



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

*“OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CITOTÓXICOS A PARTIR DE TRITERPENOS
DEL TIPO CICLOARTANO”*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. HORTENSIA PARRA DELGADO



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: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Primer vocal: Dra. Patricia Ostrosky Wegman

Segundo vocal: Dra. Carmen Aceves Velasco

Tercer vocal: Dr. R. Marcos Soto Hernández

Secretario: Dr. Rogelio Pereda Miranda

Primer Suplente: Dr. Francisco Hernández Luis

Segundo suplente: Dr. René Miranda Rubalcava

Tutor: Dr. Mariano Martínez Vázquez

Sustentante: Q. F. B. Hortensia Parra Delgado

El aislamiento de las argentatinas A y B, así como la semisíntesis de los derivados triterpénicos se llevó a cabo en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química, UNAM.

La evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos de prueba en líneas celulares de cáncer humano se llevó a cabo en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química, UNAM.

La evaluación de la actividad citotóxica, citostática y genotóxica de algunos triterpenos, se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Los estudios de relaciones estructura-actividad se llevaron a cabo durante una estancia en el laboratorio del Dr. César Compadre del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Arkansas para las Ciencias Médicas (EUA).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP, UNAM) por las becas otorgadas.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo económico otorgado mediante el proyecto IN224802.

A los técnicos académicos Monserrat Sordo, Teresa Ramírez, Simón Hernández, Georgina Espinosa, Héctor Ríos, Nieves Zavala, Ángeles Peña, Rocío Patiño, Antonio Nieto, Eréndira García, Elizabeth Huerta, Jesús Martínez, Luis Velasco, y Javier Pérez por su valiosa asistencia técnica.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, a la Dra. Patricia Ostrosky Wegman, al Dr. César M. Compadre y a la Dra. Rosa L. Compadre.

DEDICATORIAS

A mi esposo Gerardo

A mi familia

A mis amigos

A María Arceo de Parra
(In memoriam)

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<i>Índice General</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de Cuadros</i>	<i>x</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>xi</i>
Resumen	1
Abstract	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	8
II.1 CÁNCER.....	8
II.1.1 Definición.....	8
II.1.2 El cáncer como problema de salud pública.....	9
II.1.3 El tratamiento del cáncer.....	10
II.2 PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL.....	13
II.3 TRITERPENOS COMO AGENTES ANTICANCEROSOS POTENCIALES.....	20
II.4 DETECCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CITOSTÁTICA.....	45
II.4.1 Generalidades.....	45
II.4.2 El cultivo de linfocitos en la detección de sustancias citotóxicas y citostáticas.....	49
II.5 <i>Parthenium argentatum</i> (GUAYULE).....	55
III. HIPÓTESIS	59
IV. OBJETIVOS	60
V. PARTE EXPERIMENTAL	62
V.1. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.....	62
V.2. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS GENERALES.....	63
V.3. RESINA.....	64
V.4. AISLAMIENTO DE LAS ARGENTATINAS A Y B.....	64
V.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS ARGENTATINAS A Y B EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO.....	67
V.5.1. Compuestos de prueba.....	67
V.5.2. Líneas celulares.....	67
V.5.3. Evaluación.....	68
V.6. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, CITOSTÁTICOS Y GENOTÓXICOS DE LAS ARGENTA- TINAS A Y B EN LINFOCITOS HUMANOS.....	70
V.6.1. Compuestos de prueba.....	70

	Pág.
V.6.2. Donadores.....	70
V.6.3. Efectos citotóxicos.....	70
V.6.4. Efectos citostáticos.....	72
V.6.5. Efectos genotóxicos.....	74
V.6.6. Análisis estadístico.....	74
V.7. TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LAS ARGENTATINAS A Y B.....	75
V.7.1. Argentatina A.....	75
V.7.1.1 2-Bromo-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi- 16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona.....	75
V.7.1.2 (16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25- dihidroxi-cicloart-1-en-3-ona.....	76
V.7.1.3 16,25-diacetil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24- epoxi-16,25-dihidroxi-cicloart-1-en-3-ona.....	78
V.7.1.4 3-oxima-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi- 16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona.....	79
V.7.1.5 3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-20,24-lactona...	82
V.7.1.6 16,25-diacetil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24- epoxi-16,24-dihidroxi-cicloartan-3-ona.....	83
V.7.1.7 16,25-diacetil- 3-oxima-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)- 20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona.	84
V.7.1.8 2-formil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi- 16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona.....	86
V.7.1.9 [2,3- <i>d</i>] isoxazol-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24- epoxi-16,25-dihidroxicicloartano.....	88
V.7.2 Argentatina B.....	89
V.7.2.1 2 α -bromo-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona [2a].....	90
V.7.2.2 (16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1- en-3-ona.....	93
V.7.2.3 25- <i>O</i> -acetil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloart-1-en-3-ona.....	95
V.7.2.4 3-oxima-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona.....	96
V.7.2.5 4-Aza-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona.....	98
V.7.2.6 25- <i>O</i> -acetil-4-Aza-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona.....	99
V.7.2.7 25- <i>O</i> -acetil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona.....	100
V.7.2.8 25- <i>O</i> -acetil-3-oxima-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi- 25-hidroxicicloartan-3-ona.....	102
V.7.2.9 2-formil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25- hidroxicicloartan-3-ona.....	103

	Pág.
V.7.2.10 [2,3-d] isoxazol-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartano.....	105
V.7.2.11 2-formil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona.....	107
V.7.2.12 2 α -ciano-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona.....	108
V.7.2.13 2 α -ciano-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona.....	110
V.7.2.14 (16 <i>S</i> , 17 <i>R</i> , 20 <i>S</i>)-3-oxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-16,24-lactona.....	111
V.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS DERIVADOS DE LAS ARGENTATINAS A Y B EN LA PROLIFERACIÓN DE ALGUNAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO.....	113
V.9 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, CITOSTÁTICOS Y GENOTÓXICOS DE LA 2-FORMIL-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-EPOXI-25-HIDROXICICLOART-1-EN-3-ONA EN LINFOCITOS HUMANOS.....	114
V.10 ESTABLECIMIENTO DE LAS RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.....	115
V.10.1 Argentatina A.....	115
V.10.2 Argentatina B.....	117
V.11 CÁLCULO TEÓRICO Y DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOG P.....	121
V.11.1 Cálculo Teórico.....	121
V.11.2 Determinación experimental.....	121
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	124
VII. CONCLUSIONES.....	179
VIII. REFERENCIAS.....	184
IX. ANEXOS.....	210
Publicación 1. Parra-Delgado H., García-Pillado F., Sordo M., Ramírez-Apan T., Martínez-Vázquez M., Ostrosky-Wegman P. 2005. Evaluation of the Cytotoxicity, Cytostaticity and Genotoxicity of Argentatins A and B from <i>Parthenium argentatum</i> (Gray). <i>Life Sciences</i> 77 : 2855-2865.	
Publicación 2. Parra-Delgado H., Ramírez-Apan T., Martínez-Vázquez M. 2005. Synthesis of argentatin A derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines in vitro. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> 15 : 1005-1008.	

Publicación 3. Parra-Delgado H., Compadre C.M., Ramírez-Apan T., Muñoz-Fambuena M.J., Compadre R.L., Ostrosky-Wegman P., Martínez-Vázquez M. 2006. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**: 1889-1901.

Publicación 4. Hernández-Ortega S., Parra-Delgado H., Martínez-Vázquez M. 2005. *Acta Crystallographica Sect. E: Structure Reports* **E61**: o1921-o1923.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Clasificación de agentes antineoplásicos según su mecanismo de acción o su origen (Moore y Goldenberg en Kalant y Roshlau 1998).....	12
2	Actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo ursano.....	23-25
3	Actividad citotóxica de algunos derivados del ácido ursólico.....	28
4	Actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo oleanano.....	32,33
5	Actividad citotóxica de algunas quinonas metilúricas (<i>norfriedelanos</i>).....	39,40
6	Actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo cicloartano..	43,44
7	Información cristalográfica de la argentatina B [2] e incanilina [3].....	66
8	Esquema de tratamiento de los linfocitos con las argentatinas A y B.....	71
9	Información cristalográfica de la 3-oxima-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [1d].....	81
10	Información cristalográfica de los derivados 2a , 2b , 2d , 2i y 2m	92
11	Concentraciones de los triterpenos a las que se determinó el coeficiente de partición.....	121
12	Tiempo de retención de 1 , 2 y 2b	123
13	Actividad citotóxica de las argentatinas A y B en cinco líneas celulares de cáncer humano.....	128
14	Frecuencia de micronúcleos (MN) de linfocitos en proliferación tratados con las argentatinas A y B.....	136
15	Actividad citotóxica de la argentatina A y sus derivados, expresada en función de la concentración inhibitoria media.....	145
16	Actividad citotóxica de la argentatina B y sus derivados, expresada en función de la concentración inhibitoria media.....	164
17	Actividad citotóxica determinada experimentalmente para 2 , 2a-2l y 2n y la predicha mediante el modelo de trabajo en el estudio <i>CoMFA</i>	168
18	Valores de Log P calculados y determinados experimentalmente para los compuestos 1 , 2 y 2b	174
19	Frecuencia de micronúcleos (MN) de linfocitos en proliferación tratados con 2k	178

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México durante el año 2002.....	10
2	A) Flores de <i>Catharanthus roseaus</i> L. B) Estructuras químicas de la vincristina y vinblastina.....	14
3	A) Partes aéreas de <i>Podophyllum peltatum</i> B) Estructuras químicas del tenipósido y el etopósido.....	16
4	A) <i>Taxus brevifolia</i> B) Estructura química del paclitaxel.....	17
5	Compuestos de origen natural y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer.....	18
6	Algunos ejemplos de triterpenos anticancerosos del tipo ursano.....	21, 22
7	Algunos derivados del ácido ursólico con actividad citotóxica.....	27
8	Algunos triterpenos del tipo oleanano con actividad anticancerosa.....	30,31
9	Derivados bioactivos del ácido oleanólico.....	36
10	Algunas cucurbitacinas citotóxicas.....	37
11	Algunas quinonas metilúricas bioactivas.....	38
12	Algunos triterpenos del tipo cicloartano con actividad citotóxica..	41,42
13	Microfotografía de células (A) mononucleadas, (B) binucleadas y (C) polinucleadas típicas.....	51
14	Célula binucleada con micronúcleo.....	53
15	Imagen de un arbusto de <i>Parthenium argentatum</i> Gray.....	55
16	Algunos componentes de la resina obtenida a partir de <i>Parthenium argentatum</i>	57
17	Estrategia experimental de trabajo.....	62
18	Obtención de la 2-Bromo-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [1a].....	75
19	Obtención de la (16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloart-1-en-3-ona [1b].....	76
20	Obtención de 16,25-diacetil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloart-1-en-3-ona [1c].....	78
21	Obtención de la 3-oxima-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona 1d].....	79
22	Obtención de la 3,16-dioxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-20,24-lactona [1e]	82
23	Obtención de 16,25-diacetil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [1f].....	83
24	16,25-diacetil- 3-oxima-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [1g].....	84
25	Obtención de la 2-formil-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [1h].....	86
26	Obtención de la [2,3- <i>d</i>] isoxazol-(16 <i>S</i> ,17 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartano [1i].....	88

Figura		Pág.
27	Obtención de la α -bromo-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a].....	90
28	Obtención de la (16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2b].....	93
29	Obtención de la 25- <i>O</i> -acetil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2c].....	95
30	Obtención de la 3-oxima-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d].....	96
31	Obtención de la 4-Aza-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2e].....	98
32	Obtención de la 25- <i>O</i> -acetil-4-Aza-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2f].....	99
33	Obtención de la 25- <i>O</i> -acetil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2g].....	100
34	Obtención de la 25- <i>O</i> -acetil-3-oxima-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2h].....	102
35	Obtención de la 2-formil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2i].....	103
36	Obtención de la [2,3- <i>d</i>] isoxazol-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2j].....	105
37	Obtención de la 2-formil-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2k].....	107
38	Obtención de la 2 α -ciano-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2l].....	108
39	Obtención de la 2 α -ciano-(16 β ,24 <i>R</i>)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2m].....	110
40	Obtención de la (16 <i>S</i> , 17 <i>R</i> , 20 <i>S</i>)-3-oxo-25- <i>nor</i> -cicloartan-16,24-lactona [2n].....	111
41	Estructura de la ciclogalegenina.....	115
42	Representación de la obtención de los descriptores CoMFA y el análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales.....	120
43	Estructura de la argentatina B [2] e incanilina [3] obtenidas mediante el análisis de difracción de rayos X.....	126
44	Dímeros presentes en la estructura cristalina formados por la unión de dos moléculas de isoargentatina A [3] mediante enlaces de hidrógeno.....	127
45	Efectos de la argentatina A en la Viabilidad y la cinética de proliferación celular (barra) de los linfocitos tratados a tres diferentes concentraciones de los compuestos de prueba.....	131
46	Efectos de la argentatina B en la Viabilidad y la cinética de proliferación celular (barras) de los linfocitos tratados a tres diferentes concentraciones.....	132
47	Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con la argentatina A.....	133

	Pág.	
48	Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con la argentatina B.....	134
49	Transformaciones químicas de la argentatina A.....	139
50	Estructura de la 3-oxima-(16S,17R,20S,24R)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [1d] obtenida en un estudio de difracción de rayos X.....	141
51	Modelado en 3D (<i>MolCAD</i>) de la argentatina A y sus derivados en donde se muestra el potencial electrostático en la superficie de cada estructura.....	147
52	Transformaciones químicas de la argentatina B.....	149
53	Estructuras obtenidas por medio de difracción de rayos X de A) 2a , B) 2b , C) 2d , D) 2i y E) 2m	151
54	Espectro de RMN ¹ H de 300 MHz del producto de transformación del derivado 2k	156
55	Espectro de RMN ¹³ C de 75 MHz del producto de transformación del derivado 2k	156
56	Experimento DEPT del producto de transformación del derivado 2k	157
57	Mecanismo de obtención y estructura propuesta para el producto de transformación de 2k	158
58	Espectro de RMN ¹ H de 300 MHz adquirido en C ₆ D ₆ del derivado 2k	159
59	Espectro de RMN ¹³ C de 75 MHz adquirido en C ₆ D ₆ del derivado 2k	160
60	Experimento DEPT adquirido en C ₆ D ₆ del derivado 2k	160
61	Reacción del enol de la argentatina B con p-TsCN.....	161
62	(A) Plantilla empleada para el alineamiento (<i>template</i>). Los átomos de referencia son aquéllos presentes en los enlaces más oscuros. (B) Conjunto de derivados alineados sobre la plantilla (2).....	166
63	Valores de Log (1 /CI ₅₀) experimentales vs. Predichos de los compuestos empleados en el modelo final.....	168
64	A) Contornos estéricos en <i>CoMFA</i> . B) Contornos electrostáticos en <i>CoMFA</i>	170
65	Potencial electrostático molecular de A) la argentatina B, y B) 2n , codificado por colores y representado en superficies Connolly.....	172
66	Efectos del derivado 2k en la Viabilidad (x) y la cinética de proliferación celular (barras) de los linfocitos tratados a cinco diferentes concentraciones.....	176
67	Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con 2k	177

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
Ac ₂ O	Anhidrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BrEt	Bromuro de etidio
c	cuarteto
CCDC	Centro Cambridge de Datos Cristalográficos
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLogP	Logaritmo del coeficiente de partición calculado
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
COX-II	Ciclooxigenasa II
CPC	Cinética de proliferación celular
CREST	<i>Antikinetochore antibody staining</i>
Cyt -B	Citocalasina B
d	doblete
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dd	doble de doble
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
FDA	Diacetato de fluoresceína
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GTP	Guanosín trifosfato
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IDN	Índice de división nuclear
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
LDA	Diisopropilamido de litio
LogP	Logaritmo del coeficiente de partición
m	multiplete
MeOH	Metanol
MMC	Mitomicina C
MolCAD	<i>Molecular Computer-Aided Design</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
ON	Óxido nítrico
P.F.	Punto de fusión
PhSeCl	Cloruro de fenilselenio
PKC	Cinasa de la proteína C, (proteincinasa C)
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor-gamma</i>
ppm	partes por millón
pTS-CN	Cianuro de p-toluensulfonilo
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
s	singulete

sa	señal ancha
SRB	Sulforrodamina B
t	triplete
THF	Tetrahidrofurano
TGF- β	<i>Tumor growth factor-β</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-</i>
TPA	13-acetato-12-O-decanoil forbol

LÍNEAS CELULARES CITADAS EN EL TEXTO

26-L5:	Carcinoma murino de colon
A549:	Carcinoma humano de pulmón
A2780:	Carcinoma humano de ovario
A-431:	Carcinoma humano epidermoide
B16:	Melanoma murino
B16F10:	Melanoma murino
BC-1:	Cáncer humano de mama
BCA-1:	Cáncer humano de mama
CCRF-CEM:	Leucemia humana linfoblástica
CEM:	Leucemia humana
CEM/VLB:	Leucemia humana resistente a la vinblastina
Col2:	Cáncer humano de colon
COLO320:	Adenocarcinoma humano de colon no diferenciado
DU145:	Carcinoma humano de próstata (metastático).
GLC4:	Carcinoma humano de pulmón (células pequeñas)
H460:	Carcinoma humano de pulmón (células grandes)
HCT-8:	Cáncer humano de colon
HCT-15:	Cáncer humano de colon
Hep G2:	Carcinoma humano hepatocelular
HeLa:	Adenocarcinoma cervical humano
HL-60:	Leucemia promielocítica humana
HT-29:	Adenocarcinoma colorrectal humano
HT-1080:	Fibrosarcoma humano
HT-1197:	Carcinoma humano de vejiga urinaria
K562:	Leucemia mielogénica crónica humana
KB:	Contaminación de células HeLa que originalmente se creyó que provenía de un carcinoma epidermal de boca
KB-V1(+VLB)	Células KB multi-resistentes a fármacos
KB-V1(-VLB)	
L-1210:	Leucemia linfocítica murina
LNCaP:	Adenocarcinoma prostático humano
Lu1:	Cáncer humano de pulmón
M-14:	Melanoma maligno humano
MCF-7:	Adenocarcinoma de mama (humano)
MDA-MB-231:	Adenocarcinoma de mama (humano)
ME-180:	Carcinoma cervical epidermoide humano
MEL-2:	Melanoma
MK-1:	Adenocarcinoma gástrico humano
NUGC-3:	Adenocarcinoma gástrico humano
OVCAR-5:	Carcinoma humano de ovario
P388:	Leucemia linfocítica murina
PC-3:	Adenocarcinoma prostático humano
SK-MEL-3:	Melanoma maligno humano

SK-MEL-28:	Melanoma maligno humano
SK-OV-3:	Adenocarcinoma humano de ovario
SW620:	Carcinoma humano de colon
SW620/Ad-300:	Carcinoma humano de colon multi-resistente a fármacos
U251	Cáncer humano de SNC
U373:	Glioblastoma humano
UIISO:	Carcinoma cervical escamoso (humano)
UMR106:	Osteosarcoma de rata
V-79:	Células pulmonares de hamster chino
XF498:	Cáncer humano de SNC
ZR-75-1:	Cáncer de mama dependiente de hormonas

RESUMEN

Las argentatinas A y B, cicloartanos aislados de *Parthenium argentatum*, mostraron actividad citotóxica en las líneas K562, MCF-7, PC-3, HCT-15 y U251 de cáncer humano. Asimismo, usando el modelo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, se evaluaron las propiedades citotóxicas, citostáticas y genotóxicas de la argentatinas A y B en linfocitos humanos en proliferación. Los resultados indicaron que la argentatina A no mostró efectos citostáticos ni genotóxicos, aunque sí resultó ser citotóxica a la concentración de 25 μM ($P \leq 0.005$). Por su parte, la argentatina B presentó efectos citostáticos a las concentraciones de 5 a 25 μM ($P \leq 0.001$) y no presentó efectos citotóxicos ni genotóxicos. El hecho de que ambos triterpenos no mostraran efectos genotóxicos, permitió descartar que estos compuestos causaran daño al ADN por mecanismos aneugénicos o clastogénicos. Por otro lado, con el fin de establecer la relación entre la estructura química y la actividad biológica, se propusieron algunas modificaciones moleculares, mediante reacciones químicas de las argentatinas A y B. Por lo que también se describe la obtención, la caracterización y la actividad citotóxica de 23 derivados triterpénicos. En el caso de la argentatina A, se encontró que la presencia de un átomo de bromo, o un grupo formilo a C-2, así como una doble ligadura C-1/C-2 o un anillo isoxazol unido al anillo A, incrementaban su potencia. Adicionalmente, el análisis de difracción de rayos X de la oxima de la argentatina A [(16S,17R,20S,24R)-3-oxima-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona], permitió la determinación de la estereoquímica correcta de la argentatina A. Por otro lado, el derivado más activo de la argentatina B fue el 2-formil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona, el cual fue 35-50 veces más potente que la argentatina B. Asimismo, se demostró que este derivado, al igual que el compuesto original, posee efectos citostáticos y citotóxicos, pero no produce efectos genotóxicos. Posteriormente, con el fin de establecer los principales requerimientos estructurales responsables de la actividad biológica se realizó un Análisis Comparativo de Campos Moleculares (CoMFA), tomando en cuenta los resultados de actividad biológica de algunos de los derivados obtenidos. Para ello, en un primer paso, se modelaron las estructuras en tres dimensiones (3D), de los derivados de la argentatina B utilizando el sistema Sybyl6.9, partiendo de los datos cristalográficos que se habían obtenido para algunos de los compuestos durante el estudio. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de mínimos cuadrados parciales, en el que se empleó el Log (1/IC₅₀) en la línea K562 como variable dependiente y los descriptores CoMFA como variable independiente. El modelo de trabajo resultante presentó $q^2 = 0.507$, $r^2 = 0.907$, y 3 componentes. Mediante la visualización de los contornos CoMFA, se encontró que el incremento en la actividad citotóxica para la serie de derivados de la argentatina B estaba asociado a la presencia de un grupo voluminoso unido a C-2, un doble enlace C-1/C-2 y una baja densidad electrónica cercana a C-25. Adicionalmente, se determinaron los valores experimentales de LogP para tres compuestos; en donde se observó que para la argentatina B y uno de sus derivados, diferían en 1-2 unidades logarítmicas a los calculados.

ABSTRACT

Argentatins A and B are abundant triterpenes present in *Parthenium argentatum*. Both compounds have shown cytotoxic properties on K562, MCF-7, PC-3, HCT-15 and U251 human cancer cell lines. Furthermore the cytotoxic, cytostatic and genotoxic effects of the argentatins on proliferating lymphocytes were evaluated using cytokinesis-block micronucleus test. Argentatin A had no cytostatic properties, but it was cytotoxic for proliferating lymphocytes at a concentration of 25 μM ($P \leq 0.005$). On the other hand, argentatin B showed significant cytostatic effects ($P \leq 0.001$) at concentrations of 5 to 25 μM , and it did not show cytotoxic effects at the same concentrations. Neither argentatin showed genotoxic effects in terms of micronucleus frequency in human lymphocytes. According to these results the argentatins are not able to cause injury on DNA by clastogenic or aneugenic mechanisms. In order to obtain new anticancer drugs as well as to establish a structure activity relationship, 24 derivatives of both, argentatin A and argentatin B were obtained. The synthesis, characterization and anticancer activity of these derivatives are described. These compounds were assessed for their ability to inhibit growth in vitro in four human cancer cell lines. Our results showed that the presence of either a double bond at C-1/C-2, or a bromine atom or formyl moiety at C-2 as well as the presence of an isoxazol rings in argentatin A enhanced its potency in all cell lines tested. In addition, an X-ray study of (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-3-oxime-20,24-epoxy-16,25-dihydroxy-cycloartan-3-one led to the determination of the correct stereochemistry of argentatin A. On the other hand, the most active argentatin B-derivative was 2-formyl-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one. It was about 35–50 times more potent than argentatin B. The cytotoxic, cytostatic and genotoxic effects of this derivative on proliferating lymphocytes were also evaluated using cytokinesis-block micronucleus test. In this sense, this derivative showed cytostatic and cytostatic effects and it did not show genotoxic effects, as argentatin B. A Comparative Molecular Field Analysis was carried for argentatin B analogs. Structures were built using the X-ray crystallography of six derivatives for 3D modeling with Sybyl6.9. CoMFA of Log (1/ IC_{50}) in K562 cell line gave $q^2 = 0.507$, $r^2 = 0.907$, and three components. The standard deviation CoMFA contours indicate that increased activity is associated with a bulky group at C-2, a C1–C2 double bond, and low electronic density at C-25. Experimental LogP values for argentatin B and one derivative were 1–2 Log units more hydrophilic than the calculated CLogP values.

I. INTRODUCCIÓN

En México, como en el resto del mundo, el cáncer constituye un problema de salud pública. Una de las principales estrategias para el tratamiento curativo o paliativo de dicho padecimiento lo constituye la quimioterapia.

Una estrategia de búsqueda de nuevos agentes anticancerosos es la evaluación de compuestos de origen natural. El resultado de esta estrategia fue la obtención de agentes clínicamente eficaces, como son la vincristina, la vinblastina, el paclitaxel, los derivados de la podofilotoxina, las combretastatinas, etc. Sin embargo, existen en la literatura una gran cantidad de metabolitos secundarios con una actividad anticancerosa potencial. Como ejemplos podemos citar a las cumarinas, los flavonoides y los terpenos. Incluidos en este último grupo, se encuentran los triterpenos.

Los triterpenos constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios derivados del escualeno. Algunos de estos, se han referido frecuentemente como anticancerosos; por ejemplo, los del tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las cucurbitacinas y a las quinonas metilúricas.

Poco se conoce acerca de los mecanismos de acción por los que los triterpenos ejercen sus efectos. La mayoría de los estudios farmacológicos se limitan a informar el parámetro de potencia (CI_{50} , concentración que inhibe el 50%

de la proliferación celular) y a la comparación de este parámetro con aquellos previamente informados.

Algunos estudios recientes demuestran que es posible obtener agentes anticancerosos más potentes a partir de los triterpenos. Así, triterpenos bioactivos abundantes y de baja potencia (como son algunos ursanos y oleananos) se transformaron para la obtención de moléculas con una actividad significativamente mayor. De manera opuesta, compuestos altamente citotóxicos (como las cucurbitacinas) se transformaron para obtener agentes con menores efectos adversos.

Las transformaciones químicas –descritas en la literatura– que parecen mejorar la actividad citostática y/o citotóxica de algunos núcleos triterpénicos en las líneas celulares de cáncer, son la apertura del anillo A o la incorporación de grupos nitrilo, formilo, carboxilo; así como dobles ligaduras en dicho anillo y; carbonilos $\alpha\beta$ insaturados en los anillos A y C.

Los estudios químicos y biológicos del ácido oleanólico (triterpeno de especial abundancia), realizados de manera sistemática por Sport y Gribble, permitieron la obtención de una serie de moléculas bioactivas multifuncionales, las cuales constituyen una nueva clase de ligandos a los receptores nucleares PPAR- γ .

Por otro lado, los cicloartanos constituyen uno de los tipos de triterpenos estructuralmente y biológicamente menos estudiados. En este sentido, las investigaciones químicas de la especie *Parthenium argentatum* (Gray), conocida como guayule, demuestran que esta planta sintetiza de manera muy importante triterpenos del tipo cicloartano y lanostano, conocidos como argentatinas e isoargentatinas, respectivamente. Estos compuestos se aislan en un elevado rendimiento del desecho resinoso obtenido como subproducto en el proceso industrial para el aislamiento de hule natural a partir del guayule.

Tomando en consideración los antecedentes biológicos de los cicloartanos, así como la naturaleza química y la elevada abundancia en que se encuentran las argentatinas en el desecho industrial del *P. argentatum*, se planteó investigar las propiedades biológicas de dichos compuestos. Así, en una etapa preliminar nuestro grupo de investigación demostró que las argentatinas A y B inhibían, de manera dependiente de la dosis, el edema inducido por el promotor de tumores 13- acetato-12-O-decanoil forbol (TPA) en el modelo de inflamación de la oreja de ratón. Además, también se demostró que la argentatina A posee actividad antimicrobiana y, que la argentatina B es un inhibidor no competitivo de la unión de estradiol a los receptores hormonales –en tumores de mama dependientes de estrógeno–.

Tomando en consideración lo anterior, se planteó el presente proyecto, en donde se evaluaron las propiedades citotóxicas de las argentatinas A y B en

diferentes líneas celulares de cáncer humano. Además, se consideró de suma importancia la determinación de los posibles efectos genotóxicos de dichos compuestos, ya que es ampliamente conocido que la mayoría de los agentes antineoplásicos existentes en la clínica poseen entre sus efectos adversos, efectos genotóxicos.

Con el propósito de establecer relaciones entre la estructura química y la actividad anticancerosa de las argentatinas A y B, así como para obtener compuestos con un perfil farmacológico superior, se llevó a cabo la obtención de 23 derivados, mediante modificaciones moleculares por métodos químicos. Dichas modificaciones se realizaron considerando las transformaciones químicas que habían sido descritas para otros núcleos triterpénicos. La caracterización de cada derivado se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Mientras que la evaluación de la actividad citotóxica de los derivados obtenidos se llevó a cabo en cuatro líneas celulares de cáncer humano.

En resumen, se estableció el potencial citotóxico, citostático y genotóxico de las argentatinas A y B. Se obtuvieron, mediante transformaciones químicas, 24 derivados a partir de las argentatinas en estudio. Actualmente, se cuenta con un derivado de la argentatina B que presenta una actividad *in vitro* similar a la doxorubicina pero sin sus efectos secundarios. La evaluación farmacológica de tales derivados permitió el establecimiento de algunas relaciones estructura-

actividad y, en el caso de los derivados de la argentatina B, también se llevó a cabo un análisis comparativo de campos moleculares (CoMFA).

II. MARCO TEÓRICO

II.1 CÁNCER

II.1.1 Definición

El cáncer es un conjunto de padecimientos neoplásicos que se presenta en los seres humanos y en otras especies animales (Katzung, 1999). De acuerdo con Sir Rupert Willis, una neoplasia es una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede al del tejido normal y no está coordinado por él, y que persiste de la misma forma excesiva tras finalizar el estímulo que suscitó la alteración. Las neoplasias malignas tienen la capacidad de sufrir metástasis y formar tumores secundarios.

El cáncer se caracteriza por cambios en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación de las células (Katzung, 1999). Dichos cambios son el resultado de anomalías genéticas que puede aparecer por la mutación de un grupo específico de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y su pérdida o inactivación da lugar a una división celular acelerada (Gibbs 2000).

II. 1. 2 El cáncer como problema de salud pública

Hoy en día, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte de la humanidad. Cada año más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer, de las cuales, 6 millones mueren representando el 12% de las muertes en el ámbito mundial y se estima que para el año 2020 el número de nuevos casos se incrementará a 15 millones (Klug y Cummings, 1999). Según los registros de la Secretaría de Salud, desde 1990 en México, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte (Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones 2001).

En el año 2002, en México, el cáncer provocó 58,599 defunciones. En el caso de los varones, el número de fallecimientos por este padecimiento representó el 11.2 % de las muertes. Mientras que en las mujeres, esto correspondió al 14.7 %. Sin embargo, es alarmante el hecho de que para el grupo de mujeres entre 35 y 64 años de edad, el cáncer constituye ya la primera causa de muerte (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2005). En la Figura 1 se muestra la distribución porcentual por sexo de diversos tumores malignos.

Sin duda, el cáncer constituye un problema a nivel mundial y ocupa un lugar de especial importancia en los programas de salud pública, asistencia médica, prevención e investigación.

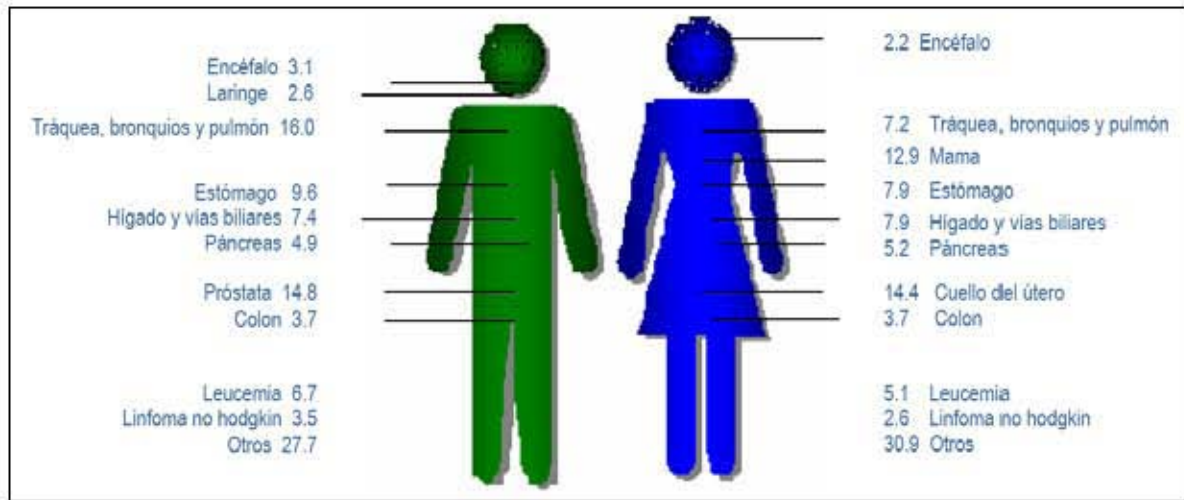


Figura 1. Distribución porcentual de defunciones por tumores malignos en México durante el año 2002.

II. 1. 3 El tratamiento del cáncer

Hasta hoy, las estrategias principales para el tratamiento curativo o paliativo del cáncer son los procedimientos quirúrgicos, la radioterapia y la quimioterapia.

En la quimioterapia del cáncer se emplean fármacos para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas. Esta estrategia se remonta al menos 500 años, con el uso de algunas preparaciones de plata, zinc y mercurio que se emplearon para tratar este tipo de padecimientos. En 1865, Lissauer observó un efecto positivo después de tratar a un paciente de leucemia con arsenito de potasio (solución de Fowler) (Lissauer en Rojas 1992).

La era moderna de la quimioterapia inició después de la Segunda Guerra Mundial con la introducción de las mostazas nitrogenadas, agentes alquilantes –desarrollados para el uso clínico como consecuencia de la toxicidad hematopoyética observada con la mostaza sulfurada (un gas de guerra)–, y la aminopterina. Estos compuestos produjeron remisiones notables en pacientes con linfoma y en niños con leucemia linfocítica aguda. Desafortunadamente, no se obtuvieron curaciones debido al rápido desarrollo de resistencia a los fármacos, un problema que se ha observado con el uso único de cada nuevo fármaco (Bertino en Browman y Rand 1984).

Los primeros resultados que se obtuvieron con la quimioterapia motivaron la creación de un programa de desarrollo de fármacos anticancerosos, en especial en los Estados Unidos de América; en 1955 se autorizó en ese país, el Centro de Servicio Nacional de la Quimioterapia de Cáncer en el Instituto Nacional del Cáncer. Desde entonces se han aprobado más de 30 fármacos para el uso en el tratamiento de los pacientes con enfermedades malignas (Chabner y Roberts 2005). Algunos de estos fármacos curan a la mayoría de los pacientes con coriocarcinoma, cancer testicular, leucemia linfocítica aguda y diversos tipos de linfomas.

Con el tratamiento combinado de fármacos se mejora la respuesta farmacológica en pacientes con cáncer de ovario o con leucemia mielocítica aguda

–aunque, la tasa de curación alcanza sólo del 10 al 20%–. Desafortunadamente otros tipos de cáncer son menos susceptibles al tratamiento quimioterapéutico.

Por otra parte, la quimioterapia se puede emplear como adyuvante en el tratamiento del cáncer. Para ello, los fármacos se administran antes (neoadyuvante) o, después del tratamiento definitivo (cirugía o radioterapia). En el Cuadro 1 se indican algunos de los agentes antineoplásicos más representativos.

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

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

II.2 PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80 % de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud. Adicionalmente, se calcula que los productos naturales representan alrededor del 50 % de los fármacos de uso clínico en países desarrollados y de estos el 25 % derivan de plantas superiores (Laza y Rodríguez, 2003).

El aislamiento de compuestos anticancerosos de origen natural se ha efectuado a partir de diferentes estrategias: una de ellas es aquélla que toma en cuenta los antecedentes etnomédicos de las especies bajo estudio; otra es el tamizaje; inclusive por medio de la evaluación directa de estructuras novedosas.

Debido a que en la práctica tradicional es difícil distinguir entre un proceso inflamatorio y un desarrollo canceroso, la búsqueda de especies con probados antecedentes etnomédicos anticancerosos no es fácil. Sin embargo, en 1982, Hartwell informó de aproximadamente 3000 especies de plantas que etnomédicamente se habían referido como anticancerosas (Hartwell, 1982).

En la medicina popular de diversas regiones del mundo se describen las propiedades beneficiosas de la “vinca” (*Vinca rosea* Sin. *Catharantus roseus*), una especie de mirto (Figura 2). Esta especie había sido referida como hipoglucemiante; sin embargo, cuando se estudiaron sus efectos farmacológicos

se encontró que provocaba granulocitopenia y depresión de la médula ósea de la rata. Investigaciones posteriores demostraron que algunas fracciones de alcaloides de esta planta tenían actividad contra la neoplasia linfocítica murina. El estudio químico permitió el aislamiento de cuatro alcaloides diméricos activos: vinblastina, vincristina, vinleurosina y vinosina. Los dos primeros, se convirtieron en agentes clínicamente importantes para el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer testicular (Figura 2) (Calabresi y Chabner en Hardman *et al.*, 1996; Cragg y Newman, 2005).

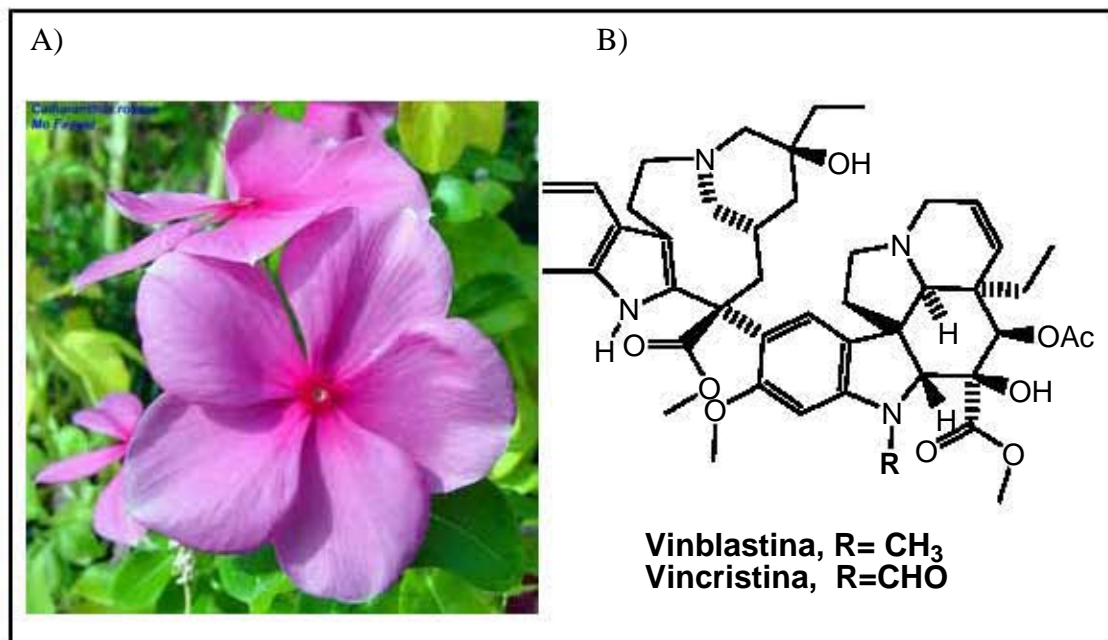


Figura 2. A) Flores de *Catharanthus roseus* L.; B) Estructuras químicas de la vincristina y vinblastina.

Las actividades biológicas de los alcaloides de la vinca se explican por su capacidad de ligarse específicamente a la tubulina y bloquear la facultad de dicha proteína para polimerizarse en microtúbulos. Así, la vinblastina se une a la subunidad β de los dímeros de tubulina a una región denominada “dominio de unión Vinca”. La unión de la vinblastina a la tubulina soluble es rápida y reversible. De manera importante, la vinblastina induce cambios conformacionales en la tubulina que hace que esta proteína se autoasocie (Jordan y Wilson, 2004).

Así mismo, la vinblastina también se une directamente a los microtúbulos, disminuyendo la dinámica de los mismos. Como consecuencia se previene la formación del huso mitótico y se reduce la tensión de los cromosomas en la región cinetocórica (Jordan y Wilson, 2004).

La especie *Podophyllum peltatum* se empleó como remedio popular por los indígenas de América y los primeros colonizadores (Figura 3), por sus efectos eméticos, catárticos y antihelmínticos. A partir de esta planta, se aisló la podofilotoxina. Este principio fue derivatizado para obtener dos glucósidos semisintéticos, el etopósido y el tenipósido (Figura 3), los cuales tienen aplicación en el cáncer testicular y el carcinoma de células pequeñas del pulmón.

El etopósido y el tenipósido, forman un complejo ternario con la topoisomerasa II y el ADN. La formación de dicho complejo ocasiona rupturas en el ADN de doble hebra que conlleva a la detención del ciclo y posterior muerte celular (Calabresi y Chabner en Hardman *et al.*, 1996).

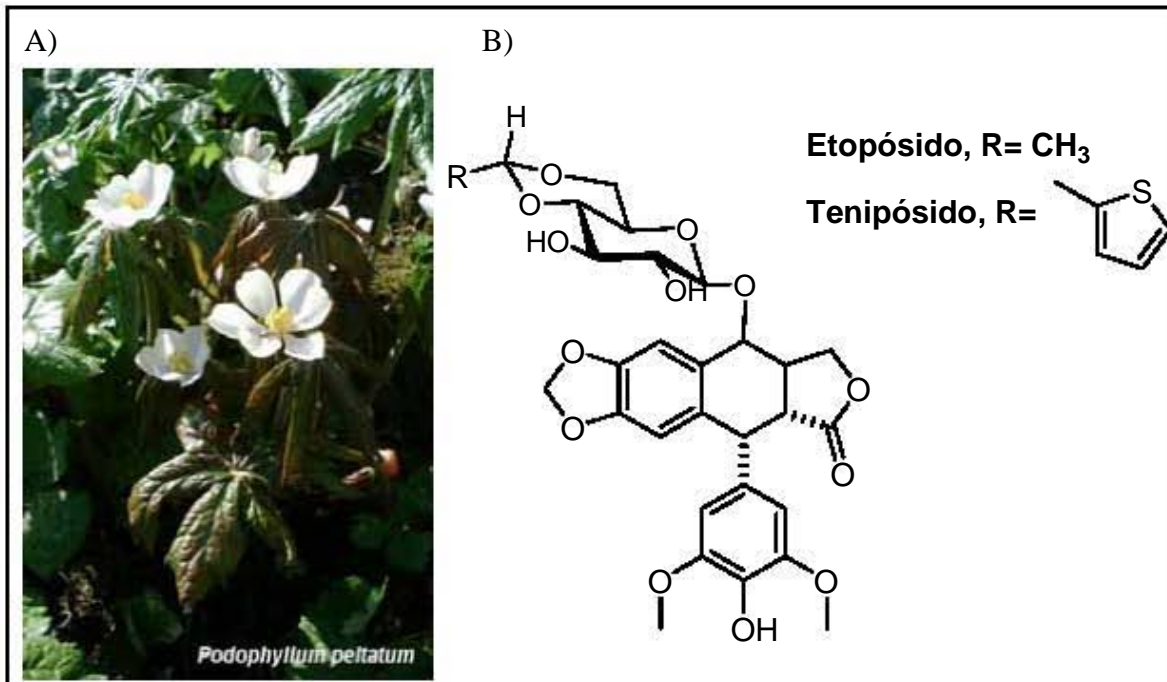


Figura 3. A) Partes aéreas de *Podophyllum peltatum*; B) Estructuras químicas del tenipósido y el etopósido.

Como resultado de la evaluación de las propiedades citotóxicas de cientos de extractos de especies vegetales por el Instituto Nacional del Cáncer (EUA), en los años 60's, se logró el descubrimiento de un potente diterpeno nombrado paclitaxel (Chabner y Roberts, 2005; Cragg y Newman, 2005; Mann, 2002). Este compuesto, se aisló a partir de la corteza del árbol milenario conocido como tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) (Figura 4).

El paclitaxel estimula la formación de microtúbulos a bajas temperaturas y en ausencia de GTP. Se liga específicamente a las subunidades β -tubulina de los microtúbulos, y al parecer antagoniza el desensamble de esta proteína citoesquelética, con lo cual aparecen en células tratadas con paclitaxel, haces de

microtúbulos y estructuras aberrantes de ellos (Jordan y Wilson, 2004). En consecuencia, el ciclo celular se detiene en la mitosis. En 1992, se aprobó el uso del paclitaxel para el tratamiento del cáncer ovárico refractario a cisplatino y ha tenido actividad promisorio contra los cánceres de mama, pulmones, esófago y cabeza, y cuello (Calabresi y Chabner en Hardman y *et al.*, 1996; Jordan y Wilson, 2004). El paclitaxel es sin duda, el compuesto anticanceroso más vendido en el mundo. En el 2000, las ganancias por la venta de este compuesto superaron los 1.5 billones de dolares anuales (Mann, 2002).

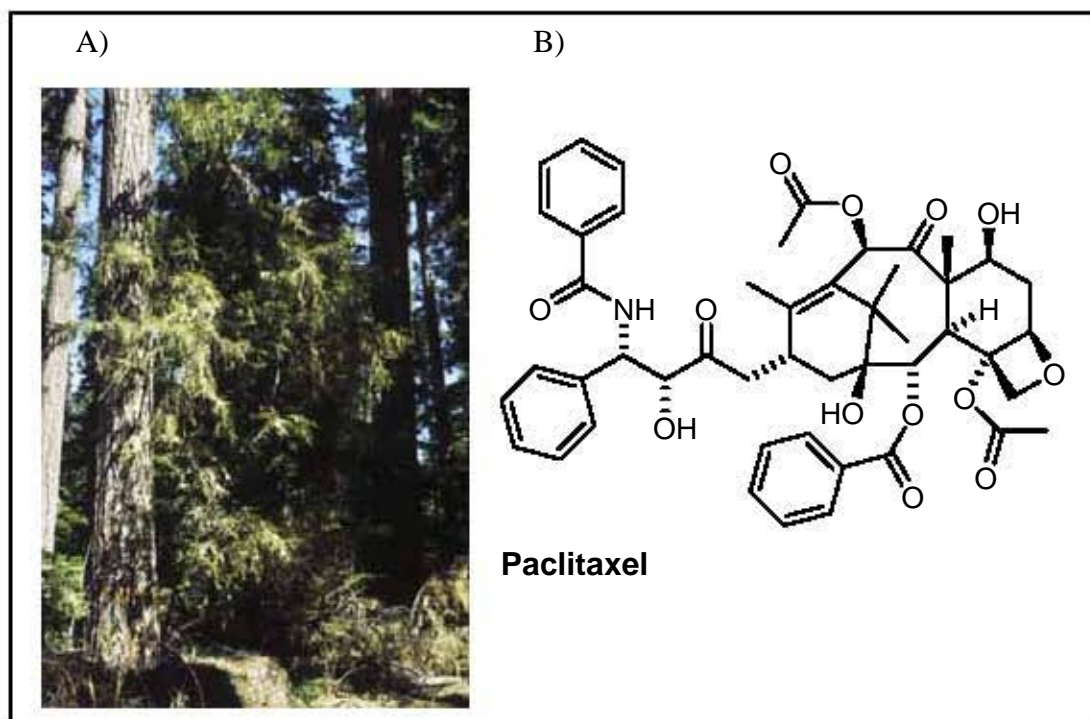


Figura 4. A) *Taxus brevifolia*; B) Estructura química del paclitaxel.

Otros compuestos con importancia clínica son la camptotecina y sus derivados, el irinotecano y el topotecano; así como la homoharringtonina, la elipticina y su derivado, el eliptinium. Este último empleado en Francia para el tratamiento del cáncer de mama (Cragg y Newman, 2005) (Figura 5).

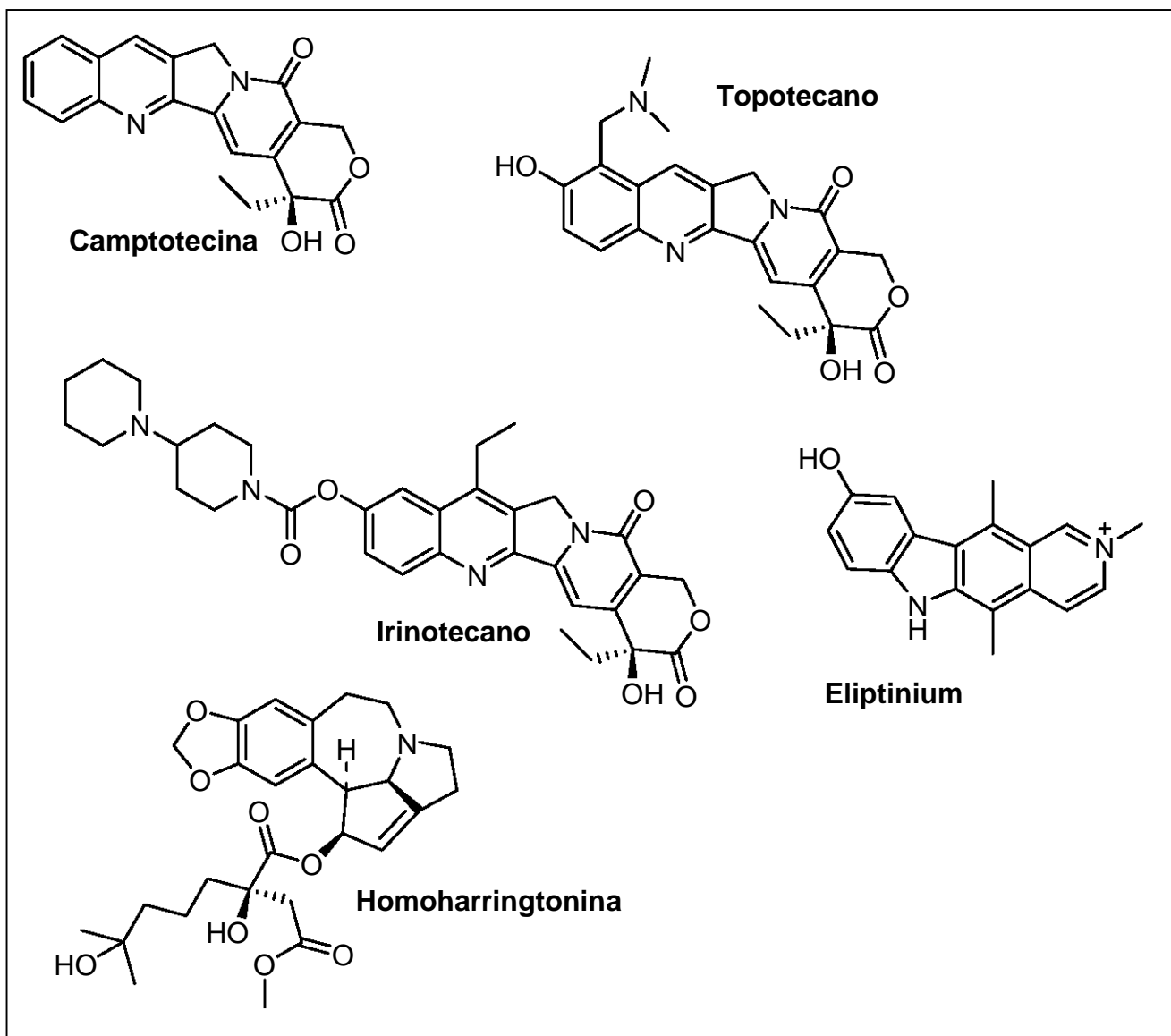


Figura 5. Compuestos de origen natural y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer.

Aunque los compuestos antes mencionados son los de mayor importancia clínica, existe una gran cantidad de metabolitos estructuralmente diversos, con probada actividad contra líneas celulares de cáncer. Es posible encontrar en cada grupo de metabolitos secundarios algún representante con propiedades anticancerosas. Algunos de estos grupos de compuestos son las cumarinas (Lee *et al.*, 2003; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004), los flavonoides (Palazzino *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004), los sesquiterpenos (Cho *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2005; Herz *et al.*, 1981; Rivero *et al.*, 2003), los diterpenos (Fujioka *et al.*, 1998; Rasikari *et al.*, 2005) y los triterpenos (Setzer y Setzer, 2003). Los mecanismos de acción, responsables de la actividad citotóxica de estos grupos de compuestos, son diversos.

Sin duda, las plantas y microorganismos continúan siendo una fuente invaluable de sustancias bioactivas. Así, en el 2000, se estimó que aproximadamente el 53% de los fármacos en estudios clínicos correspondía a metabolitos secundarios y sus derivados o a compuestos obtenidos a partir de un farmacóforo de un producto natural (Newman *et al.*, 2003).

II. 3 TRITERPENOS COMO AGENTES ANTICANCEROSOS POTENCIALES

Los triterpenos constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios derivados del escualeno o de precursores acíclicos de 30 átomos de carbono. Xu y colaboradores (2004) estimaron cerca de 200 tipos de esqueletos triterpénicos, los cuales poseen una amplia distribución en el reino vegetal.

El estudio sistemático de plantas con antecedentes etnomédicos, ha conducido frecuentemente al aislamiento de diversos triterpenos biodinámicos. Así, se conocen triterpenos antioxidantes (Zhu *et al.*, 1999), antiinflamatorios (Baricevic *et al.*, 2001; Marquina *et al.*, 2001; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004), hepatoprotectores (Liu *et al.*, 1993; 1995), cardioprotectores (Sumitra *et al.*, 2001), antagonistas de los receptores de estrógeno (Calzada *et al.*, 1995), antiproliferativos (Li *et al.*, 2002), citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano (Setzer y Setzer 2003), antiangiogénicos (Sohn *et al.*, 1993) y proapoptóticos (Kim *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se han descrito más de 100 triterpenos con actividad citotóxica. Algunos de éstos son los del tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las quinonas metilúricas. Los compuestos referidos más frecuentemente en la literatura pertenecen a los dos primeros tipos (Setzer y Setzer, 2003).

En la Figura 6 y en el Cuadro 2 se muestran algunos triterpenos citotóxicos del tipo ursano. Los ácidos ursólico, corosólico, pomólico, euscáfico y acetil- β -boswélico constituyen los ejemplos clásicos de ursanos bioactivos.

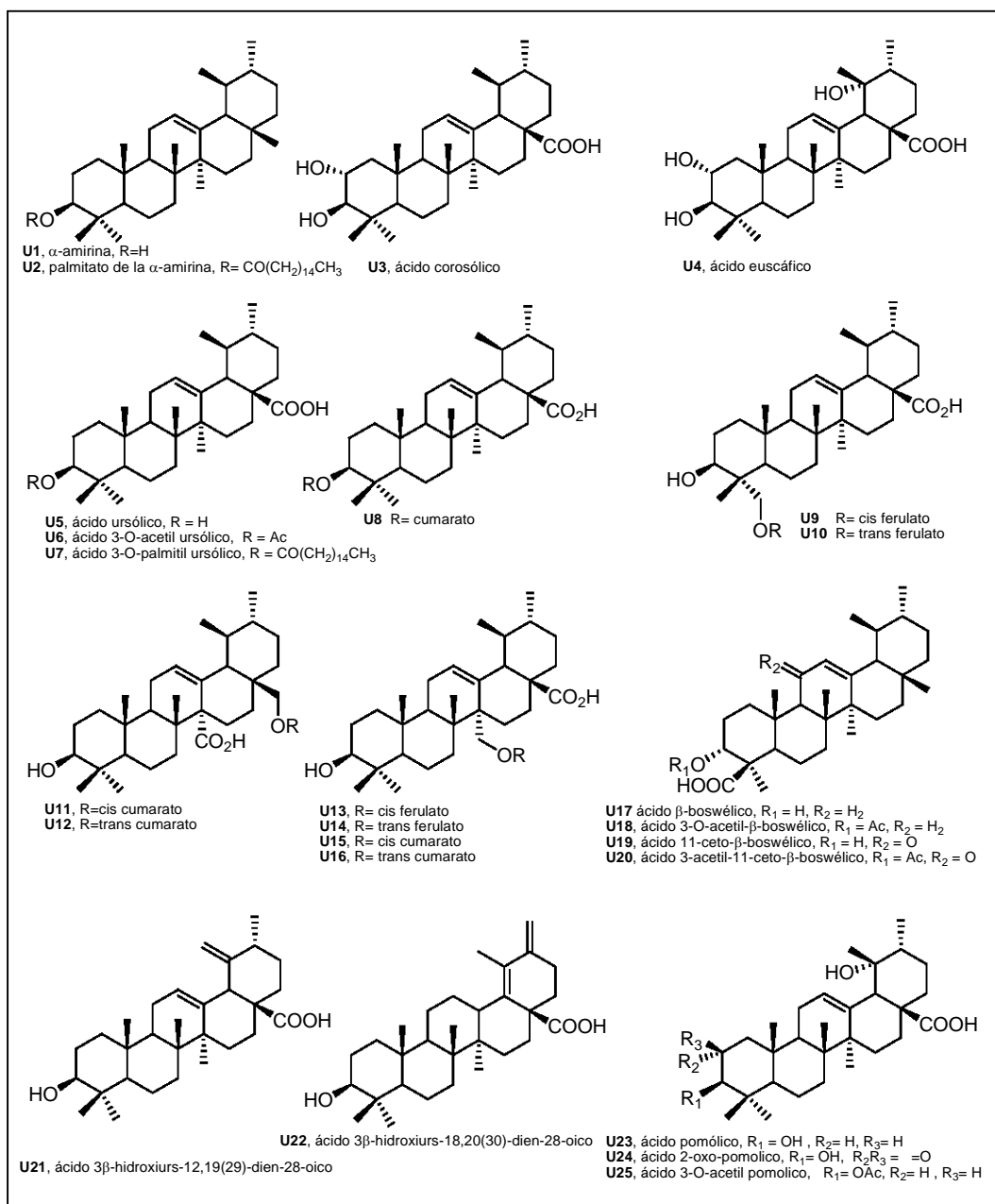
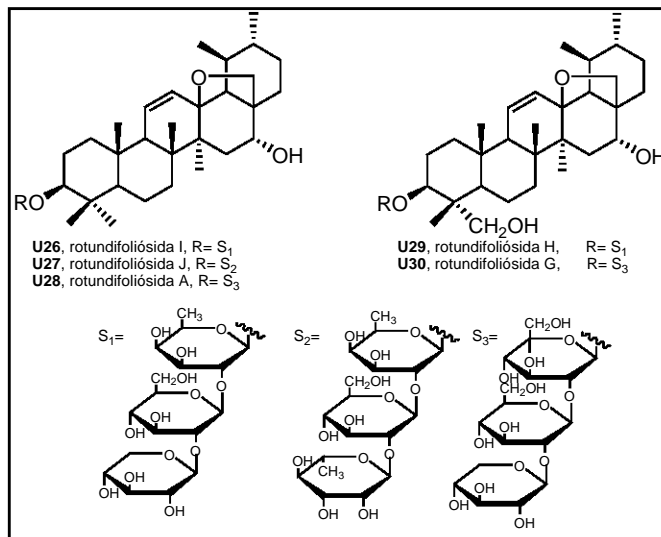


Figura 6. Algunos ejemplos de triterpenos anticancerosos del tipo ursano.



Cont. Figura 6

La actividad biológica del ácido ursólico se atribuye a su acción sobre diferentes blancos moleculares. Así, el ácido ursólico es un inhibidor de algunas de las enzimas involucradas en la duplicación celular, como son la ligasa I (Tan *et al.*, 1996) y las polimerasas del ADN (Mizushina *et al.*, 2000). En células de cáncer, el ácido ursólico incrementa la concentración de calcio intracelular (Baek *et al.*, 1997), induce arresto celular en Go/G1 mediado por p21^{waf1}, liberación de citocromo c y finalmente apoptosis mediada por activación de la caspasa 3 (Kim *et al.*, 2000).

Cuadro 2. Actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo ursano.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
U1	14	UMR106	Kweifio-Okai <i>et al.</i> , 1994.
U2	23.2	A2780	Chaturvedula <i>et al.</i> , 2002.
U3	10.4	A549	Yamagishi <i>et al.</i> , 1988.
	5.7	HCT-8	
	12.9	P-388	
	10.2	HepG2	Ahn <i>et al.</i> , 1998.
	10.6	A549	
	2.1	HeLa	
	9.1	K562	
	9.3	A549	
	8.3	SK-OV-3	Kim <i>et al.</i> , 2000a.
	10.8	SK-MEL-3	
	11.6	XF498	
9.9	HCT15		
U4	37.6	SK-OV-3	Kim <i>et al.</i> , 2000a.
U5	14.5	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	7.0	P388	
	8.8	L-1210	
	8.8	A549	
	9.9	HCT-8	
	10.7	MCF7	
	30	NUGC-3	
	7	HepG2	Ahn <i>et al.</i> , 1998.
	4.0	A549	
	3.3	HeLa	
	27.4	K562	
	7.2	HCT15	Ríos <i>et al.</i> , 2001.
	7.0	UIISO	
	7.0	OVCAR-5	
	7.7	B16	Es-saady <i>et al.</i> , 1996.
	0.9	HL-60	Simon <i>et al.</i> , 1992.
	7.9	HL-60	Baek <i>et al.</i> , 1997.
9.2	A549	Kim <i>et al.</i> , 2000a.	
7.9	K-OV-3		
10.1	SK-MEL-3		
9.9	XF498		
9.6	HCT15		

Cont. Cuadro 2.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
U5	256.2	H460	Neto <i>et al.</i> , 2000.
	249.6	ME-180	
	247.4	DU145	
	225.5	MCF-7	
	93.1	M-14	
	247.4	HT-29	
	223.3	PC-3	
	164.2	K562	
U6	25.8	Lu1	Hwang <i>et al.</i> , 2003.
	19.7	Col2	
	14.5	KB	
	14.7	LNCaP	
	28.9	hTERT-RPE1	
	9.0	HUVEC	
	351	HepG2	
U6	7.4	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	11.8	P388	
	17.1	L-1210	
	14.2	A549	
	11.6	HCT-8	
	15.0	MCF7	
U8	1.43	HepG2	Setzer y Setzer, 2003.
	15.3	MDA-MB-231	
U9	1.5	P388	Duh <i>et al.</i> , 1987.
U10	3.2	P388	Duh <i>et al.</i> , 1987.
U11	25	KB	Siddiqui <i>et al.</i> , 1995.
U12	12	KB	Siddiqui <i>et al.</i> , 1995.
U13	4.2	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	3.7	HCT15	
	0.9	MCF7	
	6.6	HT-1197	
U14	9.7	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	2.8	HCT15	
	8.8	MCF7	
	8.6	HT-1197	
U15	7.3	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	4.2	HCT15	
	1.4	MCF7	
	7.0	HT-1197	
U16	3.7	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	4.4	HCT15	
	0.9	MCF7	

Cont. Cuadro 2.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
U16	5.0	HT-1197	Lee <i>et al.</i> , 2000.
U20	31.0	HL-60	Hoernlein <i>et al.</i> , 1999.
	32.0	CCRF-CEM	
U23	17.6	ME-180	
	25.0	DU145	
	29.0	MCF-7	
	14.6	M-14	Neto <i>et al.</i> , 2000.
	32.4	H460	
	28.5	HT-29	
	28.1	PC-3	
	40	K562	
U24	425.3	H460	
	>513.7	ME-180	
	>513.7	DU145	
	378.1	MCF-7	Neto <i>et al.</i> , 2000.
	90.4	M-14	
	394.5	HT-29	
	234.2	PC-3	
	431.5	K562	
U25	109	H460	
	134.7	ME-180	
	249.7	DU145	
	138.7	MCF-7	Neto <i>et al.</i> , 2000.
	114.9	M-14	
	138.7	HT-29	
	134.7	PC-3	
	42.2	K562	
U26	22.3	MK-1	
	41.3	HeLa	Fujioka <i>et al.</i> , 2003.
	20.1	B1610	
U27	17.6	MK-1	
	23.1	HeLa	Fujioka <i>et al.</i> , 2003.
	12.1	B1610	
U28	52.63	MK-1	
	77.9	HeLa	Fujioka <i>et al.</i> , 2003.
	34.0	B1610	
U29	19.7	MK-1	
	34	HeLa	Fujioka <i>et al.</i> , 2003.
	19.7	B1610	
U30	90.5	MK-1	
	>107.8	HeLa	Fujioka <i>et al.</i> , 2003.
	49.6	B1610	

Por otro lado, Shishoda y colaboradores (2003) demostraron que el ácido ursólico inhibió la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) inducida por diversos carcinógenos, como son el factor de necrosis tumoral, el ácido okadaico, entre otros. Es conocido que el factor de transcripción NF- κ B regula diversos genes que median procesos de proliferación, angiogénesis y metástasis, por lo que, los efectos inhibitorios que posee el ácido ursólico explican en parte los efectos anticancerosos y quimiopreventivos de dicho triterpeno.

Subbaramaiah y colaboradores (2000), encontraron que el ácido ursólico inhibió la expresión de la ciclooxigenasa II (COX-II), además fué capaz de impedir la activación de la proteincinasa C (PKC) mediada por ésteres de forbol.

El ácido corosólico, al igual que el ácido ursólico, también inhibe la actividad de PKC de una manera dependiente de la dosis. Dicha inhibición correlaciona con la actividad citotóxica encontrada en células K562 (Ahn *et al.*, 2000).

En un estudio del ácido 3-acetil-11-ceto- β -boswélico, se encontró que este triterpeno inhibió de manera irreversible la síntesis del ADN. A concentraciones bajas, este compuesto presentó efectos citostáticos sin disminuir la viabilidad de células de leucemia HL-60 (Shao *et al.*, 1998). Dichos efectos correlacionaron con la inhibición de la topoisomerasa I (Hoerlein *et al.*, 1999). Sin embargo, a concentraciones mayores, este compuesto indujo apoptosis dependiente de la activación de caspasa 8 (Liu *et al.*, 2002).

Como se puede observar, los ursanos poseen efectos farmacológicos que los hacen compuestos potenciales para el desarrollo de agentes antineoplásicos. A la fecha, se ha sintetizado una gran cantidad de compuestos antiinflamatorios y citotóxicos derivados del ácido ursólico (Baglin *et al.*, 2003; Finlay *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; 2000a; 2000b; Lee *et al.*, 1988). En la Figura 7 y en el Cuadro 3 se muestran las estructuras químicas y la actividad citotóxica de algunos de los derivados de **U5**.

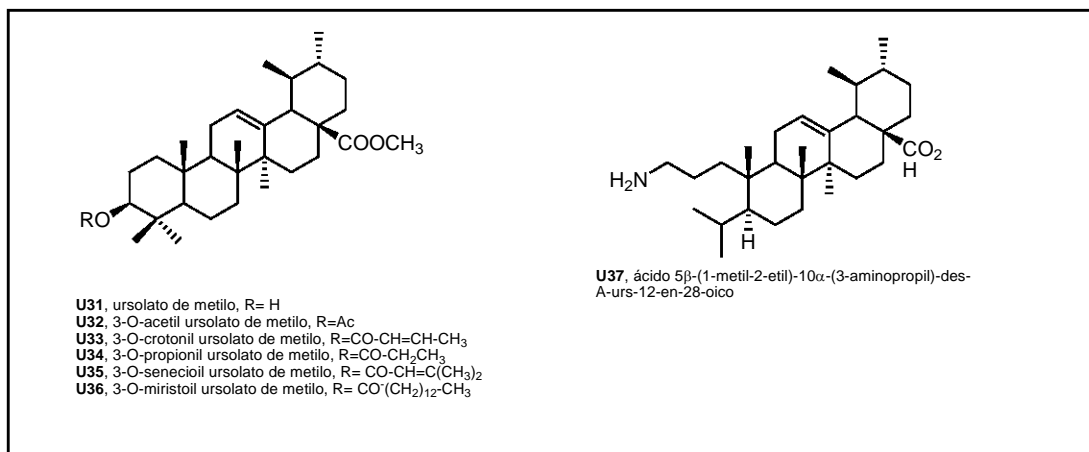


Figura 7. Algunos derivados del ácido ursólico con actividad citotóxica.

Cuadro 3. Actividad citotóxica de algunos derivados del ácido ursólico.

Compuesto	CI ₅₀ (µM)	Linea celular	Referencia
U31	>8.5	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	9.0	P388	
	10.6	L-1210	
	13.81	A549	
	16.2	HCT-8	
	>21.2	MCF7	
U32	>7.8	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	6.0	P388	
	6.8	L-1210	
	>19.5	A549	
	>19.5	HCT-8	
	>19.5	MCF7	
U33	>7.4	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	5.9	P388	
	3.9	L-1210	
	>18.6	A549	
	>18.6	HCT-8	
	10.2	MCF7	
U34	>7.6	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	5.0	P388	
	4.5	L-1210	
	14.8	A549	
	>19.0	HCT-8	
	>19.0	MCF7	
U35	>7.2	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	5.1	P388	
	4.9	L-1210	
	11.4	A549	
	>18.1	HCT-8	
	>18.1	MCF7	
U36	>5.9	KB	Lee <i>et al.</i> , 1988.
	3.9	P388	
	4.1	L-1210	
	9.3	A549	
	>14.7	HCT-8	
	>14.7	MCF7	
U37	0.3	NRP.152	Finlay <i>et al.</i> , 1997.

Los triterpenos de tipo oleanano también poseen actividad anticancerosa. Hasta la fecha, diversas investigaciones han demostrado que el ácido oleanólico posee actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer (Setzer y Setzer 2003). Además, este compuesto induce la diferenciación en líneas celulares de leucemia murina y humana (Umehara *et al.*, 1992).

El ácido oleanólico inhibe las reacciones de adenilación y ligación catalizadas por la ligasa I del ADN humano (Tan *et al.*, 1996). También, se conoce que este compuesto inhibe la actividad de la polimerasa β del ADN de rata (Deng *et al.*, 1999). Además, Choi y colaboradores (2001) encontraron que el ácido oleanólico estimula la liberación de óxido nítrico (ON) y TNF- α , a través de la regulación de la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa y el factor de necrosis tumoral, por el factor nuclear κ B (NF- κ B).

Sin embargo, el ácido oleanólico no es el único oleanano con actividad anticancerosa importante. En la Figura 8 y en el Cuadro 4 se muestran las estructuras químicas y la actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo oleanano.

Se conoce que algunos triterpenos del tipo oleanano son inhibidores catalíticos de las topoisomerasas humanas; sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la actividad citotóxica o antiproliferativa de dichos compuestos. Entre esos compuestos se pueden mencionar al ácido acetil- α -boswélico, al olean-12-

en-3 β ,15 α -diol y al olean-12-en-3 β ,15 α ,24-triol (Syrovets *et al.*, 2000; Wada *et al.*, 2001). Así mismo, se sabe que los 3-p-cumaratos (cis y trans) del ácido oleanólico son capaces de inhibir la polimerasa del ADN (Ma *et al.*, 1999).

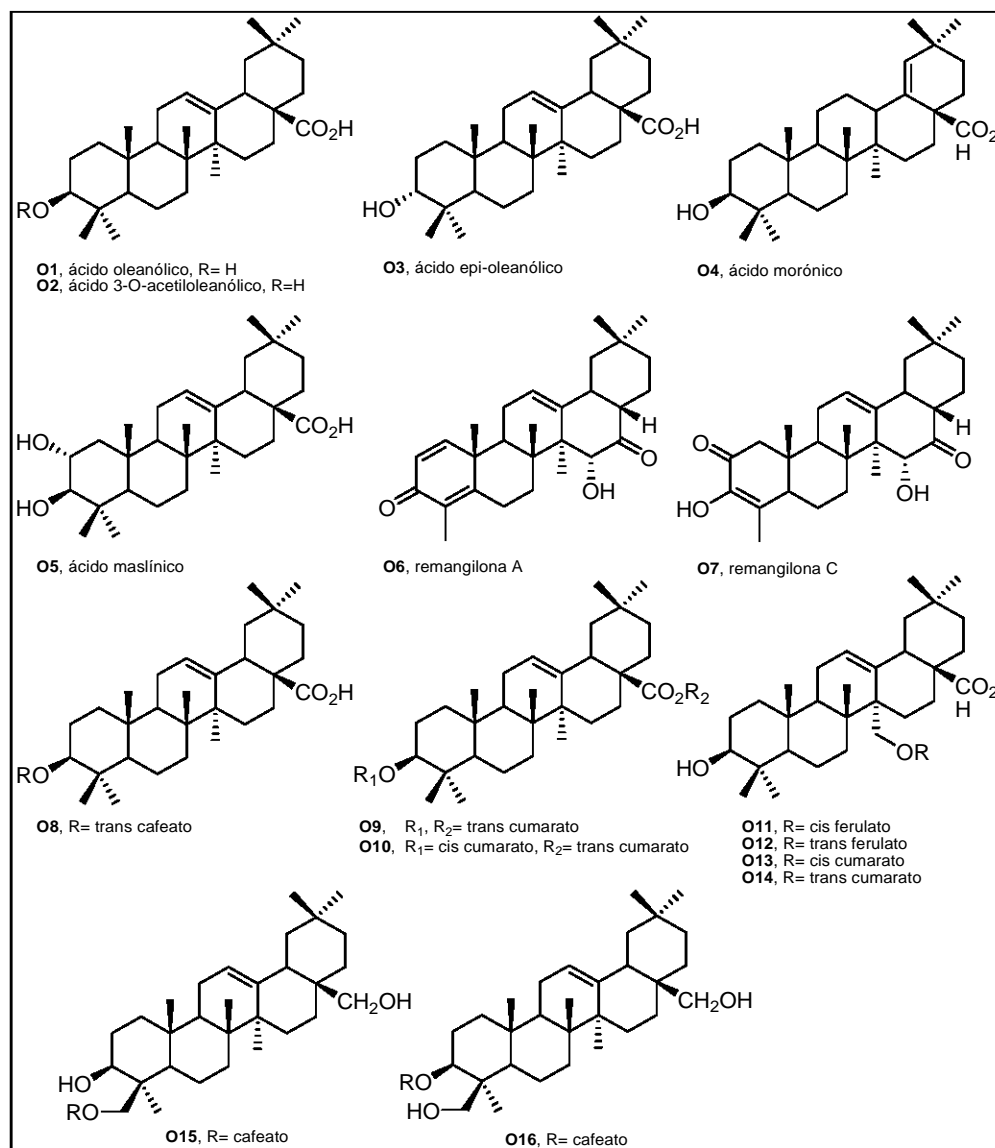
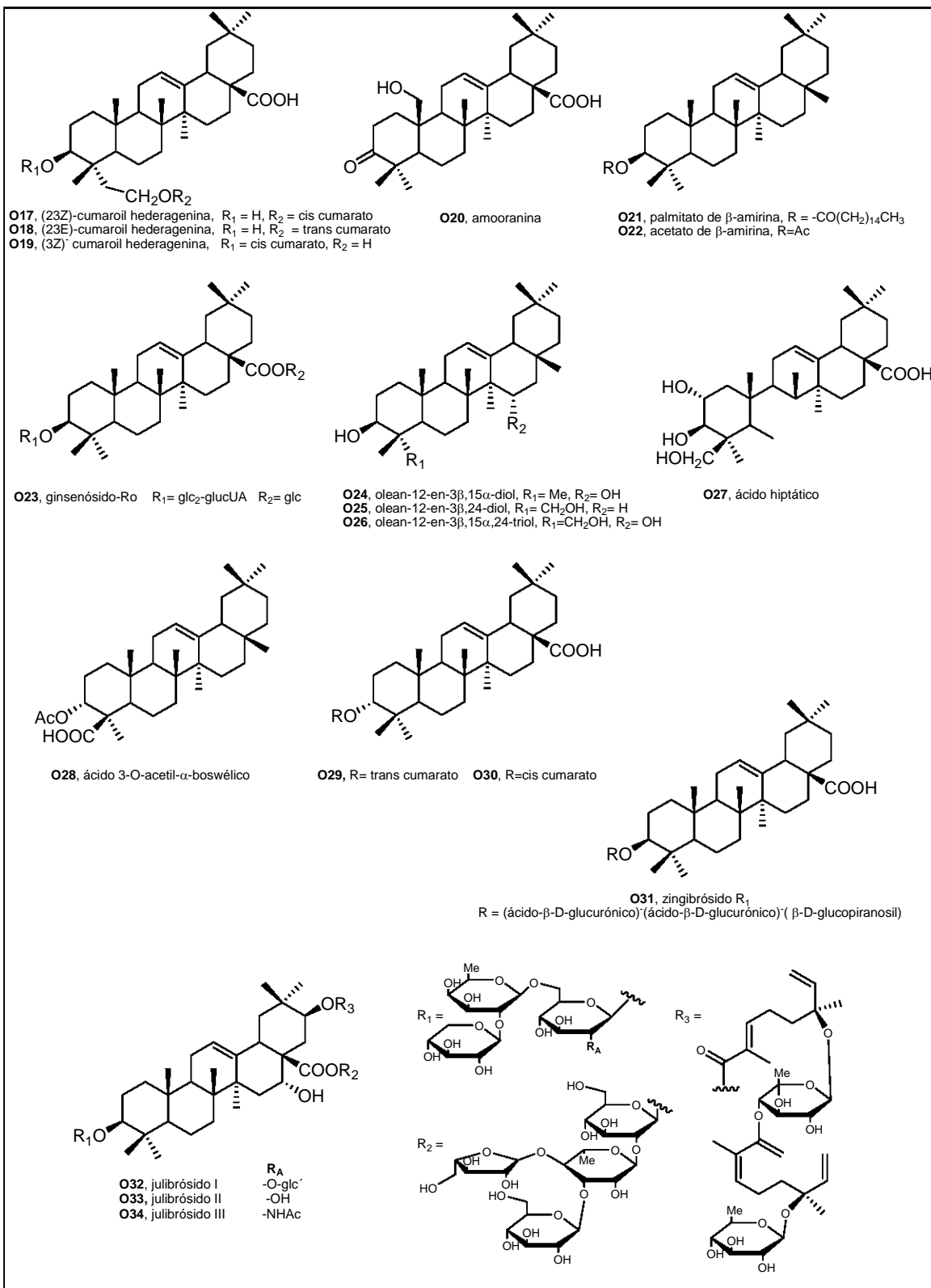


Figura 8. Algunos triterpenos del tipo oleanano con actividad anticancerosa.



Cont. Figura 8.

Cuadro 4. Actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo oleanano.

Compuesto	Cl ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
O1	35.9	A549	Kim <i>et al.</i> , 2000a.
	27.2	SK-OV-3	
	40.5	SK-MEL-3	
	26.5	HCT15	
O2	168	HepG2	Setzer <i>et al.</i> , 2000.
O3	35.7	KB	Camacho <i>et al.</i> , 2000.
	74.1	P-388	
O4	7.9	HCT-15	Ríos <i>et al.</i> , 2001.
	8.5	UIISO	
	11.6	KB	
O5	41.0	A549	Kim <i>et al.</i> , 2000a.
	38.9	SK-OV-3	
	41.9	SK-MEL-3	
	32.4	HCT15	
	>8.5	KB	Yamagishi <i>et al.</i> , 1988.
	>21.2	A549	
	>21.2	HCT-8	
	>21.2	P-388	
>21.2	L-1210		
O6	6.6	MDA-MB-231	Deng <i>et al.</i> , 1999a.
O7	1.6	MDA-MB-231	Deng <i>et al.</i> , 1999a.
O8	2.6	A549	Kim <i>et al.</i> , 2000a.
	2.6	SK-OV-3	
	2.8	SK-MEL-3	
	2.9	XF498	
	2.8	HCT15	
O9	4.91	KB	Kashiwada <i>et al.</i> , 1993.
O10	3.74	KB	Kashiwada <i>et al.</i> , 1993.
O11	2.7	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	2.1	HTC-15	
	3.9	MCF7	
	3.4	HT-1197	
O12	1.0	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	2.1	HTC-15	
	3.0	MCF7	
	5.2	HT-1197	
O13	3.0	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	1.9	HTC-15	
	1.9	MCF7	
	1.6	HT-1197	

Cont. Cuadro 4.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
O14	6.1	A549	Lee <i>et al.</i> , 2000.
	0.8	HTC-15	
	1.8	MCF7	
	3.4	HT-1197	
O15	2.9	MCF7	Yun <i>et al.</i> , 1999.
	3.5	PC-3	
	2.1	HCT-15	
O16	3.5	MCF7	Yun <i>et al.</i> , 1999.
	2.6	PC-3	
	1.3	HCT-15	
O17	1.6	KB	Chang <i>et al.</i> , 2004.
	3.6	HT29	
O18	1.3	KB	Chang <i>et al.</i> , 2004.
	2.4	HT29	
O19	1.2	KB	Chang <i>et al.</i> , 2004.
	2.1	HT29	
O20	5.31	CEM	Ramachandran <i>et al.</i> , 2003.
	10.19	CEM/VLB	
	7.70	SW620	
	12.70	SW620/Ad-300	
O21	20.1	A2780	Chaturvedula <i>et al.</i> , 2002.
O22	25.8	A2780	Chaturvedula <i>et al.</i> , 2002.
O23	125	GLC4	Atopkina <i>et al.</i> , 1999.
	172	COLO 320	
O27	>8.2	KB	Yamagishi <i>et al.</i> , 1988.
	12.1	A549	
	8.6	HCT-8	
	13.7	P-388	
	>20.5	L-1210	
O32	>4.3	KB	Ikeda <i>et al.</i> , 1997.
O33	>4.6	KB	Ikeda <i>et al.</i> , 1997.
O34	0.9	KB	Ikeda <i>et al.</i> , 1997.

Al igual que el ácido ursólico, el ácido oleanólico fué sometido a transformaciones químicas para diversos fines. Las primeras transformaciones realizadas en los años sesenta, se efectuaron con el fin de obtener agentes antiinflamatorios novedosos. Los compuestos obtenidos en tales investigaciones se patentaron en 1967 y 1976 (Hawkins, 1976; Turner y Davies, 1967). En 1984, Han y colaboradores, informaron de la síntesis de 11-oxo derivados del ácido oleanólico. Dichos derivados fueron concebidos como antiinflamatorios corticomiméticos (Han *et al.*, 1984).

Finlay y colaboradores (1997) informaron de la obtención de algunos derivados del ácido oleanólico con apertura en el anillo A. De dicha serie de compuestos, el más activo fue el ácido 5β -(1-metil-2-etil)- 10α -(3-aminopropil)-des-A-olean-12-en-28-oico (Figura 9), el cual presentó una concentración inhibitoria media de $0.7 \mu\text{M}$ contra células NRP.152 de cáncer próstata. Posteriormente, el grupo de investigación bioorgánica encabezada por el binomio Gribble y Sport lograron la síntesis y evaluación de diversos compuestos antiinflamatorios y anticancerosos a partir del ácido oleanólico (Honda *et al.*, 1997; 1998; 1999; 2000a; 2000b; 2002; Suh *et al.*, 1998; 1999). Como resultado de tales investigaciones se obtuvo el ácido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,19-dien-28-oico, conocido como CDDO (Figura 9).

El CDDO es un agente multifuncional. Dicho compuesto inhibe la proliferación de una gran cantidad de líneas celulares de cáncer humano, induce

diferenciación en células de leucemia humana y en fibroblastos murinos (Suh *et al.*, 1999), es proapoptótico (Ito *et al.*, 2000; 2001) y además, suprime la formación *de novo* de las enzimas óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Wang *et al.*, (2000) demostraron que CDDO es un agonista parcial del receptor PPAR- γ , un miembro de la superfamilia de receptores hormonales. Además, el éster metílico del CDDO es un antagonista de dicho receptor.

En un estudio diferencial efectuado en las líneas MCF-7 y MDA-MB-435, con el apoyo de microarreglos, se encontró que el CDDO reguló la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la carcinogénesis en la mama. Por lo que se postuló que esta molécula podría ser empleada para la terapia del cáncer de mama (Lapillonne *et al.*, 2003).

Con el fin de mejorar la biodisponibilidad del CDDO se generaron algunos derivados, de los cuales destaca el derivado imidazol (CDDO-Im) (Honda *et al.*, 2002). Dicho derivado inhibe la proliferación de líneas celulares de leucemia y mama en el orden de 10-30 nM. Place y colaboradores (2003) demostraron que este compuesto también es un ligando de PPAR- γ , aunque también encontraron que este compuesto induce diferenciación en células de leucemia que es independiente de la activación de PPAR- γ , lo cual sugiere su acción sobre otro blanco molecular diferente (Place *et al.*, 2003).

Estudios recientes informaron sobre la actividad sinérgica de CDDO y CDDO-Im con la familia de citocinas de la familia TGF- β (Suh *et al.*, 2003).

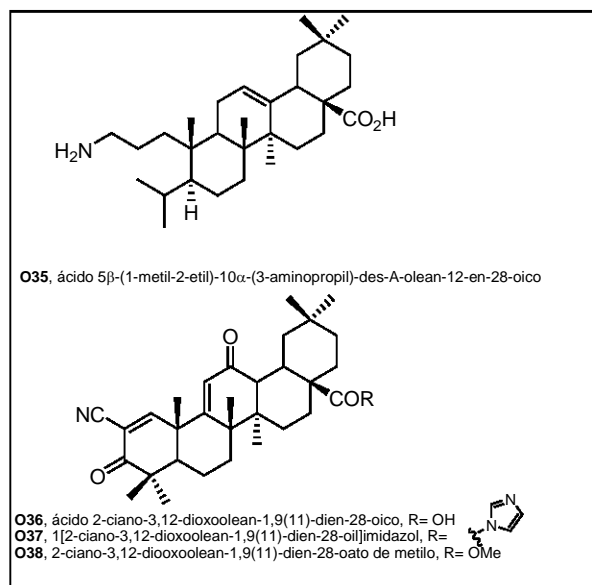


Figura 9. Derivados bioactivos del ácido oleanólico.

Otros grupos de triterpenos, especialmente importantes, son las cucurbitacinas (Figura 10) y las quinonas metilúricas (Figura 11). Las cucurbitacinas son los triterpenos citotóxicos más potentes aislados de la naturaleza (CI_{50} = 0.007 a 0.05 μ M) (Almeida *et al.*, 1992; Attard *et al.*, 2004; Konopa *et al.*, 1974a; 1974b; Le Men *et al.*, 1969; Smit *et al.*, 2000; Van dang *et al.*, 1994; Whitehouse y Doskotch, 1969; Witkowski y Konopa, 1981; Witkowski *et al.*, 1984). Los efectos antiproliferativos de este tipo de compuestos correlacionan con la desestabilización del citoesqueleto de las células de cáncer (Duncan *et al.*, 1996).

Algunos compuestos de este tipo se patentaron desde el año 2002 (Sebti y Jove, 2002).

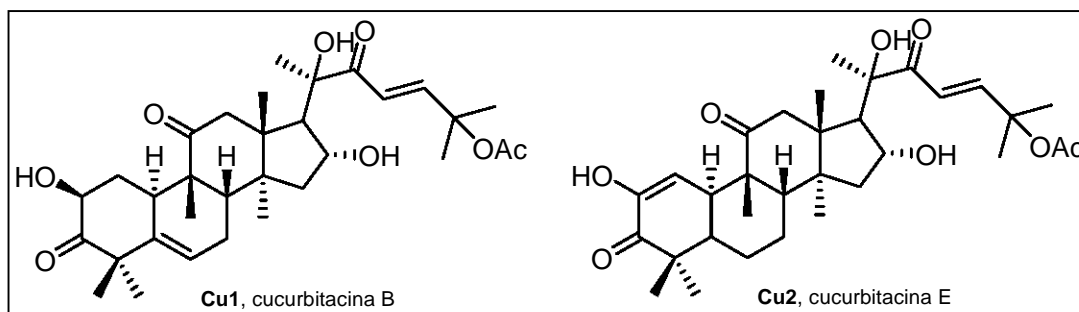


Figura 10. Algunas cucurbitacinas citotóxicas.

Por su parte, las quinonas metilúricas (*nor-friedelanos*) son potentes triterpenos cuya estructura presenta un elevado grado de insaturación (Figura 11). El tipo de estructura, así como estudios de modelado molecular sugieren que este tipo de compuestos podrían ser intercaladores del ADN y que son susceptibles a un ataque nucleofílico por las bases nitrogenadas (Setzer *et al.*, 2001). En la Figura 11 y en el Cuadro 5 se muestran las estructuras químicas y la actividad citotóxica de algunas quinonas metilúricas.

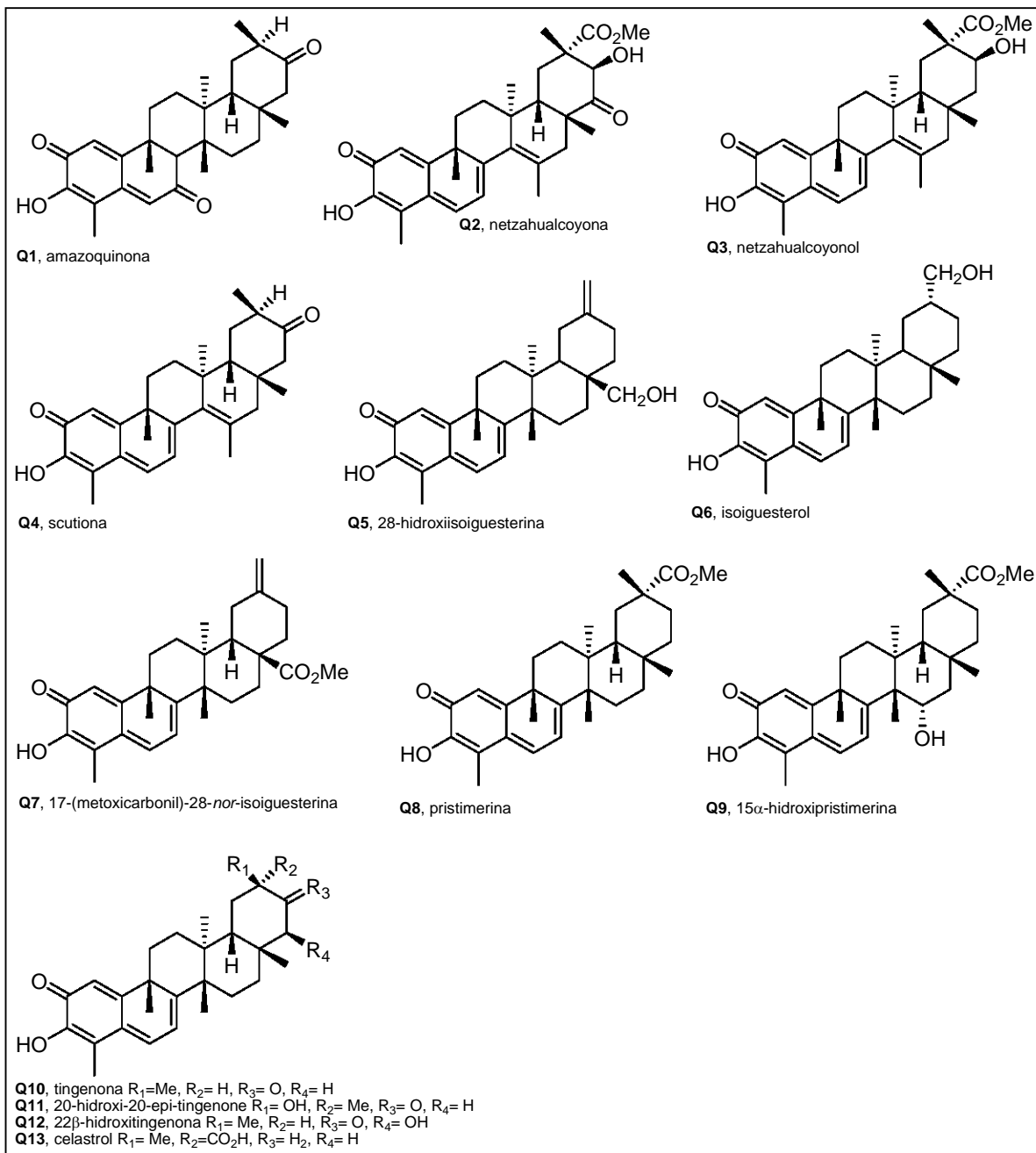


Figura 11. Algunas quinonas metilúricas bioactivas.

Cuadro 5. Actividad citotóxica de algunas quinonas metilúricas (*nor*-friedelanos).

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
Q1	5.7	P-388	Chavez <i>et al.</i> , 1999.
	11.5	A549	
	11.5	HT-29	
	11.5	MEL-28	
Q2	0.2	HeLa	Gonzalez <i>et al.</i> , 1998.
Q3	1.95	HepG2	Setzer <i>et al.</i> , 2001.
	1.23	MDA-MB-231	
Q4	11.7	HeLa	Shirota <i>et al.</i> , 1994.
	13.4	Hep2	
	17.2	Vero	
Q5	6.1	HT-29	Figueiredo <i>et al.</i> , 1998.
Q6	5.8	HT-29	Figueiredo <i>et al.</i> , 1998.
Q7	5.31	HT-29	Figueiredo <i>et al.</i> , 1998.
Q8	4.6	HT-29	Figueiredo <i>et al.</i> , 1998.
	0.65	HeLa	Gonzalez <i>et al.</i> , 1998.
	2.2	Hep-2	
	0.3	V-79	
	0.11	P388	Itokawa <i>et al.</i> , 2000.
	0.5	KB	
	1.18	KB	Shirota <i>et al.</i> , 1994.
	0.26	P388	
0.77	L-1210		
Q9	2.5	HeLa	Gonzales <i>et al.</i> , 1998.
	0.6	Hep2	
Q10	0.7	BC-1	Ngassapa <i>et al.</i> , 1994.
	1.7	HT-1080	
	1.4	LU-1	
	0.5	MEL-2	
	2.1	COL-2	
	1.2	KB	
	1.0	KB-V1(+VLB)	
	1.0	KB-V1(-VLB)	
	0.2	P-388	
	1.7	A431	
	0.5	LNCaP	
	1.4	2R-75-1	
	0.5	U373	
	0.33	L-1210	
	0.10	P-388	
0.67	KB		

Cont. Cuadro 5

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
Q11	2.1	BC-1	Ngassapa <i>et al.</i> , 1994.
	4.8	HT-1080	
	5.0	LU-1	
	3.4	MEL-2	
	13.3	COL-2	
	3.9	KB	
	7.6	KB-V1(+VLB)	
	6.9	KB-V1(-VLB)	
	4.6	P-388	
	2.5	A431	
	2.3	LNCaP	
	2.3	2R-75-1	
1.8	U373		
Q12	0.03	P-388	Shirota <i>et al.</i> , 1994.
Q13	2.9	HT-29	Figueiredo <i>et al.</i> , 1998.

Sin embargo, no todas las familias de triterpenos han sido tan estudiadas como las anteriores. Así, se han informado que algunos representantes de los farnanos, lupanos, limonoides y cicloartanos también poseen actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer.

Entre los triterpenos menos estudiados, podemos citar a los cicloartanos. Este tipo de compuestos han sido referidos como citotóxicos en estudios de cernimiento. En la Figura 12 y en el Cuadro 6 se muestran las estructuras químicas y la actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo cicloartano.

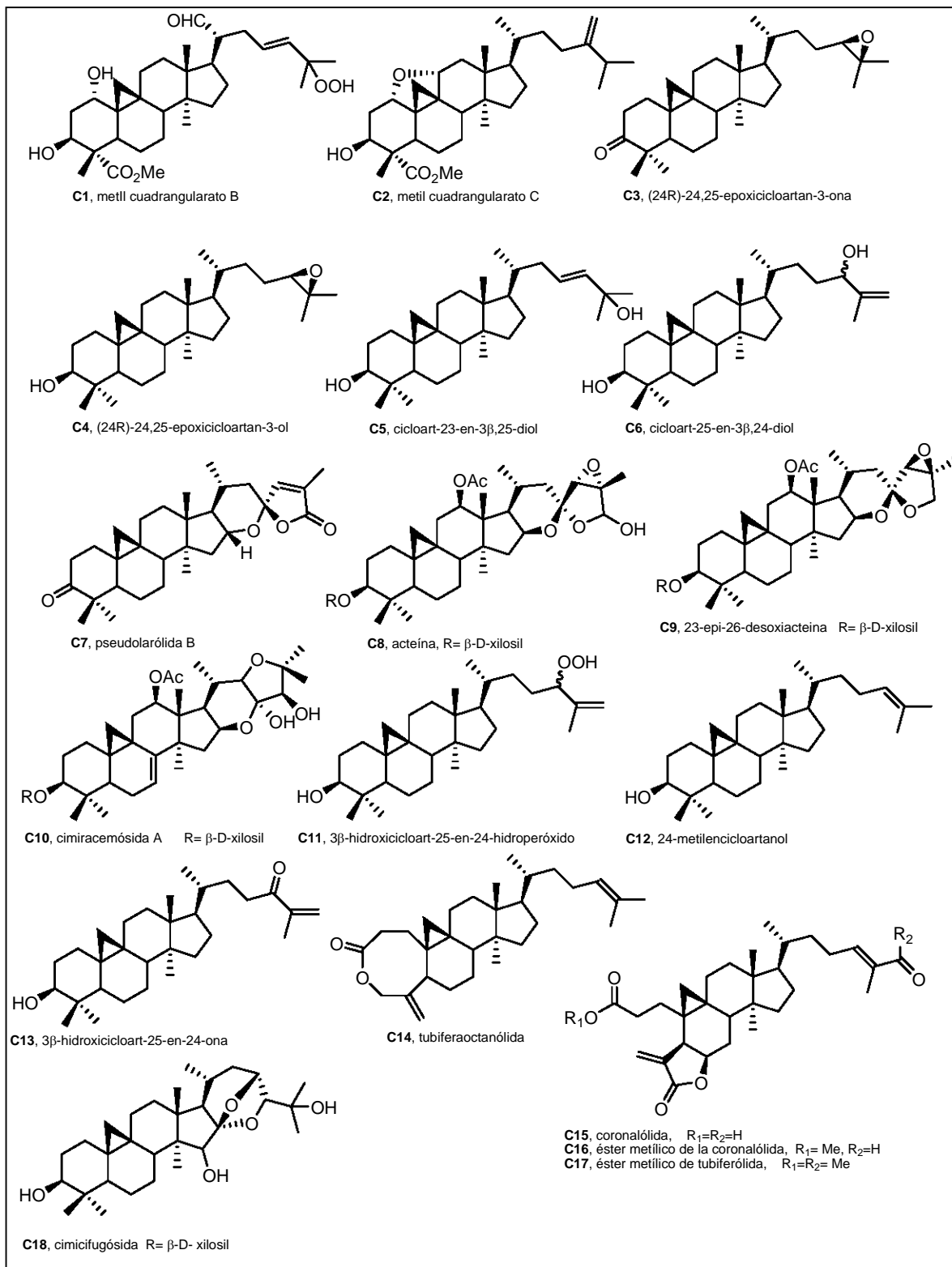
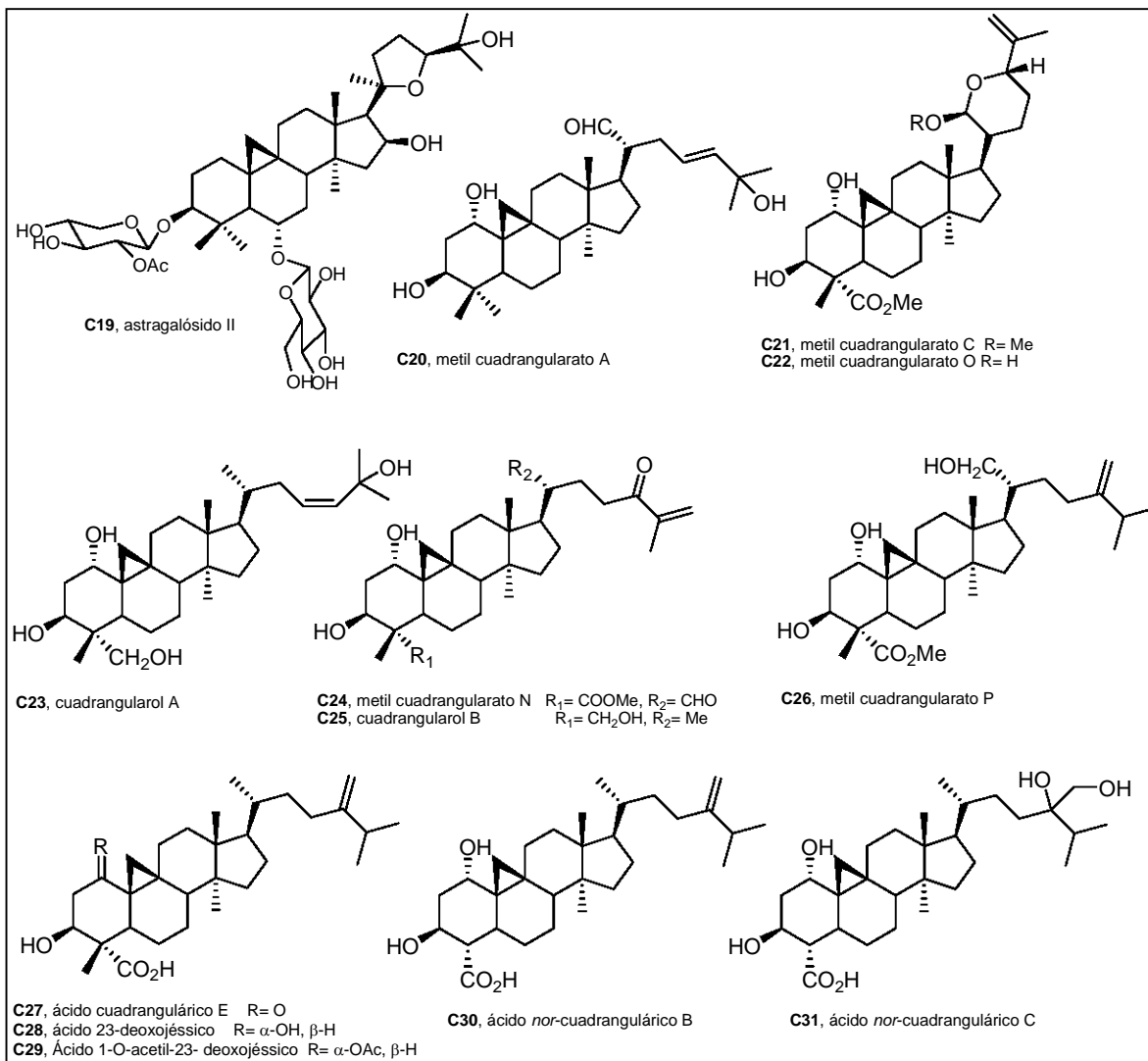


Figura 12. Algunos triterpenos del tipo cicloartano con actividad citotóxica.



Cont. Figura 12.

Cuadro 6. Actividad citotóxica de algunos triterpenos del tipo cicloartano.

Compuesto	CI ₅₀ (µM)	Linea celular	Referencia
C1	9.5	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 1998.
C2	5.4	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 1998.
C3	163	CCL-81	Cantrell <i>et al.</i> , 1996.
C4	2.9	P388	Öksüz <i>et al.</i> , 1993.
	90.1	CCL-81	Cantrell <i>et al.</i> , 1996.
C5	15.0	Erlich ascites Tumor cells	Smith-Kielland <i>et al.</i> , 1996.
C6	5.4	P388	Öksüz <i>et al.</i> , 1993
	7.5	Erlich ascites	Smith-Kielland <i>et al.</i> , 1996.
C7	1.1	KB	Chen <i>et al.</i> , 1993.
	1.4	A549	
	1.6	HCT-8	
	1.7	P-388	
C8	21	MCF-7	Einbond <i>et al.</i> , 2004.
C9	32	MCF-7	Einbond <i>et al.</i> , 2004.
C10	61	MCF-7	Einbond <i>et al.</i> , 2004.
C11	35.8	KB	Öksüz <i>et al.</i> , 1994.
C12	5.9	P388	Öksüz <i>et al.</i> , 1994.
C13	17.2	KB	Öksüz <i>et al.</i> , 1994.
	2.0	P388	
C14	>45.6	P-388	Reutrakul <i>et al.</i> , 2004.
	>45.6	KB	
	>45.6	Col-2	
	>45.6	BCA-1	
	>45.6	Lu-1	
C15	1.0	U373	Silva <i>et al.</i> , 1997.
	3.6	P-388	Reutrakul <i>et al.</i> , 2004.
	18.9	KB	
	26.1	Col-2	
	>41.4	BCA-1	
	22.4	Lu-1	
C16	1.2	ZR-75-1	Silva <i>et al.</i> , 1997.
	3.0	P-388	Reutrakul <i>et al.</i> , 2004.
	30.4	KB	
	21.5	Col-2	
	7.2	BCA-1	
	36.7	Lu-1	

Cont. Cuadro 6.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	Linea celular	Referencia
C17	1.5	P-388	Reutrakul <i>et al.</i> , 2004.
	2.5	KB	
	3.8	Col-2	
	14.0	BCA-1	
	3.2	Lu-1	
C18	35	MCF-7	Einbond <i>et al.</i> , 2004.
C20	43.8	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C21	18.9	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C22	52.6	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C23	49.7	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C24	61.4	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C25	17.6	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C26	59.7	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C27	58.6	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C28	49.6	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C29	57.7	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C30	65.9	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.
C31	>100	26-L5	Banskota <i>et al.</i> , 2000.

Sin duda, los hallazgos anteriormente descritos para algunos triterpenos hacen que este tipo de compuestos junto con otros metabolitos secundarios, se consideren como promisorios para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos. Esto, aunado a diversas propiedades benéficas de este tipo de moléculas, ocasiona que diversos grupos de investigación –con un enfoque multidisciplinario– se interesen en el estudio de los denominados *Productos Naturales*.

II. 4 DETECCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y CITOSTÁTICA.

II.4.1 Generalidades

La obtención de un fármaco, se lleva a cabo a través de distintas estrategias; como son la síntesis, la producción a partir de fuentes naturales, empleando estrategias biotecnológicas, el diseño, la modificación de fármacos ya existentes, etc. Cualquiera que sea la estrategia de obtención, se debe utilizar un bioensayo que permita la detección de un gran número de compuestos bioactivos durante el cernimiento. Un problema constante en los estudios farmacológicos es el encontrar un bioensayo adecuado para los objetivos deseados.

Una de las estrategias para la detección de compuestos bioactivos, que se emplea con mayor frecuencia, consiste en emplear un cernimiento primario y un cernimiento secundario. En el cernimiento primario se requiere de un bioensayo de gran sensibilidad que detecte una gran cantidad de moléculas potencialmente activas; mientras que, el cernimiento secundario tiene por objetivo detectar sustancias con actividad específica. Sin embargo, las estrategias de búsqueda o detección se han diversificado de acuerdo a las tecnologías con las que se cuenta y la filosofía del pensamiento del grupo de investigación.

El ejemplo más importante de investigación de nuevos agentes anticancerosos, lo constituye el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (INC). Este instituto, a través del Programa de Desarrollo Terapéutico, planea, conduce y facilita el desarrollo de agentes terapéuticos para el cáncer. El INC cuenta con una colección de compuestos superior a los 600000; de los cuales, 50000 se han obtenido de plantas superiores (Boyd y Paull, 1995; Monga y Sausville, 2002).

La estrategia de búsqueda que se emplea por el INC (Monga y Sausville, 2002), consiste en:

- 1) La evaluación preliminar de la actividad citotóxica de un compuesto de prueba, a una dosis, en tres líneas celulares de cáncer.
- 2) La evaluación de la actividad citotóxica, en 60 líneas celulares de cáncer, del compuesto de prueba en al menos cinco concentraciones diferentes. Este esquema de trabajo, permite determinar una especificidad relativa para ciertos tipos tumorales debido a la cantidad y diversidad de líneas celulares que se utilizan.
- 3) La comparación del perfil farmacológico del compuesto de prueba con el perfil mostrado por agentes antineoplásicos de mecanismo de acción conocido. Esto se realiza con el fin de postular un posible mecanismo de acción del compuesto de prueba.
- 4) La estimación de índices de eficacia mediante el ensayo "hollow fiber".
- 5) La evaluación *in vivo* mediante el uso de modelos de tumores murinos y tumores humanos transplantados en ratones desnudos.

Aunque tal estrategia posee ventajas en la búsqueda de compuestos con potencial antineoplásico, puede ser difícil de implementar en muchos centros de investigación debido a la elevada cantidad de recursos humanos y materiales necesarios (incluyendo la infraestructura).

Otra estrategia de búsqueda, consiste en el cernimiento específico de primer paso. En este tipo de estudios se buscan sustancias naturales o sintéticas que actúen en un blanco molecular específico previamente definido y el bioensayo que se utiliza para dicho cernimiento puede ser enzimático o molecular, entre otros. Un ejemplo lo constituye la búsqueda de compuestos inhibidores de las topoisomerasas (Deng *et al.*, 1999).

Por otro lado, con el advenimiento de los sistemas de microarreglos, se han propuesto algunas otras estrategias. Una de éstas, conocida como Farmacognosia Molecular, consiste en la evaluación de patrones de expresión diferencial en células, inducidos por el tratamiento con extractos o compuestos puros. Con esta aproximación se busca predecir efectos múltiples –benéficos o adversos– de una sustancia de prueba (Bruhn y Bohlin, 1997).

Pese a los esfuerzos de diversas instituciones alrededor del mundo, el descubrimiento y desarrollo de nuevos antineoplásicos continúa siendo un reto, ya que aunque se ha descubierto una gran cantidad de agentes antineoplásicos potenciales; la quimioterapia del cáncer sigue presentando los mismos problemas que fueron descritos por Goodman, Gilman y Farber, tales como la resistencia (Chabner y Roberts, 2005).

Por lo anterior y dado que la quimioterapia sistémica continúa siendo uno de los principales métodos de tratamiento, existe una clara necesidad de descubrir o diseñar nuevos agentes, así como estrategias de cernimiento más accesibles, sensibles e informativas.

II.4.2 El cultivo de linfocitos en la detección de sustancias citotóxicas y citostáticas.

El cultivo de linfocitos humanos constituye una valiosa herramienta para el estudio de los efectos genotóxicos de compuestos químicos y de la radiación (Albertini *et al.*, 1980; Obe y Beek, 1984; Ostrosky *et al.*, 1987; Rojas *et al.*, 1992)

Algunos estudios demuestran que, además de los efectos genotóxicos, es posible determinar cambios en la proliferación celular de los linfocitos de diferentes especies, como resultado de la exposición *in vivo* o *in vitro* a algunos agentes xenobióticos, incluyendo los fármacos. Tomando en cuenta lo anterior, en 1993, Rojas y colaboradores, propusieron emplear el cultivo de linfocitos como sistema de prueba, para la detección de actividad antineoplásica. Así, se encontró que el uso de este sistema de evaluación constituía un buen método para el cernimiento primario de potenciales agentes antineoplásicos.

Por otro lado, se conoce que la mayoría de los agentes antineoplásicos empleados comúnmente en la clínica, poseen efectos genotóxicos. Por esta razón, resulta importante evaluar la genotoxicidad de cualquier compuesto con potencial antineoplásico.

Existen diversos métodos que pueden ser utilizados para evaluar los posibles efectos genotóxicos de una sustancia de prueba. Uno de los más empleados en la actualidad, debido a su especificidad, sensibilidad y sencillez, es la determinación de la frecuencia de células con micronúcleos. Esta determinación se puede realizar en células procedentes de un organismo o de cultivos de células que se han expuesto *in vitro* a una sustancia de prueba (Fenech, 2000).

Los micronúcleos son biomarcadores de daño al DNA que representan rompimientos cromosómicos y/o la pérdida de cromosomas completos provenientes de eventos espontáneos, o como resultado de la exposición a agentes xenobióticos (Fenech, 2000).

El uso de los micronúcleos como marcadores de daño cromosómico en linfocitos humanos se propuso en estudios paralelos de Schmid y Heddle (Heddel, 1973; Schmid, 1975). Posteriormente, en 1985, Fenech y Morley mejoraron la técnica con la introducción de la citocalasina B (Cyt B) como agente inhibidor de la citocinesis (Fenech y Morley, 1985a; 1985b). El bloqueo de la citocinesis, permitió diferenciar, de manera sencilla, las células que no se habían dividido (células mononucleadas), de las que se habían dividido una vez (células binucleadas) y de las que lo habían hecho más veces (células polinucleadas) durante el tiempo de cultivo.

Debido a que el bloqueo de la citocinesis no afecta la cariocinesis fue posible determinar, además de los efectos genotóxicos, un índice de proliferación

conocido como *Índice de División Nuclear* (IDN). Posteriormente, este parámetro se propuso como un indicador de proliferación celular y como una herramienta para el estudio de la actividad citostática de un compuesto de prueba (Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 1997).

El IDN se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{CMN} + 2 (\text{CBN}) + 3 (\text{CPN})] / \text{N}$$

Donde: CMN, CBN y CPN corresponde a la frecuencia de células mono-, bi- y polinucleadas en un total de 200 células y; N representa el número total de células contadas (Figura 13).

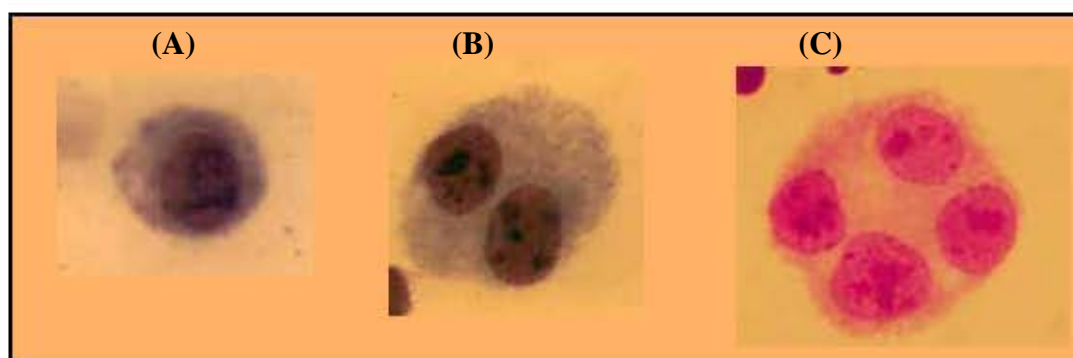


Figura 13. Microfotografía de células (A) mononucleadas, (B) binucleadas y (C) polinucleadas típicas.

La determinación de la frecuencia de micronúcleos requiere de la observación microscópica de CBN –en laminillas preparadas a partir de cultivos de células tratadas con el compuesto de interés–. La evaluación de la frecuencia de

MN se realiza analizando 1000 CBN. Los criterios de identificación de CBN y MN en CBN se describen a continuación.

Criterios de identificación de Células Binucleadas

- La célula debe ser binucleada, es decir presentar dos núcleos redondos u ovals, mantener su membrana casi intacta y distinguible de células adyacentes.
- Los núcleos deben estar separados, ser de tamaño similar y presentar un patrón de tinción similar.
- Los núcleos pueden estar muy juntos o incluso parcialmente traslapados, pero la membrana nuclear debe distinguirse.
- Ambos núcleos pueden encontrarse unidos por puentes nucleoplásmicos que no excedan $\frac{1}{4}$ del diámetro nuclear.

Criterios de identificación de micronúcleos

- Son cuerpos de forma redonda u oval.
- Su diámetro varía entre $\frac{1}{16}$ a $\frac{1}{3}$ del núcleo principal en una célula mononucleada ó $\frac{1}{25}$ a $\frac{1}{9}$ del diámetro de un núcleo en una célula binucleada.
- Debe estar separado de los núcleos principales sin traslapamiento.
- No debe ser refringente.

- Debe presentar las mismas características tintoriales del núcleo principal (aunque en ocasiones puede presentarse más intenso).
- Debe presentar la misma condensación de cromatina que los núcleos principales.



Figura 14. Célula binucleada con micronúcleo.

Para el análisis de la frecuencia de micronúcleos no se toman en cuenta:

- a) células trinucleadas, tetranucleadas, o polinucleadas.
- b) células donde el (los) núcleo(s) principal(es) se observen en apoptosis.

El ensayo de micronúcleos con el bloqueo de la citocinesis presenta muchas ventajas sobre otras técnicas, ya que no requiere de preparaciones de células en metafase, puede aplicarse a células en interfase (con la estimulación por medio de un mitógeno), no es invasivo, su costo es bajo y es relativamente más fácil de realizar que un ensayo de aberraciones cromosómicas; además, puede emplearse

en combinación con otras técnicas para discriminar entre eventos clastogénicos y aneugénicos. Entre estas técnicas se encuentran el marcaje CREST –que emplea anticuerpos anticinetocoro provenientes del suero de pacientes con una enfermedad autoinmune– y la técnica FISH con sondas centroméricas o teloméricas (Olaharsky *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2005).

II.5 *Parthenium argentatum* (GUAYULE)

P. argentatum es un arbusto que crece en las zonas áridas del norte de México y del sur de los Estados Unidos de América. Este arbusto es conocido con el nombre de “guayule”, que significa “planta que contiene hule” (Figura 15). A pesar de que dicha característica ya se conocía con anterioridad, no fue sino hasta 1852 que fue clasificado por Assa Gray, quien presentó tales características en la exposición del centenario de la independencia de los Estados Unidos de América (Velázquez *et al.*, 1981).



Figura 15. Arbusto de *Parthenium argentatum* Gray.

El guayule, se explotó comercialmente –por su contenido de hule– desde inicios del siglo pasado (1903-1951). El aprovechamiento industrial de esta especie alcanzó su auge durante la segunda guerra mundial; auge que decayó a la llegada del hule producido sintéticamente.

En nuestro país, los estudios sobre *P. argentatum* se iniciaron en forma sistemática en 1970. Dichos estudios condujeron a la creación de una planta piloto que inicia sus operaciones en 1976. Desafortunadamente, debido a la crisis financiera, esta planta piloto cierra sus operaciones en 1981 (Campos-López *et al.*, 1979).

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

El estudio sistemático de la resina del guayule reveló la presencia de compuestos aromáticos, terpenos y ácidos grasos (Campos-López *et al.*, 1981; Domínguez, 1981). Además, se encontró que la resina estaba constituida por una gran cantidad de compuestos triterpénicos, de tipo cicloartano y lanostano (Rodríguez-Hanh *et al.*, 1970). Estos compuestos constituían cerca del 55% de los componentes totales; de los cuales, el 27% lo representaban las argentatinas A, B y C (Schloman *et al.*, 1983). Resulta interesante mencionar que, hasta la fecha no se han aislado lactonas sesquiterpénicas.

Los ésteres cinamato y p-anisato de un alcohol derivado del germacrano, denominados guayulinas A y B, respectivamente, se aislaron por primera vez de un extracto de la planta *P. argentatum* (Romo *et al.*, 1970). Sin embargo, estos

compuestos también se han aislado de la resina junto con otras guayulinas (Schloman *et al.*, 1983).

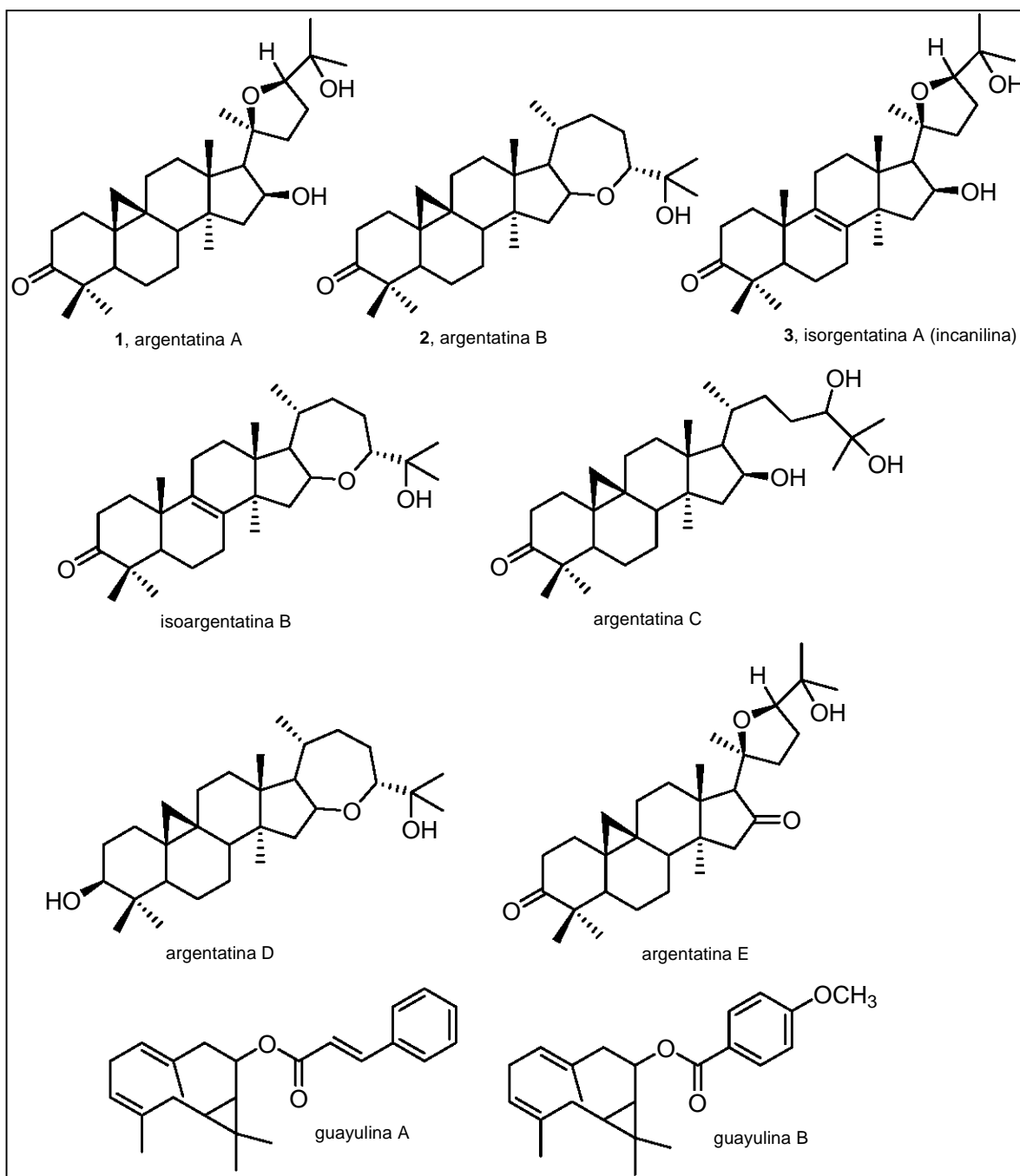


Figura 16. Algunos componentes de la resina obtenida a partir de *Parthenium argentatum*.

Desde el punto de vista biológico, nuestro grupo de trabajo demostró que la argentatina A (**1**) posee propiedades antimicrobianas (Martínez-Vázquez *et al.*, 1994) y que la argentatina B (**2**) es un inhibidor no-competitivo de la unión de ^3H -estradiol a su receptor en tumores de mama humanos dependientes de hormonas (Calzada *et al.*, 1995). Además, se demostró que **1** y **2** son capaces de disminuir de manera dependiente de la dosis el edema inducido por el promotor de tumores 13- acetato-12-O-decanoil forbol (TPA) en el modelo de inflamación de la oreja de ratón (Pineda, 1999).

III. HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes de la literatura es factible suponer que las argentatinas A y B poseen propiedades citotóxicas y citostáticas. Por lo que las transformaciones químicas de dichos triterpenos permitirán el establecimiento de relaciones estructura-actividad, así como la obtención de compuestos de mayor potencia farmacológica y menos efectos adversos.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de las argentatinas A y B para la obtención de nuevos agentes citotóxicos por medio de la evaluación de algunas de sus propiedades biológicas, así como el establecimiento de relaciones entre la estructura química y la actividad citotóxica de una serie de derivados químicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar e identificar las argentatinas A y B a partir de la resina obtenida como subproducto durante el proceso de obtención del hule a partir de la especie *Parthenium argentatum* (Gray).
2. Determinar el efecto de las argentatinas A y B en la proliferación de líneas celulares de cáncer humano.
3. Determinar los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de los compuestos bajo estudio en linfocitos humanos en proliferación tratados *in vitro*.

4. Obtener mediante transformaciones químicas derivados de las argentatinas A y B que inhiban de manera más eficiente la proliferación de líneas celulares de cáncer humano.

5. Determinar las características estructurales que son importantes en la actividad biológica de los triterpenos en estudio, por medio del establecimiento de relaciones estructura actividad.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1 ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

En la Figura 17, se ilustra la estrategia experimental que se siguió para lograr los objetivos planteados.

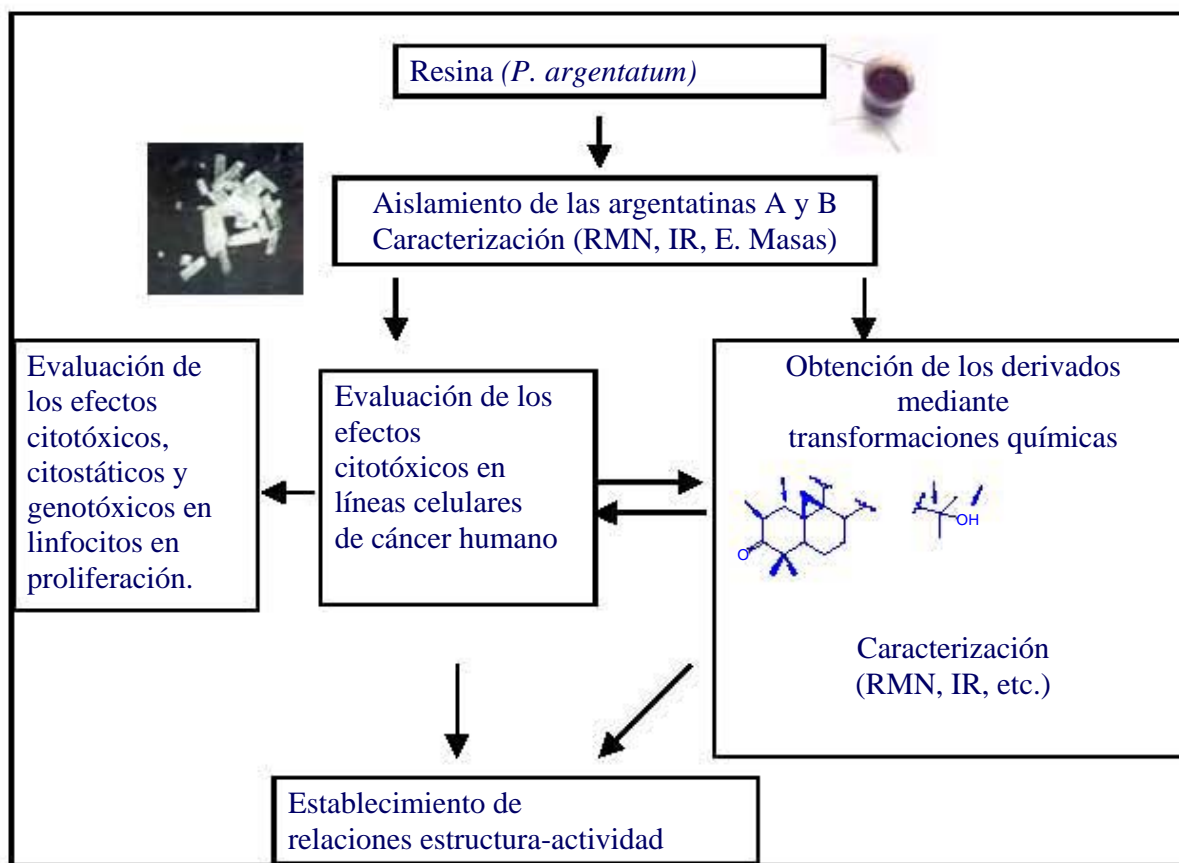


Figura 17. Estrategia experimental de trabajo.

V. 2 PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS GENERALES

Para los procedimientos de extracción se utilizaron disolventes grado industrial, destilados en el laboratorio. Los disolventes y reactivos empleados para efectuar la purificación, el análisis y las reacciones fueron de grado reactivo analítico (Sigma).

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) y en capa preparativa (CCP) se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, empleando placas de vidrio de 20 x 20 cm² recubiertas con gel de sílice F₂₅₄ de 0.2 y 2 mm de espesor respectivamente (Merck).

Los procedimientos de cromatografía en columna abierta se efectuaron en columnas de vidrio de diferentes capacidades y se emplearon tonsil y gel de sílice F₂₅₄ como adsorbentes. El revelado se realizó con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (350 nm), y con una solución de sulfato cérico.

Los puntos de fusión de cada compuesto en estudio se determinaron en un equipo Fisher Johns y no fueron corregidos. Los espectros de Infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se adquirieron a 200 ó 300 MHz y 50 ó 75.5 MHz, respectivamente, en los equipos Varian-Gemini 200, Unity 300, Eclipse 300, Jeol o Bruker-Avance 300. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm () y las constantes de

acoplamiento (J) se informaron en Hz. El tetrametilsilicio (TMS) se empleó como referencia interna. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas Jeol AH505HR. Los estudios de difracción de rayos X de algunos de los triterpenos se llevaron a cabo en los difractómetros Nicolet P3 ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) y Bruker Smart APEX ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Los datos cristalográficos se depositaron en el Centro Cambridge de Datos Cristalográficos (CCDC) y pueden ser solicitados al director (The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax: +44 (1223) 336-033) o por correo electrónico a la dirección deposit@ccdc.cam.ac.uk.

V.3 RESINA

La resina, un subproducto que es obtenido durante el proceso de industrialización de la especie *Parthenium argentatum* (Gray), fue amablemente donada por la Comisión Nacional de Zonas Áridas (CONAZA) ubicada en Saltillo, Coahuila.

V.4 AISLAMIENTO DE LAS ARGENTATINAS A Y B

157.39 g de resina se disolvieron en 100 ml de hexano y se percolaron a través de una columna empacada con tonsil, la cual fue posteriormente eluida con disolventes de polaridad ascendente hexano, AcOEt y MeOH. Las primeras cinco fracciones de 100 ml se reunieron y cromatografiaron empleando gel de sílice como adsorbente y mezclas de Hex-AcOEt como eluyentes (de 0 a 100% de

AcOEt). A partir de las fracciones eluidas con hexano se aislaron 8.7 gramos de argentatina B (**2**, (16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona), la cual se purificó por recristalización con hexano y AcOEt. Por otro lado, a partir de la reunión de las fracciones eluidas con una mezcla 1:1 de hexano/AcOEt se aislaron 4.2 gramos de argentatina A (**1**, (16*S*, 17*R*, 20*S*, 24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona) y 0.2 gramos de isoargentatina A (incanilina).

La caracterización de los tres triterpenos aislados se efectuó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las previamente informadas en la literatura (Rodríguez-Hanh *et al.*, 1970; Komoroski *et al.*, 1986; Martínez *et al.*, 1990). Además, se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos X de la argentatina B (**2**, CCDC 258725) y de la isoargentatina A. La información cristalográfica se encuentra en el Cuadro 7.

Siguiendo el proceso informado en la literatura y de manera paralela al estudio de la resina, se aislaron las argentatinas A y B, así como la isoargentatina A, a partir de especímenes recolectados en San Luis Potosí, S. L. P. de *P. argentatum* (Gray) (Matsubara y Romo de Vivar, 1986).

Cuadro 7. Información cristalográfica de la argentatina B [2] e incanilina [3].

Compuesto	2	3
Fórmula empírica	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
Peso Molecular	456.68	472.68
Sistema cristalino	Ortorrómbico	Ortorrómbico
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C 2 2 2 ₁
Dimensiones de la celda unitaria		
A	6.3338 (6) Å	13.9158 (7)
B	14.049 (1) Å	14.8078 (8)
C	30.046 (3) Å	26.3807 (14)
Volumen [Å ³]	2673.7 (4)	5436.1 (5)
Z	4	8
Densidad (calculada) [g/cm ³]	1.135	1.155
Coefficiente de absorción [mm ⁻¹]	0.071	0.074
F (000)	1008	2080
Rango θ para la colección de datos [°]	1.98 a 25.00	2.2 a 31.0
Rangos	-7 ≤ h ≤ 7 -16 ≤ k ≤ 16 -35 ≤ l ≤ 35	-16 ≤ h ≤ 16 -17 ≤ k ≤ 17 -31 ≤ l ≤ 31
% a $\theta = 25.00^\circ$	99.9	100.0
Datos/ restricciones/ parametros	4731/ 0/ 308	4785/1/325
F ²	0.819	0.993
Indices Finales R [I > 2 σ (I)]	R1= 0.0451, wR2= 0.0472	R1= 0.0465, wR2= 0.0845
Indices R (todos los datos)	R1= 0.1101, wR2= 0.0547	R1= 0.0652, wR2= 0.0893
Parámetro estructural absoluto	1.5 (14)	NA
LDPH [e. Å ³]	0.140 y -0.101	0.139 y -0.135

V.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS ARGENTATINAS A Y B EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO

V.5.1 Compuestos de prueba

Con el fin de determinar la ventana farmacológica, las argentatinas A y B se evaluaron de manera preliminar a la concentración de 50 μM . Las curvas concentración-respuesta y la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en cada línea celular de cáncer humano probada se obtuvieron evaluando las argentatinas A y B a siete concentraciones diferentes en un rango de 1 a 100 μM .

Los compuestos disueltos en dimetilsulfóxido (20 mM) se diluyeron en medio de cultivo hasta obtener las disoluciones adecuadas para el estudio. La doxorubicina se empleó como control positivo a cinco concentraciones en un rango de 0.01 a 5 μM .

V.5.2 Líneas celulares

Las cinco líneas celulares de cáncer humano que se utilizaron fueron: PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), K562 (leucemia), U251 (SNC) y HCT-15 (cáncer de colon).

Cada línea celular fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 IU/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y aminoácidos no esenciales (1%). Los cultivos se incubaron a 37 °C, humedad del 95%, en una atmósfera con un 5% de CO₂.

V.5.3 Evaluación

Posterior al cultivo, las células adherentes fueron separadas por procedimientos convencionales con una solución de tripsina-EDTA para obtener suspensiones celulares. La cantidad de células viables de cada línea celular se determinó empleando el método de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro.

En una placa de Elisa de 96 pozos se colocaron de 5 000 a 10 000 células viables (dependiendo de la línea celular) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con los compuestos de prueba e incubadas durante 48 horas. Posteriormente, las células se fijaron *in situ* por adición de 50 µl de una solución fría de ácido tricloroacético al 50% p/v. Después, las células ya fijas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de sulforrodamina B al 0.4% (SRB). Transcurrido el tiempo, se eliminó el exceso de solución colorida en las placas de Elisa y se efectuaron lavados con ácido acético al 1%. Las placas se secaron a temperatura ambiente.

Los complejos proteína-SRB se disolvieron en una solución amortiguadora Tris (tris[hidroximetil] aminometano). La densidad óptica de las soluciones en cada pozo se determinó en un lector de Elisa a 515 nm.

V.6 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, CITOSTÁTICOS Y GENOTÓXICOS DE LAS ARGENTATINAS A Y B EN LINFOCITOS HUMANOS

V.6.1 Compuestos de prueba

Se prepararon dos disoluciones concentradas de 1 y 10 mM de las argentatinas A y B en DMSO que se emplearon para llevar a cabo los tratamientos correspondientes (Cuadro 8).

V.6.2 Donadores

Se obtuvieron muestras sanguíneas de seis individuos sanos (3 hombres y 3 mujeres) con una edad promedio de 25 años, que no estuvieran bajo ningún régimen medicamentoso, así como que no hubieran cursando por algún cuadro sintomático previo o durante la semana de muestreo.

V.6.3 Efecto citotóxicos

Se evaluó el efecto citotóxico de las argentatinas A y B mediante una técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de fluoresceína-Bromuro de etidio (FDA-BrEt). Para realizar los experimentos de cada compuesto se empleó la

sangre de 3 donadores realizando 3 experimentos independientes por duplicado de cada donador.

En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 912.5 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y L-glutamina (Sigma), 62.5 μ l sangre entera y 25 μ L de fitohemaglutinina (Gibco). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo cada cultivo se trató de acuerdo al esquema que se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Esquema de tratamiento de los linfocitos con las argentatinas A y B.

GRUPO	TRATAMIENTO		
	Vehículo	Compuesto de prueba*	MMC
Control	----	----	----
DMSO	< 0.5%	----	----
Arg5	----	5 μ M	----
Arg15	----	15 μ M	----
Arg25	----	25 μ M	----
MMC	----	----	1 μ M

*concentración final en el volumen de cultivo, MMC= mitomicina C

Después de aplicado el tratamiento, los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h más. Transcurridas las 24 h los tubos se centrifugaron, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular. Posteriormente se tomaron 25 μ L de la suspensión celular y se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo en el que se adicionaron 25 μ L de la solución de tinción de FDA-BrEt. Se homogeneizó el contenido del tubo, se tomaron 25 μ L de la suspensión y se depositaron en

portaobjetos limpios; posteriormente se les colocó un cubreobjetos y se evaluaron al microscopio. Para evaluar la citotoxicidad se determinó la frecuencia de células vivas (verdes) y muertas (rojas) en 200 células para obtener el porcentaje de viabilidad.

V. 6.4 Efectos citostáticos

Para determinar el posible efecto citostático de las argentatinas A y B se empleó la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. Para la evaluación de la argentatina A se empleó la sangre de 3 donadores, dos hombres y una mujer; mientras que para la argentatina B se empleó la sangre de dos mujeres y un hombre. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado de cada donador para cada compuesto.

En tubos Falcon de 15 ml se colocaron 6.3 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y L-Glutamina (Sigma), 0.5 ml sangre entera y 0.2 ml de fitohemaglutinina (Gibco). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos se trataron de acuerdo al esquema que se muestra en el Cuadro 8.

Después de la aplicación del tratamiento, se adicionó el agente inhibidor de citocinesis citocalasina-B (Sigma) hasta una concentración final de 6 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos se homogeneizaron y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h más.

Posterior a la incubación, los paquetes celulares se resuspendieron y se transfirieron a tubos de vidrio donde fueron prefijados con 600 μL de una disolución fijadora de metanol/ ácido acético (3:1). Los tubos se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos y después se descartó el sobrenadante. Los paquetes celulares se resuspendieron y fijaron con la disolución fijadora. Se realizaron lavados con la misma disolución hasta obtener un botón celular limpio, el cual se resuspendió en 0.2 ml de fijador y se goteó cuidadosamente en portaobjetos fríos bañados en agua y se dejaron secar al aire. Finalmente, las preparaciones se tiñeron siguiendo la técnica de Giemsa, y se evaluaron al microscopio.

Para realizar la evaluación del efecto citostático se determinó la frecuencia de células mono- , bi- y polinucleadas en 200 células por laminilla y se calculó el Índice de División Nuclear (IDN).

$$\text{IDN} = [\text{CMN} + 2 (\text{CBN}) + 3 (\text{CPN})] / 200$$

V.6.5 Efectos genotóxicos

La evaluación de los efectos genotóxicos de las argentatinas A y B se efectuó al microscopio empleando las mismas preparaciones donde se evaluó el efecto citostático. Se analizó la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos en un total de 1000 células binucleadas por laminilla.

V.6.6 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para determinar la diferencia entre los grupos control (DMSO) y los grupos tratados. Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

V.7 TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LAS ARGENTATINAS A Y B

V.7.1 Argentatina A

A partir de la argentatina A se obtuvieron 9 derivados. Las transformaciones correspondientes se describen a continuación.

V.7.1.1 2 α -Bromo-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1a].

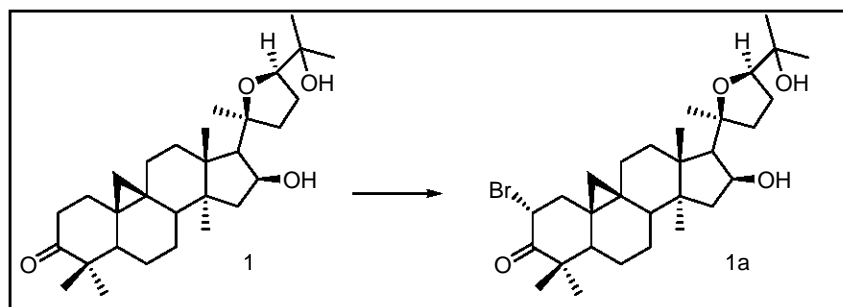


Figura 18. Obtención de la 2 α -Bromo-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1a].

100 mg de argentatina A se disolvieron en 5 ml de ácido acético glacial y se hicieron reaccionar con 0.4 ml de una disolución 1M de bromo en ácido acético. La reacción se llevó a cabo en agitación a 3 °C. Después de 1.25 h, la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo. Se observó la presencia de un precipitado abundante, el cual se lavó con una

disolución 5% NaHCO₃ y, posteriormente, se recristalizó para obtener el producto **1a**, (94%), p. f. 116-118°C. IR (película) ν_{\max} cm⁻¹: 3380.48 (O-H), 2972.39-2872.9 (C-H), 1721.94 (C=O), 1463.42, 1382.14. EM-IE m/z (%): 550 (M⁺, 0.77), 498 (15), 496 (15), 351 (5), 349 (5), 143 (100), 125 (30), 107 (31), 81 (20), 71 (32), 43 (30). RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.60 (d, $J=4.3$, 1H, H-19), 0.73 (d, $J=4.3$, 1H, H-19'), 0.89 (s, 3H, CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 6H, 2CH₃), 1.25 (s, 3H, CH₃), 1.29 (s, 3H, CH₃), 2.70 (sa, 2H, 2 O-H), 3.86 (t, $J=7.7$, 1H, H-24), 4.63 (m, 1H, H-16), 5.11 (dd, $J=6.5$, $J=12.8$, 1H, H-2 β). RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 32.9 (C-1), 37.6 (C-2), 201.4 (C-3), 50.9 (C-4), 47.7 (C-5), 21.01 (C-6), 25.6 (C-7), 43.5 (C-8), 20.8 (C-9), 25.9 (C-10), 26.6 (C-11), 31.8 (C-12), 46.2 (C-13), 46.5 (C-14), 48.3 (C-15), 73.2 (C-16), 55.4 (C-17), 21.6 (C-18), 30.2 (C-19), 87.0 (C-20), 21.1 (C-21), 37.3 (C-22), 27.3 (C-23), 84.5 (C-24), 70.9 (C-25), 27.3 (C-26), 26.1 (C-27), 20.4 (C-28), 20.7 (C-29), 21.0 (C-30).

V.7.1.2 (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-1-en-3-ona [**1b**].

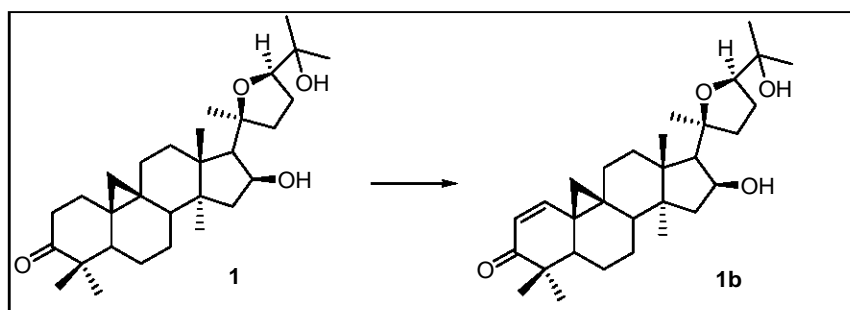


Figura 19. Obtención de la (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-1-en-3-ona [**1b**].

Una disolución de argentatina A (200 mg) y cloruro de fenilselenio (120 mg) en AcOEt (4.6 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después, se agregó 1 ml de agua a la mezcla de reacción en agitación. La fase acuosa se eliminó y se agregaron 2 ml de THF y 0.2 ml de H₂O₂ al 30% a la fase orgánica. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con una disolución de carbonato de sodio al 10% (3x, 20 ml) y después con agua (3 x 20 ml). A continuación, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para dar un sólido impuro. Dicho sólido se purificó por recristalizaciones sucesivas (Hex, AcOEt), para obtener 140 mg (70%) de la (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-1-en-3-ona. Sólido cristalino, p. f. 196-198 °C. IR (Película)_{v_{max}} cm⁻¹: 3380.47 (O-H), 2967.73, 2873.35, 1667.21 (C=O), 1463.32, 1379.72. EM-IE m/z (%): 470 (M⁺, 1), 452 (12), 434 (7), 411 (2), 143 (100), 125 (25), 107 (10), 59 (10). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.81 (d, *J*=4.6, 1H, H-19), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃), 3.86 (t, *J*= 7.6, 1H, H-24), 4.61 (m, 1H, H-16), 5.94 (d, *J*= 10.0, 1H, H-2), 6.77 (d, *J*=10.0, 1H, H-1). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ ppm: 153.7 (C-1), 126.7 (C-2), 205.1 (C-3), 47.0 (C-4), 44.9 (C-5), 19.7 (C-6), 27.6 (C-7), 44.5 (C-8), 24.1 (C-9), 29.9 (C-10), 24.0 (C-11), 32.8 (C-12), 46.1 (C-13), 46.3 (C-14), 47.6 (C-15), 73.2 (C-16), 55.5 (C-17), 21.5 (C-18), 30.8 (C-19), 87.2 (C-20), 25.5 (C-21), 37.5 (C-22), 23.8 (C-23), 84.5 (C-24), 70.9 (C-25), 27.3 (C-26), 26.1 (C-27), 19.8 (C-28), 20.1 (C-29), 19.1 (C-30).

V.7.1.3 16,25-diacetil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,24-dihidroxicicloart-1-en-3-ona [**1c**].

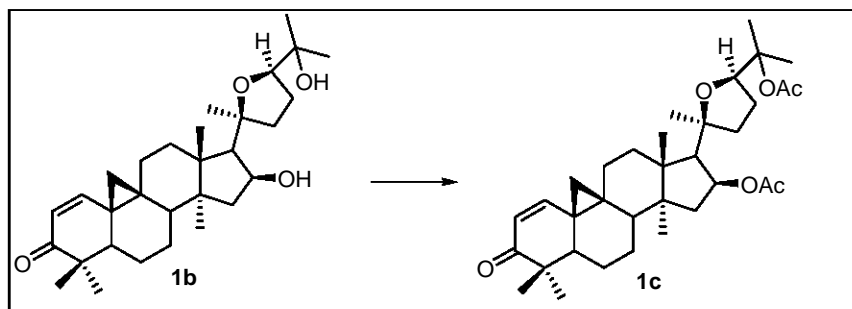


Figura 20. Obtención de la 16,25-diacetil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-1-en-3-ona [**1c**].

Una mezcla de 25.5 mg de (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-1-en-3-ona [**1b**], 21 mg de acetato de sodio y 2 ml de anhídrido acético se calentó a reflujo por una hora. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 5 g de hielo, se agitó por 3 minutos y se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se secó y concentró a presión reducida para obtener un sólido impuro. La purificación del producto de reacción se logró mediante recristalizaciones sucesivas (Hex/ AcOEt) para obtener 27.4 mg del 16,25-diacetil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloart-1-en-3-ona [**1c**] (99%), p. f. 158-160 °C. IR (Película) cm^{-1} : 2971.64, 2937.91, 2873.33, 1734.33 (C=O), 1668.83 (C=O), 1460.83, 1367.44, 1241.0, 755.46.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.95 (s, 3H, CH_3), 1.10 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 1.25 (s, 6H, 2 CH_3), 1.47 (s, 3H, CH_3), 1.55 (s, 3H, CH_3), 1.99 (s, 3H, CH_3), 2.03 (s, 3H, CH_3), 2.54 (d, $J = 8.49$, 1H), 3.74 (t, $J = 7.9$, 1H, H-24), 5.40 (m, 1H, H-

16), 5.95 (d, $J=10$, 1H, H-2), 6.77 (d, $J=10$, 1H, H-1). RMN ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) δ ppm: 153.5 (C-1), 126.9 (C-2), 205.1 (C-3), 47.0 (C-4), 44.6 (C-5), 19.6 (C-6), 27.8 (C-7), 44.2 (C-8), 24.1 (C-9), 30.1 (C-10), 23.9 (C-11), 31.8 (C-12), 46.0 (C-13), 46.9 (C-14), 44.6 (C-15), 74.8 (C-16), 56.8 (C-17), 19.4 (C-18), 29.7 (C-19), 85.1 (C-20), 22.7 (C-21), 35.1 (C-22), 25.7 (C-23), 81.7 (C-24), 82.3 (C-25), 28.6 (C-26), 22.9 (C-27), 19.1 (C-28), 19.1 (C-29), 19.1 (C-30), 21.6 y 22.5 (metilo de los grupos acetato), 170.4 y 170.3 (carbonilo de los grupos acetato).

V.7.1.4 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1d].

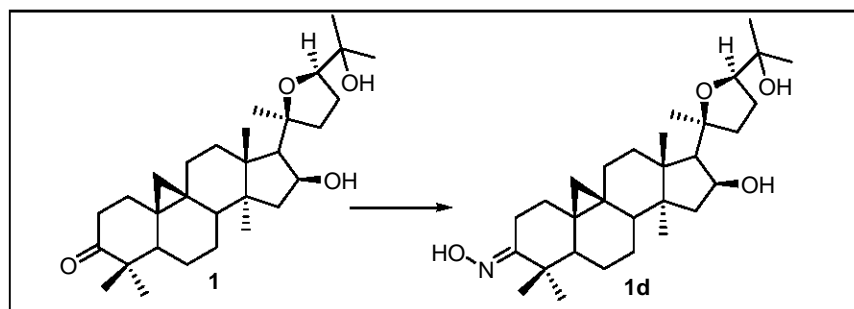


Figura 21. Obtención de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1d].

Una solución de 301 mg de argentatina A [1] en 4.5 ml de piridina se trató con 99 mg of $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. La mezcla de reacción se agitó y calentó a reflujo durante una hora. Posteriormente, la mezcla se vertió en un matraz que contenía 100 g de hielo y extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó en repetidas ocasiones con una disolución de HCl al 10% seguido de agua y

posteriormente se secó y concentró a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por medio de recristalizaciones sucesivas por par de disolventes (Hex/AcOEt), para obtener 277 mg de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [**1d**] (90%), p. f. 200-205°C. IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3379.8, 2968.9, 2870.9, 1638.5, 1460, 1380.1, 1103.9. EM-IE m/z (%): 487 (M^+ , 13), 470 (9), 452 (9), 286 (8), 143 (100), 125 (21), 59 (10). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.54 (d, $J=4.2$, 1H, H-19), 0.74 (d, $J=4.2$, 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H, CH_3), 1.1 (s, 6H, 2 CH_3), 1.3 (s, 3H, CH_3), 1.3 (s, 3H, CH_3), 1.4 (s, 3H, CH_3), 3.38 (dc, 1H), 3.9 (t, $J= 1.8$, $J= 7.8$, 1H, H-24), 4.6 (m, 1H, H-16). RMN ^{13}C (75.4 MHz) δ ppm: 32.7 (C-1), 20.0 (C-2), 167.1 (C-3), 43.4 (C-4), 48.8 (C-5), 21.7 (C-6), 26.1 (C-7), 47.6 (C-8), 20.9 (C-9), 27.3 (C-10), 26.1 (C-11), 33.1 (C-12), 46.3 (C-13), 46.6 (C-14), 48.7 (C-15), 73.4 (C-16), 55.6 (C-17), 21.2 (C-18), 30 (C-19), 87.2 (C-20), 25.7 (C-21), 37.3 (C-22), 23.7 (C-23), 84.5 (C-24), 70.8 (C-25), 27.3 (C-26), 26.3 (C-27), 20.3 (C-28), 20.9 (C-29), 20.9 (C-30). Un cristal de 0.40 x 0.32 x 0.26 mm se empleó para llevar a cabo un análisis de difracción de rayos X. Dicho análisis se realizó en un difractómetro Siemens P4 a la temperatura de 293 K. Los datos cristalográficos del compuesto se enumeran en el Cuadro 9. Las condiciones experimentales y los resultados del análisis de difracción de rayos X se depositaron en el CCDC bajo la clave CCDC 254670.

Cuadro 9. Información cristalográfica de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [**1d**].

Fórmula empírica	C ₃₀ H ₄₉ NO ₃
Peso Molecular	487.7
Sistema cristalino	Ortorrómico
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda unitaria	
A	27.458 (2) 90°
B	7.9900 (10) 90°
C	13.0030 (10) 90°
Volumen [Å ³]	2852.9 (2)
Z	4
Densidad (calculada) [g/cm ³]	1.135
Coefficiente de absorción [mm ⁻¹]	0.577
<i>F</i> (000)	1072
Rango θ para la colección de datos [°]	3.0 a 110.0
Rangos	0 ≤ <i>h</i> ≤ 29 0 ≤ <i>k</i> ≤ 8 0 ≤ <i>l</i> ≤ 13
<i>F</i> ² *	1.51
Indices Finales R [<i>I</i> >	R ₁ =5.71
2 σ (<i>I</i>)	WR ₂ =7.32
Indices R(todos los datos)	R ₁ =6.16 WR ₂ =7.32
LDPH** [e. Å ³]	0.39 , -0.26

V.7.1.5 3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan-20,24-lactona [1e].

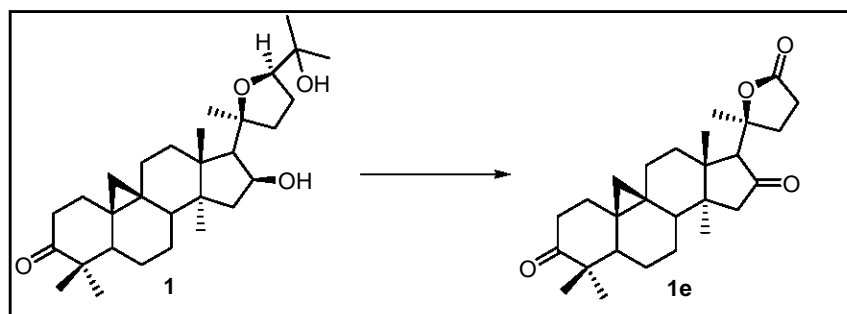


Figura 22. Obtención de la 3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan-20,24-lactona [1e].

Una disolución de 100 mg de argentatina A [1] en 4 ml de ácido acético se trató a 0-5 °C con una disolución acuosa de trióxido de cromo preparada con 100 mg de CrO₃ en 0.3 ml de agua. Después de 1 hora, la mezcla se dejó a temperatura ambiente y posteriormente se extrajo con AcOEt (3x). La fase orgánica se procesó de manera usual para obtener la 3,16-dioxo-25-*nor*-cicloartan-20,24-lactona [1e] (40 %), p. f. 138-140 °C. IR (Película)_{v_{max}} cm⁻¹: 2972.73 2876.01, 1768.64 (C=O), 1737.46 (C=O), 1703.84 (C=O), 1462.38, 1385.8. EM-IE m/z (%): 426 (M+, 100), 411 (23), 313 (35), 288 (34), 270 (15), 99 (42), 43 (27). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.68 (d, *J*= 4.5, 1H, H-19), 0.88 (d, *J*= 4.5, 1H, H-19'), 1.07 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.13 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃), 1.49 (s, 3H, CH₃). RMN ¹³C (50 MHz) δ ppm: 33.1 (C-1), 37.3 (C-2), 215.1 (C-3), 50.1 (C-4), 48.5 (C-5), 21.2 (C-6), 26.2 (C-7), 47.0 (C-8), 20.2 (C-9), 26.5 (C-10), 26.1 (C-11), 33.4 (C-12), 45.7 (C-13), 46.2 (C-14), 50.6 (C-15), 215.8 (C-16), 65.1 (C-17), 28.3 (C-18), 30.1 (C-19), 85.5 (C-20), 22.1 (C-21), 42.4 (C-22), 27.8 (C-23), 177.2 (C-24), 19.7 (C-28), 20.7 (C-29), 19.9 (C-30).

V.7.1.6 16,25-diacetil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1f]

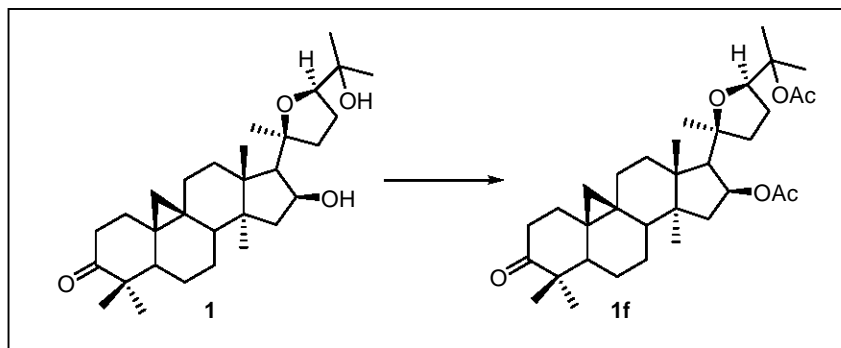


Figura 23. Obtención de la 16,25-diacetil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1f].

Una mezcla de 200 mg de argentatina A, 60.2 mg de acetato de sodio y 5 ml de anhídrido acético se calentó a reflujo por 18 horas. Posteriormente, la mezcla se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo, se agitó por 15 minutos y extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se secó y se concentró a presión reducida para obtener un sólido impuro, el cual se purificó mediante recristalizaciones sucesivas (Hex/ AcOEt) para obtener la 16,25-diacetil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1f] (99%), p. f. 200-206 °C. IR (Película) ν_{\max} cm^{-1} : 2971.49, 2943.41, 2872.45, 1734.68 (C=O), 1706.33 (C=O), 1459.92, 1368.46, 1241.62. EM-IE m/z ,(%): 556 (M⁺), 496 (24), 436 (27), 395 (28), 185 (52), 143 (42), 125 (100), 43 (57). RMN ¹H (300 MHz) CDCl₃ δ ppm: 0.53 (d, J = 4.2, 1H, H-19), 0.83 (d, J = 4.2, 1H, H-19'), 0.96 (s, 3H,

CH₃-21), 1.05 (s, 3H, CH₃-29), 1.09 (s, 3H, CH₃-18), 1.23 (s, 3H, CH₃-26), 1.40 (s, 3H, CH₃-28), 1.47 (s, 3H, CH₃-27), 1.55 (s, 3H, CH₃-21), 2.00 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃), 3.74 (t, *J* = 7.7, 1H, H-24), 5.39 (m, 1H, H-16). RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ ppm: 33.2 (C-1), 37.3 (C-2), 214.9 (C-3), 50.1 (C-4), 47.7 (C-5), 21.2 (C-6), 25.9 (C-7), 48.4 (C-8), 20.7 (C-9), 26.5 (C-10), 26.8 (C-11), 32.1 (C-12), 46.6 (C-13), 46.9 (C-14), 45.5 (C-15), 75.04 (C-16), 57.16 (C-17) 20.7 (C-18), 30.3 (C-19), 85.0 (C-20), 22.6 (C-21), 35.2 (C-22), 25.7 (C-23), 81.6 (C-24), 82.3 (C-25), 28.5 (C-26), 22.9 (C-27), 19.9 (C-28), 22.2 (C-29), 20.07 (C-30), 21.5, 22.4, 170.13, 170.29.

V.7.1.7 16,25-diacetil- 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi cicloartan-3-ona [**1g**].

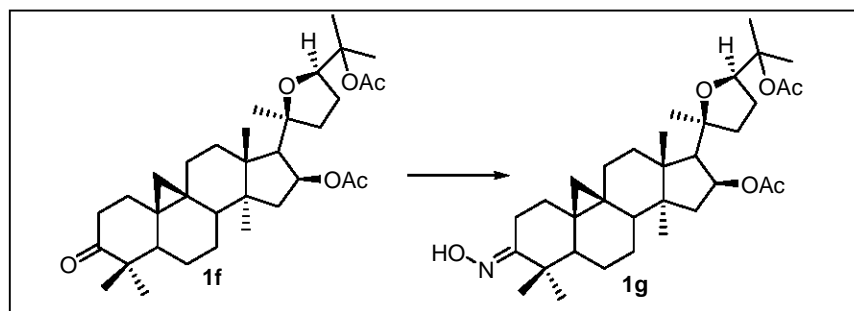


Figura 24. Obtención de 16,25-diacetil- 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [**1g**].

200 mg del diacetato de la argentatina A en 6.5 ml de piridina se hicieron reaccionar con 95 mg of NH₂OH·HCl en agitación a reflujo durante 1.5 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en un matraz que contenía 50 g de hielo y se extrajo con AcOEt (3x). La fase orgánica se lavó 3 veces con una

disolución de HCl al 10% y posteriormente con agua. La recristalización de la fase orgánica permitió la purificación de la 16,25-diacetil- 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [**1g**] (90%), p. f. 140-143 °C. IR (película) ν_{\max} cm^{-1} : 3318.57, 2972.66, 2942.16, 2872.86, 1734.27, 1456.29, 1368.98, 1242.09. EM-IE m/z (%): 571 (M^+), 511 (12), 434 (15), 185 (67), 143 (49), 125 (100), 43 (60). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.44 (d, $J=4.2$, 1H, H-19), 0.72 (d, $J=4.2$, 1H, H-19'), 0.94 (s, 3H, CH_3), 1.08 (s, 3H, CH_3), 1.14 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 1.38 (s, 3H, CH_3), 1.47 (s, 3H, CH_3), 1.54 (s, 3H, CH_3), 2.00 (s, 3H, CH_3), 2.02 (s, 3H, CH_3), 2.52 (d, $J= 8.4$, 1H, H-17), 3.36 (dc, 1H), 3.73 (t, $J= 7.5$, 1H, H-24), 5.38 (m, 1H, H-16), 6.62 (sa, 1H, O-H). RMN ^{13}C (75.5 MHz) δ ppm: 32.6 (C-1), 20.0 (C-2), 166.9 (C-3), 42.7 (C-4), 48.7 (C-5), 21.0 (C-6), 25.8 (C-7), 47.5 (C-8), 20.4 (C-9), 26.8 (C-10), 26.5 (C-11), 32.0 (C-12), 46.6 (C-13), 46.9 (C-14), 45.4 (C-15), 75.1 (C-16), 57.0 (C-17), 21.6 (C-18), 30.2 (C-19), 85.1 (C-20), 22.6 (C-21), 35.0 (C-22), 25.6 (C-23), 81.7 (C-24), 82.3 (C-25), 28.6 (C-26), 22.9 (C-27), 19.8 (C-28), 23.6 (C-29), 20.0 (C-30), 21.5 y 22.5 (carbonos de los metilos de los grupos acetato), 170.4 y 170.3 (carbonos correspondientes a los carbonilos en los grupos acetato).

V.7.1.8 2-formil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona
[1h]

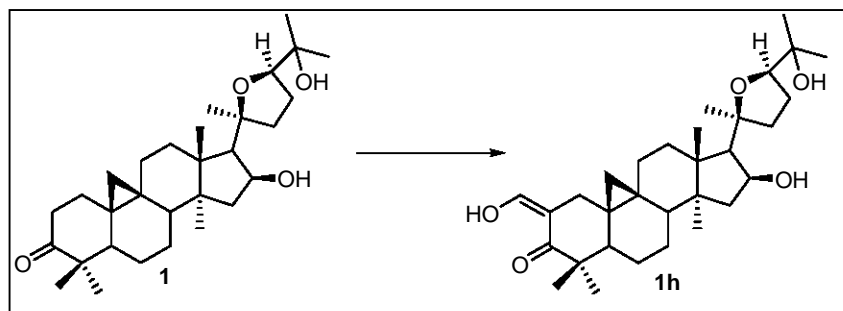


Figura 25. Obtención de la 2-formil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [1h].

A una disolución de 200 mg de argentatina A (**1**) en 6 ml de piridina seca, contenida en atmósfera inerte, se adicionaron 1 ml de formiato de etilo (recién destilado), así como 0.8 ml de una disolución de sodio en MeOH absoluto (0.44 g / 6 ml). La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La aparición de un color ocre y/o la formación de un precipitado insoluble se consideraron como evidencia de la reacción. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se colocó en una disolución fría de 3 ml de ácido acético en 27 ml de agua. Como resultado, se observó la aparición de un precipitado, el cual se extrajo con cloruro de metileno. La fase acuosa se descartó. La fase orgánica se lavó con agua y extrajo con una disolución de hidróxido de potasio al 2%. El extracto básico se lavó con éter, se acidificó con ácido acético glacial y finalmente se extrajo con cloruro de metileno. La fase de cloruro de metileno se secó y concentró a presión reducida para obtener un producto sólido impuro. El producto de reacción se

purificó por cromatografía en capa preparativa (6:4, Hex/AcOEt) para obtener la 2-formil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartan-3-ona [**1h**] (89%). IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3403.7, 2974.0, 2941.9, 2874.8, 1635.1, 1586.9, 1464.6, 1355.9. EM-IE m/z (%): 500 (M^+ , 2), 482 (6), 441 (M^+-59 , 6), 143 (100), 125 (22), 107 (13), 85 (12), 71 (12), 59 (8), 43 (13). RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.49 (d, $J= 4.4$, 1H, H-19), 0.70 (d, $J= 4.4$, 1H, H-19'), 0.92 (s, 3H, CH_3), 1.1 (s, 3H, CH_3), 1.15 (s, 3H, CH_3), 1.22 (s, 3H, CH_3), 1.26 (s, 3H, CH_3), 1.3 (s, 3H, CH_3), 1.46 (s, 3H, CH_3), 2.60 (d, $J= 15$, 1H), 3.46 (sa, 2H, 2 O-H), 3.86 (t, $J= 7.4$, 1H, H-24), 4.63 (m, 1H, H-16), 8.7 (s, 1H, H-31), 14.8 (sa, 1H, O-H). RMN ^{13}C (50 MHz) δ ppm: 33.1 (C-1), 106.6 (C-2), 190.5 (C-3), 42.7 (C-4), 48.5 (C-5), 21.4 (C-6), 26.1 (C-7), 44.7 (C-8), 19.3 (C-9), 29.7 (C-10), 25.5 (C-11), 31.8 (C-12), 46.3 (C-13), 46.6 (C-14), 48.6 (C-15), 73.5 (C-16), 55.6 (C-17), 21.2 (C-18), 30.2 (C-19), 87.2 (C-20), 25.2 (C-21), 37.3 (C-22), 23.7 (C-23), 84.5 (C-24), 70.9 (C-25), 27.3 (C-26), 26.1 (C-27), 20.6 (C-28), 24.4 (C-29), 21.6 (C-30), 188.9 (C-31).

V.7.1.9 [2,3-d] isoxazol-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartano

[1*i*]

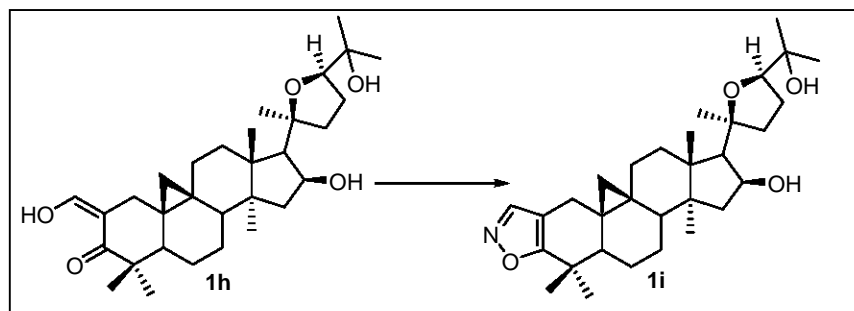


Figura 26. Obtención de la [2,3-d] isoxazol-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartano [1*i*].

Una disolución de 60 mg de la 2-formil-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartano-3-ona [1*h*] en 5 ml de ácido acético glacial, en agitación, se hizo reaccionar durante dos horas con 30 mg de clorhidrato de hidroxilamina a temperatura de reflujo. Después, la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución de bicarbonato de sodio al 5% (3x) y con agua. Las fases acuosas fueron descartadas. La fase orgánica se secó y concentró a presión reducida para obtener un semisólido impuro. Dicho semisólido fue purificado por medio de cromatografía en columna (1:1, Hex/AcOEt), para obtener el [2,3-d] isoxazol-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxicicloartano [1*i*] (80%), p. f. 125-129 °C. IR (Película) ν_{\max} cm^{-1} : 3377.57, 2970.67, 2940.45, 2875.63, 1640, 1564.63, 1463, 1379.57. EM-IE m/z (%): 497 (M^+ , 4), 479 (8), 439 (10), 420 (10), 337 (10), 296 (9), 143 (100), 125 (22), 107 (15), 43 (15). RMN¹H (300 MHz, CDCl₃)

δ ppm: 0.47 (d, J= 4.5, 1H, H-19), 0.74 (d, J= 4.5, 1H, H-19'), 0.94(s, 3H, CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.21(s, 3H, CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.36 (s, 3H, CH₃), 1.46 (s, 3H, CH₃), 2.66 (d, J= 15.6, 1H), 3.87 (t, J= 7.2, 1H, H-24), 4.63 (m, 1H, H-16), 7.98 (s, 1H). RMN ¹³C (75.4 MHz) δ ppm: 28.3 (C-1), 109.9 (C-2), 174.8 (C-3), 37.4 (C-4), 48.5 (C-5), 20.8 (C-6), 26.4 (C-7), 46.3 (C-8), 19.7 (C-9), 24.8 (C-10), 25.3 (C-11), 33.2 (C-12), 46.6 (C-13), 46.8 (C-14), 48.8 (C-15), 73.4 (C-16), 55.7 (C-17), 21.2 (C-18), 30.4 (C-19), 87.2 (C-20), 25.7 (C-21), 37.3 (C-22), 23.8 (C-23), 84.5 (C-24), 70.9 (C-25), 27.3 (C-26), 26.1 (C-27), 20.6 (C-28), 25.5 (C-29), 22.2 (C-30), 149.4 (C-31).

V.7.2 Argentatina B

A partir de la argentatina B se obtuvieron 14 derivados. Sin embargo, durante la adquisición del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de un derivado previamente sintetizado, se generó un producto adicional. Las transformaciones correspondientes se describen a continuación.

V.7.2.1 2 α -bromo-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a].

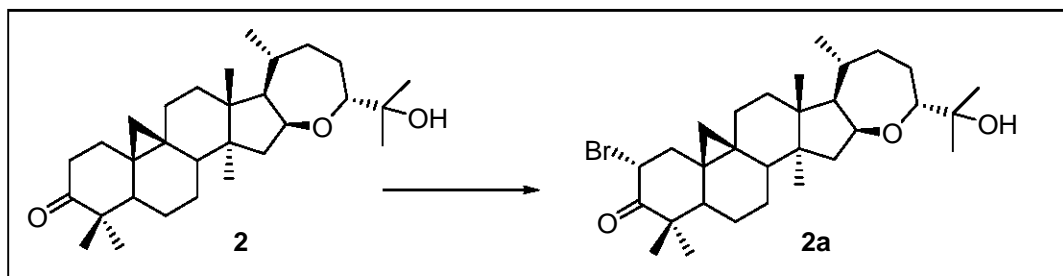


Figura 27. Obtención de la 2 α -bromo-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a].

103 mg (0.23 mmoles) de argentatina B se disolvieron en 3 ml de ácido acético glacial y se hicieron reaccionar con 0.23 ml de una disolución 1M de bromo en ácido acético. La reacción se llevó a cabo en agitación a 3°C. Después de 45 minutos, la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo. Se observó la presencia de un precipitado abundante, el cual se lavó con una disolución 5% NaHCO₃ y, posteriormente, se recristalizó para obtener 105 mg (85.5%) de la 2 α -bromo-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2a]. P. f. 156-159 °C. IR (CHCl₃)_{vmax} cm⁻¹: 3538.93 (O-H), 2977.18-2874.74 (C-H), 1720.5 (C=O), 1464.44, 1384.73. EM-IE m/z (%): 534 (M⁺, 4), 519 (M⁺ -15, 2.7), 476 (M⁺ -58, 26), 475 (M⁺ -59, 47.9), 175 (100), 143 (15.6), 85 (95.2), 59 (76.02). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.71 (d, *J*=4.8, 1H, H-19), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.94 (d, *J*= 6.6, 3H, CH₃-21), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.15 (s, 9H, 3CH₃), 2.80 (sa, 1H, O-H), 3.59 (dd, *J*= 2.2, *J*= 11.3, 1H, H-24), 4.60 (c, 1H, H-16), 5.11 (dd, *J*=6.6, *J*=12.8, 1H, H-2 β). RMN ¹³C (50 MHz) δ ppm: 33.3 (C-1), 46.0 (C-2), 205.7 (C-3),

55.0 (C-4), 48.4 (C-5), 21.2 (C-6), 20.9 (C-7), 47.4 (C-8), 21.3 (C-9), 26.19 (C-10), 26.4 (C-11), 32.4 (C-12), 45.9 (C-13), 47.5 (C-14), 44.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 18.7 (C-18), 29.2 (C-19), 29.2 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.2 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 19.5 (C-28), 23.0 (C-29), 20.8 (C-30). Además, se realizó un análisis de difracción de rayos X. Para ello, se empleó un cristal de 0.36 x 0.12 x 0.09 mm. Los datos cristalográficos se adquirieron a una temperatura de 291 K en un sistema Bruker Smart. Los datos cristalográficos se muestran en el Cuadro 10 y además se depositaron en el CCDC, con la clave CCDC 258726.

Cuadro 10. Información cristalográfica de los derivados **2a**, **2b**, **2d**, **2i** y **2m**.

Compuesto	2a	2b	2d	2i	2m
Formula empírica	C ₃₀ H ₄₇ BrO ₃	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	C ₃₀ H ₄₉ NO ₃	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	C ₃₁ H ₄₅ NO ₃
Peso molecular	535.59	454.67	471.70	484.69	479.68
Sistema cristalino	Ortorrómbico	Ortorrómbico	Ortorrómbico	Ortorrómbico	Ortorrómbico
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda unitaria					
A	8.2854(18) 90°	11.710(2) 90°	10.827(2) 90°	8.2190(8) 90°	8.2357(6) 90°
B	12.129(3) 90°	12.128(2) 90°	13.366(3) 90°	12.4021(11) 90°	12.2298(8) 90°
C	27.310(6) 90°	18.811(4) 90°	19.105(4) 90°	26.535(3) 90°	26.854(2) 90°
Volume [Å ³]	2744.5(11)	2671.5(9)	2764.8(10)	2704.7(4)	2704.8(3)
Z	4	4	4	4	4
Densidad (calculada) [g/cm ³]	1.296	1.130	1.133	1.190	1.178
Coefficiente de absorción [mm ⁻¹]	1.526	0.545	0.552	0.076	0.074
F(000)	1144	1000	1040	1064	1048
Rango θ para la colección de datos [°]	1.84 a 25.00	4.34 a 55.06	4.04 a 55.06	1.81 a 25.00	1.83 a 25.00
Rangos	-9 ≤ h ≤ 9 -14 ≤ k ≤ 14 -32 ≤ l ≤ 32	0 ≤ h ≤ 12 0 ≤ k ≤ 12 0 ≤ l ≤ 20	0 ≤ h ≤ 11 0 ≤ k ≤ 14 0 ≤ l ≤ 20	-9 ≤ h ≤ 9 -14 ≤ k ≤ 14 -31 ≤ l ≤ 31	-9 ≤ h ≤ 9 -14 ≤ k ≤ 14 -31 ≤ l ≤ 31
% a $\theta = 25.00^\circ$	100.0	99.9	97.5 ^a	100	100
Datos/restricciones/parametros	4841/ 0/ 317	1930/ 0/ 308	1958/ 0/ 314	4772/ 0/ 329	4782/ 0/ 326

F^2	0.842	1.009	1.085	0.806	0.782
Indices	$R1=$	$R1=$	$R1=$	$R1=$	$R1=$
Finales $R [I >$	0.0376,	0.0405,	0.0541,	0.0508,	0.0456,
$2\sigma(I)]$	$wR2=$	$wR2=$	$wR2=$	$wR2=$	$wR2=$
	0.0535	0.1125	0.1388	0.0513	0.0512
Indices R	$R1=$	$R1=$	$R1=$	$R1=$	$R1=$
(todos los	0.0616,	0.0431,	0.0590,	0.1278,	0.0992,
datos)	$wR2=$	$wR2=$	$wR2=$	$wR2=$	$wR2=$
	0.0561	0.1149	0.1429	0.0619	0.0591
Parámetro	0.002(7)	-0.4(5)	0.6(7)	0.0(17)	-
estructural					
absoluto					
LDPH [e. Å ³]	0.781 y	0.151 y	0.186 y	0.182 y	0.145 y
	-0.294	-0.130	-0.175	-0.150	-0.129

V.7.2.2 (16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2b]

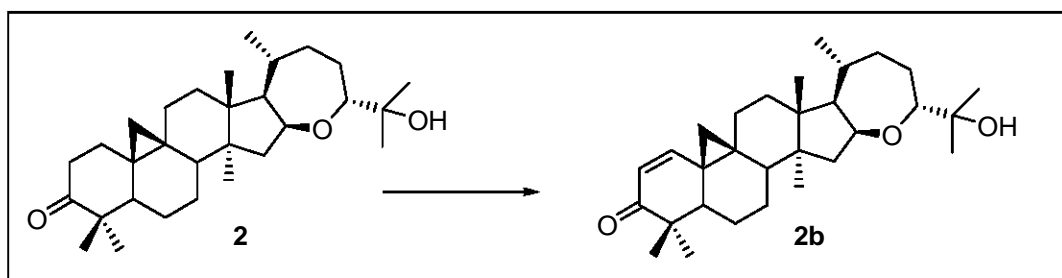


Figura 28. Obtención de la (16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2b].

Una disolución de argentatina B (200 mg, 0.44mmoles) y cloruro de fenilselenio (100 mg, 0.52 mmol) en AcOEt (4.5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después, se agregó 1 ml de agua a la mezcla de reacción en agitación. La fase acuosa se separó y se agregaron 2 ml de THF y 0.2 ml de H₂O₂ al 30%. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente por 1.4 h. Después, la fase orgánica se lavó con una disolución de carbonato de sodio 10% (3 x 20 ml) y posteriormente con agua (3 x 20 ml). A partir de la fase orgánica se obtuvo un sólido impuro. Este sólido se purificó por medio de cromatografía en columna (8:2, Hex/ AcOEt) para obtener 140 mg (70%) de la (16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2b] como un sólido cristalino de p. f. 165-167 °C. IR (CHCl₃)_vmax cm⁻¹: 3684.26 (O-H), 3050, 2976.92-2876.12 (C-H), 1663.29 (C=O), 1603, 1521.87, 1473.46, 1424.45, 1334, 1112. EM-IE m/z (%): 454 (M⁺, 27), 436 (M⁺ -18, 24), 396 (M⁺ -58, 60), 377 (35), 233 (38), 203 (62), 201 (52), 175

(61), 161 (80), 159 (77), 147 (62), 137 (100), 135 (83), 120 (56), 109 (68), 93 (54), 85 (48) 59 (39). RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.75 (d, *J*=4.7, 1H, H-19), 0.89 (s, 3H, CH₃), 0.94 (d, *J*= 6.4, 3H, CH₃-21), 0.96 (s, 3H, CH₃), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.10 (s, 3H, CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.32 (d, *J*=4.7, 1H, H-19'), 2.70 (sa, 1H, O-H), 3.60 (dd, *J*= 2.0, *J*= 12.5, 1H, H-24), 4.60 (c, 1H, H-16), 5.95 (d, *J*= 10.0, 1H, H-2), 6.78 (d, *J*=10.0, 1H, H-1). RMN¹³C (75.4 MHz) δ ppm: 153.68 (C-1), 126.77 (C-2), 205.2 (C-3), 46.3 (C-4), 44.4 (C-5), 19.5 (C-6), 27.40 (C-7), 43.2 (C-8), 24.5 (C-9), 29.9 (C-10), 23.6 (C-11), 32.2 (C-12), 45.9 (C-13), 45.8 (C-14), 43.9 (C-15), 74.6 (C-16), 57.0 (C-17), 17.5 (C-18), 29.3 (C-19), 28.4 (C-20), 21.0 (C-21), 35.5 (C-22), 23.4 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 18.8 (C-28), 21.4 (C-29), 19.1 (C-30).

Además, se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos X de un cristal de 0.50 x 0.50 x 0.20 mm a la temperatura de 291 K en un difractómetro Nicolet P3. Los datos cristalográficos correspondientes se presentan en el Cuadro 10. Los resultados de este estudio se depositaron en el CCDC, bajo la clave CCDC 258727.

V.7.2.3 25-O-acetil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2c]

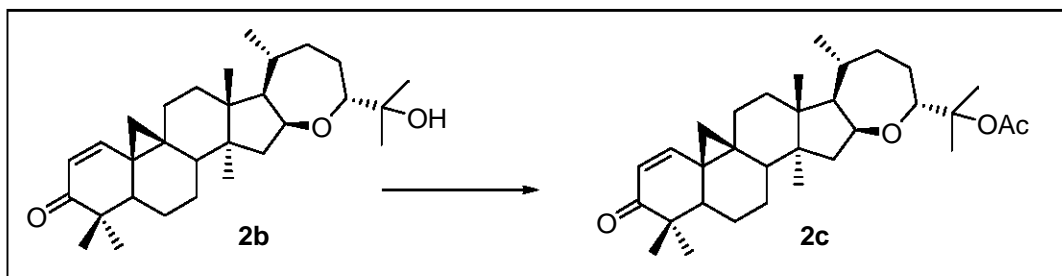


Figura 29. Obtención de la 25-O-acetil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2c].

Una disolución de 49 mg (0.11 mmoles) de la (16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2b] en Ac₂O se trató con 20 mg de acetato de sodio y se calentó a reflujo durante 12 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió y se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo. Se observó un precipitado, el cual fue purificado por medio de recristalizaciones sucesivas, para obtener 44 mg (81%) de la 25-O-acetil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2c], como un sólido de p. f. 180-182°C. IR (CHCl₃)_vmax cm⁻¹: 2955-2875.65 (C-H), 1726.3 (C=O del grupo acetato), 1662 (C=O), 1603.35, 1464.50, 1368.58, 1267, 1115.95. EM-IE m/z (%): 496 (M⁺, 13), 454 (M⁺ -42, 8), 436 (84), 395 (40), 377 (37), 351 (31), 233 (41), 219 (100), 203 (58), 201 (74), 175 (60), 161 (57), 159 (60), 147 (71), 135 (89), 133 (76), 109 (99), 107 (60), 93 (58), 85 (47), 71 (43), 59 (15), 43 (94). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.74 (d, *J*=4.7, 1H, H-19), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, *J*= 6.4, 3H, CH₃-21), 0.96 (s, 3H, CH₃), 1.10 (s, 3H, CH₃), 1.13 (s, 3H, CH₃), 1.31 (d, *J*=4.7, 1H, H-19'), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H,

CH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃), 3.83 (dd, *J* = 2.2, *J* = 12.5, 1H, H-24), 4.62 (c, 1H, H-16), 5.94 (d, *J* = 10.0, 1H, H-2), 6.78 (d, *J* = 10.0, 1H, H-1). RMN ¹³C (75 MHz) δ ppm: 153.74 (C-1), 127.1 (C-2), 205.2 (C-3), 46.5 (C-4), 44.7 (C-5), 19.8 (C-6), 27.7 (C-7), 43.5 (C-8), 24.8 (C-9), 30.3 (C-10), 23.9 (C-11), 32.5 (C-12), 46.2 (C-13), 46.0 (C-14), 44.1 (C-15), 74.5 (C-16), 57.2 (C-17), 17.8 (C-18), 30.3 (C-19), 22.7 (C-20), 21.7 (C-21), 35.6 (C-22), 22.6 (C-23), 80.5 (C-24), 85.2 (C-25), 21.7 (C-26), 23.5 (C-27), 19.0 (C-28), 21.3 (C-29), 19.4 (C-30), 170.4 and 29.3 (C=O y metilo del grupo acetato).

V.7.2.4 3-oxima-(16β,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d]

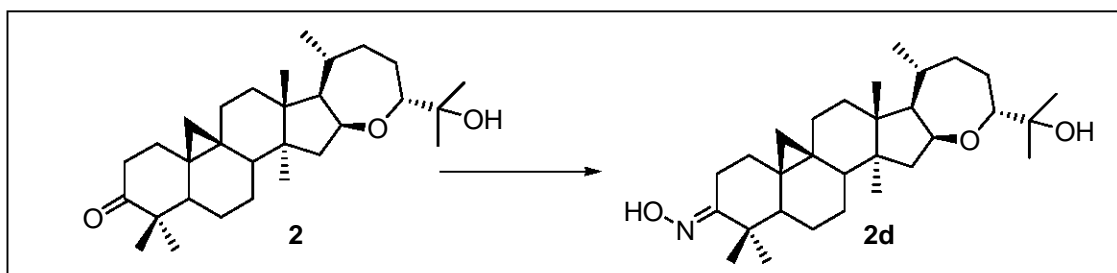


Figura 30. Obtención de la 3-oxima-(16β,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d].

Una disolución de 100 mg (0.22 mmol) de la argentatina B [2] en 1.5 ml de piridina se hizo reaccionar con 28 mg of NH₂OH·HCl (0.40mmol) en agitación a temperatura de reflujo durante una hora. Posteriormente, la mezcla de reacción se vertió en un matraz que contenía 50 g de hielo y se extrajo con AcOEt (3x). La

fase orgánica se lavó repetidas ocasiones con una disolución de HCl al 10% seguido de agua. Recristalizaciones sucesivas de la fase orgánica permitieron la obtención de 80 mg (78%) de la 3-oxima-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2d**], p. f. 224-227°C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3496.4, 3387.0 (O-H), 2964.2-2871.9 (C-H), 1645.6, 1460, 1378.6, 1168.8, 1113.4, 928.8. EM-IE m/z (%): 471 (M⁺, 78), 454 (65), 413 (M⁺ -58, 40), 412 (90), 396 (50), 107 (38), 59 (100). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.50 (d, *J*=4.5, 1H, H-19), 0.72 (d, *J*=4.5, 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, *J*= 6.3, 3H, CH₃-21), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 3.36 (dc, 1H), 3.59 (dd, *J*= 1.8, *J*= 12.5, 1H, H-24), 4.59 (c, 1H, H-16). RMN ¹³C (75.4 MHz) δ ppm: 32.7 (C-1), 35.5 (C-2), 168.9 (C-3), 45.8 (C-4), 48.8 (C-5), 21.2 (C-6), 26.1 (C-7), 47.2 (C-8), 20.9 (C-9), 25.6 (C-10), 26.3 (C-11), 32.7 (C-12), 44.8 (C-13), 42.9 (C-14), 45.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19), 29.0 (C-20), 20.7 (C-21), 35.5 (C-22), 23.4 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.8 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 20.5 (C-30).

Un cristal de 0.28 x 0.24 x 0.22 mm se empleó para llevar a cabo un análisis de difracción de rayos X. Dicho análisis se realizó en un difractómetro Nicolet P3 a la temperatura de 293 K. Los datos cristalográficos del compuesto se muestran en el Cuadro 10. Las condiciones experimentales y los resultados del análisis de difracción de rayos X se depositaron en el CCDC bajo la clave CCDC 258728.

V.7.2.5 4-Aza-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2e]

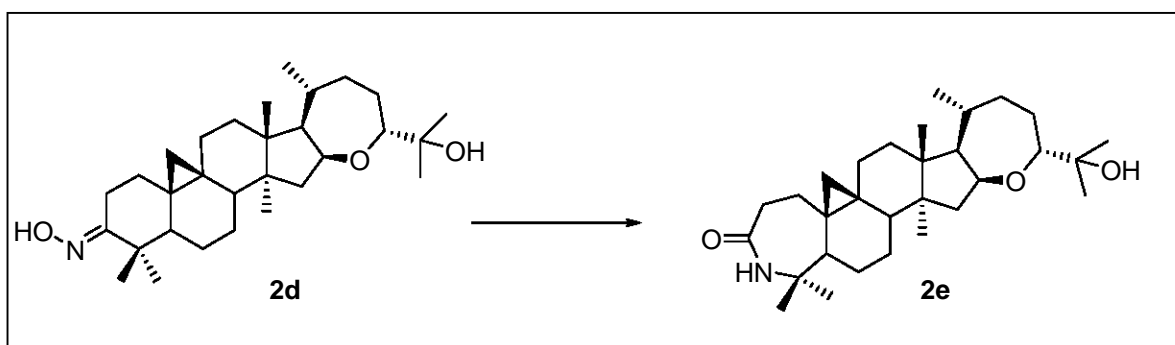


Figura 31. Obtención de la 4-aza-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2e].

Una disolución de 70 mg de la 3-oxima-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2d] en CH₂Cl₂ a 0°C en agitación, se trató con 1 ml de anhídrido trifluoroacético, durante 1 hora. Después, se adicionaron 10 ml de agua. La fase orgánica se separó y se lavó con una disolución de NaHCO₃ al 5% (3 x 20 ml) y posteriormente con agua (3 x 20 ml). A partir de la fase orgánica se aisló un sólido, el cual se purificó por medio de cromatografía en columna (MeOH). Finalmente, se obtuvieron 38.7 mg de la 4-aza-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2e], p. f. 190-193°C. IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 3405.1 (O-H), 2963 (C-H), 2871.3, 1650(CO), 1455.9, 1376.3 (C-N), 1113.0. EM-IE m/z (%): 471 (M⁺, 22), 413 (M⁺ -58, 15), 412 (40), 58 (100). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.60 (d, *J*=4.9, 1H, H-19), 0.67 (d, *J*=4.9, 1H, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, *J*=6.5, 3H, CH₃-21), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 2.56 (m, 2H, CH, OH), 3.59 (dd, *J*= 2.14, *J*= 12.2, 1H, H-24), 4.61 (c, 1H,

H-16), 6.43 (NH). RMN¹³C (50 MHz) δ ppm: 30.4 (C-1), 35.4 (C-2), 177.6 (C-3), 57.3 (C-4), 50.3 (C-5), 23.5 (C-6), 25.5 (C-7), 48.5 (C-8), 23.0 (C-9), 28.1 (C-10), 26.9 (C-11), 32.9 (C-12), 45.9 (C-13), 45.3 (C-14), 45.1 (C-15), 75.0 (C-16), 57.5 (C-17), 19.1 (C-18), 29.9 (C-19), 28.9 (C-20), 20.9 (C-21), 35.2 (C-22), 25.5 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.7 (C-27), 19.7 (C-28), 31.8 (C-29), 24.3 (C-30).

V.7.2.6 25-O-acetil-4-aza-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2f].

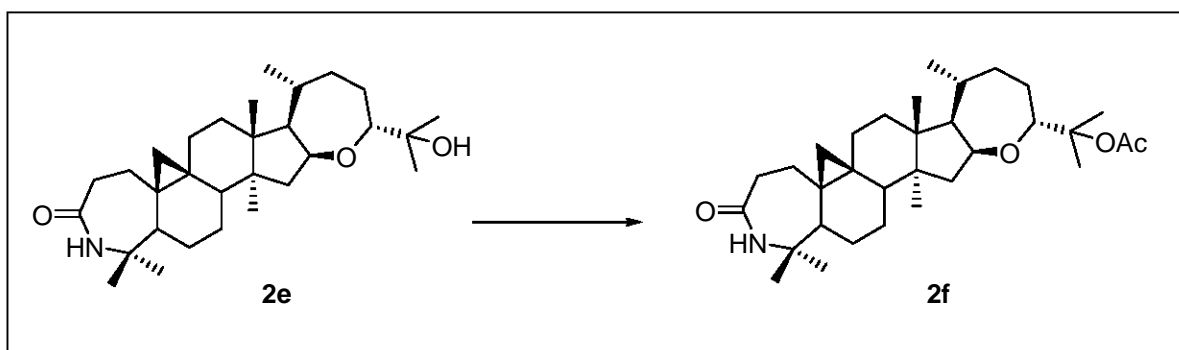


Figura 32. Obtención de la 25-O-acetil-4-aza-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2f].

Una disolución de 4-aza-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2e] (20 mg, 0.037 mmol) en Ac₂O se hizo reaccionar de la misma manera que 2 [Sección V.7.2.3] para produjo un sólido impuro, el cual fue purificado por medio de recristalizaciones sucesivas para obtener 19.1mg (89%) de la 25-O-acetil-4-Aza-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2f] como un sólido blanco de p. f. 200-203°C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3446.1, 2960 (C-H), 2873.3, 1733.5 (C=O),

1660.3(C=O), 1458.7, 1371.4, 1255.8, 1115.5. EM- IE m/z, (%): 513 (M⁺, 18), 498 (2), 453 (14), 438 (M⁺-75, 10%), 438 (10), 412 (30), 326 (15), 58 (100), 43 (13). RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.60 (d, J=4.7, 1H, H-19), 0.66 (d, J=4.7, 1H, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH₃-28), 0.92 (d, J= 6.2, 3H, CH₃-21), 1.14 (s, 3H, CH₃-18), 1.23 (s, 3H, CH₃-29), 1.31 (s, 3H, CH₃-26), 1.39 (s, 3H, CH₃-30), 1.44 (s, 3H, CH₃-27), 1.96 (s, 3H, CH₃), 2.53 (m, 2H, CH₂-2), 3.82 (dd, J= 2.3, J= 12.5 1H, H-24), 4.63 (c, 1H, H-16), 6.18 (sa, 1H, NH). RMN ¹³C (75.5 MHz) δ ppm: 30.3 (C-1), 34.7 (C-2), 177.9 (C-3), 57.8 (C-4), 50.1 (C-5), 22.2 (C-6), 25.4 (C-7), 48.4 (C-8), 23.1 (C-9), 28.0 (C-10), 26.9 (C-11), 32.8 (C-12), 45.8 (C-13), 45.2 (C-14), 45.1 (C-15), 74.5 (C-16), 57.3 (C-17), 19.1 (C-18), 29.9 (C-19), 28.9 (C-20), 21.0 (C-21), 35.2 (C-22), 25.4 (C-23), 80.1 (C-24), 84.9 (C-25), 24.1 (C-26), 23.2 (C-27), 19.7 (C-28), 31.6 (C-29), 21.3 (C-30), 170.2 and 22.5 (C=O y metilo del grupo acetato).

V.7.2.7 25-O-acetil-(16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2g]

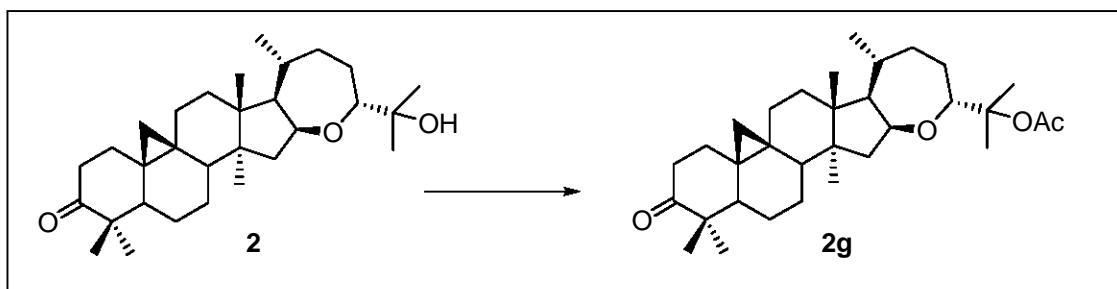


Figura 33. Obtención de la 25-O-acetil-(16β,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2g].

Una mezcla de 500 mg de argentatina B [2], 256 mg de acetato de sodio y 6 ml de anhídrido acético se calentó a temperatura de reflujo por una hora.

Posteriormente, la mezcla se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo y se agitó por 15 minutos. El contenido del matraz se extrajo con AcOEt (3x). La fase orgánica se secó y se concentró a presión reducida para obtener un semisólido. Dicho producto se recristalizó (Hex/ AcOEt) para obtener la 25-O-acetil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2g**] (89%) de p. f. 164 °C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2944.8, 2872.1, 1734.3 (C=O), 1707.6 (C=O), 1464, 1370, 1254.5, 1115.0. EM-IE m/z,(%): 498 (1.5), 440, 438, 397 (100), 143, 85. RMN ¹H (200 MHz) CDCl₃ δ ppm: 0.57 (d, *J*= 4.4, 1H, H-19), 0.82 (d, *J*= 4.4, 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, *J*= 6.3 Hz, 1H, CH₃-21), 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.10 (s, 3H, CH₃), 1.17 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃), 2.30 (ddd, *J*= 2.70, *J*= 4.3, *J*= 14.03, 1H), 2.72 (td, *J*= 6.6, *J*= 13.8, 1H), 3.83 (dd, *J*= 2.2, *J*= 12.3, 1H, H-24), 4.62 (c, 1H, H-16).

V.7.2.8 25-O-acetil-3-oxima-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2h].

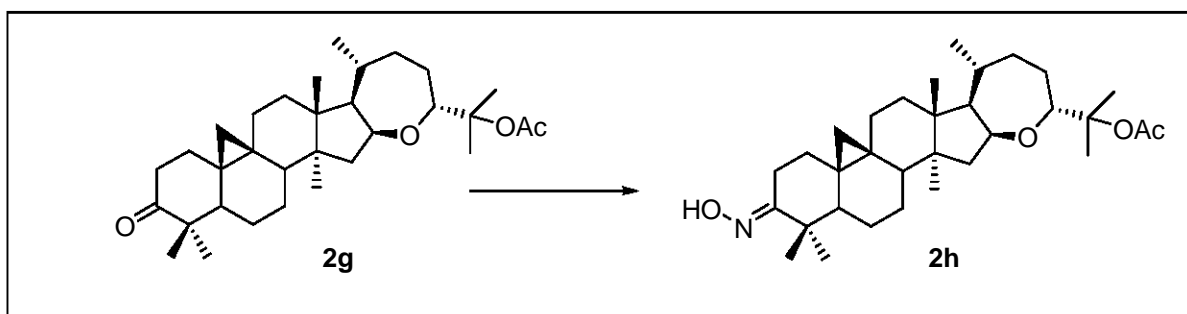


Figura 34. Obtención de la 25-O-acetil-3-oxima-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2h].

De igual manera a la descrita en la Sección V.7.2.4, 100 mg de la 25-O-acetil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2g] disueltos en piridina se hicieron reaccionar con clorhidrato de hidroxilamina para obtener 78.3 mg (76%) de la 25-O-acetil-3-oxima-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2h]. P. f. 208-210°C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3319.1 (O-H), 2950.3-2874.8 (C-H), 1734.8 (C=O), 1654, 1459.3, 1371.6, 1255.2, 1115.7, 934.5. EM-IE m/z (%): 513 (M⁺, 16), 454 (65), 497 (12), 496 (11), 453 (69), 436 (100), 412 (92), 396 (36), 109 (33), 59 (15), 43 (63). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.49 (d, *J*=4.4, 1H, H-19), 0.72 (d, *J*=4.4, 1H, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.92 (d, *J*= 6.5, 3H, CH₃-21), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.19 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃ del grupo acetato), 3.37 (dc, 1H), 3.82 (dd, *J*= 2.0, *J*= 12.3, 1H, H-24), 4.61 (c, 1H, H-16). RMN ¹³C (75.4 MHz) δ ppm: 32.6 (C-1), 20.8 (C-2), 169.2 (C-3), 43.0 (C-4), 48.7 (C-5), 21.2 (C-6), 25.7 (C-7), 47.1 (C-8), 20.8 (C-9),

26.3 (C-10), 26.1 (C-11), 32.7 (C-12), 45.7(C-13), 45.6 (C-14), 44.7 (C-15), 74.4 (C-16), 57.2 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19), 29.0 (C-20), 21.1 (C-21), 35.3 (C-22), 22.3 (C-23), 80.2 (C-24), 85.0 (C-25), 23.5 (C-26), 23.3 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 21.4 (C-30), 170.3 and 22.5 (C=O y metilo del grupo acetato).

V.7.2.9 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2i]

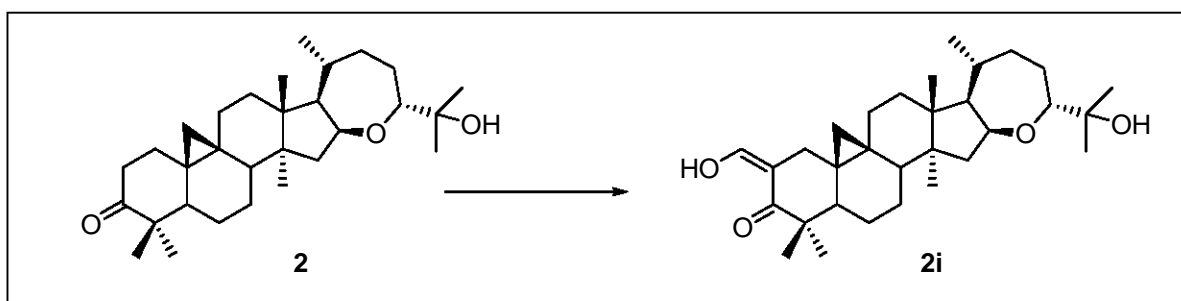


Figura 35. Obtención de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2i].

A una disolución de 2.88 mmoles de argentinina B [2] en 24 ml de piridina seca, contenida en atmósfera inerte, se adicionaron 5 ml de formiato de etilo (recién destilado), así como una disolución de sodio en MeOH absoluto (0.44 g / 6 ml). La reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La aparición de un color ocre y/o la formación de un precipitado insoluble se consideraron como evidencia de la reacción. Transcurrido el tiempo pertinente, la mezcla de reacción se colocó en una disolución fría de 16.6 ml de ácido acético en 154.4 ml de agua. Como resultado de la acción anterior, se observó la

aparición de un precipitado, el cual fue extraído con cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con agua y extrajo con una disolución de hidróxido de potasio al 2%. La solución básica se lavó con éter, después se acidificó con ácido acético glacial y finalmente se extrajo con cloruro de metileno. La fase de cloruro de metileno final se secó y concentró a presión reducida para obtener un producto semisólido impuro. Dicho producto se purificó por cristalizaciones sucesivas para obtener 992.9 mg de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [**2i**] (71%). P. f. 210-214 °C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3546.9 (OH), 3448, 2953.3 (C-H), 2874.5, 1642.9, 1588.2, 1460.3, 1374.2, 1113.1, 1058.2. EM-IE m/z (%): 484 (M⁺, 15), 466 (5), 425 (M⁺-59, 100), 407 (25), 233 (33), 175 (42), 109 (35), 85 (44), 59 (25), 43 (24). RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.48 (d, *J*= 4.5, 1H, H-19), 0.68 (d, *J*= 4.5, 1H, H-19'), 0.92(s, 3H, CH₃), 0.95(d, *J*= 6.3, 3H, CH₃-21), 1.10(s, 6H, 2CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.85 (d, *J*= 15, 1H, H-1), 2.59 (d, *J*= 15, 1H, H-1'), 3.59 (dd, *J*= 2.1, *J*= 12.5, 1H, H-24), 4.61 (c, 1H, H-16), 8.67 (d, *J*=2.4, 1H, H-31), 14.84 (d, *J*= 2.4, 1H, OH). RMN ¹³C (75.4 MHz) δ ppm: 31.8 (C-1), 106.6 (C-2), 190.4 (C-3), 42.7 (C-4), 48.2 (C-5), 21.4 (C-6), 25.7 (C-7), 44.6 (C-8), 19.4 (C-9), 23.6 (C-10), 25.6 (C-11), 32.6 (C-12), 45.8 (C-13), 45.7 (C-14), 45.1 (C-15), 74.8 (C-16), 57.4 (C-17), 19.1 (C-18), 30.0 (C-19), 29.0 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.3 (C-25), 23.8 (C-26), 25.6 (C-27), 19.8 (C-28), 24.4 (C-29), 21.6 (C-30), 189.0 (C-31).

Se llevó a cabo un estudio de difracción de rayos X de un cristal del producto **2i** de 0.30 x 0.17 x 0.07 mm. Dicho análisis se efectuó a 291 K en un

difractómetro Bruker Smart. Los datos cristalográficos correspondientes se muestran en el Cuadro 10. Las condiciones experimentales y los resultados de este estudio se depositaron en el CCDC con la clave CCDC 258729.

V.7.2.10 [2,3-d] isoxazol-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartano [2j]

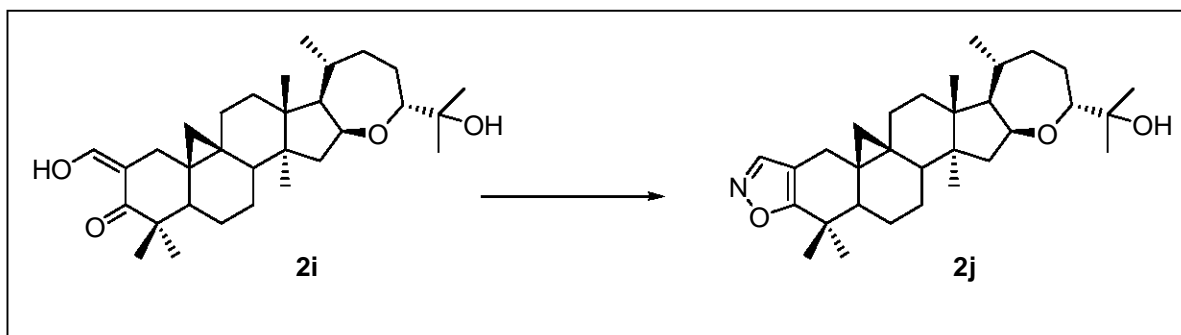


Figura 36. Obtención de la [2,3-d] isoxazol-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartano [2j].

Una disolución de 115 mg de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2i] en 7 ml de ácido acético glacial, en agitación, se hizo reaccionar durante dos horas con 45.6 mg de clorhidrato de hidroxilamina a reflujo. Después, la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución de bicarbonato de sodio al 5% (3x) y con agua. Las fases acuosas fueron descartadas. La fase orgánica se secó y concentró a presión reducida para obtener un semisólido impuro. Dicho semisólido se purificó por medio de cromatografía en columna (8:2, Hex/AcOEt) para obtener 91 mg (80%) del [2,3-d]

isoxazol-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartano [2j]. P. f. 146-150°C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3482.5 (OH), 3448, 2960.9 (C-H), 2874.5, 1735.1, 1641.3, 1462.8, 1374.7, 1112.9. EM-IE m/z (%): 481 (M⁺, 8), 463 (7), 422 (M⁺-59, 100), 404 (25), 230 (30), 175 (22), 109 (31), 85 (34), 59 (34), 43 (34). RMN ¹H (200MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.46 (d, *J*= 4.8, 1H, H-19), 0.72 (d, *J*= 4.8, 1H, H-19'), 0.93(s, 3H, CH₃), 0.95(d, *J*= 6, 3H, CH₃-21), 1.10(s, 6H, 2CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 3H, CH₃), 1.95 (d, *J*= 15.4, 1H, H-1), 2.65 (d, *J*= 15.4, 1H, H-1'), 3.60 (dd, *J*= 2, *J*= 12.4, 1H, H-24), 4.62 (c, 1H, H-16), 7.98 (s, 1H, H-31). RMN ¹³C (50 MHz) δ ppm: 28.4 (C-1), 110.0 (C-2), 135.6 (C-3), 45.8 (C-4), 48.3 (C-5), 20.8 (C-6), 26.0 (C-7), 46.7 (C-8), 24.6 (C-9), 29.3 (C-10), 25.6 (C-11), 32.7 (C-12), 45.7 (C-13), 45.7 (C-14), 45.2 (C-15), 74.9 (C-16), 57.5 (C-17), 19.1 (C-18), 30.1 (C-19), 28.9 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.5 (C-23), 82.5 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.7 (C-27), 19.8 (C-28), 25.5 (C-29), 22.2 (C-30), 149.5 (C-31).

V.7.2.11 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2k]

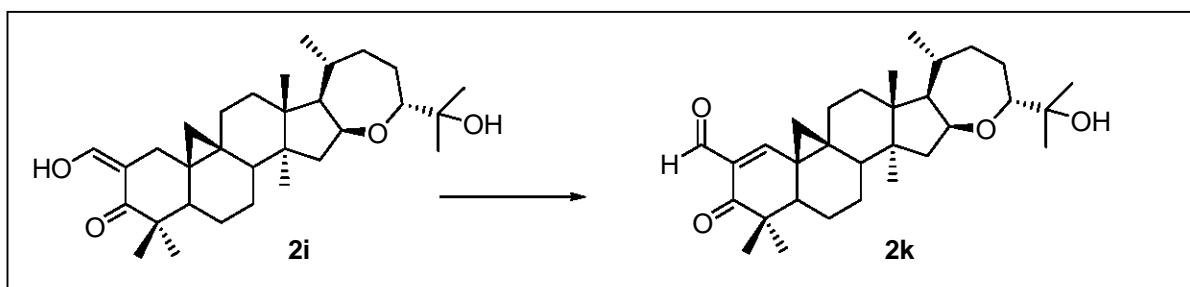


Figura 37. Obtención de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2k].

120 mg de piridina se agregaron a una disolución fría de 190 mg de cloruro de fenilselenio en 7 ml de CH₂Cl₂. Transcurridos 15 minutos, una disolución de 100 mg de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2i] en 3 ml de CH₂Cl₂ se adicionó a la mezcla fría en agitación y se permitió reaccionar por 20 minutos.

Posteriormente, la mezcla de reacción se lavó con una disolución de HCl al 10% (3x) y después con agua fría. A continuación, la mezcla de reacción se regresó al matraz de reacción limpio y frío, y se adicionó 0.1 ml de H₂O₂ al 30% cada 10 minutos durante 30 minutos. Transcurridos 10 minutos de la última adición, se agregaron 3 ml de agua destilada. La fase orgánica se separó de la mezcla de reacción y se lavó con NaHCO₃ al 5% (3 x 20ml) y agua. Finalmente, la fase orgánica se concentró y purificó para obtener 80.2 mg (81%) de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2k] de p. f. 243-247°C. IR

(KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3543.2, 2966.4, 2937.3, 2866.91, 1668.48, 1584.06, 1461.11, 1378.18, 1112.73. EM-IE m/z (%): 482 (M^+ , 55), 464 (53), 423 (M^+-59 , 53), 405 (17), 245 (80), 159 (70), 135 (60), 109 (70), 59 (100), 43 (72). RMN ^1H (300MHz, C_6D_6) δ ppm: 0.45 (d, $J= 4.6$, 1H, H-19), 0.60 (s, 3H, CH_3), 0.78 (s, 3H, CH_3), 0.90 (d, $J= 6.5$, 3H, CH_3 -21), 0.91 (d, $J= 4.6$, 1H, H-19'), 1.03 (s, 3H, CH_3), 1.12 (s, 3H, CH_3), 1.14 (s, 3H, CH_3), 1.18 (s, 3H, CH_3), 2.04 (m, 1H), 2.53 (sa, 1H, OH), 3.59 (dd, $J= 3.6$, $J= 12.5$, 1H, H-24), 4.45 (c, 1H, H-16), 7.60 (s, 1H, H-1), 10.51 (s, 1H, H-31). RMN ^{13}C (75.4 MHz) δ ppm: 160.6 (C-1), 132.2 (C-2), 201.9 (C-3), 46.2 (C-4), 43.9 (C-5), 19.5 (C-6), 27.7 (C-7), 43.6 (C-8), 27.7 (C-9), 31.5 (C-10), 23.7 (C-11), 32.3 (C-12), 45.8 (C-13), 45.8 (C-14), 44.2 (C-15), 74.5 (C-16), 57.2 (C-17), 17.9 (C-18), 32.1 (C-19), 29.2 (C-20), 21.1 (C-21), 35.7 (C-22), 23.3 (C-23), 82.9 (C-24), 73.0 (C-25), 25.1 (C-26), 25.8 (C-27), 21.5 (C-28), 18.8 (C-29), 18.7 (C-30), 188.9 (C-31).

V.7.2.12 2α -ciano-($16\beta,24R$)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [21].

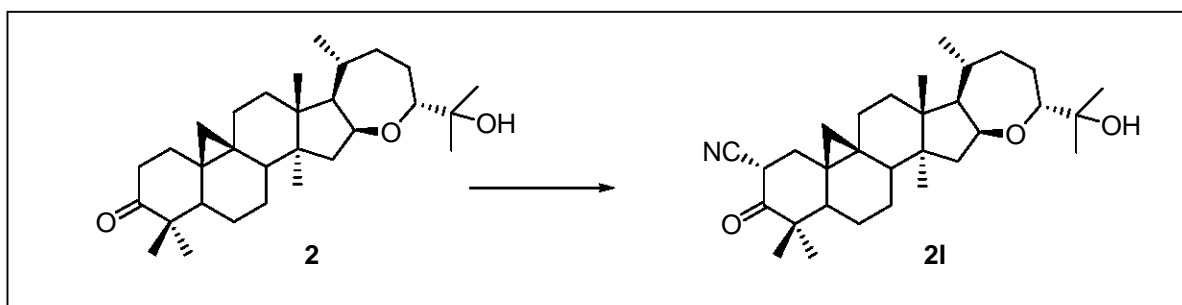


Figura 38. Obtención de la 2α -ciano-($16\beta,24R$)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [21].

Una disolución de 250 mg de la argentatina B [2] en 3 ml de THF, se enfrió a -78°C y se vertió sobre 3 ml de una disolución 0.2 M de LDA (Sigma) conservada a la misma temperatura en atmósfera inerte. La mezcla se agitó por 1 hora y se adicionó lentamente sobre una disolución de 368 mg de cianuro de p-toluensulfonilo en 3 ml de THF (-78 °C, atmósfera inerte). Después de 1 hora, la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de hidróxido de amonio y se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó con HCl al 10% y se extrajo con éter dietílico. A partir de la fase orgánica se obtuvo un semisólido, el cual se purificó por cromatografía en columna (8:2, Hex/AcOEt) para obtener 114 mg de la 2 α -ciano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2I] como un sólido blanco amorfo de p. f. de 222-223°C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3544.8 (O-H), 2968.1-2874.0 (C-H), 2251.9 (CN), 1719.7 (C=O), 1463.5, 1370.3, 1114.6, 1058.6. EM-IE m/z (%): 481 (M⁺, 3), 422 (M⁺ -59, 74), 404 (100), 336 (15), 175 (52), 161 (32), 133 (30), 109 (43), 85 (50), 59 (35), 43 (24). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.67 (d, *J*=4.8, 1H, H-19), 0.89 (s, 3H, CH₃), 0.94 (d, *J*= 5, 3H, CH₃-21), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.13 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 2.76 (sa, 1H, OH), 3.59 (dd, *J*= 2.4, *J*= 12.4, 1H, H-24), 3.93 (dd, *J*= 5.6, *J*= 13.1, 1H, H-2 β), 4.60 (c, 1H, H-16). RMN ¹³C (50 MHz) δ ppm: 38.9 (C-1), 39.9 (C-2), 204.7 (C-3), 50.4 (C-4), 48.5 (C-5), 21.2 (C-6), 25.7 (C-7), 47.1 (C-8), 21.9 (C-9), 25.5 (C-10), 26.4 (C-11), 32.5 (C-12), 45.7 (C-13), 45.7 (C-14), 44.8 (C-15), 74.8 (C-16), 57.4 (C-17), 18.8 (C-18), 29.6 (C-19), 29.0 (C-20), 21.0 (C-21), 35.4 (C-22),

23.5 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 24.0 (C-26), 25.7 (C-27), 19.5 (C-28), 22.2 (C-29), 20.3 (C-30), 117.0 (C-31).

V.7.2.13 2 α -ciano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2m]

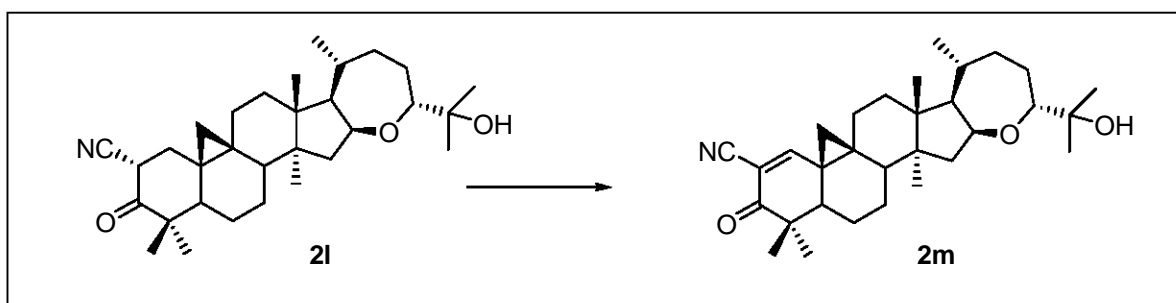


Figura 39. Obtención de la 2 α -ciano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2m].

La 2 α -ciano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2m] se obtuvo empleando el método descrito previamente en la sección V.7.2.11. Para ello, se emplearon 40 mg de 2 α -ciano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona [2l] disueltos en CH₂Cl₂ y se obtuvieron 29.1 mg (76%) de la 2 α -ciano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [2m] como un sólido blanco cristalino que fundió a 274-275 °C. IR (CHCl₃)_{v_{max}} cm⁻¹: 3544.27 (O-H), 2957.87, 2876.78, 2232.28 (CN), 1687.55 (C=O), 1594.45, 1464.18, 1385.60, 1113.03. EM-IE m/z (%): 479 (M⁺, 21), 461 (36), 420 (M⁺ -59, 45), 402 (60), 375 (25), 336 (30),

233 (68), 219 (47), 201 (24), 175 (44), 161 (90), 147 (74), 135 (64), 109 (100), 94 (73), 85 (78), 81 (51), 59 (51), 43 (57). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (s, 3H, CH_3), 0.95 (d, $J= 6.6$, 3H, CH_3 -21), 1.09 (s, 6H, 2CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.15 (s, 3H, CH_3), 3.59 (dd, $J= 2.1$, $J= 12.5$, 1H, H-24), 4.61 (q, 1H, H-16), 7.51 (s, 1H, H-1). RMN ^{13}C (75 MHz) δ ppm: 166.3 (C-1), 114.0 (C-2), 197.8 (C-3), 46.3 (C-4), 43.8 (C-5), 19.2 (C-6), 27.7 (C-7), 43.3 (C-8), 28.2 (C-9), 32.0 (C-10), 23.2 (C-11), 31.9 (C-12), 45.9 (C-13), 45.8 (C-14), 43.1 (C-15), 74.5 (C-16), 57.0 (C-17), 17.5 (C-18), 31.9 (C-19), 29.0 (C-20), 21.0 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.7 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 21.2, 18.8, 18.6 (C-28 to C-30), 115.4 (C-31). Además, se llevó a cabo un estudio de difracción de rayos X de un cristal de dimensiones 0.32 x 0.16 x 0.07 mm empleando un difractómetro Bruker Smart a la temperatura de 291 K. Los datos cristalográficos principales se muestran en el Cuadro 10. Los resultados del estudio también se depositaron en el CCDC con la clave CCDC 258730.

V.7.2.14 (16*S*, 17*R*, 20*S*)-3-oxo-25-*nor*-cicloartan-16,24-lactona [2n]

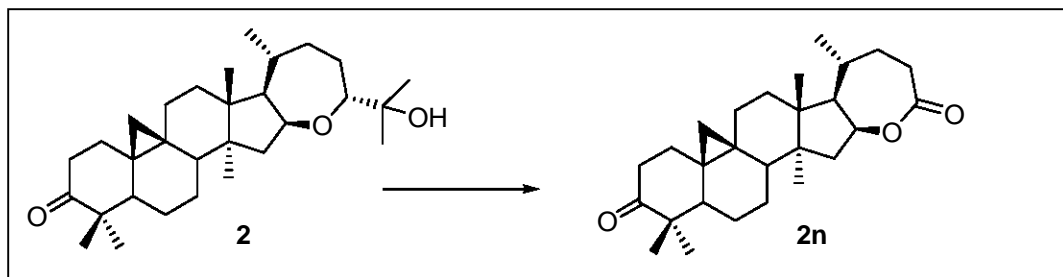


Figura 40. Obtención de la (16*S*, 17*R*, 20*S*)-3-oxo-25-*nor*-cicloartan-16,24-lactona [2n].

Una disolución de 100 mg de argentatina B [2] en 5 ml de ácido acético se trató a con una disolución acuosa de trióxido de cromo (100 mg CrO₃/ 0.3 ml H₂O), a 0-5°C. Después de 15 minutos, la mezcla se dejó a temperatura ambiente y posteriormente se extrajo con AcOEt (3 x 20 ml). La fase orgánica se procesó de manera usual para obtener la (16S, 17R, 20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24-lactona [2n] (45 %). P. f. 260-261 °C. IR (CHCl₃)_{vmax} cm⁻¹: 2964, 1730 (C=O), 1701 (C=O), 1461, 1383, 1325, 1269. EM-IE m/z (%): 412 (95), 398 (20), 397 (70), 311 (45), 274 (100), 259 (43), 133 (55), 121 (47), 119 (45), 105 (48), 93 (47), 91 (46), 55 (60), 41 (45). RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.61 (d, J= 4.52, 1H, H-19), 0.85 (d, J= 4.52, 1H, H-19'), 0.95 (s, 3H, CH₃), 1.00 (d, J= 5.5, 3H, CH₃-21), 1.06 (s, 3H, CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 4.92 (c, 1H, H-16). RMN ¹³C (50 MHz) δ ppm: 33.8 (C-1), 37.3 (C-2), 216.2 (C-3), 50.2 (C-4), 48.3 (C-5), 21.3 (C-6), 26.1 (C-7), 47.4 (C-8), 20.6 (C-9), 26.1 (C-10), 26.2 (C-11), 32.5 (C-12), 46.5 (C-13), 45.7 (C-14), 44.1 (C-15), 80.9 (C-16), 56.3 (C-17), 19.0 (C-18), 29.7 (C-19), 29.3 (C-20), 20.2 (C-21), 31.3 (C-22), 29.3 (C-23), 174.1 (C-24), 19.2 (C-28), 22.2 (C-29), 20.8 (C-30).

V.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS DERIVADOS DE LAS ARGENTATINAS A Y B EN LA PROLIFERACIÓN DE ALGUNAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO

Al igual que las argentatinas A y B, el efecto de sus derivados se determinó a una concentración de 50 μM para determinar la ventana farmacológica. Posteriormente, cada compuesto se evaluó a diferentes concentraciones (dependiendo del rango de potencia), con el fin de obtener las curvas concentración-respuesta y calcular la concentración inhibitoria media (CI_{50}). Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (20mM) y se diluyeron en medio de cultivo hasta obtener las disoluciones adecuadas para el estudio. La doxorubicina se utilizó como un control positivo a cinco concentraciones en un rango de 0.01 a 5 μM .

Las líneas celulares de cáncer humano que se emplearon son PC-3 (cáncer de próstata), K562 (leucemia), U251 (SNC) y HCT-15 (cáncer de colon). Las condiciones de cultivo fueron las previamente descritas en la sección **V.5.2**. El efecto de cada compuesto en cada línea celular se determinó empleando el modelo de la sulforrodamina como se describió previamente.

V.9 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, CITOSTÁTICOS Y GENOTÓXICOS DE LA 2-FORMIL- (16 β ,24*R*)-16,24-EPOXI-25-HIDROXICICLOART-1-EN-3-ONA EN LINFOCITOS HUMANOS

Los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de la 2-formil-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona [**2k**] se evaluaron empleando el mismo modelo que se describió para las argentatinas A y B (Sección V.6).

Se emplearon cultivos de sangre proveniente de tres donadores de sexo masculino de edad promedio de 25 años que no estuvieran bajo ningún régimen medicamentoso o que hubieran presentado síntomas de enfermedad.

El compuesto **2k** se evaluó a las concentraciones de 0.62, 1.25, 3.12, 6.2 y 10 μ M. Se utilizó mitomicina C (1 μ M) como control positivo. Cada concentración se evaluó por duplicado en tres experimentos independientes de cada donador.

Los resultados obtenidos con cada tratamiento fueron comparados estadísticamente con el testigo utilizando un ANOVA. Valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

V. 10 ESTABLECIMIENTO DE LAS RELACIONES ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Los estudios de relaciones estructura-actividad se llevaron a cabo empleando Sybyl 6.9 ® (Tripos Associates, St. Louis, MO, EUA) en una estación de trabajo silicon graphics Octane ®.

V.10.1 Argentatina A

El modelado de la argentatina A y de sus derivados se llevó a cabo partiendo de las coordenadas cristalográficas descritas para la ciclogalegenina (Figura 41) aislada de *Astragalus sp.* (Kravtsov *et al.*, 1988).

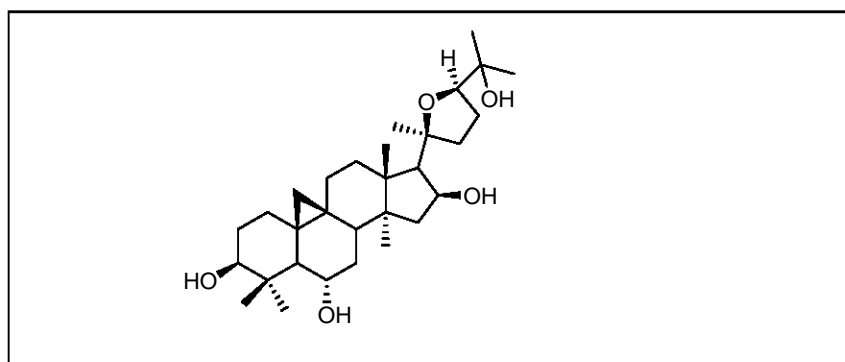


Figura 41. Estructura de la ciclogalegenina.

Compuesto 1. Se sustituyó el grupo hidroxilo ubicado en la posición 6 de la ciclogalegenina por un hidrógeno (Figura 41). Además, se modificó la hibridación de C3 y se generó el carbonilo en esa posición. Posteriormente se generó un agregado que incluía todos los átomos excepto los ubicados en el anillo A. Se obtuvo el conformero de menor energía (por minimización).

El modelado de los compuestos **1a**, **1d**, **1f**, **1g**, **1h** y **1i**, se realizó a partir de la estructura **1**, por simple modificación de los átomos previamente descritos y posterior minimización.

Compuesto **1b**. Se sustituyeron los hidrógenos de los hidroxilos del compuesto **1**, por grupos acetato. Se obtuvo el conformero de mínima energía (*Tripos Force Field*) y se calcularon las cargas de Mulliken para todos los átomos, usando *MOPAC*. Se generó un agregado que incluía todos los átomos excepto los del anillo E y los grupos acetato. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis conformacional usando la opción "*grid search*" en Sybyl (0-330°, $\Delta = 30^\circ$ para los ángulos C2'-C1'-O-C16, C1'-O-C16-C17, O-C16-C17-C20-O, O-C24-C25-O, C24-C25-O-C1'' y C25-O-C1''-C2'').

El modelado de los compuestos **1c** y **1e** se efectuó a partir de la estructura **1b** por simple modificación de las funcionalidades correspondientes y la posterior minimización.

Se realizó una comparación cualitativa del potencial electrostático de cada molécula durante la visualización de las superficies *MOLCAD* de los compuestos **1**, **1a- 1i** en Sybyl.

V.10.2 Argentatina B

El modelado molecular de los compuestos **2**, **2a**, **2b**, **2d**, **2i**, **2l** y **2n** se efectuó a partir de las coordenadas cristalográficas que se obtuvieron en el análisis de difracción de rayos X.

Sin embargo, en el caso de los compuestos en donde no se poseían datos cristalográficos, el modelado de cada estructura se realizó a partir de la estructura de compuestos cuyos datos cristalográficos eran ya conocidos y se hicieron modificaciones empleando valores estándar de enlaces y ángulos en Sybyl®, las cuales se describen a continuación.

Compuesto **2c**. Se emplearon las coordenadas cristalográficas del compuesto **2b**. El hidrógeno del alcohol se sustituyó por un grupo acetato. Después, se generó un agregado que incluía todos los átomos excepto los correspondientes al hidroxiiisopropilo y el grupo acetato. Se obtuvo el conformero de mínima energía (*Tripos Force Field*) y se calcularon las cargas de Mulliken para todos los átomos, usando *MOPAC*. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis conformacional usando la opción “*grid search*” en Sybyl (0-345°, $\Delta = 15^\circ$ para los ángulos C24-C25-O-C1' y O-C24-C25-O).

Compuesto **2e**. La estructura de este compuesto se obtuvo por modificación de la determinada para la (16 β ,24*R*)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3,4-lactona.

Se sustituyó el átomo de oxígeno de la lactona por un átomo de nitrógeno. Se generó un agregado que contenía todo excepto el anillo A. Se obtuvo el conformero de mínima energía (*Tripes Force Field*) y se calcularon las cargas de Mulliken para todos los átomos.

Compuesto **2f**. Se generó a partir del compuesto **2e** empleando el mismo procedimiento al descrito para el compuesto **2c**.

Compuesto **2g**. Se generó a partir del compuesto **2** empleando el mismo procedimiento descrito para **2c**.

Compuesto **2h**. Se generó a partir del compuesto **2d** empleando el mismo procedimiento descrito para **2c**.

Compuesto **2j**. Se obtuvo a partir de **2**. Se cambió el tipo de hibridación de C2 y se adicionó un anillo isoxazol a C2-C3. Se generó un agregado que incluía todo excepto los anillos A e isoxazol. Se obtuvo el conformero de mínima energía (*Tripes Force Field*) y se calcularon las cargas de Mulliken.

Compuesto **2k**. Dicha estructura se obtuvo a partir del compuesto **2m**. Se sustituyó el grupo nitrilo por un grupo formilo y se procedió de igual manera a lo previamente descrito.

Se realizó una comparación cualitativa del potencial electrostático de cada molécula durante la visualización de las superficies *MOLCAD* de los compuestos **2**, **2a- 2n** en Sybyl.

Se generó una base de datos en donde se almacenaron todas las moléculas. Estas últimas se alinearon sobre la argentatina B (**2**), la cual se consideró como molécula plantilla (*template*) empleando la opción 'align database' en Sybyl. Los anillos B, C y F del triterpeno se designaron como fragmento común de todas las estructuras.

Se creó una hoja de cálculo en donde cada fila correspondía a un compuesto diferente. En las columnas se incluyeron los valores de actividad biológica de cada compuesto en cada línea celular expresados como Log (1/IC₅₀).

Se generaron los descriptores CoMFA. Para ello, se calcularon las interacciones estéricas y electrostáticas empleando como sondas un carbono sp³ y una carga +1 respectivamente. El tamaño de rejilla fue de 2 Å en las direcciones x, y, z. Se asignó el valor de 30 kcal/mol como energía máxima de corte para las interacciones en estudio. Además se consideró el mínimo de 2 kcal/ mol (*column filtering*). Véase Figura 42.

Se llevó a cabo un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) empleando los descriptores CoMFA como variables independientes y la actividad citotóxica sobre una determinada línea celular de cáncer humano como

variable dependiente [Log (1/ IC₅₀)]. En primer lugar, se llevó a cabo el análisis empleando el método de validación cruzada 'leave-one-out'.

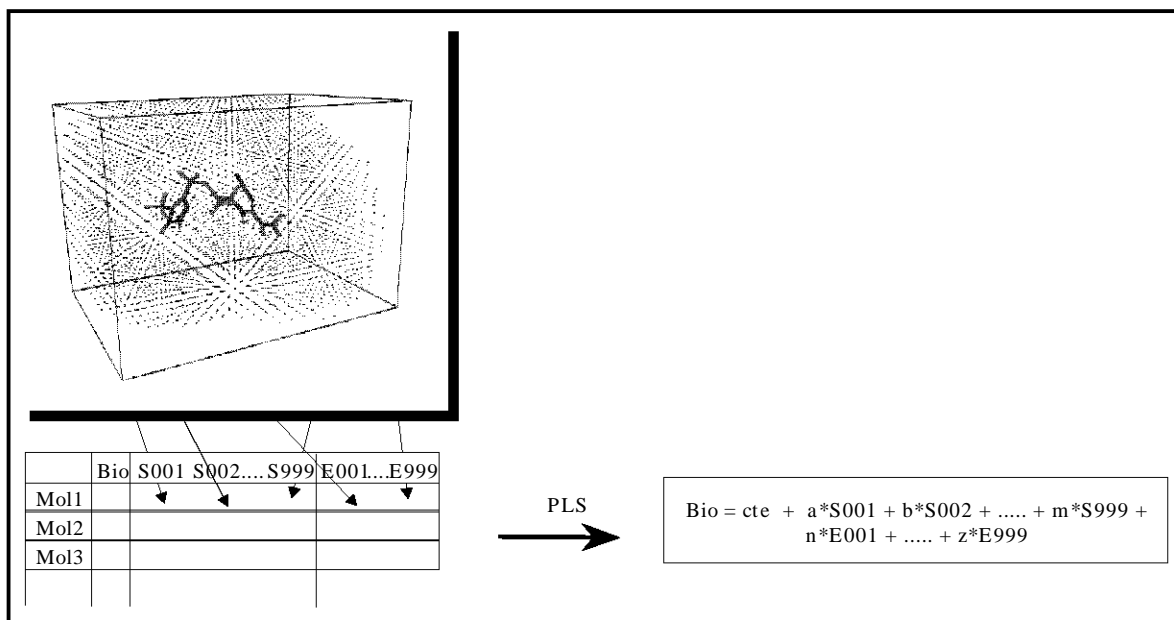


Figura 42. Representación de la obtención de los descriptores CoMFA y el análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

El análisis final se desarrolló empleando el número óptimo de componentes encontrado en el primer análisis que presentara un valor de q^2 mayor. Se obtuvieron los gráficos de actividad predicha vs. actividad experimental, y se visualizaron los contornos estéricos y electrostáticos. Posteriormente, se procedió al análisis de los resultados.

El procedimiento anterior se efectuó por separado empleando los valores de actividad citotóxica para cada línea celular de cáncer humano.

V.11 CÁLCULO TEÓRICO Y DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOG P

V.11.1 Cálculo Teórico

Se calculó el logaritmo del coeficiente de partición (Log P) de los compuestos **1**, **2** y **2b**, por medio del programa ChemDraw 8.0 (ChemOffice Ultra 2004 ®), en una PC. Además se empleó el programa CLogP en Sybyl6.9 en una estación de trabajo Silicon Graphics Octane ®.

V.11.2 Determinación experimental

Se determinó el coeficiente de partición de los compuestos **1**, **2** y **2b** a diferentes concentraciones por duplicado (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentraciones de los triterpenos a las que se determinó el coeficiente de partición.

Compuesto	Concentraciones
1	4, 2.5, 2, 1 mg/ml
2	4, 2.5, 2, 1.5, 1 mg/ml
2b	2, 1 mg/ ml

La determinación del coeficiente de partición se llevó a cabo tomando en cuenta las recomendaciones informadas por Hansch y Leo (1995) y Lyman y

Rosenblatt (1982) para compuestos con lipofilidad alta. Los experimentos se realizaron empleando 1 ml de octanol (saturado con agua) y 200 ml de agua (saturada con octanol) en un embudo de separación limpio y seco. El compuesto a evaluar se solubilizó en la fase orgánica. Durante el experimento, el embudo de separación se agitó suavemente en intervalos de 1 min de agitación continua y 9 min de reposo durante un tiempo total de 1.5 horas. Posteriormente, se permitió un reposo de 2 horas. Después, la fase acuosa se separó y transfirió a un embudo de separación donde fue extraída con cloruro de metileno grado HPLC (Sigma). La fase orgánica se llevó a sequedad en un inserto silanizado.

En el caso de los compuestos **1** y **2b**, el residuo contenido en el inserto se disolvió en 30 μ l de metanol y se colocó en un vial de automuestreo que se integraría a un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

En el caso del compuesto **2**, el residuo contenido en el inserto se derivatizó con 20 μ L MSTFA (N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) a 75°C durante 20 min y posteriormente se colocó en un vial de automuestreo para el análisis de CG-EM.

Las muestras de cada compuesto colocadas en los insertos correspondientes fueron integradas a un equipo de CG-EM Sistema HP (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) que consistía en un cromatógrafo HP conectado a un espectrómetro de masas (cuadrupolar) HP 5988. El CG estaba equipado con

un automuestrador HP7673 y una columna DB-1 (J& W, Folson, CA, EUA). Se empleó helio como gas acarreador a una presión de 15 p.s.i. El inyector y la línea de transferencia se mantuvieron a 285 °C. La temperatura de la columna se mantuvo a 160 °C por 4 minutos seguido de un gradiente de 15 °C/ min hasta alcanzar la temperatura de 230 °C. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes, impacto electrónico, temperatura de la fuente de iones 200 °C, un voltaje de 62 eV para un modo de detección de iones totales.

Se determinó el área bajo la curva (ABC) del pico correspondiente al compuesto en análisis en el cromatograma (Cuadro 12).

Cuadro 12. Tiempo de retención de **1**, **2** y **2b**.

Compuesto	Tr (min)
1	16.42
2	15.99
2b	15.95

De manera independiente se realizaron curvas de calibración de cada compuesto, las cuales fueron empleadas para determinar la cantidad del compuesto en análisis en la fase acuosa total. De manera indirecta, se calculó la cantidad de compuesto en la fase de octanol. Después, se obtuvieron las concentraciones en cada fase y se calculó el coeficiente de partición.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A partir de la resina, subproducto del proceso de industrialización de la especie *Parthenium argentatum*, se aislaron las argentatinas A, B e isoargentatina A por medio de técnicas cromatográficas convencionales en un rendimiento del 2.7, 5.5 y 0.13% respectivamente. La caracterización de los tres triterpenos se efectuó por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura (Komoroski *et al.*, 1986; Martínez *et al.*, 1990; Rodriguez-Hanh *et al.*, 1970).

Se logró el aislamiento por métodos químicos convencionales de los triterpenos bajo estudio en cantidades importantes a partir de la resina. Se estima que la resina constituye el 5% en peso del arbusto y que un 55% de la resina está constituido por triterpenos (Komoroski *et al.*, 1986), donde aproximadamente la mitad son las argentatinas (Schloman *et al.*, 1983). Tomando esto en consideración *P. argentatum* constituye una fuente potencial de triterpenos con uso farmacéutico potencial.

En 1986, Romo de Vivar y Matsubara informaron de la cristalización de la isoargentatina A (incanilina) y la argentatina B, pero las figuras correspondientes se encontraban colocadas erróneamente y, los datos cristalográficos no se depositaron (Matsubara y Romo de Vivar, 1986).

Debido a que parte de los objetivos de este trabajo fue el establecimiento de relaciones estructura-actividad, y bajo la primicia de que la actividad biológica es una función de la estructura química, se realizó el estudio de difracción de rayos X de la argentatina B e isoargentatina A (incanilina) con el fin de obtener la información cristalográfica y establecer la estereoquímica de dichos compuestos (Figura 43).

Como se puede observar en la Figura 43, la argentatina B presenta fusiones *trans-cis-trans* para los anillos A/B, B/C y C/D. El anillo B se encuentra distorsionado debido a la presencia del anillo de ciclopropano. En la estructura cristalina, la argentatina B presenta uniones de H entre el alcohol ubicado en posición 25 y el oxígeno del anillo etéreo E.

Por otro lado, se observó que la incanilina presenta configuración *S* y *R* en los carbonos 20 y 24 respectivamente. Se observa la fusión *trans* de sus anillos A/B y C/D. El anillo B adopta una conformación de sobre distorsionado, mientras que el anillo D adopta una conformación torcida. En la estructura cristalina se observa la formación de dímeros unidos por enlaces de hidrógeno O-H \cdots O (Figura 44).

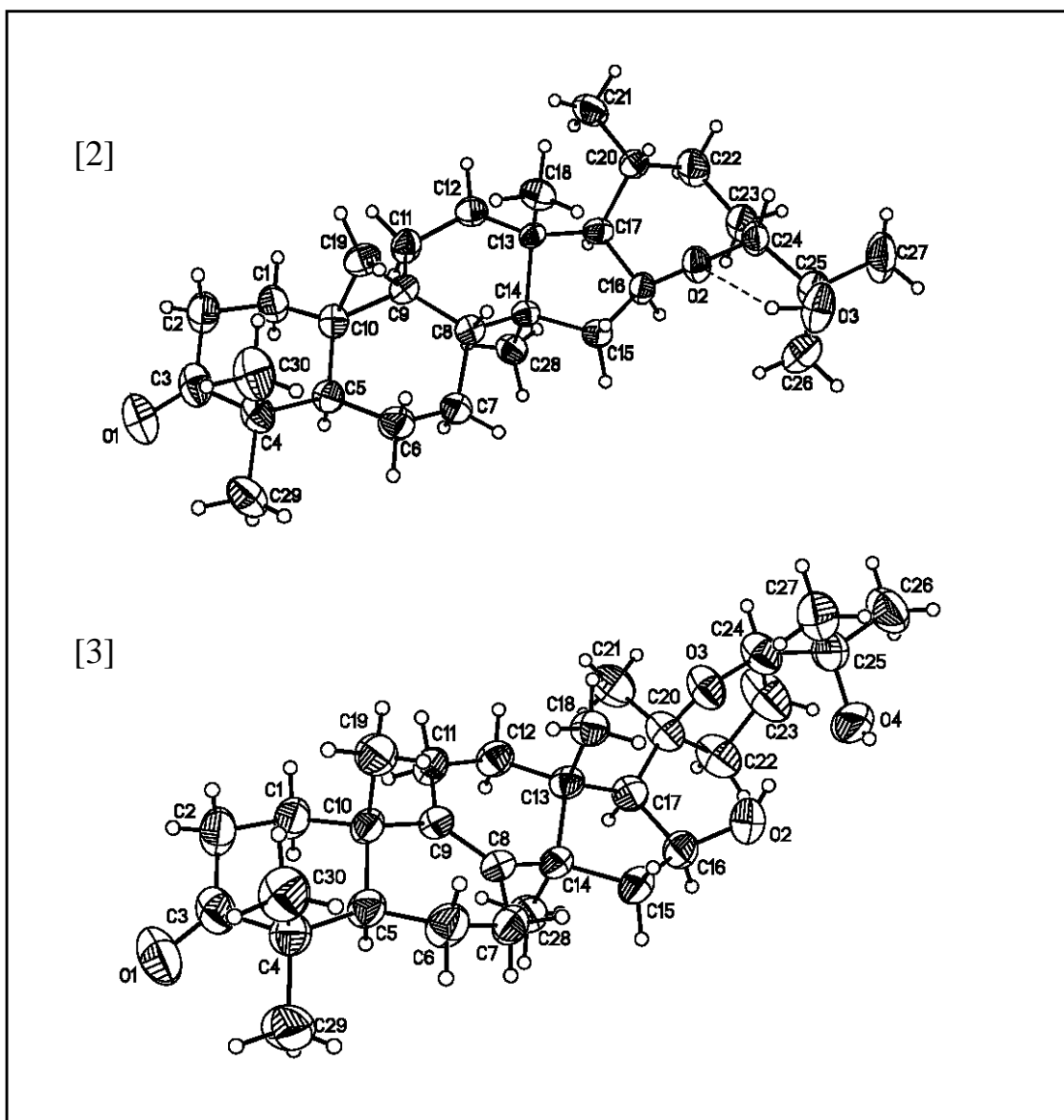


Figura 43. Estructura de la argentatina B [2] e incanilina [3] obtenidas mediante el análisis de difracción de rayos X.

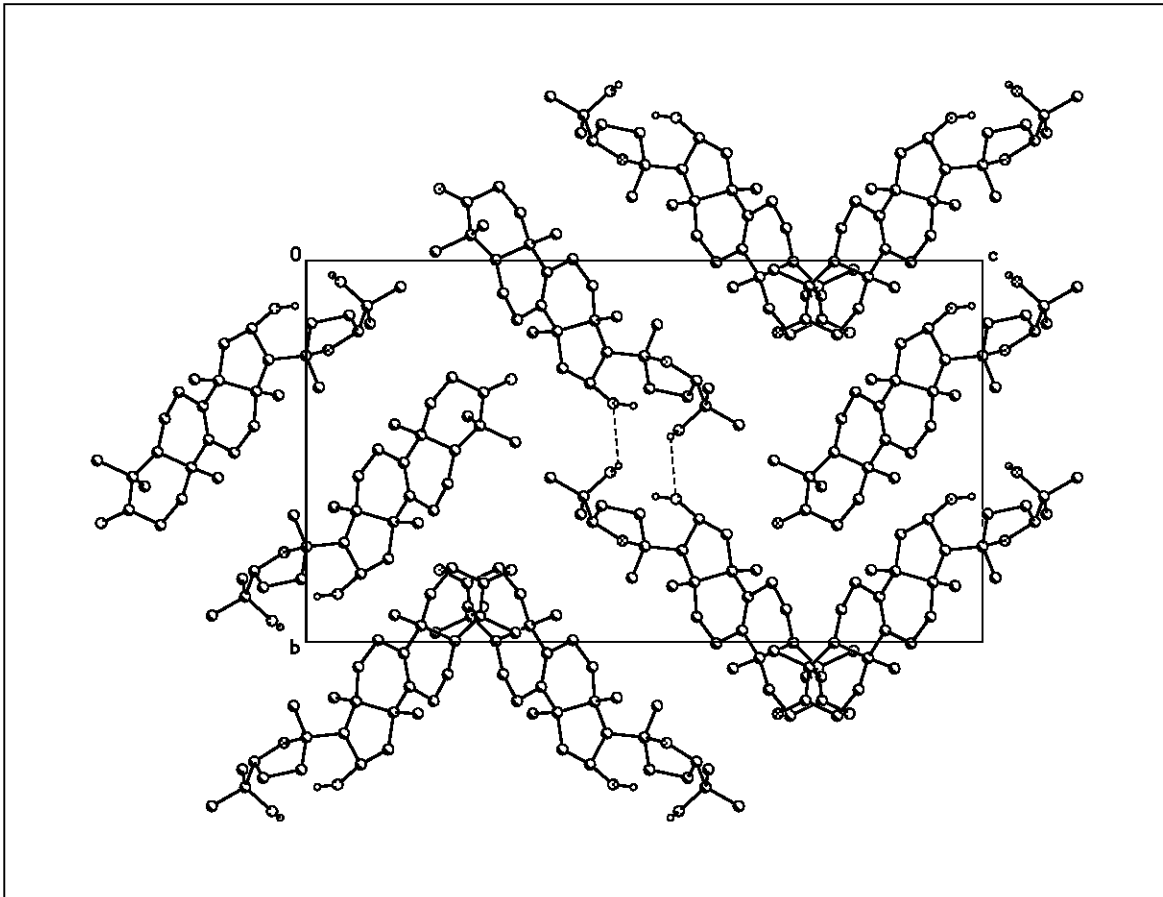


Figura 44. Dímeros presentes en la estructura cristalina formados por la unión de dos moléculas de isoargentatina A [3] mediante enlaces de hidrógeno.

Una vez que se aislaron y caracterizaron las argentatínas A y B, se llevó a cabo la evaluación de sus efectos citotóxicos en líneas celulares de cáncer humano. Para ello, se emplearon las líneas K562 (leucemia), MCF-7 (mama), HCT-15 (colon), PC-3 (próstata) y U251 (SNC).

Las argentatínas A y B presentaron actividad citotóxica dependiente de la concentración. Para ambos compuestos se calcularon los valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) en cada línea celular (Cuadro 13).

Cuadro 13. Actividad citotóxica de las argentatinas A y B en cinco líneas celulares de cáncer humano.

<i>Tratamiento</i>	CI₅₀ (μM) ± EE				
	Líneas celulares de cáncer humano				
	U251 (SNC)	PC-3 (Prostata)	HCT-15 (Colon)	MCF-7 (Mama)	K562 (Leucemia)
Argentatina A	27.34 ±1.00	20.22±3.44	31.70±1.10	27.03±4.40	38.61±4.47
Argentatina B	36.4±6.79	33.41±3.71	24.14±5.58	33.06±5.95	79.38±0.08
Doxorrubicina	0.09±0.02	0.32±0.02	0.23±0.01	0.14±0.01	0.28±0.01

Como se puede observar en el Cuadro 13, los compuestos presentan valores de CI₅₀ de 20.22 a 79.38 μM.

La actividad de la argentatina A fué similar en todas las líneas celulares de cáncer, aunque presentó mayor potencia en la línea de cáncer de próstata PC-3. Por otro lado, la argentatina B presentó menor potencia en la línea K562 que en el resto de las líneas celulares evaluadas.

La actividad citotóxica de las argentatinas evaluadas fue similar a la informada para otros triterpenos, tales como los ácidos betulínico, oleanólico y ursólico (Hyen et al., 1997; Kim et al., 2000; Wick et al., 1999). Por ejemplo, los ácidos oleanólico y ursólico presentan la CI₅₀ de 27.4 y 26.5 μM respectivamente.

Se conoce que estos triterpenos incrementan los niveles de calcio y citocromo C intracelular y que presentan actividad citostática y apoptótica.

Recientemente, se informó que la acteína, un glicósido de un triterpeno del tipo cicloartano, presentó actividad citostática en la línea celular MCF-7. Esta actividad se relacionó con un incremento en los niveles de la proteína p21cip1, así como una disminución en los niveles de la ciclina D1, cdk4 y en la forma hiperfosforilada de la proteína pRb. Aunque estos efectos explican la actividad citotóxica de la acteína, no se podían extrapolar a los efectos de las argentatinas. Mas aún, la actividad en las líneas celulares se realizó empleando el modelo de sulforrodamina B, el cual no permitía discriminar entre un efecto directo de citotoxicidad y una posible actividad citostática.

En 1988, Ostrosky y colaboradores, sugirieron el empleo de la determinación de la cinética de proliferación celular de linfocitos (CPC) como herramienta para la búsqueda de compuestos con actividad anticancerosa. Posteriormente, Fenech (2000) propuso la determinación del índice de división nuclear (IDN) en linfocitos en proliferación cuya citocinesis ha sido inhibida con citocalasina B, como parámetro de citostaticidad. Además, durante la determinación del IDN, es posible determinar los efectos genotóxicos de una sustancia de prueba por medio de la cuantificación de los linfocitos binucleados que presentan micronúcleos, como consecuencia de eventos clastogénicos o aneugénicos.

Tomando lo anterior en consideración, se evaluaron los efectos citostáticos y genotóxicos de las argentatinas A y B empleando dichas herramientas.

Se evaluaron los efectos de las argentatinas en la cinética de proliferación celular (CPC) y en el cálculo del índice de división nuclear (IDN), como parámetros de citostaticidad, empleando linfocitos humanos en proliferación cuya citocinesis ha sido inhibida con citocalasina B.

Para determinar los posibles efectos citostáticos de un compuesto de prueba es importante que las células estén vivas, por lo que se determinaron los efectos de las argentatinas A y B en la viabilidad de linfocitos en proliferación.

Como se puede observar en la Figura 45, la viabilidad de los linfocitos humanos disminuyó en un 32 % con respecto al control ($P < 0.005$) cuando se trataron a la concentración de 25 μM de argentatina A. Por otro lado, la Argentatina B no modificó de manera significativa la viabilidad a las concentraciones evaluadas.

Los efectos sobre la proliferación celular se evaluaron por conteo de la proporción de linfocitos mono (M), bi (B), o polinucleados (P). Así, se observó que la argentatina A no tuvo efectos en dicha evaluación (Figura 45).

Por su parte, la argentatina B incrementó la proporción de linfocitos mononucleados y disminuyó la proporción de linfocitos bi y polinucleados. Estos efectos fueron dependientes de la concentración y significativamente diferentes al grupo control (DMSO) (Figura 46).

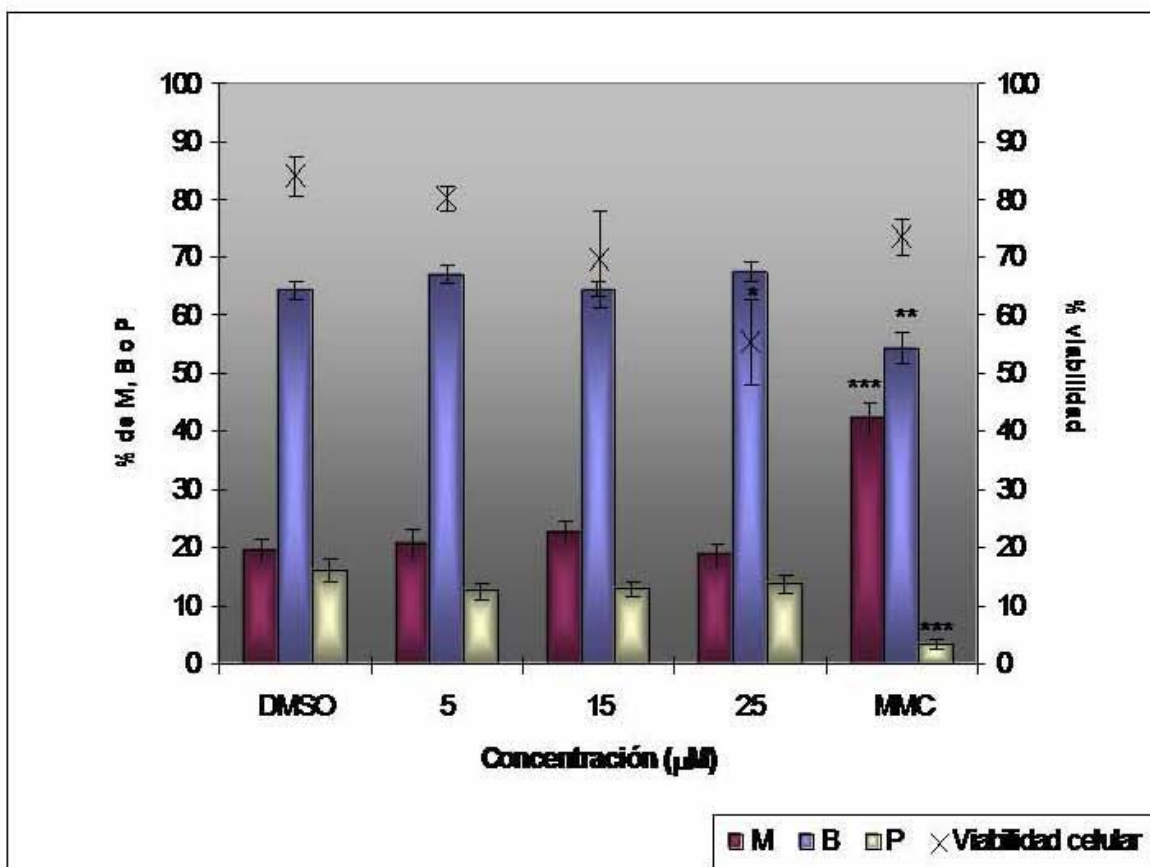


Figura 45. Efectos de la argentatina A (1) en la Viabilidad (x) y la cinética de proliferación celular (barra) de los linfocitos tratados a tres diferentes concentraciones. Porcentaje de linfocitos mononucleados (M), binucleados (B) y polinucleados (P). La mitomicina C (MMC) se empleó como control a la concentración de 1 μM . Los resultados se muestran como la media \pm EE de tres

experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (N=18). *P<0.005, **P<0.004.

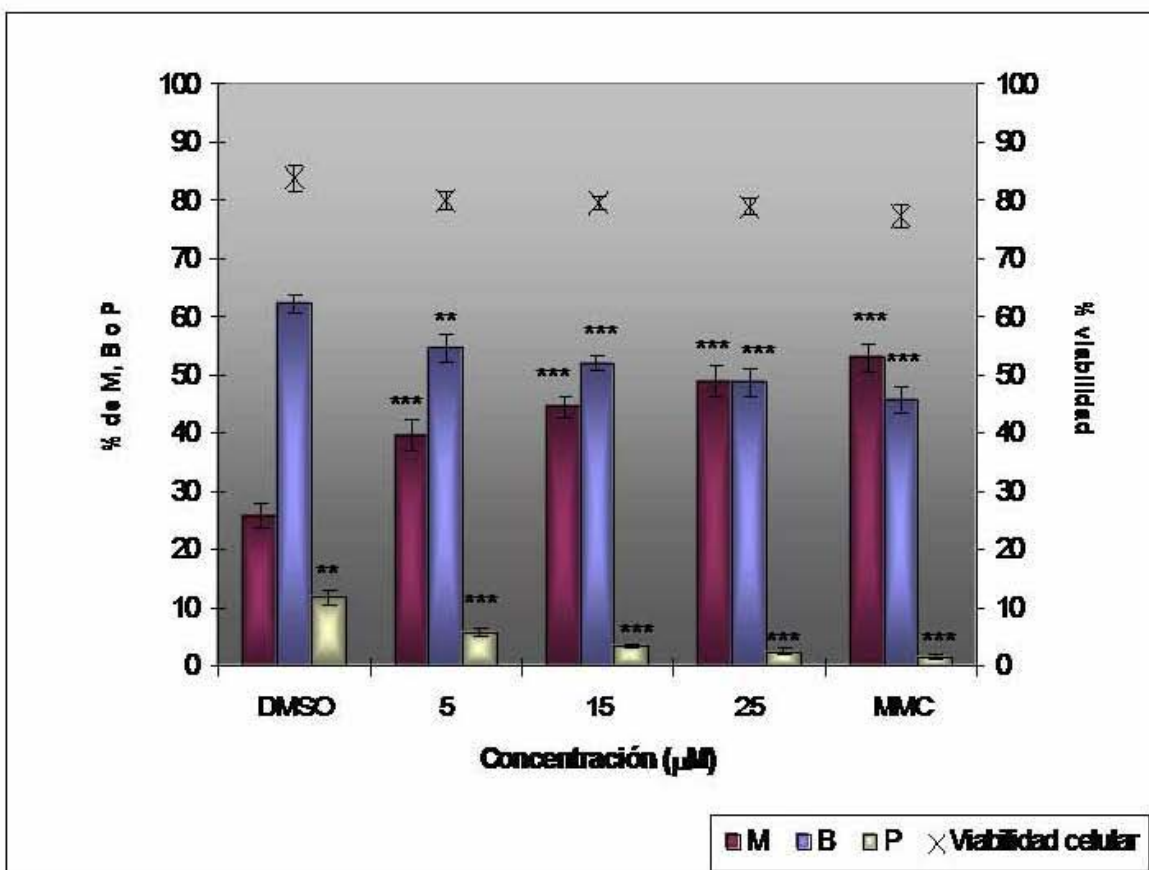


Figura 46. Efectos de la argentinina B (2) en la Viabilidad (x) y la cinética de proliferación celular (barras) de los linfocitos tratados a tres diferentes concentraciones. Porcentaje de linfocitos mononucleados (M), binucleados (B) y polinucleados (P). La mitomicina C (MMC) se empleó como control a la concentración de 1 µM. Los resultados se muestran como la media ± EE de tres

experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (N=18). ** $P < 0.004$ *** $P < 0.001$.

Una vez que se tenían las proporciones de linfocitos mono, bi o polinucleados como resultado del tratamiento con las argentatinas A y B, se calculó el índice de división nuclear (IDN). Como se puede observar en la Figura 47, la argentatina A no tuvo efectos citostáticos estadísticamente significativos. Por su parte, la argentatina B presentó efectos citostáticos ($P < 0.001$) en el modelo de prueba, los cuales fueron independientes de la viabilidad (Figura 48).

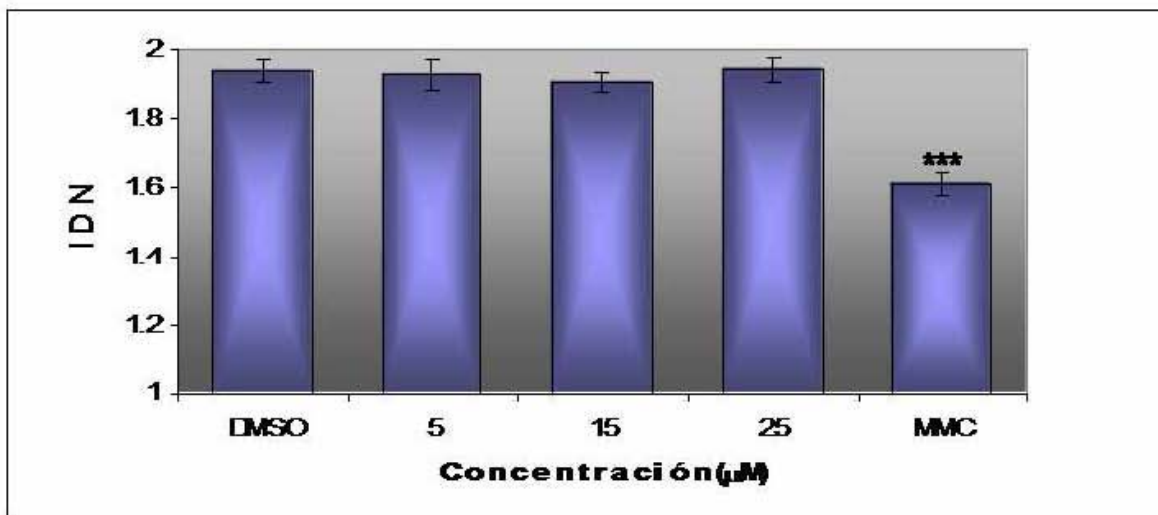


Figura 47. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con la argentatina A. La mitomicina C se empleó como control (MMC) a 1 µM. Cada barra representa la media ± EE de tres experimentos independientes por duplicado de tres donadores (N=18). *** $P < 0.001$.

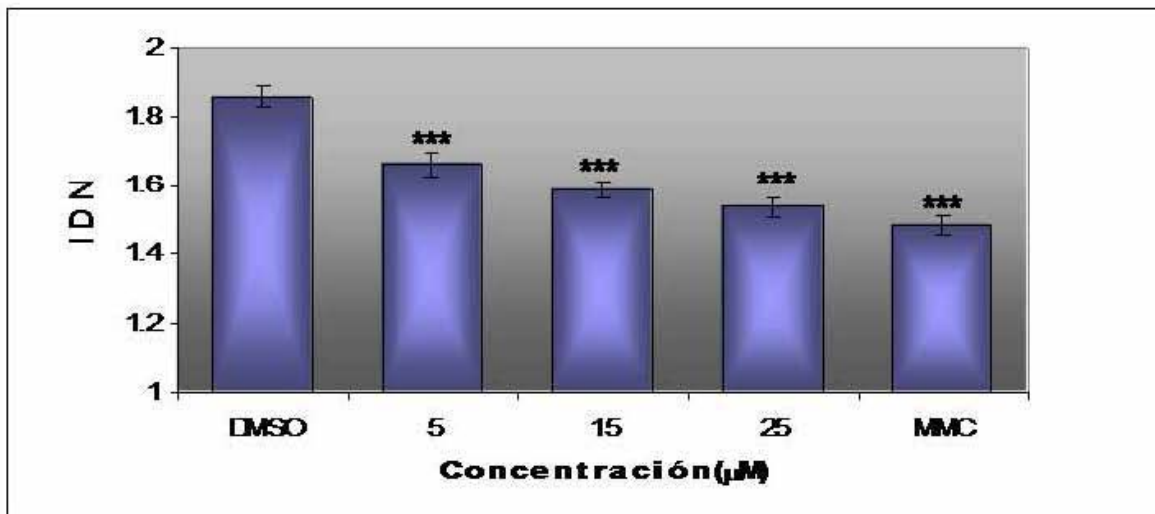


Figura 48. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con la argentatina B. La mitomicina C se empleó como control (MMC) a 1 μM. Cada barra representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes por duplicado de tres donadores (N=18). ***P<0.001.

Los efectos en el IDN mostrados por la argentatina B a la concentración de 25 μM no fueron significativamente diferentes de los determinados para la mitomicina C a 1 μM.

Aunque en el modelo de SRB, tanto la argentatina A, como la argentatina B presentaron un perfil farmacológico similar, la evaluación de la CPC y el cálculo del IDN, permitieron determinar que la acción de estos compuestos es diferente, es decir, la argentatina B puede ser considerada como un agente citostático; mientras que, la argentatina A es un agente citotóxico. Es posible que la

argentatina B impida la proliferación celular por medio de la inhibición de alguna fase del ciclo celular, ya que se sabe que la acteina, un triterpeno del tipo cicloartano semejante a la argentatina B, posee efectos citostáticos asociados a la inhibición de los niveles de ciclina D1, cdk4 y pRb en su forma hiperfosforilada, así como al incremento de los niveles de la proteína p21^{cip1} que llevan a una inhibición del ciclo celular (Saxe *et al.*, 2004).

Por otro lado, se evaluaron los efectos genotóxicos de las argentatinas A y B determinados en función de la frecuencia de micronucleos. Para ello, se empleó el modelo de linfocitos en proliferación cuya citosinesis se inhibió por la citocalasina B, bajo los lineamientos propuestos por Fenech (2000).

Como se puede ver en el Cuadro 14, ninguno de los compuestos de prueba indujo un incremento en la frecuencia de micronucleos de los linfocitos binucleados. Esto indica que ninguna de las argentatinas evaluadas es capaz de provocar daño al ADN como resultado de eventos clastogénicos o aneugénicos.

Cuadro 14. Frecuencia de micronúcleos (MN) de linfocitos en proliferación tratados con las argentatinas A y B.

		MN / 1000 células ± EE
DMSO		4.13 ± 0.30
Argentatina A (μM)		
	5	4.12 ± 0.55
	15	3.88 ± 0.54
	25	3.48 ± 0.50
Argentatina B (μM)		
	5	5.00 ± 0.53
	15	4.75 ± 0.49
	25	5.16 ± 0.51
Mitomicina C	1 μM	32.96 ± 2.31***

***P<0.001.

En el área de química de productos naturales, se conoce que algunos tipos particulares de metabolitos secundarios, tales como los flavonoides y los taninos, poseen efectos quimiopreventivos y que protegen del daño genotóxico inducido por diversos agentes. Sin embargo, también se sabe que algunos compuestos pertenecientes a estos grupos, por sí solos son capaces de inducir daño genotóxico y más aún, pueden tener efectos duales dependientes de la concentración (Kohli *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2000; Skibola and Smith, 2000). Con respecto a los triterpenos, tipo de

compuestos al cual pertenecen las argentatinas, poco se sabe acerca de los efectos genotóxicos o antígenotóxicos. Por ejemplo, Barre y colaboradores (1997) determinaron que el ácido 23 β -dimetilacriloloxi lantanólico fue capaz de reducir la genotoxicidad *in vivo* ocasionada por el tratamiento de ratones con mitomicina C (Barre *et al.*, 1997); sin embargo, no se evaluó la posible genotoxicidad del triterpeno por sí solo.

Es conocido que la mayoría de los fármacos antineoplásicos poseen una gran cantidad de efectos adversos y son capaces de producir daño genotóxico. Dicha capacidad, se ha asociado a la generación de procesos malignos secundarios resultado de los tratamientos terapéuticos (Tohamy *et al.*, 2003).

Es un hecho que la generación de nuevos agentes antineoplásicos es una necesidad; sin embargo, también es un hecho que la obtención de compuestos cada vez más potentes y tóxicos no es necesariamente la mejor solución al problema. Desde este punto de vista, es indispensable la generación de compuestos con capacidad antiproliferativa en las células de cáncer, pero con menos efectos tóxicos a las células normales. Tomando en cuenta lo anterior, se consideró durante el presente trabajo, además de la determinación de la actividad citotóxica empleando el modelo de SRB, la inclusión de la evaluación de los efectos citostáticos y genotóxicos de los compuestos bajo estudio. Nuestros resultados demostraron que las argentatinas A y B poseen un perfil farmacológico diferente. Aunque la potencia de estos compuestos fue baja, ninguno de los dos

compuestos fué capaz de inducir daño genotóxico como resultado de un evento clastogénico o aneugénico, en comparación con el fármaco de referencia, el cual, fue potente pero altamente genotóxico.

Los resultados mostrados hasta ahora, motivaron el empleo de las argentatinas A y B para la obtención de diversos derivados que permitieran el establecimiento de relaciones estructura- actividad de dichos compuestos.

A partir de la argentatina A (**1**), se obtuvieron 9 derivados (**1a-1i**) por medio de transformaciones químicas (Figura 49).

El tratamiento de la argentatina A con una solución de bromo en ácido acético, permitió la obtención del derivado **1a** en un 94% de rendimiento. En el espectro de RMN¹H de dicho derivado, se observa la presencia de una señal doble de dobles a 5.11 ppm ($J= 6.5$ y 12.8 Hz) correspondiente al hidrógeno ubicado en la posición dos (H-2). Las constantes de acoplamiento indican una relación sinclinal y antiperiplanar que evidencian la posición β axial de dicho protón y por lo tanto α ecuatorial del átomo de bromo.

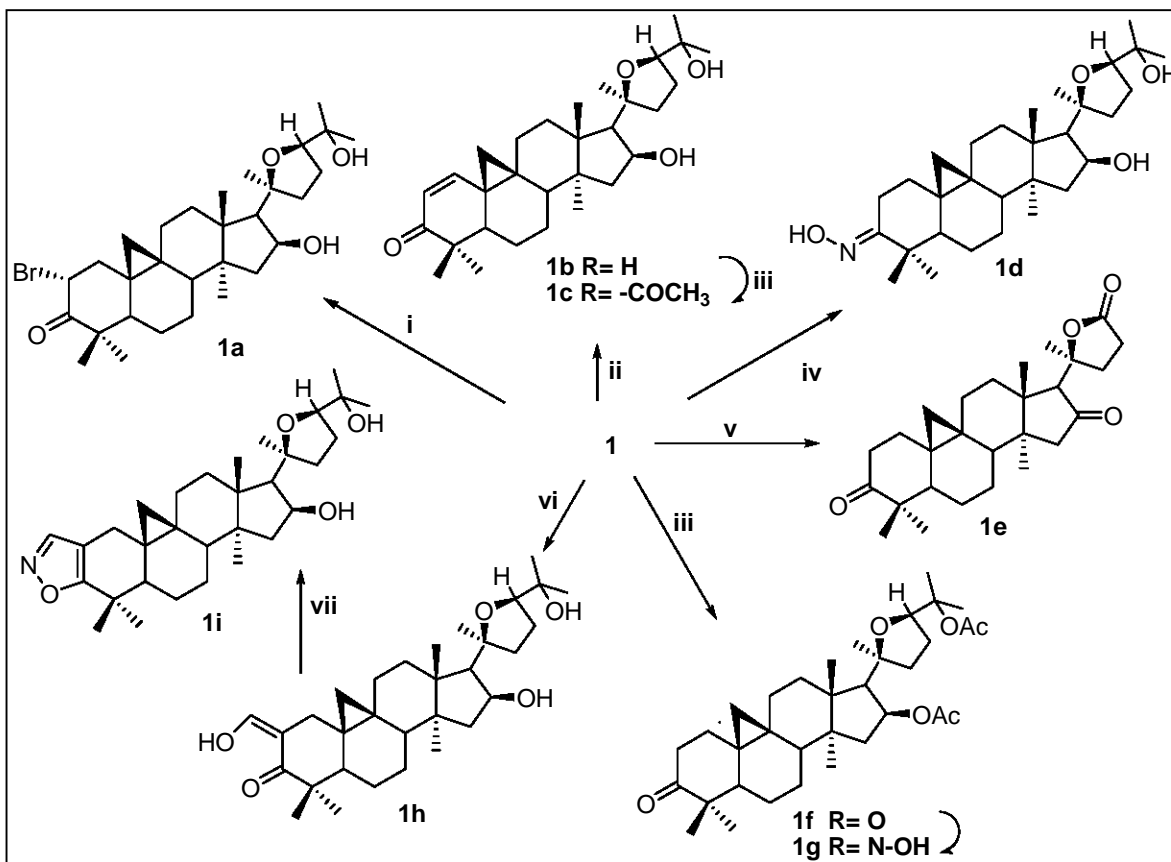


Figura 49. Transformaciones químicas de la argentatina A (1). Condiciones de reacción y rendimiento: (i) Br/CH₃COOH, 98%; (ii) a) PhSeCl, AcOEt, b) THF, H₂O₂ 70%; (iii) AcONa/ (CH₃CO)₂O, 99%; (iv) NH₂OH·HCl, C₅H₅N, 90%; (v) CH₃COOH, CrO₃, H₂O, 40%; (vi) HCO₂Et, C₅H₅N, Na/MeOH, 89%; (vii) NH₂OH·HCl, CH₃COOH, 80%.

Por otro lado, el tratamiento de la argentatina A con cloruro de fenilselenio y la oxidación posterior con peróxido de hidrógeno permitió la obtención del derivado **1b**. En el espectro IR de este derivado, se observa una banda a 1667.35 cm⁻¹,

correspondiente a un carbonilo $\alpha\beta$ insaturado. El espectro de masas muestra la presencia de un pico de m/z 470 que corresponde al ión molecular $[\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3]^+$. En el espectro de RMN¹H se observan dos señales dobles a 6.94 y 6.77 ppm ($J= 10$ Hz) que corresponden a los hidrógenos de las posiciones 2 y 1, respectivamente, que correlacionan con las señales del tipo sp^2 a δ 153.7 y 126.7 ppm observadas en RMN¹³C y evidencian la presencia del doble enlace en C1-C2.

El diacetato **1c** se obtuvo por medio de la acetilación del derivado **1b** con acetato de sodio y anhídrido acético en un 99% de rendimiento. En el espectro de IR de dicho producto se observa una banda intensa a 1734.33 cm^{-1} correspondiente a los carbonilos de los grupos acetato y una banda a 1668.83 cm^{-1} correspondiente a un carbonilo α,β -insaturado. A diferencia del espectro de RMN¹H del compuesto **1b**, se observa una señal adicional a δ 2.03 ppm que corresponde a los hidrógenos (metilo) de los grupos acetato. En el espectro de RMN¹³C de **1c**, se observa la presencia de cuatro señales adicionales a δ 21.6, 22.5, 170.3, 170.4 de los carbonos de los metilos y carbonilos de dos grupos acetato.

Cuando la argentatina A se hizo reaccionar con el clorhidrato de hidroxilamina en piridina se obtuvo el derivado **1d**. En el espectro de IR se observa la desaparición de la banda correspondiente al carbonilo en C-3, para aparecer una pequeña banda a 1638.5 cm^{-1} , asociada a la presencia de C=N; así también, en el espectro de RMN¹³C se observa una señal a δ 167.1 ppm asignada al C-3.

El análisis cristalográfico del derivado **1d** permitió la asignación de la estructura inequívoca (Figura 50).

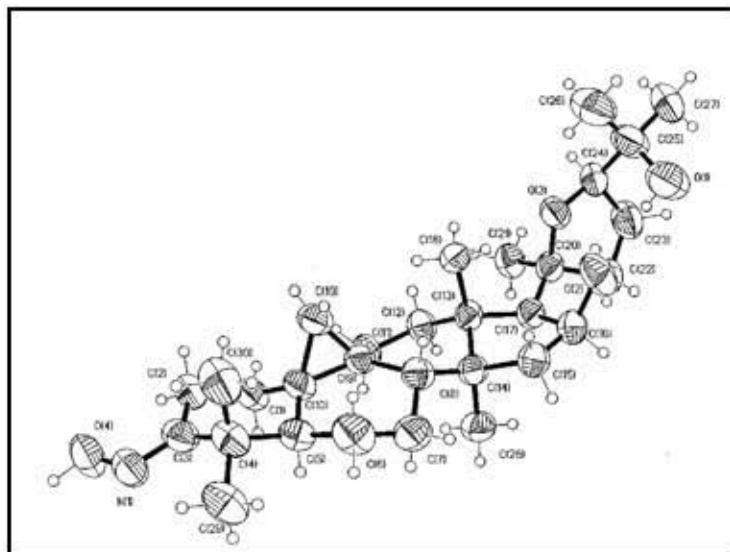


Figura 50. Estructura de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona [**1d**] obtenida en un estudio de difracción de rayos X.

Como se puede apreciar en la Figura 50, los centros estereogénicos 20 y 24 poseen una configuración *S* y *R* respectivamente. Esto, difiere de lo informado por Maatooq y Hoffmann (2002), quienes asumen que la estereoquímica es *R* y *S* para dichos centros.

Debido a que la reacción para la obtención de **1d**, involucra sólo la modificación en C-3 fue posible asignar, de manera indirecta, la configuración *S* y

R en los centros C-20 y C-24 de la argentatina A, los cuales están en concordancia con los encontrados para la isoargentatina A (incanilina).

La oxidación de la argentatina A con trióxido de cromo generó el derivado **1e**. El espectro de IR de este derivado muestra, entre otras, tres bandas intensas a 1768.64, 1737.46 y 1703.84 cm^{-1} , correspondientes a tres carbonilos: cetona cíclica de cinco miembros, éster y cetona cíclica de seis miembros. En el espectro de RMN^1H , se observa la pérdida de dos señales de grupos metilo y de la correspondiente a H-24. Así también, en RMN^{13}C se observa una señal a δ 177.2 ppm (C=O, éster), la aparición de una señal a δ 215.8 ppm (C=O) y la desaparición de las señales de los carbonos C-25, C-26 y C-27. En conjunto, tales evidencias confirman la presencia de la pérdida del hidroxisopropilo en C-24, la generación de la lactona de cinco miembros en el anillo E y la cetona de cinco miembros en el anillo D.

El tratamiento convencional de la argentatina A con acetato de sodio y anhídrido acético permitió la generación del diacetato **1f**. La presencia de una banda a 1734.68 cm^{-1} (C=O) en el espectro de IR, así como la aparición de una señal a δ 2.00 ppm (metilos) en el espectro de RMN^1H y la aparición de cuatro señales nuevas a δ 21.5, 22.4, 170.13 y 170.29 ppm en el espectro de RMN^{13}C , se consideraron como evidencia de la obtención del derivado **1f**.

De igual manera a la descrita para el derivado **1d**, se generó el derivado **1g** en un 90% de rendimiento. En el espectro de IR del derivado **1g** se observa la desaparición de la banda correspondiente al carbonilo ubicado en posición 3, pero se conserva la banda a 1734 cm^{-1} , correspondiente a los grupos acetato. Además, en el espectro de RMN¹³C se observa una señal a δ 166.9 ppm (C=N) del C en posición 3 y la presencia de las señales (cuatro carbonos) de dos grupos acetato.

La generación del derivado **1h** se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Clinton y cols., (1961). Dicha reacción consistió en la generación *in situ* del enol y la alquilación en C-2 de la argentatina A, por medio de una solución de Na/MeOH y formiato de etilo. El espectro de IR de **1h** muestra dos bandas a 1635.1 y 1586.9 cm^{-1} correspondientes al sistema conjugado β dicarbonílico. Por otro lado, en el espectro de RMN¹H se observa la aparición de una señal simple a δ 8.7 ppm y otra a δ 14.8 ppm que se intercambia con D₂O, indicativo de un hidroxilo que se encuentra quelatado. Lo anterior se explica por la generación del tautómero 2-hidroximetileno de **1h**.

La reacción del derivado **1h** con clorhidrato de hidroxilamina en ácido acético generó el isoxazol **1i**. El espectro de masas revela un fragmento de m/z 497 que corresponde al ión molecular de dicho derivado. En el espectro de RMN¹H se observa la presencia de una señal simple a δ 7.98 ppm que correlaciona con una señal a δ 149.4 ppm en RMN¹³C. Además se aprecia el desplazamiento de C-3 a δ 174.8 ppm y del C-2 a δ 109.9 ppm.

Una vez que los nueve derivados triterpénicos de la argentatina A se sintetizaron y caracterizaron, se llevó a cabo la evaluación de su actividad citotóxica en cuatro líneas celulares de cáncer humano. Para esto, se empleó el método de SRB y se siguió el protocolo previamente establecido por Monks y cols. (1991) del INC (EUA). Se obtuvieron las curvas concentración-respuesta de cada derivado en cada línea celular y, posteriormente, se calcularon las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) como parámetros de comparación.

En el Cuadro 15, se muestra la actividad citotóxica de la argentatina A (**1**) y la de sus derivados **1a- 1i**.

La comparación de la actividad de los derivados de la argentatina A permite inferir las siguientes relaciones de la estructura química con la actividad citotóxica.

Cuadro 15. Actividad citotóxica de la argentatina A y sus derivados, expresada en función de la concentración inhibitoria media.

Compuesto	CI ₅₀ ± EE, μM			
	HCT-15 (colon)	K562 (leucemia)	PC-3 (prostata)	U251 (SNC [§])
1	31.70 ±1.10	38.61 ±4.47	20.22 ±3.44	27.34 ±1.00
1a	3.23 ±1.10	4.34 ±0.75	11.06 ±0.66	13.89 ±0.44
1b	16.66 ±1.50	16.84 ±3.46	15.26 ±1.70	18.88 ±0.36
1c	>100	>100	13.93 ±0.324	58.44 ±4.00
1d	35.80 ±1.98	44.43 ±5.57	46.91 ±2.75	26.79 ±2.39
1e	>100	>100	>100	>100
1f	40.68 ±2.49	68.39 ±8.30	22.69 ±2.50	30.51 ±3.45
1g	28.87 ±3.17	15.18 ±2.35	12.56 ±2.42	21.37 ±1.67
1h	9.82 ±0.21	14.38 ±0.78	5.69 ±0.05	5.88 ±1.03
1i	10.24 ±0.77	11.02 ±1.05	13.00 ±3.56	11.30 ±1.55

Los resultados se muestran como la media ± EE de por lo menos tres experimentos independientes. Doxorubicina: HCT-15: 0.23 ± 0.01 μM; K562: 0.28 ± 0.01 μM; PC-3: 0.32 ±0.02 μM; U251: 0.09 ±0.02 μM. [§]Sistema Nervioso Central.

Los compuestos **1a**, **1b**, **1g** y **1h** fueron más activos que **1** en todas las líneas celulares empleadas, por lo que la presencia de un doble enlace entre los carbonos uno y dos (C1-C2), o la de un átomo de bromo o un grupo formilo unido

al carbono dos (C2), así como la presencia de un anillo de isoxazol unido al anillo A, incrementan la potencia de la argentatina A en todas las líneas celulares evaluadas.

Bajo las condiciones de trabajo, la lactona **1e** fue inactiva, lo cual parece indicar que la presencia del grupo 2-hidroxiisopropilo unido en posición veinticuatro (C24) del esqueleto triterpénico es indispensable para la actividad citotóxica.

Como se puede observar en la Figura 51, a diferencia de los compuestos **1**, **1a-1d** y **1f-1i**, el derivado inactivo **1e** presenta un potencial electrostático negativo en la superficie del anillo E (color azul).

Por su parte, los derivados **1b**, **1c**, **1h** y **1i** de potencia superior a la argentatina A, presentan un potencial electrostático negativo sobre el anillo A mayor que la argentatina A, pero un potencial electrostático positivo en el área correspondiente a la posición 1 del mismo anillo. De acuerdo a lo anterior, es posible que este tipo de compuestos, actúe mediante un mecanismo de adición nucleofílica en el anillo A con un blanco molecular.

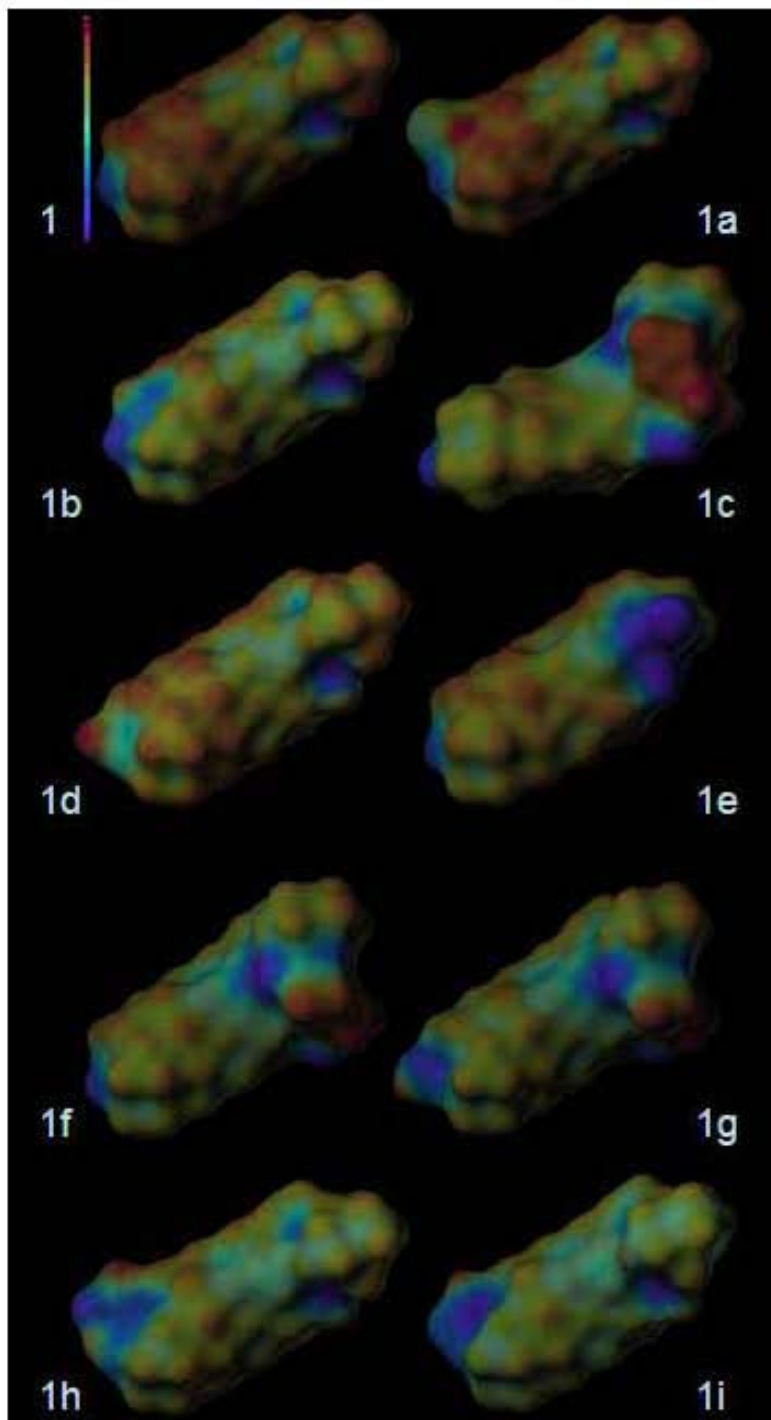


Figura 51. Modelado en 3D (*MolCAD*) de la argentatina A y sus derivados en donde se muestra el potencial electrostático en la superficie de cada estructura.

Recientemente, se informó que algunos triterpenos de tipo oleanano poseen afinidad por algunos receptores nucleares. En algunos casos, esta actividad se ha correlacionado con su capacidad citotóxica. Sin embargo, aunque se conoce que la argentatina A posee afinidad por los receptores de estrógeno (Calzada *et al.*, 1995), es necesario determinar si esta propiedad está relacionada con su actividad sobre algunas líneas celulares de cáncer o si este triterpeno y sus análogos pudiera tener actividad sobre algunos otros blancos.

A partir de la argentatina B [2], se obtuvieron 14 derivados triterpénicos (1a-1i) por medio de transformaciones químicas (Figura 52).

La reacción de la argentatina B [2] con bromo en ácido acético (Figura 52) generó el bromoderivado 2a en un 85.5%. En el espectro de masas de dicho derivado se observó un pico con m/z 534 que correspondía al ión molecular para la fórmula calculada $C_{30}H_{47}BrO_3$. En el espectro de RMN¹H se observó la presencia de una señal doble de doble a 5.11 ppm que correspondía al H-2. Las constantes de acoplamiento de 6.6 y 12.8 Hz de tal señal típicas de interacciones espín-espín de protones vecinales en conformación sinclinal y antiperiplanar respectivamente, con lo que fue posible inferir que el H-2 se encontraba en posición β -axial y el átomo de bromo en α -ecuatorial. Un estudio de difracción de rayos X del derivado 2a permitió la confirmación de la estructura (Figura 53A).

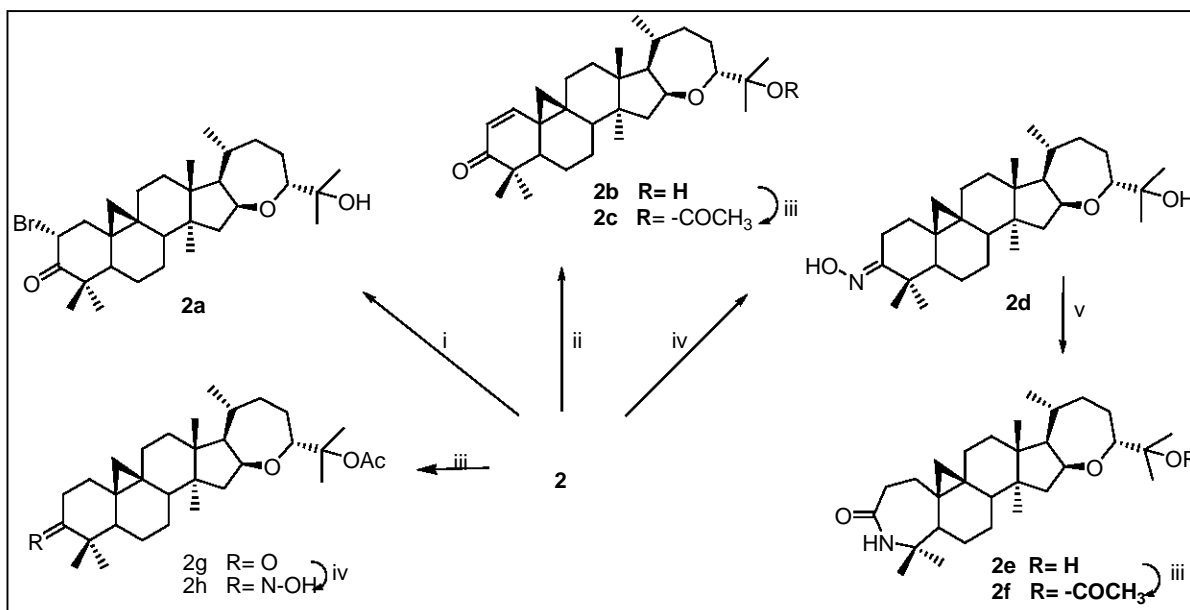
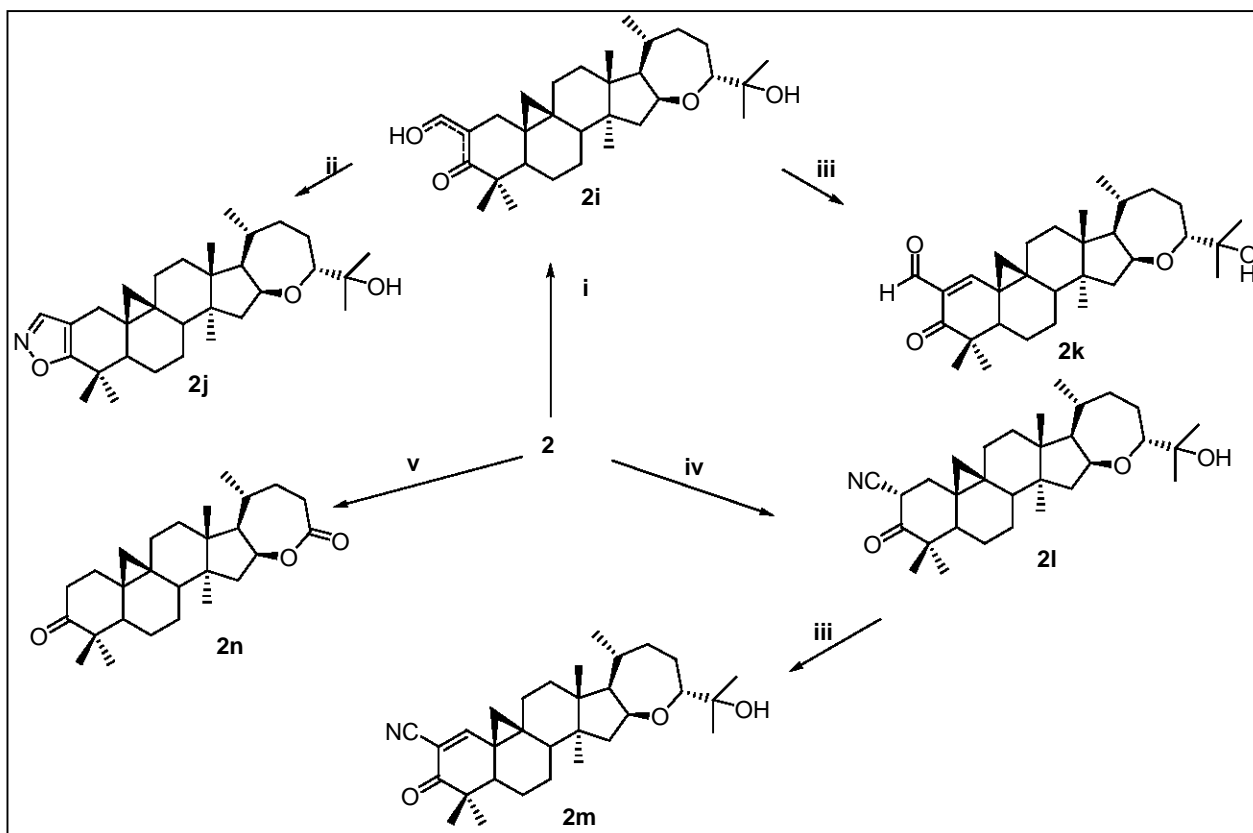


Figura 52. Transformaciones químicas de la argentatina B [2]. Condiciones de reacción y rendimiento: **i**= Br/CH₃COOH, 85.5%; **ii**= a) PhSeCl, AcOEt; b) THF, H₂O₂, 70%; **iii**= AcONa/ (CH₃CO)₂O, 81-89%; **iv**= NH₂OH·HCl, C₅H₅N, 76-78%; **v**= ATFA, CH₂Cl₂, 53%.

Para la obtención del derivado **2b**, la argentatina B se hizo reaccionar con cloruro de fenilselenio y posteriormente con peróxido de hidrógeno (Figura 52). Dicho producto se obtuvo en un rendimiento del 70%. En el espectro de IR de **2b**, se observa una banda intensa a 1663.29 cm⁻¹ que evidencia la presencia de un carbonilo α,β-insaturado. En el espectro de masas se observa un pico de m/z 454 que corresponde al ión molecular del compuesto **2b**. En el espectro de RMN¹H se observa la aparición de dos dobletes a 5.95 y 6.78 ppm (*J*= 10 Hz) correspondientes a los hidrógenos de la posición 2 y 1, respectivamente.



Cont. Figura 52. Transformaciones químicas de la argentatina B [**2**]. Condiciones de reacción y rendimiento: **i**= HCO_2Et , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, Na/MeOH , 71%; **ii**= $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl/CH}_3\text{COOH}$, 80%; **iii**= $\text{PhSeCl/CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, H_2O_2 , 76-81%; **iv**= LDA , pTS-CN , THF , 25-40%; **v**= CH_3COOH , CrO_3 , H_2O , 45%.

Por otro lado, en el espectro de RMN^{13}C se observan dos señales de carbonos sp^2 a 153.68 y 126.77 ppm. Un estudio de difracción de rayos X permitió el establecimiento de la estructura inequívoca del derivado **2b**, la cual se muestra en la Figura 53B.

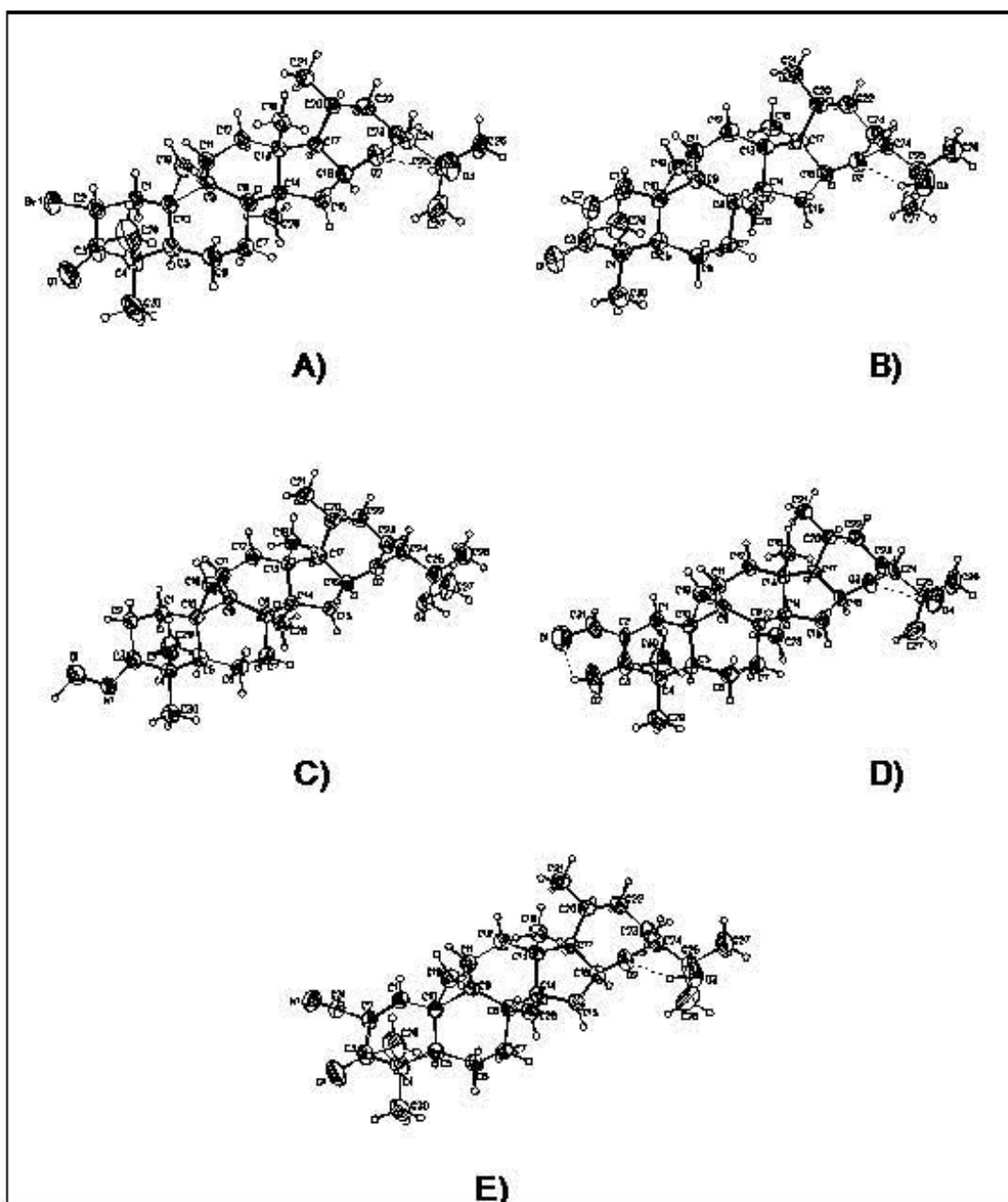


Figura 53. Estructuras obtenidas por medio de difracción de rayos X de A) 2a, B) 2b, C) 2d, D) 2i y E) 2m.

La reacción del derivado **2b** con acetato de sodio y anhídrido acético generó el derivado **2c** en un 81% de rendimiento. En el espectro de IR se observan dos bandas intensas a 1726.3 y 1662 cm^{-1} que corresponden a los carbonilos de un grupo acetato y una cetona α,β -insaturada. En el espectro de RMN¹H se observa una señal simple a 1.96 ppm correspondiente a los hidrógenos de un grupo acetato (metilo). Además, en el espectro de RMN¹³C se observan dos señales adicionales (comparado con **2b**) a δ 170.4 y 29.3 correspondientes a los carbonos del carbonilo y metilo del grupo acetato.

La oxima **2d** se obtuvo en un 78% de rendimiento por medio de la reacción de la argentatina B con clorhidrato de hidroxilamina. El espectro de masas de **2d**, muestra un pico de m/z 471 que corresponde al ión molecular del compuesto esperado. En el espectro de RMN¹³C se observa, entre otras, una señal a δ 168.9 ppm correspondiente al carbono sp^2 en posición 3 (C=N). Además, se llevó a cabo un análisis de difracción de rayos X. Con ello, se estableció de manera inequívoca la estructura de dicho compuesto (Figura 53C).

El tratamiento de la oxima **2d** con anhídrido trifluoroacético permitió la obtención de la lactama **2e**. En el espectro de RMN¹H, aparece, entre otras, una señal múltiple a 2.56 ppm que integra para dos hidrógenos de los cuales uno corresponde a un alcohol. Además, se observa una señal a 6.43 ppm asignada al N-H de una lactama. En el espectro de RMN¹³C se observa, además de las

señales correspondientes a la argentatina B, la presencia de una señal a δ 177.6 ppm, que corresponde a un carbono sp^2 , asignado al carbonilo de una lactama y que concuerda con la banda intensa a 1650 cm^{-1} en el espectro de IR.

El derivado **2e** se hizo reaccionar con anhídrido acético y piridina para obtener el compuesto **2f** en un 89% de rendimiento. Dicho producto, presentó en su espectro de IR, dos bandas intensas a 1733.5 y 1660.3 ppm correspondientes al carbonilo de un grupo acetato y de una lactama. En el espectro de RMN¹H, se destaca la presencia de una señal simple a 1.96 ppm correspondiente a los hidrógenos del grupo acetato (metilo), una señal múltiple a 2.53 ppm que corresponde a los hidrógenos en C-2, así también una señal ancha a 6.18 ppm asignada a un hidrógeno unido a nitrógeno. En el espectro de RMN¹³C, al igual que en **2e**, el derivado **2f** presenta una señal a δ 177.9 ppm asignada al carbonilo en C-3. Además, se observan las señales a 170.2 y 22.5 ppm características del grupo acetato.

A partir de la argentatina B [**2**] se sintetizó el acetato **2g** empleando las condiciones previamente descritas con acetato de sodio y anhídrido acético. En comparación con **2**, el espectro de IR muestra una banda adicional a 1734.3 cm^{-1} que corresponde al carbonilo de un grupo acetato y que concuerda con la presencia de una señal simple en RMN¹H a 1.96 ppm típica de los hidrógenos de un metilo de un grupo acetato.

El tratamiento del acetato **2g** con clorhidrato de hidroxilamina y piridina, permitió la obtención de la oxima **2h** en un 76 % de rendimiento. El espectro de IR de **2h**, presenta la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo del precursor **2g**. En el espectro de masas, se observó la presencia de un pico de m/z 513 que corresponde al ión molecular esperado para el derivado. En el espectro de RMN¹³C se observa el desplazamiento a campo alto (con respecto a **2**), de la señal asociada al C-3, debido a la pérdida del carbonilo y la generación del enlace C=N.

La obtención del derivado **2i** se efectuó de la misma manera que para **1h** (Clinton *et al.*, 1961). Para ello, se generó el enol *in situ* y posteriormente se alquiló la posición dos de la argentatina B. El espectro de masas del derivado **2i**, muestra un pico de m/z 484 que corresponde al ión molecular esperado. En el espectro de RMN¹H se observa una señal a 8.67 ppm y otra a 14.84 ppm. Esta última desaparece después de la adición de D₂O, lo que indica la presencia de un alcohol, posiblemente enol, quelatado. En el espectro de RMN¹³C, se observa presencia de tres carbonos sp², de los cuales, dos son cuaternarios y uno es terciario. Con lo anterior se evidencia la presencia de una forma tautomérica de la β dicetona. La estructura propuesta se confirmó por medio del estudio de difracción de rayos X. En la Figura 53D se observa la presencia de un equilibrio tautomérico. Las distancias encontradas en los enlaces involucrados en el equilibrio son intermedias entre un enlace sencillo y uno doble.

El tratamiento del derivado **2i** con clorhidrato de hidroxilamina y ácido acético permitió la obtención del isoxazol **2j** en un 80% de rendimiento. El espectro de masas de este derivado revela la presencia de un ión molecular de m/z 481. En el espectro de RMN¹H se observa, entre otras, la presencia de un hidrógeno a 7.98 ppm. En el espectro de RMN¹³C no se observa la presencia del carbonilo de la cetona cíclica de seis miembros, pero sí la de tres carbonos sp² a 110.0, 135.6 y 149.5 ppm respectivamente. Los datos anteriores, se tomaron como evidencia de la obtención del compuesto **2j**.

El compuesto **2i** se hizo reaccionar con cloruro de fenil selenio/piridina y posteriormente con peróxido de hidrógeno para obtener el derivado insaturado **2k**. En el espectro de masas de **2k**, se observa la presencia de un pico de m/z 482 que correspondía al ión molecular del compuesto esperado. Sin embargo, durante la adquisición del espectro de RMN¹H en CDCl₃, se observó la transformación del producto (Figura 54). En dicho espectro, se observa la presencia de tres señales de tipo vinílico y una señal ancha a 13.5 ppm (OH quelatado). De manera interesante, se observa que las señales correspondientes a los hidrógenos del metileno del ciclopropano no se encuentran. Además, en el espectro de RMN¹³C, es evidente la ausencia de la señal esperada para el carbono de un aldehído y la presencia de un mayor número de carbonos vinílicos a los esperados (Figura 55). En la Figura 56, se puede apreciar que se tiene un CH₂ menos y un CH más a los esperados para **2k**. Tomando en consideración lo anterior, se propuso el mecanismo mostrado en la Figura 57 para explicar la transformación de **2k**.

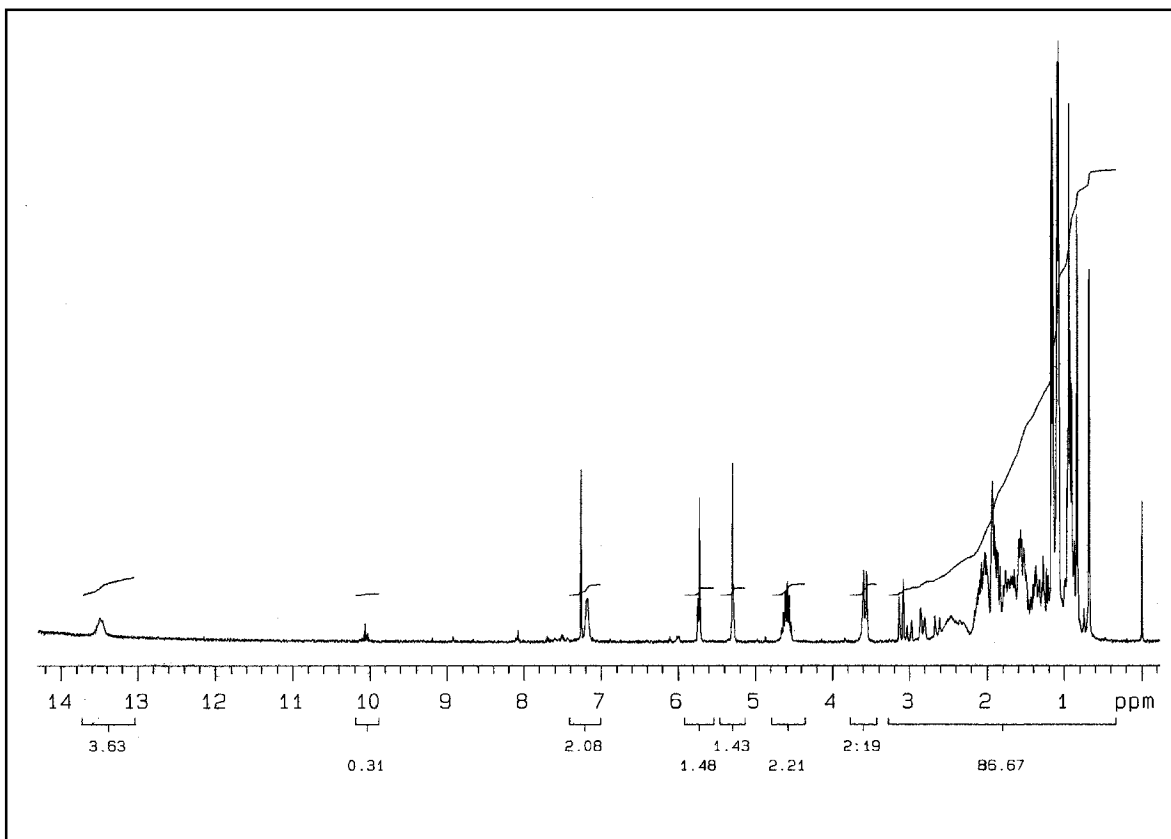


Figura 54. Espectro de RMN ^1H de 300 MHz del producto de transformación del derivado **2k**.

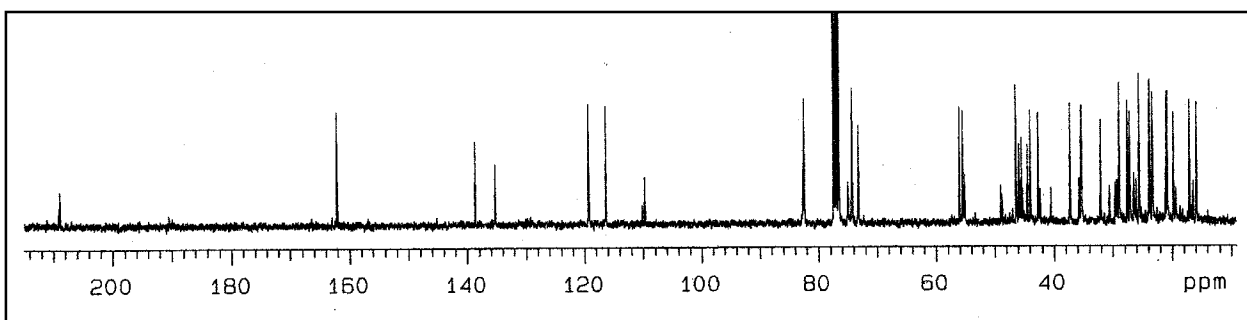


Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C de 75 MHz del producto de transformación del derivado **2k**.

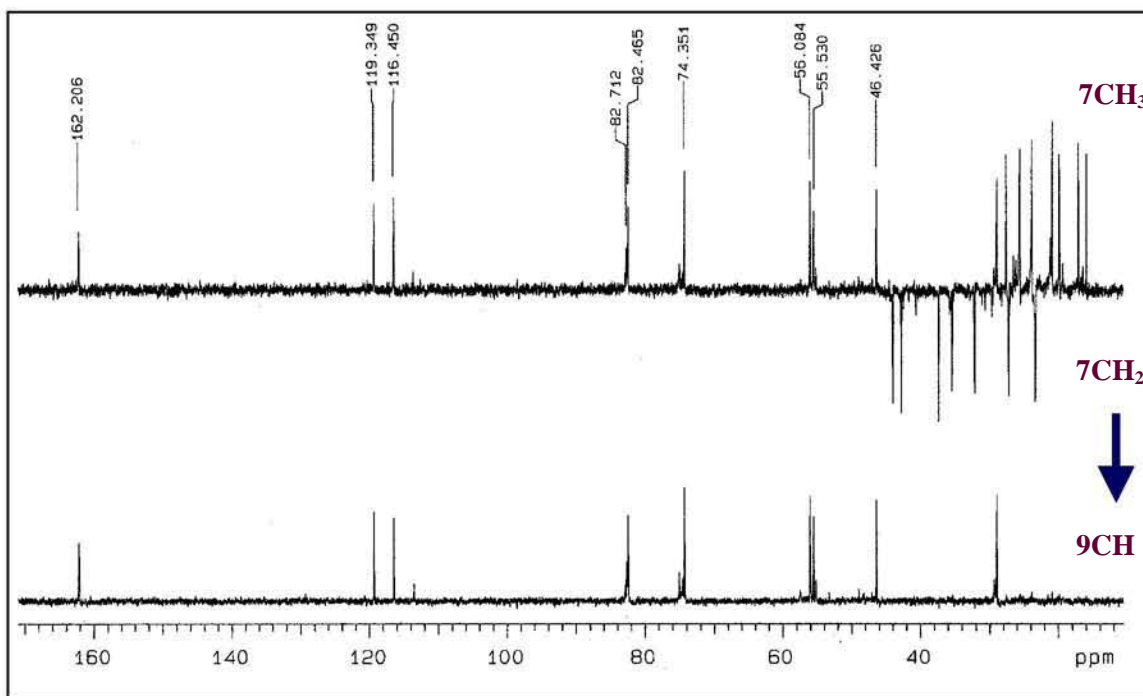


Figura 56. Experimento DEPT del producto de transformación del derivado **2k**.

La transformación se debió posiblemente a la presencia de impurezas de acidez elevada en el disolvente deuterado.

En un estudio realizado por Carmona (2004) se encontró que era posible la obtención de la 19-epi- argentatina B por métodos fotoquímicos. Aunque se propuso una apertura/ cierre del anillo ciclopropano para dar lugar a la formación del epímero, en dicho estudio, no se identificó ningún producto de expansión B/F. Por lo que, nuestros hallazgos constituyen el primer informe en el cual se ha identificado un producto de expansión de los anillos B/F de las argentatinas. Dicha expansión está facilitada por un fenómeno de hiperconjugación entre el

doble enlace C1=C2 y el anillo de ciclopropano, así como la presencia conjunta de un medio de elevada acidez.

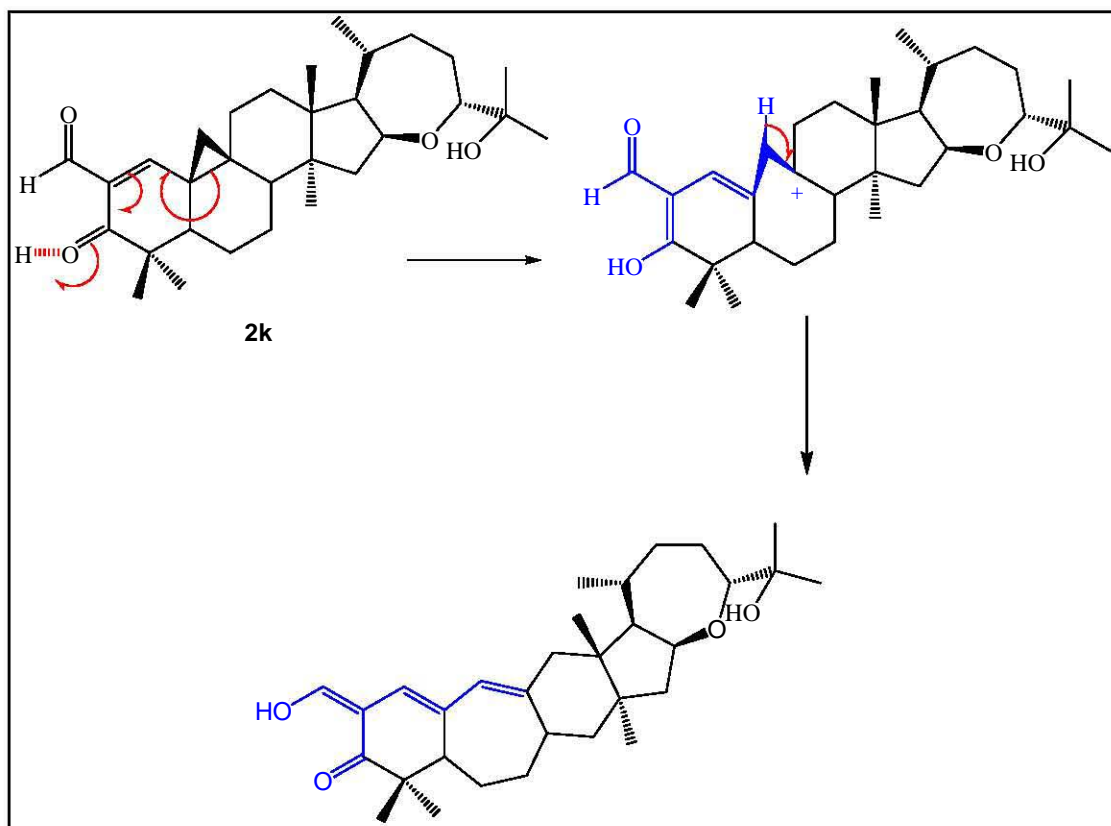


Figura 57. Mecanismo de obtención y estructura propuesta para el producto de transformación de **2k**.

Con el fin de garantizar la autenticidad del producto **2k**, se llevó a cabo el análisis espectroscópico empleando C_6D_6 como disolvente (Figuras 58-60). Como se puede observar en el espectro de RMN^1H , las señales del metileno del anillo ciclopropano se conservan (campo alto) y se observa la presencia de una señal simple a 7.60 ppm correspondiente al hidrógeno vinílico ubicado en posición 1, así como una señal simple a 10.51 ppm que no se intercambia con D_2O , lo que indica la presencia de un hidrógeno de un aldehído.

En el espectro de RMN¹³C de **2k** (Figura 59) se pueden apreciar cuatro señales de carbonos sp² a 160.6, 132.2, 201.9 y 188.9 ppm para los carbonos 1, 2, 3 y 31 (aldehido) respectivamente. En el experimento DEPT (Figura 60) se observan claramente las señales esperadas para la estructura propuesta de **2k**, siete CH₃, ocho CH₂ y ocho CH.

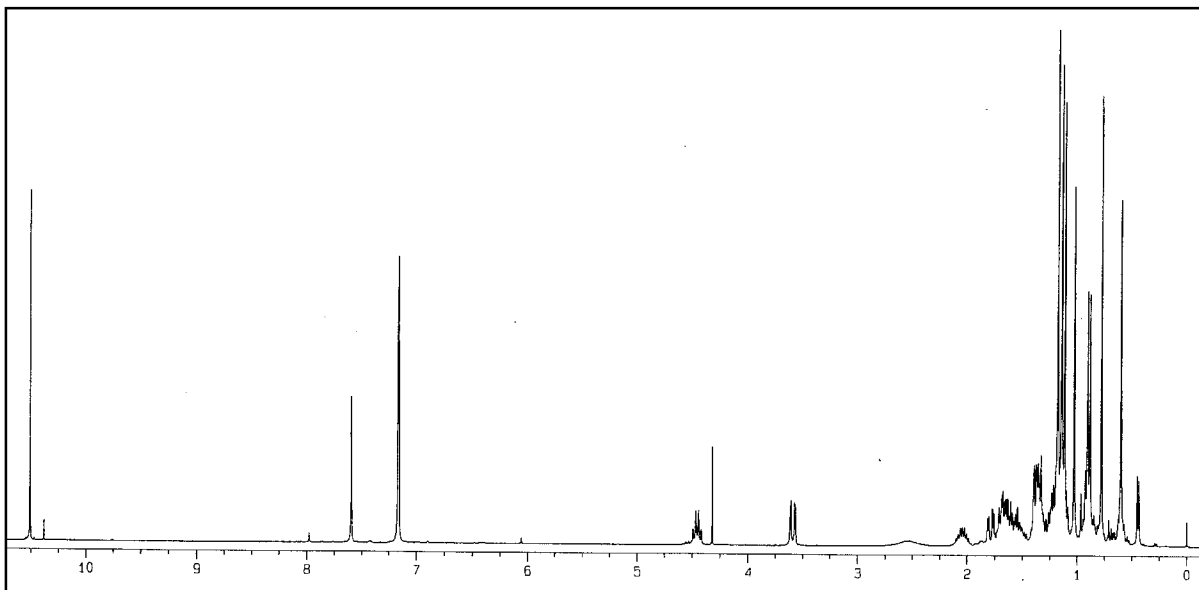


Figura 58. Espectro de RMN¹H de 300 MHz adquirido en C₆D₆ del derivado **2k**.

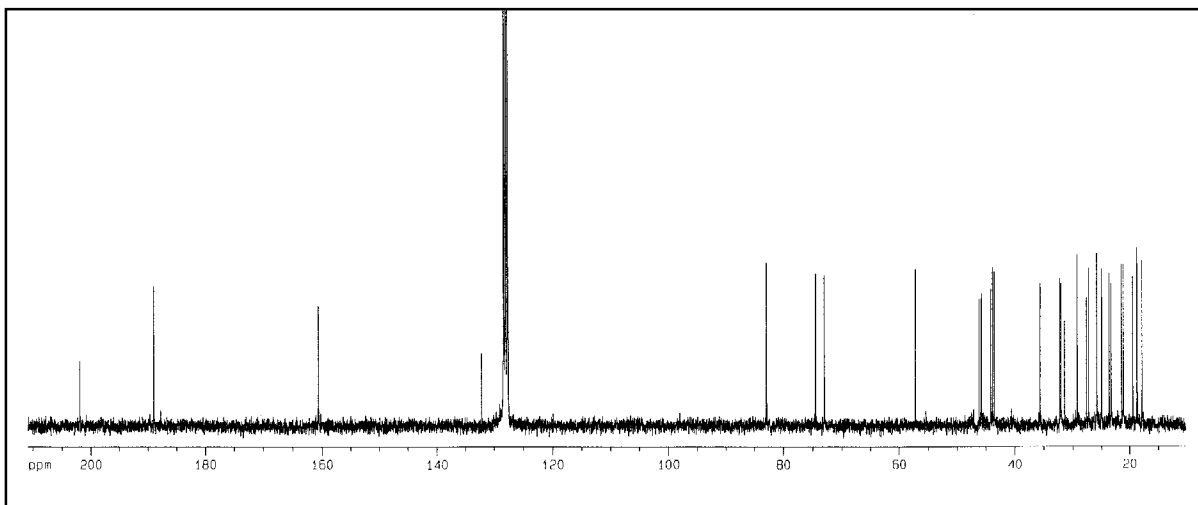


Figura 59. Espectro de RMN¹³C de 75 MHz adquirido en C₆D₆ del derivado **2k**.

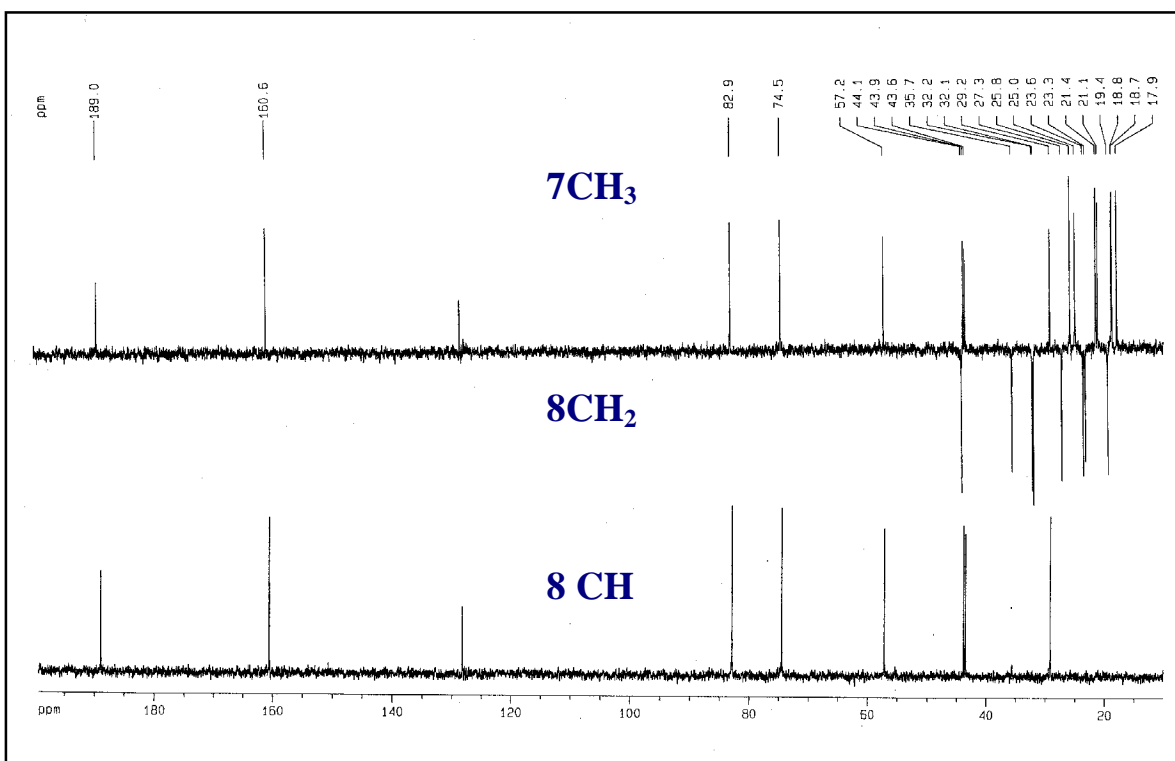


Figura 60. Experimento DEPT adquirido en C₆D₆ del derivado **2k**.

Por otro lado, el tratamiento de la argentatina B (**2**) con cianuro de p-toluensulfonilo permitió la obtención del nitrilo **21**. El espectro de IR de dicho derivado presenta, entre otras, la presencia de una banda a 2251.9 cm^{-1} que evidencia la presencia de un grupo nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$). En el espectro de masas se observa un pico de m/z 481 que correspondía al ión molecular esperado. En el espectro de RMN^1H se observó una señal doble de dobles a 3.93 ppm con constantes de acoplamiento de 5.6 y 13.1 Hz, las cuales correspondían a acoplamientos axial-ecuatorial y transdiaxial. Esto, permitió asignar dicho hidrógeno a la posición dos β -axial con lo cual se infería que el grupo nitrilo se encontraba en posición dos α -ecuatorial. El hecho de que el grupo nitrilo se encuentre en posición ecuatorial se explica por el ataque nucleofílico por la cara *2re/3si* del enol (generado *in situ*) de la argentatina B debido al impedimento estérico que ejerce el anillo de ciclopropano (Figura 61).

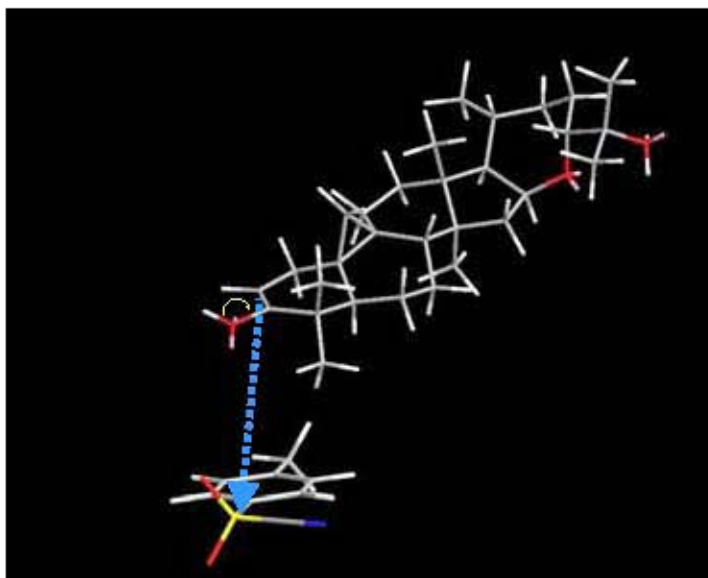


Figura 61. Reacción del enol de la argentatina B con p-TsCN.

El derivado **2m** se obtuvo por tratamiento del derivado **2l** con cloruro de fenilmagnesio/piridina de la misma manera en que se obtuvo el derivado **2k**. El espectro de IR de este compuesto muestra, entre otras, una banda a 2232.28 cm^{-1} , la cual se asocia a la presencia del grupo nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$) y además una banda intensa a 1687.55 cm^{-1} que corresponde a un carbonilo $\alpha\beta$ - insaturado. El espectro de masas presenta un pico de m/z 479 que corresponde al ión molecular del producto. En el espectro de RMN^1H de **2m**, se aprecia, entre otras, una señal simple a δ 7.51 ppm que corresponde al hidrógeno en C-1. En el espectro de RMN^{13}C se observa la presencia de dos carbonos vinílicos a δ 166.3 y 114.0 correspondientes a C1 y C2 respectivamente. A 197.3 ppm se observa la presencia del carbono del grupo carbonilo y a 115.4 ppm la presencia del carbono del nitrilo. Además, un estudio de difracción de rayos X de un cristal de **2m** permitió confirmar su estructura (Figura 53E).

El tratamiento de la argentatina B (**2**) con trióxido de cromo generó la lactona **2n** en un 45% de rendimiento. Este compuesto ya ha sido previamente informado por Martínez y colaboradores (1993). En el espectro de IR se observa, entre otras, la presencia de dos señales intensas a 1730 y 1701 cm^{-1} asociadas a la presencia de un carbonilo en un éster (lactona) y un carbonilo en una cetona cíclica de seis miembros. El espectro de masas de **2n**, muestra un pico de m/z 412, el cual presenta un 95% de abundancia y que corresponde al ión molecular de dicho derivado. En el espectro de RMN^1H se observa la pérdida de las señales de hidrógenos de dos grupos metilo, así como la señal del hidrógeno en C-24. En el

espectro de RMN¹³C se observa también la pérdida de tres átomos de carbono y el desplazamiento del C24 a campo bajo (con respecto a la argentatina B) 174.1 ppm.

Una vez que los derivados **2a-2n** se sintetizaron y caracterizaron, se llevó a cabo la evaluación de sus efectos citotóxicos en las líneas K562, U251, PC-3 y HCT-15. Para esto, se empleó el método de SRB y se siguió el protocolo previamente establecido por Monks y colaboradores (1991). Se obtuvieron las curvas concentración-respuesta de cada derivado en cada línea celular y posteriormente se calcularon las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) como parámetros de comparación.

En el Cuadro 16, se muestra la actividad citotóxica de la argentatina B (**2**) y la de sus derivados **2a- 2n**.

Como se puede observar en el Cuadro 16, la presencia de un átomo de bromo en C2 incrementó la potencia de la argentatina B (**2**) en tres líneas celulares de cáncer humano: HCT-15, K562 y PC-3 (derivado **2a**). La presencia de un grupo nitrilo en C2 mejoró la actividad citotóxica en todas las líneas celulares (derivado **2l**); sin embargo, cuando se generó una doble ligadura C1/C2 en este compuesto, se observó selectividad por las líneas PC-3 y U251 (derivado **2m**).

Cuadro 16. Actividad citotóxica de la argentatina B y sus derivados expresada en función de la concentración inhibitoria media.

Compuesto	CI ₅₀ ± EE (µM)			
	HCT-15 (colon)	K562 (leucemia)	PC-3 (prostata)	U251 (SNC) [§]
2	24.14 ± 5.58	79.38 ± 0.08	33.41 ± 3.71	36.4 ± 6.79
2a	12.42 ± 0.91	6.03 ± 0.52	18.07 ± 2.27	39.48 ± 1.75
2b	17.04 ± 5.08	19.50 ± 4.39	35.13 ± 3.90	26.19 ± 1.00
2c	19.89 ± 5.21	50.00 ± 6.10	42.19 ± 1.62	44.15 ± 2.28
2d	>100	45.81 ± 6.38	18.84 ± 3.32	>100
2e	>100	24.21 ± 2.32	59.82 ± 6.51	14.75 ± 1.96
2f	40.83 ± 4.02	29.30 ± 5.26	49.82 ± 3.52	23.82 ± 6.00
2g	27.33 ± 2.35	20.38 ± 5.45	>100	>100
2h	>100	>100	>100	38.89 ± 0.47
2i	>100	23.42 ± 3.43	28.13 ± 6.74	36.41 ± 3.52
2j	>100	>100	>100	>100
2k	0.44 ± 0.09	1.64 ± 0.62	0.940 ± 0.001	1.05 ± 0.14
2l	10.66 ± 2.37	4.26 ± 0.65	10.28 ± 0.81	10.76 ± 0.45
2m	>100	>100	39.35 ± 5.75	19.87 ± 3.72
2n	>100	>100	>100	>100
Doxorrubicina	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.09 ± 0.02

Los resultados se muestran como la media ± EE de por lo menos tres experimentos independientes. Doxorrubicina: HCT-15: 0.23 ± 0.01 µM; K562: 0.28 ± 0.01 µM; PC-3: 0.32 ± 0.02 µM; U251: 0.09 ± 0.02 µM. [§]Sistema Nervioso Central.

El derivado **2k**, el cual poseía un grupo formilo en C2 y un doble enlace C1/C2, fue citotóxico a todas las líneas de cáncer humano. Este compuesto fue de 35 a 50 veces más potente que la argentatina B (**2**).

La presencia de un anillo isozaxol fusionado en C2/C3 (derivado **2j**) disminuyó la actividad de la argentatina B en todas las líneas celulares empleadas. La lactona **2n** fue inactiva. Este hecho sugirió que la presencia de un grupo hidroxiisopropilo en C24 era importante para la actividad.

Tomando en consideración lo anterior, se llevó a cabo un estudio de relaciones estructura-actividad en 3D, el análisis comparativo de los campos moleculares (CoMFA). Para ello, se realizó el modelado de los compuestos **2** y **2a-2n** empleando las coordenadas cristalográficas de algunos de estos. Tal estudio, se llevó a cabo en el programa Sybyl 6.9 en una estación de trabajo Silicon Graphics Octane ®. Se generó una base que contenía las estructuras de todos los compuestos y sus respectivas cargas de Mulliken y se procedió al alineamiento.

En un estudio *CoMFA*, el alineamiento constituye un punto clave para el éxito en el establecimiento de relaciones estructura-actividad, ya que supone que este proceso se realizará en la conformación que es bioactiva. Sin embargo, debido a que no se conoce el blanco molecular responsable de los efectos de la argentatina B y de sus derivados, se utilizó la estructura de la argentatina B como plantilla

(*template*) para dicho alineamiento. Los átomos de carbono de los anillos B, C y F se utilizaron como puntos de referencia (Figura 62).

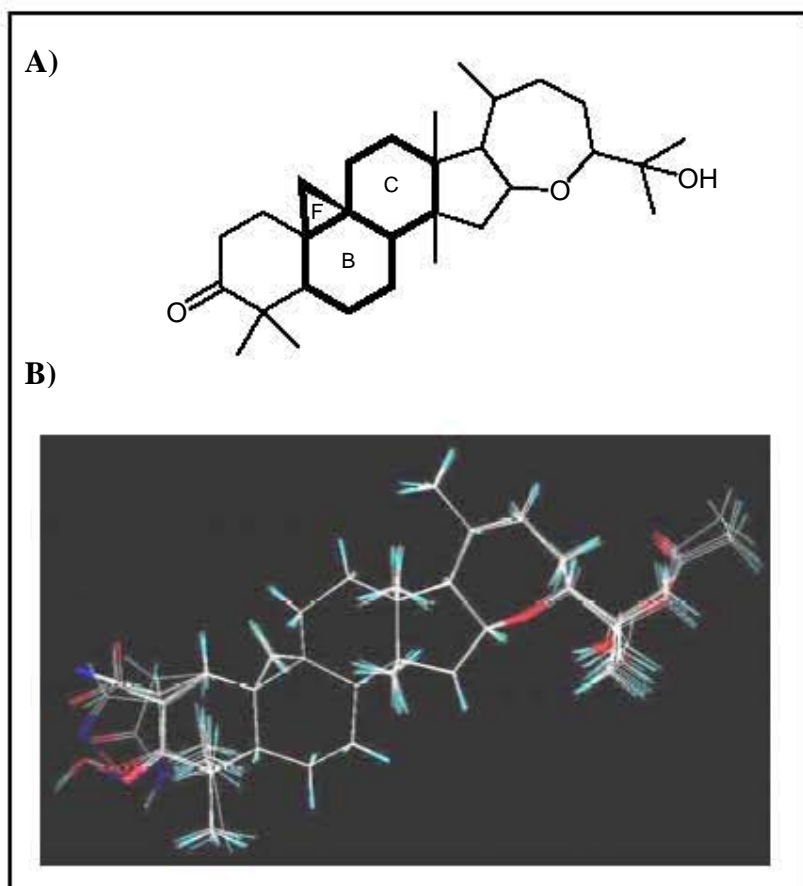


Figura 62. (A) Plantilla empleada para el alineamiento (*template*). Los átomos de referencia son aquéllos presentes en los enlaces más oscuros. (B) Conjunto de derivados alineados sobre la plantilla (2).

En una hoja de cálculo donde se encontraba el conjunto de derivados alineados, se integraron los valores de actividad biológica experimental de cada compuesto en cada línea celular expresada como $\text{Log}(1/\text{CI}_{50})$. Así también, se calcularon las interacciones estéricas y electrostáticas para cada derivado.

Posteriormente, se llevó un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) en el que se emplearon las interacciones estéricas y electrostáticas como variable independiente y la actividad biológica ($\text{Log}(1/\text{CI}_{50})$) como variable dependiente. Este análisis se realizó por separado para cada línea celular. Se efectuó una validación cruzada (*leave-one-out*) para determinar el valor de q^2 y el número óptimo de componentes en el análisis.

Aunque todos los resultados se integraron al estudio inicialmente, sólo los de la línea celular de leucemia K562 resultaron adecuados para el análisis final.

El modelo de trabajo que se empleó para el análisis final correlacionó la actividad citotóxica ($\text{Log}(1/\text{CI}_{50})$) de **2**, **2a-2l** y **2n** con una q^2 (validación cruzada) de 0.507 con un mínimo de 3 componentes. El valor de r^2 fue de 0.907 (sin validar), con F de 32.612 y un error estándar del estimado de 0.190. Las contribuciones relativas de los campos estéricos y electrostáticos fueron 0.421 y 0.579, respectivamente. En el Cuadro 17 se comparan los valores de actividad biológica encontrados experimentalmente y los predichos teóricamente con el modelo matemático de trabajo (Figura 63); así también, se enlistan los residuales.

Cuadro 17. Actividad citotóxica determinada experimentalmente para **2**, **2a-2l** y **2n** y la predicha mediante el modelo de trabajo en el estudio *CoMFA*.

Compuesto	Log (1/ CI ₅₀) Observada	Log (1/ CI ₅₀) Predicha	Residuales CoMFA
2	4.100	4.461	-0.361
2a	5.220	5.042	0.178
2b	4.710	4.466	0.244
2c	4.300	4.357	-0.057
2d	4.340	4.192	0.148
2e	4.620	4.678	-0.058
2f	4.530	4.639	-0.109
2g	4.690	4.408	0.282
2h	4.000	4.105	-0.105
2i	4.630	4.629	0.001
2j	4.000	4.053	-0.053
2k	5.790	5.851	-0.061
2l	5.370	5.384	-0.014
2n	4.000	4.035	-0.035

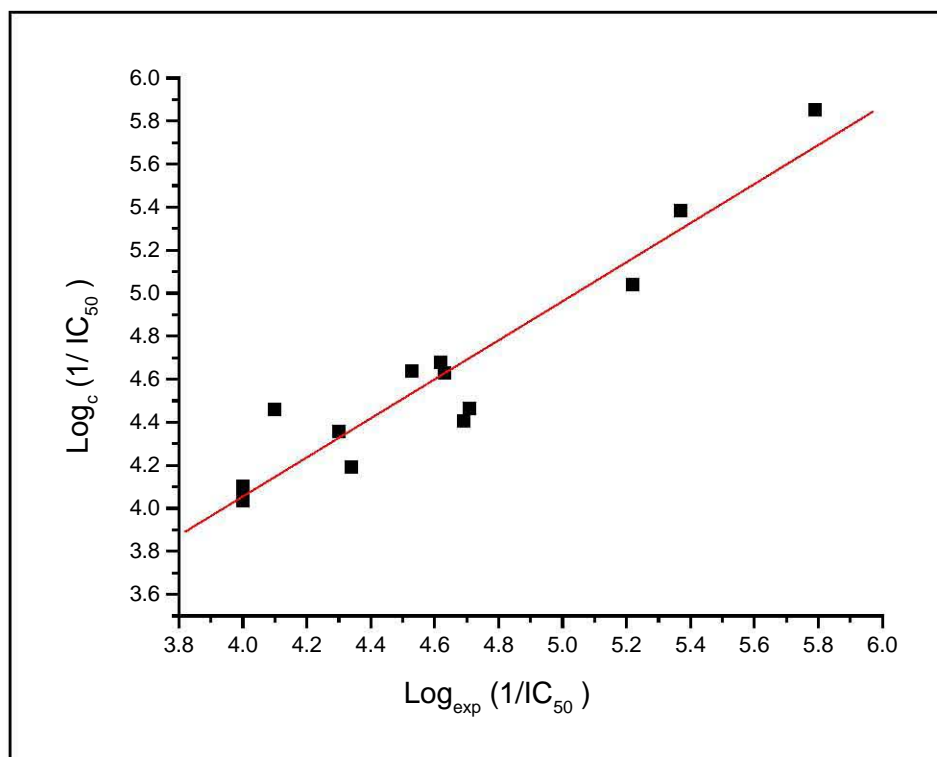


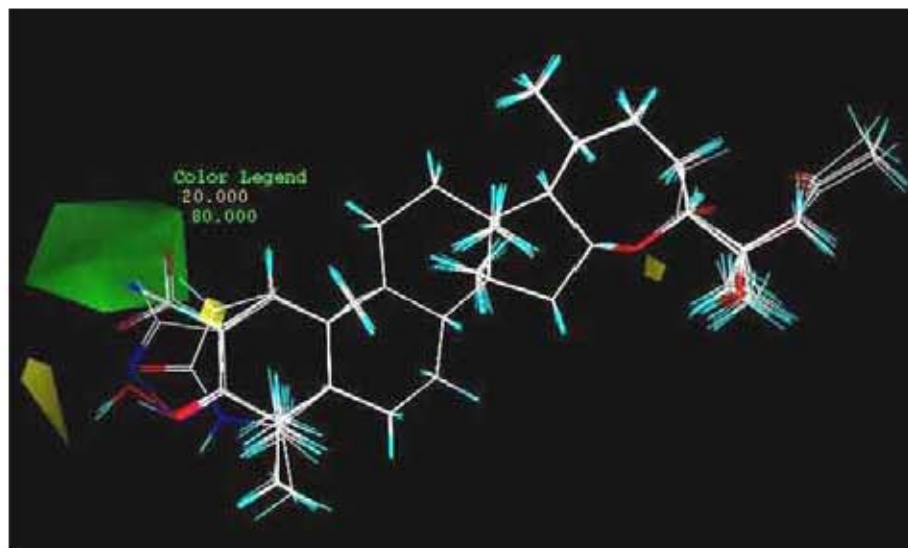
Figura 63. Valores de Log (1 /CI₅₀) experimentales vs. predichos para los compuestos empleados en el modelo final.

Como se puede apreciar en el Cuadro 17 y Figura 63, el derivado **2m** no fue incluido en el modelo final ya que en los estudios preliminares se detectó como un compuesto que no seguía las tendencias del grupo (denominado “outlier”). La baja predicibilidad de este compuesto, puede estar relacionada con una acción sobre un blanco molecular diferente al resto de las moléculas.

Una vez que se tenía el modelo de trabajo final, se llevó a cabo la visualización de los contornos estéricos y electrostáticos en el conjunto de moléculas alineadas (Figura 64).

Como se puede observar en la Figura 64A existe una región estéricamente favorable en C2, lo que indica que la presencia de sustituyentes en esta posición favorece la actividad biológica. Las moléculas **2a**, **2i**, **2k** y **2l** que presentan sustitución en C2 son más activas que **2** (Cuadros 16 y 17). Además, en la misma figura, se aprecian dos pequeñas zonas estéricamente desfavorables (amarillas); la primera, se ubica abajo del anillo A (C1/C2) y correlaciona con el hecho de que la molécula más activa (**2k**) presenta menos hidrógenos que el resto, debido a la presencia del doble enlace. El segundo contorno estérico desfavorable se ubica entre las posiciones C2/C3 y concuerda con el hecho de que la presencia de un grupo voluminoso fusionado en esa posición disminuye la actividad, como es el caso del isoxazol **2j** (Cuadros 16 y 17).

A)



B)

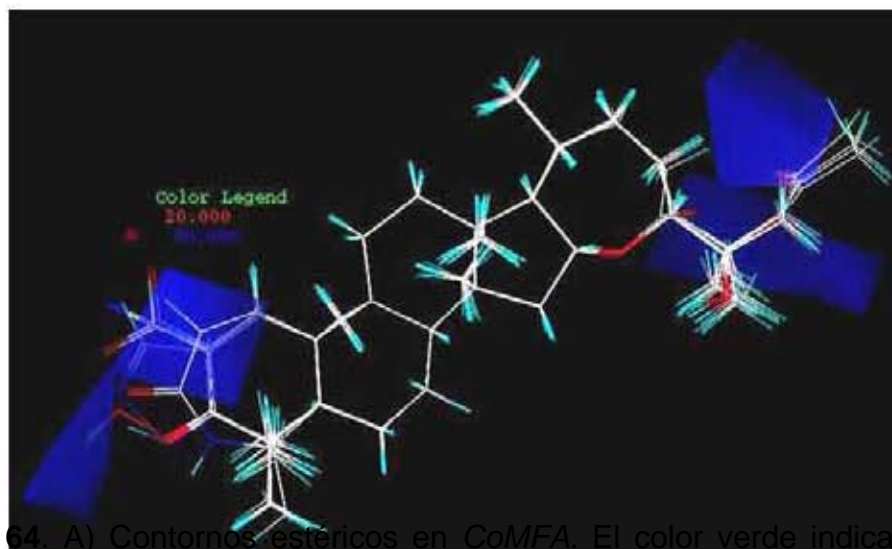


Figura 64. A) Contornos estéricos en *CoMFA*. El color verde indica que grupos voluminosos en esa área incrementan la actividad; mientras que, los contornos amarillos indican que la presencia de dichos grupos disminuirá la actividad biológica. B) Contornos electrostáticos en *CoMFA*. Los contornos azules indican regiones en donde una densidad electrónica baja incrementa la actividad biológica; mientras que la presencia de contornos rojos indica lugares en donde una densidad electrónica elevada favorece la actividad biológica.

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 64B, aparece un contorno electrostático azul que rodea las posiciones C1/C2 y que indica que una baja densidad electrónica en estas posiciones favorece la actividad citotóxica. Esto concuerda con el hecho de que los compuestos activos **2k** y **2b** poseen un carbonilo α,β -insaturado que disminuye la densidad electrónica en C1. Además, los compuestos **2a**, **2i** y **2l** con sustituyentes electroattractores en C2, que disminuyen la densidad electrónica en este carbono, son más potentes que la argentatina B (**2**).

Como se puede observar en los Cuadros 16 y 17, la lactona **2n** fue inactiva. En la Figura 65 se muestran los potenciales electrostáticos en las superficies Connolly de la argentatina B (**2**) y la lactona **2n**. A primera vista, se aprecia que para **2n**, existe la pérdida de un grupo voluminoso y la generación de un área de potencial electrostático negativo de tamaño importante. El análisis cualitativo en primer término, hacía suponer que la pérdida de actividad en **2n** podía estar relacionada con la presencia de una región estéricamente favorable en la argentatina B. Sin embargo, en el *CoMFA* (Figura 64A) no se observó ningún contorno de este tipo. Aún más, como se puede observar en la Figura 64B, existe un contorno electrostático que rodea el grupo hidroxiiisopropilo que indica que una baja densidad electrónica favorece la actividad biológica. En conjunto, es probable que la presencia de dicho contorno se deba a que el compuesto inactivo posee una mayor densidad electrónica y por ende, el contorno favorable en *CoMFA* sea inverso. Entonces, si no existe razón de tipo estérico para la inactividad en esa

región y la presencia de una zona de elevada densidad electrónica disminuye la actividad, es posible que esa región esté involucrada en la acción de la argentatina B con un blanco molecular y que las interacciones involucradas sean de tipo electrostático y no de tipo estérico. Sin embargo, no se puede descartar que la presencia de los contornos electrostáticos refleje únicamente que la inestabilidad de la lactona se encuentre interfiriendo con la actividad citotóxica.

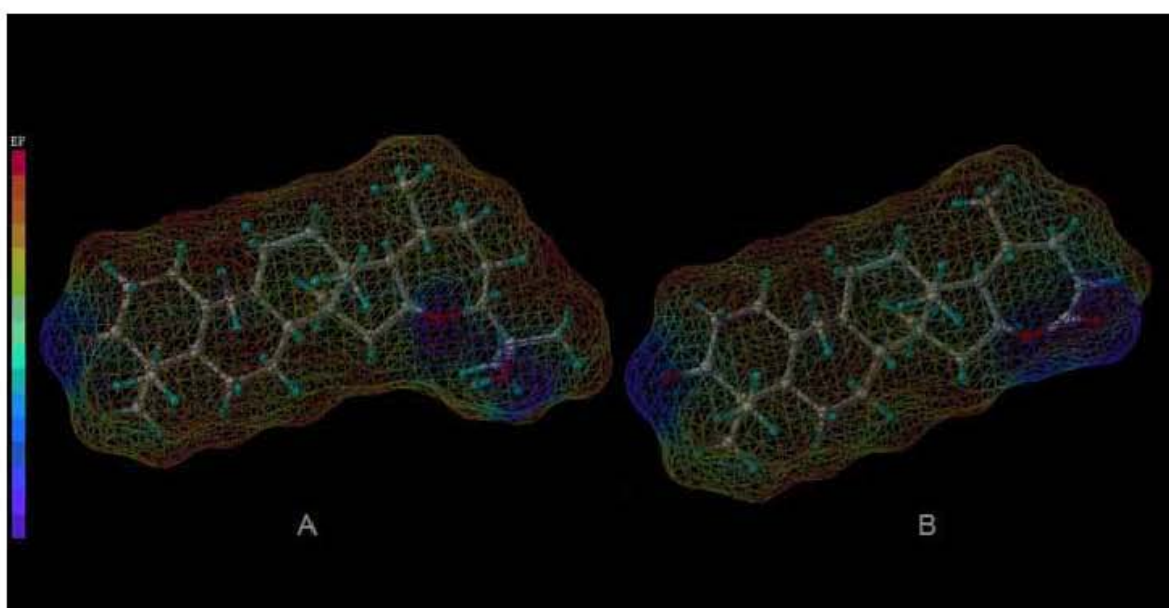


Figura 65. Potencial electrostático molecular de A) la argentatina B, y B) **2n**, codificado por colores y representado en superficies Connolly.

Por otro lado, es conocido que la lipofilidad es un factor relevante que tiene influencia en el transporte, absorción y distribución de los compuestos en un sistema biológico. Así también, este factor está relacionado con las interacciones entre un ligando con su receptor.

Para la estimación del grado de lipofilicidad de una sustancia, se emplea un parámetro denominado coeficiente de partición (P). La expresión logarítmica de este parámetro, conocido como Log P, se emplea como un descriptor de aspectos farmacocinéticos, tóxicos y farmacodinámicos en muchos estudios de relación estructura-actividad (Hansch, 1995; Poole y Poole, 2003).

Debido a la importancia que tiene el conocer el grado de lipofilicidad de una compuesto bioactivo y tomando en consideración que la determinación de los valores de Log P pueden integrarse a los estudios de relación-estructura actividad de una sustancia de prueba, se decidió realizar el cálculo de este parámetro.

Se determinó el valor de Log P por métodos teóricos y experimentales de los compuestos **1**, **2** y **2b**. El cálculo teórico de los valores de log P se realizó con los programas ChemOffice (PC) y CLOGP (en Sybyl 6.9, en estación de trabajo). Por otro lado, se llevó a cabo la determinación experimental del parámetro para los mismos compuestos.

Como se puede observar en el Cuadro 18, los valores de Log P para la argentatina B (**2**) y su derivado (**2b**), son menores al determinado para la argentatina A (**1**), hecho contrario a lo esperado teóricamente. Aunque el valor experimental del Log P de **1** se aproxima a su valor predicho, es posible que la tendencia diferente se deba a que la argentatina B y su derivado interactúen de manera más eficiente con los disolventes, ya que como se puede observar en la estructura de la argentatina A (**1**), éste compuesto posee dos grupos hidroxilos

espacialmente muy cercanos, en los que es probable que existan interacciones intramoleculares que dificulten la interacción de la molécula con los disolventes, en especial con el agua.

Cuadro 18. Valores de Log P calculados y determinados experimentalmente para los compuestos **1**, **2** y **2b**.

Compuesto	Log P (Calculado)	Log P ± DE (Determinado)
1	5.13	4.966 ± 0.373
2	6.42	4.258 ± 0.254
2b	5.74	4.839 ± 0.141

Así mismo, se puede apreciar que los valores de Log P determinados experimentalmente para la argentatina B (**2**) y su derivado (**2b**), difirieron significativamente de los predichos teóricamente.

Las diferencias significativas que se observaron entre los valores predichos y los determinados experimentalmente de Log P, se deben principalmente a la falta de información experimental existente para este tipo de moléculas. Por lo tanto, resulta de suma importancia el conocer los valores de Log P, así como el grado de predicción de dicho parámetro por métodos teóricos, antes de introducir este parámetro en un estudio de relaciones estructura-actividad.

Finalmente, como resultado de los estudios descritos se tuvieron varios derivados bioactivos de la argentatina B, de donde el derivado **2k** fue el de mayor potencia (35-50 veces mayor a la del compuesto original). Al igual que los compuestos cabeza de serie, se decidió evaluar los efectos del compuesto más activo (**2k**) en la viabilidad de linfocitos humanos tratados *in vitro* y además determinar sus posibles efectos citostáticos y genotóxicos.

Como se puede observar en la Figura 66, la viabilidad de los linfocitos disminuyó de manera significativa cuando fueron tratados con **2k** a la concentración de 6.2 y 10 μM .

Además, el tratamiento de los linfocitos con **2k** a partir de la concentración de 3.2 μM generó un cambio en la proliferación celular dependiente de la concentración. La proporción de linfocitos binucleados y polinucleados mostró una tendencia a disminuir; mientras que el porcentaje de linfocitos mononucleados se incrementó (Figura 66).

El efecto citostático global se determinó por medio del cálculo del índice de división nuclear (IDN). Como se aprecia en la Figura 67 se encontró una disminución significativa de este parámetro, aún a la concentración de 0.6 μM y es dependiente de la concentración a partir de 3.2 μM .

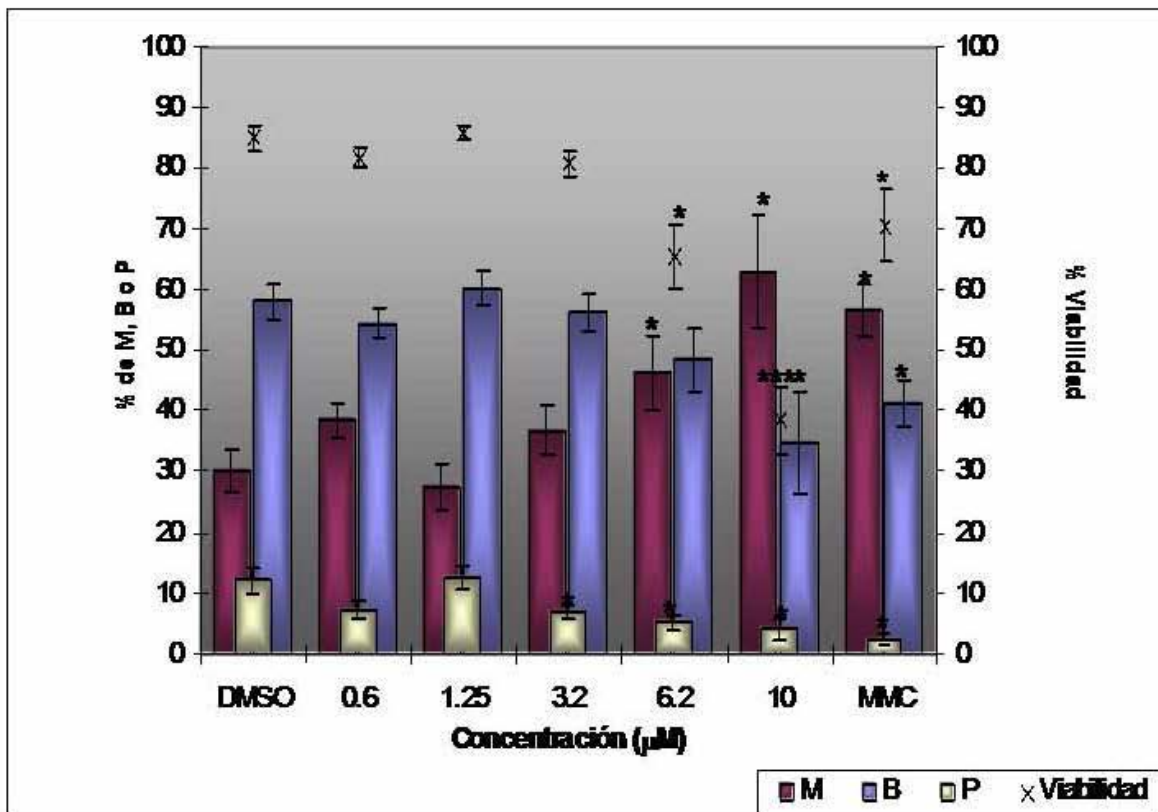


Figura 66. Efectos del derivado **2k** en la Viabilidad (x) y la cinética de proliferación celular (barras) de los linfocitos tratados a cinco diferentes concentraciones. Porcentaje de linfocitos mononucleados (M), binucleados (B) y polinucleados (P). La mitomicina C (MMC) se empleó como control a la concentración de 1 µM. Los resultados se muestran como la media ± EE de tres experimentos independientes que se realizaron por duplicado de tres donadores (N=18). *P<0.05***P<0.001.

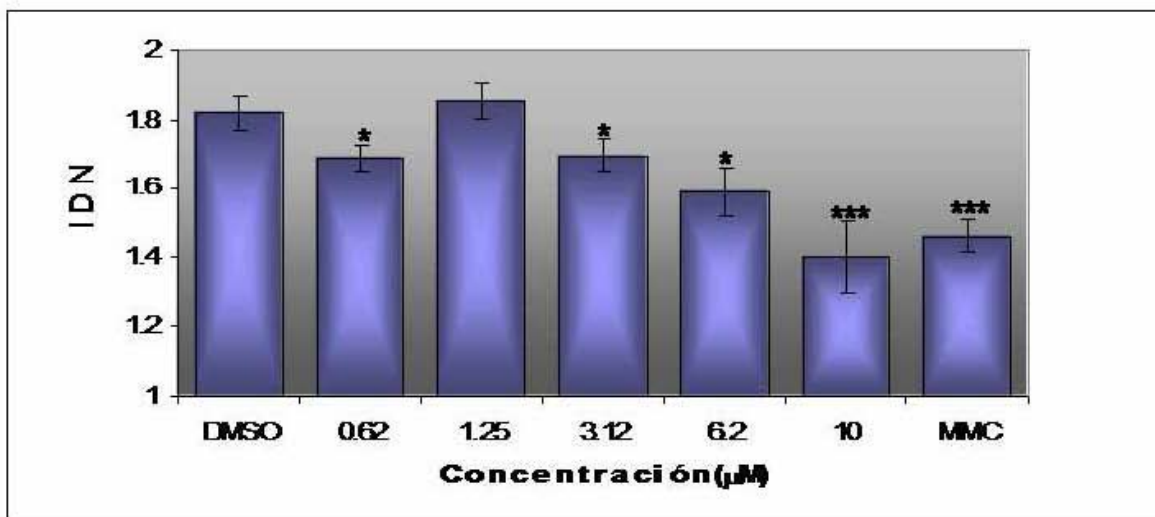


Figura 67. Índice de división nuclear calculado para los linfocitos tratados con **2k**. La mitomicina C se empleó como control (MMC) a 1 μM. Cada barra representa la media ± EE de tres experimentos independientes por duplicado de tres donadores (N=18). *P< 0.05, ***P<0.001.

Por otro lado, el compuesto **2k** no incrementó la proporción de células binucleadas con micronúcleos (Cuadro 19). Esto permite descartar eventos genotóxicos como resultado de eventos clastogénicos o aneugénicos.

Como se puede apreciar, en el presente trabajo se generó un derivado significativamente más potente que la argentatina B, que posee propiedades citostáticas a una concentración baja y propiedades citotóxicas a concentraciones elevadas. De manera importante, se encontró que a pesar de su potencia, este compuesto no generó eventos genotóxicos significativos medidos en función de la frecuencia de micronúcleos. Es conocido que los compuestos capaces de unirse al

ADN incrementan dicho parámetro; por lo que, de manera indirecta se puede inferir que **2k** no ejerce sus efectos citostáticos y citotóxicos a través de la acción directa sobre el ADN.

Cuadro 19. Frecuencia de micronúcleos (MN) de linfocitos en proliferación tratados con **2k**.

		MN / 1000 células ± EE
DMSO		3.66 ± 0.35
Derivado 2k	(μM)	
	0.62	2.34 ± 0.30
	1.25	1.98 ± 0.24
	3.12	3.85 ± 0.54
	6.20	4.55 ± 0.73
Mitomicina C	1 μM	29.77 ± 2.89***

***P<0.001.

VII. CONCLUSIONES

Las argentatinas A y B inhiben el crecimiento *in vitro* de las líneas K562, MCF-7, HCT-15, PC-3 y U251 de cáncer humano.

Por medio de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis fue posible diferenciar los efectos entre las argentatinas A y B. La argentatina A resultó ser un compuesto citotóxico, mientras que la argentatina B es un agente citostático.

Las argentatinas A y B no inducen daño genotóxico, medido en función de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos, lo que permite descartar posibles efectos aneugénicos y clastógenicos de dichos compuestos. Además, mediante esta observación es posible eliminar la presunción de que las argentatinas A y B ejerzan sus efectos por acción directa en el ADN

A una potencia diferente, la argentatina B es capaz de generar el mismo efecto citostático que la mitomicina C, pero sin generar los efectos genotóxicos de esta última.

Los resultados obtenidos en la presente investigación respaldan la propuesta de diversos autores en donde se propone el cultivo de linfocitos y el empleo de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis como sistema

de prueba para la determinación de la actividad anticancerosa de fármacos en potencia.

Las transformaciones químicas de las argentatinas A y B permitieron la obtención de 23 derivados. Dichos derivados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Esta es la primera vez, que se informa de la identificación de un producto de expansión anular B/F de la argentatina B. La presencia de una doble ligadura C1/C2, así como un grupo formilo en C2, en un medio de elevada acidez, promovieron dicha expansión.

El estudio cristalográfico de la isoargentatina A, así como de la 3-oxima-(16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona permitieron el establecimiento de la configuración de los centros estereogénicos 20 y 24 de la argentatina A como *S* y *R*.

La evaluación de la actividad citotóxica, así como el modelado molecular de los derivados de la argentatina A, permitieron el establecimiento de algunas relaciones estructura-actividad cualitativas. Así, se encontró que la presencia de un doble enlace entre los carbonos uno y dos (C1-C2), o la de un átomo de bromo o un grupo formilo unido al carbono dos (C2), así como la presencia de un anillo de isoxazol unido al anillo A, incrementan la potencia de la argentatina A sobre todas las líneas celulares evaluadas. Además, se encontró que la presencia del

grupo 2- hidroxisopropilo unido a C-24 es indispensable para la actividad citotóxica de este tipo de triterpenos.

El estudio cristalográfico de cinco derivados de la argentatina B obtenidos durante esta investigación, así como la inclusión de algunos estudios previos en la literatura, permitieron el modelado molecular de la serie de derivados químicos de la argentatina B.

La evaluación de la actividad anticancerosa en diversas líneas celulares de cáncer así como el modelado molecular de los derivados de la argentatina B, permitieron la realización de un estudio de relaciones estructura-actividad en tres dimensiones denominado análisis comparativo de campos moleculares.

En el análisis comparativo de campos moleculares (*CoMFA*) de la serie de derivados de la argentatina B que se efectuó para la línea de cáncer U251, se encontró que la presencia de un sustituyente estéricamente favorable en C2, así como la presencia de una baja densidad electrónica en C1-C2 y en C25 favorecen la actividad de este tipo de compuestos.

El derivado 2-formil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona fue el compuesto más potente que se obtuvo en el presente estudio. La obtención de dicho derivado se efectuó en rendimientos moderados en tan sólo dos pasos a partir de la argentatina B. Su actividad *in vitro* en líneas celulares de cáncer es 35

a 50 veces más potente que su precursor y similar a la informada para la doxorubicina. Así también, se encontró mediante el modelo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis que dicho derivado tiene efectos citostáticos y citotóxicos pero no es genotóxico.

La determinación experimental del coeficiente de partición de las argentatinas A y B, y de la (16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona permitió determinar el grado de liposolubilidad de estos triterpenos y además, comparar el valor de este parámetro con aquéllos predichos teóricamente. En el estudio se detectaron diferencias significativas entre los valores predichos para la argentatina B y la (16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloart-1-en-3-ona con los encontrados experimentalmente. Es probable que este resultado se deba a la falta de información empírica de este tipo de moléculas en los apoyos logísticos e indica que es necesaria la determinación experimental del coeficiente de partición para este tipo de compuestos con el fin de incluir esta información en los análisis de relaciones estructura-actividad.

En conjunto, los resultados respaldan el uso de las argentatinas A y B como precursores para la obtención de moléculas anticancerosas. Tomando en consideración que estos compuestos son químicamente estables y abundantes en la resina, obtenida como desecho durante la industrialización de la especie *Parthenium argentatum*, este estudio proporciona la evidencia para un uso

racional de la especie o de la resina como una fuente potencial de fármacos anticancerosos.

VIII. REFERENCIAS

- Ahn, K., Hahm, M. S., Park, E., Lee, H., Kim, I. 1998. Corosolic acid isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* is a protein kinase C inhibitor as well as a cytotoxic agent. *Planta Medica* **64**: 468-470.
- Albertini R.J. 1980. Drug resistant lymphocytes in man as indicators of somatic cell mutation. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **1**: 25-48.
- Almeida F.R.C., Rao V.S.N., Matos M.E.O. 1992. Antiinflammatory, antitumor and antifertility effects in rodents of two nor-cucurbitacin glucosides from *Wilbrandia* species. *Phytotherapy Research* **6**:189-93.
- Atopkina L. N., Malinovskaya G. V., Elyakov G. B., Uvarova N. I., Woerdenbag H. J., Koulman A., Pras N., Potier P. 1999. Cytotoxicity of natural ginseng glycosides and semisynthetic analogues. *Planta Medica* **65**: 30-34.
- Attard E., Cuschieri A., Scicluna-Spiteri A., Brincat M.P. 2004. The Effects of Cucurbitacin E on Two Lymphocyte Models. *Pharmaceutical Biology* **42**: 170-175.
- Baek J. H., Lee Y. S., Kang C. M., Kim J., Kwon K. S., Son H. C., Kim K. 1997. Intracellular Ca²⁺ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *International Journal of Cancer* **73**:725-728.
- Baglin I., Poumaroux A., Nour M., Tan K., Mitaine-Offer A. C., Lacaille-Dubois M. A., Chauffert B., Cave C. 2003. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **18**: 111-117.

- Banskota A.H., Tezuka Y., Kim P.H., Qui T.K., Saiki H., Miwa Y., Taga T., Kadota S. 1998. Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **8**: 3519-3524.
- Banskota A. H., Tezuka Y., Tran K. Q, Tanaka K., Saiki I., Kadota S. 2000. Methyl quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **48**: 496-504.
- Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A. 2001. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **75**: 125-132.
- Barre J.T., Bowden B.F., Coll J.C., De Jesus J., De la Fuente V.E., Janairo G.C., Ragasa C.Y. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry* **45**: 321-324.
- Berhow M.A., Wagner E.D., Vaughn S.F., Plewa M.J. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. *Mutation Research* **448**: 11-22.
- Bertino, J. R. Capítulo 58, Quimioterapia del cáncer *En* Browman W. C. y Rand J. M. 1984. Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas. Nueva Editorial Interamericana. México.
- Boyd M.R. y Paull K.D. 1995. Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Development Research* **34**: 91-109.
- Bruhn J.G.y Bohlin L. 1997. Molecular Pharmacognosy: An Explanatory model. *Drug Discovery Today* **2**: 243-246.

Calabresi, P. y Chabner, B. A. Sección X: Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas *En* Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Goodman- Gilman, A. 1996. Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol II. Novena edición. Edit. Mc-Graw-Hill/ Interamericana.

Calzada L., Salazar E-I, Téllez J., Martínez-Vázquez M., Martínez R. 1995. Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumours of human breast. *Medical Science Research* **23**: 815-816.

Camacho M.R., Mata R., Castañeda P., Kirby G.C., Warhurst D.C., Croft S.L., Phillipson J.D. 2000. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Medica* **66**: 463-468.

Campos-López E., Navaes-Camacho E., Ponce-Vélez M.A., Angulo-Sánchez J.L. 1979. *Chemtech* **9**: 50.

Campos-López E., Navaes-Camacho E., Maldonado R. Cap. 21: Guayule: Present state of knowledge. *En* 1981. Guayule, reencuentro en el desierto. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Centro de Investigación en Química Aplicada. Comisión Nacional de las Zonas Áridas. México. Pp 375-410.

Cantrell C.L., Lu T., Fronczek F.R., Fisher N.H., Adams L.B., Franzblau S.G. 1996. Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*. *Journal of Natural Products* **59**: 1131-1136.

- Carmona N.D.S. 2004. Estudio fotoquímico de 1-en-16 β -24R-epoxi-25-hidroxi-cicloartan-3-ona. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cha H.J., Bae S.K., Lee H.Y., Lee O.H., Sato H., Seiki M., Chae P.B., Kim K. 1996. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Research* **56**: 2281-2284.
- Chabner B. A. y Roberts T. J. Jr. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature* **5**: 65-72.
- Chang C., Kuo C., Chang J., Kuo Y. 2004. Three new oleanane-type triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with cytotoxic activity against two human cancer cell lines. *Journal of Natural Products* **67**: 91-93.
- Chaturvedula V.S.P., Schilling, J.K., Miller, J.S., Andriantsiferana R., Rasamison V.E., Kingston D.G.I. 2002. Two new triterpene esters from the twigs of *Brachylaena ramiflora* from the Madagascar rainforest *Journal of Natural Products* **65**: 1222-1224.
- Chavez H., Estevez-Braun A., Ravelo A.G., Gonzalez A.G. 1999. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazonica*. *Journal of Natural Products* **62**: 434-436.
- Chen G., Li Z., Pan D., Tang C., He X., Xu G., Chen K., Lee K. 1993. The isolation and structural elucidation of four novel triterpene lactones, Pseudolarolides A, B, C and from *Pseudolarix kaempferi*. *Journal of Natural Products* **56**: 1114-1122.

- Cho J.Y., Kim A.R., Jung J.H., Chun T., Rhee M.H., Yoo E.S. 2004. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. *European Journal of Pharmacology* **492**: 85-94.
- Choi C.Y., You H.J., Jeong H.G. 2001. Nitric oxide and tumor necrosis factor-production by oleanolic acid via nuclear factor- B activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**: 49-55.
- Clinton R.O., Manson A.J., Stonner F.W., Neumann H.C., Christiansen R.G., Clarke R.L., Ackerman J.H., Page D.F., Dean J.W., Dickinson W.B., Carabateas C. 1961. Steroidal [3,2-c]pyrazoles. II. Androstanes, 19-norandrostanes and their unsaturated analogs. *Journal of American Chemical Society* **83**: 1478-1491.
- Cragg G. M., Newman, D. J. 2005. Plants as source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. En prensa.
- Deng J., Starck S.R., Hecht S.M. 1999. DNA polymerase inhibitors from *Baekkea gunniana*. *Journal of Natural Products* **62**: 1624-1626.
- Deng Y., Jiang T.Y., Sheng S., Tianasoa-Ramamonjy M., Snyder J.K., 1999a. Remangilonos A-C, new cytotoxic triterpenes from *Physena madagascariensis*. *Journal of Natural Products* **62**: 471-476.
- Dhawan A., Kayani M.A., Parry J. M., Parry E., Anderson D. 2003. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis* **18**: 487-490.

- Domínguez X.A. Cap. 7: Aspectos químicos del guayule. *En* 1981. Guayule, reencuentro en el desierto. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Centro de Investigación en Química Aplicada. Comisión Nacional de las Zonas Áridas. México. Pp 27-70.
- Duh C., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., Leung S.L., Farnsworth N.R. 1987. Plant anticancer agents XLIV. Cytotoxic constituents from *Stizophyllum riparium*. *Journal of Natural Products* **50**: 63-74.
- Duffaud F., Orsiere T., Saciuchka-Palmaro M., Gigue L., Favre R., Botta A. 1998. Doxorubicin and cisplatin genotoxicity: search for a real indication using the micronucleus test. *Annales de Biologie Clinique* **56**: 183-187.
- Duncan K.L.K., Duncan M.D., Alley M.C., Sausville E.A. 1996. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* **52**: 1553-1560.
- Einbond L.S., Shimizu M., Xiao D., Nuntanakorn P., Lim J.T.E., Suzui M., Seter C., Pertel T., Kennelly E.J., Kronenberg F., Weinstein I.B. 2004. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research & Treatment* **83**: 221-231.
- Es-saady D., Simon A., Ollier M., Maurizis J.C., Chulia A.J., Delage C. 1996. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. *Cancer Letters* **106**: 193-197.
- Fang F., Sang S., Chen K.Y., Gosslau A., Ho C., Rosen R.T. 2005. Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*). *Food Chemistry* **93**: 497-501.

- Fenech M. y Morley A.A. 1985a. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* **43**: 233-246.
- Fenech M. y Morley A.A. 1985b. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* **147**: 29-36.
- Fenech M., Crott J., Turner J., Brown S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis –block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* **14**: 605-612.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* **455**: 81-95.
- Figueiredo J.N., Raz B., Sequin U. 1998. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. *Journal of Natural Products* **61**: 718-723.
- Finlay H.J., Honda T., Gribble G.W., Danielpour D., Benoit N.E., Suh N., Williams C., Sporn M.B. 1997. Novel A-ring analogs of oleanolic and ursolic acids which affect growth regulation in NRP.152 prostate cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7**: 1769-1772.
- Fujioka T., Yamamoto M., Kashiwada Y., Fujii H., Mihashi K., Ikeshiro Y., Chen I.S., Lee K.H. 1998. Novel cytotoxic diterpenes from the stem of *dysoxylum kuskusense*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **8**: 3479-3482.
- Fujioka T., Yoshida K., Fujii H., Nagao T., Okabe H., Mihashi K. 2003. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VI. New Ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of *Bupleurum rotundifolium*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **51**: 365-372.

- Gibbs, J. B. 2000. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* **287**, 1969-1973.
- Gonzalez A.G., Alvarenga N.L., Bazzocchi I.L., Ravelo A.G., Moujir L.A. 1998. New bioactive norquinone methide triterpene from *Maytenus scutioides*. *Planta Medica* **64**: 769-771.
- Han B.H., Kim-Cho M.S., Han Y.N., Park M.H. 1984. Studies on triterpenoid corticomimetics (II). Synthesis of 11-oxooleanolic acid derivatives, and their antiinflammatory activities. *Han'guk Saenghwa Hakhoechi* **17**: 91-97.
- Hansch C., Leo A. *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. ACS Professional Reference Book, EUA. 1995.
- Hartwell J. L. 1982. Plants used against cancer. Quarterman, Lawrens, MA.
- Hawkins D.W. 1976. Patente. Oleanane derivatives. DE 2527387, GB 1457359, JP 51019758, FR 227603. Reino Unido.
- Heddle, J.A. 1973. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutation Research* **18**: 187-192.
- Herz W., Govindan S.V., Kumar N. 1981. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eupatorium lancifolium* and *E. semiserratum*. *Phytochemistry* **20**: 1343-1347.
- Hoernlein R.F., Orlikowsky T., Zehrer C., Niethammer D., Sailer E.R., Simmet T., Dannecker G.E., Ammon H.P. 1999. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**: 613-619.

- Honda T, Finlay H.J., Gribble G.W., Suh N., Sporn M.B. 1997. New enone derivatives of oleanolic acid and ursolic acid as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7**: 1623-1628.
- Honda T., Rounds B.V., Gribble G.W., Suh N., Wang Y., Sporn M.B. 1998. Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **8**: 2711-2714.
- Honda T., Rounds B.V., Bore L., Favaloro F.G. Jr., Gribble G.W., Suh N., Wang Y., Sporn M.B. 1999. Novel synthetic oleanane triterpenoids: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**: 3429-3434.
- Honda T., Gribble G.W., Suh N., Finlay H.J., Rounds B.V., Bore L., Favaloro F.G. Jr., Wang Y., Sporn M.B. 2000a. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**: 1866-1877.
- Honda T., Rounds B.V., Bore L., Finlay H.J., Favaloro F.G. Jr., Suh N., Wang Y., Sporn M.B., Gribble G.W. 2000b. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: A series of Highly active inhibitors of nitric oxide productions in mouse macrophages. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**: 4233-4246.
- Honda T., Honda Y., Favaloro F.G., Gribble G.W., Suh N., Place A.E., Rendi M.H., Sporn M.B. 2002. A novel dicyanotriterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-

1,9 (11)-dien-28-onitrile, active at picomolar concentrations for inhibition of nitric oxide production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**: 1027-1030.

Huang M.T., Ho C.T., Wang Z.Y., Ferraro T., Lou Y.R., Stauber K., Ma W., Georgiadis C., Laskin J.D., Conney A.H. 1994. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Research* **51**: 701-708.

Hwang B.Y., Chai H., Kardono L.B.S., Riswan S., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. 2003. Cytotoxic triterpenes from the twigs of *Celtis philippinensis*. *Phytochemistry* **62**: 197-201.

Hyen B.J., Soo L.Y., Mo K.C., Kim J-A., Sool K.K., Chul S.H., Kim K. 1997. Intracellular Ca²⁺ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *International Journal of Cancer* **73**: 725-728.

Ikeda T., Fujiwara S., Araki K., Kinjo J., Nohara T., Miyoshi T. 1997. Cytotoxic glycosides from *Albizia julibrissin*. *Journal of Natural Products* **60**: 102-107.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. "Información sobre tumores malignos", boletín del 3 de febrero de 2005 basado en Estadísticas Vitales 2002, Base de datos y Estadísticas demográficas 2003. www.inegi.gob.mx, 15 de Noviembre de 2005.

Ito Y., Pandey P., Place A., Sporn M.B., Gribble G.W., Honda T., Kharbanda S., Kufe D. 2000. The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-

- oic acid induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Cell Growth & Differentiation* **11**: 261-267.
- Ito Y., Pandey P., Sporn M.B., Datta R., Kharbanda S., Kufe D. 2001. The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis and differentiation of human osteosarcoma cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology* **59**: 1094-1099.
- Ito H., Takeya K., Hitotsuyanagi Y., Morita H. Anti-tumor compounds isolated from higher plants *En Atta-ur-Rahman*. 2000. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. **24**: pp269-347.
- Jordan M. A., Wilson L. 2004. Microtubules as target for anticancer drugs. *Nature Review* **4**: 253-265.
- Kashiwada Y., Zhang D., Chen Y., Cheng C., Chen H., Chang H., Chang J., Lee K. 1993. Antitumor agents, 145. Cytotoxic asprellic acids A and C and asprellic acid B, New p-coumaroyl triterpenes from *Ilex asprella*. *Journal of Natural Products* **56**: 2077-2082.
- Katzung, B.G. 1999. Farmacología básica y clínica. Ed. Manual Moderno. México, Séptima edición, pp 1011-1013.
- Kim D., Baek J.H., Kang C., Kim K. 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal of Cancer* **87**: 629.
- Kim Y.K., Yoon S.K., Ryu S.Y. 2000a. Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Medica* **66**: 485-486.

- Kirsch-Volders M., Elhajouji A., Cundari E., Van H. P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research* **392**: 19-30.
- Klug S. W., Cummings R. M. 1999. Conceptos de Genética. 1ª edición, Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. Pp 625-626.
- Kohli E., Raj H.G., Kumari R., Rohil V., Kaushik N.K., Prasad A.K. 2002. Comparison of the prevention of aflatoxin b(1)-induced genotoxicity by quercetin and quercetin pentaacetate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**: 2579-2582.
- Komoroski R.A., Gregg E.C., Shockcor J.P., Geckle J.M. 1986. Identification of guayule triterpenes by two-dimensional and multipulse NMR techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* **24**: 534-543.
- Konopa J., Zielinsky J., Matuszkiewicz A. 1974a. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from *Bryonia alba*. I. Isolation and identification. *Arzneimittel-Forschung* **24**: 1554-1557.
- Konopa J., Matuszkiewicz A., Hrabowska M., Onoszka K. 1974b. Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from *Bryonia alba*. II. Biological studies. *Arzneimittel-Forschung* **24**: 1741-1743.
- Konoshima T., Takasaki M. 2000. Anti-tumor -promoting activities (cancer chemopreventive activities) of natural products. *Studies in Natural Products Chemistry* **24**(Bioactive Natural Products (Part E)): 215-267.
- Kravtsov V. Kh., Biyushkin V. N., Rebrova O. N., Isaev M. I., Gorovits M. B., Alaniya M. D., Abubakirov N. K. 1988. Triterpene glycosides and their

- genins from Astragalus. XXVII. X-ray structural investigation of cyclogalegenin. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii* **4**: 541-6.
- Kweifio-Okai G., De Munk F., Rumble B. A., Macrides T. A., Cropley M. 1994. Antiarthritic mechanisms of Amyrin triterpenes. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* **85**: 45-55.
- Lapillonne H., Konopleva M., Tsao T., Gold D., McQueen T., Sutherland R.L., Madden T., Andreeff M. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by a novel synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Research* **63**: 5926-5939.
- Laza L. D., Rodríguez L. I. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **8**. ISSN 1028-4796 [on line]. ecimed@infomed.sld.cu. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issues&pid=1028-4796&lng=es&nrm=iso.
- Le Men J., Buffard G., Provost J., Tiberghien R., Forgacs P., Lagrange E., Albert O., Arousseau M. 1969. Relation between structure of cucurbitacins and their toxicity and laxative activity. *Chimica Therapeutica* **4**: 459-465.
- Lee H.Y., Chung H.Y., Kim K.H., Lee J.J., Kim K.W. 1994. Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **120**: 513-518.

- Lee J.S., Kim J., Kim B.Y., Lee H.S., Ahn J.S., Chang Y.S. 2000. Inhibition of phospholipase C 1 and cancer cell proliferation by triterpene esters from *Uncaria rhynchophylla*. *Journal of Natural Products* **63**: 753-756.
- Lee K., Lin Y., Wu T., Zhang D., Yamagishi T., Hayashi T., Hall I., Chang J., Wu R., Yang T. 1988. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psichotria serpens*, and *Hyptis capitata*: Ursolic acid and related derivatives. *Planta medica* **55**: 308-310.
- Lee K., Chai H., Tamez P.A., Pezzuto J.M., Cordell G.A., Win K.K., Tin-Wa M. 2003. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica* . *Phytochemistry* **64**: 535-541.
- Li J., Guo W.J., Yang Q.Y. 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J.Gastroenterol.* **8**: 493-495.
- Lissauer H. En Rojas, E. 1992. Evaluación de sustancias antineoplásicas. El cultivo de linfocitos como sistema de prueba. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, División de Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp 6.
- Liu J., Liu Y., Madhu C., Klaassen C.D. 1993. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **266**: 1607-1613.
- Liu J., Liu Y., Parkinson A., Klaassen C.D. 1995. Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **275**: 768-774.

- Liu J., Nilsson A., Oredsson S., Badmev V., Zhao W., Duan R. 2002. Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis* **23**: 2087-2093.
- Lyman W. R., Rosenblatt D. H. Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behavior of Organic Compounds. Mc Graw-Hill: EUA. 1982.
- Ma J., Starck S.R., Hecht S.M. 1999. DNA Polymerase inhibitors from *Tetracera boiviniana*. *Journal of Natural Products* **62**, 1660-1663.
- Maatooq G.T., Hoffmann J.H.Z. 2002. Microbial transformation of a mixture of argentatin A and incanilin. *Zeitschrift für Naturforschung* **57c**: 489-495.
- Mann, J. 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews* **2**: 143-148.
- Marques S., Oliveira N.G., Chaveca T., Rueff J. 2002. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. *Mutation Research* **517**: 39-46.
- Marquina S., Maldonado N., Garduno-Ramírez M.L., Aranda E., Villarreal M.L., Navarro V., Bye R., Delgado G., Alvarez L. 2001. Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from roots of *Siguiera decurrens*. *Phytochemistry* **56**: 93-97.
- Martínez R., Martínez-Vázquez M., Zamorano-Macías O. 1990. Electron Impact Mass Spectrometry of Triterpenoids from Guayule. *Organic Mass Spectrometry* **25**: 237-238.

- Martínez R., Arellano-García M.R., Martínez-Vázquez M., Gallegos A.J. 1993. Síntesis of carbenoxolone analogs from argentatin B. *Oppi Briefs* **25**: 698-703.
- Martínez-Vazquez M., Martínez R., Espinosa P.G. 1994. Antimicrobial properties of argentatine A isolated from *Parthenium argentatum*. *Fitoterapia* **LXV**: 371.
- Matsubara C, Romo de Vivar, A. 1985. Tetracyclic triterpenes from *Parthenium fruticosum*. *Phytochemistry* **24**: 613-615.
- Mizushina Y., Lida A., Sugawara F., Sakaguchi K. 2000. Novel triterpenoids inhibit both DNA polimerase and DNA topoisomerase. *Biochemical Journal* **350**: 757.
- Monga M. y Sausville E.A. 2002. Developmental Therapeutics Program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia* **16**: 520-526.
- Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., VaigroWolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**: 757-766.
- Moore, M. J y Goldenberg, G. J. Capítulo 60, Fármacos antineoplásicos *En* Kalant, H y Roshlau, W. H. E. 1998. Principios de Farmacología clínica. Oxford University press Mexico, sexta edición.
- Neto C.C., Vaisberg A.J., Zhou B.N., Kingston D.G.I., Hammond G.B. 2000. Cytotoxic triterpene acids from the peruvian medicinal plant *Polylepis racemosa*. *Planta Medica* **66**: 483-484.

- Newman D.J., Cragg G.M., Kingston D.G.I. Natural Products as pharmaceuticals and sources for lead structures. *En Wermuth C.G. 2003. The practice of medicinal chemistry. Elsevier. Pp 91-109.*
- Ngassapa O., Soejarto D.D., Pezzuto J.M., Farnsworth N.R. 1994. Quinone methide triterpenes and salaspermic acid from *Kokoona ochracea*. *Journal of Natural Products* **57**: 1-8.
- Obe G. Y, Beek B. Human peripheral lymphocytes in mutation research. *En Obe G. 1984. Mutations in man. Heidelberg Springer-Verlag. Pp 177-197.*
- Öksüz S., Shieh H-L., Pezzuto J.M., Özhatay N., Cordell G.A. 1993. Biologically Active Compounds from the Euphorbiaceae; Part 1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaeensis* subsp. *Glareosa*. *Planta Medica* **59**: 472.
- Öksüz S., Gil R. R., Chai H., Pezzuto J. M., Cordell G. A., Ulubelen A. 1994. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; 2. Two triterpenoids of *Euphorbia cyparissias*. *Planta Medica* **60**: 594-596.
- Olaharsky A.J., Mondrala S.T., Eastmond D.A. 2005. Chromosomal malsegregation and micronucleus induction in vitro by the DNA topoisomerase II inhibitor fisetin. *Mutation Research* **582**: 79-86.
- Ostrosky-Wegman P., Montero R., Cortinas de Nava C., Tice R., Albertini R. 1987. The use of bromodeoxyuridine labeling in the human lymphocyte HGPRT somatic mutation assay. *Mutation Research* **191**: 211-214.
- Ostrosky P., Montero R., Hernandez L. 1988. Lymphocyte proliferation kinetics as a cytostatic screening system. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **11**: 80.

- Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez M. 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* **11**: 436-445.
- Palazzino G., Rasoanaivo P., Federici E., Nicoletti M., Galeffi C. 2003. Prenylated isoflavonoids from *Millettia pervilleana*. *Phytochemistry* **63**: 471-474.
- Pineda M. 1999. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Place A.E., Suh N., Williams C.R., Risingsong R., Honda T., Honda Y., Gribble G.W., Leesnitzer L.M., Stimmel J.B., Willson T.M., Rosen E., Sporn M.B. 2003. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-Imidazole, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. *Clinical Cancer Research* **9**: 2798-2806.
- Poole, S. K.; Poole, C. F. 2003. Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients. *Journal of Chromatography B* **797**: 3-19.
- Ramachandran C., Rabi T., Fonseca H.B., Melnick S.J., Escalon E.A. 2003. Novel plant triterpenoid drug amooranin overcomes multidrug resistance in human leukemia and colon carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer* **105**: 784-789.
- Rasikari H.L., Leach D.N., Waterman P.G., Spooner-Hart R.N., Basta A.H., Banbury L.K., Winter K.M, Forster P.I. 2005. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Glossocarya calcicola*. *Phytochemistry* **66**: 2844-2850.

- Reutrakul V., Krachangchaeng C., Tuchinda P., Pohmakotr M., Jaipetch T., Yoosook C., Kasisit J., Sophasan S., Sujarit K., Santisuk T. 2004. Cytotoxic and anti-HIV constituents from leaves and twigs of *Gardenia tubifera*. *Tetrahedron* **60**: 1517-1523.
- Reyes-Chilpa R., Estrada-Muñiz E., Ramírez Apan T., Amekraz B., Aumelas A., Jankowski C.K., Vázquez-Torres M. 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences* **75**: 1635-1647.
- Ribeiro D.M.C., Tulio V.B.F.N., Agnez-Lima L.F., Batistuzzo M.S.R. 2003. Evaluation of Mutagenic Activity in an Extract of Pepper Tree Stem Bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis* **42**: 185-191.
- Ríos M. Y., Salinas D., Villarreal M. L. 2001. Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum*. *Planta Medica* **67**: 443-446.
- Rivero A., Quintana J., Eiroa J.L., López M., Triana J., Bermejo J., Estévez F. 2003. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology* **482**: 77-84.
- Rodriguez-Hahn L., Romo de Vivar A., Ortega A., Aguilar M., Romo J. 1970. Determinación de las estructuras de las argentatinas A, B y C del guayule. *Revista Latinoamericana de Química* **1**: 24-38.
- Rojas E., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Montero R., Rodriguez R., Ostrosky-Wegman P. 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-cancer drugs* **4**: 637-640.

- Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodriguez R., Ostrosky-Wegman P. 1992. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutation Research* **282**: 283-286.
- Romo J., Romo de Vivar A., Ortega A., Díaz E. 1970. Las guayulinas A y B, nuevos sesquiterpenos aislados del guayule. *Revista Latinoamericana de Química* **1**: 132-135.
- Roy S.K., Thilagar A.K., Eastmond D.A. 2005. Chromosome breakage is primarily responsible for the micronuclei induced by 1,4-dioxane in the bone marrow and liver of young CD-1. *Mutation Research* **586**: 28-37.
- Saxe E.L., Shimizu M., Xiao D., Nuntanakorn P., Lim J. T.E., Suzui M., Seter C., Pertel T., Kennelly E.J., Kronenberg F., Weinstein I. B. 2004. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **83**: 221-231.
- Schloman W.W., Hively R.A., Krishen A., Andrew M. A. 1983. Guayule byproduct evaluation: extract characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**: 873-876.
- Sebti S.M. y Jove R. 2002. Patente. Cucurbitacin compounds, methods for treatment of cancer, and methods for identification of anticancer compounds. Núm. WO 2002078617. Estados Unidos de América.

- Setzer W.N., Setzer M.C., Bates R.B., Jackes B.J. 2000. Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, North Queensland, Australia. *Planta Medica* **66**: 176-177.
- Setzer W.N., Holland M.T., Bozeman C.A., Rozmus G.F., Setzer M.C., Moriarity D.M., Reeb S., Vogler B., Bates R.B., Haber W.A. 2001. Isolation and Frontier Molecular Orbital Investigation of Bioactive Quinone-Methide Triterpenoids from the Bark of *Salacia petenensis*. *Planta Medica* **67**: 65-69.
- Setzer W.N. y Setzer M.C. 2003. Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic agents. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* **3**: 540-556.
- Shao Y., Ho C., Chin C., Badmaev V., Ma W., Huang M. 1998. Inhibitory activity of boswellic acids from *Boswellia serrata* against human leukemia HL-60 cells in culture. *Planta Medica* **64**: 328-331.
- Shen S.C., Ko C.H., Tseng S.W., Tsai S.H., Chen Y.C. 2004. Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicology and Applied Pharmacology* **197**: 84-95.
- Shirota O., Morita H., Takeya K., Itokawa H. 1994. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *Journal of Natural Products* **57**:1675-1681.
- Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B. B. 2003. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B kinase and p65 phosphorylation: Correlation with

down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Research* **63**: 4375-4383.

Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research* **31**: 9–15.

Siddiqui B. S., Begum S., Siddiqui S., Lichter W. 1995. Two cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Nerium oleander*. *Phytochemistry* **39**: 171-174.

Silva G.L., Gil R.R., Cui B., Chai H. Santisuk T., Srisook E., Reutrokul V., Tuchinda P., Sophanson S., Sujarit S., Upatham S., Lynn S.M., Farthing J.E., Yang S., Lewis J.A., O'Neill M.J., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. 1997. Novel cytotoxic ring-A seco-cycloartane triterpenes from *Gardenia coronaria* and *G. sootepensis*. *Tetrahedron* **53**: 529-538.

Silva I.D., Gaspar J., Da Costa G.G., Rodrigues A.S., Laires A., Rueff J. 2000. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemico-Biological Interactions* **124**: 29-51.

Simon A., Najid A., Chulia A.J., Delage C., Rigaud M. 1992. Inhibition of lipoxigenase activity and HL-60 leukemic cell proliferation by ursolic acid isolated from heather flowers (*Calluna vulgaris*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1125**: 68-72.

Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones 2001 (Base de datos preliminar). Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud y Asistencia., www.ssa.gob.mx, 15 de Noviembre de 2005.

- Skibola C.F., Smith M.T. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine* **29**: 375-383.
- Smit H.F., Van Den Berg A.J.J., Kroes B.H., Beukelman C.J., Quarles van Ufford H.C., Van Dijk H., Labadie R.P. 2000. Inhibition of T-lymphocyte proliferation by cucurbitacins from *Picrorhiza scrophulariaeflora*. *Journal of Natural Products* **63**: 1300-1302.
- Smith-Kielland I., Dornish J.M., Malterud K.E., Hvistendahl G., Romming C., Bockman O.C., Kolsaker P., Stenstrom Y., Nordal A. 1996. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Medica* **62**, 322-325.
- Sohn K.L., Lee H.Y., Chung H.Y., Young H.S., Kim K.W. 1993. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Letters* **94**: 213-218.
- Subbaramaiah K., Michaluart P., Sporn M., Dannenberg A.J. 2000. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Research* **60**: 2399-2404.
- Suh N., Honda T., Finlay H.J., Barchowsky A., Williams C., Benoit N.E., Xie Q.W., Nathan C., Gribble G.W., Sporn M.B. 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Research* **58**: 717-723.
- Suh N., Wang Y., Honda T., Gribble G.W., Dmitrovsky E., Hickey W.F., Maue R.A., Place A.E., Porter D.M., Spinella M.J., Williams C.R., Wu G., Dannenberg A.J., Flanders K.C., Letterio J.J., Mangelsdorf D.J., Nathan C.F., Nguyen L., Porter W.W., Ren R.F., Roberts A.B., Roche N.S., Subbaramaiah, Sporn M. B. 1999. A novel synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-

- 28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Research* **59**: 336-341.
- Suh N., Roberts A.B., Reffey S.B., Miyazono K., Itoh S., Dijke P.T., Heiss E.H., Place A.E., Risingsong, R., Williams, C. R., Honda, T., Gribble, G. W., Sporn, M. B. 2003. Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor β /Smad signaling. *Cancer Research* **63**: 1371-1376.
- Sumitra M., Manikandan P., Kumar D.A., Arutselvan N., Balakrishna K., Manohar B.M., Puvanakrishnan R. 2001. Experimental myocardial necrosis in rats: role of arjunolic acid on platelet aggregation, coagulation and antioxidant status. *Molecular and Cellular Biochemistry* **224**: 135-142.
- Syrovets T., Buchele B., Gedig E., Slupsky J.R., Simmet T. 2000. Acetyl-Boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II . *Molecular Pharmacology* **58**: 71-81.
- Tan G. T., Lee S., Lee I., Chen J., Leitner P., Besterman J. M., Kinghorn A. D., Pezzuto J. M. 1996. Natural-product inhibitors of human DNA ligase I. *Biochemical Journal* **314**: 993-1000.
- Tohamy A.A., El-Ghor A.A., El-Nahas S.M., Noshay M.M. 2003. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutation Research* **541**: 45-53.
- Turner J.M. y Davies W.A.M. (Biorex laboratories, Ltd.). Patente. 1967. Glycyrrhetic and oleanolic acid derivatives. GB 1060344, DE 1248038, FR 1467582, FR 5167, US 3412084. Reino Unido.

- Umehara K., Takagi R., Kuroyanagi M., Ueno A., Taki T., Chen Y. 1992. Studies on differentiation-inducing activities of triterpenes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **40**: 401-405.
- Van Dang G., Rode B.M., Stuppner H. 1994. Quantitative electronic structure-activity relationship (QESAR) of natural cytotoxic compounds: maytansinoids, quassinoids and cucurbitacins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2**: 331-50.
- Velázquez M.A., Martínez O., Aguirre J. *Cap. 2: Revisión histórica de la producción de hule de guayule en México de 1903 a 1951. En 1981. Guayule, reencuentro en el desierto. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Centro de Investigación en Química Aplicada. Comisión Nacional de las Zonas Áridas. México. Pp 27-70.*
- Wada S., Aida A., Tanaka R. 2001. Screening of triterpenoids isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA topoisomerase inhibitory activity. *Journal of Natural Products* **64**: 1545-1547.
- Wang Y., Porter W. W., Suh N., Honda T., Gribble G. W., Leesnitzer L. M., Plunket K. D., Mangelsdor D. J., Blanchard S. G., Willson T. M., Sporn M. B. 2000. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Molecular Endocrinology* **14**: 1550-1556.
- Whitehouse M.W. y Doskotch R.W. 1969. Selective inhibition of thymidine incorporation into lymphocytes by cucurbitacins B and D. *Biochemical Pharmacology* **18**: 1790-1793.

- Wick W., Grimmel C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M. 1999. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **289**: 1306-1312.
- Witkowski A. y Konopa J. 1981. Binding of the cytotoxic and antitumor triterpenes, cucurbitacins, to glucocorticoid receptors of HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **674**: 246-255.
- Witkowski A., Woynarowska B., Konopa J. 1984. Inhibition of the biosynthesis of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and protein in HeLa S3 cells by cucurbitacins, glucocorticoid-like cytotoxic triterpenes. *Biochemical Pharmacology* **33**: 995-1004.
- Xu R., Fazio G.C., Matsuda P.T. 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **65**: 261-291.
- Yamagishi T., Zhang D., Chang J., McPhail D.R., McPhail A.T., Lee K. 1988. The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid A and B. *Phytochemistry* **27**: 3213-3216.
- Yang H., Acker J., Chen A., McGann L. 1998. In situ assessment of cell viability. *Cell Transplantation* **7**: 443-451.
- Yun B., Ryoo I., Lee I., Park K., Choung D., Han K., Yoo I. 1999. two bioactive pentacyclic triterpene esters from root bark of *Hibiscus syriacus*. *Journal of Natural Products* **62**: 764-766.
- Zhu M., Chang Q., Wong L.K., Chong F.S., Li R.C. 1999. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*, *Phytotherapy Research* **13**: 529-531.



Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray)

Hortensia Parra-Delgado^{a,b}, Fátima García-Pillado^b, Monserrat Sordo^b,
Teresa Ramírez-Apan^a, Mariano Martínez-Vázquez^a, Patricia Ostrosky-Wegman^{b,*}

^aInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, C. P. 04510, México, D.F.

^bDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, C. P. 04510, México, D.F.

Received 15 November 2004; accepted 19 May 2005

Abstract

Argentatins A and B are abundant triterpenes present in *Parthenium argentatum*. Both compounds have shown cytotoxic properties on K562, MCF-7, PC-3, HCT-15 and U251 human cancer cell lines. Furthermore the cytotoxic, cytostatic and genotoxic effects of the argentatins on proliferating lymphocytes were evaluated using cytokinesis-block micronucleus test. Argentatin A had no cytostatic properties, but it was cytotoxic for proliferating lymphocytes at a concentration of 25 μM ($P < 0.005$). On the other hand, argentatin B showed significant cytostatic effects ($P < 0.001$) at concentrations of 5 to 25 μM and it did not show cytotoxic effects at the same concentrations. Neither argentatin showed genotoxic effects in terms of micronucleus frequency in human lymphocytes. According to these results the argentatins are not able to cause injury on DNA by clastogenic or aneugenic mechanisms.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Argentatin A; Argentatin B; Triterpenes; Cytotoxicity; Genotoxicity; Micronucleus assay

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223846; fax: +52 55 56223365.

E-mail address: ostrosky@servidor.unam.mx (P. Ostrosky-Wegman).

Introduction

Human have relied on plants as a source of medicinal agents for centuries. Antineoplastic natural products have been shown to inhibit tumor cell proliferation in a number of ways including, for example, the interference with cytoskeleton formation, prevention of DNA replication, or interference with signal transduction mechanisms (Konoshima and Takasaki, 2000; Setzer and Setzer, 2003).

Triterpenoids, like the steroids, are formed by the cyclization of squalene with the retention of all 30-carbon atoms. The group includes a very large number of naturally occurring members that cover a variety of functional groups. Cucurbitacin triterpenoids prevent proliferation of tumor cells by depolymerizing actin, thus interfering with the cytoskeleton. Many of the cytotoxic triterpenoids described in literature seem to exert their activity by interfering with DNA replication, typically by inhibition of DNA polymerase or topoisomerase. For instance, betulinic, ursolic, and oleanolic acids show inhibition of DNA polymerase β as well as inhibition of topoisomerases I and II (Huang et al., 1994; Lee et al., 1994; Sohn et al., 1993; Cha et al., 1996; Hyen et al., 1997; Kim et al., 2000; Mizushima et al., 2000).

Taken together, those studies indicate that triterpenoids may be good candidates for therapeutic purposes. However, although triterpenoids are widely used for medicinal purposes in many Asian countries, they have not impacted on the practice of western medicine (Suh et al., 1998).

The cycloartane-type triterpenes argentatins A and B (Fig. 1) are the main components of the resin of *Parthenium argentatum*, Gray (guayule), a common desert shrub in Northern Mexico and Southwestern USA which is an important source of natural rubber. The resin from the guayule bush is a major by-product of rubber production and a possible source of biologically active natural compounds available in large amounts (Rodriguez-Hahn et al., 1970; Komoroski et al., 1986; Martínez et al., 1990).

Our previous studies on the argentatins demonstrated that argentatin A show antimicrobial properties (Martínez-Vazquez et al., 1994) and that argentatin B is a non-competitive inhibitor of ^3H -estradiol binding on receptors of human breast hormone-dependent tumors (Calzada et al., 1995).

Since, some cycloartan-type triterpenes such as methyl quadrangularates B and D have shown cytotoxic activity on carcinoma cells (Öksüz et al., 1993; Smith-Kielland et al., 1996; Banskota et al., 1998), we decided to evaluate the cytotoxic activity of argentatins A and B on PC-3, U251, MCF-7, HCT-15 and K562 human cancer cell lines in the sulforhodamine B (SRB) test.

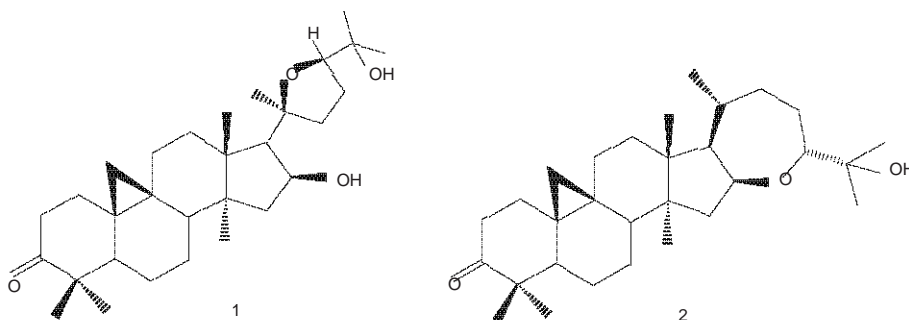


Fig. 1. Chemical structures of argentatins A (1) and B (2).

SRB assay has been widely used in pre-clinical in vitro screening of synthetic compounds or natural products for evidence of anticancer activity by measuring the growth inhibition of cancer cell lines (Monga and Sausville, 2002; Monks et al., 1991). It gives preliminary information about the cytotoxic activity and allows the comparison of potencies between two or more compounds. However, with the use of other biological endpoints, such as cell proliferation kinetics (CPK) and nuclear division index (NDI), more accurate information can be obtained.

On the other hand, it is known that some antineoplastic agents such as doxorubicin, cisplatin or mitomycin C (Rojas et al., 1992; Dhawan et al., 2003) in addition to their cytostatic effect, have important adverse effects such as genotoxicity. These effects have been determined by using several in vitro systems such as the in vitro cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay (Dhawan et al., 2003; Duffaud et al., 1998).

The CBMN assay has evolved into a robust assay for genetic damage with several applications such as testing of new pharmaceuticals (Fenech, 2000; Kirsch-Volders et al., 1997). Considering that this assay allows the evaluation of genotoxic effects and also cytostatic effects of test compounds in terms of cell proliferation and nuclear division index, we also decided to use it in order to determine the cytostatic and genotoxic effects of argentatins A and B.

Materials and methods

Isolation of argentatins A and B

The resin, a by-product of the industrial process to obtain natural rubber from *P. argentatum* was donated by CONAZA Company (Coahuila, Mexico). 157.39 g of the resin were dissolved in a small volume of hexane and percolated over tonsil. The first fractions collected were reunited and their chromatography was carried on silica gel and eluted with solvent mixtures of increasing polarity starting with hexane and ending with ethyl acetate (EtOAc). This procedure resulted in the isolation of argentatin B (8.7 g) from fractions eluted with hexane and argentatin A (4.2 g) from fractions eluted with a mixture of hexane/EtOAc (1:1). Argentatins were purified by conventional procedures, and identified by comparison with physical and spectroscopic constants (melting point, ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance) with those reported in the literature (Rodriguez-Hahn et al., 1970; Komoroski et al., 1986; Martínez et al., 1990).

Determination of cytotoxicity in human cancer cell lines using the sulforhodamine (SRB) assay

The cytotoxicity in human cancer cell lines was determined following protocols established by the NCI (Monks et al., 1991). Human prostate carcinoma (PC-3), leukemia (K562), central nervous system (U251), breast cancer (MCF-7), and colon carcinoma (HCT-15) cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 1% non-essential amino acids. They were maintained at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere with 95% humidity. For the assay, all adherent cells were detached with 0.1% trypsin–EDTA to make single-cell suspensions. Viable cells were counted using trypan blue excluding method in a hemacytometer. 5000–10,000 cells/ well were

seeded in 96-well microtiter plates and incubated at 37 °C. After 24 h the cells were treated with seven different concentrations (1–100 µM) of argentatins A or B. Doxorubicin (Sigma) was used at five different concentrations (0.01–5 µM) as a positive control. The test compounds were initially dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO, 20 mM) and further diluted in medium to produce the concentrations used. The plates were incubated for another 48 h at 37 °C.

After 48 h, adherent cell cultures were fixed in situ by adding 50 µl of cold 50% (wt/vol.) trichloroacetic acid (TCA) and incubated for 30 min at room temperature with 0.4% sulforhodamine (SRB, Sigma). Unbound SRB solution was removed by washing it three times with 1% acetic acid and the plates were air-dried. The protein-bound SRB was dissolved with TRIZMA base (Sigma, 10 mM), and the optical densities were read on an automated spectrophotometric plate reader at a single wavelength of 515 nm. The concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) were calculated (Monks et al., 1991).

Evaluation of cell proliferation kinetics and micronucleus frequency in whole blood human lymphocytes

Blood samples

Experiments were performed using blood from six healthy, non-smoker donors (blood from two men and one woman was used were employed for the study of argentatin A, and two woman and one man for the study of argentatin B) who had not taken any drug at least 15 days prior to sampling. Average age was 27 years (22–32).

Cytokinesis-block micronucleus test

Blood was obtained by venous puncture, and cultured (0.5 ml) in 6.3 ml RPMI-1640 medium supplemented with non-essential amino acids (1%, Sigma), and L-glutamine (1%, Sigma). Phytohemagglutinin was added (0.2 ml, Gibco) at the beginning of culture. Duplicate cultures were maintained at 37 °C for 72 h. After 48 h of culture, cells were treated with the test compounds and cytochalasin-B (Cyt B, 6 µg/ml, Sigma) was added to prevent cytokinesis. Three different concentrations of each argentatin dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO, Sigma) were tested (5, 15 and 25 µM). DMSO and mitomycin C (Sigma) were used as solvent and positive controls, respectively. Twenty-four hours later, cells were centrifuged (at 1200 rpm for 10 min), and fixed with methanol–acetic acid (3:1). Cells were carefully dropped onto cold glass slides avoiding membrane destruction. Dry slides were stained with Wright's dye for microscopic evaluation. Lymphocyte proliferation kinetic was analyzed in 200 cells, determining the frequency

Table 1
Cytotoxic activity of Argentatins A and B on human cancer cell lines

Treatment	IC ₅₀ (µM) ± SEM				
	Human cancer cell lines				
	U251 (CNS)	PC-3 (prostate)	HCT-15 (colon)	MCF-7 (breast)	K562 (leukemia)
Argentatin A	27.34 ± 1.00	20.22 ± 3.44	31.70 ± 1.10	27.03 ± 4.40	38.61 ± 4.47
Argentatin B	36.4 ± 6.79	33.41 ± 3.71	24.14 ± 5.58	33.06 ± 5.95	79.38 ± 0.08
Doxorubicin	0.09 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.28 ± 0.01

Each data is given as the mean and its standard error (SEM) of at least three independent experiments.

of mono (M), bi (B) and polynucleated (P) cells, corresponding to 0, 1, and 2 or more in vitro cell divisions, respectively. Cytostatic activity was determined by calculating the nuclear division index following the equation: Nuclear Division Index (NDI)=[#M+2#B+3#P]/200. The number of micronuclei (MN) was scored in 1000 binucleated cells according to published criteria (Fenech, 2000).

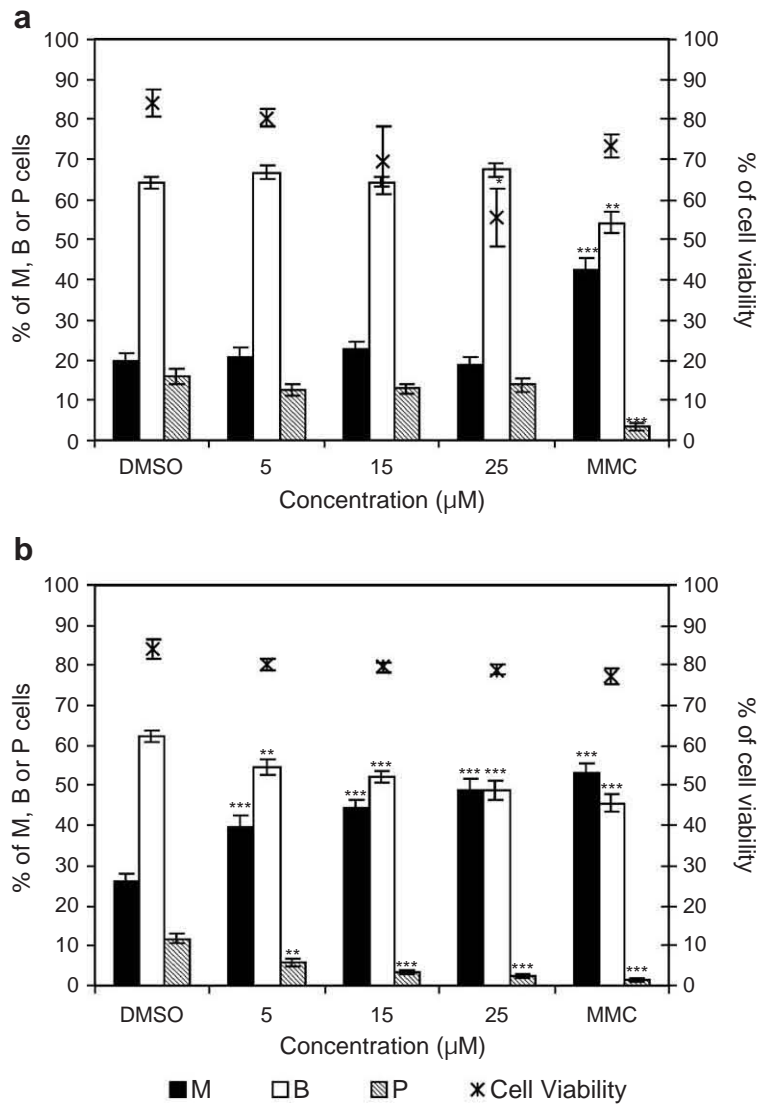


Fig. 2. Cellular effects of argentatins A (2a) and B (2b). Viability (×) and proliferation kinetics (columns) of lymphocytes treated with three concentrations of test compound. Percentage of mononucleated (M, ■), binucleated (B, □) and polynucleated (P, ▨) lymphocytes. Mitomycin C (MMC) was used as reference at 1 μM. Each data is represented as the mean and its standard error (SEM) of three duplicated experiments of three donors (* $P < 0.005$, ** $P < 0.004$, *** $P < 0.001$).

The effect of drug treatment on lymphocyte viability on parallel cultures without cytochalasin-B was measured by FDA/ Ethidium bromide assay (Yang et al., 1998).

Statistics

One way-ANOVA and the Student *t*-test were used to analyze the statistical significance of the results. Treated cultures were compared to those observed in the DMSO control. *P* values equal to or lower than 0.05 were considered significant.

Results

Cytotoxicity for human cancer cell lines

The cytotoxic activity of argentatins A and B for cancer human cell lines is given as the concentration required to inhibit 50% of cell growth of each cancer cell line (IC_{50}) (Table 1). Data obtained show that

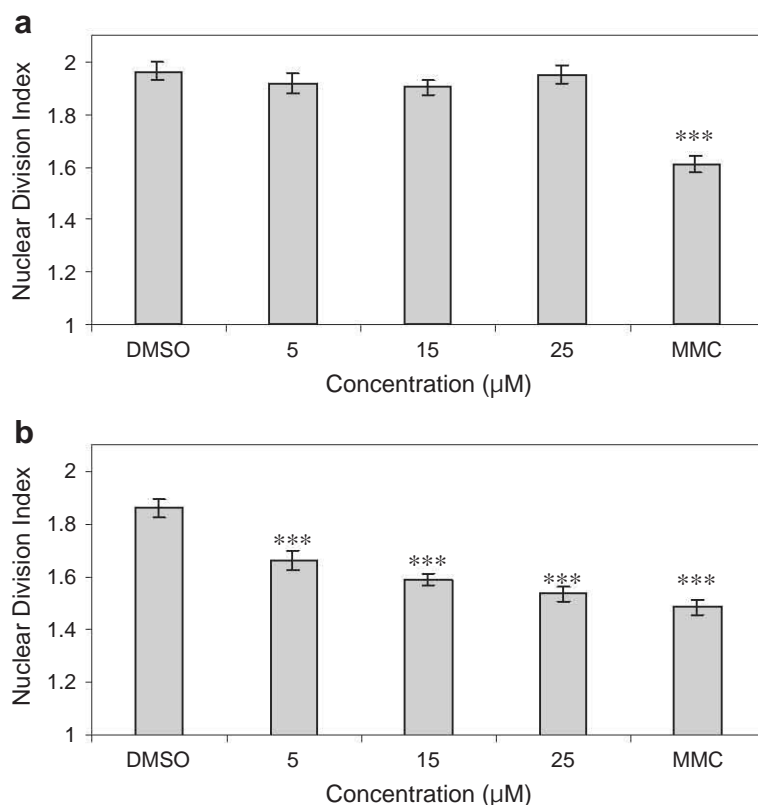


Fig. 3. Nuclear division index calculated for argentatins A (3a) and B (3b) tested at 5, 15 and 25 μ M and mitomycin C (reference, MMC) at 1 μ M. Bars represent the mean and its standard error (SEM) of three duplicated experiments of three donors. (***) $P < 0.001$).

argentatin A inhibited the growth of all cell lines tested but its potency was higher on the prostate cancer (PC-3) cell line, showing IC_{50} value of 20.22 μ M. The leukemia cell line (K562) was least sensitive to growth inhibition by argentatin B.

Effects on viability of lymphocytes

The viability of lymphocytes treated with argentatins A and B are shown in Fig. 2. Argentatin A was evaluated at three different concentrations and only at 25 μ M cell survival was significantly reduced ($P < 0.005$) to the level of 53% (Fig. 2a). No significant differences were found between DMSO and argentatin B treated cells meaning that argentatin B did not have any effect in cell viability at the tested concentrations (Fig. 2b).

Effects on cell proliferation kinetics and nuclear division index

Argentatin A did not show an effect on the percent of mono-, bi- and polynucleated lymphocytes in culture. Neither cell proliferation kinetics (CPK) (Fig. 2a) nor the NDI calculated for the treated cells were significantly different to the control (Fig. 3a). However, when Argentatin B was added to the proliferating lymphocytes the percentage of mononucleated cells increased and the percentage of bi- and polynucleated cells decreased in a concentration-dependent response. Fig. 2b shows that the cytostatic effect is not related to its cytotoxic activity because at the same concentrations argentatin B did not show any cytotoxicity. The NDI values calculated for treated cells were statistically different to the control values (Fig. 3b).

Genotoxicity

Table 2 shows the micronucleus frequency obtained when human lymphocytes were exposed to argentatins A or B. Neither argentatin showed genotoxic effects in terms of increasing micronucleus frequency.

Table 2
Micronucleus frequency (MN) on proliferating lymphocytes treated with argentatins A and B

	MN $\times 10^{-3}$ cells \pm SEM
DMSO	4.13 \pm 0.30
Argentatin A (μ M)	
5	4.12 \pm 0.55
15	3.88 \pm 0.54
25	3.48 \pm 0.50
Argentatin B (μ M)	
5	5.00 \pm 0.53
15	4.75 \pm 0.49
25	5.16 \pm 0.51
MMC 1 μ M	32.96 \pm 2.31***

Each data is given as the mean and its standard error (SEM) of three duplicated independent experiments of three donors. *** $P < 0.001$.

Discussion

According to our results, the tested argentatins have a cytotoxic concentration-related activity on human cancer cell lines with an IC_{50} interval of 20.22 to 79.38 μM . They are very similar to those reported for other triterpenes, such as betulinic, ursolic and oleanolic acids (Hyen et al., 1997; Kim et al., 2000; Wick et al., 1999). For instance, IC_{50} values of both ursolic and oleanolic acids on K562 cell line using SRB assay were 27.4 and 26.5 μM , respectively. Several studies demonstrated that these triterpenes are cytostatic agents and show apoptotic activity increasing the level of intracellular calcium and cytochrome *C* protein. Furthermore, it has recently been reported that actein, a cycloartane-type triterpene glycoside showed a cytostatic activity on MCF-7 cell line. It decreased the level of cyclin D1, cdk4 and the hyperphosphorylated form of the pRb protein and increased the level of p21^{cip1} (Saxe et al., 2004).

Although various studies on the action mechanisms of action of some triterpenoids have been carried out, further studies should be done to identify the mechanism by which argentatins inhibit the growth of human cancer cell lines.

The use of CPK of lymphocyte cultures has been proposed as a parameter for the screening of antineoplastic activity (Ostrosky et al., 1988; Rojas et al., 1993) and Fenech (2000) has proposed determining the NDI as a measure of cytostatic effects.

The cytotoxic and cytostatic effects of the argentatins on proliferating lymphocytes were evaluated using percentage of cell viability, CPK and NDI. They allowed the differentiation between cell death and cytostatic effects by delaying any phase of the cell cycle (Fenech, 2000; Kirsch-Volders et al., 1997).

Since we did not find differences on the effects of argentatins on lymphocytes collected from different donors, we decided to pool the data together. In contrast, as seen in Fig. 2, some differences in the response shown by lymphocytes from different donors to mitomycin were observed. This fact has been previously described by Rojas et al. (1992) and seems to be related to differences in the response to proliferate, age, metabolism as well as to different susceptibility of lymphocytes from each donor.

Our results demonstrated that argentatin A reduced the cell survival at 25 μM . Neither cell proliferation kinetics (CPK) nor the NDI calculated for the treated cells were significantly different to the control. These results showed that argentatin A does not behave as a cytostatic compound. On the other hand, argentatin B did not show any effect in cell viability at the tested concentrations, but it decreased the cell proliferation and calculated NDI. The cytostatic effects in terms of the NDI shown by this compound (at 25 μM) and mitomycin C (1 μM) were not significantly different, although a different potency was observed.

Several types of natural products such as flavonoids have been evaluated for genotoxic or anti-genotoxic activities (Skibola and Smith, 2000; Silva et al., 2000; Kohli et al., 2002; Marques et al., 2002; Ribeiro et al., 2003) but to our knowledge few studies have been reported for triterpenes (Berhow et al., 2000). For instance, 23 β -dimethylacryloyloxy lantanolic acid was found to reduce the in vivo genotoxicity caused by mitomycin C (Barre et al., 1997), but in the study the genotoxicity of this triterpene was not evaluated by itself. In our case, the genotoxic effects of argentatins A and B were determined using the in vitro CBMN assay. Neither argentatin showed genotoxic effects in terms of increasing micronucleus frequency, this fact suggests that these compounds are not able to cause injury to DNA by clastogenic or aneugenic mechanisms.

It is already known that some of the most effective anti-cancer drugs provide a number of signs of toxicity. Furthermore many of these anti-cancer drugs have been shown to be mutagenic and genotoxic

compounds and second malignances are known to be associated with several therapeutic treatments (Tohamy et al., 2003). The fact that argentatin B was able to stop cell divisions, without being cytotoxic nor genotoxic allows us to infer that this compound might be less toxic and has less probability to induce second malignances.

In conclusion, although both tested compounds showed a similar pattern of activity on the SRB assay, the CPK and NDI allowed us to determine that the activity of each compound is different. Argentatin A showed to be cytotoxic in all cell types tested, including lymphocytes. It also showed a higher potency on prostate cancer cells (PC-3), and had no cytostatic or genotoxic effects on proliferating lymphocytes. On the other hand, argentatin B can be considered a cytostatic compound, which inhibited the growth of all human cancer cell lines but leukemia (K562) and it did not decrease lymphocyte viability. Our results show that argentatin B is a non-genotoxic cytostatic compound that can be easily obtained in large amounts as a by-product of rubber production from *P. argentatum* and it could be interesting for further research as a lead compound for the synthesis and development of effective chemotherapy with less genotoxicity.

The differences in the kind of activity found between both argentatins tested (cycloartane-type triterpenes), will be useful for the determination of structure–activity relationships.

Acknowledgements

Partial financial support from DGAPA (IN-224802) is acknowledged. We are very grateful to Héctor Ríos, Nieves Zavala, Javier Pérez, Gabriela Salcedo and Rocío Patiño for technical assistance.

H. P. D. acknowledges the fellowships awarded by CONACYT, DGEP and DGAPA-UNAM, Mexico, to carry out graduate studies.

References

- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kim, P.H., Qui, T.K., Saiki, H., Miwa, Y., Taga, T., Kadota, S., 1998. Cytotoxic cycloartane-type triterpenes from *Combretum quadrangulare*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 8, 3519–3524.
- Barre, J.T., Bowden, B.F., Coll, J.C., De Jesus, J., De la Fuente, V.E., Janairo, G.C., Ragasa, C.Y., 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. Phytochemistry 45, 321–324.
- Berhow, M.A., Wagner, E.D., Vaughn, S.F., Plewa, M.J., 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. Mutation Research 448, 11–22.
- Calzada, L., Salazar, E.-I., Téllez, J., Martínez-Vázquez, M., Martínez, R., 1995. Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumours of human breast. Medical Science Research 23, 815–816.
- Cha, H.J., Bae, S.K., Lee, H.Y., Lee, O.H., Sato, H., Seiki, M., Chae, P.B., Kim, K., 1996. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. Cancer Research 56, 2281–2284.
- Dhawan, A., Kayani, M.A., Parry, J.M., Parry, E., Anderson, D., 2003. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. Mutagenesis 18, 487–490.
- Duffaud, F., Orsiere, T., Saciuchka-Palmaro, M., Gigue, L., Favre, R., Botta, A., 1998. Doxorubicin and cisplatin genotoxicity: search for a real indication using the micronucleus test. Annales de Biologie Clinique 56, 183–187.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research 455, 81–95.
- Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Lou, Y.R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D., Conney, A.H., 1994. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. Cancer Research 51, 701–708.

- Hyen, B.J., Soo, L.Y., Mo, K.C., Kim, J.-A., Sool, K.K., Chul, S.H., Kim, K., 1997. Intracellular Ca²⁺ release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *International Journal of Cancer* 73, 725–728.
- Kim, D., Baek, J.H., Kang, C., Kim, K., 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *International Journal of Cancer* 87, 629.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van, H.P., 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research* 392, 19–30.
- Kohli, E., Raj, H.G., Kumari, R., Rohil, V., Kaushik, N.K., Prasad, A.K., 2002. Comparison of the prevention of aflatoxin b(1)-induced genotoxicity by quercetin and quercetin pentaacetate. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 12, 2579–2582.
- Komoroski, R.A., Gregg, E.C., Shockcor, J.P., Geckle, J.M., 1986. Identification of guayule triterpenes by two-dimensional and multipulse NMR techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* 24, 534–543.
- Konoshima, T., Takasaki, M., 2000. Anti-tumor-promoting activities (cancer chemopreventive activities) of natural products. *Studies in Natural Products Chemistry* 24, 215–267 *Bioactive Natural Products (Part E)*.
- Lee, H.Y., Chung, H.Y., Kim, K.H., Lee, J.J., Kim, K.W., 1994. Induction of differentiation in the cultured F9 teratocarcinoma stem cells by triterpene acids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 120, 513–518.
- Marques, S., Oliveira, N.G., Chaveca, T., Rueff, J., 2002. Micronuclei and sister chromatid exchanges induced by capsaicin in human lymphocytes. *Mutation Research* 517, 39–46.
- Martínez, R., Martínez-Vázquez, M., Zamorano-Macias, O., 1990. Electron impact mass spectrometry of triterpenoids from Guayule. *Organic Mass Spectrometry* 25, 237–238.
- Martínez-Vázquez, M., Martínez, R., Espinosa, P.G., 1994. Antimicrobial properties of argentatine A isolated from *Parthenium argentatum*. *Fitoterapia* LXV, 371.
- Mizushima, Y., Lida, A., Sugawara, F., Sakaguchi, K., 2000. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochemical Journal* 350, 757.
- Monga, M., Sausville, E.A., 2002. Developmental Therapeutics Program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia* 16, 520–526.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigrowolf, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83, 757–766.
- Öksüz, S., Shieh, H.-L., Pezzuto, J.M., Özhatay, N., Cordell, G.A., 1993. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; Part 1. Triterpenoids of *Euphorbia nicaeensis* subsp. *Glareosa*. *Planta Medica* 59, 472.
- Ostrosky, P., Montero, R., Hernandez, L., 1988. Lymphocyte proliferation kinetics as a cytostatic screening system. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 11, 80.
- Ribeiro, D.M.C., Tulio, V.B.F.N., Agnez-Lima, L.F., Batistuzzo, M.S.R., 2003. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42, 185–191.
- Rodríguez-Hahn, L., Romo de Vivar, A., Ortega, A., Aguilar, M., Romo, J., 1970. Determinación de las estructuras de las argentatinas A, B y C del guayule. *Revista Latinoamericana de Química* 1, 24–38.
- Rojas, E., Montero, R., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Rodríguez, R., Ostrosky-Wegman, P., 1992. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutation Research* 282, 283–286.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodríguez, R., Ostrosky-Wegman, P., 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* 4, 637–640.
- Saxe, E.L., Shimizu, M., Xiao, D., Nuntanakorn, P., Lim, J.T.E., Suzui, M., Seter, C., Pertel, T., Kennelly, E.J., Kronenberg, F., Weinstein, I.B., 2004. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 83, 221–231.
- Setzer, W.N., Setzer, M.C., 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* 3, 540–556.
- Silva, I.D., Gaspar, J., Da Costa, G.G., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J., 2000. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutic agents. *Chemico-Biological Interactions* 124, 29–51.
- Skibola, C.F., Smith, M.T., 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 375–383.
- Smith-Kielland, I., Dornish, J.M., Malterud, K.E., Hvistendahl, G., Romming, C., Bockman, O.C., Kolsaker, P., Stenstrom, Y., Nordal, A., 1996. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Medica* 62, 322–325.

- Sohn, K.L., Lee, H.Y., Chung, H.Y., Young, H.S., Kim, K.W., 1993. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Letters* 94, 213–218.
- Suh, N., Honda, T., Finlay, H.J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N.E., Xie, Q.W., Nathan, C., Gribble, G.W., Sporn, M.B., 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Research* 58, 717–723.
- Tohamy, A.A., El-Ghor, A.A., El-Nahas, S.M., Noshay, M.M., 2003. β -Glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutation Research* 541, 45–53.
- Wick, W., Grimmel, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Weller, M., 1999. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 1306–1312.
- Yang, H., Acker, J., Chen, A., McGann, L., 1998. In situ assessment of cell viability. *Cell Transplantation* 7, 443–451.

Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines

Hortensia Parra-Delgado,^a César M. Compadre,^b Teresa Ramírez-Apan,^a María J. Muñoz-Fambuena,^b R. Lilia Compadre,^b Patricia Ostrosky-Wegman^c and Mariano Martínez-Vázquez^{a,*}

^a*Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F., Mexico*

^b*Department of Pharmaceutical Sciences, University of Arkansas for Medical Sciences. Slot 522, 4301 W. Markham, Little Rock, AR 72205, USA*

^c*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F., Mexico*

Received 30 August 2005; revised 20 October 2005; accepted 21 October 2005
Available online 10 November 2005

Abstract—Synthesis, characterization, anticancer activity, and comparative molecular field analysis (CoMFA) of 14 argentatin B (1) analogs are described. The effect of argentatin B derivatives on the growth of K562 (leukemia), PC-3 (prostate), U251 (CNS), and HCT-15 (colon) human cancer cell lines was determined using the sulforhodamine B test. The most active compound in this series, 2-formyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one (**12**), was about 35–50 times more potent than argentatin B (**1**). Structures were built using the X-ray crystallography of six derivatives for 3D modeling with Sybyl6.9. CoMFA of Log (1/IC₅₀) in K562 cell line gave $q^2 = 0.507$, $r^2 = 0.907$, and three components. The standard deviation CoMFA contours indicate that increased activity is associated with a bulky group at C-2, a C1–C2 double bond, and low electronic density at C-25. Experimental Log *P* values for argentatin B and one derivative were 1–2 Log units more hydrophilic than the calculated CLog *P* values.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Triterpenoids form a large class of natural products that, like steroids, are derived from the cyclization of squalene with the retention of all 30 carbon atoms.¹ The group includes members that cover a variety of functional groups and many of these naturally occurring compounds have interesting biological and pharmacological properties.² For example, ursolic acid, an ursane-type triterpene, inhibits tumorigenesis³ and induces tumor cell differentiation.⁴ It has also proven effective in the inhibition of angiogenesis⁵ and invasion,⁶ which are important events involved in tumor metastasis.

Additionally, this fact has created an interest in derivatives prepared either by organic synthesis or microbial transformations. For example, several triterpene derivatives that are highly anti-proliferative have been generated.⁷

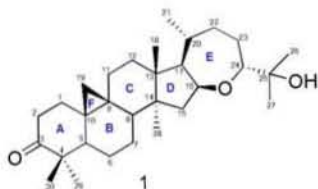
On the other hand, some cycloartane-type triterpenes⁸ such as methyl quadrangularates B and D,⁹ and actein¹⁰ have also shown cytostatic and cytotoxic activities on several cancer cell lines.

The cycloartane-type triterpenes named argentatins A and B are the principal components of the resin of the *Parthenium argentatum* Gray. This species, known as Guayule, has been intensively studied as a renewable native source of natural rubber, and it is known that when the rubber is obtained, a by-product named resin is also produced.¹¹ Taking into account that the argentatins comprise 20 percent of the resins, then these compounds

Keywords: Argentatin B; Cytotoxicity; CoMFA; Cycloartanes; Triterpenes; Log *P*.

*Corresponding author. Tel.: +52 55 56224403; fax: +52 55 56162203; e-mail: marvaz@servidor.unam.mx

are available in large amounts. Recently we had demonstrated that argentatin A and some of its derivatives showed antiproliferative activity on several human cancer cell lines.¹² With respect to argentatin B (**1**), we demonstrated that **1** is a non-competitive inhibitor of ³H-estradiol binding on receptors of hormone-dependent tumors of human breast,¹³ and in a previous report, we reported the preliminary evaluation of the effect of **1** on several human cancer cell lines.¹⁴



Here, to gain insight into the structural requirements in the inhibitory activity of argentatin B (**1**) we synthesized and tested the growth inhibition of 14 analogs in four human cancer cell lines: K562 (leukemia), PC-3 (prostate), U251 (CNS), and HCT-15 (colon).

Hydrophobicity, an established descriptor in the biological activity of numerous chemicals¹⁵ and usually described as the logarithm of a compound's partition coefficient between octanol and water, was calculated with CLogP. However, missing parameters for this triterpene produced errors in the calculation and thus we measured experimentally the LogPs of two compounds that were available in necessary amounts.

Comparative molecular field analysis (CoMFA) was employed to analyze the quantitative structure-activity relationships of the set of argentatin B analogs. The X-ray geometries of six compounds in the set were templates for conformation and overlapping of molecules (Figs. 1 and 2).

2. Chemistry

Syntheses of argentatin B derivatives (**2–15**) are shown in Schemes 1 and 2.

The 2-bromo derivative **2** was obtained from argentatin B (**1**) when treated with bromine liquid in acetic acid, while treatment of **1** with phenyl selenium chloride in methylene chloride yielded **3**.

Compound **3** was transformed into the unsaturated acetate **4** by treatment with sodium acetate in acetic anhydride.

Oxime **5** was synthesized by treatment of **1** with hydroxylamine hydrochloride in pyridine. The Beckmann rearrangement of **5** yielded **6**.

Both **1** and **6** were treated with sodium acetate in acetic anhydride to give **8** and **7**, respectively. Acetate **8** was

converted to the corresponding oxime **9** by treatment with hydroxylamine hydrochloride in pyridine.

Formyl derivative **10** was achieved from **1** by treatment with sodium methoxide prepared in situ and ethyl formate. In addition, isoxazol derivative **11** was obtained from **10** when treated with hydroxylamine hydrochloride in acetic acid.

Treatment of **10** with phenyl selenium chloride in methylene chloride followed by addition of oxygen peroxide afforded the 1-en-2-formyl argentatin B (**12**).

The reaction of **1** with lithium diisopropylamide and *p*-toluenesulfonic cyanide afforded 2-cyano-argentatin B (**13**).

The unsaturated derivative **14** was obtained from **13** when it was treated with phenyl selenium chloride in methylene chloride followed by the addition of oxygen peroxide.

Lactone **15** was obtained from **1** when it was dissolved in acetic acid and treated with chromium trioxide in water.

All the compounds were characterized by spectroscopic and analytical tools (see Section 4). Additionally, adequate crystals of **1–3**, **5**, **10**, and **14**, suitable for X-ray analyses, were obtained. Thus, the structure of such compounds (Fig. 1) was confirmed by X-ray studies. In Table 1 is shown a summary of crystal data and structure refinement for each crystal.

3. Results and discussion

The concentration to inhibit 50% cell growth (IC₅₀) of argentatin B derivatives (**2–15**) (Table 2) in K562 (leukemia), PC-3 (prostate), U251 (CNS), and HCT-15 (colon) human cancer cell lines was determined using the sulforhodamine B test according to a previously established protocol.¹⁶ Preliminary structure-activity relationship observations of the cytotoxicity results showed that a bromine atom substitution at C-2 (**2**) enhanced the potency of argentatin B (**1**) in three cell lines: HCT-15, K562, and PC-3. The C-2 cyano substitution (**13**), improved cytotoxicity of **1** and **2** in all cell lines, however **14**, the unsaturated derivative of **13** was selectively cytotoxic for PC-3 and U251 cell lines showing stronger activity in U251 CNS cancer cells. Compound **12**, a C-1/C-2 unsaturated analog of **13** with an additional formyl substitution at C-2, had a strength 35- to 50-fold higher than **1** and produced the most potent analog in the series. A fused C-2/C-3 isoxazol ring (**11**) decreased cytotoxicity of argentatin B (**1**) in all cell lines. The lactone derivative (**15**) was inactive, suggesting that the presence of an isopropyl alcohol group at C-24 is essential for activity.

CoMFA of Log (1/IC₅₀) in K562 cell line of compounds (**1–13** and **15**) produced cross-validated *q*² value of 0.507 with three components and non-cross-validated *r*² of 0.907. The estimated *F* value was 32.612 and standard

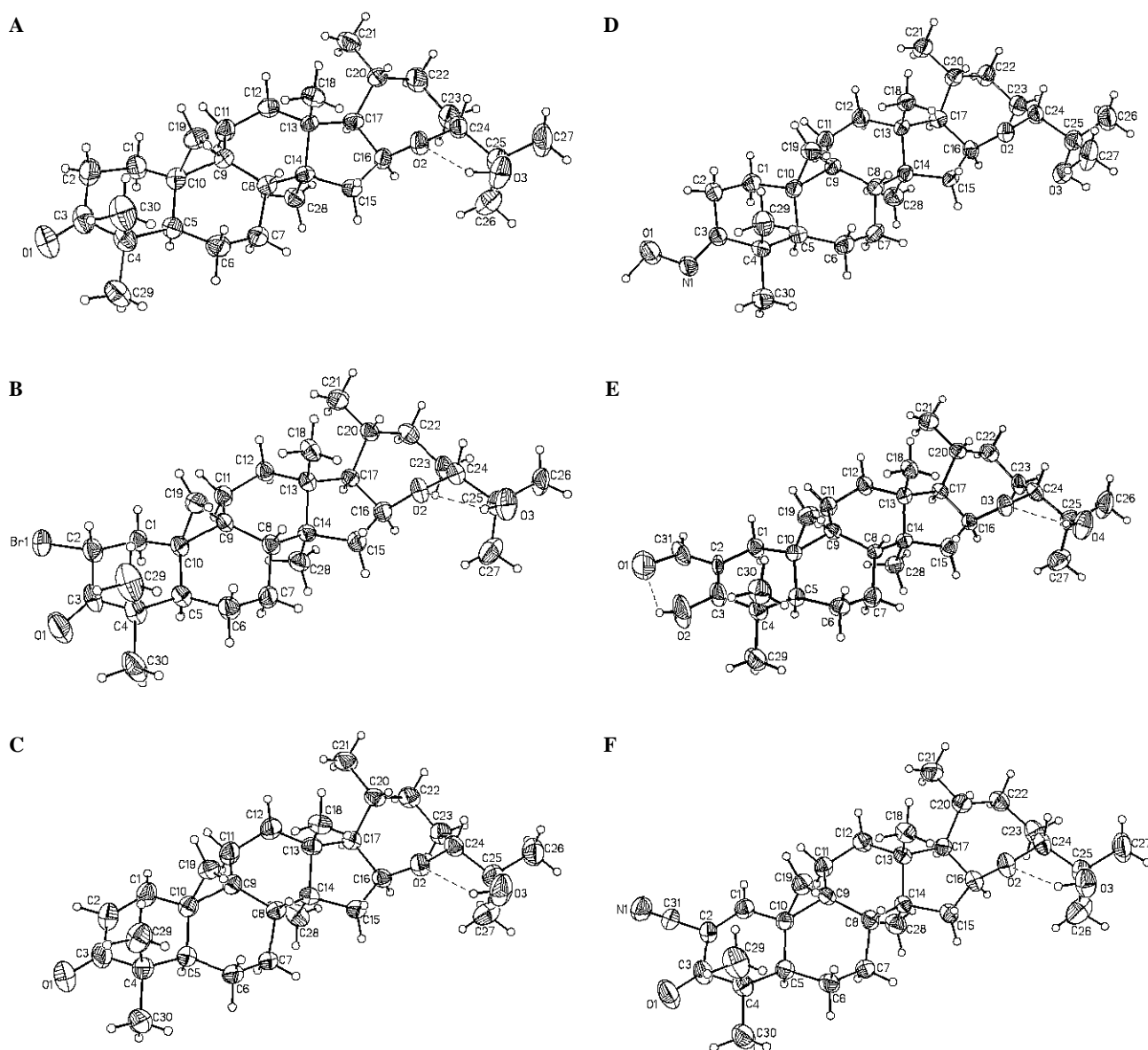


Figure 1. Perspective view of molecule crystals. (A) (16 β ,24*R*)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (argentatin B, **1**). (B) 2 α -Bromo-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**2**). (C) (16 β ,24*R*)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one (**3**). (D) 3-Oxime-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**5**). (E) 2-Formyl-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (**10**). (F) 2 α -Cyano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one (**14**). Thermal ellipsoids are drawn at 30% probability levels.

error 0.190. The relative contributions of steric and electrostatic fields were 0.421 and 0.579, respectively. Table 3 lists experimental, predicted, and residual activities of this model (Fig. 3). The standard deviation contours associated with the inhibitory potency of the series produced a relatively large sterically favorable region at C-2 (Fig. 4A, green contour), a small negative yellow contour between C-2 and C-3, and also two smaller negative yellow contours just below the ring. Indeed, molecules **2**, **10**, **12**, and **13** are substituted at C-2 and more active than **1**, however, **11** with a C-2/C-3 fused isoxazol ring is less active than **1**. The smaller yellow contours correspond to the location of hydrogens H-1 and H-2 relates with the fact that **12**, the most potent derivative, has a double bond C1–C2. Still no favorable bulky requirements appeared in the region of the 2-hydroxyisopropyl

group attached to C-24, that, with the exception of the inactive **15**, is present in the structures of all derivatives.

CoMFA electrostatic standard deviation map shows a big blue polyhedral surface surrounding atoms C-1 and C-2, indicating that low electronic density at these positions improves the activity (Fig. 4B). This region corresponds to the decreased electronic density at the α,β -unsaturated carbonyls in **3** and **12**; in analogs **2**, **10**, and **13** with electron-withdrawing groups at C-2, all more active than **1**.

Compound **15** lacking a 2-hydroxyisopropyl at C-24 (see Fig. 5B) was inactive in all cell lines; however, CoMFA showed a favorable low electronic density contours around C-25 that was not accompanied by a favorable

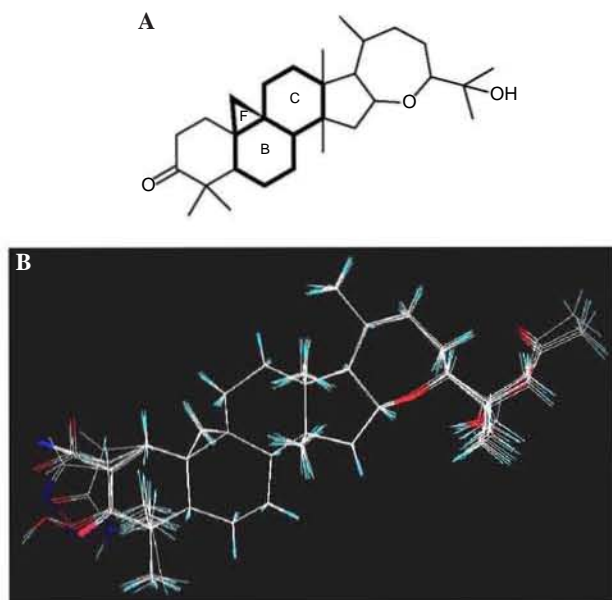


Figure 2. (A) Template used for alignment (reference atoms are shown in bold). (B) Training set aligned on **1**.

steric contour. This result suggests that the instability of the lactone ring may be interfering with cytotoxicity rather than a geometrically constrained hydrogen bond donation of 2-hydroxyisopropyl group with a cellular target.

The literature contains numerous reports indicating that lipophilicity is a relevant factor influencing transport, absorption, distribution, and receptor interaction of many chemicals in biological systems. This property parameterized as the logarithm of a compound's partition coefficient between octanol and water, $\text{Log } P$, is a descriptor of pharmacodynamic, pharmacokinetic, and toxic aspects of drug activities in QSAR studies.¹⁵ Due to that importance we calculated and also determined

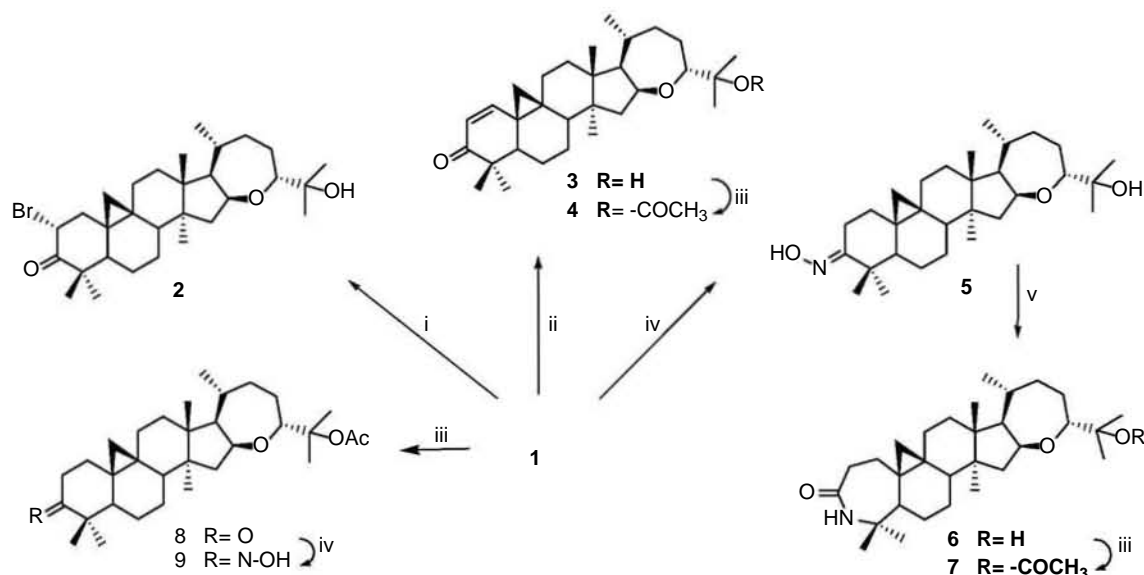
the experimental $\text{Log } P$ values for compounds **1** and **3**. The experimental $\text{Log } P$ values were 4.3 ± 0.25 and 4.8 ± 0.14 [see Experimental Section 4.4], while the calculated $\text{CLog } P$ were 6.42 and 5.74 for **1** and **3**, respectively. The significant differences between predicted and experimental $\text{Log } P$ values are likely due to the lack of experimental information in the calculating algorithms and emphasize the importance of measuring $\text{Log } P$ s for natural products for better QSAR studies.

In conclusion, 14 derivatives of argentatin B were obtained by chemical methods. These compounds were spectroscopically characterized and the crystal data for six analogs were also determined. The effect of each compound on growth of several human cancer cells was determined. The biological data for the K562 cell line were used as dependent variable in a comparative molecular field analysis. The results showed that the potency of these triterpenes in K562 increases with bulky substituents at C-2, a C1–C2 double bond, and low electronic density near C-26 and C-27. The experimentally determined $\text{Log } P$ values of two compounds (**1** and **3**) were 1–2 Log units smaller than those calculated by theoretical methods. These results will be employed to design new bioactive molecules as well as to predict how these triterpenes interact to a yet unknown target which other triterpenes is a nuclear receptor.¹⁷

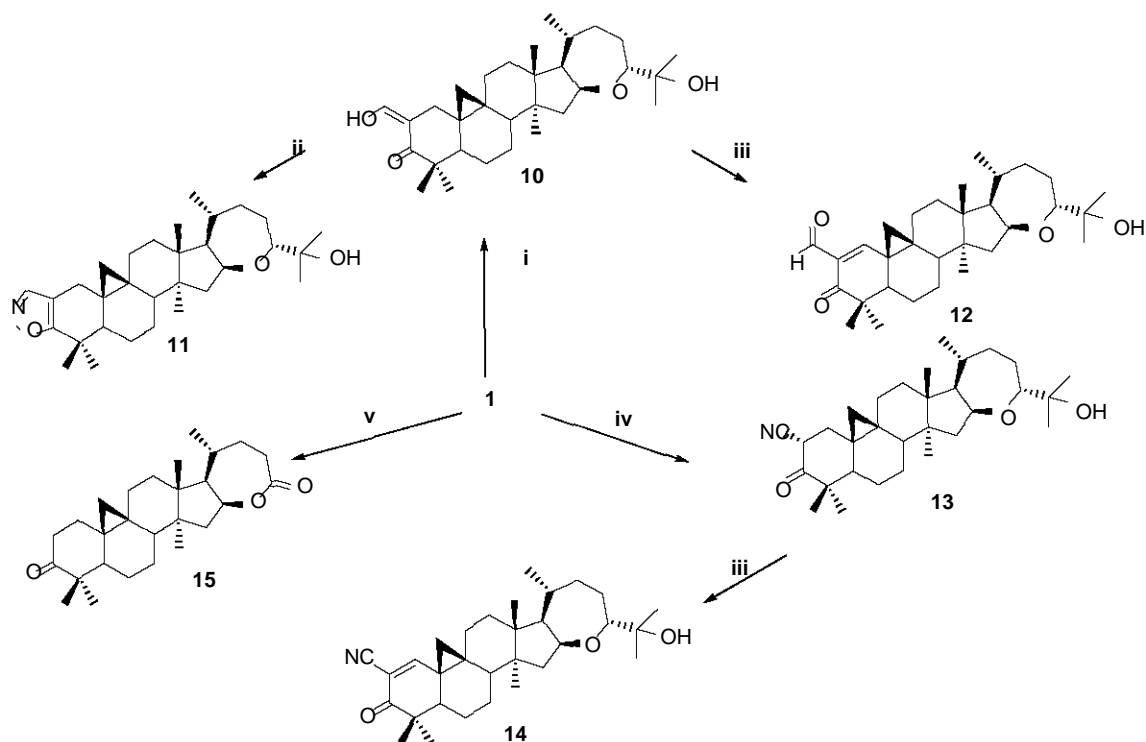
4. Experimental

4.1. Chemistry

Melting points were determined with a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. The IR spectra were recorded on a Nicolet FT-55X spectrophotometer. ^1H NMR spectra were recorded at 200 MHz or 300 MHz (as indicated) on a Varian-Gemini 200, Unity 300, Eclipse 300 Jeol or Bruker-Avance 300 spectrometer. Chemical shifts are expressed in δ (ppm)



Scheme 1. Reagents: (i) $\text{Br}/\text{CH}_3\text{COOH}$, 85.5%; (ii) (a) PhSeCl , EtOAc ; (b) THF , H_2O_2 , 70%; (iii) $\text{AcONa}/(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, 81–89%; (iv) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 76–78%; (v) TFAA , CH_2Cl_2 , 53%.



Scheme 2. Reagents: (i) HCO_2Et , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, Na/MeOH , 71%; (ii) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}$, 80%; (iii) $\text{PhSeCl}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, H_2O_2 , 76–81%; (iv) LDA , $p\text{-TS-CN}$, THF , 25–40%; (v) CH_3COOH , CrO_3 , H_2O , 45%.

relative to TMS as internal standard and coupling constants J in Hz. solvent is indicated for each compound. Mass spectra were recorded on a Jeol AH505HR mass spectrometer. X-ray analysis of some compounds was carried out using a Nicolet P3 ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) or a Bruker Smart APEX CCD-based ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) diffractometer system (as indicated). Crystallographic data for each structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center (as indicated). Copies of the data can be obtained free of charge on application to The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax: +44 (1223) 336-033; e-mail for inquiry: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

4.1.1. (16 β ,24*R*)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (argentatin B, 1). The resin, a by-product of the industrial process to obtain natural rubber from *P. argentatum*, was donated by CONAZA Company (Coahuila, Mexico). 157.39 g of the resin was dissolved in a small volume of hexane and percolated over tonsil. The first fractions collected were reunited and their chromatography was carried on silica gel. This procedure resulted in the isolation of argentatin B (8.7 g), which was purified by conventional procedures, and identified by comparison with physical and spectroscopic constants (melting point, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance) with those reported in the literature.¹¹ Additionally, an X-ray analysis of adequate crystals of argentatin B (1) was carried out (Fig. 1A and Table 1). Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258725.

4.1.2. 2 α -Bromo-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (2). To a cold solution of 103 mg (0.23 mmol) of 1 in acetic acid was added dropwise with stirring 0.23 mL of 1 M bromine solution in acetic acid. The uptake of bromine was rapid, as evidenced by the fading of the color. After 45 min, the reaction mixture was quenched into ice obtaining a white powder, which was washed with a 5% NaHCO_3 solution, filtered, and recrystallized to give 105 mg (85.5%) of product 2, mp: 156–159 °C. IR (CHCl_3) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3538.93 (O–H), 2977.18–2874.74 (C–H), 1720.5 (C=O), 1464.44, 1384.73. EIMS m/z (%): 534 (M^+ , 4), 519 (M^+-15 , 2.7), 476 (M^+-58 , 26), 475 (M^+-59 , 47.9), 175 (100), 143 (15.6), 85 (95.2), 59 (76.02). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.71 (d, $J = 4.8$, 1H, H-19), 0.88 (s, 3H, CH_3), 0.94 (d, $J = 6.6$, 3H, CH_3 -21), 1.09 (s, 6H, 2 CH_3), 1.15 (s, 9H, 3 CH_3), 2.80 (br s, 1H, O–H), 3.59 (dd, $J = 2.2$, $J = 11.3$, 1H, H-24), 4.60 (q, 1H, H-16). ^{13}C NMR (50 MHz) δ ppm: 33.3 (C-1), 46.0 (C-2), 205.7 (C-3), 55.0 (C-4), 48.4 (C-5), 21.2 (C-6), 20.9 (C-7), 47.4 (C-8), 21.3 (C-9), 26.19 (C-10), 26.4 (C-11), 32.4 (C-12), 45.9 (C-13), 47.5 (C-14), 44.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 18.7 (C-18), 29.2 (C-19), 29.2 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.2 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 19.5 (C-28), 23.0 (C-29), 20.8 (C-30). Furthermore, a colorless prism-like crystal of 2 of approximate dimensions $0.36 \times 0.12 \times 0.09 \text{ mm}$ was used for X-ray analysis. The intensity X-ray intensity data were measured at 291 K on a Bruker Smart System. Crystal data and structure are shown in Table 1 and Figure 1B. Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258726.

Table 1. Summary of crystal data and structure refinement for crystals of molecules **1**, **2**, **3**, **5**, **10**, and **14**

Compound	1	2	3	5	10	14
Empirical formula	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	C ₃₀ H ₄₇ BrO ₃	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	C ₃₀ H ₄₉ NO ₃	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	C ₃₁ H ₄₅ NO ₃
Formula weight	456.68	535.59	454.67	471.70	484.69	479.68
Crystal system	Orthorhombic	Orthorhombic	Orthorhombic	Orthorhombic	Orthorhombic	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions						
<i>A</i>	6.3338 (6) Å	8.2854 (18)	11.710 (2)	10.827 (2)	8.2190 (8)	8.2357 (6)
α (°)	90	90	90	90	90	90
<i>B</i> (Å)	14.049 (1)	12.129 (3)	12.128 (2)	13.366 (3)	12.4021 (11)	12.2298 (8)
β (°)	90	90	90	90	90	90
<i>C</i> (Å)	30.046 (3)	27.310 (6)	18.811 (4)	19.105 (4)	26.535 (3)	26.854 (2)
γ (°)	90	90	90	90	90	90
Volume (Å ³)	2673.7 (4)	2744.5 (11)	2671.5 (9)	2764.8 (10)	2704.7 (4)	2704.8 (3)
<i>Z</i>	4	4	4	4	4	4
Density (calculated) (g/cm ³)	1.135	1.296	1.130	1.133	1.190	1.178
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.071	1.526	0.545	0.552	0.076	0.074
<i>F</i> (000)	1008	1144	1000	1040	1064	1048
θ range for data collection (°)	1.98–25.00	1.84–25.00	4.34–55.06	4.04–55.06	1.81–25.00	1.83–25.00
Index ranges	$-7 \leq h \leq 7$ $-16 \leq k \leq 16$ $-35 \leq l \leq 35$	$-9 \leq h \leq 9$ $-14 \leq k \leq 14$ $-32 \leq l \leq 32$	$0 \leq h \leq 12$ $0 \leq k \leq 12$ $0 \leq l \leq 20$	$0 \leq h \leq 11$ $0 \leq k \leq 14$ $0 \leq l \leq 20$	$-9 \leq h \leq 9$ $-14 \leq k \leq 14$ $-31 \leq l \leq 31$	$-9 \leq h \leq 9$ $-14 \leq k \leq 14$ $-31 \leq l \leq 31$
Completeness to $\theta = 25.00^\circ$ [%]	99.9	100.0	99.9	97.5 ^a	100	100
Data/ restraints/ parameters	4731/ 0/ 308	4841/ 0/ 317	1930/ 0/ 308	1958/ 0/ 314	4772/ 0/ 329	4782/ 0/ 326
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	0.819	0.842	1.009	1.085	0.806	0.782
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0.0451, <i>wR</i> 2 = 0.0472	<i>R</i> 1 = 0.0376, <i>wR</i> 2 = 0.0535	<i>R</i> 1 = 0.0405, <i>wR</i> 2 = 0.1125	<i>R</i> 1 = 0.0541, <i>wR</i> 2 = 0.1388	<i>R</i> 1 = 0.0508, <i>wR</i> 2 = 0.0513	<i>R</i> 1 = 0.0456, <i>wR</i> 2 = 0.0512
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.1101, <i>wR</i> 2 = 0.0547	<i>R</i> 1 = 0.0616, <i>wR</i> 2 = 0.0561	<i>R</i> 1 = 0.0431, <i>wR</i> 2 = 0.1149	<i>R</i> 1 = 0.0590, <i>wR</i> 2 = 0.1429	<i>R</i> 1 = 0.1278, <i>wR</i> 2 = 0.0619	<i>R</i> 1 = 0.0992, <i>wR</i> 2 = 0.0591
Absolute structure parameter	1.5 (14)	0.002 (7)	−0.4 (5)	0.6 (7)	0.0 (17)	—
Largest diff. Peak and hole [e.Å ⁻³]	0.140 and −0.101	0.781 and −0.294	0.151 and −0.130	0.186 and −0.175	0.182 and −0.150	0.145 and −0.129

^a $\theta = 55.06^\circ$.

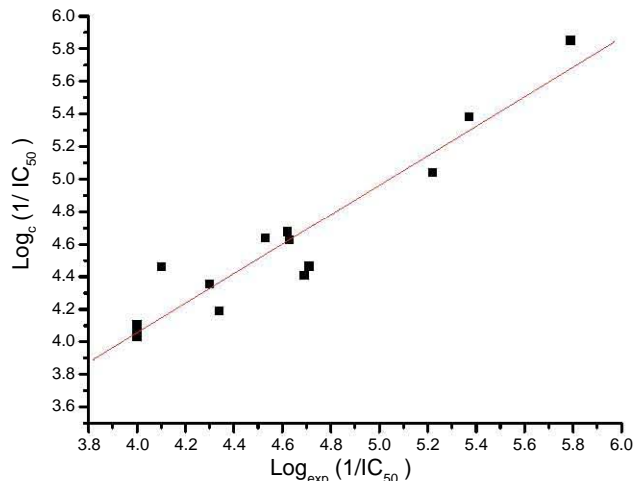
Table 2. Effect of argentatin B derivatives on the growth of human cancer cell lines (concentration causing 50% cell growth inhibition)

Compound	IC ₅₀ ± SEM (μM)			
	HCT-15 (colon)	K562 (leukemia)	PC-3 (prostate)	U251 (CNS)
1	24.14 ± 5.58	79.38 ± 0.08	33.41 ± 3.71	36.4 ± 6.79
2	12.42 ± 0.91	6.03 ± 0.52	18.07 ± 2.27	39.48 ± 1.75
3	17.04 ± 5.08	19.50 ± 4.39	35.13 ± 3.90	26.19 ± 1.00
4	19.89 ± 5.21	50.00 ± 6.10	42.19 ± 1.62	44.15 ± 2.28
5	>100	45.81 ± 6.38	18.84 ± 3.32	>100
6	>100	24.21 ± 2.32	59.82 ± 6.51	14.75 ± 1.96
7	40.83 ± 4.02	29.30 ± 5.26	49.82 ± 3.52	23.82 ± 6.00
8	27.33 ± 2.35	20.38 ± 5.45	>100	>100
9	>100	>100	>100	38.89 ± 0.47
10	>100	23.42 ± 3.43	28.13 ± 6.74	36.41 ± 3.52
11	>100	>100	>100	>100
12	0.44 ± 0.09	1.64 ± 0.62	0.940 ± 0.001	1.05 ± 0.14
13	10.66 ± 2.37	4.26 ± 0.65	10.28 ± 0.81	10.76 ± 0.45
14	>100	>100	39.35 ± 5.75	19.87 ± 3.72
15	>100	>100	>100	>100
Doxorubicin	0.23 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.09 ± 0.02

Each data is given as the means ± SEM of at least three independent experiments.

Table 3. Observed versus predicted activity (Log 1/IC₅₀) and residues on CoMFA model for the K562 cell line

Compound	Log (1/IC ₅₀)		CoMFA residuals
	Observed	Predicted	
1	4.100	4.461	-0.361
2	5.220	5.042	0.178
3	4.710	4.466	0.244
4	4.300	4.357	-0.057
5	4.340	4.192	0.148
6	4.620	4.678	-0.058
7	4.530	4.639	-0.109
8	4.690	4.408	0.282
9	4.000	4.105	-0.105
10	4.630	4.629	0.001
11	4.000	4.053	-0.053
12	5.790	5.851	-0.061
13	5.370	5.384	-0.014
15	4.000	4.035	-0.035

**Figure 3.** Plot of calculated versus experimental Log (1/IC₅₀) of CoMFA training set molecules.

4.1.3. (16β,24R)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one (3). A solution of **1** (200 mg, 0.44 mmol) and phenylselenenyl chloride (100 mg, 0.52 mmol) in EtOAc (4.5 mL) was stirred at room temperature for 2.0 h. To the stirred mixture was added water (1.0 mL). After most of the aqueous layer was removed, THF (2 mL) and 30% H₂O₂ (0.2 mL) were added to the organic layer. The mixture was stirred at room temperature for 1.4 h. The mixture was worked up according to the standard method to give a crude solid. The solid was subjected to column chromatography (CC) to give **3** as a crystalline solid (140 mg, 70%). Mp: 165–167 °C. IR (CHCl₃) ν_{max} cm⁻¹: 3684.26 (O–H), 3050, 2976.92–2876.12 (C–H), 1663.29 (C=O), 1603, 1521.87, 1473.46, 1424.45, 1334, 1112. EIMS *m/z* (%): 454 (M⁺, 27), 436 (M⁺-18, 24), 396 (M⁺-58, 60), 377 (35), 233 (38), 203 (62), 201 (52), 175 (61), 161 (80), 159 (77), 147 (62), 137 (100), 135 (83), 120 (56), 109 (68), 93 (54), 85 (48) 59 (39).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.75 (d, *J* = 4.7, 1H, H-19), 0.89 (s, 3H, CH₃), 0.94 (d, *J* = 6.4, 3H, CH₃-21),

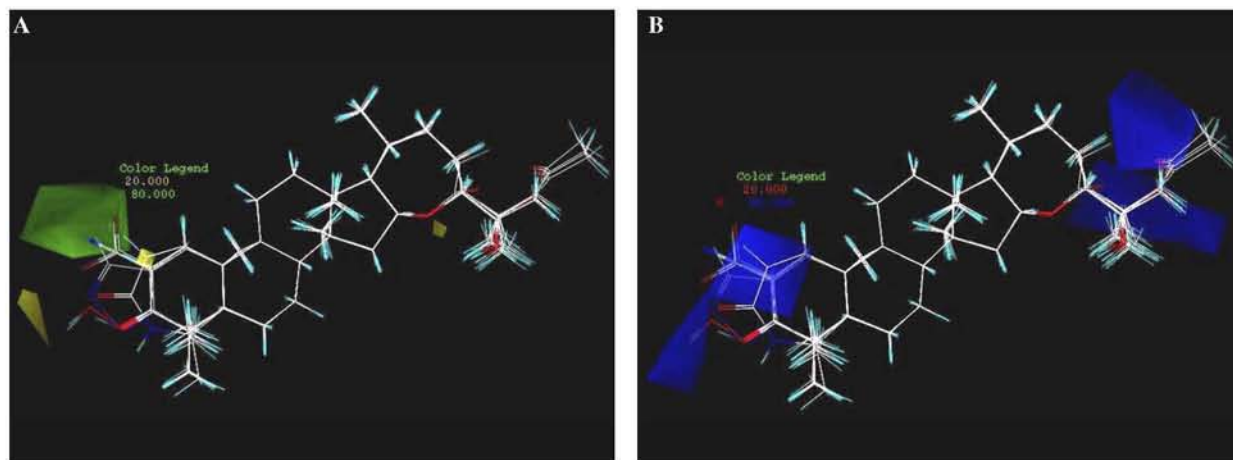


Figure 4. (A) CoMFA steric contour plot; green contours indicate regions where bulky groups increase activity, whereas yellow contours indicate regions where bulky groups decrease activity. (B) CoMFA electrostatic contour plots; blue contours indicate regions where positive charge increases activity, whereas red contour indicate regions where negative charge increases activity.

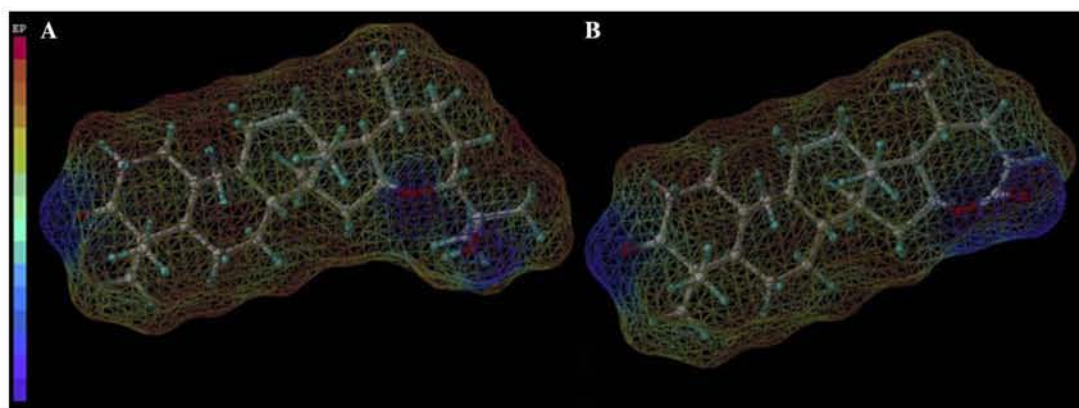


Figure 5. Molecular electrostatic potential, color coded, and represented on Connolly surfaces of (A) argentatin B (**1**) and (B) (16*S*,17*R*,20*S*)-3-oxo-25-nor-cycloartan-16,24-lactone (**15**).

0.96 (s, 3H, CH_3), 1.09 (s, 6H, $2CH_3$), 1.10 (s, 3H, CH_3), 1.14 (s, 3H, CH_3), 1.32 (d, $J = 4.7$, 1H, H-19'), 2.70 (br s, 1H, O-H), 3.60 (dd, $J = 2.0$, $J = 12.5$, 1H, H-24), 4.60 (q, 1H, H-16), 5.95 (d, $J = 10.0$, 1H, H-2), 6.78 (d, $J = 10.0$, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75.4 MHz) δ ppm: 153.68 (C-1), 126.77 (C-2), 205.2 (C-3), 46.3 (C-4), 44.4 (C-5), 19.5 (C-6), 27.40 (C-7), 43.2 (C-8), 24.5 (C-9), 29.9 (C-10), 23.6 (C-11), 32.2 (C-12), 45.9 (C-13), 45.8 (C-14), 43.9 (C-15), 74.6 (C-16), 57.0 (C-17), 17.5 (C-18), 29.3 (C-19), 28.4 (C-20), 21.0 (C-21), 35.5 (C-22), 23.4 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 18.8 (C-28), 21.4 (C-29), 19.1 (C-30). Furthermore, a pale yellow prism-like crystal of **3** of approximate dimensions $0.50 \times 0.50 \times 0.20$ mm was used for X-ray analysis. The X-ray intensity data were measured at 291 K on a Nicolet P3 diffractometer. Crystal data and structure view are shown in Table 1 and Figure 1C. Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258727.

4.1.4. 25-O-Acetyl-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxy-cycloart-1-en-3-one (**4**). A solution of **3** (49 mg,

0.11 mmol) in Ac_2O was treated with sodium acetate (20 mg, 0.24 mmol). The mixture was stirred to reflux for 12 h. The reaction mixture was worked up using conventional procedures to give 44 mg (81%) of **4** as a white solid. Mp: 180–182 °C. IR ($CHCl_3$) ν_{max} cm^{-1} : 2955–2875.65 (C–H), 1726.3 (C=O in acetyl group), 1662 (C=O), 1603.35, 1464.50, 1368.58, 1267, 1115.95. EIMS m/z (%): 496 (M^+ , 13), 454 ($M^+ - 42$, 8), 436 (84), 395 (40), 377 (37), 351 (31), 233 (41), 219 (100), 203 (58), 201 (74), 175 (60), 161 (57), 159 (60), 147 (71), 135 (89), 133 (76), 109 (99), 107 (60), 93 (58), 85 (47), 71 (43), 59 (15), 43 (94).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.74 (d, $J = 4.7$, 1H, H-19), 0.88 (s, 3H, CH_3), 0.93 (d, $J = 6.4$, 3H, CH_3 -21), 0.96 (s, 3H, CH_3), 1.10 (s, 3H, CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.31 (d, $J = 4.7$, 1H, H-19'), 1.39 (s, 3H, CH_3), 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.96 (s, 3H, CH_3), 3.83 (dd, $J = 2.2$, $J = 12.5$, 1H, H-24), 4.62 (q, 1H, H-16), 5.94 (d, $J = 10.0$, 1H, H-2), 6.78 (d, $J = 10.0$, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75 MHz) δ ppm: 153.74 (C-1), 127.1 (C-2), 205.2 (C-3), 46.5 (C-4), 44.7 (C-5), 19.8 (C-6), 27.7 (C-7), 43.5 (C-8), 24.8 (C-9), 30.3 (C-10), 23.9 (C-11), 32.5 (C-12), 46.2 (C-13), 46.0

(C-14), 44.1 (C-15), 74.5 (C-16), 57.2 (C-17), 17.8 (C-18), 30.3 (C-19), 22.7 (C-20), 21.7 (C-21), 35.6 (C-22), 22.6 (C-23), 80.5 (C-24), 85.2 (C-25), 21.7 (C-26), 23.5 (C-27), 19.0 (C-28), 21.3 (C-29), 19.4 (C-30), 170.4 and 29.3 (C=O and methyl in acetyl group).

4.1.5. 3-Oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (5). Compound **1** (100 mg, 0.22 mmol) in 1.5 mL of pyridine was treated with 28 mg NH₂OH·HCl (0.40 mmol) at reflux for 1 h. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with an acid solution followed by water. Oxime **5** was obtained (80 mg, 78%) as a crystal solid, which melted at 224–227 °C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3496.4, 3387.0 (O–H), 2964.2–2871.9 (C–H), 1645.6, 1460, 1378.6, 1168.8, 1113.4, 928.8. EIMS m/z (%): 471 (M⁺, 78), 454 (65), 413 (M⁺-58, 40), 412 (90), 396 (50), 107 (38), 59 (100). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.50 (d, $J = 4.5$, 1H, H-19), 0.72 (d, $J = 4.5$, 1H, H-19'), 0.88 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, $J = 6.3$, 3H, CH₃-21), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.11 (s, 3H, CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 3.36 (dq, 1H), 3.59 (dd, $J = 1.8$, $J = 12.5$, 1H, H-24), 4.59 (q, 1H, H-16). ¹³C NMR (75.4 MHz) δ ppm: 32.7 (C-1), 35.5 (C-2), 168.9 (C-3), 45.8 (C-4), 48.8 (C-5), 21.2 (C-6), 26.1 (C-7), 47.2 (C-8), 20.9 (C-9), 25.6 (C-10), 26.3 (C-11), 32.7 (C-12), 44.8 (C-13), 42.9 (C-14), 45.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19), 29.0 (C-20), 20.7 (C-21), 35.5 (C-22), 23.4 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.8 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 20.5 (C-30).

Furthermore, a crystal of **5** of approximate dimensions 0.28 × 0.24 × 0.22 mm was used for X-ray analysis. The X-ray intensity data were measured at 293 K on a Nicolet P3 diffractometer. Crystal data and structure view are shown in Table 1 and Figure 1D. Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258728.

4.1.6. 4-Aza-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (6). Compound **5** (70 mg, 0.15 mmol) in CH₂Cl₂ cooled at 0 °C was treated with trifluoroacetic anhydride (1 mL) and the reaction mixture was stirred for 1 h. After water was added, the organic layer was separated and washed with a 5% NaHCO₃ solution. The product was purified by CC yielding 38.7 mg of pure lactam **6** that melted at 190–193 °C. IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 3405.1 (O–H), 2963 (C–H), 2871.3, 1650 (CO), 1455.9, 1376.3 (C–N), 1113.0. EIMS m/z (%): 471 (M⁺, 22), 413 (M⁺-58, 15), 412 (40), 58 (100). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.60 (d, $J = 4.9$, 1H, H-19), 0.67 (d, $J = 4.9$, 1H, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, $J = 6.5$, 3H, CH₃-21), 1.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 2.56 (m, 2H, CH, OH), 3.59 (dd, $J = 2.14$, $J = 12.2$, 1H, H-24), 4.61 (q, 1H, H-16), 6.43 (NH). ¹³C NMR (50 MHz) δ ppm: 30.4 (C-1), 35.4 (C-2), 177.6 (C-3), 57.3 (C-4), 50.3 (C-5), 23.5 (C-6), 25.5 (C-7), 48.5 (C-8), 23.0 (C-9), 28.1 (C-10), 26.9 (C-11), 32.9 (C-12),

45.9 (C-13), 45.3 (C-14), 45.1 (C-15), 75.0 (C-16), 57.5 (C-17), 19.1 (C-18), 29.9 (C-19), 28.9 (C-20), 20.9 (C-21), 35.2 (C-22), 25.5 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.7 (C-27), 19.7 (C-28), 31.8 (C-29), 24.3 (C-30).

4.1.7. 25-O-Acetyl-4-aza-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (7). A solution of **6** (20 mg, 0.037 mmol) in Ac₂O was treated as for **3** [Section 4.1.4] to give 19.1 mg (89%) of **7** as a white powder which melted at 200–203 °C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3446.1, 2960 (C–H), 2873.3, 1733.5 (C=O), 1660.3 (C=O), 1458.7, 1371.4, 1255.8, 1115.5. EIMS m/z (%): 513 (M⁺, 18), 498 (2), 453 (14), 438 (M⁺-75, 10%), 438 (10), 412 (30), 326 (15), 58 (100), 43 (13). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.60 (d, $J = 4.7$, 1H, H-19), 0.66 (d, $J = 4.7$, 1H, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH₃-28), 0.92 (d, $J = 6.2$, 3H, CH₃-21), 1.14 (s, 3H, CH₃-18), 1.23 (s, 3H, CH₃-29), 1.31 (s, 3H, CH₃-26), 1.39 (s, 3H, CH₃-30), 1.44 (s, 3H, CH₃-27), 1.96 (s, 3H, CH₃ in acetyl moiety), 2.53 (m, 2H, CH₂-2), 3.82 (dd, $J = 2.3$, $J = 12.5$, 1H, H-24), 4.63 (q, 1H, H-16), 6.18 (br s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz) δ ppm: 30.3 (C-1), 34.7 (C-2), 177.9 (C-3), 57.8 (C-4), 50.1 (C-5), 22.2 (C-6), 25.4 (C-7), 48.4 (C-8), 23.1 (C-9), 28.0 (C-10), 26.9 (C-11), 32.8 (C-12), 45.8 (C-13), 45.2 (C-14), 45.1 (C-15), 74.5 (C-16), 57.3 (C-17), 19.1 (C-18), 29.9 (C-19), 28.9 (C-20), 21.0 (C-21), 35.2 (C-22), 25.4 (C-23), 80.1 (C-24), 84.9 (C-25), 24.1 (C-26), 23.2 (C-27), 19.7 (C-28), 31.6 (C-29), 21.3 (C-30), 170.2 and 22.5 (for C=O and methyl in acetyl group).

4.1.8. 25-O-Acetyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (8). Compound **8** was prepared by literature procedures¹¹ and identified by comparison with physical and spectroscopic constants (melting point, ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance) with those previously reported.¹¹

4.1.9. 25-O-Acetyl-3-oxime-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (9). A solution of **8** (100 mg, 0.2 mmol) in pyridine was treated as for **1** [Section 4.1.5] to give 78.3 mg (76%) of **9** as a white powder which melted at 208–210 °C.

IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3319.1 (O–H), 2950.3–2874.8 (C–H), 1734.8 (C=O), 1654, 1459.3, 1371.6, 1255.2, 1115.7, 934.5. EIMS m/z (%): 513 (M⁺, 16), 454 (65), 497 (12), 496 (11), 453 (69), 436 (100), 412 (92), 396 (36), 109 (33), 59 (15), 43 (63). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.49 (d, $J = 4.4$, 1H, H-19), 0.72 (d, $J = 4.4$, 1H, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.92 (d, $J = 6.5$, 3H, CH₃-21), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.19 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃ in acetyl group), 3.37 (dq, 1H), 3.82 (dd, $J = 2.0$, $J = 12.3$, 1H, H-24), 4.61 (q, 1H, H-16). ¹³C NMR (75.4 MHz) δ ppm: 32.6 (C-1), 20.8 (C-2), 169.2 (C-3), 43.0 (C-4), 48.7 (C-5), 21.2 (C-6), 25.7 (C-7), 47.1 (C-8), 20.8 (C-9), 26.3 (C-10), 26.1 (C-11), 32.7 (C-12), 45.7 (C-13), 45.6 (C-14), 44.7 (C-15), 74.4 (C-16), 57.2 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19),

29.0 (C-20), 21.1 (C-21), 35.3 (C-22), 22.3 (C-23), 80.2 (C-24), 85.0 (C-25), 23.5 (C-26), 23.3 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 21.4 (C-30), 170.3 and 22.5 (C=O and methyl in acetyl group).

4.1.10. 2-Formyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (10). To a solution of 2.88 mmol of **1** in 24 mL of dry pyridine, held under nitrogen, was added 5.0 mL ethyl formate (distilled from phosphorus pentoxide) followed by a solution of 0.44 g of sodium in 6 mL of absolute methyl alcohol. The resulting solution was kept at room temperature under nitrogen overnight. The appearance of a deep color and/or the formation of an insoluble precipitate evidenced the reaction. The mixture was poured into a cold solution of 16.6 mL of glacial acetic acid in 154.4 mL water, and the resulting precipitate was extracted into methylene dichloride. The organic layer was washed with water and then extracted with a 2% potassium hydroxide solution. The basic extract was washed with ether and acidified with glacial acetic acid. The product (992.9 mg, 71%) was then isolated by extraction in the usual manner. Mp: 210–214 °C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3546.9 (OH), 3448, 2953.3 (C-H), 2874.5, 1642.9, 1588.2, 1460.3, 1374.2, 1113.1, 1058.2. EIMS m/z (%): 484 (M⁺, 15), 466 (5), 425 (M⁺-59, 100), 407 (25), 233 (33), 175 (42), 109 (35), 85 (44), 59 (25), 43 (24). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.48 (d, J = 4.5, 1H, H-19), 0.68 (d, J = 4.5, 1H, H-19'), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.95 (d, J = 6.3, 3H, CH₃-21), 1.10 (s, 6H, 2CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.85 (d, J = 15, 1H, H-1), 2.59 (d, J = 15, 1H, H-1'), 3.59 (dd, J = 2.1, J = 12.5, 1H, H-24), 4.61 (q, 1H, H-16), 8.67 (d, J = 2.4, 1H, H-31), 14.84 (d, J = 2.4, 1H, OH). ¹³C NMR (75.4 MHz) δ ppm: 31.8 (C-1), 106.6 (C-2), 190.4 (C-3), 42.7 (C-4), 48.2 (C-5), 21.4 (C-6), 25.7 (C-7), 44.6 (C-8), 19.4 (C-9), 23.6 (C-10), 25.6 (C-11), 32.6 (C-12), 45.8 (C-13), 45.7 (C-14), 45.1 (C-15), 74.8 (C-16), 57.4 (C-17), 19.1 (C-18), 30.0 (C-19), 29.0 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.3 (C-25), 23.8 (C-26), 25.6 (C-27), 19.8 (C-28), 24.4 (C-29), 21.6 (C-30), 189.0 (C-31). A colorless prism-like crystal of **10** of approximate dimensions 0.30 × 0.17 × 0.07 mm was used for X-ray analysis. The X-ray intensity data were measured at 291 K on a Bruker Smart diffractometer. Crystal data and structure are shown in Table 1 and Figure 1E. Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258729.

4.1.11. [2,3-*d*]Isoxazole-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartane (11). A solution of 115 mg of **10** in 7 mL glacial acetic acid was stirred and refluxed for 2 h with 45.6 mg of powdered hydroxylamine hydrochloride. The mixture was poured into a cold solution and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with dilute sodium bicarbonate solution to remove acetic acid and then with water. Evaporation of the dried (over anhydrous sodium sulfate) solution and purification by CC afforded 91 mg (80%) of isoxazole **11** that melted at 146–150 °C.

IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3482.5 (OH), 3448, 2960.9 (C-H), 2874.5, 1735.1, 1641.3, 1462.8, 1374.7, 1112.9. EIMS m/z (%): 481 (M⁺, 8), 463 (7), 422 (M⁺-59, 100), 404 (25), 230 (30), 175 (22), 109 (31), 85 (34), 59 (34), 43 (34). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.46 (d, J = 4.8, 1H, H-19), 0.72 (d, J = 4.8, 1H, H-19'), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.95 (d, J = 6, 3H, CH₃-21), 1.10 (s, 6H, 2CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 1.21 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 3H, CH₃), 1.95 (d, J = 15.4, 1H, H-1), 2.65 (d, J = 15.4, 1H, H-1'), 3.60 (dd, J = 2, J = 12.4, 1H, H-24), 4.62 (q, 1H, H-16), 7.98 (s, 1H, H-31). ¹³C NMR (50 MHz) δ ppm: 28.4 (C-1), 110.0 (C-2), 135.6 (C-3), 45.8 (C-4), 48.3 (C-5), 20.8 (C-6), 26.0 (C-7), 46.7 (C-8), 24.6 (C-9), 29.3 (C-10), 25.6 (C-11), 32.7 (C-12), 45.7 (C-13), 45.7 (C-14), 45.2 (C-15), 74.9 (C-16), 57.5 (C-17), 19.1 (C-18), 30.1 (C-19), 28.9 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.5 (C-23), 82.5 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.7 (C-27), 19.8 (C-28), 25.5 (C-29), 22.2 (C-30), 149.5 (C-31).

4.1.12. 2-Formyl-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one (12). To a solution of phenylselenenyl chloride (190 mg) in CH₂Cl₂ (7 mL) in an ice bath was added 120 mg pyridine. After 15 min, a cold solution of **10** (100 mg) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added and the mixture was stirred an additional 20 min. The mixture was washed with 10% aqueous HCl solution twice and cooled back to 0 °C, at which time 0.1 mL of 30% H₂O₂ was added. An additional 0.1 mL of 30% H₂O₂ was added after 10 min and again after 20 min. After an additional 10 min, 3 mL of water was added. The mixture was worked up according to the standard procedures to give **12** as an amorphous solid (80.2 mg, 81%) that melted at 243–247 °C. IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3543.2, 2966.4, 2937.3, 2866.91, 1668.48, 1584.06, 1461.11, 1378.18, 1112.73. EIMS m/z (%): 482 (M⁺, 55), 464 (53), 423 (M⁺-59, 53), 405 (17), 245 (80), 159 (70), 135 (60), 109 (70), 59 (100), 43 (72). ¹H NMR (300 MHz, C₆D₆) δ ppm: 0.45 (d, J = 4.6, 1H, H-19), 0.60 (s, 3H, CH₃), 0.78 (s, 3H, CH₃), 0.90 (d, J = 6.5, 3H, CH₃-21), 0.91 (d, J = 4.6, 1H, H-19'), 1.03 (s, 3H, CH₃), 1.12 (s, 3H, CH₃), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 2.04 (m, 1H), 2.53 (br s, 1H, OH), 3.59 (dd, J = 3.6, J = 12.5, 1H, H-24), 4.45 (q, 1H, H-16), 7.60 (s, 1H, H-1), 10.51 (s, 1H, H-31). ¹³C NMR (75.4 MHz) δ ppm: 160.6 (C-1), 132.2 (C-2), 201.9 (C-3), 46.2 (C-4), 43.9 (C-5), 19.5 (C-6), 27.7 (C-7), 43.6 (C-8), 27.7 (C-9), 31.5 (C-10), 23.7 (C-11), 32.3 (C-12), 45.8 (C-13), 45.8 (C-14), 44.2 (C-15), 74.5 (C-16), 57.2 (C-17), 17.9 (C-18), 32.1 (C-19), 29.2 (C-20), 21.1 (C-21), 35.7 (C-22), 23.3 (C-23), 82.9 (C-24), 73.0 (C-25), 25.1 (C-26), 25.8 (C-27), 21.5 (C-28), 18.8 (C-29), 18.7 (C-30), 188.9 (C-31).

4.1.13. 2 α -Cyano-(16 β ,24R)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloartan-3-one (13). To 3 mL of a 0.2 M solution of lithium diisopropyl amide (Sigma) at -78 °C under nitrogen was added **1** (250 mg) in dry THF (3.0 mL). The mixture was stirred for 1 h and then the enolate was drawn up by syringe and added to a solution of *p*-toluene-sulfonyl cyanide (368 mg, 2.00 mmol) in THF at -78 °C over a period of about 3 min. The reaction

mixture was stirred for 1 h at -78°C . After 1 h, the mixture was quenched with concentrated ammonium hydroxide (0.5 mL) and warming the vessel to room temperature to decompose the residual *p*-toluene-sulfonyl cyanide, acidification with 10% HCl, and usual extractive work-up (diethyl ether) afforded the crude product. It was purified by CC and **13** (114 mg) was obtained as an amorphous solid that melted at $222\text{--}223^{\circ}\text{C}$. IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3544.8 (O–H), 2968.1–2874.0 (C–H), 2251.9 (CN), 1719.7 (C=O), 1463.5, 1370.3, 1114.6, 1058.6. EIMS m/z (%): 481 (M^+ , 3), 422 (M^+ –59, 74), 404 (100), 336 (15), 175 (52), 161 (32), 133 (30), 109 (43), 85 (50), 59 (35), 43 (24). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.67 (d, $J = 4.8$, 1H, H-19), 0.89 (s, 3H, CH_3), 0.94 (d, $J = 5$, 3H, CH_3 -21), 1.09 (s, 6H, 2CH_3), 1.12 (s, 3H, CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.16 (s, 3H, CH_3), 2.76 (br s, 1H, OH), 3.59 (dd, $J = 2.4$, $J = 12.4$, 1H, H-24), 3.93 (dd, $J = 5.6$, $J = 13.1$, 1H, H-2 β), 4.60 (q, 1H, H-16). ^{13}C NMR (75.5 MHz) δ ppm: 38.9 (C-1), 39.9 (C-2), 204.7 (C-3), 50.4 (C-4), 48.5 (C-5), 21.2 (C-6), 25.7 (C-7), 47.1 (C-8), 21.9 (C-9), 25.5 (C-10), 26.4 (C-11), 32.5 (C-12), 45.7 (C-13), 45.7 (C-14), 44.8 (C-15), 74.8 (C-16), 57.4 (C-17), 18.8 (C-18), 29.6 (C-19), 29.0 (C-20), 21.0 (C-21), 35.4 (C-22), 23.5 (C-23), 82.6 (C-24), 73.3 (C-25), 24.0 (C-26), 25.7 (C-27), 19.5 (C-28), 22.2 (C-29), 20.3 (C-30), 117.0 (C-31).

4.1.14. 2 α -Cyano-(16 β ,24*R*)-16,24-epoxy-25-hydroxycycloart-1-en-3-one (14). Derivative **14** was obtained using the method previously described in Section 4.1.12. A solution of **13** (40 mg) in CH_2Cl_2 was used to give 29.1 mg (76%) of **14** as a crystalline solid which melted at $274\text{--}275^{\circ}\text{C}$. IR (CHCl_3) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3544.27 (O–H), 2957.87, 2876.78, 2232.28 (CN), 1687.55 (C=O), 1594.45, 1464.18, 1385.60, 1113.03. EIMS m/z (%): 479 (M^+ , 21), 461 (36), 420 (M^+ –59, 45), 402 (60), 375 (25), 336 (30), 233 (68), 219 (47), 201 (24), 175 (44), 161 (90), 147 (74), 135 (64), 109 (100), 94 (73), 85 (78), 81 (51), 59 (51), 43 (57). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (s, 3H, CH_3), 0.95 (d, $J = 6.6$, 3H, CH_3 -21), 1.09 (s, 6H, 2CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.13 (s, 3H, CH_3), 1.15 (s, 3H, CH_3), 3.59 (dd, $J = 2.1$, $J = 12.5$, 1H, H-24), 4.61 (q, 1H, H-16), 7.51 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75 MHz) δ ppm: 166.3 (C-1), 114.0 (C-2), 197.8 (C-3), 46.3 (C-4), 43.8 (C-5), 19.2 (C-6), 27.7 (C-7), 43.3 (C-8), 28.2 (C-9), 32.0 (C-10), 23.2 (C-11), 31.9 (C-12), 45.9 (C-13), 45.8 (C-14), 43.1 (C-15), 74.5 (C-16), 57.0 (C-17), 17.5 (C-18), 31.9 (C-19), 29.0 (C-20), 21.0 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.7 (C-24), 73.3 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 21.2, 18.8, 18.6 (C-28 to C-30), 115.4 (C-31). A colorless prism-like crystal of **14** of approximate dimensions 0.32 x 0.16 x 0.07 mm was used for X-ray analysis. The X-ray intensity data were measured at 291 K on a Bruker Smart diffractometer. Crystal data and structure are shown in Table 1 and Fig. 1F. Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258730.

4.1.15. (16*S*,17*R*,20*S*)-3-Oxo-25-nor-cycloartan-16,24-lactone (15). Compound **15** was prepared by literature procedures^{11d,e} and identified by comparison with physical and spectroscopic constants (melting point, ^1H and

^{13}C nuclear magnetic resonance) with those previously reported.^{11d,e}

4.1.16. (16 β ,24*R*)-16,24-Epoxy-25-hydroxycycloartan-3,4-lactone (16). This derivative was prepared in order to obtain a crystalline seven-membered ring-A to be used in the X-ray analysis and it was not evaluated for biological activity. It was synthesized by literature procedures and identified by comparison with physical and spectroscopic constants with those previously reported.¹¹ An adequate crystal of approximate dimensions $0.6 \times 0.5 \times 0.06$ mm was used for X-ray analysis. Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC 258731.

4.2. Pharmacology

The inhibitory effects were determined following protocols established by the NCI.¹⁶ The human prostate carcinoma (PC-3), leukemia (K562), central nervous system (U251), and colon carcinoma (HCT-15) cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 1% non-essential amino acids. They were maintained at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere with 95% humidity. Adherent cells were detached with 0.1% trypsin–EDTA to make single-cell suspensions. Viable cells were counted using a hemacytometer. Cells (5000–10,000 cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates and incubated at 37°C . After 24 h, cells were treated with seven different concentrations (1–100 μM) of the test compounds initially dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, 20 mM) and further diluted in medium to produce the desired concentrations. The plates were incubated for another 48 h at 37°C . Doxorubicin was used at five different concentrations (0.01–5 μM) as a positive control. After 48 h, adherent cell cultures were fixed in situ by adding 50 μL of cold 50% (wt/vol) trichloroacetic acid and incubated for 30 min at room temperature with 0.4% SRB. Unbound SRB solution was removed washing three times with 1% acetic acid. Plates were air-dried. Protein-bound SRB was dissolved with Tris (tris[hydroxymethyl]aminomethane) buffer and the optical densities were read on an automated spectrophotometric plate reader at a single wavelength of 515 nm. The concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC_{50}) were calculated.¹⁶

4.3. Computational details

The inhibitory effect on K562 cancer cell line expressed as Log (1/ IC_{50}) of the series (Table 2) was used as dependent variable in a comparative molecular field analysis. Compounds were aligned over argentatin B (**1**) as template (Fig. 2). The training set used for the analysis comprised argentatin B and 13 derivatives (**1–13**, **15**), compound **14** being detected as outlier during CoMFA.

4.3.1. Molecular structures. Compounds **1–3**, **5**, **10**, and **14** were built from X-ray crystallographic data. The remaining compounds were obtained with slight modifications of these structures and the standard

bond angles and lengths in Sybyl 6.9 running on silicon graphics Octane[®]. Energy minimizations were performed using Tripos force field and Mulliken charges.

4.3.2. Molecular alignment. The most important requirement for CoMFA studies is that the 3D structures to be analyzed were aligned according to a suitable conformational template, which is assumed to be a 'bioactive conformation.' As no structural information is available about ligand–receptor complexes, compound **1** was used as template structure for the alignment and carbon atoms on cycles B, C, and F were used as common fragment (Fig. 2). Compounds **1–13** and **15** were aligned on template by using simple 'align database' option given in Sybyl.

4.3.3. CoMFA. Steric and electrostatic interactions were calculated using a sp³ carbon atom as steric probe and a +1 charge as electrostatic probe with Tripos force field. The CoMFA grid spacing was 2.0 Å in the *x*, *y*, and *z* directions. The default value of 30 kcal/mol was set as the maximum steric and electrostatic energy cutoff. Minimum-sigma (column filtering) was set to be 2.0 kcal/mol.

The CoMFA descriptors and Log (1/ IC₅₀) were used as independent and dependent variables, respectively, in partial least-square (PLS) regression analyses to derive the 3D-QSAR model. PLS analyses were first conducted using leave-one-out cross-validation method. The final model was developed with the optimum number of components equal to that yielding the highest *q*².

4.4. Determination of experimental Log *P* of **1** and **3**

4.4.1. Assay. The experimental Log *P*_{ow} of **1** was determined at five different concentrations by duplicate (4, 2.5, 2, 1.5, and 1 mg/ml), using 1 mL octanol (Sigma) and 200 mL of deionized water and GC-MS as detection system. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ and then it was evaporated, and the residue was transferred to a 100 µL silanized insert in an autosampler vial. The autosampler vial was placed in a manifold to be dried under nitrogen. The dried residue was derivatized with 20 µL MSTFA (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) at 75 °C for 20 min.

On the other hand, the experimental Log *P*_{ow} of **3** was determined at two concentrations by duplicate (2 and 1 mg/mL), using 1 mL octanol (Sigma) and 200 mL of deionized water. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ and then it was evaporated under nitrogen. The residue was reconstituted in 30 µL with methanol in an insert, which was placed in an autosampler vial.

4.4.2. Detection and quantification¹⁸. An aliquot of 2 µL of sample (**1** or **3**) was used to quantify the compound using GC-MS detection. GC-MS analyses were performed using a HP system (Hewlett-Packard, Palo

Alto, CA, USA) consisting of a HP chromatograph connected to a HP 5988 quadrupole mass spectrometer. The GC was equipped with a HP7673 autosampler and a DB-1 column from J&W (Folsom, CA, USA). Helium was used as carrier gas with a head pressure of 15 psi. The injector and transfer line were maintained at 285 °C. The column temperature was maintained at 160 °C for 4 min followed by a gradient of 15 °C/min to 230 °C. This temperature was maintained for 4 min and then a gradient of 25 °C/min to 285 °C was carried out. The mass spectrometer conditions were as follows: electron impact, ion source temperature 200 °C, and ionization voltage 62 eV for total ion mode.

Area under the curve (AUC) of the peak at 15.99 (for **1**) or 15.95 min (for **3**) was calculated. Two five-point calibration curves (one for each compound) were used to calculate the milligrams of **1** or **3** in aqueous phase. The milligrams of each compound in octanol phase was then indirectly calculated and concentrations of each compound in each phase led to determine the partition coefficients.

Acknowledgments

Partial financial support from DGAPA (IN-224802) is acknowledged. We are very grateful to Simón Hernández, Georgina Espinosa, Héctor Ríos, Nieves Zavala, Angeles Peña, Rocío Patiño, Eréndira García, Elizabeth Huerta, Luis Velasco, and Javier Pérez for technical assistance. H.P.D. acknowledges CONACYT and DGEP and DGAPA-UNAM, Mexico, for financial support.

References and notes

1. Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 609.
2. Tang, W.; Eisenbrand, G. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and use in Traditional and Modern Medicine*; Springer: Berlin, 1992.
3. Huang, M. T.; Ho, C. T.; Wang, Z. Y.; Ferraro, T.; Lou, Y. R.; Stauber, K.; Ma, W.; Georgiadis, C.; Laskin, J. D.; Conney, A. H. *Cancer Res.* **1994**, *51*, 701–708.
4. Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Kim, K. H.; Lee, J. J.; Kim, K. W. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, *120*, 513–518.
5. Sohn, K. L.; Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Young, H. S.; Kim, K. W. *Cancer Lett.* **1993**, *94*, 213–218.
6. Cha, H. J.; Bae, S. K.; Lee, H. Y.; Lee, O. H.; Sato, H.; Seiki, M.; Park, B. C.; Kim, K. W. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2281–2284.
7. (a) Finlay, H. J.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Danielpour, D.; Benoit, N. E.; Suh, N.; Williams, C.; Sporn, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1769–1772; (b) Suh, N.; Wang, Y.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Dmitrovsky, E.; Hickey, W. F.; Maue, R. A.; Place, A. E.; Porter, D. M.; Spinella, M. J.; Williams, C. R.; Wu, G.; Dannenberg, A. J.; Flanders, K. C.; Letterio, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Nathan, C. F.; Nguyen, L.; Porter, W. W.; Ren, R. F.; Roberts, A. B.; Roche, N. S.; Subbaramaiah, K.; Sporn, M. B. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 336–341.

8. (a) Öksüz, S.; Shieh, H.-L.; Pezzuto, J. M.; Özhatay, N.; Cordell, G. A. *Planta Med.* **1993**, *59*, 472; (b) Smith-Kielland, I.; Dornish, J. M.; Malterud, K. E.; Hvistendahl, G.; Romming, C.; Bockman, O. C.; Kolsaker, P.; Stenstrom, Y.; Nordal, A. *Planta Med.* **1996**, *62*, 322–325.
9. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Kim, P. H.; Qui, T. K.; Saiki, H.; Miwa, Y.; Taga, T.; Kadota, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3519–3524.
10. Saxe, E. L.; Shimizu, M.; Xiao, D.; Nuntanakorn, P.; Lim, J. T. E.; Suzui, M.; Seter, C.; Pertel, T.; Kennelly, E. J.; Kronenberg, F.; Weinstein, I. B. *Breast Cancer Res. Tr.* **2004**, *83*, 221–231.
11. (a) Rodriguez-Hahn, L.; Romo de Vivar, A.; Ortega, A.; Aguilar, M.; Romo, J. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1970**, *1*, 24–38; (b) Komoroski, R. A.; Gregg, E. C.; Shockcor, J. P.; Geckle, J. M. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 534–543; (c) Martínez, R.; Martínez-Vázquez, M.; Zamorano-Macias, O. *Org. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 237–238; (d) Romo de Vivar, A.; Martínez-Vázquez, M.; Matsubara, C.; Pérez-Sánchez, G.; Joseph-Nathan, P. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 915–918; (e) Martínez-Vázquez, M.; Martínez, R.; Toscano, R. A. *J. Crystallogr.* **1995**, *25*, 331–337.
12. Parra-Delgado, H.; Ramírez-Apan, T.; Martínez-Vázquez, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1005–1008.
13. Calzada, L.; Salazar, E-I; Téllez, J.; Martínez-Vázquez, M.; Martínez, R. *Med. Sci. Res.* **1995**, *23*, 815–816.
14. Parra-Delgado, H.; Ramírez-Apan, T.; Martínez-Vázquez, M. *Rev. Latinoamer. Quím. Suppl.* **2001**, *29*, 76.
15. (a) Poole, S. K.; Poole, C. F. *J. Chromatogr., B* **2003**, *797*, 3–19; (b) Hansch, C.; Leo, A. *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*; ACS Professional Reference Book: EUA, 1995; (c) Lyman, W. R.; Rosenblatt, D. H. *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behavior of Organic Compounds*; Mc Graw-Hill: EUA, 1982.
16. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; VaigroWolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer I.* **1991**, *83*, 757–766.
17. Wang, Y.; Porter, W. W.; Suh, N.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Leesnitzer, L. M.; Plunket, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Blanchard, S. G.; Willson, T. M.; Sporn, M. B. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 1550–1556.
18. Logsdon, T. W.; Zhou, X.; Breen, P.; Anderson, P.; Gann, L.; Hiller, C.; Compadre, C. M. *J. Chromatogr., B* **1997**, *692*, 472–477.

Synthesis of argentatin A derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines in vitro

Hortensia Parra-Delgado, Teresa Ramírez-Apan and Mariano Martínez-Vázquez*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán C. P. 04510, México, DF

Received 4 November 2004; revised 10 December 2004; accepted 14 December 2004
Available online 13 January 2005

Abstract—The syntheses of nine argentatin A analogs are described. These compounds were assessed for their ability to inhibit growth in vitro in four human cancer cell lines. Our results showed that the presence of either a double bond at C-1/C-2, or a bromine atom or formyl moiety at C-2 as well as the presence of an isoxazol ring in argentatin A enhanced its potency in all cell lines tested. In addition, an X-ray study of (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-3-oxime-20,24-epoxy-16,25-dihydroxy-cycloartan-3-one led to the determination of the correct stereochemistry of argentatin A.

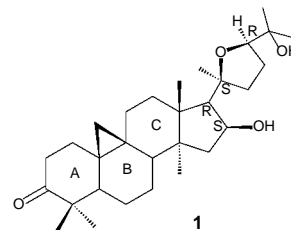
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Triterpenoids form a large class of compounds derived biosynthetically from the cyclization of squalene with the retention of all 30 carbon atoms.¹ Many of these naturally occurring compounds have interesting biological and pharmacological properties.² For example, ursolic acid, an ursane-type triterpene, inhibits tumorigenesis,³ and induces tumor cell differentiation.⁴ It has also proven effective in the inhibition of angiogenesis⁵ and invasion,⁶ which are important events involved in tumor metastasis.

On the other hand, some cycloartane-type triterpenes, such as methyl quadrangularates B and D, and actein, have also shown cytotoxic activity on several cancer cell lines.⁷

Argentatin A (**1**), a cycloartane-type triterpene, is an important component of the resin of *Parthenium argentatum* Gray (Guayule).⁸ Guayule is a common desert shrub in Northern Mexico and Southwestern USA. It has been intensively studied as a renewable native source of natural rubber, and it is known that for each kilogram of natural rubber obtained, 1 kg of a by-product named resin is also produced.⁸ Taking into account that

the argentatins, including argentatin A, comprise 20% of the resin, it can be inferred that these compounds will be available in large amounts.



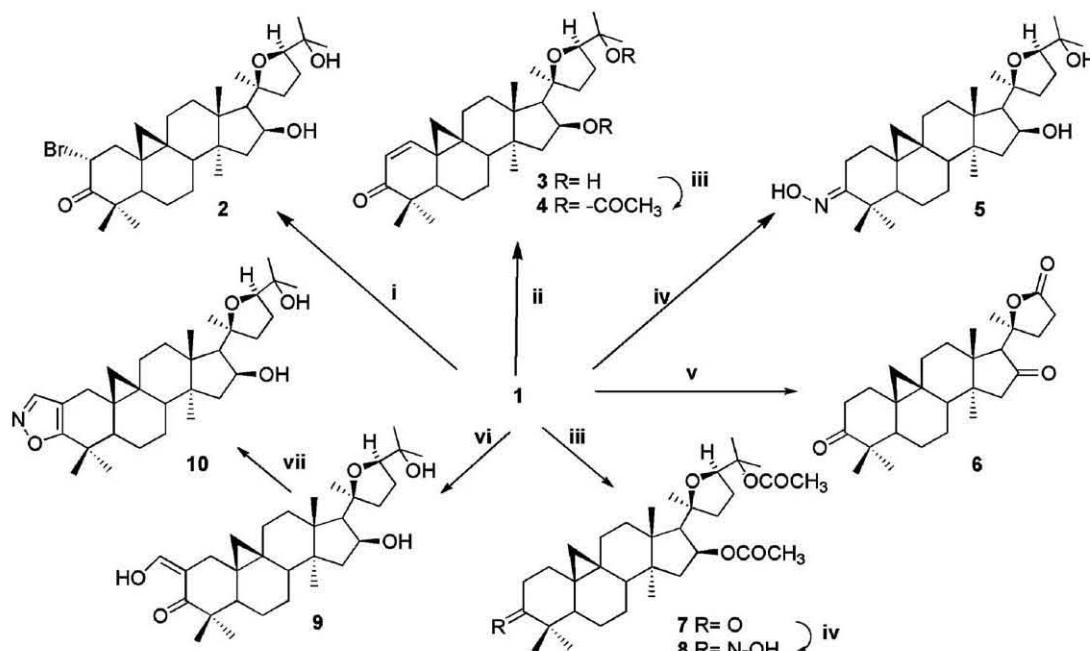
Our studies on the argentatins have demonstrated that argentatin A (**1**) possesses anti-microbial properties.⁹ Additionally, in a previous paper, we reported that **1** inhibited 100% of cell growth in six cancer human cell lines (HeLa, K562, U251, PC-3, MCF-7, and HCT15) at 100 μ M.¹⁰

As a strategy to elucidate structural requirements involved in the cytotoxic activity of **1**, we now wish to report the synthesis and biological evaluation of nine derivatives of argentatin A.

Argentatin A was obtained from the resin of *P. argentatum* (Gray) as previously reported¹¹ and identified by comparison of its physical and spectroscopic constants (mp, ¹H and ¹³C NMR) with those reported in

Keywords: Cycloartane; Argentatin A; Cytotoxicity.

*Corresponding author. Tel.: +52 55 56224403; fax: +52 55 56162203; e-mail: marvaz@servidor.unam.mx



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) Br/CH₃COOH, 98%; (ii) (a) PhSeCl, EtOAc, (b) THF, H₂O₂ 70%; (iii) AcONa/(CH₃CO)₂O, 99%; (iv) NH₂OH·HCl, C₅H₅N, 90%; (v) CH₃COOH, CrO₃, H₂O, 40%; (vi) HCO₂Et, C₅H₅N, Na/MeOH, 89%; (vii) NH₂OH·HCl, CH₃COOH, 80%.

literature, as well as by comparison with an authentic sample.⁸

Syntheses of argentinin A derivatives (2–10) are described in Scheme 1.

The 2-bromo derivative **2** was obtained from Argentinin A (**1**) when treated with bromine liquid in acetic acid, while treatment of **1** with phenyl selenium chloride in ethyl acetate followed by addition of tetrahydrofuran and hydrogen peroxide yielded **3**.

Compound **3** was transformed into the unsaturated acetate **4** by treatment with sodium acetate in acetic anhydride. Oxime **5** was synthesized by treatment of **1** with hydroxylamine hydrochloride in pyridine.

Lactone **6** was obtained from **1**, when it was dissolved in acetic acid and treated with chromium trioxide in water.

The treatment of **1** with sodium acetate in acetic anhydride gave **7**. The resulting acetate was transformed into its corresponding oxime **8** by treatment with hydroxylamine hydrochloride in pyridine.

Formyl derivative **9** was obtained from **1** by treating with sodium methoxide prepared in situ and ethyl formate. In addition, isoxazol derivative **10** was obtained from **9**, when treated with hydroxylamine hydrochloride in acetic acid.

All the compounds were characterized by spectroscopic and analytical tools. Additionally, adequate crystals of **5**, suitable for X-ray analysis were obtained. This analysis permitted the assignment of the structure

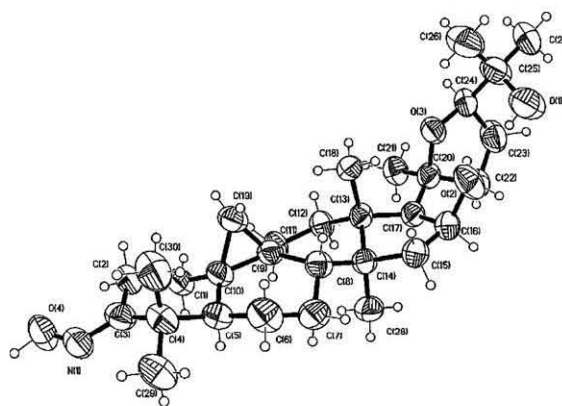


Figure 1. Crystal structure of **5**.

as (16*S*, 17*R*,20*S*,24*R*)-3-oxime-20,24-epoxy-16,25-dihydroxy-cycloartan-3-one (Fig. 1).¹²

The view of molecule **5** in Figure 1 shows the *trans*, *cis*, *trans*, *cis* junctions for rings A–D similar configuration to those previously described for some argentinins.¹³ In **5**, the ring A adopts a chair conformation, while the ring B displays a half-chair conformation due to the presence of the cyclopropane ring. The central ring, C, is present as intermediate between half chair and twist, while the five-membered ring D adopts a twist conformation.

Even though argentinin A has been isolated since 1970 from *P. argentatum* and from other *Parthenium* species,¹⁴ its stereochemistry has not been accurately determined. For instance, some authors assigned an *R* configuration to the stereogenic center at C-20,¹⁵ while

Table 1. Effect of argentatin A derivatives on the growth of human cancer cell lines (concentration causing 50% cell growth inhibition)

Compound	IC ₅₀ (SEM), μM			
	HCT-15 (colon)	K562 (leukemia)	PC-3 (prostate)	U251 (CNS ^a)
1	31.70 ± 1.10	38.61 ± 4.47	20.22 ± 3.44	27.34 ± 1.00
2	3.23 ± 1.10	4.34 ± 0.75	11.06 ± 0.66	13.89 ± 0.44
3	16.66 ± 1.50	16.84 ± 3.46	15.26 ± 1.70	18.88 ± 0.36
4	>100	>100	13.93 ± 0.324	58.44 ± 4.00
5	35.80 ± 1.98	44.43 ± 5.57	46.91 ± 2.75	26.79 ± 2.39
6	>100	>100	>100	>100
7	40.68 ± 2.49	68.39 ± 8.30	22.69 ± 2.50	30.51 ± 3.45
8	28.87 ± 3.17	15.18 ± 2.35	12.56 ± 2.42	21.37 ± 1.67
9	9.82 ± 0.21	14.38 ± 0.78	5.69 ± 0.05	5.88 ± 1.03
10	10.24 ± 0.77	11.02 ± 1.05	13.00 ± 3.56	11.30 ± 1.55

Each data is given as the mean and its standard error (SEM) of at least three independent experiments. Doxorubicin: HCT-15: 0.23 ± 0.01 μM; K562: 0.28 ± 0.01 μM; PC-3: 0.32 ± 0.02 μM; U251: 0.09 ± 0.02 μM.

^a Central Nervous System.

others did not specify the stereochemistry of the same center. Since no stereogenic center was modified in the reaction to obtain **5** from **1**, then the stereochemistry of **1** was established as (16*S*,17*R*,20*S*,24*R*)-20,24-epoxy-16,25-dihydroxy-cycloartan-3-one.

The cytotoxic activity of argentatin A derivatives on K562 (leukemia), PC-3 (prostate), U251 (central nervous system), and HCT-15 (colon) cancer human cell lines was determined using the sulforhodamine B test.¹⁶ The concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) were calculated according to the protocol previously established.¹⁶

The cytotoxic activity of argentatin A (**2–10**) derivatives is shown in Table 1.

An analysis of the results of cytotoxic activity of the synthetic argentatin A derivatives led to the establishment of an important fact with respect to their structure–activity relationship. The presence of either a double bond at C-1/C-2, or a bromine atom or formyl moiety at C-2, as well as the presence of an isoxazol moiety linked to ring A enhanced the potency of argentatin A in all cell lines tested (**2**, **3**, **9**, and **10** are more active than **1**).

Lactone derivative **6** was inactive in all cell lines tested; this fact suggests that the presence of an isopropyl alcohol group at C-24 is essential for the inhibitory activity.

In conclusion the modification of argentatin A afforded four compounds that resulted in more active than **1** on all cell lines tested.

Acknowledgements

Partial financial support from DGAPA (IN-224802) is acknowledged. We are very grateful to Georgina Espinosa, Simón Hernández, Héctor Ríos, Nieves Zavala, Javier Pérez, Rocío Patiño, Ángeles Peña, Elizabeth Huerta, Eréndira García and Gabriela Salcedo for technical assistance. H.P.D. Acknowledges to CONACYT,

DGEP, and DGAPA-UNAM, Mexico for financial support.

References and notes

- Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 609.
- Tang, W.; Eisenbrand, G. *Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*; Springer: Berlin, 1992.
- Huang, M. T.; Ho, C. T.; Wang, Z. Y.; Ferraro, T.; Lou, Y. R.; Stauber, K.; Ma, W.; Georgiadis, C.; Laskin, J. D.; Conney, A. H. *Cancer Res.* **1994**, *51*, 701.
- Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Kim, K. H.; Lee, J. J.; Kim, K. W. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, *120*, 513.
- Sohn, K. L.; Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Young, H. S.; Kim, K. W. *Cancer Lett.* **1993**, *94*, 213.
- Cha, H. J.; Bae, S. K.; Lee, H. Y.; Lee, O. H.; Sato, H.; Seiki, M.; Park, B. C.; Kim, K. W. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2281.
- (a) Öksüz, S.; Shieh, H.-L.; Pezzuto, J. M.; Özhatay, N.; Cordell, G. A. *Planta Med.* **1993**, *59*, 472; (b) Smith-Kielland, I.; Dornish, J. M.; Malterud, K. E.; Hvistendahl, G.; Romming, C.; Bockman, O. C.; Kolsaker, P.; Stenstrom, Y.; Nordal, A. *Planta Med.* **1996**, *62*, 322; (c) Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Kim, P. H.; Qui, T. K.; Saiki, H.; Miwa, Y.; Taga, T.; Kadota, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3519; (d) Saxe, E. L.; Shimizu, M.; Xiao, D.; Nuntanakorn, P.; Lim, J. T. E.; Suzui, M.; Seter, C.; Pertel, T.; Kennelly, E. J.; Kronenberg, F.; Weinstein, I. B. *Breast Cancer Res. Tr.* **2004**, *83*, 221.
- (a) Céspedes, C. L.; Martínez-Vázquez, M.; Calderón, J. S.; Salazar, J. R.; Aranda, A. Z. *Naturforsch.* **2001**, *56c*, 95; (b) Komoroski, R. A.; Gregg, E. C.; Shockcor, J. P.; Geckle, J. M. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 534; (c) Martínez, R.; Martínez-Vázquez, M.; Zamorano-Macías, O. *Org. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 237.
- Martínez-Vázquez, M.; Martínez, R.; Espinosa, P. G. *Fitoterapia* **1994**, *LXV*(4), 371.
- Parra-Delgado, H.; Ramírez-Apan, T.; Martínez-Vázquez, M. *Rev. Latinoam. Quím. Suppl.* **2001**, *29*, 76.
- The resin, a by-product of the industrial process to obtain natural rubber from *P. argentatum* was donated by CONAZA Company (Coahuila, Mexico). The resin (157.39 g) was dissolved in a small volume of hexane and percolated over tonsil. The first fractions collected

were reunited and chromatographed on Silica gel. This procedure resulted in the isolation of argentatin A (4.2 g), which was purified by conventional procedures.

12. X-ray data were collected on a Siemens P4 diffractometer. Space group $P2_12_12_1$, $a = 27.458$ (2), $b = 7.9900$ (10), $c = 13.0030$ (10). Crystallographic data for the structure have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC-254670. Copies of the data can be obtained free of charge on application to The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax: +44 (1223)336 033; e-mail for inquiry: fileserv@ccdc.cam.ac.uk).
13. Martínez-Vázquez, M.; Martínez, R.; Toscano, R. A. *J. Chem. Crystallogr.* **1995**, 25, 331.
14. Jakupovic, J.; Pathak, V. P.; Bohlmann, F.; Dominguez, X. A. *Phytochemistry* **1987**, 26, 761.
15. Maatooq, G. T.; Hoffmann, J. H. *Z. Naturforsch.* **2002**, 57c, 489.
16. (a) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; VaigroWolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757; (b) Doxorubicin was used at five different concentrations (0.01–5 μM) as a positive control.

Acta Crystallographica Section E

Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

Editors: **W. Clegg** and **D. G. Watson**

Incaniline (isoargentatin A) from *Parthenium argentatum*

Simón Hernández-Ortega, Hortensia Parra Delgado and Mariano Martínez

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases or the like is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

Incaniline (isoargentatin A) from *Parthenium argentatum*

Simón Hernández-Ortega,
Hortensia Parra Delgado and
Mariano Martínez*

Instituto de Química, Universidad Nacional
Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad
Universitaria, México DF 04510, Mexico

Correspondence e-mail:
simonho@servidor.unam.mx

Key indicators

Single-crystal X-ray study

$T = 291\text{ K}$

Mean $\sigma(\text{C}-\text{C}) = 0.005\text{ \AA}$

R factor = 0.049

wR factor = 0.117

Data-to-parameter ratio = 8.6

For details of how these key indicators were
automatically derived from the article, see
<http://journals.iucr.org/e>.

The title compound, (20*S*,24*R*)-incanilin, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$, contains three six-membered rings and two five-membered rings. The six-membered ring *B* adopts a distorted envelope conformation and five-membered ring *D* adopts a twist conformation. In the crystal structure, the molecules exist as $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen-bonded dimers.

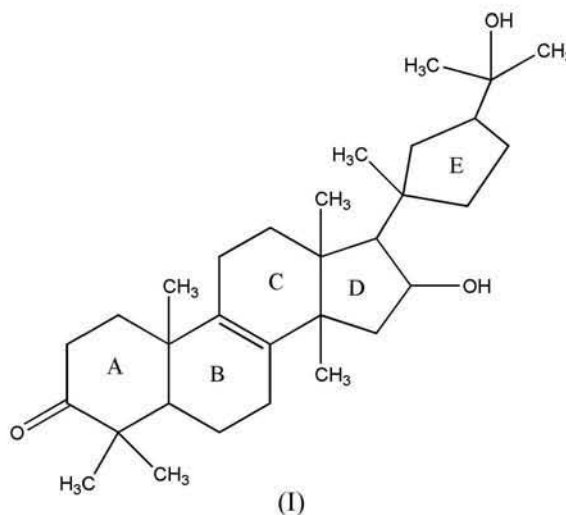
Received 14 April 2005

Accepted 23 May 2005

Online 31 May 2005

Comment

Guayule (*Parthenium argentatum*) has been studied due to the high content of rubber in its roots and aerial parts. As a result of the industrial process used to obtain this rubber, high quantities of a resin by-product are also produced. Our research has shown that cycloartane-type triterpenes are the main constituents of this resin. We have also demonstrated that some of these triterpenes possess antimicrobial activity (Martínez-Vázquez *et al.*, 1994) and show a non-competitive inhibition of oestrogens in breast cancer (Calzada *et al.*, 1995).



Although there is a previous report on the stereochemistry of incaniline (isoargentatine A; Romo de Vivar & Matsubara, 1986), no report on the crystal structure determination of this compound has appeared. Therefore, due to this lack of data and as part of an effort to explore the structure–activity relationships of natural products isolated from guayule, the X-ray crystal structure determination of incaniline, (I), was undertaken.

Incaniline is a pentacyclic triterpene (Fig. 1), with three six-membered rings (*A*, *B* and *C*) and two five-membered rings (*D* and *E*). The *A/B* and *C/D* ring junctions are *trans* fused. Ring *A* adopts a slightly distorted chair conformation, as evidenced by the Cremer & Pople (1975) puckering parameters of $q_2 =$

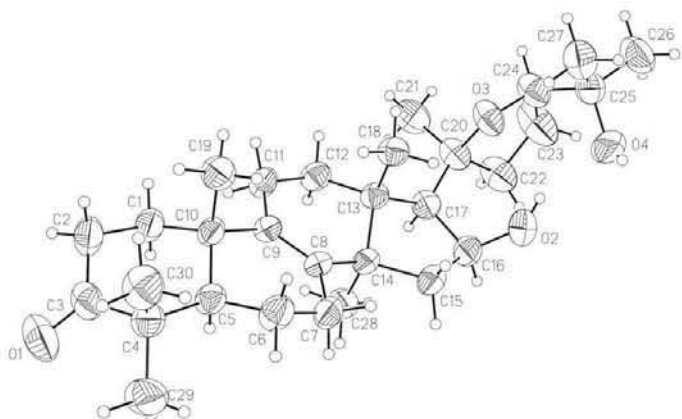


Figure 1
The molecular structure of (I), showing 40% probability displacement ellipsoids and the atomic numbering scheme.

0.083 (2) Å, $q_3 = 0.512$ (2) Å and $\varphi_2 = -18$ (2)°. This distortion is caused by the O1=C3 carbonyl bond [1.213 (4) Å]. The total puckering amplitude, Q_T [0.518 (2) Å], is slightly lower than the value for an ideal chair conformation [0.63 Å].

Rings B and C are fused through the C=C double bond [C8=C9 1.335 (4) Å]. The puckering parameters of ring B show that this ring adopts a half-boat conformation, with $q_2 = 0.401$ (2) Å, $q_3 = 0.331$ (2) Å, $\varphi_2 = 11.0$ (3)° and $Q_T = 0.520$ (2) Å. The C10–C9–C8–C7–C6 fragment in ring B is planar (r.m.s deviation 0.038 Å), with atom C5 deviating from it by 0.698 (5) Å. Ring C also adopts a half-boat conformation, with $q_2 = 0.418$ (2) Å, $q_3 = 0.324$ (2) Å, $\varphi_2 = -107.0$ (3)° and $Q_T = 0.528$ (2) Å. Atom C13 deviates from the C14/C8/C9/C11/C12 plane (r.m.s deviation 0.045 Å) by 0.720 (4) Å.

Ring D is twisted around the C13–C14 bond, with puckering parameters $q_2 = 0.464$ (2) Å and $\varphi_2 = -163.6$ (3)°. Ring E adopts a slightly distorted envelope conformation, with $q_2 = 0.350$ (2) Å and $\varphi_2 = -132.0$ (4)°. The relative orientation of rings D and E in (I) is different from that observed in Beesioside J (Ju *et al.*, 2002) and 3,15,16,18-tetra-acetoxy-20,24-epoxy-9,19-cyclolanostane-3,15,25-triol-D-pyranoside hemihydrate (Sakurai *et al.*, 1986).

In the crystal structure of (I), the molecules exist as O–H...O hydrogen-bonded dimers (Table 2).

Experimental

The title compound was isolated from the roots of *Parthenium argentatum*, as previously reported by Romo de Vivar *et al.* (1990). Crystals of (I) suitable for X-ray diffraction were grown by recrystallization from an ethanol solution.

Crystal data

C₃₀H₄₈O₄
 $M_r = 472.68$
 Orthorhombic, C22₁
 $a = 13.9158$ (7) Å
 $b = 14.8078$ (8) Å
 $c = 26.3807$ (14) Å
 $V = 5436.1$ (5) Å³
 $Z = 8$
 $D_x = 1.155$ Mg m⁻³

Mo K α radiation
 Cell parameters from 8001 reflections
 $\theta = 2.2$ –31.0°
 $\mu = 0.07$ mm⁻¹
 $T = 291$ (2) K
 Prism, colourless
 0.40 × 0.30 × 0.30 mm

Data collection

Bruker SMART APEX CCD area-detector diffractometer
 φ and ω scans
 Absorption correction: none
 22368 measured reflections
 2652 independent reflections

2096 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{int} = 0.047$
 $\theta_{max} = 25.0^\circ$
 $h = -16 \rightarrow 16$
 $k = -17 \rightarrow 17$
 $l = -31 \rightarrow 31$

Refinement

Refinement on F^2
 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.049$
 $wR(F^2) = 0.117$
 $S = 1.02$
 2652 reflections
 309 parameters

H-atom parameters constrained
 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0707P)^2]$
 where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
 $(\Delta/\sigma)_{max} = 0.006$
 $\Delta\rho_{max} = 0.17$ e Å⁻³
 $\Delta\rho_{min} = -0.16$ e Å⁻³

Table 1

Selected geometric parameters (Å, °).

O1–C3	1.210 (4)	C1–C10	1.530 (4)
O2–C16	1.433 (4)	C2–C3	1.481 (5)
O3–C24	1.435 (4)	C3–C4	1.517 (5)
O3–C20	1.439 (4)	C4–C5	1.564 (5)
O4–C25	1.404 (5)	C5–C10	1.549 (4)
C1–C2	1.525 (5)		
C24–O3–C20	109.7 (2)	O3–C20–C17	110.8 (3)
O1–C3–C2	120.6 (4)	O3–C24–C25	107.8 (3)
O1–C3–C4	122.7 (4)	O3–C24–C23	106.5 (3)
O2–C16–C15	109.6 (3)	O4–C25–C27	109.8 (4)
O2–C16–C17	114.6 (3)	O4–C25–C24	106.3 (3)
O3–C20–C21	108.5 (3)	O4–C25–C26	108.2 (3)
O3–C20–C22	103.1 (3)		
C10–C1–C2–C3	–56.7 (4)	C10–C9–C11–C12	176.0 (3)
C1–C2–C3–C4	51.3 (5)	C11–C12–C13–C14	54.1 (3)
C7–C8–C9–C11	177.5 (3)	C15–C16–C17–C13	15.8 (3)
C7–C8–C9–C10	0.8 (5)	O3–C20–C22–C23	–36.6 (4)
C8–C9–C11–C12	–0.9 (5)		

Table 2

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

D–H...A	D–H	H...A	D...A	D–H...A
O2–H2...O4 ⁱ	0.82	2.00	2.689 (4)	141

Symmetry code: (i) $x, -y + 1, -z + 1$.

H atoms were included in calculated positions (O–H = 0.82 Å and C–H = 0.96–0.98 Å) and refined using a riding model, with $U_{iso}(H) = 1.5U_{eq}(\text{carrier})$ for hydroxy and methyl H atoms and $1.2U_{eq}(\text{carrier})$ for other H atoms. A rotating-group refinement was used for the OH groups. In the absence of significant anomalous scattering effects, Freidel pairs were merged during refinement and the absolute configuration was not determined; the enantiomer used in the refined model was assigned arbitrarily.

Data collection: SMART (Bruker, 2001); cell refinement: SAINT (Bruker, 2001); data reduction: SAINT; program(s) used to solve structure: SHELXTL (Bruker, 2000); program(s) used to refine structure: SHELXTL; molecular graphics: SHELXTL; software used to prepare material for publication: SHELXTL and PARST95 (Nardelli, 1995).

The authors acknowledge Gabriela Salcedo for technical assistance.

References

Bruker (2000). SHELXTL. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.

- Bruker (2001). *SMART* and *SAINT*. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Calzada, L., Salazar, E.-I., Tellez, J., Martínez-Vázquez, M. & Martínez, R. (1995). *Med. Sci. Res.* **23**, 815–816.
- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
- Ju, J.-H., Liu, D., Lin, G., Zhang, Y.-M., Yang, J.-S., Lu, Y., Gong, N.-B. & Zheng, Q.-T. (2002). *J. Nat. Prod.* **65**, 147–152.
- Martínez-Vázquez, M., Martínez, R. & Espinosa, P. G. (1994). *Fitoterapia*, **LXV**, 371–372.
- Nardelli, M. (1995). *J. Appl. Cryst.* **28**, 659.
- Romo de Vivar, A. & Matsubara, C. (1986). *Rev. Latinoamer. Quim.* **17**, 7–9.
- Romo de Vivar, A., Martínez-Vázquez, M., Matsubara, C., Pérez-Sánchez, G. & Joseph-Nathan, P. (1990). *Phytochemistry*, **29**, 915–918.
- Sakurai, N., Nagai, M., Nagase, H., Kawai, K. I., Inoue, T. & Xiao, P. (1986). *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 582–585.