



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Preparación de furanonas con actividad inhibitoria de la  
proliferación de líneas de cáncer humano”**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
Q.F.B. ALEJANDRA GUADALUPE VILLEGAS PAÑEDA**

**TUTOR  
Mariano Martínez Vázquez  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. ENERO DE 2015**



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Preparación de furanonas con actividad inhibitoria de la  
proliferación de líneas de cáncer humano**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. ALEJANDRA GUADALUPE VILLEGAS PAÑEDA



Tutor: Dr. Mariano Martínez Vázquez  
Instituto de Química, UNAM.

México, D.F., 2015

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi *alma mater* y formarme como profesionista y posgraduada. Por todas las oportunidades y retos que implica ser universitaria.

Al Instituto de Química de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado (No. de becaria: 273413)

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por su asesoría y por su confianza.

A la M. en C. Elizabeth Huertas Salazar,

a la Q. María de los Ángeles Peña González

a la M. en C. Teresa Ramírez Apan

gracias por sus contribuciones y por su invaluable apoyo técnico para la realización de esta tesis.

Al Dr. José Guadalupe López Cortés por sus sugerencias y por brindarme el estímulo que necesité para concluir este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Lena Ruíz Azuara, Dr. José Gustavo Águila Zárraga, Dr. Manuel Jiménez Estrada y muy especialmente a la Dra. Rosa Ventura Martínez y al Dr. Alejandro Cordero Vargas por su tiempo, dedicación, orientación y aportaciones para la corrección de este escrito.

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS**

Laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales en el Instituto de Química de la UNAM.

## **PRESENTACIÓN EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES**

En la modalidad de cartel en el Simposio Interno del Instituto de Química 2014 con el título “Preparación de furanonas con potencial anticanceroso”. Premio al mejor cartel de maestría.

Colaboración para la publicación del artículo titulado: “Resistance to the quorum-quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates” (Contreras y cols., 2013)

*Mi más profundo agradecimiento siempre y todo mi amor  
A mis padres Teresa y Manuel*

*Con mucho amor a  
Mi hermana Kimena*

*Gracias a  
Mi tía Lú  
José Francisco Meri González  
Gabriela Hernández Galicia  
Abundio Gil Becerril Márquez*

*Todo mi cariño a  
José Luis Galindo Zarala*

*Gracias a mis compañeros de clases  
Marco Antonio, Raymundo, Ricardo, Luis y José Antonio*

Dedico mi trabajo a la dolorosa memoria  
de nuestros 43 compañeros estudiantes  
asesinados y desaparecidos en Ayotzinapa, Guerrero.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1 Furanonas.....	2
2.2 Butenólidos.....	2
2.2.1 Butenólidos de origen natural.....	2
2.2.2 Importancia biológica de los butenólidos.....	2
2.2.3 Protoanemonina, anemonina y ranunculina.....	5
2.3 Estudios de síntesis de la protoanemonina.....	6
2.4 Productos naturales en el tratamiento y la prevención del cáncer.....	8
2.5 Cáncer.....	9
2.5.1 Tratamiento contra el cáncer.....	11
2.5.2 Efectos adversos de antineoplásicos.....	13
2.5.3 Resistencia a los fármacos antineoplásicos.....	14
2.6 Métodos <i>in vitro</i> para la evaluación de la actividad antiproliferativa.....	14
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
6.1 Preparación química y purificación de los compuestos.....	19
6.1.1 Reactivos y materiales empleados en la preparación de las furanonas.....	19
6.1.2 Métodos de separación y purificación.....	19
6.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	20

6.2 Evaluación de la actividad biológica.....	21
6.2.1 Ensayo de inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano.....	21
<b>7. EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
7.1 Síntesis de furanonas 4-Bromo-5-(bromometilen) -2(5 <i>H</i> )-furanona (5), 5-(Dibromometilen)-2(5 <i>H</i> )- furanona (6) y 5-(Bromometilen)-2(5 <i>H</i> )-furanona (7).....	25
7.1.1 Bromación del ácido 4-oxopentanoico.....	25
7.1.2 Formación de lactonas promovida por ácido.....	26
7.1.3 Síntesis de la 5-metilen-2(5 <i>H</i> )-furanona o protoanemonina (8).....	27
7.2 Actividad biológica.....	30
7.2.1 Actividad de inhibición del crecimiento celular mediante el método con sulforrodamina B (SRB).....	30
7.2.2 Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) por el método con SRB.....	31
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
8.1 Elucidación estructural.....	33
8.1.1 Caracterización de los compuestos 5-7.....	33
8.1.2 Caracterización del compuesto 8.....	27
8.1.3 Mecanismo de reducción para la obtención de la protoanemonina.....	35
8.2 Evaluación de la actividad biológica.....	36
8.2.1 Inhibición <i>in vitro</i> de la proliferación de células de cáncer humano.....	36
<b>9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>39</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>41</b>

<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>49</b>
Espectroscopía de la 5-metilen-2(5 <i>H</i> )-furanona o protoanemonina ( <b>8</b> ).....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la 2,3-dihidrofuran-2-ona (I) y de la 2,5-dihidrofuran-2-ona (II).....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura general de los cardenólidos .....	3
<b>Figura 3.</b> Estructura general de la anoscuanina .....	3
<b>Figura 4.</b> Ácido ascórbico y sotolón.....	4
<b>Figura 5.</b> Estructura general de los fimbrólidos .....	4
<b>Figura 6.</b> Estructuras de la protoanemonina (I), la ranunculina (II) y la anemonina (III).....	5
<b>Figura 7.</b> Síntesis de Grundman y Kobe (1955), y síntesis de Shaw (1946).....	6
<b>Figura 8.</b> Síntesis de Alibés y Font (1990).....	7
<b>Figura 9.</b> Síntesis de Crey y Dumy (2003).....	7
<b>Figura 10.</b> Ácido 4-oxopentanoico (ácido levulínico) .....	25
<b>Figura 11.</b> Bromación del ácido levulínico .....	25
<b>Figura 12.</b> Desplazamientos químicos de protón para los cetoésteres 2 -4 en RMN <sup>1</sup> H a 300 MHz .....	26
<b>Figura 13.</b> Ciclación de los cetoácidos, mediada por ácido .....	26
<b>Figura 14.</b> Estructura química de las furanonas 5-7 .....	27
<b>Figura 15.</b> Reacción de adición oxidativa .....	28
<b>Figura 16.</b> Reactivos y condiciones para la obtención de la protoanemonina .....	28
<b>Figura 17.</b> Estructura de la protoanemonina .....	29
<b>Figura 18.</b> Curvas concentración-respuesta de los compuestos 5-8 .....	31
<b>Figura 19.</b> Principales correlaciones C→ H para el compuesto 8 según el experimento HMBC .....	34

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales fármacos antineoplásicos y su mecanismo de acción .....	12
<b>Cuadro 2.</b> Efectos adversos de los antineoplásicos .....	13
<b>Cuadro 3.</b> Resultados de inhibición de proliferación celular de los compuestos <b>4-8</b> en líneas de cáncer .....	30
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de $CI_{50}$ ( $\mu M$ ) de los compuestos <b>5-8</b> .....	32

## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anhídrido acético
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BF<sub>3</sub>-OEt<sub>2</sub></b>	Dietileterato de Trifluoruro de Boro
<b>Br<sub>2</sub></b>	Bromo
<b>CCA</b>	Cromatografía en columna abierta
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CP</b>	Cromatografía preparativa
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b><i>m</i>-CPBA</b>	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>DME</b>	Dimetoxietano
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>Hex</b>	Hexano
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>m / z</b>	Masa sobre carga
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	Borohidruro de sodio
<b>NaOAc</b>	Acetato de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio

<b>NEt<sub>3</sub></b>	Trietilamina
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>ToCl</b>	Cloruro de <i>p</i> -toluoilo
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano

## 1. INTRODUCCIÓN

La naturaleza es una fuente de compuestos biológicamente activos y de modelos químicos para el diseño de fármacos eficientes.

Los butenólidos (2,5-dihidrofuran-2-onas) son fracciones químicas comunes que se hallan en una variedad de productos naturales bioactivos. La protoanemonina es un producto natural de este tipo que se ha identificado y aislado de extractos orgánicos de plantas de los géneros *Anemone* y *Ranunculus*, cuyos preparados se utilizan en la medicina tradicional china para el tratamiento del cáncer.

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

En este marco de referencia se planteó el presente proyecto que refiere la síntesis de la protoanemonina involucrando un paso de deshalogenación reductiva, y la preparación de algunos derivados halogenados, así como un estudio biológico preliminar *in vitro* de la potencial actividad anticancerosa de estos compuestos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Furanonas

Las **furanonas** son compuestos orgánicos heterocíclicos que se componen de una lactona en un anillo de tipo furano (Kumar, 2013).

### 2.2 Butenólidos

Los butenólidos son lactonas  $\gamma$ -insaturadas que pueden ser consideradas también como derivados de furano 2,3- y 2,5-dihidrofuran-2-onas (I y II). Este tipo de compuestos también son conocidos como crotonolactonas (Shyamasunder, 1964).



**Figura 1.** Estructura química de la 2,3-dihidrofuran-2-ona (I) y de la 2,5-dihidrofuran-2-ona (II).

Este trabajo se enfoca en los butenólidos 2,5-dihidrofuran-2-ona.

#### 2.2.1 Butenólidos de origen natural

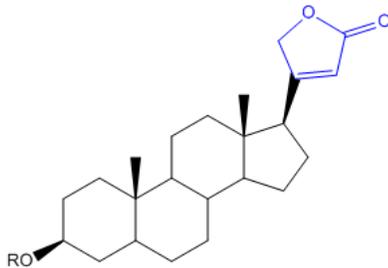
Los butenólidos (*5H*-furan-2-onas) son fracciones químicas comunes que se encuentran en una variedad de productos naturales bioactivos (Calderón-Montaño, 2013) como los glicósidos cardíacos, acetogeninas, fimbrólidos, entre otros.

#### 2.2.2 Importancia biológica de los butenólidos

Los butenólidos representan un amplio grupo de compuestos de importancia médica y biológica. En las últimas décadas, un número significativo de compuestos de diversas estructuras, en general del tipo butenólido alquilideno han sido aislados y han mostrado ser bioactivos como fungicidas, bactericidas, insecticidas y antiinflamatorios (Kumar y cols., 2013; Tamma y Guerraf, 2013). A continuación se presentan algunos ejemplos de este tipo de compuestos.

### Glicósidos cardíacos

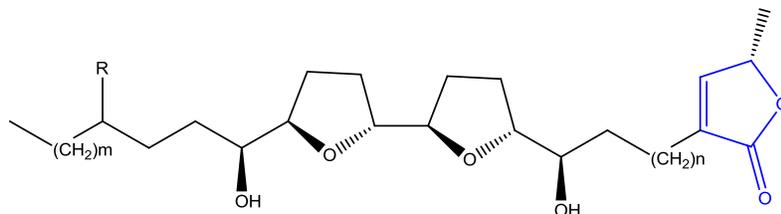
Los glicósidos cardíacos, específicamente los cardenólidos, son quizá los compuestos más conocidos que contienen lactonas insaturadas en su estructura (Calderón-Montaño, 2013). Estos compuestos inhiben la enzima  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPasa que es esencial y ubicua en los animales (Anurag y cols., 2012).



**Figura 2.** Estructura general de los cardenólidos.

### Acetogeninas anonáceas

Otros compuestos de relevancia que contienen un anillo 2-furanona en su estructura son las acetogeninas anonáceas, que exhiben propiedades biológicas como antioxidantes, inmunosupresoras, citotóxicas, pesticidas, antiparasitarias y antimicrobianas (Chen y cols., 2012).

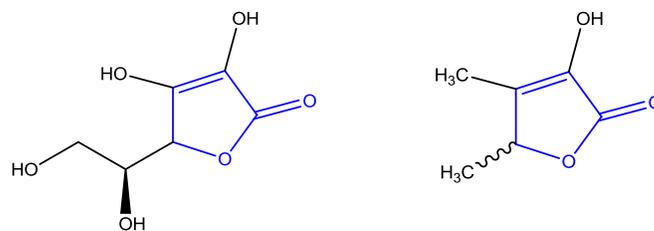


**Figura 3.** Estructura general de la anosuacina, una clase de acetogenina anonácea.

### Ácido ascórbico y sotolón

El **ácido ascórbico** ((2*R*)-2-[(1*S*)-1,2-dihidroxi-etil]-3,4-dihidroxi-2*H*-furan-5-ona) es un nutriente esencial para la dieta humana presente en frutas y vegetales y es un agente antioxidante muy conocido, se ha descrito su actividad protectora contra padecimientos de tipo cardiovascular, el cáncer y la osteoartritis (Afkhami-Ardekani

y Shojaoddiny-Ardekani, 2007). El **sotolón** (3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5*H*)-furanona) es un compuesto del aroma presente en algunos alimentos como el jarabe de maple. También es responsable del sabor de envejecimiento prematuro en el vino blanco (Sulser, 1967). Ambos compuestos presentan un esqueleto butenólido (Colin y cols., 1999; Podebrad y cols., 1999). Se ha demostrado que estas furanonas al ser administradas en la dieta de animales tratados con compuestos inductores de cáncer como  $\alpha$ -benzopireno o azoximetano han resultado agentes anti-cancerígenos muy eficientes (Colin y cols., 1999)

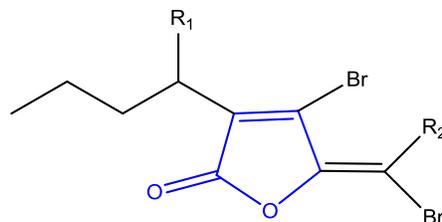


**Figura 4.** Ácido ascórbico y sotolón

### Fimbrólidos

El alga roja marina *Delisea pulchra* produce un grupo de furanonas bromadas llamadas fimbrólidos, que comparten un esqueleto 4-halo-3-butil-5-halometilen-2(5*H*)-furanona, pero difieren en el número y en la naturaleza de los sustituyentes halógeno y en la presencia o ausencia de oxígeno funcionalizado en la cadena lateral (Manny y cols., 1997).

Esta clase de compuestos han mostrado ser una clase prometedora de inhibidores de la autoinducción bacteriana, que inhibe la formación de biopelículas y la expresión de virulencia en modelos *in vitro* e *in vivo* (Sabbah y cols., 2013).



**Figura 5.** Estructura general de los fimbrólidos

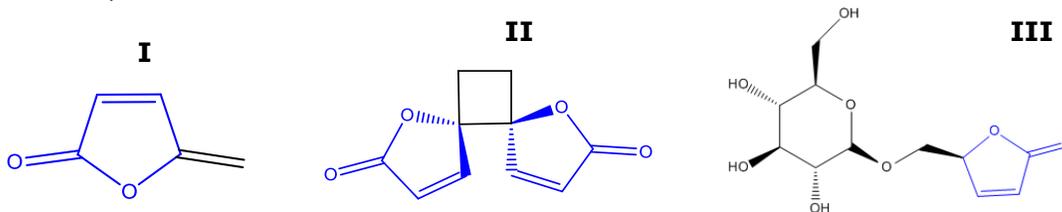
$R_1 = \text{H, OAc, OH, H}$

$R_2 = \text{H, Br}$

### 2.2.3 Protoanemonina, anemonina y ranunculina

La **protoanemonina (I)** (5-metilen-2(5*H*)-furanona), la **anemonina (II)** (1,7-dioxadispiro[4.0.4.2]dodeca-3,9-diene-2,8-diona) y la **ranunculina (III)** ((5*S*)-5-[( $\beta$ -d-glucopiranosiloxi)metil]furan-2(5*H*)-ona) también son productos naturales que comparten una fracción butenólido en sus estructuras.

La protoanemonina (**I**) es un agente antimicrobiano muy activo que también se conoce por ser un irritante que provoca dermatitis ampollar al contacto e ingestión de las especies de plantas frescas que lo contienen. Es un hecho conocido que durante el secado del material vegetal la protoanemonina se dimeriza rápidamente para generar la anemonina, que es un compuesto inocuo (Rakesh y cols. 2012). La protoanemonina (**I**) también ejerce efectos antifúngicos y se ha descrito su actividad antipirética, así como la antiinflamatoria de la anemonina (Mares, 1987). Ambos compuestos **I** y **II** se han descrito como agentes sedantes (Martin y cols., 1988).



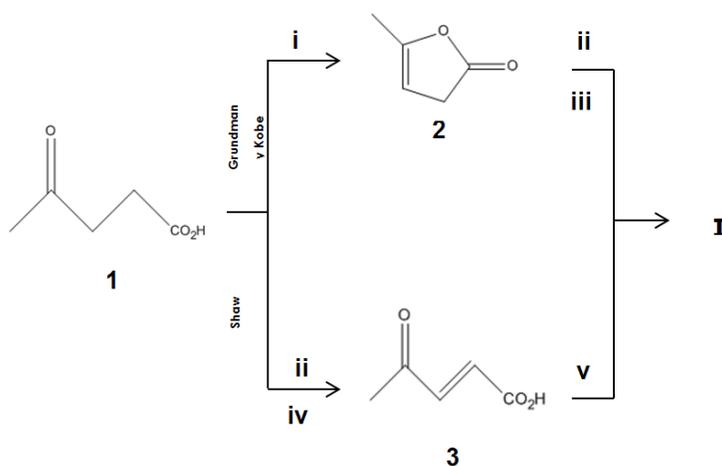
**Figura 6.** Estructuras de la protoanemonina (I), la anemonina (II) y la ranunculina (III).

La **protoanemonina (I)**, la **anemonina (II)** y la **ranunculina (III)** han sido identificados y aislados de extractos orgánicos de plantas de los géneros *Anemone*, *Clematis*, y *Ranunculus* (Álvarez y cols., 2002; Hu y cols., 2003; Martin y cols., 1988). En la medicina tradicional china se utilizan preparados medicinales de estas plantas para el tratamiento de procesos inflamatorios no microbianos (Hu, 2003), así como para el tratamiento de náusea y vómito producido por la radioterapia y la quimioterapia (Zhang, 2008), y para el tratamiento y la prevención del cáncer (Zhang, 1999; Hu, 2005), lo cual hace importante el estudio de estas moléculas como potenciales antineoplásicos.

### 2.3 Estudios de síntesis de la protoanemonina.

Existen pocos informes que describan síntesis de la protoanemonina (5-metilen-2(5*H*)-furanona), probablemente porque se trata de una furanona poco estable que se dimeriza espontáneamente a anemonina por la vía de cicloadición [2 + 2] de forma regioselectiva y estereoespecífica (Moriarty y cols., 1965). Sin embargo la protoanemonina ha demostrado ser una molécula de interés sintético como síntón C5 por su reactividad, particularmente como dienófilo en cicloadiciones de tipo Diels-Alder (Crey y cols., 2003), y de interés biológico como antimicrobiano y antifúngico (Mares, 1987), así como sedante (Martin y cols., 1988), además de su posible potencial en el tratamiento del cáncer, como lo refiere este trabajo, lo que hace fundamental el estudio de nuevas formas de síntesis de esta molécula.

De los métodos sintéticos descritos en la literatura, los primeros dos parten del ácido levulínico (**1**). La síntesis de Grundman y Kobe (1955) recurre a la  $\alpha$ -angelica lactona (**2**) como intermediario, después mediante bromación y posterior deshidrobromación se obtiene la protoanemonia. El método de Shaw (1946) involucra una isomerización de un doble enlace (*E* a *Z*) seguida de la ciclación del ácido  $\beta$ -acrílico (**3**).

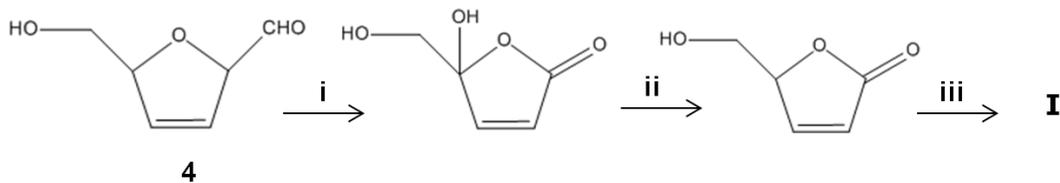


**Reactivos.** i: Ácido polifosfórico. ii: Br<sub>2</sub>. iii: NEt<sub>3</sub> iv: NaOAc. v: Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Figura 7.** Síntesis de Grundman y Kobe (1955), y síntesis de Shaw (1946).

Los métodos mencionados involucran múltiples pasos de separación y otros autores han informado problemas de reproducibilidad de los mismos.

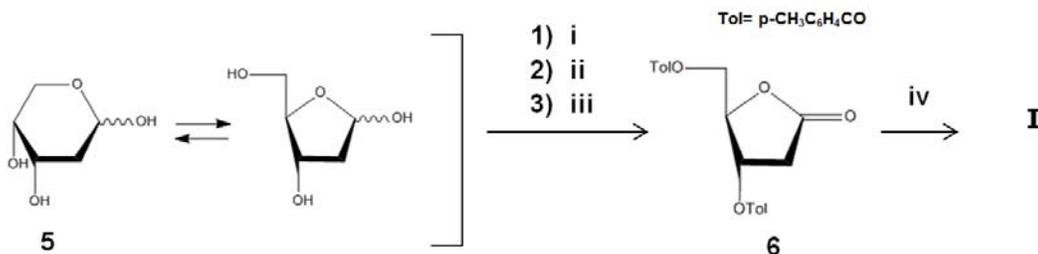
Alibés y sus colaboradores (1990) desarrollaron un método utilizando fotooxigenación del 5-hidroximetilfurfuril (**4**), seguida de una reducción y una deshidratación para obtener la protoanemonina con un rendimiento total de 25%.



**Reactivos. i:** O<sub>2</sub>, Rosa de Bengala, EtOH. **ii:** NaBH<sub>4</sub>, NaOH, DME-H<sub>2</sub> **iii:** NaOAc, H<sub>2</sub>O

**Figura 8.** Síntesis de Alibés y cols. (1990).

El último método publicado por Crey y Dumy (2003), informa el mejor rendimiento final de los métodos descritos (58%), describe la síntesis de la protoanemonina a partir de la D-desoxirribosa (**5**), que es glicosilada con cloruro de acetilo en metanol, posteriormente los grupos hidroxilo no metilados se protegen con cloruro de *p*-toluilo en piridina y la lactona **6** se obtiene mediante la oxidación del grupo metóxido con ácido *m*-cloroperoxibenzoico en presencia de una cantidad catalítica de eterato de trifluoruro de boro; finalmente se producen una β- y δ- eliminaciones por el tratamiento con trietilamina.



**Reactivos. i:** HCl-MeOH. **ii:** TolCl/piridina. **iii:** *m*-CPBA/BF<sub>3</sub>-OEt<sub>2</sub>. **iv:** NEt<sub>3</sub>

**Figura 9.** Síntesis de Crey y Dumy (2005).

Es necesario continuar el estudio de opciones que pudieran reducir los pasos de síntesis y sustituir la mayor cantidad de reactivos por otros alternativos que sean ambientalmente sustentables.

#### **2.4 Productos naturales en el tratamiento y la prevención del cáncer.**

El cáncer constituye una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial (OMS, 2014), y en la búsqueda de compuestos para el tratamiento de esta enfermedad, las plantas medicinales han tenido un papel importante (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Se tienen informes de más de 3 000 plantas para el tratamiento del cáncer (Graham y cols., 2000) por lo que las especies naturales son una fuente importante de posibles sustancias anticancerosas.

Es significativo que del total de medicamentos anticancerosos disponibles en el primer mundo, aproximadamente el 67% es de origen natural (Vega-Ávila y cols., 2006). Estos medicamentos se han clasificado como productos de origen natural, productos semisintéticos o productos sintéticos para los que se ha empleado como modelo un producto de origen natural para su diseño (Newman y cols., 2000).

Los derivados de alcaloides de la vinca como la vinblastina o la vincristina son fármacos antineoplásicos de origen natural que se utilizan para tratar varios tipos de cáncer como las leucemias agudas, linfomas y algunos tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama y de pulmón). Estos fármacos interactúan con la tubulina, proteína que forma los microtúbulos del huso acromático en la mitosis, impidiendo su polimerización para formar los microtúbulos, deteniendo la mitosis en la metafase. Otro ejemplo son los fármacos derivados del taxol, como Paclitaxel y Docetaxel que se generaron a partir del estudio de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*. Estas moléculas se unen de manera reversible a la subunidad de la tubulina favoreciendo la polimerización en microtúbulos estables pero poco funcionales. Son activos sobre tumores sólidos frecuentemente rebeldes a otros

fármacos. Sin embargo, ambos producen leucopenia o neutropenia. (Newman y cols., 2000 y Rodilla, 2000).

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

## 2.5 Cáncer

El **cáncer** es un término que se aplica genéricamente a un conjunto de enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos (Instituto Nacional de Cáncer [E.U.A], 2014).

El cáncer se caracteriza por la existencia de células cuyo rasgo común es la inoperancia de los mecanismos que regulan normalmente su diferenciación, su proliferación y su muerte (Schlaepfer y Mendoza, 2010; Flores y Martínez, 2008).

La mayoría de los cánceres toma el nombre del órgano o de las células de las que se originan. Los tipos principales de cáncer son:

- Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.
- Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales.

- Linfoma y mieloma: cánceres que empiezan en las células del sistema inmunitario.
- Cánceres del sistema nervioso central: cánceres que empiezan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

El cáncer comienza en una célula. La transformación de una célula normal en una cancerosa es un proceso que se desarrolla en varias etapas a lo largo de un número de años o incluso décadas. Las etapas de la carcinogénesis son la iniciación, la promoción y la progresión. La primera de ellas involucra la reacción entre la sustancia que produce el cáncer (carcinógeno) y el DNA de las células del tejido. Puede existir una susceptibilidad genética. Esta etapa puede permanecer latente, y el sujeto puede sólo permanecer en riesgo de desarrollar el cáncer en una etapa posterior. La segunda etapa ocurre muy lentamente a lo largo de un período que puede variar de meses hasta años. La tercera y última etapa implica la progresión y la diseminación del cáncer (Reddy y cols., 2003)

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo. En el 2012 causó 8.2 millones de defunciones.

Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama.

Más del 60% de los nuevos casos anuales de cáncer en el mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. En estas regiones se presenta el 70% de las muertes por cáncer en el mundo.

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), esta enfermedad es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud [SSA], 2013)

Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (Instituto Nacional del Cáncer [E.U.A], 2014).

### 2.5.1 Tratamiento contra el cáncer

El objetivo de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula maligna mediante métodos quirúrgicos, radioterapia, anticuerpos monoclonales, inmunoterapia, hormonoterapia y farmacológicos (Flórez, 2003).

El enfoque terapéutico “multidisciplinario” consiste en asociar los distintos tipos de tratamientos para lograr la recuperación total del paciente, con lo que se consigue un avance en el control de la enfermedad.

Para cada tipo de cáncer y dependiendo de la fase de la enfermedad, se utilizan esquemas de tratamiento específicos, pero la terapia farmacológica o quimioterapia es generalmente una de las opciones ineludibles.

La finalidad de la terapia farmacológica puede ser:

❖ **Quimioterapia de inducción o neoadyuvante:** en este caso la quimioterapia se administra antes de cualquier tratamiento local, como la radioterapia o la cirugía. Los objetivos de iniciar el tratamiento oncológico con quimioterapia son principalmente dos:

1. Disminución del tamaño del tumor, lo que permite realizar tratamientos locales menos agresivos y reducir el riesgo de recaída (reaparición del tumor).
2. Destrucción de las células tumorales que emigraron a otros órganos del cuerpo, destruyendo tempranamente, focos que no se hayan podido detectar debido a su tamaño reducido.

❖ **Quimioterapia concomitante:** se administra de forma simultánea a la radioterapia. Con esta modalidad se pretende realizar un tratamiento

sistémico y local al mismo tiempo, que se potencian entre sí para aumentar la eficacia terapéutica.

- ❖ **Quimioterapia adyuvante o complementaria a otro tratamiento (generalmente local):** pretende reducir el riesgo de recaída de la enfermedad y por tanto, aumentar la supervivencia y el índice de recuperación (AECC, 2012).

<b>Mecanismo de acción</b>	
<b>Antimetabolitos</b>	
Fludarabina 5-fluorouracilo(5-FU) Metotrexato (MTX)	Fármacos específicos del ciclo celular que interfieren en la síntesis de ADN y ARN (fase S)
<b>Taxanos</b>	
Docetaxel Paclitaxel	Fármacos específicos del ciclo celular que inhiben la mitosis (fase M), tras unirse a la tubulina, inhibiendo la formación de los microtúbulos (alcaloides de la vinca) o estabilizándolos (taxanos).
<b>Alcaloides de la vinca</b>	
Vinblastina Vincristina Vinorelbina	
<b>Compuestos alquilantes</b>	
Busulfán Ciclofosfamida Temozolomida	Fármacos inespecíficos del ciclo celular. Forman enlaces químicos con ADN y las proteínas, impidiendo la replicación del ADN y la transcripción del ARN.
<b>Antraciclinas</b>	
Doxorrubicina Daunorrubicina Idarrubicina	Fármacos inespecíficos del ciclo celular. 1) Inhibición de la topoisomerasa II. 2) Unión de gran afinidad al ADN 3) Generación de radicales que reaccionan con proteínas y 4) Fijación a las membranas celulares.
<b>Camptotecinas</b>	
Irinotecán Topotecán	Fármacos inespecíficos del ciclo celular. Inhiben la topoisomerasa I.
<b>Análogos del platino</b>	
Carboplatino Cisplatino	Fármacos inespecíficos del ciclo celular. Se unen al ADN mediante la formación de enlaces cruzado intracatenarios e intercatenarios, inhibiendo la síntesis y función del ADN.

**Cuadro 1.** Principales fármacos antineoplásicos y su mecanismo de acción

El empleo de la poliquimioterapia, concebida desde 1960, es importante porque proporciona un efecto terapéutico máximo en el intervalo de efectos adversos tolerados por el paciente para cada fármaco, proporciona una gama amplia de

interacciones entre los fármacos y las células tumorales genéticamente heterogéneas y previene o lentifica la aparición subsiguiente de resistencia farmacológica (Chu y cols., 2002).

### 2.5.2 Efectos adversos de antineoplásicos.

Actualmente, el mecanismo de acción de la mayoría de los antineoplásicos se basa en la diferencia cinética de replicación de las células cancerosas en comparación con la de las células sanas, por lo que es inevitable que los fármacos también ocasionen daños y muerte a las células sanas de rápida división, como las de la sangre, las del tracto gastrointestinal, etc. (Schlaepfer y Mendoza, 2010). Algunos efectos adversos que producen los antineoplásicos se mencionan a continuación:

<b>Efectos comunes a muchos fármacos</b>	
<b>1. Inmediata</b> (horas-días)	Náusea y vómitos Necrosis tisular local Flebitis Insuficiencia renal Erupción cutánea Anafilaxia
<b>2. Temprana</b> (días a semanas)	Leucopenia Trombocitopenia Alopecia Estomatitis Diarrea Megaloblastosis
<b>3. Diferida</b> (semanas-meses)	Anemia Aspermia Lesión hepatocelular Hiperpigmentación Fibrosis pulmonar
<b>4. Tardía</b> (meses-años)	Esterilidad Hipogonadismo Carcinogénesis (Leucemia aguda, linfomas, tumores sólidos)

**Cuadro 2.** Efectos adversos de los antineoplásicos  
(Tomado y modificado de Flórez, 2003)

### **2.5.3 Resistencia a los fármacos antineoplásicos.**

Un aspecto fundamental de la quimioterapia del cáncer, y uno de los principales obstáculos para tratar la enfermedad, es la aparición de resistencia celular a los fármacos. Es posible que desde que se inicia la formación del tumor, todas o una fracción de las células sean intrínsecamente resistentes al fármaco: *resistencia primaria*. Pero también es posible que las células inicialmente sensibles desarrollen procesos de adaptación utilizando mecanismos de diversa naturaleza: *resistencia adquirida*. La adquisición de resistencia no se desarrolla en células normales, sólo en las cancerosas; es una propiedad que acompaña a la existencia de un genoma mutable e inestable como el de las células cancerosas (Flórez, 2003; Chu y cols., 2002).

Este contexto justifica la importancia que en los últimos años se le ha dado al desarrollo de nuevas moléculas quimioterapéuticas, con la intención de encontrar nuevos fármacos que sean específicos para las células tumorales para incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos adversos (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

En general, la identificación de nuevas moléculas anticancerosas involucra una serie de pasos secuenciales, entre los que las pruebas farmacológicas preclínicas *in vitro* se consideran como primera opción (Damia y D'Incalci, 2009).

### **2.6 Métodos *in vitro* para la evaluación de la actividad antiproliferativa.**

Los ensayos *in vitro* de inhibición de la proliferación de líneas de células cancerosas son muy útiles en la selección inicial de nuevos agentes con efecto anticanceroso porque dan una medida de la posible eficacia de los compuestos probados como potenciales quimioterapéuticos (Woolf, 1999). Uno de los métodos empleados es el de tinción con sulforroamina B, que se describe a continuación.

**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 y sus colaboradores (1990); después fue adoptado por el Instituto Nacional de Cáncer (E.U.A) como una prueba de rutina en las investigaciones de nuevos agentes anticancerosos (Papazisis y cols., 1997).

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

### 3. HIPÓTESIS

La protoanemonina (5-metilen-2(5*H*)-furanona) es una furanona de origen natural aislada de especies vegetales que se emplean en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer. Es factible que tanto la protoanemonina como algunos análogos halogenados sintetizados, tengan potencial uso como anticancerosos.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad de importancia nacional y mundial. Además, el 70% de los fallecimientos por cáncer se produce en países subdesarrollados (OMS, 2014). En México, de acuerdo con la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), muere el 53.2% de los 128 000 nuevos casos que se detectan cada año.

La falta de un diagnóstico oportuno en nuestro país y de servicios de salud eficientes, así como las limitaciones de la quimioterapia, principalmente por la adquisición de resistencia farmacológica en tumores en el 30% de los enfermos tratados (UICC, 2014), son responsables de la baja tasa de sobrevivencia de los pacientes a esta enfermedad. De aquí surge la necesidad de descubrir nuevos fármacos anticancerosos, eficaces, y que ejerzan menores efectos adversos.

La naturaleza es una fuente conocida de compuestos químicos con actividades biológicas diversas de interés para su aplicación médica (Newmann y cols., 2000). El estudio de especies de origen natural ha conducido al descubrimiento y al desarrollo de fármacos anticancerosos.

Preparados medicinales de especies vegetales de los géneros *Anemone* y *Ranunculus* son utilizados en la medicina tradicional china para el tratamiento del cáncer, entre otros padecimientos. Por lo tanto, es de gran interés estudiar la posible actividad anticancerosa de los compuestos de tipo butenólido que se han identificado en estas plantas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Sintetizar la protoanemonina (5-metilen-2(5*H*)-furanona), preparar algunos de sus análogos halogenados y evaluar estas moléculas frente a 6 líneas celulares de cáncer humano con la intención de establecer una relación de estructura con actividad biológica.

### 5.2 Objetivos particulares

- Sintetizar la protoanemonina a partir del ácido 4-oxopentanóico (ácido levulínico) Preparar algunos derivados bromados de la protoanemonina.
- Realizar un ensayo preliminar de actividad biológica en 6 líneas celulares de cáncer.
- Calcular la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) de los compuestos más activos según el primer ensayo.
- Tratar de establecer una relación estructura-actividad biológica de los compuestos sintetizados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Preparación química y purificación de los compuestos

#### 6.1.1. Reactivos y materiales empleados en la preparación química de furanonas.

Los disolventes utilizados (hexano, acetato de etilo, metanol, diclorometano) se destilaron previamente a su manejo.

Se emplearon los siguientes reactivos:

- Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ).
- Ácido levulínico ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ ), 98%, marca Aldrich-Chemistry.
- Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- Bromo ( $\text{Br}_2$ ), marca Aldrich-Chemistry.
- Celita.
- Éter etílico ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2$ ), marca Aldrich-Chemistry.
- Hidroquinona ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ), marca Aldrich-Chemistry.
- Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),
- Zinc (Zn), polvo  $\geq 98\%$  marca Aldrich-Chemistry.

Se utilizó también un sonicador Cole-Parmer ®.

#### 6.1.2. Métodos de separación y purificación.

Como técnica de separación y purificación química de los compuestos obtenidos se emplearon métodos cromatográficos: Cromatografía por columna abierta (CCA) a presión reducida empleando gel de sílice (Macherey Nagel, MERCK ®) de malla 70-230. Se usó en todos los casos como eluyente, mezclas de hexano-acetato de etilo.

La purificación mediante cromatografía preparativa (CP) se realizó mediante placas de vidrio pre-cubiertas con gel de sílice (Macherey Nagel, MERCK ®) con indicador de fluorescencia a 254 nm y con espesor de 2.0 mm.

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se realizaron en folios de aluminio cubiertos con gel de sílice con indicador de fluorescencia (ALUGRAM® SILG/UV<sub>254</sub>) con 0.2 mm de espesor.

### **6.1.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.**

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

Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (EM), Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia (HPLC) fueron realizados en los laboratorios del Instituto de Química de la UNAM.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica RMN (<sup>1</sup>H) y de carbono 13 (<sup>13</sup>C) se generaron con espectrómetros de 300 MHz (Varian VXR-300) y de 400 MHz (Bruker Avance III). Los disolventes utilizados para los experimentos fueron metanol deuterado ALDRICH® (CD<sub>3</sub>OD) 99.8% deuterio y cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) 99.8% deuterio. Los desplazamientos químicos se informan en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS). Los experimentos adicionales de RMN incluyeron DEPT, HSQC, HMBC y COSY que fueron generados con un espectrómetro Bruker Avance III, de 400 MHz.

Se utilizan las siguientes abreviaciones para la descripción de las señales y multipletes: singulete (s), doblete (d), doble de dobles (dd), doble de triples (dt), doble de doble de dobles (ddd).

La espectrometría de masas fue generada por los equipos Hewlett Packard® modelo JEOL AX505 Y JEOL SX102.

Los experimentos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se realizaron en un cromatógrafo Agilent Technologies. La temperatura del inyector fue de 310 °C, con una rampa de temperatura inicial de 40°C durante 1

min, aumentando a una temperatura de 310 °C con una rapidez de 8 °C/ min. El detector acoplado fue un espectrómetro de masas JEOL GCmate.

Los experimentos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200, con un detector UV-visible de arreglo de diodos Waters modelo 2996, a una longitud de onda de 300 nm. Se usó una columna Eclipse Plus C-18 100 X 2.1 mm 3.5 um. La elución se realizó con el siguiente gradiente: Inicial metanol/agua (30/70), 40 min metanol/agua (100/0), con un flujo de 0.2 mL/min.

## **6.2 Evaluación de la actividad biológica**

Las pruebas de actividad biológica las realizó la M. en C. Teresa Ramírez Apan en el laboratorio de pruebas biológicas en el Instituto de Química de la UNAM, utilizando el protocolo que se describe a continuación:

### **6.2.1 Ensayo de inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano.**

- **Condiciones generales**

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

**U-251 (Glioblastoma):** Esta línea celular se deriva de un tumor de glioblastoma maligno de un paciente de 75 años. Su cultivo es adherente. Su morfología es de tipo fibroblástico o pleomórfica/ astrocitoide (ATCC, 2014).

**PC-3 (Carcinoma de próstata):** Las células PC-3 provienen de una metástasis de cáncer de hueso. Tienen un alto potencial metastásico. Su cultivo es adherente pero las células pueden adaptarse a un cultivo en suspensión. No responden a andrógenos, glucocorticoides o factores de crecimiento (ATCC, 2014).

**K-562 (Leucemia mieloide crónica):** Los linfocitos K-562 provienen de un paciente de 53 años. Son tumorigénicos. Se han caracterizado como altamente indiferenciadas pero rápidamente se diferencian a progenitores reconocibles de las series eritrocítica, granulocítica y monocítica (ATCC, 2014).

**HCT-15 (Adenocarcinoma de colon):** Las células epiteliales HCT-15 provienen de un paciente masculino con adenocarcinoma colorrectal tipo C de Duke. El cultivo de estas células es adherente. Son tumorigénicas (ATCC, 2014).

**MCF-7 (Adenocarcinoma de mama):** Las células epiteliales MCF-7 provienen de una paciente de 69 años. El cultivo de estas células es adherente. La línea MCF-7 mantiene algunas características del epitelio mamario diferenciado incluyendo la habilidad para procesar estradiol por la vía de los receptores de estrógeno citoplasmáticos (ATCC, 2014).

**SKLU-1 (Adenocarcinoma de pulmón):** Las células epiteliales SKLU-1 provienen de una paciente de 60 años. Son células tumorigénicas cuyo cultivo es adherente (ATCC, 2014).

Las 6 líneas celulares mencionadas proceden del INC y se empleó como fármaco de referencia cisplatino (ALDRICH ®).

- **Procedimiento**

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF (suero bovino fetal) inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 UI/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 mg/mL de anfotericina B (GIBCO ®) y 2mM de L-glutamina (GIBCO ®). Los cultivos celulares se mantuvieron incubados a una temperatura de 37°C, con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad. Se determinó la densidad y la viabilidad celular mediante un hematocitómetro empleando la técnica de exclusión con azul tripano.

Se realizaron diluciones para obtener la densidad celular adecuada y 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular resultante se sembró en placas de 96 pozos y se incubaron.

**Método de la sulforrodamina B (SRB) para la determinación de proliferación celular *in vitro*.**

Los compuestos se evaluaron a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9%. Se añadió 100  $\mu\text{L}$  de cada disolución de prueba a los pozos preparados para cada tipo de línea celular. Se empleó DMSO como control negativo y cisplatino como control positivo. Se dejaron en incubación durante 48 h bajo las condiciones antes descritas.

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

La actividad de los compuestos se informa como porcentaje de la inhibición de la proliferación celular y se determinó de acuerdo a la **Ecuación 1**, donde  $\text{DO}_C$  corresponde a la densidad óptica media del grupo control y  $\text{DO}_T$  se refiere a la densidad óptica media del grupo tratado. Los resultados se informan como el promedio del experimento.

$$\% \text{ IC} = 100 - \left( \frac{\text{DO}_T}{\text{DO}_C} \times 100 \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

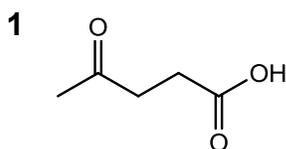
Para los compuestos que mostraron un resultado satisfactorio en estos experimentos de tamizaje, se calculó la Concentración Media Inhibitoria (**CI<sub>50</sub>**), mediante la construcción de una curva patrón. Los resultados se informan como el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar de la media.

## 7. EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### 7.1 Síntesis de furanonas 4-Bromo-5-(bromometileno)-2(5H)-furanona (5), 5-(Dibromometileno)-2(5H)-furanona (6) y 5-(Bromometileno)-2(5H)-furanona (7).

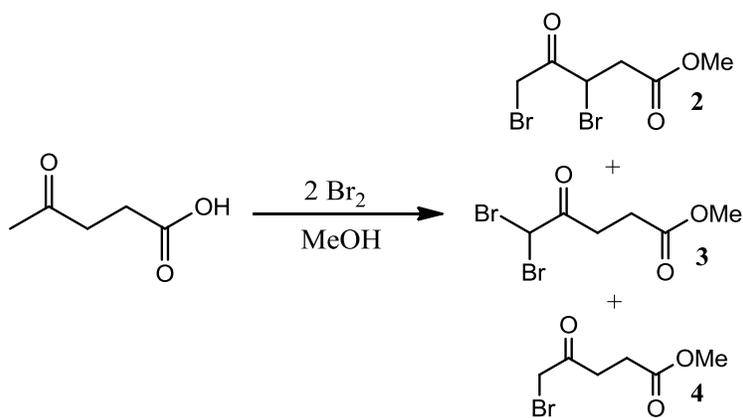
#### 7.1.1 Bromación del ácido 4-oxopentanoico

La bromación del ácido 4-oxopentanoico (ácido levulínico) **1** se realizó con base a lo informado por MacDonald (1974).



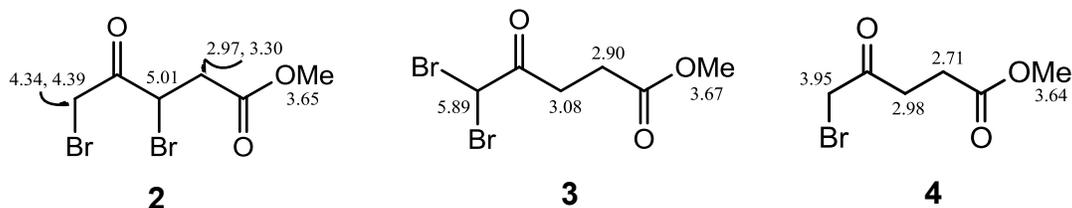
**Figura 10.** Ácido 4-oxopentanoico (ácido levulínico)

Una solución de ácido levulínico (10 g) en metanol (80 mL, destilado con sodio) se agitó en un baño de agua a 20 °C mientras se agregaba bromo (26 g, 2 moles) a una rapidez tal que la temperatura de la solución no excediera los 30 °C. Después de 2.5 h la mezcla de reacción se colocó en reflujo durante 1 h (**Figura 11**). El metanol se eliminó (rotaevaporador), y el residuo se agitó con éter (80 mL) y agua (25 mL) mientras se añadía un exceso de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se lavó con bicarbonato acuoso, se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y el éter se destiló.



**Figura 11.** Bromación del ácido 4-oxopentanoico

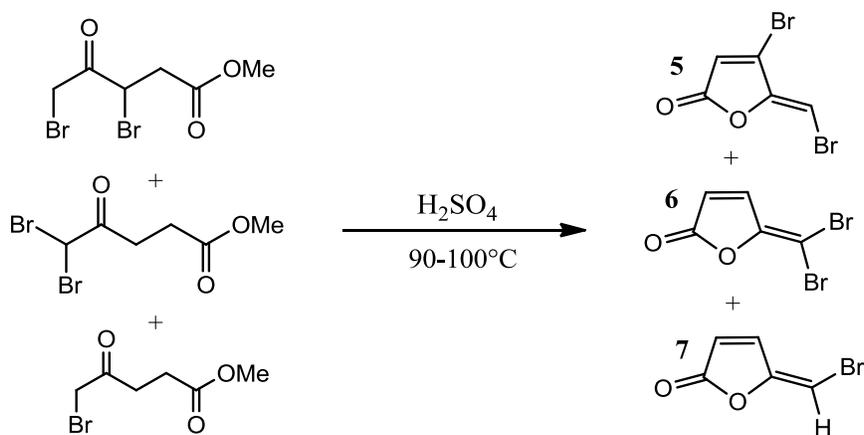
El aceite oscuro resultante (11g, 70%) se separó mediante cromatografía en columna y se obtuvieron los ácidos 3,5-dibromolevulínico **2** (40.6%), 5,5-dibromolevulínico **3** (24.5%) y 5-bromolevulínico **4** (5%), en una proporción 58: 35: 7, como ésteres metílicos que se identificaron por comparación de sus datos espectroscópicos (**Figura 12**) con lo informados en la literatura (Manny y cols., 1997).



**Figura 12.** Desplazamientos químicos de protón para los cetoésteres **2 -4** en RMN  $^1\text{H}$  a 300 MHz

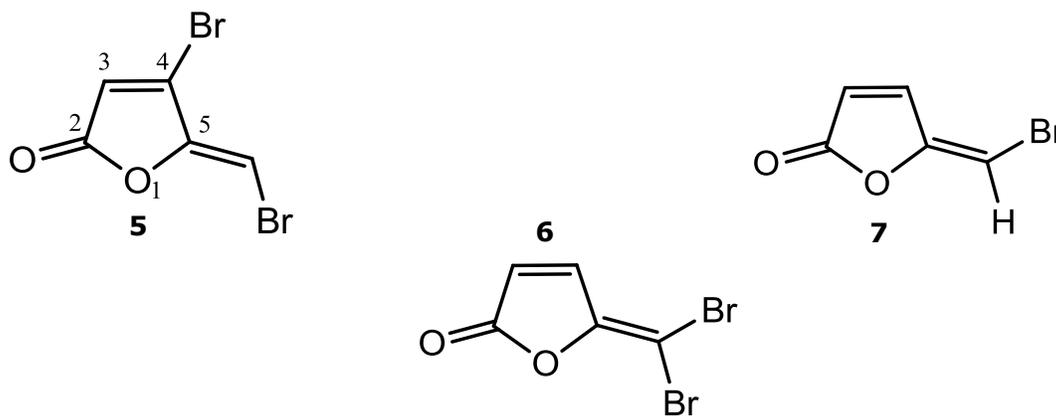
### 7.1.2 Formación de lactonas promovida por ácido

Se añadió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (98%) (20 mL) al crudo (6.8 g) de la reacción previa a temperatura ambiente, la mezcla se calentó a una temperatura de entre 90-100°C en un baño de aceite durante 15 min (**Figura 13**). Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se vertió sobre hielo. La solución oscura resultante se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 60 mL). Los extractos se lavaron con  $\text{H}_2\text{O}$ , se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó el disolvente (Manny y cols., 1997).



**Figura 13.** Ciclación de los cetoácidos, mediada por ácido.

El producto oleoso se separó en una columna cromatográfica empacada en sílice empleando Hex / AcOEt (99:1). Se obtuvieron tres productos cristalinos (**Figura 14**) que fueron purificados mediante lavados con éter isopropílico:



**Figura 14.** Estructura química de las furanonas **5**, **6** y **7**.

**4-Bromo-5-(bromometilen)-2(5H)-furanona (5)** (41%). Cristales blancos; p.f. 82-83 °C; HPLC 99.86% pureza;  $^1\text{H RMN (CDCl}_3, 200 \text{ MHz)}$   $\delta$ : 6.41 (s, 1H, 5-CHBr), 6.50 (s, 1H, H-3).

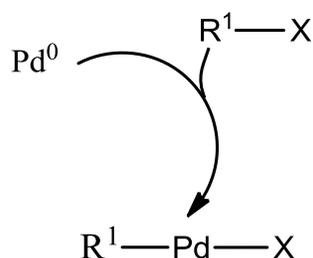
**5-(Dibromometilen)-2(5H)-furanona (6)** (12%). Cristales color durazno; p.f. 124-126 °C; HPLC 99.22 % pureza;  $^1\text{H RMN (CDCl}_3, 300 \text{ MHz)}$   $\delta$ : 6.42 (d, 1H, H-3,  $J=5.6 \text{ Hz}$ ), 7.68 (d, 1H, H-4,  $J=5.6 \text{ Hz}$ ).

**5-(Bromometilen)-2(5H)-furanona (7)** (2.5%). Cristales blancos; p.f. 75-76 °C; HPLC 100% pureza;  $^1\text{H RMN (CDCl}_3, 300 \text{ MHz)}$   $\delta$ : 6.12 (s, 1H, 5-CHBr), 6.33 (d, 1H, H-3,  $J=5.4 \text{ Hz}$ ), 7.40 (d, 1H, H-4,  $J=5.4 \text{ Hz}$ ).

### 7.1.3 Síntesis de la 5-metilen-2(5H)-furanona o protoanemonina (8)

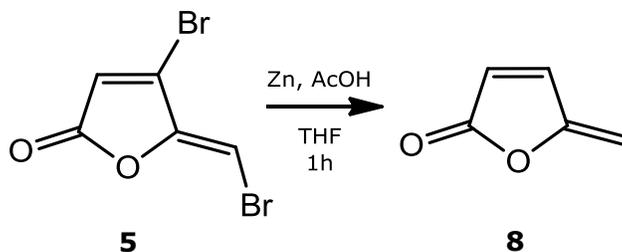
Se utilizó el butenólido **5** como molécula base para la obtención de la protoanemonina, por el rendimiento en su preparación, por la posición de los halógenos en la molécula y porque no se hallaron referencias bibliográficas que describieran su utilización para la síntesis de la protoanemonina.

Se intentó la síntesis de la 5-metilen-2(5*H*)-furanona a partir de **5** en dos pasos: 1) Reducción catalítica de las dobles ligaduras y 2) Eliminación bimolecular o deshidrohalogenación con una base para regenerar las dobles ligaduras en las posiciones 3 y 5. Sin embargo, la reducción catalítica de **5** utilizando como disolvente AcOEt y como catalizador Pd/C 10% (10-20% m/m respecto al sustrato) a temperatura ambiente, no se llevó a cabo. Esto se explica porque previo a la hidrogenación deseada, el Pd<sup>0</sup> participa en una reacción de adición oxidativa (**Figura 15**), insertándose entre el carbono sp<sup>2</sup> y el halógeno del haloalqueno presente, generándose productos no deseados en este caso.



**Figura 15.** Reacción de adición oxidativa

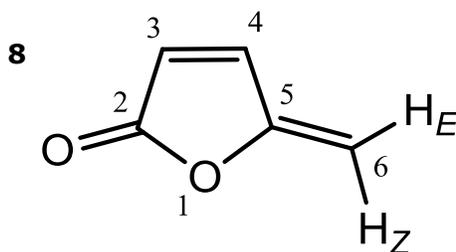
Una exhaustiva exploración bibliográfica nos llevó a probar como una opción viable, un método de deshalogenación reductiva del haloalqueno con base en el procedimiento de Sorg y Brückner (2004) utilizando Zn, AcOH-THF y sonicación. La reacción procedió según el siguiente esquema:



**Figura 16.** Reactivos y condiciones para la obtención de la protoanemonina

La furanona **5** (100 mg) se disolvió en THF anhidro (5 mL) y se añadió Zn en polvo (1 equiv) previamente activado\* (Armarego y Chai, 2003); también se agregó una pequeña cantidad de hidroquinona con la finalidad de inhibir la polimerización del producto. La mezcla se dejó en sonicación durante 20 min y se añadió AcOH glacial (2 gotas). La reacción se mantuvo en sonicación y se monitoreó mediante CCF cada 15 min. Después de completarse la reacción a los 60 min, el producto se filtró por gravedad sobre celita para retener el residuo de zinc, utilizando una mínima cantidad de metanol.

La purificación del producto se realizó mediante cromatografía en placa preparativa. El filtrado se adsorbió en una placa de 20 x 20 cm y se eluyó por duplicado en una fase móvil de Hex-AcOEt (7:3). El producto de reacción, con un  $R_f = 0.32$ , se extrajo con AcOEt obteniendo un total de 35 mg (35 % rendimiento) de la protoanemonina **8**, que fue identificada al analizar sus datos espectroscópicos y espectrométricos (**Anexo1**) (Shaw, 1946; Minakata y cols., 1983; Alibés y cols., 1990; Crey y cols., 2003).



**Figura 17.** Estructura de la protoanemonina.

**5-metilen-2(5H)-furanona o protoanemonia (8)** (35 %). Aceite ligeramente amarillo;  $\lambda_{\text{máx}} = 260$  nm.  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$ : 6.3 (ddd, 1H, H-3,  $J = 5.5, 1.8, 0.9$  Hz), 7.68 (dt, 1H, H-4,  $J = 5.5, 0.5$  Hz), 5.23 (ddd, 1H,  $=\text{CH}_E\text{H}_Z$ ,  $J = 2.4, 1.8, 0.5$  Hz), 5.03 (ddd, 1H,  $=\text{CH}_E\text{H}_Z$ ,  $J = 2.5, 0.9, 0.5$  Hz).  $^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$ : 170.4 (C-2), 121.0 (C-3), 143.9 (C-4), 155.5 (C-5), 97.0 ( $=\text{CH}_2$ ). **EM-IE** m/z: 96  $[\text{M}]^+$ , 68  $[\text{M}-\text{CO}]^+$ , 54  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$ , 42  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_2\text{O}]^+$ , 40  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_4]^+$ , 39  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_3]^+$ .

\*Activación del polvo de zinc: Se pone 2 g de Zn en agitación con 5 mL de HCl 2% durante 1 minuto, después se retira el ácido por filtración y se lava el residuo con 5 mL de HCl 2%, 2 mL de agua destilada (x3), 2 mL de etanol 95% (x2) y 2 mL de éter etílico (x2) (las soluciones de lavado se remueven mediante filtración). El material se pone a secar y si es necesario se pulveriza en un mortero.

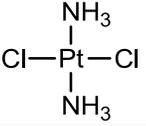
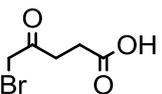
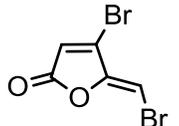
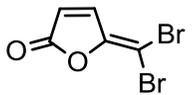
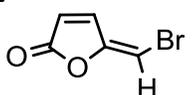
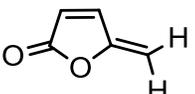
## 7.2 Evaluación de la actividad biológica

Se realizó un primer experimento *in vitro*, según el método descrito en la **sección 6.2**, de los compuestos **4-8** para examinar su actividad antineoplásica.

### 7.2.1 Actividad de inhibición del crecimiento celular mediante el método con sulforrodamina B (SRB)

La primera evaluación de los compuestos se efectuó a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  de cada compuesto para probar su capacidad de inhibición del crecimiento de 6 líneas de cáncer humano.

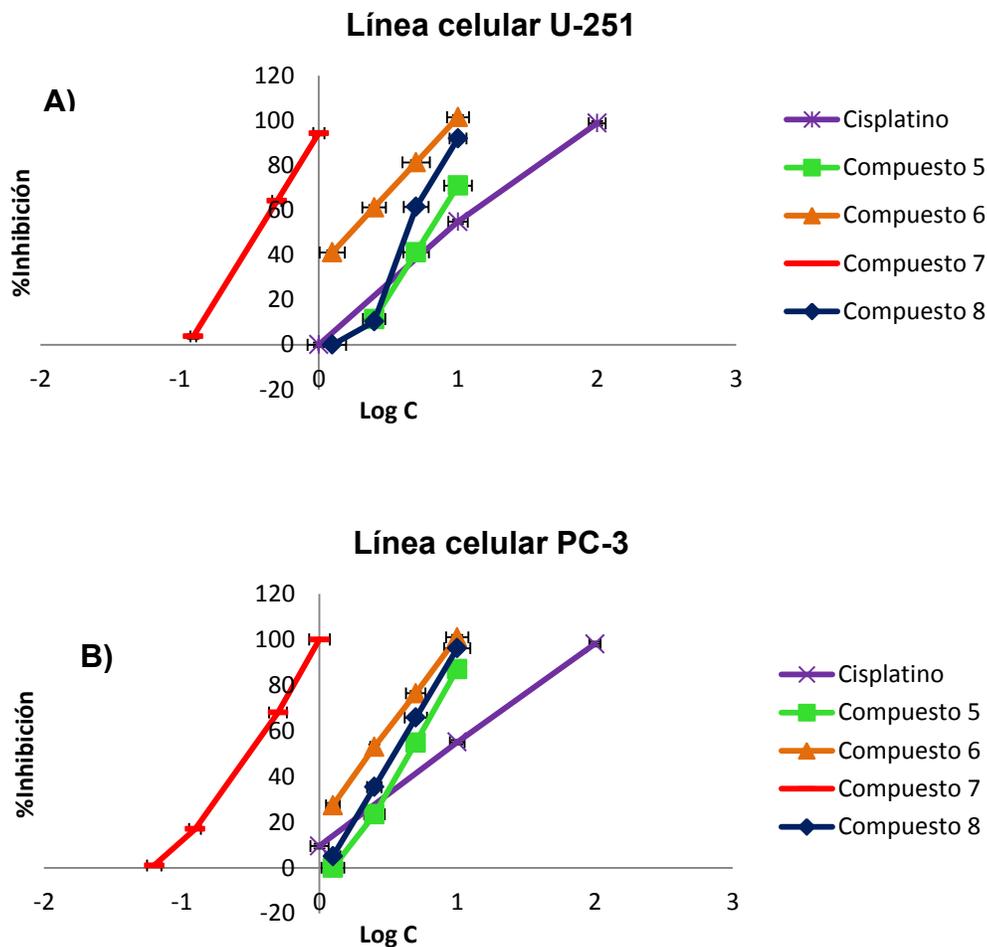
**Cuadro 3.** Resultados promedio de inhibición de proliferación celular de los compuestos **4-8** en líneas de cáncer

Compuesto	% Inhibición					
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
<b>Cisplatino</b> 	100	100	100	100	100	100
<b>4</b> 	15.83	29.21	5.62	35.03	5.79	13.43
<b>5</b> 	100	100	100	96.51	100	100
<b>6</b> 	100	100	100	68.78	98.24	100
<b>7</b> 	100	100	76.02	92.1	100	100
<b>8</b> 	100	100	93.96	93.14	100	100

❖ El vehículo utilizado fue DMSO que se utilizó en una proporción no mayor al 1% en el medio de cultivo.

### 7.2.2 Concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) por el método con SRB.

Se calculó la concentración inhibitoria media  $CI_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos más activos de la prueba anterior, en las líneas celulares que se tenían disponibles, U-251 (Glioblastoma) y PC-3 (próstata), utilizando 4 puntos para la construcción de cada curva de los compuestos **5**, **6**, **8** y el **cisplatino**: 1.25, 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$  y para el compuesto **7**: 0.063, 0.125, 0.5, 1  $\mu\text{M}$ . A continuación se muestran las curvas de concentración-respuesta de los compuestos **5-8**.

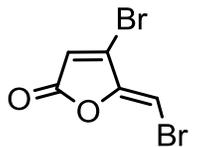
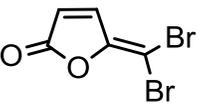
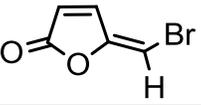
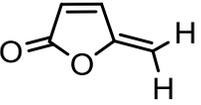


**Figura 18.** Curvas concentración-respuesta de los compuestos **5-8**  $\pm$  DE

**A)** Línea celular U-251 (Glioblastoma) y **B)** PC-3 (próstata).

A partir de las curvas previas se calculó la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) de cada compuesto:

**Cuadro 4.** Resultados de  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) de los compuestos 5-8

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	
	U-251	PC-3
<b>cisplatino</b>	$8.31 \pm 0.08$	$8.09 \pm 0.05$
<b>5</b> 	$7.3 \pm 0.08$	$6.65 \pm 0.02$
<b>6</b> 	$1.56 \pm 0.1$	$2.33 \pm 0.05$
<b>7</b> 	$0.36 \pm 0.13$	$0.31 \pm 0.02$
<b>8</b> 	$5.3 \pm 0.13$	$4.1 \pm 0.05$

- ❖ Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar.
- ❖ El vehículo utilizado fue DMSO; el cual se utilizó en una proporción no mayor al 1% en el medio de cultivo.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Elucidación estructural

#### 8.1.1 Caracterización de los compuestos 5-7

La bromación del ácido levulínico y la ciclación de los ácidos bromados resultaron con los rendimientos esperados, de acuerdo a lo descrito por Manny y sus colaboradores (1997). La identificación de la 4-Bromo-5-(bromometilen)-2(5*H*)-furanona (**5**), la 5-(Dibromometilen)-2(5*H*)-furanona (**6**) y la 5-(Bromometilen)-2(5*H*)-furanona (**7**) se logró al analizar sus datos espectroscópicos de RMN que coinciden con aquéllos informados en la literatura (Manny y cols., 1997).

#### 8.1.2 Caracterización del compuesto 8

La furanona **8** (5-metilen-2(5*H*)-furanona) fue obtenida a partir de **5** con un rendimiento del 35% mediante una deshalogenación reductiva mediada por Zn.

El producto **8** es de aspecto oleoso y con un punto de ebullición de 56-59 °C, características que concuerdan con las referidas previamente (Alibés y cols., 1990; Shaw, 1946). El compuesto mostró un máximo de absorción a una longitud de onda de  $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$  (**Anexo 1.1**), que es una propiedad espectral descrita para la protoanemonina (Shaw, 1946).

Respecto a sus datos espectroscópicos, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **8** muestra cuatro señales que integran para cuatro protones de tipo vinílico entre 5.03 y 7.68 ppm. La señal más desplazada hacia campo bajo en 7.68 ppm corresponde a un sistema de doble de triples (dt;  $J=5.5, 0.5 \text{ Hz}$ ) para un protón vinílico en un sistema  $\alpha, \beta$  insaturado, asignado al H-4. La señal de doble de doble de dobles (ddd;  $J= 5.5, 1.8, 0.9 \text{ Hz}$ ) a 6.33 ppm corresponde también a un protón vinílico dentro de un sistema  $\alpha, \beta$  insaturado, asignado al H-3. La siguiente señal a 5.23 ppm con una multiplicidad de doble de doble de dobles (ddd,  $J=2.4, 1.8, 0.5 \text{ Hz}$ ) corresponde al protón H-6Z, mientras que la señal más desplazada hacia campo alto en 5.03 ppm con la misma multiplicidad de doble de doble de dobles

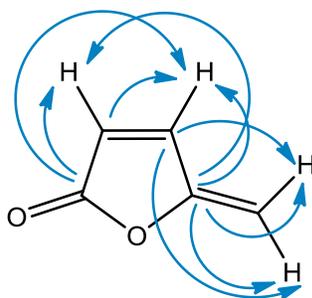
(ddd,  $J=2.5, 0.9, 0.5$  Hz) fue asignada al protón H-6E. El espectro se muestra en el **ANEXO 1.2**

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  del **ANEXO 1.3** hay una señal característica de carbonilo de éster a 170.4 ppm que fue asignada al C-2. En 155.5 ppm se observa una señal para carbono  $\text{sp}^2$  cuaternario asignado al C-5, y pueden observarse otras señales para carbonos  $\text{sp}^2$  tipo metino a 121.0 y 143.9 ppm asignadas a los C-4 y C-3 respectivamente. Finalmente se aprecia una señal a 97.0 ppm para carbono  $\text{sp}^2$  tipo metileno que corresponde al metileno exocíclico. El análisis del experimento HSQC del **Anexo 1.4** permitió confirmar las asignaciones.

Al analizar el espectro de masas que se muestra en el **ANEXO 1.5**, se encuentra la señal correspondiente al ión molecular a 96 m/z  $[\text{M}]^+$ , que es también el pico base. A continuación se observa un pico a 68 m/z  $[\text{M} - 28]^+$  que representa la pérdida de un grupo carbonilo, le sigue la pérdida del metileno exocíclico a 54 m/z  $[\text{M} - 28 - 14]^+$ , también se observa una señal a 42 m/z  $[\text{M} - 54]^+$ , que indica la fractura de la lactona en dos fragmentos principales. También se observa el fragmento que corresponde al carbonilo 28 m/z  $[\text{M} - 68]^+$ .

La estructura de la protoanemonina también se comprobó mediante el análisis de los experimentos de resonancia magnética nuclear bidimensional HMBC y COSY.

En la siguiente figura se representan las principales correlaciones halladas en el espectro del experimento heteronuclear HMBC.



**Figura 19.** Principales correlaciones C→H para el compuesto **8** según el espectro HMBC.

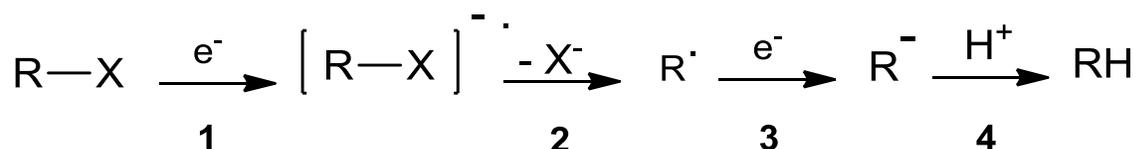
### 8.1.3 Mecanismo de reducción para la obtención de la protoanemonina

Sorg y sus colaboradores (2004) lograron la reducción estereoselectiva mediada por Zn, de un dibromobutenólido. Con base en lo anterior, en este trabajo se empleó zinc con ácido acético y THF como disolvente en condiciones suaves de sonicación, que promovió la generación de la protoanemonina a partir de la furanona **5** como resultado de un intercambio de bromo/ hidrógeno.

El zinc es un elemento metálico que pertenece al grupo 12 de la tabla periódica, su configuración electrónica es  $[\text{Ar}] 4s^2 3d^{10}$  y su potencial normal de reducción negativo ( $E^\circ = -0.76 \text{ V}$ ) nos indica que es un buen agente reductor.

El zinc es, después del sodio, el metal reductor más abundante y es excelente entre otros tipos de reducciones, para reemplazar halógenos por hidrógeno (Hudlicky, 1984). El uso de zinc como agente reductor disminuye la producción de residuos tóxicos al ambiente, en comparación con la utilización de otros reductores como por ejemplo, compuestos de estaño, cuyos residuos son conocidos por su toxicidad.

Asumiendo que la formación de la protoanemonina descrita en este trabajo involucra la formación de radicales, como lo sugieren algunos estudios previos de deshalogenación reductiva en haluros de alquilo (Rahim y cols., 2008; Laev y Shteingarts, 1999) el mecanismo de reacción podría proceder en los siguientes pasos: el haloalqueno captura un electrón del metal para generar un radical anión (**1**), el radical-anión se fragmenta en un radical y un ión haluro (**2**), el radical resultante se reduce a un anión (**3**) y finalmente se produce la protonación del anión (**4**) para generar los productos de hidrodeshalogenación. (**Figura 21**) (Parsons, 2000; Rahim y cols., 2008)



**Figura 21.** Probable mecanismo de deshalogenación reductiva

## 8.2 Evaluación de la actividad biológica.

Una vez realizada la caracterización química de las furanonas y con la finalidad de establecer un resultado preliminar respecto al potencial antineoplásico de las mismas, los compuestos se evaluaron en su capacidad de inhibición del crecimiento de 6 líneas celulares de cáncer humano, según los protocolos del Instituto Nacional del Cáncer (EUA).

### 8.2.1 Inhibición de la proliferación de células de cánceres humanos *in vitro*

Los resultados del primer estudio *in vitro* se muestran en el **Cuadro 3**. Se incluyó el cetoácido bromado **4** para comparar su eficacia contra la de las furanonas y definir la importancia de la estructura cíclica para la actividad biológica.

Los resultados muestran que el ácido **4** fue el menos activo de los compuestos evaluados a pesar de tener un átomo de bromo enlazado, mientras que las furanonas **5-8** demostraron una eficacia comparable a la del cisplatino en todas las líneas celulares. La furanona **8** presentó una excelente actividad inhibitoria aún sin poseer halógenos en su estructura. Es común el uso de sustituyentes halógenos en la química farmacéutica ya que pueden actuar como fracciones hidrofóbicas de una molécula y como bases de Lewis según su electronegatividad, pero también como ácidos de Lewis en un sistema biológico, al interactuar principalmente con proteínas (Rainer y cols., 2013); estas características generalmente los convierten en herramientas muy útiles para mejorar la afinidad de sustancias activas con sus sitios de acción. En el caso de las furanonas sintetizadas según los resultados, la presencia de átomos de bromo no es esencial para la actividad, aunque el anillo 2,5-dihidrofuran-2-ona sí es necesario para la acción biológica.

Las curvas concentración-respuesta construidas para los compuestos **5-8 (Figura 18)**, corresponden con el modelo farmacológico logarítmico-lineal, que permite deducir con exactitud el efecto comprendido entre un 20 - 80 % del efecto máximo de la molécula (Chu y cols., 2002), permitiéndonos calcular la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) en las líneas celulares U-251 (glioblastoma) y PC-3 (próstata) de

las moléculas **5-8 (Cuadro 4)**. Las concentraciones medias obtenidas deben compararse con el valor de  $CI_{50}$  del cisplatino que también se muestra en el **Cuadro 4**. Se eligió al cisplatino como referencia porque es uno de los fármacos más potentes y más ampliamente utilizados en el tratamiento contra varios tipos de cáncer, en especial el de tumores sólidos (Schuldes y cols., 1997)

Las furanonas **5-8** mostraron ser más potentes que el cisplatino, siendo **7** y **6** las que presentaron mayor potencia de inhibición, mientras que la furanona **5** resultó la menos potente.

Las furanonas **7** y **6** poseen uno y dos halógenos respectivamente en la doble ligadura exocíclica, mientras que la furanona menos potente (**5**), además de tener un halógeno enlazado al carbono exocíclico, contiene otro átomo de halógeno unido al esqueleto 2, 5-dihidrofuran-2-ona. La molécula **8**, a pesar de no poseer halógenos en su estructura presenta una potencia superior al cisplatino.

Las furanonas **5-8** que se evaluaron son moléculas pequeñas que tienen una estereoquímica plana, lo que hace posible que su mecanismo de acción biológica sea mediante su interacción directa con el ADN; son muchos los fármacos anticancerosos que poseen las características mencionadas y tienen como blanco molecular directo el ADN: la doxorubicina y la daunorrubicina, la mitoxantrona, la elipticina y el topotecán, entre otros (Hill y cols., 2011), son fármacos que tienen la capacidad de intercalarse o unirse al surco (Palchaudhuri y Hergenrother, 2007).

Respecto a la presencia de átomos de bromo en las furanonas, se ha mencionado que los sustituyentes de halógeno en las moléculas bioactivas pueden participar en interacciones electrostáticas con las biomoléculas (como proteínas o ácidos nucleicos) con una fuerza comparable a la de los enlaces de hidrógeno (Metrangolo y Resnati, 2001; Pascal y cols., 2004), los halógenos también tienen la capacidad de funcionar como aceptores de electrones al actuar como ácidos de Lewis frente a la transferencia de carga negativa de un oxígeno, nitrógeno o azufre de otra molécula (Foster, 1969). Estas características deben formar parte o influir en el mecanismo de acción de los butenólidos evaluados, y como puede

observarse según los resultados, sólo es necesario un grupo funcional polarizable, como el bromo, unido al carbono exocíclico para mejorar su bioactividad.

Se ha concluido que algunas  $\alpha$ -metilenlactonas ejercen un efecto antitumoral al inhibir la enzima fosfofructocinasa y reaccionar con los grupos sulfhidrilos que posee (Kumar y cols., 2013; Sanderson y cols., 2008). Dada la similitud estructural de las  $\alpha$ -metilenlactonas, con las furanonas aquí sintetizadas, otra posibilidad es que estas últimas ejerzan el mismo mecanismo de acción que las  $\alpha$ -metilenlactonas.

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- Se prepararon las furanonas halogenadas 4-Bromo-5-(bromometilen)-2(5*H*)-furanona (**5**), 5-(Dibromometilen)-2(5*H*)-furanona (**6**) y 5-(Bromometilen)-2(5*H*)-furanona (**7**) a partir del ácido 4-oxopentanoico, por un método sintético conocido.
- Se logró la síntesis de la 5-metilenefuran-2(5*H*)-ona o protoanemonina (**8**) a partir de la 4-Bromo-5-(bromometilen)-2(5*H*)-furanona (**5**) mediante una deshalogenación reductiva mediada por zinc.
- La síntesis de la protoanemonina se logró en 3 pasos a partir del ácido levulínico. Éste es el primer informe de la preparación de la protoanemonina por este método.
- El uso de zinc en la síntesis de la protoanemonina (**8**) reduce el costo del paso de deshalogenación y los residuos producidos son de menor toxicidad al ambiente con respecto a otros posibles reductores.
- La evaluación biológica sugiere que la hidrólisis de este tipo de bromolactonas resulta en la pérdida de su bioactividad.
- Las furanonas **5** a **8** mostraron una excelente eficacia de inhibición de las líneas celulares de cáncer humano evaluadas. Esto muestra un panorama prometedor respecto a su potencial anticanceroso.
- Las furanonas **5** a **8** mostraron ser más potentes que el cisplatino en su efecto inhibitor de la proliferación de dos líneas celulares de cáncer (U-251 y PC-3).

- La potencia de actividad biológica *in vitro* de este tipo de furanonas mejora cuando un átomo de halógeno se encuentra enlazado a la doble ligadura exocíclica de la molécula, mientras que disminuye al aumentar el número de halógenos sustituyentes en la molécula.
- La potencia de las furanonas **5-7** halogenadas y de la protoanemonina (**8**), en la inhibición de células cancerosas *in vitro*, su sencilla preparación sintética a partir del ácido levulínico que es una materia prima abundante y de bajo costo, hace a este tipo de moléculas ideales para su estudio como potenciales fármacos anticancerosos.

### **Perspectivas:**

Es necesario conocer el mecanismo de acción que los compuestos sintetizados en este trabajo ejercen dentro de las células cancerosas para conocer su potencial como fármacos, por lo tanto, el mecanismo de acción biológica de los compuestos **5-8** está en proceso de estudio por nuestro equipo de investigación, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

## 10. LITERATURA CITADA

- ❖ AECC Asociación Española Contra el Cáncer (2012). ¿Qué es la quimioterapia? Recuperado el 5 de febrero de 2014, de <https://www.aecc.es/>
  
- ❖ Afkhami-Ardekani M, Shojaoddiny-Ardekani A (2007). Effect of vitamin C on blood glucose, serum lipids & serum insulin in type 2 diabetes patients. *Indian J. Med. Res.* ;126(5):471-4.
  
- ❖ Alibés R., Font J., Mulá A., Ortuño R. (1990). Studies on structurally simple  $\alpha$ ,  $\beta$ - butenolides. A new and convenient synthesis of protoanemonin. *Synth. Commun.*, 20 (17), 2607-2615.
  
- ❖ Anurag A., Petschenka G., Bingham R., Weber M., Rasman S. (2012). Toxic cardenolides: Chemical ecology and coevolution of specialized plat-herbivore interactions. *New Phytol.*, 194, 28-45.
  
- ❖ Álvarez M.E., Rotelli A.E., Pelzer L.E., Saad J.R. (2002). Actividad irritante de *Clematis Montevidensis* Sprengel (Ranunculaceae). *Dermatol. Peru.*, 12 (1).
  
- ❖ Armarego W. L. F. y Chai C. Lin L. (2003) Purification of Laboratory Chemicals. 5ª edición. Editorial Elsevier, Gran Bretaña, pp 497.
  
- ❖ ATCC *American Type Culture Collection*. Características de los cultivos. Recuperado el 4 de noviembre de 2014 de <http://www.atcc.org/>
  
- ❖ Calderón-Montaño J.M., Burgos-Morón E., Orta M., Pastor N., Austin C., Mateos S., López-Lázaro M. (2013). Alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage, formation of

- topoisomerase I- and II-DNA complexes and cancer cell death, *Toxicol. Lett.*, 222, 64-71.
- ❖ Chen Y., Chen J., Wang Y., Xu S., Li X. (2012). Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. *Food Chem.*, 135, 960-965.
  - ❖ Crey C., Dumy P., Lhomme J., Kotera M. (2003). A convenient synthesis of protoanemonin. *Synth. Comm.* 33 (21), 3727-3732.
  - ❖ Colin, S.J., (1999). The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 74, 259–276.
  - ❖ Damia G., D’Incalci M., (2009). Contemporary pre-clinical development of anticancer agents- What are the optimal preclinical models?. *Eur. J. Cancer*, 45, 2768-2781.
  - ❖ Foster, R. (1969) *Organic Charge-Transfer Complexes* (Academic, London).
  - ❖ Flores Rosete G., Martínez Vázquez M., (2008), Antiinflammatory and cytotoxic cycloartanes from Guayule (*Parthenium argentatum*), *Nat. Prod. Comm.*, 3, 413-422.
  - ❖ Flórez J. (2003). Quimioterapia antinoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos, fijadores a la tubulina, inhibidores de topoisomerasas. En Flórez J. *Farmacología Humana*, 4ª edición, Editorial Masson, Madrid.pp 1019-1038.

- ❖ García-Contreras, R., Martínez-Vázquez Ma., Velázquez-Guadarrama N., Villegas-Pañeda A. G., Takahiro H., Toshinari M. (2013), Resistance to the quorum-quenching compounds brominated furanone C-30 and 5-fluorouracil in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *FEMS Immunol. Med. Mic.* 68 (1), 8-11.
- ❖ Graham J. G., Quinn M. L., Fabricant D. S., Farnsworth N. R., (2000), Plants used against cancer- an extension of the work of Jonathan Hartwell *J. Ethnopharmacol.*, 73, 347-377.
- ❖ Grundman C. y Kober E. (1955) An improved synthesis of protoanemonin. *J. Chem. Soc.* 77, 2332-2333.
- ❖ Hill G., Moriarty D. y Setzer W. (2011) Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine. *Sci. Pharm.* 79, 729-747.
- ❖ Hu B. (2005). Chinese medicinal composition for topical application for treating primary liver cancer and liver cirrhosis. China. CN 1626171 A 20050615.
- ❖ Hu S., Hu, S., Hu, Q. (2003). Anti-inflammatory medicine prepared from *Ranunculus*. China. CN 1406591 A 20030402.
- ❖ Hu S., Hu, S., Hu, Q. (2006). Use of anemonin for treating aseptic inflammations. Estados Unidos. US 20060062860.
- ❖ Hudlicky M. (1984). Reductions in organic Chemistry. Virginia Polytechnic Institute and State University. E.U.A., Ellis Horwood Limited, 28-34.
- ❖ Instituto Nacional del Cáncer (E.U.A). (2014). Qué es el cáncer. Recuperado el 10 de octubre de 2014 de <http://www.cancer.gov/espanol/>

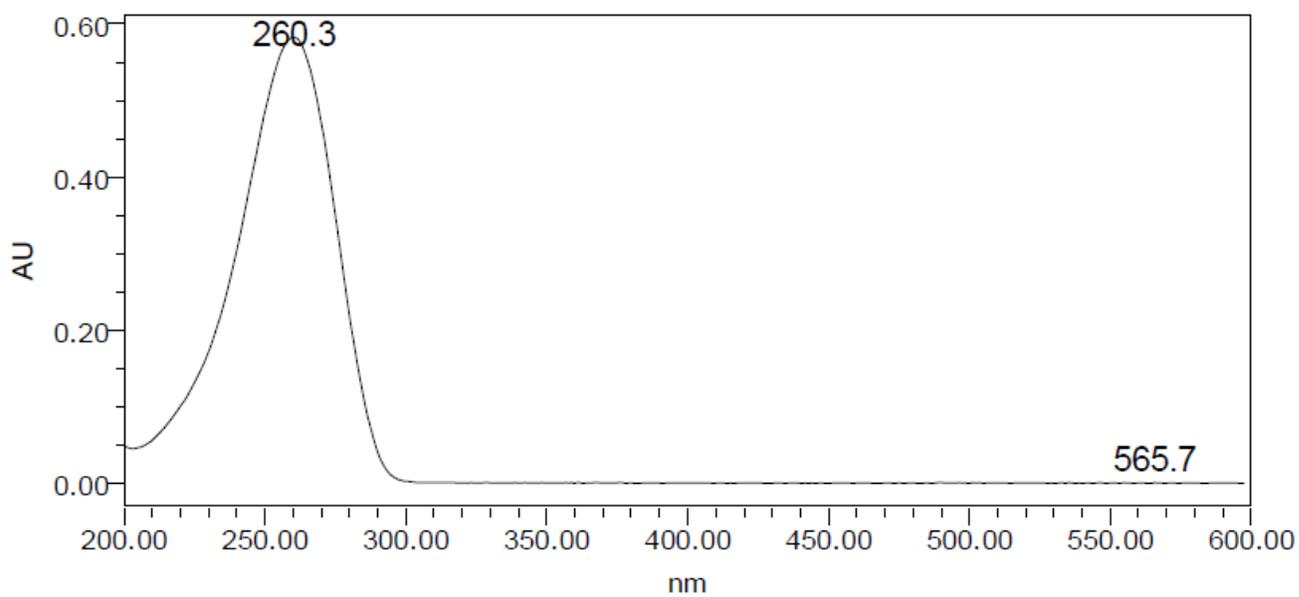
- ❖ Chu E., Alan C., Sartorelli (2002). Quimioterapia del cáncer. En Katzung, Farmacología básica y Clínica, 10ª edición. Editorial El Manual Moderno. México. pp 935-961.
- ❖ Klobb T. (1900) Effect of Pheny isocyanate and aniline on some  $\gamma$ -Ketonic acid., *C. r. d. l'Acad. d. Sciences*, 130, 1254-1256.
- ❖ Kumar S., Garg R., Kabra A. (2013). Review on butenolides. *World J. Pharm. Res. Technol.* 1(2), 131-142.
- ❖ Laev S., Shteingarts V. D. (1999). Selective hydrodechlorination of fluorinated arylamines. *J. Fluorine Chem.*, 96, 175-185.
- ❖ MacDonald S.F. (1974). Methyl 5-Bromolevulinate. *Can. J. Chem.*, 52, 3257-3258.
- ❖ Manny A. J., Kjelleberg S., Kumar N., Nys de R., Read R.W., Steinberg P. (1997). Reinvestigation of the sulfuric acid-catalysed cyclisation of brominated 2-alkyllevulinic acids to 3-alkyl-5-methylene-2(5H)-furanones. *Tetrahedron*, 53(46), 15813-15826.
- ❖ Mares D. (1987). Antimicrobial activity of protoanemonin, a lactone from ranunculaceous plants. *Mycopathologia*, 98(3), 133-40.
- ❖ Martin M. L., Ortiz de Urbina A.V., Montero M. J., Carrón R., San Román L. (1988). Pharmacologic effects of lactones isolated from *Pulsatilla alpina* subsp. *Apiifolia*. *J. Ethnopharmacol.*, 24 (2-3), 185-191
- ❖ Metrangolo P. y Resnati G. (2001). Halogen bonding: a paradigm in supramolecular chemistry. *Chem. Eur. J.* 7, 2511 -2519.

- ❖ Minakata H., Komura H., Nakanishi K., Kada T. (1983) Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants. *Mutat. Res.*, 116 (317-322).
- ❖ Moriarty R. M., Romain C. R., Karle I.L., Karle J. (1965). The structure of anemonin. *J.Am. Chem. Soc.*, 87, 3251-3252.
- ❖ Newmann DJ., Cragg GM., Snader KM. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234.
- ❖ OMS, Organización Mundial de la Salud (2014). Las estadísticas sanitarias mundiales. Recuperado el 10 de octubre de 2014 de <http://www.who.int/research/es/>
- ❖ Palchaudhuri R. y Hergenrother P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action, *Curr. Opin. Biotech.*, 6, 497-503.
- ❖ Papazisis K., Geromichalos G., Dimitriadis K., Kortsaris A. H. (1997) Optimization of the sulphorhodamine B colorimetric assay, *J. Immun. Methods*, 208, 151-158.
- ❖ Parsons A. F. (2000). An introduction to free radical chemistry. 1<sup>a</sup> edición. Editorial Oxford: Blackwell Science, Inglaterra.
- ❖ Pascal A., Hays F., Westhof H. (2004). Halogen bonds in biological molecules. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 101 (48), 16789-16794.
- ❖ Podebrad, F., Heil, M., Reichert, S., Mosandl, A., Sewell, A.C., Bohles, H. (1999). 4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone) – the odour of maple syrup urine disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 22, 107–114.

- ❖ Shyamsunder R. Y. (1964). Chemistry of butenolides. *Chem. Rev.* 64(4), 353-88.
- ❖ Rahim H., Sajadi S., Heravi M. (2008). Reductive dehalogenation of arylhalides and alkylhalides with zinc in THF saturated aqueous ammonium chloride. *J. Chin. Chem. Soc-TAIP.* 55, 616-618.
- ❖ Rainer W., Zimmermann M. O., Lange A., Joerger A., Boeckler F. (2013). Principles and applications of Halogen Bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.*, 56 (4).
- ❖ Rakesh Ch., Kumar S., Sharman A. (2012). The genus *Clematis* (Ranunculaceae). Chemical and pharmacological perspectives. *J. Ethnopharm.* 143, 116-150.
- ❖ Reddy L., Odhav B., Bhoola K.D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharm. Therapeut.* 99, 1-13
- ❖ Rodilla Calvelo F. (2000). Mecanismos de acción antitumoral. *Bol. Oncol.* [en línea], 15 (3) [citado 2014]. Disponible en Internet: <http://www.boloncol.com/boletin-15/index.html>
- ❖ Sabbah M., Bernollin M., Doutheau A., Soul L., Queneau Y. (2013) A new route towards fimbrolide analogues: importance of the exomethylene motif in LuxR dependent quorum sensing inhibition. *Med. Chem. Comm.*, 4, 363-366.
- ❖ Sanderson T., Renaud M., Scholten D., Nijmeijer S., van den Berg M., Cowell S., *et al.* (2008). Effects of lactone derivatives on aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical and (anti) androgenicity in

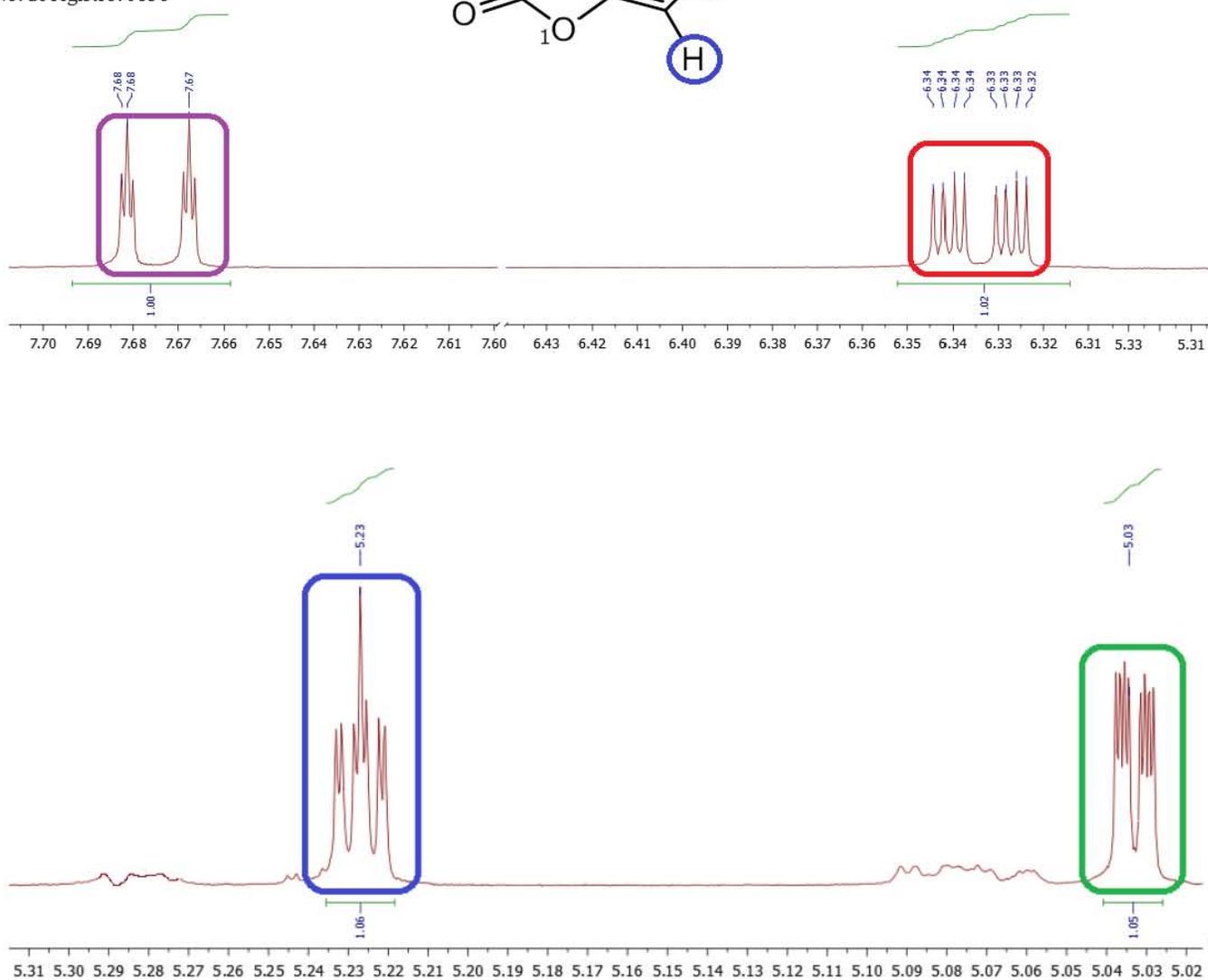
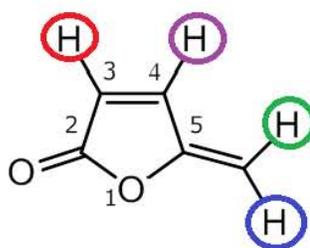
- transfected LNCaP human prostate cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 593, 92-98.
- ❖ Schlaepfer L., Mendoza E. (2010) Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer: Relevancia en México. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* [en línea] 2010, vol. 41 [citado 2014]. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57916060003>.
  - ❖ Schuldes H., Bade S., Knobloch J., Jonas D. (1999) Loss of in vitro cytotoxicity of cisplatin after storage as stock solution in cell culture medium at various temperatures. *Cancer*. 79(9):1723-8.
  - ❖ Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS]. (2013). Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. Recuperado el 10 de enero de 2014, <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias.html>
  - ❖ Shaw E. (1946) A synthesis of protoanemonin. The tautomerism of acetylacrylic acid of penicillic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (12), 2510–2513.
  - ❖ Shyamsunder R. (1964). Chemistry of butenolides. *Chem. Rev.* 64 (4), 353–388.
  - ❖ Skehan P., Storeng R., Scudeiri D., Monks A., *et al.* (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107-1112.

- ❖ Sorg A., Siegel K., Brückner R. (2004) Novel access to  $\gamma$ -alkylidenebutenolides: Sequential stille couplings of dibromomethylenebutenolides. *Synlett.* 2, 321-325.
- ❖ Sulser, H.; Depizzol, J.; B. chi, W.(1967). A probable flavoring principle in vegetable-protein hydrolysates *J. Food Sci*, 32, 611–615
- ❖ Tamma N., Gherraf N. (2013). Synthesis of some butenolides and studies on their antimicrobial activity. *Int. Lett. Chem. Phys. Astron.*, 9 (1), 61-67.
- ❖ Vega-Ávila Elisa, Velasco-Lezama R., Jiménez-Estrada M., (2006). Las plantas como fuentes de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*, 31, 91-111.
- ❖ Union for International Cancer Control [UICC]. (2014). World Cancer Day 2014. Recuperado el 9 de enero de 2014, <http://www.worldcancerday.org/>
- ❖ Virchai V., Kirtikara K., Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.*, 1112-1116.
- ❖ Woolf T.(1999). Handbook of drug metabolism, Marcel Dekker Incorporated, Nueva York, 443-451.
- ❖ Zhang X., Zhang X., Zhang X. (2008). Use of radix Clematidis chinensis in preparing medicinal preparation for treating nausea and emesis. China. CN 101214292.
- ❖ Zhang Q. (1999). A Chinese medicinal composition for the prevention and the treatment of cancer, and the preparation method thereof. China. CN 1234273 A 19991110.

**ANEXO 1****Espectroscopía de la 5-metilen-2(5*H*)-furanona o protoanemonina (8)****1. Espectro de absorción ultravioleta**

## 2. Espectro de RMN $^1\text{H}$ de **8** y sus asignaciones

0836 H-14.1.fid  
 INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta  
 Dr. Mariano Martínez/ Alejandra Villegas  
 Clave: diBrfirH2  
 Disolvente: CD3OD  
 Hidrogeno-1  
 Bruker Avance III 400 MHz (H)  
 22-04-14  
 No. de registro: 0836



### 3. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT de **8** y sus asignaciones

0836.C-14.2.fid

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/E. Huerta

Dr. Mariano Martínez/ Alejandra Villegas

Clave: diBrfurH2

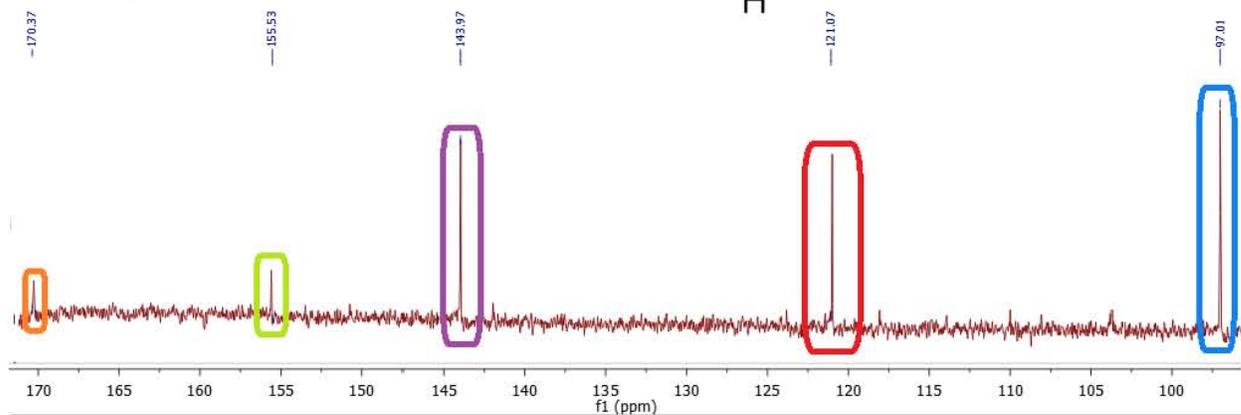
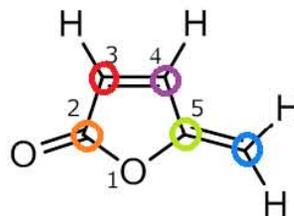
Disolvente: CD3OD

Carbono-13

Bruker Avance III 400 MHz (H)

22-04-14

No. de registro: 0836



0836.dept90-14.4.fid

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/E. Huerta

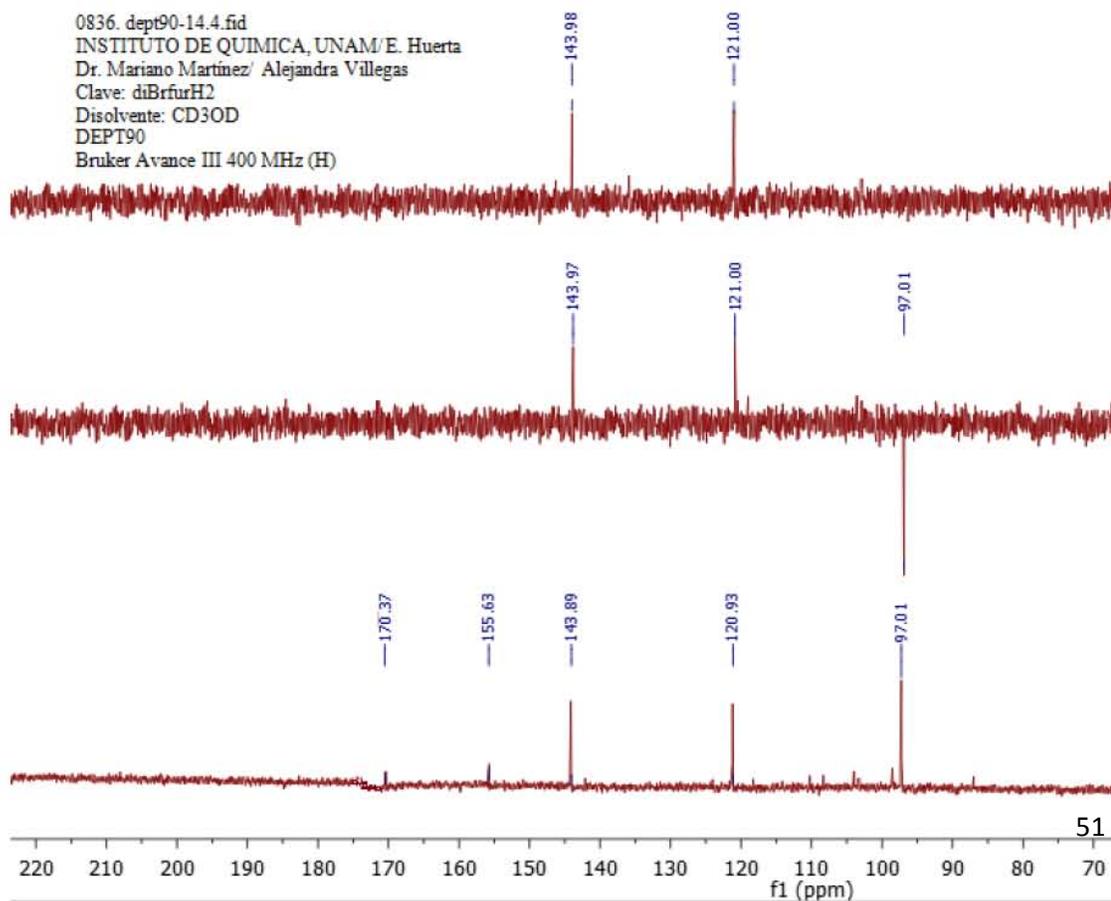
Dr. Mariano Martínez/ Alejandra Villegas

Clave: diBrfurH2

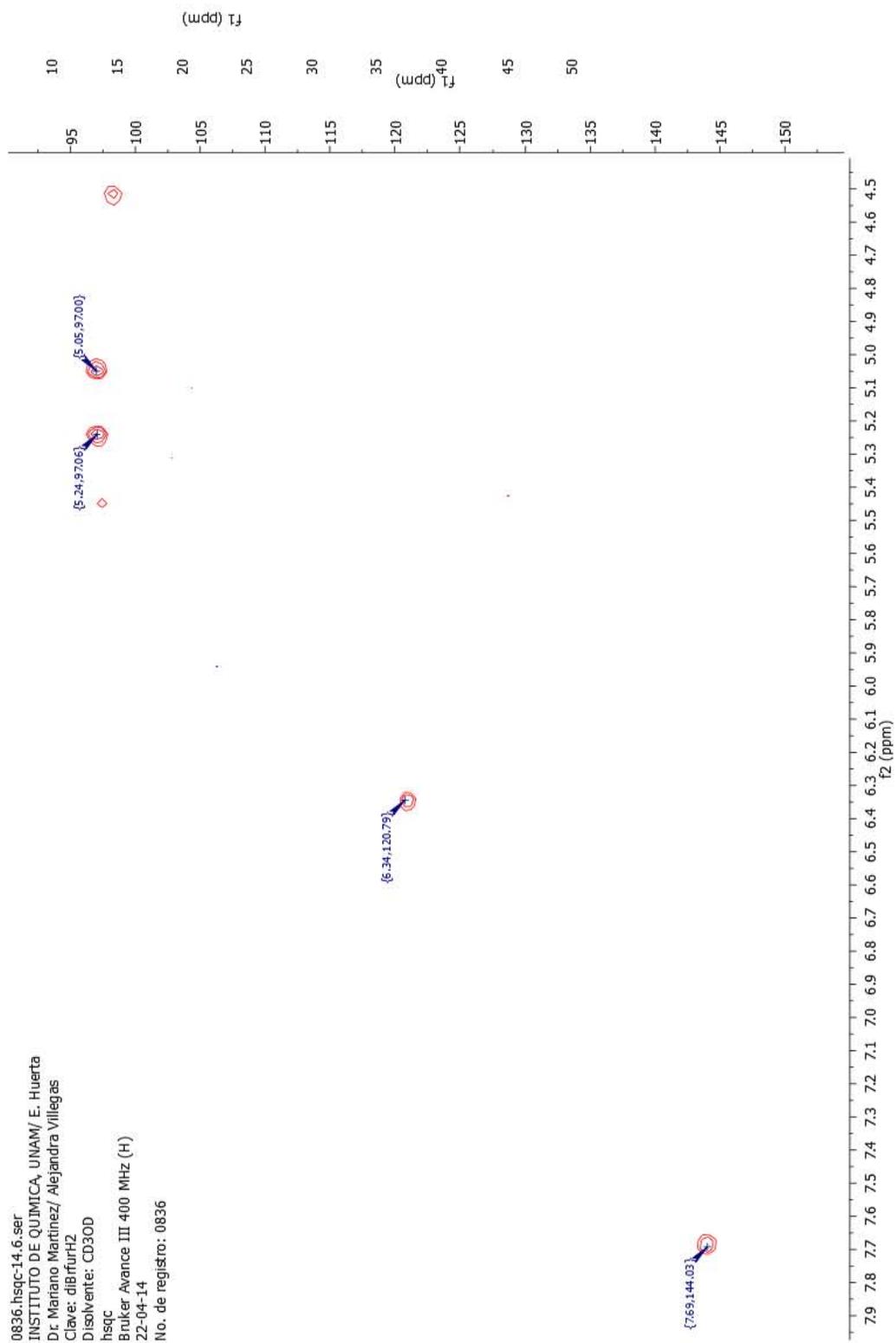
Disolvente: CD3OD

DEPT90

Bruker Avance III 400 MHz (H)



## 4. Experimento HSQC de 8



## 5. Espectro de masas de 8.

