



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

“Obtención, purificación y caracterización de cinco derivados de Argentatina B, 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 25-O-acetil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona.”

Trabajo de fin de titulación

AUTOR: García Hoyos, Gabriela María

DIRECTOR: Romero Benavides Juan Carlos, Ing.

LOJA-ECUADOR

2013

CERTIFICACIÓN

Ingeniero

Juan Carlos Romero Benavides.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **“Obtención, purificación y caracterización de cinco derivados de Argentatina B, 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 25-O-acetil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona”**, realizado por Gabriela María García Hoyos, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2013

Ing. Juan Carlos Romero Benavides

C.I: 1103018477

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Gabriela María García Hoyos, declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: **“Obtención, purificación y caracterización de cinco derivados de Argentatina B, 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 25-O-acetil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona”**, de la titulación Bioquímica y Farmacia, siendo el Ing. Juan Carlos Romero Benavides, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo de investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Gabriela García Hoyos

Nº 1105041626

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, salud para culminar el presente trabajo. A mi madre, hermano, a Leonardo y Luciana que siempre han estado a mi lado brindandome su amor, comprensión y confianza impulsandome a terminar mi carrera

Gabriela García Hoyos

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida y los medios necesarios, para concluir mi carrera universitaria.

A la Universidad Técnica Particular de Loja en la persona del Ingeniero Juan Carlos Romero Benavides, quien con su tiempo, conocimiento y buena voluntad enrumbo el desarrollo de la presente investigación.

A todos los docentes que durante estos cinco años compartieron conmigo sus enseñanzas, al Departamento de Química y su personal por brindarme todos los medios para la culminación de este trabajo .

A mis compañeros que día a día formaron parte de esta formación académica siempre quedaran en mis recuerdos.

Gracias a todos.

Gabriela García Hoyos

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
CARATULA	i
CERTIFICACION	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	1
ABSTRACT AND KEY WORDS	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	5
1. Fin, propósito y componentes del proyecto	6
CAPITULO II	7
2. Aspectos Generales	8
2.1. Terpenos	9
2.2. Triterpenos	9
2.3. <i>Parthenium Argentatum</i> y argentatinas A y B	11
CAPITULO III	13
3. Metodología	14
3.1. Resina	15
3.2. Procedimientos químicos generales	15
3.2.1. Cromatografía de columna	15
3.2.2. Cromatografía de capa fina	15
3.2.3. Purificación por re cristalización	15
3.2.4. Punto de fusión	16
3.2.5. Resonancia magnética nuclear	16

3.2.6. Espectroscopía de masas	16
3.2.7. Espectrofotometría de Infrarrojo	16
3.3. Aislamiento de las argentatinas A y B	16
3.4. Purificación de argentatina B mediante cromatografía de columna abierta	17
3.5. Caracterización de las argentatinas A y B	17
3.6. Transformaciones químicas de la argentatina B	17
3.6.1. Preparación de la 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (3)	17
3.6.2. Preparación de la 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (4)	18
3.6.3. Preparación de la 25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (5)	19
3.6.4. Preparación de (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona (6)	19
3.6.5. Preparación de 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (7)	20
CAPITULO IV	21
4. Resultados y discusión	22
4.1. Aislamiento de las Argentatinas A y B	23
4.2. Caracterización de las Argentatinas A y B	23
4.3. Transformaciones químicas de la Argentatina B	23
4.3.1. Obtención de la 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (3)	24
4.3.2. Obtención de la 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (4)	25
4.3.3. Obtención de la 25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (5)	26
4.3.4. Obtención de la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona (6)	27
4.3.5. Obtención de la 25-O-acetil-3-oxima-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan -3-ona (7)	28
4.3.6. Obtención de derivado bromado con apertura del anillo ciclopropano	29

CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Argentatina A (1) y Argentatina B (2)	12
Figura 2. Resumen de metodología utilizada para la obtención, purificación y caracterización de cinco derivados de Argentatina B (2)	14
Figura 3. Obtención de la 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (3)	18
Figura 4. Obtención de la 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (4)	18
Figura 5. Obtención de 25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (5)	19
Figura 6. Obtención de (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona (6)	20
Figura 7. Obtención de 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (7)	21
Figura 8. Transformaciones químicas de la argentatina B (2). Condiciones de reacción y rendimiento	24
Figura 9. Obtención de derivado bromado con apertura del anillo del ciclopropano	29

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AcOEt	Acetato de Etilo
HCl	Ácido Clorhídrico
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
MCF-7	Cáncer de mama
PC-3	Cáncer de próstata
HCT-15	Cáncer de Colon
U251	Cáncer del Sistema Nervioso Central
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
Cl ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
Hex	Hexano
IR	Infrarrojo
K562	Leucemia
MS	Metabolitos Secundarios
MeOH	Metanol
Pf	Punto de fusión
RMN	Resonancia Nuclear Magnética
RMN ¹ H	Resonancia Nuclear Magnética de Hidrogeno
RMN ¹³ C	Resonancia Nuclear Magnética de Carbono
ATR	Reflectancia total atenuada
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La argentatina B principal componente de la resina de *Parthenium argentatum*, se obtiene como subproducto del proceso de industrialización del guayule para obtener latex natural, presenta actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer humano con valores de CI_{50} de 25 a 78 μ M, en el presente trabajo se realizaron modificaciones químicas sobre los anillos A y E de la argentatina B (**2**), obteniendo cinco derivados que fueron purificados utilizando técnicas convencionales y caracterizados utilizando IR, RMN de 1H y de ^{13}C y EM.

Los derivados obtenidos fueron: derivado bromado **3** se obtuvo por tratamiento de **2** con bromo líquido en ácido acético (rendimiento 66,6%), el derivado oxima **4** se obtuvo por tratamiento de **2** con clorhidrato de hidroxilamina y piridina (rendimiento 78,53%), el derivado acetilado **5** se obtuvo por tratamiento de **2** con ácido acético y piridina (rendimiento 61,9%), el derivado lactona **6** se obtuvo por tratamiento de **2** con ácido acético glacial y piridina (rendimiento 78,7%) y el derivado de oxima acetilada **7** se obtuvo del tratamiento de **5** con piridina y clorhidrato de hidroxilamina (rendimiento 84%).

Palabras clave: *Parthenium argentatum*, Argentatina B, hemisíntesis.

ABSTRACT

The main component of “resin” *Parthenium argentatum* is Argentatin B, it is obtained as a by-product of the industrialization process for guayule natural latex, shows cytotoxic activity against several human cancer cell lines with IC50 values of 25 to 78 μ M, in this chemical modification work carried out on the rings A and E argentatina B (**2**), obtaining five derivatives were purified using conventional techniques and characterized using IR, ¹H NMR and ¹³C NMR and MS. The derivatives obtained were brominated derivative 3 was obtained by treatment of 2 with liquid bromine in acetic acid (66.6% yield), the oxime derivative 4 was obtained by treatment of 2 with hydroxylamine hydrochloride and pyridine (78.53% yield), the acetylated derivative 5 was obtained by treatment of 2 with acetic acid and pyridine (61.9% yield), the lactone derivative 6 was obtained by treatment of 2 with glacial acetic acid and pyridine (78.7% yield) and acetylated oxime derivative 7 was obtained from treatment of 5 with pyridine and hydroxylamine hydrochloride (84% yield).

Key words: *Parthenium argentatum*, Argentatin B, hemisynthesis.

INTRODUCCION

El término "productos naturales" se refiere generalmente a los metabolitos secundarios (MS), que son sintetizados por el metabolismo secundario. Durante muchos años, la ciencia descuido el metabolismo secundario vegetal. Se creía que los Metabolitos secundarios generalmente eran productos de desecho, sin función aparente (Newman et al., 2003). Hoy en día, su origen se ha explicado por diversas hipótesis, una de las cuales propone que este tipo de metabolito juega un papel en la supervivencia del organismo o son compuestos fisiológicamente importantes. En nuestro contexto, una de las razones más importantes para el estudio de MS es que, efectivamente, desencadenan respuestas fisiológicas muy específicas, en muchos casos mediante la unión a receptores con una notable complementariedad (Cichewitz et al., 2004). Se sabe que los compuestos de productos naturales han sido una fuente importante de varios agentes anti-cáncer clínicamente útiles. En el 2000, aproximadamente el 53% de los compuestos utilizados en ensayos clínicos como agentes antitumorales o eran productos naturales o compuestos derivados de los mismos, o diseñados a partir de un producto natural farmacoforo (Newman et al., 2003).

Por otro lado, hay varios tipos de productos naturales que se encuentran en fase de desarrollo preclínico. Un grupo importante son los triterpenos. Por ejemplo, el ácido betulínico, un metabolito secundario aislado a partir de varias fuentes (Argumedo-Delira et al., 2003) (Cichewitz et al., 2004), es citotóxico en varias líneas celulares de cáncer humano. El ácido ursólico y ácido oleanólico, triterpenos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son conocidos por sus propiedades anti-inflamatorias y anti-cancerosas (Choi et al., 2001) (Subbaramaiah et al., 2000).

La diversidad estructural de los triterpenos es, quizás, la responsable de sus efectos biológicos y farmacológicos. La mayoría de ellos se encuentran en grandes cantidades en látex y en la resina de ciertas plantas, en donde constituyen un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros.

Se sabe que los principales componentes de "la resina" del *Parthenium argentatum* son las argentatinas A y B, comprenden el 20%; añadiendo su gran parecido estructural con compuestos esteroides, es una fuente potencial para realizar transformaciones químicas, esto, con el propósito de obtener compuestos con posibles propiedades antitumorales (Parra-Delgado et al., 2005).

Se ha demostrado que las argentatinas A y B poseen actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer humano (K562, MCF-7, PC3, HCT15 y U251) obteniéndose valores de CI_{50} en un rango de 25 a 78uM, además de presentar efectos citoestáticos (Parra-Delgado et al., 2005).

Estos hallazgos y el hecho de que podamos tener cantidades importantes de argentatina B, alrededor 125.000 toneladas de hule al año, y es conocido que por cada kilogramo de hule extraído se obtiene al menos un kilogramo de resina, la hacen un candidato prometedor para la terapia de cáncer en la actualidad, por lo que en el presente proyecto proponemos la obtención de cinco derivados de este triterpeno que sean más activos en líneas celulares de cáncer humano y menos tóxicos en células normales.

Se obtuvo 5 derivados, el tratamiento de **2** con bromo líquido en ácido acético generó el derivado bromado **3** el derivado oxima **4** se obtuvo por tratamiento de **2** con clorhidrato de hidroxilamina y piridina, el derivado acetilado **5** se obtuvo por tratamiento de **2** con ácido acético y piridina, el derivado lactona **6** se obtuvo por tratamiento de **2** con ácido acético glacial y piridina y el derivado de oxima acetilada **7** se obtuvo del tratamiento de **5** con piridina y clorhidrato de hidroxilamina.

CAPITULO I

1. Fin, propósito y componentes del proyecto

1.1. Fin del proyecto

Contribuir con el estudio de principios activos y obtener derivados semisintéticos a partir de la argentatina B para utilizarlos como agentes antitumorales

1.2. Propósito del proyecto

Obtener, purificar y caracterizar la Argentatina B para luego realizar modificaciones químicas que permitan desarrollar, purificar y caracterizar cinco derivados de la argentatina B.

1.3. Componentes del proyecto

- 1.3.1. Obtención, purificación y caracterización de Argentatina B (16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona
- 1.3.2. Obtención, purificación y caracterización de 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (derivado bromado)
- 1.3.3. Obtención, purificación y caracterización de 25-O-acetil-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (derivado acetilado.)
- 1.3.4. Obtención, purificación y caracterización de 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (derivado oxima)
- 1.3.5. Obtención, purificación y caracterización de 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (oxima acetilada)
- 1.3.6. Obtención, purificación y caracterización de (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona (derivado lactona)

CAPITULO II

2. ASPECTOS GENERALES

El uso de plantas con posibles propiedades medicinales data de épocas muy remotas. Actualmente se estima que unas 20.000 especies de plantas son utilizadas como medicamentos a nivel mundial (Rodríguez et al., 2006), sobre todo en aquellos países donde el acceso a servicios de salud y medicinas básicas es limitado, la medicina natural tiene un rol significativo para atender sus necesidades primarias de asistencia médica (Ansah et al., 2004).

La importancia de las especies vegetales como agentes terapéuticos es relevante, suelen ser la materia prima o los constituyentes activos de casi un 30% del arsenal farmacéutico actual (Anwarul et al., 2005). Se han utilizado las especies vegetales con fines terapéuticos, estableciéndose una fuerte tradición constituyéndose un rasgo cultural en la sociedad, esto debido a la fácil accesibilidad, al bajo costo y los antecedentes etnofarmacológicos de las especies vegetales utilizadas (Harvey, 2008).

Sin duda, las plantas han sido utilizadas a través de la historia para tratar innumerables enfermedades, una práctica que ha llevado a la síntesis de moléculas provenientes de plantas con actividades medicinales (Hernández et al., 2002), las cuales constituyen una fuente potencial de compuestos químicos entre ellos los triterpenos que tienen uso farmacéutico promisorio.

Se han identificado productos vegetales (incluidos extractos de plantas) capaces de modificar la actividad de mutágenos y carcinógenos como: pigmentos, vitaminas, carotenos, lactonas fenólicas, flavonoides y taninos. Un número limitado de plantas, particularmente de relevancia médica, han sido estudiadas por sus posibles propiedades citotóxicas y genotóxicas. Estudios adicionales han sido necesarios para evaluar las posibles actividades antimutagénicas, anticlastogénicas y/o anticarcinogénicas de las plantas y sus derivados (Sánchez-Lamar et al., 1999).

La búsqueda de metabolitos secundarios de origen vegetal involucra una combinación de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares; que juegan un papel importante en el tratamiento del cáncer (Parra et al., 2005), Malaria, Alzheimer, VIH y otras enfermedades (Balunas et al., 2006).

Muchas especies se caracterizan por su amplia gama de sustancias triterpénicas, presentes en sus órganos en donde desempeñan diferentes actividades. Pueden ser parte constitutiva de la planta o su expresión se puede inducir a través de estrés biótico (Salminen et. al., 2008).

2.1. Terpenos

Los terpenos, algunas veces referidos como isoprenoides, son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos; estos pueden verse formados por unidades de 5 carbonos ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes, siempre basadas en el esqueleto isopreno (Konoshima et al., 2000), además su esqueleto hidrocarbonado puede verse como una combinación de numerosas unidades de isopreno, por lo general unidades de forma cabeza-cola, y también combinaciones cabeza-cabeza, la clasificación de los terpenos según su estructura química, se basa en el número de unidades de isopreno presentes: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos.

2.2. Triterpenos

Los triterpenos son terpenos de 30 carbonos, poseen seis unidades de isopreno, constituyen un grupo importante y estructuralmente diverso de metabolitos secundarios, (Bruneton 2001; Parra et al., 2005), son por lo general generados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola. Esta clase de moléculas incluye a los brassinoesteroides, componentes de la membrana que son fitoesteroides, algunas fitoalexinas, varias toxinas y componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas (Ávalos et al., 2009).

La diversidad estructural de los triterpenos es, quizás, la responsable de sus efectos biológicos y farmacológicos. La mayoría de ellos se encuentran en grandes cantidades en látex y en la resina de ciertas plantas, en donde constituyen un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros (Armas, 2008).

Se han descrito más de 100 triterpenos con actividad citotóxica. Algunos de éstos son de tipo ursano, oleanano, cicloartano, lupano, así como las quinonas metilúricas (Setzer y Setzer, 2003) siendo los triterpenos tipo cicloartanos uno de los grupos menos estudiados. Los compuestos referidos más frecuentemente en la literatura pertenecen a los dos primeros tipos los cuales poseen una débil actividad antiinflamatoria y antitumoral (Liby et al., 2007).

Se sabe que el ácido ursólico y el ácido oleanólico han sido sometidos a transformaciones químicas para diversos fines. Las primeras transformaciones realizadas en los años sesenta, se efectuaron con el fin de obtener agentes antiinflamatorios novedosos. En 1984, Han y colaboradores, informaron de la síntesis de 11-oxo derivados del ácido oleanólico. Dichos derivados fueron concebidos como antiinflamatorios corticomiméticos. Finlay y colaboradores (1997) informaron de la obtención de algunos derivados del ácido oleanólico con apertura en el anillo A. De dicha serie de compuestos, el más activo fue el ácido 5β -(1-metil-2- etil)- 10α -(3-aminopropil)-des- A olean-12-en-28-oico. Posteriormente, el grupo de investigación bioorgánica encabezada por el binomio Gribble y Sport lograron la síntesis y evaluación de diversos compuestos antiinflamatorios y anticancerosos a partir del ácido oleanólico obteniéndose el ácido 2-ciano-3,12-dioxoolean-1,19-dien-28-oico, conocido como CDDO. Este compuesto es un agente multifuncional, inhibe la proliferación de una gran cantidad de líneas celulares de cáncer humano, induce diferenciación en células de leucemia humana y en fibroblastos murinos.

En la literatura se han señalado las acciones antiinflamatorias de los triterpenos, abarcando desde experimentos in vitro hasta in vivo. Los efectos son referidos principalmente a su interferencia con diversas moléculas o mecanismos del proceso de inflamación (Connelly et al., 2005) (Calixto et al., 2003).

Existe una inmensa información publicada que da cuenta de las propiedades citotóxicas y anticancerosas de algunos triterpenos. La mayoría de los compuestos que se han evaluado actúan a nivel de la replicación del DNA, generalmente inhibiendo enzimas como la DNA polimerasa y/o las topoisomerasas (Ávalos et al., 2009).

Si bien los triterpenoides han sido ampliamente empleados con propósitos medicinales en muchos países asiáticos, esta clase de moléculas no han tenido un impacto en las prácticas medicinales occidentales. Las excelentes actividades citotóxicas en líneas de cáncer humano de los triterpenos hacen de este tipo de compuestos candidatos promisorios en la búsqueda de nuevos agentes antineoplásticos (Ávalos et al., 2009).

Investigaciones recientes han demostrado que es posible obtener nuevos antineoplásticos a partir de los triterpenos, pudiéndose obtener nuevos fármacos que tengan propiedades anticancerosas, antimutagénicas y no tóxicas, disminuyéndose así los efectos adversos (Parra-Delgado et al., 2005).

2.3. *Parthenium argentatum* y argentatinas A y B

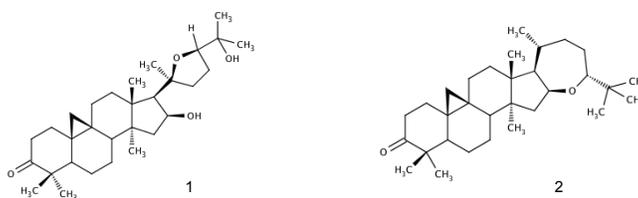
El *Parthenium argentatum* es un arbusto que crece en las zonas áridas del norte de México y sur de Estados Unidos, el cual tiene como nombre “guayule” que significa “árbol de hule”, esta presente en prácticamente en todos los órganos de la planta, tallo, raíces y hojas, se sabe que esta especie contiene cantidades suficientes de hule para ser de importancia económica (Rao et al., 2004).

El aprovechamiento del guayule de manera industrial se llevó a cabo en México de 1903 a 1951 exportando a los Estados Unidos 125,000 toneladas de hule. La extracción se realizaba por el método de flotación que era el económicamente más atractivo (Armas 2008), éste consistía en colocar el material vegetal seco y molido en un estanque, posteriormente se adicionaba una solución diluida de hidróxido de sodio, con lo que se facilitaba la extracción de látex. De esta forma el hule, en mezcla con el residuo vegetal, flotaba en la solución alcalina. El hule se purificaba mediante lavados con acetona. Finalmente, la recuperación de acetona mediante destilación, dejaba un residuo al cual se lo llamo “la resina” (Parra-Delgado et al., 2005).

El guayule ha sido intensamente estudiado y es conocido que por cada kilogramo de hule extraído se obtiene al menos un kilogramo de resina. Al conocer la constitución química de este residuo se convirtió en un asunto de interés y las primeras investigaciones hechas a la resina fueron con fines industriales usándola en la fabricación de adhesivos y barnices (Armas, 2008).

Se sabe que los principales componentes de “la resina” son las argentatinas A y B (ver figura 1) comprenden el 20%, por lo que se puede disponer de cantidades considerables de estos metabolitos, añadiendo su gran parecido estructural con compuestos esteroides, es una fuente potencial de intermediarios susceptibles a sufrir transformaciones químicas, esto, con el propósito de obtener compuestos con posibles propiedades antitumorales (Parra-Delgado et al., 2005).

Figura1. Argentatina A (1) y Argentatina B (2)



Fuente: Autora

La Argentatina B muestra propiedades citoestáticas y no muestra actividad genotóxica sobre la proliferación de linfocitos, lo cual abre un campo muy prometedor sobre sustancias antineoplásicas sin efecto sobre el DNA (Parra-Delgado et al., 2005).

En cuanto a la actividad biológica se ha observado que las argentatinas A y B presentaron actividad insecticida significativa en gusanos de *Spodoptera frugiperda*. Se ha informado que las argentatinas A, B y D inhiben el crecimiento de tumores hormona-dependientes, antagonizando la acción del estradiol por medio de una inhibición no competitiva de su receptor (Céspedes et al., 2001).

Adicionalmente se ha demostrado que las argentatinas A y B poseen actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer humano (K562, MCF-7, PC3, HCT15 y U251) obteniéndose valores de CI_{50} en un rango de 25 a 78 μ M, además de presentar efectos citoestáticos. Se han sintetizado derivados de este triterpeno y realizado estudios cuantitativos de estructura-actividad de la argentatina B (Parra-Delgado et al., 2005).

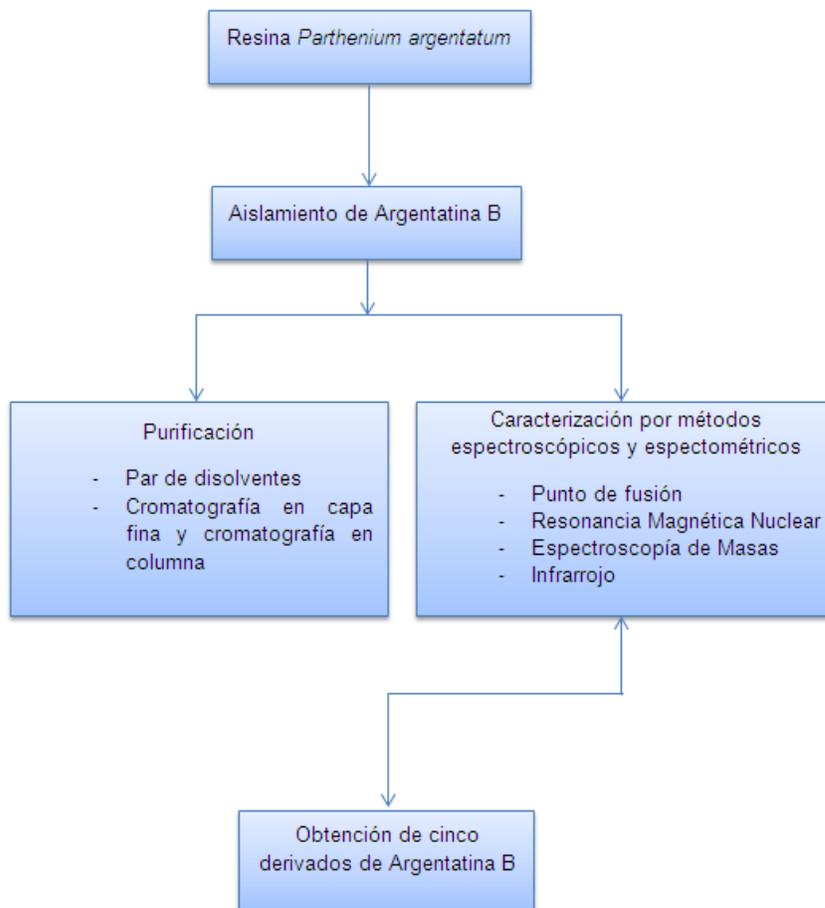
Estos hallazgos y el hecho de que podamos tener cantidades importantes de argentatina B, la hacen un candidato prometedor para la terapia de cáncer en la actualidad, por lo que en el presente proyecto proponemos la obtención de cinco derivados de este triterpeno que sean más activos en líneas celulares de cáncer humano y menos tóxicos en células normales.

CAPITULO III

3. METODOLOGÍA

En la figura 2 se indica la metodología utilizada en el presente trabajo de investigación.

Figura 2. Resumen de metodología utilizada: Obtención, purificación y caracterización de derivados de Argentatina B (2)



Fuente: Autora

3.1. Resina

La resina, un subproducto que es obtenido durante el proceso de industrialización de la especie *Parthenium argentatum* (Gray), fue donada por el Dr. Mariano Martínez Vázquez del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.2. Procedimientos químicos generales

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

3.2.1. Cromatografía de columna:

El procedimiento de cromatografía en columna abierta se efectuó en columnas de vidrio de 60 mm de diámetro, se utilizó silica gel g60 F254 y como disolventes hexano, acetato de etilo y metanol en diferentes polaridades.

3.2.2. Cromatografía de capa fina:

La cromatografía en capa fina se realizó en placas de silica gel g60 F254, para luego ser colocados en una cámara de elución compuesta de disolventes en distintas polaridades de acuerdo a como se observe el corrido de la placa en distintas proporciones, se observó en lámpara UV y se utilizó sulfato cérico como revelador.

3.2.3. Purificación por recristalización:

Una vez que se seleccionaron las fracciones con un perfil similar estas se procedieron a purificar por el método de par de disolventes, el cual consiste en: a la fracción agregarle un disolvente en la cual sea muy soluble, luego calentarla hasta ebullición (no olvidar usar cuerpos porosos para controlar la ebullición), una vez que la muestra debe tener apariencia chiclosa se agrega gota a gota el disolvente en el cual la fracción es insoluble con la ayuda de una espátula raspar las paredes del vial con lo que se deben generar núcleos de cristalización, la solución saturada resultante se deja enfriar a temperatura ambiente, una vez formados los cristales, se separan las aguas madres por filtración al vacío.

3.2.4. Punto de fusión:

Se tomó una pequeña cantidad de cristales en el equipo de Fisher Johns, los valores no fueron corregidos.

3.2.5. Resonancia magnética nuclear:

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica RMN ^1H y de carbono RMN ^{13}C se adquirieron en 400 MHz y 100 MHz. Respectivamente en un equipo Varian 400 ASC. Para disolver las muestras se utilizó CDCl_3 , los desplazamientos químicos están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se informó en Hz, se uso TMS como estándar interno.

3.2.6. Espectroscopía de Masas:

Los espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) acoplado a espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5973 inert) con una columna cromatografica BSNS.

3.2.7. Espectrometría de Infrarrojo:

Las muestras fueron analizadas en el espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier-IR marca Perkin Elmer modelo spectrum two, el cual consta con un accesorio Miracle Single Reflection ATR, esto se realizó en la ciudad de Quito en Proinstra S.A.

3.3. Aislamiento de las argentatinas A y B:

50 gramos de resina de *P. argentatum*, se disolvieron en hexano y se percolaron a través de una columna usando como fase estacionaria 450 gr. de gel de sílice g60 F254 (0.015-0.040 mm) de la marca Merck, la cual fue posteriormente eluida con disolventes de polaridad ascendente hexano, acetato de etilo y metanol.

La caracterización de los dos triterpenos se efectuó por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura (Komoroski et al., 1986) (Rodriguez et al., 1970).

3.4. Purificación de Argentatina B mediante cromatografía de columna abierta

Se tomaron 5 gramos de Argentatina B, se disolvieron en diclorometano y se percolaron a través de una columna usando como fase estacionaria 43 gramos de gel de sílice g60 F254 (0.015-0.040 mm) de la marca Merck, la cual fue posteriormente eluida con disolventes de polaridad ascendente hexano, acetato de etilo y metanol, en diferentes proporciones.

3.5. Caracterización de argentatinas A y B.

La caracterización de los dos triterpenos se efectuó por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura (Komoroski et al., 1986)(Rodriguez et al., 1970).

3.6. Transformaciones químicas de la Argentatina B.

A partir de la argentatina B se obtuvieron 5 derivados:

2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**3**),

3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**4**),

25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**5**),

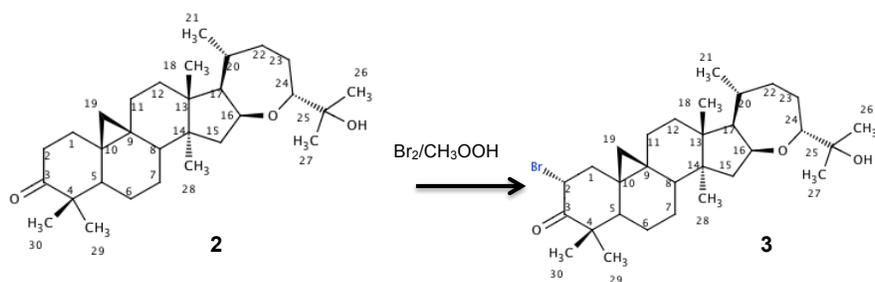
25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (**6**)

(16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona, (**7**)

3.6.1. Preparación de la 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (3**)**

Para la obtención del derivado **3** (como se puede ver en la figura 3), se disolvieron 100.4 mg de argentatina B (0.439 mmol) en 5 ml de ácido acético glacial y se hicieron reaccionar con 0.44 ml de una disolución 1M de bromo en ácido acético glacial.

Figura 3. Obtención de la 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona **3**



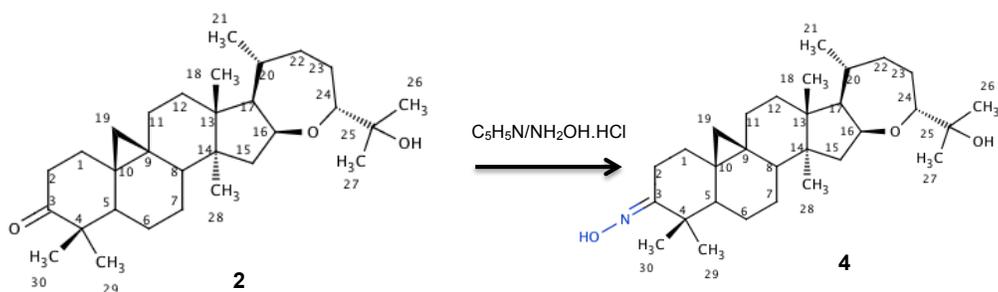
Fuente: Autora

La reacción se llevó a cabo en agitación a 5 °C, después de 75 minutos la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlemmeyer que contenía 35 gramos de hielo, el precipitado formado se filtró y lavó con solución al 10% de NaHCO₃, se disolvió en AcOEt, se secó sobre Na₂SO₄, se rotaevaporó y se cristalizó con Hex/AcOEt.

3.6.2. Preparación de la 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**4**)

En la obtención del derivado **4** (ver figura 4), se disolvieron 400 mg de argemantina B (0.22 mmol) en 1.5 ml de piridina y se hicieron reaccionar con 0.28 mg de clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH-HCl) (0.40 mmol),

Figura 4. Obtención de la 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona **4**



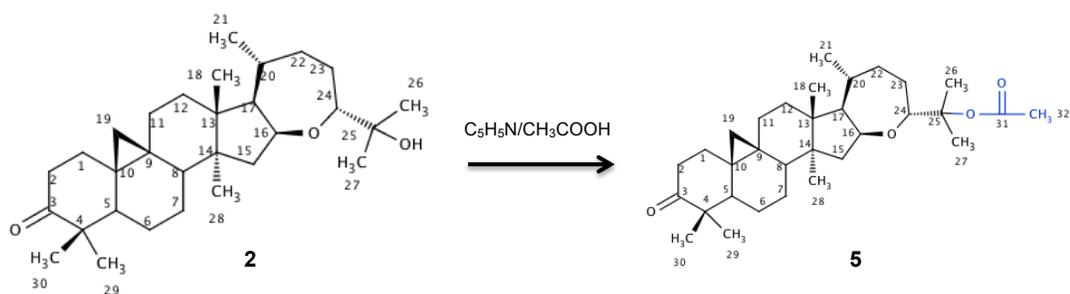
Fuente: Autora

La reacción se llevó a cabo en agitación a temperatura de reflujo por 1 hora, luego la mezcla de reacción se vertió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 gramos de hielo. El precipitado formado se filtró y posteriormente se disolvió en AcOEt, se lavó con HCl al 10% y agua, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se rotaevaporó y se cristalizó con Hex/AcOEt.

3.6.3. Preparación de la 25-O-acetil-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (5)

Para la obtención del derivado **5** como se puede (ver figura 5), se realizó una mezcla de 100 mg de argentatina B, 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético.

Figura 5. Obtención de 25-O-acetil-(16β, 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona **5**



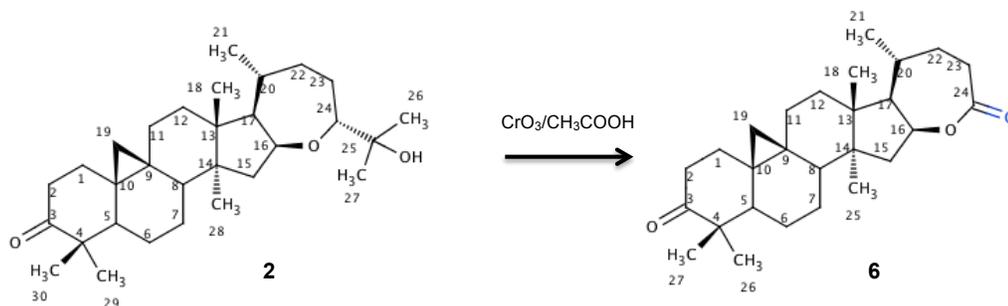
Fuente: Autora

Se calentó a temperatura de reflujo por 5 horas, posteriormente se vertió sobre un matraz erlenmeyer que contenía 50 g de hielo y se agitó por 15 minutos, El precipitado formado se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se evaporó a presión reducida y el producto obtenido se recrystalizó con Hex/AcOEt .

3.6.4. Preparación de (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona (6).

Para la obtención del derivado **6** (ver figura 6), se disolvieron 400 mg de argentatina B en 5 ml de ácido acético glacial, se adicionó gota a gota una solución acuosa de CrO₃ (0.131 mg de CrO₃ en 0.3 ml de agua) con agitación constante a una temperatura entre 3 y 6 °C. Se mantuvo a esta temperatura por 15 minutos más, y 3 horas a temperatura ambiente.

Figura 6. Obtención de (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona **6**



Fuente: Autora

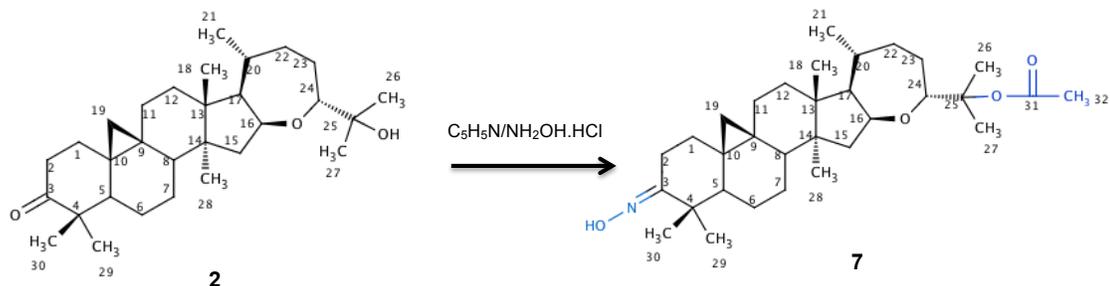
Se adicionó agua con lo que se formó un precipitado que se disolvió en AcOEt, la fase orgánica se lavó con una solución al 10% de NaHCO_3 , se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtro y evaporó.

Para purificar el compuesto se utilizó una microcolumna en proporción 1:20, con 262 mg del derivado **6** y 500 mg de la fase estacionaria silica gel g60 F254 marca Merck, la cual fue posteriormente eluida con mezclas de disolventes de polaridad ascendente empezando por Hex y terminando con AcOEt.

3.6.5. Preparación de 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**7**).

En la obtención del derivado **7** (ver figura 7), se tomaron 128 mg de 25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**5**), disueltos en 1.5 ml piridina, se hicieron reaccionar con 37 mg de clorhidrato de hidroxilamina a temperatura de reflujo por 1.5 horas.

Figura 7. Obtención de 25-O-acetil-3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona **7**.



Fuente: Autora

Luego la mezcla de reacción se vertió en un matr az erlenmeyer que contenía 50 gramos de hielo. El precipitado formado se filtró y se lavó con HCl al 10% y agua, luego se colocó en la cámara de secado a vacío para que se evapore el agua. Para purificar el compuesto se utilizó una microcolumna, en una proporción 1:20, con 112 gr del derivado y 390 mg de la fase estacionaria silica gel g60 F254 la marca Merck, la cual fue posteriormente eluida con mezcla de disolventes de polaridad ascendente empezando por Hex y terminando con AcOEt.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento de las Argentatinas A y B.

A partir de la resina, subproducto del proceso de industrialización de la especie *P. argentatum*. De las fracciones eluidas con una mezcla 90:10 de Hex:AcOEt se obtuvieron 3.6 gramos de argentatina B ((16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona) con un rendimiento de 8,3%. Ver espectros 1, 2, 3, 4 y 5. Las constantes físicas son las siguientes:

Formula Molecular: $C_{30}H_{48}O_3$

Punto de fusión: 158-162 °C

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt 60:40 se aislaron 6,72 gramos de argentatina A ((16S, 17R, 20S, 24R)-20-24-epoxi-16,25-dihidroxi-cicloartan-3-ona) con un rendimiento del 6.09%.

Formula Molecular: $C_{30}H_{48}O_4$

Punto de fusión: 173-177 °C

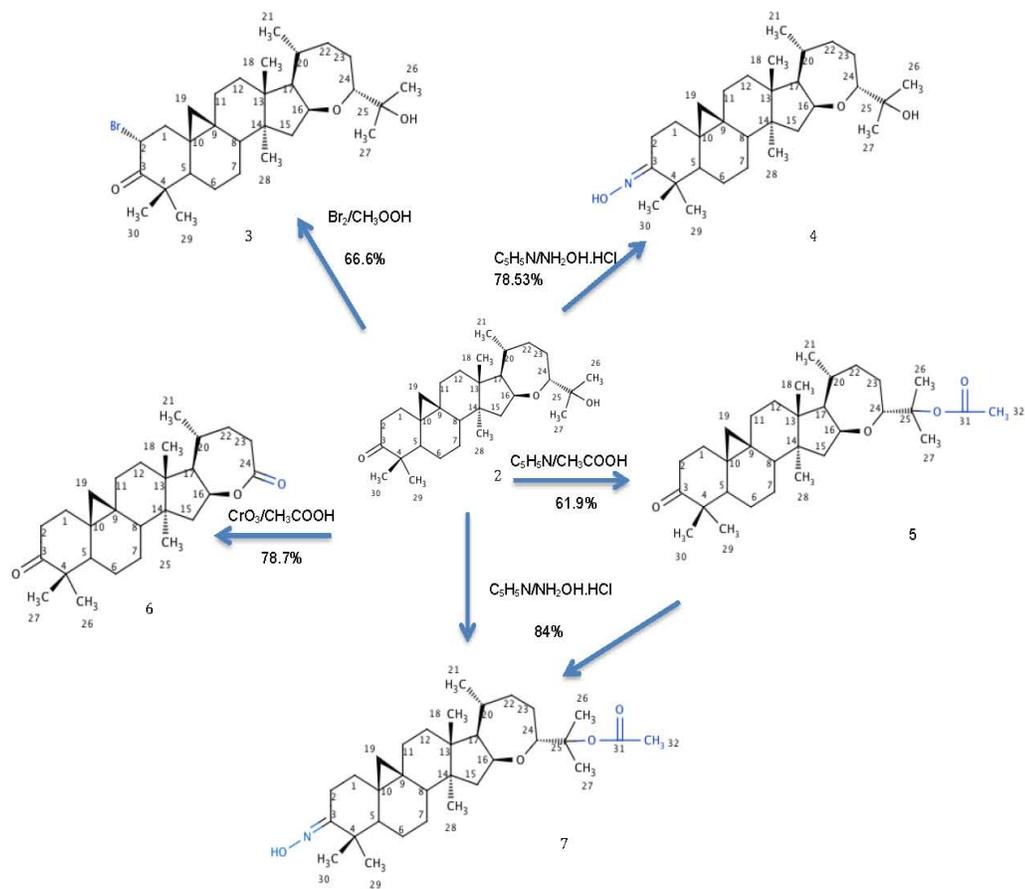
4.2. Caracterización de las argentatinas A y B

La caracterización de los dos triterpenos se efectuó por medio de la comparación de los datos espectroscópicos previamente informados en la literatura (Komoroski et al., 1986) (Rodriguez et al., 1970).

4.3. Transformaciones químicas de la argentatina B

A partir de la argentatina B (**2**), se obtuvieron 5 derivados por medio de reacciones químicas. En la figura 8 se muestra un esquema de las reacciones con los reactivos utilizados y los rendimientos obtenidos

Figura 8. Transformaciones químicas de la argentatina B **2**. Condiciones de reacción y rendimiento



Fuente: Autora

4.3.1. Obtención de la 2 α -Bromo-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (**3**)

La reacción de la argentatina B con bromo en ácido acético generó el bromo derivado con 66.6% de rendimiento. Se obtuvo 74 mg, con p. f. 198-200 °C.

La identidad del derivado se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos:

IR (CHCl₃) ν_{\max}^{-1} cm⁻¹: 3538.93 (O-H), 2977.18 - 2874.74 (C-H), 1720.5 (C=O), 1464.44, 1384.73.
EM-IE m/z (%): 534 (M⁺, 4), 519 (M⁺ -15, 2.7), 476 (M⁺ -58, 26), 475 (M⁺ -59, 47.9), 175 (100), 143 (37.63), 85 (10.36), 67 (22.7). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.71 (d, J=3.52 Hz, 1 H, H-19) 0.88 (s, 3H, CH₃) 0.94 (d, J=6.26 Hz, 3H, CH₃-21) 1.09 (s, 6 H, 2CH₃) 1.15 (s, 9 H, 3CH₃) 3.59 (d, J=12.91 Hz, 1 H, H-24) 4.60 (c,1H, H-16) 5.10 (dd, J=12.91, 6.26 Hz, 1 H, H-2 β).
RMN ¹³C (100 MHz) δ ppm: 32.74 (s, 1 C, C-1), 46.10 (s, 1 C, C-2), 206.00 (s, 1 C, C-3), 55.25 (s, 1 C, C-4), 48.85 (s, 1 C, C-5), 21.22 (s, 1 C, C-6), 19.76 (s, 1 C, C-7), 47.27 (s, 1 C, C-8), 21.13 (s, 1 C, C-9), 26.69 (s, 1 C, C-10), 25.99 (s, 1 C, C-11), 35.71 (s, 1 C, C-12), 45.06 (s, 1 C, C-13), 46.37 (s, 1 C, C-14), 46.00 (s, 1 C, C-15), 75.06 (s, 1 C, C-16), 57.62 (s, 1 C, C-17), 18.95 (s, 1 C, C-18), 29.23 (s, 1 C, C-19), 29.23 (s, 1 C, C-20), 21.51 (s, 1 C, C-21), 29.59 (s, 1 C, C-22), 23.72 (s, 1 C, C-23), 82.85 (s, 1 C, C-24), 51.64 (s, 1 C, C-25), 23.35 (s, 1 C, C-26), 25.97 (s, 1 C, C-27), 21.59 (s, 1 C, C-28) 24.22 (s, 1 C, C-29), 28.02 (s, 1 C, C-30). Ver espectros 6, 7, 8 y 9.

En el espectro de masas de dicho derivado se observó un pico con m/z 534 que corresponde al ión molecular para la fórmula calculada C₃₀H₄₇BrO₃. En el espectro de RMN ¹H se observó la presencia de una señal doble de dobles a 5.10 ppm que correspondía al H-2, el cual es el que posee el átomo de Bromo. Las constantes de acoplamiento de 6.26 y 12.91 Hz de tal señal típicas de interacciones espín-espín de protones vecinales en conformación sinclinal y antiperiplanar respectivamente, con lo que fue posible inferir que el H-2 se encontraba en posición β -axial y el átomo de bromo en α -ecuatorial.

Estudios cinéticos indican un mecanismo consistente en ataque por parte del bromo molecular, se observa que la apertura del ión bromonio se produce por el lado opuesto al bromo positivo que es el grupo saliente, esto hace que los halógenos queden anti en el producto final (Breslow, 2003).

4.3.2. Obtención de la 3-oxima-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (4)

La oxima se obtuvo por medio de la reacción de **2** con clorhidrato de hidroxilamina. Con un rendimiento de 78.53. Se obtuvo 326 mg con p.f. 215-217 °C.

La identidad del derivado se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos:

IR (KBr) cm^{-1} : 3498, 3386 (O-H), 2958, 2927 (C-H) 1737, 1460, 1378, 1115, 1058, 929. EM-IE m/z (%): 471 (M^+ , 78), 454 (65), 413 (M^+ -58, 40), 412 (90), 396 (50), 107 (48), 59 (100). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.50 (d, $J=4.4$, H-19 1H, H-19), 0.73 (d, $J=4.4$, 1H, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH_3), 0.94 (d, $J=6.3$, 3H, CH_3 -21), 1.08 (s, 6H, 2CH_3), 1.10 (s, 3H, CH_3), 3.36 (m, 1H), 3.59 (dd, $J=1.7$, $J=12.4$, 1H, H-24), 4.59 (m, 1H, H-16). RMN ^{13}C (100 MHz) δ ppm: 32.32 (C-1), 35.1 (C-2), 168.1 (C-3), 45.5 (C-4), 48.3 (C-5), 21.3 (C-6), 25.9 (C-7), 46.8 (C-8), 20.8 (C-9), 25.7 (C-10), 28.6 (C-11), 32.39 (C-12), 44.7 (C-13), 42.5 (C-14), 45.5 (C-15), 74.5 (C-16), 57.0 (C-17), 18.3 (C-18), 29.1 (C-19), 28.96 (C-20), 20.6 (C-21), 35.1 (C-22), 23.5 (C-23), 82.3 (C-24), 72.9 (C-25), 23.6 (C-26), 25.7 (C-27), 19.1 (C-28), 21.3 (C-29), 20.6 (C-30) Ver espectros 10,11, 12 y 13.

El espectro de masas, muestra un pico de m/z 471 que corresponde al ión molecular del derivado. En el espectro de RMN ^{13}C se observa, entre otras, una señal en 168.1 ppm correspondiente al carbono C=N. La formación de la oxima se da en un proceso que ocurre en dos pasos, primero se produce la adición al carbonilo, que es seguida por la deshidratación. La adición requiere hidroxilamina libre, y en el medio fuertemente ácido la hidroxilamina está en su mayor parte protonizada, de manera que la concentración de hidroxilamina libre resulta muy pequeña, la deshidratación es catalizada por un ácido; es por esto que la preparación de oximas y de otros derivados carbonílicos se realiza frecuentemente empleando como catalizador el ácido acético, que produce un pH óptimo para que se dé la reacción (Breslow, 2003).

4.3.3. Obtención de la 25-O-acetil-(16 β , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona (5)

A partir de la argentatina B (2) empleando piridina y anhídrido acético se sintetizó el derivado acetilado con un rendimiento del 61.9%. Se obtuvo 68 mg con p.f. 128-130 °C.

La identidad del derivado se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos :

IR (KBr) cm^{-1} : 2944, 2872, 1734 (C=O), 1707 (C=O), 1464, 1370, 1254, 1115. p. f. 164 °C. IR

(KBr) $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 2944.8, 2872.1, 1734.3 (C=O), 1707.6 (C=O), 1464, EM-IE m/z,(%): 498 (1.5), 440, 438, 397 (100), 143, 85. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.57 (d, $J=4.40$ Hz, 1 H, H-19) 0.81 (d, $J=4.40$ Hz, 1 H, H-19) 0.89 (s, 3 H, CH_3) 0.94 (d, 1 H, CH_3 -21) 1.05 (s, 3 H, CH_3) 1.10 (s, 3 H, CH_3) 1.17 (s, 3 H, CH_3) 1.39 (s, 3 H, CH_3) 1.44 (s, 3 H, CH_3) 1.97 (s, 3 H, CH_3) 2.26 - 2.34 (m, 1 H) 2.71 (td, $J=13.82, 6.36$ Hz, 1 H) 3.82 (dd, $J=12.59, 2.32$ Hz, 1 H, H-24) 4.58 - 4.70 (m, 1 H, H-16) Ver espectros 14, 15 y 16.

El espectro de masas, muestra un pico de m/z 498 que corresponde al ión molecular del derivado. Se observa la presencia de una señal (singulete) en RMN ^1H a 1.97 ppm típica de los hidrógenos de un metilo de un grupo acetato (Romo et al., 1990). Se conoce que en reacciones de acetilación hay la adición de un grupo acetilo en el compuesto químico, este proceso de transferencia del grupo acetilo a un compuesto, debe implicar la sustitución del grupo acetilo por un átomo de hidrógeno, la sustitución de dicho átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo con un grupo acetilo (CH_3CO) genera el éster específico (Breslow, 2003).

4.3.4. Obtención de la (16S,17R,20S)-3-oxo-25-nor-cicloartan-16,24 lactona (6)

A partir de argentatina B (2) se obtuvo el derivado lactona con un rendimiento de 78.7% (262 mg). Se utilizó una microcolumna para la purificación, de las fracciones eluidas en 75:35 hexano/acetato de etilo se obtuvieron 20 mg del derivado 6.

La identidad del derivado se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos :

IR (CHCl_3) $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 2964, 1730 (C=O), 1701 (C=O), 1461, 1383, 1325, 1269. EM-IE m/z (%): 412 (45), 398 (20), 397 (70), 311 (45), 274 (100), 259 (43), 133 (55), 121 (47), 119 (45), 105 (48), 93 (47), 91 (46), 55 (60), 41 (45). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.62 (d, $J= 4.4$, 1H, H-19), 0.86 (d, $J= 4.4$, 1H, H-19'), 0.96 (s, 3H, CH_3), 1.00 (d, $J= 5.5$, 3H, CH_3 -21), 1.07 (s, 3H, CH_3), 1.55 (s, 12H), 1.12 (s, 3H, CH_3), 1.19 (s, 3H, CH_3), 4.8 (c, 1H, H-16). RMN ^{13}C (100 MHz) δ ppm: 33.5 (C-1), 37.5 (C-2), 216.4 (C-3), 50.3 (C-4), 48.5 (C-5), 21.4 (C-6), 26.1 (C-7), 47.5 (C-8), 20.8 (C-9), 26.1 (C-10), 26.3 (C-11), 32.6 (C-12), 46.6 (C-13), 45.9 (C-14), 44.2 (C-15), 81.1 (C-16), 56.4 (C-17), 19.2 (C-18), 29.9 (C-19), 29.3 (C-20), 20.3 (C-21), 31.4 (C-22), 29.3

(C-23), 174.3 (C-24), 19.2 (C-25), 22.3 (C-26), 20.9 (C-27) Ver espectro 17, 18, 19 y 20.

El espectro de masas mostró un pico de m/z 412, que corresponde al ión molecular de dicho derivado. En el espectro de RMN ^1H se observó la pérdida de las señales de hidrógenos de dos grupos metilo. En el espectro de RMN ^{13}C se observó también la pérdida de tres átomos de carbono y el desplazamiento del C-24 a campo bajo (con respecto a la argentatina B) 174.3 ppm.

4.3.5. Obtención de la 25-O-acetil-3-oxima-(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan -3-ona (7)

La formación del derivado **7** se lo realizó a partir del derivado **5** con tratamiento en anhídrido acético y piridina y clorhidrato de hidroxilamina, con un rendimiento de 84%. Se obtuvieron 112 mg., p. f. 181-183 °C. De las fracciones eluidas en 85:25 hexano/acetato se obtuvieron 22 mg del derivado.

La identidad del derivado se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos :

EM-IE m/z (%): 513 M^+ , (16), 454 (56.7), 497 (55.6), 496 (44.6), 453 (56.6), 436 (100), 412 (18.7), 396 (19.8), 109 (13.6), 59 (6). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.52 (d, $J=4.3$, 1H, H-19), 0.74 (d, $J=4.3$, 1H, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH_3), 0.93 (d, $J=6.6$, 3H, CH_3 -21), 1.15 (s, 3H, CH_3), 1.19 (s, 3H, CH_3), 1.40 (s, 3H, CH_3), 1.44 (s, 3H, CH_3), 1.96 (s, 3H, CH_3 del grupo acetato), 3.36 (dc, 1H), 3.81 (dd, $J=2.3$, $J=12.5$, 1H, H-24), 4.60 (c, 1H, H-16). RMN ^{13}C (100 MHz) δ ppm: 32.5 (C-1), 19.4 (C-2), 170.26 (C-3), 43.5 (C-4), 48.8 (C-5), 21.15 (C-6), 25.7 (C-7), 47.0 (C-8), 21.06 (C-9), 26.0 (C-10), 26.1 (C-11), 32.5 (C-12), 45.5 (C-13), 45.6 (C-14), 44.7 (C-15), 77.7 (C-16), 57.1 (C-17), 18.7 (C-18), 29.5 (C-19), 28.9 (C-20), 21.7 (C-21), 35.2 (C-22), 22.3 (C-23), 84.96 (C-24), 84.98 (C-25), 22.5 (C-26), 23.2 (C-27), 19.5 (C-28), 21.7 (C-29), 21.3 (C-30), 170.2 y 22.5 (C=O y metilo del grupo acetato) Ver espectros 21, 22 y 23.

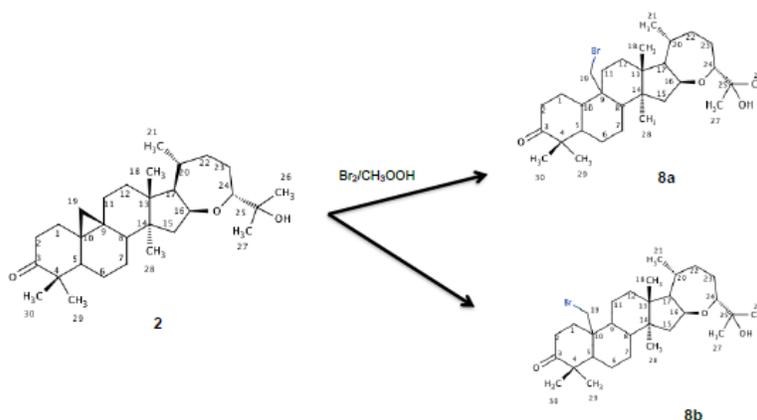
En el espectro de masas, se observó la presencia de un pico de m/z 513 que corresponde al ión molecular esperado para el derivado. En el espectro de RMN ^{13}C se observa el desplazamiento

a campo alto (con respecto a **2**), de la señal asociada al C-3, debido a la pérdida del carbonilo y la generación del enlace C=N.

4.3.6. Obtención de derivado bromado con apertura del ciclopropano

Cuando se efectuó la reacción de obtención del derivado bromado se generó un compuesto no esperado (ver figura 9).

Figura 9. Obtención de derivado bromado con apertura cicloartano (**8a**, **8b**)



Fuente: Autora

La identidad del derivado se determinó por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos:

La obtención de este derivado se debió a la falta de control en la temperatura al momento de realizar la reacción para obtener el derivado α bromado, al no realizarla en frío se produjo la reacción típica de apertura del ciclopropano por la alta reactividad de sus H, formándose dos isómeros en distintas proporciones uno con 80% y el otro con 20%, la estructura de este derivado se la determinó utilizando RNM de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas. Como se puede ver en el espectro No. 24, existen dos señales una a 3.18 ppm y otra a 3.6 ppm que corresponden a los dos hidrógenos del ciclopropano abierto.

EM-IE m/z (%): 537 (M^+ , 4), 519 (M^+ -15, 2.7), 476 (M^+ -58, 26), 475 (M^+ -59, 47.9), 175 (100), 143 (15.6), 85 (95.2), 59 (76.02). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 0.90 (d, $J=0.78$ Hz, 1 H) , 0.95 (d, $J=6.26$ Hz, 3H, CH_3 -21) 1.09 (s, 6H, $2CH_3$) 1.18 (s, 9 H, $3CH_3$), 1.24 (s, 3H, CH_3), 1.47 (s, 3H, CH_3), 2.78 (d, $J=15.26$ Hz, 1 H, CH_3) 3.18 (d, $J=15.65$ Hz, 1 H, CH_3) 3.60 (d, $J=12.91$ Hz, 1 H, H-24) 4.60 (c, 1 H, H-16). RMN ^{13}C (100 MHz) δ ppm: 32.4 (s, 1 C, C-1) , 45.83 (s, 1 C, C-2), 201.4 (s, 1 C, C-3), 55.6 (s, 1 C, C-4), 35.39 (s, 1 C, C-5), 20.91 (s, 1 C, C-6), 19.59 (s, 1 C, C-7), 47.53 (s, 1 C, C-8) , 21.68 (s, 1 C, C-9), 26.35 (s, 1 C, C-10), 25.75 (s, 1 C, C-11), 35.39 (s, 1 C, C-12), 44.91 (s, 1 C- C13), 50.95 (s, 1 C, C-14), 45.65(s, 1 C, C-15), 74.77 (s, 1 C, C-16), 57.43 (s, 1 C, C-17), 18.88 (s, 1 C, C-18), 25.45(s, 1 C, C-19), 29.89 (s, 1 C, C-20), 21.68 (s, 1 C, C-21), 28.92(s, 1 C, C-22), 23.72 (s, 1 C, C-23), 82.85 (s, 1 C, C-24), 51.64 (s, 1 C, C-25), 23.42 (s, 1 C, C-26), 25.75 (s, 1 C, C-27), 21.68 (s, 1 C, C-28) 25.29 (s, 1 C, C-29), 28.9 (s, 1 C, C-30) Ver espectros 24, 25 y 26.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron cinco derivados a partir de la Argentatina B (**2**): el derivado bromado **3** con un rendimiento de 66.6%, el derivado oxima **4** con un rendimiento de 78.53%, el derivado acetilado **5** con 61.9% de rendimiento, el derivado lactona **6** con 78.7% y el derivado oxima acetilado **7** con un rendimiento de 84%.

El sexto derivado **8** se obtuvo por falta de control en la temperatura al momento de realizar la reacción.

RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de compuestos sobre los cuales se pueda realizar transformaciones químicas para buscar compuestos más activos y menos tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

Ansan, Ch., Khan, A. & Gooderham, N. (2004). In vitro gentoxicity of the West anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. Elsevier; Toxicology.

Anwarul, H. & Ayya, R. (2005). Trends in ethnopharmacology. Perspective paper, 100, 43-49

Argumedo-Delira, R., Parra-Delgado, H., Ramirez-Apan, T., Nieto-Camacho, A. & Martinez-Vazquez M. (2003) Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Bcnth. Revista de la Sociedad Quimica de Mexico. 47,167-172

Armas, J. (2008). Obtención y evaluación de las propiedades citotóxicas, antiinflamatorias y su capacidad de inhibir la óxido nítrico sintasa inducible de los derivados acilados de las argentatinas A, B y la 7-O- β -D-glucosil-acetina. Tesis obtención de grado químico farmacéutico biólogo. Facultad de estudios superiores. Zaragoza.

Ávalos, A. & Pérez, E. (2009). Metabolismo Secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Madrid. 3, 119-145

Balunas, M., Jones, W., Chin, Y., Mi, Q., Farnsworth, N., Soejarto, D., Cordell, G., Swanson, S., Pezzuto, J., Chai, H. & Kinghorn, D. (2006). Relationships between Inhibitory Activity against a Cancer Cell Line Panel, Profiles of Plantas Collected, and Compound Classes isolated in an Anticancer Drug Discovery Project. Chemistry and Biodiversity. 3, 897-915.

Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Segunda ed. Editorial Acribia. Zaragoza-España.

Calixto, J., Otuki, M. & Santos, A. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway nitric oxide and nuclear factor κ B(NF- κ B). Planta medica. 69, 973-983.

Calzada, L. Salazar, E. Tellez, J. Martinez, M. Matinez, R. (1995). Med.Sci.Res. 23, 815-816

Céspedes, C. Martínez, M. Calderón, J. Salazar, J. Aranda, E. (2001). Zeitschrift Fur Naturforschung. 56, 95-105

Choi, C., You, I. & Jeong, H. (2001) Nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by oleanolic acid via nuclear factor- κ B activation in macrophages. Biochemistry Biophysics Research Communications, 288, 49-55.

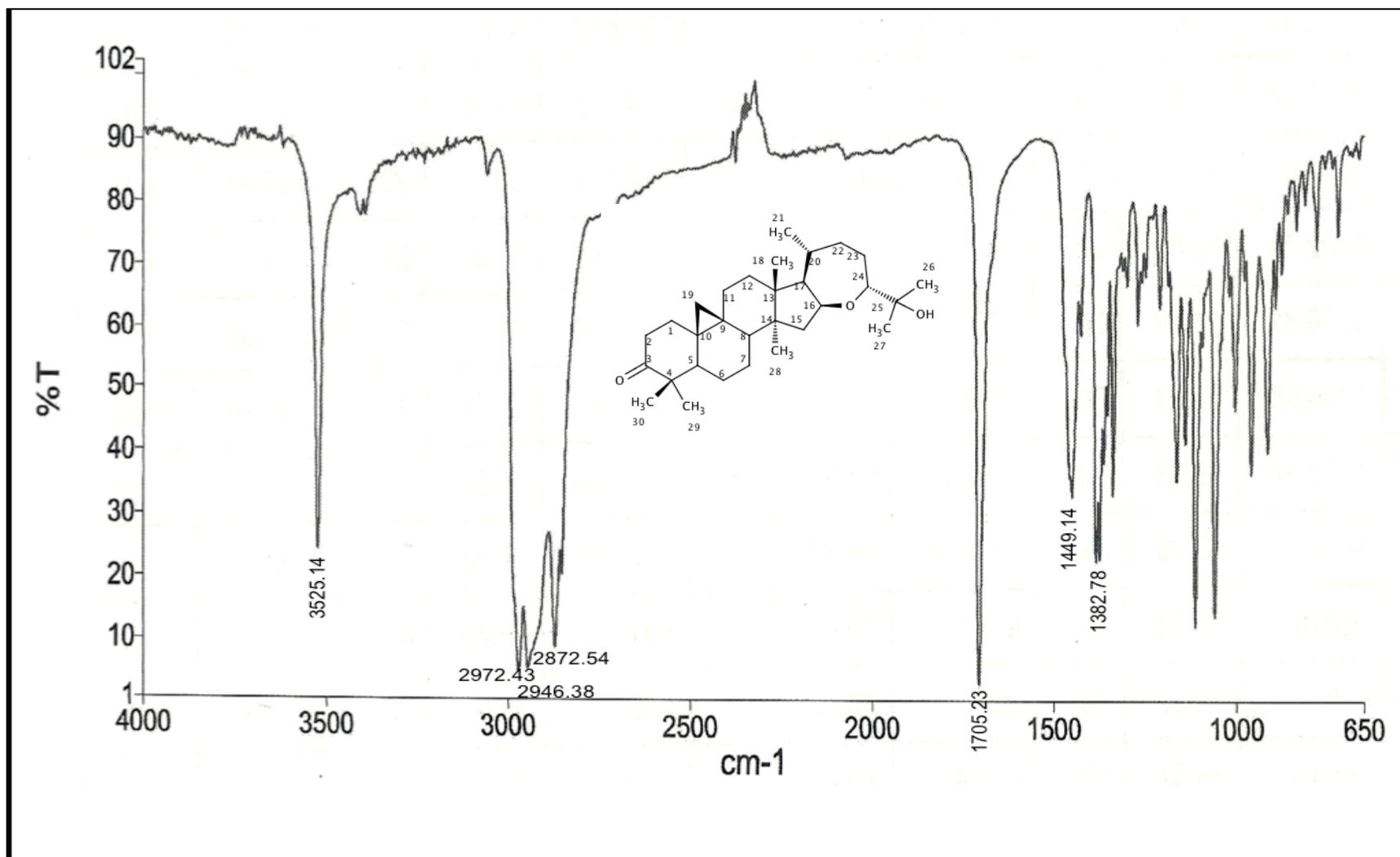
Cichewitz, R. & Kouzi, S. (2004) Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infections. Medicinal Research Reviews. 24, 90-114

Connelly, L., Palacios, M., Amexia, C., Moncada, S. & Hobbs, A. (2005). Biphasic regulation of Nf- κ B activity underlies the pro-and antiinflammatory actions of notric oxide. Journal of

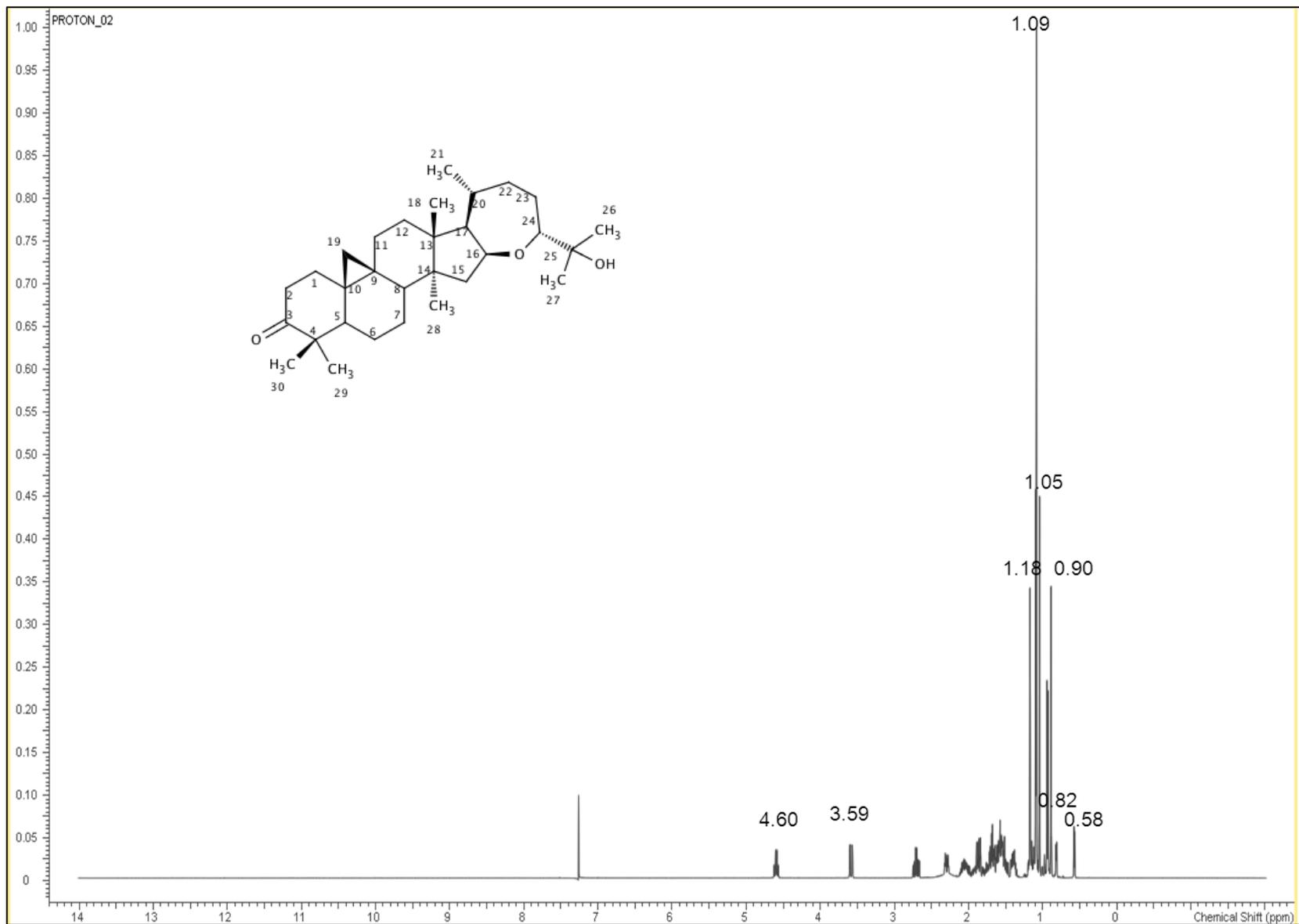
Croteau, R., Kutchan, N. & Lewis, G. (2000). "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Buchanan, Grussem, Jones (editors). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Estados Unidos

- Harvey, A. (2008). Drug discovery today. 13,894-901
- Hernández, A., Madrigal, E. & De la Cruz, C. (2002). Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicology Letters*. 135, 103-110.
- Komoroski, R., Gregg, E., Shockocor, J. & Geckle, J. (1986). *Magn. Res. Chem*, 24, 534
- Konoshima, T., Takasaki, M. (2000). Anti-tumor-promoting activities (cancer chemopreventive activities) of natural products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24, 215–267.
- Liby, K., Yore, M. & Sporn, M. (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 337-366.
- Newman, O., Cragg, G. & Kingston, D. (2003) Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth CG. (Ed), Elsevier, 91-109
- Parra, H., García, F., Sordo, M., Ramírez, T., Martínez, M. & Ostrosky, P. (2005). Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatina A and Argentatina B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences* 77, 2844-2865.
- Patocka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, 1, 7-12
- Rao, C. & Raddy, B. (2004). NSAIDs and chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*. 4, 29-42
- Rodriguez-Hahn, L., Romo, A., Ortega, A., Aguilar, M. & Romo, J. (1970). *Rev., Latinoamer. Quím.* 1, 24–38
- Romo, A., Martínez-Vasquez, M., Matsubara, C., Pérez-Sánchez, G. & Nathan, J. (1990). "Triterpenes in *Parthenium Argentatum*, structures of Argentatins C and D. 29, 915-918.
- Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, K., Kaarniranta, K. & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 2979-2999
- Sánchez-Lamar, A., Cápiro, N. & Fonseca, G. (1998). Evaluación in vitro e in vivo de las propiedades genotóxicas de la especie endémica *Phyllanthus orbicularis* Hbk. *Rev. Cubana Invest Biomed*, 18(1),16-8.
- Setzer, W., Setzer, M., Bates, R. & Jackes B.J. (2000). Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from Paluma, North Queensland, Australia. *Planta Medica*. 66, 176-177
- Subbaramaiah, K., Michaluart, P., Sporn, M. & Dannenberg, A. (2000) Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 60, 2399-2404

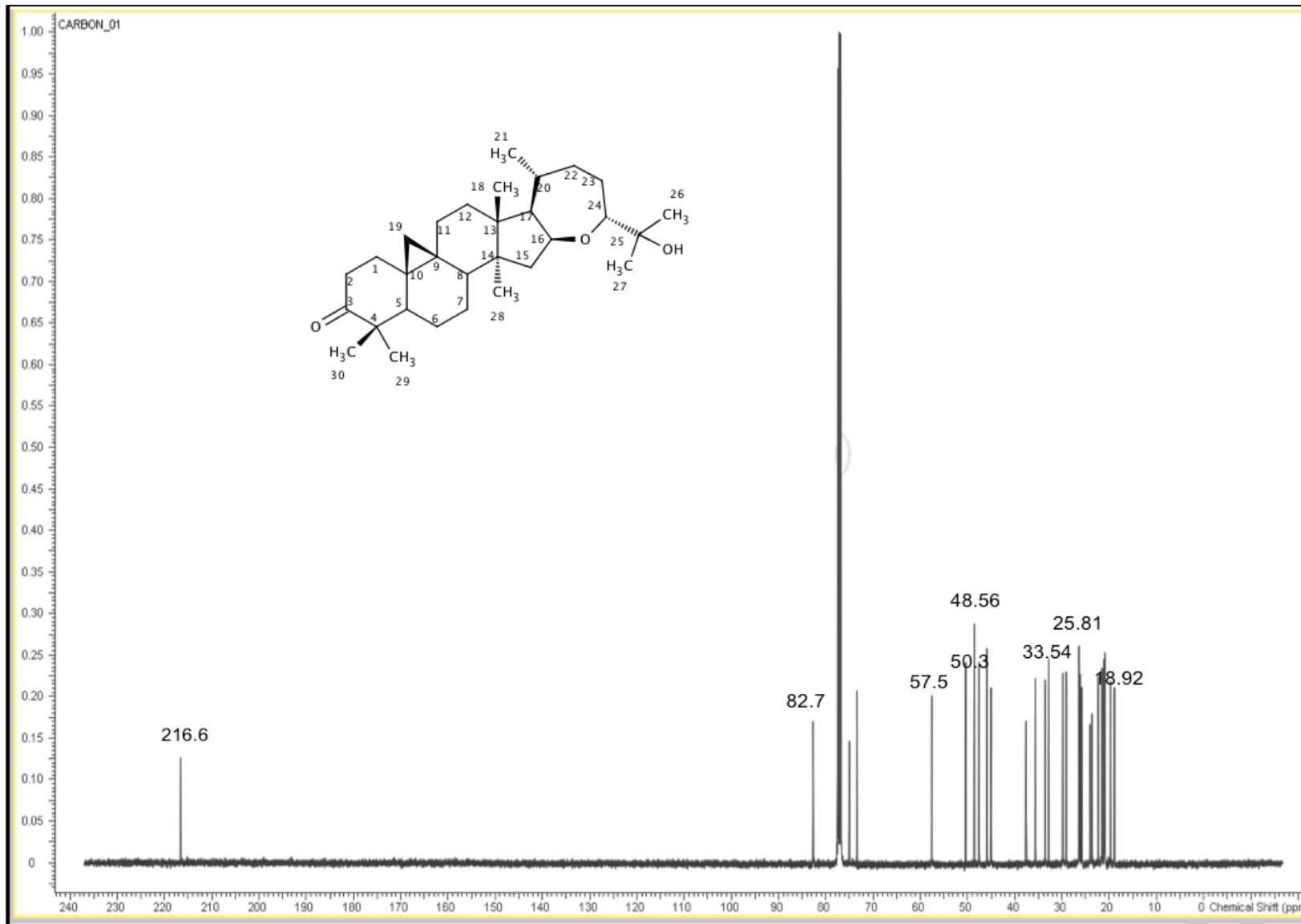
ANEXOS



Espectro N°1: Espectro de IR de Argentatina B (2) (C₃₀H₄₈O₃)



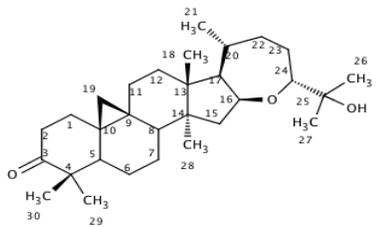
Espectro N°2: Espectro de RMN ¹H de Argentinina B (2) (C₃₀H₄₈O₃)



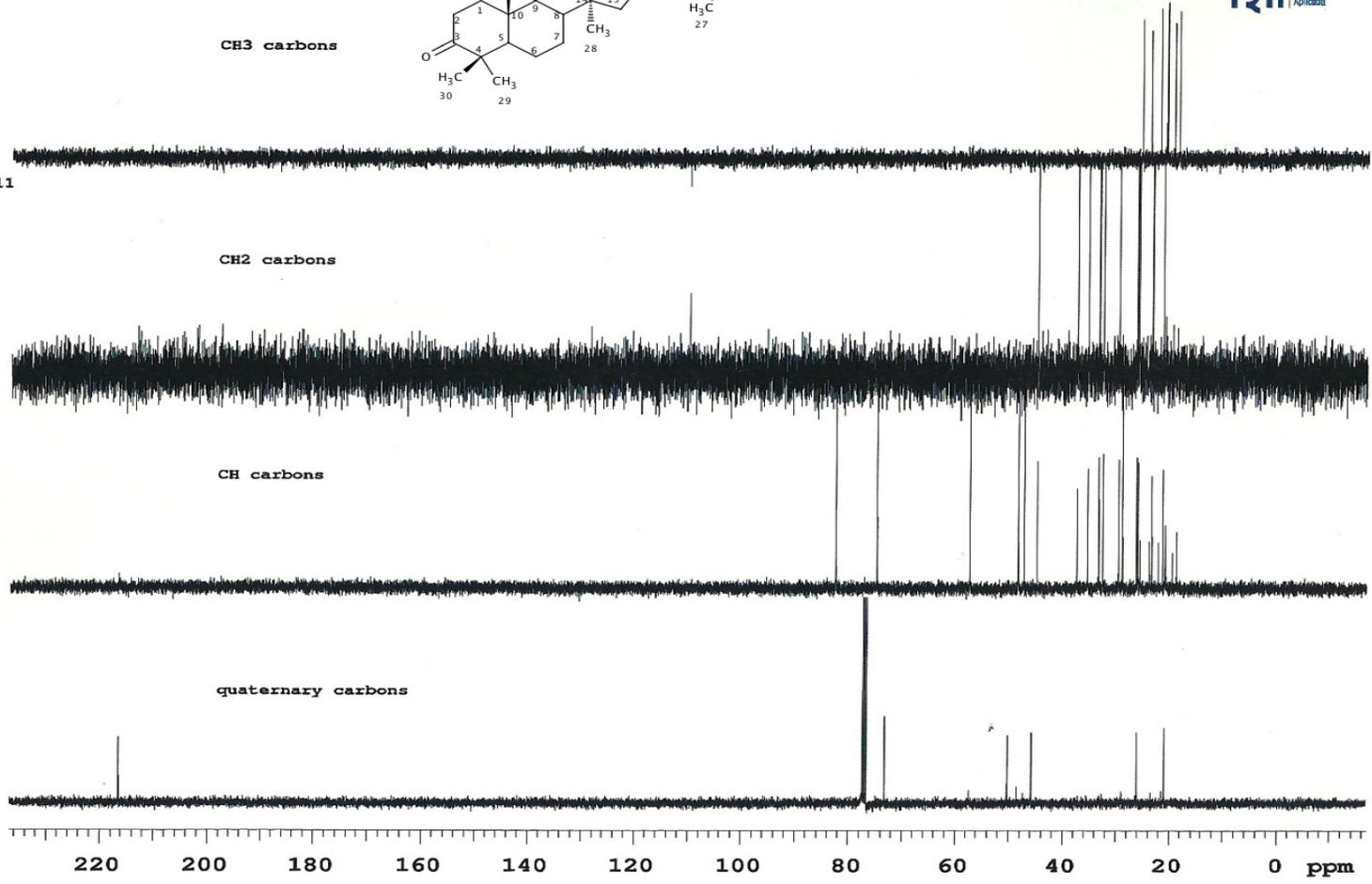
Espectro N°3: Espectro de RMN ¹³C de Argentinina B (2) (C₃₀H₄₈O₃)

STANDARD 1H OBSERVE - profile

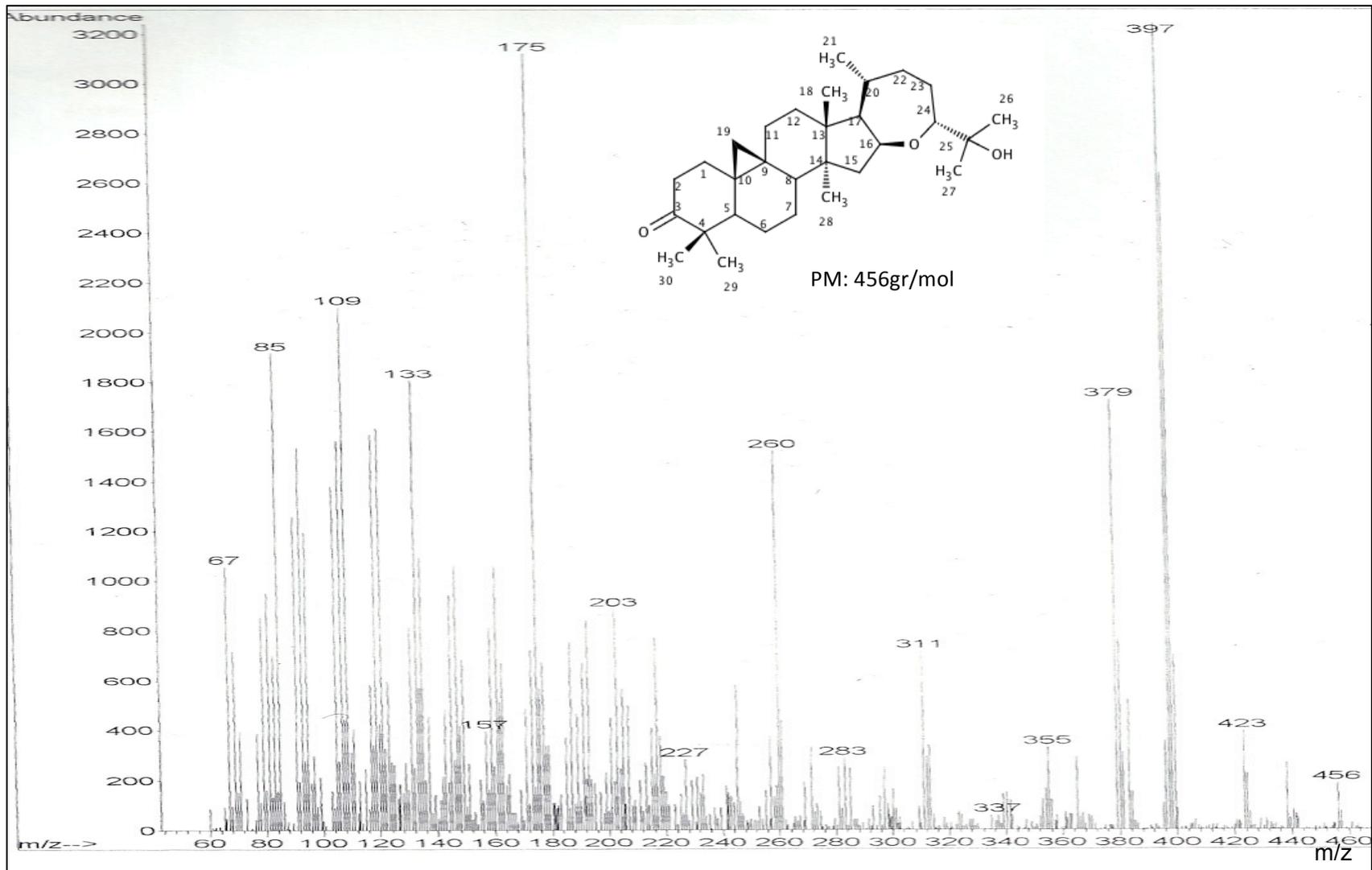
Sample Name:
LR073_F_68-72
Data Collected on:
wormhole-vnmrs400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
LR073_F_68-72_20110919_01
FidFile: DEPT_01



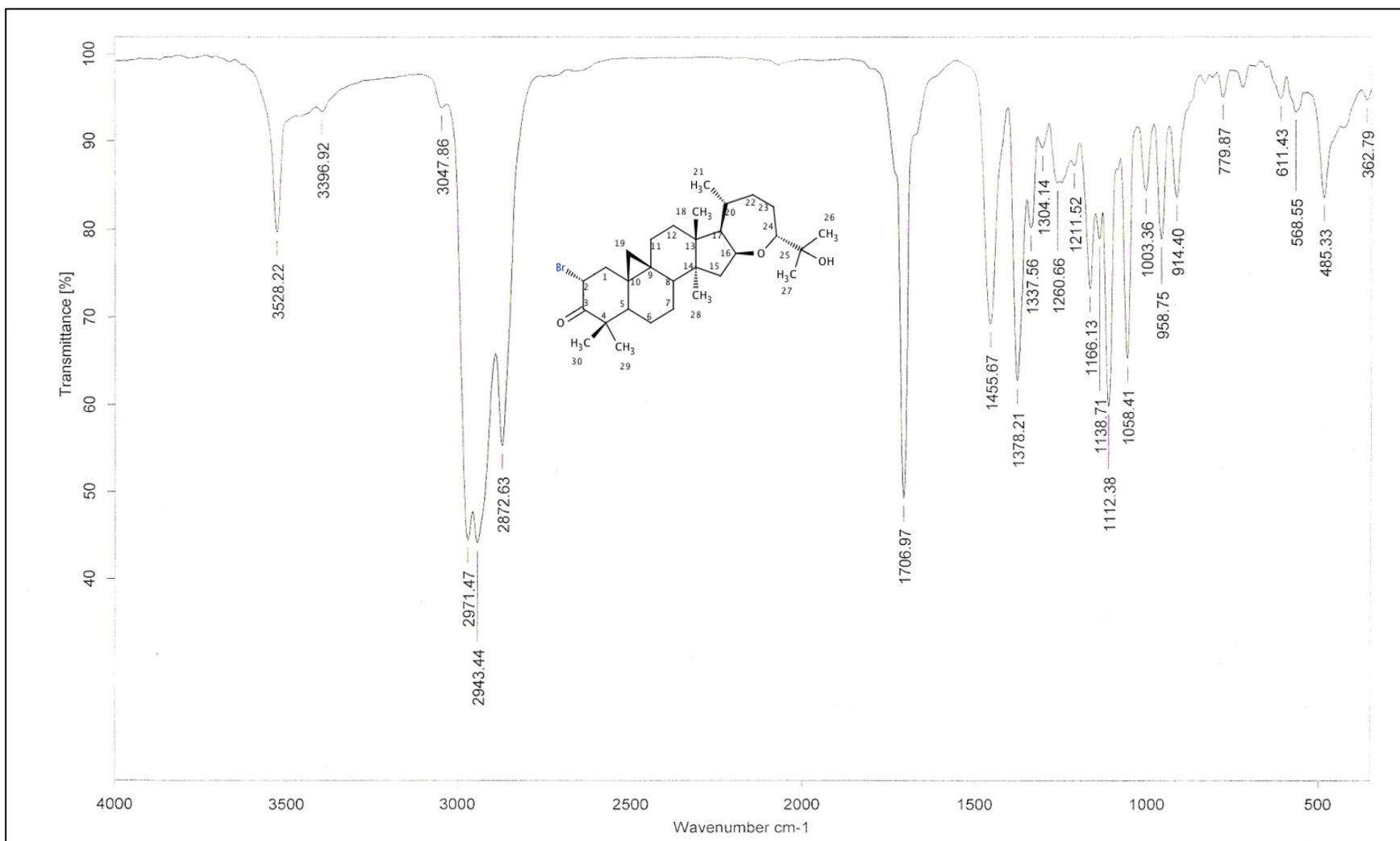
Pulse Sequence: DEPT
Solvent: cdcl3
Data collected on: Sep 20 2011



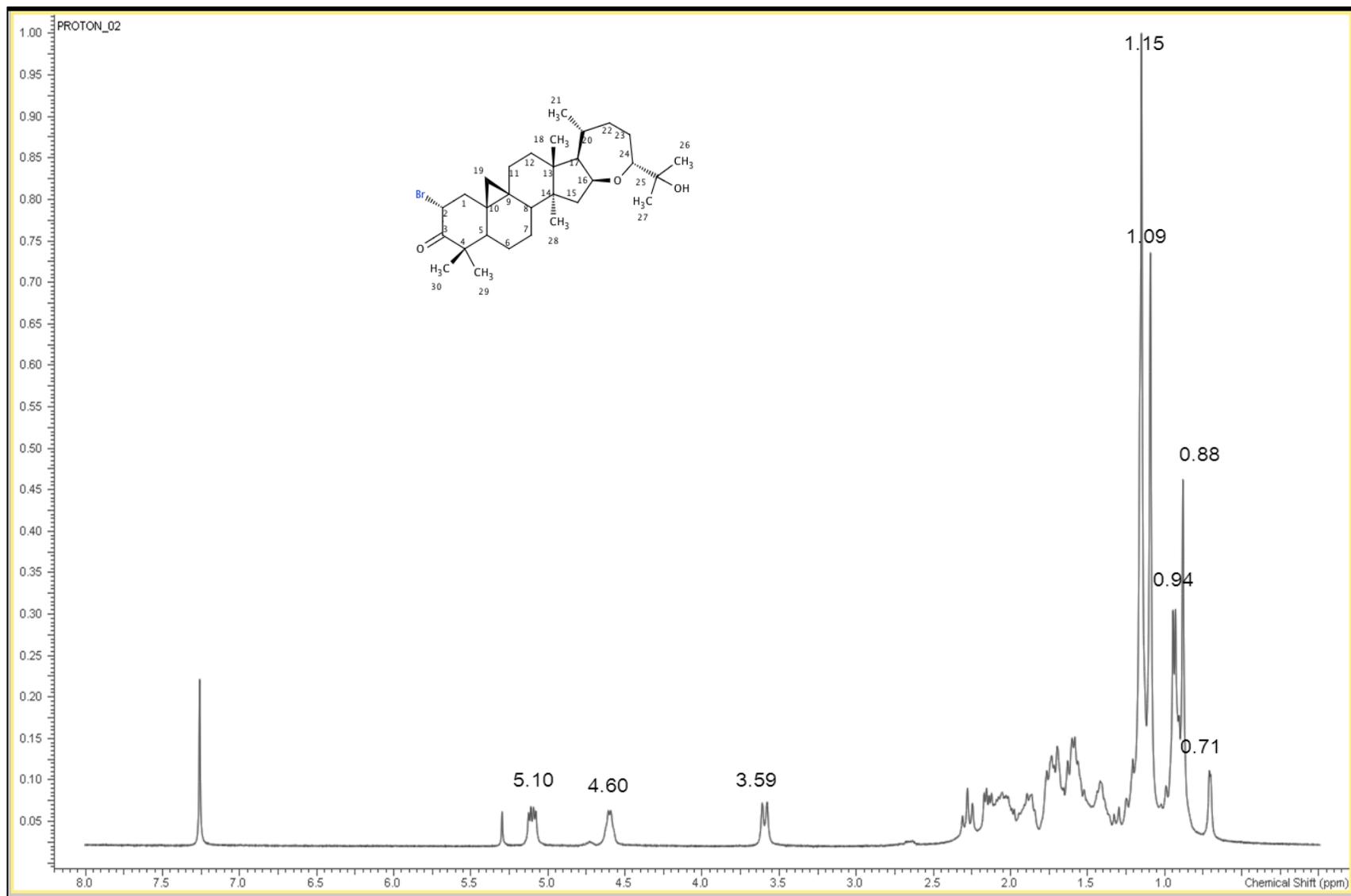
Espectro N°4: Espectro de RMN DEPT de Argentantina B (2) (C₃₀H₄₈O₃)



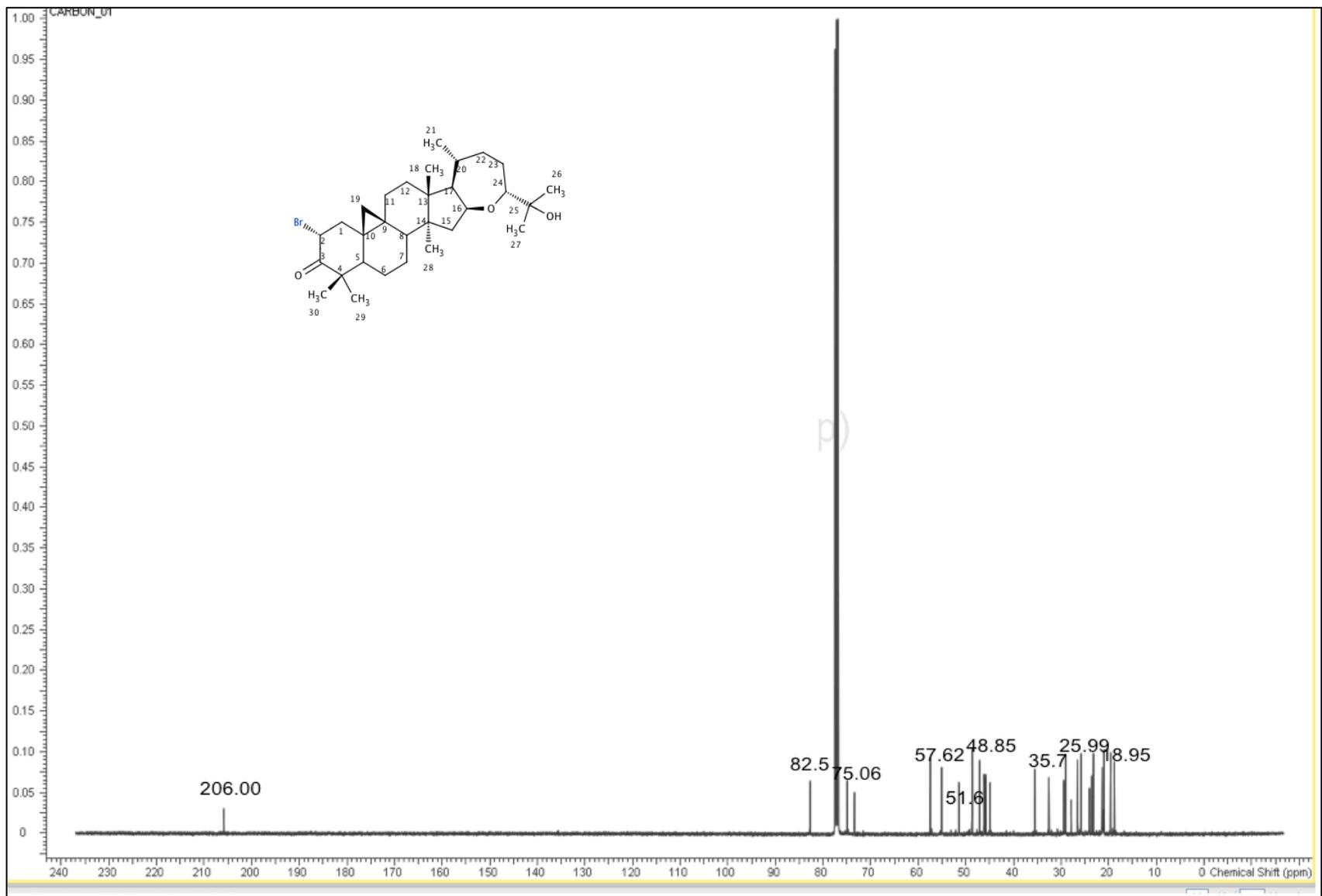
Espectro N°5: Espectro de Masas de Argentinina B (2) (C₃₀H₄₈O₃)



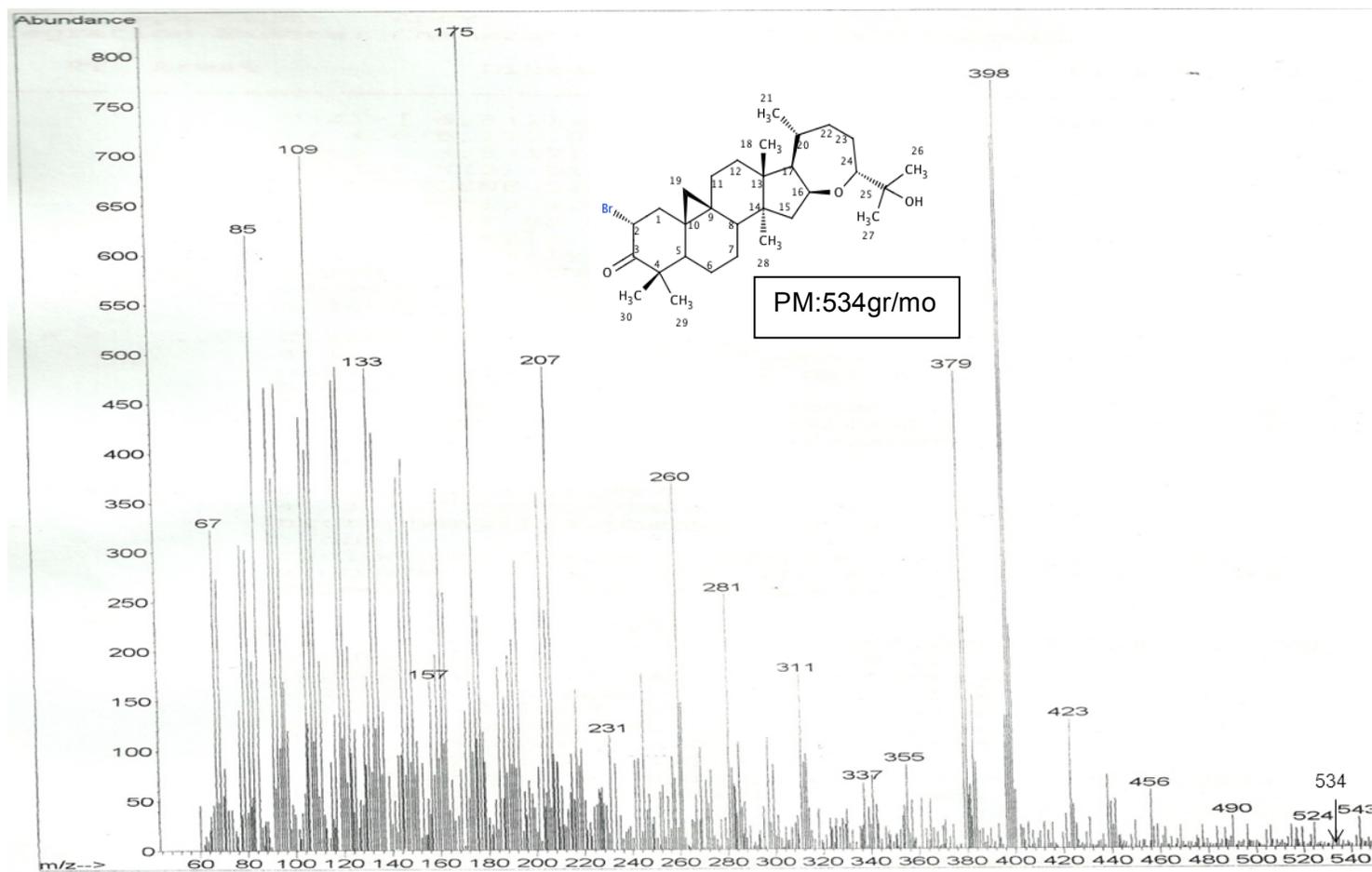
Espectro N°6: Espectro de IR del derivado bromado (**3**) ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{BrO}$)



Espectro N°7: Espectro de RMN ¹H del derivado bromado (**3**) (C₃₀H₄₇BrO)

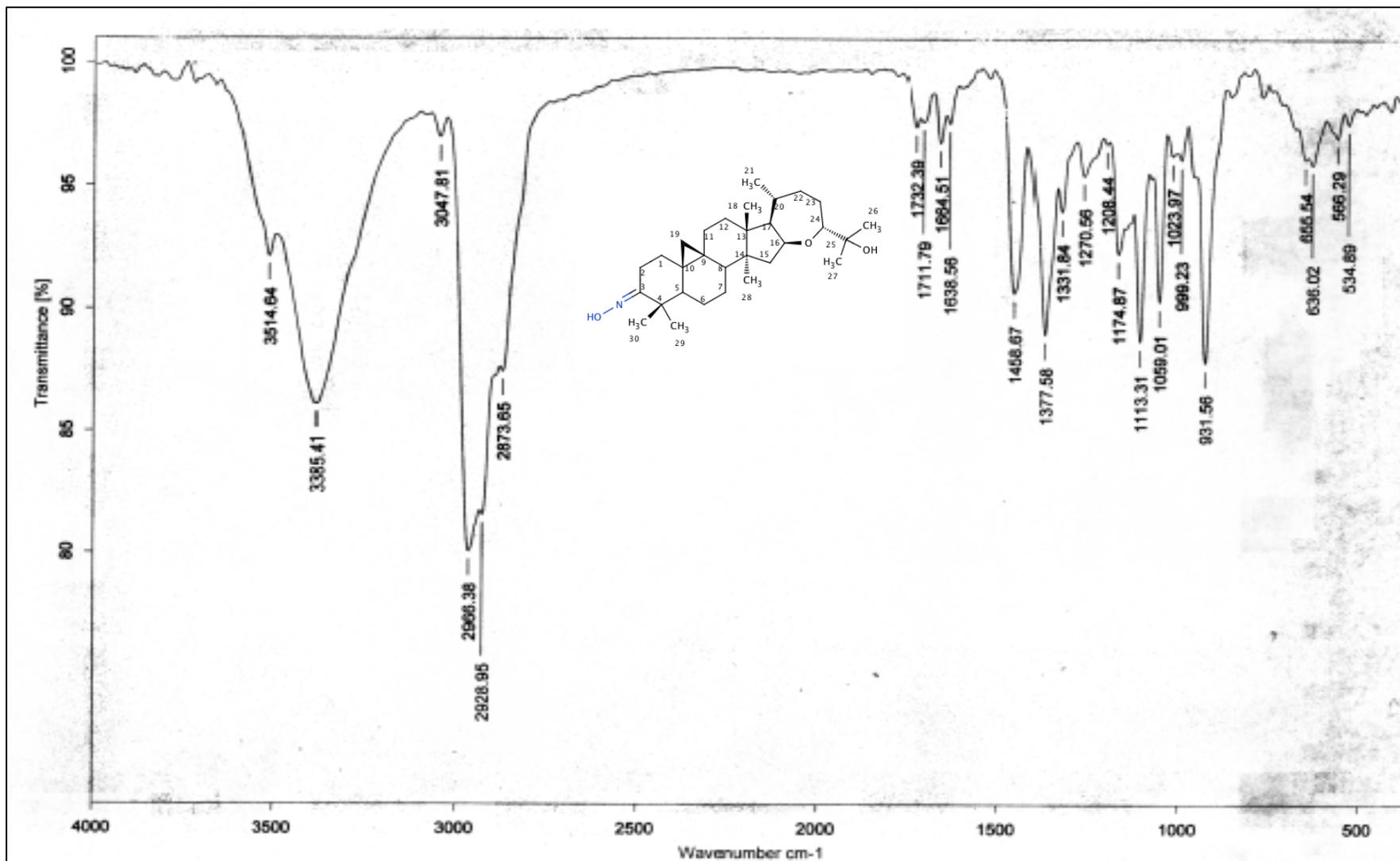


Espectro N°8: Espectro de RMN ¹³C del derivado bromado (**3**) (C₃₀H₄₇BrO)

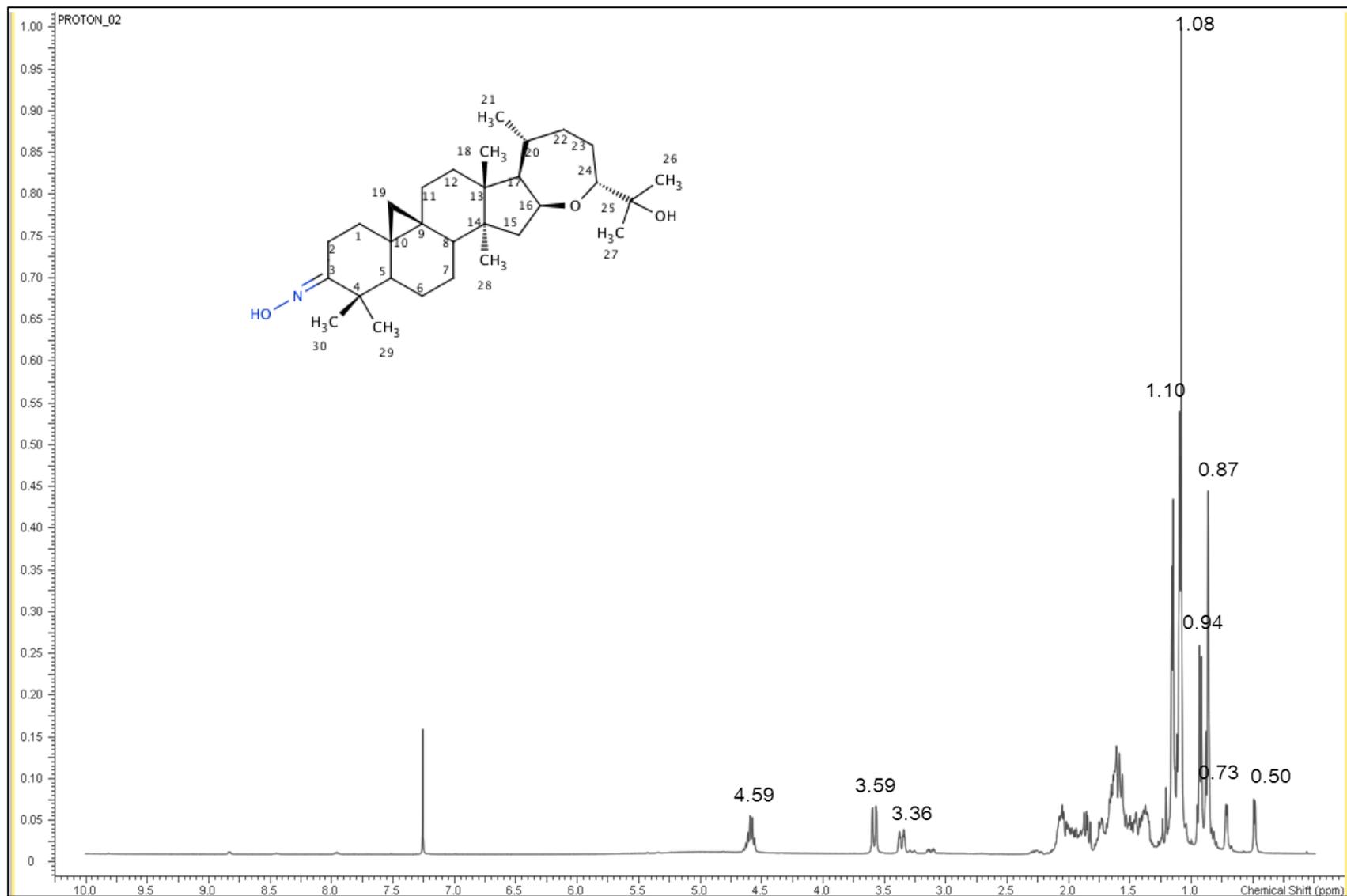


m/z

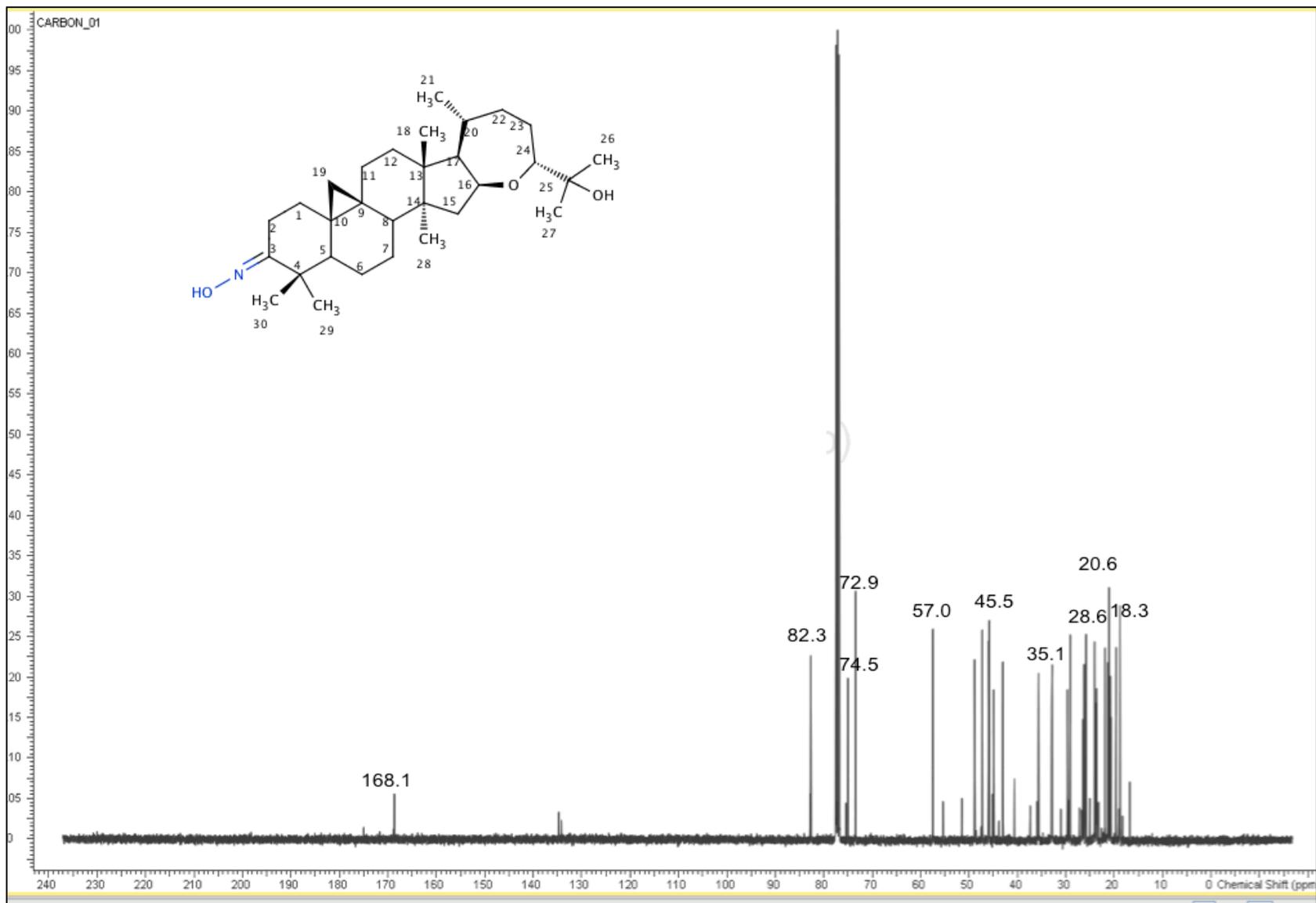
Espectro N°9: Espectro de masas del derivado bromado (**3**) C₃₀H₄₇BrO



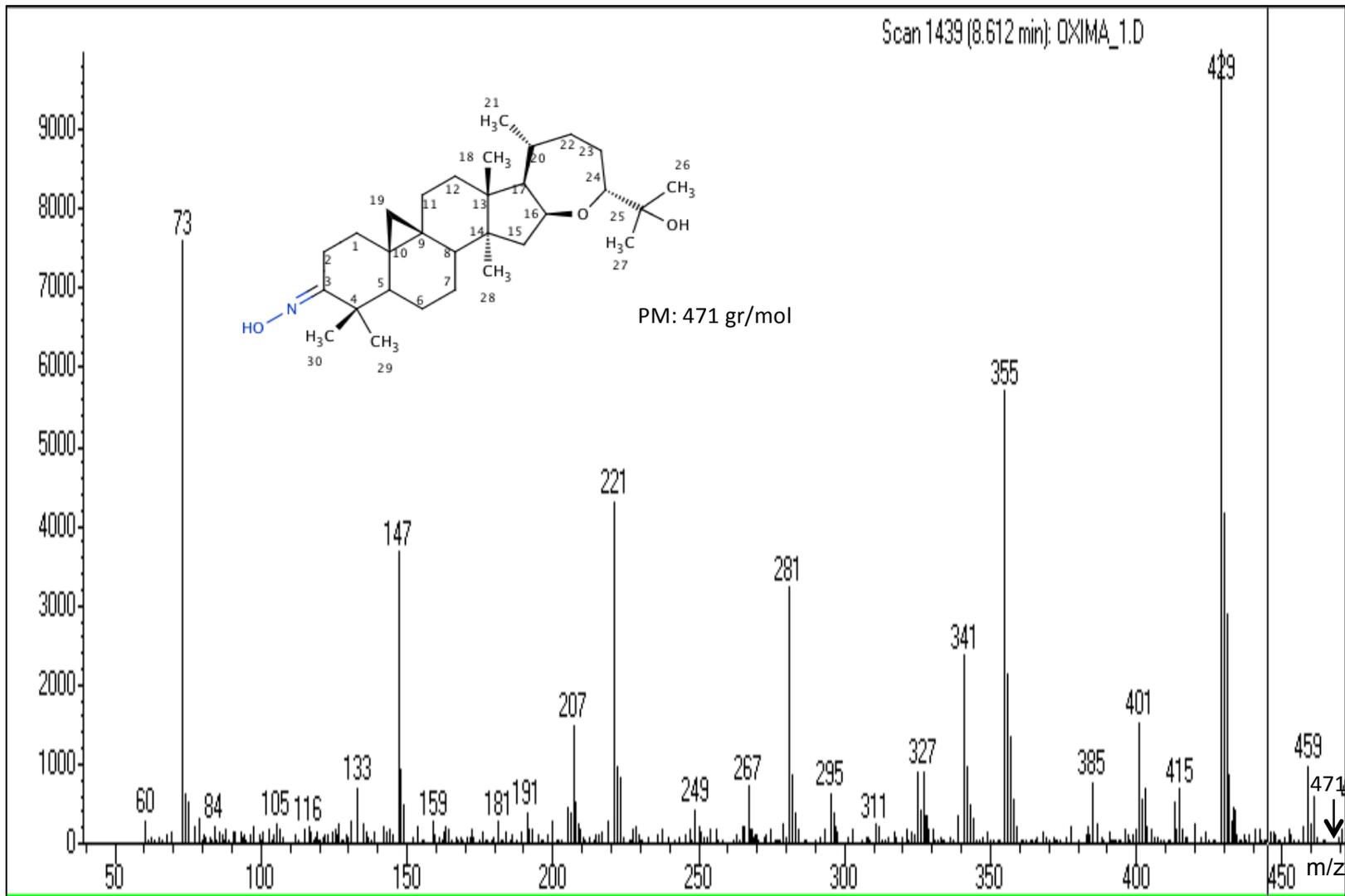
Espectro N° 10: Espectro de IR del derivado oxima (4) (C₃₀H₄₉NO₃)



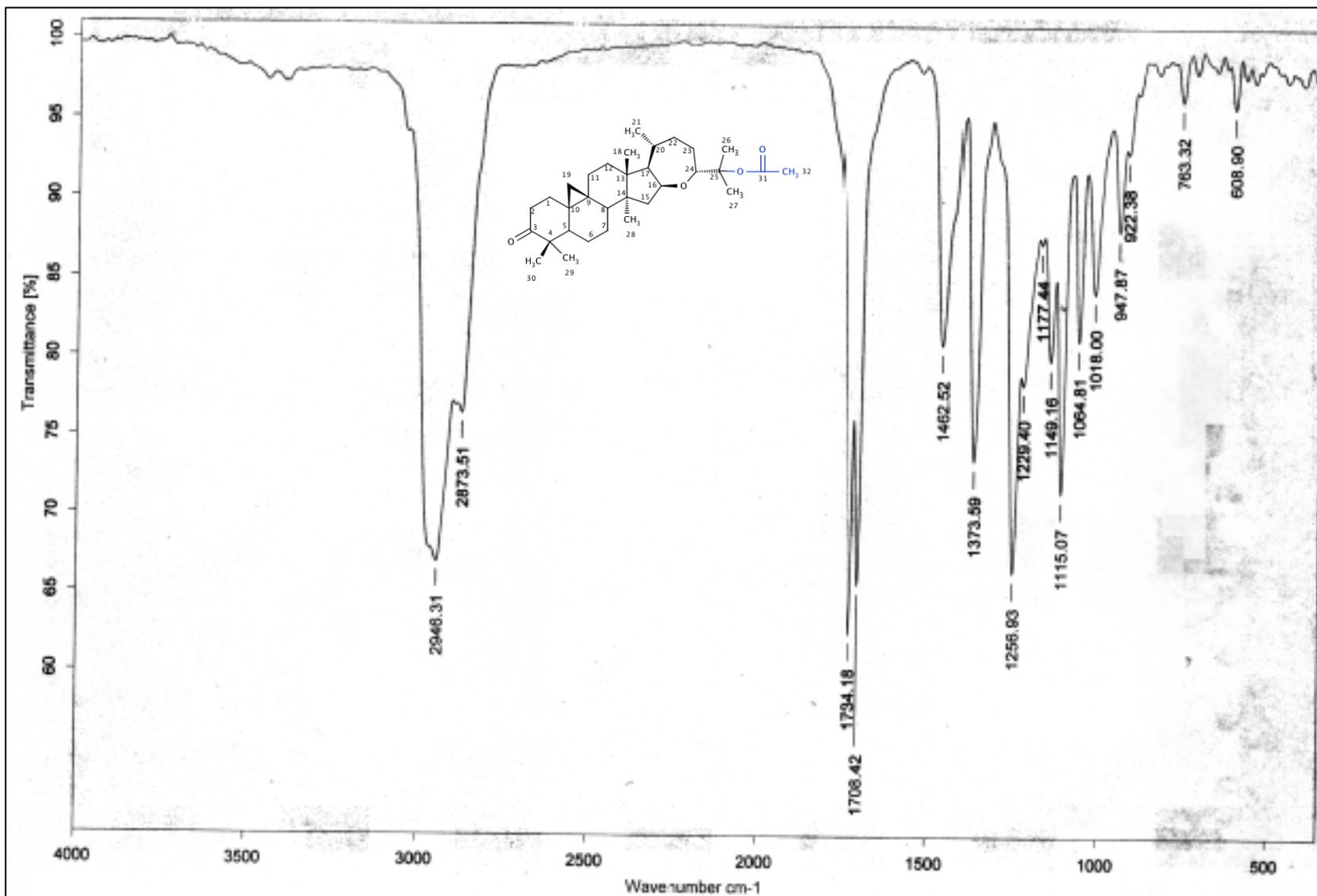
Espectro N°11: Espectro de RMN ¹H del derivado oxima (**4**) (C₃₀H₄₉NO₃)



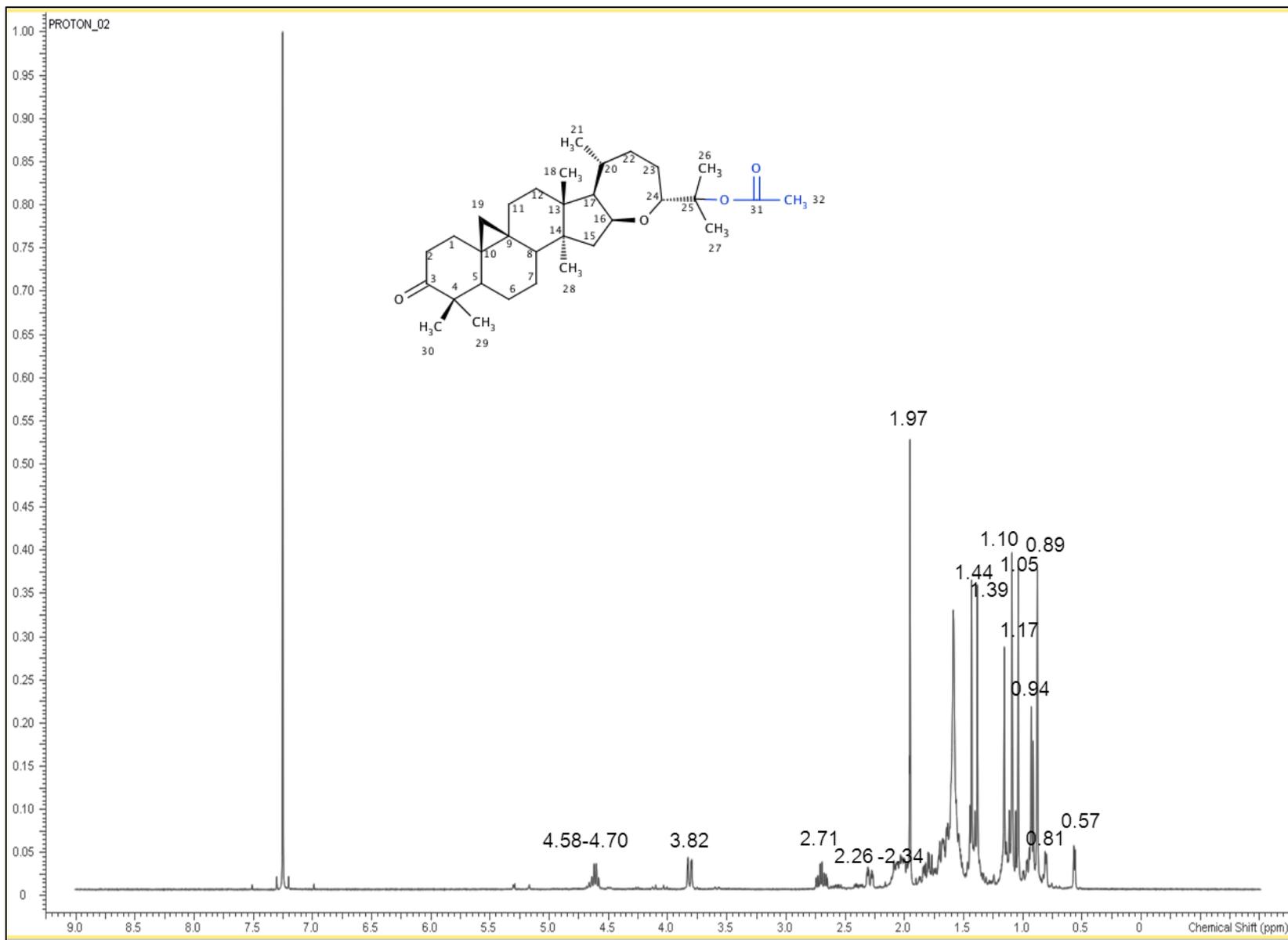
Espectro N°12: Espectro de RMN ¹³C del derivado oxima (**4**) (C₃₀H₄₉NO₃)



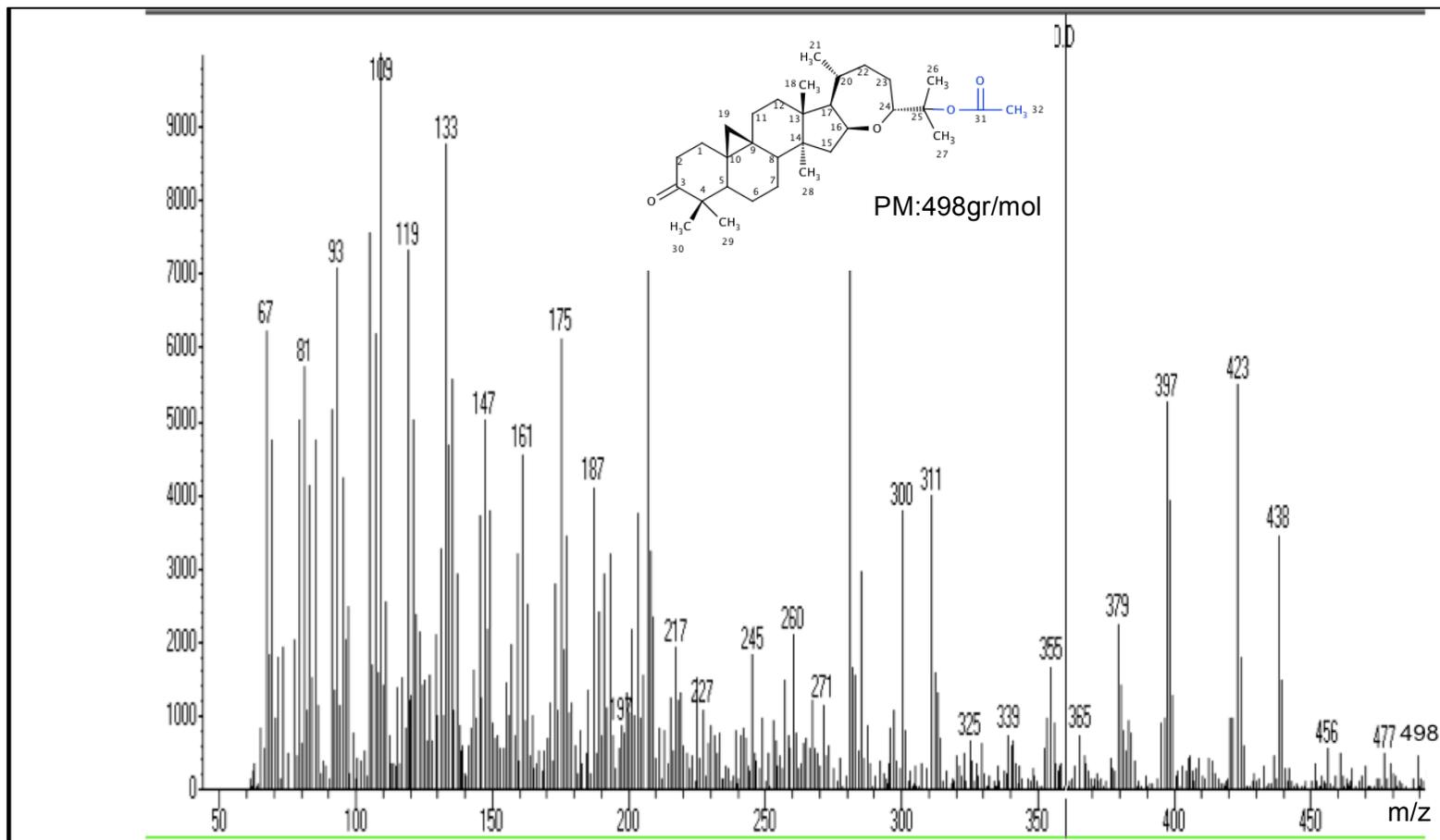
Espectro N° 13: Espectro de masas del derivado oxima (4) (C₃₀H₄₉NO₃)



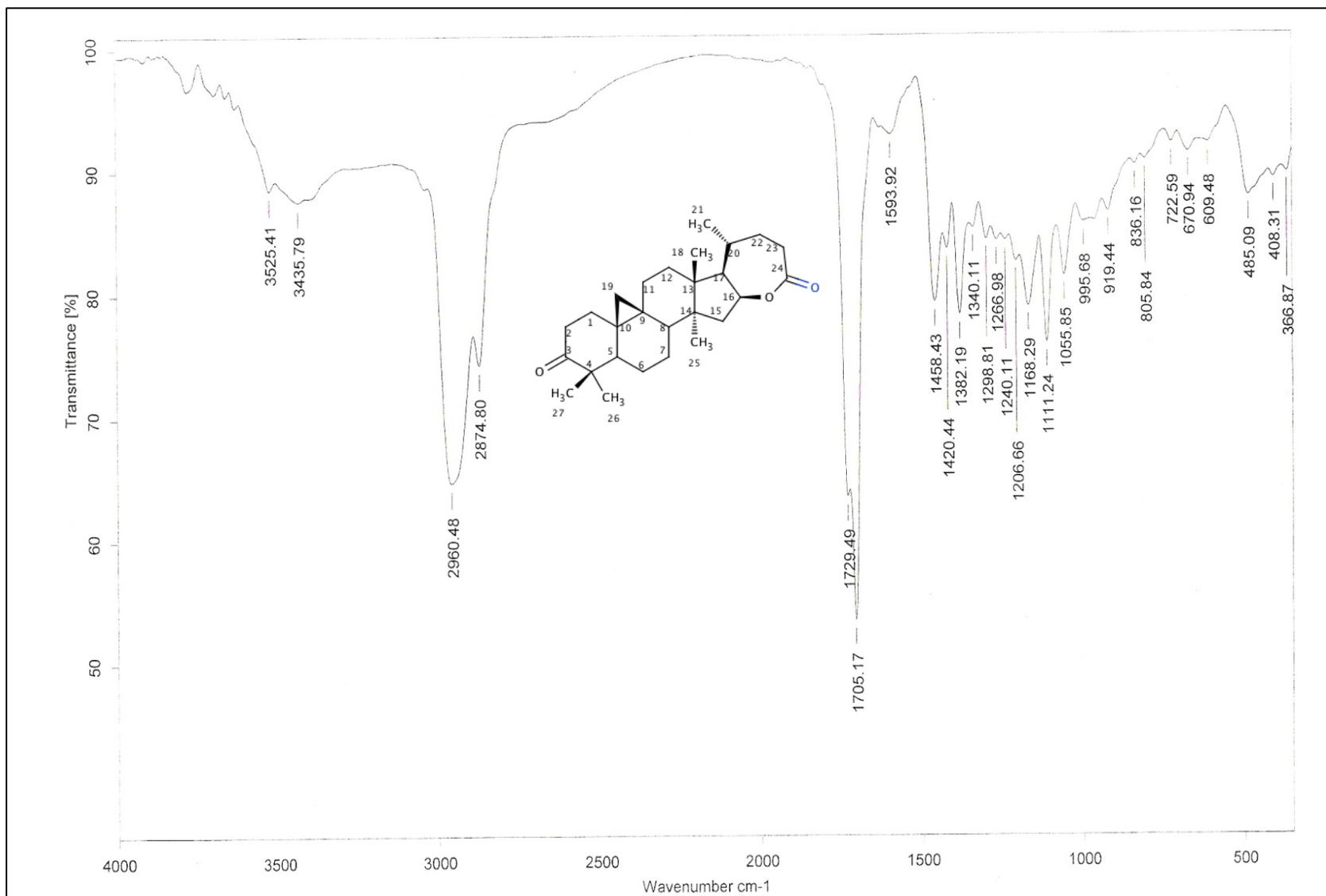
Espectro N°14: Espectro de IR del derivado acetilado (**5**) (C₃₂H₅₀O₄)



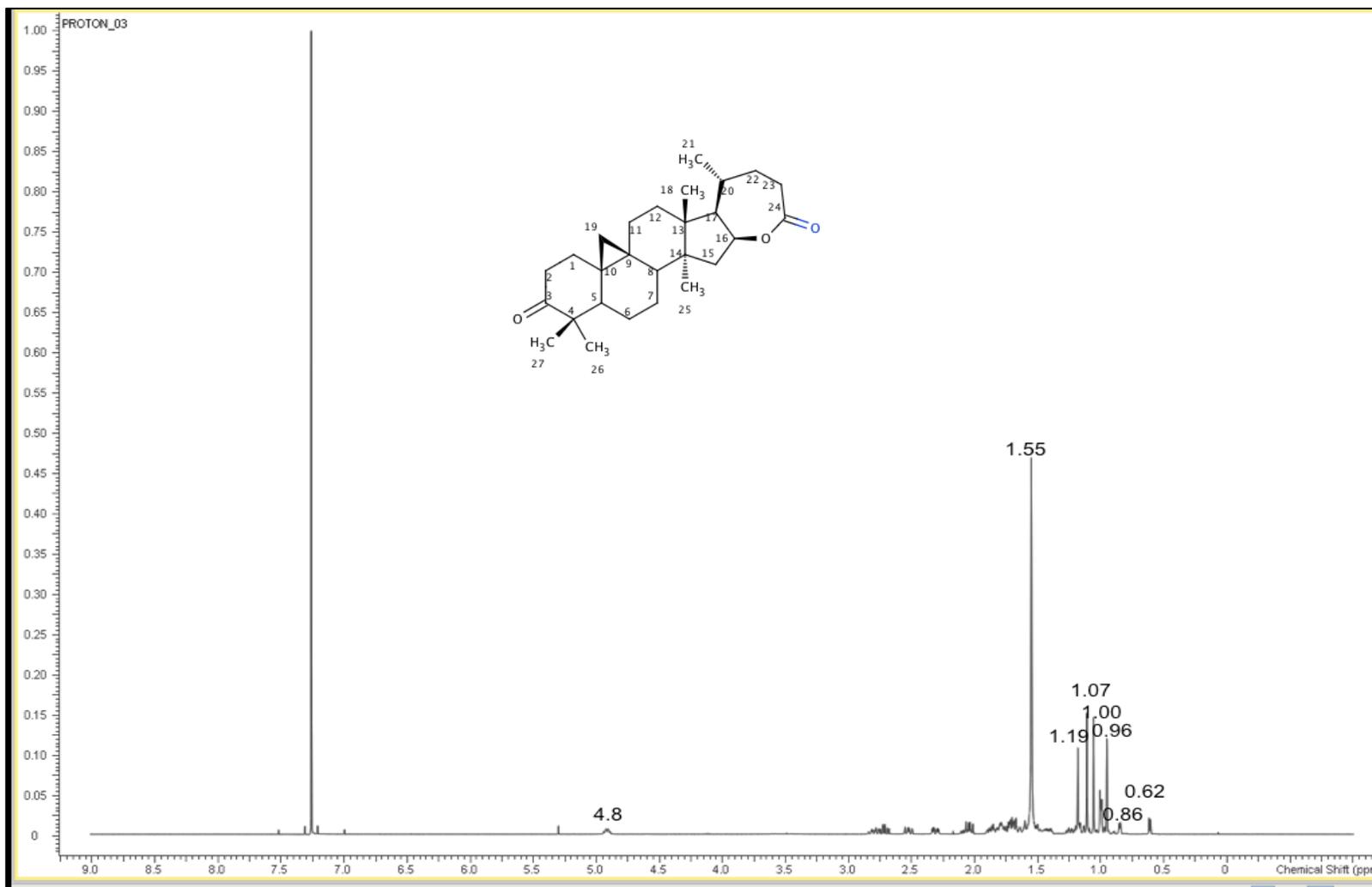
Espectro N°15: Espectro de RMN ¹H del derivado acetilado (5) (C₃₂H₅₀O₄)



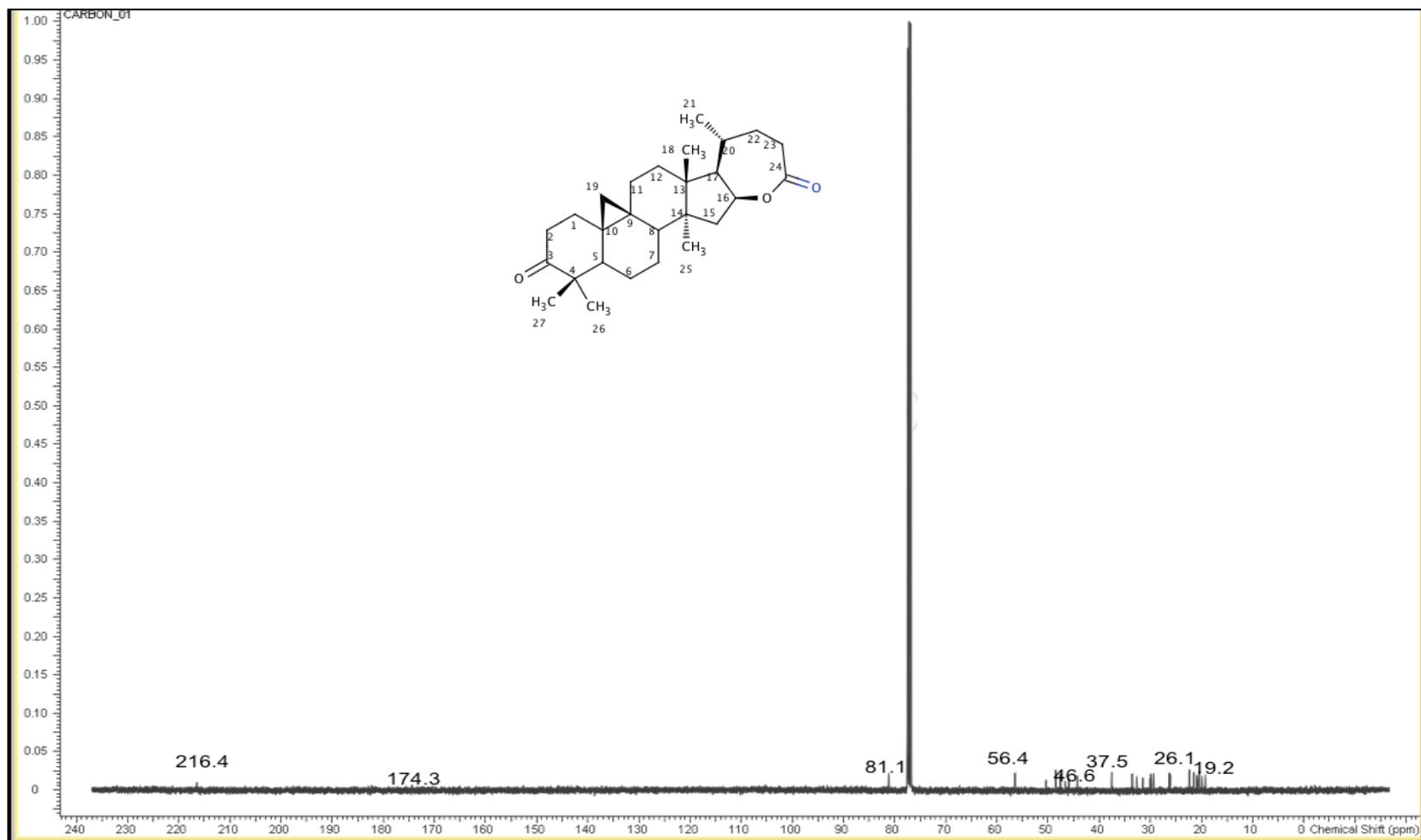
Espectro N°16: Espectro de masas del derivado acetilado (5) (C₃₂H₅₀O₄)



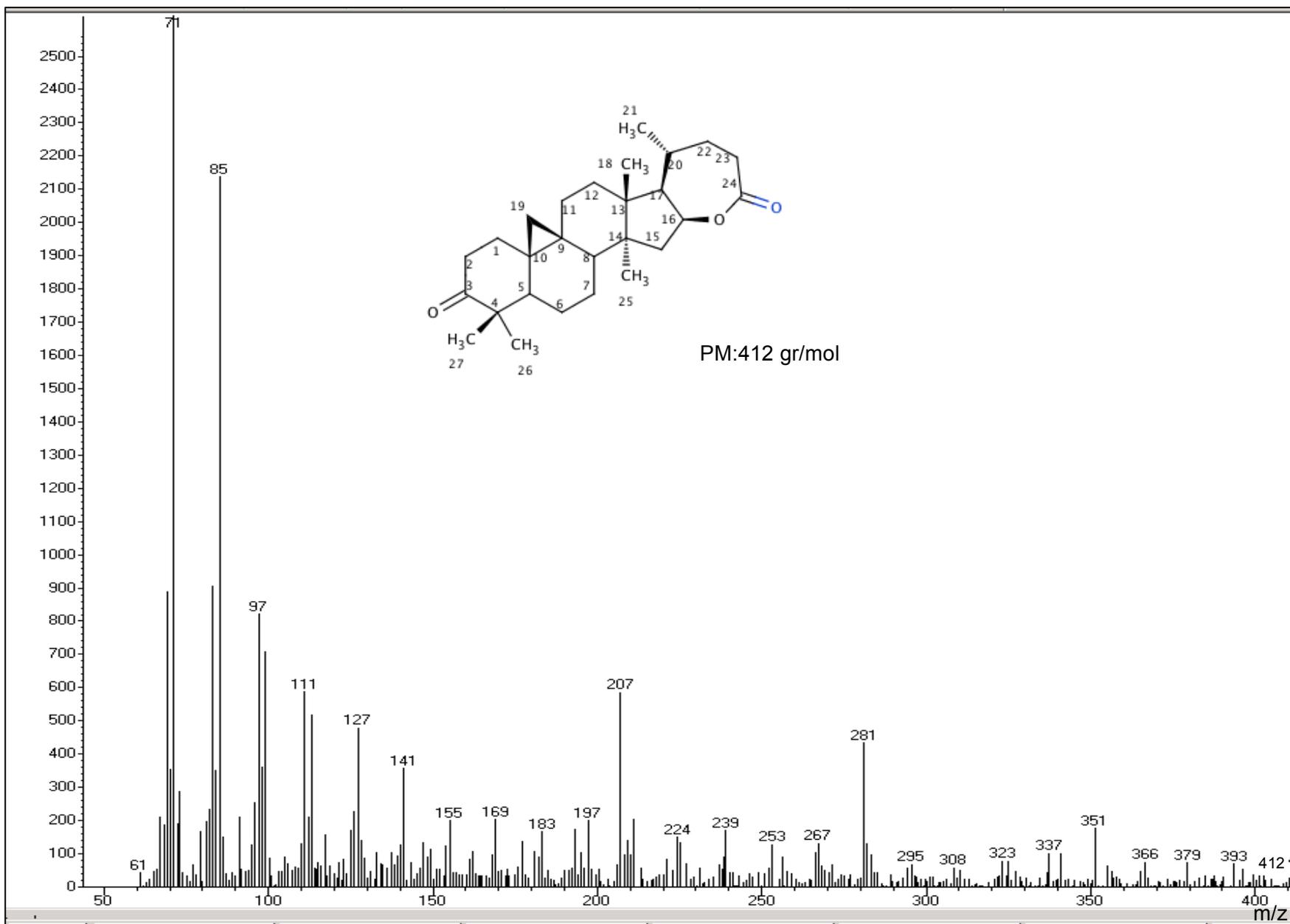
Espectro N°17: Espectro IR del derivado lactona (**6**) (C₂₇H₄₀O₃)



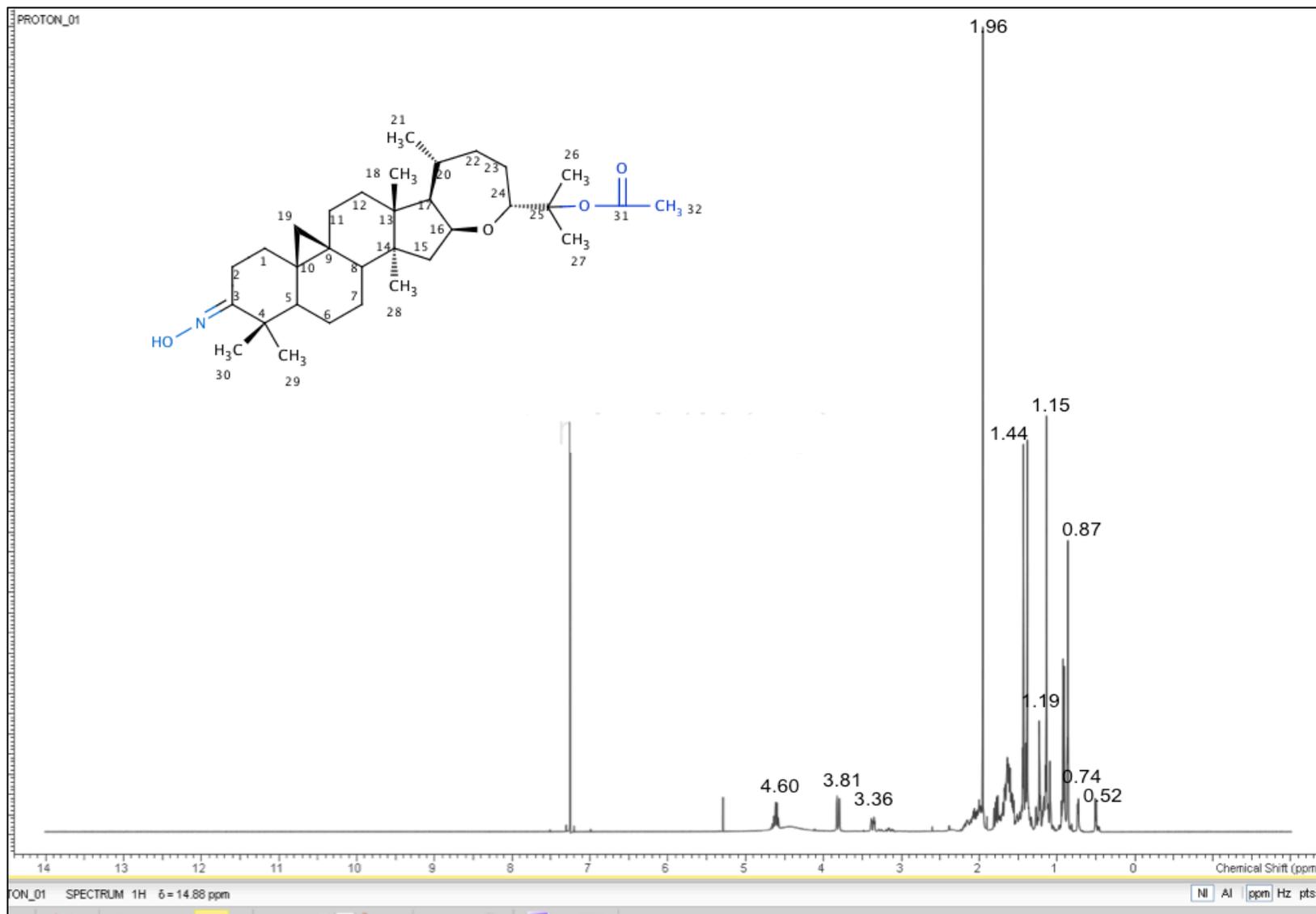
Espectro N°18: Espectro de RMN ¹H del derivado lactona (**6**) (C₂₇H₄₀O₃)



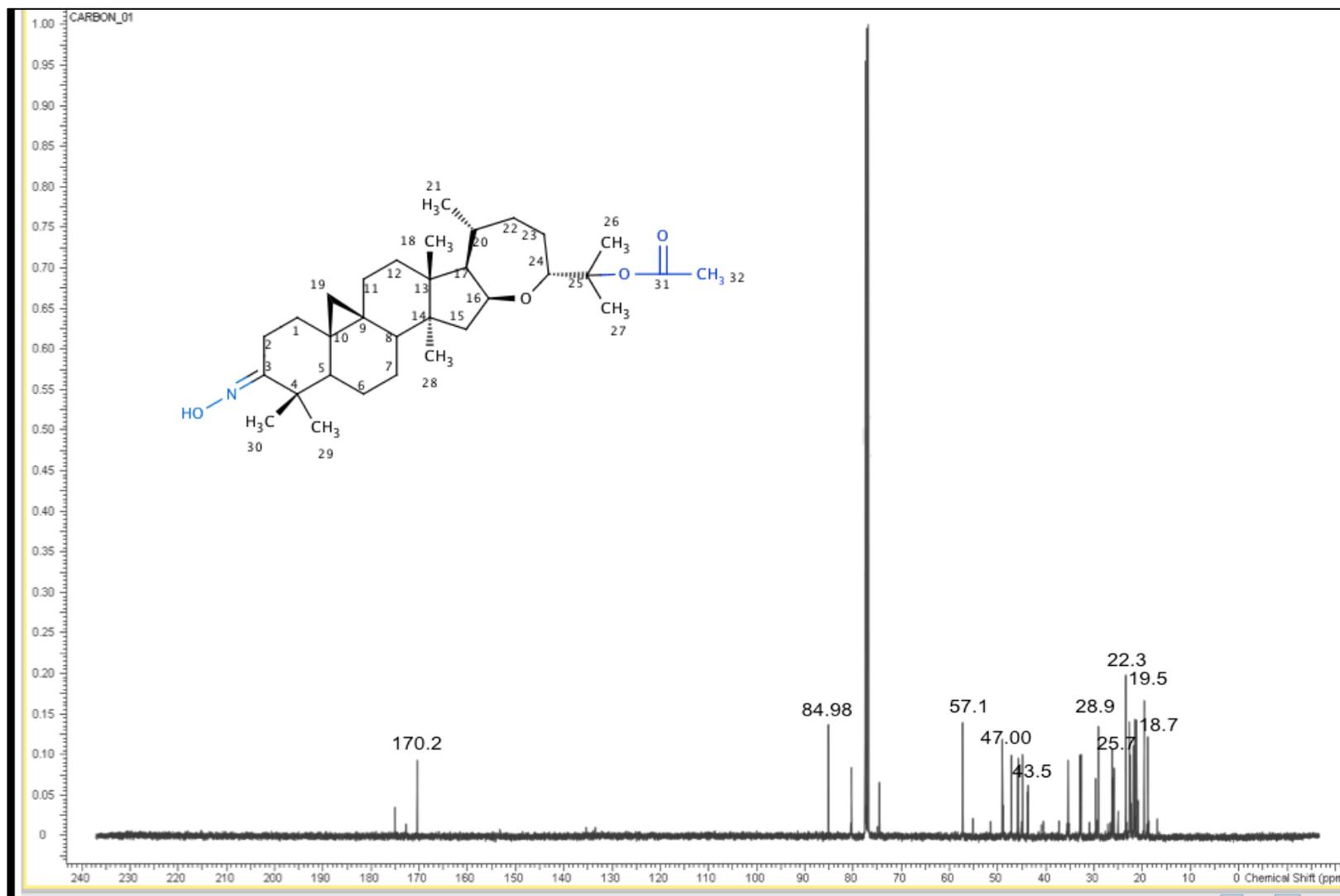
Espectro N°19: Espectro de RMN ^{13}C del derivado lactona (**6**) ($\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$)



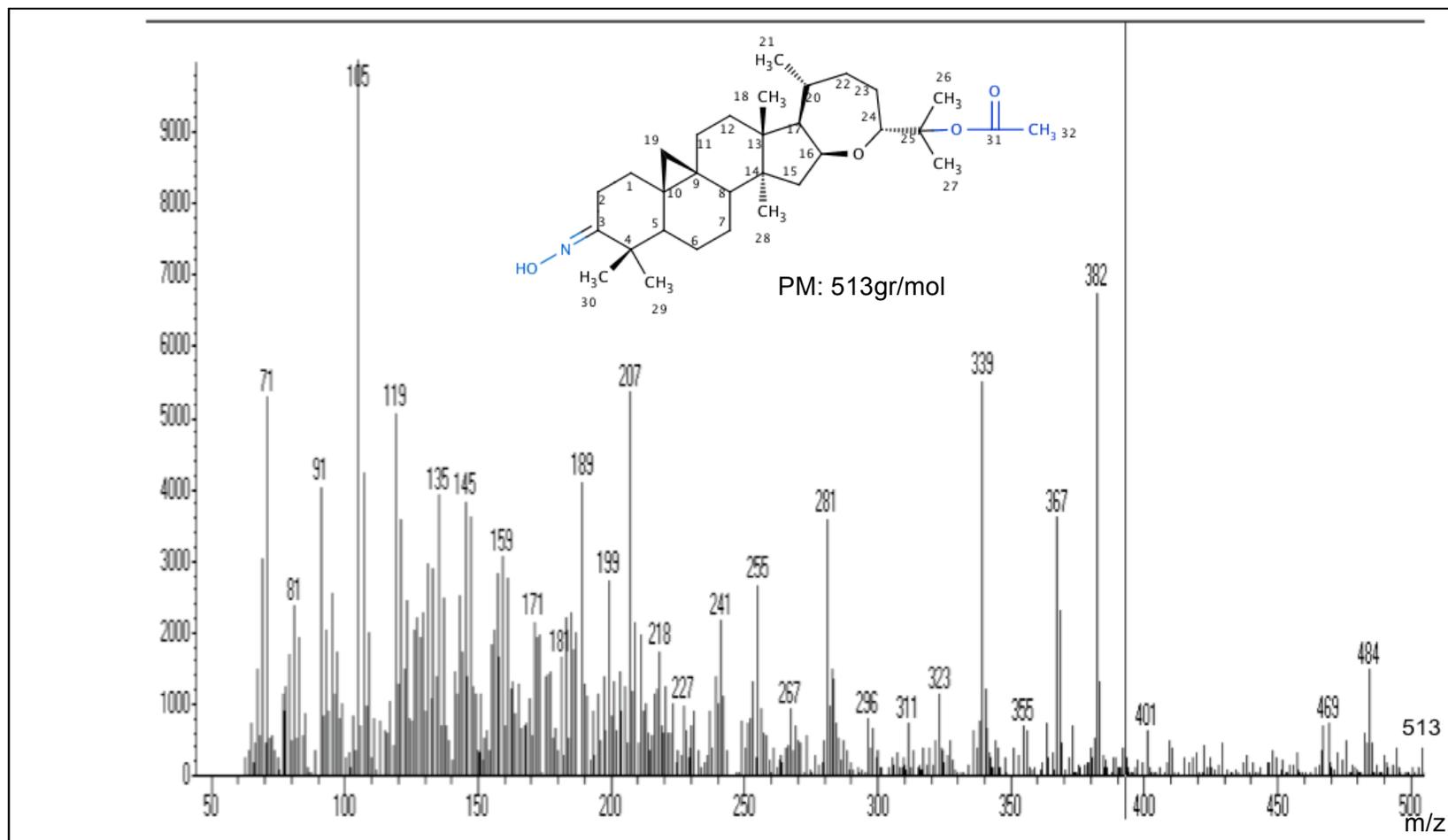
Espectro N°20: Espectro de masas del derivado lactona (6) (C₂₇H₄₀O₃)



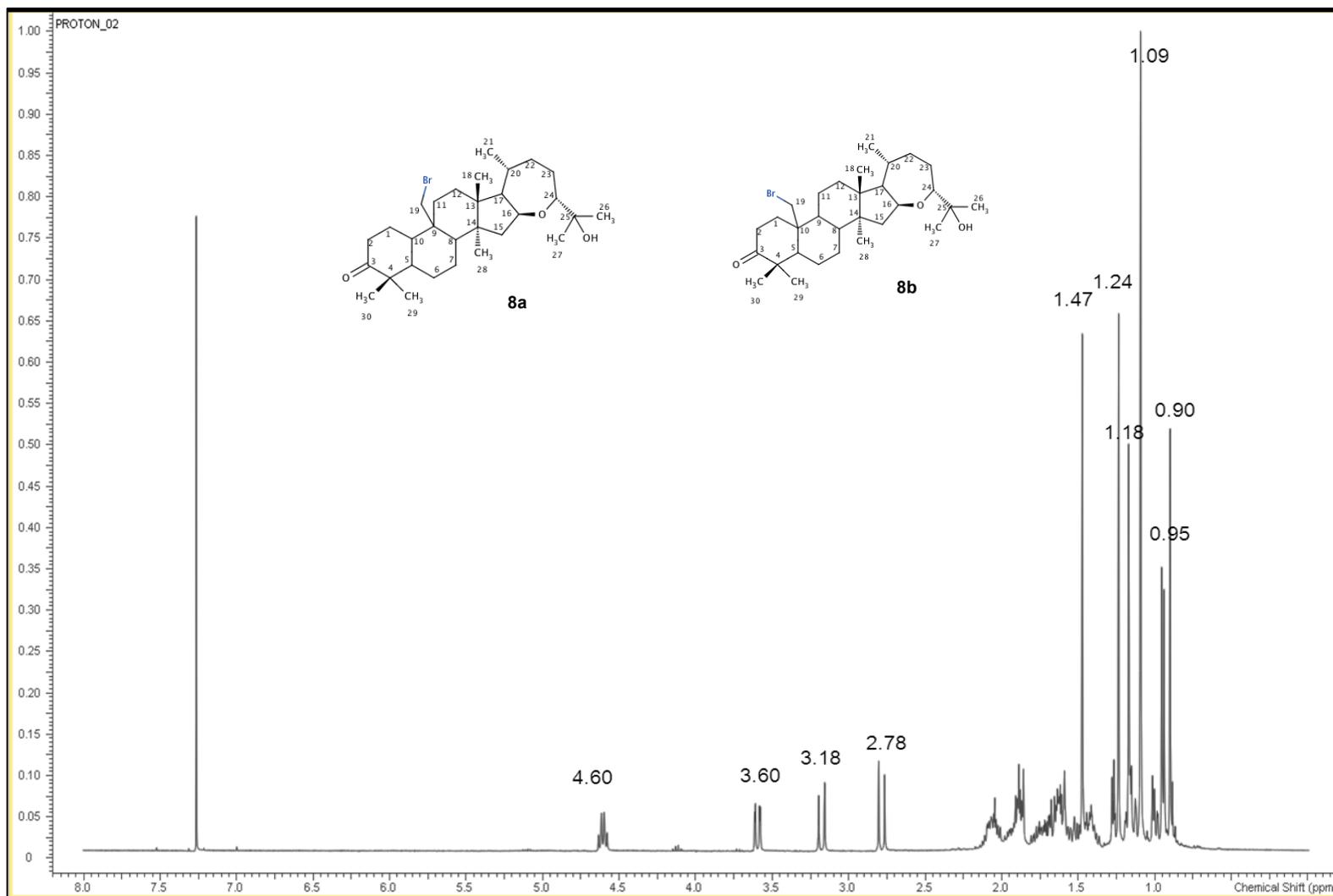
Espectro N° 21: Espectro de RMN ¹ H del derivado oxima-acetilado (7) (C₃₂H₅₁NO₄)



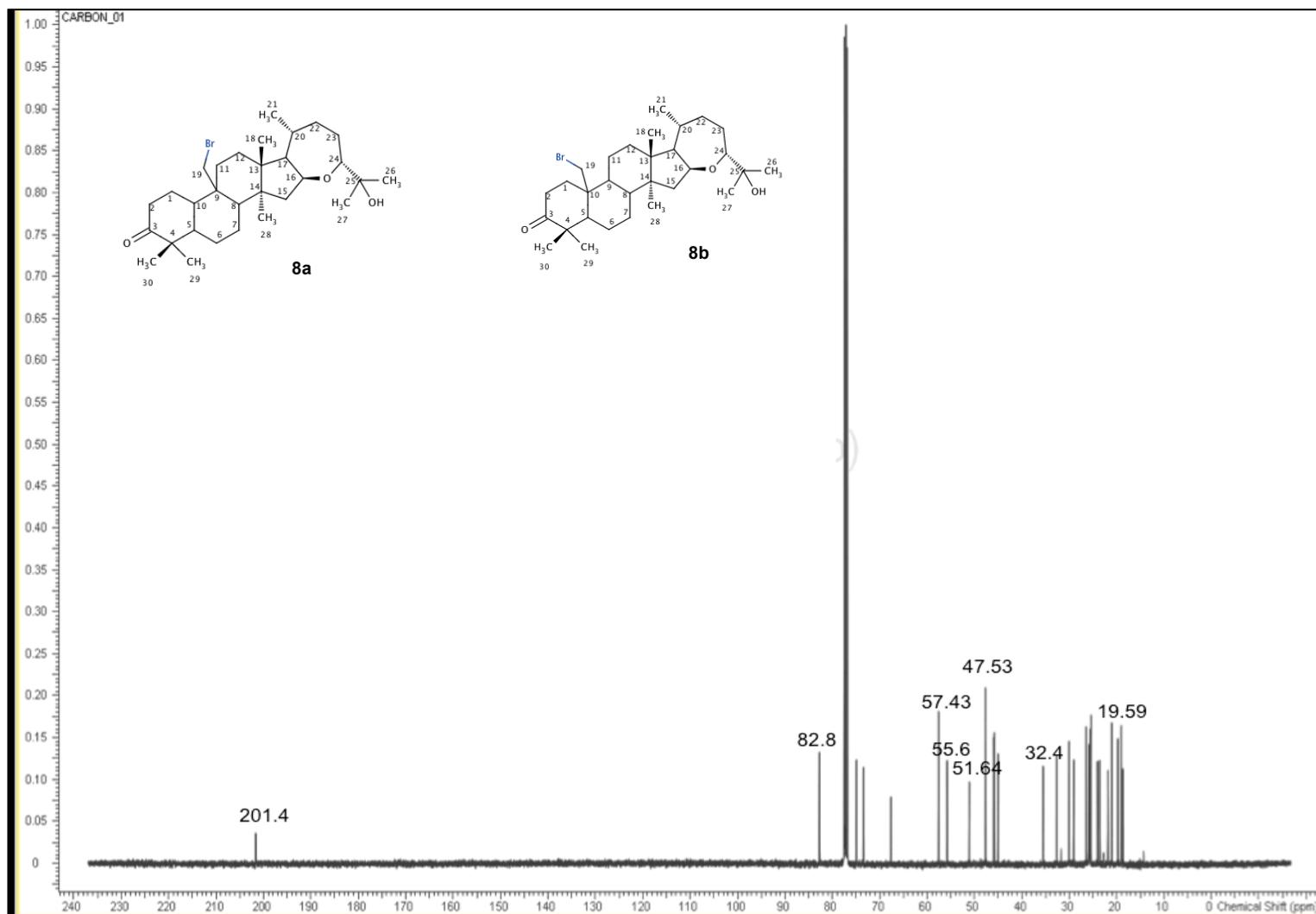
Espectro N° 22: Espectro de RMN ¹³C del derivado oxima-acetilado (7) (C₃₂H₅₁NO₄)



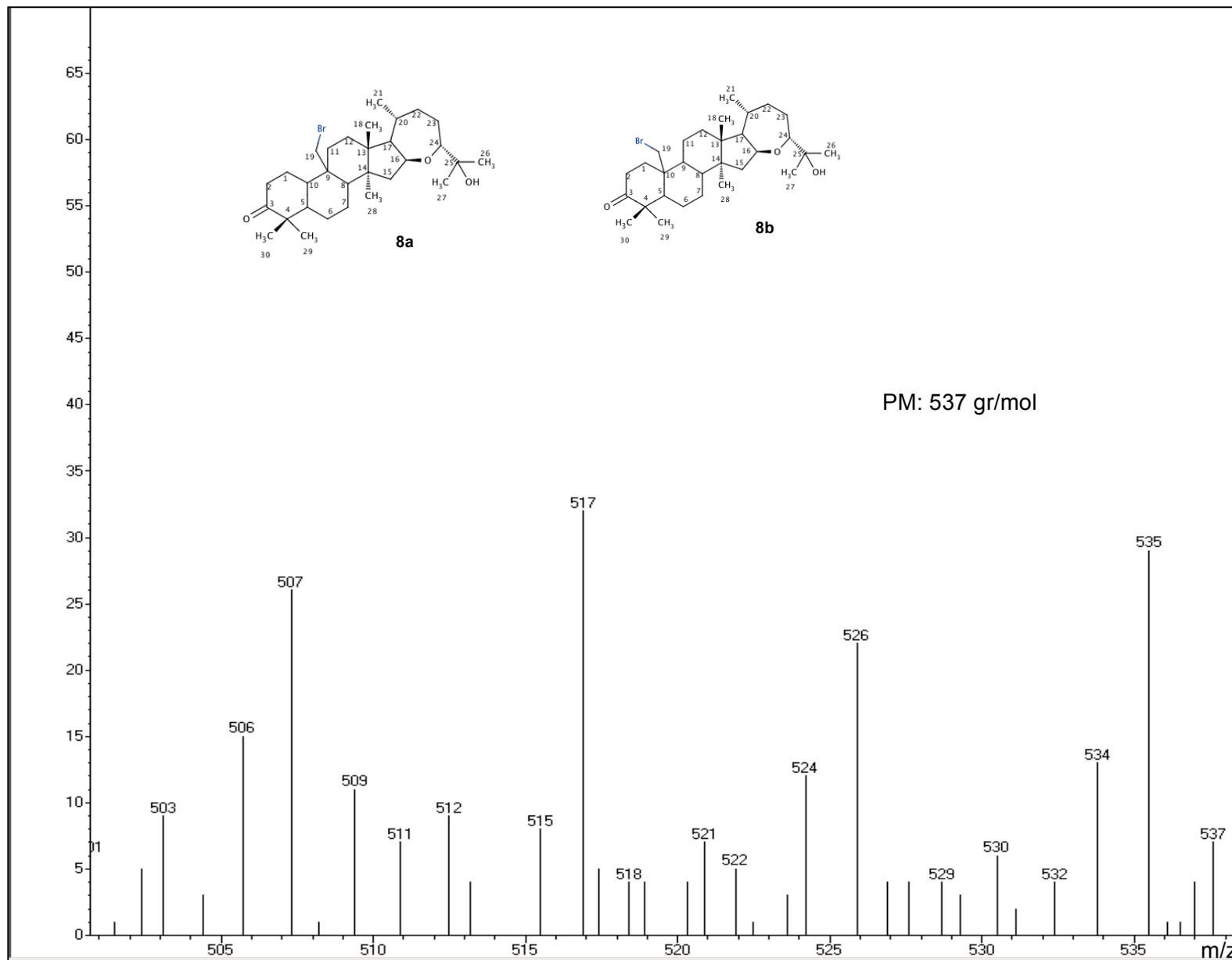
Espectro N°23: Espectro de masas del derivado oxima-acetilado (7) (C₃₂H₅₁NO₄)



Espectro N°24: Espectro de RMN ¹H de la mezcla de isómeros del derivado bromado con apertura del ciclopropano (**8a,8b**) (C₃₀H₄₉BrO₃)



Espectro N° 25: Espectro de RMN de la mezcla de isómeros del derivado bromado con apertura del ciclopropano (**8a,8b**) (C₃₀H₄₉BrO₃)



Espectro N°26: Espectro de masas de la mezcla de isómeros del derivado bromado con apertura del ciclopropano (**8a,8b**) (C₃₀H₄₉BrO₃)