



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES CITOTÓXICAS Y
ANTIINFLAMATORIAS DE LOS ÉSTERES BENCÍLICOS DE LOS
ÁCIDOS MASTICADIENÓNICO (AMD) Y 3A-
HIDROXIMASTICADIENÓNICO (3A) AISLADOS DE
AMPHIPTERYGIUM ADSTRINGENS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

NOEMI SILVA JIMÉNEZ

ASESORES: Dr. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

Dr. VÍCTOR ALBERTO CASTRO TORRES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MATA ESSAYAG RACHEL

VOCAL: Profesor: LARA NUÑEZ AURORA

SECRETARIO: Profesor: MARTINEZ VÁZQUEZ MARIANO

1er. SUPLENTE: Profesor: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA

2° SUPLENTE: Profesor: DOMÍNGUEZ ROMERO ALLAN NOE

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 1-4 DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ Y LA ASESORÍA TÉCNICA DEL DR. VÍCTOR ALBERTO CASTRO TORRES.

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

DR. VÍCTOR ALBERTO CASTRO TORRES

SUSTENTANTE

NOEMI SILVA JIMÉNEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de su alumnado desde el nivel bachillerato, dándome la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

A la Facultad de Química, mi alma mater, por enfrentarme a grandes cambios, aprendizajes y experiencias que el día de hoy me permiten definir la profesional que soy.

Al Instituto de Química, por permitirme ser parte de su alumnado y por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por toda la asesoría brindada para este proyecto y porque desde hace 7 años me permitió formar parte de su grupo de trabajo, compartiéndome toda su experiencia y sabiduría. Además de impulsarme cada día a enfrentarme a nuevos retos. Muchas gracias Dr.

Al Dr. Víctor Alberto Castro Torres, por su invaluable asesoría y capacitación que sin lugar a duda, fueron parte fundamental de mi formación profesional a lo largo de todo el tiempo que hemos trabajado en equipo.

Al Dr. José Salud Rodríguez Zavala, por todo el apoyo brindado en este trabajo.

A la Dra. Lidia Díaz Sánchez, por todo su apoyo y asesoría en este proyecto.

A los Maestros en Ciencias, Simón Hernández Ortega, Ma. Teresa Ramírez Apan y Antonio Nieto Camacho, por su extraordinario apoyo, enseñanzas y colaboración en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi madre, Noemí Jiménez Ávila, por todo su esfuerzo, cariño y apoyo incondicional brindados en cada momento. Gracias por darme una formación excepcional, por ser padre y madre a la vez, por ser mi ejemplo y motor en todo lo que hago. Este logro es tuyo.

A mi abuela, Margarita Ávila Roldán, por todo su cariño, cuidado y sus enseñanzas. Gracias por cuidarme tanto, y ser para mí como una segunda madre. Eres una de las razones que tengo para superarme, y sin todo tu apoyo, no lo hubiese logrado.

A mi abuelo, Demetrio Jiménez Castro (*in memoriam*), por todo tu cariño y cuidado. Gracias por ser un padre para mi hermano y para mí.

A Gustavo y Dominic, por su apoyo incondicional y por ser parte muy importante en mi vida.

A mis tíos: Mirna, Javier, y a mi prima Haydee, que siempre me han apoyado y han creído en mí.

A mi familia, Jiménez Ávila, por siempre estar presentes.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 1-4:

A los Dres. Víctor Castro Torres y Javier Porras Ramírez, por su amistad e invaluable apoyo, por las enseñanzas, las risas y lágrimas compartidas. Sin ustedes, mi paso por la Facultad no hubiese sido lo mismo.

A Atzin, David, Erik, Mónica, por su compañía y amistad en las tardes de café y las pláticas, siempre acompañaron mis días de Facultad y mi trabajo en el laboratorio.

A mis profesores de la Facultad: Blanca Bonilla, Ricardo Gutiérrez, por todas sus enseñanzas y apoyo, y de quienes hoy en día tengo la fortuna de llamar amigos.

A Jessica Ivette Márquez, por representar la gran oportunidad de entrar a la industria cosmética. Quien además de ser mi jefa, es una gran amiga que me enseñó no sólo las maravillas del mundo olfativo, sino también de valorarme.

A mis alumnas, Mía y Leslie, que me han permitido compartir con ustedes nuevos conocimientos y experiencias, que me retan constantemente.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Definición del cáncer	1
1.2. Epidemiología del cáncer	2
1.3. Etiología del cáncer	5
1.4. Quimioterapia del cáncer	7
1.5. Productos naturales contra el cáncer	13
1.6. Cuachalalate	15
2. Antecedentes	17
3. Planteamiento del problema	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivo	25
5.1. Objetivos particulares	25
6. Metodología	26
6.1. Materiales	26
6.2. Procedimiento experimental	28
7. Resultados	34
8. Análisis de Resultados	47
9. Conclusiones	76
10. Referencias	77
Anexo	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de casos de diferentes tipos de cáncer en el mundo.

Figura 2. Estadísticas de los tipos de cáncer de mayor prevalencia en hombres de todas las edades.

Figura 3. Vía intrínseca de inflamación asociada con cáncer.

Figura 4. Estructura química de la Bendamustina.

Figura 5. Estructura química de la armustina y de la lomustina.

Figura 6. Estructura química del 5-fluoracilo

Figura 7. Estructura química de algunos antibióticos contra el cáncer (Mitomicina C).

Figura 8. Estructura química de la Prednisona.

Figura 9. Estructura química del híbrido entre la vinorelbina y la podofilotoxina

Figura 10. *Amphipterygium adstringens* (árbol del cuachalalate).

Figura 11. Estructura química de los ácidos masticadenónico (**AMD**) y el ácido 3 α -hidroximasticadenónico (**3 α**).

Figura 12. Vía de señalización de la enzima Akt.

Figura 13. Determinación de la inhibición de la enzima Akt mediante la técnica de Western Blot.

Figura 14. Estructuras utilizadas en el análisis de acoplamiento molecular (docking).

Figura 15. Estructura de la unión en el sitio activo **AKT1** humana con el inhibidor **espiroindolina** (control positivo en el análisis de docking).

Figura 16. Resultados del análisis de acoplamiento molecular con **AKT1** (primer sitio de unión de Akt).

Figura 17. Estructura de la unión del inhibidor **G98** en el sitio activo **AKT2** humana (control positivo en el análisis de docking).

Figura 18. Resultados del análisis de acoplamiento molecular con **AKT2** (segundo sitio de unión de Akt).

Figura 19. Estructuras de los metabolitos aislados del extracto de AcOEt de la corteza de *A. adstringens*. A la izquierda el ácido 3 α -hidroximasticadenónico (**3 α**) y a la derecha el ácido masticadenónico (**AMD**).

Figura 20. Síntesis de los ésteres masticadienato de metilo (**AMD-1**) y 3 α -hidroximasticadienato de metilo (**3 α -1**).

Figura 21. Síntesis de ésteres masticadienato e hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo y masticadienato de 2,6-diclorobencilo a partir de 3 α y AMD. (**Compuestos AMD-2 y AMD-3, y 3 α -2 y 3 α -3**).

Figura 22. Prueba de inhibición de edema inducido por **TPA**.

Figura 23. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**)

Figura 24. Ácido masticadienónico (**AMD**)

Figura 25. 3 α -hidroximasticadienato de metilo (**compuesto 3 α -1**)

Figura 26. Masticadienato de metilo (**compuesto AMD-1**)

Figura 27. 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (**compuesto 3 α -2**)

Figura 28. 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto 3 α -3**)

Figura 29. Masticadienato de *p*-bromobencilo (**compuesto AMD-2**)

Figura 30. Masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto AMD-3**)

Figura 31. Estructura del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto 3 α -3**).

Figura 32. Estructura del Masticadienato de *p*-bromobencilo (**compuesto AMD-2**)

Figura 33. Espectro de RMN-¹H (500 MHz CDCl₃) del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. (**3 α**).

Figura 34. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del ácido masticadienónico. (**AMD**).

Figura 35. Espectro de RMN-¹³C (126 MHz CDCl₃) del ácido 3α-hidroxi-masticadienónico. (**3α**).

Figura 36. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del ácido masticadienónico (**AMD**).

Figura 37. Espectro de Infrarrojo (IR) del ácido 3α-hidroxi-masticadienónico. (**3α**)

Figura 38. Espectro de Infrarrojo (IR) del ácido masticadienónico. (**AMD**)

Figura 39. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención del masticadienato de metilo (**AMD-1**) y del 3α-hidroxi-masticadienato de metilo (**3α-1**).

Figura 40. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

Figura 41. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

Figura 42. Espectro de RMN-HMBC (CDCl₃) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

Figura 43. Espectro de RMN-¹H (300 MHz CDCl₃) del 3α-hidroxi-masticadienato de metilo. (**3α-1**).

Figura 44. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz CDCl₃) del 3α-hidroxi-masticadienato de metilo. (**3α-1**).

Figura 45. Espectro de RMN-HMBC (CDCl₃) del 3α-hidroxi-masticadienato de metilo. (**3α-1**).

Figura 46. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los ésteres bencílicos (compuestos **AMD-1**, **AMD-2**, **3α-1**, **3α-2**).

Figura 47. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo. (**AMD-2**).

Figura 48. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo. (**AMD-2**).

Figura 49. Espectro de RMN-HSQC (CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

Figura 50. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

Figura 51. Espectro de RMN-HMBC (CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

Figura 52. Correlaciones RMN HMBC del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

Figura 53. Estructura determinada mediante cristalografía de rayos X del compuesto **AMD-2**

Figura 54. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**3 α -3**).

Figura 55. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**3 α -3**).

Figura 56. Espectro de RMN HSQC (CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

Figura 57. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

Figura 58. Espectro de RMN HMBC (CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

Figura 59. Estructura determinada mediante cristalografía de rayos X del compuesto **3 α -3**.

Figura 60. Estéreo estructura de **AMD** determinada por difracción de rayos X.

Figura 61. Estereo estructura de **ADM-1** determinada por difracción de rayos X.

Figura 62. Estéreo estructura de **AMD-2** determinada por difracción de rayos X.

Figura 63. Estéreo estructura de **AMD-3** determinada por difracción de rayos X

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Tasa de defunciones por tumor maligno indicadas por género y edad.

Tabla 2. Factores carcinogénicos y sus carcinomas asociados.

Tabla 3. Ejemplos de fármacos en la terapia dirigida.

Tabla 4. Principales fármacos dirigidos aprobados por la FDA o en diferentes fases de evaluación

Tabla 5. Principales metabolitos secundarios y algunos de sus derivados utilizados en la clínica contra el cáncer.

Tabla 6. Parámetros obtenidos del análisis de acoplamiento molecular de los compuestos propuestos con AKT y sus sitios activos.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas para el análisis de HPLC-UV de los compuestos sintetizados.

Tabla 8. Condiciones de administración tópica para la prueba de Edema inducido por TPA.

Tabla 9. Datos cristalográficos (**compuestos 3 α -3 y AMD-2**).

Tabla 10. Datos de inhibición de crecimiento celular de todos los compuestos.

Tabla 11. Datos de IC₅₀ de todos los compuestos en la línea celular de cáncer de próstata.

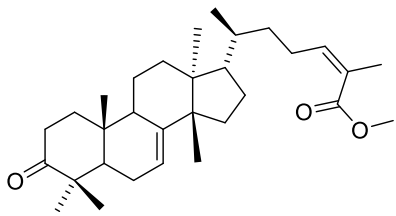
Tabla 12. Datos de porcentaje de inhibición de edema de todos los compuestos.

Gráfica 1. Resultados de inhibición de crecimiento celular para células de diferentes tipos de cáncer

Gráfica 2. Actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en la línea celular PC-3.

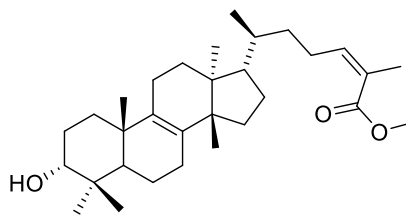
Gráfica 3. Resultados de actividad antiinflamatoria por inhibición de edema.

ÍNDICE DE COMPUESTOS SINTETIZADOS



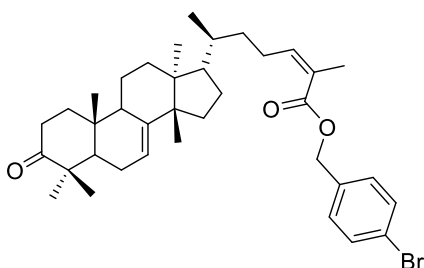
Masticadienato de metilo

AMD-1



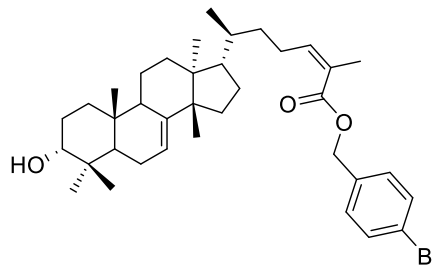
3α-hidroximasticadienato de metilo

3α-1



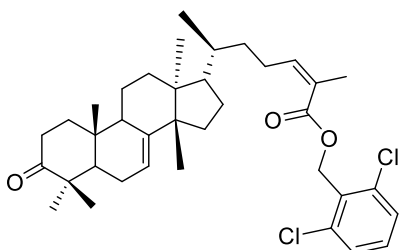
Masticadienato de p-bromobencilo

AMD-2



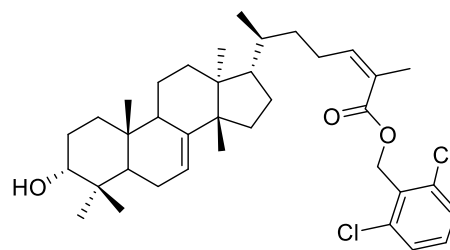
3α-hidroximasticadienato de p-bromobencilo

3α-2



Masticadienato de 2,6-diclorobencilo

AMD-3



3α-hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo

3α-3

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muertes en el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, los tipos de cáncer que más se manifiestan en la población son los de mama, pulmón, colon y próstata. En nuestro país, el cáncer de próstata es uno de los de mayor prevalencia en hombres. A su vez, se ha observado que ciertos tipos de cáncer de próstata pueden generar resistencia farmacológica al tratamiento inicial de tipo hormonal. De igual forma, se conoce que la presencia de un ambiente inflamatorio, favorece la diseminación de células cancerosas. Recientemente se ha informado la síntesis y evaluación de la actividad citotóxica de ésteres bencílicos derivados de diversos triterpenos de origen natural. Los resultados indicaron que los ésteres mostraron mayor actividad citotóxica que sus precursores. Por lo anterior y con el objetivo de encontrar nuevas moléculas que puedan mejorar la actividad anticancerígena de sus precursores, el presente trabajo describe la síntesis de derivados de tipo ésteres bencílicos de los ácidos masticadienónico (**AMD**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**). Estos compuestos fueron evaluados en su actividad citotóxica y antiinflamatoria. Siendo los ésteres metílicos de ambos ácidos, los de mayor actividad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de Cáncer

Se define al cáncer como una enfermedad caracterizada por el crecimiento incontrolado de células anormales con mecanismos alterados de supervivencia y diferenciación; las cuales pueden diseminarse a diferentes partes del cuerpo humano e invadir distintos órganos y tejidos. Esta enfermedad se puede desarrollar en cualquier parte del organismo y se clasificará según el lugar corporal donde se haya originado. [1]

Este crecimiento celular descontrolado se define como “tumor”. El tumor o neoplasia, se define como la masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o evaden los mecanismos de muerte celular. Los tumores se pueden clasificar en benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos).

Los tumores benignos, aunque pueden desarrollar masas celulares importantes, no se diseminan y tampoco invaden los tejidos de otras partes del cuerpo. Por otro lado, los tumores cancerosos (tumores malignos) se diseminan a los tejidos cercanos, e incluso pueden trasladarse por la sangre o la linfa a otras partes del cuerpo, y formar tumores (proceso conocido como metástasis). Hay muchos tipos de cáncer que forman tumores sólidos. No obstante, los cánceres de la sangre, como la leucemia, en general no forman tumores sólidos.

Por lo anterior, cáncer o tumor canceroso es aquella masa celular con crecimiento descontrolado que presenta metástasis, a diferencia de un tumor benigno que no la presenta. [1]

Las células que componen a los tumores cancerosos se les denomina “células cancerosas”, y se caracterizan por presentar mutaciones en los genes que controlan el ciclo celular. Esto conduce a la persistencia de señales de crecimiento, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción a angiogénesis, evasión del sistema inmunológico, promoción de un ambiente inflamatorio, entre otras [2].

Ya sea por la interrupción en la eliminación de células defectuosas, o por un desequilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación, las mutaciones dentro de estos procesos impulsan la modificación de las proteínas y sus vías de señalización asociadas, dando como resultado la generación de tumores. A medida que aumenta la proliferación celular, también hay cambios metabólicos asociados que resultan en una mayor absorción de glucosa y producción de lactato, los cuales promueven aún más el crecimiento tumoral [3].

En la actualidad, se conoce que los tumores cancerosos no solo están constituidos por células cancerosas, sino que en estas masas celulares participan varios tipos de células, entre ellas sobresalen: los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) [4] y macrófagos asociados al cáncer (TAM). Estas células desarrollan un papel importante en el desarrollo de los tumores, la modulación de la angiogénesis, supresión inmunológica y metástasis [5].

Las etapas iniciales del cáncer son las más indicadas para tratar de erradicar el proceso tumoral. Desafortunadamente, muchas veces la detección temprana del tumor no se realiza, y en consecuencia, muchos pacientes presentan tumores con crecimientos importantes.

1.2. Epidemiología del Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muertes en el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en 2020 se registraron alrededor de 10 millones de defunciones por esta razón. Los tipos de cáncer que más se manifiestan en la población son los de mama, pulmón, colon y próstata; siendo el cáncer de pulmón el que presenta un mayor número de casos. [6]

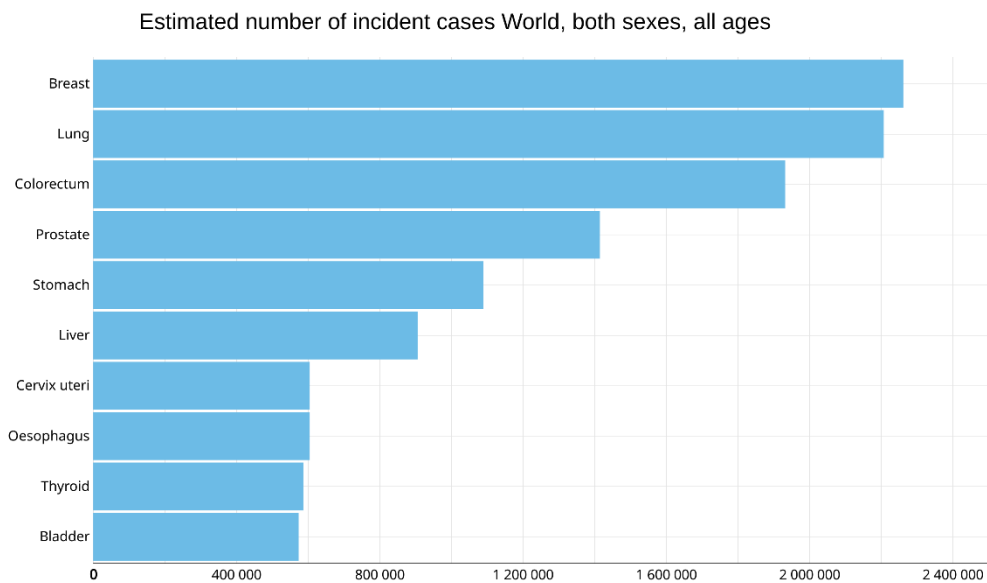


Figura 1. Incidencia de casos de diferentes tipos de cáncer en el mundo. Adaptada [6].

El cáncer de próstata es el más frecuente entre los hombres, después del cáncer de pulmón. Se estima que en 2020 a nivel internacional, 1,414,259 personas fueron diagnosticadas con cáncer de próstata. Aproximadamente el 70% de los casos se encuentran en los países desarrollados [7] (Figura 2). Mientras que en la región de América Latina, se registran 413,000 nuevos casos y 85,000 muertes cada año [8].

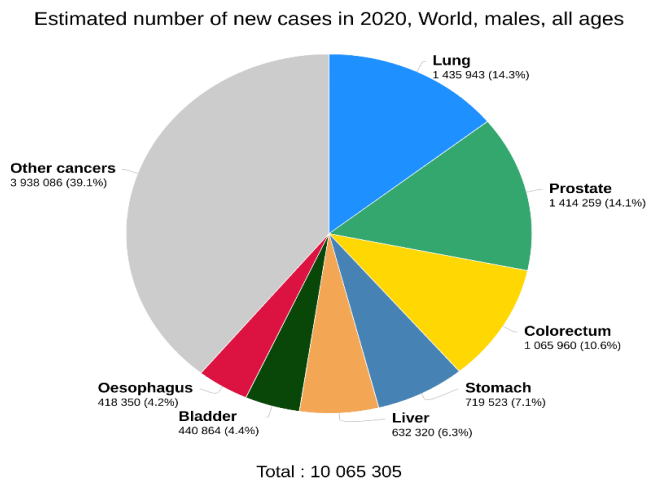


Figura 2. Estadísticas de los tipos de cáncer de mayor prevalencia en hombres de todas las edades. Adaptada [6].

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), en México el cáncer de próstata es el tipo de cáncer más mortífero entre los hombres (9.8 muertes por cada 100 mil hombres) [8].

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y geografía (INEGI), las defunciones debidas a cáncer de próstata se incrementan con la edad. Las estadísticas reportan que en los hombres de entre 30 a 59 años, las causas principales de muerte son: el tumor maligno del colon, del recto y del ano, con una tasa de defunción de 0.55 muertes por cada 10 mil varones; seguido de los tumores malignos del estómago con una tasa de 0.47 por cada 10 mil hombres.

Por otro lado, para las mujeres del mismo grupo etario las principales causas de fallecimientos son el cáncer de mama y el cáncer de cuello uterino. Ambos con tasas de mortalidad de 1.56 y 0.86 defunciones por cada 10 mil mujeres, respectivamente.

El panorama es distinto para las personas mayores de 60 años, ya que en los hombres la principal causa de fallecimiento es debido a la presencia de tumores malignos en la próstata seguida de aquellos presentes en pulmón, con tasas de 10.89 y 4.79 defunciones por cada 10 mil hombres, respectivamente. En el caso de las mujeres mayores de 60 años, la tasa más alta se debió a tumores malignos de la mama (4.71 defunciones por cada 10 mil mujeres), seguida por los tumores malignos del hígado y de las vías biliares intrahepáticas con una tasa de 3.34 defunciones [8] (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de defunciones por tumor maligno indicadas por género y edad [8].

Género	Grupo etario	Tipo de tumor maligno	Tasa de defunciones
Hombres	30 a 59 años	Tumor del colon, del recto y del ano	0.55
		Tumores del estómago	0.47
		Tumor de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	0.32
		Leucemia	0.31
	Mayores de 60 años	Tumor de la próstata	10.89
		Tumor de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	4.79
		Tumor del colon, del recto y del ano	3.95
		Tumor del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	3.81
Mujeres		Tumor de la mama	1.56

30 a 59 años	Tumor del cuello del útero	0.86
	Tumor del ovario	0.54
	Tumor del estómago	0.43
Mayores de 60 años	Tumor de la mama	4.71
	Tumor del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	3.34
	Tumor del colon, del recto y del ano	2.82
	Tumor del estómago	2.57

1.3. Etiología del cáncer

La distribución geográfica e incidencia de cada tipo de cáncer se ve influenciado por factores como: raza, género, edad, entre otras. Sin embargo, se sabe que las principales causas que pueden originar ciertos tipos de cáncer son: la exposición a factores carcinogénicos, la predisposición genética, y los mecanismos relacionados con el microambiente celular [2].

- **Exposición a factores carcinogénicos**

Los carcinógenos se definen como aquellas sustancias que al entrar en contacto con el organismo, provocan el incremento de la presencia de neoplasias de diferentes tipos. Estas sustancias se pueden clasificar en tres tipos: biológicos, físicos y químicos [9] (Tabla 2).

Tabla 2. Factores carcinogénicos y sus carcinomas asociados [9].

Tipos de carcinógenos	Carcinógenos	Cáncer o neoplasias relacionadas
Biológicos	Virus de Epstein-Bar	Linfoma de Burkitt
	Virus del papiloma humano	Cáncer cervicouterino
	Virus de la hepatitis B y C	Hepatocarcinoma
	Virus de herpes asociado con sarcoma de Kaposi	Sarcoma de Kaposi
	<i>Helicobacter pylori</i>	Cáncer de estómago
Químicos	Hollín y alquitrán (antraceno y benzopireno)	Cáncer de escroto
	2-naftilamina	Carcinoma en vejiga
	Aflatoxinas	Cáncer de pulmón, piel o vejiga
	Compuestos con arsénico	Cáncer de pulmón o piel
Físicos	Radiación UV	Cáncer de piel
	Rayos X	Cáncer de piel

- **Predisposición genética-Teoría del oncogén**

A partir de toda la investigación que se realizó para determinar el efecto carcinogénico de diversas sustancias y su mecanismo de acción, aumentó la relevancia de identificar el papel del material genético de las células en la aparición del cáncer.

El dogma central de la biología postula la secuencia de ADN, ARN, proteína; y en un estadio sano, se creía que cada gen codificaba una proteína que se encargaba de una acción específica para el cuerpo. Sin embargo, se demostró que los genes pueden producir más de una sola proteína con diversas funciones y que esto puede suceder de manera natural o derivado de una alteración genética [10].

Las mutaciones o alteraciones genéticas, pueden propiciar el desarrollo de células cancerosas. Sin embargo, es necesario que los mecanismos fisiológicos de protección del genoma, se encuentran alterados o dañados para que el desarrollo del tumor se lleve a cabo. Aquellos genes mutados que puedan alterar estos mecanismos de protección o favorecer neoplasias, se les conoce como oncogenes.

En contra parte, se conoce que uno de los mecanismos más importantes de protección al ADN está asociado a los genes supresores de tumor (GST), los cuales fueron descritos en 1984, cuando se demostró que la aparición de un tumor de Wilms estaba relacionada a la delección de los GST.

- **Microambiente inflamatorio**

Una de las características que permite el desarrollo y diseminación del cáncer, es la existencia de un ambiente inflamatorio. En 1863, Rudolf Virchow encontró la presencia de leucocitos en lesiones cancerosas.

Hoy en día, existen reportes suficientes de carcinogénesis mediadas por un ambiente inflamatorio. Generalmente, algunos leucocitos pueden generar mediadores inflamatorios como: citocinas, quimiocinas y prostaglandinas; al igual que las células tumorales. Posteriormente, se activan algunos factores de transcripción como el factor nuclear kB o el factor inducible de hipoxia (HIF-1), que favorecen el aumento del microambiente inflamatorio y la proliferación de más células tumorales. Al haber una mayor cantidad de células cancerosas y mediadores

inflamatorios, estos atraen un promotor del tumor que son los macrófagos asociados a tumores (TAM), que promueven la angiogénesis, la supervivencia y la diseminación tumoral [11] [12] [13].

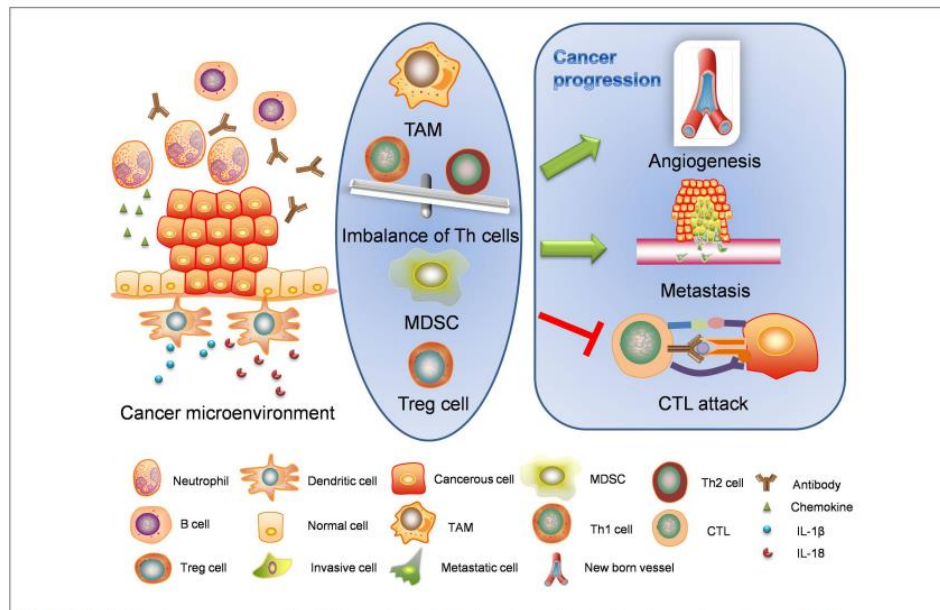


Figura 3. Vía intrínseca de inflamación asociada con cáncer [13].

1.4. Quimioterapia del Cáncer

Desde que la humanidad reconoció al cáncer como enfermedad ha tratado un sin número de formas para erradicarlo. Uno de los documentos más antiguos de los que se tiene referencia es un papiro que data del año 1600 A.C, donde se detallan los primeros casos de cáncer. Este documento conocido como papiro de Edwin Smith, es un texto egipcio que describe tumores o úlceras en el pecho que fueron tratadas con cauterización [14].

El desarrollo de la quimioterapia moderna contra el cáncer se inicia en la Oficina de Investigación y Desarrollo Científico (OSRD), una agencia del Departamento de Guerra de los Estados Unidos. Dicha entidad apoyó al investigador Milton Winternitz de la Universidad de Yale, quien realizó investigaciones secretas sobre la guerra química con el objetivo de encontrar antídotos derivados del gas mostaza, un arma química utilizada en la primera guerra mundial.

Winternitz en colaboración con Alfred Gilman Sr. (1908–1984) y Louis S. Goodman (1906–2000), evaluaron el potencial terapéutico del gas mostaza de nitrógeno

(derivado del gas mostaza original que sustituye el átomo de azufre por un átomo de nitrógeno). Los estudios iniciales de Gilman y Goodman confirmaron la toxicidad de este nuevo compuesto a las células sanguíneas de los conejos y su actividad antitumoral en ratones xenotransplantados con un tumor linfoide. Estos resultados alentadores llevaron al primer uso experimental de mostaza de nitrógeno en un inmigrante polaco de 48 años con linfosarcoma refractario.

El paciente recibió su primera dosis de quimioterapia basada en estudios previos de toxicología realizados en conejos. Sin lugar a duda, se observó una mejoría después del quinto tratamiento, y la biopsia no reveló tejido tumoral. Sin embargo, con el paso del tiempo el recuento de plaquetas y glóbulos blancos comenzaron a disminuir, dando como resultado un sangrado gingival, la erosión y hemorragia de la mucosa bucal y el fallecimiento del paciente. Para el bien o para el mal, la era de la quimioterapia había comenzado [15].

Debido a su concepción, la quimioterapia del cáncer se dirigió a obtener compuestos con actividad citotóxica a células principalmente cancerosas, así se han sintetizado varios compuestos citotóxicos que actualmente son utilizados en la clínica.

- **Agentes alquilantes.**

Los agentes alquilantes impiden la reproducción de las células al provocar daños en el material genético (ADN). Su mecanismo de acción consta en la transferencia de grupos alquilo a diferentes residuos de los ácidos nucleicos presentes en diferentes componentes celulares.

Estos fármacos han sido empleados en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres, incluyendo: el cáncer de pulmón, de mama y de ovario, así como la leucemia, el linfoma, la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple y el sarcoma.

Algunos ejemplos de los agentes alquilantes más utilizados en la clínica son: Altretamina, Bendamustina (Figura 4), Bulsufán, Carboplatino, Carmustina, Clorambucilo, Cisplatino, Ciclofosfamida, Dacarbazina, Ifosfamida, Lomustina, Mecloretamina, Melfalán, Oxaliplatino, Temozolomida, Tiotepa, Trabectedin. [3]

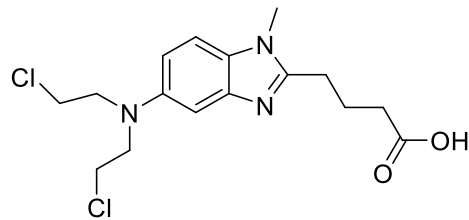


Figura 4. Estructura química de la Bendamustina.

El riesgo de desarrollar leucemia después de la administración de agentes alquilantes, es mayor después de 5 a 10 años de tratamiento pero puede disminuirse si se administran dosis bajas.

Por otra parte, un grupo especial de agentes alquilantes son las nitrosoureas. Estos fármacos, pueden cruzar la barrera hematoencefálica, estructura que evita que la mayoría de los medicamentos alcancen el cerebro. Debido a lo anterior, estos medicamentos son útiles en el tratamiento de ciertos tipos de tumores cerebrales. Algunos ejemplos de nitrosoureas se muestran en la Figura 5.

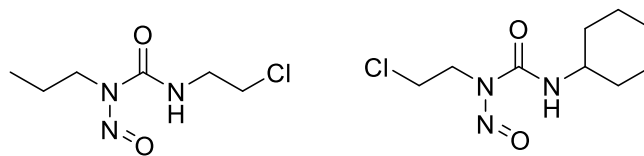


Figura 5. Estructura química de la armustina y lomustina.

- **Antimetabolitos.**

Las antimetabolitos sustituyen los elementos fundamentales para la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Cuando esto sucede, la célula no puede reproducirse. Se usan comúnmente para tratar leucemias, cánceres de seno, de ovarios y del tracto intestinal, así como otros tipos de cáncer. Algunos ejemplos de antimetabolitos son: Azacitidina, 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), Capecitabina (Xeloda), Cladribina, Clofarabina, Citarabina (Ara-C), Decitabina, Floxiridina, Fludarabina, Gemcitabina (Gemzar), Hidroxiurea, Metotrexato, Nelarabine, Pemetrexed (Alimta), Pentostatina, Pralatrexato, Tioguanina y la combinación trifluridina/tipiracilo [3].

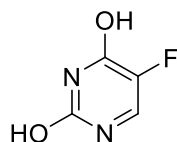


Figura 6. Estructura química del 5-fluoracilo

- **Antibióticos antitumorales**

Estos medicamentos ejercen su acción al unirse al ADN a través de la intercalación entre las bases nitrogenadas, bloqueando la síntesis de DNA, RNA o proteínas dentro de las células cancerosas para impedir que crezcan y se multipliquen. Las antraciclinas son antibióticos contra tumores cancerosos que interfieren con las enzimas involucradas en la replicación de ADN durante el ciclo celular. Se usan ampliamente para tratar varios tipos de cáncer. Algunos ejemplos de antraciclinas son: Daunorubicina, Doxorubicina (Adriamicina), Epirubicina, Idarubicina y Valrubicina

Un problema importante que se debe tomar en cuenta en la administración de estos medicamentos es que pueden dañar permanentemente el corazón si se administran en altas dosis. Por esta razón, frecuentemente se establecen límites en las dosis de estos medicamentos que se pueden recibir a lo largo de la vida (dosis acumulativa).

Los antibióticos contra el cáncer que no son antraciclinas son: Bleomicina, Dactinomicina, Mitomicina C y Mitoxantrona.

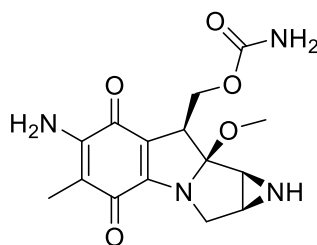


Figura 7. Estructura química de algunos antibióticos contra el cáncer (Mitomicina C).

- **Inhibidores de la topoisomerasa**

Estos fármacos también se llaman alcaloides de origen vegetal e interfieren con las enzimas llamadas topoisomerasas, que ayudan a separar las hebras de ADN para que se puedan transcribir. Los inhibidores de la topoisomerasa se usan para tratar ciertas leucemias, así como cánceres de pulmón, de ovario, gastrointestinales, colorrectales y pancreáticos.

Los inhibidores de la topoisomerasa se agrupan según el tipo de enzima que afectan. Algunos inhibidores de la topoisomerasa I (también llamados camptotecinas) son: Irinotecán y Topotecán

Los inhibidores de la topoisomerasa II (también se denominan epipodofilotoxinas) incluyen: Etopósido (VP-16), Mitoxantrona y Tenipósido. Los inhibidores de la topoisomerasa II pueden aumentar el riesgo de un segundo cáncer [16].

- **Corticosteroides**

Los corticosteroides, a menudo simplemente llamados “esteroides”, son hormonas naturales o sintéticas que son útiles en el tratamiento de varios tipos de cáncer, así como de otras enfermedades. Algunos ejemplos de corticosteroides son: Prednisona, Metilprednisolona y Dexametasona

Los esteroides comúnmente se utilizan para ayudar a prevenir las náuseas y los vómitos causados por la quimioterapia. También se administran para prevenir reacciones alérgicas graves inducidas por algunos fármacos anticancerosos [16].

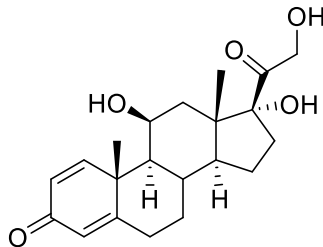


Figura 8. Estructura química de la Prednisona.

Desafortunadamente, todos los fármacos citados anteriormente no son selectivos a las células cancerosas, lo cual implica graves consecuencias secundarias que, en ciertos pacientes, dificultan su administración y favorecen que el tratamiento sea más complejo.

- **Terapias dirigidas.**

El principal desafío de la investigación del cáncer clínico es encontrar un enfoque terapéutico que elimine específicamente a las células malignas, al tiempo que limita los efectos secundarios en los tejidos normales. Sin embargo, hasta hace poco, el tratamiento sistémico del cáncer ha involucrado principalmente agentes citotóxicos dirigidos a objetivos que no son específicos de las células tumorales, lo que provoca un amplio espectro de efectos secundarios en los pacientes. En los últimos años,

debido a los avances en la comprensión de los mecanismos involucrados en la carcinogénesis, se han desarrollado moléculas (Tabla 3) que juegan un papel crucial y bastante específico en el crecimiento tumoral, lo que ha permitido postular un nuevo enfoque terapéutico. Esta llamada "terapia dirigida", se ha convertido en un hito en el tratamiento del cáncer, ya que ofrece la posibilidad de eliminar de una manera más eficiente y específica a los tumores, reduciendo significativamente los efectos no deseados en los tejidos normales [18].

Tabla 3. Ejemplos de fármacos en la terapia dirigida.

Fármacos con un solo blanco molecular	Blanco molecular	Uso clínico
Trastuzumab	HER 2	HER-2 sobre expresión en cáncer de mama
Cetuximab	HER 1	CRC, HNSCC
Bevacizumab	VEGF	CRC, NSCLC
Pertuzumab	HER 2	Ensayos fase II: cánceres de ovario y mama, NSCLC
Gefitinib	HER 1	NSCLC
Erlotinib	HER 1	NSCLC

*CRC, cáncer colorrectal; HNSCC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Las terapias dirigidas difieren de la quimioterapia en varias formas:

- Las terapias dirigidas actúan en blancos moleculares específicos que están asociados con el cáncer, mientras que la mayoría de las quimioterapias regulares actúan en todas las células que se dividen con rapidez, ya sean células sanas o cancerosas.
- Las terapias dirigidas se eligen o diseñan deliberadamente para que actúen blancos terapéuticos definidos, mientras que las quimioterapias regulares se caracterizan por carecer de un blanco terapéutico definido.
- Las terapias dirigidas son con frecuencia citostáticas (es decir, bloquean la proliferación de las células tumorales), mientras que las sustancias ordinarias de quimioterapia son citotóxicas (es decir, destruyen células).

En la actualidad, el descubrimiento de terapias dirigidas es uno de los objetivos centrales de la investigación de fármacos contra el cáncer. Estos fármacos dirigidos, son la piedra angular de la medicina de precisión, una forma de medicina que usa

información de los genes y proteínas de una persona para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades.

Con el fin de tratar tipos específicos de tumores, numerosas terapias dirigidas contra el cáncer han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) (Tabla 4).

Tabla 4. Principales fármacos dirigidos aprobados por la FDA o en diferentes fases de evaluación

Fármacos con blancos moleculares específicos	Blancos moleculares	Uso clínico
Imatinib	BCR-Abl, c-Kit, PDGFR	CML, GIST
Sunitinib	VEGFR, PDFGR, c-Kit, Flt-3, RET, CSF-1R	RCC, imatinib-resistente GIST
Sorafenib	b-RAF, VEGFR, PDFGR, c-Kit, Flt-3	RCC
Lapatinib	HER1, HER 2	Fase II-III: cáncer de mama, NSCLC
Vandetanib	HER 1, VEGFR, RET	Fase II-III: NSCLC, cáncer de tiroides

*CRC, cáncer colorrectal; HNSCC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas; CML, leucemia mielógena crónica; GIST, tumor estromal gastrointestinal; RCC, cáncer de células renales.

1.5. Productos Naturales en el tratamiento del cáncer.

Actualmente, la medicina tradicional ha obtenido el reconocimiento de ser un recurso invaluable en la conservación de la salud de millones de personas y en la preservación de la identidad y cultura de los pueblos originarios.

En el caso de México, la medicina tradicional indígena se constituye principalmente de plantas; aunque también existen registros del uso de hongos, organismos marinos, insectos e incluso algunos animales. Algunas de las especies que son ampliamente utilizadas para diversas afecciones son: *Bocconia frutescens* “gordolobo” (afecciones respiratorias), *Heterotheca inuloides* “árnica” (agente cicatrizante, antiinflamatorio), *Plectranthus hadiensis* “vaporrub” (descongestionante, disminuye síntomas de resfriado), entre otras [18].

Para combatir el cáncer, la aportación de los llamados productos naturales se ve reflejada por el uso clínico de varios fármacos de origen natural (Tabla 5).

Tabla 5. Principales metabolitos secundarios y algunos de sus derivados utilizados en la clínica contra el cáncer [19, 20, 21, 22, 23].

Fármaco	Mecanismo de acción	Uso clínico
Taxol y sus derivados semisintéticos	Se une a la subunidad- β de la tubulina polimerizándola, bloqueando el desacoplamiento del huso mitótico y deteniendo el ciclo celular en la fase M.	Carcinoma metastásico de ovario, cáncer de mama (administrado en combinaciones), pulmonar, prostático.
Alcaloides de la vinca (<i>Catharanthus roseus</i>)	Inhibición de la polimerización de la tubulina, alterando el ensamble de microtúbulos y deteniendo la mitosis en la metafase	Leucemia linfocítica aguda en niños (vincristina), cáncer cervicouterino, de colon, de mama y otros carcinomas. Linfoma de Hodgkin, carioepitelioma y cáncer de ovario (vinblastina). Cáncer avanzado de ovario, pulmonar y mamario (vinorelbina). Cáncer de pulmón (vindesina).
Epipodofilotoxina y sus derivados (lignan, etopósido, tenipósido e isómero de la podofilotoxina)	Estabilizan la unión de la enzima Top2 y el ADN, evitando la reunión de las hebras rotas de ADN y así, la condensación correcta de los cromosomas.	Principalmente usados para tratar el cáncer de pulmón, ovario, testicular y linfoma.
Alcaloides quinolinicos (camptotecina y sus derivados, irinotecan, belotecan y topotecan)	Inhiben la actividad de la Topoisomerasa I.	Cáncer colorrectal.

Esta reportado que los fármacos anticancerosos de origen natural inducen la muerte celular sin gran selectividad a las células cancerosas. Por lo tanto, presentan

algunos efectos secundarios, no tan graves como los quimioterapéuticos sintéticos utilizados en la clínica.

Con el fin de obtener nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer que retomen los fundamentos de la terapia dirigida, y al mismo tiempo sean de origen natural y menos tóxicos, se han iniciado nuevos caminos en la investigación preclínica.

En este sentido, la obtención de derivados semisintéticos a partir de metabolitos secundarios se vuelve interesante para los investigadores ya que abre la posibilidad de aumentar la selectividad de las moléculas naturales; o bien, buscar atacar más blancos terapéuticos pero que sigan siendo específicos para las células cancerosas.

Tal es el caso de los reportes de síntesis de híbridos de la colchicina con fármacos como el vorinostat (Saha), cobalamina, adamantina, pironectina, triazoles, y los fármacos naturales alcaloides de la vinca y taxoles [24]. También se han sintetizado híbridos de vinorelbina con fármacos anticancerosos como la podofilotoxina [25].

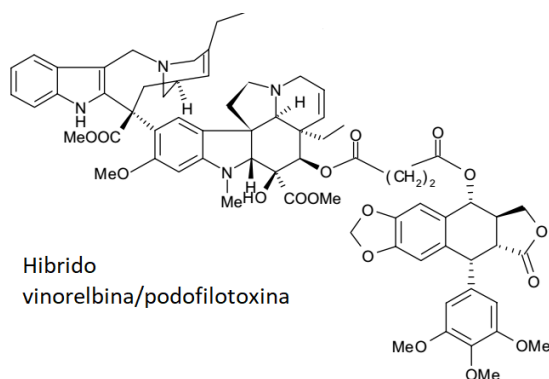


Figura 9. Estructura química del híbrido entre la vinorelbina y la podofilotoxina

La actividad citotóxica del híbrido de la podofilotoxina y la vinorelbina, fue mayor a la de sus precursores [25]. Esta aproximación está abierta para un sin número de síntesis de derivados que permitan mejorar las actividades anticancerígenas de las moléculas iniciales más prominentes.

1.6. Cuachalalate

Dentro de la herbolaria mexicana, existe una especie de gran interés por su aplicación en el tratamiento de diferentes padecimientos como: quemaduras,

procesos cicatrizantes, úlceras gástricas, padecimientos inflamatorios, entre otros; “el cuachalalate”.

Amphipterygium adstringens, es un árbol de hasta 10 metros de alto con tronco torcido y corteza grisácea con escamas. Sus hojas son de color verde opaco en el anverso, grisáceas en el reverso y se agrupan en las puntas de las ramas. Las flores suelen estar en ramilletes y los frutos son nueces abultadas. Comúnmente crece en climas cálidos y semicálidos como bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, matorrales y bosques espinosos. En nuestro país, se puede encontrar en los estados de Morelos, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Puebla [18] [26] [27].



Figura 10. *Amphipterygium adstringens* (árbol del cuachalalate).

Se ha encontrado que diversos extractos de la corteza de *A. adstringens* contienen metabolitos de gran interés medicinal, siendo más abundantes los de naturaleza triterpénica de tipo tirucalano. Tal es el caso de los compuestos ácido masticadenónico (**AMD**) y el ácido 3 α -hidroximasticadenónico (**3 α**), los cuales han demostrado importantes actividades biológicas como agentes antiinflamatorios y citotóxicos.

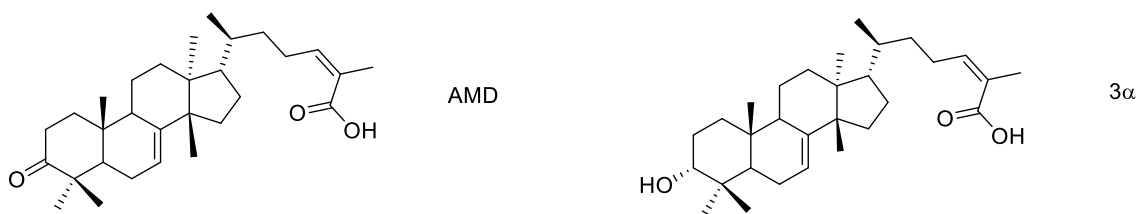


Figura 11. Estructura química de los ácidos masticadenónico (**AMD**) y el ácido 3 α -hidroximasticadenónico (**3 α**).

2. ANTECEDENTES

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más diagnosticado y la quinta causa de muerte entre los hombres en todo el mundo, con un estimado de 1,414,000 casos de cáncer nuevos y 375,304 muertes en 2020 en 48 países. Vale la pena señalar que el cáncer de próstata aumenta debido al envejecimiento de la población [28].

La fisiopatología del cáncer de próstata comienza con un fenotipo dependiente de andrógenos, que puede remitirse por tratamiento hormonal. Sin embargo, a pesar de este tratamiento, la enfermedad a veces evoluciona. Entre los cambios que son característicos, están el aumento de la proliferación celular y la activación de diferentes vías intracelulares que permiten la evasión de la apoptosis. Estas alteraciones dan como resultado el desarrollo de células cancerosas resistentes a la terapia hormonal [29] [30].

Al mismo tiempo, se conoce que en el 50% de los cánceres de próstata y en el 40% de los cánceres de mama, se produce un aumento de la actividad quinasa Akt. La vía de Akt, juega un papel clave en la regulación de la división celular y la supervivencia en células cancerosas [30] (Figura 12).

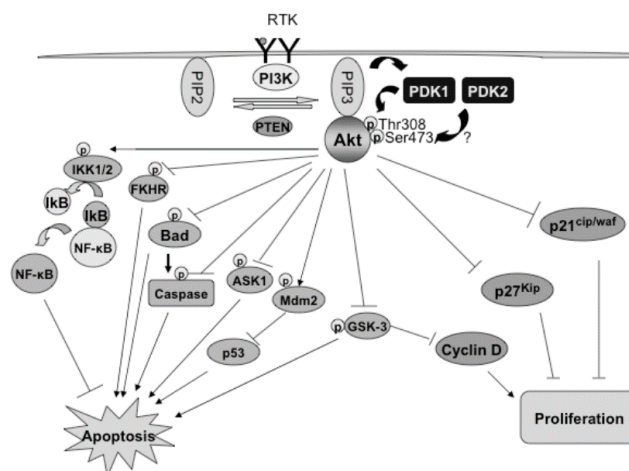


Figura 12. Vía de señalización de la enzima Akt [30].

Estos hechos sugieren la necesidad de una búsqueda continua de fármacos anticancerígenos nuevos, más efectivos y con blancos moleculares definidos.

Por otra parte, nuestro estudio sistemático de las actividades biológicas de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 α -hidroximasticadienoico (3 α) aislados de

Amphyterigium adstringens, ha informado sobre las actividades citotóxicas, antitumorales y antiinflamatorias de estos triterpenos [31-34].

Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha determinado que **AMD** y **3 α** inhiben la fosforilación de la enzima Akt en la línea de próstata PC-3 mediante ensayos de separación y caracterización enzimática (Figura 13). Este resultado indicó que posiblemente Akt fuera el blanco molecular de **AMD** y **3 α** .

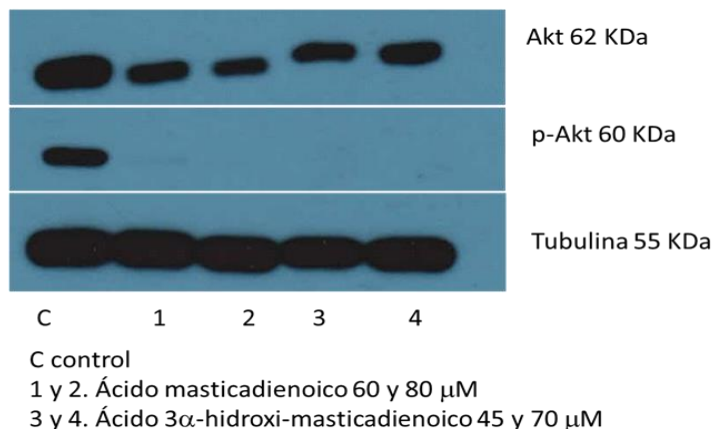


Figura 13. Determinación de la inhibición de la enzima Akt mediante la técnica de Western Blot.

Por otro lado, se sabe que los ácidos oleanólico y glicirretínico son triterpenos con efectos anticancerígenos, y que los ácidos aromáticos del tipo cinámico también presentan actividad citotóxica para algunos tipos de cáncer. Tomando en cuenta lo anterior, y con el fin de mejorar la actividad citotóxica de los triterpenos oleanólico y glicirretínico, se han sintetizado una serie de ésteres aromáticos con derivados del ácido cinámico. Los resultados de la actividad citotóxica indicaron que algunos de los ésteres mostraron mayor actividad que los compuestos iniciales [35].

De igual manera, se conoce que algunos benzil-isotiocianatos naturales inducen apoptosis y confieren protección al DNA [36, 37].

Recientemente se ha informado la síntesis y evaluación de ésteres bencílicos de los triterpenos: ácido asiático, betulínico y glicirretinoico. Los resultados indicaron que los ésteres mostraron mayor actividad citotóxica que los triterpenos iniciales.

También mostraron actividad inhibitoria contra la tirosin-cinasa relacionada al oncogén Abalson [38].

Retomando los antecedentes antes mencionados y con el fin de conocer si algunos derivados de los ácidos **AMD** y **3 α** pudieran tener actividad sobre la enzima Akt, en nuestro grupo de investigación se realizó un estudio de ensamble molecular (docking) entre los dos sitios activos de Akt (**AKT1** y **AKT2**) con el derivado hipotético “AMD-Der2” (Figuras 14, 16 y 18). Lo anterior, con el objetivo de conocer si la presencia de residuos bencílicos podría alterar la factibilidad de la unión a la enzima Akt. En este estudio, cada uno de los dos sitios activos de Akt (**AKT1** y **AKT2**) fueron acoplados con sus ligandos más afines: **Espiroindolina** y **G98**, respectivamente (Figuras 15 y 17).

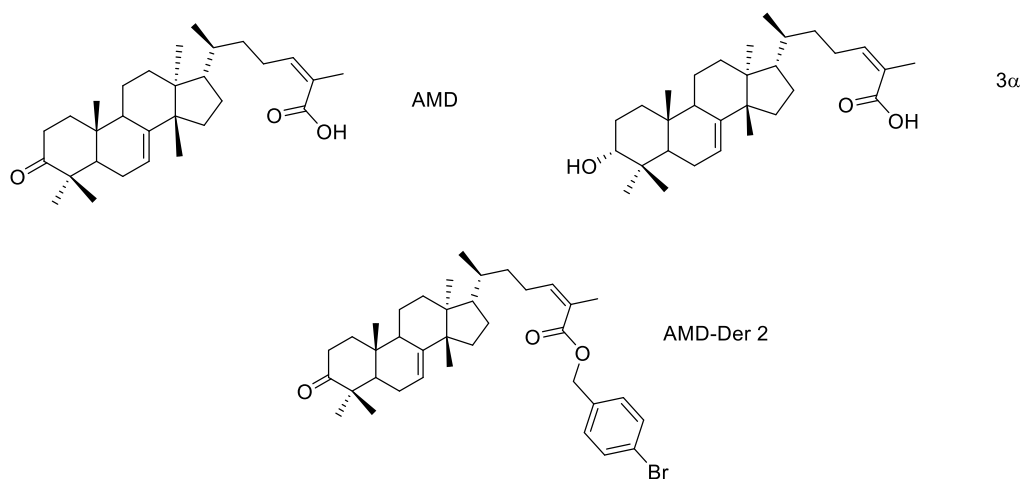


Figura 14. Estructuras utilizadas en el análisis de acoplamiento molecular (docking).

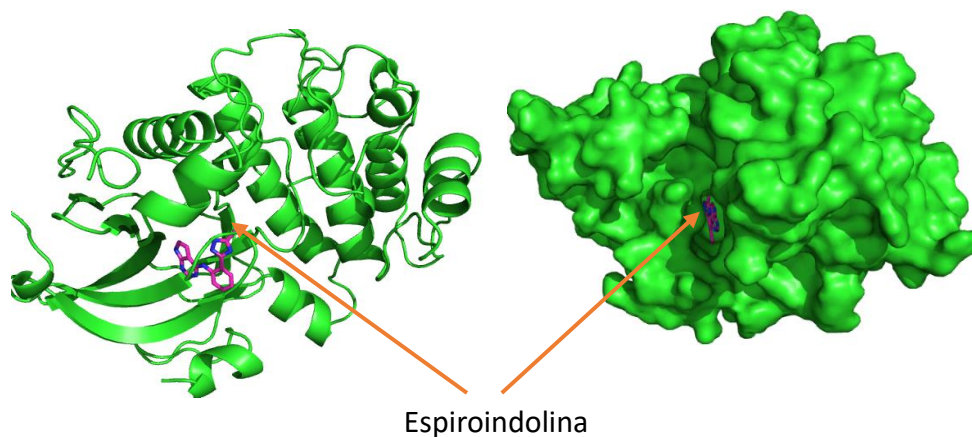


Figura 15. Estructura de la unión en el sitio activo **AKT1** humana con el inhibidor **espiroindolina** (control positivo en el análisis de docking).

Resultados del análisis de acoplado molecular de AMD, 3 α AMD y sus derivados en el sitio activo de AKT1 humana

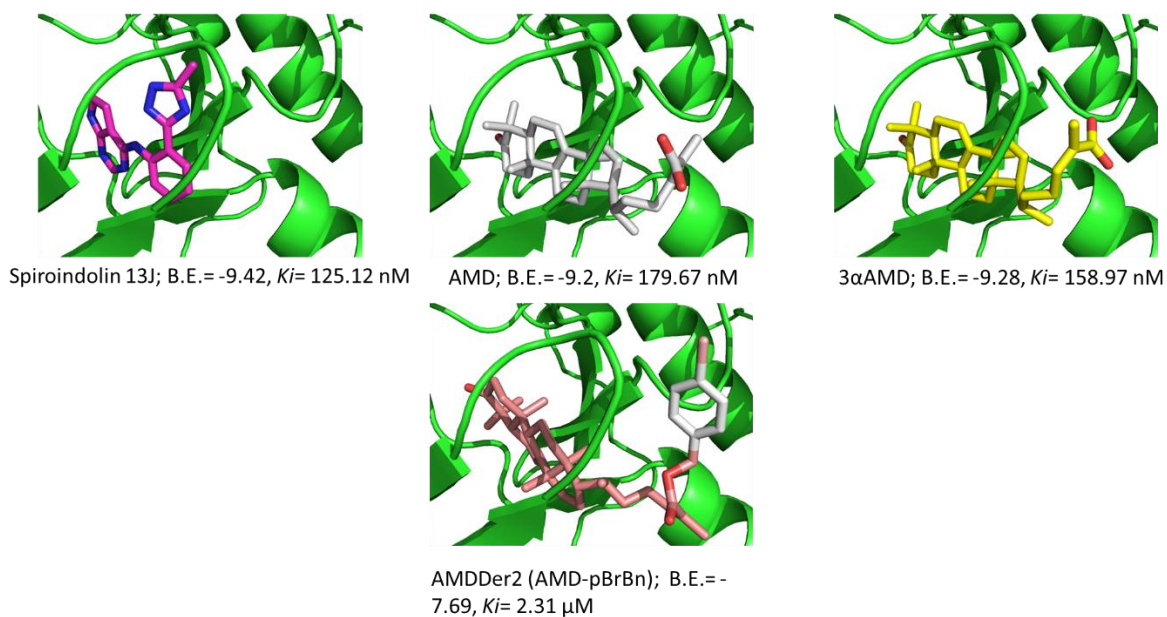


Figura 16. Resultados del análisis de acoplamiento molecular con **AKT1** (primer sitio de unión de Akt).

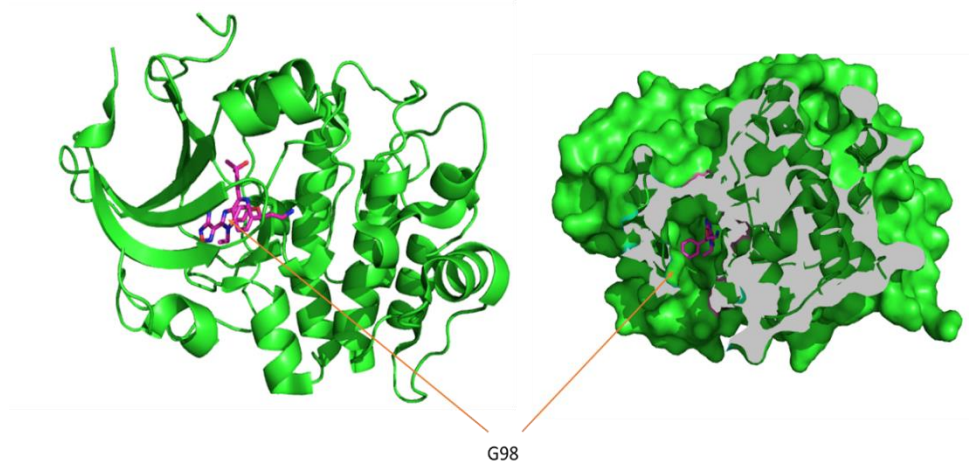


Figura 17. Estructura de la unión del inhibidor **G98** en el sitio activo **AKT2** humana (control positivo en el análisis de docking).

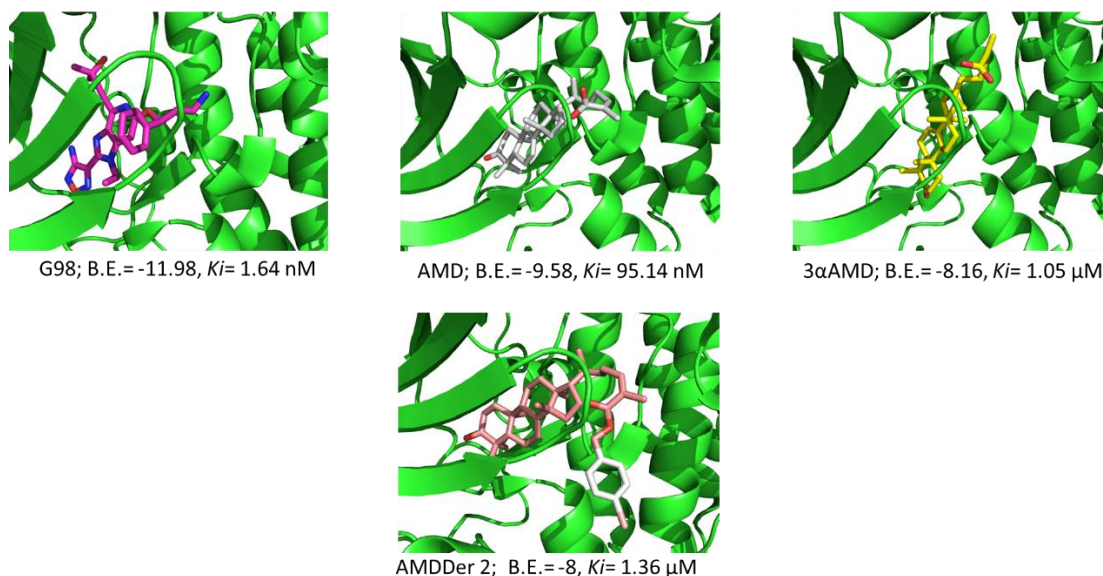


Figura 18. Resultados del análisis de acoplamiento molecular con **AKT2** (segundo sitio de unión de la enzima Akt).

La energía libre de unión (ELU) es la suma de todas las interacciones intermoleculares que están presentes entre el ligando y el objetivo. Las energías de unión de los mejores compuestos acoplados pueden variar entre -8.0 kcal/mol y -11.71 kcal/mol [39].

Comparando los valores de energía libre de unión (ELU) y de la constante de inhibición (K_i) de los ligandos modelo (**Espiroindolina** y **G98**) con los determinados para los compuestos **AMD**, **3 α** y **AMD-Der 2**, se observa que **AMD** y **3 α** mostraron valores de acoplamiento moleculares muy similares a los ligandos controles; lo cual indica una gran posibilidad que estos compuestos inhibieran la fosforilación de Akt. En cuanto al compuesto **AMD-Der 2**, se observó un ligero decremento en estos parámetros. Sin embargo, se esperaría un acoplamiento molecular significativo entre el ligante y la enzima en su sitio de unión AKT1 (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros obtenidos del análisis de acoplamiento molecular de los compuestos propuestos con Akt y sus sitios activos.

Compuesto	AKT1		AKT2	
	Energía libre de unión (ELU)	Constante de inhibición (Ki)	Energía libre de unión (ELU)	Constante de inhibición (Ki)
Espirroindolina	-9.42 Kcal/mol	125.12 nM	N/A	N/A
G98	N/A	N/A	-11.98 Kcal/mol	1.64 nM
AMD	-9.20 Kcal/mol	179.67 nM	-9.58 Kcal/mol	95.14 nM
3α	-9.28 Kcal/mol	158.97 nM	-8.16 Kcal/mol	1.05 nM
AMD Der 2	-7.69 Kcal/mol	2.31 μ M	-8.0 Kcal/mol	1.36 μ M

Por otra parte, es conocida la relación entre inflamación y cáncer. Se ha reconocido que algunas citocinas y procesos fisiológicos son centrales tanto para la inflamación como para el cáncer. La inflamación crónica puede inducir ciertos tipos de cánceres y de tumores sólidos, que a su vez, pueden iniciar y perpetuar procesos inflamatorios locales que fomentan el crecimiento y la diseminación tumoral.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se decidió sintetizar y evaluar las actividades citotóxicas y antiinflamatorias de los ésteres *p*-bromo y 2,6-diclorobencílicos de **AMD** y **3 α** . Con fines de comparación en la actividad citotóxica, también se sintetizaron los ésteres metílicos de **AMD** y **3 α** . La actividad citotóxica fue evaluada por el método de sulforrodamina B, mientras que la actividad antiinflamatoria se evaluó por la prueba de edema inducido por TPA.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muertes en el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, los tipos de cáncer que más se manifiestan en la población son los de mama, pulmón, colon y próstata. En nuestro país el cáncer de próstata es uno de los de mayor prevalencia y debido a sus características fenotípicas, que le permiten desarrollar cierta resistencia a la terapia convencional, es necesario proponer nuevas alternativas farmacéuticas. Al mismo tiempo, los fármacos anticancerígenos convencionales presentan poca selectividad sobre las células cancerígenas y efectos secundarios que pueden complicar el tratamiento y estado de los pacientes. Es por ello, que existe la necesidad de encontrar nuevas moléculas semisintéticas que puedan mejorar la actividad anticancerígena de sus precursores, teniendo una mayor selectividad o actuando sobre blancos terapéuticos específicos para ciertos tipos de cáncer.

4. HIPÓTESIS

Se ha informado que la presencia de ésteres bencílicos en algunos triterpenos citotóxicos, incrementa dicha actividad. Por lo tanto, los ésteres bencílicos de los ácidos triterpénicos: masticadienónico (**AMD**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**) aislados a partir del extracto de acetato de etilo de la corteza de *A. adstringens*, aumentarán la citotoxicidad de las moléculas iniciales.

5. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y evaluar las actividades citotóxicas y antiinflamatorias de los ésteres metílicos, *p*-bromobencílicos y 2,6-diclorobencílicos de los ácidos masticadienoico (**AMD**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**).

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Aislar y purificar los ácidos masticadienónico (**AMD**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**), a partir del extracto de acetato de etilo de la corteza de *A. adstringens*.
- Sintetizar los ésteres: masticadienato de metilo, masticadienato de *p*-bromobencilo y masticadienato de 2,6-dicloro bencílico a partir de **AMD**.
- Purificar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas a los ésteres obtenidos a partir de **AMD**.
- Sintetizar los ésteres: 3 α -hidroximasticadienato de metilo, 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo y 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo a partir de **3 α** .
- Purificar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas a los ésteres obtenidos a partir de **3 α** .
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en las líneas de cáncer humano: glía de sistema nervioso central (U251), PC-3: cáncer de próstata (**PC-3**), leucemia (**K-562**), cáncer de colon (**HCT-15**), cáncer de mama (**MCF-7**), cáncer de pulmón (**SKLU-1**) células de riñón de mono (**COS7**, no cancerosa), usando el método de sulforrodamina B.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en la línea celular de cáncer de próstata (**PC-3**), de los compuestos con mayor actividad.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de todos los ésteres sintetizados, utilizando el método de inhibición del edema ocasionado por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (**TPA**).

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

6.1.1. Material de vidrio

Columnas de vidrio para cromatografía de fase abierta, matraces de fondo redondo, pipetas Pasteur, viales de 5, 10 y 20 mL, tapones de plástico, jeringas de adición de 5 mL con aguja metálica, pipetas graduadas de 5 y 10 mL, vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 1000 mL, probetas de 100 y 1000 mL, matraces Erlenmeyer de 250 mL, embudos de filtración rápida, embudos de separación, matraces Kitasato, embudos Hirsch, cápsulas de evaporación, cápsulas de porcelana, cámara de elución de placas cromatográficas, capilares, termómetro graduado (-10°C a 400 °C), tubos de resonancia magnética nuclear para 500 y 700 MHz (Norell ® Sample Vault Series 5 mm x 178 mm)

6.1.2. Materiales y equipo diverso

Parrillas de calentamiento con agitación, agitadores magnéticos, pinzas de metal, espátulas de metal, soportes universales, pinzas de tres dedos, anillos de metal, papel filtro, algodón, pisetas, recipientes de peltre, balanza analítica, rotavapor con recirculador.

6.1.3. Disolventes destilados

Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo, Acetona, Metano, Etanol, Agua, N,N-dimetilformamida.

6.1.4. Reactivos

Bromuro de p-bromobencilo (98%, CAS 112186), Cloruro de 2,6-diclorobencilo (97%, CAS T56308), Eterato de trifluoruro de boro (51%, CAS 175501) de Sigma-Aldrich. Carbonato de potasio anhidro (99%, CAS 584087) de Fisher Scientific. Sulfato cérico, Sulfato de sodio anhidro

6.1.5. Cromatografía en columna abierta

Sílica gel-60 for column chromatography (0.040-0.063 mm) de Merck.

6.1.6. Cromatografía en placa fina

Placas de aluminio impregnadas con sílice DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ 20 x 20 cm de la marca MACHEREY-NAGEL.

6.1.7. Disolventes deuterados

Cloroformo (CDCl₃, D-99.8% + 0.03% V/V TMS + SILVER FOIL) de Cambridge Laboratories.

6.1.8. Evaluación de la actividad citotóxica

Cultivo celular, medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), FBS (suero fetal bovino, BIO-S1650-500) y tripsina (BIO-L0931-100) de Bio West. Sulfóxido de dimetilo y Dicloruro de cis diammineplatinum (II) de Sigma-Aldrich.

L-glutamina, G-penicilina, estreptomina, b-anfotericina, sulforodamina-B.

Líneas celulares U251 (glía de sistema nervioso central), PC-3 (cáncer de próstata humano), K-562 (leucemia), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama), SKLU-1 (cáncer de pulmón) y COS7 (células de riñón de mono no cancerosas), fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).

Placas de 96 pocillos (0.7 × 10⁵ para células adherentes en 100 mm³ medio).

6.1.9. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

21 ratones ICR-CD1 hembra de entre 30 y 35 gramos de peso, cajas de acrílico con rejillas, bebederos, alimento, aserrín, cámara de CO₂, jeringas de insulina de 3 mL, sacabocado de 7 mm, balanza granataria, balanza analítica, tubos eppendorf, pulmones.

Solución de pentobarbital (1 mg/μL), solución de TPA en etanol (0.25 mg/mL), cloroformo, micropipetas de 10 a 50 μL.

6.2. Procedimiento Experimental.

6.2.1. Obtención de los ácidos masticadenónico y 3 α -hidroximasticadenónico (**Compuestos 3 α** y **AMD**)

A partir del extracto de acetato de etilo de la corteza de *A. adstringens* (24 g), se preparó el punto de aplicación en relación 1:1 con sílice gel y se aislaron los ácidos masticadenónico (**AMD**, 1.0 g) y 3 α -hidroximasticadenónico (**3 α** , 1.9 g) en fase móvil de 9:1 Hexano:Acetato de Etilo. Los sólidos blancos cristalinos, se caracterizaron por RMN (^1H y ^{13}C , HSQC, HMBC) y se compararon con los datos previamente reportados en la literatura.



Figura 19. Estructuras de los metabolitos aislados del extracto de AcOEt de la corteza de *A. adstringens*. A la izquierda el ácido 3 α -hidroximasticadenónico (**3 α**) y a la derecha el ácido masticadenónico (**AMD**).

6.2.2. Síntesis de los ésteres masticadienato de metilo y 3 α -hidroximasticadienato de metilo (**Compuestos 3 α -1** y **AMD-1**).

En un matraz de fondo redondo con tapón de plástico, se colocaron 30 mL de metanol anhidro previamente secado con sodio metálico. Posteriormente se agregaron 500 mg de **3 α** (o **AMD**) con agitación vigorosa hasta su total disolución. Una vez formada la disolución, se adicionaron 5 mL de $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ con goteo durante 30 minutos. Después de terminar la adición, se colocó un sistema de reflujo y la mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 5 horas para continuar a temperatura ambiente durante 24 horas adicionales. Al concluir dicho tiempo, al crudo de reacción se le añadieron 10 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio hasta observar la desaparición del burbujeo producido por la adición de la disolución anterior. Posteriormente, se añadió trozos de hielo hasta observar la formación de una emulsión. Inmediatamente, se realizó una extracción con Acetato de Etilo destilado (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró

con destilación a presión reducida. Finalmente, la mezcla de reacción obtenida se purificó mediante columna cromatográfica de fase abierta para la obtención del compuesto puro **3 α -1** (o **AMD-1**) con fase móvil de Hx:AcOEt en proporción 9:1, obteniendo un sólido blanco.

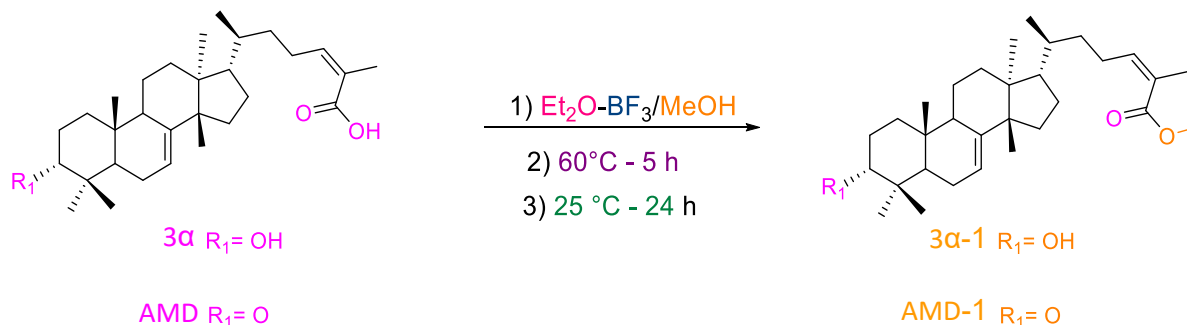


Figura 20. Síntesis de los ésteres masticadienato de metilo (**AMD-1**) y 3 α -hidroximasticadienato de metilo (**3 α -1**).

6.2.3. Síntesis de ésteres bencílicos de los ácidos 3 α -hidroximasticadenónico y del masticadenónico. Procedimiento general. (**Compuestos 3 α -2, 3 α -3, AMD-2 y AMD-3**)

Se colocó 10 mL de DMF anhidra como disolvente en un matraz de fondo redondo y se añadieron 500 mg de K_2CO_3 con agitación vigorosa a temperatura ambiente, hasta observar su completa disolución. Enseguida, se adicionaron 400 mg de **3 α** (o **AMD**) con agitación vigorosa hasta su completa disolución durante 30 minutos. Después se adicionaron 370 mg de bromuro de *p*-bromobencilo (o cloruro de 2-diclorobencilo). La reacción procedió durante 8 horas más a temperatura ambiente. En seguida, se procesó la reacción añadiendo 10 mL de una solución saturada de cloruro de sodio y se extrajo con Acetato de Etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró con destilación a presión reducida. Finalmente, la mezcla de reacción obtenida se purificó mediante columna cromatográfica abierta para la obtención del compuesto puro **3 α -2** (**3 α -3** o **AMD-2** o **AMD-3**) con fase móvil de Hx:AcOEt en proporción 9:1, obteniendo un sólido blanco (o cristales para los compuestos **3 α -3** y **AMD-2**).



Figura 21. Síntesis de ésteres masticadienato e hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo y masticadienato de 2,6-diclorobencilo a partir de 3α y AMD. (**Compuestos AMD-2 y AMD-3, y $3\alpha-2$ y $3\alpha-3$**).

6.2.4. Puntos de fusión

Las temperaturas de fusión de cada uno de los derivados semisintéticos, fueron determinadas utilizando el aparato de Fisher-Johns y se reportan sin corrección.

6.2.5. RMN

Los espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC y HMBC fueron adquiridos en el equipo de 300 MHz del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear y en los equipos de 500 y 700 MHz, Bruker 500 Ascend y Bruker Advanced III HD, del Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN).

6.2.6. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas de alta resolución de cada uno de los compuestos sintetizados fue obtenida mediante la técnica de DART+ en el Espectrómetro JOEL The AccuTOF JMS-T100LC del Laboratorio de Espectrometría de Masas.

6.2.7. IR

Los espectros de infrarrojo de cada uno de los compuestos, se obtuvieron mediante la técnica de pastilla de bromuro de potasio (KBr) en el Espectrómetro FT-IR Brucker Tensor 27 del Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría.

6.2.8. Cristalografía de Rayos X

La cristalografía de Rayos X fue obtenida por la técnica de difracción de rayos X por monocristal en el Difractómetro de Monocristal Bruker D8 Venture.

6.2.9. HPLC-UV

El porcentaje de pureza de cada uno de los compuestos sintetizados, se obtuvo mediante la técnica de HPLC-UV en el cromatógrafo de líquidos Waters 1525 del Laboratorio de Cromatografía. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas para el análisis de HPLC-UV de los compuestos sintetizados.

Muestra	Cromatógrafo de líquidos	Detector	λ onda	Columna	Eluyente
3 α -1	Waters 1525	Waters 2996 UV arreglo de diodos	241 nm	Eclipse XDB Phenyl 150 x 4.5 mm x 5 μ m	Inicio: Metanol: Agua 60:40 35 min: Metanol 100 %
AMD-1			241 nm		
3 α -2			241 nm		
3 α -3			245 nm	ZORBAX ECLIPSE PLUS C 18 100 x 2.1 mm	Inicio: Metanol: Agua 20:80 35 min: Metanol 100 %
AMD-2			237 nm		
AMD-3			242 nm		

6.3. Evaluación de la actividad citotóxica de los derivados semisintéticos.

Las células de cada línea, se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina G, estreptomicina (100 μ g/mL) y 0.25 μ g/mL de B-anfotericina, y se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se sembraron 150 μ L de cada línea celular (10,000 células aproximadamente), en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37°C en CO₂ al 5%.

Posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se adicionó 150 μ L de las diluciones de los compuestos por evaluar (concentración de 25 μ M para el screening primario), y/o del fármaco de referencia (cisplatino, concentración de 16 μ M), según sea el caso. La placa se incubó por 48 h bajo las condiciones ya mencionadas. Los grupos control contenían solamente un volumen equivalente de cada línea celular y RPMI-1640 + 10% SFB.

Después, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 10% m/v (100 μ L/pozo). La placa se incubó durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se desechó, la placa se lavó 4 veces con agua corriente y se dejó secar. Posteriormente las células fueron tratadas con 100 μ L de sulforrodamina B al 0.4% durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lavó tres veces con una disolución de ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris pH 10.5. Las absorbancias se determinaron con un lector de placas a una λ de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas, por lo tanto, a mayor coloración menor porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación:

$$\%IC = 100 - \left[\left(\frac{B}{A} \right) * 100 \right]; \text{ donde}$$

A = densidad óptica de las células sin tratamiento

B = densidad óptica de las células tratadas con compuesto prueba o fármaco

Para la determinación de la IC₅₀, se construyeron curvas de dosis-respuesta, donde los valores de concentración de los compuestos a evaluar fueron de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μ M.

6.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los derivados semisintéticos.

Se registraron los pesos de cada uno de los 21 ratones hembra, para determinar el volumen de la disolución de pentobarbital (1 mg/ μ L) a administrar por vía intraperitoneal, con base a la dosis de 0.63 mg/Kg peso.

Una vez administrado el sedante y después de que los ratones se encontraban en estado de sedación, se identificaron en grupos de 3 y se realizó la administración tópica de las muestras (pabellón de oreja derecha) y los vehículos (pabellón oreja izquierda), según la siguiente tabla:

Tabla 8. Condiciones de administración tópica para la prueba de Edema inducido por TPA.

Grupo	Oreja izquierda	Oreja derecha
I (control-vehículo CHCl ₃)	Etanol (10 µL) + CHCl ₃ (20 µL)	TPA (10 µL) + CHCl ₃ (20 µL)
II (compuesto 3α-1)		TPA (10 µL) + Compuesto correspondiente (20 µL)
III (compuesto 3α-2)		
IV (compuesto 3α-3)		
V (compuesto AMD-1)		
VI (compuesto AMD-2)		
VII (compuesto AMD-3)		

Transcurridas 4 horas de la administración tópica, se sacrificaron los animales mediante hipoxia inducida en cámara de CO₂. Enseguida, se realizó la disección de las orejas de cada sujeto y se registraron los pesos de cada una (Figura 22).

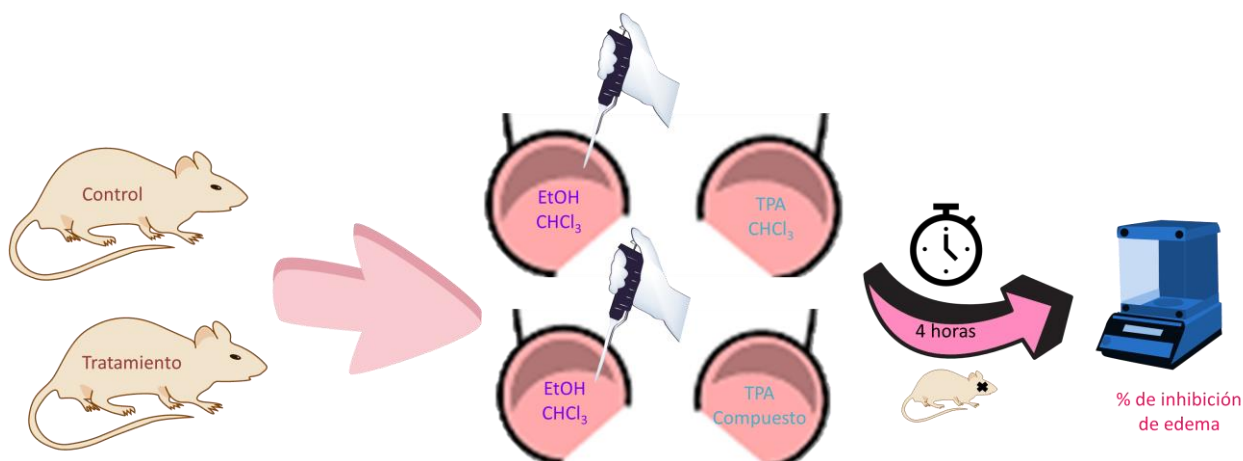


Figura 22. Prueba de inhibición de edema inducido por TPA.

Finalmente, se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición de edema a partir de la siguiente fórmula:

$$\%IE = \left(\frac{I - IN}{I} \right) \times 100; \text{ donde}$$

I = Peso de la Oreja Inflamada

IN = Peso de la Oreja no inflamada

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de los ácidos masticadenónico y 3 α -hidroximasticadenónico

7.1.1. Ácido 3 α -hidromasticadenónico (**3 α**)

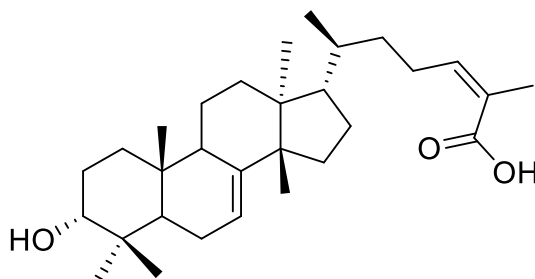


Figura 23. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**)

Se obtuvo un sólido blanco fino (1.9 g). Rendimiento 7.92%. P.f= 117-120°C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.08 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H24), 5.25 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H7), 3.47 (s, 1H, H3), 1.92 (s, 3H, H27a, H27b, H27c), 0.97 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 0.94 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 0.91 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 0.90-0.89 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.82 (s, 3H, H18a, H18b, H18c), 0.77 (s, 3H, H19a, H19b, H19c).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 172.40 (C26), 147.19 (C24), 146.14 (C8), 125.68 (C25), 117.85 (C7), 76.36 (C3), 27.79 (C30), 27.27(C28), 22.66 (C29), 21.89 (C21), 21.82 (C18), 20.58 (C27), 14.13 (C19).

IR (cm⁻¹): 3437.09, 2929.65, 1697.09, 1366.47, 1065.88, 973.16.

7.1.2. Ácido masticadienónico (AMD)

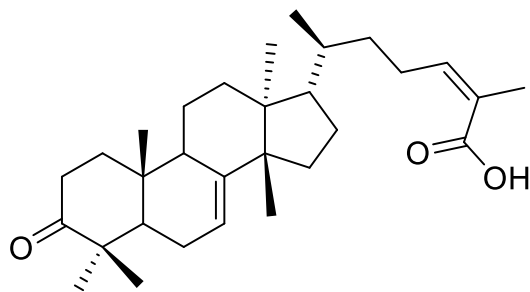


Figura 24. Ácido masticadienónico (AMD)

Se obtuvo un sólido blanco fino (1 g). Rendimiento 4.17%. P.f= 136-138°C.

RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.08 (t, *J*= 7.3 Hz, 1H, H24), 5.30 (d, *J*= 3.0 Hz, 1H, H7), 1.92 (s, 3H, H27a, H27b, H27c), 1.11 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 1.05 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 1.01 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 1.00 (s, 3H, H19a, H19b, H19c), 0.90-0.89 (d, *J*= 6.4 Hz, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.81 (s, 3H, H18a, H18b, H18c).

RMN ¹³C (176 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 216.94 (C3), 172.85 (C26), 147.22 (C24), 145.98 (C8), 125.78 (C25), 117.82 (C7), 27.43 (C30), 24.56 (C29), 21.97 (C18), 21.61 (C28), 20.54 (C27), 18.24 (C21), 12.80 (C19).

IR (cm⁻¹): 3433.08, 2934.58, 1639.47, 1380.32, 1061.41, 925.84.

Estas señales fueron corroboradas con lo ya reportado. De igual forma, la asignación completa de las señales del esqueleto de los ácidos, se reporta en los Anexos.

7.2. Síntesis de ésteres 3 α -hidroxi-masticadienato de metilo y masticadienato de metilo (compuestos 3 α -1 y AMD-1).

7.2.1. 3 α -hidroximasticadienato de metilo (compuesto 3 α -1)

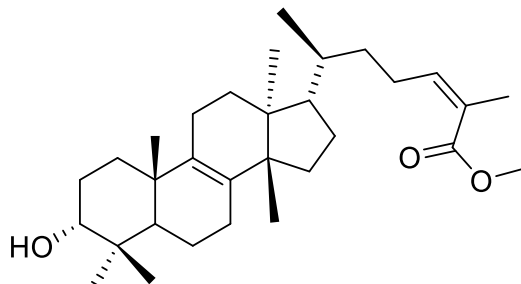


Figura 25. 3 α -hidroximasticadienato de metilo (compuesto 3 α -1)

Se obtuvo un sólido blanco fino (50 mg). Rendimiento 14.76%. P.f= 80-83°C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.90 (t, $J= 7.1$ Hz, 1H, H24), 3.71 (d, $J= 1.8$ Hz, 3H, H27), 3.41-3.39 (m, 1H, H3), 2.13 (m, 2H, H7), 1.87 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 1.09 (s, 3H, H31a, H31b, H31c), 0.99-0.95 (d, $J= 10.8$ Hz, 6H, Met-29 y Met-30), 0.85 (s, 3H, H19a, H19b, H19c), 0.83 (s, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.81 (s, 3H, H18a, H18b, H18c).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.48 (C26), 143.70 (C24), 139.56 (C9), 133.89 (C8), 126.46 (C25), 76.19 (C3), 51.47 (C27), 29.07 (C7), 28.30 (C30), 23.23 (C31), 22.22 (C21), 20.64 (C28), 19.94 (C29), 16.67 (C18), 16.21 (C19).

IR (cm^{-1}): 3419.56, 2948.73, 1717.87, 1373.55, 1200.56, 1062.92, 977.21.

Determinación de masas exactas M^{+1} (m/z):

Masa Exacta (valor teórico)	Masa calculada (valor experimental)	Fórmula molecular	Número de insaturaciones
471.38490	471.38382	$^{12}\text{C}_{31}^{1}\text{H}_{51}^{16}\text{O}_3$	10

HPLC-UV: 97.0% de pureza.

7.2.2. Masticadienato de metilo (**compuesto AMD-1**)

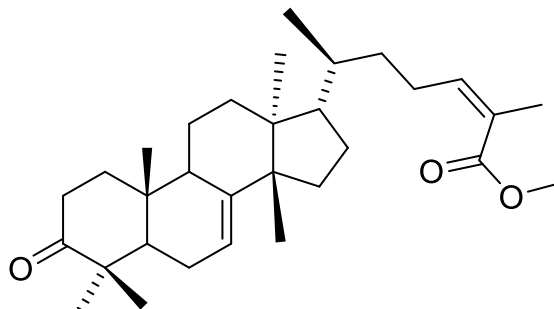


Figura 26. Masticadienato de metilo (**compuesto AMD-1**)

Se obtuvo un sólido blanco fino (80 mg). Rendimiento 26.70%. P.f= 120-122°C.

RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.95 (t, *J*= 6.8 Hz, 1H, H24), 5.32 (q, *J*= 3.3 Hz, 1H, H7), 3.75 (s, 3H, H27a, H27b, H27c), 1.91 – 1.91 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 1.13 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 1.07 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 1.03 (s, 3H, H31a, H31b, H31c), 1.02 (s, 3H, H19a, H19b, H19c), 0.92-0.91 (d, *J*= 6.5 Hz, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.83 (s, 3H, H18a, H18b, H18c).

RMN ¹³C (176 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 217.00 (C3), 168.58 (C26), 145.98 (C8), 144.07 (C24), 126.49 (C25), 117.81 (C7), 51.20 (C27), 27.43 (C31), 24.55 (C30), 21.96 (C18), 21.61 (C29), 20.70 (C28), 18.24 (C21), 12.80 (C19).

IR (cm⁻¹): 2948.92, 1714.16, 1383.96, 1212.89, 975.55.

Espectrometría de masas M⁺¹ (m/z): 468.72172, ¹²C₃₁¹H₅₁¹⁶O₃.

HPLC-UV: 85% pureza.

7.3. Síntesis de los ésteres masticadienato de *p*-bromobencilo y masticadienato de 2,6-diclorobencilo a partir de 3 α y AMD (compuestos 3 α -2, 3 α -3, AMD-2 y AMD-3).

7.3.1. 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (compuesto 3 α -2)

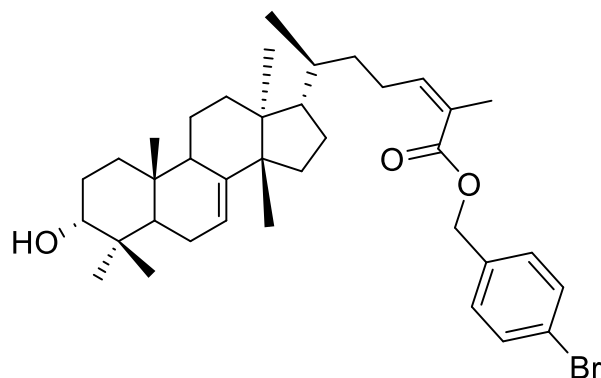


Figura 27. 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (compuesto 3 α -2)

Se obtuvo un sólido blanco fino (100 mg). Rendimiento 24.39%. P.f= 140-143°C.

RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.48 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H, H34-H34'), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H33-H33'), 5.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H24), 5.24 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H7), 5.13 (s, 2H, H31a, H31b), 3.46 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, H3), 1.91 – 1.90 (m, 3H, H27a, H27b, H27c), 0.95 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 0.93 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 0.91 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 0.84-0.83 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.80 (s, 3H, H18a, H18b, H18c), 0.77 (s, 3H, H19a, H19b, H19c).

RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.71 (C26), 146.11 (C8), 144.88 (C24), 134.87 (C32), 131.68 (C34 y C34'), 129.81 (C33 y C33'), 126.20 (C25), 122.10 (C35), 117.89 (C7), 76.32 (C3), 65.11 (C31), 27.80 (C29), 27.26 (C28), 21.88 (C30), 21.83 (C18), 20.71 (C27), 18.20 (C21), 13.00 (C19).

IR (cm^{-1}): 3422.74, 2951.52, 1712.29, 1468.22, 1384.41, 1147.00, 1071.85, 993.33, 804.63.

Determinación de masas exactas M^{+1} (m/z):

Masa Exacta (valor teórico)	Masa calculada (valor experimental)	Fórmula molecular	Número de insaturaciones
625.32593	625.32563	$^{12}\text{C}_{37}^{1}\text{H}_{54}^{70}\text{Br}_1^{16}\text{O}_3$	10.5

HPLC-UV: 93.0% de pureza

7.3.2. 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto 3 α -3**)

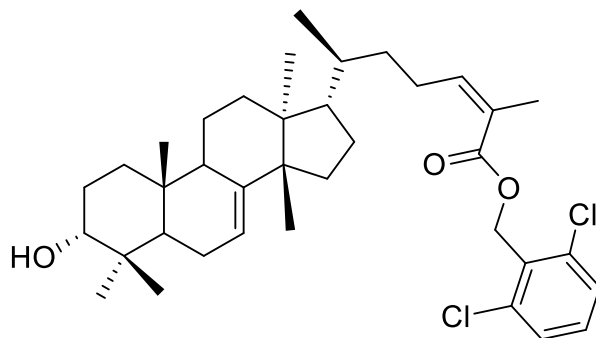


Figura 28. 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto 3 α -3**)

Se obtuvo un sólido blanco fino (210 mg). Rendimiento 38.77%. P.f= 119-122°C.

RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H34-H34'), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H35), 5.98 – 5.94 (m, 1H, H24), 5.46 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H31), 5.26 (q, $J = 2.9$ Hz, 1H, H7), 3.48 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, H3), 1.92 – 1.90 (m, 3H, H27a, H27b, H27c), 0.97 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 0.96 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 0.94 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 0.80 (s, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.79 (s, 3H, H18a, H18b, H18c), 0.78 (s, 3H, H19a, H19b, H19c).

RMN ^{13}C (176 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167.88 (C26), 146.16 (C8), 144.29 (C24), 137.03 (C33 y C33'+), 131.74 (C32), 130.39 (C35), 128.39 (C34 y C34'), 126.24 (C25), 117.86 (C7), 76.34 (C3), 61.05 (C31), 27.79 (C29), 27.27 (C28), 21.89 (C21), 21.83 (C30), 20.75 (C27), 17.99 (C18), 13.01 (C19).

IR (cm^{-1}): 3563.43, 2951.66, 1706.15, 1438.66, 1384.39, 1147.52, 1072.25, 983.01, 769.13, 727.18.

Determinación de masas exactas M^{+1} (m/z):

Masa Exacta (valor teórico)	Masa calculada (valor experimental)	Fórmula molecular	Número de insaturaciones
615.33849	615.33717	$^{12}\text{C}_{37}^{1}\text{H}_{53}^{35}\text{Cl}_2^{16}\text{O}_3$	10.5

HPLC-UV: 81% de pureza.

7.3.3. Masticadienato de *p*-bromobencilo (**compuesto AMD-2**).

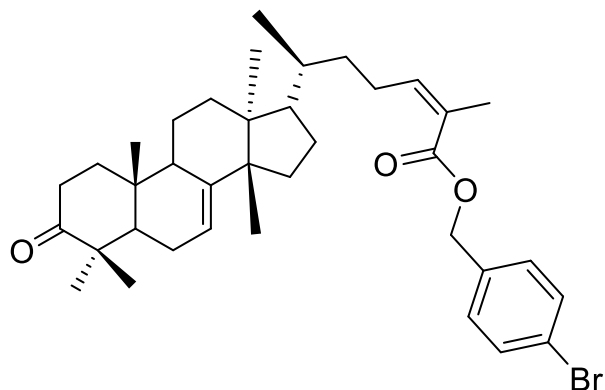


Figura 29. Masticadienato de *p*-bromobencilo (**compuesto AMD-2**)

Se obtuvo un sólido blanco fino (400 mg). Rendimiento 58.13%. P.f= 100-102°C.

RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.50 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H34, H34'), 7.27 (d, *J*= 2.4 Hz, 2H, H33, H33'), 6.00-5.98 (t, *J*= 6.8 Hz, 1H, H24), 5.32 (d, *J*= 3.1 Hz, 1H, H7), 5.14 (s, 2H, H31a, H31b), 1.93 (s, 3H, H27a, H27b, H27c), 1.13 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 1.06 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 1.02 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 1.00 (s, 3H, H19a, H19b, H19c), 0.86-0.85 (d, *J*= 6.5 Hz, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.80 (s, 3H, H18a, H18b, H18c).

RMN ¹³C (176 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 216.90 (C3), 167.68 (C26), 145.95 (C8), 144.81 (C24), 135.33 (C32), 131.68 (C34 y C34'), 129.81 (C33 y C33'), 126.25 (C25), 122.11 (C35), 117.83 (C7), 65.11 (C31), 27.42 (C19), 24.57 (C30), 21.95 (C18), 21.62 (C29), 20.71 (C27), 18.19 (C21), 12.81 (C28).

IR (cm⁻¹) 2949.99, 1703.58, 1454.76, 1370.07, 1194.17, 973.75, 817.03.

Determinación de masas exactas M⁺¹ (m/z):

Masa Exacta (valor teórico)	Masa calculada (valor experimental)	Fórmula molecular	Número de insaturaciones
623.30971	623.30998	¹² C ₃₇ ¹ H ₅₂ ⁷⁰ Br ₁ ¹⁶ O ₃	11.5

HPLC-UV: 96.7% de pureza.

7.3.4. Masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto AMD-3**)

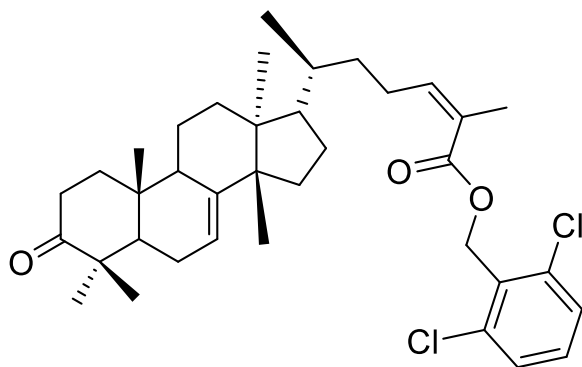


Figura 30. Masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto AMD-3**)

Se obtuvo un sólido blanco fino (300 mg). Rendimiento 55.77%. P.f= 101-104°C.

RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36 (d, *J*= 8.1 Hz, 2H, H34, H34'), 7.25 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H, H35), 5.96 (t, *J*= 7.5 Hz, 1H, H24), 5.47 (d, *J*= 2.4 Hz, 1H, H31a, H31b), 5.32 (d, *J*= 3.1 Hz, 1H, H7), 1.91 (s, 3H, H27a, H27b, H27c), 1.14 (s, 3H, H29a, H29b, H29c), 1.07 (s, 3H, H30a, H30b, H30c), 1.03 (s, 3H, H28a, H28b, H28c), 1.01 (s, 3H, H19a, H19b, H19c), 0.80 (s, 3H, H21a, H21b, H21c), 0.79 (s, 3H, H18a, H18b, H18c).

RMN ¹³C (176 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 216.89 (C3), 167.84 (C26), 146.00 (C8), 144.22 (C24), 137.03 (C33 y C33'), 131.74 (C32), 130.38 (C35), 128.39 (C34 y C34'), 126.30 (C25), 117.80 (C7), 61.04 (C31), 26.88 (C19), 24.38 (C30), 22.66 (C29), 21.96 (C18), 20.74 (C27), 18.30 (C21), 12.81 (C28).

IR (cm⁻¹): 2949.20, 1713.20, 1439.14, 1370.24, 1133.10, 980.59, 773.58, 725.23.

Determinación de masas exactas M⁺¹ (m/z):

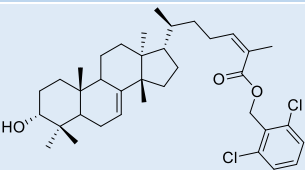
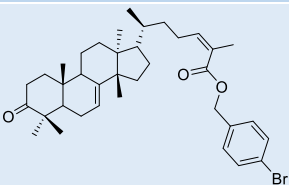
Masa Exacta (valor teórico)	Masa calculada (valor experimental)	Fórmula molecular	Número de insaturaciones
613.31916	613.32152	¹² C ₃₇ ¹ H ₅₁ ³⁵ Cl ₂ ¹⁶ O ₃ .	11.5

HPLC-UV: 90.9% de pureza.

7.4. Cristalografía de Rayos X.

A continuación se presentan los datos obtenidos en la cristalografía de rayos X para los compuestos **3 α -3** y **AMD-2**.

Tabla 9. Datos cristalográficos (**compuestos 3 α -3 y AMD-2**).

Parámetros	Compuestos	
	3 α -3	AMD-2
Estructura		
Fórmula empírica	C ₃₇ H ₅₂ Cl ₂ O ₃	C ₃₇ H ₅₁ BrO ₃
Peso molecular	615.68	623.68
Temperatura	200 K	150 K
Longitud de onda	0.71073 Å	1.54178 Å
Sistema cristalino	Triclinic	Orthorhombic
Grupo espacial	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de celda unitaria	a=7.5376 (3) Å α = 81.4320° b= 12.6031 (5) Å β = 80.4700° c= 18.5035 (8) Å γ = 80.1460°	a=6.9397 (3) Å α = 90° b= 20.5163 (5) Å β = 90° c= 22.8282 (6) Å γ = 90°
Volumen	1694.73 (12) Å ³	3250.21 (15) Å ³
Z	2	4
Densidad (calculada)	1.207 mg/m ³	1.275 mg/m ³
Coeficiente de absorción	0.226 mm ⁻¹	1.978 mm ⁻¹
F (000)	664	1328
Tamaño de cristal	0.562 x 0.184 x 0.120 mm ³	0.439 x 0.420 x 0.318 mm ³
Rango de θ para la colección de datos	2.250-25.369°	2.896-68.253°
Rango index	-9 \leq h \leq 9 -15 \leq k \leq 15	-8 \leq h \leq 8 -22 \leq k \leq 24

	$-22 \leq I \leq 22$	$-27 \leq I \leq 27$
Reflexiones colectadas	47159	19500
Reflexiones independientes	12360 [R(int) = 0.0448]	5871 [R(int) = 0.0206]
Integridad a $\theta=25.242^\circ$	99.9%	99.6%
Corrección de absorción	Semi-empirical from equivalents	Semi-empirical from equivalents
Transmisión máxima y mínima	0.7452 y 0.7142	0.7531 y 0.6237
Método de refinamiento	Full-matrix least-squares on F^2	Full-matrix least-squares on F^2
Datos/ restricciones/ parámetros	12360/ 555/ 825	5871/ 0 / 377
Ajuste de F^2	1.085	1.074
índice final R [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0676, wR2 = 0.1129	R1 = 0.0255, wR2 = 0.0650
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1061, wR2 = 0.1283	R1 = 0.0258, wR2 = 0.0652
Parámetro absoluto estructural	-0.03 (2)	0.029 (3)
Mayor diferencia de pico y fondo	0.240 y -0.190 e.Å ⁻³	0.525 y -0.270 e.Å ⁻³

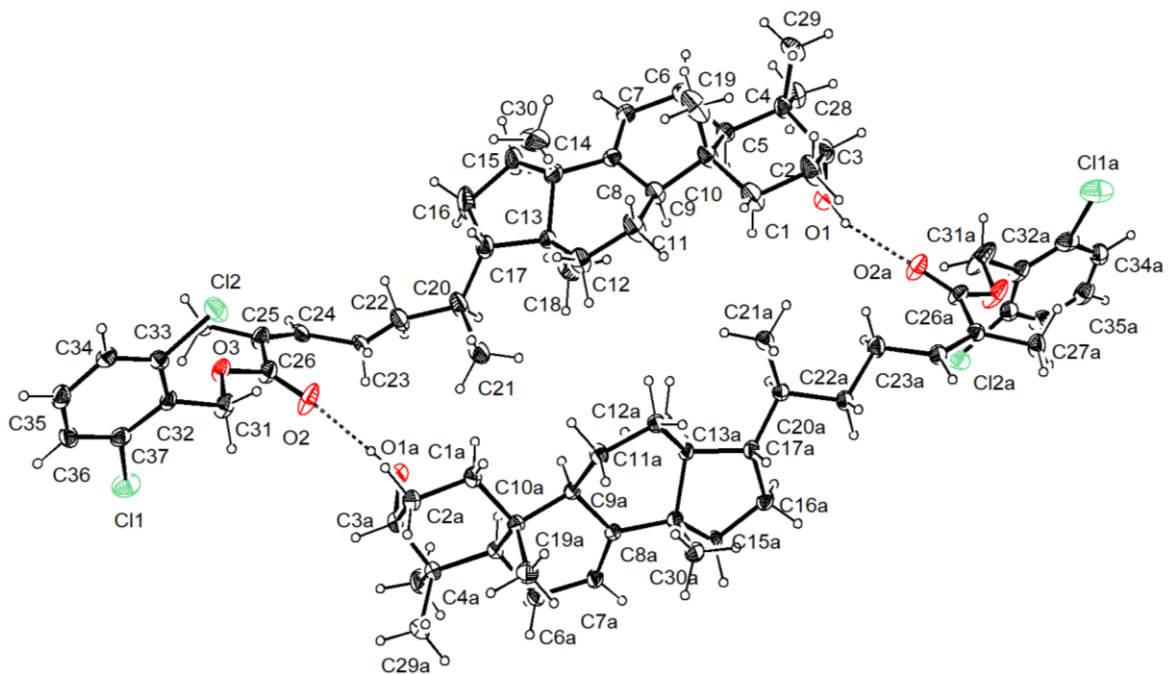


Figura 31. Estructura del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**compuesto 3a-3**)

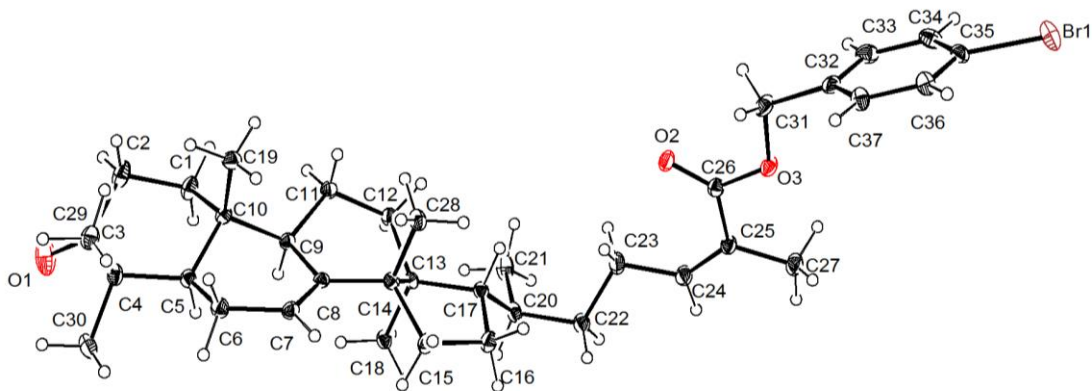


Figura 32. Estructura del Masticadienato de *p*-bromobencilo (**compuesto AMD-2**)

7.5. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados.

7.5.1. Determinación del porcentaje de inhibición de crecimiento celular (Screening primario).

Se obtuvieron los siguientes porcentajes de inhibición de crecimiento celular en diferentes líneas de cáncer humano y en una línea de células sanas.

Tabla 10. Datos de inhibición de crecimiento celular de todos los compuestos.

Compuesto	% de inhibición de crecimiento celular						
	U251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS7
3α³	30.59	32.1	19.56	3.72	37.26	37.87	25.82
3α-1²	44.70	78.90	67.80	1.60	16.27	52.55	3.76
3α-2²	NC	47.5	NC	NC	7.10	11.65	NC
3α-3²	NC	19.2	NC	NC	9.92	NC	NC
AMD³	4.74	NC	NC	NC	4.22	NC	35.06
AMD-1¹	20.67	48.15	66.59	9.75	34.38	26.32	19.74
AMD-2¹	6.75	3.81	3.65	3.00	3.24	0.04	2.11
AMD-3¹	1.40	2.64	0.30	2.78	1.21	NC	3.45

U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: cáncer de próstata, K-562: leucemia, HTC-15: cáncer de colon, MCF-7: cáncer de mama, SKLU-1: cáncer de pulmón, COS7: células de riñón de mono (no cancerosa).

Los compuestos fueron evaluados a una única concentración de 25 μ M.

*NC: no citotóxico.

Vehículos utilizados:

¹Metanol, ²Etanol, ³DMSO

7.5.2. Determinación de IC₅₀ en línea celular de cáncer de próstata (PC-3)

La determinación de IC₅₀ se realizó en la línea celular PC-3 debido a su actividad significativa determinada en el screening primario. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11. Datos de IC₅₀ de todos los compuestos en la línea celular de cáncer de próstata.

Compuesto	IC ₅₀
	PC-3
Control (Cisplatino)	15.86 ± 0.6
3α	47.5 ± 0.4
3α-1	15.9 ± 0.5
3α-2	43.0 ± 0.3
3α-3	79.9 ± 0.2
AMD	50.0 ± 0.1
AMD-1	32.1 ± 0.6
AMD-2	76.0 ± 0.4
AMD-3	68.0 ± 0.3

PC-3: línea de células de cáncer de próstata, n=3

Las concentraciones utilizadas en la elaboración de la curva fueron: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µM.

Los datos obtenidos fueron analizados en una prueba ANOVA, p=0.001, en el software Prisma.

7.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos sintetizados

Los resultados de la prueba de inhibición de edema inducido por TPA, se muestran en la siguiente tabla

Tabla 12. Datos de porcentaje de inhibición de edema de todos los compuestos.

Compuesto	% Inhibición de Edema
Control (Vehículo CHCl ₃)	0.00
3α*	6.70
3α-1	39.71
3α-2	22.25
3α-3	29.90
AMD*	18.00
AMD-1	43.54
AMD-2	15.07
AMD-3	14.35

Los compuestos fueron evaluados a una concentración de 0.02 g/µL.

El % de inhibición de edema es el resultado de la media de n=3 para cada grupo.

*Datos tomados de Ibeth, 2007.

Los datos obtenidos fueron analizados en una prueba Dunnet, p=0.05.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1. Obtención de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico, metabolitos secundarios de *A. adstringens*. (compuestos **3 α** y **AMD**)

A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que el aislamiento de los metabolitos secundarios de interés presentes en *A. adstringens*, permitió obtener los ácidos masticadienónico (**AMD**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**). Las estructuras de estos compuestos fueron corroboradas mediante diversas técnicas espectroscópicas (RMN, IR, Masas), y los datos fueron comparados con lo reportado en la literatura.

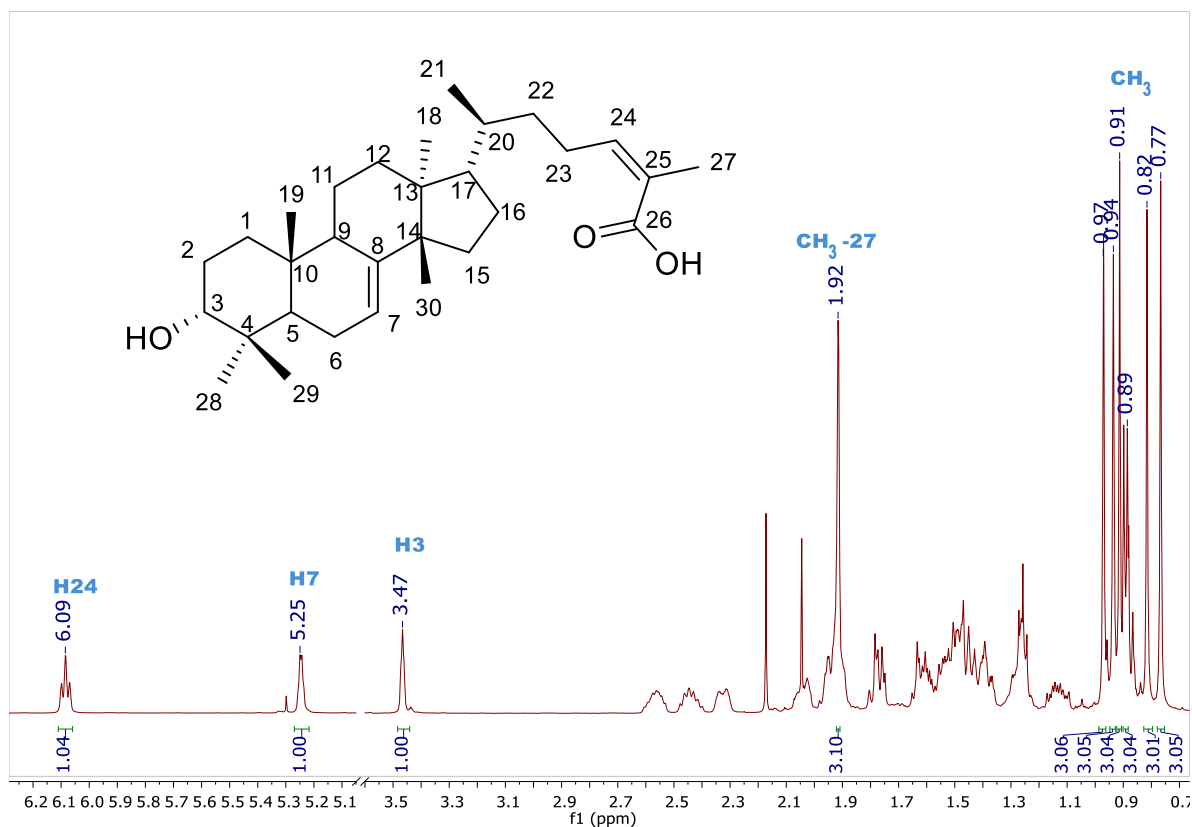


Figura 33. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz CDCl_3) del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. (**3 α**).

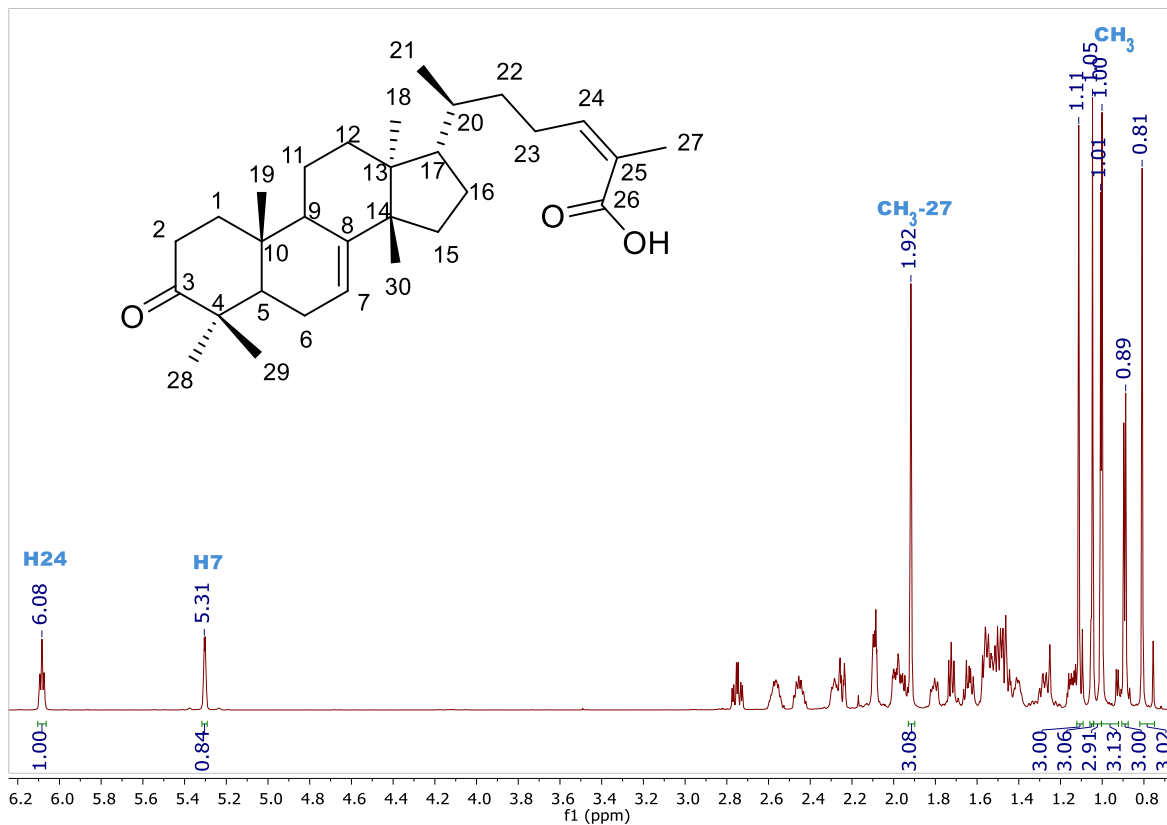


Figura 34. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz CDCl_3) del ácido masticadienónico. (**AMD**).

El análisis de RMN- ^1H del **3 α** y del **AMD** (Figuras 33 y 34), mostró las señales características de este tipo de triterpenos. Las señales con desplazamiento: 6.09 y 5.25 ppm (en el caso del **3 α**) y 6.08 y 5.30 ppm (en el caso del **AMD**), corresponden a los protones vinílicos de H24 y H7 en ambos casos. La señal en 3.47 ppm corresponde al protón H3 base alcohol presente en el **3 α** , mientras que en el **AMD** no se observa esta señal. Las señales con desplazamiento: 1.92, 0.94, 0.91, 0.97 ppm para el caso del **3 α** y 1.92, 1.11, 1.05, 1.01 ppm para el caso del **AMD**, representan los protones metílicos de los CH_3 -27, CH_3 -28, CH_3 -29 y CH_3 -30 respectivamente. Es importante señalar que lo anterior, coincide con lo reportado en la literatura.

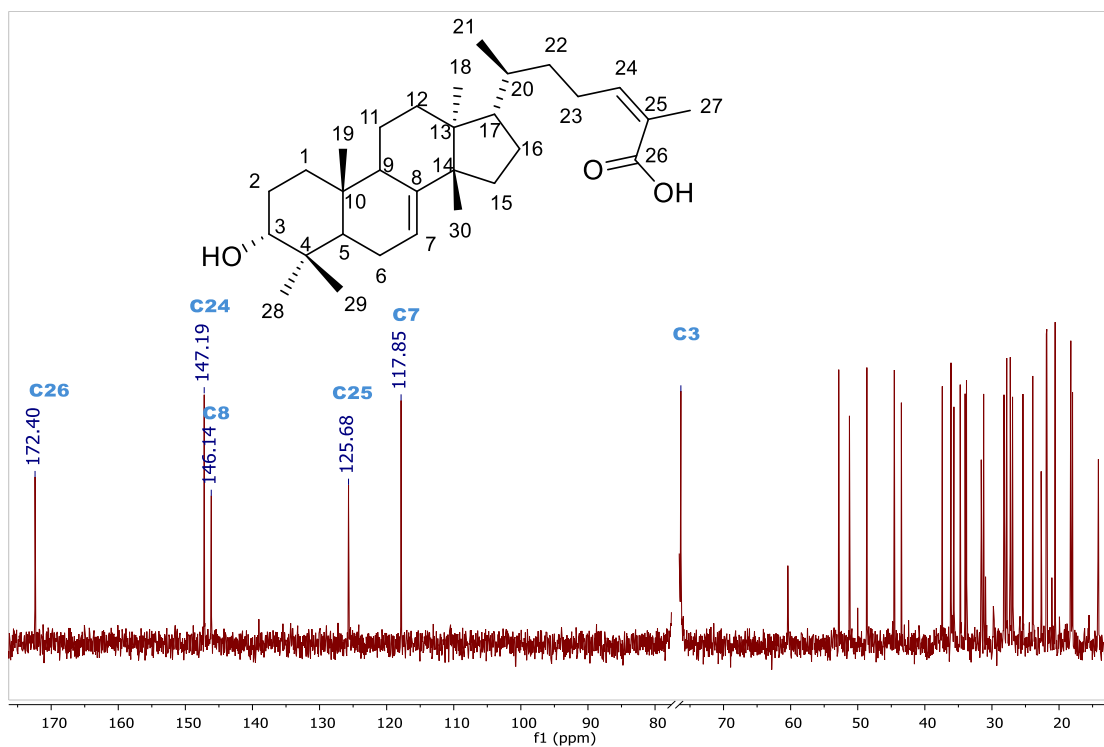


Figura 35. Espectro de RMN-¹³C (126 MHz CDCl₃) del ácido 3α-hidroximasticadienónico. (3α).

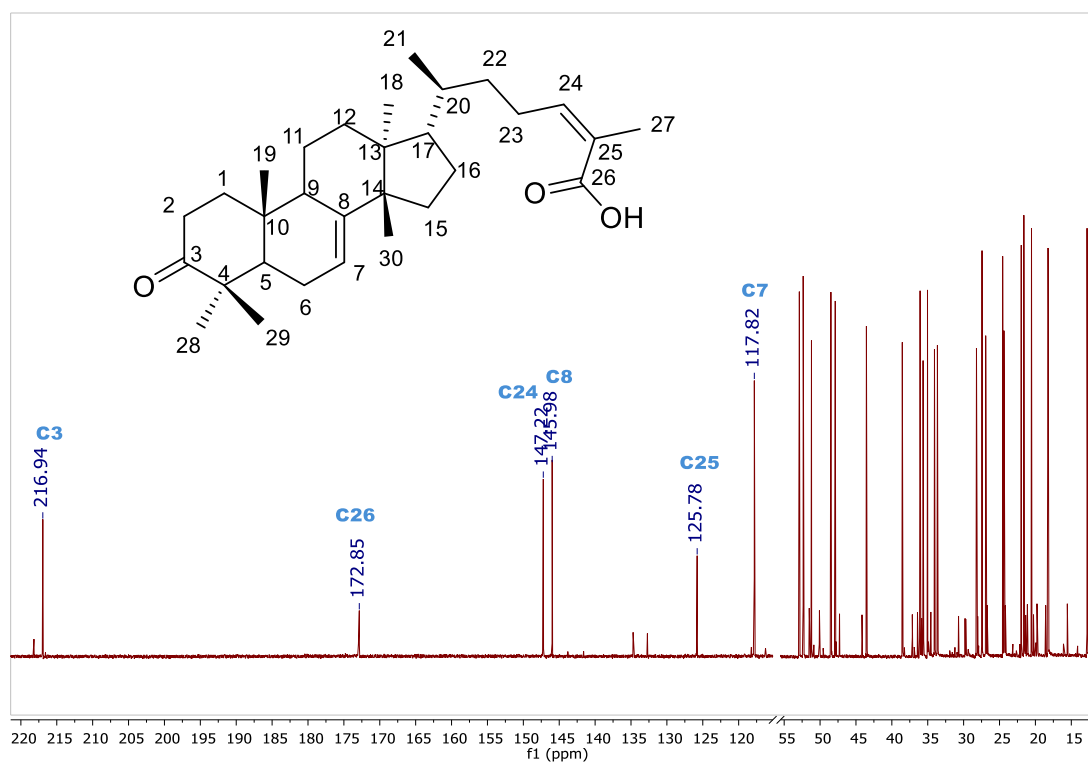


Figura 36. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del ácido masticadienónico (AMD).

En el caso del análisis de RMN-¹³C (Figuras 35 y 36), las señales con desplazamiento a: 172.40 ppm para el **3α** y 172.85 ppm para el **AMD**, corresponden a los carbonos de tipo ácidos carboxílicos de C26. De igual forma, en el caso del **AMD** se observa una señal a 216.94 ppm correspondiente a un carbono de tipo cetona, presente en el C3 del anillo A de este ácido. Sin embargo, en el caso del **3α** se observa una señal a 76.37 ppm correspondiente al C3 de tipo alcohol. En ambos casos se observa la presencia de los carbonos de tipo vinílicos a desplazamientos de: 147.19, 146.14, 125.68, 117.86 ppm en el caso del **3α** y 147.34, 145.98, 125.78, 117.83 ppm en el caso del **AMD** correspondientes a los C24, C8, C25, C7 (Figuras 35 y 36). De igual forma, estas asignaciones coinciden con lo reportado en la literatura.

Las asignaciones completas así como los espectros bidimensionales de RMN, se reportan en los anexos.

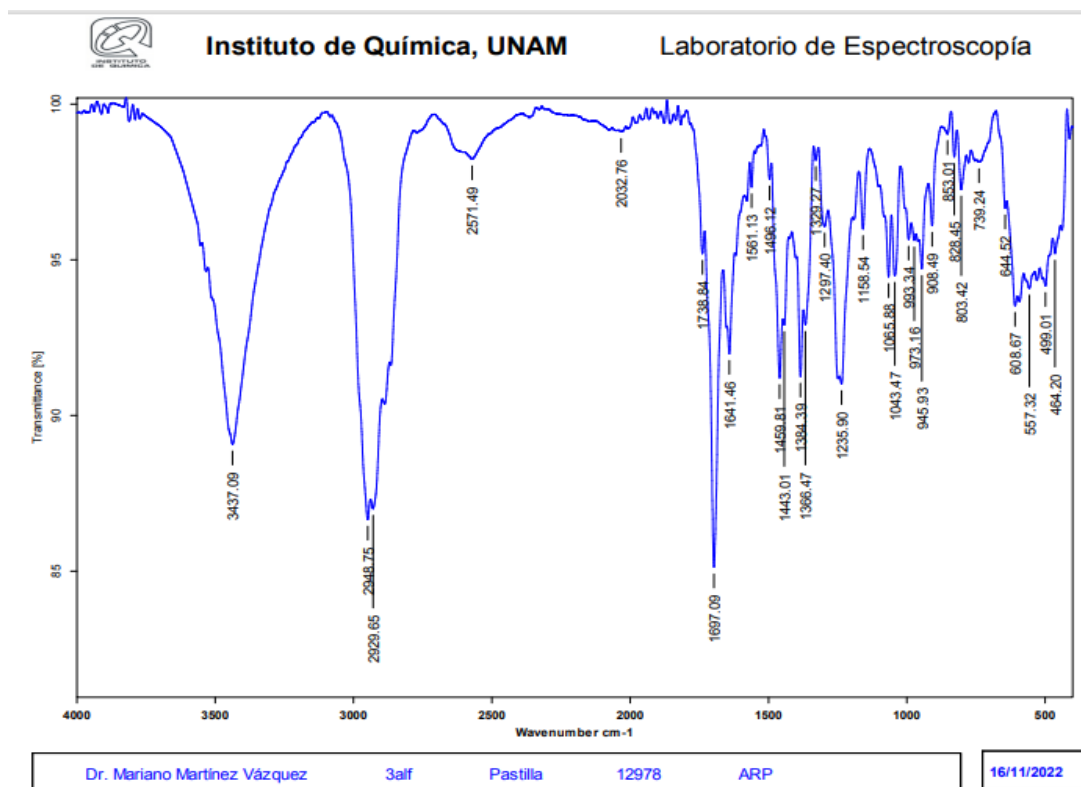


Figura 37. Espectro de Infrarrojo (IR) del ácido 3α-hidroximasticadienónico. (**3α**)

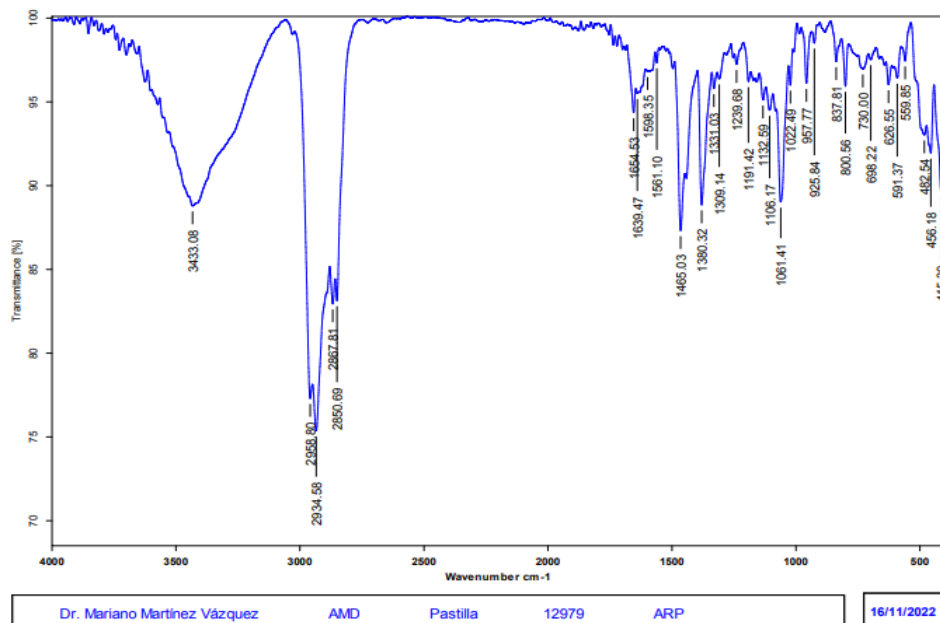


Figura 38. Espectro de Infrarrojo (IR) del ácido masticadienónico. (**AMD**)

Al mismo tiempo se realizaron los análisis de infrarrojo para ambos compuestos, observando bandas características: 3433.08 y 1061.41 (OH del ácido carboxílico de C26), 1639.47 (carbonilos de C3 y C26) para el caso del **AMD**; 3437.09 y 1062.92 (alcohol secundario de C3 y del ácido carboxílico de C26), 1697.09 (carbonilo de C26) para el caso del **3 α** (Figuras 37 y 38). Lo anterior coincide con lo reportado en la literatura.

El análisis de la espectroscopía en conjunto y su comparación con lo ya reportado en la literatura, confirma las estructuras de los metabolitos aislados.

8.2. Síntesis de los ésteres 3 α -hidroximasticadienato de metilo y masticadienato de metilo (**compuestos 3 α -1 y AMD-1**).

La síntesis de los ésteres metílicos (compuestos **AMD-1** y **3 α -1**), se plantea a través del siguiente mecanismo de reacción, donde el Et₂O-BF₃ produce la activación del grupo carbonilo del ácido carboxílico de C26, favoreciendo el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo del metanol, sufriendo una transferencia intermolecular de protón y finalmente estabilizando el intermediario mediante la pérdida de una molécula de agua (Figura 39).

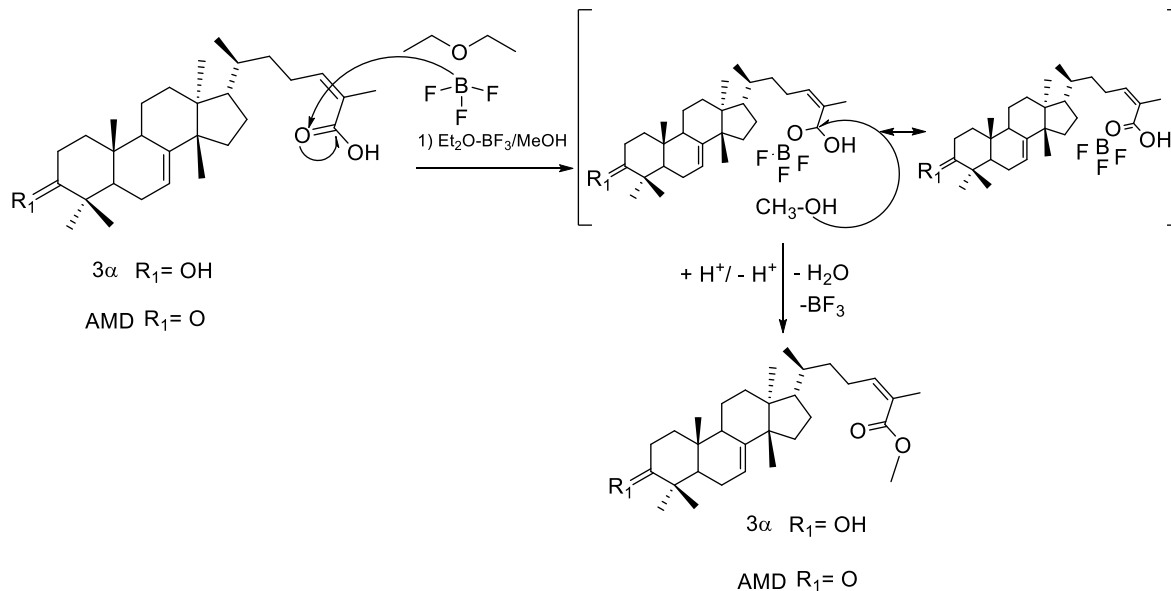


Figura 39. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención del masticadienato de metilo (**AMD-1**) y del 3α -hidroximasticadienato de metilo (**3 α -1**).

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de **AMD-1** determinaron de manera inequívoca la estructura de este compuesto.

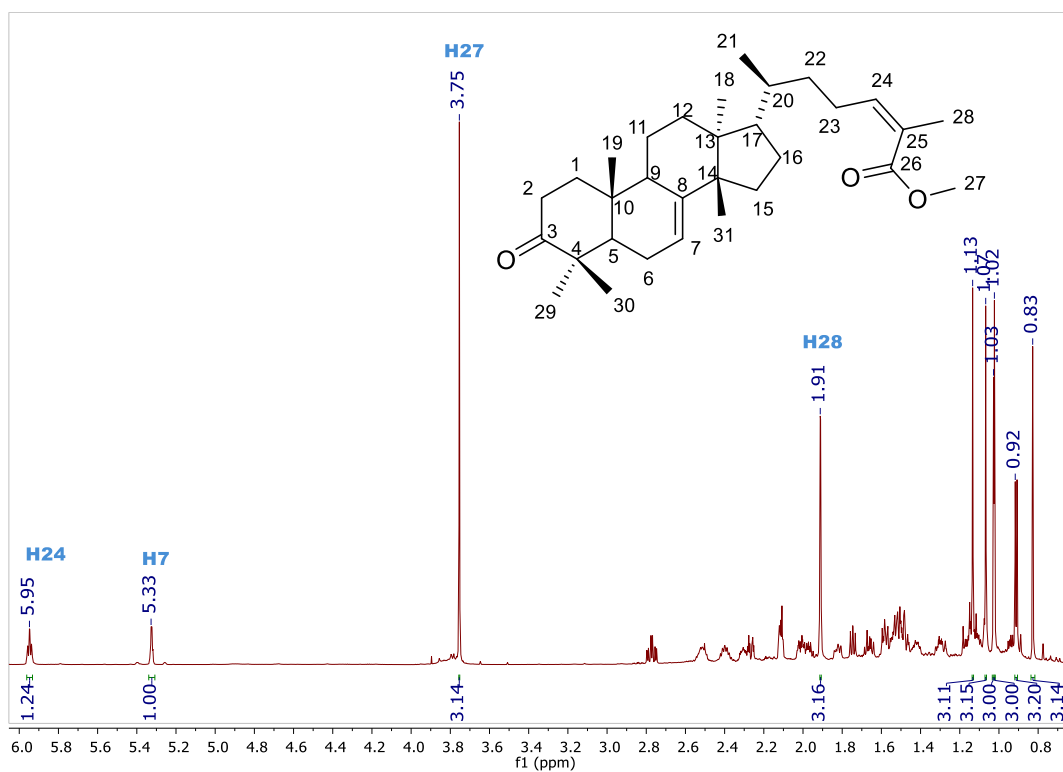


Figura 40. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz CDCl_3) del masticadienato de metilo (**AMD-1**).

En la RMN-¹H se puede observar una señal singulete a 3.75 ppm que corresponde a los protones del grupo metoxilo de la señal C27 del éster metílico (Figura 40).

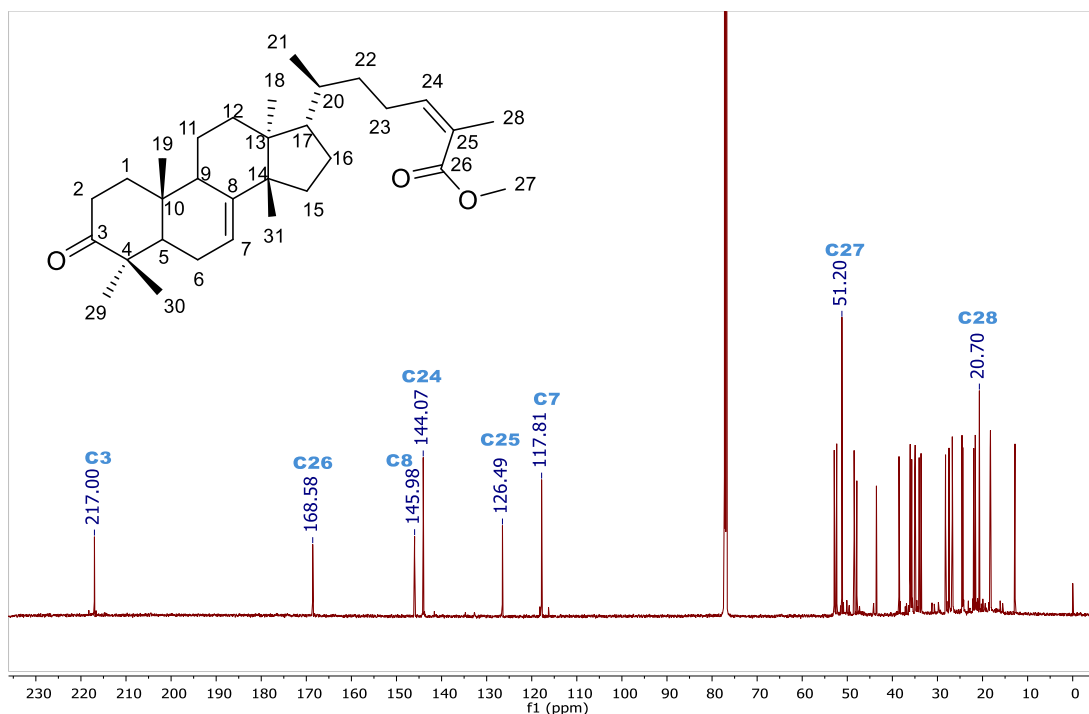


Figura 41. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

En el caso de la RMN-¹³C se observó una señal a 51.20 ppm correspondiente a un carbono base oxígeno de la señal C27 del éster metílico (Figura 41).

Además el análisis bidimensional HMBC confirma la correlación ¹H-¹³C a 3 enlaces de distancia con el carbono del grupo carbonilo del ácido carboxílico correspondiente a la señal C26 (Figura 42).

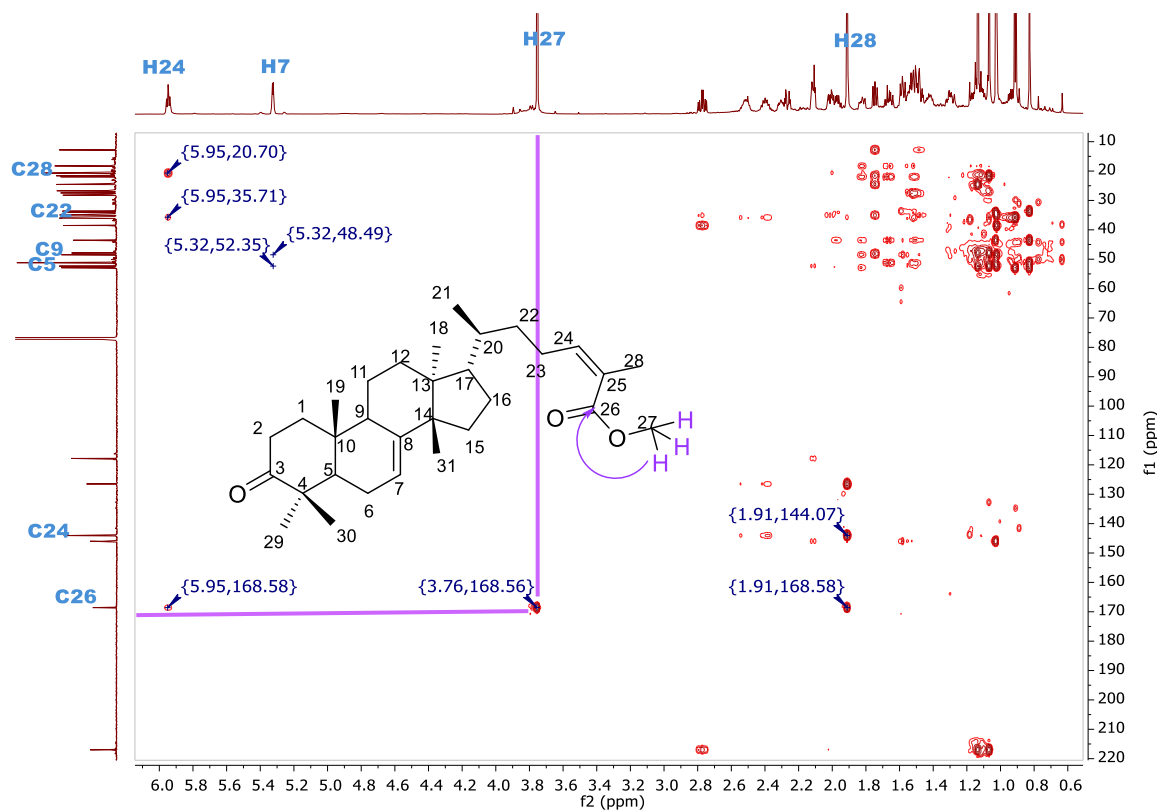


Figura 42. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

Cabe señalar que aunque en este trabajo se realizó una metodología de síntesis diferente, el producto obtenido (**compuesto AMD-1**) ya se había reportado de manera previa por Ibeth, 2007; por lo que todos los datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos corresponden a lo ya reportado en la literatura.

Los espectros completos de RMN, IR, datos de espectrometría de Masas, se encuentran en los anexos.

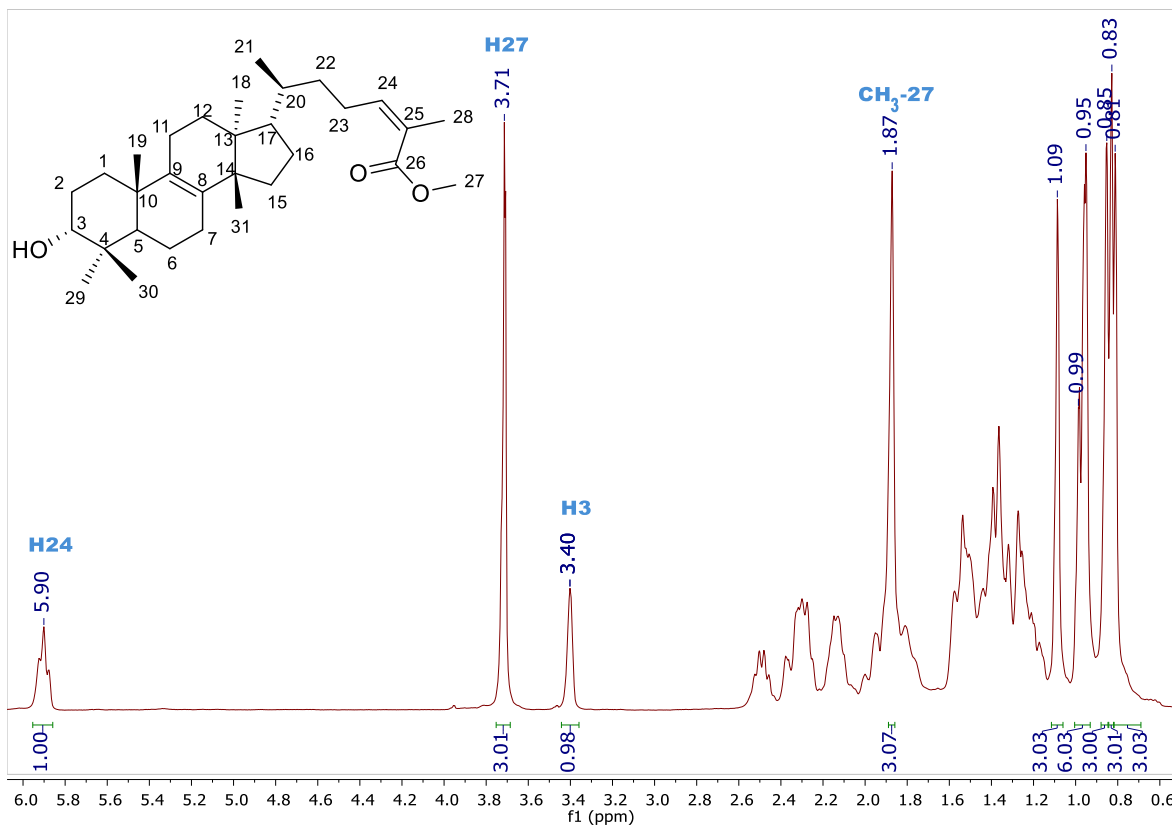


Figura 43. Espectro de RMN-¹H (300 MHz CDCl₃) del 3α-hidroxiasticadienato de metilo. (3α-1).

Por otro lado, en el espectro de resonancia magnética protónica de **3α-1** no se observó la señal a 5.30 ppm del protón vinílico en H7 característica de estos tirucalanos (Figura 43). Aunado a lo anterior, en el espectro de resonancia magnética de ¹³C se observaron dos señales de carbono vinílicos cuaternarios a 133.8 y 139.5 ppm. Estas señales indicaron que la doble ligadura entre C7 y C8 originales en el precursor, el ácido 3α-hidroxiasticadienónico, sufrió una isomerización hacia los átomos C8 y C9 en el producto (Figura 44).

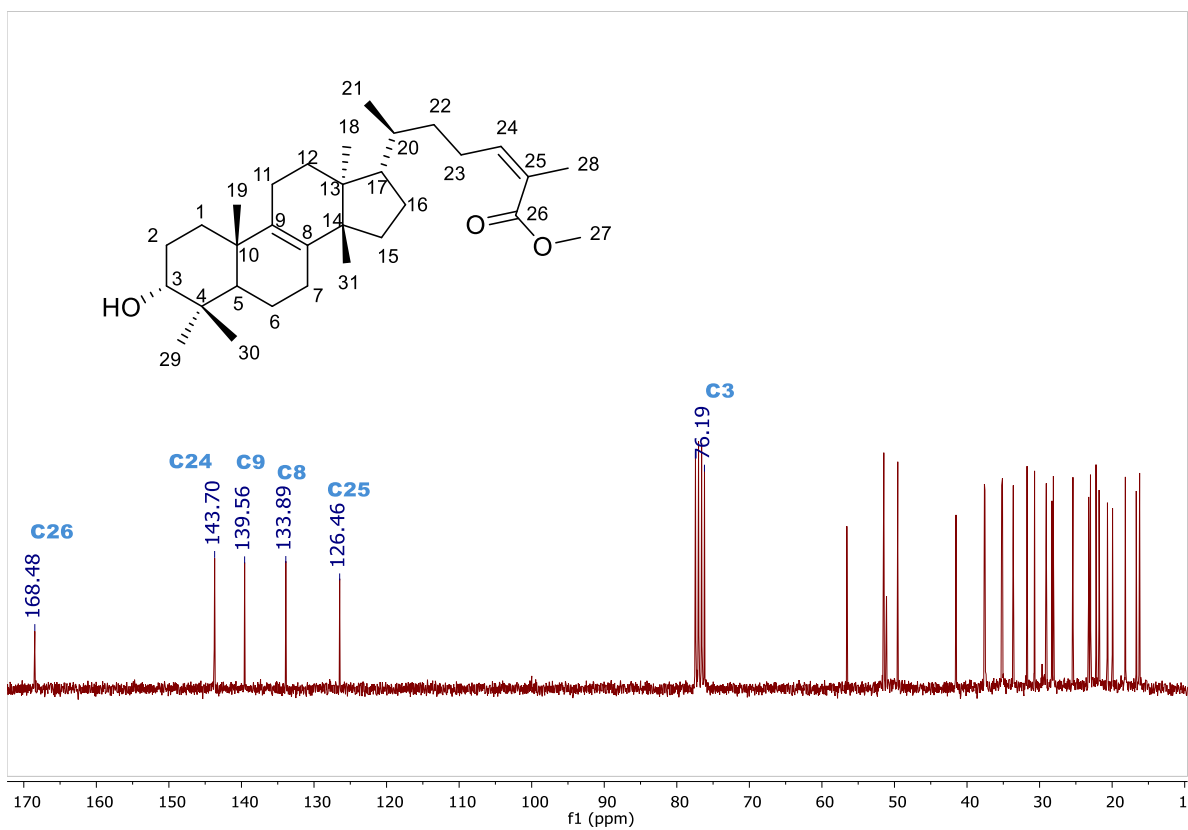


Figura 44. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz CDCl₃) del 3α-hidroximasticadienato de metilo.
(3α-1).

La presencia de los carbonos cuaternarios correspondientes a las señales mencionadas para C8 y C9, se confirman con el análisis de HSQC en donde se puede observar claramente que estos carbonos no tienen ninguna correlación con algún protón a un enlace de distancia.

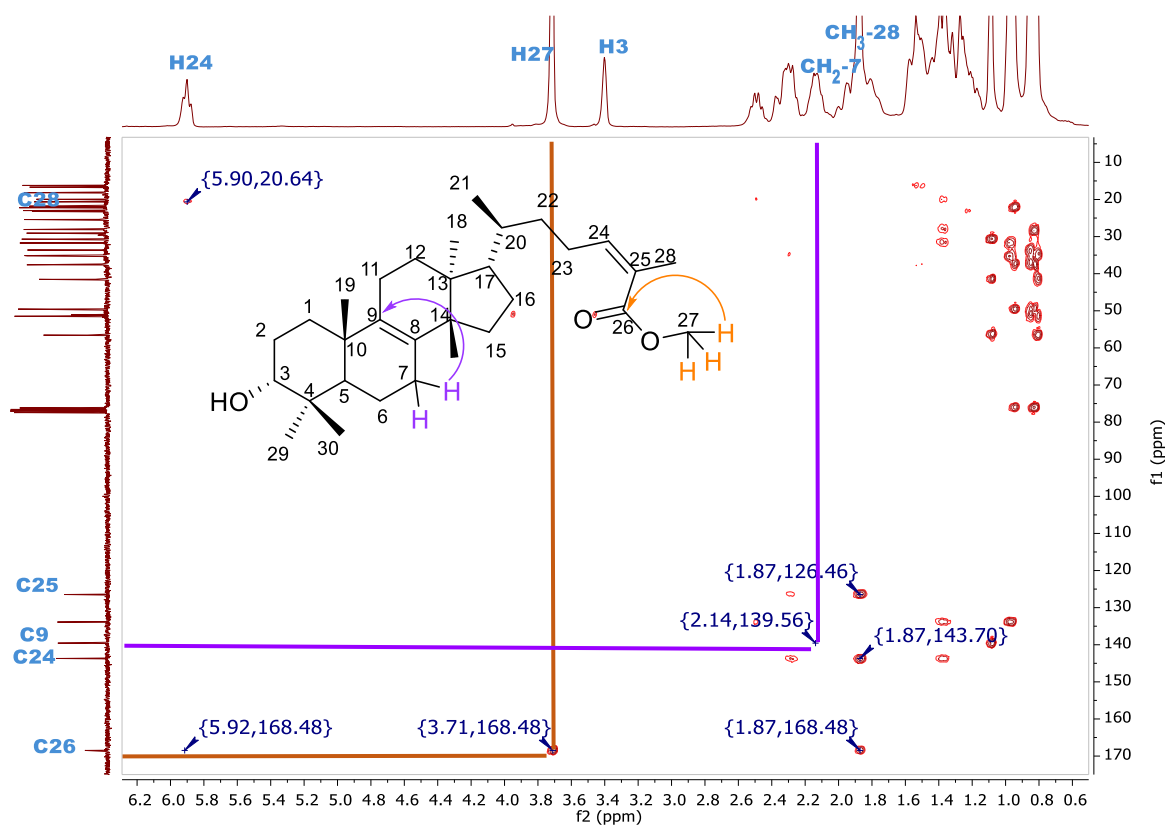


Figura 45. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**).

En el análisis bidimensional de HMBC (Figura 45), se muestra la correlación de los protones del CH_2 -7 con un desplazamiento de 2.14 ppm con el C9, lo que confirma la presencia de dos protones en el C7 que correlacionan a 3 enlaces de distancia. Además se confirma la correlación de los protones del metoxilo de C27 con el carbono del carbonilo de C26.

Esta isomerización se había observado previamente en la síntesis de ésteres etílicos a partir de **AMD** y **3 α** cuando se trataron con H_2SO_4 en EtOH (Ibeth, 2007). A diferencia del tratamiento con H_2SO_4 , en este caso la acidez del $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ solo logró la isomerización en **3 α -1**, pero no en el producto **AMD-1**.

Los espectros completos de RMN, IR, datos de espectrometría de Masas, se encuentran en los anexos.

8.3. Síntesis de los ésteres bencílicos del 3 α y AMD

La formación de los ésteres bencílicos (**compuestos AMD-2, AMD-3, 3 α -2 y 3 α -1**), se llevó a cabo mediante el siguiente mecanismo de reacción

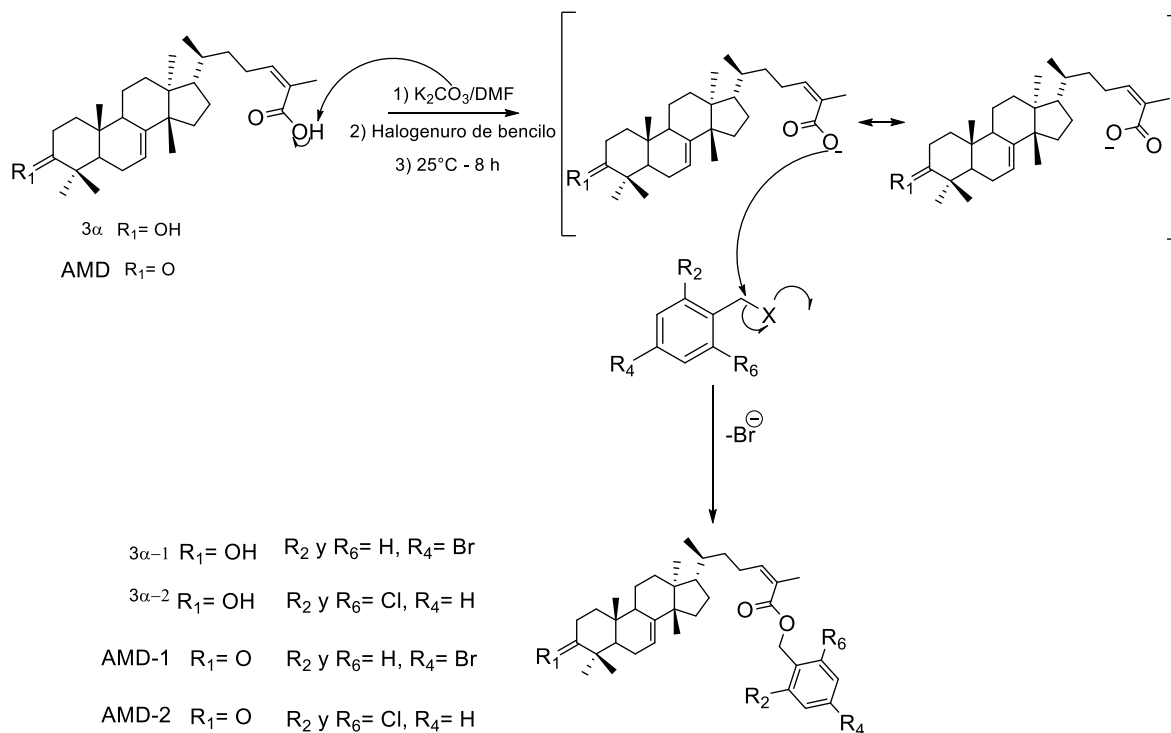


Figura 46. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los ésteres bencílicos (**compuestos AMD-1, AMD-2, 3 α -1, 3 α -2**).

A partir de la neutralización del protón del ácido carboxílico, se genera un grupo carboxilato que realiza un ataque nucleofílico al carbono del CH₂ presente en el halogenuro de bencilo. El halógeno actúa como grupo saliente, rompiendo en el enlace con el carbono del CH₂ y permitiendo la formación del éster (Figura 46).

De manera general, en todos los compuestos se observó la aparición de una nueva señal correspondiente al CH₂ base oxígeno que confirma la formación del enlace tipo éster. De igual forma, se observaron señales correspondientes a protones y carbonos aromáticos, que confirman la presencia de los bencilos sustituidos en la molécula.

Como ejemplos característicos se tomaron los compuestos **AMD-2 y 3 α -3**.

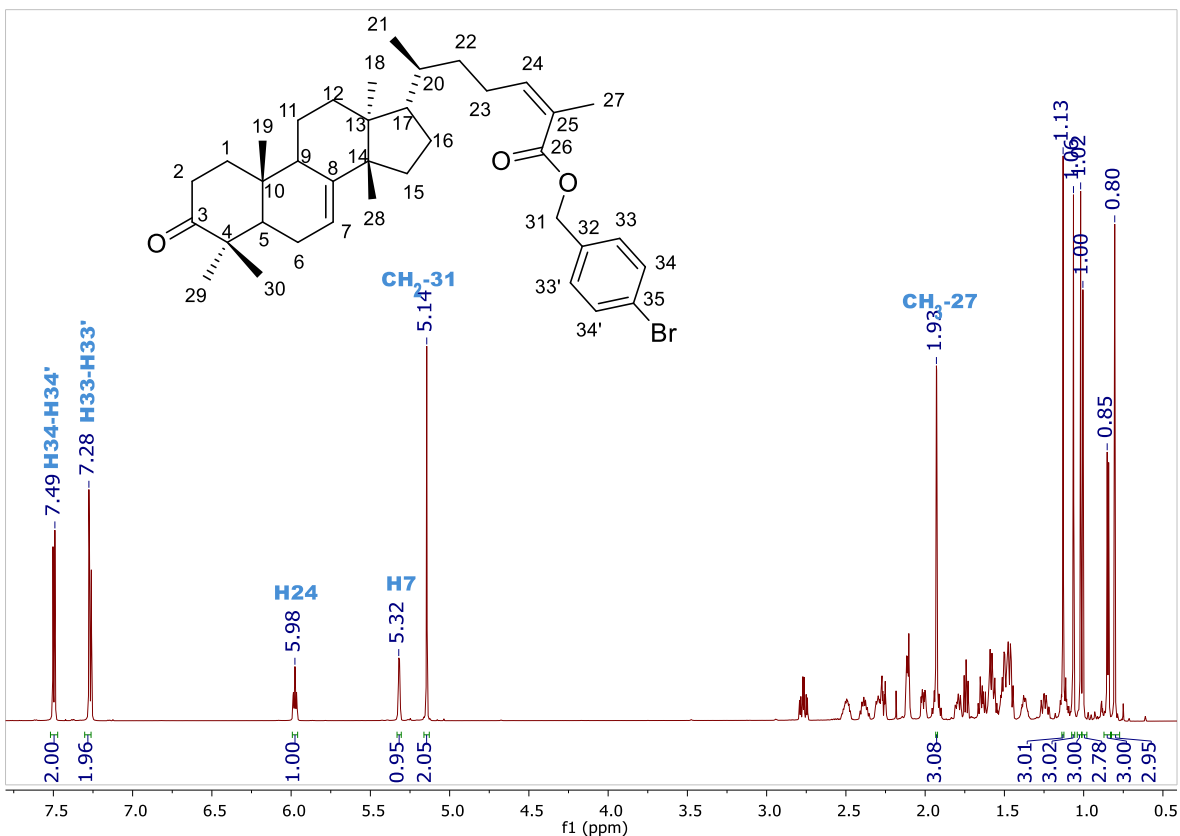


Figura 47. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo. (AMD-2).

La resonancia magnética nuclear de protón en el compuesto **AMD-2**, mostró una señal de tipo singulete en 5.14 ppm que corresponde a los protones de un carbono base oxígeno de tipo éster (H31a y H31b), la cual en el precursor (**AMD**) no se observaba. En esta señal muestra una integración para dos protones. También, se pueden observar señales a 7.29-7.28 ppm y 7.49-7.50 ppm de tipo doble de dobles para un sistema AA' BB' de los anillos de benceno disustituídos en posición *para*-. En ambos casos corresponden a los protones aromáticos de las posiciones H33-H33' y H34-H34' respectivamente (Figura 47).

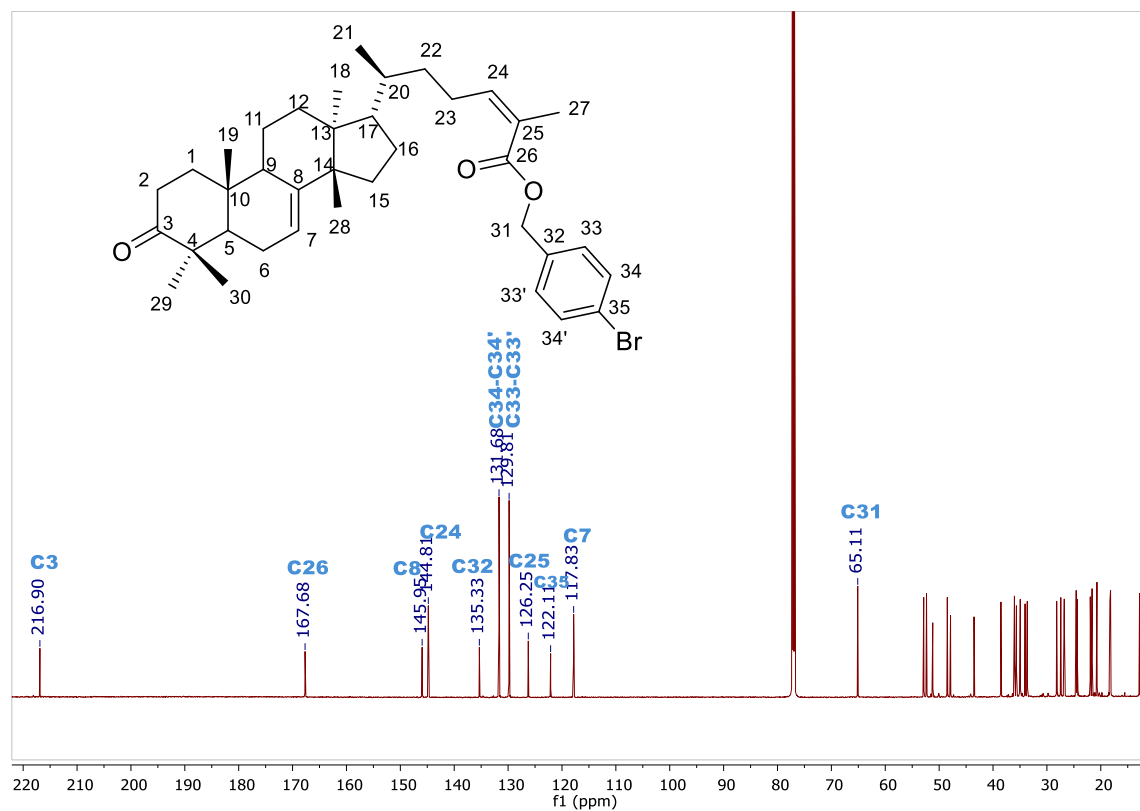


Figura 48. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo. (AMD-2).

Por otra parte, la RMN-¹³C muestra señales de carbonos aromáticos del anillo de benceno a 131.60 y 129.81 ppm, que corresponden a los carbonos C34-C34' y C33-C33' respectivamente. La señal a 65.11 ppm corresponde al carbono C31 (Figura 48).

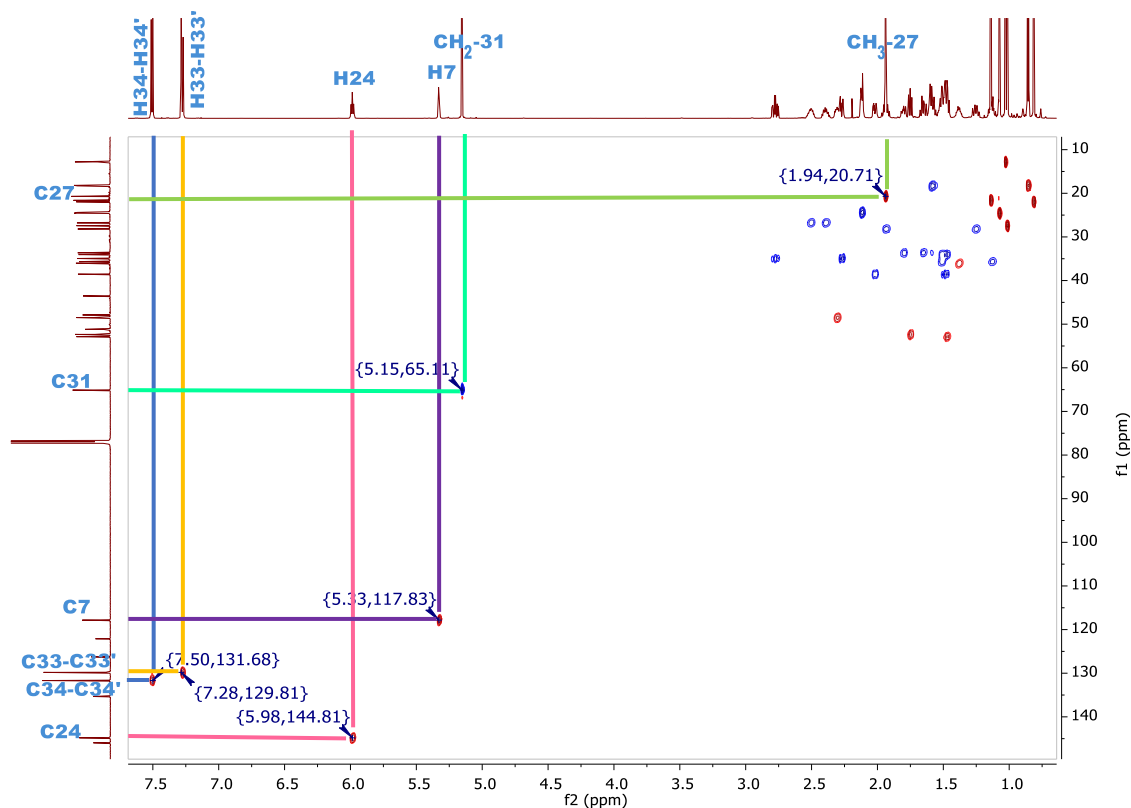


Figura 49. Espectro de RMN-HSQC (CDCl_3) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

En el análisis bidimensional de resonancia de HSQC, se ve que la señal protónica a 5.14 ppm mencionada anteriormente, correlaciona con un carbono a un enlace de distancia a 65.11 ppm, lo que confirma que ese desplazamiento es del carbono del C31. Por su parte la asignación de las señales aromáticas de 7.29-7.30 ppm y 7.51-7.50 en el análisis de HSQC correlacionan con los carbonos en 131.60 y 129.8, lo que confirma su asignación. Sin embargo, debido a las características del átomo de bromo, que es uno de los sustituyentes en posición *para*-, estos carbonos sufren el efecto de apantallamiento por lo que no es posible diferenciar entre los carbonos equivalentes de C34-C34' y los de C33-C33' (Figura 49).

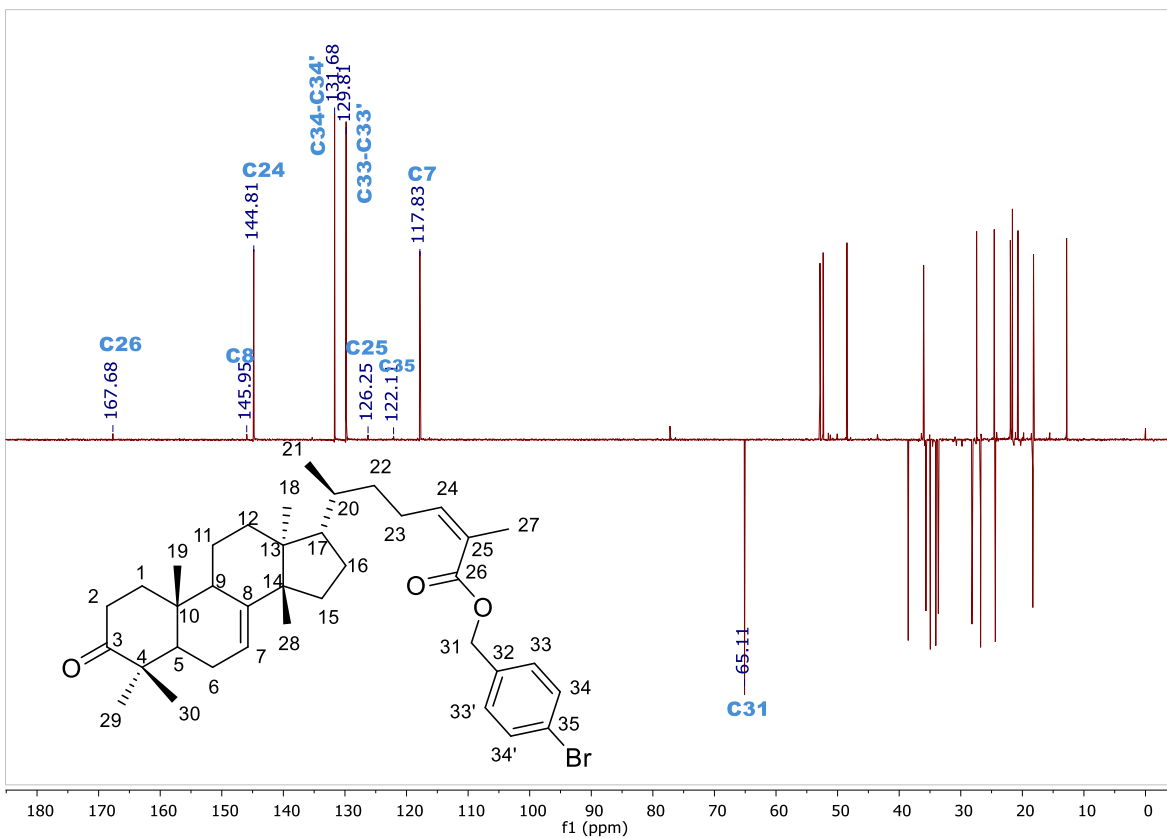


Figura 50. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3) del masticadienato de *p*-bromobencilo (AMD-2).

De igual forma, la correlación de la señal protónica a 5.14 ppm con la señal de ^{13}C a 65.11 ppm, se confirma con el análisis de DEPT 135, en el que esa señal de carbono se observa en la fase negativa, específica para los carbonos de CH_2 (Figura 50).

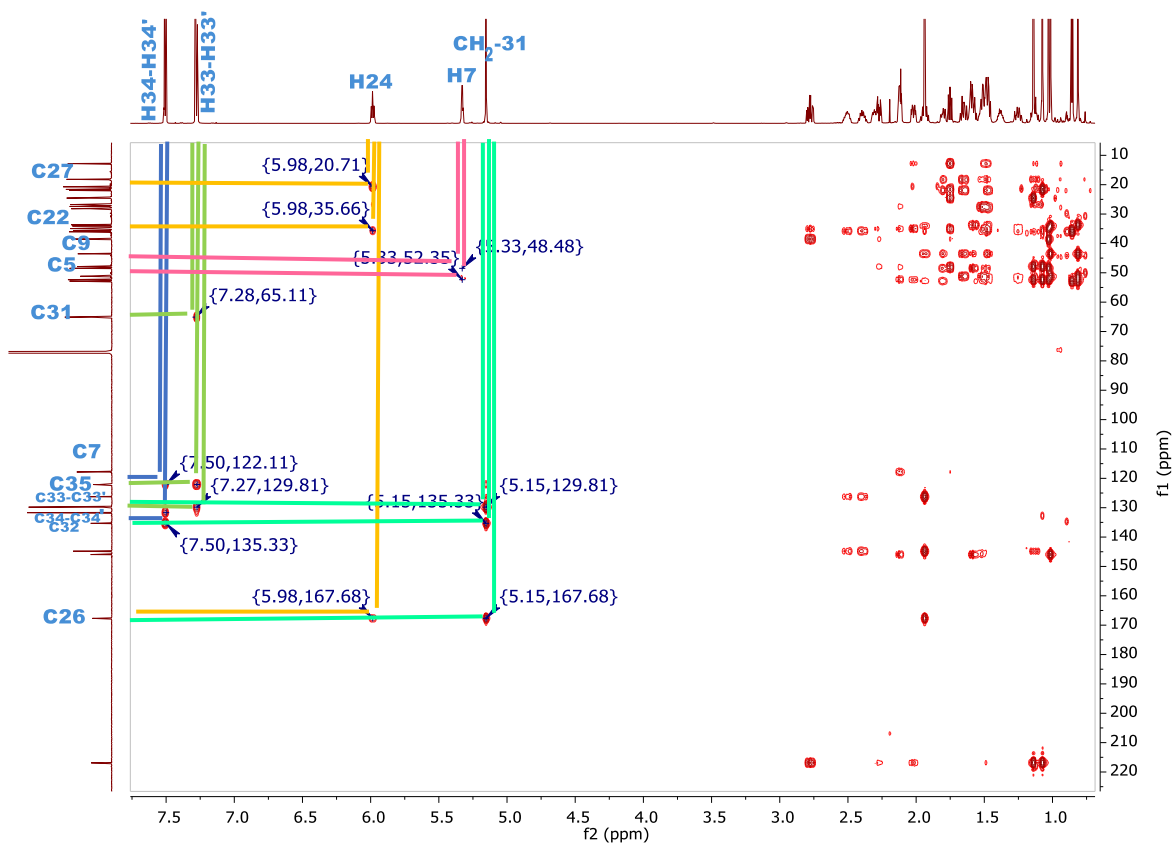


Figura 51. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

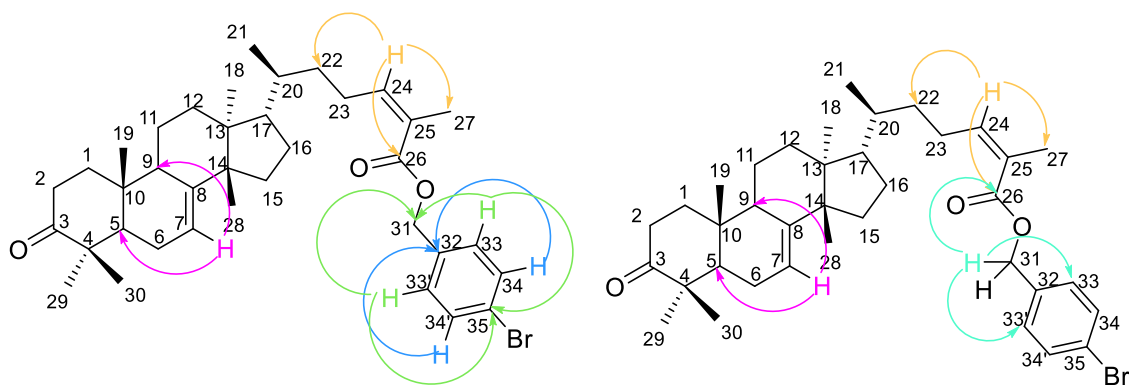


Figura 52. Correlaciones RMN HMBC del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

En el caso del análisis bidimensional HMBC (Figuras 51 y 52), se puede observar las correlaciones de los protones aromáticos H34-H34' con el carbono a 3 enlaces de distancia de C32, lo que confirma su asignación. De manera similar sucede con los protones aromáticos H33-H33', que correlacionan con los carbonos de C31 y

C35. A su vez, los protones de CH₂-31 correlacionan con los carbonos de C33-C33' y con el carbono de carbonilo de C26.

La asignación de la estructura anterior, se confirmó mediante la determinación de la estructura de la cristalografía de rayos X para el caso del compuesto **AMD-2** (Figura 53).

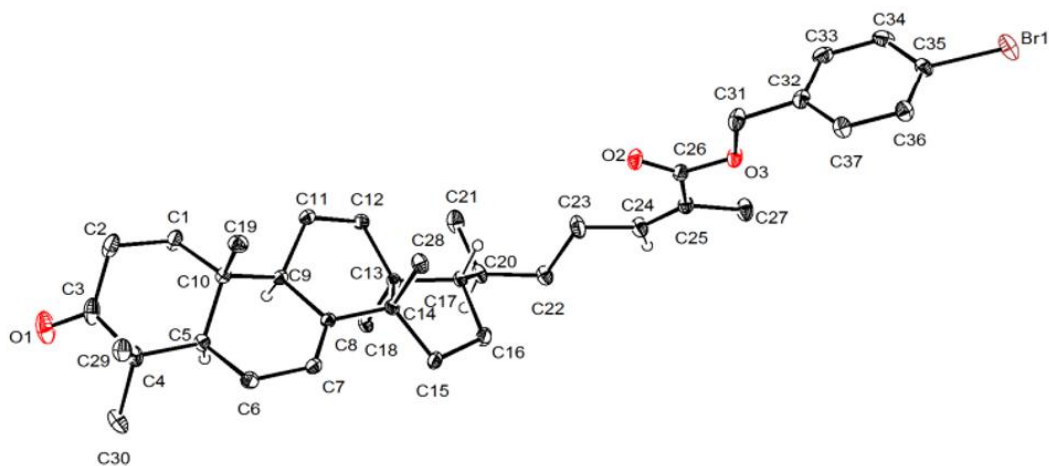


Figura 53. Estructura determinada mediante cristalografía de rayos X del compuesto **AMD-2**.

Todos los datos espectroscópicos y espectrométricos aparecen de forma completa en los anexos.

Un comportamiento similar se observó en el compuesto **3 α -2**, con la particularidad de mostrar una señal a 3.46 ppm en la RMN-¹H, correspondiente al protón base alcohol de H3.

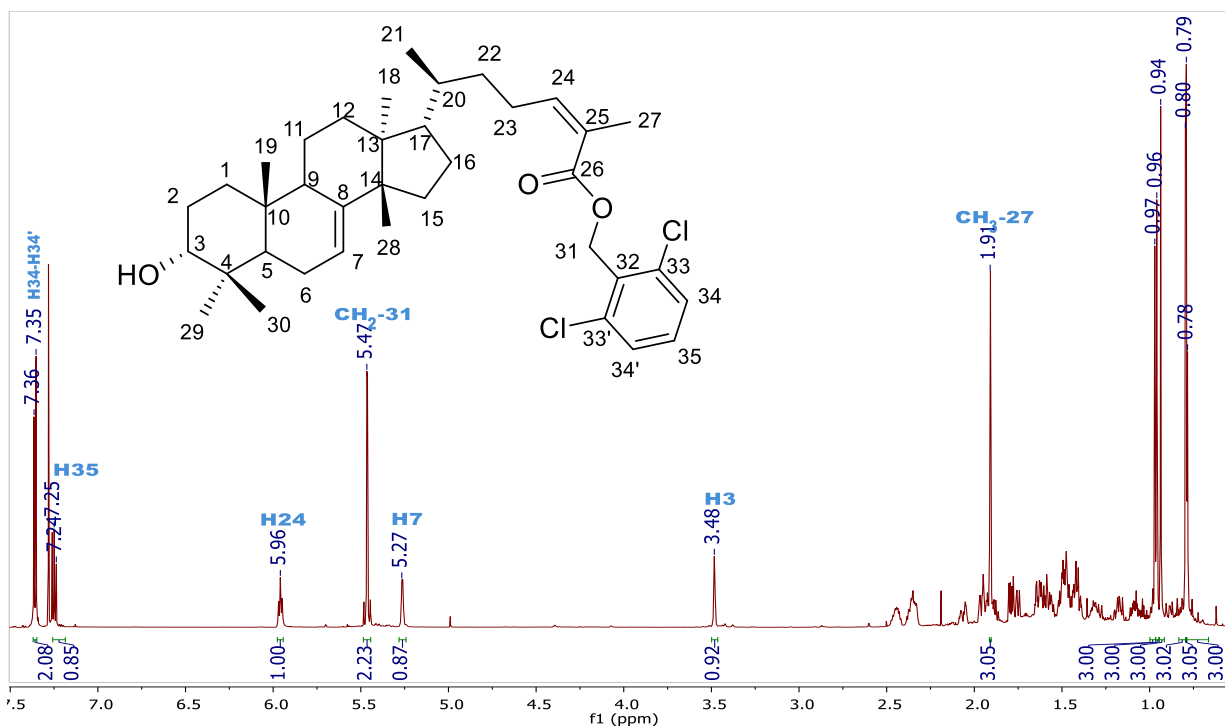


Figura 54. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del 3α-hidroxiasticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**3α-3**).

Por otra parte, para la RMN-¹H del compuesto **3α-3**, mostró señales de tipo doblete a 5.47 ppm correspondiente al CH₂ del C31 y las señales de tipo doblete a 7.36-7.35 ppm y 7.28 ppm, que corresponden a los protones del anillo de benceno (H34-H34' y H35 respectivamente) trisustituido *meta*- (Figura 54).

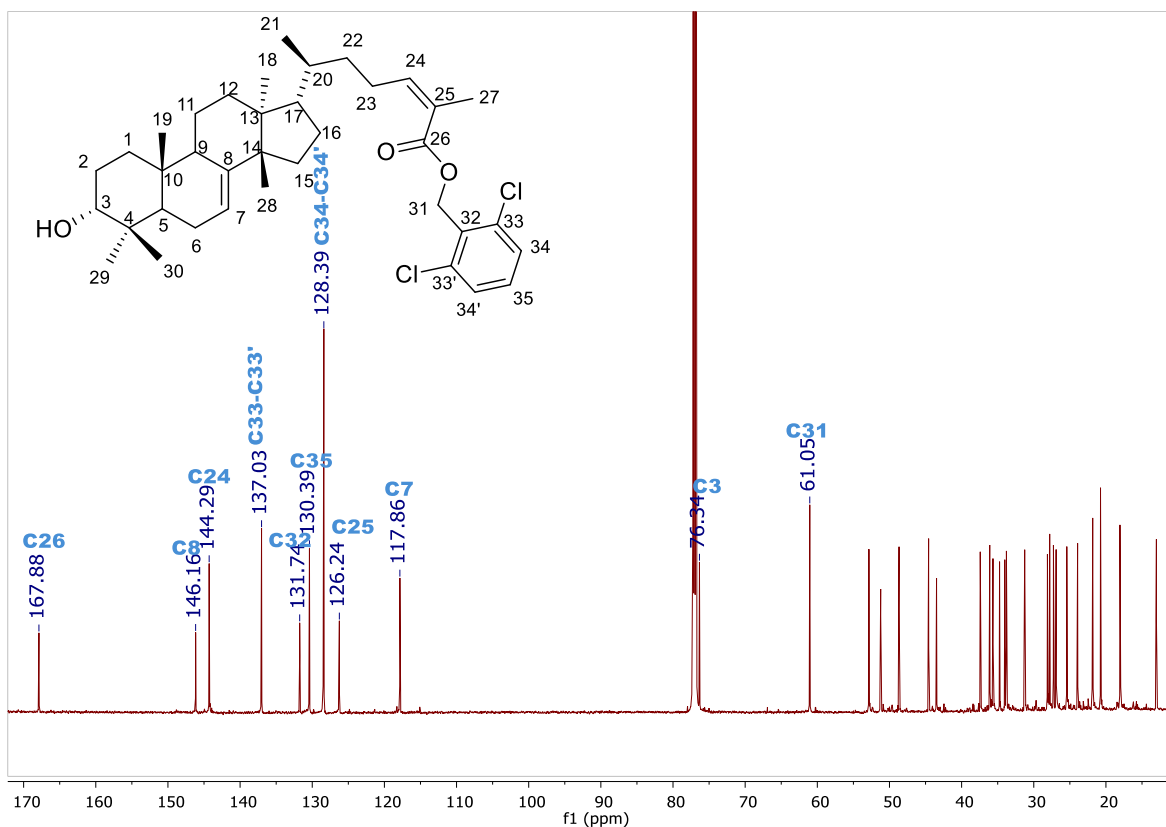


Figura 55. Espectro de RMN- ^{13}C (176 MHz CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**3 α -3**).

En cuanto a la resonancia magnética nuclear de ^{13}C (Figura 55), las señales que se observan en 128.34 ppm y 130.39 ppm corresponden a los carbonos aromáticos de C34-C34' y C35, de los cuales los primeros son equivalentes y presentan efecto de apantallamiento por sus posiciones vecinales a los átomos de cloro, por lo que no es posible diferenciar entre el C34 y el C34'.

Las correlaciones en HSQC muestran las asignaciones a los carbonos aromáticos antes mencionados y el carbono correspondiente al CH_2 (Figura 56).

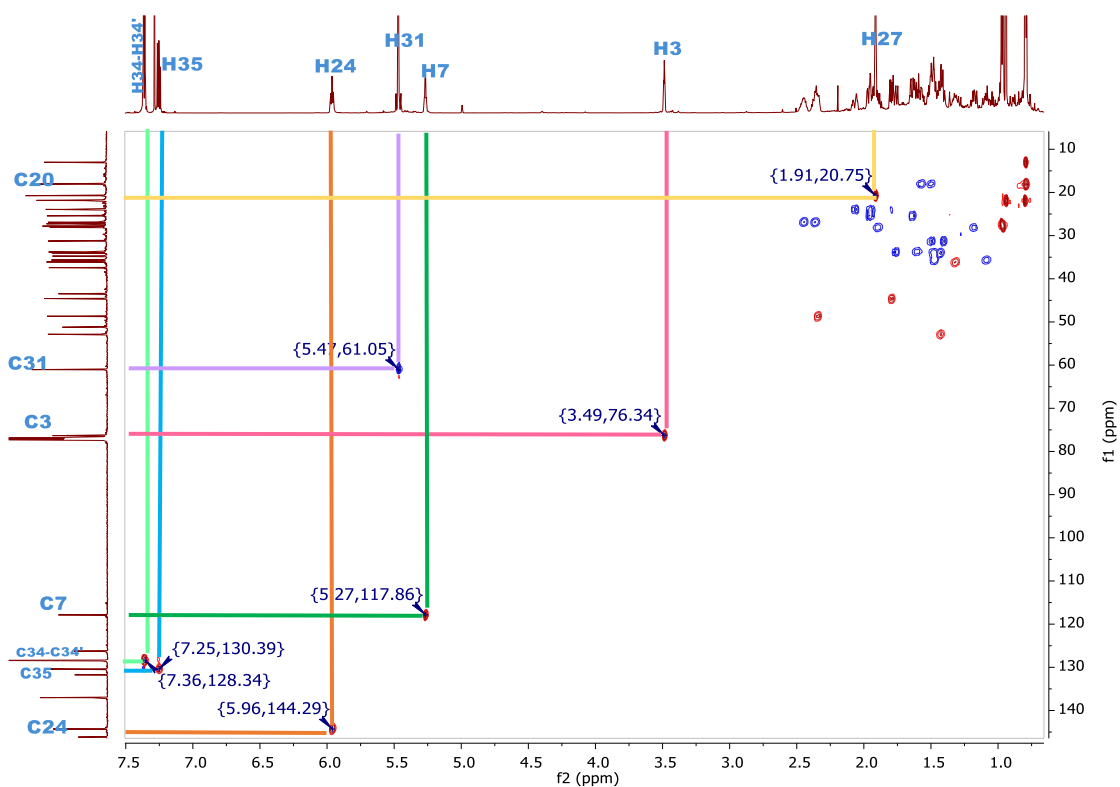


Figura 56. Espectro de RMN HSQC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

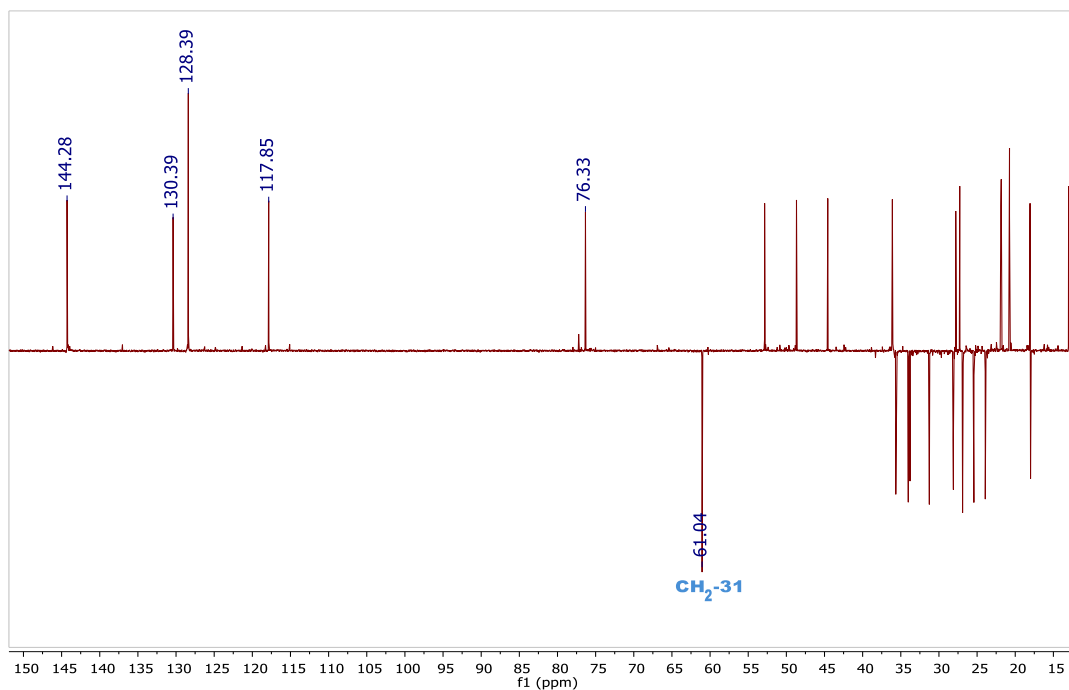


Figura 57. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

En el análisis bidimensional de DEPT 135 (Figura 57), se confirma que la señal a 61.05 ppm corresponde al CH₂ de C31.

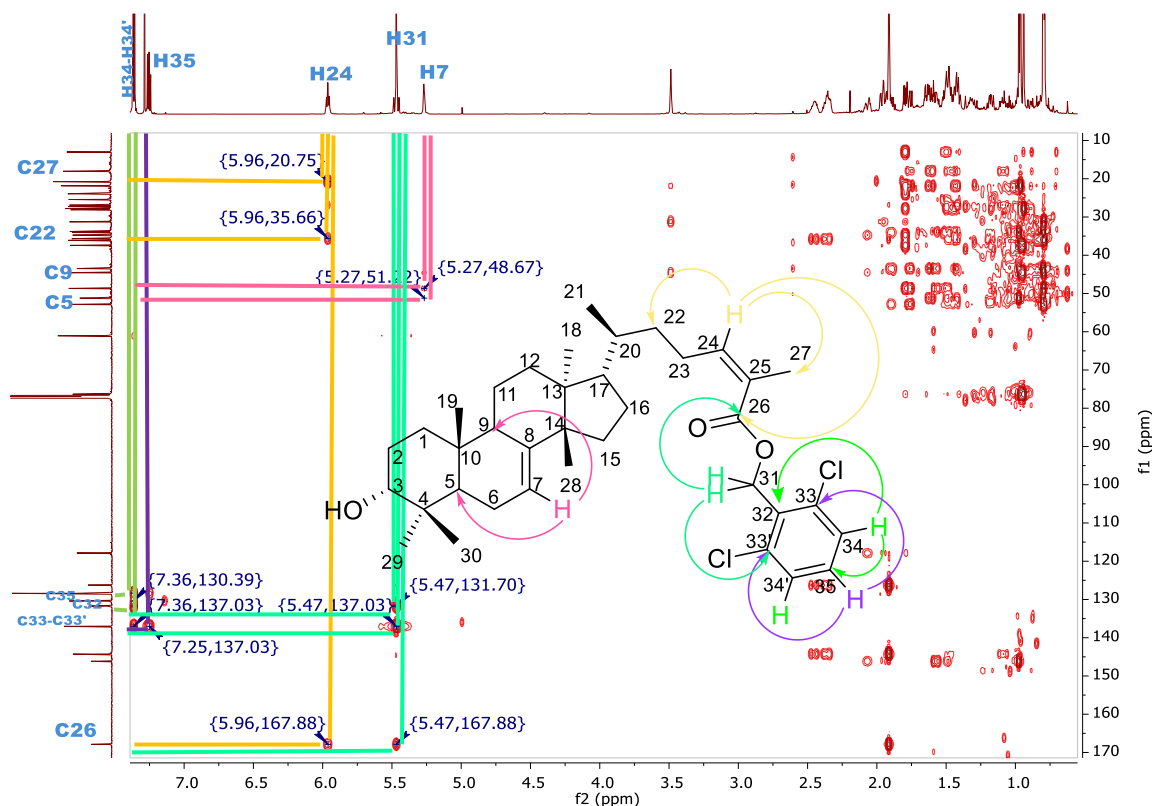


Figura 58. Espectro de RMN HMBC (CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

Las correlaciones observadas en el análisis de HMBC, confirman la asignación de los protones H34-H34' y sus correlaciones con C35 y C32, mientras que el protón H35 demuestra su correlación con C33-C33'. Finalmente los protones de CH₂-31, confirman su asignación mediante las correlaciones con C33-C33' y el carbono del carbonilo de C26 (Figura 58).

La asignación fue confirmada mediante la determinación de la estructura completa por cristalografía de rayos X (Figura 59).

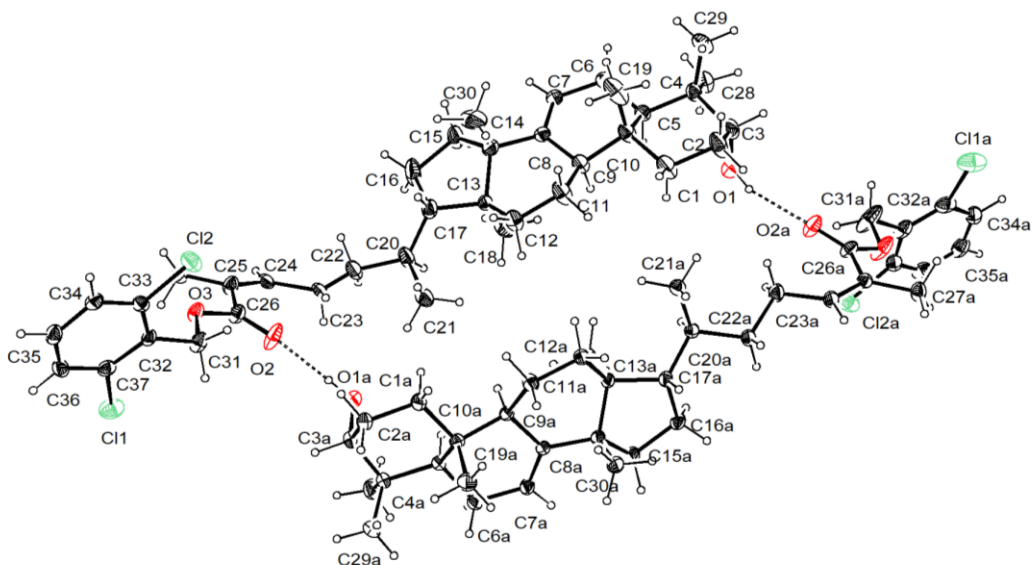
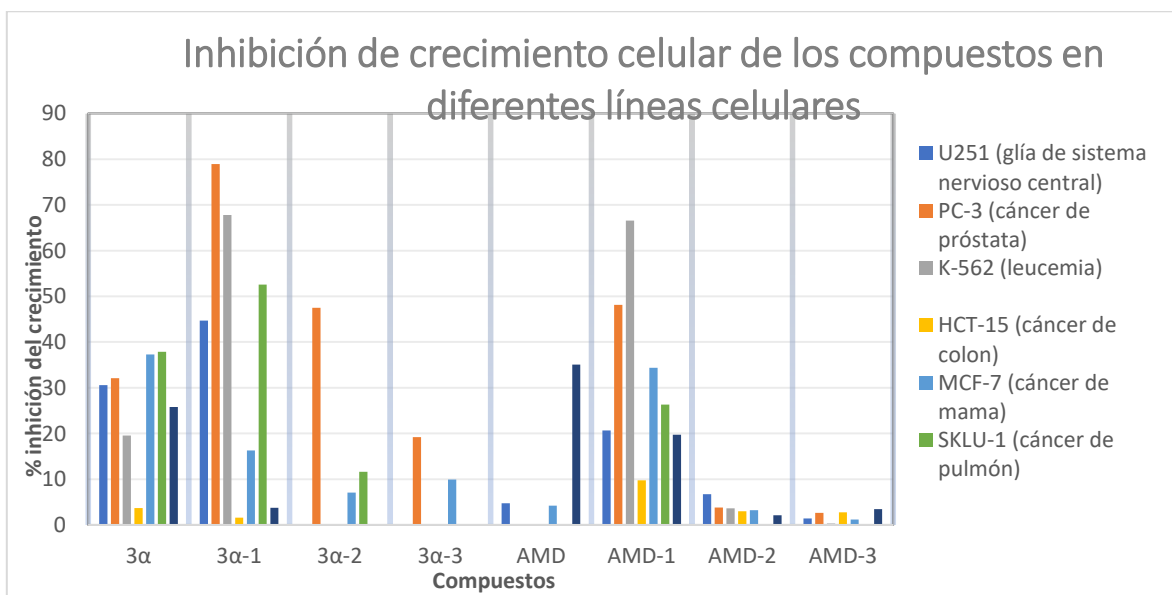


Figura 59. Estructura determinada mediante cristalografía de rayos X del compuesto **3α-3**.

El mismo análisis se realizó para el compuesto **AMD-3**, con la particularidad de no mostrar la señal de protón base alcohol del **3α**.

8.4. Evaluación de la actividad citotóxica

Los resultados de la evaluación de inhibición de crecimiento celular de todos los compuestos (tanto de los metabolitos secundarios, como de los compuestos sintetizados), en diferentes líneas celulares de cáncer humano, muestra que la mayor actividad se presenta en las líneas de cáncer de próstata (PC-3) y leucemia (K-562), seguido de la línea de cáncer de pulmón y por último de cáncer de mama (SKLU y MCF-7). Además, se demostró que los compuestos más activos son los ésteres metílicos de los ácidos aislados (compuestos **AMD-1** y **3α-1**) (Tabla 11). También, el éster bencílico sustituido en posición *para*- del **3α** (compuesto **3α-2**), presentó una actividad considerable en PC-3.

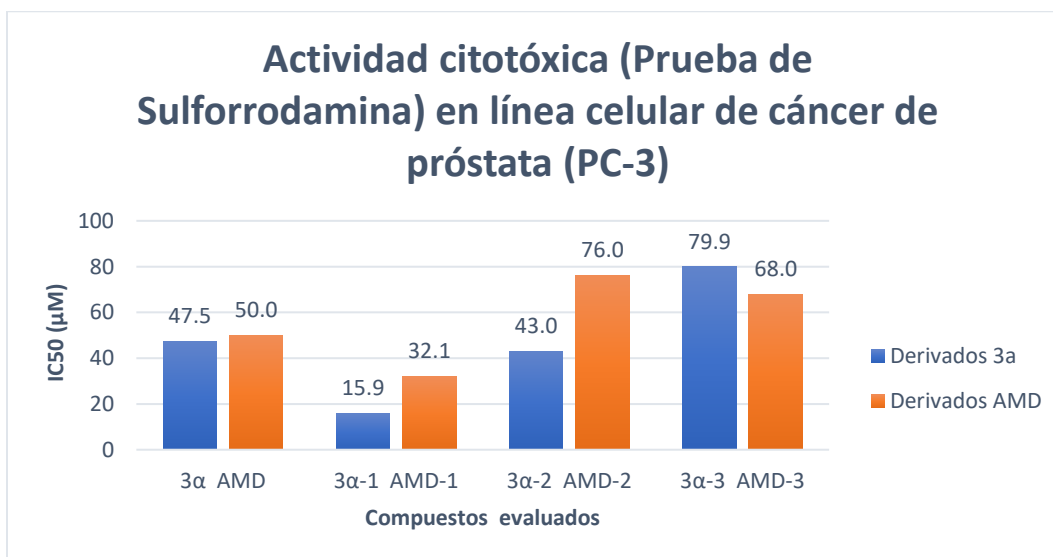


Gráfica 1. Resultados de inhibición de crecimiento celular para células de diferentes tipos de cáncer

Cabe señalar que este ensayo se realizó a una sola concentración (25µM), por lo que los resultados deben confirmarse con la determinación de la IC₅₀ de los compuestos potencialmente activos. Es importante mencionar que los resultados reportados por Ibeth, 2007, muestran el porcentaje de inhibición de crecimiento celular para el compuesto AMD-1 pero evaluado a una concentración de 50 µM.

Un aspecto relevante, es que los ésteres metílicos mostraron cierta selectividad contra las células cancerosas en comparación con las células sanas, ya que disminuyen considerablemente la posible toxicidad de sus precursores. El caso contrario sucede con los derivados bencílicos, los cuales aun cuando disminuyen considerablemente la citotoxicidad en células sanas, no se puede hablar de selectividad ya que la actividad en células cancerosas también se mostró disminuida (Gráfica 1).

A partir de la determinación de la IC₅₀ en la línea de cáncer de próstata (PC-3), se observó que los compuestos con una mayor actividad citotóxica respecto a sus precursores, en efecto son los ésteres metílicos y sólo uno de los ésteres bencílicos de los ácidos (compuestos **AMD-1**, **3α-1** y **3α-2**).



Gráfica 2. Actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en la línea celular PC-3.

Un hecho que llama la atención es que solo la adición de un grupo metilo en el residuo del ácido carboxílico C-26 de ambas moléculas, aumenta considerablemente la actividad, mientras que la presencia de residuos bencílicos hace menos tóxicas a estas moléculas.

Estos resultados indican que la citotoxicidad muy probablemente no sea por inhibición de la fosforilación de Akt, como inicialmente se había propuesto. Lo anterior, debido a que no se está observando una mejora en la actividad citotóxica al adicionar el residuo bencílico en los ésteres, por lo que los triterpenos aislados de *A. adstringens* no mejoran su actividad con este tipo de modificaciones químicas.

8.5. Análisis conformacional de algunos ésteres bencílicos

Las Figuras 60, 61, 62 y 63, muestran claramente las diferentes dimensiones de **AMD** y sus derivados: **AMD-1**, **AMD-2** y **AMD-3** (estos últimos con datos obtenidos a través de su cristalografía de Rayos X). Es claro que los derivados halogenados **AMD-2** y **AMD-3** son moléculas aproximadamente 6 Å más grandes que **AMD** y **AMD-1**, lo que podría ser la razón por la cual no presentan el mismo efecto citotóxico al posiblemente no inhibir a la enzima Akt. Esto último, sin importar los resultados obtenidos en el estudio de acoplamiento molecular, donde se sugería lo contrario.

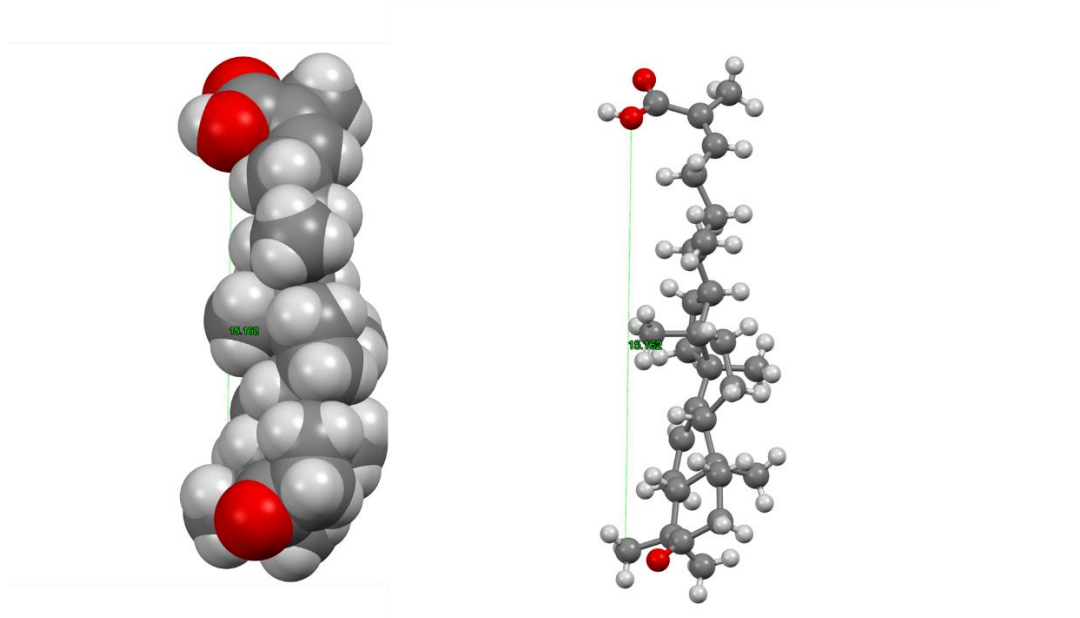


Figura 60. Estéreo estructura de **AMD** determinada por difracción de rayos X.
Longitud total de la molécula 15.162 Å

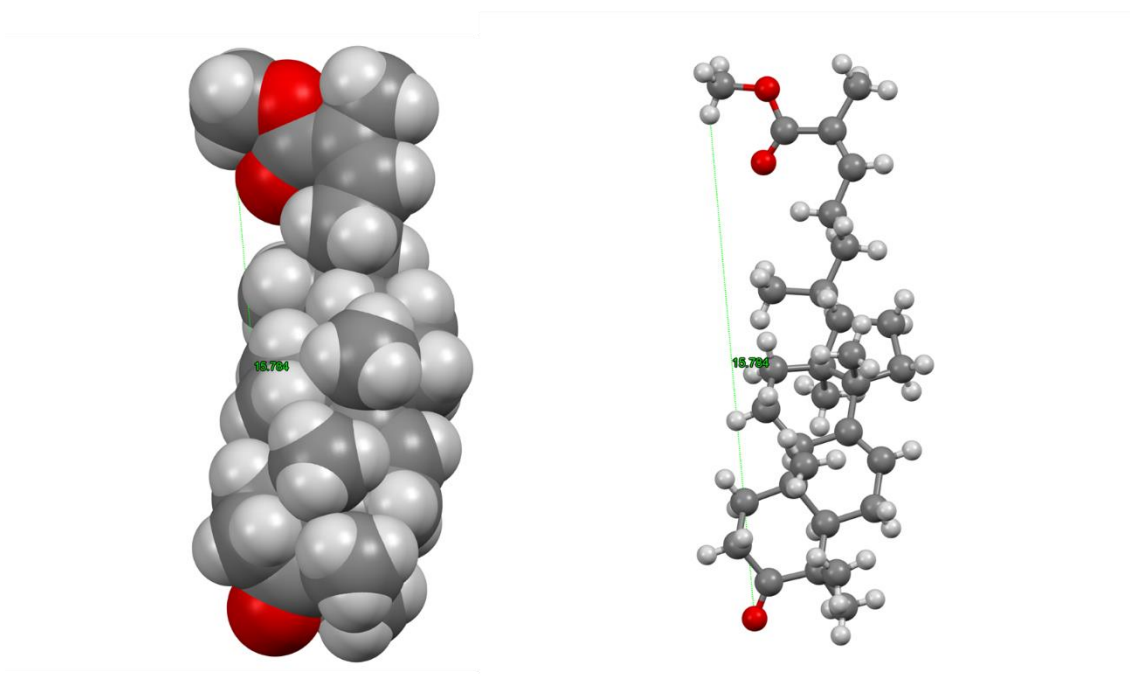


Figura 61. Estéreo estructura de **ADM-1** determinada por difracción de rayos X.
La longitud total de la molécula es de 15.78 Å

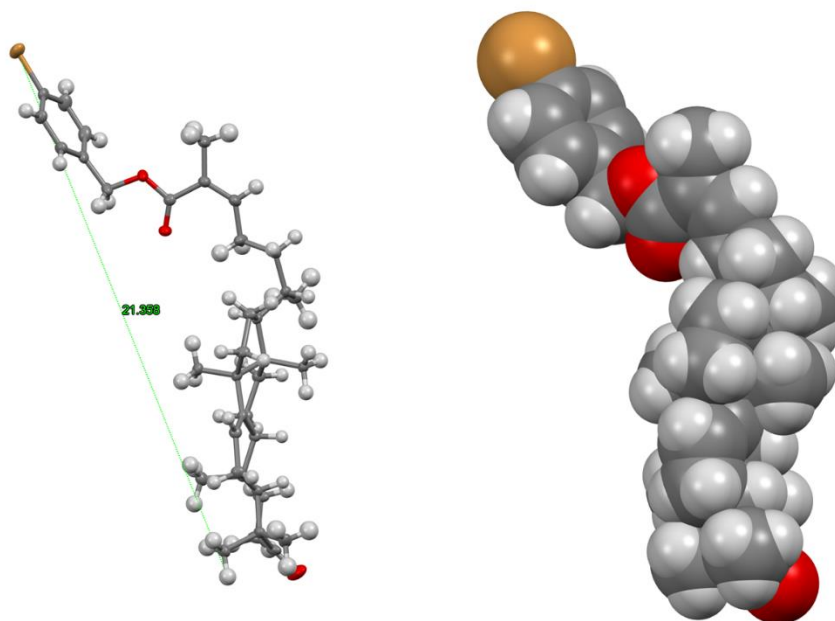


Figura 62. Estéreo estructura de **AMD-2** determinada por difracción de rayos X.

Longitud total de la molécula 21.35 Å

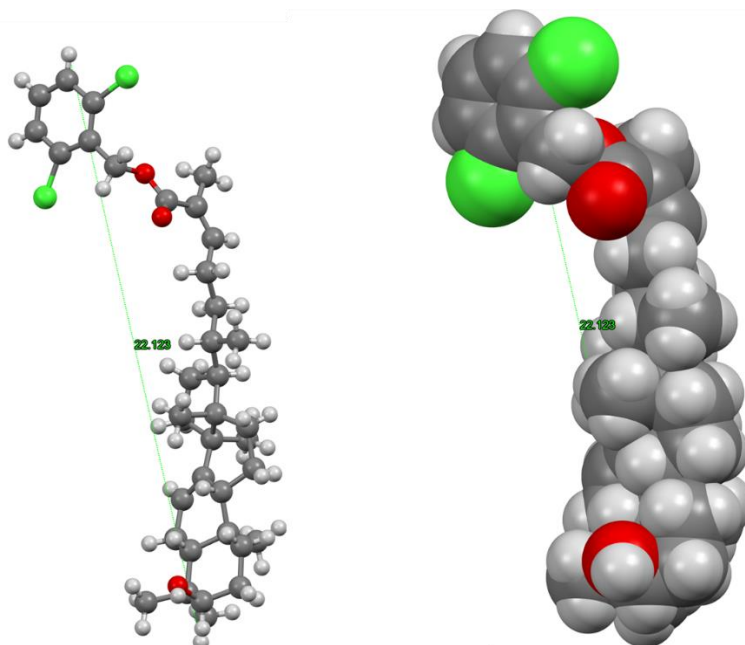


Figura 63. Estéreo estructura de **AMD-3** determinada por difracción de rayos X.

Longitud total de la molécula 22.12 Å

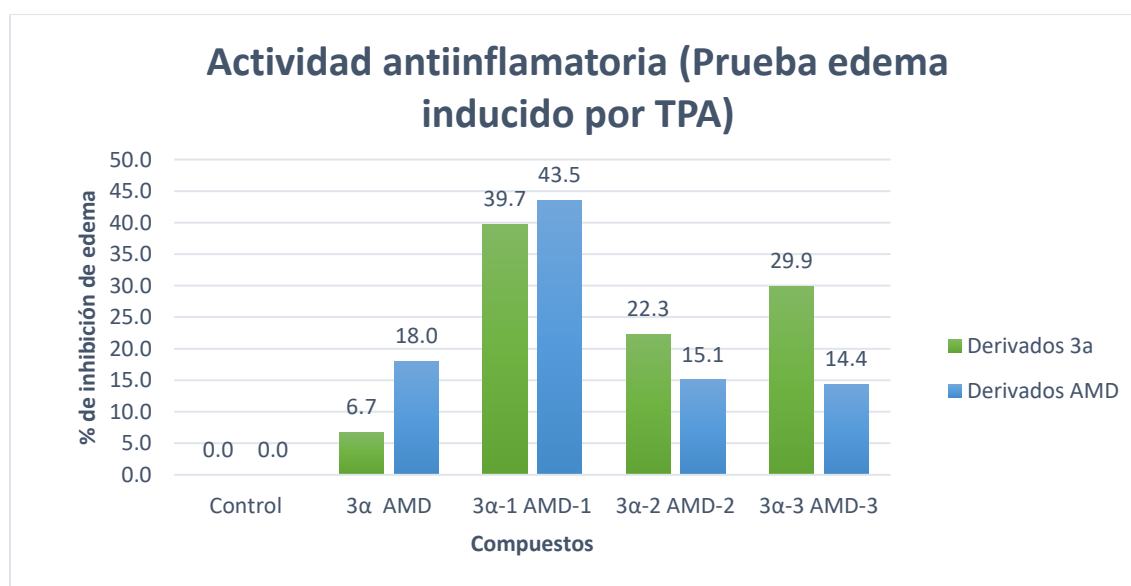
Otro punto destacable es que, a pesar de que las dimensiones de **AMD** y **AMD-1** son prácticamente iguales, la presencia de un solo grupo metilo en el ácido carboxílico en C26 de **AMD-1** aumentó en 36% la actividad citotóxica con respecto a su precursor. El mismo efecto se observó en **3 α -1** con respecto a **3 α** .

Estos resultados indican la posibilidad de que el cambio en el tamaño molecular puede resultar en un aumento de la lipofilicidad proporcionada por el grupo metilo en el ácido carboxílico, y esto a su vez, se convierte un factor importante en las actividades citotóxicas y antiinflamatorias.

Para corroborar esta hipótesis, se sugiere realizar evaluaciones biológicas con diferentes sustituyentes de tipo alquilo.

8.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Por otro lado, los resultados de actividad antiinflamatoria evaluada por el método de edema inducido por TPA en oreja de ratón, indicaron que nuevamente los derivados más activos fueron los ésteres metílicos **AMD-1** y **3 α -1** (Tabla 12). Sin embargo, en el caso de los derivados **3 α -2** y **3 α -3**, también presentaron un mayor efecto antiinflamatorio respecto a su precursor, lo que no sucede en el **AMD** (Gráfica 3).



Gráfica 3. Resultados de actividad antiinflamatoria por inhibición de edema

Una razón que podría explicar este comportamiento, además de lo ya mencionado, es la presencia del alcohol en el C3, lo cual pudiera tener una influencia en la actividad antiinflamatoria.

Cabe señalar que debido a las características de la prueba realizada, no es posible proponer un blanco biológico específico, simplemente se observa si hay actividad o no. Además, se sugiere realizar la prueba con un número de n más grande.

Los resultados de las actividades citotóxicas y antiinflamatorias indican que posiblemente, dos son los factores importantes que explican el comportamiento de los derivados sintetizados en estas actividades: el aumento de la lipofilicidad de **AMD-1** y **3 α -1** con respecto a **AMD** y **3 α** , y el tamaño del sustituyente en el ácido carboxílico en C-26.

9. CONCLUSIONES

- La obtención de los ácidos masticadienónico (**AMD**) y 3 α -hidroximasticadienónico (**3 α**), se realizó mediante la metodología reportada. La caracterización de las estructuras corresponde con la literatura.
- La síntesis de los ésteres metílicos, se realizó bajo una nueva propuesta de ruta sintética utilizando Et₂O-BF₃ (ácido de Lewis). Las condiciones ácidas proporcionadas por esta metodología, influyen selectivamente en la isomerización de la doble ligadura del C7, solo para el caso del 3 α .
- La obtención de los ésteres bencílicos de los ácidos, se realizó bajo la metodología reportada por Wang en 2019.
- La adición de grupos metilo en el C26, favorece la actividad citotóxica y antiinflamatoria de los metabolitos utilizados. Mientras que los residuos bencílicos, no incrementan esta actividad para este tipo de triterpenos específicamente.
- Existe la posibilidad de que el tamaño molecular de los derivados bencílicos sea una de las razones por las cuales estos compuestos no se acoplen a la AKT y no se observe un incremento en la citotoxicidad, aun cuando los análisis computacionales indiquen lo contrario.
- Se sugiere realizar la síntesis de ésteres alquílicos con más átomos de carbono, para comprobar si la lipofilicidad, podría ser el motivo del incremento de la actividad citotóxica.
- La prueba de TPA indica que los ésteres metílicos podrían ser los de mayor actividad antiinflamatoria. Sin embargo, los ésteres bencílicos muestran una ligera mejoría sobre sus precursores.
- Se sugiere implementar más técnicas que ayuden a definir el posible mecanismo antiinflamatorio de los derivados sintetizados. De igual forma, determinar su DE₅₀.

10. REFERENCIAS

1. INC. (2021). ¿Qué es el cáncer?. Recuperado el: 2023/02/01. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Katzung, Bertram. (2013). Farmacología básica y clínica. (12ª edición). China: McGraw Hill.
3. De la Cruz, KG. Castro, LJ. Reyes, DO. García, A and Manzo, J. (2019). Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front. Oncol.* 9:1143. doi: 10.3389/fonc.2019.01143
4. Maol, Wang. Ruifa, Feng. Zihao, Chen. Wenjie, Shi. Cheng, Li. Huiquan, Liu. Kejin, Wu. Dajin Li and Xiqing Li. (2022). Identification of Cancer-Associated Fibroblast Subtype of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Oncology* Volume 2022, Article ID 6452636, <https://doi.org/10.1155/2022/6452636>
5. Cendrowicz, E. Sas, Z. Bremer, E. Rygiel, T.P. (2021). The Role of Macrophages in Cancer Development and Therapy. *Cancers*. Vol. 13:1946. <https://doi.org/10.3390/cancers13081946>
6. OMS. (2022). Cáncer. Recuperado el: 2023/02/01. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
7. ASCO. (2023). Cáncer de próstata: Estadísticas. Recuperado el: 2023/02/08. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pr%C3%B3stata/estad%C3%ADsticas>
8. INEGI. (2022). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero) datos nacionales. Recuperado el: 2023/02/10. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANCER22.pdf
9. Medawar, Peter. (2003). La etiología del cáncer. Vigencia de cinco paradigmas sucesivos. *Medicina Buenos Aires*. 63: 757-760. ISSN 0025-7680.
10. Antillón, Juan. (2010). Avances y contradicciones (paradojas) en relación con las causas del cáncer. *Revista Acta Medica Costarricense*. Vol. 52, núm. 4. pp 246-254. ISSN 0001-6002
11. Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*, 357:539-5. doi:10.1016 / S0140-6736 (00) 04046-0

12. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454; 436-444. doi:10.1038/nature07205
13. Lin, C. & Zhang, J. (2017). Inflammasomes in Inflammation-Induced Cancer. *Front. Immunol*, 8:271. doi:10.3389/fimmu.2017.00271
14. Vargas, Alex. López, Marcelo. Lillo, Claudio, Vargas, María Josefina. (2012). El papiro de Edwin Smith y su trascendencia médica y odontológica. *Rev Med Chile* 140: 1357-1362.
15. Faguet, Guy. (2015). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int. J. Cancer*:136, 2022–2036 (2015). DOI:10.1002/ijc.29134
16. Arístil, Mitchel. (2010). *Manual de Farmacología básica y clínica*. (5ta edición). México: McGraw Hill.
17. Petrelli A, Giordano S. (2008). From single- to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage. *Curr Med Chem*. 15(5):422-32. doi: 10.2174/092986708783503212. PMID: 18288997.
18. Galván, Marco. (2019). El Tronco “Mágico” del Cuachalalate: Regalo de la Medicina Tradicional Mexicana a la Química de Productos Naturales. *Naturaleza y Tecnología*. 6(1): 36-48.
19. Xiao, Hui. (2006). Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 103. No. 27. 10166-10173.
20. Al-Hajeili M, Azmi AS, Choi M. (2014). Nab-paclitaxel: potential for the treatment of advanced pancreatic cancer. *Onco Targets Ther*. 4;7:187-92.
21. Vega, Elisa. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Medigraphic*, 31, (3), 97-111.
22. Muñoz, Diego. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Rev Colomb Cancerol.*, 20(3):124-134.
23. Tasmia, Syeda. (2022). Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. *Cancers*. 14: 6203. <https://doi.org/10.3390/cancers14246203>

24. Punganuru, Surendra. (2016). Colchicine-Based Hybrid Anticancer Drugs to Combat Tumor Heterogeneity. *Medicinal Chemistry*. 6, (3): 165-173. 2016. <https://doi:10.4172/2161-0444.100034>
25. Passarella, Daniele. (2008). Inhibitors of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of hybrids of vindoline, anhydrovinblastine and vinorelbine with thiocolchicine, podophyllotoxin and baccatin III. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 6269–6285.
26. Oliver, AG. Soto, M. Martínez, M. Terrazas, T. Solares, F. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology* 68, 109–113.
27. Oviedo, I. Ramírez, T. Soto, M. Martínez, M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. 11: 436-445.
28. Wang, Le. (2019). Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. *Public Health*. 2022, 10, <http://doi:10.3389/fpubh.2022.811044>
29. Thangavel C, Dean JL, Ertel A, Knudsen KE, Aldaz CM, Witkiewicz AK, Clarke R, Knudsen ES. (2011). Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 28;18(3):333-45. doi: 10.1530/ERC-10-0262. PMID: 21367843; PMCID: PMC3624623.
30. Wang Y, Kreisberg JI, Ghosh PM. (2007). Cross-talk between the androgen receptor and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 7(6):591-604. doi: 10.2174/156800907781662248. PMID: 17896924.
31. Oviedo, I. Martínez, M. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J. Pharmacy and Pharmacology*, 57: 1087–1091.
32. Dalia, L. Braga, A. García, A. Martínez, M. (2012). 3 α -Hydroxymasticadienonic Acid as an Antiproliferative Agent That Impairs Mitochondrial Functions. *J. Nat. Prod.*, 75, 557–562. [dx.doi.org/10.1021/np200607b](https://doi.org/10.1021/np200607b)

33. Sánchez, B. Jacobo, N. Zentella, A. Hernández, B. Martínez, M. (2017). Masticadienonic and 3 α -OH Masticadienoic Acids Induce Apoptosis and Inhibit Cell Proliferation and Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts In Vivo. *Molecules* 22(9), 1479. <https://doi.org/10.3390/molecules22091479>
34. Piñón, G. Reyes, F. Sánchez, B. Velasco, M. Martínez, M. Cárdenas, C.A. Hernández, B. Jarquín, K. Herrera, M.Á. Castell, A.E. (2022). Immunomodulatory Properties of Masticadienonic Acid and 3 α -Hydroxy Masticadienoic Acid in Dendritic Cells. *Molecules* 27:1451. <https://doi.org/10.3390/molecules27041451>
35. Wanga, Rui. (2019). Design and synthesis of the novel oleanolic acid-cinnamic acid ester derivatives and glycyrrhetic acid-cinnamic acid ester derivatives with cytotoxic properties. *Bioorganic Chemistry* 88: 102951. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102951>
36. Bonnesen, C. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 15;61(16):6120-30. PMID: 11507062.
37. Miyoshi, N. (2006). Selective cytotoxicity of benzyl isothiocyanate in the proliferating fibroblastoid cells. *Int. J. Cancer*: 120, 484–492.
38. Ciftci, H. (2019). Design, Synthesis and Biological Evaluation of Pentacyclic Triterpene Derivatives: Optimization of Anti-ABL Kinase Activity. *Molecules*, 24(19), 3535; <https://doi.org/10.3390/molecules24193535>
39. Bahadur, A. (2016). Exploring the physicochemical profile and the binding patterns of selected novel anticancer Himalayan plant derived active compounds with macromolecular targets. *Informatics in Medicine Unlocked* 5, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imu.2016.09.004>

ANEXO

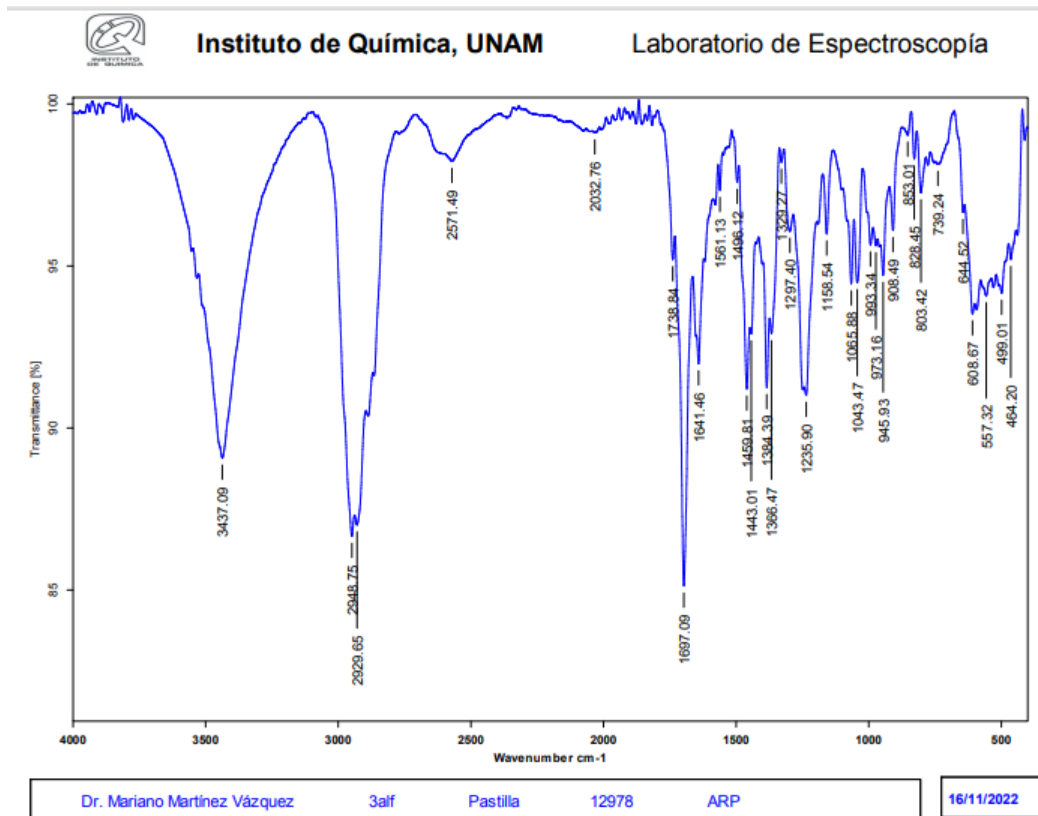


Figura I. Espectro de Infrarrojo (IR) del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. (**3 α**)

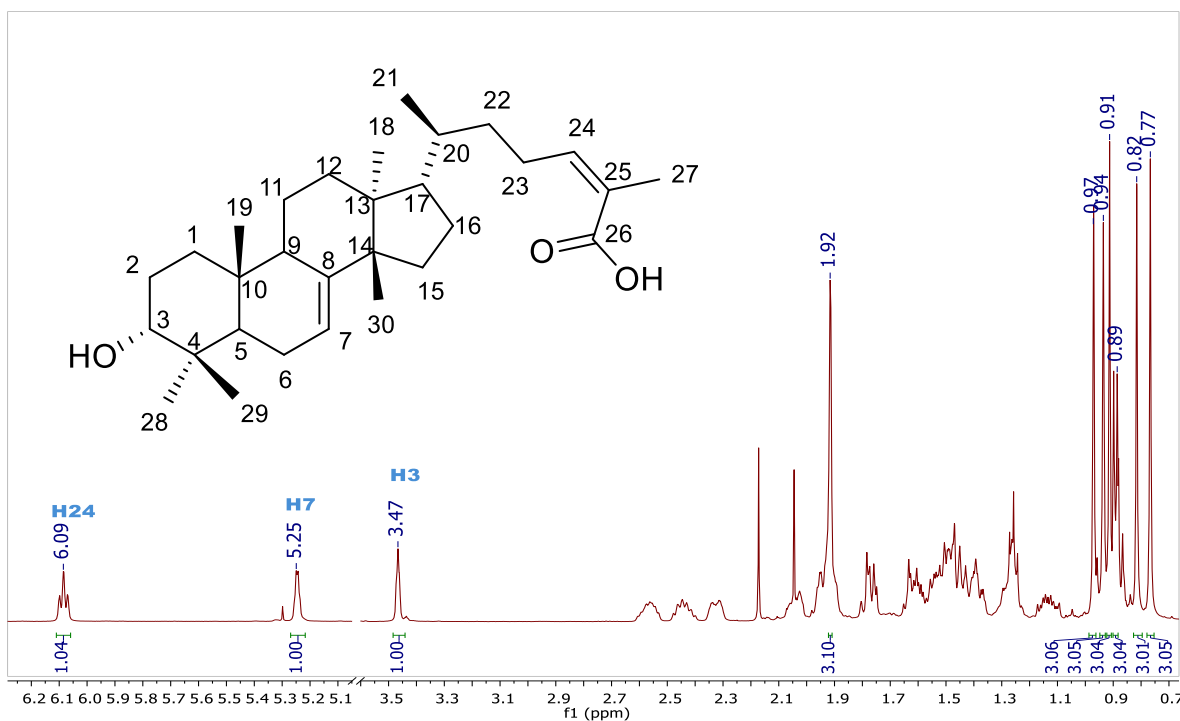


Figura II. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz CDCl_3) del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. (**3 α**)

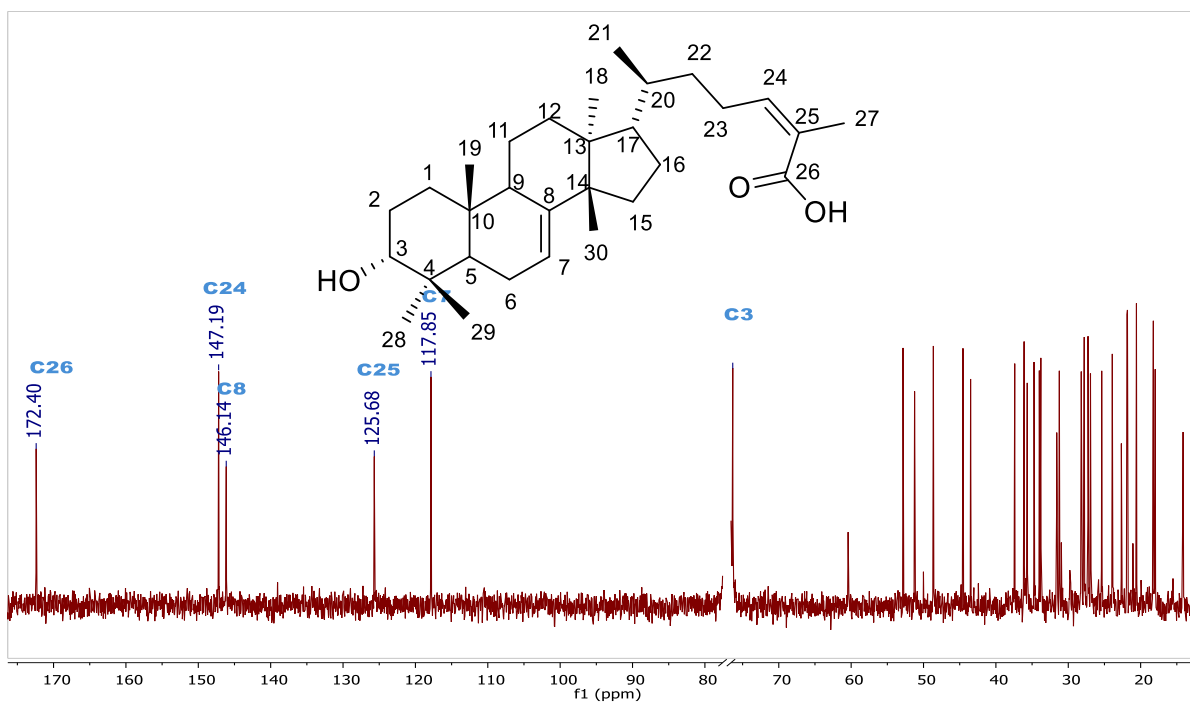


Figura III. Espectro de RMN-¹³C (126 MHz CDCl₃) del ácido 3α-hidroxicasticadienónico. (3α)

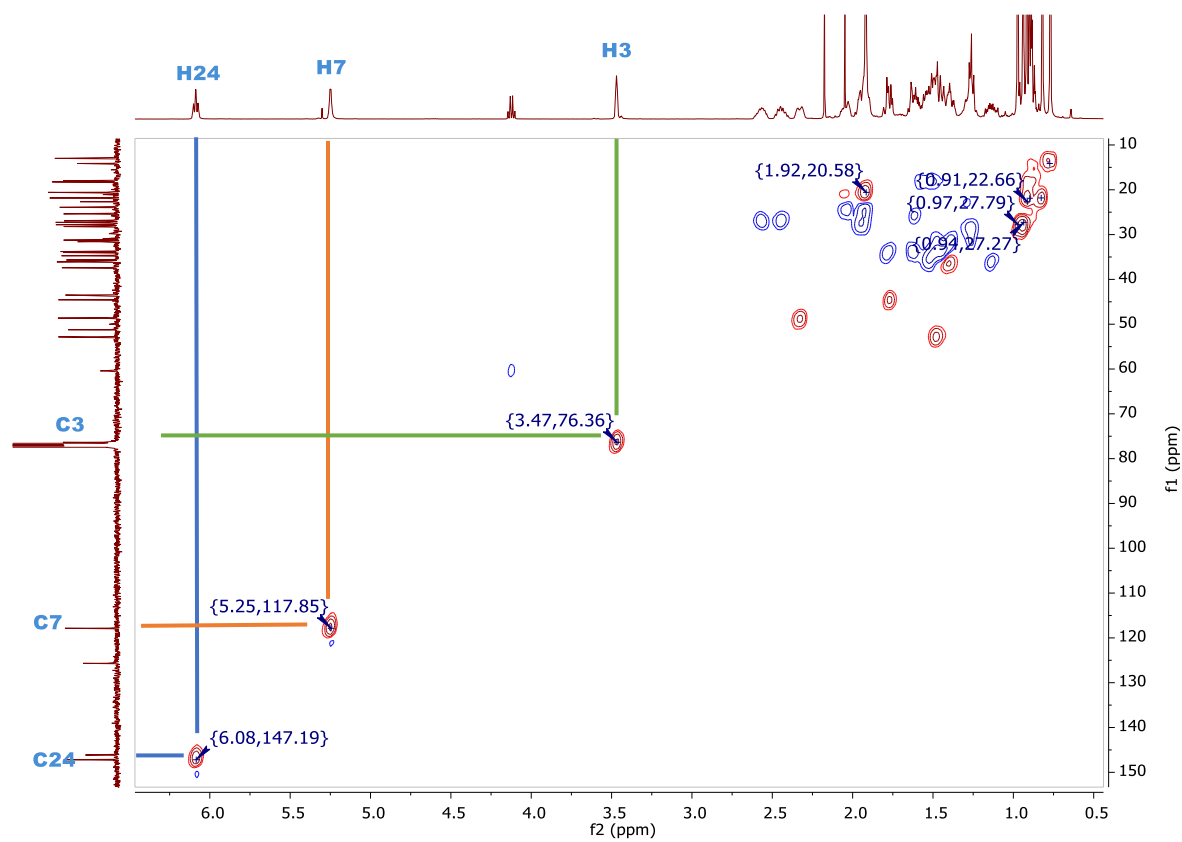


Figura IV. Espectro de RMN-HSQC (CDCl₃) del ácido 3α-hidroxicasticadienónico. (3α)

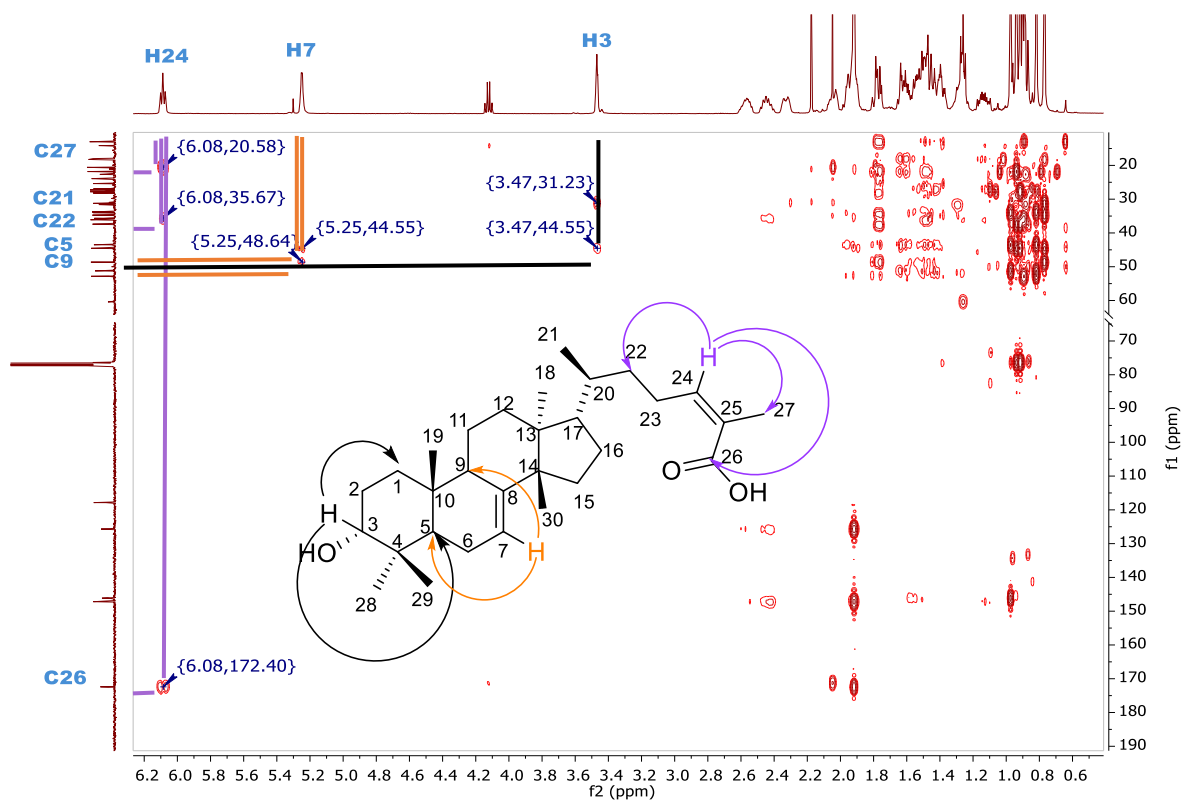
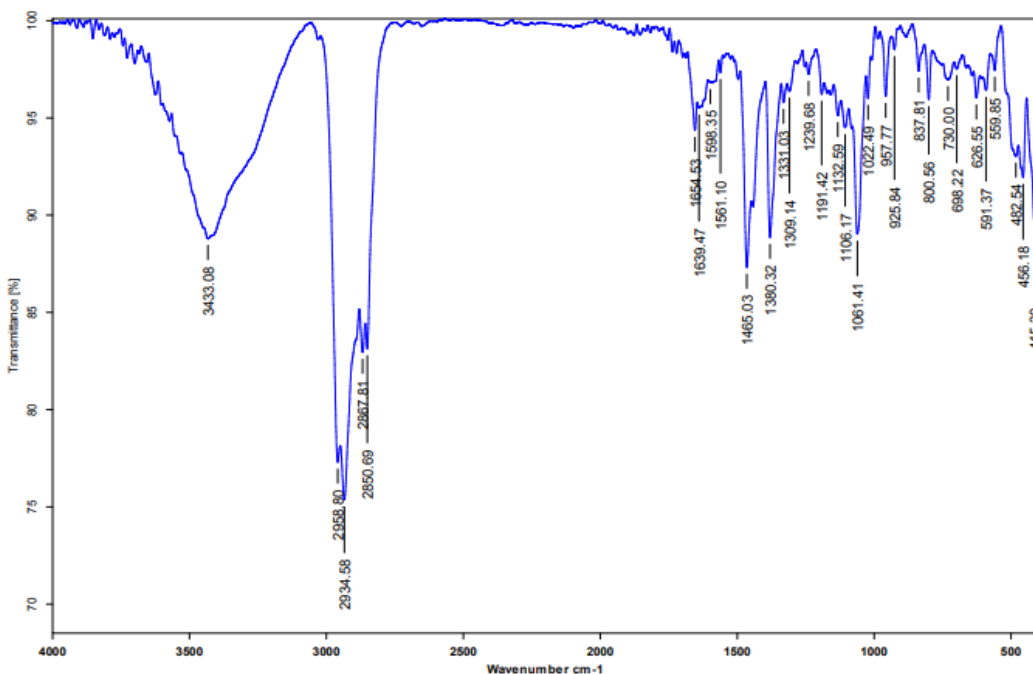


Figura V. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del ácido 3 α -hidroximasticadienónico. (**3 α**)



Dr. Mariano Martínez Vázquez

AMD

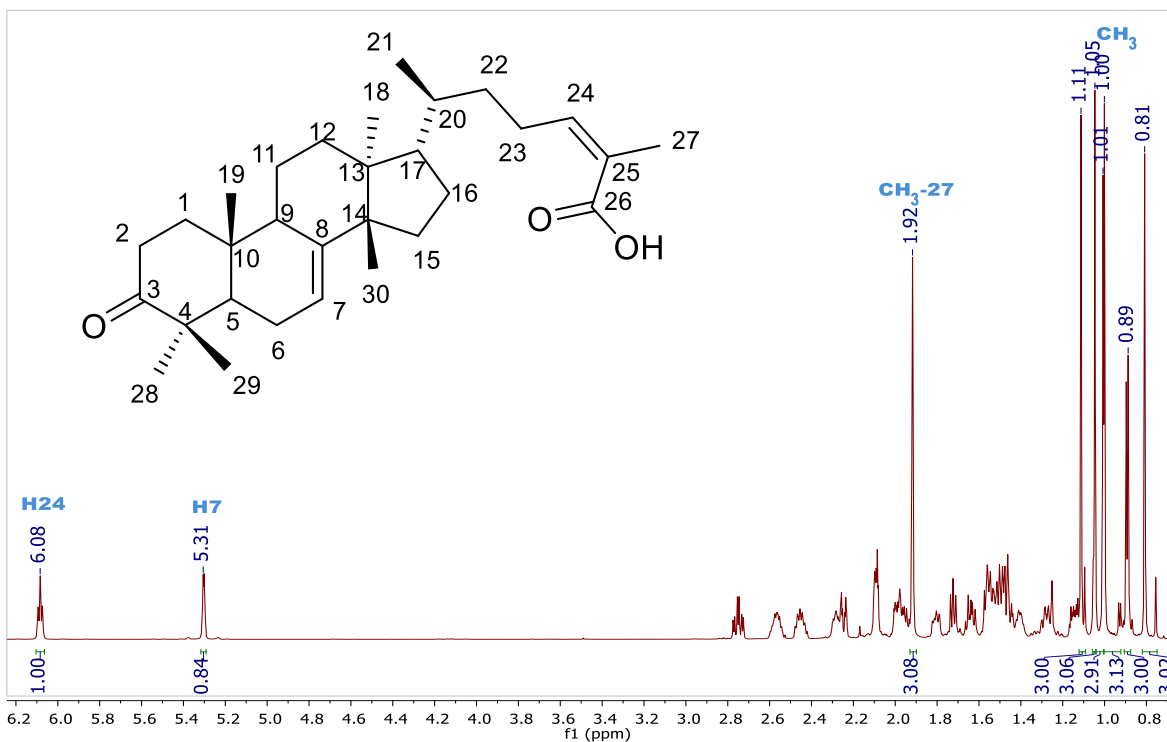
Pastilla

12979

ARP

16/11/2022

Figura VI. Espectro de Infrarrojo (IR) del ácido masticadienónico. (AMD)

Figura VII. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del ácido masticadienónico. (AMD)

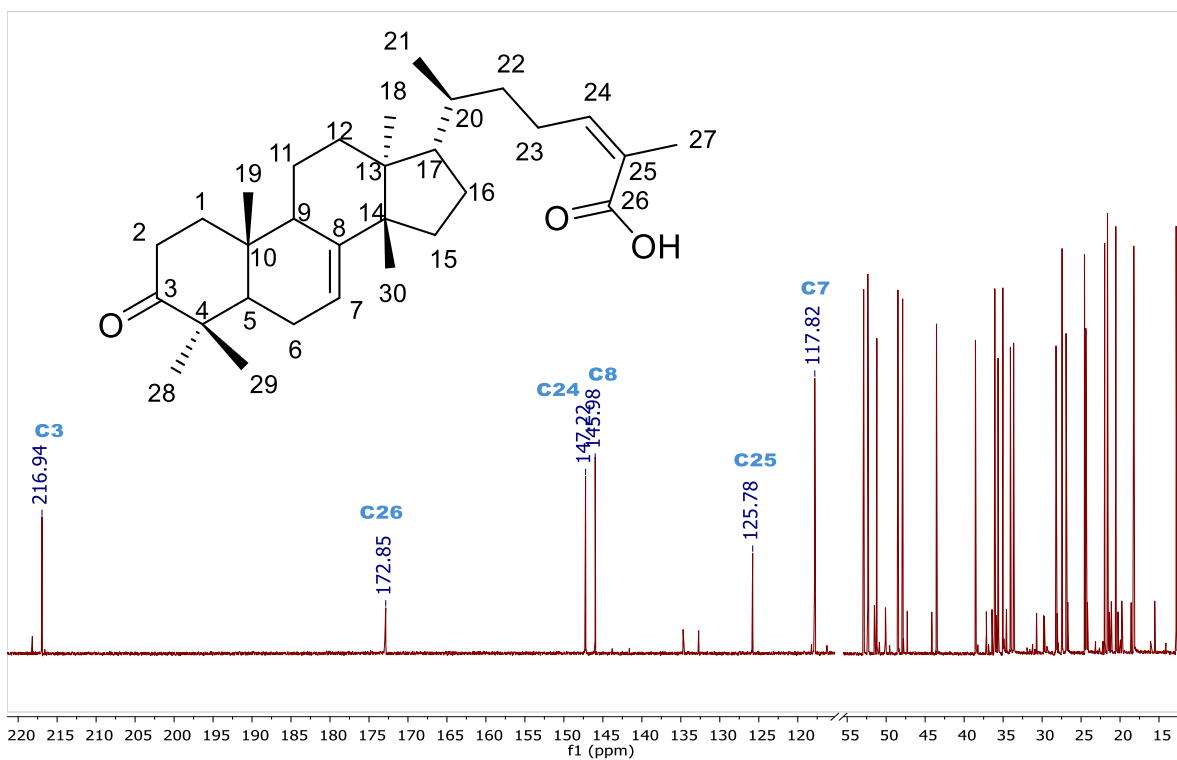


Figura VIII. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del ácido masticadienónico. (AMD)

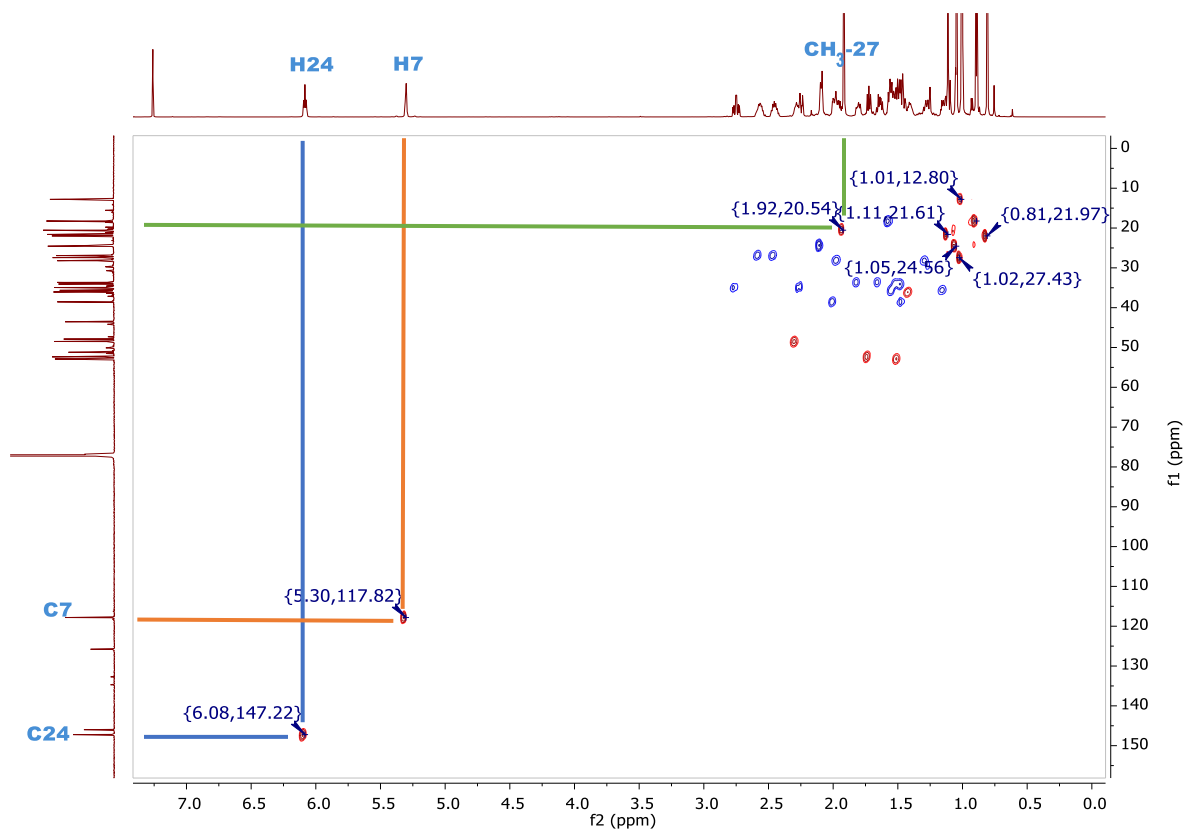


Figura IX. Espectro de RMN-HSQC (CDCl₃) del ácido masticadienónico. (AMD)

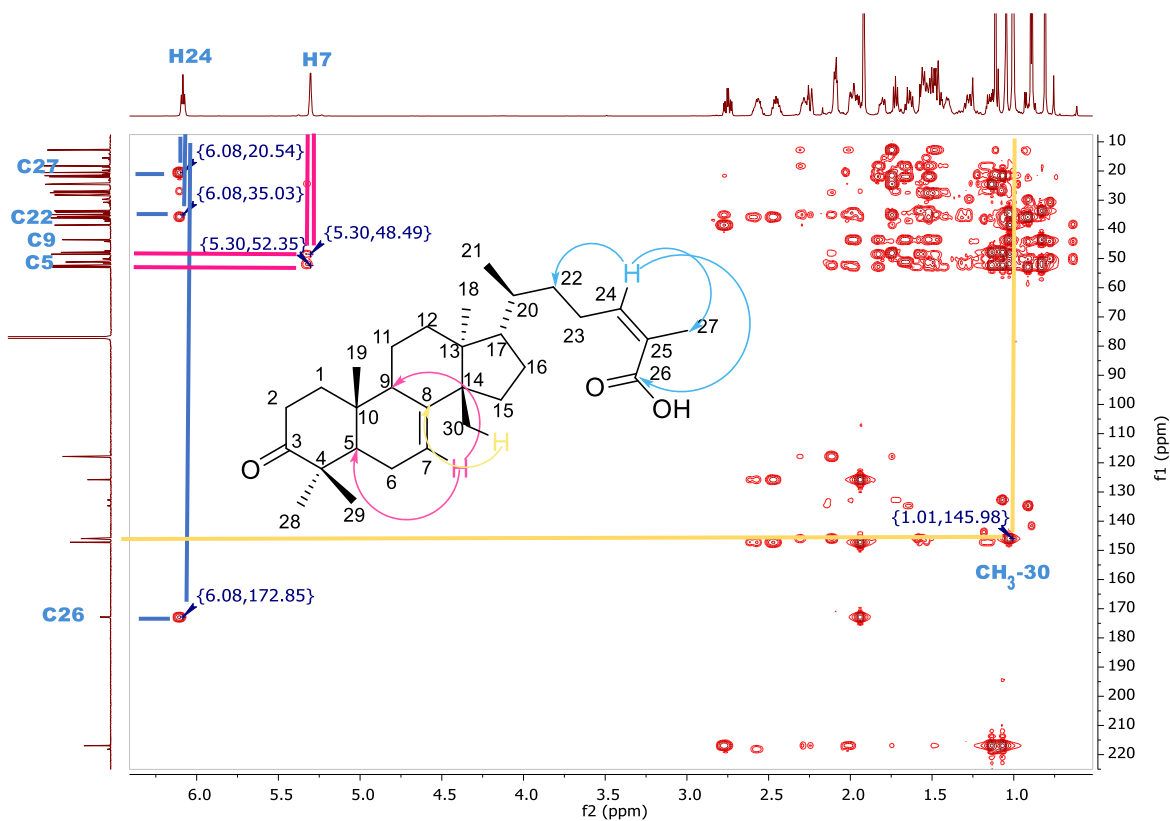
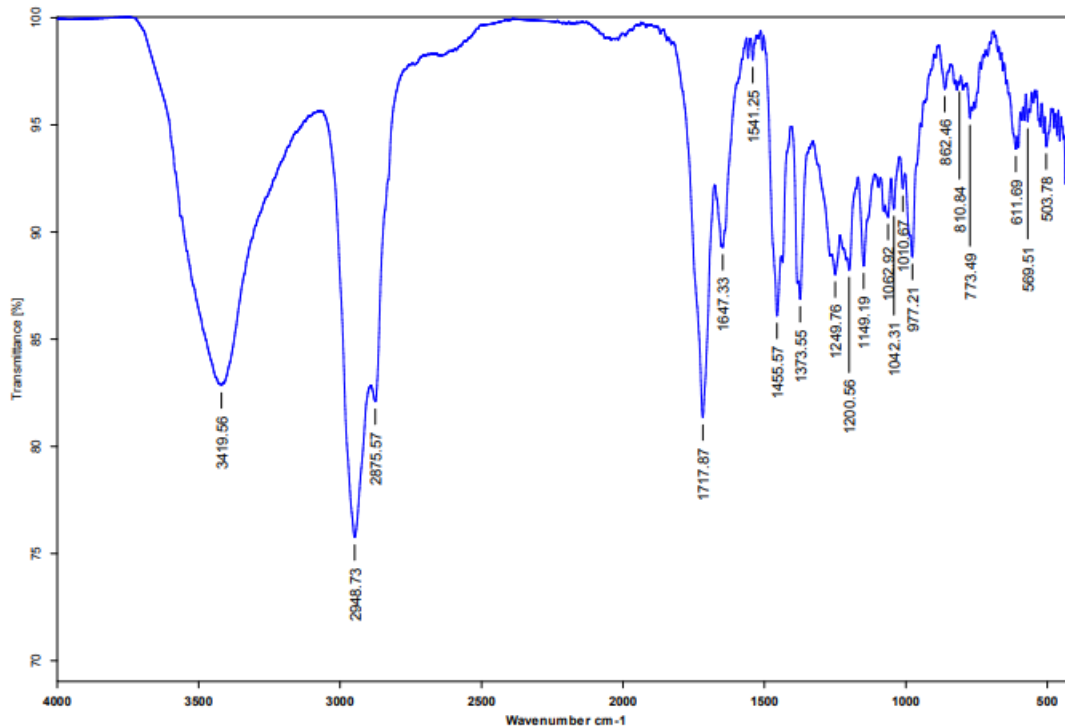


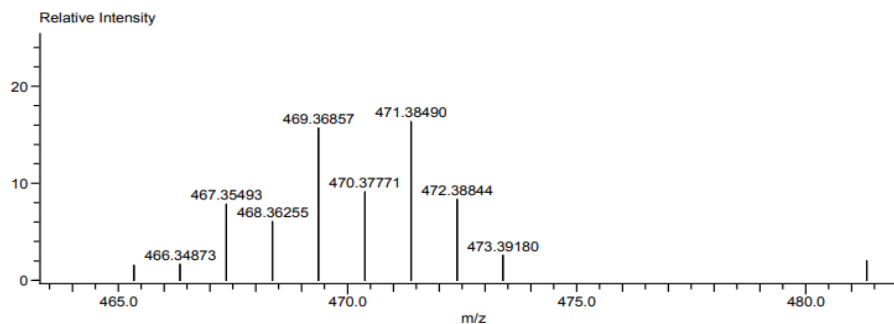
Figura X. Espectro de RMN-HMBC (CDCl₃) del ácido masticadienónico. (AMD)



Dr. Mariano Martínez Vázquez 3alf-OMels Pastilla 833 ARP 23/11/2021

Figura XI. Espectro de Infrarrojo (IR) del 3α-hidroximasticadienato de metilo. (**3α-1**)

Data:U-53 3alf-OMels	Acquired:3/16/2022 3:12:45 PM
Sample Name:Dr. Mariano Martinez/Noemi Silva	Operator:AccuTOF
Description:	Mass Calibration data:cal-PEG-600-nu...
Ionization Mode:ESI+	Created:3/16/2022 3:35:50 PM
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5];...	Created by:AccuTOF
Charge number:1	Tolerance:5.00(mmu)
Element: ¹² C:29 .. 32, ¹ H:45 .. 60, ¹⁶ O:1 .. 3	Unsaturation Number:0.0 .. 100.0 (Fra...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
471.38490	16793.45	471.38382	1.08	2.29	¹² C ₃₁ ¹ H ₅₁ ¹⁶ O ₃

Figura XII. Determinación de masas exactas (M^{+1}) del 3α-hidroximasticadienato de metilo. (**3α-1**)

LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	3alfOMels	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	terpenos 111121
Vial:	4	Acq. Method Set:	triterpenos mvm
Injection #:	1	Processing Method:	terpenos mvm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	241.0nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 241.0 nm (210-600)nm
Date Acquired:	12/11/2021 04:48:37 PM CST		
Date Processed:	16/11/2021 11:13:27 AM CST		

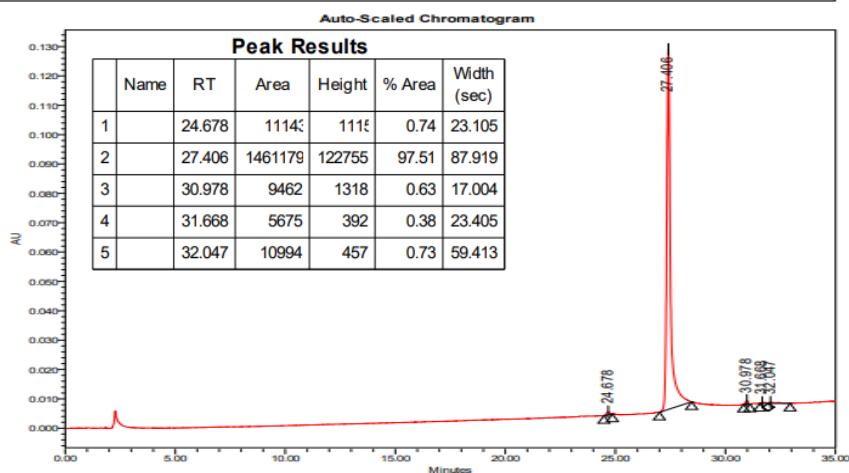


Figura XIV. Determinación del grado de pureza mediante HPLC-UV del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**)

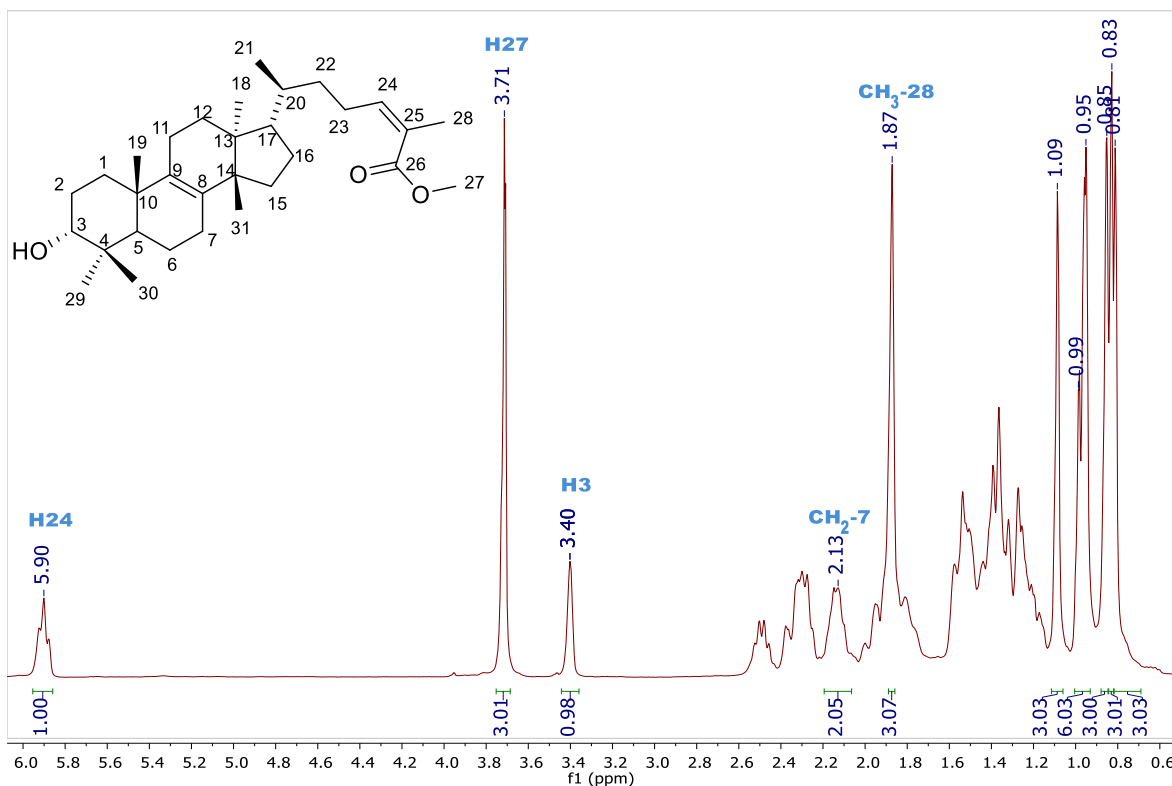


Figura XV. Espectro de RMN-¹H (300 MHz CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**)

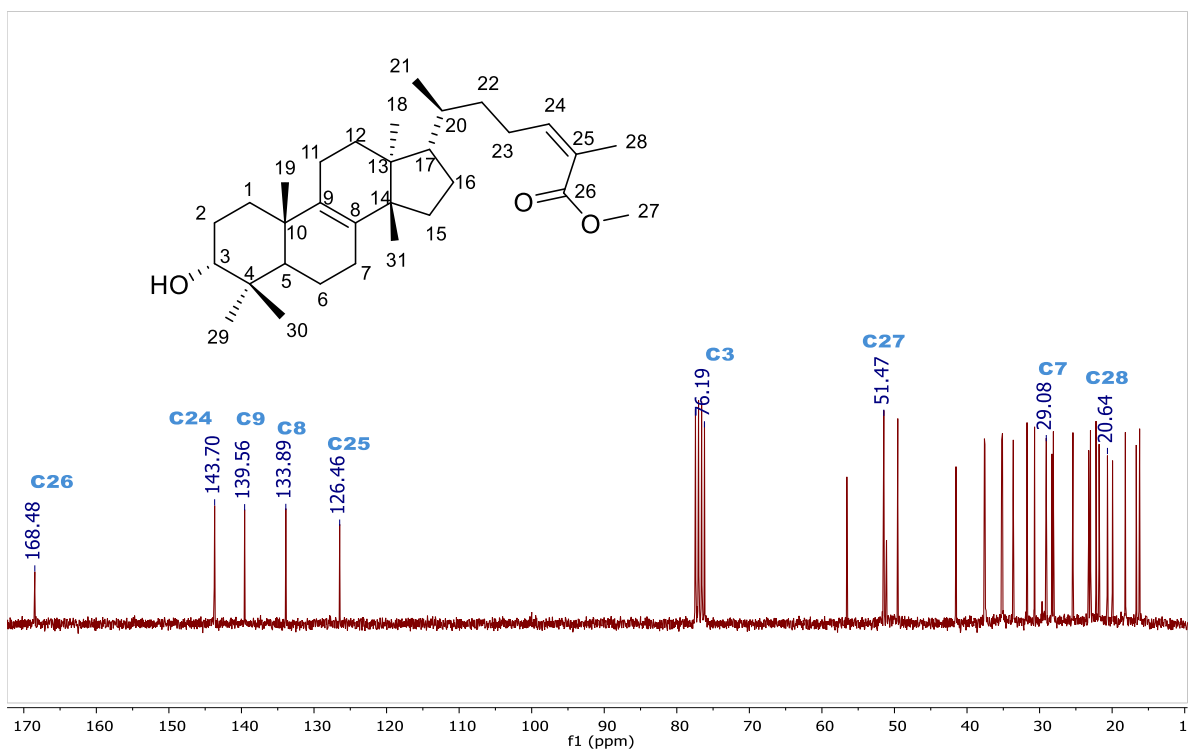


Figura XVI. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**).

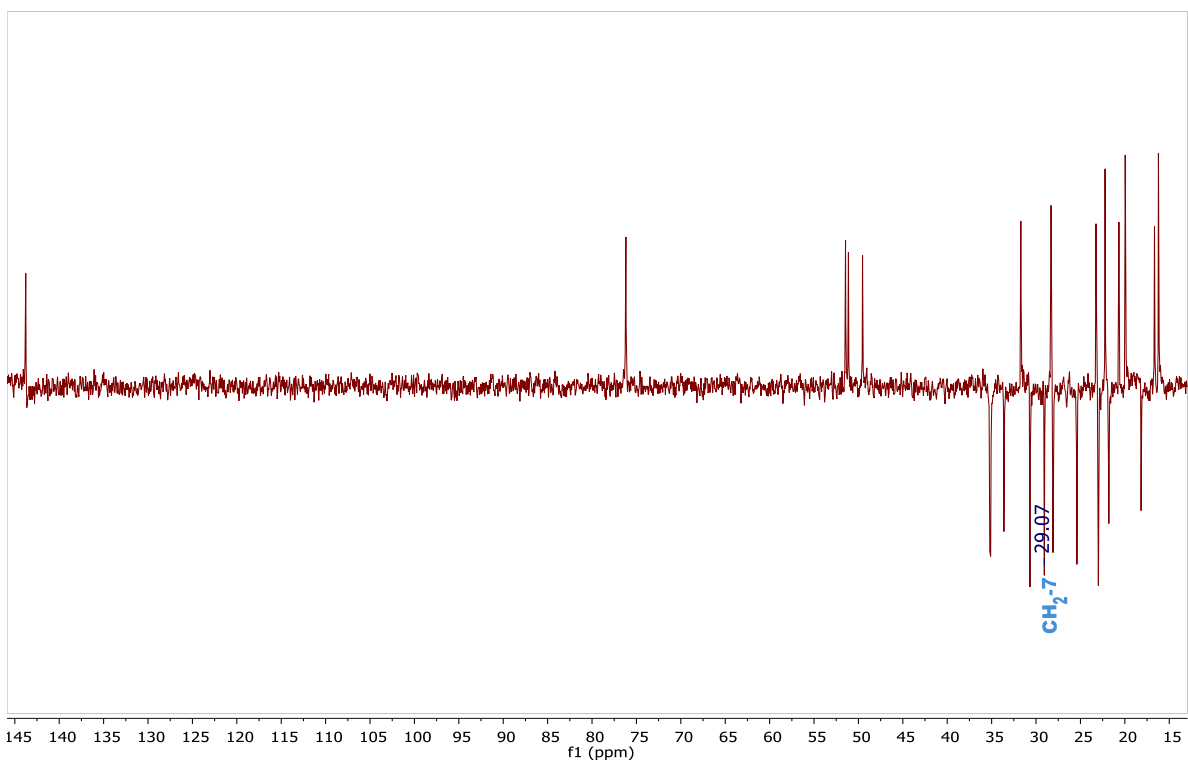


Figura XVII. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**)

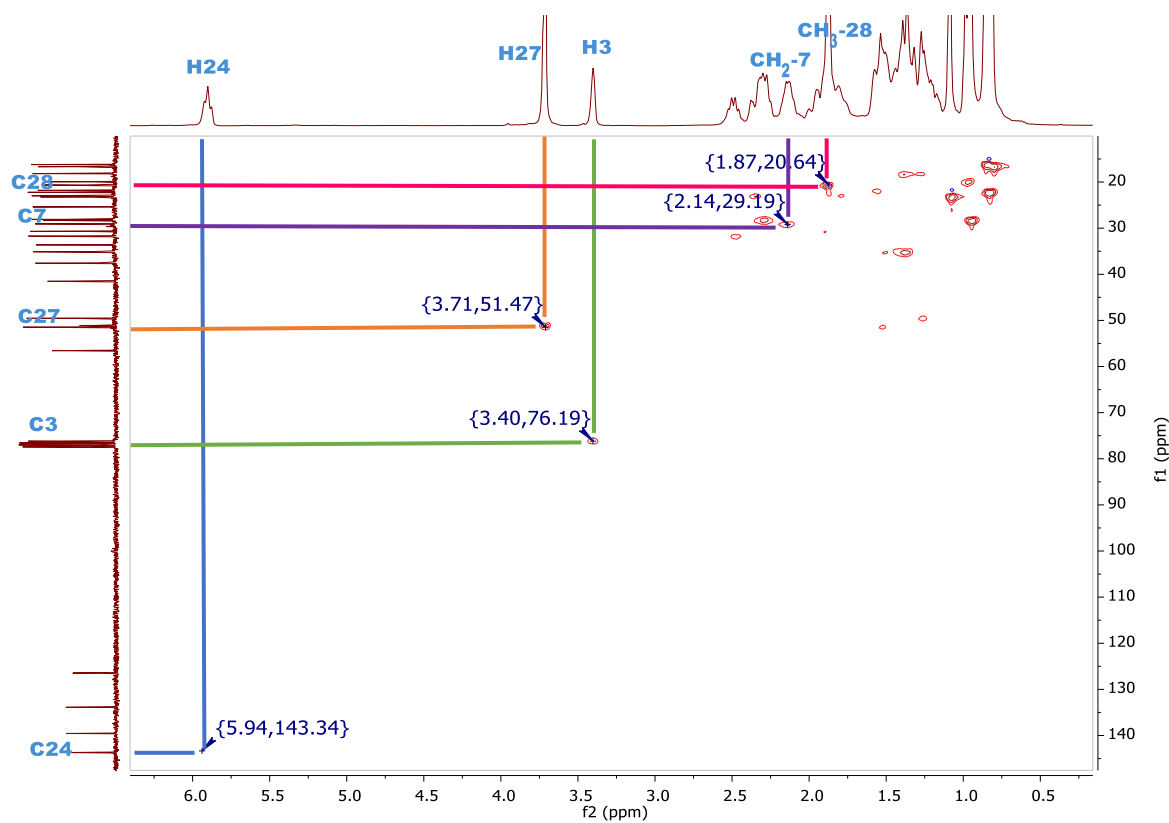


Figura XVIII. Espectro de RMN-HSQC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**)

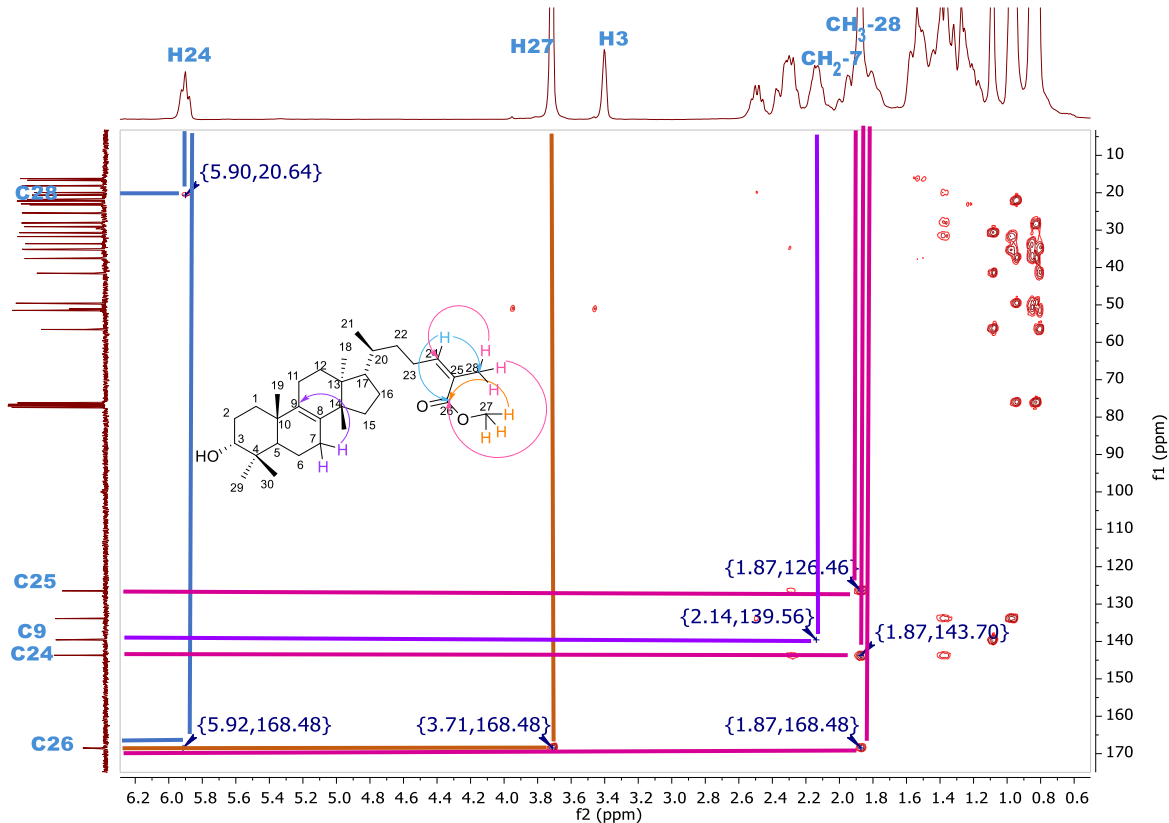
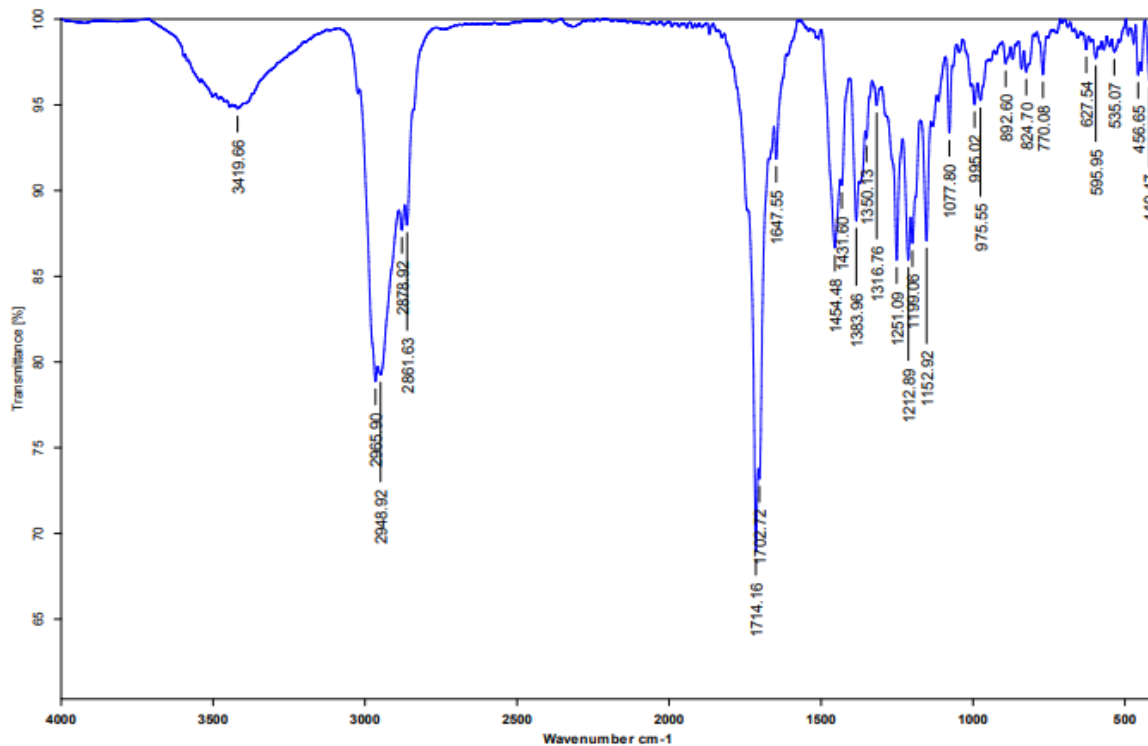


Figura XIX. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de metilo. (**3 α -1**)



Dr. Mariano Martínez

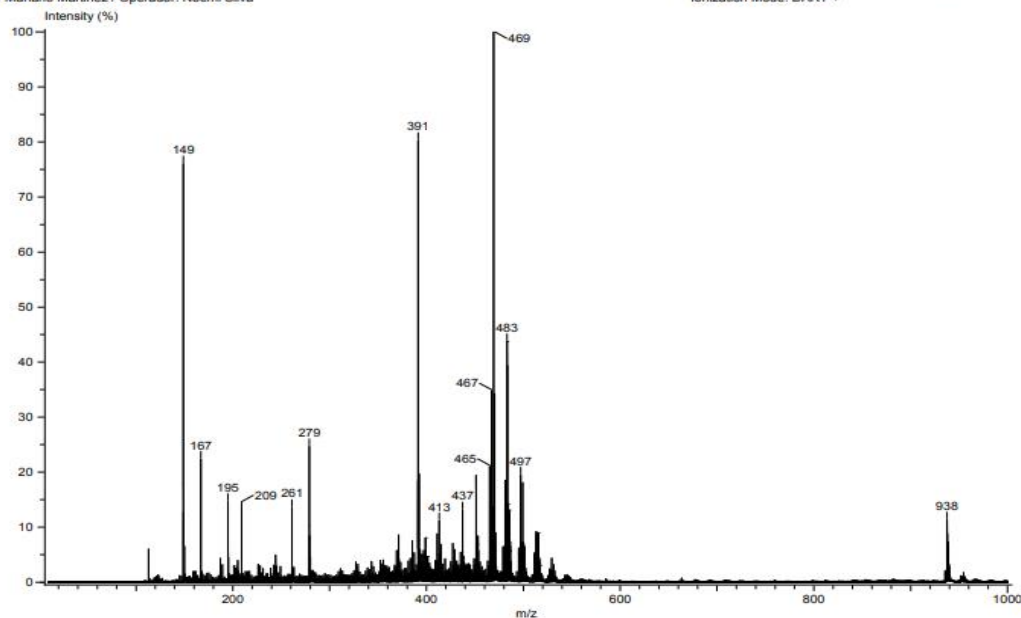
AMD-OMe

Pastilla

15571

ARP

28/03/2023

Figura XX. Espectro de Infrarrojo (IR) del masticadienato de metilo (**AMD-1**).INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASASAcq. Data Name: U-408 AMD-OMe
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.0)
Dr Mariano Martínez / Operador: Noemí SilvaExperiment Date/Time: 3/14/2023 12:37:31 PM
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC
Ionization Mode: DART +Figura XXI. Determinación de masas del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

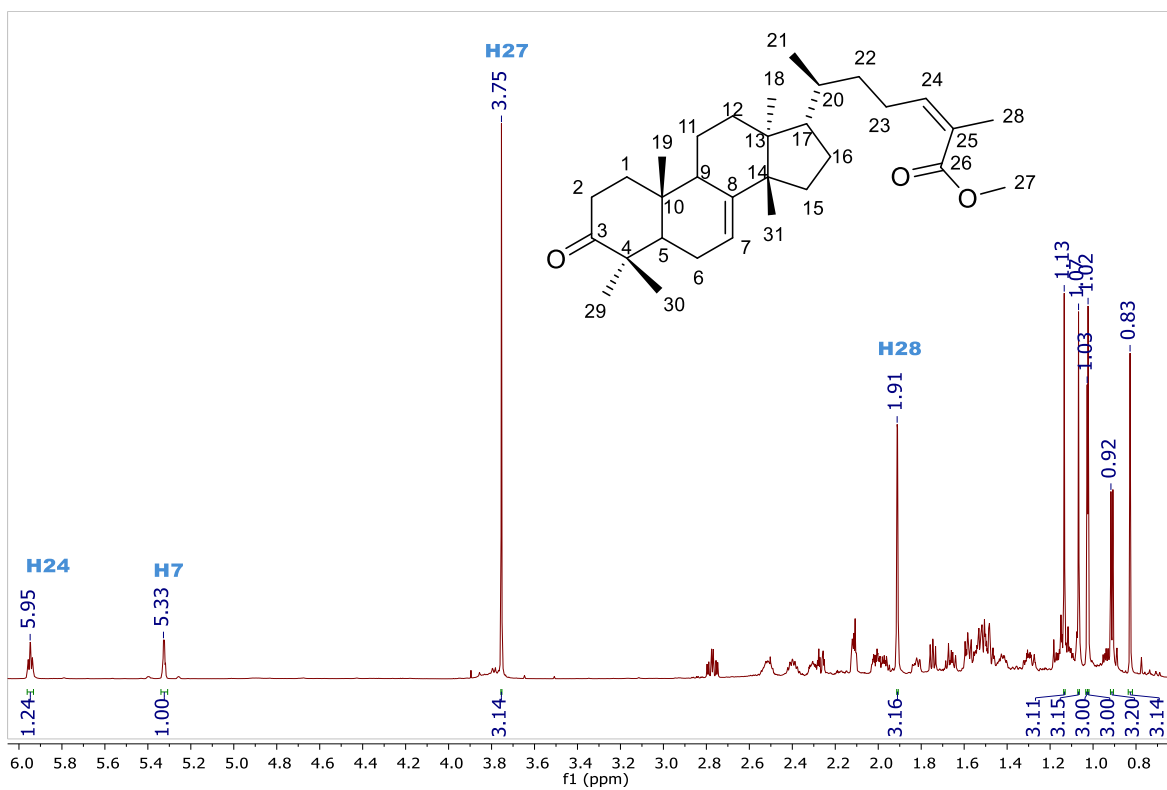


Figura XXII. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz CDCl_3) del masticadienato de metilo. (AMD-1).

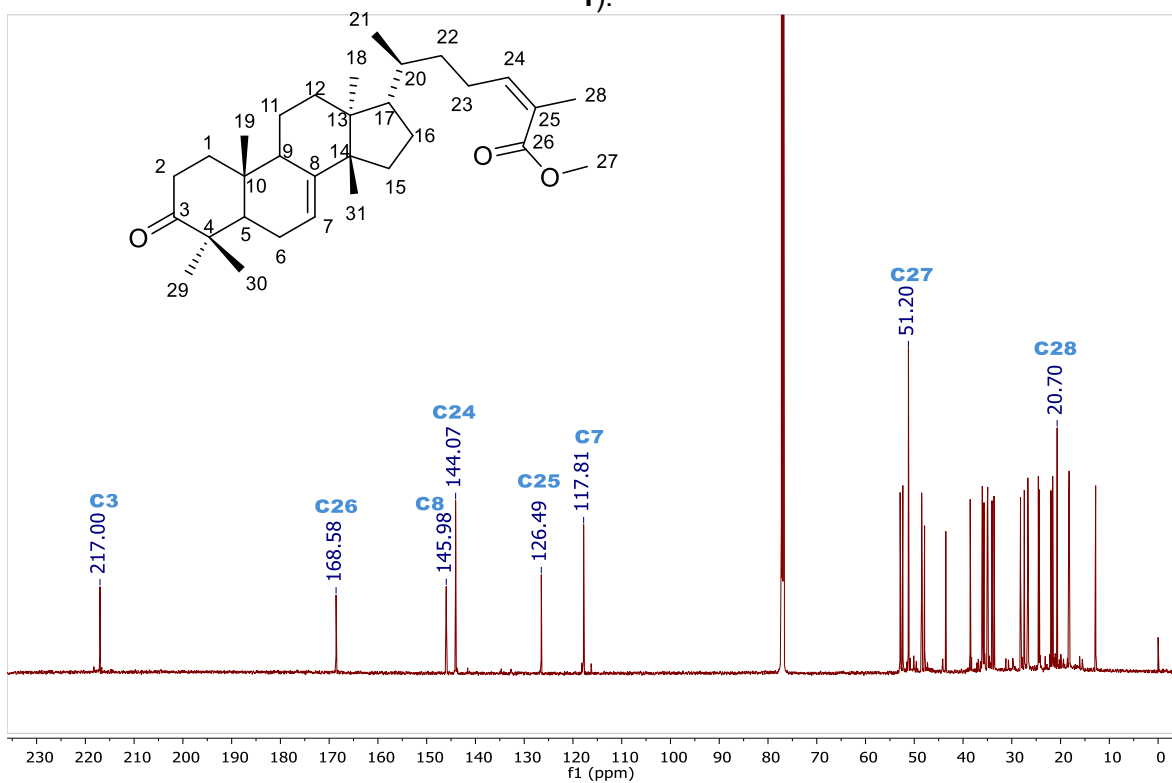


Figura XXIII. Espectro de RMN- ^{13}C (176 MHz CDCl_3) del masticadienato de metilo. (AMD-1).

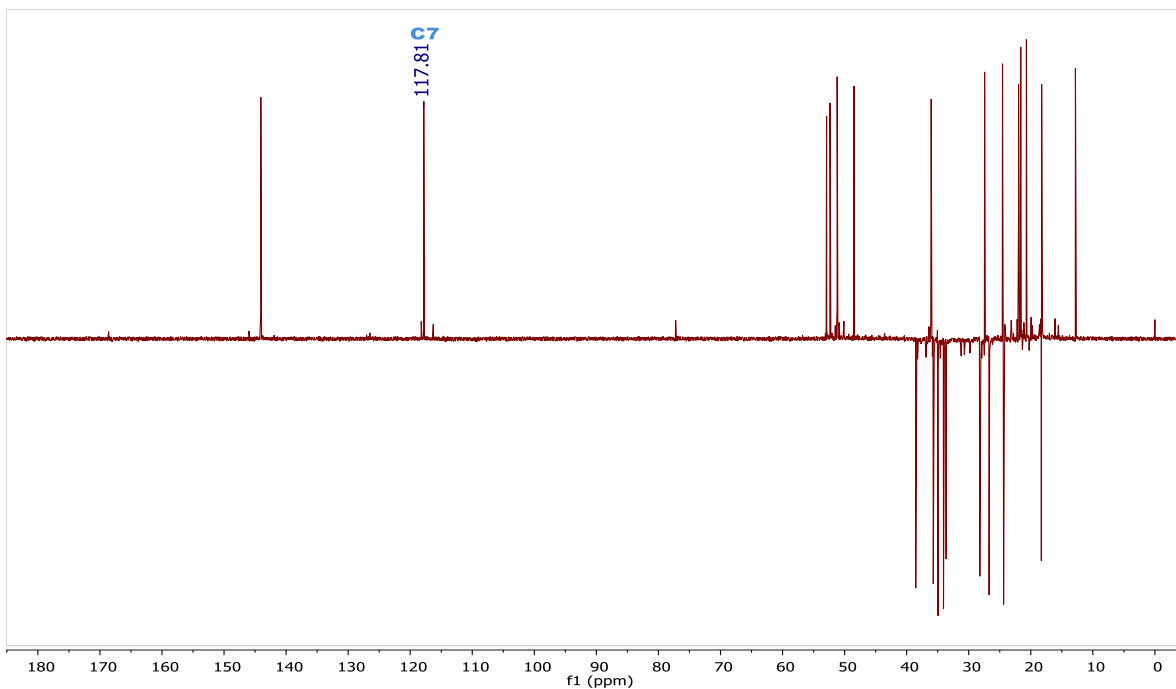


Figura XXIV. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

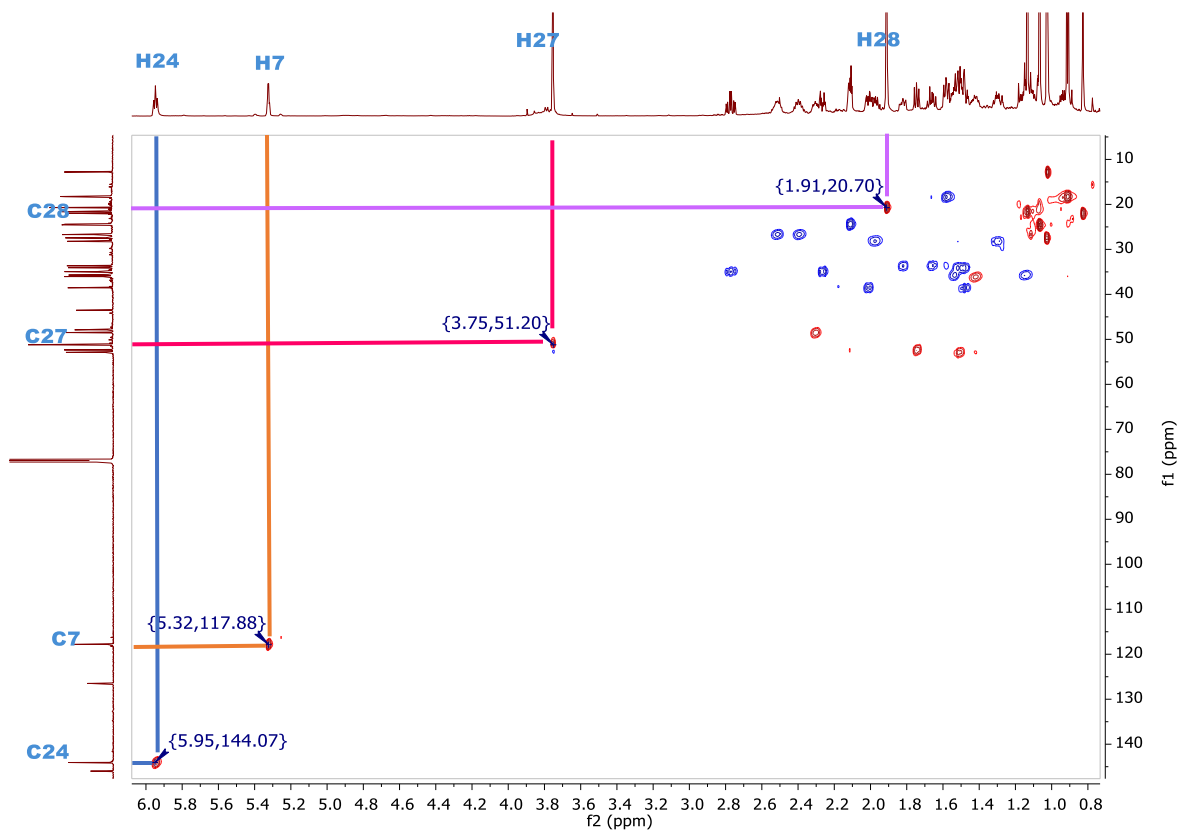


Figura XXV. Espectro de RMN-HSQC (CDCl_3) del masticadienato de metilo. (**AMD-1**).

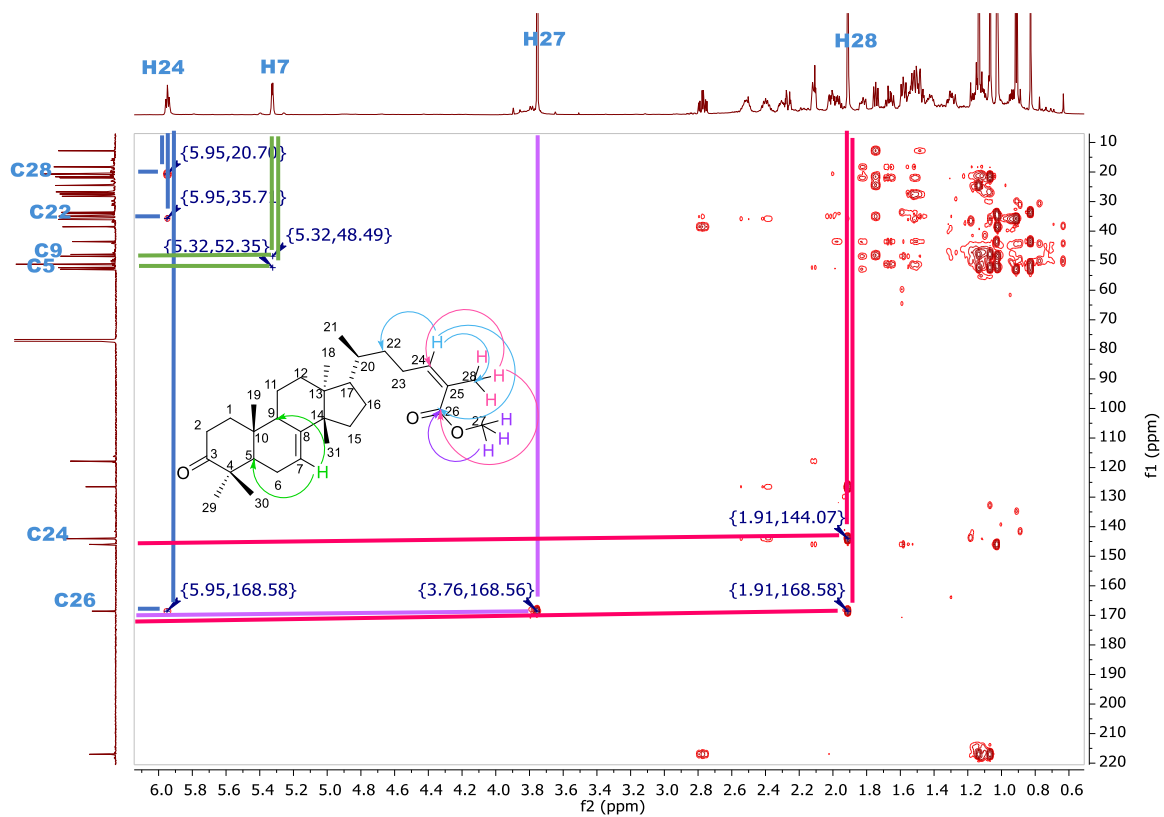
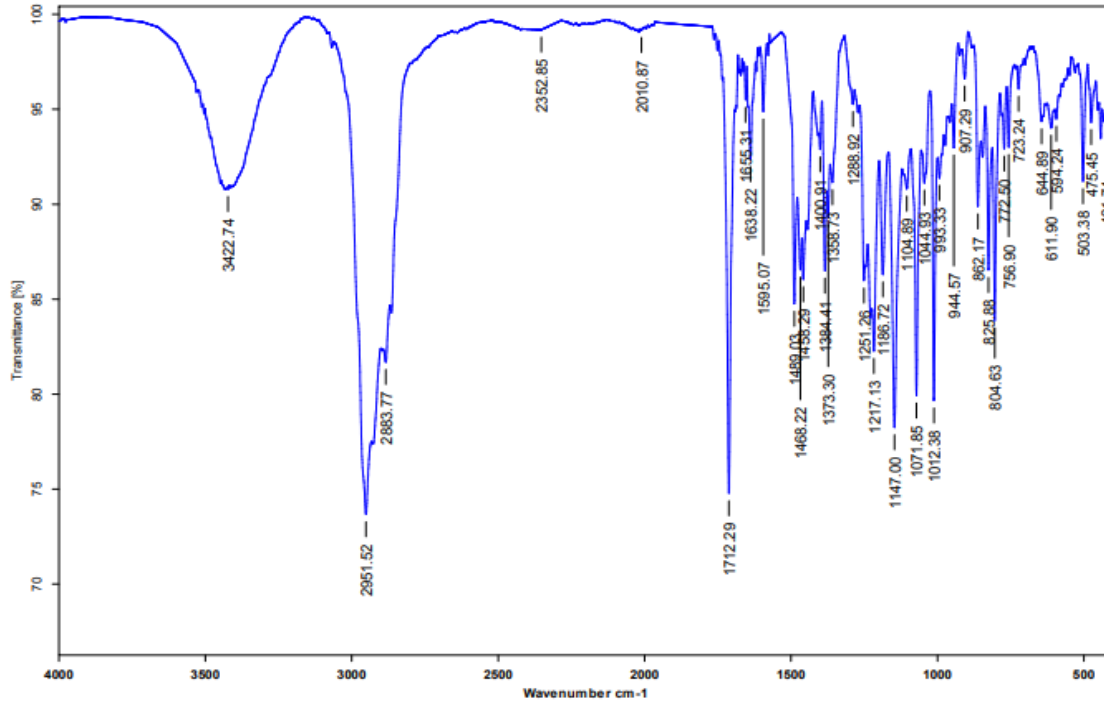


Figura XXVI. Espectro de RMN-HMBC (CDCl₃) del masticadienato de metilo. (AMD-1).



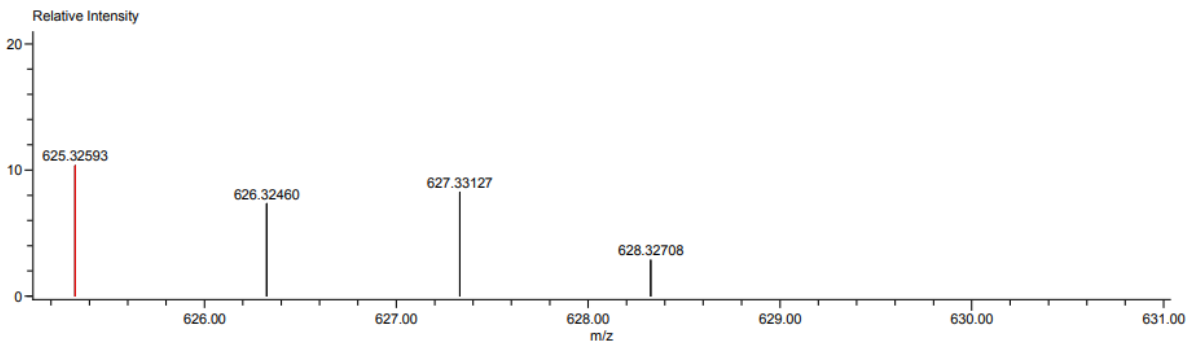
Dr. Mariano Martínez Vázquez 3αf-BrBn Pastilla 835 ARP 23/11/2021

Figura XXVII. Espectro de Infrarrojo (IR) del 3α-hidroxi-masticadienato de *p*-bromobencilo (3α-2).

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:1708 3αf-pBrBn Acquired:11/24/2021 10:54:31 AM
 Sample Name:Dr. Martínez Mariano / Operador: Carmen Garcia Operator:AccuTOF
 Description: Mass Calibration data:Cal_PEG_600-nov-21
 Ionization Mode:ESI+ Created:12/17/2021 1:49:03 PM
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5];Correct Base[5.0%];Average(MS[...])]
 Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:50.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)
 Element:¹²C:0 .. 40, ¹H:0 .. 70, ⁷⁹Br:0 .. 1, ¹⁶O:0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
625.32593	7372.74	625.32563	0.30	0.48	¹² C ₃₇ ¹ H ₅₄ ⁷⁹ Br ₁ ¹⁶ O ₃	10.5

Figura XXVIII. Determinación de masas exactas (M⁺) del 3α-hidroxi-masticadienato de *p*-bromobencilo (3α-2).

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	3a1fpBrBn	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	terpenos 111121
Vial:	3	Acq. Method Set:	triterpenos.mvm
Injection #:	1	Processing Method:	terpenos.mvm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	241.0nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 241.0 nm (210-600)nm
Date Acquired:	12/11/2021 04:01:58 PM CST		
Date Processed:	16/11/2021 11:39:06 AM CST		

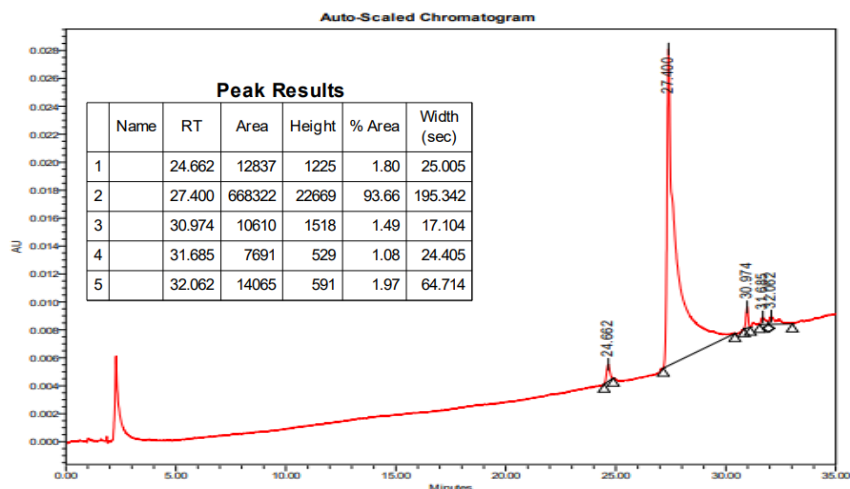


Figura XXIX. Determinación del grado de pureza mediante HPLC-UV del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (**3 α -2**).

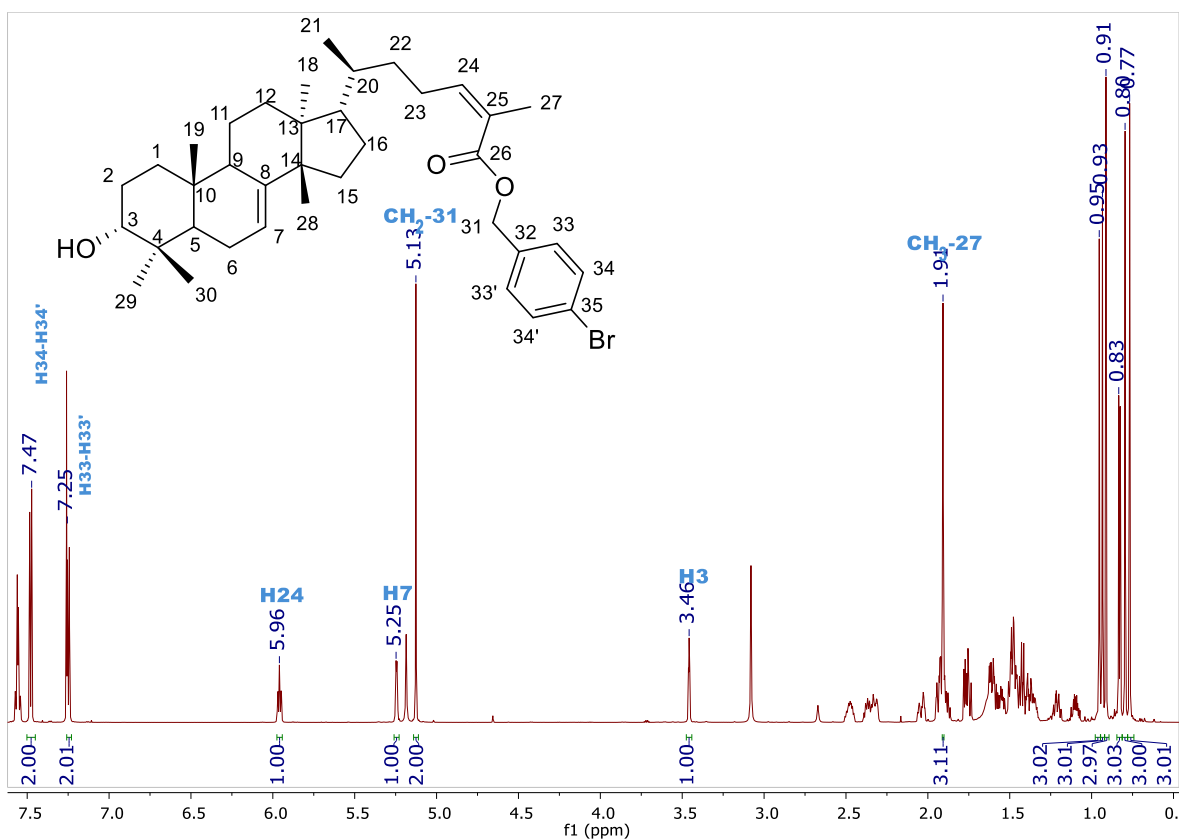


Figura XXX. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo. (**3 α -2**).

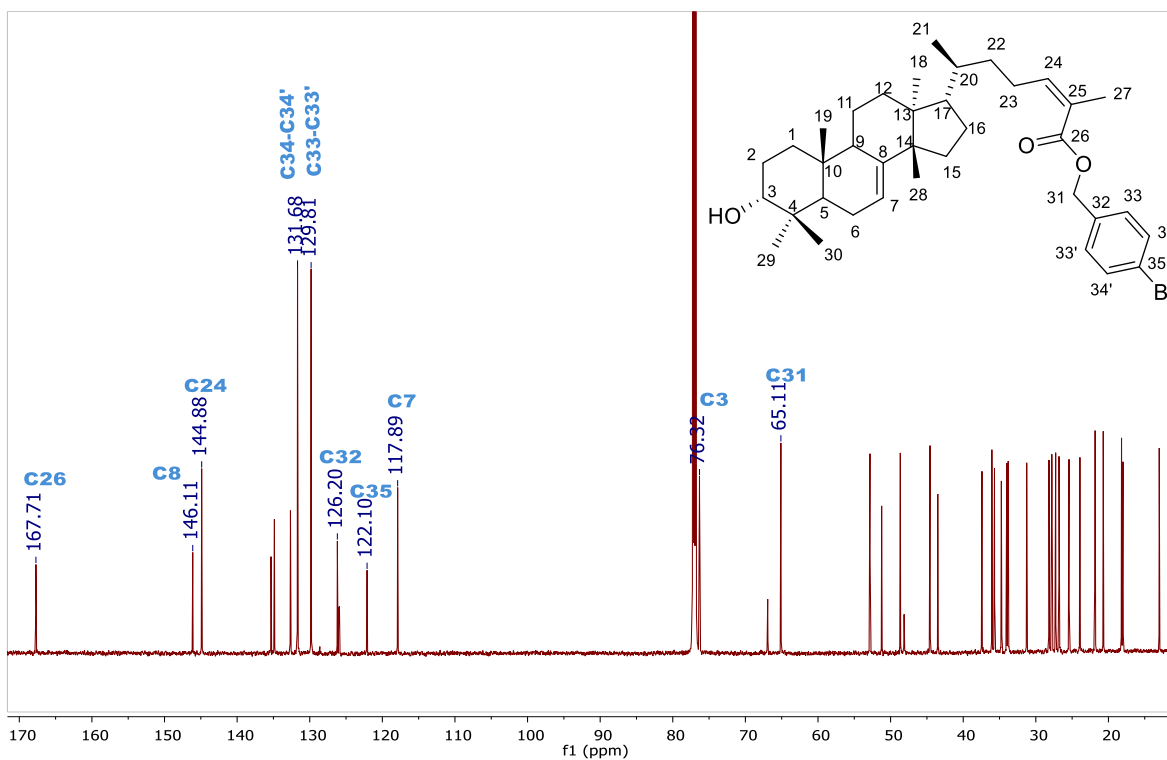


Figura XXXI. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo. (**3 α -2**).

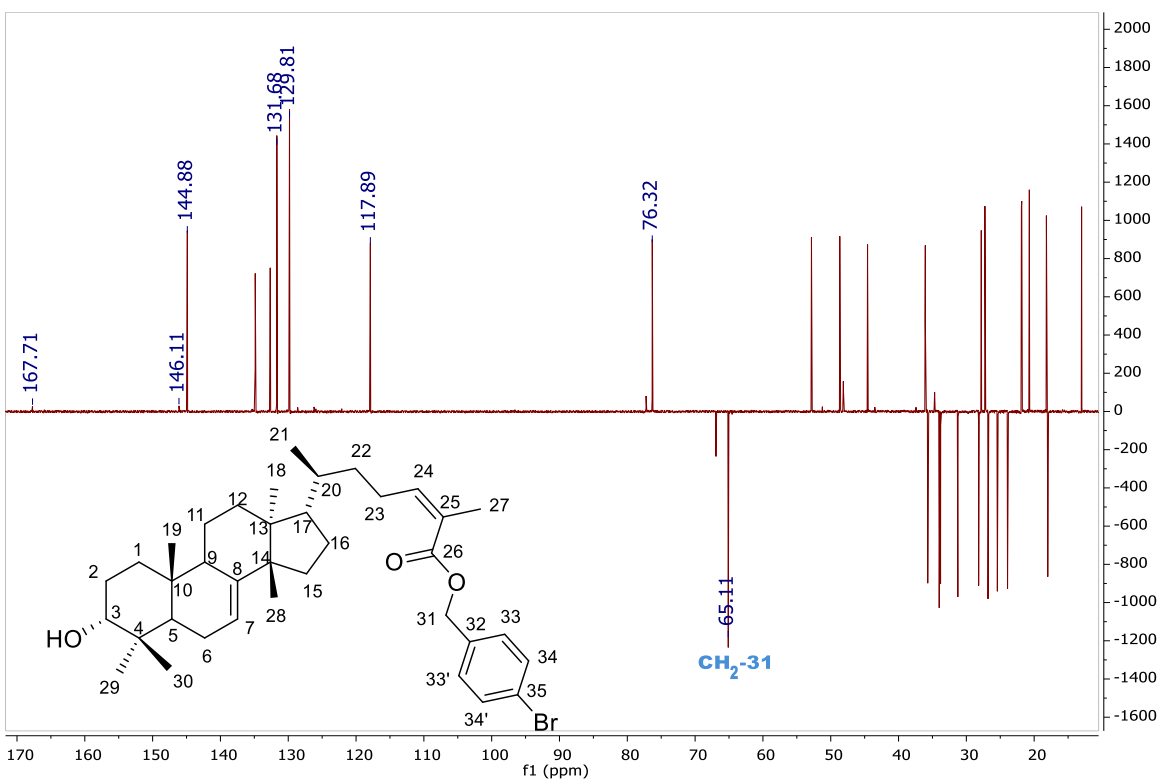


Figura XXXII. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo. (**3 α -2**).

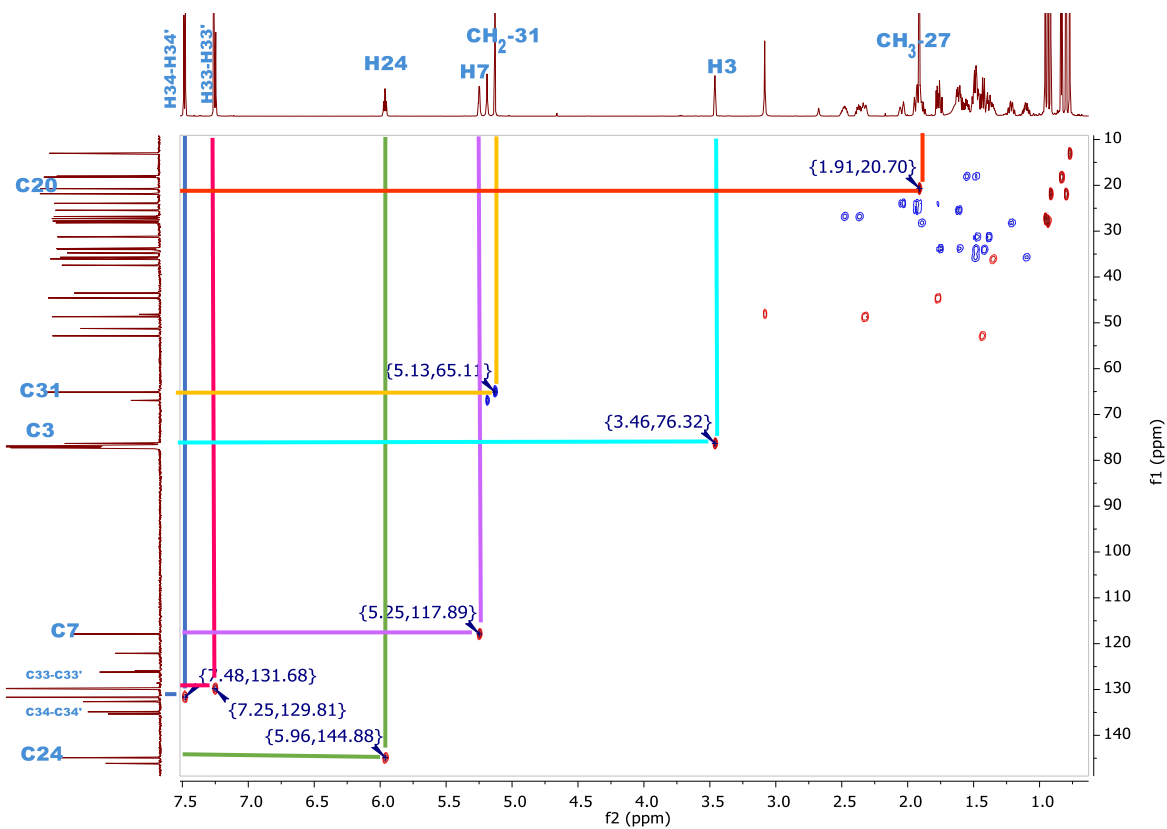


Figura XXXIII. Espectro de RMN-HSQC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (3 α -2).

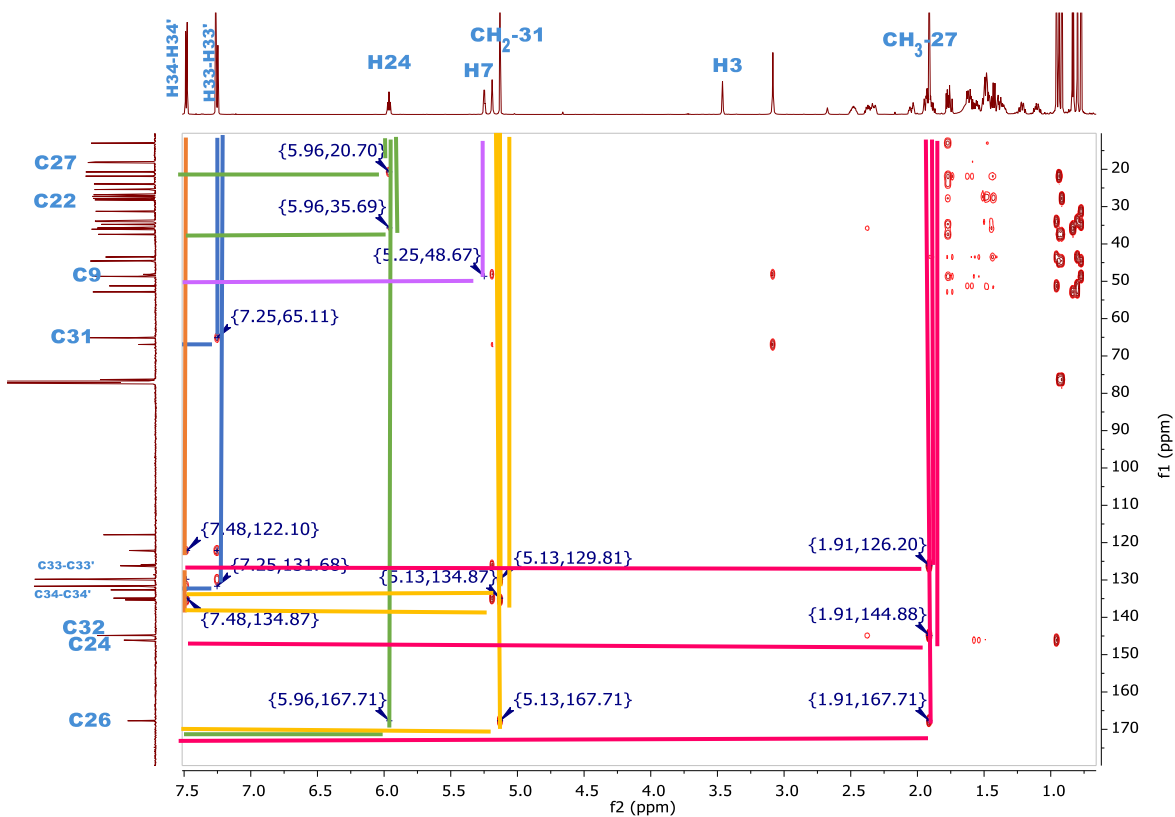


Figura XXXIV. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (3 α -2).

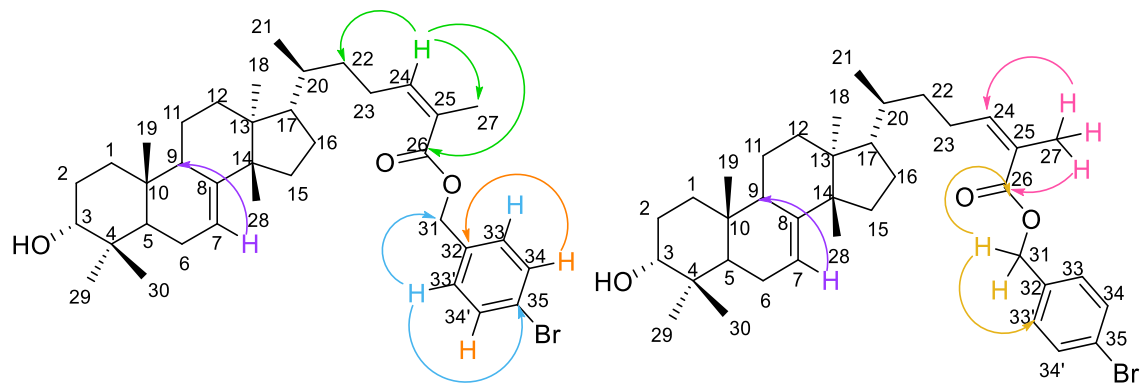
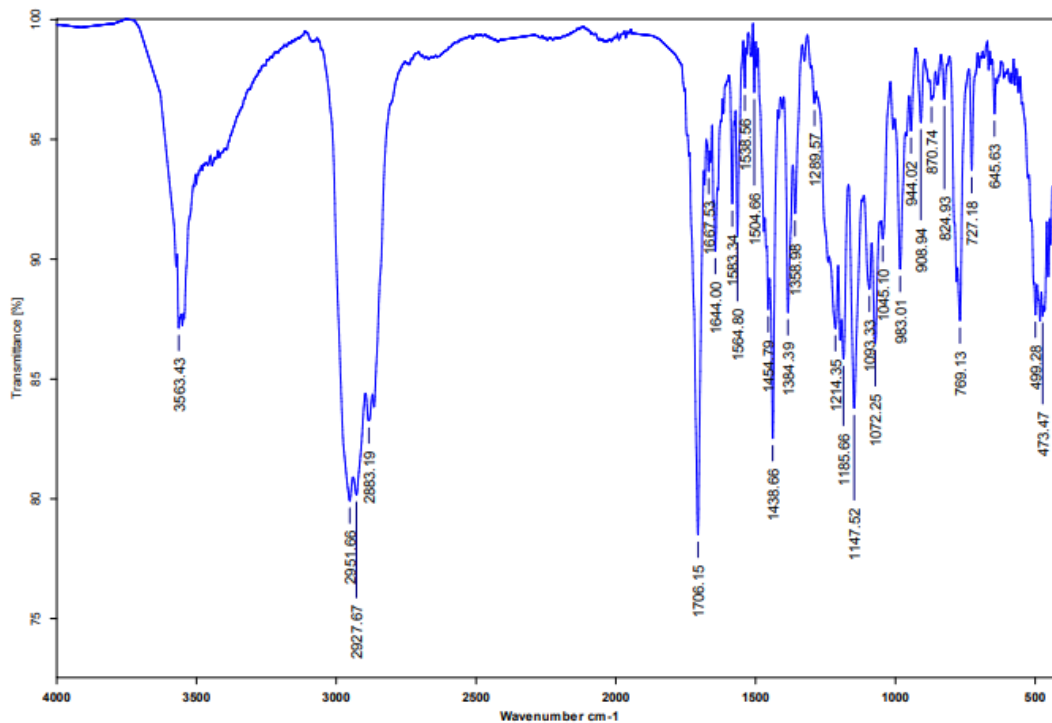


Figura XXXV. Correlaciones RMN HMBC del 3 α -hidroximasticadienato de *p*-bromobencilo (3 α -2).



Dr. Mariano Martínez Vázquez 3αf-Cl2Bn Pastilla 838 ARP 23/11/2021

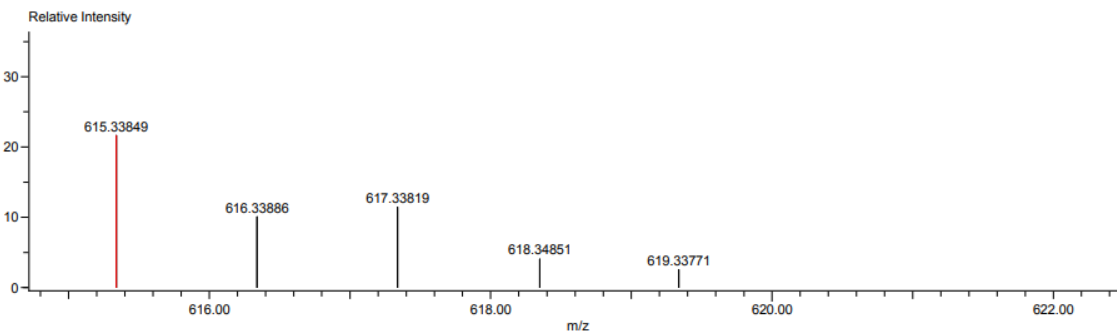
Figura XXXVI. Espectro de Infrarrojo (IR) del 3α-hidroxi-masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3α-3**).

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:1672 3αf-Cl2Br
Sample Name:Dr Martinez Mariano / Operador: Carmen Garcia
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average[MS][...

Acquired:11/24/2021 10:25:00 AM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal_PEG_600-nov-21
Created:12/17/2021 1:59:46 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:1.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)
Element:¹²C:0 .. 40, ¹H:0 .. 70, ³⁵Cl:0 .. 2, ¹⁶O:0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
615.33849	4588.28	615.33717	1.32	2.14	¹² C ₃₇ ¹ H ₅₃ ³⁵ Cl ₂ ¹⁶ O ₃	10.5

Figura XXXVII. Determinación de masas exactas (M⁺) del 3α-hidroxi-masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3α-3**).

Instituto de Química UNAM
Laboratorio de Cromatografía

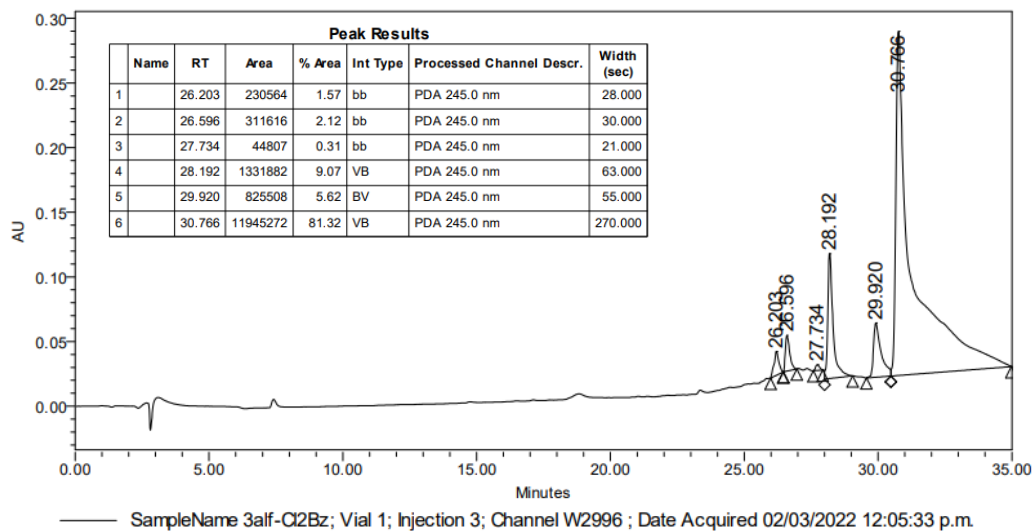


Figura XXXVIII. Determinación del grado de pureza mediante HPLC-UV del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).

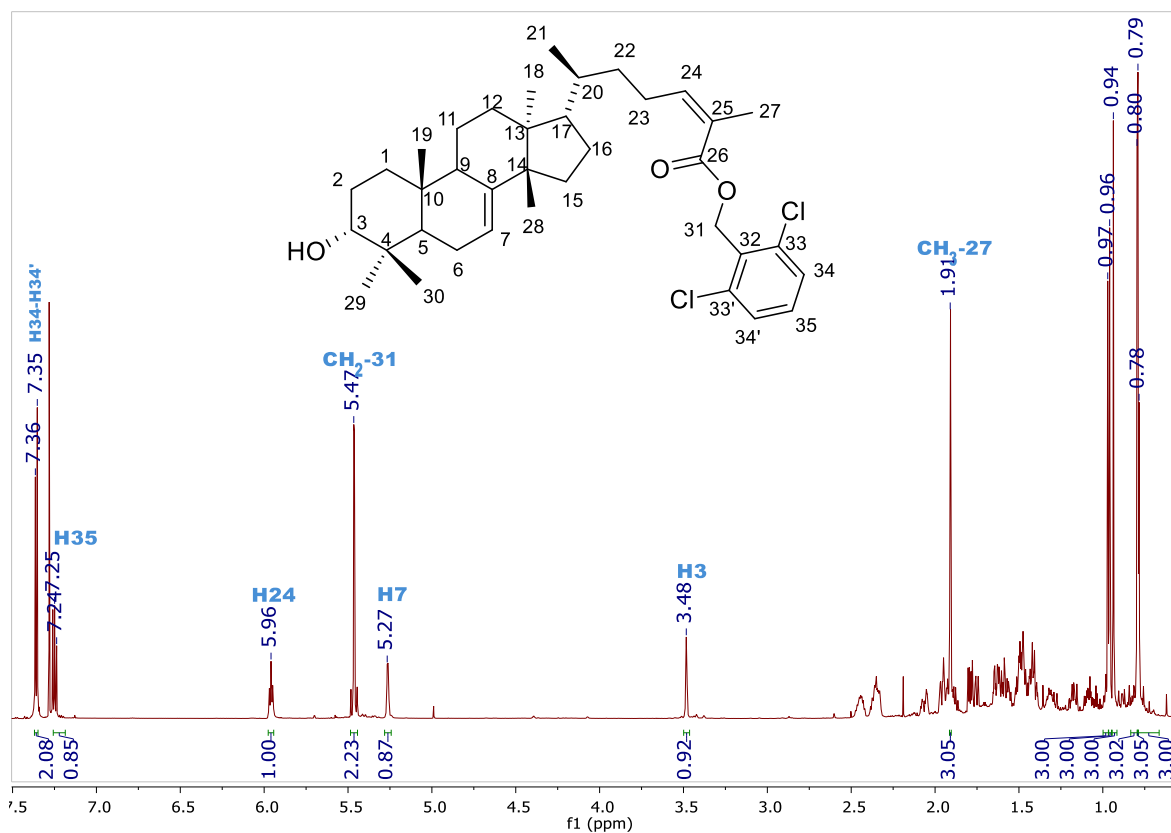


Figura XXXIX. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**3 α -3**).

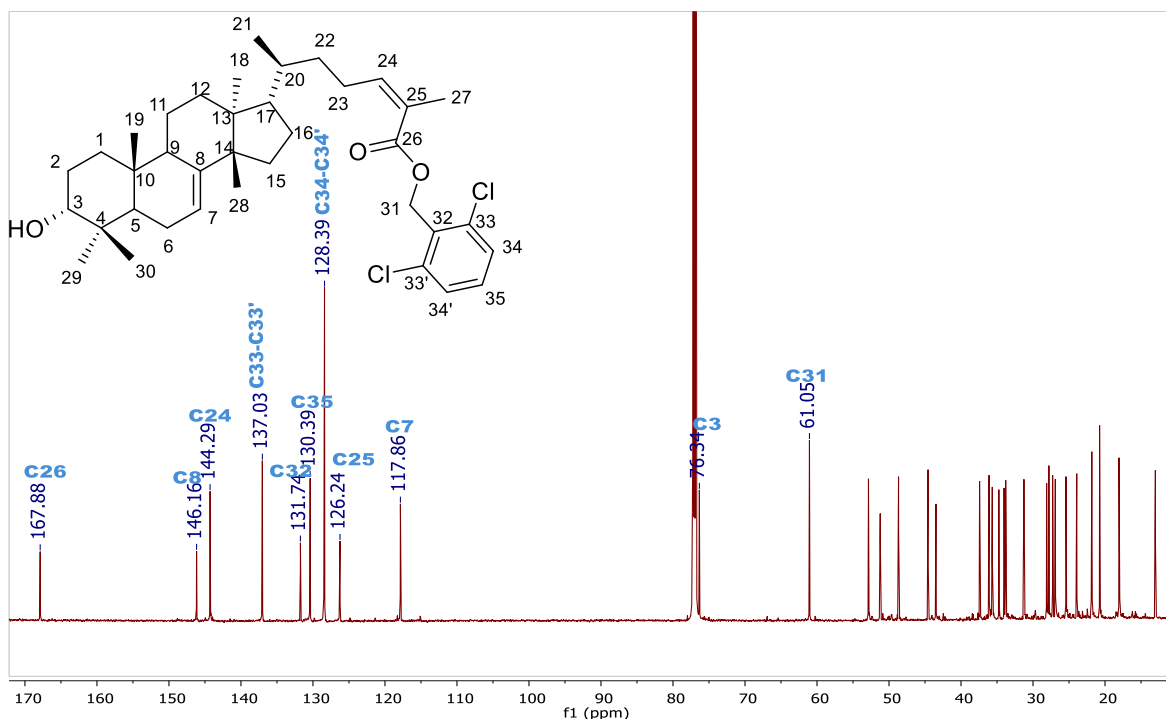


Figura XL. Espectro de RMN- ^{13}C (176 MHz CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo. (3 α -3).

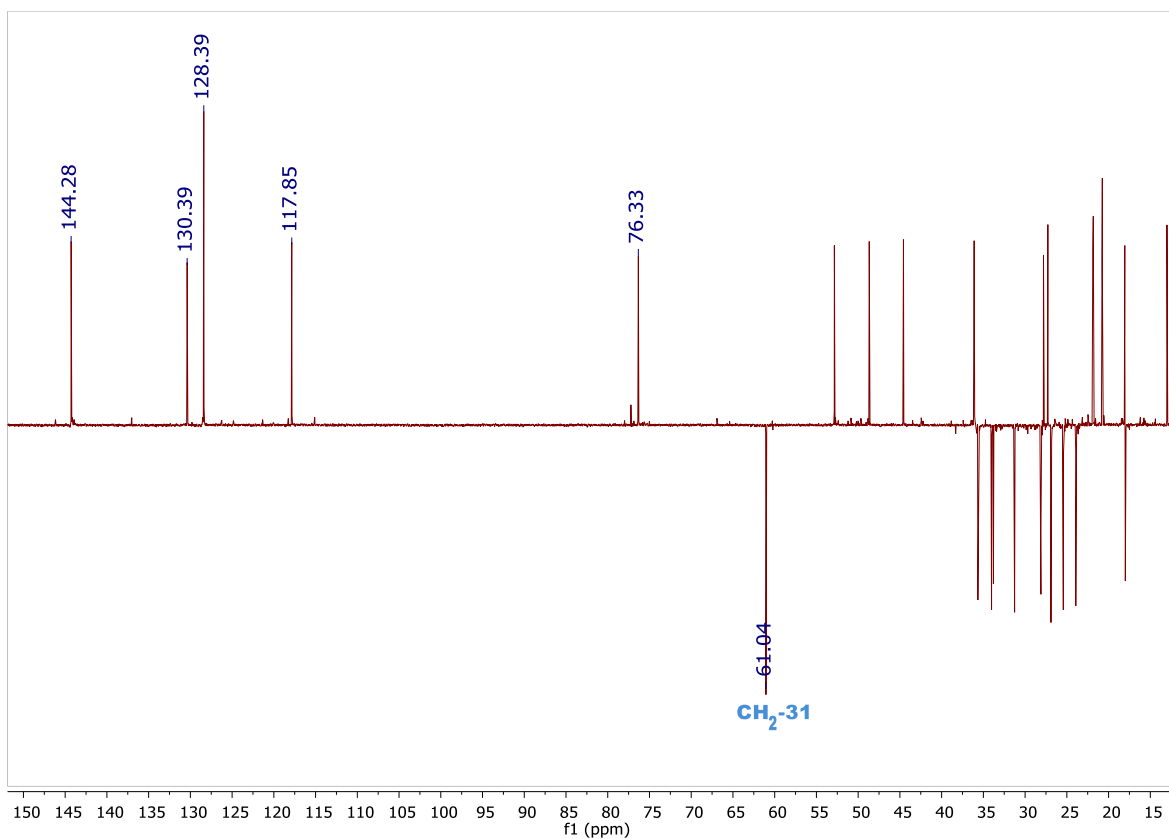


Figura XLI. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (3 α -3).

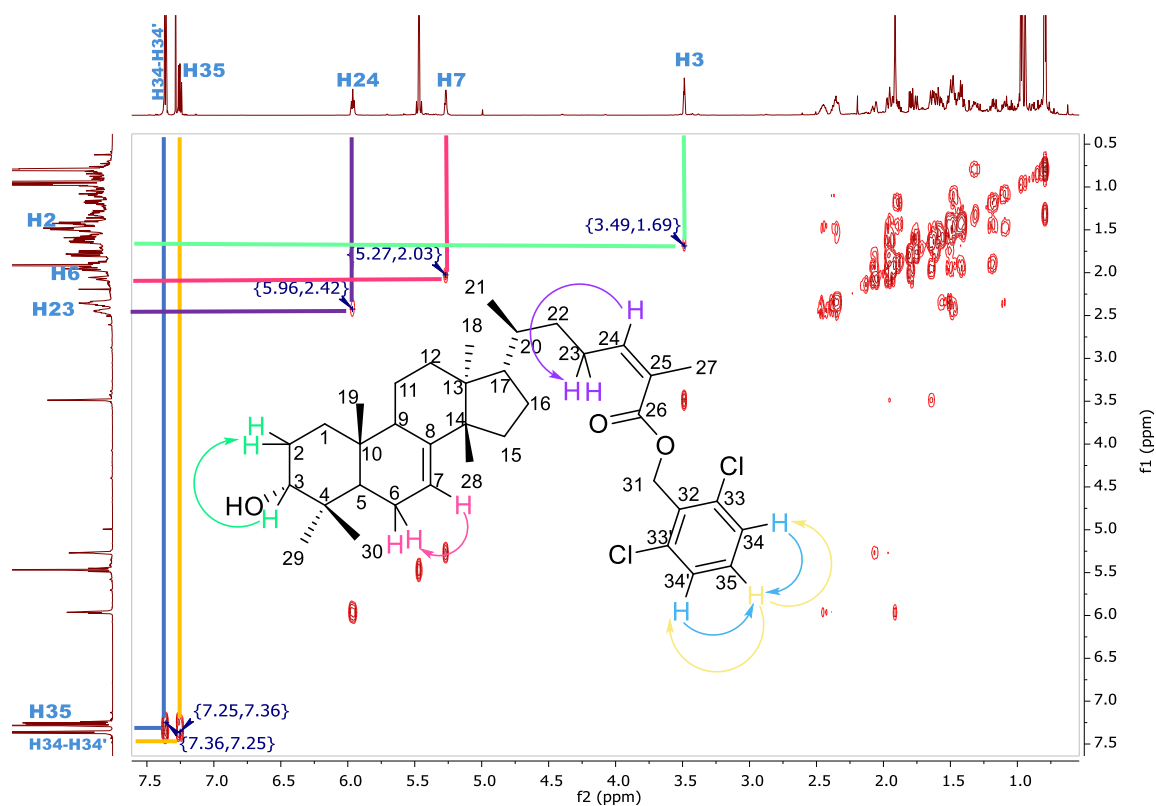


Figura XLII. Espectro de RMN-COSY (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (3 α -3).

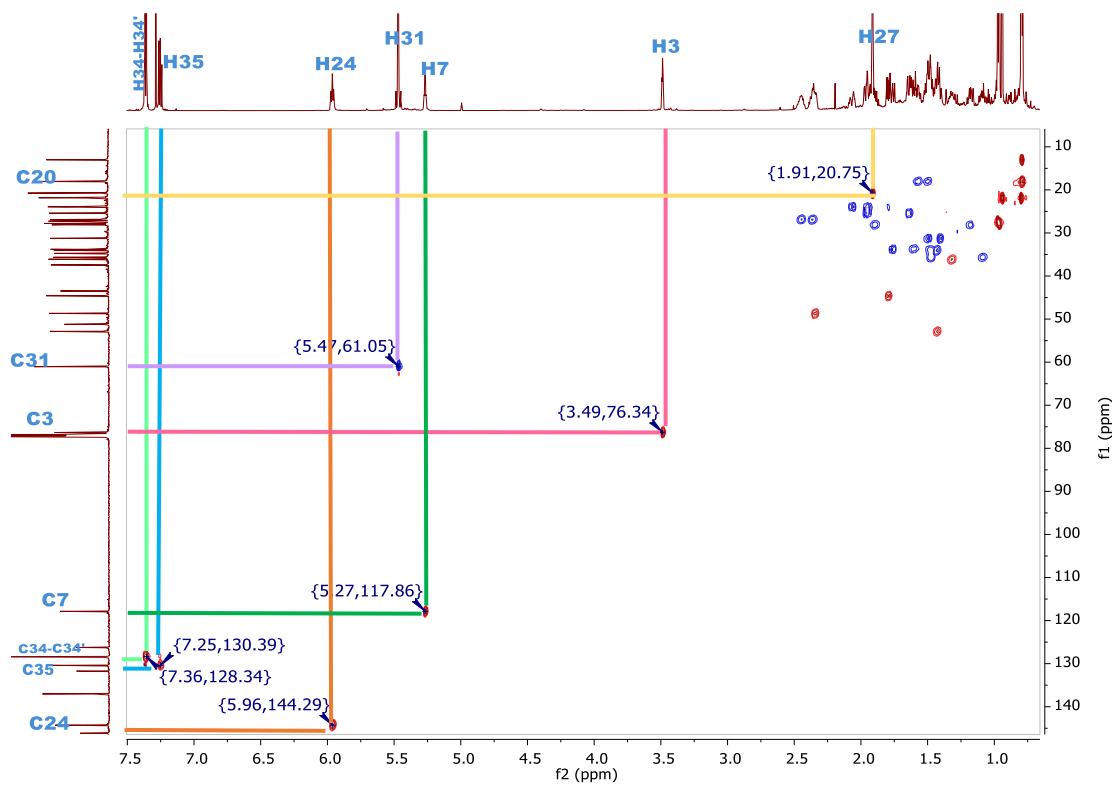


Figura XLIII. Espectro de RMN HSQC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (3 α -3).

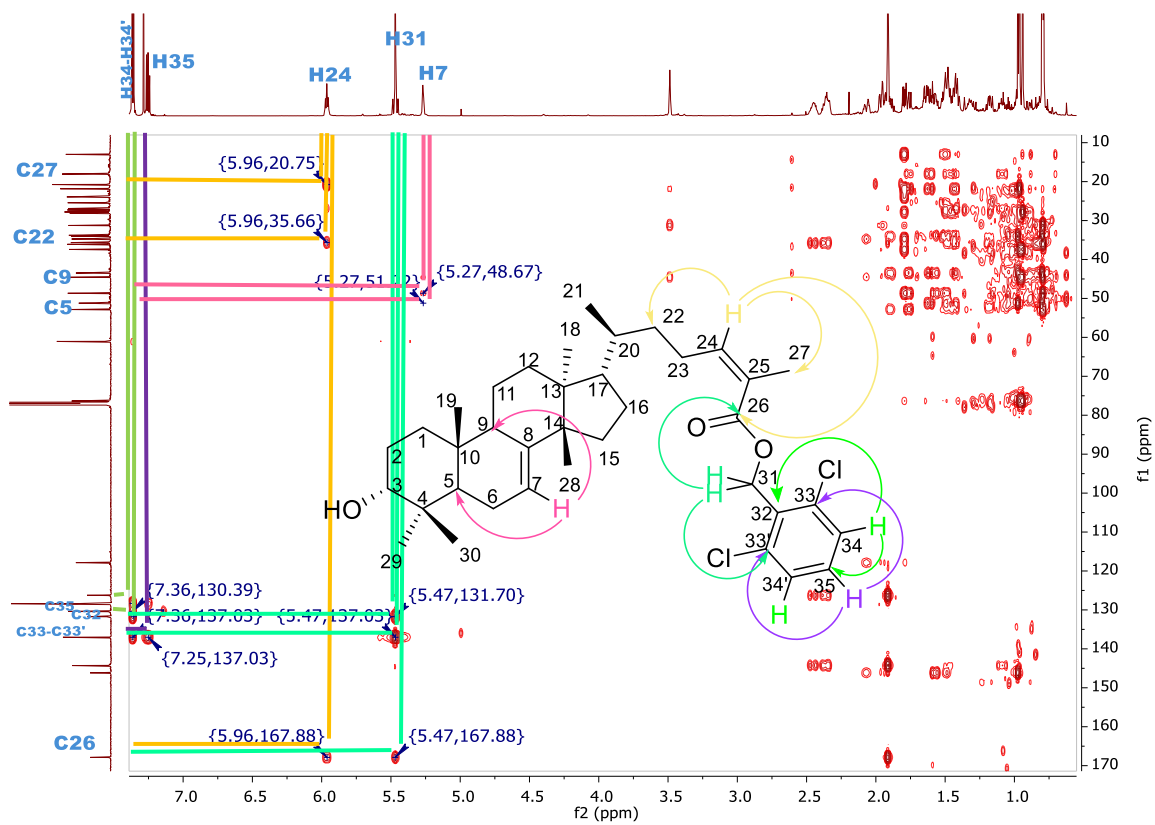
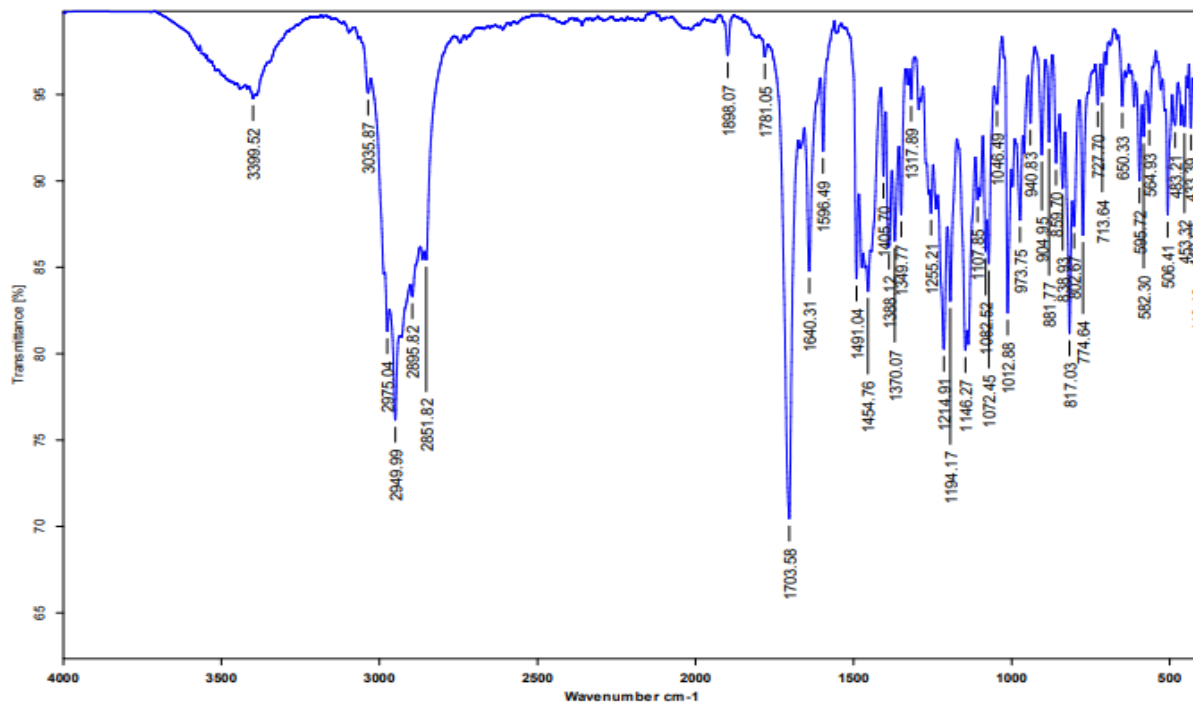


Figura XLIV. Espectro de RMN HMBC (CDCl_3) del 3 α -hidroximasticadienato de 2,6-diclorobencilo (**3 α -3**).



Dr. Mariano Martínez Vázquez

AMD-BrBn

Pastilla

836

ARP

23/11/2021

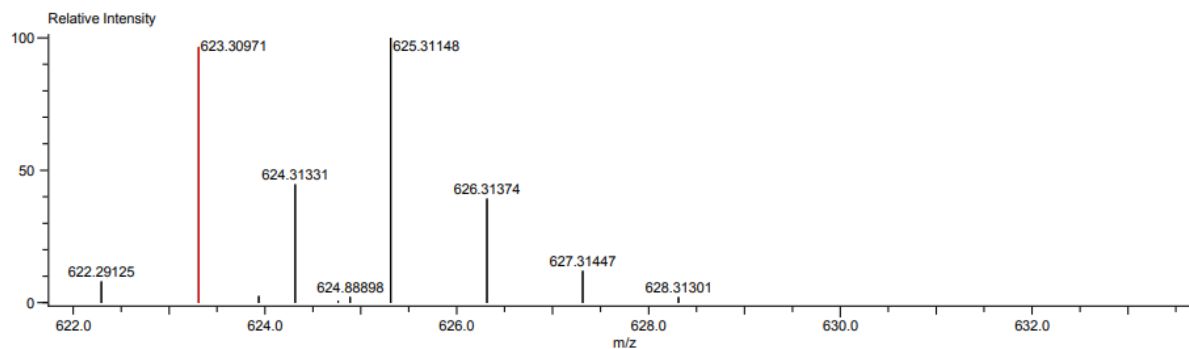
Figura XLV. Espectro de Infrarrojo (IR) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Data:1671 AMD-pBrBn
Sample Name:Dr Martinez Mariano / Operador: Carmen Garcia
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average[MS[...

Acquired:11/24/2021 10:22:23 AM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal_PEG_600-nov-21
Created:12/17/2021 1:56:02 PM
Created by:AccuTOF

Charge number:1 Tolerance:50.00(ppm), 5.00 .. 15.00(mmu) Unsaturacion Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)
Element:¹²C:0 .. 40, ¹H:0 .. 70, ⁷⁹Br:0 .. 1, ¹⁶O:0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturacion Number
623.30971	60387.03	623.30998	-0.27	-0.44	¹² C ₃₇ ¹ H ₅₂ ⁷⁹ Br ₁ ¹⁶ O ₃	11.5

Figura XLVI. Determinación de masas exactas (M^+) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

Instituto de Química UNAM
Laboratorio de Cromatografía

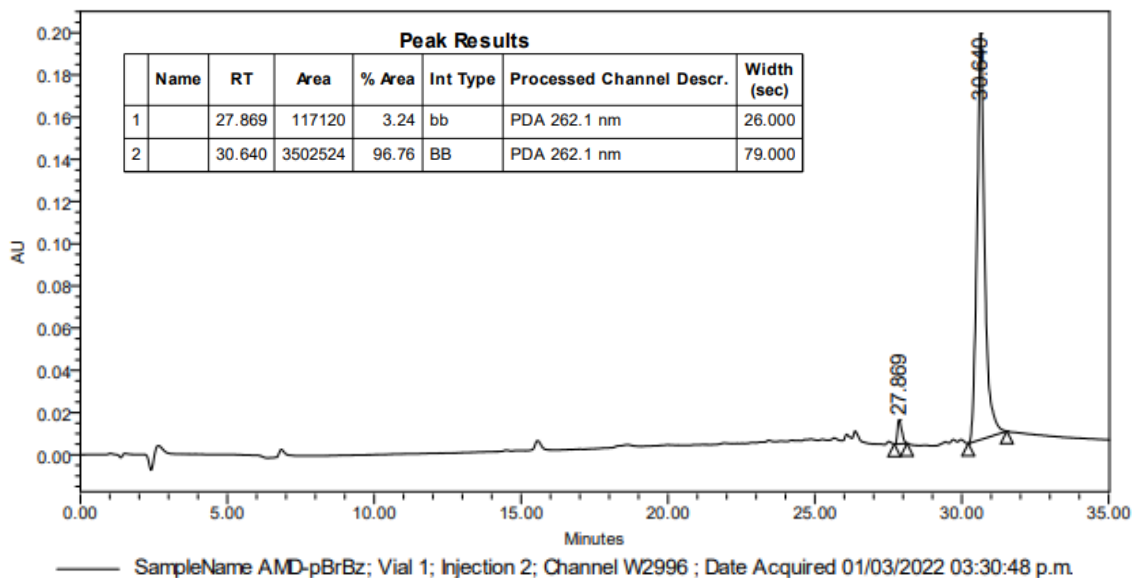


Figura XLVII. Determinación del grado de pureza mediante HPLC-UV del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

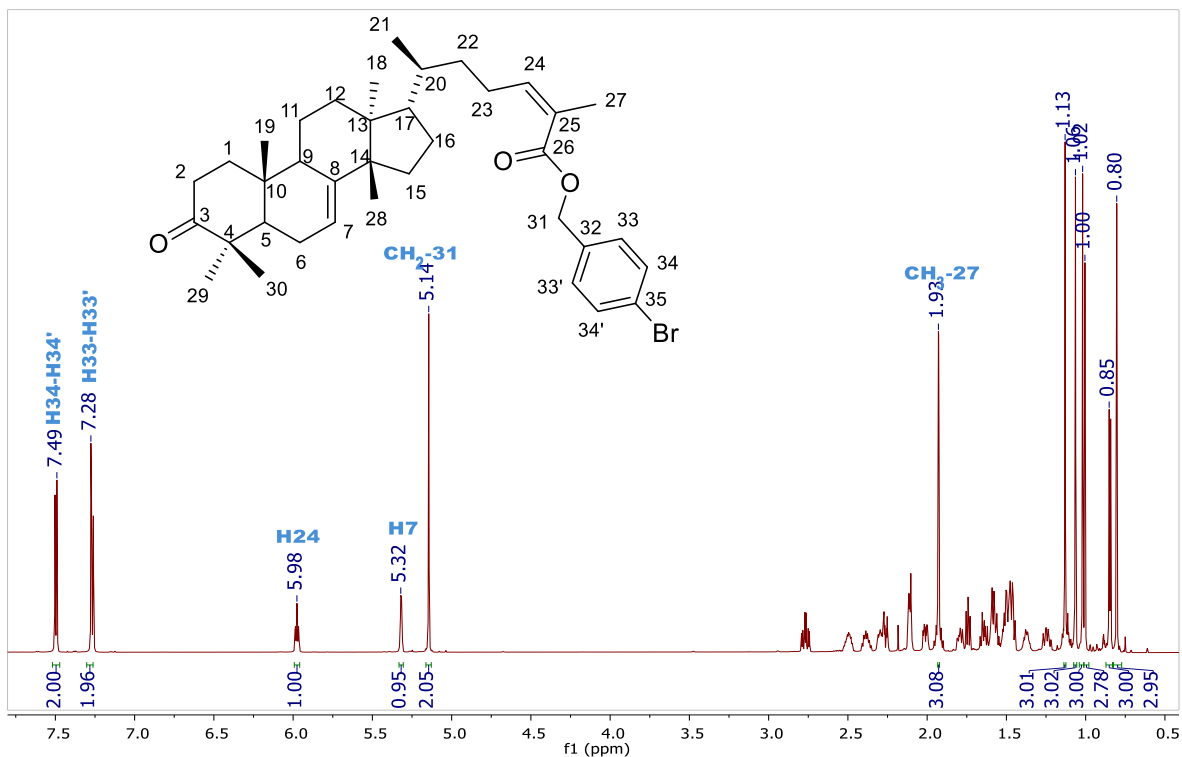


Figura XLVIII. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo. (**AMD-2**).

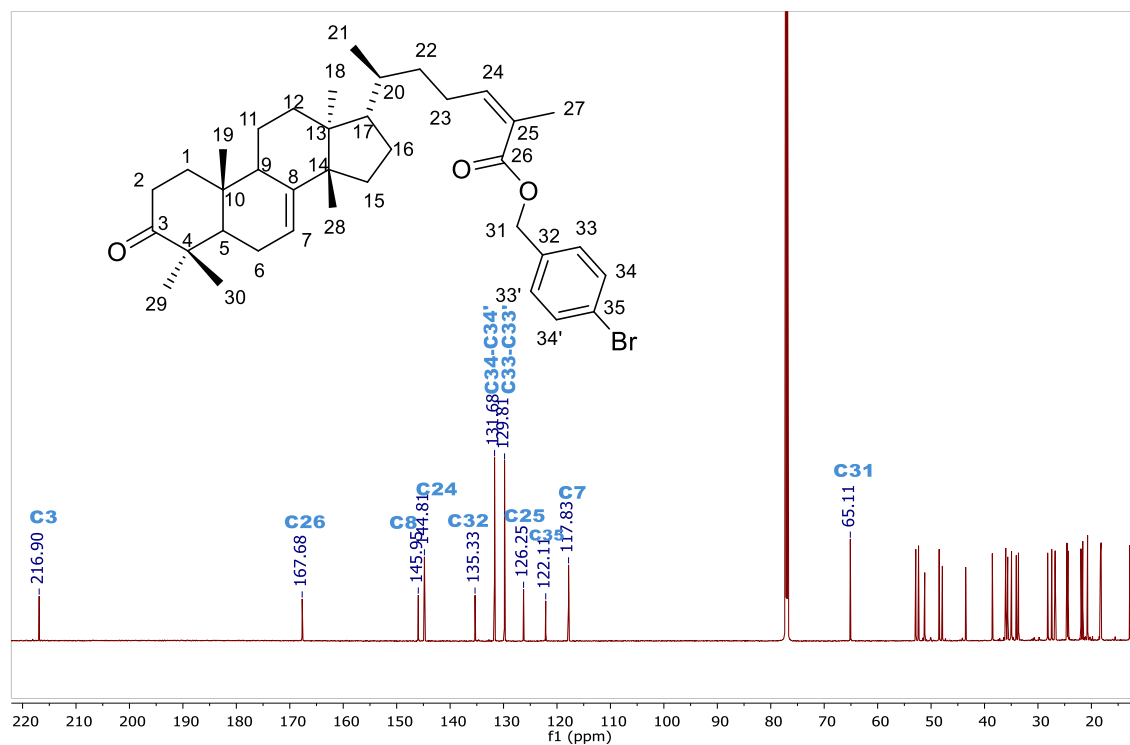


Figura XLIX. Espectro de RMN-¹³C (176 MHz CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo. (**AMD-2**).

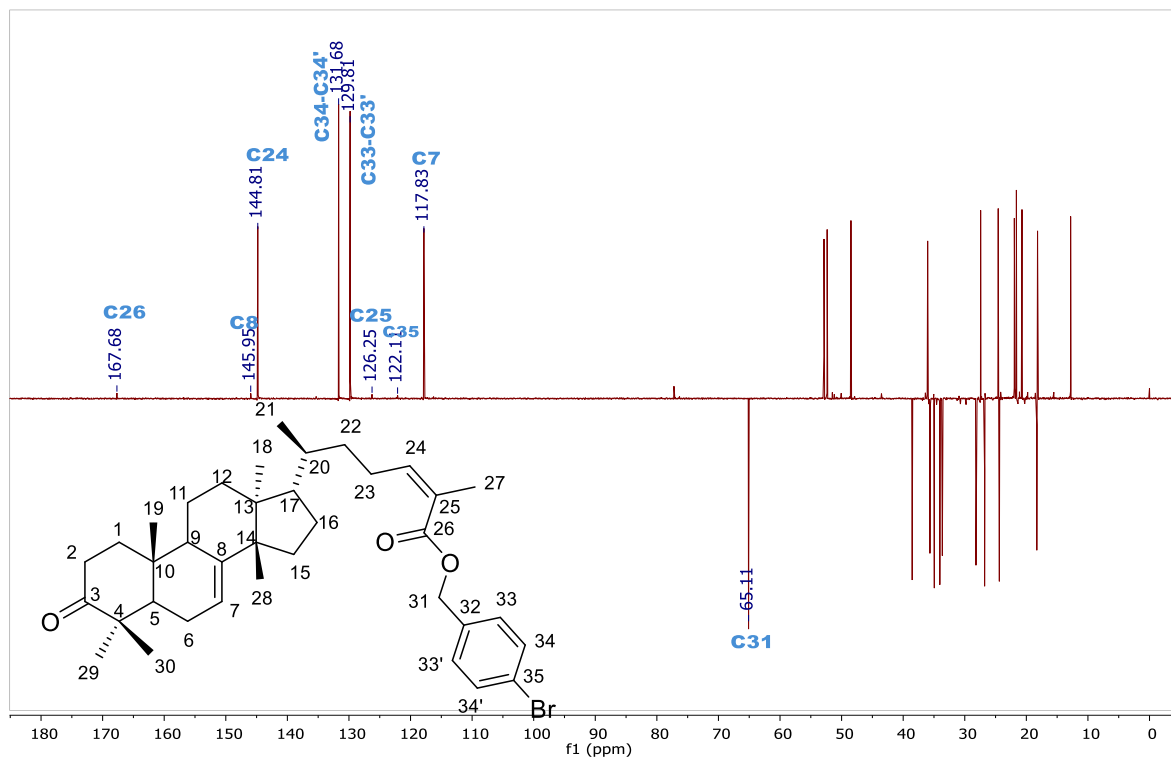


Figura L. Espectro de RMN DEPT-135 (CDCl₃) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

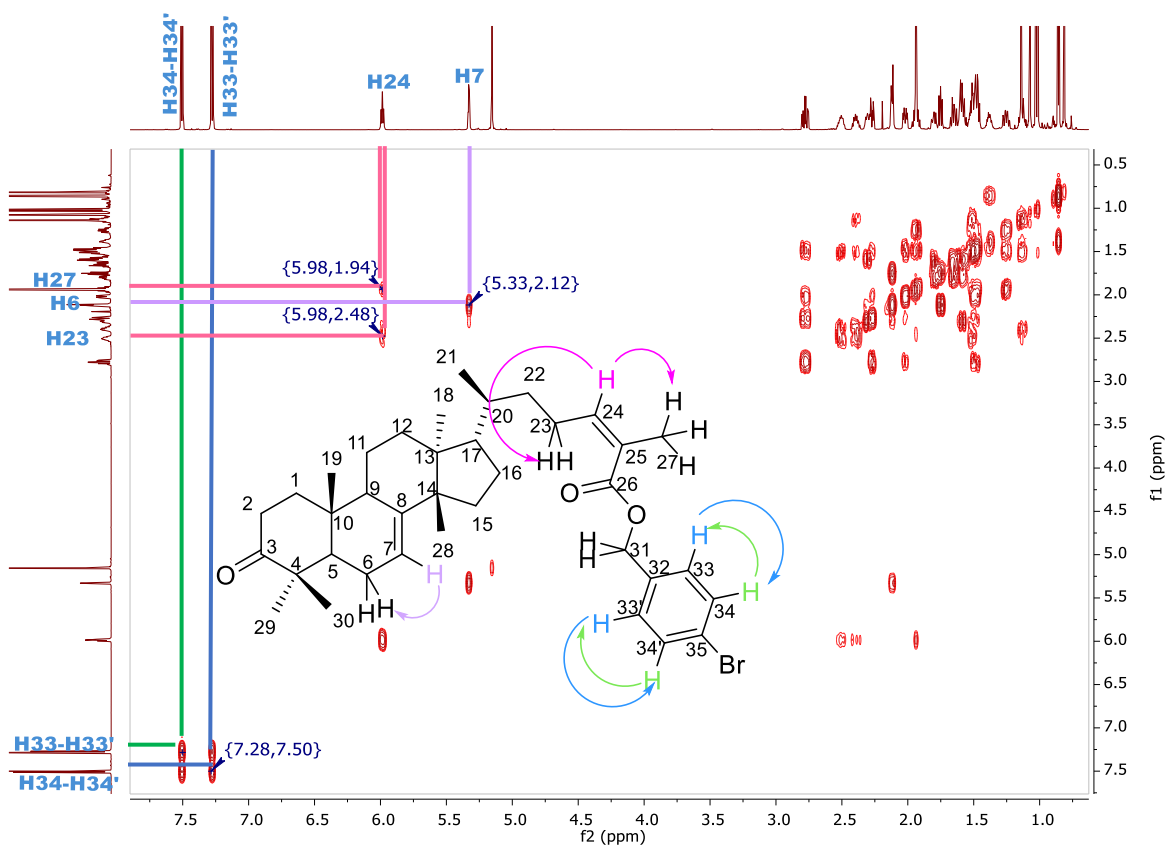


Figura LI. Espectro de RMN-COSY (CDCl_3) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

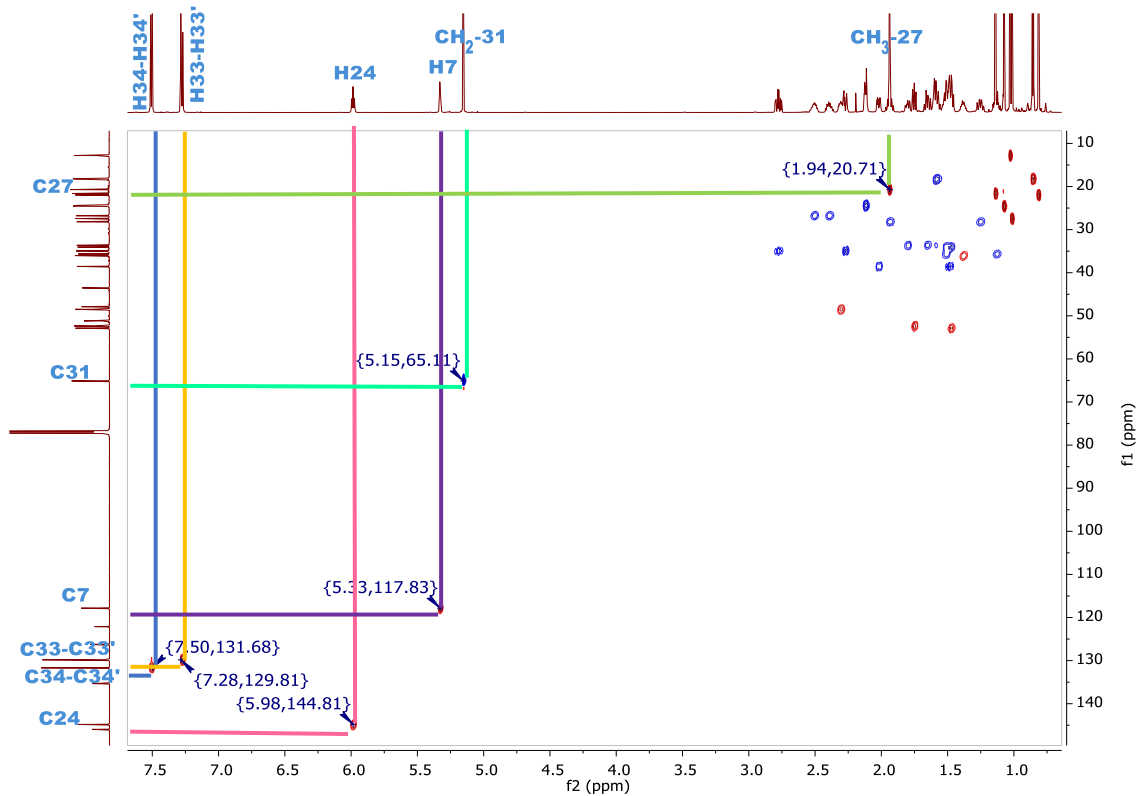


Figura LII. Espectro de RMN-HSQC (CDCl_3) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

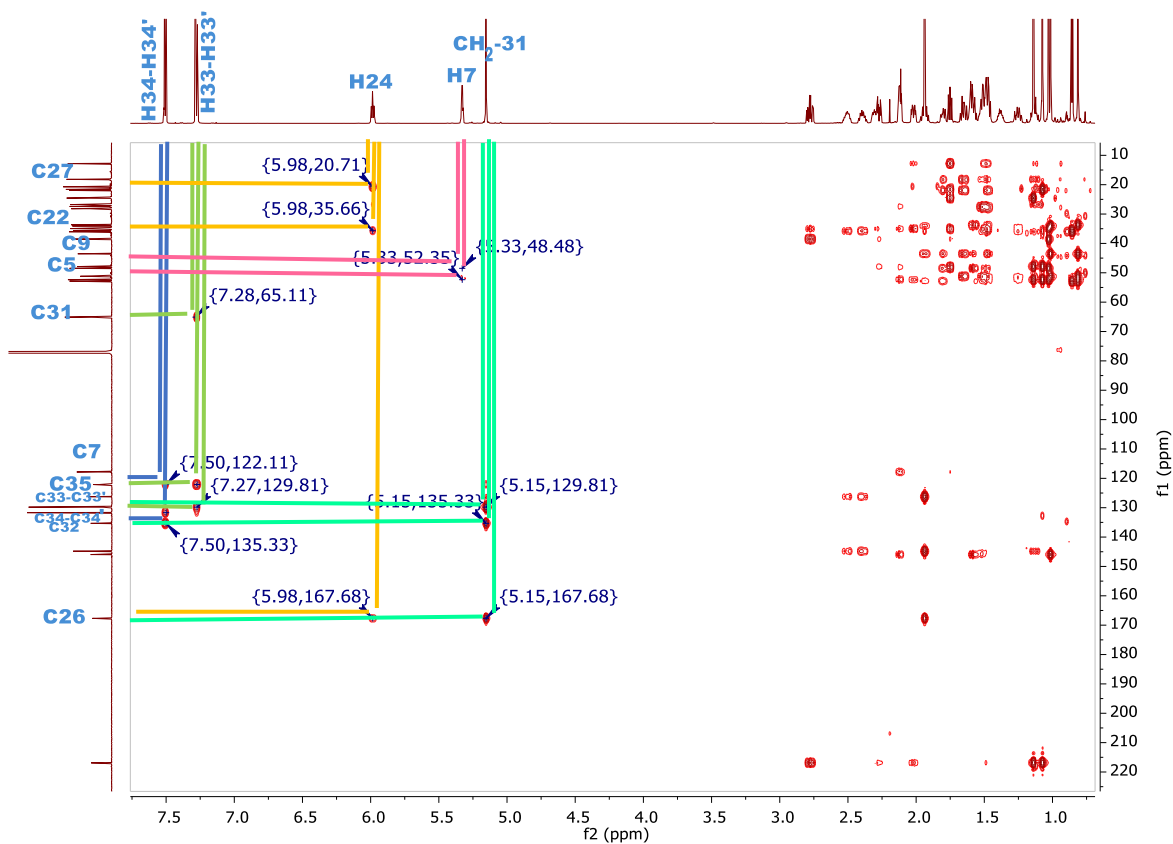


Figura LIII. Espectro de RMN-HMBC (CDCl_3) del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).

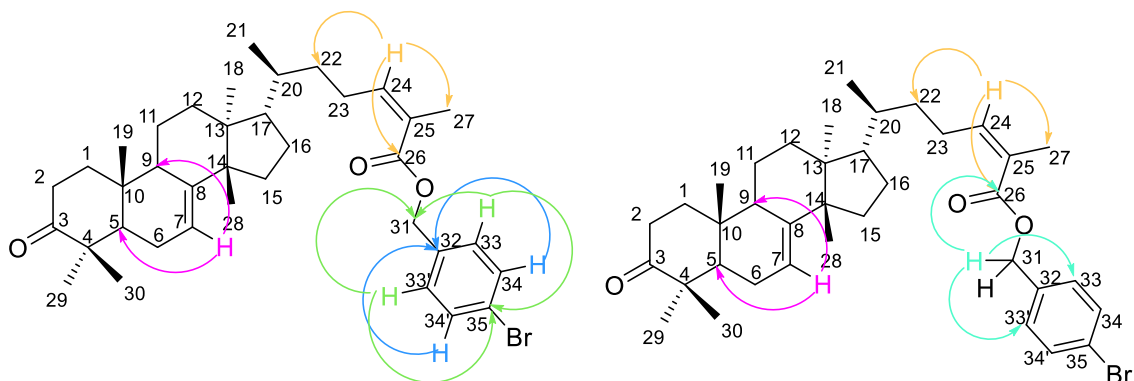
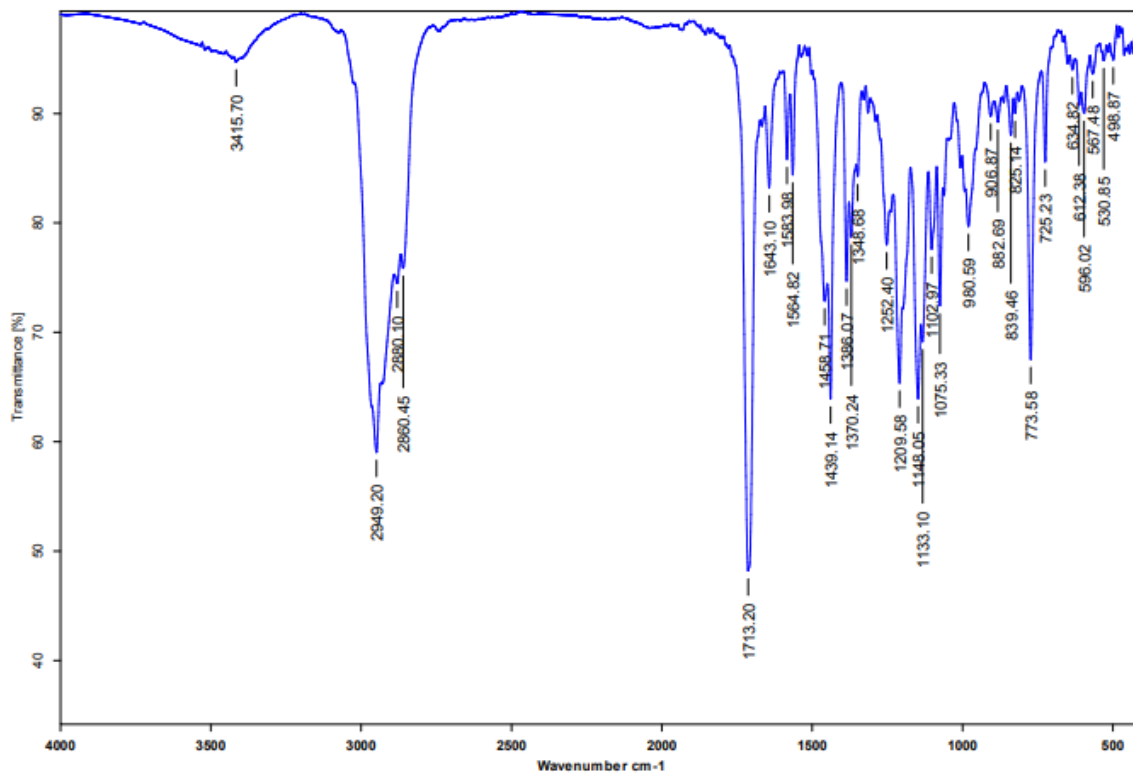


Figura LIV. Correlaciones RMN HMBC del masticadienato de *p*-bromobencilo (**AMD-2**).



Dr. Mariano Martínez Vázquez

AMD-CI2Bn

Pastilla

837

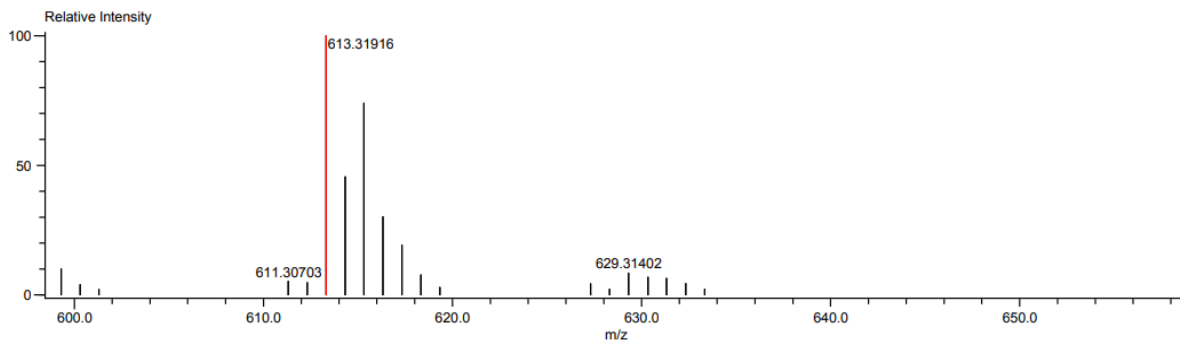
ARP

23/11/2021

Figura LV. Espectro de Infrarrojo (IR) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**AMD-3**).

Data:U-39
 Sample Name:Dr. Mart[inez Mariano / Operador: Noemi Silva
 Description:
 Ionization Mode:ESI+
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average(MS[...
 Acquired:3/8/2022 4:29:42 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:cal-PEG-600-nuevo
 Created:3/15/2022 4:22:50 PM
 Created by:AccuTOF

Charge number:1
 Tolerance:100.00(mmu)
 Unsaturation Number:0.0 .. 50.0 (Fraction:Both)
 Element:¹²C:0 .. 37, ¹H:48 .. 52, ³⁵Cl:1 .. 2, ¹⁶O:0 .. 4



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
613.31916	85232.97	613.32152	-2.37	-3.86	¹² C ₃₇ ¹ H ₅₁ ³⁵ Cl ₂ ¹⁶ O ₃	11.5

Figura LVI. Determinación de masas exactas (M⁺¹) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**AMD-3**).

Instituto de Química UNAM
Laboratorio de Cromatografía

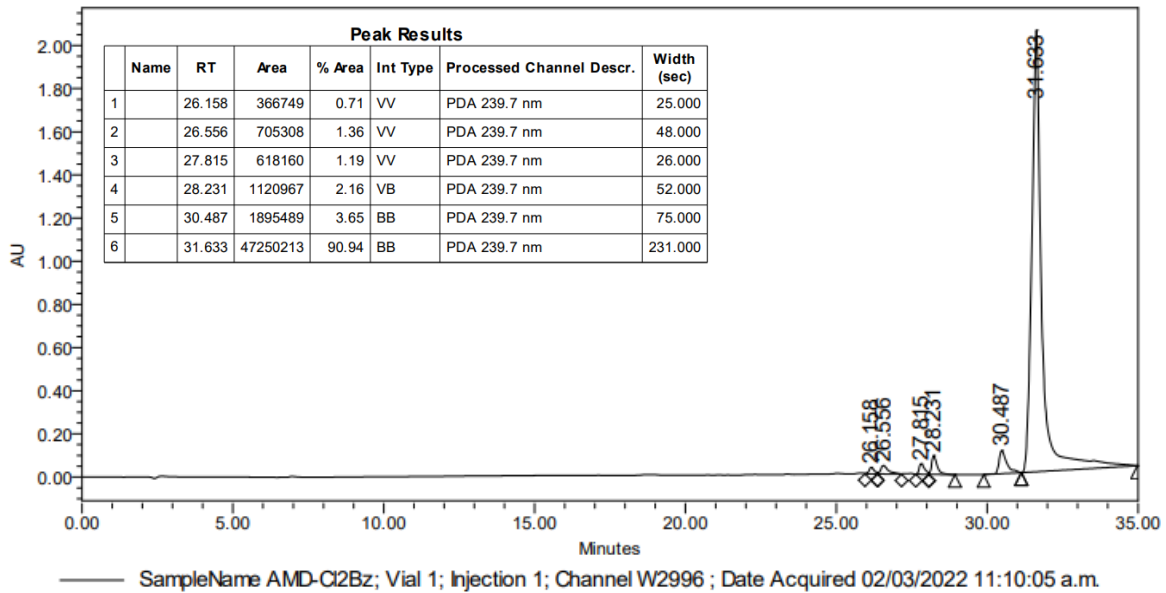


Figura LVII. Determinación del grado de pureza mediante HPLC-UV del masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**AMD-3**).

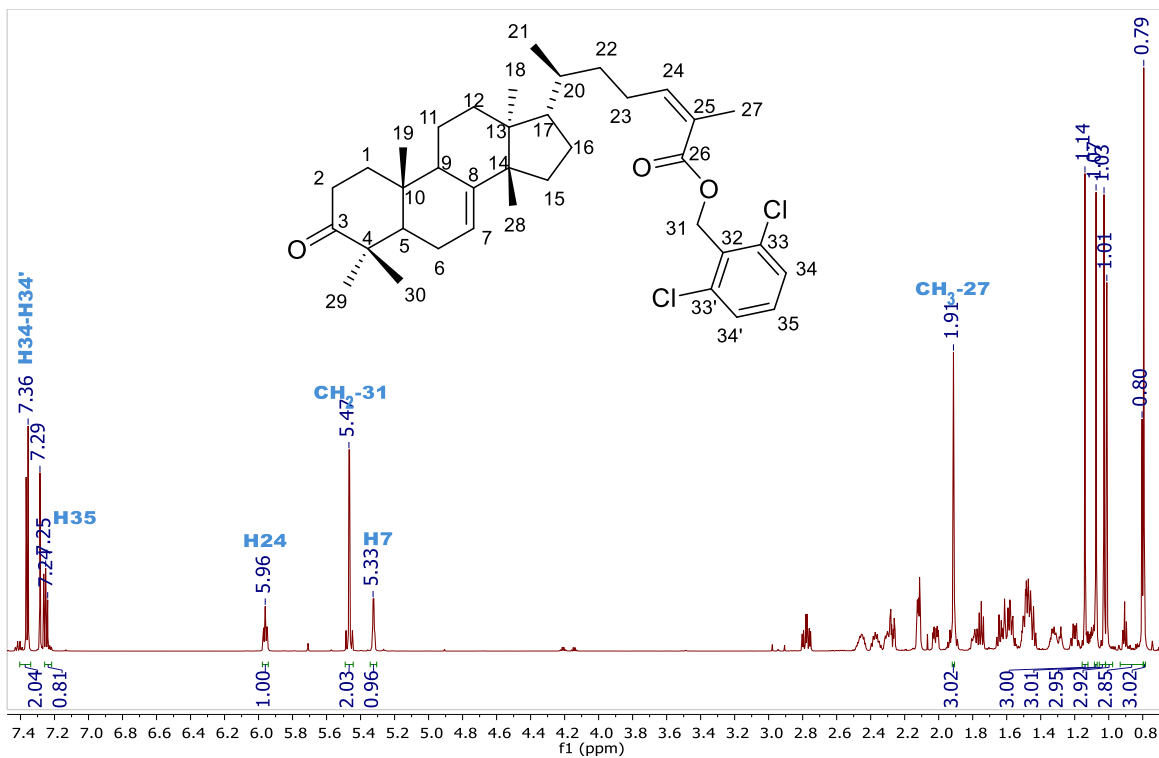


Figura LVIII. Espectro de RMN-¹H (700 MHz CDCl₃) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**AMD-3**).

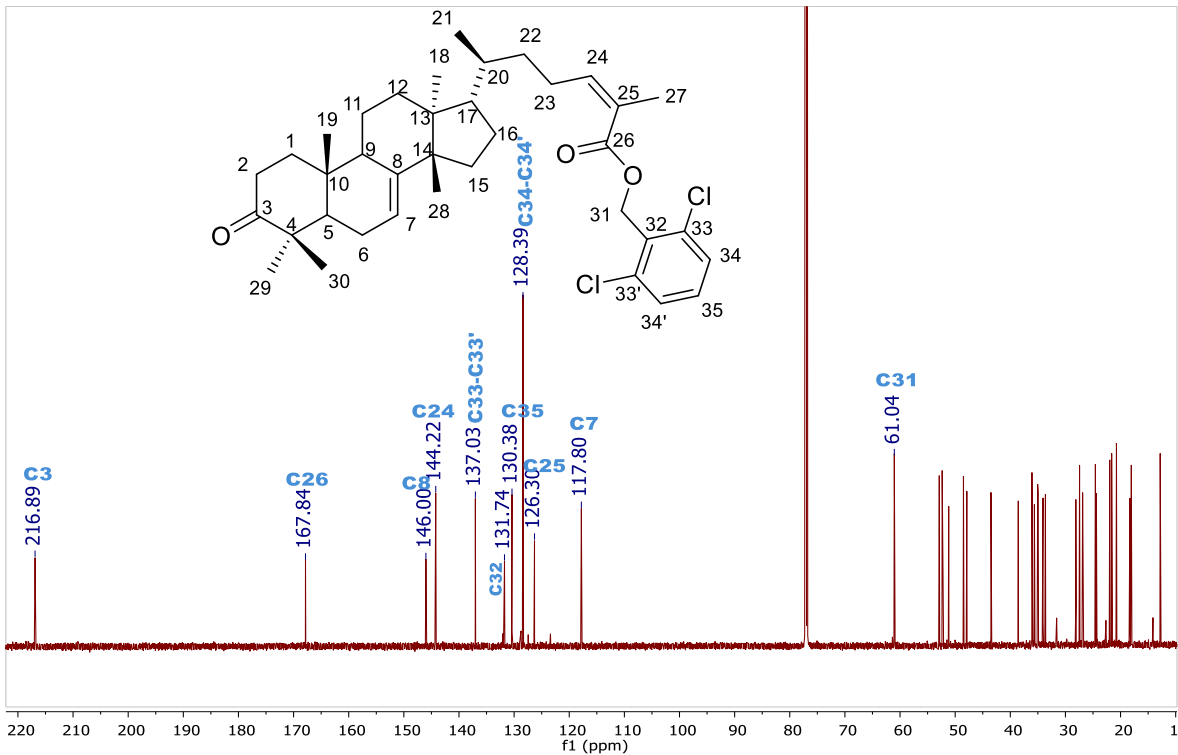


Figura LIX. Espectro de RMN- ^{13}C (176 MHz CDCl_3) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo. (**AMD-3**).

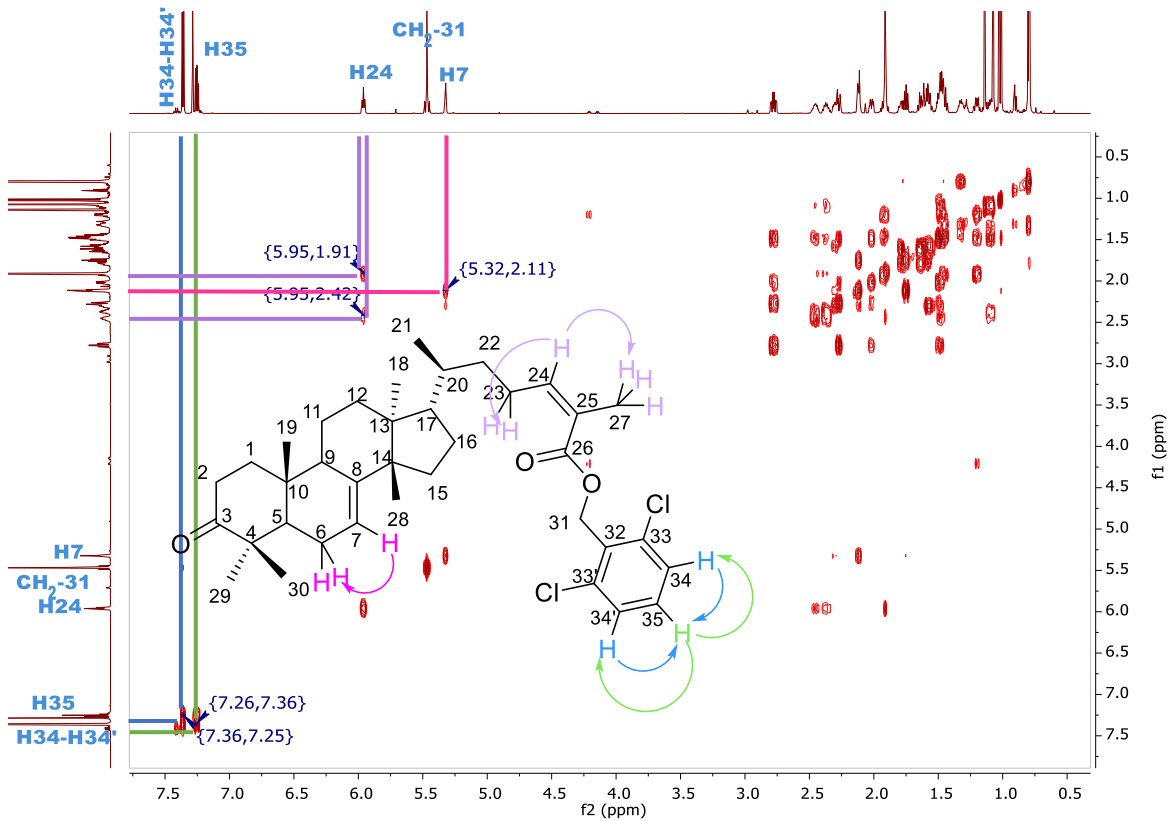


Figura LX. Espectro de RMN-COSY (CDCl_3) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**AMD-3**).

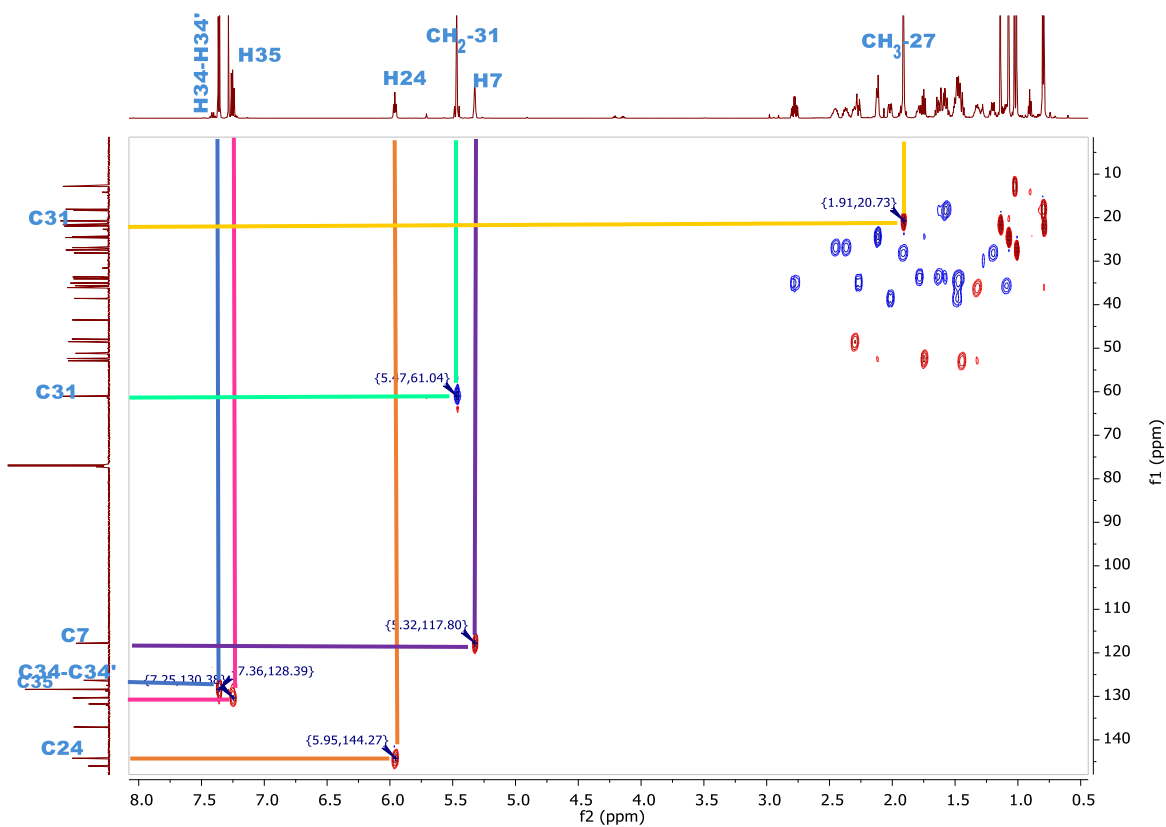


Figura LXI. Espectro de RMN HSQC (CDCl₃) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**AMD-3**).

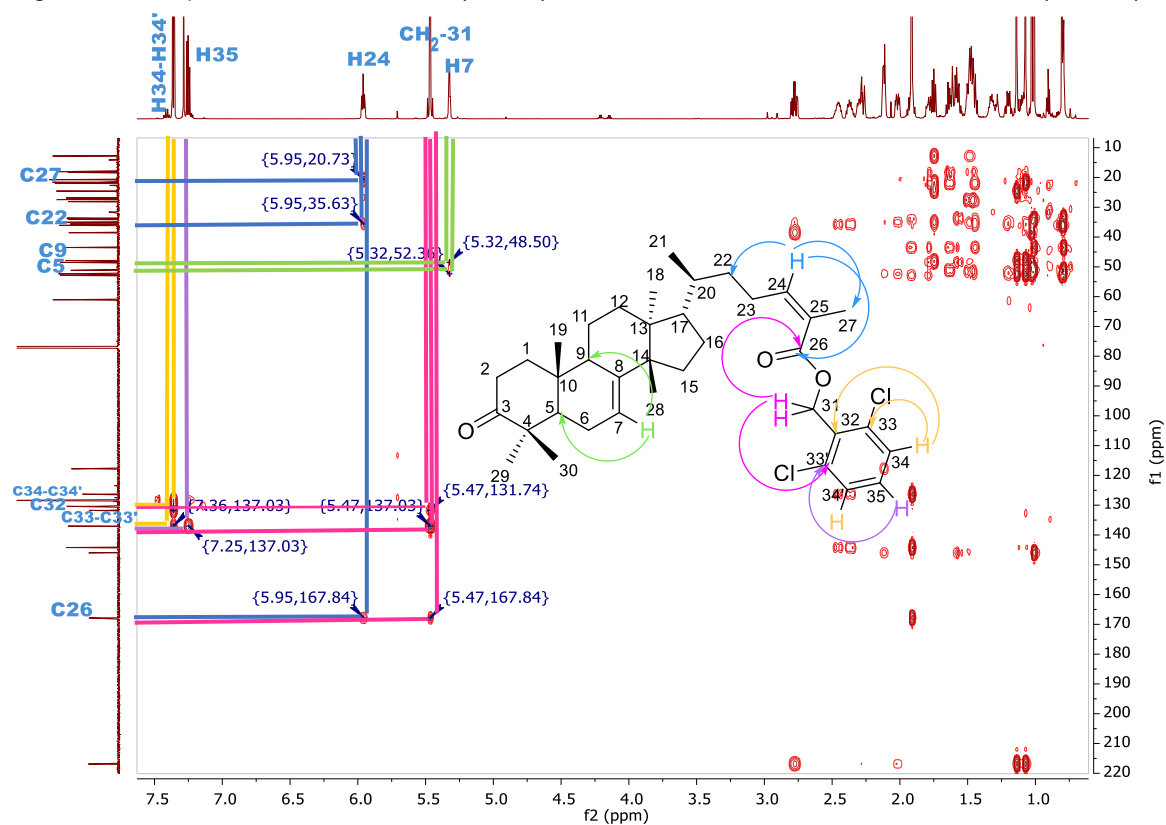


Figura LXII. Espectro de RMN HMBC (CDCl₃) del masticadienato de 2,6-diclorobencilo (**AMD-3**).