



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**SÍNTESIS QUÍMICO-ENZIMÁTICA DE UNA
NUEVA AMIDA N-METILDIAZABICÍCLICA
DERIVADA DEL ÁCIDO 12-
FENILACETILRICINOLEICO CON
POTENCIAL ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A

ARACELI GUEVARA CABRERA

DIRECTOR: M. EN C. MARÍA PATRICIA SHIRLEY DEMARE NEGRETE
ASESOR: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS



México D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Introducción	3
2. Fundamentación teórica	6
2.1 Cáncer	7
2.1.1 Clasificación	8
2.1.2 Incidencia	8
2.1.3 Cáncer cérvico-uterino	9
2.1.3.1 Incidencia	9
2.1.3.2 Causas	9
2.1.3.3 Diagnóstico	10
2.1.3.4 Prevención	10
2.1.3.5 Tratamiento	11
2.2 Muerte celular	13
2.2.1 Apoptosis	13
2.2.2 Necrosis	14
2.3 Capsaicina y capsaicinoides	16
2.3.1 Rinvanil y 12-fenilacetilrinvanil	17
2.4 Enzimas	20
2.4.1 Aplicación en síntesis orgánica	20
2.4.2 Lipasa	22
2.5 Sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano	24
3. Planteamiento del problema	26
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
5. Hipótesis	30
6. Material y métodos	32
6.1 Métodos y técnicas generales	33
6.2 Materiales	33
6.2.1 Reactivos y materias primas	33
6.2.2 Disolventes grado técnico	34

6.2.3 Cristalería	34
6.2.4 Material y equipos	34
7. Parte experimental	36
7.1 Esquema general de síntesis	37
7.2 Ricinoleato de metilo (2)	37
7.3 12-Fenilacetilricinoleato de metilo (3)	38
7.4 Ácido 12-fenilacetilricinoleico (4)	38
7.5 Fenilacetato de (1 <i>R</i> ,3 <i>Z</i>)-1-hexil-12-[(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (5)	38
8. Resultados y discusión	40
8.1 Tabla de resultados	41
8.2 Síntesis de 12-fenilacetilrinvanil (6)	41
8.3 Síntesis y caracterización de ácido 12-fenilacetilricinoleico (4)	43
8.4 Síntesis y caracterización de fenilacetato de (1 <i>R</i> ,3 <i>Z</i>)-1-hexil-12-[(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (5)	44
8.5 Evaluación farmacológica de fenilacetato de (1 <i>R</i> ,3 <i>Z</i>)-1-hexil-12-[(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (5)	49
9. Conclusiones	50
10. Anexos	52
10.1 Ricinoleato de metilo (2)	53
10.2 12-fenilacetilricinoleato de metilo (3)	55
10.3 Ácido 12-fenilacetilricinoleico (4)	57
10.4 Fenilacetato de (1 <i>R</i> ,3 <i>Z</i>)-1-hexil-12-[(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (5)	59
11. Bibliografía	62

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer cérvico-uterino es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer;¹ sin embargo, gracias a la citología y a la histopatología se le puede detectar y tratar oportunamente, reduciendo el impacto de esta enfermedad. Actualmente se cuenta con vacunas que pueden disminuir este tipo de cáncer, especialmente en países en vías de desarrollo, donde no hay una cultura de prevención. En estos países, como es el caso de México, aún se presentan casos de cáncer cérvico-uterino en etapas avanzadas, que sólo pueden ser tratados por cirugía, radioterapia o quimioterapia, y se sabe que dichos tratamientos son muy agresivos, por lo que deterioran la calidad de vida de la paciente.

Es conocido que los fármacos empleados en la quimioterapia no discriminan en su totalidad entre células normales y células cancerosas, llevando a una pérdida en la homeostasis del organismo, ya que se eliminan células normales además de las tumorales. Por lo antes mencionado, se hace necesario el desarrollo de nuevos compuestos con mayor selectividad hacia las células malignas.

Aunque hay reportes que describen el efecto carcinogénico de la capsaicina (figura 1a),² compuesto que le da el efecto pungente a los frutos del género *Capsicum*, se ha informado que presenta efecto citotóxico en diversas líneas tumorales humanas, como las de epitelio branquial (BEAS-2B), adenocarcinoma de epitelio alveolar (A549), hepatoma (HepG2)³ y en células de glioma (C6),⁴ además induce apoptosis en células de leucemia (HTLV-1)⁵ y de próstata (PC3).⁶ Aunque la capsaicina presenta grandes cualidades como agente antineoplásico, no ha sido implementado su uso debido a sus propiedades irritantes, por lo que se han buscado análogos sintéticos que conserven la actividad biológica, pero dejando de lado la alta pungencia y el difícil manejo; es por ello que en 2005 se reportaron dos nuevos compuestos, rinvanil (figura 1b) y 12-fenilacetilrinvanil (FAR) (figura 1b),⁷ análogos de capsaicina, los cuales presentan muchas de las cualidades terapéuticas de ésta sin el inconveniente de ser pungentes.

El desarrollo de compuestos con actividad antineoplásica y alta selectividad para discriminar entre las células normales y las malignas asume un papel de gran importancia, por lo que el presente trabajo describe la síntesis de una nueva amida diazabicíclica análoga a FAR, que sustituye el fragmento de vainillilamina, presente en este compuesto, por el sistema (1S,4S)-2-

metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (figura 1c) y su evaluación preliminar como agente antineoplásico en líneas celulares tumorales de cérvix CaSki, HeLa y ViBo.⁸

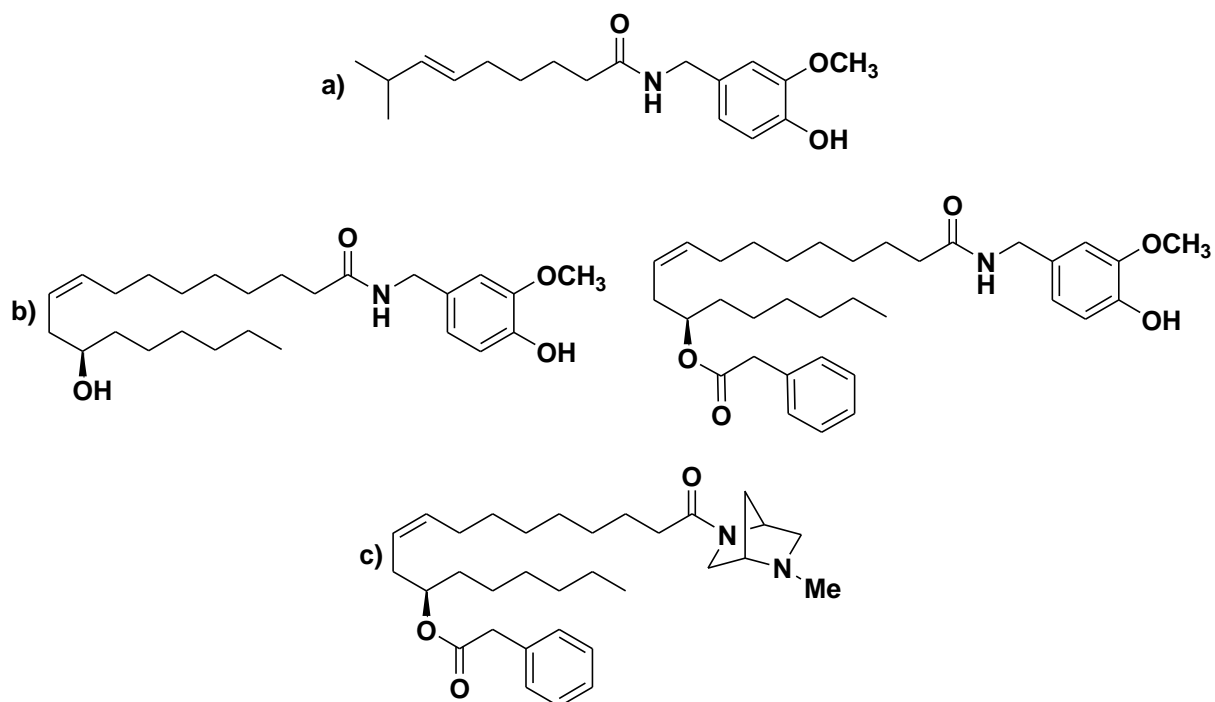


Figura 1. Estructuras de: a) Capsaicina; b) rinvanil y FAR (respectivamente); c) Amida diazabíclicla análoga a FAR.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Cáncer

Cáncer, del latín *Karikinos* que significa cangrejo, es el término adoptado para definir el desequilibrio de la división y crecimiento celular, caracterizado por la pérdida de la homeostasis entre la proliferación y muerte celular; presenta interacciones complejas que intervienen en la conducta de las células y en su información genética, lo que modifica el correcto funcionamiento de los mecanismos reguladores del ciclo celular, diferenciación y muerte (figura 2).⁹

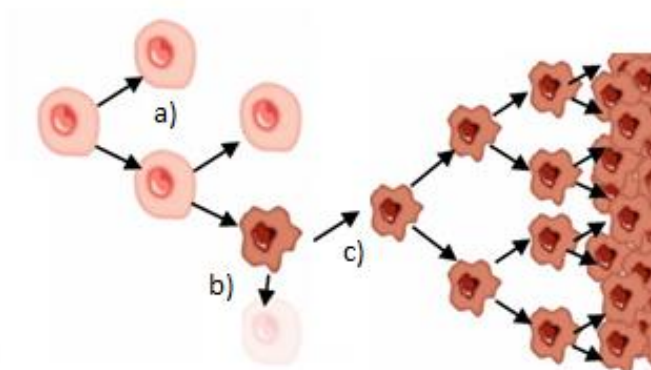


Figura 2. a) división celular normal; b) ciclo celular normal, muerte de célula dañada; c) reproducción descontrolada de células dañadas (células neoplásicas).¹⁰

El cáncer es una enfermedad que se manifiesta en cualquier tejido u órgano, y que por la manera en la que se desarrolla es un proceso multifactorial, en el cual intervienen factores de tipo:

- Biológicos, entre los cuales se encuentran los agentes infecciosos, como virus y bacterias.
- Químicos, entre los que se pueden mencionar sustancias cancerígenas como el benceno así como la contaminación ambiental.
- Físicos, entre los cuales se encuentran la radiación ionizante, los rayos UV, etc.

Todos estos factores muestran una característica en común, provocan cambios en el genoma, sin embargo, la mayoría de los cánceres requiere de múltiples mutaciones para que se desarrollen.¹¹

El cáncer es una enfermedad degenerativa e invasiva. En algunos casos las células del tumor primario migran hacia otros sitios dentro del sistema donde se están desarrollando; a este proceso se le llama metástasis, donde se producen tumores secundarios. En el proceso de desarrollo de un tumor secundario por una vía linfática o sanguínea, la célula maligna que se desprende del tumor primario y coloniza un órgano donde se ancla, no lo hace de manera aleatoria, sino que depende de la naturaleza del tejido invadido. La metástasis se facilita si las células tumorales producen factores de crecimiento y de angiogénesis, que es la inducción del crecimiento de vasos sanguíneos que proveen de nutrientes al tumor.¹²

La malignidad o benignidad del tumor radica en que los tumores clasificados como benignos se limitan o encapsulan, y no invaden ni producen metástasis. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero algunos, por el linaje celular de su origen no lo hacen, por ejemplo las leucemias. Todo esto se desarrolla por la interacción de factores ambientales, así como inmunológicos y genéticos específicos de cada individuo, por lo que las anormalidades genéticas pueden variar entre los distintos tipos de cáncer.¹³

2.1.1 Clasificación

El cáncer se puede clasificar a partir del tejido y el tipo de célula en el cual se origina:

- Leucemias y linfomas: Son el cáncer de los tejidos formadores de las células sanguíneas, producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.
- Sarcomas: Se encuentran en tejido conectivo, como huesos, cartílago, nervios, vasos sanguíneos, músculo y tejido adiposo.
- Carcinoma: Se encuentran en tejido epitelial, como la piel o en los epitelios que revisten cavidades y órganos.¹⁴

2.1.2 Incidencia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que una de las principales causas de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y

mama.¹⁵ En México durante 2009, murieron 65 de cada 100 mil personas a consecuencia de tumores malignos.¹⁶

Se prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues se estima que pasara de 7.6 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones.¹⁵

2.1.3 Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino es un tumor epitelial, que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La dispersión por la parte superior de la vagina, los parametrios, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación. Los casos de cáncer cérvico-uterino primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano o del epitelio glandular. Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en grado de diferenciación y características morfológicas.¹⁷

2.1.3.1 Incidencia

De acuerdo a la OMS, el cáncer cérvico-uterino es el segundo tipo de cáncer más frecuente en la mujer, y prácticamente todos los casos están relacionados con la infección genital por virus del papiloma humano (VPH). Cerca de un 80% de los casos y una proporción aún mayor de las muertes por esta causa se registran hoy en países de bajos ingresos, donde prácticamente no hay acceso a la detección y tratamiento de esta enfermedad.¹⁵

En el año 2009, el porcentaje más alto de incidencia de cáncer cérvico-uterino en México se presentó en mujeres de 35 a 59 años de edad, principalmente en la población de 45 a 49 años (15.1%), seguido de las mujeres de 40 a 44 años (14%) y de las de 50 a 54 años (13.2%), y es considerado como la segunda causa de muerte en la población femenina, representando el 12.1% del total de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas.¹⁶

2.1.3.2 Causas

Las posibles causas de cáncer cérvico-uterino son:¹⁵

- Infección por VPH (principalmente subtipos considerados oncogénicos).

- Infecciones de transmisión sexual.
- Infecciones vaginales tratadas inadecuadamente.
- Antecedentes genéticos de cáncer y específicamente cáncer cérvico-uterino.
- Inicio de práctica sexual antes de los 18 años.
- Tabaquismo.

2.1.3.3 Diagnóstico

Los exámenes para diagnosticar el cáncer cérvico-uterino son los siguientes:¹⁵

- Examen de Papanicolaou.

Detecta cáncer cérvico-uterino, así como tejidos precancerosos en el cérvix.

- Colposcopia

Examinación de la vagina y cuello uterino. Se indica si el examen de Papanicolaou sugiere precáncer o neoplasia cervical (cáncer).

- Examen de VPH

Se puede examinar el mismo material de la prueba de Papanicolaou para detectar tipos de VPH (principalmente tipos considerados oncogénicos).

- Biopsia

Se realiza si el examen de Papanicolaou resulta positivo a displasia o neoplasia, y consiste en realizar un corte del cuello uterino para ser examinado y determinar el grado NIC (neoplasia intracervical) del tejido.

2.1.3.4 Prevención

Para prevenir la formación de cáncer cérvico-uterino es recomendable:¹⁵

- Realizar el examen de Papanicolaou cada año a partir de los 18 años, y cada seis meses a partir de los 35 años o si existen antecedentes genéticos de cáncer.
- Respetar el periodo de cuarentena después del alumbramiento.
- No fumar.
- Llevar una práctica sexual segura.

- Hacer ejercicio y mantener una dieta sana.

2.1.3.5 Tratamiento

Existen tres principales tratamientos:¹⁵

- Cirugía.

Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar específico y posible de someter a cirugía. Consiste en extirpar el tumor cancerígeno. Para obtener un mejor resultado se precisa extirpar parte del tejido que rodea al tumor, para así, asegurar que todas las células cancerosas han sido extirpadas; sin embargo, esto no le asegura totalmente al paciente que más adelante el cáncer reaparezca.

- Radioterapia

Utiliza partículas de alta energía capaces de penetrar el cuerpo y destruir células cancerosas o aminorar su crecimiento; esto lo hace a través de una máquina, llamada acelerador lineal, que genera y dirige esas partículas hacia el lugar del cuerpo donde se localiza el cáncer. Al irradiar las células con enormes cantidades de partículas de energía, provoca modificaciones profundas, principalmente a nivel del núcleo celular, y de ello resultan perturbaciones que pueden destruirlas o hacerlas incapaces de reproducirse. La desventaja de la radioterapia, es que lesiona todas las células que se encuentran en el haz, sin distinción entre células normales o malignas, y a pesar de las precauciones tomadas, no puede evitarse la irradiación de los tejidos sanos.

- Quimioterapia

Actúa sobre las células que se dividen con gran rapidez, que es lo que suelen hacer las cancerosas. Pero también existen otras células, que no son cancerosas y que también se dividen de forma rápida. Algunos medicamentos quimioterapéuticos actúan interrumpiendo la fase donde la célula cancerosa se divide y esto hace que el tiempo de crecimiento sea mayor y que la célula muera. Los medicamentos quimioterapéuticos pueden administrarse de diferentes formas: a través de un comprimido por vía oral; mediante un suero o inyección intravenosa; por inyección intramuscular o mediante una inyección a través de una punción en la médula ósea. Los medicamentos quimioterapéuticos al actuar sobre células que se dividen con mayor

frecuencia, como lo hacen las células cancerosas, también pueden actuar sobre aquellas células normales que se dividen de igual manera. Estas células son por ejemplo, las células de la médula ósea (donde se fabrican las células sanguíneas) y las membranas mucosas del conducto gastrointestinal. Los folículos pilosos también se dividen con frecuencia y son sensibles a algunos medicamentos de quimioterapia. Por este motivo, algunos de estos fármacos producen náuseas, vómito, diarrea y llagas en la boca. Otros dan lugar a una pérdida temporal del cabello; la médula queda temporalmente perjudicada en su función de producir células sanguíneas. Por esto es más fácil que se produzcan infecciones, pues el número de leucocitos disminuye, o que se produzca cansancio o anemia, ya que el número de hematíes también puede disminuir.

2.2 Muerte celular

La muerte celular fisiológica fue descrita por primera vez en 1858 por Virchow, él describió los procesos de muerte celular observados en el microscopio, definiéndolos como degeneración, mortificación y necrosis. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Currie establecieron el término apoptosis, que evoca a la caída de las hojas de los árboles en la estación otoñal o la caída de los pétalos de una flor. La muerte celular es un proceso fundamental para mantener la homeostasis de cualquier organismo; en las células de los organismos pluricelulares impera el autosacrificio, es decir que al ser miembros de una comunidad sumamente organizada, el número de células está regulado con precisión, de tal manera que, aquellas células que ya no son necesarias, se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte.¹⁸

Existen diferentes tipos de muerte celular, siendo las más importantes necrosis y apoptosis. Estos dos tipos de muerte presentan diferencias basadas en su morfología y bioquímica (figura 3).

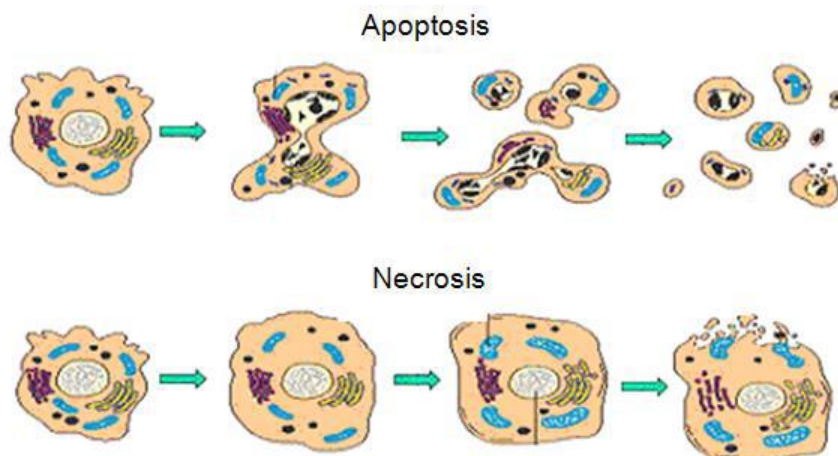


Figura 3. Tipos de muerte celular: apoptosis y necrosis.¹⁸

2.2.1 Apoptosis

Si la replicación o la reparación del ADN o el ensamblaje de los cromosomas son aberrantes, la célula detiene su progresión por el ciclo celular hasta que se corrige esta condición. Esto reduce el número de mutaciones y de anomalías cromosómicas que se acumulan en las células en proliferación. Sin embargo, si el daño en el ADN o en los cromosomas es tan grave que no se puede reparar, la célula puede iniciar una segunda línea defensiva, un proceso denominado

apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis es un proceso controlado genéticamente en el que la célula se autodestruye.¹⁹ Este proceso de autodestrucción celular controlada permite al organismo su correcta morfogénesis, así como su renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia. Esta muerte es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta, la regulación de la respuesta inmunológica, así como la muerte natural de las células diferenciadas en el final de su vida útil.²⁰ Muchos de los mecanismos moleculares de la apoptosis se han conservado a lo largo de la escala evolutiva, desde nematodos hasta mamíferos.²¹

Las moléculas responsables de iniciar la apoptosis y de dirigir los componentes intracelulares son un grupo de proteasas denominadas caspasas.²² La apoptosis se puede dividir en fase de iniciación, cuando las caspasas se activan y en una fase de ejecución, cuando las enzimas causan la muerte celular.²³ Existen dos vías alternativas para activar a las caspasas: una es disparada por cambios en la integridad mitocondrial, denominada vía intrínseca, y la otra es iniciada por señales externas al activar a un receptor de muerte en la superficie celular, denominada vía extrínseca.²⁴

2.2.2 Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es un tipo de muerte accidental, resultante de un daño mecánico o por la exposición a un agente tóxico. En este proceso, la célula que muere activa el sistema inmunitario del huésped.¹⁷

El origen de las alteraciones necróticas es un desequilibrio osmótico; la permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones hacia el interior (principalmente de iones de calcio) que va acompañado de la entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta y algunas rutas metabólicas se alteran debido a las nuevas concentraciones iónicas que se establecen. Así la mayor concentración intracelular de calcio inhibe la producción de ATP a la vez que estimula la síntesis de algunas enzimas proteolíticas, la cromatina nuclear pierde su conformación original y constituye pequeños agregados, mientras que algunos orgánulos membranosos, como el retículo endoplásmico o las mitocondrias, se dilatan por la entrada de agua, los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Como etapa final, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se

fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior promoviendo una respuesta inflamatoria, posteriormente las células fagocíticas degradan los restos.²⁵

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima catalizadora que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones; corresponde a la categoría de las oxidoreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a lactato. Está presente en el citoplasma y se libera al medio al romperse la membrana celular, por lo que al ser detectada extracelularmente se comprueba que la célula murió por necrosis.²⁶

2.3 Capsaicina

La Capsaicina (figura 4) es un compuesto orgánico de origen natural y componente mayoritario de los capsaicinoides, grupo de compuestos que le confieren el efecto de pungencia al fruto de chile (*Capsicum spp*).²

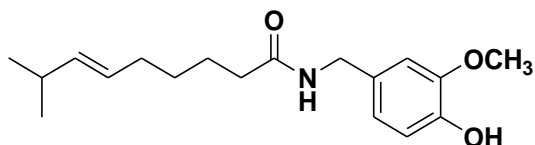


Figura 4. Estructura Capsaicina.

Uno de los principales efectos fisiológicos de la capsaicina es como agonista de los receptores TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid subfamily 1*, por sus siglas en inglés) los cuales son canales catiónicos no selectivos activados por calor ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) y por protones y son fuertemente expresados en neuronas sensoriales.²⁷ La activación de estos receptores ocasiona la liberación endógena de diversos mediadores químicos proinflamatorios, como prostaglandinas, bradicinina y ATP, lo que resulta en la liberación de diversos neurotransmisores, induciendo dolor e inflamación neurogénica, por lo que estos receptores juegan un papel importante en estados de dolor neuropático, inflamación intestinal y otros desórdenes.²⁸ Uno de los muchos neurotransmisores involucrados en los impulsos del dolor es el péptido conocido como sustancia P.²⁹ En la actualidad se sabe que el principal mecanismo por el cual la capsaicina ejerce un efecto analgésico y antiinflamatorio después de un tratamiento prolongado es debido al decremento de la sustancia P en las neuronas sensoriales, ocasionando desensibilización.³⁰

El papel de la capsaicina en relación con el cáncer ha sido polémico; algunos investigadores han publicado que la capsaicina es un carcinógeno,² aunque también se ha demostrado que presenta actividad como agente antineoplásico en líneas tumorales derivadas de epitelio branquial humano (BEAS-2B), adenocarcinoma de epitelio alveolar humano (A549), hepatoma humano (HepG2)³ y células de glioma (C6),⁴ pero la pungencia característica de este compuesto limita su uso en gran medida.

El mecanismo por el cual este vanilloide media los efectos anticancerígenos aun está en discusión, pero se ha encontrado que induce apoptosis en células de leucemia (HTLV-1)⁵ y de próstata (PC3).⁶ También se han reportado que altera el metabolismo de algunos carcinógenos,

como la aflatoxina B1 y la nitrosamina específica del tabaco.³¹ Por los estudios de actividad estructural, la capsaicina tradicionalmente se ha dividido en tres fracciones, la región aromática (A), la amida enlazante (B) y la región lipofílica (C) (figura 5).⁷

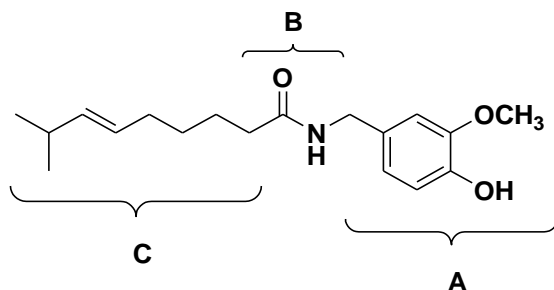


Figura 5. División estructural de la Capsaicina.

A lo largo de la investigación que se ha realizado en torno a la capsaicina, se han modificado la fracción aromática y la fracción amida, y de igual manera han sido ampliamente estudiadas estas modificaciones. Sin embargo, las modificaciones en la fracción acilo son nuevas y se requiere de información al respecto.

2.3.1 Rinvanil y 12-fenilacetilrinvanil

Recientemente se han desarrollado nuevas rutas sintéticas para la preparación de vainillilamidas propuestas como análogos de la capsaicina, las cuales intercambian la fracción proveniente del ácido graso por nuevas fracciones acilo de relevancia biológica, empleadas para investigar los cambios que conlleva esta modificación estructural en el efecto farmacológico ya conocido para capsaicina.^{7,32,33}

En 2005, con la intención de mejorar las cualidades terapéuticas de la capsaicina y disminuir el efecto de pungencia, Appendino y col.,⁷ reportaron la síntesis y evaluación farmacológica como agonistas del receptor TRPV1 de rinvanil y FAR (figura 6). Este último es el agonista de los receptores TRPV1 más potente que ha sido sintetizado y que carece de acción pungente; además posee moderada afinidad por los receptores cannabinoides humanos CB₂, lo que sugiere que la interacción con estos receptores también este contribuyendo al aumento en el umbral del dolor ó efecto analgésico. En términos de afinidad al receptor TRPV1, el FAR es similar a la resiniferatoxina (figura 6), la cual es un producto natural aislado de la planta africana *Euphorbia resinifera* y que es 1000 veces más a fin a este receptor con respecto a capsaicina.³²

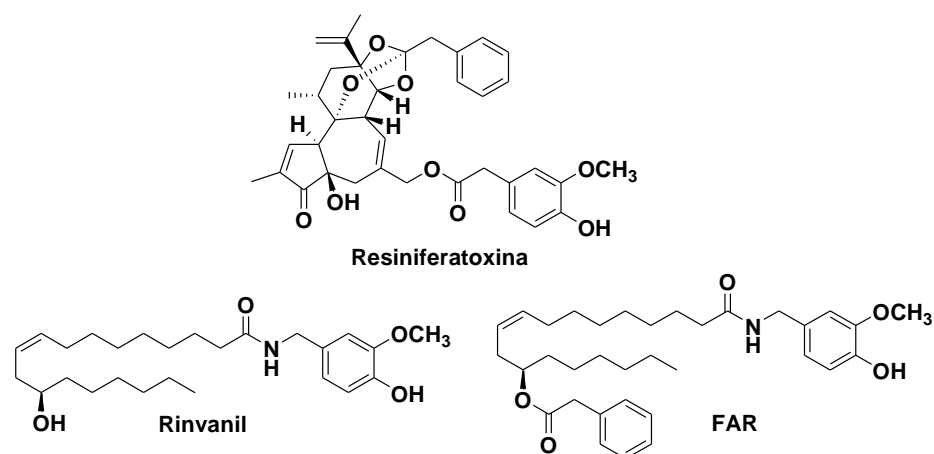
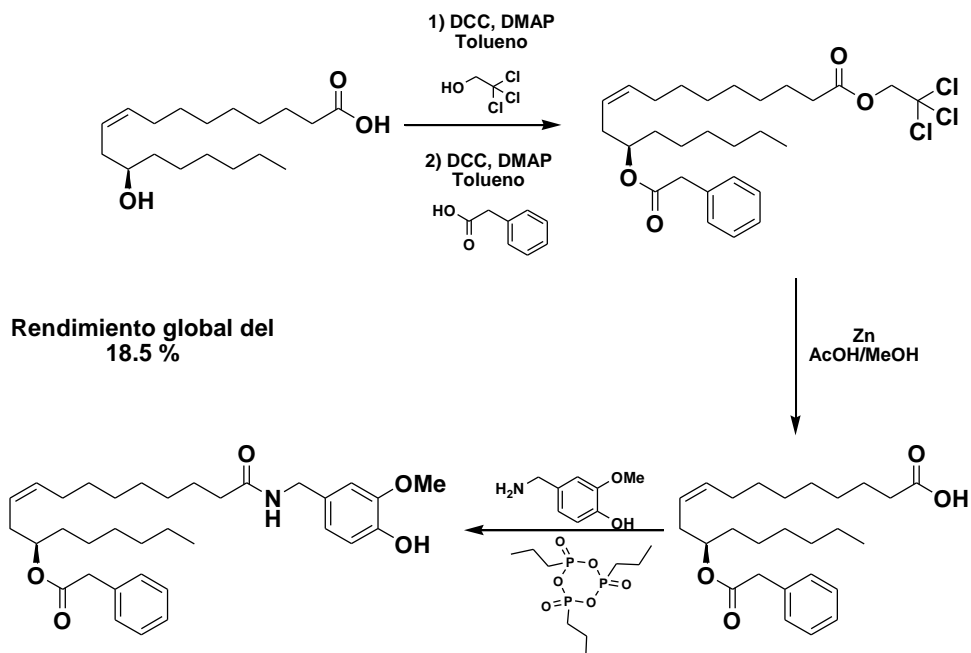


Figura 6. Estructuras de Resiniferatoxina, rinvanil y FAR.

La estrategia reportada por Appendino y col.⁷ para la síntesis de FAR, parte de ácido ricinoleico (esquema 1). El primer paso de la síntesis fue la esterificación del ácido ricinoleico con tricloroetanol y la posterior fenilacetilación del alcohol en posición 12; el diéster resultante se trató con Zn/AcOH para generar el ácido 12-fenilacetilricinoleico, el cual, mediante una amidación con vainillilamina y anhídrido propilfosfónico, produjo FAR con un rendimiento global del 18.5%.



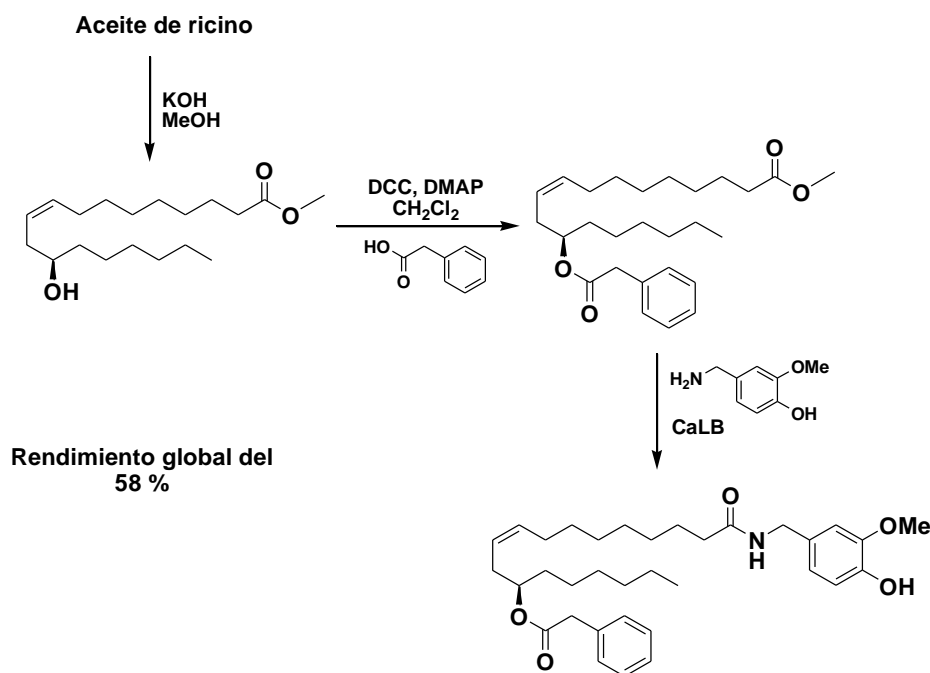
Esquema 1. Síntesis de Appendino para preparación de FAR.

Los inconvenientes de esta estrategia de síntesis son:

1. Emplear como materia prima de partida ácido ricinoleico, el cual es poco accesible debido a su alto costo.

2. El empleo de un grupo protector y su posterior eliminación en el producto final.
3. Bajo porcentaje de rendimiento global de la síntesis.

En 2008, Castillo y col.³² reportaron la síntesis químico-enzimática de FAR, tomando como materia prima de partida aceite de ricino (esquema 2). La primera etapa de síntesis consistió en la transesterificación del tricirinoleilglicerol (componente mayoritario en el aceite de ricino) con metanol para generar el ricinoleato de metilo, el cual, mediante una fenilacetilación del hidroxilo en posición 12 permitió obtener 12-fenilacetilricinoleato de metilo; este último, mediante una amidación con vainillilamina catalizada con CaLB dio lugar a FAR con un rendimiento global del 58%.



Esquema 2. Síntesis de Castillo para preparación de FAR.

En contraste con lo informado por Appendino y col.,⁷ la estrategia sintética de Castillo presenta diversas ventajas, como son:

1. Emplear como materia prima de partida aceite de ricino, el cual es mucho más económico (más de 1000 veces) que el ácido ricinoleico.
2. La implementación de la reacción enzimática para generar a FAR, que permitió realizar la síntesis con una etapa menos de reacción.
3. Rendimiento global del 58 %.

2.4 Enzimas

Las enzimas son compuestos proteicos que pertenecen a un grupo muy amplio de catalizadores naturales, producidos por células para promover reacciones químicas propias de los seres vivos. Un catalizador es una sustancia que altera la energía de activación de una reacción, modificando su velocidad y/o selectividad, y regenerándose al final de ésta. La energía de activación es la cantidad de energía necesaria para inducir en las moléculas un estado reactivo, y así sobrepasar la barrera energética que impide que las reacciones se den de manera espontánea.

Las enzimas son altamente específicas para cierto tipo de sustratos, lo cual está íntimamente relacionado con su arreglo tridimensional. Para que una enzima catalice una reacción, el sustrato debe unirse al sitio activo; a esta unión se le conoce como complejo enzima-sustrato y el resultado es la disminución de la energía de activación, lo que lleva a la formación del producto y la regeneración de la enzima (figura 7).

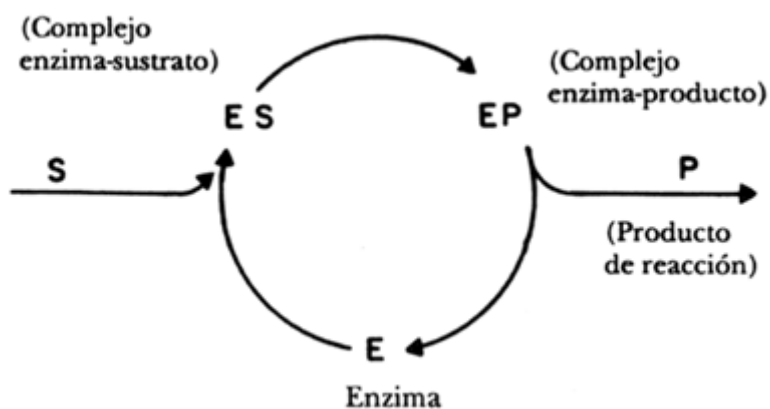


Figura 7. Diagrama de acción catalítica de una enzima.

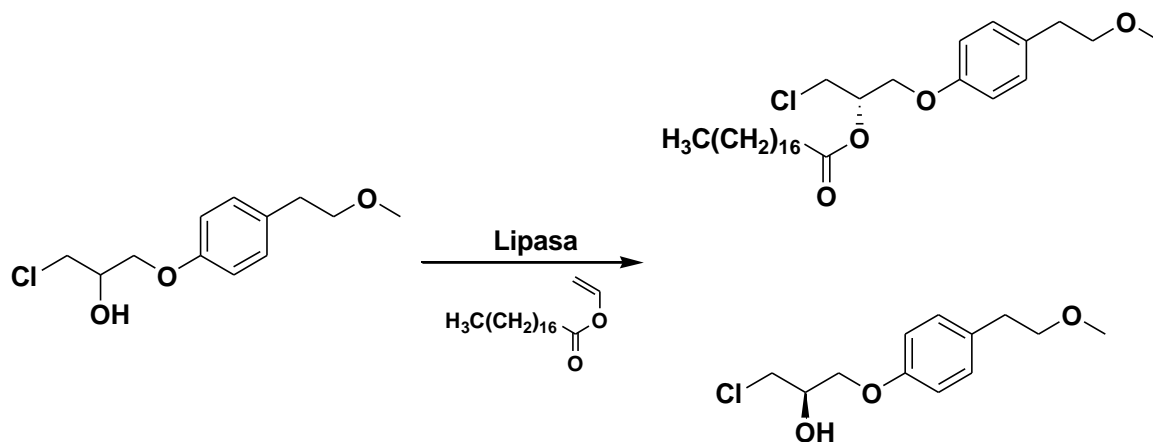
2.4.1 Aplicación en síntesis orgánica

Entender los mecanismos por los cuales las enzimas actúan es de gran importancia para la comunidad científica y la sociedad en general, ya que pueden ser empleadas en muchos procesos industriales, como por ejemplo, en la fabricación de bebidas y alimentos y en la síntesis de diversos sustratos.

El papel de las enzimas en la preparación de productos de insumo y en la fabricación de productos químicos se ha ampliado enormemente. Hoy en día, las aplicaciones de las enzimas son muy variadas, como por ejemplo, en la producción de detergentes, de líquidos para conservación de lentes de contacto, elaboración de lácteos, etc.³⁴ Entre las enzimas más ocupadas en síntesis orgánica y en procesos industriales se encuentran las hidrolasas.³⁵ Se estima que más del 70% de las enzimas empleadas en la industria pertenecen a este grupo.

Las hidrolasas catalizan la ruptura de enlaces de tipo C-O, C-N e incluso de enlaces tipo P-O. Son enzimas comercialmente disponibles, que no requieren cofactor y que presentan una gran versatilidad catalítica, puesto que pueden adoptar diversos arreglos tridimensionales, lo que les permite acomodar en su centro activo una amplia variedad de sustratos.³⁶ Dentro de este grupo de enzimas destacan las amidasas, esterasas, proteasas, nitrilasas y lipasas, que catalizan la hidrólisis de amidas, ésteres, péptidos, nitrilos y triglicéridos, respectivamente.

En la química orgánica, las enzimas tienen gran aplicación en reacciones estereoselectivas y enantioselectivas; ejemplo de ello es la resolución de alcoholes racémicos mediante la transesterificación de diversos sustratos, como son el estearato de vinilo o el acetato de vinilo; un ejemplo es la resolución de la mezcla racémica de la clorohidrina precursora de metoprolol con lipasa (esquema 3).³⁷



Esquema 3. Resolución enzimática de clorohidrina racémica precursora de metoprolol.

2.4.2 Lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB)

Una enzima altamente utilizada en biocatálisis es la CaLB, debido al amplio grupo de reacciones en donde puede tener aplicación (figura 8); un ejemplo es la amidación regioselectiva de 12-fenilacetilricinoleato de metilo con vainillilamina, recientemente reportada por Regla y col.³²

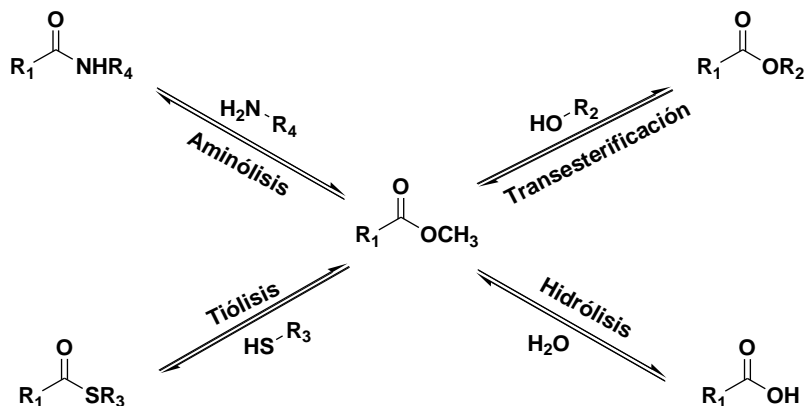


Figura 8. Tipo de reacciones catalizadas por CaLB.³⁸

A diferencia de la gran mayoría de las enzimas, la CaLB, en su forma inmovilizada Novozym 435, tiene eficiencia hasta un límite de temperatura de 80 °C y puede ser empleada con disolventes orgánicos, gracias a su resistencia a la desnaturalización por ellos.³⁹ El mecanismo de acción de la CaLB se puede describir básicamente en tres etapas:³⁸

a) El ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de una serina ubicada en el sitio activo de la enzima sobre el grupo carbonilo, para la formación del intermediario tetrahédrico (figura 9).

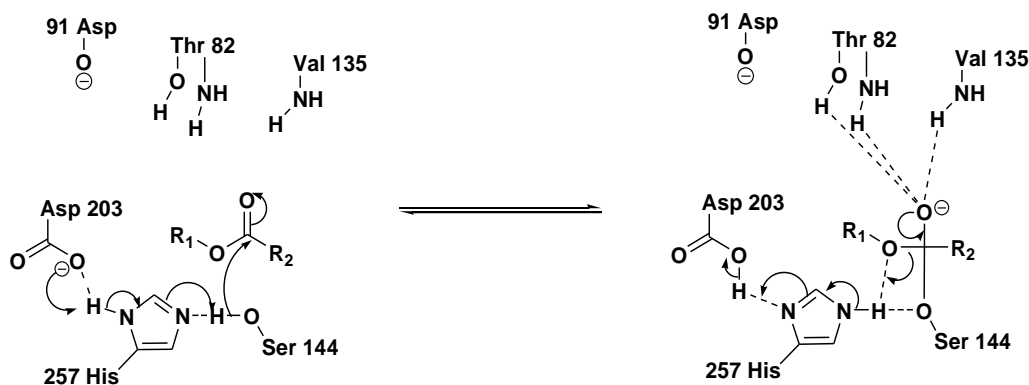


Figura 9. Formación del estado tetrahédrico enzima-sustrato.³⁸

b) Formación del complejo sustrato-enzima (figura 10).

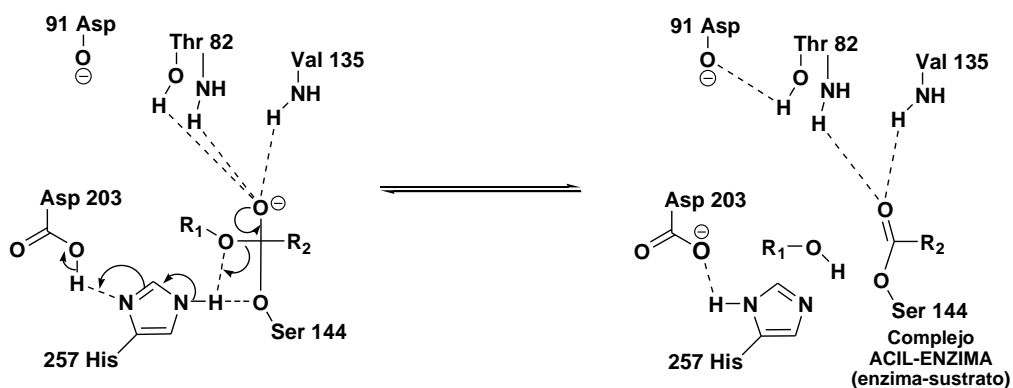


Figura 10. Complejo enzima-sustrato.³⁸

c) El ataque del nucleófilo sobre el complejo sustrato-enzima, con la consiguiente formación del producto y regeneración del sitio activo (figura 11).

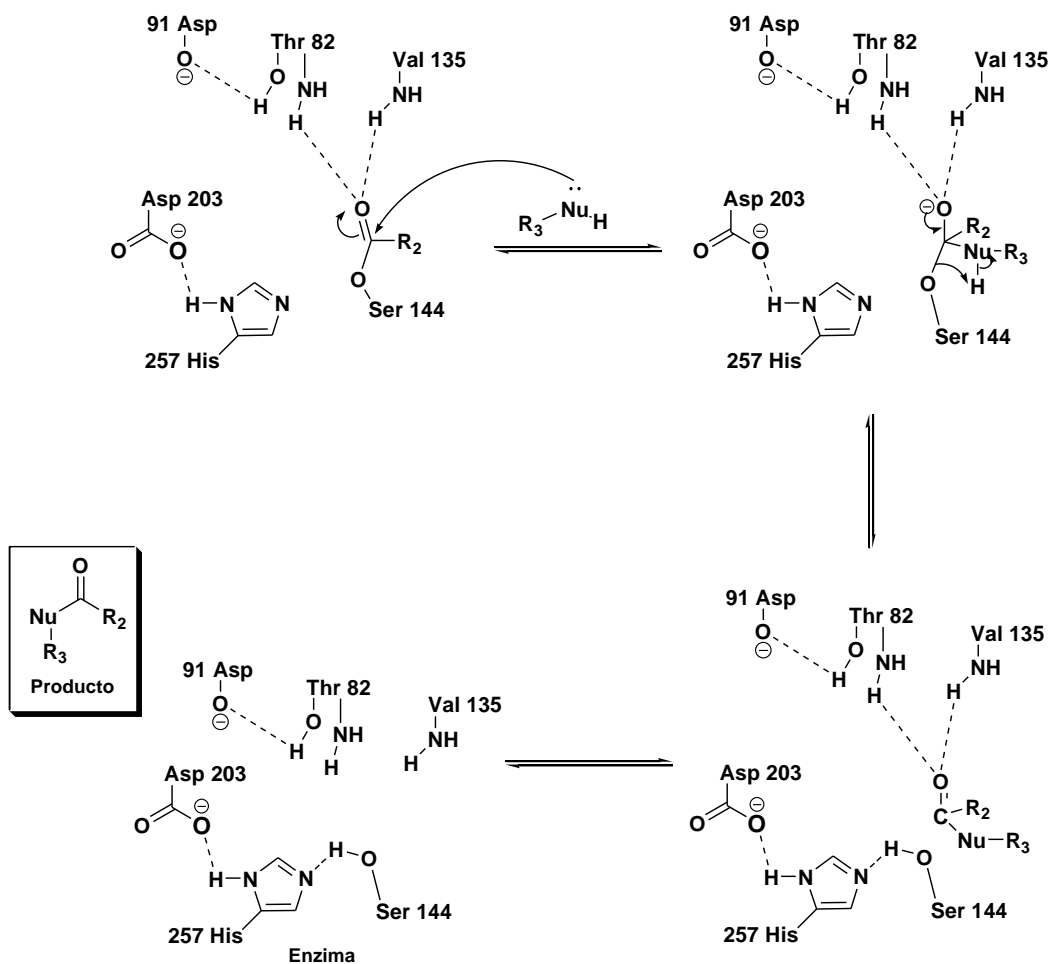


Figura 11. Liberación del producto y regeneración de la enzima.³⁸

2.5 Sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano

Dentro de la química orgánica, una de las áreas más estudiadas y desarrolladas ha sido la heterocíclica, debido a las propiedades estructurales y biológicas que induce la presencia de heteroátomos en moléculas cíclicas. El sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, descrito por primer vez en 1966,⁴⁰ es estructuralmente equivalente a una piperazina, pero con equilibrio conformacional restringido; por un lado, la piperazina presenta dos tipos de inversiones, la inversión piramidal de los sustituyentes del nitrógeno (*inv-N*) y la inversión del anillo (*inv-Anillo*) (figura 12a),⁴¹ mientras que el sistema diazabíclico no sufre la inversión del anillo, debido al puente de metileno que le confiere rigidez, aunque sigue presentando la inversión piramidal del nitrógeno (figura 12b), además de integrar dos centros estereogénicos.

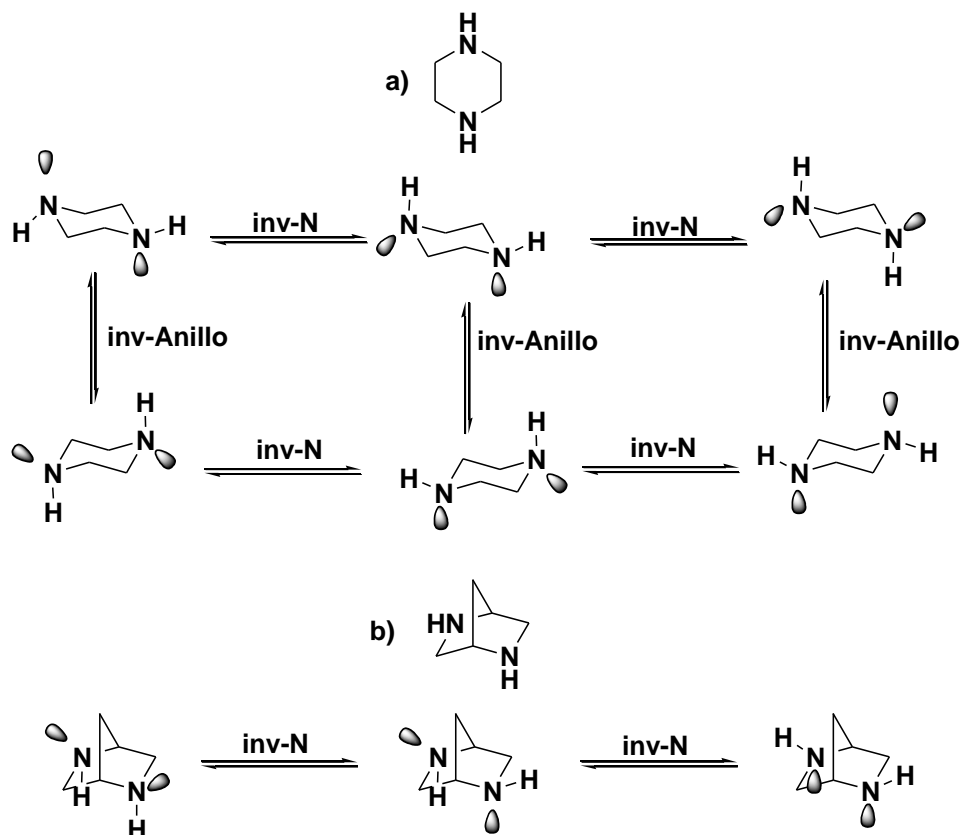


Figura 12. a) Piperazina; b) 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

Este sistema diazabíclico ha sido incorporado en algunas moléculas de carácter medicinal, como son ciertas quinolinas con actividad antibacteriana; tal es el caso de la danofloxacina, un análogo diazabíclico de la ciprofloxacina (figura 13).^{42,43}

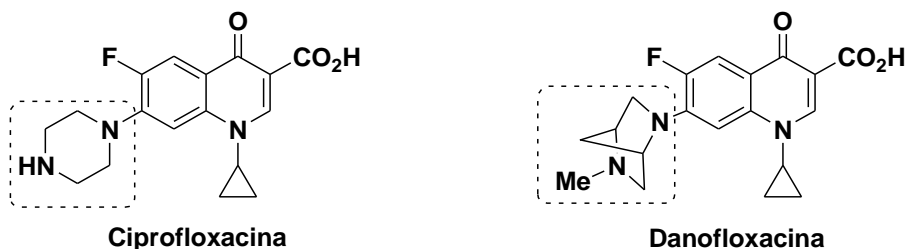


Figura 13. Estructuras químicas de la ciprofloxacina y danofloxacina, esta última sustituye el fragmento de la piperazina por el sistema diazabíciclico.

Otro compuesto que contiene el sistema diazabíciclico en su estructura es el análogo de la dietilcarbamazina, el cual presenta actividad antifilárica (figura 14).⁴⁴

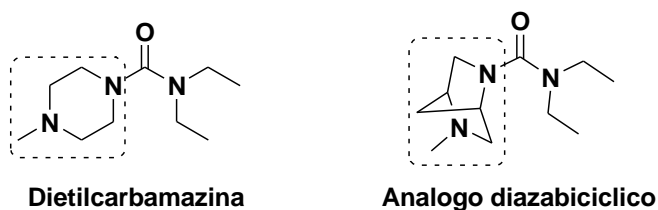


Figura 14. Estructuras de la dietilcarbamazina y su análogo diazabíciclico.

Con base en estas características, el diseño de compuestos que integren el sistema diazabíciclico es la puerta a un interesante campo de investigación.⁴⁵

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un problema prioritario de salud pública en México. Los tumores malignos exigen cada vez mayores recursos hospitalarios, mejores tecnologías de diagnóstico y tratamientos cada vez más costos. La quimioterapia es una herramienta importante en el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer; sin embargo, existe aun la necesidad de encontrar fármacos con mejores cualidades terapéuticas y menores efectos adversos. Lo anterior, aunado a la necesidad de importar estos productos y a su elevado costo, hace que el desarrollo de compuestos con actividad antineoplásica adquiera gran relevancia.

La capsaicina ha mostrado actividad antitumoral; sin embargo, su característica pungencia constituye una limitación para su uso, por lo que se ha dirigido la atención hacia la búsqueda de otros compuestos estructuralmente relacionados que no tengan este inconveniente. Así, por ejemplo, el FAR ha mostrado actividad como agonista de los receptores TRPV1, CB₂ y, más recientemente, como antineoplásico. Debido a lo anterior, se propuso ampliar estos estudios mediante la síntesis de una nueva amida diazabíclicica análoga a FAR, que sustituye el fragmento de vainillilamina, presente en este compuesto, por el sistema (1S,4S)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (figura 15) y su evaluación preliminar como agente antineoplásico en líneas celulares tumorales de cérvix CaSki, HeLa y ViBo.⁸

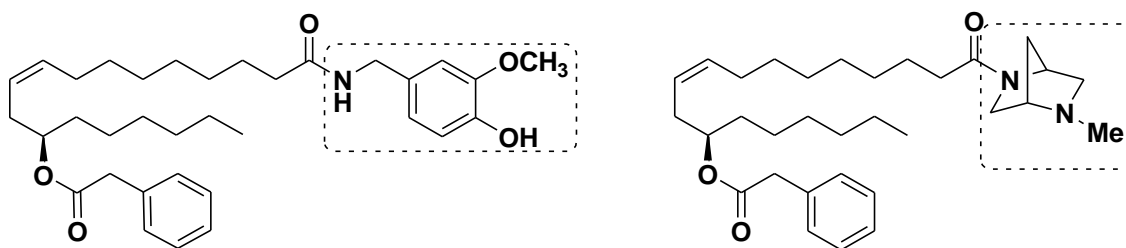
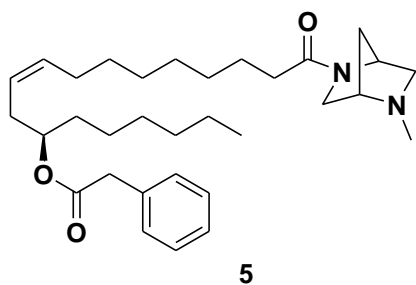


Figura 15. Estructuras de FAR y su análogo diazabíclicico.

4. OBJETIVOS

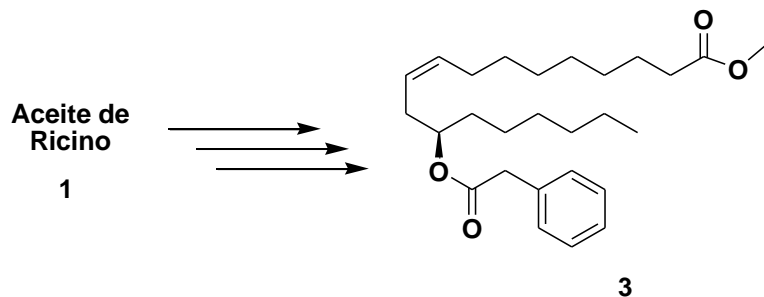
4.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar la amida **5**, análoga de FAR, en la que se sustituye el fragmento de vainillilamina por el sistema (1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

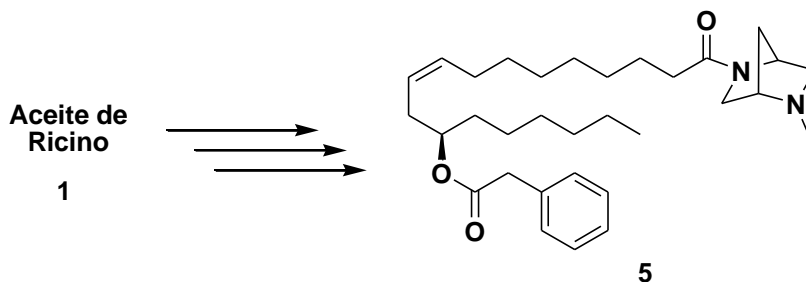


4.2 Objetivos particulares

1. Reproducir lo descrito por Castillo y col.,³² para la síntesis de 12-fenilacetilricinoleato de metilo (**3**) a partir de aceite de ricino (**1**).



2. Sintetizar la amida **5** a partir de aceite de ricino (**1**).



3. Caracterizar cada uno de los intermediarios de reacción, así como la amida final **5**.
4. Remitir 200 mg del producto **5** para su evaluación *in vitro* como anticancerígeno en las líneas celulares de cérvix CaSki, HeLa y ViBo.

5. HIPÓTESIS

Es posible sintetizar fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (**5**), análogo de FAR, con potencial actividad como agente antineoplásico, a partir de materias comercialmente disponibles y aplicando métodos químicos y enzimáticos de síntesis.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Métodos y técnicas generales

Se empleó Lipasa B de *Candida antárctica* (CaLB) en su forma inmovilizada Novozym 435 que fue un donativo de la empresa Novozymes® México. Los reactivos y materias primas fueron adquiridos de Aldrich®.

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, empleando como fase estacionaria gel de sílice; los reveladores que se utilizaron son: radiación ultravioleta 254/366 nm y vapores de yodo. Para las columnas de cromatografía se empleó como fase estacionaria gel de sílice flash (malla 230–400).

Para las reacciones enzimáticas se empleó una incubadora con agitación orbital **Heidolph** mod. **Unimax 1010**. Los productos se caracterizaron por RMN de ^1H y ^{13}C realizada en un equipo **JEOL Eclipse** a 300 MHz, empleando tetrametilsilano como referencia interna y como disolventes se emplearon CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ y D_2O , los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) a partir del tetrametilsilano. Los análisis espectrométricos de masas fueron determinados en un equipo **JEOL** mod. **JMS–SX102A**.

6.2 Materiales

6.2.1 Reactivos y materias primas

- Aceite de ricino*
- Cloruro de pivaloilo*
- 4-Dimetilaminopridina**
- Fosfato ácido de sodio*
- Hidróxido de amonio*
- Novozym 435***
- Sulfato de sodio*
- 2-Metil-(1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano*
- Ácido fenilacético*
- Cloruro de tionilo**
- *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida**
- Fosfato diácido de sodio*
- Hidróxido de potasio*
- Sílice flash***
- Trietilamina**

*Reactivo Analítico Aldrich; **Grado Reactivo Aldrich; ***Alta pureza

6.2.2 Disolventes grado técnico (destilados fraccionadamente)

- Acetato de Etilo*
- Agua*
- Hexano*
- Éter metiliterbutílico*
- Acetona*
- Cloruro de metileno**
- Metanol*
- Tolueno**

*Destilado; **Anhidro

6.2.3 Cristalería

- Adaptador para termómetro
- Cámaras de elución
- Columna de fraccionamiento
- Embudos
- Embudos de separación
- Matraces bola
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas
- Refrigerantes
- Trampas de humedad
- Viales
- Cabeza de destilación
- Cola de destilación
- Columnas para cromatografía
- Embudos de adición
- Frascos con sello hermético
- Matraces bola de tres bocas
- Matraces kitazato
- Reductores
- Tapones
- Vasos de precipitados

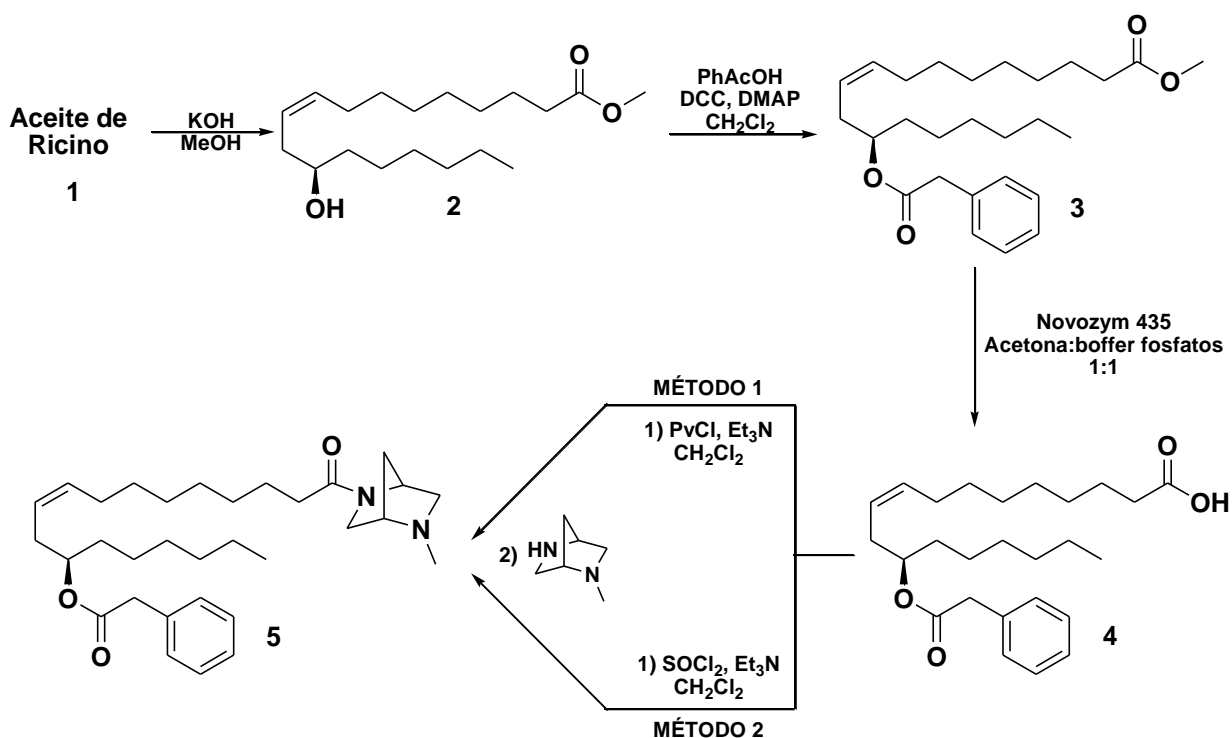
6.2.4 Materiales y equipos

- Aceite de silicón para baños
- Algodón
- Balanza analítica; OHAUS mod. EP64C
- Canastillas de calentamiento
- Mangueras de látex
- Parrilla de agitación; IKA mod. RET-CV-S1
- Agitadores magnéticos
- Anillo metálico
- Bomba de vacío; Vacuubrand mod. MZ2CNT
- Lámpara de UV; UVP mod. UVGL-58
- Micro-pipetas; Gilson mod. EK91997
- Papel filtro

- Pinzas de tres dedos
- Reóstatos; ESTACO-ENERGY mod. 3PN1010B
- Rotavapor; Büchimod. R-205
- Sonicator; Aquasonic mod. 150D
- Soporte universal
- Termómetro de mercurio

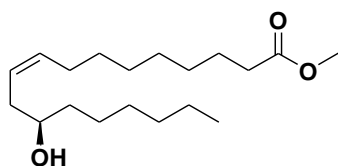
7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Esquema general de síntesis



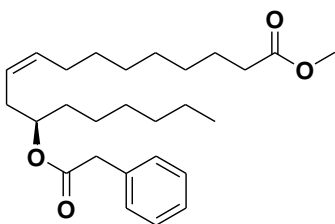
Esquema 4. Ruta de síntesis para la obtención del análogo diazabíclico de FAR.

7.2 Ricinoleato de metilo (2)



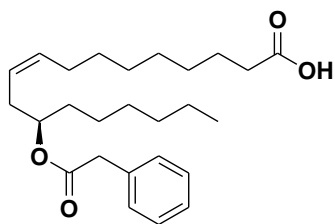
En un matraz esférico de 500 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 20.1 g (85 % de tricinoleilglicerol, 17.1 g, 18.3 mmol) de aceite de ricino (**1**) en 155 mL de metanol y se adicionaron 60 mg (0.30 % con respecto al peso de **1**) de hidróxido de potasio. La mezcla se colocó a reflujo por 30 min y se verificó el termino de reacción por CCF (Hex:MTBE 85:15). Se adicionaron 61 μL (1 equivalente con respecto a KOH) de ácido acético y la mezcla de reacción se concentro a sequedad en el rotavapor. El residuo se disolvió en 50 mL de hexano y se lavó con agua (2 X 30 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en el rotavapor, obteniendo 19.5 g de producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (195 g de sílice flash, fase móvil Hex:MTBE 6:4) obteniendo 14.5 g de **2** como producto puro.

7.3 12-Fenilacetilricinoleato de metilo (3)



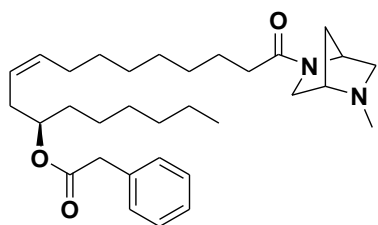
En un matraz esférico de tres bocas de 250 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 13.5 g (43 mmol) de **2** y 11.7 g (85.7 mmol) de ácido fenilacético en 150 mL de CH_2Cl_2 . La mezcla se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se adicionaron 17.6 g (85.7 mmol) de DCC, dejando agitar por 10 min. Se adicionaron 6.3 g (30 mmol) de DMAP y se dejó agitar por 1 h a temperatura ambiente. La mezcla se colocó a reflujo por 20 min, verificando el término de la reacción por CCF (Hex:AcOEt 85:15). La reacción se enfrió, se filtró sobre celita y el residuo se concentró a sequedad en el rotavapor obteniendo 24.68 g del producto crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (480 g de sílice flash, fase móvil Hex:AcOEt 9:1) para generar 16.37 g de **3** como producto puro.

7.4 Ácido 12-fenilacetilricinoleico (4)



En un frasco con sello hermético de 500 mL se disolvieron 2.1 g (5 mmol) de 12-fenilacetilricinoleato de metilo (**3**) en 200 mL de una solución 1:1 de acetona:buffer fosfatos 50 mmolar. Se adicionaron 0.2 g (1 mg por mL de mezcla) de Novozym 435 y la mezcla se colocó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y 350 rpm durante 1 h, verificando el término de la reacción por CCF (Hex:MTBE 8:2). La reacción se concentró hasta eliminar completamente la acetona y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 X 50 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se concentró a sequedad en el rotavapor obteniendo 2.2 g de crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (22 g de sílice flash, fase móvil Hex:AcOEt 92:8) obteniendo 1.8 g de **4** como producto puro.

7.5 Fenilacetato de (1R,3Z)-1-hexil-12-[(1S,4S)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (5)



Método 1

En un matraz esférico de 25 mL provisto de agitación magnética se agregaron 834mg (2 mmol) de ácido 12-fenilacetilricinoleico (**4**) y fueron enfriados a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se adicionaron 500 μL (815 mg, 7 mmol) de cloruro de tionilo lentamente y la mezcla de reacción

se dejó agitar por 10 min, verificando el término de la reacción por CCF (Hex:AcOEt 8:2). La mezcla de reacción se concentró en el rotavapor para eliminar el exceso de cloruro de tionilo y el residuo se disolvió en 10 mL de CH₂Cl₂ y se adicionaron 450mg (4 mmol) de 5-metil-(1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (**S,S-14**) y 800 mg (1.1 mL, 8 mmol) de trietilamina, dejando agitar por 12 h a temperatura ambiente y verificando el término de la reacción por CCF (CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH 9:1:1). La mezcla de reacción se concentró en el rotavapor, obteniendo 1.3 g de crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (30 g de sílice flash, fase móvil CH₂Cl₂:MeOH 95:5) para obtener 190 mg de **5** como producto puro.

Método 2

En un matraz esférico de 25 mL provisto de agitación magnética se disolvieron 834mg (2 mmol) de ácido 12-fenilacetilricinoleico (**4**) y 404 mg (556 µL, 4 mmol) de trietilamina en 10 mL de CH₂Cl₂. La mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionaron 241 mg (2 mmol) de cloruro de pivaloilo, dejando agitar por 10 min y verificando el término de la reacción por CCF (Tolueno:THF:AcOH 90:9:1). Se adicionaron 225 mg (2 mmol) de **S,S-14** y se dejó agitar por 15 min a temperatura ambiente, verificando el término de la reacción por CCF (CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH 9:1:1). La reacción se lavó con agua (2 X 5 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a sequedad en el rotavapor obteniendo 950 mg de crudo, el cual se purificó por cromatografía en columna (9.5 g de sílice flash, fase móvil CH₂Cl₂:MeOH 95:5) para generar 610 mg de **5** como producto puro.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Tabla de resultados

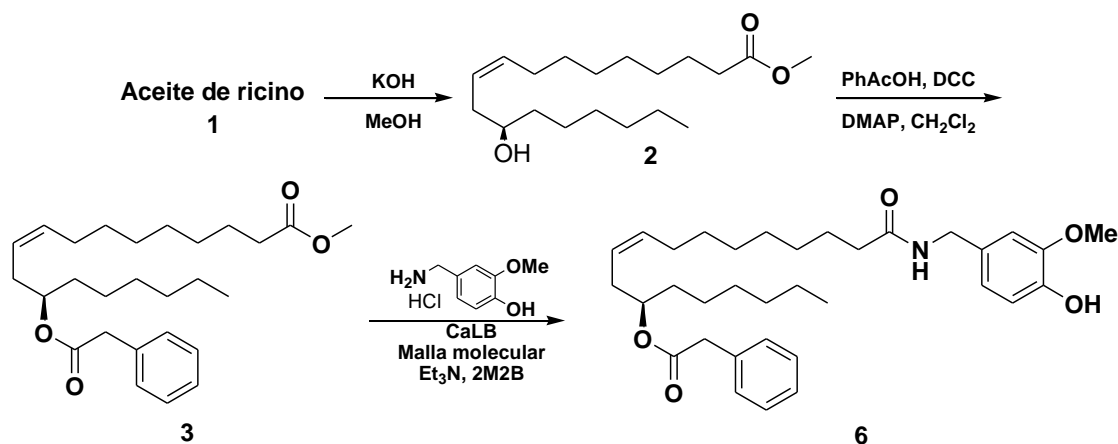
TABLA 1

Rendimientos, apariencia y análisis para la identificación de los compuestos preparados en este trabajo.

Compuesto	Rendimiento (%)	Apariencia	Análisis identificación
2	85	Aceite incoloro	RMN (H y ¹³ C)
3	89	Aceite incoloro	RMN (H y ¹³ C)
4	89	Aceite ligeramente amarillo	RMN (H y ¹³ C)
5 (método 1)	19	Aceite ligeramente amarillo	RMN (H y ¹³ C), Espectrometría de masas
5 (método 2)	60		

8.2 Síntesis de 12-fenilacetilrinvanil (**6**)

Para realizar los ensayos como agente anticancerígeno del compuesto **5**, fue necesario emplear FAR (**6**) como compuesto de referencia.⁴⁶ Este compuesto se prepara de acuerdo a lo reportado por Castillo y col.,³² en donde el primer paso de síntesis consiste en la transesterificación de los triglicéridos en el aceite de ricino (**1**), para generar ricinoleato de metilo (**2**), el cual, mediante una reacción de tipo Steglich, es esterificado en el alcohol de la posición 12 para producir el diéster **3** con un rendimiento de 74 %. La obtención de FAR (**6**) se realizó por aminólisis enzimática regioselectiva del éster metílico catalizada con Novozym 435, con un rendimiento del 79 % (esquema 5). El rendimiento global es del 58 %.



Esquema 5. Síntesis de FAR.³²

La esterificación de Steglich es una reacción que se lleva a cabo en condiciones suaves, permitiendo la conversión de sustratos que son lábiles en medio ácido. Esta reacción se puede describir en cuatro etapas: a) la formación del carboxilato de DMAP; b) el ataque nucleofílico del carboxilato a DCC, lo que tiene como consecuencia la generación de un intermediario más reactivo; c) el ataque nucleofílico de DMAP al carbonilo del intermediario y d) por último, el ataque nucleofílico del alcohol, lo que tiene como consecuencia la formación de *N,N'*-diciclohexilurea, la regeneración de DMAP y la formación del éster correspondiente (figura 16).

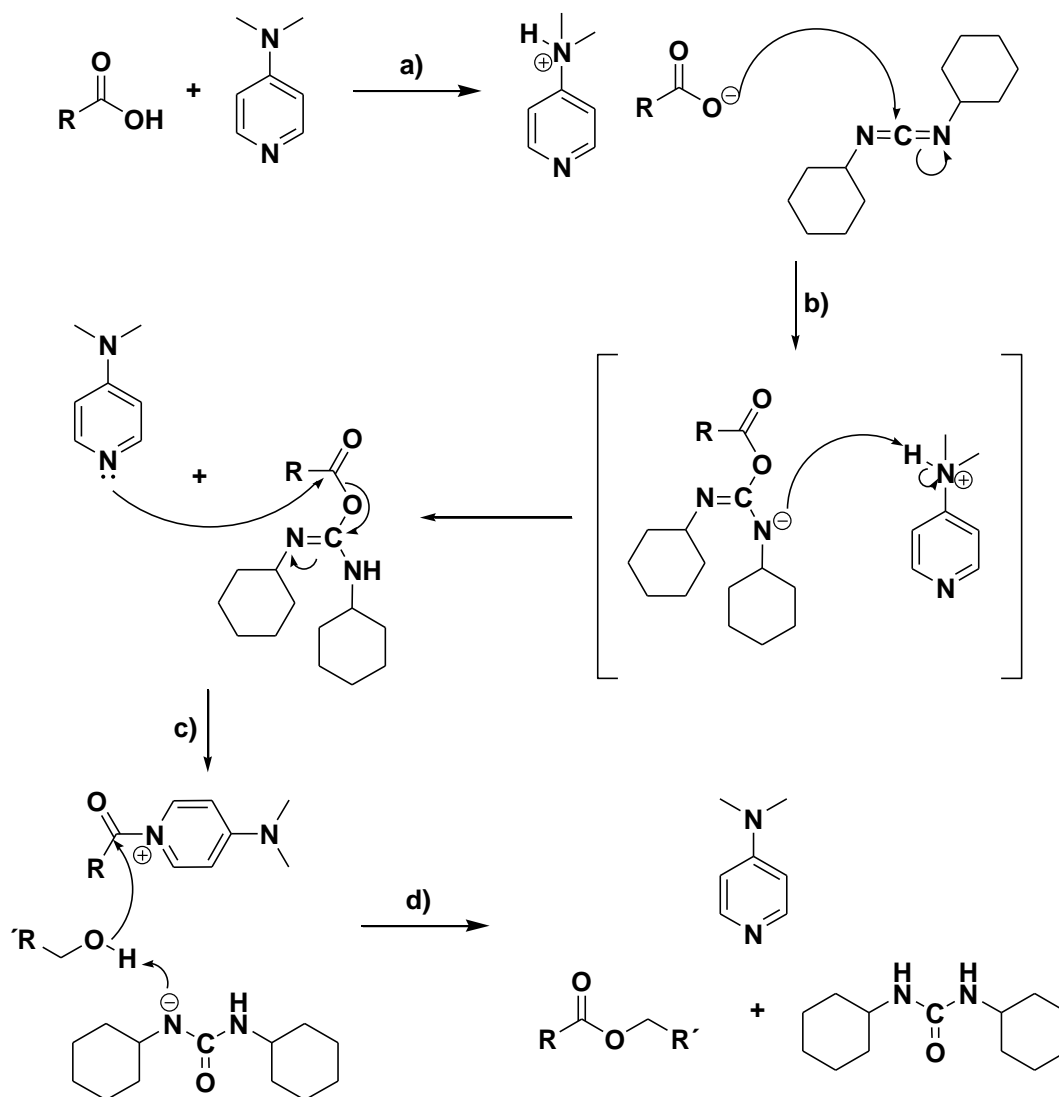


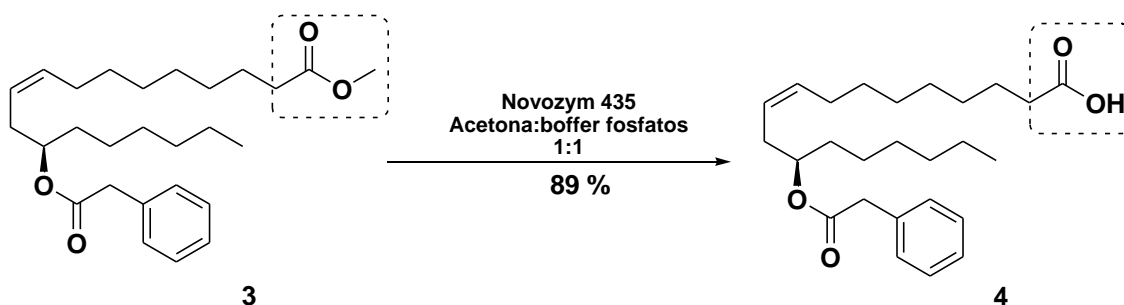
Figura16. Mecanismo de reacción de esterificación de Steglich.

El empleo del método de Steglich permitió obtener 12-fenilacetilricinoleato de metilo (**3**) sin afectar al éster metílico de **2**, el cual probablemente no se hubiera obtenido con buen

rendimiento empleando una esterificación clásica, debido a que este tipo de reacción se realiza utilizando catálisis ácida, lo que podría provocar la hidrólisis del éster metílico debido a que se libera agua como subproducto en este tipo de esterificación.

8.3 Síntesis y caracterización de ácido 12-fenilacetilricinoleico (4)

Uno de los grandes beneficios que surge al emplear enzimas como catalizadores, es la capacidad de plantear transformaciones regioselectivas de diferentes sustratos, esto debido a que son capaces de diferenciar, dentro de una molécula, entre dos o más grupos funcionales que presentan características similares de reactividad y que los métodos químicos convencionales de síntesis no lograrían discriminar. El problema al intentar obtener al compuesto **4**, fue plantear una estrategia que permitiera la hidrólisis regioselectiva del éster metílico presente en 12-fenilacetilricinoleato de metilo (**3**), lo cual se logró mediante una hidrólisis enzimática catalizada con Novozym 435 y obteniendo un rendimiento del 89 % (esquema 6).



Esquema 6. Síntesis del ácido 12-fenilacetilricinoleico (4).

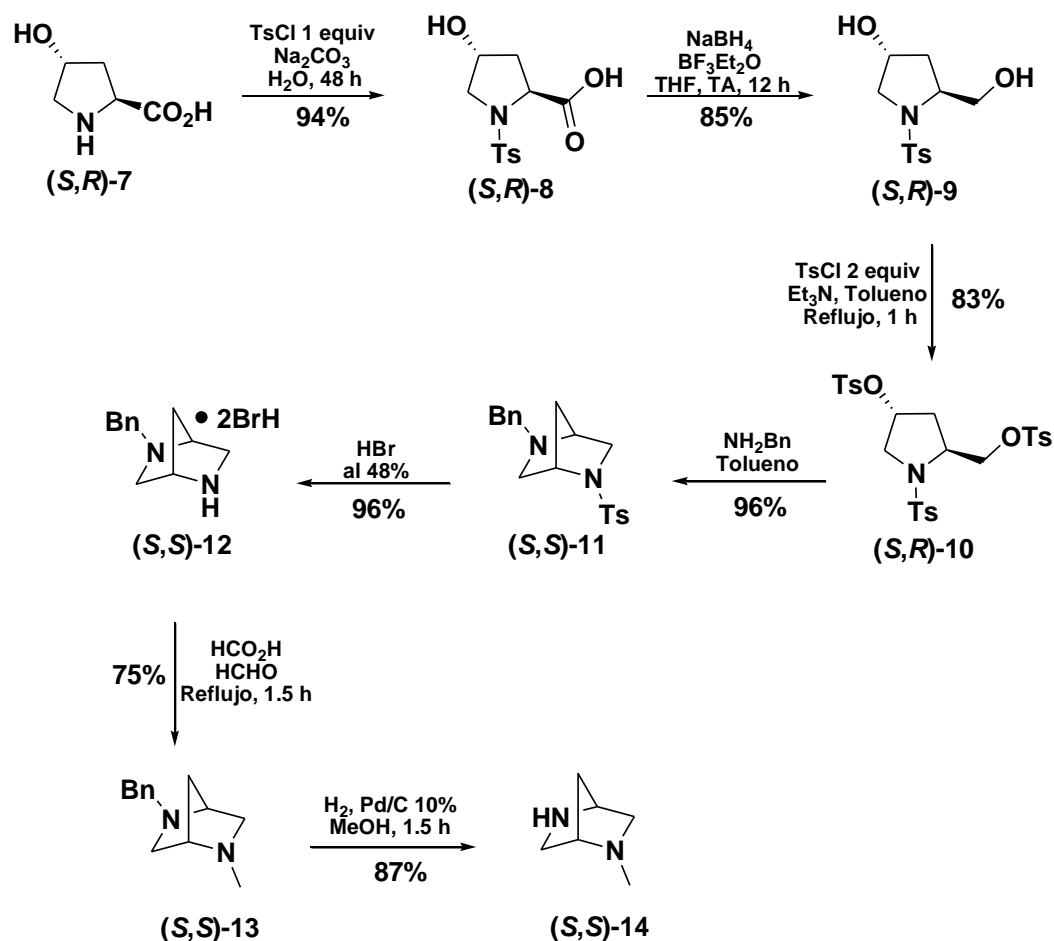
El compuesto **4** se caracterizó mediante **RMN ¹H** (200 MHz): δ 0.86 (t, J=6.6 Hz, 3H), 1.21-1.30 (m, 16H), 1.49-1.66 (m, 4H), 1.84-2.08 (m, 2H), 2.20-2.40 (m, 4H), 3.59 (s, 2H), 4.87 (q, J=6.2 Hz, 1H), 5.21-5.33 (m, 1H), 5.37-5.50 (m, 1H), 7.23-7.32 (m, 5H), 9.66 (bs, 1H); **RMN ¹³C** (68 MHz): δ 14.05, 22.50, 24.61, 25.16, 27.23, 29.04, 29.46, 31.65, 31.86, 33.50, 34.00, 41.72, 74.46, 124.12, 126.91, 128.43, 129.19, 132.57, 134.22, 171.37, 179.97 (**anexo 10.3**).

Las señales observadas en el espectro de **RMN ¹H** para **4** que hicieron posible la caracterización del mismo fueron: la señal triple que aparece en 0.86 ppm se el cual se atribuye a los hidrógenos del metilo terminal; la señal simple en 3.59 ppm corresponde a los hidrógenos del

metileno del fragmento de fenilacetilo; la señal quintuple que aparece en 4.87 ppm corresponde al hidrógeno del carbono asimétrico 12; las señales múltiples que aparecen entre 5.21 y 5.50 ppm corresponden a los hidrógenos vinílicos de los carbonos 9 y 10; la señal múltiple que aparece entre 7.23 y 7.32 ppm se atribuye a los hidrógenos del anillo aromático; la señal simple ensanchada en 9.66 ppm corresponde al hidrógeno del ácido carboxílico.

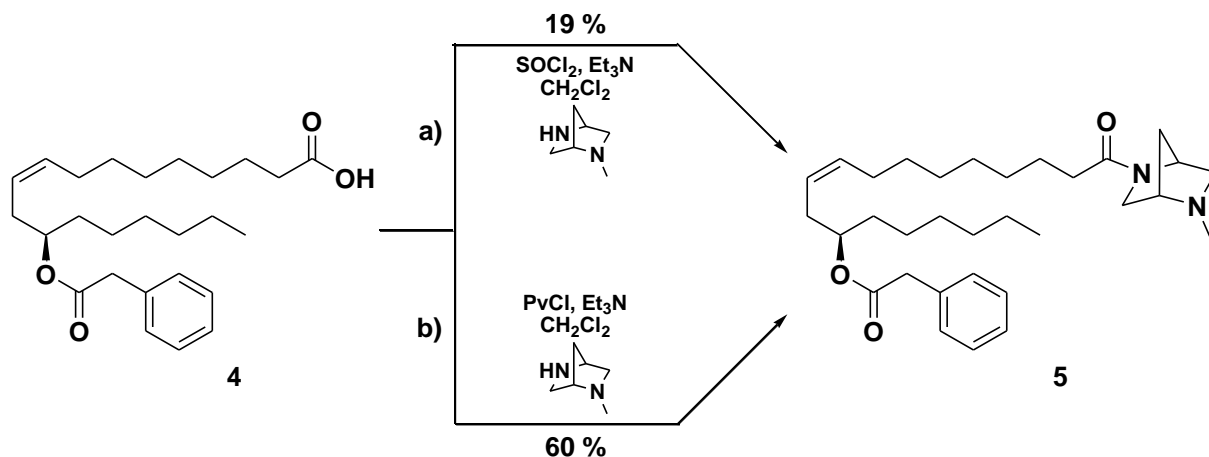
8.4 Síntesis y caracterización de fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (**5**)

Para la preparación de la aminoamida **5**, análogo diazabicyclíco de FAR, se utilizó (1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano [(*S,S*)-**14**],⁴⁶ el cual se prepara apartir de *trans*-hidroxi-L-prolina, según el método reportado por Melgar y col.⁴⁵ en un rendimiento global de 40 % (esquema 7).



Esquema 7. Ruta de síntesis de (1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano [(*S,S*)-**14**].

Para la obtención de **5** se emplearon dos métodos: el primero consistió en la formación del correspondiente cloruro de acilo de **4** con cloruro de tionilo y su posterior amidación con la diamina (**S,S**)-**14**, permitiendo obtener la aminoamida **5** con un rendimiento del 19 %. El segundo método consistió en la formación del anhídrido mixto del compuesto **4** con cloruro de pivaloilo y su posterior amidación con la diamina (**S,S**)-**14**, generando el compuesto **5** con un rendimiento del 60 % (esquema 8).



Esquema 8. Ruta de síntesis de **5**; a) método uno; b) método dos.

La primera alternativa produjo la aminoamida **5** con un rendimiento bajo, probablemente debido al deterioro que sufre el cloruro de acilo intermedio durante el aislamiento; una de las explicaciones puede ser que la reactividad de este tipo de compuestos es muy alta, por lo que se degradan con facilidad.

El mecanismo que explica la transformación de ácido 12-fenilacetilricinoleico al compuesto **5** mediante el método uno, se puede describir en tres etapas:

- El ataque nucleofílico del ácido carboxílico a cloruro de tionilo y la liberación de un ion cloruro, generando un anhídrido clorosulfónico intermediario.
- El ataque nucleofílico del cloruro al carbonilo, provocando el desplazamiento de dióxido de azufre y liberación de cloruro de hidrógeno (atrapado con trietilamina), lo que produce el cloruro de acilo.
- El ataque nucleofílico de la diamina (**S,S**)-**14** al carbonilo del cloruro de acilo (atrapado con trietilamina), con liberación de cloruro de hidrógeno, lo que tiene como consecuencia la formación de la aminoamida **5** (figura 17).

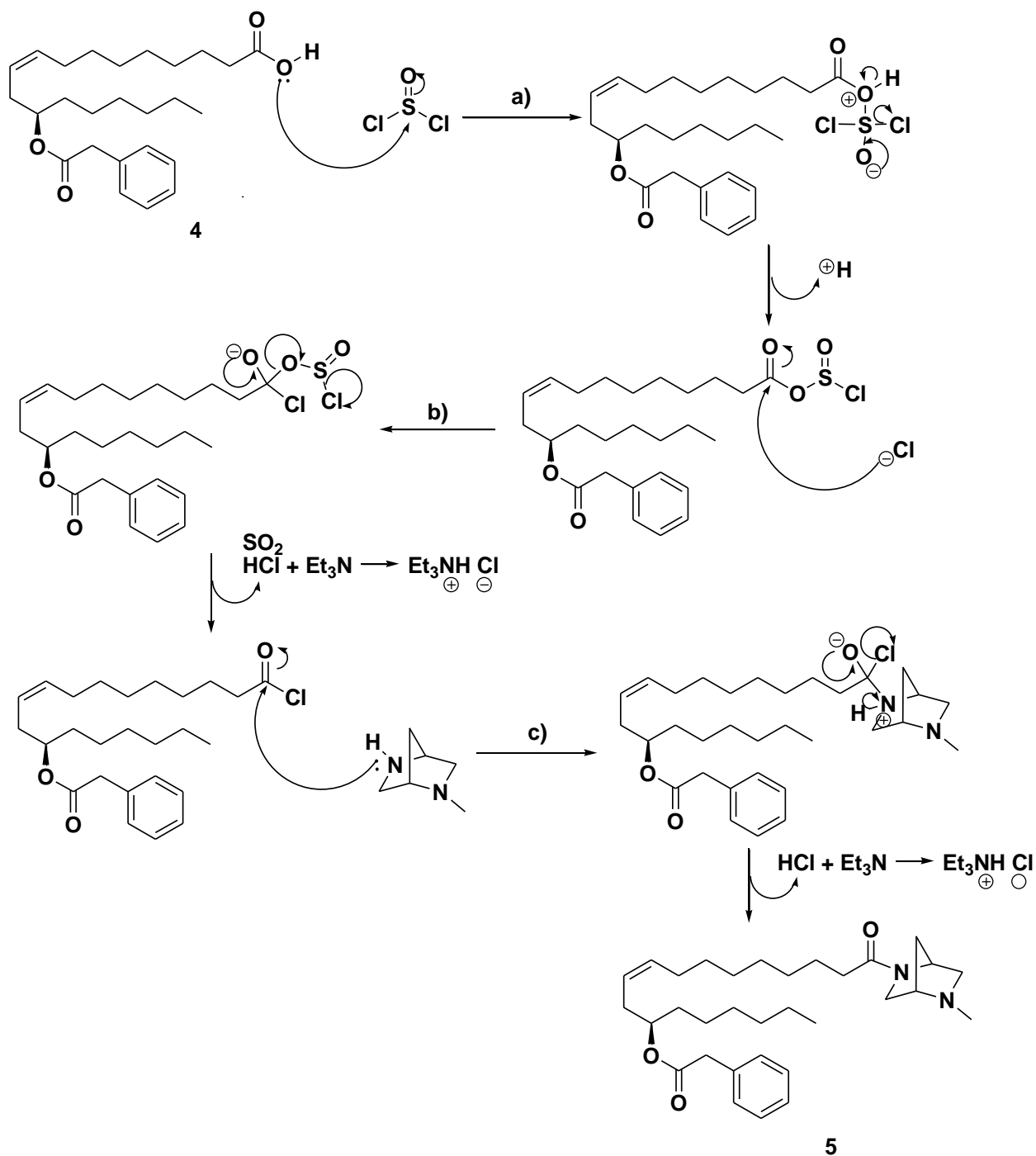


Figura17. Mecanismo de reacción para la síntesis de 5; método uno.

El segundo método evita la necesidad de aislar el intermedio reactivo, debido a que el anhídrido mixto intermediario no requiere de aislamiento, pudiendo reaccionar *in situ* con la diamina (**S,S**)-14. Otra ventaja que presenta la estrategia del anhídrido mixto piválico es que la adición nucleofílica de la diamina es selectiva al carbonilo del fragmento de fenilacetilricinoilo,

puesto que el carbonilo proveniente del pivaloilo presenta alto impedimento estérico debido al *ter*butilo.

El mecanismo que explica la generación de **5** a partir de ácido 12-fenilacetilricinoleico empleando el método dos se puede describir en dos etapas:

- El ataque nucleofílico del ácido carboxílico a cloruro de pivaloilo, con liberación de cloruro de hidrógeno (atrapado con trietilamina), lo que genera un anhídrido mixto.
- El ataque nucleofílico de la diamina (**(S,S)**-**14**) al carbonilo del anhídrido mixto con la posterior liberación de ácido pívico (atrapado con trietilamina), lo que tiene como consecuencia la formación de la aminoamida **5** (figura 18).

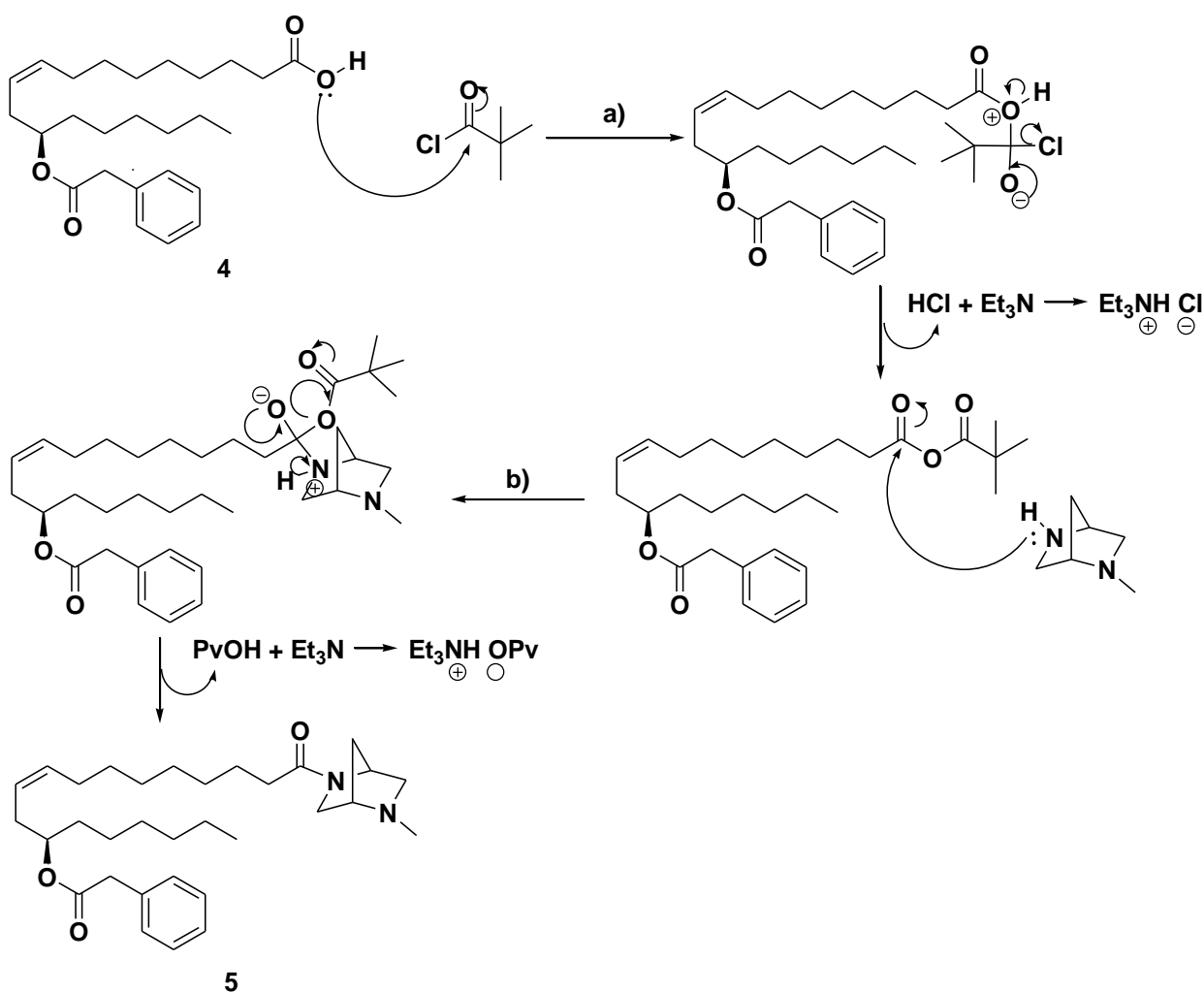


Figura18. Mecanismo de reacción para la síntesis de **5**; método dos.

El compuesto **5** se caracterizó mediante **RMN ¹H** (300 MHz): δ 0.90 (t, J=7.2 Hz, 3H), 1.28-1.35 (m, 16H), 1.48-1.66 (m, 4H), 1.77 (d, J=10.5 Hz, 1H), 1.85-2.02 (m, 3H), 2.11-2.36 (m, 4H), 2.41-2.42 (m, 3H), 2.45-2.75 (confórmeros endo/exo, sistema AB, J=7.6 Hz, 1H), 2.79-3.08 (confórmeros endo/exo, sistema ABX, J₁=7.6 Hz, J₂=0.4 Hz, 1H), 3.21-3.31 (confórmeros endo/exo, sistema ABX, J₁=7.6 Hz, J₂=0.4 Hz, 1H), 3.48 (bs, 1H), 3.55-3.71 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 4.21-4.75 (confórmeros endo/exo, bs, 1H), 4.87 (q, J=6.2 Hz, 1H), 5.21-5.33 (m, 1H), 5.37-5.50 (m, 1H), 7.21-7.32 (m, 5H); **RMN ¹³C** (100 MHz): δ 13.95, 22.41, 25.07, 27.19, 28.95, 29.05, 29.24, 29.33, 29.42, 31.56, 31.80, 33.45, 41.65, 47.70, 50.12, 56.05, 58.75, 61.09, 61.27, 61.73, 62.93, 74.35, 124.04, 126.83, 128.36, 129.12, 132.53, 134.24, 170.45, 170.91, 171.19; **EM (FAB⁻)** (% m/z): 511 [ión molecular (C₃₂H₅₀N₂O₃), 100 %], 375 [pico base (C₂₄H₄₃N₂O⁺), 63 %], 113, 82, 68, 55, 44 (**anexo 10.4**).

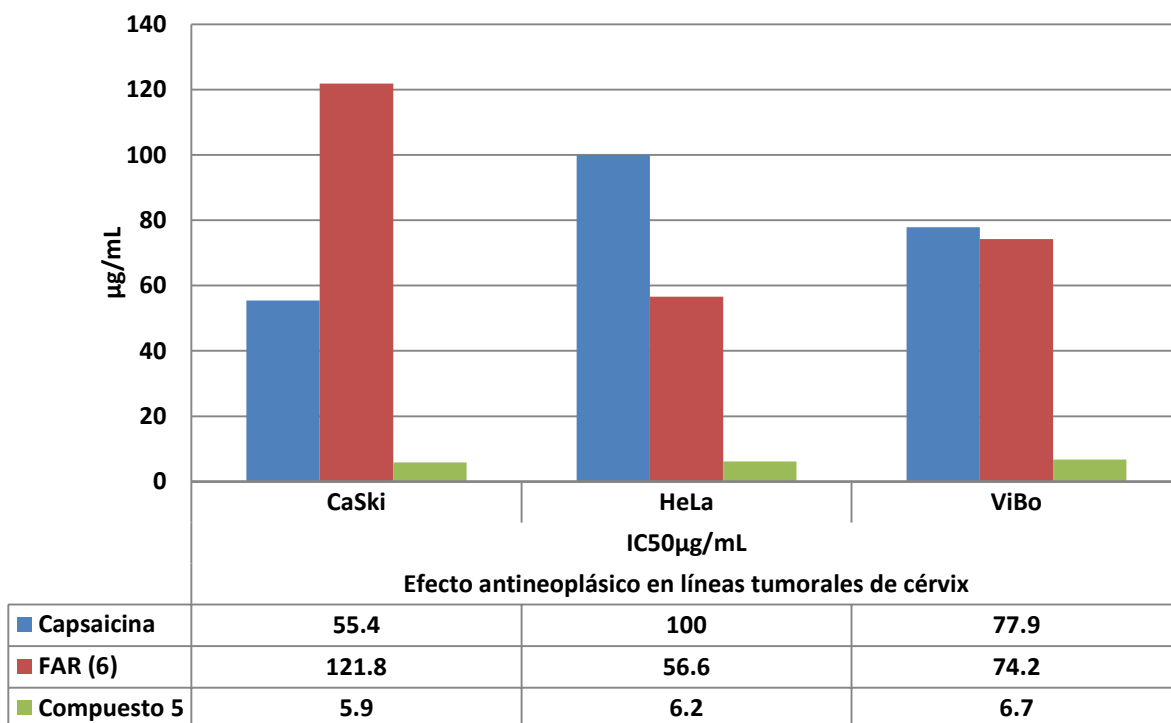
Las señales observadas en el espectro de **RMN ¹H** para **5** que hicieron posible la caracterización del mismo fueron: la señal triple que aparece en 0.90 ppm se atribuye a los hidrógenos del metilo terminal; la señal doble que aparece en 1.77 ppm corresponde a uno de los hidrógenos del puente de metileno del dizabicyclo; la señal simple en 3.58 ppm corresponde a los hidrógenos del metileno del fragmento de diazabicyclo; la señal quintuple que aparece en 4.87 ppm corresponde al hidrógeno del carbono asimétrico 12; las señales múltiples que aparecen entre 5.21 y 5.50 ppm corresponden a los hidrógenos vinílicos de los carbonos 9 y 10; la señal múltiple que aparece entre 7.21 y 7.33 ppm se atribuye a los hidrógenos del anillo aromático. El ión molecular observado en el espectro de masas ratifica la identidad del compuesto **5**.

8.5 Evaluación farmacológica de fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (5).

Los ensayos farmacológicos preliminares del compuesto **5** como agente antineoplásico,⁸ mostraron que esta molécula presentó mayor actividad que la presentada por FAR (**6**) y capsaicina, en las tres líneas celulares tumorales de cérvix CaSki, HeLa y ViBo, (gráfica 1).

Gráfica 1

Comparación de actividad antineoplásica entre el análogo **5**, FAR (**6**) y capsaicina en líneas celulares tumorales de cérvix CaSki, HeLa y ViBo.



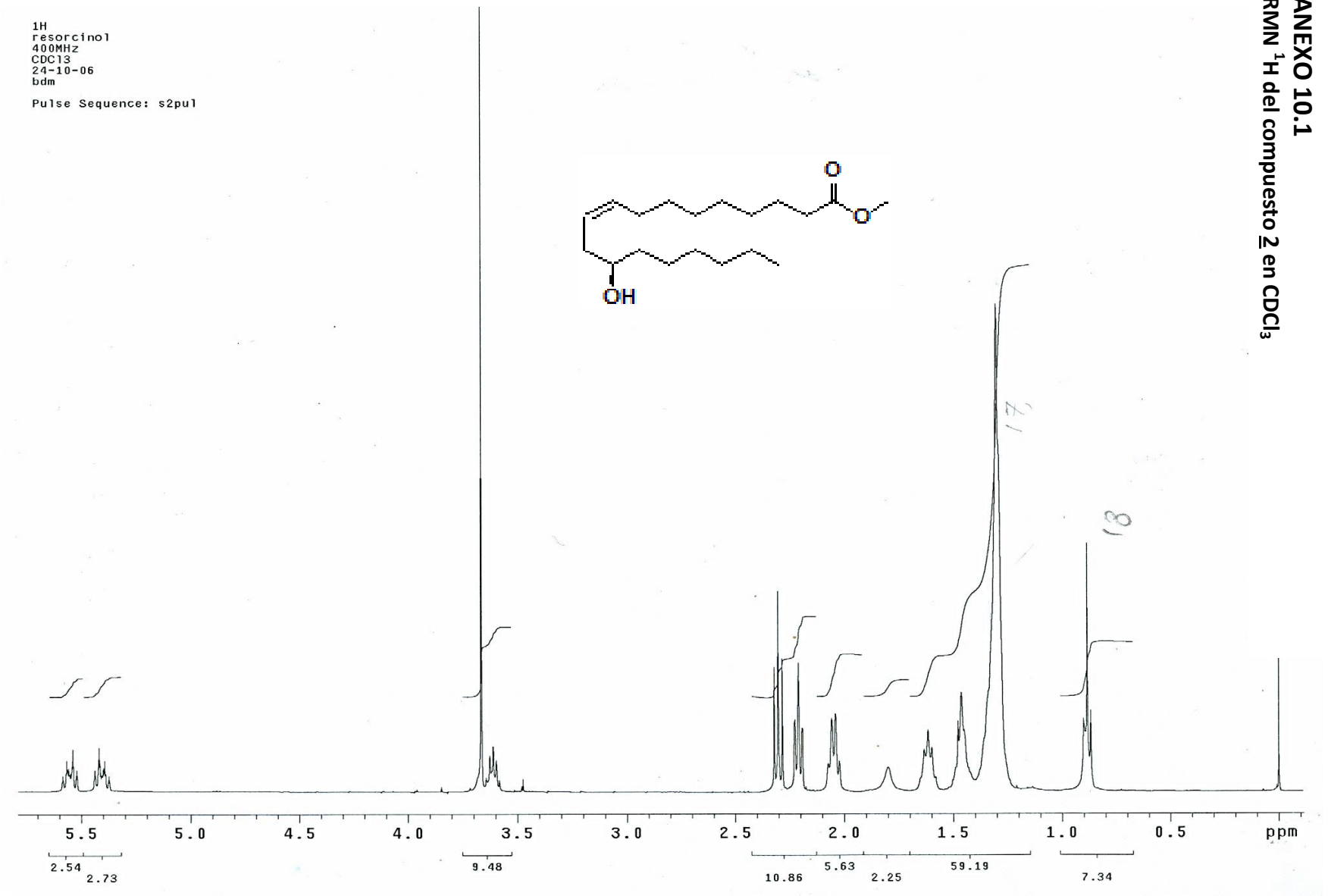
9. CONCLUSIONES

Se confirmó la viabilidad de sintetizar el compuesto deseado, fenilacetato de (1*R*,3*Z*)-1-hexil-12-[(1*S*,4*S*)-2-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano]-12-oxo-3-dodecenilo (**5**), análogo de FAR, a partir de materias primas que fueron comercialmente disponibles y aplicando estrategias químicas y enzimáticas de síntesis.

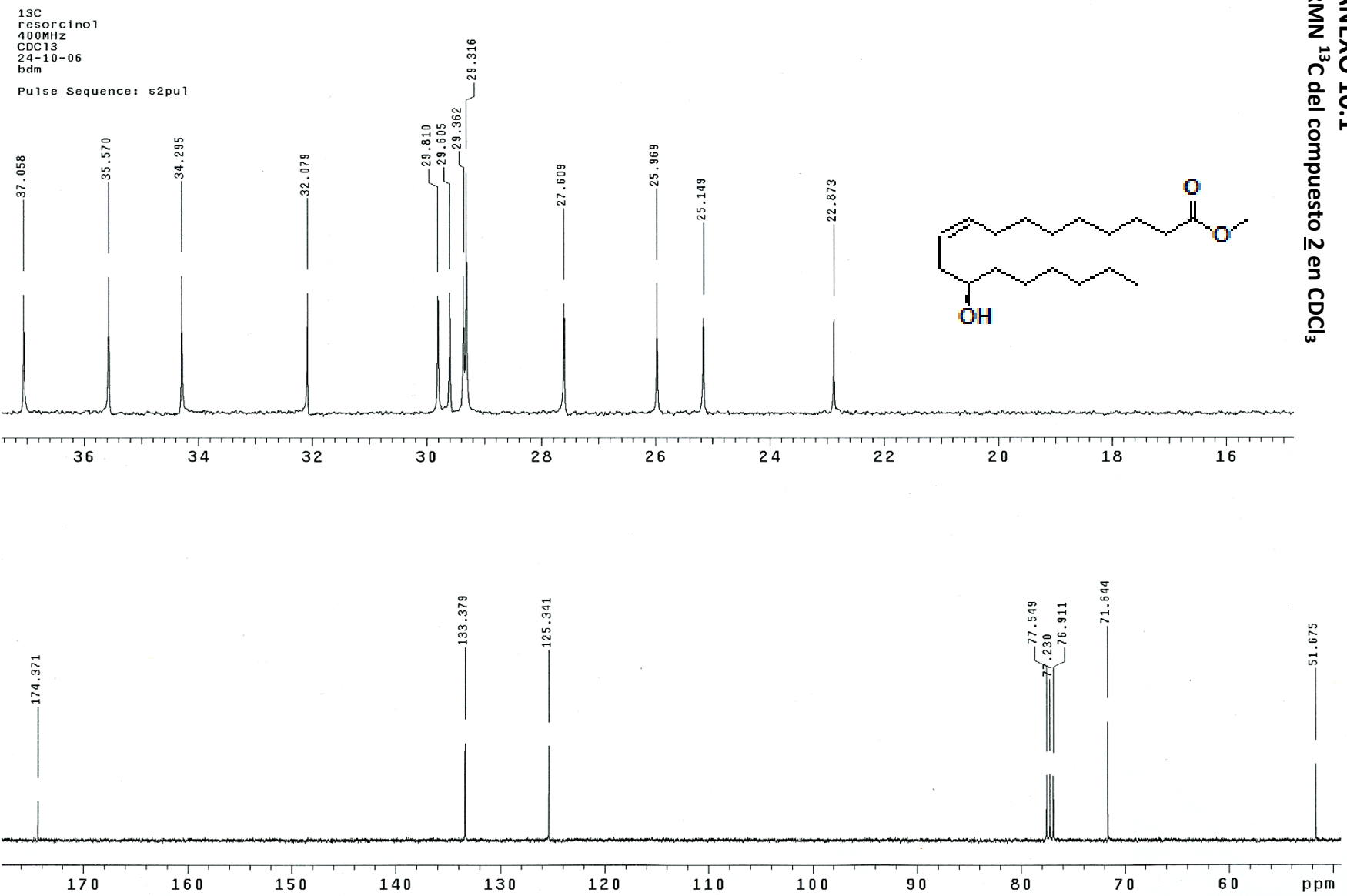
La evaluación del compuesto **5** como agente antineoplásico en líneas celulares tumorales de cérvix, mostró buena actividad antitumoral, en comparación con 12-fenilacetilrinvanil y capsaicina, lo que lo ubica como un buen candidato para posteriores estudios farmacológicos.

10. ANEXOS

ANEXO 10.1
RMN ¹H del compuesto 2 en CDCl₃

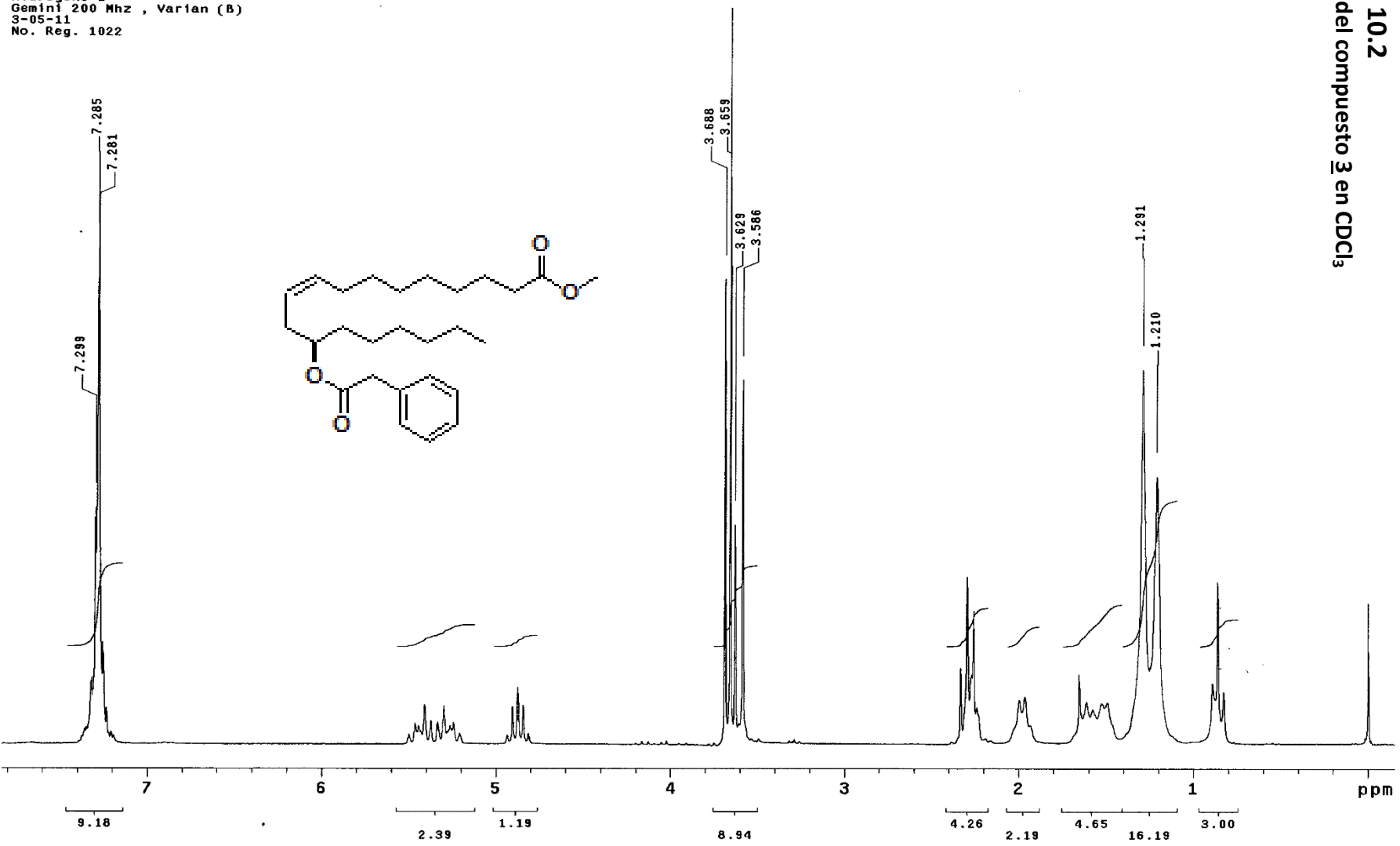


ANEXO 10.1
RMN ¹³C del compuesto 2 en CDCl₃

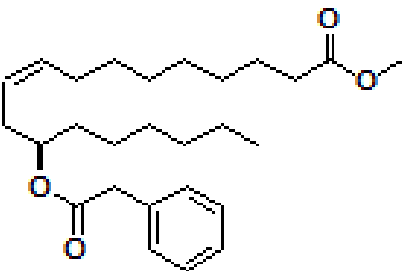


ANEXO 10.2
RMN ¹H del compuesto 3 en CDCl₃

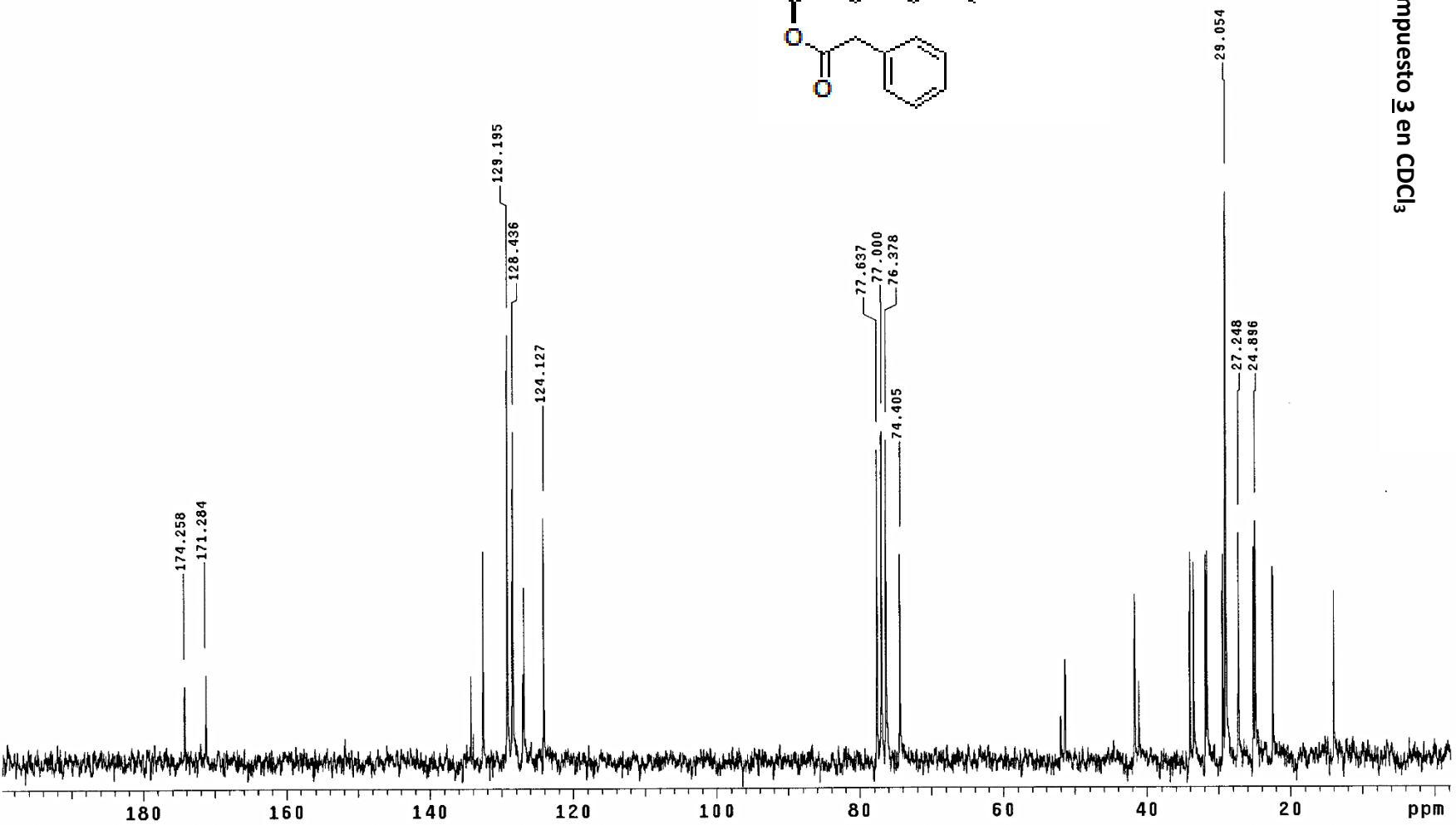
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clas: DLT-107
Disolvente: CDC13
Hidrogeno-1
Gemini 200 Mhz , Varian (B)
3-05-11
No. Reg. 1022



ANEXO 10.2
RMN ¹³C del compuesto 3 en CDCl₃

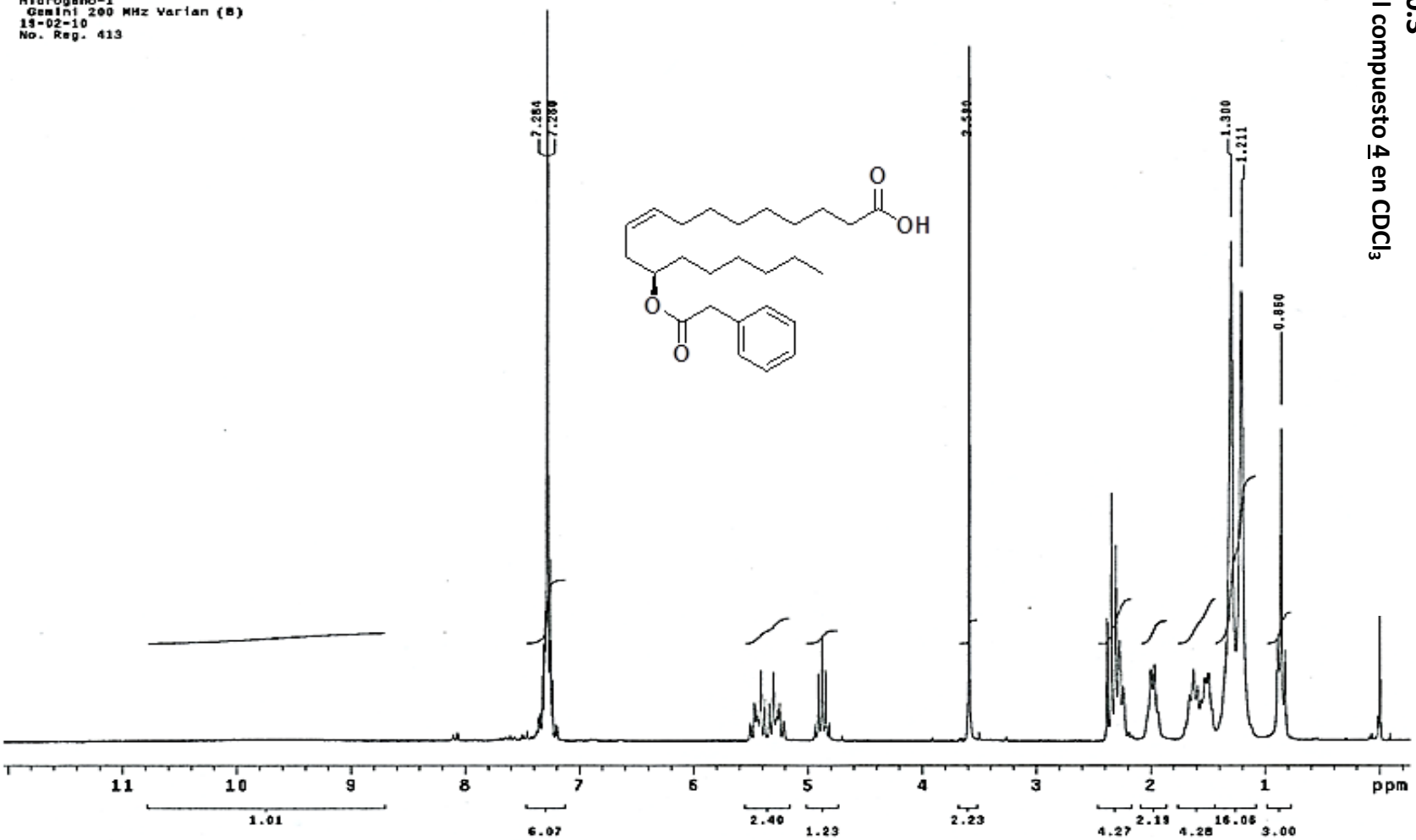


UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clae: DLT-107
Disolvente: CDCl₃
Carbono-13
Gemini 50 MHz, Varian (B)
3-05-11
No. Reg. 1022



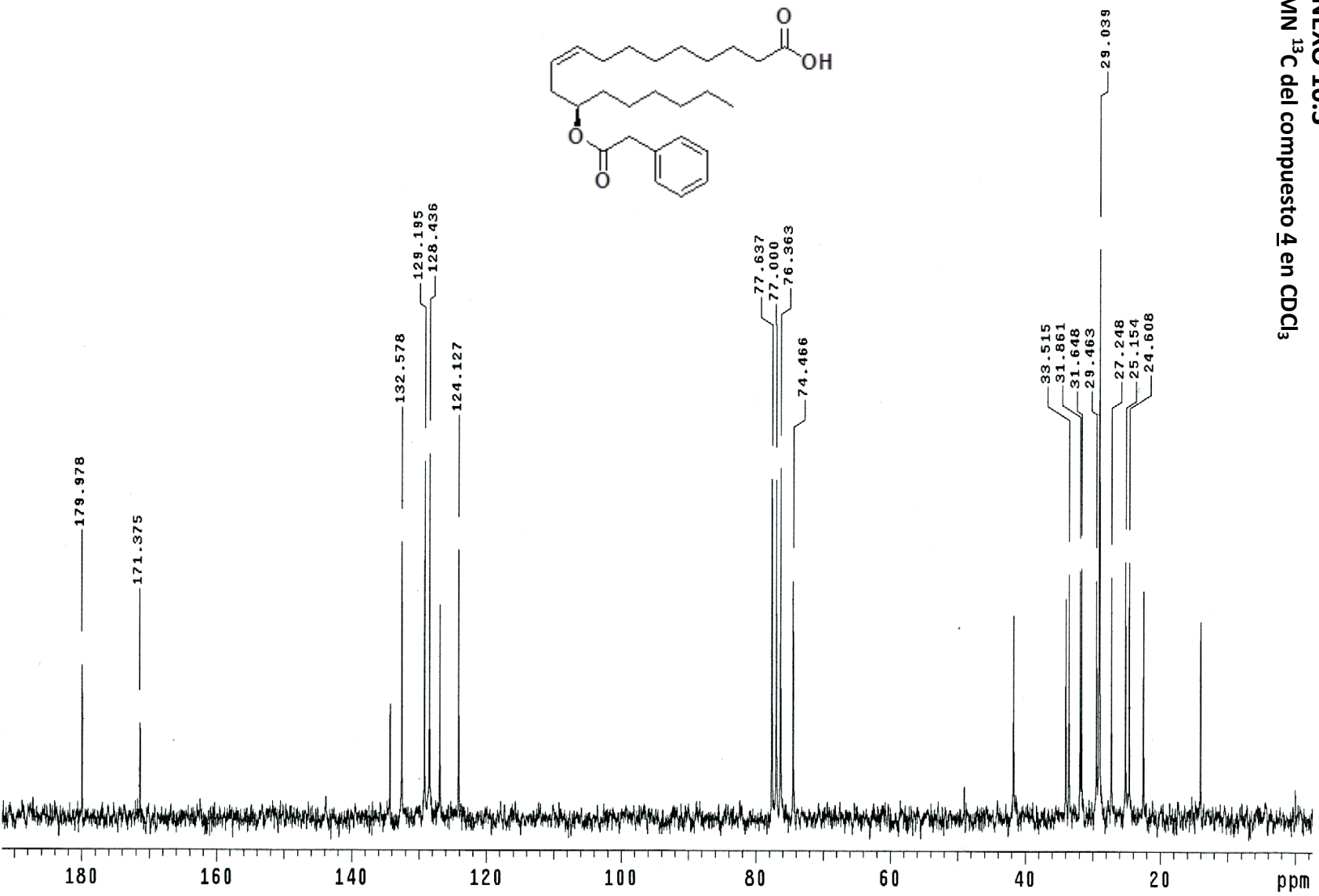
ANEXO 10.3
RMN ¹H del compuesto 4 en CDCl₃

UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, app
Dr. Ignacio Regla
Claver AMQ-105
Disolvente: CDCl₃
Hidrógeno-1
Gemini 200 MHz Varian (B)
13-02-10
No. Reg. 413



ANEXO 10.3

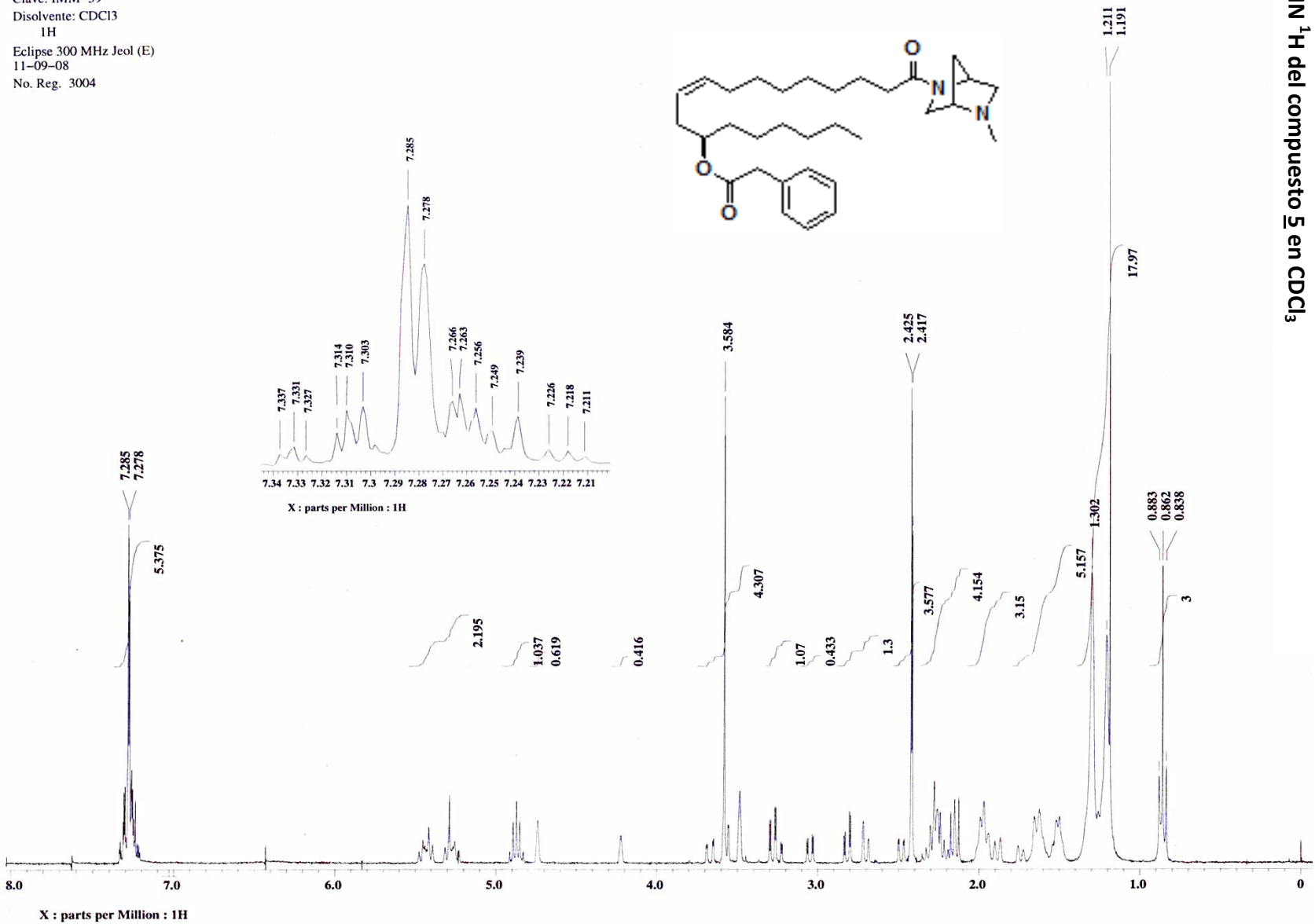
RMN ¹³C del compuesto **4** en CDCl₃



ANEXO 10.4

RMN ¹H del compuesto 5 en CDCl₃

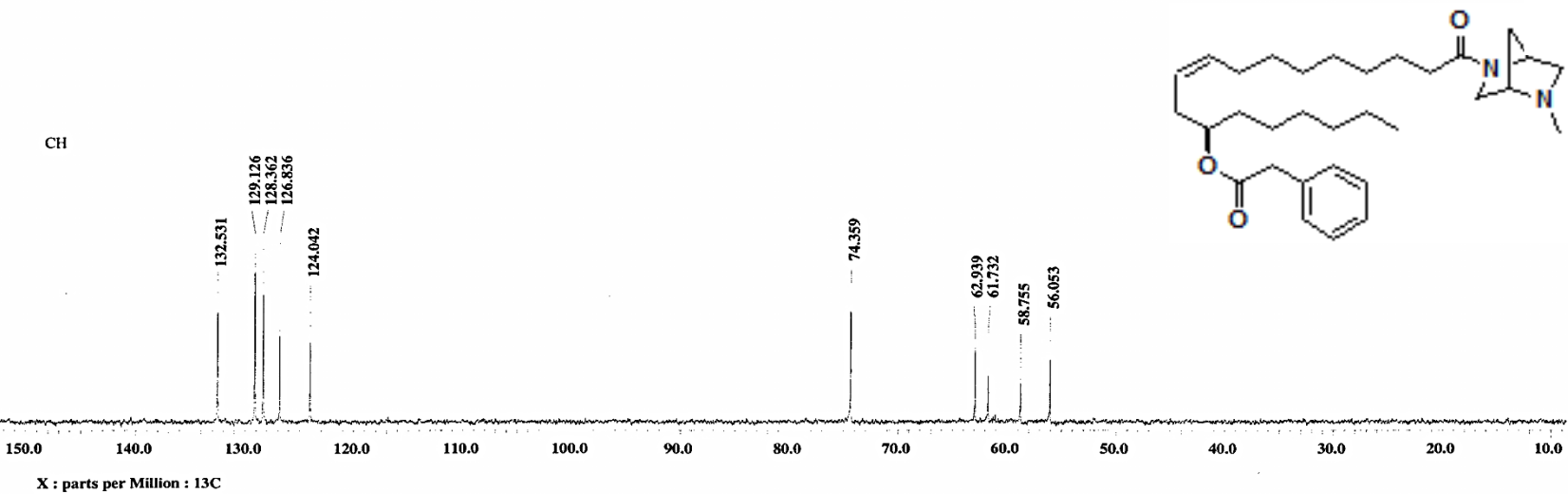
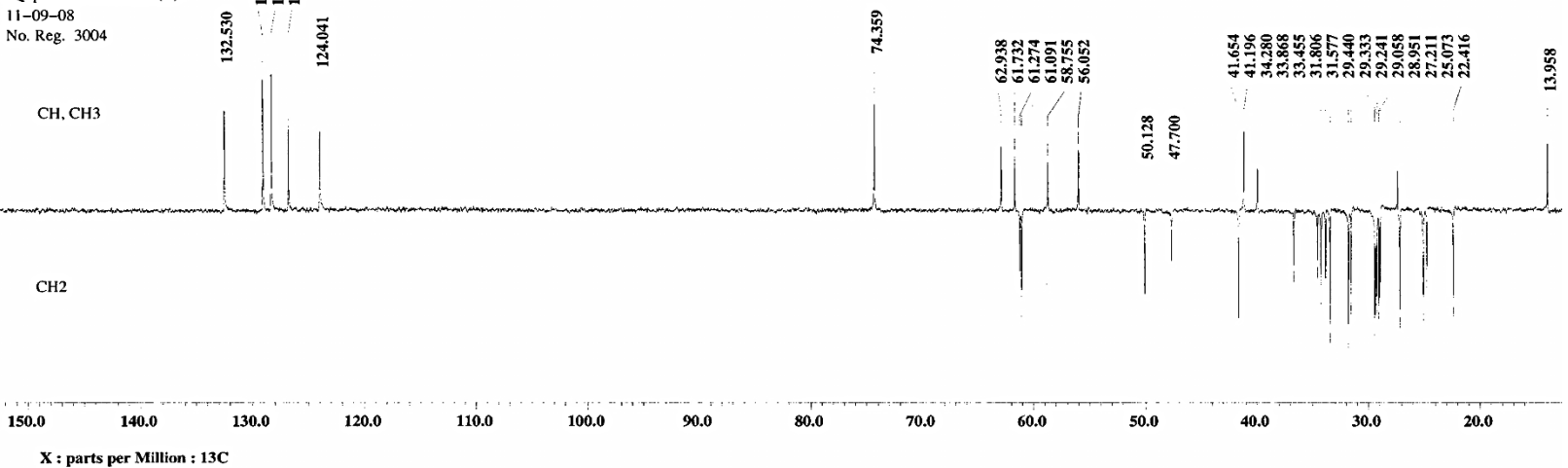
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clave: IMM-59
Disolvente: CDCl₃
1H
Eclipse 300 MHz Jeol (E)
11-09-08
No. Reg. 3004



ANEXO 10.4

RMN ¹³C del compuesto 5 en CDCl₃

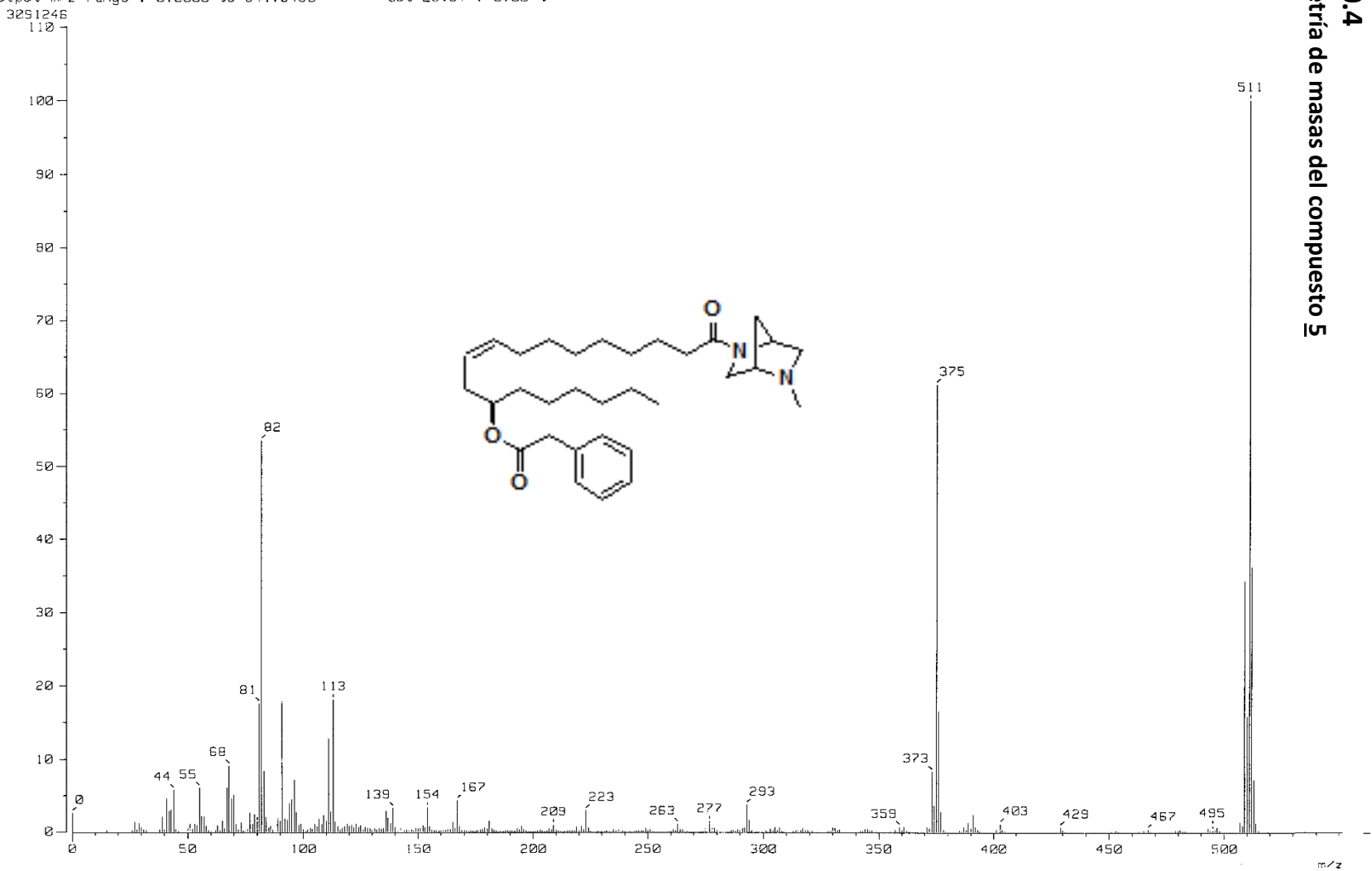
UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, apg
Dr. Francisco Yuste / Ignacio Regla
Clave: IMM-59
Disolvente: CDCl₃
DEPT
Eclipse 300 MHz Jeol (E)
11-09-08
No. Reg. 3004



ANEXO 10.4

Espectrometría de masas del compuesto 5

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Ignacio-Regal17 Date : 11-Sep-2008 17:12
Sample: 2095 IMM-59 Jeol-102
Note : Luis-Velasco
Inlet : Direct Ion Mode : FAS-
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.54 min Scan# : (1,1)
BP : m/z 511.0000 Int. : 267.72
Output m/z range : 0.2000 to 641.5430 Cut Level : 0.00 %



11. BIBLIOGRAFÍA

- ¹World Health Organization. *International Agency for Research on Cancer*, **2008**; Disponible en: <http://www.iarc.fr>. Acceso el 24 de noviembre del 2012.
- ²Lopez C.; Hernandez L.; Dubrow R. *Am J Epidemiol*, **1994**, 139: 263-271.
- ³Reilly C.; Taylor J.; Lanza D.; Carr B.; Crouch D.; G. Yost. *Toxicological Sciences*, **2003**, 73: 170–181.
- ⁴Qiao S.; Li W.; Tsubouchi R.; Haneda M.; Murakami K.; Yoshino M. *Neurosciency Research*, **2005**, 51:175–183.
- ⁵Zhang J.; Nagasaki M.; Tanaka Y.; Morikawa S. *Leukemia Reseach*, **2003**, 27: 275-283.
- ⁶Sánchez A.; Malagarie S.; Vara N.; Chiloeches A.; Diaz I. *Apoptosis*, **2007**, 12: 2013–2024.
- ⁷Appendino G.; De Petrocellis L.; Trevisani M.; Minassi A.; Daddario N.; Moriello A.; Gazzieri D.; Ligresti A.; Campi B.; Fontana G.; Pinna C.; Geppetti P.; Di Marzo V. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2005**, 312: 561–570.
- ⁸Laboratorio 2 PB de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, de la FES Zaragoza, C-II, UNAM.
- ⁹Hanahan D.; Weinberg A. *Cell*, **2000**, 100: 57-70.
- ¹⁰Rick A. *Cancer Renal*. Aurora Health Care®. Disponible en: <http://www.aurorahealthcare.org>. Acceso el 17 de mayo del 2013.
- ¹¹Hernández M.; Ríos M. *Revista Cubana de Oncología*, **1999**, 15: 119-130.
- ¹²Folkman, J. *Annu. Rev. Med.*, **2006**, 57: 1-18.
- ¹³Lodish H.; Berk A.; Matsudaria P.; Kaiser C.; Scott M.; Zipursky S.; Darnell J. *Biología celular y molecular*. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana. México. **2005**.
- ¹⁴Boticario B. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, **2005**, 71: 609-633.
- ¹⁵OMS. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad **2009**. Consultada el 25 de noviembre de 2012 de: <http://www.who.int/es>.
- ¹⁶INEGI. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad **2010**. Consultada el 25 de noviembre de 2012 de: <http://www.inegi.gob.mx>.
- ¹⁷Cameron R. *Oncología Práctica*. Panamericana. Barcelona. **2005**.
- ¹⁸Alberts B.; Bray D.; Hopkin K.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P. *Introducción a la biología celular: Cáncer*. 2ª Ed. Editorial Panamericana, Madrid. **2006**.
- ¹⁹Klug-William S.; Cummings M.; Spencer C. *Conceptos de Genética*. 8ª Ed. Prentice Hall. Madrid. **2006**.
- ²⁰De la Rosa E.; Díaz B.; Sánchez N. *Ciencia al Día Internacional*, **2000**, 3 (3): 1-13.
- ²¹Vaux D.; Weissman I.; Kim S. *Science*, **1992**, 258: 1955-1957.
- ²²Sánchez-Socarrás V. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, **2001**, 20: 266-274.

- ²³Stevens A.; Lowe J. *Anatomía Patológica*. 2ª Ed. Elsevier. España. **2001**.
- ²⁴Jiménez L.; Merchant H. *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México. **2003**.
- ²⁵Gómez-Álvarez R.; Nistal-Martín M.; Sesma-Egozcue P.; Álvarez-Uria M.; Fraile-Laiz B.; Anadón-Álvarez R.; Sáez-Crespo F. *Biología Celular*. 3ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. **2007**.
- ²⁶Karp G. *Biología celular*, 2 Ed. Mc Graw Hill, México DF. **1996**.
- ²⁷Caterina M.; Schumacher M.; Tominaga M.; Rosen T.; Levine J.; Julius D. *Nature***1997**, 389: 816-824.
- ²⁸(a) Walker K.; Urban L.; Medhurst S.; Patel S.; Panesar M.; Fox A.; McIntyre P. *J. Pharmacol. Exper. Ther.***2003**, 304: 56-62; b) Voets T.; Droogmans G.; Wissenbach U.; Janssens A.; Flockerzi V.; Nilius B. *Nature*,**2004**, 430: 748-754; c) Szallasi A.; Cortright D.; Blum C.; Eid S. *Nat. Rev. Drugs Discovery***2002**, 6: 357-372.
- ²⁹a) Millan M. *Prog. Neurobiol.***1999**, 57: 1-164; b) Szallasi S.; Blumberg P. *Pharmacol. Rev.***1999**, 51: 159-210.
- ³⁰Winter, J.; Bevan, S.; Campbell, E. *BJA*,**1995**, 75: 157-168.
- ³¹Aggarwal B.; Kunnumakkara A.; Harikumar K.; Tharakan S.; Sung B.; Anand P. *Planta Med.***2008**; 74: 1560–1569.
- ³²Castillo E.; Regla I.; Demare P.; Luviano-Jardón A.; López-Munguía A. *Synlett*, **2008**, 18: 2869-2873.
- ³³a) Morazzoni P.; Riva A.; Fontana G.; Apendino G.; Di Marzo V. WO 2006010445 (**2006**); b) Appendino G.; Minassi A.J. *Med. Chem.* **2002**, 45: 3739-3745; c) Appendino G.; Cascio M.; Bacchiega S.; Moriello A.; Minassi A.; Thomas A.; Ross R.; Pertwee R.; De Petrocellis L.; Di Marzo V. *FEBS Lett.* **2006**, 580: 568-574.
- ³⁴ Copeland, R. *Enzymes, a practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2ª ed. WILEY-VCH, USA, **2000**; 7-10.
- ³⁵Roberts, S. *J. Chem. Soc., Perkin trans. I*, **2001**; 1475-1499.
- ³⁶Bomscheuer, U.; Kaszlauskas, R. *Hydrolases in organic synthesis: Regio and stereoselective biotransformation*. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- ³⁷Regla, I.; Luviano-Jardón, A.; Demare, P.; Hong, E.; Torres-Gavilán, A.; López-Munguía, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19; 2439-2442.
- ³⁸Schmid, R.; Verger, R. *AngewChemInt Ed.*,**1998**, 37; 1608-1633.
- ³⁹Salis, A.; Svensson, I.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Adlercreutz, P. *BiochimBiophysActa: Proteins & Proteomics.*, **2003**, 1646; 145-151.
- ⁴⁰Portoguese, P.; Mikhail, A. *J Org Chem*, **1966**, 31; 1059-1062.
- ⁴¹Gilchrist T. *Heterocyclic Chemistry*. 2thed, Wilmington, Addison-Wesley Iberoamericana, **1999**.

⁴²(a) Remuzon, P.; Bouzard, D.; Guiol, C.; Jacquet, J. *J Med Chem.* **1992**, 35; 2898-2909; (b) Remunzon, P.; Massoudi, M.; Bouzard, D.; Jacquet, J. *Heterocycles*, **1992**, 34; 679-684.

⁴³(a) Bouzard, D.; Di Cesare, P.; Essiz, M.; Jacquet, J.; Kiechel, J.; Remuzon, P. *J Med Chem.*, **1990**, 33; 1344-1352; (b) McGuirk, P.; Jefson, M.; Mann, D.; Elliott, N.; Chang, P.; Cisek, E. *J Med Chem.*, **1992**, 35; 611-620.

⁴⁴Sturm, P.; Henry, D. *J Med Chem*, **1974**, 17; 481-487.

⁴⁵a) Melgar-Fernández, R.; González-Olvera, R.; Olivares-Romero, L.; González-López, V.; Romero-Ponce, L.; Ramírez-Zárate, R.; Demare, P.; Regla, I.; Juaristi E. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2008 (4); 655-672; b) González-Olvera, R.; Demare, P.; Regla, I.; Juaristi, E. *ARKIVOC*, **2008** (vi); 61-72.

⁴⁶Preparado por el QFB Ivan Monsalvo en el laboratorio 9 PA de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, de la FES Zaragoza, C-II, UNAM.