



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“SÍNTESIS DE ÉSTERES DEL GRUPO CINAMOILO POR  
RADIACIÓN DE MICROONDAS CON POTENCIAL ACTIVIDAD  
CITOTÓXICA”**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**ALFONSINA REYES MOSSO**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Ofelia Espejo González.  
**VOCAL:** Profesor: Armando Daniel Cabrera Ortíz.  
**SECRETARIO:** Profesor: Elena Guadalupe Ramírez López.  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Simón Hernández Ortega.  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Eugene Athanas Bratoeff Tittef.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 125, CONJUNTO E,  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM).**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LÓPEZ** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. EUGENE ATHANAS BRATTOEFF TITTEF.** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: ALFONSINA REYES MOSSO.** \_\_\_\_\_

***“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles.”***

***Bertolt Brecht.***

***“Preferible perder una batalla por los sueños, que ganar una lucha sin saber por qué se hace.”***

***Anónimo.***

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi alma mater UNAM por tan cálida y hermosa aventura.

A la Dra. Elena por confiarme tan grandes proyectos e ideas, por su gran apoyo académico y enseñanzas.

Al Dr. Eugene Bratoeff por su apoyo para la realización este trabajo.

Al programa PAPIME-PE 200711 por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

Al los miembros de mi jurado, por las críticas y correcciones realizadas así como por el tiempo dedicado para la evaluación de esta tesis.

Al Q.F.B. Francisco Cortés por sus críticas y apoyo técnico ofrecidos durante la realización de este trabajo.

Al Q.F.B. Iván Acevedo por tan valiosas críticas, correcciones y enseñanzas para la culminación de este escrito.

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

Al personal de la USAI, Q. Marisela Gutiérrez y M. en C. Rosa Isela del Villar, por su colaboración en la realización de los espectros de IR y RMN.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por tantas bendiciones otorgadas.

A mis abuelos M<sup>a</sup> Magdalena “Mami” y Julian por tan maravillosa guía y formación para ser lo que soy ahora, por enseñarme el camino y por el amor brindado... Siempre vivirán en mi corazón.

A mis padres Maricela y Alfonso por el incansable soporte moral, son mi más grande apoyo, mi mayor fortaleza y mi mayor orgullo.

A mis tíos Magdalena “Mama Nena” y Armando por los consejos más acertados, el cariño y apoyo, siempre serán mis segundos padres y mi mejor hogar.

A mis primos Carolina Berenice y Marcos por su apoyo, su incomparable compañía, por las risas y por estar incondicionalmente conmigo, con ustedes mi vida ha estado completa.

A Miryam por su compañía, apoyo, por haberme inculcado el hábito de la lectura, las ganas de saber y aprender.

A Alberto por su constante apoyo moral y emocional durante estos años, por soportarme y aconsejarme como nadie. Muchas gracias.

A la Dra. Elena por el cariño y apoyo brindado, por abrirme su corazón y permitirme ser parte de su vida en más de un aspecto, la admiro, la respeto y la quiero, es mi segunda fortaleza.

A mis amigas Adriana, Gladys, Maru y Nancy por ser como son, por acompañarme en mis buenos y malos ratos, por compartir conmigo este camino. Gracias comunidad del Anillo.

A los chicos del laboratorio 125 Alejandra, Aylin, Eduardo, José, Luis, Maestro Beto y Paco, por su compañía, sus ocurrencias y consejos brindados en este camino que sin ustedes, no habría sido tan divertido.

A Gerardo por haber sido la primera persona que me brindo su amistad y apoyo, además de haber hecho de mis clases y mis comidas algo para recordar.

A Gonzalo por su apoyo moral y académico además de su valiosísima amistad, cariño y confianza, por soportar mis locuras y “casi siempre” tener la razón.

A Iván por estar conmigo, brindarme su amistad y aguantar las largas jornadas en las que nunca pare de hablar.

A Javier por seguir siendo mi amigo después de tantos años, por ser la compañía y el oído que nunca ha fallado.

A Allan, Armando, Dani, Cesar, Israel, Luis, Octavio y Toño por la gran amistad brindada que hizo mi vida en la Universidad amena y llena de alegrías.

A las personas que por mi desmemoria no mencione pero me apoyaron con una sonrisa o una buena intención.

A Morfeo por su compañía a lo largo de estos años, por ahuyentar fantasmas, por desvelarse conmigo y guardar mis más sórdidos secretos.



## INDICE

INTRODUCCION .....	4
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1 Química sustentable .....	5
2.2 Radiación de Microondas en síntesis orgánica .....	5
2.3 Los disolventes en el microondas .....	7
2.4 Cáncer .....	9
2.4.1 Cáncer y ciclo celular .....	9
2.4.2 Cáncer en el mundo .....	11
2.5 Factores carcinogénicos .....	12
2.6 Cáncer e Inflamación .....	13
2.7 Cáncer, estrés oxidativo y antioxidantes .....	14
2.7.1 Ácido cinámico .....	15
2.8 Tratamientos contra el cáncer .....	16
2.9 Hormonas lipídicas y cáncer .....	17
2.9.1 Progesterona y Pregnenolona .....	19
2.9.2 Diseño de nuevas hormonas .....	20
2.9.3. Grupo éster y su importancia farmacológica .....	21
2.9.4 Isosterismo y bioisosterismo .....	21
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS .....	23
5. OBJETIVO GENERAL .....	23
6. OBJETIVOS PARTICULARES .....	23
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	24
7.1 Reactivos y disolventes utilizados .....	24
7.2 Instrumentación general .....	24
7.3 Metodología: Síntesis química .....	26
7.3.1 Síntesis de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OHP) .....	26
7.3.2 Síntesis de 17 $\alpha$ -aciloiloxiderivados de ácido cinámico .....	26
7.3.3 Síntesis de 3 $\beta$ -aciloiloxiderivados de ácido cinámico .....	27
7.3.4 Síntesis de Ácido cinamoiloxisalicílico (ACS) .....	28





7.4 Metodología: Evaluación Biológica.....	29
7.4.1 Evaluación de citotoxicidad en células cancerosas.....	29
7.4.2 Evaluación de la viabilidad de macrófagos murinos .....	30
7.4.3 Evaluación de actividad antiinflamatoria.....	31
7.4.4. Ensayo de MPO (mieloperoxidasa).....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSION .....	33
8.1 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OHP).....	33
8.2 3 $\beta$ -Hidroxipregnenolona (3 $\beta$ -OHP).....	34
8.3 Acido cinamoiloxisalicílico. (ACS).....	35
8.4 17 $\alpha$ -cinamoiloxiprogesterona (17 $\alpha$ -CiOP) .....	35
8.5 17 $\alpha$ -3-fluorocinamoiloxiprogesterona (17 $\alpha$ -3f-CiOP).....	37
8.6 3 $\beta$ -cinamoiloxipregnenolona (3 $\beta$ -CiOP).....	39
8.7 3 $\beta$ -3fluorocinamoiloxipregnenolona (3 $\beta$ -3f-CiOP).....	41
Análisis de parámetros fisicoquímicos.....	50
Análisis de PME (Mapa de potencial electrostático) .....	51
9. CONCLUSIONES .....	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS.....	56
ANEXO 1. Espectro IR del compuesto 17 $\alpha$ -OHP. ....	57
ANEXO 2. Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto 17 $\alpha$ -OHP.....	58
ANEXO 3. Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 17 $\alpha$ -OHP.....	59
ANEXO 4. Espectro IR del compuesto 3 $\beta$ -OHP (Materia prima) .....	60
ANEXO 5. Espectro de IR del compuesto 17 $\alpha$ -CiOP. ....	61
ANEXO 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 17 $\alpha$ -CiOP. ....	62
ANEXO 7. Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 17 $\alpha$ -CiP .....	63
ANEXO 8. Espectro IR del compuesto 17 $\alpha$ -3f-CiOP. ....	64
ANEXO 9. Anexo 9. Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto 17 $\alpha$ -3f-CiOP. ....	64
ANEXO 10. Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 17 $\alpha$ -3f-CiOP. ....	66
ANEXO 11. Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ -CiOP. ....	67
ANEXO 12. Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ -CiOP. ....	68
ANEXO 13. Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto 3 $\beta$ -CiOP.....	69
ANEXO 14. Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ -3f-CiOP.....	70
ANEXO 15. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ -3f-CiOP. ....	71
ANEXO 16. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 3 $\beta$ -3f-CiOP. ....	72



---

ANEXO 17. Espectro de IR del compuesto Acido cinamoiloxisalicílico.....	73
ANEXO 18. Espectro RMN $^1\text{H}$ del compuesto Acido cinamoiloxisalicílico. ....	74
ANEXO 19. Espectro RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto Acido cinamoiloxisalicílico. ....	75
ANEXO 20. Los 12 puntos de la química sustentable.....	76



## INTRODUCCION

La búsqueda de formas alternativas a la síntesis química convencional ha sido de gran importancia en los últimos años, debido al gasto energético y a la situación costo beneficio que la industria química ha tenido que enfrentar por el surgimiento globalizado del concepto de sustentabilidad. El uso de técnicas como la síntesis por radiación de microondas ha tenido un fuerte auge en el área de la química. Esta forma de síntesis empieza a abarcar terrenos que involucran el diseño de fármacos para tratar diversas enfermedades, de manera más puntual aquellas con alta incidencia, un claro ejemplo es el cáncer que se sabe ha ganado terreno de una manera muy importante en los últimos años y se ha convertido en un problema severo de salud pública a nivel mundial debido a su rápida propagación y a la falta de un tratamiento específico que permita solventar de manera efectiva una cura o mejora en la calidad de vida del paciente.

Es por ello que este trabajo se centra en la síntesis por medio de radiación con microondas de agentes hormonales, ya que estudios previos han demostrado que algunos tipos de cáncer son hormonodependientes, y las hormonas sintéticas se han utilizado como paliativo en el tratamiento de este tipo de padecimientos, permitiendo también el estudio y diseño de nuevas moléculas que nos permitan analizar el efecto de un cambio estructural en la molécula y su posible impacto en su actividad biológica.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Química sustentable

Debido al rápido aumento de contaminación global por el uso desmesurado de energías no renovables y agentes altamente contaminantes, así como el gasto energético tan severo que se genera, ha nacido el concepto de sustentabilidad, que es el desarrollo de técnicas o procesos que permitan hacer frente a las necesidades presentes sin comprometer el bienestar de futuras generaciones

Dentro del terreno de la síntesis química, que es una de las más importantes en la industria, en las últimas décadas nace el concepto de química sustentable, que se define como el diseño de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso de sustancias peligrosas para el medio ambiente <sup>[1]</sup>, Y para ello se han implementado prácticas y normas que disminuyan el uso y producción de residuos, por ello se establecieron los 12 principios (anexo 20) de la química sustentable, que son especificaciones que deben tomarse en cuenta ante cualquier proceso químico para disminuir la cantidad de contaminantes producidos, permitiéndole que estos procesos tengan cabida en el ámbito sustentable.

En un proceso de síntesis, esta necesidad permitió el estudio y apertura de técnicas conocidas pero no explotadas para la síntesis química, tal es el caso de la radiación de microondas cuya utilización para química fue utilizada hasta los años 80's siendo el descubrimiento de esta forma de energía para su uso humano en 1947 por Percy Lebaron Spencer <sup>[2]</sup>.

### 2.2 Radiación de Microondas en síntesis orgánica

La radiación de microondas es una forma de energía electromagnética que tiene un rango de frecuencia baja (de 300 a 300,000 MHz) con una longitud de onda de  $10^{-2}$  m y una energía de  $10^{-4}$  kcal/mol aproximadamente y genera movimientos rotacionales en las moléculas. (Figura 1)

La rotación molecular es una forma de excitabilidad electrónica que corresponde a la aplicación de energía sobre la misma y para casi cualquier reacción química es necesaria una energía de activación que permita abatir las fuerzas de repulsión electrónica para que se lleven a cabo la transformación de reactivos a productos.

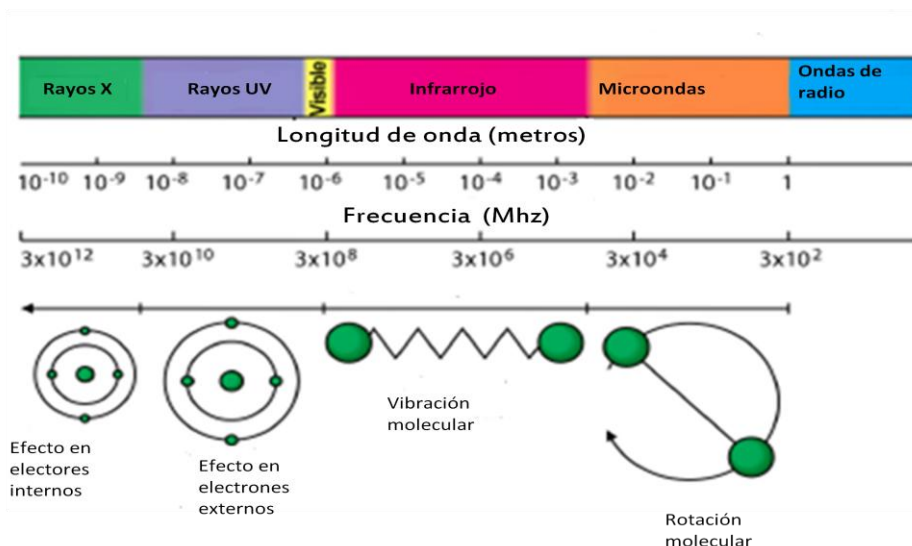


Figura 1. Representación del espectro electromagnético y su efecto en moléculas.

Estas características son las que permiten la utilización de las microondas en la síntesis química, ya que las ondas transmiten la energía de manera directa a las moléculas irradiadas sin cambiar su estructura (llamado “calentamiento molecular”), debido a que la energía de los fotones de esta forma de radiación está muy por debajo de la necesaria para romper enlaces (80 -120 kcal/mol), siendo la excitación molecular producida puramente cinética, esto permite que se llevan a cabo reacciones químicas que no se consiguen con un calentamiento convencional; este último es utilizado en casi todas las reacciones, sin embargo el efecto es meramente conductivo. Primeramente, se calienta la superficie del recipiente que contiene al medio de reacción y posteriormente esta energía en forma de calor es transmitida a las moléculas de los reactivos generando una variación entre la temperatura del recipiente y la temperatura del medio siendo ésta más baja, y al no ser continua, esta diferencia tiende a generar zonas de distinta temperatura<sup>[3]</sup>. (Figura 2)

Con la radiación de microondas esto no ocurre, el proceso depende de la capacidad molecular para absorber las microondas, esta capacidad depende de dos factores que son: la rotación dipolar y la conducción iónica; el primero se refiere a una interacción en la cual las moléculas tratan de alinearse con el campo magnético que va cambiando tan rápidamente y el segundo depende de la presencia de iones libres o sustancias iónicas en el medio de reacción, en ambas situaciones se genera un súper calentamiento localizado generado por la rápida rotación molecular y otorgándole la energía necesaria para la reacción.

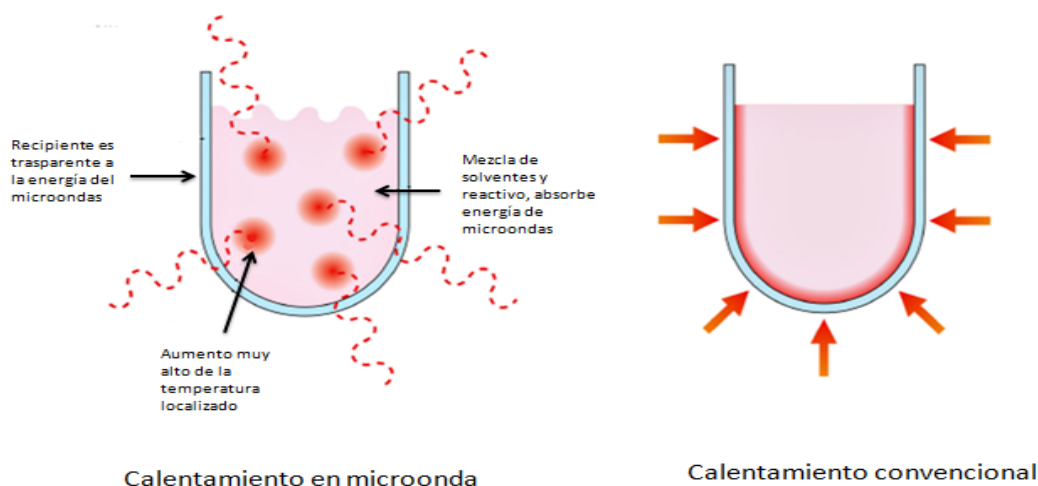


Figura 2. Representación de las diferencias que existe entre el calentamiento convencional y el calentamiento con radiación de microondas.

Otra de las grandes ventajas que tiene la radiación de microondas es que aumenta la velocidad de reacción, debido a que permite llegar a la energía de activación de forma eficiente, esto se debe a que la cantidad de energía que transfieren las ondas son continuas lo que no permite que la molécula deje de rotar (absorbiendo más energía) o que regrese a un estado de equilibrio y además esta energía irradiada es mayor a las que necesitan los productos para llevar a cabo la reacción pero sin tener una afección en la estructura molecular; es por ello que es efectivo tanto en reacciones cinéticas como termodinámicas.

### 2.3 Los disolventes en el microondas

Los disolventes juegan un papel muy importante en las reacciones realizadas en horno microondas ya que estas ondas interactúan con el disolvente de la misma manera que lo hacen con los reactivos, es por ello que se su capacidad para absorber mucha o poca energía será crucial para el tiempo y rendimiento de reacción.

La característica que definen a un buen disolvente para síntesis en microondas es la polaridad<sup>[4]</sup> usualmente los aquellos disolventes que son polares pueden absorber y distribuir de mejor manera las microondas así que esta característica se basa en los siguientes parámetros:

Constante dieléctrica: Permisibilidad relativa de un solvente para admitir cargas eléctricas



Perdida dieléctrica: La cantidad de energía de microondas que pierde el disolvente por la disipación de esta en forma de calor.

Momento dipolar: Producto de la distancia entre los centros de carga, multiplicados por la magnitud de esa misma carga

Tangente  $\delta$ : La habilidad del disolvente para convertir energía electromagnética en calor.

Estos parámetros pueden ser obtenidos de tablas para definir el disolvente a utilizar dependiendo que es lo que se requiera para llevar a cabo la reacción, es decir si requiere de un calentamiento leve o un aumento de temperatura abrupta.

Con los modelos existentes de microondas modificados (multimodales) y adaptados para reacciones químicas se pueden variar múltiples condiciones, como realizar reacciones a presión abatiendo así el punto de ebullición de los disolventes, con enfriamiento para aquellas reacciones lábiles, con sistema de reflujo, así como modificación de potencia de radiación, temperatura, agitación y tiempo de reacción, también se pueden llevar a cabo reacciones en fase sólida eliminando el uso de disolventes que en su mayoría son contaminantes.

Las reacciones en fase sólida pueden llevarse a cabo embebiendo los reactivos en una matriz sólida (cómo la sílice o un polímero) que es inerte y permite el paso de las microondas o de manera directa donde los reactivos se funden y generan una matriz reactante con energía suficiente para llevar a cabo la reacción.

Las ventajas que ofrece la síntesis química por medio de las microondas permite abarcar campos de síntesis compleja como lo es el área farmacéutica, donde la obtención de fármacos en las últimas décadas se ha visto ampliamente beneficiado por la intervención de diversas técnicas que permitan la disminución de tiempos de reacción y utilización de agentes contaminantes.

La síntesis de fármacos nace de la necesidad de encontrar tratamientos a enfermedades que disminuyen el tiempo y la calidad de vida, es por ello que valiéndose de tecnologías nuevas se



han buscado alternativas para aquellas enfermedades que tienen tasas de morbilidad y mortalidad altas, siendo las más importantes en el siglo XXI las enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades metabólicas como la diabetes.

## 2.4 Cáncer

El cáncer es el nombre con el que se conocen a más de 100 enfermedades, cuya característica principal es el crecimiento no controlado de células anormales, lo que causa un daño muy severo a los tejidos circundantes y también a tejidos lejanos por medio de la propagación (llamada metástasis) de las células cancerosas en el torrente sanguíneo o linfático<sup>[5]</sup>.

### 2.4.1 Cáncer y ciclo celular

El ciclo celular se define como el conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento y replicación de la célula y también es necesario para la reparación de células dañadas; éste ciclo se divide principalmente en 4 fases ordenadas G1(gap1, crecimiento), S (síntesis de ADN), G2 (gap 2, crecimiento) y M (mitosis/meiosis). (Figura 3)

Las células normales tienen regulado el ciclo por una cascada de señales bioquímicas (principalmente por complejos formados de cinasas y ciclinas) que son dependiente de los estímulos tanto internos como externos, esta comunicación celular permite a la célula detectar no solo el momento de iniciar con el proceso de división, sino también tiene varios sistemas de señalización y puntos de restricción (de G1 a S, de G2 a M y en M) que le permiten monitorear daños al ADN; este es un punto crítico para la división ya que las células hijas son idénticas a las células madre y un error implicaría la generación de células dañadas desde su genoma, en general cualquier afección o alteración al ADN detiene el ciclo celular y si no se puede reparar el daño se induce la apoptosis que no es más que el conjunto de sucesos ordenados que conducen a la muerte celular. Ambos sucesos son regulados por genes, receptores, señalizadores y un conjunto de pequeños sistemas ordenados<sup>[6]</sup>.



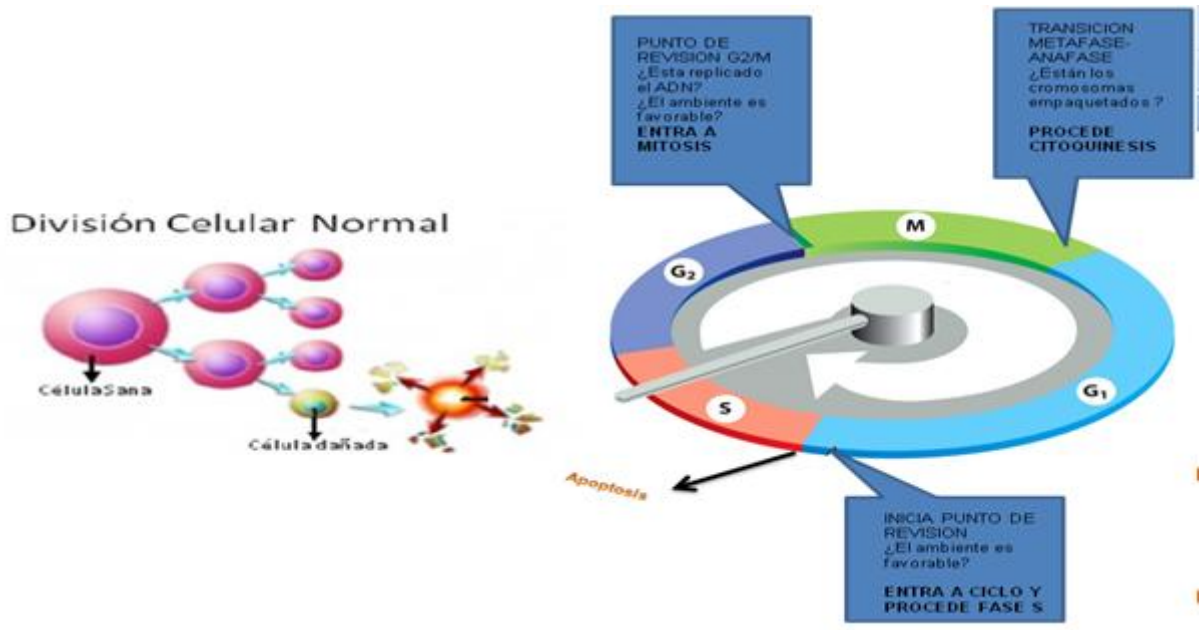


Figura 3. Relación entre en ciclo y división en célula sana.

La transformación de una célula normal a célula cancerosa suele ser un proceso lento y multifactorial, sin embargo se sabe que el proceso se debe a una acumulación de mutaciones (resultado de un agente carcinógeno) que daña la secuencia del ADN, todas las células cancerosas tienen un origen monoclonal (una sola célula) surgida de la acumulación crítica de esas mutaciones que inicialmente generan un daño genético y que se transmite a células hijas, esto desencadena la producción de proteínas defectuosas y cambios estructurales que se irán transmitiendo y multiplicando con cada división celular. Posteriormente puede existir un cambio en la conformación de la membrana celular que ya no les permite permanecer unidas entre ellas y es así como viajan por el organismo generando metástasis.

Como se observa, el cáncer es consecuencia de alteraciones en el balance de señalización y puntos de control durante el ciclo celular y las mutaciones generadas provocan la aparición de características cancerosas en las células, afectando genes cuyos productos proteicos intervienen en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis promoviendo así a la aparición de tumores (neoplasia maligna). (Figura 4.)



### División Celular Cancerígena

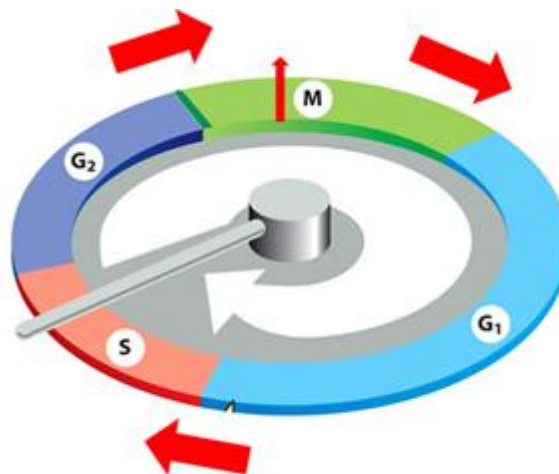
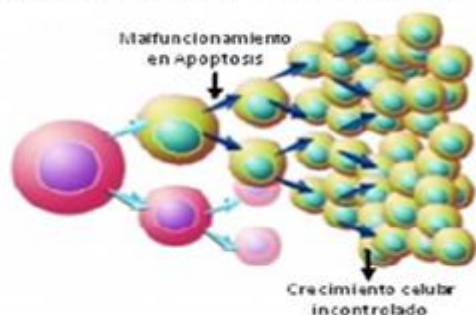


Figura 4. Fases descontroladas en el desarrollo de células cancerosas.

## 2.4.2 Cáncer en el mundo

### Nivel mundial

El cáncer de acuerdo a la OMS es una de las enfermedades con mayor incidencia y tasa de mortalidad a nivel mundial, aproximadamente 7.6 a 11.5 millones de personas mueren anualmente (siendo las personas con recursos bajos las más afectadas) por algún tipo de cáncer y se estima que para el 2030 existirá un aumento del 45% en los casos de mortalidad debido al aumento demográfico y el envejecimiento de la población <sup>[7]</sup>.

El cáncer de pulmón mata a un mayor número de gente que cualquier otro tipo de cáncer, y se prevé un aumento de esta tendencia hasta 2030 a menos que se intensifiquen mucho las actividades de control mundial del tabaquismo y control de agentes contaminantes en el ambiente. Algunos tipos de cáncer, como los de próstata, mama y colon, son más frecuentes en los países desarrollados. Otros tipos de cáncer, como los de hígado, estómago y cuello uterino, son más frecuentes en los países en desarrollo <sup>[8]</sup>.

### Nivel nacional

En México en el año 2007 se registraron 4 tipos de cáncer con la mayor tasa de mortalidad, pulmón, estómago, hígado, colon y mama y en el año 2009, la tasa de mortalidad observada por tumores malignos en hombres fue de 65.11 por cada 100 mil hombres y en las mujeres de 65.49 por cada 100 mil mujeres <sup>[9]</sup>.

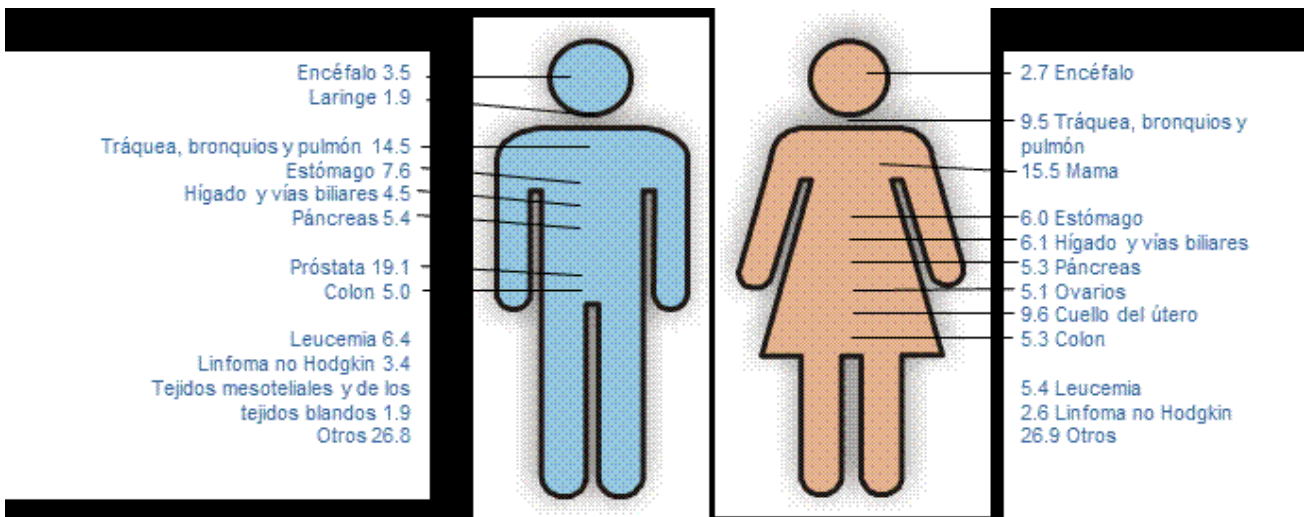


Figura 5. Distribución porcentual de fallecimientos por tumores malignos para cada sexo en los periodos 2008-2009. [10]

## 2.5 Factores carcinogénicos

Las causas que inician la mutación de una célula normal a una célula cancerosa son diversos pero de manera general se pueden englobar en la figura siguiente. (Figura 6).

### ALTERACIÓN INMUNOLÓGICA

Disminución o exacerbación en la respuesta inmune.

### FACTORES HEREDITARIOS

Mutaciones intrínsecas en genes reguladores del ciclo celular.

### FACTORES VIRALES

Alteración viral del genoma hospedero

### RADIACIÓN IONIZANTE

Ruptura y daño en ADN por penetrancia de radiación al núcleo celular.

### PRODUCTOS QUÍMICOS

Exceso de agentes alquilantes o mûgatenos que se encuentran en productos de uso y consumo frecuente.



Figura 6. Factores más comunes que se consideran de riesgo para el desarrollo de cáncer.

Es importante recalcar que se ha descubierto que los productos químicos como carcinógenos juegan hoy en día uno de los papeles más importantes en el desarrollo del cáncer porque están ligados al estilo de vida y hábitos de las personas y estos presentan efectos biológicos



acumulativos, persistentes y tardíos, esto implica que se debe estar expuesto de manera crónica al carcinógeno para que se genere una monoclonal de cáncer.

La forma en que una sustancia provoca cambios en una célula normal y la transforma en una célula neoplásica, no ha sido totalmente comprendida para todos los carcinógenos. Sin embargo, en algunos de ellos se ha logrado un avance en la comprensión de sus mecanismos. Hoy se sabe que el cáncer es un fenómeno que se lleva a cabo en dos tiempos, la conversión y el desarrollo neoplásico, mismos que a su vez abarcan tres etapas: iniciación, promoción, progresión <sup>[11]</sup>. La ubicación de todos ellos se ilustra en el siguiente esquema. (Figura 7).

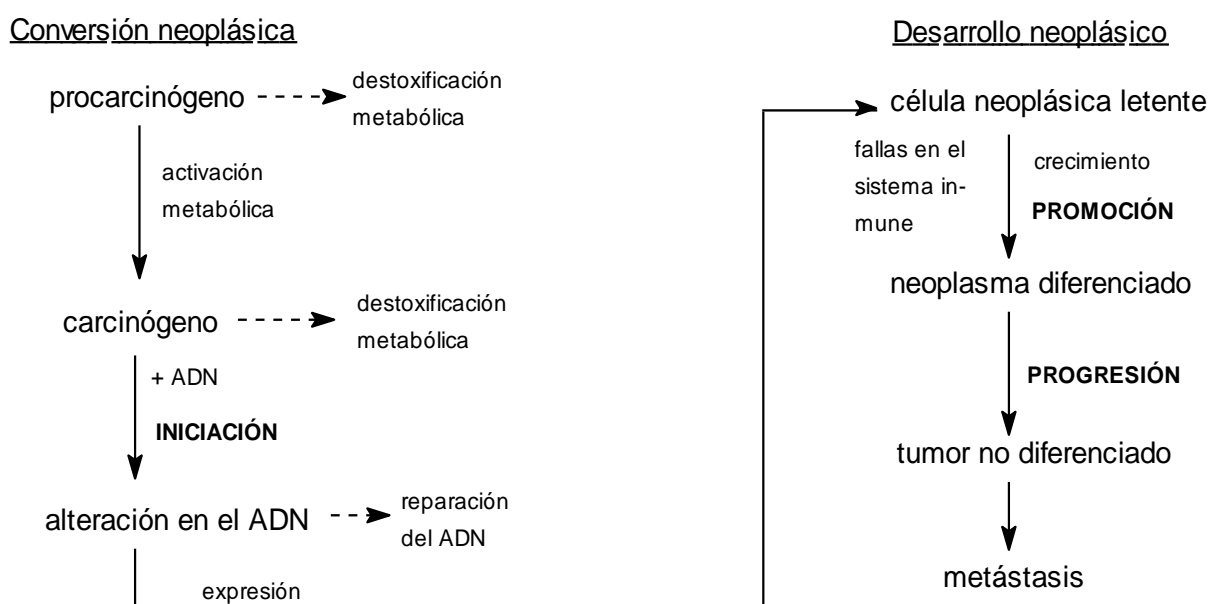


Figura 7. Proceso celular conocido para el desarrollo del cáncer relacionado con un carcinógeno externo (producto químico).

Como se observa en la figura 7 existen mecanismos metabólicos que funcionan para destoxificar a la célula de los agentes que la dañan.

## 2.6 Cáncer e Inflamación

La inflamación se define como una respuesta inmune inespecífica y primaria de las células de defensa a las agresiones del medio se caracteriza por estar presente en cualquier proceso interno o externo y el proceso se describe con la alta vascularización, nocicepción e interrupción de la homeostasis del sitio afectado <sup>[12]</sup>.



Su relación con el cáncer se basa en la cronicidad, ya que los factores que intervienen de manera normal en la cascada de señalización de un proceso inflamatorio como son interleucinas, factor KappaB, factor de necrosis tumoral, lipopolisacáridos y prostaglandinas, que por medio de señalización química promueven la activación de células inmunoreguladoras (macrófagos principalmente), que permiten que los tejidos involucrados se regeneren, es un respuesta inmunológica primaria ante el daño; sin embargo la pérdida de control en la regulación de los factores inflamatorios generada por sobreexposición a la sustancia o factor de agresión celular produce un cambio, haciendo tóxicos a estos señalizadores produciendo cambios importantes en la expresión de genes proliferativos (inducidos por factor KappaB y el factor de necrosis tumoral principalmente), así como originando la aparición de especies reactivas que dañan al ADN y nuevamente se ve alterado el ciclo celular. Es por ello que la inflamación crónica se encuentra estrechamente ligada al cáncer, lo que ha producido una elevación en el estudio de fármacos antiinflamatorios como terapia preventiva.

## 2.7 Cáncer, estrés oxidativo y antioxidantes

Considerables progresos se han llevado a cabo para que hoy en día se vislumbre el papel que juegan los procesos de oxidación celular en enfermedades tales como diabetes, cáncer, Alzheimer, distrofia muscular, Parkinson, artritis reumatoide etc. Los antioxidantes endógenos son generalmente adecuadas para neutralizar la elevada producción de especies oxidantes reactivas en individuos sanos, sin embargo, estos antioxidantes disminuyen en su concentración a medida que la edad avanza, y también se ven alterados por el estilo de vida

El estrés oxidativo en las células y tejidos generalmente se refiere a la generación incrementada de  $O_2^-$  (anión superóxido),  $H_2O_2$  (peróxido que es susceptible a metabolización para generar más especies reactivas) y especies reactivas de nitrógeno; las especies reactivas son altamente electrofílicas y reaccionan rápidamente con sitios ricos en densidad electrónica, como lo es la cadena de ADN, lípidos y proteínas lo que daña severamente a las célula; puntualmente el daño al material genético se debe a una mutación, ya que la abstracción de electrones puede promover uniones no convencionales entre los pares de bases, produciendo síntesis errónea de proteínas lo que puede activar señalizadores genéticos para proliferación celular (oncogen) y posteriormente la transformación a célula cancerosa<sup>[13]</sup>. (Figura 8)

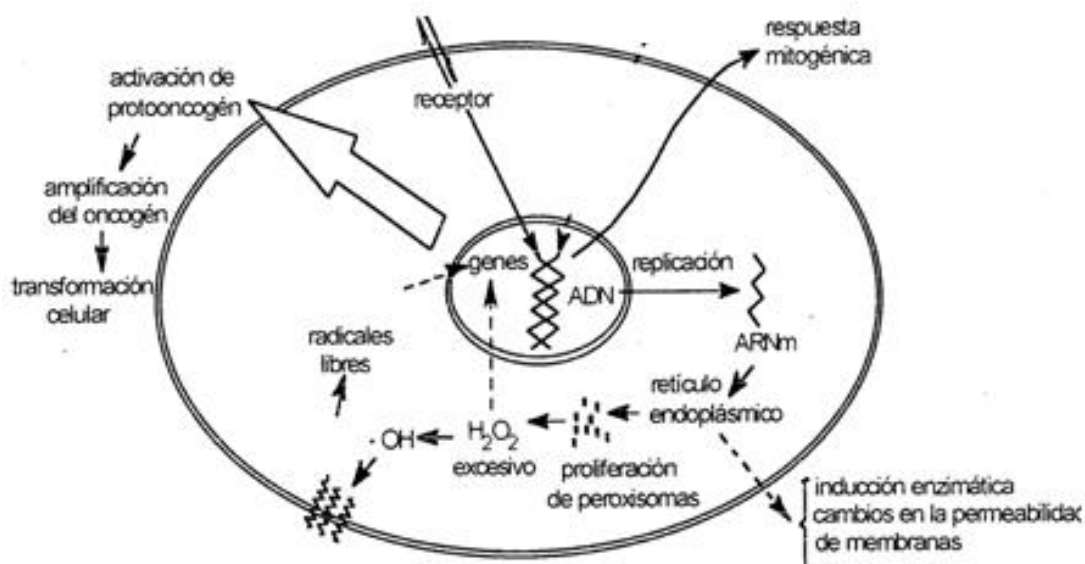


Figura 8. Transformación celular mediada por la presencia elevada de radicales libres.

Las causas de esta elevación de especies oxidantes reactivas son variadas pero las más comunes son la modificación o inactivación de sistemas metabólicos antioxidantes endógenos (glutación y superóxido dismutasa principalmente) y la acumulación de especies oxidantes.

Los antioxidantes son sustancias que, cuando están presentes en concentraciones menores comparadas con el sustrato oxidable, detienen o previenen significativamente la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes pueden ser de origen natural o sintético y su principal característica es que son fuentes ricas de electrones, es decir en contacto con una especie reactiva reacciona, impidiendo así su interacción con las biomoléculas de la célula, Esta característica la poseen las vitaminas, los polifenoles, las cumarinas y los flavonoides <sup>[14]</sup>. Es importante recalcar que el estrés oxidativo genera inflamación y a su vez muchos agentes antioxidantes también tienen propiedades antiinflamatorias.

### 2.7.1 Ácido cinámico

Ácido 3-fenil propenoico es el constituyente mayor de la planta oriental *Cinnamomun casia*, es un polifenol y metabolito secundario que es conocido por sus amplias propiedades terapéuticas antiinflamatorias y antioxidantes convirtiéndolo en un agente anticancerígeno de interés general <sup>[15]</sup>.





Los derivados del ácido cinámico han sido ampliamente estudiados y se le han atribuido muchos mecanismos de acción para ejercer su efecto protector siendo un buen paliativo y adyuvante en el tratamiento del cáncer.

De manera general se conocen por medio de publicaciones los siguientes efectos<sup>[16-20]</sup>:

- Suprimen la motilidad de células cancerosas de pulmón in vitro (antimetastásico), ya que reduce la actividad enzimática que degrada la matriz celular.
- Inhibe la actividad de  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- Protege a células medulares del estrés oxidativo ocasionado por quimioterapia.
- Reduce la inflamación producida por la producción de lipopolisacáridos de macrófagos.
- Algunos ésteres del ácido cinámico poseen actividad antitumoral, limitando la angiogénesis.

## 2.8 Tratamientos contra el cáncer

El tratamiento contra el cáncer de manera específica y total no existe ya que como se ha venido analizando, es una enfermedad multifactorial y que responde a los hábitos y genética de cada individuo, así como el estadio en el que se localice la enfermedad.

Generalmente la cirugía y extirpación del tumor es el primer paso del tratamiento combinado con quimioterapia (agentes citotóxicos muy agresivos e inespecíficos) y/o radioterapia (radiación localizada que por medio de químicos radiactivos rastrean en el sitio de las células cancerosas) son hoy en día el tratamiento de primera línea, ya que estadísticamente han funcionado, sin embargo la invasividad y efectos adversos han presentado un obstáculo para su aplicación y seguimiento.

Desde hace algunas décadas se desarrollaron tratamientos con hormonas sintéticas (hormonoterapia) debido a la relación con las hormonas sexuales que existe en el desarrollo de cierto tipo de cánceres como son el cáncer de mama, de próstata, de ovario y de útero; es por ello que en los últimos años ha adquirido fuerza ya que los resultados que se han tenido en su aplicación concomitante con la cirugía han sido de relevancia médica.



## 2.9 Hormonas lipídicas y cáncer

Las hormonas esteroidales son moléculas derivadas del colesterol (Figura 9) y tienen una estructura base formada por 4 anillos llamada ciclopentanoperhidrofenantreno, funcionan mayormente como mensajeros químicos y son secretadas por glándulas endocrinas (ovarios, testículos y glándulas suprarrenales). La distribución de sus receptores es amplia en el organismo presentando tanto receptores de membrana para realizar su función de segundos mensajeros como receptores nucleares que al unirse permiten la síntesis de proteínas necesarias para alguna función específica [22].

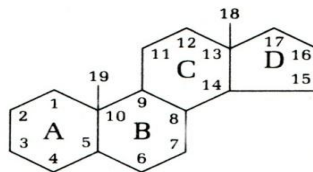


Figura 9. Estructura de ciclopentanoperhidrofenantreno.

Las hormonas sexuales controlan principalmente el crecimiento de tejidos y maduración de órganos sexuales, ejerciendo su acción mediante receptores nucleares que modifican la síntesis de proteínas (Figura 10). Exhiben diversas actividades biológicas y por estudios recientes se sabe que muchos de los derivados esteroideos son agentes farmacológicos contra enfermedades como el cáncer; por ello se han realizado de manera sintética modificaciones químicas en anillo A y D (principalmente) y los resultados han sido nuevos agentes antimicrobianos, antiinflamatorios hipotensivos, diuréticos e hipocolesterolemicos principalmente.

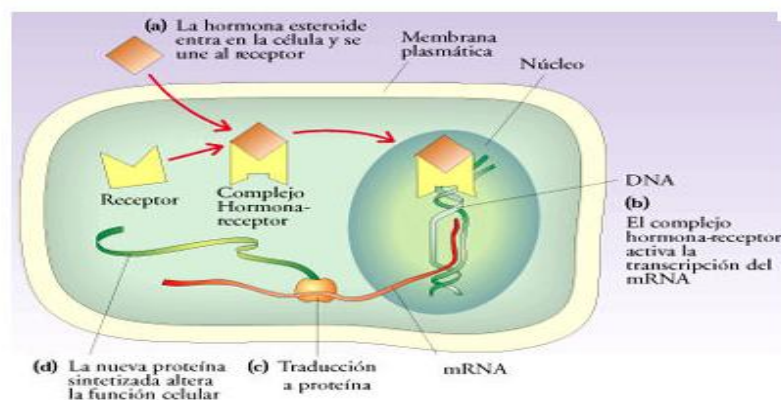


Figura 10. Mecanismo de acción general de las hormonas en el cuerpo.



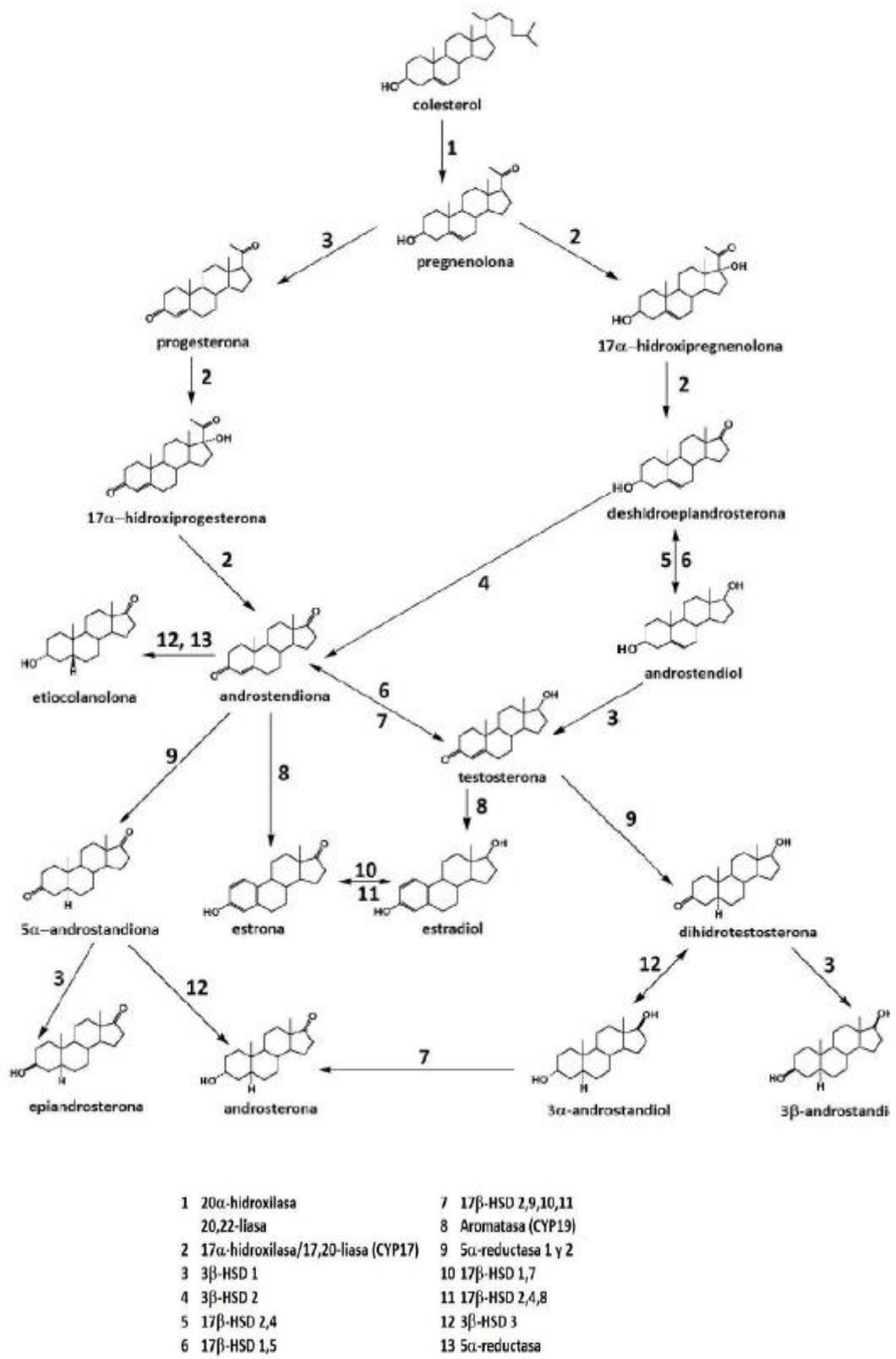


Figura 11. Ruta biosintética de las hormonas sexuales y enzimas que intervienen en el proceso.



### 2.9.1 Progesterona y Pregnenolona

La progesterona es una hormona sexual femenina secretada por los ovarios y la placenta en el embarazo, interviene en el engrosamiento del endometrio para la implantación del embrión, en el útero, modula el sistema inmunológico para evitar el rechazo del feto e inhibe la lactancia durante el embarazo.

Tiene efectos protectores en el sistema nervioso central afectando la mielinización y la transcripción de genes que inducen la apoptosis.

La progesterona también tiene efecto como factor de crecimiento epidérmico, reduce contracciones en músculo liso, reduce actividad biliar, regula los niveles de factores de coagulación de la sangre, regula la función tiroidea, tiene propiedades antiinflamatorias y controla los efectos (principalmente los neoplásicos) del estrógeno.

Debido a sus múltiples efectos dentro del organismo y la poca cantidad sintetizada de forma natural de esta hormona en el organismo, se han sintetizado fármacos con una estructura similar a la progesterona (progestinas) que permitan inducir efectos que mejoren ciertas patologías prolongando los efectos benéficos en el tratamiento de las diversas patologías <sup>[23]</sup>.

Los efectos de las progestinas dependen de los diversos grupos sustituyentes encontrados en su estructura principalmente en C17. Las progestinas más comunes son las derivadas de la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (que es un metabolito estable de la progesterona) la síntesis de estas progestinas, permite la protección molecular ante el metabolismo hepático, lo que brinda una mayor biodisponibilidad partiendo de la administración oral, lo que puede aumentar el efecto así como dirigir al fármaco a una diana específica dependiendo de las interacciones que tengan los diversos grupos sustituyentes con las biomoléculas.

La pregnenolona es un esteroide natural conocido como precursor de otras hormonas incluyendo estrógenos, testosterona, y progesterona, al igual que estas sus receptores en el organismo no solo se centran a gónadas, sino también a sistema nervioso central y células epiteliales. Tiene efectos antiinflamatorios, neuroprotectores, y metabólicos principalmente.



Los compuestos modificados de esta molécula (usualmente en C3 y C17) tienen efectos conocidos en el sistema metabólico y cardiovascular así como citotóxicos en algunas líneas cancerosas <sup>[24]</sup>.

Es por ello que se han realizado diversas investigaciones con el objetivo de diseñar derivados de hormonas para el tratamiento de diversos padecimientos, permitiendo analizar el papel que juegan los cambios estructurales con efecto biológico.

### 2.9.2 Diseño de nuevas hormonas

El efecto farmacológico a partir de una modificación estructural dependerá de las características del grupo funcional que se esté añadiendo o modificando, esto con el fin de mejorar alguna propiedad fisicoquímica del prototipo, en el caso de las hormonas es la búsqueda de agentes que le permitan tener un mayor efecto biológico de interés (como el efecto antiinflamatorio y citotóxico). Los estudios que permiten observar cómo afecta el cambio estructural a la hormona son aquellos que parten de la analogía, es decir mantienen una estructura líder similar con cambios pequeños por las modificaciones añadidas (cadenas laterales de carbono, adición de grupos funcionales, adición de halógenos etc.).

Partiendo del conocimiento del efecto endógeno de las hormonas, es posible diseñar análogos, con moléculas que potencien el efecto ya conocido, con ello se pueden elegir aquellas que tengan un efecto farmacológico conocido y diseñar una hormona que contenga este grupo, obteniendo así de primera línea una molécula híbrida (compuestos que constan de dos subunidades que tienen efecto farmacológico de manera independiente); cuya ventaja radica en que se conocen las propiedades toxicológicas, que aunque pueden variar al existir como híbridos, son un buen panorama para elegir el método de síntesis que permitirá el diseño de estos fármacos, esperando un efecto sinérgico de ambas moléculas para ejercer su efecto.



### 2.9.3. Grupo éster y su importancia farmacológica

El grupo éster ( $R-COO^-$ ) es de relevante importancia dentro del diseño de fármacos (sobre todo en híbridos) debido a que tiene enlaces de un nivel energético medio, es un aceptor de puentes de hidrógeno, es un enlace rico en electrones y es susceptible a hidrólisis pero tiene estabilidad suficiente para mantener su conformación. Estas características permiten que sea un tipo de enlace con alto nivel de interacción que puede intervenir de manera importante con los efectos biológicos.

### 2.9.4 Isosterismo y bioisosterismo

El isosterismo es un término utilizado en la química que se define como un conjunto de átomos que presentan características electrónicas y estéricas similares. Dos moléculas se denominan isósteras si contienen el mismo número y disposición de sus electrones. Las moléculas isósteras deben, por lo tanto, contener el mismo número de átomos, siendo la única variable la carga de sus núcleos <sup>[25]</sup>.

Un fármaco bioisótero es una molécula que surge de la sustitución de cualquiera de uno de sus átomos o un grupo de átomos, con uno biológicamente equivalente, proporcionándole a la molécula propiedades farmacológicas similares a las de la molécula original, se clasifican en bioisósteros clásicos (grupos funcionales que poseen configuraciones electrónicas similares de valencia) y bioisósteros no clásicos (grupos funcionales que no poseen configuraciones electrónicas similares de valencia).



### 3. JUSTIFICACIÓN

La alta tasa de morbilidad de enfermedades como el cáncer, nos motiva a impulsar el desarrollo de nuevos tratamientos o coadyuvantes de los mismos que no sean tóxicos o invasivos. En los últimos años los tratamientos hormonales para ciertos tipos de cáncer (como el de próstata y en algunos casos de mama) han resultado ser eficaces y selectivos, disminuyendo los efectos secundarios de los tratamientos convencionales lo que ha permitido mejorar la calidad de vida de los pacientes, es por ello que se han llevado a cabo la síntesis y el diseño de nuevas hormonas.

La síntesis en microondas como ya se mencionó, es un método actual de síntesis química que optimiza rendimientos, tiempos y sustentabilidad en los procesos químicos y bajo esta técnica se realizará la síntesis de nuevas moléculas híbridas de hormonas por medio de enlaces éster de dos núcleos esteroidales pregnenolona y  $17\alpha$ -Hidroxiprogesterona con derivados del ácido cinámico que como ya se analizó es un compuesto que así como sus derivados, tiene actividad biológica. Bajo esta premisa se estudiará el efecto antiinflamatorio *in vivo* y citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), cáncer de próstata (PC-3) y cáncer de pulmón (SKLU-1) de estas nuevas hormonas sintéticas.



#### 4. HIPÓTESIS

Si se sintetizan nuevas moléculas conformadas de dos unidades con actividad biológica conocida (antiinflamatoria, antioxidante y antiproliferativa) entonces el efecto farmacológico de las moléculas híbridas se verá modificado y podrá ser analizado de acuerdo a la posición de hibridación (C3 o C17) así como el isósterismo presente en las moléculas.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Realizar la síntesis por radiación de microondas de derivados del ácido cinámico para su posterior unión con los núcleos de pregnenolona y 17 $\alpha$ -hidroxipogesterona en anillos A y D para evaluar posteriormente su citotoxicidad en células cancerosas.

#### 6. OBJETIVOS PARTICULARES

Sintetizar por medio de la radiación de microondas los compuestos:

17 $\alpha$ -cinamoiloxiprogesterona, 17 $\alpha$ -3-fluorocinamoiloxiprogesterona, 3 $\beta$ -cinamoiloxipregnenolona, 3 $\beta$ -3-fluorocinamoiloxipregnenolona y ácido cinamoiloxisalicílico.

Purificar e identificar los productos obtenidos mediante métodos químicos y espectroscópicos. (Cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, espectroscopia de infrarrojo y espectroscopia de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ ).

Evaluar la actividad antiinflamatoria de las materias primas y de los compuestos sintetizados en un modelo *in vivo*.

Evaluar la citotoxicidad de las materias primas y de los compuestos sintetizados en líneas celulares cancerígenas.

Mediante los resultados obtenidos analizar la influencia posicional de las moléculas híbridas en el efecto biológico producido.



## 7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este tema se encuentra dividido en dos partes, la primera consta de la metodología empleada para la síntesis química de los compuestos, esta se realizó en el edificio A y E de la Facultad de Química. La segunda parte consta de la evaluación biológica que se realizó en el Instituto de Química, ambas instalaciones localizadas en la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 7.1 Reactivos y disolventes utilizados

DISOLVENTES		REACTIVOS*	
Agua Destilada	-----	Hidróxido de Sodio	NaOH
Metanol	MeOH	Cloruro de Tionilo	SOCl <sub>2</sub>
Acetato de Etilo	AcOEt	Ácido p-toluensulfónico	APTS
Hexano	Hex	17- $\alpha$ -acetoxiprogesterona	17 $\alpha$ -ACP
Cloroformo	CHCl <sub>3</sub>	17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona	17 $\alpha$ -OHP
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Pregnenolona	Prgn
		Cloruro de cinamoilo	CiCl
		Acido -3- <i>trans</i> - fluorocinamico	AFCi
		Bicarbonato de Sodio	NaHCO <sub>3</sub>
		Sulfato de Sodio	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		Acido Salicílico	AS

Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de los compuestos.

### 7.2 Instrumentación general

Para la síntesis química por medio de la radiación de microondas (RMO) de estos compuestos se utilizó un horno de microondas modificado CEM Discover System, Modelo No. 9080050, No de Serie. DU8925 que se utilizó a través de un software Synergy compatible con Windows 7 instalado en una computadora portátil marca ThinkPad. El horno de microondas para reacciones cuenta con una copa de reacción de teflón, un atenuador, un soporte, pinzas de tres dedos, mangueras para enfriamiento y un adaptador de vidrio permitiendo el uso de un sistema abierto (reflujo), así como un módulo de presión (sistema cerrado) con un atenuador modificado y tubos de vidrio salinizado de 15 mL con tapa de caucho y sistema de cierre por



presión. Además permite modificar variables como: potencia, temperatura, presión, tiempo rampa (tiempo necesario para alcanzar las condiciones establecidas), tiempo de reacción, velocidad de agitación y enfriamiento.

Los puntos de fusión se determinaron por medio de un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Como método de monitoreo para determinar avance de reacción se utilizó la Cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de vidrio de gel sílice de 60F 254, Merk cuyo revelador fue una solución de sulfato cérico ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ). Para el caso de los compuestos esteroidales, la mezcla de elución fue  $\text{CHCl}_3$ :Acetona (9.8:0.5).

En algunos casos se llevó a cabo la purificación de los productos obtenidos con Cromatografía en columna (CC) utilizando como fase estacionaria sílice 60 Merk, y como fase móvil la mezcla de polaridad adecuada para cada caso.

Los equipos utilizados para caracterización espectroscópica fueron: Para Espectroscopia de Infrarrojo ( $\text{IR cm}^{-1}$ ) Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR/FT-FIR utilizando la técnica de reflectancia por ATR y para la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $\text{RMN}^1\text{H ppm}$ ) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ( $\text{RMN}^{13}\text{C ppm}$ ) se utilizaron los equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300s, utilizando  $\text{CDCl}_3$  (Cloroformo deuterado) como disolvente.

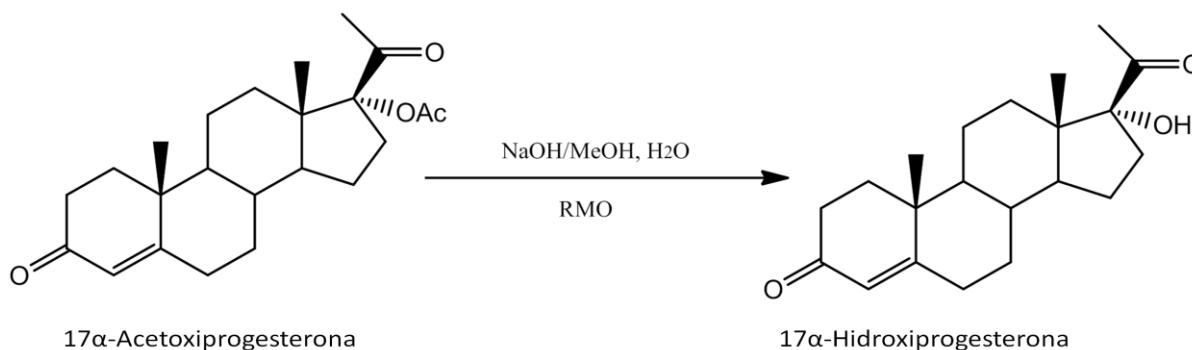
El análisis computacional se llevó a cabo con el programa Spartan 8.0 utilizando el método semiempírico AM1.





## 7.3 Metodología: Síntesis química

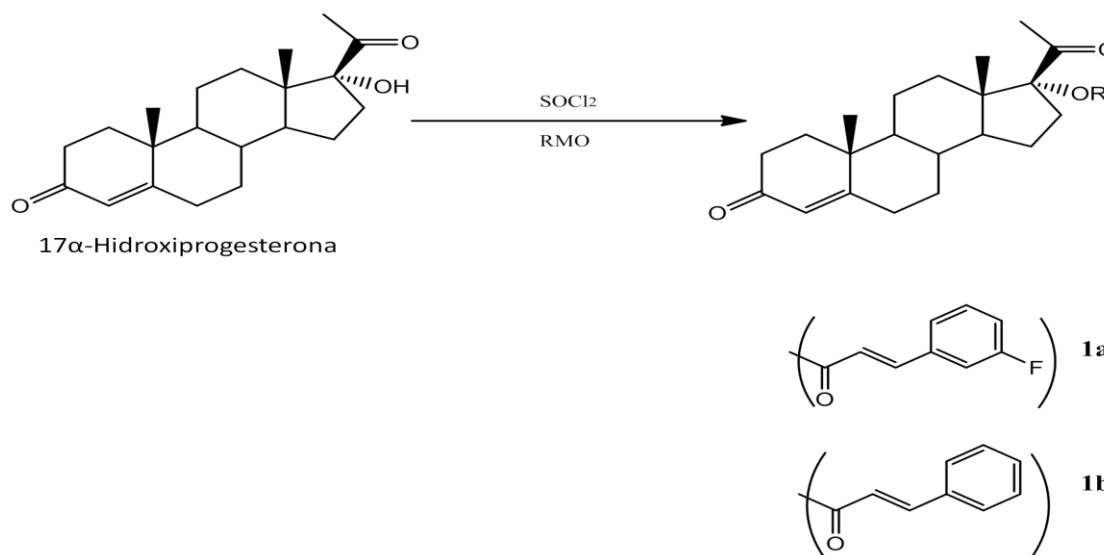
### 7.3.1 Síntesis de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OHP).



En un matraz bola de 100 mL se colocaron 50 mL de MeOH, 25 mL de una solución al 4% de NaOH y 1 gramo de 17 $\alpha$ -ACP. El matraz se colocó en la copa de reacción del horno de microondas a sistema abierto bajo las siguientes condiciones: tiempo rampa de 3 minutos, tiempo de reacción de 5 minutos, agitación rápida, 70 $^{\circ}$  C de temperatura y 70 watts de potencia.

Se obtuvo una solución amarilla que se vertió en 30 mL de agua destilada, produciéndose inmediatamente la formación de cristales por el efecto de solubilidad, esta mezcla se filtró al vacío.

### 7.3.2 Síntesis de 17 $\alpha$ -aciloiloxiderivados de ácido cinámico.



**1a** 17 $\alpha$ -3-fluorocinamoiloxiprogesterona **1b** 17 $\alpha$ -cinamoiloxiprogesterona.

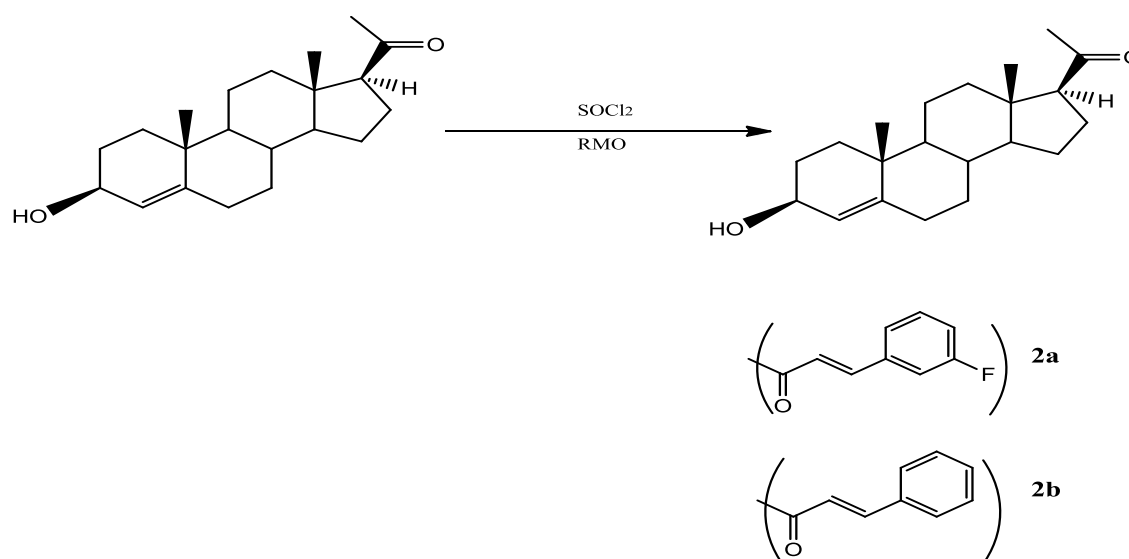


En un tubo de vidrio para reacciones en microondas de 15 mL se colocan 42 mg (0,127 mmol) de 17 $\alpha$ -OHP, 54 mg de  $\text{Cl}_2\text{C}$  o de AFCi (0.325 mmol), con 3 gotas de una solución 1:1 de  $\text{SOCl}_2:\text{CHCl}_3$ . El tubo se cerró y se colocó en la copa de reacción, con el atenuador modificado para sistema cerrado. Las condiciones fueron: tiempo de reacción de 5 minutos, agitación rápida, 120° C de temperatura, potencia de 70 watts.

\*Se realizó este mismo método con 2mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 25% de APTS a 160 psi.

La mezcla resultante se disolvió en  $\text{CHCl}_3$  y se trató en agitación con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  hasta eliminar el ácido sin reaccionar resultante, la muestra se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Para eliminar la 17 $\alpha$ -OHP que no reaccionó así como su deshidratado se realizó una CC cuyos eluyentes fueron  $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$  en proporciones respectivas de 95:0.5

### 7.3.3 Síntesis de 3 $\beta$ -aciloiloxiderivados de ácido cinámico.



**1a.** 3 $\beta$ -3-fluorocinamoiloxipregnenolona **2b.** 3 $\beta$ -cinamoiloxipregnenolona.

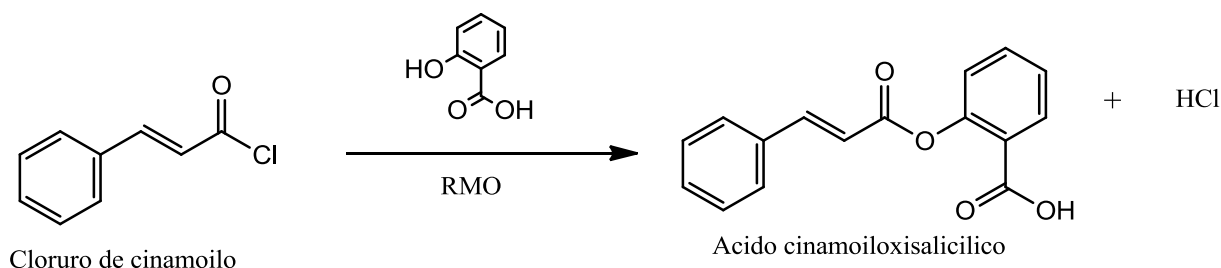


En un tubo de vidrio para reacciones en microondas de 15 mL se colocan 36 mg (0,113 mmol) de Prgn, 54 mg de  $\text{ClCl}$  o de AFCi (0.325 mmol), con 3 gotas de una solución 1:1 de  $\text{SOCl}_2:\text{CHCl}_3$ . El tubo se cerró y se colocó en la copa de reacción, con el atenuador modificado para sistema cerrado. Las condiciones fueron: tiempo de reacción de 4 minutos, agitación rápida,  $120^\circ\text{C}$  de temperatura, potencia de 70 watts.

\*Se realizó este mismo método con 2mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 20% de APTS a 160 psi.

La mezcla resultante se disolvió en  $\text{CHCl}_3$  y se trató en agitación con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  hasta eliminar el ácido sin reaccionar resultante, la muestra se seco con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Para su purificación se realizó una recrystalización con  $\text{AcOEt}:\text{Hex}$ , el sólido resultante se filtró al vacío.

#### 7.3.4 Síntesis de Ácido cinamoiloxisalicílico (ACS)



En un tubo de vidrio para reacciones en microondas de 15 mL se colocan 125 mg (0,753 mmol) de  $\text{ClCl}$ , 69 mg de AS (0.5 mmol), con 2 gotas de  $\text{SOCl}_2$ . El tubo se cerró y se colocó en la copa de reacción, con el atenuador modificado para sistema cerrado y sobre el tubo se posicionó el módulo de presión. Las condiciones fueron: tiempo de reacción de 4 minutos, agitación rápida,  $120^\circ\text{C}$  de temperatura, potencia de 60 watts.

La mezcla resultante se recrystalizó por par de disolventes  $\text{AcOEt}:\text{Hex}$  y se filtro al vacío, lavándose una sola vez con agua destilada fría.

\*Se realizó este mismo método con 2mL de  $\text{AcOEt}$  y 25% de APTS a 150psi.



## 7.4 Metodología: Evaluación Biológica

### 7.4.1 Evaluación de citotoxicidad en células cancerosas.

El bioensayo se realizó por medio del método colorimétrico con sulforrodamina B (SRB) donde se determinó la viabilidad de la célula después de su tratamiento los compuestos sintetizados, las líneas celulares cancerígenas utilizadas fueron PC-3 (próstata), MCF-7 (mama), y SKLU-1 (pulmón).

En una placa de 96 pozos (ya que cada ensayo tendrá 3 repeticiones) se colocaron inóculos de 100µL de medio celular (vienen de una densidad ajustada de  $1 \times 10^6$  cel/mL), esto se realizó tanto en el plato experimental (contendrá los compuestos a evaluar) como en un plato basal (que servirá de control), en el plato experimental se colocaron 100µL de compuesto prueba disuelto en Dimetilsulfóxido (DMSO) que vienen de una concentración 20mM para una concentración final fue de 50µM en cada pozo y se dejó incubar por 48hrs. Al plato basal se le colocaron 100µL de medio y se incubó por 1 hora. Cada compuesto de prueba se agrega en 3 pozos así como su respectivo vehículo.

Trancurrido el tiempo a ambo platos se les trató con una solución de ácido trifluoroacético al 30% para fijar proteínas y se colocaron a 4°C por 60 minutos, para proceder con el lavado con agua, dejándose secar por 24 horas. Una vez secos los platos se les agregó una solución de SRB al 0.4% que teñirá los aminoácidos básicos permitiendo teñir únicamente las células viables.

Para retirar el exedente del colorante que no se adhirió a las células las placas se lavaron con una solución de ácido acético al 1% para secar nuevamente y se procedió con la lectura a 515 nm (longitud de onda que absorbe la SRB).

El porcentaje de inhibición del crecimiento se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ IC} = 100 - (\text{densidad óptica del puesto prueba} / \text{densidad óptica del vehículo})$$



#### 7.4.2 Evaluación de la viabilidad de macrófagos murinos

Los macrófagos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones Swiss hembras de peso entre 25-30 g; se administró por vía intraperitoneal 0.5 ml de medio de trioglicolato estéril al 3% p/v (estimula la génesis de macrófagos) después de 72 hrs, los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Bajo condiciones de esterilidad, se inyectó en la cavidad peritoneal 7 ml de buffer de fosfatos (PBS) y se realizó un masaje abdominal vigoroso, para extraer con la ayuda de una jeringa el líquido peritoneal, el cual se depositó en la placa de cultivo para favorecer el 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> por un lapso de dos horas. Al finalizar este periodo, se lavó con PBS en 3 ocasiones, y con la ayuda de un cosechador de células se procedió a desprender los macrófagos murinos. La cuenta de los macrófagos se realizó con azul de tripano (colorante que atraviesa la membrana de las células muertas) la densidad del inóculo se ajustó a  $1.0 \times 10^6$  cel/mL en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% Suero fetal Bovino. En placas de 96 pozos se depositaron 100 µl de la suspensión de células, (antes de haber agregado el compuesto de prueba, se dejó pasar un lapso de 60 minutos para los macrófagos se adhieran al sustrato del pozo). Los compuestos de prueba, se prepararon en Dimetil sulfoxido (DMSO) o agua a la concentración de 20 mM. Se agregaron 100 µl de la solución del compuesto de prueba cuya concentración final en cada pozo correspondía a 50 µM. Cada compuesto de prueba se agrega en 3 pozos así como su respectivo vehículo, al finalizar se incuban a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

##### **Viabilidad del macrofago.**

La actividad de los compuestos de ensayo sobre la viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenitetrazolio) que permite cuantificar la viabilidad celular después del tratamiento, basándose en la alta correlación que existe entre la cantidad de MTT metabolizado a formazán y el número de células vivas y/o metabólicamente activas

El MTT se preparó en una solución amortiguador de fosfatos a una concentración de 5mg/ml. Se adicionaron 20 µl / pozo y se incubó durante 4 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar este periodo se descartó el sobrenadante y los cristales de formazán generados en cada pozo fueron disueltos agregando 100µl de DMSO. La placa se mantuvo en agitación durante 10 min



y posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de Viabilidad se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

% Viabilidad =  $100 \times (\text{promedio absorbancia compuesto prueba} / \text{promedio absorbancia vehículo})$

### 7.4.3 Evaluación de actividad antiinflamatoria

Se evaluó la actividad antiinflamatoria tópica de los compuestos utilizando el test del edema de oreja en ratón inducido por 12-o-tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA).

Se utilizaron ratones hembras CD1 de entre 25 y 30 gramos de peso, se dividieron en grupos de 4 ratones. La oreja izquierda de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2.5µg /10µL, a una concentración de TPA de 0.125 µg/µl en etanol y 20µL de la solución con compuesto a evaluar de 1µM/20µL disuelta en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 10µL de etanol y 20µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, esto para evaluar la diferencia de peso entre cada oreja considerando la tasa de variabilidad del disolvente.

En el grupo control se siguió el mismo procedimiento solo que no se le aplicó la solución de muestra con el compuesto a evaluar, únicamente se agregaron 20µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Después de 4 horas de la administración de tópica de TPA y los compuestos los animales se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> y se extrajeron con un sacabocados en cada oreja discos de 7 mm de diámetro para determinar su peso. La diferencia promedio de peso entre la oreja derecha e izquierda de cada grupo se tomó como expresión del edema y se calculó el porcentaje de inhibición del edema en los animales tratados

### 7.4.4. Ensayo de MPO (mieloperoxidasa).

Se tomaron las porciones de oreja utilizadas para el ensayo de TPA y se homogeneizó el tejido con una solución al 0.5% de bromuro de hexatrimetilamonio y se ajustó el pH a 6 con una solución 50mM de fosfato de sodio, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos para separar el sobrenadante del botón de células.

Se tomó 0.1 mL del sobrenadante y se le colocaron 2.9 mL de una solución 50 mM de fosfatos que contiene 0.167mg/mL de dicloruro de dianisidina, y 0.0005% de peróxido de hidrógeno.



---

Se colocó en una celda esta solución y se midió el cambio de absorbancia a 460 nm con el parámetro en la degradación de la MPO de 1mM de peróxido por minuto a 25 °C.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

### 8.1 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OHP).

PROPIEDAD FISICOQUÍMICA	VALOR
Fórmula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular	330.22 g/mol
Punto de fusión	224-226°C
Rendimiento	88%
Factor de retención	0,52 (CHCl <sub>3</sub> :Acetona 9.8:0.5)
<b>ESTRUCTURA</b>	
<b>PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>	
IR (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACIÓN
3417	O-H en C <sub>17</sub>
2931	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>
1701 y 1663	C=O de C <sub>3</sub> y C <sub>20</sub>
RMN <sup>1</sup> H (ppm)	
2.28 (s, 3H)	H de metilo C <sub>21</sub>
1.19 (s, 3H)	H de metilo C <sub>18</sub>
0.76 (s, 3H)	H de metilo C <sub>19</sub>
5.73 (s, 1H)	H vinílico C <sub>4</sub>
1.42 (s, 1H)	H del alcohol C <sub>17</sub>
RMN <sup>13</sup> C (ppm)	
20.47	C <sub>18</sub> Carbonos de metilo
15.39	C <sub>19</sub> Carbono de metilo
89.76	C <sub>3</sub> Carbono de enlace
170.97	C <sub>4</sub> Carbono vinílico del anillo A
123.86	C <sub>5</sub> Carbono vinílico del anillo A



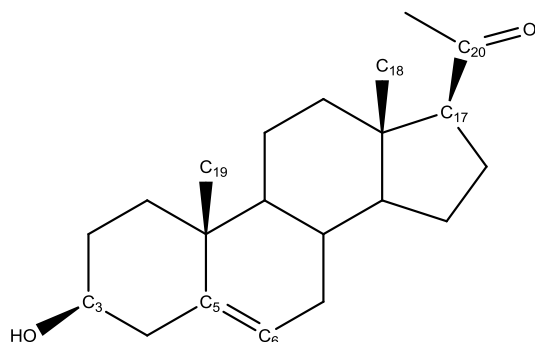


211.84 y 99.55	C <sub>20</sub> y C <sub>3</sub> Carbono de cetona
89.58	C <sub>17</sub> Carbono de OH

## 8.2 3β-Hidroixipregnenolona (3β-OHP).

PROPIEDAD FISICOQUÍMICA	VALOR
Fórmula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	316.24 g/mol
Punto de fusión	189-191°C
Rendimiento	----
Factor de retención	0,5 CHCl <sub>3</sub> :Acetona (9.8:0.5)

### ESTRUCTURA



### PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS

IR (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACIÓN
3504	O-H en C <sub>3</sub>
2835	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>
1682	C=O de C <sub>20</sub>



### 8.3 Acido cinamoiloxisalicílico. (ACS)

PROPIEDAD FISCOQUÍMICA		VALOR
Fórmula molecular		C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Peso molecular		268.07 g/mol
Punto de fusión		128-131°C
Rendimiento		45 %    30%*
Factor de retención		0,11 (Hex:AcOet 7:3)
<b>ESTRUCTURA</b>		
<b>5PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>		
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>ASIGNACIÓN</b>	
3024-2542	O-H de C <sub>1</sub> acido	
1727	C=O del C <sub>1a</sub> de éster	
1200-1800	Sobretonos de o-sustitución	
<b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b>		
7.98 (dd, J=11.8Hz, 1H)	H vinílico de C <sub>2a</sub>	
7.55 (m, 1H)	H aromático	
7.42 (m, 1H)	H aromático	
7.20 (d, 2H)	H aromático	
6.65 (s, J=16Hz, 1H)	H vinílico de C <sub>3a</sub>	
<b>RMN <sup>13</sup>C (ppm)</b>		
146.94	C <sub>3a</sub> Carbono vinílico	
116.96	C <sub>2a</sub> Carbono vinílico	
169.96	C <sub>1a</sub> Carbono de éster	
151.02	C <sub>3</sub>	
165.4	C <sub>1</sub> Carbono de ácido	

### 8.4 17α-cinamoiloxiprogesterona (17α-CiOP)



PROPIEDAD FÍSICOQUÍMICA		VALOR
Fórmula Molecular	$C_{30}H_{36}O_4$	
Peso molecular	460.26 g/mol	
Punto de fusión	230-232°C	
Rendimiento	78%	70%*
Factor de retención	0,68 (CHCl <sub>3</sub> :Acetona 9.8:0.5)	
<b>ESTRUCTURA</b>		
<b>PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>		
IR (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACIÓN	
2921	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>	
1719	C=O de éster en C <sub>1a</sub>	
1694	C=O de C <sub>20</sub> y C <sub>3</sub>	
RMN <sup>1</sup> H (ppm)		
6.48 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>2b</sub>	
7.72 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>3b</sub>	
7.40 (dd, 2H)	H aromáticos	
7.44 (m, 2H)		
7.41 (d, 1H)		
2.09 (s, 3H)	H de metilo C <sub>21</sub>	
0.72 (s, 3H)	H de metilo C <sub>18</sub>	
1.22 (s, 3H)	H de metilo C <sub>19</sub>	
5.76 (s, 1H)	H vinílico C <sub>4</sub>	
RMN <sup>13</sup> C (ppm)		
166.34	C <sub>1a</sub> Carbono de éster	
117.34	C <sub>2b</sub> Carbono vinílico del anillo aromático	



146.17	C <sub>3b</sub> Carbono vinílico del anillo aromático
128.9-123.9	C <sub>b</sub> Carbonos aromáticos
17.40	C <sub>18</sub> Carbonos de metilo
14.46	C <sub>19</sub> Carbono de metilo
96.70	C <sub>17</sub> Carbono de enlace
133.94	C <sub>4</sub> Carbono vinílico del anillo A
170.66	C <sub>5</sub> Carbono vinílico del anillo A
199.34	C <sub>20</sub> Carbono de cetona
203.96	C <sub>3</sub> Carbono de cetona

### 8.5 17 $\alpha$ -3-fluorocinamoiloxiprogesterona (17 $\alpha$ -3f-CiOP)



PROPIEDAD FISCOQUIMICA		VALOR
Fórmula molecular		$C_{30}H_{35}FO_4$
Peso molecular		478.25 g/mol
Punto de fusión		265-267 <sup>o</sup> c
Rendimiento		70%      64%*
Factor de retención		0,81 (CHCl <sub>3</sub> :Acetona 9.8:0.5)
<b>ESTRUCTURA</b>		
<b>PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>		
IR (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACIÓN	
2939	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>	
1719	C=O de éster en C <sub>1a</sub>	
1659	C=O de C <sub>20</sub> y C <sub>3</sub>	
RMN <sup>1</sup> H (ppm)		
6.47 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>2b</sub>	
7.63 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>3b</sub>	
7.4 -7.34 (t, 1H)	H aromáticos	
7.23 (d, 1H)		
2.09 (s, 3H)	H de metilo C <sub>21</sub>	
0.13 (s, 3H)	H de metilo C <sub>18</sub>	
1..21 (s, 3H)	H de metilo C <sub>19</sub>	
5.63 (s, 1H)	H vinílico C <sub>4</sub>	
7.1 (t, 1H)	Señal de acoplamiento a flúor.	
RMN <sup>13</sup> C (ppm)		
166.18	C <sub>1a</sub> Carbono de éster	
117.25	C <sub>2b</sub> Carbono vinílico del anillo aromático	



143.87	C <sub>3b</sub> Carbono vinílico del anillo aromático
129.33-128.54	C <sub>b</sub> Carbonos aromáticos
16.93	C <sub>18</sub> Carbono de metilo
14.3	C <sub>19</sub> Carbono de metilo
96.43	C <sub>17</sub> Carbono de enlace
170.73	C <sub>4</sub> Carbono vinílico del anillo A
125.22	C <sub>5</sub> Carbono vinílico del anillo A
203.84	C <sub>20</sub> Carbono de cetona
198.95	C <sub>3</sub> Carbono de cetona
161.53	C <sub>8</sub> Carbono acoplado al flúor

### 8.6 3β-cinamoiloxipregnenolona (3β-CiOP).

PROPIEDAD FISICOQUIMICA	VALOR	
Fórmula molecular	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	
Peso molecular	446.28 g/mol	
Punto de fusión	198-201°C	
Rendimiento	89%	73%*
Factor de retención	0,87 (CHCl <sub>3</sub> :Acetona 9.8:0.5)	
<b>ESTRUCTURA</b>		
<b>PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>		



IR (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACION
2938	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>
1701	C=O de éster en C <sub>1a</sub>
1636	C=O de C <sub>20</sub>
RMN <sup>1</sup> H (ppm)	
6.41 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>2a</sub>
7.70 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>3a</sub>
7.36 (dd, 2H) 7.39 (m, 2H) 7.38 (d, 1H)	H aromáticos
2.13 (s, 3H)	H de metilo C <sub>21</sub>
0.64 (s, 3H)	H de metilo C <sub>18</sub>
1.05 (s, 3H)	H de metilo C <sub>19</sub>
6.45 (s, 1H)	H vinílico C <sub>5</sub>
RMN <sup>13</sup> C (ppm)	
166.39	C <sub>1a</sub> Carbono de éster
148.56	C <sub>2a</sub> Carbono vinílico del anillo aromático
116.72	C <sub>3a</sub> Carbono vinílico del anillo aromático
130.18-120.39	C <sub>b</sub> Carbonos aromáticos
19.34	C <sub>18</sub> Carbonos de metilo
13.23	C <sub>19</sub> Carbono de metilo
73.93	C <sub>3</sub> Carbono de enlace
139.68	C <sub>5</sub> Carbono vinílico del anillo A
122.39	C <sub>6</sub> Carbono vinílico del anillo A
209.58	C <sub>20</sub> Carbono de cetona



### 8.7 3β-3fluorocinamoiloxipregnenolona (3β-3f-CiOP).

PROPIEDAD FISICOQUIMICA		VALOR
Fórmula molecular		C <sub>30</sub> H <sub>37</sub> FO <sub>3</sub>
Peso molecular		464.27 g/mol
Punto de fusión		233-235°C
Rendimiento		82%      76%*
Factor de retención		0,92 (CHCl <sub>3</sub> :Acetona 9.8:0.5)
<b>ESTRUCTURA</b>		
<b>PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS</b>		
IR (cm <sup>-1</sup> )	ASIGNACION	
2943	C-H de CH <sub>3</sub> y CH <sub>2</sub>	
1773	C=O de éster en C <sub>1a</sub>	
1692	C=O de C <sub>20</sub>	
RMN <sup>13</sup> H (ppm)		
6.43 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>2a</sub>	
7.83 (d, 1H)	H vinílico de C <sub>3a</sub>	
7.63 -7.29 (t, 1H)	H aromáticos	
7.58 (d, 1H)		
2.13 (s, 3H)	H de metilo C <sub>21</sub>	
0.63 (s, 3H)	H de metilo C <sub>18</sub>	
1.49 (s, 3H)	H de metilo C <sub>19</sub>	
5.38 (s, 1H)	H vinílico C <sub>4</sub>	
7.07 (t, 1H)	Señal de acoplamiento a fluor.	





RMN <sup>13</sup> C (ppm)	
165.84	C <sub>1a</sub> Carbono de éster
143.14	C <sub>2a</sub> Carbono vinílico del anillo aromático
122.47	C <sub>3a</sub> Carbono vinílico del anillo aromático
130.4-128	C <sub>b</sub> Carbonos aromáticos
19.42	C <sub>18</sub> Carbonos de metilo
13.47	C <sub>19</sub> Carbono de metilo
63.69	C <sub>3</sub> Carbono de enlace
139.28	C <sub>5</sub> Carbono vinílico del anillo A
118.93	C <sub>6</sub> Carbono vinílico del anillo A
209.45	C <sub>20</sub> Carbono de cetona
161.53	C <sub>8b</sub> Carbono de enlace a Flúor

De manera general se buscaron en los espectros IR de los compuestos finales la aparición de bandas alrededor de 1700-1750 cm<sup>-1</sup> características del grupo carbonilo del enlace éster y su banda confirmatoria en 1300 cm<sup>-1</sup>. También la presencia de bandas alrededor de 1600 cm<sup>-1</sup> indicando correspondientes al grupo. Así como la presencia de bandas alargadas alrededor de 2900 cm<sup>-1</sup> indicando la presencia de grupos metilo, la desaparición de la banda correspondiente al alcohol alrededor de 3417 cm<sup>-1</sup> para 17 $\alpha$ -OHP y alrededor de 3504 cm<sup>-1</sup> para 3 $\beta$ -OHP puede implicar la formación de un enlace que involucre al grupo -OH.

Para RMN<sup>1</sup>H para ambos derivados se confirma que las señales múltiples alrededor de 7.30-7.40 ppm no desaparezcan, implicando esto la presencia de hidrógenos acoplados a un anillo aromático así como señales dobles alrededor de 6.4 y 7.7 ppm, lo que indica la presencia de hidrógenos vinílicos, todas estas señales características del grupo cinamoilo.

Para el caso de RMN<sup>13</sup>C la presencia de una señal alrededor de 165 ppm indica la presencia del carbono del carbonilo del éster.



La síntesis por medio de radiación de microondas (RMO), es un método que provee muchas ventajas en la síntesis química, permite una gran variación de condiciones lo que ayuda a optimizar las reacciones en un lapso muy reducido en comparación con los métodos de síntesis convencional.

Para los casos analizados se obtiene además una gran ventaja en la aplicación del concepto de sustentabilidad, ya que las reacciones se llevaron a cabo en fase sólida lo que permite hacer al proceso libre de disolventes y por lo tanto, permite la eliminación de residuos, de igual manera al realizar la reacción con disolvente, las cantidades utilizadas son mínimas (en este caso particular 2mL) por lo que se concluye que es un proceso sustentable.

Se puede apreciar que los rendimientos marcados con un (\*) son menores, esto es debido al uso de un disolvente ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) que tiene una capacidad de absorción de RMO baja, sin embargo se empleo debido a la alta solubilidad que presentaban los reactivos con ese solvente (la solubilidad es un factor determinante que permite que el medio homogéneo reaccione mucho mejor que uno en dos fases).

En el método con disolvente se empleó APTS y en el método en fase sólida se empleo  $\text{SOCl}_2$  en cantidades catalíticas (2-3 gotas de una solución 1:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{SOCl}_2$ ), es importante mencionar que esto se realizó así debido a que la matriz sólida con APTS generaba una mezcla de muy alta viscosidad, su tratamiento no era sencillo (aumenta pasos) y se ocupaban cantidades altas para un catalizador (25 mg) además de que el rendimiento se mejoró mucho al utilizar gotas de  $\text{SOCl}_2$  aunque no varían de manera importante, se buscaba la optimización de la reacción en general.

Esta variación en el rendimiento puede deberse a que con el uso de disolvente puede facilitar la presencia de agua y esto desplaza el equilibrio hacia productos. El APTS resultó ser un buen catalizador en medio líquido pero también es altamente higroscópico.

Con el uso del catalizador  $\text{SOCl}_2$  se observaron rendimientos mayores en fase sólida, se utilizaron aproximadamente 0,027mmol de este reactivo y la reacción final tiene rendimientos muy altos, esto puede deberse a que el papel de activación que tiene el  $\text{SOCl}_2$  para la esterificación de Fisher es doble, puede estar activando al ácido presente en el medio



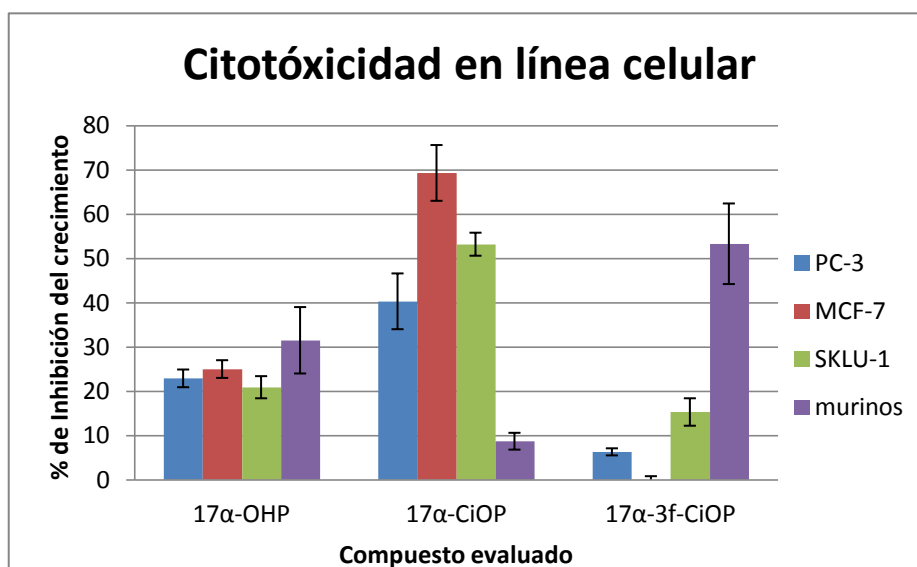
haciéndolo cloruro y permitiendo que se lleve a cabo la reacción entre un cloruro de acilo y un alcohol, y también al no estar en condiciones anhidras completamente forma el HCl, que es un ácido fuerte necesario para la esterificación de Fisher pero en cantidades tales que no permite una deshidratación del grupo alcohol del esteroide como reacción prioritaria, además el agua que se genera es menor (igualmente por las cantidades) y es rechazada del medio sólido, permitiendo que el equilibrio no se desplace a reactivos.

Es importante mencionar que las esterificaciones realizadas presentaron un rendimiento mayor en posición C3 del esteroide debido a que hay un impedimento estérico mucho menor (alcohol secundario) que el encontrado en C17.

Para el caso particular de la obtención de ACS el rendimiento se encuentra muy diferido entre las técnicas en fase sólida y fase líquida, esta también es una esterificación de adición eliminación así que las gotas agregadas de  $\text{SOCl}_2$  fueron de forma directa, esto es porque la formación de este compuesto está condicionada a un ambiente ácido más fuerte para la activación del ácido y su posterior reacción con el alcohol que no es susceptible a deshidratación (AS) y además tiene la ventaja de que no genera subproductos.

La variación en rendimientos de fase sólida y líquida corresponde igualmente a la formación de moléculas de agua, además que la reacción es termodinámica y al encontrarse en fase sólida se genera una matriz de los reactivos fundidos aumentando mucho la interacción molecular, en fase líquida el disolvente esta absorbiendo también radiación y puede ser que esto interfiera con el rendimiento esperado.

Finalmente se puede hablar de que el uso de RMO para síntesis, permite mejorar rendimientos, tiempos y sustentabilidad en las reacciones químicas y además permite experimentar bajo condiciones que no son fácilmente alcanzadas en los métodos empleados en síntesis convencional, siendo útil para reacciones condicionadas a altas temperaturas así como a aquellas lábiles.



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de las líneas de las células correspondientes al ser tratadas con los compuestos derivados de la progesterona. Los datos de macrófagos murinos se corrigieron para realizar el análisis de inhibición.

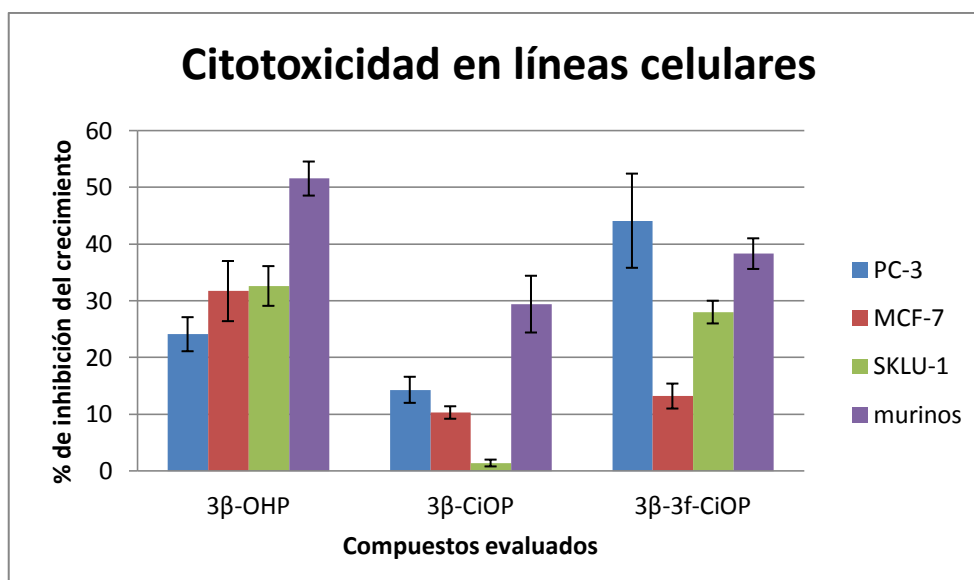
El análisis de los 17 $\alpha$ -cinamoiloxid derivados de la progesterona muestra que la adición del Cloruro de cinamoilo por un enlace éster modifica de manera importante su actividad citotóxica siendo el 17 $\alpha$ -CiOP el compuesto con mayor actividad en las células cancerígenas y no así en la viabilidad del macrófago, es decir es selectivo para las líneas celulares analizadas en ese estudio, se puede observar que funciona como antagonista en el efecto proliferativo que tienen los estrógenos principalmente y la deshidrotestosterona en el desarrollo de cáncer de próstata y mama respectivamente.

En el caso del compuesto 17 $\alpha$ -3f-CiOP se observa un decremento en la actividad citotóxica en células de cáncer y no así en macrófagos elucidando esta molécula como no selectiva pero altamente citotóxica, la adición del AFCi no mejora los resultados biológicos de la molécula prototipo 17 $\alpha$ -OHP.

La variación en la respuesta de estos isómeros se atribuye a la presencia del flúor en la posición *meta* del anillo aromático que cuya característica principal es que es un átomo pequeño pero altamente electroattractor, factor que posiblemente este modificando la interacción fármaco-receptor para la respuesta biológica posiblemente por una interacción electrostática (por la carga parcial negativa que contiene este átomo) con algún residuo proteico de la diana impidiendo quizá el acoplamiento que desencadena el efecto inhibitorio.



Es importante destacar que en las células SKLU-1, no se observa la pérdida total del efecto inhibitorio lo que pone de manifiesto que la respuesta no solo depende del núcleo esteroideal sino de la presencia del grupo cinámico ya que se sabe que el cáncer de pulmón no es hormonodependiente, aunque estas células también presentan receptores a hormonas y como se puede apreciar la molécula híbrida  $17\alpha$ -CiOP también presentó una actividad alta como inhibidora del crecimiento.



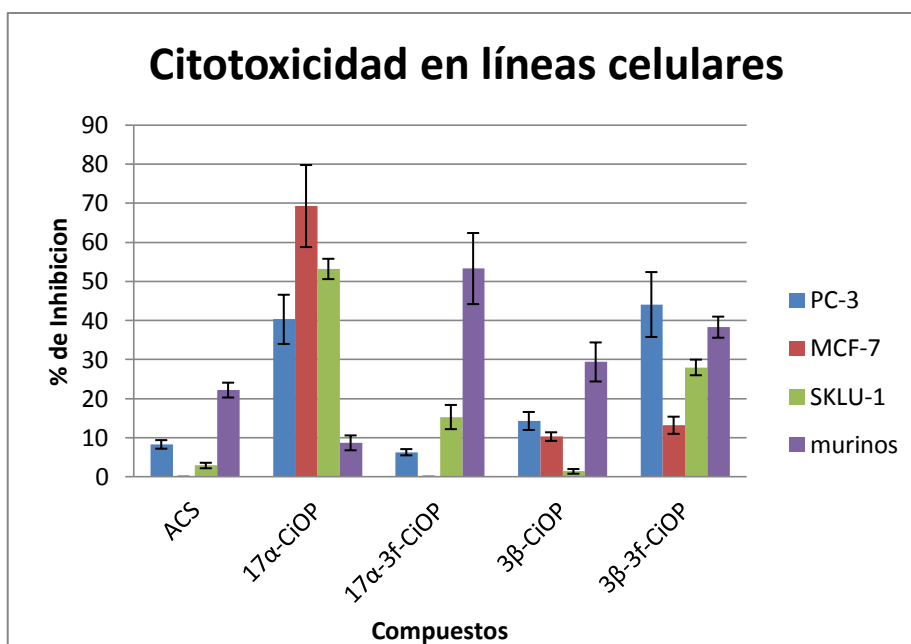
Gráfica 2. Porcentaje de inhibición de las líneas de las células correspondientes al ser tratadas con los derivados de la pregnenolona. No se tienen datos de macrófagos murinos.

En este caso es importante observar que la adición de un grupo como los derivados cinámicos al anillo D de  $3\beta$ -OHP presentan un decremento en la actividad inhibitoria de manera general (siendo esto muy evidente en el caso del compuesto  $3\beta$ -CiOP) esto puede indicar que la respuesta biológica se altera por la pérdida del grupo hidroxilo que es un donador de electrones y aceptor de puentes de hidrógeno.

El compuesto  $3\beta$ -3f-CiOP presenta únicamente una actividad inhibitoria alta para las líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón no se observa un aumento con respecto a la molécula prototipo  $3\beta$ -OHP, de igual manera el isosterismo entre el hidrógeno y el flúor está condicionando la actividad en la diana del compuesto analizado. Sin embargo no muestra especificidad celular por la alta toxicidad en macrófagos.



De manera hipotética se puede inferir (al menos en los receptores de PC-3) que el anillo aromático del AFCi al tener un átomo como el flúor en *meta* produce interacciones nuevas dentro del receptor que restituye la actividad perdida por el grupo hidroxilo.



Gráfica 3. % de Inhibición producida por derivados del ácido cinámico en líneas celulares. Los datos de macrófagos murinos se corrigieron para realizar el análisis de inhibición.

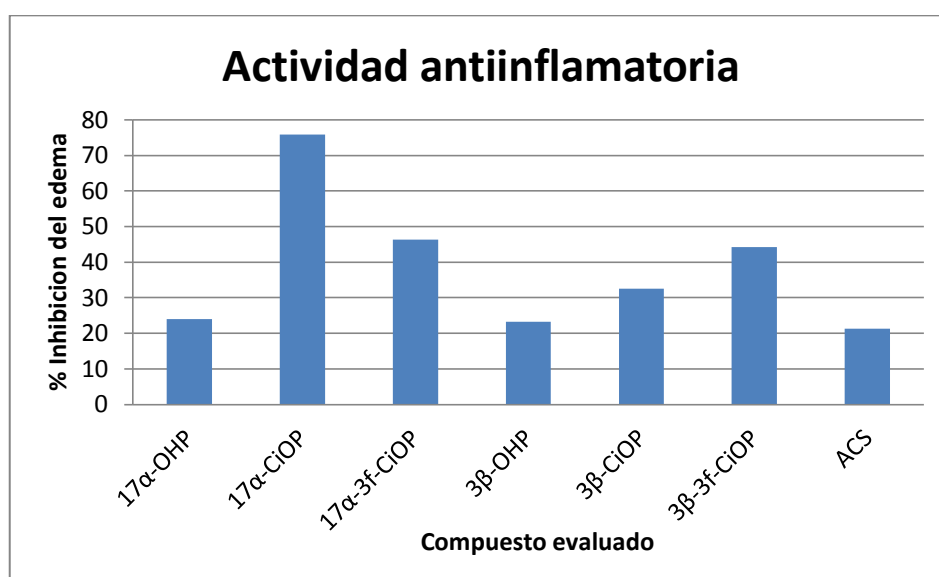
De manera general se observa que los nuevos derivados del ácido cinámico confieren una actividad mayor con respecto al ácido cinámico solo en lo que a la actividad citotóxica se refiere, en el caso de la incorporación de derivados del ácido cinámico a núcleos esteroidales en el anillo A y D puede decirse que en posición 17 los nuevos derivados permiten un aumento en la actividad inhibitoria de células, pese al tamaño de estas moléculas la actividad en el receptor parece responder a la alta conjugación que contiene al ácido cinámico (por anillo y enlace vinílico) por lo que pareciera que la interacción con la diana esta ligada a los enlaces pi (ricos en electrones) y su selectividad depende de las características del átomo sustituyente en posición *meta*, el anillo aromático.

En el caso de la incorporación del ácido cinámico al anillo A en posición 3 la actividad disminuye y su reactivación depende de las características de la sustitución en el anillo aromático del cinamoilo.



Ambas posiciones ( $C_3$  y  $C_{17}$ ) son de potencial sustitución para nuevas moléculas y permiten la adición de grupos voluminosos lo que implica que el receptor tiene amplio grado de libertad para interacciones nuevas, sin embargo las interacciones para el anillo A parecen no desencadenar respuestas biológicas importantes sin algún átomo que polarice la molécula adicionada. En ambos casos las moléculas híbridas adquieren toxicidad por la adición del flúor.

Para el caso del ACS que no reporta un aumento significativo en la toxicidad es posible que el éster formado no tenga ni el tamaño ni las propiedades fisicoquímicas necesarias para generar un efecto farmacológico citotóxico en estas líneas celulares, o tal vez la concentración debe ser más alta para poder apreciar los resultados.



Gráfica 5. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los derivados del ácido cinámico por medio del % inhibitorio de edema inducido con TPA. \*Ácido cinámico no reporto actividad antiinflamatoria.

De manera general se sabe que el mecanismo de acción de algunos esteroides para la inflamación es modular los factores y células proinflamatorias del sistema inmunitario, de manera general al unirse con su receptor nuclear, los esteroides inducen el aumento en la transcripción del inhibidor de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  previniendo que se activen genes de proteínas proinflamatorias presentes en la inflamación crónica.

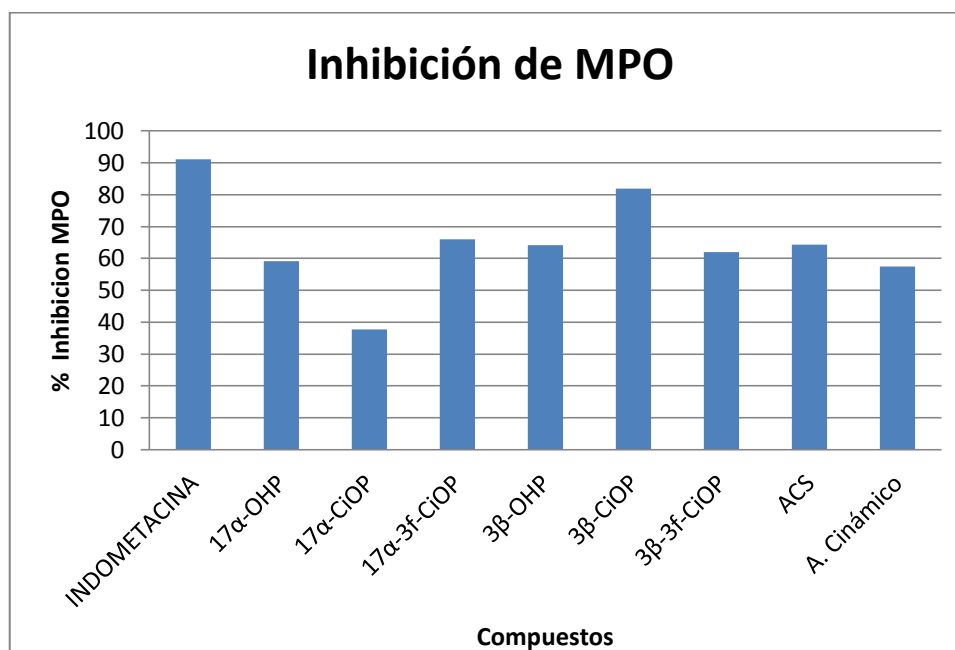
El edema es producto de la infiltración de líquido debido a la vasodilatación que se origina para permitir el ingreso de células del sistema inmune para restaurar daño tisular.



Se observa que nuevamente el compuesto  $17\alpha$ -CiOP es el compuesto más activo, esto implica que no solo es un adyuvante en el tratamiento contra el cáncer, sino también un agente preventivo e inmunomodulador de la inflamación que como ya se sabe puede ser un factor procarcinogénico,

De igual forma que en la relación de citotoxicidad se puede observar que en la posición 17 el efecto disminuye al estar presente un átomo electroattractor en *meta* y por el contrario para posición 3 la actividad antiinflamatoria aumenta con el halógeno, esto puede implicar que el mecanismo de acoplamiento tanto para toxicidad como para inflamación es el mismo.

El ACS por otro lado permite un efecto antiinflamatorio no observado en el ácido cinámico, al ser derivado del ácido salicílico, es posible que esta subunidad añadida le haya conferido actividad antiinflamatoria cuyo mecanismo puede estar ligado a la interacción con la COX -1 y COX-2 con el residuo de serina, esto por la adición de la porción de ácido salicílico.



Gráfica 9. Inhibición de la enzima Mieloperoxidaza (MPO) como indicador de migración de células (neutrófilos). Siendo la indometacina un control positivo.

En esta tabla es posible comparar el efecto inhibitorio de los compuestos en la migración e infiltración celular de neutrófilos del sitio de inflamación (inducido por TPA), en comparación con la indometacina, como se observa todos los compuestos esteroidales tienen una propiedad inmunomoduladora primaria (a excepción de  $17\alpha$ -CiOP) siendo el compuesto más





activo 3 $\beta$ -CiOP y además se puede apreciar que contrario a los análisis anteriores que el cinamoilo con flúor en el anillo aromático en la posición 3 del esteroide, provoca un decremento en la actividad biológica y esto mismo en la posición C17 la aumenta, esto puede indicar que el sitio de acoplamiento y las interacciones por las cuales modula estas respuestas es distinto, ya que la hibridación en C3 se ve favorecida en la respuesta.

El efecto inhibitorio de la infiltración celular teniendo como marcador la MPO de estos compuestos, puede deberse a su interacción con el receptor en células endoteliales y macrófagos ya que puede estar modificando las vías de síntesis de proteínas que por quimiotáxis guían al neutrófilo rico en MPO durante daño tisular. La acción de 3 $\beta$ -CiOP parece ser modulador de la inflamación primaria.

### Análisis de parámetros fisicoquímicos

	Volumen	Area	Ovalidad	Log P
17 $\alpha$ -CiOP	476,54	489,47	1,59	6,49
17 $\alpha$ -3f-CiOP	489,37	486,39	1,62	6,63
3 $\beta$ -CiOP	494,37	482,54	1,63	6,65
3 $\beta$ -3f-CiOP	494,29	492,55	1,63	6,79

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las moléculas finales obtenido con el software Spartan 8 por el método semiempírico.

Se puede observar que la actividad de las moléculas análogas e híbridas no guardan una relación con el Log P y la actividad biológica sin embargo podemos observar que la molécula 17 $\alpha$ -CiOP que es el compuesto que presentó mayor actividad biológica tiene un Log P menor que los otros compuestos lo que puede indicar que atravieza de manera más fácil la membrana lipídica (los otros compuestos pueden ser sensibles a quedarse embebidos en ella). Esta molécula también presenta el valor más alto en área y el más pequeño en volumen y ovalidad, implicando esto que dentro del receptor el acomodo estructural que presenta esta molécula parece ser el más adecuado, para interaccionar de manera efectiva con los aminoácidos presentes.

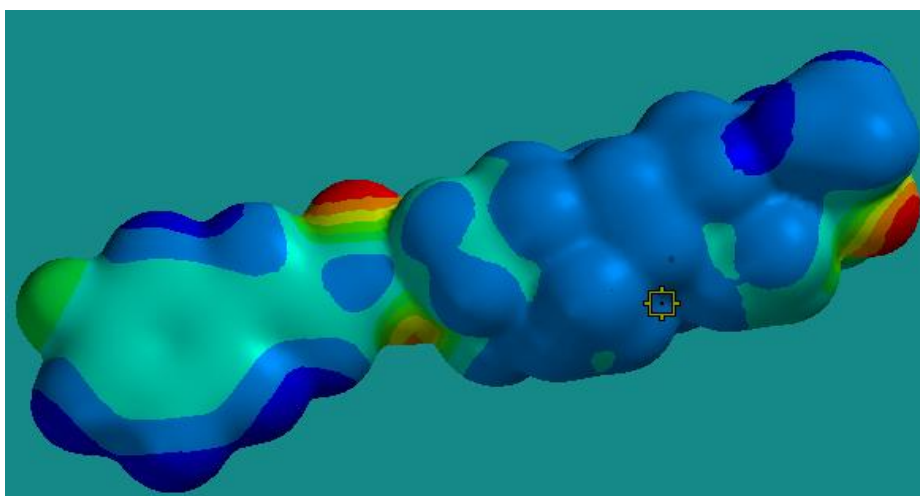
Para el caso de 3 $\beta$ -3f-CiOP, se presentan los valores más altos para volumen, Log P y ovalidad, de acuerdo a esto y sus efectos biológicos podemos inferir que la posición C3 con estos grupos funcionales no presenta un acomodo estructural adecuado para el efecto biológico deseado, y los hacen susceptibles a quedarse en membranas lipídicas



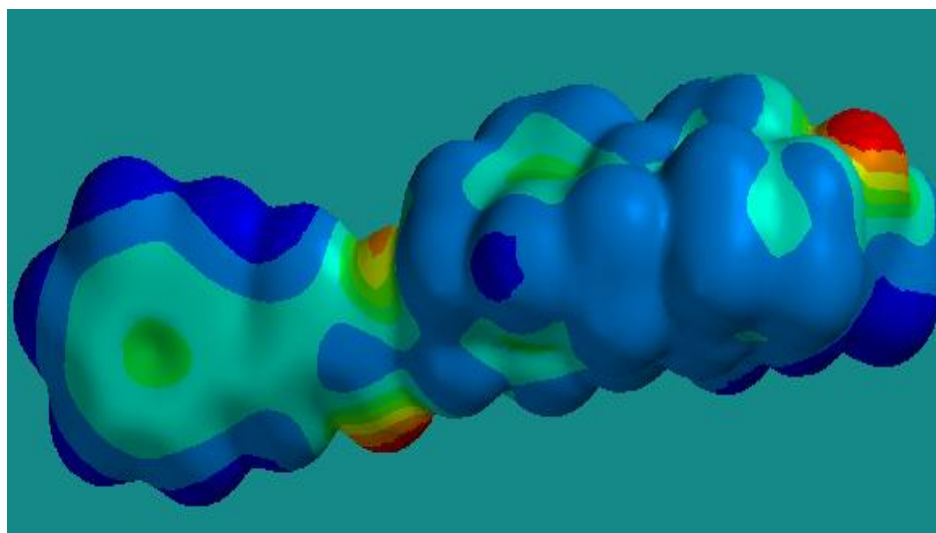
Los datos obtenidos con el análisis estructural de los compuestos permiten que mas adelante se pueda realizar una evaluación farmacodinamia en cuanto al acoplamiento al receptor se refiere pero para ello los estudios deberán ser dirigidos a una diana hipotética.

### Análisis de PME (Mapa de potencial electrostático)

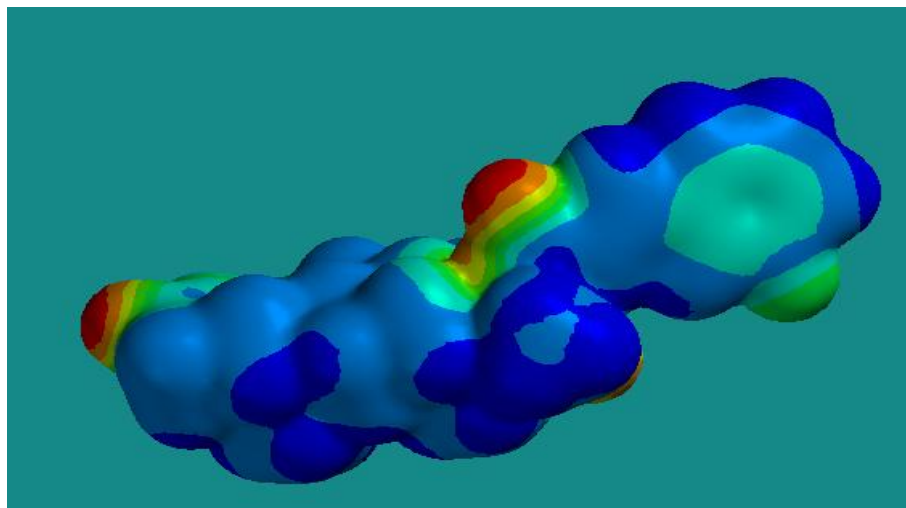
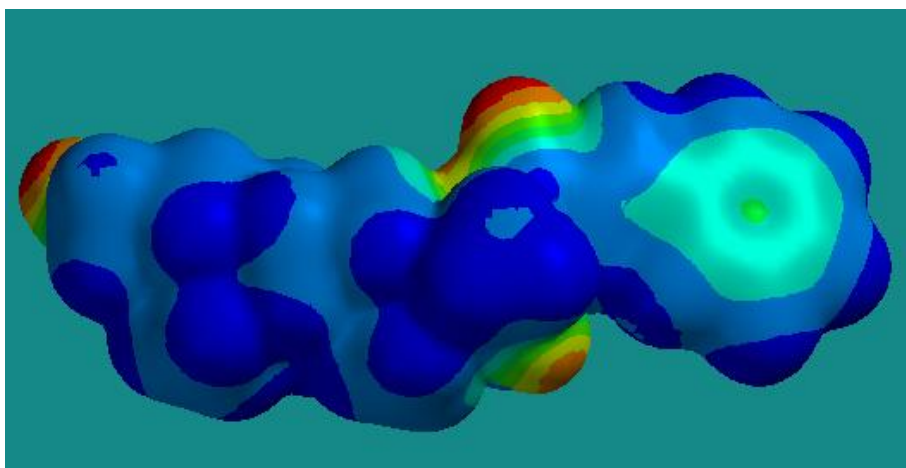
El mapa de potencial electrostático nos permite observar la manera en la que se encuentran distribuidos los electrones en una molécula, basándose para indicar esto en los colores del arcoíris siendo el color rojo la zona con mayor densidad electrónica y el azul la zona con menos electrones en el campo, los colores intermedios como verde o amarillo indican la presencia de nubes homogéneas de electrones es decir aquellas producidas por enlaces covalentes.



3β-3f-CiOP.



3β-CiOP

17 $\alpha$ -3f-CiOP17 $\alpha$ -3f-CiOP

Para los 3 $\beta$ -derivados de la pregnenolona, se observa primeramente una amplitud molecular mayor (más volumen) así como zonas de densidad electrónica baja (azul) y zonas de alta densidad (rojo) otorgada por los electrones del oxígeno, para los 17 $\alpha$ -cinamoiloxiderevados de la progesterona, las moléculas se encuentran más compactadas (oval) y las densidades electrónicas son mayores ya que hay más oxígenos cuyos electrones libres aumentan la densidad.

Para ambos casos es importante mencionar como se afectan las nubes electrónicas del anillo aromático con la presencia del flúor, la zona verde indica una densidad electrónica homogénea pero esto puede deberse a la desactivación del anillo generada por la sustracción de electrones por parte del fluor que es muy electroattractor.



## 9. CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis por radiación de microondas, purificación y optimización de  $17\alpha$ -cinamoiloxiprogesterona,  $17\alpha$ -3-fluorocinamoiloxiprogesterona,  $3\beta$ -cinamoiloxipregnenolona,  $3\beta$ -3-fluorocinamoiloxipregnenolona y ácido cinamoiloxisalicílico.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los compuestos obtenidos en un modelo *in vivo*, así como su actividad citotóxica por un método *in vitro*.

La síntesis por microondas es un método que permite realizar reacciones en menor tiempo, con mayor rendimiento y con un gasto menor de energía y de disolventes haciendo el proceso altamente sustentable.

La hibridación molecular e isosteria fueron las técnicas empleadas para este análisis en el nuevo diseño de moléculas con actividad biológica y se observaron variaciones importantes en el efecto producido por la estructura de estos compuestos.

Los derivados de cinamoilo en posición 17 resultaron tener mejor actividad biológica y esta se vio modificada por el grupo en *meta*. Lo que permite un posterior análisis para la realización de series derivadas de cinámicos en esta posición.

La adición de grupos voluminosos en C17 parece no presentar impedimento estérico para el efecto farmacológico.

El compuesto  $17\alpha$ -CiOP, es un buen candidato para análisis en un modelo *in vitro* como potencial agente terapéutico, para analizar de mejor manera su farmacodinamia.

De manera general los compuestos presentan propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (tanto en respuesta inflamatoria crónica y primaria) lo que los convierte en buenos quimiopreventivos y coadyuvantes en el tratamiento del cáncer.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

### 1. *Master en Química Sustentable de la Universidad de Zaragoza*

<http://ciencias.unizar.es/master/> 2009

2. al 4. Hayes B. *Microwave Synthesis, Chemistry at the speed of light*, CEM Publishing, 2002.

5. *OMS Cancer*, <http://www.who.int/topics/cancer/es/> 2012.

6. Strachan T., Read P., *Genética Humana*, Ed. Mc Graw Hill Interamericana Editores, 3ª Edición, 2007, Capítulo 3, Células y desarrollo.

7. y 8. *OMS*, [http:// who.int/research/es/Datos y estadísticas](http://who.int/research/es/Datos y estadísticas) 2012.

9. y 10. *INEGI*, <http://www.inegi.org.mx>. 2007.

11. Hudgson E., *A Text Book of modern toxicology* Wiley-Interscience Editors, 3<sup>rd</sup>. edition, E.U.A., 2005, Chapter 12, Chemical Carcinogenesis, p.128-133.

12. Kindt T., Goldsby R., *Inmunología de Kuby*, Ed.McGraw Hill Interamericana Editores, 6ª Edición, Mexico D.F., 2007, Capítulo 3, Inmunidad Innata, Inflamación p.345-358.

13. Ernest Hudgson Ph.D., *A Text Book of modern toxicology*, Wiley-Interscience Editors, 3<sup>rd</sup>. edition, 2005, Chapter 8. Reactive Metabolites.

14. Thapa D., Ghosh R., *Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: Challenges and opportunities*, Biochemical Pharmacology, Vol. 83, 2012.

15. Bhooshan K., Ibrahim P., *Polyphenols as a dietary antioxidants in human health and disease*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Vol.270-278, December 2009.

16. Yen G., Chen Y., *A comparative study on the effectiveness of cis- and trans- form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells*, European Journal of Pharmaceutical Science, Vol.44, 2011.

17. Brozic P., Golob B., *Cinnamic acids as a new inhibitors of 17 $\beta$ -hidroxy steroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3)*, Molecular and Cellular Endocrinology, Vol. 248, 2008.

18. Patra K., Bose S., Muckherjee A., *Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid*, Chemico- Biological Interactions, Vol.195, 2012.

19. Kim E., Min K, *Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw macrophages*, Food and Chemical Toxicology, Vol. 50, 2012.



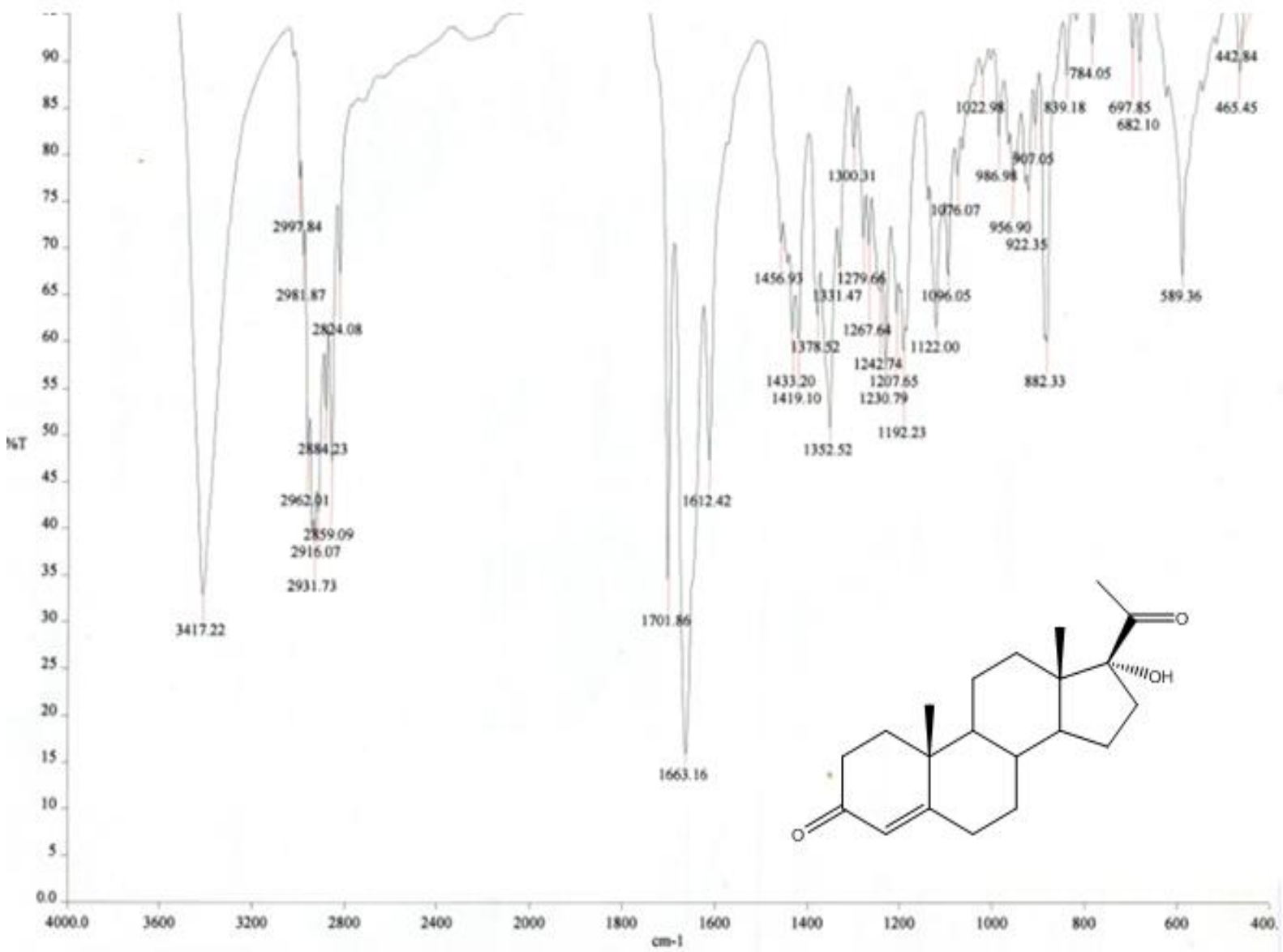
20. Qian Y., Zhang H., Zhang H., ***Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of cinnamic acid metronidazole ester derivatives as a novel anticancer agents***, Bioorganic and Medicinal Chemistry, Vol.18, 2010.
21. Guyton Hall, ***Tratado de Fisiología Médica***, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, 10<sup>a</sup> Edición, Unidad XIV, Endocrinología y reproducción, 2008.
22. Jacobsen B., Horwitz K., ***Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulates transcription***, Molecular and Cellular Endocrinology Vol.24, 2011.
23. Choudhary I., Alam S., Ur-Raham A., ***Pregnenolone derivatives as potencial anticancer agents***, Steroids 76, 2011.
24. Nogrady T., Waver D., ***Medicinal Chemistry, A molecular and Biochemical Approach***, Editorial Oxford University Press, 3<sup>rd</sup> Edition, EUA, 2005, Chapter 1 General Molecular Principles of Drug Design.
25. J.P. Wibe, M.J. Lewis, ***The role of progesterone metabolites in breast cáncer. Potencial for new diagnosis and therapeutics***, Journal of Steroid Biochemistry, Vol.93, 2008.



# ANEXOS



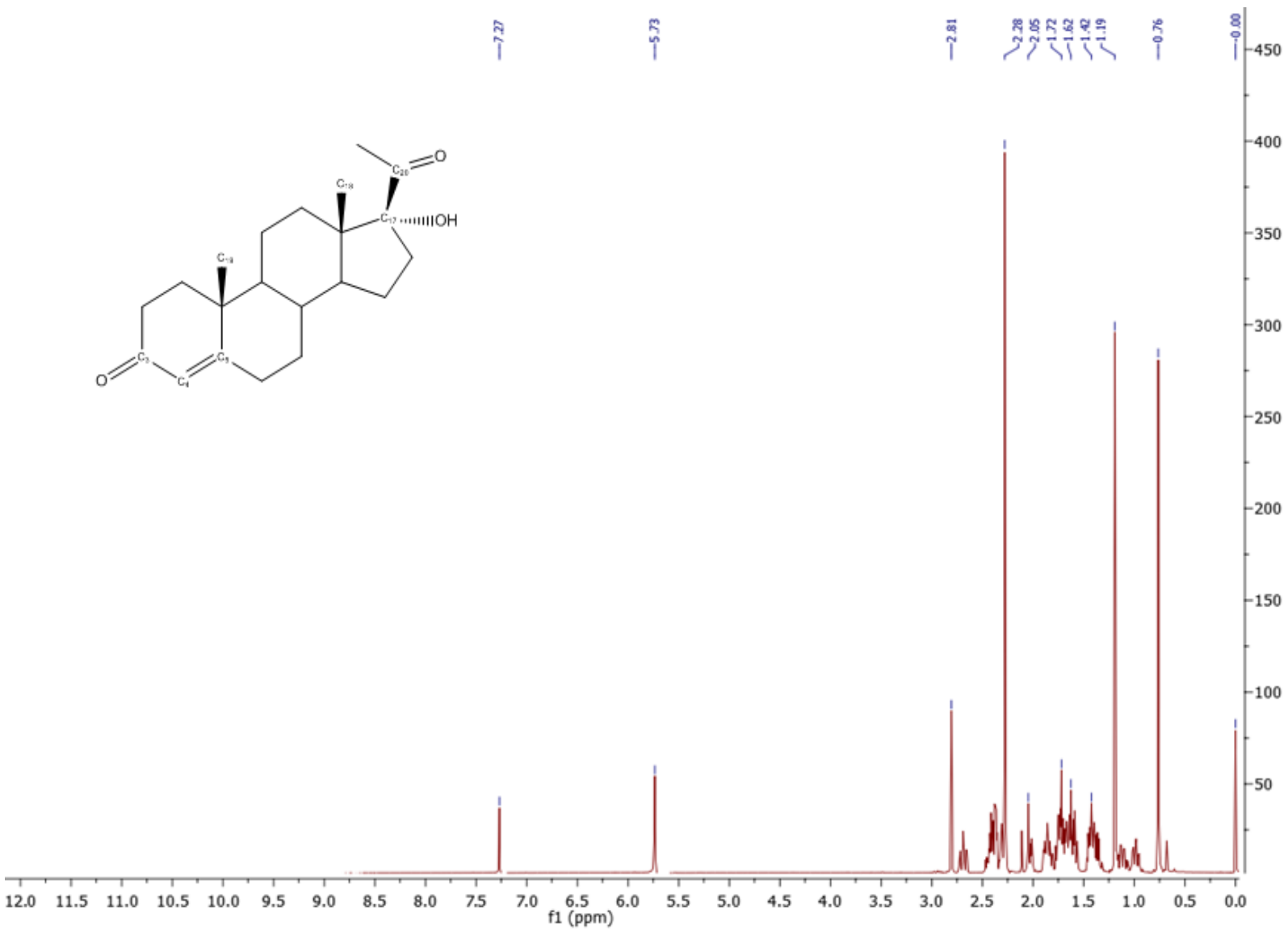
ANEXO 1. Espectro IR del compuesto 17 $\alpha$ -OHP.





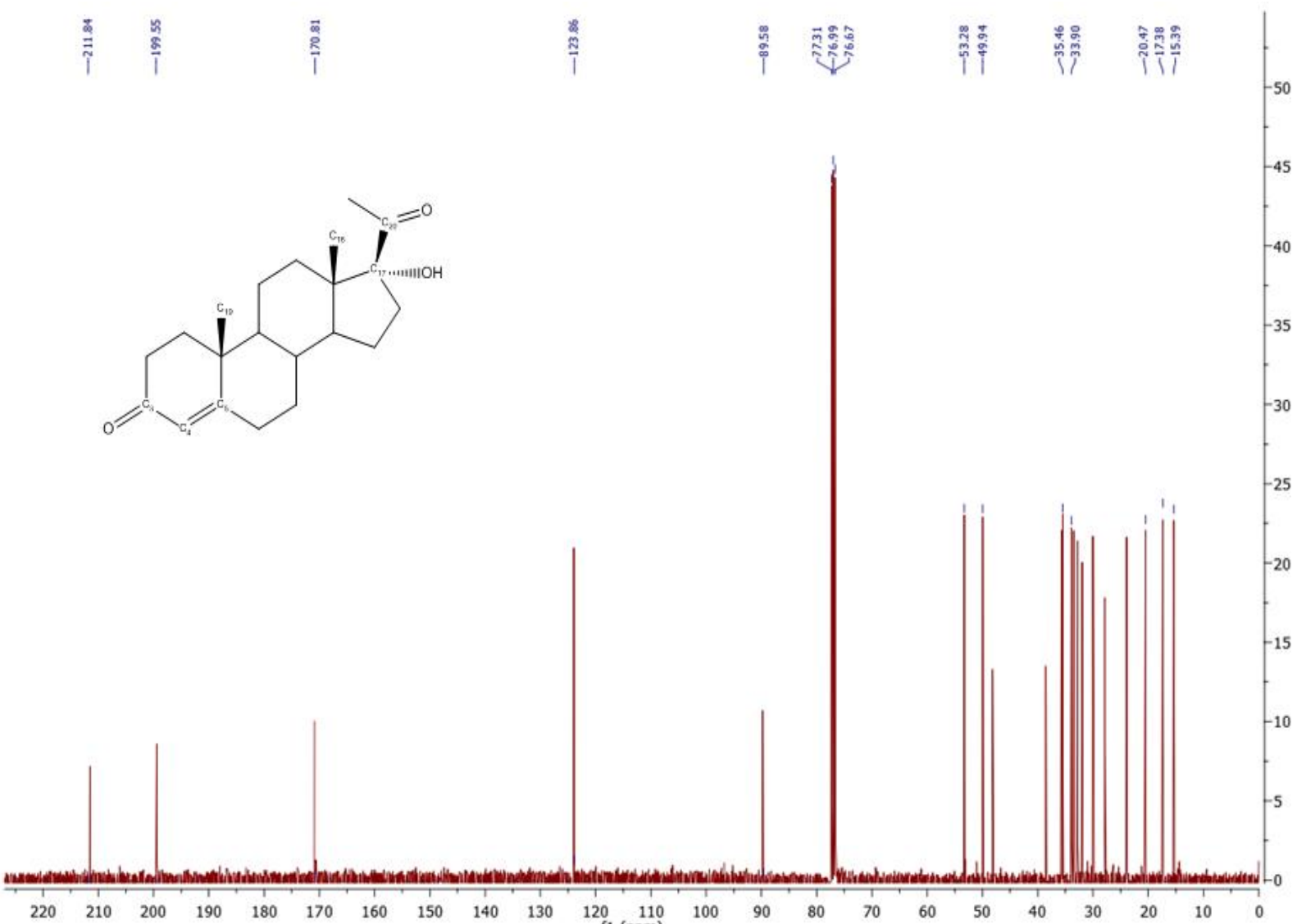


ANEXO 2. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 17α-OHP.



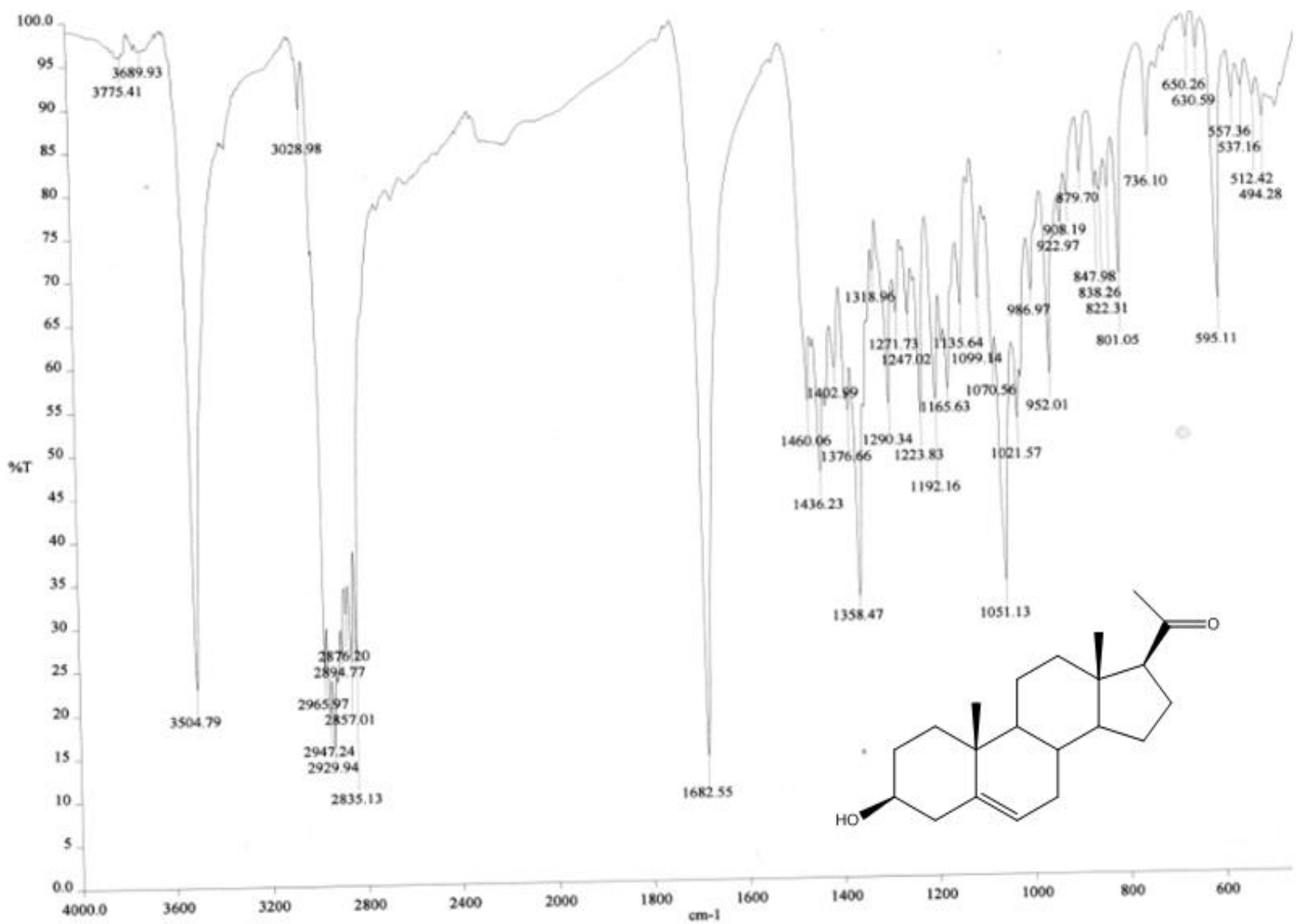


ANEXO 3. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 17α-OHP.



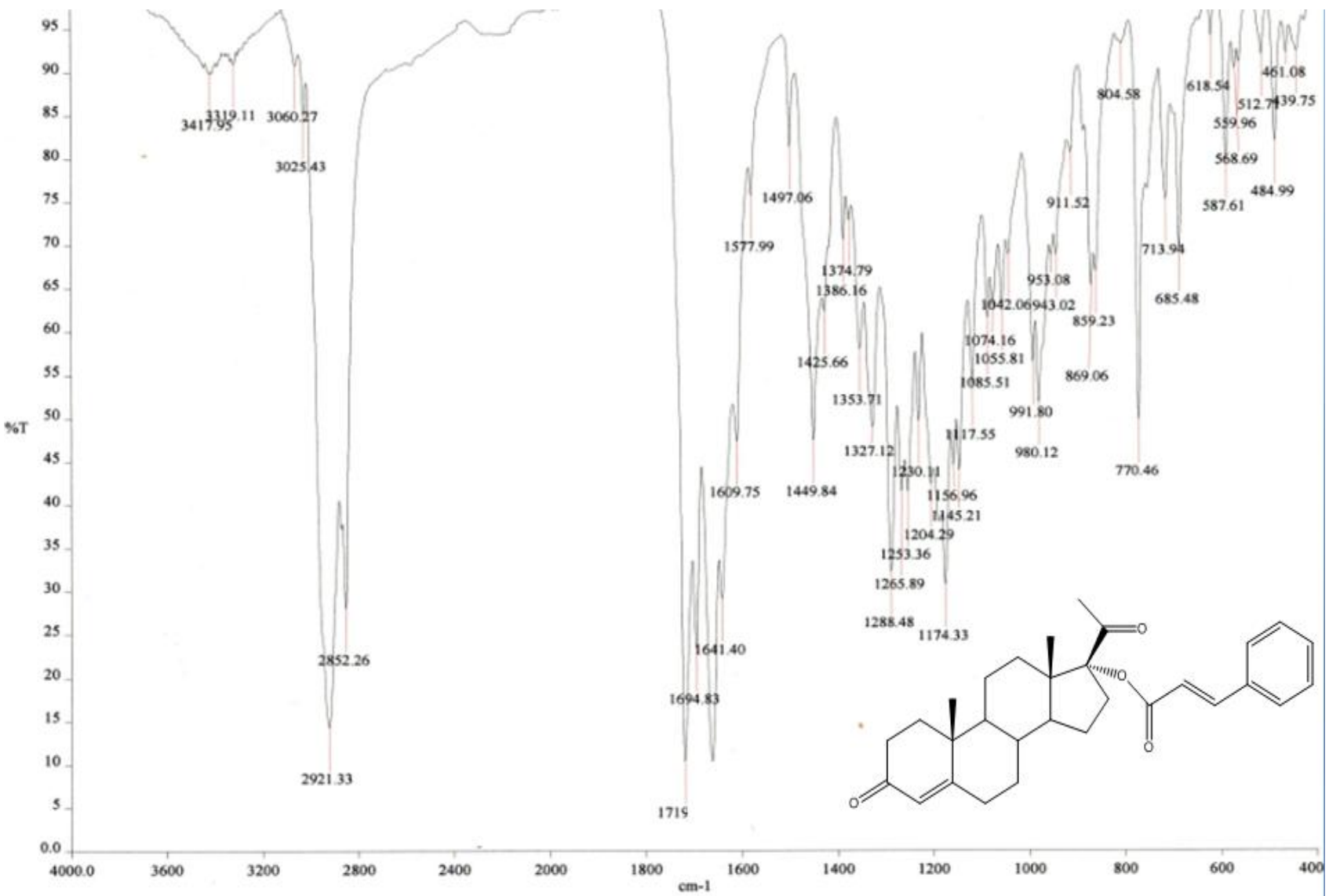


ANEXO 4. Espectro IR del compuesto 3 $\beta$ -OHP (Materia prima)



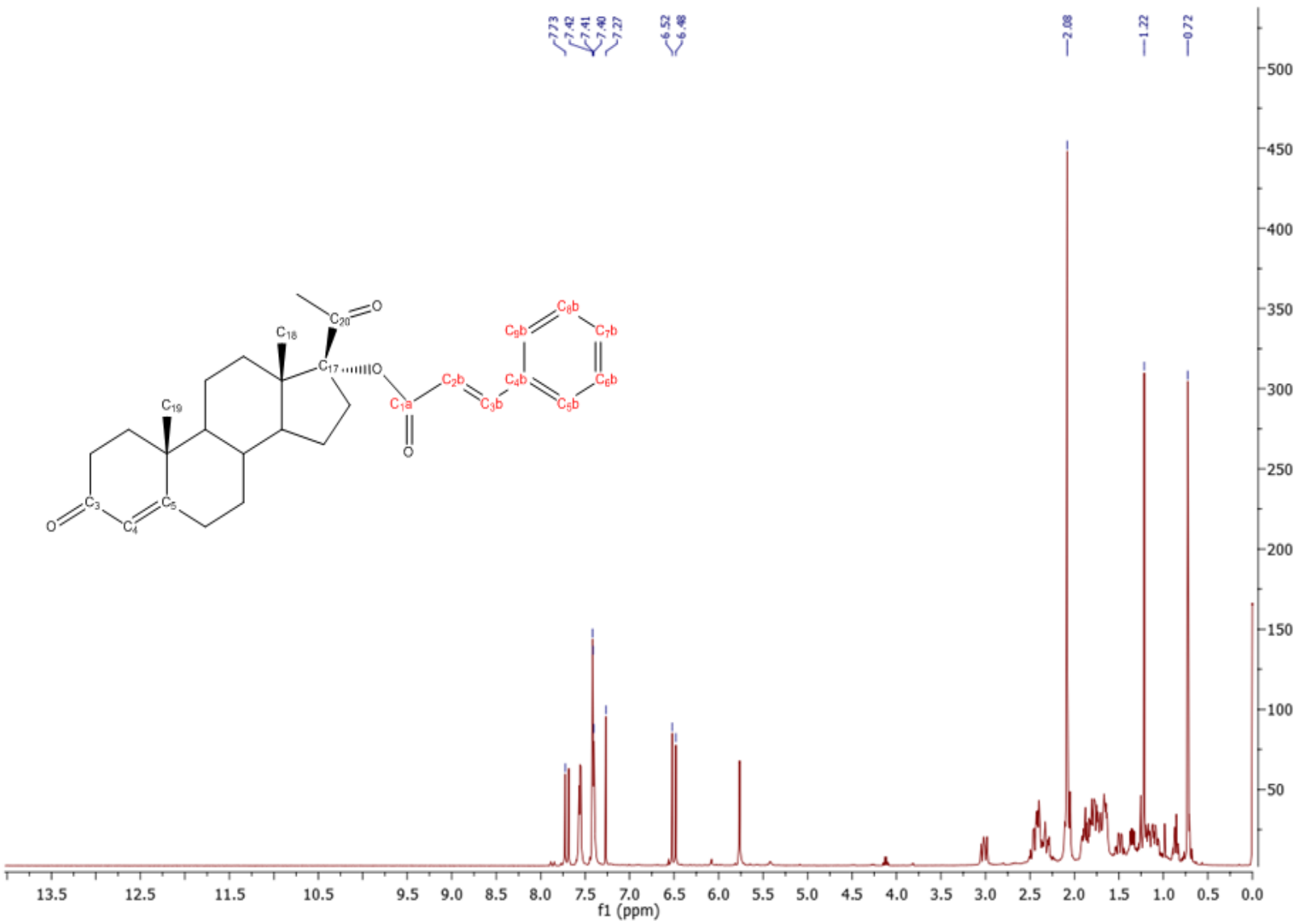


ANEXO 5. Espectro de IR del compuesto 17 $\alpha$ -CIOP.



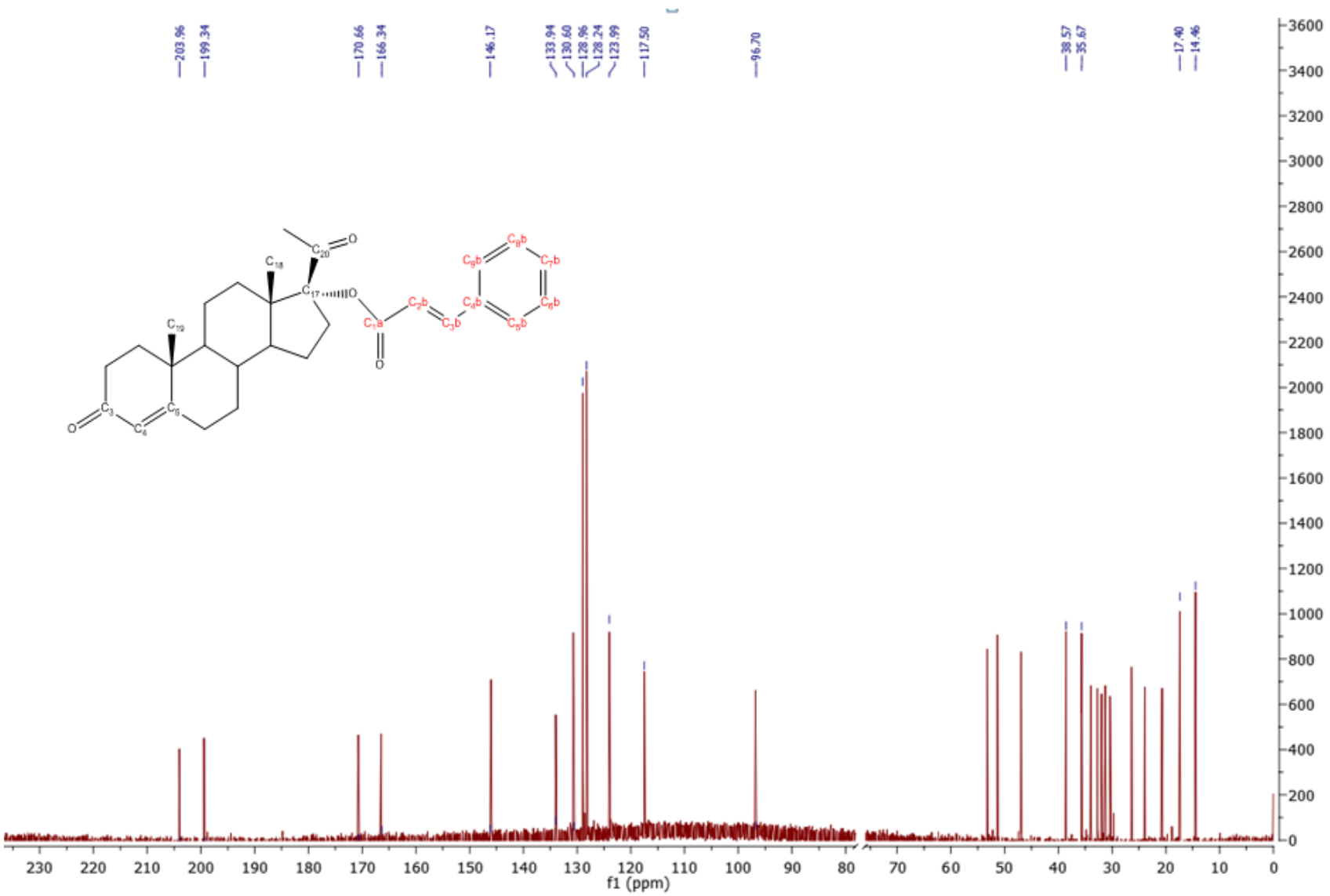


ANEXO 6. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 17α-CiOP.



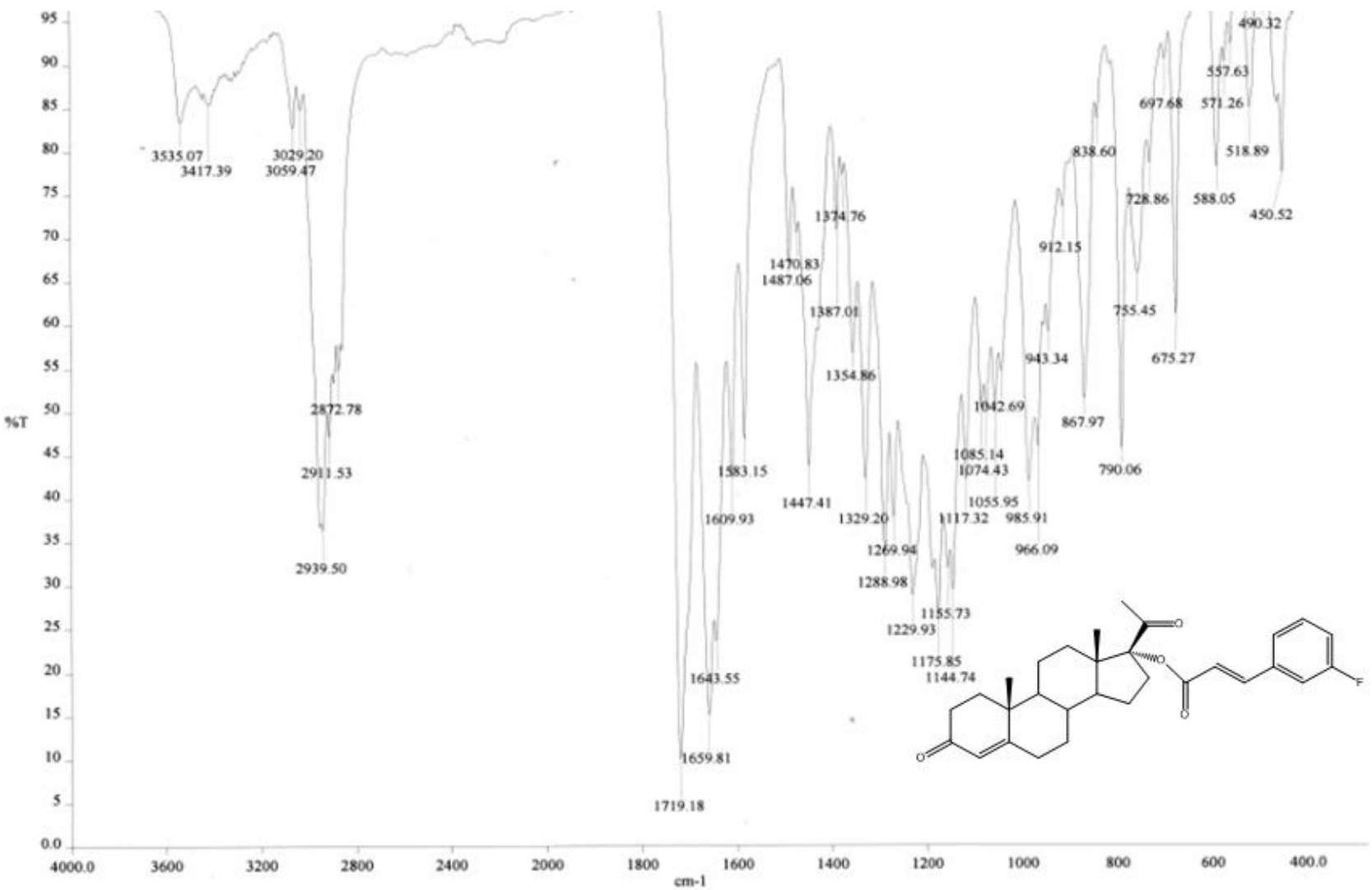


ANEXO 7. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 17 $\alpha$ -Cip



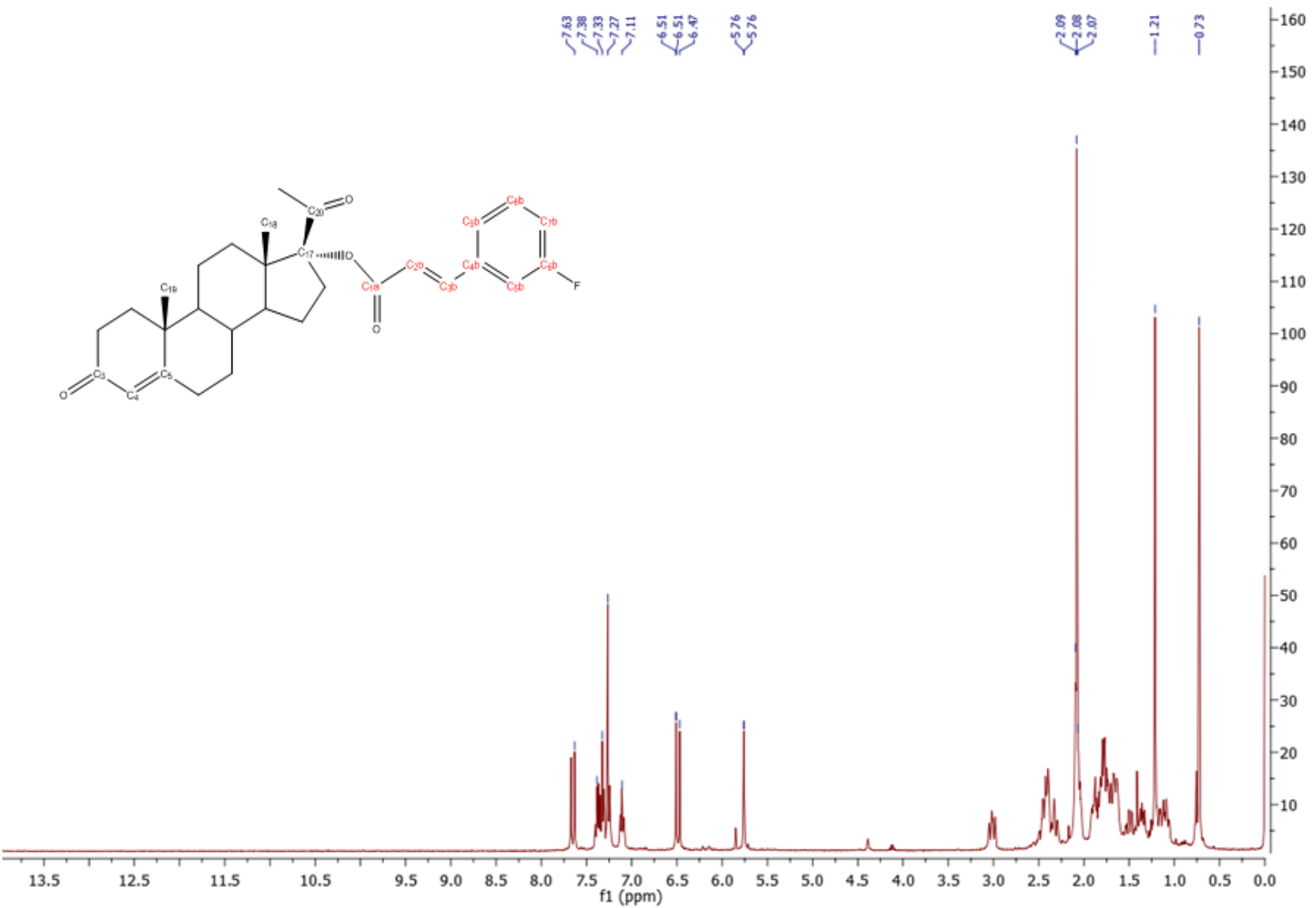


ANEXO 8. Espectro IR del compuesto 17 $\alpha$ -3f-CiOP.





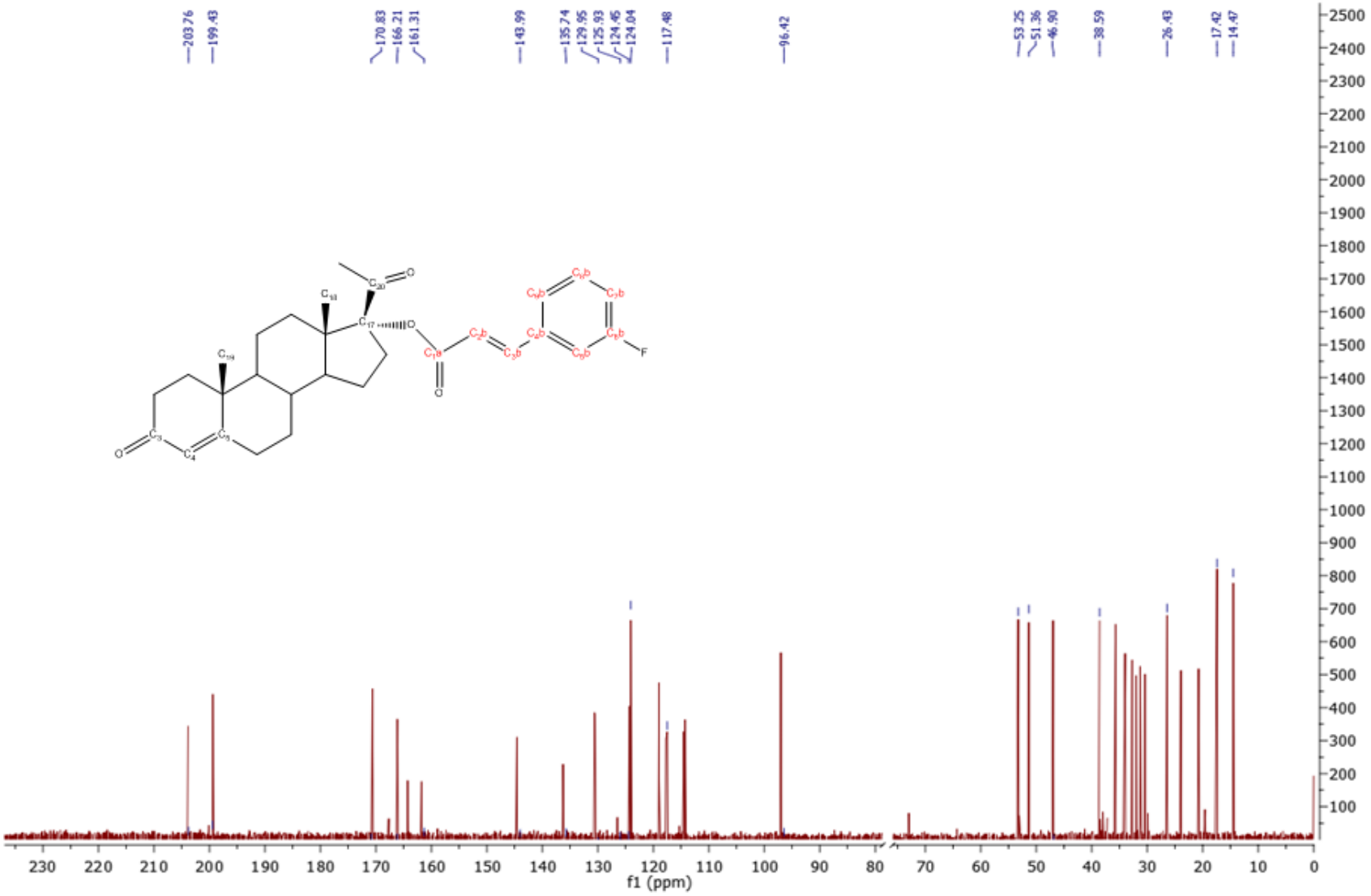
Anexo 9. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 17α-3f-CiOP.





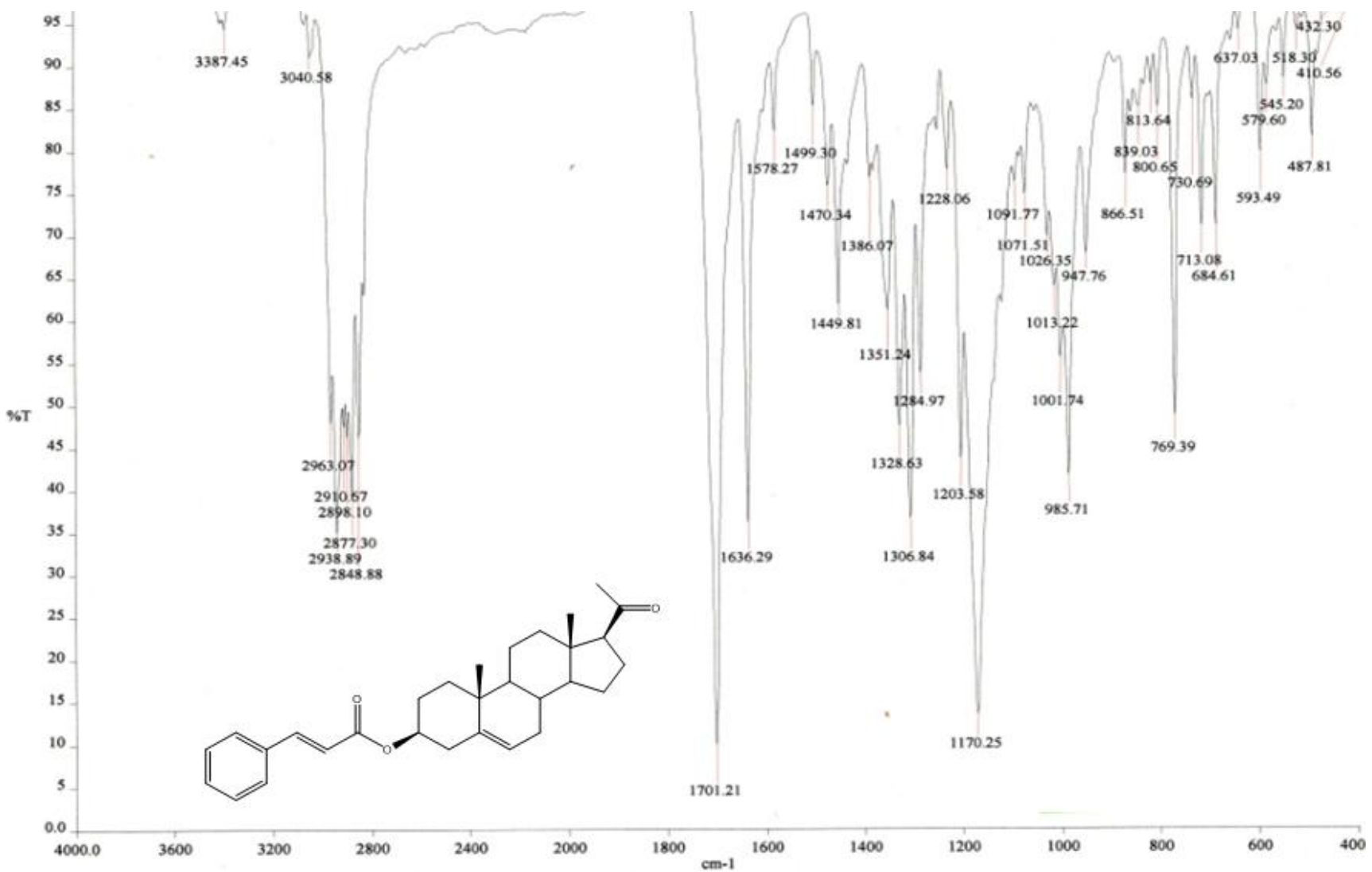


ANEXO 10. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 17α-3f-C10P.



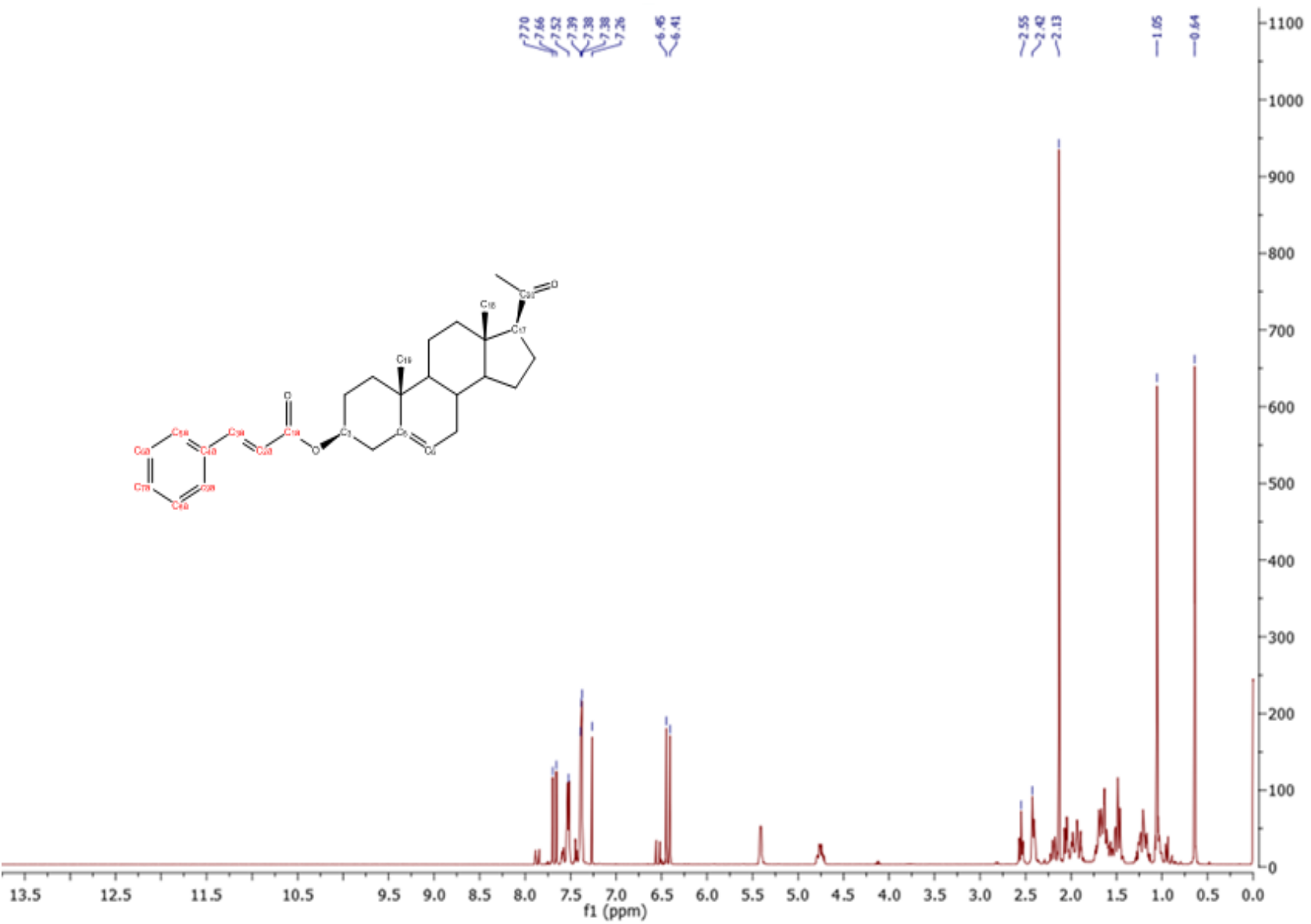


ANEXO 11. Espectro de IR del compuesto 3β-CiOP.



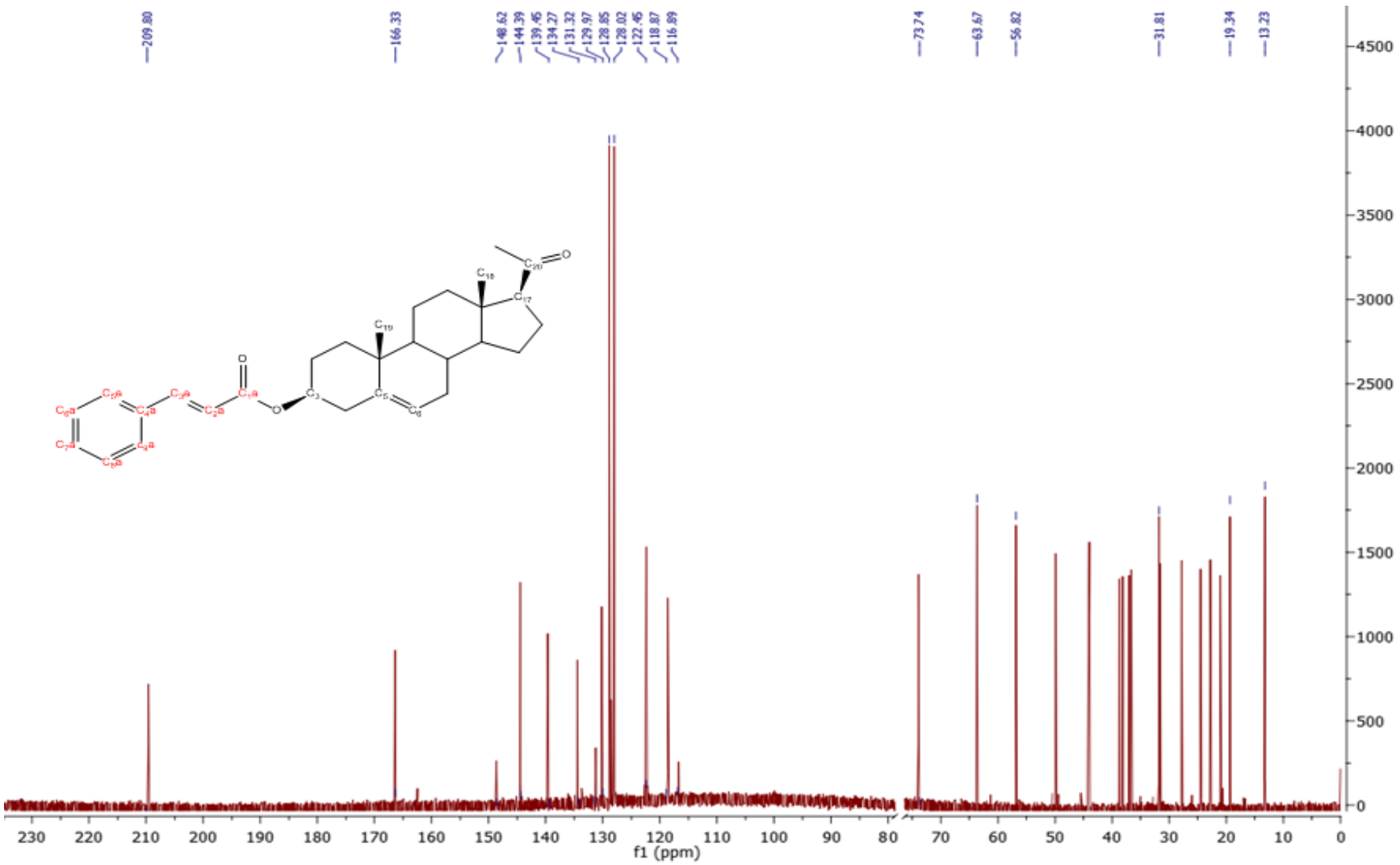


ANEXO 12. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 3β-C10P.



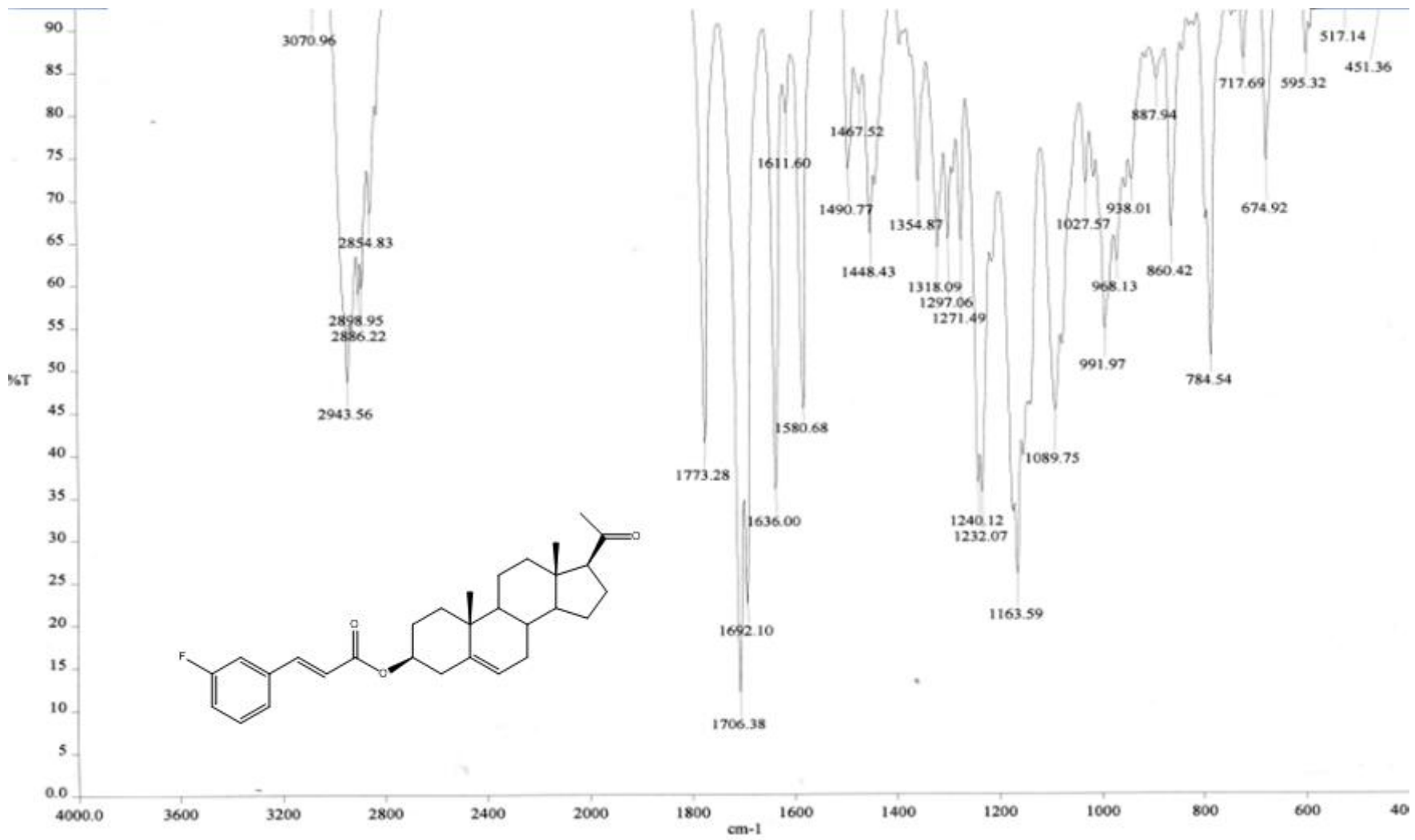


ANEXO 13. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 3β-CiOP.



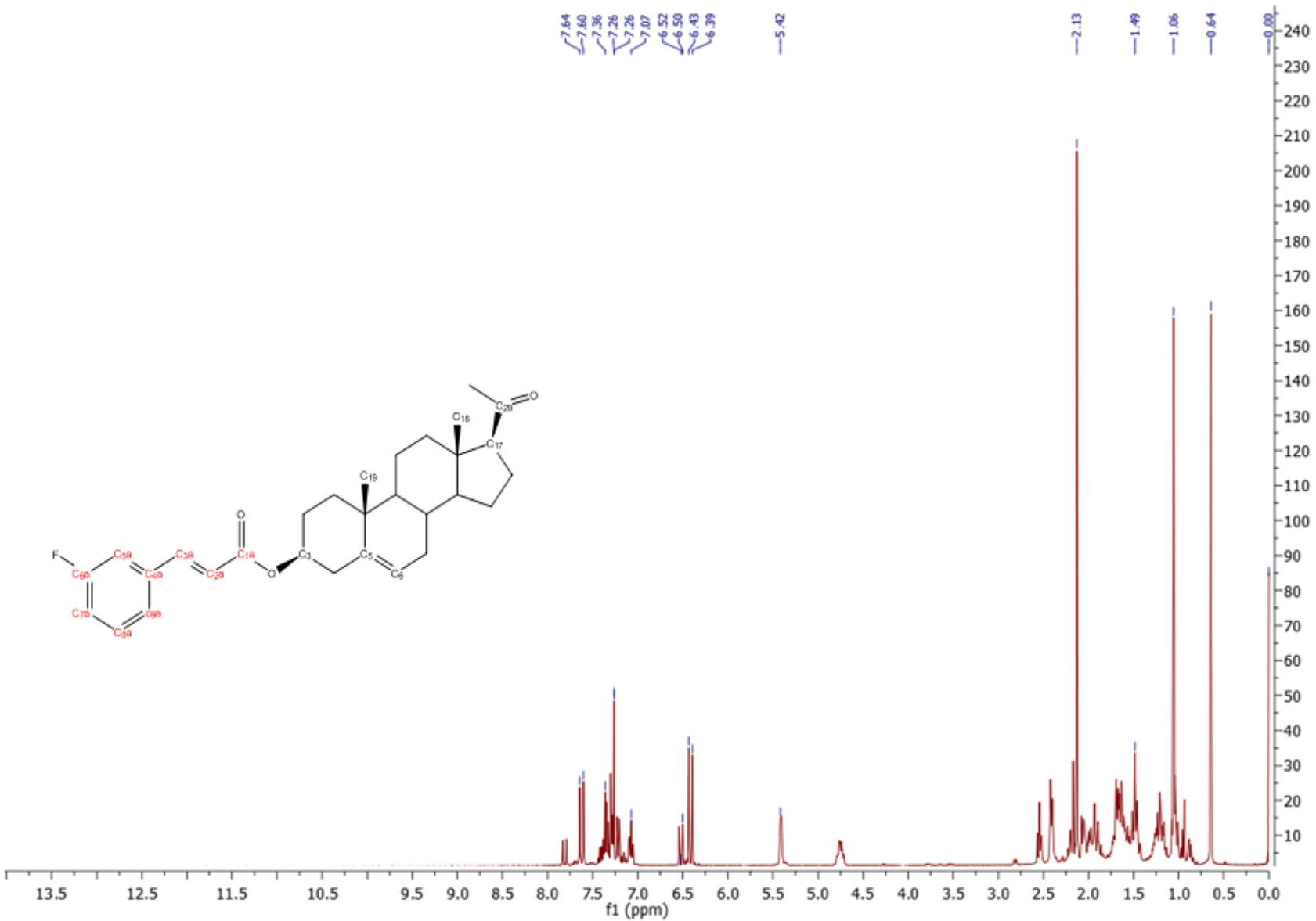


ANEXO 14. Espectro de IR del compuesto 3β-3f-CiOP.



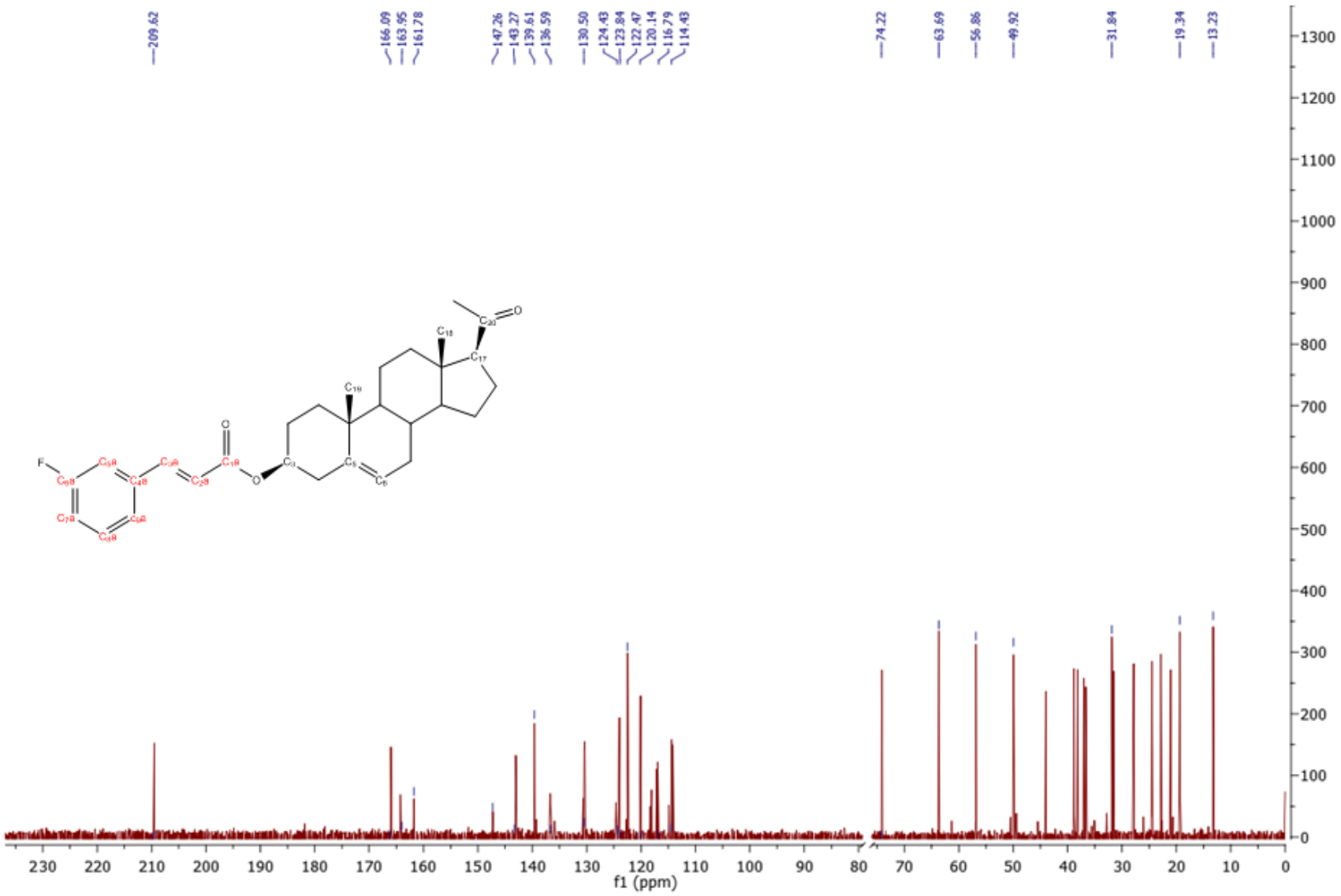


ANEXO 15. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 3β-3f-C10P.



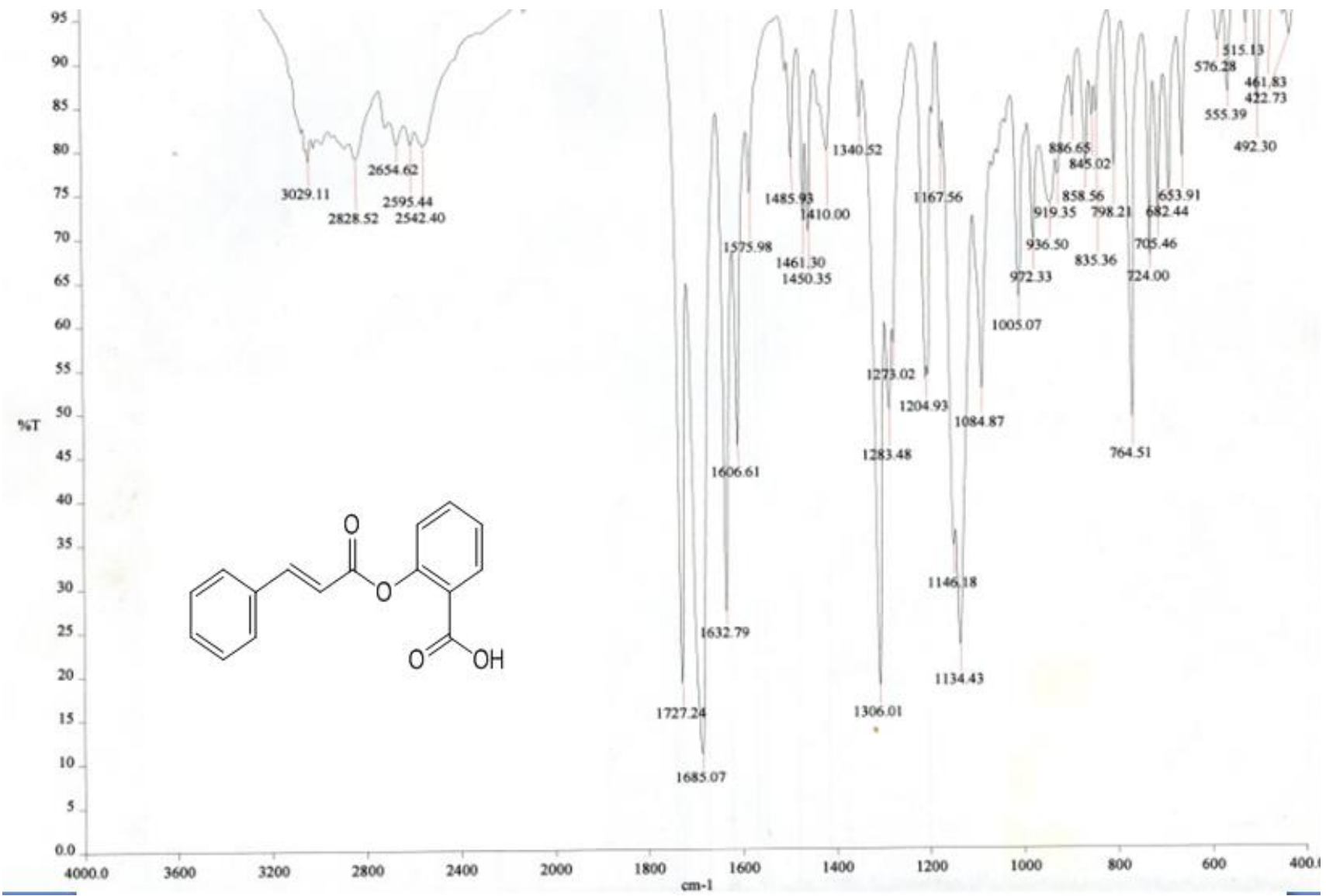


ANEXO 16. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto 3β-3f-CiOP.





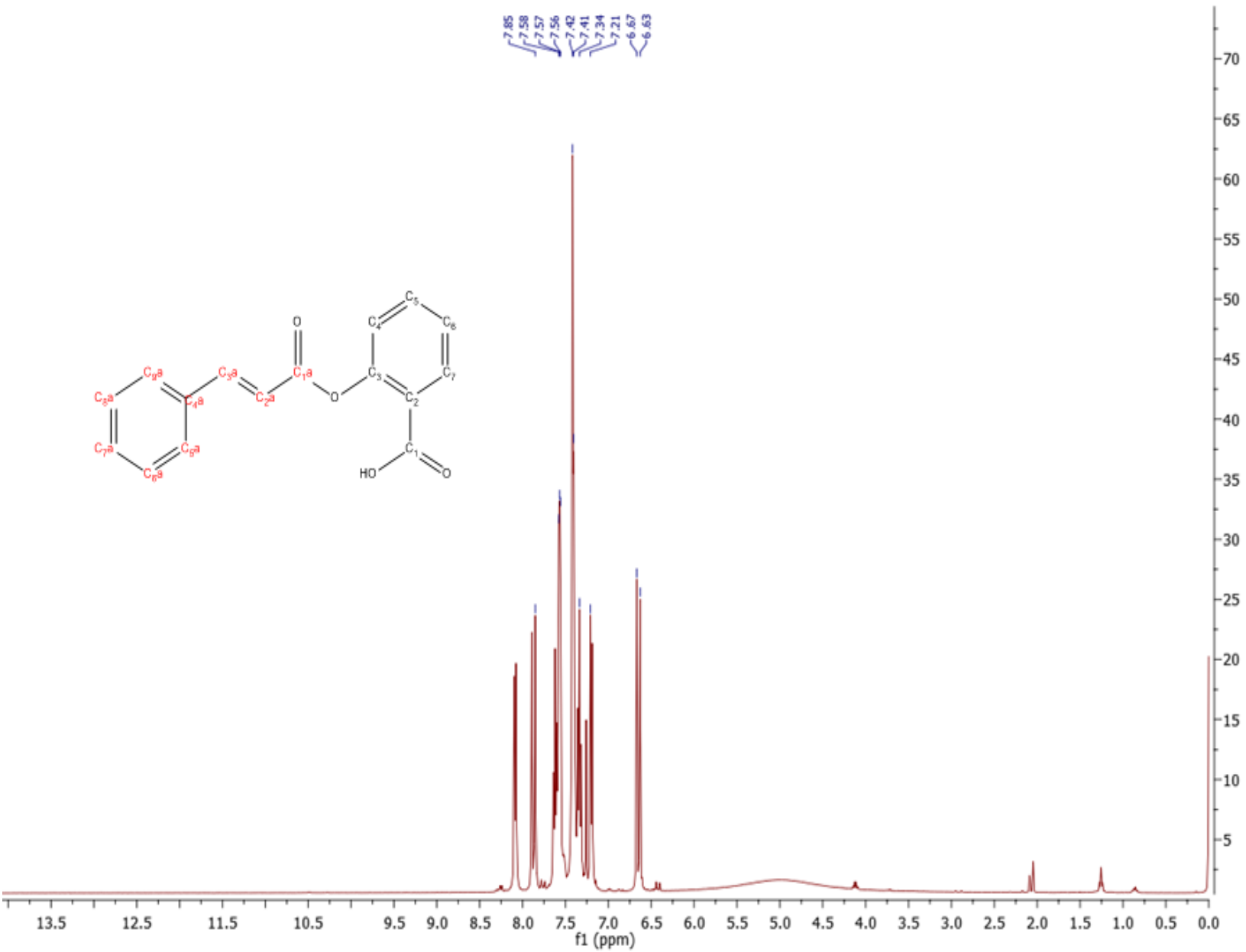
ANEXO 17. Espectro de IR del compuesto Acido cinamoiloxisalicílico.





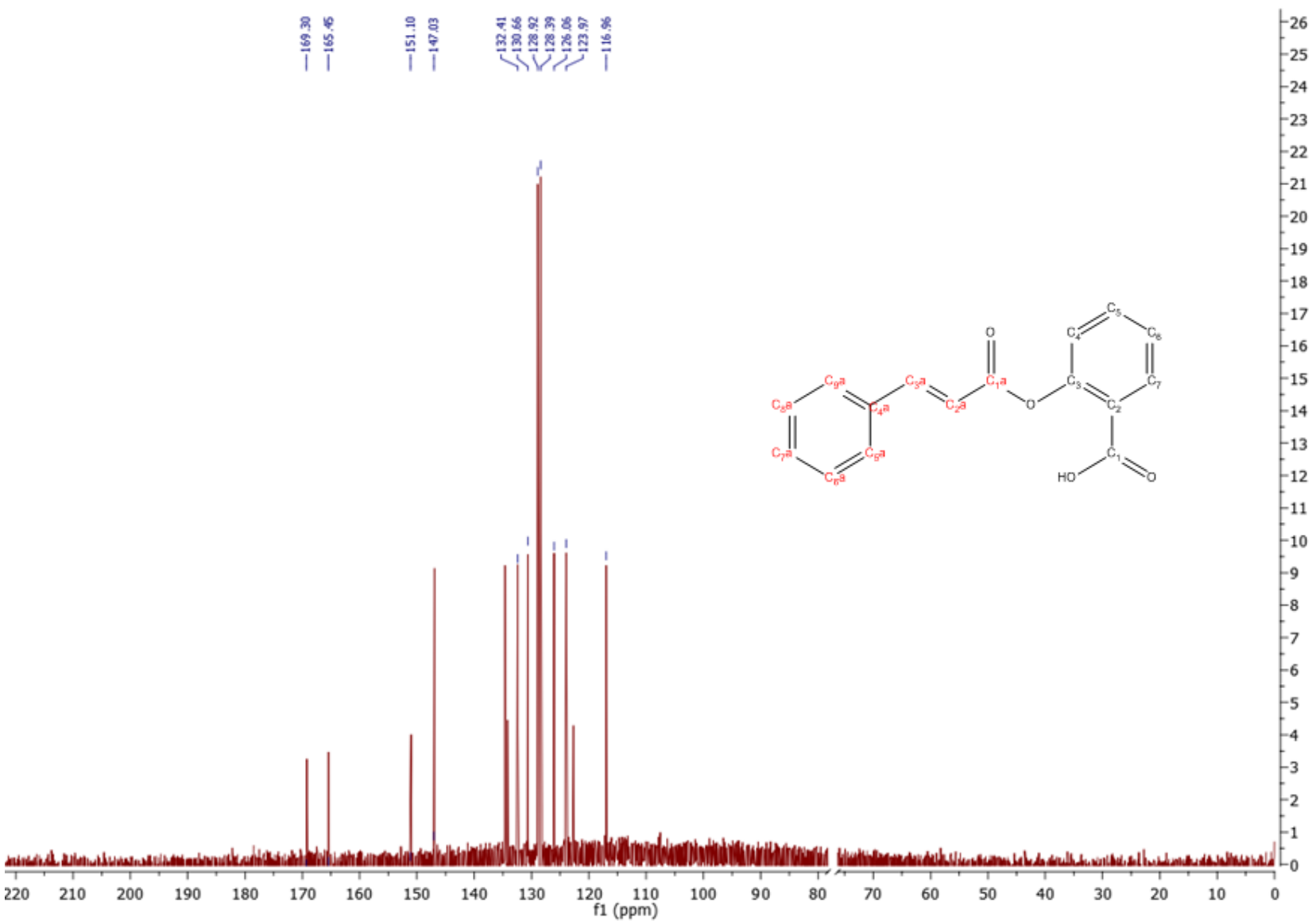


ANEXO 18. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto Acido cinamoiloxisalicílico.





ANEXO 19. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto Acido cinamoiloxisalicílico.





## ANEXO 20. Los 12 puntos de la química sustentable.

1. Es mejor prevenir la formación de residuos que tratar de limpiar tras su formación.
2. Los métodos sintéticos deben ser diseñados para conseguir la máxima incorporación en el producto final de todas las materias usadas en el proceso.
3. En cuanto posible, se deben diseñar metodologías sintéticas para el uso y la generación de sustancias con escasa toxicidad humana y ambiental.
4. Se deben diseñar productos químicos que, preservando la eficacia de su función, presenten una toxicidad escasa.
5. Las sustancias auxiliares (disolventes, agentes de separación, etc.) deben resultar innecesarias en lo posible y, cuanto menos deben ser inocuas.
6. Las necesidades energéticas deben ser consideradas en relación a sus impactos ambientales y económicos. Los métodos sintéticos deben ser llevados a temperatura y presión ambiente.
7. Las materias de partida deben ser renovables y no extinguidas, en la medida que esto resulte practicable técnica y económicamente.
8. La formación innecesaria de derivados (bloqueo de grupos, protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos) debe ser evitada en cuanto sea posible.
9. Los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a los estequiométricos.
10. Los productos químicos han de ser diseñados de manera que, al final de su función, no persistan en el ambiente, sino que se fragmenten en productos de degradación inerte.
11. Se deben desarrollar las metodologías analíticas que permitan el monitoreo a tiempo real durante el proceso y el control previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. Las sustancias y las formas de su uso en un proceso químico, deben ser elegidas de manera que resulte mínima la posibilidad de accidentes.