



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

ESTUDIOS DE SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD  
ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA DE ANÁLOGOS MONOMÉRICOS DE CEFALOSTATINA A  
PARTIR DE TRITERPENOS AISLADOS DE LAS ESPECIES VEGETALES DE LA FAMILIA  
EUPHORBIACEAE.

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB. FABIOLA ANGÉLICA LÓPEZ HUERTA

TUTOR.  
DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO 2016



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**

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Vocal: Dr. Jesús Martín Torres Valencia

Secretario: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 1-C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas.

---

QFB. Fabiola Angélica López Huerta

Sustentante

---

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

Tutor

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (Becario 307784).

A la Coordinación y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, permitirme ser parte de su grupo de trabajo así como por la asesoría y el apoyo brindados durante la realización de la presente tesis.

Al personal técnico del Instituto de Química, especialmente a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, la Q. María de los Ángeles Peña González, las Doctoras Beatriz Quiroz García y María Isabel Chávez Uribe del laboratorio de resonancia magnética nuclear, a la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, del laboratorio de espectroscopía y polarimetría; al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al I. Q. Luis Velasco Ibarra, del laboratorio de espectrometría de masas; y a los M. en C. Antonio Nieto Camacho y María Teresa Ramírez Apán, del laboratorio de pruebas biológicas.

A los miembros del jurado Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. María Isabel Aguilar Laurens, M. en C. Emma Maldonado Jiménez, Dr. Jesús Martín Torres Valencia y al Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis así como por los comentarios, sugerencias y aportaciones a la misma.

A José Antonio Rivera, Fernando Novillo, Gabriela Salazar, Félix Morales, John Corredor, Casandra Cruz, infinitas gracias por los momentos compartidos y su invaluable amistad, los quiero mucho.

A Mayela del Ángel, José Luis Gonzalez Ávila y a José Luis Rodríguez, gracias por ser más que mis compañeros, agradezco su amistad y apoyo.

A Gustavo Pretelín, gracias amigo, Francisco Domínguez, Carolina Neira y Marcela López por su amistad y por haberme acompañado en este trayecto de dos años, siempre fueron un gran apoyo.

A Aline García, Teresa Medina y a todos mis amigos que han estado siempre.

*A mi papá, gracias por estar siempre, a mi mamá, a Sandra la mejor hermana que puedo tener, a mi "mejor" amigo Francisco, a Ángel, Álvaro, Monse y Moni, gracias infinitas por su apoyo y cariño.*

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| ÍNDICE DE ESQUEMAS .....  | 9  |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | 10 |
| ÍNDICE DE ESPECTROS.....  | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 14 |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 16 |
| 2.1 Cefalostatinas.....   | 16 |
| 2.1.1 Generalidades.....  | 16 |
| 2.1.2 Actividad citotóxica .....                                | 17 |
| 2.1.3 Síntesis de cefalostatinas.....                           | 20 |
| 2.2 Triterpenos .....   | 22 |
| 2.2.1 Generalidades.....  | 22 |
| 2.2.2 Triterpenos pentacíclicos.....                            | 23 |
| 2.2.3 Actividad antiinflamatoria y citotóxica.....              | 24 |
| 2.2.4 Lupeol.....   | 25 |
| 2.2.5 $\beta$ -amirina .....                                    | 26 |
| 3. HIPÓTESIS.....   | 27 |
| 4. OBJETIVOS.....   | 28 |
| 4.1 General.....  | 28 |
| 4.2 Particulares.....   | 28 |
| 5. JUSTIFICACIÓN.....   | 29 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                  | 30 |
| 6.1 Separación de palmitatos de lupeólo y $\beta$ -amirilo..... | 30 |
| 6.1.1 Por cromatografía en columna .....                        | 32 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 6.1.2 | Por derivatización.....                           | 32 |
| 6.2   | Reacción de <b>27</b> y NH <sub>2</sub> OH.....   | 37 |
| 6.3   | Derivados de lupeol ( <b>23</b> ).....            | 41 |
| 6.3.1 | Reacción de <b>23</b> con SeO <sub>2</sub> .....  | 41 |
| 6.3.2 | Reacción de <b>29</b> con NH <sub>2</sub> OH..... | 42 |
| 6.4   | Pirazinas esteroidales.....                       | 43 |
| 6.4.1 | Pirazina derivada de <b>25</b> .....              | 44 |
| 6.4.2 | Derivados de <b>31</b> .....                      | 47 |
| 6.4.3 | Benzopirazina derivada de <b>25</b> .....         | 50 |
| 6.4.4 | Pirazina derivada de <b>26</b> .....              | 51 |
| 6.5   | Actividad citotóxica.....                         | 53 |
| 6.6   | Actividad antiinflamatoria .....                  | 57 |
| 7.    | CONCLUSIONES .....                                | 60 |
| 8.    | SECCION EXPERIMENTAL .....                        | 62 |
| 9.    | REFERENCIAS.....                                  | 81 |
| 10.   | ANEXO .....                                       | 85 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Paclitaxel (Taxol) .....   | 14 |
| <b>Figura 2.</b> Colchicina.....  | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Estructura de la cefalostatina <b>1</b> .....  | 16 |
| <b>Figura 4.</b> <i>Cephalodiscus gilchristi</i> .....  | 17 |
| <b>Figura 5.</b> Rutas para la síntesis de pirazinas bi-esteroidales .....  | 21 |
| <b>Figura 6.</b> Algunos esqueletos de triterpenos pentacíclicos .....  | 23 |
| <b>Figura 7.</b> Estructura de betulina (R=OH), ácido betulínico (R=COOH).....  | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Estructura del lupeol.....   | 25 |
| <b>Figura 9.</b> Estructura de la $\beta$ -amirina .....  | 26 |
| <b>Figura 10.</b> <i>Sapium nitidum</i> .....   | 30 |
| <b>Figura 11.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la mezcla de palmitatos ( <b>21+22</b> ).....   | 31 |
| <b>Figura 12.</b> Estructuras del palmitato de lupeílo ( <b>21</b> ) y palmitato de $\beta$ -amirilo ( <b>22</b> ).....                         | 31 |
| <b>Figura 13.</b> Centros químicamente reactivos de <b>21</b> y <b>22</b> .....   | 33 |
| <b>Figura 14.</b> Proyecciones conformacionales del palmitato de lupeílo y palmitato de $\beta$ -amirilo. ....                                  | 34 |
| <b>Figura 15.</b> Correlación selecta NOESY de H-30, compuesto <b>27</b> .....  | 36 |
| <b>Figura 16.</b> Correlaciones selectas NOESY y HMBC de H-30, compuesto <b>28</b> .....  | 39 |
| <b>Figura 17.</b> Espectros apilados de los compuestos <b>27</b> y <b>28</b> en donde se compara el desplazamiento del H-30.....                | 40 |
| <b>Figura 18.</b> Espectros apilados de los compuestos <b>23</b> , <b>29</b> y <b>30</b> en donde se compara el desplazamiento del H-30.....    | 43 |
| <b>Figura 19.</b> Espectros apilados de los compuestos <b>31</b> , <b>32</b> y <b>33</b> en donde se comparan los desplazamientos de H-30. .... | 49 |
| <b>Figura 20.</b> Derivados de <b>21</b> .....  | 54 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 21.</b> Derivados de <b>30</b> .....  | 54 |
| <b>Figura 22.</b> Derivados de <b>31</b> .....  | 55 |
| <b>Figura 23.</b> Pirazina y benzopirazina derivadas de <b>25</b> .....                             | 55 |
| <b>Figura 24.</b> Pirazinas con esqueletos tipo lupano ( <b>31</b> ) y oleanano ( <b>35</b> ) ..... | 56 |
| <b>Figura 25.</b> Gráfica de actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos.....             | 58 |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Esquema 1.</b> Reacción de Riley de la mezcla <b>21+22</b> .....                            | 33 |
| <b>Esquema 2.</b> Mecanismo de oxidación alílica con SeO <sub>2</sub> de <b>21</b> .....       | 34 |
| <b>Esquema 3.</b> Reacción entre <b>27</b> y NH <sub>2</sub> OH .....                          | 37 |
| <b>Esquema 4.</b> Mecanismo de adición nucleofílica entre <b>27</b> y NH <sub>2</sub> OH ..... | 38 |
| <b>Esquema 5.</b> Derivatización de <b>21</b> .....  | 41 |
| <b>Esquema 6.</b> Secuencia de reacciones para la obtención de lupenona ( <b>25</b> ) .....    | 43 |
| <b>Esquema 7.</b> Preparación de la pirazina <b>31</b> .....                                   | 44 |
| <b>Esquema 8.</b> Mecanismo propuesto para la formación de pirazinas esteroidales .....        | 45 |
| <b>Esquema 9.</b> Derivatización de <b>31</b> en la posición C-30 .....                        | 47 |
| <b>Esquema 10.</b> Preparación de la benzopirazina <b>34</b> .....                             | 50 |
| <b>Esquema 11.</b> Secuencia de reacciones para la obtención de β-amirona ( <b>26</b> ) .....  | 51 |
| <b>Esquema 12.</b> Preparación de la pirazina <b>35</b> .....                                  | 51 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Datos taxonómicos de <i>C. gilchristi</i> .....   | 17 |
| <b>Tabla 2.</b> Actividad inhibitoria (nM) frente a la línea celular tumoral P-388 (linfoma de ratón).....  | 18 |
| <b>Tabla 3.</b> Datos taxonómicos <i>Sapium nitidum</i> .....   | 30 |
| <b>Tabla 4.</b> Condiciones de la reacción de Riley para la mezcla (21+22) para obtener 27 ..   | 35 |
| <b>Tabla 5.</b> Condiciones de reacción para obtener 28 .....   | 37 |
| <b>Tabla 6.</b> Condiciones de la reacción Willgerodt-Kindler para obtener 31.....  | 46 |
| <b>Tabla 7.</b> Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de los compuestos 21, 27-35.....  | 53 |
| <b>Tabla 8.</b> Resultados de evaluación antiinflamatoria en el modelo de inflamación auricular murina de los compuestos obtenidos en este trabajo..... | 57 |

## ÍNDICE DE ESPECTROS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Espectro 1.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>27</b> .....     | 86  |
| <b>Espectro 2.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>27</b> .....  | 87  |
| <b>Espectro 3.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>28</b> .....     | 88  |
| <b>Espectro 4.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>28</b> .....  | 89  |
| <b>Espectro 5.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>29</b> .....     | 90  |
| <b>Espectro 6.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>29</b> .....  | 91  |
| <b>Espectro 7.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>31</b> .....     | 92  |
| <b>Espectro 8.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>31</b> .....  | 93  |
| <b>Espectro 9.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>32</b> .....     | 94  |
| <b>Espectro 10.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>32</b> ..... | 95  |
| <b>Espectro 11.</b> RMN $^1\text{H}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>33</b> .....    | 96  |
| <b>Espectro 12.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>33</b> .....  | 97  |
| <b>Espectro 13.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>34</b> .....    | 98  |
| <b>Espectro 14.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>34</b> ..... | 99  |
| <b>Espectro 15.</b> RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>35</b> .....    | 100 |
| <b>Espectro 16.</b> RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de <b>35</b> ..... | 101 |

## ABREVIATURAS COMUNES

AcOEt- Acetato de etilo

C- Cuadruplete

°C- Grado Celsius

ccf- Cromatografía en capa fina

CI<sub>50</sub>- Concentración inhibitoria media

COSY- Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)

d- Doble

dd- Doble de dobles

ddd- Doble de doble de dobles

dt- Doble de triples

δ- Desplazamiento químico

DART- Análisis directo en tiempo real (Direct Analysis in Real Time)

DEPT- Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

EtOH- Etanol

HMBC- Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Hz- Hertz

Hex- Hexan

IES- Ionización con electrospray

*J*- Constante de acoplamiento

L- Litro

m- Multiplete

MeOH- Metanol

Me<sub>2</sub>CO- Acetona

mL- Mililitro

MHz- Megahertz

NOESY-Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

PCC-Clorocromato de piridinio

p.f.- Punto de fusión.

Ppm- Partes por millón.

RMN- Resonancia Magnética Nuclear.

RMN <sup>1</sup>H- Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno.

RMN <sup>13</sup>C- Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13.

s- Singulete.

t.a-temperatura ambiente

TMS- Tetrametilsilano.

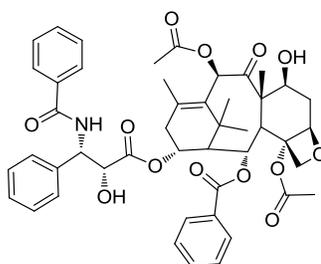
UV- Espectroscopia de ultravioleta.

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las problemáticas de salud pública importantes en México y en el mundo se encuentra el cáncer.<sup>1</sup> Del total de defunciones en México durante 2013, las neoplasias fueron la tercera causa de mortalidad, sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus,<sup>2</sup> razón por la cual existe una creciente necesidad de nuevos compuestos terapéuticos que sean seguros.

Las plantas y organismos marinos representan una fuente importante de compuestos para prevenir, mejorar o tratar padecimientos físicos o mentales que aquejan a la población.<sup>3-5</sup>

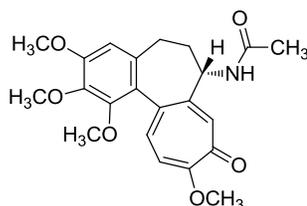
Es interesante notar que un gran porcentaje de los fármacos anticancerígenos utilizados en la terapéutica actual, derivan de fuentes naturales, ejemplo de ello es el taxol (Figura 1), metabolito aislado de diferentes especies de *Taxus* (principalmente *Taxus brevifolia* Nutt.),<sup>4</sup> el cual se utiliza en el tratamiento de cáncer de mama, de ovario y que también ha demostrado eficacia contra el sarcoma de Kaposi.<sup>5</sup>



**Figura 1.** Paclitaxel (Taxol)

Por otro lado, la inflamación es una respuesta del organismo a estímulos químicos, físicos y biológicos.<sup>6</sup> Las enfermedades asociadas a procesos inflamatorios tales como la gota, el reumatismo o la fiebre mediterránea familiar tienen una incidencia del 1 al 2% de la población mundial, el tratamiento de las mismas es importante porque su progresión puede

incapacitar a quienes las padecen. Al igual que en el cáncer, los productos naturales representan una fuente de compuestos para el tratamiento de estos padecimientos. Ejemplo de ello es la colchicina (Figura 2), alcaloide tricíclico aislado de *Colchicum autumnale* L.<sup>8</sup>



**Figura 2.** Colchicina

Ciertos productos naturales obtenidos a partir de fuentes naturales se emplean como agentes terapéuticos, mientras que otros pueden servir como materias primas para la preparación de compuestos semisintéticos que posean mejor actividad farmacológica y/o menor toxicidad,<sup>7, 8</sup> tal es el caso de las cefalostatinas, compuestos esteroideos aislados del gusano marino *Cephalodiscus gilchristi* que tienen un mecanismo de acción novedoso y una alta citotoxicidad que las convierte en sustancias prometedoras para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos,<sup>9</sup> sin embargo su disponibilidad en la fuente biológica es muy baja. Con base en lo anterior la presente investigación tuvo como propósito la obtención de derivados de los palmitatos de lupeólo y  $\beta$ -amirilo, hacia la preparación de pirazinas esteroidales como aproximación sintética de la unidad monomérica norte de las cefalostatinas, con lo cual se pretende aportar conocimiento sobre la reactividad de estos triterpenos, a la par que se determina la actividad antiinflamatoria y citotóxica que presentan estos derivados.

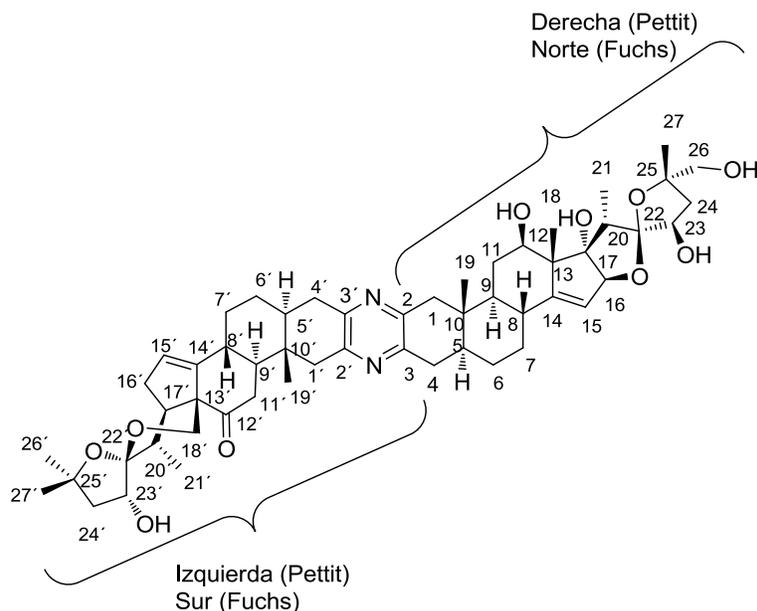
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cefalostatinas

#### 2.1.1 Generalidades

Los cefalostatinas son una familia de 20 compuestos que se caracterizan por poseer un esqueleto bis-esteroide pirazínico,<sup>9</sup> es decir son alcaloides constituidos por dos unidades esteroideas altamente oxigenadas unidas a través de un anillo de pirazina ubicado en la posición C2-C3 de cada unidad monomérica. Esas sustancias fueron aisladas por Pettit y colaboradores principalmente entre 1988 y 1998 (cefalostatinas **1-19**)<sup>9-13</sup> y en 2015 (cefalostatina **20**).<sup>14</sup>

El grupo de Pettit nombró a las dos unidades esteroideas de las cefalostatinas como “cara derecha” y “cara izquierda”; por su parte, el grupo de Fuchs adoptó la terminología “zona norte” y “zona sur”.<sup>15</sup> Las unidades esteroideas de otros compuestos aislados fueron designadas por comparación con la cefalostatina **1** (Figura 3) (primera cefalostatina aislada y caracterizada).<sup>10</sup>



**Figura 3.** Estructura de la cefalostatina **1**

Las cefalostatinas fueron aisladas a partir del gusano marino *Cephalodiscus gilchristi*, el cual mide aproximadamente 5 mm de longitud y se encuentra en aguas templadas y poco profundas del Océano Índico al Sureste de África.<sup>13</sup> El cuerpo de este organismo (Figura 4) se divide en tres regiones: escudo cefálico, cuello y tronco en donde presenta brazos tentaculares distintivos que emanan de la parte dorsal de cuello. Los datos taxonómicos de esta especie se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Datos taxonómicos de *C. gilchristi*

|         |                      |
|---------|----------------------|
| Phylum  | Hemichordata         |
| Clase   | Graptolithoidea      |
| Orden   | Cephalodiscoidea     |
| Familia | Cephalodiscoidea     |
| Género  | <i>Cephalodiscus</i> |
| Especie | <i>gilchristi</i>    |



**Figura 4.** *Cephalodiscus gilchristi*

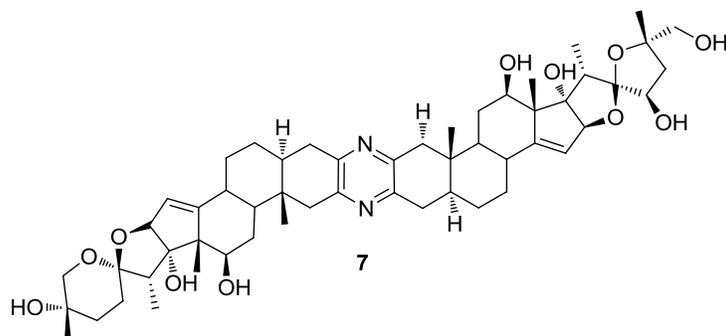
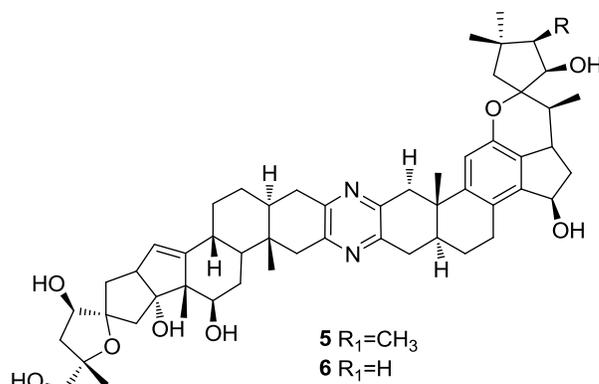
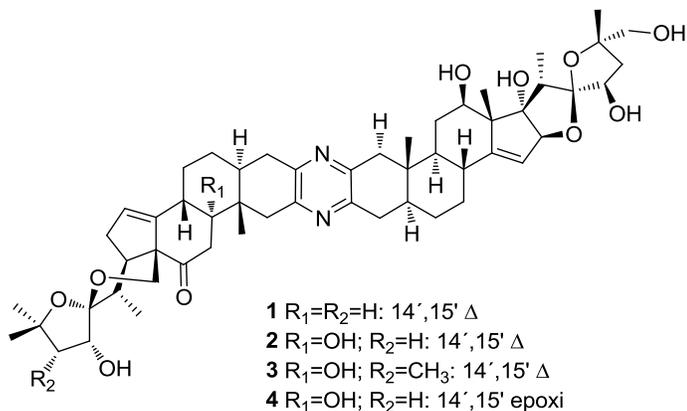
### 2.1.2 Actividad citotóxica

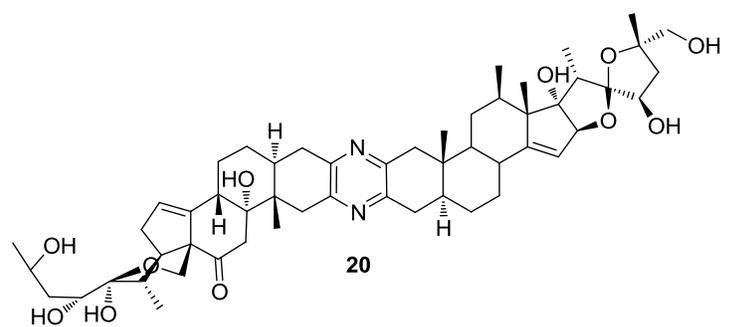
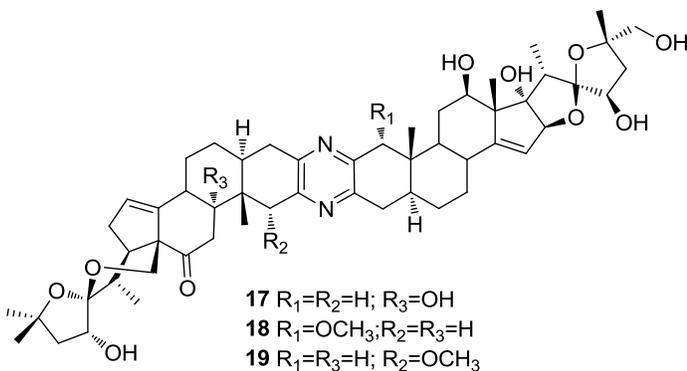
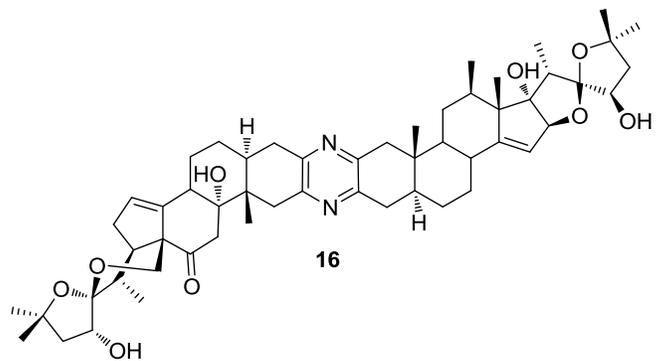
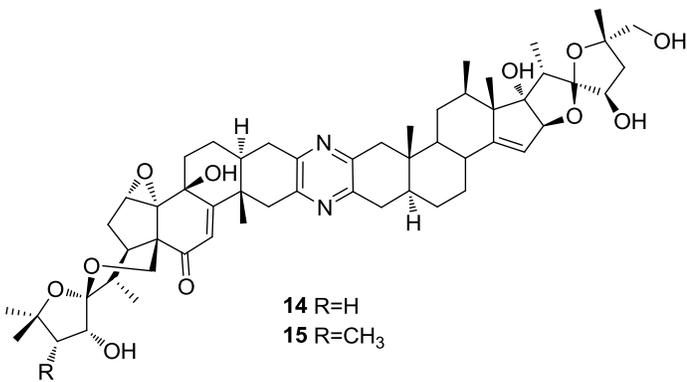
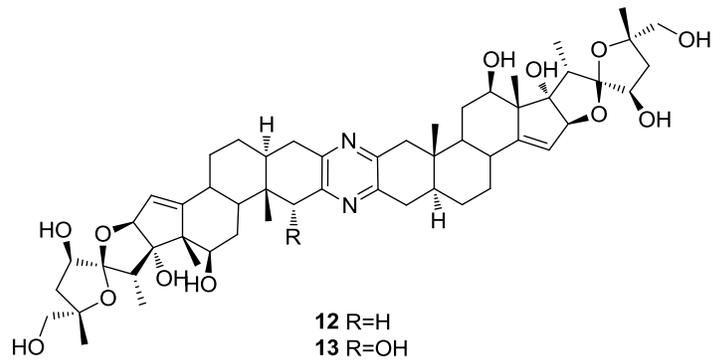
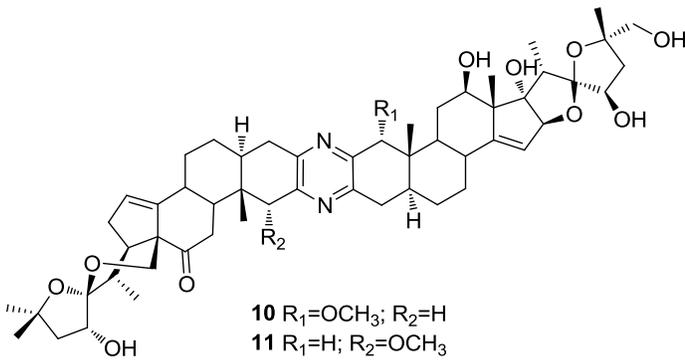
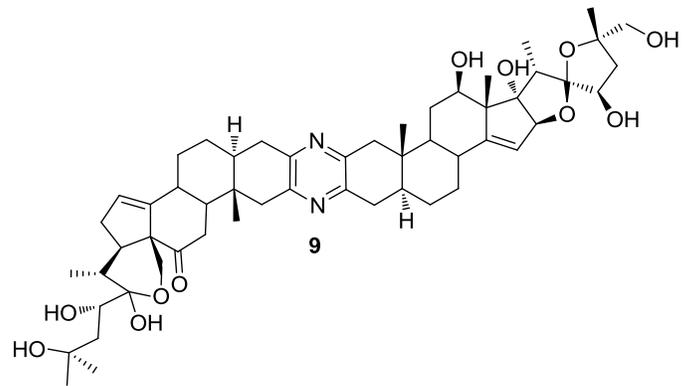
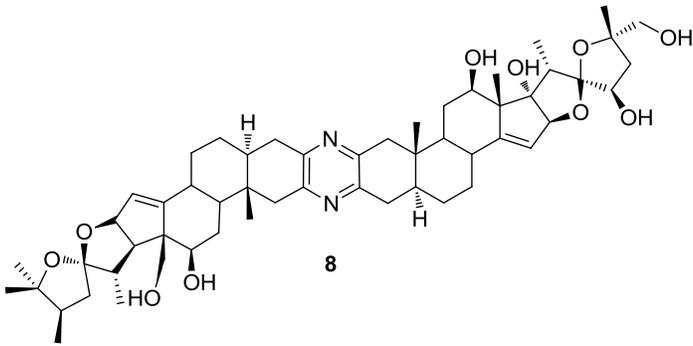
La mayoría de las cefalostatinas aisladas mostraron valores citotóxicos elevados (Tabla 2), siendo las cefalostatinas **1**, **2**, **3** y **4** las más activas frente a la línea celular tumoral P-388 (linfoma de ratón).<sup>15</sup> Por otro lado, la cefalostatina **20** fue objeto de un estudio teórico de la relación entre la estructura y la actividad (REA) que comprendió un panel de seis líneas celulares de cáncer humano, frente a las cuales no presentó una actividad notable en comparación con la cefalostatina **1**.<sup>14</sup>

Los estudios de estructura-actividad en diferentes cefalostatinas han revelado que la parte "norte" de estas moléculas es el fragmento estructural más comúnmente compartido entre las cefalostatinas que presenta un sistema 1,6-dioxaspiro-[4,4]-nonano, y el cual está asociado con la actividad antitumoral.<sup>16</sup> La síntesis de esta unidad de las cefalostatinas fue realizada por Fuchs y colaboradores.<sup>17</sup>

**Tabla 2.** Actividad inhibitoria (CI<sub>50</sub> nM) frente a la línea celular tumoral P-388 (linfoma de ratón).<sup>15</sup>

| Cefalostatina | P388(nM)                                  |
|---------------|---|
| 1             | 1x 10 <sup>-4</sup> -1 x 10 <sup>-6</sup> |
| 2             | 1x 10 <sup>-4</sup> -1 x 10 <sup>-6</sup> |
| 3             | 1x 10 <sup>-4</sup> -1 x 10 <sup>-6</sup> |
| 4             | 1x 10 <sup>-4</sup> -1 x 10 <sup>-6</sup> |
| 5             | 42.5                                      |
| 6             | 2.3                                       |
| 7             | 1-<0.1                                    |
| 8             | 1-<0.1                                    |
| 9             | 1-<0.1                                    |
| 10            | 3.2                                       |
| 11            | 2.7                                       |
| 12            | 76.2                                      |
| 13            | 47.9                                      |
| 14            | 4.4                                       |
| 15            | 26.2                                      |
| 16            | <1.1                                      |
| 17            | 4.4                                       |
| 18            | 4.6                                       |
| 19            | 7.9                                       |





La cefalostatina **1** es de particular importancia ya que se considera como uno de los agentes antitumorales más potentes frente al panel de 60 líneas tumorales del Instituto Nacional del Cáncer, siendo incluso más activa que el paclitaxel en ensayos *in vitro*.<sup>10,15,18,19</sup>

La biodisponibilidad de la cefalostatina **1** es baja, ya que a partir de 166 kg de material de gusano marino crudo, sólo fueron aislados 139 mg de este compuesto en 1988 con un rendimiento del  $8.36 \times 10^{-4}$  % en peso.<sup>10</sup>

El mecanismo de acción que presenta la cefalostatina **1** es de particular interés ya que por sus dimensiones ( $\sim 30 \text{ \AA} \times 9 \text{ \AA} \times 5 \text{ \AA}$ )<sup>10,20</sup> y su naturaleza esteroidea puede penetrar la membrana celular, y es capaz de inducir apoptosis en una vía inusual y diferente a la de otros agentes citotóxicos. Esta vía es independiente del citocromo-C debido a que se lleva a cabo la liberación selectiva del complejo Smac/DIABLO de la mitocondria, de manera independiente de la activación de caspasas, además de que cefalostatina **1** activa la caspasa-9 sin la formación de un apoptosoma.<sup>20</sup>

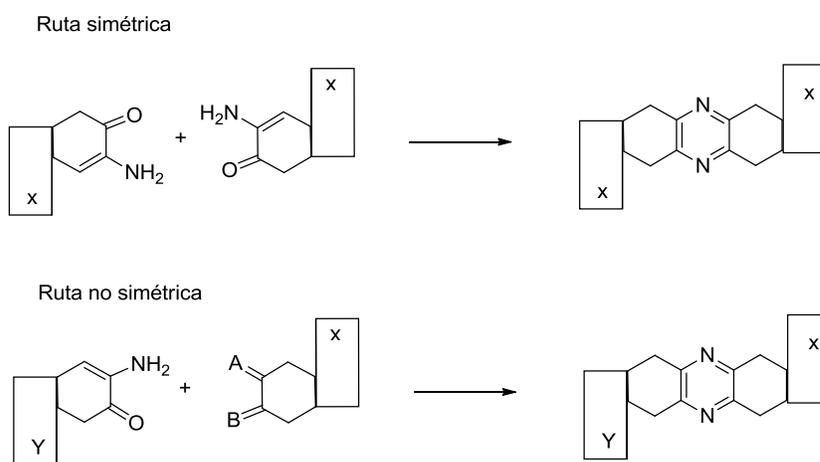
La cefalostatina **1** también ha demostrado ser eficaz en varios xenoinjertos incluyendo melanoma, sarcoma, leucemia y en un modelo de carcinoma mamario humano.<sup>18</sup>

### 2.1.3 Síntesis de cefalostatinas

La baja biodisponibilidad combinada con la arquitectura molecular y la importancia biológica de estos compuestos motivaron la síntesis total de la cefalostatina **1** que fue publicada por Fuchs en 1998, la cual consistió de 65 pasos, obteniéndose 2 mg del compuesto (con un rendimiento del  $10^{-5}$  %).<sup>21</sup> Por su parte, Shair en 2009 llevó a cabo la síntesis enantioselectiva de la cefalostatina **1** con 47% de rendimiento.<sup>22</sup>

Se han explorado diferentes rutas para la síntesis de análogos de esta familia de compuestos ya sea de alguna de las unidades monoméricas (norte o sur) o bien del dímero esteroidal.<sup>23</sup>

Existen varias metodologías para la síntesis de análogos que se basan principalmente en dos tipos de rutas, las cuales se muestran esquemáticamente en la Figura 5. La llamada *ruta simétrica* consiste en la síntesis directa de pirazinas bi-esteroidales simétricas por dimerización de una cetona o un precursor  $\alpha$ -aminocetona. Las pirazinas simétricas (denominadas de tipo A) obtenidas de esta manera son posteriormente desimetrizadas y funcionalizadas. La ruta *no simétrica*, es la síntesis directa de pirazinas no simétricas bi-esteroidales de *tipo B* por acoplamiento químico y regioselectivo.<sup>24</sup>



**Figura 5.** Rutas para la síntesis de pirazinas bi-esteroidales

Los grupos de Heathcock<sup>25</sup> y Winterfeld<sup>26</sup> han realizado contribuciones importantes a la síntesis de pirazinas bi-esteroidales asimétricas.

## 2.2 Triterpenos

### 2.2.1 Generalidades

Los triterpenos son metabolitos secundarios que contienen 30 átomos de carbono provenientes de la incorporación de seis unidades de isoprenilo. Biosintéticamente provienen de la ciclación del escualeno (dos moléculas de pirofosfato de farnesilo) y del (2,3)-óxido de escualeno, que dan lugar a diferentes tipos de esqueletos de triterpenos y esteroides mediante la formación de carbocationes, intermediarios que experimentan reordenamientos moleculares de acuerdo a la posición de la carga y la estereoquímica del producto de ciclación.<sup>27</sup>

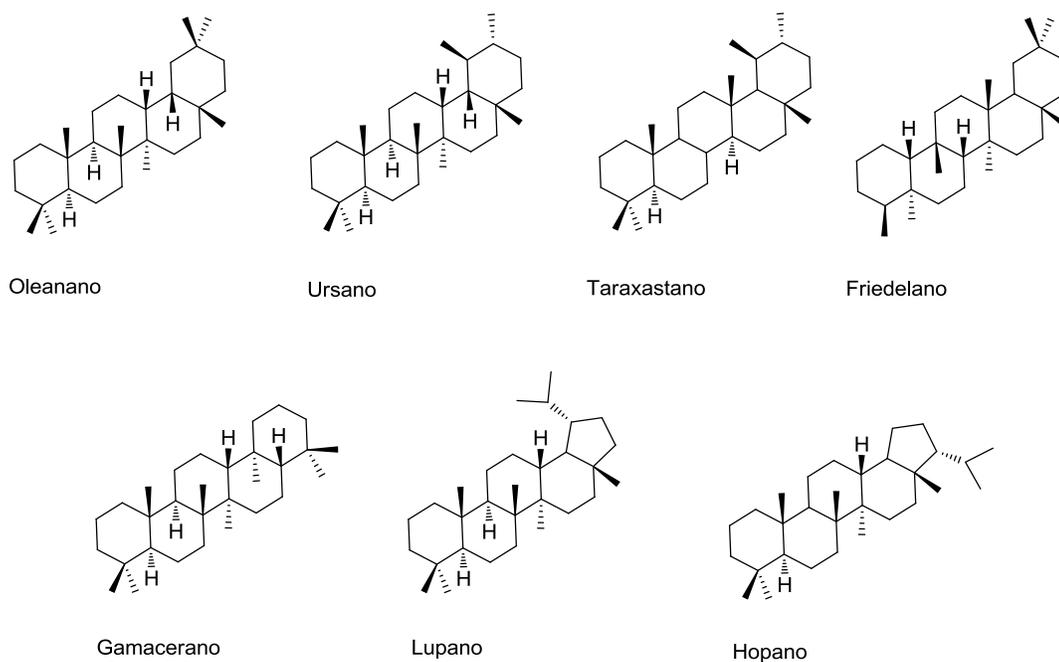
Para que se lleve a cabo la policiclación (del escualeno y el óxido de escualeno) es necesario que adopten una conformación plegada adecuada en donde los centros electrónicamente deficientes queden próximos a los centros nucleofílicos lo que da origen a los triterpenos.

Se conocen alrededor de 20,000 triterpenos naturales que se distribuyen ampliamente en la naturaleza de forma libre o combinados con azúcares (glicósidos).<sup>28</sup> La mayoría de los triterpenos se produce en el reino vegetal, aunque otros organismos como los hongos también los producen,<sup>29</sup> y comprende diferentes tipos de compuestos que pueden ser divididos en familias en función de su estructura química. Los principales grupos están representados por derivados tetracíclicos de protostano, cicloartano, dammarano, eufano y derivados pentacíclicos de tipo ursano, lupano y hopano entre otros.<sup>30</sup>

El esqueleto triterpenoide destaca por ser una fuente de rigidez estructural y lipofilia combinado en un sistema alifático que posee un elevado número de centros estereogénicos y además es susceptible a ser funcionalizado,<sup>31</sup> por lo que representa una fuente importante de compuestos para la exploración química y biológica.

## 2.2.2 Triterpenos pentacíclicos

La estructura de los triterpenos pentacíclicos puede contener cinco anillos de seis miembros o cuatro anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros. Algunos ejemplos de esqueletos se ilustran en la Figura 6: <sup>29,32,</sup>



**Figura 6.** Algunos esqueletos de triterpenos pentacíclicos

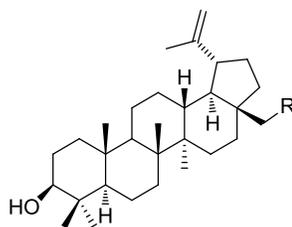
Los triterpenos han mostrado diversas actividades farmacológicas entre las que se encuentran la actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, citotóxica y hepatoprotectora, anti-VIH, antimalárica y antihelmíntica. Por lo que constituyen una fuente importante de estructuras bioactivas. <sup>32-35</sup>

### 2.2.3 Actividad antiinflamatoria y citotóxica

Algunos triterpenos inhiben directamente el crecimiento tumoral, la progresión del ciclo celular e inducen la apoptosis de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*.<sup>36</sup> Se ha identificado que la actividad antitumoral procede por varios mecanismos, entre los cuales se pueden mencionar, la activación del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B, inhibición de las señales de transducción, supresión de la angiogénesis o daño mitocondrial.<sup>37</sup>

Parte de los mecanismos de la actividad antiinflamatoria<sup>35</sup> de los triterpenos pentacíclicos puede atribuirse a su capacidad para inhibir la 5-lipooxigenasa y la elastasa de leucocitos humanos, así como su potencial para la modulación de la respuesta inmune al afectar al complemento y la producción de anticuerpos.

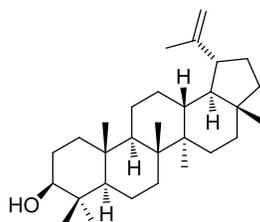
Uno de los ejemplos más representativos y estudiados de los triterpenos pentacíclicos es la betulina y sus análogos como el ácido betulínico, cuyas estructuras se observan en la Figura 7, que poseen diversas bioactividades, entre las que sobresale la actividad antitumoral. El ácido betulínico suprime la proliferación de neuroblastoma y de las células de carcinoma de ovario,<sup>38,39</sup> e inhibe selectivamente el crecimiento de células de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* con aparente especificidad.<sup>30</sup>



**Figura 7.** Estructuras de betulina (R=OH) y ácido betulínico (R=COOH)

## 2.2.4 Lupeol

El lupeol es un triterpeno pentacíclico como se observa en la Figura 8, que está presente en diversas especies del reino vegetal,<sup>40</sup> incluida una amplia variedad de frutas.<sup>41</sup>



**Figura 8.** Estructura del lupeol

Este triterpeno ha sido ampliamente estudiado ya que exhibe una gran variedad de actividades farmacológicas relacionadas con algunos padecimientos importantes como la diabetes, la artritis, enfermedades cardiovasculares, trastornos renales, inflamación y cáncer.<sup>41</sup>

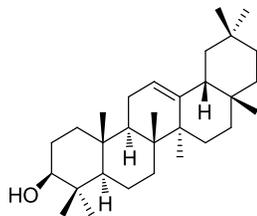
Se ha demostrado que el lupeol reduce la respuesta inflamatoria de la artritis en ratas.<sup>42</sup> En otro estudio se observó que la aplicación tópica de lupeol (0.5 y 1 mg / oreja) reduce la inflamación en un modelo de oreja de ratón inducida por TDF (acetato de O-tetradecanoilforbol), disminuye los niveles de mieloperoxidasa y causa una reducción en la infiltración de células en los tejidos inflamados.<sup>43</sup>

Se ha establecido que la actividad antiinflamatoria del lupeol está relacionada con el factor nuclear (NF)- $\kappa$ B, la caspasa-8 como proteína inhibidora, la fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt.<sup>44</sup> También se ha informado que modula la expresión de la 15-lipooxigenasa, Interleucina  $\beta$ , citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ -Th1), mieloperoxidasa, macrófagos y linfocitos.<sup>43</sup>

El intervalo de dosis entre las cuales el lupeol presenta actividad antiinflamatoria es de 25-200 mg/kg. Es destacable que el lupeol no muestra toxicidad para las células y tejidos normales cuando se administran de forma oral a una dosis de 2g/ kg.<sup>41</sup>

### 2.2.5 $\beta$ -amirina

Este compuesto se encuentra en diversos materiales vegetales tales como hojas, corteza, madera y resinas. La  $\beta$ -amirina presenta diversas actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* como antimicrobiana, antifúngica, antiviral e inhibición de la proliferación de células cancerosas.<sup>45</sup>



**Figura 9.** Estructura de la  $\beta$ -amirina

El extracto de *Ligustrum* spp que presenta un alto contenido  $\beta$ -amirina redujo el edema inducido por carragenina 1%.<sup>46</sup> El tratamiento de células de cáncer de vejiga humano (NTUB1) con  $\beta$ -amirina o  $\beta$ -amirina en co-tratamiento con *cis*-platino durante 24 h dio como resultado una reducción de la viabilidad de las células. Este trabajo sugiere que la  $\beta$ -amirina presenta una actividad citotóxica débil.<sup>47</sup> En otro ensayo de citotoxicidad *in vitro*, la  $\beta$ -amirina exhibió una actividad citotóxica débil contra líneas celulares de cáncer A549 y HL- 60.<sup>48</sup>

### 3. HIPÓTESIS

Considerando que las cefalostatinas son dímeros esteroidales pirazínicos con una notable actividad citotóxica y que la bioactividad de una molécula modelo depende de su estructura molecular, la cual puede racionalizarse en función de los fragmentos estructurales que la constituyen, se propone que las pirazinas esteroidales monoméricas obtenidas a partir de triterpenos pentacíclicos con cierta similitud química a las cefalostatinas, posiblemente muestren una bioactividad similar a la de éstas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Realizar la semisíntesis de análogos monoméricos de las cefalostatinas (pirazinas esteroidales) a partir de algunos aciltriterpenos pentacíclicos disponibles, aislados de especies vegetales de la familia Euphorbiaceae, para la evaluación preliminar de su actividad citotóxica y antiinflamatoria.

### 4.2 Particulares

- Llevar a cabo la separación de la mezcla de triterpenos; palmitato de lupeólo y palmitato de  $\beta$ -amirilo presentes en una fracción del extracto de *Sapium nitidum*.
- Obtener derivados del palmitato de lupeólo mediante reacciones de hidrólisis, oxidación y adición nucleofílica en las posiciones C-2, C-3 y C-30.
- Llevar a cabo la semisíntesis de pirazinas esteroidales a partir de palmitato de lupeólo y palmitato de  $\beta$ -amirilo.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica (en ciertas líneas celulares) de los derivados obtenidos.
- Establecer posibles relaciones estructura-actividad entre los derivados obtenidos.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Considerando la importancia del cáncer y los padecimientos inflamatorios como una problemática de salud pública, es relevante realizar investigaciones concernientes al descubrimiento de nuevas estructuras que posean actividad antitumoral y/o antiinflamatoria con vista a que sean la base para el desarrollo de nuevos fármacos seguros y eficaces. Las cefalostatinas han sido de particular interés por exhibir una actividad citotóxica excepcional, pero con el inconveniente de tener una baja disponibilidad en su fuente natural, por lo que se consideró relevante sintetizar análogos de la parte norte de estas moléculas (unidad asociada a la actividad antitumoral) a partir del palmitato de lupeílo y palmitato de  $\beta$ -amirilo (disponibles en nuestro grupo de trabajo), sustancias que guardan cierta similitud estructural con los monómeros de las cefalostatinas, lo que permitirá obtener nuevos análogos y evaluar su actividad antiinflamatoria y citotóxica.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen y discuten los resultados de la reactividad del palmitato de lupeílo (**21**), palmitato de  $\beta$ -amirilo (**22**) y de sus derivados, producto de las modificaciones realizadas en las posiciones C-2, C-3 y C-30, y finalmente, se dan a conocer los resultados de la actividad antiinflamatoria y citotóxica (en las líneas celulares U251, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1) de los compuestos obtenidos en la presente investigación.

### 6.1 Separación de palmitatos de lupeílo y $\beta$ -amirilo.

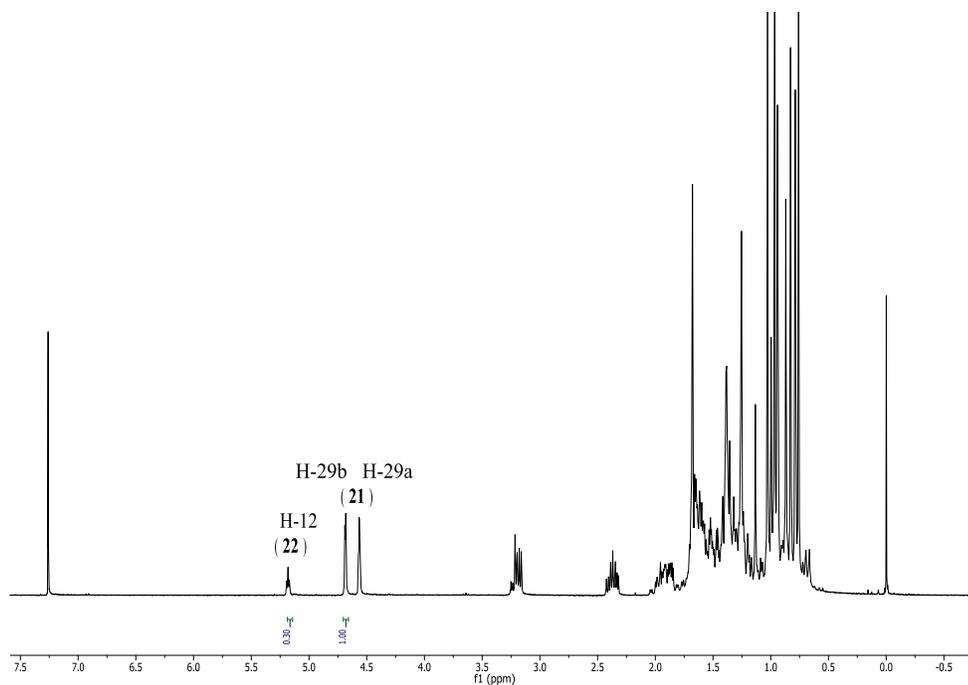
Se partió de la mezcla de triterpenos obtenida a partir del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Metanol (1:1) de las hojas de *Sapium nitidum* (Figura 10) en una proporción de 1:3, caracterizada en un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación. Con base en sus desplazamientos químicos en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 11) se determinó que esta mezcla estaba constituida por palmitato de lupeílo (**21**) y palmitato de  $\beta$ -amirilo (**22**).<sup>49</sup>



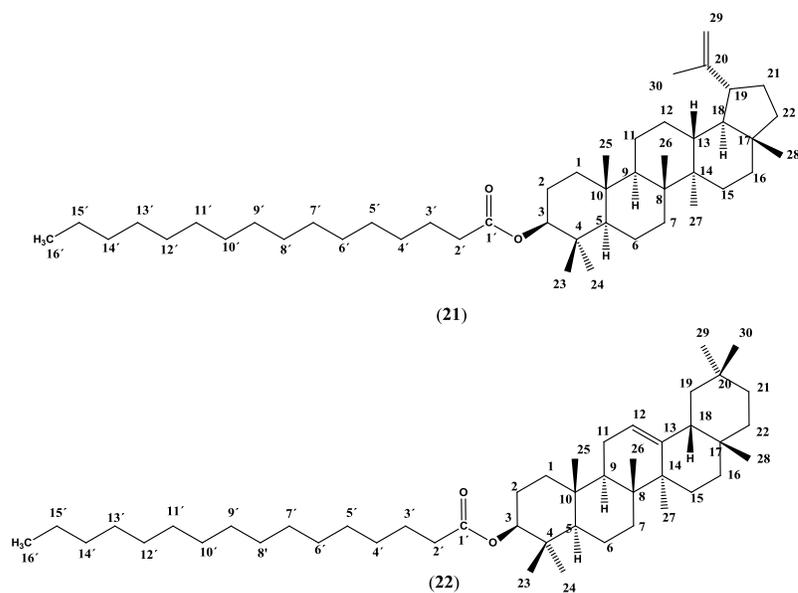
Figura 10. *Sapium nitidum*

Tabla 3. Datos taxonómicos *Sapium nitidum*

|            |                |
|------------|----------------|
| Familia    | Euphorbiaceae  |
| Subfamilia | Euphorbioideae |
| Género     | <i>Sapium</i>  |
| Especie    | <i>nitidum</i> |



**Figura 11.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla de palmitatos (**21+22**)



**Figura 12.** Estructuras del palmitato de lupeól (**21**) y palmitato de  $\beta$ -amirilo (**22**)

### 6.1.1 Por cromatografía en columna

En primera instancia se consideró como estrategia de separación la técnica de cromatografía, para lo cual se llevó a cabo un análisis previo por ccf evaluando diferentes sistemas de disolventes para lograr la separación de ambos triterpenos, sin embargo, ambas sustancias tienen similitud de los valores de  $R_f$ , debido a que poseen una polaridad semejante atribuida en gran medida al grupo éster presente en ambas estructuras, a pesar de poseer un esqueleto hidrocarbonado diferente: lupano para el palmitato de lupeílo y oleanano para el palmitato de  $\beta$ -amirilo, como se observa en la Figura 12.

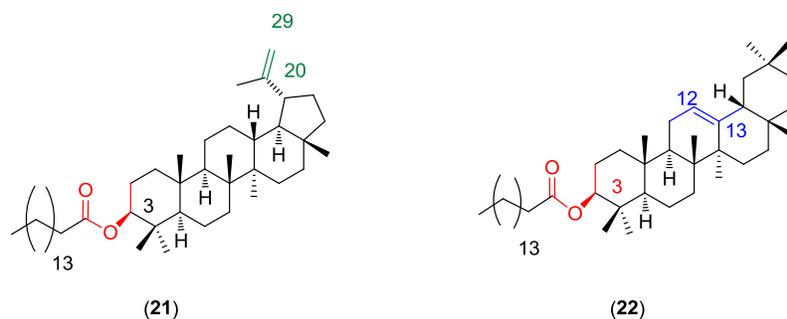
El sistema de elución más eficiente fue el de Hexano: tolueno 9:1, ya que la elución consecutiva de la placa analítica cuatro veces condujo a la separación de los dos palmitatos con un  $r_f$  de 0.35 y 0.45.

El compuesto menos polar es el palmitato de  $\beta$ -amirilo (106.8 mg) que fue el primero en eluir, seguido de la mezcla nuevamente (1243 mg) y por último de palmitato de lupeílo (294.7 mg) con un rendimiento del 5.3 % y 14.6 %, respectivamente. El seguimiento de esta separación fue mediante ccf.

### 6.1.2 Por derivatización

Se consideró derivatizar los compuestos presentes como estrategia de separación, considerando las diferencias de reactividad de ambas moléculas basadas en su estructura molecular.

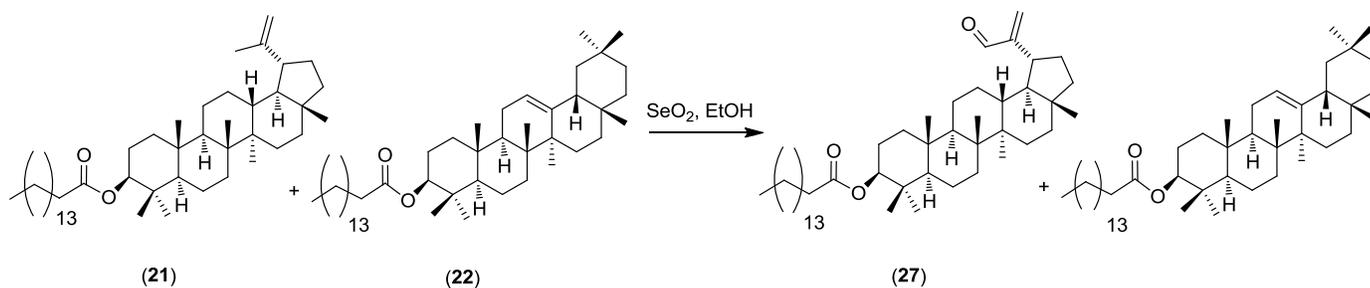
Las funcionalidades objeto de posible modificación en estas moléculas son: el éster de la posición C-3 y el doble enlace; endocíclico  $\Delta$  12,13 para el caso del palmitato de  $\beta$ -amirilo y exocíclico  $\Delta$  20,29 para el palmitato de lupeílo como se observa en la Figura 13.



**Figura 13.** Centros químicamente reactivos de **21** y **22**

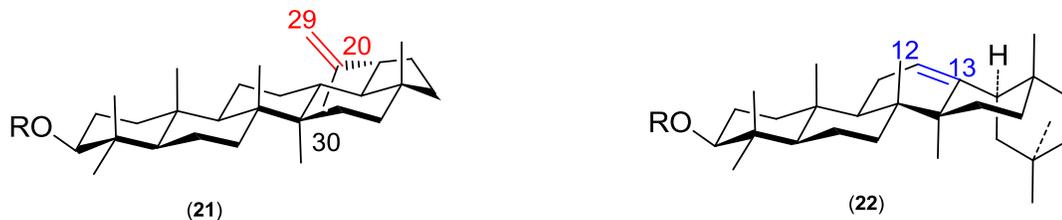
### 6.1.2.1 Derivatización de la mezcla de **21+22**. Reacción de Riley

El palmitato de lupeólo presenta en su estructura un metileno exocíclico en la posición C-20, el cual se encuentra disponible para funcionalizarse. Mediante una oxidación alílica con dióxido de selenio ( $\text{SeO}_2$ ) el palmitato de lupeólo puede ser convertido a un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado, tal reacción es conocida como reacción de Riley.<sup>50</sup>



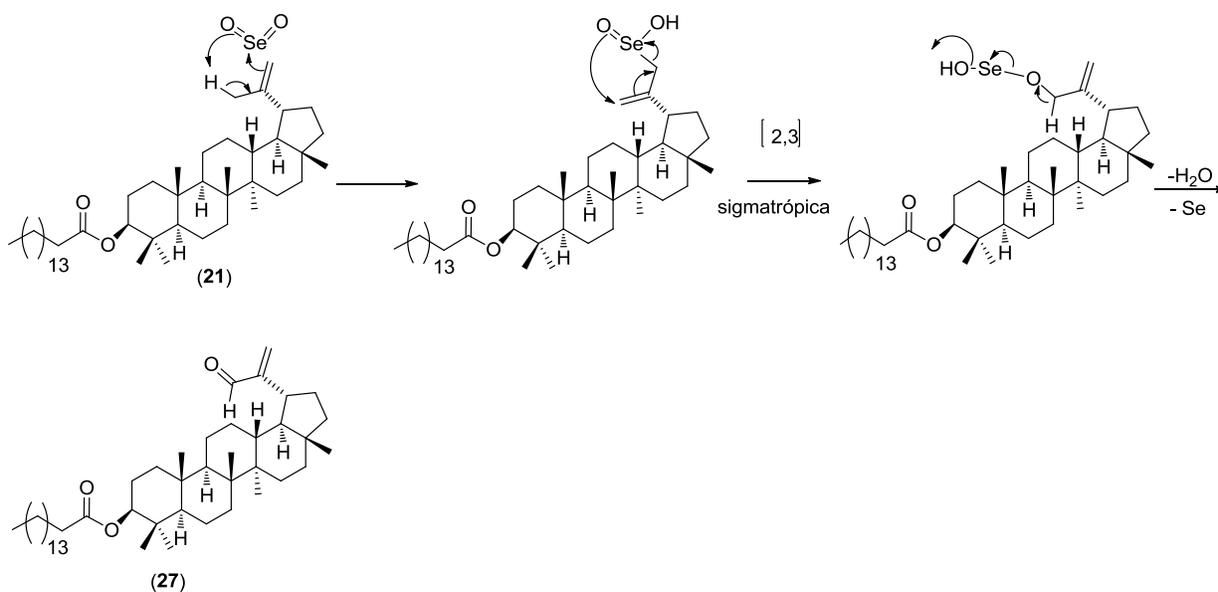
**Esquema 1.** Reacción de Riley de la mezcla **21+22**

Respecto al palmitato de  $\beta$ -amirilo, éste presenta un congestionamiento estérico en C-11 (Figura 14), bien conocido en esteroides y triterpenos pentacíclicos, que disminuye su reactividad frente al  $\text{SeO}_2$ .



**Figura 14.** Proyecciones conformacionales del palmitato de lupeólo y palmitato de  $\beta$ -amirilo.

Como se observa en el Esquema 2, la oxidación alílica implica una cicloadición de tipo eno con el ataque preferencial del extremo más nucleofílico del doble enlace, que en este caso es la posición C-29 al selenio, para obtener el ácido alilselenínico que sufre un reordenamiento sigmatrópico [2,3] que conduce el éster selenito (y al retorno del doble enlace a su posición original). En el último paso el éster se hidroliza para obtener el aldehído.



**Esquema 2.** Mecanismo de oxidación alílica con  $\text{SeO}_2$  de 21

La reacción de Riley de la mezcla de palmitatos se llevó a cabo en condiciones a) térmicas (calentamiento normal) y b) de calentamiento asistido por microondas. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción empleando las microondas, variando la temperatura de exposición, el tiempo y/o la cantidad del SeO<sub>2</sub>, observándose que con 60 min de exposición a 170 °C, se obtienen el mejor rendimiento. Los resultados se observan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de la reacción de Riley para la mezcla (21+22) para obtener 27

|          | Mezcla 1+2<br>(mmol) | SeO <sub>2</sub><br>(mmol) | Condiciones      | Rendimiento |
|----------|----------------------|----------------------------|------------------|-------------|
| <b>a</b> | 0.148                | 0.75                       | 72 h reflujo     | 23%         |
| <b>b</b> | 0.151                | 1.1                        | MW 170°C, 60 min | 68%         |

Con base a los resultados las mejores condiciones de reacción fueron las asistidas por microondas (b), con las cuales se requirió menos tiempo y se incrementó el rendimiento.

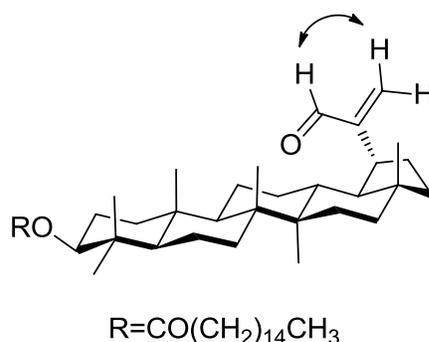
El curso de la reacción se analizó por ccf con base en dos criterios: el primero fue la disminución de la cantidad palmitato de lupeilo respecto a la del palmitato de β-amirilo presente en la mezcla inicial (Hex-Tol 9:1 x 4). Por otra parte, se dio seguimiento a la formación del aldehído correspondiente (Hex-AcOEt 9:1 x 4). Al finalizar la reacción se observó (por ccf) que había presencia de materia prima (palmitato de β-amirilo), un compuesto mayoritario y varios subproductos.

El producto mayoritario (27), se separó por medio de cca, su identificación y caracterización se llevó a cabo mediante el análisis de los datos obtenidos de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas como se discute a continuación.

En el espectro de infrarrojo se observan dos bandas de estiramiento C=O en 1717 y en 1689 cm<sup>-1</sup>, que corresponden al carbonilo del éster y al del aldehído α,β-insaturado, respectivamente.

La presencia del ión molecular a  $m/z$  679 (M+H)<sup>+</sup> es consistente con la fórmula molecular C<sub>46</sub>H<sub>78</sub>O<sub>3</sub> y el pico base a  $m/z$  423 (M+H)<sup>+</sup> corresponde a pérdida del éster. La masa de alta resolución de este compuesto es 679.60214 (M+H).

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 2) se observan 46 señales, las cuales mediante el experimento DEPT se identificaron como 7 metilos, 25 metilenos, 7 metinos y 7 carbonos sin hidrógenos. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 1) se observa un singlete en  $\delta_H$  9.51 cuyo desplazamiento químico es característico de un hidrógeno de aldehído, éste a su vez correlaciona en el experimento HSQC con la señal de carbono en  $\delta_C$  195.25. Se observan dos singletes en  $\delta_H$  6.29 y en 5.91, correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-29b y H-29a respectivamente, que correlacionan con el carbono en  $\delta_C$  133.36. En el experimento NOESY, el hidrógeno del aldehído correlaciona sólo con el protón vinílico H-29a, la correlación H-29b y H-29a como se observa en la Figura 15 también es manifiesta. En  $\delta_H$  2.75 se observa un triple de dobles ( $J = 11, 5.8$  Hz) el cual integra para el hidrógeno correspondiente al metino C-19.



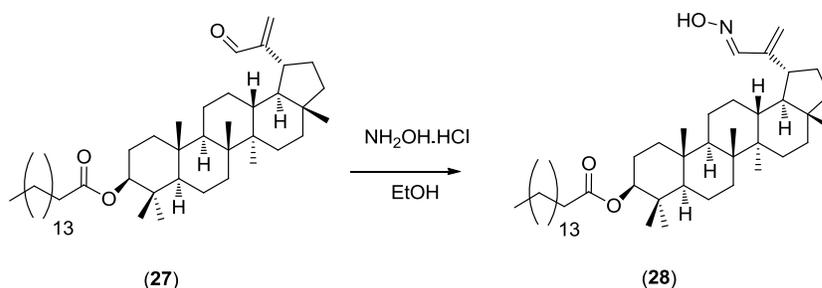
**Figura 15.** Correlación selecta NOESY de H-30, compuesto **27**

Consistente con el esqueleto base esterificado en la posición C-3 ( $\delta_C$  80.71); en  $\delta_H$  4.47 se observa un doble de dobles ( $J = 10.3, 5.7$  Hz) que integra para el hidrógeno correspondiente a este carbono. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observa a campo bajo en  $\delta_C$  173.86 la señal del carbonilo del grupo éster. Se observa un triplete ( $J = 7.4$  Hz,) en  $\delta_H$  2.28

el cual integra para dos hidrógenos correspondientes al primer metileno de la cadena alifática C-2' ( $\delta_C$  35.01) unida al grupo éster. En el espectro de RMN  $^1H$  se observa a campo alto una señal intensa correspondiente a una cadena alifática de metilenos de las posiciones 4'-13' en  $\delta_H$  1.25 y finalmente en  $\delta_H$  1.28, 1.21, 0.92, 0.83, 0.81, se observan señales singuletes correspondientes a los metilos de la posición 28, 26, 27, (23, 24, 16') y 25, respectivamente.

## 6.2 Reacción de 27 y $NH_2OH$

El aldehído  $\alpha, \beta$ -insaturado presente en el compuesto **27** es una funcionalidad que se considera motivo reactivo, ya que poseen dos posiciones electrofílicas: el carbono del carbonilo y el carbono en posición  $\beta$ . En este caso se exploró la reactividad de esta funcionalidad frente a la hidroxilamina como se observa en el Esquema 3.



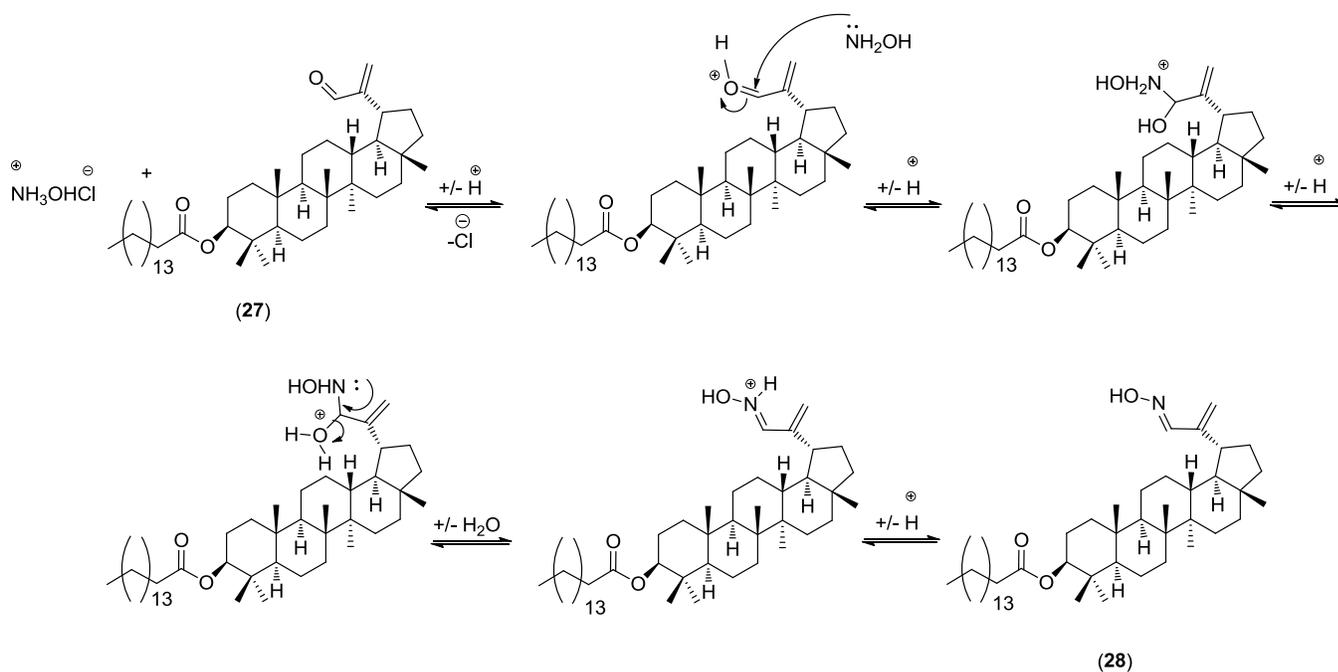
**Esquema 3.** Reacción entre **27** y  $NH_2OH$

La reacción se llevó a cabo en condiciones a) térmicas (calentamiento normal) y b) calentamiento asistido por microondas (Tabla 5), en ambos casos sólo se obtuvo el compuesto **28** en buenos rendimientos

**Tabla 5.** Condiciones de reacción para obtener **28**

| Reacción | <b>27</b><br>(mmol) | $NH_2OH\cdot HCl$<br>(mmol) | Condiciones         | Rendimiento |
|----------|---------------------|-----------------------------|---------------------|-------------|
| <b>a</b> | 0.147               | 0.65                        | 2 h, t.a            | 91.8%       |
| <b>b</b> | 0.174               | 0.72                        | MW 100°C, 10<br>min | 92%         |

El compuesto **28** es el resultado de la adición 1, 2 del nucleófilo (hidroxilamina). Esta reacción es catalizada por el protón proveniente del hidrocloreto de hidroxilamina que provoca un aumento de la electrofilia del carbonilo. Esto deja libre al par de electrones del átomo de nitrógeno (más nucleofílico que el del oxígeno) para llevar a cabo el ataque nucleofílico al carbonilo como se observa en el Esquema 4.



**Esquema 4.** Mecanismo de adición nucleofílica entre **27** y  $\text{NH}_2\text{OH}$

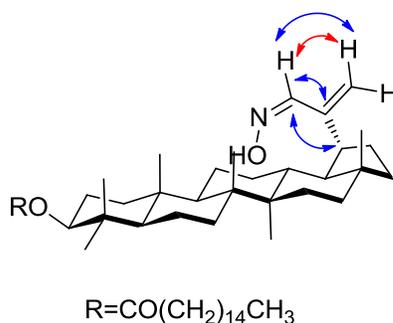
El compuesto **28** presenta en el espectro de IR una banda de absorción correspondiente al grupo hidroxilo de la oxima en  $3589\text{ cm}^{-1}$  y en  $1662\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda de estiramiento  $\text{C}=\text{N}$ .

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostró 46 señales y mediante la técnica DEPT se pudieron identificar 7 metilos, 25 metilenos, 7 metinos y 7 carbonos sin hidrógenos lo anterior nos permite obtener la fórmula para este compuesto como  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{NO}_3$ , lo que es consistente con

el pico base  $m/z$  440  $(M+H)^+$  observado en el espectro de masas resultado de pérdida del éster.

El compuesto **28** presenta en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 4) una señal en  $\delta_{\text{C}}$  153.64 que corresponde al C-30, en el experimento HSQC se observa que dicha señal correlaciona con un singulete en  $\delta_{\text{H}}$  7.44 que integra para un hidrógeno. En el experimento HMBC es clara la correlación de C-30 con las señales en  $\delta_{\text{C}}$  149.1 (C-20),  $\delta_{\text{C}}$  119.53 (C-29) y  $\delta_{\text{C}}$  39.89 (C-19) (Figura 16).

El C-29 correlaciona con dos singuletes en  $\delta_{\text{H}}$  5.41 (Hb) y 5.20 (Ha) correspondientes a los protones vinílicos de este carbono. En  $\delta_{\text{H}}$  2.75 ( $J = 11, 5.8$  Hz) se observa un triple de dobles el cual integra para el hidrógeno correspondiente al C-19 (39.89 ppm). En el experimento NOESY se aprecian las correlaciones entre el hidrógeno de la posición C-30 y H-29<sup>a</sup> (Figura 16). Respecto a la geometría de la oxima se infiere que ésta es (*E*), con base a que dicha disposición espacial de los sustituyentes es en la que se observa una menor compresión estérica, factor que explica la estabilidad de la oxima.

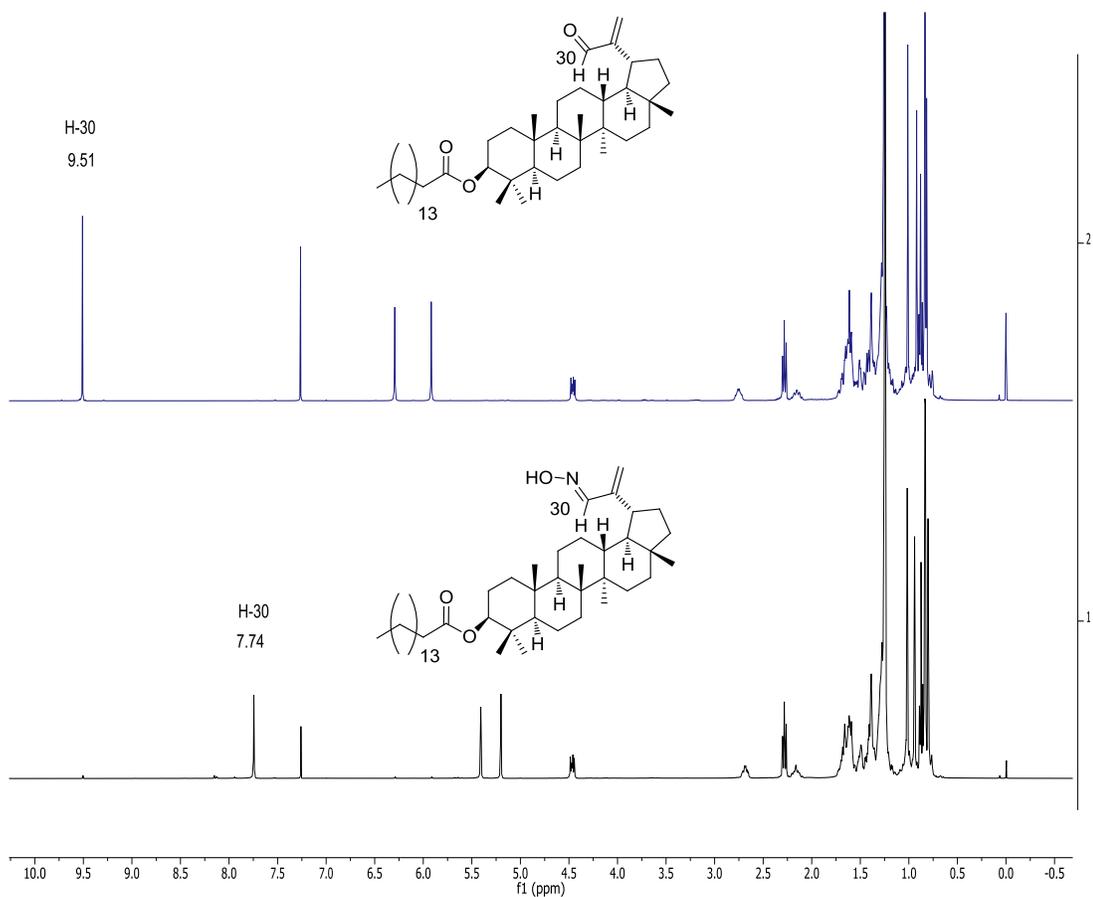


**Figura 16.** Correlaciones selectas **NOESY** y **HMBC** de H-30, compuesto **28**

En  $\delta_{\text{H}}$  4.47 se observa un doble de dobles ( $J = 10.6, 5.5$  Hz) que integra para un hidrógeno del C-3 (80.76 ppm), por su parte el carbono del carbonilo del éster se observa como una señal en  $\delta_{\text{C}}$  173.92; en  $\delta$  2.28 ( $J = 7.5$  Hz) se observa un triplete el cual integra para dos hidrógenos correspondientes a la posición C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  35.01) del éster, en el espectro IR en  $1722\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda C=O de dicho grupo funcional.

A campo alto en  $\delta_H$  1.25 se observa la cadena de metilenos de la cadena alifática de la posición 4'-13' y finalmente en  $\delta$  1.28, 1.21, 0.92, 0.834, 0.830, 0.81, se observan señales singuletes correspondientes a los metilos de la posición 28, 26, 27, (23, 16'), 24, y 25, respectivamente.

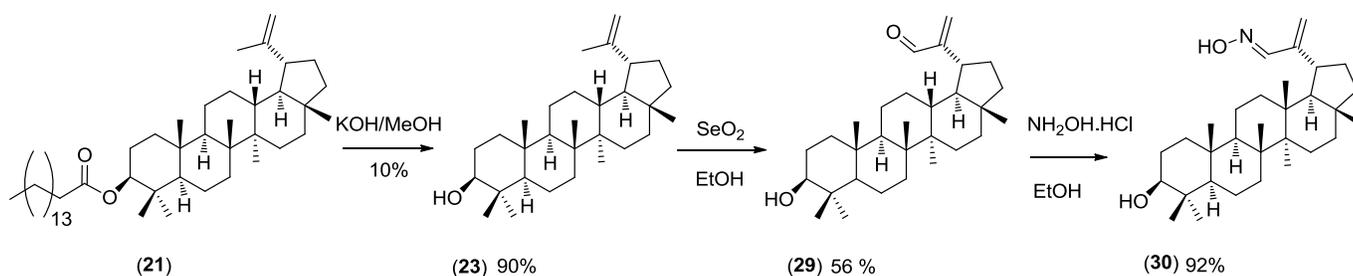
La comparación de los espectros de RMN  $^1H$  de los derivados obtenidos (**27** y **28**) se observa en la siguiente Figura:



**Figura 17.** Espectros apilados de los compuestos **27** y **28** en donde se compara el desplazamiento del H-30

### 6.3 Derivados de lupeol (23)

Como se observa en el Esquema 5, a partir del palmitato de lupeólo se obtuvo lupeol y derivatizó con base a las modificaciones realizadas en el palmitato de lupeólo, para obtener nuevos derivados que permitan el establecimiento de relaciones-estructura actividad.



Esquema 5. Derivatización de 21

#### 6.3.1 Reacción de 23 con SeO<sub>2</sub>

La oxidación alílica de **23** con SeO<sub>2</sub> se llevó a cabo utilizando como fuente de calentamiento las microondas. En la ccf se observó que no todo el lupeol reaccionó, el producto mayoritario (**29**) se comparó con una referencia estándar de un trabajo previo de nuestro grupo de investigación.

La reacción de Riley condujo a la introducción del grupo funcional en C-30. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H se observa un singulete a δ<sub>H</sub> 9.5 cuyo desplazamiento químico es característico de los hidrógenos de aldehído y en el espectro de RMN <sup>13</sup>C está presente la señal δ<sub>C</sub> 194.76, se observan dos singuletes en δ<sub>H</sub> 6.29 y en 5.9, correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-29b y H-29a, respectivamente, que correlacionan con el carbono en δ<sub>C</sub> 132.81. En δ<sub>H</sub> 2.73 se observa un triplete de dobles (*J* = 11, 5.6 Hz) el cual integra para un hidrógeno, correspondiente al metino C-19; estos datos fueron consistentes con lo informado en la literatura.<sup>51</sup>

### 6.3.2 Reacción de 29 con NH<sub>2</sub>OH

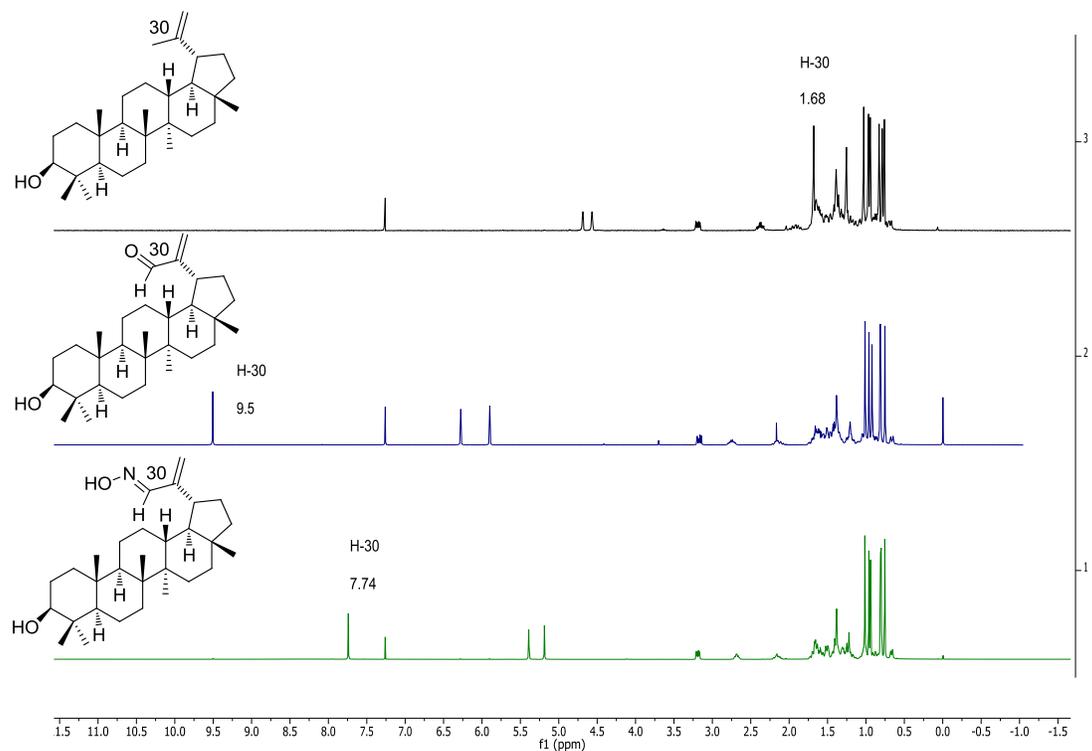
La formación de la oxima se llevó a cabo utilizando NH<sub>2</sub>OH·HCl en condiciones de calentamiento asistidas por microondas. En ccf se observó **30** que fue el único producto formado, y que es de mayor polaridad que el aldehído precursor.

El esqueleto de este derivado está formado de 30 átomos de carbono, que con base a los datos obtenidos en el espectros RMN <sup>13</sup>C (Espectro 5) y la técnica DEPT, se identificaron 6 metilos, 11 metilenos, 7 metinos y 6 carbonos sin hidrógenos. La presencia del ion molecular en *m/z* 456 (M+H)<sup>+</sup> es consistente con su fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>2</sub>. La masa de alta resolución de este compuesto es 456.38464 (M+H).

La oxima obtenida presenta en el espectro de IR dos bandas en 3589 cm<sup>-1</sup> y en 3262 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los hidroxilos presentes en la molécula.

El compuesto **30** presenta en RMN <sup>13</sup>C (Espectro 6) una señal en δ<sub>C</sub> 153.52 que correlaciona en el experimento HSQC con un singulete en δ<sub>H</sub> 7.74 que integra para el hidrógeno correspondiente al C-30. En el experimento HMBC es clara la correlación de H-30 con las señales en δ<sub>C</sub> 149.29 (C-20), δ<sub>C</sub> 119.32 (C-29) y δ<sub>C</sub> 39.9 (C-19). En el experimento NOESY el H-30 correlaciona con el hidrógeno en δ<sub>H</sub> 5.39. El C-29, por su parte, correlaciona con dos singuletes en δ<sub>H</sub> 5.39 (Hb) y 5.19 (Ha) correspondientes a los protones vinílicos de este carbono. En δ<sub>H</sub> 2.71 (*J* = 11, 5.8 Hz) se observa un triple de dobles el cual integra para un hidrógeno correspondiente al metino 19 (δ<sub>C</sub> 39.90). Debido a que sólo se modificó la posición C-30 de la materia prima, las señales del esqueleto base se mantuvieron constantes. En δ<sub>H</sub> 3.17 se observa un doble de dobles (*J* = 11.0, 5.6 Hz) que integra para un hidrógeno de C-3 (δ<sub>C</sub> 79.20); los metilos δ<sub>H</sub> 1.01, 0.96, 0.94, 0.81 0.80, 0.75 se observan como señales singuletes correspondientes a los metilos de las posiciones 26, 23, 27, 25, 28 y 24, respectivamente.

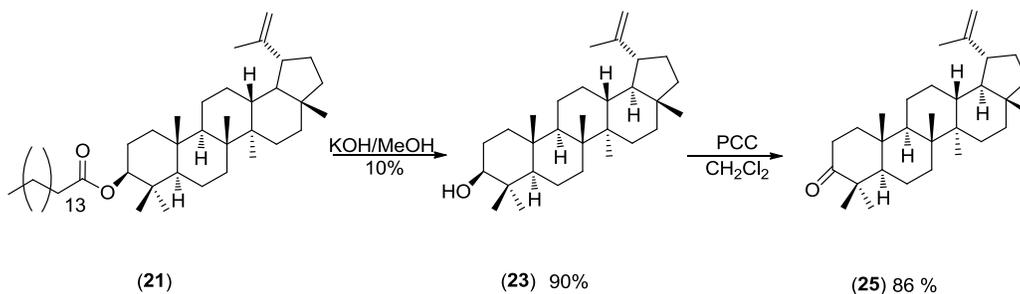
La comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los derivados obtenidos (**27** y **28**) se observa en la Figura 18:



**Figura 18.** Espectros apilados de los compuestos **23**, **29** y **30** en donde se compara el desplazamiento del H-30

#### 6.4 Pirazinas esteroidales.

Se llevó a cabo la secuencia de reacciones que se muestra en el Esquema 6, la cual nos permitió obtener la lupenona (**25**).



**Esquema 6.** Secuencia de reacciones para la obtención de lupenona (**25**)

### 6.4.1 Pirazina derivada de 25

El procedimiento sintético utilizado para la preparación de 1,4-pirazinas se conoce como la reacción Willgerodt – Kindler y se esquematiza a continuación:

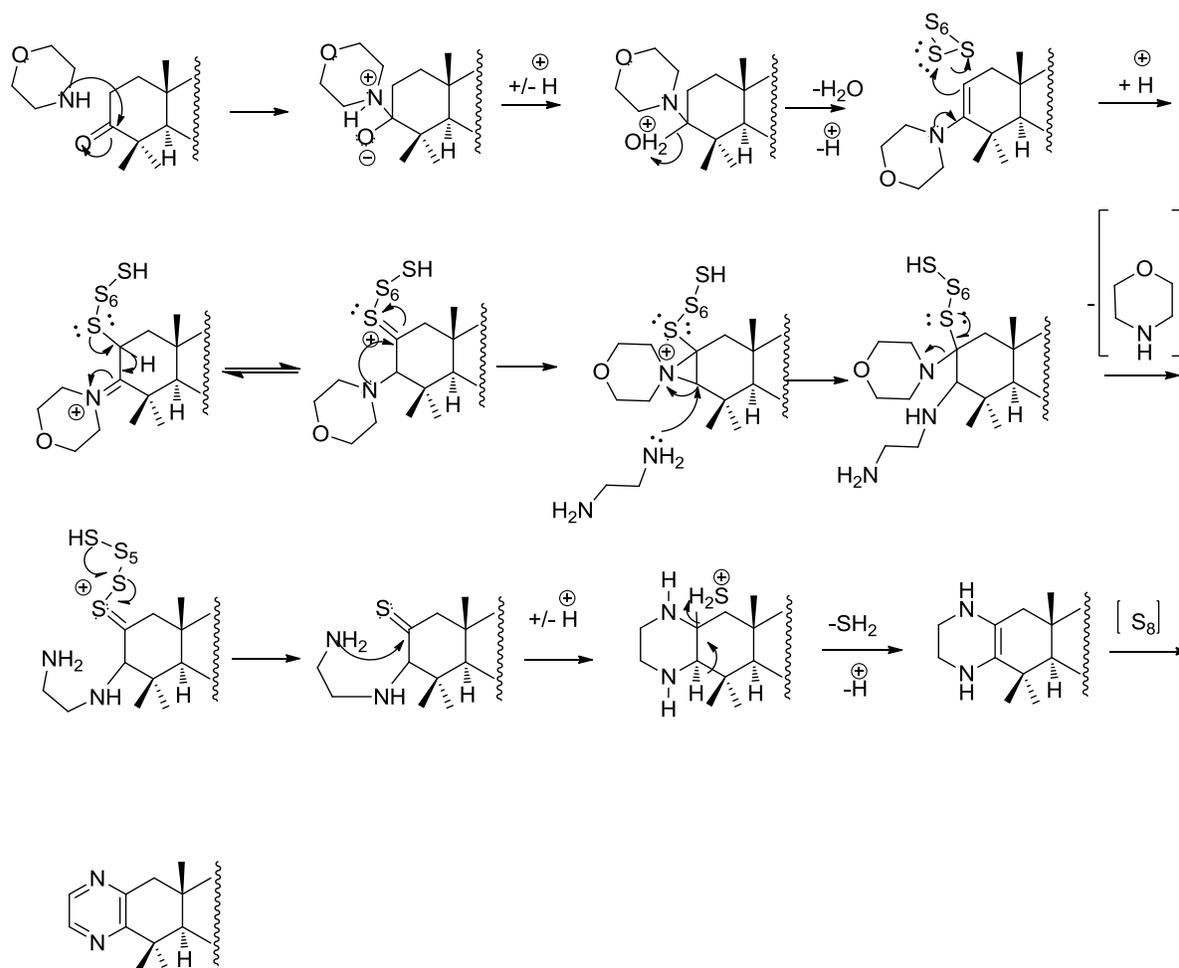


**Esquema 7.** Preparación de la pirazina **31**

La reacción de Willgerodt-Kindler se puede considerar como una reacción realizada en un solo procedimiento experimental (one pot) para la síntesis de tioamidas. Normalmente se lleva a cabo utilizando una cetona o aldehído, azufre elemental y una amina (o amoníaco) a temperaturas elevadas.<sup>52</sup> Debido a la amplia gama de sustratos que reaccionan bajo condiciones estándar de la reacción Willgerodt – Kindler<sup>53</sup> la postulación de una sola vía mecanística no ha sido directa, y se han propuesto varios mecanismos plausibles a lo largo de los años. Sejbal<sup>54</sup> y colaboradores en 1985 realizaron una modificación de la reacción de Willgerodt – Kindler para llevar cabo la preparación de pirazinas triterpénicas.

En el Esquema 8 se ilustra esquemáticamente la propuesta mecanística para la formación de las pirazinas esteroidales. La morfolina es una base débil que reacciona como nucleófilo y se adiciona al grupo carbonilo del C-3 del triterpeno, seguido por eliminación de H<sub>2</sub>O para formar una enamina; ésta reacciona con el azufre para producir un catión iminio, que formará un catión iminio – aziridinio en donde la etilendiamina lleva a cabo un ataque nucleofílico que permitirá la eliminación de morfolina, y mediante una adición a la

tioacetona seguida de la eliminación se forma el heterociclo, el cual se aromatiza para formar la pirazina



**Esquema 8.** Mecanismo propuesto para la formación de pirazinas esteroidales

En el primer ensayo de esta reacción se utilizaron cantidades menores de azufre y etilendiamina, sin embargo, no ocurrió transformación alguna, lo cual se explica con base a que el azufre sublima en la mezcla de reacción y se ha reportado que también forma otros subproductos con la morfolina,<sup>54</sup> por lo que es necesario tener un exceso de este reactivo para que la reacción proceda como se indica en el intento 2 (Tabla 6).

La reacción de la cetona con etilendiamina en presencia de azufre y morfolina generó una transformación parcial de la materia prima ya que en la ccf se observaron materia prima sin reaccionar y dos compuestos, siendo el más polar la pirazina.

**Tabla 6.** Condiciones de la reacción Willgerodt-Kindler para obtener **31**

| Intento | Lupenona<br>(mmol) | S <sub>8</sub><br>(mmol) | Morfolina<br>(mL) | Etilendiamina<br>(mmol) | Observaciones |
|---------|--------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|---------------|
| 1       | 0.094              | 0.5                      | 10                | 0.04                    | n.r           |
| 2       | 0.23               | 6.25                     | 15                | 25                      | 65%           |

La pirazina **31** fue aislada y caracterizada mediante el análisis de los datos obtenidos por las técnicas espectroscópicas y espectrométricas: en el espectro de masas se observa el ión molecular como el pico base con una relación  $m/z$  461 (M+H)<sup>+</sup>. La masa exacta para este compuesto es 461.38957, consistente con fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 8) se observaron 32 señales, y mediante la técnica DEPT se identificaron 7 metilos, 10 metilenos, 7 metinos y 8 carbonos sin hidrógenos.

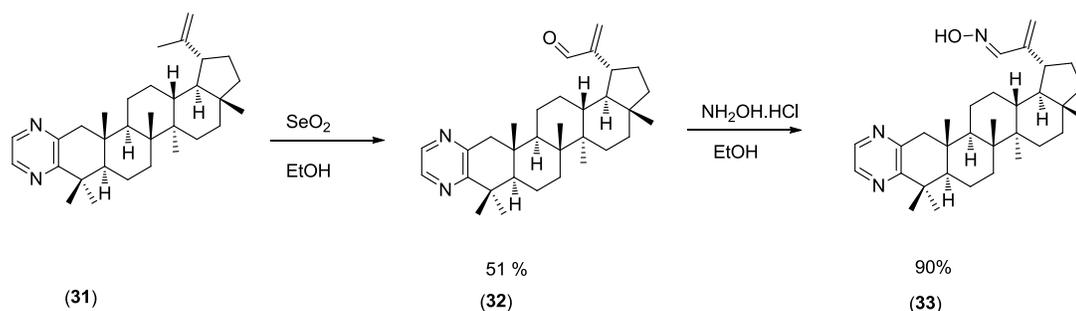
En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 7) se observan dos señales de hidrógenos aromáticos en δ<sub>H</sub> 8.41 y 8.27 que forman un sistema AB. Estos protones correlacionan en HSQC con los carbonos en δ<sub>C</sub> 142.43 y 141.46 que son señales típicas de las pirazinas 2,3 disustituídas; complementariamente se observan los carbonos C-3 y C-2 en δ<sub>C</sub> 150.99 y 150.93, respectivamente. La presencia de la pirazina también fue observada en el espectro de IR con la banda en 1640 característica de la absorción C=N.

La presencia del heterociclo provoca que la señal en RMN <sup>13</sup>C de C-1 se desplace a campo bajo (en δ<sub>C</sub> 48.77) y que los dos protones con los que correlaciona en el espectro HSQC (δ<sub>H</sub> 3.03 y 2.45) formen un sistema AB con *J* de acoplamiento geminal de 16.5 Hz. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H también se observa un doble de triples en δ<sub>H</sub> 2.39 que integra

para un hidrógeno ( $J = 10.5$  y  $5.4$ ), que en el espectro de HSQC correlaciona con C-19 ( $\delta_C$  48.11). En  $\delta_C$  109.61 se observa una señal correspondiente al carbono C-29, la cual correlaciona con un doblete en  $\delta_H$  4.71 ( $J = 2.3$  Hz) el cual integra para un hidrógeno vinílico (H-29b), y en  $\delta_H$  4.60 se observa un multiplete el cual integra para el protón correspondiente al H-29a.

#### 6.4.2 Derivados de 31.

A partir del compuesto **31** se modificó C-30 como se observa en el Esquema 9, para explorar la reactividad química de estos compuestos.



**Esquema 9.** Derivatización de **31** en la posición C-30

##### 6.4.2.1 Reacción de 31 con $\text{SeO}_2$

A partir de **31** se llevó a cabo una reacción de oxidación alílica para obtener el aldehído correspondiente en la posición C-30. La reacción se llevó a cabo con el calentamiento asistido por microondas y el seguimiento de la misma por ccf, lo cual permitió observar que sólo se llevó a cabo la formación de un producto y quedó materia prima sin reaccionar.

La pirazina **32** está constituida por 32 carbonos; 6 metilos, 10 metilenos, 8 metinos y 8 carbonos sin hidrógenos (identificados mediante el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  y la técnica

DEPT). La observación en el espectro de masas del ión molecular en  $m/z$  475 (M+H)<sup>+</sup> fue consistente con la masa esperada para este compuesto cuya fórmula es C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O cuya masa exacta es 475.36951 (M+H).

La presencia del aldehído en el C-30 quedó evidenciada por el singulete en  $\delta_H$  9.54 que correlaciona con la señal en el espectro de RMN <sup>13</sup>C en  $\delta_C$  195.29. En el espectro de IR se observa una banda en 1688 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la vibración del enlace C=O, así como la bandas 1619 características de la vibración C=N.

En el espectro de RMN de **32** en la modalidad HSQC, el C-29 ( $\delta_C$  133.45) correlaciona con dos singuletes en  $\delta_H$  6.31 y en  $\delta_H$  5.95, los cuales corresponden a los protones vinílicos H-29b y H-29a. La presencia de dos señales aromáticas en  $\delta_H$  8.43 y  $\delta_H$  8.26 que forman un sistema AB, los cuales correlacionan en el HSQC con los carbonos en  $\delta_C$  142.56 y 141.06, que son señales típicas de pirazinas 2,3-disustituídas; complementariamente, se observan los carbonos C-3 y C-2 en  $\delta_C$  160.20 y 150.70, respectivamente.

La presencia del heterociclo provoca que la señal en RMN <sup>13</sup>C del C-1 se desplace a campo bajo  $\delta_C$  48.52 y que los dos protones unidos a este ( $\delta_H$  3.06 y 2.45) formen un sistema AB.

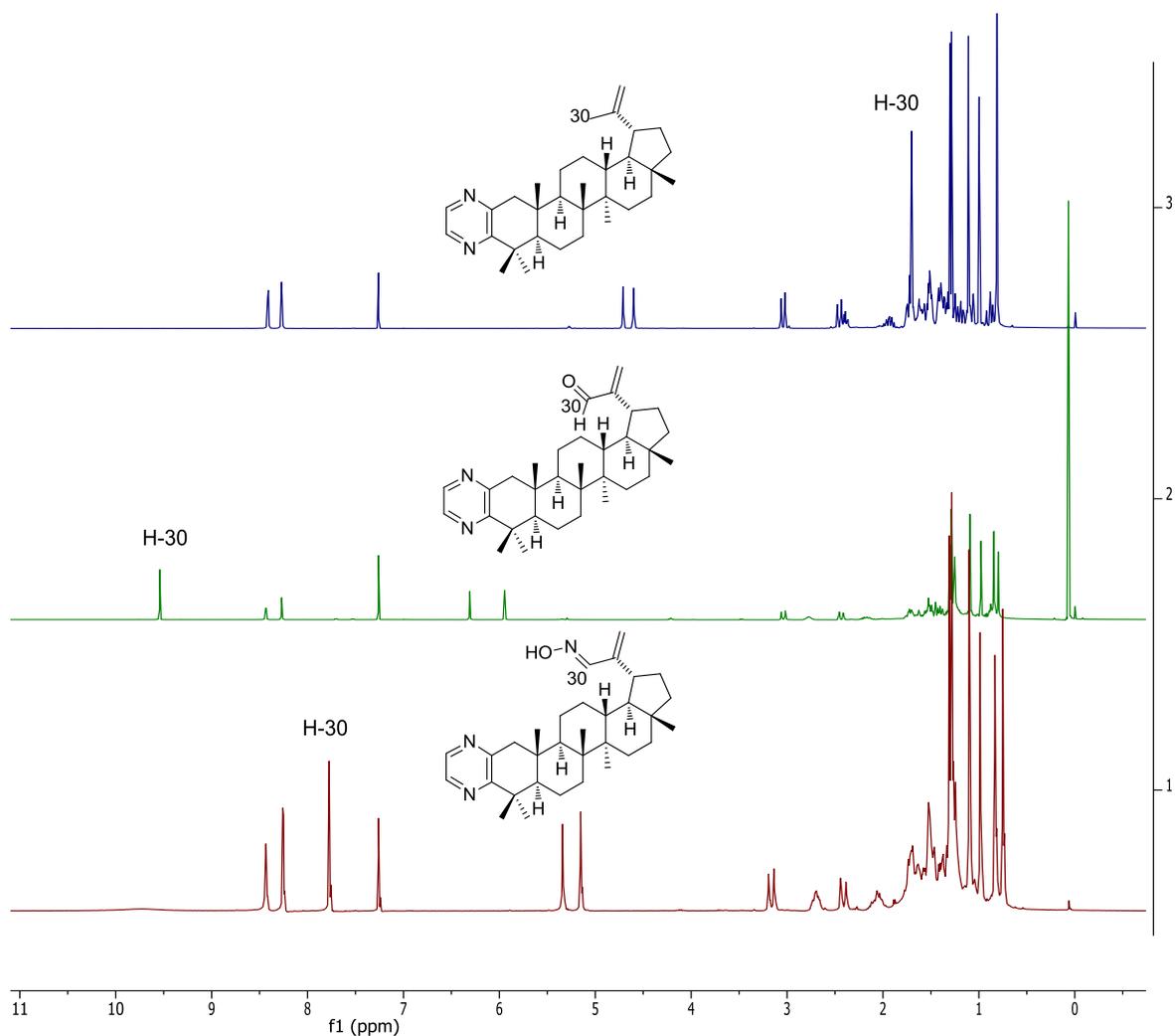
#### 6.4.2.2 Reacción de **32** con NH<sub>2</sub>OH

La transformación de **32** se llevó a cabo mediante la reacción con hidroxilamina. El producto **33** se obtuvo con buen rendimiento (90 %). La presencia del ion molecular en  $m/z$  490 (M+H)<sup>+</sup> es consistente con su fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O cuya masa exacta es 490.37974 (M+H).

El compuesto **33** presenta en el espectro de IR una banda característica correspondiente al hidroxilo de la oxima en 3582 cm<sup>-1</sup>. La vibración en 1689 cm<sup>-1</sup> corresponde al enlace C=N del anillo pirazínico.

El cambio de funcionalización en la posición en el C-30 con la oxima quedó evidenciado por la señal a campo bajo en el espectro RMN <sup>1</sup>H en  $\delta_H$  7.77 que correlaciona

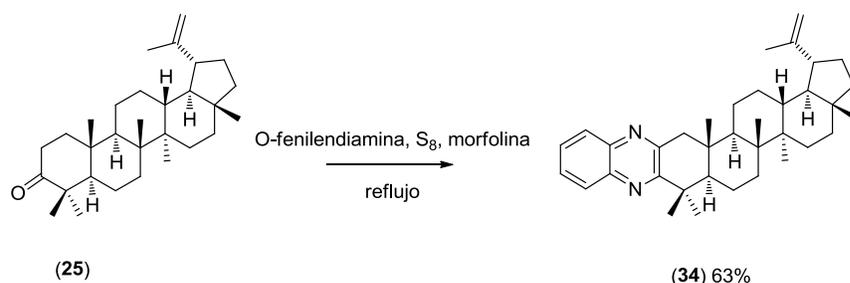
con el carbono  $sp_2$  de  $\delta_C$  153.15 en el espectro HSQC. En el espectro HMBC, el H-30 presenta correlación con el C-20 ( $\delta_C$  149.49), C-19 ( $\delta_C$  32.68) y C-29 ( $\delta_C$  118.31). En el espectro HSQC el C-29 correlaciona con dos singuletes en  $\delta_H$  5.34 (29-Hb) y 5.15 (29-Ha). En  $\delta_H$  2.71 ( $J = 11, 5.8$  Hz) se observa un triple de dobles el cual integra para un hidrógeno, correspondiente al de la posición 19.



**Figura 19.** Espectros apilados de los compuestos **31**, **32** y **33** en donde se comparan los desplazamientos de H-30.

### 6.4.3 Benzopirazina derivada de 25

Las benzopirazinas son conocidas también como quinoxalinas y en continuidad con la exploración química se decidió llevar a cabo la reacción ilustrada en el Esquema 10.



**Esquema 10.** Preparación de la benzopirazina **34**

El compuesto **34** está formado por 36 átomos de carbono identificados como 7 metilos, 10 metilenos, 9 metinos y 10 carbonos sin hidrógenos, de acuerdo a las evidencias observadas en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y mediante la técnica DEPT. La presencia del ion molecular en  $m/z$  511 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> es consistente con su fórmula molecular  $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_2$  cuya masa exacta es 551.40444 ( $\text{M}+\text{H}$ ).

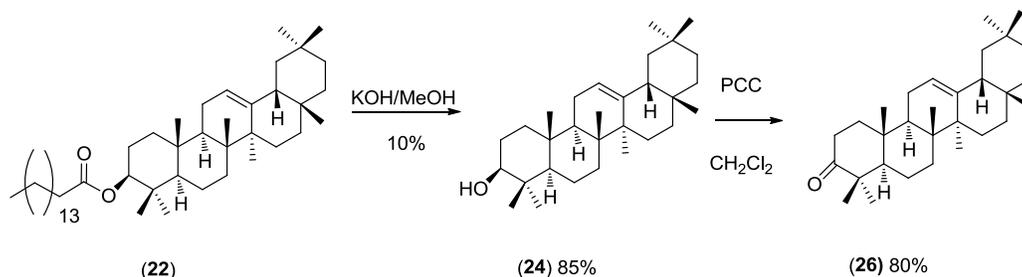
La presencia de la benzopirazina es evidenciada por las dos señales múltiples que se encuentran en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  en  $\delta_{\text{H}}$  8.00 y  $\delta_{\text{H}}$  7.65, las cuales integran para dos protones y correlacionan con los carbonos  $\delta_{\text{C}}$  129.06, 128.94, 128.74 y 128.02, los cuales son atribuidos al anillo del benceno. Respecto a los carbonos de la pirazina, estos se observan en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en  $\delta_{\text{C}}$  142.32 y 140.65, y los carbonos C-3 y C-2 que completan el heterociclo en  $\delta_{\text{C}}$  161.35 y 152.36.

El C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  49.78) correlaciona con dos dobletes que aparecen en espectro de RMN  $^1\text{H}$  en  $\delta_{\text{H}}$  3.33 ( $J = 16.6, 1\text{H}$ ) y en 2.60 ( $J = 16.6, 1\text{H}$ ). Estos protones forman un sistema AB debido a la vecindad con el anillo pirazínico. El carbono del metileno exocíclico (C-29) aparece en un desplazamiento  $\delta_{\text{C}}$  109.65 y en el espectro HSQC se observa la correlación

con el doblete ( $J = 2.36$  Hz) en  $\delta_H$  4.76 que integra para el protón H-29b y también correlaciona con otro protón en  $\delta_H$  4.63 (H-29a).

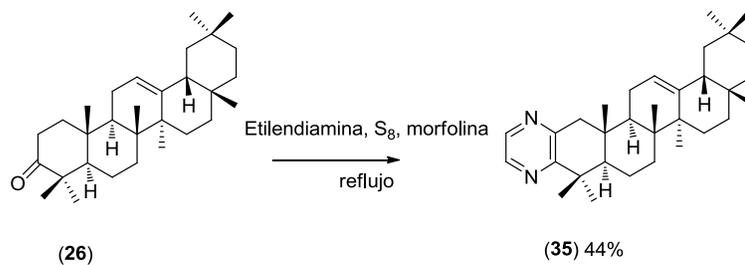
#### 6.4.4 Pirazina derivada de 26

La separación del palmitato de  $\beta$ -amirilo permitió la realización de la secuencia de reacciones que se muestra en el Esquema 11, para la obtención de la  $\beta$ -amirona.



**Esquema 11.** Secuencia de reacciones para la obtención de  $\beta$ -amirona (26)

La reacción de la  $\beta$ -amirona en presencia de etilendiamina, azufre y morfolina (reacción de Willgerodt-Kindler, Esquema 9) condujo a la transformación parcial de la materia prima en un producto mayoritario que es la pirazina de la  $\beta$ -amirina.



**Esquema 12.** Preparación de la pirazina 35

La formación del producto se comprobó por medio del análisis de los datos obtenidos de espectroscopia y espectrometría de masas. En el espectro de masas de baja resolución se observa el ión molecular correspondiente a  $m/z$  461 ( $M+H$ ) y en el espectro de alta resolución es de  $m/z$  461.38861 ( $M+H$ ), consistente con la masa molecular esperada para

este compuesto cuya fórmula molecular es  $C_{32}H_{48}N_2$ . En el espectro IR también se observa la banda en  $1681\text{ cm}^{-1}$ , característica de la vibración  $C=N$ .

La pirazina de  $\beta$ -amirona consta de 32 carbonos de los cuales 8 son metilos, 9 metilenos, 6 metinos y 9 carbonos sin hidrógenos, de acuerdo con la información de deducidas los espectros DEPT y de RMN  $^{13}C$ .

En el espectro de RMN  $^{13}C$  están presentes dos señales a campo alto en  $\delta_C$  142.51 y 141.32, que son características de los carbonos de pirazina. En el espectro HSQC estos carbonos correlacionan con los protones en  $\delta_H$  8.43 y 8.28 (d,  $J = 2.48\text{ Hz}$ ). Los C-2 y C-3 se observan en  $\delta_C$  160.07 y 150.77, respectivamente.

Como se ha descrito anteriormente, la presencia del heterociclo provoca que la señal en RMN  $^{13}C$  del C-1 se desplace a campo bajo ( $\delta_C$  48.45) y que los dos protones con los que correlaciona ( $\delta_H$  3.01 y 2.53) formen un sistema AB con  $J$  de acoplamiento geminal de 16.6 Hz

Se observa a campo bajo una señal en  $\delta_C$  121.81 que corresponde al C-12 de la olefina endocíclica, este carbono correlaciona en el espectro HSQC con el triplete  $\delta_H$  5.27 ( $J = 3.54\text{ Hz}$ ). El C-13 parte de la olefina presenta un desplazamiento de  $\delta_C$  145.23.

## 6.5 Actividad citotóxica

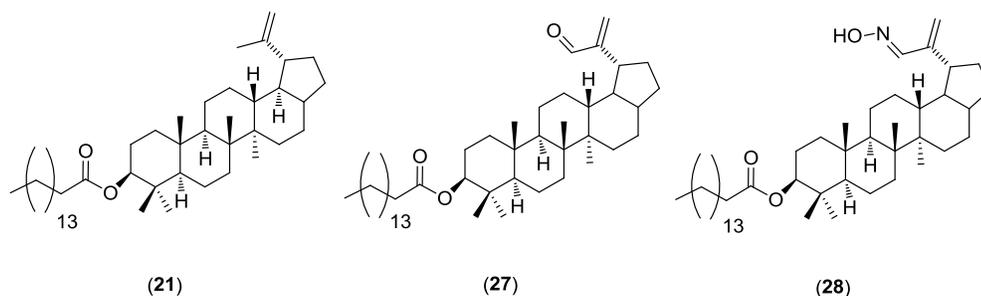
Considerando que los derivados semisintéticos obtenidos (**27-35**) son análogos monoméricos de las cefalostinas, se evaluó su actividad citotóxica y así como la del compuesto **21**, frente a las líneas celulares tumorales U251, K562, HCT, MCF-7 y SKLU-1.

**Tabla 7.** Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de los compuestos **21, 27-35**.

| Compuesto | % de inhibición de la proliferación celular en líneas cancerígenas humanas |              |              |              |            |
|-----------|--|--------------|--------------|--------------|------------|
|           | U251   | K562         | HCT-15       | MCF-7        | SKLU-1     |
| <b>21</b> | NC   | 6.88         | 10.46        | 3.24         | 21.95      |
| <b>27</b> | NC   | 18.6         | NC           | NC           | NC         |
| <b>28</b> | NC   | NC           | NC           | 15.85        | NC         |
| <b>29</b> | NC   | 38.46        | 9.52         | 14.48        | 20.84      |
| <b>30</b> | <b>88.72</b>   | <b>75</b>    | <b>98.05</b> | <b>100</b>   | <b>100</b> |
| <b>31</b> | NC   | 34.75        | NC           | NC           | NC         |
| <b>32</b> | <b>98.95</b>   | <b>100</b>   | <b>71.73</b> | <b>69.71</b> | <b>100</b> |
| <b>33</b> | <b>100</b>   | <b>98.98</b> | <b>100</b>   | <b>100</b>   | <b>100</b> |
| <b>34</b> | NC   | 0.2          | NC           | NC           | NC         |
| <b>35</b> | NC   | NC           | NC           | 25.74        | NC         |

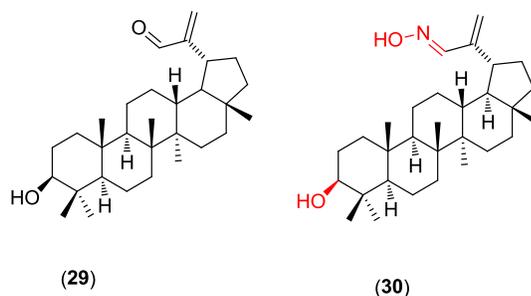
Concentración: (50  $\mu$ M) vehículo DMSO. U251: glía de sistema nervioso central, K562: leucemia, HCT-15: colon, MCF-7: mama, SKLU: pulmón. NC= no citotóxico.

Como se observa en la Tabla 7, respecto a los derivados del palmitato de lupeól (27 y 28), ninguno de estos presenta una actividad citotóxica mayor al 50 %, por lo que la bioactividad en este ensayo no puede considerarse como relevante.



**Figura 20.** Derivados de 21

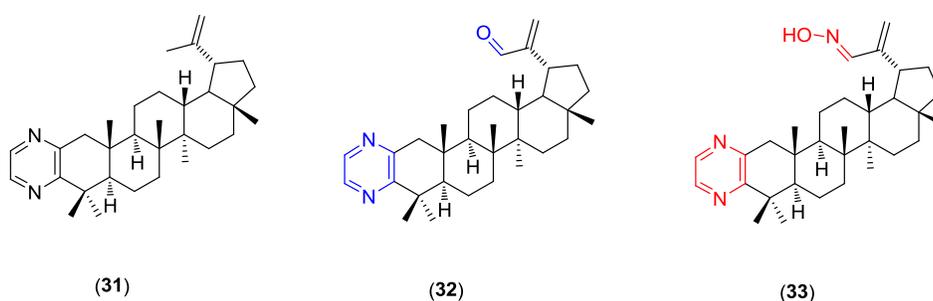
De los compuestos derivados del lupeol (29 y 30), estos presentan una actividad mayor respecto a 27 y 28, lo cual indica que el éster disminuye la actividad citotóxica y es notable el porcentaje de inhibición de la proliferación celular que presenta la oxima (30). Esta observación sugiere que la presencia conjunta del alcohol en C-3 y la oxima en C-30 son importantes para dicha actividad.



**Figura 21.** Derivados de 30

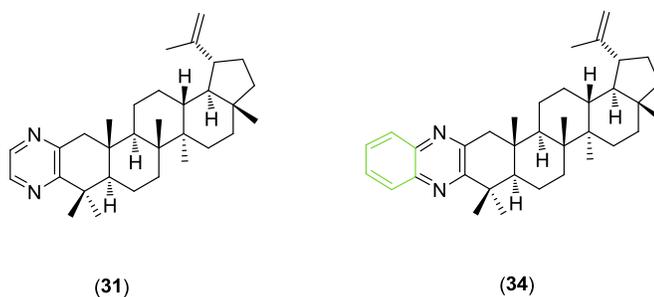
La pirazina es considerada como un grupo farmacóforo importante ya que muchas moléculas naturales o semisintéticas biológicamente activas contienen este fragmento. En

el derivado **31**, la sola presencia del anillo pirazínico (sin la modificación en C-30) no condujo a un compuesto con actividad citotóxica destacable, solamente se observa un incremento de la actividad del derivado **31** frente a la línea celular K562. La oxidación de la posición C-30 resultó en un compuesto (**32**) que exhibe una actividad citotóxica frente a todas las líneas celulares, sobresaliendo en U251, K562 y SKLU-1. La presencia de la oxima y la pirazina de manera conjunta (**33**) incrementa la actividad en todas las líneas celulares evaluadas, lo que permite inferir que la presencia del heterociclo y la oxima importantes para dicha actividad.



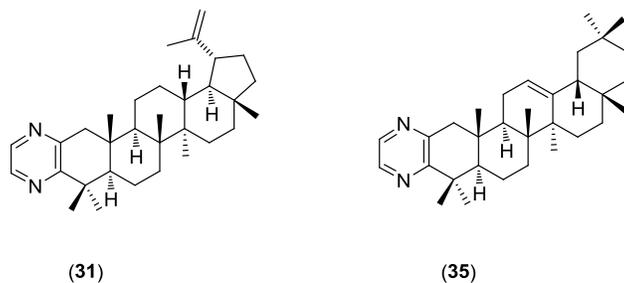
**Figura 22.** Derivados de **31**.

La modificación de **21** para obtener **34** produce la pérdida de la actividad biológica del derivado respecto al material de partida. Puede observarse que la quinaxolina (**34**) no muestra un cambio en la actividad biológica respecto de la pirazina (**31**).



**Figura 23.** Pirazina y benzopirazina derivadas de **25**

Las pirazinas **31** y **35** no fueron citotóxicas frente a la mayoría de las líneas celulares, solamente se observó una actividad selectiva frente a la línea celular MFC-7 con el compuesto **31** y con la línea K562 para el compuesto **35**, sin embargo, la actividad inhibitoria en ambos casos fue menor al 50%.



**Figura 24.** Pirazinas con esqueletos tipo lupano (**31**) y oleanano (**35**)

## 6.6 Actividad antiinflamatoria

La inflamación crónica y persistente es un proceso que contribuye al desarrollo de cáncer y predispone a la carcinogénesis. Las moléculas implicadas en la relación tumor-inflamación pueden surgir como dianas atractivas en la intervención terapéutica contra el cáncer.<sup>6</sup>

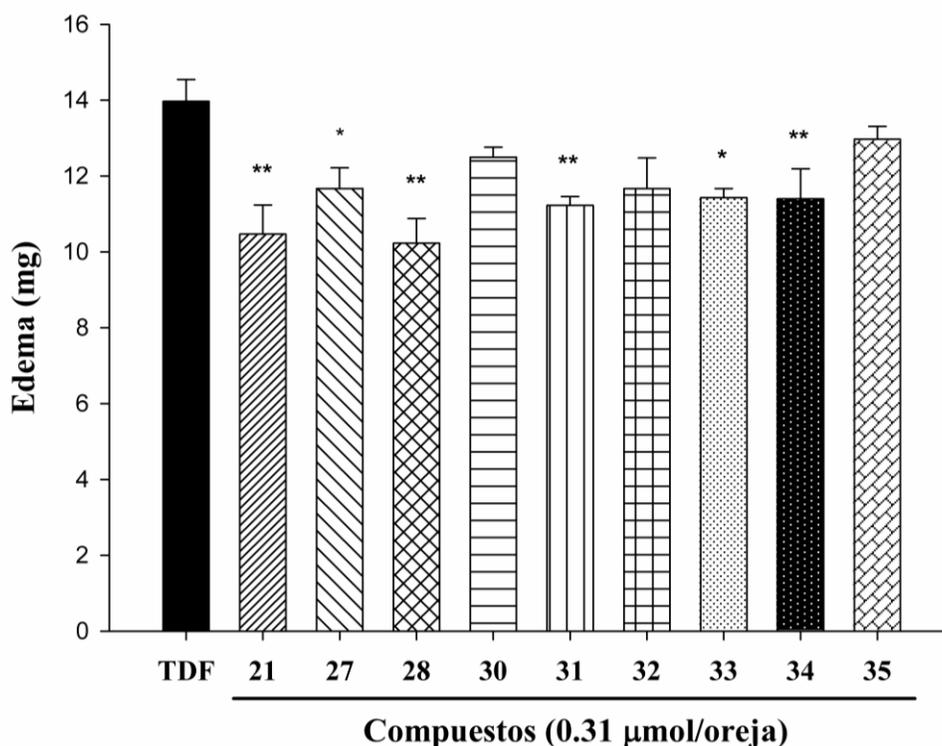
Con el propósito de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de los derivados semisintéticos se llevó a cabo la evaluación de su actividad antiinflamatoria. Los resultados de esta actividad se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Resultados de evaluación antiinflamatoria en el modelo de inflamación auricular murina de los compuestos obtenidos en este trabajo.

| Muestra                     | Dosis<br>( $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ ) | Edema<br>(mg)      | Inhibición<br>(%)  |
|-----------------------------|---|--------------------|--------------------|
| Control ( $\text{CHCl}_3$ ) | -   | 13.97 $\pm$ 0.58   | -                  |
| <b>21</b>                   | 0.31                                      | 10.47 $\pm$ 0.77** | 25.06 $\pm$ 5.49** |
| <b>27</b>                   | 0.31                                      | 11.67 $\pm$ 0.55*  | 18.41 $\pm$ 3.84*  |
| <b>28</b>                   | 0.31                                      | 10.23 $\pm$ 0.65** | 26.73 $\pm$ 4.65** |
| <b>30</b>                   | 0.31                                      | 12.50 $\pm$ 0.26   | 10.50 $\pm$ 1.89   |
| <b>31</b>                   | 0.31                                      | 11.23 $\pm$ 0.23** | 21.45 $\pm$ 1.63** |
| <b>32</b>                   | 0.31                                      | 11.67 $\pm$ 0.81   | 16.47 $\pm$ 5.79   |
| <b>33</b>                   | 0.31                                      | 11.43 $\pm$ 0.24*  | 18.14 $\pm$ 1.72*  |
| <b>34</b>                   | 0.31                                      | 11.40 $\pm$ 0.79** | 20.28 $\pm$ 5.55** |
| <b>35</b>                   | 0.31                                      | 12.97 $\pm$ 0.34   | 7.16 $\pm$ 2.42    |

Los datos representan el promedio de tres animales  $\pm$  el error estándar de la media ( $\bar{x} \pm EEM$ ). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Como se observa en la gráfica (Figura 25) los compuestos **21**, **27**, **28**, **31**, **33** y **34** disminuyeron el edema inducido por el tetradecanoil forbol (TDF), observándose diferencias estadísticamente significativas respecto al control, sin embargo, en ninguno de los casos la inhibición fue mayor al 50%.



**Figura 25.** Gráfica de actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos

Para el derivado del palmitato de lúpulo **27** se observa que la presencia del aldehído en el C-30, conduce a una disminución de esta actividad respecto a la que presenta el compuesto **21**. La oxima (**28**) presenta un mayor porcentaje de inhibición, sin embargo, no es estadísticamente diferente a **21**. La modificación del sustituyente en la posición C-3 del compuesto **28** altera la actividad antiinflamatoria, lo cual se observa en el compuesto **30** que tiene un grupo -OH en dicho carbono lo cual provoca una disminución de la actividad respecto a su oxima análoga esterificada. Entre las pirazinas **31**, **32** y **33**, el compuesto **31**

presentó el mayor porcentaje de inhibición, sin embargo, ninguno de estos compuestos superó el porcentaje del compuesto **28**. La introducción del anillo aromático en la benzopirazina no modificó la actividad antiinflamatoria respecto al compuesto **31**. Dentro de los compuestos evaluados se observa que el compuesto **35**, que es el único con esqueleto de oleanano, presentó la menor actividad frente al resto de los compuestos que tienen un esqueleto de lupano.

## 7. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la semisíntesis y evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de análogos monoméricos de las cefalostatinas (pirazinas esteroidales) a partir de algunos aciltriterpenos pentacíclicos.

La reacción de Riley condujo a la obtención del derivado palmitato de 30-oxo-lupeílo (**27**) y permitió la separación de los palmitatos de lupeílo y palmitato de  $\beta$ -amirilo.

La derivatización de los productos naturales **21** y **22** mediante reacciones de hidrólisis, oxidación (con PCC y  $\text{SeO}_2$ , reacción de Riley) y la reacción de Willgerodt-Kindler, permitió integrar un grupo de compuestos que guardan semejanza estructural y permiten ampliar el espacio químico conocido.

Los compuestos **27** (pamitato de 30-oxo-lupeílo), **28** (oxima del palmitato de 30-oxo-lupeílo), **30** (oxima del 30-oxo-lupeol), **32** ([2,3] pirazina de 30-oxo-lupenona), **33** (oxima de la [2,3] pirazina de 30-oxo-lupenona), **34** ([2,3] benzopirazina de lupenona), **35** ([2,3] pirazina de la  $\beta$ -amirona) se informan por primera vez en la literatura.

Respecto a la actividad biológica de los derivados, se obtuvieron dos análogos de cefalostinas (**32** y **33**) que exhibieron una alta citotoxicidad frente a las líneas celulares evaluadas y ninguno de los derivados obtenido presentó una actividad relevante (mayor al 50%) en la evaluación de su actividad antiinflamatoria

Los derivados del palmitato de lupeílo (**27** y **28**) no presentaron una actividad citotóxica mayor al 50 %. Los compuestos derivados del lupeol (**29** y **30**) presentaron una actividad mayor respecto a sus análogos esterificados **27** y **28**, lo cual sugiere que el éster disminuye la actividad citotóxica.

La presencia conjunta del hidroxilo en C-3 y la oxima en C-30 son importantes para inhibición de la proliferación celular que presenta la oxima **30**.

Los compuestos con pirazina sin la modificación en C-30 (**31** y **35**), no presentaron actividad citotóxica destacable. La oxidación de la posición C-30 incrementa la actividad citotóxica, lo cual se observa en el compuesto **32** sobresaliendo en las líneas celulares

U251, K562 y SKLU-1. El compuesto más citotóxico de los evaluados fue el **33**, lo que permite inferir que la presencia del heterociclo y la oxima son importantes para dicha actividad. El anillo aromático en **34** produce la pérdida de la actividad biológica del derivado respecto al material de partida (**31**).

Respecto a la actividad antiinflamatoria, se observa que la modificación estructural conduce a cambios en la actividad biológica; para **27** la presencia del aldehído en el C-30, conduce a una disminución de esta, la presencia de la oxima (**28**) no modifica la actividad. La presencia del grupo -OH en C-3 del compuesto **30** provoca una disminución de la actividad respecto a su oxima análoga esterificada. La introducción del anillo de pirazina (**31**, **32** y **33**) no modifica la actividad del compuesto **28**. La introducción del anillo aromático en el compuesto **34**, no modificó la actividad antiinflamatoria respecto al compuesto **31**. Se observa que el compuesto **35** con esqueleto de oleanano presentó menor actividad que los compuestos con esqueleto de lupano.

Los resultados descritos permiten ampliar el espacio biológico de los productos naturales y semisintéticos, por lo que se cumplieron los objetivos planteados al inicio de la presente investigación.

## 8. SECCION EXPERIMENTAL

Para las reacciones llevadas a cabo se emplearon disolventes de grado analítico y los reactivos (Sigma-Aldrich) se emplearon directamente del envase. Se empleó un reactor de microondas Anton Paar Monowave 300, con el modo de calentamiento “Heat as fast as possible” con potencia variable, con viales de vidrio de borosilicato (10 mL). La temperatura se determinó con el termómetro interno de infrarrojo.

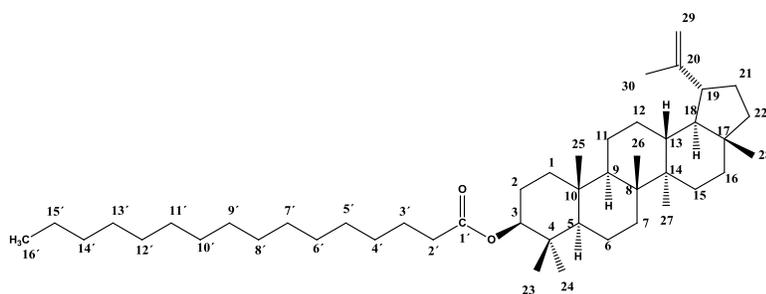
A menos que se indique de otra forma, la purificación por cromatografía en columna abierta se llevó a cabo con gel de sílice malla 230-400, que fue monitoreada por cromatografía en capa fina (cromatofolios Merck 60 F254 de 0.2 mm de espesor), visualizando con lámpara de ultravioleta y con revelador de sulfato cérico de amonio. Cuando fue necesario, se emplearon cromatoplasmas de gel de sílice (Merck 60 F254 2mm 20 x 20 cm).

Los espectros de RMN se adquirieron en equipos Varian Inova a 500 MHz, Bruker Avance III a 400 MHz, Jeol Eclipse a 300 MHz, y se reportan los desplazamientos químicos en ppm, referenciando con TMS o el disolvente; los de UV, en un equipo Shimadzu UV160U; y los de IR, en un equipo FT-IR Bruker Tensor 750. La espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo Jeol AccuTOF JMS-T100LC. Los puntos de fusión fueron tomados con un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos.

La actividad antiinflamatoria se determinó basándose en el protocolo de inflamación auricular murina aguda inducida por acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, usando ratones machos (cepa CD-1) de 25-30 g, con disolventes (etanol) Baker y reactivos Aldrich. La actividad inhibitoria de la proliferación celular se llevó a cabo mediante el método de sulforrodamina B .

La separación se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta. 2.01 g de la mezcla de triterpenos se disolvieron en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase estacionaria se utilizaron 70 g de sílica gel y como fase móvil, mezclas de hexano-tolueno en orden creciente de polaridad hasta la proporción 9:1 lo que permitió la separación de ambos triterpenos.

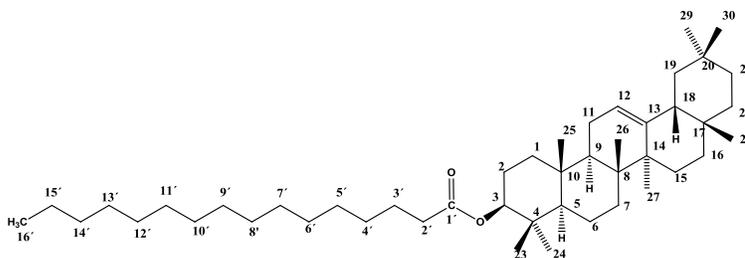
*Palmitato de lupeólo* (Lit<sup>49</sup>) (**21**)



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0.79 (s, 3H, H-28), 0.84 (s, 6H, H-25,16'), 0.86 (s, 3H, H-24), 0.87 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 1.02 (s, 3H, H-26), 1.25 (s, 20H, H4'-13'), 1.67 (s, 3H, H-30), 2.29 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 2.38 (td, 1H, *J* = 11, 5.8 Hz, H-19), 4.50 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.8 Hz, H-3) 4.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-29b), 4.57 (m, 1H, H-29a).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 38.38 (C-1), 23.75 (C-2), 80.61(C-3), 37.84 (C-4), 55.39 (C-5), 18.21 (C-6), 34.22 (C-7), 40.86 (C-8), 50.34 (C-9), 37.09 (C-10), 20.95 (C-11), 25.11 (C-12), 38.05 (C-13), 42.83 (C-14), 27.44 (C-15), 35.57 (C-16), 43.00 (C-17), 48.30 (C-18), 48.01 (C-19), 150.95 (C-20), 29.69 (C-21), 40.00 (C-22), 27.97 (C-23), 16.57 (C-24), 16.17 (C-25), 15.98 (C-26), 14.52 (C-27), 18.00 (C-28), 109.33 (C-29), 19.28 (C-30), 173.68 (C-1'), 34.86 (C-2'), 25.17 (C-3'), 29.17-29.84 (C4'-13'), 31.92 (C-14'), 22.69 (C-15'), 14.11(C-16').

*Palmitato de β-amirilo* (lit <sup>49</sup>) (22)



RMN <sup>1</sup>H (400 MHz. CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0.83 (s, 3H, H-28), 0.88 (s, 15H, H-23, 24, 29, 30, 16'), 0.97 (d, 6H, *J* = 2.2 Hz, H-25, 26), 1.13 (s, 3H, H-27), 1.25 (s, 20H, H4'-13'), 2.29 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 4.50(dd, 1H, *J* = 9.2, 6.8 Hz, H-3), 5.18 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz, H-12).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz. CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 38.26 (C-1), 22.69 (C-2), 80.57 (C-3), 37.76 (C-4), 55.26 (C-5), 18.27 (C-6), 32.60 (C-7), 39.81 (C-8), 47.55 (C-9), 36.85 (C-10), 23.61 (C-11), 121.64 (C-12), 145.20 (C-13), 41.72 (C-14), 26.93 (C-15), 26.14 (C-16), 33.32 (C-17), 47.24 (C-18), 46.79 (C-19), 31.08 (C-20), 34.87 (C-21), 37.14 (C-22), 28.06 (C-23), 16.81 (C-24), 15.55 (C-25), 16.77 (C-26), 25.95 (C-27), 28.39 (C-28), 33.32 (C-29), 23.69 (C-30), 173.67 (C-1'), 34.73 (C-2'), 25.18 (C-3'), 29.18-29.69 (C4'-13'), 31.92 (C-14'), 23.54 (C-15'), 14.11 (C-16').

## Derivatización de la mezcla de **21** +**22**. Reacción de Riley

La reacción se llevó a cabo en condiciones a) térmicas (calentamiento normal) y b) calentamiento asistido por microondas

### a) Condiciones térmicas (calentamiento normal)

La mezcla **21**+ **22** (100.2 mg, 0.15 mmol) fue disuelta en un matraz de 50 mL en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se adicionó etanol (10 mL) y posteriormente se añadió SeO<sub>2</sub> (84.8 mg, 0.76 mmol).

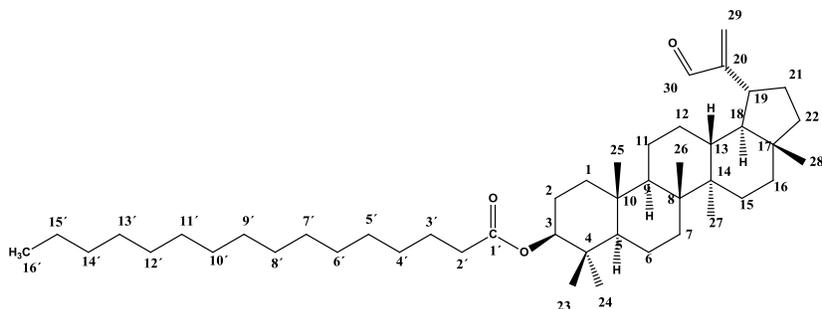
La reacción se mantuvo 72 h en condiciones de reflujo y agitación constante. Transcurrido el tiempo de reacción, se concentró al vacío, el producto crudo (199.9 mg) se adsorbió en gel de sílice (200 mg) y se aplicó en una columna (3 cm de diámetro) empacada con gel de sílice (10 g) suspendida en una mezcla de Hex-AcOEt 98:02, eluyente que se empleó en la columna. Se obtuvieron 18 mg (0.026 mmol, 23%) de un sólido blanco (**28**). R<sub>f</sub>: 0.6 (Hex-AcOEt 9:1), p.f: 82-84 °C

### b) Condiciones de calentamiento asistido por microondas

En un vial para microondas (10 mL) con una disolución de la mezcla **21**+**22** (103.4 mg, 0.156 mmol) disueltos previamente en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y EtOH (3 mL) se adicionó SeO<sub>2</sub> (28 mg, 0.25 mmol) y se calentó por 15 min a 170 °C en el reactor de microondas. Transcurrido el tiempo de reacción nuevamente se adicionaron 28.7 mg (0.25 mmol) de SeO<sub>2</sub>, y se mantuvieron las condiciones de tiempo y temperatura anterior. El procedimiento anterior se repitió dos veces más hasta completar 1 mmol de SeO<sub>2</sub>

Transcurrido el tiempo de reacción, se concentró al vacío, el producto crudo se adsorbió en gel de sílice que se aplicó en una columna (3 cm de diámetro) empacada con gel de sílice (10 g) suspendida en una mezcla Hex-AcOEt 98:02, eluyente que se empleó en la columna. Se obtuvo el compuesto **27** (51 mg, 0.072 mmol, 68 %) como un sólido blanco. R<sub>f</sub>: 0.6 (Hex-AcOEt 9:1), p.f. 82-84 °C.

*Palmitato de 30-oxo-lupeílo (27)*



Sólido cristalino blanco.  $R_f$ : 0.6 (Hex-AcOEt 9:1), Pf 82-84 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 2929, 2851, 1717, 1689, 1619, 1465, 1381, 1365, 1109, 1008, 941.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm): 9.51 (s, 1H, H-30), 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.91 (s, 1H, H-29a), 4.46 (dd,  $J = 10.3, 5.7$  Hz, 1H, H-3), 2.75 (td,  $J = 11, 5.8$  Hz, 1H, H-19), 2.28 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-2'), 1.24 (s, 20H, H-4'-13'), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-27), 0.83 (s, 9H, H-23, 24, 16'), 0.81 (s, 6H, s, H-25, H-28).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  195.25 (C-30), 173.86 (C-1'), 157.31 (C-20), 133.36 (C-29), 80.71 (C-3), 55.51 (C-5), 50.28 (C-9, C-18), 43.41 (C-17), 42.82 (C-14), 40.93 (C-8), 40.07 (C-22), 38.50 (C-4), 37.97 (C-1), 37.85 (C-13), 37.19 (C-10), 35.52 (C-16, C-19), 35.01 (C-2'), 34.34 (C-7), 32.80 (C-21), 32.08 (C-14'), 29.82 (C-4'-C-13'), 28.11 (C-23), 27.77 (C-3'), 27.46 (C-15), 25.32 (C-12), 23.86 (C-2), 22.85 (C-15'), 21.09 (C-11), 18.32 (C-6), 17.94 (C-28), 16.72 (C-24), 16.26 (C-25), 16.08 (C-26), 14.52 (C-24), 14.28 (C-16').

EM (DART)  $m/z$  679 [M + H]<sup>+</sup>

EMAR-ESI+  $m/z$  679.60214 [M + H]<sup>+</sup> (Calculado para C<sub>49</sub>H<sub>78</sub>O<sub>3</sub>: 679.60214)

## Reacción de **27** con NH<sub>2</sub>OH. Obtención de **28**

La reacción se llevó a cabo en condiciones a) térmicas y asistidas por microondas en ambos casos se obtuvo un buen rendimiento.

a) El compuesto **27** (100.3 mg, 0.147 mmol) se disolvió en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y en condiciones de agitación constante se adicionó de NH<sub>2</sub>OH·HCl (45 mg, 0.65 mmol) en 10 mL de EtOH.

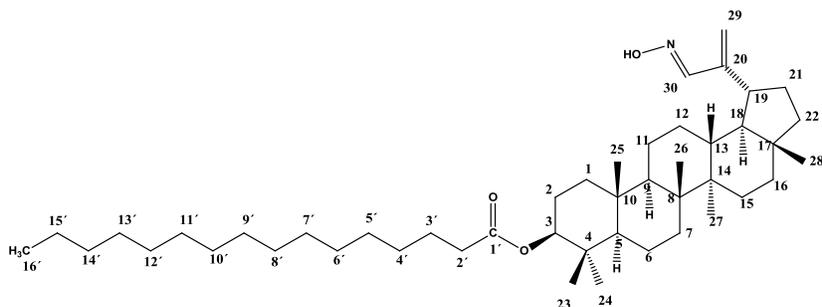
Transcurrido el tiempo reacción (2 h) se añadieron 10 mL de H<sub>2</sub>O y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 5 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó el disolvente y el crudo se purificó por cromatografía en columna Hex-AcOEt (9:1). Se obtuvo un sólido cristalino blanco **28** (94.1 mg, 0.135 mmol, 91 %) R<sub>f</sub>: 0.45 (Hex-AcOEt 9:1). p.f. 238-240 °C

b) Una mezcla de **27** (118 mg, 0.17 mmol) y NH<sub>2</sub>OH·HCl (50 mg, 0.72 mmol) en EtOH (2 mL) se calentó en el reactor de microondas a 100 °C por 10 min. Transcurrido el tiempo reacción se añadieron 10 mL de H<sub>2</sub>O y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 5 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó el disolvente y el crudo se purificó por cromatografía en columna abierta con Hex-AcOEt (9:1). Se obtuvo un sólido cristalino blanco **28** (112.1 mg, 0.161 mmol, 92%).

EM (DART)  $m/z$  679 [M + H]<sup>+</sup>

EMAR-ESI+  $m/z$  679.60214 [M + H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>49</sub>H<sub>79</sub>O<sub>3</sub>: 679.60214)

*Oxima del palmitato de 30-oxo-lupeílo (28)*



R<sub>f</sub>: 0.45 (Hex-AcOEt 9:1). Pf 238-240 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> cm<sup>-1</sup>: 3590, 2951, 2859, 1722, 1662, 1462, 1383, 1361, 1261, 1004, 972.80, 941, 906, 852.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 7.74 (s, 1H, H-30), 5.41 (s, 1H, H-29a), 5.20 (s, 1H, H-29b), 4.47 (dd, *J* = 10.6, 5.5 Hz, 1H, H-3), 2.69 (td, *J* = 11.2, 5.8 Hz, 1H, H-19), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.25 (s, 20H, H4'-13'), 1.21 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-27), 0.83 (s, 9H, H-23, 24, 16'), 0.81 (s, 6H, H-25, H-28).

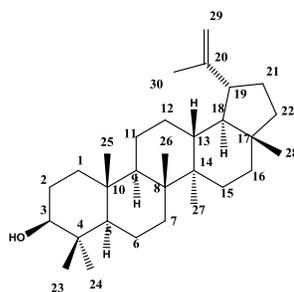
RMN <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.92 (C-1'), 153.64 (C-30), 149.21 (C-20), 119.53 (C-29), 80.76 (C-3), 55.50 (C-5), 50.37 (C-9), 49.88 (C-18), 43.16 (C-17), 42.88 (C-14), 40.98 (C-8), 39.89 (C-19, C-22), 38.50 (C-4), 38.05 (C-1), 37.98 (C-13), 37.20 (C-10), 35.63 (C-16), 35.01 (C-2'), 34.38 (C-7), 32.64 (C-21), 32.07 (C-14'), 29.83-29.32 (C-4'-C-13'), 28.11 (C-23), 27.55 (C-3'), 27.43 (C-15), 25.32 (C-12), 23.87 (C-2), 22.84 (C-15'), 21.19 (C-11), 18.33 (C-6), 18.00 (C-28), 16.72 (C-24), 16.30 (C-25), 16.13 (C-26), 14.63 (C-27), 14.27 (C-16').

EM (DART) *m/z* 440 [M + H]<sup>+</sup>

Hidrólisis de **21** .Obtención de lupeol.

En un matraz bola, disuelto en la mínima cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y en condiciones de agitación constante se adicionó palmitato de lupeólo (200.3mg, 0.301 mmol) y 10 mL de una solución de KOH/MeOH 10%. Transcurrido el tiempo de reacción (24 h), al crudo resultante se le adicionó  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL): La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . La separación del compuesto **23** se llevó a cabo por cca (2.5 cm de diámetro) con una suspensión de gel de sílice (10 g) en Hex-AcOEt 8:2, obteniéndose (115 mg, 0.271 mmol, 90 %), como un sólido cristalino. el cual se comparó por cromatografía en capa fina con una muestra de estándar de lupeol obtenida anteriormente en el laboratorio. Rf: 0.5 Hex-AcOEt (8:2).

*Lupeol (23)*

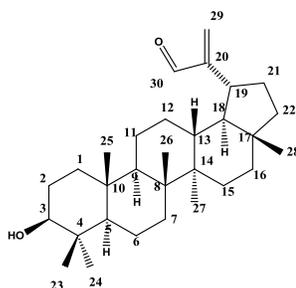


RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz.  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.92 (s, 1H, H-29a), 3.18 (dd,  $J = 10.7, 5.3$  Hz, 1H, H-3), 2.73 (td,  $J = 11, 5.6$  Hz, H-1, H-19), 1.68 (s, 3H, H-30), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.81 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

### Reacción de Riley de **23**. Obtención de **29**

En un vial para microondas de 10 mL se adicionaron lupeol (101.4 mg, 0.237 mmol), disuelto previamente en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y SeO<sub>2</sub> (30 mg, 0.27 mmol) y finalmente se agregó EtOH (3 mL), se calentó por 30 min a 170 °C en el reactor de microondas. Transcurrido el tiempo de reacción nuevamente se adicionó SeO<sub>2</sub> (28.5 mg, 0.25 mmol) y se mantuvieron las condiciones de tiempo y temperatura anterior. El procedimiento anterior se repitió dos veces más. El crudo de la reacción se concentró al vacío y la separación del compuesto **29** se llevó a cabo mediante una cromatografía en placa preparativa que se eluyó con el sistema Hex-AcOEt 8:2. El compuesto **29** (58.9 mg, 0.133 mmol, 56 %) se obtuvo como un sólido blanco.

#### 30-oxo-lupeol (**29**)



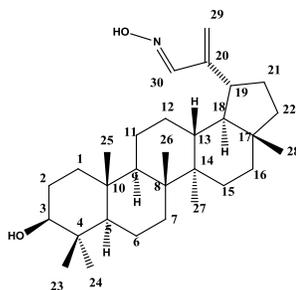
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz; δ, ppm): 9.52 (s, 1H, H-30), 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.9 (s, 1H, H-29a), 3.18 (dd, *J* = 10.7, 5.32 Hz, 1H, H-3), 2.73 (td, *J* = 11, 5.6 Hz, H-1, H-19), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.81 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

### Reacción de **29** con NH<sub>2</sub>OH. Obtención de **30**.

Una mezcla del **29** (118 mg, 0.17 mmol) y NH<sub>2</sub>OH·HCl (50 mg, 0.72 mmol) en EtOH (2 mL) se calentó en el reactor de microondas a 90 °C por 10 min. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 10 mL de H<sub>2</sub>O y se realizó una extracción con AcOEt (10

mL x 3). La fase orgánica se lavó con 5 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó el disolvente y el crudo se purificó por cromatografía en placa preparativa con un sistema de elución Hex-AcOEt (8:2). Se obtuvo un sólido cristalino blanco **30** (112.1 mg, 0.161 mmol, 92%).

*Oxima del 30-oxo-lupeol (30)*



R<sub>f</sub>: 0.48 (Hex-AcOEt 9:1 x 29, P<sub>f</sub>: 218-220 °C).

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>cm<sup>-1</sup>: 3589, 3261, 2951, 2930, 2858, 1663, 1462, 1384, 1362, 1261, 1239, 1139, 1091, 1025, 941, 906, 853, 825.

RMN <sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 7.74 (s, 1H, H30), 5.39 (s, 1H, H-29b), 5.19 (s, 1H, H-29a), 3.17 (dd, *J* = 11.0, 5.6 Hz, 1H, H-3), 2.71 (td, *J* = 11, 5.6 Hz, 1H, H-19), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.81 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153.52 (C-30), 149.29 (C-20), 119.32 (C-29) 79.20 (C-3), 55.42 (C-5), 50.46 (C-9), 49.92 (C-18), 43.16 (C-17), 42.87(C-14), 40.95(C-8), 39.90 (C-19, C-22) 38.98 (C-4), 38.85(C-1), 38.05(C-13), 37.28 (C-10), 35.63 (C-16), 34.44 (C-7), 32.62 (C-21), 28.13 (C-23), 27.55(C-2), 27.46 (C12, C-15), 21.17 (C-11), 18.44 (C-6), 18.00 (C-8), 16.25 (C-25), 16.13 (C-26), 15.54 (C-24), 14.65(C-27)

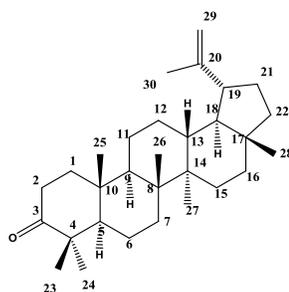
EM (DART) *m/z* 456 [M + H]<sup>+</sup>

EMAR-ESI+ *m/z* 456.38464 [M + H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>NO<sub>2</sub> 456.38415)

## Oxidación con PCC de **23**. Obtención de **25**

A una solución de 100 mg de lupeol (0.234 mmol) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro se añadió clorocromato de piridinio (PCC) (200 g, 0.925 mmol), la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en condiciones de agitación constante por 6 h. Posteriormente el crudo de reacción se filtró a través de una columna de 2 cm de diámetro empacada con 5 g de sílice, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna abierta con Hex-AcOEt (98:02). Se obtuvo un sólido cristalino blanco (86 mg, 0.202 mmol, 86 %).

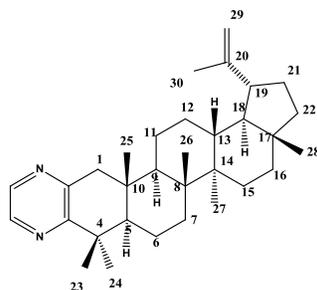
### *Lupenona (25)*



### Obtención de **31**.

En un matraz se adicionó lupenona (100 mg, 0.23 mmol) en condiciones de agitación constante disuelta en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente se agregó etilendiamina (1.5 mL, 25 mmol), azufre (200 mg, 6.25 mmol) y morfolina (15 mL). La reacción se mantuvo en condiciones de reflujo por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadió H<sub>2</sub>O (10 mL) y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 10 mL de HCl 10% y luego con 10 mL de H<sub>2</sub>O, finalmente se adicionaron 10 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó el disolvente y el residuo obtenido (250.1 mg) se adsorbió en gel de sílice (aplicado sobre una columna previamente empacada con una suspensión de 10 g de gel de sílice en Hexano, sistema con el que se eluyó la columna). Se obtuvo el compuesto **31** (68.1 mg, 0.148 mmol; 65 %) como un sólido blanco.

[2,3] pirazina de 30-oxo-lupenona (31)



R<sub>f</sub>: 0.30 (Hex-AcOEt 9:1 X 2). p.f. 162-164 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 2950, 2871, 1640, 1454, 1433, 1403, 1382, 1239, 1232, 1212, 1195, 1184, 1138, 1107, 1064, 1028, 1012, 961, 918, 888, 853 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 8.41 (s, 1H, H-pz ), 8.27 ( s, 1H, H-pz ), 4.71 (d, *J* = 2.44, 1H, H-29a), 4.60 (m, 1H, H-29b), 3.03 (d, *J* = 16.7, 1H, H-1a), 2.45(d, *J* = 16.7, 1H, H-1b), 1.70 ( s, 3H, H- 30), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.28 (s, 3H, H-23), 1.11 (s, 3H, H-26), 1.00 (s, 3H, H-27), 0.81 (s, 6H, H- 25, H-28).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 159.94 (C-3), 150.99 (C-2), 150.93 (C-20), 142.43 (C-pz 1), 141.46 (C-pz 2), 109.61 (C-29), 53.15 (C-5), 48.81 (C-18), 48.77 (C-1), 48.37 (C-9), 48.11 (C-19), 43.20 (C-17), 43.06 (C-14), 40.85 (C-8), 40.13 (C-22), 39.65 (C-4), 38.32 (C-13), 36.93 (C-10), 35.67 (C-16), 33.44 (C-7), 31.66 (C-23), 30.03 (C-21), 27.61 (C-15), 25.30 (C-12), 24.20 (C-24), 21.64 (C-11), 20.28 (C-6), 19.52 (C-30), 18.19 (C-28), 16.28 (C-6), 15.75 (C-26), 14.69 (C-27).

EM (DART) *m/z* 461 [M + H]<sup>+</sup>

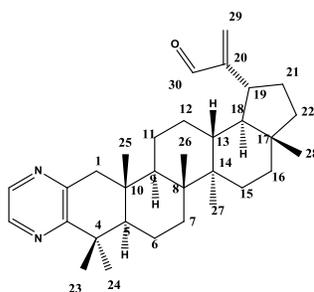
EMAR-ESI+ *m/z* 461.38876 [M + H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>: 461.38957)

## Reacción de **31** con SeO<sub>2</sub>. Obtención de **32**

En un vial de 10 mL con una disolución de **31** (53 mg, 0.115 mmol) en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se adicionaron EtOH (3 mL) y se calentó por 20 min a 150 °C en el reactor de microondas cuatro veces y en cada uno de ellas se adicionó SeO<sub>2</sub> (12.5 mg, 0.11 mmol).

El crudo de reacción se filtró a través de una columna de sílice. Se evaporó el disolvente y se obtuvo un residuo que se aisló mediante un cromatoplaaca analítica en un sistema de elución Hex-AcOEt 80:20. Se obtuvo el compuesto **32** (27 mg, 0.06 mmol; 51.4 %) como un sólido cristalino

### [2,3] pirazina de 30-oxo-lupenona (**32**)



R<sub>f</sub>: 0.25 (Hex-AcOEt 8:2). p. f. 142-144 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub>: 2928, 2856, 1688, 1619, 1458, 1403, 1381, 1262, 1137, 1107, 1009, 942, 872, 855 cm<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 9.54 (s, 1H, H-30), 8.43 (s, 1H, H- pz ), 8.26 ( s, 1H, H- pz ) , 6.31 (s, 1H, H-29b), 5.95 (s, 1H, H-29a), 3.06 (d, J = 16.7, 1H, H-1b), 2.45 (d, J=16.7, 1H, H-1a), 1.29 (s, 3H, H-23), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.09 (s, 3H, H-26) 0.98 (s, 3H, H-27), 0.84 (s, 3H, H-28), 0.80 (s, 3H, H-25).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.29 (C-30), 160.20(C-3), 157.13 (20), 150.70 (2), 142.56 y 141.06 (C-pz),133.45 (C-29), 53.10 (C-5), 48.61 (C-1, C-18), 48.52 (C-9), 43.45 (C-17), 42.93 (C-14), 40.79 (C-8), 40.04 ( C-22), 39.69 (C-4), 37.99 (C-13), 36.88 (C-10, C-19), 35.47 (C-16), 33.42 (C-7), 31.65 (C-23), 29.86 (C-21), 27.74 (C-12,C-15) 24.20 (C-24), 21.63 (C-11), 20.23 (C-6), 17.97 (C-28), 16.25 (C-25), 15.71 (C-26), 14.54 (C-27).

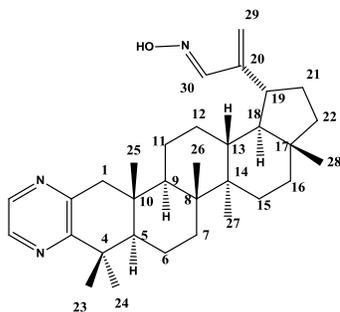
EM -DART  $m/z$  475  $[\text{M} + \text{H}]^+$

EMAR-ESI+  $m/z$  475.36951  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}$ : 475.36884)

### Reacción de **32** con $\text{NH}_2\text{OH}$ . Obtención de **33**

Una mezcla del **32** (40 mg, 0.084 mmol) y  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (25 mg, 0.36 mmol) en EtOH (2 mL) se calentó en el reactor de microondas a 90 °C por 5 min. Transcurrido el tiempo se añadieron 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y se realizó una extracción con AcOEt (5 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 5 mL de una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y luego 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evaporó el disolvente y el crudo se purificó por cromatoplaque preparativa con un sistema de elución Hex-AcOEt (8:2). Se obtuvo un sólido cristalino blanco **33** (37 mg, 0.075 mmol, 90 %)

### *Oxima de la [2,3] pirazina de 30-oxo-lupenona (**33**)*



R<sub>f</sub>: 0.25 (Hex-AcOEt 9:1). p.f. 238-240 °C.

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{max}}$ : 3581, 2959, 2867, 1689, 1524, 1475, 1454, 1431, 1404, 1382, 1195, 1139, 1108, 1012, 931, 909, 851.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz;  $\delta$ , ppm): 8.44 (s, 1H, H-pz ), 8.25(s, 1H, H-pz), 7.74 (s, 1H, H-30 ), 6.34 (s, 1H, H-29b), 5.15 (s, 1H, H-29b), 3.16 (dd,  $J = 16.7$  Hz, 1H, H-1b), 2.41 (d,  $J = 16.7$  Hz, 1H, H-1a), 2.73 (td,  $J = 11, 5.6$  Hz, H1, H-19), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.28 (s, 3H, H-23), 1.10 (s, 3H, H-26), 0.99 (s, 3H, H-27), 0.83 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-25).

RMN <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  160.75 (C-3), 153.15 (C-30), 150.54 (C-2), 149.48 (C-20), 142.73 (C-pz), 140.22 (C-pz), 118.34 (C-29), 53.06 (C-5), 49.06 (C-18), 48.62 (C-9), 47.82 (C-1), 43.16 (C-17), 43.06 (C-14), 40.85 C-8), 40.05 (C-19, C-22), 39.81 (C-4), 38.23 (C-13), 36.87 (C-10), 35.68 (C-16), 33.57 (C-7), 31.62 (C-23), 29.86 (C-21), 27.62 (C-12), 27.56 (C-15), 24.25 (C-24), 21.77 (C-11), 20.21 (C-6), 18.06 (C-28), 16.51 (C-25), 15.73 (C-26), 14.73 (C-27).

EM (DART)  $m/z$  490 [M + H]<sup>+</sup>

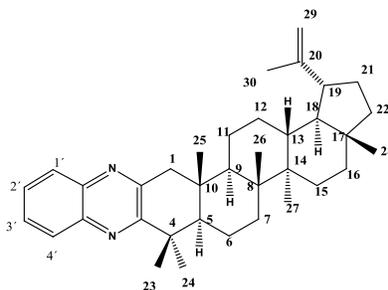
EMAR-ESI+  $m/z$  490.38057 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O: 490.37974)

#### Obtención de **34**

En un matraz se adicionó en condiciones de agitación constante lupenona (80 mg, 0.184 mmol) disueltos en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente se agregaron O-fenilendiamina (400 mg, 3.7 mmol), azufre (200 mg, 6.25 mmol) y 15 mL de morfolina.

La reacción se mantuvo en condiciones de reflujo por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 10 mL de H<sub>2</sub>O y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 10 mL de HCl 10% y luego con 10 mL de H<sub>2</sub>O, finalmente se adicionaron 10 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente, el residuo obtenido (95 mg) se aisló por cromatoplaaca analítica con un sistema de elución Hexano: AcOEt 9:1. Se obtuvo el compuesto **34** (59 mg, 0.115 mmol; 63 %) como un sólido blanco.

[2,3] Benzopirazina de la lupenona (**34**)



R<sub>f</sub>: 0.30 (Hex: AcOEt 9:1 X 2). p. f. 276-278 °C.

IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 2951, 2871, 1639, 1529, 1485, 1457, 1429, 1382, 1354, 1242, 1221, 1193, 1078, 923, 888, 850  $\text{cm}^{-1}$

RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.00 (m, 2H, Ar) 7.65 (m, 2H, Ar), 3.33 (d,  $J = 16.6$ , 1H, H-1b), 2.60 (d,  $J = 16.6$ , 1H, H-1a), 1.72 (s, 3H, H-30), 1.43 (s, 3H, H-23), 1.42 (s, 3H, H-24), 1.13 (s, 3H, H-26), 1.02 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.82 (s, 3H, H-28).

RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 161.35 (C-3), 152.36 (C-2), 150.88 (C-20), 142.32 y 140.65 (C-pz), 129.06, 128.94, 128.74, 128.02 (C-Ar), 109.65 (C-29), 53.64 (C-5), 49.78 (C-1), 48.64 (C-18), 48.38 (C-9), 48.12 (C-19), 43.22 (C-17), 43.11 (C-14), 40.89 (C-8), 40.59 (C-4), 40.14 (C-22), 38.34 (C-13), 37.23 (C-10), 35.69 (C-16), 33.47 (C-7), 32.30 (C-23), 30.07 (C-21), 27.63 (C-15), 25.33 (C-12, C-24), 21.69 (C-11), 20.54 (C-6), 19.55 (C-30), 18.20 (C-28), 16.40 (C-25), 15.77 (C-26), 14.72 (C-27).

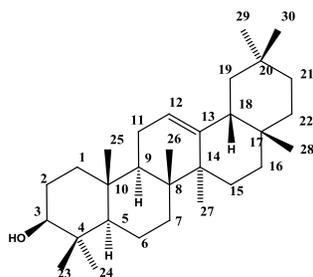
EM-DART  $m/z$  511  $[\text{M} + \text{H}]^+$

EMAR-ESI+  $m/z$  551.40444  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_2$ : 551.40522)

## Hidrólisis de **22**. Obtención de $\beta$ -Amirina **24**.

En un matraz bola, disuelto en la mínima cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y en condiciones de agitación constante se adicionó palmitato del  $\beta$ -amirilo (200.3 mg, 0.301 mmol) y se agregó una solución de KOH-MeOH 10% (10 mL). Transcurrido el tiempo de reacción de 24 h, al crudo resultante se le adicionó  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL): la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl y se secó con  $\text{NaSO}_4$ . La separación del compuesto **24** se llevó a cabo en columna (2.5 cm de diámetro) con una suspensión de gel de sílice (10 g) en Hex-AcOEt (80:20), obteniéndose (185 mg, 0.434 mmol, 85 %), como un sólido cristalino. el cual por cromatografía en capa fina se comparó con una muestra estándar de  $\beta$ -amirina obtenida anteriormente nuestro grupo de investigación. Rf: 0.5 Hex-AcOEt (80:20).

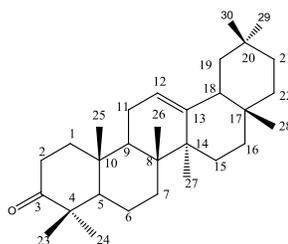
### *$\beta$ -amirina (24)*



## Oxidación **24** con PCC. Obtención de **26**.

A una solución de  $\beta$ -amirina (185.5 mg, 0.434 mmol) en de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (10 mL) se añadió clorocromato de piridinio (PCC) (400 mg, 1.85 mmol), la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en condiciones de agitación constante por 6 h. Posteriormente el crudo de reacción se filtró a través de una columna de sílice, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna abierta con Hex-AcOEt (98:02). Se obtuvieron **26** como un sólido cristalino (147 mg, 0.347 mmol, 80 %).

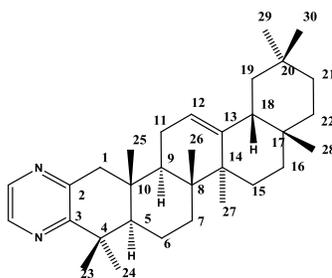
*β*-amirona (**26**)



Obtención de **35**

En un matraz se adicionó en condiciones de agitación constante *β*-amirona (76 mg, 0.179 mmol) disuelta en la mínima cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, posteriormente se agregó azufre (250 mg, 7.83 mmol), etilendiamina (1.5 mL, 25 mmol) y finalmente morfolina (15 mL). La reacción se mantuvo en condiciones de reflujo por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 10 mL de H<sub>2</sub>O y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 10 mL de HCl 10% y luego con 10 mL de H<sub>2</sub>O, finalmente se adicionaron 10 mL de una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se evaporó el disolvente y el crudo se purificó por cromatografía en placa analítica Hex-AcOEt (9:1). Se obtuvo **35** como un sólido cristalino blanco (37.1 mg, 0.08 mmol, 44 %).

[2,3]pirazina de la *β*-amirona (**35**).



R<sub>f</sub>: 0.45 (Hex-AcOEt 9 X 2). p.f. 142-144 °C

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$ : cm<sup>-1</sup> 2953, 2928, 2857, 1681, 1590, 1558, 1455, 1433, 1403, 1382, 1361, 1195, 1183, 1165, 1105, 1015, 853.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.43 (m, 1H, H-pz), 8.28 (d,  $J = 2.48$ , 1H, H-pz), 5.27 (t,  $J = 3.54$ , 1H, H-12) 3.01 (d,  $J=16.6$ , 1H, H-1b), 2.53 (d, 1H, H1), 1.33 (s,  $J = 16.6$ , 3H,H-24), 1.32 (s, 3H, H-23), 1.19 (s, 3H, H-27), 1.06 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-25), 0.88 (s, 6H, H29-30), 0.86 (s, 3H, H-28).

RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  160.08 (C-3), 150.77 (C-2), 145.23 (C-13), 142.51 (C-pz), 141.32 (C-pz), 121.81 (C-12), 53.16 (C-5), 48.45 (C-1), 47.52 (C-9), 46.94 (C-19), 45.88 (C-18), 42.10 (C-14), 39.86 (C-8), 39.62 (C-4), 37.28 (C-22), 36.68 (C-10), 34.90 (C-21), 33.48 (C-29), 32.71 (C-17), 32.14 (C-7), 31.84 (C-23), 31.27 (C-20), 28.61 (C-28), 27.14 (C-16), 26.26 (C-15), 25.96 (C-27), 24.40 (C-24), 23.83 (C-30), 23.66 (C-11), 20.36 (C-6), 16.66 (C-26), 15.81 (25).

EM -DART  $m/z$  461 [M + H]<sup>+</sup>

EMAR-ESI +  $m/z$  461.38861 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>: 461.38957)

## 9. REFERENCIAS

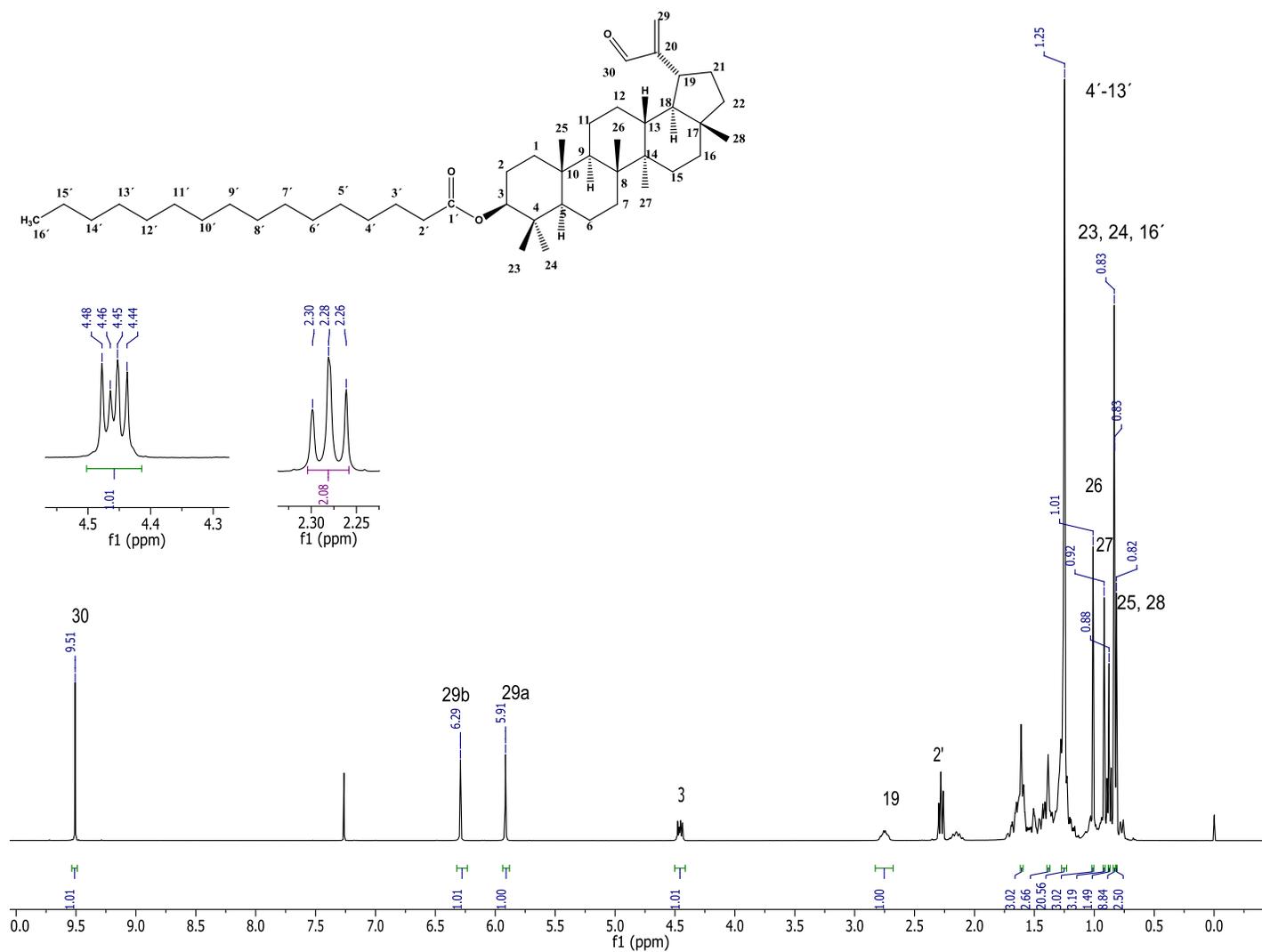
1. Mantovani, A.; Allavena, P. *Nature*, **2008**, *454*, 436–444.
2. INEGI [Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática]. Estadísticas a propósito del día mundial contra el Cáncer. **2015**. Boletín consultado el 7 de agosto del 2015.
3. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Marine Drugs*. **2014**, *12*, 255–278.
4. Cragg, G. M. *Med. Res. Rev.* **1998**, *185*, 315–331.
5. Cragg G. M.; Newman, D. J. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72–79.
6. Eiró, N. *World J Gastrointest Surg.* **2012**, *4*, 62-72.
7. Cocco, G., Chu, D. C. C.; Pandolfi, S. *Clin. Kidney. J.* **2010**, *21*, 503–508.
8. Phillipson, J. D. *Phytochemistry*. **2007**, *68*, 2960–2972.
9. Flessner, T.; Jautelat, R.; Scholz, U.; Winterfeldt, E. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **2004**, *87*, 1-80
10. Pettit, G. R.; Inue, M.; Kamano, Y.; Herald D.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, J. M.; Schmidt, J. M.; Doubek, D.; Krupa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2006-2007.
11. Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 812–821.
12. Pettit, G. R.; Tan, R.; Xu, J-P.; Ichihara, Y.; Williams, M.; Boyd, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 955–958.
13. Pettit, G. R.; Xu, J-P.; Schmidt, J. M.; Boyd, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2027–2032 .
14. Pettit, G. R.; Xu, J.-P.; Chapuis, J.-C.; Melody, N. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*,1446-1450.
15. Moser, B. R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 487–491.
16. Kim, S.; Sutton, S. C.; Guo, C.; LaCour, T. G.; Fuchs, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2056–2070

17. LaCour, T. G.; Guo, C.; Ma, S.; Jeong, J. U.; Boyd, M. R.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Fuchs, P.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2587–2592.
18. Kanduluru, A. K.; Banerjee, P.; Beutler, J.; Fuchs, P. L. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9085–9092.
19. Wani, M. C.; Taylor, H. L., Wall.; Coggon, P.; McPhail A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (9), 2325–2327.
20. Rudy, A.; López-Antón, N.; Dirsch, V. M.; Vollmar, A. M. T. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 482–486.
21. LaCour, T. G.; Guo, C.; Bhandaru, S.; Boyd, M. R.; Fuchs, P. L. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 692–707.
22. Fortner, K. C.; Kato, D.; Tanaka, Y.; Shair, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *120*, 275–280.
23. Nahar, L.; Sarker, S. *Steroid Dimers: Chemistry and Applications in Drug Design and Delivery*, First Edition. John Wiley & Sons, 2012.
24. Droegemueller, M.; Flessner, T.; Jautelat, R.; Scholz, U. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *3*, 2811–2831.
25. Smith, S. C.; Heathcock, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6380–6382 .
26. Kramer, A.; Ullmann, U.; Winterfeldt, E. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, *1*, 2865–2867.
27. Das, M. C.; Mahato, S. B. *Phytochemistry.* **1983**, *22*, 1071–1095
28. Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M-C.; Steingroewer, C. H.; Bleyb, T.; Neuhaus, E.; Mirata, M. A.; Ulber, R. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1–15.
29. Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O’Maille, P.; Osbourn, A. T. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, *65*, 225–257.

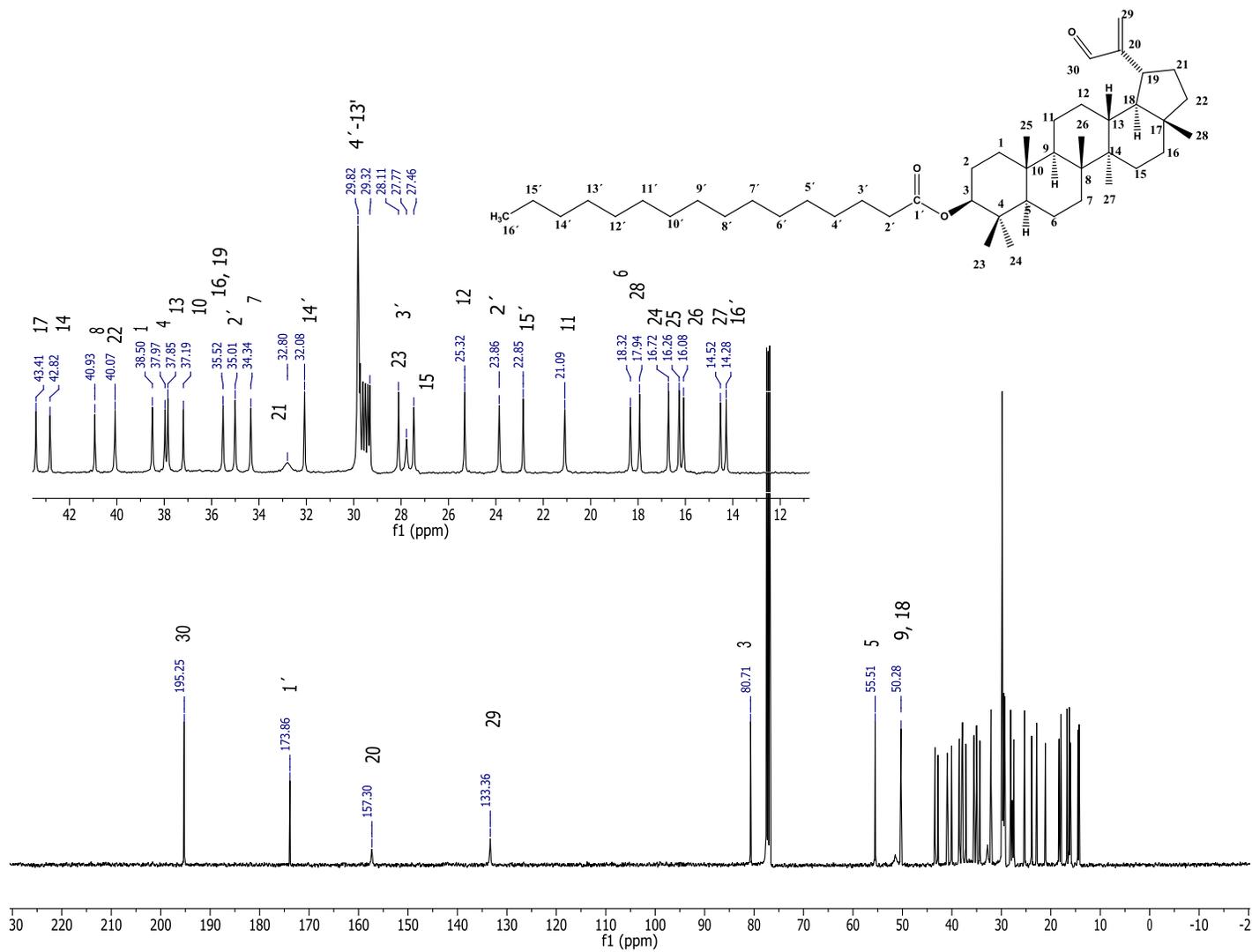
30. Patočka, J. *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7–12.
31. Khan, M. F.; Maurya, K. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2674–2679.
32. Volkman, J. K. *Org. Geochem.* **2005**, *36*, 139–159.
33. Chaturvedi, P. K.; Bhui, K.; Shukla, Y. *Cancer Lett.* **2008**, *263*, 1–13.
34. Yan, X. J.; Gong, L-H.; Zheng, F-Y.; Cheng, K-J. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 482–488.
35. Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394–411.
36. Zhang, D-M.; Xu H-G.; Wang, L.; Li, Y-J.; Sun P-H.; Wu, X-M.; Wang, G-J.; Chen, W-M.; Ye, W-C. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 1127-1155.
37. Molnár, J.; Gyémánt N.; Tanaka, M.; Hohmann, J.; Bergmann-Leiner, E-; Molnár, P.; Deli, J.; Didiziapetris, R.; Ferreira, J. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 287–311.
38. Honda, T.; Liby, K.T.; Su, X.; Sundararajan, C.; Honda, Y.; Suh, N.; Rinsingsong,R.; Williams, C.; Royce, D.; Gribblea, G.W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6306–6309.
39. Jachak, M.; Gautam, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *29*, 767–820.
40. Saleem, M. *Cancer Lett.* **2009**, *285*, 109–115.
41. Gallo, M. B. C.; Sarachine, M. J. *J Pharm Biomed Sci.* **2009**, *1*, 46-66.
42. Geetha, T.; Varalakshmi, P. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 77–80.
43. Fernández, M.; De las Heras, B.; García, M. D.; Sáenz, M. T.; Villar, A., *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1533–1539 .
44. Menea, F.; Badole, S. L.; Menea, B.; Menea, A. Anti-Inflammatory Benefits of Pentacyclic Triterpenes. Bioactive Food as Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Elsevier Inc, **2013**

45. Vázquez, L.; Palazon, J.; Navarro.-Ocaña, A. Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. Dr Venketeshwer Rao. **2012**.
46. Wu, C.-R.; Hseu, Y-C.; Lien, J-C.; Lin, L-W.; Lin, Y-T.; Ching, H. *Molecules*. **2010**, *16*, 1–15.
47. Lin, K.-W.; Huang, A-M.; Tu, H-Y.; Lee, L-Y.; Changwu, C.; Hour, T-C.; Yang, S-C.; Pu, Y-S.; Lin, C-N. *J. Agric. Food. Chem.* **2011**, *59*, 407–414.
48. Holanda Pinto, S. A.; Cunha, M. A.; Chaves, .H.; Santos, F. A.; Rao, V, S. *Inflammopharmacology*. **2008**, *16*, 48–52.
49. Barrios, E. V. Estudio químico de *Sapium nitidum* en búsqueda de sustancias bioactivas (citotóxicas y anti-inflamatorias), 2014. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana.
50. Warpehoski, M. A.; Chabaud, B.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2897–2900 .
51. Bhandari, P.; Patel, N. K.; Bhutani, K. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3596–3599.
52. Priebbenow, D. L.; Bolm, C. *Chemical Society Reviews*. **2013**, *42*, 7870-4880.
53. Brown, E. V. *Synthesis*, **1975**, *6*, 358-375.
54. Sejbal, J. Klinot, J.; Protativa, J.; Vystrčil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1986**, *51*, 118-127
55. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Hose, C.; Langley J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goddrich, A.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.

## 10. ANEXO

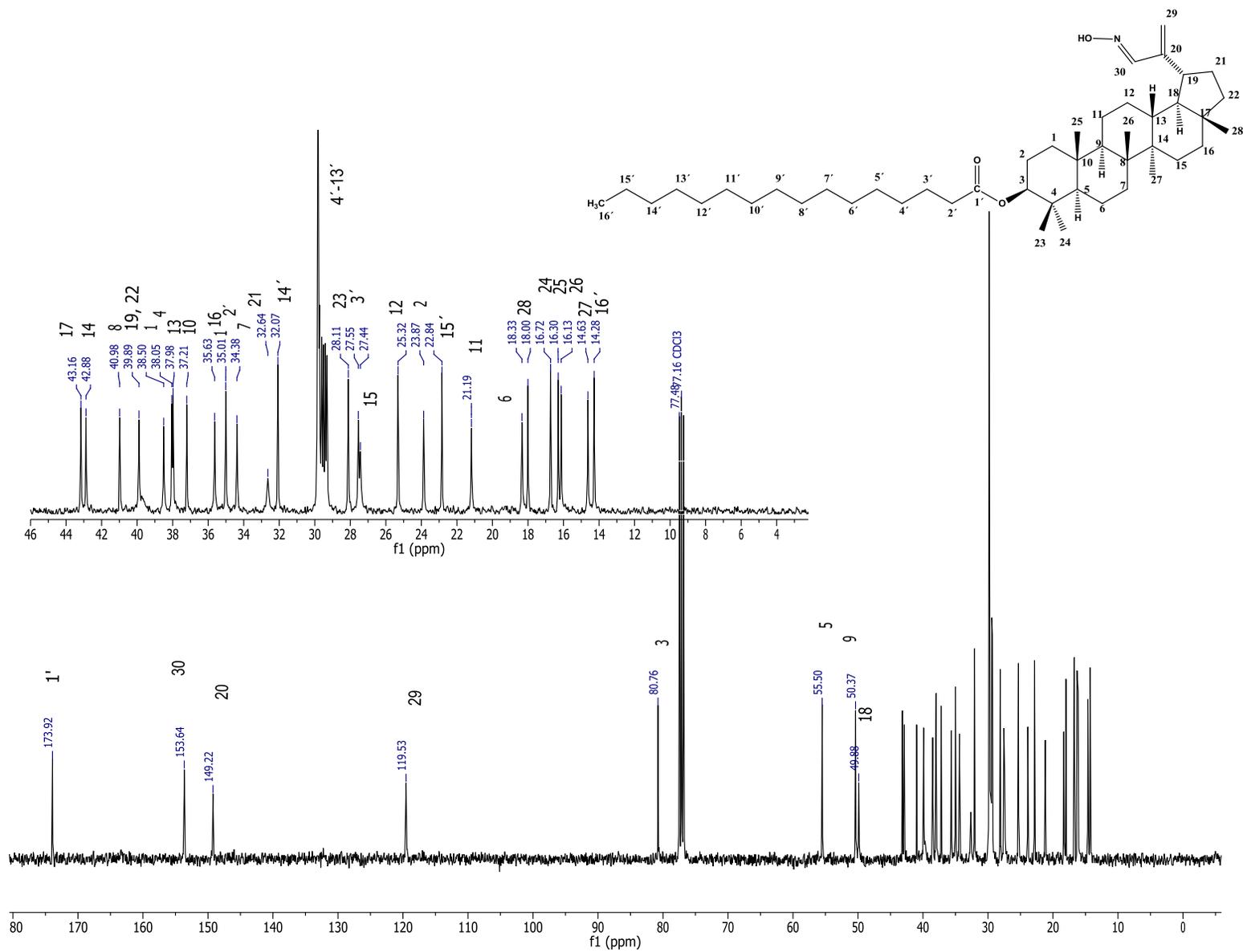


**Espectro 1. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 27**

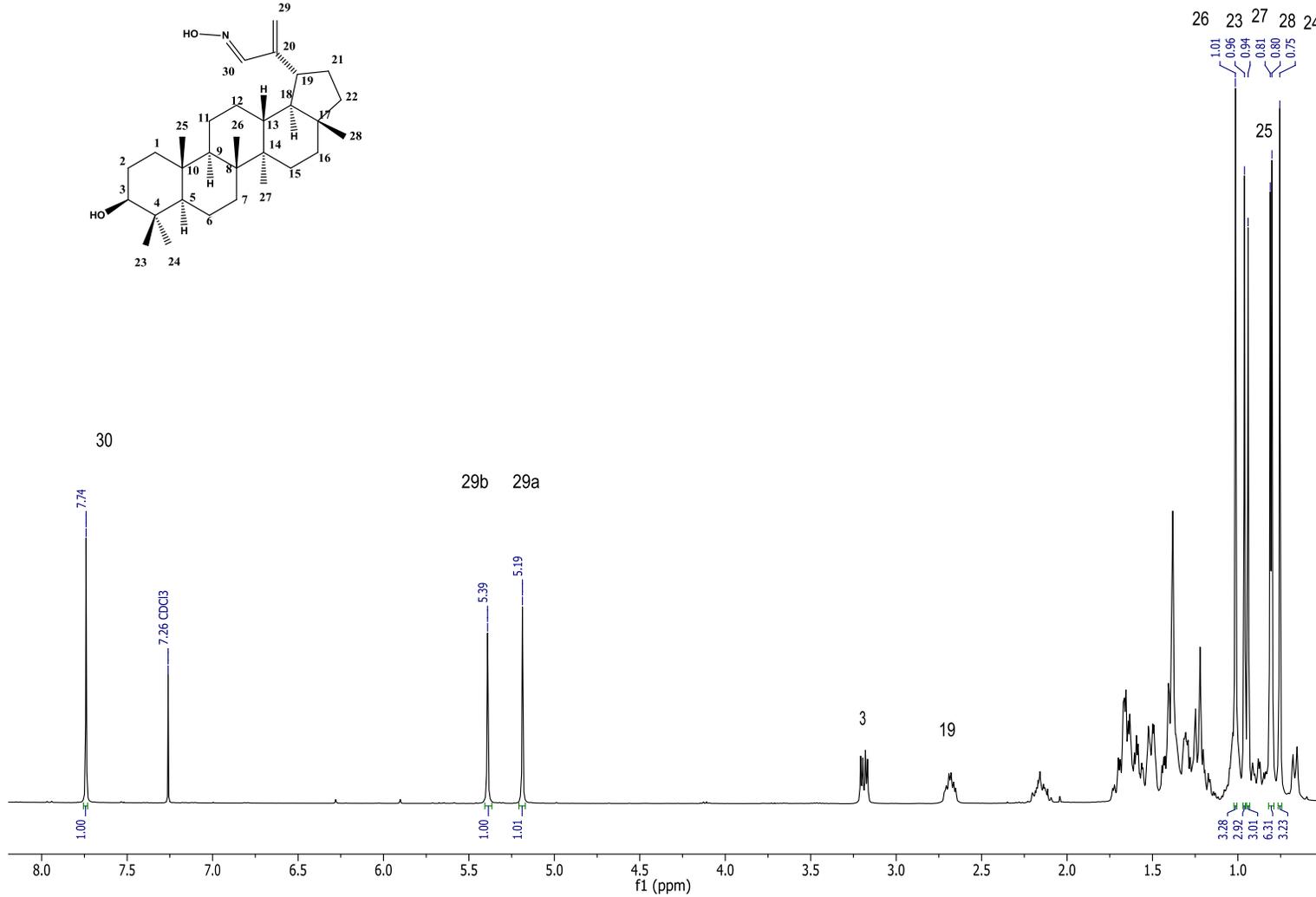
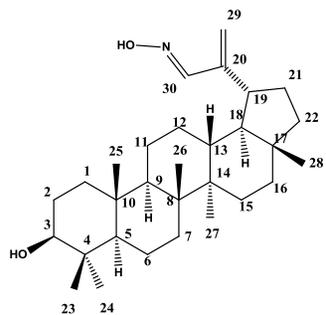


**Espectro 2. RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 27**

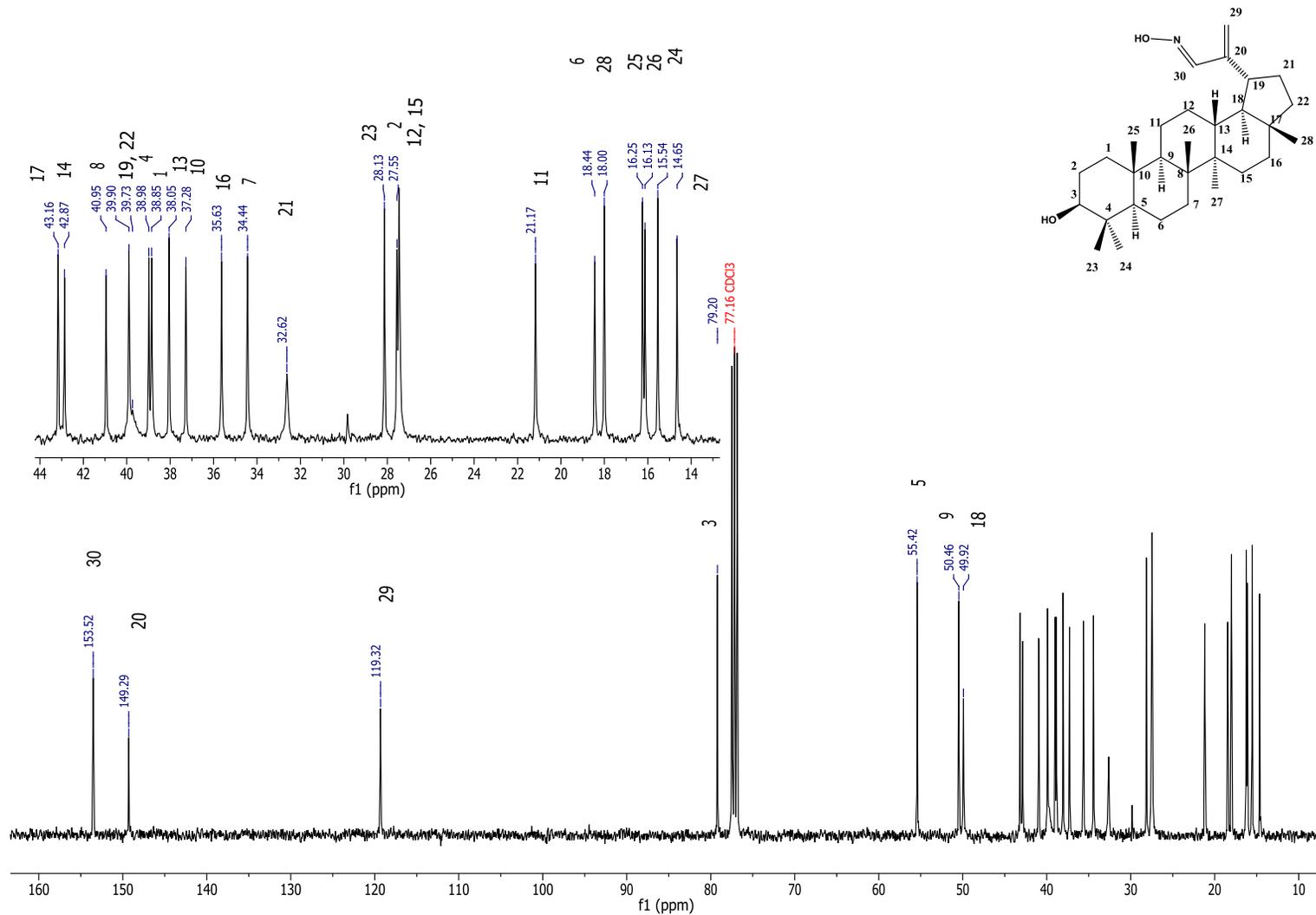




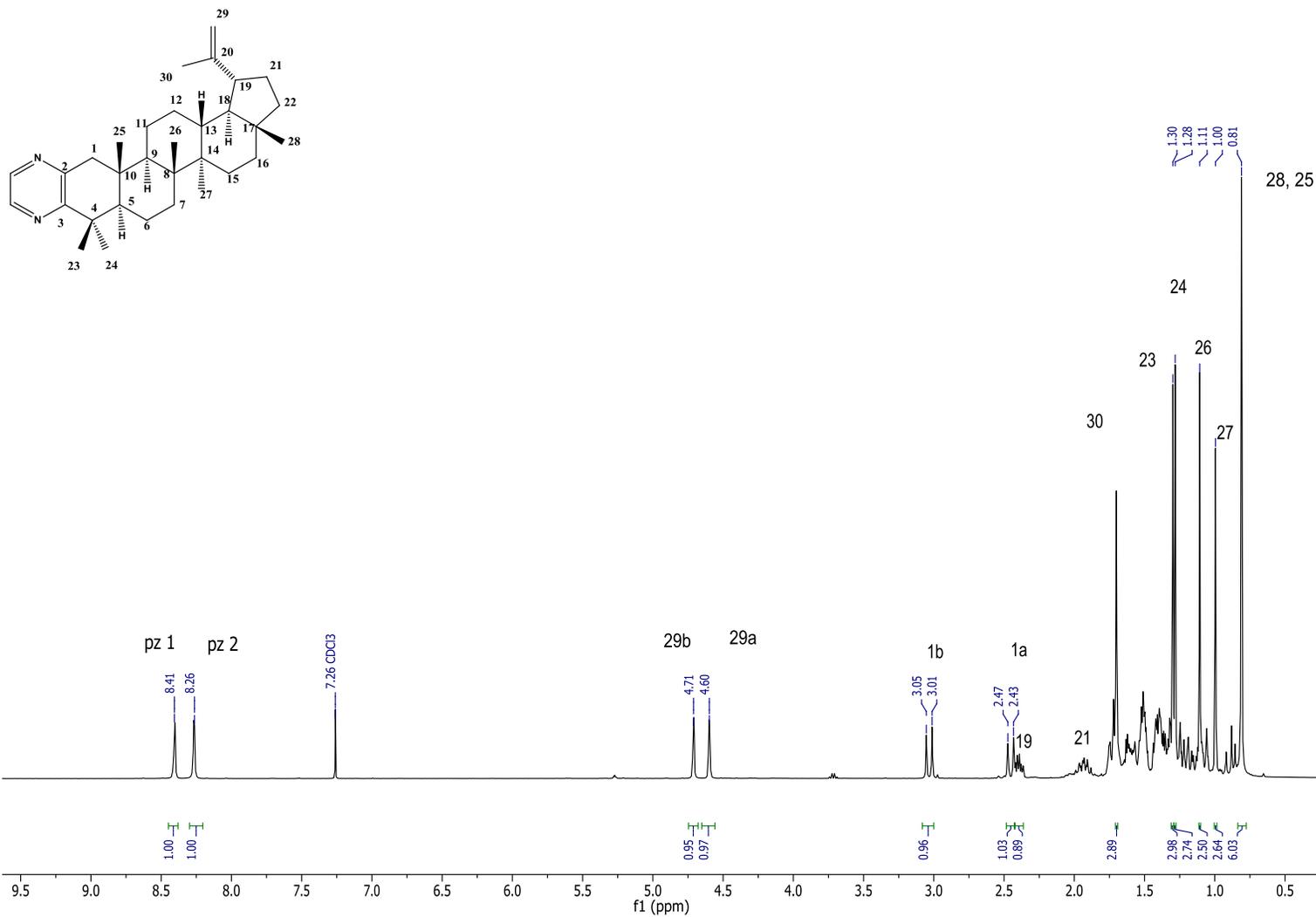
**Espectro 4. RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 28**



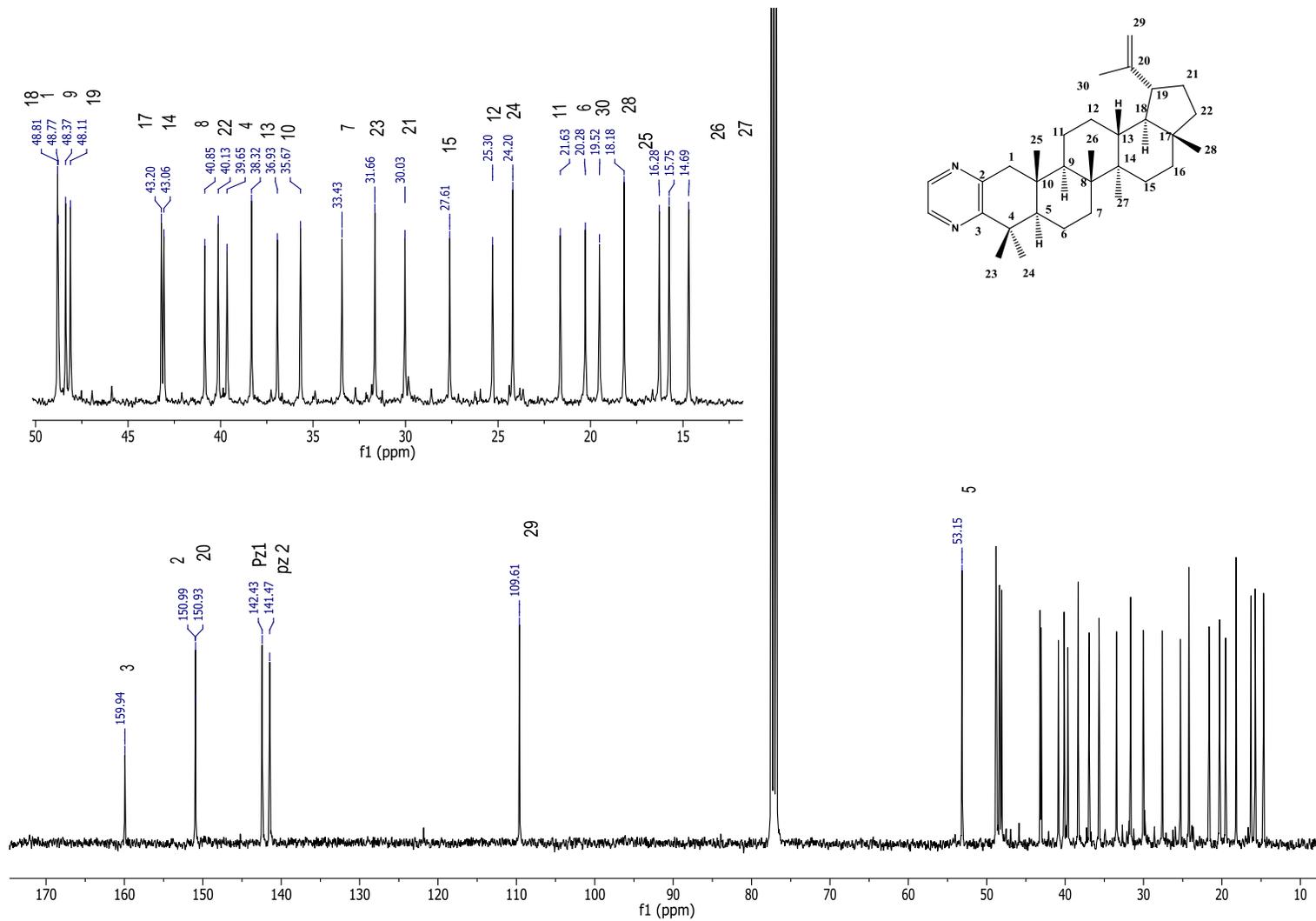
**Espectro 5. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 29**



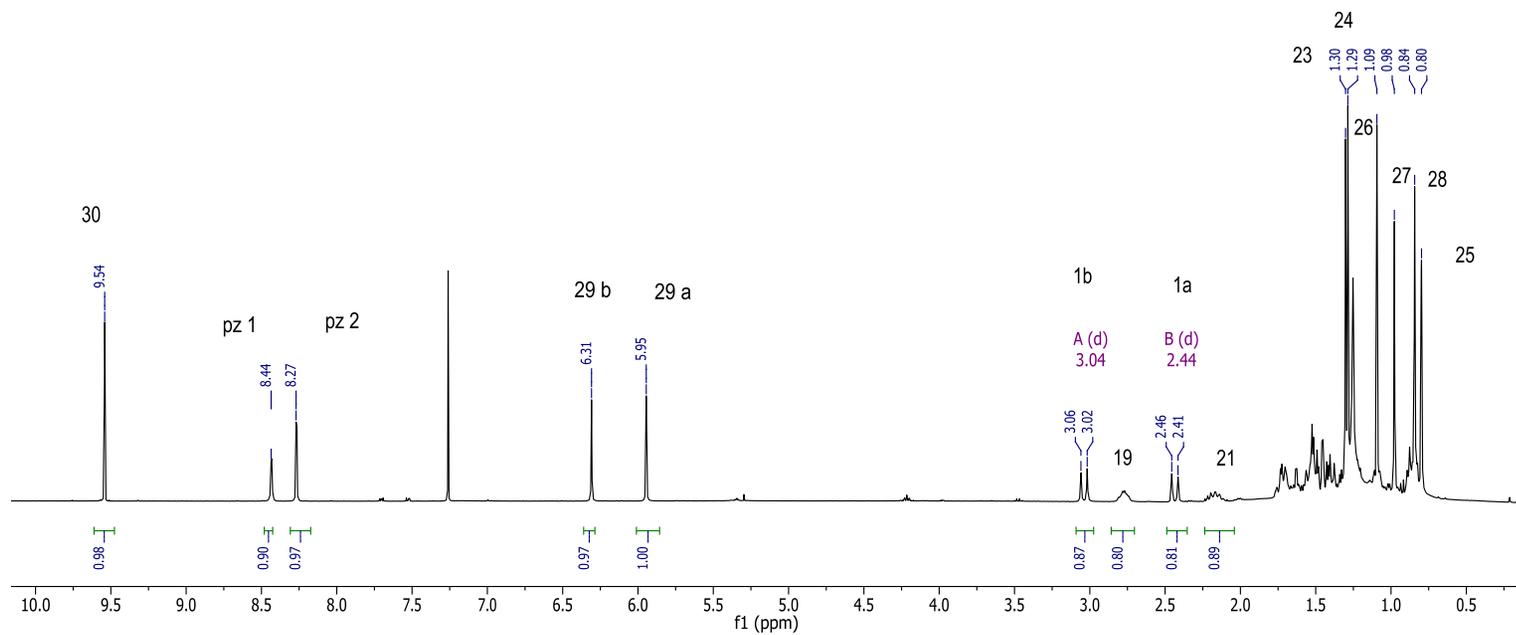
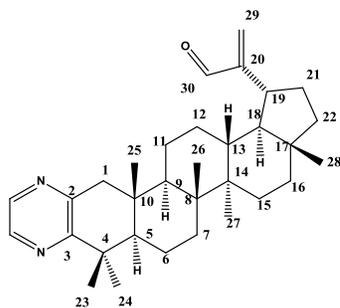
**Espectro 6. RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 29.**



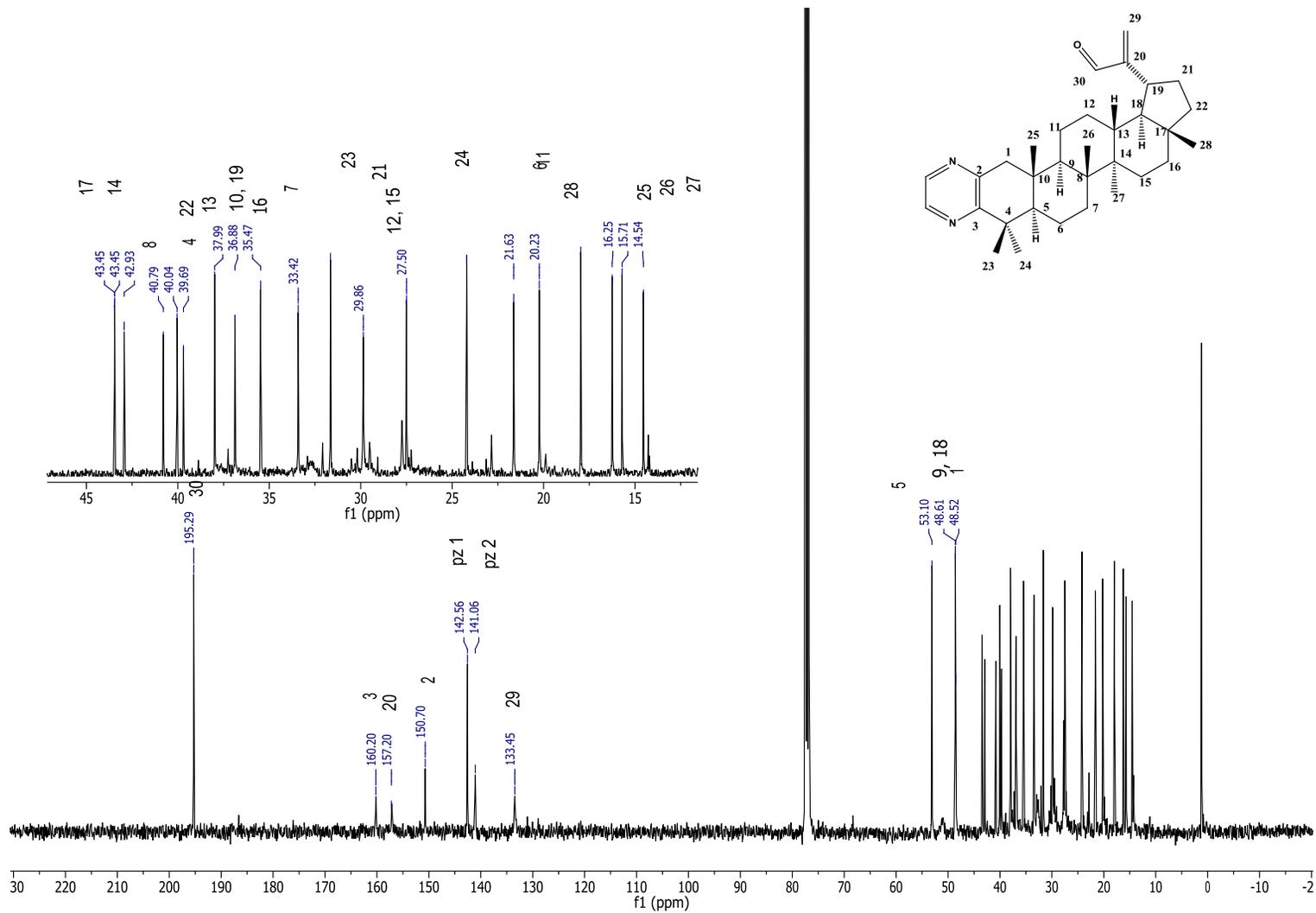
**Espectro 7. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 31**



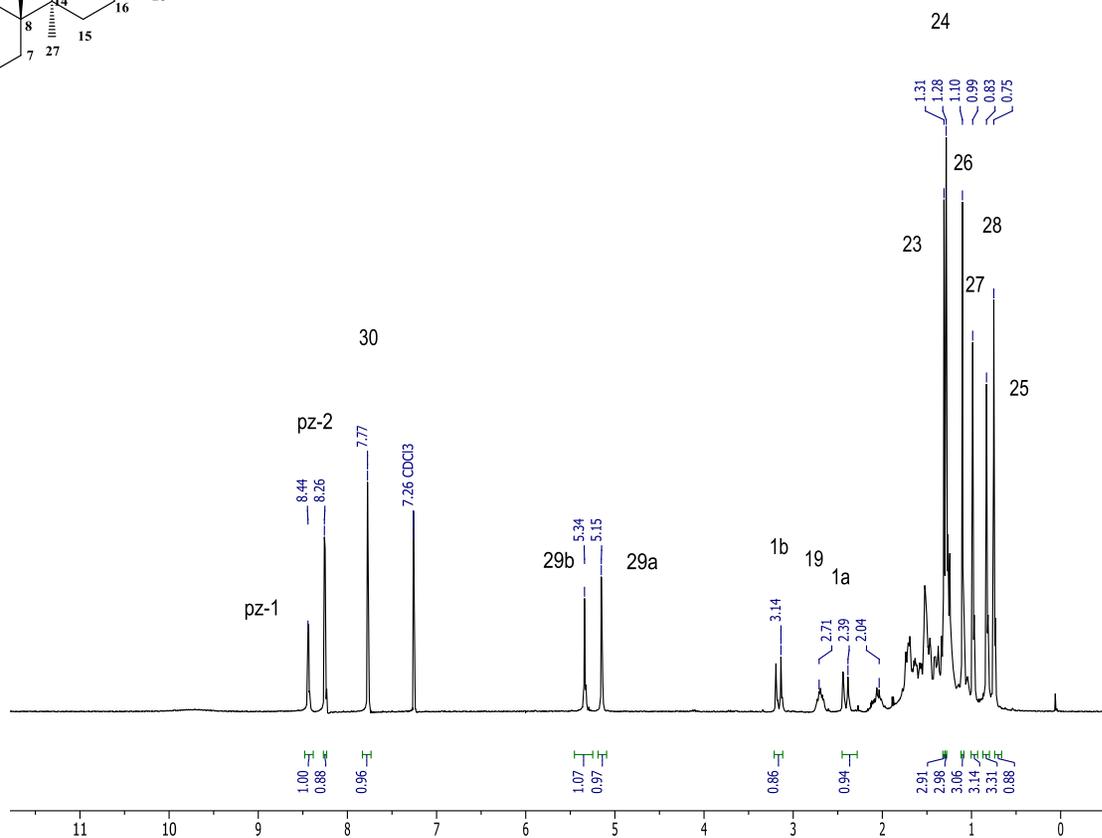
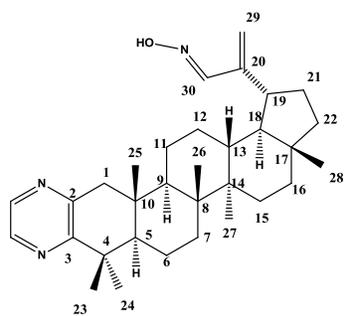
**Espetro 8.** RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 31



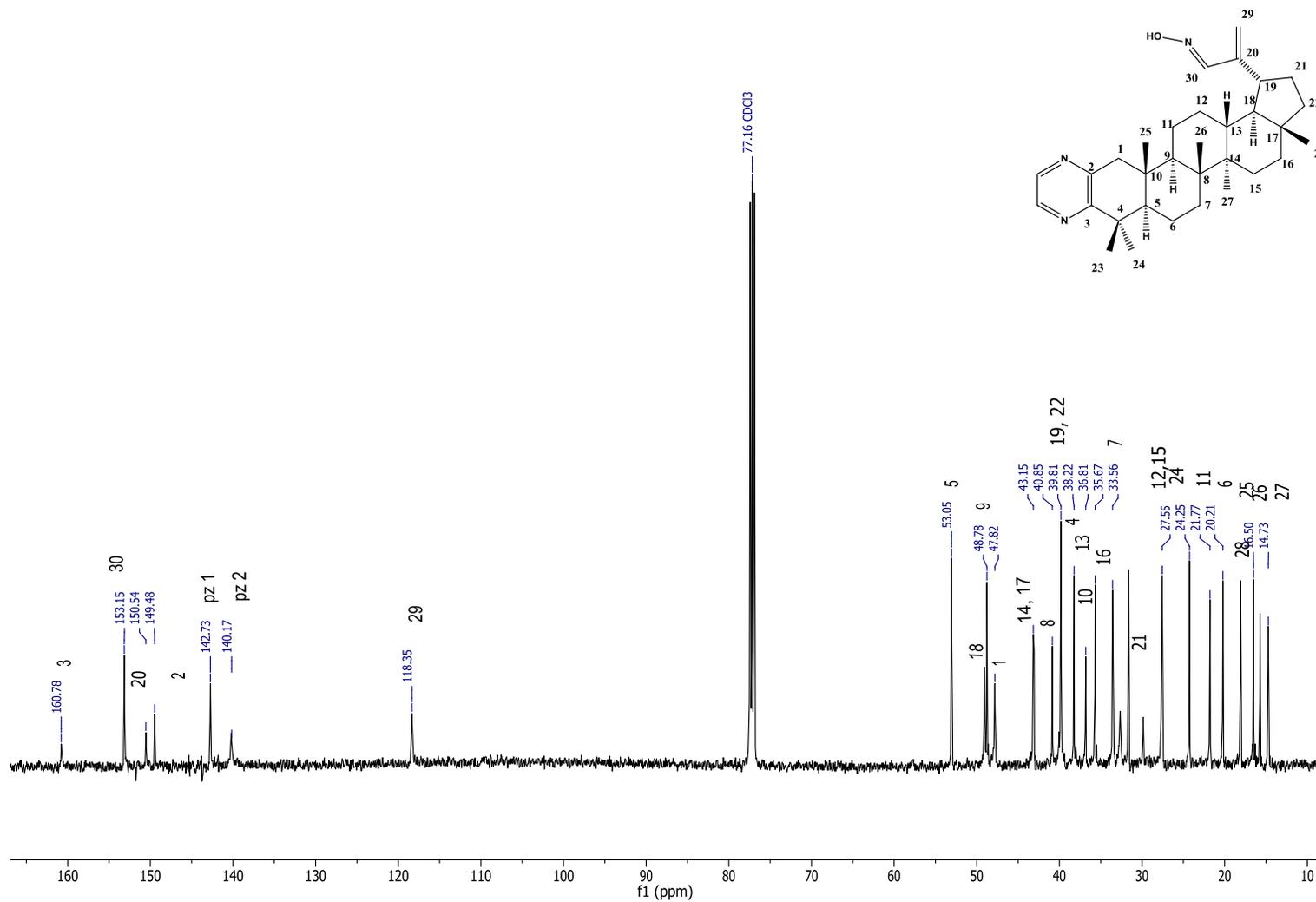
**Espectro 9. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 32**



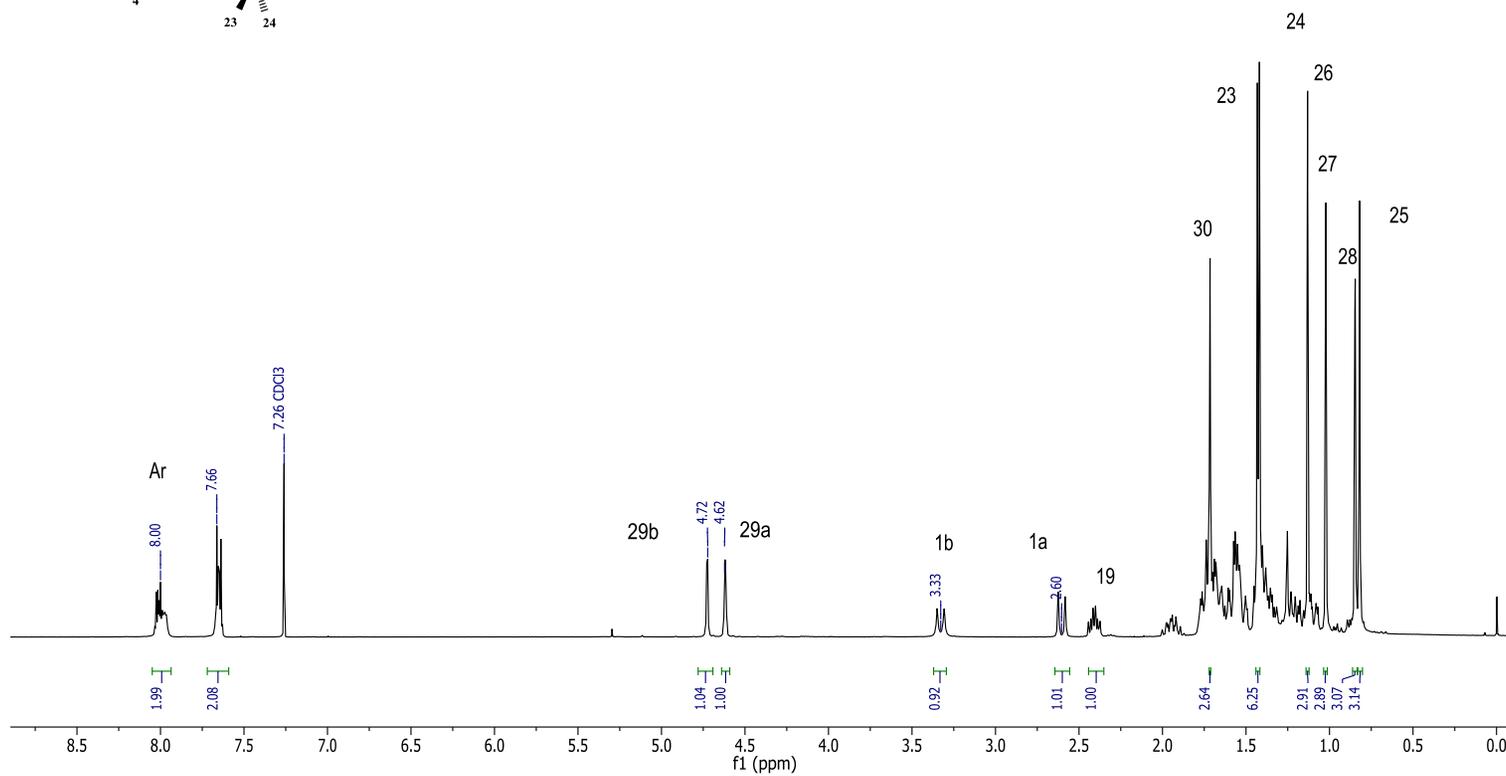
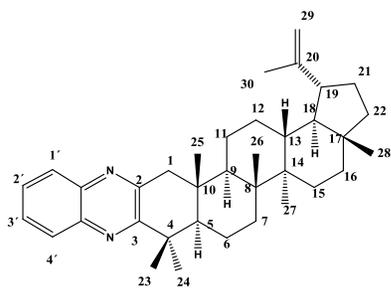
**Espectro 10.** RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **32**



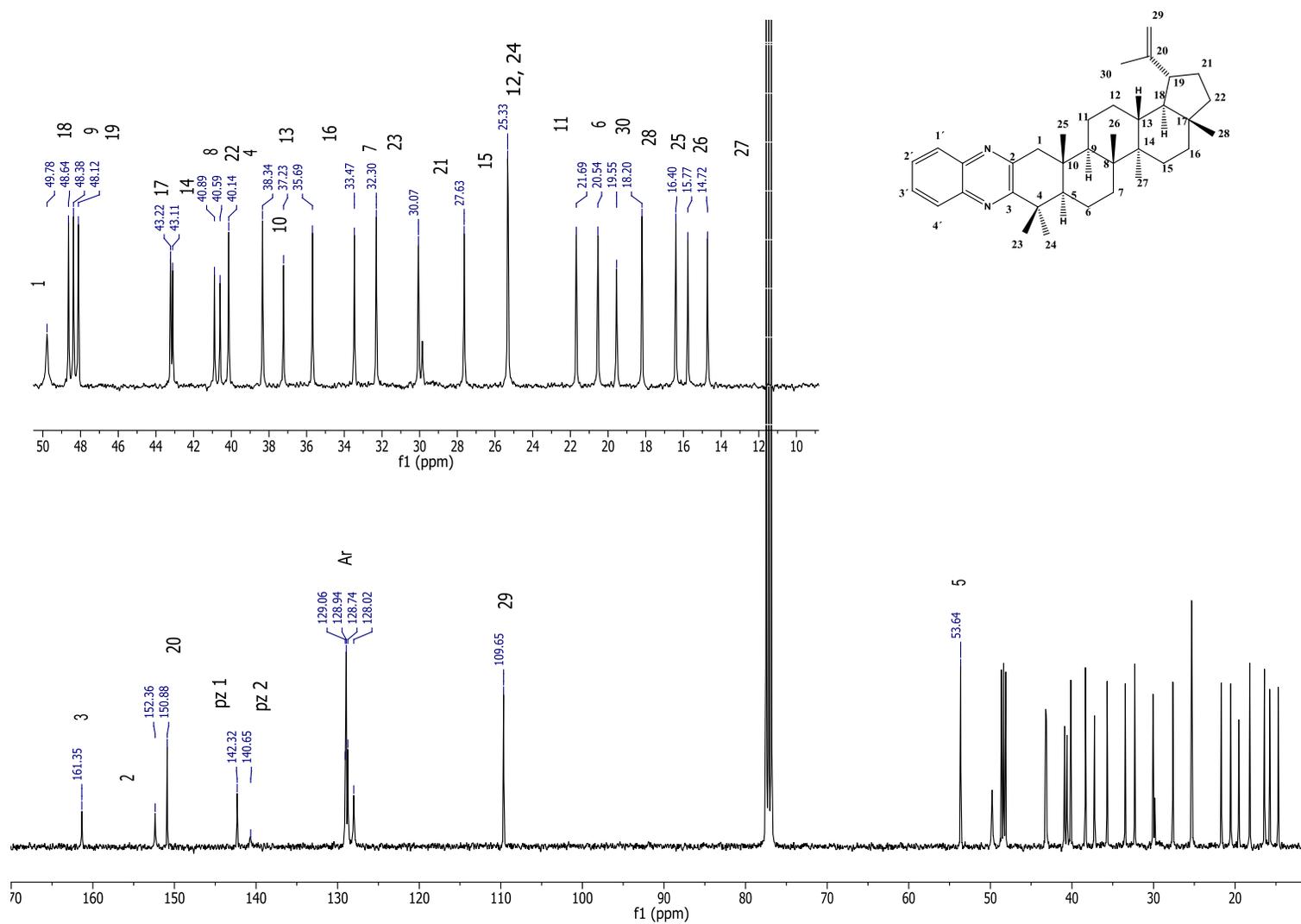
**Espectro 11.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **33**



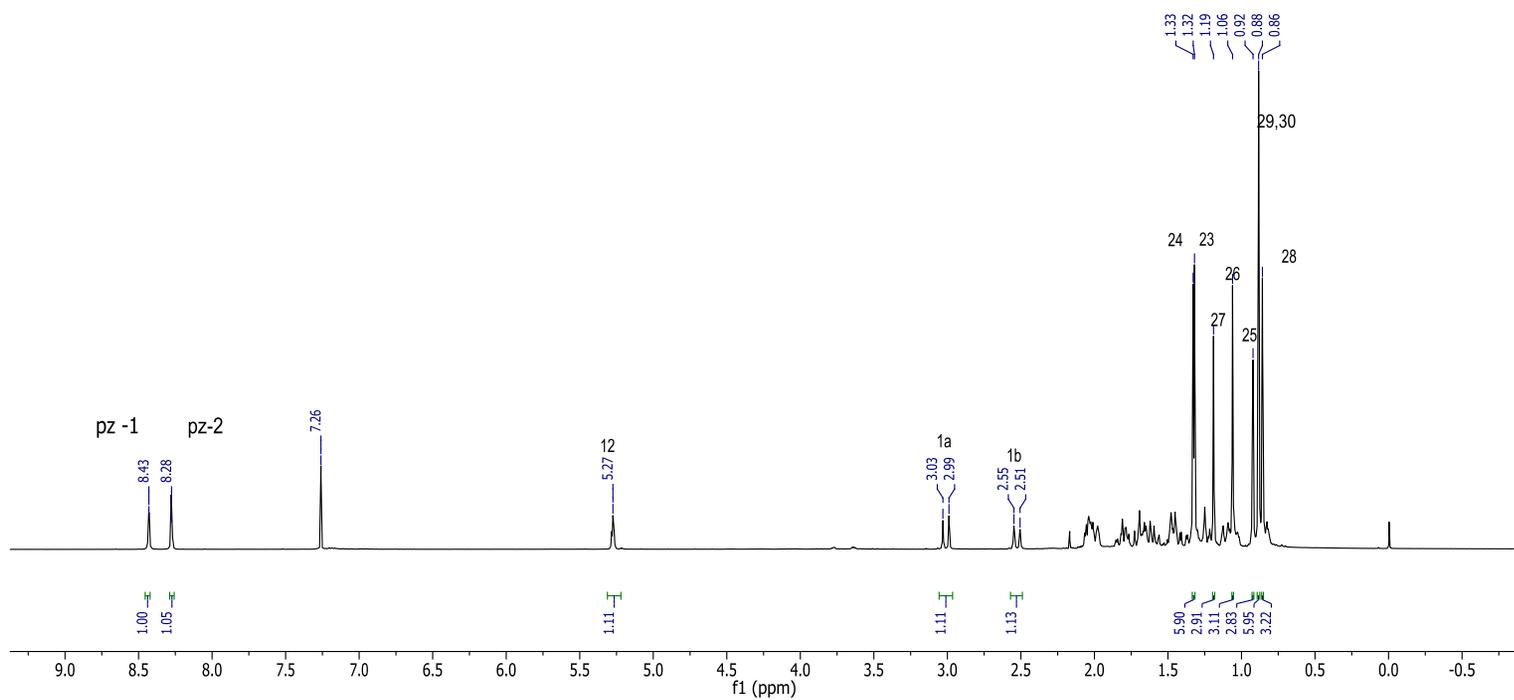
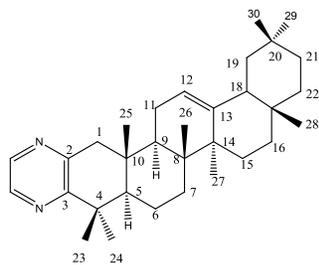
**Espectro 12. RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 33**



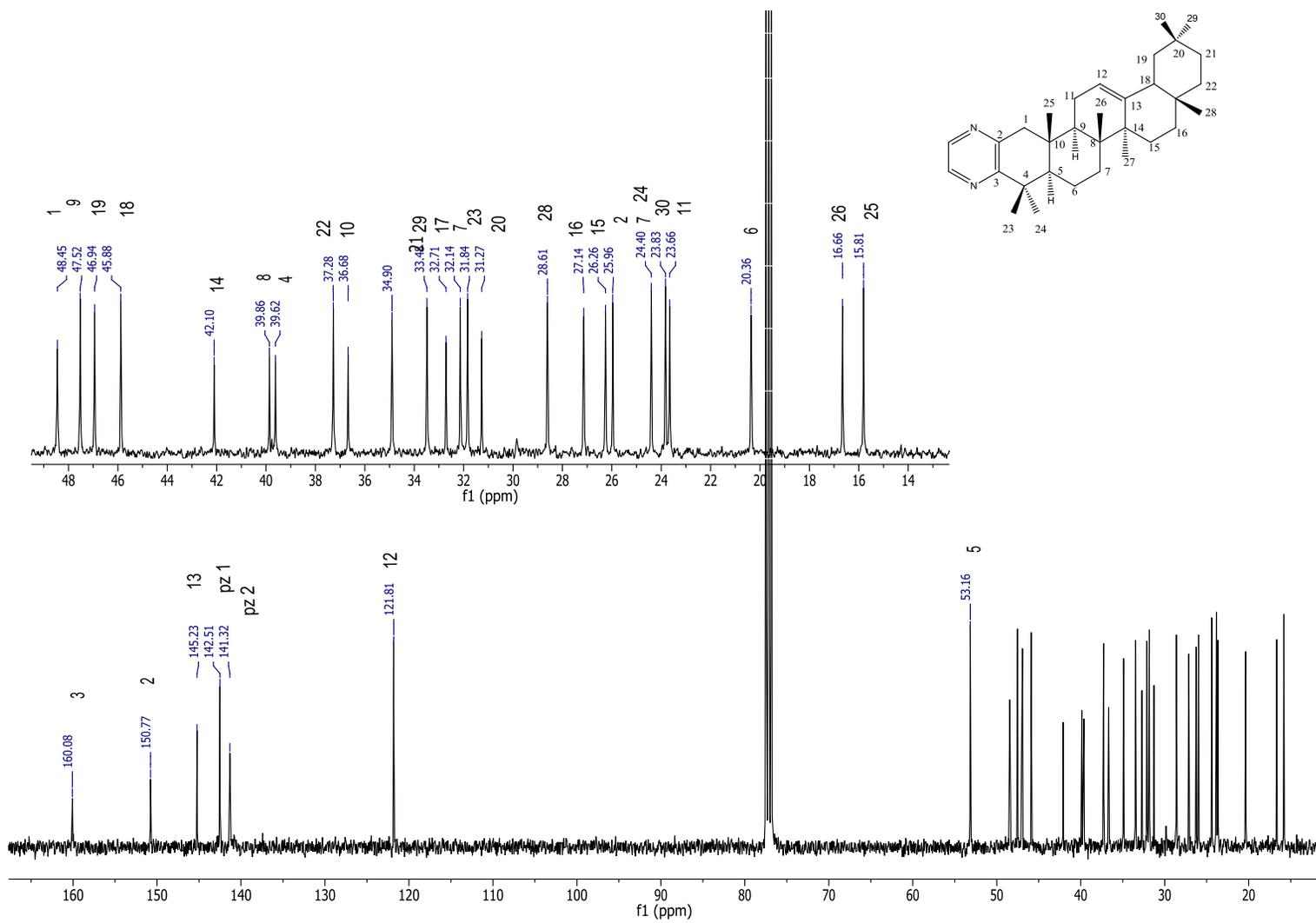
**Espectro 13.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **34**



**Espectro 14. RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 34**



**Espectro 15.** RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **35**



**Espectro 16. RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 35**