



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

SÍNTESIS DE  $17\alpha$ -SALICILOXIDERIVADOS DE LA  
PROGESTERONA, ASISTIDA POR RADIACIÓN DE  
MICROONDAS Y SU EVALUACIÓN COMO POTENCIALES  
AGENTES CITOTÓXICOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

LEOBARDO IVÁN ACEVEDO HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ

**VOCAL:** Profesor: CONSUELO GARCÍA MANRÍQUE

**SECRETARIO:** Profesor: ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LÓPEZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: CARLOS DAMÍAN ZEA

**2° SUPLENTE:** Profesor: EUGENE ATHANAS BRATOEFF TITEFF

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 125, CONJUNTO E,  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LÓPEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**DR. EUGENE ATHANAS BRATOEFF TITTEF**

**SUSTENTANTE (S):**

**LEOBARDO IVÁN ACEVEDO HERNÁNDEZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM y a la Facultad de Química por otorgarme la valiosa oportunidad de formarme académicamente en sus instalaciones.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el financiamiento otorgado a través del Proyecto PAPIME-200711 que hizo posible la realización de esta tesis.

Al personal de USAI por la realización de la espectroscopia de IR y RMN.

A la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho que se ubican en la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, por la realización de las pruebas biológicas.

A la Dra. Elena Ramírez por toda su enseñanza, apoyo tanto académico como moral, paciencia, cariño y amistad; por darme la oportunidad de pertenecer a este gran grupo de trabajo, y por contribuir significativamente a mi formación como profesor.

A mis padres Leobardo Acevedo y Ricarda Hernández por darme la vida y formarme como una persona de bien, y sobre todo por su cariño y dedicación, así como por todos los esfuerzos que hicieron para que todo esto fuera posible.

A mis hermanos: Teo, Rosa, Cándido y José por todo el cariño y apoyo moral y económico, así como por sus enseñanzas que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis carnales de la prepa: Alba, Mike y Neto por su amistad incondicional.

A mis amigos de la facultad: Bere, Bety, Imelda, Itzia, Karina, Lalo, Laura, Marisol, Norma, Sam, Stephani y los que me hayan faltado por mencionar, les agradezco por su amistad, compañía, apoyo, consejos, cariño y comprensión que me demostraron durante la carrera; y por todos aquellos momentos tanto alegres como tristes que compartimos juntos.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio 125: Ale, Aylín, Beto, Dulce, Fonsy, Gladys, Karen, Luis, Maru, Paco y Yazmín por todo su apoyo, enseñanzas, amistad, compañía, consejos, ocurrencias y cariño que me otorgaron durante toda mi estancia en este laboratorio; y por todos los convivios, las reuniones, las fiestas y los Reginazos.

Y finalmente, a todas mis fans jajajaja.

iiiYO SOY 125!!!

**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	v
<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1. Cáncer.	3
2.1.1. Panorama actual del cáncer en México y el Mundo.	3
2.1.2. Etiología.	4
2.2. Tratamiento del cáncer.	4
2.2.1. Quimioterapia.	5
2.3. Hormonas Esteroideas.	7
2.3.1. Relación entre Cáncer y las Hormonas Esteroideas.	11
2.3.2. Terapia Endócrina.	11
2.3.3. Progesterona (P).	13
2.3.3.1. Progestágenos sintéticos derivados de la progesterona.	14
2.4. Inflamación.	15
2.4.1. Etiología.	15
2.4.1.1. Mediadores químicos inflamatorios.	16
2.4.2. Tratamiento de la inflamación.	17
2.4.2.1. Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).	17
2.4.2.1.1. Ácido acetilsalicílico (AAS) y sus derivados.	18
2.5. Relación entre el Cáncer y la Inflamación.	19
2.6. Técnicas de modificación estructural en la Química Farmacéutica.	22
2.6.1. Homología.	22
2.6.2. Hibridación Molecular.	23
2.7. El concepto de la Química Verde y Sustentable (QVyS).	25
2.7.1. Condiciones de reacción alternativas basadas en QVyS	27
2.7.1.1. Radiación de microondas (RMW).	27



2.7.2. Rutas sintéticas alternativas basadas en QVvS.	30
2.7.2.1. Reacciones de esterificación empleando métodos convencionales y no convencionales.	30
2.7.2.1.1. Esterificación de Fisher.	31
2.7.2.1.2. Conversión de cloruros y anhídridos de ácido en ésteres.	31
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>32</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
4.1. Hipótesis.	33
4.2. Objetivos.	33
4.2.1. Objetivos Generales.	33
4.2.2. Objetivos Particulares.	33
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
5.1. Métodos y Materiales.	35
5.2. Síntesis Química.	36
5.2.1. Síntesis de productos intermediarios: ácido 2-acetoxibenzoico (2a), ácido 2-propioniloxibenzoico (2b) y ácido 2-butiloxibenzoico (2c).	37
5.2.2. Síntesis de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4).	38
5.2.3. Síntesis de productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a), 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b) y 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c).	39
5.3. Evaluación Biológica de los productos intermediarios y finales.	40
5.3.1. Evaluación de la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano.	40
5.3.2. Evaluación de la actividad citotóxica en macrófagos murinos.	41
5.3.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.	42
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
6.1. Síntesis Química de los productos intermediarios y finales.	44
6.1.1. Síntesis de productos intermediarios: ácido 2-acetoxibenzoico (2a), ácido 2-propioniloxibenzoico (2b) y ácido 2-	44



butiriloxibenzoico (2c).	
6.1.2. Síntesis de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4).	46
6.1.3. Síntesis de productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a), 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b) y 17 $\alpha$ -(2-butiriloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c).	47
6.2. Caracterización de los productos intermediarios y finales.	49
6.2.1. Caracterización de productos intermediarios: ácido 2-acetoxibenzoico (2a), ácido 2-propioniloxibenzoico (2b) y ácido 2-butiriloxibenzoico (2c).	49
6.2.2. Caracterización de productos intermediarios: 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4).	53
6.2.3. Caracterización de productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a), 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b) y 17 $\alpha$ -(2-butiriloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c).	55
6.3. Evaluación biológica de los productos intermediarios y finales.	60
6.3.1. Evaluación de la actividad citotóxica.	60
6.3.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.	65
<b>7. CONCLUSIONES</b>	68
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	70
<b>9. ANEXO</b>	76
9.1. Lista de Espectros.	76





## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
°C	grado celsius	ER	receptor de estrógenos
µg	microgramos	EtOH	etanol
µL	microlitros	h	horas
µM	micromolar	HCl	ácido clorhídrico
µmol	micromol	Hz	hertz
AA	ácido araquidónico	IL-2	interleucina-2
AAS	ácido acetilsalicílico	IR	infrarrojo
Abs	absorbancia	Log P	coeficiente de partición
AcOEt	acetato de etilo	m	multiplete
AcOH	ácido acético	MeOH	metanol
ADN	ácido desoxirribonucleico	mg	miligramo
AINEs	analgésicos antiinflamatorios no esteroideos	MHz	megahertz
AR	receptor de andrógenos	mL	mililitro
AS	ácido salicílico	mm	milímetro
CC	cromatografía en columna	mM	milimolar
CCF	cromatografía en capa fina	mmol	milimol
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado	MW	microondas
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono	NaCl	cloruro de sodio
COX	ciclooxigenasa	NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
COX-1	ciclooxigenasa isoforma 1	NaOH	hidróxido de sodio
COX-2	ciclooxigenasa isoforma 2	NF-κB	factor nuclear kappa B
d	doblete	nm	nanómetro
DCM	diclorometano	OMS	Organización Mundial de la Salud
dd	doble de dobles	P	Progesterona
DMAP	4-dimetilaminopiridina	p.f.	punto de fusión
DMSO	dimetilsulfóxido	PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E2
DO	densidad óptica	PGs	prostaglandinas
		PM	peso molecular



ppm	partes por millón
PR	receptor de progesterona
PTSA	ácido p-toluensulfónico
QV	Química Verde
QVyS	Química Verde y Sustentable
RHE	Receptor de Hormonas Esteroides
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética de Carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética de Protón
RMW	radiación de microondas
s	singulete
t	triplete
td	triple de dobles
TMS	tetrametilsilano
TPA	acetato de tetradecanoil forbol
UV	ultravioleta
W	watt



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada género en el año de 2008.	3
<b>Figura 2.</b> Esquema simplificado que muestra el proceso de progresión tumoral y las bases moleculares del cáncer.	5
<b>Figura 3.</b> Sistema de anillos de los esteroides.	7
<b>Figura 4.</b> Esquema simplificado que muestra el mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas.	9
<b>Figura 5.</b> Biosíntesis de las hormonas esteroideas a partir del colesterol.	10
<b>Figura 6.</b> Diferentes progestágenos derivados de la progesterona.	15
<b>Figura 7.</b> Ruta biosintética de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina. Sitios blancos para el tratamiento de la inflamación.	17
<b>Figura 8.</b> Estructuras químicas de algunos derivados del ácido salicílico.	18
<b>Figura 9.</b> Funciones celulares y microambientales de PGE2 en el proceso carcinogénico.	20
<b>Figura 10.</b> Control hormonal de la expresión de COX-2 en el cáncer de mama.	21
<b>Figura 11.</b> Distintos tipos de homólogos.	22
<b>Figura 12.</b> Curvas características de relación actividad biológica y el número de grupos metileno entre series homólogas.	23
<b>Figura 13.</b> Homólogos de la 3 $\beta$ -cicloalquilcarboniloxipregna-4,16-dien-6,20-diona.	23
<b>Figura 14.</b> Formas de conexión de dos porciones estructurales en las moléculas híbridas.	24
<b>Figura 15.</b> Estructuras de algunas moléculas híbridas.	25
<b>Figura 16.</b> Espectro electromagnético.	28
<b>Figura 17.</b> Comparación de la transferencia de calor entre el calentamiento convencional y debido a la radiación por microondas.	28
<b>Figura 18.</b> Transferencia de energía de MW por el mecanismo de rotación dipolar y conducción iónica.	29
<b>Figura 19.</b> Comparación de los productos de referencia, intermediarios y	61



finales respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer humano PC-3, MCF-7 y SKLU-1 y los macrófagos murinos.

**Figura 20.** Comparación entre los compuestos homólogos derivados de **1** (productos intermediarios) y los homólogos derivados de **4** (productos finales) por cada línea celular de cáncer humano y cultivo primario: PC-3, MCF-7, SKLU-1 y Macrófagos murinos. 64

**Figura 21.** Comparación de los productos de referencia, intermediarios y finales respecto al porcentaje de inhibición del edema auricular inducido por TPA. 66

**Figura 22.** Comparación entre los compuestos homólogos derivados de **1** (productos intermediarios) y los homólogos derivados de **4** (productos finales) respecto a su actividad antiinflamatoria en el modelo de inducción del edema auricular por TPA. 67



## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Clasificación actual de los fármacos anticancerígenos.	6
<b>Tabla 2.</b> Hormonas esteroideas: Clasificación, fuente, actividad que tienen de las principales clases de hormonas esteroideas y algunos ejemplos.	8
<b>Tabla 3.</b> Comparación entre un método convencional y la RMW para la obtención de los productos intermediarios.	44
<b>Tabla 4.</b> Comparación entre tres métodos para la obtención del producto intermediario <b>4</b> , dos métodos de QVyS y uno convencional.	46
<b>Tabla 5.</b> Comparación entre dos métodos que emplean RMW pero que se distinguen por el uso o no de disolvente y a distintas condiciones de presión, para la obtención de los productos finales.	48
<b>Tabla 6.</b> Propiedades físicas y peso molecular de los productos intermediarios <b>2a-2c</b> .	49
<b>Tabla 7.</b> Señales características de IR de los productos intermediarios <b>2a-2c</b> .	50
<b>Tabla 8.</b> Señales características de RMN- <sup>1</sup> H de los productos intermediarios <b>2a-2c</b> .	51
<b>Tabla 9.</b> Señales características de RMN- <sup>13</sup> C de los productos intermediarios <b>2a-2c</b> .	52
<b>Tabla 10.</b> Señales características de IR del producto <b>4</b> .	53
<b>Tabla 11.</b> Señales características de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C del producto <b>4</b> .	54
<b>Tabla 12.</b> Características físicas y peso molecular de los productos finales <b>5a-5c</b> .	55
<b>Tabla 13.</b> Señales características de IR de los productos finales <b>5a-5c</b> .	56
<b>Tabla 14.</b> Señales características de RMN- <sup>1</sup> H de los productos finales <b>5a-5c</b> .	57
<b>Tabla 15.</b> Señales características de RMN- <sup>13</sup> C de los productos finales <b>5a-5c</b> .	58
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento de las tres líneas celulares de cáncer humano producido por los distintos productos sintetizados.	60
<b>Tabla 17.</b> Porcentaje de inhibición del edema auricular producido por los distintos compuestos sintetizados.	65



## 1. RESUMEN

En este trabajo experimental se llevó a cabo la síntesis de tres derivados del AS como fueron el ácido 2-acetoxibenzoico (**2a**), ácido 2-propioniloxibenzoico (**2b**) y ácido 2-butiloxibenzoico (**2c**) y se esterificaron en la posición C-17 de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (**4**), obteniéndose los compuestos 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (**5a**), 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (**5b**) y 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (**5c**). Los productos intermedios (**2a-2c**) y los finales (**5a-5c**) se caracterizaron mediante métodos físicos (punto de fusión y apariencia) y espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C).

El diseño de los productos intermedios se basó en la técnica de modificación molecular denominada homología y el diseño de los productos finales en la técnica de hibridación molecular.

La obtención de los productos intermedios y los productos finales, se realizó empleando métodos no convencionales y rutas sintéticas alternativas basadas en QVvS como fue la radiación de microondas (RMW) como fuente de energía. El empleo de la RMW presentó diversas ventajas como la reducción de los tiempos de reacción, la disminución de la generación de residuos, la realización de reacciones efectivas en fase sólida (libres de disolventes), el incremento en los rendimientos y el empleo de reactivos y catalizadores menos tóxicos para la salud humana y ambiental. De esta manera, se contribuyó con una alternativa novedosa, más eficiente y amigable para el medioambiente para la obtención de dichos derivados.

Por otro lado, se determinó la citotoxicidad de los productos intermedios y finales, los cuales se evaluaron frente a tres líneas celulares de cáncer humano como fueron PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SKLU-1 (pulmón) y un cultivo primario de macrófagos murinos. Se observó que los productos **2a-2c** presentaron mayor potencia frente a PC-3 y nula contra MCF-7 y al compararlos como homólogos, presentaron en su mayoría un comportamiento de tipo “zig-zag”. Los productos **5a-5c** fueron los más potentes pero no mostraron selectividad por algún tipo celular y exhibieron una tendencia al incremento continuo en la actividad citotóxica por cada línea celular, por lo cual el compuesto más potente de la serie



fue el **5c**. En cuanto a la evaluación sobre macrófagos murinos, se observó que tanto los productos intermediarios y los finales fueron poco tóxicos frente a este tipo de células no cancerosas y ambas series de homólogos mostraron un comportamiento tipo “zig-zag” en dicho intervalo de metilenos. No obstante, los compuestos híbridos **5a y 5c** fueron mucho menos tóxicos que sus respectivas unidades **2a o 2c** y **4**. Por tanto, se produjo una mejora en la selectividad y seguridad respecto a otros agentes citotóxicos como los compuestos de referencia **3** y **4**, los cuales son empleado en el área clínica para el tratamiento de algunos tipos de cáncer humano.

Además, se evaluó la actividad antiinflamatoria de los productos intermediarios y finales y se determinó que existe una relación entre la lipofilia y la actividad biológica. También se observó que la serie de homólogos **5a-5c** exhibió un incremento no continuo en dicha actividad, mientras que los productos **2a-2c** presentaron un comportamiento tipo “zig-zag”.

Cabe mencionar que la actividad dual que presentó este tipo de moléculas, las posiciona como potenciales agentes anticancerígenos, considerando la importante relación que existe entre el cáncer y la inflamación.

## 2. ANTECEDENTES

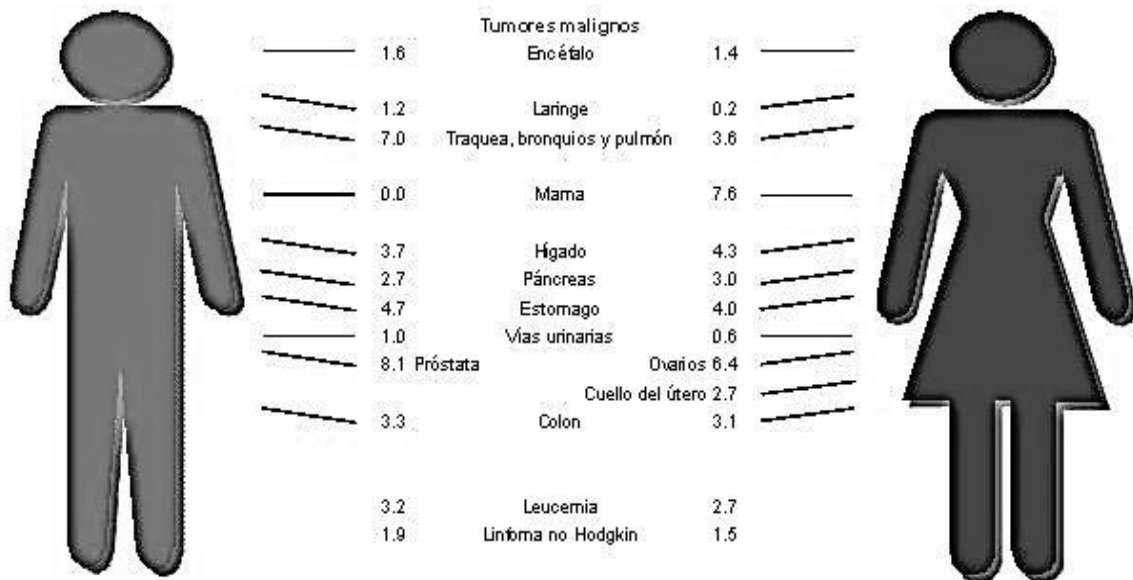
### 2.1. Cáncer.

#### 2.1.1. Panorama actual del cáncer en México y el Mundo.

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial con 7.6 millones de defunciones ocurridas en el año de 2008 y se estima que el número de defunciones, anuales a nivel mundial, por cáncer seguirá aumentando hasta 11 millones para el año 2030. La OMS, estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015.<sup>1</sup>

En México, durante el año de 2007, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país y por género, el cáncer representó la tercer causa de muerte entre las mujeres, mientras que en los hombres fue la cuarta.<sup>2</sup> El informe más reciente a nivel nacional (2008), indicó que el mayor porcentaje de defunciones por tumores malignos entre los hombres fueron el de próstata (8.1%), seguido por los tumores de tráquea, bronquios y pulmón (7.0%), enfermedad asociada al consumo de tabaco; y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4%) (Figura 1).<sup>3</sup>

Porcentaje de defunciones por tumores malignos para cada sexo 2008



Fuente: INEGI Estadísticas Vitales, Defunciones 2008. Base de datos.

Figura 1. Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada género en el año de 2008.<sup>3</sup>





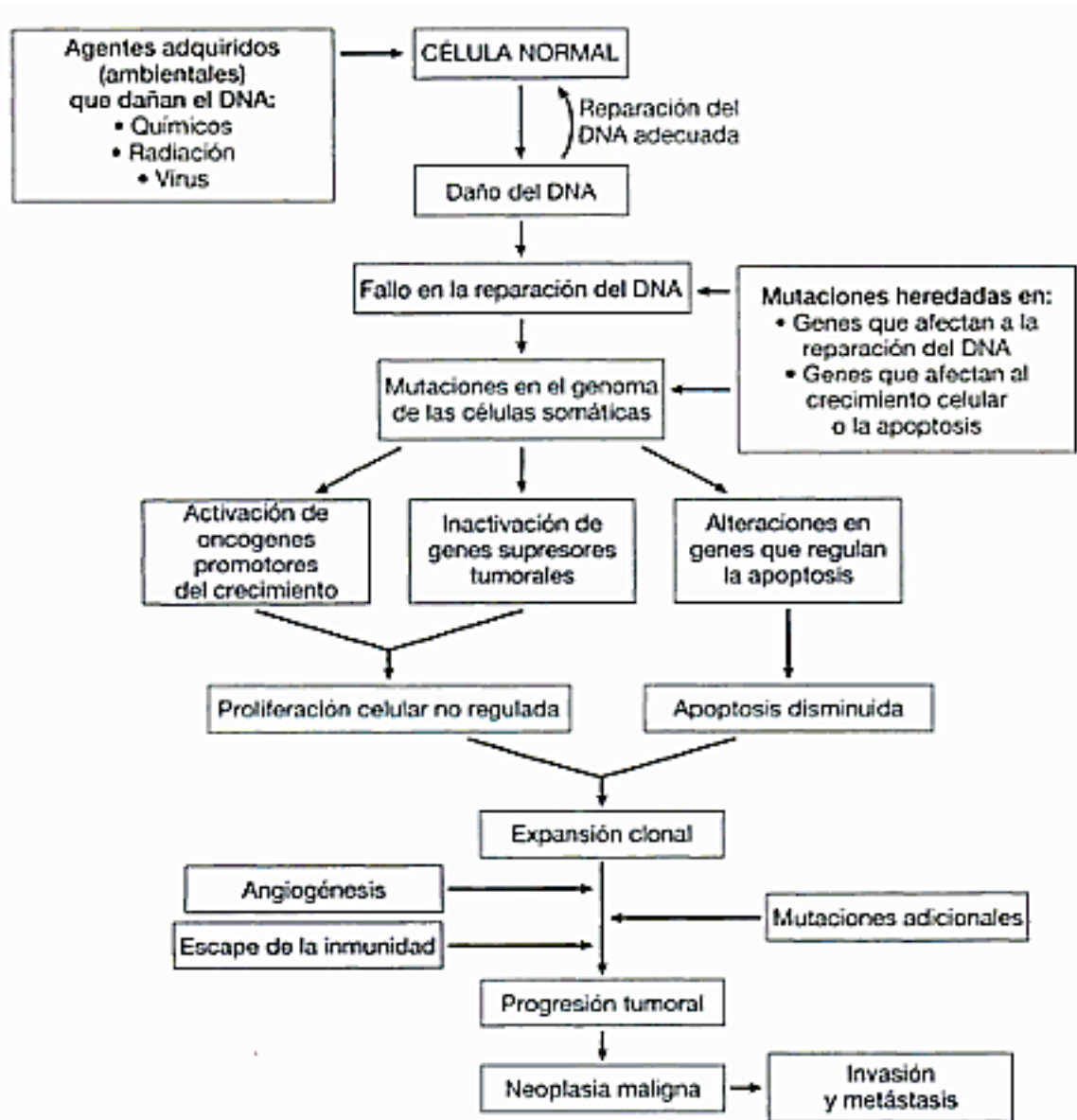
### 2.1.2. Etiología.

El cáncer, también denominado neoplasia o tumor maligno, es una enfermedad que se caracteriza por una multiplicación y diseminación incontroladas de formas anormales de las propias células del cuerpo.<sup>4</sup> La carcinogénesis se considera como un proceso con múltiples fases, en las que sucede una serie de alteraciones genéticas en el interior de la célula, que mediante los procesos de promoción y progresión, conducen a la malignización.<sup>5</sup> Dichas alteraciones genéticas pueden heredarse o adquirirse por la acción de agentes ambientales o exógenos, tales como los agentes químicos (humo de tabaco, contaminantes de alimentos y en solventes usados en la industria), la radiación (ionizante, X y UV) o virus (algunos virus ADN y ARN).<sup>6,7</sup>

Se ha determinado que las alteraciones genéticas o mutaciones que promueven la carcinogénesis ocurren sobre los protooncogenes promotores del crecimiento, los genes supresores de tumores, los que regulan la apoptosis y los que están implicados en la reparación del ADN, dichos daños producen la pérdida de la regulación de la proliferación y diferenciación celular, lo que favorece que las células normales se transformen mediante un proceso denominado *progresión tumoral* y el cuál consiste en el desarrollo de diversos atributos fenotípicos de una manera escalonada en las células cancerosas (*Figura 2*).<sup>5,6</sup>

### 2.2. Tratamiento del cáncer.

El cáncer es una familia de enfermedades donde cada tipo de cáncer tiene su curso clínico y su tratamiento característico que depende de la etapa de la enfermedad. Es importante considerar que la presencia de una sola célula cancerígena puede ocasionar una recaída y la muerte del huésped; por tanto, es muy importante la eliminación total de las células cancerígenas para alcanzar la recuperación. Actualmente, se conocen tres métodos principales para tratar el cáncer, como son la quimioterapia, la cirugía y la radioterapia, los cuales se pueden emplear en combinaciones.<sup>4,7</sup>



**Figura 2.** Esquema simplificado que muestra el proceso de progresión tumoral y las bases moleculares del cáncer.<sup>6</sup>

### 2.2.1. Quimioterapia.

La quimioterapia del cáncer tiene como finalidad detener el progreso del tumor en tratamiento. Lo ideal es que esta terapia sólo interfiera con los procesos celulares de las células malignas; sin embargo, los fármacos contra el cáncer, en su mayoría, no reconocen de manera específica a las células neoplásicas, por lo cual también afectan a todas las células que proliferan, tanto normales como anormales.<sup>8</sup> En la tabla 1 se muestran los grupos de fármacos anticancerígenos más empleados en el área clínica.

**Tabla 1.** Clasificación actual de los fármacos anticancerígenos.<sup>4,7,8,9,10</sup>

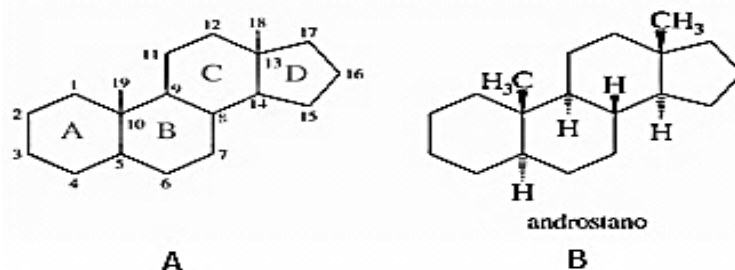
Subgrupo	Mecanismo de acción	Detalles del mecanismo	Ejemplos
<b>Fármacos Antineoplásicos</b>			
Agentes citotóxicos que interactúan directamente con el ADN	Alquilantes	Actúan formando enlaces covalentes con el ADN e impiden de esta manera la replicación del mismo.	ciclofosfamida, clorambucilo, lomustina, carmustina
	Complejos de platino	Inhiben la replicación del ADN por unión al mismo.	cisplatino, carboplatino
	Antibióticos citotóxicos	Actúan intercalándose entre los pares de bases del ADN interfiriendo en su síntesis.	doxorrubicina, dactinomicina, bleomicinas, mitomicina,
Agentes citotóxicos que interactúan indirectamente con el ADN	Antimetabolitos	Bloquean una o más vías metabólicas que intervienen en la síntesis de ADN.	metotrexato, fluorouracilo, mercaptopurina,
	Inhibidores del huso mitótico	Detienen la segregación de los cromosomas al inhibir la formación del huso mitótico.	vincristina, vinblastina, docetaxel
	Inhibidores de la topoisomerasa	Estabilizan los complejos ADN-enzimas provocando la escisión de la cadena de ADN.	etopósido, tenipósido, irinotecán, topotecán
Citostáticos	Anticuerpos monoclonales	Bloquean los receptores extracelulares de células tumorales.	rituximab, trastuzumab, imatinib
	Modificadores de la respuesta biológica	Potencian la respuesta inmune del huésped.	interferón- $\gamma$ , interferón- $\alpha 2(A)$ , IL-2,

Terapia Endócrina			
Hormonas esteroideas	Antiestrógenos Antiandrógenos	Suprimen la secreción de las hormonas endógenas o antagonizan su acción.	tamoxifeno, raloxifeno, flutamida, ciproterona
	Antiaromatasa	Inhiben a biosíntesis de estrógenos.	formestano, aminoglutetimida, anastrozol

### 2.3. Hormonas Esteroideas.

Los esteroides son un grupo de compuestos naturales que son ampliamente utilizados como antiinflamatorios, diuréticos, anabolizantes, anticonceptivos, antiandrogénicos, progestacionales, anticancerígenos, entre otras aplicaciones.<sup>11</sup> El grupo de los esteroides está constituido por una gran variedad de compuestos, entre los cuales destacan los compuestos del grupo del colesterol y otros esteroides, los ácidos biliares, las hormonas esteroideas, los cardiotónicos (digitalinas), entre otros.<sup>12</sup>

Químicamente, los esteroides son moléculas policíclicas complejas, cuyas estructuras están basadas en el sistema tetracíclico *androstano*, comúnmente denominado ciclopentanoperhidrofenantreno (*Figura 3A*). Los cuatro anillos tienen asignadas las letras A, B, C y D, comenzado por el anillo inferior izquierdo; los anillos A, B y C son de seis miembros y el anillo D es de cinco. Los átomos de carbono se numeran a partir del anillo A y terminando con los dos grupos metilos angulares (*Figura 3B*).<sup>13,14</sup>



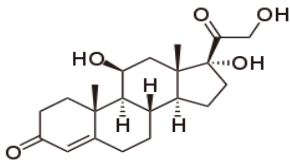
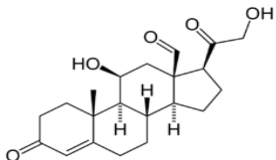
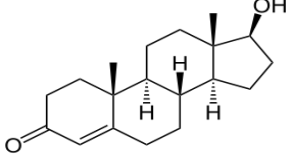
**Figura 3.** Sistema de anillos de los esteroides. A) Designación de anillos y numeración de carbonos. B) Estructura y estereoquímica del androstano.<sup>14</sup>



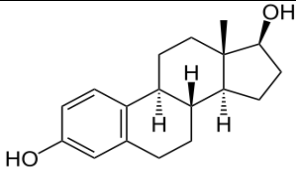
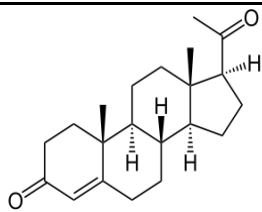
La mayoría de los esteroides se caracterizan por ser moléculas rígidas, con los grupos metilo axiales perpendiculares al plano; esto es debido a que todos los anillos están fusionados *trans* (conformación más estable).<sup>13</sup> Además, se caracterizan por poseer un grupo carbonilo o hidroxilo en C3, alguna cadena lateral u otro grupo funcional en C17 y también, puede haber un doble enlace entre las posiciones C5 y C4 o C6.<sup>14</sup>

Biológicamente, las hormonas esteroideas son mensajeros químicos que son sintetizados en glándulas y transportados por el torrente sanguíneo a tejidos diana para estimular o inhibir algún proceso.<sup>13</sup> La importancia de las hormonas esteroideas reside en el papel que tienen sobre la regulación del metabolismo, crecimiento y desarrollo celular y tisular como se observa en la tabla 2.<sup>7</sup>

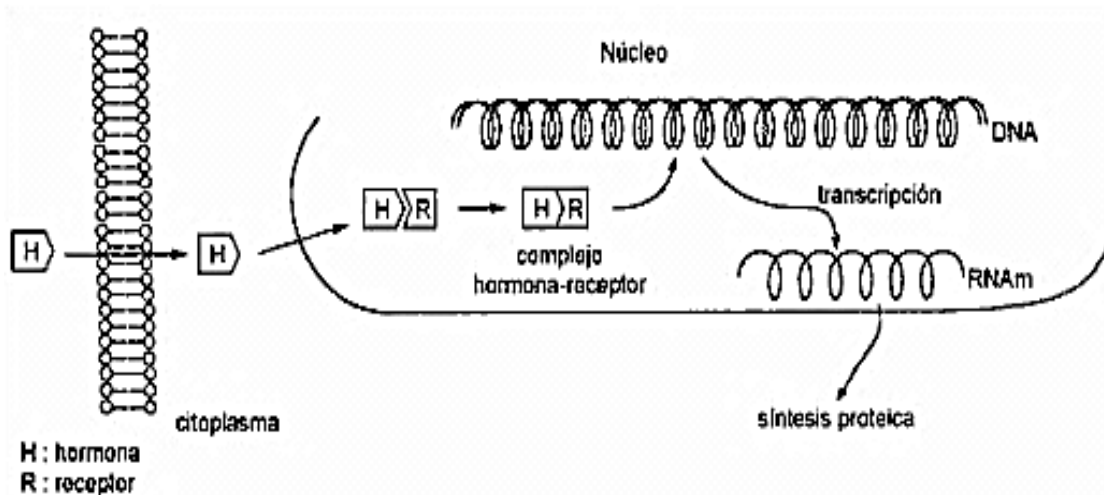
**Tabla 2.** Hormonas esteroideas: Clasificación, fuente, actividad que tienen de las principales clases de hormonas esteroideas y algunos ejemplos.<sup>7</sup> (Adaptada y modificada de Roskoski, R. Bioquímica. 1ª edición, McGraw-Hill, México. 1998).

Clasificación	Fuentes Principales	Acción	Ejemplos
Glucocorticoides	Suprarrenales	Promueve el catabolismo.	 Cortisol
Mineralocorticoides	Suprarrenales	Promueve la reabsorción de sodio por el riñón.	 Aldosterona
Andrógenos	Testículos	Mantiene las características sexuales masculinas.	 Testosterona



Estrógenos	Ovarios	Promueve el crecimiento y desarrollo uterino y mamario.	 Estradiol
Progestágenos	Ovarios, suprarrenales, placenta	Promueve el crecimiento uterino y mantiene las características sexuales femeninas.	 Progesterona

En cuanto al mecanismo de acción de las hormonas esteroideas, se conoce que éstas son reguladoras de la expresión génica en las células diana a través de la formación de complejos con los receptores de hormonas esteroideas (RHEs), los cuales son proteínas específicas localizadas inicialmente en el citoplasma, cuya asociación con la hormona da lugar a un complejo hormona-receptor, se transloca hacia el núcleo e interacciona con regiones concretas del ADN (elementos de respuesta a hormonas). Esta interacción activa o inhibe el proceso de transcripción a RNA mensajero y, como consecuencia puede afectar la síntesis de proteínas (*Figura 4*).<sup>7,15,16</sup>



*Figura 4.* Esquema simplificado que muestra el mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas.<sup>15</sup>



De acuerdo a la tabla 2, se puede observar que existe una gran similitud estructural entre las diversas hormonas esteroideas debido a que todas tienen como precursor metabólico al colesterol. Para la síntesis de las diversas hormonas, es necesaria una serie de reacciones enzimáticas, como la degradación de la cadena lateral, que da lugar a la pregnenolona, y que por oxidación en C3 conduce a la progesterona, siendo ésta un intermediario sintético de las diversas clases de hormonas esteroideas (Figura 5).<sup>15</sup>

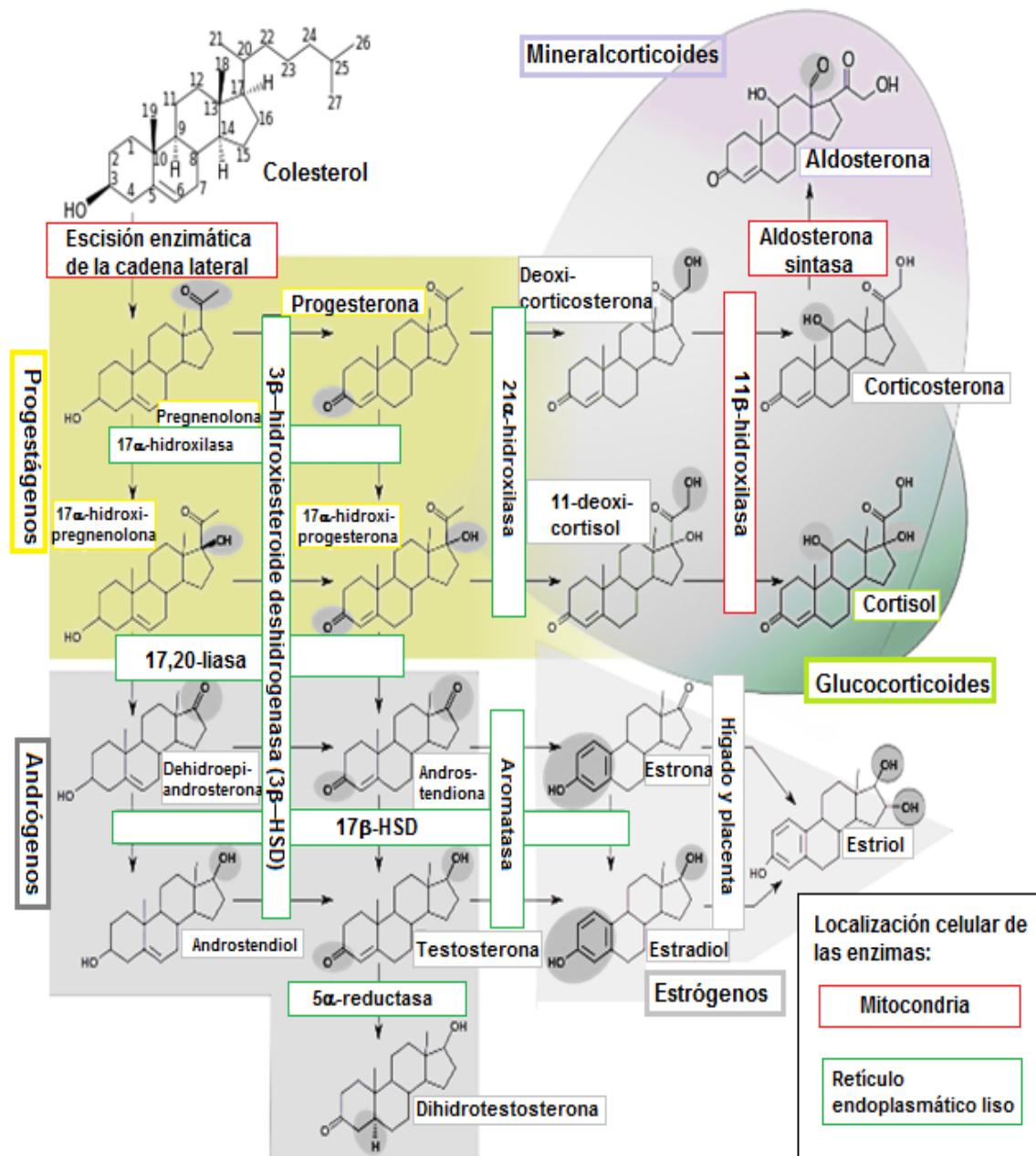


Figura 5. Biosíntesis de las hormonas esteroideas a partir del colesterol.



### 2.3.1. Relación entre Cáncer y las Hormonas Esteroideas.

Las hormonas esteroideas, también se encuentran involucradas en el crecimiento y desarrollo de muchos cánceres humanos.<sup>16</sup> Algunos estudios han demostrado que los tumores derivados de tejidos sensibles a hormonas pueden ser hormono-dependientes.<sup>4</sup> De acuerdo a lo anterior, si se produce una estimulación hormonal excesiva de los órganos (a través de RHEs en tejidos específicos), aumenta el número de divisiones celulares, cuyo proceso es susceptible de la acumulación de errores genéticos, entonces se favorece la promoción del desarrollo de fenotipos malignos.<sup>7</sup> Además, se ha determinado que la interrupción de las funciones normales de dichos receptores promueve el desarrollo de diversos tipos de cánceres tales como el cáncer de mama, próstata, ovario y pulmón, y leucemias y linfomas, entre otros.<sup>16</sup>

### 2.3.2. Terapia Endócrina.

La terapia endócrina se basa en la hormono-dependencia de algunos tumores, los cuales deberán responder a las hormonas esteroideas y cuya remoción deberá producir la regresión tumoral.<sup>8</sup> Por tanto, la terapia endócrina consiste en el tratamiento con hormonas que tienen acciones opuestas, antagonistas hormonales o fármacos que inhiben la síntesis de las hormonas implicadas u hormonas o análogos de las mismas que en sí mismos presentan acciones inhibitorias sobre tejidos específicos.<sup>4</sup> Es importante considerar que dichos tratamientos sólo serán eficaces, si las células tumorales expresan el RHE correspondiente.<sup>7</sup> En este trabajo se hará énfasis en dos tipos de cánceres hormono-dependientes como son el cáncer de mama y el cáncer de próstata y por otro lado, el cáncer de pulmón.

En el cáncer de mama, los estrógenos, como el estradiol, incrementan la proliferación tanto de células epiteliales mamarias normales como transformadas. Se ha observado que alrededor del 60% de los cánceres de mama expresan receptores de estrógeno (ER).<sup>16</sup> Con base en lo anterior, el objetivo del tratamiento de cáncer de mama es disminuir los niveles de estrógenos mediante el empleo de distintos grupos de fármacos como los *antiestrógenos* (inhiben el crecimiento





tumoral mediado por estrógenos a través del bloqueo competitivo por el ER, como el tamoxifeno, raloxifeno y clomifeno); los *inhibidores de la aromatasa* (bloquean la actividad enzimática de la aromatasa, que afecta la conversión de andrógenos a estrógenos, como formestano, aminoglutetimida y anastrozol); los *progestágenos* [actúan a través de receptores de progesterona (PR), inhibe la activación del ER e induce la producción de ER anómalos, como el acetato de megestrol y el acetato de medroxiprogesterona].<sup>17,18</sup>

En el cáncer de próstata, los andrógenos, como la testosterona, ejercen sus acciones a través de receptores de andrógenos (AR) con lo que contribuyen al crecimiento y desarrollo de la próstata tanto normal como maligno.<sup>16</sup> El objetivo del tratamiento de dicho padecimiento se basa en la disminución de los niveles de andrógenos y la inhibición de la actividad de AR mediante el empleo de los *estrógenos* como el etenilestradiol y el dietiestilbestrol (bloquean la producción de hormona luteinizante y como consecuencia disminuyen la síntesis de andrógenos en el testículo);<sup>8</sup> los *antiandrógenos* como la flutamida y la ciproterona (bloquean competitivamente el AR);<sup>4</sup> y los *inhibidores de la 5 $\alpha$ -reductasa* como la finasterida (inhibe competitivamente a la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, produciendo una disminución de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, metabolito más potente y con mayor afinidad al AR).<sup>19</sup>

En el cáncer del pulmón, es bien conocida la relación que existe con el fumar tabaco; sin embargo, estudios han determinado que el 53% de todas las mujeres del mundo con cáncer de pulmón nunca fumaron. Con base en evidencia actual, se sugirió que las hormonas esteroideas tienen un papel importante en el desarrollo y la progresión tumoral mediante la comprobación de la presencia de ER y PR tanto en células epiteliales normales como en determinados tipos de líneas celulares de cáncer de pulmón (NSCLC), mientras que la aromatasa sólo se expresa en estas últimas, lo que destaca el papel que tienen los estrógenos y los progestágenos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En células de cáncer de pulmón, se ha observado que los estrógenos junto con los progestágenos estimulan la proliferación celular y la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente factor pro-angiogénico, que



promueve el desarrollo, invasión y metástasis. Se ha determinado que los antiestrógenos y los inhibidores de la aromatasa disminuyen los efectos carcinogénicos de los estrógenos; por lo cual, se sugieren tratamientos, como la administración de antihormonas, dirigidos a la modulación de la actividad de ERs o PRs para disminuir la progresión del cáncer de pulmón.<sup>20</sup>

### 2.3.3. Progesterona (P).

La progesterona (P) es una hormona esteroidea que se secreta por el cuerpo lúteo durante la segunda fase del ciclo menstrual (fase lútea), como respuesta a la hormona luteinizante (LH), y por la placenta durante el embarazo; además, se secreta por los testículos y la corteza suprarrenal, pero en bajas cantidades.<sup>4,8</sup>

En la actualidad se ha descrito que la P tiene importantes funciones fisiológicas en el organismo, por ejemplo, en el sistema reproductor femenino interviene en el mantenimiento del embarazo<sup>8</sup> y la regulación de la proliferación del endometrio dependiente de estrógenos,<sup>21</sup> la supresión de la ovulación<sup>15</sup> y la menstruación.<sup>7</sup> En el tejido mamario, promueve el desarrollo y diferenciación de las glándulas mamarias junto con los estrógenos.<sup>9</sup> En el sistema nervioso central, actúa como agente neuroprotector mediante la estimulación de la regeneración axonal, la mielogénesis de nervios periféricos lesionados y oligodendrocitos, regulación de la función sináptica y la mielinización.<sup>22,23</sup> En el sistema cardiovascular, la P es capaz de regular la estructura y la función de los vasos sanguíneos,<sup>24</sup> mediante la regulación de la activación de las enzimas óxido nítrico sintetasa (ONS) y la ciclooxigenasa (COX), que estimulan la producción de óxido nítrico endotelial y regulación de la agregación plaquetaria.<sup>25</sup>

La mayoría de los efectos fisiológicos de la P se deben a la alteración de la transcripción de genes específicos en células diana a través de la unión y regulación de la actividad de PR. Aunque, los efectos progestacionales son generalmente debidos a la unión al PR en el tejido reproductor femenino, muchos de sus otros efectos son atribuidos a la unión, en tejidos no reproductivos, a otros miembros de la misma familia de receptores como son los receptores de



mineralcorticoides (MR), glucocorticoides (GR) y AR (debido a las similitudes estructurales revisadas en la sección 2.3).<sup>19,23</sup> Por lo cuál, se ha determinado que posee actividades antiestrogénicas y antimineralcorticoides, débiles actividades glucocorticoides y antiandrogénicas y carece de actividad androgénica o estrogénica.<sup>19</sup> Por ejemplo, la P actúa como un agente antiinflamatorio y regula la respuesta inmune a través de GR<sup>23</sup> e incrementa la excreción de sodio al antagonizar al MR frente a la aldosterona.<sup>19</sup>

No obstante, no todos los efectos se deben a la unión a receptores, lo que explica sus propiedades antiandrogénicas y antiestrogénicas. En el caso de su actividad antiandrogénica, esta se debe a la capacidad que tiene la progesterona para inhibir competitivamente la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, lo que origina una disminución de la conversión de testosterona a la dihidrotestosterona. La actividad antiestrogénica, se debe a su unión a PR, lo que produce una disminución en la expresión de genes que codifican a los ER y como consecuencia, disminuye la capacidad de las células para responder a los estrógenos y además, se produce un incremento en la expresión de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) tipo 2, la cuál inactiva al estradiol por conversión a estrona.<sup>19,26</sup>

### 2.3.3.1. Progestágenos sintéticos derivados de la progesterona.

La P es inactiva por vía oral porque sufre amplio metabolismo de primer paso (metabolismo hepático), por lo cual la administración mediante esta vía es bastante limitada. Lo anterior, despertó la necesidad de desarrollar nuevos derivados.<sup>4,19</sup>

Los primeros derivados activos por vía oral fueron la 17 $\alpha$ -acetoxiprogesterona **(1)** y la 17 $\alpha$ -caproiloxiprogesterona **(2)**. Actualmente, se han desarrollado nuevos derivados con un perfil mejorado respecto a la P como la hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona **(3)**, dihidrogesterona, clormadinona **(4)**, ciproterona **(5)**. Dichos derivados se caracterizan por la introducción de sustituyentes sobre la posición 17 $\alpha$ , específicamente ésteres de cadena variable y

voluminosos o sobre la posición 6 (grupos alquilo o halógenos), lo que conduce a ser derivados más estables metabólicamente (Figura 6).<sup>4,15</sup>

Los progestágenos sintéticos incluyen un amplio rango de moléculas con variables grados de actividades antiestrogénica, antiandrogénica, glucocorticoide y antimineralcorticoide, y de acuerdo a sus propiedades, pueden ser empleados como *anticonceptivos* (en conjunto con estrógenos o solos), en la *terapia de remplazo hormonal* (HTR), en el *tratamiento de desórdenes ginecológicos* (el síndrome premenstrual y el tratamiento de infertilidad femenina) y en la *terapia del cáncer*.<sup>4,9,11,19</sup>

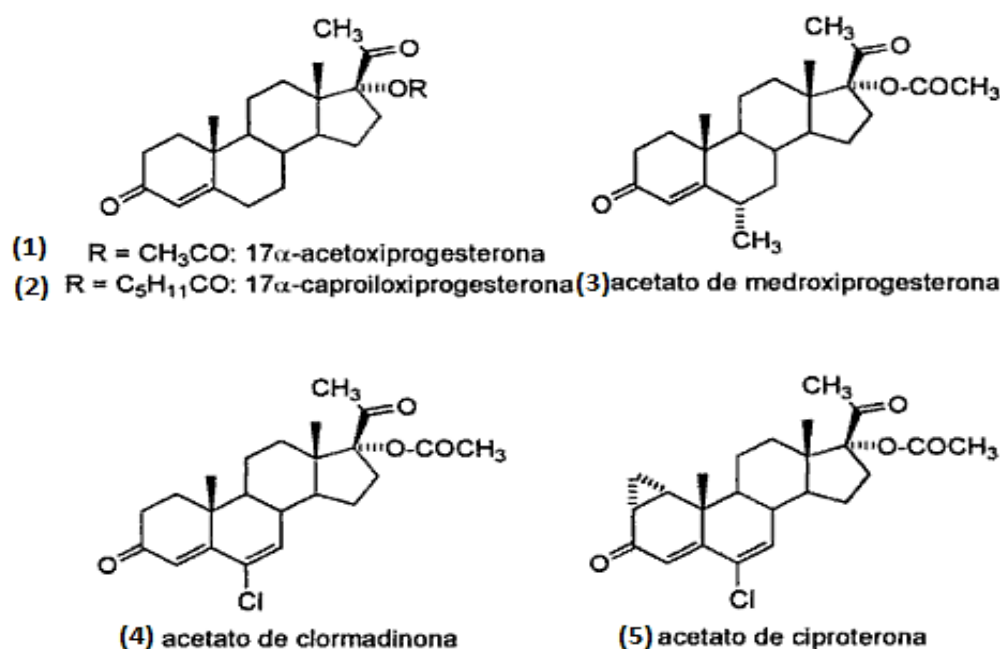


Figura 6. Diferentes progestágenos derivados de la progesterona.<sup>15</sup>

## 2.4. Inflamación.

### 2.4.1. Etiología.

La inflamación es una respuesta protectora del organismo frente a la lesión (debida a infecciones microbianas, agentes físicos o químicos, tejido necrótico o reacciones de tipo inmunitario). La inflamación tiene como finalidad la contención y el aislamiento de la lesión, destrucción de los microorganismos invasores e inactivación de toxinas y la preparación del tejido para la reparación.<sup>27</sup>



La inflamación se puede clasificar en dos tipos: *aguda* y *crónica*. La inflamación aguda es de comienzo temprano (segundos a minutos), tiene una duración corta (minutos a días) y se caracteriza por el aumento del flujo sanguíneo en la zona afectada y de la permeabilidad capilar y la migración de leucocitos (neutrófilos) de los vasos capilares hacia los espacios intersticiales cercanos a los sitios de lesión; como consecuencia, se pueden presentar signos como calor, enrojecimiento, edema y dolor. La inflamación crónica es de comienzo tardío (días), tiene una mayor duración (semanas a años) y se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias en el sitio de la lesión (macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) e inducción de proliferación de vasos sanguíneos y fibrosis (debida al daño tisular inducido por las células inflamatorias).<sup>27</sup>

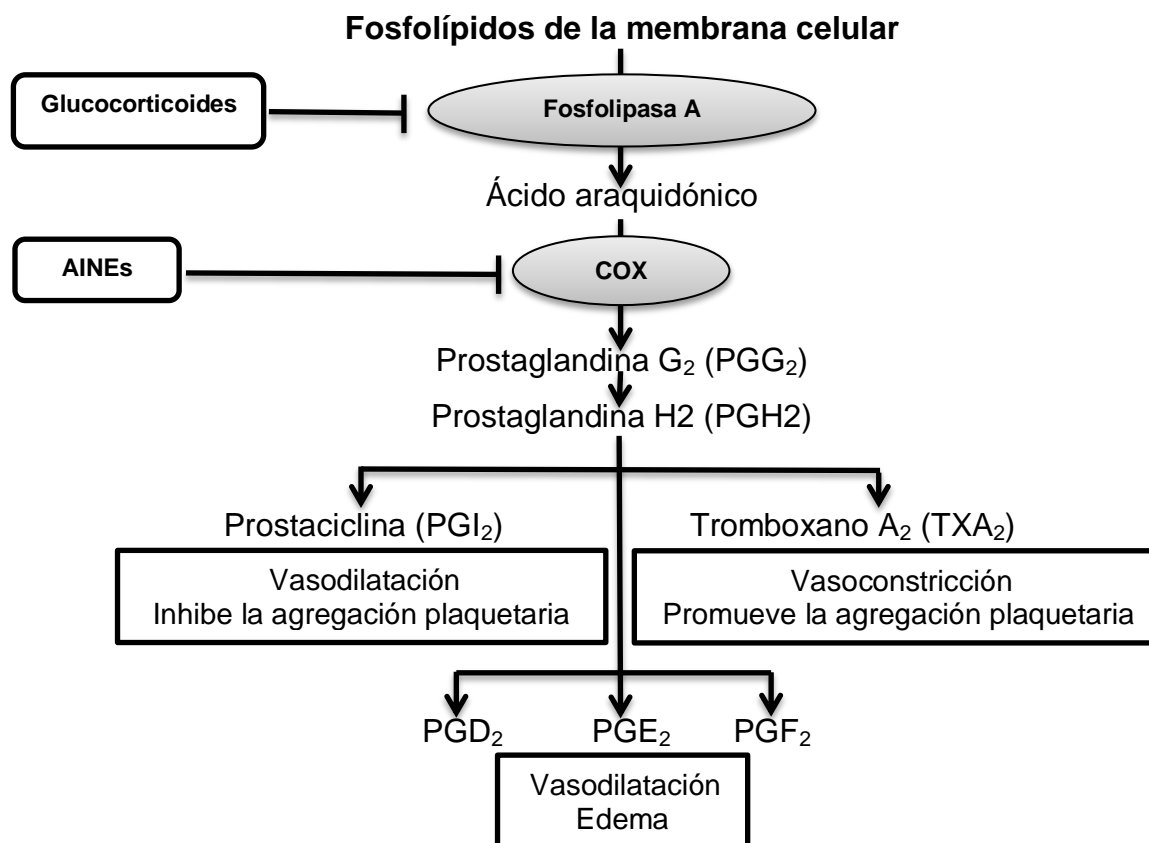
#### **2.4.1.1. Mediadores químicos inflamatorios.**

La inflamación se caracteriza por una respuesta vascular y una respuesta celular. Los efectos son mediados por las proteínas circulantes en el plasma (sistema del complemento, bradicinina y factores de coagulación) y por factores producidos localmente por las células de la pared vascular o las células inflamatorias (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, histamina, serotonina, enzimas lisosómicas, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citocinas).<sup>27,28</sup>

Dentro de los mediadores químicos inflamatorios más estudiados, destacan las prostaglandinas (PGs). Las PGs provienen del metabolismo del ácido araquidónico mediante la vía de la Ciclooxygenasa (COX). Se han descrito tres tipos de isoenzimas de COX denominadas COX-1 (constitutiva), COX-2 (inducible) y COX-3 (abundante en corteza cerebral y corazón y diana del paracetamol). La COX-1 se expresa de manera constitutiva en el tracto gastrointestinal, riñones, tejido vascular, plaquetas, órganos reproductores masculinos y femeninos y pulmones y regula las funciones fisiológicas normales. La COX-2 se expresa tanto en células inflamatorias (monocitos y macrófagos) como en células no relacionadas con la inflamación (fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales), por inducción de diversos mediadores relacionados con la respuesta inflamatoria como factores de crecimiento y algunas citocinas.<sup>29,30</sup>

### 2.4.2. Tratamiento de la inflamación.

Como se mencionó anteriormente, las PGs tienen una función importante en la respuesta inflamatoria, por lo que resulta de gran utilidad clínica el bloqueo de su síntesis mediante la interrupción del metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la COX (*Figura 7*). Entre los fármacos capaces de disminuir los signos y síntomas de la inflamación se encuentran los glucocorticoides y los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).<sup>28</sup>



**Figura 7.** Ruta biosintética de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina. Sitios blancos para el tratamiento de la inflamación.<sup>27</sup>

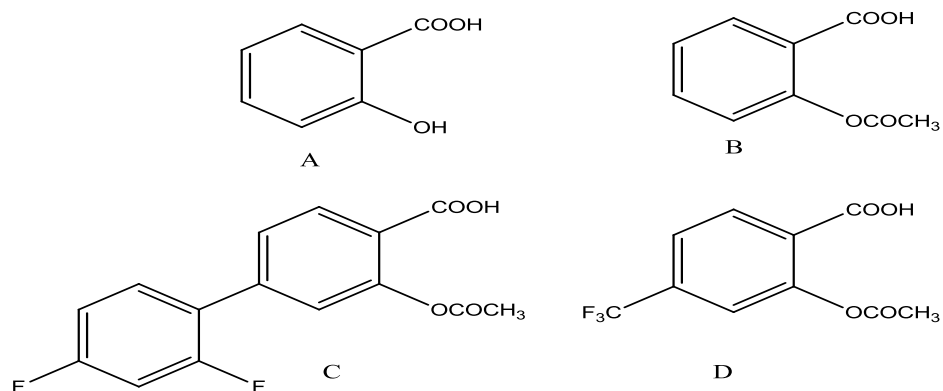
#### 2.4.2.1. Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).

Los AINEs están conformados por moléculas de muy diversa estructura química, pero que comparten la capacidad de inhibir la actividad de la COX y como consecuencia, la síntesis de PGs (*Figura 7*).<sup>28</sup> La importancia que tiene la inhibición selectiva de COX-2 sobre COX-1 se debe a que la COX-2 tiene un papel muy importante en el proceso inflamatorio y que la inhibición de la COX-1 produce severos efectos adversos en el tracto gastrointestinal como lesiones

gastroduodenales, los cuales son consecuencia de una disminución en la producción de PGs citoprotectoras ( $PGE_2$  y  $PGI_2$ ). Con base en lo anterior, se han desarrollado compuestos que inhiben selectivamente a la COX-2 sin afectar la biosíntesis de PGs dependiente de la COX-1, las cuales son necesarias para las funciones fisiológicas normales.<sup>29</sup> Debido a la importancia que tiene la inhibición selectiva de la COX-2 sobre la COX-1, los AINEs se pueden clasificar de acuerdo a su selectividad hacia la COX-2 como: **1) Inhibidores no selectivos** (ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, naproxeno, piroxicam, sulindaco, tolmetina); **2) Inhibidores preferencialmente de COX-2** (etodolaco, meloxicam, nimesulida); y **3) Inhibidores selectivos de COX-2** (celecoxib, etoricoxib, parecoxib, rofecoxib, valdecoxib).<sup>29</sup>

#### 2.4.2.1.1. Ácido acetilsalicílico (AAS) y sus derivados.

El AAS (*Figura 8B*) pertenece a la familia de los salicilatos, derivado del ácido salicílico (AS, *Figura 8A*). El AAS no es selectivo hacia COX-2, sin embargo es el prototipo de todos los AINEs dado que no se ha encontrado hasta la fecha un salicilato tan eficaz. No obstante, algunos derivados de naturaleza difenólica como el diflunisal (*Figura 8C*) muestran una mayor potencia antiinflamatoria y analgésica. Otros análogos del AAS, como el triflusal (*Figura 8D*) se emplean fundamentalmente como agentes antiagregantes plaquetarios.<sup>15</sup>



**Figura 8.** Estructuras químicas de algunos derivados del ácido salicílico.<sup>15</sup>

Un aspecto importante en las relaciones estructura-actividad (SAR) de los salicilatos es la necesidad del grupo carboxilato en forma libre, dado que esta porción interacciona con el residuo de Arg-120 del sitio activo de la COX, para



producir el efecto antiinflamatorio.<sup>15,31</sup> Los derivados acetilados del AS, como el AAS y diflunisal, dan lugar a la inhibición irreversible de la COX como consecuencia del cambio conformacional derivado de la acetilación del residuo Ser-530, mientras que los derivados no acetilados son inhibidores reversibles no competitivos.<sup>15,31</sup>

## 2.5. Relación entre el Cáncer y la Inflamación.

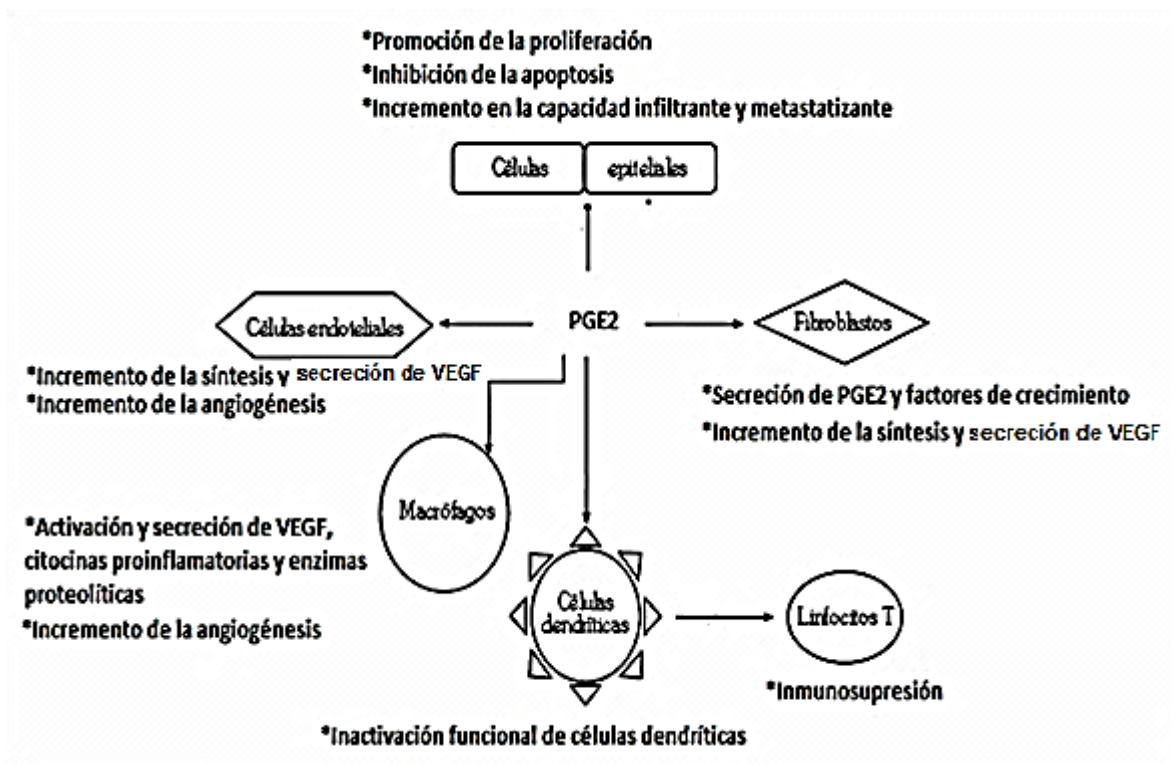
Cuando la inflamación se dirige a los tejidos normales y no se controla, se puede convertir en la causa de lesiones y enfermedades, tal es el caso de la inflamación crónica en el desarrollo del cáncer.<sup>32</sup> Desde que se observaron por primera vez infiltrados de leucocitos en tejidos tumorales, se ha ido acumulando evidencia de que en los sitios de inflamación crónica existe una mayor probabilidad de que se genere un tumor y que los procesos inflamatorios locales promueven el crecimiento y desarrollo de algunos cánceres previamente establecidos y que muchos tumores generan por si mismos un ambiente pro-inflamatorio, lo que amplifica el proceso inflamatorio preexistente y repercute en el crecimiento del tumor.<sup>33</sup> Actualmente se ha demostrado que diversos cánceres están asociados con condiciones de inflamación crónica tales como el cáncer de colon asociado con enfermedades inflamatorias intestinales y la inflamación crónica en los pulmones debida a agentes no-digeribles como los asbestos, el carbón, el polvo de sílice y el humo de cigarro que predisponen al desarrollo de cáncer de pulmón.<sup>30</sup>

Para determinar la relación existente entre la inflamación y la predisposición al cáncer se ha requerido de la identificación de los mediadores inflamatorios implicados y los agentes que previenen la transformación neoplásica a través de la inhibición del proceso inflamatorio.<sup>30</sup> Existe fuerte evidencia que sugiere que las PGs (PGE<sub>2</sub>) contribuyen al desarrollo del cáncer mediante funciones específicas sobre diversos tipos celulares (*Figura 9*).<sup>30,34,35</sup> En adición, datos epidemiológicos, estudios clínicos y genéticos destacan una sobreexpresión de COX-2 en alrededor del 85% de los cánceres como el cáncer de esófago, estómago, mama, páncreas, pulmón, colon, piel, vejiga urinaria, próstata, vías aerodigestivas superiores y



cérvicouterino.<sup>4,36,37,38,39,40</sup> Por otro lado, se ha generado abundante evidencia experimental y epidemiológica que destaca que la terapia con AINEs es capaz de proteger, suprimir, retrasar o revertir el proceso carcinogénico.<sup>34</sup> Es por ello que la COX-2 se considera como una diana potencial para el desarrollo de nuevos antineoplásicos.<sup>4,37,41</sup>

Estudios epidemiológicos, preclínicos y clínicos sugieren que los AINEs contribuyen a una reducción del riesgo de cáncer entre el 50-90%;<sup>30</sup> también protegen, retardan, reducen o revierten los cánceres del aparato digestivo como el de esófago (indometacina, sulindaco y AAS),<sup>4,38</sup> colon [AAS, sulindaco, piroxicam, celecoxib, SC560 (inhibidor selectivo de COX-1), NS-398, SC-58125, JTE-552 (inhibidores selectivos de COX-2)];<sup>35,36,41</sup> en el cáncer de vías aerodigestivas superiores (piroxicam, indometacina, nimesulida, celecoxib);<sup>36</sup> el cáncer de mama (indometacina, celecoxib, NS-398 y SC560);<sup>4,35</sup> el cáncer de próstata (NS-398, diclofenaco, sulindaco);<sup>41</sup> el cáncer de pulmón (indometacina y el NS-398).<sup>39</sup>

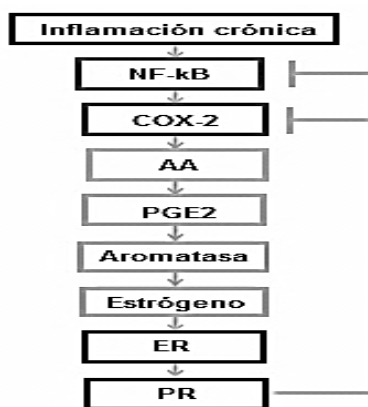


**Figura 9.** Funciones celulares y microambientales de PGE<sub>2</sub> en el proceso carcinogénico.<sup>35</sup> (Imagen adaptada y modificada de Grau, J. Inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en la prevención del cáncer, *Rev. Clin. Esp.*, 2005, 205, p. 450)



Se han descritos distintos mecanismos de acción de los AINEs frente al desarrollo tumoral como la restauración de la inmunidad celular antitumoral; la inhibición de la invasión y metástasis [cáncer de próstata (sulindaco),<sup>41</sup> cáncer colon (sulindaco, celecoxib, indometacina, NS-398, SC560),<sup>35,41</sup> cáncer de mama (celecoxib, indometacina, NS-398, SC560)<sup>35,41</sup>]; la inhibición de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) [cáncer de próstata (diclofenaco)<sup>41</sup>]; la actividad antiproliferativa [cáncer de esófago (indometacina),<sup>30</sup> cáncer de boca (nimesulida)<sup>36</sup>]; la inducción de la apoptosis (muerte celular programada) [cáncer de próstata (NS-398),<sup>41</sup> cáncer de pulmón (indometacina, NS-398),<sup>36</sup> cáncer de esófago (AAS),<sup>35</sup> cáncer de colon (SC-58125, JTE-552)<sup>41</sup>].

Por otro lado, se ha determinado que existe un control hormonal sobre la expresión de la COX-2 (*Figura 10*). La COX-2 está involucrada en la inflamación crónica y es responsable de la producción de PGs. Las PGs están asociadas con el incremento de la expresión de aromatasa, lo que estimula la generación de altos niveles de ER. Los estrógenos mediante ER incrementan la cantidad de PR; y este afecta la activación de la COX-2 a través de la inhibición del factor NF- $\kappa$ B (factor de transcripción que desempeña una función clave en la respuesta inmune e inflamatoria, en el desarrollo, progresión y apoptosis de tumores). De esta manera e intrínsecamente el PR regula la progresión y el desarrollo de tumores de mama (*Figura 10*).<sup>9,40,42,43</sup> Otros estudios han revelado que los AINEs tienen la capacidad de disminuir la actividad de la aromatasa, tal es el caso de dos análogos de la nimesulida que además de suprimir la actividad de dicha enzima, inhiben la proliferación celular estimulada por testosterona.<sup>44,45</sup>



**Figura 10.** Control hormonal de la expresión de COX-2 en el cáncer de mama.<sup>43</sup>

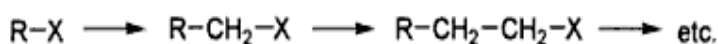
## 2.6. Técnicas de modificación estructural en la Química Farmacéutica.

La modificación estructural de una molécula tiene por objeto optimizar su actividad farmacológica principal, a fin de disponer de fármacos más selectivos y menos tóxicos, con mejor farmacocinética o sin problemas de formulación farmacéutica debidos a una solubilidad o estabilidad inadecuadas.<sup>31</sup> En el campo de la química farmacéutica existen numerosas formas de buscar moléculas activas, dos de ellas son la homología y la hibridación molecular.

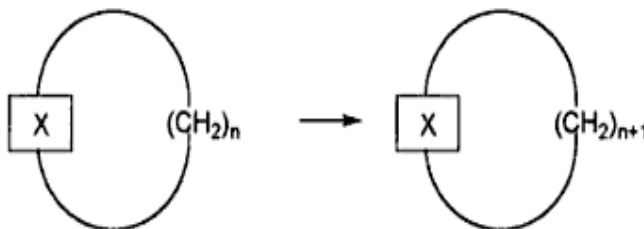
### 2.6.1. Homología.

Un homólogo es el análogo que resulta de la adición o sustracción de un carbono a una cadena o anillo, es decir, difieren exclusivamente en la presencia o ausencia de, uno o varios, grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-).<sup>31,46</sup> Las series homólogas de compuestos más frecuentemente empleadas en Química Farmacéutica se muestran a continuación (*Figura 11*):

#### Derivados monoalquilados



#### Derivados ciclometilénicos

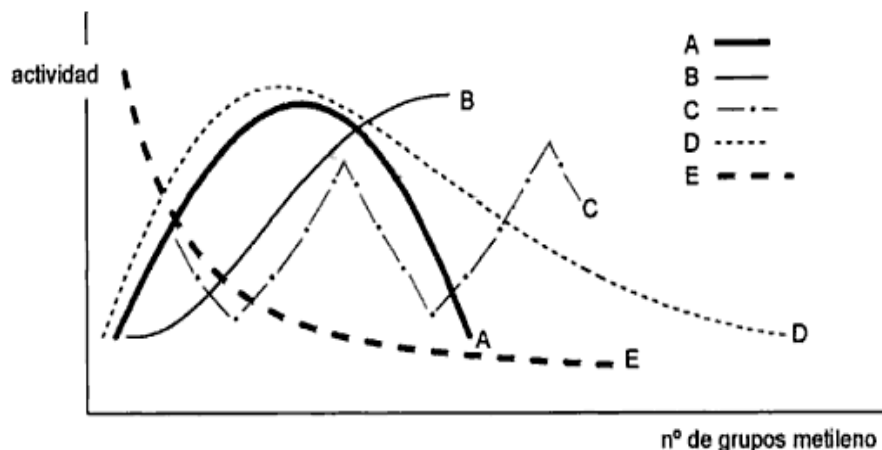


#### Derivados difuncionales



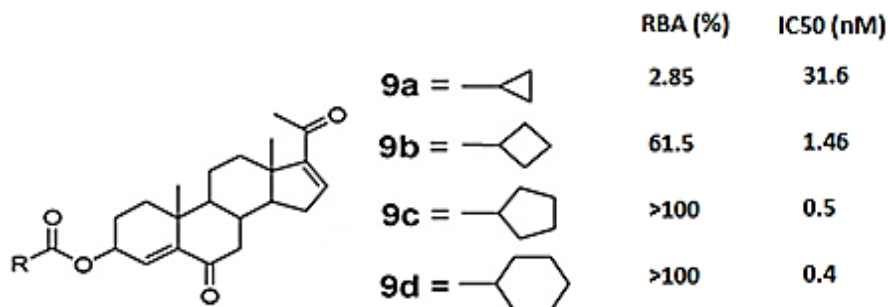
*Figura 11. Distintos tipos de homólogos.*<sup>15</sup>

Generalmente, un cambio de dicho tipo suele producir un aumento o disminución de la lipofilia.<sup>31</sup> Se ha observado que la relación entre el número de grupos metileno y la actividad biológica en una serie de homólogos puede mostrar algunos perfiles característicos como: A) distribución parabólica, B) aumento continuo, C) perfil “zig-zag”, D) perfil asimétrico con un máximo de actividad y E) disminución continua (*Figura 12*).<sup>15</sup>



**Figura 12.** Curvas características de relación actividad biológica y el número de grupos metileno entre series homólogas.<sup>15</sup>

En la literatura se han reportado diversos ejemplos de homólogos, un ejemplo son los nuevos derivados de la progesterona que poseen un grupo cicloalquilo en la posición C-3 del núcleo androstano en forma de éster (*Figura 13*). Se determinó que al aumentar el número de carbonos en el anillo alifático, aumenta el porcentaje de unión relativa al receptor de andrógeno (%RBA) y disminuye la IC<sub>50</sub> de los homólogos.<sup>47</sup>



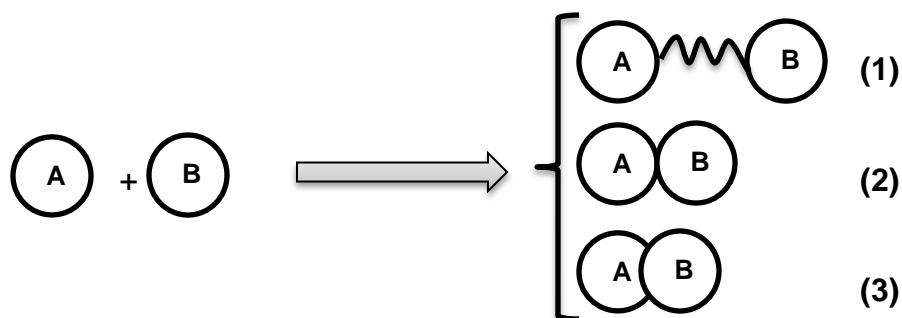
**Figura 13.** Homólogos de la 3β-cicloalquilcarboniloxipregna-4,16-dien-6,20-diona.<sup>47</sup>

### 2.6.2. Hibridación Molecular.

Las moléculas híbridas son aquellas que están constituidas por diferentes componentes con actividad biológica, tanto naturales como sintéticos, con el objetivo de generar nuevas moléculas activas, en las cuales las características de los componentes individuales son moduladas, amplificadas o modificadas.<sup>48</sup> Este tipo de moléculas se caracteriza por contener, al menos dos grupos farmacóforos unidos covalentemente dentro de una misma. En adición, si las moléculas



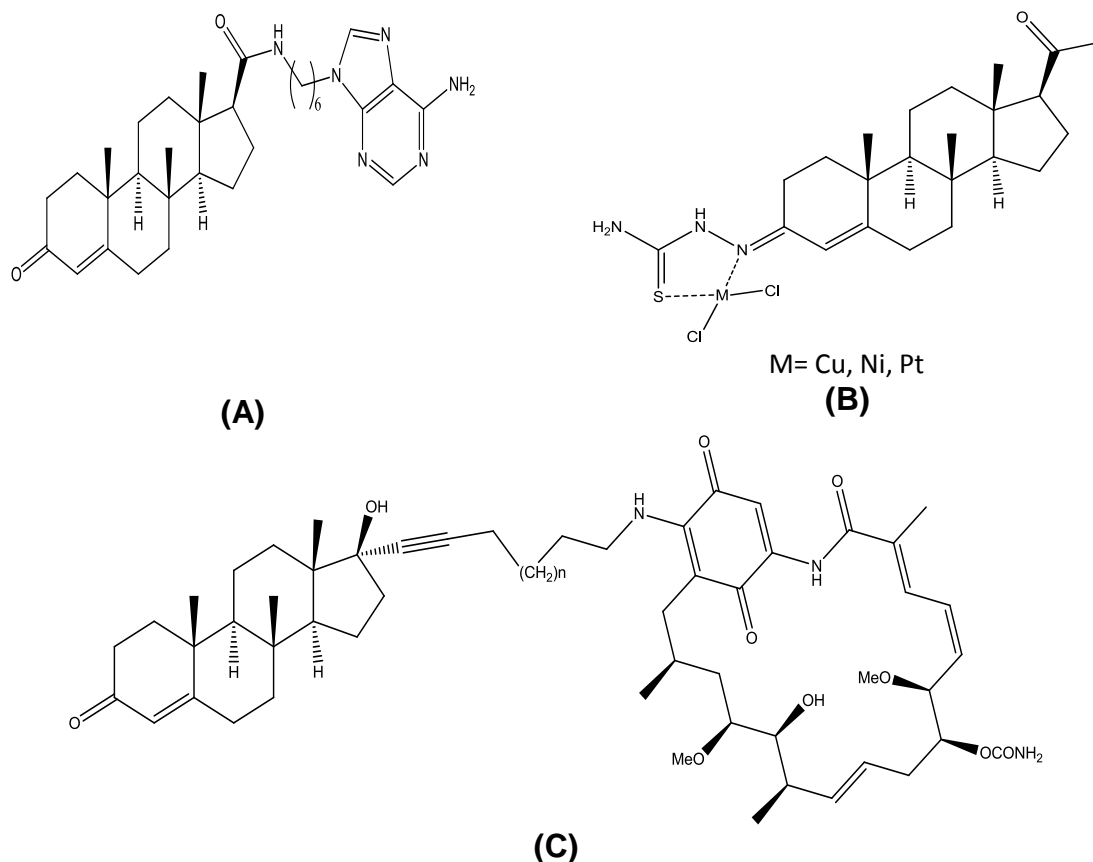
asociadas tienen distintas actividades biológicas, se indicará que poseen una *actividad dual*.<sup>46</sup> Las dos porciones estructurales tienen que estar situadas a la distancia adecuada para que interactúen eficazmente con los sitios activos de enzimas o receptores; por lo cual, para la unión de las dos moléculas, a veces se utilizan espaciadores o linkers **(1)**, pueden estar unidas directamente **(2)** o traslapadas **(3)** (*Figura 14*).<sup>46</sup>



**Figura 14.** Formas de conexión de dos porciones estructurales en las moléculas híbridas.<sup>46</sup>

Dado que las dianas biológicas sobre las que actúan las moléculas híbridas pueden estar o no relacionadas es necesaria una clasificación mecanística. Esto da lugar a tres tipos de híbridos: tipo A (una sola diana y ambas porciones interactúan en el mismo sitio de la diana), tipo B (dos dianas y las dos porciones de la molécula híbrida actúan en dianas independientes) y tipo C (dos sitios de la misma diana y las dos porciones de la molécula híbrida actúan al mismo tiempo).<sup>49</sup>

Actualmente, se han diseñado moléculas híbridas con actividad anticancerígena, las cuales combinan un agente terapéutico con un vector-transportador biológico con el objeto de disminuir la toxicidad, aumentar la actividad antiproliferativa y conferir cierta especificidad. Tales vectores pueden ser ligandos esteroideos o no esteroideos; los cuales, en forma de moléculas híbridas, pueden exhibir actividades biológicas específicas.<sup>50</sup> Algunos de los agentes anticancerígenos más comunes que se han combinado con vectores esteroideos son las nitrosoureas, aminoácidos N-protegidos o péptidos, purinas (*Figura 15A*),<sup>51</sup> productos naturales como geldanamicina (*Figura 15C*)<sup>48</sup> e isotiocianatos<sup>50</sup> y algunos metalofármacos como el cisplatino (*Figura 15B*).<sup>50</sup>



**Figura 15.** Estructuras de algunas moléculas híbridas. **(A)** Híbrido de progesterona con adenina como inhibidor de la glicoproteína P que presentó la mayor actividad sobre células de leucemia humana K562/R7 resistentes. **(B)** Híbrido de progesterona con la porción estructural activa de las tiosemicarbazidas (grupo tiocianato) y forma complejos metálicos semejantes al cisplatino como agente citotóxico y apoptótico. **(C)** Híbrido de testosterona con geldanamicina es activo contra células de cáncer de mama (MCF-7).

### 2.7. El concepto de la Química Verde y Sustentable (QVYS).

Durante mucho tiempo, uno de los mayores inconvenientes de la química ha sido el problema de la generación de residuos y productos que afectan al medioambiente. En los inicios de la industria química, se tenía la creencia de que los recursos naturales eran infinitos y que el uso y explotación indiscriminada no tendrían ningún efecto sobre el medioambiente; sin embargo, la aparición de los efectos de la emisión de contaminantes a la atmósfera comenzó a producir estragos, de tal manera que incitó al desarrollo de una consciencia ecológica y de estrategias que tienen como finalidad disminuir la emisión de contaminantes al medioambiente; es así como nació el concepto de “Química Verde” (QV).<sup>52,53</sup>



La QV consiste en el diseño, desarrollo e implementación de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas para la salud humana y el medioambiente mediante la aplicación de la ciencia y la producción química de una manera sustentable, menos costosa, segura, no contaminante y con requerimientos de cantidades mínimas de materiales y energía, mientras se produce poco o ningún material de desecho y menores riesgos y daño ambiental.<sup>54,55,56,57</sup> Por otro lado, la Química Sustentable (QS), concepto confundido generalmente con la QV, tiene un enfoque relacionado con la ecoeficiencia, el crecimiento económico y la calidad de vida en términos de un análisis costo/beneficio.<sup>55</sup> A pesar de ello, ambas estrategias convergen en diversos puntos como: la disminución de los riesgos asociados a los procesos químicos; la reducción del impacto ambiental a un nivel sustentable, asegurando una adecuada calidad de vida; el empleo de tecnologías químicas nuevas y mejoradas que relaciona la protección ambiental con el crecimiento económico; la QV es sustentable porque cuesta normalmente menos, en términos económicos, que la química convencional; la QV es sustentable porque usa eficientemente los materiales, reciclando al máximo y con el uso mínimo de materias primas, lo que repercute en los costos y el uso eficiente de materiales; la QV es sustentable respecto a los residuos porque reduce o elimina totalmente su producción, lo que implica una disminución en los gastos para el tratamiento o desecho de los mismos.<sup>55,58</sup>

De acuerdo a lo anterior, la QV también es considerada como sustentable, por lo cual se puede denominar como QVyS. La QVyS se encuentra fundamentada por doce principios que permiten conocer que tan “verde” es un proceso, método, síntesis o compuesto químico; los cuales se mencionan a continuación:

- 1. Prevención de la generación de residuos.**
- 2. Economía atómica.**
- 3. Síntesis químicas menos peligrosas.**
- 4. Diseño de sustancias químicas seguras.**
- 5. Disolventes y auxiliares seguros.**



6. Diseño para mejorar la eficiencia energética.
7. Uso de materias primas renovables.
8. Reducción de derivatizaciones.
9. Catálisis.
10. Diseño de la degradación
11. Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación.
12. Química segura para la prevención de accidentes.<sup>54,56,58</sup>

A pesar de que todavía persiste el empleo de sustancias peligrosas y los múltiples pasos en los procesos químicos, la mejora en otros aspectos, de acuerdo a los doce principios, contribuye de manera positivamente a lograr la prevención de la contaminación.

Por otro lado, la investigación se ha centrado en el incremento de la eficiencia energética mediante el empleo de técnicas renovables y ecológicas. Por esta razón, en los últimos años han sido desarrolladas diversas técnicas energéticas más ecológicas (condiciones no convencionales de reacción) como la electroquímica, la fotoquímica, la sonoquímica y la radiación por microondas.<sup>59</sup> Además, la QVys cuenta con tecnologías, las cuáles pueden ser clasificadas en alguna las siguientes dos áreas de enfoque:

- La utilización de condiciones de reacción alternativas basadas en QVys (condiciones no convencionales de reacción).
- La utilización de rutas sintéticas alternativas basadas en QVys.<sup>53</sup>

### **2.7.1. Condiciones de reacción alternativas basadas en QVys (condiciones no convencionales de reacción).**

#### **2.7.1.1. Radiación de microondas (RMW)**

La radiación de microondas (RMW) es una forma de energía electromagnética situada en el rango de frecuencias de 300 a 300 000 MHz correspondiente a una longitud de onda de 1m a 1mm. Dentro de este rango de energía, sólo se ve afectada la rotación molecular (*Figura 16*).<sup>60</sup>



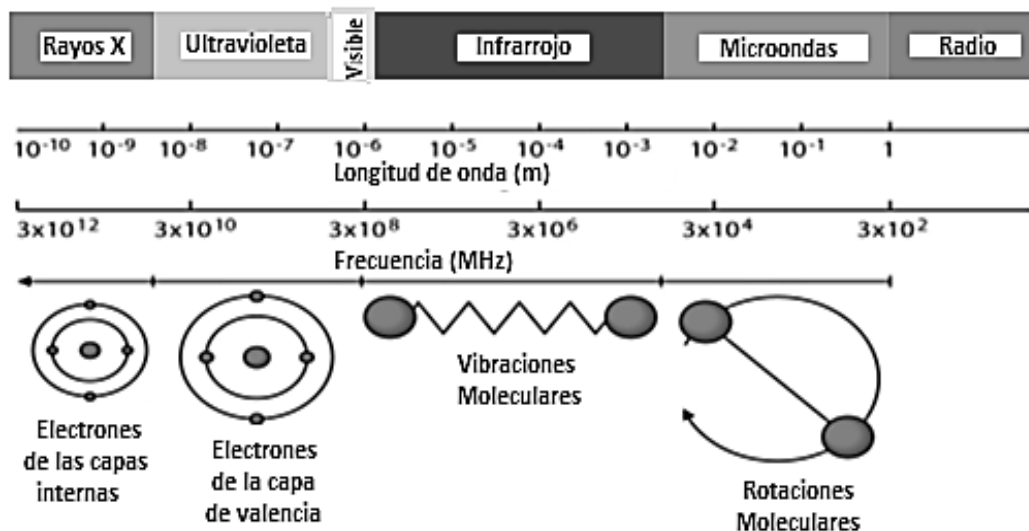


Figura 16. Espectro electromagnético.<sup>60</sup>

El calentamiento por RMW ofrece ciertas ventajas frente al calentamiento convencional, debido a que este último se basa en la transferencia de calor por conducción a partir de una fuente externa de calor, donde el calor se transmite primero a las paredes del recipiente de reacción, luego al disolvente y finalmente, a los reactivos (Figura 17a); y por tanto, este método resulta ser lento e ineficiente para transferir calor, dado que dependerá de la conductividad térmica del material del recipiente. Por otro lado, el calentamiento por RMW se basa en que las microondas inciden directamente sobre las moléculas que están presentes en la mezcla de reacción, lo que origina un aumento rápido e instantáneo de la temperatura con zonas de supercalentamiento (Figura 17b).<sup>60</sup>

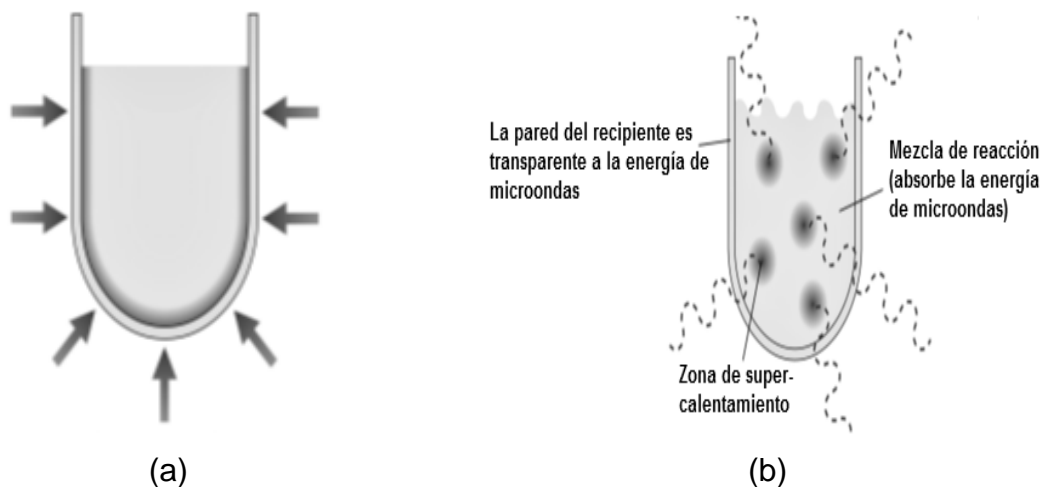
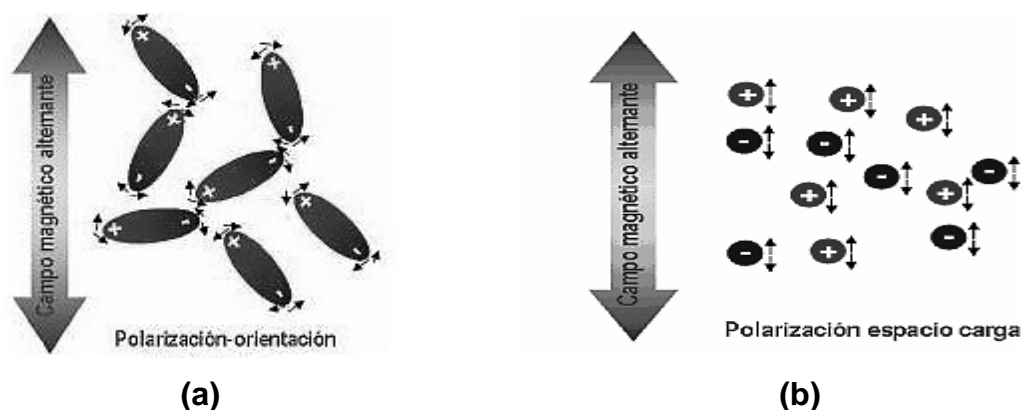


Figura 17. Comparación de la transferencia de calor entre el calentamiento: (a) convencional y (b) debido a la radiación por microondas.<sup>60</sup>

Los dos mecanismos que describen la transferencia de energía mediante la aplicación de RMW son: a) **Rotación dipolar**, en esta interacción las moléculas polares intentan alinearse respecto al campo eléctrico de las microondas, las moléculas tienen tiempo para alinearse, pero no para seguir la oscilación de dicho campo, por lo cual esta reorientación incesante produce fricción y así se genera calor (*Figura 18a*); y b) **Conducción iónica**, en esta el campo eléctrico genera movimiento de los iones libres o especies iónicas que intentan orientarse al rápido cambio del campo eléctrico de las MW, este movimiento genera fricción y como consecuencia, calor (*Figura 18b*).<sup>60,61,62</sup>



**Figura 18.** Transferencia de energía de MW por el mecanismo de (a) rotación dipolar y (b) conducción iónica.<sup>62</sup>

Se ha descrito que las interacciones entre los materiales (disolventes, reactivos, soportes sólidos polares) y la radiación provocan un incremento en la rapidez de las reacciones, el cual se adjudica a *efectos térmicos y cinéticos de las MW*. Los efectos térmicos están relacionados con los mecanismos de transferencia de energía y se incrementan respecto a la polaridad de los materiales; mientras que los efectos cinéticos, están relacionados con el incremento en la probabilidad de colisiones y la proporción de la energía suficiente (casi de forma instantánea) para superar la barrera energética de las reacciones (energía de activación).<sup>63,64</sup>

Además, de los efectos antes mencionados, se deben considerar otros denominados *efectos específicos de las MW*. Estos son esencialmente efectos térmicos que dependen del medio de reacción (el efecto de supercalentamiento de los disolventes a presión atmosférica, el calentamiento selectivo de reactivos o



catalizadores heterogéneos altamente absorbentes de radiación de microondas en un medio de reacción no polar, la formación de zonas de supercalentamiento por acoplamiento directo de la energía de MW con reactivos específicos en una disolución homogénea) y del mecanismo de reacción (se presentan cuando la polaridad del sistema se incrementa durante el progreso de la reacción).<sup>63,64</sup>

Otra ventaja que ofrece el empleo de la RMW, es la posibilidad de realizar transformaciones en ausencia de disolventes. Existen tres tipos de metodologías que pueden llevarse a cabo bajo dichas condiciones:

- a) Reacciones en las que los reactivos son adsorbidos sobre soportes sólidos (óxidos minerales como alúminas, zeolita, sílica gel, arcillas, entre otros).**
- b) Reacciones que emplean catálisis de transferencia de fase sólido-líquido (PTC).**
- c) Reacciones en las que uno de los reactivos es líquido.**

Estos métodos son muy empleados por la QVyS, dado que se llevan a cabo bajo condiciones experimentales muy seguras y más ecológicas. Además, se ha observado que las reacciones que se llevan a cabo bajo estas condiciones, ofrecen diversas ventajas relacionadas con el aumento de la reactividad, la selectividad y con la disminución de la energía y la generación de residuos.<sup>60,64</sup>

## **2.7.2. Rutas sintéticas alternativas basadas en QVyS.**

### **2.7.2.1. Reacciones de esterificación empleando métodos convencionales y no convencionales.**

En la actualidad, los ésteres se preparan mediante los métodos convencionales que implican la reacción de alcoholes o fenoles con ácidos y sus derivados. Por otro lado, los métodos no convencionales se basan en los anteriores; sin embargo, tienen por objetivo disminuir el consumo energético, utilizar reactivos y catalizadores menos tóxicos, reducir la producción de subproductos que pueden ser dañinos para la salud humana y ambiental, disminuir los tiempos de reacción o mejorar los rendimientos.



### 2.7.2.1.1. Esterificación de Fisher.

La esterificación de Fischer convierte a los ácidos carboxílicos y los alcoholes en ésteres mediante un catalizador ácido como es el ácido sulfúrico, fosfórico o clorhídrico seco y emplea calentamiento convencional durante un intervalo de horas. Sin embargo, esta reacción tiene la desventaja de ser reversible, por lo que alcanza el equilibrio cuando aún quedan cantidades apreciables de reactivos, impactando en el rendimiento de la misma.<sup>14,65</sup>

Por otro lado, se han reportado algunas reacciones de esterificación que emplean la RMW como fuente de calentamiento y como catalizador ácido p-toluensulfónico (PTSA); las cuales aseguran la posibilidad de llevarse a cabo en ausencia de disolvente, en periodos de tiempo de 3 – 10 minutos y con buenos rendimientos (82 – 97%).<sup>60,66</sup>

### 2.7.2.1.2. Conversión de cloruros y anhídridos de ácido en ésteres.

Los ácidos carboxílicos pueden ser convertidos a ésteres mediante la previa transformación en cloruros (con cloruro de tionilo) o anhídridos de ácidos o mediante el empleo directo de éstos últimos junto con alcoholes y como catalizador piridina o ácido sulfúrico.<sup>65,67</sup>

Por otro lado, se han reportado algunas reacciones que utilizan la RMW como fuente de calentamiento y como catalizador imidazol; las cuales se realizaron en ausencia de disolvente durante intervalos de tiempo de 3 minutos y se obtuvieron rendimientos aceptables (63-90%), los cuales son semejantes a los reportados con 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador.<sup>68</sup>

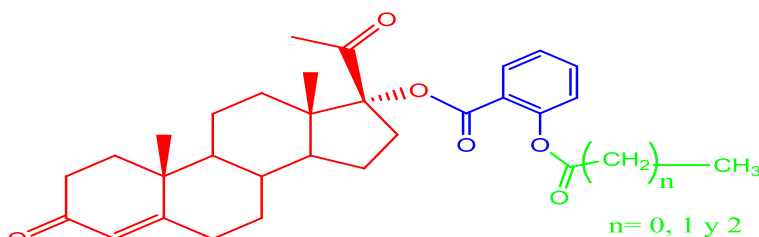


### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel nacional y mundial donde los tumores malignos que han registrado más muertes son el cáncer de próstata, mama y pulmón.

La terapia endócrina ha sido una útil herramienta para el tratamiento de dichos padecimientos; sin embargo, sus problemas de potencia y seguridad han promovido el diseño y desarrollo de nuevas moléculas con estructura esteroidea. Trabajos anteriores han mostrado que los derivados de la P poseen actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano como PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SKLU-1 (pulmón), y que la introducción de un grupo voluminoso en C17 de la P, es capaz de modular dicha actividad. Por lo cual, se decidió emplear a la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona y modificar sobre C17.

En cuanto al diseño estructural, se decidió emplear la técnica de modificación molecular denominada **hibridación**, considerando la relación que existe entre el cáncer y la inflamación, por lo que se optó por conjugar algunos derivados del AS (*Esquema 1*, porción estructural azul) con la estructura esteroidea (*Esquema 1*, porción estructural roja), cuya finalidad sería incrementar la actividad citotóxica, modular la selectividad frente a células no cancerosas y atribuir una actividad antiinflamatoria. Por otro lado, se recurrió a la **homología** para determinar el efecto de la lipofilia sobre dichas actividades (*Esquema 1*, porción estructural verde).



*Esquema 1. Molécula modelo para el diseño estructural de los productos finales.*

En cuanto a la obtención de los derivados, se decidió sintetizarlos empleando condiciones no convencionales de reacción y rutas sintéticas alternativas basadas en QVvS como es la radiación de microondas (RMW) para obtenerlos de una manera más eficiente y más amigable para el medioambiente, respecto a los métodos tradicionales de síntesis orgánica.



## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1. HIPÓTESIS

Si se sintetizan compuestos homólogos derivados del AS y se unen a la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona podrían obtenerse moléculas híbridas con actividades citotóxicas y antiinflamatorias superiores a sus respectivas unidades y que tengan baja toxicidad sobre células no cancerosas. Además, si se sintetizan tanto los productos intermediarios como los finales, empleando la radiación de microondas como método de QVyS, se espera que se obtengan de una manera más eficiente y más amigable para el medioambiente, respecto a los métodos convencionales.

### 4.2. OBJETIVOS

#### 4.2.1. Objetivos generales.

- Sintetizar una serie de 17 $\alpha$ -saliciloxiderivados de la progesterona empleando métodos de Química Verde y Sustentable (QVyS) como es la radiación de microondas (RMW).
- Evaluar *in vitro* la posible actividad citotóxica tanto en células cancerosas como en células normales, así como evaluar *in vivo* la posible actividad antiinflamatoria de los productos intermediarios y de los productos finales.

#### 4.2.2. Objetivos particulares.

- Sintetizar mediante el empleo de la radiación de microondas (RMW) como método de QVyS, los productos intermediarios: ácido 2-acetoxibenzoico, ácido 2-propioniloxibenzoico y ácido 2-butiloxibenzoico, los cuales son homólogos, para su posterior esterificación en la posición C-17 de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona.
- Sintetizar mediante el empleo de la radiación de microondas (RMW) como método de QVyS, los productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona, 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona y 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona, los cuales son híbridos, a partir de los ácidos previamente mencionados.



- Determinar las ventajas que tiene el empleo de la RMW como método de QVvS frente a los métodos de síntesis convencional.
- Caracterizar los productos intermediarios y los productos finales mediante métodos físicos (punto de fusión y apariencia) y espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C).
- Evaluar *in vitro* la posible actividad citotóxica de los productos intermediarios y los productos finales mediante ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares de cáncer humano como PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SKLU-1 (pulmón).
- Evaluar *in vitro* la posible toxicidad los productos intermediarios y los productos finales mediante la prueba de viabilidad celular sobre cultivos primarios de macrófagos murinos (células no cancerosas).
- Evaluar *in vivo* la posible actividad antiinflamatoria de los productos intermediarios y los productos finales mediante la prueba de edema auricular inducido por ésteres de forbol (TPA).
- Determinar que las técnicas de modificación molecular empleadas fueron adecuadas para la mejora de las actividades biológicas evaluadas.



## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1. Métodos y Materiales.

Las reacciones se llevaron a cabo en un horno de microondas marca CEM®, modelo Discover System, No. 908005 y No. de serie DU8925. Las reacciones que se realizaron a presión emplearon un módulo de presión marca CEM®. Las condiciones de todas las reacciones fueron previamente programadas mediante un sistema de cómputo acoplado al horno de microondas y empleando el software Synergy® adquirido con el proveedor, el cuál monitoreó la temperatura, presión y potencia, respectivamente, durante el progreso de las mismas.

La pureza de los productos y el progreso de las reacciones se monitoreó mediante CCF, empleando cromatoplasmas Merck de gel de sílice 60F<sub>254</sub> con 0.25 mm de espesor y los sistemas de elución Hexano-AcOEt (1:1) para los productos intermediarios y CHCl<sub>3</sub>-Acetona (9.8:0.5) para la materia prima y los productos finales. Las cromatoplasmas se visualizaron con lámpara de luz UV a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm) y posteriormente, se revelaron con yodo (productos intermediarios) o una solución de sulfato cérico al 4% (m/v) en ácido sulfúrico al 7% (v/v) (materia prima y productos finales).

La purificación de los productos finales se realizó mediante CC empleando sílicagel MN-Kieselgel G empacada en columnas de vidrio y como sistema de elución Hexano-Acetona (95:5).

Los puntos de fusión de los productos se determinaron en un aparato de Fischer-Johns y los cuales se reportan sin corregir.

Los espectros de IR se obtuvieron de un equipo Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR/FT-FIR utilizando la Técnica de Reflectancia por ATR. Las unidades se reportan como cm<sup>-1</sup>.

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C fueron determinados en los equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300s, respectivamente. Se empleó como disolvente CDCl<sub>3</sub> y TMS como estándar interno. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se muestran en ppm y las constantes de acoplamiento en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa como singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble de doble (dd) y triple de doble (td).

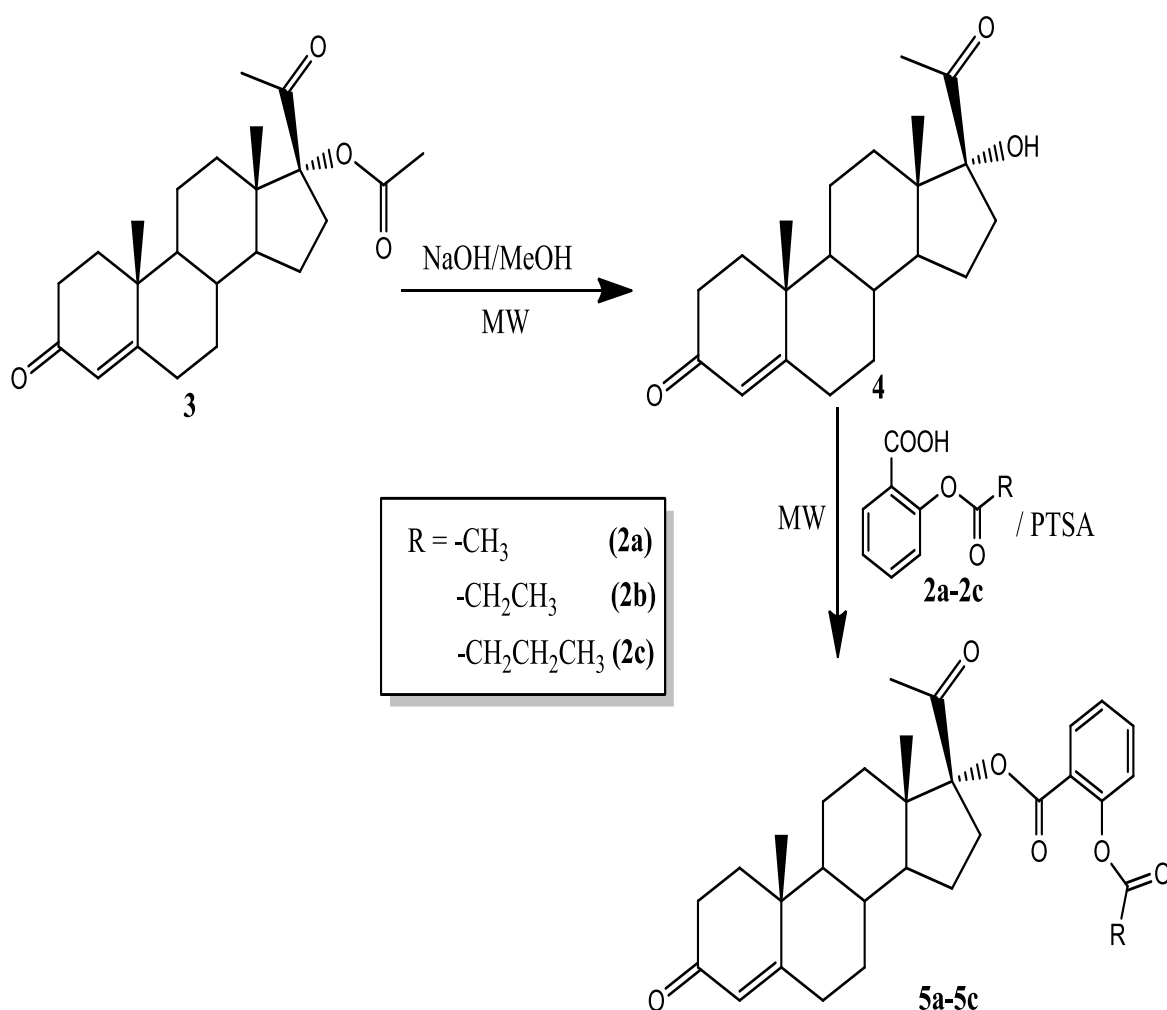




Las materias primas como el ácido salicílico (**1**) con pureza del 99% y punto de fusión de 158°C y la 17 $\alpha$ -acetoxiprogesterona (**3**) con pureza del 98% y punto de fusión de 252°C, se consiguieron con el proveedor Sigma Aldrich.

## 5.2. Síntesis Química.

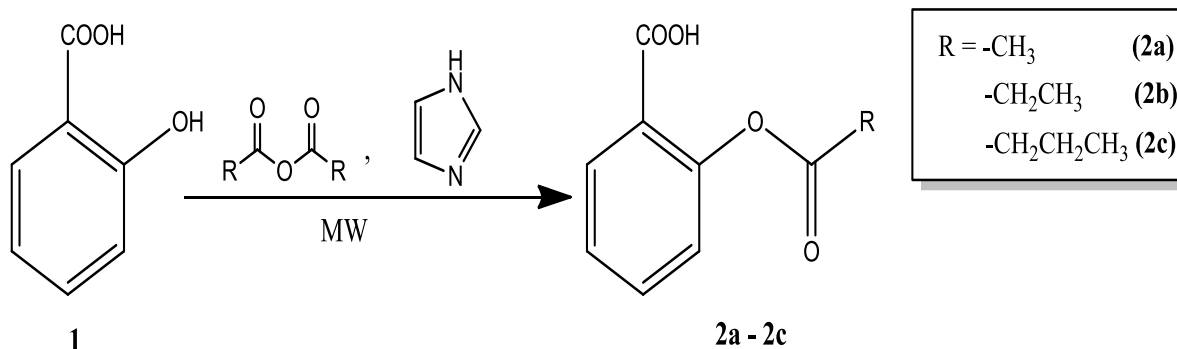
La ruta sintética realizada consistió de tres etapas: 1) Síntesis de los productos intermedios (**2a-2c**), 2) Síntesis del producto (**4**) y 3) Síntesis de los productos finales (**5a-5c**).



Esquema 2. Ruta sintética general para la obtención de los productos derivados de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (**4**).



### 5.2.1. Síntesis de productos intermedios: ácido 2-acetoxibenzoico (**2a**), ácido 2-propioniloxibenzoico (**2b**) y ácido 2-butiloxibenzoico (**2c**).

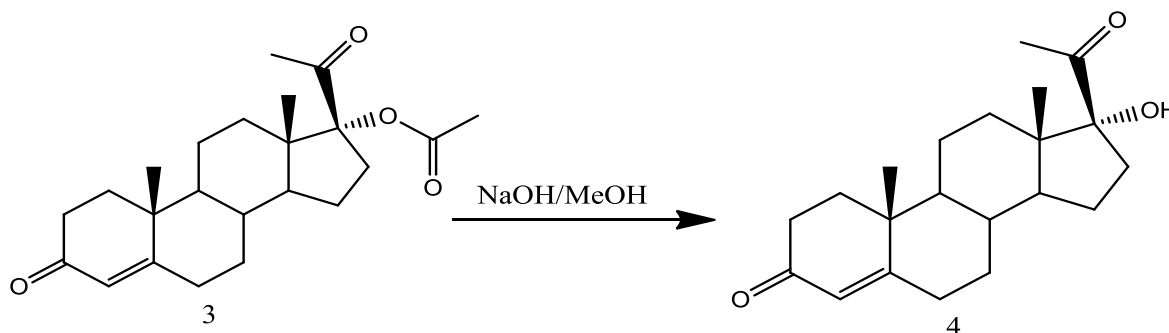


Esquema 3. Método general para la síntesis de los productos intermedios (**2a-2c**).

En un tubo de vidrio provisto de agitación magnética y tapa, se colocaron 552 mg (2 mmol) de AS (**1**), 136 mg de imidazol (2 mmol) y 3 mmol del anhídrido del ácido correspondiente. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones de 25 W de potencia, 100°C de temperatura y durante 2 minutos para el derivado (**2a**) y para los derivados (**2b**) y (**2c**) 5 minutos a presión atmosférica. Al término de la reacción, la mezcla se disolvió en 10 mL de AcOEt y se acidificó con una solución de HCl 10% (2x10 mL). La fase orgánica se separó y se lavó con una solución saturada de NaCl (3X10 mL). Dicha fase se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida. Los productos (**2a-2c**) obtenidos se purificaron mediante cristalización con Hexano-AcOEt.



### 5.2.2. Síntesis de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (**4**).



Esquema 4. Método general para la síntesis del producto (**4**).

#### 1) Método de radiación de microondas (RMW)

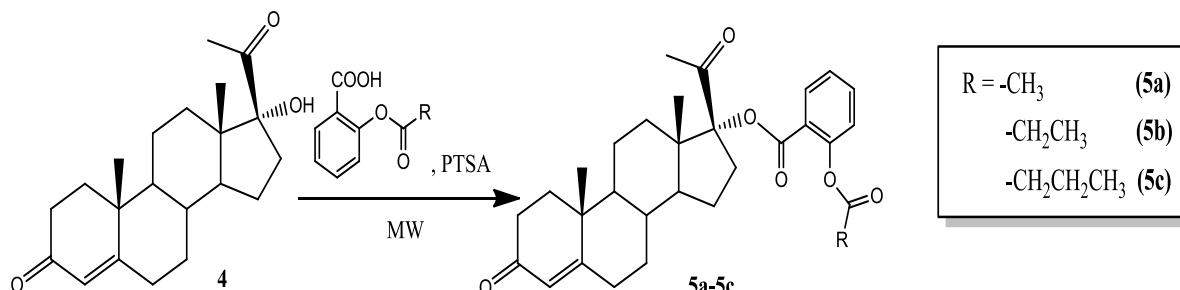
En un matraz de bola de 100 mL con junta esmerilada 24/40 y provisto de una barra de agitación magnética, se colocaron 1 g de 17 $\alpha$ -acetoxiprogesterona (**3**), 25 mL de una solución de NaOH 4% y 50 mL de MeOH. Se introdujo el matraz en el interior del horno de microondas y se colocó un refrigerante en posición de reflujo. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones de 100 W de potencia, 70°C de temperatura y durante 5 minutos a presión atmosférica. Al término de la reacción, la mezcla se vertió en 200 mL de agua destilada. El sólido obtenido se separó mediante filtración al vacío y se lavó con agua. El producto (**4**) se purificó mediante cristalización con MeOH.

#### 2) Método de agitación a temperatura ambiente.

En un matraz Erlenmeyer de 25 mL provisto de una barra magnética, se disolvieron 8 lentejas de NaOH en 16 mL de una mezcla de MeOH-Agua (15:1) y se agregó 1 g (2.68 mmol) de (**3**). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Al término de la reacción, se siguió el mismo tratamiento y purificación que se emplea en el método anterior.



**5.2.3. Síntesis de productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a), 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b) y 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c).**



Esquema 5. Método general para la síntesis de los productos finales (5a-5c).

**1) Método con disolvente:**

En un tubo de vidrio y provisto de una barra de agitación magnética y tapón, se colocaron 50 mg (0.15 mmol) de **(4)**, 0.45 mmol del ácido correspondiente (**2a-2c**) y 7 mg de ácido p-toluensulfónico (PTSA) y se disolvieron en 1 mL de DCM. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones de 70 W de potencia, 100°C de temperatura y durante 10 minutos a presión hasta completar 30 minutos de reacción y 20 mg de PTSA. Al término de la reacción, la mezcla se disolvió en 10 mL de AcOEt y se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x10 mL). Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl (2X10 mL). La fase orgánica se separó, secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida. Los productos (**5a-5c**) obtenidos se purificaron mediante CC.

**2) Método sin disolvente:**

En un tubo de vidrio y provisto de agitación magnética, se colocaron 50 mg (0.15 mmol) de **(4)**, 0.45 mmol del ácido correspondiente (**2a-2c**) y 60 mg de PTSA. La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones de 70 W de potencia, 100°C de temperatura y durante 4 minutos a presión atmosférica. Al término de la reacción, se siguió el mismo tratamiento y purificación que se emplea en el método anterior.



### 5.3. Evaluación Biológica de los productos intermediarios y finales.

#### 5.3.1. Evaluación de la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano.

La actividad citotóxica de los productos intermediarios y finales se evaluó en cultivos de líneas celulares de cáncer humano como PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama) y SKLU-1 (cáncer de pulmón) mediante la técnica de tinción con Sulforrodamina B (SRB). La Sulforrodamina B (SRB) es un colorante aniónico que posee dos grupos sulfónicos ( $SO_3^-$ ) capaces de unirse electrostáticamente a los cationes. En condiciones ácidas, la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular cancerosa.<sup>69,70</sup>

Las líneas celulares cancerosas se cultivaron en medio RPMI-1640 adicionado de suero fetal bovino (SFB) y glutamina 2.0  $\mu$ M y se incubaron bajo condiciones de humedad y una atmósfera de 5% de  $CO_2$  a una temperatura de 37°C. Las células adheridas a las paredes del frasco se removieron mediante una solución de tripsina-EDTA al 0.05%. La densidad del inóculo se ajustó a  $7.5 \times 10^4$  (PC-3 y SKLU-1) y  $5.0 \times 10^4$  células/mL (MCF-7). La suspensión celular se inoculó en placas de 96 pozos y se incubaron durante un periodo de 24 h a 37°C.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO para obtener una concentración de 20 mM. Se agregaron 100  $\mu$ L de la solución a cada uno de los pozos que contenían las líneas celulares (plato experimental) o 100  $\mu$ L de DMSO o vehículo (plato basal), para obtener un volumen total de 200  $\mu$ L por cada pozo y una concentración de 50  $\mu$ M (compuestos de prueba). Los platos experimentales se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de  $CO_2$  y saturada de humedad. El plato basal sólo se incubó durante 1 h bajo las mismas condiciones.

Transcurridos los periodos de incubación respectivos, los platos experimentales y basales se fijaron con 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 50%, y se incubaron durante 60 minutos a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavaron con agua desionizada, dejándolos secar durante 24 horas. Una vez secos, se tiñeron con 100  $\mu$ L de SRB 0.4% (p/v) en AcOH al 1% y el exceso de SRB se retiró mediante lavados de AcOH 1% y se dejaron secar



durante un periodo de tiempo de 24 h. Finalmente, el complejo SRB-proteínas se disolvió con una solución de Tris pH 10.5 y se determinó la densidad óptica (DO) de los micropozos mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La DO es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de cada compuesto de prueba. La citotoxicidad se reportó como porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó mediante la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = 100 - \left[ \left( \frac{DO \text{ promedio muestra}}{DO \text{ promedio vehículo}} \right) * 100 \right]$$

### 5.3.2. Evaluación de la actividad citotóxica en macrófagos murinos.

La actividad citotóxica de los productos intermediarios y finales también se evaluó en cultivos primarios de macrófagos murinos mediante el método colorimétrico de reducción de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. La técnica se basa en la reducción metabólica del MTT (sal amarilla) por deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas o viables dando como producto formazán (cristales de color púrpura e insolubles en agua); de este modo la absorción en la región del visible del formazán disuelto está relacionada con la cantidad de células vivas.<sup>71,72</sup>

Los macrófagos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones hembras Swiss de peso entre 25-30 g. Bajo condiciones de asepsia, se administró por vía intraperitoneal 0.5 mL de medio tioglicolato estéril al 3% (p/v). Después de 72 h, los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, se inyectó en la cavidad peritoneal 7 mL de buffer de fosfatos y se realizó un masaje abdominal vigoroso. Mediante una jeringa, se extrajo el líquido peritoneal y se depositó en una 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 CO<sub>2</sub> durante 2 h. Al finalizar dicho periodo, se lavó la placa con PBS en tres ocasiones, y con la ayuda de un cosechador de células, se



desprendieron los macrófagos murinos. La cuenta de los macrófagos se realizó con azul de tripano y se ajustó la densidad del inóculo a  $1.0 \times 10^6$  células/mL en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB. En placas de 96 pozos, se depositaron 100  $\mu$ L de la suspensión de células y se incubaron durante 60 minutos para que los macrófagos se adhirieran al sustrato del pozo. Los compuestos de prueba, se disolvieron en DMSO a una concentración de 20 mM. Se agregaron 100  $\mu$ L de la solución del compuesto de prueba cuya concentración final en cada pozo correspondería a 50  $\mu$ M. Cada compuesto de prueba, se agregó en 3 pozos y su respectivo vehículo. Finalmente, se incuban a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h.

El MTT se prepara en una solución amortiguadora de fosfatos a una concentración de 5mg/mL. Se adicionaron 20  $\mu$ L de la solución por cada pozo y se incubó durante 4 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar este periodo, se retiró el sobrenadante y los cristales de formazán generados en cada pozo, se disolvieron con 100 $\mu$ L de DMSO. La placa se mantuvo en agitación durante 10 minutos y posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm.

La absorbancia es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de cada compuesto de prueba. La citotoxicidad se reportó como porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{Abs promedio muestra}}{\text{Abs promedio vehículo}} \right) * 100 \right]$$

### 5.3.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.

La actividad antiinflamatoria de los productos intermediarios y finales también se evaluó mediante la prueba de edema auricular inducido por ésteres de forbol. El método se basa en la aplicación de un agente irritante en la oreja del ratón como el acetato de tetradecanoil forbol (TPA), lo cual origina una respuesta inflamatoria que consiste en eritema, edema e infiltración de leucocitos polimorfonucleares y se liberan mediadores inflamatorios tipo eicosanoides, por lo



cual las sustancias inhibidoras de la biosíntesis de PGs y leucotrienos pueden ser evaluadas mediante esta técnica.<sup>73</sup>

Se emplearon ratones machos de 20 a 25 g, los cuales fueron pesados y agrupados en dos: control (n=4) y prueba (n=4). Cada uno de los ratones fue anestesiado mediante la administración de una solución de pentobarbital sódico al 10% por vía intraperitoneal. A todos los ratones, se les administró 10µL de una solución etanólica 0.25 µg/µL de TPA vía tópica sobre la superficie posterior e inferior de la oreja derecha; mientras que en la oreja izquierda, se aplicaron 10 µL de EtOH y 20 µL de una mezcla Acetona: DCM (1:1) (vehículo). En la oreja derecha de los ratones de prueba, se les administraron 20 µL del compuesto de prueba disuelto en el vehículo a una dosis de 1µmol/oreja y en los ratones control, sólo se les administraron 20 µL del vehículo.

Trascurridas 4 h todos los animales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> y se tomó una biopsia tanto de la oreja inflamada (derecha) como de la no inflamada (izquierda) mediante un sacabocados de 7 mm de diámetro. La inflamación se determinó como una diferencia de peso entre cada porción circular de ambas orejas. La actividad antiinflamatoria de los compuestos se reportó como el porcentaje de inhibición del edema y se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición del edema} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{peso promedio prueba}}{\text{peso promedio control}} \right) * 100 \right]$$

Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student con un nivel de significancia de  $p \leq 0.01$ .





## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Síntesis Química de los productos intermediarios y finales.

#### 6.1.1. Síntesis de productos intermediarios: ácido 2-acetoxibenzoico (2a), ácido 2-propioniloxibenzoico (2b) y ácido 2-butiloxibenzoico (2c).

La síntesis de los productos intermediarios derivados del ácido 2-hidroxibenzoico o comúnmente conocido como ácido salicílico (**1**), se llevó a cabo mediante una reacción de esterificación catalizada por una base, empleando el anhídrido de ácido correspondiente y como catalizador imidazol. El imidazol, siendo una base moderadamente fuerte (pKa 7.0), sustrae los protones ácidos tanto del grupo carboxilo y el fenol, y se producen los iones carboxilato y fenóxido, siendo éste último más nucleofílico que el fenol, por lo cual se favorece el ataque nucleofílico al grupo acilo del anhídrido de ácido.

Las reacciones de esterificación se realizaron empleando un método de QVyS: la RMW como una fuente de energía y un método no convencional de reacción con el objetivo de obtener tanto los productos intermediarios como los finales, de una manera eficiente y más amigable para el medioambiente, lo que contribuye a la prevención de la contaminación (Principio 1 de la QV). Los procedimientos y resultados experimentales se compararon con los reportados en la literatura por Hung y colaboradores (<sup>67</sup>), los cuales se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Comparación entre un método convencional y la RMW para la obtención de los productos intermediarios.

	<b>Calentamiento Convencional<sup>67</sup></b>	<b>Calentamiento RMW</b>
<b>Reactivos</b>	Anhídridos/cloruros de ácido	Anhídridos de ácido
<b>Catalizadores</b>	Ácido sulfúrico/Piridina	Imidazol
<b>Tiempo de reacción</b>	1-2 h	2-5 minutos
<b>Rendimientos</b>		
<b>2a</b>	-----	76.9%
<b>2b</b>	75.8%	74.9%
<b>2c</b>	28.2%	72.7%



De acuerdo a la tabla anterior, se pueden observar diversas ventajas entre la ruta sintética empleada y el método de RMW frente a una ruta y método convencionales, las cuales se mencionan a continuación:

La ruta sintética empleada para la obtención de los productos intermedios **2a-2c**, utilizó anhídridos en sustitución de cloruros de ácido, con base en que éstos últimos resultan ser más tóxicos porque generan ácido clorhídrico durante el progreso de la reacción. Por otro lado, el empleo de imidazol como catalizador contribuye a la QV, considerando que los métodos convencionales reportados en la literatura utilizan catalizadores básicos tóxicos como piridina o DMAP. De esta manera, esta ruta sustituye el uso de sustancias que pueden ser muy tóxicas para la salud tanto humana como ambiental (Principio 3), disminuye el riesgo de accidentes químicos como emanaciones debido los reactivos y catalizadores convencionalmente utilizados (Principio 12) y emplea un catalizador para mejorar la eficiencia de las reacciones (Principio 9). En adición, el imidazol también puede ser recuperado a partir de los lavados con HCl 10% mediante un tratamiento con NaOH, lo que lo convierte en un catalizador reutilizable (Principio 9).

En cuanto al método para obtener los productos intermedios **2a-2c**, éste proporcionó la posibilidad de llevar a cabo las reacciones de esterificación en ausencia de disolventes, con base en que uno de los reactivos es líquido (provee de un medio de reacción homogéneo) y que los reactivos polares son capaces de absorber directamente la RMW. Por tanto, dicho método contribuye a la reducción del uso de sustancias auxiliares como son los disolventes (Principio 5).

Se observó una reducción de los tiempos de reacción de 2 horas a 5 minutos comparados con lo que se reporta para la síntesis de éstos mismos derivados **2b** y **2c**. Dicha disminución en los tiempos, puede ser explicada por una mejor homogeneidad de la temperatura en el medio de reacción respecto al calentamiento convencional (efectos térmicos); además, la literatura indica que la radiación de microondas es capaz de disminuir la energía de activación de las reacciones, lo que produce un incremento en la rapidez de la misma y como resultado, una disminución en los tiempos de reacción (efectos cinéticos).



Entonces se observó que este método contribuye a la disminución del consumo energético respecto al método convencional (Principio 6).

En adición, también se observó un incremento en los rendimientos respecto a los reportados en la literatura para éstos mismos derivados, lo que indicó que se llevó a cabo una mayor incorporación de los reactivos al producto final y que se minimizó la formación de subproductos (Principio 2). Dicha observación demuestra que la RMW es capaz de favorecer la selectividad de las reacciones.

### 6.1.2. Síntesis de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4).

La síntesis del producto intermediario 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4) se realizó mediante una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo catalizada por una base y agua (hidrólisis básica). A partir de la 17 $\alpha$ -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona (3) y empleando una solución hidroalcohólica (MeOH/agua) de NaOH. El grupo acetilo es desplazado del oxígeno unido al C-17 $\alpha$  por el ion hidroxilo mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica; de esta manera, queda libre el grupo hidroxilo en C-17 $\alpha$ .

Las reacciones de hidrólisis se realizaron empleando métodos de QVvS (métodos no convencionales de reacción) como fueron la RMW y la agitación a temperatura ambiente. Los resultados y métodos experimentales se compararon con los reportados en la literatura, los cuales se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación entre tres métodos para la obtención del producto intermediario 4, dos métodos de QVvS y uno convencional.

	<b>RMW</b>	<b>Temperatura ambiente</b>	<b>Reflujo<sup>74</sup></b>
<b>Tiempo de reacción</b>	5 min	5 h	1 h
<b>Rendimiento</b>	80.3%	80.2%	83.8



La tabla anterior muestra algunas ventajas y desventajas entre los métodos de QVyS respecto a métodos convencionales. Al comparar los tres métodos de síntesis, se observó que la RMW es la técnica que favorece una mayor disminución del consumo energético, atribuido a que la reacción se llevó a cabo en pocos minutos (Principio 6). Por otro lado, el método de QVyS que empleó agitación a temperatura ambiente resultó ser el menos eficaz (por requerir un mayor tiempo de reacción); sin embargo, tiene la ventaja de llevarse a cabo a temperatura ambiente (Principio 6). Los rendimientos de las tres técnicas resultaron ser altos (Principio 2) y semejantes.

No obstante, los tres métodos coinciden en algunas ventajas como la generación de productos con baja toxicidad como es el acetato de sodio (Principio 3); el empleo de catalizador como es el NaOH (Principio 9), el cual puede ser desechado sin atentar contra la salud humana y ambiental (posterior a ser neutralizado) y no persiste en el medioambiente (Principio 10).

### **6.1.3. Síntesis de productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a), 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b) y 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c).**

La síntesis de los productos finales, se llevó a cabo mediante una reacción de esterificación de Fisher (reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo catalizada por ácido), donde los ácidos (**2a-2c**) y la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona son convertidos en ésteres empleando PTSA como catalizador ácido.

En cuanto a la ruta de síntesis descrita para los productos finales (**5a-5c**), destacó el empleo del PTSA como catalizador, en sustitución de los tradicionales catalizadores ácidos como son el sulfúrico, fosfórico y clorhídrico (más corrosivos, tóxicos y peligrosos). De esta manera, esta ruta sustituye el uso de sustancias que pueden ser muy tóxicas para la salud humana y ambiental (Principio 3), disminuye el riesgo de accidentes químicos como emanaciones o explosiones debido los reactivos y catalizadores convencionalmente utilizados (Principio 12) y permite el empleo de catalizador para mejorar la eficiencia de la misma (Principio 9).



Las reacciones de esterificación se realizaron empleando la RMW y mediante dos condiciones distintas: con y sin disolvente. Los procedimientos y resultados experimentales de las reacciones de esterificación llevadas a cabo sin disolvente y con el disolvente DCM se compararon entre sí, los cuales se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Comparación entre dos métodos que emplean RMW pero que se distinguen por el uso o no de disolvente y a distintas condiciones de presión, para la obtención de los productos finales.

	<b>Esterificación Con disolvente</b>	<b>Esterificación Sin disolvente</b>
<b>Tiempo de reacción</b>	30 minutos	4 minutos
<b>Presión</b>	Si	No
<b>Rendimiento</b>		
<b>5a</b>	70%	40%
<b>5b</b>	75%	50%
<b>5c</b>	60%	60%

De acuerdo a la tabla anterior, las reacciones libres de disolvente mostraron mayores ventajas frente a las que se realizaron con disolvente como la posibilidad de llevar a cabo este tipo de reacciones con rendimientos aceptables y contribuyendo a la reducción del uso de sustancias auxiliares que pueden ser tóxicas como el DCM, disolvente clorado (Principio 5). El método libre de disolvente se basa en que una mezcla de sólidos de distinta naturaleza, se impurifican entre sí y como resultado, se produce una disminución del punto de fusión de los mismos y cuando funde uno de los componentes, éste es capaz de transferir el calor (originado por la absorción de la RMW) directamente a los demás reactivos mediante los mecanismos previamente revisados.

Otra ventaja del método libre de disolvente fue la disminución del tiempo de reacción de 7.5 veces respecto al método con disolvente. Por lo tanto, dicho método contribuye a la reducción del consumo energético respecto al método de RMW con disolvente y a los métodos convencionales que emplean calentamiento

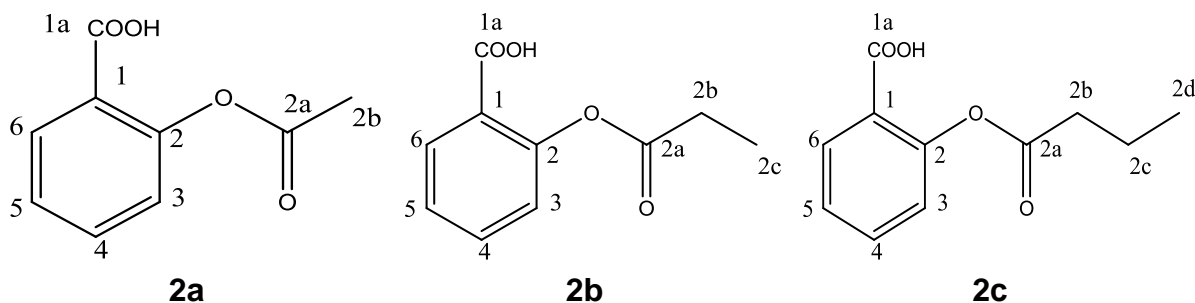


tradicional y además, se prefieren los métodos que se llevan a cabo a presión atmosférica (Principio 6).

No obstante, el método que emplea disolvente, mostró los mejores rendimientos respecto al método libre del mismo, lo que indica una mayor incorporación de los materiales en el producto final y que se minimizó la formación de subproductos (Principio 2). La desventaja que presentó el método sin disolvente pudo deberse a que los reactivos absorbieron directamente la RMW y el calor generado favoreció la pirolisis de los productos formados.

## 6.2. Caracterización de los productos intermedios y finales.

### 6.2.1. Caracterización de productos intermedios: ácido 2-acetoxibenzoico (2a), ácido 2-propioniloxibenzoico (2b) y ácido 2-butiloxibenzoico (2c).



Esquema 6. Estructura y numeración de los productos intermedios (2a-2c).

Se determinaron las propiedades físicas de los tres productos intermedios, las cuales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Propiedades físicas y peso molecular de los productos intermedios 2a-2c.

Compuestos	PM (g/mol)	Aspecto	p.f. (°C)
2a	180	Sólido blanco cristalino	136-137
2b	194	Sólido blanco cristalino	92-93
2c	208	Sólido blanco cristalino	79-81

Por otro lado, los compuestos intermedios se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C), cuyos resultados se muestran en las tablas 7-9.

**Tabla 7.** Señales características de IR de los productos intermedios **2a-2c**.

Valores (cm <sup>-1</sup> )			Asignación
2a	2b	2c	
2400-3500 (banda ancha)	2500-3200 (banda ancha)	2500-3000 (banda ancha)	O-H del ácido carboxílico
1751	1760	1756	C=O del éster
1675	1682	1681	C=O del ácido carboxílico
1605	1604	1605	C=C del anillo aromático
1293	1300	1304	C-O del éster
1185	1120	1142	C-O del éster
756	758	750	1,2-disustitución aromática
1600-2000 (Sobretonos)	1600-2000 (Sobretonos)	1600-2000 (Sobretonos)	1,2-disustitución aromática

Mediante la espectroscopia de IR (Espectros 1, 4 y 7), se comprobó la presencia de los grupos funcionales más importante de los derivados como son el *ácido carboxílico* (COOH), el cuál corresponde a la banda ancha entre 2400-3500 cm<sup>-1</sup> debida al grupo hidroxilo (OH) y la banda intensa en 1675 (**2a**), 1682 (**2b**) y 1681cm<sup>-1</sup> (**2c**) del grupo carbonilo (C=O). El *éster* (R'COOR) se determinó mediante la banda intensa en 1751 (**2a**), 1760 (**2b**) y 1756 cm<sup>-1</sup> (**2c**) producida por el C=O, y las dos bandas entre 1120-1185 y 1293-1304 cm<sup>-1</sup> que corresponden a las vibraciones del enlace C-O. El *anillo aromático* se corroboró mediante la banda de intensidad media en 1605 (**2a**), 1604 (**2b**) y 1605 cm<sup>-1</sup> (**2c**) originada por la vibración del enlace doble carbono-carbono (C=C), y la respectiva banda de intensidad baja en 756,158 y 750 cm<sup>-1</sup> debida a la 1,2-disustitución aromática y mediante los sobretonos característicos entre 1600-2000 cm<sup>-1</sup>.

**Tabla 8.** Señales características de RMN-<sup>1</sup>H de los productos intermediarios **2a-2c**.

Valores (ppm)			Asignación
2a	2b	2c	
-----	-----	1.06 (t,3H)	H-2d
-----	1.28 (t,3H)	1.80 (m,2H)	H-2c
2.35 (s,3H)	2.64 (m,2H)	2.60 (t,2H)	H-2b
7.14 (dd, <i>J</i> =8.0,1.2 Hz, 1H)	7.13 (dd, <i>J</i> =8.2,1.0 Hz,1H)	7.12 (dd, <i>J</i> =8.0,1.2 Hz,1H)	H-3
7.36 (td, <i>J</i> =7.6,7.7,0.9 Hz,1H)	7.35 (td, <i>J</i> =7.8,7.7,1.1 Hz,1H)	7.34 (td, <i>J</i> =7.6,7.7,0.9 Hz,1H)	H-5
7.63 (td, <i>J</i> =7.6,7.8,1.9 Hz,1H)	7.62 (td, <i>J</i> =7.8,7.8,1.6 Hz,1H)	7.61 (td, <i>J</i> =7.6,7.7,1.7 Hz,1H)	H-4
8.13 (dd, <i>J</i> =8.0,1.6 Hz, 1H)	8.12 (dd, <i>J</i> =7.8,1.8 Hz, 1H)	8.11 (dd, <i>J</i> =8.0,1.6 Hz, 1H)	H-6
11.19 (s, 1H)	11.55 (s, 1H)	10.21 (s, 1H)	H-1a

La espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H (Espectros 2, 5 y 8) permitió determinar los protones del anillo aromático, cuyos desplazamientos químicos se encontraron entre 7.00-8.00 ppm, las señales con multiplicidad *dd* corresponden a H-3' y H-6' (con un protón vecino en *orto* y uno en *meta*) mientras que las *td* a H-4' y H-5' (con dos protones vecinos en *orto* y uno en *meta*); además, se determinaron sus constantes de acoplamiento (*J*), donde aquellas cercanas a 8.0 Hz (7.6-8.2 Hz) corresponden a los protones acoplados en posición *orto* respecto a los mismos, y aquellas cercanas a 2-0 Hz (0.9-1.9) a protones en *meta*. Las señales entre 1.00-3.00 ppm corresponden a los protones unidos a carbonos alifáticos como los metilos (-CH<sub>3</sub>) y metilenos (-CH<sub>2</sub>-) de las cadenas hidrocarbonadas del grupo O-acilo, cuya multiplicidad depende del número de protones vecinos. Los singuletes





que se encontraron a campo bajo en 10.21 (**2a**), 11.19 (**2b**) y 11.55 ppm (**2c**) corresponden a los protones ácidos del grupo carboxilo.

**Tabla 9.** Señales características de RMN-<sup>13</sup>C de los productos intermediarios **2a-2c**.

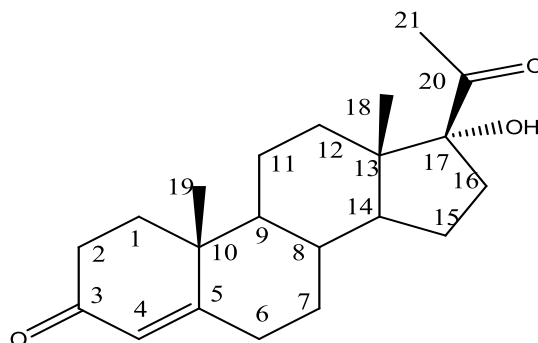
Valores (ppm)			Asignación
2a	2b	2c	
-----	-----	13.8	<b>C-2d</b>
-----	9.0	18.2	<b>C-2c</b>
21.2	27.8	36.2	<b>C-2b</b>
122.4	122.4	122.6	<b>C-1</b>
124.2	124.2	124.2	<b>C-3</b>
126.3	126.2	126.2	<b>C-5</b>
132.7	132.6	132.6	<b>C-6</b>
135.0	135.0	134.9	<b>C-4</b>
151.4	151.5	151.4	<b>C-2</b>
169.9	170.4	170.2	<b>C-1a</b>
170.2	173.2	172.3	<b>C-2a</b>

Con base en la Espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C (Espectros 3, 6 y 9), se determinaron los carbonos del anillo aromático de los derivados, los cuales se encontraron entre 120-150 ppm. Las señales correspondientes a los carbonos alifáticos -CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>3</sub>, se observaron a campos altos entre 9.0-40.0 ppm. Los carbonos de los grupos O-acilo se observaron a campo bajo en 170.2 (**2a**), 173.2 (**2b**) y 172.3 ppm (**2c**), y los del grupo COOH en 169.9, 170.4 y 170.2 ppm, respectivamente.



### 6.2.2. Caracterización de la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4).

El compuesto **4** (PM: 330 g/mol) se obtuvo como un sólido cristalino color amarillo con un punto de fusión de 219-220°C.



Esquema 7. Estructura y numeración del producto (**4**).

Se caracterizó mediante métodos espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C) y cuyos resultados se muestran las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Señales características de IR del producto **4**.

Valor (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3417	O-H en C-17 $\alpha$
2932	C-H de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>
1702	C=O en C-20
1663	C=O $\alpha,\beta$ insaturada en C-3
1613	C=C entre C-4 y C-5

Con base en la espectroscopia de IR (Espectro 10), se llevó a cabo la identificación de los grupos funcionales más relevantes como el *OH en C-17*, el cuál corresponde a la banda intensa en 3417 cm<sup>-1</sup>. Los grupos C=O en C-3 y C-20 corresponden a las bandas intensas en 1663 y 1702 cm<sup>-1</sup>, respectivamente; la disminución de la frecuencia del grupo carbonilo en C-3 respecto a C-20 se debe al efecto de resonancia que éste se encuentra conjugado con un doble enlace carbono-carbono. Las -CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>3</sub> corresponden a la señal intensa que tiene



como máximo  $2932\text{ cm}^{-1}$  y El C=C entre C-4 y C-5 corresponde a la señal de intensidad baja en  $1613\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabla 11.** Señales características de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  del producto 4.

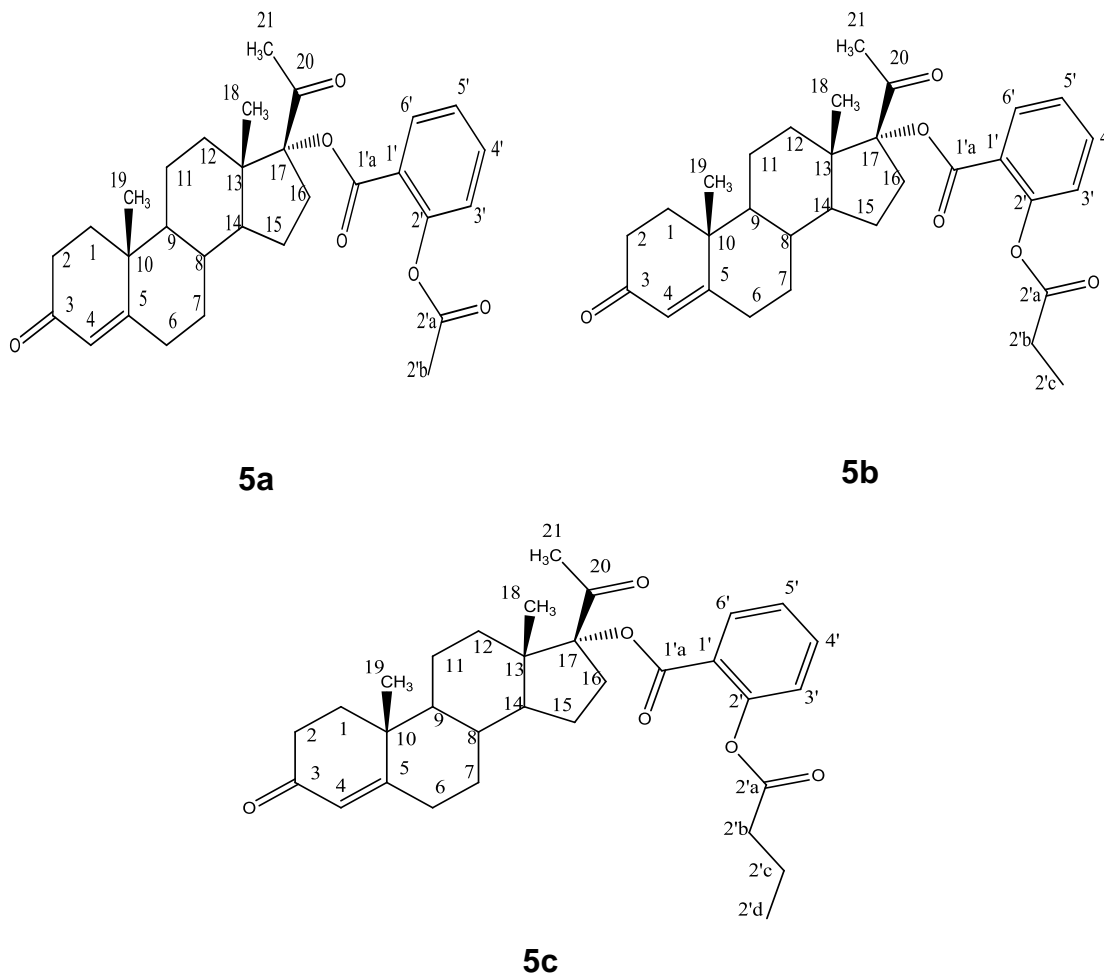
RMN- $^1\text{H}$ (ppm)		RMN- $^{13}\text{C}$ (ppm)	
Valor	Asignación	Valor	Asignación
0.75 (s,3H)	H-18	15.6	C-18
1.18 (s, 3H)	H-19	17.6	C-19
2.27 (s, 3H)	H-21	28.0	C-21
2.80 (s,1H)	OH	89.9	C-17
5.72 (s,1H)	H-4	124.1	C-4
		171.1	C-5
		199.6	C-3
		211.7	C-20

Mediante la espectroscopia de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 11) se comprobó la presencia de los protones unidos a los grupos más importantes del esteroide como son los H-18,-19 y -21, los cuales corresponde a los singuletes de  $-\text{CH}_3$  que tienen como desplazamientos químicos 0.75, 1.18 y 2.27 ppm, respectivamente. El protón del OH se observó como un singulete en 2.80 ppm. El protón vinílico H-4 que está se encontró como un singulete en 5.72 ppm.

La Espectroscopia de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 12) permitió determinar los carbonos más importantes del esteroide como son los  $-\text{CH}_3$  en C-18 (15.6 ppm), C-19 (17.6 ppm) y C-21 (28.0 ppm). La señal del C-17 se observó en 89.9 ppm. Los carbonos del enlace C=C en C-4 y-5 se observaron en 124.1 y 171.1 ppm, respectivamente. Las señales de los C=O en C-3 y -20 corresponden a las señales a campo bajo en 199.6 y 211.7 ppm, respectivamente.



**6.2.3. Caracterización de productos finales:  $17\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a),  $17\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b) y  $17\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c).**



Esquema 8. Estructura y numeración de los productos finales (5a-5c).

Se obtuvieron tres ésteres derivados de **4** (5a-5c), de los cuales se determinaron sus características físicas (tabla 12).

Tabla 12. Características físicas y peso molecular de los productos finales 5a-5c.

Compuestos	PM (g/mol)	Aspecto	p.f. (°C)
5a	492	Sólido blanco	235-237
5b	506	Sólido blanco	160-162
5c	520	Sólido blanco	118-120



Complementariamente, los productos finales se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C), cuyos resultados se muestran en las tablas 13-15.

**Tabla 13.** Señales características de IR de los productos finales **5a-5c**.

Valores (cm <sup>-1</sup> )			Asignación
5a	5b	5c	
2946	2934	2948	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>
1731	1727	1727	C=O en C-1'a y C-2'a
1717	1711	1708	C=O en C-20
1655	1669	1664	C=O α,β insaturada en C-3
1616	1621	1621	C=C entre C-4 y C-5 y del anillo aromático
1250	1258	1254	C-O-C de los ésteres
1194	1193	1196	C-O-C de los ésteres
1600-2000 (sobretonos)	1600-2000 (sobretonos)	1600-2000 (sobretonos)	1,2-disustitución aromática

La espectroscopia de IR (Espectro 13, 16 y 19) permitió comprobar la presencia de los grupos funcionales más importante de los productos como el grupo *éster* (R'COOR) en C-1'a y C-2'a, el cual se determinó mediante la banda intensa en 1731 (**5a**), 1727 (**5b**) y 1727 cm<sup>-1</sup> (**5c**) producidas por el C=O; y las dos bandas entre 1193-1196 y 1250-1258 cm<sup>-1</sup> que corresponden a las vibraciones del enlace C-O. Los grupos *carbonilo* (C=O) en C-3 y C-20 se corroboraron con base en la presencia de bandas intensas en 1655 (**5a**), 1669 (**5b**) y 1664 cm<sup>-1</sup> (**5c**); y 1717 (**5a**), 1711 (**5b**), 1708 cm<sup>-1</sup> (**5c**), respectivamente. El *anillo aromático* y el C=C entre C-4 y C-5 se determinaron con la banda de intensidad media en 1616 (**5a**), 1621 (**5b**) y 1621 cm<sup>-1</sup> (**5c**), y los sobretonos característicos entre 1600-2000 cm<sup>-1</sup>. Los *metilos* y *metilenos* del esteroide y cadenas laterales se corroboraron mediante la banda intensa con un máximo en 2946 (**5a**), 2934 (**5b**) y 2948 cm<sup>-1</sup>



(5c). Además, la formación de los productos se comprobó por la ausencia de la banda del -OH de la materia prima (4).

Tabla 14. Señales características de RMN-<sup>1</sup>H de los productos finales 5a-5c.

Valores (ppm)			Asignación
2a	2b	2c	
0.68 (s, 3H)	0.68 (s, 3H)	0.68 (s, 3H)	H-18
-----	-----	0.98 (t, 3H)	H-2'd
1.20 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	1.20 (s, 3H)	H-19
-----	1.17 (t, 3H)	1.67 (m, 2H)	H-2'c
2.05 (s, 3H)	2.04 (s, 3H)	2.04 (s, 3H)	H-21
2.11 (s, 3H)	2.39 (m, 2H)	2.34 (t, 2H)	H-2'b
5.75 (s, 1H)	5.75 (s, 1H)	5.75 (s, 1H)	H-4
6.91 (dd, J=10,1.8 Hz,1H)	6.95 (dd, J=7.6,1.6 Hz,1H)	6.95 (m, 1H)	H-3'
7.27 (m, 1H)	7.00 (td, J=7.6,7.6,1.2 Hz, 1H)	7.00 (m, 1H)	H-5'
7.48 (td, J=8.0, 7.8, 2.1 Hz, 1H)	7.52 (td, J=7.2,7.6,1.6 Hz, 1H)	7.53 (m, 1H)	H-4'
7.89 (dd, J=8.0, 1.6 Hz, 1H)	7.87 (dd, J=8.8,1.6 Hz, 1H)	7.86 (dd, J=7.2,2.4 Hz, 1H)	H-6'

Con base en la espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 14, 17 y 20) se determinaron los protones unidos a los grupos más importantes tanto del esteroide como de los derivados del ácido salicílico pero ahora unidos mediante un enlace éster. Los protones H-18,-19,-21 de -CH<sub>3</sub> del esteroide corresponden 0.68, 1.20 y 2.04-2.05 ppm, respectivamente; mientras que las señales entre 1.00-3.00 ppm corresponden a los protones unidos a carbonos alifáticos como los -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>-



de las cadenas hidrocarbonadas del grupo O-acilo de los derivados del ácido salicílico, cuya multiplicidad depende del número de protones vecinos. El protón vinílico H-4 se encontró como un singulete en 5.72 ppm en todos los casos. Los protones del anillo aromático (H-3' a H-6') corresponden a las señales cuyos desplazamientos químicos se encontraron entre 6.90-8.00 ppm; la multiplicidad de las señales *doble de doble* (dd) corresponde a H-3' y H-6' (con un protón vecino en *orto* y uno en *meta*) mientras que las *triple de doble* (td) a H-4' y H-5' (con dos protones vecinos en *orto* y uno en *meta*); además, se determinaron las constantes de acoplamiento donde aquellas entre 7.2-10.0 Hz corresponden a los protones acoplados en posición *orto* y las de 1.6-2.4 Hz a los protones acoplados en *meta*. Para los casos de los protones H-5' (**5a**) y H-3',-4' y -5' (**5c**) se reportaron como multipletes debido a que no fue posible determinar de una manera adecuada dicha multiplicidad (ver espectro 14 y 20); por lo cual, tampoco fue posible determinar sus respectivas *J*'s.

**Tabla 15.** Señales características de RMN-<sup>13</sup>C de los productos finales **5a-5c**.

Valores (ppm)			Asignación
2a	2b	2c	
-----	-----	13.7	C-2'd
14.4	14.4	14.4	C-18
-----	9.0	17.4	C-2'c
17.4	17.4	18.4	C-19
26.4	27.9	26.4	C-21
20.7	26.3	35.6	C-2'b
96.7	96.4	96.4	C-17
119.7	121.0	120.6	C-1'
124.0	122.7	124.0	C-4
124.6	124.0	124.7	C-3'
126.0	128.3	126.7	C-5'
129.7	130.3	132.8	C-6'



134.5	135.9	138.1	<b>C-4'</b>
147.6	153.3	155.8	<b>C-2'</b>
159.7	163.0	163.8	<b>C-1'a</b>
170.7	170.6	170.6	<b>C-5</b>
170.6	173.9	173.2	<b>C-2'a</b>
199.3	199.3	199.3	<b>C-3</b>
204.0	204.0	204.0	<b>C-20</b>

Mediante la Espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 15, 18 y 21) se determinaron los carbonos más importantes del esteroide unido a cada uno de los derivados del ácido salicílico. Los -CH<sub>3</sub> del esteroide se encontraron en 14.4 (C-18), 17.4-18.4 (C-19) y 26.4-27.9 ppm (C-21). La señal del C-17 se observó en 96.4-96.7 ppm. Los carbonos del enlace C=C en C-4 y-5 se observaron en 122.7-124.0 y 170.6-170.7 ppm, respectivamente. Las señales de los C=O en C-3 y C-20 corresponden a las señales a campo bajo en 199.3 y 204.0 ppm, respectivamente. Los carbonos del anillo aromático se encontraron entre 120-140 ppm. Las señales correspondientes a los carbonos alifáticos -CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>3</sub>, se observaron a campos altos entre 10.0-40.0 ppm. Los carbonos de los grupos O-C=O en C-1'a y C-2'a se observaron a campo bajo en 159.7 y 170.6 (**5a**), 163.0 y 173.9 (**5b**), y 163.8 y 173.2 ppm (**5c**), respectivamente.





### 6.3. Evaluación biológica de los productos intermediarios y finales.

#### 6.3.1. Evaluación de la actividad citotóxica.

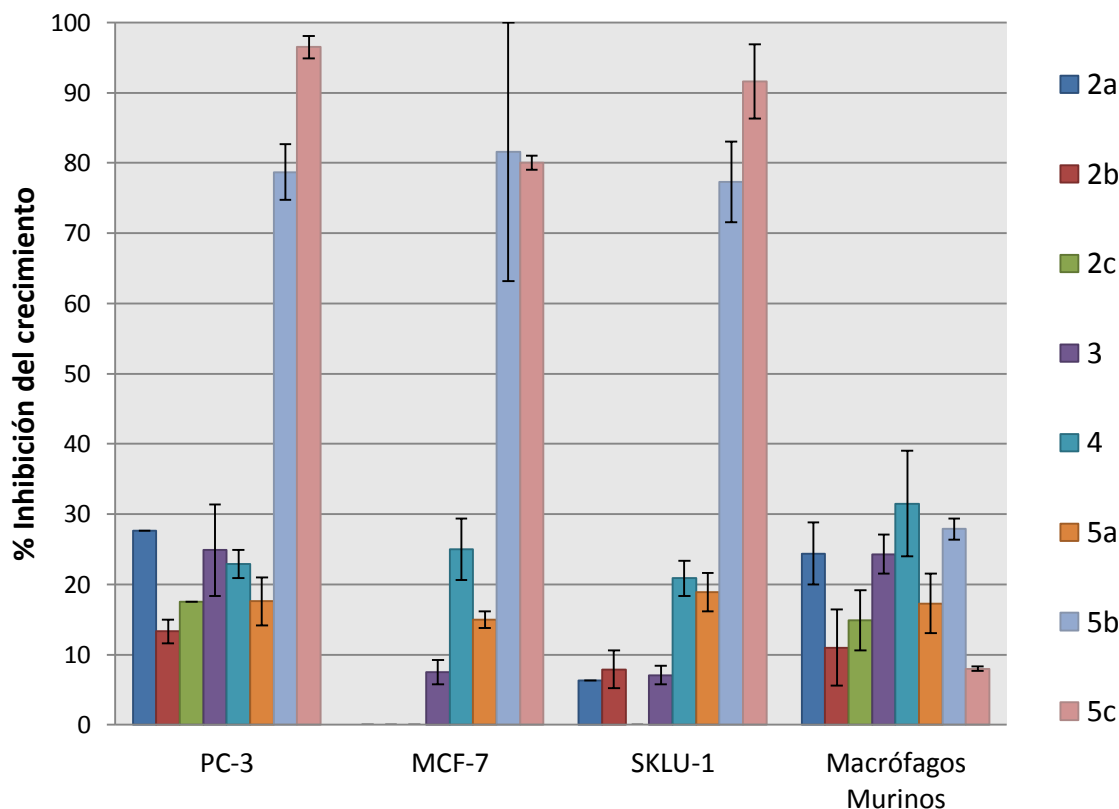
Los productos intermediarios **2a-2c**, los productos finales **5a-5c** y los compuestos de referencia **3** y **4** se evaluaron en pruebas de actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano como fueron PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SKLU-1 (pulmón) mediante la técnica de Sulforrodamina B. Además, se evaluó la actividad citotóxica de los mismos, frente a cultivos primarios de macrófagos murinos mediante el modelo de MTT para determinar toxicidad en células normales. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición del crecimiento celular con su respectivo error estándar medio (EEM) como se observa en la tabla 16.

**Tabla 16.** Porcentaje de inhibición del crecimiento de las tres líneas celulares de cáncer humano producido por los distintos productos sintetizados.

Compuesto	% inhibición del crecimiento (50 $\mu$ M)				Log P*
	PC-3	MCF-7	SKLU-1	Macrófagos murinos	
<b>Productos Intermediarios</b>					
<b>2a</b>	27.61	0	6.3	24.4 $\pm$ 4.4	1.43
<b>2b</b>	13.3 $\pm$ 1.7	0	7.9 $\pm$ 2.7	11.0 $\pm$ 5.4	1.76
<b>2c</b>	17.58	0	0	14.9 $\pm$ 4.3	2.04
<b>Compuestos de Referencia</b>					
<b>3</b>	24.9 $\pm$ 6.5	7.5 $\pm$ 1.7	7.1 $\pm$ 1.3	24.3 $\pm$ 2.8	3.10
<b>4</b>	22.9 $\pm$ 2.0	25.0 $\pm$ 4.4	20.9 $\pm$ 2.5	31.5 $\pm$ 7.5	2.99
<b>Productos Finales</b>					
<b>5a</b>	17.6 $\pm$ 3.4	15.0 $\pm$ 1.2	18.9 $\pm$ 2.7	17.3 $\pm$ 4.2	4.31
<b>5b</b>	78.7 $\pm$ 4.0	81.6 $\pm$ 18.4	77.3 $\pm$ 5.7	27.9 $\pm$ 1.5	4.68
<b>5c</b>	96.5 $\pm$ 1.6	80.0 $\pm$ 1.0	91.6 $\pm$ 5.3	8.0 $\pm$ 0.3	4.93

PD: Evaluación Pendiente.

\*El Log P se determinó mediante el programa ALOGPS 2.1 en <http://www.vcclab.org/lab/alogps/> para realizar un análisis cualitativo.



**Figura 19.** Comparación de los productos de referencia, intermediarios y finales respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento de las líneas celulares de cáncer humano PC-3, MCF-7 y SKLU-1 y los macrófagos murinos.

De acuerdo a los resultados, se pudo apreciar que los productos intermediarios **2a-2c** fueron poco activos frente a las líneas celulares PC-3 y SKLU-1 y no mostraron actividad contra MCF-7. Sin embargo, el producto **2c** mostró selectividad hacia PC-3 y **2a** presentó la mayor actividad hacia la misma línea celular, pero no mostró selectividad; el producto **2b** exhibió las menores actividades. Por lo cual, se observó que estos fueron más selectivos y más potentes frente a la línea celular de cáncer de próstata.

Por otro lado, se evaluaron los productos **3** (derivado de la progesterona acetilado en la posición C17) y **4** (derivado con el grupo hidroxilo libre en la misma posición), los cuales son productos comerciales y son empleados en algunos tratamientos de cáncer hormono-dependiente. De acuerdo a los resultados, se corroboró que estos compuestos de origen esteroidal mostraron actividad



citotóxica ante los tres tipos de líneas celulares cancerosas. En adición, se determinó el papel de un sustituyente en el carbono de la posición 17 del esteroide respecto a la actividad biológica entre los compuestos de referencia **3** y **4**. Se observó que al remover el grupo acetilo, se incrementó la actividad citotóxica sobre MCF-7 y SKLU-1, mientras que se mantiene contra PC-3. Por consiguiente, se determinó que alguna modificación sobre dicha posición es capaz de modular la actividad del compuesto **4**, lo que justifica la obtención de los productos finales.

En el caso de los productos finales **5a-5c**, los cuales son una combinación de dos moléculas con actividad biológica (híbridos), se observó que estos exhibieron actividades citotóxicas superiores no aditivas respecto a sus unidades; por lo cual, se determinó que la unión de dichas unidades favoreció un incremento sinérgico en la potencia de las mismas. Los productos **5b** y **5c** mostraron las mayores actividades, aunque no fueron selectivos, lo que puede estar relacionado con el incremento de la lipofilia; sin embargo, el derivado **5a** resultó ser el menos activo de todos los compuestos de origen esteroideo.

En cuanto a la evaluación sobre macrófagos murinos, se observó que tanto los productos **2a-2c**, **5a-5c** y los de referencia fueron poco tóxicos frente a este tipo de células no cancerosas. Además, se observó que los productos **2a-2c** tuvieron baja toxicidad respecto a los compuestos de referencia **3** y **4**. No obstante, los compuestos híbridos **5a** y **5c** fueron mucho menos tóxicos que sus respectivas unidades **2a** o **2c** y **4**, excepto el compuesto **5b**. Por tanto, los productos **5a** y **5c** presentaron una mejora en la selectividad y seguridad respecto a otros agentes citotóxicos como los compuestos de referencia **3** y **4**, los cual son empleado en la clínica para el tratamiento de algunos tipos de cáncer humano.

El diseño de los productos intermediarios y finales también se basó en la homología, incrementando el número de metilenos (-CH<sub>2</sub>-) en la cadena lateral del O-acilo que está unido al anillo aromático del AS desde 0 (**2a** y **5a**), 1 (**2b** y **5b**) y 2 (**2c** y **5c**). En la *figura 21*, se observa una comparación entre las dos series homólogas por cada línea celular y un cultivo primario.

En la evaluación sobre la línea celular PC-3 (*Figura 20A*), se observó que los productos **2a-2c** presentaron una tendencia a comportarse como tipo “zig-zag”

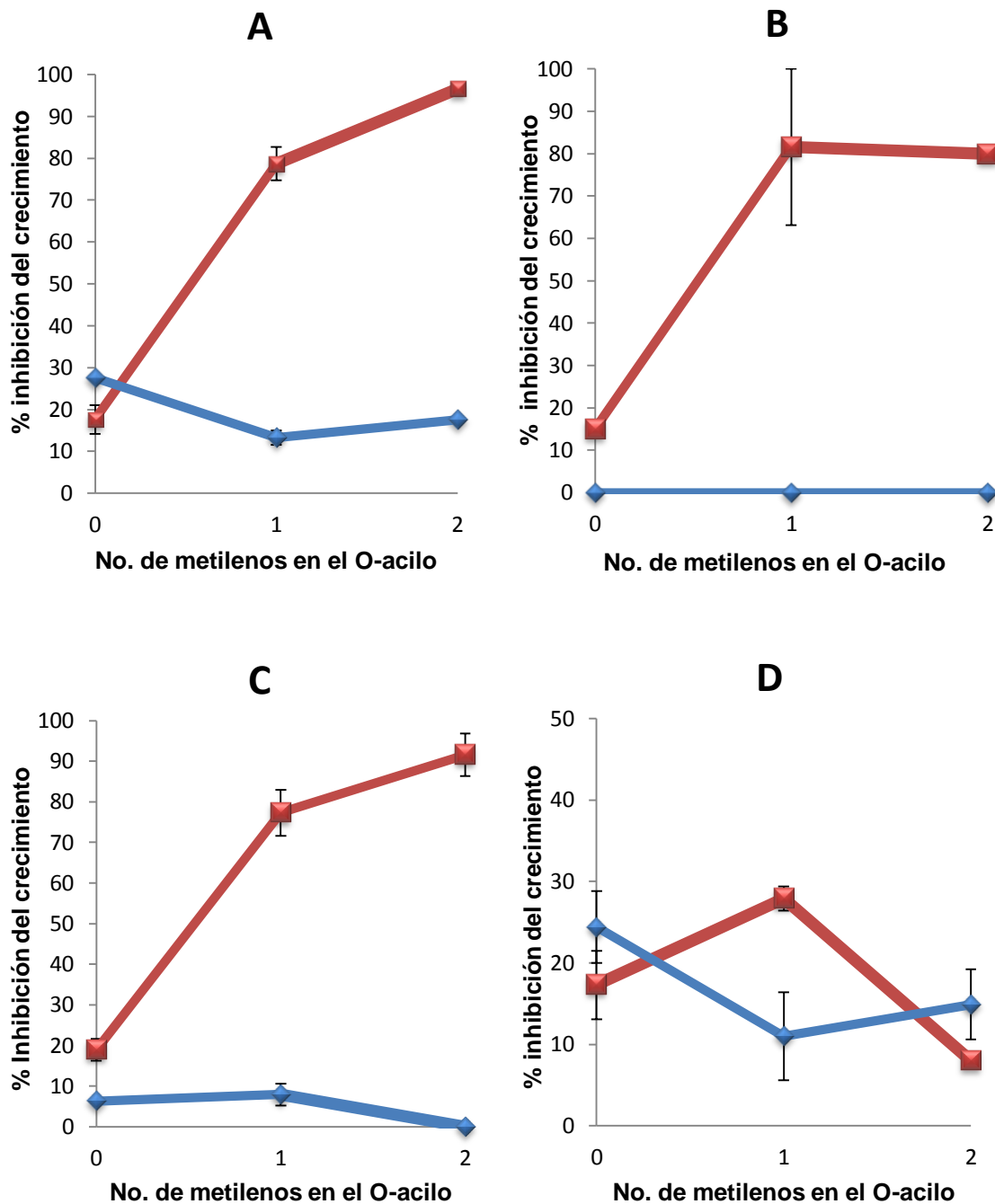


en este intervalo, donde los compuestos con 0 y 2 tienen mayor actividad que el que tiene 1 metileno, cuyo comportamiento no está relacionado con la lipofilia. No obstante, estos mismos compuestos al estar unidos al esteroide **4** exhibieron un aumento continuo no lineal de su actividad, lo cual puede relacionarse directamente con un incremento en la lipofilia.

En el caso de la evaluación frente a MCF-7 (*Figura 20B*), se observó que ninguno de los productos **2a-2c** presentó actividad frente a la misma en el intervalo de metilenos de estudio. Sin embargo, al estar conjugados con **4** exhibieron actividad citotóxica contra dicha línea celular, lo que puede indicar que la porción esteroidea de las moléculas híbridas es la que proporciona, en mayor parte, la actividad. En la *figura 21B*, se observa que los productos **5a-5c** mostraron un incremento de la actividad entre los compuestos con 0 y 1 metilenos, y se mantiene entre los compuestos con 1 y 2.

De acuerdo a los resultados de la evaluación contra SKLU-1 (*Figura 20C*), se observó que la serie de los productos **2a-2c** exhibió una tendencia tipo “zig-zag” en este intervalo, donde el compuesto con 1 metileno mostró mayor actividad respecto a los de 0 y 2. Por otro lado, las moléculas híbridas **5a-5c** presentaron un aumento continuo no lineal respecto a su actividad, lo cual puede estar relacionado con un incremento en la lipofilia de la molécula.

En la evaluación sobre macrófagos murinos (*Figura 20D*), se determinó que los productos **2a-2c** mostraron una tendencia tipo “zig-zag” en este intervalo de metilenos donde el compuesto **2b** presentó la menor toxicidad frente a células no cancerosas. Los productos **5a-5c** también mostraron una tendencia tipo “zig-zag”; sin embargo, en este caso el compuesto **5b** (producto intermediario **2b** unido al esteroide **4**) mostró la mayor toxicidad respecto a los otros dos homólogos.



**Figura 20.** Comparación entre los compuestos homólogos derivados de **1** (productos intermedios) y los homólogos derivados de **4** (productos finales) por cada línea celular de cáncer humano y cultivo primario: **(A)** PC-3, **(B)** MCF-7, **(C)** SKLU-1 y **(D)** Macrófagos murinos. La serie azul corresponde a los productos intermedios y la roja a los productos finales.



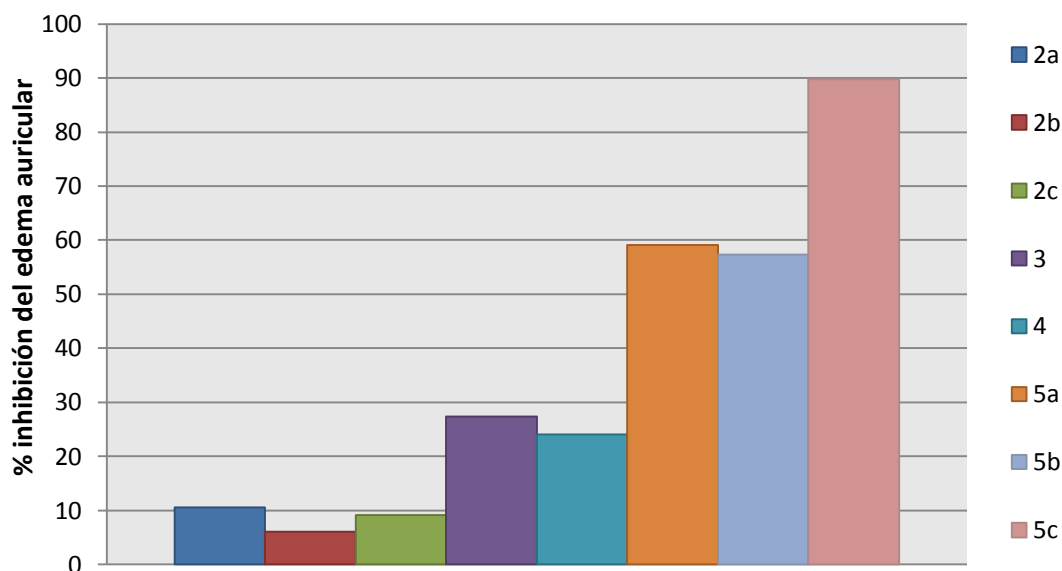
### 6.3.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.

Los productos intermedarios, finales y de referencia también se sometieron a la prueba de inducción del edema auricular por esteres de forbol (TPA) para determinar sus posibles actividades antiinflamatorias, con el fin de incrementar las propiedades de los derivados sintetizados como potenciales agentes anticancerígenos, considerando la relación que existe entre la inflamación y el cáncer. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición del edema y aquellos marcados con (\*\*) presentaron una diferencia significativa respecto al control (tabla 17).

**Tabla 17.** Porcentaje de inhibición del edema auricular producido por los distintos compuestos sintetizados.

Compuesto	% inhibición del edema (1 $\mu$ mol/oreja)	Log P*
<b>Productos Intermediarios</b>		
<b>2a</b>	10.58	1.43
<b>2b</b>	6.08	1.76
<b>2c</b>	9.09	2.04
<b>Compuestos de Referencia</b>		
<b>3</b>	27.34**	3.10
<b>4</b>	24.05**	2.99
<b>Productos Finales</b>		
<b>5a</b>	59.13**	4.31
<b>5b</b>	57.37**	4.68
<b>5c</b>	89.73**	4.93

\*El Log P se determinó mediante el programa ALOGPS 2.1 en <http://www.vcclab.org/lab/alogps/> para realizar un análisis cualitativo.



**Figura 21.** Comparación de los productos de referencia, intermediarios y finales respecto al porcentaje de inhibición del edema auricular inducido por TPA.

Al comparar los resultados de los productos **2a-2c**, se observó que el producto **2a** presentó la mayor actividad antiinflamatoria de los tres homólogos. También se observó que los productos **2a-2c** presentaron las menores actividades antiinflamatorias de todos los compuestos, a pesar de ser derivados del AS, mientras que los productos **5a-5c** exhibieron las mayores actividades. Además, en la tabla 17 se observó que los productos **2a-2c** tienen bajos coeficientes de distribución (Log P de 1.43-2.04), mientras que los productos **5a-5c** poseen los más altos (4.31-4.93). Por tanto, se pudo establecer una posible relación entre la lipofilia y la actividad antiinflamatoria, dado que los compuestos con bajo Log P tuvieron bajas actividades antiinflamatorias y viceversa, y considerando que dicho modelo implica una administración tópica, por lo cual la acción de los productos está relacionada con la absorción de los mismos. En adición, se observó que los compuestos de referencia **3** y **4** tienen mayor actividad antiinflamatoria respecto a los productos intermediarios y menor a los finales, lo cual también coincidió con la relación antes mencionada.

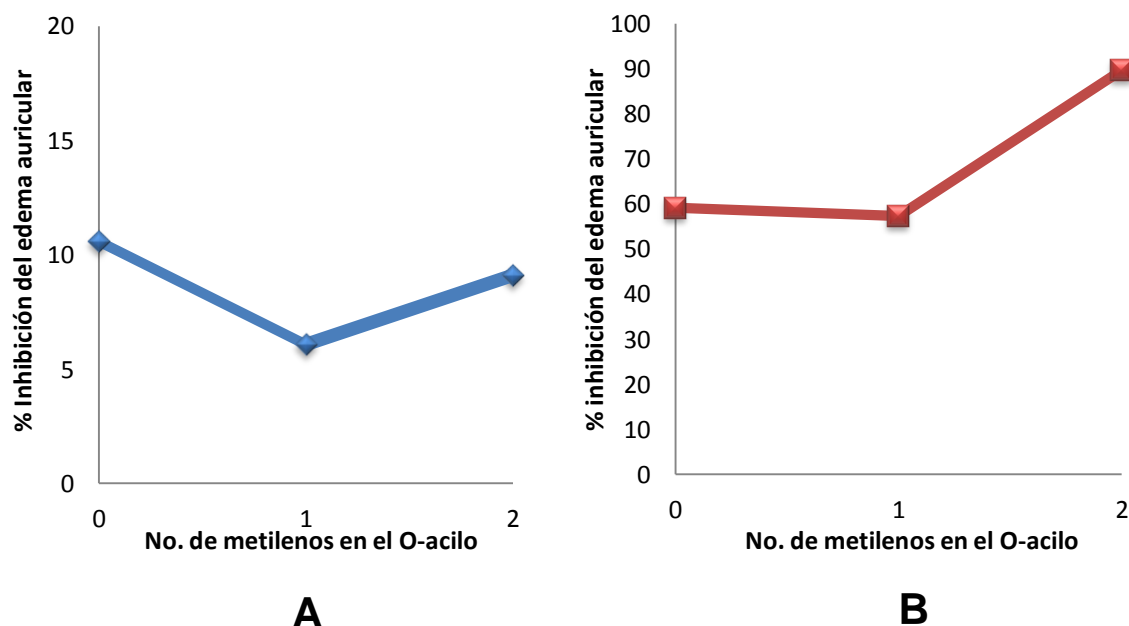
Se compararon los compuestos de referencia entre ellos mismos (única diferencia estructural que existe entre ambos es la presencia de un grupo acetilo



en el carbono que está en la posición 17 del esteroide) y se observó que el compuesto **3** presentó una mayor actividad respecto a **4**, por lo cual se determinó que un sustituyente voluminoso o lipofílico en la posición C-17 $\alpha$  puede ser capaz de incrementar la actividad biológica aunado a la lipofilia.

En el caso de los productos finales (moléculas híbridas), se observó que el producto que presentó la mayor actividad fue el **5c**. Los productos **5a** y **5b** tuvieron actividades semejantes, y los tres exhibieron actividades citotóxicas superiores respecto a sus unidades **2a-2c** y **4**, por lo cual se determinó que la unión de dichas unidades favoreció un incremento sinérgico en la potencia de las mismas.

Por otro lado, se compararon las dos series homólogas (productos intermediarios y finales) y se observó que entre los productos intermediarios (*Figura 22A*) se mostró una tendencia a comportarse como tipo zig-zag en este intervalo, donde los compuestos con 0 y 2 metilenos tienen mayor actividad que el que tiene uno. Sin embargo, al estar unidos al compuesto **4** (*Figura 22B*) se observó un aumento no continuo de la actividad antiinflamatoria.



**Figura 22.** Comparación entre los productos homólogos intermediarios (**A**) y los productos homólogos finales (**B**) respecto a su actividad antiinflamatoria en el modelo de inducción del edema auricular por TPA.





## 7. CONCLUSIONES

Se sintetizaron y caracterizaron mediante métodos físicos (punto de fusión y apariencia) y espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) los productos intermediarios: ácido 2-acetoxibenzoico, ácido 2-propioniloxibenzoico y ácido 2-butiloxibenzoico, los cuales son homólogos, para su posterior esterificación con la 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona.

Se sintetizaron y caracterizaron mediante métodos físicos (punto de fusión y apariencia) y espectroscópicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) los productos finales: 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona, 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona y 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona, los cuales son híbridos y homólogos entre sí.

Se empleó la radiación de microondas (RMW) como método de QVvS para la obtención tanto de los productos intermediarios como los productos finales y se determinaron diversas ventajas respecto a los métodos de síntesis convencional.

Se evaluó la posible actividad citotóxica de los productos intermediarios **2a-2c** y los productos finales **5a-5c** sobre líneas celulares de cáncer humano como PC-3 (próstata), MCF-7 (mama) y SKLU-1 (pulmón) y se determinó que los **2a-2c** presentaron mayor potencia frente a PC-3 y nula contra MCF-7. Los productos **5a-5c** fueron los más potentes pero no mostraron selectividad por algún tipo celular, donde el compuesto **5c** fue el más potente de la serie.

Se evaluó la posible toxicidad de los productos **2a-2c** y los **5a-5c** sobre macrófagos murinos y se mostró que ambas series fueron poco tóxicas frente a este tipo de células no cancerosas. No obstante, los compuestos híbridos **5a** y **5c** fueron mucho menos tóxicos que sus respectivas unidades.

Se evaluó la posible actividad antiinflamatoria de los productos **2a-2c** y los **5a-5c** y se observó una relación entre la lipofilia y dicha actividad, donde los productos más potentes resultaron ser los compuestos **5a-5c** y los menos, los **2a-2c**.

Se determinó que las técnicas de modificación molecular (homología e hibridación) empleadas fueron adecuadas para la mejora de las actividades biológicas evaluadas, debido a que los productos **5a-5c** presentaron un



incremento en la potencia citotóxica frente a líneas celulares de cáncer humano y en la potencia antiinflamatoria y una disminución de la toxicidad en células no cancerosas respecto a sus unidades y respecto a otros agentes citotóxicos como los compuestos de referencia **3** y **4**, los cuales son empleado en el área clínica para el tratamiento de algunos tipos de cáncer humano. Cabe mencionar que la actividad dual que presentó este tipo de moléculas, las posiciona como potenciales agentes anticancerígenos, considerando la importancia de la relación que existe entre la inflamación y el cáncer.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>. (30 de enero de 2012).
2. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/estadisticas/2009/cancer0.doc>. (21 de enero de 2012).
3. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>. (31 de enero de 2012).
4. Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J.; Moore, P. Farmacología, 6ª ed.; Elsevier: España, 2004; p. 244-252, 429-438, 693-709.
5. Rubin, P. Oncología Clínica, 8ª ed.; Elsevier: España, 2003; p. 1,5,7.
6. Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N. Patología Humana, 7ª ed.; Elsevier: España, 2005; p. 273-343.
7. Roskoski, R. Bioquímica, 1ª ed.; McGraw-Hill: México, 1998; p. 456-458, 462-482.
8. Mycek, M.; Harvey, R.; Champe, P. Farmacología, 2ª ed.; McGraw-Hill: México, 2008; p. 445-480.
9. Florez, J. Farmacología Humana, 3ª ed.; Masson: España, 1997; p. 867-883, 1017-1038, 1039-1057.
10. Besse, J.; Latour, J.; Garric, J. Anticancer drugs in surface waters. *Environ. Int.* **2012**, 39, pp 73-86.
11. Shan, L-H.; Liu, H-M.; Huang, K-X.; Dai, G-F.; Cao, C.; Dong, R-J. Synthesis of 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -trihydroxy-pregn-21-benzylidene-5-en-20-one derivatives and their cytotoxic activities. *Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, p. 6637-6639.
12. Primo, E. Química orgánica básica y aplicada: De la molécula a la industria, Vol. 2; Reverté: España, 1995; p. 947-948, 953-954.
13. Bruice, P. Química orgánica, 5ª ed.; Pearson Educación: México, 2008; p. 1186-1189.
14. Wade, L. Química Orgánica, 5ª ed; Pearson Prentice-Hall: España, 2004; p. 922-924, 1171-1173.
15. Delgado, A. Introducción a la Química Terapéutica, 2ª ed; Ediciones Díaz de Santos: España, 2004; p. 357-365, 399-403.



16. Ahmad, N.; Kumar, R. Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Lett.* **2011**, 300, pp 1-9.
17. Carretero, M. Nuevo tratamiento del cáncer de mama. *OFFARM* **2001**, junio, pp 174-176.
18. Herruzo, I. Tratamiento hormonal del cáncer de mama. *Oncología* **2004**, 27 (7), pp 427-434.
19. Africander, D.; Verhoog, N.; Hapgood, J. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids* **2011**, 76, pp 636-652.
20. Marquez, D.; Mah, V.; Alavi, M.; Maresh, E.; Chen, H.; Bgryanova, L.; Horvath, S.; Chia, D.; Garon, E.; Goodglick, L.; Pietras, R. Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids* **2011**, 76, pp 910-920.
21. Chwalisz, K.; Brenner, R.; Fuhrmann, U.; Hess-Stumpff, H.; Elger, W. Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* **2000**, 65, pp 741-751.
22. De Nicola, A.; González, M.; Garay, L.; González, S.; Labombarda, F. Progesterona: Rol Neuroprotector en Sistema Nervioso Central. *Rev. Arg. Endocrin. Metabol.* **2004**, 41, pp 31-36.
23. Álvarez, L.; Dansey, M.; Martí, M.; Bertucci, P.; Di Chenna, P.; Pecci, A.; Burton, G. Biological activity and ligand binding mode to the progesterone receptor of A-homo analogues de la progesterone. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, pp 1683-1691.
24. Simoncini, T.; Mannella, P.; Fornari, L.; Caruso, A.; Varone, G.; Genazzani, A. In vitro effects of progesterone and progestins on vascular cells. *Steroids* **2000**, 65, pp 671-679.
25. Cutini, P.; Massheimer, V. Role of progesterone on the regulation of vascular muscle cells proliferation, migration and apoptosis. *Steroids* **2010**, 75, pp 355-361.



26. Chwalisz, K.; Brenner, R.; Fuhrmann, U.; Hess, H.; Elger, W. Antiproliferative effects of progesterone antagonist and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* **2000**, 65, pp 741-751.
27. Mitchell, R.; Kumar, V.; Abbas, A.; Fausto, N. Compendio de Robbins y Cotran: Patología Estructural y Funcional, 7ª ed.; Elsevier: España, 2007; p. 30-58.
28. Rodríguez, R.; Vidrio, H.; Campos, A. Guía de Farmacología y Terapéutica, 2ª ed.; McGraw-Hill: México, 2009; p. 91-98.
29. Clària, J. Cyclooxygenase-2 Biology. *Curr. Pharm. Design* **2003**, 9, pp 2177-2190.
30. Kumar, N. et al. NSAID's and selectively COX-2 inhibitors as potential chemoprotective agents against cancer. *Arabian Journal of Chemistry* (2011), doi:10.1016/j.arabjc.2011.07.020 (En prensa).
31. Avendaño, C. Introducción a la Química Terapéutica, 2ª ed.; Mc Graw-Hill: España, 2001; p. 313-317.
32. Kumar, V.; Aster, J.; Fausto, N.; Abbas, A. Patología Estructural y Funcional, 8ª ed.; Elsevier: España, 2011; p. 44-77.
33. Bruzzo, J.; Chiarella, P.; Fernández, G.; Busuoabad, O.; Ruggiero, R. Cáncer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino. *Medicina* **2007**, 67, pp 469-474.
34. Na, H.; Park, J.; Lee, H.; Lee, H.; Myung, S.; Surh, Y. 15-Hydroxyprstaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 82, pp 1352-1360.
35. Grau, J. Inhibidores de la ciclooxigenasa-2 en la prevención del cáncer. *Rev. Clin. Esp.* **2005**, 205(9), pp 446-456.
36. Mohan, S.; Epstein, J. Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* **2003**, 39, pp 537-546.
37. Urade, M. Cyclooxygenase (COX)-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer. *Jpn. Dent. Sci. Review* **2008**, 44, pp 57-65.
38. Gupta, R.; DuBois, R. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of Cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, pp 11-21.



39. Sánchez, J.; Bradbury, D.; Pang, L.; Knox, A. Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer* **2003**, 40, 33-44.
40. Orejuela, F.; Ramondetta, L.; Smith, J.; Brown, J.; Lemos, L.; Li, Y.; Hollier, L. Estrogen and progesterone receptors and cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer, endometrial hyperplasia and normal endometrium. *Gynecol. Oncol.* **2005**, 97, pp 483-488.
41. Dempke, W.; Rie, C.; Grothey, A.; Schmoll, H. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2001**, 127, pp 411-417.
42. Echeverri, N.; Mockus, I. Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B): signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer. *Rev. Fac. Med.* **2008**, 56, pp 133-146.
43. Almeida, M.; Munoz, J.; Nunes, S.; Fonseca, J. Cyclooxygenase-2 immunoexpression in breast cáncer: Progesterone receptor influence. *Cancer Epidemiology* (2011), doi: 10.1016/j.canep.2011.05.007 (En prensa).
44. Su, B.; Cai, X.; Hong, Y.; Chen, S. COX-2 inhibitor nimesulide analogs are aromatase supressors in breast cáncer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, 122, pp 232-238.
45. Brueggemeiner, R.; Su, B.; Sugimoto, Y.; Díaz, E.; Davis, D. Aromatase and COX in breast cancer: Enzyme inhibitors and beyond. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, 106, pp 16-23.
46. Galbis, J. Panorama actual de la Química Farmacéutica, 2ª ed.; Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla: España, 2004.; p. 253-260, 298-301.
47. Cabeza, M.; Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Heuze, I.; Recillas, S.; Berrios, H.; Cruz, A.; Cabrera, O.; Pérez, V. Biological activity of novel progesterone derivates having a bulky ester side chains at C-3. *Steroids* **2008**, 73, pp 838-843.
48. Mehta, G.; Singh, V. Hybrid systems through natural products leads: An approach towards new molecular entities. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, pp 323-334.



49. Mendoza-Martínez C. Tesis de Maestría de la Facultad de Química, UNAM. 2009.
50. Adsule, S.; Banerjee, S.; Ahmed, F.; Padhye, S.; Sarkar, F. Hybrid anticancer agents: Isothiocyanate-progesterone conjugates as chemotherapeutic agents and insights into their cytotoxicities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, pp 1247-1251.
51. Zeinyeh, W.; Alameh, G.; Radix, S.; Grenot, C.; Dumontet, C.; Walchshofer, N. Design, synthesis and evaluation of progesterone-adenine hybrids as bivalent inhibitors of P-glycoprotein-mediated multidrug efflux. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, pp 3165-3168.
52. Meléndez, C.; Camacho, A. Química verde, la química del nuevo milenio. *Synthesis* **2008**, 45, pp 1-5.
53. <http://www.epa.gov/greenchemistry>. Folleto de información sobre la química verde, 2002. Oficina de prevención de la contaminación y sustancias tóxicas (OPPT/EPA). Consultada el 18 de julio de 2011.
54. <http://www.acs.org/greenchemistry>. Consultada el 10 de junio de 2012.
55. Stanley M.; Mora, I. Introducción a la química ambiental, 1ª ed.; Reverté: España, 2007; p. 5-11.
56. Anastas, P.; Bartlett, L.; Kirchoff, M.; Williamson, T. The role of catalysis in the design, development and implementation of green chemistry. *Catal. Today* **2000**, 55, pp 11-22.
57. Manley, J.; Anastas, P.; Cue, B. Frontiers in Green Chemistry: meeting the grand challenges for sustainability in R&D and manufacturing. *J. Clean Prod.* **2008**, 16, pp 743-750.
58. Centi, G.; Perathoner, S. Catalysis and sustainable (Green) chemistry. *Catal. Today* **2003**, 77, pp 287-297.
59. Aradilla, D.; Oliver, R.; Estrany, F. La Química de la radiación de microondas. *Técnica Industrial* **2009**, 289, pp 55-58.
60. Hayes, B. Microwave Synthesis, 1ª ed.; CEM Publishing: USA, 2002; p. 11-25.
61. Zarco-Juárez Mónica. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2008.



62. Carballido, M. Tesis de Doctorado de la Facultad de Ciencias, Universidad de Santiago de Compostela. 2007.
63. Loupy, A. Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *C. R. Chimie* **2004**, 7, pp 103-112.
64. Loupy, A.; Perreux, L.; Liagre, M.; Burle, K.; Moneuse, M. Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanism. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73(1), 161-166.
65. Morrison, R.; Boyd, R. Química Orgánica, 5ta. Edición; Addison Wesley Longman: México, 1998; p. 851-855, 858-859, 867-868.
66. Loupy, A.; Petit, A.; Ramdani, M.; Yvanaeff, C.; Majdoub, M.; Labiad, B.; Villemin, D. The synthesis of esters under microwave irradiation using dry-media conditions. *Can. J. Chem.* **1993**, 71, pp 90-95.
67. Hung, D.; Mellick, G.; Prankerd, R.; Roberts, M. Synthesis, identification, characterization, stability, solubility, and protein binding of ester derivatives of salicylic acid and diflunisal. *Int. J. Pharm.* **1997**, 153, pp 25-39.
68. Hirose, T.; Kopek, B.; Wang, Z.; Yusa, R.; Baldwin, B. Microwave oven synthesis of esters promoted by imidazole. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1831-1833.
69. Montoya-Hernández, A. Tesis de Licenciatura de la FES Zaragoza, UNAM. 2011.
70. Escobar, L.; Alfonso, P.; Aristizábal, F. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **2009**, 11 (2), 49-56.
71. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63.
72. Huerta-Magaña, I. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM. 2005.
73. Vela-Méndez, E. Tesis de Maestría de la Facultad de Química, UNAM. 2009.
74. García-Guzmán, P. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, UNAM. 2009.

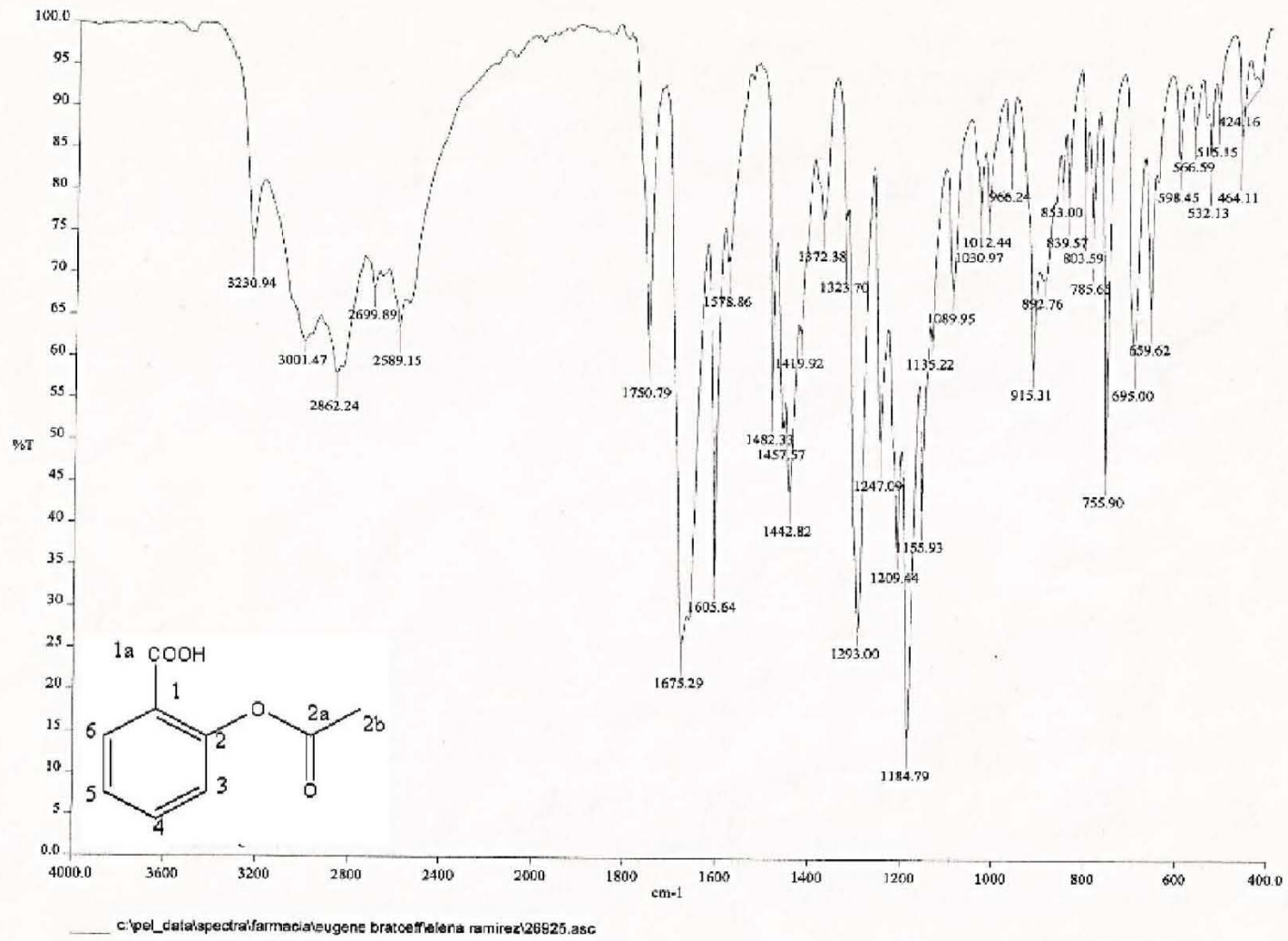




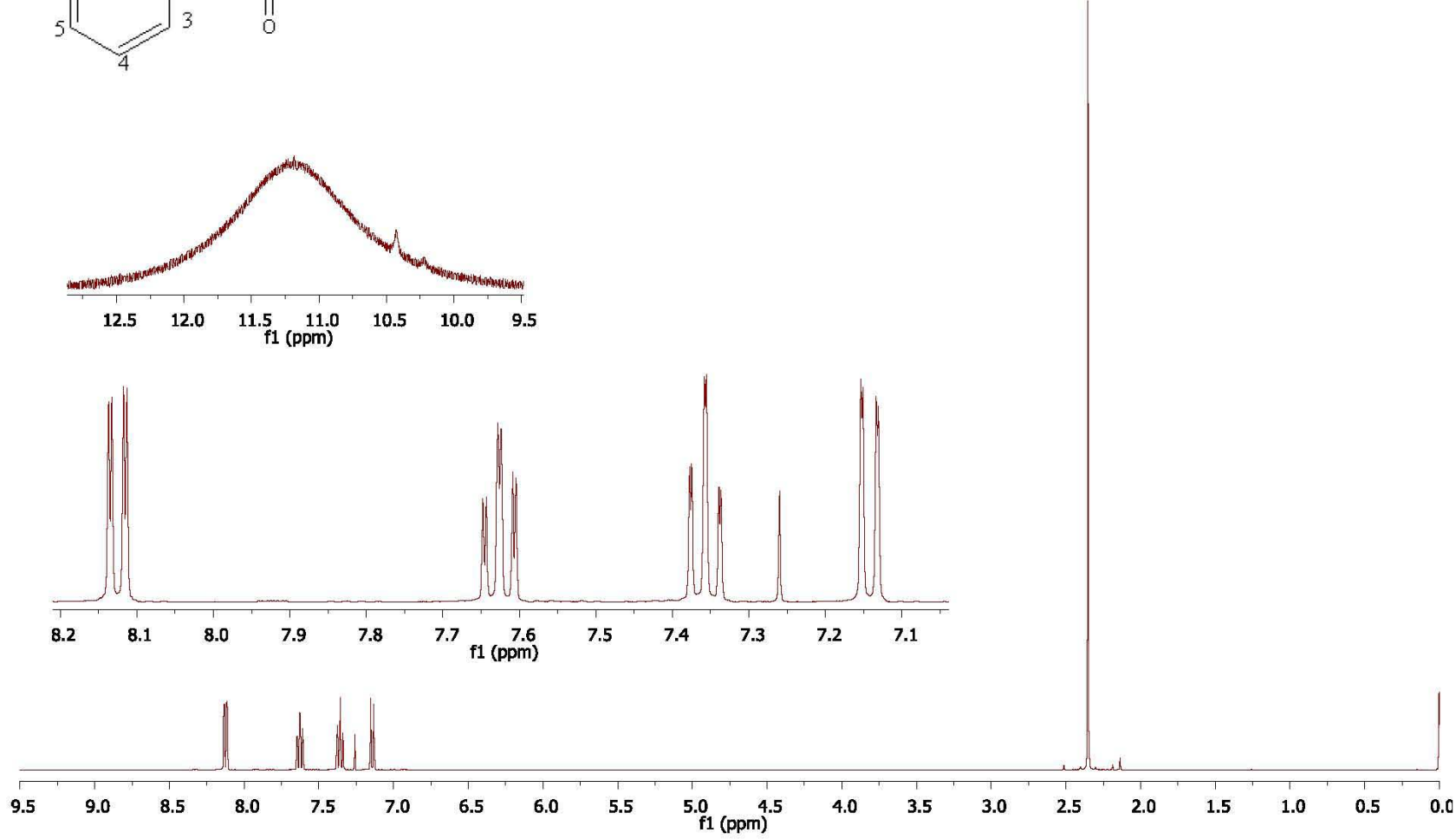
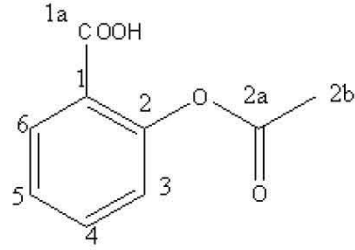
## 9. ANEXO

### 9.1. Lista de Espectros.

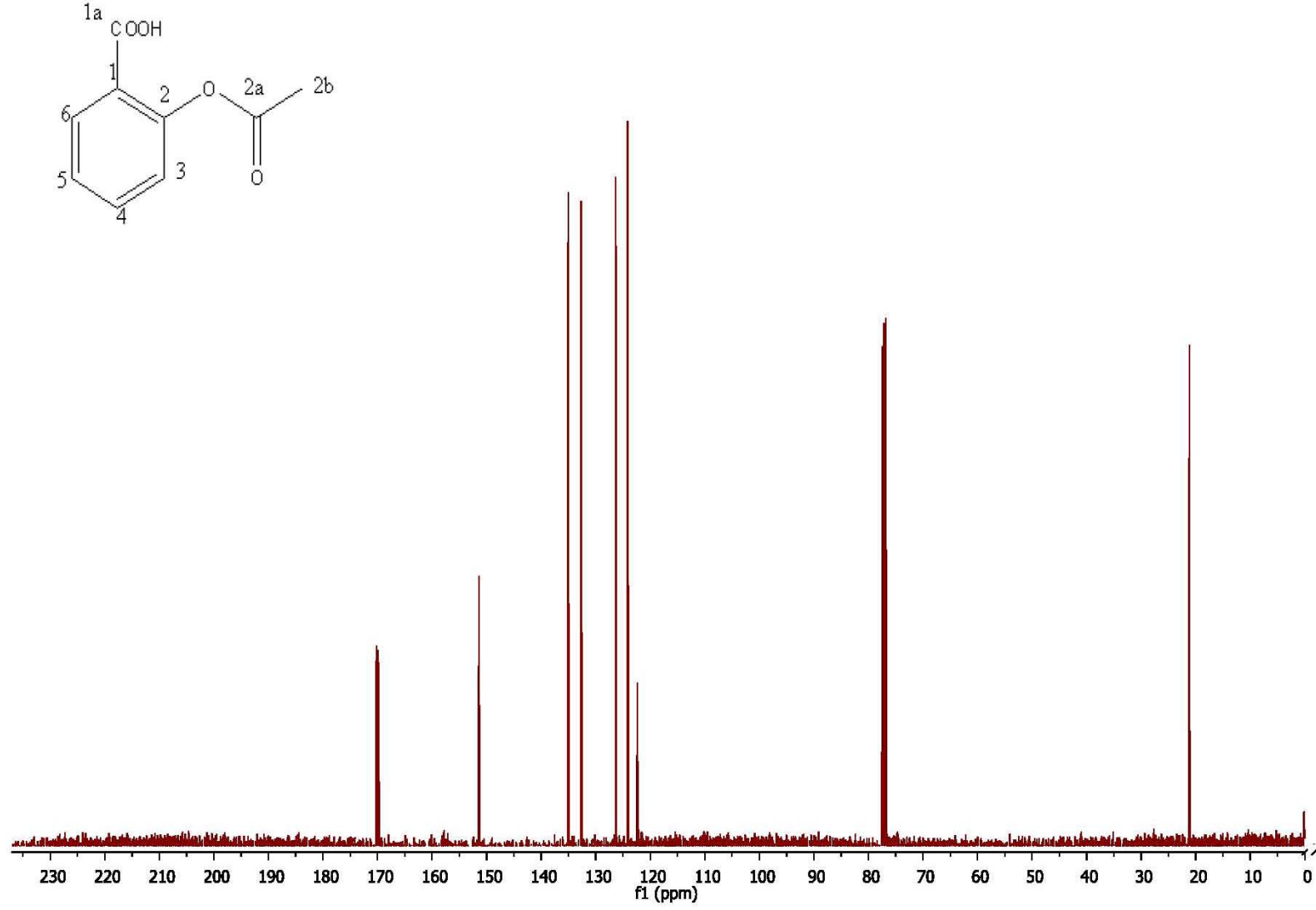
	Página
Espectro 1. IR del ácido 2-acetoxibenzioco (2a)	77
Espectro 2. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2-acetoxibenzoico (2a)	78
Espectro 3. RMN- <sup>13</sup> C del ácido 2-acetoxibenzoico (2a)	79
Espectro 4. IR del ácido 2-propioniloxibenzoico (2b)	80
Espectro 5. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2-propioniloxibenzoico (2b)	81
Espectro 6. RMN- <sup>13</sup> C del ácido 2-propioniloxibenzoico (2b)	82
Espectro 7. IR del ácido 2-butiloxibenzoico (2c)	83
Espectro 8. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2-butiloxibenzoico (2c)	84
Espectro 9. RMN- <sup>13</sup> C del ácido 2-butiloxibenzoico (2c)	85
Espectro 10. IR de 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4)	86
Espectro 11. RMN- <sup>1</sup> H de 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4)	87
Espectro 12. RMN- <sup>13</sup> C de 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4)	88
Espectro 13. IR de 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a)	89
Espectro 14. RMN- <sup>1</sup> H de 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a)	90
Espectro 15. RMN- <sup>13</sup> C de 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a)	91
Espectro 16. IR de 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b)	92
Espectro 17. RMN- <sup>1</sup> H de 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b)	93
Espectro 18. RMN- <sup>13</sup> C de 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b)	94
Espectro 19. IR de 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c)	95
Espectro 20. RMN- <sup>1</sup> H de 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c)	96
Espectro 21. RMN- <sup>13</sup> C de 17 $\alpha$ -(2-butiloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c)	97



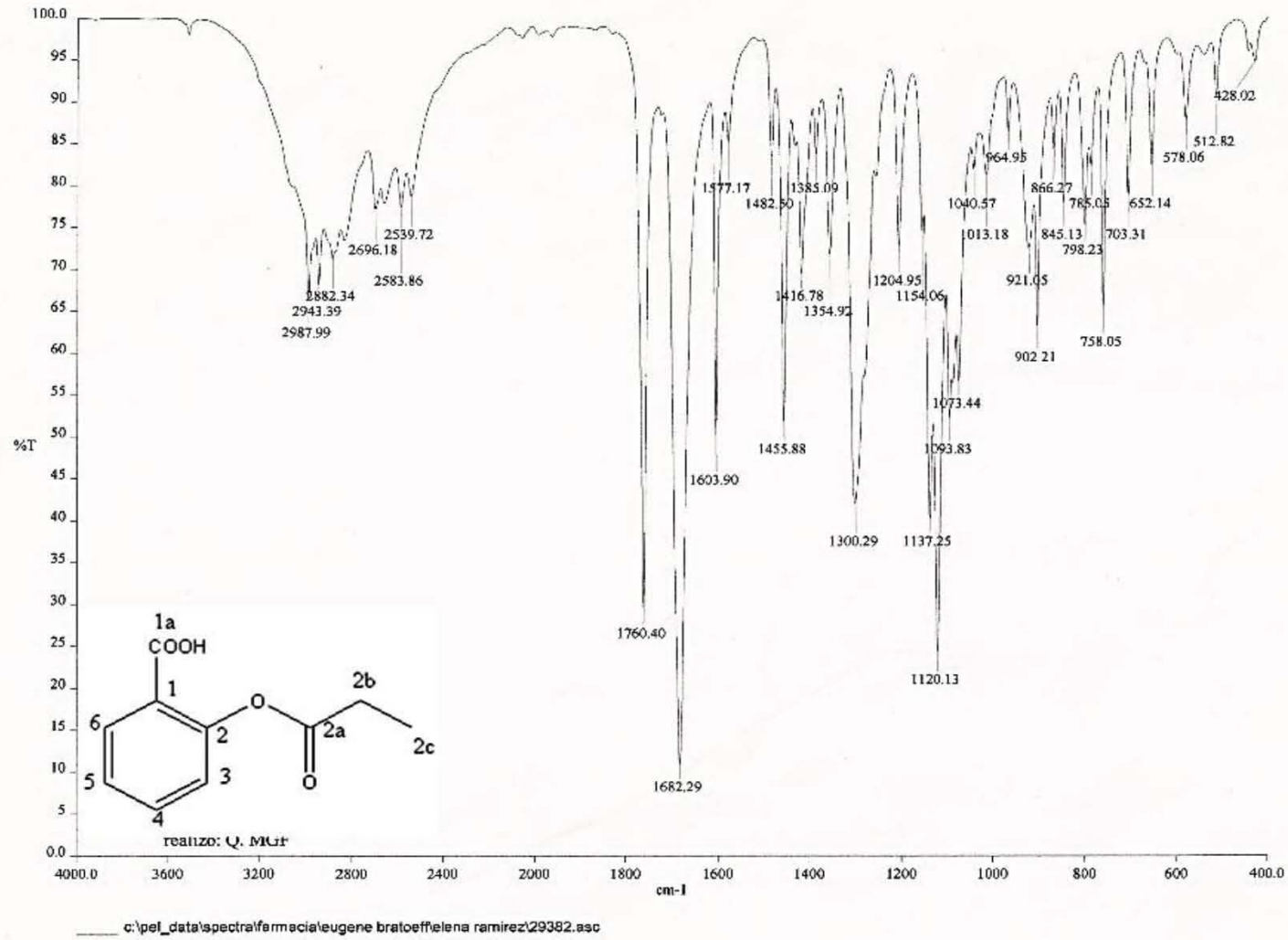
Espectro 1. IR del ácido 2-acetoxibenzoico (2a)



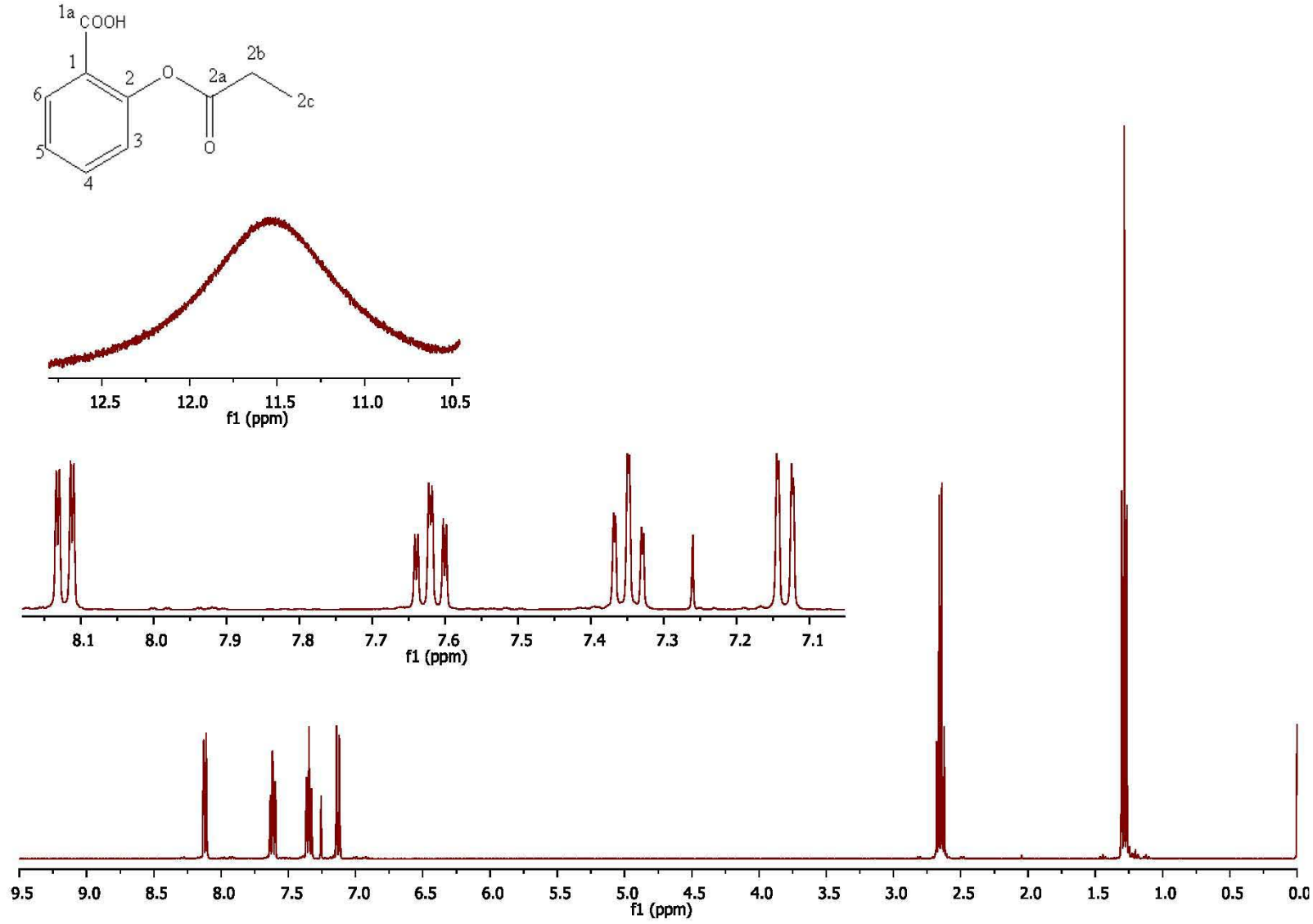
Espectro 2. RMN- $^1\text{H}$  del ácido 2-acetoxibenzoico (2a)



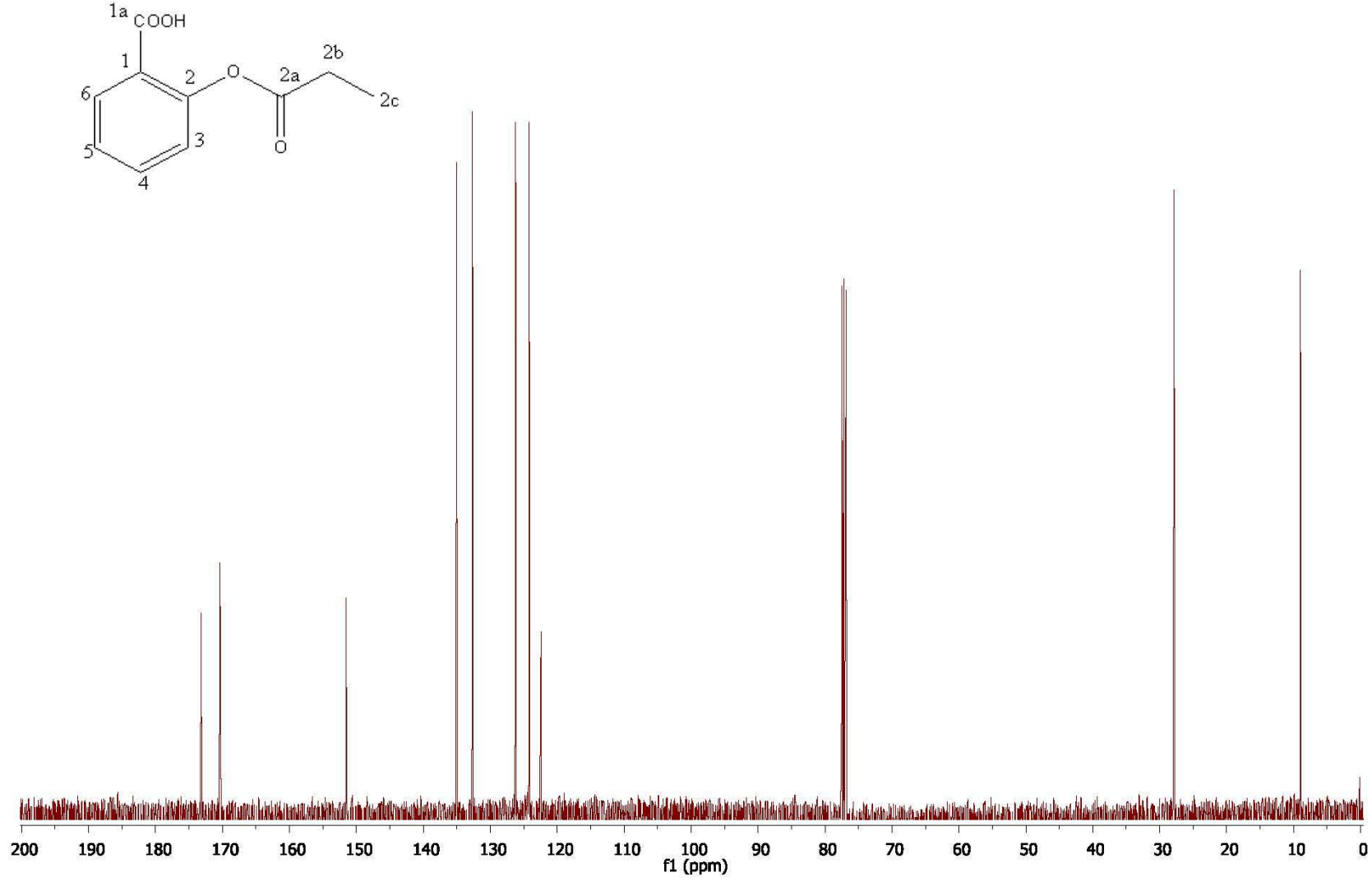
Espectro 3. RMN- $^{13}\text{C}$  del ácido 2-acetoxibenzoico (2a)



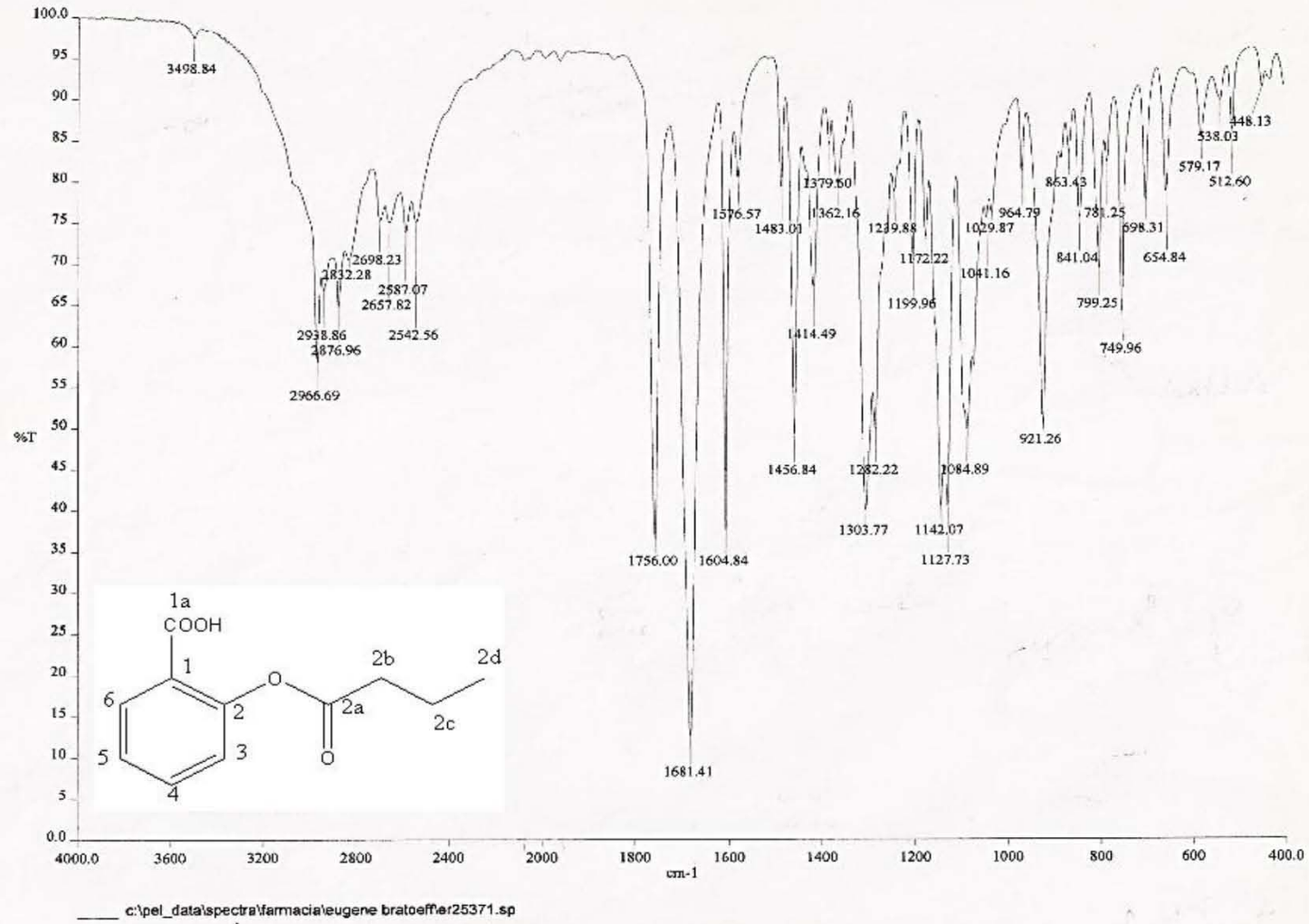
Espectro 4. IR del ácido 2-propioniloxibenzoico (2b)



Espectro 5. RMN-<sup>1</sup>H del ácido 2-propioniloxibenzoico (2b)

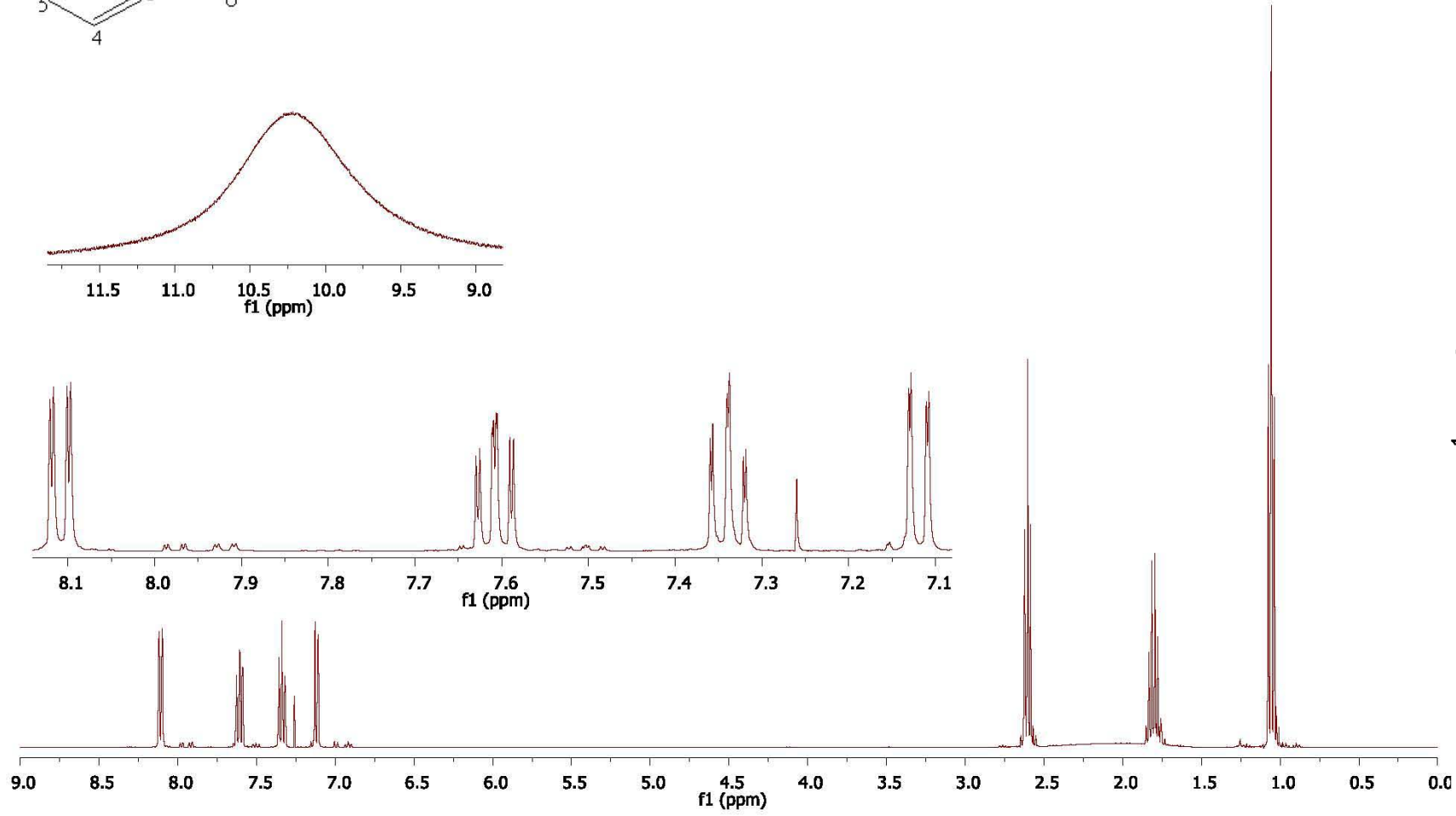
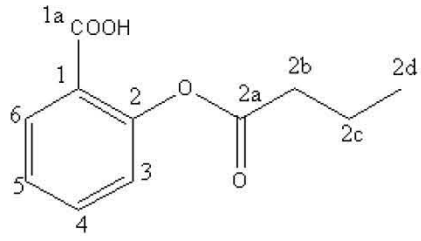


Espectro 6. RMN-<sup>13</sup>C del ácido 2-propioniloxibenzoico (2b)

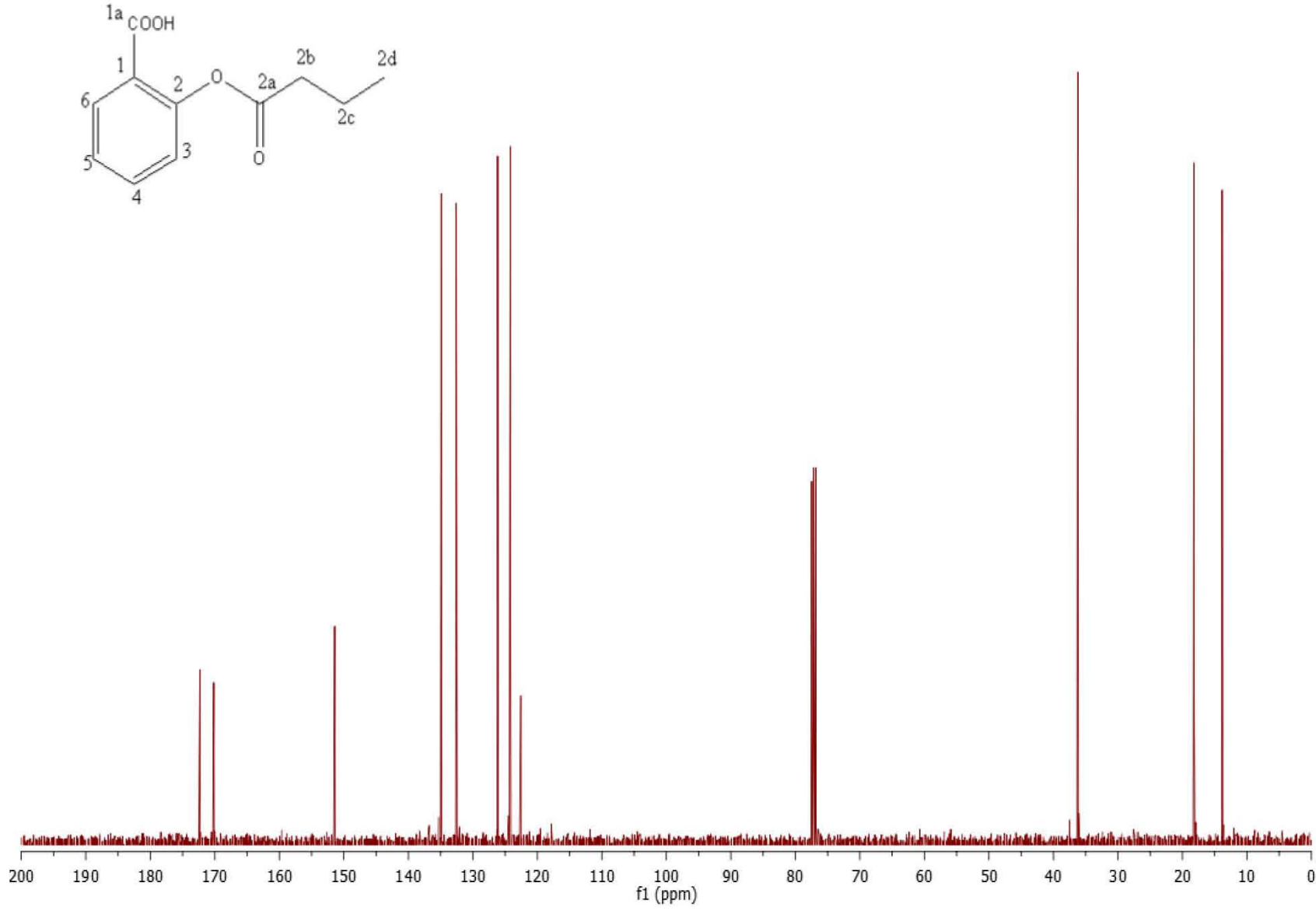


Espectro 7. IR del ácido 2-butiriloibenzóico (2c)

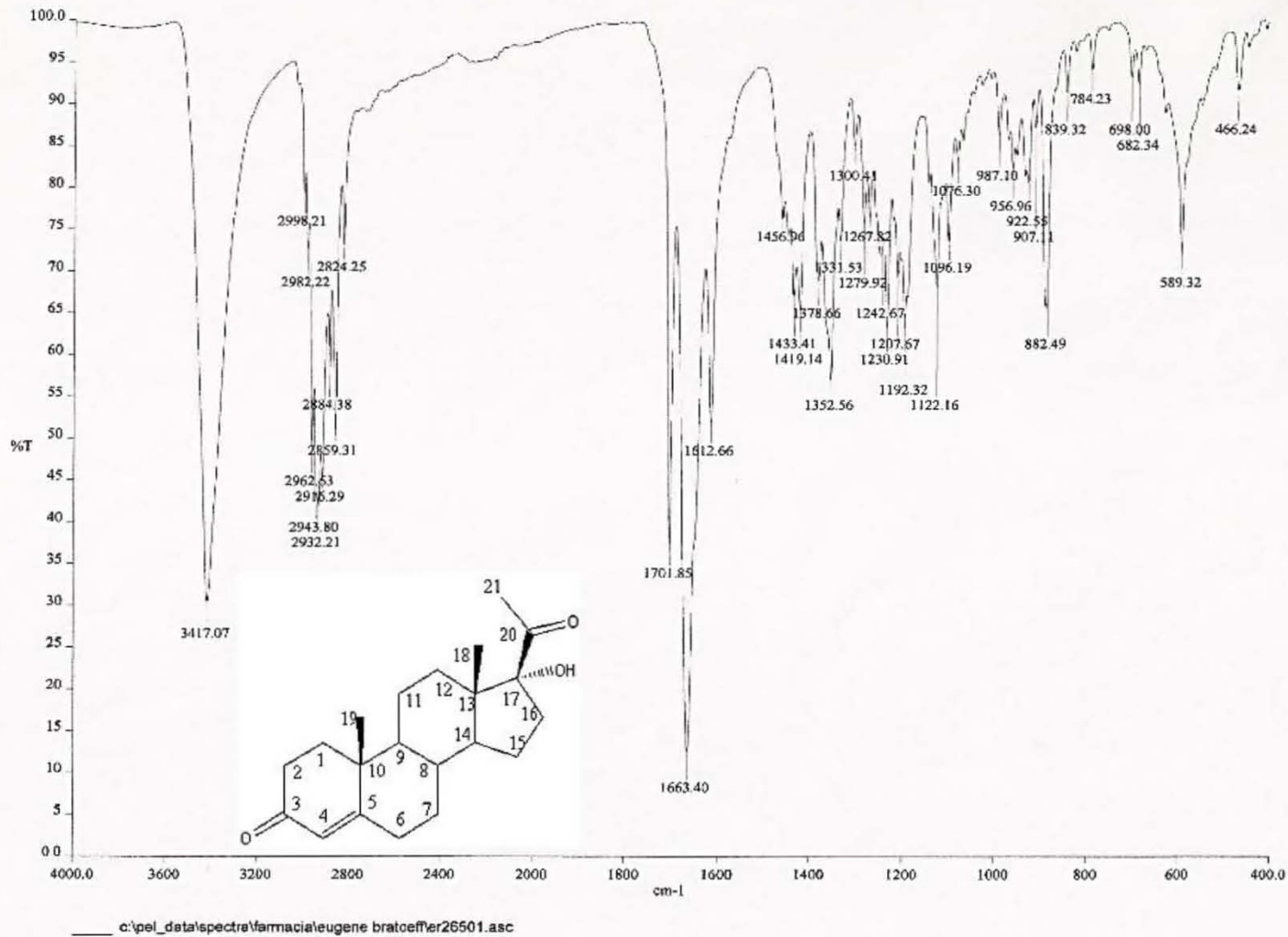




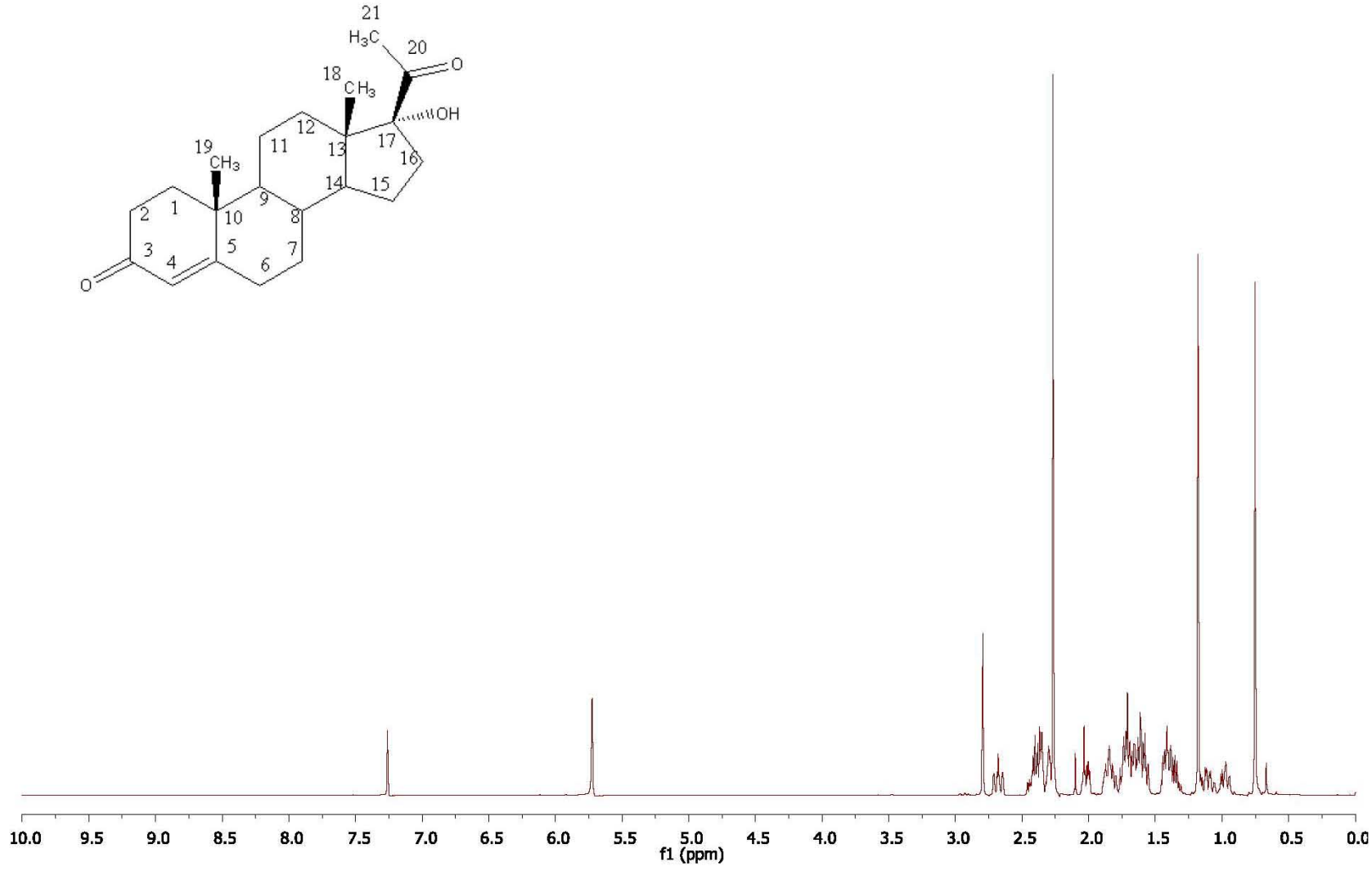
Espectro 8. RMN-<sup>1</sup>H del ácido 2-butiriloxibenzoico (2c)



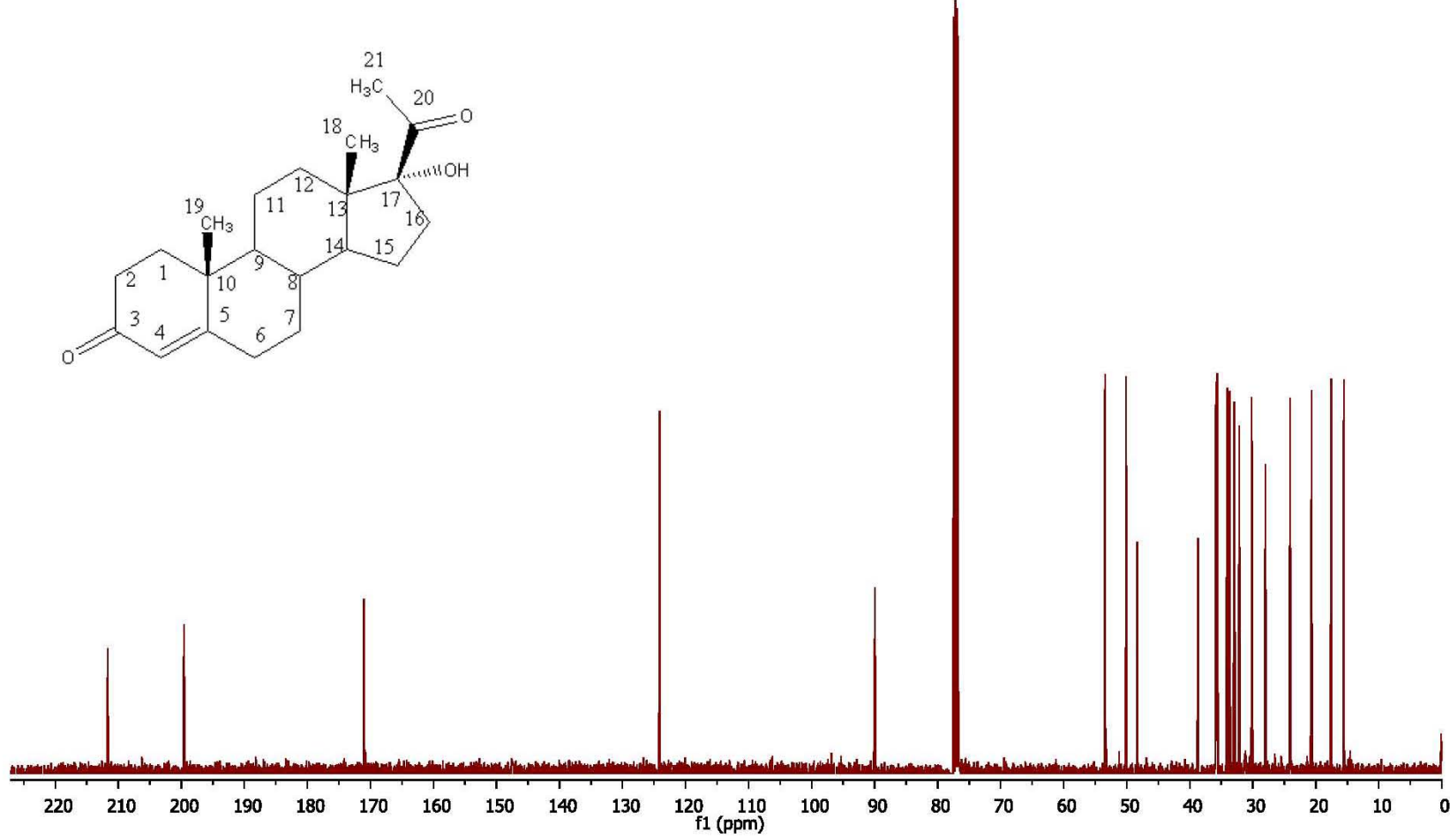
Espectro 9. RMN- $^{13}\text{C}$  del ácido 2-butiriloxybenzoico (2c)



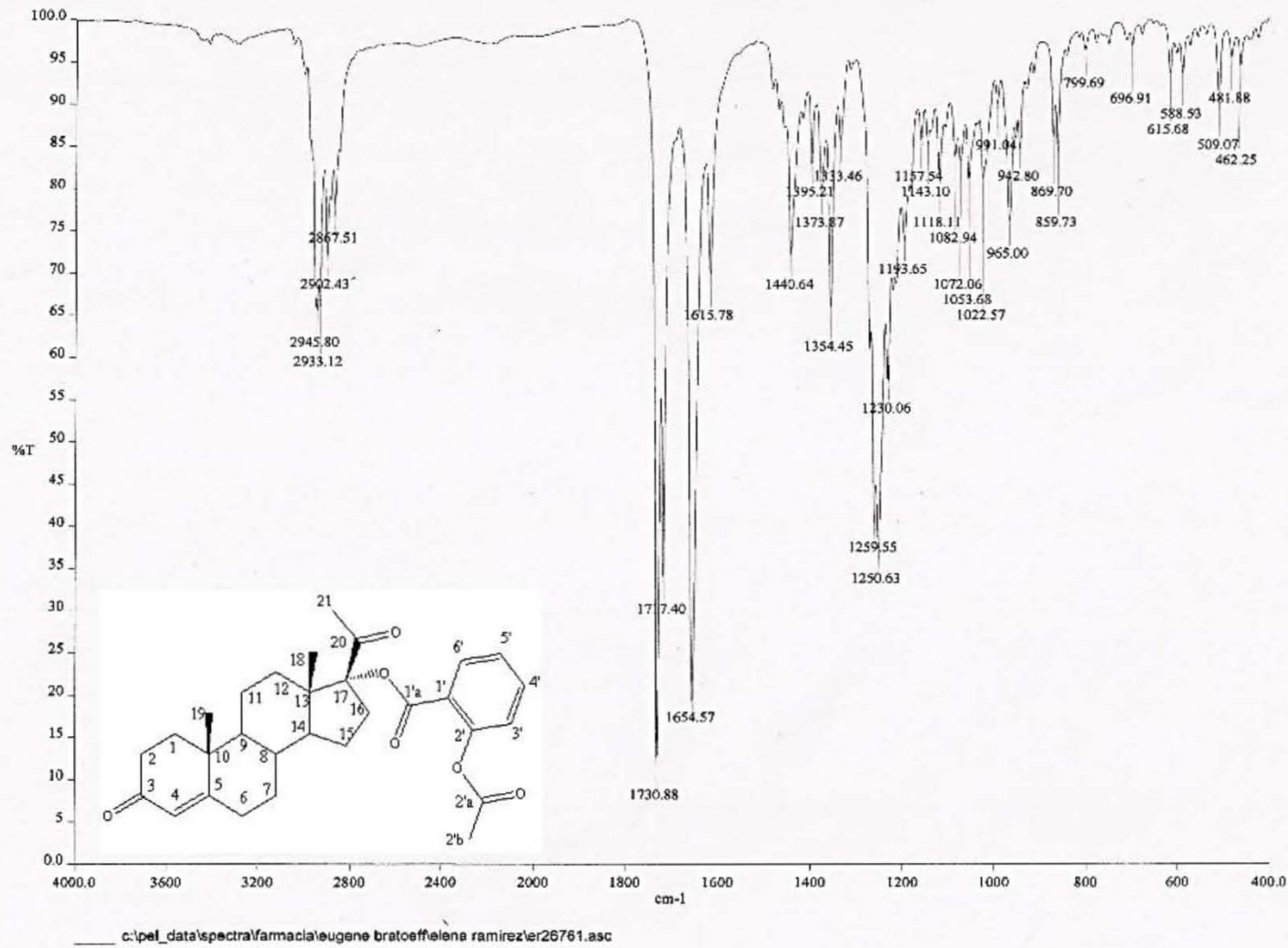
Espectro 10. IR de 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4)



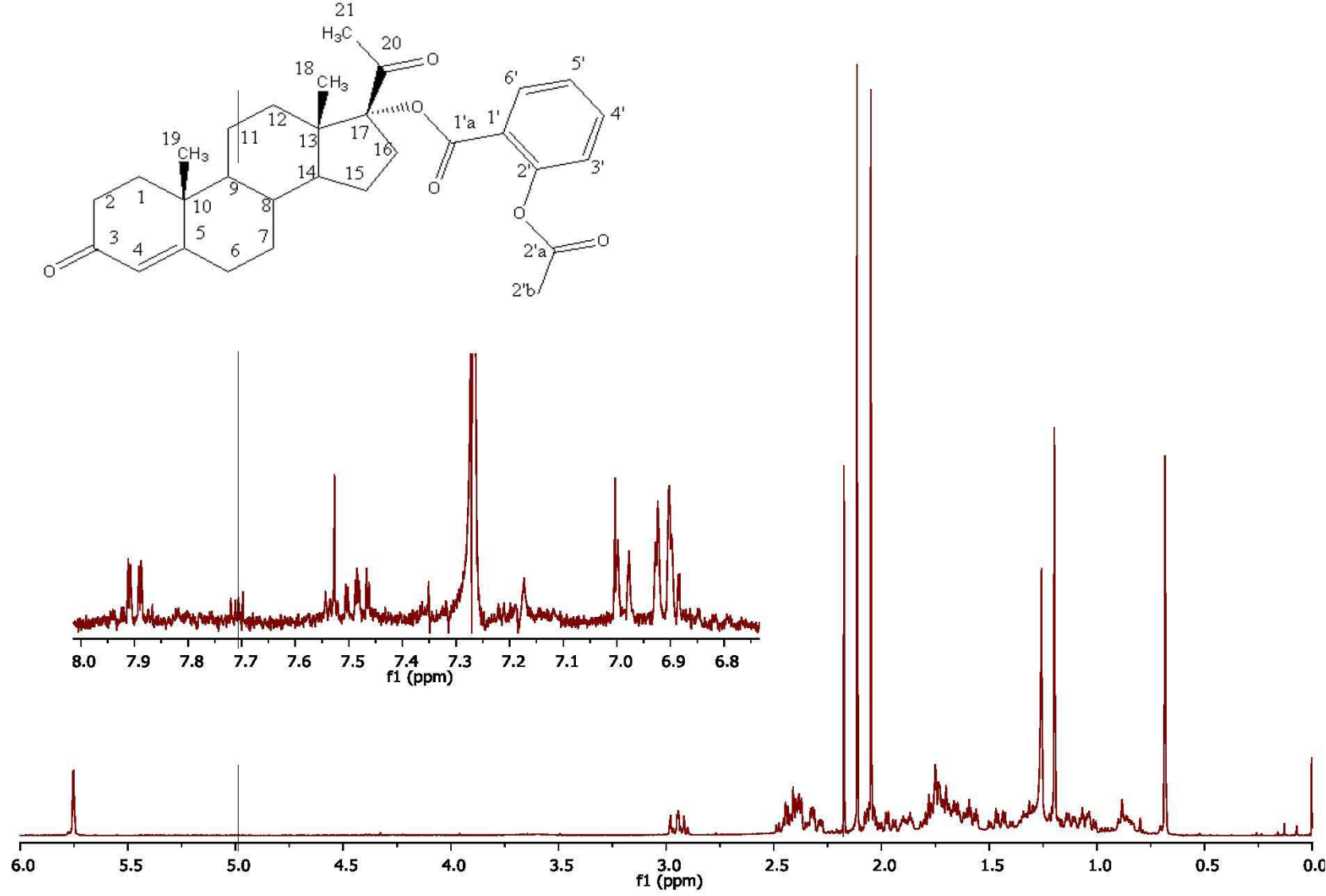
Espectro 11. RMN-<sup>1</sup>H de 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4)



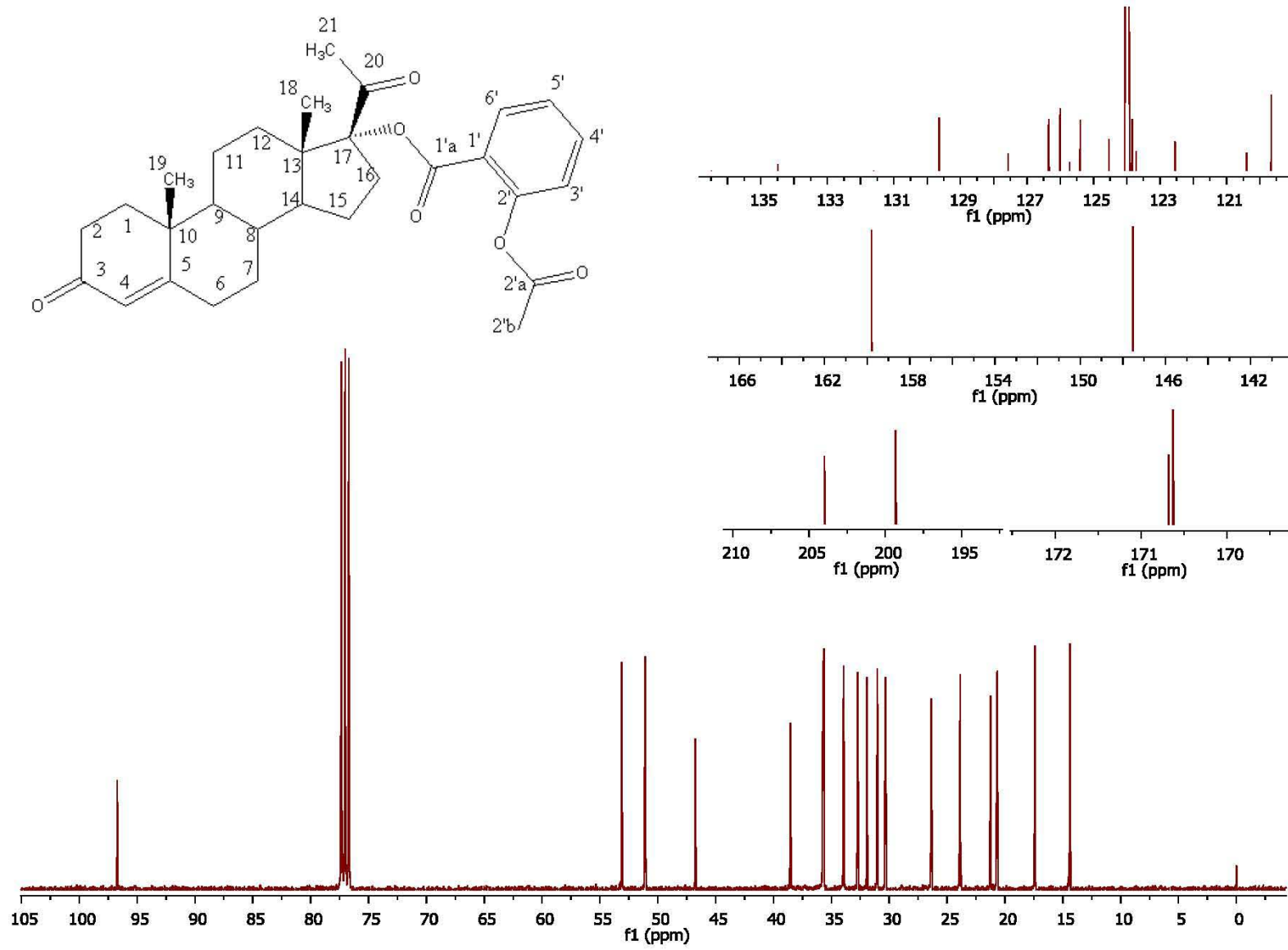
Espectro 12. RMN-<sup>13</sup>C de 17α-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (4)



Espectro 13. IR de 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a)

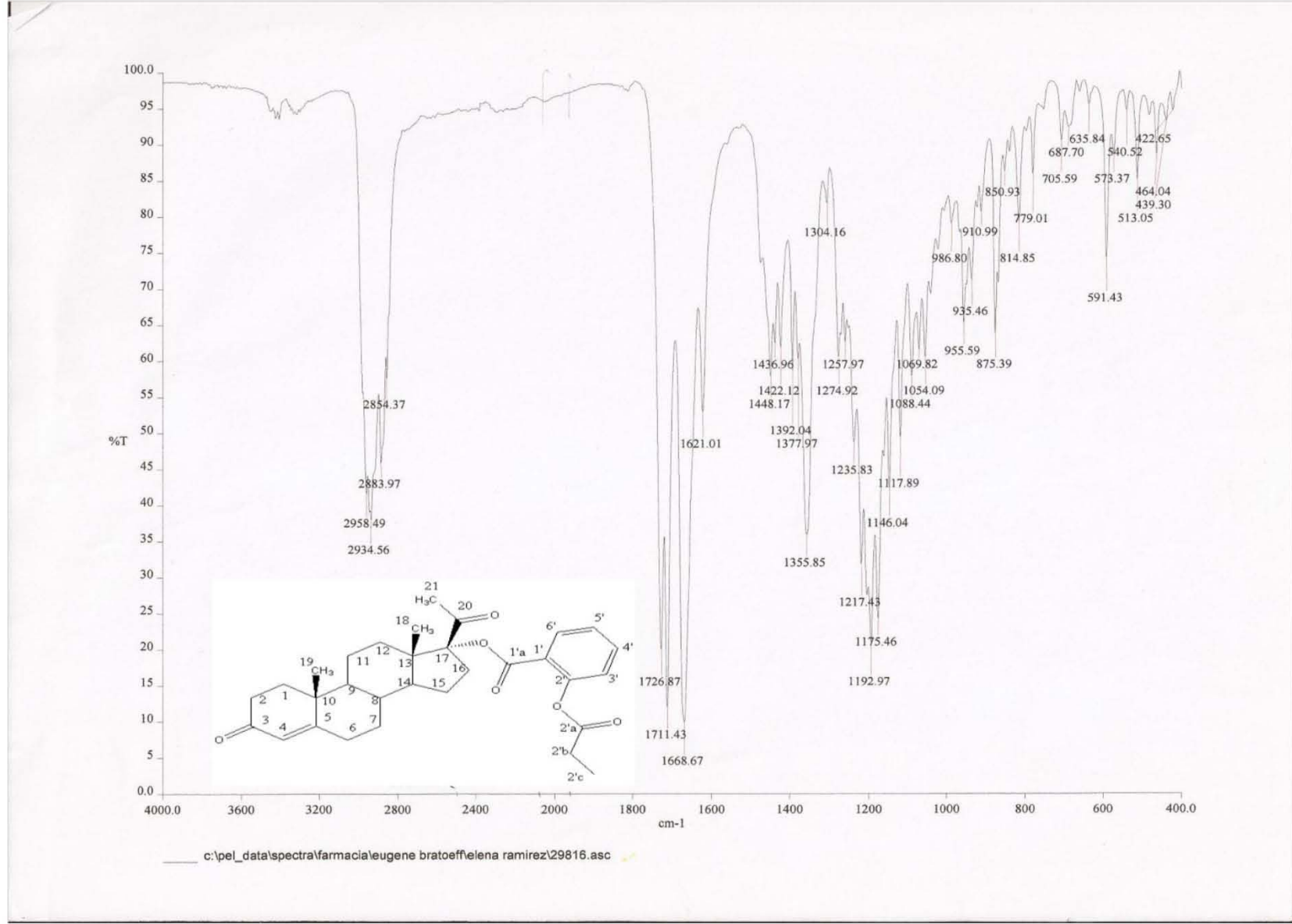


Espectro 14. RMN-<sup>1</sup>H de 17 $\alpha$ -(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a)

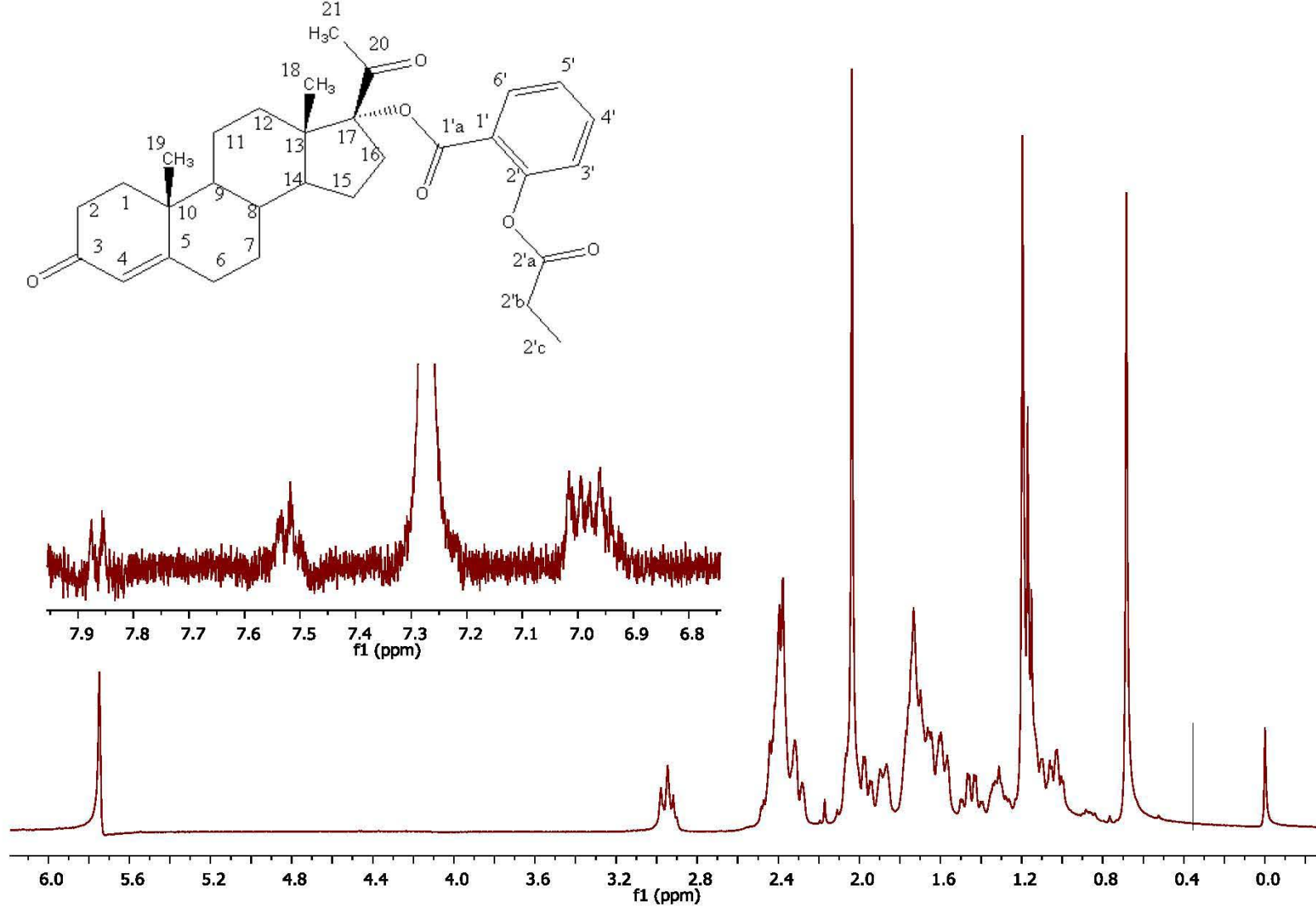


Espectro 15. RMN-<sup>13</sup>C de 17α-(2-acetoxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5a)

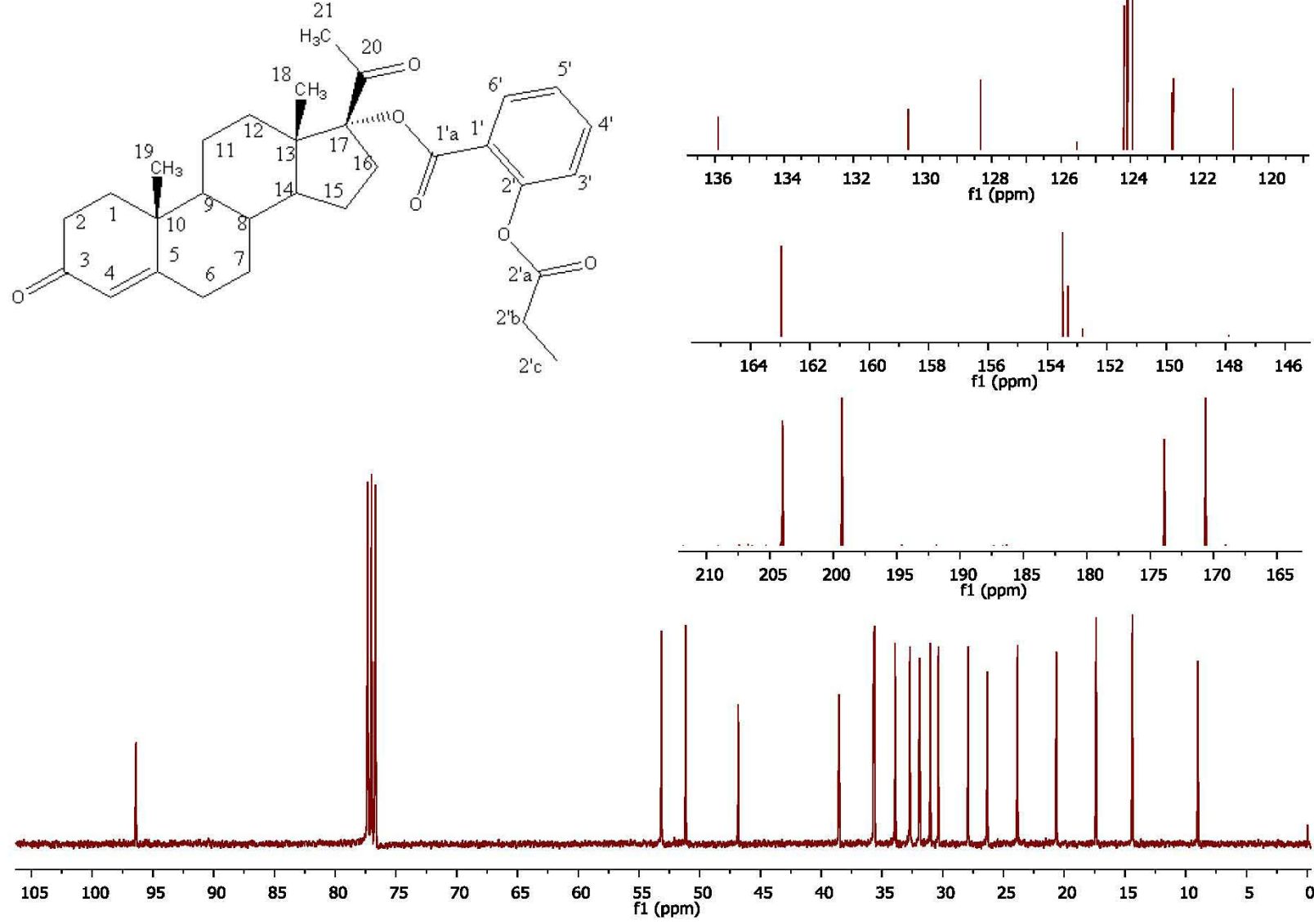




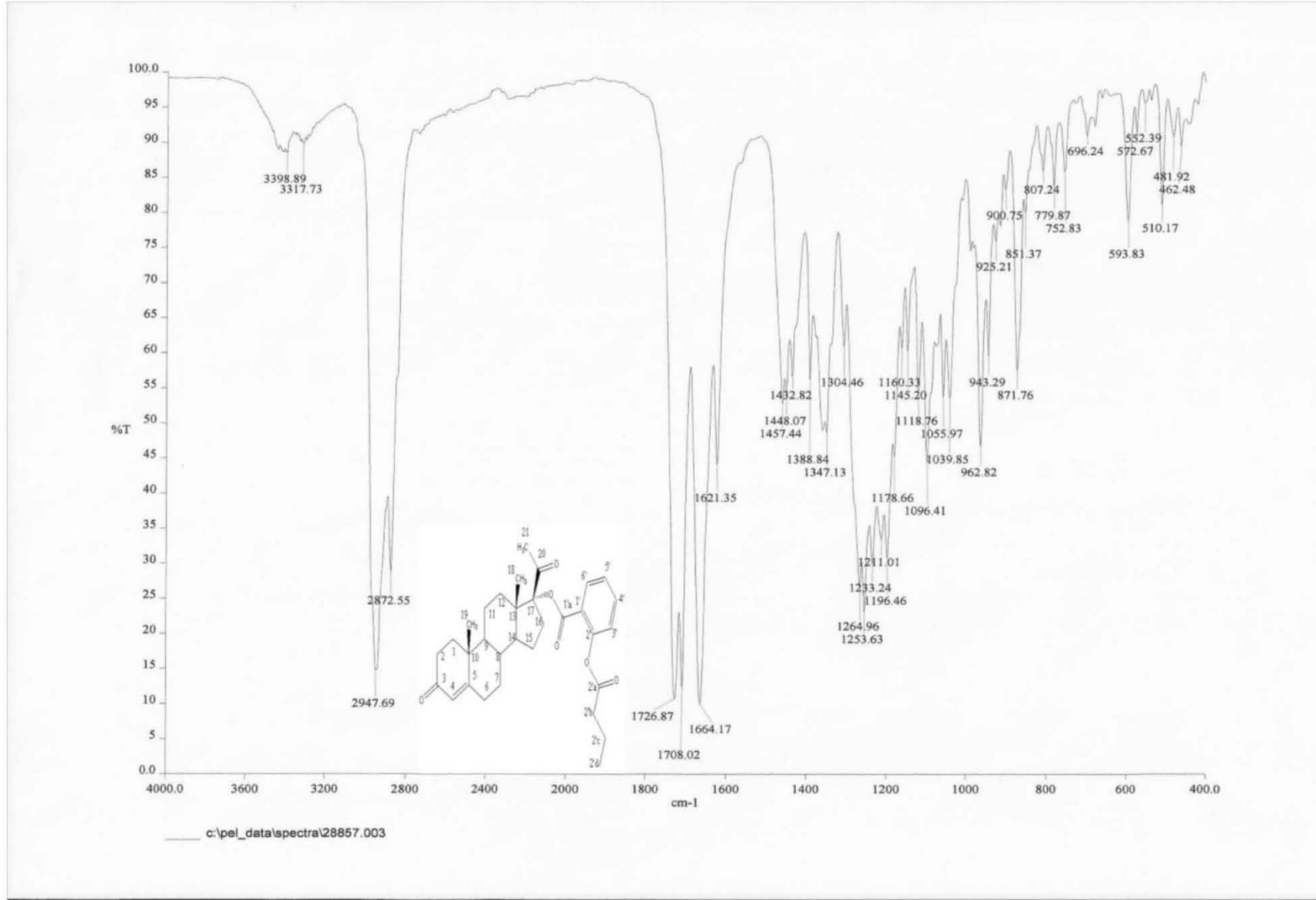
Espectro 16. IR de 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b)



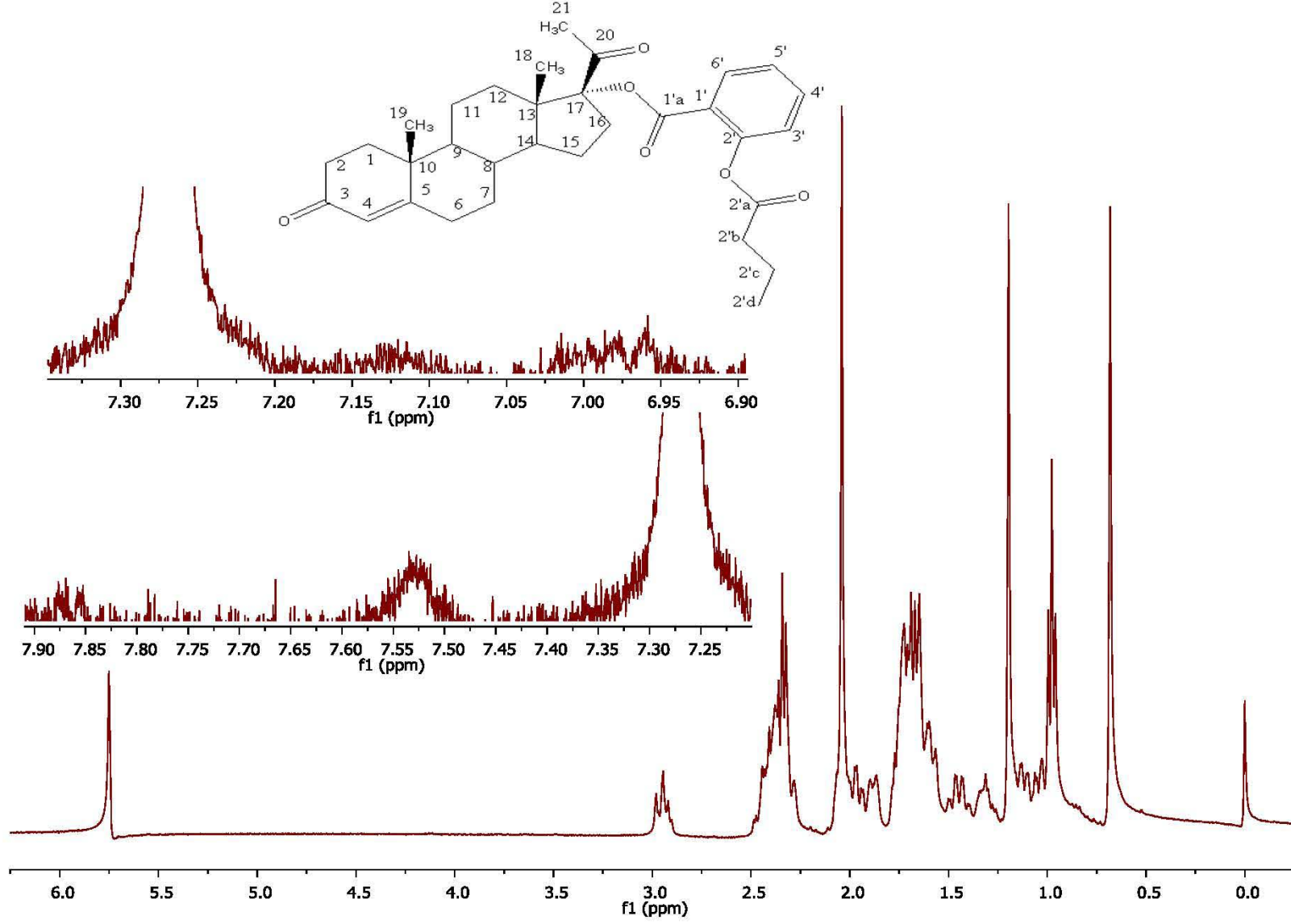
Espectro 17. RMN-<sup>1</sup>H de 17α-(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b)



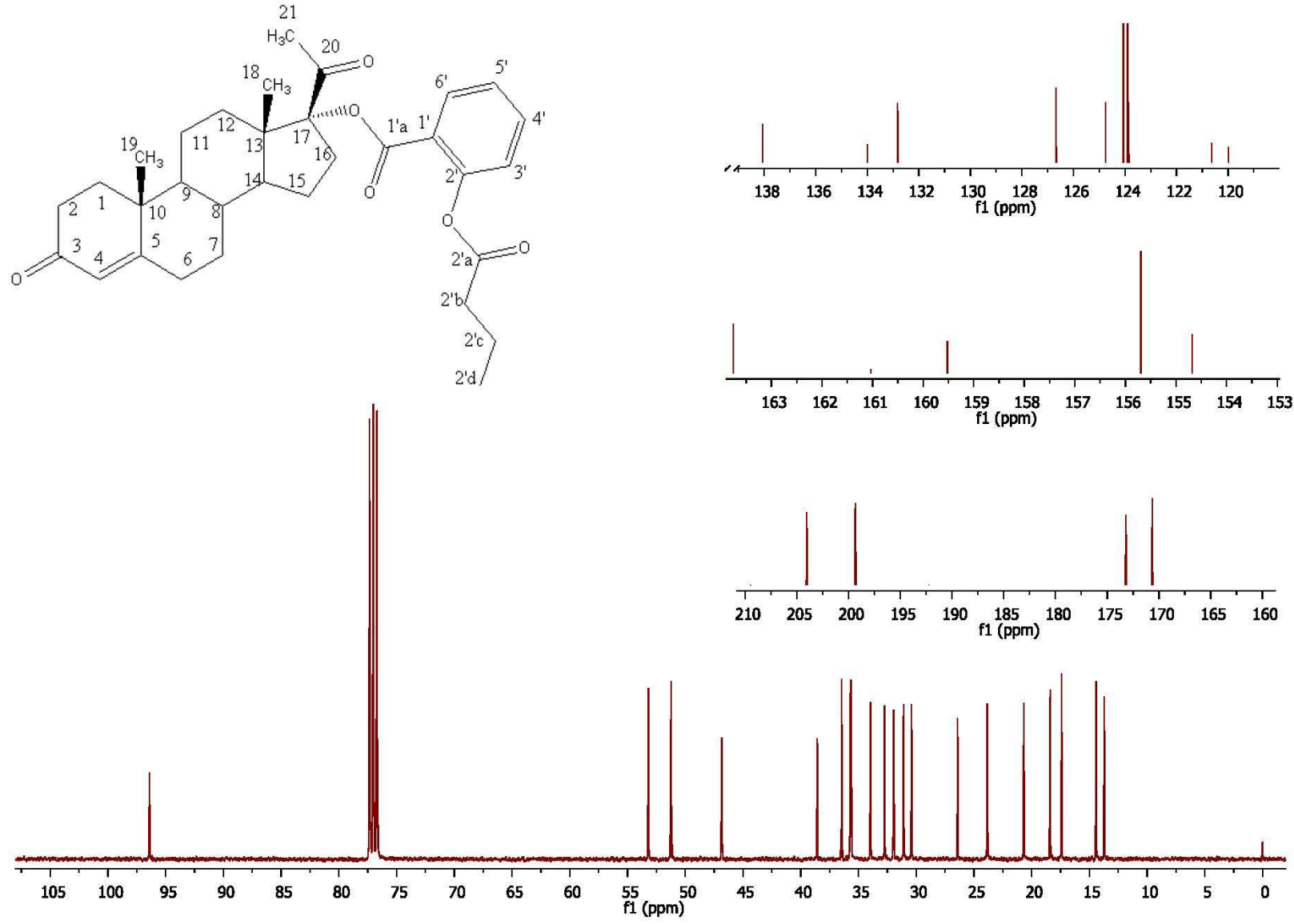
Espectro 18. RMN-<sup>13</sup>C de 17 $\alpha$ -(2-propioniloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5b)



Espectro 19. IR de 17 $\alpha$ -(2-butiriloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c)



Espectro 20. RMN- $^1\text{H}$  de 17 $\alpha$ -(2-butiriloibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c)



Espectro 21. RMN-<sup>13</sup>C de 17 $\alpha$ -(2-butiriloxibenzoiloxi)-4-pregnen-3,20-diona (5c)