



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

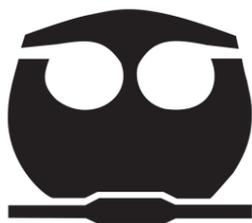
**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DERIVADOS
TETRACÍCLICOS DE LA ARGENTATINA B.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JOSÉ ALFREDO TORRES RODRÍGUEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

VOCAL: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

SECRETARIO: Dr. Mariano Martínez Vázquez

1er. SUPLENTE: Dra. María Eva González Trujano

2º SUPLENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 1-4 DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

SUSTENTANTE:

JOSÉ ALFREDO TORRES RODRÍGUEZ

CONTENIDO

ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Cáncer.....	11
2.1.1. Definición.	11
2.1.2. Cáncer como problema de salud pública.	12
2.1.3. Tratamiento del cáncer.....	13
2.2. Inflamación	21
2.2.1. Definición.	21
2.2.2. Inflamación aguda e inflamación crónica.....	21
2.2.3. Relación cáncer-inflamación.	22
2.3. Terpenos.....	24
2.3.1. Definición.	24
2.3.2. Biogénesis	25
2.3.3. Clasificación	25
2.3.3. Triterpenos	26
2.4. <i>Parthenium argentatum</i>	30
2.4.1. Estudios previos de actividad biológica	33
2.5. Métodos para la evaluación de la actividad biológica.	33
2.5.1. Ensayo de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares de cáncer humano	33
2.5.2. Ensayo para evaluar la actividad antiinflamatoria.....	34
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo principal.	37
4.1.1. Objetivos particulares.	37
V. PARTE EXPERIMENTAL	38

5.1. Procedimientos Químicos Generales.....	38
5.2. Resina	39
5.3. Transformaciones químicas de la argentatina B	40
5.3.1. Obtención de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2) y del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).....	40
5.4. Evaluación de la actividad biológica	42
5.4.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) in vitro. 42	
5.4.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA. ...	44
VI. DISCUSIÓN	47
6.1. Aislamiento de la 16,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (1) (argentatina B).....	48
6.2. Obtención de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).....	49
6.3. Obtención del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).....	55
6.4. Actividad biológica.....	60
6.4.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de la sulforrodamina B (SRB) in vitro.	60
6.4.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.	61
VII. CONCLUSIONES.....	62
VIII. REFERENCIAS	63
IX. APÉNDICE	69
9.1. Espectro de RMN ¹ H de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).	69
9.2. Espectro de RMN ¹³ C de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).	70
9.3. Espectro Dept135 de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).	71
9.4. Espectro HMBC de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).	72
9.5. Espectro de RMN ¹ H del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).	73
9.6. Espectro de RMN ¹³ C del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).	74

9.7. Espectro Dept135 del $3\alpha,16\beta$ -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (3).....	75
9.8. Espectro HMBC del $3\alpha,16\beta$ -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (3).....	76

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
C ₆ D ₆	Benceno deuterado
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EM	Espectrometría de masas
EM-IE	Espectrometría de masas-Impacto Electrónico
eV	Electron-Volts
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
INC	Instituto Nacional del Cáncer
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IR	Infrarrojo
m	multiplete
M ⁺	Ion molecular
mL	Mililitro
m/z	Masa sobre carga
MHz	Megahertz
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Singulete
SBF	Suero Bovino Fetal
TPA	13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol
t	triplete
δ	Desplazamiento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1. Flores de <i>Catharanthus roseus</i> y estructuras químicas de la Vincristina y la Vinblastina.....	17
Figura No. 2. <i>Podophyllum peltatum</i> y estructuras químicas del etopósido y teniopósido.....	18
Figura No. 3. <i>Taxus brevifolia</i> y estructura química del taxol.	19
Figura No. 4. <i>Camptotheca acuminata</i> y estructuras químicas de la camptotecina, topotecán e irinotecán.	20
Figura No. 5. Unidades de los terpenos.....	25
Figura No. 6. Síntesis de terpenos.	27
Figura No. 7. Biosíntesis de esteroides.	28
Figura No. 8. <i>Parthenium argentatum</i> Gray.	30
Figura No. 9. Estructura química de algunos compuestos presentes en la resina obtenida a partir de <i>P. argentatum</i>	32
Figura No. 10. Obtención de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2) y del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (3).	40
Figura No. 11. Mecanismo de apertura de un ciclopropano.....	47
Figura No. 12. Estructura química de la argentatina B (1).	49
Figura No. 13. Estructura química de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).	50
Figura No. 14. Patrón de fragmentación para la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).	51
Figura No. 15. Principales interacciones en el experimento HMBC de 2	51
Figura No. 16. Posible mecanismo de reacción de la argentatina B con BF ₃ para la obtención de 2	53
Figura No. 17. Reacción del acetato de argentatina B con BF ₃	54
Figura No. 18. Estereoestructura de la mezcla binaria de 2 y 4 obtenida por medio de un estudio de difracción de rayos X.	54
Figura No. 19. Estructura química del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (3).	56
Figura No. 20. Principales fragmentos del espectro de masas de 3 . ..	57
Figura No. 21. Principales interacciones HMBC para 3	57
Figura No. 22. Posible mecanismo de reacción de la argentatina B con BF ₃ , para la obtención del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (3).	59
Figura No. 23. La formación del compuesto 2 precede a la formación del compuesto 3	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen.	15
Tabla 2. Principios antineoplásicos más importantes obtenidos a partir de especies vegetales.	20
Tabla 3. Clasificación general de los terpenos.	26
Tabla 4. Actividad antiproliferativa de 2	44
Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de 2	46
Tabla 6. Datos de RMN de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2). ..	52
Tabla 7. Datos de RMN del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).....	58

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y se prevé que las muertes por cáncer a nivel mundial seguirán en aumento.¹

Una de las principales estrategias para el tratamiento terapéutico o paliativo del cáncer lo constituye la quimioterapia. Aunque existen varios fármacos anticancerosos en la clínica, la poca selectividad de éstos así como el desarrollo de la resistencia de las células cancerosas a los diferentes fármacos hace imperiosa la necesidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer.

En éste contexto los productos naturales representan una alternativa, ya que son una fuente importante de sustancias anticancerosas, y es significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos de América aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural.²

México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética debido a su topografía y variaciones climáticas. Aprovechando esto, se han utilizado especies vegetales con fines terapéuticos, estableciendo una fuerte tradición, de tal forma que el uso de especies vegetales con fines terapéuticos constituye un rasgo cultural de la sociedad mexicana.³

Los triterpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y constituyen un grupo de metabolitos secundarios derivados del escualeno. Las excelentes actividades citotóxicas, en líneas de cáncer humano de algunos triterpenos, hacen de este tipo de compuestos

candidatos promisorios en la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos.

Así, triterpenos bioactivos abundantes y de baja potencia, como son algunos ursanos y oleanos, se transformaron para la obtención de moléculas con una actividad significativamente mayor. De manera opuesta, compuestos altamente citotóxicos, como las cucurbitacinas, se transformaron para obtener agentes con menores efectos adversos.⁴

Por otra parte, los triterpenos también han llamado la atención por sus propiedades antiinflamatorias. Un gran número de triterpenos ha sido reportado por su capacidad antiinflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro*.⁵

En éste orden de ideas nuestro grupo ha demostrado que la argentatina B, un triterpeno del tipo cicloartano, posee propiedades antiinflamatorias e inhibitorias de la proliferación celular de células de diferentes cánceres. Con el fin de obtener algunos derivados con posibles mejores perfiles de actividad, en el presente trabajo se presentan algunas transformaciones químicas de la argentatina B así como sus evaluaciones antiinflamatorias y citotóxicas a líneas celulares de cáncer humano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer

2.1.1. Definición.

El término “cáncer” es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del cuerpo. Se caracteriza por la multiplicación rápida de células que no siguen los mecanismos normales de regulación de la proliferación y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos, a este proceso se le denomina “metástasis”.¹

El proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que son acumuladas en la célula y que terminan por permitir un crecimiento no regulado de ésta. Entre los cambios genéticos podemos mencionar la presencia de mutaciones en genes claves que participan en la regulación del ciclo y crecimiento celulares y promueven el crecimiento anormal. Por otro lado, los fenómenos epigenéticos, como la metilación de citosinas, favorecen la aparición de mutaciones. Un desbalance en el patrón de metilación del ADN ha sido particularmente observado en los cánceres esporádicos. Los cambios en la metilación que con mayor frecuencia han sido detectados en células cancerosas, incluyen la pérdida de ésta en secuencias normalmente metiladas (hipometilación) y la metilación aberrante de secuencias usualmente no metiladas (hipermetilación), localizada principalmente en islas CpG. Este tipo de alteraciones se presenta generalmente en tumores donde la resultante es en general una disminución en el nivel total de metilación.

Las etapas de la carcinogénesis son la iniciación, la promoción y la progresión. La primera de ella involucra la reacción entre la sustancia

que produce el cáncer (carcinógeno) y el ADN de las células del tejido. Puede existir una susceptibilidad genética. Esta etapa puede permanecer latente, y el sujeto puede sólo permanecer en riesgo de desarrollar el cáncer en una etapa posterior. La segunda etapa ocurre muy lentamente a lo largo de un período que puede variar de meses hasta años. La tercera y última etapa implica la progresión y la diseminación del cáncer.⁶

Los principales tipos de cáncer son los siguientes:

- pulmonar (1.37 millones de defunciones);
- gástrico (736 000 defunciones);
- hepático (695 000 defunciones);
- colorrectal (608 000 defunciones);
- mamario (458 000 defunciones);
- cervicouterino (275 000 defunciones).

Por otro lado, el oncólogo británico Sir Rupert Willis define a una neoplasia como una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede y no está coordinado con el de los tejidos normales y persiste de la misma manera en exceso tras cesar el estímulo que suscitó el cambio.

2.1.2. Cáncer como problema de salud pública.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7.6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total) debidas principalmente a cáncer de pulmón (primer lugar en hombres), estomago, hígado, colon y mama (primer lugar en mujeres). Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13.1 millones en 2030 (Globocan 2008, IARC, 2010).

En México, el porcentaje de letalidad por tumores malignos durante 2009 fue de 6.4, es decir, aproximadamente 6 de cada 100 personas hospitalizadas con estos padecimientos murieron en el hospital.

Así mismo, considerando el total de defunciones en México durante 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 (INEGI, 2012), esto representa aproximadamente un 13% de la población y coloca al cáncer como la segunda causa de mortalidad en el país.

2.1.3. Tratamiento del cáncer.

Los tratamientos para el cáncer tienen como objetivos eliminar células cancerosas, prevenir o demorar su reaparición o tratar los síntomas, si este no es curable.¹

Se han desarrollado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas. Sin embargo, muchos de los medicamentos nuevos obtenidos por síntesis química y/o derivados de plantas no tienen el efecto esperado en la clínica, esto debido a la complejidad de la enfermedad. Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente, en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. La selección de uno de ellos o su combinación depende de la etapa en que se encuentra el tumor.⁷

2.1.3.1. Quimioterapia.

Esta estrategia consiste en administrar un fármaco que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular.

Dependiendo de cuándo se administre la quimioterapia podemos hablar de, quimioterapia de inducción o neoadyuvante, es decir, la quimioterapia se administra en primer lugar antes de cualquier tratamiento local como la radioterapia o la cirugía; quimioterapia concomitante, se administra simultáneamente a otro tratamiento, generalmente de radioterapia y quimioterapia adyuvante, la cual se realiza de forma complementaria a otro tratamiento (generalmente local).

Debido a la alta citotóxicidad y a la baja especificidad que tienen los fármacos actuales hacia las células tumorales, también ocasiona la muerte de células no cancerosas. El daño a estas células sanas causa efectos secundarios, los más comunes son náuseas y vómito y pérdida temporal de cabello.

Algunos de los agentes antineoplásicos más representativos se muestran en la Tabla 1.

<p>Agentes alquilantes y de unión a ADN</p> <p>Mostaza nitrogenada Melfalan Ciclofosfamida e Ifosfamida Clorambucil Busulfan Nitrosoureas Cisplatino y carboplatino Dacarbacida y Procarbacida Mitomicina</p> <p>Antibióticos</p> <p>Actinomicina D Doxorrubicina, daunorrubicina Epirubicina, Bleomicina</p> <p>Diversos</p> <p>L-Asparaginasa Hidroxiureas</p>	<p>Antimetabolitos</p> <p>Metotrexato 5-Fluorouracilo Arabinósido de citosina Gemcitabina 6-mercaptopurina y 6-tioguanina 2-clorodesoxiadenosina</p> <p>Compuestos de origen natural y/o sus derivados</p> <p>Vincristina, Vinblastina Vinorelbina, Etopósido, Tenipósido Paclitaxel, Docetaxel Derivados de la camptotecina</p> <p>Hormonas</p> <p>Glucocorticoides Tamoxifeno Agentes progestacionales Agentes antiandrógenos</p>
---	--

Tabla 1. Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen (Moore y Goldenberg en Kalant y Roshlau 1998).

2.1.3.1.1. Principios activos de origen natural

Los productos naturales, especialmente las plantas, han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades por miles de años⁸.

La Organización Mundial de la Salud define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estima que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud.¹

Los estudios químicos de las plantas medicinales han permitido el aislamiento de agentes terapéuticos y/o materia prima para la obtención de medicamentos sintéticos más complejos.

De 1950 a 1970, se introdujeron en el mercado farmacéutico de Estados Unidos cerca de 100 nuevos fármacos antineoplásicos derivados de plantas, incluyendo a deserpina, rescinamina, reserpina, vinblastina y vincristina. De 1971 a 1990, aparecieron en el mercado mundial etopósidos, tenipósido y glicósidos. De 1991 a 1995, se introdujeron el paclitaxel, tapotecán, irinotecán, y de 1996 a 2007 aparecieron, entre derivados y nuevos, 50 fármacos antineoplásicos, entre los que destacan el interferón alfa (Roferon-A), interferón gama (Biograma), interleucina-2 (Proleukin).⁹⁻¹¹

Los primeros compuestos anticancerosos obtenidos de las plantas fueron la vincristina (Oncovin[®]) y vinblastina (Velban[®]), aislados de *Catharanthus roseus* (Figura No. 1), planta empleada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes.¹² La vincristina es utilizada en el tratamiento de leucemia linfocítica aguda en niños, cáncer cervicouterino, de colon, de mama y otros carcinomas, mientras que la vinblastina se emplea en el tratamiento de linfoma de Hodgkin, carioepiteloma y cáncer de ovario.

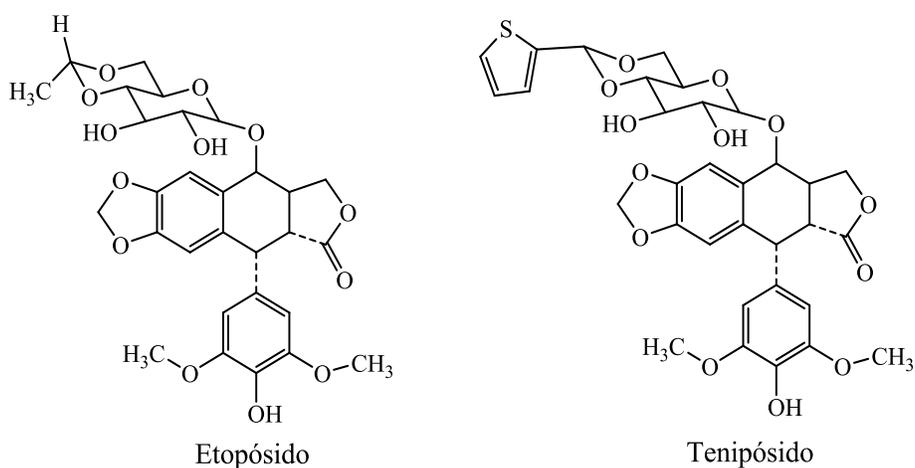


Figura No. 2. *Podophyllum peltatum* y estructuras químicas del etoposido y teniposido.

El paclitaxel (Taxol[®]), es un diterpeno que inicialmente se aisló de la corteza de *Taxus brevifolia* (Figura No. 3) en 1962 en el estado de Washington por el botánico Arthur Barclay. En 1964 en el NCI se descubrió que un extracto de la corteza de *Taxus brevifolia* era tóxico para los cultivos de células leucémicas. El paclitaxel se lanzó al mercado en 1993 para el tratamiento del cáncer de ovario, de pulmón, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y de colon.

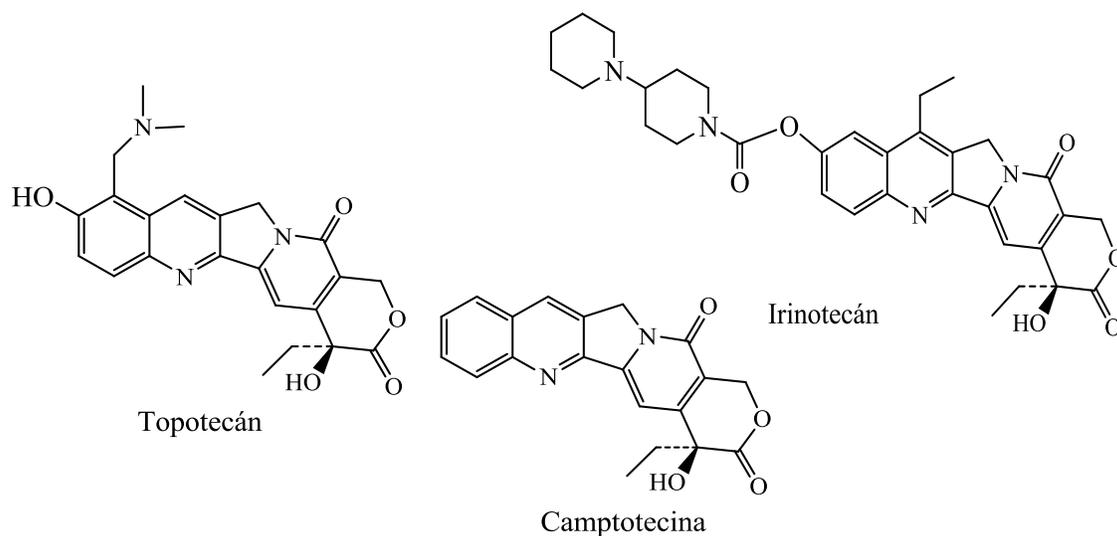


Figura No. 4. *Camptotheca acuminata* y estructuras químicas de la camptotecina, topotecán e irinotecán.

Especie vegetal	Metabolito aislado	Derivado sintetizado
<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristina (Oncovin [®]) Vinblastina (Velban [®])	Vinolrebina (Navelbine [®]) Vindesina (Eldisine [®])
<i>Podophyllum emodi</i> y <i>Podophyllum peltatum</i>	podofilotoxina	Etopósido y Tenipósido (Vepesid [®])
<i>Taxus brevifolia</i>	Paclitaxel (Taxol [®])	Docetaxel (Taxotere [®])
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina	Topotecán (Hycamtin [®]) Irinotecán (Camptosar [®])

Tabla 2. Principios antineoplásicos más importantes obtenidos a partir de especies vegetales.

2.2. Inflamación

2.2.1. Definición.

La inflamación es la respuesta primaria del sistema inmunológico del organismo cuando existe daño celular causado por diversos estímulos nocivos (agentes químicos, físicos, infecciosos e inmunes) y tiene como objetivo eliminarlos y promover la reparación del tejido. Consiste en la acumulación local de líquido acompañado de edema, enrojecimiento y dolor, producidos por cambios inducidos en los capilares sanguíneos locales que conducen a un aumento de su diámetro, una reducción de la velocidad de flujo sanguíneo y un incremento de la permeabilidad de la pared vascular.¹⁸

El aumento del aporte de sangre a la región causa el enrojecimiento local y el calor asociados con la inflamación. El incremento en la permeabilidad vascular permite la extravasación de proteínas plasmáticas que a su vez amplifican la reacción inflamatoria. La inflamación es esencialmente una respuesta benéfica que normalmente se resuelve con la restauración de la estructura y la función normal del tejido, sin embargo, cuando la inflamación persiste (inflamación crónica) ésta puede causar daño tisular y pérdida de la función del tejido y está ligada con la incidencia del cáncer y su progresión.¹⁹

2.2.2. Inflamación aguda e inflamación crónica.

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica.²⁰

La inflamación aguda es de duración corta, (minutos, horas o algunos días) y se inicia rápidamente; es caracterizada por aumento de la irrigación sanguínea en el área afectada, exudado de fluidos

plasmáticos y migración de leucocitos predominantemente neutrófilos al sitio de la lesión.

La inflamación crónica dura semanas, meses e incluso años y es de carácter sistémico. La inflamación crónica puede ocurrir debido a la persistencia de una infección o un antígeno, al daño tisular recurrente o por una falla de los mecanismos antiinflamatorios endógenos que conducen en condiciones normales a la resolución de la inflamación.¹⁹ Se caracteriza por dolor persistente, tumefacción y proliferación celular, sin rubor ni calor, con pérdida crónica e importante de la función. El infiltrado celular está compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, principalmente, además de que se promueve la formación de tejido fibroso sobre el exudado de líquidos.

2.2.3. Relación cáncer-inflamación.

En 1863 Virchow propuso que el origen del cáncer se encontraba en los sitios de inflamación crónica ya que algunas clases de irritantes junto con una lesión de tejido y el proceso inflamatorio, generaban proliferación celular.

Varios tipos de inflamación, que difieren por su causa, mecanismo, consecuencia e intensidad existen, y todos ellos pueden potencialmente promover el desarrollo de un cáncer y su progresión.²¹

Se considera que durante la inflamación crónica o el daño a un tejido se puede promover el microambiente necesario para transformar la célula a través de daño al ADN o de factores proinflamatorios que producen células tumorales.²² En el proceso inflamatorio se sintetizan productos potencialmente genotóxicos o mutagénicos que pueden causar daño al ADN induciendo la transformación de células normales a cancerosas, afectando su crecimiento, induciendo la no diferenciación, la

proliferación y la resistencia a la apoptosis. Así, las células inmunitarias pro-inflamatorias, citocinas, quimiocinas, enzimas como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) o la sintasa de óxido nítrico (NOSi), sus productos, prostaglandinas (por ejemplo, PGE₂) y el radical gaseoso óxido nítrico (ON), respectivamente, y factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF-*κ*B) se encuentran en niveles aumentados en el microambiente de los tumores.²³ Por ejemplo, las infecciones por *Helicobacter pylori* o por el virus de la hepatitis C (HCV) causan gastritis, úlceras, y hepatitis, y eventualmente conducen al cáncer gástrico o de hígado, respectivamente. La inflamación crónica puede ser también inducida por exposición ambiental o factores dietéticos/metabólicos. Partículas de algunos materiales, así como algunos componentes del humo del tabaco provocan daño e inflamación crónica en el tejido pulmonar. La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de hígado. También varios tipos de autoinmunidad pueden contribuir a un desarrollo tumoral, como es el caso del cáncer asociado a la colitis (CAC), o el factor de riesgo que representa la enfermedad celíaca para desarrollar un linfoma.²⁴

Por otro lado, se ha establecido que el cáncer puede promover y exacerbar las infecciones y la inflamación.²⁵ Cánceres que evolucionan sin inflamación crónica subyacente exhiben inflamación asociada al tumor y contienen infiltrados inflamatorios. Muchos, si no es que todos los tumores sólidos están infiltrados con células inmunes e inflamatorias.²⁴

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

1. Varios mediadores inflamatorios (por ejemplo, citosinas) son factores de crecimiento y supervivencia importantes que estimulan la subsistencia y la proliferación de células pre-malignas.

2. Mediadores inflamatorios con frecuencia activan factores de transcripción de oncogenes, como NF- κ B y STAT3, mientras que oncogenes como Ras y Myc inician una respuesta inflamatoria.

3. La inflamación asociada a los tumores puede suprimir la respuesta inmune anti-tumoral y desviar a células inmunes específicas de ser antitumorígenicas a convertirse en pro-tumorígenicas.

4. La inflamación puede estimular la angiogénesis tumoral.

5. La inflamación puede estimular la invasividad tumoral y la diseminación metastásica.²⁴

2.3. Terpenos.

2.3.1. Definición.

Los terpenos son productos naturales estructuralmente diversos y ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos de ellos se han asociado con el aroma de las especies vegetales. El nombre proviene de los primeros miembros derivados del aguarrás ("turpentine" en inglés, "terpentin" en alemán).²⁶ Cuando los terpenos contienen en su estructura una molécula de oxígeno, se da preferencia al término terpenoide, aunque ambas denominaciones, terpeno y terpenoide, suelen utilizarse indistintamente. También se emplea el término isoprenoide, porque las dos unidades biosintéticas, el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y el pirofosfato de isopentenilo (IIP) (Figura No. 5),

de los cuales provienen los terpenos son las unidades biogénicas equivalentes al isopreno, una molécula con cinco átomos de carbono.

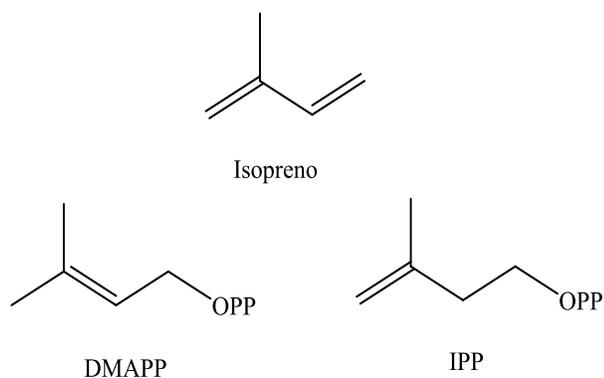


Figura No. 5. Unidades de los terpenos.

2.3.2. Biogénesis

Los terpenos derivan de las reacciones entre el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) y su isómero el pirofosfato de isopentenilo (IPP). Estas unidades son biosintetizadas en las especies vegetales, ya sea por la vía del ácido mevalónico o por la vía del fosfato de la desoxixilulosa.²⁷

2.3.3. Clasificación

Los terpenos se clasifican según el número de carbonos presentes en la molécula como se muestra en el Tabla 3.

Nombre	No. de átomos de carbono	No. de unidades de isopreno	Ejemplo
Hemiterpenos	5	1	Isopreno
Monoterpenos	10	2	Geraniol
Sesquiterpenos	15	3	Farnesol
Diterpenos	20	4	Geranil-geraniol
Sesterterpenos	25	5	Ofobiolina A
Triterpenos	30	6	Escualeno
Tetraterpenos	40	8	Fitoeno
Politerpenos	C _{5n}	N	Caucho

Tabla 3. Clasificación general de los terpenos.

2.3.3. Triterpenos

Los triterpenos son metabolitos secundarios derivados del escualeno que en su estructura fundamental contienen 30 átomos de carbono. A los triterpenos tetracíclicos convencionalmente se les ha otorgado nombres triviales, como protostano, lanostano, cicloartano, damarano, eufano y tirucalano. A su vez los compuestos pentacíclicos pueden ser de tipo ursano, oleanano, friedelano, gamacerano, lupano entre otros.²⁸

2.3.3.1. Biogénesis

Una vez formada la unidad isoprénica, prosigue la síntesis de los terpenos por condensaciones "cabeza – cola" del IPP con el DMAPP, para formar pirofosfato de geranilo (GPP) que es el precursor de los compuestos monoterpénicos. Cuando el GPP se condensa también en forma "cabeza-cola" con otra unidad de IPP, por la acción de la enzima geraniltransferasa se genera el pirofosfato de farnesilo (FPP). La

condensación "cola-cola" de dos unidades de FPP genera una unidad de escualeno, precursor general de los triterpenos (Figura No. 6). La epoxidación de uno de los dobles enlaces terminales del escualeno da lugar al óxido de escualeno.

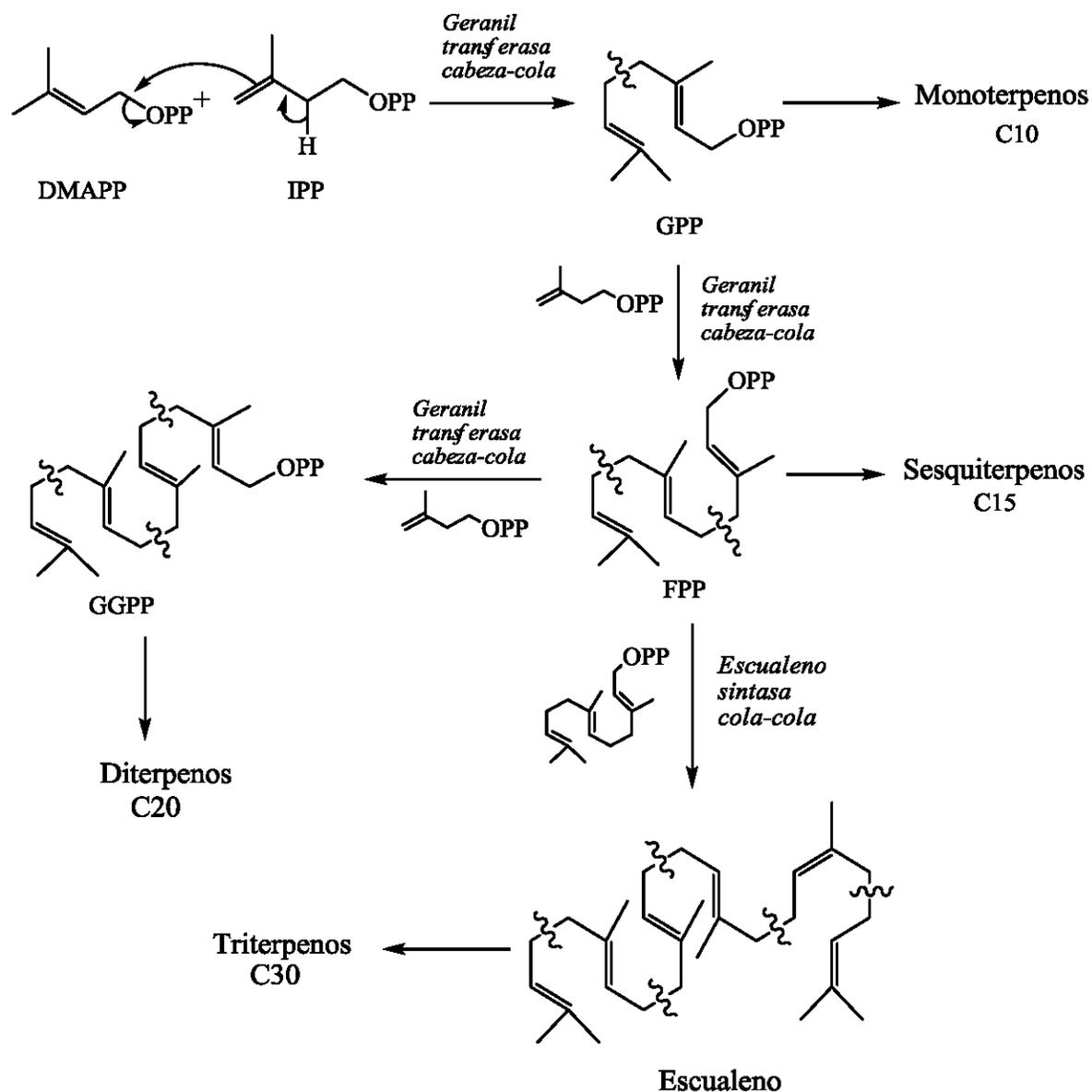


Figura No. 6. Síntesis de terpenos.

Cuando el escualeno adquiere la conformación silla-bote-silla-bote se epoxida, para formar el intermediario A, el cual se postula como el precursor de esteroides y esteroles como el lanosterol en animales y el cicloartenol en plantas (Figura No. 7). El cicloartenol es el intermediario biosintético común de los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos sintetizados en el reino vegetal.

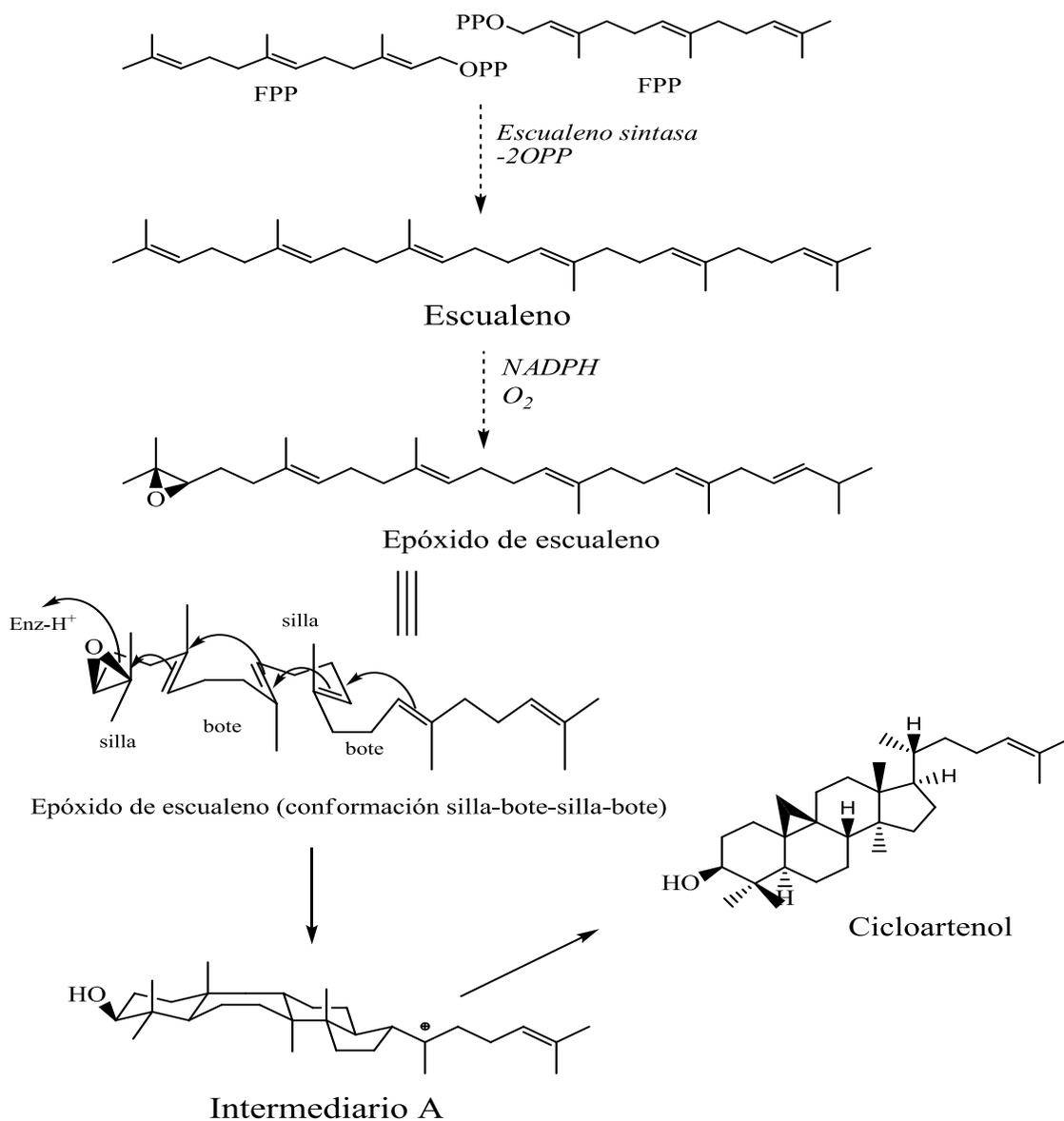


Figura No. 7. Biosíntesis de esteroides.

2.3.3.2. *Triterpenos como potenciales agentes anticancerosos.*

Diversos estudios dan cuenta del potencial de los triterpenos para ser empleados como agentes anticancerosos. La mayoría de los compuestos que se han evaluado actúan a nivel de la replicación del ADN. Ejemplos son algunos derivados de triterpenos de tipo ursano, como el ácido ursólico, inhibidor de algunas de las enzimas involucradas en la duplicación celular, como son la ligasa I²⁹ y las polimerasas del ADN.³⁰ Los triterpenos de tipo oleanano, como el ácido oleanólico, poseen actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer.³¹ Los de tipo lupano, como el lupeol, exhibe actividad antimutagénica en ensayos *in vitro* e *in vivo*.³²

2.3.3.3. *Triterpenos como potenciales agentes antiinflamatorios.*

Un gran número de experimentos han demostrado la actividad antiinflamatoria de los triterpenos tanto *in vivo* como *in vitro*. Los efectos son referidos principalmente a su interferencia con diversas moléculas o mecanismos del proceso de inflamación³³⁻³⁴ como la inhibición en la producción de eicosanoides y citosinas, la actividad hidrolítica de enzimas, y la lipoperoxidación.³⁵

Los triterpenos son capaces de inhibir y modular la acción y la expresión de diversas moléculas y complejos enzimáticos como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa y la sintasa inducible de óxido nítrico (NOSi). Por ejemplo, su acción antiprostanoide se asocia con la inhibición de la expresión de COX-2 y NOSi. Al respecto, el ácido ursólico puede inhibir la acción de AMPc (Monofosfato cíclico de adenosina) sobre las proteínas cinasas, estas enzimas promueven la expresión de COX-2 al interactuar sobre la región promotora del gen de la enzima. Por otro

lado, algunos triterpenos poseen cierta especificidad en su acción anti-prostanoide. Por ejemplo, el lupeol es capaz de disminuir la producción de PGE₂ sin afectar la de LTC₄. Por el contrario, ciertos triterpenos inhiben la acción de la enzima 5-LO. Al respecto, se sugirió que el tipo de núcleo policíclico era el responsable de su actividad.³⁴

2.4. *Parthenium argentatum*

P. argentatum es un arbusto que crece en las zonas áridas del norte de México y del sur de los Estados Unidos de América. Éste arbusto es conocido con el nombre de "guayule", que significa "planta que contiene hule" (Figura No. 8), el cual fue descubierto por J. M. Bigelow en 1852, y sus características botánicas fueron descubiertas por Assa Gray de la Universidad de Harvard en 1859.³⁶



Figura No. 8. *Parthenium argentatum* Gray.

El guayule por su contenido de hule ha sido utilizado comercialmente desde los inicios del siglo XX³⁷, realizándose esta explotación con relativo éxito ya que durante mas de cien años ha competido frente a la *Hevea brasiliensis*, que es el productor por excelencia de hule natural.³⁸ El aprovechamiento industrial de *P. argentatum* alcanzó su auge durante la Segunda Guerra Mundial; auge que decayó a la llegada del hule producido sintéticamente.

En nuestro país los estudios sobre el guayule, se iniciaron en forma sistemática a partir de 1970. Dichos estudios condujeron a la creación de una planta piloto que inicia sus operaciones en 1976.

En 1977, durante la Segunda Conferencia internacional sobre el Guayule, se planteó la posibilidad de hacer más atractiva la explotación de guayule, mediante la utilización de los compuestos presentes en "la resina", material de desecho durante el proceso de extracción del hule.

La resina es una mezcla de compuestos, dentro de los que destacan terpenos, compuestos aromáticos y ácidos grasos.³⁹⁻⁴⁰ Además se encontró que la resina estaba constituida por una gran cantidad de compuestos triterpénicos, de tipo cicloartano y lanostano.⁴¹ Estos compuestos constituían cerca del 55% de los componentes totales; de los cuales, el 27% lo representaban las argentatinas A, B y C⁴² por lo que se puede disponer de cantidades considerables de estos metabolitos (Figura No. 9). Aunado a su gran parecido estructural con compuestos esteroides, es una fuente potencial de intermediarios susceptibles a sufrir transformaciones químicas, esto con el propósito de obtener compuestos con posibles propiedades biológicas.⁴³

Los ésteres cinamato y p-anisato de un alcohol derivado del germacrano denominadas guayulinas A y B, respectivamente, se

aislaron por primera vez de un extracto de la planta *P. argentatum*.⁴⁴ Sin embargo, estos compuestos también se han aislado de la resina junto con otras guayulinas.⁴²

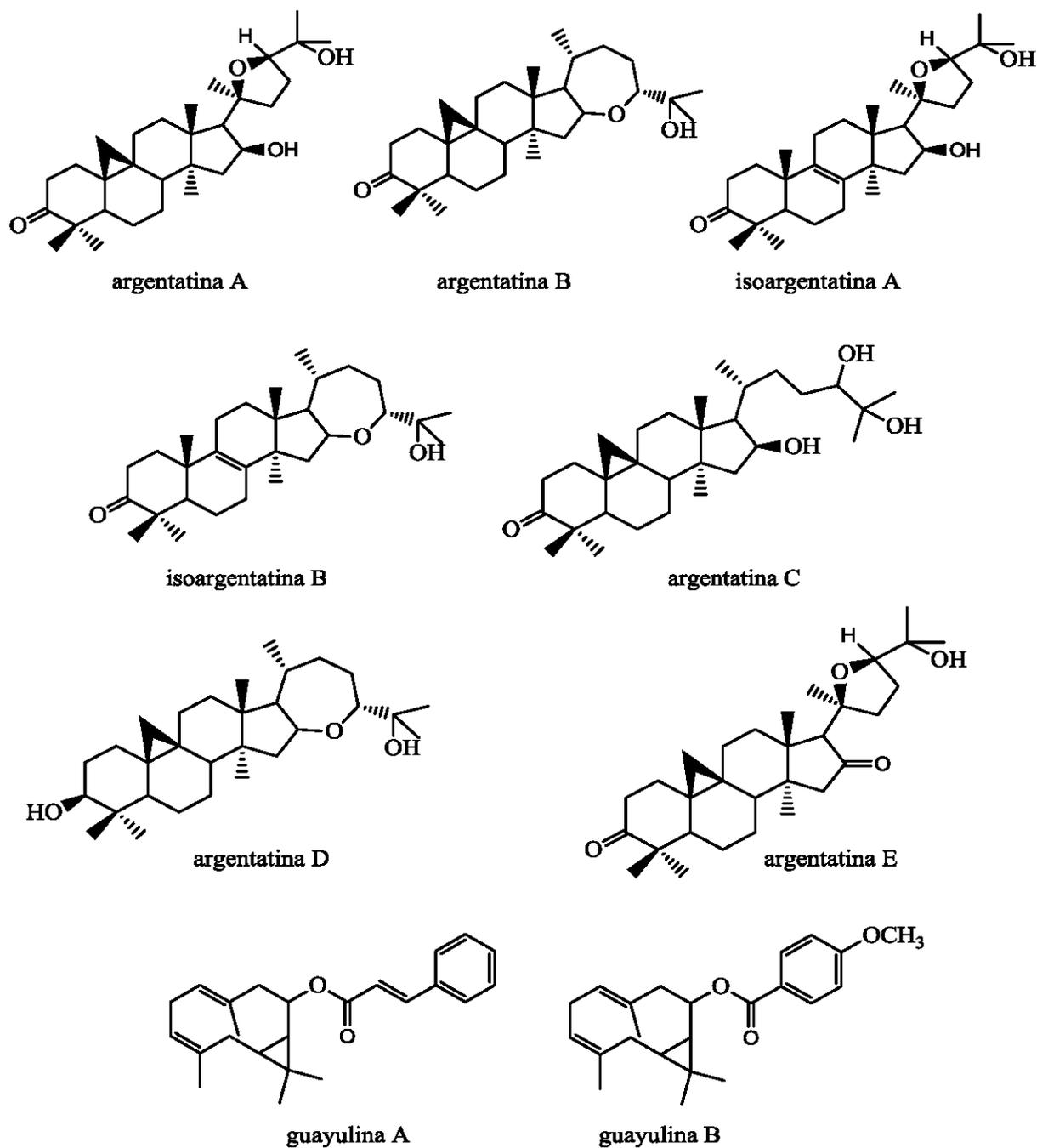


Figura No. 9. Estructura química de algunos compuestos presentes en la resina obtenida a partir de *P. argentatum*.

2.4.1. Estudios previos de actividad biológica

Desde el punto de vista biológico se ha demostrado que las argentatinas A y B así como el extracto metanólico del guayule presentaron actividad insecticida significativa en gusanos de *Spodoptera frugiperda*.⁴⁵ También se ha demostrado la susceptibilidad microbiana que ejerce la argentatina A contra *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* entre otras.⁴⁶ Se ha informado que las argentatinas A, B y D inhiben el crecimiento de tumores hormona-dependientes, antagonizando la acción del estradiol por medio de una inhibición no competitiva de su receptor.⁴⁷ Además, se demostró que la argentatina A y B son capaces de disminuir de manera dependiente de la dosis el edema inducido por el promotor de tumores 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en el modelo de inflamación de la oreja de ratón.⁴⁸

2.5. Métodos para la evaluación de la actividad biológica.

2.5.1. Ensayo de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares de cáncer humano

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

El desarrollo del método de tinción de proteínas con sulforrodamina B (SRB) para la estimación del contenido de proteína celular en cultivos adheridos y en suspensión fue establecido por Skehan et al. (1990); después fue adoptado por el Instituto Nacional del Cáncer como una prueba de rutina en las investigaciones de nuevos agentes anticancerosos.⁴⁹

El método consiste en la incubación de cultivos celulares de líneas tumorales en presencia o ausencia de sustancias de prueba, el efecto de

viabilidad se determina mediante un ensayo colorimétrico con sulforrodamina B (SRB). El fundamento de este método se encuentra en la tinción de proteínas celulares totales con el colorante SRB, el cual es un aminoxanteno que contiene dos sustituyentes sulfónicos y en condiciones ligeramente ácidas, el carácter aniónico de la SRB forma enlaces electrostáticos exclusivamente con aminoácidos básicos (arginina, histidina y lisina) de células vivas. La intensidad del color es directamente proporcional a la viabilidad celular.⁵⁰

2.5.2. Ensayo para evaluar la actividad antiinflamatoria

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

El modelo del edema auricular inducido por 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) consiste en la aplicación de TPA en el pabellón auditivo del animal. Se propicia una respuesta inflamatoria local.⁵¹ El mecanismo por el cual el TPA induce el incremento de los eicosanoides no es conocido completamente, pero se piensa que debido a que es un análogo conformacional del diacilglicerol, desencadena un cascada de eventos bioquímicos vinculados con la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio⁵², así como la activación de la fosfolipasa A₂, inducción de la ciclooxigenasa y translocación/activación de la lipooxigenasa.⁵¹ Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como la indometacina. La ventaja del método es la rapidez y poca muestra necesaria para desarrollar el estudio.⁵¹

Por otro lado, es conocido que ciertos promotores de tumores como el TPA, no solo provocan una respuesta inflamatoria aguda, sino que causan alteraciones en las vías de señalización de citosinas

implicadas en el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, es posible que aquellos compuestos que exhiben efectos antiinflamatorios en el modelo de TPA tengan también efectos antiproliferativos o quimiopreventivos.⁵³

III. HIPÓTESIS

Previamente se ha demostrado que la argentatina B aislada de *Parthenium argentatum* (Gray) presenta actividad antiinflamatoria e inhibe la proliferación de algunas líneas de cáncer humano, entonces es factible suponer que la transformación química de la argentatina B permitirá obtener compuestos con mayor potencia biológica contra células cancerosas así como con mejor perfil antiinflamatorio.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal.

Obtener y evaluar la actividad citotóxica y antiinflamatoria de derivados tetracíclicos obtenidos a partir de la transformación química de la argentatina B.

4.1.1. Objetivos particulares.

- Aislar y purificar la argentatina B a partir de la resina obtenida como subproducto en la extracción del hule proveniente de la especie *Parthenium argentatum* (Gray).
- Modificar químicamente la argentatina B, mediante una reacción con BF_3 .
- Caracterizar los derivados de la argentatina B obtenidos a partir de la reacción con BF_3 , por métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales (IR, RMN, EM).
- Evaluar la capacidad de los derivados obtenidos para inhibir la proliferación celular en algunas líneas celulares de cáncer humano.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Procedimientos Químicos Generales.

Para los procedimientos de extracción se utilizaron disolventes grado industrial, destilados en el laboratorio. El reactivo empleado para la reacción, trifluoruro de boro (Sigma-Aldrich), fue de grado reactivo analítico.

Los procedimientos de cromatografía en columna abierta (CCA) se efectuaron en columnas de vidrio de diferentes capacidades y se emplearon tonsil y gel de sílice (MN-Kieselgel G 60, MERCK®) de malla 70-230 como adsorbentes.

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, empleando cromatofolios de aluminio recubiertas con gel de sílice (ALUGRAM® SILG/UV₂₅₄). Se visualizaron con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (350 nm) y se revelaron con una solución de sulfato cérico (Ce(SO₄)₂) al 1% en ácido sulfúrico (H₂SO₄), seguido de calentamiento.

Los puntos de fusión de cada compuesto se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Los espectros de Infrarrojo fueron registrados en un espectrofotómetro Nicolet modelo Magna 750, en solución, empleando como disolvente CHCl₃.

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

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C , se obtuvieron en espectrómetros Varian Gemini XL-200 y Varian VXR-300, utilizando como disolvente CDCl_3 y como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en ppm. Las constantes de acoplamiento están expresadas en Hertz. La multiplicidad de las señales protónicas se indica de la siguiente manera: (s) señal simple, (d) señal doble, (t) señal triple y (m) multiplete.

5.2. Resina

La resina, un subproducto en la obtención industrial del hule natural a partir de *Parthenium argentatum* (Gray), fue donada por la Comisión Nacional de Zonas Áridas (CONAZA), ubicada en Saltillo, Coahuila.

5.2.1. Aislamiento de la 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (**1**) (argentatina B).

Se fraccionaron 230 g de resina por cromatografía en columna abierta sobre tonsil y se eluyó con una mezcla de hexano acetato de etilo de polaridad ascendente, obteniendo un total de 223 fracciones de 200 mL.

Por similitud cromatográfica se reunió de la fracción 2 a la fracción 77. Estas fracciones se percolaron a través de una columna empacada con gel de sílice y se eluyó con una mezcla de hexano acetato de etilo de polaridad ascendente. De las fracciones 121 a 144, se obtuvo por cristalizaciones 11.6053 g (rendimiento de 5.04 % a partir de la resina) de argentatina B (**1**), la cual se purificó por recristalización con hexano y acetato de etilo. La identificación de **1** se realizó mediante la

comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las previamente informadas en la literatura.⁴³

5.3. Transformaciones químicas de la argentatina B

5.3.1. Obtención de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**) y del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclanost-9,11-eno (**3**).

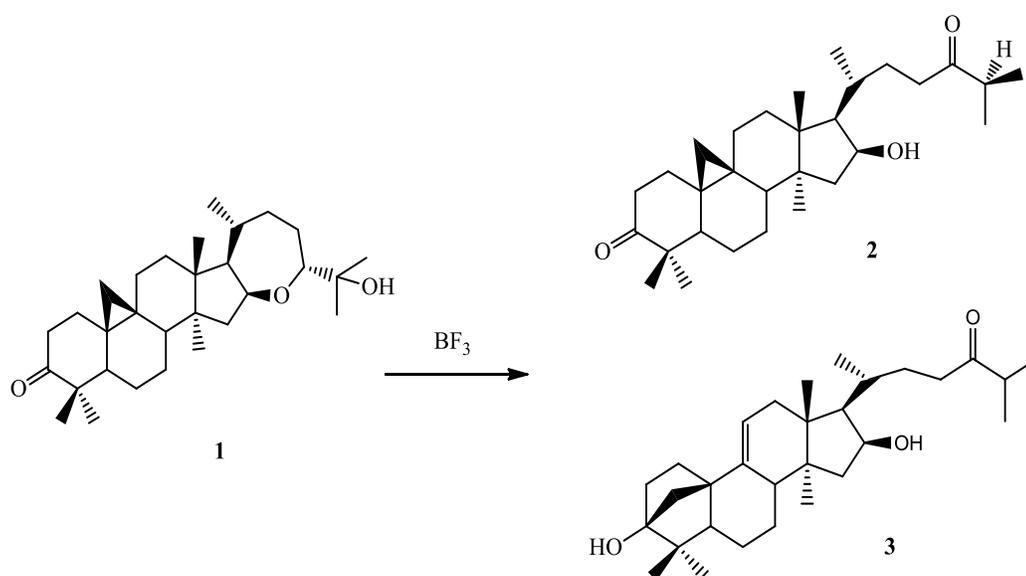


Figura No. 10. Obtención de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**) y del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclanost-9,11-eno (**3**).

A una solución de argentatina B (500 mg) en CH_2Cl_2 (13 ml), se le adicionó 9 ml de BF_3 , con agitación constante, a temperatura ambiente y en atmosfera inerte se dejó reaccionar durante 20 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se neutralizó con una disolución

de bicarbonato de sodio al 10% y agua. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida evaporando el disolvente. La mezcla de reacción obtenida se separó por cromatografía en columna obteniendo de las fracciones 10-12, eluidas con una mezcla 8:2 Hex-AcOEt, 64.1 mg (rendimiento 12.8%) de **2** con p. f. 132-135°C. **IR (Sol/CHCl₃)** ν_{max} cm^{-1} : 3460.09 (O-H), 2972.73, 2953.69, 2874.53 (C-H), 1700.37 (C=O). **RMN ¹H**: 0.57 (d, 1H, H-19), 0.82 (d, 1H, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.91 (d, 3H, CH₃), 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.10 (s, 3H, CH₃), 1.10 (d, 3H, CH₃), 1.11 (d, 3H, CH₃), 1.17 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (125.71MHz, CDCl₃) δ ppm**: 29.38 (C-1), 36.68 (C-2), 216.74 (C-3), 45.81 (C-4), 48.52 (C-5), 21.43 (C-6), 25.93 (C-7), 47.88 (C-8), 143.71 (C-9), 26.09 (C-10), 26.48 (C-11), 33.39 (C-12), 46.66 (C-13), 50.24 (C-14), 46.81 (C-15), 72.17 (C-16), 57.39 (C-17), 20.16 (C-18), 29.84 (-19), 29.58 (C-20), 18.36 (C-21), 32.69 (C-22), 37.46 (C-23), 216.53 (C-24), 40.92 (C-25), 17.75 (C-26), 18.28 (C-27), 18.93 (C-28), 20.79 (C-29) y 22.17 (C-30). **HSQC ¹H/¹³C**: 4.53/72.17, 1.58/57.39, 1.69/48.52, 1.69/47.88, 1.43/46.81, 2.02/46.81, 2.60/40.92, 2.28/37.46, 2.69/37.46, 2.53/36.68, 2.66/36.68, 1.52/33.39, 1.83/33.39, 1.64/32.69, 0.55/29.84, 0.80/29.84, 1.61/29.58, 1.00/29.38, 2.01/29.38, 1.14/26.48, 2.04/26.48, 1.41/25.93, 1.05/22.17, 1.56/21.43, 1.10/20.79, 0.90/20.16, 1.17/18.93, 1.11/18.36, 1.10/18.29, 0.90/17.75. **Fórmula mínima**: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. **Masa molecular**: 456.36 g/mol. **EM-IE (70 eV) m/z, (%)**: 456 [M^+], 423 (85), 311, 133, 71 (100), 43 (86).

De las fracciones 16-17, se obtuvieron 8 mg (rendimiento 1.6%) de **3**, con p. f. 142-144°C. **RMN¹H (300MHz, C₆D₆) δ ppm**: 0.76 (s, 3H, CH₃), 0.80 (d, 3H, CH₃), 0.82 (d, 3H, CH₃), 0.88 (d, 3H, CH₃), 0.91 (s, 3H, CH₃), 0.99 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 1H, H-25), 4.65 (dd, 1H, H-16), 5.56 (d, 1H, H-11) **RMN ¹³C (125.71MHz, C₆D₆)**

δ ppm: 33.61 (C-1), 31.82 (C-2), 84.74 (C-3), 41.38 (C-4), 45.02 (C-5), 26.36 (C-6), 27.12 (C-7), 45.02 (C-8), 140.35 (C-9), 47.01 (C-10), 118.47 (C-11), 36.71 (C-12), 44.19 (C-13), 45.27 (C-14), 38.29 (C-15), 72.09 (C-16), 56.69 (C-17), 16.06 (C-18), 48.50 (C-19), 30.11 (C-20), 18.20 (C-21), 29.64 (C-22), 45.70 (C-23), 215.40 (C-24), 40.83 (C-25), 18.04 (C-26), 18.16 (C-27), 18.92 (C-28), 21.25 (C-29), 25.47 (C-30).

HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$: 5.56/118.72, 4.65/72.09, 1.20/56.69, 1.02/48.50, 1.95/48.50, 1.80/45.70, 2.13/45.70, 1.80/45.02, 2.12/45.02, 2.06/40.83, 1.97/38.29, 2.09/38.29, 1.97/36.71, 2.26/36.71, 1.19/33.61, 2.30/33.61, 1.49/31.82, 1.91/31.82, 1.80/30.11, 0.77/29.64, 2.05/29.64, 1.10/27.12, 1.53/27.12, 1.10/26.36, 1.45/26.36, 0.98/25.47, 0.90/21.25, 0.75/18.92, 0.75/18.20, 0.80/18.16, 0.87/18.04, 1.10/16.06. **Fórmula mínima:** $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$.

Masa molecular: 456.36 g/mol. **EM-IE (70 eV) m/z, (%):** 456 [M^+], 425 (30), 311 (100), 127 (20), 71 (15).

5.4. Evaluación de la actividad biológica

5.4.1. *Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) in vitro.*

5.4.1.1. *Condiciones generales.*

La citotoxicidad en líneas tumorales se determinó de acuerdo con los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos.⁵⁴⁻⁵⁵ Los derivados **2** y **3** se evaluaron en líneas de cáncer humano de próstata (PC-3) y mama (MCF-7). Las líneas se obtuvieron del INC. La doxorubicina (SIGMA[®]) se utilizó como fármaco de referencia.

5.4.1.2. Procedimiento.

Las células se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomina, 0.25 µg/mL de anfotericina B (GIBCO®) y 2mM de *L*-glutamina (GIBCO®). Se conservaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100µL de cada línea celular. Las densidades celulares fueron de 5×10^4 células/mL de MCF-7 y de 7.5×10^4 células/pozo de PC-3. A continuación, la placa se incubó durante 24 h a 37°C en CO₂ al 5%. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de las sustancias de prueba o del fármaco de referencia. La placa se incubó 48 h en las mismas condiciones. Los grupos testigo contenían solo un volumen equivalente de cada línea celular.

Después, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 50% p/v (50 µL/pozo). La placa se incubó durante 60 min a 4 °C. Los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó 3 veces con agua destilada desionizada y se dejó secar. Las células se trataron con 100 µL de sulforrodamina B (SRB, SIGMA®) al 4% durante 30 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con una disolución de ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris (SIGMA®) no amortiguada. Las absorbancias se determinaron en un lector de placas a una λ de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas, por lo tanto, a mayor coloración menor porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación 1. En donde A correspondía al valor de DO de las células sin tratar; y B al valor de DO de las células tratadas con las sustancias de prueba o de referencia.

$$\% IC = 100 - \left[\frac{B}{A} * 100 \right] \quad (1)$$

En la tabla 4 se muestra la actividad antiproliferativa de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**) sobre las líneas celulares PC-3 y MCF-7 a diferentes concentraciones.

Tratamiento	PC-3	MCF-7
Vehículo	97.07 \pm 0.17	95.19 \pm 1.23
10 μM	96.69 \pm 1.92	94.75 \pm 1.15
20 μM	94.92 \pm 1.24	89.78 \pm 2.11
40 μM	90.57 \pm 1.03	84.48 \pm 1.82
80 μM	89.79 \pm 1.76	81.81 \pm 2.05
IC₅₀	>80 μ M	>80 μ M

Tabla 4. Actividad antiproliferativa de **2**.

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

5.4.2.1. Condiciones generales

Se emplearon ratones machos de la cepa CDI con un peso comprendido entre 20 y 30 g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo, con acceso *ad libitum* de agua y alimento.

5.4.2.2. Procedimiento

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

Cada animal fue anestesiado con una dosis de 31.5 mg/Kg de pentobarbital sódico (PBS) por vía intraperitoneal (ip).

Posteriormente a todos los ratones se les administró tópicamente 10 μ L de una solución etanólica de TPA (250 μ g/mL) en la oreja derecha (5 μ L de cada lado).

Diez minutos después se administró tanto el fármaco de referencia (indometacina) como el compuesto a evaluar disuelto en el vehículo correspondiente. La indometacina se administró en una dosis de 0.36 mg/oreja y el compuesto en una dosis de 1 μ mol/oreja (0.456 mg/oreja).

En la oreja izquierda se administraron 10 μ L de EtOH y luego 20 μ L del vehículo correspondiente. Después de 4 h se sacrificó a los animales en una cámara de dióxido de carbono y se obtuvieron las biopsias de cada oreja.

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

$$\% \text{ Inhibición del edema} = 100 - \left(\frac{E_T}{E_C} * 100 \right) \quad (2)$$

Los datos experimentales se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control.

En la tabla 5, se observan los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria en el modelo inducido con TPA de la 16 β -hidroxicicloartan-3,24-diona (**2**).

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	-	15.20 \pm 0.65	-
2	1 μ mol/oreja	6.55 \pm 2.15	56.91**

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de **2**.

VI. DISCUSIÓN

Estudios recientes han demostrado la actividad antiproliferativa de la argentatina B. Con el fin de obtener compuestos con mayor actividad nuestro grupo ha sintetizado varios derivados citotóxicos de éste triterpeno.⁵⁶ La mayoría de estos derivados se han obtenido por la modificación del anillo A de la argentatina B. Por otro lado, se ha informado de la apertura de ciclopropanos cercanos a grupos carbonílicos. El mecanismo propuesto involucra que uno de los enlaces de este ciclo realiza un ataque nucleofílico al carbono de un carbonilo que esta interaccionando con un ácido de Lewis como el SnCl_4 . El mecanismo de esta reacción se ilustra en la Figura No. 11.⁵⁷

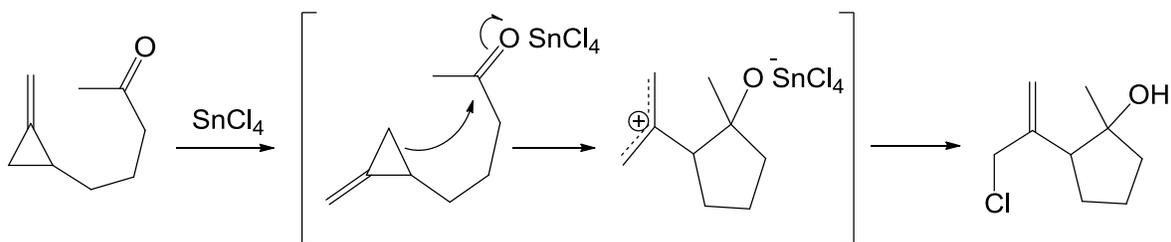
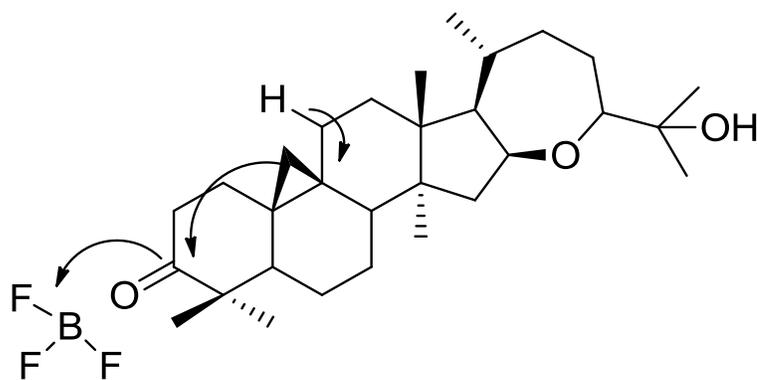


Figura No. 11. Mecanismo de apertura de un ciclopropano.

Considerando que la argentatina B presenta un carbonilo en la posición 3 el cual está cercano al ciclopropano de la posición 19, entonces es factible suponer que en presencia de un ácido de Lewis como el BF_3 , el carbono de éste carbonilo sufriría un ataque de parte del ciclopropano. El siguiente diagrama ilustra esta hipotética reacción.



Reacción propuesta por interacción de BF_3 con la argentatina B.

Tomando en cuenta lo anterior en este proyecto se propuso la reacción de la argentatina B con el eterato de trifluoruro de boro [BF_3 (Et_2O)].

6.1. Aislamiento de la 16 β ,24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona (**1**) (argentatina B).

Mediante métodos químicos convencionales, a partir de la resina obtenida como subproducto en la extracción del hule proveniente de la especie *Parthenium argentatum* (Gray), se aisló **1**, con un rendimiento del 2.5 %. La identificación de este compuesto se logró por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura. La presencia del anillo de tres miembros formado por los carbonos C-9, C-10 y C19 con una orientación β ubica a **1** como un triterpeno de tipo cicloartano (Figura No. 12).

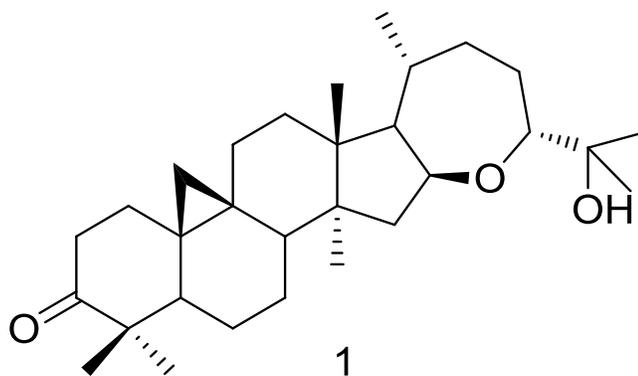


Figura No. 12. Estructura química de la argentatina B (**1**).

6.2. Obtención de **16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2)**.

La reacción de **1** con trifluoruro de boro (BF_3) permitió la formación de **2**, un producto cristalino con un punto de fusión de 132-135°C. El espectro de infrarrojo (IR) mostró una banda a 3460.09 cm^{-1} , asignada a un grupo hidroxilo y una banda a 1700.37 cm^{-1} correspondiente a la energía de vibración del enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo carbonilo. Por otro lado, el espectro de masas (EM) obtenido por impacto electrónico para el compuesto **2**, mostró un ion molecular a 456 m/z correspondiente a una fórmula mínima de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Al analizar el espectro de RMN ^1H se observó una señal a 4.54 ppm, la cual se asignó a un protón unido a un átomo de carbono que soporta un grupo hidroxilo, además, fue evidente la pérdida de la señal a 3.59 ppm asignada al protón de la posición 24R del espectro de la argentatina B. Al comparar estos dos espectros, se pudo observar que el producto de reacción conservó el protón 16α . También se observaron los dobletes característicos de los protones del ciclopropano en C-19 a 0.82 y 0.57 ppm. De lo anterior, se dedujo que el compuesto poseía un grupo hidroxilo en la posición 16β y que el ciclopropano no se había alterado. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron dos señales a 216.74 y 216.53 ppm y fueron asignadas a dos grupos carbonilo. En el espectro del

experimento Dept135, se observaron señales para siete metilos [26.16, 20.78, 20.17, 18.93, 18.36, 18.28 y 17.75 ppm], diez metilenos [46.81, 37.46, 36.68, 33.39, 32.69, 29.84, 29.38, 26.48, 25.93 y 21.43 ppm], seis metinos [72.17, 57.39, 48.52, 47.88, 40.92 y 29.58 ppm] y siete carbonos sin hidrógenos [216.74, 216.53, 143.71, 50.24, 46.66, 45.81 y 26.09 ppm]. Tomando en cuenta lo anterior se propuso la siguiente estructura para **2** (Figura No. 13).

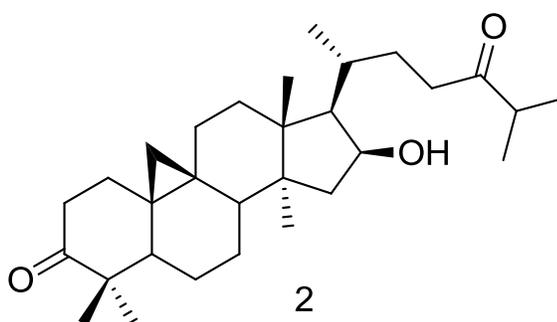


Figura No. 13. Estructura química de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**).

El patrón de fragmentación apoyó dicha estructura, el cual mostró una señal a 43 m/z y una a 71 m/z, lo que indicaba que el grupo isopropilo estaba unido a un grupo carbonilo, lo anterior, aunado a la señal observada a 4.54 ppm del espectro de RMN ^1H , nos llevó a deducir que el trifluoruro de boro (BF_3) abrió el éter entre las posiciones 16 β y 24R de la argentatina B, dejando un hidroxilo en la posición 16 β y formando una cadena de ocho átomos de carbono con un grupo isopropilo en su posición terminal (Figura No. 14).

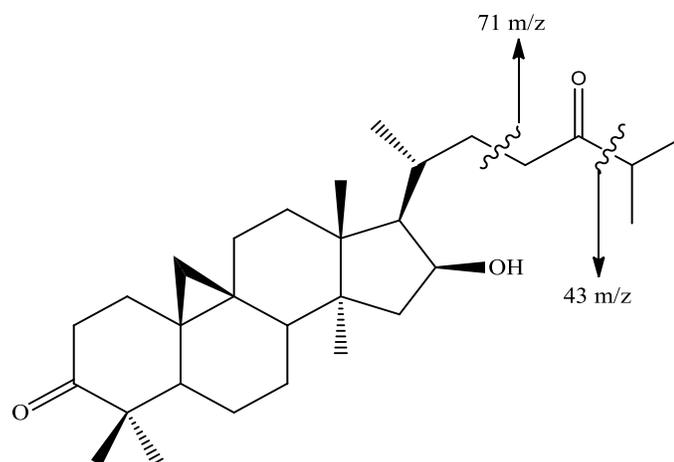


Figura No. 14. Patrón de fragmentación para la 16β-hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**).

Mediante el análisis de los experimentos HSQC y HMBC se comprobó la estructura propuesta (Figura No. 15).

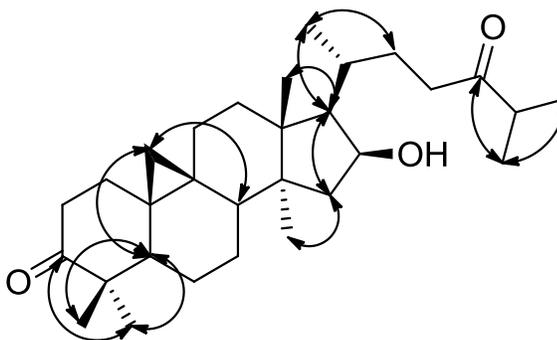


Figura No. 15. Principales interacciones en el experimento HMBC de **2**.

Posición	¹³ C / DEPT	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)
1	CH ₂	29.38	1.00 2.01
2	CH ₂	36.68	2.53 2.66
3	C	216.74	
4	C	45.81	
5	CH	48.52	1.69
6	CH ₂	21.43	1.56 1.56
7	CH ₂	25.93	1.41 1.41
8	CH	47.88	1.69
9	C	143.71	
10	C	26.09	
11	CH ₂	26.48	1.14 2.04
12	CH ₂	33.39	1.52 1.83
13	C	46.66	
14	C	50.24	
15	CH ₂	46.81	1.43 2.02
16	CH	72.17	4.53
17	CH	57.39	1.58
18	CH ₃	20.16	0.90
19	CH ₂	29.84	0.55 0.80
20	CH	29.58	1.61
21	CH ₃	18.36	1.11
22	CH ₂	32.69	1.64
23	CH ₂	37.46	2.28 2.69
24	C	216.53	
25	CH	40.92	2.60
26	CH ₃	17.75	0.90
27	CH ₃	18.29	1.10
28	CH ₃	18.93	1.17
29	CH ₃	20.79	1.10
30	CH ₃	22.17	1.05

Tabla 6. Datos de RMN de la 16β-hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**).

Un posible mecanismo para explicar la formación de **2** es postular inicialmente el ataque del BF_3 sobre el átomo de oxígeno que forma el éter entre la posición 16β y la 24R (Figura No. 16).

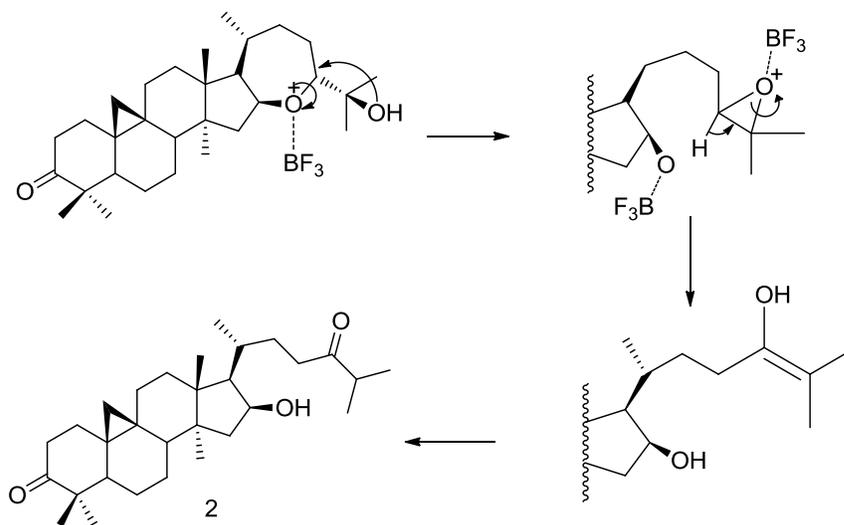


Figura No. 16. Posible mecanismo de reacción de la argentatina B con BF_3 para la obtención de **2**.

Este producto se había aislado previamente como una mezcla cristalina de **2** y **4** obtenida a partir de 25-acetiloxi- 16β , 24R -cicloartan-3-ona (acetato de argentatina B) tratada con eterato de trifluoruro de boro [$\text{BF}_3 (\text{Et}_2\text{O})$] (Figura No. 17).⁵⁸ Sin embargo, éste es el primer informe acerca de la obtención de **2** a partir del tratamiento de **1** con eterato de trifluoruro de boro [$\text{BF}_3 (\text{Et}_2\text{O})$].

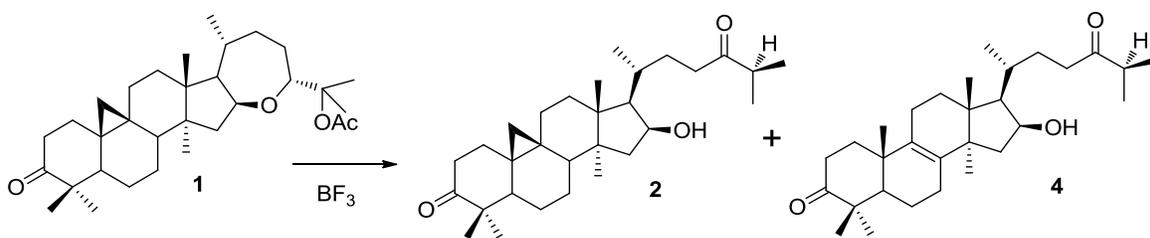


Figura No. 17. Reacción del acetato de argentatina B con BF_3 .

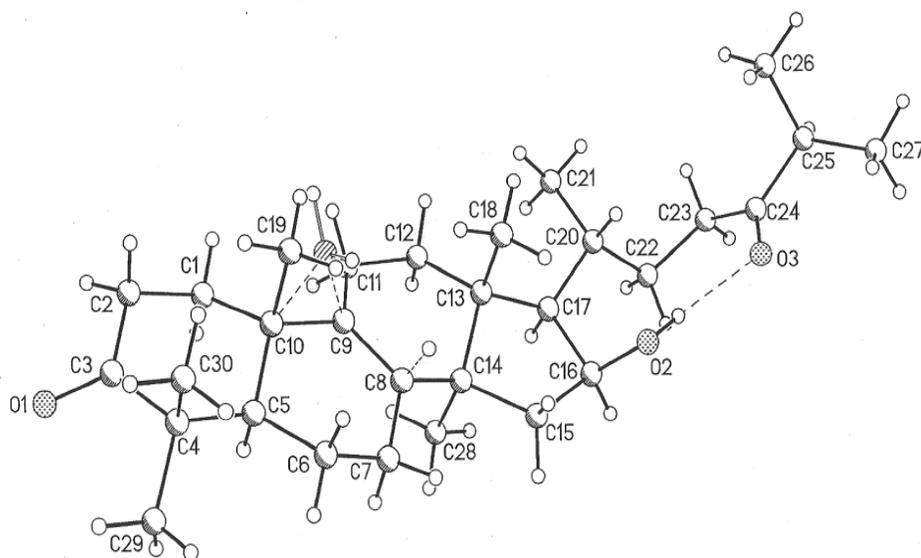


Figura No. 18. Estereoestructura de la mezcla binaria de **2** y **4** obtenida por medio de un estudio de difracción de rayos X.

La configuración *S* del nuevo centro quiral en C-16 fue determinado por la estructura cristalina de la mezcla de **2** y **4** (Figura No. 18).

6.3. Obtención del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (**3**).

La reacción de **1** con trifluoruro de boro (BF₃) también permitió la formación del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (**3**), un producto cristalino con punto de fusión de 142-144°C y cuya estructura se elucidó tomando en cuenta los siguientes resultados. El espectro de masas (EM) de **3**, obtenido por impacto electrónico, mostró un ion molecular a 456 m/z que corresponde a una fórmula mínima de C₃₀H₄₈O₃. La esperada apertura del ciclopropano se ve apoyada por el hecho de que en el espectro de RMN ¹H de **3** no se observaron los dobletes típicos a 0.82 y 0.58 ppm asignados a los protones del metileno en C-19, así como la aparición de una señal en RMN ¹³C a 84.74 ppm asignado a un átomo de carbono sin hidrógenos pero que está unido a un átomo de oxígeno. Ésta señal se asignó al átomo de carbono en C-3 en **3** el cual ésta unido a un grupo hidroxilo. Debido a que el ciclopropano en la argentatina B tiene una orientación β y dado que el ataque de C-19 tiene que ser del mismo lado, entonces se propone que el hidroxilo en C-3 tiene una orientación α . La formación de la doble ligadura en C-9/C-11 fue evidente por la presencia de una señal a 5.57 ppm que correlacionó con la señal a 118.7 ppm en el espectro de RMN ¹³C de **3**. En el mismo espectro se observó la señal del átomo de carbono en C-9 a 140.3 ppm que corresponde a un átomo de carbono que no contiene hidrógenos.

Adicionalmente a la modificación esperada existen evidencias espectrales que indican que el anillo de siete miembros también se modificó. Pues es evidente la pérdida de la señal asignada al protón en 24 R a 3.59 ppm. En el experimento DEPT de RMN ¹³C se observaron las señales para los 30 átomos de carbono indicados por la fórmula mínima. Así se observaron siete metilos [25.88, 21.65, 19.32, 18.60,

18.56, 18.44 y 16.46 ppm] nueve metilenos [48.50, 45.70, 38.29, 36.71, 33.61, 31.82, 29.64, 27.12 y 26.36 ppm], siete metinos [118.72, 72.09, 56.69, 45.42, 45.42, 41.38 y 30.11 ppm] y siete señales asignadas a átomos de carbono sin hidrógenos [215.40, 140.35, 84.74, 47.01, 45.27, 44.19 y 41.38 ppm]. En el espectro de RMN ^{13}C de **3** se observó una señal a 215.9 ppm que fue asignada a un grupo carbonilo. Tomando en cuenta la fórmula mínima y los datos de la RMN ^1H y RMN ^{13}C se propuso la siguiente estructura para el compuesto **3** (Figura No.19).

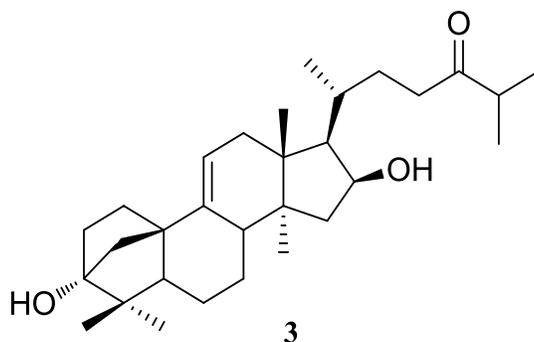


Figura No. 19. Estructura química del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (**3**).

Esta propuesta fue apoyada por el patrón de fragmentación para **3** (Figura No. 20). El pico a 127 m/z observado en el espectro de masas (EM) nos llevó a deducir que el trifluoruro de boro (BF₃) abrió el éter entre las posiciones 16 β y 24R de la argentatina B, dejando un hidroxilo en la posición 16 β y formando una cadena de ocho átomos de carbono con un grupo isopropilo en su posición terminal. Esta modificación es igual a la sufrida por **1** para la obtención de la diona **2**.

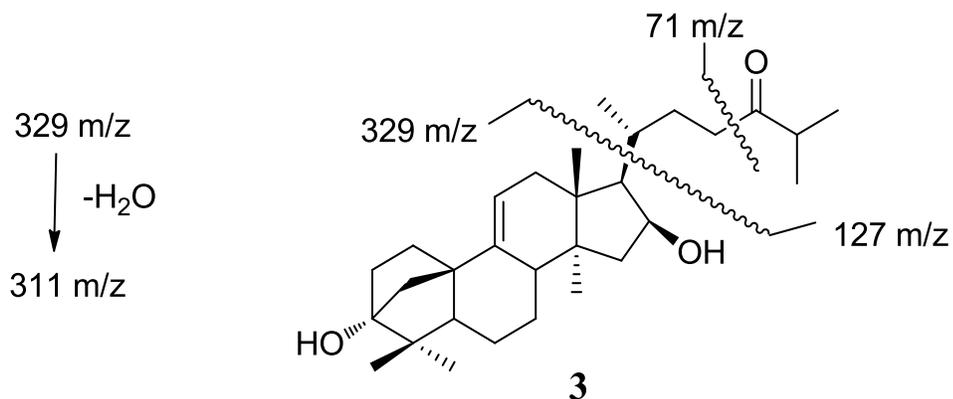


Figura No. 20. Principales fragmentos del espectro de masas de **3**.

Adicionalmente, esta propuesta estructural fue confirmada mediante los experimentos HSQC y HMBC (Figura No. 21).

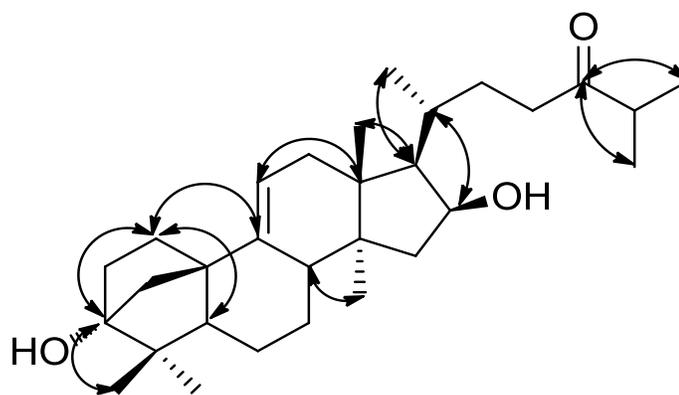


Figura No. 21. Principales interacciones HMBC para **3**.

Posición	¹³ C / DEPT	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)
1	CH ₂	33.61	1.19 2.30
2	CH ₂	31.82	1.49 1.91
3	C	84.74	
4	C	41.38	
5	CH	45.42	1.80
6	CH ₂	26.36	1.10 1.45
7	CH ₂	27.12	1.10 1.53
8	CH	45.42	2.12
9	C	140.35	
10	C	47.01	
11	CH	118.72	5.56
12	CH ₂	36.71	1.97 2.26
13	C	44.19	
14	C	45.27	
15	CH ₂	38.29	1.97 2.09
16	CH	72.09	4.65
17	CH	56.69	1.20
18	CH ₃	16.06	1.10
19	CH ₂	48.50	1.02 1.95
20	CH	30.11	1.80
21	CH ₃	18.20	0.75
22	CH ₂	29.64	0.77 2.05
23	CH ₂	45.70	1.80 2.13
24	C	215.40	
25	CH	41.38	2.06
26	CH ₃	18.04	0.87
27	CH ₃	18.16	0.80
28	CH ₃	18.92	0.75
29	CH ₃	21.25	0.90
30	CH ₃	25.47	0.98

Tabla 7. Datos de RMN del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (**3**).

Éste constituye el primer informe acerca de la obtención de **3** a partir del tratamiento de la argentatina B con eterato de trifluoruro de boro [$\text{BF}_3(\text{Et}_2\text{O})$].

En reacciones previas a las que se ha sometido la argentatina B, el ciclopropano de éste triterpeno no había podido ser modificado. Sin embargo, en la reacción con BF_3 , además de abrir el anillo E cuyo mecanismo de reacción se ha descrito previamente, se logró romper este ciclo. Un posible mecanismo para explicar la formación de este nuevo compuesto, es postular el ataque nucleofílico del ciclopropano al carbono del carbonilo en C-3, provocado por la interacción de éste con el BF_3 y posiblemente de manera concertada la eliminación de un protón en C-11 (Figura No. 22).

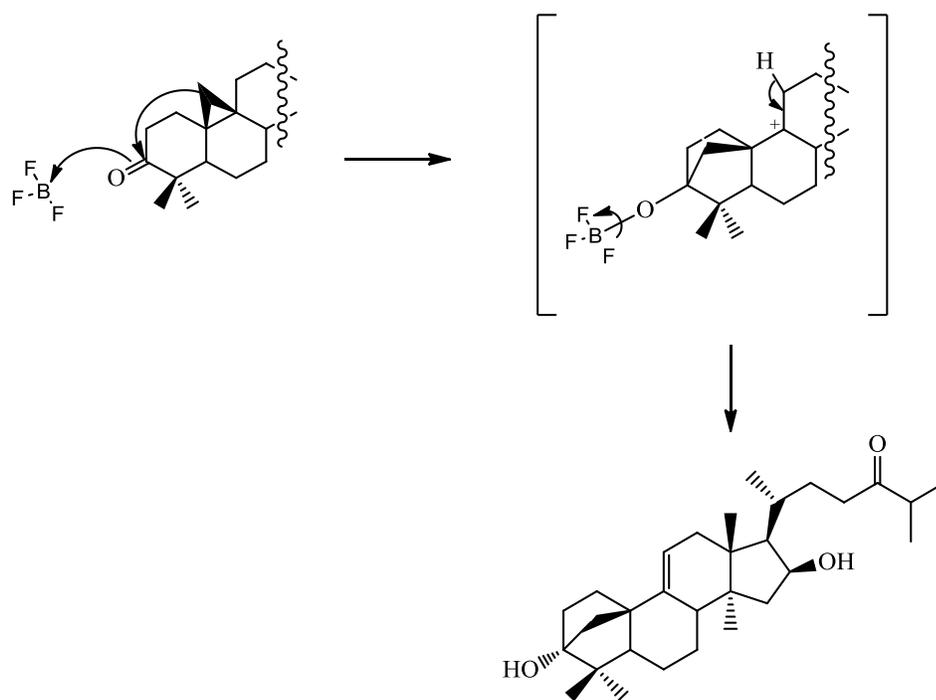


Figura No. 22. Posible mecanismo de reacción de la argentatina B con BF_3 , para la obtención del $3\alpha,16\beta$ -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (**3**).

De acuerdo con nuestros resultados la formación de **2** precede a la formación de **3** (Figura No. 23).

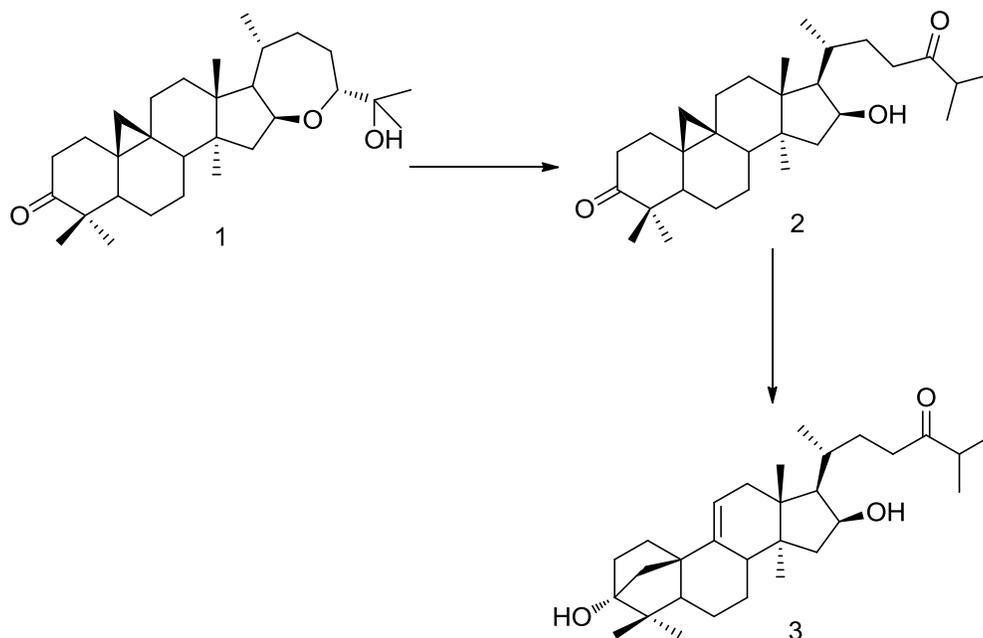


Figura No. 23. La formación del compuesto **2** precede a la formación del compuesto **3**.

6.4. Actividad biológica.

Uno de los objetivos de este proyecto, fue la obtención de derivados de la argentatina B, para su evaluación citotóxica en líneas celulares de cáncer humano.

6.4.1. Evaluación de la inhibición de crecimiento de células de cáncer humano por el método de la sulforrodamina B (SRB) *in vitro*.

El compuesto **2**, se sometió a la evaluación inhibitoria de la proliferación de dos líneas celulares de cáncer humano, PC-3 y MCF-7. Los resultados mostraron que este compuesto presentó una actividad

muy baja frente a estas dos líneas celulares ya que su IC₅₀ fue mayor a 80µM, muy por encima de la IC₅₀ reportada para la argentatina B (Parra 2005). Sin embargo, esto no descarta que este compuesto tenga resultados más satisfactorios en estudios *in vivo*, pues estudios recientes han demostrado que triterpenos con baja actividad en líneas celulares presentan una buena actividad anti tumoral *in vivo*.

6.4.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.

También se evaluó la actividad antiinflamatoria del compuesto **2**, la cual mostró el 56.91% de inhibición del edema por cada 0.456 mg/oreja, un porcentaje de inhibición mayor que el de la propia argentatina B, la cual es del 85% de inhibición por cada 1 mg/oreja. Por lo anterior podemos afirmar, que la apertura del anillo E modifica la actividad antiinflamatoria.

VII. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (**2**) y el 3 α , 16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (**3**) a partir de la reacción de la argentatina B con el éterato de trifluoruro de boro [BF₃ (Et₂O)].
- Es la primera vez que se obtienen los derivados (**2**) y (**3**) a partir de la modificación a la argentatina B usando éterato de trifluoruro de boro [BF₃ (Et₂O)].
- Se logró la apertura del ciclopropano y su reacomodo en C-3 de la argentatina B para permitir la formación de (**3**), por interacción del éterato de trifluoruro de boro [BF₃ (Et₂O)].
- En presencia de ácidos de Lewis, se favorece además de la apertura del éter entre C-16 y C-24, la apertura del ciclopropano de la argentatina B.
- La actividad antiinflamatoria de (**2**) fue mejor que la actividad antiinflamatoria de la argentatina B.
- La actividad antiproliferativa de (**2**), estuvo muy por debajo de la actividad reportada en la literatura de la argentatina B.
- La apertura del anillo E de la argentatina B favorece la actividad antiinflamatoria de este triterpeno, no así a la actividad antiproliferativa en líneas de células cancerosas PC-3 y MCF-7.

VIII. REFERENCIAS

1. OMS. Organización Mundial de la Salud. (2011). www.who.int/es/. Consultada 13 junio 2013 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
2. Vega E., Velasco R., Jiménez M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*, 31(3), 97-111.
3. Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales en México*. Distrito Federal: Botas.
4. Parra Delgado, Hortensia (2006). *Obtención de compuestos citotóxicos a partir de triterpenos del tipo cicloartano*. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.
5. Rao, C. V. & Raddy, B. S. (2004). NSAIDs and chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*, 4(1), 29-42.
6. Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology and therapeutics*, 99(1), 1-13.
7. Schlaepfer, L. & Mendoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
8. Mohammad, S. (2006). Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 1(1), 35-41.
9. Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60(1), 52-60.
10. Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2005). Plants as source of anticancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(5), 72-79.
11. Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader M. K. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037.
12. Cragg, G. G., Boyd, M. R., Cardellina II, J. H., Newman, D. J., Snader, K. M., McCloud, T. G. (1994). Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. In: Chadwick, D. J.,

Marsh, J. *Ethnobotany and the search for new drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. Chichester, UK.

13. Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 2000, 17(3), 215-234.

14. Moore, M. J. & Erlichman, C. (1998). *Pharmacology of anticancer drugs*. In: Tannock, I. F., Hill, R. P. The basic science of oncology. The McGraw-Hill Companies, New Baskerville, USA.

15. Hartwell, J. (1968). Plants used against cancer. A survey. *Lloydia*. 31(2), 71-170.

16. Lorence, A., Nessler, CL. (2004). Molecules of interest. Camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry*, 65(1), 2735-2749.

17. Shu, Y.Z. (1998) Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod*, 61(8), 1053-1071.

18. Roitt, I. & Delves P. (1994). *Inmunología*. (3a ed.). España: Ediciones científicas y técnicas S. A.

19. Rodríguez-Vita, J., Lawrence, T. (2010). The resolution of inflammation and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21(1), 61-65.

20. Smith, C. & Reynard, A. (1993). *Farmacología*. Argentina: Médica Panamericana S. A.

21. Mantovani, A., Allavena, P., Sica A., Balwill F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*. 454(7203), 436-444.

22. Lawrence, T. Inflammation and cancer: a failure of resolution? (2007). *Pharm. Sci.* 28(4), 162-165.

23. Kundu, J. K., Surh, Y. J. (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation Research*, 659(1), 15-30.

24. Grivennikov, Sergei I. & Karin M. (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics and Development*. 20(1), 65-71.

-
-
25. Chaturvedi, P. K., Bhui, K., Shukla, Y. (2008). Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Canc. Lett*, 263(1), 1-13.
26. Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B. B., Grissem W., Jones R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, Estados Unidos.
27. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. (2004). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. *Elsevier*, 60(1), 132-142.
28. Patocka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, 1(1), 7-12.
29. Tan, G. T., Lee, S., Lee, I., Chen, J., Leitner, P., Besterman, J. M., Kinghom, A. D., Pezzuto, J. M. (1996). Natural-product inhibitors of human DNA ligase I. *Biochemical Journal*, 314(1), 993-1000.
30. Mizushina, Y., Lida, A., Sugawara, F., Sakaguchi, K. (2000). Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and topoisomerase. *Biochemical Journal*, 350(1), 757.
31. Setzer, W. N. & Setzer, M .C. (2003). Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic agents. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* 3(6), 540-556.
32. You, Y., Nam, N.H., Kim, Y., Bae, K. H., Ahn, B. Z. (2003). Antiangiogenic activity of lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytother. Res*, 17(4), 341-344.
33. Mahato, S. B. & Sen, S. (1997). Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry*, 44(7), 1185-1236.
34. Calixto, J. B., Otuki, M. F., Santos. A. R. S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). *Planta médica*, 69(11), 973-983.
35. Huguet, A. I., Recio M. C., Máñez S., Giner R. M., Ríos J. L. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induce by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology*, 410(1), 69-81.
36. Angulo, S. J. L. and Quero-Gutiérrez, E. (1984). C.I.Q.A.

37. Siddiqui, I. A., Connel, J.L. and Locktow. (1980). Guayule natural rubber development project second year report. State of California Department.

38. Campos-Lopez, E., Nevaez-Camacho, E., Ponce-Vélez, M.A., and Angulo-Sánchez, J.L., Chemtec., vol. 9, 1979, p.50.

39. Campos, E., Nevaez, E., Maldonado R. Guayule: Present state of knowledge. *En* 1981. Guayule, reencuentro en el desierto. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Centro de investigación en Química Aplicada. Comisión Nacional de las Zonas Áridas. México. Pp 375-410.

40. Domínguez X. A. Aspectos químicos del guayule. *En* 1981. Guayule, reencuentro en el desierto. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Centro de investigación en Química Aplicada. Comisión Nacional de las Zonas Áridas. México. Pp 27-70.

41. Rodríguez, L., Romo de Vivar A., Ortega A., Aguilar M., Romo J. (1970). Determinación de las estructuras de las argentatins A, B y C del guayule. *Revista Latinoamericana de Química*, 1(1), 24-38.

42. Schloman, W. W., Hively, R. A., Krishen, A., Andrew, M. A. (1983). Guayule byproduct evaluation: extract characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(1), 873-876.

43. Martínez, R., Martínez, M., Zamorano, O. (1990), Electron impact mass spectrometry of triterpenoids from guayule. *Organic Mass Spectrometry*, 25(4), 237-238.44. Romo J., Romo de Vivar A., Ortega A., Díaz, E. (1970). Las guayulinas A y B, nuevos sesquiterpenos aislados del guayule. *Revista Latinoamericana de Química*, 1(1), 132-135.

45. Cespedes, C. L., Martínez, M., Calderon J. S., Salazar, J. R., Aranda, E. (2001), Insect growth regulatory activity of some extracts and compounds from *Parthenium argentatum* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, 56(1-2), 95-105.

46. Martinez, M. J., Vasquez, S. M., Espinosa, C., Dias, M., Herrera, M. (1994). Antimicrobial properties of argentatine A isolated from *Parthenium argentatum*. *Fitoterapia*, 65(1), 371-372.

47. Calzada, L., Salazar, E. L., Tellez, J., Martínez M., Martínez, R. (1995). Effect of tetracyclic triterpenes (argentatin A, argentatin B and argentatin D) on the estradiol-receptor of hormone-dependent tumors of human breast. *Medical science research*, 23(12), 815-816.

48. Pineda Herrera, Maribel (1999). *Modificaciones moleculares de los triterpenos aislados del Parthenium argentatum y su evaluación como agentes antiinflamatorios*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.

49. Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A., Kortsaris, A. H. (1997). Optimization of the sulphorhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, 208(2), 151-158.

50. Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulphorhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116.

51. Massao M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., Fukuda, Y. (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol*, 71(9), 1331-1336.

52. Robles, M. (2010). Proteína cinasa C: Mecanismos de acción y perspectivas en la comunicación celular. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado el 22 de febrero del 2013 de <http://www.smb.org.mx/text/beb/beb92111511.pdf>.

53. Flores, G. & Martínez, M. (2008). Anti-inflammatory and cytotoxic cycloartanes from Guayule (*Parthenium argentatum*). *Natural Product Communications*, 3(3), 413-422.

54.- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.

55. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 38(11), 757-766.

56. Parra, H., Compadre, C. M., Ramirez, T., Munoz, M. J., Compadre, R. L., Ostrosky, P., Martínez, M. (2006). Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (6), 1889-1901.

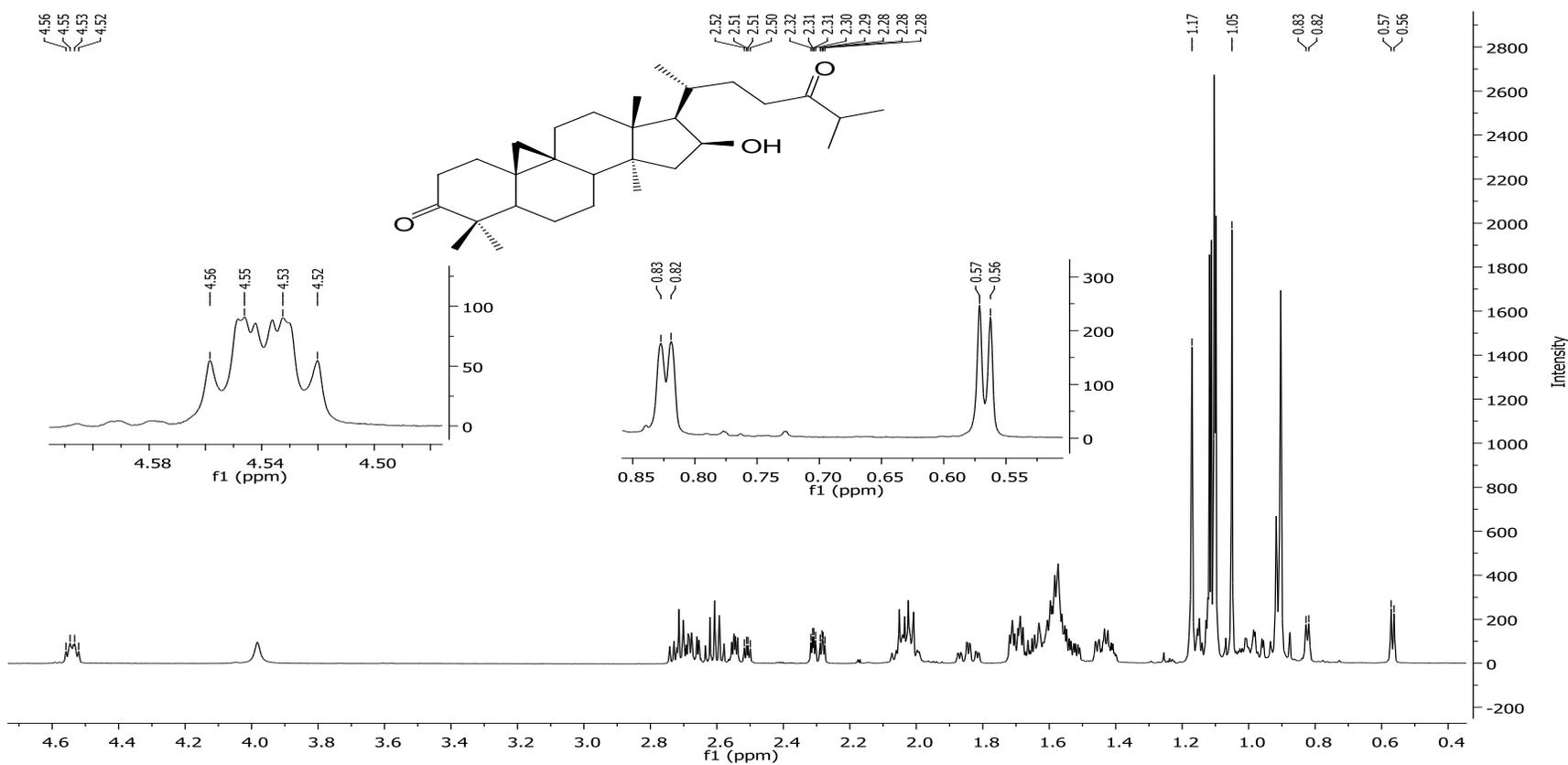
57. Peron, G. L. N., Kitteringham, J., Kilburn, J. D. (2000). Lewis acid mediated cascade reactions of silyl-substituted methylenecyclopropyl ketones. *Tetrahedron Letters*, 41(10), 1615-1618.

58. Luna Toledo, Cesar (2006). Obtención de compuestos citotóxicos a partir de un triterpeno tetracíclico de tipo cicloartano (argentatina B). Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.

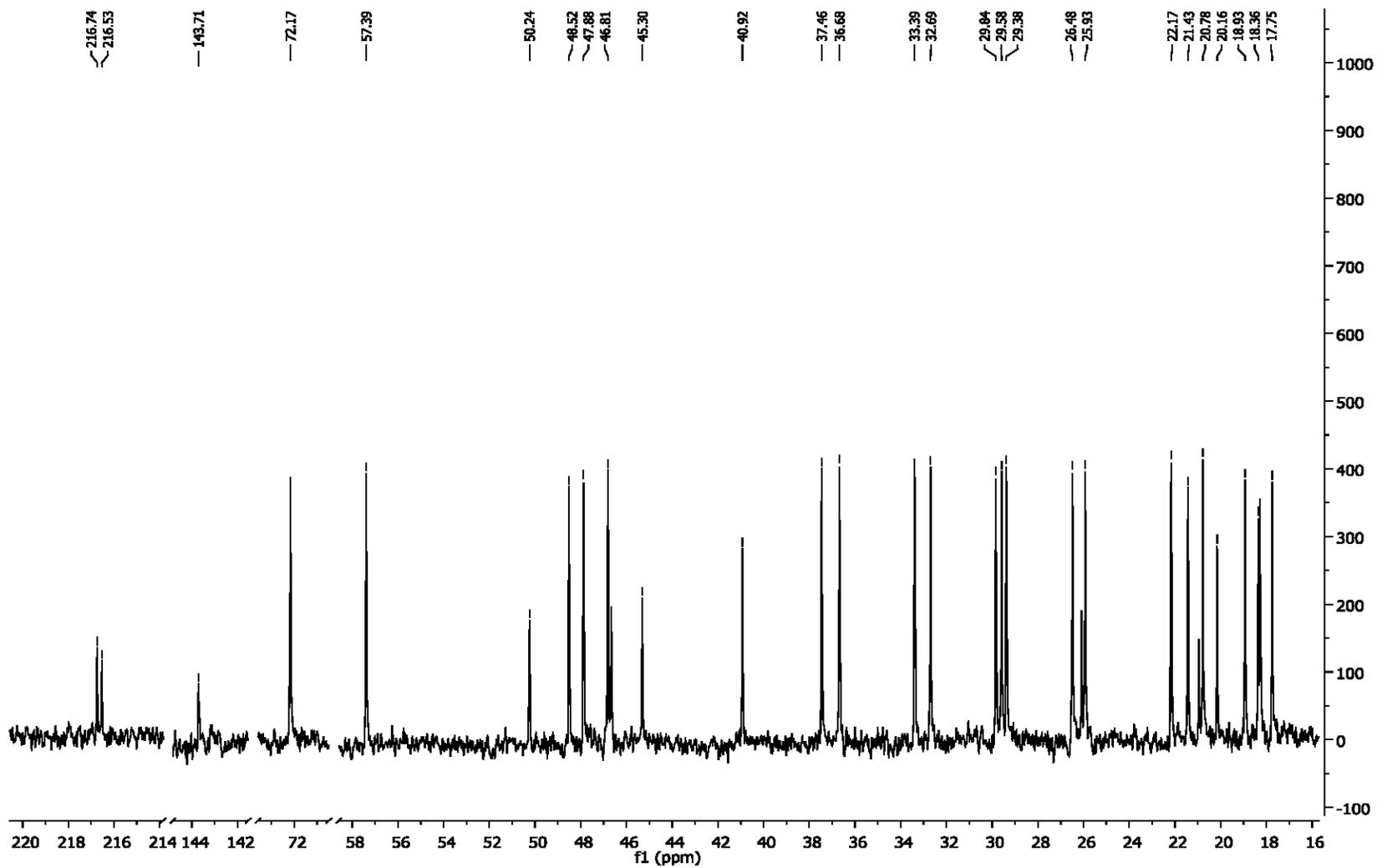
59. Parra, H., García, F., Sordo, M., Ramírez, T., Martínez, M., Ostrosky, P. (2005). Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life sciences*, 77(22), 2855-2865.

IX. APÉNDICE

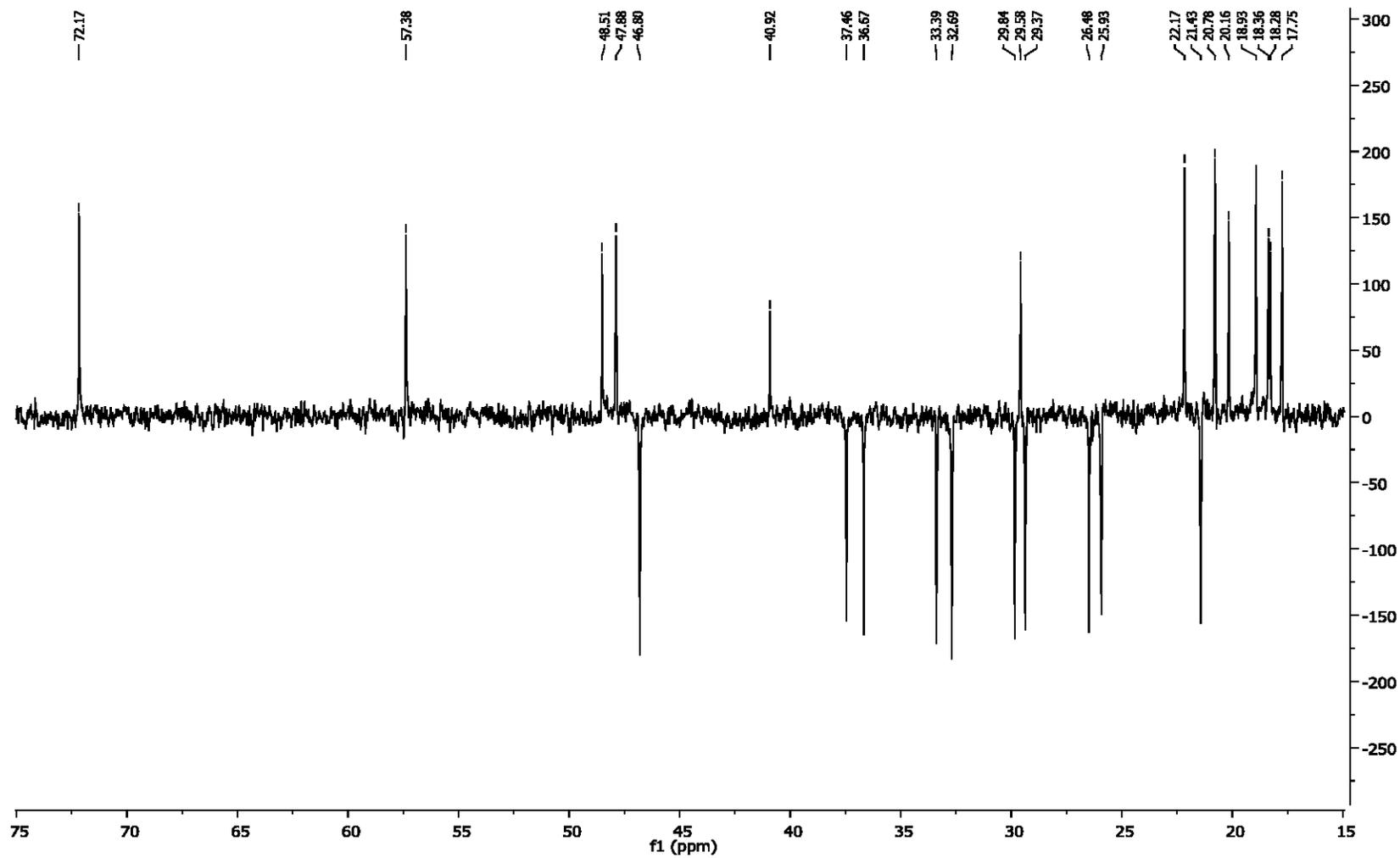
9.1. Espectro de RMN ^1H de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).



9.2. Espectro de RMN ^{13}C de la 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).

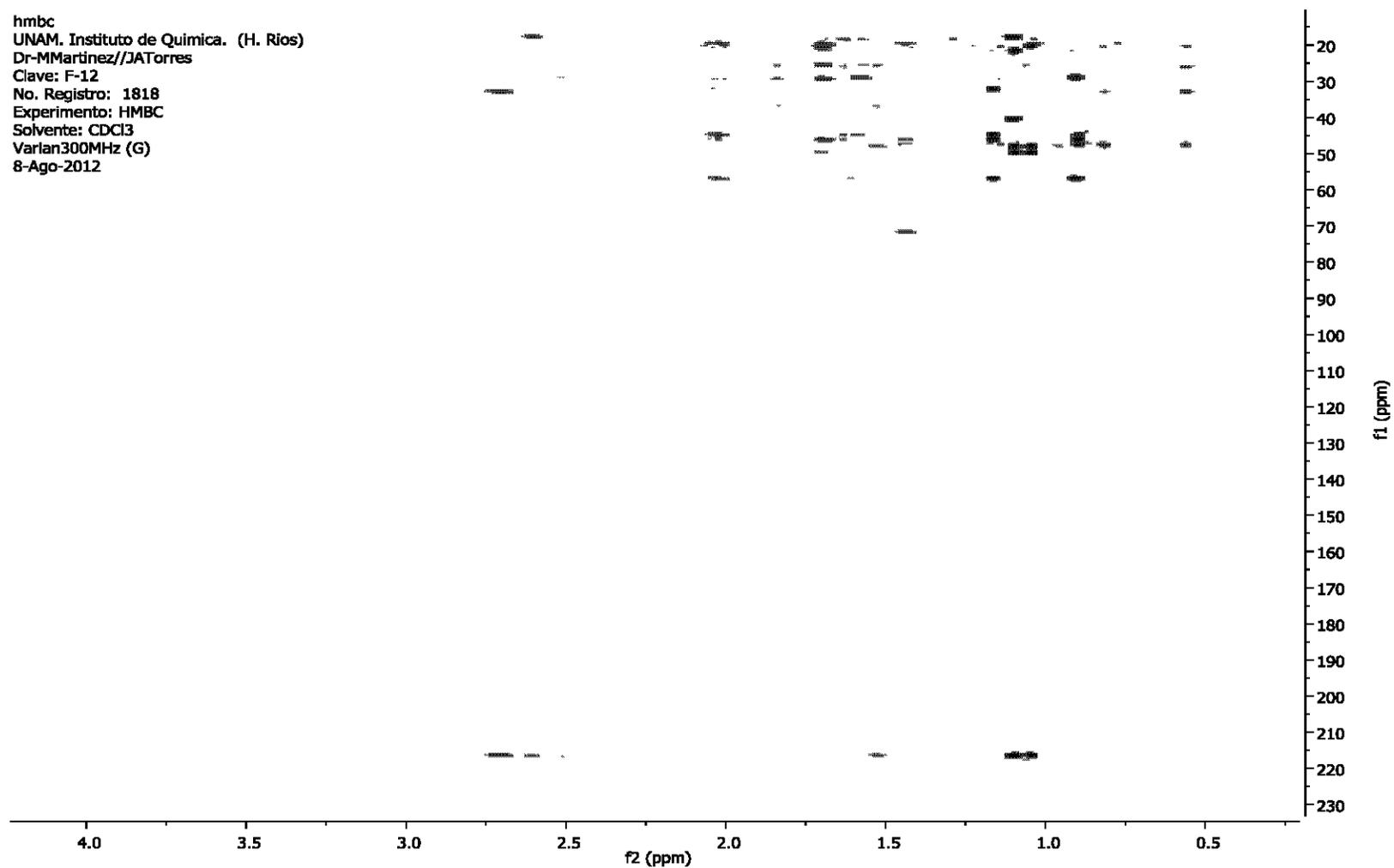


9.3. Espectro Dept135 de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).

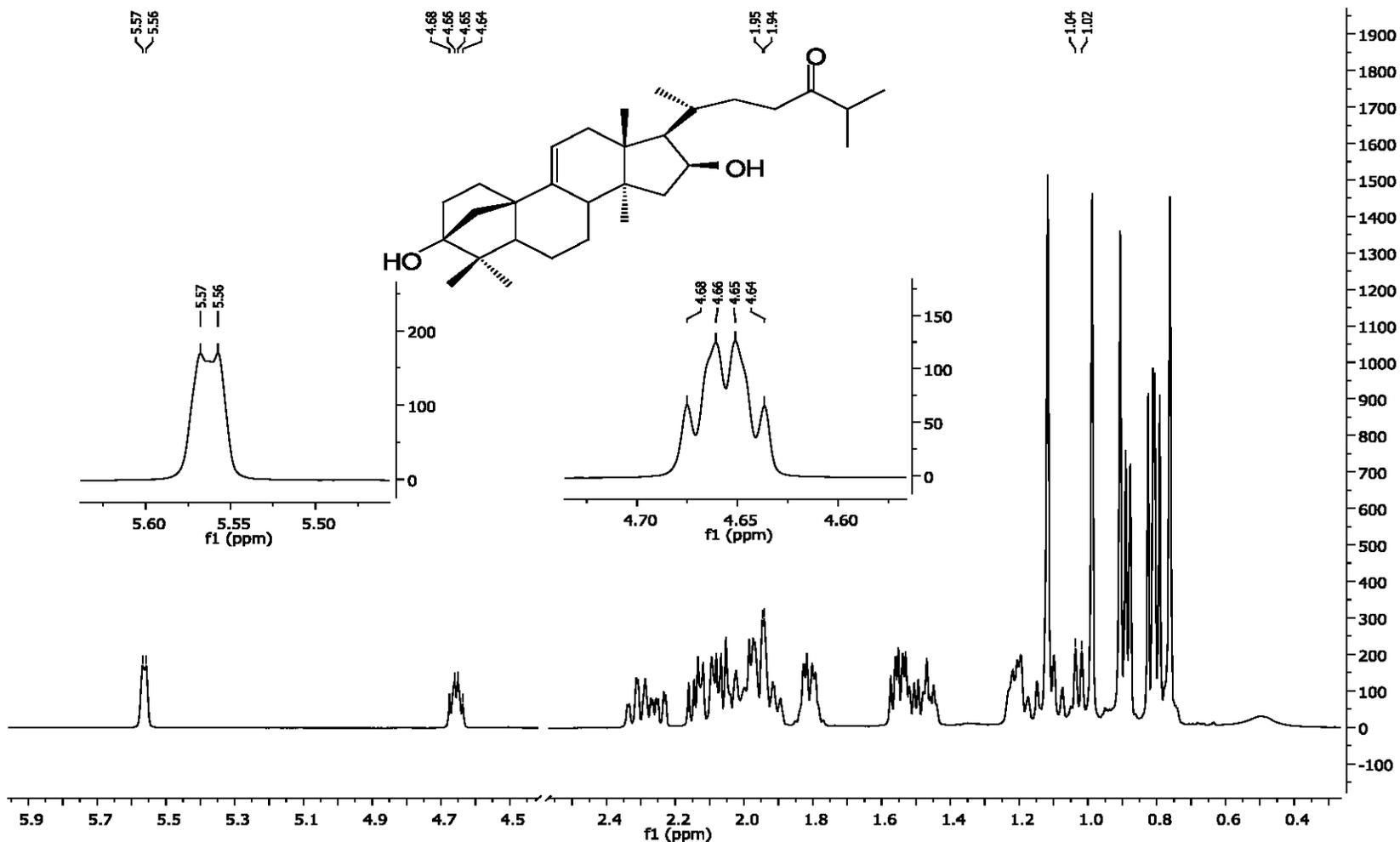


9. 4. Espectro HMBC de 16 β -hidroxi-cicloartan-3,24-diona (2).

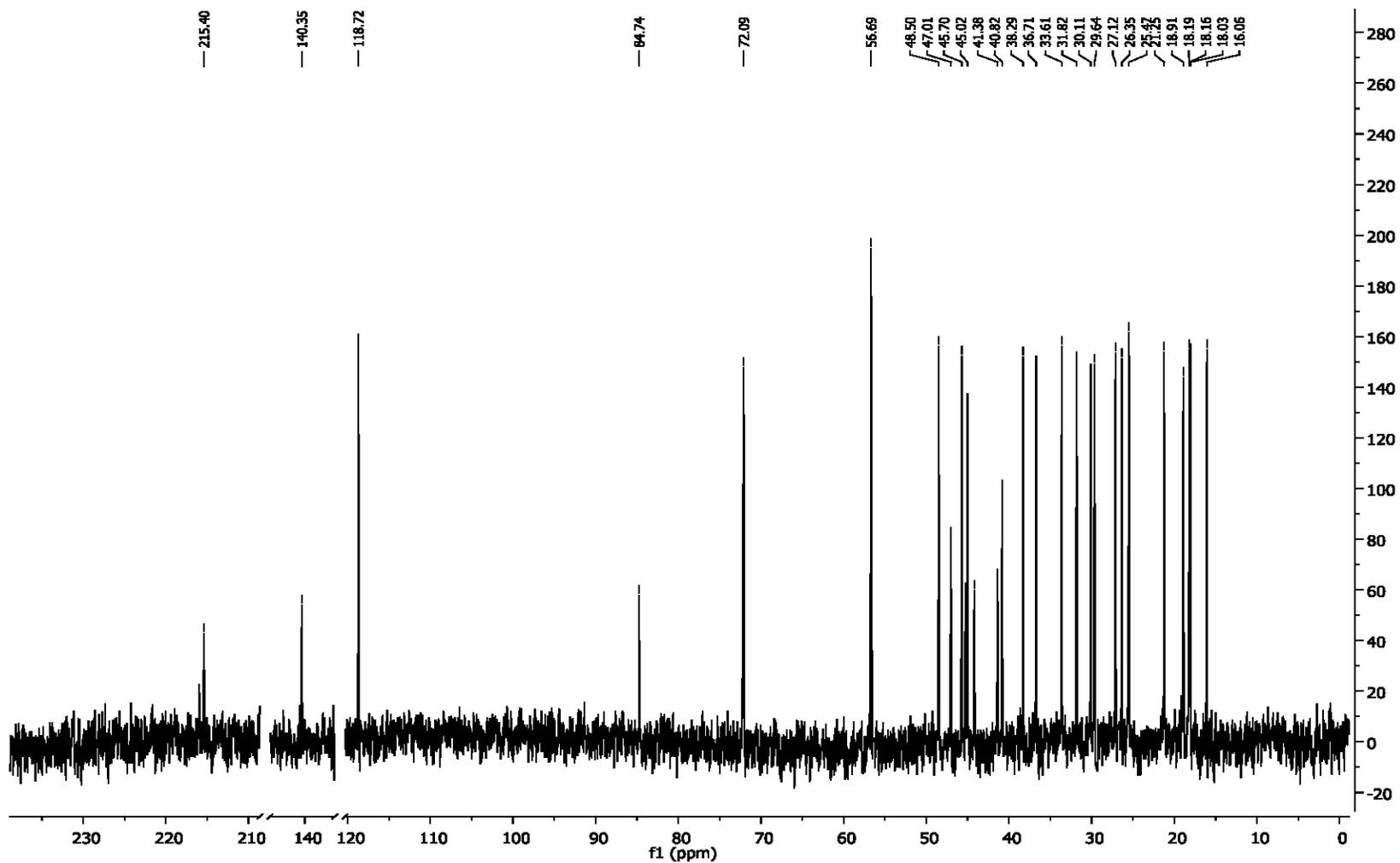
hmbc
UNAM, Instituto de Quimica. (H. Rios)
Dr-MMartinez//JATorres
Clave: F-12
No. Registro: 1818
Experimento: HMBC
Solvente: CDCl₃
Varian300MHz (G)
8-Ago-2012



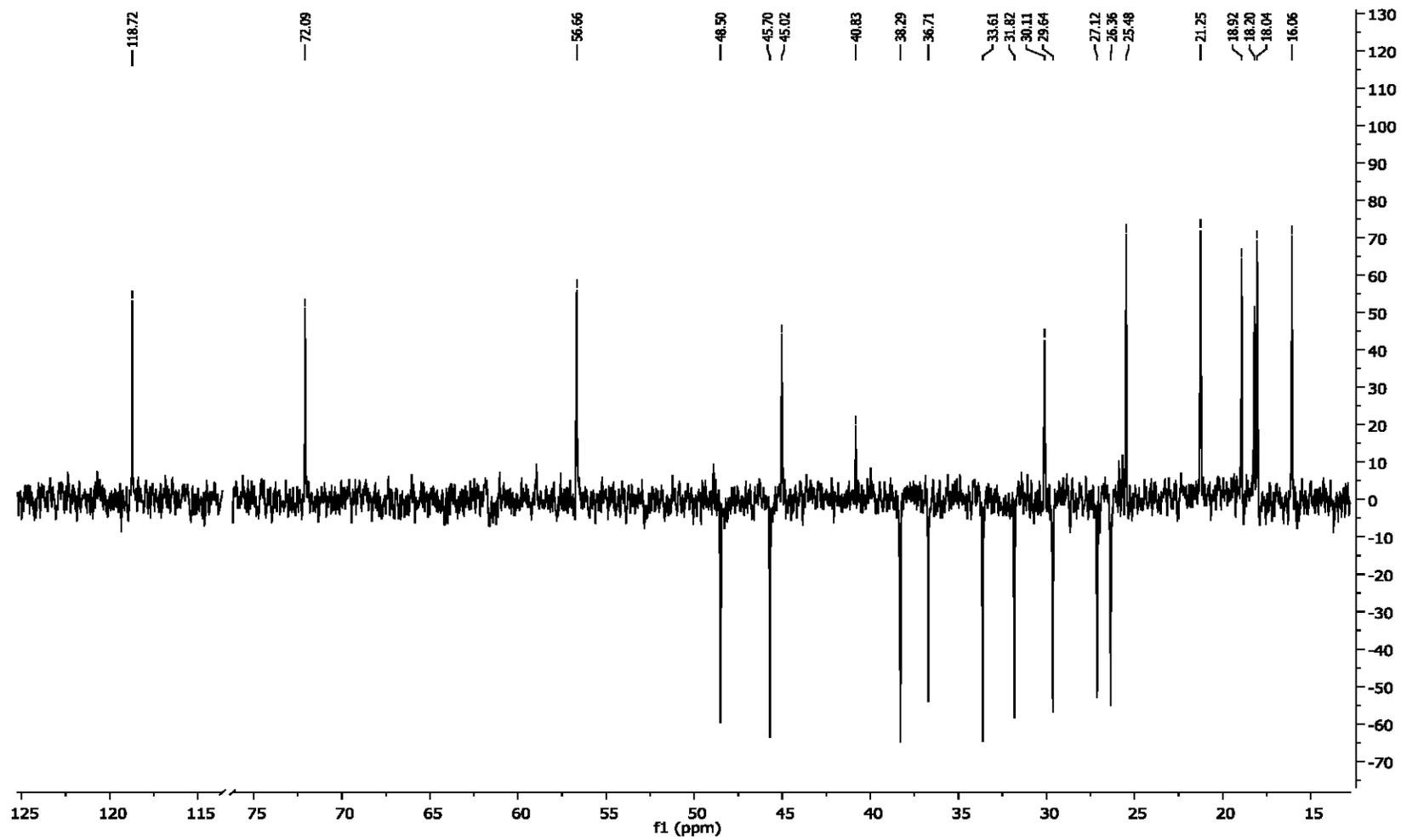
9.5. Espectro de RMN ^1H del $3\alpha,16\beta$ -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).



9.6. Espectro de RMN ^{13}C del $3\alpha,16\beta$ -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).



9.7. Espectro Dept135 del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolano-9,11-eno (3).



9.8. Espectro HMBC del 3 α ,16 β -dihidroxi-24-oxo-3,19-ciclolanost-9,11-eno (3).

