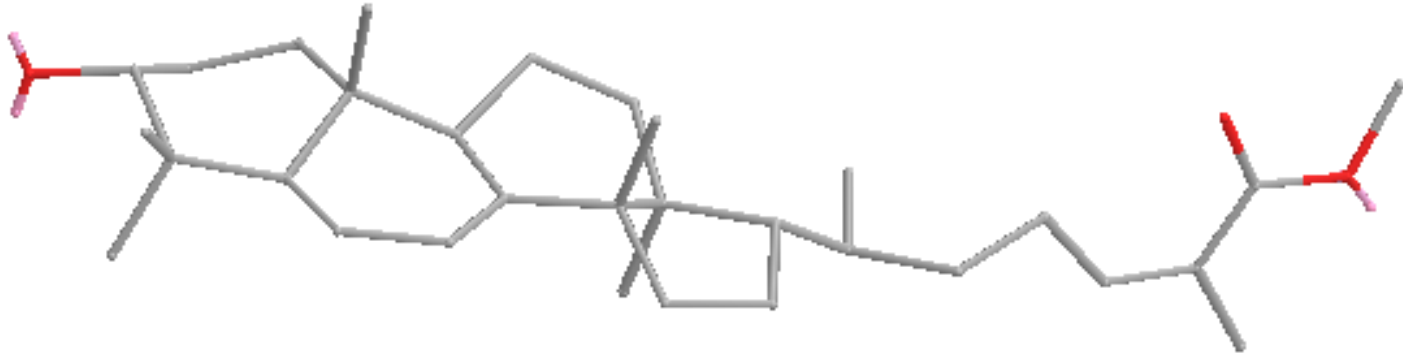
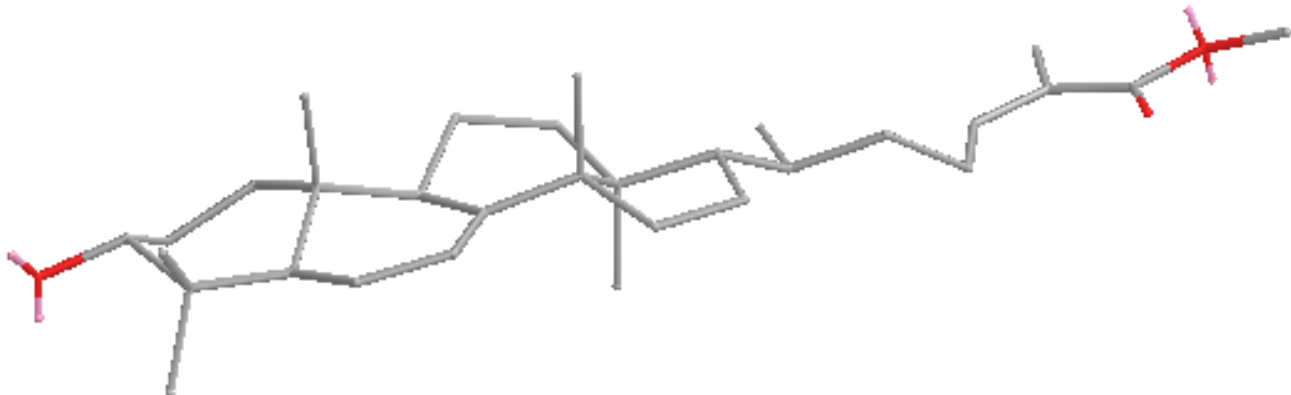
Así el cambio de un grupo polar como el hidróxilo en C-3 presente en **2**, por un residuo de menor polaridad como el acetilo, como en **6**, le confiere mayor actividad.

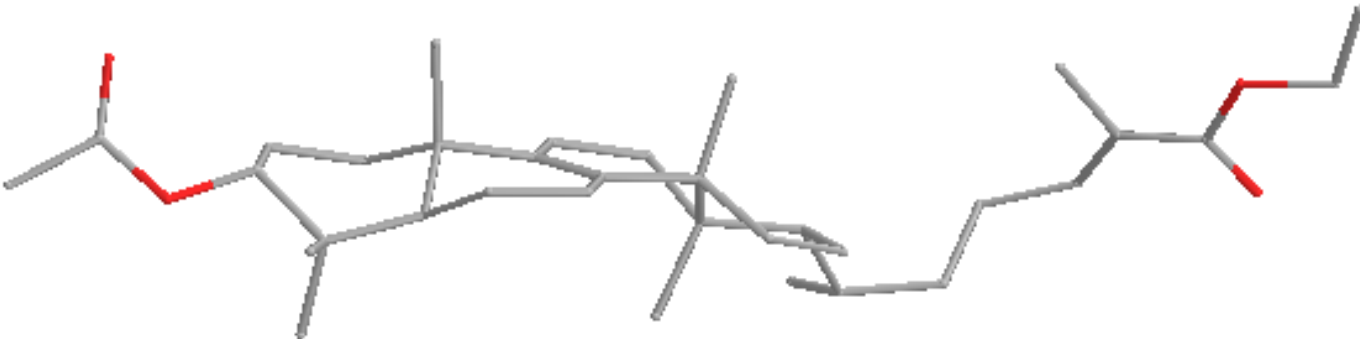
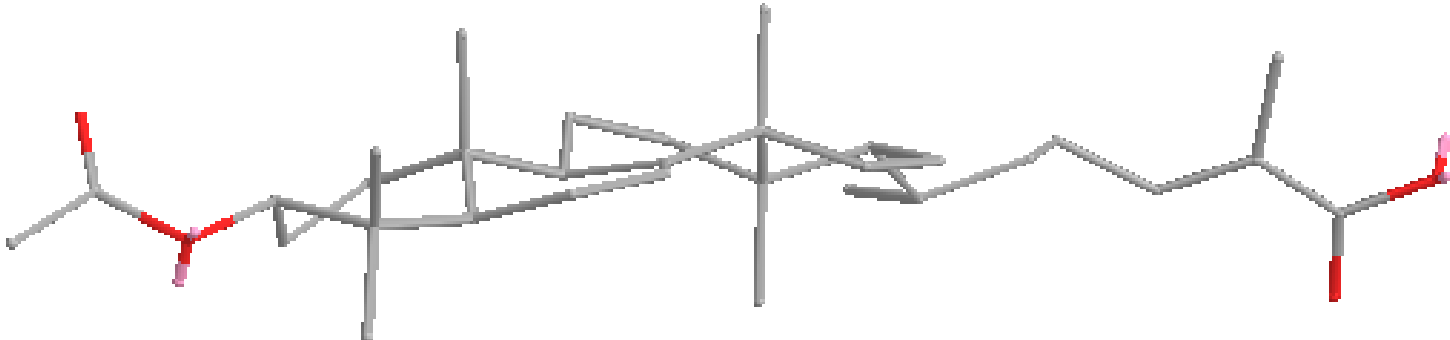
Sin embargo, los derivados **5** y **7** que son los compuestos de menor polaridad ensayados, mostraron muy diferente actividad mientras que **5** fue activo en las líneas de próstata (PC-3), de colon (HCT-15) y de mama (MCF-7), el derivado **7** fue inactivo en todas las líneas ensayadas.

En resumen nuestros resultados indican que para una mejor actividad inhibitoria debe formarse un grupo menos polar como un residuo de acetilo en C-3 y dejar libre el ácido carboxílico en el C-25.

Esta es una relación cualitativa de la variación estructural con la actividad biológica, sin embargo para un mejor análisis es necesario realizar una relación cuantitativa (QSAR).

Tabla VI. 8. Esqueletos hidrocarbonatos de 2, 3, 5 y 6.

Estructura	Esqueletos hidrocarbonados de los conformeros más estables calculados por MM2.
2	
3	

5	
6	

Con el fin de validar las estereoestructuras obtenidas por MM2, se comparó la estereoquímica de **2** obtenida por difracción de rayos X (Figura Vi.36), con aquella obtenida por métodos teóricos (Figura Vi.37). La comparación indica una gran similitud entre las dos estereoestructuras, validando así nuestros cálculos teóricos.

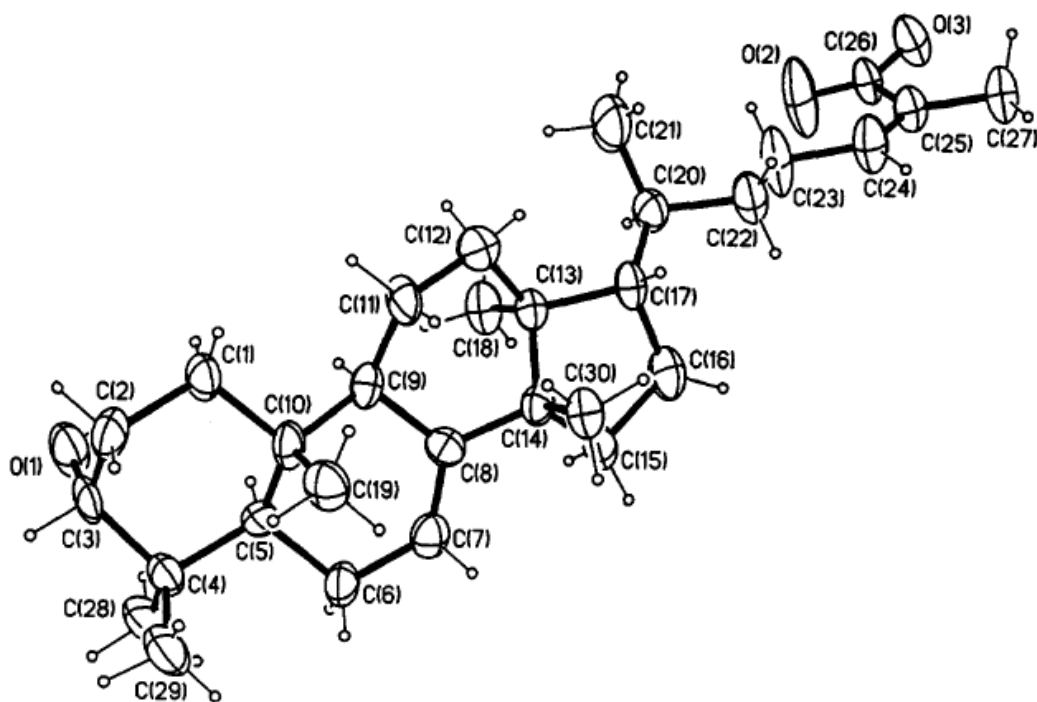


Figura VI.36. Imagen del ácido 3 α -hidroximasticadienónico obtenida por difracción de rayos X. (*Phytochemistry*, Vol. 39, No. 3, pp. 537-547, 1995).

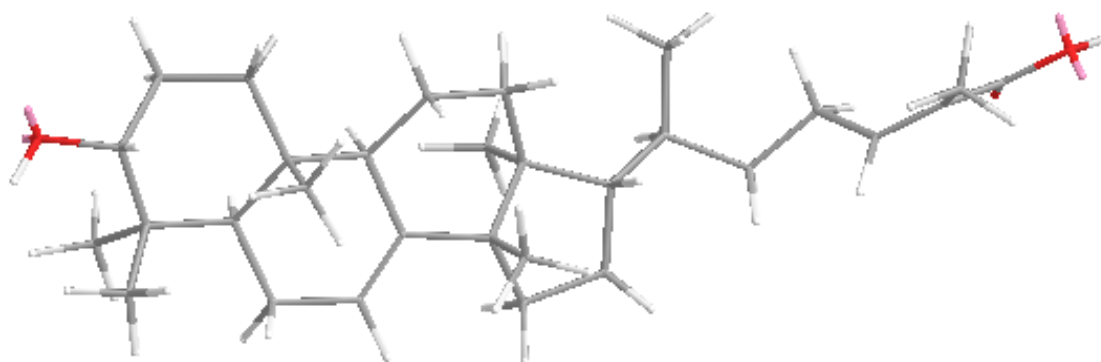


Figura VI.37. Imagen del ácido 3 α -hidroximasticadienónico obtenida por cálculos utilizando MM2.

Tabla VI. 9. Porcentaje de inhibición de proliferación celular de los compuestos 2-7 a una concentración de 50µg/mL.

Derivado	PC-3	HCT-15	SKUL-1	U-251	MCF-7	K-562
2	29.80	36.30	n.d	100.0	41.88	24.20
3	92.00	100.0	91.84	69.37	89.11	90.12
4	66.21	35.16	62.41	96.55	79.80	71.22
5	94.60	100.0	15.32	100.0	100.0	0.30
6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	58.53
7	14.51	s.a.	19.33	3.90	s.a.	61

Líneas de cáncer humano: **(U-251)** sistema nervioso central, **(PC-3)** próstata, **(K-562)** leucemia promielocítica, **(HCT -15)** colon, **(MCF-7)** mama y **(SKUL-1)** pulmón. **n.d**= no determinado; **s.a**= sin actividad.

7 Conclusiones.

7.1 Conclusiones.

- Se logró el aislamiento del ácido 3 α - hidroximasticadienónico (**2**) a partir de la corteza de la especie *Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht (cuachalalate)* recolectada en la barranca Honda, municipio de Tlaltizapan, estado de Morelos, México, en 2008.

- Identificamos el ácido 3 α - hidroximasticadienónico (**2**) por la comparación de sus datos espectroscópicos con aquellos informados para estos metabolitos secundarios (Barton y Seoane, 1956; Soriano-García et al., 1987; Papageorgiou et al., 1997; Oviedo y Martínez, 2005).

- Modificamos químicamente el ácido el ácido 3 α - hidroximasticadienónico (**2**), obteniendo 5 derivados químicos:

3 α -hidroximasticadienolato de metilo (**3**).

3 α -hidroxi-tirucala-7E-25-S-en-26-olato de metilo (**4**).

3 α -hidroxi-tiruca-8,24Z-dien-26-olato de etilo (**5**).

3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-oico (**6**).

3 α -acetoxi-tirucala-7E,24Z-dien-26-olato de metilo (**7**).

- Caracterizamos los derivados químicos del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**2**) por métodos espectroscópicos (IR, RMN) y espectrométricos (EM).
- Evaluamos la inhibición de la proliferación de células cancerosas del ácido 3 α - hidroximasticadienonico (**2**) y sus derivados **3-7** mediante el ensayo de sulforodamina B in vitro en líneas de cáncer humano. Las líneas evaluados fueron:

(U-251) sistema nervioso central.

(PC-3) próstata.

(K-562) leucemia promielocítica.

(HCT -15) colon.

(MCF-7) mama.

(SKUL-1) pulmón.

Figura VII.1. Esquema general de modificaciones estructurales al ácido (2).

- Nuestros resultados indicaron que la actividad de inhibición de la proliferación celular en las líneas de cáncer humano probadas, dependen de la sustitución en el alcohol en C-3 y en el ácido carboxílico de la estructura de **2**.
- Todos los derivados a excepción de **7**, resultaron más activos que **2**. Sin embargo el acetato del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**6**), fue el más activo, relevando la importancia de este grupo.
- La correlación de los efectos de volumen (estéricos) con la actividad inhibitoria de los derivados del ácido **2**, determinada por la comparación de las estereoestructuras **3**, **5** y **6** con aquella de **2**, mostró que no existe una gran diferencia entre ellas. Este resultado sugiere que la diferencia de la actividad inhibitoria de la proliferación celular de estos triterpenos se debe principalmente a efectos electrónicos.
- Nuestros resultados indican que para una mejor actividad inhibitoria debe formarse un grupo menos polar como un residuo de acetilo en C-3 y dejar inalterado el ácido carboxílico en el C-25. Esta es una relación cualitativa de la variación estructural con la actividad biológica, sin embargo para un mejor análisis es necesario realizar una relación cuantitativa (QSAR).

8 BIBLIOGRAFIA.

-
- Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*. 1993; 93: 2189-2206.
 - Adcock, I. M. Molecular mechanisms of glucocorticoids actions. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2000; 13: 115-126.
 - Anwarul, H. G. & Atta-ur-Rahman. Perspective paper: Trends in ethnopharmacology. 2005; 100:43-49.
 - Argueta, V. A.; Cano, L.; Rodarte, M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Indigenista. México. 1994; 542-543.
 - Arrieta, J.; Benítez, J.; Flores, E.; Castillo, C.; Navarrete, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicinsensitive neurons. *Planta Medica*. 2003; 69: 905-909.
 - Assimopoulou, A. N. & Papageorgiou, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomedical Chromatography*. 2005; 19: 285-311.
 - Barton, D. H. R. & Seoane, E. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *Journal of the Chemical Society*. 1956; 4150-4157.
 - Bernal, D, Carvajal, L, Guadarrama, G.; Hernández.; Infección por virus del papiloma humano y lesiones precancerosas de cerviz en mujeres del estado Morelos, México.
 - Borne, R. F. Non-esteroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Principles of Medical Chemistry*. 4a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, EU. 1995, 535-580.
 - Boyle, P.; Levin, B, 2008. World cancer report International Agency for Research on Cancer, Lyon Cedex. France.
 - 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.; Tasdemir, D.; Wright, A. D.; Sticher, O.; Luo, Y. D.; Pezzuto, J. M. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus melanophurrius*. *Planta Medica*. 1997; 63: 183-186.
 - Calixto, J. B.; Campos, M. M.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. 2004; 70: 93-103.
 - 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 (NF-κB). *Planta Medica*. 2003; 69: 973-983.
 - Cantrell, C. L.; Lu, T.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; Adams, L. B.; Franzblau, S. G. Antimycobacterial cycloartanes from *Borrhichia frutescens*. *Journal of Natural Products*. 1996; 59: 1131-1136.
 - Chabner B. A., T. J. Roberts. Anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Nature*. 2005; 5: 65-72.
 - Cragg G. M., Y. Newman, D. J., Plants as source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1-2): 72-79.
-

-
- Cirino, G. Multiple controls in inflammation. *Biochemical Pharmacology*; 1998;55:105-111.
 - Coussens, L. M., Z. Werb. Inflammation and Cancer. *Nature*. 2002; 420: 860-867
 - Del Rayo, C. M.; Mata, R.; Castañeda, P.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C.; Croft, S. L.; Phillipson, J. D. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Medica*. 2000; 66: 463-468.
 - 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.
 - Espinós, D.; López, A.; Calvo, E. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. En: *Monografía XV, Nuevos avances en medicamentos*. Eds. Avendaño, C. & Tamargo, J. Real Academia Nacional de Farmacia- España. 2004; 237-286.
 - Fung, H. B. & Kirschenbaum H. L. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clinical Therapeutics*. 1999; 21: 1131-1157.
 - Fürstenberger, G.; Berry, D. L.; Sorg, B.; Marks, F. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 1981; 78: 7722-7726.
 - Fürstenberger, G.; Gross, M.; Marks, F. Eicosanoids 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.
 - Gan, K. H.; Fann, Y. F.; Hsu, S. H.; Kuo, K. W.; Lin, C. N. 1998. Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*. 1998; 61: 485- 487.
 - Gibbs, J. B., *Science*, (2000), 287, 1969-1973.
 - González de Mejía E., Chandra S., Ramirez-Mares Marco V., Wang W., *Food and Chemical Toxicology*, (2006), 44, 1191–1203.
 - Gordon M. D., I. Kingston, J. David. *Anticancer agents from natural products*. Taylor and Francis CRC. 2005; 12(6): 98-102.
 - Hardman, Joel G.; Limbird, Lee E.; Goodman Gilman, Alfred. (1996). «Capítulo 27: Analgésicos-antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos que se utilizan en el tratamiento de la gota.», Goodman & Gilman, *las bases farmacológicas de la terapéutica.*, 9 edición, México, D. F.: Ed. McGraw-Hill Interamericana. ISBN 0-07-026266-7.
 - Hecker, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Research*. 1968; 28: 2338 -2349.
 - Hersch-Martínez, P. Comercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla-México. *Economic Botany*. 1995; 49: 197-206.
 - Hübscher, U.; Maga, G.; Spadari, S. Eukaryotic DNA polymerases. *Annual Reviews of Biochemistry*. 2002; 71: 133-163.
 - INEGI. www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/.../estadisticas/.../cancer07.pdf
 - Jain, M. K.; Yu, B. Z.; Rogers, J. M.; Smith, A. E.; Boger, E. T. A.; Ostrander, R. L.; Rheingold, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. 1995; 39: 537-547.
-

-
- Katzung, Bertram G. (2007). «Chapter 36. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout», Basic & Clinical Pharmacology, 9 edición, McGraw-Hill
 - Kier, L. B.; Lehn, J. M.; Ourisson, G. Nuclear magnetic resonance (N.M.R.) of natural products. IV. Structure and stereochemistry of terebinthone and of schinol. Bulletin de la Société Chimique de France. 1963; 4: 911-912.
 - Lastra, A. L., Ramírez, T. O., Salazar, L., Martínez, M., Trujillo-Ferrara, J. Journal of Ethnopharmacology, (2004), 95, 221-227.
 - Lawrence, T.; Willoughby, D. A.; Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nature Reviews Immunology. 2002; 2: 787-795.
 - Laye, J. P. & Gill, J. H. Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? Drug Discovery Today. 2003; 8: 710-716.
 - Makino, M.; Motegi, T.; Fujimoto, Y. Tirucallane -type triterpenes from *Juliania adstringens*. Phytochemistry. 2004; 65: 891-896.
 - Malgor, L. A. & Valsecia, M. E. Prostaglandinas y productos relacionados. En: Farmacología Médica Vol. 4. 2000; 93-111.
 - Mann J. *Taxus brevifolia*. Nature Reviews. 2002; 2:143-148.
 - Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 6ta ed. México, DF: Editorial Botas; 1996. p. 656.
 - Martínez, M. Plantas Medicinales de México. 6ª ed. Botas. México. 1992; 404. Makino, M.; Motegi, T.; Fujimoto, Y. Tirucallane -type triterpenes from *Juliania adstringens*. Phytochemistry. 2004; 65: 891-896.
 - Martínez, R. E. & Flores, G. R. 2003. Estudio de la acción anti-clastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. 32-50.
 - Mata, R.; Calzada, F.; Navarrete, A.; Del Río, F.; Delgado, G. Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology. 1991; 34: 147-154.
 - Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacological Reviews. 1991; 43: 109-142.
 - Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, 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 of 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.
 - Montuschi, P.; Barnes, P. J.; Roberts II, L. J. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. FASEB Journal. 2004; 18: 1791-1800.
 - 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.
-

-
- Navarrete, A.; Mata, R.; Delgado, G. Alkylanacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Medica*.1989; 55: 579.
 - Navarrete, A.; Martínez-Uribe, L. S.; Reyes, B. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*. 1998; 12: 1 -4.
 - Navarrete, A.; Oliva, I.; Sánchez-Mendoza, M.; Arrieta, J.; Cruz-Antonio, L.; Castañeda-Hernández, G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005; 57: 1629-1636.
 - Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002; 420: 846-852.
 - Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7384-7388.
 - Nevalainen, T. J.; Haapamäki, M. M.; Grönroos, J. M. Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000; 1488: 83-90.
 - 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.
 - Olivera, O. G.; Soto, H. M.; Martínez, V. M.; Terrazas, S. T.; Solares, A. F. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex. Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology*.1999; 68: 109-113.
 - Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005, 2005, pag1-2.
 - Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. 2004; 11: 436-445.
 - Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M. Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005; 57: 1087 -1091.
 - Papageorgiou, V. P.; Bakola-Christianopoulou, M. N.; Apazidou, K. K.; Psarros, E. E. Gas chromatographic –mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A* 1997; 769: 263-273
 - 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.
 - 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.
 - Rao, C. V. & Reddy, B. S. NSAIDs and chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*. 2004; 4: 29-42.
 - Ricupero, D.; Taylor, L.; Tlucko, A.; Navarro, J.; Polgar, P. Mechanisms in bradykinin stimulated arachidonate release and synthesis of prostaglandin and platelet activating factor. *Mediators of Inflammation*. 1992; 1: 133-140
-

-
- Rivero-Cruz, I.; Acevedo, L.; Guerrero, J. A.; Martínez, S.; Bye, R.; Pereda-Miranda, R.; Franzblau, S.; Timmermann, B. N.; Mata, R. Antimycobacterial agents from selected mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005; 57: 1117-1126.
 - Safayhi, H. & Sailer, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica*. 1997; 63: 487-493.
 - Shanley, T. P.; Warner, R. L.; Ward, P. A. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Molecular Medicine Today*. 1995; 1: 40-45.
 - Skehan, P.; Storeng, 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.
 - Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, M. R. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2000; 69: 145-182.
 - Soriano-García, M.; Toscano, R. A.; Ortiz, B.; Navarrete, A.; Sánchez-Obregón, R.; Barrios, H.; Yuste, F. Structure and stereochemistry of the methyl ester. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. 1987; C43: 990-992.
 - 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.
 - Tithof, P. K.; Peters-Golden, M.; Ganey, P. E. Distinct phospholipases A2 regulate the release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils. *Journal of Immunology*. 1998; 160: 953-960.
 - Titos-Rodríguez, E. 2004. Biosíntesis de mediadores lipídicos derivados de la 5-lipooxigenasa en el sinusoide hepático. Implicaciones en la fibrogénesis hepática. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, Barcelona, España. 1-3.
 - Villar, C.M, Lopez, R.A. Carcinoma epidermoide vesical de tipo verrucoso 33:153-156
 - Virchow, RLK (1978) Cellular pathology. 1859 special ed., 204-207 John Churchill London, RU
 - Watson, W. H.; Domínguez, X. A.; Vázquez, G.; García, S. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química*. 1987; 18: 89-90.
 - 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.; Rådmark, O. *Blood*. 2001; 97: 2487-2495.
 - West, A.R., Galloway, M.P. y Grace, A.A. (2002). Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44, 227-245.
 - 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.
-

-
- Witkowski A, B. Woynarowska, J. Konopa. Inhibition of the biosynthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in HeLa S3 cells by cucurbitacins, glucocorticoid-like cytotoxic triterpenes. *Biochem Pharmacol.* 1984; 33: 995-1004.
 - Wu, C. C. Nitric oxide and inflammation. *Current Medicinal Chemistry—Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents.* 2004; 3: 217-222.
 - Zhang, S., Li, X., Zhang, F., Yang, P., Gao, X., Song, Q., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, (2006), 3888-3895.