



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biotecnología

**“Síntesis de Nuevos Derivados de Hecogenina y su  
Evaluación Biológica en Líneas Celulares de Cáncer Hormona  
y No-Hormona Dependiente.”**

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciada en Biotecnología

Presenta:

Ilse Daniela Monroy Nicolás

Directora de Tesis:

Dra. María Guadalupe Hernández Linares

Co-directora de Tesis:

Dra. Maura Cárdenas García

PUEBLA, PUEBLA, SEPTIEMBRE DE 2018.

**1er Simposio Estudiantil del Laboratorio del Jardín Botánico Universitario, BUAP**, el cual se realizó en el Jardín Botánico Universitario, BUAP del 22 al 23 de noviembre de 2017, modalidad ponencia: “Síntesis de nuevos derivados de hecogenina y su evaluación biológica en líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino”.

**4ta Reunión Anual del Colegio Mexicano para Investigación del Cáncer**, realizado en el Centro Cultural Universitario, BUAP, los días 7 al 10 de octubre de 2017, modalidad cartel.

**XIII Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica**, que se realizó en el Centro de Vinculación y Enseñanza de la Universidad Autónoma de Tabasco, los días 3 al 7 de abril de 2017, modalidad cartel: “Oxidación selectiva de esteroides”. Ilse Daniela Monroy Nicolás, Alan Carrasco Carballo, Ma. Guadalupe Hernández Linares, Maura Cárdenas García.

**Foro de Investigación Multidisciplinaria sobre la Biodiversidad: del laboratorio, al campo y la industria, BUAP**, realizado en el Jardín Botánico Universitario, BUAP, los días 15 y 16 de junio de 2016, modalidad cartel: “La importancia de la diosgenina en la farmoquímica: obtención y transformación”. Ilse Daniela Monroy Nicolás, Alan Carrasco Carballo, Ma. Guadalupe Hernández Linares.

**XII Reunión Mexicana de Química Orgánica**, realizada en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato del IPN, los días 7 al 11 de marzo de 2016, modalidad cartel: “Metodología estandarizada de obtención de sapogeninas de fuentes naturales”. Ilse Daniela Monroy Nicolás, Ma. Guadalupe Hernández Linares, Jesús Sandoval Ramírez, María A. Fernández Herrera, Alan Carrasco Carballo, Gabriel Guerrero Luna.

**XXVII Verano de la Investigación Científica**, realizado en el Laboratorio de Biomoléculas y Biomateriales del Departamento de Física Aplicada del Cinvestav, Merida, del 19 de junio al 4 de agosto de 2017, modalidad estancia: “Obtención de esteroides con posible actividad antiproliferativa derivados de la hecogenina”. Investigador anfitrión: María Antonieta Fernández Herrera.

# INDICE

ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN .....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	8
3. JUSTIFICACIÓN .....	29
4. HIPÓTESIS .....	30
5. OBJETIVOS .....	31
5.1 Objetivo General .....	31
5.2 Objetivos específicos .....	31
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	32
6.1 Equipos, técnicas y materias primas .....	32
6.1.1 Equipos y técnicas síntesis .....	32
6.1.2 Técnicas de purificación.....	33
6.1.3 Materias primas de síntesis.....	33
6.1.4 Equipos biológicos .....	34
6.1.5 Técnicas biológicas.....	35
6.1.6 Líneas celulares .....	36
6.2 Síntesis .....	39
6.2.1 Hidrólisis básica acetato de hecogenina .....	39
6.2.2 Oxidación de hecogenina.....	41
6.2.3 Acetólisis acetato de hecogenina.....	42
6.2.4 Hidrólisis de los derivados epoxicolesténico y furosténico de hecogenina .....	44
6.2.5 Oxidación de 23-Acetil hecogenina.....	45
6.2.6 Acetilación de 23-Acetil hecogenina .....	46
6.2.7 Obtención de los compuestos 22-oxo-26-OAc y -26-OH de acetato de hecogenina .....	47
6.3 Evaluación biológica.....	49
6.3.1 Curva de calibración .....	49
6.3.2 Evaluación antiproliferativa de compuestos sintetizados. ....	52
7. RESULTADOS .....	53
7.1 Hecogenina .....	53
7.2 Acetato de Hecogenina .....	57
7.3 Hecogenona.....	61

7.4 23-acetil-hecogenina .....	65
7.5 23-acetil-hecogenona.....	69
7.6 Acetato de 23 acetil-hecogenina .....	73
7.7 Derivado Epoxicolesténico de hecogenina .....	77
7.8 Derivado furosténico C-33 de hecogenina .....	79
7.9 Derivado 26 OH 22 Oxocolestánico de hecogenina.....	81
7.10 Derivado 26 OAc 22 Oxocolestánico de hecogenina. ....	85
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	89
8.1 Modificación del anillo A de hecogenina .....	89
8.2 Obtención de 23 Acetil-hecogenina.....	95
8.3 Modificación del anillo A de 23 acetil-hecogenina.....	102
8.4 Apertura del anillo F .....	107
9. CONCLUSIONES.....	112
10. BIBLIOGRAFÍA .....	115

## ABREVIATURAS

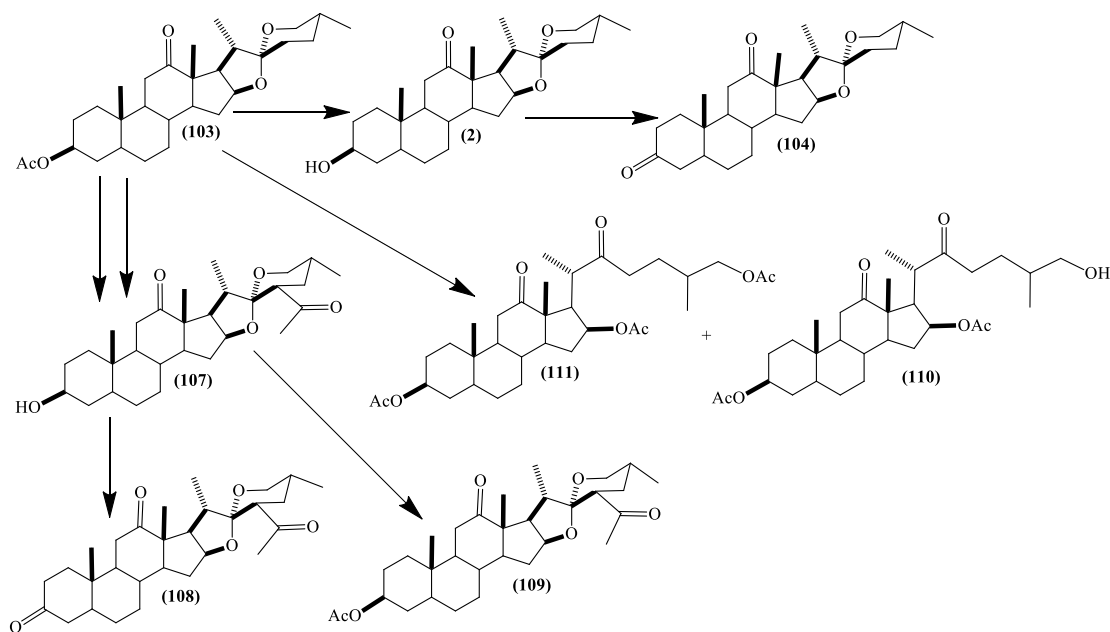
---

$B_0$	Campo magnético externo
$IC_{50}$	Concentración inhibitoria media
COSY	Correlation Spectroscopy
$\sigma$	Desviación estándar
$\delta$	Desplazamiento químico
$DL_{50}$	Dosis letal media
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Spectrum Quantum Correlation
$\nu$	Intervalo de frecuencias, Hz
$\bar{\nu}$	Intervalo de número de onda, $cm^{-1}$
$IC_{50}$	Concentración inhibitoria media
IR	Infrarrojo
$\mu m$	Micrómetro
$cm^{-1}$	Número de onda
ppm	Partes por millón
P.M	Peso Molecular
P.f	Punto de fusión
RMN $^1H$	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN $^{13}C$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
THF	Tetrahidrofurano
$BF_3 \cdot OEt_2$	Trifloururo de boro eterado
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

## RESUMEN

La hecogenina es un esteroide con la característica que presenta un grupo carbonilo en C-12, normalmente se obtiene de por hidrolisis acida de saponinas aisladas en plantas de tipo Agavacea, misma que ha mostrado propiedades de tipo antiinflamatoria, antioxidante, antifúngica, anticancerígena, siendo esta última de gran interés para el desarrollo de nuevos compuestos que puedan incorporarse a la terapia contra el cáncer, enfermedad que presenta millones de casos al año, así como una alta tasa de mortalidad.

Por lo que la formación selectiva de grupos carbonilos en diversas partes de la molécula permitió analizar el efecto de la posición de este con respecto a su actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer tanto hormona como no hormona dependientes; mediante síntesis orgánica se obtuvieron 8 compuestos puros y correctamente caracterizados, por técnicas físicas y espectroscópicas, procediendo a su evaluación en líneas de cáncer de colón (HCT-15), mama (MDA-MB-231 y MCF-7) y cervicouterino (HeLa). Dichas líneas fueron cultivadas en condiciones idóneas según sus requerimientos particulares y realizando experimentos de inhibición de la proliferación a partir del kit XTT, obteniendo los  $IC_{50}$  de los compuestos activos.



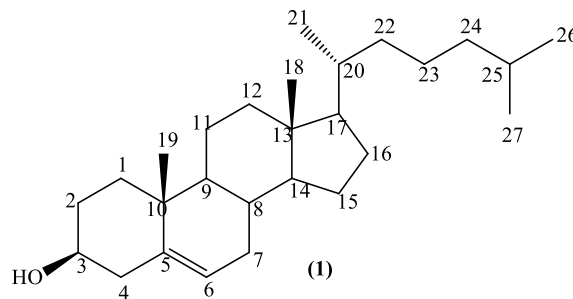
### **Esquema A. Compuestos obtenidos para evaluación biológica.**

Al analizar la relación entre la estructura y la actividad biológica se observó que al acetilar C-3 disminuía el valor del  $IC_{50}$ , en el caso de células de cáncer no hormona dependiente, y en cambio un mayor grado de oxidación en la molécula se volvía selectivo contra células de cáncer hormona dependiente, mientras que los menores valor de  $IC_{50}$  se mostraron en casos donde se formaba la cadena lateral 22 oxo-colestánicas

# 1. INTRODUCCIÓN

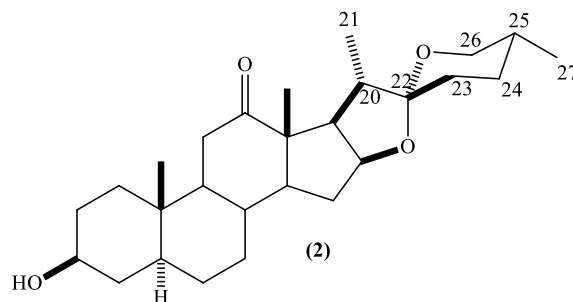
---

Los esteroides son compuestos orgánicos que poseen un núcleo de *ciclopentano[α]perhidrofenantreno* como base de su estructura, comprendida por un sistema fusionado de 4 anillos compuestos de 17 átomos de carbonos o más, siendo el colesterol (figura 1) el compuesto más conocido perteneciente a este tipo de sustancias. Se consideran compuestos bioactivos debido su comportamiento como hormonas, drogas y formas de control en diversos procesos fisiológicos. [1]



**Figura 1. Estructura del colesterol.**

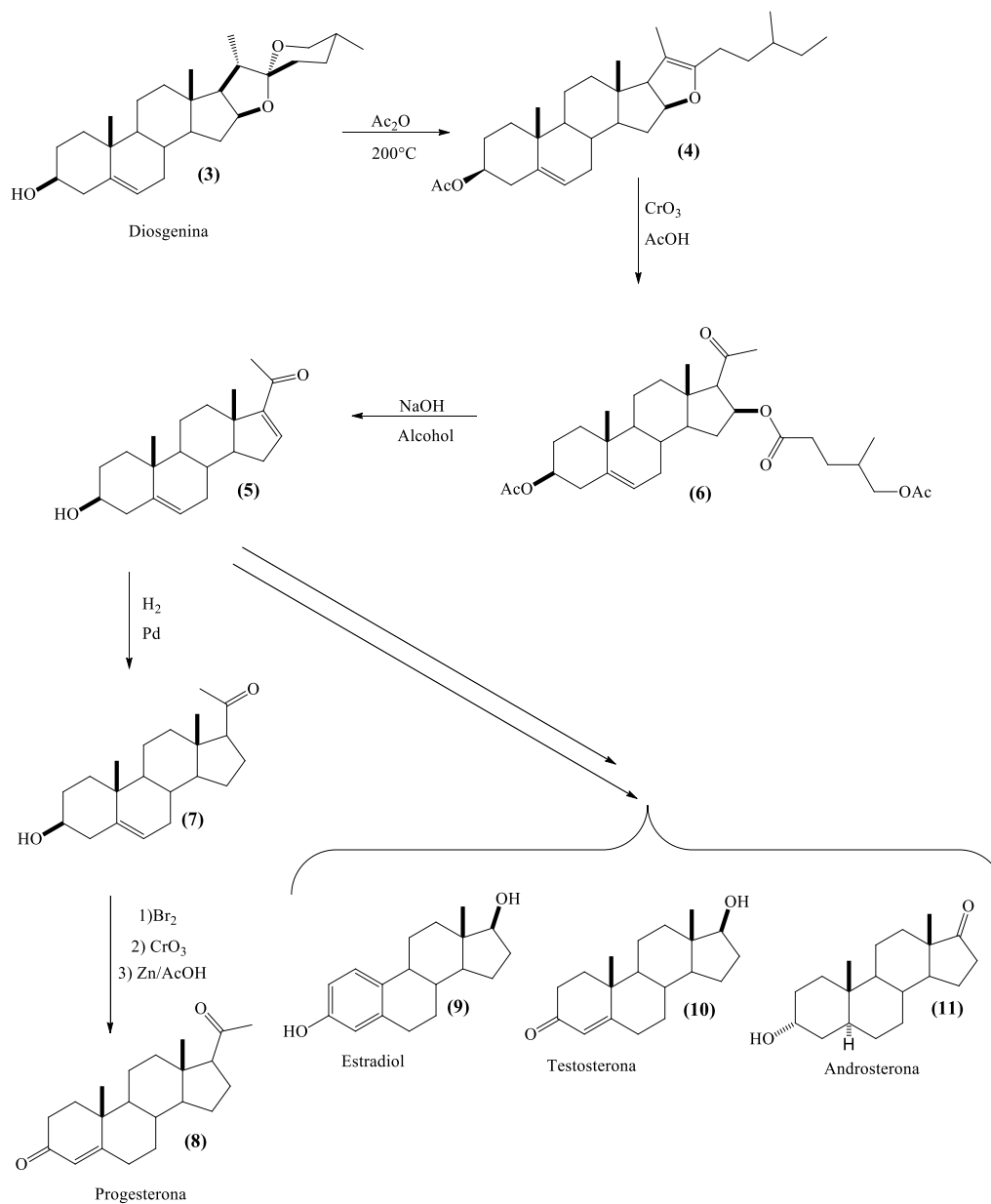
Entre los compuestos pertenecientes a esta clasificación se encuentran las saponinas, las cuales presentan un amplio espectro de actividades en sistemas biológicos, siendo de interés para el humano propiedades como inmunoestimulante, hipocolesterolémicas y anticancerígenas. Estructuralmente hablando las saponinas son glicósidos producidos principalmente por plantas, conformados por azúcares (glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, etc.) unidos a una aglicona hidrofóbica, también llamada sapogenina (figura 2). [2]



**Figura 2. Ejemplo de sapogenina, hecogenina.**

Las sapogeninas cobraron gran importancia en nuestro país durante la década de los 50's con la creación de la industria Syntex, la cual se enfocaba en la producción de hormonas esteroidales, colocándose entre los primeros lugares en el mercado de producción y exportación de dichos compuestos. [3] El surgimiento de dicha empresa se atribuyó a la problemática que enfrentaba la industria química en aquella época; en la década de los años treinta el costo de la progesterona era de 80 dólares el gramo. Aunado a esto se necesitaba de hormonas en grandes cantidades y de buena calidad, esto se dificultaba debido a que los procesos de producción eran limitados y los precios muy elevados, en gran medida por los procesos complejos con rendimientos bajos que usaban las compañías europeas. [4]

Debido a la demanda de progesterona el científico Russel E. Marker se aventuró en la búsqueda de fuentes viables para la producción de dicho compuesto; llegando al estado de Veracruz en donde se recolectó un tubérculo llamado por lo habitantes locales como "cabeza de negro", de nombre científico *Dioscorea mexicana*, el cual contiene una alta proporción de sapogeninas, en especial de diosgenina. Mismo que utilizó como precursor para la producción de progesterona, metodología denominada como "Degradación de Marker" (ve esquema 1). La producción de progesterona por dicha vía resultó ser viable, redujo los costos de producción y causó una revolución en la industria de la síntesis química de la época; así es como, junto con la ayuda de otros científicos se fundó la empresa Syntex en México. [5]



**Esquema 1. Degradación de Marker.**

Syntex es uno de los grandes ejemplos en los cuales los esteroides juegan un papel importante en la industria y la investigación, es este caso en el área de la salud, investigaciones de esta índole sirvieron de pauta para ampliar los conocimientos que se tenían sobre compuestos de este tipo, así como sus posibles aplicaciones en diversos campos.

Otra sapogenina de interés es la hecogenina encontrada en plantas de tipo Agavacea, un ejemplo de ellas es el sisal (*Agave sisalana*) (figura 3), la cual ha sido cultivada para la obtención de fibras y es común en el este de África. Fue inicialmente obteniendo del desecho de hojas, después de que las fibras fueran

retiradas. Para su extracción se realizaban diversos procesos, dentro de los cuales destacan una fermentación anaerobia, un tratamiento bajo presión que permitía la hidrólisis de su saponina característica y posteriormente un proceso de filtración y purificación para obtener una mezcla de sapogeninas. [6]



**Figura 3. *Agave sisalana*.**

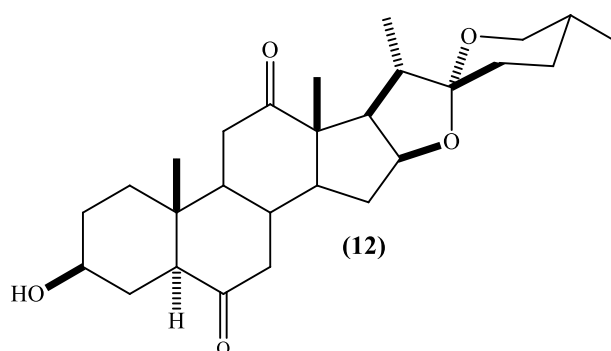
En nuestro país la presencia de esta sapogenina se ha observado en el *Agave lechuguilla* (figura 4), el cual se distribuye en la región del norte, principalmente en los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas, aprovechándose sus fibras debido a su alta resistencia a distintas condiciones y sustancias [7]: además de la hecogenina se ha demostrado la presencia de otras sapogeninas, tal es el caso de yucagenina, gitogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizogenina, siendo una fuente rica en compuestos esteroidales [8].



**Figura 4. *Agave lechuguilla* de México.**

Esta sapogenina tuvo un papel importante cuando Callow C.y Spensley, mostraron que la hecogenina se podría obtener del desecho de licores generados de la manufactura del sisal para la posterior conversión en cortisona. [9] Además, se le ha atribuido efectos terapéuticos debido a sus propiedades benéficas las cuales destacan actividad antiinflamatoria potente, antioxidante, antifúngica, anticancerígena. [10]

Al analizar la estructura de esta sapogenina, (ver figura 5) destaca la presencia de un grupo cetónico, [11] mismos a los cuales en esteroides se les ha observado actividades biológicas particulares, (figura 4) como inhibidores de enzimas ligadas a diabetes tipo II [12] y agentes anticancerígenos. [13]

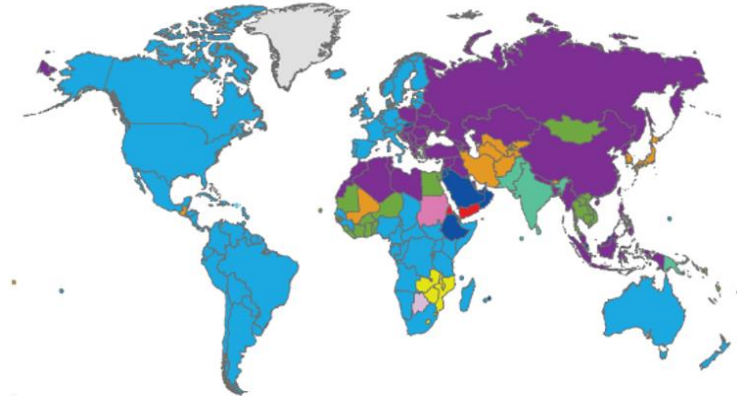


**Figura 5. Estructura de una cetona esteroideal, laxogenina.**

Una actividad biológica que sale a relucir en este tipo de compuestos es su función como anticancerígenos, el cáncer en particular ya que es la segunda causa de muerte a nivel mundial, superado solo por enfermedades cardiovasculares, esta enfermedad se presenta cuando células normales empiezan a desarrollarse y crecer sin control en determinadas partes del cuerpo. Existen diferentes tipos aun así en todos, las células continúan creciendo, dividiéndose y proliferando pudiendo viajar a través del cuerpo usando distintas vías de circulación, depositándose en otra región y empezando a proliferar y desarrollarse, este proceso se llama metástasis. [14]

Según cifras reportadas en 2012, se observaron 14.1 millones nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de defunciones ocurridas por este padecimiento alrededor del mundo, los tipos de cáncer más común para mujeres y hombres varían según el país o región donde habiten. En mujeres los tipos de cáncer más común son mama, cervicouterino, hígado, pulmón y tiroides (figura 6) y en hombres el cáncer de próstata, pulmón, estomago, hígado entre otros (figura 6). [15]

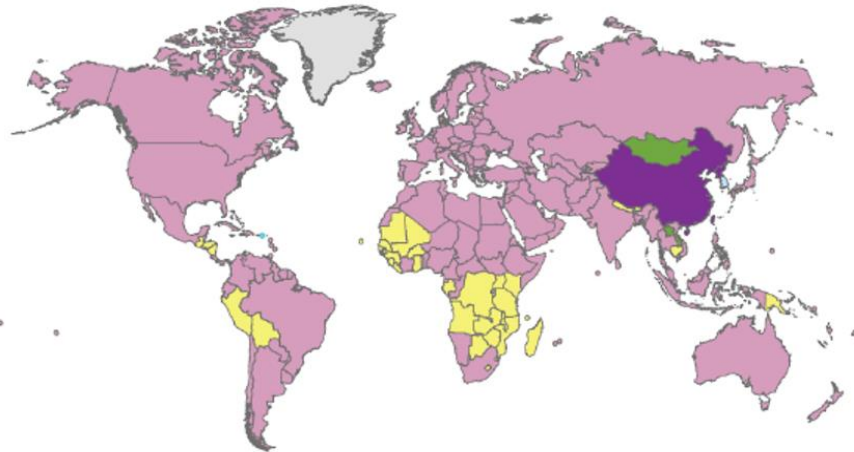
### Hombres



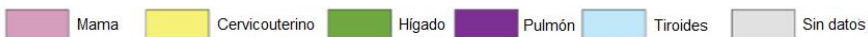
Tipos de cáncer más comunes:



### Mujeres

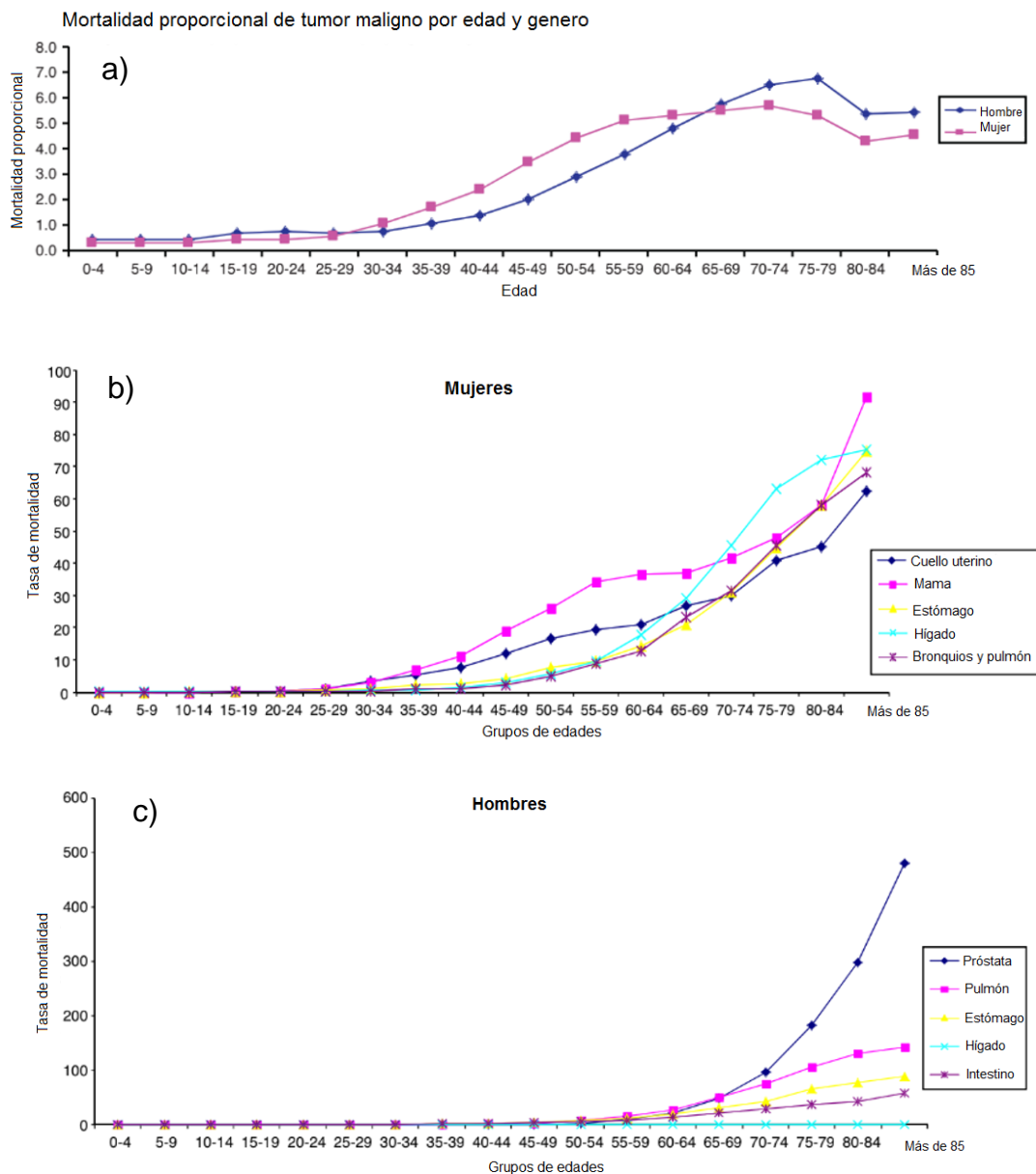


Tipos de cáncer más comunes:



**Figura 6. Tipos de cáncer más diagnosticados en 2012.**

En México los casos de cáncer han ido en aumento desde 1999, siendo reportado en 2012 como la segunda causa de muerte en nuestro país, según estadísticas el riesgo de muerte a causa de dicha patología aumenta conforme a la edad tanto en hombres como en mujeres (figura 7), y los tipos de cáncer más comunes que padecen los mexicanos coinciden con los encontrados en estadísticas mundiales, en el caso de las mujeres volvemos a encontrar al cáncer de mama, cervicouterino, hígado y pulmón y siendo un nuevo caso factor el cáncer de estómago, mientras que en hombres se reflejan el cáncer de próstata, pulmón, estomago, hígado e intestino (figura 7). [16]

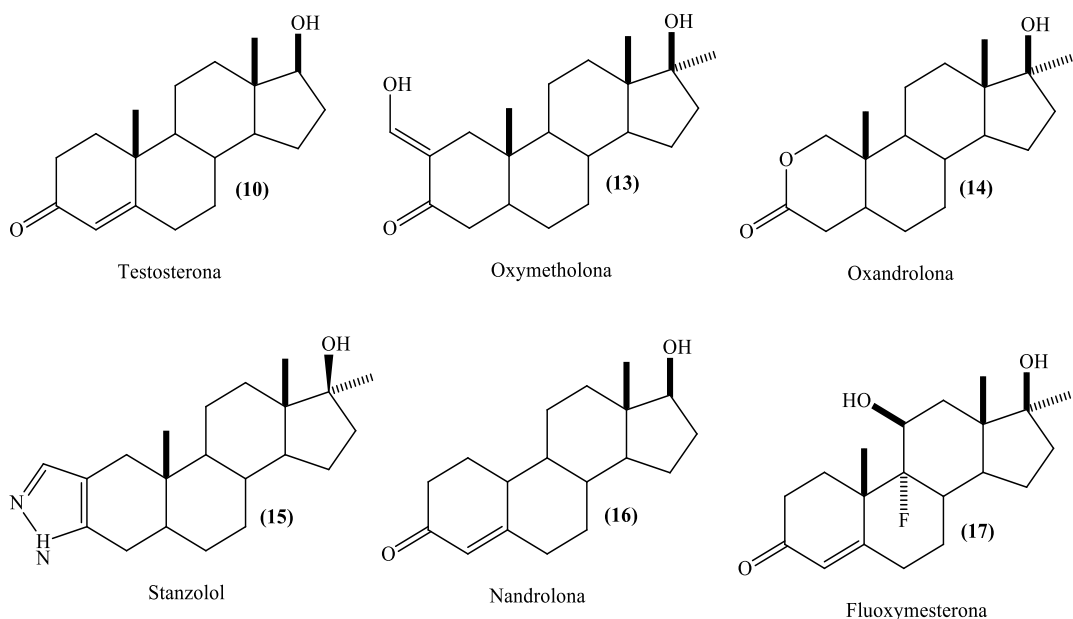


**Figura 7. (a) Mortalidad por cáncer acorde a la edad. (b) Tipos de cáncer más comunes en mujeres en México. (c) Tipos de cáncer más comunes en hombres en México.**

El diseño de nuevas opciones de terapias contra enfermedades emergentes, como el cáncer, es un eje fundamental como biotecnólogo en el área de la salud, por lo que el diseño y síntesis de nuevos derivados esteroidales cetónicos que, en conjunto con su evaluación biológica en líneas de cáncer hormona y no-hormona dependientes se vuelve un tema de investigación de interés, así como multidisciplinario, permitiendo la generación de conocimiento en el área de la salud.

## 2. ANTECEDENTES

El término esteroide data desde 1813 cuando se denominó a la estructura del colesterol, aunque los esteroides más conocidos son los de tipo anabólico-androgénico, que son derivados sintéticos de la testosterona (figura 8); el término “androgénico” se refiere a masculinización y “anabólico” indica formación de tejidos. Sus efectos en organismos vivos se remontan a hace más de 6000 años, cuando granjeros notaron que la domesticación de animales era más sencilla después de castrarlos, años más adelante las teorías medicas del “humoralismo” trataban de dar una explicación a las enfermedades en base a desequilibrios en los “humores” presentes en el cuerpo, así mismo antiguos atletas griegos usaban sustancias para mejorar su desempeño, tal es el caso de extractos de plantas y testiculares. Todas estas teorías dieron pauta a diversos estudios que sirvieron para relacionar el efecto que dichas sustancias tenían en organismo de distintas especies y su implicación en el área de la salud [17].

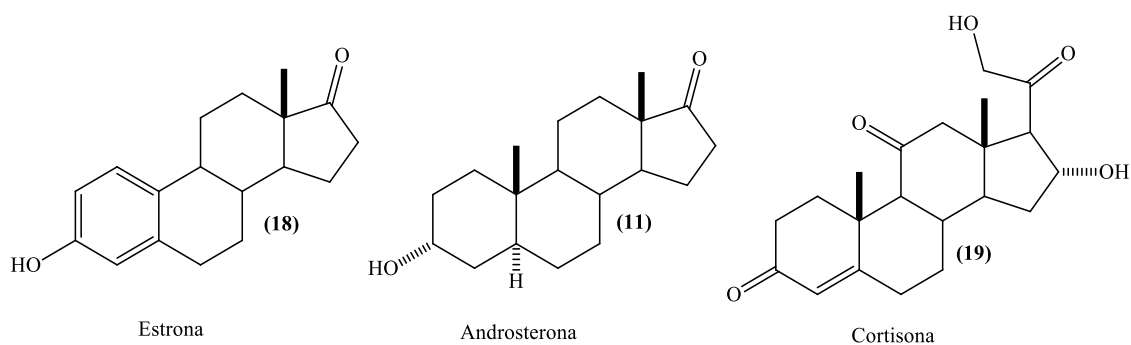


**Figura 8. Estructura de la testosterona y algunos esteroides anabólico-androgénicos**

En búsqueda de la relación de ciertas secreciones y el sistema endocrino, Brown-Séquard se enfocó en el estudio de las glándulas adrenales, testículos, tiroides, páncreas, hígado, bazo y riñones, también experimento con sustancias

testiculares proporcionando las bases para otras investigaciones con la finalidad de generar una posible cura para varios padecimientos, tales como: diabetes, tuberculosis, epilepsia, parálisis, gangrena, anemia, influenza, arterioesclerosis, enfermedad de Addison, histeria y migraña [17].

El resultado de esta investigación llevo al aislamiento de distintas sustancias fundamentales en estos procesos, las cuales fueron denominadas hormonas, tales como la estrona (figura 8) aislada de la orina de una mujer embarazada y la androsterona (figura 8) aislada igualmente de la orina de un hombre en el año de 1929 [17]. Paralelamente se buscó el aislamiento de hormonas adrenales activas a partir de modelos animales, con el objetivo de aplicarlos en el campo militar, desembocando en la generación de cortisona (figura 9) y otros corticoesteroides con fines terapéuticos [18].

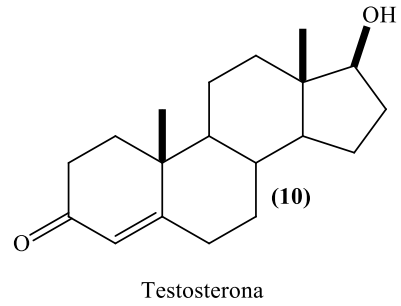


**Figura 9. Hormonas de interés en los años 90's**

La industria farmacéutica tenía un creciente interés por el aislamiento de la testosterona, siendo Ernst Laqueur quien aisló por primera vez dicha sustancia de los testículos de un toro (esquema 2), observando las implicaciones que dicha sustancia tenía se propuso su uso para el tratamiento de distintas patologías entre ellas el cáncer de mama derivado de estrógeno; esto debido a que la tercera parte de este tipo de cáncer son hormona dependiente y responden a este tipo de terapias, aun así los efectos secundarios de estos compuestos limitaron su campo de aplicación por lo cual se han buscado nuevos derivados que sean igual de efectivos pero no presenten efectos contraproducentes [17].

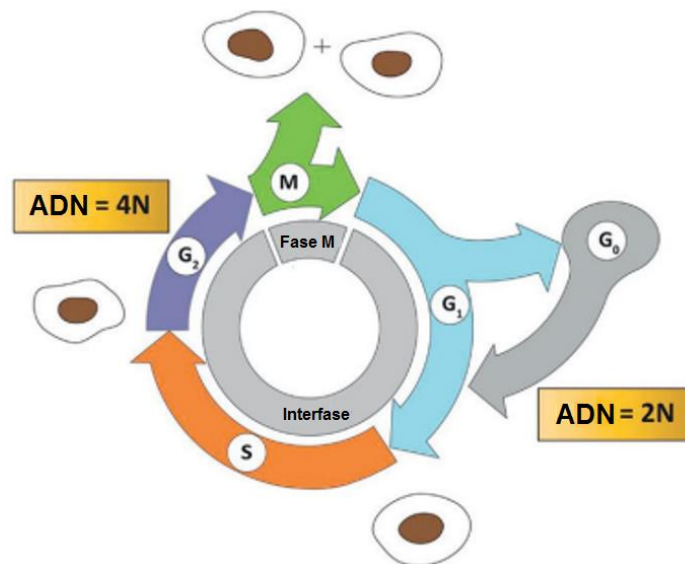


Extracción  
Diferencial



**Esquema 2. Aislamiento de testosterona a partir de testículos de toro.**

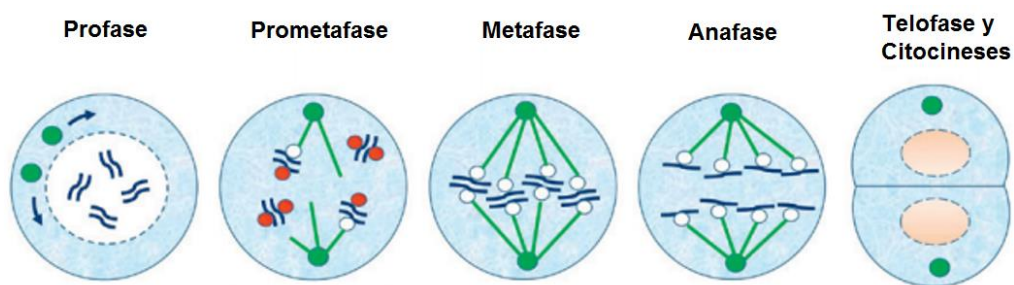
El ciclo celular normal en organismos eucariontes se trata de una serie de eventos los cuales desencadenan la reproducción de células hijas a partir de una madre, los mayores retos que tiene la célula en este proceso son la duplicación de su genoma y la división en 2 células, dicho proceso se divide en 5 fases (figura 10), la primera fase es la  $G_0$  la cual es un estado de latencia en el cual la célula mediante un impulso externo comenzara su ciclo de división entrando en la fase  $G_1$  el contenido de ADN es diploide, después en la fase S se realiza el proceso de replicación de la información genética, la cual entra a la fase  $G_2$  con un contenido tetraploide, el cual se dividirá en dos células hijas en la fase M del ciclo, el cual corresponde al proceso de mitosis y citocinesis, en el cual finalmente se obtiene las dos células hijas [19].



**Figura 10. Ciclo celular de un organismo sano.**

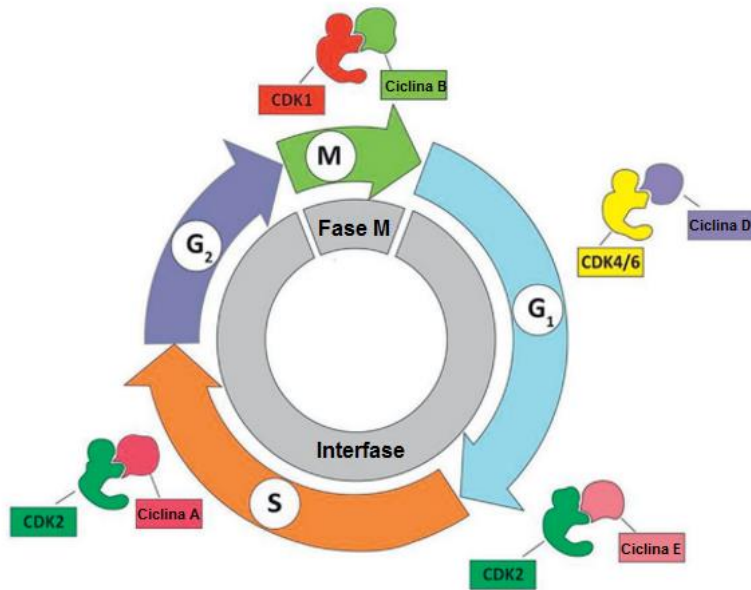
El proceso de mitosis (figura 11) consiste en la condensación de ADN en cromosomas visibles, seguido de una separación de estos en 2 sets idénticos,

mientras que la citocinesis consiste en la separación de las 2 células hijas resultantes con núcleo y organelos individuales. La mitosis se compone de 5 etapas: profase es cuando la membrana nuclear sufre una ruptura y da lugar a la condensación de los cromosomas y separación de los centrómeros, la prometafase es la formación de los husos mitóticos los cuales se unen a los centrosomas y cinetocoro, después ocurre la metafase donde los cromosomas se concentran en el ecuador y durante la anafase estos se separan a polos opuestos, acto seguido la formación de nuevas membranas nucleares ocurren en la telofase y separándose finalmente durante la citocinesis en dos células hijas independientes [19].



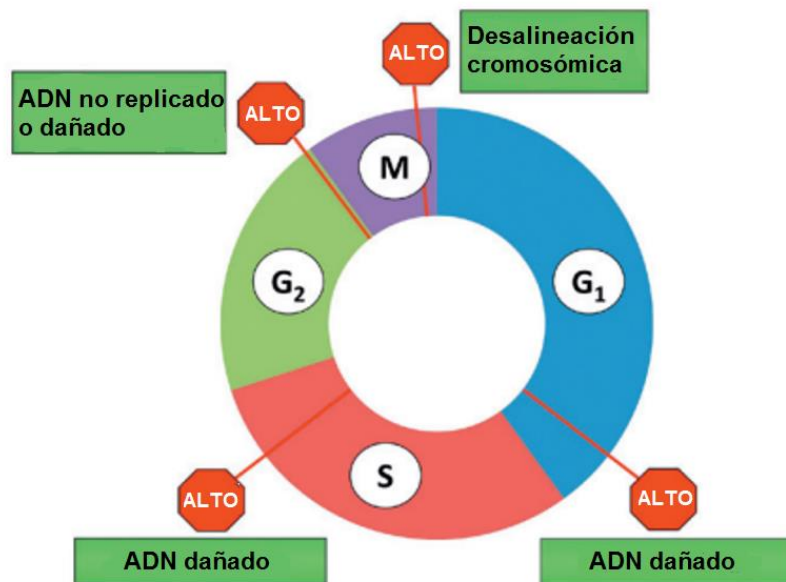
**Figura 11. Etapas de la mitosis.**

El ciclo celular posee distintos sitios de control debido a la cantidad de información que maneja y la importancia de su correcto desarrollo, para evitar malformaciones o mutaciones en las células resultantes, por lo que todo un conjunto de proteínas se encarga de evitar este tipo de errores a lo largo del ciclo. Entre las proteínas más importantes se encuentran las ciclinas y ciclinas dependientes de quinasa (CDKs), las cuales se encuentran en la mayor parte del ciclo celular (figura 12), ambos tipos de proteínas se complementan ya las CDKs se consideran inactivas en la ausencia de su ciclina pareja; el primer grupo de ciclinas permite el acceso al ciclo a raíz de respuestas extracelulares, así mismo son necesarias para mantener la correcta transición a la fase S y finalmente son necesarias para el inicio de la replicación y entrada a mitosis [19].



**Figura 12. Ciclinas y CDKs involucradas en el ciclo celular.**

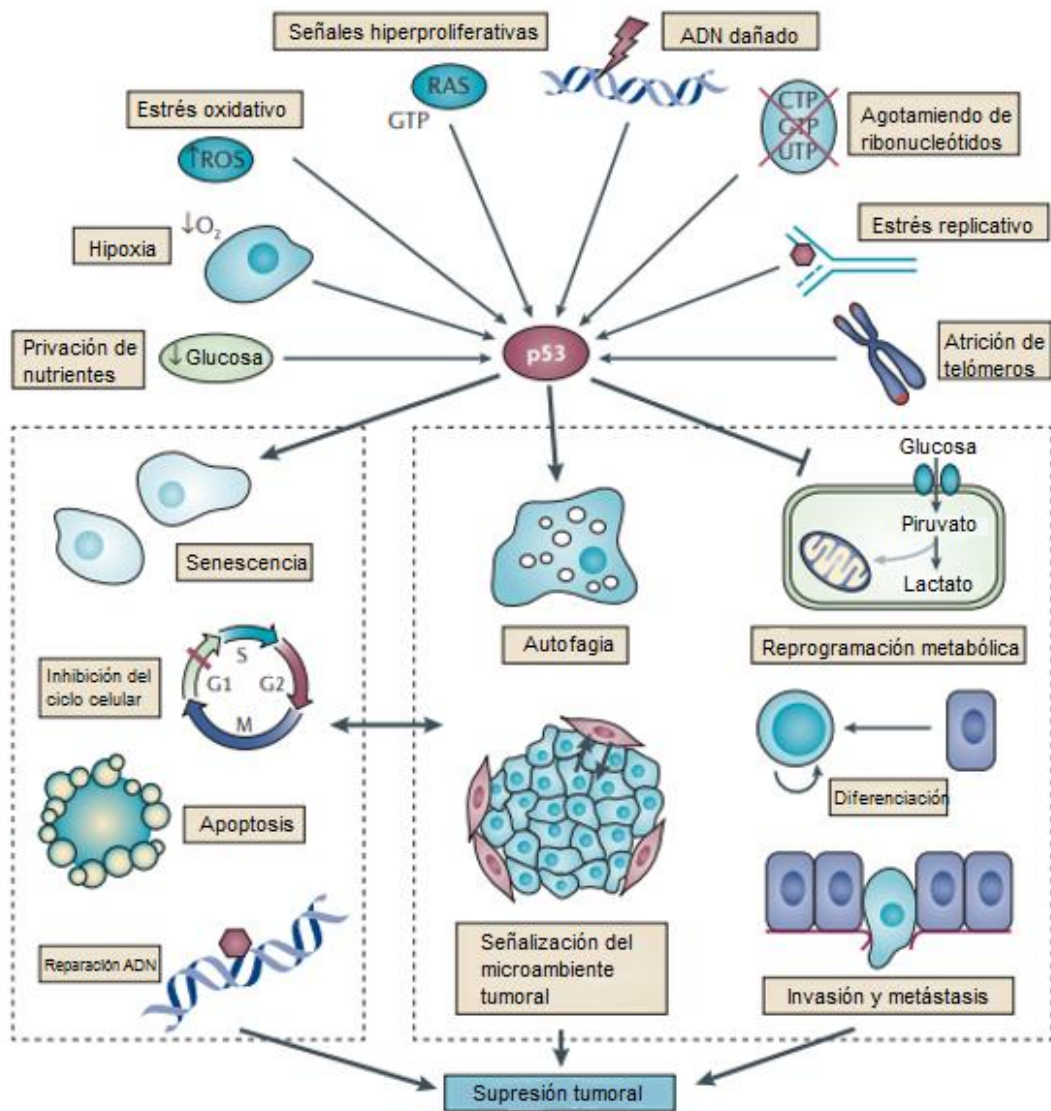
Así mismo existen distintos sitios de control (figura 13) donde el ciclo sufre un paro momentáneo para asegurarse de que no existe daño en ADN o cromosomas, estos procesos son regulados por un conjunto de nuevas proteínas, entre las cuales destaca p53 [19].



**Figura 13. Sitios de control correspondientes al ciclo celular.**

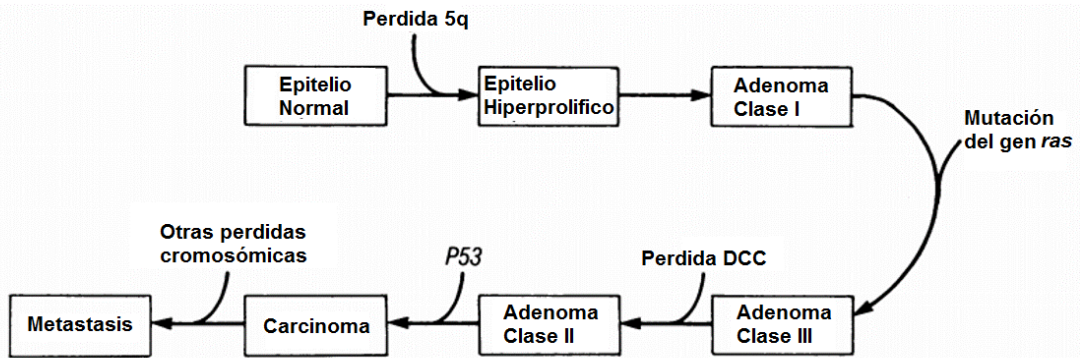
La proteína p53 es un supresor tumoral crucial en el ciclo celular el cual responde a diversas señales de estrés regulando una respuesta específica resultando en el arresto del ciclo, senescencia o apoptosis (figura 14) [20], se ha observado

que más del 50% de los cánceres en humanos tienen una relación directa con la inactivación a partir de mutaciones de esta proteína [21].



**Figura 14. Factores que promueven a p53 y sus efectos.**

El cáncer, como se mencionó anteriormente se caracteriza por un crecimiento descontrolado de células, las cuales no pueden completar su ciclo de vida normal, es decir no mueren, debido a daños ocasionados en el ADN a causa de factores ambientales, hereditarios o epigenético [14], desencadenando diferentes mecanismos moleculares tales como la activación de proto-oncogenes por translocación o mutaciones puntuales o la inactivación de genes completos desencadenando patologías específicas (figura 15) [22].



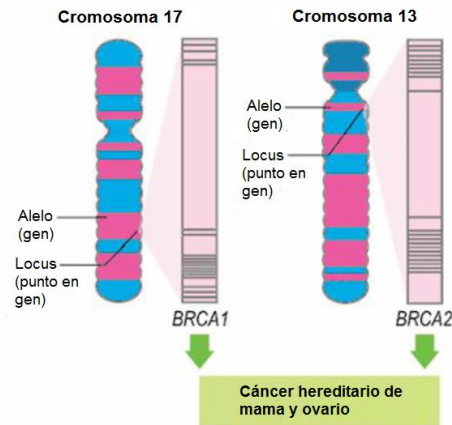
**Figura 15. Evolución de una célula cancerígena.**

Las antiguas teorías del cáncer nos remontan nuevamente a Hipócrates y los 4 “humores” (figura 16), en la cual un exceso de bilis negra en un órgano específico era la causa de dicha enfermedad, en esa época las autopsias fueron prohibidas limitando los conocimientos que se tenían sobre el cáncer. Su estudio se retomó en el siglo XVII creyéndose que el crecimiento de tumores se debía a un constante flujo de linfa por el cuerpo, inclusive hasta un siglo después, científicos creían que esta enfermedad era contagiosa y se diseminaba a través de un parásito [14].



**Figura 16. Los cuatro humores según Hipócrates.**

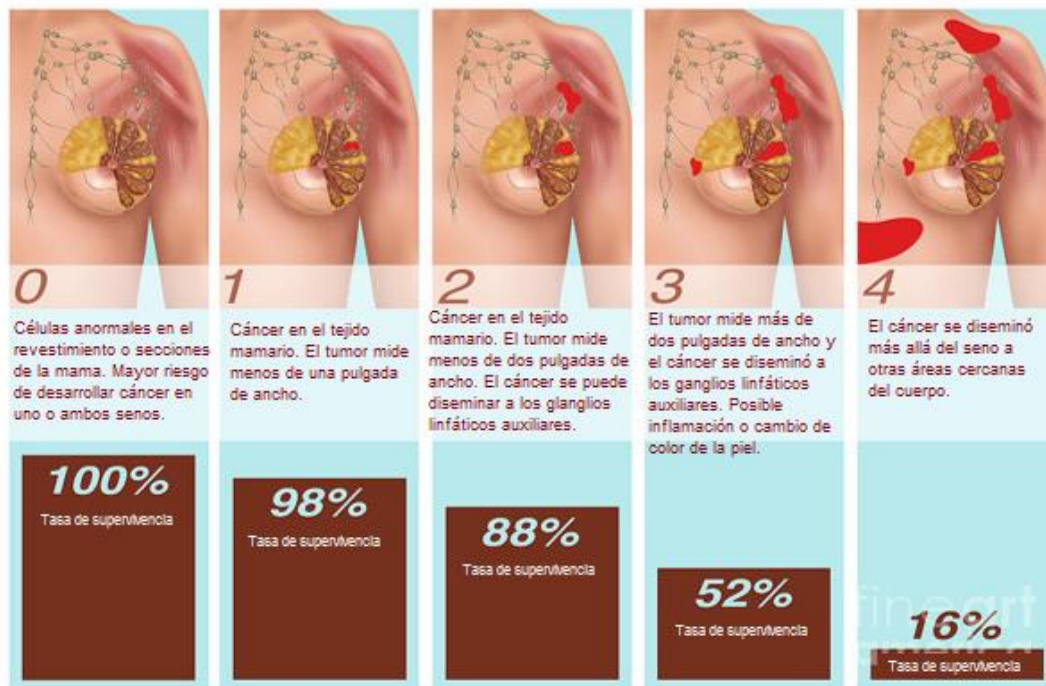
No fue hasta el siglo XX cuando se empezó a resolver los paradigmas químicos y biológicos detrás del cáncer, a raíz del descubrimiento de la estructura helicoidal del ADN se ahondó en el funcionamiento de los genes y como estas las mutaciones los afectaban (figura 17); se identificó a ciertos químicos, radiaciones, virus y factores hereditarios como la posible causa de la enfermedad, los cuales ocasionaban daños al ADN y por consiguiente el crecimiento anormal de células, las cuales no morían [14].



**Figura 17. Mutaciones involucradas en el desarrollo del cáncer de mama.**

Para determinar el mejor tratamiento contra el cáncer se deben de tomar en cuenta distintos factores asociados a la enfermedad, la AJCC (American Joint Cancer Committee) ha clasificado dicha patología en 4 fases (figura 18) acorde a 3 parámetros tumor-nodo-metástasis (TNM), la categoría T se determina por la profundidad o espesor del tumor primario, expresado en mm, teniendo como una sub-clasificación en base a la generación de ulceras, el factor N es determinado por la presencia de y grado de afectación de los ganglios linfáticos regionales y por último el factor M se determina por la presencia o ausencia de metástasis lejana, el sitio de enfermedad y los niveles de LDH en suero. Los melanomas en etapa I y II se caracterizan por no esparcirse a los ganglios linfáticos regionales, en la etapa III ya existe una propagación a los ganglios linfáticos y/o la presencia de metástasis satelitales, por último, la fase IV involucra la propagación de metástasis a distancia disminuyendo las probabilidades de supervivencia del paciente [23].

## Etapas del cáncer de mama



**Figura 18. Etapas del cáncer de mama.**

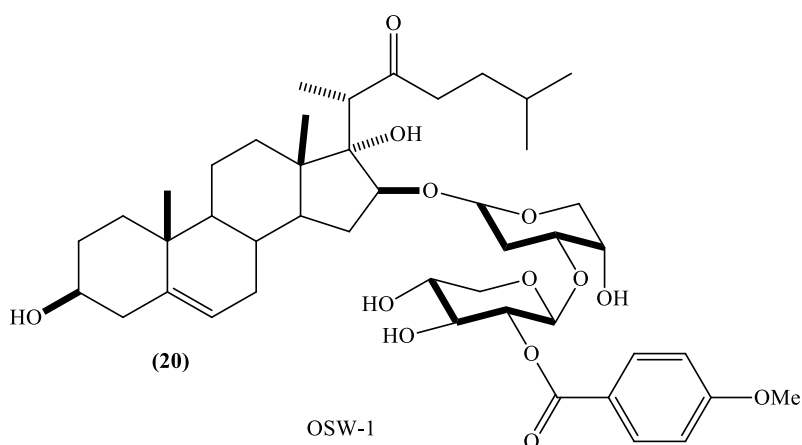
Los tratamientos actuales (figura 19) abarcan la extracción quirúrgica de los tumores generados con la finalidad de erradicar las células malignas del organismo, el uso de una mezcla de fármacos no específicos que ayudan a eliminar las células “malas” pero que a la vez generan numerosos efectos adversos [14], la terapia hormonal en donde se utilizan inhibidores de aromatasas los cuales disminuyen la cantidad de estrógeno en el organismo relacionado a el desarrollo de cáncer tipo hormona dependiente [24], la radioterapia que utiliza rayas X, gamma entre otro tipo de radiaciones para la eliminación puntual de un grupo de células o tumores y la inmunoterapia que ocupa anticuerpos monoclonales para activar la respuesta inmune y generar una cascada de señalización que ayude en la activación de factores que controlen el crecimiento tumoral [14].



**Figura 19. Terapias tradicionales contra cáncer.**

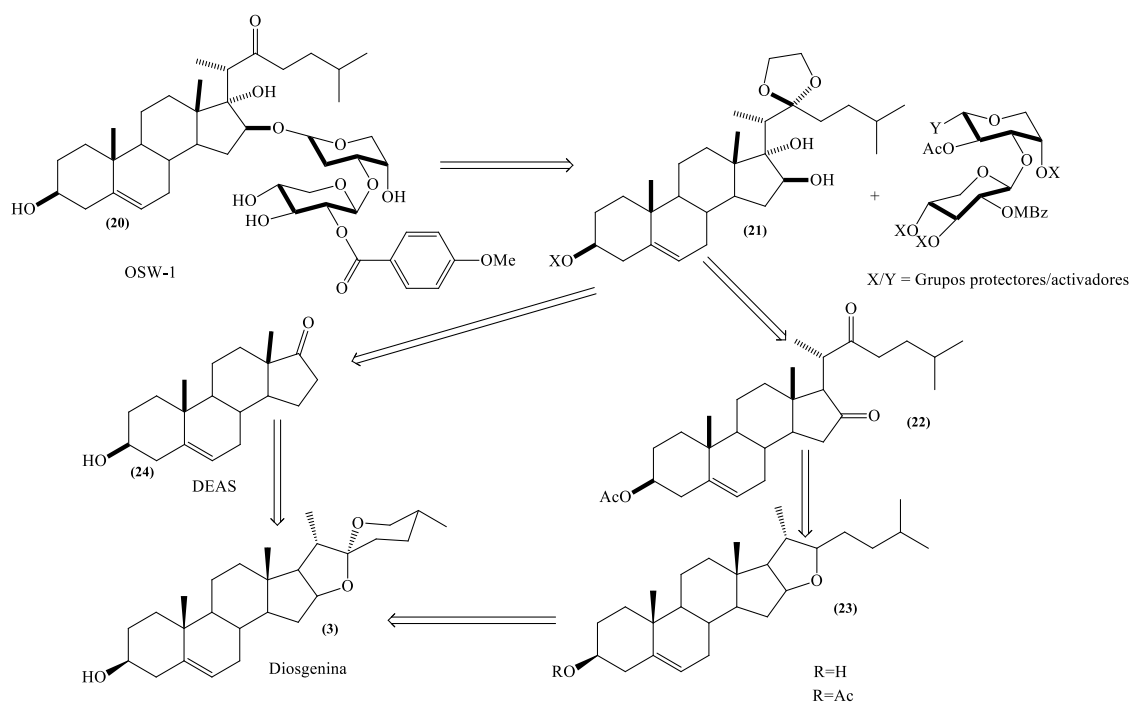
Debido a los efectos secundarios provocados por las terapias tradicionales se continua en la búsqueda de nuevos tratamientos que no afecten células sanas, entre los que destacan el desarrollo de ARN pequeños o el estudio de su expresión durante la enfermedad, así mismo se busca la creación de nuevos fármacos que induzcan la muerte por apoptosis de células malignas [14].

Entre los compuestos esteroidales que tienen relevancia como anticancerígenos se encuentra el OSW-1 (figura 20) una saponina esteroideal que pertenece a la familia de los glicósidos colestánicos [25], aislada en 1992 de los bulbos de una planta decorativa llamada *Ornithogalum saundersiae*; el creciente interés por este compuesto radica en su alta actividad citostática, al tener un  $IC_{50}$  0.02-0.3 nM es de 10 a 100 veces más potente que muchos agentes anticancerígenos clínicamente aprobados, tal es el caso de la mitomicina C, adriamicina, cisplatino, campotecina, taxol, entre otros. Aunado a esto su toxicidad es menor para células sanas comparado con los compuestos mencionados anteriormente [26].



**Figura 20. Estructura de OSW-1.**

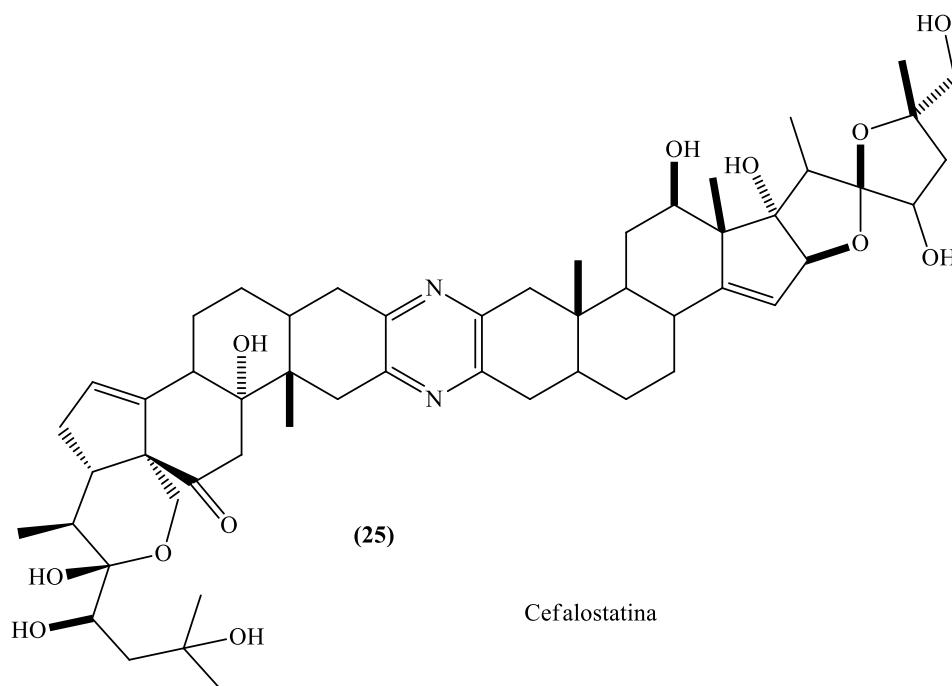
Se han buscado nuevas formas para la obtención del compuesto OSW-1 debido a su escaso rendimiento al aislarlo directamente de la planta, desarrollándose diferentes rutas de síntesis sin obtener resultados alentadores ya que se obtienen bajos rendimientos a causa de los numerosas reacciones realizadas para la obtención del producto o precursores del mismo (esquema 3) [26] [27].



**Esquema 3. Análisis retro sintético para la obtención de OSW-1**

En un principio se creía que el mecanismo de acción del OSW-1 era similar al de las cefalostatinas (figura 21) [25], las cuales son alcaloides esteroidales aislados de organismos marinos con una notoria actividad anticancerígena relacionada a su habilidad de producir apoptosis mediante transportadores de

secuenciamiento mitocondriales de tipo Smac/DiABLo [28] a comparación de OSW-1 causando daño a nivel membrana mitocondrial, lo cual aumenta los niveles de calcio en citosol desencadenando el mismo mecanismo de muerte [26].

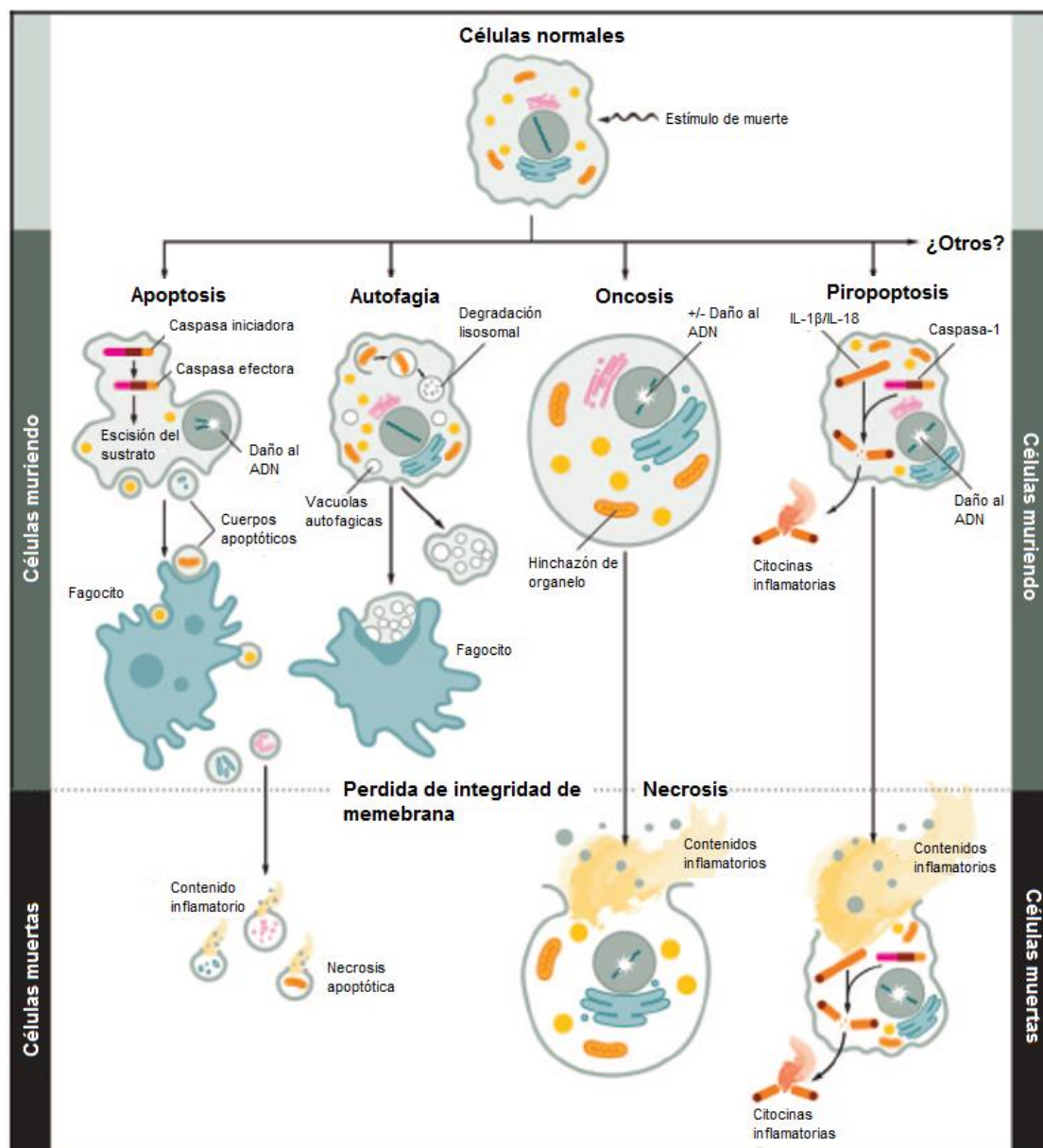


**Figura 21. Estructura de cefalostatina.**

El tipo de muerte que produce un fármaco es importante, ya que existen distintos mecanismos de muerte en células, cada uno con sus características:

La muerte por apoptosis se refiere a una muerte celular programada para evitar la acumulación de tejido, es mediada por caspasas, produciendo cuerpos apoptóticos los cuales son degradados por fagosomas reutilizando los componentes celulares y no generando una respuesta inflamatoria. Por otro lado, la necrosis se considera una muerte pasiva y accidental que resulta de las perturbaciones del ambiente desencadenando una respuesta inflamatoria. Por otro lado, existen otros tipos de muerte que no han sido tan estudiados, como es el caso de la oncosis la cual es una vía pre-lethal que conduce a la muerte a causa de hinchazón celular y aumento de la permeabilidad en membrana produciendo un efecto proinflamatorio en el organismo; la autofagia consiste en la degradación de componentes celulares y células muertas a través de vacuolas, siendo un proceso no inflamatorio, por último la piroptosis es un mecanismo

dependiente de caspasa-1 que destruye la membrana desencadenando un proceso proinflamatorio (esquema 4) [29].

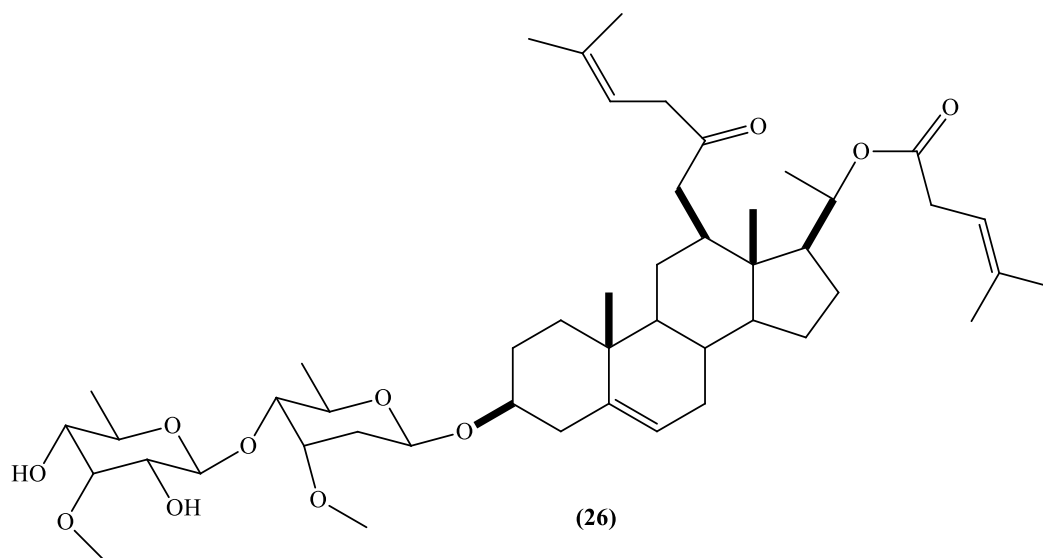


**Esquema 4. Mecanismos de muerte celular**

Actualmente existen diversos estudios *in vitro* para estudiar citotoxicidad y mecanismos de acción de nuevos compuestos, esto se realiza en líneas cancerígenas inmortalizadas y a partir conjunto de técnicas específicas, tal es el caso de los siguientes compuestos esteroidales:

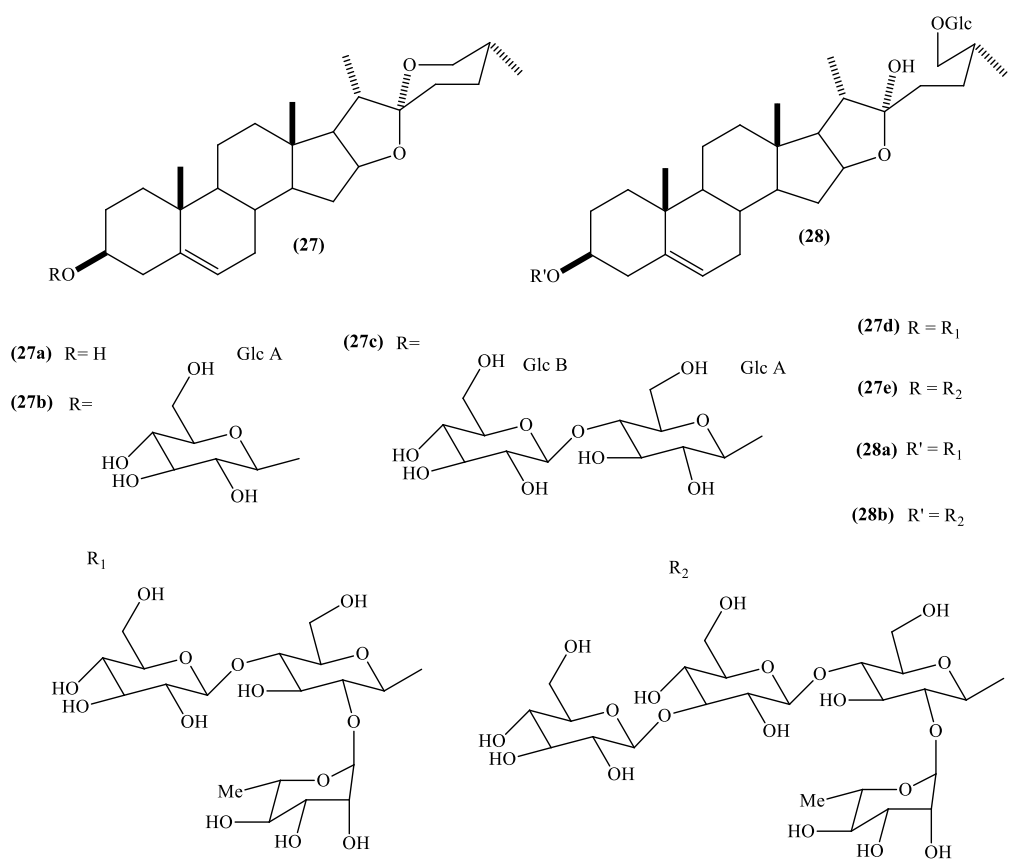
El aislamiento de compuestos de interés a partir de plantas ha sido de importancia para la investigación, una prueba de ello son las saponinas glicosiladas (figura 22) aisladas de *Fagonia indica*, un arbusto pequeño utilizado

por su actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Se realizaron pruebas con el compuesto en líneas células de cáncer de mama y de colon, teniendo una actividad apoptótica en la el cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-468) y colon (CaCo-2) en bajas concentraciones, mientras que en otra línea de cáncer (MCF-7) tiene un efecto necrótico a altas concentraciones [30].  $\beta$



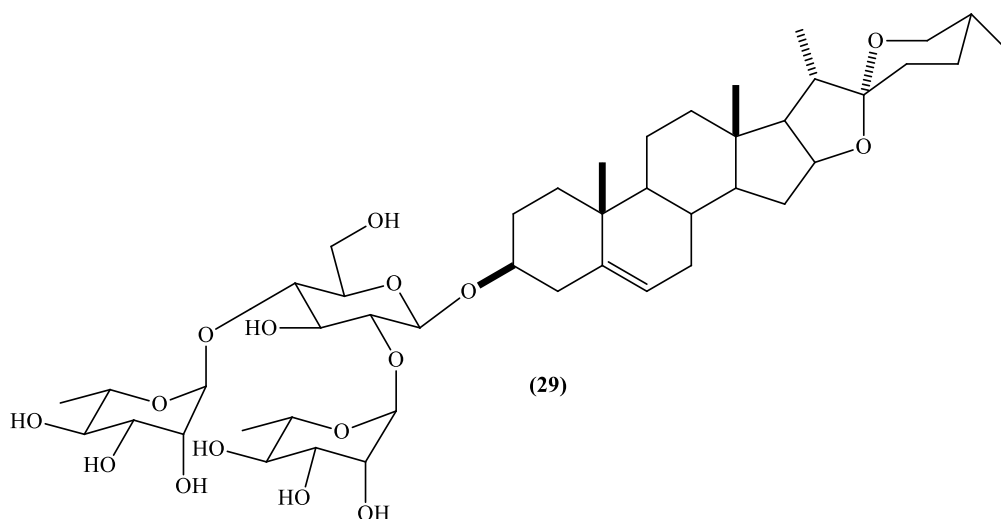
**Figura 22. Saponina aislada de *Fagonia indica*.**

Otra planta de interés es *Dioscorea zingiberensis* Wright, de la que se han aislado saponinas esteroidales tales como: diosgenina, deltonina, parviflosida y saponina zingiberensis (figura 23), siendo la última evaluada en diferentes líneas de cáncer de tipo humano y murino, determinando que la muerte inducida por este compuesto es de tipo apoptótico mediada por caspasas de tipo 3 y 9 [31].



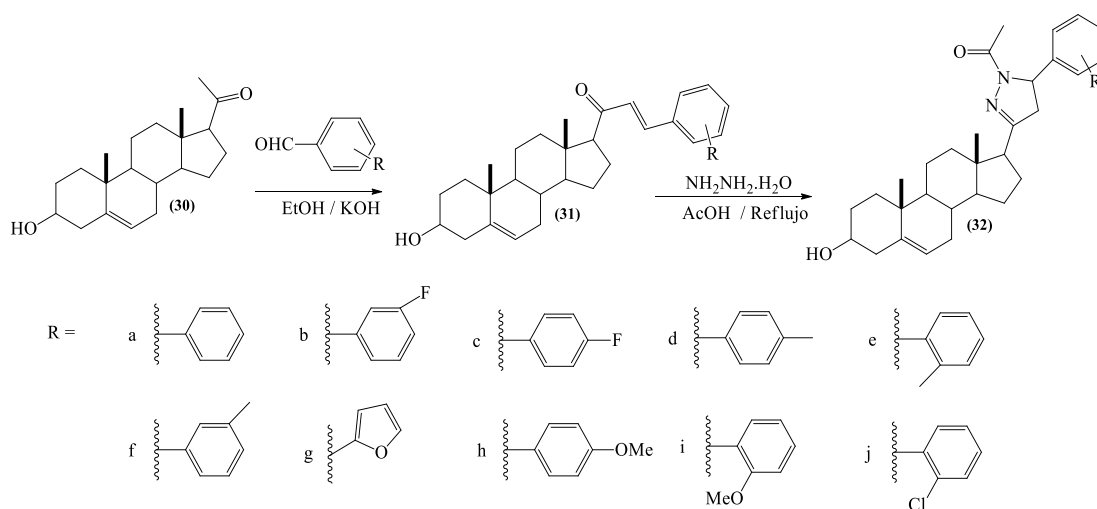
**Figura 23. Estructura de (a) diosgenina, (b) trilina, (c) diosgenina diglucosidada, (d) deltonina, (e) saponina zingiberensis, (f) protodeltonina y (g) parviflosido.**

Por otra parte, diversos grupos de investigación se han dedicado a la modificación de compuestos activos de plantas con la finalidad de potenciar su actividad o conferirles otras diferentes, tal es el caso de las modificaciones realizadas en dioscina (figura 24) una saponina esteroidea que posee una potente actividad anticancerígena, por lo cual se realizaron modificaciones en la parte glicosídica con la finalidad de potenciar su actividad [32].



**Figura 24. Estructura de dioscina.**

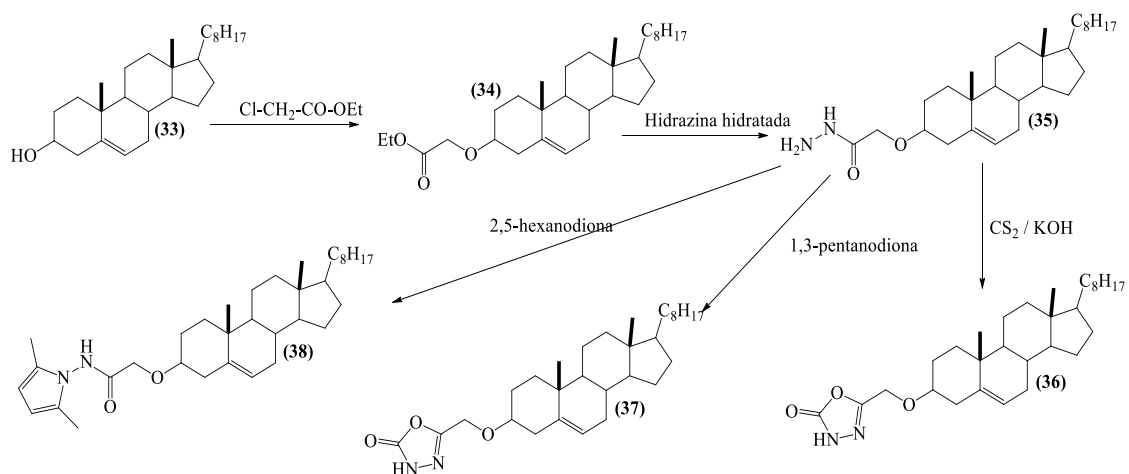
Otro tipo de compuestos esteroidales de interés son las pirazolinas, el grupo de investigación de Bandy y colaboradores realizaron diferentes modificaciones en el anillo D (esquema 5) de este tipo de compuestos con la finalidad de evaluar su actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de colon (HT-29 y HCT-15), pulmón (HOP-62 y A549), mama (MCF-7) y del sistema nervioso central (SF-295), obteniéndose resultados interesantes de IC<sub>50</sub> en 4 compuestos sintetizados [33].



**Esquema 5. Pirazolinas sintetizadas.**

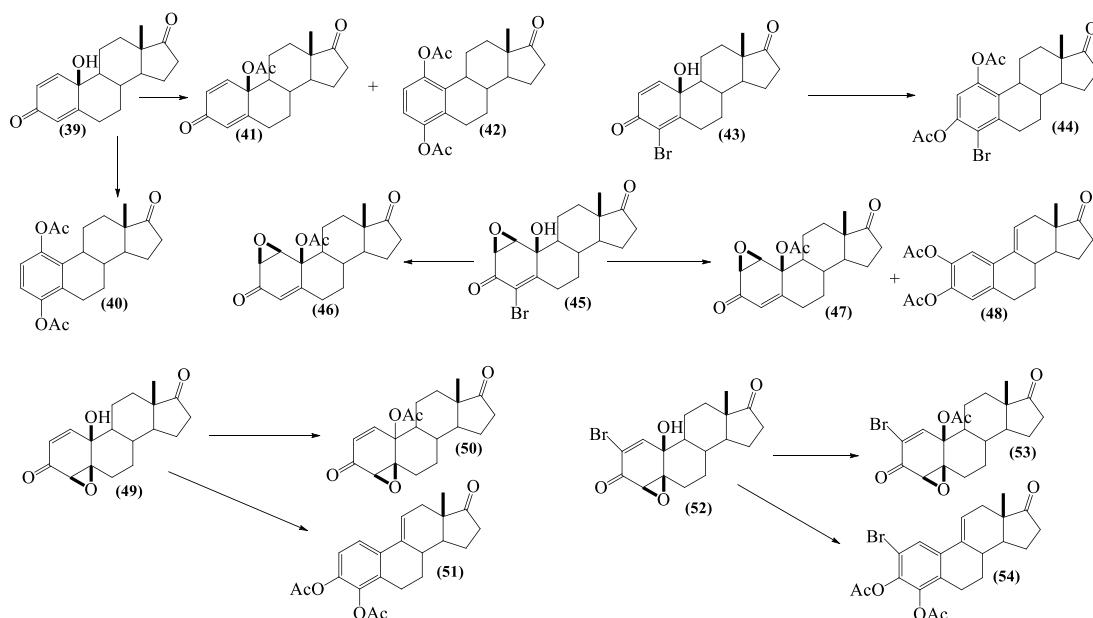
Por otro lado, Shamsuzzaman y colaboradores modificaron una estructura colestánica para obtener sus derivados oxadiazoles, pirroles y pirazoles (esquema 6) para probar su actividad como anticancerígeno sobre una línea

celular correspondiente a leucemia (HL-60), mediante el ensayo de citotóxica MTT, obteniendo resultados favorecedores en uno de sus compuestos [34].



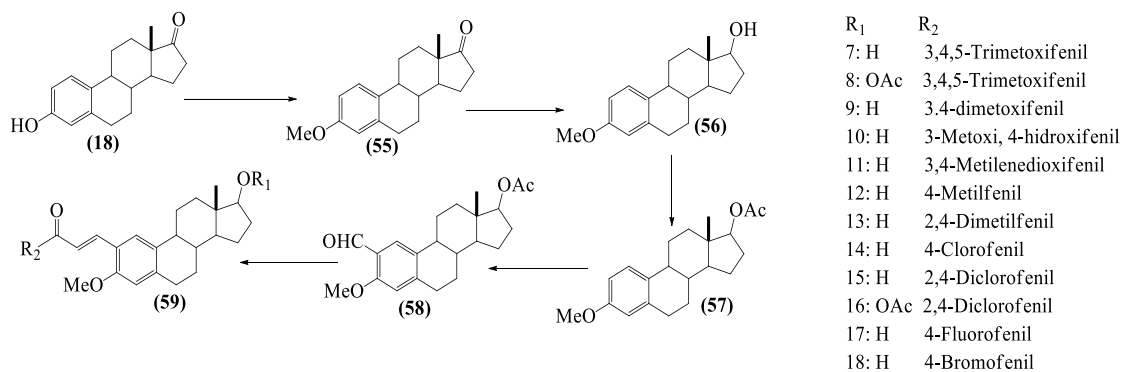
**Esquema 6. Síntesis de derivados oxiadiazoles, pirroles y pirazoles.**

Milic y colaboradores probaron modificaciones en el anillo A (esquema 7) de compuestos esteroidales con el fin de probarlos en más de 60 líneas celulares de distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentra, cáncer de pulmón, colon, sistema nervioso central, próstata, leucemia, entre otro, obteniendo resultados interesantes en 3 de sus compuestos [35].



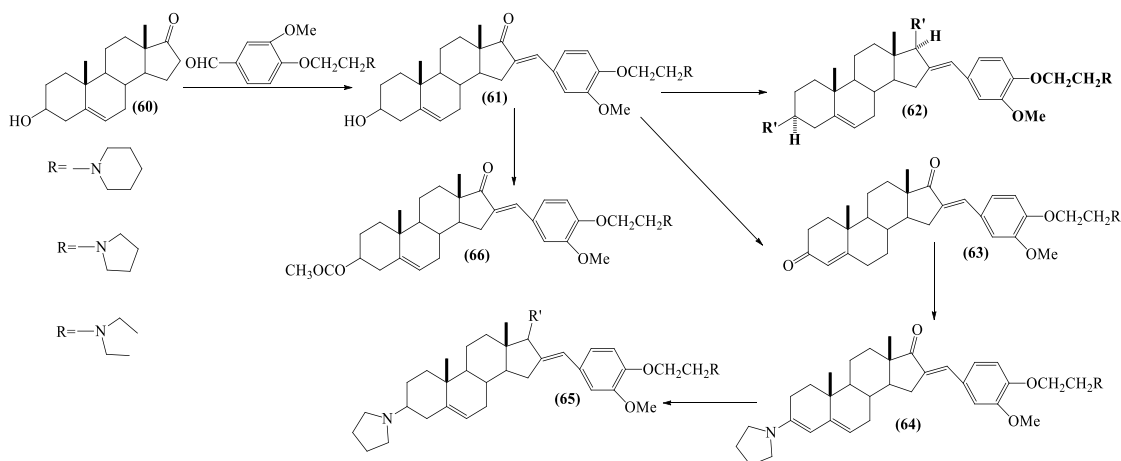
**Esquema 7. Modificaciones en el anillo A de compuestos esteroidales.**

Mientras tanto Saxena y colaboradores buscaron la forma de sintetizar derivados de chalconas acoplados a una estructura esteroidal (esquema 8), probando sus resultados en MCF-7 una línea celular correspondientes a cáncer de mama, colon, hígado, etc. [36].



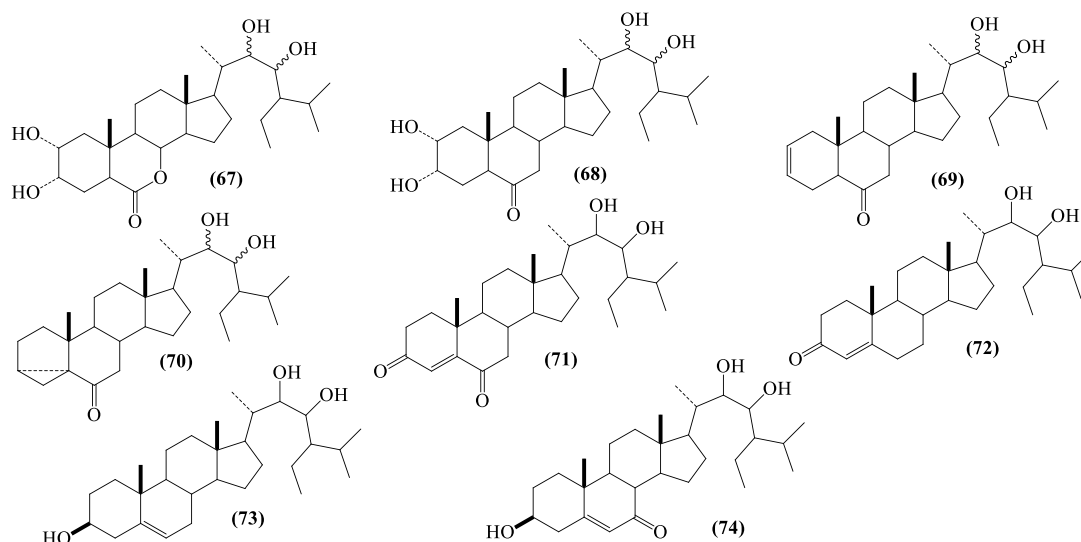
### Esquema 8. Síntesis de derivados de chalconas probados en líneas de cáncer.

Bansal y Guliera desarrollaron una ruta de síntesis para la obtención de nuevos compuestos 16E-arilideno androstánicos (esquema 9) para su evaluación contra líneas de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso central [37].



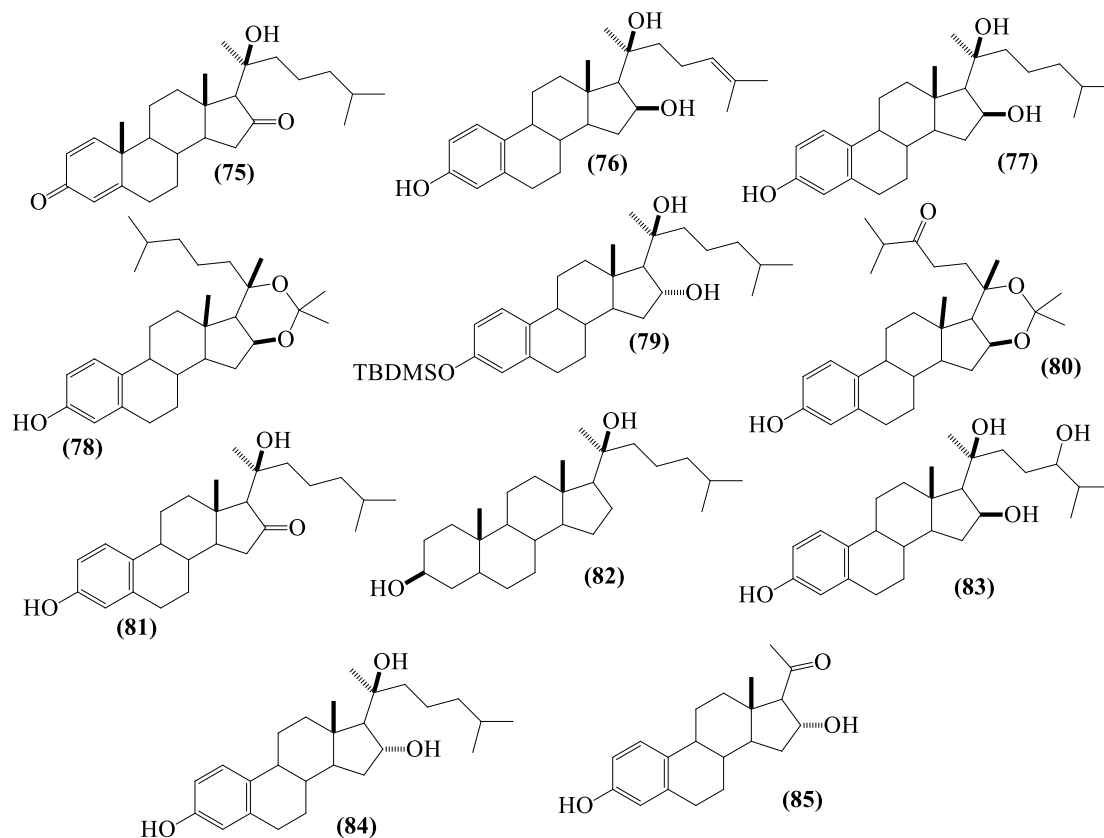
### Esquema 9. Síntesis de nuevos derivados androstánicos.

Misharin y colaboradores llevaron a cabo la síntesis de 8 derivados del 22,23-dihidroxiestigmastano (figura 25) y sus respectivos isómeros para su prueba contra líneas celulares de cáncer de mama, ovario y próstata obteniendo resultados alentadores [38].



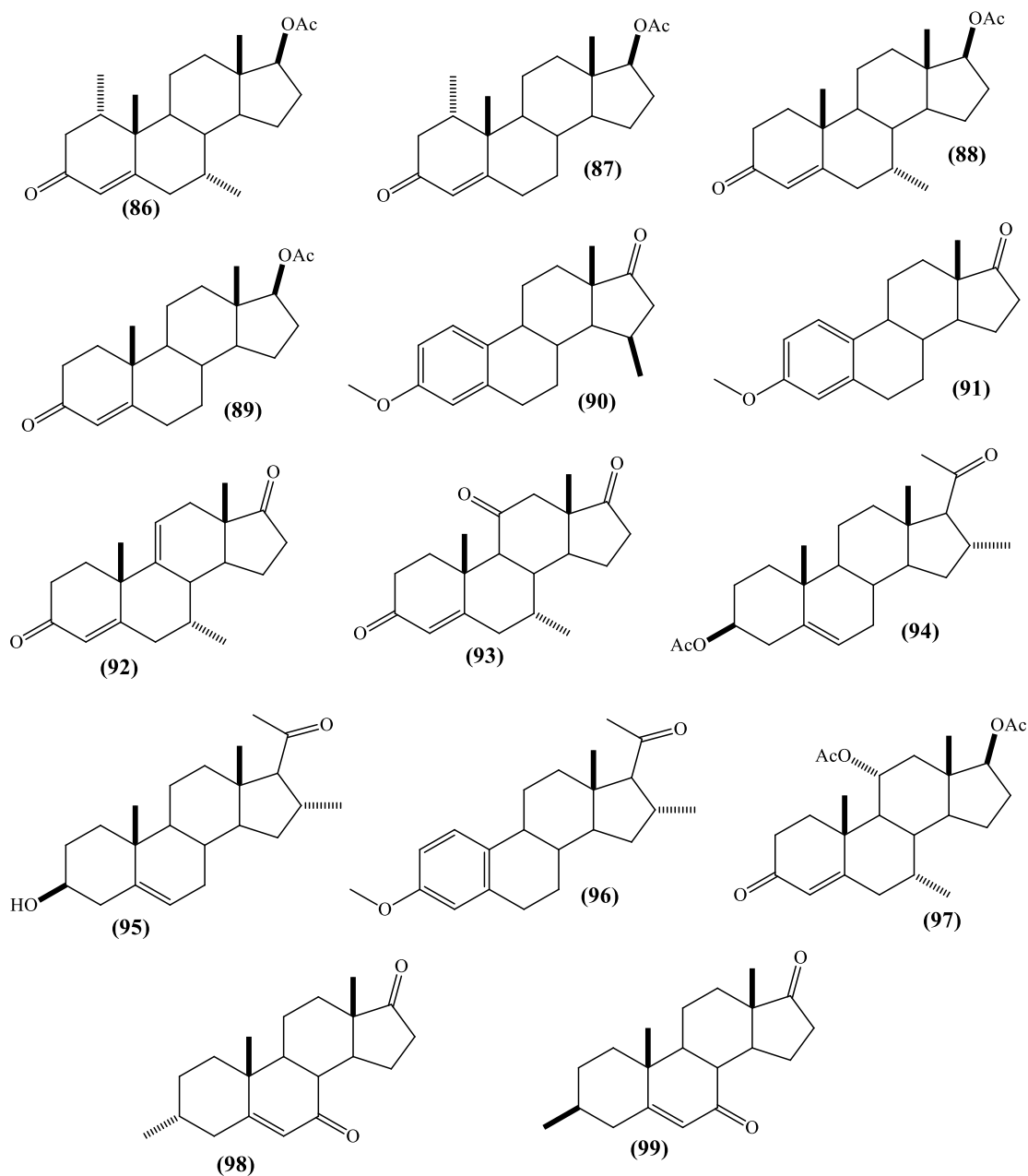
**Figura 25. Derivados del 22,23-dihidroxiestigmastano.**

Bunyathaworn y colaboradores a partir de estructuras de sapogeninas esteroidales llegaron a la interconversión del anillo A para la generación de nuevos derivados de estradiol (figura 26), modificando la cadena lateral y las sustituciones en la posición 3 evaluándose en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), pulmón (NCI) y oral (KB) [39].



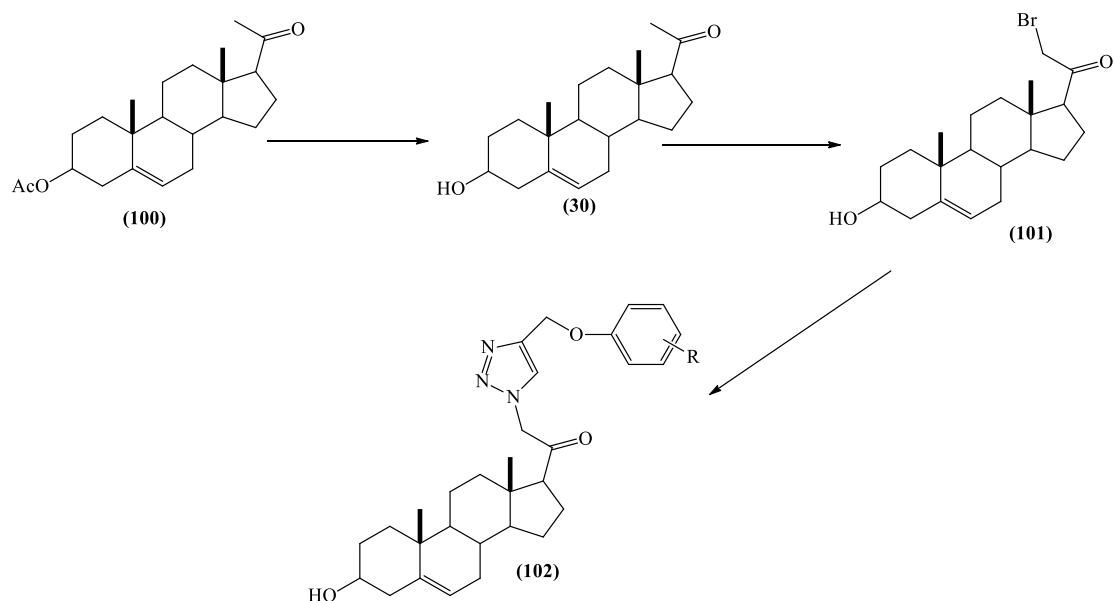
**Figura 26. Compuestos probados contra líneas celulares de cáncer.**

Chun Li y colaboradores realizaron una síntesis selectiva de sustitutos metilo en hormonas esteroidales (figura 27) para probar su actividad citotóxica contra MGC-803, línea celular de cáncer gástrico [40].



**Figura 27. Derivados de hormonas esteroidales probados en MGC-803.**

Banday y colaboradores realizaron modificaciones en el anillo D de pregnanos (esquema 10) para observar como afectaba la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de próstata, colon, sistema nervioso central, hígado y pulmón [41].



**Esquema 10. Ruta de síntesis para la obtención de los derivados de interés.**

La constante búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas de interés ha originado la creación de diversos estudios en el área de la salud, como se puede apreciar en la mayoría de los compuestos sintetizados reportados en la literatura la presencia de grupos cetónicos en las estructuras es común, de ahí el interés de sintetizar esteroides que tuviesen presentes este grupo y hacer una comparación acorde a la actividad como anticancerígeno que tienen frente a otros grupos funcionales.

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

Actualmente el cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia a nivel social, debido al gran número de casos presentados y la alta tasa de mortandad generada por dicha patología. En México el cáncer de mama y cervicouterino son la primera y segunda causa de muerte por cáncer respectivamente, siendo un problema de salud el cual demanda la búsqueda de soluciones efectivas, viables y con mejores resultados que las ya establecidas. Por lo que la implementación de terapias alternativas como es el caso del tratamiento del cáncer con esteroides, el cual ha creado un área de búsqueda e investigación para el desarrollo de nuevas soluciones que sean más amigables con los pacientes, así como disminuir los efectos provocados por tratamiento tradicionales, observándose desde hace tiempo que este tipo de compuestos tiene un efecto y regulación sobre el sistema lo cual ayuda a la generación de una respuesta favorable para los fines antes mencionados. En este trabajo se presenta la síntesis de derivados de hecogenina para su aplicación en pruebas biológicas contra cáncer de mama y cervicouterino, como propuesta para el futuro desarrollo de un tratamiento contra dicho padecimiento, si se obtiene una actividad favorable.

## 4. HIPÓTESIS

---

- La inserción de grupos cetónicos a la estructura esteroideal potenciará el efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer tipo hormona dependiente y la presencia de grupos acetilo favorecerá la actividad en líneas no-hormona dependientes.
- Las condiciones de temperatura, tiempo y tipo de reactivos afectaran la selectividad de reacción y por ende la formación de subproductos.
- La solubilidad de los productos se verá afectada por los grupos polares que contenga la molécula.
- Las líneas celulares susceptibles a receptores hormonales o que estén involucrados en vías metabólicas afines serán más susceptibles a las pruebas con los compuestos.

## 5. OBJETIVOS

---

### 5.1 Objetivo General

- Sintetizar selectivamente nuevos análogos cetónicos de hecogenina para comprobar su efecto citotóxico en líneas de cáncer hormona y no-hormona dependientes.

### 5.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y purificar los nuevos derivados cetónicos de interés en cantidades adecuadas para su evaluación biológica.
- Proliferación de líneas celulares de Hormona y no-Hormona dependientes.
- Analizar el efecto citotóxico en función de la posición del grupo cetónico en el esqueleto esteroidal.
- Caracterizar por diferentes métodos espectroscópicos los nuevos derivados cetónicos obtenidos.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

### 6.1 Equipos, técnicas y materias primas

#### 6.1.1 Equipos y técnicas síntesis

- Punto de fusión

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Melt Temp, mediante rampas de temperatura de 10 °C/min y 1°C/min por la técnica de capilar abierto y no fueron corregidos.

- Rotación óptica

La desviación óptica fue medida en un polarímetro compacto modular MCP100 con celda de 10 cm de longitud y una longitud de emisión de 589 nm (emisión del Na) a temperatura constante de 25 °C, en solución de cloroformo o metanol según su solubilidad y se presenta como rotación óptica específica.

- Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 500 MHz se obtuvieron en el equipo Bruker para la obtención de experimentos de 1D (1H, 13C y DEPT) y 2D (COSY, HMBC, HSQC, NOESY), utilizando cloroformo deuterado conteniendo tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$ ), las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hertz (Hz).

- Espectroscopia de infrarrojo

Para la obtención de los espectros de IR se utilizó un equipo Agilent Cary 630 FTIR, con interfases ATR con punta de diamante para sólidos y DIAL PATH para líquidos, la ubicación de las bandas de transmitancia se expresa en número de onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

- Espectrometría de masas

Para la obtención de los datos de masa molecular exacta y espectros de masas se utilizó un equipo HPLC-acoplado a Agilent 6230 TOF LC/MS

### 6.1.2 Técnicas de purificación

- Cromatografía en capa fina

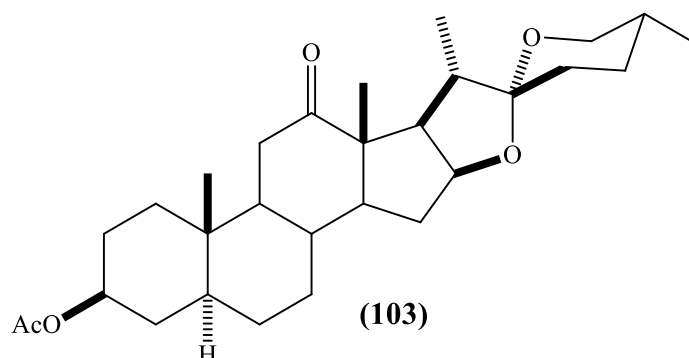
Para el monitoreo de los procesos realizados se utilizaron placas cromatográficas de gel de sílice, como fase móvil se agregó sistema a partir de hexano-acetato de etilo, para su revelado se empleó solución 50/50 agua-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y exposición térmica.

- Cromatografía en columna

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, Alemania, de acuerdo con la técnica "flash" utilizando un sistema de eluyente de hexano/acetato de etilo con polaridad creciente.

### 6.1.3 Materias primas de síntesis

- Acetato de hecogenina



**Figura 28. Acetato de hecogenina.**

El acetato de hecogenina (103) se obtuvo de fuentes comerciales y se purificó por columna cromatográfica con sistema 9:1 (hexano: acetato de etilo) y caracterizó por métodos físicos y espectroscópicos, obteniéndose un polvo blanco.

#### **Caracterización.**

Formula molecular: C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>, P.M.: 472.66, Polvo blanco amorfo, p.f. 205-207 °C,  $\alpha_D = -13.4^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c=1.0), IR: 2957 (CH), 1734 (AcO), 1702 (CO), 1223 (C-O), [M+H<sup>+</sup>]= 473.3241, calc: 472.3243

## RMN <sup>1</sup>H

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 4.67 (tt, *J* = 11.2, 4.7 Hz, 1H, H-3), 4.43 – 4.26 (m, 1H, H-16), 3.56 – 3.43 (m, 1H, H-26e), 3.35 (tt, *J* = 11.0, 1.4 Hz, 1H, H-26a), 2.51 (ddt, *J* = 8.4, 6.7, 1.6 Hz, 1H, H-17), 2.40 (td, *J* = 13.9, 13.3, 1.6 Hz, 1H, H-11''), 2.22 (ddd, *J* = 14.4, 4.9, 1.7 Hz, 1H, H-11'), 2.12 (ddd, *J* = 9.2, 4.6, 1.7 Hz, 1H, H-23-e), 2.04 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, H-20), 2.03 – 2.01 (m, 3H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3''), 1.06 (d, *J* = 5.2 Hz, 4H), 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27).

## RMN <sup>13</sup>C

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 73.17 (C-3), 170.60 (CH<sub>3</sub>-COO-3), 55.32 (C-5), 213.38 (C-12), 55.09 (C-13), 79.17 (C-16), 53.51 (C-17), 16.03 (C-18), 11.87 (C-19), 13.28 (C-21), 109.23 (C-22), 66.88 (C-26), 17.14 (C-27).

### 6.1.4 Equipos biológicos

- Campana de flujo laminar

Para cultivo celular se utilizó una campana de flujo laminar vertical modelo CFL-100V Prendo-Seve, con filtro absoluto HEPA que atrapa partículas hasta 0.3 micras, las paredes tienen una cubierta de acero inoxidable y un recubrimiento de epoxipoliéster, equipado con lámpara de luz fluorescente y de luz UV.

- Incubadora

Para el desarrollo de las líneas celulares se utilizó una incubadora de CO<sub>2</sub> Forma, Steri-Cycle de Thermo Scientific, que cuenta con control de temperatura preciso, sensor TC (conductividad térmica) o de IR, con ciclos de descontaminación a alta temperatura. Tiene incorporado un sistema de filtración de aire HEPA en cámara exclusiva.

- Lector de placas

Para la lectura de los experimentos, se utilizó un Fotómetro para microplacas Multiskan FC de Thermo Scientific, mide la absorbancia en una longitud de onda entre 340 y 850nm, lectura rápida de 96 y 384 pocillos, cuenta con agitación e incubación de hasta 50°C.

### 6.1.5 Técnicas biológicas

- Esterilización

Para la correcta esterilización y limpieza del cuarto de cultivo se emplea una solución de etanol al 70% y posteriormente se irradian las superficies con luz UV, así mismo el material y reactivos utilizados se esteriliza ya sea por irradiación, filtración o por autoclave, esto con la finalidad de eliminar cualquier fuente de contaminación que afecte a las células en desarrollo.

- Descongelamiento

Se tempera el contenido del criovial y se añade el contenido mediante pipeteo a un falcón que contenga medio suplementado, posteriormente se centrifuga para la obtención del pellet celular y su posterior siembra en un frasco T-25 para la correcta aclimatación de las células.

- Congelamiento

Al llegar a confluencia se opta por la tripsinización de las mismas y su posterior congelación para crear un banco de trabajo adecuado, se utilizan sustancias criopreservantes como el DMSO para el correcto almacenamiento de las células, procurando la viabilidad de las mismas.

- Tripsinización

Mediante este proceso se busca deshacer las células de la superficie del frasco para su manipulación ya sea para conteo celular, congelación, o pase a un frasco con mayor superficie para seguir su proliferación, se utilizan enzimas como la tripsina con la finalidad de romper las interacciones entre las células y la superficie del material.

- Conteo celular

Se utiliza azul tripano para la diferenciación de las células vivas de las muertas, tomándose como células muertas las teñidas y las que no como vivas para su posterior inserción en una cámara de Neubauer para su conteo, con la finalidad de sembrar una cantidad específica de células en las placas o frascos a ocupar.

- Experimento antiproliferativo

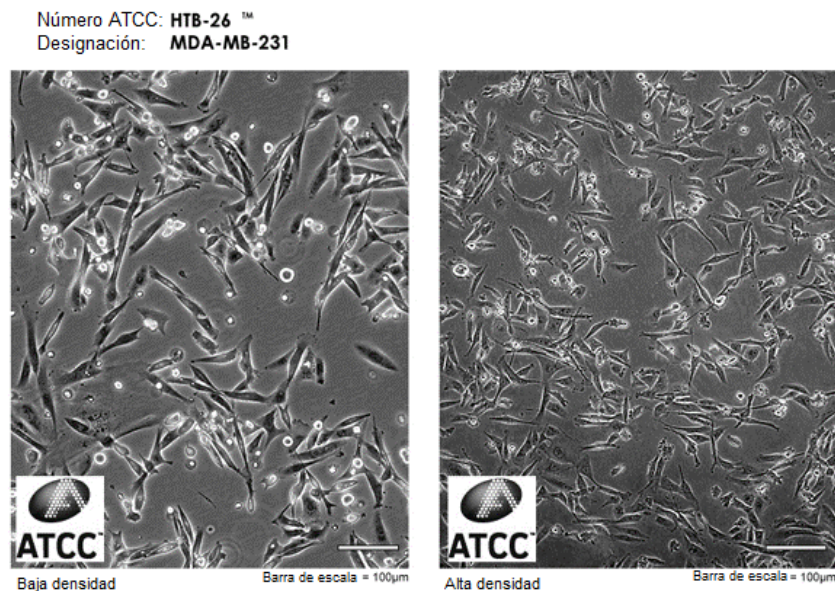
Se emplea para medir la efectividad de un compuesto contra una línea celular específica, utilizando una sal de tetrazolio metabolizada por las células dando una coloración determinada acorde a las células vivas y midiendo esta coloración por técnicas espectroscópicas.

#### 6.1.6 Líneas celulares

Se seleccionaron 4 líneas celulares de cáncer inmortales para su cultivo y evaluación biológica *in vitro*, todas caracterizadas por la ATCC, 2 hormona dependientes y 2 no-hormona dependientes.

- MDA-MB-231

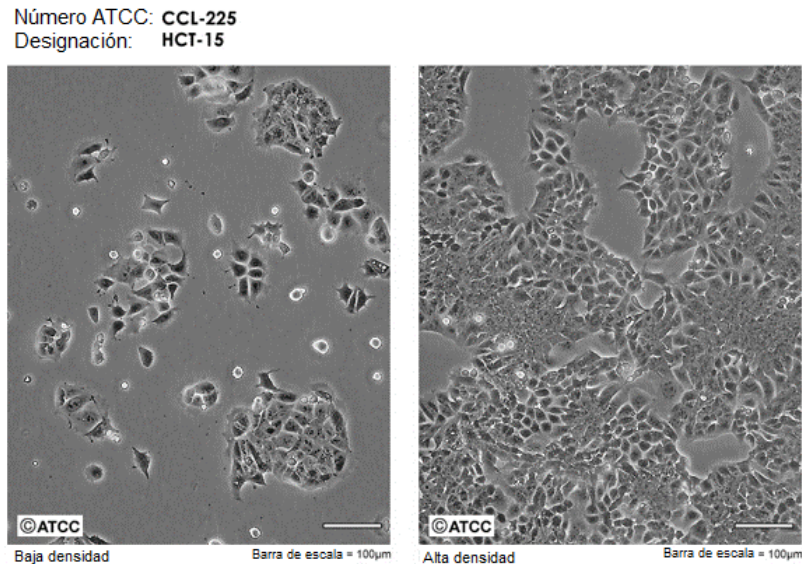
En el caso de las no-hormona dependientes la primera seleccionada fue la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama, que se caracteriza por su morfología de tipo estrellada [42], con receptores negativos a estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2, por lo cual es un tipo de cáncer bajo en claudina permitiendo su metástasis hacia sitios críticos [43]; para comprobar el estado de la línea celular se comparó su morfología en baja y alta densidad con el estándar otorgado por la ATCC, como se observa en la figura 29.



**Figura 29. Línea celular MDA-MB-231, lado izquierdo en crecimiento, lado derecho en confluencia.**

- HCT-15

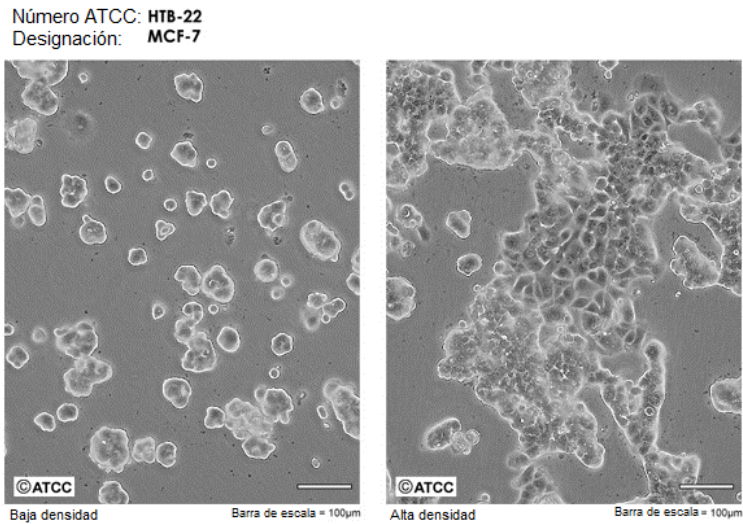
Otro tipo de cáncer no-hormona dependiente es la línea de cáncer de colón HCT-15, la cual se caracteriza por su morfología en masa, la cual forma conglomerados característicos de estas células; se comprobó el correcto desarrollo de las células comparándolas con la morfología reportada por ATCC.



***Figura 30. Línea celular HCT-15, lado izquierdo en crecimiento, lado derecho en confluencia.***

- MCF-7

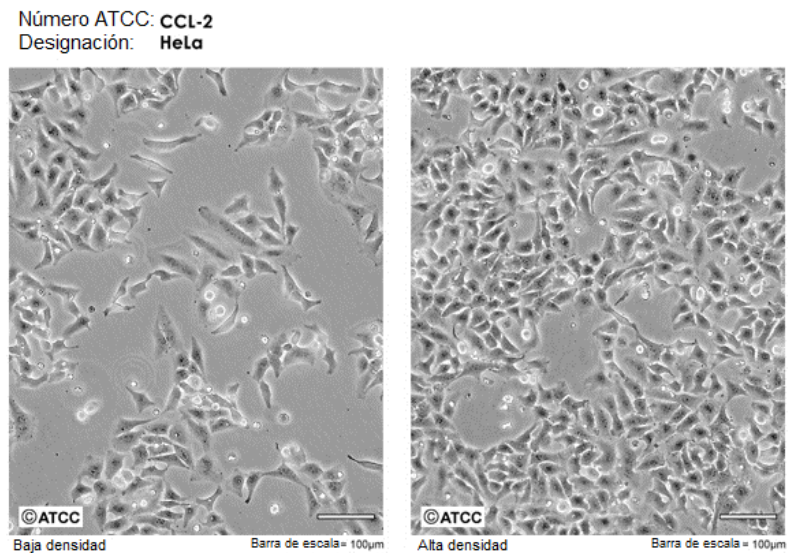
Por otro lado, se realizó el comparativo con líneas celulares hormona dependiente, tal es el caso de MCF-7 correspondiente a cáncer de mama, con morfología en masa y positiva a receptores de tipo ER, PR y negativo para HER-2, correspondientes a un tipo de cáncer luminal A, el cual no es agresivo y responde a terapias ya establecidas [44].



**Figura 31. Línea celular MCF-7, lado izquierdo en crecimiento, lado derecho en confluencia.**

- HeLa

HeLa es una línea de cáncer cervicouterino, que contiene el virus del papiloma humano (VPH) subtipo 18, morfológicamente es de tipo estrellada-alargada, y de crecimiento rápido; se comparó su desarrollo con las imágenes reportadas en ATCC.



**Figura 32. Línea celular HeLa, lado izquierdo en crecimiento, lado derecho en confluencia.**

El cultivo de cada línea celular requiere de un medio y suplementos específicos para su correcto desarrollo y proliferación, tabla 1.

**Tabla 1. Suplemento del medio de cultivo según la línea celular.**

<b>Línea celular</b>	<b>Medio</b>	<b>SFB</b>	<b>L-Glut</b>	<b>Antibiótico</b>
<i>MCF-7</i>	MEM	10%	1%	0.5%
<i>MDA-MB-231</i>	DMEM	10%	-	0.5%
<i>HeLa</i>	RPMI-1640	10%	-	0.5%
<i>HCT-15</i>	MEM	10%	1%	0.5%

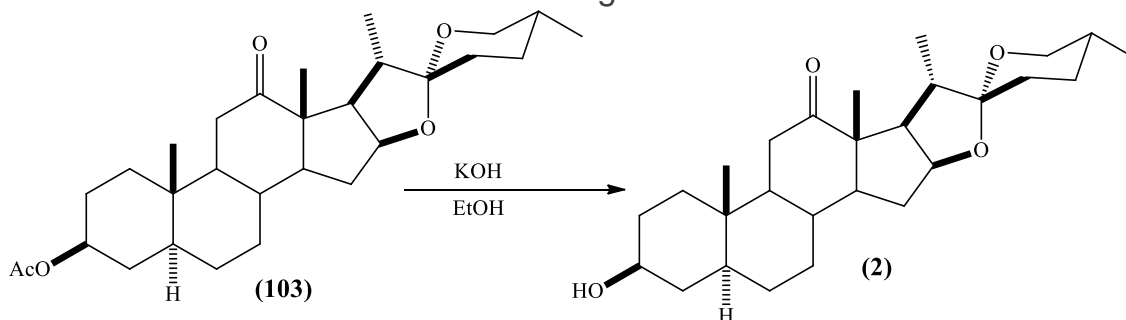
Todas las células se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, son de tipo adherente y con distintos tiempos de duplicación, el cual determina la frecuencia con la que se cambiara el medio, tabla 2.

**Tabla 2. Tiempo de duplicación y cambio de medio en función a la línea celular.**

<b>Línea celular</b>	<b>Tiempo de duplicación</b>	<b>Cambio de medio</b>
<i>MCF-7</i>	38 horas	Cada 2 días
<i>MDA-MB-231</i>	38 horas	Cada 2 días
<i>HeLa</i>	24 horas	Cada día
<i>HCT-15</i>	20-25 horas	Cada 2 días

## 6.2 Síntesis

### 6.2.1 Hidrólisis básica acetato de hecogenina



**Esquema 11. Hidrólisis de acetato de hecogenina.**

Se disuelven 1.0 g (2.12 mmol) del esteroide en 20 ml de etanol, después se agrega 20 ml de una solución de KOH al 10%, manteniendo en agitación por una hora y media, monitoreando con CCF el desarrollo de reacción. Una vez pasado ese tiempo se neutraliza la reacción con HCl concentrando, el solvente se elimina a presión reducida. Por último, para recuperar el producto se realizan lavados con agua y extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniéndose un polvo de color blanco, el cual se purifica por columna cromatográfica en fase móvil con sistema 9:1 (Hexano: Acetato de etilo), obteniendo un rendimiento del 85 % (774 mg).

### **Caracterización.**

Formula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>, P.M.: 430.3083, Polvo blanco, p.f. 266-267°C  $\alpha_D = +15^\circ$  IR: 3521 (OH), 1701 (CO), [M+H<sup>+</sup>]= 431.3149

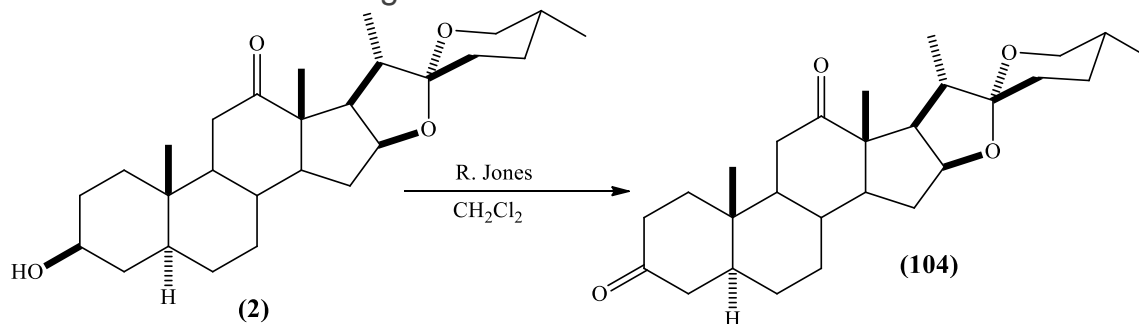
### **RMN <sup>1</sup>H**

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 4.36 (ddd,  $J = 8.8, 7.5, 6.0$  Hz, 1H, H-16), 3.61 (tt,  $J = 11.1, 4.8$  Hz, 1H, H-3), 3.50 (ddd,  $J = 10.9, 4.3, 2.2$  Hz, 1H, H-26e), 3.36 (t,  $J = 11.0$  Hz, 1H, H-26a), 2.53 (dd,  $J = 8.8, 6.8$  Hz, 1H, H-17), 2.42 (dd,  $J = 14.3, 13.2$  Hz, 1H, H-11''), 2.24 (dd,  $J = 14.3, 5.0$  Hz, 1H, H-11'), 2.17 – 2.09 (m, 1H, H-23e), 1.92 (qd,  $J = 10.9, 3.9$  Hz, 1H, H-20), 1.77 – 1.71 (m, 1H, H-24e), 1.64 (ddt,  $J = 9.6, 5.2, 2.1$  Hz, 1H, H-25), 1.62 – 1.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-25), 1.46 – 1.44 (m, 1H, H-23a), 1.38 – 1.36 (m, 1H, H-23a), 1.15 – 1.11 (m, 1H, H-5a), 1.08 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.80 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27).

### **RMN <sup>13</sup>C**

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 70.92 (C-3), 55.51 (C-5), 44.63 (C-9), 36.10 (C-10), 37.86 (C-11), 213.67 (C-12), 55.12 (C-13), 79.20 (C-16), 53.49 (C-17), 16.04 (C-18), 11.98 (C-19), 34.35 (C-20), 13.29 (C-21), 109.28 (C-22), 31.14 (C-23), 31.41 (C-24), 30.19 (C-25), 66.89 (C-26), 17.15 (C-27).

## 6.2.2 Oxidación de hecogenina



**Esquema 12. Oxidación de hecogenina.**

En un matraz de fondo redondo se disuelve un gramo (2.3239 mmol) del esteroide, previamente se prepara un baño de hielo para mantener la temperatura bajo cero grados centígrados, monitoreando con ayuda de CCF se observa la formación de producto lo cual indica la neutralización de la mezcla de reacción con isopropanol, cambiando de una coloración naranja a verde. Posteriormente se filtra el crudo de reacción en gel de sílice para retirar el oxidante, finalmente se realizan lavados con agua y extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para la recuperación del producto, concentrando el solvente a presión reducida, obteniéndose un polvo blanco con las características correspondientes, obteniéndose un rendimiento del 92% (978 mg).

### Caracterización.

Formula molecular: C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>, P.M.: 428.2927, polvo blanco, p.f. 239-241,  $\alpha_D = +23.8^\circ$  IR: 1701 (CO), [M+H<sup>+</sup>]= 429.3106

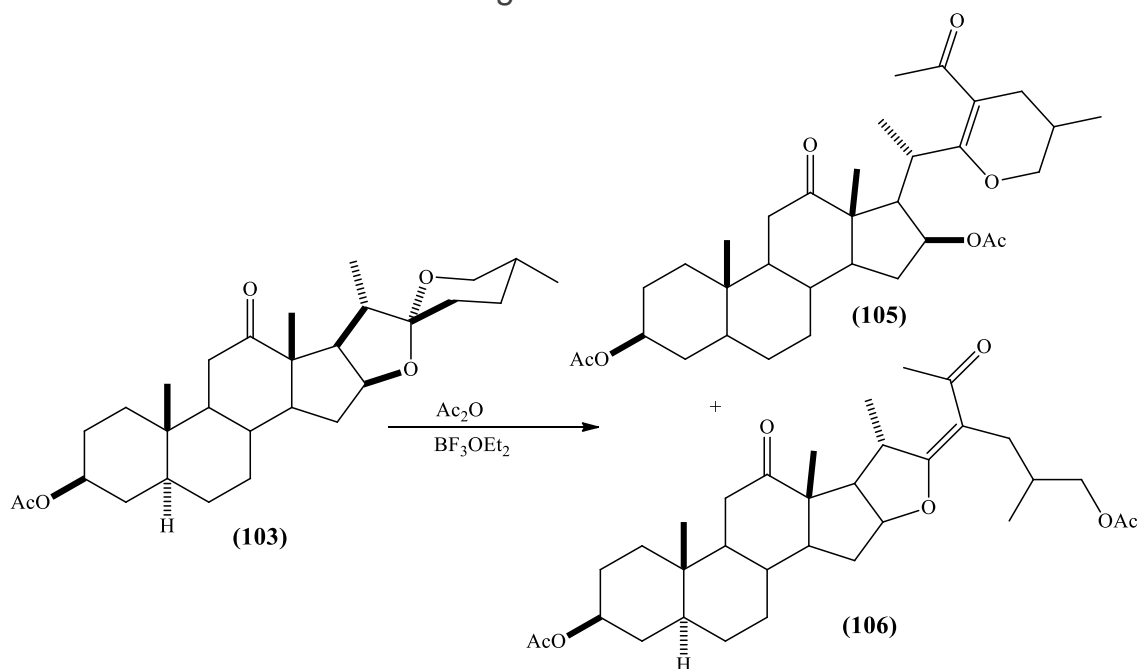
### RMN <sup>1</sup>H

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 4.35 (ddd,  $J = 8.8, 7.4, 5.8$  Hz, 1H, H-16), 3.49 (ddd,  $J = 10.9, 4.4, 2.2$  Hz, 1H, H-26e), 3.35 (t,  $J = 11.0$  Hz, 1H, H-26a), 2.53 (dd,  $J = 6.8, 4.4$  Hz, 1H, H-17), 2.49 (dd,  $J = 13.7, 11.4$  Hz, 1H, H-11b), 2.43 – 2.35 (m, 1H, H-4b), 2.35 – 2.32 (m, 1H, H-2a), 2.32 – 2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-11a), 2.16 (td,  $J = 5.3, 4.6, 2.6$  Hz, 1H, H-20), 2.13 (ddd,  $J = 8.1, 4.0, 2.5$  Hz, 1H, H-23e), 1.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-5a), 0.97 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.87 (s, 5H, CH<sub>3</sub>-19), 0.79 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27).

### RMN <sup>13</sup>C

RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 210.62 (C-3), 55.08 (C-5), 44.38 (C-9), 36.15 (C-10), 37.77 (C-11), 212.67 (C-12), 54.84 (C-13), 79.09 (C-16), 53.56 (C-17), 15.97 (C-18), 11.09 (C-19), 34.64 (C-20), 13.22 (C-21), 109.20 (C-22), 31.17 (C-23), 31.39 (C-24), 30.18 (C-25), 66.86 (C-26). 17.08 (C-27).

### 6.2.3 Acetólisis acetato de hecogenina



#### **Esquema 13. Acetólisis de hecogenina.**

En un matraz de fondo redondo se mezcla 1.0 g (2.1172 mmol) del esteroide adicionando 5 mL de anhídrido acético y 1 mL de  $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ , dejando en agitación constante por 10 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla se vierte en un matraz con agua fría dejando en agitación por una hora, neutralizando con bicarbonato de sodio. Se realizan lavados con agua y extracciones con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para recuperar el producto, obteniéndose un polvo blanco, con un rendimiento del 83% (977.6429 mg).

#### **Caracterización (105).**

Formula molecular:  $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_7$ , P.M.: 556.73, polvo blanco, p.f. 194-195°C  $\alpha_D = +37.5^\circ$ , IR: 1731 (AcO), 1700 (CO).

#### **RMN $^1\text{H}$ (105)**

RMN  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 5.22 – 5.09 (m, 1H, H-3), 4.67 (ddd,  $J = 11.4, 6.4, 4.9$  Hz, 1H, H-16), 4.05 (ddd,  $J = 10.5, 3.5, 2.2$  Hz, 1H, H-26”), 3.99

(dt,  $J = 11.3, 7.0$  Hz, 1H, H-26'), 3.46 (t,  $J = 10.1$  Hz, 1H, H-24), 2.75 (dd,  $J = 11.4, 8.0$  Hz, 1H, H-24''), 2.60 (t,  $J = 12.7$  Hz, 1H, H-17), 2.45 – 2.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-11), 2.19 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, H-20), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3''), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-16), 1.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-23''), 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.09 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.97 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27), 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19).

#### **RMN <sup>13</sup>C (105)**

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 73.16 (C-3), 170.61 (C-3'), 21.06 (C-3''), 55.51 (C-5), 44.38 (C-9), 38.27 (C-11), 213.64 (C-12), 57.00 (C-13), 73.80 (C-16), 171.29 (C-16'), 21.42 (C-16''), 46.78 (C-17), 14.14 (C-18), 11.88 (C-19), 12.59 (C-21), 106.72 (C-22), 170.44 (C-23), 198.08 (C-23'), 19.38 (C-23''), 36.32 (C-24), 71.57 (C-26), 16.86 (C-27).

#### **Caracterización (106).**

Formula molecular: C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>, P.M.: 556.73, polvo blanco, p.f. 144-145°C  $\alpha_D = +83.56^\circ$ , IR: 1730 (AcO), (CO).

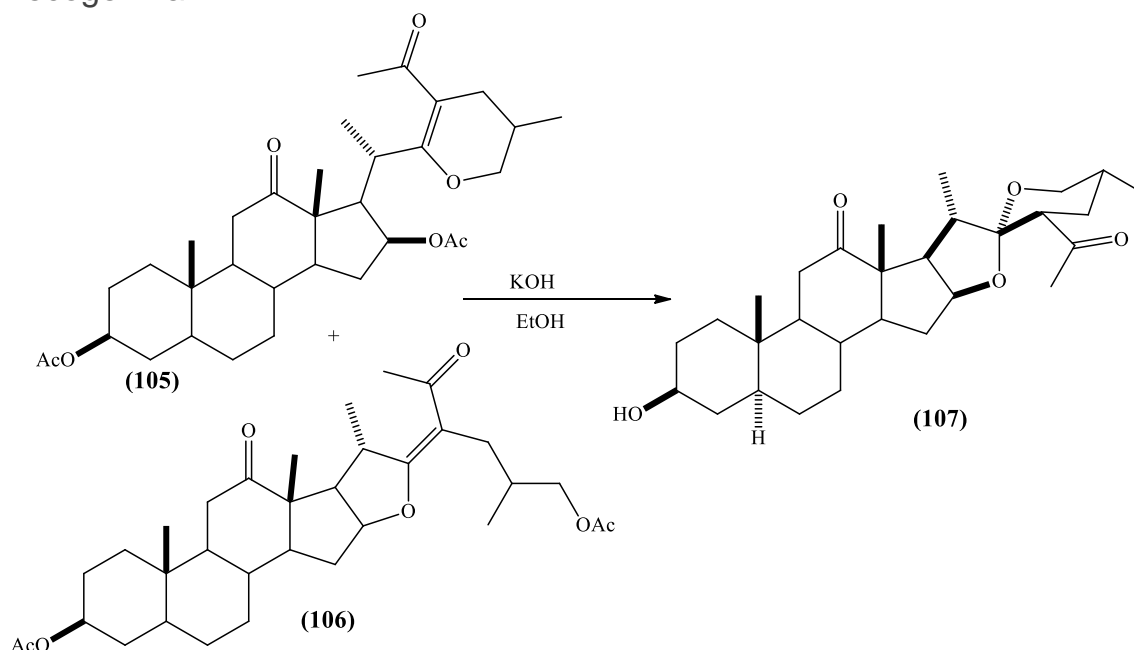
#### **RMN <sup>1</sup>H (106)**

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 5.23 – 5.08 (m, 1H, H-3), 4.90 (td,  $J = 7.5, 4.1$  Hz, 1H, H-16), 4.68 (ttt,  $J = 11.4, 4.8, 1.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-26), 3.76 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-20), 2.77 (dd,  $J = 11.4, 8.1$  Hz, 1H, H-17), 2.66 – 2.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-24), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-26), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-3''), 1.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-23''), 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 1.10 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.94 (d,  $J = 1.0$  Hz, 4H, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-27), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19).

#### **RMN <sup>13</sup>C (106)**

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 73.82 (C-3), 170.63 (C-3'), 213.65 (C-12), 84.18 (C-16), 16.88 (C-18), 11.85 (C-19), 13.51 (C-21), 177.87 (C-22), 106.75 (C-23), 198.43 (C-23'), 73.08 (C-26), 171.30 (C-26'), 17.23 (C-27).

## 6.2.4 Hidrólisis de los derivados epoxicolesténico y furosténico de hecogenina



**Esquema 14. Hidrólisis de 105 y 106.**

Se disuelve 1.0 g (1.7974 mmol) esteroide en etanol y se agrega una solución de KOH al 10% manteniendo en agitación constante por una hora a temperatura ambiente, posteriormente se neutraliza con HCl y se concentra el etanol a presión reducida. Se realizan lavados con agua y extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para recuperar el producto, obteniéndose un polvo de color blanco, con un rendimiento del 87% (738 mg) OAc con las siguientes características:

### Caracterización.

Formula molecular: C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>, P.M.: 472.3189, polvo blanco, p.f.= 148-150 °C, IR: 3521 (OH), 1702 (CO), [M+H<sup>+</sup>]= 473.3255

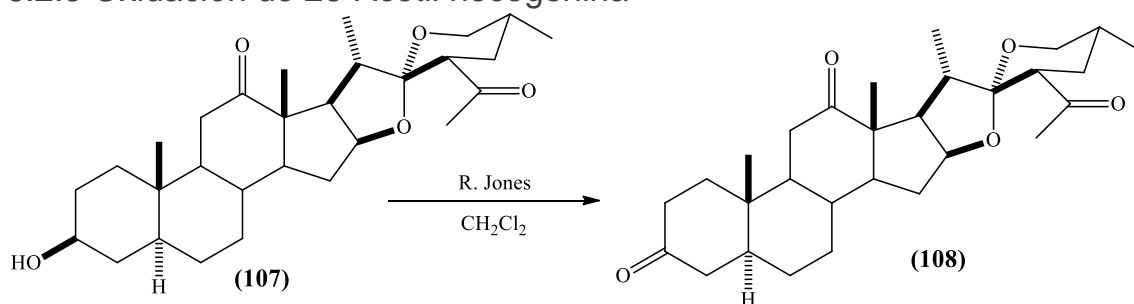
### RMN <sup>1</sup>H

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Cloroformo-d) δ: 4.34 (dt, J = 8.9, 6.8 Hz, 1H, H-16), 3.59 (td, J = 11.0, 5.4 Hz, 1H, H-3), 3.52 (ddd, J = 11.0, 4.4, 1.6 Hz, 1H, H-26e), 3.39 (t, J = 10.9 Hz, 1H, H-26a), 2.71 – 2.61 (m, 1H, H-23), 2.56 (dd, J = 9.1, 7.3 Hz, 1H, H-17), 2.40 (dd, J = 14.4, 13.2 Hz, 1H, H-11''), 2.27 – 2.20 (m, 1H, H-11'), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO-23''), 2.12 (td, J = 7.4, 3.8 Hz, 1H, H-20), 1.06 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0.89 (s, 2H, CH<sub>3</sub>-19), 0.86 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27).

## RMN <sup>13</sup>C

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 70.87 (C-3), 55.33 (C-5), 44.64 (C-9), 37.81 (C-11), 213.24 (C-12), 54.54 (C-13), 79.55 (C-16), 52.36 (C-17), 15.92 (C-18), 11.92 (C-19), 12.86 (C-21), 108.04 (C-22), 55.49 (C-23), 210.00 (C-23'), 66.17 (C-26), 16.93 (C-27).

### 6.2.5 Oxidación de 23-Acetil hecogenina



### Esquema 15. Oxidación 23-acetil de hecogenina.

Se disuelve en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> un gramo (2.2 mmol) esteroide y se añade gota a gota reactivo de Jones, previamente se prepara un baño de hielo para mantener la reacción debajo de los cero grados centígrados, monitoreando por CCF se observa la formación de producto, señal para neutralizar el crudo de reacción con isopropanol, observándose un cambio de coloración de naranja a verde. Después se filtra la mezcla con gel de sílice para separar el oxidante, posteriormente se realizan lavados con agua y extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y finalmente se concentra el solvente a presión reducida, obteniéndose un polvo de color blanco en un rendimiento del 90% (896 mg), con las características correspondientes.

### Caracterización.

Formula molecular: C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>, P.M.: 470.3032, polvo blanco, p.f.144-146 °C, IR: 1702 (CO), [M+H<sup>+</sup>]= 471.3094

### RMN <sup>1</sup>H

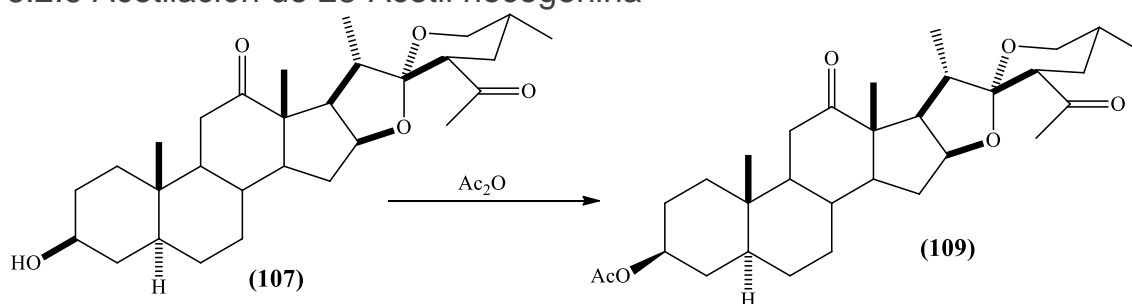
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 4.36 (dt, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 1H, H-16), 3.60 – 3.48 (m, 1H, H-26e), 3.41 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H, H-26a), 2.73 – 2.62 (m, 1H, H-23), 2.58 (dd, *J* = 9.1, 7.2 Hz, 1H, H-17), 2.49 (t, *J* = 13.8 Hz, 1H, H-11''), 2.44 –

2.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-2''), 2.30 – 2.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-4''), 2.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-11'), 2.16 (ddd,  $J = 14.0, 4.4, 2.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CO-23''), 1.98 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-20), 1.10 (s, 2H, CH<sub>3</sub>-18), 1.08 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.97 (s, 2H, CH<sub>3</sub>-19), 0.87 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27).

### RMN <sup>13</sup>C

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 210.19 (C-3), 55.34 (C-5), 44.44 (C-9), 36.19 (C-10), 37.87 (C-11), 212.64 (C-12), 55.26 (C-13), 79.48 (C-16), 54.46 (C-17), 15.98 (C-18), 11.16 (C-19), 34.00 (C-20), 12.96 (C-21), 108.06 (C-22), 38.83 (C-23), 211.17 (C-23'), 66.20 (C-26), 17.00 (C-27).

#### 6.2.6 Acetilación de 23-Acetil hecogenina



#### **Esquema 16. Acetilación de 23-acetil hecogenina.**

Se disuelve un gramo (2.1 mmol) del esteroide en 10 mL de anhídrido acético y se deja a reflujo una hora aproximadamente en agitación constante, monitoreando por CCF. Después se vierte el curdo de reacción en un matraz con agua fría, dejándolo en agitación constante y neutralizando con bicarbonato de sodio. Posteriormente se realizan lavados con agua y extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, concentrando el solvente a presión reducida y obteniéndose un polvo blanco en un rendimiento del 89% (959 mg) con las siguientes características:

#### **Caracterización.**

Formula molecular: C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>, P.M.: 514.3294, polvo blanco, p.f. 161-165°C  $\alpha_D =$   
IR: 1733 (AcO), 1700 (CO), [M+H]<sup>+</sup>= 515.3359

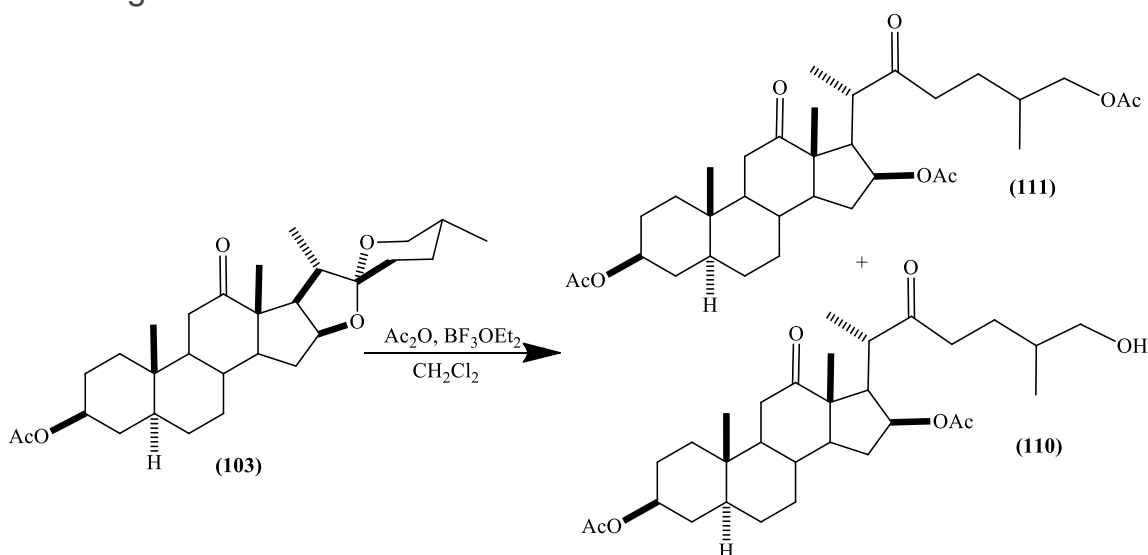
#### **RMN <sup>1</sup>H**

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 4.67 (tt,  $J = 11.3, 4.9$  Hz, 1H, H-3), 4.43 – 4.25 (m, 1H, H-16), 3.52 (ddd,  $J = 11.1, 4.3, 1.7$  Hz, 1H, H-26e), 3.39 (t,  $J = 10.9$  Hz, 1H, H-26a), 2.72 – 2.61 (m, 1H, H-23), 2.56 (dd,  $J = 9.1, 7.3$  Hz, 1H, H-17), 2.39 (dd,  $J = 14.4, 13.1$  Hz, 1H, H-11''), 2.27 – 2.21 (m, 1H, H-11'), 2.19 (s, 2H, CH<sub>3</sub>CO-23), 2.16 – 2.08 (m, 1H, H-20), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO-2-3), 1.06 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-21), 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18), 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19), 0.86 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-27).

### RMN $^{13}\text{C}$

RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 73.15 (C-3), 170.62 (C-3'), 55.31 (C-5), 212.97 (C-12), 55.30 (C-13), 79.53 (C-16), 54.53 (C-17), 15.92 (C-18), 12.86 (C-19), 108.03 (C-22), 209.93 (C-23'), 55.45 (C-23''), 66.17 (C-26), 11.82 (C-27).

### 6.2.7 Obtención de los compuestos 22-oxo-26-OAc y -26-OH de acetato de hecogenina



### Esquema 17. Obtención de 22-oxo-26-OAc (111) y 26-OH de acetato de hecogenina (110).

Se disuelve 1.0 g (2.1 mmol) del esteroide en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 10mL de Ac<sub>2</sub>O, después se enfría la reacción hasta -5°C y se agregan 0.6mL de BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>O, se deja en agitación durante 15 minutos y después se transfiere la reacción a un matraz con agua a 0°C manteniéndose en agitación constante y monitoreando la formación de los productos mediante CCF., posteriormente se neutraliza el crudo con una solución de bicarbonato saturada y se realizan lavados con agua y extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, concentrando el solvente a presión

reducida, obteniéndose un polvo blanco, separando ambos compuestos mediante cromatografía en columna, obteniéndose un rendimiento del 55% (619.88 mg) de **110** y 36% (437.76 mg) de **111** y caracterizándolos mediante técnicas físicas y espectroscópicas.

#### **Caracterización (110).**

Formula molecular:  $C_{33}H_{48}O_7$ , P.M.: 532.3400, polvo blanco, p.f. 125-127°C,  $\alpha_D = +82.1^\circ$  IR:  $[M+H^+] = 533.3398$

#### **RMN $^1H$**

RMN  $^1H$  (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 4.94 (1H, m, H-3), 4.59 (1H, m, H-16), 3.35 (2H, d,  $J_{26-25} = 6.0$ , H-26), 2.98 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, *m*, H-23a), 2.21 (1H, m, H-5, H-7a), 1.96 (3H, s,  $CH_3CO_2-16$ ), 1.9 (3H, s,  $CH_3CO_2-3$ ), 1.13 (3H, d,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz,  $CH_3-21$ ), 1.01 (3H, s,  $CH_3-18$ ), 0.90 (3H, d,  $J_{27,25} = 6.7$ ,  $CH_3-27$ ), 0.85 (3H, s,  $CH_3-19$ ).

#### **RMN $^{13}C$**

RMN  $^{13}C$  (125 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : (125 MHz): 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 59.8 (C-5), 214.1 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 210.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 169.9 ( $CH_3COO-3$ ), 170.5 ( $CH_3COO-16$ ), 21.4 ( $CH_3COO-3$ ), 21.1 ( $CH_3COO-16$ ).

#### **Caracterización (111).**

Formula molecular:  $C_{33}H_{50}O_8$ , P.M.: 574.3506, polvo blanco, p.f. 160-161°C,  $\alpha_D = +78.2^\circ$  IR: 3468 (OH), 2947 (CH), 1795, 1752, 1735, 1682 (CO), 1343 (C-O)  $cm^{-1}$ ,  $[M+H^+] = 574.3509$

#### **RMN $^1H$**

RMN  $^1H$  (500 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 5.01 (1H, m, H-3), 4.68 (1H, m, H-16), 3.9 (2H, d,  $J_{26-25} = 6.0$ , H-26), 2.98 (1H, m, H-20), 2.62 (1H, *m*, H-23a), 2.31 (1H, m, H-4, H-7a), 2.09 (3H, s,  $CH_3CO_2-16$ ), 2.05 (3H, s,  $CH_3CO_2-26''$ ), 1.93 (3H, s,  $CH_3CO_2-3$ ), 1.13 (3H, d,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz,  $CH_3-21$ ), 1.01 (3H, s,  $CH_3-18$ ), 0.90 (3H, d,  $J_{27,25} = 6.7$ ,  $CH_3-27$ ), 0.85 (3H, s,  $CH_3-19$ ).

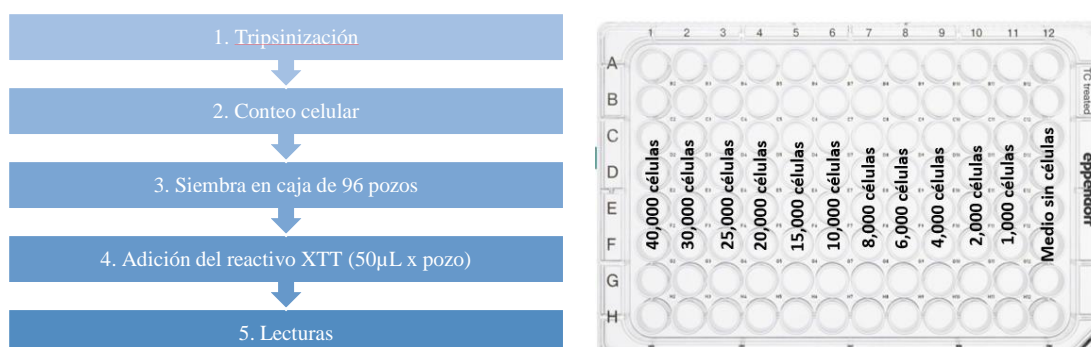
## RMN <sup>13</sup>C

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, Cloroformo-*d*) δ: (125 MHz): 36.8 (C-1), 27.6 (C-2), 75.7 (C-3), 38.0 (C-4), 124.8 (C-5), 154.5 (C-6), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.5 (C-12), 41.8 (C-13), 53.8 (C-14), 34.8 (C-15), 73.8 (C-16), 55.0 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.8 (C-21), 213.7 (C-22), 38.5 (C-23), 26.1 (C-24), 35.4 (C-25), 67.4 (C-26), 16.6 (C-27), 172.5 (CH<sub>3</sub>C=O-26), 169.9 (CH<sub>3</sub>C=O-3), 170.5 (CH<sub>3</sub>C=O-16), 21.4 (CH<sub>3</sub>COO-3), 21.1 (CH<sub>3</sub>COO-16).

### 6.3 Evaluación biológica

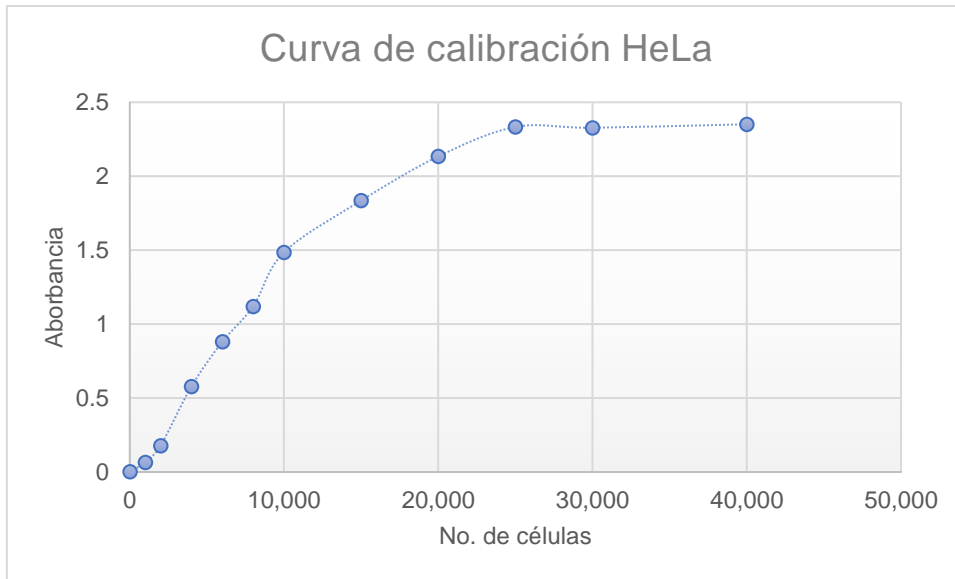
#### 6.3.1 Curva de calibración

Previo a la realización del experimento de citotoxicidad con el kit XTT se debe de realizar una curva de calibración por línea celular para encontrar el tiempo y cantidad de células óptimos para la realización de este, esquema 18.

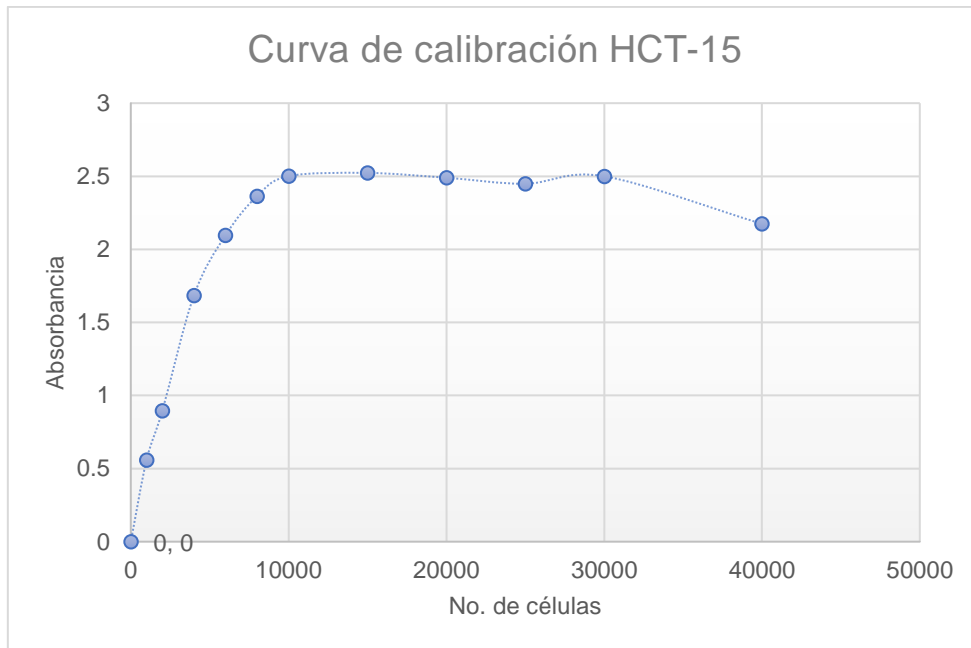


#### **Esquema 18. Pasos para realizar curva de calibración.**

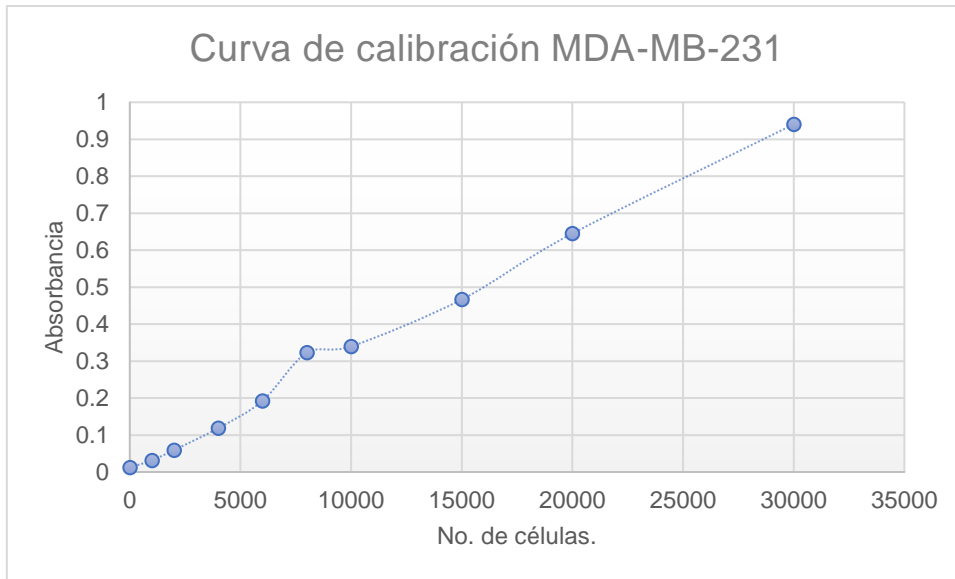
El número de células óptimo para sembrar acorde a cada línea celular se obtuvo obteniéndose el gráfico del experimento, como se muestra a continuación:



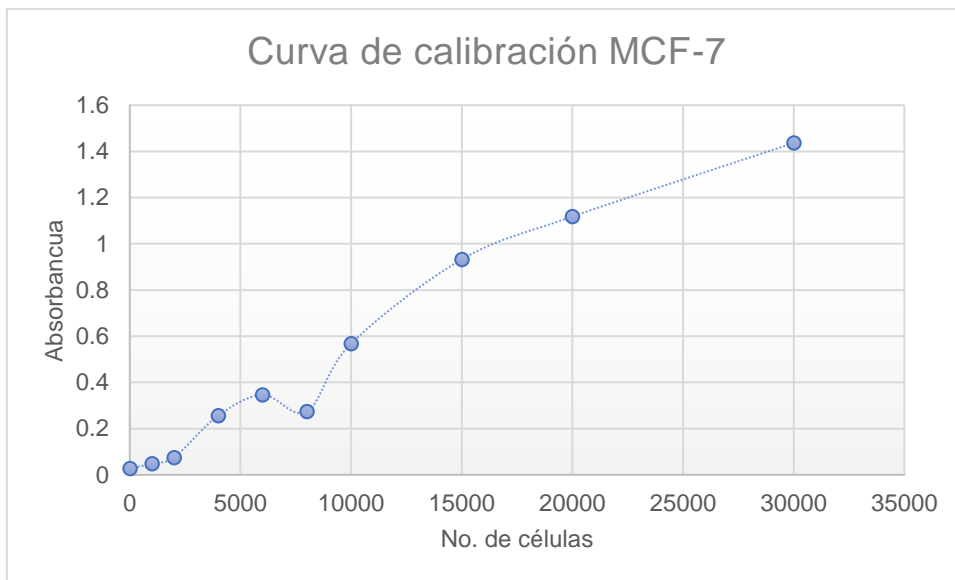
**Figura 33. Curva de calibración de la línea HeLa.**



**Figura 34. Curva de calibración de la línea HCT-15**



**Figura 35. Curva de calibración de la línea MDA-MB-231.**



**Figura 36. Curva de calibración de la línea MCF-7.**

Acorde a las gráficas obtenidas el número de células sembradas por pozo es el siguiente:

**Tabla 3. Número de célula sembradas por pozo para experimento XTT.**

<b>Línea celular</b>	<b>No. células sembradas por pozo</b>
<i>MCF-7</i>	5, 000
<i>MDA-MB-231</i>	5, 000
<i>HeLa</i>	5, 000
<i>HCT-15</i>	4, 000

### 6.3.2 Evaluación antiproliferativa de compuestos sintetizados.

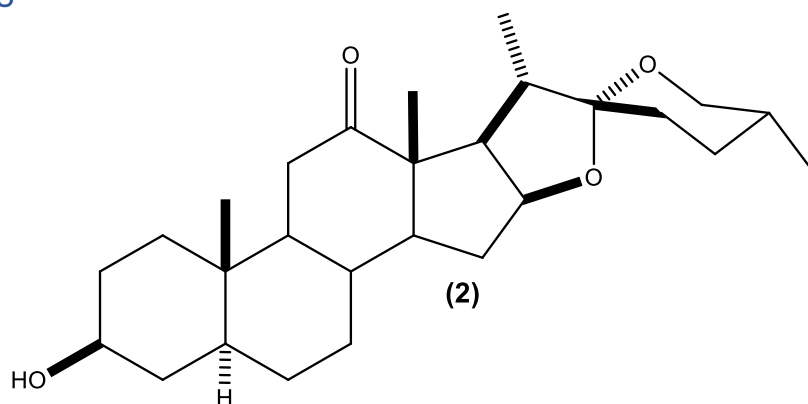
Día 1: Se realiza la tripsinización y el conteo celular del frasco correspondiente, se siembran en cada pozo el número de células idóneo acorde a la curva de calibración de la línea utilizada a utilizar, teniendo un volumen final de 100µL por pozo, se deja incubando 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Día 2: Se desecha el medio de cada pozo y se añade el compuesto de estudio a distintas concentraciones dejándose incubar nuevamente por 24 horas.

Día 3: Se retira el medio de cada pozo y se añaden 100µL de medio fresco, así mismo se añade por pipeto 50µL del reactivo XTT (5mL reactivo más 100µL del activador) por pozo, dejando incubar por 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, finalmente se realizan lecturas a 500 y 650 nm.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Hecogenina

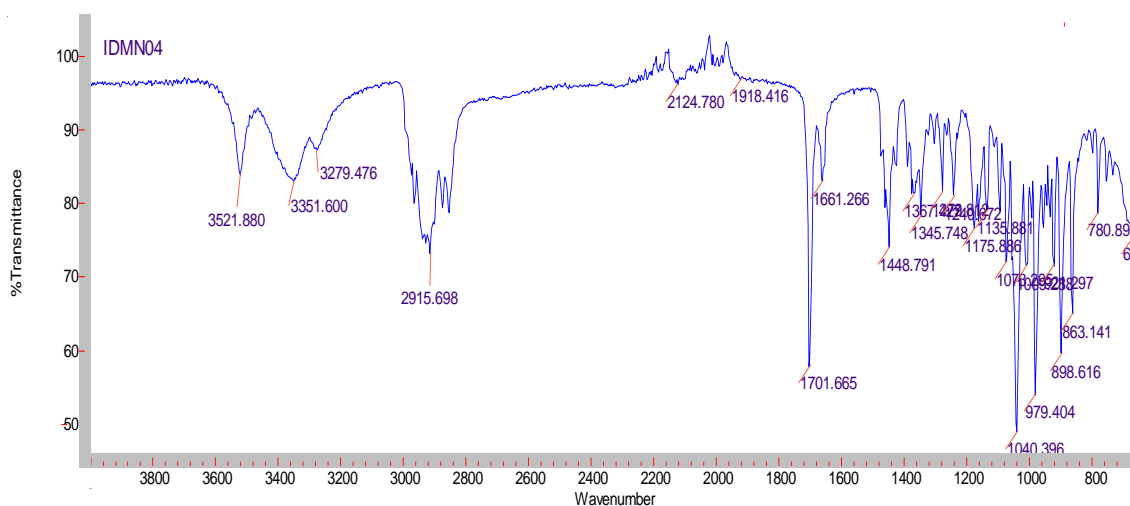


**Figura. 37 Hecogenina (2)**

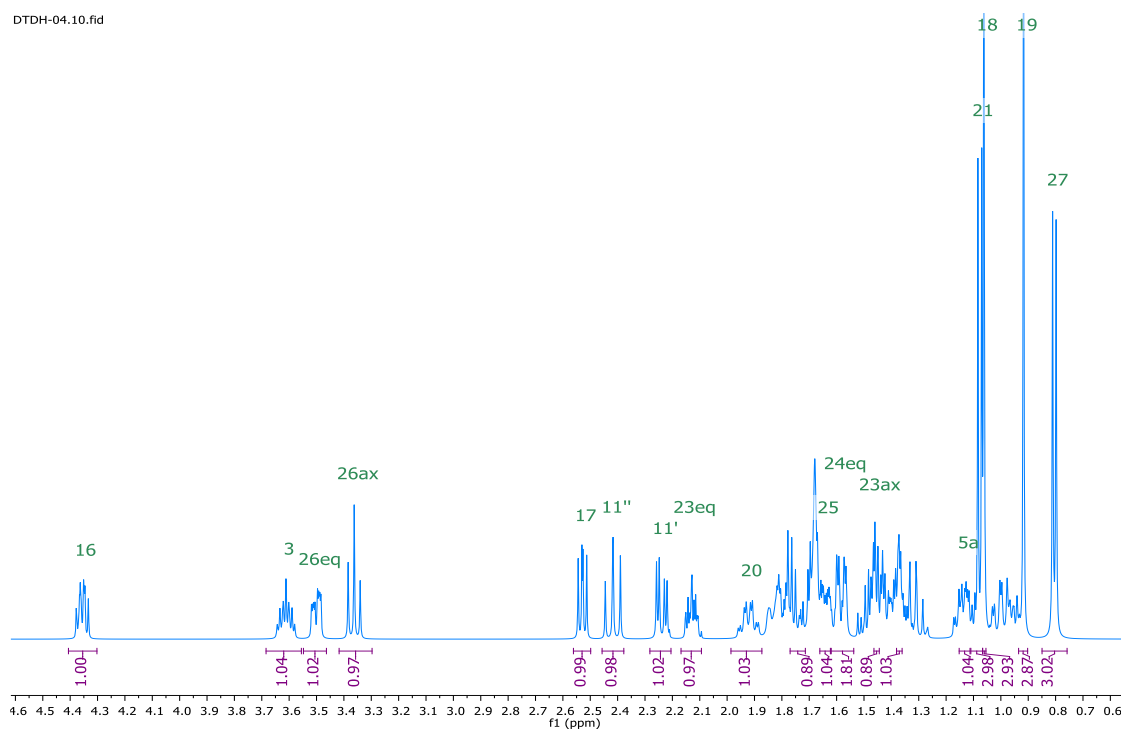
El compuesto (2) se purificó mediante cromatografía en columna y se obtuvieron los siguientes datos y espectros para su correcta identificación y caracterización.

**Tabla 4. Características de la hecogenina.**

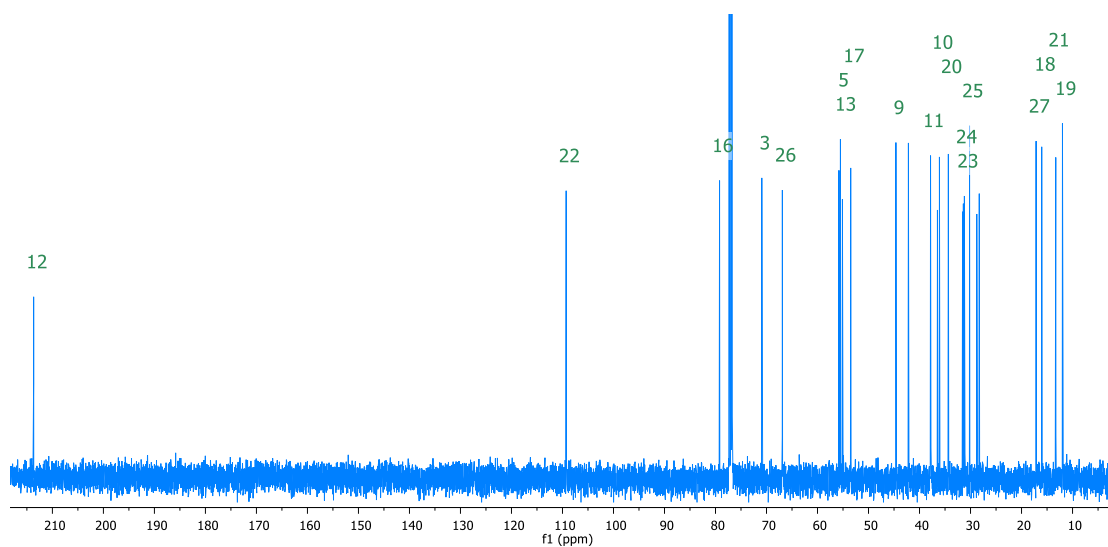
Característica	Valor
Punto de fusión	266-267°C
$\alpha_D$	+15°
$[M+H^+]$	431.3149



**Figura 38. Espectro de IR de hecogenina (2).**

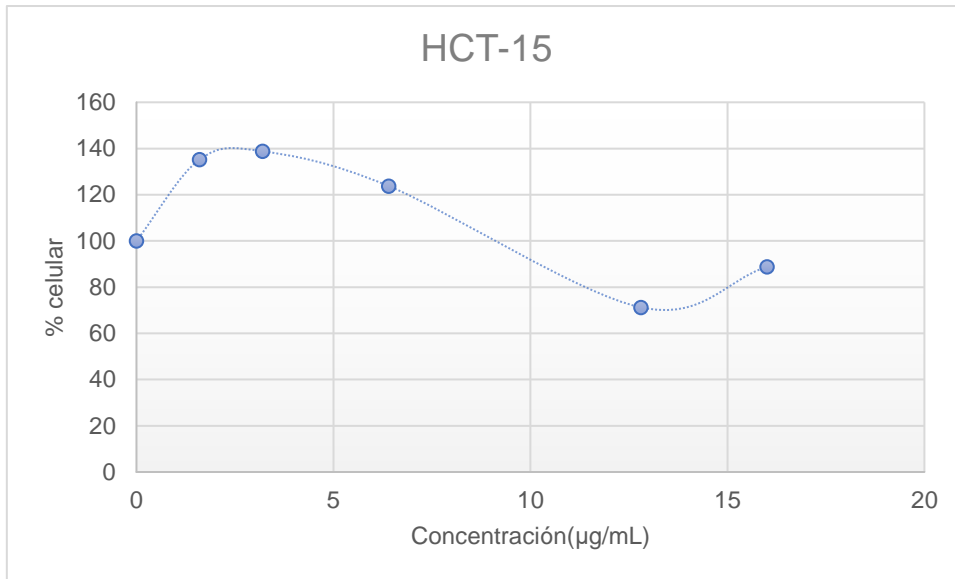


**Figura 39. Espectro de  $^1\text{H}$  de hecogenina (2) a 500 MHz**

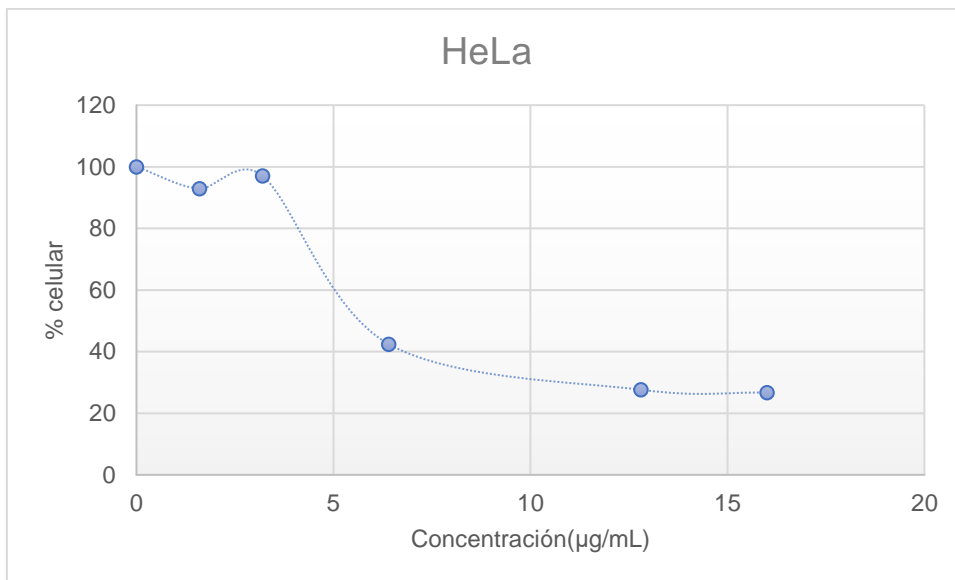


**Figura 40. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de hecogenina (2) a 125 MHz**

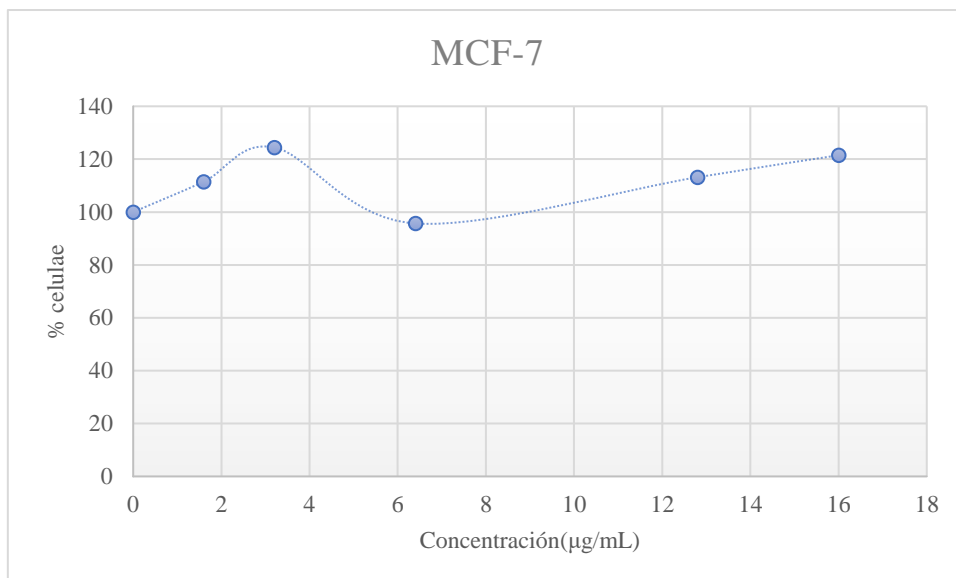
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



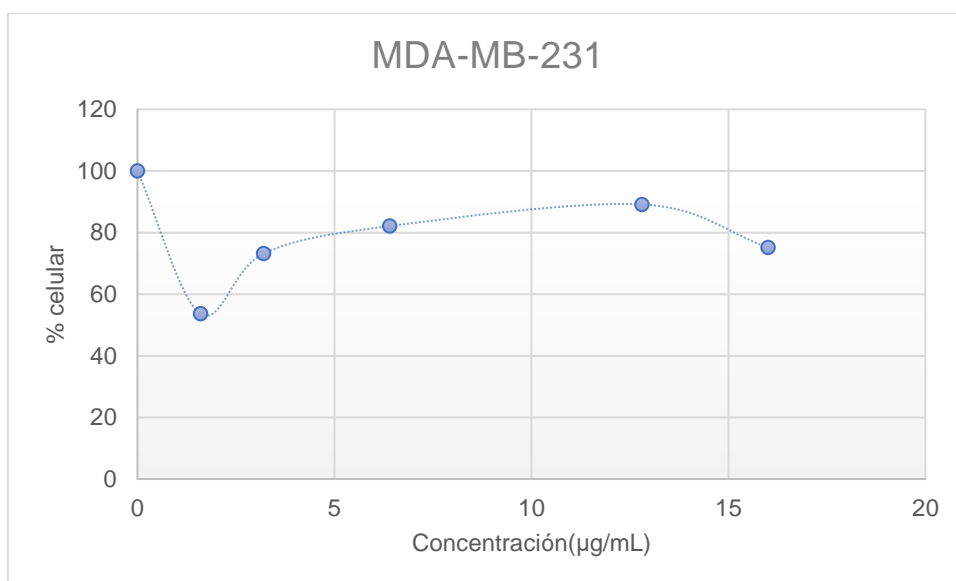
**Figura 41. Curva dosis-respuesta en HCT-15 de (2).**



**Figura 42. Curva dosis-respuesta en HeLa de (2).**



**Figura 43. Curva dosis-respuesta en MCF-7 de (2).**

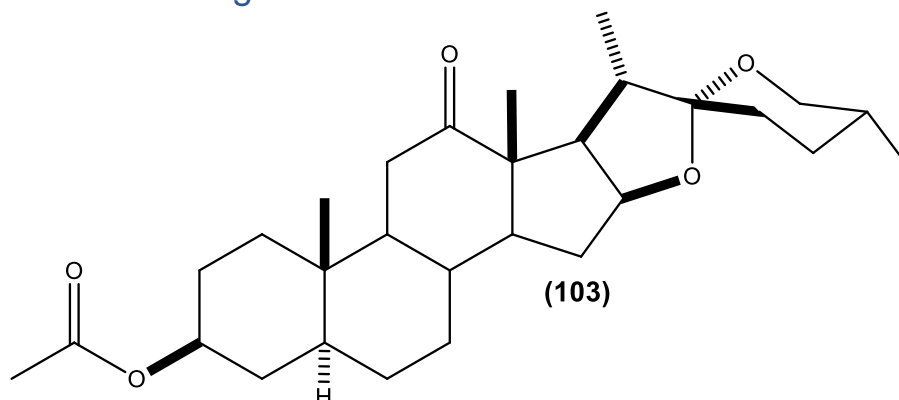


**Figura 44. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231 de (2).**

**Tabla 5. Valores de IC<sub>50</sub> del compuesto (2).**

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HCT-15	>20
HeLa	5.95
MCF-7	No activo
MDA-MB-231	No activo

## 7.2 Acetato de Hecogenina

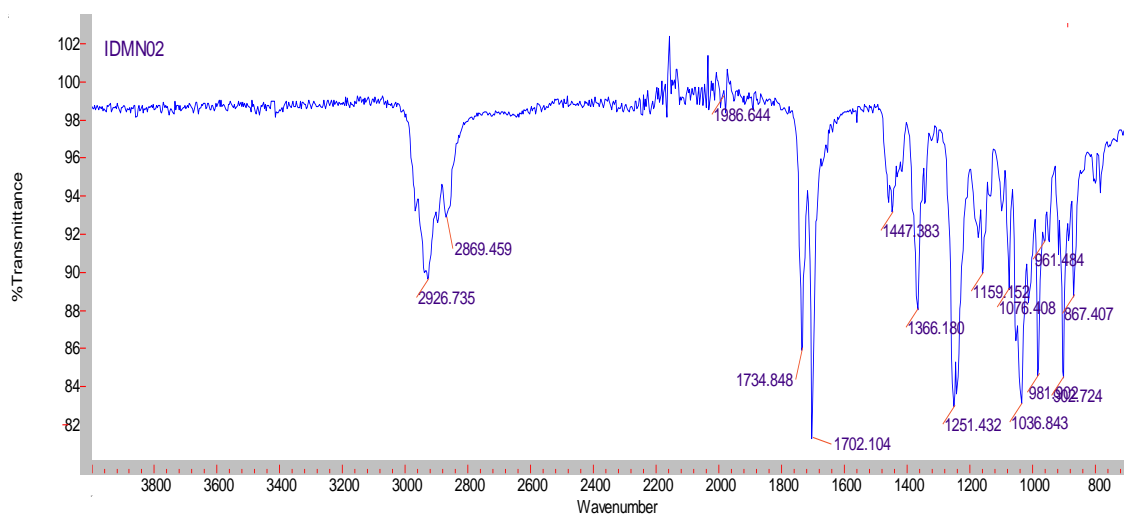


**Figura 45. Acetato de Hecogenina (103)**

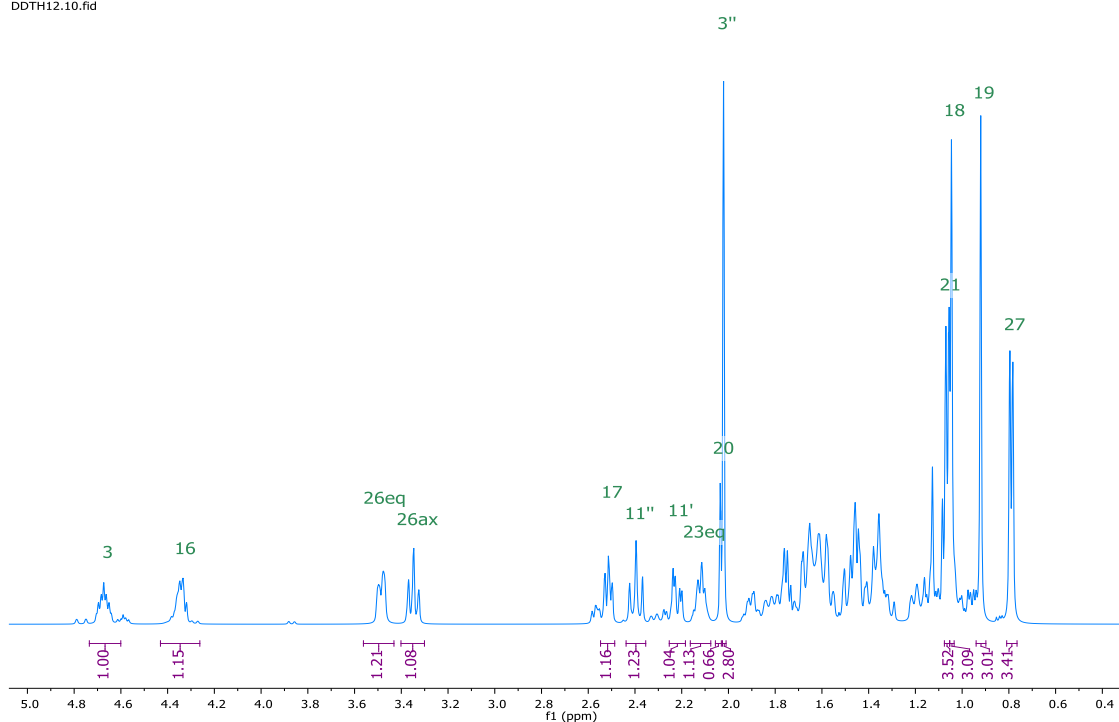
Para el compuesto (103), se realizaron pruebas para la identificación de sus características físicas y así mismo se obtuvieron espectros de resonancia e IR para su caracterización.

**Tabla 6. Características de (103),**

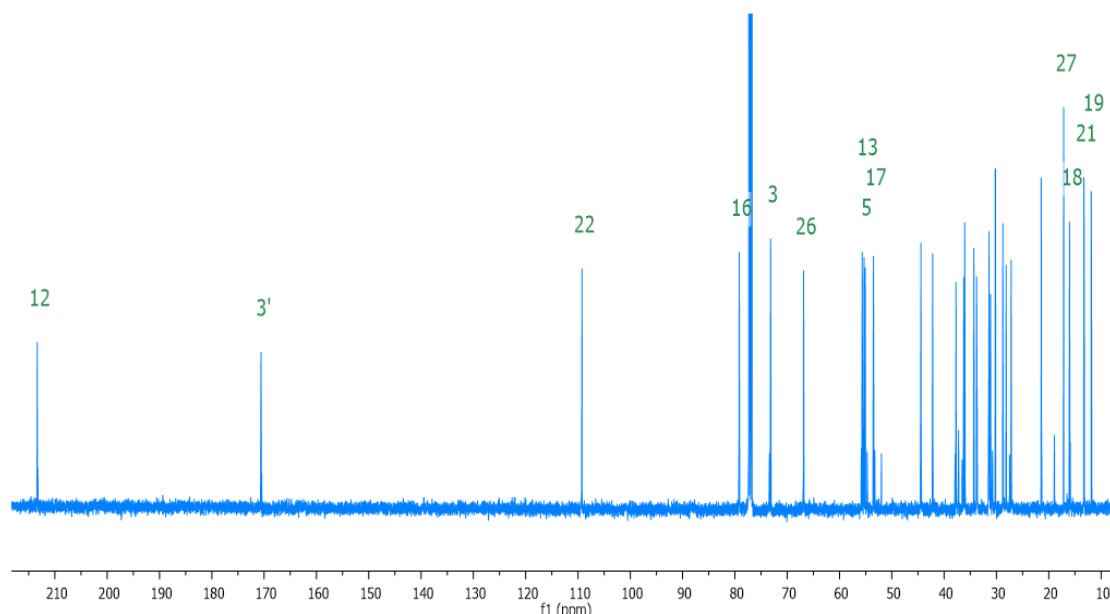
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	205-207°C
$\alpha_D$	-13.4 °
$[M+H^+]$	473.3241



**Figura 46. Espectro de IR de acetato de hecogenina (103).**

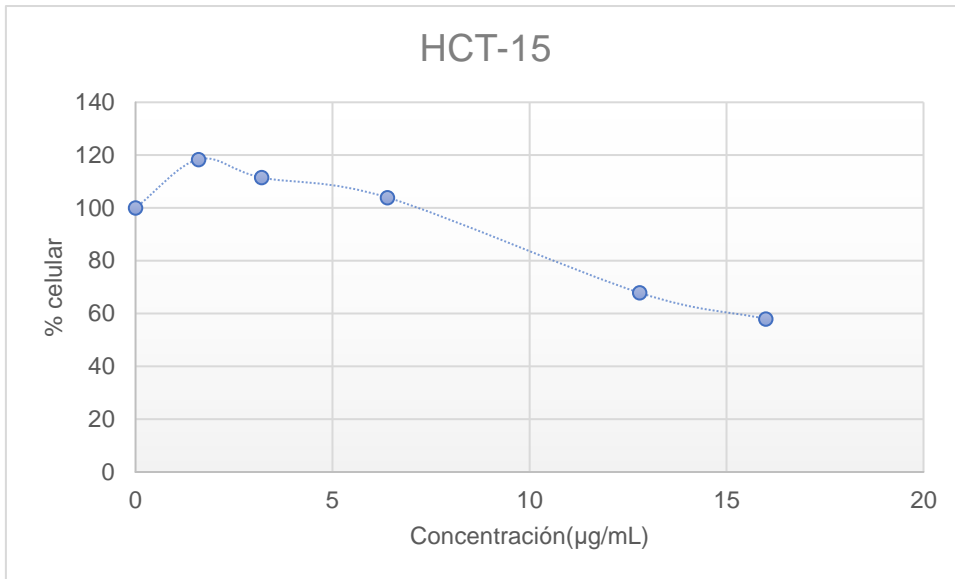


**Figura 47. Espectro de  $^1\text{H}$  de acetato de hecogenina (103) a 500 MHz.**

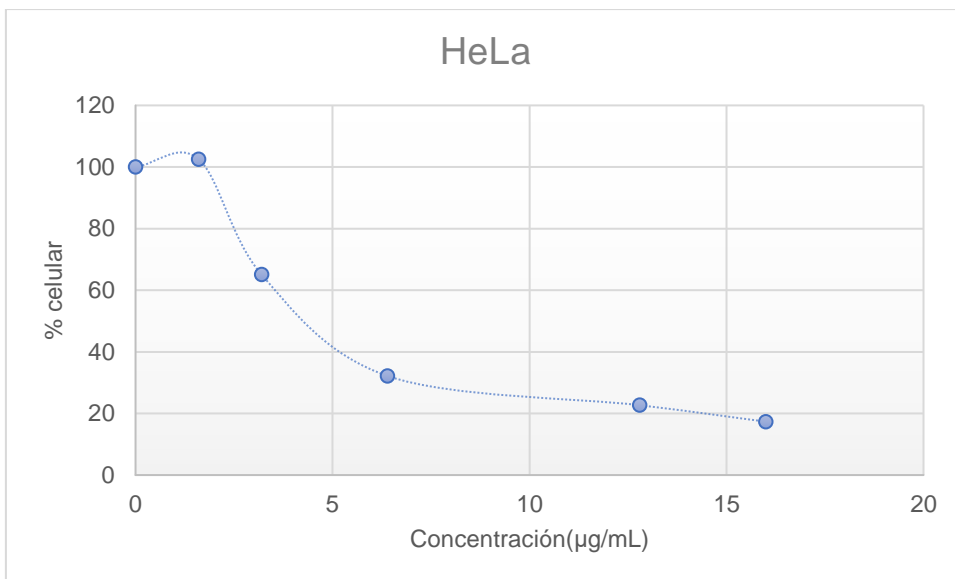


**Figura 48. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de acetato de hecogenina (103) a 125 MHz.**

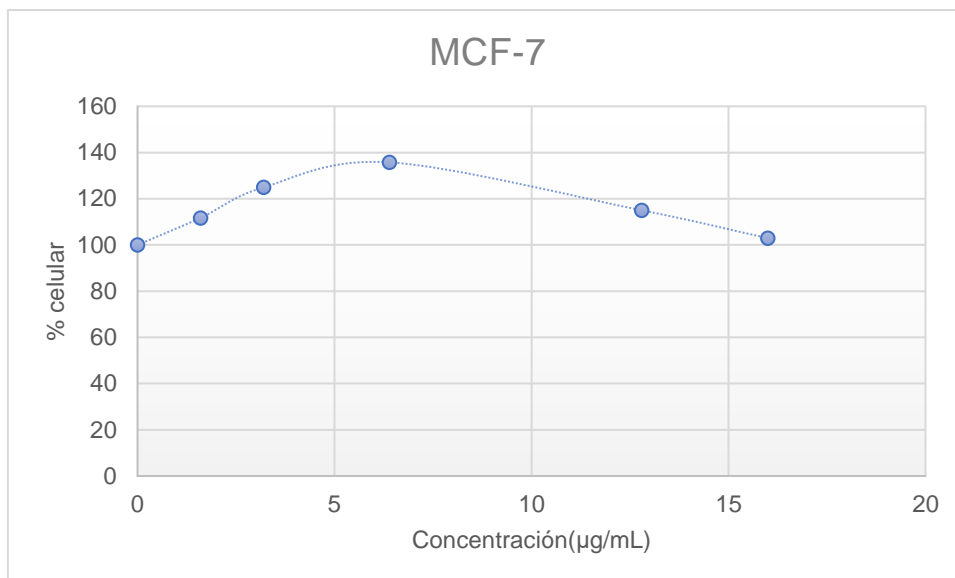
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



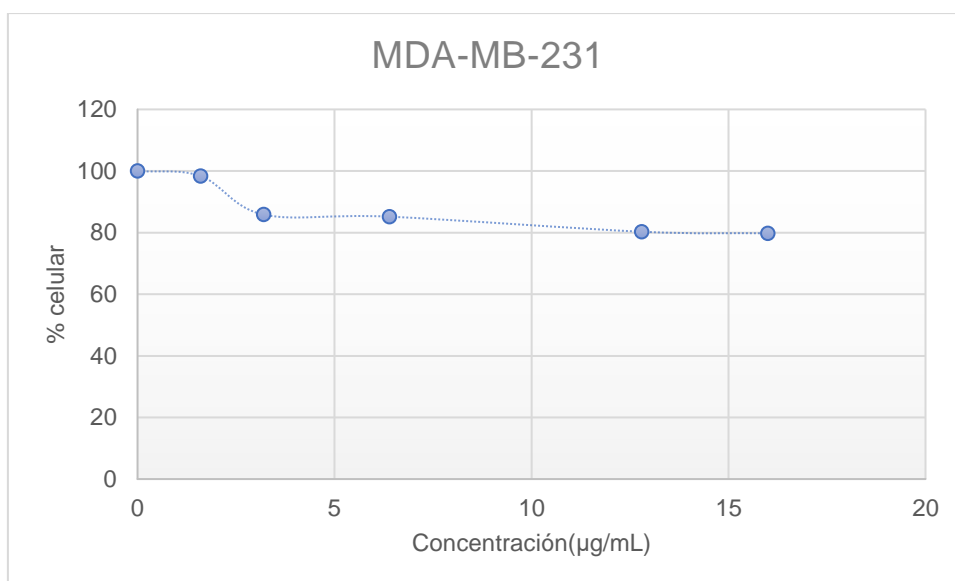
**Figura 49. Curva dosis-respuesta en HCT-15 de 103.**



**Figura 50. Curva dosis-respuesta en HeLa de 103.**



**Figura 51. Curva dosis-respuesta en MCF-7 de 103.**

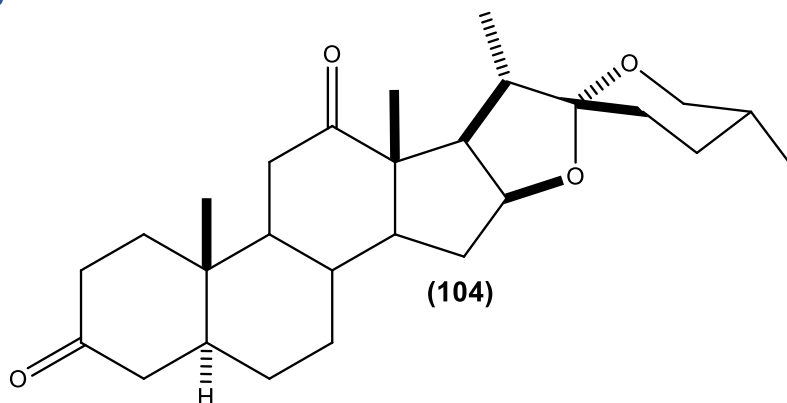


**Figura 52. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231 de 103.**

**Tabla 7. Valores de IC<sub>50</sub> del compuesto (103).**

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HCT-15	>15.8
HeLa	4.66
MCF-7	No activo
MDA-MB-231	No activo

### 7.3 Hecogenona

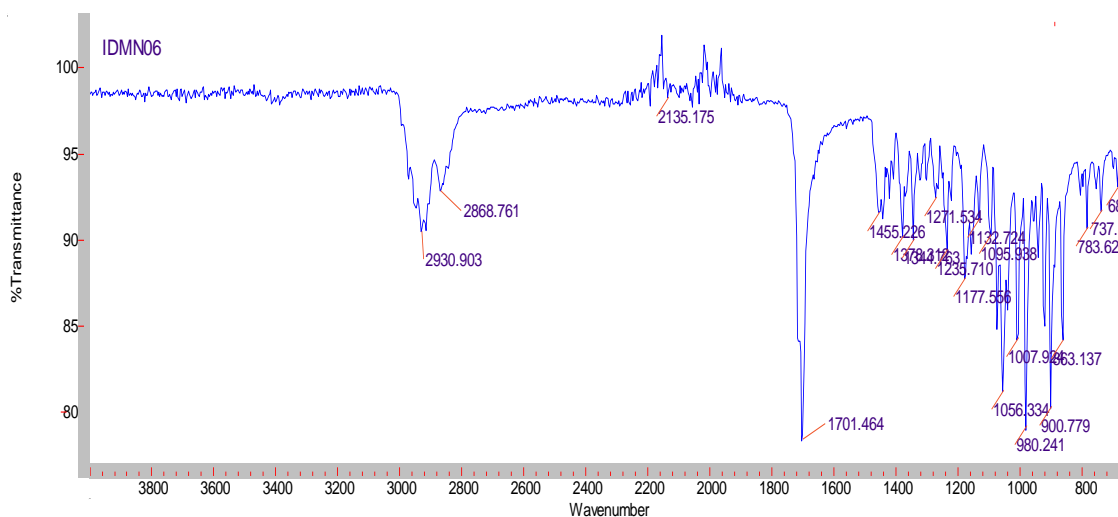


**Figura 53. Hecogenona (104)**

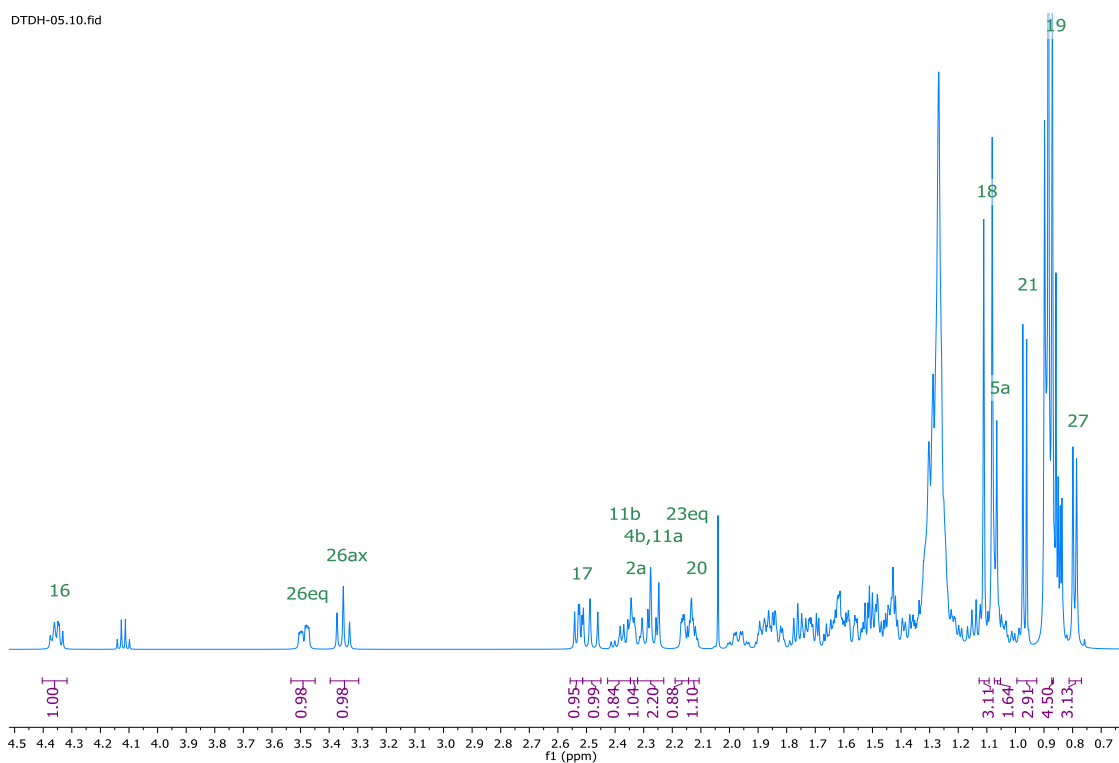
El compuesto (104) una vez puro se caracterizó debidamente acorde a sus características físicas y espectros de IR y RMN.

**Tabla 8. Características de (104)**

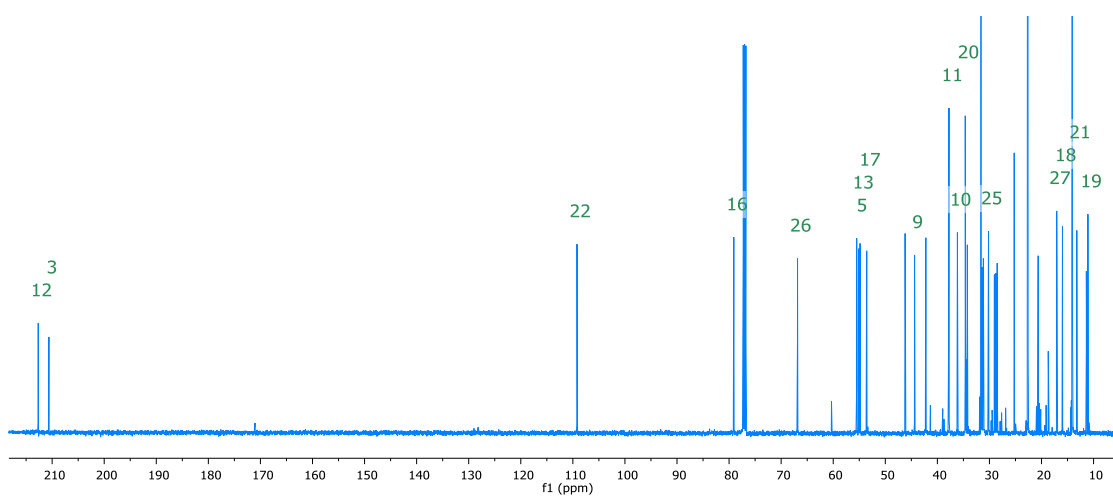
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	239-241
$\alpha_D$	+23.8 °
$[M+H^+]$	429.3106



**Figura 54. Espectro de IR de hecogenona (104).**

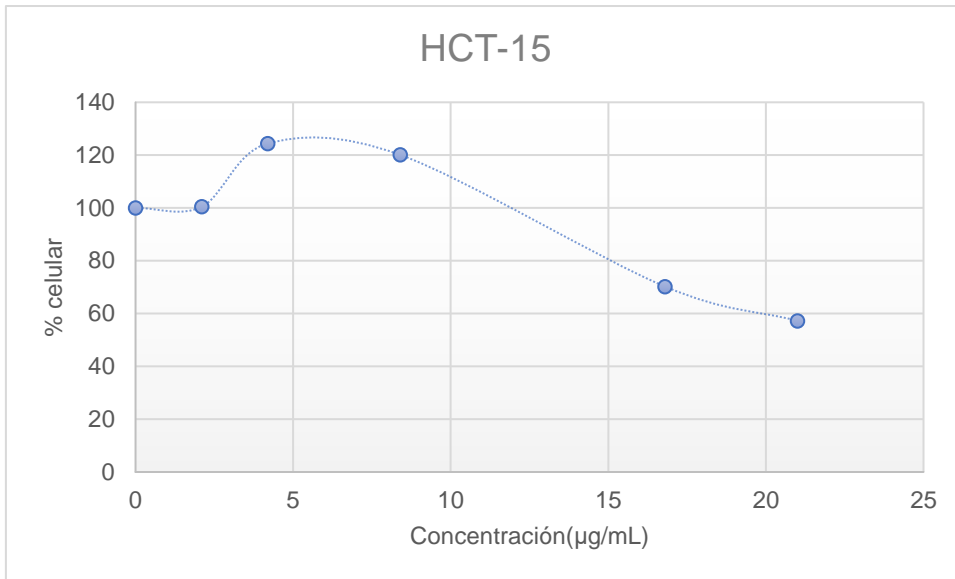


**Figura 55. Espectro de  $^1\text{H}$  de hecogenona (104) a 500 MHz.**

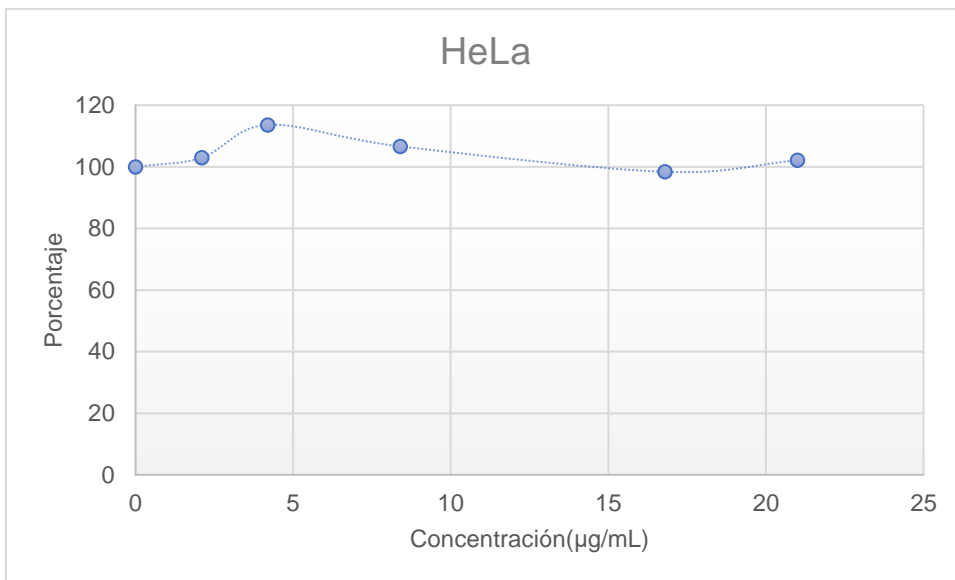


**Figura 56. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de de hecogenona (104) a 125 MHz.**

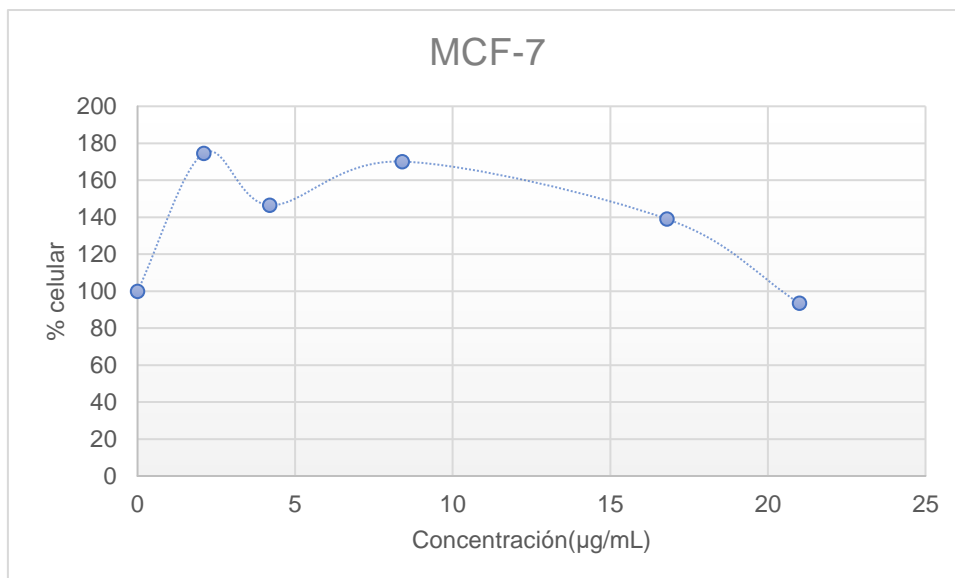
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



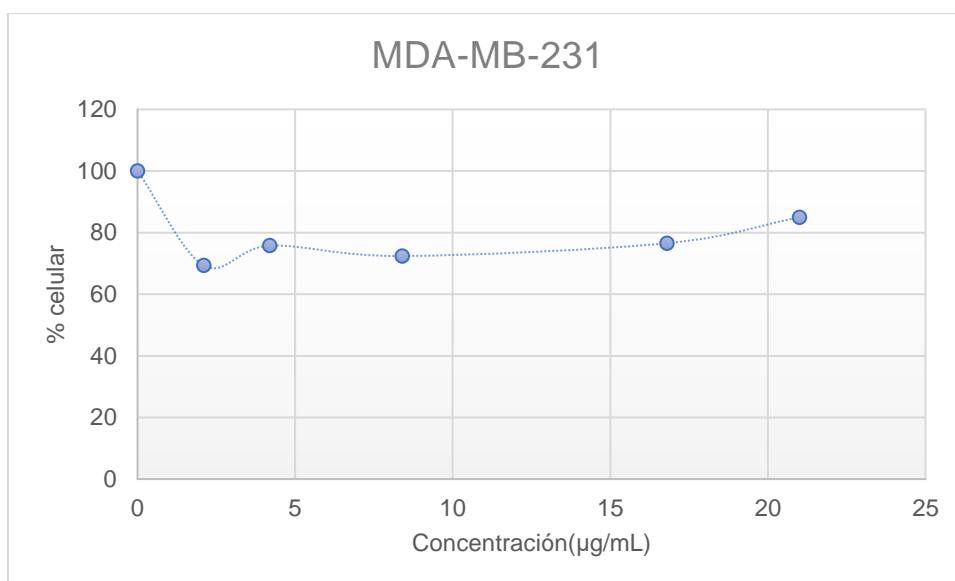
**Figura 57. Curva dosis-respuesta en HCT-15 de 104.**



**Figura 58. Curva dosis-respuesta en HeLa de 104.**



**Figura 59. Curva dosis-respuesta en MCF-7 de 104.**

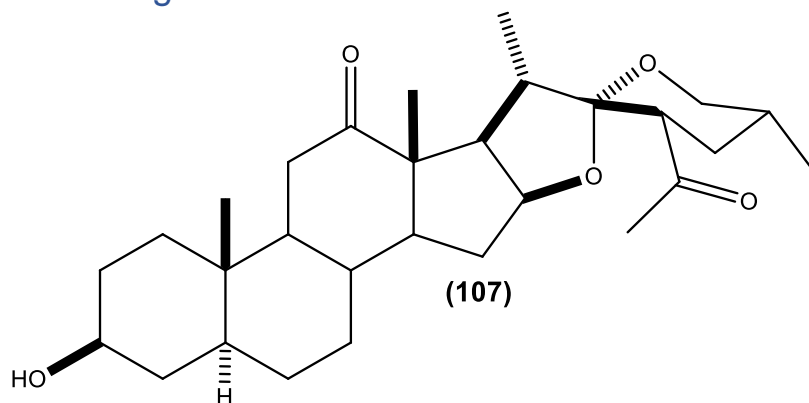


**Figura 60. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231 de 104.**

**Tabla 9. Valores de IC<sub>50</sub> de (104).**

<b>Línea celular</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
HCT-15	>20
HeLa	No activo
MCF-7	Proliferativo
MDA-MB-231	No activo

## 7.4 23-acetil-hecogenina

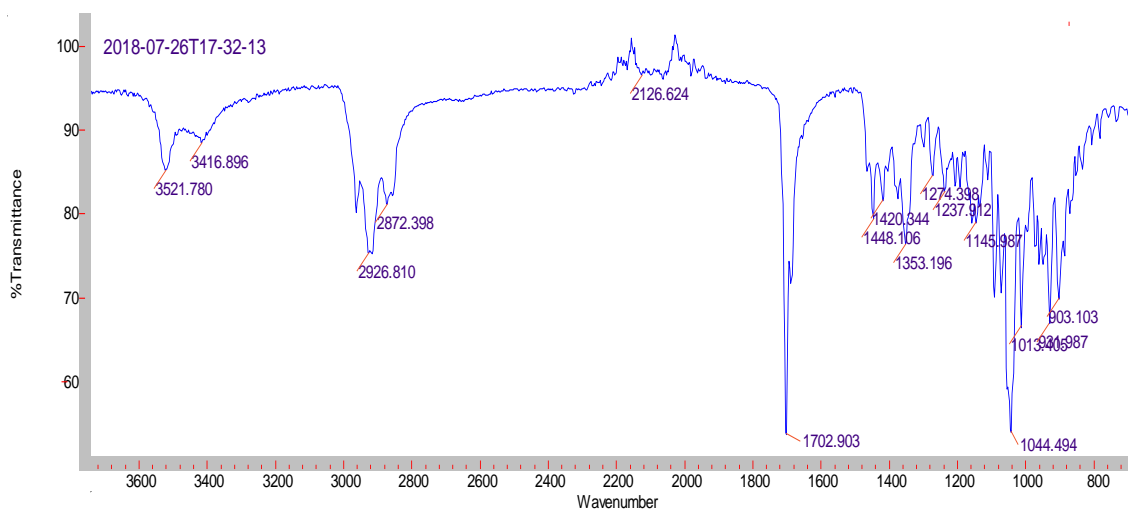


**Figura 61. 23 acetil-hecogenina (107)**

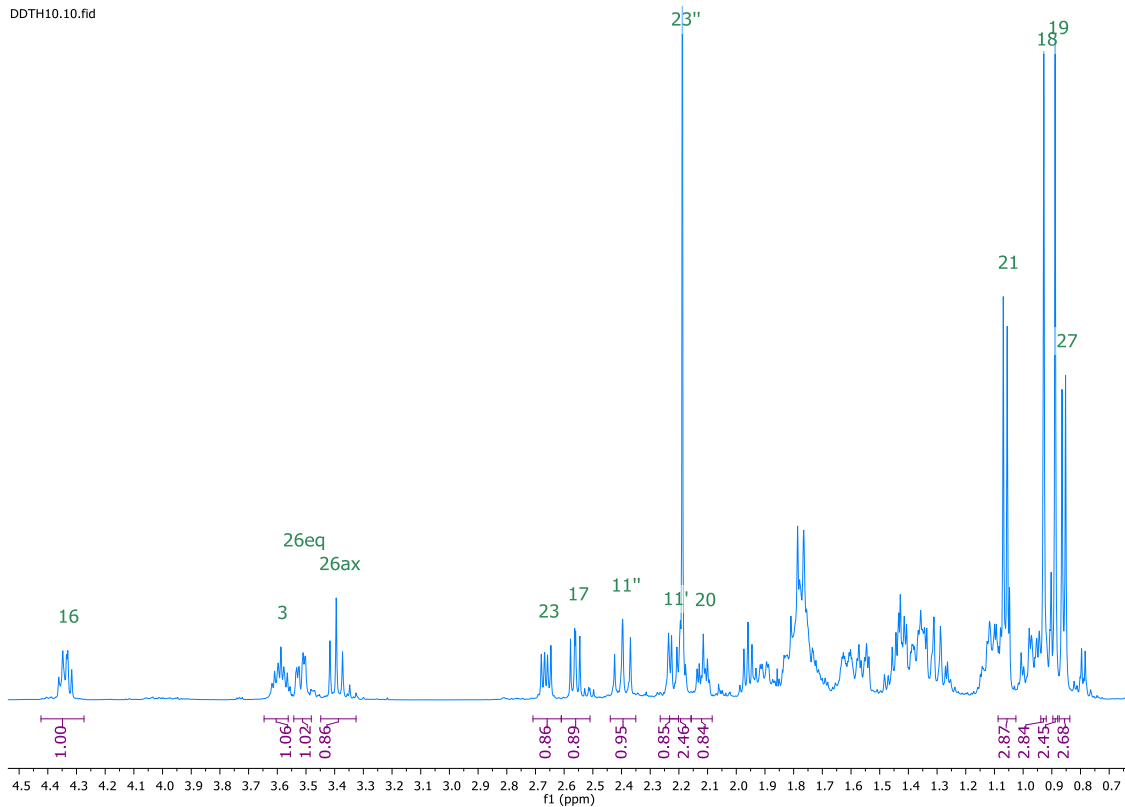
El compuesto (107) se caracterizó física y espectroscópicamente para asegurar su pureza y estructura.

**Tabla 10. Características de (107).**

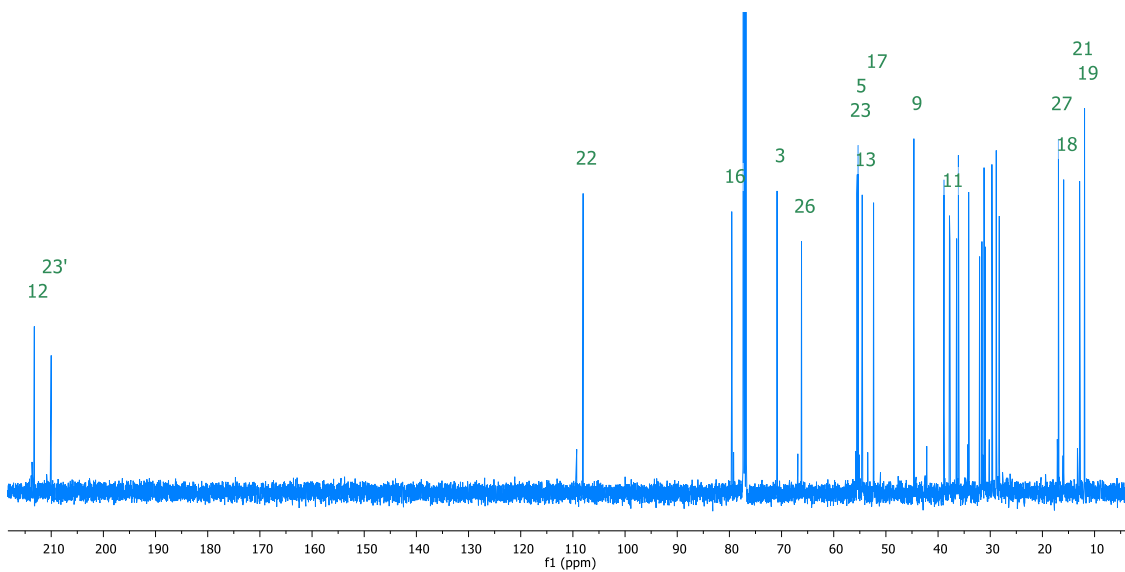
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
<b>Punto de fusión</b>	148-150 °C
<b>[M+H<sup>+</sup>]</b>	473.3255



**Figura 62. Espectro de IR de 23-acetil hecogenina (107).**

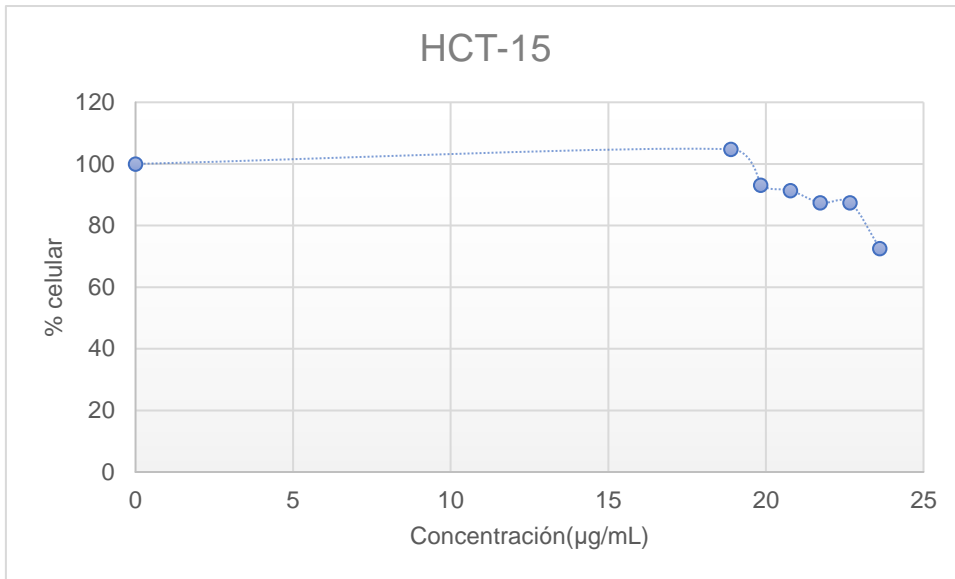


**Figura 63. Espectro de  $^1\text{H}$  de 23-acetil de hecogenina (107) a 500 MHz.**

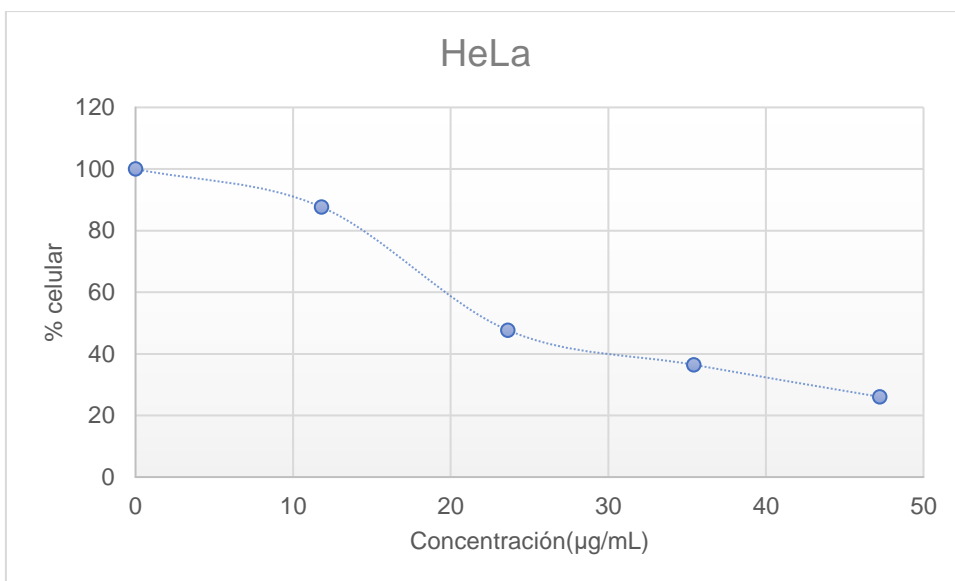


**Figura 64. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de 23-acetil de hecogenina (107) a 125 MHz**

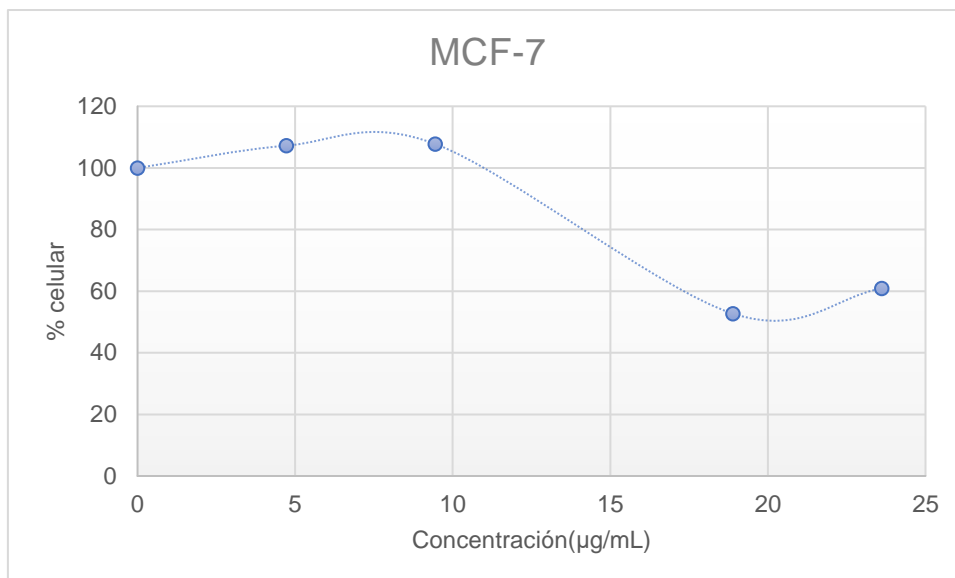
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



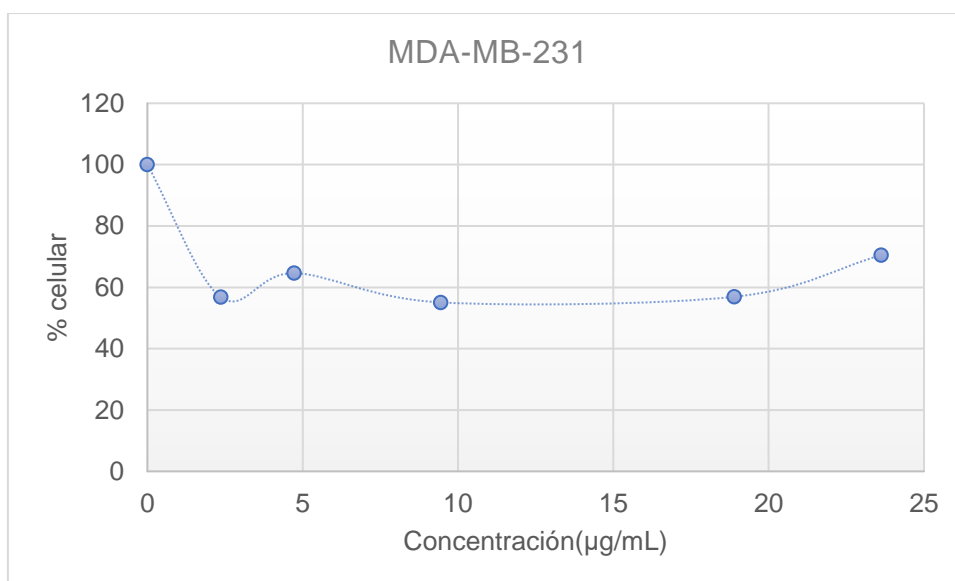
**Figura 65. Curva dosis-respuesta en HCT-15 de 107.**



**Figura 66. Curva dosis-respuesta en HeLa de 107.**



**Figura 67. Curva dosis-respuesta en MCF-7 de 107.**



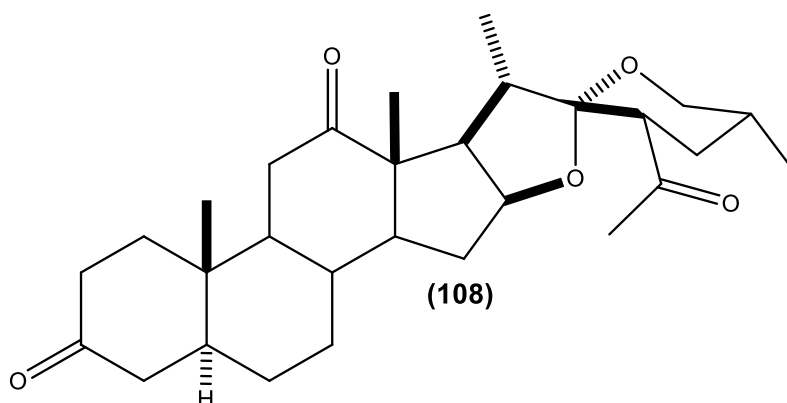
**Figura 68. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231 de 107.**

**Tabla 11. Valores de IC<sub>50</sub> de (107).**

<b>Línea celular</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
HCT-15	No activo
HeLa	22.93
MCF-7	23.10*
MDA-MB-231	2.5*

\*Determinado para IC<sub>40</sub> sin efecto a mayores concentraciones

## 7.5 23-acetil-hecogenona

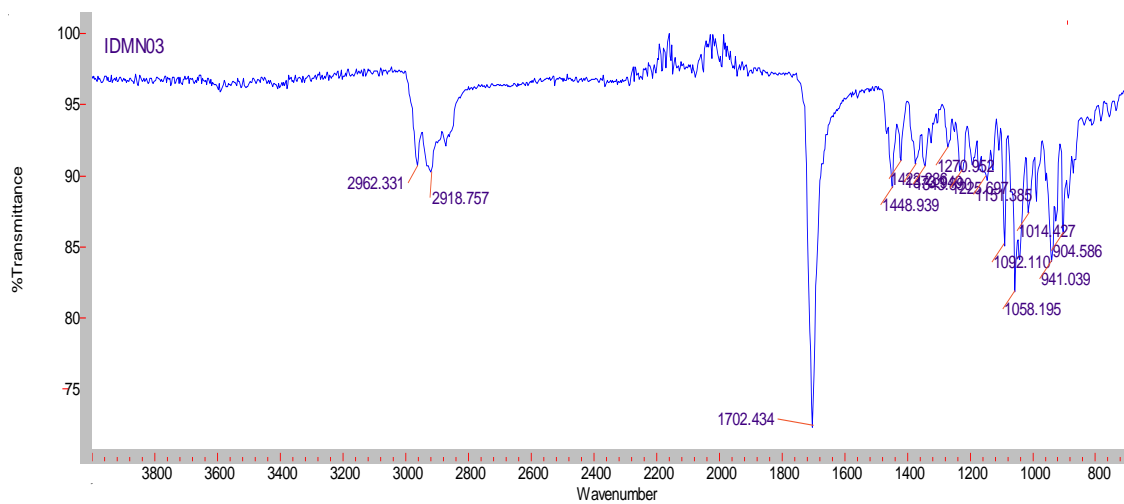


**Figura 69. 23 acetil-hecogenona (108).**

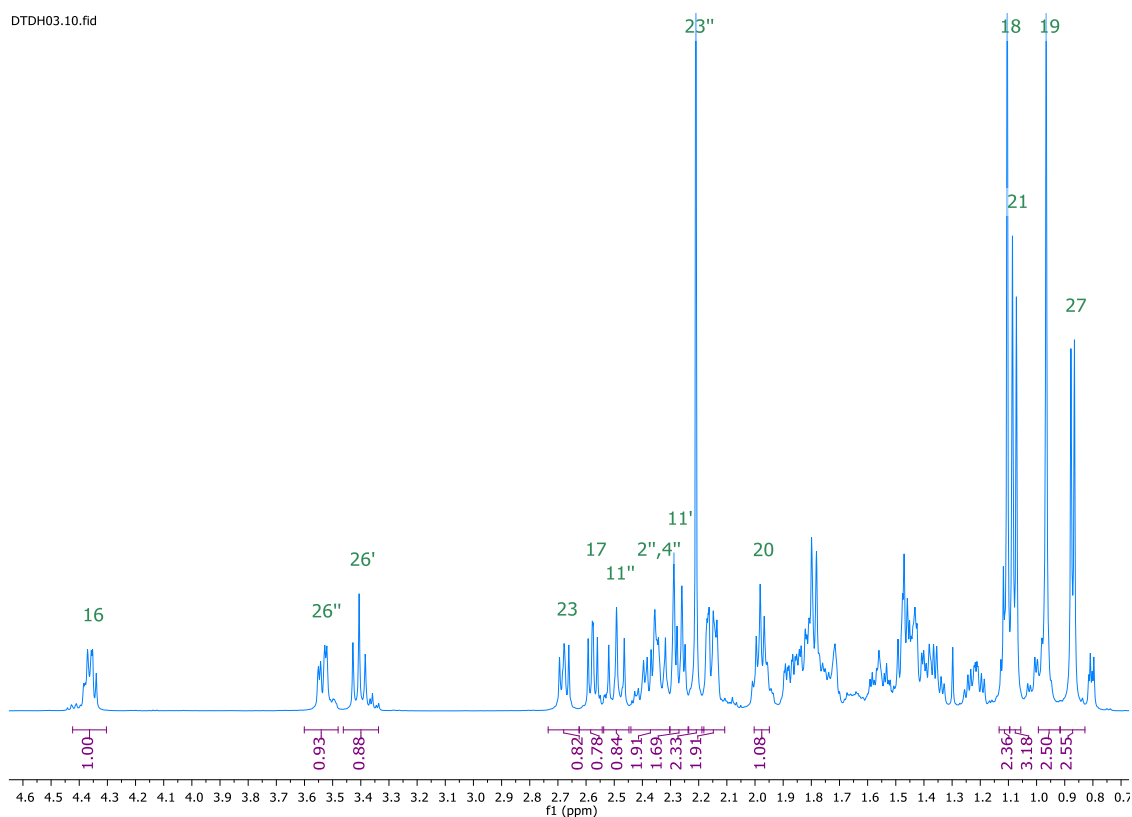
El compuesto (108) se caracterizó correctamente para asegurar su estructura y pureza, obteniendo los datos mostrados a continuación.

**Tabla 12. Características de (108).**

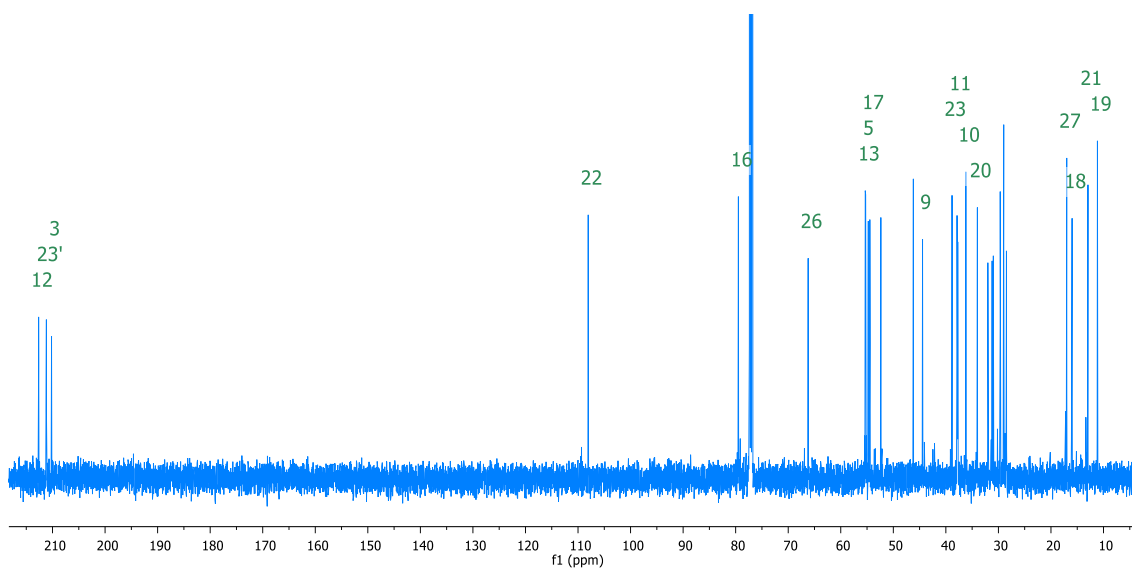
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	144-146
$[M+H^+]$	471.3094



**Figura 70. Espectro de IR de 23-acetil hecogenona (108).**

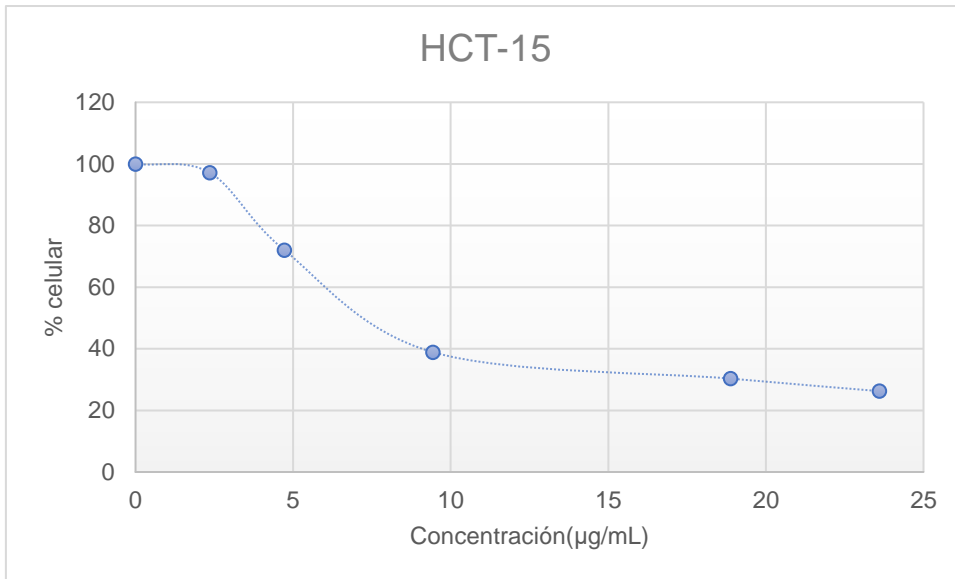


**Figura 71. Espectro de  $^1\text{H}$  de 23-acetil de hecogenona (108) a 500 MHz.**

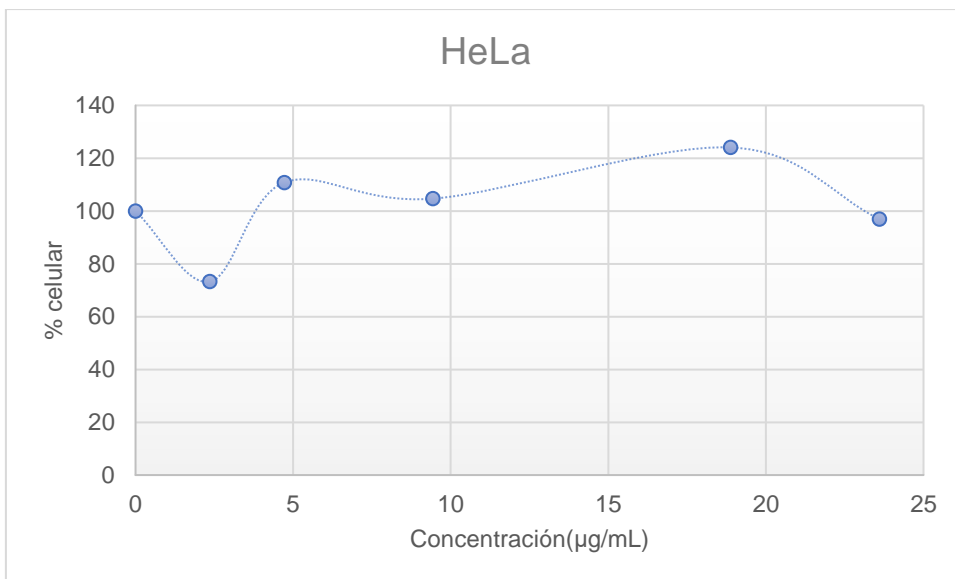


**Figura 72. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de 23-acetil de hecogenona (108) a 125 MHz**

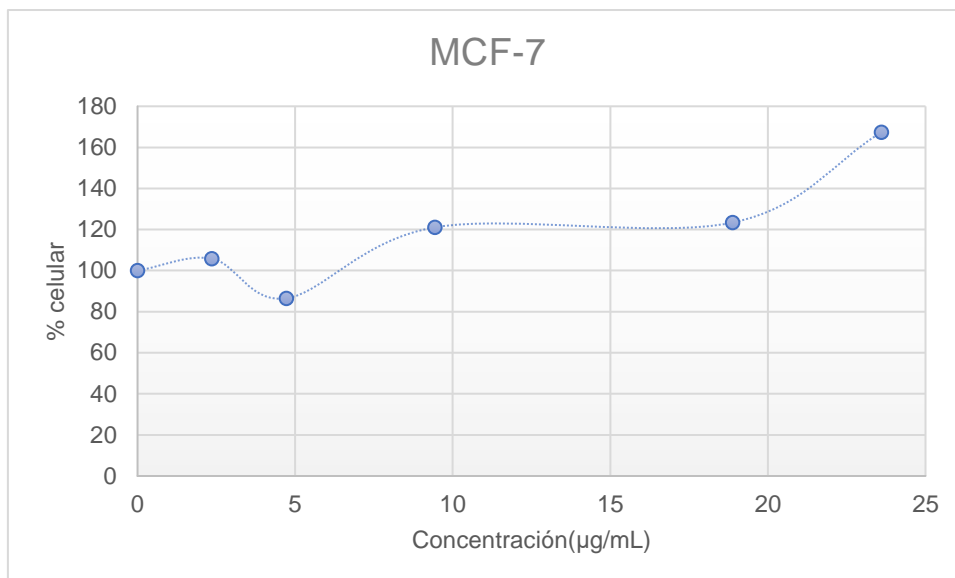
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



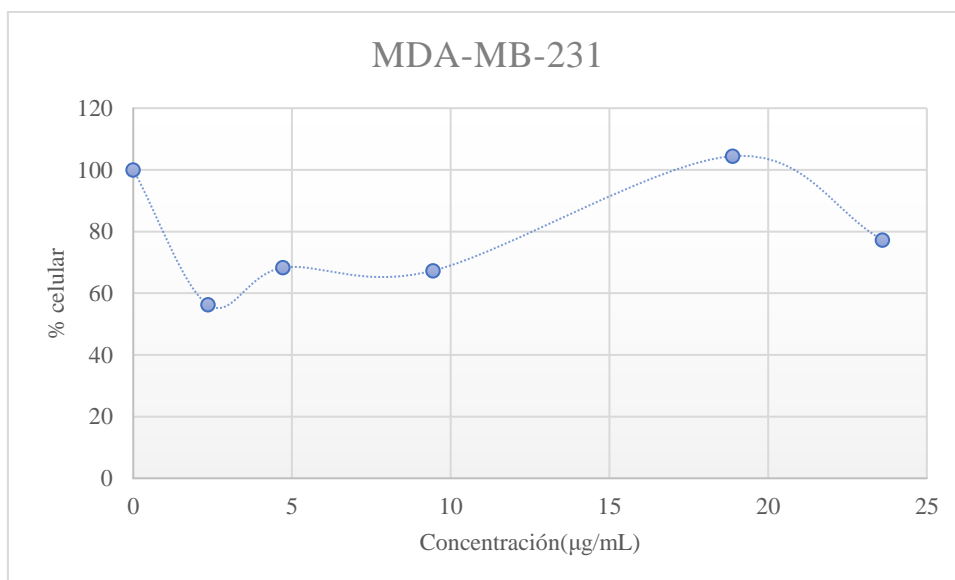
**Figura 73. Curva dosis-respuesta en HCT-15 de 108.**



**Figura 74. Curva dosis-respuesta en HeLa de 108.**



**Figura 75. Curva dosis-respuesta en MCF-7 de 108.**



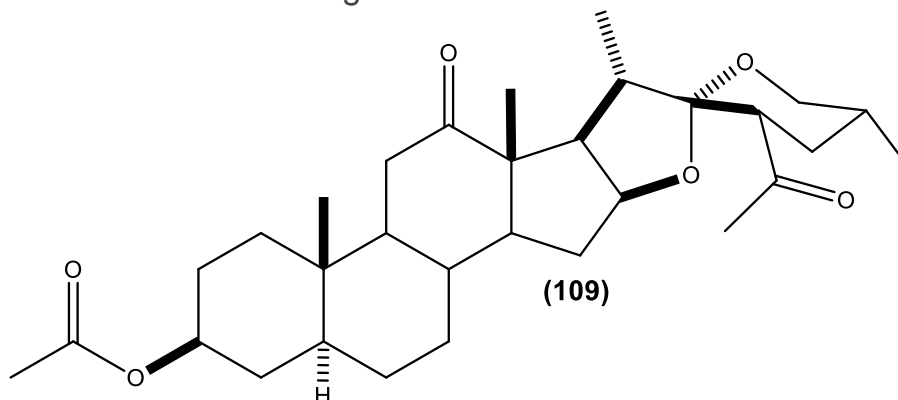
**Figura 76. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231 de 108.**

**Tabla 13. Valores de IC<sub>50</sub> de 108.**

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HCT-15	7.85
HeLa	No activo
MCF-7	Proliferativo
MDA-MB-231	2.5**

\*\* Determinado para IC<sub>40</sub> con efecto proliferante a mayores concentraciones

## 7.6 Acetato de 23 acetil-hecogenina

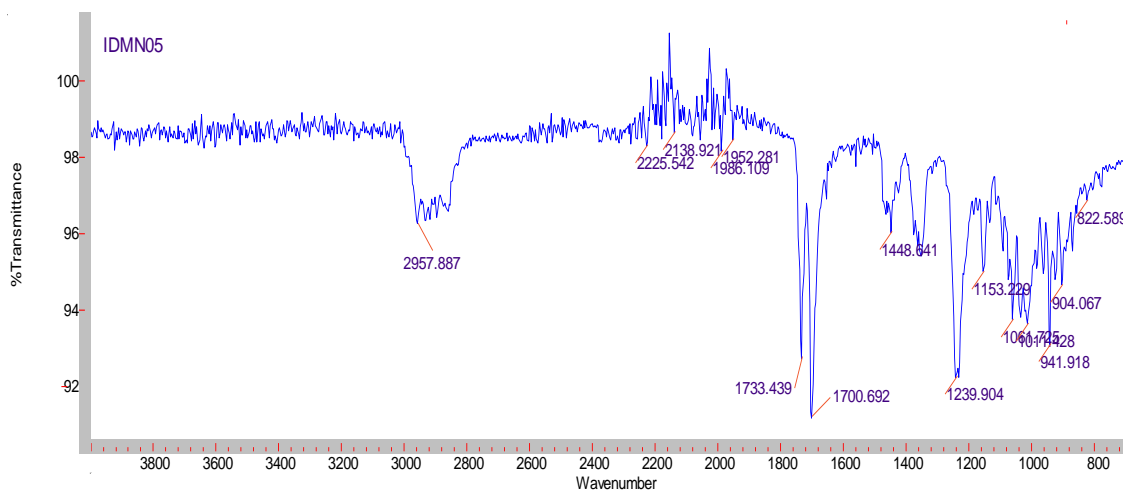


**Figura 77. Acetato de 23 acetil-hecogenina (109)**

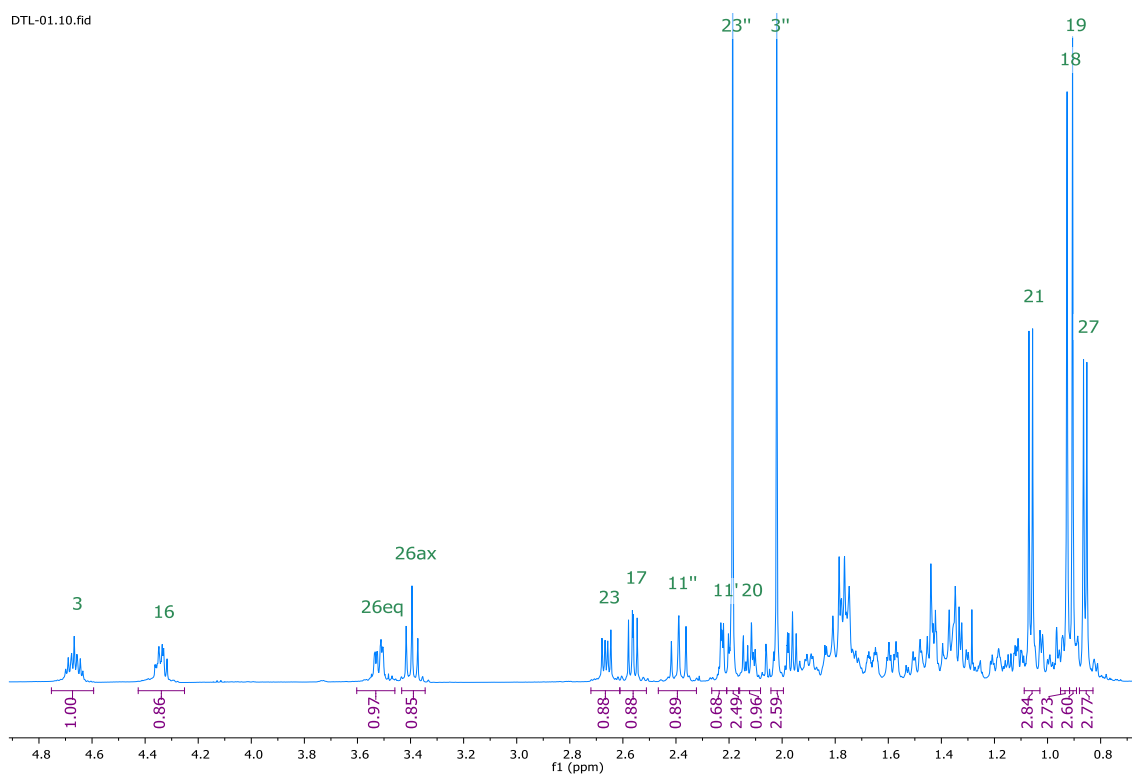
El compuesto (109) se caracterizó e identificó mediante sus características físicas y técnicas espectroscopias, obteniendo los siguientes resultados.

**Tabla 14. Características de (109).**

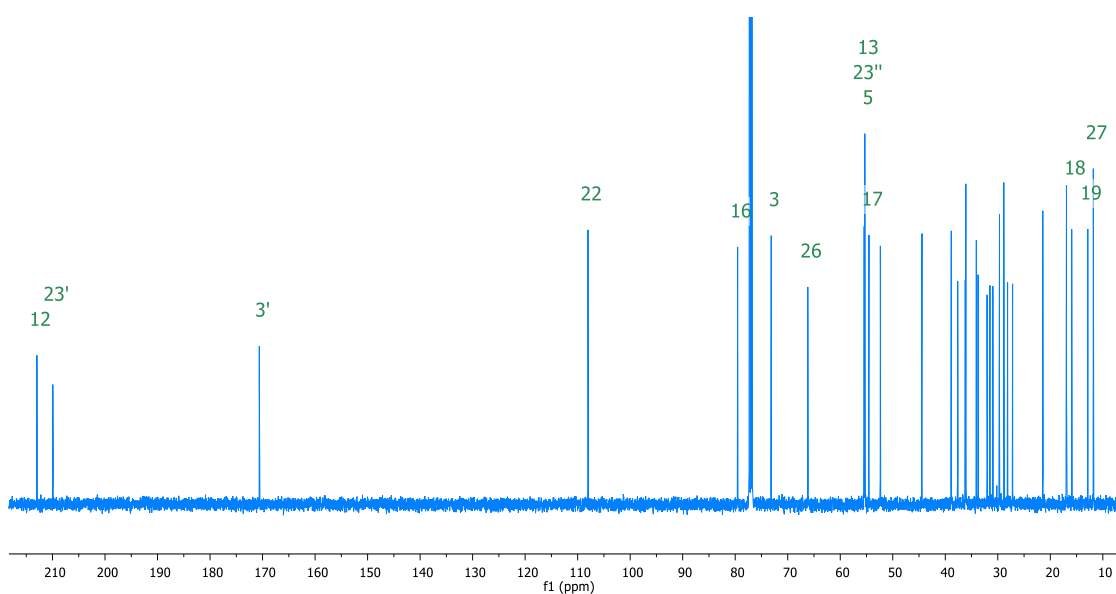
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	161-165°C
$[M+H^+]$	515.3359



**Figura 78. Espectro de IR de acetato de 23-acetil de hecogenina (109).**

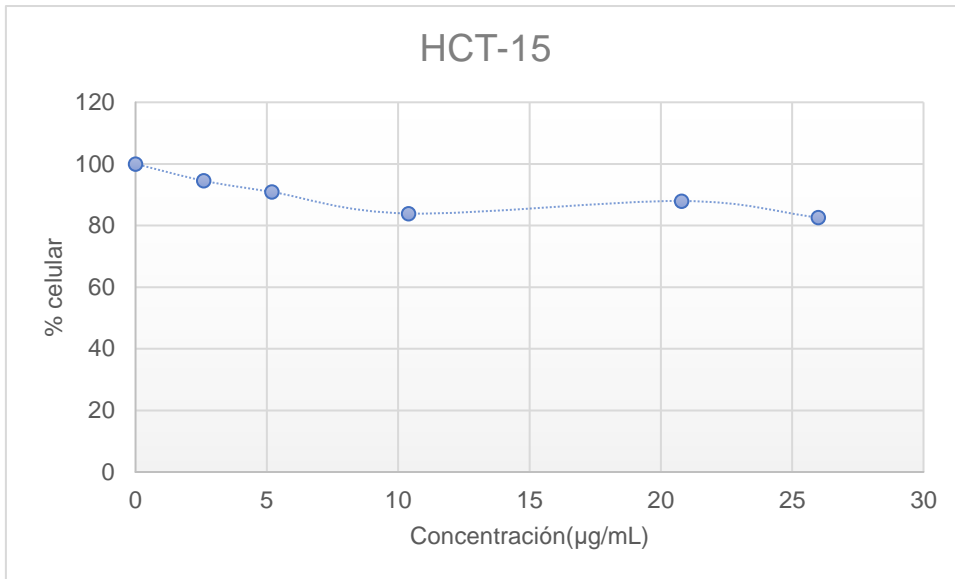


**Figura 79. Espectro de  $^1\text{H}$  de acetato de 23-acetil hecogenina (109) a 500 MHz.**

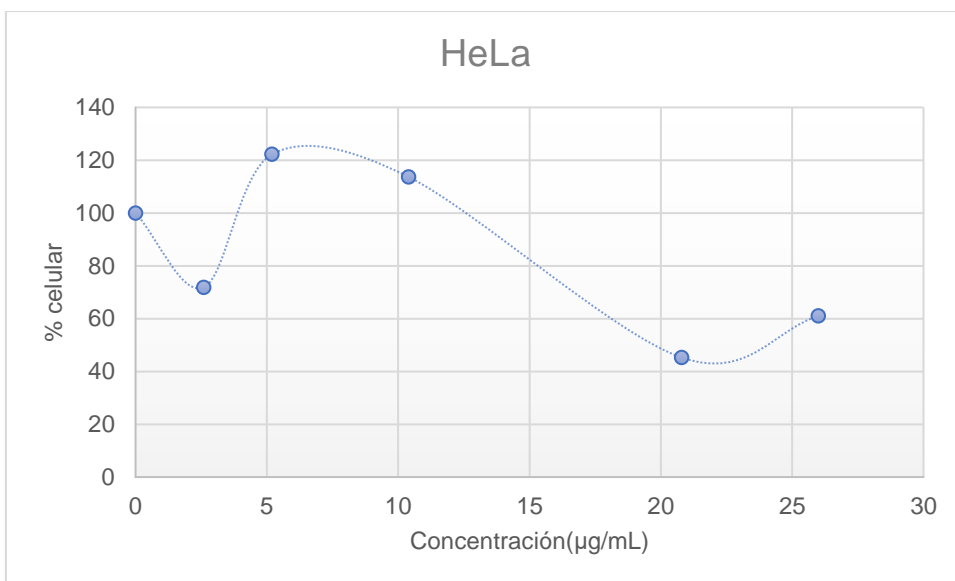


**Figura 80. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de acetato de 23-acetil hecogenina (109) a 125 MHz**

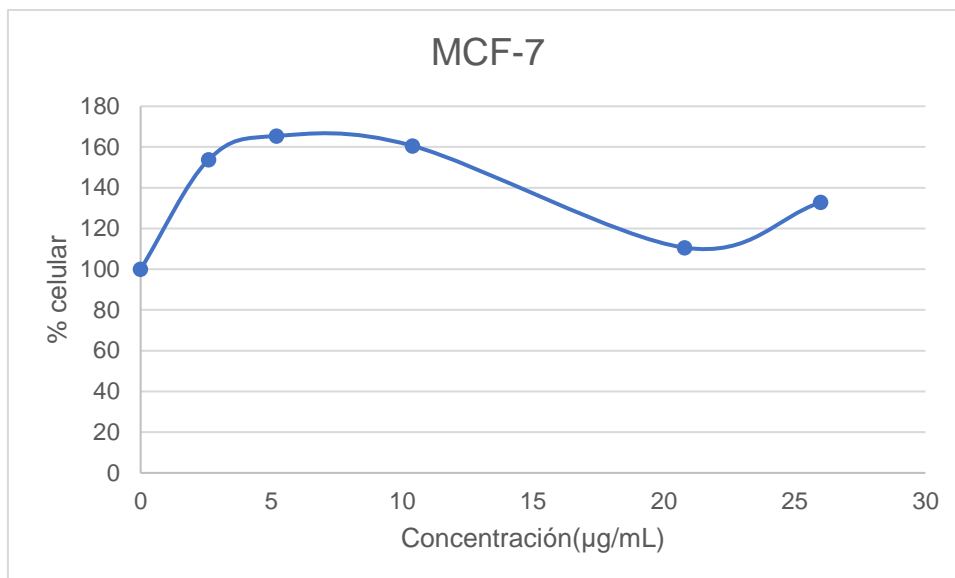
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



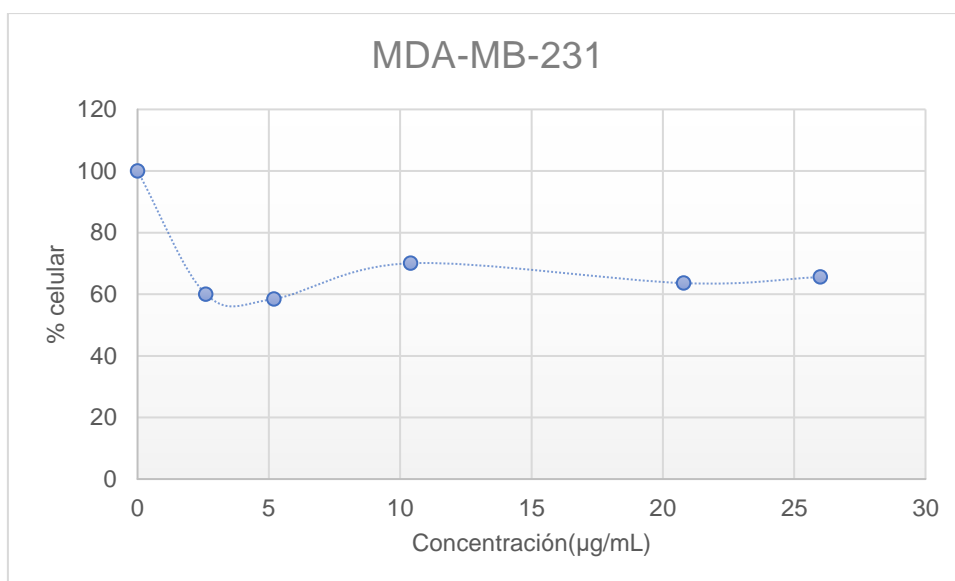
**Figura 81. Curva dosis-respuesta en HCT-15 de 109.**



**Figura 82. Curva dosis-respuesta en HeLa de 109.**



**Figura 83. Curva dosis-respuesta en MCF-7 de 109.**



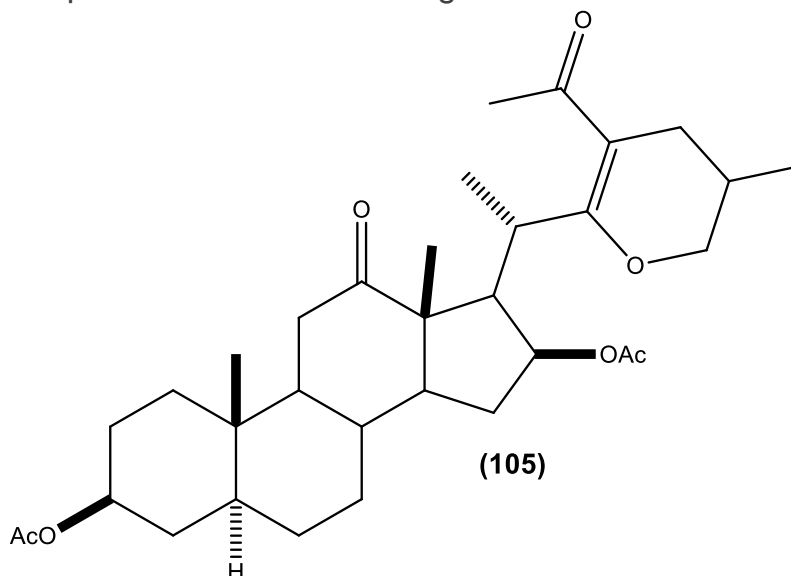
**Figura 84. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231 de 109.**

**Tabla 15. Valores de IC<sub>50</sub> de (109).**

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
HCT-15	No activo
HeLa	20.07
MCF-7	Proliferativo
MDA-MB-231	2.5*

\*Determinado para IC<sub>40</sub> sin efecto a mayores concentraciones

## 7.7 Derivado Epoxicolesténico de hecogenina

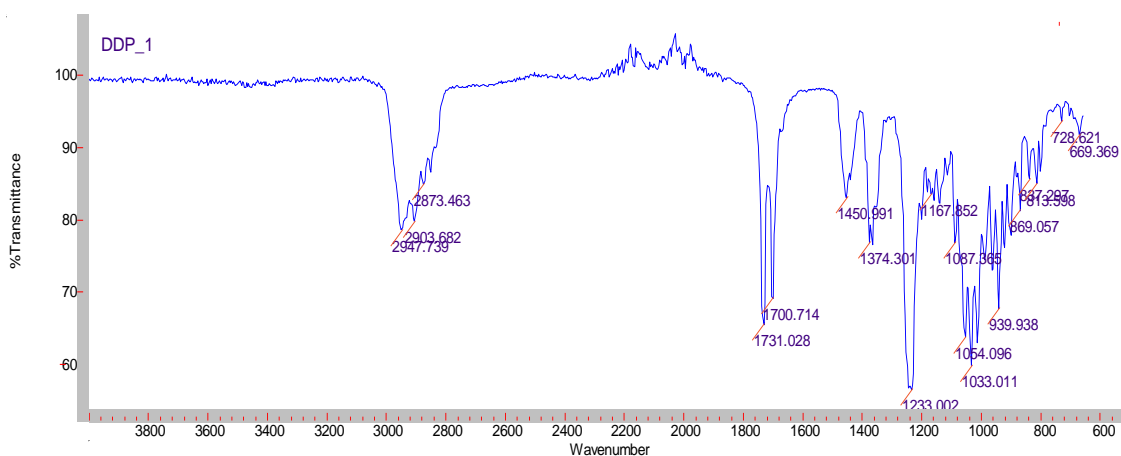


**Figura 85. Derivado Epoxicolesténico de hecogenina (105)**

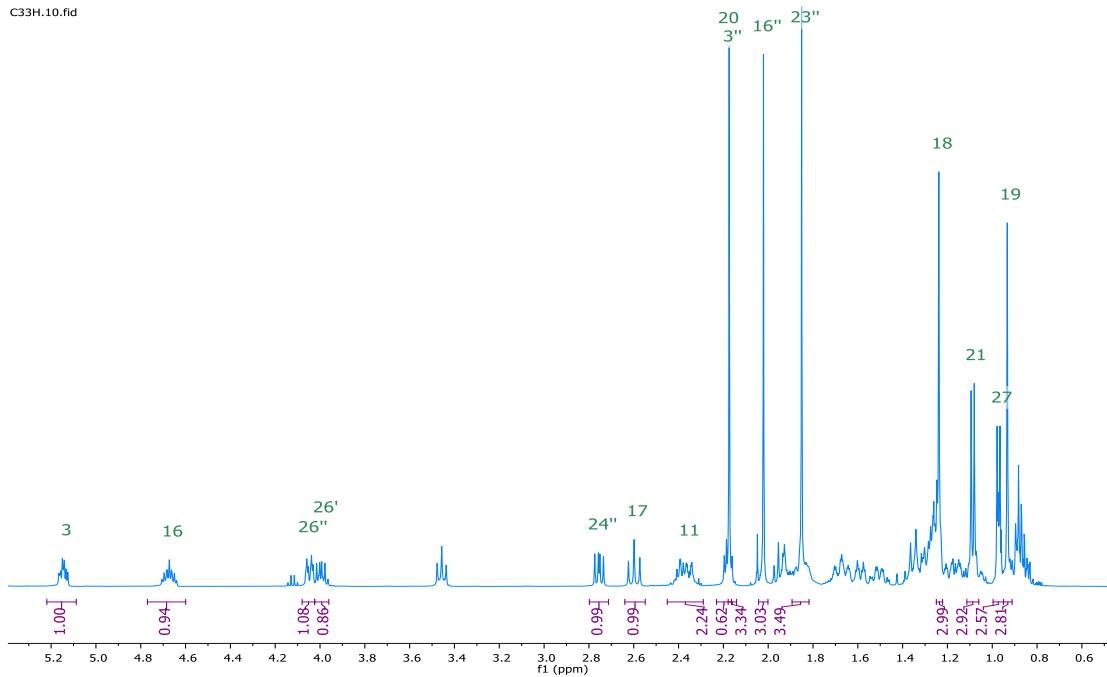
El compuesto (105) se caracterizó e identificó mediante sus características físicas y técnicas espectroscopias, obteniendo los siguientes resultados.

**Tabla 16. Características de (105).**

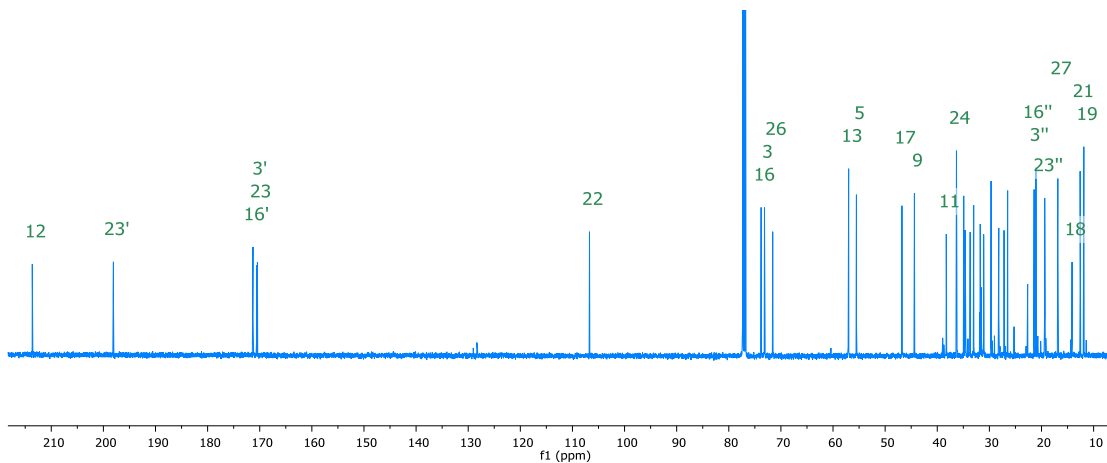
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
<b>Punto de fusión</b>	<b>194-195°C</b>
<b><math>\alpha_D</math></b>	<b>+37.5°</b>



**Figura 86. Espectro de IR del derivado epoxicolesténico de hecogenina (105).**

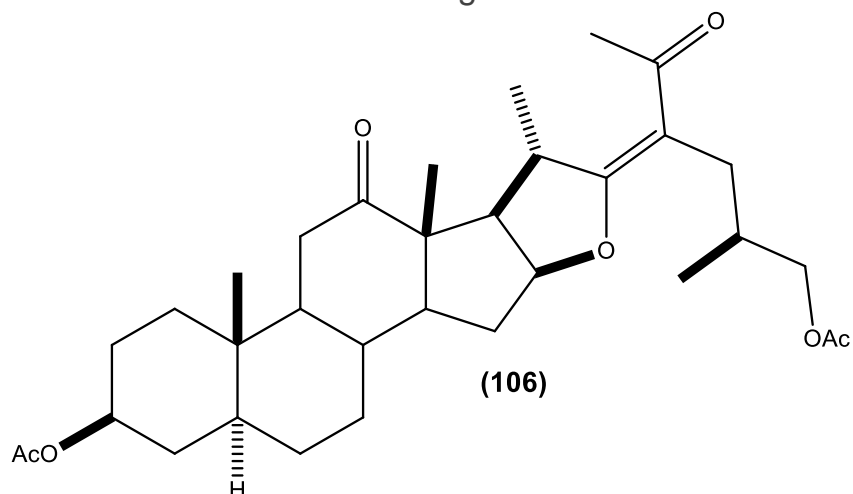


**Figura 87. Espectro de  $^1\text{H}$  del derivado epoxicolesténico de hecogenina (105) a 500 MHz.**



**Figura 88. Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado epoxicolesténico de hecogenina (105) a 125 MHz.**

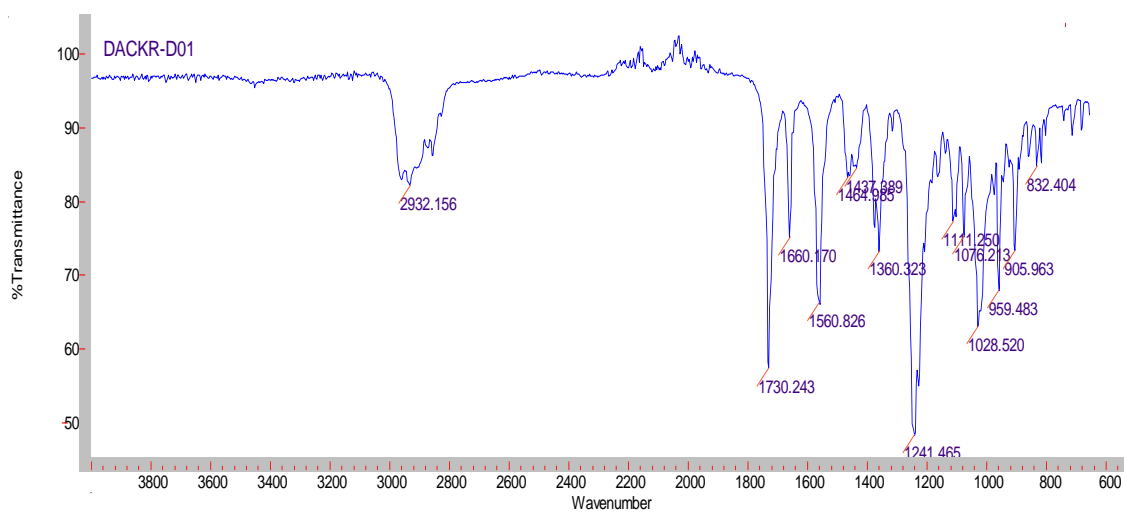
## 7.8 Derivado furosténico C-33 de hecogenina



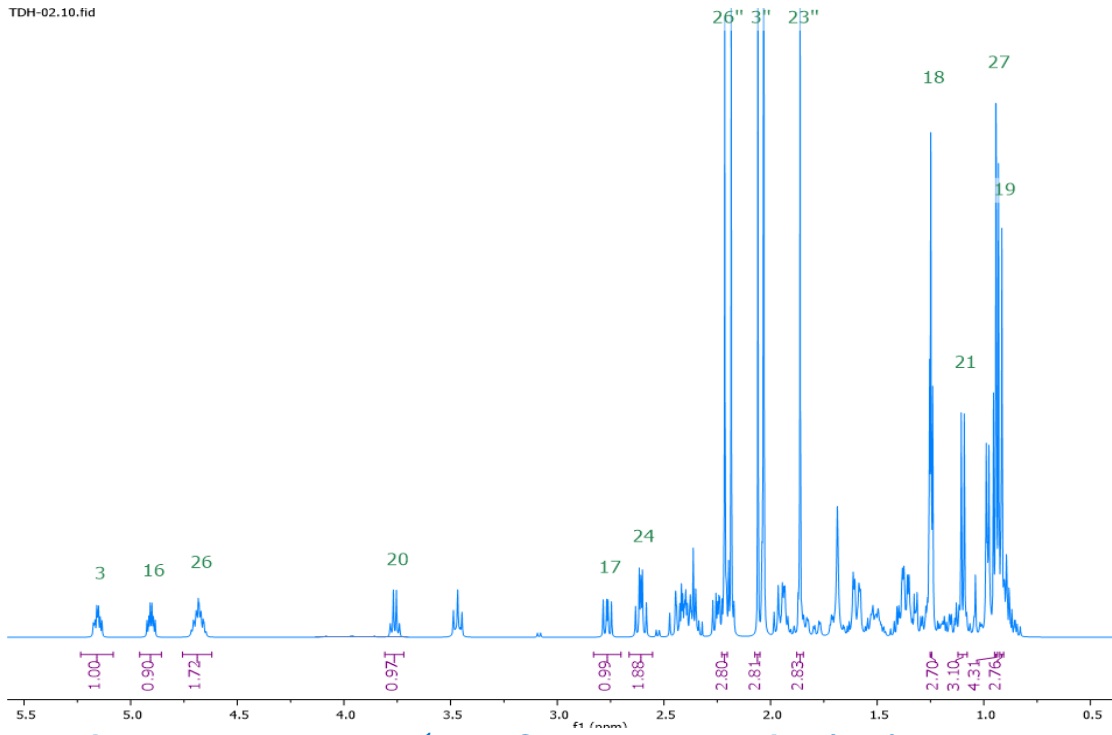
**Figura 89. Derivado furosténico C33 de hecogenina (106).**

**Tabla 17. Características de (106).**

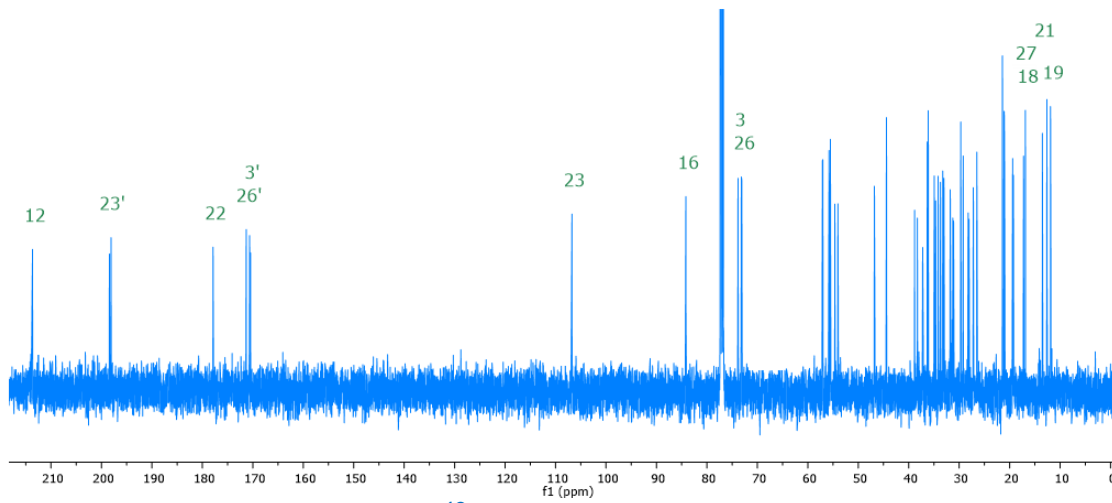
Característica	Valor
Punto de fusión	144-145°C
$\alpha_D$	+83.06°



**Figura 90. Espectro de IR derivado furosténico de hecogenina (106).**

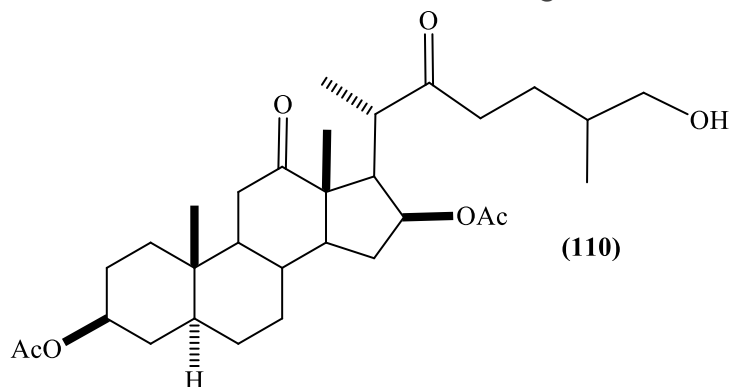


**Figura 91. Espectro de  $^1\text{H}$  de C-33 de hecogenina (106) a 500 MHz.**



**Figura 92. Espectro de  $^{13}\text{C}$  C-33 de hecogenina (106) a 125 MHz**

7.9 Derivado 26 OH 22 Oxocolestánico de hecogenina.

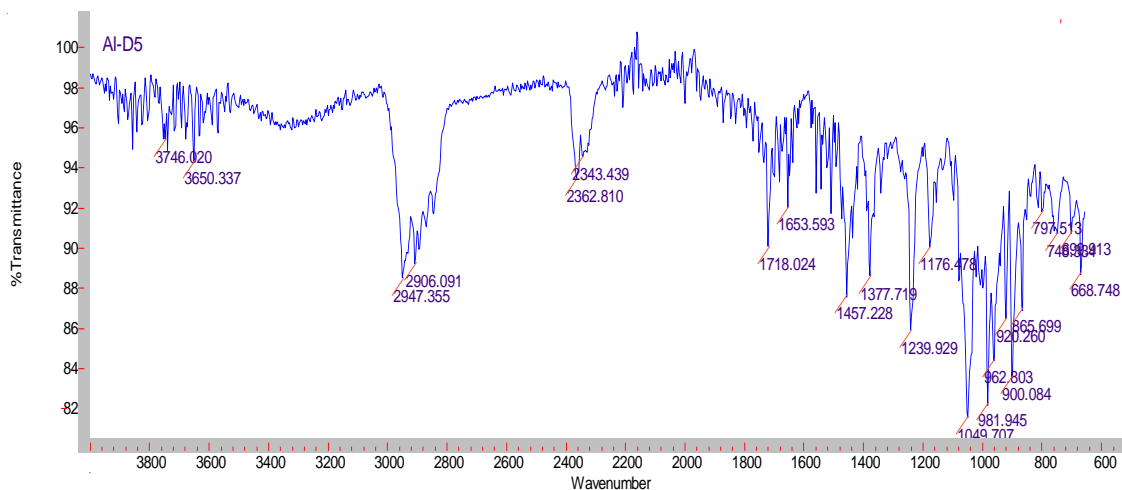


**Figura 93. Derivado 26 OH 22 Oxocolestánico de hecogenina (110).**

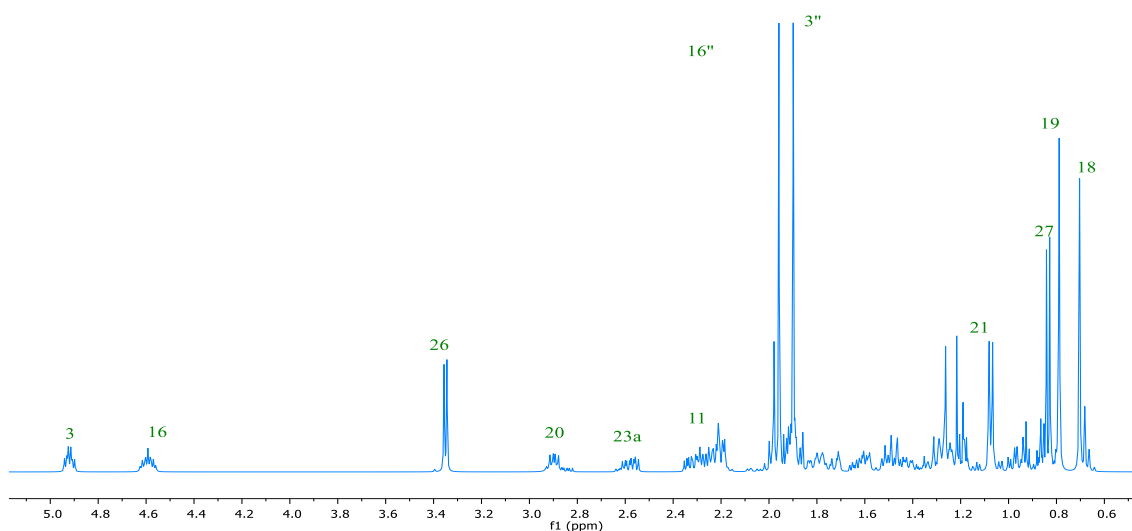
El compuesto (110) fue debidamente caracterizado por técnicas físicas y espectroscópicas para confirmar la estructura.

**Tabla 18. Características de (110)**

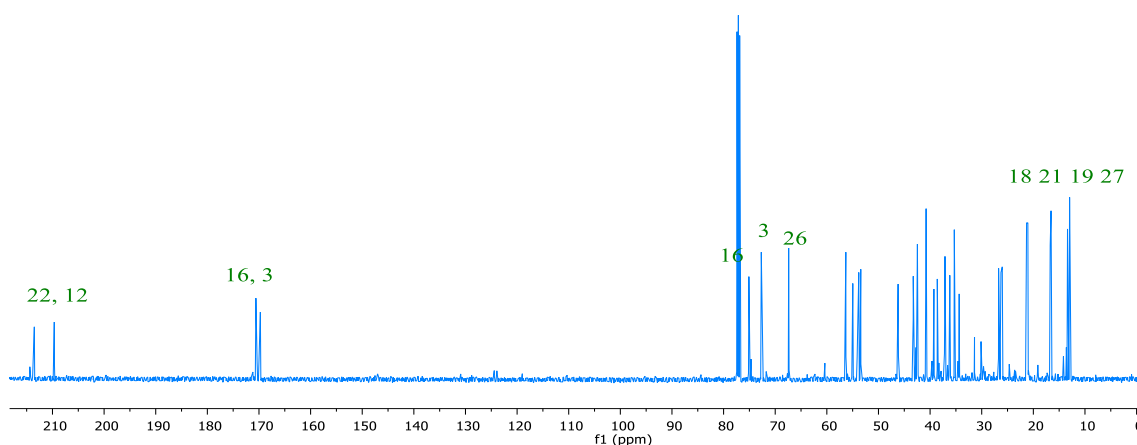
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	125-127°C
$\alpha_D$	+82.1°
$[M+H^+]$	533.3398



**Figura 94. Espectro de IR del derivado 26 OH 22 oxocolestánico de hecogenina (110).**

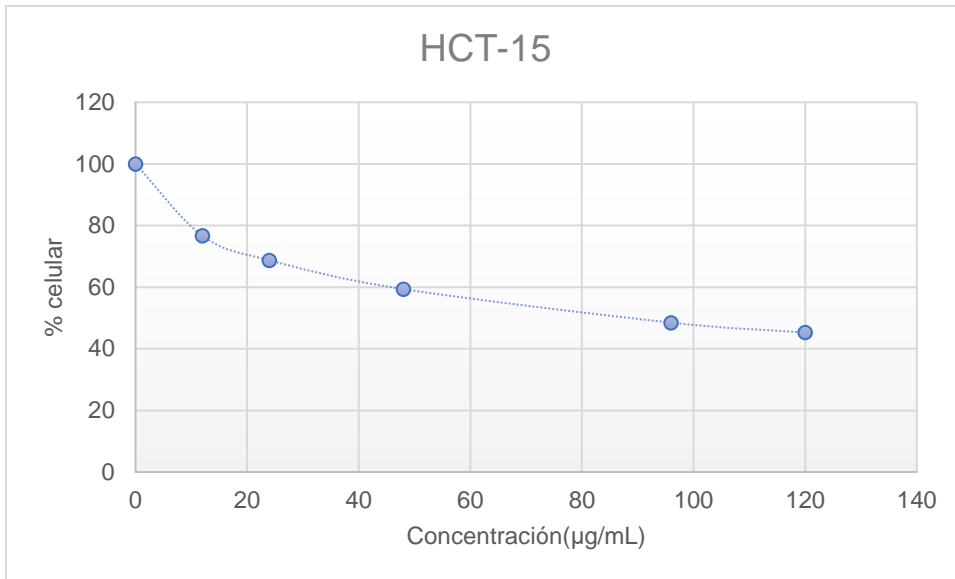


**Figura 95. Espectro de  $^1\text{H}$  del derivado 26 OH 22 oxocholestánico de hecogenina (110).**

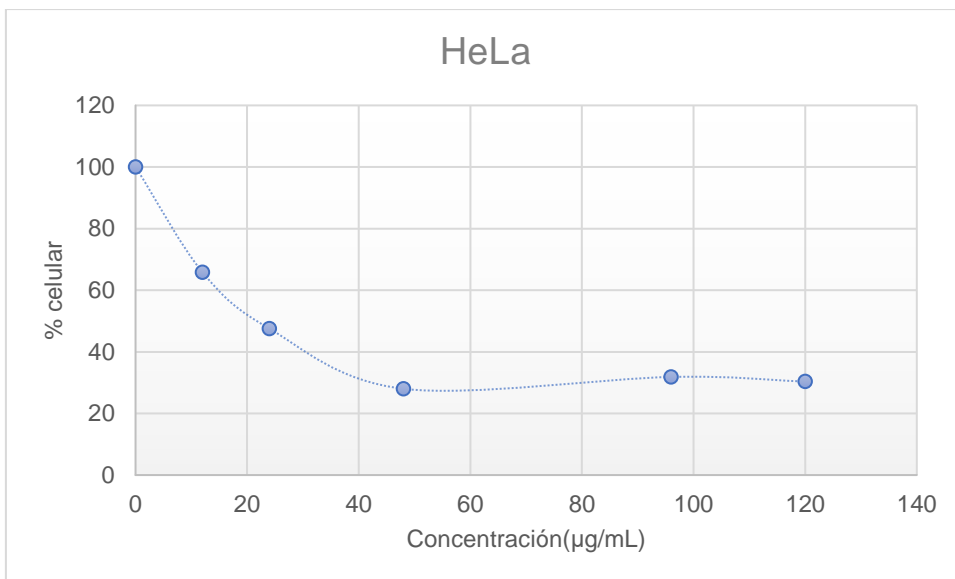


**Figura 96. Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado 26 OH 22 oxocholestánico de hecogenina (110).**

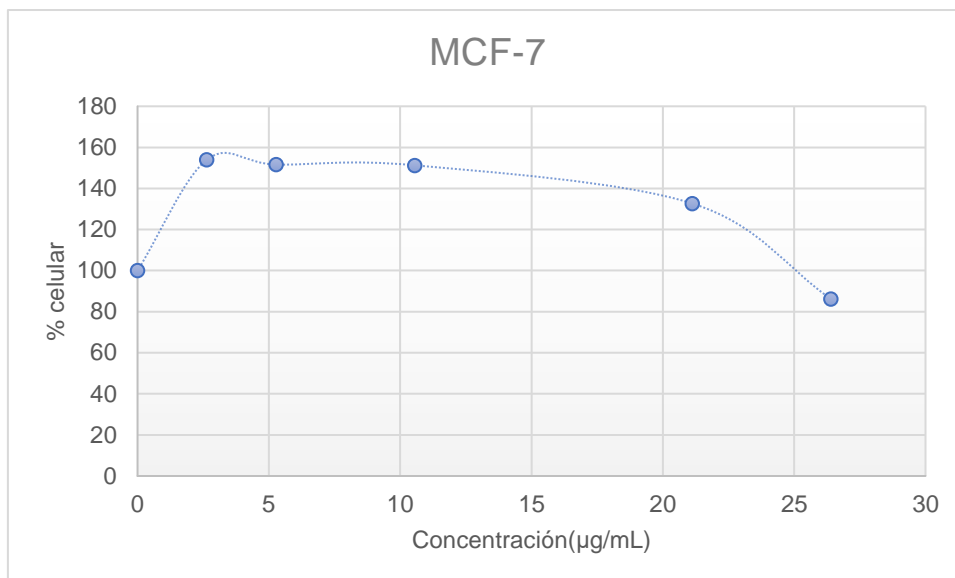
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



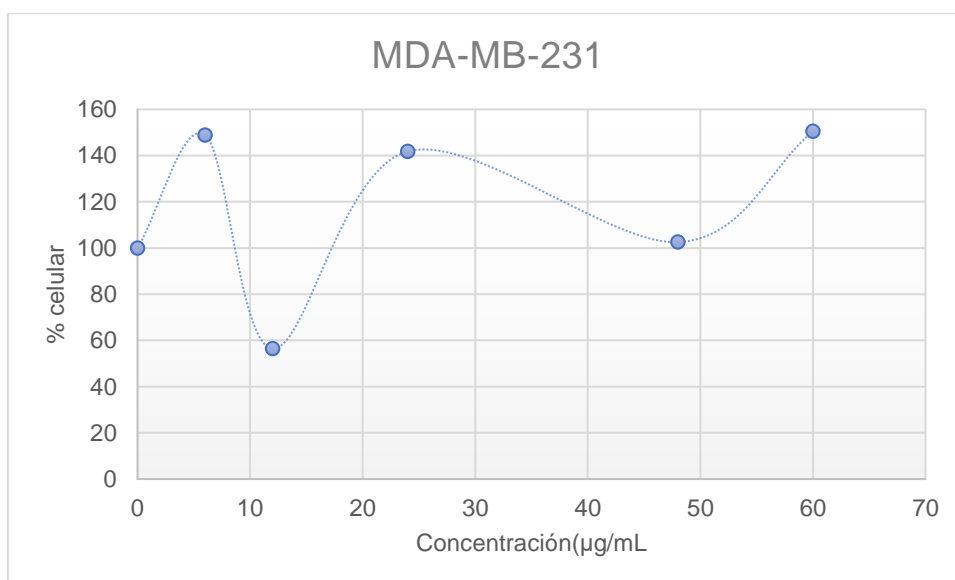
**Figura 97. Curva dosis-respuesta en HCT-15.**



**Figura 98. Curva dosis-respuesta en HeLa.**



**Figura 99. Curva dosis-respuesta en MCF-7.**



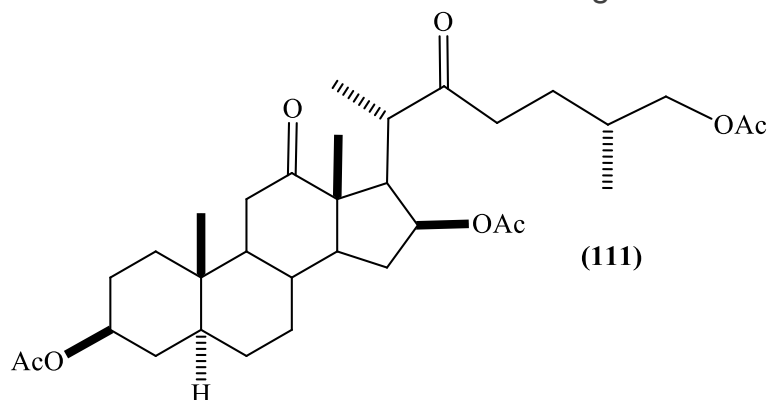
**Figura 100. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231.**

**Tabla 19. Valores de  $IC_{50}$  de (110)**

Línea celular	$IC_{50}$ (µg/mL)
HCT-15	89.27
HeLa	22.38
MCF-7	Proliferativo*
MDA-MB-231	No activo

\*A concentraciones altas decrece el efecto

7.10 Derivado 26 OAc 22 Oxocolestánico de hecogenina.

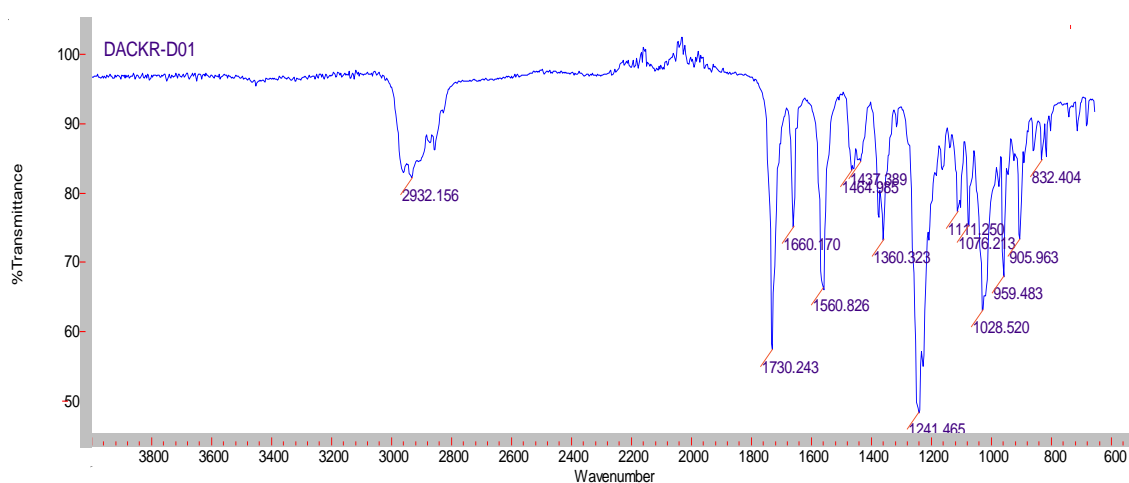


**Figura 101. Derivado 26 OAc 22 Oxocolestánico de hecogenina (111).**

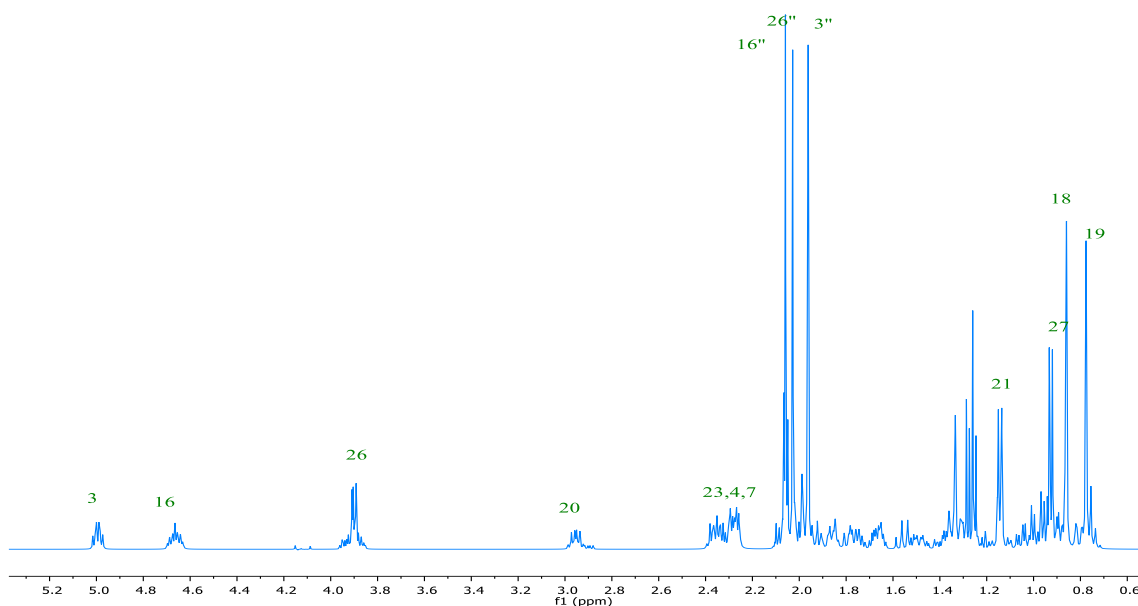
El compuesto (111) se caracterizó debidamente por técnicas físicas y espectroscópicas obteniéndose los siguientes datos.

**Tabla 20. Características de (111).**

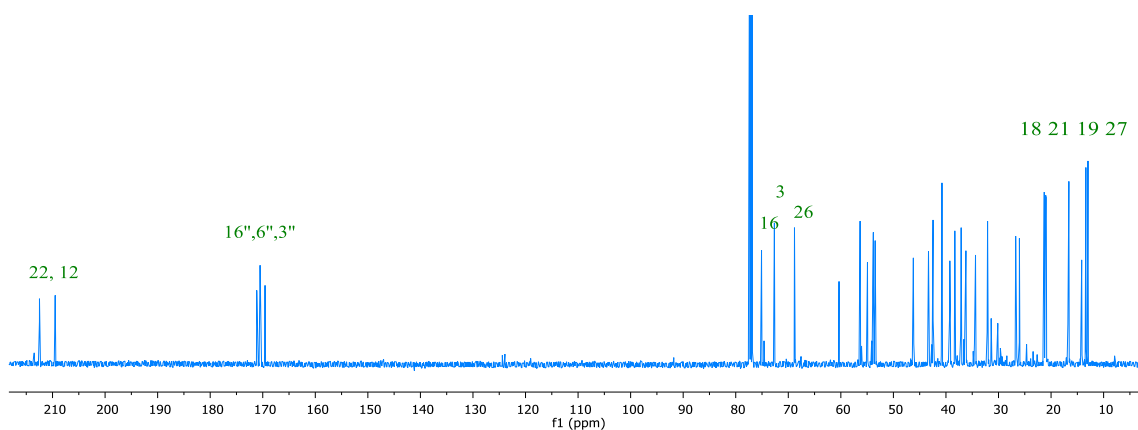
<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	145-147°C
$\alpha_D$	+78.2°
$[M+H^+]$	574.3509



**Figura 102. Espectro de IR del derivado 26 OAc 22 oxocolestánico de hecogenina (111).**

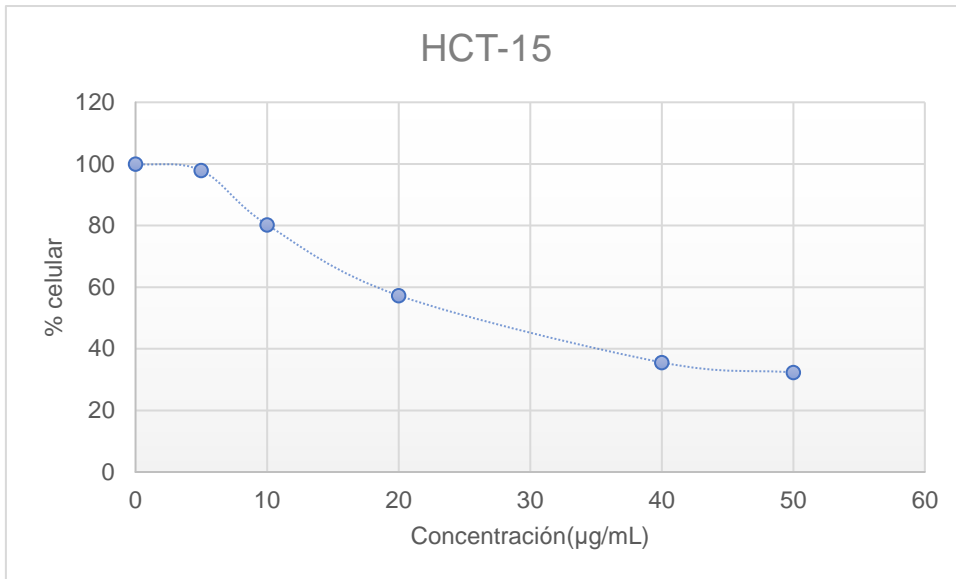


**Figura 103. Espectro de  $^1\text{H}$  del derivado 26 OAc 22 oxocolestánico de hecogenina (110).**

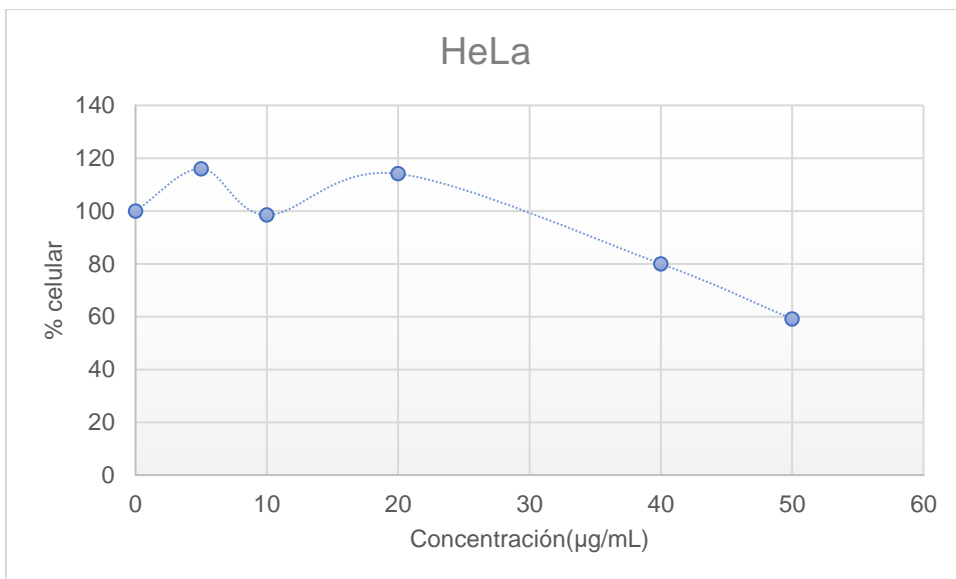


**Figura 104. Espectro de  $^{13}\text{C}$  del derivado 26 OAc 22 oxocolestánico de hecogenina (110).**

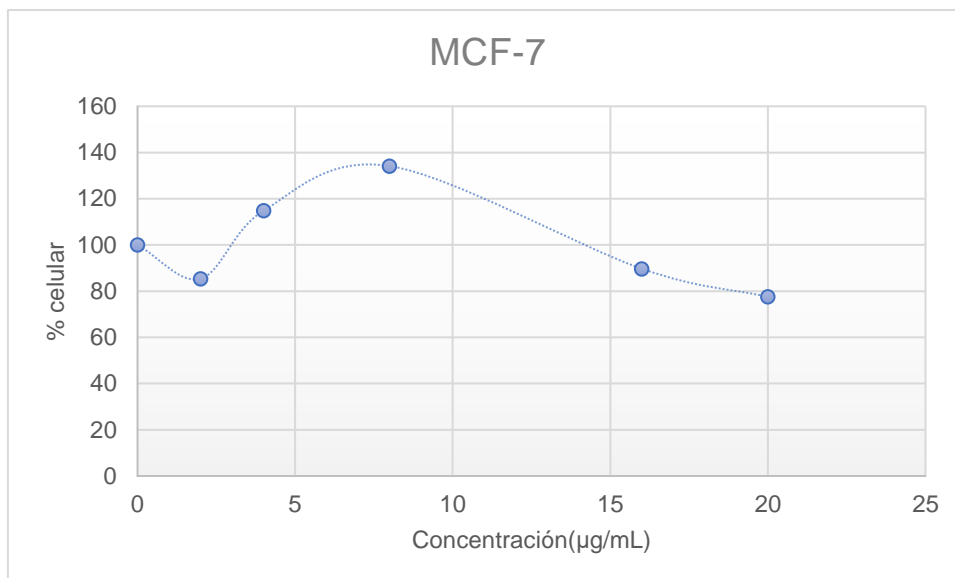
A dicho compuesto se le realizaron pruebas antiproliferativas en líneas de cáncer tanto hormona y no-hormona dependiente, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.



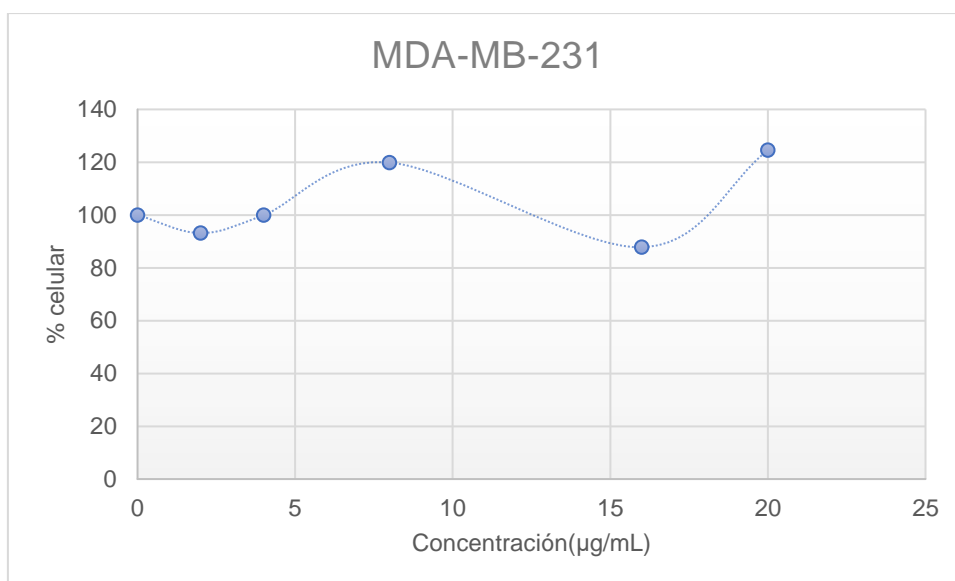
**Figura 105. Curva dosis-respuesta en HCT-15.**



**Figura 106. Curva dosis-respuesta en HeLa.**



**Figura 107. Curva dosis-respuesta en MCF-7.**



**Figura 108. Curva dosis-respuesta en MDA-MB-231.**

**Tabla 21. Valores de IC<sub>50</sub> de (111).**

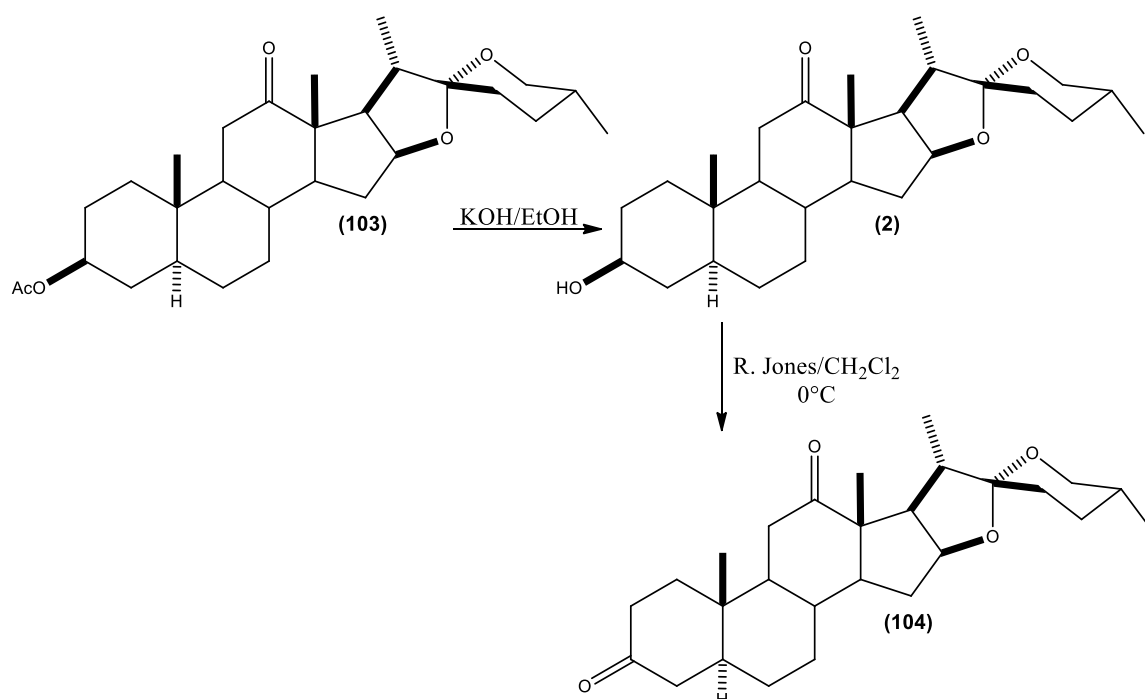
<b>Línea celular</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
HCT-15	10.68
HeLa	No activo
MCF-7	Proliferativo*
MDA-MB-231	No activo

\*A concentraciones altas decrece el efecto

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Modificación del anillo A de hecogenina

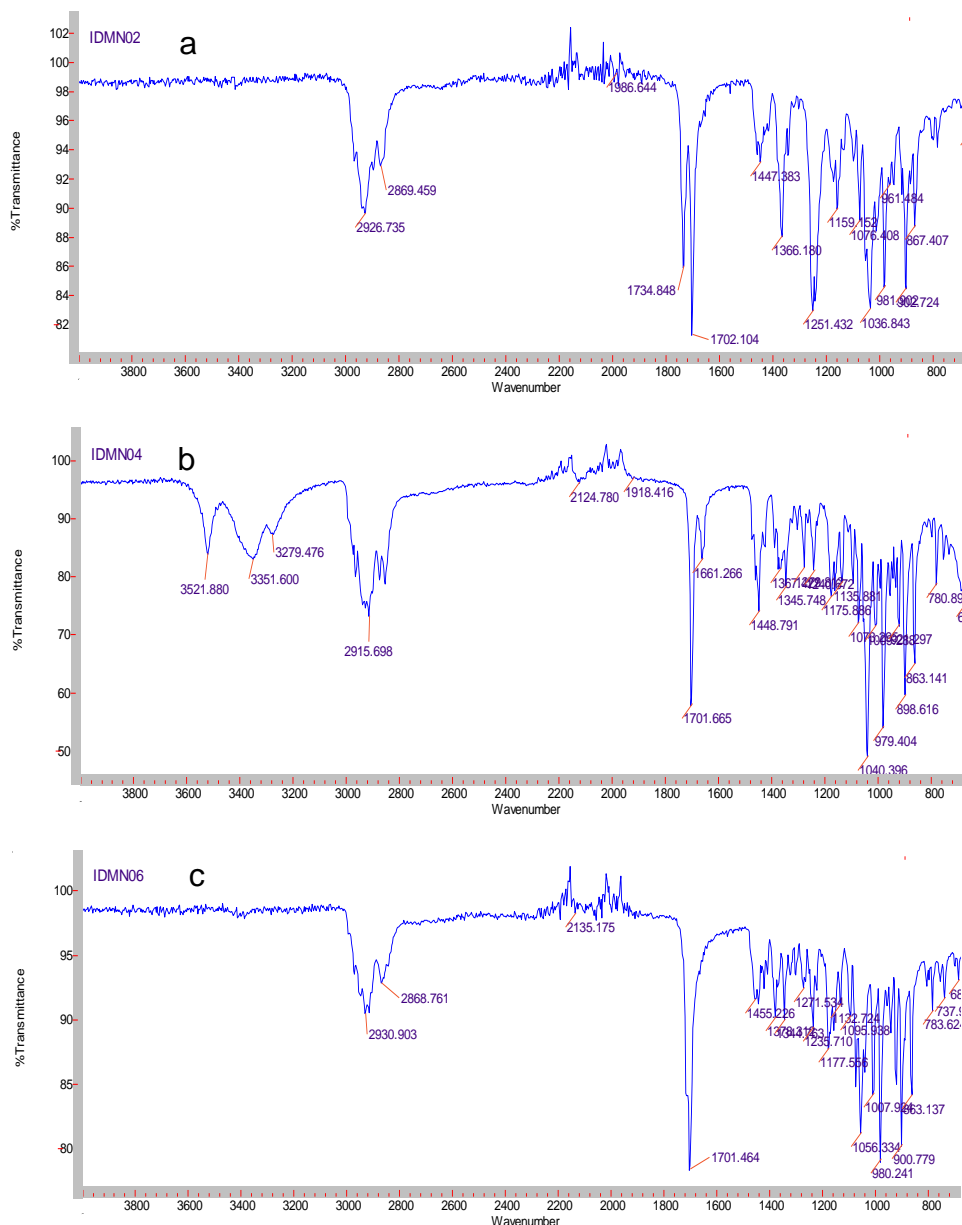
Se realizó la modificación en la posición 3 del anillo A de hecogenina (2), partiendo de acetato de hecogenina (103) cambiando el grupo acetato por una cetona o un hidroxilo, para ello se realizaron reacciones de oxidación e hidrólisis respectivamente, con rendimientos del 85 y 92%.



#### **Esquema 19. Modificaciones en C-3 de Acetato de Hecogenina.**

Para la identificación de los compuestos, se obtuvieron espectros de IR y RMN, en el caso del acetato de hecogenina (103) (figura 109-a), aparece una banda en 1734 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo carbonilo del acetato en posición 3 así como una banda alrededor de 1200 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo ester, al igual que una banda en 1702 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la cetona en posición 12, mientras tanto en la hecogenina (2) (figura 109-b) se observa una banda en la región 3521 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo hidroxilo en posición 3 y se mantiene la banda en 1701 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo cetónico en posición 12 pero desaparece la banda en 1734 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo acetato. En el caso del derivado cetónico (104) (figura 109-c) se observa una banda ancha en 1701

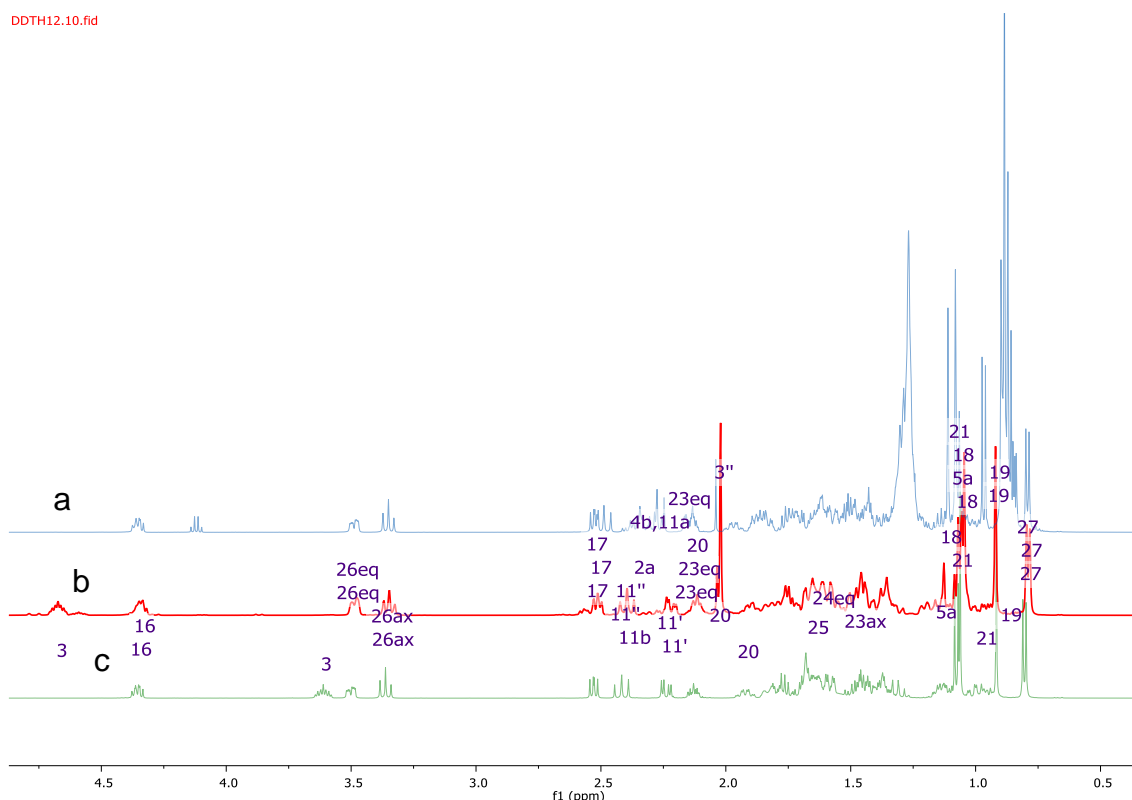
$\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos carbonilos en posición 3 y 12, así mismo desaparece la señal en  $3521 \text{ cm}^{-1}$  del grupo hidroxilo indicativo de la oxidación de este carbono, esto corrobora los cambios de grupo funcionales esperados al realizar las modificaciones selectivamente.



**Figura 109. Espectros de IR de a)103, b)2 y c)104.**

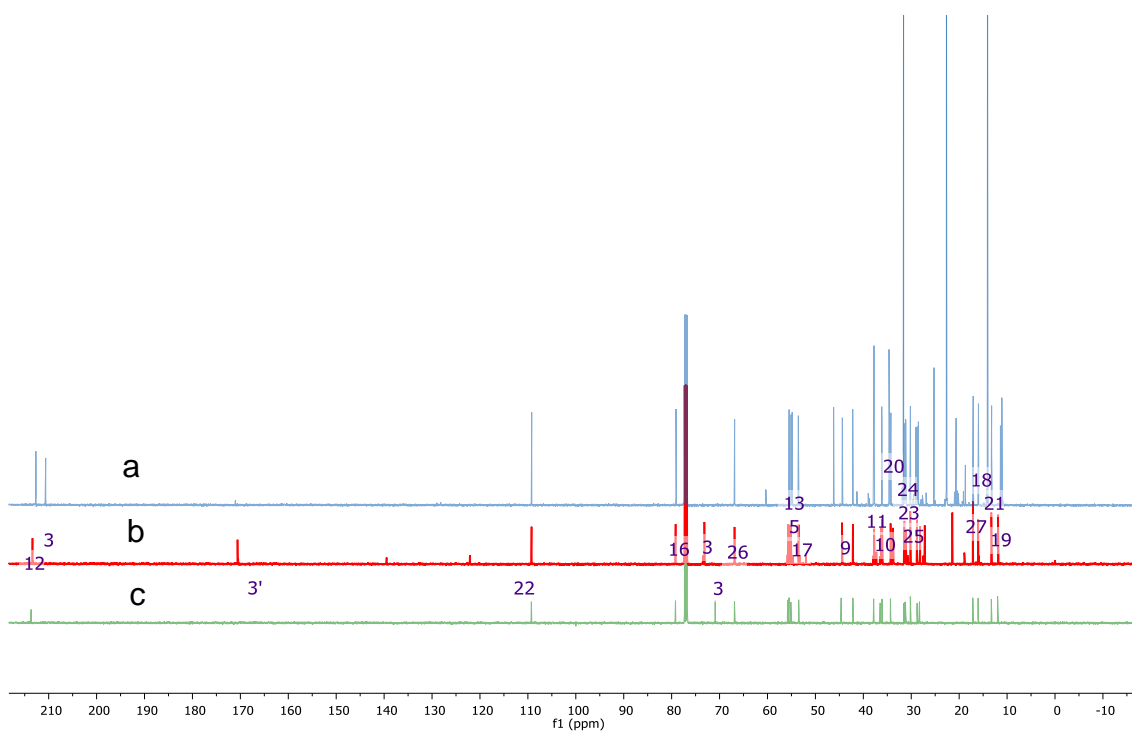
Por otro lado con la finalidad de confirmar la posición de las modificaciones realizadas se utilizaron espectros de RMN, en el caso del espectro de  $^1\text{H}$  a 500 MHz, para el compuesto **103** (figura 110-b), se observa una señal en 2.03 ppm que integra para 3H, correspondiente al metilo del acetato en C-3 así como otra señal en 4.67 que integra para 1H correspondiente al protón en C-3, mientras

que el compuesto (2) (figura 110-c) presenta una señal *ddd* en 3.7 ppm correspondiente al protón en C-3 base del grupo hidroxilo, a menor frecuencia que cuando se tiene la presencia de un acetato en la misma posición (figura 110-b), paralelamente se destaca que no se observa una señal en 2.1 ppm indicativo de que se ha hidrolizado el grupo acetato en C-3; por último en el caso del compuesto **104** (figura 110-a) ha desaparecido la señal correspondiente al protón en C-3 debido a la formación del grupo carbonilo, de igual forma en la región de 2.05-2.1 ppm aparecen 2 señales nuevas correspondientes a los protones H-2a y H-4a desplazados a mayor frecuencia debido a la formación del grupo carbonilo y cambio de hibridación en C-3; por otro lado cabe destacar que en los tres espectros se observan las señales correspondientes a los protones diastereotópicos H-26 demostrando que los anillo E y F no han sufrido modificaciones durante las reacciones realizadas, al igual que las señales asignadas a H-17, H-23a y los metilos 18, 19, 21, y 27.



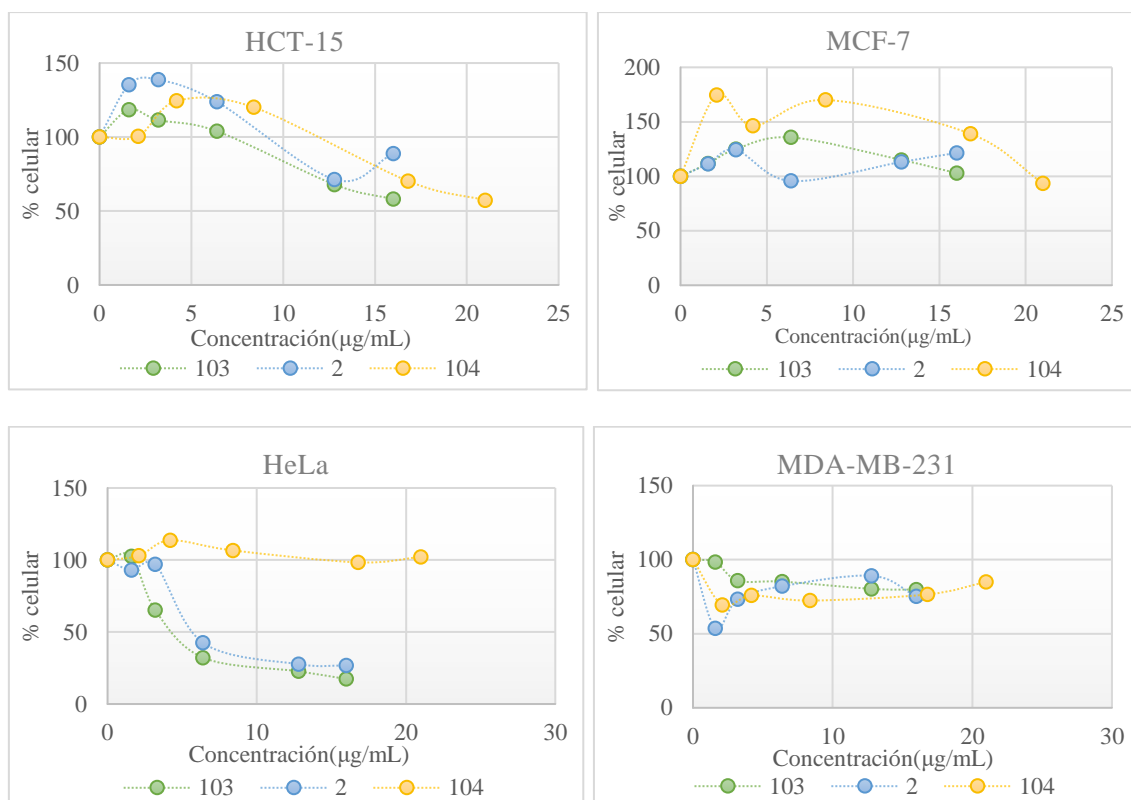
**Figura 110. Espectro de  $^1\text{H}$  de a) 104, b) 103 y c) 2.**

En el caso del espectro de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz de **103** (figura 111-b) se muestran 3 señales características, la primera en de 212 ppm correspondiente a la cetona en posición 12, otra alrededor de 171.8 ppm correspondiente al carbonilo del grupo acetato y por ultimo una en 72.5 ppm correspondiente al C-3 sustituido por un grupo ester, en cambio en el espectro de **2** (figura 111-c) la señal en 170 ppm desaparece y la señal antes en 72.5 ppm de C-3 se desplaza a menor frecuencia (70 ppm) debido a la hidrolisis del acetato mientras que se mantienen la señal correspondientes a la cetona en posición 12 (215 ppm); por último para el compuesto **104** (figura 111-a) aparecen 1 señal nueva en 208 ppm correspondientes a la formación del nuevo grupo carbonilo en C-3 manteniéndose la señal en 212 ppm de C-12, de igual forma desaparece la señal en 70 ppm correspondiente a C-3 debido a la oxidación ocurrida; cabe destacar que las otras señales características de estas sapogeninas se mantiene sin cambios significativos, como en el caso de C-22 en 110 ppm en los tres derivados se mantiene constante, confirmando la estabilidad del espiroacetal en estas reacciones, de igual forma la señal de C-26 (68 ppm) y las señales de los grupos metilos se mantienen en los tres espectros confirmando la estructura de los tres derivados de análisis.



**Figura 111. Espectro de  $^{13}\text{C}$  del 104, 103, 2.**

Una vez caracterizados espectroscópicamente y confirmado su peso molecular por espectrometría de masas, así como la pureza de las muestras de análisis se procedió a realizar los ensayos con líneas celulares de cáncer tanto hormona como no-hormona dependiente se observaron resultados interesantes mostrados en la figura 112.



**Figura 112. Resultados por línea celular de los compuestos 103, 2 y 104.**

El compuesto (103) muestra una actividad citotóxica a bajas concentraciones en la línea celular HeLa, mientras que en HCT-15 se desarrolla un efecto antiproliferativo, pero a altas concentraciones lo cual no es recomendable para el desarrollo de un nuevo fármaco, en las demás líneas no mostro efecto alguno, por lo cual se puede decir que responde tanto a líneas de tipo hormona y no-hormona dependiente, teniendo una preferencia de acción por los del primer tipo, tal es el caso del cáncer cervicouterino.

El compuesto 2 presenta un efecto citotóxico en la línea celular HeLa, en HCT-15 se comienza a observar un efecto antiproliferativo a altas concentraciones mientras que en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 no se observa efecto, esto debido a que esta línea es triple negativo lo que limita los mecanismos de acción de fármacos esteroideos.

Por último, el compuesto **104**, muestra un efecto antiproliferativo a altas concentraciones en las líneas HCT-15, no siendo recomendable el estudio a concentraciones más altas a las estudiadas, pero por el contrario en MCF-7 se observa un efecto proliferante, siendo ambas líneas de tipo hormona dependiente pero de ambiente diferente al ser el primero cáncer cervicouterino y el segundo mama, se podría pensar que la molécula tiene distintos sitios de acoplamiento en los receptores, desencadenando una respuesta opuesta, así mismo cabe destacar que aun siendo tipos de cáncer hormona dependiente no tendrán los mismos receptores debido al tipo de tejido en donde se desarrollan, por lo cual sería pertinente ampliar las pruebas en otras líneas de tipo hormona dependiente para observar si se repite este tipo de patrón en el caso de las líneas no hormona dependientes y por otro lado en las demás líneas celulares no mostro efecto alguno, respondiendo a un tipo de ruta de tipo no-hormona dependiente.

A continuación, se presentan los IC<sub>50</sub> de cada compuesto por línea celular:

**Tabla 22. Valore de IC<sub>50</sub> de los compuestos 103, 2 y 104.**

<b>Línea/Compuesto</b>	<b>103</b>	<b>2</b>	<b>104</b>
<i>HCT-15</i>	>15.8 µg/mL	>20 µg/mL	>20 µg/mL
<i>HeLa</i>	4.66 µg/mL	5.95 µg/mL	No activo
<i>MCF-7</i>	No activo	No activo	Proliferativo
<i>MDA-MB-231</i>	No activo	No activo	No activo

Al analizar el efecto de las modificaciones en el anillo A de la hecogenina, se observa que la presencia del grupo acetato en posición 3 del compuesto (103) ayuda a potenciar el efecto antiproliferativo en comparación al mostrado por el compuesto **2**, ambos responden a líneas celulares de tipo hormona y no-hormona dependiente, pero muestran una tendencia a las del primer tipo dado las bajas concentraciones que necesitan para presentar un efecto antiproliferativo, por el contrario la presencia de un grupo cetónico en posición 3 del compuesto **104** lo hizo específico a la línea celular HCT-15, pero a altas concentraciones. Por lo que preliminarmente se podría analizar que la presencia de grupos acetilos aumenta la actividad antiproliferativa mientras que la oxidación de C-3 lo disminuye por lo que sería necesario realizar otras modificaciones estructurales para confirmar dicho efecto

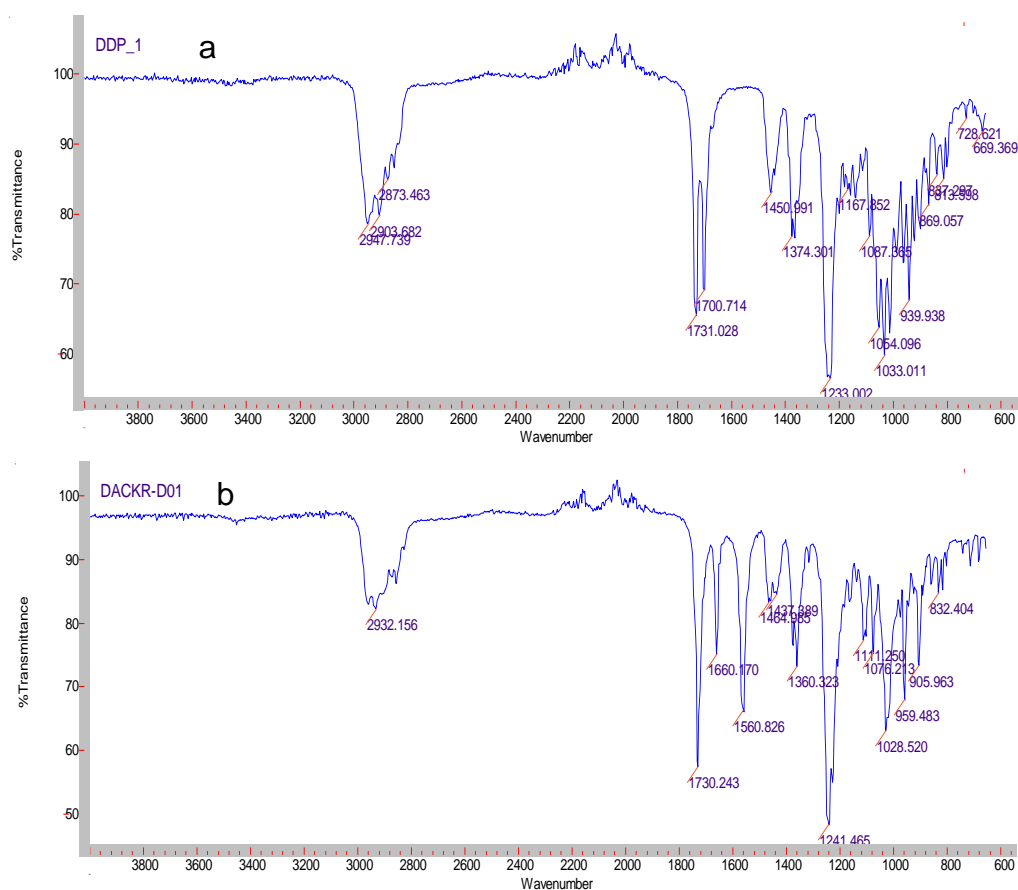
## 8.2 Obtención de 23 Acetil-hecogenina.

Debido a los valores de  $IC_{50}$  y la tendencia de los mismos presentados por los compuestos previamente analizados, se optó por la inserción de un grupo acetilo en la posición 23 para observar si existía un cambio significativo en la actividad biológica presentada por la molécula, para lo cual partiendo del compuesto **104** se realizó una reacción de acetólisis para la apertura del anillo F y la obtención del derivado epoxicolesténico y furosténico C-33 de hecogenina, **105** y **106** respectivamente (esquema 20).



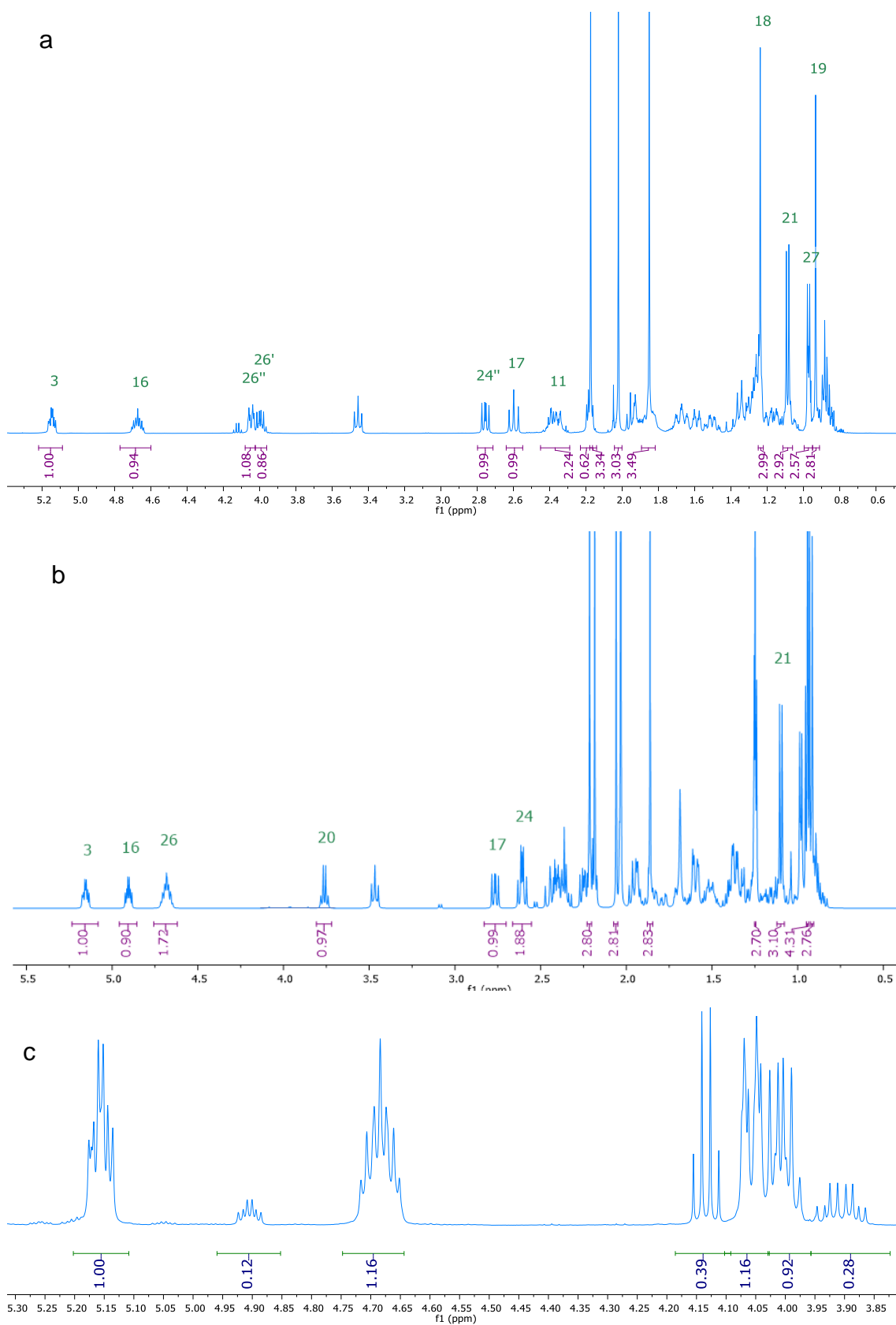
**Esquema 20. Ruta para la obtención de los derivados epoxicolesténico y furosténico C-33 de hecogenina**

Para la identificación de los nuevos compuestos se obtuvieron los espectros de IR y RMN ( $^1H$  y  $^{13}C$ ), en los espectros de IR podemos observar en el caso del compuesto **105** (figura 113-a) bandas alrededor de  $1730\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos carbonilos de los acetatos y de los grupos cetónicos alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , por otro lado, para el compuesto **106** (figura 113-b), se observa una banda característica en  $1730\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a el grupo acetato y los grupos cetónicos presentes en la molécula.



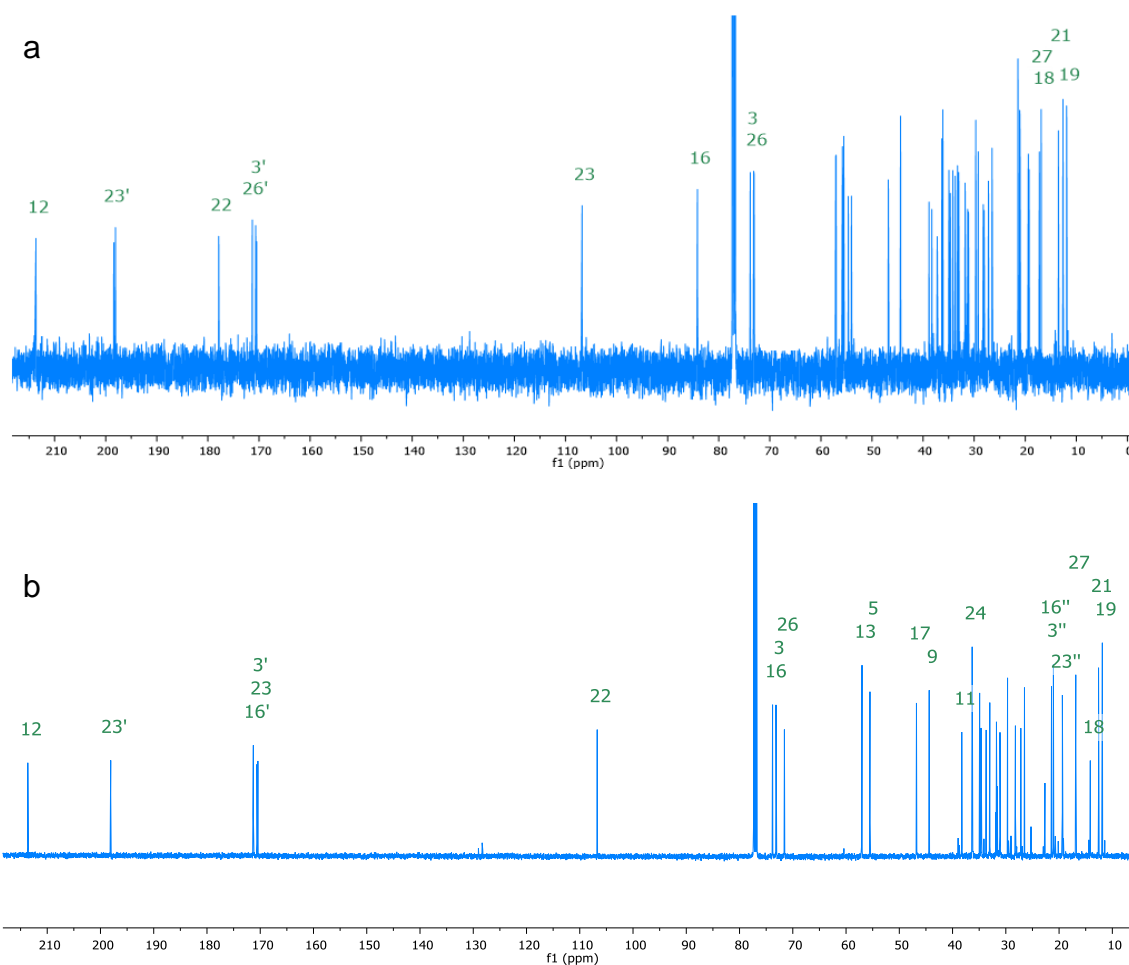
**Figura 113. Espectro de IR de los compuestos 105, 106.**

En el espectro de  $^1\text{H}$  para el compuesto **105** (figura 114-a) se observan 2 señales que integran para 3H alrededor de 2.17 y 2.12 ppm correspondientes a los grupo acetato de la posición 3 y 16 respectivamente, por otro lado, en el caso de **106** (figura 114-b) se presentan nuevamente dos señales alrededor de 2.06 y 2.21 correspondientes a los grupos acetato en posición 3 y 26 respectivamente, así como en el caso del espectro de **106** podemos observar que la señal correspondiente a H-16 se mantiene en 4.7 ppm indicando que se mantiene el ciclo furosténico mientras que en el caso de **105** esta señal se desplaza a mayor frecuencia debido a la formación del acetato en C-16, de igual forma la señal de los H-26 en el caso de **105** se mantiene el efecto debido a estos protones diastereotópicos en cambio en **106** al tener libre giro se vuelve una sola señal a mayor frecuencia debido al ester formado en dicho carbono; por otro lado en la figura 114-c podemos observar el espectro de la mezcla de reacción indicándonos una relación 8:2 (**105/106**) obtenido directo de la reacción de acetólisis.



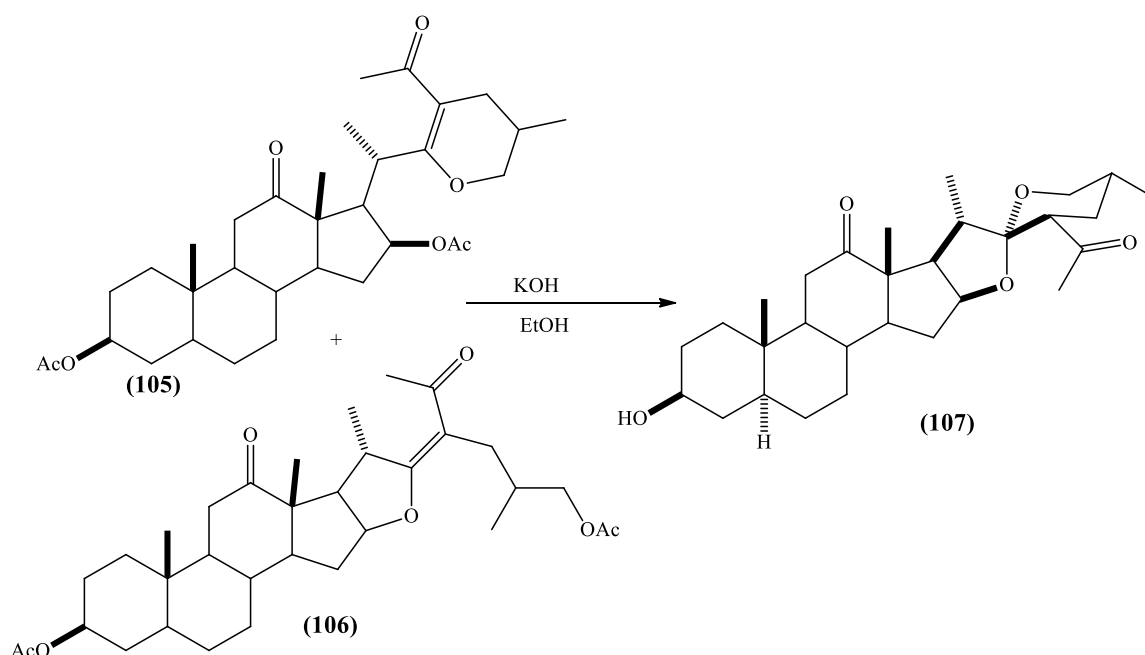
**Figura 114. Espectro de  $^1\text{H}$  a 500 MHz de los compuestos a)105 b)106 y c) mezcla de reacción.**

Por otro lado en el espectro de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **105**, se presentan las señales características de los acetatos en posición 3 y 16 alrededor de 170.61 y 171.29 ppm, así mismo en 213.64 y 198.08 ppm se muestran las señales de los grupos cetónicos en posición 12 y 23', así como específicamente una señal en 178.5 ppm correspondiente al C-22 de tipo enólico formado en el derivado epoxicolestánico, para el compuesto **106** se mantiene la señal en 213.65 del grupo cetónico en posición 12 y en 210 ppm de la cetona en 23', y en 170.63 y 171.30 ppm correspondientes a los acetatos en 3' y 26' y C-22 observa alrededor de 178.5 ppm debido a la estructura del compuesto, otra característica particular se presenta en el caso de C-16, en el derivado 106 la señal se observa en 82.5 ppm después de la señal de disolvente y en cambio en el caso del derivado 105 se observa en 72.5 ppm antes de la señal del disolvente efecto típicamente mostrado al abrir el anillo furosténico E de las sapogeninas esteoridales.



**Figura 115. Espectro  $^{13}\text{C}$  a 500 MHz de a) 105 y b) 106.**

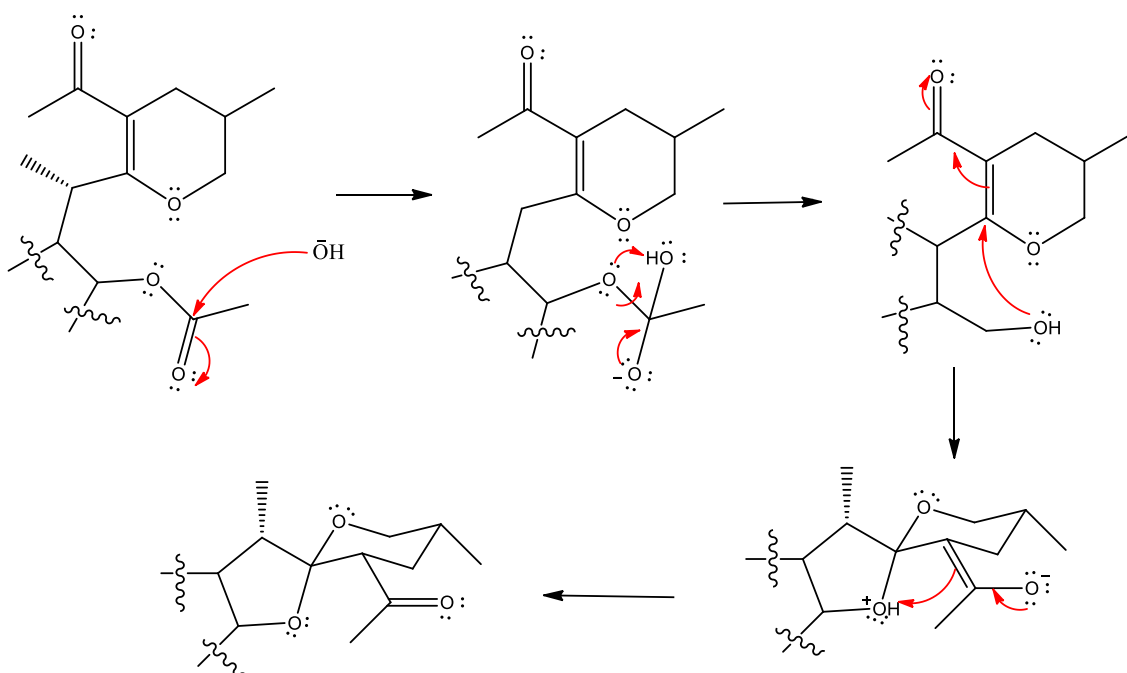
A partir de los derivados **105** y **106** mediante hidrolisis básica se procedió a la formación del **107**, de estructura similar a la hecogenina solo con un acetilo en C-23 como se observa en el esquema 21.



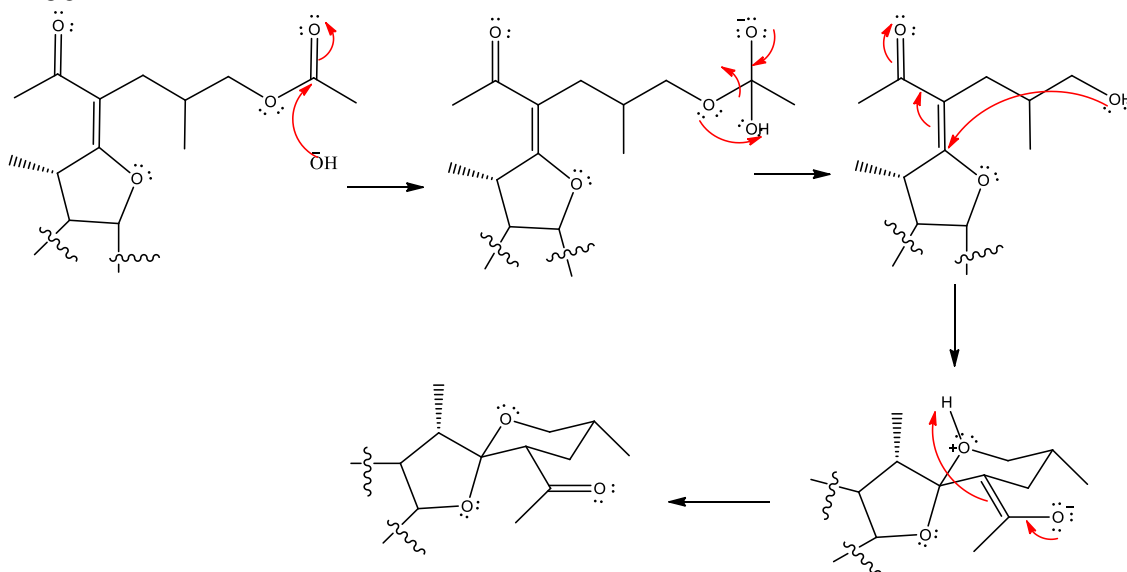
### **Esquema 21. Obtención del compuesto 107.**

Cabe destacar que ambos compuestos **105** y **106** dan lugar al mismo producto como se observa en el mecanismo de la figura 116, esto debido a que en ambos casos al realizar la regeneración del espiroacetal en C-22 da lugar al mismo derivado sustituido en C-23 por el grupo acetilo, conservando la estereoquímica en cada uno de los carbonos debido a la orientación espacial de las moléculas, de igual forma se hidroliza el grupo acetato en C-3, para comprobar lo anterior de manera independiente se realizó la hidrolisis de ambos derivados así como de la mezcla de reacción obtenida en la acetólisis del acetato de hecogenina **104** dando en todos los casos como producto mayoritario el derivado **107**, mismo que se caracterizó por IR y RMN (figura 117) mostrando, aparece una banda en 3521 correspondiente al OH en posición 3 y se mantiene la señal en 1702 del grupo cetónico en posición 12. Por último, para **107** se mantiene la señal de la cetona en posición 12 en 213.34 ppm y del acetilo en posición 23 en 210.00 ppm, en 70.87 ppm del carbono C-3 base del hidroxilo

105



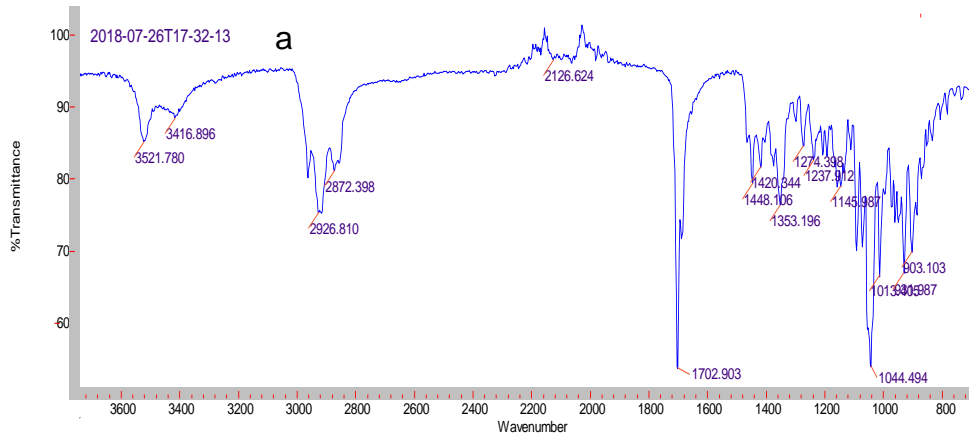
106



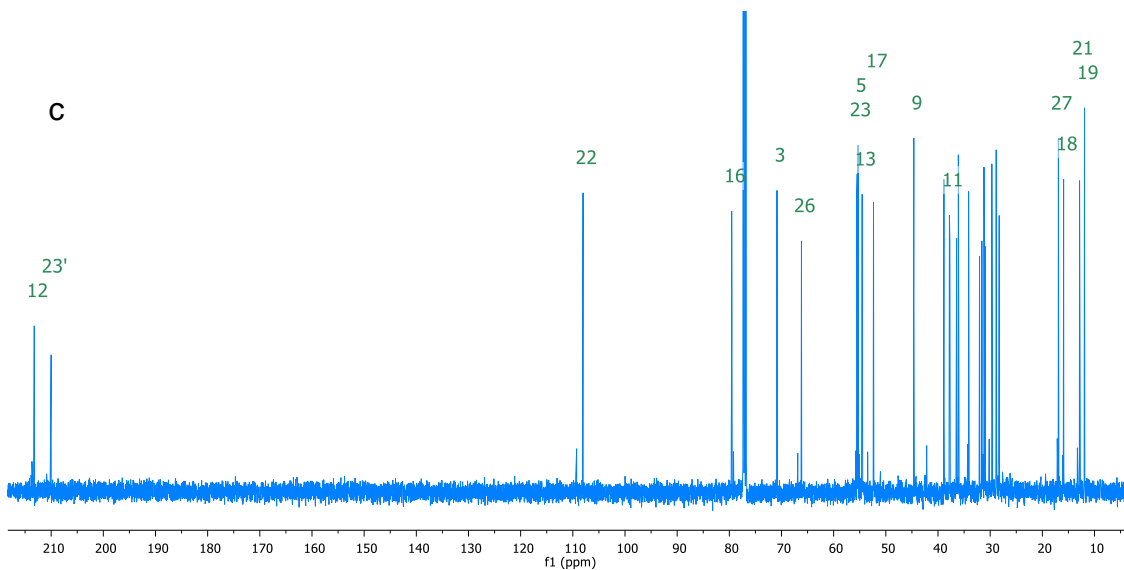
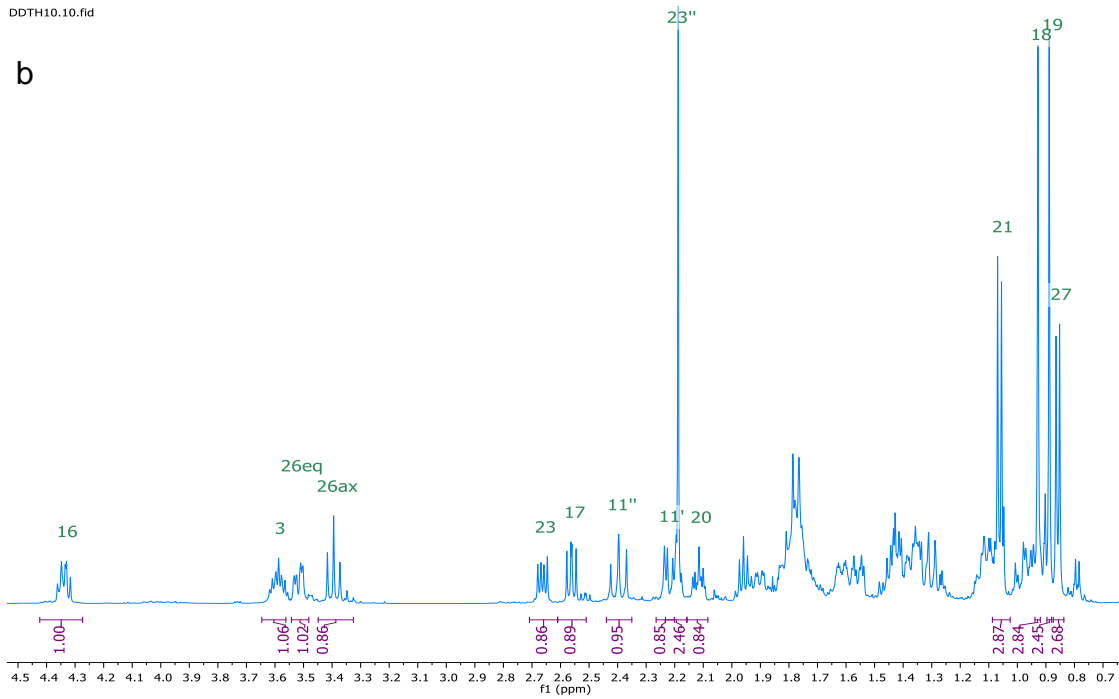
**Figura 116. Mecanismo de obtención de 107 a partir de 105 y 106.**

Para el compuesto **107** (figura 113-c), aparece una banda en  $3521\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al OH en posición 3 y se mantiene la señal en  $1702\text{ cm}^{-1}$  del grupo cetónico en posición 12. Mientras tanto en el espectro de  $^1\text{H}$  alrededor de 2.19 ppm se encuentra una señal que integra para 3H característica del  $\text{CH}_3\text{CO}-23''$ . En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se mantiene la señal de la cetona en posición 12 en

213.34 ppm y del acetilo en posición 23 en 210.00 ppm, en 70.87 ppm se muestra la señal del OH-3.



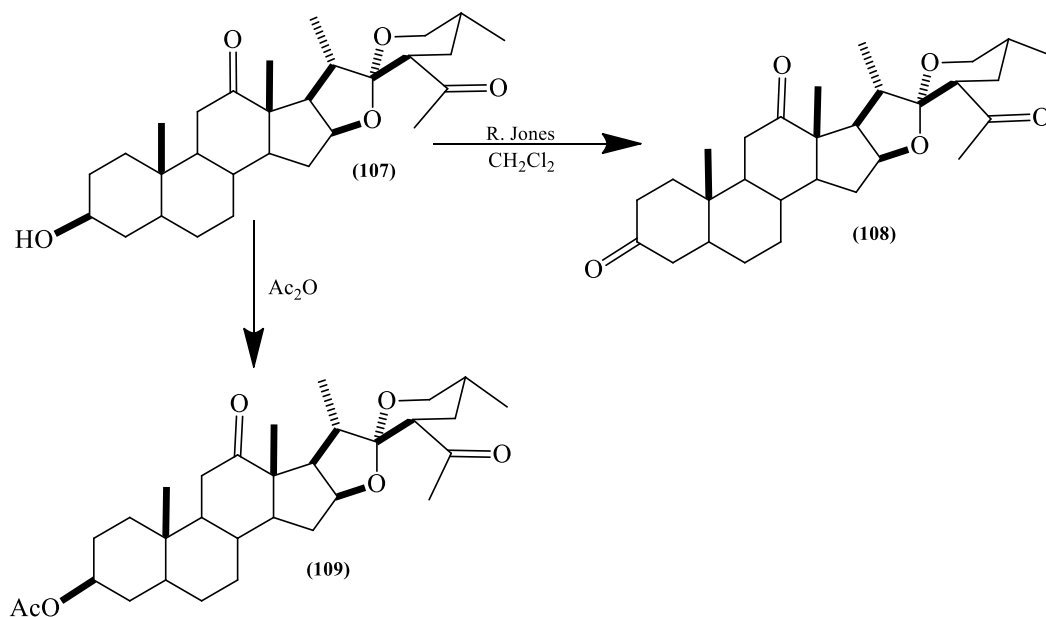
DDTH10.10.fid



**Figura 117. Espectro a) IR, b)  $^1\text{H}$  a 500 MHz y c)  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz de 107.**

### 8.3 Modificación del anillo A de 23 acetil-hecogenina.

A raíz de los efectos mostrados por la anterior ruta se optó por adicionar un grupo acetilo en posición 23 y hacer modificaciones en la posición 3 del anillo A, con rendimientos de entre el 83 y 90%.



**Esquema 22. Obtención de los compuestos 108 y 109.**

A partir del compuesto (107) se llevó a cabo una oxidación selectiva del hidroxilo en posición 3 para la obtención del derivado cetónico (108), y por último para la obtención del acetato en posición 3, se partió del compuesto (107) y se realizó una reacción de acetilación para la obtención del compuesto (109).

Para la correcta caracterización de los compuestos se obtuvieron espectros de IR y RMN descritos a continuación:

El compuesto (108) (figura 118-b) se observa una banda en  $1702\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos cetónicos de las posiciones 3 y 12, desapareciendo la banda en  $3521\text{ cm}^{-1}$  del compuesto (107-a), lo cual nos demuestra que la oxidación del OH en posición 3 se realizó de manera dirigida, el compuesto (109) (figura 118-c) muestra dos bandas una en  $1733\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al acetato en posición 3, observándose que la acetilación de

hidroxilo en posición 3 se llevó a cabo exitosamente y mantiene la señal del grupo cetónico en posición 12

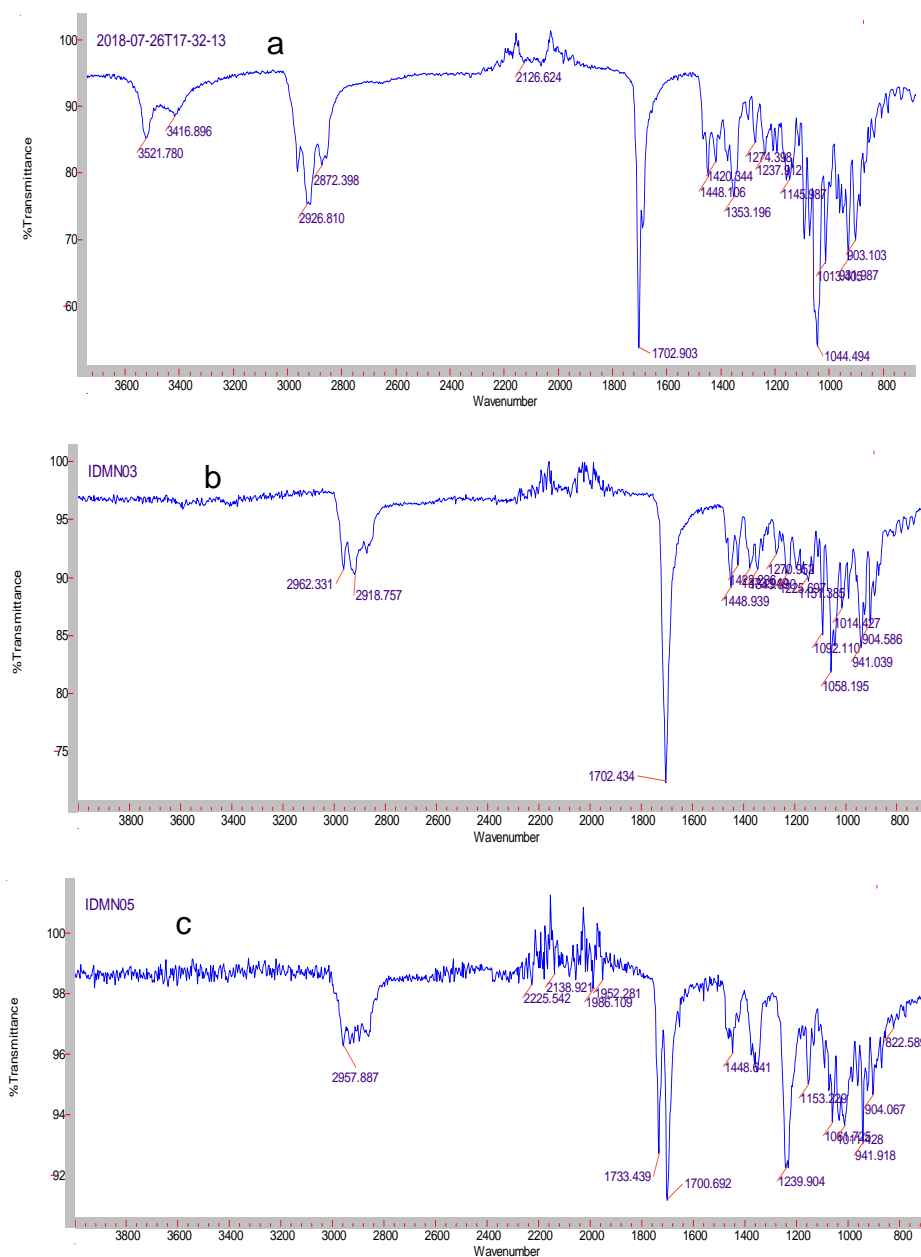
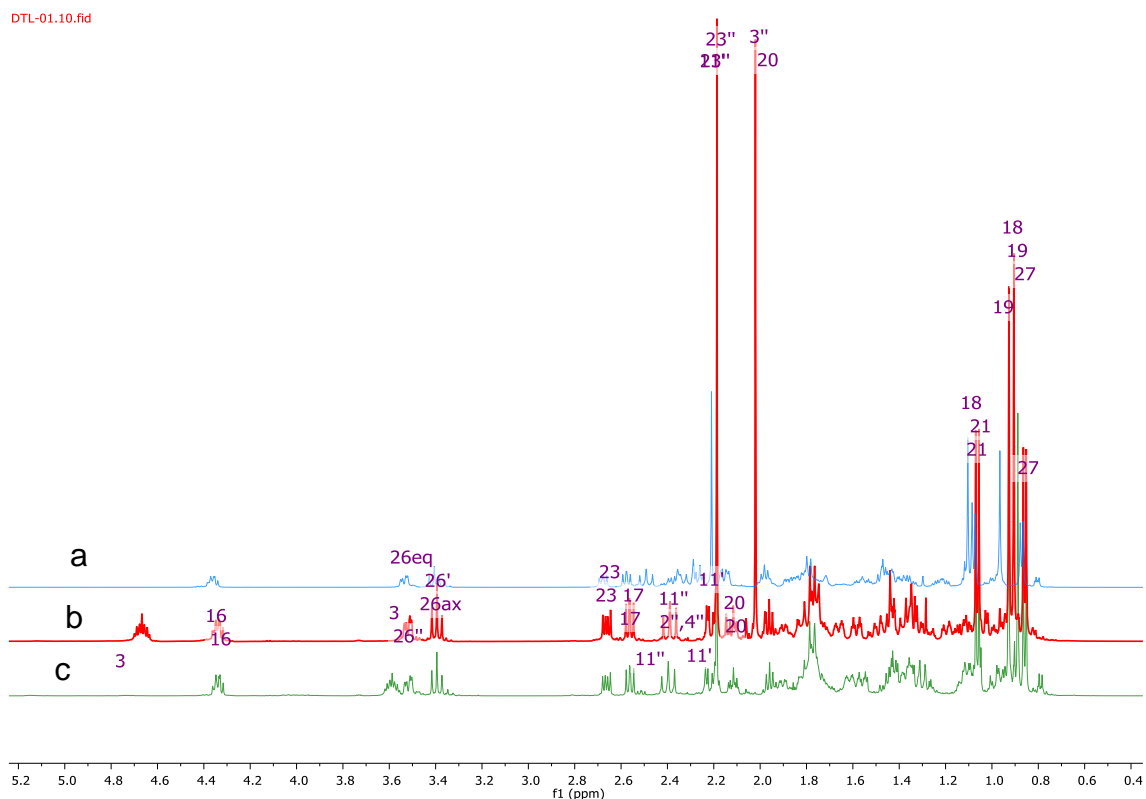


Figura 118. Espectro de IR de los compuestos a) 107, b) 108 y c) 109.

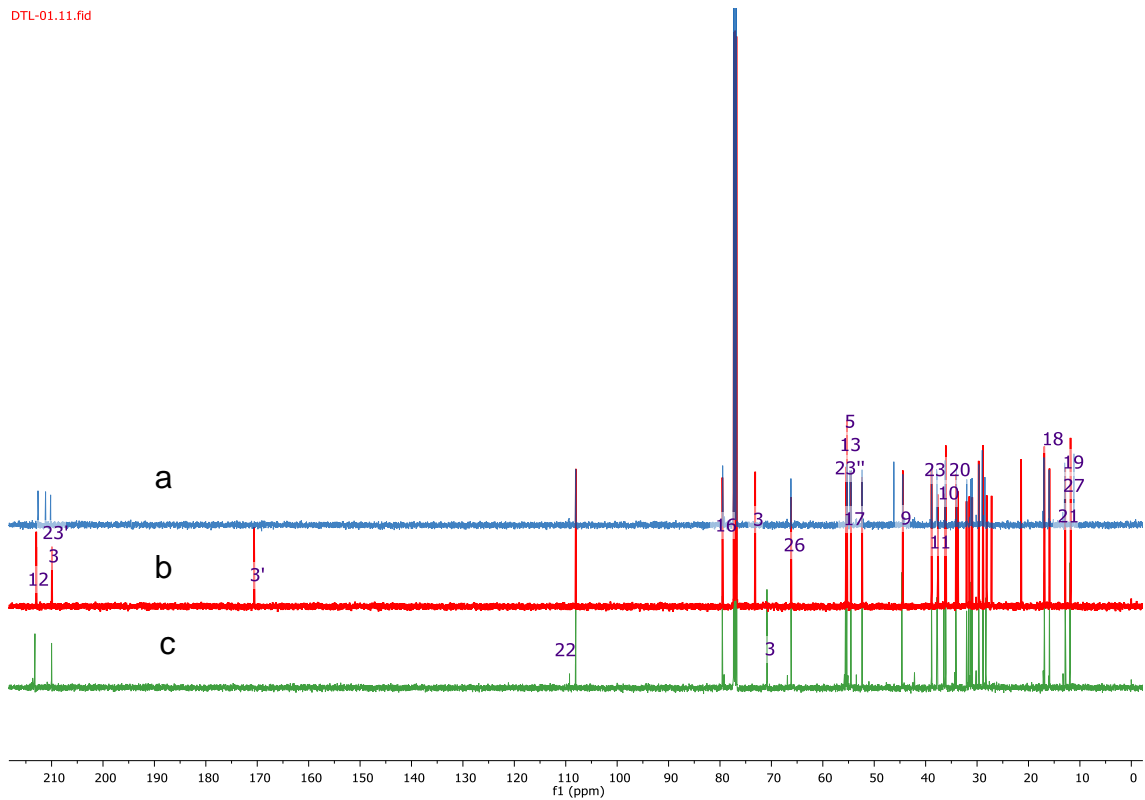
En el espectro de  $^1\text{H}$  para el compuesto **108** (figura 119-a), se observa una señal *ddd* alrededor de 2.16 ppm que integra para 3H correspondiente a  $\text{CH}_3\text{CO}-23''$ , desapareciendo la señal en 3 debido a la presencia del grupo cetónico en esta posición, para el caso de **109** (figura 119-b) se observa una señal alrededor de 4.67 que integra para 1H de H-3 con un desplazamiento mayor al mostrado por el H del H-3 del compuesto **107** debido a la presencia del hidroxilo en C-3, así

mismo **109**, alrededor de 2.02 ppm integra para 3H presentando el grupo acetato del C-3. Las señales características de los metilos en posiciones 27, 21, 19 y 18 se mantienen en los 3 compuestos en ppm similares o iguales.



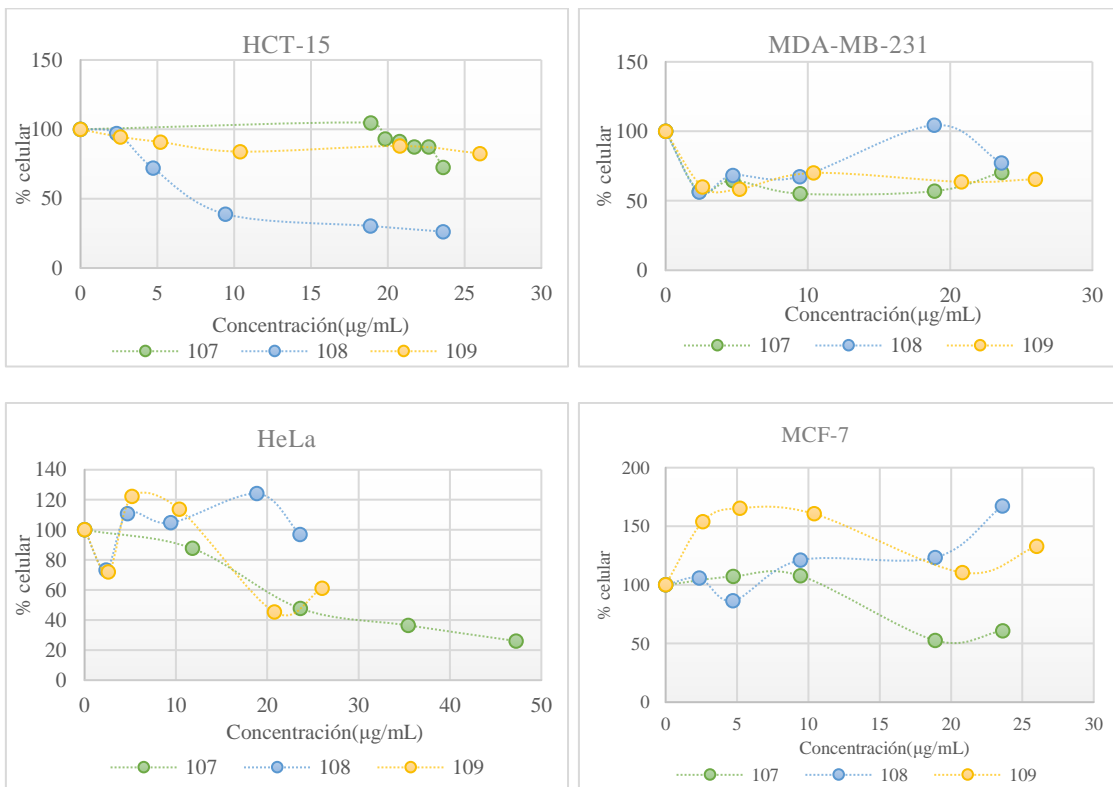
**Figura 119. Espectro de  $^1\text{H}$  de a) 108, b) 109, c) 107.**

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  el compuesto (108) (figura 120-a) muestra una señal adicional alrededor de 210 ppm debido a la formación de la cetona C-3. En el compuesto (109) (figura 120-b), se observan 2 señales alrededor de 210 ppm correspondientes a la cetona en posición 12 y el acetilo en posición 23, alrededor de 170 ppm se muestra la señal del  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{-3}$ , los 3 compuestos mantienen alrededor de 110 ppm la señal del espiroacetal.



**Figura 120. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de a) 108, b) 109, c) 107.**

Los resultados biológicos de los compuestos 107, 108 y 109 se muestran a continuación:



**Figura 121. Resultados por línea celular de los compuestos 107, 108 y 109.**

En las pruebas de actividad antiproliferativa, el compuesto **107** mostro un efecto antiproliferativo en las líneas celulares HeLa y MCF-7 a altas concentraciones, mientras tanto en MDA-MB-231 tuvo un efecto antiproliferativo a bajas concentraciones y al aumentarla no mostro efecto alguno, demostrando una actividad específica a determinada concentración, mientras tanto en HCT-15 no se observó efecto alguno, por lo cual el compuesto sigue una ruta de tipo hormona dependiente y no-hormona dependiente, teniendo preferencia por la de segundo tipo al tener un mejor efecto a menores dosis.

El compuesto **108** no fue activo en HeLa, por otro lado en HCT-15 a bajas concentraciones se presenta un efecto de antiproliferante, mientras que en la línea MDA-MB-231 de igual manera se observa un efecto citotóxico a concentraciones bajas, pero al ir aumentándola se genera un efecto proliferativo, por lo cual se debería ampliar el estudio a bajas concentraciones de este compuesto, para determinar la concentración exacta en la cual tiene un mayor efecto antiproliferante, mientras tanto en la línea MCF-7 muestra un efecto proliferante en razón al aumento de concentración.

En el compuesto **109** no se observó efecto en HCT-15, mientras que en se mostró un efecto citotóxico a altas concentraciones, mientras que en MDA-MB-231 presenta un efecto antiproliferante a bajas dosis, pero al ir aumentándola no se observa efecto alguno, por último en MCF-7 se muestra un efecto proliferante.

A continuación, se muestran los IC<sub>50</sub> de los compuestos:

**Tabla 23. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos 107, 108 y 109.**

<b>Línea/Compuesto</b>	<b>107</b>	<b>108</b>	<b>109</b>
<i>HCT-15</i>	No activo	7.85 µg/mL	No activo
<i>HeLa</i>	22.93 µg/mL	No activo	20.07 µg/mL
<i>MCF-7</i>	23.10* µg/mL	Proliferante	Proliferante
<i>MDA-MB231</i>	2.5* µg/mL	2.5** µg/mL	2.5* µg/mL

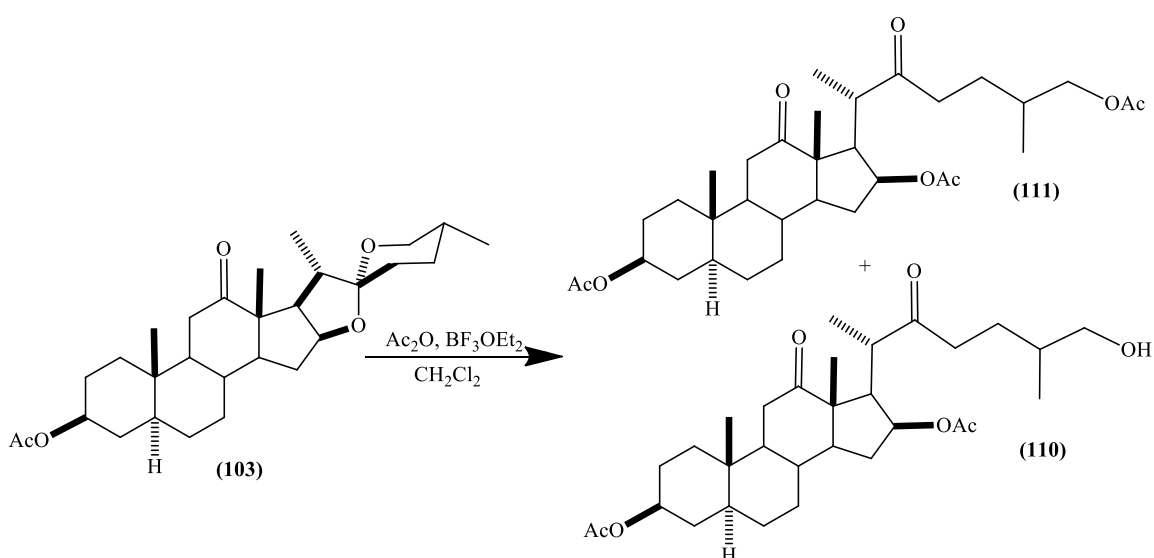
\*Determinado para IC<sub>40</sub> sin efecto a mayores concentraciones

\*\* Determinado para IC<sub>40</sub> con efecto proliferante a mayores concentraciones

En este caso se muestra que la presencia del grupo acetilo tiene repercusión en el efecto que desencadenara la molécula, en el caso del derivado cetónico **108**, se mostró una activación de la molécula y un comportamiento tanto hormona y no-hormona dependiente, sugiriendo que la adición de dicho grupo en posición 23 puede activar a un compuesto que antes no tenía efecto notorio. Por otro lado, el compuesto **107**, el cual tiene un hidroxilo en la posición 3, presenta una actividad tanto hormona y no-hormona dependiente. Mientras tanto en el compuesto **109** se observa efecto citotóxico en las líneas HeLa, y MDA-MB-231, la presencia del acetilo en posición 23 disminuye el efecto citotóxico contra la línea de cáncer cervicouterino y presenta un IC<sub>40</sub> a bajas concentraciones en la línea MDA-MB-231, por lo cual de nuevo se muestran mejores resultados en la molécula con la presencia del acetato en posición 3.

#### 8.4 Apertura del anillo F

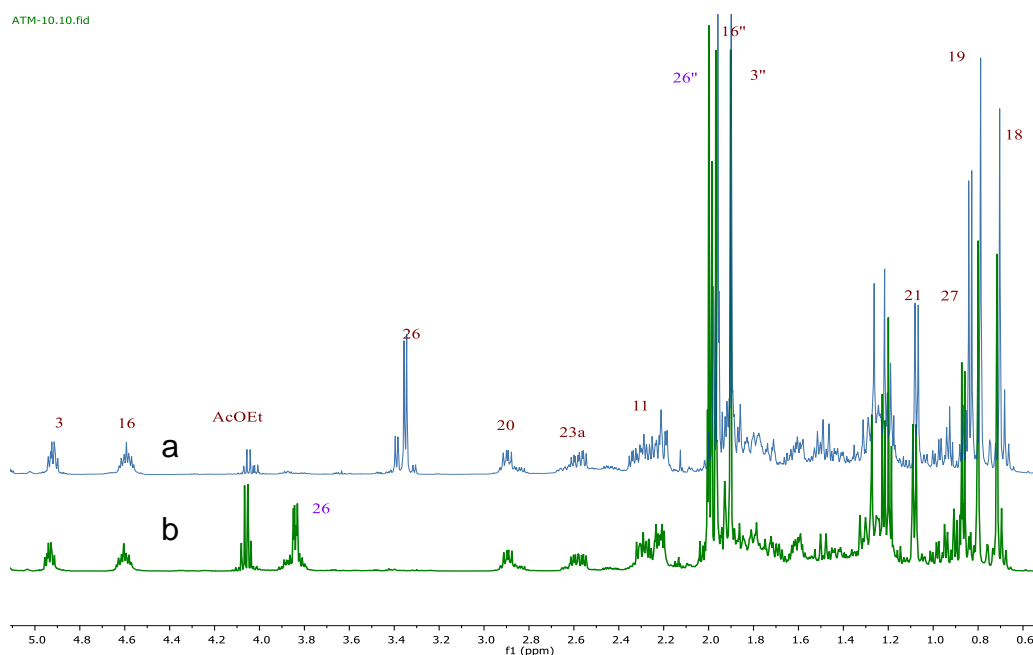
Finalmente, con el objetivo de seguir comparando el efecto que tiene la modificación en los diferentes anillos del esteroide se optó por la apertura del anillo F, partiendo del compuesto **103** para la obtención de 2 compuestos de interés los cuales solo cambia su grupo funcional en la posición 26, presentando un acetato **111** o un hidroxilo **110** con rendimientos de entre el 55 y el 36%.



**Esquema 22. Obtención de los compuestos 111 y 110.**

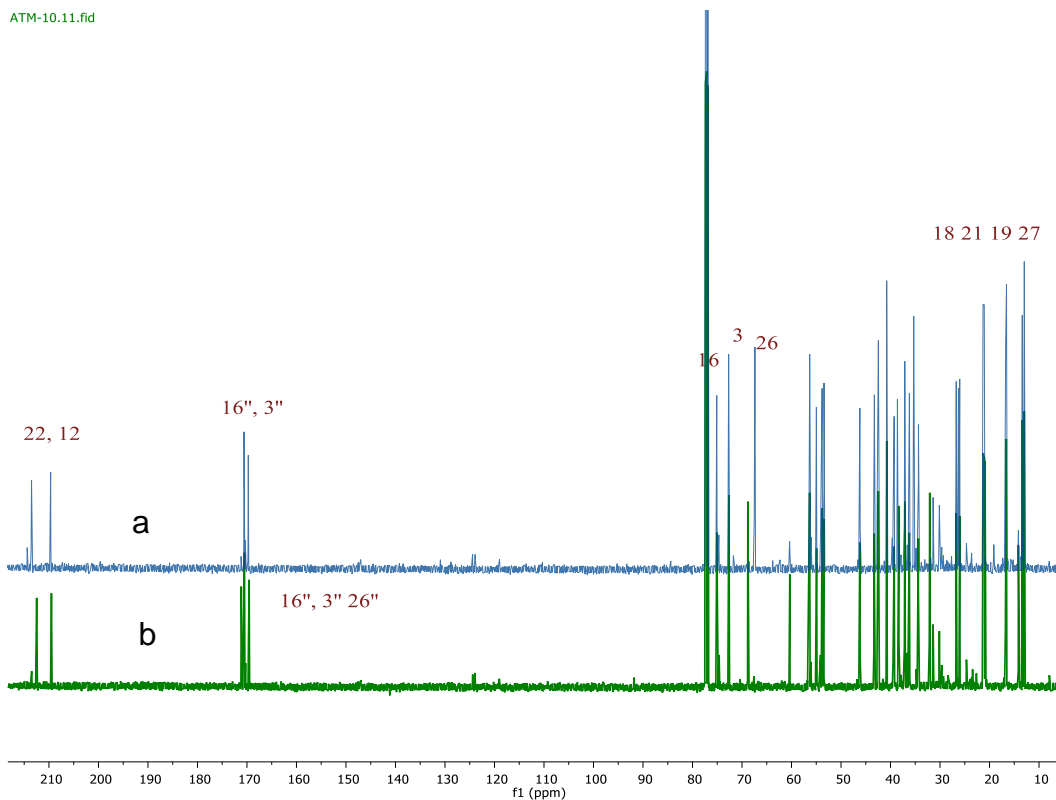
En el espectro de  $^1\text{H}$  del compuesto **110** (figura 123-a) se observan 3 señales características que integran para 3H correspondientes a los acetatos en

posiciones 3 y 16 alrededor de 1.9 y 1.96 ppm respectivamente, así mismo la señal alrededor de 3.35 correspondiente al H-26 del hidroxilo en posición 3, por otro lado, para el compuesto **111** (figura 123-b) la señal en 26 se desplaza hacia 3.9 debido a la presencia del acetato en esa posición, así mismo, las señales que integran para 3H correspondientes a CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub> de 3 y 16 se desplazan ligeramente hacia 1.93 y 2.09 ppm.



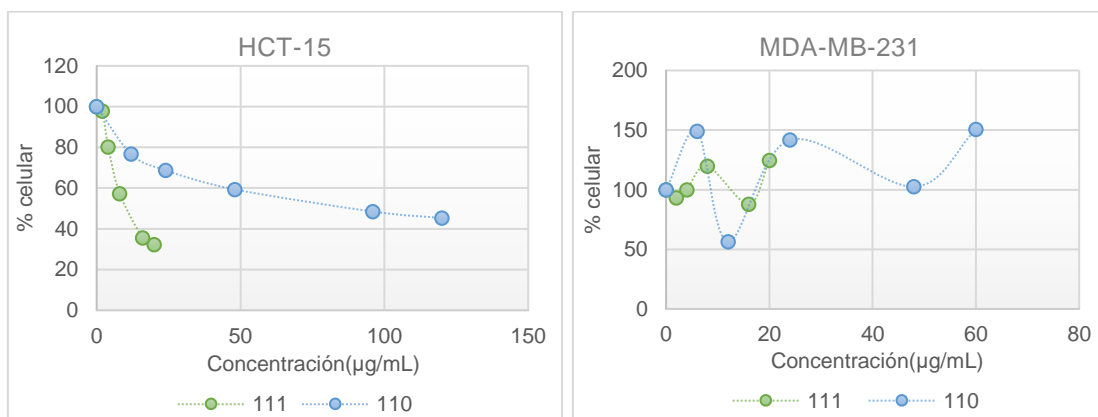
**Figura 123. Espectro de <sup>1</sup>H de los compuestos a) 110 y b) 111.**

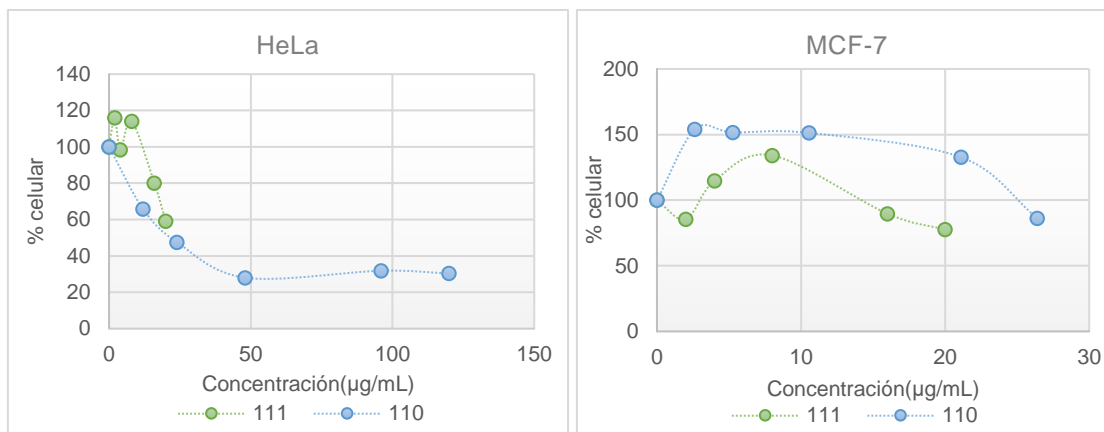
En el caso del espectro de <sup>13</sup>C para ambos compuestos aparecen señales alrededor de 169.9 y 170.5 ppm correspondientes a los acetatos en posición 3 y 16 respectivamente, distinguiéndose en la señal de 26, que para **110** (figura 124-a) se encuentra alrededor de 75.7 ppm indicando la presencia del OH-3 y en **111** (figura 124-b) se observa un desplazamiento de la señal hasta 172.5 ppm correspondientes al CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>-26.



**Figura 124. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos a) 110 y b) 111.**

Se realizaron las pruebas biológicas de los compuestos 110 y 111, obteniéndose los siguientes datos:





**Figura 125. Resultados por línea celular de los compuestos 110 y 111.**

Acorde a lo observado en las pruebas de citotoxicidad, se muestra que el compuesto **111** tiene actividad en las líneas HCT-15 y MCF-7, siguiendo ambas rutas, tanto la de tipo hormona y la no-hormona dependiente, pero teniendo preferencia por el primer tipo, dado que en cáncer de colón muestra un efecto antiproliferativo y por el contrario en cáncer de mama se observa un efecto proliferativo a bajas concentraciones. Por otro lado, el compuesto **110** tiene efecto tanto en HCT-15, HeLa y MCF-7, siguiendo ambos tipos de ruta, pero mostrando preferencia nuevamente por la de tipo hormona dependiente, debido a que requiere menores concentraciones para mostrar efecto antiproligerante, en el caso de MCF-7 se observa una actividad proliferante a bajas concentraciones.

**Tabla 24. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos 110 y 111.**

Línea/Compuesto	110	111
HCT-15	89.27 µg/mL	10.68 µg/mL
HeLa	22.38 µg/mL	No activo
MCF-7	Proliferante*	Proliferante*
MDA-MB-231	No activo	No activo

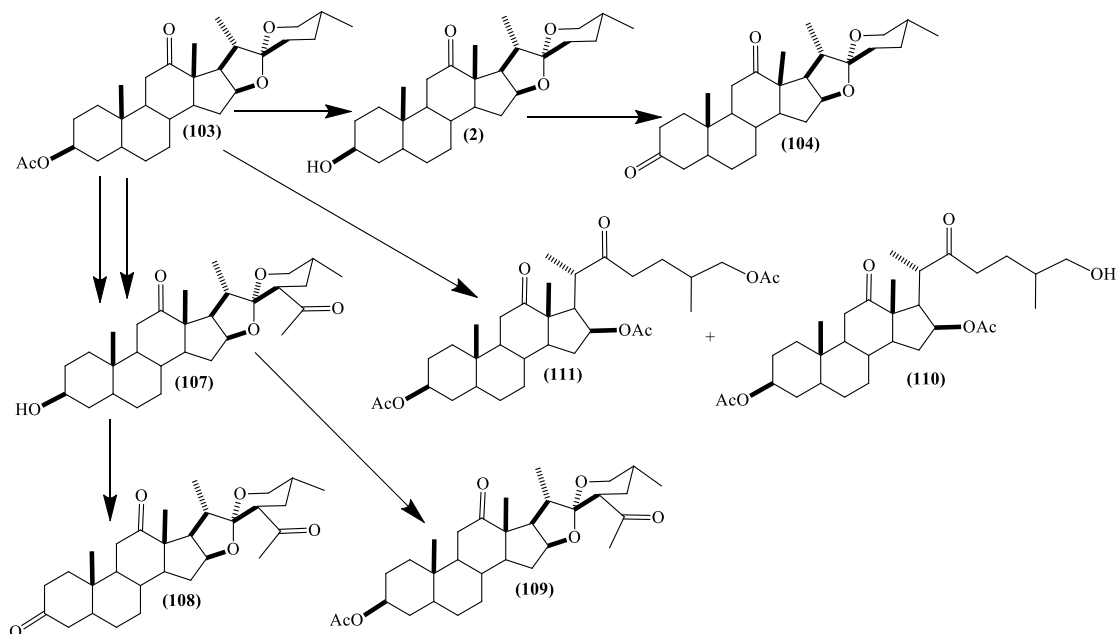
\*A concentraciones altas decrece el efecto

Acorde a los resultados obtenidos, la apertura del anillo F favorecerá la acción contra los tipos de cáncer hormona dependientes y la presencia del OH en posición 26 no demuestra tener un efecto positivo en la estructura dado que lo hace susceptible a otro tipo de líneas celulares, teniendo un efecto antiproliferativo a altas concentraciones, se debe tener en cuenta el efecto

proliferativo presente en ambos compuestos a bajas concentraciones sobre la línea MCF-7, no pudiendo ampliar el compuesto si la persona presenta cáncer de mama de tipo hormona dependiente, requiriéndose ampliar los estudios en este tipo de líneas para analizar el efecto que desencadenan.

## 9. CONCLUSIONES

La síntesis de nuevos derivados de hecogenina se logró con buenos rendimientos y acorde a las rutas propuestas, la purificación para realizar las pruebas biológicas también fue exitosa.



**Esquema 23. Ruta para la obtención de derivados de hecogenina.**

Se proliferó adecuadamente las líneas HCT-15, HeLa, MDA-MB-12 y MCF-7 para la realización de un comparativo del efecto que tendrían los compuestos en cáncer de tipo hormona y no-hormona dependiente y el tipo de cáncer presentado, colón, cervicouterino o mama.

Los resultados globales de las pruebas se muestran a continuación:

**Tabla 25. Valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos evaluados.**

<b>Compuesto/ Línea</b>	<b>HCT-15</b>	<b>HeLa</b>	<b>MCF-7</b>	<b>MDA-MB- 231</b>
103 (AcO)	>15.8 µg/mL	4.66 µg/mL	No activo	No activo
2 (OH)	>20 µg/mL	5.95 µg/mL	No activo	No activo
104 (CO)	>20 µg/mL	No activo	Proliferativo	No activo
107 (OH)	No activo	22.93 µg/mL	23.10 µg/mL*	2.5* µg/mL
108 (CO)	7.85 µg/mL	No activo	Proliferativo	2.5** µg/mL
109 (AcO)	No activo	20.07 µg/mL	Proliferativo	2.5* µg/mL

110 (OH)	89.27 µg/mL	22.38 µg/mL	Proliferativo***	No activo
111 (AcO)	10.68 µg/mL	No activo	Proliferativo***	No activo

\*Determinado para IC<sub>40</sub> sin efecto a mayores concentraciones

\*\* Determinado para IC<sub>40</sub> con efecto proliferante a mayores concentraciones

\*\*\*A concentraciones altas decrece el efecto

En primera instancia en la ruta de modificación del anillo A de hecogenina se observó en el compuesto **103** que la presencia del acetato en C-3 mejoro el efecto antiproliferativo en las líneas de cáncer de colón y cervicouterino, teniendo un mayor efecto en el segundo tipo, comparado con los compuestos **2** que presentaba OH en C-3 y el **104** correspondiente al grupo cetónico en C-3 el cual no presento efectos relevantes, los compuestos activos resultaron ser afines a la línea de cáncer cervicouterino presentando valores de IC<sub>50</sub> bajos.

Acorde a esos resultados se siguió la modificación de las moléculas, ahora insertando el grupo acetilo en posición 23 y realizando modificaciones en la posición 3 del anillo A, obteniendo nuevamente resultados interesantes, dado que la presencia de dicho grupo activo la molécula del derivado cetónico, dando como resultado que **108** fuese activo en 3 líneas celulares, por otro lado el derivado acetilado **109** mostro tener mejores resultados antiproliferativos que **107** con OH en C-3, mostrando así la capacidad que tiene el grupo acetilo de activar las moléculas y de potenciar su efecto en líneas celulares de tipo no-hormona dependientes.

Se demostró que la apertura del anillo F afecta la actividad antiproliferativa de las moléculas, siendo el caso de **110** y **111** en donde la concentración del efecto antiproliferante en comparación a las otras moléculas, acorde a la tendencia mostrada se determina que este tipo de compuestos son susceptibles a ambos tipos de cáncer.

En conclusión, la presencia de grupos acetato en posición 3 mejora la actividad de las moléculas, en comparación con la presencia de un grupo hidroxilo, el cual requiere una mayor concentración para desarrollar un efecto antiproliferativo, mientras que el grupo cetónico en el anillo A no muestra efecto alguno, así mismo la adición del acetilo en posición 23 modificara el efecto que tienen las moléculas, pudiendo activar, mejorar o desfavorecer la acción de estas. Por último, la

apertura del anillo F no demuestra una mejora notable en el efecto citotóxico de las moléculas, aun así, se observaron mejores resultados en el derivado 26-OAc-22-oxocolestánico, en comparación con el derivado con OH en la posición 26.

La constante búsqueda de nuevos fármacos para combatir el cáncer es importante, así como su modificación para potenciar su actividad o dirigir la molécula hacia un tipo específico con la finalidad de no afectar células sanas o se ocasionen repercusiones o efectos secundarios no deseados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Talapatra, S.; Talapatra B.; *Chemestry of Plant Natural Products*, 1a. Ed. Springer, India, **2015**.
- [2] Francis, C.; Kerem, Z.; Makkar, H.; Becker, K.; *Br. J. Nutr.*, **2002**, 88, 6, 587-605.
- [3] Miramontes, L.; *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **2001**, 45, 3, 102-104.
- [4] León, F.; *Rev. Soc. Quím. Méx.*, **2001**, 45, 2, 93-96.
- [5] A.C.S.; S.Q.M.; *Am. Chem. Soc., Soc. Quim. Méx.*, **1999**.
- [6] Dewick, P.; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3a. Ed. John Wiley & Sons, New York, **2011**.
- [7] Castillo, D.; Cano, A.; Berlanga, C.; *Establecimiento y aprovechamiento de lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.)*, Comisión Nacional Forestal-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias, México, **2012**.
- [8] Cervantes, A.; *BIOZ*, **2016**, 1, 1, 1-4.
- [9] Slinn, J.; *Glaxo: A history to 1962*, 1a. Ed., Cambridge University, Cambridge, **1992**.
- [10] Sampaio, M.; Cabral, S.; Alejandro, J.; Rocha, M.; Barbosa, J.; De Oliveira, H.; Souza, V.; *Toxicol. Rep.*, **2016**, 3, 539-543.
- [11] Morrison, R.; Boyd, R.; *Química Orgánica*, 5a. Ed., Addison Wesley Longman, Edo. de México, **1998**.
- [12] He, W.; Xue, D.; Yao, L.; Li, J.; Liu, H.; Guo, Y.; *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2015**, 18, 2, 195-199.
- [13] Mashrai, A.; Mahmood, A.; Mir, S.; Gupta, H.; Shamsuzzaman.; *Nat. Prod. Chem. Res.*, **2017**, 5, 1, 1-5.
- [14] Sudhakar, A.; *J. Cancer Sci. Ther.*, **2009**, 1, 2, 1-4.
- [15] Torre, L.; Siegel, R.; Ward, E.; Jemal, A.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2016**, 1, 25, 16-27.
- [16] Rizo, P.; González, A.; Sánchez, F.; Murguía, P.; *Rev. Med. Hosp. Gen. Méx.*, **2015**, 78, 2, 85-94.
- [17] Dotson, J.; Brown, R.; *Pediatr. Clin. North Am.*, **2007**, 54, 4, 761-769.
- [18] Burns, C.; *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **2016**, 42, 1, 1-14.

- [19] Yang, V.; *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 5a. Ed., Academic Press, **2012**.
- [20] Biegling, K.; Mello, S.; Attardi, L.; *Nat. Rev. Cancer*, **2014**, 14, 5, 359-370.
- [21] Joerger, A.; Fersht, A.; *Annu. Rev. Biochem.*, **2016**, 85, 375-404.
- [22] Koeffler, H.; McComicky, F.; Denny, C.; *West. J. Med.*, **1991**, 5, 155, 505-514.
- [23] Rubin, K.; *J. Dermatol. Nurses Assoc.*, **2010**, 2, 6, 254-259.
- [24] Fabian, C.; *Int. J. Clin. Pract.*, **2007**, 61, 12, 2051-2063.
- [25] Guo, K.; Fuchs, P.; *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 10, 1099-1102.
- [26] Lapitskaya, M.; Vasiljeva, L.; Pivnitsky, K.; *Mendeleev Commun.*, **2010**, 20, 6, 318-320.
- [27] Tang, P.; Mamdani, F.; Hu, X.; Liu, J.; Yu, B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4, 1003-1007.
- [28] Pettit, G., Xu, J.; Chapuis, J.; Melody, N., *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 6, 1446, 1450.
- [29] Fink, S.; Cookson, B.; *Infect. Immun.*, **2005**, 37, 4, 1907-1916.
- [30] Waheed, A.; Barker, J.; Barton, S.; Owen, C.; Ahmed, S.; Carew, M.; *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2012**, 47, 2, 464-473.
- [31] Tong, Q.; He, Y.; Zhao, Q.; Qing, Y.; Huang, W.; Hu, X.; *Steroids*, **2012**, 77, 12, 1219-1227.
- [32] Kaskiw, M.; Tassotto, M.; Mok, M.; Tokar, R.; Pycko, R.; Th'ng, J.; Jiang, Z.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 22, 7670-7679.
- [33] Bunday, A.; Mir, B.; Lone, I.; Suri, K.; Kumar, S.; *Steroids*, **2010**, 75, 12, 805-809.
- [34] Shamsuzzaman,; Siddiqui, T.; Alam, M.; Mahmood, A.; *J. Saudi Chem. Soc.*, **2015**, 19, 4, 387-391.
- [35] Milic, D.; Kop, T.; Juranic, Z.; Gasic, M.; Tinant, B.; *Steroids*, **2005**, 70, 14, 922-932.
- [36] Saxena, H.; Faridi, U.; Kumar, J.; Luqman, S.; Darokar, M.; Shanker, K.; Chanotiya, C.; Gupta, A.; Negi, A.; *Steroids*, **2007**, 72, 13, 892-900.
- [37] Bansal, R.; Guleria, S.; *Steroids*, **2008**, 73, 14, 1391-1399.
- [38] Misharin, A.; Mehtiev, A.; Zhabinskii, V.; Khripach, V.; Timofeev, V.; Tkachev, Y.; *Steroids*, **2010**, 75, 3, 287-294.

- [39] Bunyathawon, P.; Boonanwong, S.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N.; *Steroids*, **2010**, 78, 6, 432-444.
- [40] Li, C.; Qiu, W.; Yang, Z.; Luo, J.; Yang, F.; Liu, M.; Xie, J.; Tang, J.; *Steroids*, **2010**, 75, 12, 859-869.
- [41] Banday, A.; Shameen, S.; Gupta, B.; Sampath, H.; *Steroids*, **2010**, 75, 12, 801-804.
- [42] Harrel, J.; Myers, C.; Never, R.; Semeiks, J.; Spellman, P.; Bissel, M., *Mol. Oncol.*, **2007**, 1, 1, 84-96.
- [43] Harrel, J.; Ptefferle, A.; Zalles, N.; Prat, A.; Fran, C.; Khramtsov, A.; Perou, C.; *Clin. Exp. Metastasis*, **2014**, 31, 1, 33-45.
- [44] Holliday, D.; Speirs, V.; *Breast Cancer Res.*, **2011**, 13, 215, 1-7.