



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y MODIFICACIONES
QUÍMICAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS
CON ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIINFLAMATORIA
DE *Rosmarinus officinalis L.***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ALEJANDRA GUADALUPE VILLEGAS PAÑEDA



MÉXICO, D.F.

2011



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: Dr. José Fausto Rivero Cruz
VOCAL: Dra. Elena Guadalupe Ramírez López
SECRETARIO: Dr. Mariano Martínez Vázquez
1er. SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2° SUPLENTE: Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales en el
Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mariano Martínez Vázquez

SUSTENTANTE :

Alejandra Guadalupe Villegas Pañeda

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México.**

A la **Facultad de Química.**

Al **Instituto de Química.**

Al **Dr. Mariano Martínez Vázquez**; por su apoyo, sus exigencias, sus enseñanzas, su gran paciencia, su disposición, sus consejos, por ser buena persona; con cariño.

A los miembros del jurado: **Dr. José Fausto Rivero Cruz, Dra. Elena Guadalupe Ramírez López**; por su tiempo para leer y corregir este trabajo; a la **Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano** y el **Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga.**

A los profesores de la Facultad de Química, en especial al Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

AGRADECIMIENTOS

A Teresa Pañeda Calderón y Manuel Villegas Ávila, mis padres; no acierto a escribir las palabras perfectas para decirles cuánto significan en mí. Son mi orgullo, mi soporte y mi oasis. Son el ejemplo de trabajo, honestidad, perseverancia y entusiasmo que admiro. Gracias por vivir la felicidad y las desilusiones a mi lado. Debo agradecer a *un alguien* por darme la suerte de ser su hija. Les dedico esta tesis. Son mi pareja favorita. Los amo.

A mi hermana Xime, por los 24 años juntas, me gusta que no te rindas, por todo lo que me enseñas, porque me cuidas, porque confías en mí, porque crees en mí, porque siempre me rescatas y por lo que nos falta por lograr. Te amo menix.

A Vicky, a mi tía Rosi y a Pao, porque me hace muy feliz estar con ustedes, son el ejemplo de honestidad, honradez e integridad en mi mundo. Las quiero tanto.

A mi tía Lū, por tu cariño, por tu tiempo, por escucharme y por tu ayuda siempre. ¡Te quiero!

A mis abuelitos Francisco y Lupita, por estar siempre, por su preocupación y cariño.

A Cristi y Polly; a Mari, Anlly, Rocí, Tany, Oce y Adri, por estar cuando las necesito, en las celebraciones y en los momentos tristes, por las pláticas divertidas, las abstractas y las profundas, por las fiestas, los pasos de baile, los cafecitos, por las horas en la jardi, el sentido del humor, los consejos, las sesiones de fotos, y por lo que nos falta por compartir. Porque he aprendido de ustedes, porque siempre dicen lo que piensan y por saberlas mis amigas: las quiero mucho.

A Paco, sé que siempre seremos amigos, por tu sinceridad, te quiero; **a Esteban,** por las buenas pláticas, por tus consejos, por escucharme, porque siempre respondes a mis llamados de auxilio y de paseos; **a Javi,** porque cuando hablo contigo me haces sentir que todo se puede y te admiro; **a Carlos Luna** por los buenos momentos que hemos compartido desde chiquitos; **a Esteban Hernández,** por ser buen amigo y siempre decir algo agradable. **A Luis,** por tu sentido del humor, tu templanza, por tu agradable compañía, **a Geovi, a Marco y a Pablo.** Los quiero.

A Carlos, por esa rebanada de pastel imposible, por el apoyo y el cariño que me diste. Te quiero.

A Denisse, Gaby, Ela, Clarisa, Mario, César, Juan Carlos y Beto por hacer tan agradable el trabajo en el laboratorio, por su ayuda, sus consejos y su amistad; **a la Dra. Hortensia** por sus consejos y su gran ayuda durante los momentos de mi pánico en el laboratorio.

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | vi |
| ÍNDICE DE DIAGRAMAS..... | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | viii |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| | |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| | |
| 2.1 Plantas medicinales | 2 |
| 2.2 Plantas medicinales en el tratamiento y la prevención del cáncer | 2 |
| 2.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn. (romero) | 4 |
| 2.3.1 Parte utilizada del romero | 5 |
| 2.3.2 Composición química | 5 |
| 2.3.3 Etnobotánica | 6 |
| 2.3.4 Acciones farmacológicas | 6 |
| 2.4 Triterpenos | 8 |
| 2.4.1 Biosíntesis de triterpenos | 9 |
| 2.4.2 Potencial terapéutico de los triterpenos..... | 12 |
| 2.4.2.1 Triterpenos como potenciales agentes anticancerosos..... | 12 |
| 2.4.2.2 Triterpenos como potenciales agentes antiinflamatorios. ... | 13 |
| 2.5 Cáncer | 14 |
| 2.5.1 Tratamiento contra el cáncer | 15 |
| 2.6 Inflamación..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 2.6.1 Inflamación aguda e inflamación crónica | 17 |
| 2.7 Relación cáncer-inflamación | 17 |
| 2.8 Métodos para la evaluación de la actividad biológica | 19 |
| 2.8.1 Ensayo de la inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano | 19 |
| 2.8.2 Ensayo para evaluar la actividad antiinflamatoria | 20 |
| | |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 22 |
| | |
| 4. HIPÓTESIS | 23 |
| | |
| 5. OBJETIVOS | |
| 5.1 Objetivo general | 24 |
| 5.2 Objetivos particulares | 24 |
| | |
| 6. EXPERIMENTAL | |
| 6.1 Generalidades | 25 |
| 6.1.1 Material vegetal | 25 |
| 6.1.2 Métodos de separación | 25 |
| 6.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas..... | 26 |
| 6.1.4 Transformaciones químicas | 26 |
| 6.1.4.1 Reacción de acetilación..... | 26 |
| 6.1.4.2 Reacción de bromación..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1.4.3 Reacción de epoxidación..... | 27 |
| 6.1.5 Evaluación de la actividad biológica | 28 |
| 6.1.5.1 Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano | 28 |
| 6.1.5.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA | 30 |
| 6.2 Desarrollo..... | 32 |
| 6.2.1 Procesamiento del material vegetal | 32 |
| 6.2.2 Obtención del extracto bioactivo seco de romero (ES-ROM).... | 32 |
| 6.2.3 Fraccionamiento primario de ES-ROM | 33 |
| 6.2.4 Análisis químico de la fracción ES-ROMAc..... | 34 |
| 6.2.5 Obtención de la 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1) y la 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2) | 35 |
| 6.2.6 Identificación de la 3-acetiloxi- β -amirina (3), la β -amirona (4) y la α -amirona (5) en ES-ROMAc | 38 |
| 6.2.7 Aislamiento de los acetatos de la betulina (6) y del ácido betulínico(7) | 40 |
| 6.2.8 Identificación de los ácido 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y 3 β -acetiloxi-lup(13),20(29)-dien-28-oico (9) | 43 |
| 6.2.9 Obtención del ácido 3 β -acetil-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor- ursólico (10) y el ácido 3 β -acetil-lup-12-en-28-oico(8) | 45 |

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|-----------|
| 7.1 Elucidación estructural | 50 |
|--|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 7.1.1 Identificación de las lactonas 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1), y 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2), así como del diacetato de betulina (6), el acetato del ácido betulínico (7) y el ácido 3 β -acetiloxi-lup-12-en-28-oico (8) | 50 |
| 7.1.2 Mezcla del acetato del ácido betulínico (7), el 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y el 3 β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico (9) | 52 |
| 7.1.3 Caracterización del ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (10) | 54 |
| 7.2 Actividad biológica | 59 |
| 7.2.1 ES-ROM | 59 |
| 7.2.1.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos <i>in vitro</i> del extracto bioactivo seco de romero ES-ROM..... | 59 |
| 7.2.1.2 Resultados de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de ES-ROM | 60 |
| 7.2.2 Fraccionamiento primario de ES-ROM | 61 |
| 7.2.2.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos <i>in vitro</i> de las fracciones primarias de ES-ROM | 61 |
| 7.2.2.2 Resultados de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de las fracciones primarias de ES-ROM. | 61 |
| 7.2.3 Actividad biológica de los compuestos 1 y 2 (derivados bromo-lactónicos del ácido oleanólico) | 63 |
| 7.2.3.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos <i>in vitro</i> de 1 y 2 | 63 |
| 7.2.3.2 Resultados de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de 1 y 2 . . | 65 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2.4 Actividad biológica de los compuestos 6, 7, 8 y 10 , y de la mezcla de 7 y 8 | 66 |
| 7.2.4.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos <i>in vitro</i> de 6, 7, 8 y 10 , y de la mezcla de 7 y 8 | 66 |
| 7.2.4.2 Resultados de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de 6, 7, 8, 10 , y de la mezcla de 7 y 8 .. | 69 |
| 8. CONCLUSIONES | 73 |
| 9. REFERENCIAS | 76 |
| 10. ANEXOS | |
| 1. Perfil cromatográfico de ES-ROM | 84 |
| 2. Perfil cromatográfico de ES-ROMAc | 86 |
| 3. Resultados de CG-EM de la Fr 14-26 | 88 |
| • Identificación de la β -amirina | |
| 4. Resultados de CG-EM de la Fr 28-30 | 89 |
| • Identificación de la β -amirona (4) y la α -amirona (5) | |
| 5. Perfil cromatográfico de Fr 122-200 | 90 |
| 6. Perfil cromatográfico de Fr 17-23. | 92 |
| • Identificación de los ácidos betulínico (7), 3β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y 3β -acetiloxi- lup-12(13),20(29)-dien-28-oico(9). | |
| 7. Espectroscopía de ácido 3β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (10) | 94 |
| 7. Espectroscopía de los ácidos betulínico (7), 3β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y 3β -acetiloxi- lup-12(13),20(29)-dien-28-oico(9). . | 97 |

**ABREVIATURAS**

| | |
|-------------------------------------|--|
| AcOEt | Acetato de Etilo |
| Ac₂O | Anhidrido acético |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ATC | Ácido tricloroacético |
| EtOH | Etanol |
| C₆D₆ | Benceno deuterado |
| CCA | Cromatografía en Columna Abierta |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina |
| CDCl₃ | Cloroformo deuterado |
| CH₂Cl₂ | Diclorometano |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. |
| COSY | Correlation Spectroscopy |
| dd | Doble de dobles |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DO | Densidad óptica |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Coherence |
| HSQC | Heteronuclear Single Bond Coherence |
| IR | Infrarrojo |
| INC | Instituto Nacional del Cáncer |
| mL | mililitro |
| m/z | Masa sobre carga |
| <i>m</i>-ACPB | Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico |
| MeOH | Metanol |
| MHz | Megahertz |
| Na₂SO₃ | Sulfato de sodio |
| NaHCO₃ | Bicarbonato de sodio |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ppm | Partes por millón |
| s | singulete |
| SRB | Suforrodamina B |
| TPA | 12- <i>o</i> -tetra-decanoilforbol-13-acetato |
| δ | Desplazamiento químico |
| μg | microgramo |
| μmol | micromol |



ÍNDICE DE DIAGRAMAS

| | |
|---|-----------|
| Diagrama VI.1 Procesamiento de las partes aéreas de <i>R. officinalis</i> L. | 32 |
| Diagrama VI.2 Fraccionamiento primario de ES-ROM | 33 |
| Diagrama VI.3 Obtención de las lactonas 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1) y la 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2) | 38 |
| Diagrama VI.4 Identificación de 3, 4 y 5 , y obtención de 6, 7 y la mezcla de 7, 8 y 9 | 44 |
| Diagrama VI.5 Obtención del ácido 3-acetiloxi,lup-12-en-28-oico (8) y del ácido 3 acetiloxi-12,13dihidro-19,20-epoxi-30-nor-ursólico (10) .. | 48 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura II.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) | 5 |
| Figura II.2 Esqueletos de triterpenos.. | 9 |
| Figura II.3 Ruta mevalónica..... | 10 |
| Figura II.4 Síntesis de terpenos..... | 11 |
| Figura VI.1 Lactona 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1) | 36 |
| Figura VI.2 Lactona 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (1) | 37 |
| Figura VI.3 3-acetiloxi- β -amirina (3), la β -amirona (4) y la α -amirona (5) | 36 |
| Figura VI.4 Diacetato de betulina (6) | 37 |
| Figura VI.5 Acetato del ácido betulínico (7)..... | 42 |
| Figura VI.6 Ácidos 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y 3 β - acetiloxi- lup-12(13),20(29)-dien-28-oico(9). | 43 |
| Figura VI.7 Obtención del Ácido 3 β -acetiloxi-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor-ursólico (10) y el ácido 3 β -acetiloxi-lup 12-en-28-oico (8) mediante el tratamiento de la mezcla de 7 y 8 con ácido <i>m</i> -CPB. | 46 |
| Figura VII.1 Composición de la mezcla Fr 17-23. Compuestos 7 , 8 y 9 | 52 |
| Figura VII.2 Asignaciones de las señales de RMN protónica a los compuestos 7 , 8 y 9 | 53 |
| Figura VII.3 3 β -acetiloxi-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor-ursólico (10) | 54 |



Figura VII.4 Fragmentaciones propuestas para el ácido 3 β -acetiloxi-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor-ursólico (**10**) **56**

Figura VII.5 Principales interacciones C \rightarrow H a tres ligadura para el ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (**10**)..... **56**

Figura VII.6 Mecanismo propuesto de la transformación de **7** en **10** a partir de su tratamiento con ácido *m*-CPB..... **58**

Figura VII.7 Imágenes tridimensionales de los isómeros **7** (ácido 3 β -acetiloxi-betulínico) y **8** (ácido 3 β -acetiloxi,lup 12-en-28-oico) **70**

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|-----------|
| Gráfico VII.I Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROM..... | 60 |
| Gráfico VII.2 Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROMAc, ES-ROMME y ES-ROMin. | 62 |
| Gráfico VII.3 Resultados de inhibición de la proliferación celular de 12α -bromo, 3-oxo-oleanan- $13\beta,28$ -ólida (1) y la 12α -bromo, 3β -hidroxioleanan- $13\beta,28$ -ólida (2) en cultivos de líneas celulares de cáncer humano..... | 64 |
| Gráfico VIII.4 Resultados de inhibición de la proliferación celular 6 (diacetato de betulina), 7 (ácido 3-acetiloxi-betulínico), 8 (ácido 3β -acetiloxi-lup 12-en-28-oico), 10 (ácido 3β -acetiloxi-12,13-dihidro-19-20-epoxi-30-nor ursólico) y la mezcla de 7 y 8 en cultivos de líneas celulares de cáncer humano. | 68 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla VI.1 Antineoplásicos de origen natural empleados en la clínica... 3 | 3 |
| Tabla VII.1 Estructuras químicas y referencias en la literatura de las lactonas 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1), y 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2), así como del diacetato de betulina (6), el acetato del ácido betulínico (7) y el ácido 3 β -acetiloxi-lup-12-en-28-oico (8)..... 51 | 51 |
| Tabla VI.2 Datos de RMN del ácido 3-acetiloxi, 12-13 dihidro, 19-20-epoxi, 30-nor ursólico (10) en C ₆ D ₆ 58 | 58 |
| Tabla VII.3 Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROM.. 59 | 59 |
| Tabla VII.4 Resultados de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de ES-ROM..... 60 | 60 |
| Tabla VII.5 Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROMAc, ES-ROMMe y ES-ROMin..... 61 | 61 |
| Tabla VII.6 Resultados de la actividad antiinflamatoria de las fracciones primarias de ES-ROMAc, ES-ROMMe y ES-ROMin..... 63 | 63 |
| Tabla VII.7 Resultados de inhibición de la proliferación celular de (1) 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida y (2) 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida en cultivos de líneas celulares de cáncer humano. 64 | 64 |
| Tabla VII.8 CI ₅₀ de 2 (lactona 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida) en U-251=Glioblastoma. 65 | 65 |



Tabla VII.9 Resultados de la actividad antiinflamatoria de **(1)** 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida y **(2)** 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida **65**

Tabla VII.10 Resultados de inhibición de la proliferación celular de **6** (diacetato de betulina), **7** (ácido 3-acetil betulínico), **8** (ácido 3 β -acetiloxi-lup 12-en-28-oico), **10** (ácido 3 β -acetil-12,13-dihidro-19-20-epoxi-30-nor ursólico) y la mezcla de **7** y **8** en cultivos de líneas celulares de cáncer humano..... **67**

Tabla VII.11 Resultados de la actividad antiinflamatoria de **6** (diacetato de betulina), **7** (ácido 3-acetil betulínico), **8** (ácido 3 β -acetiloxi-lup 12-en-28-oico), **10** (ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19-20-epoxi-30-nor ursólico) y la mezcla de **7** y **8** **69**

1. INTRODUCCIÓN

La mortalidad debida al cáncer va en continuo aumento no obstante los grandes avances en el estudio de esta enfermedad. Por ello es necesario encontrar nuevas opciones tanto para el tratamiento como para la prevención del cáncer (Reddy, 2003).

Las plantas medicinales como fuentes de compuestos activos representan una alternativa.

Los triterpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son constituyentes de la dieta humana y son reconocidos como los principios activos de muchas plantas medicinales con uso terapéutico (Huguet 2000). Se les ha atribuido una variedad de actividades biológicas, entre ellas la antiinflamatoria (Huguet 2000) y la de inhibir la proliferación de líneas tumorales humanas (Cichewicz, 2003).

Dentro de la gran diversidad mundial de plantas medicinales se ha descrito el uso tradicional de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) en padecimientos de tipo inflamatorio; por otra parte se ha informado que extractos orgánicos de esta planta demuestran acción antiinflamatoria y de inhibición de la iniciación y progresión tumoral en modelos *in vivo*, además de actividad antiproliferativa de células cancerosas *in vitro*.

En este marco de referencia se planteó el presente proyecto de investigación que describe el estudio químico y biológico de un extracto hidroalcohólico de romero y de algunos derivados triterpénicos procedentes de éste.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales

Desde siempre el hombre se ha confiado a la naturaleza para satisfacer sus necesidades elementales, y las plantas han sido empleadas como medicinas por miles de años (Samuelsson, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 2011)

Las plantas medicinales han formado los sistemas tradicionales de medicina que han perdurado por miles de años y que aún ahora proveen a la humanidad de nuevos remedios (Gurib-Fakim, 2006). La OMS estima que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplea la medicina tradicional con plantas para la procuración de su salud (OMS, 2011).

Por otro lado, los estudios químicos de las plantas medicinales han permitido el aislamiento de agentes terapéuticos y/o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos (Schlaepfer, 2010)

2.2 Plantas medicinales en el tratamiento y la prevención del cáncer.

El cáncer constituye la primera causa de mortalidad a nivel mundial, y en la búsqueda de compuestos que combatan esta enfermedad, las plantas medicinales han jugado un papel importante (Schlaepfer, 2010).

Se ha informado más de 3 000 plantas para el tratamiento del cáncer (Graham JG., 2000) por lo que las especies vegetales son una fuente importante de posibles sustancias anticancerosas.

Es significativo que del total de medicamentos anticancerosos en el mercado de Estados Unidos de América (EUA) aproximadamente el 67% es de origen natural (Vega-Ávila, 2006). Estos medicamentos se han clasificado como productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural (Newman, 2000).

En la Tabla II.1 se muestran algunos de los agentes citotóxicos más comunes empleados actualmente en la clínica, su fuente de aislamiento y su mecanismo de acción.

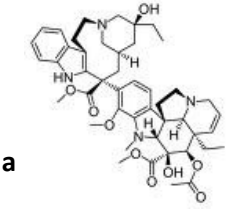
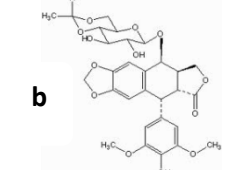
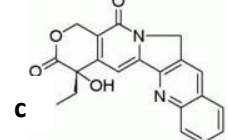
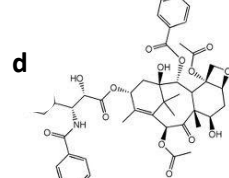
| Fuente Natural | Antineoplásico | Estructura química | Mecanismo de Acción |
|--|---|--|--|
| Vincapervinca de Madagascar (Catharanthusroseus) | <i>Alcalaloides de la vinca</i> <ul style="list-style-type: none"> • Tipo A Vinblastina (a) Vincristina Vindesina • Tipo B Vinorrelbina |  | Son específicos del ciclo celular, bloquean las células que se encuentran en mitosis. |
| Raíz de Mandrágora (Podophyllumpeltatum) | <i>Epipodofilotoxina</i> Tenopósido Etopósido (b) |  | Inhiben la enzima topoisomerasa II, previniendo la replicación de DNA y por lo tanto su replicación. |
| Árbol chino (Camptotecaacuminata) | <i>Camptotecinas</i> Camptotecina (c) Topotecán Rinotecán |  | Inhibición de la topoisomerasa I. |
| Corteza del tejo (Taxusbrevifolia) | <i>Taxanos</i> Paclitaxel (d) Docetaxel |  | Estabiliza los microtúbulos impidiendo la división celular. |

Tabla II.1 Antineoplásicos de origen natural utilizados actualmente en la clínica.

La lista de medicamentos derivados de productos naturales es aún corta en comparación con los candidatos propuestos con actividad antineoplásica. Esto es debido a lo riguroso de las pruebas y por el tiempo requerido en los estudios clínicos y farmacológicos. A pesar de lo anterior, existen agentes derivados de productos naturales, como el discodermólido, pironetina, roscovitina, combrestatina y flavopiridos que se encuentran en etapa de desarrollo clínico y/o empleados como base para el diseño de nuevas estructuras con actividad antineoplásica (Vega-Ávila, 2006).

Lo anterior demuestra la importancia de la investigación de las plantas medicinales en el descubrimiento de fármacos anticancerosos.

Entre las muchas especies vegetales que se han informado con actividad biológica, una de ellas es el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) como potencial fuente de agentes anticancerosos y antiinflamatorios.

2.3 *Rosmarinus officinalis* Linn. (romero)

Se trata de un arbusto aromático perenne, perteneciente a la familia de las Labiadas (Lamiáceas), caracterizado por presentar una altura cercana al metro, con hojas de color verde en el anverso y blanquecinas en el reverso y de hasta 3.5 cm de longitud, flores pequeñas bilabiadas de color azulado (rara vez rosadas). El romero es originario de la zona del Mediterráneo, creciendo silvestre sobre todo tipo de sustratos (Alonso, 2007).

Sin embargo, se cultiva por lo general con fines comestibles u ornamentales. Culturalmente esta planta se ha asociado con el amor y el matrimonio, el nacimiento y la muerte, y como símbolo de recuerdo se convirtió en un emblema de fidelidad (Alonso, 2007).



Figura II. 1 *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

2.3.1 Parte utilizada del romero droga

Las preparaciones activas están constituidas por la hoja y en menor medida por las sumidades floridas. Ocasionalmente se emplean el tallo y las flores (1, 2011)

2.3.2 Composición química

Aceite esencial (0,5-2%): Compuesto principalmente por hidrocarburos monoterpénicos tales como el α -pineno (25%), β -pineno, canfeno, mirceno y limoneno; ésteres terpénicos, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona isobornil-acetato, β -cariofileno, etc. Existen notables diferencias en su composición según el área de cultivo y la etapa de desarrollo de la planta.

Terpenoides: carnosol o picrosalvina, ácido oleanólico, ácido 2- β -OH-oleanólico, ácido 3-o-acetiloleanólico, ácido ursólico y ácido 3-o-acetilursólico (triterpenos), ácido carnosílico, rosmaridienol, 7-metoxi-rosmarol, α y β -amirenona.

Flavonoides: apigenina, diosmetina, diosmina, genwanina, 6-metoxi-genwanina, hispidulina, luteolina (y derivados), 6-metoxi-homoplantagina, cirsimarina, etc.

Otros: ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico), colina, taraxasterol, lupeol, taninos. (Alonso, 2007)

2.3.3 Etnobotánica.

Los usos medicinales más socorridos para esta planta incluyen varios trastornos del aparato digestivo como indigestión, diarrea, gastritis, colitis, gases, apéndice y como *desinflamatoria* del estómago. Para tratar desórdenes ginecológicos en Oaxaca, se hace uso del romero, particularmente en casos de retención de la placenta y para hacer lavados después del parto. En la zona centro del país, Hidalgo, Michoacán, Morelos y Puebla, se utiliza contra la infección vaginal. Se le emplea en problemas de la piel, para cicatrizar heridas, aftas, sarampión; evita la caída de cabello, sirve para lavar el cabello y contra la caspa. Además, aplicada, se usa en dolores musculares, de espalda, caderas, huesos, por golpes, reumas e inflamación de articulaciones y artritis. También se utiliza en enfermedades respiratorias (1, 2011).

2.3.4 Acciones farmacológicas.

Actividad antiinflamatoria: Extractos etanólicos crudos de romero mostraron actividades antiinflamatoria y antioxidante en la inhibición de producción de NO, y reducción de la citosina pro-inflamatoria IL-1 β y de la expresión del RNAm de COX-2 (Cheung y Tai, 2006). Extractos metanólicos de las hojas de romero también han mostrado poseer una buena actividad antiinflamatoria en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Bernal, 2003). Se conocen más de 20 compuestos antioxidantes en el romero, entre ellos el ácido carnósico, carnosol, rosmanol y epirosmanol, los cuales inhiben la formación de aniones superóxido y la peroxidación lipídica (Alonso, 2007).

Oncología experimental: Se ha comprobado los efectos de extractos crudos etanólicos de romero en la inhibición de la proliferación de líneas celulares de cánceres de mama y leucemia (Cheung y Tai, 2006). El ácido ursólico contenido en extractos brutos de hojas de romero, presentó *in vitro* (250 mg/mL) efectos antiproliferativos frente a varias líneas celulares de cánceres humanos: mama, colon, melanoma, riñón, pulmón, ovario y próstata (Friguetto N. et al., 2003). Investigadores suizos encontraron que extractos totales de romero previenen los daños sobre el ADN de cultivos celulares causados por aflatoxina, un potente carcinogénico hepático (Offord E. et al., 1997). La aplicación tópica de extractos alcohólicos elaborados con hojas de romero inhiben experimentalmente la iniciación y el progreso de tumores epidérmicos inducidos por benzo- α -pireno y 7, 12-dimetilbenzoantraceno, con un 40-60% de eficacia (Huang M. et al., 1994; Offord E. et al., 1997).

Otros estudios: Así mismo se ha probado que extractos de romero poseen actividad hepatoprotectora y una significativa acción colerética. Se ha demostrado también sus actividades antimicrobiana, espasmolítica y a nivel neurológico, el extracto acuoso de romero demostró retrasar la aparición de convulsiones inducidas por picrotoxina en ratones produciendo una mayor actividad locomotriz en ratas (Alonso, 2007).

2.4 Triterpenos.

Las plantas elaboran un vasto conjunto de metabolitos secundarios cuyas funciones se centran en conferir a las plantas ventajas selectivas dentro de su ambiente (Dixon, 2001).

La principal característica que convierte a determinados metabolitos en secundarios es que, a diferencia de los primarios, los metabolitos secundarios son generalmente no esenciales para los procesos metabólicos básicos de la planta (Dixon, 2001).

No obstante se ha postulado que los metabolitos secundarios actúan en la planta como defensa contra microorganismos, insectos y depredación animal. Adicionalmente estos compuestos ejercen efectos en los seres humanos, muchas veces beneficiosos, lo que los convierte en objetos de estudio (Dixon, 2001).

De entre los diversos tipos de metabolitos secundarios destacan los terpenoides. Éstos se dividen en monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), y tetraterpenos (C_{40}), donde el esqueleto de carbono es acíclico, o contiene una estructura mono-, bi-, tri-, tetra-, y pentacíclica, (Kai Muffler, 2010).

Los triterpenos son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo biológicamente versátil de los terpenos, formados por subunidades de isopreno, este grupo consiste en aproximadamente 30,000 compuestos identificados (Dzubak P., 2006). A su vez, los triterpenos pentacíclicos pueden ser de tipo ursano, oleanano, friedelano, gamacerano, taraxastano, lupano y hopano, entre otros (Patocka, 2003).

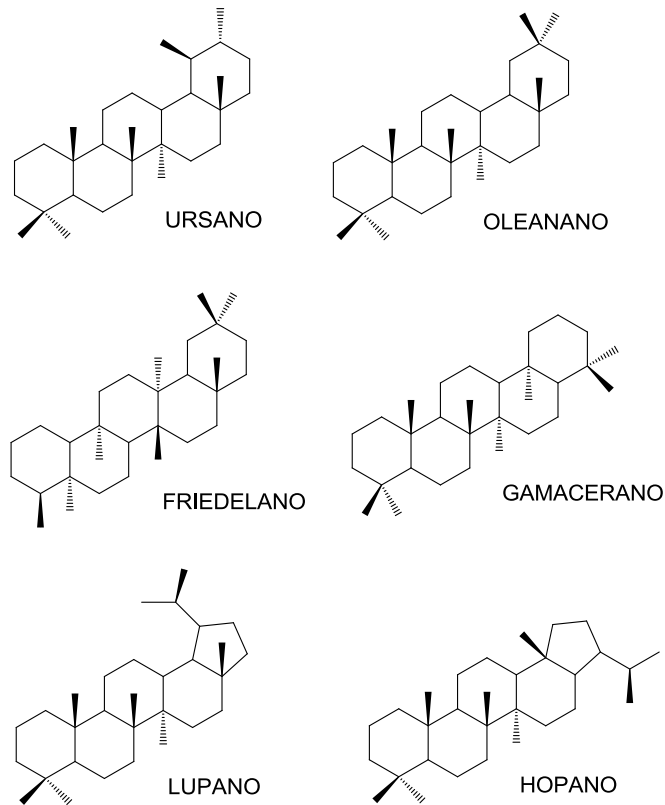


Figura II.2 Esqueletos de triterpenos.

2.4.1 Biosíntesis de triterpenos

La biogénesis de los terpenos se inicia a partir del ácido mevalónico (ácido (*R*)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), que se forma por la condensación de tres unidades de acetil-CoA. Posteriormente la fosforilación del hidroxilo en C-5 y la descarboxilación conducen a pirofosfato de 3-isopentenilo (IPP), éste puede isomerizarse en pirofosfato de 2-isopentenilo. Ésta se conoce como la ruta mevalónica, que junto con la ruta a partir de pirofosfato y triosa fosfato constituyen las fuentes naturales de isopreno (IPP) (Rosellón Dueñas, 2005).

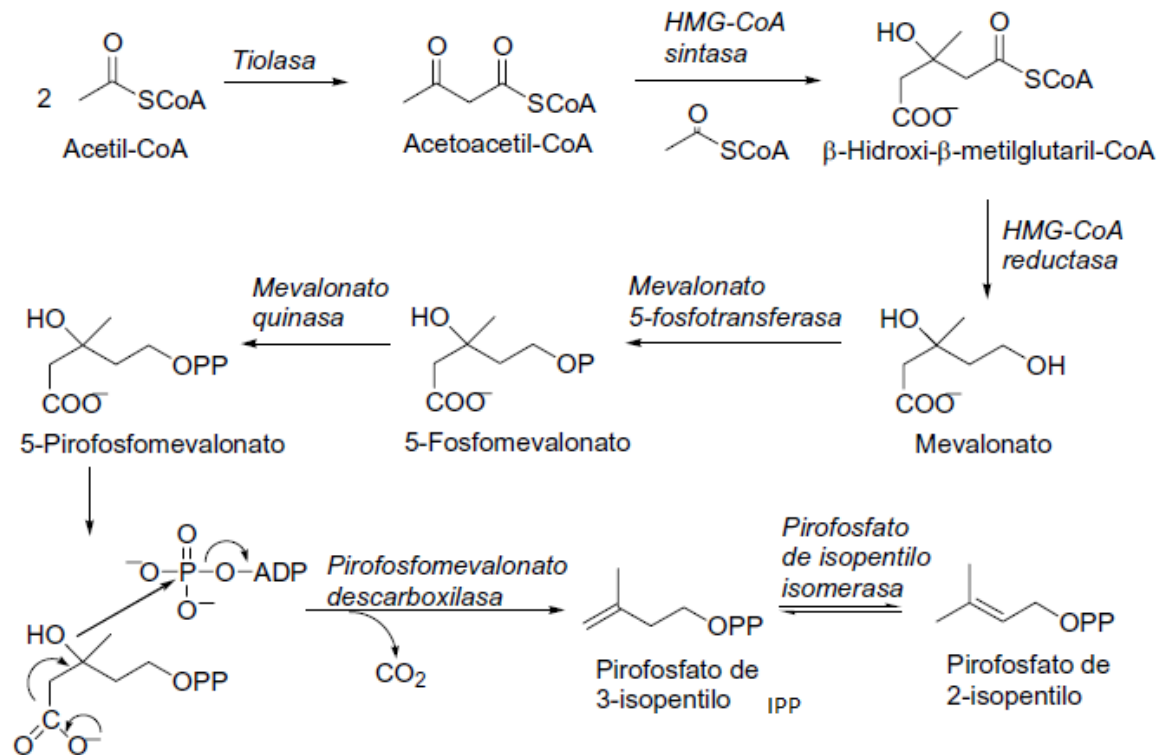


Figura II.3 Ruta mevalónica (tomada de Rosellón Dueñas, 2005)

El doble enlace nucleófilo del 3-isopentenilo sufre la adición electrofílica una vez eliminado el grupo pirofosfato de 2-isopentenilo, dando lugar tras la pérdida de un protón por parte del intermedio de reacción carbocatiónico, al pirofosfato de geranilo (GPP) que es el precursor de los compuestos monoterpénicos (Figura II.4) .

Si el pirofosfato de geranilo (GPP) se condensa con una nueva unidad isoprenónica en forma de pirofosfato de 3-isopentenilo, por la acción de la enzima geraniltransferasa da lugar al pirofosfato de farnesilo (FPP) que dará origen a los compuestos sesquiterpénicos.

La condensación del pirofosfato de farnesilo (FPP) con pirofosfato de 3-isopentenilo (IPP) da lugar al pirofosfato de geranil-geranilo (GGPP), precursor de los compuestos diterpénicos.

La condensación cola-cola de dos unidades de pirofosfato de farnesilo (FPP) genera una unidad de escualeno que es el precursor de los triterpenos. La epoxidación de uno de los dobles enlaces terminales del escualeno da lugar al óxido de escualeno (Rosellón Dueñas, 2005).

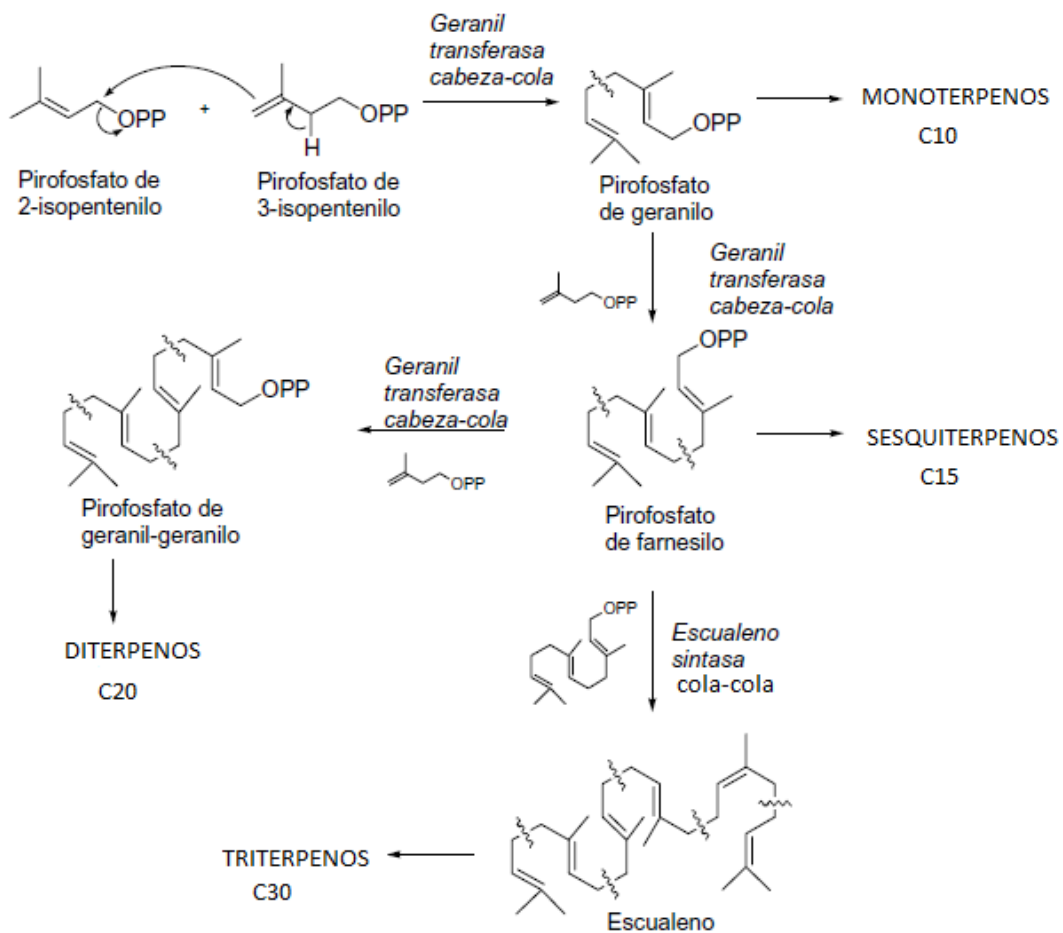


Figura II.4 Síntesis de terpenos (tomada y modificada de Rosellón Dueñas, 2005)

Hoy en día se acepta que el escualeno y el (2,3)-óxido de escualeno dan lugar a numerosos tipos de esqueletos de triterpenos y esteroides mediante la formación de carbocationes intermedios que experimentan reordenamientos moleculares, originando diferentes esqueletos (Figura II.2) según sea la posición de la carga y la estereoquímica del producto

de ciclación. Para que los precursores acíclicos escualeno y epoxiesqualeno inicien el proceso de policiclación hasta dar los correspondientes triterpenos, es necesario que adopten una conformación plegada adecuada, de modo que queden próximos en el centro los centros electrónicamente deficientes y aquellos nucleofílicos que han de atacar a los primeros durante el proceso. De la naturaleza de esta conformación plegada dependerá también la estereoquímica del triterpeno formado. (Rosellón Dueñas, 2005).

2.4.2 Potencial terapéutico de los triterpenos

Desde una perspectiva biológica se ha asumido que los esqueletos triterpénicos más importantes son el oleanano, ursano y lupano. Estos tipos de terpenos y sus derivados se han estudiado por sus efectos antiinflamatorio, hepatoprotector, analgésico, antimicrobiano, antimicótico, virostático, inmunomodulador y por su potencial antineoplásico (KaiMuffler, 2010).

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

2.4.2.1 Triterpenos como potenciales agentes anticancerosos.

Se ha reportado que triterpenos como el lupeol, el ácido betulínico y el ácido oleanólico, además de algunos de sus derivados exhiben actividad antimutagénica en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Sunitha et. Al., 2001; Sultana et al., 2003; You et al., 2003). También muestran potencial quimioterapéutico y quimiopreventivo contra una variedad de cánceres (Saleem, 2001) e inhiben el crecimiento de varios tipos de tumores (Saleem, 2004).

2.4.2.2 Triterpenos como potenciales agentes antiinflamatorios.

Un gran número de triterpenos ha sido reportado por su capacidad antiinflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro* (Saleem, 2011) mediante varios mecanismos, incluyendo la inhibición en la producción de eicosanoides y citosinas, la actividad hidrolítica de enzimas, y la lipoperoxidación (Huguet, 2000). Empleando modelos de inflamación en ratones se ha establecido el potencial antiinflamatorio del lupeol, el ácido betulínico, el ácido oleanólico y el ácido ursólico (Huguet, 2000; Ramírez-Apan et. Al., 2004; Giner-Larza, 2001).

2.5 Cáncer

El **cáncer** es un término que se aplica genéricamente a un conjunto de enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos (Instituto Nacional del Cáncer, 2011).

El cáncer se caracteriza por la existencia de células cuyo rasgo común es la inoperancia de los mecanismos de las mismas que regulan normalmente su diferenciación, su proliferación y su muerte (Schlaepfer, 2010; J.Flores, 1997).

La mayoría de los cánceres toman el nombre del órgano o de las células de las que se originan. Las categorías principales de cáncer son:

- **Carcinoma:** cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.
- **Sarcoma:** cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- **Leucemia:** cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.
- **Linfoma y mieloma:** cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.
- **Cánceres del sistema nervioso central:** cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en una cancerosa es un proceso que se desarrolla en varias etapas a lo largo de un número de años o incluso décadas. Las etapas de la carcinogénesis son la iniciación, la promoción y la progresión. La

primera de ellas involucra la reacción entre la sustancia que produce el cáncer (carcinógeno) y el DNA de las células del tejido. Puede existir una susceptibilidad genética. Esta etapa puede permanecer latente, y el sujeto puede sólo permanecer en riesgo de desarrollar el cáncer en una etapa posterior. La segunda etapa ocurre muy lentamente a lo largo de un período que puede variar de meses hasta años. La tercera y última etapa implica la progresión y la diseminación del cáncer (Reddy, 2003)

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 7.6 millones de defunciones (aproximadamente el 13%) ocurridas en todo el mundo en 2008. Los principales tipos de cáncer son los siguientes:

- pulmonar (1,4 millones de defunciones)
- gástrico (740 000 defunciones)
- hepático (700 000 defunciones)
- colorrectal (610 000) defunciones
- mamario (460 000 defunciones)

Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y pasará de 11 millones en 2030 (OMS, 2011).

2.5.1. Tratamiento contra el cáncer

El objetivo último de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa, mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos.

Si esta extirpación completa es posible, se habla de curación, pero si la neoplasia no está localizada, existen metástasis o no es posible la

erradicación por motivos diversos, el objetivo de la terapéutica se enfoca en reducir el tamaño del tumor o el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con una calidad de vida aceptable. La farmacología anticancerosa constituye un método terapéutico muy útil que coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia a mejorar el pronóstico de la enfermedad (Flores J., 1997).

2.6 Inflamación

La inflamación es la respuesta primaria del sistema inmunológico a una infección o un daño, tiene la finalidad de eliminar el agente o material nocivo y promover la reparación del tejido. Se caracteriza por la liberación secuencial de un conjunto de mediadores que incluye: aminas bioactivas, eicosanoides, citosinas, quimiocinas y factores de crecimiento que regulan el incremento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células del sistema inmunológico (Rodríguez-Vita, 2010).

El incremento en la permeabilidad vascular permite la extravasación de proteínas plasmáticas que a su vez amplifican la reacción inflamatoria. La inflamación es esencialmente una respuesta benéfica que normalmente se resuelve con la restauración de la estructura y la función normales del tejido, sin embargo, cuando la inflamación persiste (inflamación crónica) ésta puede causar daño tisular y pérdida de la función del tejido y está ligada con la incidencia del cáncer y su progresión (Rodríguez-Vita, 2010).

2.6.1 Inflamación aguda e inflamación crónica.

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

La **inflamación aguda** es de duración relativamente corta (segundos, minutos o pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos.

La **inflamación crónica** dura semanas, meses e incluso años. La inflamación crónica puede ocurrir debido a la persistencia de una infección o un antígeno, al daño tisular recurrente o por una falla de los mecanismos inflamatorios endógenos que conducen en condiciones normales a la resolución de la inflamación (Rodríguez-Vita, 2010). Se caracteriza por la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos, con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo que prevalecen respecto al exudado de fluidos inflamatorios.

2.7 Relación cáncer-inflamación.

Varios tipos de inflamación, que difieren por su causa, mecanismo, consecuencia e intensidad existen, y todos ellos pueden potencialmente promover el desarrollo de un cáncer y su progresión (Mantovani, 2008).

La inflamación crónica puede resultar del daño e infección persistentes en un tejido debido a que durante el proceso inflamatorio se sintetizan productos potencialmente genotóxicos o mutagénicos que pueden causar daños al ADN, induciendo la transformación de células normales a cancerosas, afectando su crecimiento, induciendo su no diferenciación, la proliferación y la resistencia a la apoptosis. Por ejemplo, las infecciones por *Helicobacter pylori* o por el virus de la hepatitis C (HCV) causan gastritis, úlceras, y hepatitis, y eventualmente conducen al

cáncer gástrico o de hígado, respectivamente. La inflamación crónica puede ser también inducida por exposición ambiental o factores dietéticos/metabólicos. Partículas de algunos materiales, así como algunos componentes del humo del tabaco provocan daño e inflamación crónica en el tejido pulmonar. La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de hígado. También varios tipos de autoinmunidad pueden contribuir a un desarrollo tumoral, como es el caso del cáncer asociado a la colitis (CAC), o el factor de riesgo que representa la enfermedad celíaca para desarrollar un linfoma (Sergei, 2010).

Incluso cánceres que evolucionan sin inflamación crónica subyacente exhiben inflamación asociada al tumor y contienen infiltrados inflamatorios. Muchos, si no es que todos los tumores sólidos están infiltrados con células inmunes e inflamatorias (Sergei, 2010).

Se tiene evidencia también de que mediadores de tipo inflamatorio liberados por células cancerosas muertas mediante quimioterapia o radioterapia, terapias que generalmente provocan una muerte de naturaleza necrótica, dirigen la activación de infiltraciones de macrófagos en el tumor, los cuales producen citosinas que a su vez activan factores de transcripción de oncogenes en las células sobrevivientes que estimulan su supervivencia y su proliferación (Sergei, 2010).

Además la inflamación puede conducir a modificaciones epigenéticas incluyendo la metilación de ADN e histonas que eventualmente llevan al silenciamiento de *loci* supresores de tumores (Sergei, 2010).

Lo que determina en conjunto la contribución del proceso inflamatorio al desarrollo tumoral es:

1. Muchos mediadores inflamatorios (por ejemplo, citosinas) son factores de crecimiento y supervivencia importantes que estimulan la subsistencia y la proliferación de células pre-malignas.
2. Mediadores inflamatorios con frecuencia activan factores de transcripción de oncogenes, como NF- κ B y STAT3, mientras que oncogenes como Ras y Myc inician una respuesta inflamatoria.
3. La inflamación asociada a los tumores puede suprimir la respuesta inmune anti-tumoral y desviar a células inmunes específicas de ser antitumorigénicas a convertirse en pro-tumorigénicas.
4. La inflamación puede estimular la angiogénesis tumoral.
5. La inflamación puede estimular la invasividad tumoral y la diseminación metastásica (Sergei, 2010).

2.8 Métodos para la evaluación de la actividad biológica.

2.8.1 Ensayo de la inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano.

Los ensayos de inhibición de la proliferación de células cancerosas *in vitro* son muy útiles en el cribado inicial de nuevos agentes con potencial anticanceroso porque dan una medida de la posible eficacia de los compuestos probados como probables quimioterapéuticos (Woolf, 1999).

Método de la sulforrodamina B (SRB) *in vitro*.

El desarrollo del método de tinción de proteínas con sulforrodamina B (SRB) para la estimación del contenido de proteína celular en cultivos adheridos y en suspensión fue establecido por Skehan et al. (1990); después fue adoptado por el Instituto Nacional del Cáncer como una

prueba de rutina en las investigaciones de nuevos agentes anticancerosos (Papazisis et al., 1990).

La técnica se basa en la capacidad de la SRB para unirse a componentes proteínicos de aquellas células que han sido fijadas con ácido tricloroacético (ATC). La SRB es un colorante aminoxantano con dos grupos sulfónicos que se unen electrostáticamente a los residuos de aminoácidos básicos (histidina, arginina y lisina) en condiciones ligeramente ácidas. La evaluación colorimétrica permite estimar la masa total de la proteína celular que se relaciona proporcionalmente con el número de células (Virchai y Kirtikara, 2006).

2.8.2 Ensayo para evaluar la actividad antiinflamatoria.

Modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA.

El edema en oreja de ratón inducido por el 13-acetato del 12-*o*-tetradecanoilforbol (TPA) ha sido usado como modelo animal para evaluar la actividad antiinflamatoria. En este modelo se conoce que el edema cutáneo está asociado con un incremento en el contenido de eicosanoides como la prostaglandina E₂ (PGE₂) y el leucotrieno B₄ (LTB₄). El mecanismo por el que el TPA induce el incremento de eicosanoides no está completamente resuelto pero se piensa que involucra la activación de la proteína cinasa C, así como de la fosfolipasa A₂, inducción de la ciclooxigenasa y translocación/activación de la lipooxigenasa (Masao et al., 2006).

Adicionalmente a la producción de eicosanoides, se ha demostrado que el TPA también promueve la expresión de citosinas pro-inflamatorias en queratinocitos, los cuales se sabe que tienen un rol importante en la inflamación cutánea. También se ha demostrado que el tratamiento

tópico con TPA incrementa la producción y la liberación de TNF_{α} en el sitio de aplicación del compuesto (Masao, 2006).

Es conocido que ciertos promotores de tumores como el TPA, no sólo provocan una respuesta inflamatoria aguda, sino que causan alteraciones en las vías de señalización de citosinas implicadas en el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, es posible que aquellos compuestos que exhiben efectos antiinflamatorios en el modelo de TPA tengan también efectos antiproliferativos o quimiopreventivos (Flores R. y Martínez V., 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad de importancia mundial y nacional. Es una de las principales causas de mortalidad con un aumento continuo en el número total de casos.

Las terapias convencionales contra el cáncer producen serios efectos laterales y con mucho, sólo alargan el tiempo de vida del paciente algunos años. De aquí surge la necesidad de hallar nuevas opciones terapéuticas y preventivas.

Las plantas medicinales, que gran parte de la población en México y otros países utiliza como único recurso para la procuración de su salud, representa una alternativa.

El estudio de varias especies vegetales ha conducido al descubrimiento de entidades químicas novedosas y al desarrollo de fármacos anticancerosos, como el taxol.

Rosmarinus officinalis L. es una planta medicinal cuyos extractos orgánicos han demostrado, entre otros efectos, ejercer acción antiinflamatoria y antitumoral en modelos de estudio *in vivo*, así como inhibir la proliferación de células cancerosas *in vitro*. Se conoce algunos principios activos de esta especie, como el carnosol y los ácidos ursólico y oleanólico, no obstante, es necesario continuar la búsqueda de otros metabolitos secundarios activos presentes en el romero y el estudio de su actividad biológica en relación con su estructura química, todo esto con el fin de contribuir al conocimiento científico que responda a un compromiso social.

4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que extractos hidroalcohólicos de romero tienen acción antiinflamatoria y son capaces de inhibir la proliferación de líneas de cáncer humano. A su vez, muchos triterpenos se han descrito como efectivos agentes antiinflamatorios y antitumorales, por lo que puede suponerse que son este tipo de compuestos sean los principales responsables de la actividad biológica del romero.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar el aislamiento y la modificación química de los triterpenos, posibles responsables de la acción biológica del romero, con el fin de tratar de establecer una relación de cambios estructurales y actividad biológica.

5.2 Objetivos particulares

- ▣ Obtener un extracto hidroalcohólico de romero
- ▣ Obtener las fracciones primarias del extracto hidroalcohólico de romero y evaluar sus actividades biológicas.
- ▣ Aislar, identificar y modificar químicamente los triterpenos mayoritarios.
- ▣ Evaluar la capacidad de los derivados triterpénicos aislados para inhibir la proliferación de 6 líneas celulares de cáncer humano.
- ▣ Evaluar la actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos.
- ▣ Tratar de establecer una relación estructura-actividad biológica de los derivados triterpénicos obtenidos.



6. EXPERIMENTAL

6.1 GENERALIDADES

6.1.1 Material vegetal

Las partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L. fueron recolectadas en los alrededores de Atlixco, Puebla en 2010 y una muestra, para su identificación, fue depositada en el Herbario Nacional del Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México. El material vegetal se trasladó para su procesamiento a las instalaciones del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6.1.2 Métodos de separación.

Como técnica de separación y purificación se utilizó la cromatografía en columna abierta (CCA) a presión reducida. Las columnas fueron empacadas con sílice (MN-Kieselgel G 60, MERCK®) de malla 70-230. Se utilizó una relación de 10 g de sílice por cada 1 g de producto a separar. En todos los casos se inició la elución con hexano y se aumentó gradualmente la polaridad del eluyente con mezclas de hexano-acetato de etilo hasta eluir con acetato de etilo 100%. Posteriormente se eluyó con mezclas de acetato de etilo-metanol de polaridad creciente hasta terminar con metanol.

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron en folios de aluminio cubiertos con gel de sílice (ALUGRAM® SILG/UV₂₅₄) y se visualizaron con luz UV a 254 y 365nm; se revelaron con sulfato cérico (Ce₂SO₄) al 1% en ácido sulfúrico (H₂SO₄) seguido de calentamiento.

Algunas muestras se analizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) acoplada a un espectrómetro de masas marca Bruker serie Esquire modelo 6000 con fuentes de ionización (APCI o ESI).



6.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher-Johns y se reportan sin corrección.

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Nicolete modelo Magna 750, mediante las técnicas de pastilla en KBr, disolución y película.

La Espectrometría de Masas fue generada por los equipos Hewlett-Packard® modelo JEOL AX505 y JEOL SX102.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica RMN (^1H) y de carbono 13 (^{13}C) se generaron con los espectrómetros Varian Gemini XL-200 y Varian VXR-300. Se emplearon disolventes deuterados ALDRICH®: Cloroformo (CDCl_3) y benceno (C_6D_6). Los desplazamientos químicos se informan en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS). Los experimentos adicionales de RMN incluyeron DEPT, COSY, HSQC y HMBC, que fueron generados con un espectrómetro Varian-Inova 500MHz.

6.1.4 Transformaciones químicas

6.1.4.1 Reacción de acetilación

Procedimiento general. Para una muestra de 100 mg, ésta se disolvió en piridina (1 mL) y se añadió anhídrido acético (1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo aproximadamente a 70°C durante 4h. Posteriormente la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadió hielo. En el caso de que se formara un sólido, éste se filtró al vacío y el sólido obtenido se lavó con agua. Posteriormente se disolvió en AcOEt y a la solución se le trató con Na_2SO_4 anhidro para eliminar el



agua residual, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Cuando no se formó un sólido, a la mezcla de reacción se le adicionó agua (20 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10mL). La fase orgánica se lavó con una solución de HCl al 10 % (3 x 10 mL) y posteriormente con agua; se trató con Na₂SO₄ anhidro para eliminar el agua residual, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida.

6.1.4.2 Reacción de bromación

Una mezcla (326 mg) de ácidos triterpénicos se disolvió en 6.8 mL de ácido acético al 90% con ligero calentamiento. Se agregó 0.17 g de acetato de sodio y 6.8 mL de etanol. Esta mezcla se trató con una solución de bromo en ácido acético al 3% p/v (0.45 mL). Se dejó reaccionar con agitación durante 75 min. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo, y el precipitado resultante se filtró al vacío y se lavó con H₂O destilada (Lewis y Tucker, 1983). El sólido se disolvió entonces en la mínima cantidad de AcOEt para lavarlo con una disolución de NaHCO₃ al 10%. El producto se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente orgánico se eliminó a presión reducida.

6.1.4.3 Reacción de epoxidación

A una solución de 300 mg del sustrato en CH₂Cl₂ previamente destilado (8.4 mL) se le agregó ácido *m*-cloroperoxibenzoico (AMCPB) al 77% (196.6 mg, 0.80 mmol). La solución se agitó durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente se añadió una disolución acuosa al 10% de Na₂SO₃ (30 mL). La solución acuosa se extrajo 2 veces con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ y con salmuera; finalmente se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente orgánico se eliminó a presión reducida (Fatma, 2009).



6.1.5 Evaluación de la actividad biológica.

6.1.5.1 Ensayo de Inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano.

Condiciones generales.

El ensayo se realizó de acuerdo a los protocolos validados por el Instituto Nacional del Cáncer (INC) de los Estados Unidos de Norteamérica (Skehan *et al.*, 1990). Los extractos y compuestos se evaluaron en las siguientes líneas celulares de cáncer humano:

U-251 (Glioblastoma)

PC-3 (Carcinoma de próstata)

K-562 (Leucemia mieloide crónica)

HCT-15 (Adenocarcinoma de colon)

MCF-7 (Adenocarcinoma de mama)

SKLU-1 (Adenocarcinoma de pulmón)

Las líneas celulares provienen del INC y se empleó como fármaco de referencia la doxorrubicina (SIGMA®)

Procedimiento

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 UI/mL de sulfato de estreptomicina, 0,25mg/mL de anfotericina B (GIBCO®) y 2mM de L-glutamina (GIBCO®). Los cultivos celulares se mantuvieron incubados a una temperatura de 37°C, con una atmósfera al 5% de CO₂ y saturación de humedad. Se determinó la densidad y viabilidad celular mediante un hematocitómetro empleando la técnica de exclusión con azul de tripano.



Se realizaron diluciones para obtener la densidad celular adecuada, y 100 μL de la suspensión celular resultante se sembró en placas de 96 pozos y se incubaron.

Los extractos y compuestos se evaluaron en una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO). Se añadió 100 μL de cada disolución de prueba a los pozos preparados para cada tipo de línea celular. Se empleó DMSO como control negativo y doxorubicina como control positivo. Se dejaron en incubación durante 48h bajo las condiciones antes descritas.

Transcurrido el tiempo de incubación, la proteína celular se fijó con una disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) 50% p/v (50 μL /pozo). La placa se incubó durante 60 min a 4°C y transcurrido el tiempo los sobrenadantes se desecharon. La placa se lavó con agua destilada y se dejó secar 24 h. A cada pozo se añadió 100 μL de sulforrodamina B (SRB) 0.4% p/v y se dejó durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente la placa se lavó cinco veces con una disolución de ácido acético 1% para extraer el exceso de colorante; se dejó secar durante 24 h. El botón celular teñido se solubilizó en 100 μL de TRIS base (pH 10). Se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro (lector de ELISA BIO-TEK ELx-808) a una longitud de onda de 515 nm. La densidad óptica es directamente proporcional a la masa total de proteína, que se relaciona con el número presente de células, que es una medida relativa de la proliferación celular.

La actividad de los extractos y los compuestos se reporta como porcentaje de la inhibición de la proliferación celular y se determinó de acuerdo a la **Ecuación 1**, donde DO_c corresponde a la densidad óptica



media del grupo control y DO_T se refiere a la densidad óptica media del grupo tratado.

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DO_T}{DO_C} \times 100 \right)$$

Ecuación 1

Para algunos de los compuestos que mostraron un resultado satisfactorio en este tamizaje se calculó la CI_{50} , graficando los valores de % de inhibición de la proliferación contra los valores de concentración.

6.1.5.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el Modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA.

Condiciones generales

Se emplearon ratones machos de la cepa CDI con un peso comprendido entre 20 y 30g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo, con acceso *ad libitum* de agua y alimento. Durante el experimento los animales fueron tratados de acuerdo a los lineamientos nacionales e internacionales de cuidado y manejo de animales de laboratorio. (NOM-062-ZOO-1999)

Procedimiento

Para cada muestra a probar, los ratones se dividieron al azar en tres grupos de tres individuos que correspondieron a: grupo control (TPA + vehículo) de referencia (TPA + indometacina) y de prueba (TPA + muestra)

Cada animal fue anestesiado con una dosis de 31,5 mg/kg de pentobarbital sódico (PBS) por vía intraperitoneal (ip).



Posteriormente a todos los ratones se les administró tópicamente 10 μL de una solución etanólica de TPA (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la oreja derecha (5 μL en cada lado).

Diez minutos después se administró tanto el fármaco de referencia (indometacina) como los extractos o compuestos a evaluar disueltos en los vehículos correspondientes. La indometacina se administró en una dosis de 0.36mg/oreja, los extractos, las fracciones y los compuestos de prueba se administraron en una dosis de 0.31mg/oreja.

En la oreja izquierda se administró 10 μL de EtOH y luego 20 μL del vehículo correspondiente. Después de 4 h se sacrificó a los animales en una cámara de dióxido de carbono y se obtuvieron las biopsias de cada oreja con ayuda de un sacabocados circular de 9 mm de diámetro.

Del peso neto de la oreja tratada se restó el peso de su respectiva oreja no tratada para determinar la diferencia de peso debida a la inflamación (edema). El porcentaje de inhibición del edema se calculó mediante la **Ecuación 2**. Donde E_C corresponde a la proporción de la inflamación media del grupo control y E_T se refiere a la proporción de la inflamación media del grupo tratado.

$$\% \text{Inhibición del edema} = 100 - \left(\frac{E_T}{E_C} \times 100 \right)$$

Ecuación 2

Análisis Estadístico

Los datos experimentales se presentan como la Media \pm Error Estándar de la Media (EESM) del porcentaje de inhibición del edema. El análisis se realizó por una prueba t de Student, y los valores de $p \leq 0.05(*)$ y $p \leq 0.001(**)$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

6.2 DESARROLLO

6.2.1 Procesamiento del material vegetal

Un kilogramo de las partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L. secas y molidas se sometió a extracción a reflujo durante 30 min con 3L de una mezcla de EtOH-H₂O (7:3).

6.2.2 Obtención del extracto bioactivo seco de romero (ES-ROM)

El extracto hidroalcohólico (EXHA) se concentró a presión reducida mediante un Rotavapor® BÜCHI R-200; durante este proceso se formó un precipitado que se filtró obteniéndose 8 g de un sólido al que se denominó PRPRO. El disolvente de la solución residual se evaporó a presión reducida obteniéndose 500 g de un residuo sólido nombrado ES-ROM.

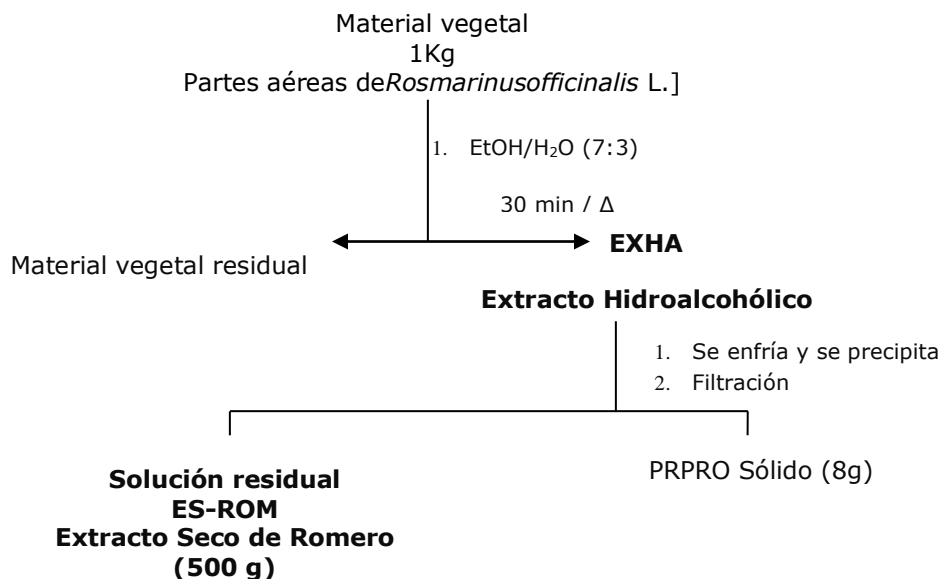


Diagrama VI.1 Procesamiento de las partes aéreas de *R. officinalis* L.

Considerando que el sólido PRPRO se precipitó en una mezcla de disolventes polares, es factible suponer que se trata de una mezcla de



compuestos de baja polaridad como lípidos y grasas, por lo que se decidió trabajar con ES-ROM. Con el propósito de conocer la complejidad de este extracto, se realizó su perfil cromatográfico (anexo 1) por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

Con el fin de conocer la posible actividad de ES-ROM como inhibidor de la proliferación de células cancerosas, éste se evaluó en 6 líneas de cáncer humano. También se evaluó su capacidad antiinflamatoria *in vivo* mediante el modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido con TPA. Aunque la actividad antiinflamatoria fue moderada, los resultados demostraron buena actividad de ES-ROM contra las líneas de cáncer humano, por lo que se decidió proseguir su estudio. Los resultados de estas evaluaciones se encuentran en el capítulo VII.

6.2.3 Fraccionamiento primario de ES-ROM

Con el fin de facilitar el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en ES-ROM, este extracto se trató con diferentes disolventes. De esta forma se obtuvo una fracción soluble en AcOEt (ES-ROMAc), otra soluble en MeOH (ES-ROMMe) y una parte insoluble tanto en AcOEt como en MeOH (ES-ROMin) como lo ilustra el diagrama VI.2

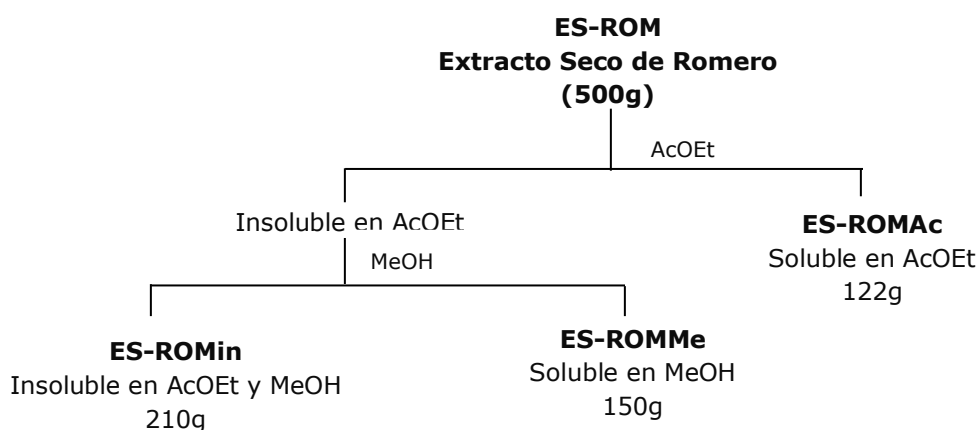


Diagrama VI.2 Fraccionamiento primario de ES-ROM



Para ubicar la parte más activa de este primer fraccionamiento se evaluó la capacidad de inhibición de la proliferación de líneas de cáncer humano *in vitro* y la actividad antiinflamatoria *in vivo* de ES-ROMAc, ES-ROMMe y ES-ROMin.

6.2.4 Análisis químico de la fracción ES-ROMAc

Los resultados de las pruebas de inhibición de la proliferación de células cancerosas así como de actividad antiinflamatoria, que se presentan en el capítulo VII, indicaron que las fracciones ES-ROMAc y ES-ROMMe fueron las más activas. Tomando en cuenta que desde el punto de vista experimental, supuestamente es más fácil estudiar una fracción con polaridad intermedia, en este trabajo se decidió estudiar la fracción ES-ROMAc. El estudio de la fracción ES-ROMMe será objeto de un estudio posterior.

El perfil cromatográfico de ES-ROMAc mediante CLAR acoplado a un detector de masas (anexo 2), reveló la presencia de 18 compuestos. Sin embargo, tres de ellos son mayoritarios con tiempos de retención muy cercanos. Los espectros de masas, obtenidos en este análisis, mostraron que estos tres componentes poseían un peso molecular de 456 g/mol. De acuerdo con la literatura, de extractos de *R. officinalis*, se han aislado los ácidos ursólico, oleanólico y betulínico (Jorge Alonso, 2007; Al-Sereitia, 1999) todos con peso molecular de 456 g/mol, entonces es factible suponer que los compuestos mayoritarios, detectados por CLAR, posiblemente sean triterpenos de este tipo.



6.2.5 Obtención de la **12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1)** y la **12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2)**.

De la cromatografía en columna empacada con sílice y eluida con mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad ascendente de ES-ROMAc (21g), las fracciones 19-25 eluidas con una mezcla 9:1 (Fr 19-25, 838 mg) se reunieron por su similitud cromatográfica en capa fina (CCF). Fr 19-25 se sometió a CCA eluida con una mezcla de hexano y acetato de etilo de polaridad ascendente obteniéndose un total de 76 fracciones de 100 mL. De acuerdo con su similitud en CCF se reunieron las fracciones 26 a 64, el conjunto resultante se denominó, FIV (400 mg). En el espectro de IR de FIV se observaron bandas asociadas a grupos hidroxilos y carbonilos, lo anterior aunado a los colores característicos en CCF y los datos obtenidos en CLAR nos permitió suponer que FIV era una mezcla de triterpenos pentacíclicos. FIV se trató con hexano y se obtuvo una parte soluble en hexano (70 mg) y otra insoluble en hexano (326 mg); de esta última se procedió a separar la probable mezcla de triterpenos mediante su tratamiento con una solución de bromo en ácido acético (Martínez, 1997 y Lewis y Tucker, 1983). La mezcla de reacción se separó mediante CCA colectándose 46 fracciones en total. De las fracciones 16 y 17 (Fr 16-17) eluidas con una mezcla 9:1 se aislaron 11 mg de un producto cristalino el cual se identificó por sus datos espectroscópicos como la lactona **12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1)**. Así mismo de las fracciones 19 a 21 (Fr 19-21) eluidas con la misma mezcla, se aislaron 15 mg de un producto cristalino que fue identificado como la lactona **12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2)**. Éste es el primer informe de la presencia del ácido 3-oxo oleanólico en extractos de *R. officinalis*.



A continuación se presentan los datos físicos y espectroscópicos de las lactonas **1** y **2**.

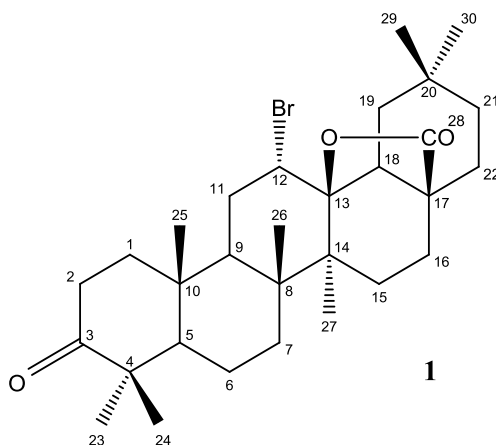


Figura VI.1 Lactona **12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1)**.

Datos físicos: Sólido blanco y cristalino, p.f. 240-242°C (lit. 238-241°C) (Lewis y Tucker, 1983).

Fórmula mínima: C₃₀H₄₅BrO₃. **Masa molecular:** 533, 58 g/mol

EM MS (EI, 70eV). m/z: 533 [M]⁺

IR (Sol/CHCl₃), $\nu_{\text{máx}}$ 3008, 2962 (-CH); 1766 (γ -lactona); 1700 (C=O); 1387 (-CH₃) cm⁻¹

RMN ¹H (500MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.90 (s, 3H, CH₃); 0.95 (s, 3H, CH₃); 1.00 (s, 3H, CH₃); 1.04 (s, 3H, CH₃); 1.10 (s, 3H, CH₃); 1.26 (s, 3H, CH₃); 1.46 (s, 3H, CH₃); 1.89 (dd, 1H, H₉); 2.00 (s, 1H, H₁₈); 1.49 (dd, 1H, H₅); 4.31 (dd, 1H, H₁₂).

RMN ¹³C (500MHz, CDCl₃): δ (ppm) 40.00 (C-1); 33.87 (C-2); 217.53 (C-3); 47.17 (C-4); 54.52 (C-5); 19.09 (C-6); 33.97 (C-7); 42.26 (C-8); 44.82 (C-9); 36.25 (C-10); 30.85 (C-11); 56.17 (C-12); 91.56 (C-13); 43.50 (C-14); 27.52 (C-15); 21.31 (C-16); 45.50 (C-17); 52.40 (C-18); 39.07 (C-19); 31.88 (C-20); 33.78 (C-21); 29.16 (C-22); 33.25 (C-23); 26.97 (C-24); 16.96 (C-25); 18.69 (C-26); 26.97 (C-27); 178.70 (C-28); 20.90 (C-29); 20.90 (C-30). La completa caracterización



de **1** se logró por medio de los experimentos bidimensionales HMBC y HSQC.

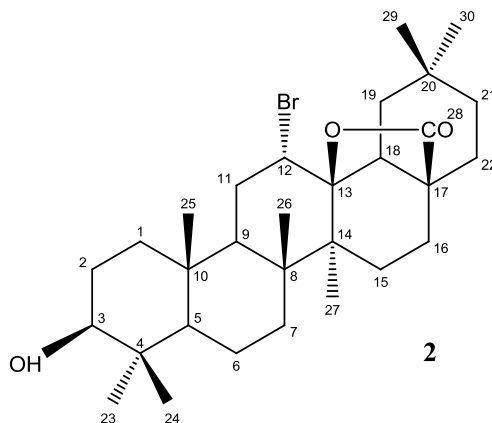


Figura VI.2 Lactona **12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2)**.

Datos físicos: Sólido blanco y cristalino, p.f. 145-155°C, (lit. 225-226°C) (Lewis y Tucker, 1983).

Fórmula mínima: C₃₀H₄₇BrO₃. **Masa molecular:** 534. 27g/mol

EM MS (EI,70 eV) m/z: 534 [M]⁺

IR (Sol/CHCl₃), $\nu_{\text{máx}}$ 3688 (-OH); 3006, 2957 (-CH); 1763 (γ -lactona); 1388 (-CH₃) cm⁻¹.

RMN ¹H (500MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.89 (s,3H,CH₃); 0.90 (s,3H,CH₃); 1.00 (s, 6H,2CH₃); 1.22 (s,3H,CH₃); 1.44 (s,3H,CH₃); 1.99 (s,3H,CH₃); 3.28 (dd, 1H, H3); 4.31 (dd, 1H, H12).

RMN ¹³C (500MHz, CDCl₃): δ (ppm) 39.95 (C-1); 27.97 (C-2); 78.74 (C-3); 36.57 (C-4); 55.24 (C-5); 17.71 (C-6); 34.64 (C-7); 38.92 (C-8); 45.59 (C-9); 31.87 (C-10); 30.46 (C-11); 56.49 (C-12); 91.64 (C-13); 42.46 (C-14); 27.55 (C-15); 21.35 (C-16); 45.54 (C-17); 52.36 (C-18); 38.35 (C-19); 33.89 (C-21); 21.11 (C-22); 29.19 (C-23); 23.57 (C-24); 15.40 (C-25); 16.94 (C-26); 19.08 (C-27); 178.00 (C-28); 33.27 (C-29); 27.97 (C-30).

La caracterización completa de **2** se logró con los experimentos bidimensionales HMBC y HSQC.

En el siguiente diagrama se resume el proceso seguido para la obtención de **1** y **2**.

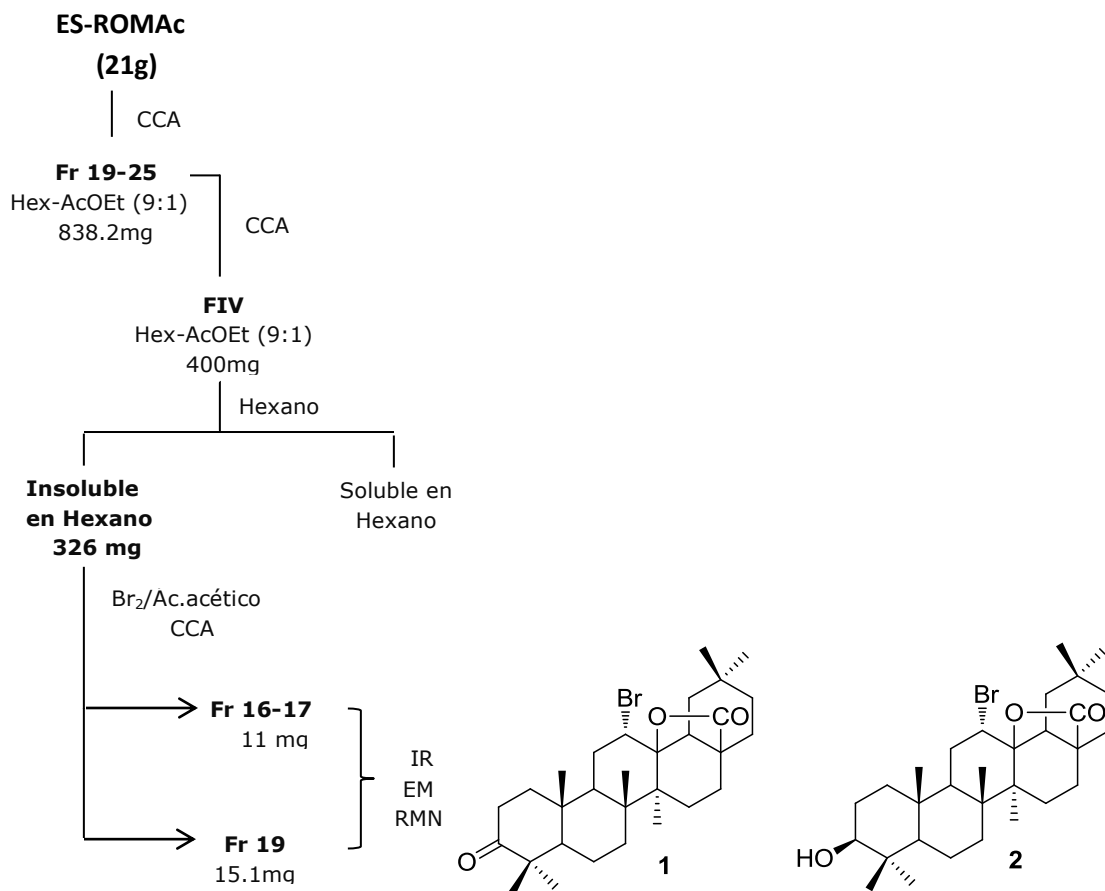


Diagrama VI.3 Obtención de las lactonas **12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1)** y la **12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2)**.

Se evaluó la capacidad de inhibición de la proliferación celular de **1** y **2**, así como su potencial antiinflamatorio *in vivo*.

6.2.6 Identificación de la 3-acetiloxi- β -amirina (**3**), la β -amirona (**4**) y la α -amirona (**5**) en ES-ROMAc.

Durante el proceso de aislamiento de las bromo-lactonas **1** y **2**, se observó la posibilidad de que varios metabolitos secundarios presentes en ES-ROMAc tuvieran carácter no polar o de polaridad intermedia. Tomando en cuenta lo anterior, se realizó una partición con hexano de



ES-ROMAc (74g) previamente disuelto en una mezcla de MeOH/AcOEt. La parte hexánica seca, se separó en soluble en AcOEt y parte insoluble en AcOEt. La primera mostró por CCF ser la mezcla de nuestro interés y se prosiguió entonces a su separación por CCA.

De la cromatografía en columna de la parte insoluble en AcOEt (39g), empacada con sílice y eluida con mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad ascendente, se obtuvo un total 220 fracciones de 100mL.

Por su similitud en CCF se reunieron las fracciones 14-26 eluidas con hexano (Fr 14-26, 500 mg), también las fracciones 28-30 se reunieron (Fr 28-30, 300 mg). El análisis de Fr 14-26, mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM) identificó al acetato de la β -amirina (**3**) como el componente mayoritario con un 80% de abundancia (anexo 3), también se detectó a la β -amirona (**4**) y a la α -amirona (**5**) en un análisis similar (anexo 4) que reveló que los compuestos **4** y **5** eran los constituyentes mayoritarios de Fr28-30. La identificación de **3**, **4** y **5** se obtuvo por comparación de sus espectros de masas con aquellos contenidos en la biblioteca del equipo de GC-MS.

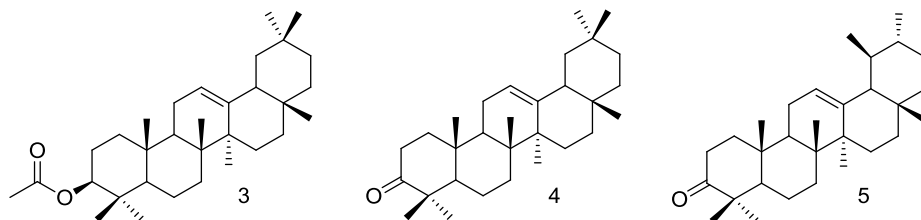


Figura VI.3-acetil- β -amirina (3), la β -amirona (4) y la α -amirona (5)



6.2.7 Aislamiento de los acetatos de la betulina (6) y del ácido betulínico (7).

Las fracciones 122-200, de la cromatografía de la parte insoluble en AcOEt, eluidas con una polaridad 7:3 se reunieron por su semejanza en CCF (Fr 122-200, 1.8045g). Fr122-200 se trató con MeOH obteniéndose una solución y un sólido (Frs 122-200). El análisis de éste sólido, mediante CLAR acoplada a un detector másico (anexo 5) mostró una señal predominante de 456g/mol, que posiblemente correspondería a triterpenos pentacíclicos con pesos moleculares similares, como el ácido betulínico. Con el fin de facilitar el análisis cromatográfico se decidió acetilar 1.5g del sólido Frs122-200. De la cromatografía en columna del producto acetilado de Frs122-200 (1.35g), empacada en sílice y eluida con mezclas de polaridad ascendente de hexano y acetato de etilo, se colectó un total de 100 fracciones de 50mL.

De la fracción 12 (Fr-12) eluida con una polaridad 9:1 se aislaron 72 mg de un sólido cristalino que se identificó, por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los informados en la literatura, como el diacetato de betulina (6).

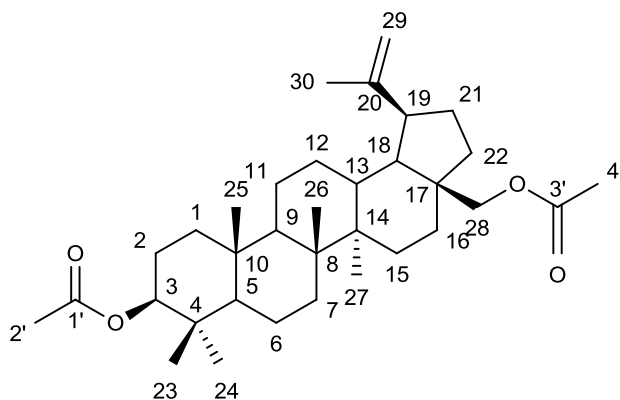


Figura VI.4 Diacetato de betulina (6).



Datos físicos: Sólido blanco y cristalino, p.f. 167-170°C, (lit. 219-220°C) (Sammi Alakurtti et. Al., 2010).

Fórmula mínima: C₃₄H₅₄O₄. **Masa molecular:** 526.40 g/mol

EM (EI, 70 eV). m/z: 526 [M]⁺

IR (Sol/CHCl₃), $\nu_{\text{máx}}$ 2946 (-CH); 1642 (C=C); 1694, 1732 (2 carbonilos); 1453 (-CH₂); 1372 (-CH₃) cm⁻¹

RMN ¹H (500MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.835 (s, CH₃); 0.84 (s, CH₃); 0.85 (s, CH₃); 0.97 (s, CH₃); 1.03 (s, CH₃); 1.68 (s, 3H, CH₃-30); 2.04 (s, 3H, CH₃-33); 2.05 (s, 3H, CH₃-34); 3.86 (d, H-28); 4.26 (d, H-28); 4.46 (dd, H-3); 4.59 (d, CH₂-29); 4.69 (d, CH₂-29); 5.05 (dd, H-12).

RMN ¹³C (500MHz, CDCl₃): δ (ppm) 38.06 (C-1); 23.96 (C-2); 81.17 (C-3); 38.67 (C-4); 55.65 (C-5); 18.44 (C-6); 34.81 (C-7); 41.18 (C-8); 50.55 (C-9); 38.06 (C-10); 21.52 (C-11); 25.45 (C-12); 37.84 (C-13); 42.97 (C-14); 27.35 (C-15); 29.87 (C-16); 46.58 (C-17); 49.05 (C-18); 47.97 (C-19); 150.36 (C-20); 30.03 (C-21); 34.42 (C-22); 21.56 (C-23); 21.28 (C-24); 16.29 (C-25); 16.41 (C-26); 14.99 (C-27); 63.07 (C-28); 110.08 (C-29); 19.37 (C-30); 171.78 (C-1'); 18.39 (2'); 171.18 (C-3'); 16.76 (C-4').



De las fracciones 15 y 16 (Fr15-16) eluidas con una polaridad 9:1 (hexano/AcOEt), se obtuvo 361.6 mg de un sólido cristalino que por sus datos espectroscópicos y espectrométricos se identificó como el acetato del ácido betulínico (**7**).

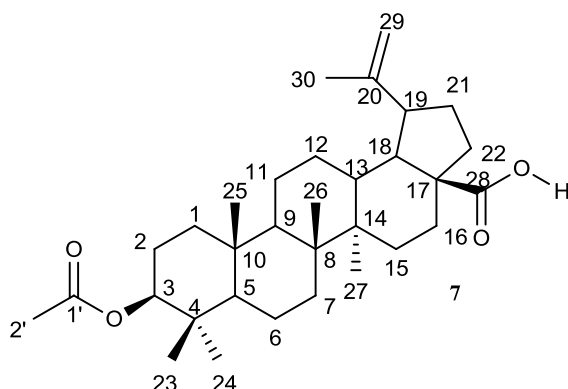


Figura VI.5 acetato del ácido betulínico (**7**),

Datos físicos: Sólido blanco y cristalino, **p.f.** 255-256°C (lit. 275-276°C) (Ahmed, 2004)

Fórmula mínima: C₃₂H₅₀O₄. **Masa molecular:** 498.37 g/mol

EM (EI, 70 eV) m/z: 498 [M]⁺

IR (Película), $\nu_{\text{máx}}$ 2946 (-CH); 1642 (C=C); 1694, 1732 (2 carbonilos); 1453 (-CH₂); 1372 (-CH₃) cm⁻¹

RMN ¹H (500MHz, C₆D₆): δ (ppm) 0.75 (s, CH₃); 0.88 (s, 6H, 2CH₃); 0.92 (s, CH₃); 1.04 (s, CH₃); 1.67 (s, CH₃-30); 1.75 (s, CH₃-32); 4.69 (dd, H-3); 4.75 (d, CH₂-29); 4.89 (d, CH₂-29).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 38.93 (C-1); 24.50 (C-2); 80.99 (C-3); 37.70 (C-4); 56.11 (C-5); 18.89 (C-6); 35.03 (C-7); 41.45 (C-8); 51.07 (C-9); 38.42 (C-10); 21.44 (C-11); 26.35 (C-12); 39.20 (C-13); 43.14 (C-14); 30.55 (C-15); 32.89 (C-16); 57.20 (C-17); 50.21 (C-18); 47.93 (C-19); 150.68 (C-20); 31.39 (C-21); 37.75 (C-22); 17.89 (C-23); 17.43 (C-24); 16.72 (C-25); 19.89 (C-26); 15.31 (C-27); 183.29 (C-28); 110.68 (C-29); 21.31 (C-30); 170.53 (C-1'); 28.51 (C-2').



6.2.8 Identificación de los ácidos 3β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (**8**) y 3β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico(**9**).

Las fracciones 17-23 (Fr17-23, 186.6mg) se reunieron según su similitud en CCF. A pesar de que el análisis de esta muestra por CCF utilizando diferentes mezclas de disolventes mostró una sola mancha, sin embargo el espectro de RMN ^1H y los resultados de la CLAR acoplada a EM(anexo 6)demostraron que en realidad era una mezcla en la cual el acetato **7** era el compuesto mayoritario. Los ácidos 3β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (**8**) y el 3β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico (**9**) también fueron identificados en esta mezcla. La elucidación estructural de los componentes de esta mezcla se discute en la sección de resultados.

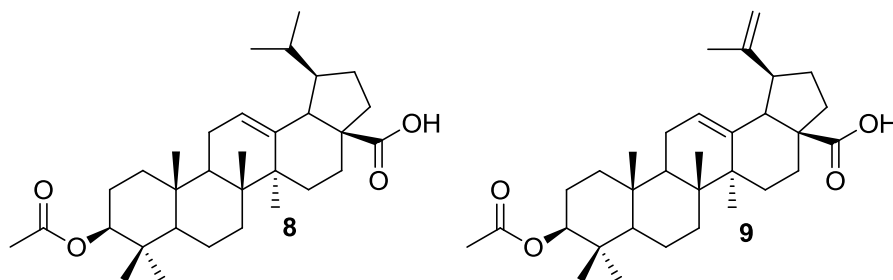


Figura VI.6 Ácidos 3β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (**8**) y 3β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico(**9**).

En el siguiente diagrama de flujo se ilustra el proceso seguido que permitió identificar **3**, **4**, **5**, **8** y **9** así como el aislamiento de los acetatos **6** y **7**.

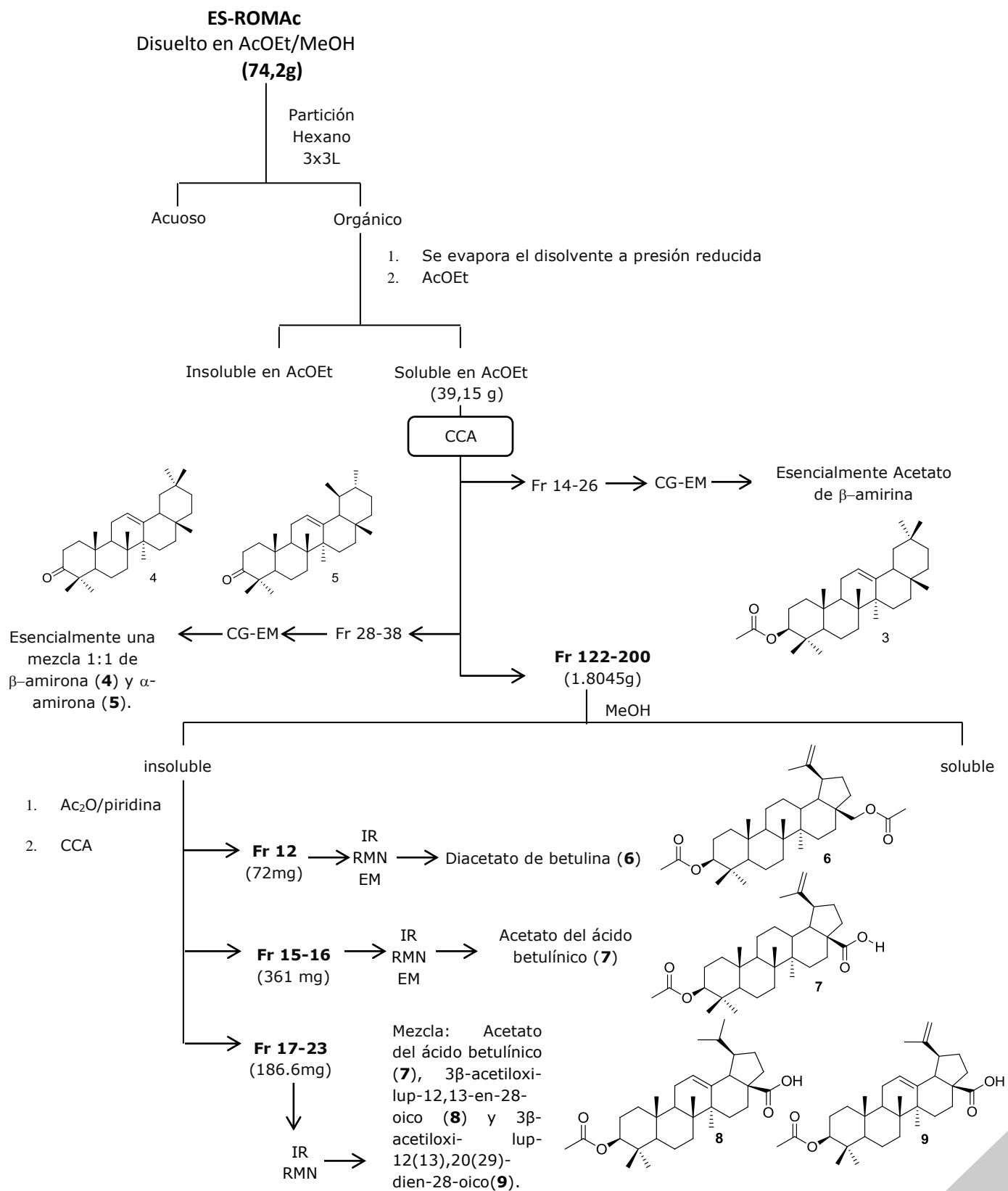


Diagrama VI.4 Identificación de **3,4 y 5**, y obtención de **6,7** y la mezcla de **7, 8 y 9**.



Se evaluó la actividad biológica de **6** y **7**, así como la de la mezcla de **7**, **8** y **9**, por sus capacidades de inhibición de la proliferación celular y su potencial antiinflamatorio *in vivo*.

6.2.9 Obtención del ácido 3 β -acetil-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor-ursólico (10) y el ácido 3 β -acetil-lup 12-en-28-oico (8)

Los resultados de inhibición de la proliferación de células cancerosas y de actividad antiinflamatoria indicaron que la mezcla de **7**, **8** y **9** fue activa, pero **7** mostró mayor actividad que la mezcla. Con el fin de evaluar sus propiedades biológicas se determinó aislar a los acetatos **8** y **9**.

Se acetilaron 38 g de ES-ROMAc y el producto de reacción se separó mediante CCA. De la cromatografía en columna del producto acetilado empacada en sílice y eluida con mezclas de polaridad ascendente de hexano y acetato de etilo, se colectaron 110 fracciones de 50 mL. Las fracciones 19-21 (Fr19-21, 600mg) se reunieron por su similitud en CCF, y mediante RMN protónica se concluyó que correspondía a una mezcla de los compuestos **7** y **8**, siendo **7** el componente mayoritario.

Se procedió a separar Fr19-21 (300mg) mediante su tratamiento con ácido *m*-cloroperoxibenzoico (*m*-ACPB). La mezcla de reacción (320 mg) se separó mediante CCA empacada en sílice y eluida con mezclas de polaridad ascendente de hexano y acetato de etilo, se colectaron 80 fracciones de 15mL. De las fracciones 18-25 (Fr18-25, 25 mg) eluidas con una polaridad 9:1 (Hex-AcOEt) y reunidas según su similitud en CCF se obtuvo un sólido cristalino que según sus datos espectroscópicos corresponde al ácido **3-acetiloxi-lup-12-en-28-oico (8)** (Manoharan, 2007). De las fracciones 65-68 (Fr-65-68, 20 mg) eluidas con una



polaridad 9:1 se obtuvo un sólido cristalino que corresponde al **ácido 3-acetiloxi, 12-13 dihidro, 19-20 epoxi, 30-nor ursólico (10)**. Éste es el primer informe de la obtención del derivado **10** a partir de **7**. La Figura VI.6 ilustra lo anterior.

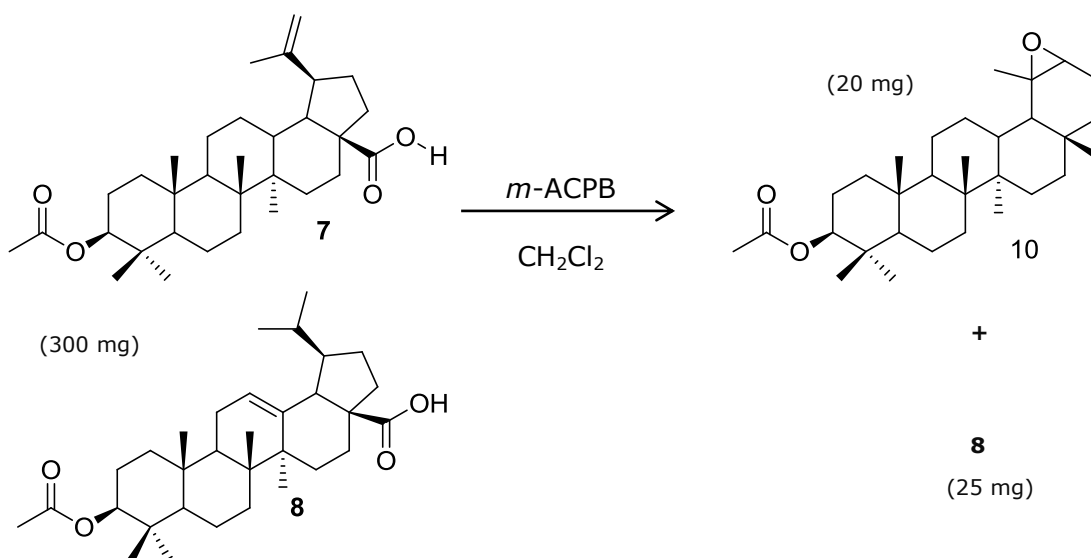


Figura VI.7 Obtención del **Ácido 3 β -acetiloxi-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor-ursólico(10)** y el **ácido 3 β -acetiloxi-lup 12-en-28-oico (8)** mediante el tratamiento de la mezcla de **7** y **8** con ácido *m*-cloroperoxibenzoico.

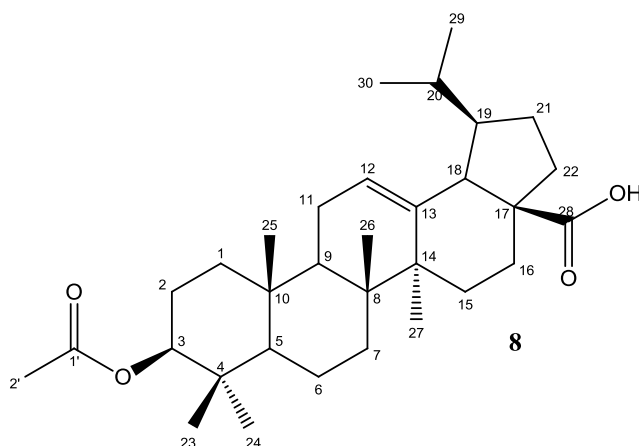


Figura VI.8 Ácido 3β-acetiloxi-lup-12-en-28-oico (**8**).

Datos físicos: Sólido blanco y cristalino, **p.f.** 225-230°C

Fórmula mínima: C₃₂H₅₀O₄. **Masa molecular:** 498.37 g/mol

EM MS (EI,70eV) m/z: 498 [M]⁺

IR (Película), $\nu_{\text{máx}}$ 2942 (-CH); 1693,1733 (2 carbonilos); 1461 (-CH₂); 1368 (-CH₃) cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz, C₆D₆): δ(ppm) 0.84 (s, CH₃); 0.88 (s, CH₃); 0.88 (s, CH₃); 0.89 (s, CH₃); 0.93 (s, CH₃); 0.98 (s, CH₃); 1.13 (s, CH₃); 1.72 (s, CH₃-32); 4.69 (dd, H-3); 5.34 (H-12).

RMN ¹³C (500MHz, CDCl₃): δ(ppm) 37.31 (C-1); 23.74 (C-2); 80.52 (C-3); 37.93 (C-4); 55.59 (C-5); 18.60 (C-6); 32.85 (C-7); 41.42 (C-8); 47.86 (C-9); 39.73 (C-10); 23.53 (C-11); 123.19 (C-12); 143.79 (C-13); 46.23 (C-14); 24.42 (C-15); 23.64 (C-16); 46.96 (C-17); 52.91 (C-18); 39.39 (C-19); 39.06 (C-20); 23.93 (C-21); 34.03 (C-22); 15.56 (C-23); 17.06 (C-24); 15.56 (C-25); 17.06 (C-26); 33.15 (C-27); 184.73 (C-28); 20.83 (C-29); 17.71 (C-30); 169.95 (C-1'); 23.78 (C-2').

Los espectros obtenidos se compararon con los datos espectroscópicos reportados (Manoharan, 2007) para el ácido 3β-hidroxi-lup-12-en-28-oico.



En el siguiente diagrama se resume la obtención de los compuestos **8** y **10**.

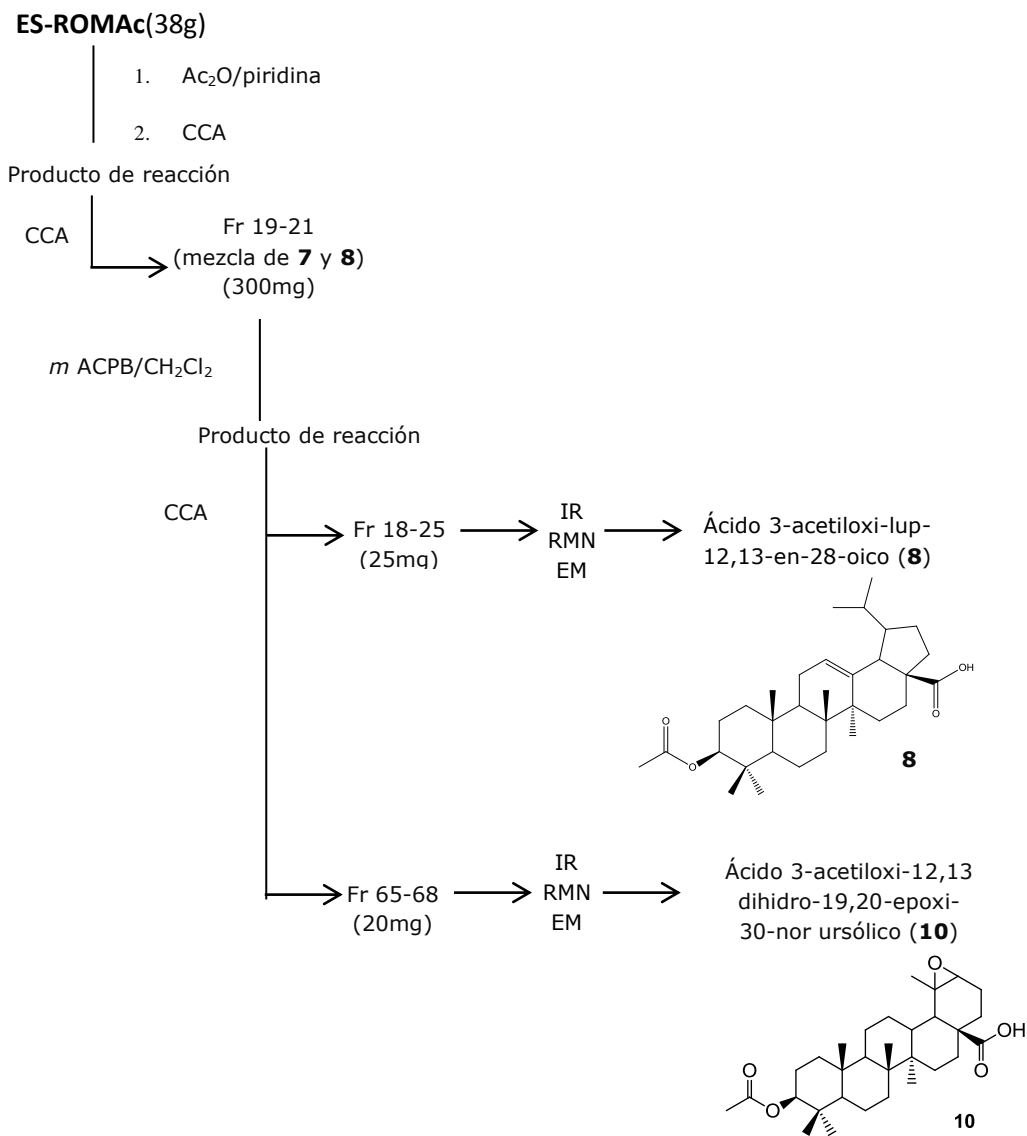


Diagrama VI.5 Obtención del **ácido 3-acetiloxi,lup-12-en-28-oico (8)** y del **ácido 3 acetiloxi-12,13dihidro-19,20-epoxi-30-nor-ursólico(10)**



El mecanismo propuesto de la obtención de **10** a partir del tratamiento de **7** con AMCPB se discute en el capítulo VII.

Se evaluó la capacidad de inhibición de la proliferación celular de los compuestos **8** y **10** en líneas de cáncer humano, así como su actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido con TPA.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describe la elucidación estructural mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos de los diferentes metabolitos secundarios identificados y aislados de *R. officinalis*. También se informa y se discute la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* tanto de algunos extractos, como de varios metabolitos secundarios y sus derivados provenientes del romero.

7.1 Elucidación estructural

7.1.1 Identificación de las lactonas 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1), y 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2), así como del diacetato de betulina (6), el acetato del ácido betulínico (7) y el ácido 3 β -acetil-lup-12-en-28-oico (8).

La identificación de las lactonas 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (1), y 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (2), así como del diacetato de betulina (6), el acetato del ácido betulínico (7) y el ácido 3 β -acetil-lup-12-en-28-oico (8) se logró por la comparación de sus datos espectroscópicos y físicos con aquellos informados en la literatura (Tabla VII.1)

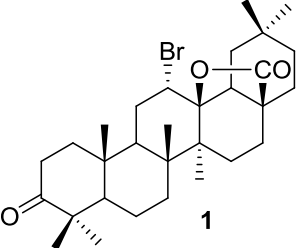
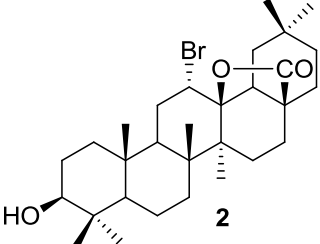
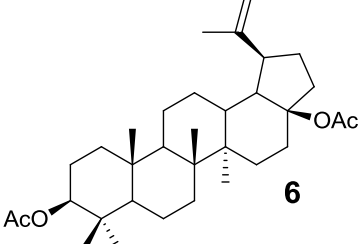
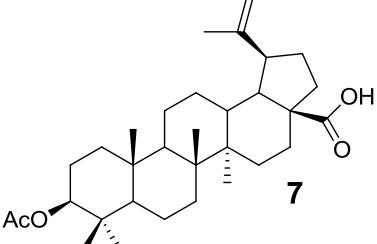
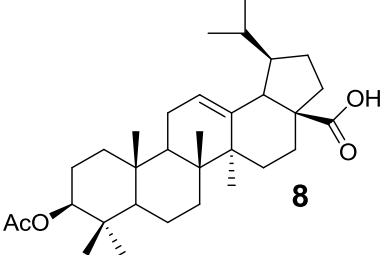
| Estructura | Nombre | Referencia |
|---|--|--------------------------------------|
|  <p style="text-align: center;">1</p> | <p>Lactona 12α-bromo, 3-oxo-oleanan-13β,28-ólida (1)</p> | <p>Lewis y Tucker, 1983</p> |
|  <p style="text-align: center;">2</p> | <p>Lactona 12α-bromo, 3β-hidroxi-oleanan-13β,28-ólida (2)</p> | <p>Lewis y Tucker, 1983</p> |
|  <p style="text-align: center;">6</p> | <p>Diacetato de betulina (6)</p> | <p>Sammi Alakurtti et. Al., 2010</p> |
|  <p style="text-align: center;">7</p> | <p>Acetato del ácido betulínico (7)</p> | <p>Ahmed, 2004</p> |
|  <p style="text-align: center;">8</p> | <p>Ácido 3β-acetiloxi-lup-12-en-28-oico (8)</p> | <p>Manoharan, 2007</p> |

Tabla VII.1 Estructuras químicas y referencias en la literatura de las lactonas 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida (**1**), y 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida (**2**), así como del diacetato de betulina (**6**), el acetato del ácido betulínico (**7**) y el ácido 3 β -acetiloxi-lup-12-en-28-oico (**8**)

7.1.2 Mezcla del acetato del ácido betulínico (7), el 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y el 3 β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico (9)

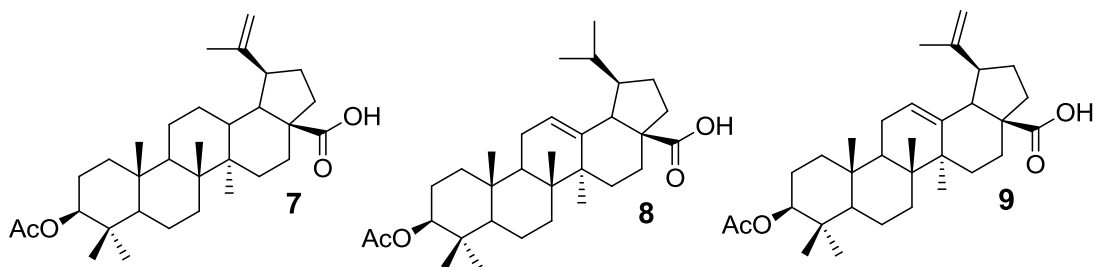


Figura VII.1 Composición de la mezcla Fr17-23. Compuestos **7**, **8** y **9**.

La CCF de la reunión de las fracciones 17-23 provenientes del residuo soluble en hexano de ES-ROMAc reveló una sola mancha, aún cuando se eluyó en varias mezclas de disolventes, indicando que posiblemente se trataba de un solo compuesto. Sin embargo los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C demostraron que en realidad se trataba de una mezcla. Las señales para dos protones 4.74 y 4.62 ppm en RMN ^1H que correlacionaron con una señal de un metileno a 109 ppm y la presencia de una señal a 145.8 ppm en el espectro de RMN ^{13}C indicaron la presencia de la doble ligadura entre C-20 y C-29 típica de los triterpenos como el ácido betulínico. El análisis detallado de ambos espectros demostró que el componente mayoritario de esta mezcla era el acetato del ácido betulínico (**7**) previamente aislado de la fracción 15-16 de la misma cromatografía. También en el espectro de RMN ^1H de esta mezcla se observó una señal a 5.27 ppm típica de un protón vinílico en C-12 de los triterpenos pentacíclicos, sin embargo esta señal mostró una integración sólo de 0.7 con respecto a las señales del acetato **7**. Una señal similar se observó a 5.26 ppm, pero su integración sólo correspondía a 0.3 con respecto al triterpeno **7**. Estas dos señales se



correlacionaron con las señales de metinos a 125.76 y 122.58 ppm en el espectro de RMN ^{13}C . Estos datos indicaron que posiblemente dos triterpenos con una doble ligadura a C-12 podrían ser parte de la mezcla. También se observaron dos señales a 4.66 y 4.72 ppm asignadas a los protones vinílicos de la posición 29 de un triterpeno del tipo del ácido betulínico, sin embargo su integración sólo fue de 0.3 respecto del acetato del ácido betulínico (**7**). Un análisis detallado de los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C permitió proponer que esta mezcla está constituida por **7**, **8** y **9** en una relación de 1: 0.7 : 0.3.

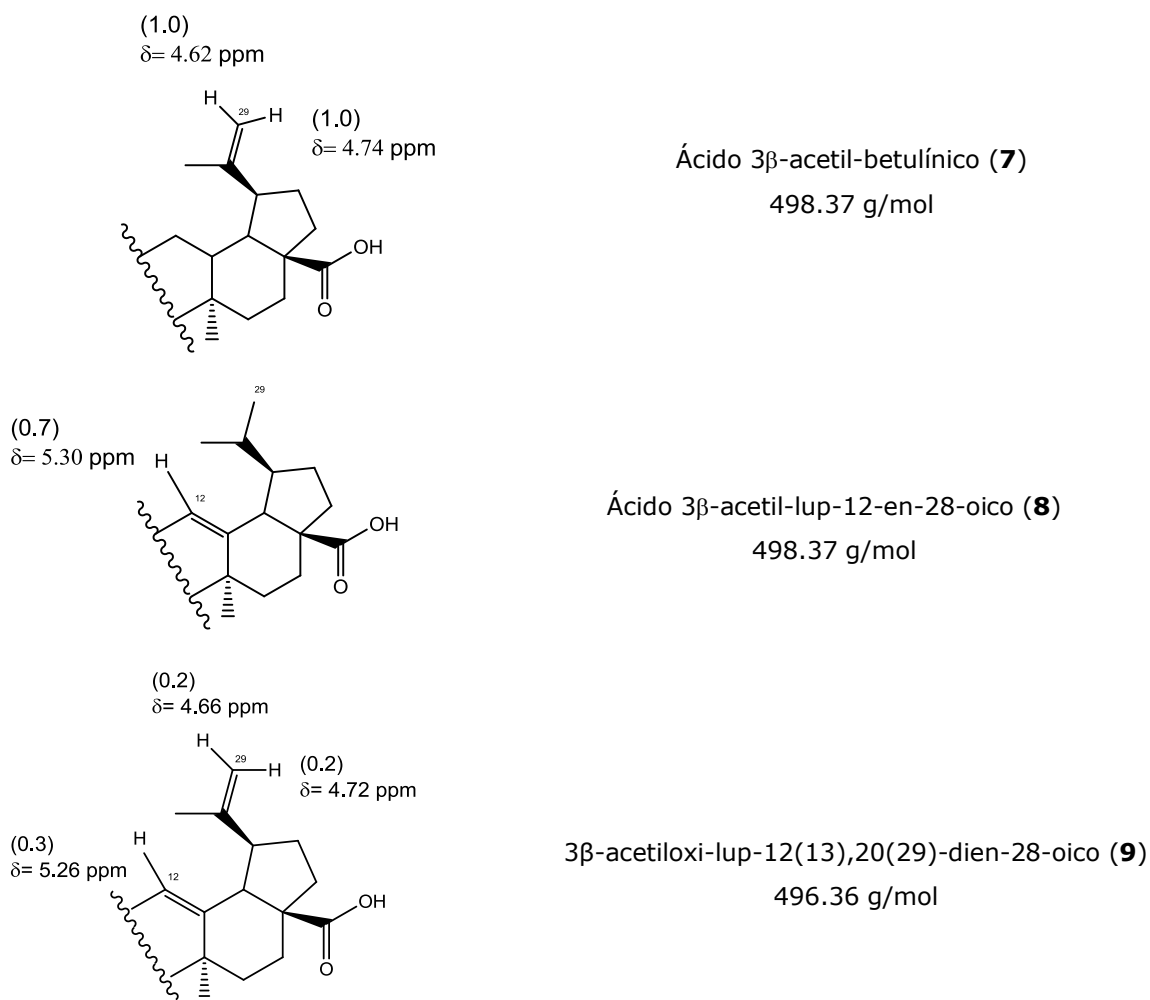


Figura VII.2 Asignación de las señales de RMN protónica a los compuestos **7**, **8** y **9**.

En el cromatograma del análisis por CLAR-EM de la mezcla Fr 17-23 se observaron tres picos con mayor abundancia. El primero con un tiempo de retención de 26.0 min y cuyo espectro de masas mostró un ion a 495 $[M^+ - 1]$, el segundo con un tiempo de retención de 26.9 min y un ion a de 497 $[M^+ - 1]$ y un tercer pico con un tiempo de retención de 27.2 min y un ion ar 497 $[M^+ - 1]$.

En la figura VII.2 también se muestran los pesos moleculares de **7** (498 g/mol), **8** (498 g/mol) y **9** (496 g/mol). Estos resultados apoyan la propuesta de que la mezcla Fr 17-23 está constituida por **7**, **8** y **9**.

7.1.3 Caracterización del ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (10)

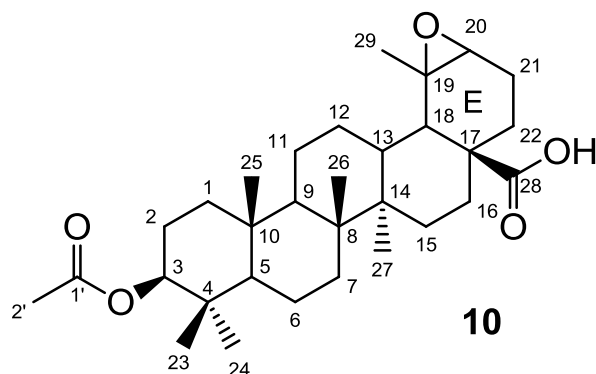


Figura VII.3. Ácido 3 β -acetil-12-13-dihidro-19-20 epoxi-30-nor-ursólico (10).

De la reunión de las fracciones 19-21 de la cromatografía del producto de acetilación de ES-ROMAc se obtuvo una mezcla binaria. El análisis detallado de los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C permitió concluir que esta mezcla estaba formada por los acetatos **7** y **8**.

Es conocido que el ácido *m*-cloroperoxibenzoico (AMCPB) es un reactivo epoxidante común, para transformar alquenos en epóxidos que tengan la misma estereoquímica *cis* o *trans*. Tomando en cuenta lo anterior

para formar un epóxido del acetato **7**, y con el fin de obtener productos puros se decidió tratar la mezcla de **7** y **8** con AMCPB.

La cromatografía del producto de reacción permitió el aislamiento del acetato **8**, con lo cual se demostraba que este compuesto estaba originalmente en la mezcla.

También se aisló otro producto sólido. El análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos nos permitieron concluir que se trataba del **ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (10)**.

Al analizar el espectro de IR de éste último se observó: $\nu_{\text{máx}}$ 2947 (-CH); 1696,1728 (2 carbonilos); 1453 (-CH₂); 1372 (-CH₃) cm⁻¹

En el espectro de RMN ¹³C se observó un número total de señales que corresponde a 31 átomos de carbono. De acuerdo con el experimento DEPT se asignaron siete señales a grupos metilos. Además se distinguieron 10 CH₂ y 6 CH; y por diferencia de éstas con el total de las señales, resultaron 8 carbonos sin hidrógenos (Tabla VII.2).

La pérdida evidente de las señales asignadas a la doble ligadura en C-29, tanto en el espectro de ¹³C como en el de ¹H, y la presencia de una señal a 60,12 ppm que se asignó a un carbono cuaternario unido a un grupo metilo (C-29) a 18,83 ppm y a un grupo metino (C-20) a 50.23ppm, nos permitió sugerir la formación de un epóxido entre C-19 y C-20 en un anillo de seis miembros como lo ilustra el mecanismo sugerido en la Figura VII. 6. El resto de las señales en ambos espectros fueron muy similares al acetato del ácido betulínico. Tomando en cuenta lo anterior se propuso la estructura **10** para este producto. Esta

propuesta se ve apoyada por el patrón de fragmentación deducido a partir del espectro de masas.

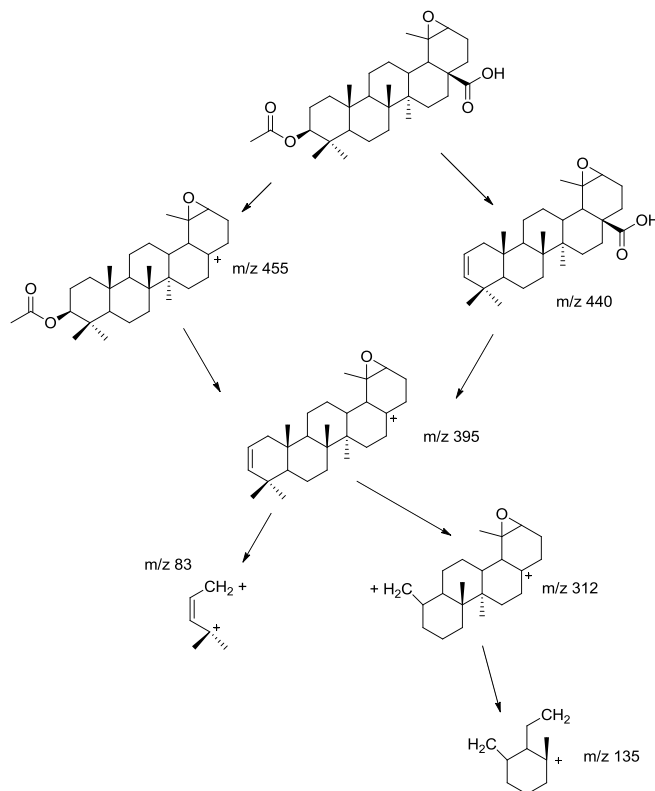


Figura VII.4. Fragmentaciones propuestas para el **ácido 3β-acetiloxi-12,13-dihidro-19,20-epoxi-30-nor-ursólico (10)**

Esta propuesta se comprobó por los experimentos de HMBC y HSQC.

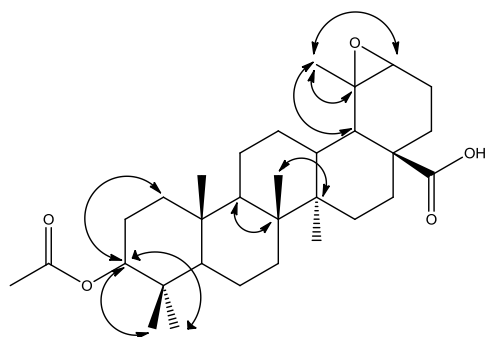


Figura VII.5. Principales interacciones C->H a tres ligadura para el **ácido 3β-acetiloxi-12,13-dihidro-19,20-epoxi-30-nor-ursólico (10)**.

| Posición | ¹³ C / DEPT | δ _c (ppm) | δ _H (ppm) | HMBC (C->H) |
|----------|------------------------|----------------------|----------------------|-------------|
| 1 | CH ₂ | 38.66 | 2.38 m 2.41 m | 3 |
| 2 | CH ₂ | 27.2 | 1.27 m 1.50 m | 1 |
| 3 | CH | 80.66 | 4.71 dd | 23,24 |
| 4 | C | 38.26 | | 3 |
| 5 | CH | 55.81 | 2.38 m | |
| 6 | CH ₂ | 18.56 | 1.31 m 1.40 m | |
| 7 | CH ₂ | 34.68 | 1.30 m 1.30 m | |
| 8 | C | 41.40 | | 6 |
| 9 | CH | 50.67 | 1.28 m | |
| 10 | C | 37.53 | | 11 |
| 11 | CH ₂ | 21.34 | 1.40 m 1.40 m | |
| 12 | CH ₂ | 24.97 | 1.60 m 1.70 m | |
| 13 | CH | 38.02 | 2.41 m | |
| 14 | C | 43.06 | | |
| 15 | CH ₂ | 27.80 | 1.50 m 1.50 m | |
| 16 | CH ₂ | 32.41 | 1.31 m 2.40 m | |
| 17 | C | 56.80 | | 13, 21 |
| 18 | CH | 45.80 | 2.38 m | 13, 21 |
| 19 | C | 60.12 | | |
| 20 | CH | 50.23 | 2.53 dd | |
| 21 | CH ₂ | 29.97 | 1.13 m 1.65 m | |
| 22 | CH ₂ | 37.25 | 1.32 m 2.40 m | |
| 23 | CH ₃ | 28.22 | 0.89 s | 3 |
| 24 | CH ₃ | 16.92 | 0.89 s | 3 |
| 25 | CH ₃ | 16.48 | 0.77 s | 1, 5, 9 |
| 26 | CH ₃ | 16.50 | 1.018 s | 7, 9, 14 |
| 27 | CH ₃ | 15.05 | 0.89 s | 8, 9, 15 |
| 28 | C | 182.24 | | |
| 29 | CH ₃ | 18.83 | 1.12 s | 18,19,20 |
| 1' | C | 170.56 | | |
| 2' | CH ₃ | 20.98 | 1.76 s | |

Tabla VII.2 Datos de RMN del ácido 3β-acetil, 12-13 dihidro, 19-20-epoxi, 30-nor ursólico (10) en C₆D₆.

Éste constituye el primer informe acerca de la obtención de **10** a partir del tratamiento de **7** con ácido *m*-cloroperoxibenzoico.

Existe una serie de publicaciones en las que se ha propuesto el mecanismo por el que el ácido *m*-cloroperoxibenzoico promueve la fragmentación oxidativa de dobles ligaduras para la formación de cetonas (Borowitz, 1966 y 1968; Singh 2009; Prado, 2010). Tomando en cuenta lo anterior se ha propuesto un mecanismo para explicar la transformación de **7** a **10**, que se ilustra en la Figura VII.6.

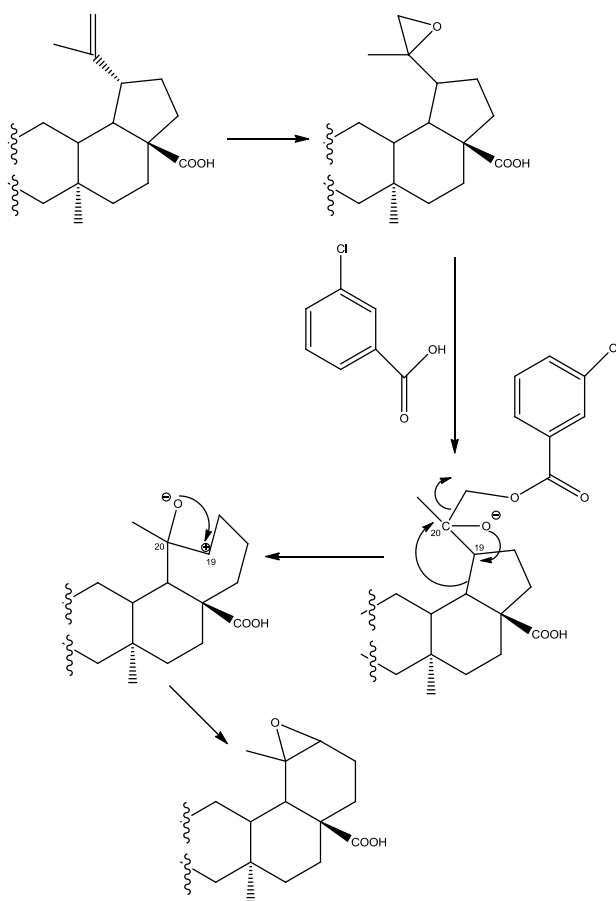


Figura VII.6. Mecanismo propuesto de la transformación de **7** en **10**, a partir de su tratamiento con ácido *m*-cloroperoxibenzoico.

7.2 Actividad biológica.

Con la finalidad de obtener compuestos bioactivos y establecer un resultado preliminar respecto al potencial antineoplásico y antiinflamatorio de los mismos, el extracto ES-ROM, algunas fracciones de ES-ROM y los compuestos aislados se sometieron a la evaluación de su capacidad de inhibición del crecimiento de 6 líneas celulares de cáncer humano, según los protocolos del INC, y también de sus efectos antiinflamatorios mediante el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA.

7.2.1 ES-ROM

7.2.1.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos *in vitro* del extracto bioactivo seco de romero ES-ROM

Los resultados de la inhibición por ES-ROM de la proliferación de las líneas celulares de cánceres humanos U-251, PC-3, K-562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1 se muestran en la tabla VII.3. Como se observa las más sensibles al efecto de inhibición fueron las líneas MCF-7 y la K-562.

| | Línea celular | | | | | |
|--------|--|-------|-------|--------|-------|--------|
| | % Inhibición de la Proliferación celular | | | | | |
| | U-251 | PC-3 | K-562 | HCT-15 | MCF-7 | SKLU-1 |
| ES-ROM | 48.1 | 59.33 | 98.36 | 57.58 | 100 | 74.91 |

Tabla VII.3 Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROM. Concentración 50µg/mL. U-251=Glioblastoma, PC-3= Carcinoma de próstata, K-562=Leucemia mieloide crónica, HCT-15= Adenocarcinoma de colon, MCF-7=Adenocarcinoma de mama, SKLU-1= Adenocarcinoma de pulmón.

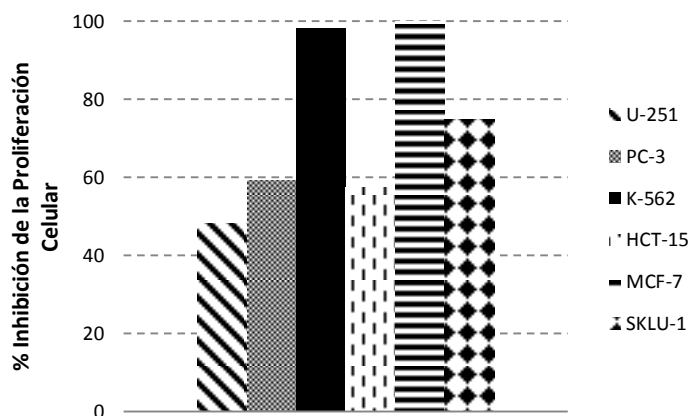


Gráfico VII.I Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROM. Concentración 50µg/mL.

7.2.1.2 Resultados de actividad antiinflamatoria *in vivo* de ES-ROM.

El resultado de capacidad antiinflamatoria de ES-ROM se muestra en la tabla VII.4. El extracto y los controles se administraron por vía intraperitoneal en los ratones debido a la poca solubilidad de ES-ROM en los disolventes orgánicos empleados.

| Muestra | Dosis | % Inhibición del edema |
|--------------------|---------|------------------------|
| Control | - | - |
| ES-ROM (ip) | 50mg/kg | 26,74 |

Tabla VII.4 Resultados de la actividad antiinflamatoria de ES-ROM mediante el Modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA. Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.001$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

La baja actividad antiinflamatoria producida por ES-ROM puede deberse a que los compuestos presentes en dicha fracción sufrieron metabolismo por efecto del primer paso en el hígado del animal, disminuyendo la biodisponibilidad de los componentes, y por la pérdida de actividad biológica de los metabolitos producidos.

Para estudiar el metabolismo de triterpenos pentacíclicos, se ha realizado una serie de aproximaciones a partir de modelos *in vitro* con microorganismos con el fin de predecir el destino de dichos xenobióticos en un mamífero. Los metabolitos aislados en tales experimentos, del ácido betulínico, por ejemplo, resultaron perder o disminuir su actividad respecto al ácido betulínico contra líneas de cáncer humano *in vitro*. (Perumal Yogeeswari, 2005)

7.2.2 Fraccionamiento primario de ES-ROM

7.2.2.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos *in vitro* de las fracciones primarias de ES-ROM.

Se probó la actividad antiproliferativa de ES-ROMAc, ES-ROMMe y ES-ROMin contra seis líneas celulares de cáncer humano.

| | Línea celular | | | | | |
|----------|--|-------|-------|--------|-------|--------|
| | % Inhibición de la Proliferación celular | | | | | |
| | U-251 | PC-3 | K-562 | HCT-15 | MCF-7 | SKLU-1 |
| ES-ROMAc | 81.27 | 80.31 | 100 | 88.7 | 51.16 | 100 |
| ES-ROMMe | 100 | 100 | 100 | 96,4 | 100 | 88.88 |
| ES-ROMin | 30.08 | 46.15 | 97.46 | 33.67 | 58.12 | 65.1 |

Tabla VII.5 Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROMAc, ES-ROMMe y ES-ROMin. Concentración 50µg/mL. U-251=Glioblastoma, PC-3= Carcinoma de próstata, K-562=Leucemia mieloide crónica, HCT-15= Adenocarcinoma de colon, MCF-7=Adenocarcinoma de mama, SKLU-1= Adenocarcinoma de pulmón.

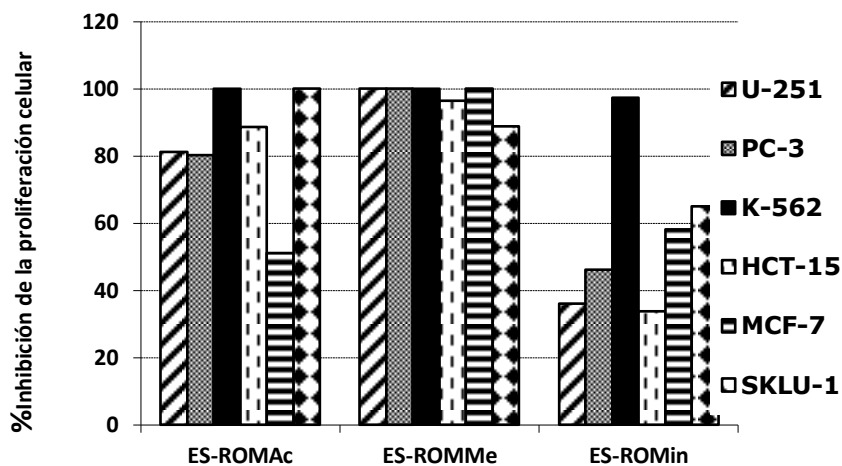


Gráfico VII.2 Resultados de inhibición de la proliferación celular en cultivos de líneas celulares de cáncer humano de ES-ROMAc, ES-ROMMe y ES-ROMin. Concentración 50µg/mL.

En general, las fracciones mostraron una actividad biológica significativa sobre las líneas celulares con las que se realizó el ensayo. Los extractos ES-ROMAc y ES-ROMMe inhiben del 51-100% la proliferación de los seis cultivos celulares utilizados a una concentración de 50 µg/mL. ES-ROMAc y ES-ROMMe mostraron mejor actividad que ES-ROM contra la mayoría de las líneas probadas, por lo que es posible que en ellos estén concentrados en mayor proporción los compuestos responsables. Por otra parte, se observa que la actividad de ES-ROMin resultó selectiva contra la proliferación de la línea celular K-562.

7.2.2.2 Resultados de actividad antiinflamatoria *in vivo* de las fracciones primarias de ES-ROM.

El resultado de capacidad antiinflamatoria de las fracciones primarias se muestra a continuación. ES-ROMin se administró por vía intraperitoneal en los ratones debido a la poca solubilidad de esta fracción en los disolventes orgánicos empleados.

| Muestra | Dosis | Inhibición del edema (%) |
|----------------------|---------------|--------------------------|
| Control | - | - |
| Indometacina | 0.36 mg/oreja | 78.76** |
| ES-ROMAc | 1mg/oreja | 50.64** |
| ES-ROMMe | 1mg/oreja | 79.53** |
| ES-ROMin (ip) | 50mg/kg | 11.86 |

Tabla VII.6 Resultados de la actividad antiinflamatoria de las fracciones primarias de ES-ROM mediante el Modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA. Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media ($x \pm EEM$). Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.001$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Como se observa en la tabla anterior, las fracciones más activas en este modelo resultaron ES-ROMAc y ES-ROMMe, al igual que en la prueba de inhibición de la proliferación celular de líneas de cáncer humano.

Aunque podría justificarse la poca actividad antiinflamatoria de ES-ROMin por su administración vía intraperitoneal, el estudio de esta fracción no se prosigue en este trabajo debido a que también presentó baja capacidad antiproliferativa en líneas de cáncer humano.

7.2.3 Actividad biológica de los compuestos 1 y 2 (derivados bromolactónicos del ácido oleanólico)

7.2.3.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos *in vitro* de 1 y 2.

Los datos de inhibición de la proliferación de líneas de cánceres humanos por los compuestos **1** y **2** se muestran en la tabla VII.5. Se observa claramente que, a pesar de que la única diferencia estructural ente **1** y **2** es la sustitución de C-3, que en **2** es un alcohol, y en **1** éste aparece oxidado como un grupo ceto, **2** presenta una mayor actividad como inhibidor de la proliferación celular.



| Muestra | Concentración | Línea celular | | | | | |
|-----------------|---------------|--|-------|-------|--------|-------|--------|
| | | % Inhibición de la Proliferación celular | | | | | |
| | | U-251 | PC-3 | K-562 | HCT-15 | MCF-7 | SKLU-1 |
| <p>1</p> | 50 µg/mL | 54.99 | 56.77 | 47.49 | 13.87 | 54.64 | 12.60 |
| <p>2</p> | 50 µg/mL | 100 | 96.14 | 86.37 | 89.07 | 48.74 | 86.47 |

Tabla VII.7 Resultados de inhibición de la proliferación celular de **(1)** 12 α -bromo, 3-oxo-oleanan-13 β ,28-ólida **(1)** y **(2)** 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-ólida en cultivos de líneas celulares de cáncer humano. Concentración 50 µg/mL. U-251=Glioblastoma, PC-3= Carcinoma de próstata, K-562=Leucemia mieloide crónica, HCT-15= Adenocarcinoma de colon, MCF-7=Adenocarcinoma de mama, SKLU-1= Adenocarcinoma de pulmón.

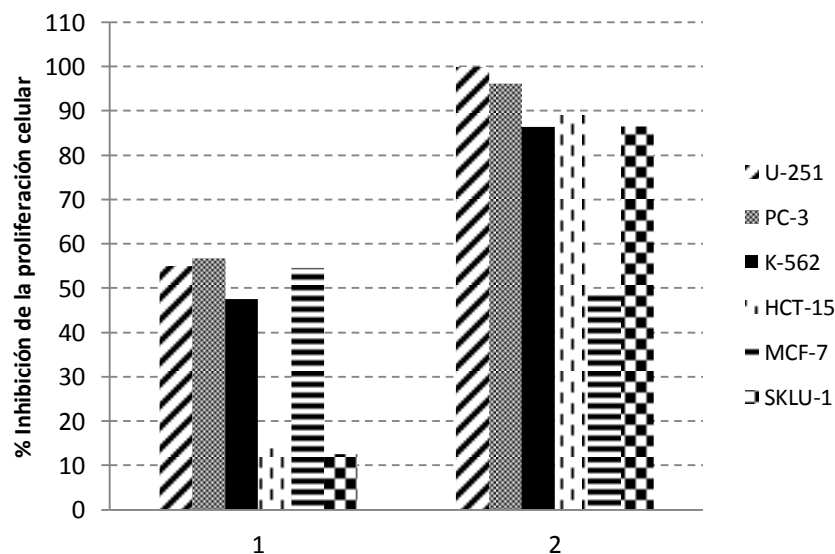


Gráfico VII.3 Resultados de inhibición de la proliferación celular de **(1)** lactona 3-oxo, 12 α -bromo-oleanólica y **(2)** lactona 12 α -bromo-oleanólica en cultivos de líneas celulares de cáncer humano.

Se calculó la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de **2** para la línea celular de cáncer contra la que fue más activo: U-251 (Glioblastoma).

| | Lactona 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-olida (2) |
|---------------|--|
| Línea Celular | CI ₅₀ (μ M) |
| U-251 | 5.59 \pm 0.01 |

Tabla VII.8 CI₅₀ de **2** (lactona 12 α -bromo, 3 β -hidroxi-oleanan-13 β ,28-olida) en U-251=Glioblastoma.

7.2.3.2 Resultados de actividad antiinflamatoria *in vivo* de **1** y **2**.

Los datos obtenidos por el ensayo de edema inducido por TPA en oreja de ratón se presentan en la tabla VII.9. Ambos compuestos demostraron actividad antiinflamatoria, siendo **2** el más activo.

| Muestra | | Dosis | Inhibición (%) |
|---------------------|---|----------------------|----------------|
| Control | Acetona-CH ₂ Cl ₂ | - | - |
| | Acetona | - | - |
| Indometacina | | 1.00 μ mol/oreja | 78.76** |
| 1 | | 0.58 μ mol/oreja | 51.75** |
| 2 | | 0.58 μ mol/oreja | 64.64** |

Tabla VII.9 Resultados de la actividad antiinflamatoria de (1) lactona 3-oxo, 12 α -bromo-oleanólica y (2) lactona 12 α -bromo-oleanólica mediante el Modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA. Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media ($x \pm$ EEM). Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.001$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

El compuesto **2**, con un grupo hidroxilo en C-3 muestra mayor actividad antiinflamatoria que **1**, que en cambio posee un grupo ceto en la posición mencionada.

De lo anterior se establece que el grado de oxidación de C-3 en estos derivados bromolactónicos influye en su actividad biológica, su capacidad antiinflamatoria y de inhibición de la proliferación celular decrecerá mientras C-3 se encuentre más oxidado.

No obstante que **2** fue más activo que **1**, éste último resultó más activo como agente antiinflamatorio que el ácido oleanónico en el modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA. Mientras que la lactona **1** mostró una inhibición del 51% del edema a una dosis de 0.58 μmol /oreja, el ácido oleanónico, a una dosis de 1.0 μmol /oreja, presentó un porcentaje del 28% de inhibición (Giner-Larza, 2001). Lo anterior muestra que la generación de un derivado menos polar del ácido oleanónico, como su bromo-lactona, mejora la actividad antiinflamatoria de dicha molécula.

7.2.4 Actividad biológica de los compuestos 6, 7, 8 y 10, y de la mezcla de 7 y 8.

La sección anterior se dedicó a los resultados de actividad biológica de los derivados bromolactónicos **1** y **2**, que corresponden a esqueletos de triterpenos tipo oleanano. A continuación se discutirán los resultados de la actividad biológica de los compuestos **6,7,8** y **10**, los primeros tres derivados de tipo lupano y el derivado **10**, de tipo ursano.

7.2.4.1 Resultados de inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos *in vitro* de 6, 7, 8 y 10, y de la mezcla de 7 y 8.

Los datos de inhibición de la proliferación celular de los compuestos **6, 7, 8** y **10**, así como de la mezcla de **7** y **8** se informan a continuación.

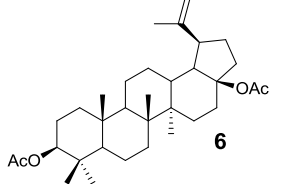
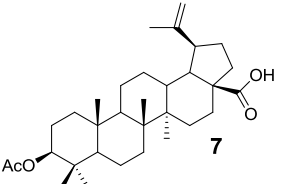
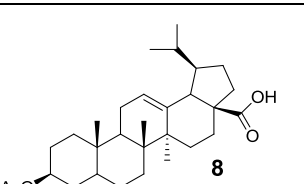
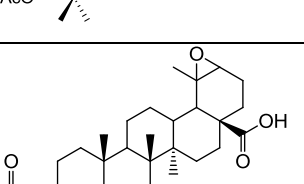
| Muestra | Concentración | Línea Celular | | | | | |
|--|---------------|---|-------|-------|--------|-------|--------|
| | | % Inhibición de la Proliferación celular. | | | | | |
| | | U-251 | PC-3 | K-562 | HCT-15 | MCF-7 | SKLU-1 |
|  6 | 50 µg/mL | 52.35 | 69.76 | 100 | 20.27 | 28.26 | 16.7 |
|  7 | | 58.45 | 87.27 | 68.27 | 100 | 100 | 100 |
|  8 | | 100 | 100 | 100 | 90.71 | 80.74 | 100 |
|  10 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Mezcla de 7 y 8 | | 70.09 | 66.17 | 65.44 | 59.98 | 78.24 | 74.89 |

Tabla VII.10 Resultados de inhibición de la proliferación celular de **6** (diacetato de betulina), **7** (ácido 3-acetiloxi-betulínico), **8** (ácido 3β-acetiloxi-lup 12-en-28-oico), **10** (ácido 3β-acetil-12,13-dihidro-19-20-epoxi-30-nor ursólico) y la mezcla de **7** y **8** en cultivos de líneas celulares de cáncer humano. Concentración 50µg/mL. U-251=Glioblastoma, PC-3= Carcinoma de próstata, K-562=Leucemia mieloide crónica, HCT-15= Adenocarcinoma de colon, MCF-7=Adenocarcinoma de mama, SKLU-1= Adenocarcinoma de pulmón.

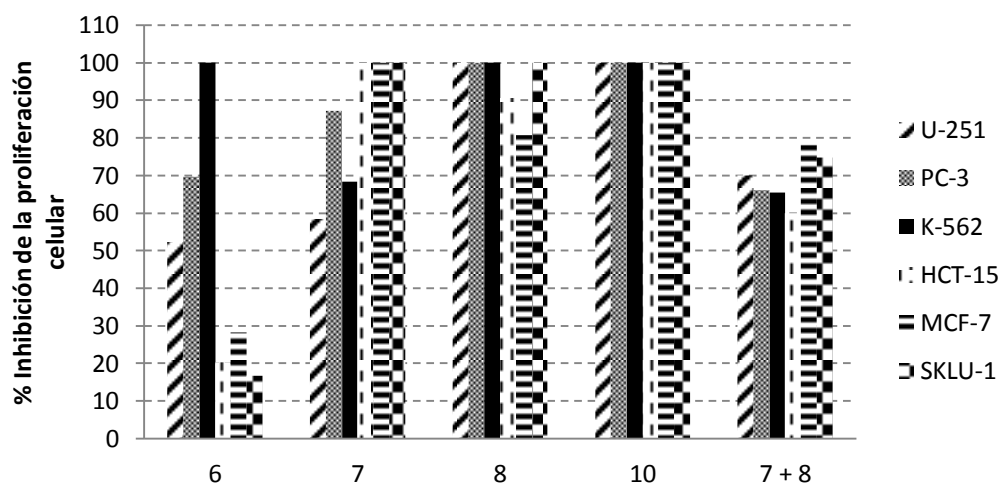


Gráfico VII.4 Resultados de inhibición de la proliferación celular de **6, 7, 8, 10** y la mezcla de **7 y 8** en cultivos de líneas celulares de cáncer humano.

Como puede observarse en el gráfico VII.4, el compuesto **6**, con un grupo acetiloxi en el C-28, exhibe una actividad inhibitoria selectiva contra la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562, inhibiendo su crecimiento en un 100%. Por otro lado, los compuestos **7** y **8**, con un ácido carboxílico en C-28, muestran una alta actividad inhibitoria sobre las seis líneas de cáncer, sin manifestar selectividad por alguna de ellas.

La mezcla formada por los compuestos **7** y **8**, mostró una importante actividad de inhibición de la proliferación de las seis líneas de cáncer probadas pero dicha actividad mejoró para los derivados **7** y **8** evaluados individualmente. **8** presenta mejor actividad de inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano que su isómero **7**.

El compuesto **10** presentó una excelente actividad de inhibición de la proliferación sobre las 6 líneas de cáncer probadas. Su capacidad de inhibición de la proliferación celular mejoró respecto a **7**.

De la información anterior se puede establecer que la presencia de un grupo menos polar como el acetilo en la posición C-28 del compuesto

6 le confiere a éste selectividad contra la línea celular K-562, mientras que un grupo muy polar como el ácido carboxílico en C-28 presente en los compuestos **7** y **8** representa una alta actividad inhibitoria de la proliferación contra las seis líneas de cáncer probadas sin mostrar selectividad por alguna línea celular.

7.2.4.2 Resultados de la actividad antiinflamatoria *in vivo* de **6**, **7**, **8**, **10**, y de la mezcla de **7** y **8**.

En la tabla VII.11 se informan los resultados de las actividades antiinflamatorias de **6**, **7**, **8**, **10** y de la mezcla de **7** y **8** en el modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido con TPA.

Todos los productos mostraron actividad antiinflamatoria significativa respecto al control.

| Muestra | | Dosis | Inhibición (%) |
|------------------------|---|--------------|----------------|
| Control | Acetona-CH ₂ Cl ₂ | - | - |
| | Acetona | - | - |
| Indometacina | | 0,31mg/oreja | 78,76** |
| 6 | | | 33,09** |
| 7 | | | 72,73** |
| 8 | | | 55,40** |
| 10 | | | 65,03** |
| Mezcla de 7 y 8 | | | 52,52** |

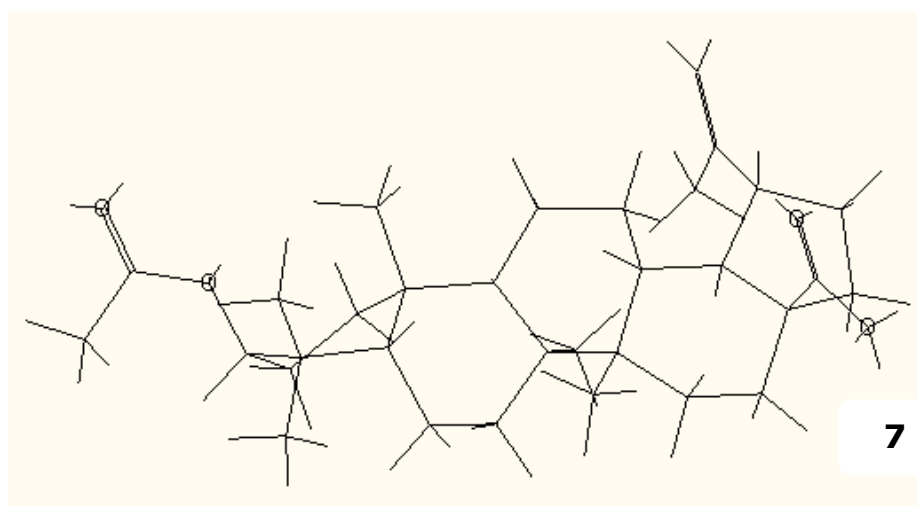
Tabla VII.11 Resultados de la actividad antiinflamatoria de **6** (diacetato de betulina), **7** (ácido 3-acetil betulínico), **8** (ácido 3β-acetiloxi, lup 12-en-28-oico), **10** (ácido 3β-acetil-12,13-dihidro-19-20-epoxi-30-nor ursólico) y la mezcla de **7** y **8** mediante el Modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA. Los datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar de la media (x±EEM). Los valores de p≤0.05(*) y p≤0.001(**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Los acetatos **6** y **7** se diferencian por el grado de oxidación del átomo C-28. En **6** está un residuo acetilo en dicha posición, mientras que en **7**, que fue el compuesto más activo de todos lo evaluados incluso que la indometacina, posee un ácido carboxílico en C-28,

Por otro lado, la mezcla formada por **7** y **8** exhibe una capacidad antiinflamatoria menor que la de los compuestos evaluados individualmente, mientras que el derivado 10 presentó un efecto antiinflamatorio ligeramente menor que **7**.

En resumen, los resultados anteriores indican que la presencia de un grupo polar como el ácido carboxílico unido a C-28 en los compuestos **7** y **8**, favorece su actividad biológica tanto en su capacidad de inhibición de la proliferación de líneas celulares cancerosas, como en sus efectos antiinflamatorios. En cambio, la presencia en C-28 de un grupo menos polar como el acetilo en el derivado **6** afecta negativamente su capacidad antiinflamatoria, pero le confiere selectividad en la inhibición de la proliferación de la línea K-562.

La diferente actividad antiinflamatoria de **7** y **8** debe estar influida por los cambios conformacionales entre ambos isómeros que se relaciona además con la diferente reactividad entre ellos (Figura VII.11).



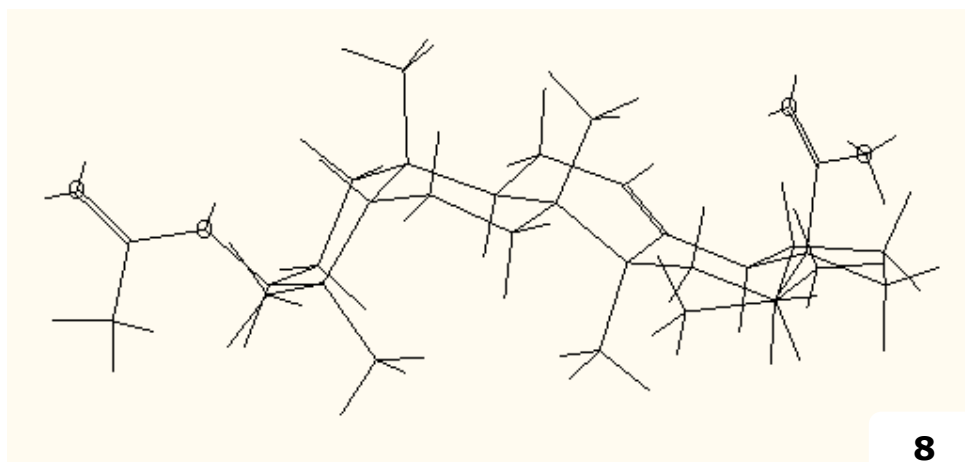


Figura VII.7. Imágenes tridimensionales de los isómeros **7** (Ácido 3 β -acetil betulínico) y **8** (ácido 3 β -acetil,lup 12-en-28-oico)

La evaluación in vitro de los compuestos **1**, **2**, **6**, **7**, **8** y **10** respecto a su capacidad de inhibición de las líneas celulares de cáncer humano nos permitió realizar aproximaciones de estructura-actividad y nos proporcionó un precedente del potencial de estos derivados en su utilidad como probables agentes quimioterapéuticos.

Respecto a su actividad antiinflamatoria, la respuesta positiva de los derivados triterpénicos **1**, **2**, **6**, **7**, **8** y **10** en el ensayo de TPA no nos revela el mecanismo bioquímico específico de los compuestos, pero podríamos suponer que involucra la inhibición de enzimas como la proteína cinasa C (Wang y Polya, 1996), la fosfolipasa A₂ (Kenneth, 1992), la 5-lipooxigenasa (Giner-Larza, 2001) o la enzima ciclooxigenasa-2 (Ringbom et al., 1998), como se ha sugerido para compuestos del tipo oleanano y ursano, de los que forman parte **1**, **2** y **10**. También podríamos sospechar que **6**, **7** y **8** actúan por un mecanismo relacionado con el de los glucocorticoides, como se ha referido para el ácido betulínico (Recio et al., 1995).

Es necesario determinar cuáles son los mecanismos involucrados en la actividad biológica de los compuestos evaluados en este trabajo y determinar si el mecanismo por el que exhiben actividad antiinflamatoria está relacionado con aquél por el que inhiben la proliferación de células cancerosas *in vitro*.

8. CONCLUSIONES

- ▣ El extracto hidroalcohólico seco de romero y sus fracciones de acetato de etilo y metanol inhibieron significativamente la proliferación de líneas celulares de cáncer humano y tienen actividad antiinflamatoria en un modelo *in vivo*.
- ▣ De la fracción de acetato de etilo del extracto de romero se obtuvo una serie de derivados de triterpenos pentacíclicos de tipo oleanano, lupano y ursano con actividad de inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano y antiinflamatoria en el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA.
- ▣ Se obtuvieron las lactonas 12α -bromo, 3-oxo-oleanan- $13\beta,28$ -ólida (**1**), y 12α -bromo, 3β -hidroxi-oleanan- $13\beta,28$ -ólida (**2**) a partir de la reacción de bromación de una mezcla de los triterpenos.
- ▣ Los resultados de inhibición de la proliferación de células de cáncer humano y de actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA para **1** y **2**, mostraron que la presencia del alcohol en C-3 es indispensable para su actividad biológica.
- ▣ Éste es el primer informe de la actividad biológica respecto a inhibición de líneas celulares de cáncer humano y efecto antiinflamatorio de las lactonas **1** y **2**.



- ▣ Se identificó el acetato de β -amirina (**3**), la β -amirona (**4**) y la α -amirona (**5**). La presencia de estos 3 metabolitos secundarios debe contribuir también a la actividad biológica de *R. officinalis*.
- ▣ De la acetilación de una fracción de triterpenos se aisló una mezcla de tres triterpenos: acetato del ácido betulínico (**7**), 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (**8**) y 3 β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico (**9**).
- ▣ La mezcla constituida por **7**, **8** y **9** mostró capacidad de inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano y actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA.
- ▣ Se aisló el diacetato de betulina (**6**), el acetato del ácido betulínico (**7**) y su isómero el 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (**8**).
- ▣ Los resultados de actividad biológica muestran que el residuo de acetilo en C-28 de **6** le confiere selectividad contra la línea de cáncer K-562, pero no favorece su actividad antiedematosa, mientras que **7** con la misma estructura pero con un grupo polar como el ácido carboxílico en C-28 demostró ser muy activo contra las seis líneas celulares de cáncer y demostró la mejor actividad antiinflamatoria de todos los compuestos evaluados.
- ▣ **7** demostró ser más activo que **8** en las pruebas de actividad biológica; la estereoquímica de estos isómeros podría estar influyendo en la diferencia de sus resultados antiinflamatorios *in vivo* y de capacidad de inhibición de células cancerosas *in vitro*.

- ▣ Se obtuvo el ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (**10**) a partir del tratamiento de una mezcla de **7** y **8** con ácido m-cloroperoxibenzoico; **10** es un derivado novedoso y éste es el primer informe de la obtención de **10** a partir de **7**.
- ▣ **10** presentó una excelente capacidad de inhibición de las líneas celulares de cáncer humano evaluadas y una buena actividad antiinflamatoria.

9. REFERENCIAS

- ▣ Abe I., Rohmer M., Prestwich GD. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*. 1993. 93: 2189-2206.
- ▣ Ahmed M. Salama, Gamboa S. y Buitrago G., Antinociceptive activity of triterpenes isolated from *Clusia ellipticifolia*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 2004. 33: 156-162.
- ▣ Alonso Jorge, Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos, Corpus, 2007.883.887.
- ▣ Bernal Vanaclocha, Cañigueral Salvador, Fitoterapia, Vademécum de Prescripción, Elsevier Masson, 2003. 431-432.
- ▣ Borowitz, I.J., Williams, G., Groos,L. and Rapjo, R. The synthesis of 6-ketononanolides, 6- and 7-ketrodecanolides, and 7- ketoundeconolide via Enamine Reaction. *Journal Org.Chem*. 1968. 33: 2013-2020.
- ▣ Borowitz, I., Gonis, G., Kelsey, R., Rapp, R. and Williams, G. The synthesis of 6-ketononanolides from Chromons. *Journal Org.Chem*. 1966. 31: 3027-3032.
- ▣ Cheung Susan y Tai Joseph, Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology Reports*. 2007. 17: 1525-1535.
- ▣ Cichewicz, R.H., Kouzi S. A., Chemistry, Biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Medicinal Research Reviews*. 2004. 24: 90-114

- ▣ Dixon RA., Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 2001. 41: 843-847.
- ▣ Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Report*. 2006. 23: 394-411.
- ▣ Fatma M. Abdel Bar, Mohammad A. K., Ahmed Y. E., Hui L., Ahmed M. Z., Farid A. B., Sylvester P. W., Kadria F. A. Raisch K. P. and Khalid A. El Sayed. Rational design and semisynthesis of betulinic acid analogues as potent topoisomerase inhibitors. *J. Nat. Prod.* 2009. 72: 1643-1650.
- ▣ Flores Rosete G., Martínez Vázquez M., Anti-inflammatory and cytotoxic cycloartanes from Guayule (*Parthenium argentatum*), *Natural Product Communications*, 2008, 3: 413-422.
- ▣ Friguetto N., Ogusuku F., Carvalho J., Kohn L., Atividade antiproliferativa dos extratos obtidos de *Eugenia brasiliensis*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis*. Abstract 12.081. FeSBE 2003- XVIII Reunión anual de la Feder. Soc. Biología Experimental. Brasil (2003).
- ▣ Giner-Larza E.M., Máñez S., Recio M.C., Giner R.M., Prieto J.M., Cerdá-Nicolás M., Ríos J.L., Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmacology*. 2001. 428: 137-143.
- ▣ Graham JG., Quinn ML., Fabricant DS., Farnsworth NR., Plants used against cancer- an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol.* 2000. 73: 347-377.

- ☐ Gurib-Fakim Ameenah, Medicinal plantas: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*. 2006. 27: 1-93.
- ☐ Huang M., Ho C., Wang Z. et al., Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res*. 1994. 54: 701-708.
- ☐ Huguet Ana-Isabel Recio M. C., Máñez S. , Giner R.M., Ríos J.L., Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology*, 2000. 410: 69-81.
- ☐ Jayaprakasha G.K., K.K.Mandadi, Shibu M.P., Y.Jadegoud, G.A. Nagana Gowda, B.S.Patil. Inhibition of colon cancer cell growth and antioxidant activity of bioactive compounds from *Panicum trifoliate* (L.) Raf. *Bioorganica and Medicinal Chemistry*. 2007. 15: 4923-4932.
- ☐ Kai Muffler, Leipold D., Scheller M-C., Haas C. et al., Biotransformation of triterpenes, *Process Biochemistry*, 2011. 46: 1-15.
- ☐ Kenneth M.T., Steiner S.A., Stanley P.L., Nettleton D.O., Franson R.C., Lewin A.H., Carroll F.I., Novel inhibitor of phospholipase A₂ with topical anti-inflammatory activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992, 189: 272-279.
- ☐ Lewis K.G., Tucker D.J. The separation of substituted Olean-12-en-28-oic acids from the corresponding Urs-12-28-oic acid isomers. *Aust.J.Chem*. 1983. 36:2297-2305
- ☐ Manoharan K. P., Song, K. P., Song F. J., Benny H. T.K. y Yang D., Triterpenoids from *Eugenia grandis*: structure elucidation by NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Chem*. 2007. 45: 279-281.

- ▣ Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balwill F., Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008. 454: 436-444.
- ▣ Máñez S., Recio M.C., Giner, R.M., Ríos J.L., Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation, *European Journal of pharmacology*. 1997. 334: 103-105.
- ▣ Martínez, V. M., Lastra A. L. Constituents and anti-inflammatory activity of *Sambucus Mexicana*. *Rev. Latinoamericana de Química*. 1997. 25/3: 126-127
- ▣ Masao M., Yamaoka K., Tanaka Y., Fukuda Y., Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice, *Bioch. Pharm.*, 2006, 71: 1331-1336.
- ▣ Newman DJ., Cragg GM., Snader KM., The influence of natural products upon drug discovery. *Natural products Reports*. 2000. 17: 215-234.
- ▣ NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- ▣ Offord E. et al., Mechanism involved in the chemoprotective effects of Rosemary extract studied in human liver and bronchial cells. *Cancer letters*. 1997. 114: 275-281.
- ▣ Papazisis K., Geromichalos G., Dimitriadis K., Kortsaris A.H., Optimization of the sulphorhodamine B colorimetric assay, *J. Imm. Methods*, 1997. 208: 151-158.
- ▣ Patocka Jiri, Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Medicine*. 2003. 1: 7-13.


- ▣ Perumal, Y. and Dharmarajan S., Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*. 2005. 12: 657-666.
- ▣ Prado Ramírez, Aurea Carolina. (2010). Obtención de derivados por transformaciones químicas de triterpenos citotóxicos y antiinflamatorios (Tesis de licenciatura-Universidad Nacional Autónoma de México) (consulta junio de 2011)
- ▣ Ramirez Apan, A.L. Pérez-Castorena and A.R. de Vivar, Anti-inflammatory constituents of *Mortonia greggii* Gray, *Z. für Naturforsch. (C)*.2004. 41: 237–243.
- ▣ Reddy L., Odhav B., Bhoola K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology and therapeutics*.2003. 99: 1-13.
- ▣ Rodríguez-Vita, Lawrence T., The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2010. 21: 61-65.
- ▣ Ringbom T., Segura, L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L., Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*1998. 61: 1212-1215.
- ▣ Rosellón Dueñas, Antonio. (2005). Nuevas estrategias sintéticas hacia triterpenos irregulares y cromano derivados (Tesis doctoral-Universidad de Granada, Facultad de Ciencias) (consulta agosto de 2011)
- ▣ Saleem M., F. Afaq, V.M. Adhami and H. Mukhtar, Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice, *Oncogene* 2004. 23: 5203–5214.

- ▣ Saleem M., Alam, S. Arifin, M.S. Shah, B. Ahmed and S. Sultana, Lupeol, a triterpene inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin, *Pharmacol. Res.* 2001. 43. 127-134.
- ▣ Samuelsson G., *Drugs of natural origin: A text book of pharmacognosy*, 5a edición, Swedish Pharmaceutical Press, Stockhol, 2004.
- ▣ Sami Alakurtti, Tuomo Heiska, Alexandros Kiriazis, Nina Sacerdoti-Sierra c, Charles L. Jaffe c, Jari Yli-Kauhaluoma, Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010. 18: 1573-1582.
- ▣ Schlaepfer Loraine, Mendoza-Espinoza J. A., Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer: Relevancia en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea] 2010, vol. 41 [citado 2011-08-27]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57916060003> . ISSN 1870-0195.
- ▣ Sergei I. Grivennikov, Karin M., Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics and Development.* 2010. 20: 65-71.
- ▣ Singh, F., Milagre, H., Eberlin, M. and Stefani, H. Synthesis of benzophenones from germinal biaryl ethenes using m-chloroperbenzoic acid. *Tetrahedron letters.* 2009. 50: 2312-2316.
- ▣ Skehan, P., Storeng, R., Scudeiri, 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.

- ▣ Sunitha M. Nagaraj and P. Varalakshmi, Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats, *Fitoterapia*, 2001, 7: 516–523.
- ▣ Sultana, M. Saleem, S. Sharma and N. Khan, Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin, *Ind J. Exp Biol*. 2003, 41: 827–831.

- ▣ Vega Ávila Elisa, Velasco-Lezama R., Jiménez-Estrada M., Las plantas como fuentes de compuestos antineoplásicos. *Bioquimia*. 2006. 31: 91-111.
- ▣ Vichai V., Kirtikara K., Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. protocols*, 2006, 1112-116.
- ▣ Wang, B.H., Polya, G.M., 1996. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphipilic triterpenoids and related compounds. *Phytochemistry*. 1996. 41: 55-63.
- ▣ Woolf Thomas F., Handbook of Drug Metabolism, *Marcel Dekker Inc.*, Nueva York, 1999, 443-451.
- ▣ You, N.H. Nam, Y. Kim, K.H. Bae and B.Z. Ahn, Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*, *Phytother. Res*. 2003, 17: 341–344.

 Páginas electrónicas:

1. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Rosmarinus%20officinalis&id=7455> fecha de consulta 1 de agosto de 2011.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html> fecha de consulta 29 de octubre de 2011.

ANEXOS

1. Perfil cromatográfico de ES-ROM.

Compound Mass Spectrum List Report

Analysis Info

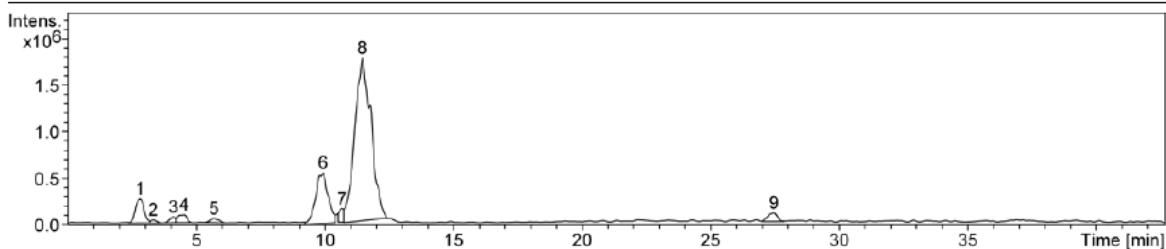
Analysis Name D:\Data\mvm\mvm00467.d
 Method DEF_MS.M
 Sample Name ES-ROM
 Comment 110322-mvm-01

Acquisition Date 04/05/2011 04:37:46 p.m.

Operator Carmen Marquez
 Instrument esquire6000

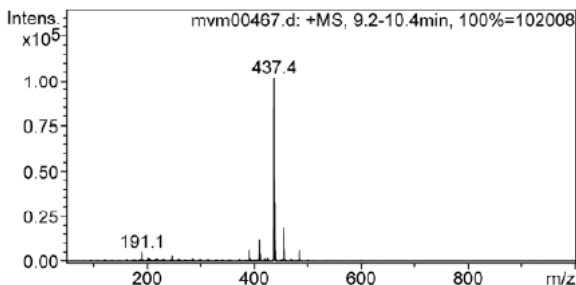
Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------------|------------|--------------|-----------|--------------------------|----------|
| Ion Source Type | APCI | Ion Polarity | Positive | Alternating Ion Polarity | off |
| Mass Range Mode | Std/Normal | Scan Begin | 50 m/z | Scan End | 1000 m/z |
| Capillary Exit | 118.9 Volt | Skim 1 | 40.0 Volt | Trap Drive | 59.2 |
| Accumulation Time | 105798 µs | Averages | 6 Spectra | Auto MS/MS | off |

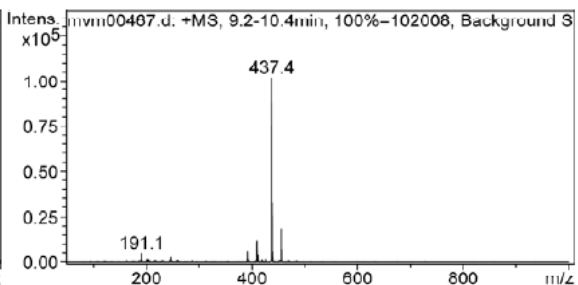


| # | RT [min] | Area | Area Frac % |
|---|----------|----------|-------------|
| 1 | 2.8 | 5903042 | 5.3 |
| 2 | 3.3 | 532230 | 0.5 |
| 3 | 4.1 | 935392 | 0.8 |
| 4 | 4.5 | 2072854 | 1.9 |
| 5 | 5.7 | 1029359 | 0.9 |
| 6 | 9.9 | 18401821 | 16.7 |
| 7 | 10.7 | 1701766 | 1.5 |
| 8 | 11.5 | 77566372 | 70.2 |
| 9 | 27.5 | 2335642 | 2.1 |

Cmpd 6, 9.9 min

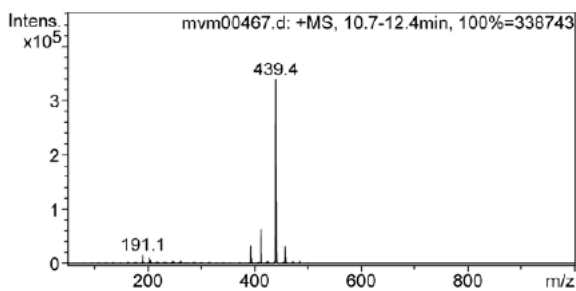


| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 191.1 | 5248 |
| 2 | 391.4 | 6068 |
| 3 | 409.4 | 11745 |
| 4 | 411.4 | 4234 |
| 5 | 437.4 | 102008 |
| 6 | 438.4 | 32379 |
| 7 | 439.4 | 5873 |
| 8 | 455.4 | 18537 |
| 9 | 456.4 | 6768 |
| 10 | 484.2 | 5948 |

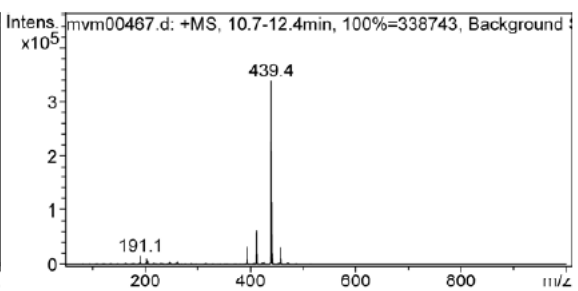


| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 191.1 | 4969 |
| 2 | 391.4 | 5801 |
| 3 | 409.4 | 11658 |
| 4 | 410.4 | 2906 |
| 5 | 411.4 | 4041 |
| 6 | 437.4 | 101893 |
| 7 | 438.4 | 32342 |
| 8 | 439.4 | 5686 |
| 9 | 455.4 | 18433 |
| 10 | 456.4 | 6737 |

Cmpd 8, 11.5 min



| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 191.1 | 16206 |
| 2 | 203.1 | 10373 |
| 3 | 393.4 | 32656 |
| 4 | 411.4 | 63411 |
| 5 | 412.4 | 18712 |
| 6 | 439.4 | 338743 |
| 7 | 440.4 | 113228 |
| 8 | 441.4 | 19543 |
| 9 | 457.4 | 30977 |
| 10 | 458.4 | 10275 |



| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 191.1 | 15927 |
| 2 | 203.1 | 10110 |
| 3 | 393.4 | 32590 |
| 4 | 411.4 | 63217 |
| 5 | 412.4 | 18627 |
| 6 | 439.4 | 338556 |
| 7 | 440.4 | 113176 |
| 8 | 441.4 | 19398 |
| 9 | 457.4 | 30882 |
| 10 | 458.4 | 10235 |

2. Perfil cromatográfico de ES-ROMAc.

Compound Mass Spectrum List Report

Analysis Info

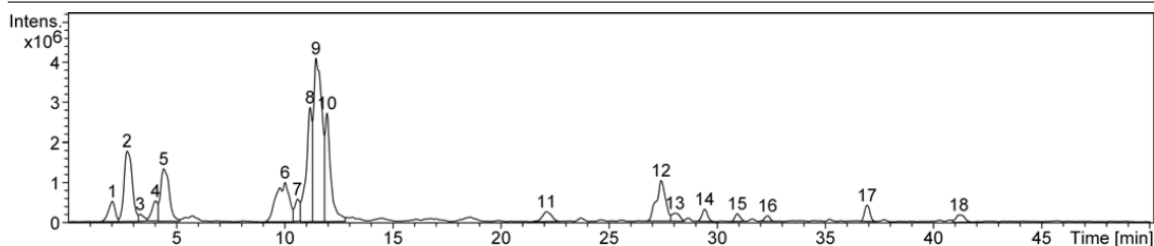
Analysis Name D:\Data\mvm\mvm00468.d
 Method DEF_MS.M
 Sample Name ES-ROMAc
 Comment 110322-mvm-02

Acquisition Date 04/05/2011 05:32:31 p.m.

Operator Carmen Marquez
 Instrument esquire6000

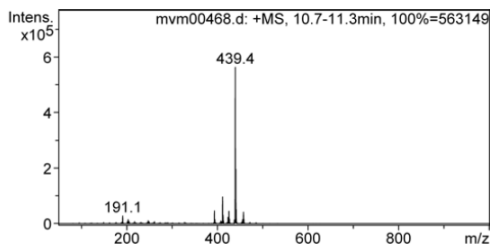
Acquisition Parameter

Ion Source Type APCI Ion Polarity Positive Alternating Ion Polarity off
 Mass Range Mode Std/Normal Scan Begin 50 m/z Scan End 1000 m/z
 Capillary Exit 118.9 Volt Skim 1 40.0 Volt Trap Drive 59.2
 Accumulation Time 84912 µs Averages 6 Spectra Auto MS/MS off



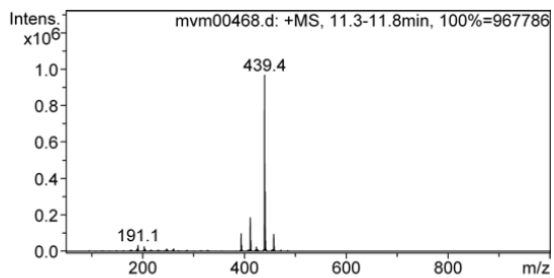
| # | RT [min] | Area | Area Frac % |
|----|----------|-----------|-------------|
| 1 | 2.0 | 10868221 | 2.5 |
| 2 | 2.7 | 46978953 | 10.8 |
| 3 | 3.3 | 2905718 | 0.7 |
| 4 | 4.0 | 9300413 | 2.1 |
| 5 | 4.4 | 36672246 | 8.4 |
| 6 | 10.0 | 41262133 | 9.5 |
| 7 | 10.6 | 9179427 | 2.1 |
| 8 | 11.2 | 53817060 | 12.4 |
| 9 | 11.4 | 107796001 | 24.8 |
| 10 | 12.0 | 50602766 | 11.6 |
| 11 | 22.1 | 7326673 | 1.7 |
| 12 | 27.4 | 29934000 | 6.9 |
| 13 | 28.0 | 5104081 | 1.2 |
| 14 | 29.4 | 5320217 | 1.2 |
| 15 | 30.9 | 3169117 | 0.7 |
| 16 | 32.3 | 2306104 | 0.5 |
| 17 | 36.9 | 6946627 | 1.6 |
| 18 | 41.2 | 5105783 | 1.2 |

Cmpd 8, 11.2 min



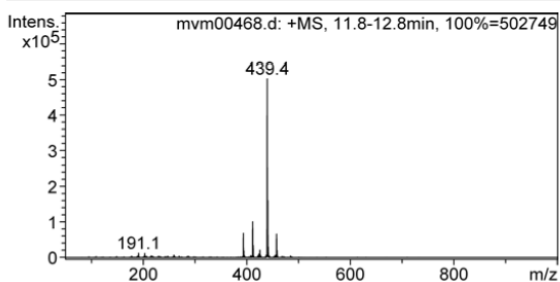
| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 191.1 | 28028 |
| 2 | 393.4 | 46145 |
| 3 | 411.4 | 96523 |
| 4 | 412.4 | 30476 |
| 5 | 423.4 | 23122 |
| 6 | 425.4 | 45247 |
| 7 | 439.4 | 563149 |
| 8 | 440.4 | 195950 |
| 9 | 441.4 | 50833 |
| 10 | 457.4 | 41777 |

Cmpd 9, 11.4 min



| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 191.1 | 32922 |
| 2 | 203.1 | 25925 |
| 3 | 393.4 | 97149 |
| 4 | 394.4 | 31003 |
| 5 | 411.4 | 185137 |
| 6 | 412.4 | 59310 |
| 7 | 439.4 | 967786 |
| 8 | 440.4 | 325986 |
| 9 | 441.4 | 58479 |
| 10 | 457.4 | 93823 |

Cmpd 10, 12.0 min



| # | m/z | I |
|----|-------|--------|
| 1 | 393.4 | 68632 |
| 2 | 394.4 | 18337 |
| 3 | 411.4 | 101320 |
| 4 | 412.4 | 34019 |
| 5 | 425.4 | 20941 |
| 6 | 439.4 | 502749 |
| 7 | 440.4 | 160344 |
| 8 | 441.4 | 30023 |
| 9 | 457.4 | 66313 |
| 10 | 458.4 | 19792 |

4. Resultados de CG-EM de la Fr 28-30.

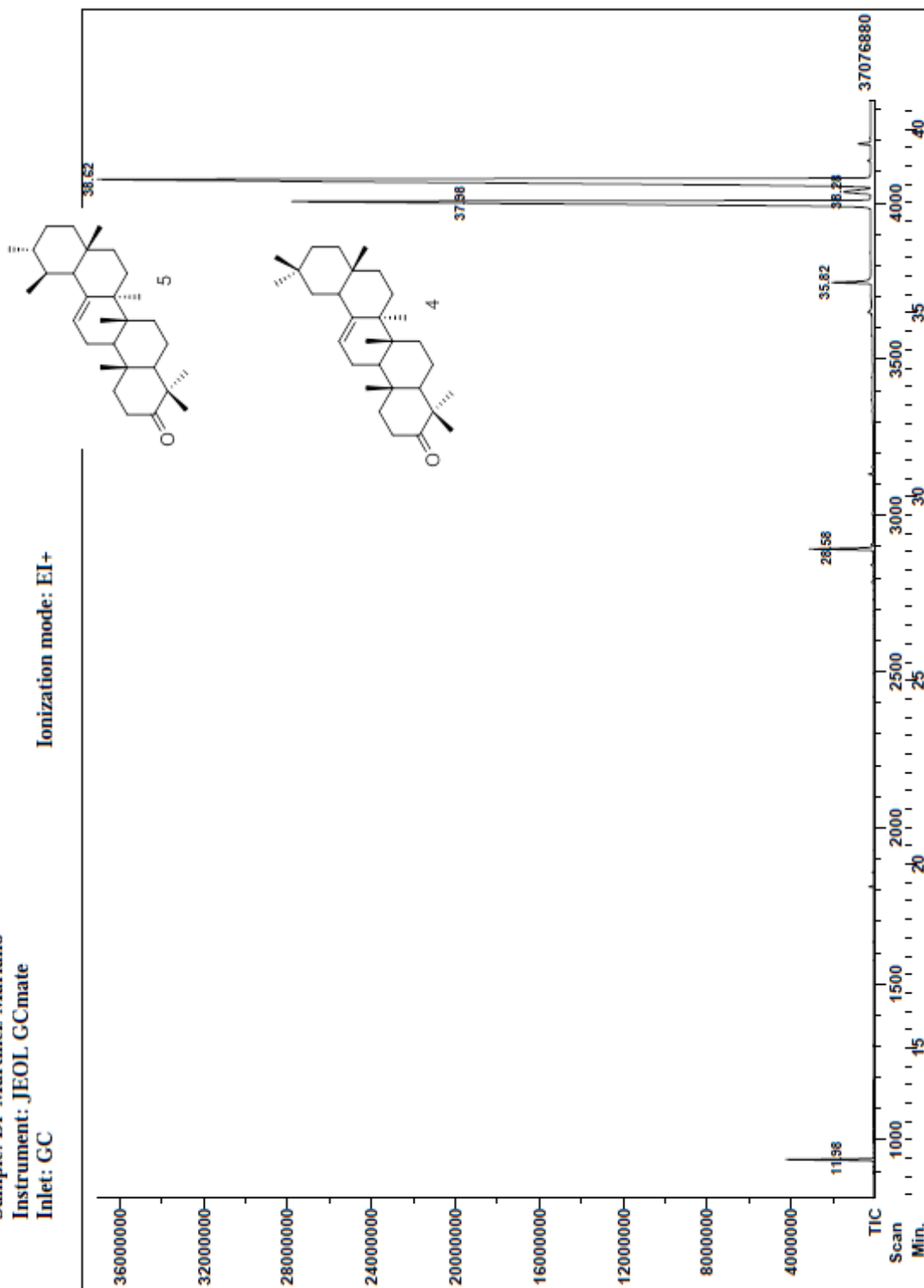
- Identificación de la β -amirona (4) y la α -amirona (5)

Instituto de Química (UNAM)

File: 261-Fr 28-30-1 Date Run: 02-11-2011 (Time Run: 09:59:03)

Sample: Dr-Martinez-Mariano
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Ionization mode: EI+



5. Perfil cromatográfico de Fr 122-200.

Compound Mass Spectrum Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\mvm\mvm00477.d

Acquisition Date 30/05/2011 12:01:08 p.m.

Sample Name Fr 122-200

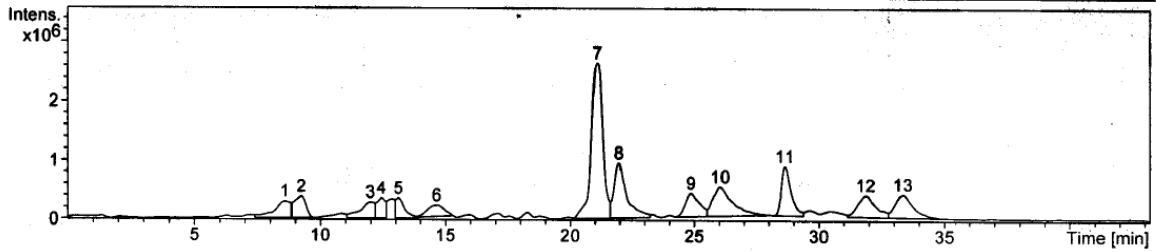
Operator Carmen Marquez

Comment 110526-ext-02

Instrument esquire6000

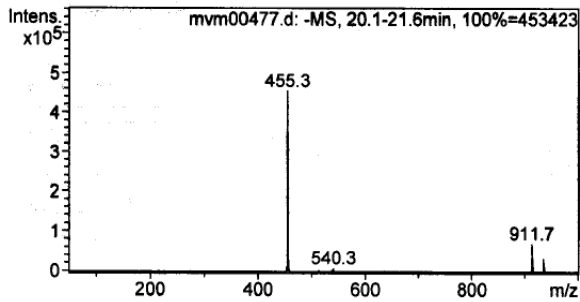
Acquisition Parameter

| | | | | | |
|-------------------|-------------|--------------|------------|--------------------------|----------|
| Ion Source Type | ESI | Ion Polarity | Negative | Alternating Ion Polarity | off |
| Mass Range Mode | Std/Normal | Scan Begin | 50 m/z | Scan End | 1000 m/z |
| Capillary Exit | -121.8 Volt | Skim 1 | -40.0 Volt | Trap Drive | 54.1 |
| Accumulation Time | 41406 µs | Averages | 10 Spectra | Auto MS/MS | off |

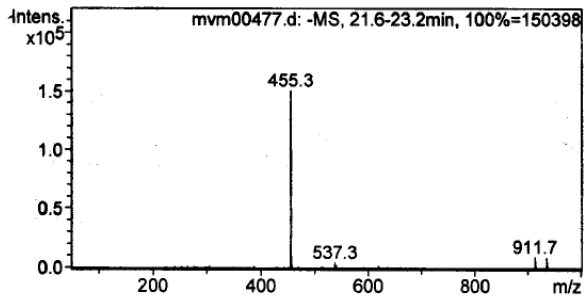


| # | RT [min] | Area | Area Frac % |
|----|----------|----------|-------------|
| 1 | 8.6 | 12918158 | 4.5 |
| 2 | 9.2 | 12152330 | 4.3 |
| 3 | 12.0 | 10949888 | 3.8 |
| 4 | 12.5 | 8572742 | 3.0 |
| 5 | 13.1 | 9102282 | 3.2 |
| 6 | 14.7 | 9379472 | 3.3 |
| 7 | 21.1 | 84247859 | 29.5 |
| 8 | 21.9 | 33081929 | 11.6 |
| 9 | 24.8 | 15943747 | 5.6 |
| 10 | 26.0 | 27475191 | 9.6 |
| 11 | 28.6 | 22948453 | 8.0 |
| 12 | 31.9 | 18754556 | 6.6 |
| 13 | 33.3 | 19914057 | 7.0 |

Cmpd 7, 21.1 min



Cmpd 8, 21.9 min



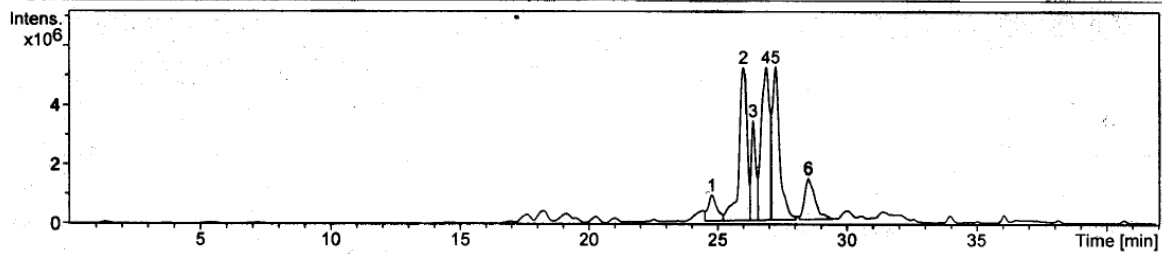
6. Perfil cromatográfico de Fr 17-23.

- **Identificación de los ácidos betulínico (7), 3β-acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y 3β-acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico(9).**

Compound Mass Spectrum Report

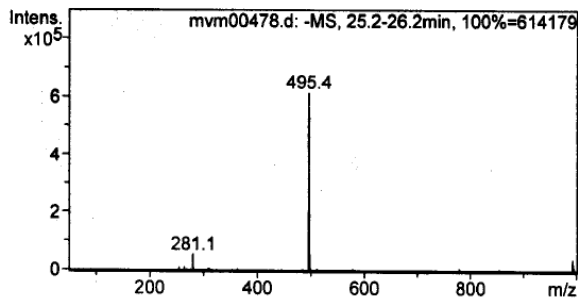
Analysis Info Acquisition Date 30/05/2011 01:07:27 p.m.
 Analysis Name D:\Data\mvm\mvm00478.d
 Sample Name Fr 17-23 Operator Carmen Marquez
 Comment 110526-ext-01 Instrument esquire6000

Acquisition Parameter *Sum 11*
 Ion Source Type ESI Ion Polarity Negative Alternating Ion Polarity off
 Mass Range Mode Std/Normal Scan Begin 50 m/z Scan End 1000 m/z
 Capillary Exit -121.8 Volt Skim 1 -40.0 Volt Trap Drive 54.1
 Accumulation Time 52797 μs Averages 10 Spectra Auto MS/MS off

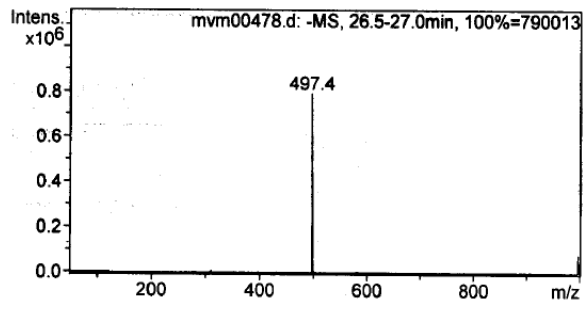


| # | RT [min] | Area | Area Frac % |
|---|----------|-----------|-------------|
| 1 | 24.8 | 21148264 | 4.9 |
| 2 | 26.0 | 111094760 | 25.5 |
| 3 | 26.4 | 42096470 | 9.7 |
| 4 | 26.9 | 115585420 | 26.6 |
| 5 | 27.2 | 104818497 | 24.1 |
| 6 | 28.5 | 40107244 | 9.2 |

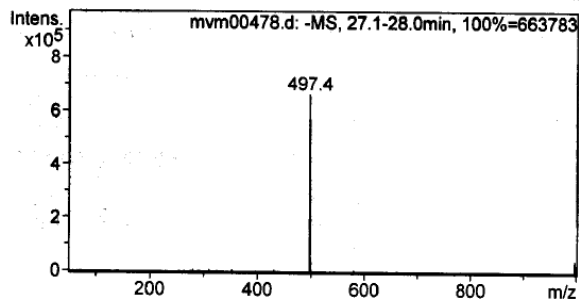
Cmpd 2, 26.0 min



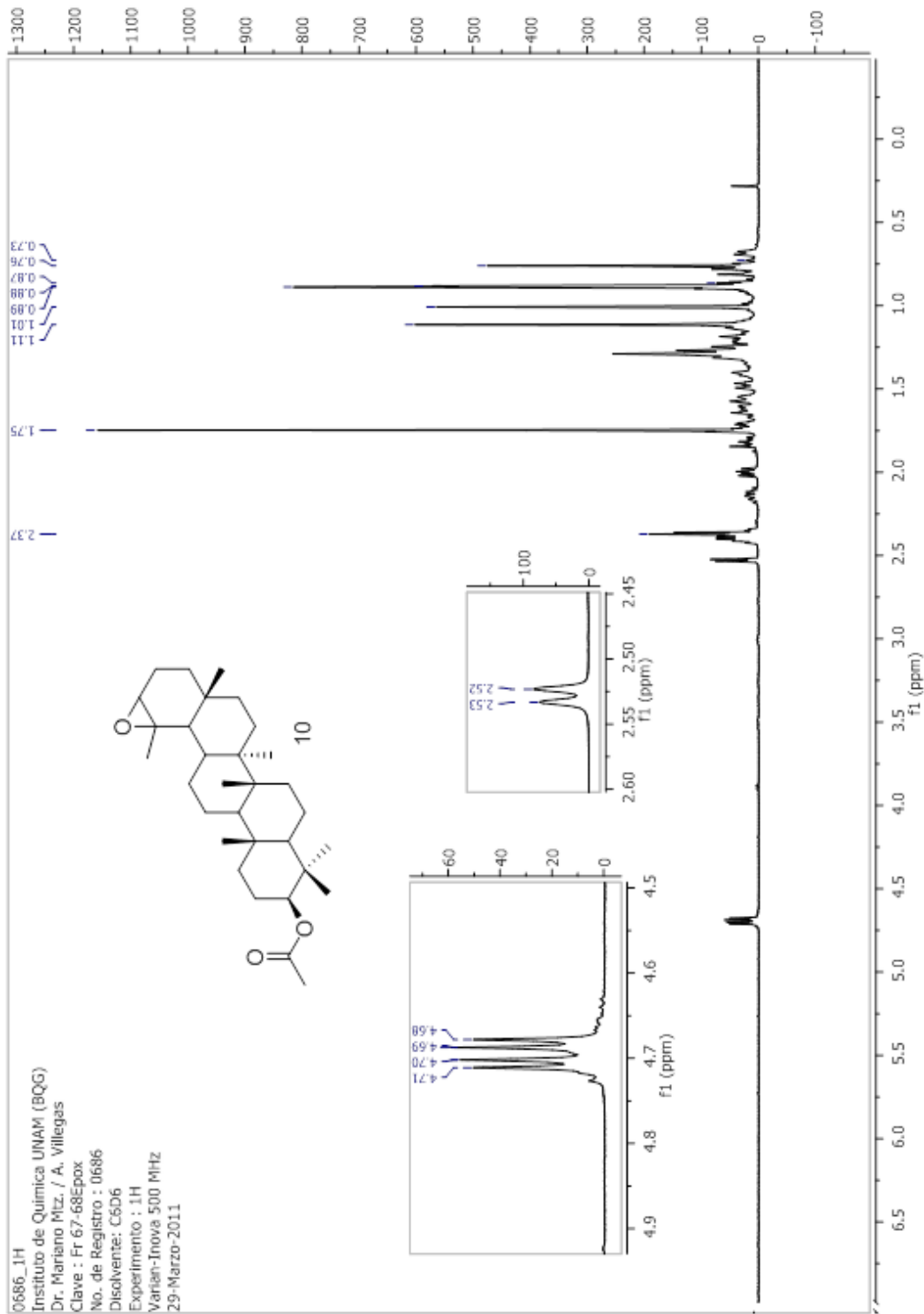
Cmpd 4, 26.9 min

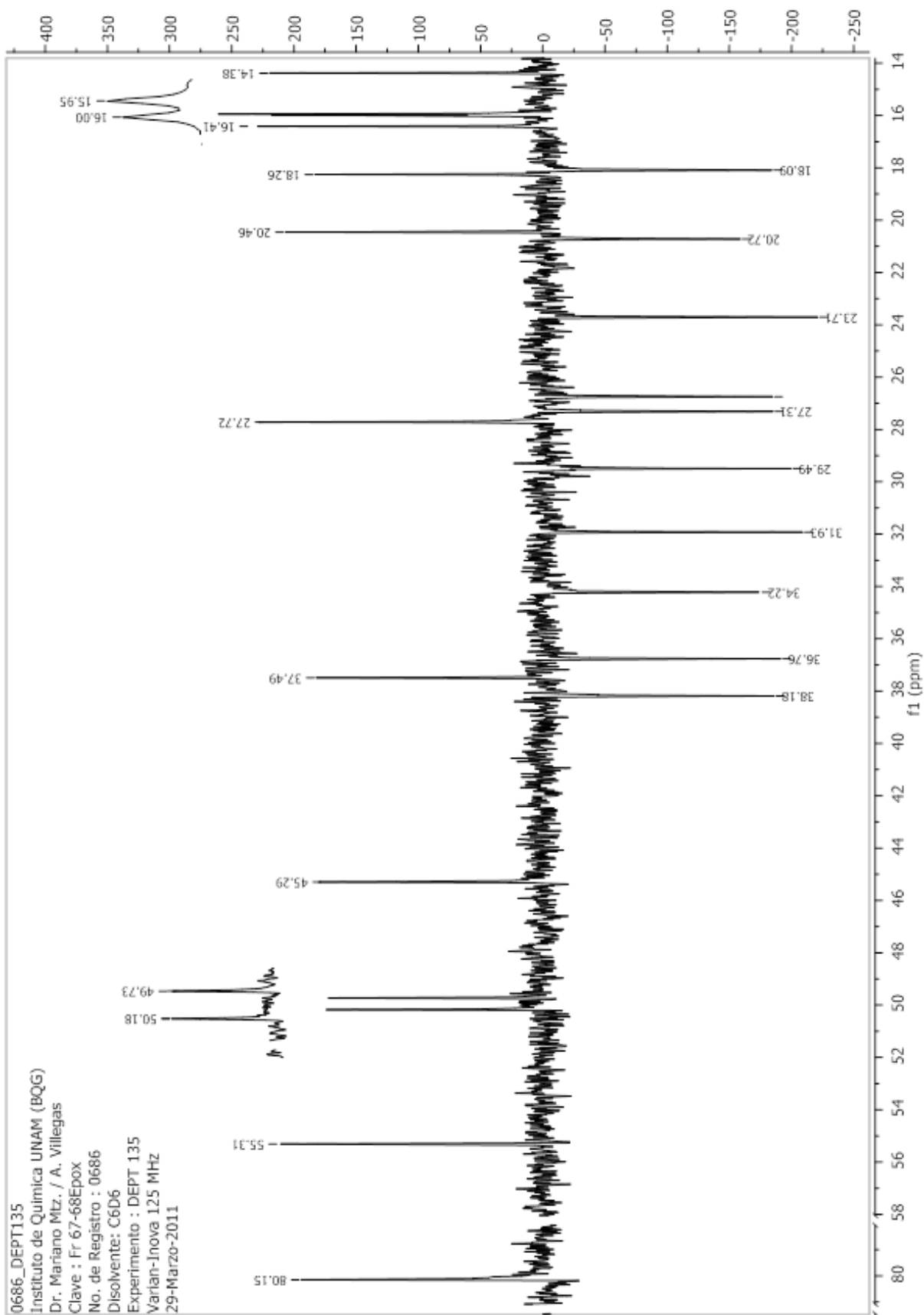


Cmpd 5, 27.2 min

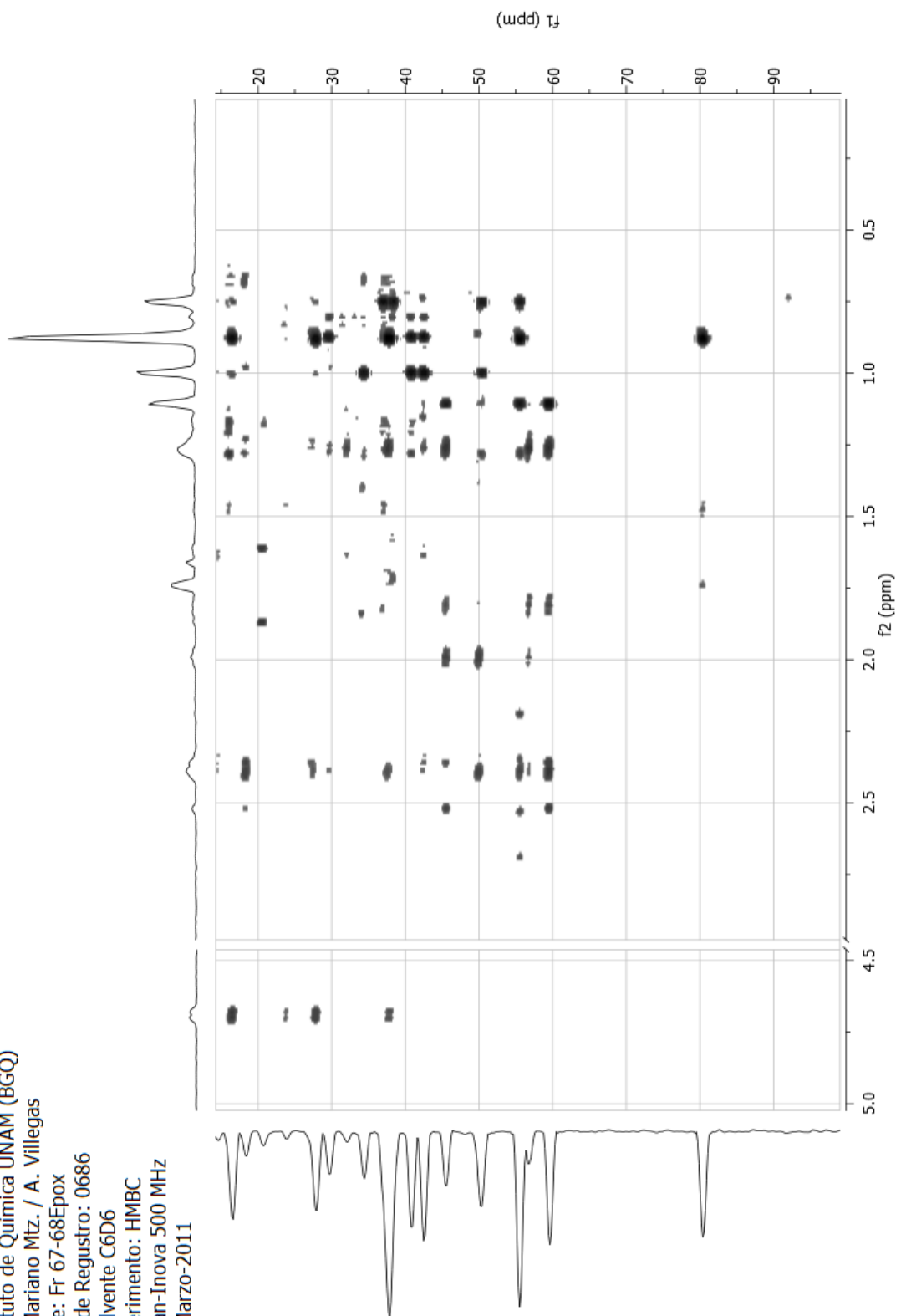


7. Espectroscopía del ácido 3 β -acetiloxi-12,13-dihidro-19,20 epoxi-30-nor-ursólico (10).





0686_HMBC
 Instituto de Química UNAM (BGQ)
 Dr. Mariano Mtz. / A. Villegas
 Clave: Fr 67-68Epoxy
 No. de Registro: 0686
 Disolvente C6D6
 Experimento: HMBC
 Varian-Inova 500 MHz
 30-Marzo-2011



8. Espectroscopía de la mezcla del acetato del ácido betulínico (7), el 3 β -acetiloxi-lup-12,13-en-28-oico (8) y el 3 β -acetiloxi-lup-12(13),20(29)-dien-28-oico (9).

