



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE NUEVOS 16-HALODERIVADOS DE LA
PREGNENOLONA CON POTENCIAL ACTIVIDAD
BIOLÓGICA”**

TESIS

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

PRESENTA

MARÍA EUGENIA MENDOZA JASSO



MÉXICO D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UNAM y a la Facultad de Química por permitirme formar parte de tan gran comunidad.

A la Dra. Elena G. Ramírez López por brindarme la oportunidad de desarrollarme académicamente, por creer y confiar en mí, por las críticas realizadas para la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Eugene A. Bratoeff T. por su apoyo como supervisor técnico para la realización y conclusión de este trabajo.

Al programa PAPIME-PE 200711 por el financiamiento otorgado para la realización de la presente tesis.

Al jurado asignado para la evaluación de este trabajo. Gracias por las críticas realizadas al mismo.

Al Q.F.B. Francisco Cortés Benítez, por el apoyo ofrecido y por el aporte de conocimientos brindados para la realización y conclusión de esta tesis.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho por la realización de las pruebas biológicas.

A la Q. Marisela Gutiérrez. Q. Georgina Duarte Lisci y a la M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, por su colaboración en la realización de los espectros de IR, EM y RMN, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Antonio y Rosario, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, por ser mi pilar y sostenerme día a día. Este proyecto va dedicado a ustedes, porque gracias a ustedes, a su compañía, a su confianza, a su apoyo y a su amor esto ha sido posible. Gracias por brindarme la mejor de las oportunidades y hacerme la mejor de las herencias, el estudio. Los amo.

A mis hermanos, Ceci, Charly, Lulú, Oscar y César, por el apoyo brindado a lo largo de este proyecto. Los quiero. Y también al pequeño Alexis, por todas sus ocurrencias que me hicieron reír mientras escribía esta tesis. Te quiero mi niño.

A Nancy, Fonsy y Adri, porque a pesar de que nuestros caminos se separaron siempre ha habido un apoyo de su parte. Gracias por todos los consejos y las experiencias compartidas. Las quiero niñas.

Gracias a Gladys porque cuando inició esta nueva etapa me brindaste un gran apoyo y no dejaste que me rindiera, porque fuiste parte importante para que yo siguiera adelante. Gracias por todos los buenos y malos momentos a lo largo de la carrera, por aguantarme en los peores momentos, por tus palabras de aliento y por permitir que esta carrera fuera mucho más amena a tu lado con tus loqueras y consejos. Te quiero mucho nena.

Gracias a Juan Alberto por siempre estar a mi lado apoyándome, por tu amistad. Te quiero mucho amiguito.

Agradezco a la Dra. Elenita, por todo el apoyo brindado desde mi llegada al laboratorio y hasta la fecha, porque más que mi tutora se

convirtió en mi amiga. Gracias por todos los consejos brindados, por todas las pláticas tan amenas, por todos los momentos agradables durante mi estancia. La quiero Doctora.

A todos los amigos y compañeros del 125, por hacer muy amena mi estancia en este laboratorio, por permitirme formar parte de este grandioso grupo, por todos los momentos compartidos, por ser tan buen equipo. Los estimo demasiado.

A la gente agradable con la que me fui topando a lo largo de la carrera, Farid, José Luis, Chio, Yaz, Osky, porque a su lado las clases fueron mucho más agradables.

A Paco, por todo el apoyo brindado no sólo en este proyecto sino también en la carrera. Porque este proyecto es tuyo y mío, sin tu apoyo académico, moral y emocional esto no hubiera sido tan fácil. Gracias por las críticas constructivas para esta tesis, para el trabajo experimental, así como por los conocimientos aportados. Gracias por ser un apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado y por creer en mí. Te amo.

“El éxito no es algo que encontramos. Es algo que atraemos como consecuencia de la persona en la que nos convertimos”

Jim Rhon

“El éxito no debe medirse por la posición a que una persona ha llegado sino por su esfuerzos por triunfar”

Booker T. Washington



Índice

Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	3
2.1 Esteroides y hormonas esteroidales.....	3
2.1.1. Efectos fisiológicos de los esteroides.....	3
2.1.2. Uso de los esteroides.....	5
2.2 Cáncer.....	5
2.2.1. Cáncer e inflamación.....	9
2.2.2. Agentes quimiopreventivos del cáncer.....	11
2.2.2.1. Antiestrógenos y antiandrógenos.....	11
2.2.2.2. Agentes antiinflamatorios.....	12
2.2.2.3. Agentes antioxidantes.....	12
2.3. Derivados fenólicos con actividad antioxidante y antiinflamatoria.....	13
2.4. Isosterismo y bioisosterismo.....	14
2.5. Importancia de los ésteres y halógenos en la relación estructura-actividad biológica.....	15
2.5. Síntesis química asistida por microondas.....	18
Capítulo 3. Planteamiento del problema.....	23



Capítulo 4. Hipótesis.....	25
Capítulo 5. Objetivos.....	26
Capítulo 6. Resultados y discusión.....	28
6.1 Parte química.....	28
6.1.1. Síntesis general para la obtención de ésteres de derivados del ácido cinámico (3a-3d).....	30
6.1.2. Síntesis general para la obtención de derivados 16 β -halo-3 β - (cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (serie 4a-4c y 5a-5c).....	38
6.2 Parte Biológica.....	49
Capitulo 7. Procedimiento experimental.....	55
7.1 Reactivos y equipo.....	55
7.1.2 Cromatografía.....	55
7.2 Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.....	56
7.3 Ensayo de viabilidad de macrófago.....	57
7.3.1. Aislamiento del cultivo primario de macrófagos murinos.....	57
7.3.2. Viabilidad del macrófago.....	58
7.4 Actividad antiinflamatoria.....	58
7.5 Descripción de la ruta de síntesis.....	60
7.5.1. Método para la obtención de 3 β -hidroxi-16 α ,17 α -epoxi -5-pregnen-20-ona (2).....	61



7.5.2. Método general para la obtención de derivados	
3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3a-3d).....	62
7.5.3. Método general para la obtención de derivados	
16 β -Cl-3 β -(cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (4a-4c).....	65
7.5.4 Método general para la obtención de derivados	
16 β -Br-3 β -(cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (5a-5c).....	69
7.5.5 Método general para la obtención de derivados 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α , 17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona empleando microondas (3a-3c).....	72
7.5.6. Método para la obtención de 16 β -Cloro-3 β -(4-cloro-cinamoil-oxi)- 17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (4c) empleando microondas.....	73
Capítulo 8. Conclusiones.....	75
Capítulo 9. Bibliografía.....	76
Anexo I. Espectros.....	78

1. Introducción



Los esteroides son lípidos derivados del colesterol que contienen la estructura base del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno. Están ampliamente distribuidos en los organismos eucariontes, tanto en el reino animal como en el vegetal. Las características funcionales de las moléculas esteroidales están determinadas por la conformación de sus cuatro anillos (A, B, C, D) y la posición relativa de los grupos funcionales en el espacio.^{1,2.}

Dentro de los esteroides se encuentran las hormonas esteroidales, moléculas sintetizadas en el organismo a partir del colesterol, las cuales se clasifican de acuerdo a su función biológica en: *glucocorticoides*, esenciales para la adaptación al estrés; *mineralocorticoides*, que regulan el equilibrio normal de Na⁺ y K⁺ en el organismo; *progestinas*, cuya función principal es el mantenimiento del embarazo y *hormonas sexuales*, estrógenos y andrógenos que definen las características sexuales secundarias femeninas y masculinas, respectivamente.¹

En el campo de la medicina, los esteroides juegan un papel importante como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer así como agentes antiinflamatorios.⁵

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. Este flagelo es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis).^{6,7}

El uso del microondas en síntesis orgánica ha introducido un enfoque completamente nuevo para la obtención de fármacos. El sistema de microondas

1. Introducción



ofrece la oportunidad de completar reacciones en minutos, ofreciendo la opción de regresar a métodos más secuenciales. Esta ventaja permite al químico analizar la reacción antes de continuar con el siguiente paso.²⁵

Frente al desafío ecológico y económico creciente, existe la urgente necesidad de desarrollar un método sencillo, económico y ecológico para la síntesis de compuestos orgánicos.²⁶

En el presente trabajo se reportan la obtención y la evaluación biológica (antiinflamatoria y citotóxica) de nuevos 16-haloderivados de la pregnenolona, los cuales se caracterizan por la incorporación de derivados del ácido cinámico en la posición 3 del núcleo esteroide.



2.1 Esteroides y hormonas esteroidales

Los esteroides son lípidos derivados del colesterol que contienen la estructura base del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (Figura 2.1), están ampliamente distribuidos en los organismos eucariontes, tanto en el reino animal como en el vegetal. Las características funcionales de las moléculas esteroidales están determinadas por la conformación de sus cuatro anillos (A, B, C, D) y la posición relativa de los grupos funcionales en el espacio.^{1,2}

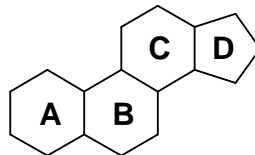


Figura 2.1. Núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno.

2.1.1. Efectos fisiológicos de los esteroides

Dentro de los esteroides se encuentran las hormonas esteroidales, moléculas sintetizadas en el organismo a partir del colesterol, las cuales se clasifican de acuerdo a su función biológica en: *glucocorticoides*, esenciales para la adaptación al estrés; *mineralocorticoides*, que regulan el equilibrio normal de Na^+ y K^+ en el organismo; *progestinas*, cuya función principal es el mantenimiento del embarazo y *hormonas sexuales*, estrógenos y andrógenos que definen las características sexuales secundarias femeninas y masculinas, respectivamente (Figura 2.2).¹ Los efectos fisiológicos varían de un compuesto a otro, su función va desde vitaminas hasta hormonas sexuales. En la Tabla 2.1 se presentan algunos ejemplos.

2. Antecedentes

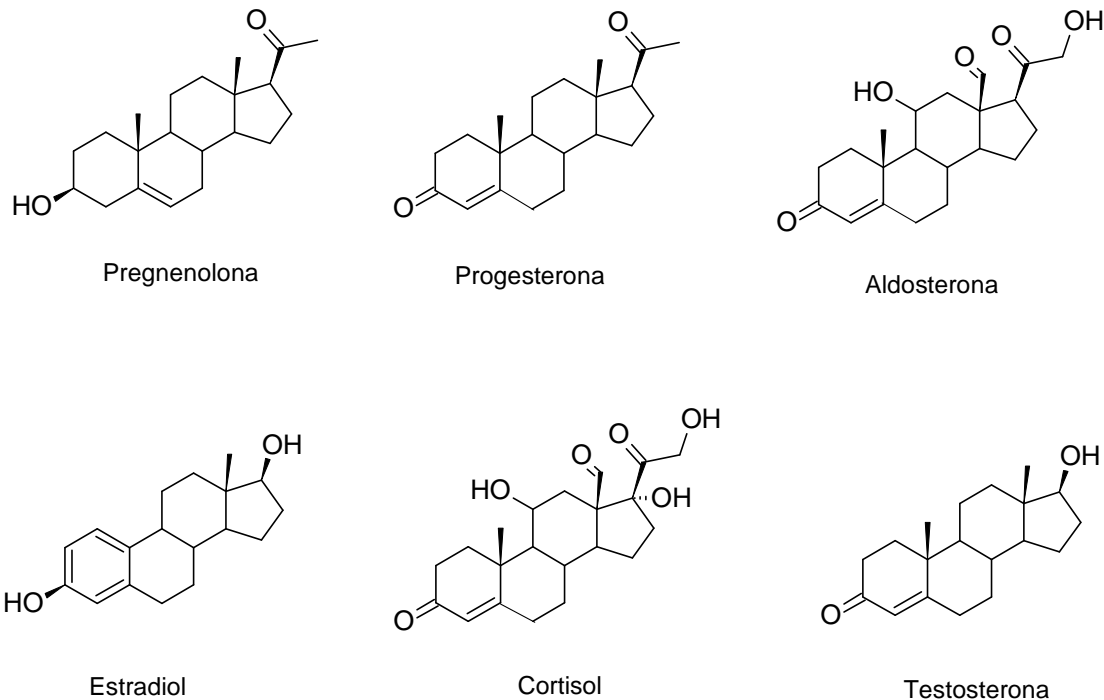


Figura 2.2. Ejemplos de hormonas esteroidales sintetizadas a partir del colesterol.

Tabla 2.1. Efectos fisiológicos de los esteroides.

Esteroides	Efecto fisiológico ^{3,4.}
Pregnenolona	Producida directamente del colesterol. Es la molécula precursora todas las hormonas esteroidales.
Progesterona	Progestina producida directamente de la pregnenolona y secretada por el <i>corpo lúteo</i> , responsable de los cambios asociados con la fase lútea del ciclo menstrual, factor de diferenciación para las glándulas mamarias. Mantenimiento del embarazo.
Aldosterona	Principal mineralocorticoide. Hormona secretada por la glándula adrenal. Se encarga de mantener el balance electrolítico del organismo.

2. Antecedentes



Testosterona	Andrógeno. Hormona sexual masculina responsable de los caracteres sexuales secundarios masculinos.
Estradiol	Principal hormona femenina encargada de las características sexuales secundarias femeninas.
Cortisol	Glucocorticoide más abundante en los humanos. Involucrado en la adaptación al estrés y en procesos inflamatorios.

2.1.2. Uso de los esteroides

En el campo de la medicina, los esteroides juegan un papel importante como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer así como agentes antiinflamatorios. Por ejemplo el empleo de metilttestosterona (andrógeno) para el tratamiento de cáncer de mama, finasterida (antiandrógeno) para cáncer de próstata y tamoxifen (antiestrógeno) para cáncer de mama. Como agentes antiinflamatorios se puede mencionar la prednisona, que también es empleada como agente quimioterapéutico, dexametasona y betametasona, entre otros.⁵

2.2 Cáncer

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. Este flagelo es resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos) que produce la degeneración de las células, con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse a otros órganos (metástasis). Los tumores malignos representan aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de bajos y medios ingresos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2030, si no se adoptan medidas preventivas, se pronosticarán 26 millones de nuevos casos de cáncer, de los cuales 17 millones podrían ser mortales.^{6,7}

2. Antecedentes



En México, la Secretaría de Salud reporta que cada hora mueren seis personas por culpa de este mal; y en esos mismos sesenta minutos otras 11 más reciben la noticia de que padecen este mal. Cada año se diagnostican en el país 120 mil nuevos casos, de los cuales 75 mil fallecen debido a una detección tardía. Las cifras convierten a este padecimiento en una de las principales causas de muerte en la población mexicana. Por género, las estadísticas arrojan que hasta ahora hay una mayor incidencia entre las mujeres, quienes representan el 55% de los pacientes; los tipos de cáncer más comunes en este grupo de pacientes son cáncer de mama y cérvico-uterino, con 16,000 y 12,000 diagnósticos nuevos cada año, respectivamente. El 45% restante corresponde a pacientes varones; los tipos de cáncer que más afectan a este grupo son cáncer de próstata, testicular y de colon. El cáncer de pulmón es el más extendido entre ambos sexos.^{6, 7}

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por la pérdida de control en el crecimiento, división y proliferación de un grupo de células, llevando a la formación de un tumor primario el cual suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo; esta última es la causa de cerca del 90% de muertes debidas al cáncer. El cáncer es generalmente causado por anormalidades en el material genético de las células afectadas. La formación del tumor es un proceso de pasos múltiples que involucra la acumulación de mutaciones sucesivas en oncogenes y genes supresores de tumores que desregulan el ciclo celular. Los eventos de formación de tumores incluyen cambios a pequeña escala en la secuencia del ADN, como mutaciones puntuales; y a gran escala como aberraciones cromosómicas debido a translocaciones, deleciones y amplificaciones; y genes que afectan la estructura de la cromatina y están asociados a un control epigénético disfuncional, como metilación aberrante de ADN o acetilación de histonas.⁸⁻¹⁰

2. Antecedentes



Estudios realizados sobre modelos animales, *in vitro* y epidemiológicos han llevado a los investigadores a concluir que la patogénesis neoplásica es un proceso complejo el cual está dividido en tres diferentes etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 2.3). La Tabla 2.2 ilustra algunas características de cada una de las etapas involucradas en el proceso de carcinogénesis.^{11, 12}

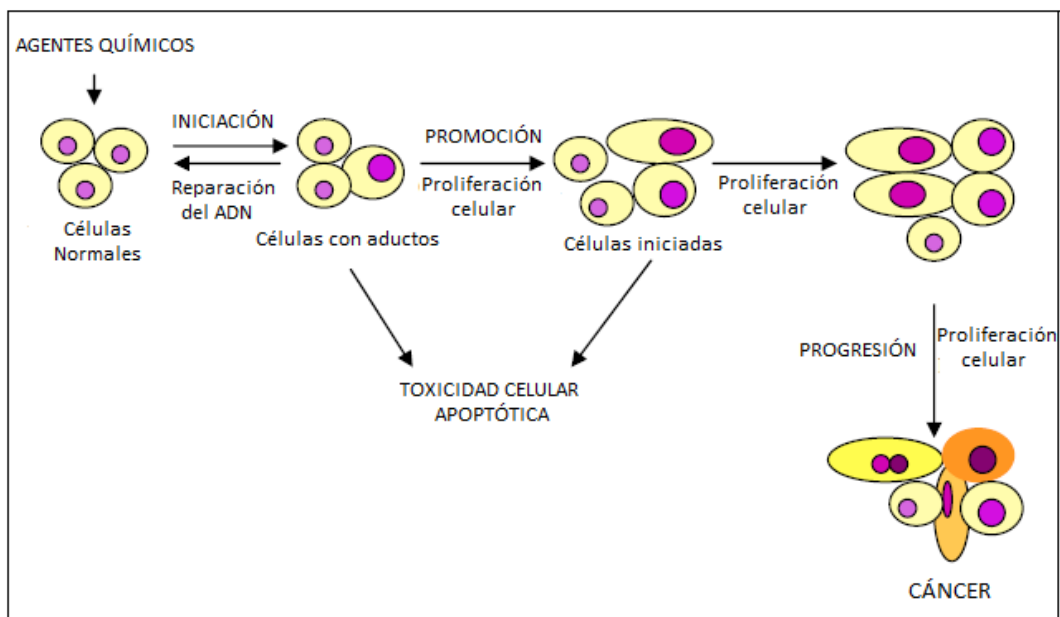


Figura 2.3. Etapas de la carcinogénesis química y procesos involucrados.

Tabla 2.2. Principales características de las tres etapas de desarrollo carcinogénico.

	Iniciación	Promoción	Progresión
Tipo de interacción	Irreversible	Reversible	Irreversible
Factores causales	Mutágenos	Metabolitos (dieta/	Metabolitos (dieta/

2. Antecedentes



		ambientales, hormonas)	ambientales, hormonas)
Aparición	Espontánea	-	Espontánea
Participación en el proceso carcinogénico	Interferencia con el ADN.	Potencia el crecimiento celular anormal.	Alteraciones en el genoma, cambios morfológicos. Aparición de la neoplasia.
Sustancias que la promueven	Genotóxicas (ej. Sulfato de dimetilo).	Mitóticas (ej. TPA).	Clastógenas (ej. Peróxido de benzoilo)

Iniciación

Esta etapa es causada por cambios genéticos irreversibles que predisponen a las células normales sensibles a la evolución maligna y a la inmortalidad. La célula inicial no es neoplásica, pero ha dado su primer paso para entrar a este estado, es decir, esta célula es igual que el resto de las células, pero después de sufrir cambios genéticos sucesivos se induce la proliferación pero no la diferenciación. Estas células que han sufrido mutaciones y que proliferan tienen un menor tiempo para reparar el ADN dañado y eliminar los enlaces covalentes que se establecen entre los productos químicos y el ADN. En esta etapa, las células iniciales pueden permanecer en estado de latencia por semanas, meses o años, o pueden crecer automáticamente y clonarse.

Promoción

Ésta es una etapa reversible en la cual después de la desaparición de algún promotor la regresión en la proliferación puede ocurrir. Los agentes promotores no interactúan de manera directa con el ADN pero son capaces de desencadenar

2. Antecedentes



efectos biológicos sin ser metabólicamente activos. Estos agentes incrementan la proliferación celular en tejidos susceptibles contribuyendo de esta manera a que se fijen las mutaciones, incrementen las alteraciones sobre la expresión genética y causen cambios en el control del crecimiento celular. No todas las células expuestas a agentes promotores participan en la etapa de promoción, sólo aquellas que son estimuladas para la división, que no se diferencian y que han sobrevivido a la apoptosis pueden contribuir a la inestabilidad entre el crecimiento y la muerte celular y llevar a la aparición de una neoplasia maligna.

Progresión

La transformación de las lesiones detectadas en las etapas anteriores a lesiones malignas es la última etapa y la más extensa en el proceso de la carcinogénesis y es denominada progresión. Esta etapa se caracteriza por ser irreversible, por la presencia de inestabilidad genética, porque existe un crecimiento celular rápido, invasión, metástasis y cambios en las características bioquímicas, metabólicas y morfológicas de las células.¹¹

2.2.1. Cáncer e inflamación

La inflamación, un mecanismo de defensa del huésped, es una respuesta inmediata del cuerpo a la lesión del tejido causada por una infección microbiana y otros estímulos nocivos. La inflamación aguda desempeña un papel beneficioso contra la infección y las lesiones. Sin embargo, la resolución inadecuada de la inflamación y las reacciones inflamatorias no controladas pueden provocar un estado de inflamación crónica la cual es un nivel bajo de inflamación, pero cuando es persistente por períodos largos de tiempo puede causar enfermedades crónicas como el cáncer. Se estima que aproximadamente el 15% de todos los cánceres están asociados con procesos inflamatorios e infecciosos.^{13, 14} Hoy en día, existen evidencias que demuestran que la inflamación crónica está asociada con un

2. Antecedentes



mayor riesgo de cáncer. Por ejemplo, el cáncer de estómago, de hígado, de vesícula biliar, de próstata y páncreas están causalmente relacionados con la inflamación gástrica, hepatitis crónica, colecistitis, atrofia inflamatoria de la próstata y la pancreatitis crónica, respectivamente.¹³ Las investigaciones a lo largo de los años han llevado al descubrimiento de las principales vías que vinculan la inflamación con el cáncer: vía intrínseca (impulsada por los eventos genéticos que causan neoplasia) y vía extrínseca (impulsada por procesos inflamatorios que predisponen al cáncer). Uno de los factores importantes que intersecta ambas vías es el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) que ayuda a la proliferación y supervivencia de las células malignas, promueve la angiogénesis y metástasis y altera la respuesta a las hormonas y agentes quimioterapéuticos.¹⁵ Entre los marcadores de la inflamación crónica se encuentran citocinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral, TNF), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), quimiocinas y enzimas proinflamatorias (ciclooxigenasas-2, COX-2).¹⁴

Algunos de los mecanismos por los que la inflamación contribuye a la carcinogénesis incluyen: (i) la inducción de la inestabilidad cromosómica, (ii) las modificaciones en los eventos epigenéticos y posterior expresión de genes inapropiados, (iii) el aumento de la proliferación celular, (iv) la evasión de la apoptosis, entre otros.¹⁴

Recientemente se ha encontrado que el factor de transcripción NF- κ B, sensible a óxido-reducción, desempeña un papel importante en la determinación del rumbo celular durante el estrés oxidante. En el cáncer de mama, el tratamiento con antraciclinas lleva a efectos no deseados por parte de estos fármacos, además de que están involucrados en el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) entre las que se encuentran radicales hidroxilo (OH $^{\bullet}$), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y aniones superóxido (O₂ $^{\bullet-}$). El aumento en la concentración de estas especies puede causar muerte celular (citotoxicidad) como consecuencia de un daño oxidante masivo a los lípidos

2. Antecedentes



celulares, proteínas y ácidos nucleicos, y la pérdida de la función de barrera de la membrana mitocondrial activando la maquinaria apoptótica. Se sabe que NF-kB se activa después del tratamiento de células con peróxido de hidrógeno (y antraciclinas) y a su vez conduce a la activación transcripcional de numerosos genes de respuesta al estrés incluyendo manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD), enzima antiestrés.¹⁶

Una amplia variedad de células inflamatorias e inmunes (por ejemplo, neutrófilos, fagocitos, células dendríticas, leucocitos, monocitos, macrófagos, células naturales asesinas) presentes de manera persistente sobre el tejido inflamado, generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNS) que causan daño al ADN y contribuyen a la carcinogénesis por la activación de oncogenes y/o desactivación de genes supresores de tumores. Considerando que la inflamación crónica conduce a la generación de ROS/RNS celulares, el estrés oxidante o nitroxidante, resultado del desequilibrio redox celular o la exposición a tóxicos ambientales induce inflamación de los tejidos locales contribuyendo así a la carcinogénesis.¹³

2.2.2. Agentes quimiopreventivos del cáncer

El término quimiopreención puede ser definido como el uso de agentes farmacológicos o naturales para suprimir, detener o revertir la carcinogénesis en etapas tardías. Está enfocada en la reducción de la incidencia y está relacionada con una epidemiología clásica, mientras que la quimioterapia se enfoca en la prognosis y está relacionada con la epidemiología clínica.^{17, 18}

Muchos tipos de agentes han demostrado ser buenos quimiopreventivos. Estos incluyen antiestrógenos, antiinflamatorios, antioxidantes y otros agentes obtenidos a partir de la dieta alimenticia.



2.2.2.1. Antiestrógenos y antiandrógenos

Las hormonas sexuales esteroidales se han visto involucradas en la etiología de algunos cánceres, por ejemplo cáncer de mama, de próstata, ovario, testículo, entre otros. Puesto que las hormonas sexuales son factores de crecimiento, favorecen la proliferación celular e incrementan el potencial para mutaciones. Por esta razón, los antiestrógenos, inhibidores de la aromatasa y de la 5 α -reductasa son buenos candidatos para la quimioprevención del cáncer relacionado con esteroides. El Tamoxifen y el Raloxifen son ejemplos de este tipo de agentes.¹⁸

2.2.2.2. Agentes antiinflamatorios

Como ya se mencionó, la inflamación crónica está ligada con el riesgo de desarrollar cáncer. La quimioprevención por la modulación de los mecanismos antiinflamatorios ha sido propuesta a través de vías con ciertos componentes celulares presentes durante la inflamación crónica. Un ejemplo de antiinflamatorio de naturaleza esteroidal empleado para el tratamiento del cáncer es la prednisona. Indometacina, piroxicam y ácido acetilsalisílico son ejemplos de antiinflamatorios no esteroideos. Con respecto al ácido acetilsalicílico, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la ingesta regular de aspirina disminuye cerca del 50% el riesgo de cáncer colorectal.^{17, 18.}

2.2.2.3. Agentes antioxidantes

Los antioxidantes son enzimas u otras sustancias orgánicas capaces de contrarrestar los efectos dañinos por la oxidación en tejidos animales. Ejercen su función de protección mediante la interrupción de formación de radicales libres o bien por la captura de éstos. Algunos antioxidantes derivados de la dieta son los

2. Antecedentes



carotenoides, la vitamina C y E. Muchos productos naturales son ricos en este tipo de agentes y son muy usados por sus propiedades benéficas para la salud. Muchos de estos agentes son derivados fenólicos, entre estos encontramos derivados del ácido cinámico, que se sabe presenta actividad antioxidante.¹⁷⁻¹⁹

2.3. Derivados fenólicos con actividad antioxidante y antiinflamatoria

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que han sido aislados de una gran variedad de plantas y a los cuales se les han atribuido actividades antivirales, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticarcinogénicas. Se ha estudiado la influencia de estos compuestos sobre enzimas metabolizadoras de esteroides encontrando que inhiben la aromatasa, sulfatasa, sulfotransferasa, 5 α -reductasa, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), 17 β -HSD, entre otras. La biosíntesis de los flavonoides en las plantas ocurre vía ácido *trans* cinámico y ácidos fenólicos relacionados, por ejemplo ácido caféico, felúrico y clorogénico.

La quercetina es un flavonoide que generalmente se encuentra en las uvas, el vino, té, manzana y vegetales verdes y ha demostrado ser un potente antioxidante y antiinflamatorio. Modula también, enzimas de la fase I y II del metabolismo e induce apoptosis en células MDA-mB-435 de cáncer de mama.

Las catequinas presentes en el té verde, juegan un papel importante en la quimiopreención del cáncer. Estudios *in vitro* han demostrado que los polifenoles del té verde causan inhibición del crecimiento e inducen la apoptosis de numerosas líneas celulares incluyendo melanoma, cáncer de mama, de pulmón, de colon y leucemia.

La curcumina, obtenida de *Curcuma longa* Linn, ha sido empleada durante años como antiinflamatorio tópico. Además de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, la curcumina es interesante debido a su poder anticarcinogénico,

2. Antecedentes



el cual se basa en la disminución de la proliferación celular de las células cancerosas mediante la inducción de apoptosis.²⁰

El ácido cinámico es otro compuesto fenólico que puede ser hallado en la naturaleza, partiendo del reino vegetal, especialmente en composiciones de sabor y productos que contienen aceite de canela. El ácido cinámico y sus derivados han sido descritos por poseer un amplio espectro terapéutico, incluyendo actividad antimicrobiana y antifúngica. Recientemente se demostró que también exhibe actividad antitumoral contra tumores malignos humanos, incluyendo melanoma, glioblastoma y adenocarcinoma de próstata y pulmón. Se ha demostrado también que presenta baja toxicidad en ratas y conejos, lo cual favorece su uso en la prevención y tratamiento del cáncer.²¹

2.4. Isosterismo y bioisosterismo

El concepto de isosterismo fue introducido en 1919 por Langmuir, quién estaba interesado en el estudio de las reacciones físico-químicas de este tipo de moléculas, entendiendo por tales, átomos o grupos de átomos que presentan una distribución electrónica (electrones de valencia) y una disposición estérica similar.^{22, 23} El concepto de isosterismo introducido por Langmuir se define de la siguiente manera:

“Dos moléculas se denominan isósteras si contienen el mismo número y disposición de sus electrones. Las moléculas isósteras deben, por lo tanto, contener el mismo número de átomos. La única diferencia esencial entre moléculas isósteras está constituida por la carga de los núcleos de los átomos constituyentes”.²³

Algunos átomos y grupos isósteros se muestran a continuación:

1. Monovalentes: H, F, Cl, Br, I, OH, SH, NH₂, CH₃, CF₃.

2. Antecedentes



2. Divalentes: -Se-, -S-, -CH=CH-, -O-, -NH-, -CH₂-, -CF₂-.
3. Trivalentes: -CH=, -N=, -P=.
4. Tetravalentes: =C=, =N=, =P=, C.

Existen también isósteros no clásicos, definidos como átomos o grupo de átomos que no cumplen con las propiedades electrónicas y estéricas para definir un isósteros clásico, sin embargo comparten propiedades físicas y químicas. La Figura 2.4 muestra estructuras de isósteros no clásicos para un grupo tiourea. La propiedad que tienen en común es que son grupos planares de basicidad similar.²²

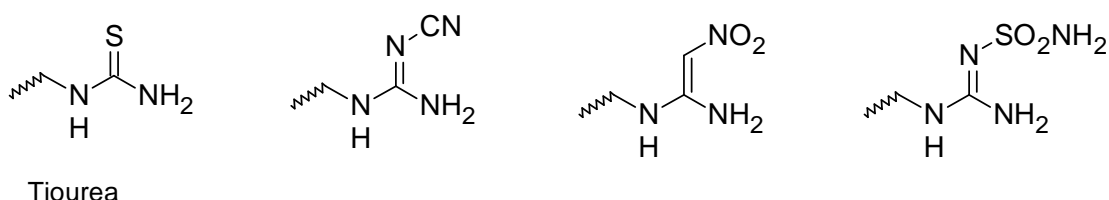


Figura 2.4. Isósteros no clásicos para un grupo tiourea

El término bioisósteros es empleado en el área de diseño de fármacos y comprende tanto el isosterismo clásico como el no clásico. Un *bioisósteros* se define como un grupo que puede usarse para sustituir a otro dentro de una molécula manteniendo la actividad biológica deseada de ésta. Friedman consideró que los isósteros que presentan actividad biológica opuesta (antagónica) también deben ser considerados como bioisósteros, ya que estos compuestos generalmente actúan sobre el mismo sitio activo del receptor.^{22, 23}

2.5. Importancia de los ésteres y halógenos en la relación estructura-actividad biológica

El grupo éster cuenta con el potencial para interactuar con un sitio de unión sólo como aceptor de enlaces de hidrógeno. Es más probable que el oxígeno carbonílico actúe como aceptor de enlaces de hidrógeno que el oxígeno alcoxílico,

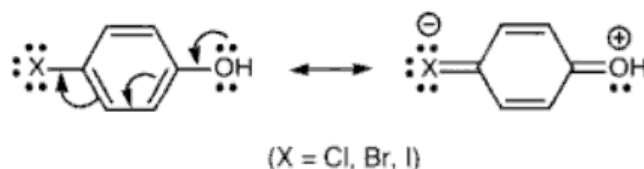
2. Antecedentes



debido a que se encuentra menos impedido y tiene una gran densidad electrónica. La ventaja o desventaja de tener grupos éster en la molécula de interés es que sufren hidrólisis *in vivo* por parte de las esterasas y por ende el tiempo de vida media del fármaco puede verse afectado, siempre y cuando sea este grupo de crucial importancia para la unión del ligando con su sitio activo. La ventaja radica que, en muchas ocasiones son empleados para dar estabilidad metabólica a la molécula gracias a sus factores electrónicos que estabilizan al grupo éster o bien, factores estéricos que lo protegen.²²

El efecto de los halógenos en anillos aromáticos aporta cuatro características principales: efectos electrónicos, hidrofóbicos, estéricos y de halogenación obstructiva.

1. *Efectos electrónicos.* Estos efectos ejercidos por los halógenos son de resonancia como consecuencia de sus tres pares de electrones libres. El efecto de resonancia entre los pares de electrones no compartidos del grupo OH^- y el grupo X no es posible cuando X=flúor ya que este átomo carece de orbitales tipo *d*.



2. *Efectos hidrofóbicos.* Es reconocido que dentro de los factores que influyen en el comportamiento biológico de un fármaco se encuentra la liposolubilidad, la cual es indispensable para que el compuesto atraviese la membrana celular y alcance su sitio de acción a concentraciones terapéuticas efectivas. Dicho carácter lipofílico está expresado por el

2. Antecedentes



coeficiente de partición (P) e indica la relación entre la solubilidad de un compuesto en la fase orgánica (n-octanol) y la fase acuosa.

$$P = \frac{[\text{Compuesto}]_{\text{orgánica}}}{[\text{Compuesto}]_{\text{acuosa}}}$$

De acuerdo con lo anterior, la introducción de un átomo halogenado en la molécula le imparte características hidrofóbicas que aumentan la solubilidad en lípidos y por lo tanto mejoran la absorción del compuesto.

3. *Efectos estéricos.* Otro aspecto es que en muchos derivados halogenados, el efecto biológico del compuesto es resultado estérico que ejerce el halógeno. Si se compara el radio atómico de los halógenos, la sustitución de alguno de ellos por hidrógeno podría imponer ciertas conformaciones a la molécula lo cual se reflejaría en la actividad biológica.

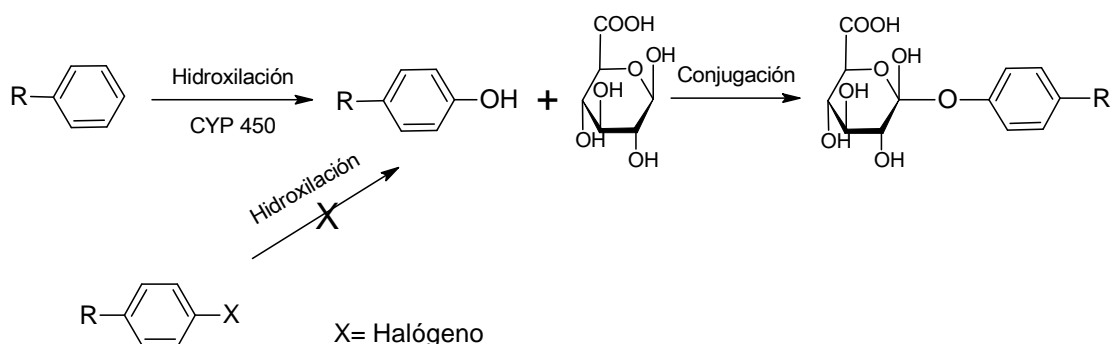
Átomo	Radio atómico (Å)
Hidrógeno	0.29
Flúor	0.64
Cloro	0.99
Bromo	1.14
Iodo	1.33

Los tres efectos de halogenación mencionados anteriormente se pueden resumir de manera cuantitativa en los siguientes parámetros: π que representa la contribución lipofílica ($\log P$), σ que representa el carácter electrónico (electroatractor) y la refractividad molar (MR) que está relacionada con el efecto estérico.



Átomo	π	σ (<i>para</i>)	MR
Hidrógeno	0.0	0.0	1.03
Flúor	0.14	0.06	0.92
Cloro	0.71	0.23	6.03
Bromo	0.86	0.23	8.88
Iodo	1.12	0.18	13.94

4. *Efectos de halogenación obstructiva.* En general, el proceso metabólico que experimentan los anillos aromáticos en el organismo comprenden la hidroxilación (reacción de fase I) y posteriormente la conjugación con el ácido glucorónico (reacción de fase II) para formar el correspondiente glucorónido. La presencia de un halógeno en la posición *para* en el anillo aromático previene este proceso (halogenación obstructiva).²⁴



2.5. Síntesis química asistida por microondas

Una microonda es una forma de energía electromagnética que cae en el extremo de menor frecuencia del espectro electromagnético y está definida en un rango de frecuencia de 300 a 300,000 megahertz (MHz), aproximadamente.

2. Antecedentes



Dentro de esta región, de energía electromagnética, sólo la rotación molecular es la que se ve afectada no la estructura molecular.

La energía de microondas consiste en un campo eléctrico y uno magnético, aunque es el campo eléctrico quien transfiere calor a la sustancia. La manera en cómo el microondas calienta la sustancia es la siguiente, las microondas se acoplan directamente con las moléculas que están presentes en la mezcla se reacción llevando a un rápido aumento de la temperatura permitiendo un supercalentamiento localizado de alguno de los reactivos presentes que va a reaccionar por cualquiera de las dos formas de transferencia de energía del microondas a la mezcla de reacción, rotación dipolar o conducción iónica.

La rotación dipolar es una interacción en la cual las moléculas polares tratan de alinearse con el campo eléctrico del microondas que cambia rápidamente.

La conducción iónica ocurre si hay iones libres o especies iónicas presentes cuando comienza el calentamiento. El campo eléctrico provoca movimiento iónico de las moléculas, quienes tratan de orientarse hacia el campo eléctrico del microondas que cambia rápidamente.

En las reacciones orgánicas está implicada la energía de activación, y aquellas reacciones que tienen una energía de activación elevada requieren de condiciones fuertes para que se puedan completar. En la reacciones realizadas por microondas, a las moléculas se les proporciona una potente energía instantánea lo que permite que alcancen los niveles tan altos de energía que requieren, dando lugar a la obtención del producto termodinámico.

En la síntesis asistida por microondas, el papel que desempeña el disolvente es el de disipador térmico que actúa extrayendo la energía térmica fuera de los reactivos.

2. Antecedentes



La elección del disolvente adecuado es importante en esta técnica de síntesis. Para elegirlo debe considerarse su constante dieléctrica, que mide la capacidad del disolvente de almacenar cargas eléctricas; el momento dipolar, producto de la carga fraccional presente sobre cada átomo por la distancia que los separa; tangente delta (δ) o pérdida de tangente, eficiencia con la cual la energía de microondas es convertida a energía térmica; pérdida dieléctrica, cantidad de energía de microondas de entrada que se pierde cuando empieza a disiparse en forma de calor. Todos estos parámetros están relacionados con la capacidad del disolvente de absorber energía. La Tabla 2.3 muestra una lista con los disolventes más empleados en síntesis orgánica y su clasificación de capacidad de absorción (alta, media, baja).²⁵

Tabla 2.3 Constante dieléctrica, pérdida de tangente y pérdida dieléctrica de los disolventes más comunes en síntesis orgánica (mediciones realizadas a temperatura ambiente a 2450 MHz)

Disolvente (p.e. °C)	Constante dieléctrica (ϵ')	Disolvente	Tan δ	Disolvente	Pérdida dieléctrica (ϵ'')
Agua (100)	80.4	Etilenglicol	1.350	Etilenglicol	49.950
Ácido Fórmico (100)	58.5	Etanol	.941	Ácido Fórmico	42.237
DMSO (189)	45.0	DMSO	.825	DMSO	37.125
DMF (153)	37.7	2-Propanol	.799	Etanol	22.866
Acetonitrilo (82)	37.5	1-Propanol	.757	Metanol	21.483
Etilenglicol (197)	37.0	Ácido fórmico	.722	Nitrobenzeno	20.497
Nitrometano (101)	36.0	Metanol	.659	1-Propanol	15.216
Nitrobenzeno (202)	34.8	Nitrobenzeno	.589	2-Propanol	14.622
Metanol (65)	32.6	1-Butanol	.571	Agua	9.889
NMP (215)	32.2	Isobutanol	.522	1-Butanol	9.764

2. Antecedentes



Etanol (78)	24.3	2-Butanol	.447	NMP	8.855
Acetona (56)	20.7	2-Metoxietanol	.410	Isobutanol	8.248
1-Propanol (97)	20.1	o-Diclorobenceno	.280	2-Butanol	7.063
MEK (80)	18.5	NMP	.275	2-Metoxietanol	6.929
2-Propanol (82)	18.3	Ácido acético	.174	DMF	6.070
1-Butanol (118)	17.1	DMF	.161	o-Diclorobenceno	2.772
2-Metoxietanol (124)	16.9	1,2-Dicloroetano	.127	Acetonitrilo	2.325
2-Butanol (100)	15.8	Agua	.123	Nitrometano	2.304
Isobutanol (108)	15.8	Clorobenceno	.101	MEK	1.462
1,2-Dicloroetano (83)	10.4	Cloroformo	.091	1,2-Dicloroetano	1.321
o-Diclorobenceno (180)	9.9	MEK	.079	Acetona	1.118
Diclorometano (40)	9.1	Nitrometano	.064	Ácido acético	1.079
THF (66)	7.4	Acetonitrilo	.062	Cloroformo	0.437
Ácido acético (113)	6.2	Acetato de etilo	.059	Diclorometano	0.382
Acetato de etilo (77)	6.0	Acetona	.054	Acetato de etilo	0.354
Cloroformo (61)	4.8	THF	.047	THF	0.348
Clorobenceno (132)	2.6	Diclorometano	.042	Clorobenceno	0.263
o-xileno (144)	2.6	Tolueno	.040	Tolueno	0.096
Tolueno (111)	2.4	Hexano	.020	o-Xileno	0.047
Hexano (69)	1.9	o-Xileno	.018	Hexano	0.038

2. Antecedentes



Los disolventes con mayor capacidad de absorción son aquellos que tienen un valor de pérdida dieléctrica mayor a 14.00, éstos permiten un calentamiento rápido dentro de la cámara del microondas; los que se ubican entre 13.99 y 1.0 son de absorción media, su calentamiento es eficiente, pero requieren de mayor tiempo para alcanzar la temperatura deseada. Y aquellos que tienen un valor de pérdida dieléctrica menor a 1.0 son disolventes de absorción baja, y requieren de mayor calentamiento y tiempo para alcanzar la temperatura de sus puntos de ebullición.

La radiación por microondas no sólo aplica para síntesis en fase líquida sino que también aplica para reacciones en fase sólida, libres de disolvente. Existen tres tipos de reacciones libres de disolvente: mezcla de reacción adsorbida dentro de óxidos minerales, catálisis de transferencia de fase y reacción neta.

La adsorción en óxidos minerales comprende disolver los reactivos en disolvente polar y agregar algún soporte sólido (sílice gel, alúmina o zeolita), posteriormente se elimina el disolvente por evaporación y el sólido obtenido (reactivos + óxido mineral) es irradiado con microondas.

En la catálisis de transferencia de fase uno de los reactivos actúa como reactivo y como disolvente, por ejemplo el polietilenglicol que a temperaturas menores a 50°C se encuentra en fase sólida, por arriba de esta temperatura se funde.

La reacción neta es el tercer tipo de reacción libre de disolvente. En ésta los reactivos se usan directamente desde sus contenedores sin ser diluidos.

El uso del microondas en síntesis orgánica ha introducido un enfoque completamente nuevo para la obtención de fármacos. El sistema de microondas ofrece la oportunidad de completar reacciones en minutos, ofreciendo la opción de

2. Antecedentes



regresar a métodos más secuenciales. Esta ventaja permite al químico analizar la reacción antes de continuar con el siguiente paso.²⁵

Los ésteres aromáticos son productos químicos muy importantes con amplias aplicaciones en diversas áreas de la industria química, tales como perfumes, sabores, productos farmacéuticos, plastificantes, disolventes y productos intermedios, y existen muchas rutas que permiten su preparación, el método más simple y más empleado es la esterificación de Fisher. Sin embargo, la esterificación de Fisher convencional sufre problemas relacionados con la generación de reacciones secundarias (oxidación, eterificación), corrosión de los equipos, procesos tediosos de purificación, tiempos de reacción prolongados, descarga de grandes volúmenes de desechos ácidos. Aunado a estos problemas, este proceso industrialmente importante, padece el uso de disolventes orgánicos volátiles. Frente al desafío ecológico y económico creciente, existe la urgente necesidad de desarrollar un método sencillo, económico y ecológico para la síntesis de compuestos orgánicos.²⁶

3. Planteamiento del Problema



En el campo de la medicina, los esteroides juegan un papel importante como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer así como agentes antiinflamatorios.⁵ Debido a que existe evidencia de que la inflamación y el estrés oxidante están ligados al desarrollo de cáncer se propone la incorporación de derivados del ácido cinámico en la posición 3 de un derivado de pregnenolona mediante una reacción de esterificación. Se trabaja con ésteres ya que en muchas ocasiones son empleados para dar estabilidad metabólica a la molécula, gracias a sus factores electrónicos que estabilizan al grupo éster o bien factores estéricos, que lo protegen.²² El ácido cinámico es un compuesto fenólico, y al isómero *trans*, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se le han atribuido un amplio espectro de propiedades terapéuticas, entre las que destacan actividad antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antioxidante y antitumoral contra tumores malignos humanos, incluyendo melanoma, glioblastoma y adenocarcinoma de próstata y pulmón. Se ha demostrado también que presenta baja toxicidad en ratas y conejos, lo cual favorece su uso en la prevención y tratamiento del cáncer.²¹

El ácido cinámico presenta un patrón de sustitución halogenado en la posición *para* (Figura 3.1). El efecto de los halógenos en anillos aromáticos aporta cuatro características principales: efectos electrónicos, hidrofóbicos, estéricos y de halogenación obstructiva.²⁴

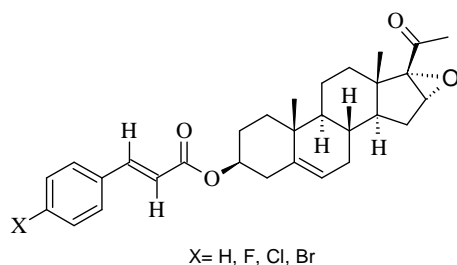


Figura 3.1. Estructura química de los compuestos intermediarios (**serie 3**).

3. Planteamiento del Problema



Los compuestos finales tienen un grupo OH en C-17 y un átomo de halógeno (Cl y Br) en C-16 (Figura 3.2). Los alcoholes y fenoles son grupos comunes en muchos fármacos y generalmente están involucrados en el enlace de hidrógeno. El oxígeno de estos grupos puede actuar como aceptor de puentes de hidrógeno, mientras que el hidrógeno actúa como donador de puentes de hidrógeno. Este tipo de interacciones pueden ser importante en la unión del fármaco con su sitio de unión.²²

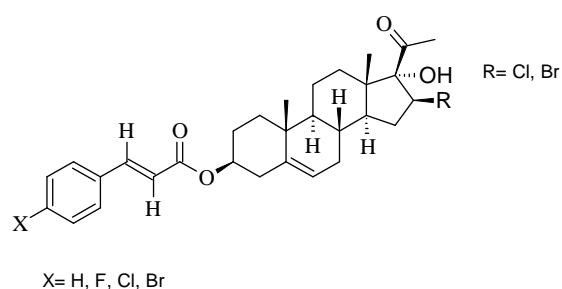


Figura 3.2. Estructura química de los compuestos finales (serie 4 y 5).

4. Hipótesis



La incorporación de ácido cinámico con patrón de sustitución halogenado en posición *para*, sobre un derivado esteroideal (pregnenolona), así como la sustitución del grupo oxirano por un halógeno en C-16 le conferirá actividad antiinflamatoria y/o citotóxica al núcleo esteroideal.

5. Objetivos



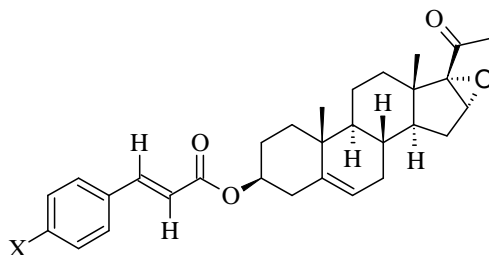
5.1 Objetivo general

Sintetizar y determinar la actividad citotóxica y antiinflamatoria de nuevos 16-haloderivados de la pregnenolona que contengan derivados del ácido cinámico en el C-3 del núcleo esteroidal.

5.2. Objetivos particulares

- I. Sintetizar los siguientes compuestos intermediarios

Tabla 5.1. Compuestos propuestos para ser sintetizados y su nomenclatura.



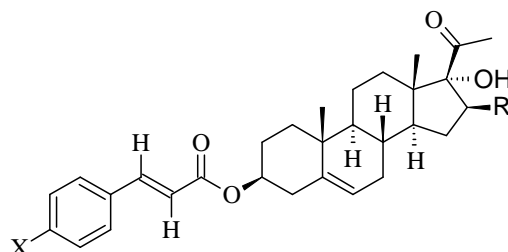
Compuesto	Sustituyente (X)	Nombre
3a	H	3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona
3b	F	3 β -[(4-fluoro)-cinamoil-oxi]-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona
3c	Cl	3 β -[(4-cloro)-cinamoil-oxi]-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona
3d	Br	3 β -[(4-bromo)-cinamoil-oxi]-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona

- II. Sintetizar los siguientes compuestos finales

5. Objetivos



Tabla 5.2. Compuestos propuestos para ser sintetizados y su nomenclatura.



Compuesto	R	X	Nombre
4a	Cl	H	16β-Cloro-3β-(cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona
4b	Cl	F	16β-Cloro-3β-(4-fluoro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona
4c	Cl	Cl	16β-Cloro-3β-(4-cloro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona
5a	Br	H	16β-Bromo-3β-(cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona
5b	Br	F	16β-Bromo-3β-(4-fluoro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona
5c	Br	Cl	16β-Bromo-3β-(4-cloro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona

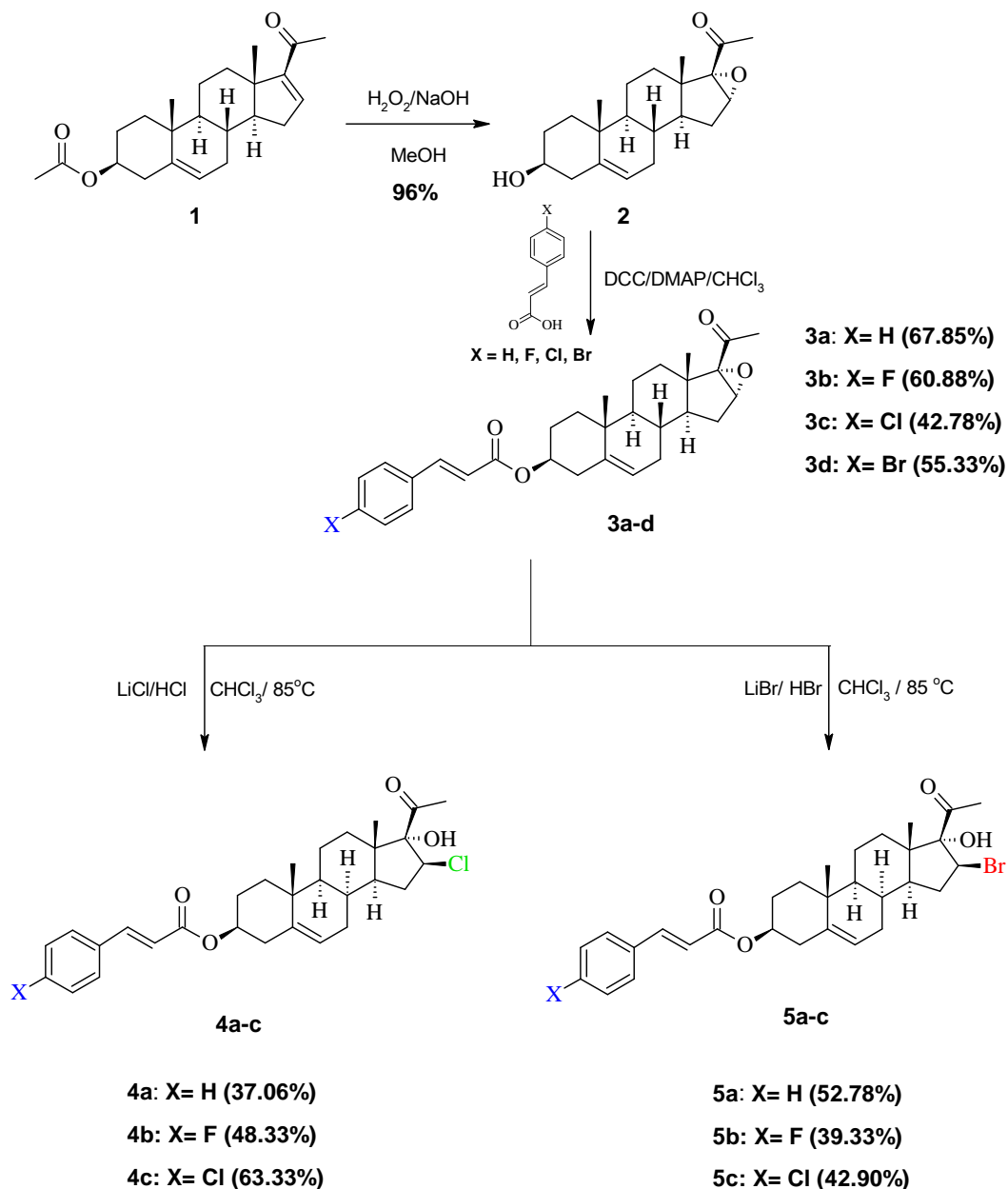
- III. Caracterizar los compuestos obtenidos por sus constantes físicas (punto de fusión y R_f), espectroscópicas (IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y EM).
- IV. Someter a evaluación biológica los productos obtenidos sobre líneas celulares de cáncer de próstata de humano (PC-3), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de pulmón (SKLU-1) y actividad antiinflamatoria.

6. Resultados y Discusión



6.1 Parte química

Los compuestos propuestos fueron obtenidos mediante el esquema 6.1



Esquema 6.1. Reactivos y condiciones para la obtención de nuevos derivados de la pregnenolona.

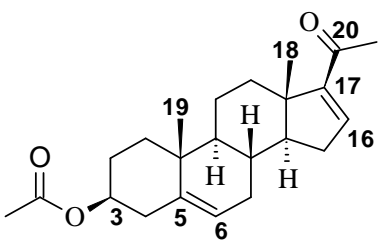
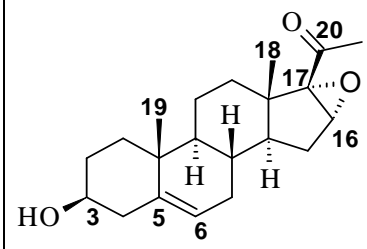
6. Resultados y Discusión



Para la síntesis de nuevos derivados de la pregnenolona, se empleó como materia prima acetato de 16-deshidropregnenolona (DPA) (**1**). Este es un compuesto comercialmente disponible y con un costo accesible. Los datos espectroscópicos (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C) fueron tomados de la literatura (Tabla 6.1).^{27, 28}

Como primer paso de síntesis se llevó a cabo la incorporación del grupo oxirano en la molécula para lo cual fue necesario realizar una epoxidación de la doble ligadura en C-16 y C-17. El compuesto obtenido **2** fue recristalizado de metanol obteniendo un rendimiento del 96%; fue caracterizado por sus propiedades físicas y sus constantes espectroscópicas descritas en la literatura (Tabla 6.1).^{27, 28}

Tabla 6.1. Asignación de bandas de IR para DPA (**1**) y el compuesto **2**.

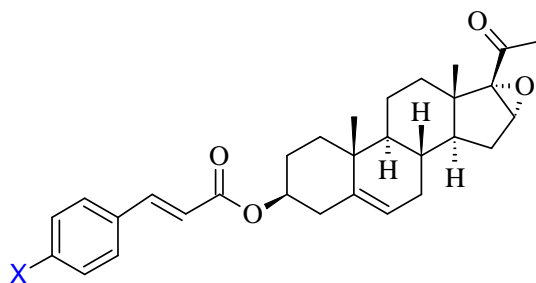
Estructura		
(C=O), (C-O) (cm ⁻¹)	1729, 1661, 1237, 1037	1692, 1056, 857
(C=C) (cm ⁻¹)	1584	1376
(O-H) (cm ⁻¹)	-----	3371



6.1.1. Síntesis general para la obtención de ésteres de derivados del ácido cinámico (3a-3d).

Se llevó a cabo la esterificación con derivados del ácido cinámico sobre el C-3 del esteroide. Esta síntesis se realizó mediante la esterificación de Steglich, en la cual la DCC y el ácido carboxílico (ácido cinámico) junto con DMAP dan lugar a una amida reactiva que reacciona con el alcohol en C-3 del esteroide para la formación del éster³². La síntesis para la obtención de ésteres de derivados del ácido cinámico se llevó a cabo por dos técnicas, mediante síntesis tradicional (técnica A) y empleando un horno de microondas diseñado para reacciones orgánicas (técnica B). Cabe destacar que los tiempos de reacción para la obtención de los productos deseados empleando el horno de microondas se redujeron a más de la mitad comparados con los tiempos de reacción por química tradicional, sin embargo, los rendimientos obtenidos por la técnica de microondas están por debajo de los que se obtuvieron vía química tradicional (Tabla 6.2) debido a que no hubo un consumo total de materia prima debido a que el disolvente, cloroformo, tiene una capacidad baja de absorción por lo tanto se requiere de mayor tiempo y calentamiento para que pueda alcanzar su punto de ebullición. Los rendimientos para los compuestos obtenidos por la técnica B están reportados por observación en placa cromatográfica de sílice (*).

Tabla 6.2. Rendimientos obtenidos mediante el método de química tradicional y de microondas de los compuestos **3a-3d**.





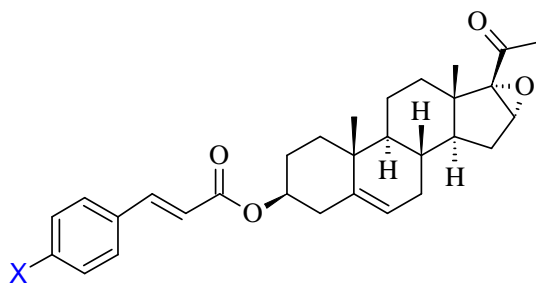
Compuesto	% Rendimientos	
	Técnica A	Técnica B
3a (X=H)	67.85	40*
3b (X=F)	60.88	50*
3c (X=Cl)	42.78	20*
3d (X=Br)	55.33	-----

* Rendimientos reportados por observación en placa cromatográfica de sílice.

6.1.1.1 Espectroscopía de IR.

En los espectros de IR de la **serie 3** de compuestos, la presencia del éster se confirmó por la intensa banda alrededor de 1710 cm^{-1} debida a la vibración del enlace C=O y por la banda de mediana intensidad en 1200 cm^{-1} por la vibración del enlace C-O. Las bandas por arriba de 3000 cm^{-1} se deben a la vibración del enlace =C-H y en 1642 cm^{-1} a causa de la vibración de alargamiento del enlace C=C del sistema conjugado del anillo aromático (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Asignación de bandas de IR de los compuestos **3a-3d**.



Compuesto	(C=O), (C-O) (cm^{-1})	(=C-H), (C=C) (cm^{-1})
3a (X=H)	1710, 1697, 1199	3030, 1642

6. Resultados y Discusión

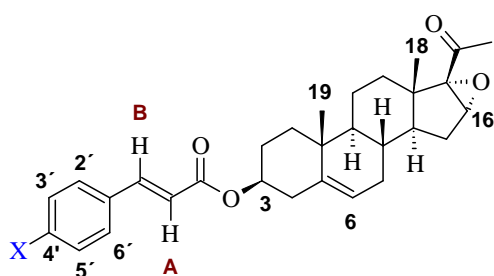


3b (X=F)	1704, 1199	3020, 1639
3c (X=Cl)	1704, 1202	3019, 1634
3d (X=Br)	1704, 1202	3020, 1635

6.1.1.2. Espectroscopía de RMN-¹H.

En la espectroscopía de RMN-¹H se confirmó la presencia del sistema aromático por las señales que aparecen entre 7.3-7.8 ppm (Tabla 6.4). La señal doble de 5.39 ppm fue asignada a H-6, mientras que el multiplete en 4.74 corresponde a H-3. También se observan dos señales dobles en 6.44 y 7.65 ppm que tienen una constante de acoplamiento de 16 Hz que pertenecen a la doble ligadura en *trans* del ácido cinámico (protones H-A y H-B). Para el compuesto **3b** se observó un acoplamiento de los protones H-2'-H-6' con el átomo de flúor en el C-4' del anillo aromático lo que confirmó la presencia de éste átomo en el anillo aromático.

Tabla 6.4. Desplazamiento químico (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de los compuestos **3a-3c**.



Protón	Sustituyente (X)			
	H	F	Cl	Br
H-19	1.06 (s, 3H)	1.06 (s, 6H)	1.06 (s, 6H)	1.06 (s, 6H)

6. Resultados y Discusión



H-18	1.05 (s, 3H)			
H-16	3.68 (s, 1H)	3.68 (s, 1H)	3.68 (s, 1H)	3.67 (s, 1H)
H-6	5.40 (d, $J= 5.0$ Hz, 1H)	5.39 (d, $J= 3.6$ Hz, 1H)	5.38 (d, $J= 4.9$ Hz, 1H)	5.39 (d, $J= 5.1$ Hz, 1H)
H-3	4.74 (m, 1H)	4.74 (m, 1H)	4.73 (m, 1H)	4.74 (m, 1H)
H-A	6.44 (d, $J= 16$ Hz, 1H)	6.34 (d, $J= 16$ Hz, 1H)	6.39 (d, $J= 16$ Hz, 1H)	6.39 (d, $J= 16$ Hz, 1H)
H-B	7.65 (d, $J= 16$ Hz, 1H)	7.62 (d, $J= 16$ Hz, 1H)	7.61 (d, $J= 16$ Hz, 1H)	7.61 (d, $J= 16$ Hz, 1H)
H-2' y H-6'	7.52 (dd, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=2.1$ Hz, 2H)	7.07 (t, $J= 8.3$ Hz, 2H)	7.45 (d, $J=8.5$ Hz, 2H)	7.37 (t, $J= 5.3$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'	7.37 (m, 2H)	7.50 (t, $J= 5.7$ Hz, 2H)	7.35 (d, $J=8.5$ Hz, 2H)	7.51 (dd $J_1=$ 8.7 Hz, $J_2= 2.1$ Hz, 2H)
H-4'	7.37 (m, 1H)	-----	-----	-----

6.1.1.3. Espectroscopía de RMN-¹³C

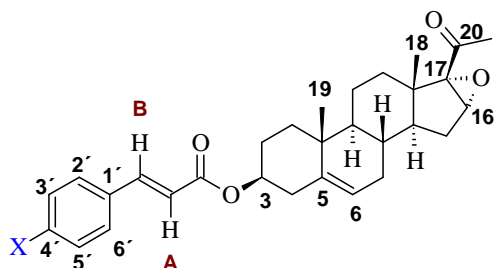
En los espectros de RMN-¹³C, la presencia del éster se hace evidente con la señal que se ubica alrededor de 166 ppm. Para el derivado 3β-[(4-fluoro)-cinamoil-oxi]-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (**3b**) se observa un doblete con un desplazamiento de 162 ppm que corresponde al carbono con hibridación sp² que está unido directamente al átomo de flúor; en 116 ppm un doblete que corresponde al C-3' y C-5', y en 129 ppm un doblete que corresponde al C-2' y C-6' del sistema aromático. El desplazamiento de 60 y 70 ppm corresponde al C-16 y

6. Resultados y Discusión



C-17 respectivamente, que están directamente unidos al oxígeno del epóxido. Se detectó una señal entre 204-206 ppm que corresponde al carbonilo en C-20. En la Tabla 6.5 se enlistan los desplazamientos de los diferentes carbonos con el patrón de sustitución en el sistema aromático.

Tabla 6.5. Desplazamiento químico (ppm) de los compuestos **3a-3c**.



Carbono	Sustituyente (X)			
	H	F	Cl	Br
C-18	15.24	15.33	15.34	15.01
C-19	19.34	19.42	19.43	19.06
C-16	60.55	60.64	60.64	60.32
C-17	73.95	74.11	74.19	73.89
C-3	71.07	71.16	71.16	70.83
C-5	140.12	140.17	140.14	139.81
C-6	122.06	122.19	122.23	121.91
C-A	118.70	118.52 118.54	119.39	119.18
C-B	144.50	143.28	143.13	142.87
C-2' y C-6'	128.08	129.97, 130.06	129.32	129.22

6. Resultados y Discusión

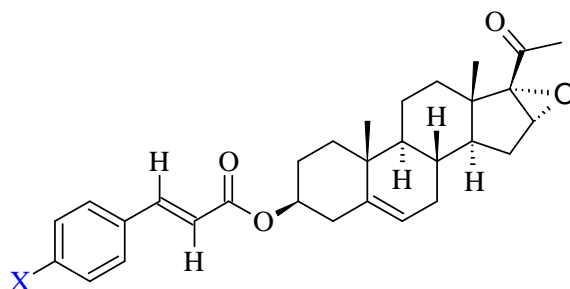


C-3' y C-5'	128.91	116.04, 116.26	129.32	131.94
C-1'	134.57	130.88, 130.91	133.15	133.25
C-4'	130.21	162.72, 165.22	136.22	124.23
COOR	166.39	166.36	166.23	165.89
20-C=O	204.96	206.07	206.06	204.74

6.1.1.4. Espectrometría de Masas (EM-FAB).

El análisis de los espectros de masas de los compuestos **3a-3d** permitió observar los picos correspondientes a la especie $[M+1]^+$ (Tabla 6.6). Para los compuestos **3c** y **3d** por la isotopía que presentan los átomos de cloro y bromo, respectivamente, se observó la especie $[M+3]^+$ (Tabla 6.6). Los espectros de masas de los cuatro derivados presentan un pico $m/z = 312$ correspondiente a la especie $[C_{21}H_{28}O_2]^+$ (Fragmento C, Esquema 6.2). El Esquema 6.2 ilustra el mecanismo de fragmentación propuesto para los picos más representativos de los compuestos **3a-3d**.

Tabla 6.6. Asignación de los principales fragmentos (m/z) de los compuestos **3a-3d**.

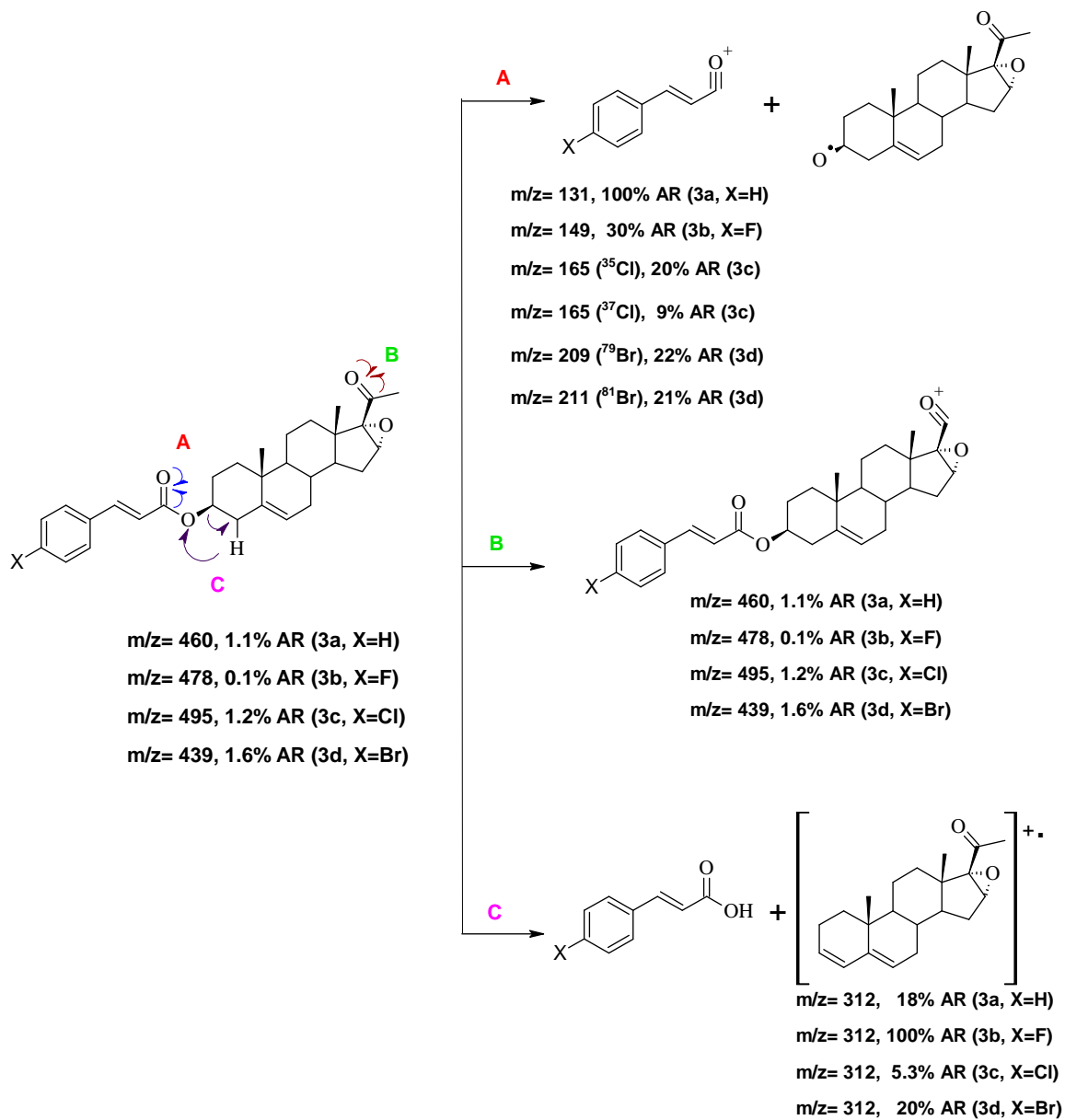


6. Resultados y Discusión



Compuesto	3a (X=H)	3b (X=F)	3c (X=Cl)	3d (X=Br)
[M+1]⁺ (m/z)	461	479	496	541
% AR	1.4%	0.5%	0.8%	1.0%
[M+3]⁺ (m/z)	----	----	498	543
% AR			0.3%	0.6%
[X-C₆H₄C=C-CO]⁺ (m/z)	131	149	165 (³⁵ Cl) 20%	209 (⁷⁹ Br) 21%
% AR	100%	30%	167 (³⁷ Cl) 9.0%	211 (⁸¹ Br) 20%
[C₂₁H₂₈O₂]⁺	312	312	312	312
% AR	12%	100%	5.3%	20%

6. Resultados y Discusión



Esquema 6.2. Mecanismo de fragmentación de los compuestos **3a-3d**.



6.1.2. Síntesis general para la obtención de derivados 16 β -halo-3 β -(cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (serie 4a-4c y 5a-5c).

Una vez obtenidos los derivados esterificados, se procedió a la apertura del grupo oxirano vía sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2). El planteamiento en esta reacción fue la inserción de un halógeno en el C-16 que se realizó empleando ácido clorhídrico o ácido bromhídrico, con la sal de litio pertinente, para la obtención de la clorhidrina y bromhidrina, respectivamente. La Tabla 6.7 muestra los rendimientos obtenidos para ambos halo-derivados.

Tabla 6.7. Rendimientos de los derivados 4a-4c y 5a-5c.

Estructura						
Compuesto	4a (X=H)	4b (X=F)	4c (X=Cl)	5a (X=H)	5b (X=F)	5c (X=Cl)
% Rendimiento	37.06	48.33	63.33	52.38	39.33	42.90

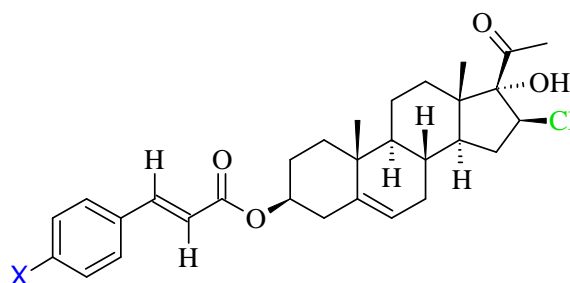
Se realizó la síntesis del derivado 16 β -Cloro-3 β -(4-cloro-cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (**4c**) empleando la técnica del microondas. El tiempo de reacción se redujo a 35 minutos, es importante observar que el rendimiento obtenido (60%) es muy cercano al que se consiguió por la técnica de química tradicional.



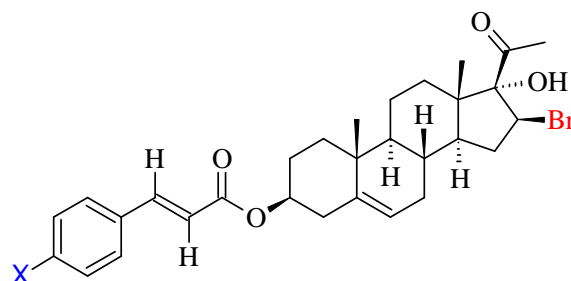
6.1.2.1. Espectroscopía de IR

En los espectros de IR de los compuestos **4a-4c** y **5a-5c** es evidente una banda que oscila entre 3380 cm^{-1} y 3410 cm^{-1} que corresponde a la vibración O-H que indica la aparición del grupo hidroxilo en el C-17. La banda intensa alrededor de 1710 cm^{-1} indica que se conservó el éster en la molécula. Las Tablas 6.8 y 6.9 muestran las bandas características para los compuestos **4a-4c** y **5a-5c**, respectivamente.

Tabla 6.8. Asignación de las principales bandas de IR de los derivados **4a-4c**.



Compuesto	(O-H) (cm^{-1})	(C=O), (C-O) (cm^{-1})	(=C-H),(C=C) (cm^{-1})
4a (X=H)	3387	1712, 1682 1205	3028,1630
4b (X=F)	3387	1712, 1683, 1200	3021, 1638
4c (X=Cl)	3399	1715, 1687, 1202	3019, 1635

Tabla 6.9. Asignación de las principales bandas de IR de los derivados **5a-5c**.

Compuesto	(O-H) (cm ⁻¹)	(C=O), (C-O) (cm ⁻¹)	(=C-H),(C=C) (cm ⁻¹)
5a (X=H)	3386	1710, 1680, 1204	3029, 1641
5b (X=F)	3377	1711, 1694, 1199	3021, 1638
5c (X=Cl)	3412	1714, 1704, 1190	3020, 1640

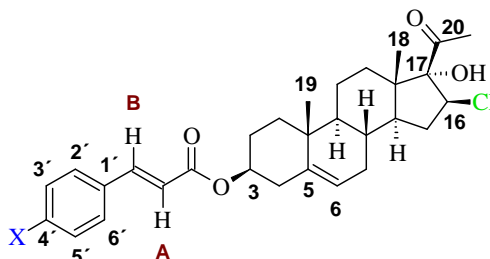
6.1.2.2. Espectroscopía de RMN-¹H

Los espectros de RMN-¹H de la **serie 4 y 5** de compuestos mostraron un singlete con un desplazamiento entre 3.3 y 3.6 ppm que se asignó al protón del grupo O-H. Esta señal intercambió con agua deuterada. Las señales que presentaron un desplazamiento alrededor de 4.13 ppm fueron asignadas a H-16. Las señales con un desplazamiento que oscila entre 7.3 y 7.5 ppm fueron asignadas al sistema aromático. La Tabla 6.10 muestra los desplazamientos químicos (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones para los compuestos **4a-4c**. La Tabla 6.11 muestra los desplazamientos químicos (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones para los compuestos **5a-5c**.

6. Resultados y Discusión



Tabla 6.10. Desplazamiento químico (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de los derivados **4a-4c**.

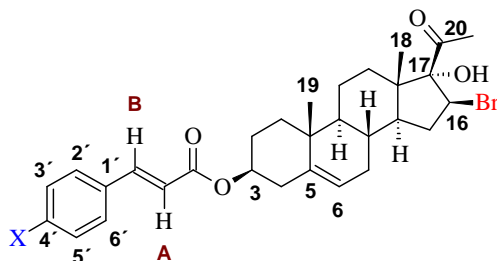


Protón	Sustituyente (X)		
	H	F	Cl
H-19	1.24 (s, 3H)	1.24 (s, 3H)	1.24 (s, 3H)
H-18	1.08 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)
H-16	4.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H)	4.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H)	4.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16
O-H	3.42 (s, intercambia con D_2O , 1H)	3.36 (s, intercambia con D_2O , 1H)	3.36 (s, intercambia con D_2O , 1H)
H-6	5.40 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H)	5.40 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.40 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H)
H-3	4.75 (m, 1H) H-3	4.75 (m, 1H)	4.74 (m, 1H)
H-A	6.42 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	6.36 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	6.39 (d, $J = 16$ Hz, 1H)
H-B	7.67 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	7.63 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	7.61 (d, $J = 16$ Hz, 1H)
H-2' y H-6'	7.52 (dd, $J_1 = 6.4$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 2H)	7.51 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 2H)	7.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'	7.38 (m, 2H)	7.07 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H)	7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H)

6. Resultados y Discusión



Tabla 6.11. Desplazamiento químico (ppm), tipo de señal, constante de acoplamiento (Hz) y número de protones de los derivados **5a-5c**.



Protón	Sustituyente (X)		
	H	F	Cl
H-19	1.30 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)	1.30 (s, 3H)
H-18	1.08 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)	1.07 (s, 3H)
H-16	4.11 (dd, $J_1 = 8.2$, $J_2 = 6.6$ Hz, 1H)	4.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16	4.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16
O-H	3.31 (s, intercambia con D ₂ O, 1H)	3.30 (s, intercambia con D ₂ O, 1H)	; 3.27 (s, intercambia con D ₂ O, 1H)
H-6	5.41 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H)	5.40 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H)	5.41 (s, 1H)
H-3	4.75 (m, 1H)	4.73 (m, 1H)	4.75 (m, 1H)
H-A	6.42 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	6.36 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	6.41 (d, $J = 16$ Hz, 1H)
H-B	7.67 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	7.60 (d, $J = 16$ Hz, 1H)	7.59 (d, $J = 16$ Hz, 1H)
H-2' y H-6'	7.52 (dd, $J_1 = 6.7$, $J_2 = 2.9$ Hz, 2H)	7.50 (m, 2H)	7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H)
H-3' y H-5'	7.38 (dd, $J_1 = 6.4$, $J_2 = 2.7$ Hz, 2H)	7.07 (t, $J = 8.04$ Hz, 2H)	7.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H)



6.1.2.3. Espectroscopía de RMN-¹³C.

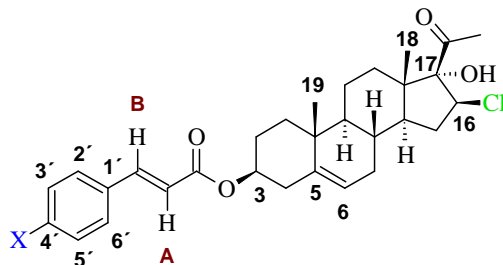
En los espectros de RMN-¹³C, para ambos 16β-halo-derivados (cloro y bromo) se detectó una señal alrededor de 90 ppm que se asignó al C-17 que tiene al grupo O-H. La señal del C-16 evidencia la presencia de cloro o de bromo ya que en los compuestos **4a-c** presentan un desplazamiento de 63 ppm, mientras que para los compuestos **5a-c** es de 50 ppm, lo cual se debe a que el átomo de cloro es más electronegativo que el átomo de bromo y desplaza ésta señal a campo más bajo. La señal de 162 ppm es un doblete que se atribuyó al C-4' que se encuentra directamente unido al átomo de flúor. Esta señal doble apareció en los espectros de los compuestos **4b** y **5b**. De igual manera, para ambos compuestos hubo un doblete 116 ppm que correspondió al C-3' y C-5', en 129 ppm un doblete que se asignó a C-2' y C-6' de esta forma se demuestra la presencia del átomo de flúor en el anillo aromático.

Para los compuestos restantes (**4a**, **4c**, **5a**, **5c**) las señales detectadas entre 128 y 129 ppm fueron asignadas a C-2'-C-6', mientras que la señales entre 130 y 136 ppm fueron asignadas a C-1' y C-4'. Al grupo éster se le asignó la señal alrededor de 166 ppm, mientras que la señal de 206 ppm fue asignada al C-20. En la Tabla 6.12 se muestran los desplazamientos (ppm) químicos de los 16β-cloro-derivados con diferente patrón de sustitución (**X**) sobre el sistema aromático. En Tabla 6.13 se muestran los desplazamientos (ppm) químicos de los 16β-bromo-derivados con diferente patrón de sustitución (**X**) sobre el sistema aromático.

6. Resultados y Discusión



Tabla 6.12. Desplazamiento químico (ppm) de los derivados **4a-4c**.

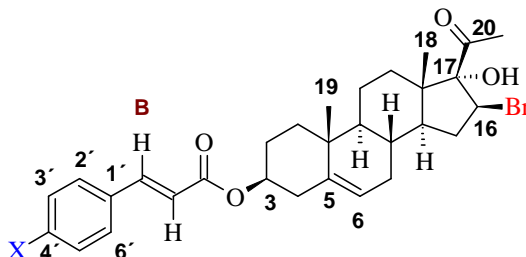


Carbono	Sustituyente (X)		
	H	F	Cl
C-18	16.31	15.85	15.85
C-19	19.50	19.49	19.49
C-16	51.87	63.21	63.21
C-17	89.88	90.29	90.29
C-3	74.05	74.09	74.18
C-A	118.72	118.48	119.33
C-B	144.73	143.38	143.23
C-2' y C-6'	128.19	129.99, 130.07	129.31
C-3' y C-5'	129.02	116.06, 116.28	129.31
C-1'	134.62	130.86	133.12
C-4'	130.37	162.75, 166.25	136.27
COOR	166.59	166.43	166.30
20-C=O	206.40	206.67	206.66

6. Resultados y Discusión



Tabla 6.13. Desplazamiento químico (ppm) de los derivados **5a-5c**.



Carbono	Sustituyente (X)		
	H	F	Cl
C-18	16.32	16.31	16.34
C-19	19.79	19.49	20.03
C-16	50.38	50.39	50.39
C-17	89.86	89.87	89.89
C-3	74.14	74.10	74.17
C-A	118.38	118.48	119.45
C-B	143.40	143.41	143.23
C-2' y C-6'	128.06	129.99, 130.08	129.33
C-3' y C-5'	129.46	116.07, 116.28	129.33
C-1'	135.88	130.84, 130.88	133.13
C-4'	130.85	162.76, 166.25	136.27
COOR	165.26	166.45	166.29
20-C=O	206.41	206.41	206.43

6.1.2.4. Espectrometría de Masas (EM, FAB)

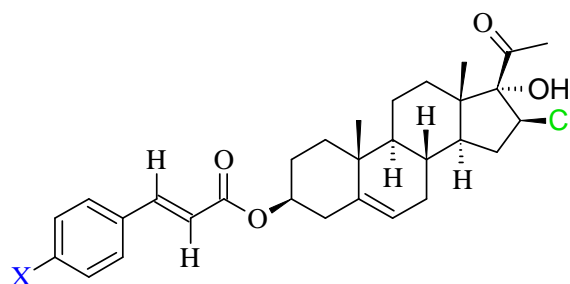
En los espectros de masas para los compuestos **4a-4c** y **5a-5c** se observaron los picos correspondientes a las especies $[M+1]^+$ y $[M+3]^+$, respectivamente. En los derivados **4a-4c** se observó un pico $m/z = 349$ y uno $m/z =$

6. Resultados y Discusión



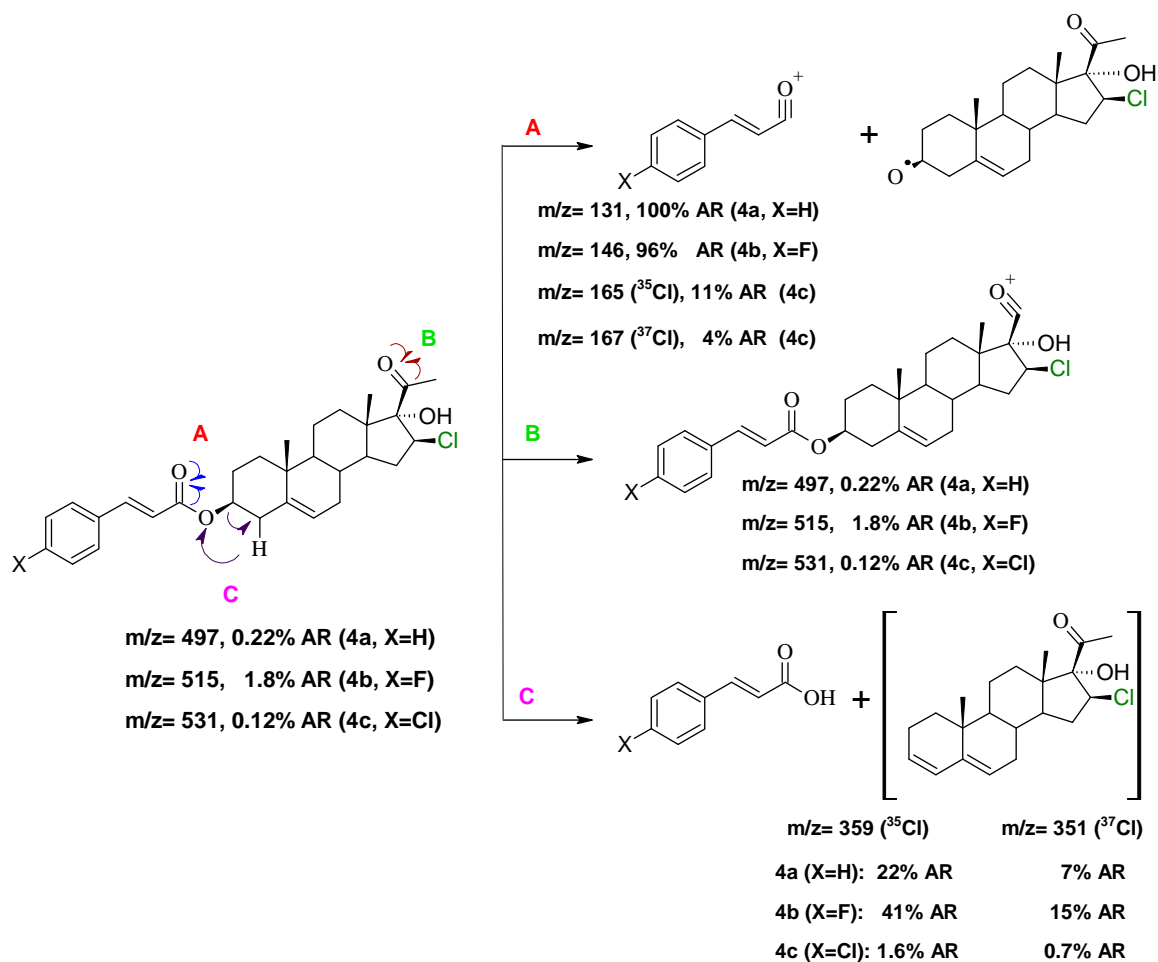
351 concernientes a las especies $[C_{21}H_{29}^{35}ClO_2]^+$ y $[C_{21}H_{29}^{37}ClO_2]^+$ (Fragmento, esquema 6.3), respectivamente (Tabla 6.14). Para los derivados **5a-5c**, las especies $[C_{21}H_{29}^{79}BrO_2]^+$ y $[C_{21}H_{29}^{81}BrO_2]^+$ (Fragmento C, esquema 6.4) fueron representados por los picos $m/z=393$ y $m/z=395$, respectivamente (Tabla 6.15).

Tabla 6.14. Asignación de los principales fragmentos (m/z) de los derivados **4a-4c**.



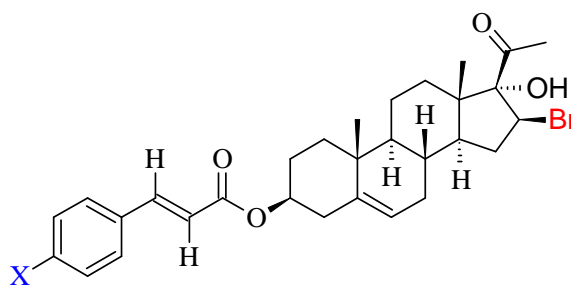
Compuesto	4a (X=H)	4b (X=F)	4c (X=Cl)
$[M+1]^+$ (m/z)	498	516	532
% AR	1.0%	1.0%	0.9%
$[M+3]^+$ (m/z)	500	518	534
% AR	0.4%	0.5%	1.1%
$[X-C_6H_4C=C-CO]^+$			165 (^{35}Cl)
(m/z)	131	149	11%
% AR	100%	96%	167 (^{37}Cl)
			4%
$[C_{21}H_{29}^{35}ClO_2]^+$	349	349	349
% AR	22%	41%	1.6%
$[C_{21}H_{29}^{37}ClO_2]^+$	351	351	351
%AR	7	15%	0.7%

6. Resultados y Discusión



Esquema 6.3. Mecanismo de fragmentación de los derivados **4a-4c**.

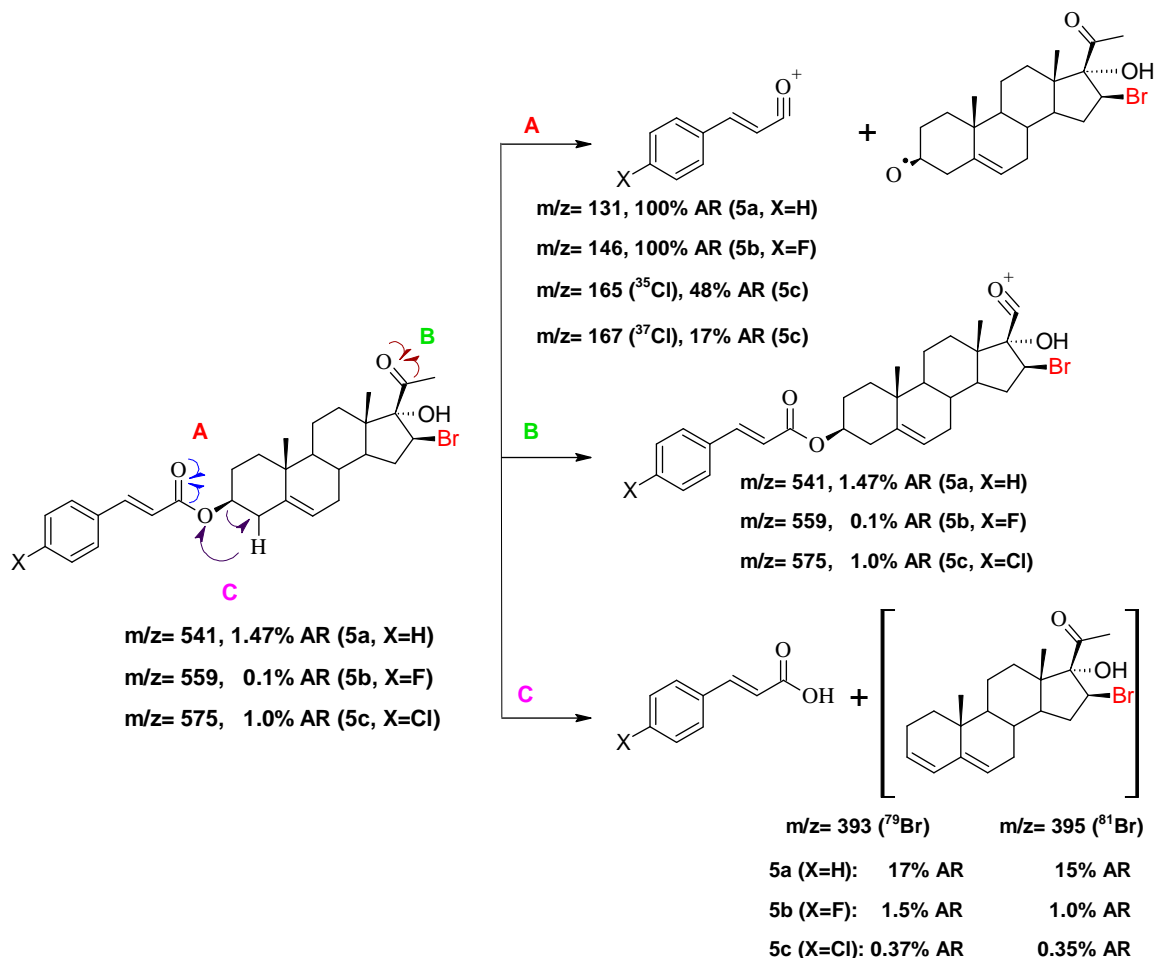
Tabla 6.15. Asignación de los principales fragmentos (m/z) de los derivados **5a-5c**.



6. Resultados y Discusión



Compuesto	5a (X=H)	5b (X=F)	5c (X=Cl)
$[M+1]^+$ (m/z)	542	560	576
% AR	0.6%	0.01%	0.41%
$[M+3]^+$ (m/z)	544	562	578
% AR	0.3%	0.01%	0.41%
$[M+5]^+$ (m/z)	—	—	580
% AR			0.4%
$[X-C_6H_4C=C-CO]^+$			165 (^{35}Cl)
(m/z)	131	149	48%
% AR	100%	100%	167 (^{37}C) 17%
$[C_{21}H_{29}^{79}BrO_2]^+$	393	393	393
% AR	17%	1.5%	0.37%
$[C_{21}H_{29}^{81}BrO_2]^+$	395	395	395
%AR	15%	1.0%	0.35%



Esquema 6.4. Mecanismo de fragmentación de los derivados **4a-4c**.

6.2 Parte Biológica

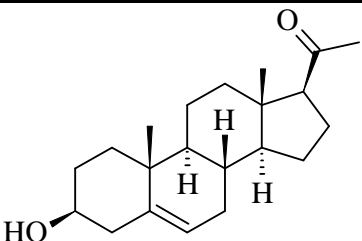
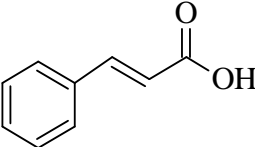
Los ensayos de citotoxicidad, viabilidad del macrófago y actividad antiinflamatoria de los cuatro intermediarios (**serie 3**) así como de los compuestos de la **serie 4** y el compuesto **5b**, se desarrollaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo utilizando el método de Sulfonamida B (SRB) ²⁹ sobre las líneas celulares PC-3, MCF-7 y SKLU-1. El

6. Resultados y Discusión



ensayo de viabilidad de macrófago se desarrolló por el método de MTT^{29, 30} y el ensayo de actividad antiinflamatoria fue desarrollado mediante el ensayo de edema auricular producido por TPA³¹ (D=1µmol/oreja). Los resultados de los ensayos de citotoxicidad y viabilidad del macrófago reportan el promedio de tres experimentos \pm el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$), los resultados del ensayo de actividad antiinflamatoria muestran el promedio de cuatro animales ($\bar{x} \pm EEM$). Todos los resultados de los ensayos están expresados como % de inhibición. Los valores de Log P reportados se calcularon utilizando el programa virtual "Molecular Property Explorer"³².

Tabla 6.16. Actividad citotóxica, viabilidad del macrófago y Log P de la pregnenolona y ácido cinámico.

Compuesto	Log P	% Inhibición (50µM)		
		PC-3	MCF-7	SKLU-1
 Pregnenolona	3.81	24.1±3.0	31.7±5.4	32.6±3.5
 Ácido cinámico	1.63	0.0	0.0	0.0

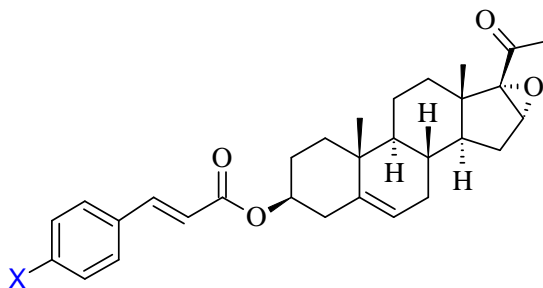
6. Resultados y Discusión



Tabla 6.17. Actividad antiinflamatoria de la pregnenolona y el ácido cinámico.

Compuesto	Pregnenolona	Ácido cinámico
Edema	1.56±0.52	12.88±0.86
% Inhibición	23.70	0.39

Tabla 6.18. Actividad citotóxica, viabilidad del macrófago y Log P de los compuestos **3a-3d**.



Compuesto	Log P	% Inhibición (50µM)			
		PC-3	MCF-7	SKLU-1	MΦ
3a (X=H)	4.84	41.6±5.8	17.1±3.2	23.5 ±6.4	17.6±1.3
3b (X=F)	4.90	46.0±2.6	20.3±4.7	27.2±5.6	22.7±1.3
3c (X=Cl)	5.46	36.2±7.8	16.2±3.6	24.5±3.6	16.4±4.5
3d (X=Br)	5.54	43.8±4.5	14.0±7.2	18.1±4.8	33.9±3.6

PC-3: Cáncer de Próstata, **MCF-7:** Cáncer de mama, **SKLU-1:** Cáncer de pulmón, **MΦ:** Macrófago.

Tabla 6.19. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **3a-3d**.

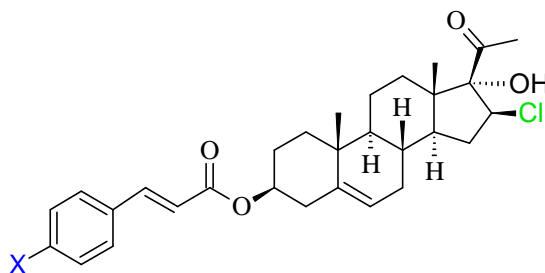
Compuesto	3a (X=H)	3b (X=F)	3c (X=Cl)	3d (X=Br)
Edema	10.63±0.74	11.95±0.37	6.88±1.06	11.28±0.87
% Inhibición	26.47	17.30	50.00	18.00

6. Resultados y Discusión



Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los compuestos **3a-3d**, así como el ácido cinámico y la pregnenolona (Tabla 6.18 y 6.17, respectivamente) en la que se observa la actividad presentada por el ácido cinámico (0.39%) y la pregnenolona (23.70%). Al parecer la sustitución por un halógeno en la posición *para* del éster cinámico en C-3 del esteroide y la presencia del epóxido en C-16 y C-17 es un factor negativo para la actividad antiinflamatoria ya que el compuesto **3a** tiene un 26.47% de inhibición pero cuando se incorporaron los halógenos flúor y bromo dicha actividad cae entre 17.30% y 18.00% respectivamente, la excepción es el compuesto **3c** que contiene el átomo de cloro que aumenta notablemente la actividad antiinflamatoria a un 50.00%.

Tabla 6.20. Actividad citotóxica y Log P de los compuestos **4a-4c**.



Compuesto	Log P	% Inhibición		
		PC-3	MCF-7	SKLU-1
4a (X=H)	5.46	49.6±5.0	71.8±8.8	10.7±0.4
4b (X=F)	5.52	62.7±7.4	87.9 ±12	35.0±4.7
4c (X=Cl)	6.08	42.9±6.3	30.2±6.8	26.3±8.5

Tabla 6.21. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **4a-4c**.

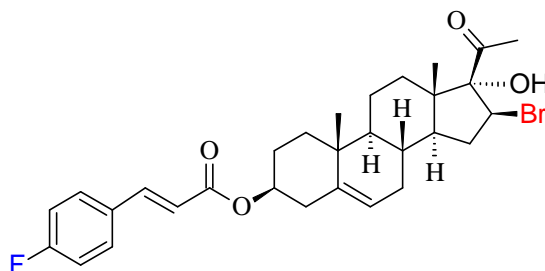
Compuesto	4a (X=H)	4b (X=F)	4c (X=Cl)
Edema	11.10±0.58	3.93±0.47	10.30±0.20
% Inhibición	20.71	71.96	26.43

6. Resultados y Discusión



Los compuestos **4a** y **4b** presentaron un mayor porcentaje de inhibición en la línea celular MCF-7. Comparando con la actividad presentada por la pregnenolona y el ácido cinámico son menores a la de estos derivados (**4a-b**). Al parecer un átomo de cloro en C-16 y el hidroxilo en C-17 es crucial para la actividad biológica de ambos compuestos. Y en comparación con los derivados **3a** y **3b** es notable que el epóxido en C-16 y C-17 es el responsable de no favorecer la actividad citotóxica ni antiinflamatoria. Estos resultados también sugieren que, probablemente, el factor involucrado en la actividad de estos derivados sea de tipo electrónico, ya que el compuesto fluorado (**4b**) que es el átomo más electronegativo entre estos derivados fue quién presentó la mayor actividad en ambos ensayos, sin embargo se requieren de más estudios para poder corroborar esta hipótesis.

Tabla 6.22. Actividad citotóxica y Log P del compuesto **5b**.



Compuesto	Log P	% Inhibición		
		PC-3	MCF-7	SKLU-1
5b (X=F)	5.57	42.3±3.9	25.8±7.7	19.7±3.9

Tabla 6.23. Actividad antiinflamatoria del compuesto **5b**.

Compuesto	5b (X=F)
Edema	1.60±0.50
% Inhibición	88.57

6. Resultados y Discusión



En el caso de este compuesto se observa que la sustitución en C-16 por un átomo de bromo no favorece la actividad biológica de este compuesto, en comparación con el compuesto **4b** que tiene un átomo de cloro en la misma posición, lo que nos indica que posiblemente es un factor estérico el que está involucrado en la actividad de este compuesto al interaccionar con su hipotético sitio receptor. Con respecto a la actividad antiinflamatoria, este compuesto presentó una alta actividad, por lo que nuevamente se sugiere que es el átomo de flúor quién está participando en la actividad de este compuesto. También se observa que en este caso la actividad antiinflamatoria aumenta mientras que la actividad citotóxica disminuye, caso contrario al derivado clorado **4b**.

7. Procedimiento Experimental



7.1 Reactivos y equipo.

Todas las materias primas utilizadas se obtuvieron comercialmente en grado reactivo y se utilizaron sin mayor purificación.

Para la evaporación de los disolventes se empleó un rotaevaporador marca. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (400 MHz) y Varian 300S (75 MHz) respectivamente. Se utilizó tetrametilsilano como referencia interna y como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3); los desplazamientos químicos están dados en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresan como: s= simple, d= señal doble, dd= señal doble de doble, m= señal múltiple.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un aparato Perkin Elmer modelo 1605 en pastilla de KBr. Las unidades se reportan en cm^{-1} .

Los espectros de masas se determinaron por la técnica de ionización de bombardeo de átomos rápidos (FAB por sus siglas en inglés) en un espectrómetro JEOL Sx102 utilizando alcohol 3-nitrobencílico como matriz interna; la introducción de la muestra fue mediante sonda directa. El ion molecular se indica como M^+ . La nomenclatura se indica como m/z = masa/carga con su respectiva abundancia relativa (AR).

7.1.2 Cromatografía.

Los análisis cromatográficos se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice marca Aldrich con 0.2 mm de espesor. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y/o una solución de cloruro de cobalto al 2% en H_2SO_4 2N.

7. Procedimiento Experimental



Los sistemas de elución se muestran en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Sistemas de elución empleados en CCF.

Sistema	Mezcla de disolventes	Proporción
I	Hexano: Acetato de Etilo	6:4
II	Hexano: Acetato de Etilo	8:2
III	Hexano: Acetato de Etilo	7:3

7.2 Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.³³

Los ensayos de citotoxicidad de los cuatro intermediarios (**serie 3**) así como de los compuestos de la **serie 4** y el compuesto **5b**, se desarrollaron en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo utilizando el método de Sulforonamida B (SRB)²⁹ sobre las líneas celulares PC-3, MCF-7 y SKLU-1. Estas células se cultivaron en el medio RPMI-1640, enriquecido con 10% v/v de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de Penicilina G, sulfato de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B y 1% de aminoácidos no esenciales; fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

Posteriormente se tomaron 100 µL del cultivo celular correspondiente, el contenido de células por pozo varía entre 5000 a 10 000 dependiendo del tiempo de duplicación de cada línea celular; se incubó durante 24 horas. Se depositaron Se preparó una solución stock en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada compuesto a evaluar; dicha solución se adicionó a cada pozo de las líneas celulares en 100 µL de medio de cultivo, siendo la concentración final de cada compuesto 50 µM y se incubó por 48 horas (el plato experimental). De manera adicional se preparó otro plato al cuál se le adicionó, únicamente, medio de cultivo; éste se incubó por una hora (plato basal). Ambas incubaciones se realizaron a temperatura de 37°C con 5% de CO₂ 100% de humedad relativa.

7. Procedimiento Experimental



Finalizado el tiempo de incubación se realizó la fijación de los cultivos celulares *in situ* por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (p/v) frío, se incubaron durante una hora a 4°C. El sobrenadante se desechó, se realizaron 5 lavados con agua desionizada y se dejaron secar por 24 horas. Las células fijadas se resuspendieron en solución amortiguadora Tris 10 mM (pH=10) manteniéndolas en agitación por 5 minutos.

Finalmente se determinó la densidad óptica (DO) utilizando un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados del análisis primario muestran porcentaje de inhibición del crecimiento por línea celular ± desviación estándar. El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\%IC = \frac{100 - (DO \text{ muestra})}{(DO \text{ vehículo})} \times 100$$

7.3 Ensayo de viabilidad de macrófago

7.3.1. Aislamiento del cultivo primario de macrófagos murinos.³³

Los macrófagos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones Swiss hembras de peso entre 25-30 g. Bajo condiciones de asepsia, se administraron por vía intraperitoneal 0.5 mL de medio de trioglicolato estéril al 3% p/v. Después de 72 hrs, los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Bajo condiciones de esterilidad, se inyectaron 7 mL de buffer de fosfatos (PBS) en la cavidad peritoneal y se realizó un masaje abdominal vigoroso. Con la ayuda de una jeringa se extrajo el líquido peritoneal, el cual fue depositado en placa de cultivo para favorecer la separación de los macrófagos de otras células del fluido del peritoneo. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante dos horas. Al concluir este tiempo, la placa fue lavada 3 veces con PBS, y con la ayuda de un cosechador de células se procedió al desprendimiento de los macrófagos murinos. La cuenta de los macrófagos se realizó con azul de tripano y de esta manera se

7. Procedimiento Experimental



ajustó la densidad del inóculo a 1.0×10^6 cél/mL en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino. En placas de 96 pozos se depositaron 100 μ L de la suspensión de células, dejándolas en reposo por un lapso de 60 minutos para que los macrófagos se adhieran al sustrato del pozo. Los compuestos de prueba se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) o agua a una concentración de 20 mM. Se agregaron 100 μ L de la solución del compuesto de prueba cuya concentración final en cada pozo correspondió a 50 μ M. Cada compuesto de prueba se agregó en 3 pozos así como su respectivo vehículo, al finalizar se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 horas.

7.3.2. Viabilidad del macrófago.³⁴

La actividad de los compuestos de ensayo sobre la viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico de MTT²⁹ (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5difenitetrazolium bromado). El MTT se preparó en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a una concentración de 5 mg/mL. Se adicionaron 20 μ L/pozo y se incubó durante 4 horas a 37°C con 5% de CO₂. Al finalizar este periodo se descartó el sobrenadante y los cristales de formazán generados en cada pozo, fueron disueltos agregando 100 μ L de DMSO. La placa se mantuvo en agitación durante 10 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de viabilidad se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$Viabilidad = \left(\frac{\text{promedio de absorbancia compuesto de prueba}}{\text{promedio absorbancia vehículo}} \right) \times 100$$

7.4 Actividad antiinflamatoria.³⁰

La actividad antiinflamatoria de los compuestos de la **serie 4** y el compuesto **5b** fue determinada mediante el ensayo de edema auricular producido por TPA. Se emplearon cuatro ratones por muestra. El edema en la oreja derecha de cada animal fue inducido por 2.5 μ g de acetato de tetradecanoilforbol (TPA)

7. Procedimiento Experimental

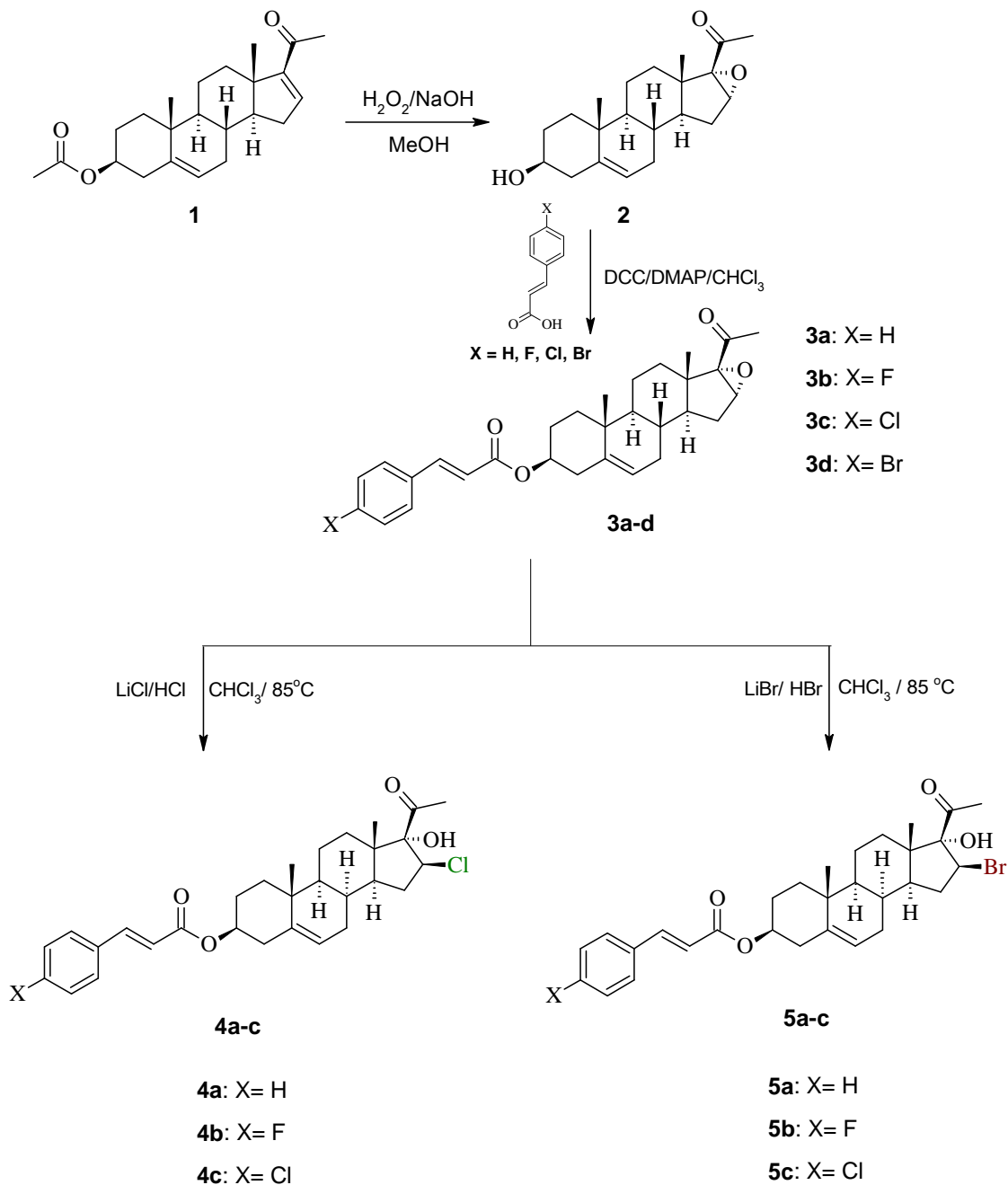


disueltos en etanol. Se aplicaron vía tópica 10 μL de la solución de TPA e inmediatamente se aplicaron 20 μL del compuesto a evaluar. En la oreja izquierda (control) se aplicó el vehículo, 10 μL de etanol al 70% y 20 μL de diclorometano. Transcurridas 4 horas, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO_2 y se procedió a seccionar (7 mm) y pesar la porción central de cada oreja de cada animal. El valor del edema se calculó por diferencia de peso entre las orejas tratadas (derecha) y no tratadas (izquierda), así mismo se expresó el porcentaje de inhibición del edema frente al grupo control (TPA y vehículo). Los datos representan el promedio de cuatro animales \pm el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de t de Student.

7. Procedimiento Experimental



7.5 Descripción de la ruta de síntesis.



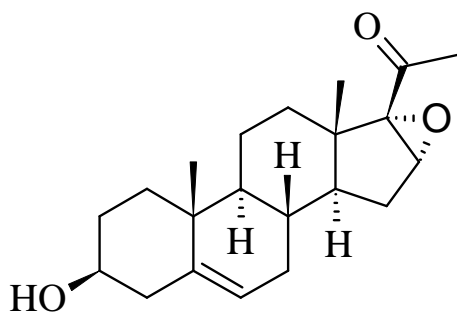
Esquema 7.1. Condiciones de reacción para la obtención de 16-haloderivados de la pregnenolona.

7. Procedimiento Experimental



7.5.1. Método para la obtención de 3 β -hidroxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (2).

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se mezcló con agitación magnética 1g de acetato de 16-deshidropregnenolona (1) en 50 mL de metanol. Posteriormente se agregaron 2 mL de una solución de hidróxido de sodio 4N y 4 mL de una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. Ésta mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Concluido este tiempo se eliminó el exceso de metanol, se agregó hielo a la mezcla, el precipitado obtenido se filtró al vacío, se lavó con agua hasta que las aguas madres tuvieron un pH neutro. Posteriormente éste se recrystalizó con metanol.



Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 96% $R_f=0.45$ (sistema I)

p.f.: 190-192°C

Fórmula molecular: $C_{21}H_{30}O_3$

Peso molecular (uma): 330

IR (KBr, cm^{-1}): 3371 (O-H); 2937 (-C-H); 1692 (C=O cetona); 1376 (C=C); 1056 (C-O)

RMN-¹H ($CDCl_3$, δ ppm): 1.02 (s, 3H) H-18; 1.05 (s, 3H) H-19; 2.03 (s, 3H) H-21; 3.52 (m, 1H) H-3; 3.6 (dd, $J_1=4$ Hz, $J_2=2$ Hz, 1H) H-16; 5.38 (dd, $J_1=4$ Hz, $J_2=2$ Hz, 1H) H-6.

RMN-¹³H ($CDCl_3$, δ ppm): 15.16 (C-18); 19.29 (C-19); 25.96 (C-21); 60.51 (C-16); 71.09 (C-17); 71.61 (C-3); 121.40 (C-6); 141.50 (C-5); 205.3 (C-20).

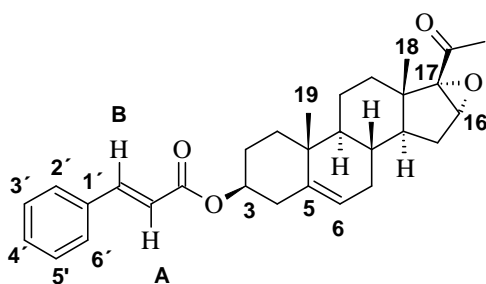
7. Procedimiento Experimental



7.5.2. Método general para la obtención de derivados 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3a-3d).

En un matraz de fondo redondo de 50 mL y con agitación magnética se pesaron 371 mg (1.8 mmoles) de *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), 220 mg (1.8 mmol) de 4-(dimetilamino)piridina y 1.8 mmol del ácido cinámico con el patrón de sustitución deseado y se agregaron 5 mL de cloroformo. Posteriormente se agregaron lentamente 200 mg (0.6 mmol) de 3 β -hidroxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (**2**). La mezcla resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2.5 horas después de las cuales se agregaron 40 mL de acetato de etilo y la mezcla de reacción se dejó en reposo durante una noche. El precipitado blanco obtenido (exceso de DCU) se filtró por gravedad; la fase orgánica se lavó con una solución de ácido clorhídrico al 10% v/v (3x20 mL), solución saturada de bicarbonato de sodio (3x20 mL) y agua (3x20 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el exceso de disolvente a presión reducida obteniendo un sólido el cual se recrystalizó de cloroformo-metanol.

7.5.2.1. 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3a).



Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 67.85% $R_f=0.41$ (sistema II)

p.f= 192-194°C

Fórmula molecular: C₃₀H₃₆O₄

Peso molecular (uma): 460

IR (espectro 1. KBr, cm⁻¹): 3030 (H-C=C-H); 2937 (-C-H); 1710, 1199, 1169 (C=O éster); 1697 (C=O cetona); 1642 (C=C); 1251 (C-O).

RMN-¹H (espectro 2. CDCl₃, δ ppm): 1.05 (s, 3H) H-18; 1.06 (s, 3H) H-19; 2.03 (s, 3H) H-21; 3.68 (s, 1H) H-16; 4.74 (m, 1H) H-3; 5.40 (d, $J=5.0$ Hz, 1H) H-6; 6.44 (d,

7. Procedimiento Experimental



$J = 16$ Hz, 1H) H-A; 7.37 (m, 3H) H-3',H-4',H-5'; 7.52 (dd, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.65 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-B.

RMN-¹³C (espectro 3. CDCl₃, δ ppm): 15.24 (C-18); 19.34 (C-19); 60.55 (C-16); 71.07 (C-3); 73.95 (C-17); 118.70 (C-A); 122.06 (C-6); 128.08 (C-2',C-6'); 128.91 (C-3',C-5'); 130.21 (C-4'); 134.57 (C-1'); 140.12 (C-5); 144.50 (C-B); 166.39 (C=O); 204.96 (C-20).

EM (FAB m/z): 461 [M+1]⁺, 1.4% AR; 131 [C₆H₅C=C-CO]⁺, 100% AR.

7.5.2.2. 3 β -[(4-fluoro)-cinamoil-oxi]-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3b).

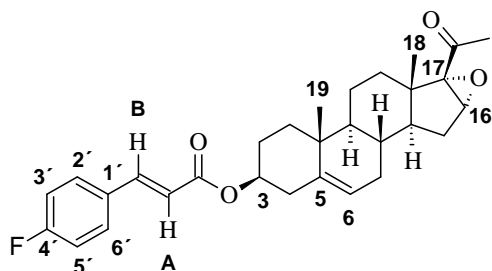
Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 60.88% $R_f = 0.43$ (sistema II)

p.f. = 188-189°C

Fórmula molecular: C₃₀H₃₅FO₄

Peso molecular (uma): 478



IR (espectro 4. KBr, cm⁻¹): 3020 (H-C=C-H); 2939 (-C-H); 1704, 1199, 1169 (C=O éster); 1639 (C=C); 1246 (C-O).

RMN-¹H (espectro 5. CDCl₃, δ ppm): 1.06 (s, 6H) H-18, H-19; 2.03 (s, 3H) H-21; 3.68 (s, 1H) H-16; 4.74 (m, 1H) H-3; 5.39 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H) H-6; 6.34 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-A; 7.07 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.50 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.62 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-B.

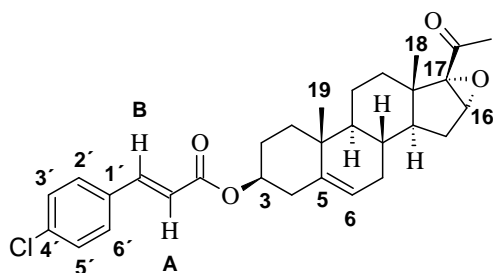
RMN-¹³C (espectro 6. CDCl₃, δ ppm): 15.33 (C-18); 19.42 (C-19); 60.64 (C-16); 71.16 (C-3); 74.11 (C-17); 116.04, 116.26 (C-3',C-5'); 118.52, 118.54 (C-A); 122.19 (C-6); 129.97, 130.06 (C-2',C-6'); 130.88, 130.91 (C-1'); 140.17 (C-5); 143.28 (C-B); 162.72, 165.22 (C-4'); 166.36 (C=O); 206.07 (C-20).

7. Procedimiento Experimental



EM (FAB m/z): 479 $[M+1]^+$, 0.5% AR; 149 $[F-C_6H_4C=C-CO]^+$, 30% AR.

7.5.2.3. 3β -[(4-cloro)-cinamoil-oxi]-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3c).



Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 42.78% $R_f=0.43$ (sistema II)

p.f= 252-253°C

Fórmula molecular: $C_{30}H_{35}ClO_4$

Peso molecular (uma): 495

IR (espectro 7. KBr, cm^{-1}): 3019 (H-C=C-H); 2941 (-C-H); 1704, 1202, 1174 (C=O éster); 1634 (C=C); 1245 (C-O).

RMN- 1H (espectro 8. $CDCl_3$, δ ppm): 1.06 (s, 6H) H-18, H-19; 2.03 (s, 3H) H-21; 3.68 (s, 1H) H-16; 4.73 (m, 1H) H-3; 5.38 (d, $J=4.9$ Hz, 1H) H-6; 6.39 (d, $J=16$ Hz, 1H) H-A; 7.35 (d, $J=8.5$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.45 (d, $J=8.5$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.61 (d, $J=16$ Hz, 1H) H-B.

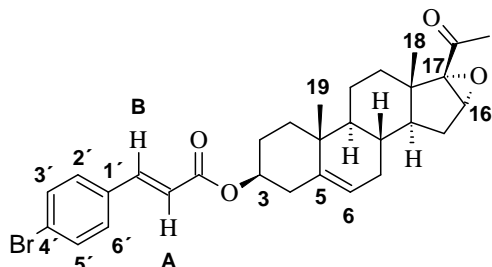
RMN- ^{13}C (espectro 9. $CDCl_3$, δ ppm): 15.34 (C-18); 19.43 (C-19); 60.64 (C-16); 71.16 (C-3); 74.19 (C-17); 119.39 (C-A); 122.23 (C-6); 129.30, 129.32 (C-2',C-3',C-5',C-6'); 133.15 (C-1'); 136.22 (C-4'); 140.14 (C-5); 143.13 (C-B); 166.23 ($\underline{C}OOR$); 206.06 (C-20).

EM (FAB m/z): 496 $[M+1]^+$, 0.8% AR; 498 $[M+3]^+$, 0.3% AR; 165 $[^{35}Cl-C_6H_4C=C-CO]^+$, 20% AR; 167 $[^{37}Cl-C_6H_4C=C-CO]^+$, 9.0% AR.

7. Procedimiento Experimental



7.5.2.4. 3 β -[(4-bromo)-cinamoil-oxi]-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3d).



Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 55.33% $R_f=0.43$ (sistema II)

p.f= 255-256°C

Fórmula molecular: C₃₀H₃₅BrO₄

Peso molecular (uma): 539

IR (espectro 10. KBr, cm⁻¹): 3020 (H-C=C-H); 2941 (-C-H)); 1704, 1202, 1174 (C=O éster); 1635 (C=C); 1245 (C-O); 496 (Br).

RMN-¹H (espectro 11. CDCl₃, δ ppm): 1.06 (s, 6H) H-18, H-19; 2.02 (s, 3H) H-21; 3.67 (s, 1H) H-16; 4.74 (m, 1H) H-3; 5.39 (d, $J=5.1$ Hz, 1H) H-6; 6.39 (d, $J=16$ Hz, 1H) H-A; 7.37 (t, $J=5.3$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.51 (dd $J_1=8.7$ Hz, $J_2=2.1$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.61 (d, $J=16$ Hz, 1H) H-B.

RMN-¹³C (espectro 12. CDCl₃, δ ppm): 15.01 (C-18); 19.10 (C-19); 60.32 (C-16); 70.83 (C-3); 73.89 (C-17); 119.18 (C-A); 121.91 (C-6); 124.23 (C-4'); 129.22 (C-2', C-6'); 131.94 (C-3',C-5'); 133.25 (C-1'); 139.81 (C-5); 142.87 (C-B); 165.89 (C=O); 204.74 (C-20).

EM (FAB m/z): 541 [M+1]⁺, 1.0% AR; 543 [M+3]⁺, 0.6% AR; 209 [⁷⁹Br-C₆H₄C=C-CO]⁺, 21% AR; 211 [⁸¹Br-C₆H₄C=C-CO]⁺, 20% AR.

7.5.3. Método general para la obtención de derivados 16 β -Cl-3 β -(cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (4a-4c).

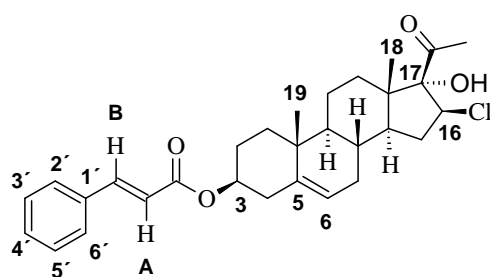
En un matraz de fondo redondo de 10 mL se mezclaron 0.2 mmol del derivado 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona con el patrón de sustitución deseado, 87 mg (1.0 mmol) de bromuro de litio y 2 mL de cloroformo. Posteriormente se agregaron gota a gota 2 mL (21.4 mmol) de ácido bromhídrico

7. Procedimiento Experimental



al 48%. La solución obtenida se mantuvo en agitación bajo una temperatura de 85°C durante 24 horas. Concluido este tiempo, a la mezcla se le agregó solución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH neutro. La fase orgánica se extrajo con cloroformo y se secó con sulfato de sodio anhidro. El exceso de disolvente fue eliminado a presión reducida obteniendo un sólido ligeramente amarillo el cual se lavó con hexano- acetato de etilo.

7.5.3.1. 16β-Cloro-3β-(cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona (4a).



Aspecto: sólido compacto color blanco.

Rendimiento: 37.06% $R_f=0.51$ (sistema III)

p.f= 212-213°C

Fórmula molecular: $C_{30}H_{37}ClO_4$

Peso molecular (uma): 497

IR (espectro 13. KBr, cm^{-1}): 3387 (O-H); 3028 (H-C=C-H); 2932 (-C-H); 1712, 1205, 1172 (C=O éster); 1682 (C=O cetona); 1630 (C=C).

RMN-¹H (espectro 14. $CDCl_3$, δ ppm): 1.08 (s, 3H) H-18; 1.24 (s, 3H) H-19; 2.41 (s, 3H) H-21; 3.42 (s, intercambia con D_2O , 1H) O-H; 4.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16; 4.75 (m, 1H) H-3; 5.40 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H) H-6; 6.42 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-A; 7.38 (m, 3H) H-3',H-4',H-5'; 7.52 (dd, $J_1=6.4$ Hz, $J_2=2.7$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.67 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-B.

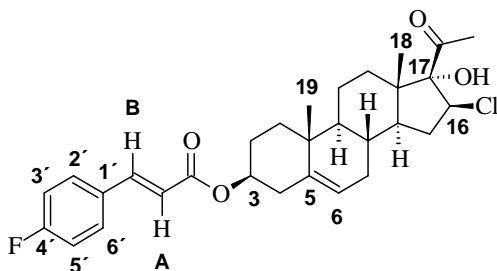
RMN-¹³C (espectro 15. $CDCl_3$, δ ppm): 15.83 (C-18); 19.50 (C-19); 63.22 (C-16); 74.04 (C-3); 90.27 (C-17); 118.73 (C-A); 122.18 (C-6); 128.19 (C-2',C-6'); 129.02 (C-3',C-5'); 130.36 (C-4'); 134.63 (C-1'); 139.93 (C-5); 144.71 (C-B); 166.58 (C=O); 206.64 (C-20).

7. Procedimiento Experimental



EM (FAB m/z): 498 [M+1]⁺, 1.0% AR; 500 [M+3]⁺, 0.4% AR; 349 [C₂₁H₂₉³⁵ClO₂]⁺, 22% AR; 351 [C₂₁H₂₉³⁷ClO₂]⁺, 7% AR; 131 [C₆H₅C=C-CO]⁺, 100% AR.

7.5.3.2. 16β-Cloro-3β-(4-fluoro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona (4b).



Aspecto: sólido compacto color blanco.

Rendimiento: 48.33% $R_f = 0.53$ (sistema III)

p.f= 198-199°C

Fórmula molecular: C₃₀H₃₆ClFO₄

Peso molecular (uma): 515

IR (espectro 16. KBr, cm⁻¹): 3387 (O-H); 2942 (-C-H); 1712, 1200 (C=O éster); 1683 (C=O cetona); 1638 (C=C).

RMN-¹H (espectro 17. CDCl₃, δ ppm): 1.07 (s, 3H) H-18; 1.24 (s, 3H) H-19; 2.41 (s, 3H) H-21; 3.36 (s, intercambia con D₂O, 1H) O-H; 4.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16; 4.75 (m, 1H) H-3; 5.40 (d, $J=4.7$ Hz, 1H) H-6; 6.36 (d, $J=16$ Hz, 1H) H-A; 7.07 (t, $J=8.6$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.51 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=5.4$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.63 (d, $J=16$ Hz, 1H) H-B.

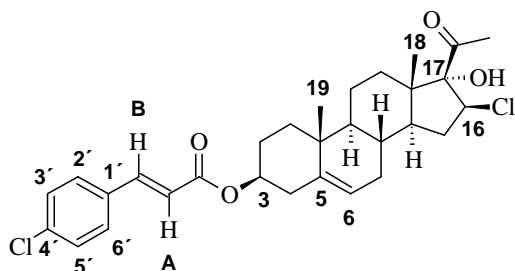
RMN-¹³C (espectro 18. CDCl₃, δ ppm): 15.85 (C-18); 19.49 (C-19); 63.21(C-16); 74.09 (C-3); 90.29 (C-17); 116.06, 116.28 (C-3',C-5'); 118.48 (C-A); 122.22 (C-6); 129.99, 130.07 (C-2',C-6'); 130.86 (C-1'); 139.89 (C-5); 143.38 (C-B); 162.75, 166.25 (C-4'); 166.43 (C=O); 206.67 (C-20).

EM (FAB m/z): 516 [M+1]⁺, 1.0% AR; 518 [M+3]⁺, 0.5% AR; 349 [C₂₁H₂₉³⁵ClO₂]⁺, 41% AR; 351 [C₂₁H₂₉³⁷ClO₂]⁺, 15% AR; 149 [F-C₆H₄C=C-CO]⁺, 96% AR.

7. Procedimiento Experimental



7.5.3.3. 16β-Cloro-3β-(4-cloro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona (4c).



Aspecto: sólido compacto color blanco.

Rendimiento: 63.33% $R_f=0.51$ (sistema III)

p.f.=210-212°C

Fórmula molecular: $C_{30}H_{36}Cl_2O_4$

Peso molecular (uma): 531

IR (espectro 19. KBr, cm^{-1}): 3399 (O-H); 2924 (-C-H); 1715,1202 (C=O éster); 1687 (C=O cetona); 1635 (C=C).

RMN-¹H (espectro 20. $CDCl_3$, δ ppm): 1.07 (s, 3H) H-18; 1.24 (s, 3H) H-19; 2.41 (s, 3H) H-21; 3.36 (s, intercambia con D_2O , 1H) O-H; 4.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16; 4.74 (m, 1H) H-3; 5.40 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H) H-6; 6.39 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-A; 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.61 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-B.

RMN-¹³C (espectro 21. $CDCl_3$, δ ppm): 15.85 (C-18); 19.49 (C-19); 63.21 (C-16); 74.18 (C-3); 90.29 (C-17); 119.33 (C-A); 122.24 (C-6); 129.31 (C-2',C-3',C-5',C-6'); 133.12 (C-1'); 136.27 (C-4'); 139.86 (C-5); 143.23 (C-B); 166.30 ($\underline{C}OOR$); 206.66 (C-20).

EM (FAB m/z): 532 $[M+1]^+$, 0.9% AR; 534 $[M+3]^+$, 1.1% AR; 349 $[C_{21}H_{29}^{35}ClO_2]^+$, 1.6% AR; 351 $[C_{21}H_{29}^{37}ClO_2]^+$, 0.7% AR; 165 $[^{35}Cl-C_6H_4C=C-CO]^+$, 11% AR; 167 $[^{37}Cl-C_6H_4C=C-CO]^+$, 4% AR.

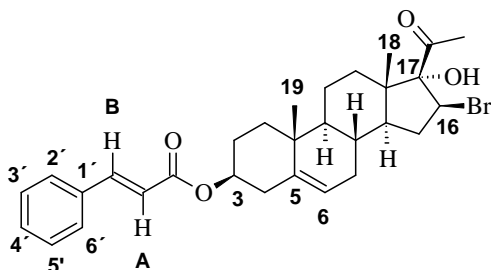
7. Procedimiento Experimental



7.5.4 Método general para la obtención de derivados 16 β -Br-3 β -(cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (5a-5c).

En un matraz de fondo redondo de 10 mL se mezclaron 0.2 mmol del derivado 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona con el patrón de sustitución deseado, 42 mg (1.0 mol) de cloruro de litio y 2 mL de cloroformo. Posteriormente se agregó gota a gota 1 mL (11.8 mmol) de ácido clorhídrico al 36 % v/v. La solución obtenida se mantuvo en agitación bajo una temperatura de 85°C durante 24 horas. Concluido este tiempo, a la mezcla se le agregó solución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH neutro. La fase orgánica se extrajo con cloroformo y se secó con sulfato de sodio anhidro. El exceso de disolvente fue eliminado a presión reducida obteniendo un sólido ligeramente amarillo el cual se lavó con hexano-acetato de etilo.

7.5.4.1. 16 β -Bromo-3 β -(cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (5a).



Aspecto: sólido compacto color beige

Rendimiento: 52.38% $R_f=0.52$ (sistema III)

p.f= 204-205°C

Fórmula molecular: C₃₀H₃₇BrO₄

Peso molecular (uma): 541

IR (espectro 22. KBr, cm⁻¹): 3386 (O-H); 2936-2829 (-C-H); 1710, 1204 (C=O éster); 1680 (C=O cetona); 1641 (C=C).

RMN-¹H (espectro 23. CDCl₃, δ ppm): 1.08 (s, 3H) H-18; 1.30 (s, 3H) H-19; 2.43 (s, 3H) H-21; 3.31 (s, intercambia con D₂O, 1H) O-H; 4.11 (dd, $J_1= 8.2$, $J_2= 6.6$ Hz, 1H) H-16; 4.75 (m, 1H) H-3; 5.40 (d, $J= 4.7$ Hz, 1H) H-6; 6.42 (d, $J= 16$ Hz, 1H) H-A; 7.38 (dd, $J_1= 6.4$, $J_2= 2.7$ Hz, 3H) H-3',H-4',H-5'; 7.52 (dd, $J_1= 6.7$, $J_2= 2.9$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.67 (d, $J= 16$ Hz, 1H) H-B.

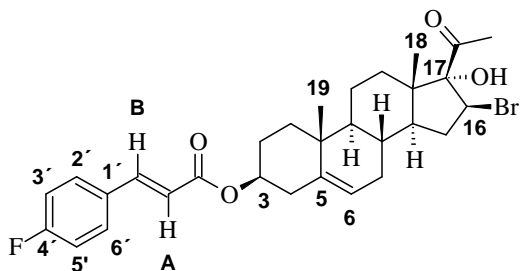
7. Procedimiento Experimental



RMN-¹³C (espectro 24. CDCl₃, δ ppm): 16.31 (C-18); 19.750 (C-19); 51.87 (C-16); 74.05 (C-3); 89.88 (C-17); 118.72 (C-A); 122.17 (C-6); 128.19 (C-2',C-6'); 129.02 (C-3',C-5'); 130.37 (C-4'); 134.62 (C-1'); 139.92 (C-5); 144.73 (C-B); 166.59 (COOR); 206.40 (C-20).

EM (FAB m/z): 542 [M+1]⁺, 0.6% AR; 544 [M+3]⁺, 0.3% AR; 393 [C₂₁H₂₉⁷⁹BrO₂]⁺, 17% AR; 395 [C₂₁H₂₉⁸¹BrO₂]⁺, 15% AR; 131 [C₆H₅C=C-CO]⁺, 100% AR.

7.5.4.2. 16β-Bromo-3β-(4-fluoro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona (5b).



Aspecto: sólido compacto color beige.

Rendimiento: 39.33% $R_f = 0.51$ (sistema III)

p.f = 192-194°C

Fórmula molecular: C₃₀H₃₆BrFO₄

Peso molecular (uma): 559

IR (espectro 25. KBr, cm⁻¹): 3377 (O-H); 2940 (-C-H); 1711, 1199 (C=O éster); 1694 (C=O cetona); 1638 (C=C).

RMN-¹H (espectro 26. CDCl₃, δ ppm): 1.07 (s, 3H) H-18; 1.30 (s, 3H) H-19; 2.43 (s, 3H) H-21; 3.30 (s, intercambia con D₂O, 1H) O-H; 4.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16; 4.73 (m, 1H) H-3; 5.40 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H) H-6; 6.36 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-A; 7.07 (t, $J = 8.04$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.50 (m, 2H) H-2',H-6'; 7.60 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-B.

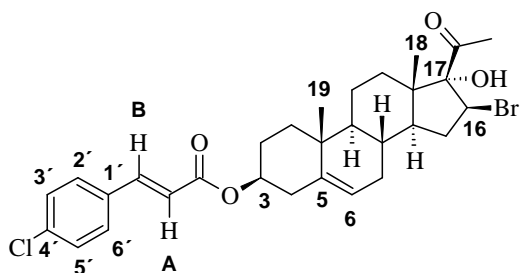
RMN-¹³C (espectro 27. CDCl₃, δ ppm): 16.31 (C-18); 19.49 (C-19); 50.39 (C-16); 74.10 (C-3); 89.87 (C-17); 116.07, 116.28 (C-3',C-5'); 118.48 (C-A); 122.20 (C-6); 129.99, 130.08 (C-2',C-6'); 130.84, 130.88 (C-1'); 139.88 (C-5); 143.41 (C-B); 162.76, 166.25 (C-4'); 166.45 (COOR); 206.41 (C-20).

7. Procedimiento Experimental



EM (FAB m/z): 560 $[M+1]^+$, 0.01% AR; 562 $[M+3]^+$, 0.01% AR; 393 $[C_{21}H_{29}^{79}BrO_2]^+$, 1.5% AR; 395 $[C_{21}H_{29}^{81}BrO_2]^+$, 1.0% AR; 149 $[F-C_6H_4C=C-CO]^+$, 100% AR.

7.5.4.3. 16 β -Bromo-3 β -(4-cloro-cinamoil-oxi)-17 α -hidroxi-5-pregnen-20-ona (5c).



Aspecto: Sólido compacto color blanco.

Rendimiento: 42.90% $R_f = 0.51$ (sistema III)

p.f = 210-211°C

Fórmula molecular: $C_{30}H_{36}BrClO_4$

Peso molecular (uma): 575

IR (espectro 28. KBr, cm^{-1}): 3412 (O-H); 2949 (-C-H); 1714, 1190 (C=O éster); 1704 (C=O cetona); 1640 (C=C).

RMN- 1H (espectro 29. $CDCl_3$, δ ppm): 1.07 (s, 3H) H-18; 1.30 (s, 3H) H-19; 2.43 (s, 3H) H-21; 3.27 (s, intercambia con D_2O , 1H) O-H; 4.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H) H-16; 4.75 (m, 1H) H-3; 5.41 (s, 1H) H-6; 6.41 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-A; 7.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.59 (d, $J = 16$ Hz, 1H) H-B.

RMN- ^{13}C (espectro 30. $CDCl_3$, δ ppm): 16.34 (C-18); 20.03 (C-19); 50.39 (C-16); 74.17 (C-3); 89.89 (C-17); 119.35 (C-A); 122.22 (C-6); 129.33 (C-2',C-3',C-5',C-6'); 133.13 (C-1'); 136.27 (C-4'); 139.87 (C-5); 143.23 (C-B); 166.29 ($\underline{C}OOR$); 206.43 (C-20).

EM (FAB m/z): 576 $[M+1]^+$, 0.41% AR; 578 $[M+3]^+$, 0.41%; 580 $[M+5]^+$, 0.4%; 393 $[C_{21}H_{29}^{79}BrO_2]^+$, 0.35% AR; 395 $[C_{21}H_{29}^{81}BrO_2]^+$, 0.37% AR; 165 $[^{35}Cl-C_6H_4C=C-CO]^+$, 48% AR; 167 $[^{37}Cl-C_6H_4C=C-CO]^+$, 17% AR.



7.5.5 Método general para la obtención de derivados 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona mediante el uso de microondas (3a-3c).

En un tubo de precipitados de 10 mL se mezclaron 50 mg (0.2 mmol) de 3 β -hidroxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (2), 25 mg (0.1 mmol) de ácido p-toluensulfónico (APTS), 0.4 mmol de ácido cinámico con el patrón de sustitución deseado y 0.5 mL de cloroformo. El tubo con la mezcla de reacción se colocó dentro del horno de microondas y se hizo reaccionar, con agitación constante, bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 100°C

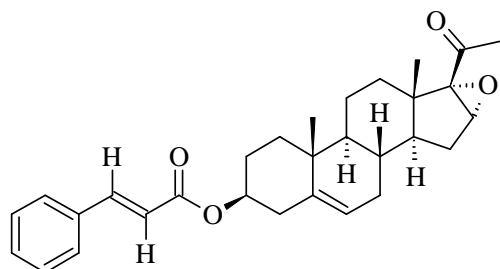
Potencia: 70 W

Presión: 250 psi

Tiempo: 40 min.

Concluido este tiempo, la solución café obtenida se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH neutro y con agua destilada. La fase orgánica se extrajo con cloroformo (3x10 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por sistema de presión reducida. El sólido beige obtenido se recristalizó de cloroformo-metanol.

7.5.5.1. 3 β -(cinamoil-oxi)-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (3a).



Aspecto: sólido blanco cristalino.

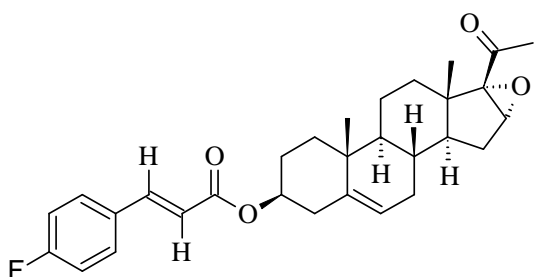
Rendimiento: 40.31%

Fórmula molecular: C₃₀H₃₆O₄

7. Procedimiento Experimental



7.5.5.2. 3β-[(4-fluoro)-cinamoil-oxi]-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (3b).

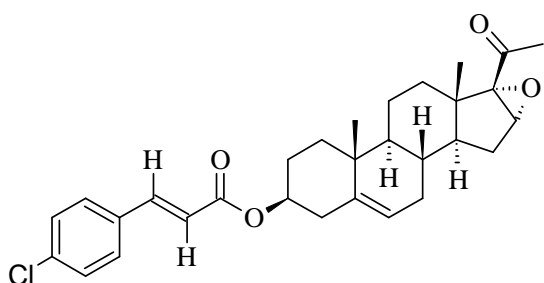


Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 51.02%

Fórmula molecular: C₃₀H₃₅FO₄

7.5.5.3. 3β-[(4-cloro)-cinamoil-oxi]-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (3c).



Aspecto: sólido blanco cristalino.

Rendimiento: 20.22%

Fórmula molecular: C₃₀H₃₅ClO₄

7.5.6. Método para la obtención de 16β-Cloro-3β-(4-cloro-cinamoil-oxi)-17α-hidroxi-5-pregnen-20-ona (4c).

En un tubo de precipitados de 10 mL se mezclaron 50 mg (0.1 mmol) de 3β-[(4-cloro)-cinamoil-oxi]-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (3c), 0.1 mL de anhídrido acético y 0.1 mL de ácido clorhídrico al 36%. Este tubo se colocó dentro del horno de microondas y se hizo reaccionar bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 100°C

Potencia: 70 W

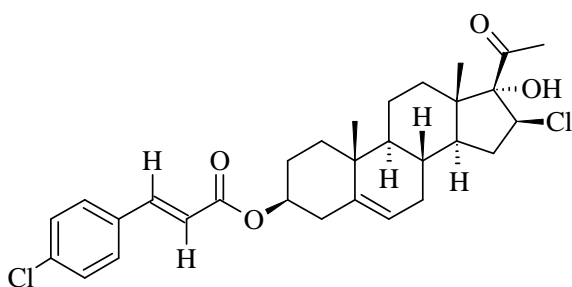
Tiempo: 35 min.

Concluido este tiempo, al sólido obtenido se le agregó 1 mL de acetato de etilo y se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio hasta pH neutro y con agua destilada. La fase orgánica se extrajo, se secó con sulfato de sodio

7. Procedimiento Experimental



anhidro y se eliminó el exceso de disolvente por sistema de presión reducida obteniendo un sólido ligeramente amarillo, el cual se lavó de hexano-acetato de etilo.



Aspecto: sólido compacto color blanco.

Rendimiento: 65%

Fórmula molecular: $C_{30}H_{36}Cl_2O_4$

8. Conclusiones



- Se incorporaron, mediante una reacción de esterificación, derivados del ácido cinámico sustituido con átomos de halógenos (F, Cl, Br) en la posición *para*, en la posición 3 del derivado de pregnenolona.
- Se incorporaron, mediante una sustitución nucleofílica bimolecular, átomos de halógeno (Cl, Br) en la posición 16 del derivado de pregnenolona.
- Los compuestos intermediarios (**3a-3d**) y finales (**serie 4 y 5**) fueron caracterizados por sus constantes físicas (punto de fusión y R_f), espectroscópicas (IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) y espectrométricas (espectrometría de masas).
- Fue posible evaluar la actividad citotóxica y antiinflamatoria de todos los compuestos, observando que el átomo de flúor sustituido en posición *para* en el ácido cinámico juega un papel importante en la actividad biológica de estos novedosos 16-haloderivados de la pregnenolona.
- El átomo de cloro en la posición 16 del núcleo de pregnenolona también confiere actividad biológica a la molécula.
- La actividad biológica de las moléculas sintetizadas no depende del Log P de las mismas.

9. Bibliografía

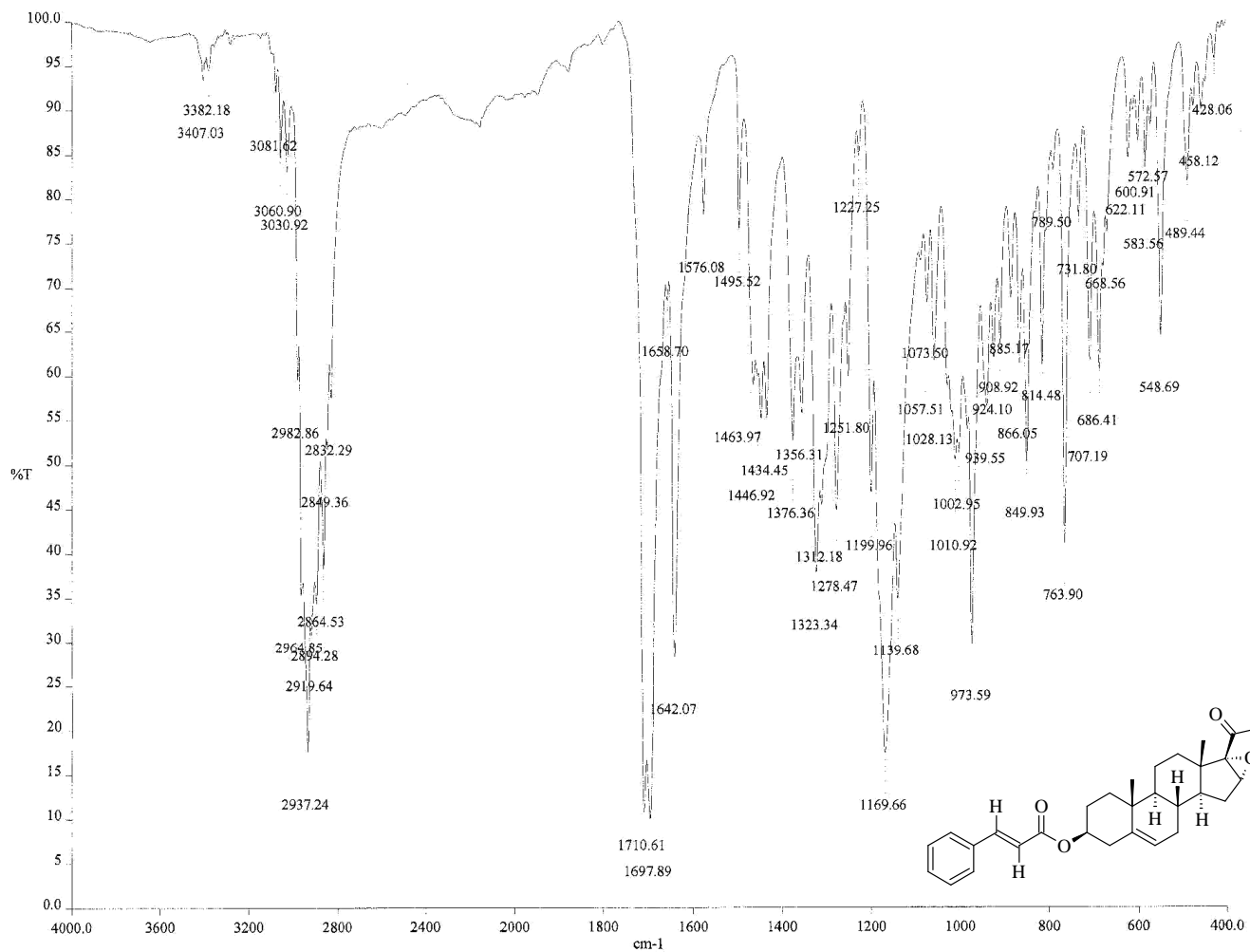


1. Segura Moctezuma, Tania. Síntesis de ésteres derivados de la progesterona con átomo de halógeno en C-4. Tesis de Maestría, UNAM, México (2008).
2. Cruz Hernández, Ángel Alejandro. Síntesis de derivados de la progesterona con un grupo éster en C-3 como antiandrógenos. Tesis de Licenciatura, UNAM, México (2006).
3. Drug Bank, página web consultada en <http://www.drugbank.ca/> el 17 de julio de 2012
4. La página de bioquímica médica, página web consultada en <http://themedicalbiochemistrypage.org/> el 17 de julio de 2012
5. Lupulescu, AP. *Cancer*. American Cancer Society (1996) 78, 2264-2280.
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), página web consultada en <http://www.inegi.org.mx/> el 23 de junio de 2012
7. Coordinación de la Investigación Científica (CIC), página web consultada en <http://www.cicctic.unam.mx/> el 23 de junio de 2012
8. Organización Mundial de la Salud (OMS), página web consultada en <http://www.who.int/> el 23 de junio de 2012
9. National Center Institute (NCI), página web consultada en <http://www.cancer.gov/> el 23 de junio de 2012
10. Avendaño C, Menéndez, JC. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Elsevier, España (2008) páginas 1, 2.
11. Oliveira, PA., Colaco, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De la Cruz, LF. & Lopes, C. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* (2007) 79 (4), 593-616.
12. Cortés Benítez, Juan Francisco. Síntesis de nuevos derivados de imidazol[4,5-b]quinolina como potenciales antitumorales. Tesis de Licenciatura, UNAM, México (2010).
13. Kundu, JK., Suhr, Y-J. *Free Radical Biology & Medicine* (2012) 52, 2013-2037.
14. Sung, B., Prasad, S., Vivek, R.Y., Lavasanifar, A., Aggarwal, B.B. *Free Radical Research* (2011) 45 (8), 864-879.
15. Del Prette, A., Allavena, P., Santoro, G., Fumarulo, R., Corsi, MM., Mantovani, A., *Biochimica Medica* (2011) 21 (3), 264-275.
16. Adzic, M., Niciforovic, A., Vucic, V. et.al. *Redox Report* (2006) 11 (1), 39-44.
17. Tan, AC., Konezak, I., Sze, DM-Y., Ramzan, I., *Nutrition and Cancer* (2010) 63 (4), 495-505.
18. Tamimi, RM., Lagiou, P., Adami, HO., Trichopoulos, D., *Journal of Internal Medicine* (2002) 251, 286-300.
19. Agadzhanian, VS., Oganessian, ET., Abaev, VT. *Pharmaceutical Chemistry Journal* (2010) 44 (7), 21-26.
20. Reiko Nagasaka, Chatchawan Chotimarkorn, et.al. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007) 358, 615-619.
21. Ekmekcioglu, C., Feyertag, J., Marktl, W. *Cancer Letters* (1998) 128, 137-144.
22. Patrick, GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4a edición. Oxford University Press. Gran Bretaña (2009). p. 213-219, 222, 252.

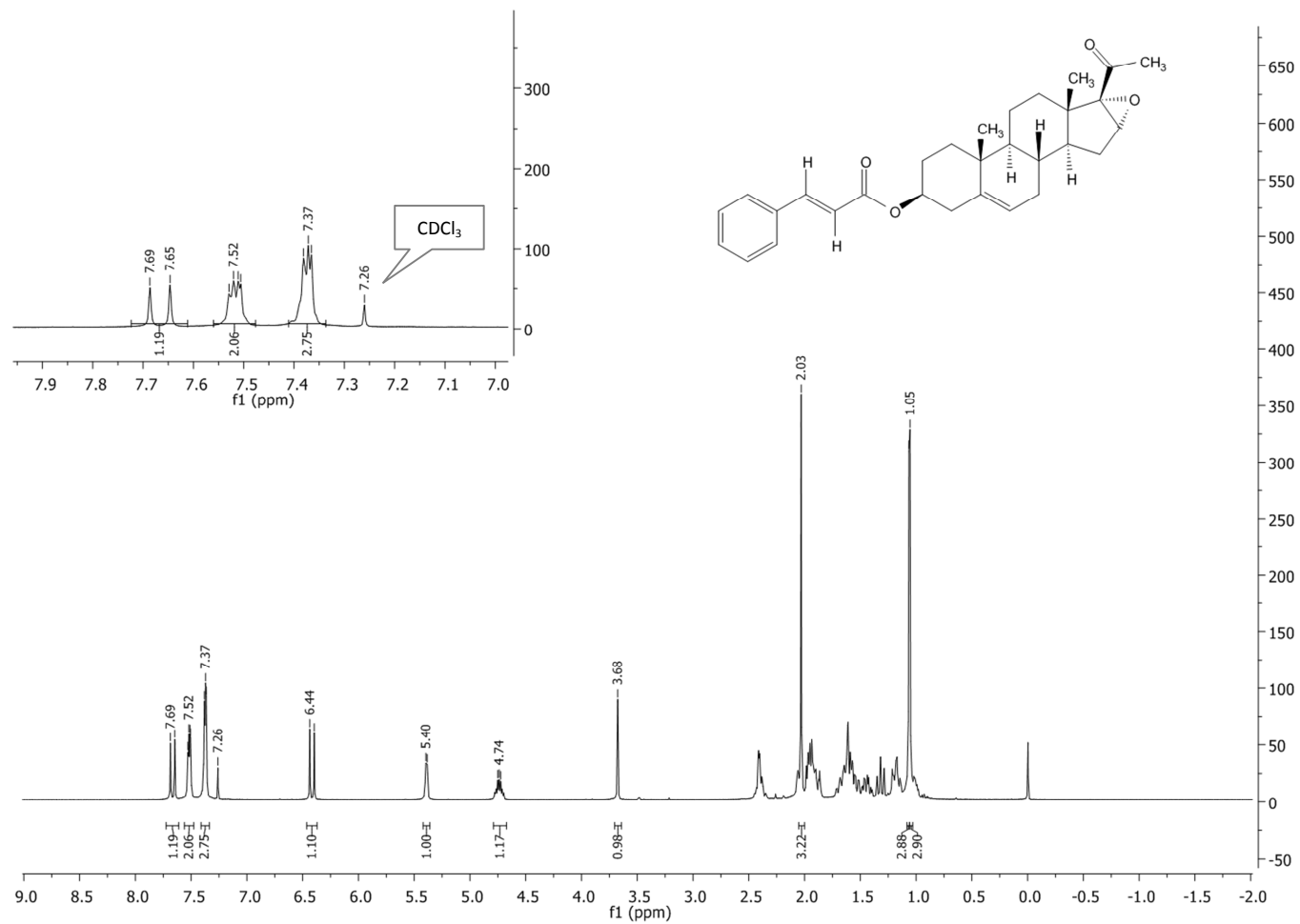
9. Bibliografía



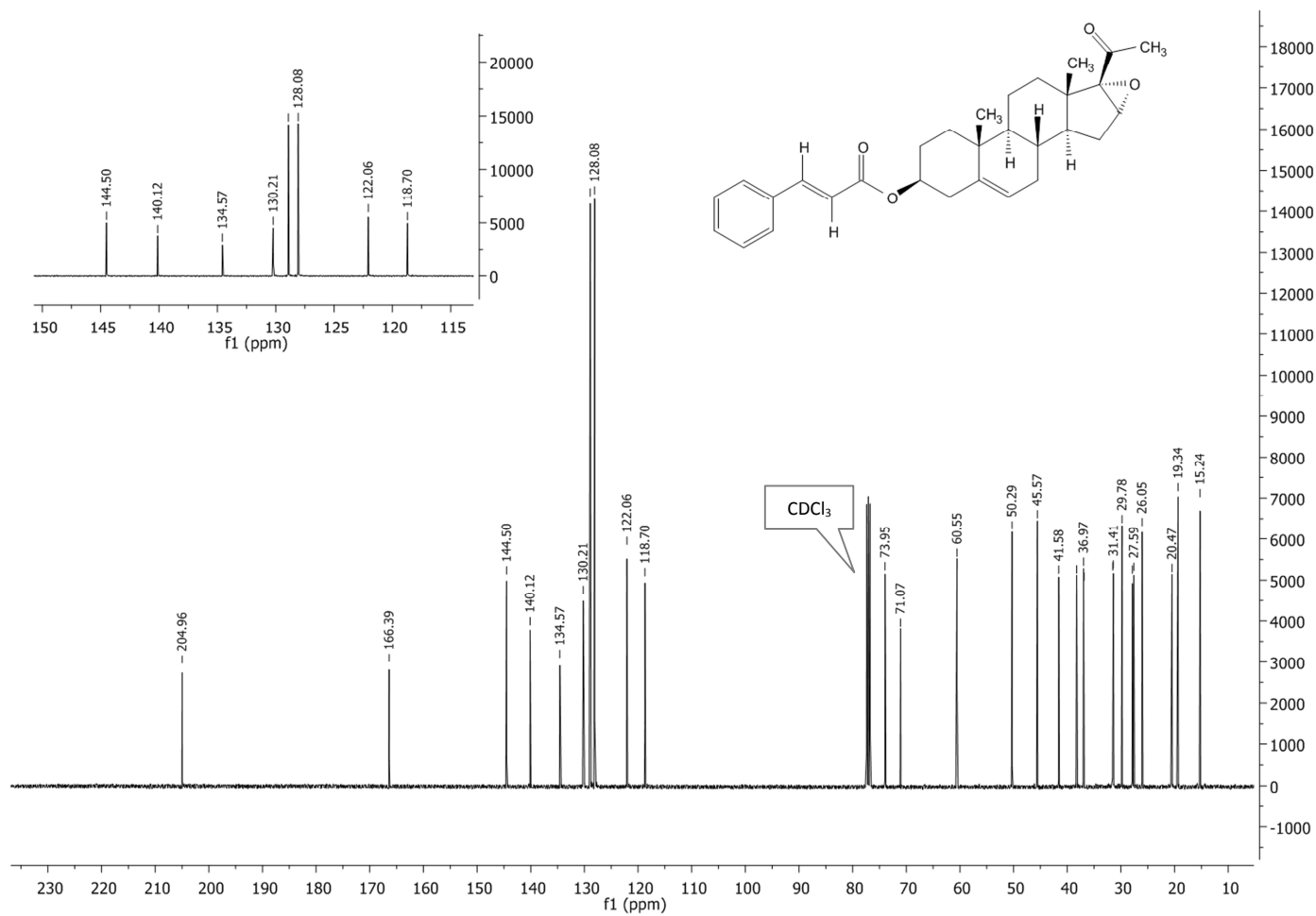
23. Galbis Pérez, JA. *Panorama Actual de la Química Farmacéutica*. 2a edición. Universidad de Sevilla **(2004)**, p. 265-266.
24. Bautista Redonda, Emmanuel Baruch. Síntesis de ésteres en C-17, derivados de la progesterona con actividad antiandrógena. Tesis de Licenciatura, UNAM, México **(2010)**.
25. Hayes, BL. *Microwave Synthesis, Chemistry at the Speed of Light*. CEM Publishing, USA **(2002)**, p. 15-19, 24-26, 29-36, 83-88, 91-96.
26. Xinzhong Li, Wumanjiang Eli, Gang Li. *Catalysis Communications* **(2008)** 9, 2264–2268.
27. Ramírez López, Elena Guadalupe. Síntesis de 17 α -aciloiloxi derivados del pregnano con un sustituyente en C-16- β como antiandrógenos. Tesis de Doctorado, UNAM, México **(2002)**.
28. Rojas Arenas, Rosa Arely. Síntesis de ésteres halogenados de pregnadieno con un grupo metilo en C-16. Tesis de Maestría, UNAM, México **(2006)**.
29. Montoya Hernández, Alin Amanda. Revisión bibliográfica de los modelos experimentales en fase preclínica para evaluar actividad antineoplásica. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México **(2011)**.
30. Mossman, T. *Journal of Immunology Methods* **(1983)** 65, 55-63.
31. De la Puerta, R., Maestro-Durán, R., Ruíz Gutiérrez, V., *Grasas y aceites* **(1997)** 48(2), 93-95.
32. Organic Chemistry Portal, página web consultada en <http://www.organic-chemistry.org/> el 3 de julio de 2012
33. Martínez, R., Menes Arzate, M., Ramírez- Apan, MT. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **(2009)** 17, 1849-1856.
34. Zhang X., Golcalves R., Mosser D.M. *Current Protocols in Immunology* **(2008)** 83, 14.1.1-14.1.14.



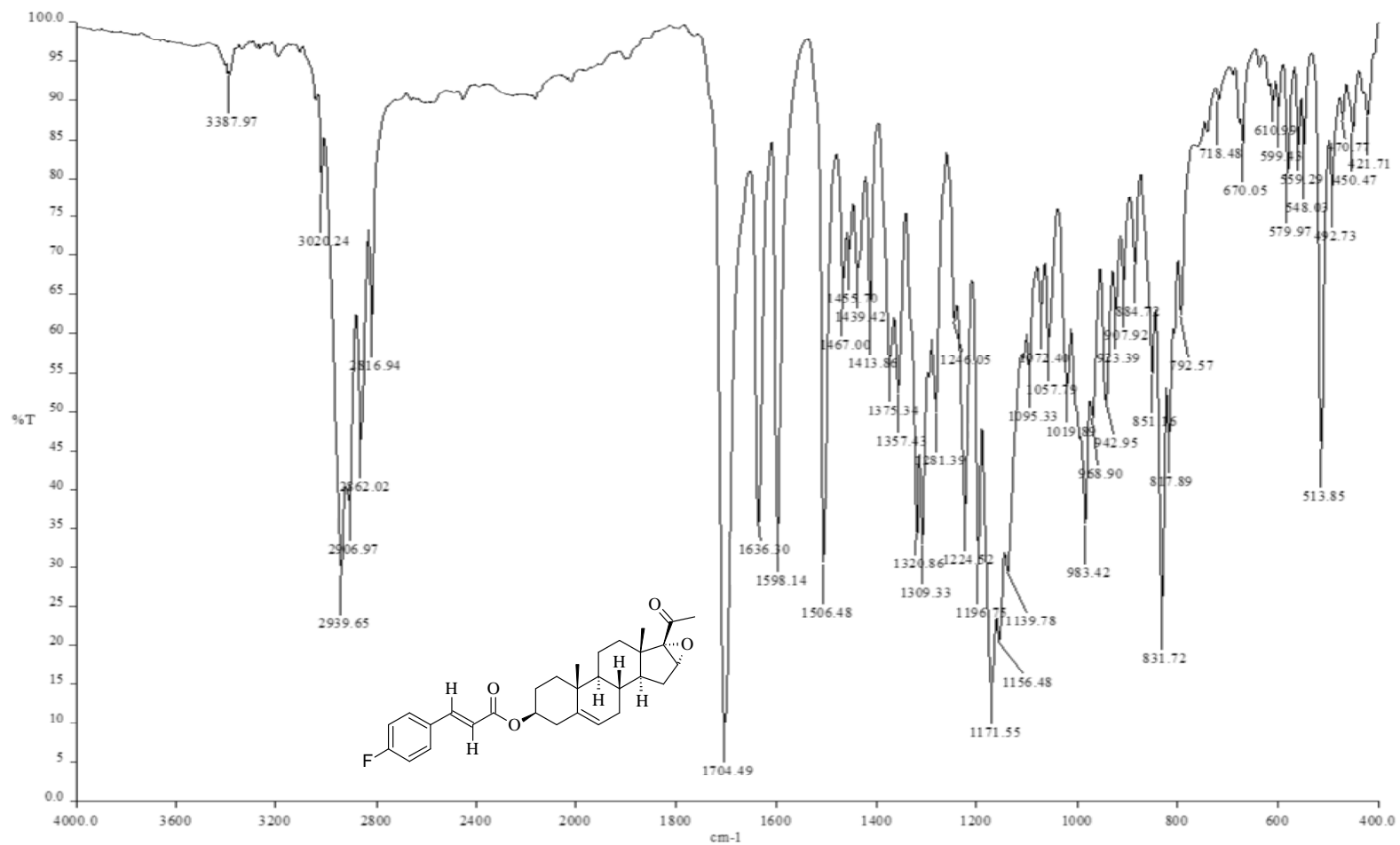
Espectro 1. IR (pastilla de KBr) del compuesto 3a.



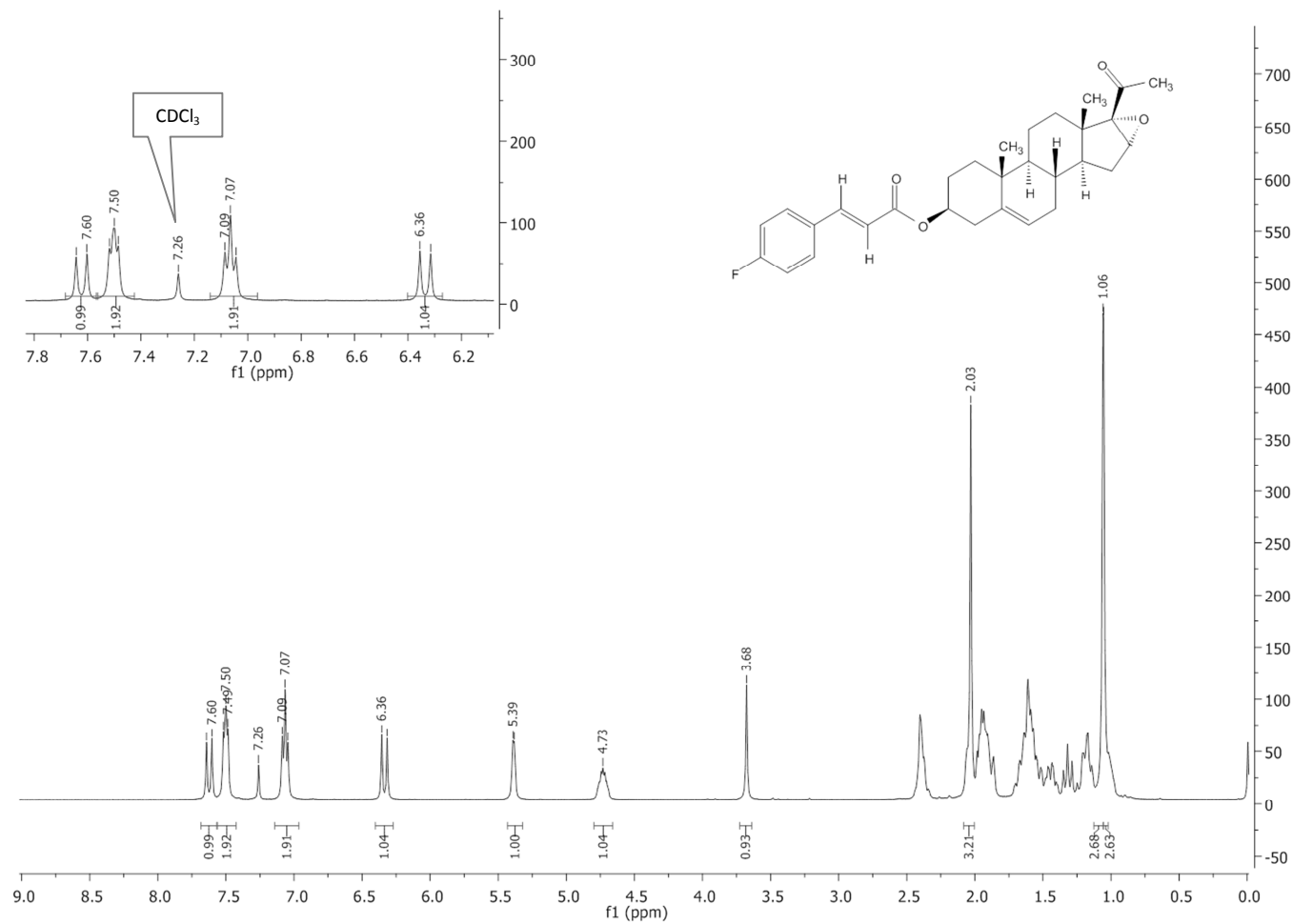
Espectro 2. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 3a.



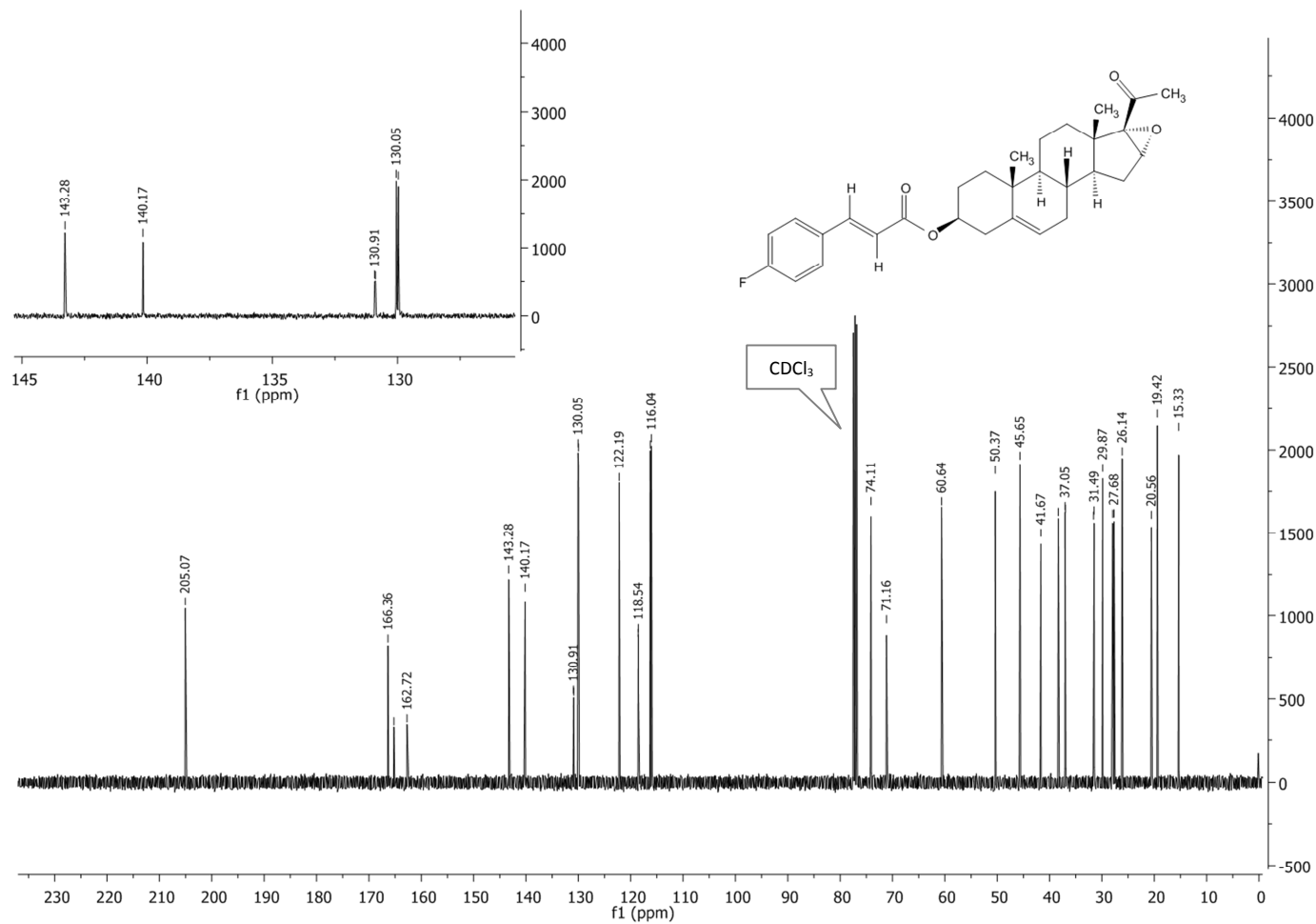
Espectro 3. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 3a.



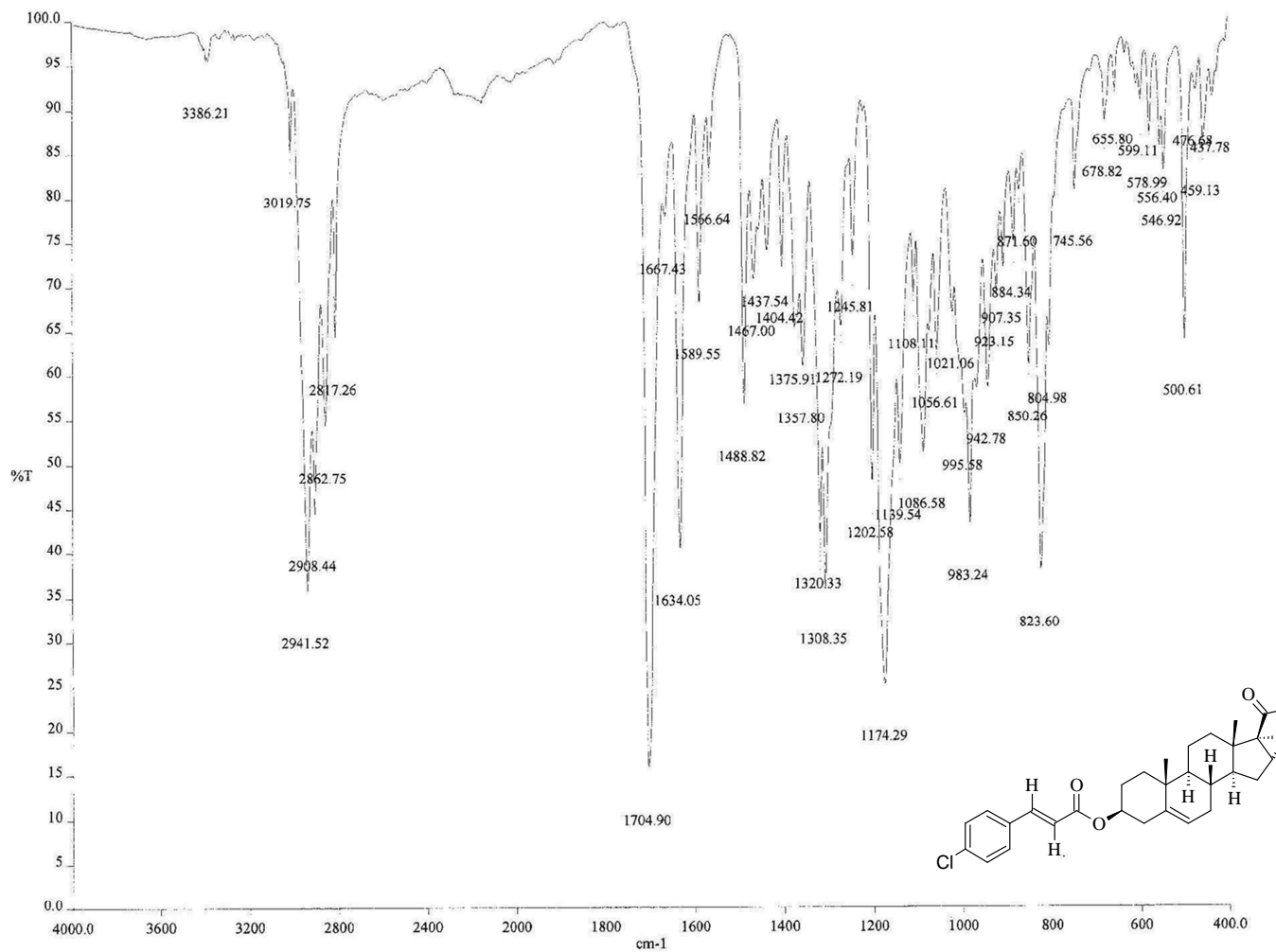
Espectro 4. IR (pastilla de KBr) del compuesto **3b**.



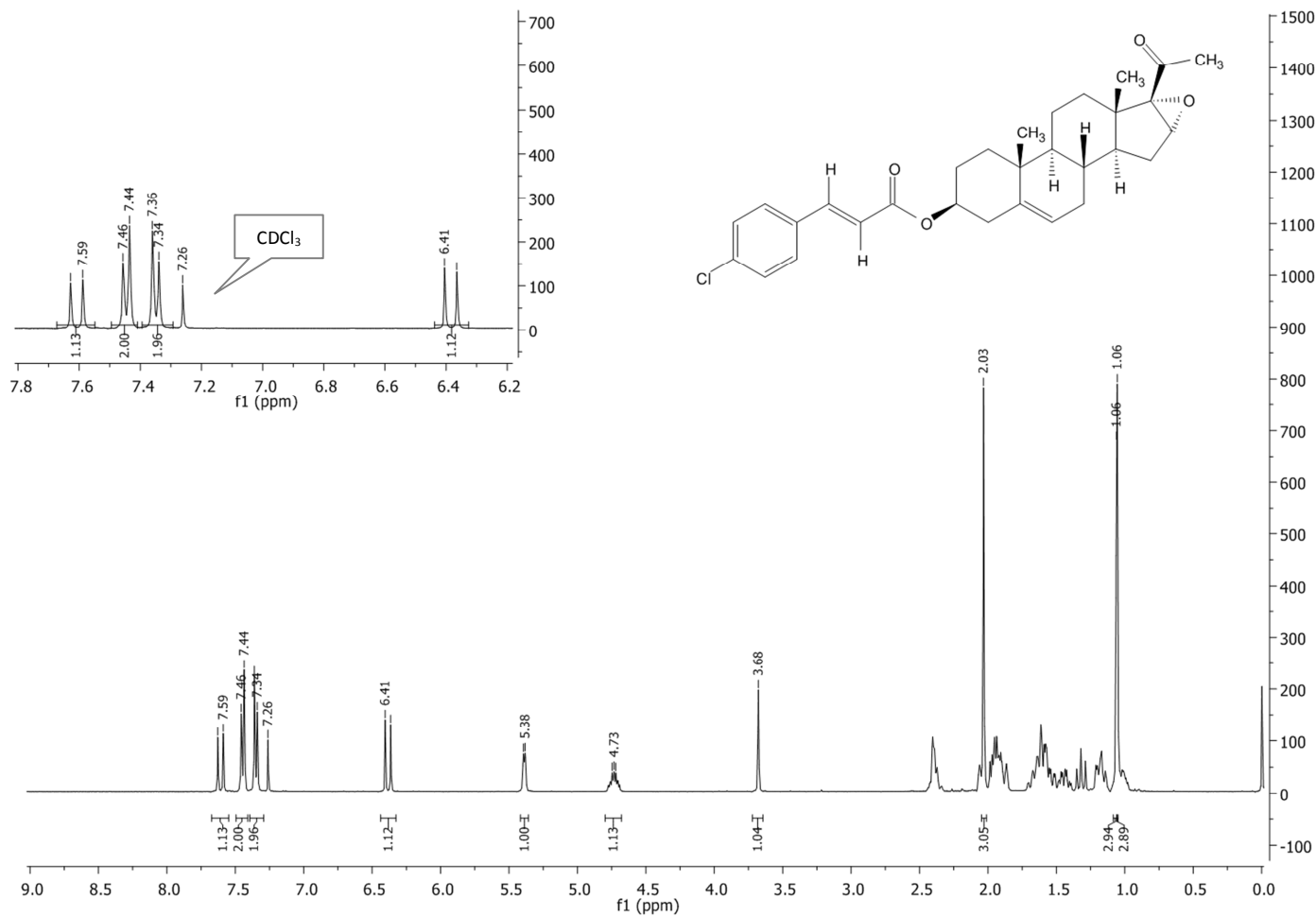
Espectro 5. RMN- ^1H (CDCl_3) del compuesto **3b**.



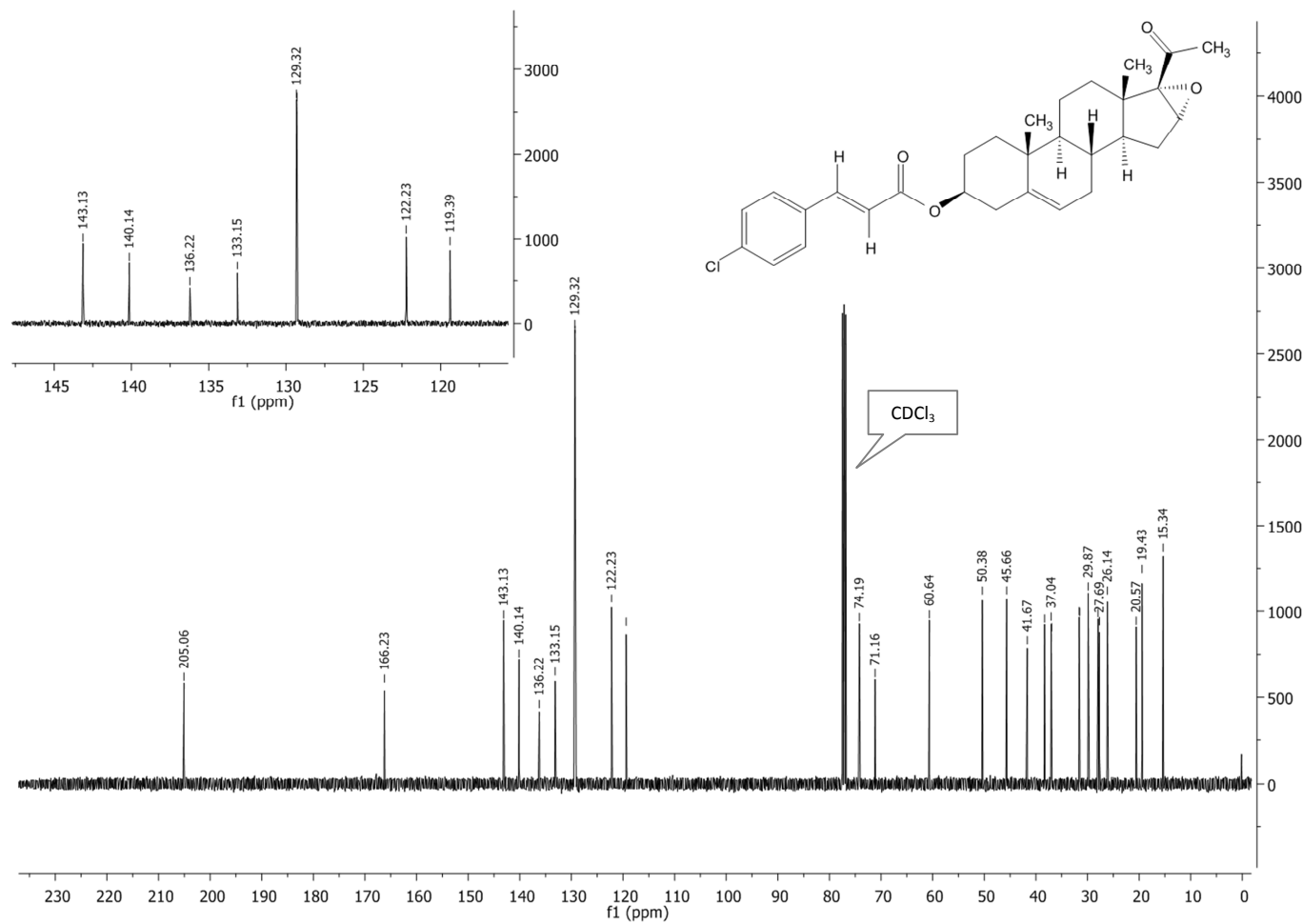
Espectro 6. RMN- ^{13}C (CDCl_3) del compuesto 3b.



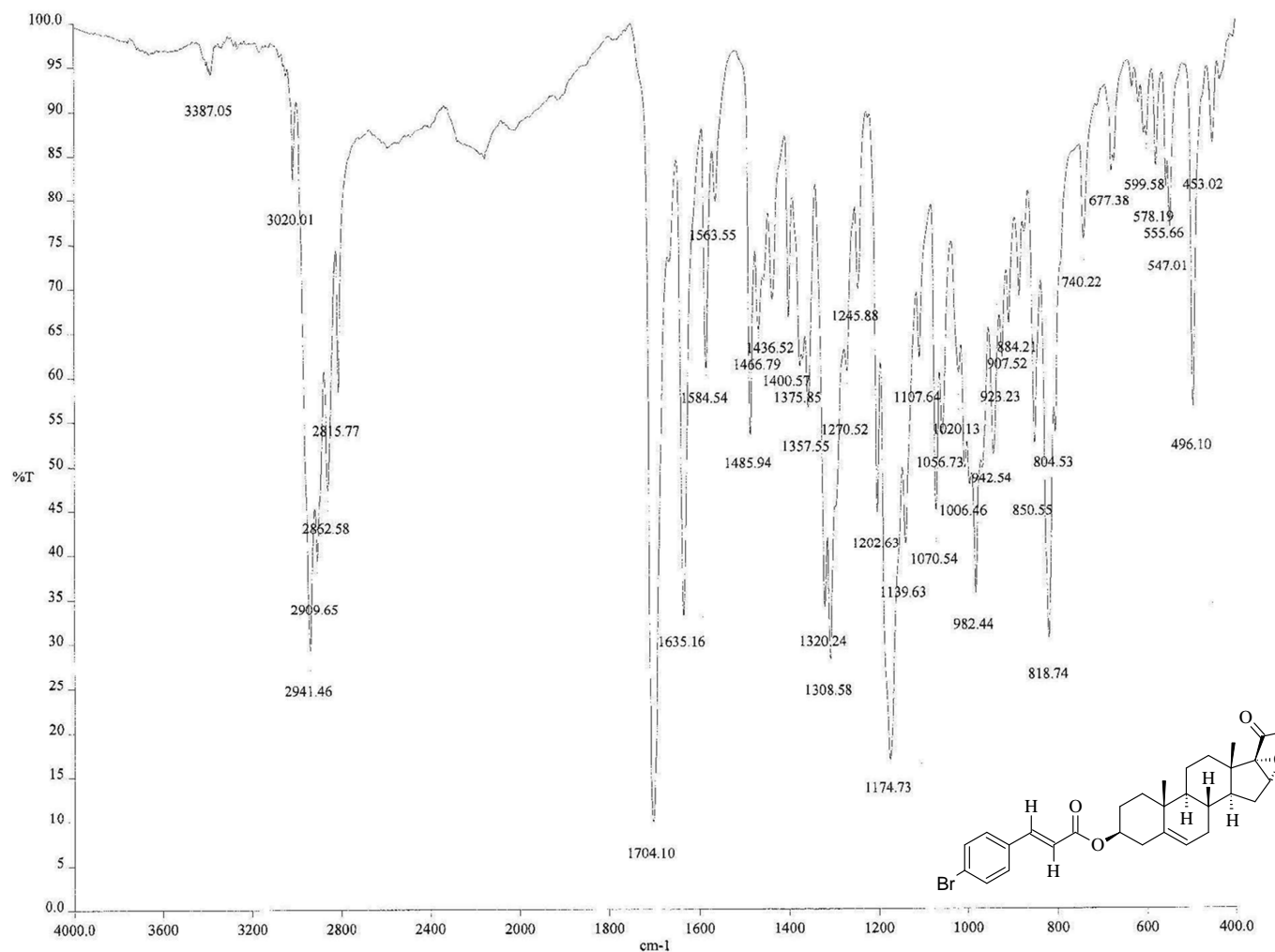
Espectro 7. IR (pastilla de KBr) del compuesto 3c.



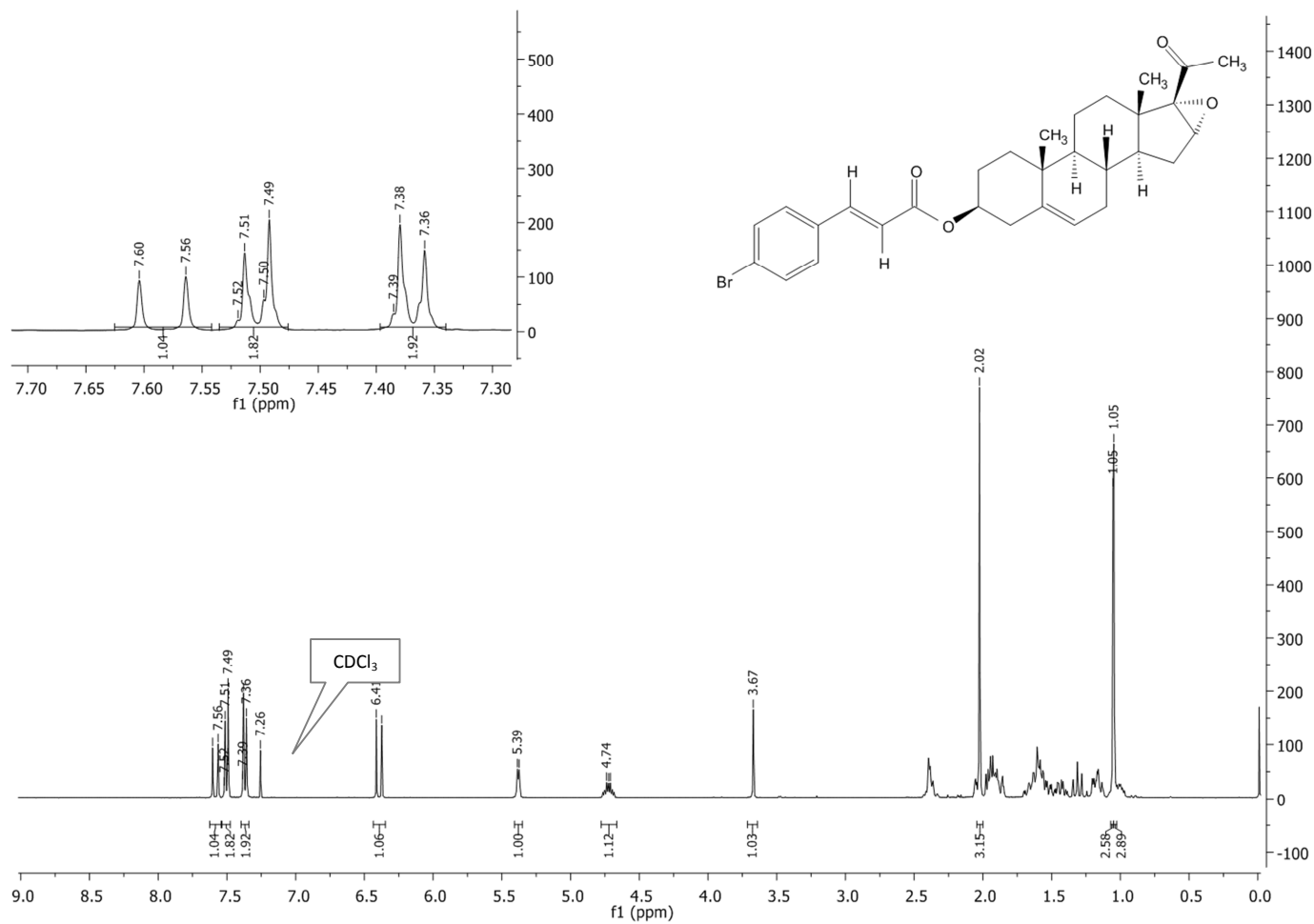
Espectro 8. RMN- ^1H (CDCl_3) del compuesto **3c**.



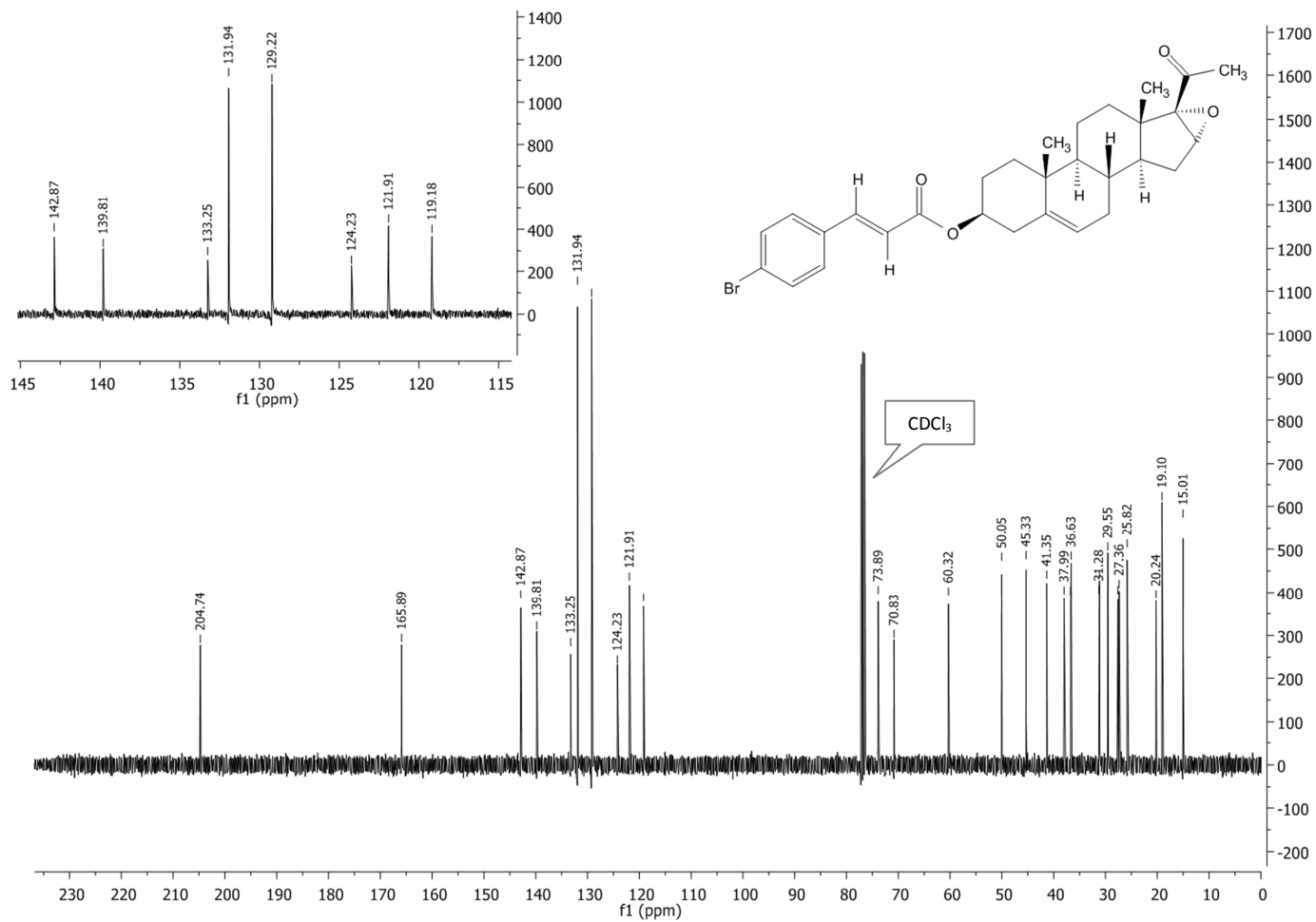
Espectro 9. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto **3c**.



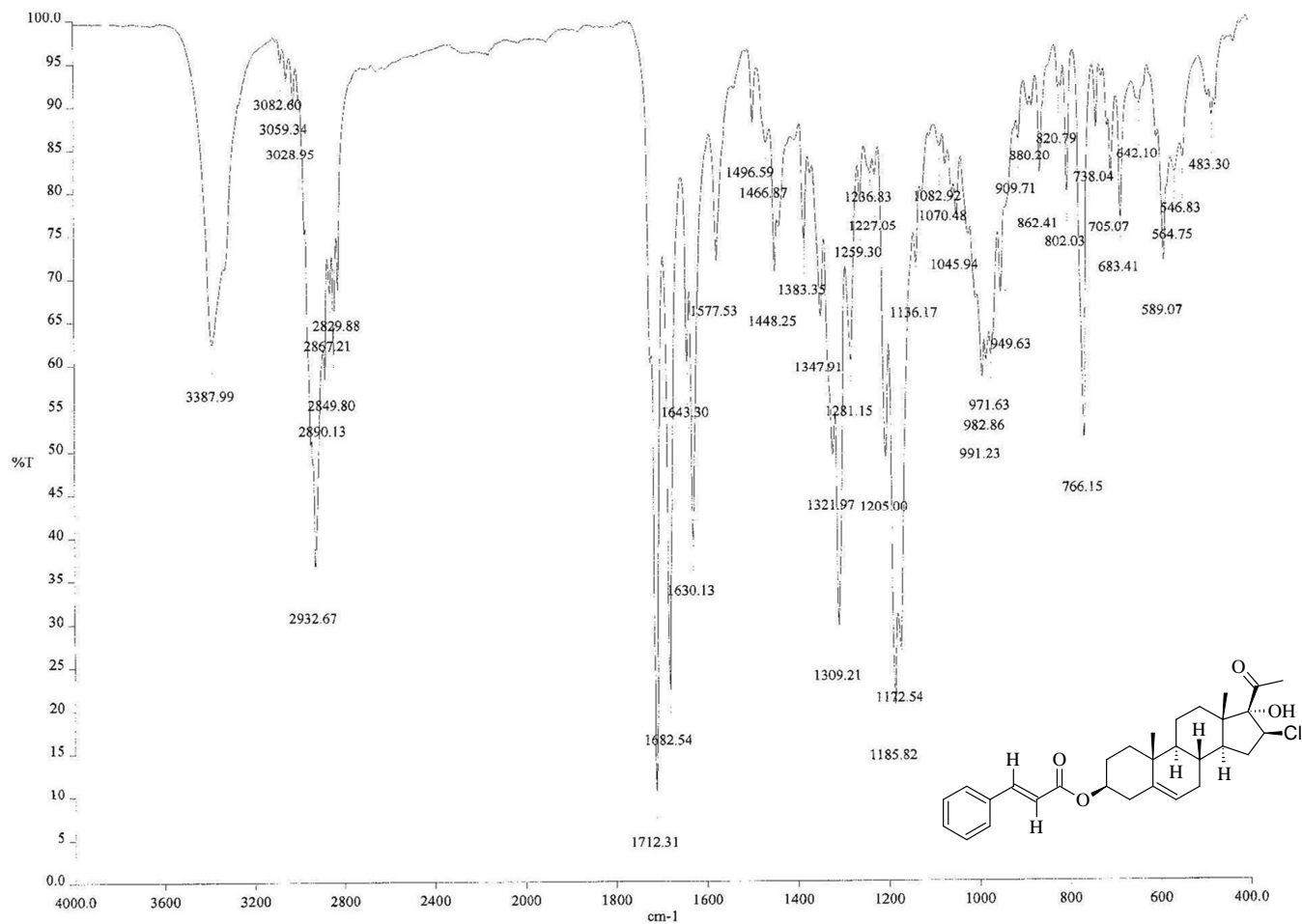
Espectro 10. IR (pastilla de KBr) del compuesto **3d**.



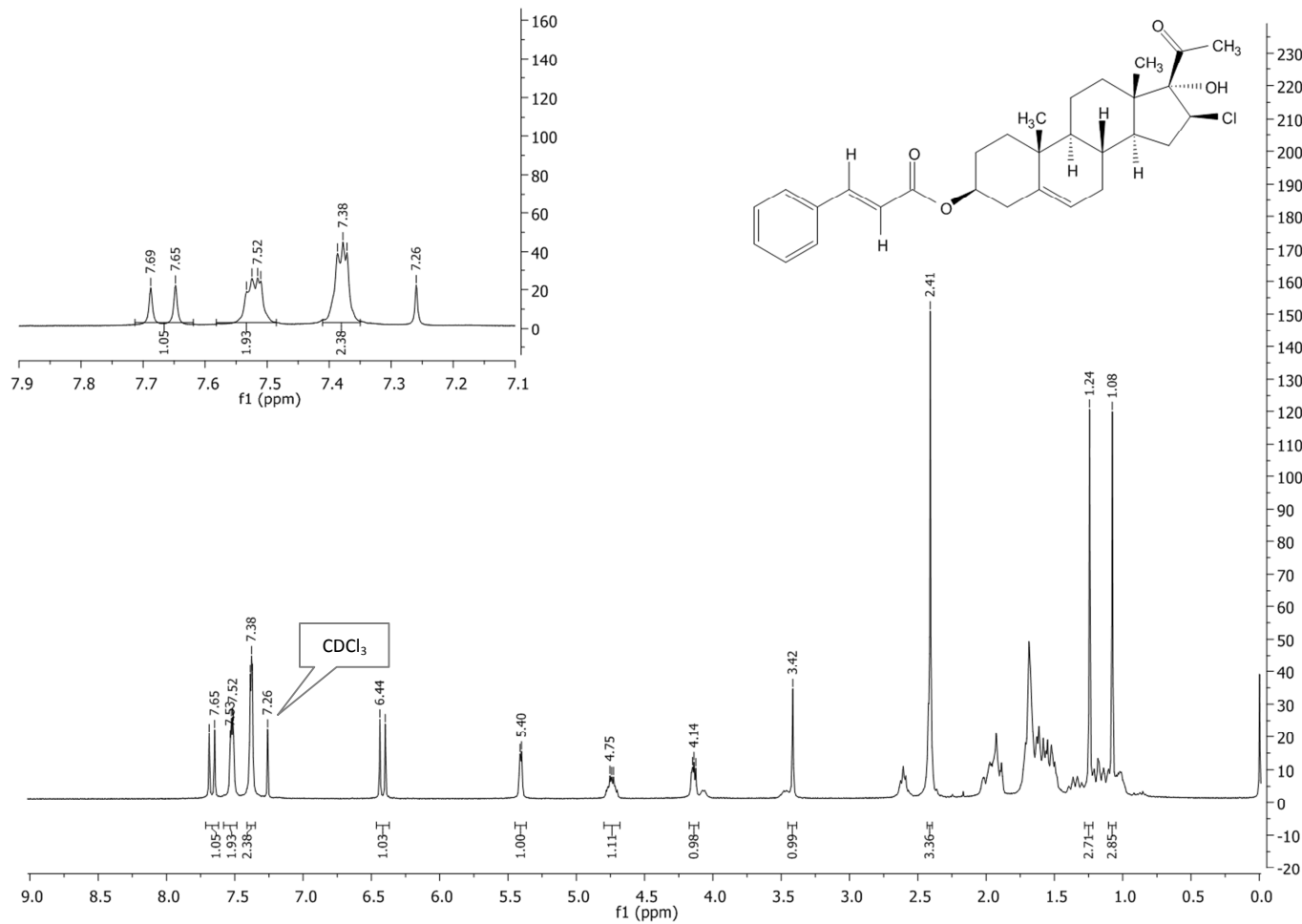
Espectro 11. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto **3d**.



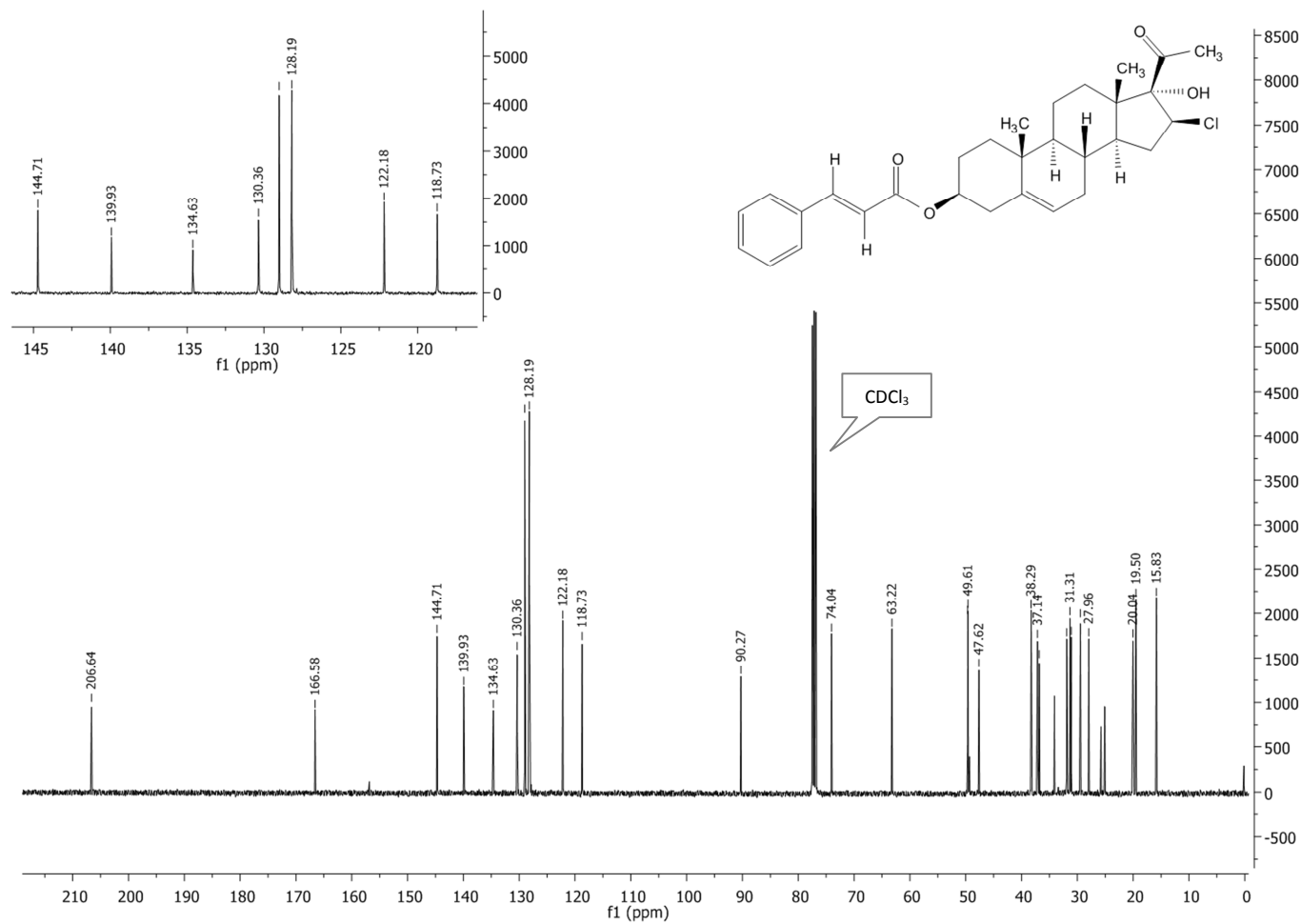
Espectro 12. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto **3d**.



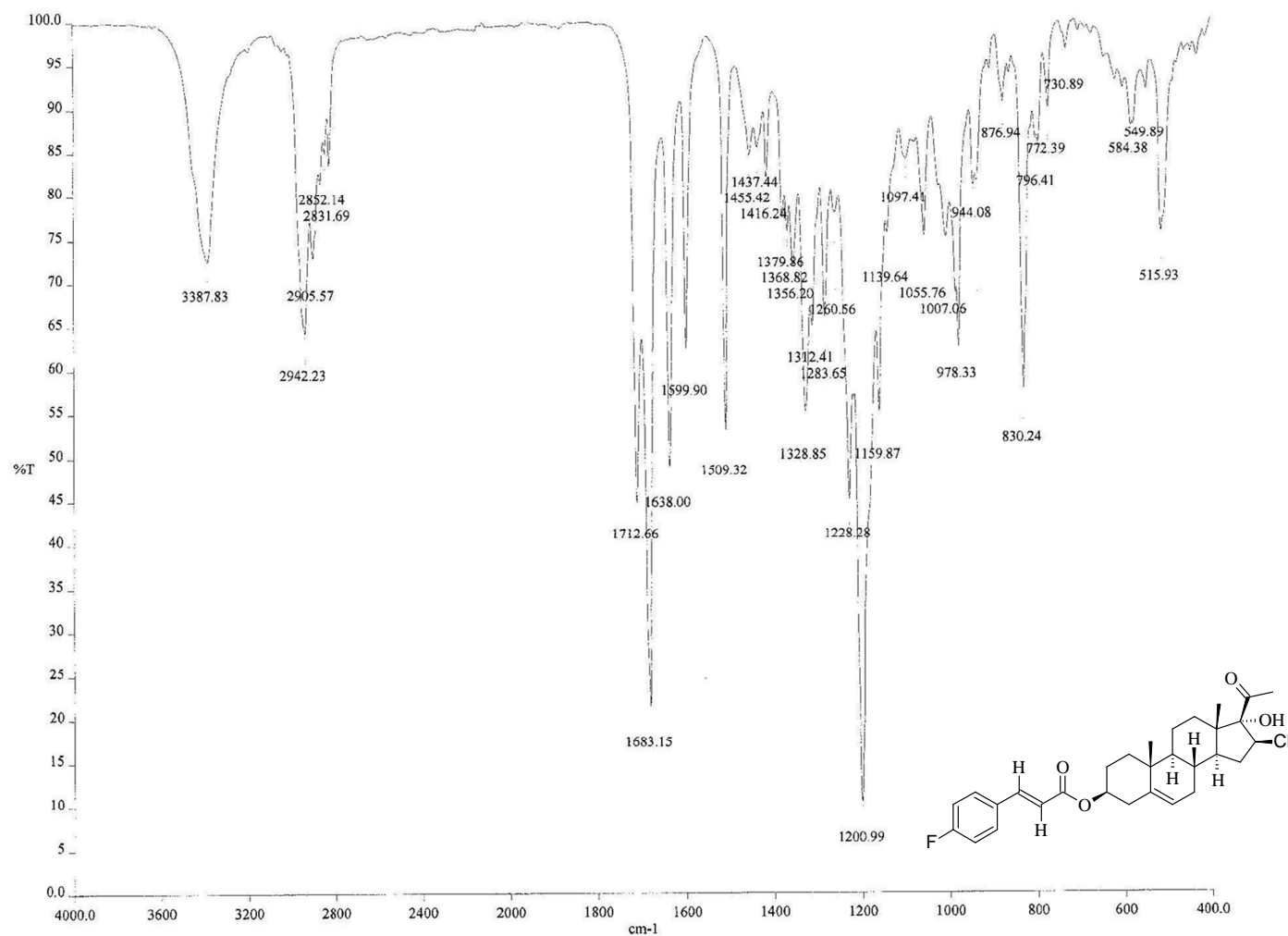
Espectro 13. IR (pastilla de KBr) del compuesto **4a**.



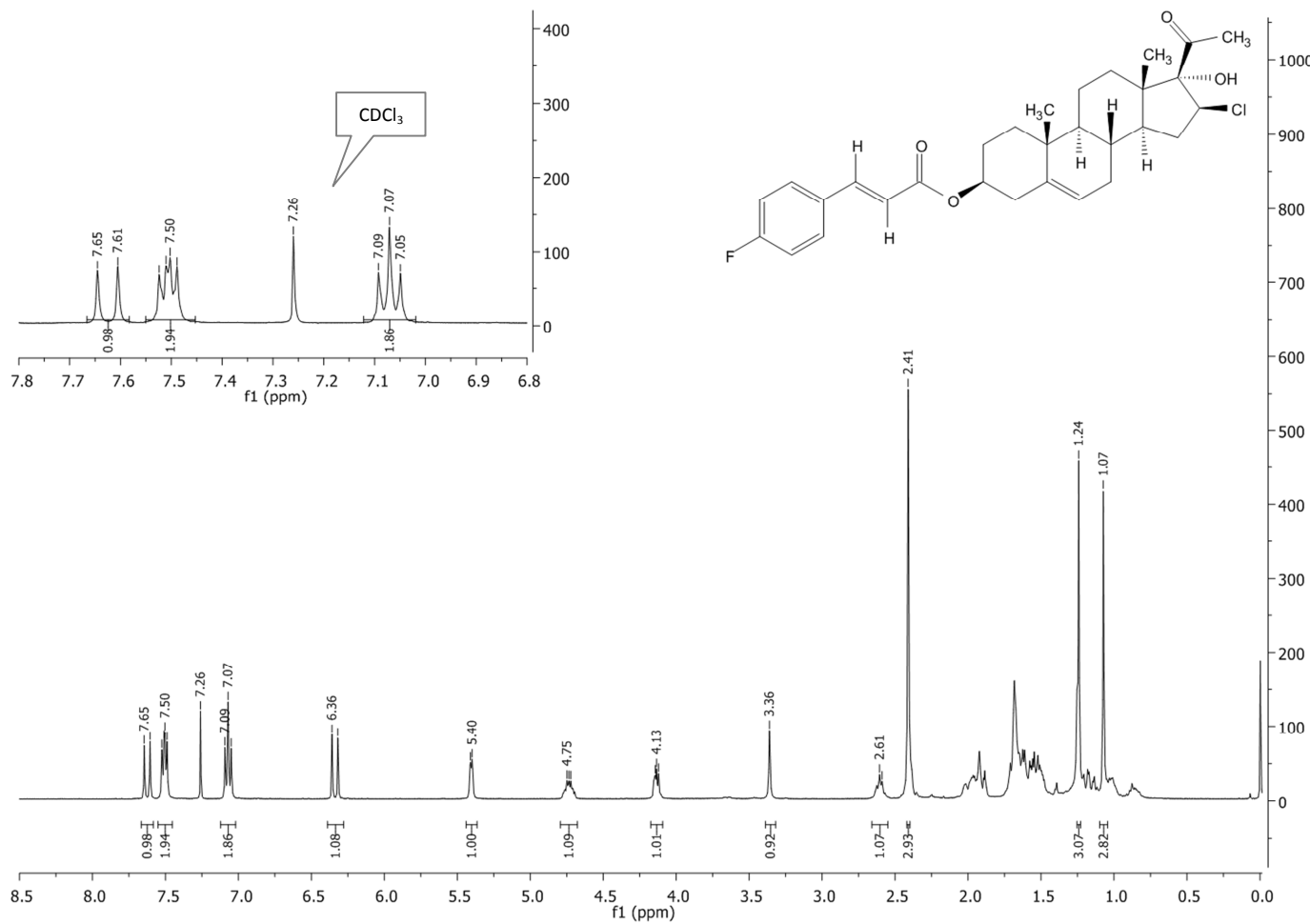
Espectro 14. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto **4a**.



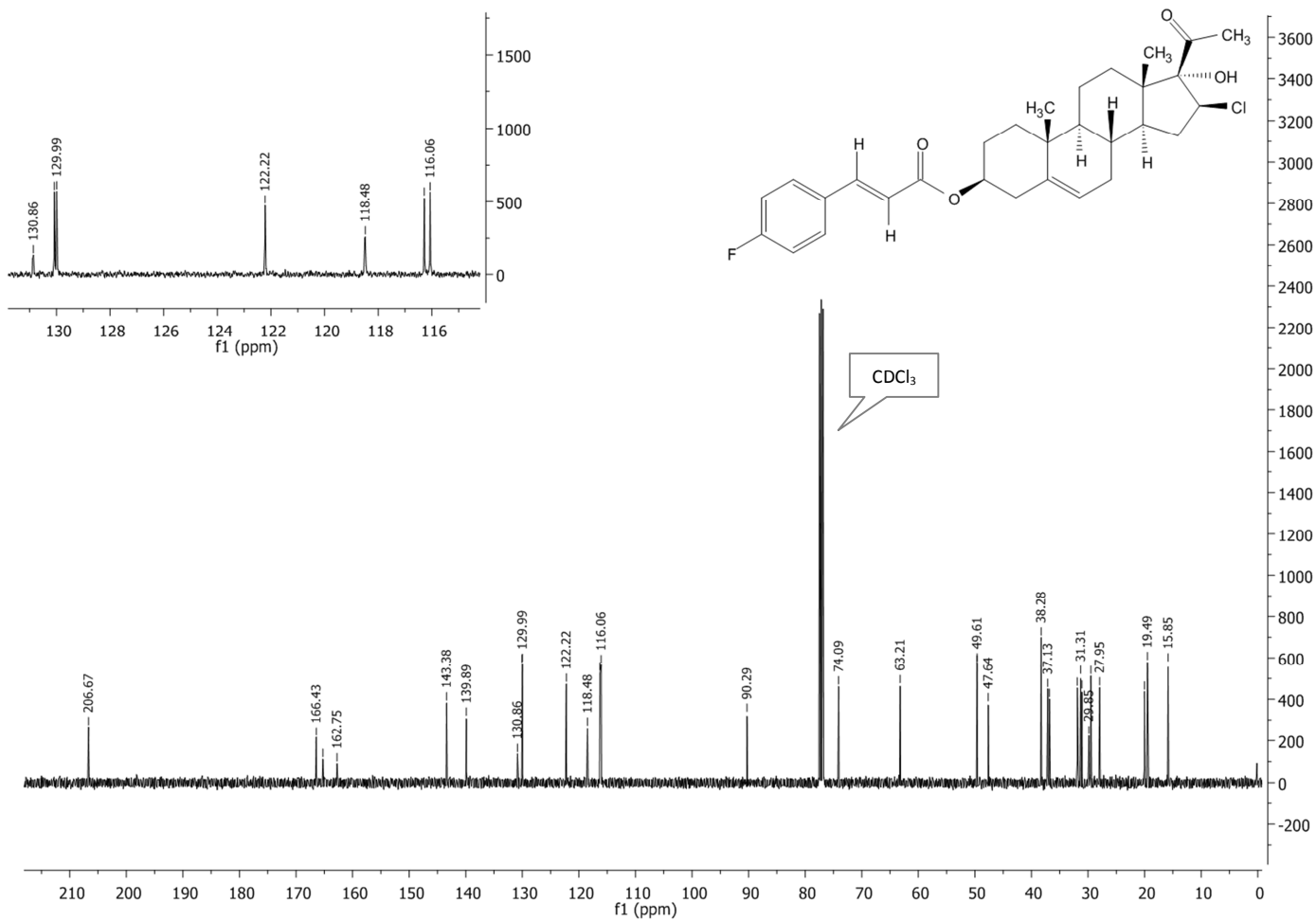
Espectro 15. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 4a.



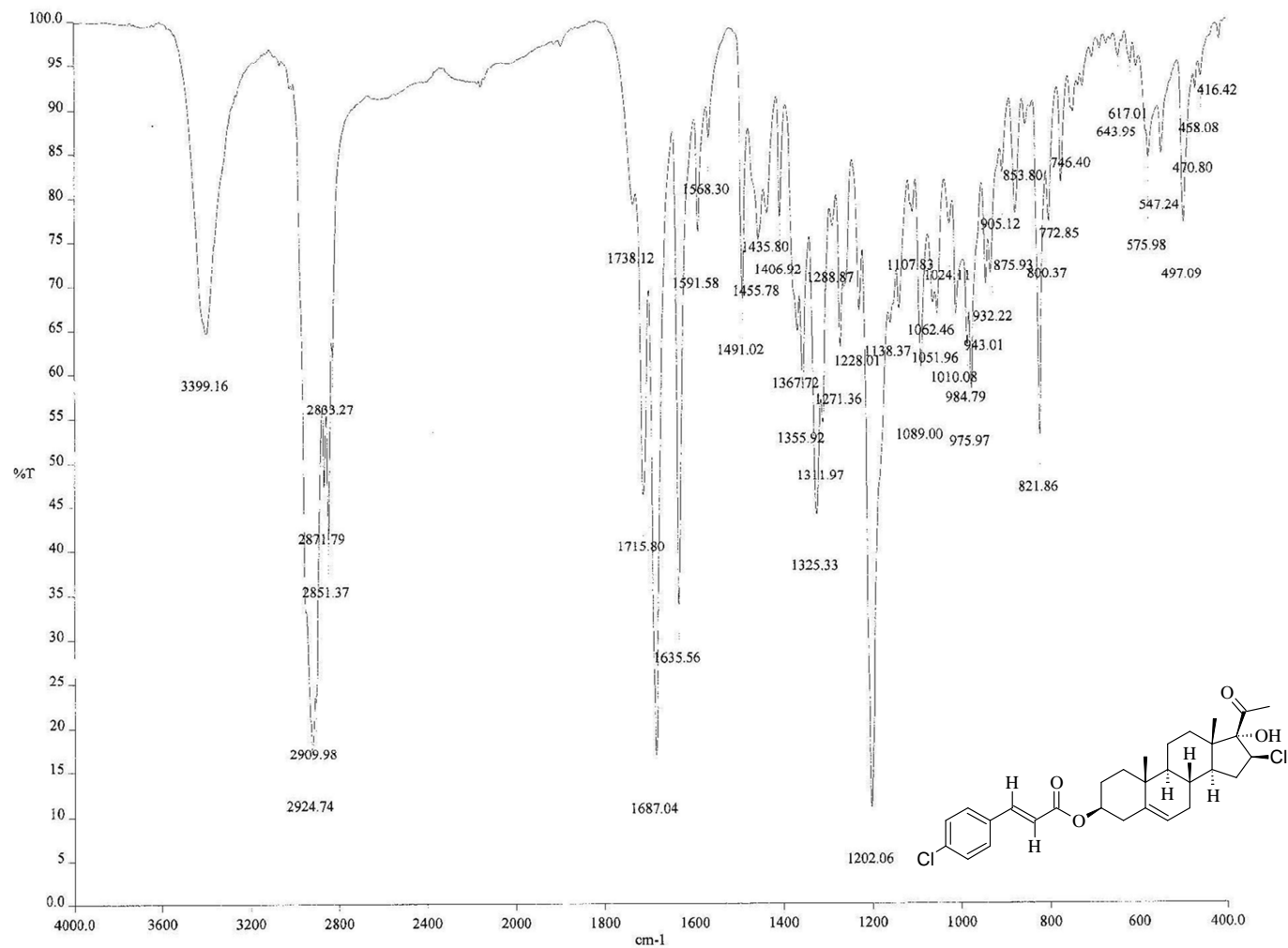
Espectro 16. IR (pastilla de KBr) del compuesto **4b**.



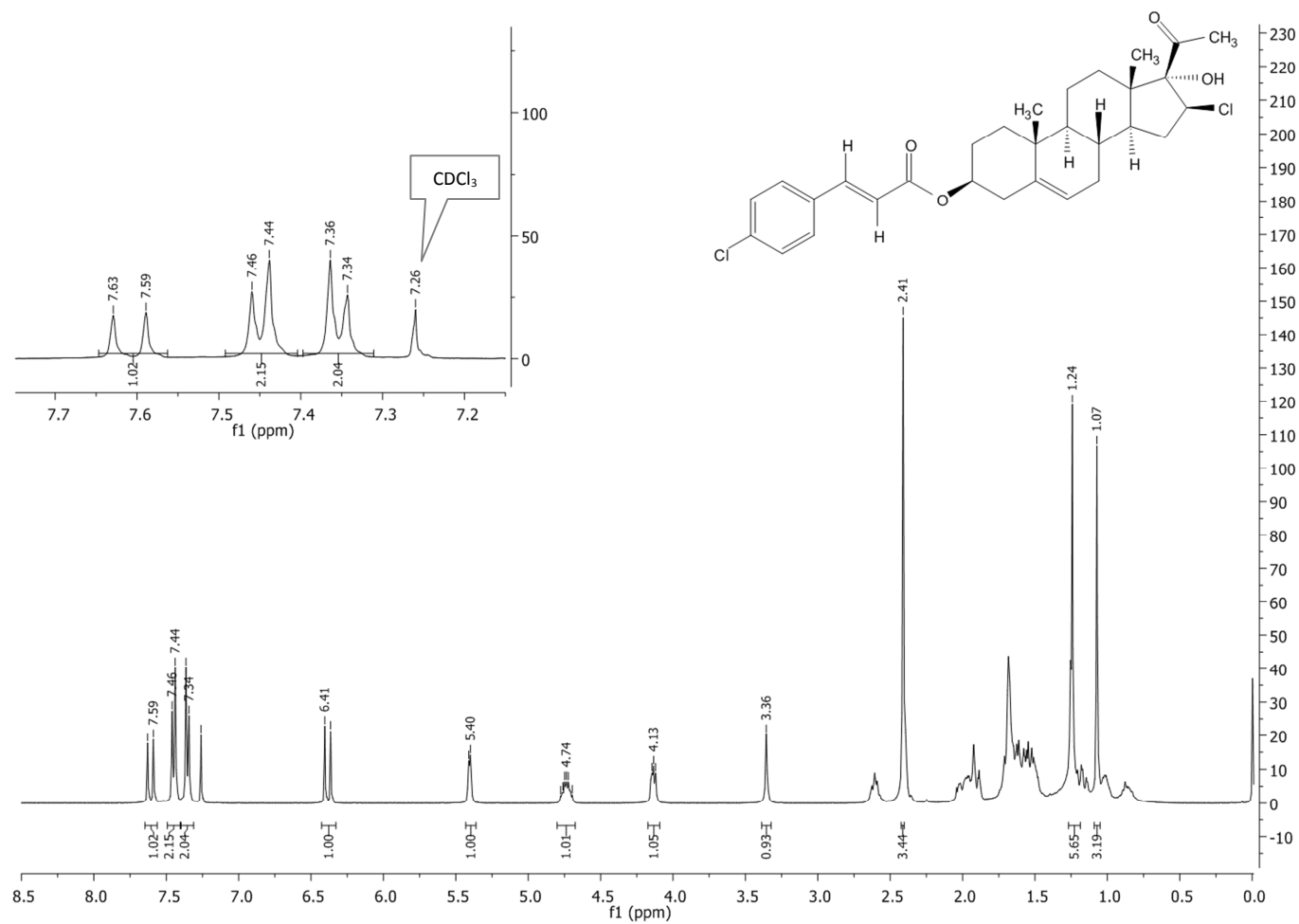
Espectro 17. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto 4b.



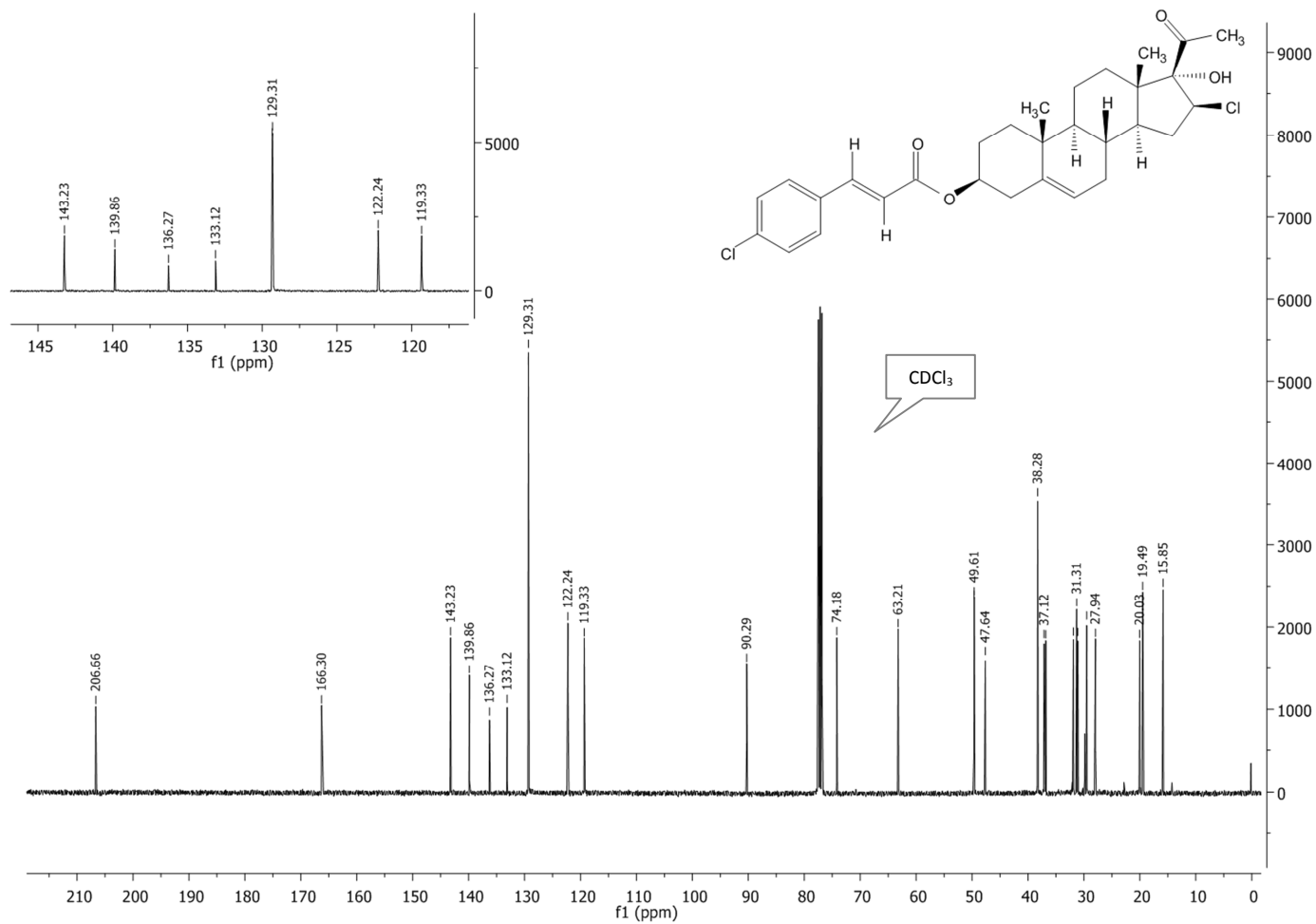
Espectro 18. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto **4b**.



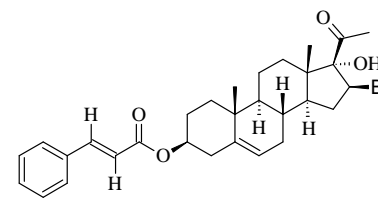
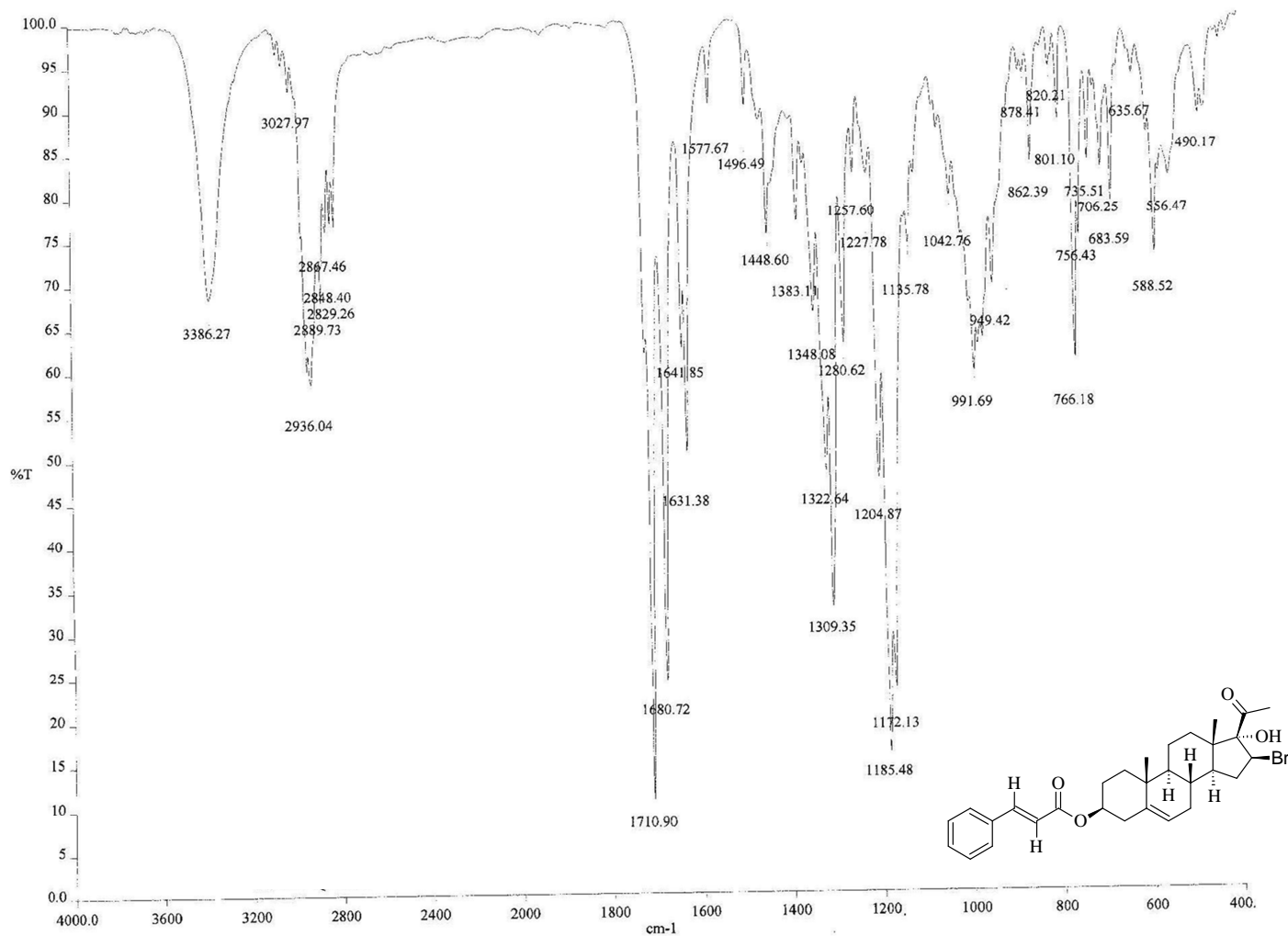
Espectro 19. IR (pastilla de KBr) del compuesto **4c**.



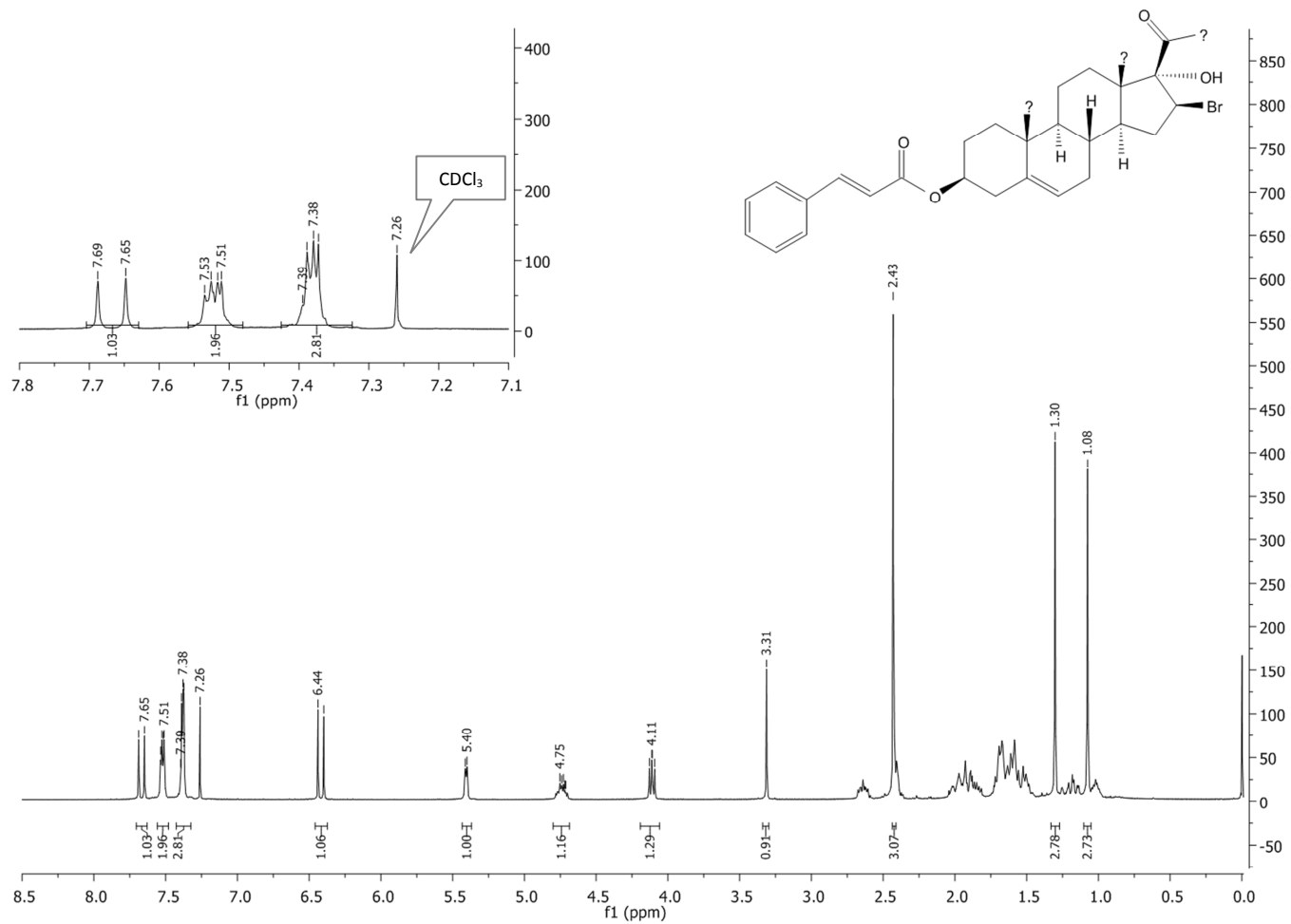
Espectro 20. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto **4c**.



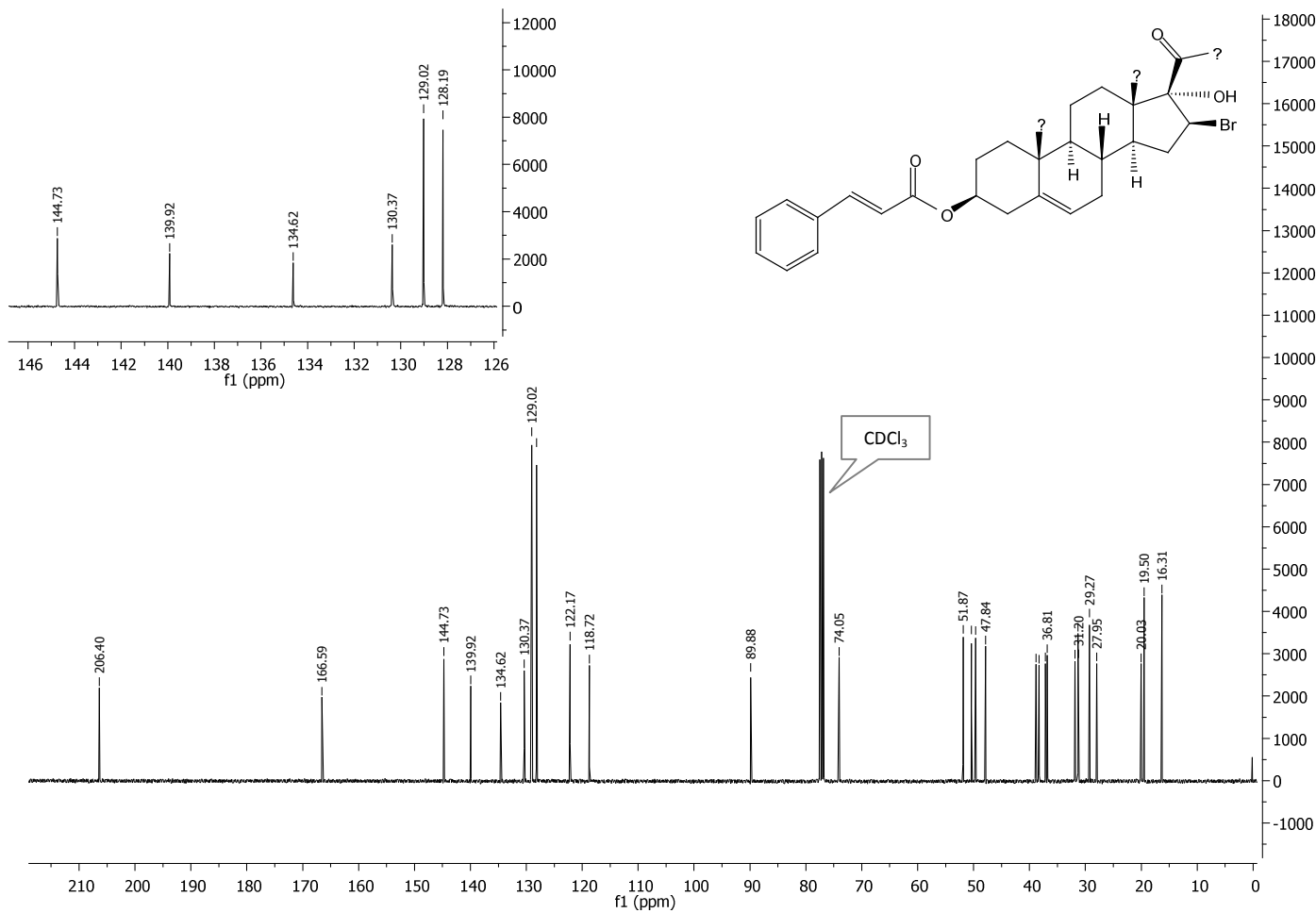
Espectro 21. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto 4c.



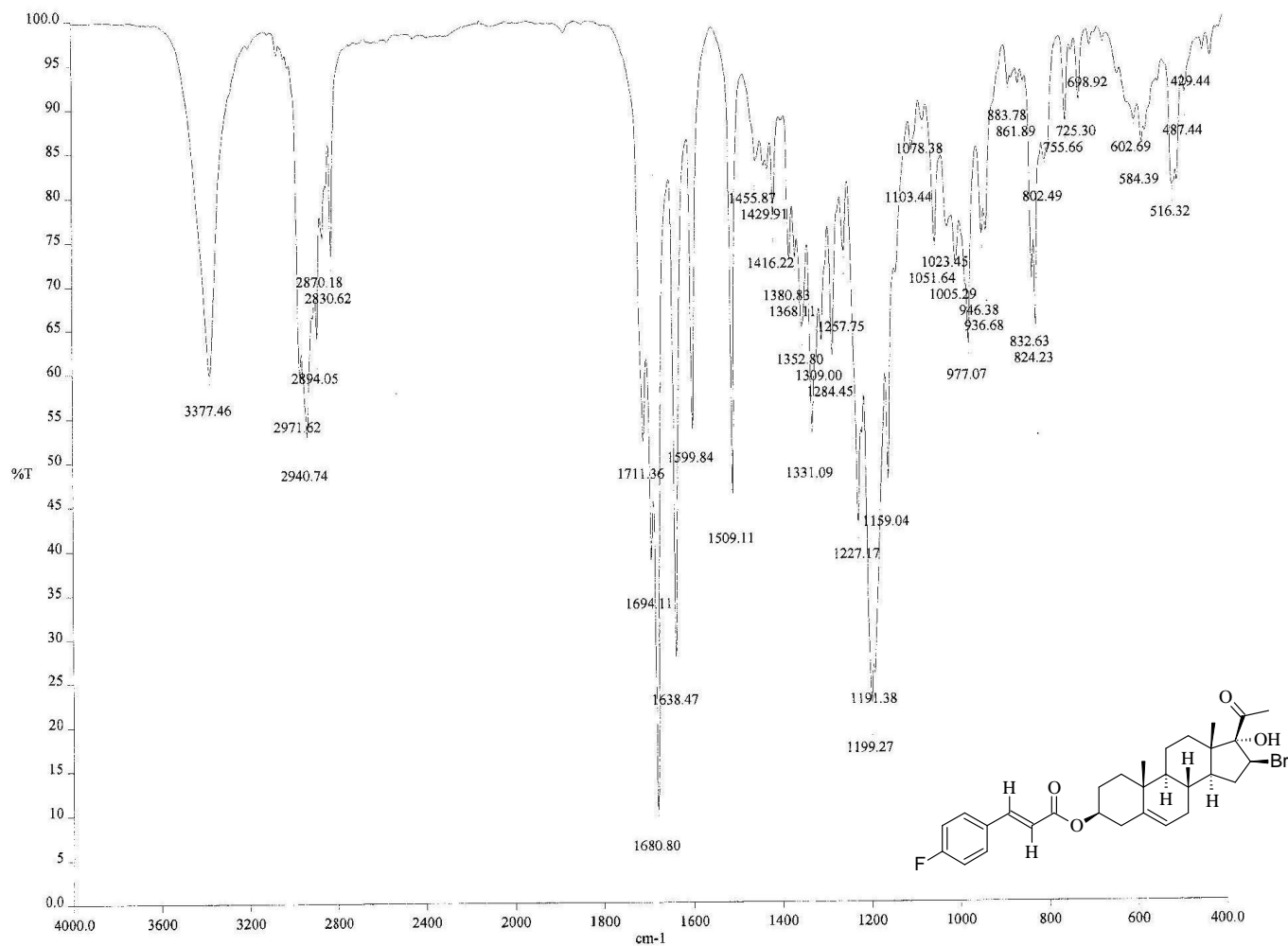
Espectro 22. IR (pastilla de KBr) del compuesto **5a**.



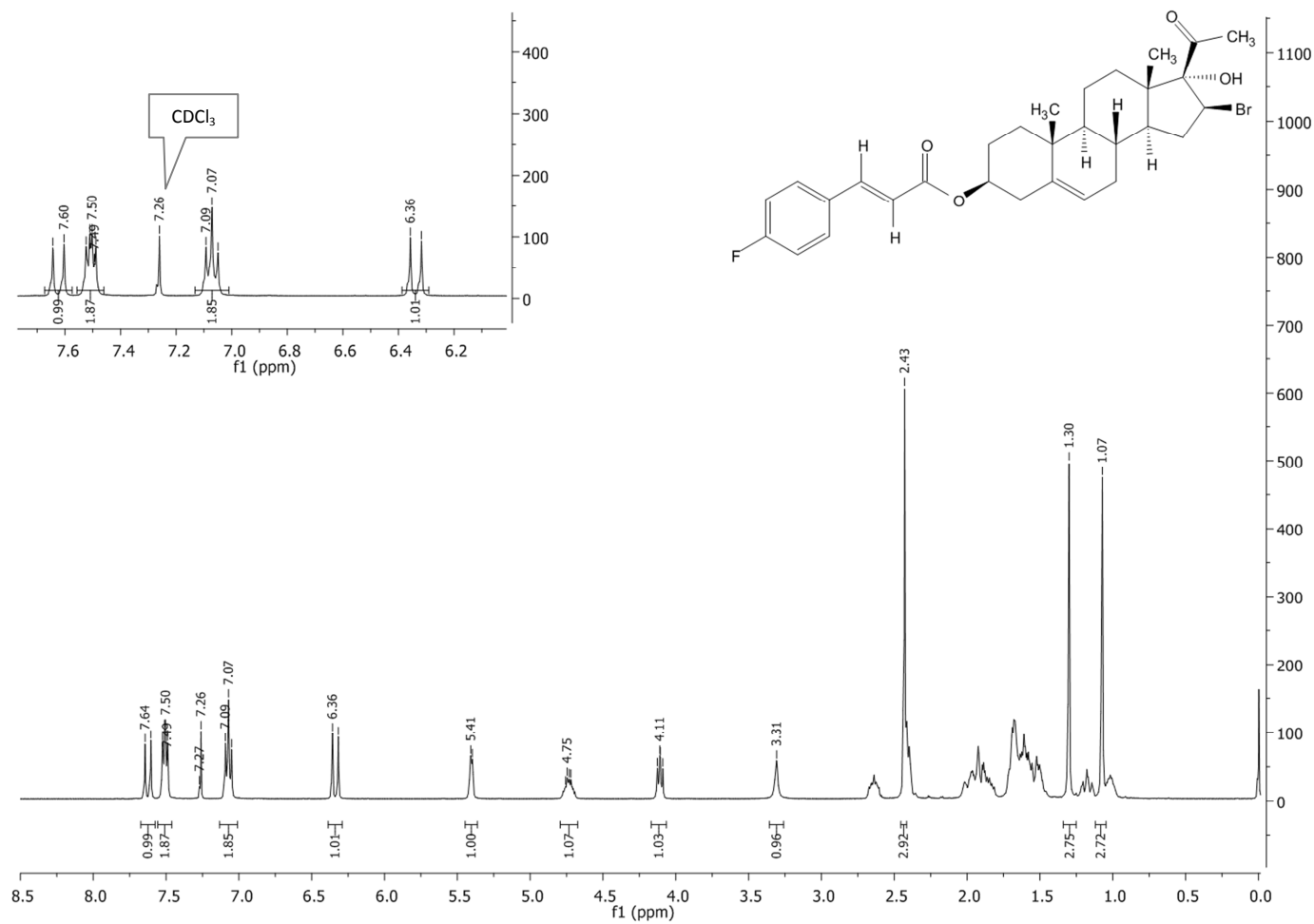
Espectro 23. RMN- ^1H (CDCl_3) del compuesto **5a**.



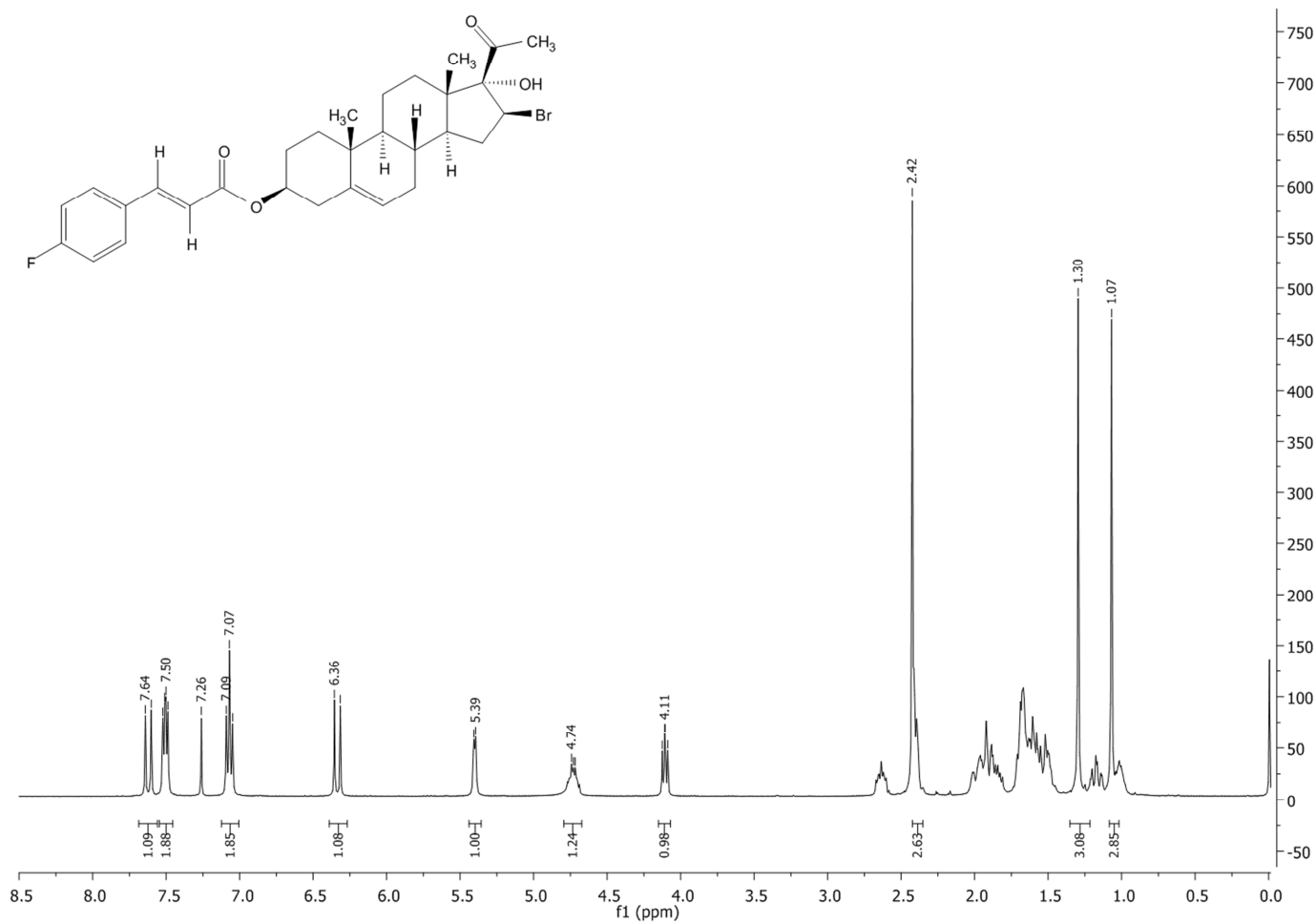
Espectro 24. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto **5a**.



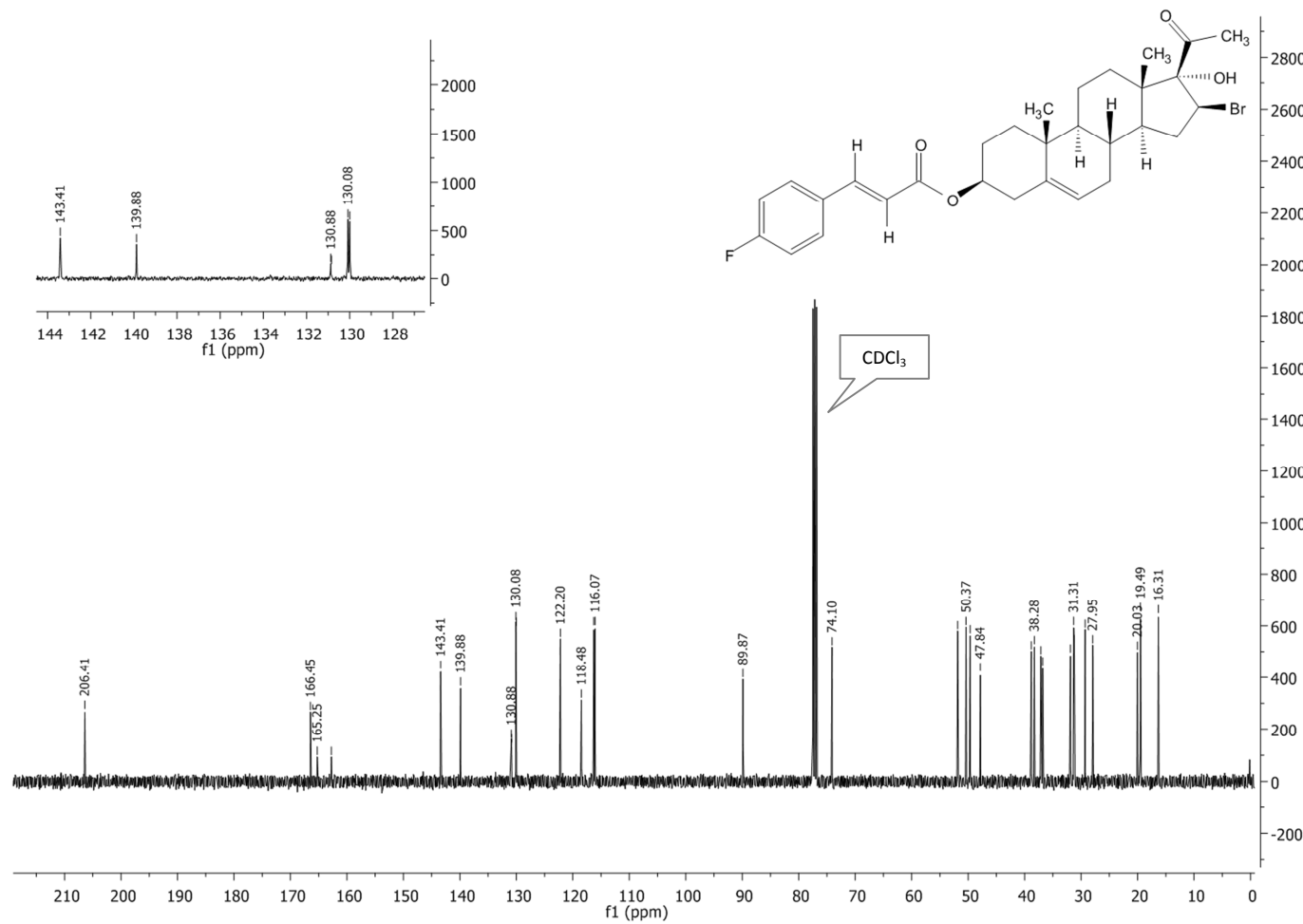
Espectro 25. IR (pastilla de KBr) del compuesto 5b.



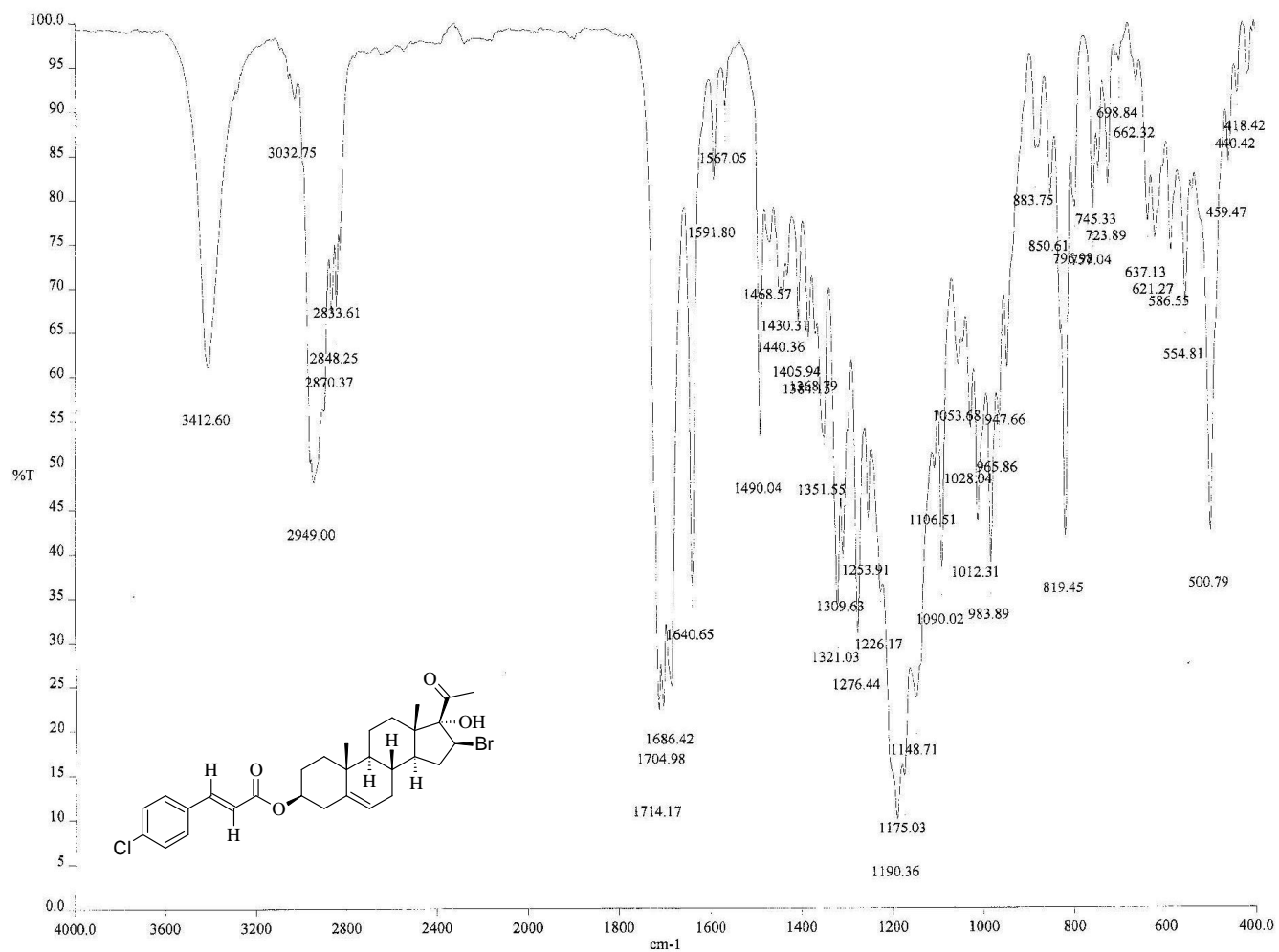
Espectro 26. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto **5b**.



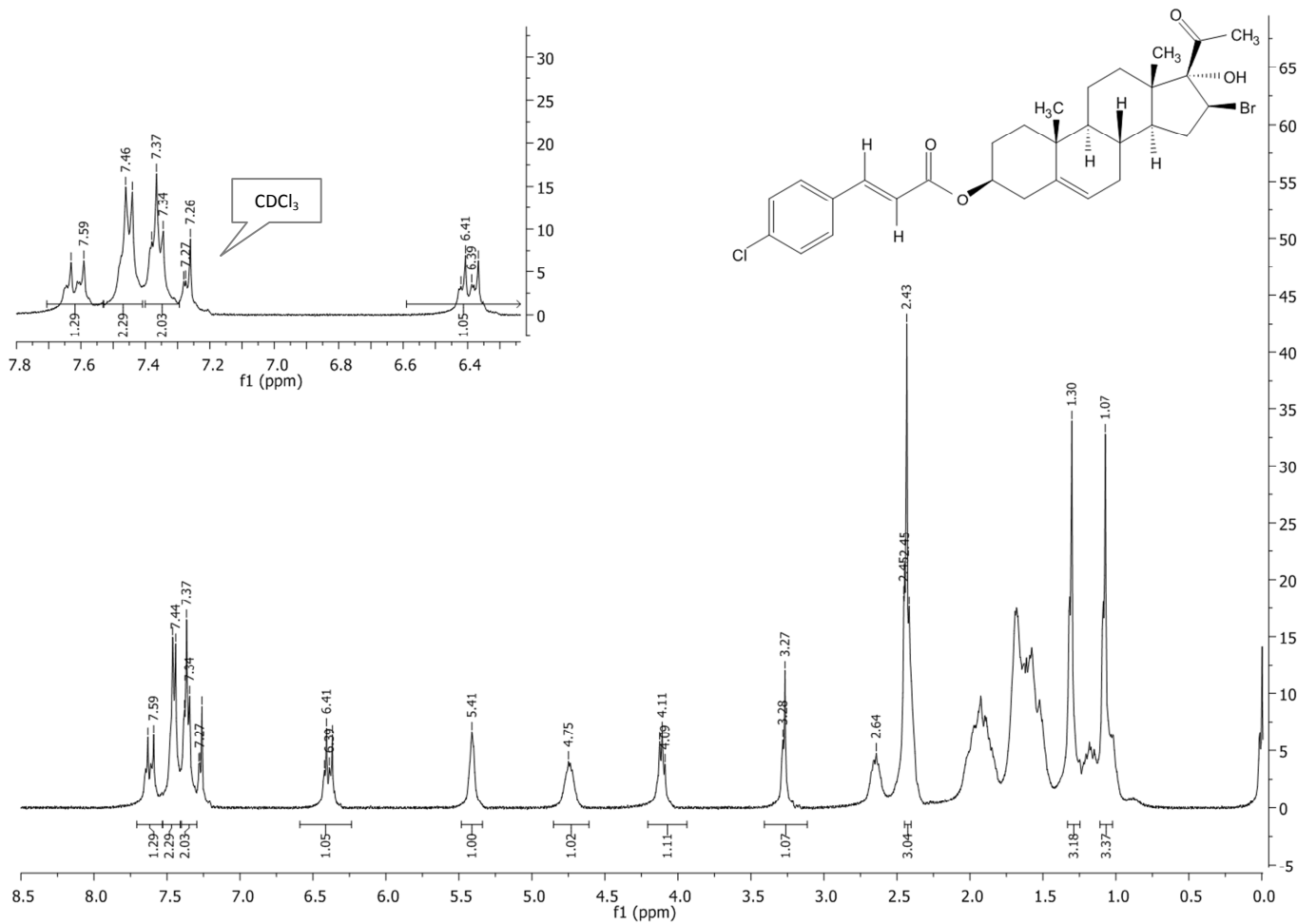
Espectro 26a. RMN-¹H (D₂O, CDCl₃) del compuesto 5b.



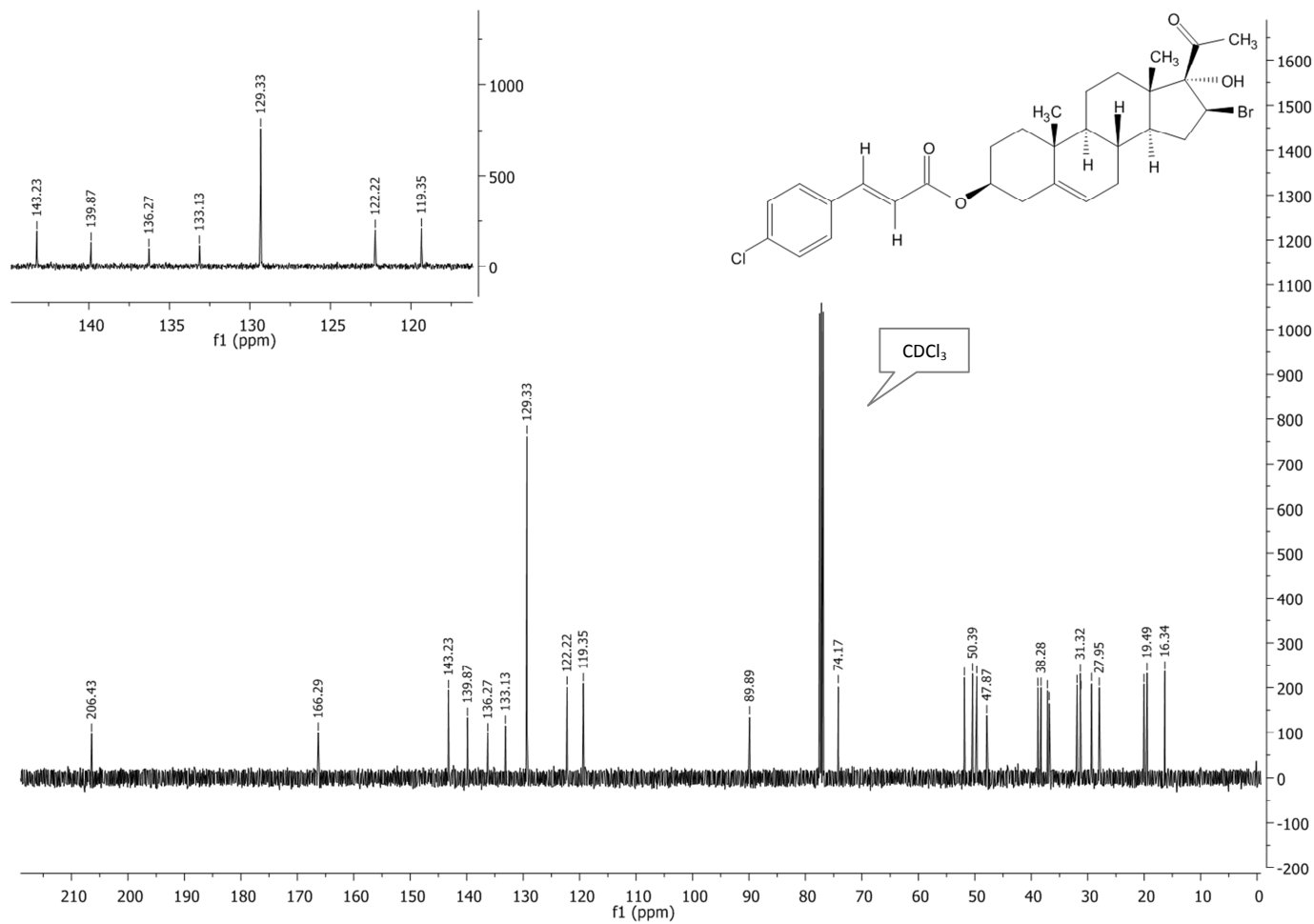
Espectro 27. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto **5b**



Espectro 28. IR (pastilla de KBr) del compuesto **5c**.



Espectro 29. RMN-¹H (CDCl₃) del compuesto **5c**.



Espectro 30. RMN-¹³C (CDCl₃) del compuesto **5c**.